

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860048

研究課題名(和文) Kif24による一次繊毛サイクル制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of primary cilia formation cycle by Kif24

研究代表者

小林 哲夫 (Kobayashi, Tetsuo)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：80433994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：一次繊毛は、細胞外のシグナルを受容するアンテナとして機能し、その構造・機能異常が多くの疾患を惹起する。細胞が細胞周期を脱してG0期に移行すると一次繊毛は形成され、細胞周期に戻ると消失するが、一次繊毛の形成・消失を制御する分子メカニズムについては不明な点が多く残されている。本研究において、我々は一次繊毛形成に重要な役割を担う中心小体タンパク質群であるCP110、Kif24が結合する新規タンパク質Talpid3を同定した。我々は、Talpid3と繊毛性疾患原因タンパク質Cep290が、繊毛小胞形成を制御することにより、一次繊毛形成の初期段階に寄与することを示した。

研究成果の概要(英文)：Primary cilia function as cell's antenna and malfunction of this organelle causes various diseases called ciliopathy. Once cells exit cell cycle and go to quiescent phase, a primary cilium is formed. On the other hand, the primary cilium disappears when cells reenter to cell cycle. However, molecular mechanisms underlying assembly and disappearance of primary cilia are unclear. Here, we identified Talpid3 to associate with centriolar proteins CP110 and Kif24, requisite proteins for regulation of primary ciliogenesis. We showed that Talpid3 and Cep290, a causal protein of ciliopathies, play an essential role in early stage of primary ciliogenesis by controlling ciliary vesicle formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次繊毛 中心小体

1. 研究開始当初の背景

繊毛 (cilia/flagella) は、細胞の運動性や感覚受容に重要な役割を担っている。近年、繊毛構造・機能の異常が、多数の疾患 (繊毛性疾患) を惹起することが明らかにされつつある。これらの疾患の症状は、嚢胞腎、網膜変性、内臓逆位、無臭覚、呼吸異常、不妊症、水頭症、肥満、糖尿病、高血圧、多指症など多岐に渡り、その発症メカニズムの解明は重要な課題となっている。

繊毛は、運動性繊毛と非運動性繊毛 (一次繊毛: Primary cilia) に分けられる。細胞運動や細胞外液の移動に働く運動性繊毛に対して、ほとんど全ての哺乳動物細胞に存在する一次繊毛は、受容器官 (センサー) として機能し、光、化学、機械刺激だけでなく Hedgehog, Wnt, PDGF といった発生や器官形成に必須のシグナル分子も受容することが知られている。分裂期 (M 期) の紡錘体形成に重要な働きを担う中心小体 (Centriole) は、細胞が細胞周期を脱して G0 期に入ると、細胞膜近傍へ移動して基底小体 (Basal body) と成り、そこから細胞膜外側へ微小管が伸展し一次繊毛が形成される。一方、細胞が再び細胞周期に戻ると、一次繊毛は消失する。しかしながら、細胞の G0 期移行に伴う一次繊毛形成、G0 期離脱に伴う一次繊毛消失の分子メカニズムは未だほとんど分かっていない。

我々は、中心小体に局在するタンパク質である CP110 が Cep97 と複合体を形成し、細胞周期中の一次繊毛形成を抑制することを報告した。さらに我々は、CP110-Cep97 の相互作用分子として新規キネシン Kif24 を同定し、Kif24 が中心小体に局在する微小管分解酵素であり、その活性により細胞周期中の一次繊毛形成抑制に寄与することを報告した。しかしながら、Kif24 や CP110 による一次繊毛形成制御機構は不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

上記の知見から、Kif24 や CP110 が哺乳動物細胞における一次繊毛サイクル (一次繊毛形成、消失) において、重要な役割を果たすことが想定された。そこで本研究では、これらのタンパク質による一次繊毛形成過程、消失過程制御の分子機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

HEK293T 細胞を用いた過剰発現系により、Kif24, CP110, Talpid3 と相互作用する分子を網羅的に探索した。得られた候補分子と

Kif24, CP110 の結合は免疫沈降法で調べた。各タンパク質の細胞内局在や動態については、免疫染色法、GFP 融合タンパク質を用いたライブイメージングで調べた。また、繊毛小胞は透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

Kif24, CP110 と結合する因子として、新規タンパク質 Talpid3 を同定した。Talpid3 は、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュを用いた遺伝学的な解析から、一次繊毛形成に必要であることが示されていたが、その作用機序は不明であった。

(1) Talpid3 は CP110, Kif24, Cep97, Cep290 と結合する

Talpid3 と CP110 の結合を調べるために、Flag タグを付加した Talpid3 を発現させた HEK293T 細胞から抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降実験を行った。その結果、Flag-Talpid3 と内在性 CP110 の共沈降が観察された。次に、Talpid3 の特異抗体を作製し、免疫沈降実験を行った。その結果、Talpid3 は CP110, Kif24, Cep97, 繊毛性疾患原因タンパク質 Cep290 と複合体を形成することが示された。

(2) Talpid3 は中心小体に局在する

(1) で作製した抗 Talpid3 抗体を用いて、Talpid3 の細胞内局在を免疫染色法により調べた。その結果、Talpid3 は細胞周期を通じて中心小体マーカーである Centrin2 と共局在した。さらに、超解像顕微鏡を用いて、Talpid3 の中心小体上での局在を詳細に調べたところ、Talpid3 は中心小体の末端面 (distal end) においてリング状に局在することが分かった。

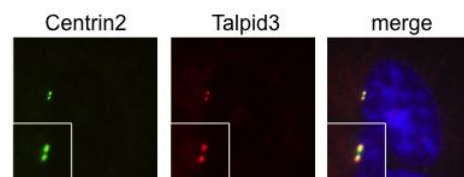


図1 Talpid3は中心小体に局在する

(3) Talpid3 は Centriolar satellites の動態を制御する

網膜上皮由来 RPE1 細胞において Talpid3 の発現抑制が一次繊毛形成に影響するか調べたところ、先の報告から予想された通り、一次繊毛形成率の低下が観察された。そこで、Talpid3 が一次繊毛形成に寄与する分子機構を明らかにするため、Talpid3 と相互作用するタンパク質を網羅的に探索した結果、Centriolar satellites (中心小体近傍に存在する粒状の構造物) に局在する PCM1 と結合する

ことが示された。さらに Talpid3 の発現抑制は、Cep290 の発現抑制と同様に、Centriolar satellites の中心小体近傍における凝集を引き起こした。これらの結果から、Cep290 と同様に、Talpid3 は PCM1 との結合を介して、Centriolar satellites の動態に寄与することが示唆された。

(4) Talpid3 と Cep290 は Rab8 の局在を制御する

Cep290 が低分子量 G タンパク質 Rab8 と結合することが報告されていることから、Talpid3 と Rab8 の結合を調べた結果、両者の結合が確認された。Rab8 は一次繊毛形成初期に中心小体近傍に局在し、繊毛小胞形成に働くことが示唆されている。そこで、Talpid3, Cep290 発現抑制細胞における Rab8 の局在を免疫染色法、及びライブイメージングにより調べた結果、Rab8 の中心小体近傍への集積が阻害されることが分かった。これらの結果は、一次繊毛形成初期における Rab8 の中心小体近傍への局在に Talpid3 と Cep290 が必要であることを示唆している。

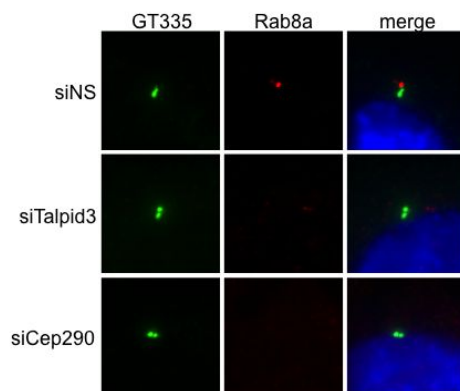


図2 Talpid3, Cep290はRab8aの中心小体近傍への局在化に必要なものである

(5) 一次繊毛形成過程において Rab8 は Talpid3, Cep290 の下流で機能する

次に、Talpid3 や Cep290 の発現抑制による一次繊毛形成異常が活性化型 Rab8、または Rab8 のグアニンヌクレオチド交換因子 Rabin8 の過剰発現でレスキューされるか調べた。その結果、活性化型 Rab8、Rabin8 の発現により Talpid3, Cep290 発現抑制細胞の一次繊毛形成率が回復することが分かった。これらの結果から、一次繊毛形成経路において Rab8 は Talpid3, Cep290 より下流で機能することが示唆された。

(6) Talpid3 と Cep290 は繊毛小胞形成過程に必要なものである

Rab8 が繊毛小胞形成に必要なことが示唆されていることから、透過型電子顕微鏡を用いて Talpid3, Cep290 発現抑制細胞におけ

る繊毛小胞を観察した。その結果、Talpid3 発現抑制細胞では繊毛小胞が形成されず、Cep290 発現抑制細胞ではコントロールと比べて小さい繊毛小胞が観察された。これらの結果から、Talpid3 は繊毛小胞形成の初期段階に必要であり、Cep290 は繊毛小胞の拡大に必要なことが示唆された。

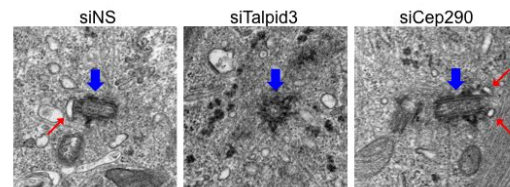


図3 Talpid3, Cep290は繊毛小胞形成に必要なものである

(7) まとめ

以上の結果から、哺乳動物細胞において、Talpid3 と Cep290 は、低分子量 G タンパク質 Rab8 の局在、または活性化を制御することにより、繊毛小胞形成の異なる段階を制御することが示唆された。今後は、CP110, Kif24 が Talpid3, Cep290 と相互作用する意義について、明らかにする必要がある。

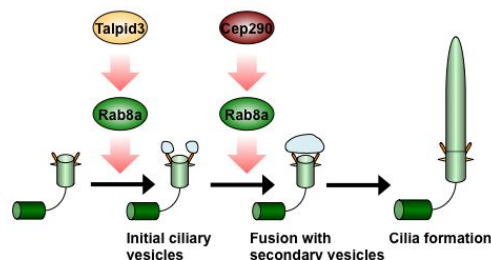


図4 Talpid3, Cep290による繊毛小胞形成制御モデル

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 1 件)

1. Kobayashi T, Kim S, Lin YC, Inoue T, Dynlacht BD.
The CP110-interacting proteins Talpid3 and Cep290 play overlapping and distinct roles in cilia assembly
J. Cell Biol., 204: 215-229 (2014)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 太田 麗央、小林 哲夫、伊東 広
一次繊毛における Rab-like ファミリータンパク質群の機能解析
第 37 回日本分子生物学会 ポスター発表
2014 年 11 月 27 日 パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

2. 伊達山 泉、小林 哲夫、伊東 広
一次繊毛を介したセロトニンシグナル伝達

機構の解析
第 66 回日本細胞生物学会 ポスター発表
2014 年 6 月 13 日 奈良県新公会堂(奈良県、
奈良市)

3. Kobayashi T, Kim S, Lin YC, Inoue T,
Dynlacht BD
CP110-interacting proteins, Talpid3 and Cep290,
play distinct roles in cilia assembly
第 4 回繊毛研究会 口頭発表
2013 年 9 月 7 日 東京大学(東京都、文京区)

4. 小林 哲夫, Brian David Dynlacht、伊東
広
CP110 結合タンパク質群による一次繊毛形成
制御メカニズムの解析
第 12 回生命科学研究会 口頭発表
2013 年 6 月 28 日 浅虫観光ホテル(青森県、
青森市)

5. Kobayashi T, Kim S, Lin YC, Inoue T,
Dynlacht BD
CP110-interacting proteins, Talpid3 and Cep290,
play distinct roles in cilia assembly
第 65 回日本細胞生物学会 口頭発表(招待
演者)
2013 年 6 月 20 日 ウィンクあいち(愛知県、
名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://bsw3.naist.jp/itoh/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 哲夫 (Kobayashi Tetsuo)

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサ
イエンス研究科 助教
研究者番号：80433994

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：