OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	TULP3 is required for localization of membrane-associated proteins ARL13B and INPP5E to primary cilia
Author(s)	韓, 薩日娜
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72633
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　韓薩日娜　）	
論文題名	TULP3 is required for localization of membrane-associated proteins ARL13Band INPP5E to primary cilia （TULP3は膜結合タンパク質ARL13BおよびINPP5Eの一次繊毛局在に必要である）

論文内容の要旨

肥満、網膜変性、認知機能障害などの症状を共通して呈する繊毛病は一次繊毛を介したシグナル伝達の異常で惹起される。

脊椎動物細胞において、一次繊毛は、繊毛膜に局在するタンパク質を介してシグナルを伝達するバイオセンサーとして機能する。繊毛膜タンパク質には膜貫通タンパク質および膜結合タンバク質が含まれる。Tubbyファミリーの一つであるTubby-like protein 3（TULP3）は、繊毛内輸送複合体A（IFT-A）と結合し、膜貫通タンパク質の繊毛局在に関与することが示されているが、膜結合タンパク質の繊毛局在へのTULP3の寄与は未だ不明である。本研究では、TULP3が膜結合タンパク質の繊毛局在に必要であるか否かを解明するために、TULP3をノックアウト（KO）したhTERT RPE-1（RPE1）細胞を作製し、解析した。免疫蛍光染色により、TULP3-KO細胞株において、一次繊毛の形成率の低下および長さの短縮を認めるとともに、膜結合タンパク質ADP-ribosylation factor-like 13B（ARL13B）およびInositol polyphosphate-5-phosphatase E（INPP5E）の繊毛局在の欠失を認めた。TULP3-KO細胞株における一次繊毛の低形成とARL13B、INPP5Eの局在異常は、外因性のTULP3の導入により回復した。一方で、IFT-Aと結合できない変異型TULP3の導入によっては、ARL13B、INPP5Eの局在異常は回復されなかった。また、TubbyファミリーのTUBはRPE1細胞では内因性には発現しないが、TULP3-KO細胞株へのTUBの導入により、ARL13B、INPP5Eの局在異常が回復した。これは、TULP3とTUBの機能的な冗長性を示唆する知見である。

本研究で得られた結果から、TULP3が一次繊毛の形成に関与すること、およびTULP3がIFT-Aとの結合により膜結合タンパク質の一次繊毛局在に寄与することが示された。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　　名　（　　韓　薩日娜　　）		
論文審査担当者	（職）	氏　　名
	主査　　教授	松　崎　秀　夫
	副査　　教授	堀　　修
	副査　　教授	清　水　栄　司

論文審査の結果の要旨

知的障害、自閉スペクトラム症（ASD）などの神経発達症についての分子基盤を明らかにすることは、同症の診断・治療・支援を行う上で重要である。このような中、一次繊毛の異常によるとされる疾患　繊毛病は、知的障害、ASD等を合併することが報告されているが、その分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。一次繊毛とは、細胞体から突出した微小管が細胞膜に包まれた一本だけ独立したすべての細胞が持つ細胞小器官である。繊毛膜には膜を貫通するTransmembrane proteinと膜と結合するMembrane-associated proteinが局在し、それらのタンパク質によるシグナル伝達機能が生体の発達や恒常性維持に関与するとされる。一方、最近、ASD家系で見つかった繊毛関連遺伝子の変異によって、繊毛膜タンパク質の局在異常が起こり、繊毛のシグナル伝達機能が阻害されることが報告された。一次繊毛の微小管に沿ったタンパク質輸送系Intraflagellar transport（以下IFT）が繊毛形成や繊毛局在に必要であるといわれているが、繊毛膜タンパク質の繊毛局在機構は未だ不明な点が多い。そこで、申請者は、IFTを構成する複合体IFT-AおよびPhosphatidylinositol 4,5-bisphosphate（以下 PIP_2）ドメインを持つ、繊毛関連タンパク質Tubby-like protein 3 (TULP3) に着目し、TULP3はこれまでTransmembrane proteinの繊毛局在に関与すると報告があるが、Membrane-associated proteins の繊毛局在に関与するかどうか不明であったため、本論文で次の研究を行った。

まず、ゲノム編集技術CRISPR/Cas9を用いて異なるターゲットによる2種類のTULP3ノックアウト（以下 KO）RPE1細胞株を樹立し、この細胞を用いて、一次繊毛の形成、繊毛局在タンパク質、特にMembrane-associated proteinであるADP-ribosylation factor-like 13B （以下ARL13B）および、Inositol polyphosphate- 5-phosphatase E（以下 INPP5E）の局在について、それぞれの特異的抗体並びに、繊毛マーカーであるアセチル化チューブリン、脱チロシン化チューブリン抗体を用いた免疫蛍光染色法で繊毛の形成と局在を観察した。その結果、コントロール細胞と比べTULP3-KO細胞の繊毛形成率が低下し、繊毛の長さが短縮すること、TULP3-KO細胞でMembrane-associated proteins、ARL13BとINPP5Eの繊毛への局在が欠失することが明らかとなった。さらに、TULP3KO細胞に外因性のTULP3を導入し、KOによって変化した上記ARL13BとINPP5Eの局在が元に戻るか否かの回復実験を行ったところ、TULP3KO細胞に野生型のTULP3を導入すると繊毛形成率と長さが回復し、ARL13BとINPP5Eの繊毛局在も回復することが判明した。また、TULP3の機能をさらに調べるため、IFT-Aドメインを欠く変異体、PIP2ドメインを欠く変異体、及び両ドメインを欠く変異体それぞれの変異型TULP3を回復実験に用いたところ、PIP_2ドメインを欠く変異型TULP3はARL13BとINPP5Eの繊毛局在を回復させたが、IFT-Aドメインを欠く変異型TULP3はその繊毛局在が回復しなかった。

以上のことから、本論文では①TULP3が繊毛の形成や長さを制御すること、②TULP3とIFT-Aの結合がMembrane-associated proteins であるARL13BとINPP5Eの繊毛局在にとって重要であることを明らかにした。以上の成果は繊毛膜タンパク質の形成、局在メカニズムを明らかにし、繊毛タンパク質の繊毛局在異常の病態への関与について、新たな知見を与えるものであり、当研究科の学位授与に値するものと判断した。