

論文内容の要旨

申請者氏名 伊達山 泉

哺乳類のほぼすべての細胞には一次繊毛と呼ばれる一本の短い毛のような突起構造が存在し、細胞外のシグナル分子を感知して細胞内へ伝えるアンテナとして機能する。一次繊毛の形成・機能の異常は網膜変性、多指症、肥満などの繊毛性疾患を引き起こす。一次繊毛は細胞膜および細胞質とひとつづきでありながら、細胞器官として独立した区画を持ち、タンパク質の一次繊毛局在は厳密に制御されている。一次繊毛にはセロトニン受容体 5HT6、ソマトスタチン受容体 SSTR3、Sonic Hedgehog シグナルの負の制御因子である GPR161 など約 30 種類の GPCR(ciliary GPCR)が局在することが報告された。しかしながら、ciliary GPCR の一次繊毛局在制御機構は不明な点が多い。そこで、本研究では 3 種類の ciliary GPCR、5HT6、SSTR3、GPR161 に着目し、ciliary GPCR の一次繊毛局在を制御する新規分子の探索と局在機構を解析した。

まず、これまでに局在機構が全く不明であった 5HT6 の局在関連分子の探索を行なった。マウスの腎臓髄質集合管由来の IMCD3 細胞を用いて 5HT6 の恒常発現株を樹立し、一次繊毛に局在するタンパク質の輸送に関連する遺伝子を含む 26 遺伝子の発現を抑制した。免疫染色の結果、10 分子の発現抑制により 5HT6 の一次繊毛局在率が低下した。さらに、HEK293T 細胞に 5HT6 とこれらのタンパク質群をそれぞれ共発現させ、免疫沈降実験を行なったところ、Rab12、Rab13、Rab8a、Arf4 の 4 分子と 5HT6 が共沈降した。Rab12 は ciliary GPCR の局在機構への関与が全く未知であったことから、Rab12 の機能解析を試みた。光退色後蛍光回復法により 5HT6 の一次繊毛局在を動的に検証したところ、Rab12 の発現抑制により 5HT6 の一次繊毛への輸送が遅くなることが判明した。網膜色素上皮細胞(RPE1)における内在性 GPR161 の一次繊毛局在も Rab12 の発現抑制により減弱したが、RPE1 細胞 SSTR3::GFP 恒常発現株における SSTR3 の一次繊毛局在に与える影響は弱かった。Rab12 恒常活性化型変異体の過剰発現は GPR161 および 5HT6 の一次繊毛局在を促進したが、SSTR3 の一次繊毛局在にはほとんど影響しなかった。また、Rab12 と GPR161 を共発現させ、免疫沈降実験を行なったところ Rab12 と共沈降が認められた。Rab12 は中心小体タンパク質 Cep19 依存的に一次繊毛の根元に局在し、一次繊毛内でのタンパク質輸送を担う IFT-B 複合体の一次繊毛局在に関与することが報告されている。そこで、Cep19 あるいは IFT-B の構成分子である IFT88 を発現抑制したところ、GPR161 の一次繊毛局在率は減弱したが、SSTR3 の一次繊毛局在への影響は殆ど見られなかった。Ciliary GPCR の一次繊毛局在に関与する分子として報告のあった Tulp3 を IFT88 と一緒に発現抑制すると、GPR161 の一次繊毛局在が相加的に減弱したが、Tulp3 の発現抑制は IFT88 の一次繊毛局在に影響しなかった。以上の結果から、Cep19-Rab12-IFT-B は ciliary GPCR の一次繊毛局在を選択的に促進することが示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 伊達山 泉

一次繊毛は哺乳類のほとんどすべての細胞に形成され、細胞外からのシグナルを細胞内に伝達するセンサーとして機能し、その形成や機能に不具合が生じることで肥満や多指症など多岐にわたる疾患が引き起こされる。一次繊毛には約 30 種類の G タンパク質共役受容体(ciliary GPCR)が局在することが報告されており、正常な機能を発揮するためには ciliary GPCR が一次繊毛に局在することが必要であると考えられている。しかし、その局在機構の全貌は明らかになっていない。

申請者は ciliary GPCR であるセロトニン受容体 5HT6 の一次繊毛局在関連分子を探索し、ciliary GPCR の一次繊毛局在における Rab12 による促進機能を初めて見出した。さらに、5HT6 だけでなく、Sonic Hedgehog シグナルの負の制御因子である GPR161 およびソマトスタチン受容体 SSTR3 の 3 種類の ciliary GPCR に着目し、ciliary GPCR の一次繊毛局在機構における Rab12 の機能解析を行なった。5HT6 と GPR161 の一次繊毛局在は Rab12 の発現抑制により減弱し、Rab12 の恒常活性化型変異体の過剰発現により有意に増加した。また、過剰発現による免疫沈降実験の結果から、5HT6 および GPR161 は Rab12 と相互作用することが示唆された。一方、Rab12 の発現抑制および恒常活性化型変異体の過剰発現による SSTR3 の一次繊毛局在への影響は弱く、Rab12 は選択的に ciliary GPCR の一次繊毛局在を促進することが示唆された。Rab12 は Cep19 依存的に一次繊毛の根元に局在し、IFT-B 複合体の一次繊毛局在を促進することが報告されている。申請者は Cep19 および IFT-B 複合体の構成分子 IFT88 の発現抑制により GPR161 の一次繊毛への局在が減弱したことから、Cep19-Rab12-IFT-B による ciliary GPCR の一次繊毛局在機構の存在を示唆した。さらに、ciliary GPCR の一次繊毛局在を促進的に制御する既知の分子 Tulp3 と IFT88 の同時発現抑制が個別発現抑制に比べて相加的に GPR161 の一次繊毛局在を減弱させる一方、Tulp3 の発現抑制が IFT-B の一次繊毛局在に影響しなかったことから、Cep19-Rab12-IFT-B は Tulp3 に依存しない新規の ciliary GPCR 一次繊毛局在機構であることを示唆した。

これまでに 5HT6 の一次繊毛局在機構に関する報告は全くなかったが、本論文により Rab12 による局在制御機構が初めて示唆され、今後の 5HT6 シグナル伝達解析に大きく貢献する可能性がある。また、ciliary GPCR の局在機構における Rab12 の関与は ciliary GPCR に関連した繊毛性疾患の原因の理解と解決法探索の糸口となる重要な知見となった。さらに、本研究は ciliary GPCR が複数の局在機構により制御されている可能性を示唆しており、各局在機構の個別の存在意義を問う大変興味深い結果である。

以上のように、本論文は ciliary GPCR の一次繊毛局在機構について新たな知見を示すものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。