

論文の内容の要旨

論文題目 G 蛋白質 Arl13b の繊毛局在化におけるパルミトイル化修飾の役割

氏名 堀 裕次

【序論】

繊毛は、細胞膜から突出した細胞小器官であり、脊椎動物の多くの細胞に存在するが、その機能は長らく不明であり、これまでは“無用の長物”と考えられてきた。しかし近年、繊毛の形成・機能異常が、嚢胞腎、Bardet-Biedl 症候群、Joubert 症候群などの疾患の原因であることが明らかとなり、その生理機能が一躍脚光を浴びるようになった。現在、繊毛は細胞外環境を感知して細胞内にシグナルを伝達するアンテナとしての役割を担っており、チャンネルや受容体などのシグナル伝達分子が繊毛に密集して存在していることが明らかとなっている。しかし、繊毛局在性の膜タンパク質がどのようにして繊毛内に輸送されるかに関しては不明な点が多い（図 1a）。近年の研究により、膜タンパク質が繊毛に局在するために必要な配列（CTS: Cilia Targeting Signal）がいくつか発見されてきた。繊毛の根元部分には繊毛の膜と

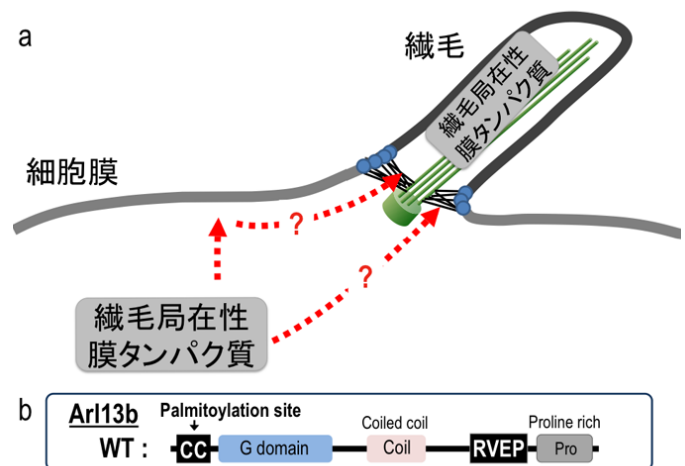


図 1. 繊毛への蛋白質局在化機構と Arl13b の一次構造

細胞膜を隔てるバリア構造が存在しており、膜蛋白質の繊毛内への進入は厳密に制御されていると考えられることから、これらの CTS を介した繊毛特異的な膜輸送系の存在が期待される。しかしながら、CTS を介した輸送機構、特に CTS が細胞内のどこでどのように選別されているかについてはほとんど明らかとなっていなかった。

繊毛局在性 Arf/Arl ファミリー G タンパク質 Arl13b は、一次繊毛の形成や機能に重要であることが知られている G タンパク質であり、最近、繊毛性疾患の一つである Joubert 症候群の原因遺伝子であることが報告された。Arl13b の機能発現には、Arl13b が繊毛に局在することが重要であるが、Arl13b の繊毛への局在化機構については全く未解明であった。私は以前に、各種欠失変異体および点変異体を用いた解析から、Arl13b の繊毛への局在には N 末端の パルミトイル化修飾が必要であることを報告した (図 1 b)。しかしパルミトイル化が Arl13b の繊毛への局在にどのような役割を果たしているかについては不明であった。

本研究では、Arl13b のパルミトイル化修飾に着目することによって、Arl13b の繊毛局在化機構の解明を目指した。その結果、Arl13b がゴルジ体に局在する酵素によってパルミトイル化修飾を受け、ゴルジ体を經由して繊毛に輸送されることを見いだした。また Arl13b が CTS の一つである RVxP モチーフを有することを見出し、ゴルジ体でパルミトイル化修飾されることが、RVxP モチーフの認識および選別に重要な役割を果たしている可能性を見出したので以下に報告する。

【方法と結果】

1. Arl13b の繊毛局在性におけるパルミトイル化修飾の重要性の検討

Arl13b が属する Arf/Arl ファミリー G タンパク質は一般に N 末端にミリストイル化修飾を受けて脂質膜にアンカーされる。そこで私は Arl13b の脂質修飾をミリストイル化にした際の繊毛局在への影響を検討するため、Arl13b の Arf 相同領域を、ミリストイル化修飾を受ける Arf ファミリー分子である Arf6 に置換したキメラ蛋白質を作製し局在を検討した。その結果、キメラ蛋白質は Arf6 が本来局在する細胞膜に局在し、繊毛への局在は観察されなかった (図 2)。次にこのキメラ蛋白質のミリストイル化される部位を Arl13b のパルミトイル化修飾を受ける配列に置換したキメラ蛋白質を作製したところ、この蛋白質は繊毛に局在した。この結果は、Arl13b のパルミトイル化修飾が単に脂質膜にアンカーするだけでなく、ミリストイル化では代替できない何らかの役割を担っている可能性が考えられた。

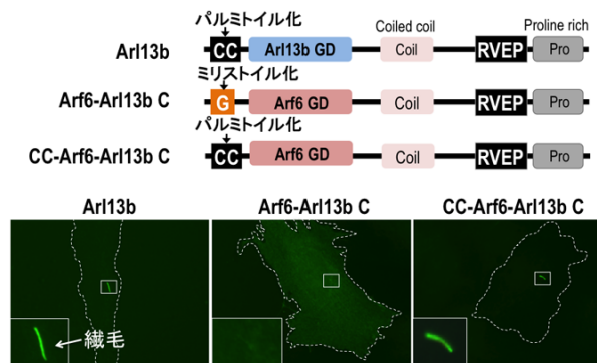


図 2. キメラ蛋白質の一次構造と細胞内局在

2. ゴルジ体に局在する酵素群によって Arl13b はパルミトイル化修飾を受ける

次に私は、細胞内のどこで Arl13b がパルミトイル化されるのかを明らかにするために、Arl13b のパルミトイル化修飾酵素の探索を行った。近年の研究から、細胞内における蛋白質のパルミトイル化は主に DHHC パルミトイル化修飾酵素ファミリーにより担われていることが知られている。

HEK293T 細胞に全 23 種類の DHHC パルミトイル化修飾酵素と Arl13b を共発現し、細胞に ³H 標識したパルミチン酸を取り込ませて Arl13b のパルミトイル化を検出した。その結果、DHHC3,7,15 及び 21 が Arl13b のパルミトイル化修飾を強く亢進させることを見出した (図 3)。さらにそれぞれの酵素の細胞内局在を観察したところ、いずれの酵素もゴルジ体に局在することを見出した。これらの結果により、Arl13b はゴルジ体に局在する酵素群によってパルミトイル化修飾を受けることが示唆された。

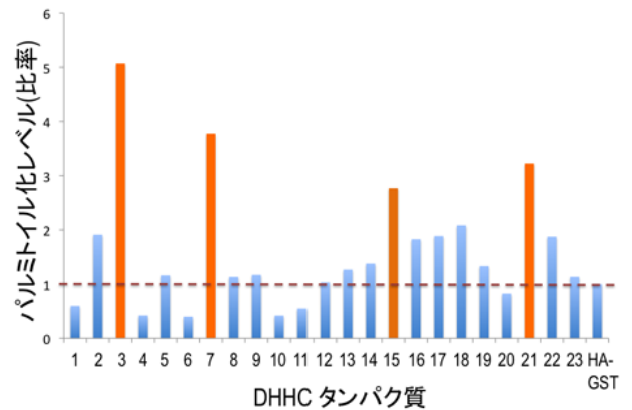


図 3. パルミトイル化酵素の探索結果

3. Arl13b はゴルジ体を経由して繊毛に輸送される

Arl13b がゴルジ体に局在する酵素群によってパルミトイル化修飾を受ける可能性が考えられたことから、Arl13b が実際にゴルジ体を経由して繊毛に輸送されるかを検討した。まず、生合成後の Arl13b の細胞内局在を経時的に観察する目的で、ドキシサイクリン依存的に Arl13b-GFP を発現する IMCD3 細胞を確立した。一般的に培養温度を 19 °C にすると、ゴルジ体からの物質輸送が阻害されることが知られている。そこで前述の IMCD3 細胞にドキシサイクリン添加して Arl13b を発現させた後、37 °C または 19 °C で細胞を培養した際の Arl13b の細胞内局在を観察した。その結果、37 °C では Arl13b は繊毛に局在したが、19 °C では Arl13b がゴルジ体に蓄積する様子が観察された (図 4 上)。この結果から Arl13b がゴルジ体を経由した後に、小胞輸送により繊毛に運ばれていることが示唆された。

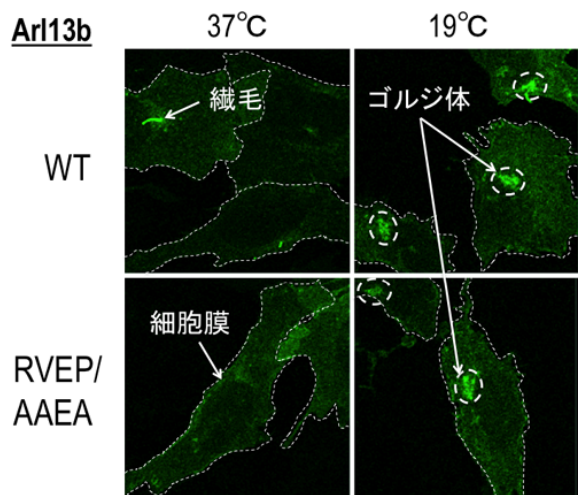


図 4. ゴルジ体からの輸送を阻害すると Arl13b はゴルジ体に蓄積する(19°C丸枠内)

4. Arl13b の繊毛への局在には RVxP モチーフが必要である

ではなぜゴルジ体を経由する必要があるのでしょうか。ここで私は Arl13b の C 末端側の領域に着目した。私は以前に、Arl13b の繊毛への局在に C 末端側の領域も必要であることを報告していた。そこで Arl13b の各種欠失変異体を作製して、繊毛局在に必要な C 末端側の領域の絞り込みを行った結果、Arl13b が RVxP モチーフを有することを見出した (図 1 b)。RVxP モチーフは、繊毛局在性カルシウムチャネルである PKD2 において同定された CTS である。RVxP モチーフをアラニン置換した RVEP/AAEA 変異体が繊毛に局在せず、細胞膜に局在したことから、Arl13b の RVxP モチーフが CTS として機能することが明らかとなった。

5. RVxP モチーフの選別はゴルジ体以降の過程で起こる

RVEP/AAEA 変異体が細胞膜に局在したことから、私は次に RVEP/AAEA 変異体がゴルジ体を経由するかどうかを野生型の際と同様の方法で調べた。その結果、RVEP/AAEA 変異体もゴルジ体からの小胞輸送を阻害した際に、ゴルジ体に蓄積する様子が観察された (図 4 下)。したがって RVEP/AAEA 変異体では、ゴルジ体までは野生型と同様に局在するものの、ゴルジ体から先において、挙動が異なっていることが示唆された。このことは、RVxP モチーフの選別がゴルジ体以降の過程で起きていることを示唆していると考えられた。

6. Arl13b の繊毛への局在には Arf4 および Rab8A が関与している

さらに私は Arl13b のゴルジ体から繊毛への輸送過程にどのような因子が関わっているか探る目的で、これまでにゴルジ体から繊毛への輸送過程に関与していることが明らかになっている GMAP210, Arf4 および Rab8A を発現抑制した際に Arl13b の繊毛への局在に影響が出るかどうか検討した。その結果、Arf4 および Rab8A の発現抑制により Arl13b の繊毛への局在が減弱したことから、Arl13b が Arf4 および Rab8A による小胞輸送によってゴルジ体から繊毛へと運ばれることが示唆された。RVxP モチーフが繊毛への局在に必要なことを考え合わせると、この結果は RVxP モチーフの認識および選別がゴルジ体で起こっている可能性を示唆していると考えられた。

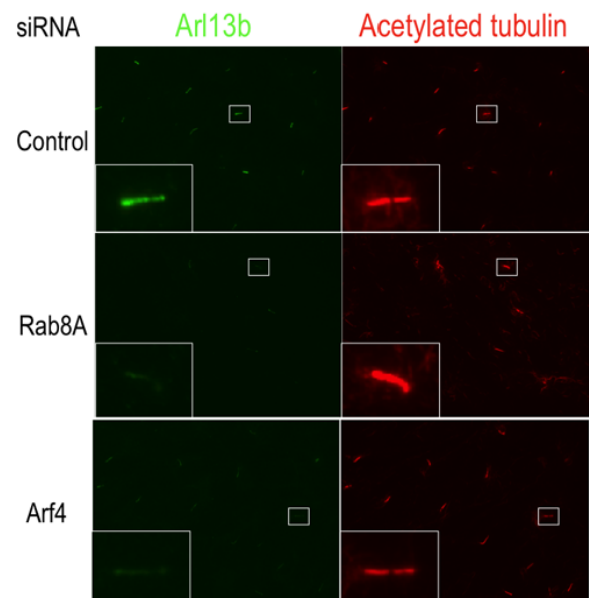


図 5. Arl13 の繊毛への局在には Arf4 および Rab8A が関与している

7. ゴルジ体に局在する DHHC7 に RVxP モチーフを付加すると繊毛への局在能を獲得する

RVxP モチーフの認識および選別がゴルジ体で起きている可能性をさらに検証するため、ゴルジ体に局在する DHHC7 に Arl13b の RVxP モチーフを含む領域を付加したキメラ蛋白質を作製して局在を観察した (図 5)。その結果、キメラ蛋白質はゴルジ体に加えて繊毛にも局在する様子が観察された。前項の結果と合わせると、ゴルジ体において RVxP モチーフが選別されている可能性が示唆された。

【まとめと考察】

本研究において私は、Arl13b の繊毛への局在に必要な領域を同定し、細胞質で合成された Arl13b がゴルジ体に局在する酵素群によってパルミトイル化を受けてゴルジ膜に係留され、ゴルジ体において RVxP モチーフが認識および選別されて、Arf4, Rab8A 依存的な小胞輸送によって繊毛へと運ばれることを見出した。これらの結果から、Arl13b の RVxP モチーフの認識過程において、パルミトイル化が Arl13b を認識場所へと導く役割を担っていることが示唆された。これまで RVxP モチーフを始めとする CTS が、細胞内のどこでどのように認識および選別されるかについてはあまりよくわかってい

なかった。今回のようにパルミトイル化が CTS の認識および選別に重要な役割を示すという報告は、本研究が初めてである。今後、RVxP モチーフを認識する因子の同定や、ゴルジ体から先の輸送機構のより詳細な解析を通じて、繊毛への膜蛋白質局在化機構のさらなる分子メカニズムの解明が期待される。

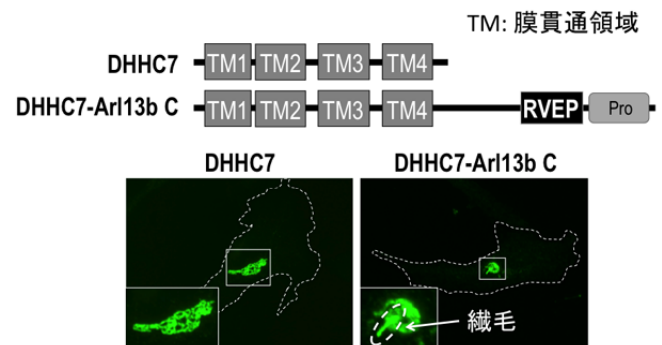


図 6. ゴルジ体に局在する DHHC7 に Arl13b C 末端部位を付加すると繊毛局在能を獲得する

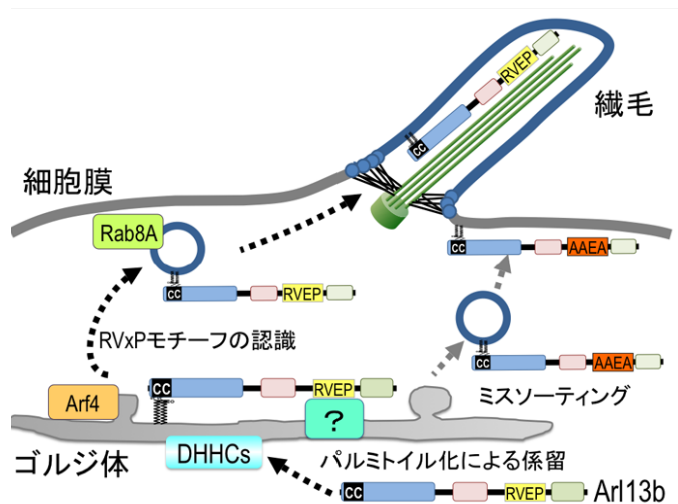


図 7. Arl13b の繊毛局在化のモデル