

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590182

研究課題名（和文）非上皮系細胞における primary cilia の細胞生物学的意義の解明

研究課題名（英文）Cell biological study of primary cilia in non-epithelial cells

研究代表者

萩原 治夫 (HAGIWARA HARUO)

群馬大学・医学部・教授

研究者番号：80189464

研究成果の概要（和文）：一次線毛を形態学的、細胞生物学的に解析した。一次線毛はダイニン腕を欠き運動能がないこと、ネキシンリンクがアクソネームの構造維持に関与すること、線毛基部の高電子密度物質がIFTにおける関門の役割を担うことが示唆された。線毛の膜構造の変化が線毛消失の初期変化として見出された。Rab8a は、線毛の構成分子と線毛形成を制御する分子の輸送に関わることを明らかにした。中心体や領域と細胞分裂部の細胞膜にチューブリン分子のアセチル化を担う分子の局在が観察された。

研究成果の概要（英文）：Primary cilia in the oviduct mucosa and non-epithelial cultured cells were investigated by morphological and cell biological methods. The axoneme of primary cilia were lacking dynein arms and immotile. Displacement of peripheral doublets was suggested to be attributable to the lack of nexin links. Electron dense materials at the ciliary neck were thought to work as a barrier of the ciliary transport. Primary cilia of cultured fibroblasts such as KD cells extended into cytoplasmic vesicles and observed as a cilium within a periciliary sheath. Morphological changes of the ciliary membrane initially occurred at deciliation. The Rab family is a key regulator of vesicle trafficking and it is known that GTP-bound Rab8 is required for the biogenesis of ciliary membrane. About 20% of cultured fibroblast transected with siRNAs of Rab8a displayed giant primary cilia, indicating that Rab8a is concerned with the transport of the molecules that control the ciliary length. Microtubules of cilia, centrioles, and contractile rings were usually acetylated. Tubulin acetylase were demonstrated to be localized to the centrosome region.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：一次線毛、非上皮系細胞、線維芽細胞、基底小体

1. 研究開始当初の背景

線毛は細胞表面の細長い細胞突起で、気道や卵管粘膜の線毛細胞に見られる運動線毛と、細胞から一本だけのび出る一次線毛 primary cilia（孤立線毛）の2つのタイプが知られている。線毛を伸長する基底小体は中心子と同じ形態をしている。多くの細胞はペアの中心子をもっているため、線毛細胞でなくても中心子から線毛が伸びることがある。これを一次線毛という。

一次線毛は、100年前から様々な細胞腫に出現することが知られていたが、長いあいだ何ら意味をもたない構造であると考えられてきた。最近になって、上皮細胞の一次線毛は機械的・化学的センサーとして働き、腎臓の尿細管の一次線毛の異常により多発性嚢胞腎が発症することが明らかになった。また、胎生期のノードの一次線毛（単線毛）は運動能があり、体の左右軸の決定に重要な働きを担っていることが明らかにされた。一次線毛の異常が Meckel syndrome や Bardet-Biedl syndrome などの様々な遺伝性疾患の原因になっていることも解明されつつあった。

上皮細胞のほかにも、非上皮系細胞でも一次線毛が発現することが知られていたが、非上皮系細胞における一次線毛の発現動態や役割についてはほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

一次線毛は、線維芽細胞をはじめとするさまざまな間葉系細胞にも高頻度に出現するが、このような細胞種における一次線毛の機能的意義については未解明な点が多い。線維芽細胞などの非上皮系細胞やそのほかの一次線毛を発現する細胞を用いて、一次線毛の形態、一次線毛の細胞周期性動態、一次線毛への分子局在、一次線毛形成の制御機構について解析し、一次線毛の構造と細胞生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 材料

材料として線維芽細胞株 (KD、3Y1-B) や筋細胞株 (C2C12、A7r5) などの培養細胞株と卵管粘膜組織を用いた。

2) 細胞培養

細胞培養には 10%FCS-DMEM 液を用いた。線維芽細胞株は、1%FCS-DMEM で長期間 (4 か月) 培養し解析した。C2C12 は、0.11%FCS-DMEM で分化を誘導し解析した。KD 細胞は、コン

フルエントの状態トリプシン処理して剥離し、再度同じ条件で培養して脱線毛を誘導して解析した。

3) 構造解析

1. 25-2.5%グルタルアルデヒド+1-2%パラホルムアルデヒドで前固定し、1%オスミウム液で後固定後脱水し、定法に従って試料を作製して透過型電子顕微鏡、走査型電子顕微鏡を用いて電顕観察した。コンフルエントの KD 細胞をトリプシン処理して剥離し、再度培養して継時的に解析した。

4) 免疫組織学的解析

Acetylated-tubulin、 γ -tubulin、 α -tubulin、inversin、Rab8a、FTCD、PCNT、centrin-1、AKAP-9、rootletin などの線毛関連分子に対する抗体や R67 抗体を用い、これらの分子局在について蛍光抗体法により解析した。

5) 中心体領域分子の RNAi 解析

RAB8a、PCNT、FTCD、TUBG1 に対する siRNA を KD 細胞に導入し、これらの分子の発現抑制と線毛形成について解析した。

6) 微小管のアセチル化解析

Mec17 は、微小管内腔で働くアルファチューブリンアセチル化酵素である。マウスの TAT1 (Mec17) 遺伝子の cDNA を入手し、その N 末部に GFP を融合した GFP 標識遺伝子を作製し、線維芽細胞株 3Y1-B に導入し細胞内分子動態の解析を行った。

4. 研究成果

1) 一次線毛の発現と構造解析

培養線維芽細胞、卵管粘膜固有層の筋線維芽細胞、分泌細胞には一次線毛が形成された。筋細胞株や分化誘導された横紋筋細胞には線毛形成はなかった。一次線毛のアクソネームは 9+0 配列で、ダイニン腕は欠損し運動能がないこと認められた。ネキシンリンクも欠如し、周辺微小管の位置異常に関与することが考えられた。線毛頸部の細胞膜下の高電子密度物質が IFT における関門であると示唆された。

基底小体には複数個 (平均 2.65 個) の基底小足が付随し、基底小足から核に向かって根小毛が伸長していた。一次線毛は、多方面から力学的な影響を受けていると考えられる。基底小体と基底小体附属構造は、一次線毛を細胞表面の定まった位置に固定するための強固な地盤を構築していることがわかった。

線維芽細胞の一次線毛は、細胞質の小胞に伸長し、電顕レベルでは a cilium within a periciliary sheath の形態を示した。Rab8a

の RNAi により一次線毛の過伸長が引き起こされたが、このような線毛も細胞表面から伸長する像は見られなかった。

コンフルエントに培養された KD 細胞のトリプシン処理 8 時間後に、蛍光抗体法で線毛の消失とおもわれる像がみられ、電顕的には線毛の膜構造の変化が観察された。

2) 一次線毛の動態と分子局在

KD 細胞における一次線毛の出現率は、細胞増殖時で約 20% で、静止期では約 80% であった。低栄養状態で長期間培養した KD 細胞でも一次線毛は存在し、一次線毛、基底小体、基底小体付属構造に局在する分子の発現に変化はなかった。機能的にサイレントな状態でも、一次線毛が保存されることが明らかになった。一次線毛は、細胞の静止期の構造要素として、細胞の構造的安定化にも関与するものと思われる。一次線毛の細胞膜には裏打ち構造が存在し、細胞膜の裏打ち構造が機能分子の局在に密接に関与することが考えられた。

3) 中心体領域分子の RNAi 解析

Rab8a の siRNA の導入により、一次線毛の無形成と一次線毛の過伸長という 2 つの抑制効果が見られた。Rab8a は線毛の構成分子の輸送と線毛伸長の制御分子の輸送に関与することが考えられた。すでに一次線毛が伸長しつつある細胞で Rab8a をノックダウンした場合、線毛の伸長を制御する分子が線毛に到達できなくなり、線毛の過伸長が起こることが示唆された。線毛の伸長は PCNT、FTCD、TUBG1 に対する RNAi では観察されなかった。

4) 微小管のアセチル化解析

微小管は、アセチル化することで安定化し脱重合されにくくなる。蛍光抗体法では、チューブリンのアセチル化は、一次線毛、基底小体（中心子）、細胞分裂時の収縮環領域にみられ、中心体から放射状に伸長している微小管の一部にもみられた。GFP-・TAT1 は主に中心体に局在し、また細胞分裂後に残存する細胞接着面にもやや強いシグナルが認められた。さらに、100 mM の塩化リチウムで刺激し 16 時間後の様子を観察したところ、中心体におけるシグナルがやや伸張した。この結果は、アセチル化微小管を染色した結果に酷似しており、私たちの作製した GFP-・TAT1 プロープによって、細胞内での微小管アセチル化部位を可視化に成功したものと考えられる。また、GFP-・TAT1 は細胞周辺部の葉状仮足部にも発現し、細胞移動時に細胞辺縁部における微小管のアセチル化が重要な役割を演じていることが考えられた。今後は、細胞分裂過程や分化過程についてタイムラプス解析を行い、チューブリンアセチル化の分子機能動態の解析をすすめたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Thatcher SE, Fultz ME, Tanaka H, Hagiwara H, Zhang H-L, Zhang Y, Hayakawa K, Yoshiyama S, Nakamura A, Wang HH, Katayama T, Watanabe M, Lin Y, Wright GL, Kohama K, Myosin light chain kinase/actin interaction in the phorbol dibutyrate-stimulated smooth muscle cell, J Pharm Sci (in press)、査読有
- ② Hagiwara H, Aoki T, Suzuki T, Takata K, Pre-embedding immunoelectron microscopy of chemically fixed mammalian tissue culture cells, Methods Mol Biol, 査読有, Vol. 657, 2010, pp145-154
- ③ Hagiwara H, Aoki T, Suzuki T, Takata K, Double-label immunoelectron microscopy for studying the colocalization of proteins in cultured cells, Methods Mol Biol, 査読有, Vol. 657, 2010, pp249-257
- ④ 萩原治夫, 卵管の発生と解剖学、産婦人科の世界、査読無、58 巻、2009、pp1259-1265
- ⑤ Shiba D, Yamaoka Y, Hagiwara H, Takamatsu T, Hamada H, Yokoyama T, Localization of Inv in a distinctive intraciliary compartment requires the C-terminal ninein-homolog-containing region, J Cell Sci, 査読有, Vol. 122, No. 1, 2009, pp44-54
- ⑥ Hagiwara H, Ohwada N, Aoki T, Suzuki T, Takata K, Immunohistochemical and electron microscopic observations of stromal cells in the human oviduct mucosa, Med Mol Morphol, 査読有, Vol. 41, No. 4, 2008, pp221-226
- ⑦ Hagiwara H, Ohwada N, Aoki T, Suzuki T, Takata K, The primary cilia of secretory cells in the human oviduct mucosa, Med Mol Morphol, 査読有, Vol. 41, No. 4, 2008, pp193-198

[学会発表] (計 10 件)

- ① 田中秀幸、萩原治夫、平滑筋細胞におけるスフィンゴ脂質による細胞内微細形態変化、第 116 回日本解剖学会、2011、3、30、パシフィコ横浜会議センター (神奈川県)
- ② 田中秀幸、萩原治夫、ラット結腸平滑筋形質膜におけるデンスプラーク領域とカベオラ密集領域、第 42 回日本臨床分子形

- 態学会、2010. 9. 24、東レ総合研修センター（静岡県）
- ③ 芝大、萩原治夫、横山尚彦、一次繊毛内分子領域（inv compartment）へのNphp3-Nek8集積機構解析、第115回日本解剖学会、2010. 3. 28、岩手県民会館（岩手県）
 - ④ 萩原治夫、卵管の形態、The 10th Annual Symposium Japanese Society for the Advancement of Women's Imaging、2009. 9. 4、淡路夢舞台国際会議場（兵庫県）
 - ⑤ 萩原治夫、高田邦昭、ヒト卵管の一次線毛（primary cilia）の形態学的解析、第40回日本臨床分子携帯学会、2008. 10. 3、福岡国際会議場（福岡県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 治夫 (HAGIWARA HARUO)

群馬大学・医学部・教授

研究者番号：80189464

(2) 研究分担者

なし