

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06382

研究課題名（和文）一次繊毛を基軸とした神経回路網形成機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism underlying neural circuit formation based on primary cilia

研究代表者

鳥山 道則（Toriyama, Michinori）

関西学院大学・生命環境学部・講師

研究者番号：90457151

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では一次繊毛に局在する分子の同定と機能解析を進めることで、一次繊毛を介したシグナル伝達を明らかにする。我々は新たに同定した新規遺伝子C6orf141(Chromosome 6 Open Reading Frame 141)の機能解析を進めたところ、C6orf141タンパク質は一次繊毛の根元に存在する中心体に強く局在することを明らかにした。特に、中心体のdistal appendageと考えられる部位に局在した。また、C6orf141の発現抑制細胞では、一次繊毛の伸長が有意に阻害された。以上の結果からC6orf141は一次繊毛形成を正に制御する分子であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性疾患である繊毛病は、全身様々な組織で形態的・機能的な異常を示すことが知られている。中でも脳・神経系の症状は重篤であり、脳構造の異常により、記憶、学習、運動といった高次脳機能障害が起こることがわかっている。本研究では、新たに繊毛形成分子としてC6orf141を発見し、その機能解析からC6orf141の正常な機能が一次繊毛の形成に必要とされることを明らかにした。今後、発症機序および原因遺伝子が不明の繊毛病において、C6orf141の遺伝子変異検査といった方面への応用が期待でき、難病の診断と治療に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the signaling pathways mediated by primary cilia by identifying and functionally analyzing molecules localized to primary cilia. We have functionally characterized a newly identified gene, C6orf141 (Chromosome 6 Open Reading Frame 141), and, revealed that the C6orf141 protein localizes strongly to the centrosome, existing at the base of the primary cilium. Notably, it localizes to the region considered to be the distal appendage of the centrosome. Furthermore, in cells with suppressed C6orf141 expression, the elongation of primary cilia was significantly inhibited. Based on these results, it is believed that C6orf141 is a molecule that positively regulates primary cilia formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次繊毛 中心体 繊毛病 神経回路

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一次繊毛とは、細胞分裂休止期の動物細胞に出現する不動性繊毛である。一次繊毛は基底小体(中心小体)を起点として微小管を伸長させ細胞膜より突出する構造をしており、細胞に1本のみ形成される。一次繊毛は細胞外からシグナル受け取り、細胞内に伝達する「アンテナ」のような役割を担う細胞小器官である。このシグナル受容を可能にするため、一次繊毛の細胞膜にはGタンパク質共役型受容体(GPCR)やイオンチャンネルなどが局在している。これにより一次繊毛は、成長因子、ペプチドホルモン、モルフォジェンといった化学シグナルや光、細胞外の流れといった物理シグナルなどの細胞外シグナルを受容することが可能である。この一次繊毛を介したシグナル伝達は、個体発生時の組織形成に関与していることが示唆されている。

ヒト遺伝性疾患である「繊毛病」では一次繊毛の形成や機能発揮に関わる遺伝子に変異が生じることで分子機能の喪失や低下が起き、繊毛の形成不全、機能不全が生じ、様々な組織で異常を示す。繊毛病の症状多様であり、腎・肝嚢胞、腎・肝不全、知的障害、奇形、多指症、眼球運動障害、内臓逆位など、複合的な病態を顕す。また、繊毛病は遺伝子変異による疾患であるため根本的な治療法は確立されておらず、指定難病の一つに指定されている。

特に脳では、左右の脳を連結する脳梁の低形成や神経細胞数の減少に伴う脳室の拡大などの形態的な異常を呈することが報告されている。さらにこれらの異常により記憶、学習、運動といった高次脳機能に障害を示すことも近年の研究から報告されている。しかしながら、一次繊毛の機能異常により脳機能の低下を誘発する分子機序は不明であり、脳・神経系において一次繊毛により受容される細胞外シグナルおよび神経細胞へ生理的影響については未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究ではこれまで研究が立ち遅れていた脳・神経系における一次繊毛の形成と機能を司る分子の機能解析を目的とする。脳を構成する個々の神経細胞にも一次繊毛の存在は報告されており、細胞外シグナルの受容と伝達を介した神経細胞の機能制御が脳・神経系の発生と機能発揮に必要であることが予測されている。しかしながら、神経細胞の一次繊毛が細胞外からどのようなシグナルを受容し、そして細胞に伝達した後に神経細胞はどのような応答を示すのか?といった問題は未だ解き明かされていない。そこで本研究では、Ar113b-APEXを用いた近傍依存性標識法により一次繊毛に局在する受容体分子の同定を行うことで受容されるシグナルの同定および細胞応答の理解を目指す。特に新たに一次繊毛への局在が同定された分子に関して重点的な機能解析から、一次繊毛の機能の全貌に迫る。

3. 研究の方法

(1) Ar113b-APEX ノックインマウスの作製と一次繊毛局在分子の網羅的同定

これまでに一次繊毛に局在する分子の探索およびシグナル伝達経路の解明が様々な手法を用いて行われてきた。例えば、一次繊毛特異的にビオチン化酵素 APEX(engineered ascorbate peroxidase)を過剰発現させ、APEXによりビオチン化された一次繊毛局在分子を網羅的に同定する方法が確立されている。しかし、この方法は遺伝子導入効率が低い初代培養神経細胞では困難が予想される。加えて、APEXの過剰発現細胞を用いた解析では、一次繊毛に局在する受容体の同定ができなかったことから、可能な限り *in vivo* に近い系を用いることとした。そこで、本研究では研究分担者らの協力のもと、一次繊毛局在タンパク質の1つである Ar113B(ADP Ribosylation Factor Like GTPase 13B)のC末端側にAPEXのcDNAを付加した遺伝子型をもつノックインマウスを作製した。このマウスから培養した神経細胞を用いてAPEX法により繊毛内タンパク質のビオチン化標識と生化学的手法によるビオチン化標識タンパク質の精製、さらに質量分析法によるタンパク質の同定を進めた。

(2) データベース検索による新規一次繊毛関連分子の同定

タンパク質間相互作用データベースである BioGRID を用いた検索から、一次繊毛および一次繊毛の形成起点となる中心小体に局在すると予測される分子を探索した。予測された候補遺伝子のcDNAをクローニングした後、EGFPおよびFLAGタグを融合する発現ベクターを構築し、動物細胞内におけるタンパク質の発現および細胞内局在をWestern blot、免疫蛍光染色法およびライブイメージング法により解析した。

(3) 新規中心体局在タンパク質 C6orf141 の機能解析

C6orf141は機能解析の報告例が存在しない新規分子であり、発現部位、細胞内局在、分子機能のすべてが不明であった。そこで、まずマウス各組織からRNAを抽出し、リアルタイムqPCR法によりマウス組織間におけるC6orf141の発現量を解析した。次にマウス胎仔線維芽細胞(MEF)およびNIH3T3細胞において強制発現および発現抑制を行い、一次繊毛の形成に与える影響について免疫蛍光染色法により解析した。

4. 研究成果

(1) 抗 C6orf141 抗体の作製と評価

マウス C6orf141 のアミノ酸配列に基づきウサギポリクローナル抗体を2種類作製した。双方ともに ELISA では抗体価の優位な上昇が認められたものの、Western blot 法によるマウス生体組織およびマウス胎生線維芽細胞、NIH3T3 細胞より調製した細胞抽出液では反応が認められなかった。さらに、免疫染色法においても反応は認められなかった。以上のことより作製した抗体は、Western blot 法および免疫染色での利用は困難であり、細胞内局在の変化等の解析は断念せざるを得なかった。

(2) マウス組織における新規分子 C6orf141 の発現量解析

上記のように、マウス内在性 C6orf141 タンパク質を検出できる抗体の取得には至らなかったため、リアルタイム qPCR 法により C6orf141 の mRNA 量をマウス各組織間で解析した。その結果、解析したほとんどのマウス組織で C6orf141 の mRNA が確認され、普遍的に発現することが示された。さらに、胃、小腸、大腸といった消化器系の組織では、他の組織と比較して極めて高い発現が認められた。

(3) 新規分子 C6orf141 の細胞内局在の解析

ライプイメーキング等の各種実験に使用するため、C6orf141 の C 末端に EGFP を融合させた C6orf141-EGFP の発現ベクターを構築した。しかし、この発現ベクターを導入した細胞由来のタンパク質抽出液を用いた Western blot 法では、目的分子量付近でのタンパク質の発現はほとんど見られず、低分子側に分解されたと考えられるバンドが多く検出された。そのため、C6orf141 と EGFP との間にフレキシブルリンカー配列である GGGGS を導入することで、C6orf141 タンパク質と EGFP タンパク質との間の運動性を向上させる発現ベクターを構築した。この発現ベクターでは、細胞内におけるタンパク質分解が抑制され、目的分子量付近に C6orf141-EGFP のバンドが検出された。この C6orf141-EGFP をトランスフェクションした MEF では、中心体マーカーである Centrin2-mRFP と近い細胞内局在を示した。

(4) C6orf141 の強制発現および発現抑制が一次繊毛形成に与える影響の解析

MEF および NIH3T3 細胞において FLAG-C6orf141 の強制発現を行ったが、一次繊毛の形成率およびその長さに有意な差は認められなかった。一方で、RNAi 法により発現抑制を行った細胞では、コントロールと比較し、一次繊毛の長さが有意に減少した。この結果から、C6orf141 は一次繊毛の形成を正に制御する機能を有すると考えられる。

C6orf141 の RNA 結合能に関する解析

さらに我々が独自に開発した RNA 結合タンパク質の新規同定手法である Fluorescence RNA Immunoprecipitation (FRIP 法) を用いた解析から、C6orf141 に RNA 結合能を有することを明らかにした。さらに、C6orf141 の欠損変異体を用いた解析から、C6orf141 の C 末端側の 50 アミノ酸が RNA との結合に必要なことを明らかにした。一方で、この C 末端側の 50 アミノ酸を欠損する変異体 C6orf141 は正常に中心体に局在した。これらの結果から、C6orf141 の中心体への局在には C 末端領域およびこの領域への RNA 分子の結合は依存しないことが明らかとなった。既にいくつかの中心体局在タンパク質が同定され報告されているが、それらのタンパク質が RNA と結合する報告例はない。我々はいくつかの中心体や一次繊毛に局在するタンパク質をコードする cDNA をクローニングし、FRIP 法により RNA 結合の解析を行ったが、RNA との結合活性を示すタンパク質は C6orf141 以外に発見できなかった。

以上の結果から、本研究で同定した新規分子 C6orf141 は、中心体に局在することで機能し、一次繊毛の形成を担う分子活性を有することが示唆された。これまでの報告では、ヒト繊毛病患者において C6orf141 の遺伝子変異などの報告例は存在しないが、今後の解析から C6orf141 の変異による繊毛病の発症も十分に考えられる。そのため、C6orf141 は繊毛病の診断、治療といった方面への応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Kastian Ria Fajarwati, Baba Kentarou, Kaewkascholkul Napol, Sasaki Hisashi, Watanabe Rikiya, Toriyama Michinori, Inagaki Naoyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Dephosphorylation of neural wiring protein shootin1 by PP1 phosphatase regulates netrin-1-induced axon guidance	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104687 ~ 104687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.104687	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱本稜斗, 矢尾育子, 鳥山道則
2. 発表標題 神経細胞における不飽和脂肪酸の老化抑制効果の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江戸谷歩, 矢尾育子, 鳥山道則
2. 発表標題 DHAが脳機能に与える影響の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前川北斗, 鳥山道則, 矢尾育子
2. 発表標題 神経回路網形成時におけるケルセチンの機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中藤誠信、豊永優月、矢尾育子、鳥山道則
2. 発表標題 神経回路網形成時におけるAAK1の機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山ノ井 俊宏、鳥山真奈美、伊東広、矢尾育子、鳥山道則
2. 発表標題 RNA結合能を有する新規Asef2スプライシングバリエーションの同定と機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横田麻里子、苅田憲人、矢尾育子、鳥山道則
2. 発表標題 ドコサヘキサエン酸の摂取は脳における一次繊毛の伸長を促進する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
研究分担者	鳥山 真奈美 (Toriyama Manami) (30773121)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	横田 麻里子 (Yokota Mariko)	関西学院大学・生命環境学部 (34504)	
研究協力者	豊永 優月 (Toyonaga Yuzuki)	関西学院大学・生命環境学部 (34504)	
研究協力者	土居 紀香 (Doi Norika)	関西学院大学・生命環境学部 (34504)	
研究協力者	伊藤 瑞穂 (Itoh Mizuho)	関西学院大学・生命環境学部 (34504)	

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