

85. 繊毛内タンパク質輸送機構と繊毛病の分子基盤の解明

中山 和久

Key words : 繊毛, BBSome, タンパク質間相互作用

京都大学 大学院薬学研究科
生体情報制御学分野

緒言

ほぼすべての細胞に存在する一次繊毛は、外部シグナルのセンサーとして機能し、発生や細胞分化などの過程において重要な役割を果たす。繊毛の機能異常は、繊毛病と総称されるさまざまな遺伝性疾患（例：Bardet-Biedl 症候群, BBS）を引き起こす。

繊毛内へのタンパク質輸送および繊毛内でのタンパク質輸送においては、いくつかのタンパク質複合体が重要な役割を果たす。このような複合体には、もともとはクラミドモナスの鞭毛輸送で見つかった IFT-A 複合体と IFT-B 複合体、および BBS の原因遺伝子産物によって構成される BBSome 複合体がある（図 1）。BBSome 複合体のサブユニットのなかには、クラスリンのアダプタータンパク質と類似のドメイン構成を有するものがあることから、BBSome はタンパク質輸送の過程で、クラスリン-アダプター複合体と類似の機能を果たす可能性が考えられた。

本研究では、BBSome 複合体の機能を知る端緒を得るために、BBSome 複合体の構築様式の解明をめざした。

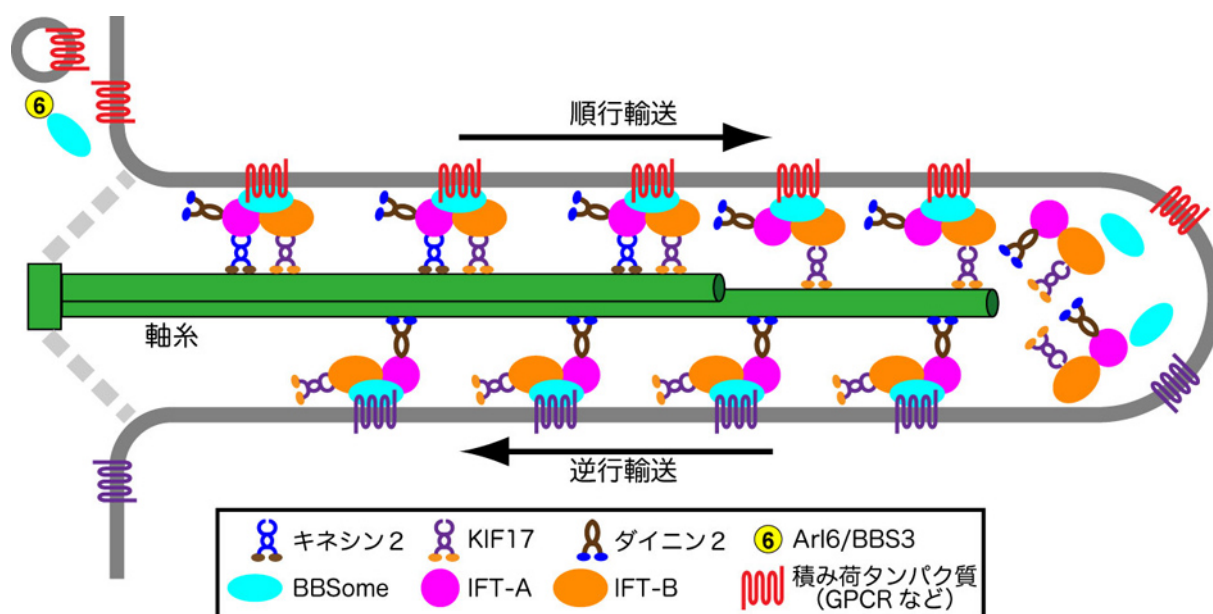


図 1. BBSome, IFT-A, IFT-B 複合体による繊毛内のタンパク質輸送のモデル。

IFT-A 複合体と IFT-B 複合体は、キネシンやダイニンのようなモータータンパク質と結合することによって、繊毛内の順行輸送や逆行輸送を媒介すると考えられる。BBSome 複合体は IFT 複合体と積み荷タンパク質に結合することによって、繊毛内のタンパク質輸送を媒介すると予想される。

方法

タンパク質間相互作用解析は、図2に概要を示すVIP (Visible Immunoprecipitation) アッセイによって次のように行った。EGFP 融合タンパク質と tRFP 融合タンパク質を HEK293T 細胞に共発現させた後に細胞溶解液を調製し、GST-抗 GFP-Nanobody とグルタチオンセファロースビーズを用いて溶解液を免疫沈降した。沈降したビーズを BZ-8000 顕微鏡 (KEYENCE) を用いて直接観察することによって、EGFP 融合タンパク質と tRFP 融合タンパク質の間の相互作用を調べた。ビーズが緑色と赤色の両方で光ることは、二つのタンパク質の間に相互作用があり、緑色でのみ光るときには相互作用がないことを表している。

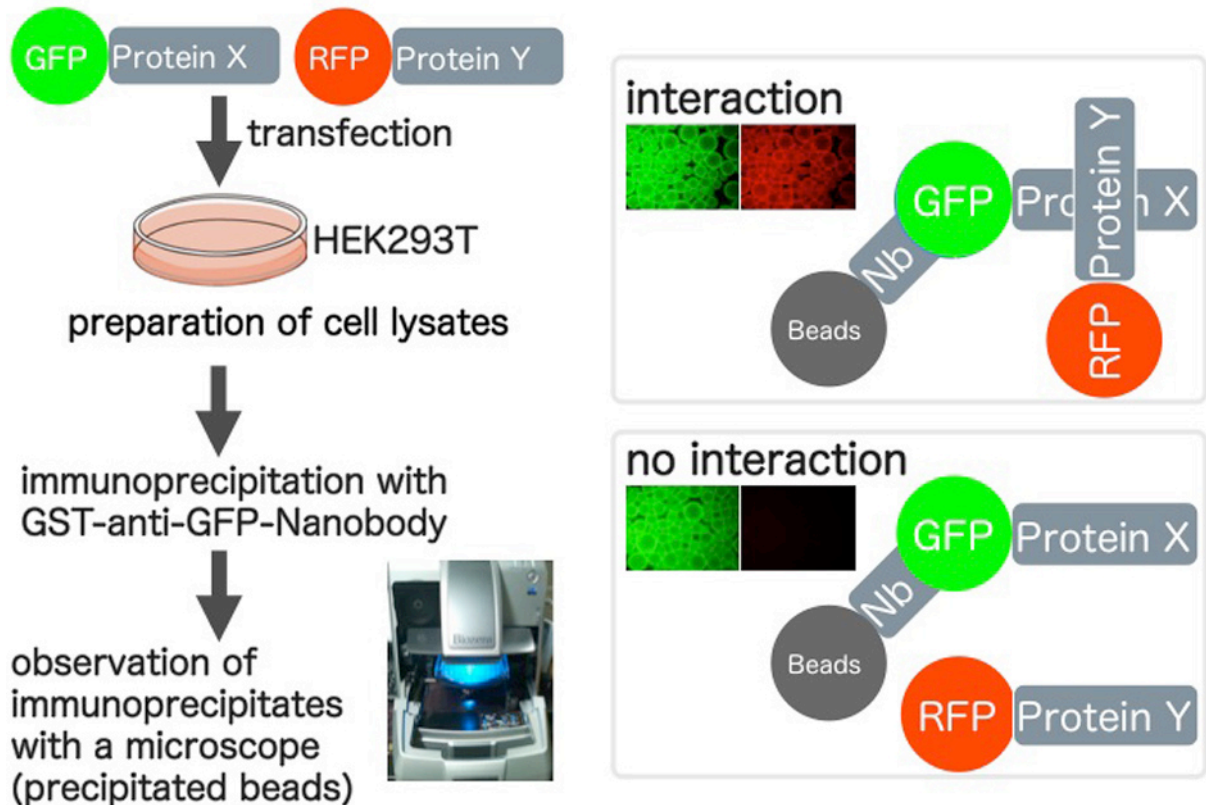


図2. VIP アッセイによるタンパク質間相互作用解析の概要。

解析方法の詳細については本文を参照。

BBSome の各サブユニットの細胞内局在解析は次のようにして行った。一つのサブユニットを EGFP 融合タンパク質として、他のサブユニットを tRFP 融合タンパク質として HEK293T 細胞、または繊毛形成能を有する hTERT-RPE1 細胞に発現させ、hTERT-RPE1 細胞については繊毛を形成する栄養飢餓条件下で培養した後に蛍光顕微鏡で発現したタンパク質の局在を観察した。

結果

1. タンパク質間相互作用解析のための VIP アッセイ

8つのサブユニットから成る BBSome 複合体のすべてのサブユニット間の相互作用を迅速に解析するために VIP アッセイ法を開発した (図2) ¹⁾。

a) EGFP と融合させたサブユニット、および tRFP と融合させたサブユニットの発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションした。

b) そこから調製した細胞溶解液を、GST-抗 GFP-Nanobody とグルタチオンセファロースビーズを用いて免疫沈降した。

c) 沈降したビーズを BZ-8000 顕微鏡を用いて直接観察した。

このような方法で調べた tRFP-BBS9 と EGFP 融合の他の BBSome サブユニットの相互作用解析の結果を図 3 に示す。この解析結果から、BBS9 は BBS1, BBS2, BBS5, および BBS8 と相互作用することが明らかになった。特に、BBS2 や BBS8 との相互作用は強固であった。

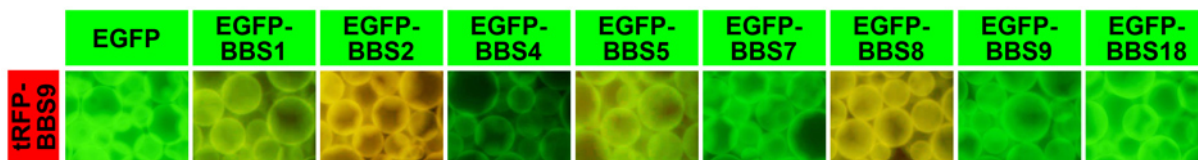


図 3. BBS9 と他の BBSome サブユニットとの間の相互作用の解析。

tRFP-BBS9 と EGFP 融合の他の BBSome サブユニットの発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションした後に、細胞溶解液を調製し、GST-抗 GFP-Nanobody とグルタチオンセファロースビーズを用いて免疫沈降を行った。その後、沈降したビーズを BZ-8000 顕微鏡を用いて直接観察した。黄色く見えているものが、EGFP 融合の BBSome サブユニットと tRFP-BBS9 が共沈降したことを表している。この結果から、BBS9 は BBS1, BBS2, BBS5 および BBS8 と相互作用することが明らかになった。

2. すべての BBSome サブユニット間の相互作用解析

次に、8 つすべてのサブユニットの組合せ ($8 \times 8 = 64$ 通り) について、EGFP と tRFP の融合タンパク質として HEK293T 細胞に共発現させ、VIP アッセイで相互作用を解析した (図 4)。このような 1 : 1 の相互作用の解析結果から、図 5 に示すような 8 つのサブユニットから成る BBSome の構築様式が予想された。

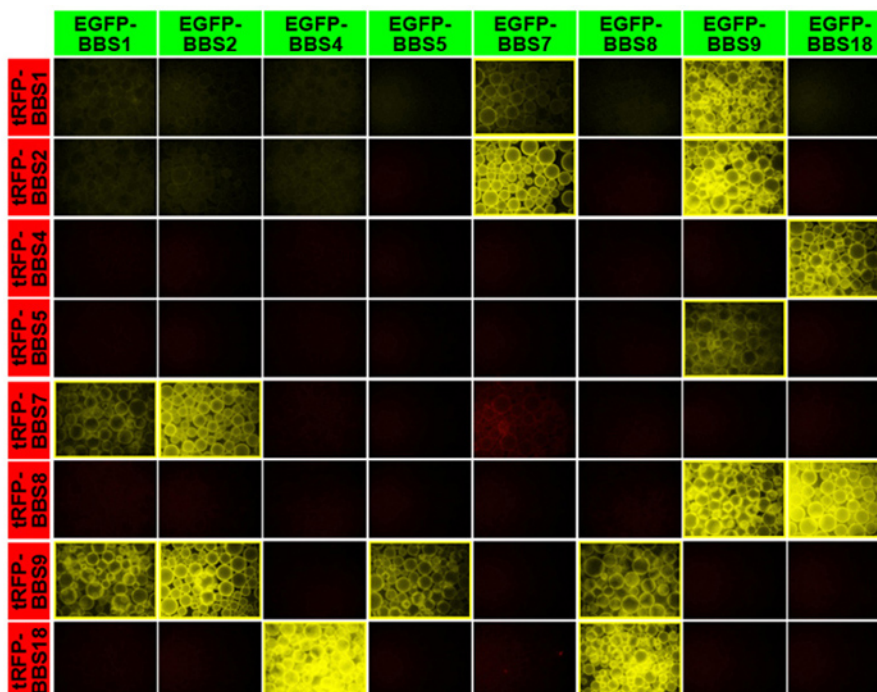


図 4. VIP アッセイによる BBSome サブユニット間の 1 : 1 の相互作用解析。

EGFP 融合と tRFP 融合の BBSome サブユニットを HEK293T 細胞に共発現し、VIP アッセイを行った。ビーズが黄色く光っていれば、サブユニットどうしが相互作用していることを意味する。

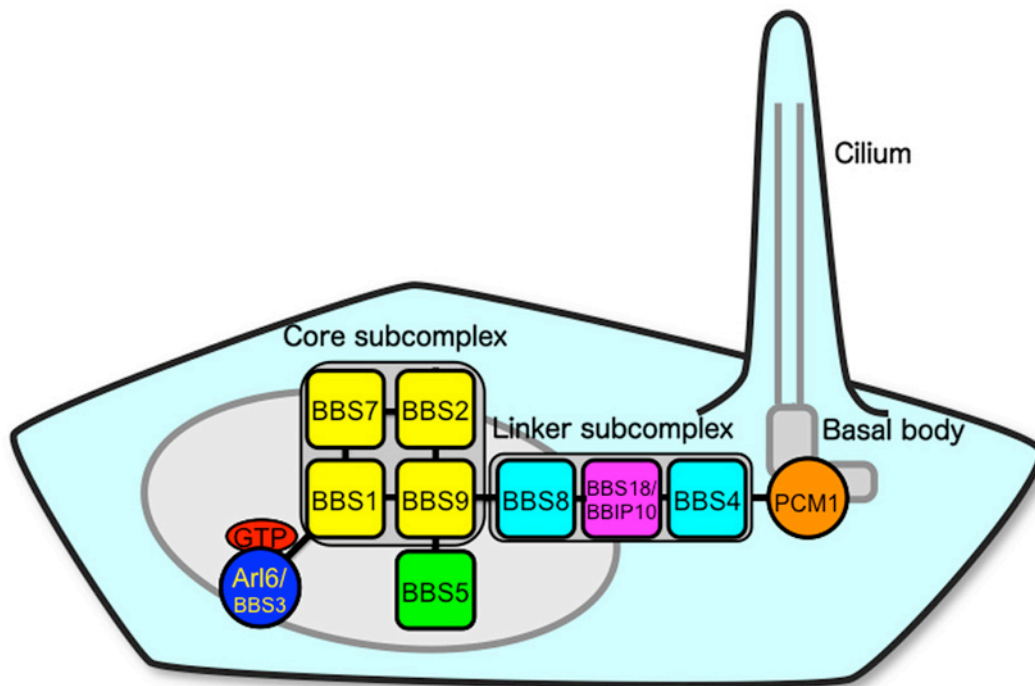


図5. 予想される BBSome の構築様式と基底小体／中心体への局在化機構。

BBSome 複合体は、大まかにコアサブ複合体とリンカーサブ複合体に分けられる。リンカーサブ複合体のサブユニット BBS4 が基底小体／中心体に局在する PCM1 と相互作用することによって、基底小体／中心体の近傍で BBSome が構築されると考えられる。

3. 低分子量 GTPase の BBS3/Arl6 と BBSome サブユニットの相互作用

これまでに、BBS の原因遺伝子の一つである *BBS3/ARL6* の産物は BBS1 と相互作用することが報告されている。VIP アッセイによって他のすべてのサブユニットについても相互作用を調べたところ、BBS3/Arl6 は BBS1 とのみ相互作用することが確認された (図5)。

4. 3 サブユニット間、および4 サブユニット間の相互作用解析

EGFP, tRFP, tBFP, および iRFP 融合の BBSome サブユニットを HEK293T 細胞に同時に発現させ、三者間、および四者間の相互作用を VIP アッセイにより解析することによって、図5に示す BBS4-BBS18-BBS8-BBS9 間の直線的な相互作用、および BBS9-BBS2-BBS7-BBS1 間の環状の相互作用を証明したり。

5. 中心体／基底小体近傍での BBSome の構築

HEK293T 細胞に発現させると、EGFP-BBS4 は中心体近傍局在タンパク質の PCM1 と結合し、中心体近傍に局在するが、他の BBSome サブユニットは局在しなかった。また、繊毛を形成している hTERT-RPE1 細胞では、EGFP-BBS4 は繊毛基部の基底小体近傍に局在していた。一方、EGFP-BBS18 を tRFP-BBS4 とともに HEK293T 細胞で発現させると、中心体近傍に局在するようになった。次に、EGFP-BBS8 を tRFP-BBS4 とともに発現させても中心体近傍には局在しないが、tRFP-BBS18 をさらに共発現すると中心体近傍に局在するようになった。このような共発現実験を順次行うことによって、図5に示すモデルに従って、BBSome が中心体近傍で構築されることを証明したり。

考 察

本研究によって明らかになった BBSome 複合体の構築様式 (図5) は、クラスリン-アダプター複合体の構築様式とはまったく異なるものである。また、これまでの報告で予想されている BBSome 複合体のサブユニット間相互作用

とも異なる。特に、BBS18はこれまではBBSomeを構成するサブユニットかどうかはわかっていなかったが、図5に示すリンカーサブ複合体の一部としてBBSomeの構築において必須のサブユニットであることが明らかになった。

一方、BBSomeのサブユニットをさまざまな組合せで細胞に発現させることによって、中心体局在タンパク質のPCM1に結合するBBS4が起点となって、BBSome複合体が中心体／基底小体の近傍で順次構築されることが明らかになった。

今後は、実際にBBSの患者に見られるBBSomeサブユニットの変異体が他のサブユニットと相互作用するのかどうかや中心体／基底小体に局在するのかどうかを解析することによって、BBS発症機構の解明をめざす。

なお、本研究によって開発したVIPアッセイ法は、繊毛内タンパク質輸送にかかわる他のタンパク質複合体（IFT-A複合体やIFT-B複合体など）だけでなく、細胞内のさまざまな輸送過程に関与するタンパク質複合体の解析にも有用である^{1,2)}。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学大学院薬学研究科・助教の加藤洋平である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深謝いたします。

文 献

- 1) Katoh, Y., Nozaki, S., Hartanto, D., Miyano, R. & Nakayama, K. : Multisubunit complex architectures revealed by visible immunoprecipitation (VIP) assay using fluorescent fusion proteins. *J. Cell Sci.*, **128** : 2351-2362, 2015.
- 2) Kubo, K., Kobayashi, M., Nozaki, S., Yagi, C., Hatsuzawa, K., Katoh, Y., Shin, H.-W., Takahashi, S. & Nakayama, K. : SNAP23/25 and VAMP2 mediate exocytic event of transferrin receptor-containing recycling vesicles. *Biol. Open*, **4** : 910-920, 2015.