

一次繊毛への輸送において機能する SNARE タンパク質のライブセルイメージングによる探索

京都大学薬学部 6 年 八木智佳子

一次繊毛 (Primary Cilia) は、私たちの身体のほとんどの細胞に存在するアンテナ様構造のオルガネラである。近年、一次繊毛には多くの受容体やチャネルが存在し、外部環境を感知するシグナルセンサーとして重要な役割をもつことが明らかになってきた。また、一次繊毛の形成異常や機能不全は、網膜色素変性、病的肥満、嚢胞腎、多指症、内臓逆位など多様な症状を呈する「繊毛病」を引き起こす。

一次繊毛形成の際には、繊毛形成に特異的な小胞を介する輸送系の役割が不可欠である (図 1)。また、繊毛の基部には拡散障壁となる構造が存在し、繊毛の内部や膜は、細胞質や細胞膜とは区別されるため、繊毛の内部や膜へのタンパク質の供給にあたっては、繊毛に対して選択的な輸送系が必要であると考えられる。しかし、このような繊毛特異的な輸送系の分子基盤はほとんどわかっていない。

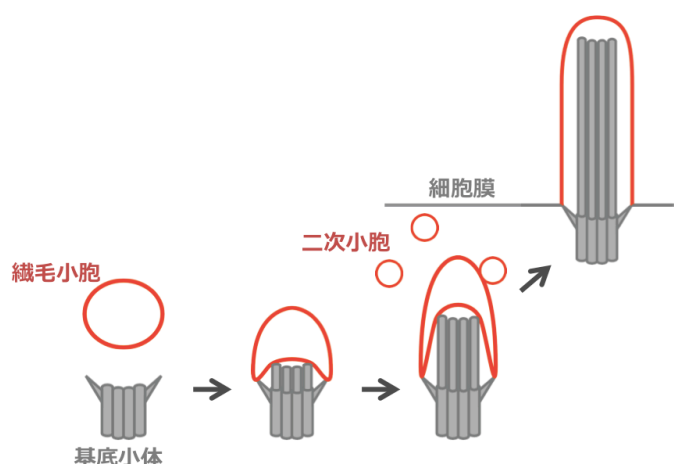


図 1 小胞輸送が関わる一次繊毛の形成・維持過程

一次繊毛は、中心体由来の基底小体に繊毛小胞が融合、二次小胞による膜の供給を伴いながら軸系が伸びてゆき、最終的に細胞膜と融合することで細胞外へ突出する。また、完成した繊毛を維持していくための膜やタンパク質の供給にも小胞輸送が必要だと考えられる。

繊毛への輸送において、膜同士の「融合」が起こっていると予想し、SNARE タンパク質に着目した。SNARE は膜融合を推進するタンパク質で、標的膜側に存在する Q-SNARE (t-SNARE ともいう) と小胞膜側に存在する R-SNARE (v-SNARE) に由来する 4 本のヘリックスが絡み合って複合体を形成することによって膜融合を推進する。Q-SNARE、R-SNARE には多くの種類が存在し、ある特定の組み合わせのときのみ融合が起こるため、SNARE の種類や局在によって膜融合が調節される。本研究では、繊毛への輸送を調節している SNARE を同定することを目的とした。

繊毛形成のモデル細胞である hTERT-RPE1 細胞に、EGFP 標識したさまざまな R-SNARE (VAMP2、VAMP3、VAMP4、VAMP7、VAMP8) を発現させたところ、VAMP2、VAMP3、および VAMP8 の繊毛基部への集積が観察された。さらに、EGFP 標識した各 VAMP と、tRFP

標識した Arl13b（一次繊毛マーカー）を発現させ、共焦点顕微鏡によってタイムラプス観察を行った。すると、VAMP2、VAMP3、および VAMP8 が常に一次繊毛の基部に局在し、繊毛と挙動を共にする様子が観察された（図2）。また、全反射蛍光顕微鏡（TIRFM）によるタイムラプス観察を行ったところ、繊毛基部で VAMP2、3、8 の存在する小胞の融合が起こる様子も観察された。これらのイメージングの結果から、一次繊毛の基部で、VAMP2、VAMP3、VAMP8 による融合が起こっていることが示唆される。

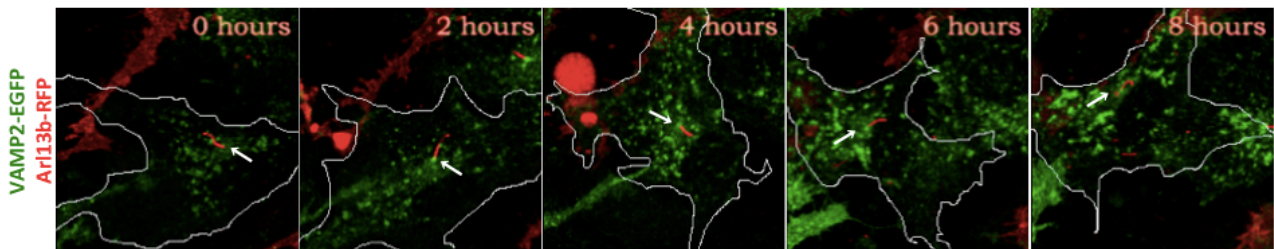


図2 一次繊毛基部に局在する VAMP2 の挙動

hTERT-RPE1 細胞において、tRFP 標識した一次繊毛マーカーの Arl13b(赤)と EGFP 標識した VAMP2 を発現させ、共焦点顕微鏡でタイムラプス観察を行った。一次繊毛基部には VAMP2 が常に局在し、挙動を共にしている。

そこで、VAMP2、VAMP3、VAMP8 が一次繊毛における何らかの膜融合過程に関与すると予想し、hTERT-RPE1 細胞でこれら 3 つの R-SNARE を同時にノックダウンして、一次繊毛に与える影響を観察した。すると、野生型の細胞に比べてノックダウンを行った細胞で、繊毛の形成率に減少傾向が見られた。また、繊毛に局在し機能することが知られている G タンパク質共役受容体であるソマトスタチン受容体 3 (SSTR3) およびメラニン凝集ホルモン受容体 1 (MCHR1) の安定発現株を利用して同様なノックダウンを行ったが、これら受容体の繊毛上局在は変化しなかった。すなわち、繊毛基部に集積する R-SNARE による融合は、これらの受容体を運ぶ輸送経路には関与しないようだ。

以上より、本研究では一次繊毛基部では小胞の融合が高頻度に行っており、融合する小胞には R-SNARE である VAMP2、VAMP3、VAMP8 が存在していることを発見した。さらに、これらの R-SNARE の機能として、繊毛形成や維持の過程への関与が示唆された。今後は、今回同定した R-SNARE のより詳細な機能の検討、および共役して働く分子の同定を行っていきたい。