

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07326

研究課題名（和文）繊毛内における蛋白質の輸送を制御する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanisms that regulate protein transport in cilia.

研究代表者

茶屋 太郎（Chaya, Taro）

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：50747087

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）：繊毛病の病態メカニズムを明らかにするために、繊毛病原因キナーゼIck、Makと相互作用する分子のスクリーニングを行い、繊毛病原因遺伝子として知られるSdccag8を候補因子として同定した。免疫沈降法によって、IckとMakはSdccag8のC末端領域（Sdccag8-C）と相互作用した。また、Sdccag8-CはSdccag8の基底小体への局在と繊毛形成に必要であることが明らかとなり、Sdccag8はIck、Makと機能的に相互作用してい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

ヒトのSDCCAG8遺伝子において、SDCCAG8のC末端領域（Sdccag8-C）を欠失すると予想される変異が網膜変性をはじめとした多様な臓器の障害と関連することが報告されている。私たちの結果より、Sdccag8-CはSdccag8の中心体や基底小体への局在に必要なIckやMakとの結合モジュールを構成し、繊毛形成とそれに関連した臓器の発生や恒常性維持に必須であることが示唆された。本研究により、SDCCAG8遺伝子の変異と関連した繊毛病の病態メカニズムに対する知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the pathophysiological mechanism of ciliopathy, we screened for molecules that interact with ciliopathy-causing kinases Ick and Mak, and identified Sdccag8, a known ciliopathy gene, as a candidate factor. Immunoprecipitation revealed that Ick and Mak interact with the C-terminal region of Sdccag8 (Sdccag8-C). In addition, we found that Sdccag8-C is required for the localization of Sdccag8 to the basal body and for cilia formation. Our results suggest that Sdccag8 functionally interacts with Ick and Mak.

研究分野：細胞生物学

キーワード：繊毛 リン酸化 タンパク質輸送 キナーゼ 繊毛病 網膜 ゲノム編集 マウス

1. 研究開始当初の背景

繊毛は細胞の表面に形成される微小管を軸系とした突起状の細胞小器官であり、進化的に幅広い生物種にわたってその構造が保存されている。繊毛は大きく“動く繊毛”と“動かない繊毛”に分類することができる。“動く繊毛”としては、運動能を有する精子の鞭毛や細菌やウイルス等の異物の排出に関与する気道上皮の繊毛などが有名である。

一方で、“動かない繊毛”(一次繊毛)は様々な種類の細胞に存在している。一次繊毛には受容体が局在しており、細胞外からのシグナルを受け取る役割を持っている。例えば、発生期の様々な種類の前駆細胞の繊毛はヘッジホッグシグナルの受容に関与しており、骨格系や神経系をはじめとした個体の発生に不可欠の役割を担う。繊毛は生物の発生過程や恒常性の維持に重要な役割を果たしており、ヒトにおいて繊毛の機能異常は、網膜色素変性症、難聴、無嗅覚症、嚢胞腎、肥満・糖尿病、不妊、多指症、精神・神経疾患、水頭症などの「繊毛病」(Ciliopathy)と呼ばれる一群の疾患を引き起こすことが知られているが、その発症メカニズムは不明な点が多く、根本的な治療法は確立されていない。このような背景から、繊毛がどのように形成され機能するのかを理解することは、繊毛病の治療法開発の基盤を構築する上で重要な課題である。

2. 研究の目的

脊椎動物の網膜は眼球の後方に位置する薄いシート状の中樞神経系の組織であり、主に5種類の神経細胞から構成される。その中で網膜視細胞は外界からの光を受容し電気信号へと変換する細胞として機能している。視細胞の繊毛は外節と結合繊毛から構成され、オプシンといった光受容体タンパク質を外節に局在させることによって光を受け取っている。視細胞の繊毛の形成や機能不全は、網膜色素変性症や錐体ジストロフィー、レーバー先天黒内障といった視細胞の脱落や細胞死が観察され、最終的に失明へと至る疾患を引き起こすことが知られている。これらの疾患の中でも、網膜色素変性症は比較的患者数の多い疾患であり、日本人における視覚障害の原因として緑内障に次ぐ第2位となっている。網膜色素変性症は基本的に遺伝性の疾患として知られており、日本人における網膜色素変性症の原因遺伝子のうち、繊毛関連遺伝子が約80%を占める。また世界的に見ても、網膜色素変性症の原因として繊毛関連遺伝子の変異が多いことが報告されている。このように繊毛に関連する遺伝子の変異が網膜色素変性症に大きく寄与することは明らかとなってきたが、発症や病態の分子メカニズムは不明な点が多い。また、網膜色素変性症は指定難病として定められており、有効な治療法は未だ確立されていない。本研究では、私たちがこれまで研究対象としてきた繊毛内におけるタンパク質輸送の制御の観点から、網膜色素変性症の分子病態機構を解明し、治療法確立のための基盤構築を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

網膜色素変性症をはじめとした繊毛病の分子病態メカニズムを明らかにするため、繊毛内タンパク質輸送制御因子 Ick と相互作用する分子を酵母ツーハイブリッド法により探索し候補因子を得て、免疫沈降法によって Ick や、Ick とアミノ酸の相同性が高い Mak との結合部位を同定した。結合部位を欠損するマウスを CRISPR/Cas9 法を用いたノックインにより作製し、網膜における組織学的解析を行った。

4. 研究成果

網膜色素変性症などの繊毛病の分子メカニズムを調べるために、酵母ツーハイブリッド法により Ick と結合するタンパク質をスクリーニングし Sdccag8 を同定した。まず、私たちは HEK293T 細胞を用いた免疫沈降により、Ick と Mak が全長の Sdccag8 (Sdccag8-FL) と相互作用することを確認した(図1)。ヒト SDCCAG8 は8つの coiled-coil モチーフから構成されると予想されており、これに基づいて N 末端領域、真ん中の領域、C 末端領域の3つの領域に分割することができる。Sdccag8 のどの領域が Ick や Mak と相互作用するか調べるために、私たちはマウス Sdccag8 を N 末端領域 (Sdccag8-N)、真ん中の領域 (Sdccag8-M)、C 末端領域 (Sdccag8-C) の3領域に分割し、それらと Ick あるいは Mak との相互作用を免疫沈降法により調べた。その結果、Ick と Mak は Sdccag8-C とは相互作用したが、Sdccag8-N や Sdccag8-M とは相互作用しなかった(図1)。これらの結果から、Ick と Mak は Sdccag8-C と相互作用することが示唆された。

Sdccag8-C の生体における役割を調べるために、私たちは CRISPR/Cas9 システムを用いて Sdccag8^{C/C} マウスを作製した。Sdccag8^{C/C} マウスにおいては、Sdccag8-C をコードする DNA 配列の前に終止コドンと制限酵素 EcoRI の認識配列をノックインした(図2a)。EcoRI 認識配列は終止コドンの検出を促進するために挿入した(図2b)。

網膜における Sdccag8-C の役割を調べるために、私たちは野生型と Sdccag8^{C/C} マウスの網膜切片を用いた組織学的解析を行った。トルイジンブルー染色を行ったところ、生後14日目の野生型と Sdccag8^{C/C} マウス網膜では有意な差は認められなかったが、生後6週以降において Sdccag8^{C/C} マウス網膜の視細胞層の厚みが進行性に薄くなっていった(図3a, b)。一方、野生型と Sdccag8^{C/C} マウス網膜の他の層の厚みには有意な差は見られなかった(図3a, c)。これら

の結果から、*Sdccag8*^{+/C} マウスは進行性の網膜視細胞変性を示すことが明らかとなった。*Sdccag8*^{+/C} マウス網膜の外節を観察するために、私たちはロドプシン（桿体視細胞の外節のマーカー）、青色オプシン（青色錐体視細胞の外節のマーカー）、緑色オプシン（緑色錐体視細胞の外節のマーカー）に対する抗体を用いて網膜切片の免疫組織化学染色を行った。生後 14 日目の *Sdccag8*^{+/C} マウス網膜において外節の乱れと、ロドプシン、青色、緑色オプシンの視細胞の細胞体への異所性の局在が観察された（図 3d）。*Sdccag8* の視細胞における局在を調べるために、私たちは *Sdccag8*^{+/C} マウス網膜の視細胞において *Sdccag8* とアセチル化 チューブリンを免疫染色し、野生型マウス網膜の視細胞と比較して *Sdccag8*^{+/C} マウス網膜の視細胞では基底小体における *Sdccag8* のシグナルが減弱しており（図 3e）*Sdccag8*^{+/C} マウス網膜の視細胞においては *Sdccag8* の基底小体への局在が弱くなっていることが示唆された。また、私たちはアセチル化 チューブリンを免疫染色し、野生型マウス網膜と比較して *Sdccag8*^{+/C} マウス網膜においては視細胞の繊毛の数が有意に減少していた（図 3f, g）予想に反して私たちは野生型マウス網膜と比較して *Sdccag8*^{+/C} マウス網膜においては、長い視細胞の繊毛が多くなっていた（図 3f, h）。これらの結果から、*Sdccag8*-C は視細胞の繊毛形成に必須であることが示唆された。

ヒトの *SDCCAG8* 遺伝子において、*SDCCAG8* の C 末端領域を欠失すると予想される変異が網膜変性をはじめとした多様な臓器の障害と関連することが報告されている。私たちの結果より、*Sdccag8*-C は *Sdccag8* の中心体や基底小体への局在に必要な Ick や Mak との結合モジュールを構成し、繊毛形成とそれに関連した臓器の発生や恒常性維持に必須であることが示唆された。本研究により、*SDCCAG8* 遺伝子の変異と関連した繊毛病の病態メカニズムに対する知見を得ることができた。今後の *Sdccag8* と Ick および Mak との関係に焦点を当てた研究により、詳細な繊毛病の分子病態メカニズムの理解が進むことが期待される。

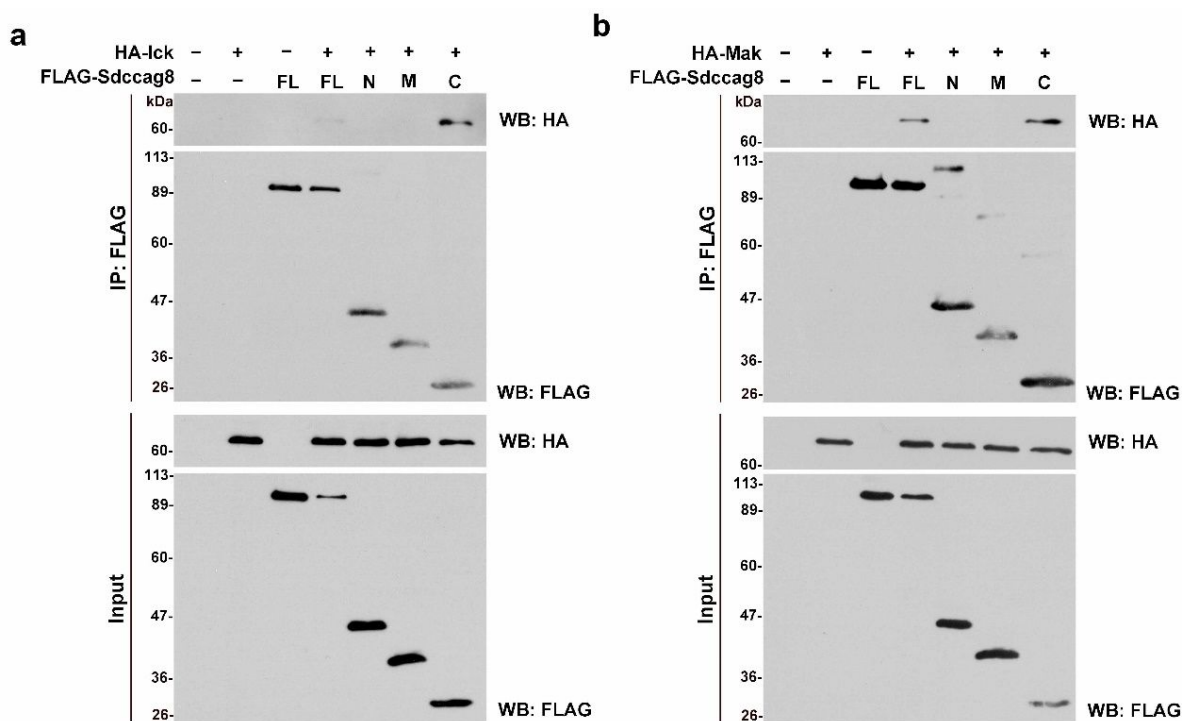


図 1. *Sdccag8* と Ick および Mak との相互作用

a) Ick と *Sdccag8*-FL、*Sdccag8*-N、*Sdccag8*-M および *Sdccag8*-C との免疫沈降解析。

b) Mak と *Sdccag8*-FL、*Sdccag8*-N、*Sdccag8*-M および *Sdccag8*-C との免疫沈降解析。

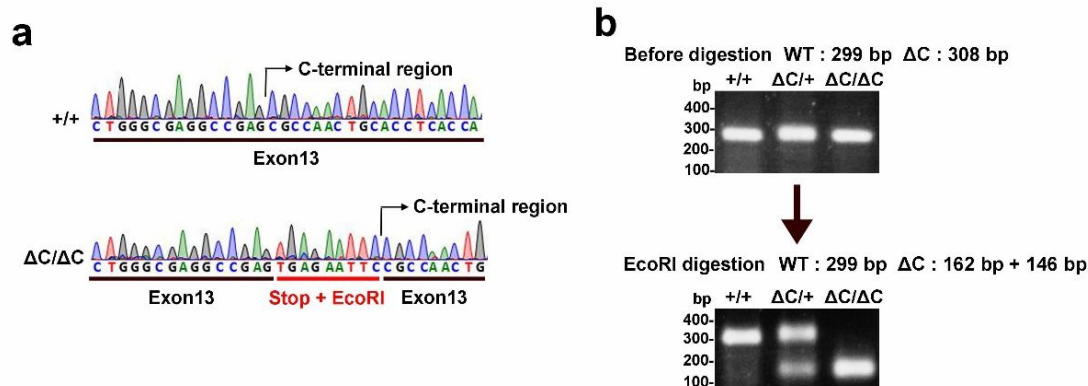


図2. *Sdccag8*^{C/C}マウスの作製

a) 野生型と *Sdccag8*^{C/C}マウスにおける *Sdccag8* のC末端領域周辺をコードする DNA 配列。
 b) 野生型、*Sdccag8*^{C/+}、*Sdccag8*^{C/C}マウスの PCR 解析。*Sdccag8*^{C/+}マウスと *Sdccag8*^{C/C}マウスからの PCR 産物は制限酵素 *EcoRI* により切断された。

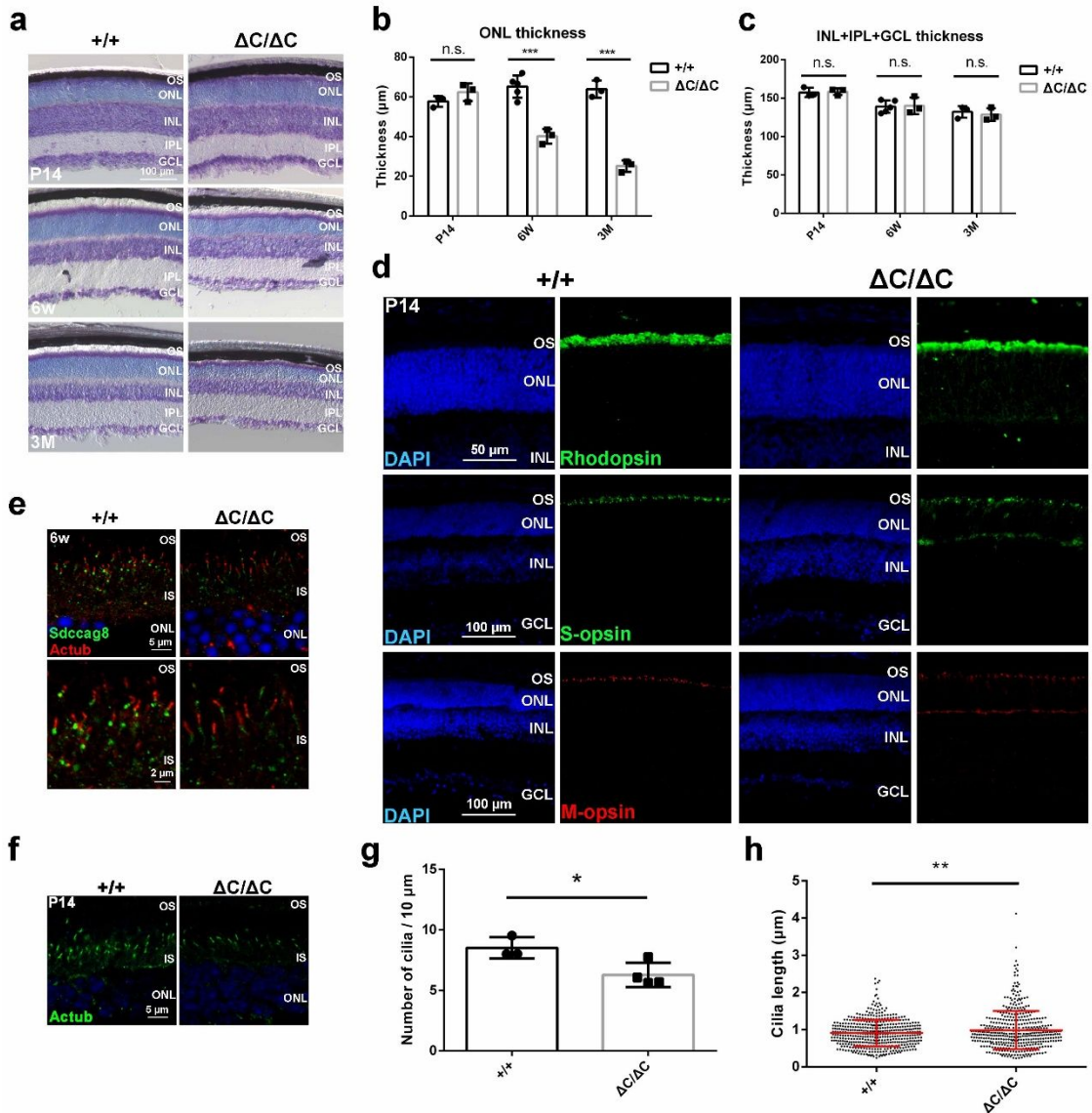


図3. *Sdccag8*^{C/C}マウス網膜の解析

a) 生後14日齢、6週齢、3か月齢の野生型と *Sdccag8*^{C/C}マウスの網膜切片を用いたトルイジンブルー染色。スケールバー：100 μm
 b, c) aをもとに野生型と *Sdccag8*^{C/C}マウス網膜のONL (b) と INL+IPL+GCL (c) の厚さを定量化した。n.s.：有意差なし、***P < 0.001 (unpaired t test)。
 d) 生後14日齢の野生型と *Sdccag8*^{C/C}マウスの網膜切片を用いた免疫染色。スケールバー：50 μm (上)、100 μm (真ん中、下)
 e) 6週齢の野生型と *Sdccag8*^{C/C}マウスの網膜切片を用いた免疫染色。スケールバー：5 μm (上)、2 μm (下)
 f) 生後14日齢の野生型と *Sdccag8*^{C/C}マウスの網膜切片を用いた免疫染色。スケールバー：5 μm
 g, h) fをもとに野生型と *Sdccag8*^{C/C}マウス網膜の視細胞の繊毛の数 (g) と長さ (h) を定量化した。*P < 0.05、**P < 0.01 (unpaired t test)。
 OS：外節、IS：内節、ONL：外顆粒層 (視細胞層)、INL：内顆粒層、IPL：内網状層、GCL：神経節細胞層。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Chaya Taro, Ishikane Hiroshi, Varner Leah R, Sugita Yuko, Maeda Yamato, Tsutsumi Ryotaro, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Furukawa Takahisa	4. 巻 31
2. 論文標題 Deficiency of the neurodevelopmental disorder-associated gene Cyfip2 alters the retinal ganglion cell properties and visual acuity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 535 ~ 547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab268	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 Gyoten Daichi, Ueno Shinji, Okado Satoshi, Chaya Taro, Yasuda Shunsuke, Morimoto Takeshi, Kondo Mineo, Kimura Kazuhiro, Hayashi Takaaki, Leroy Bart P., Woo Se Joon, Mukai Ryo, Joo Kwangsic, Furukawa Takahisa	4. 巻 212
2. 論文標題 Broad locations of antigenic regions for anti-TRPM1 autoantibodies in paraneoplastic retinopathy with retinal ON bipolar cell dysfunction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 108770 ~ 108770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2021.108770	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 該当する
1. 著者名 Whittaker DE, Oleari R, Gregory LC, Le Quesne-Stabej P, Williams HJ; GOSgene, Torpiano JG, Formosa N, Cachia MJ, Field D, Lettieri A, Ocaka LA, Paganoni AJ, Rajabali SH, Riegman KL, De Martini LB, Chaya T, Robinson IC, Furukawa T, Cariboni A, Basson MA, Dattani MT.	4. 巻 131
2. 論文標題 A recessive PRDM13 mutation results in congenital hypogonadotropic hypogonadism and cerebellar hypoplasia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e141587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI141587	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 該当する
1. 著者名 Tsutsumi Ryotaro, Chaya Taro, Tsujii Toshinori, Furukawa Takahisa	4. 巻 298
2. 論文標題 The carboxyl-terminal region of SDCCAG8 comprises a functional module essential for cilia formation as well as organ development and homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101686 ~ 101686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101686	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 Sugiyama Takefumi, Yamamoto Haruka, Kon Tetsuo, Chaya Taro, Omori Yoshihiro, Suzuki Yutaka, Abe Kentaro, Watanabe Dai, Furukawa Takahisa	4. 巻 10
2. 論文標題 The potential role of Arhgef33 RhoGEF in foveal development in the zebra finch retina	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78452-6	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 Kubo Shun, Yamamoto Haruka, Kajimura Naoko, Omori Yoshihiro, Maeda Yamato, Chaya Taro, Furukawa Takahisa	4. 巻 11
2. 論文標題 Functional analysis of Samd11, a retinal photoreceptor PRC1 component, in establishing rod photoreceptor identity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83781-1	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 Chaya Taro, Furukawa Takahisa	4. 巻 -
2. 論文標題 Post-translational modification enzymes as key regulators of ciliary protein trafficking	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	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) 10.1093/jb/mvab024	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 Chaya Taro, Maeda Yamato, Sugimura Ryo, Okuzaki Daisuke, Watanabe Satoshi, Varner Leah R., Motoooka Daisuke, Gyoten Daichi, Yamamoto Haruka, Kato Hidemasa, Furukawa Takahisa	4. 巻 298
2. 論文標題 Multiple knockout mouse and embryonic stem cell models reveal the role of miR-124a in neuronal maturation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102293 ~ 102293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102293	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Taro Chaya, Ryotaro Tsutsumi, Takahisa Furukawa
2. 発表標題 Functional mechanisms of cilia and their roles in sensory perceptions
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会 感覚研究コンソーシアム共催シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茶屋 太郎
2. 発表標題 繊毛内におけるタンパク質輸送制御のメカニズムと生理的意義の解明
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 茶屋 太郎
2. 発表標題 繊毛病の発症メカニズム解明と治療法開発を目指して
3. 学会等名 感覚研究コンソーシアム 第1回ピッチイベント（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taro Chaya, Ryotaro Tsutsumi, Yamato Maeda, Takahisa Furukawa
2. 発表標題 Functional analysis of the ciliary protein transport regulating kinase ICK in retinal photoreceptor cells
3. 学会等名 the Cold Spring Harbor Asia conference on Cilia & Centrosomes（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学蛋白質研究所分子発生学研究室ホームページ
http://www.protein.osaka-u.ac.jp/furukawa_lab/

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			
英国	King's College London	Royal Veterinary College	The Francis Crick Institute	他1機関
イタリア	University of Milan			
マルタ	Mater Dei Hospital			
ベルギー	Ghent University			
米国	The Children's Hospital of Philadelphia			