



Title	Centriolar Satellites : Molecular Characterization, ATP-dependent Movement Toward Centrioles and Possible Involvement in Ciliogenesis
Author(s)	久保, 亮治
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41736
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	久 保 亮 治
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 15284 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年3月24日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学 位 论 文 名	Centriolar Satellites : Molecular Characterization, ATP-dependent Movement Toward Centrioles and Possible Involvement in Ciliogenesis (Centriolar satellites : 構成蛋白の同定、ATP 依存性の中心体方向への運動、纖毛形成への関与の可能性)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉川 邦彦
	(副査) 教 授 門田 守人 教 授 祖父江憲治

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

Pericentriolar material-1 (PCM-1) 蛋白の細胞内局在の解析。Centriolar satellites (CS) が中心体近辺に局在するメカニズムの解析。CS の機能解析。

【方法ならびに成績】

1. 抗中心体周辺物質モノクローナル抗体 (mAb) の作成

精製した中心体と *Xenopus* 卵抽出液とを混ぜてインキュベーションし、中心体と共に沈する蛋白を抗原としてマウスを免疫、mAb を作製した。細胞の免疫染色によりスクリーニングし、複数の抗中心体周辺物質 mAb が得られた。

2. 抗中心体周辺物質 mAb・W8C3 による発現スクリーニング

得られた抗中心体周辺物質 mAb の一つである W8C3 mAb を用いて、*Xenopus* 卵 cDNA ライブラリをスクリーニングしたところ、pericentriolar material-1 (PCM-1) 蛋白の *Xenopus* ホモログの cDNA を得た。PCM-1 は CREST 症候群患者の抗中心体自己抗体を用いたスクリーニングにより発見された蛋白であるが、その細胞内局在の詳細及び機能は不明のままであった。そこで我々はまず PCM-1 蛋白についての解析を始めた。

3. PCM-1 の細胞内局在の解析

まず、*Xenopus* PCM-1 (XPCM-1) の C 末端側のポリペプチドを抗原として抗 XPCM-1 ポリクローナル抗体 (pAb) を作製し、その pAb が XPCM-1 を特異的に認識する事を確認した。次にこの pAb を用いて免疫染色を行った。*Xenopus* A6 細胞を抗 γ tubulin-mAb と抗 XPCM-1 pAb を用いて免疫二重染色したところ、抗 XPCM-1 pAb による中心体の染色は γ tubulin の染色に比べてより大きく、形も不整であった。また XPCM-1 は細胞質内に散在する点状の染色が認められた。さらに免疫電顕を行ったところ、XPCM-1 が中心体周辺物質の構成蛋白ではなく、centriolar satellites (CS) の構成蛋白である事が明らかとなった。CS は中心体周辺に散在する ϕ 80~100nm の電子密な球状の非膜系構造物であり、今迄 CS に局在する蛋白は知られていなかった。

4. CS の中心体周辺への局在メカニズムの解析

次に CS の中心体周辺への局在メカニズムについて検討した。*Xenopus* A6 細胞を nocodazole 処理し細胞内微小管ネットワークを破壊した後観察すると、CS は中心体を離れ細胞質内に散在していた。次に nocodazole 処理後、細胞を培地で洗い経時的に固定、観察したところ、微小管ネットワークの再構築に伴い CS は中心体近辺に再局在した。

以上より、CS の中心体への局在は微小管依存性である事がわかった。

5. CS の動きの観察

次に、green fluorescent protein (GFP) と XPCM-1 のキメラ蛋白を発現する A6 細胞を作製し、このキメラ蛋白が CS に局在する事を確認した。この細胞を観察したところ、CS は細胞質内を運動し、その速度は最大 $0.7 \mu\text{m}/\text{s}$ である事がわかった。

さらに上記の細胞から GFP でラベルされた CS を粗精製し、*Xenopus* 卵抽出液を用いた *in vitro* 再構成系で CS の運動を観察した。CS は微小管に沿って、中心体方向（微小管マイナス端方向）に最大秒速 $0.7 \mu\text{m}/\text{s}$ で運動し、結果として中心体周辺に集積した。微小管プラス端方向への運動は観察されなかった。この CS の運動は AMP-PNP $100 \mu\text{M}$ では阻害されなかったが、vanadate $10 \mu\text{M}$ 、または抗 dynein 中間鎖抗体により完全に阻害された。以上より CS の運動が dynein motor 依存性である事が示唆された。

6. 繊毛形成時の PCM-1 の細胞内局在の解析

纖毛形成時には fibrous granules (FG) と呼ばれる電子密な構造物が細胞質内に多数出現し、中心子（基底小体）複製に何らかの役割を担っているとされる。FG は CS と非常に似た構造を持ち、形態学的に区別出来ない。そこで、PCM-1 が FG に局在するか否か検討した。マウス鼻呼吸上皮を $1\% \text{ZnSO}_4$ 水溶液で処理する事で纖毛形成を惹起し、4 日後に固定、観察した。免疫染色にて PCM-1 が纖毛形成時に著明に増加する事が示された。免疫電顕により PCM-1 が FG に局在する事が示された。

【総括】

今回我々は、CS/FG に局在する蛋白を初めて同定し、CS が微小管依存性に細胞質内を運動し、微小管マイナス端に集積する性質を持つ新規非膜系オルガネラである事を示した。CS の機能は未だ不明であるが、纖毛形成時における観察より、CS と FG が同一のオルガネラであり、共に中心子複製に関与している可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、25~40年前に行われた中心体、纖毛形成及び基底小体形成の電顕観察を基に、近代の分子細胞生物学的な手法を駆使する事で、非常に興味深い知見を得たものである。まず、中心体近傍に存在する $\phi 80\sim100\text{nm}$ の電子密な構造物として形態学的に記載されていた centriolar satellites を構成する蛋白 (PCM-1) を初めて同定した。次に、生細胞内において、centriolar satellites が微小管依存性に輸送され中心体近傍に局在する事を示し、さらに *Xenopus* 卵抽出液を用いた *in vitro* 再構成系において、centriolar satellites が微小管依存性モーター蛋白により輸送され、中心体近傍に集積する新規非膜系オルガネラである事を示した。また、纖毛上皮において、纖毛形成に伴う基底小体（中心子）複製時に出現すると記載されていた fibrous granules に PCM-1 蛋白が局在する事を示し、fibrous granules と centriolar satellites が同一のオルガネラであり、共に中心子複製に関与している可能性を示唆した。以上より、本研究は博士の学位授与に値すると考えられる。