

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03447

研究課題名（和文）繊毛タンパクによる転写制御機構の証明

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of transcription by ciliary proteins.

研究代表者

水津 太（Suizu, Futoshi）

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：90431379

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：Inversinは、転写活性中心の一つである核内Cajal body様構造体へ集積し、特定の転写制御活性をもつことから、繊毛タンパクInversinが新規転写制御因子として機能していることが強く示唆された。また、単細胞繊毛虫Colpoda cucullusのシスト形成誘導時に急激な繊毛構成タンパクbeta-tubulinの断片化と発現変化が生じ、体内に取り込まれることが明らかになった。繊毛タンパクの動態変化から、繊毛タンパクの局在・構造・機能変化や再吸収によってシスト形成（細胞構造の再編成）へ向けたアミノ酸や核酸等の再利用を行い、低温、低pH、UV耐性の性質を獲得重要であると推測される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞性一次繊毛は、外界の環境変化を素早く感知し生物反応するための重要な細胞器官である。そのため様々な増殖因子受容体やイオンチャネルなどの重要なタンパク複合体が繊毛特異的に蓄積され、繊毛は細胞内へのシグナル伝達のハブとして機能する。本研究の目的である繊毛タンパクが転写因子として直接機能することを明らかにすることで、細胞の迅速な生物反応と恒常性、増殖、分化制御における繊毛の生物機能の分子メカニズムを解明出来ると考える。本研究成果により、一次繊毛機能の破綻が惹起する繊毛病やがんなどの疾患新規診断・治療法開発へつながら、基礎生物学から臨床研究への波及効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Inversin accumulates in a Cajal body-like structure in the nucleus, which is one of the centers of transcriptional activity, and has a specific transcriptional regulatory activity. This strongly suggests that the ciliary protein Inversin functions as a novel transcriptional regulator. In addition, it was clarified that during the induction of cyst formation in the unicellular ciliate Colpoda cucullus, rapid fragmentation and expression change of the ciliate constituent protein beta-tubulin occurred and it was taken up into the body. From the dynamic changes of ciliary proteins, it is considered that the localization, structure, and functional changes of ciliary proteins and reabsorption lead to the reuse of amino acids and nucleic acids for cyst formation. In addition, it is presumed that changes in the transcriptional control function of ciliary proteins are important because they acquire the properties of low temperature, low pH, and UV resistance with the rapid change to cysts.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次繊毛 転写 シスト 細胞極性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一次繊毛 (primary cilia; non-motile cilia) は、細胞膜と9+0の微小管細胞骨格から成る一本の毛様体で、現在では哺乳類のほとんど全ての細胞に存在することが知られている (図1c、および図2参照)。9+2の骨格から成る運動性繊毛 (motile cilia) と違い、一次繊毛は、これまで機能を持たない単なる遺残物として見なされてきた。近年、この一次繊毛が多様な機能を持ち、一次繊毛の欠失や機能異常により嚢胞性腎疾患をはじめ網膜萎縮、肝線維症、多指症、肥満、中枢神経系異常や骨格形成異常などの遺伝性疾患 (繊毛病; ciliopathy) が引き起こされることが分かってきた。

繊毛病のうち最も多い症例として、多発性嚢胞腎 (図1) が挙げられその特徴は、尿細管上皮細胞の平面内細胞極性 (planar cell polarity, PCP) が破綻しており、細胞分裂方向 (軸) が異常になる。分裂軸異常により、おおよそ尿の流れと垂直方向に分裂が進行し (図1c、d参照)、尿細管が拡張し嚢胞を形成する (図1d-h参照)。その結果、正常な尿の流れが阻害され、重篤な腎不全をもたらす (図1f-h参照)。PCP破綻の原因として、尿細管細胞表面に存在する一次繊毛 (図1c参照) の構造的・機能的異常が指摘されているが、未だその分子メカニズムについては不明である。

セリンスレオニンキナーゼ Akt (Protein Kinase Bの別称) は、細胞死 (アポトーシス) や細胞生存制御において、要となる細胞内シグナル伝達因子である。Aktは細胞外成長因子などの刺激を受けPI3K (Phosphoinositide 3 kinase) によって活性化される。このPI3K-Aktシグナル伝達系は細胞死と増殖の制御、細胞周期、タンパク合成、糖代謝、血管新生などの多岐にわたる細胞反応制御に重要な役割を果たす細胞内シグナル伝達系である。近年、Aktの細胞運動や細胞極性調節因子としての機能が注目され始めているが、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。(Menager C. et al., *J Neurochem*, 2004, Yoshimura et al., *Cell*, 2005, Higuchi et al., *Nat. Cell Biol.*2008)

2. 研究の目的

筆者らは最近、Yeast Two Hybridシステムを用いた包括的なスクリーニング法により、Akt特異的に結合する繊毛タンパク Inversin を同定した。イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来 (MDCK) 細胞を用いた解析では、Aktによる Inversin のリン酸化が、正確な細胞分裂軸の傾きと細胞配向を伴った尿細管三次元構築に必須であることが明らかとなった。(図4参照) Inversin 遺伝子 (*NPHP2*) の変異は常染色体劣性 (潜性) 遺伝であり、形質が表れにくい。古くから *NPHP2* 欠失マウスの解析では、繊毛病 (嚢胞腎や内蔵逆位など) の原因遺伝子とし

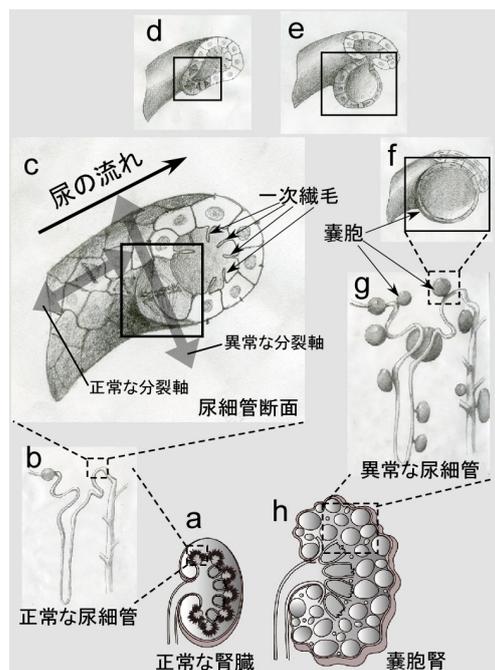


図1. 繊毛病の一例、多発性嚢胞腎発生過程の模式図。PCP破綻による尿細管細胞の分裂軸異常(c)、嚢胞形成により(d-h)、尿の流れが阻害され(f)、重篤な腎不全(g、h)へと発展する。

て認知されてはいたが、その疾患分子メカニズムは明らかになっていなかった。本研究の基盤研究では、Akt-Inversin リン酸化シグナル伝達が、*NPHP2* が関わる疾患の重要な分子制御機構である事実を解明した^{1,2}。

これまでの解析から、

- 1) ヒト Inversin の Akt リン酸化サイトはアミノ酸配列 Thr-Ser-Thr (864-866) であることが分かった (図 3)。またそのリン酸化サイトアミノ酸配列はヒトやチンパンジーを始めとする霊長類、およびウシやイヌなどの進化上比較的霊長類との分岐が新しい種属には保存されているが、マウスやカエル、ゼブラフィッシュなどの動物群には欠如していることが明らかとなった。Inversin-Akt リン酸化部位は、マウスには保存されておらず、Inversin の細胞内局在や Wnt シグナル阻害活性に関しては全く影響が無かった。したがって、Akt による Inversin リン酸化の機能的な保存性は無いと考えられる。
- 2) Inversin は、基本転写因子 TFIID と結合する ICP4 に高い相同性領域をもつことから、Inversin が新規転写制御因子として機能している可能性が示唆される。(図 4)

本研究では、研究期間内に繊毛タンパクによる PCP 制御に加え、転写調節因子としての生物機能開発に向けた解析を行う、Inversin のリン酸化修飾による生物機能制御メカニズムをモデル動物を用いて明らかにしたい。

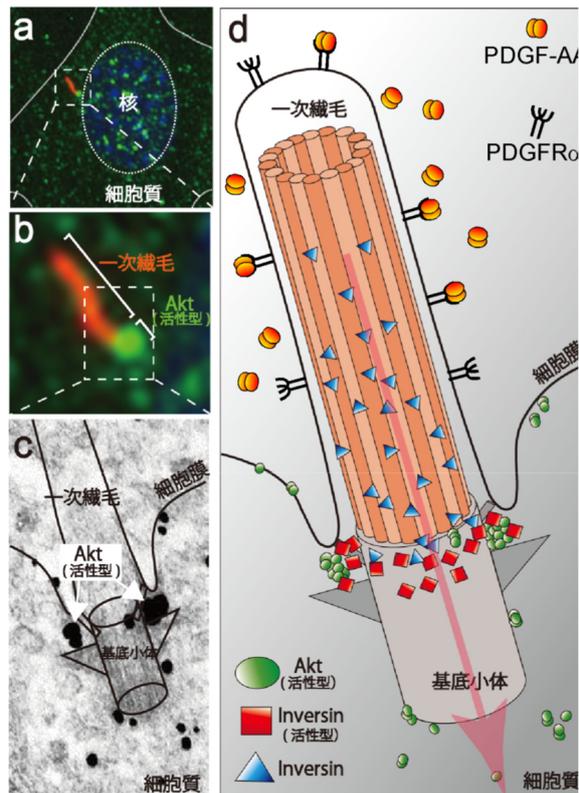


図 2

- (a および b) NIH3T3 細胞に存在する一次繊毛。間接免疫蛍光抗体法により活性化 Akt が一次繊毛の基部に局在することがわかる。
- (c) 透過型電子顕微鏡を用いた高解像観察から活性化 Akt (黒く見える金コロイド粒子) は基底小体から一次繊毛への移行帯 (transition zone) に多く存在する。
- (d) 一次繊毛における Akt と Inversin の相互作用のモデル図。PDGF-AA 刺激下で Inversin が Akt によってリン酸化され、そのリン酸化シグナル伝達は、一次繊毛の形態形成、および細胞極性、細胞分裂軸決定に重要な役割を果す。

	Aktリン酸化サイト	
ヒト	849	STEELRSGARRLETSTLSED 870
チンパンジー	753	STEELRSGARRLETSTLSKD 774
ウシ	848	STEVLRS GVRKLGTSARSED 871
イヌ	848	NTEVLRS GVRKSGTSTLSED 871
マウス	846	STEASRSGCKQ-----LYED 868
ツメガエル	821	SEKEFSSTGIQG-----RVD 847
ゼブラフィッシュ	815	REKDKRS--RTEGDKQTVRE 832

図 3. 各動物種の Inversin アミノ酸配列の multiple alignment

3. 研究の方法

1) 核内繊毛タンパクの網羅的解析：

単細胞繊毛虫 *Colpoda cucullus* のもつ運動性繊毛は、遊泳運動の動力原として機能するだけでなく、環境センサーとして機能し、環境変化に対して素早い生物反応を示す。(図 5a) *Colpoda* は、栄養飢餓を感知し、約 1 日という短時間にシスト (耐久細胞) へと変態する。(図 5b)

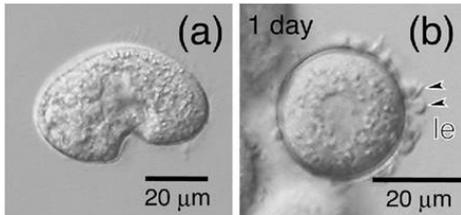


図 5.

- (a) 全身無数の運動繊毛をもつ繊毛虫 *Colpoda cucullus*
- (b) 栄養枯渇 (飢餓) を繊毛で感知し、シスト (耐久細胞) へと変態する。(FEMS Microbiol Lett 2016)

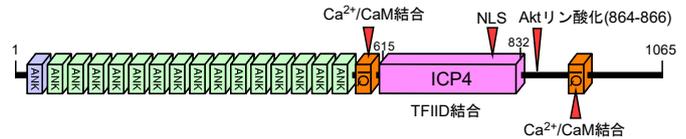


図 4. Inversin タンパクの模式図。Inversin には、Ankyrin リピード領域、Ca²⁺/CaM 結合領域 (IQ)、転写因子 TFIIID 結合性の ICP4 相同性領域、核移行シグナル領域 (NLS)、そして Akt リン酸化領域がある。(Yasuhiko et al. Dev Growth Differ 2001; EMBO J 2016)

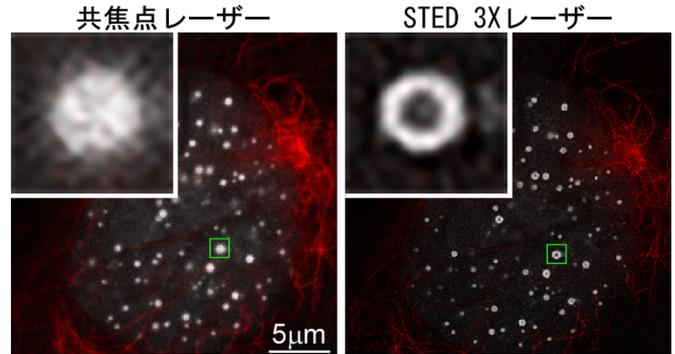


図 6. 繊毛タンパク Inversin が転写活性中心の一つ核内 Cajar body 様構造体 (ドーナツ型) に局在する。

本項計画

では、シスト変態過程において、速やかに核移行し、転写制御因子として機能する核内繊毛タンパクの網羅的解析を行う。

2) 核内繊毛タンパクの機能解析：

腎尿細管上皮由来細胞はマトリゲル上で培養すると、きれいな一層の三次元管腔 (尿細管様) 構造を作る。細胞極性異常 (分裂軸異常) で、かつ細胞増殖が異常亢進した細胞では、変形した管腔構造を呈す^{1,2}。同定した核内繊毛タンパクの生物機能解析の為、人為的に核内で繊毛タンパク発現を誘導することにより腎尿細管上皮細胞の三次元管腔 (尿細管様) 構造変化を解析する。

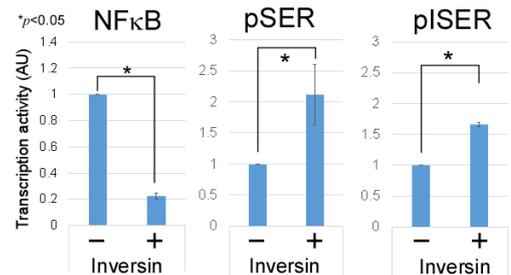


図 7. Inversin タンパクの核内発現によって転写活性が制御される。

研究成果

Inversin は、転写活性中心の一つである核内 Cajar body 様構造体へ集積し、特定の転写制御活性をもつことが明らかになった。(図 6、7) このことから、繊毛タンパク Inversin が新規転写制御因子として機能していることが強く示唆された。また、単細胞繊毛虫 *Colpoda cucullus* のシスト形成誘導時に急激な繊毛構成タンパク β-tubulin の断片化と発現変化が生じ、体内に取り込まれることが明らかになった。繊毛タンパクの動態変化から、繊毛タンパクの局在・構造・機能変化や再吸収によってシスト形成 (細胞構造の再編成) へ向けたアミノ酸や核酸等の再利用に繋がっていると考察される (図 8)。またシストへの急速な変化に伴い、低温、低 pH、UV 耐性の性質を獲得することから³⁻⁹、繊毛タンパクの転写制御機能変化が重要であると推測される。

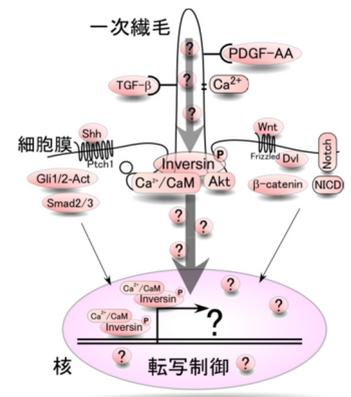


図 8. Inversin をはじめとした核内繊毛タンパク群による転写制御機構の仮説モデル

1. Suizu F., Hirata N., Kimura K., Edamura T., Tanaka T., Ishigaki S., Donia T., Noguchi H., Iwanaga T., & Noguchi M.*
Phosphorylation dependent Akt-Inversin interaction at basal body of primary cilia.
EMBO Journal 35(12):1346-1363. (2016)
2. Suizu F.*, Hirata N., Ishigaki S., Edamura T., Kimura K., Tanaka T. & Noguchi M.
Primary cilium-mediated crosstalk of signaling cascades in ciliogenesis: Implications for tumorigenesis and senescence.
Cell Communication Insights (Invited review) 8: 13-24. (2016)
3. Ohtsuka S., Okumura T., Tabuchi Y., Miyagawa T., Kanayama N., Magari M., Hatano N., Sakagami H., Suizu F., Ishikawa T., & Tokumitsu H.*
Conformation-Dependent Reversible Interaction of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase with an Inhibitor, TIM-063.
Biochemistry 61(7), 545-553 (2022).
4. Ohtsuka S., Ozeki Y., Fujiwara M., Miyagawa T., Kanayama N., Magari M., Hatano N., Suizu F., Ishikawa T., & Tokumitsu H.*
Development and characterization of novel molecular probes for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase, derived from STO-609.
Biochemistry 59(17) 1701-1710 (2020)
5. Matsuoka T.*, Sogame Y., Nakamura R., Hasegawa Y., Arikawa M., & Suizu F.* 共責任著者
Antifreeze water-rich dormant cysts of the terrestrial ciliate Colpoda cucullus Nag-1 at -65°C: possible involvement of ultra-antifreeze polysaccharides.
Acta Protozoologica 59: 141-147. (2020)
6. Sogame Y, Kojima K, Takeshita T, Kikuchi S, Shimada Y, Nakamura R, Arikawa M, Miyata S, Kinoshita E, Suizu F.*, & Matsuoka T.* 共責任著者
Analysis of Water-Soluble Proteins by Two-Dimensional Electrophoresis in the Encystment Process of Colpoda cucullus Nag-1 and Cytoskeletal Dynamics.
Acta Protozoologica 59: 107-120. (2020)
7. Yamane S., Watanabe M., Funadani R., Miyazaki R., Hasegawa Y., Arikawa M., Suizu F., Matsuoka K., & Matsuoka T.*
Tolerance of Colpoda cucullus Nag-1 Resting Cysts and Presumed Structure for Protection against UV Light.
Acta Protozoologica 59: 55-60. (2020)
8. Morishita M., Arikawa M., Suizu F.*, & Matsuoka T.* 共責任著者
Effects of Chlorophyllin on Encystment Suppression and Excystment Induction in Colpoda Cucullus NAG-1: An Implication of Chlorophyllin Receptor.
Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Science 22(4): 573-578. (2020)
9. Nakamura R., Sogame Y., Arikawa M., Suizu F.*, & Matsuoka T.* 共責任著者
Tolerance of Colpoda cucullus Nag-1 wet resting cysts to extreme pH (pH 1 and 13): Implications of less permeability of the cyst membrane to H⁺ and OH⁻.
The Journal of Protozoology Research 30. 38-46. (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamane S, Watanabe M, Funadani R, Miyazaki R, Hasegawa Y, Arikawa M, Suizu F, Matsuoka K, and Matsuoka T	4. 巻 59
2. 論文標題 Tolerance of Colpoda cucullus Nag-1 Resting Cysts and Presumed Structure for Protection against UV Light.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Protozoologica	6. 最初と最後の頁 55-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4467/16890027AP.20.004.12160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sogame Y, Kojima K, Takeshita T, Kikuchi S, Shimada Y, Nakamura R, Arikawa M, Miyata S, Kinoshita E, Suizu F, and Matsuoka T.	4. 巻 59
2. 論文標題 Analysis of Water-Soluble Proteins by Two-Dimensional 1 Electrophoresis in the Encystment Process of Colpoda cucullus Nag-1 and Cytoskeletal Dynamics.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Protozoologica	6. 最初と最後の頁 107-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4467/16890027AP.20.009.13264	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka T, Sogame Y, Nakamura R, Hasegawa Y, Arikawa M, and Suizu F.	4. 巻 59
2. 論文標題 Antifreeze water-rich dormant cysts of the terrestrial ciliate Colpoda cucullus Nag-1 at -65 : possible involvement of ultra-antifreeze polysaccharides.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Protozoologica	6. 最初と最後の頁 141-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4467/16890027AP.20.011.13266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohtsuka S, Ozeki Y, Fujiwara M, Miyagawa T, Kanayama N, Magari M, Hatano N, Suizu F, Ishikawa T, and Tokumitsu H.	4. 巻 59(17)
2. 論文標題 Development and Characterization of Novel Molecular Probes for Ca ²⁺ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase, Derived from ST0-609.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1701-1710
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.0c00149.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura R, Sogame Y, Arikawa M, Suizu F, and Matsuoka T.	4. 巻 30
2. 論文標題 Tolerance of Colpoda cucullus Nag-1 wet resting cysts to extreme pH (pH 1 and 13): Implications of less permeability of the cyst membrane to H+ and OH-.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Protozoology Research	6. 最初と最後の頁 38-46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24556/00004711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morishita M, Arikawa M, Suizu F, and Matsuoka T.	4. 巻 22(4)
2. 論文標題 Chlorophyllin on Encystment Suppression and Excystment Induction in Colpoda Cucullus NAG-1: An Implication of Chlorophyllin Receptor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Science	6. 最初と最後の頁 573-578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	徳光 浩 (Tokumitsu Hiroshi) (20237077)	岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・教授 (15301)	
研究分担者	平田 徳幸 (Hirata Noriyuki) (40595956)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教 (10101)	
研究分担者	松岡 達臣 (Matsuoka Tatsuomi) (90209510)	高知大学・教育研究部自然科学系理工学部門・教授 (16401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------