

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07356

研究課題名(和文) CG-NAPによる中心小体サテライト制御を介した一次繊毛形成機構

研究課題名(英文) CG-NAP function in ciliogenesis through regulation of centriolar satellite formation

研究代表者

金 憲誠 (Kim, Honsong)

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号：70469899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：一次繊毛はほとんどの細胞に1本ずつあるアンテナのような膜突起で、細胞のセンサーとして機能するが、その形成過程は未だ不明な点が多く残されている。中心小体サテライト(CS)と呼ばれる粒状構造は繊毛の形成に必要な因子の輸送に関わる。我々は中心体とゴルジ体に局在するCG-NAPというタンパク質が、PCM1(CSの主成分)のゴルジ体近傍への局在に必要であることを新たに発見した。CG-NAP欠損細胞ではCS成分が中心体近傍に過剰に蓄積し一次繊毛の形成が阻害されたことから、CG-NAPは直接または微小管を介してPCM1のゴルジ体-中心体間の適切な輸送を調節し、それが一次繊毛の形成に重要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次繊毛の形成に関わる分子の遺伝子変異は、腎嚢胞、肝臓・胆管異常、糖尿病などの症状を呈する繊毛病を引き起こすことが知られている。なかでも一次繊毛の組み立てに関わる分子の細胞質における輸送は、繊毛の形成に必須のプロセスであり、繊毛病の発症に密接に関係するといえる。本研究結果よりCG-NAPとCG-NAP依存的に形成されたゴルジ微小管が繊毛分子の輸送調節に関わることが新たに明らかになった。今後、CG-NAPと微小管が関わる繊毛因子の輸送調節機構の全貌を明らかにしていくことで、繊毛病の発症メカニズムの理解につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Primary cilia are antenna-like membrane projections that are present in most cells in vivo, one per cell, and serve as cellular sensors, but the process of their formation remains largely unknown. Granular structures called centriolar satellites (CSs) are involved in the transport of factors necessary for the formation of primary cilia. We newly found that CG-NAP, a protein that localizes to the centrosome and Golgi apparatus, is required for the localization of PCM1, the main component of CS, in the vicinity of the Golgi apparatus. CG-NAP knockout cells showed excessive accumulation of CS components near the centrosomes and impaired primary cilia formation, indicating that CG-NAP regulates the proper transport of PCM1 between the Golgi and centrosome, either directly or via microtubules, which is important for the formation of primary cilia.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次繊毛 中心小体サテライト AKAP450

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非運動性の一次繊毛は内部に軸系である微小管構造を持ち、細胞外からのシグナルを受容するアンテナのような役割を担うシグナリングオルガネラである。近年、一次繊毛形成に関わる分子の遺伝子変異が、腎嚢胞、肝臓・胆管異常、糖尿病などの症状を呈する繊毛病を引き起こすことがわかってきたが、その形成機構については未だ謎が多く残されている。一次繊毛の形成は Rab11-Rabin8 経路の活性化を引き金に、母中心小体上の distal appendage (DA)へ繊毛小胞の集積に始まる。集積した繊毛小胞は融合を促進する活性化型 Rab8 によって DA へと融合することで繊毛小胞となり、続いて軸系と繊毛膜の伸長が起こり繊毛が形成される。Rab8 の母中心小体へのターゲティングには中心小体サテライト(CS)と呼ばれる構造が関わると考えられている。CS は主成分である PCM1 をはじめ繊毛病の原因となる複数のタンパク質から構成されており、微小管依存的に中心体周辺に集積した局在を示す。しかし、CS の細胞内分布がどのように制御されているのか、CS が一次繊毛形成時にどうやってゴルジ体に局在する Rab8 の選択的輸送に関与できるのか、など不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

ゴルジ微小管の形成に必要な不可欠なタンパク質 CG-NAP/AKAP450 をノックアウトしたヒト網膜色素上皮細胞 RPE-1(CG-NAP KO 細胞)では、Rab8 の母中心小体への集積が阻害されることで一次繊毛形成能が著しく損なわれる。そこで本研究は CG-NAP がどのようなメカニズムで Rab8 のターゲティングに関与し一次繊毛形成を調節しているのかを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

CG-NAP KO 細胞では一次繊毛形成のどの段階が損なわれているか、CS の細胞内局在への影響などを、生化学的手法、免疫染色法などを用いて詳細に解析した。CG-NAP の各種欠失変異体を作製し、PCM1 結合ドメインの絞り込みを行なった。各種ドメインを欠失させた CG-NAP 変異体を CG-NAP KO 細胞に発現させ一次繊毛形成能が回復するかを調べることで、その機能を推測・評価した。蛍光タグを付加した CG-NAP および PCM1 を用いた 2 波長ライブイメージングによってその細胞内挙動を詳細に追跡・観察することで、得られた生化学実験のデータとの整合性を図った。

4. 研究成果

CRISPR/CAS9 法を用いて単離した CG-NAP KO 細胞株で、一次繊毛形成過程のどのプロセスが阻害されているかを調べたところ、繊毛形成の初期に見られる Rab11 の中心体への集積、キャッピングタンパク質 CP110 の分解、IFT20 の中心体上へのリクルートなどは正常に起こっていたが、Rab11 の下流因子で繊毛小胞の形成や繊毛膜の伸長に関わる低分子量 G タンパク質 Rab8 の母中心小体上への集積が阻害されていることがわかった。CG-NAP KO 細胞で Rab8 を過剰発現させると一次繊毛形成能が部分的に回復したことから、CG-NAP は繊毛形成初期に起こる Rab8 のリクルートに必要であると考えられた。そこで Rab8 の中心体集積に関わると考えられている CS の細胞内分布への影響を詳細に調べた。野生型 hTERT/RPE-1 細胞では CS の主要なコンポーネントである PCM1 が、中心体近傍に加えてゴルジ体周辺にも局在していることを発見した。超解像度顕微鏡 Delta-vision を用いた 2 波長タイムラプスイメージング解析から、mcherry-CG-NAP と PCM1-GFP はゴルジ体およびその近傍で、ダイナミックな小胞として観察され、両者は融合や接着、解離を繰り返しながら挙動を共にしていることがわかった。一方、CG-NAP KO 細胞では PCM1 のゴルジ体周辺への局在がほとんど消失し、代わりに中心体周辺への異常な蓄積が認められた。

次に CG-NAP の欠損が PCM1 以外の他の CS コンポーネントにも影響を与えているかを調べた。PCM1 依存的に CS に局在する繊毛病関連タンパク質 CEP290 やユビキチン E3 リガーゼである MIB1 は、いずれも CS から中心体上に移行するタンパク質である。微小管の重合を阻害した条件下でこれらの中心体近傍への蓄積を調べたところ、CEP290、MIB1 共に中心体周辺への過剰な蓄積が認められたことから、CG-NAP は PCM1 をゴルジ体周辺へ繋ぎ止めることで、CS の中心体周辺への集積を抑制するように働くことが示唆された。MIB1 は中心体上で Rab8 のリクルートに必要な Talpid3 のポリユビキチン化と分解を促進することで一次繊毛の形成を抑制する分子として報告されている。CG-NAP KO 細胞での一次繊毛形成不全が MIB1 の集積に付随する Talpid3 の分解に起因しているかを検証したところ、CG-NAP KO 細胞での中心体 Talpid3 量は野生型に比べ優位に減少していた。そこで CG-NAP KO 細胞で MIB1 をノックダウンし、一次繊毛形成能が回復するかを調べたが、期待に反してわずかな回復が見られたのみであった。この結果より、CG-NAP KO 細胞での Rab8 のリクルートおよび一次繊毛形成不全は、MIB1 の蓄積以外の要因も存在するのではないかと判断した。

CS は微小管上でダイニンモーター依存的に運ばれることで中心体周辺へ分布する。CG-NAP

依存的に形成されたゴルジ微小管が PCM1 のゴルジ体周辺への局在に関与しているかを調べた。細胞を脱重合剤であるノコダゾールで処理し微小管を全て破壊し、薬剤除去後の微小管再形成過程（約 1~3 分後）を観察することで、中心体から、もしくはバラバラになったゴルジ体膜から伸長する中心体、ゴルジ微小管を識別することができる。このとき野生型細胞では PCM1 の顆粒が中心体微小管とゴルジ微小管上の両方に存在していたが、CG-NAP KO 細胞では PCM1 が中心体周辺へ強く蓄積していた。CG-NAP KO 細胞ではゴルジ微小管が完全に消失しているため、PCM1 が中心体微小管依存的に中心体近傍へと運ばれていると考えられる。すなわち PCM1 は CG-NAP により形成されたゴルジ微小管上にロードされていることがわかった。

Hela 細胞の抽出液を用いた解析より、内在性 CG-NAP と PCM1 の結合が確認できたため、種々の欠失変異体を用いて CG-NAP 上の PCM1 結合ドメインの絞り込みを行なった。その結果、CG-NAP は C 末端側に存在する PACT ドメイン（3518-3836 アミノ酸領域）を介して、PCM1 と結合することがわかった。次に CG-NAP のどの機能が一次繊毛の形成に必要なのかを CG-NAP KO 細胞を用いたレスキュー実験によって調べた。変異体は以下のものを用いた：（1）全長 CG-NAP（1-3907aa）、（2） Δ PACT（1-3568aa：PCM1 結合不可）、（3）miniCG-NAP（16-1229[^]3414-3836：中間ドメインの欠失）。（1）の発現はゴルジ微小管形成、PCM1 のゴルジ体周辺への局在、一次繊毛形成能など、KO 細胞の表現型全てを回復させた。一方、（2）の発現はゴルジ微小管の形成を回復させることができたが、PCM1 のゴルジ体周辺への局在は回復できなかった。変わって、（3）の発現は PCM1 のゴルジ体局在を回復させたが、ゴルジ微小管の形成は回復できなかった。また（2）、（3）いずれの発現も一次繊毛形成は回復できなかったことを踏まえると、CG-NAP 依存的なゴルジ微小管の形成と、PCM1 のゴルジ体周辺への局在の両方が一次繊毛の形成には必要不可欠であるといえる。以上の結果から CG-NAP は PCM1 を直接またはゴルジ微小管を介してゴルジ体近傍に繫留することで、CS の中心体への過剰な集積を制限し、それが正しい一次繊毛の形成に必要であると考えられた。

本研究より CG-NAP およびゴルジ微小管の一次繊毛形成における新規機能が明らかになった。このような CG-NAP 依存的な CS の細胞内局在の調節は Hela 細胞やマウス筋芽細胞株（C2C12）でも確認できたことから、哺乳類細胞で保存されたメカニズムであると考えられる。しかしながら、PCM1/CS がどのようなメカニズムで Rab8 のリクルートを阻害するのは未だ明らかになっていない。今後は中心体周辺に過剰に蓄積した CS がどのようなメカニズムで Rab8 の集積に影響を与えているのかを調べていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金恵誠
2. 発表標題 CG-NAP/AKAP450は中心小体サテライトの細胞内局在を調節する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金恵誠、会田紗也加、赤江亮祐、石原賢、鷺飛鳥、鈴木捺美、高橋美樹子
2. 発表標題 CG-NAP/AKAP450はPCM1の細胞内局在を制御することで一次繊毛形成に寄与する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松尾 和彦 (Matsuo Kazuhiko) (70599753)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究分担者	高橋 美樹子 (Takahashi Mikiko) (90324938)	帝京平成大学・薬学部・教授 (32511)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------