

機関番号：24303

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21790187

研究課題名 (和文) 一次繊毛内分子コンパートメントの解析

研究課題名 (英文) Study of the molecular compartment of primary cilia

研究代表者

芝 大 (SHIBA DAI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：50360722

研究成果の概要 (和文)：

一次繊毛は細胞表面から突出する細胞内小器官であるが、そこには 650 種以上もの蛋白が局在する。Inv は内臓逆位とともに嚢胞腎を発症する *inv* マウスの責任遺伝子産物である。人においては、2 型若年性ネフロン癆 (NPHP2) の原因遺伝子でもある。我々は、Inv がこれまで見出されていなかった一次繊毛基部領域に局在することを発見し、この領域を「Inv コンパートメント」と名づけた。さらに本研究において、Nphp3, Nphp9/Nek8 蛋白が Inv コンパートメントに局在することを見出した。また、Nphp3, Nphp9/Nek8 のコンパートメント局在は Inv により制御されていた。Inv, Nphp3, Nphp9/Nek8 の欠失マウスは内臓逆位とともに嚢胞腎を発症するため、我々が見出した繊毛基部領域は、繊毛内における反応場として機能していることが推測される。

研究成果の概要 (英文)：

Primary cilia have diverse functions in cell signaling pathways, including mechanosensation and hedgehog signaling. More than 650 proteins are now identified to localize in the cilium. Inv, which is a mouse homolog of human Nphp2, is responsible for *situs inversus* and multiple renal cysts of the *inv* mutant mouse. Inv is localized at a distinctive proximal segment of the primary cilium, which we have named as the Inv compartment of the cilium. Nphp3 and Nek8/Nphp9 are also localized to the Inv compartment in wild type cells. Interestingly, the compartment localization of Nphp3 and Nek8/Nphp9 are lost in *Inv* mutant cells. Introduction of an *Inv* gene into *Inv* mutant cells restores in the compartment localization, suggesting that the compartment localization of Nphp3 and Nek8/Nphp9 is dependent on Inv function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成 22 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：シグナル伝達、細胞・組織、一次繊毛、遺伝子

1. 研究開始当初の背景  
近年、一次繊毛が発生初期の左右非対称性を

決定するためのノード流を生成することや、  
腎尿細管における尿流れを感知するメカノ

センサーとして機能することが報告され、一次繊毛は組織や細胞ごとに多様な役割を果たすことが明らかとなった (Hirokawa *N Cell*, 2006 / Singla *V Science*, 2006)。一次繊毛の多様な機能は、一次繊毛に局在する蛋白質の違いにより規定されると考えられる。繊毛機能の全貌を理解するには、繊毛蛋白質の局在制御メカニズムの解明が必須であるが、未だその制御機構は明らかになっていない。解析が遅れていた要因として、*in vitro* で容易に一次繊毛を形成しうるマウス由来細胞株が樹立されていなかったことや、ライブ (生細胞) での一次繊毛観察が容易でなかった点があげられる。

*inv* (inversion of embryonic turning) マウスは内臓逆位とともに囊胞腎を発症する変異体として我々の研究室で作出し原因遺伝子を同定したマウスである (Yokoyama *T Science*, 1993, Mochizuki *T Nature*, 1998)。しかし、*Inv* 蛋白質の機能は未解明である。

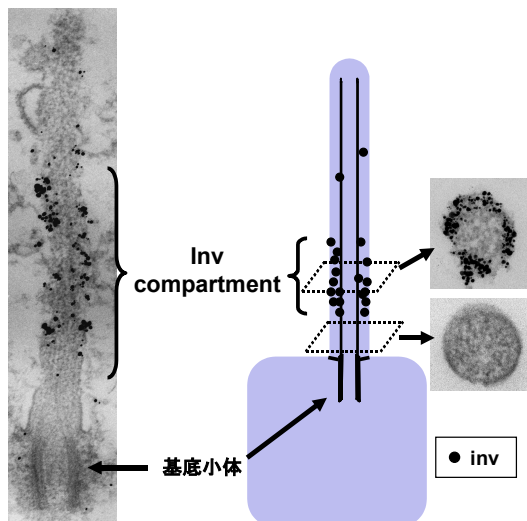


図1. 一次繊毛の免疫電子顕微鏡写真 *inv* 蛋白質は繊毛基部に局在する。

平成 17-18 年度若手研究 B (解剖学) 研究において、高解像度で腎尿細管上皮細胞の一次繊毛観察を行う実験系を構築し、*inv* マウス細胞一次繊毛のメカノセンサー機能を解析した (Shiba *D Cell Struct. Funct.*, 2005)。引き続いて採択された平成 19-20 年度若手研究 B (解剖学) で、*in vitro* で一次繊毛を形成可能なマウス腎尿細管由来細胞株の樹立に成功し、GFP 融合 *inv* 蛋白や抗 *inv* 抗体を作成・利用し、*inv* 蛋白質が 繊毛基部に局在することを明らかにした (図 1)。繊毛内にこのような分子の偏りが存在することを初めて発見し、*inv* 蛋白質が局在する繊毛基部領域を「Inv compartment」と名付けた (Shiba *D J. Cell Sci.*, 2009)。

## 2. 研究の目的

細胞には細胞表面から突き出した一次繊毛という細胞内小器官が存在する。繊毛には 650 種以上の蛋白質の存在が報告されているが、繊毛内での蛋白質局在制御メカニズムは未解明である。最近、繊毛基部領域にこれまで見出されていなかった蛋白局在の偏りがあることを発見した (Shiba *D J. Cell Sci.*, 2009)。これは繊毛機能を分子レベルで解明する上で足がかりになる成果であり、一次繊毛内の分子コンパートメント研究へと発展させることが研究の全体構想である。本研究の目的は、繊毛内に新しく見出した分子領域が単一蛋白に特有でなく、他の繊毛蛋白にも関係することを明らかにし、この領域内の新規蛋白局在制御機構を解明することである。

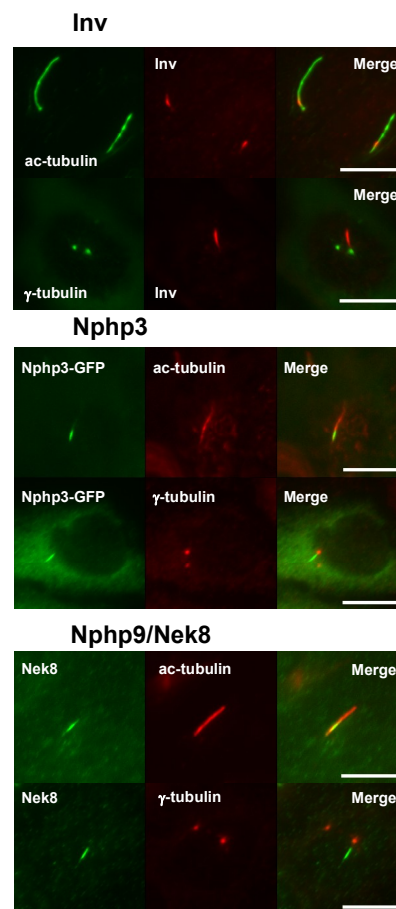


図2 *Inv*, *Nphp3*, *Nphp9/Nek8* は繊毛基部に集積する

## 3. 研究の方法

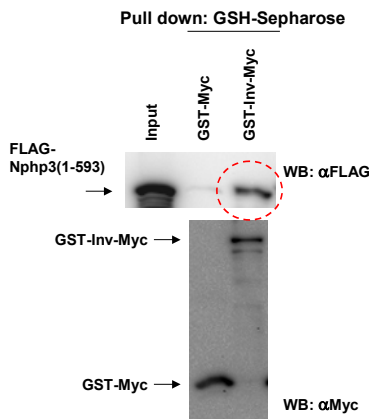
*Nphp* 責任遺伝子のクローニングは mKIAA もしくは FANTOM ライブラリーを利用し PCR 法により行った。種々の遺伝子発現コンストラクト (GFP, mKO2, Myc, GST, FLAG, mcherry) は適切な制限酵素を用いて作成した。細胞は 0.5% FBS 入りの DMEM/F12 培地で 37 度 CO2 制御恒温機で維持した。培養シャーレにはコラーゲン type IV コートシャーレ

を用いた。  
 繊毛の可視化は抗アセチル化チューブリン抗体および抗ガンマチューブリン抗体を用いた。  
 細胞写真はオリンパス社製 IX71 蛍光顕微鏡に CCD カメラを接続し取得した。繊毛の直径が 0.25 $\mu$ m であるため、解像度の高い CCD カメラ (QE) 選択した。  
 画像解析はソフトウェア MetaMorph を使用して行った。  
 蛋白間相互作用は、pull down 法および免疫沈降法で取得したサンプルをウェスタンブロッティングで検出することにより評価した。

#### 4. 研究成果

マウス *inv* 遺伝子のヒトホモログは 2 型若年性ネフロン癆 (NPHP 2) の責任遺伝子であり、NPHP 疾患遺伝子は他に 8 つが報告されている (Salomon R *Pediatr Nephrol.*, 2008)。これらと *Inv* 蛋白質との共局在は不明であるため、これらのマウス遺伝子をクローニングした。GFP タグを付加した融合蛋白コンストラクトを細胞にトランスフェクシ

#### A Pull down assay (Inv/Nphp3)



#### B IP assay (Inv/Nek8)

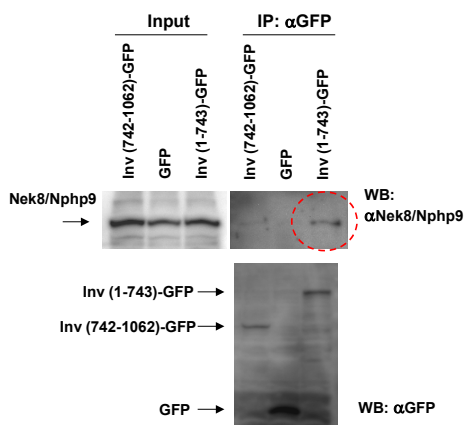


図3 *Inv*, *Nphp3*, *Nphp9/Nek8* は結合する

ョンし、蛋白の繊毛内局在を調べたところ、

NPHP 疾患遺伝子産物のうち ***Nphp3* および *Nphp9/Nek8* は *Inv* 蛋白質と同様に繊毛基部に局在した(ac-tubulin 染色と比較)**。しかし、**繊毛の根元構造である基底小体には局在しなかった(r-tubulin 染色と比較)**(図 2)。さらに、蛋白シグナルを画像解析 (line scan) したところ、*Inv*・*Nphp3*・*Nphp9/Nek8* の局在は完全に一致した。

*Inv* 蛋白の機能を調べるために、*Inv* 欠失細胞において GFP 融合 *Nphp3*・*Nphp9/Nek8* を強制発現させたところ、*Nphp3*・*Nphp9/Nek8* はどちらも *Inv* compartment へ局在しなかった。さらに、全長 *Inv* 蛋白を共発現させたところ、失われていた *Nphp3*・*Nphp9/Nek8* の *Inv* コンパートメント局在は完全に回復した。これらの結果から *Inv* が *Nphp3*・*Nphp9/Nek8* の繊毛局在を制御していると想定された。

また、*Inv* と *Nphp3*・*Nphp9/Nek8* の結合を調べるために、pull down 法および免疫沈降法により調べたところ、どちらも *Inv* と共沈した (図 3 A, B)。以上から、***Inv*・*Nphp3*・*Nphp9/Nek8* は *Inv* compartment で複合体を形成しており、*Inv* 蛋白質が主として複合体の局在を制御していると想定された。**

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① *Inv* acts as a molecular anchor for *Nphp3* and *Nek8* in the proximal segment of the primary cilia.

Shiba D, Manning DK, Koga H, Beier DR, Yokoyama T.

*Cytoskeleton* 67(2):112-9, 2010. (査読有)

② 嚢胞性腎疾患と繊毛

横山尚彦、杉山紀之、芝大

細胞工学 Vol.28, No.10, 1021-1026, 2009. (査読無)

③ Polycystic kidney disease in the medaka (*Oryzias latipes*) *pc* mutant caused by a mutation in the *Gli-Similar3* (*glis3*) gene.

Hashimoto H, Miyamoto R, Watanabe N, Shiba D, Ozato K, Inoue C, Kubo Y, Koga A, Jindo T, Narita T, Naruse K, Ohishi K, Nogata K, Shin-I T, Asakawa S, Shimizu N, Miyamoto T, Mochizuki T, Yokoyama T, Hori H, Takeda H, Kohara Y, Wakamatsu Y.

*PLoS One*. 4(7):e6299, 2009. (査読有)

④ A murine model of neonatal diabetes mellitus in *Glis3*-deficient mice.

Watanabe N, Hiramatsu K, Miyamoto R, Yasuda K, Suzuki N, Oshima N, Kiyonari H, Shiba D, Ni shio S, Mochizuki T, Yokoyama T, Maruyama S, Matsuo S, Wakamatsu Y, Hashimoto H. *FEBS Lett.* 583(12):2108-13, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

① Inv compartment of the primary cilia  
Yokoyama T and Shiba D  
Society for Developmental Biology 68th Annual Meeting, Hyatt Regency, San Francisco, CA, July 23-27, 2009  
抄録 *Developmental Biology*, 331, A125 (2009)

② Localization and relationship among NPHP proteins in the primary cilia  
Dai Shiba, Danielle K. Manning, David R. Beier and Takahiko Yokoyama  
The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, December 11-15, 2010  
抄録 *The American Society for Cell Biology, Annual Meeting Program*, 182 (2010)

③ 尿管形態維持装置としての繊毛蛋白 Inv の機能  
Cilia as a maintainer for renal tubule diameter -Functional analysis of ciliary protein Inv-  
横山尚彦、杉山紀之、芝大.  
第 32 回分子生物学会年会 2009 年 12 月 (横浜)  
抄録 *MBSJ program* 2009, 99 (2009)

④ Inv controls the intra-ciliary molecular compartmentalization of renal epithelial primary cilia  
芝大、古閑 比佐志、横山尚彦.  
第 61 回日本細胞生物学会 2009 年 6 月 (名古屋)  
抄録 第 61 回日本細胞生物学会 要旨集, 224 (2009)

⑤ 一次繊毛内分子領域「Inv コンパートメント」への Nphp3・Nek8 集積機構解析  
Inv-based molecular accumulation machinery in the proximal segment of primary cilium  
芝大、萩原治夫、横山尚彦.  
第 115 回解剖学会全国学術集会 2010 年 3 月 (岩手)  
抄録 *解剖学雑誌*, 85 (Suppl): 108 (2010)

⑥ Inv 蛋白における IQ ドメイン機能解析  
福井一、芝大、横山尚彦.  
第 115 回解剖学会全国学術集会 2010 年 3 月 (岩手)  
抄録 *解剖学雑誌*, 85 (Suppl): 136 (2010)

⑦ 若年性ネフロン癆責任遺伝子産物 Nphp3 の繊毛局在制御ドメイン解析  
Analysis of cilium localization signal of Nphp3  
中田香奈、芝大、横山尚彦.  
第 115 回解剖学会全国学術集会 2010 年 3 月 (岩手)  
抄録 *解剖学雑誌*, 85 (Suppl): 108 (2010)

⑧ Renal cystic diseases as a ciliopathy  
Takahiko Yokoyama, Noriyuki Sugiyama, Dai Shiba, Hajime Fukui, Kana Nakata  
第 116 回 解剖学会全国学術集会 2011 年 3 月 (横浜)  
抄録 *The Journal of Physiological Sciences* 61(suppl): s78(2011)

⑨ Searching for the region regulating ciliary localization of Glis3  
Miki Miyamoto, Dai Shiba, Hisashi Hashimoto, Takahiko Yokoyama  
第 116 回 解剖学会全国学術集会 2011 年 3 月 (横浜)  
抄録 *The Journal of Physiological Sciences* 61(suppl): s104(2011)

⑩ Functional analysis of ciliary protein Nek8 in zebrafish  
Ryousuke Ikeda, Hajime Fukui, Dai Shiba, Takahiko Yokoyama  
第 116 回 解剖学会全国学術集会 2011 年 3 月 (横浜)  
抄録 *The Journal of Physiological Sciences* 61(suppl): s104(2011)

⑪ Ciliary localization of Inv is essential for in vivo function and is regulated by its IQ domain  
Hajime Fukui, Dai Shiba, Takahiko Yokoyama  
第 116 回 解剖学会全国学術集会 2011 年 3 月 (横浜)  
抄録 *The Journal of Physiological Sciences* 61(suppl): s274 (2011)

⑫ NPHP pathway in the primary cilia  
Dai Shiba, Takahiko Yokoyama  
第 116 回 解剖学会全国学術集会 2011 年 3 月 (横浜)  
抄録 *The Journal of Physiological Sciences* 61(suppl): s275 (2011)

[その他]

その他活動

・ 繊毛研究会の立ち上げ

国内で繊毛研究を行っている研究者は多数いるが、その情報交換を効率的に行うために、繊毛研究会を立ち上げた。数名の研究メンバーとともに会の発足に貢献した。

[http://www.geocities.jp/cilia\\_club/](http://www.geocities.jp/cilia_club/)

第一回研究会を 2010 年 11 月 13 日「繊毛の構造と機能のインターフェイス」と題し、基礎生物学研究所（明大寺地区） 会議室（111 号室）で行った。

・ 学術講演会

2010 年 11 月 16 日 「嚢胞性腎疾患と一次繊毛機能」と題し、大塚製薬徳島研究所（徳島） で学術講演会を行った。

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anat2/Projects/thema2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芝 大 (SHIBADA)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：50360722