

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06636

研究課題名(和文) G蛋白質共役型受容体の繊毛局在を決定付けるメカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism that determines cilia localization of G protein-coupled receptors

研究代表者

三好 耕 (MIYOSHI, KO)

大阪大学・連合小児発達学研究所・助教

研究者番号：90362996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：特定のG蛋白質共役型受容体が1次繊毛に局在する機構を解明するために、セロトニン6型受容体の繊毛局在を促進する分子を探索した。酵母two-hybridスクリーニングにより、同受容体の繊毛局在にとって重要な第4細胞内ドメイン内の領域と結合する分子として -アダプチンを見出した。 -アダプチンのノックアウトhTERT-RPE1細胞での局在の解析によって、セロトニン6型受容体は、第4細胞内ドメインへの -アダプチンの作用により、1次繊毛への局在が促進されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

G蛋白質共役型受容体の繊毛への「搬入」や「搬出」に必要な蛋白質として、Tubby-like protein 3や繊毛病Bardet-Biedl症候群の原因遺伝子産物が報告されている。一方、本研究では、未だ不明な点が多い、特定のG蛋白質共役型受容体が1次繊毛に局在する機構に焦点を当てた。本研究で得られた成果は、小胞輸送において、積荷であるG蛋白質共役型受容体に対するアダプター蛋白質複合体の作用が、特定の受容体の1次繊毛への局在に関与する可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanism by which specific G protein-coupled receptors localize to primary cilia, molecules that upregulate ciliary localization of serotonin receptor type 6 (Htr6) were explored. Yeast two-hybrid screening identified -adaptn as an interacting molecule of a region in the fourth intracellular domain of Htr6 that is important for ciliary localization of Htr6. By analysis of localization in hTERT-RPE1 cells knocked-out for -adaptn, it was suggested that localization of Htr6 to primary cilia is upregulated through the action of -adaptn on the fourth intracellular domain of Htr6.

研究分野：細胞生物学

キーワード：G蛋白質共役型受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の殆どの体細胞は、細胞当たり1本の1次繊毛(primary cilium)と呼ばれる突起を持つ。細胞周囲の刺激を感知する1次繊毛の「細胞のアンテナ」としての機能は、発達や恒常性維持に寄与する。1次繊毛の機能異常は、脳の形成異常を伴うJoubert症候群、肥満・網膜変性等を呈するBardet-Biedl症候群等の「繊毛病」を惹起するが、その機序は不明である。

哺乳類脳の殆どのニューロンも数 μm 長の1次繊毛を1本持つ。ニューロンの1次繊毛には、セロトニン6型受容体やメラニン凝集ホルモン1型受容体等の特定のG蛋白質共役型受容体(GPCR)がAdenylyl Cyclase 3型と共に局在し(繊毛受容体;現在までに約30種類が同定されている)、非シナプス性の神経伝達を担う可能性が指摘されている(Guemez-Gamboa et al. Neuron 2014)。尚セロトニン6型受容体は、海馬等で高い発現を示し、統合失調症・アルツハイマー病の認知機能障害や樹状突起の伸展への関与が報告されている繊毛受容体である(Meffre et al. EMBO Mol Med 2012, Duhr et al. Nat Chem Biol 2014, Jacobshagen et al. Development 2014等)。

何故、特定のGPCRのみが繊毛に局在し得るのかは解明されていない。研究代表者は、小胞輸送により細胞表面に輸送されるGPCRのうち、繊毛受容体の細胞内ドメインに何らかの分子が結合、作用し、繊毛膜への輸送を促進するというモデルを考えた。研究代表者は、各繊毛受容体の第3細胞内ドメイン(i3)、第4細胞内ドメイン(i4)に、1回膜貫通蛋白質のhCD8 α とMycタグを融合させたもの(hCD8 α -i3-Myc、hCD8 α -i4-Myc)をhTERT-RPE1細胞内で発現させた。その結果、セロトニン6型受容体はhCD8 α -i4-Mycが高い選択性を伴い繊毛に局在した。更に、セロトニン6型受容体ではi4内の34アミノ酸残基からなる領域が、受容体の繊毛局在にとって重要なCilia Targeting Sequence (CTS)であると考えられた。

2. 研究の目的

特定のG蛋白質共役型受容体が1次繊毛に局在する機構を解明するという全体目標のなかで、本研究では、セロトニン6型受容体の繊毛局在にとって重要なCTSと結合する分子の探索により、受容体の繊毛局在を促進する分子を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスのセロトニン6型受容体の第4細胞内ドメイン内のCTSと結合する分子を探索するために、CTSを含む82アミノ酸残基をBaitとして、マウスcDNAライブラリーを対象として酵母two-hybridスクリーニングを行った。

(2) 酵母two-hybridスクリーニングにより得られた陽性候補クローンがコードする蛋白質とBaitあるいはCTSとの酵母内での結合の確認を行った。

(3) 酵母two-hybridスクリーニングにより得られた陽性クローンがコードする蛋白質について、哺乳類細胞におけるセロトニン6型受容体との結合を、免疫沈降法・ウェスタンブロッティング法により検証した。

(4) ヒト網膜色素上皮細胞由来の培養細胞であるhTERT-RPE1細胞に対して、ゲノム編集技術Crispr/Cas9を用いることにより、陽性クローンの遺伝子の機能が破壊されたノックアウト細胞株を作製した。

(5) ノックアウト細胞株およびコントロールhTERT-RPE1細胞に、セロトニン6型受容体および同受容体の第3、第4細胞内ドメインのhCD8 α 融合体を発現させ、それらの繊毛局在の様式を免疫蛍光染色により観察した。

4. 研究成果

(1) セロトニン6型受容体の第4細胞内ドメイン内のCTSを含む82アミノ酸残基をBaitとして酵母two-hybridスクリーニングを行った。Baitの配列をpGBKT7 vectorに挿入し、これをY2H Gold酵母に導入し、酵母内でGAL4 DNA結合ドメインとBaitとの融合蛋白質を発現させた。このY2H Gold酵母と、pGADT7-RecAB vectorに組み込まれたマウスcDNAライブラリーが導入されたY187酵母(GAL4活性化ドメインとライブラリー内の各クローンとの融合蛋白質を発現する)をmatingさせて、X-alpha-Gal(発色酵素基質)とAureobasidin A(抗真菌抗生物質)を含むDouble dropout選択培地に塗布し、出現したDiploidコロニーを更に選択度が高いX-alpha-GalとAureobasidin Aを含むQuadruple dropout選択培地に移植した(Diploid内で両融合蛋白質が結合すれば、GAL4のDNA結合ドメインと活性化ドメインが近接し、レポーター遺伝子の発現を誘導するため、選択培地で生育可能となる)。各陽性候補コロニーからpGADT7-

RecAB プラスミドを抽出し（酵母から一旦プラスミドを抽出し、大腸菌に導入し増殖させ再度抽出）、cDNA の塩基配列を解析し遺伝子を同定した。この結果、20 個の unique な陽性候補クローンが得られた。

(2) 膜蛋白質の小胞輸送において重要な役割を担っているアダプター蛋白質複合体には AP-1 ~AP-5 の 5 種類が属している。上記のスクリーニングの陽性候補クローンには、AP-1 を構成するサブユニットである γ 1 サブユニット (γ -アダプチン) をコードする cDNA が含まれていた。以下では、 γ -アダプチンを中心に解析を行った。GAL4 活性化ドメインと γ -アダプチンとの融合蛋白質を発現する pGADT7-RecAB プラスミド、および上記のスクリーニングで用いた Bait または CTS と GAL4 DNA 結合ドメインとの融合蛋白質を発現する pGBKT7-Bait または pGBKT7-CTS プラスミドを同時に Y2H Gold 酵母に導入し、X-alpha-Gal を含む Double dropout 培地 (DDO/X) および Xalpha-Gal と Aureobasidin A を含む Quadruple dropout 培地 (QDO/X/A) で生育させ、酵母内での γ -アダプチンと Bait、CTS との結合の確認を行った[表 1]。Dropout 培地でのコロニーの生育状況より、 γ -アダプチンは Bait および CTS と結合すること、 γ -アダプチンは偽陽性クローンではないことが示された。

	Bait		CTS		p53	
	DDO/X	Blue Colonies	DDO/X	Blue Colonies	DDO/X	White Colonies
γ -アダプチン	DDO/X	Blue Colonies	DDO/X	Blue Colonies	DDO/X	White Colonies
	QDO/X/A	Blue Colonies	QDO/X/A	Blue Colonies	QDO/X/A	No Colonies
large T-antigen	DDO/X	White Colonies	DDO/X	White Colonies	DDO/X	Blue Colonies
	QDO/X/A	No Colonies	QDO/X/A	No Colonies	QDO/X/A	Blue Colonies

表 1 酵母内での γ -アダプチンと Bait、CTS との結合の確認。DDO/X および QDO/X/A でのコロニーの生育状況を示す。マウス p53 と GAL4 DNA 結合ドメインとの融合蛋白質を発現する pGBKT7-53 および SV40 large T-antigen と GAL4 活性化ドメインとの融合蛋白質を発現する pGADT7-T をコントロールとして用いた (p53 と large T-antigen は酵母内で結合する)。

(3) Myc タグを付加した γ -アダプチン、FLAG タグを付加したセロトニン 6 型受容体 (Htr6) およびその変異体 (第 4 細胞内ドメイン (i4) 内の CTS 領域、Bait 領域を欠損する Htr6- Δ CTS、Htr6- Δ Bait) の cDNA を哺乳類細胞用発現プラスミドベクター (pcDNA3.1(+), pEF-BOS-EX) に挿入した [図 1]。これらを図内に示した組み合わせでヒト胎児腎細胞由来の培養細胞である HEK293T 細胞に導入し (mock として空のベクターを用いた)、ライセートに対して抗 FLAG タグ抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降産物を SDS-PAGE により分離し、抗 Myc タグ抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った [図 1]。 γ -アダプチン-Myc と FLAG-Htr6 を同時に導入した免疫沈降産物でのみ γ -アダプチン-Myc のバンドが検出され、FLAG-Htr6- Δ CTS や FLAG-Htr6- Δ Bait の導入ではバンドが検出されなかったことから、HEK293T 細胞内で γ -アダプチンとセロトニン 6 型受容体は結合すること、セロトニン 6 型受容体内の CTS 領域が γ -アダプチンとの結合に必要なことが示された。

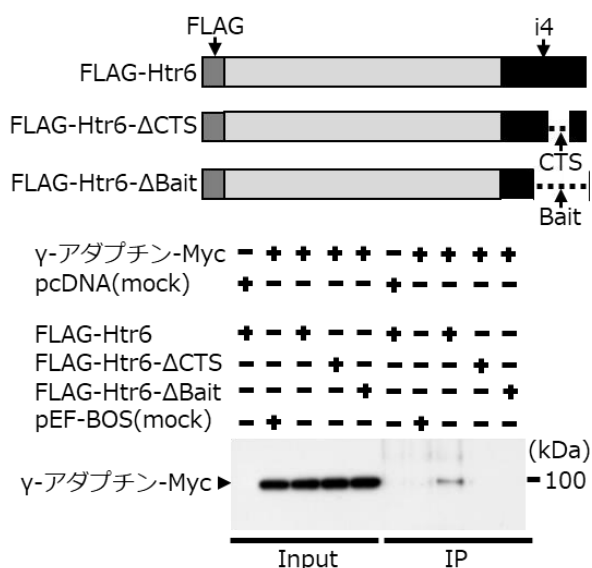


図 1 免疫沈降 (IP)、ウェスタンブロッティング (WB) による HEK293T 細胞内での γ -アダプチンとセロトニン 6 型受容体との結合の確認。IP: 抗 FLAG タグ抗体
WB: 抗 Myc タグ抗体

(4) hTERT-RPE1 細胞に、 γ -アダプチン遺伝子のゲノム DNA 内標的領域に対応する guide RNA 配列や Cas9 蛋白質などをコードする all-in-one 型のプラスミドベクターを導入し、クローン化された各細胞集団のゲノム DNA 内標的領域の塩基配列を解析し、非同相末端結合により生じる挿入欠失変異を両アレルに持つクローンを γ -アダプチンのノックアウト細胞株として選抜した。

(5) セロトニン 6 型受容体 (Htr6) およびアミノ末端側に 1 回膜貫通蛋白質の hCD8 α を融合させた同受容体の第 3 細胞内ドメイン (hCD8 α -Htr6-i3)、第 4 細胞内ドメイン (hCD8 α -Htr6-i4 (CTS 領域・Bait 領域を含む)) の各々に Myc タグ付加したものを [図 2] を、コントロール hTERT-RPE1 細胞および γ -アダプチンのノックアウト (KO) 細胞に発現させ、これらの局在の様式を抗

Myc タグ抗体、抗アセチル化チューブリン抗体（1次繊毛のマーカー）を用いた免疫蛍光染色により観察し、コントロール細胞・ γ -アダプチン KO 細胞間で比較した[図3]。得られた染色像から、繊毛に局在する場合（cilium）、繊毛外の細胞膜と繊毛の両方に局在する場合（plasma membrane + cilium）、繊毛外の細胞膜に局在する場合（plasma membrane）に分類し、各々の比率を解析した[図4]。Htr6-Myc が繊毛に局在する比率は、 γ -アダプチン KO 細胞においてはコントロール細胞よりも低かった。hCD8 α -Htr6-i3-Myc は、コントロール細胞と KO 細胞において同様の局在が見られた。hCD8 α -Htr6-i4-Myc は、コントロール細胞では繊毛に局在する比率が高かったのに対し、KO 細胞では繊毛外の細胞膜と繊毛の両方に局在する比率が高かった。以上より、セロトニン6型受容体は、第4細胞内ドメインへの γ -アダプチンの作用により、1次繊毛への局在が促進されることが示唆された。

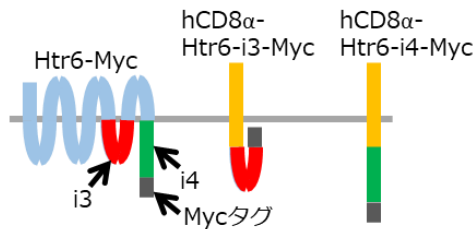


図2 セロトニン6型受容体（Htr6）、hCD8 α を融合させた同受容体の第3細胞内ドメイン（hCD8 α -Htr6-i3）、第4細胞内ドメイン（hCD8 α -Htr6-i4）の各々にMycタグ付加した。

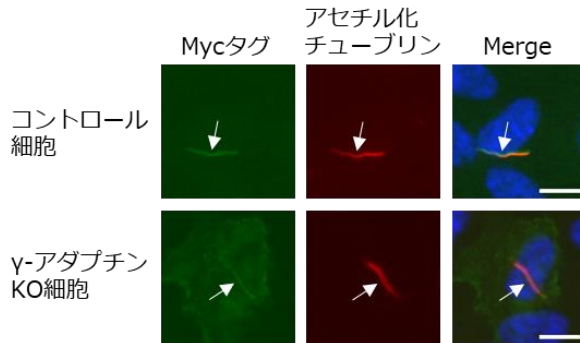


図3 Htr6-Mycをコントロール細胞および γ -アダプチン KO細胞に発現させ、局在を抗Mycタグ抗体、抗アセチル化チューブリン抗体（1次繊毛のマーカー）を用いた免疫蛍光染色により観察した。核をDAPIで染色した。矢印は1次繊毛を示す。スケールバー：10 μ m

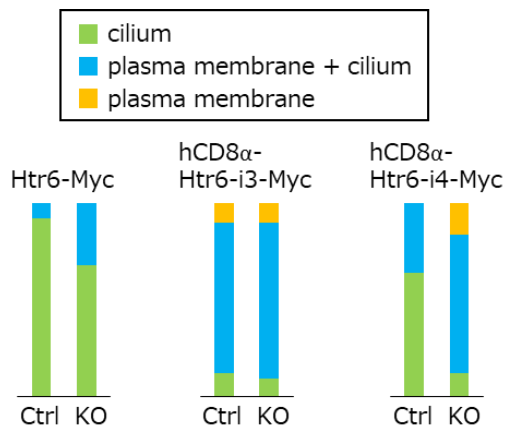


図4 コントロール細胞（Ctrl）および γ -アダプチン KO細胞に発現させたHtr6-Myc、hCD8 α -Htr6-i3-Myc、hCD8 α -Htr6-i4-Mycの局在様式の解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sho Shikada, Ko Miyoshi, Sarina Han, Zhuoma Yinsheng, Yuanyuan Qin, Yuuki Fujiwara, Takeshi Yoshimura, Taiichi Katayama	4. 巻 in press
2. 論文標題 Elongation of primary cilia by expression of serotonin receptor type 6 is mediated by cyclin-dependent kinase 5	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Brain Science	6. 最初と最後の頁 -
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 吉村 武、三好 耕、天野元揮、片山泰一	4. 巻 12
2. 論文標題 神経細胞の発達や機能に関わる分子メカニズム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 子どものこころと脳の発達	6. 最初と最後の頁 10-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34572/jcbd.12.1_10	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 三好 耕	4. 巻 87(5)
2. 論文標題 ニューロンの繊毛と受容体	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 717-722
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 無
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13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三好 耕、韓薩日娜、銀生卓瑪、秦 圓圓、天野元揮、吉村 武、片山泰一
2. 発表標題 G蛋白質共役型受容体の繊毛局在機構の解析
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会・第51回日本神経精神薬理学会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三好 耕、韓薩日娜、銀生卓瑪、秦 圓圓、天野元揮、吉村 武、片山泰一
2. 発表標題 G蛋白質共役型受容体の繊毛への局在を制御するメカニズム
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会・第1回CJK国際会議（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 銀生卓瑪、三好 耕、韓薩日娜、秦 圓圓、天野元揮、吉村 武、片山泰一
2. 発表標題 Functional analysis of the ciliopathy-associated proteins in hTERT-RPE1 cells
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秦 圓圓、三好 耕、銀生卓瑪、吉村 武、片山泰一
2. 発表標題 The molecular mechanism by which GPCRs localize to the primary cilia-Implications for ciliopathies with intellectual disability and autism-
3. 学会等名 第48回日本脳科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 銀生卓瑪、三好 耕、秦 圓圓、吉村 武、片山泰一
2. 発表標題 Analysis of the relationship among ciliopathy-associated proteins in hTERT-RPE1 cells
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三好 耕、銀生卓瑪、秦 圓圓、吉村 武、片山泰一
2. 発表標題 G蛋白質共役型受容体の1次繊毛への局在を制御する機構の解析
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会・第65回日本神経化学会大会・第32回日本神経回路学会大会 合同年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三好 耕、韓薩日娜、鹿田 星、銀生卓瑪、秦圓圓、天野元揮、吉村 武、片山泰一
2. 発表標題 繊毛病関連遺伝子を破壊する変異を持つhTERT-RPE1細胞におけるGタンパク共役型受容体の繊毛局在
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三好 耕、韓薩日娜、鹿田 星、銀生卓瑪、秦圓圓、天野元揮、吉村 武、片山泰一
2. 発表標題 hTERT-RPE1細胞におけるG蛋白質共役型受容体の繊毛局在
3. 学会等名 第50回日本神経精神薬理学会年会・第42回日本生物学的精神医学会年会・第4回日本精神薬学会総会 合同年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 銀生卓瑪、三好 耕、韓薩日娜、秦圓圓、天野元揮、吉村 武、片山泰一
2. 発表標題 知的障害を呈する繊毛病の原因遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第47回日本脳科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 銀生卓瑪、三好 耕、韓薩日娜、秦圓圓、天野元揮、吉村 武、片山泰一
2. 発表標題 纖毛病関連遺伝子にコードされる纖毛蛋白質のhTERT-RPE1細胞における機能解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会全国学術集会・第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鹿田 星、三好 耕、早田敦子、吉村 武、韓薩日娜、天野元揮、高村明孝、片山泰一
2. 発表標題 Gタンパク質共役型受容体とベータアレクチンの相互作用が1次纖毛局在に与える影響
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学学会大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 韓薩日娜、三好 耕、鹿田 星、天野元揮、王銀生卓瑪、吉村 武、尾内康臣、片山泰一
2. 発表標題 hTERT RPE-1細胞においてTULP3は纖毛膜タンパクの局在に必要である
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学学会大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sarina Han, Ko Miyoshi, Sho Shikada, Genki Amano, Yinshengzhuoma Wang, Takeshi Yoshimura, Yasuomi Ouchi, Taiichi Katayama
2. 発表標題 TULP3 is required for localization of ciliary membrane proteins
3. 学会等名 光科学技術研究振興財団 第18回 光科学技術で拓く脳・精神科学平和探求研究会
4. 発表年 2020年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------