

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570209

研究課題名(和文) チューブリンポリグルタミン酸化修飾による一次繊毛構造・機能調節機構とその破綻

研究課題名(英文) Studies on regulation of structure and function of primary cilia by tubulin polyglutamylation

研究代表者

池上 浩司 (IKEGAMI, KOJI)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20399687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、一次繊毛においてチューブリンポリグルタミン酸化を調節している酵素の特定を目指し、TTLL1, TTLL6, CCP1という三つの酵素の特定に成功した。さらに、TTLL6の繊毛局在阻害、機能阻害により、チューブリンポリグルタミン酸化が繊毛軸系の構造維持に必須であることを見出した。くわえて、ポリグルタミン酸化の低下と繊毛病ジュベール症候群との関連を示唆した。一次繊毛が高度に変形した網膜光受容細胞の維持には適切なポリグルタミン酸化レベルが必須であることを実証した。くわえて、CCP1の機能喪失によるポリグルタミン酸化レベル制御の破綻により光受容細胞内のタンパク質分布が異常になることを発見した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to identify enzymes that regulated tubulin polyglutamylation in primary cilia. We have finally identified three enzymes, TTLL1, TTLL6, and CCP1, as polyglutamylation-regulating enzymes in primary cilia. We found, by blocking the localization of TTLL6 into primary cilia or by the direct inhibition of TTLL6 function, that tubulin polyglutamylation was essential for maintaining the structural integrity of the ciliary axonemes. The results suggest an association of the dysregulation of tubulin polyglutamylation with a ciliary disease, Joubert syndrome. We also demonstrated that appropriate polyglutamylation level was essential for the maintenance of retinal photoreceptor cells. In addition, we found that intracellular distribution of a protein in photoreceptor cells were affected by the dysregulated hyper-polyglutamylation in CCP1-deficient mouse retina.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：翻訳後修飾 繊毛病 微小管 チューブリン 繊毛 軸系

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 21世紀に入り、繊毛研究は世界的に非常に活発化し、とりわけ、全身の細胞で“センサー”の役割を担っている一次繊毛(Primary cilia)に関する研究は、一次繊毛の構造や機能の異常が網膜変性を含む全身性の繊毛病(Ciliopathy)の原因になると分かり、目覚ましい発展を見せていた。中でも、繊毛構成物質を一次繊毛内に輸送するIntraflagellar transport (IFT)に関する研究が非常に盛んになっていた。一方、IFTの『レール』として、また一次繊毛の『柱』として働く軸糸を構成するチューブリンやそのポリグルタミン酸化修飾については、一次繊毛で修飾を調節する酵素の特定がなされておらず、全く研究が進んでいなかった。ポリグルタミン酸化修飾による一次繊毛の形態や機能の制御、ポリグルタミン酸化修飾異常による繊毛病発症に着目した研究は、研究開始当初、国内外に存在しなかった。

(2) 研究代表者は、チューブリンポリグルタミン酸化を担う修飾酵素(ポリグルタミン酸化酵素: TTLLs)の同定、脱修飾酵素(脱グルタミン酸化酵素: CCPs)の同定に成功してきた。また、チューブリンポリグルタミン酸化修飾が気道上皮の繊毛運動調節や、精子鞭毛の構築に重要であることを見出してきた。これら一連の研究成果から、修飾/脱修飾酵素の on/off 制御によるチューブリンポリグルタミン酸化修飾レベルの調整機構、修飾調整による一次繊毛の形態や機能の調節機構の存在を予想し、それらの解明を目指す本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、一次繊毛でチューブリンポリグルタミン酸化を調節する酵素の特定を最低到達目標とした。さらに、特定された酵素の機能阻害を通して、チューブリンポリグルタミン酸化による一次繊毛の構造や機能の調節を明らかにすることを達成目標とした。

(2) 異常ポリグルタミン酸化マウスが示す網膜変性を、ポリグルタミン酸化異常による繊毛病の一例として解析し、遺伝学的レスキュー実験を行うことにより、修飾異常による繊毛病を実証し、疾患分子基盤の一端を明らかにすることを努力目標とした。

## 3. 研究の方法

(1) 一次繊毛におけるチューブリンポリグルタミン酸化調節酵素の特定と機能解析

カリフォルニア大学サンディエゴ校の Joseph G Gleeson らのグループとの国際共同研究を推進し、繊毛病の一つジュベール症候群の原因となる CEP41 の変異を軸に、CEP41

と相互作用する TTLL を絞り込んだ。

共同研究により、CEP41 の機能阻害による TTLL の一次繊毛への局在、ならびに一次繊毛におけるチューブリンポリグルタミン酸化レベルを検証した。

共同研究により、絞り込んだ TTLL の機能阻害を行い、繊毛におけるチューブリンポリグルタミン酸化のレベル、および繊毛の構造を検証した。

(2) チューブリンポリグルタミン酸化制御異常による繊毛病の実証

ポリグルタミン酸化の脱グルタミン酸化酵素 CCP1 の変異マウス(pcd マウス)の網膜を免疫染色で解析し、網膜のどの部位で最もポリグルタミン酸化が亢進しているか検証した。

pcd マウスとポリグルタミン酸化酵素 TTLL1 の変異マウス(TTLL1K0 マウス)を交配し、二重変異マウスを作製した。二重変異マウス網膜におけるポリグルタミン酸化の状態を免疫染色で解析した。

半年間飼育した二重変異マウスの網膜を組織学的に解析し、網膜光受容細胞の変性度合いを解析した。

変性前の pcd マウス網膜を組織化学的に解析し、各種タンパク質の局在を検証した。

## 4. 研究成果

(1) 一次繊毛におけるチューブリンポリグルタミン酸化調節酵素の特定と機能解析

カリフォルニア大学サンディエゴ校の Joseph G Gleeson らのグループとの国際共同研究により、ポリグルタミン酸化修飾酵素の一つ TTLL6 が繊毛局在タンパク質 CEP41 依存的に繊毛に集積し、CEP41 の機能阻害により TTLL6 が一次繊毛に局在しなくなり一次繊毛のチューブリンポリグルタミン酸化が低下することを明らかにした。これらの知見から、TTLL6 が一次繊毛においてチューブリンポリグルタミン酸化を制御している酵素であると特定された(雑誌論文)。

共同研究により、TTLL6 のノックダウンによる繊毛におけるチューブリンポリグルタミン酸の低下が、繊毛の軸糸構造とくに周辺微小管の A 管の変形を引き起こすことを見出した。この知見から、チューブリンポリグルタミン酸化が繊毛軸糸の周辺微小管 A 管の構造維持に寄与していることが明らかとなった(雑誌論文)。

以上の一連の知見は、繊毛病の一つであるジュベール症候群の解析に端を発したものであり、実際のヒト繊毛病疾患における一

次繊維チューブリンポリグルタミン酸化制御異常に関する洞察を与えた点で、基礎生命科学のみならず医学的にも意義深いものとなった。

## (2) チューブリンポリグルタミン酸化制御異常による繊維病の実証

*pcd* マウス網膜の免疫染色解析により、一次繊維に相当する光受容細胞の桿体層でチューブリンポリグルタミン酸化が特に亢進していることが明らかとなった(図1)(学会発表, , , , , , )。

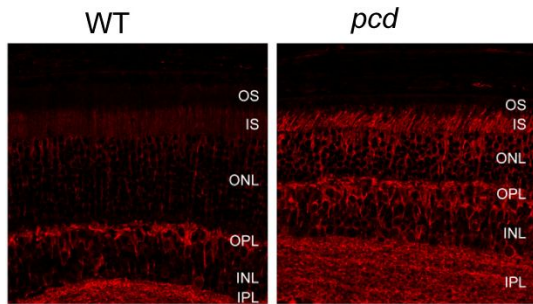


図1. *pcd* マウス網膜におけるポリグルタミン酸化の異常亢進

*pcd* マウスと *TTL1* KO マウスの二重変異マウスを解析した結果、*pcd* 網膜光受容細胞の桿体層で見られたポリグルタミン酸化修飾の異常亢進が抑制されることを見出した(図2)。

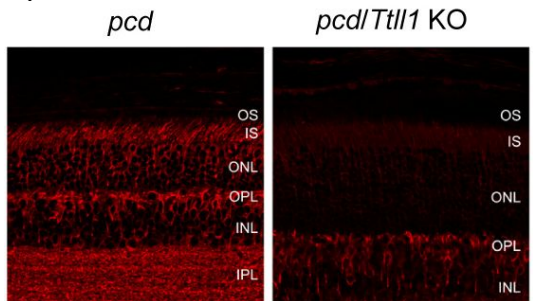


図2. *pcd*/*TTL1*KO 二重変異マウス網膜におけるポリグルタミン酸化状態

この結果より、網膜光受容細胞の桿体および錐体では *TTL1* が主なポリグルタミン酸化酵素であることが明らかとなった(学会発表, , , , , , )。

*pcd* マウス網膜で観察される桿体層の薄化および光受容細胞の変性脱落が、二重変異マウスでは完全に抑止できることを見出した(図3)。

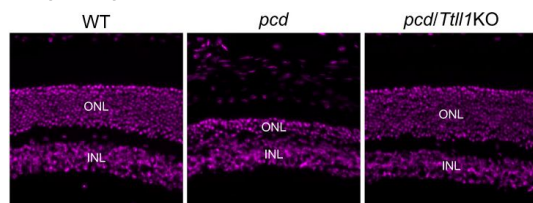


図3. *pcd*/*TTL1*KO 二重変異マウス網膜における光受容細胞の維持

これによりチューブリンポリグルタミン酸化の異常亢進が網膜光受容細胞桿体の構造異常の原因になることが示された(学会発表, , , , , , )。

*pcd* マウス網膜光受容細胞を構成する主要タンパク質の分布を免疫組織化学染色で解析した結果、ある種のタンパク質の光受容細胞内局在の異常を見出した(学会発表, , , , , , )。

以上の一連の発見は、網膜光受容細胞の繊維構造と機能の維持に、ポリグルタミン酸化酵素 *TTL1* と脱グルタミン酸化酵素 *CCP1* の拮抗による適切なポリグルタミン酸化状態の維持が必須であることが明らかとなった。繊維を介した物質輸送(IFT)におけるポリグルタミン酸化修飾の役割とその破綻による繊維機能異常に関する重要な分子の洞察を与えた点で基礎生物学的に意義が大きい。

(3) 上記の当初計画した研究以外に、国内外で共同研究を推進し、複数の興味深く且つ重要な知見を得た。

原子間力顕微鏡によるチューブリン C 末端領域の検出に成功した(雑誌論文)。これは、軸系を構成する微小管チューブリンのポリグルタミン酸化を直接イメージングする技術に繋がる点で、本研究のさらなる発展のために非常に重要な成果となった。

網膜の一次繊維で脱ポリグルタミン酸化を担っている酵素 *CCP1* について、その酵素学的特性を明らかにした(雑誌論文)。また、*CCP1* のホモログである *CCP5* についてもその酵素学的特性が明らかとなった(雑誌論文)。これらの発見は、ポリグルタミン酸化修飾異常による実際の疾患に対する治療薬開発につながる可能性を秘めており、医学的に意義深い。

研究全体を総括する内容で講演を行い(学会発表, , , , , , ), さらに、英文総説(雑誌論文)およびチューブリンポリグルタミン酸化の解析法に関する概説(図書)を発表した。これらの発表は、国内外の多くの研究者が繊維軸系チューブリンポリグルタミン酸化の研究に参入しやすくなり、研究分野のすそ野を広げるという点で、大いに意義あるものとなった。

繊維軸系においてポリグルタミン酸化に対し拮抗的に作用するポリグリシン化に着目し、ポリグリシン化を消失させポリグルタミン酸化が相対的に優位な状態を人為的に作り出すことで、ポリグルタミン酸化/ポリグリシン化のバランスが繊維機能に及ぼす影響について新しい知見を得た(学会発表, , , , , , )。

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5件)

Berezniuk I, Lyons PJ, Sironi JJ, Xiao H, Setou M, Angeletti RH, Ikegami K, Fricker LD. Cytosolic carboxypeptidase 5 removes  $\gamma$ - and  $\beta$ -linked glutamates from tubulin. 2013. J Biol Chem. 288, 30445-30453. 【査読有】  
DOI: 10.1074/jbc.M113.497917.

Konno A, Setou M, Ikegami K. Ciliary and flagellar structure and function - their regulations by posttranslational modifications of axonemal tubulin. 2012. Int Rev Cell Mol Biol. Vol.294, pp.133-170. 【査読無】  
DOI:10.1016/B978-0-12-394305-7.00003-3.

Lee JE, Silhavy JL, Zaki MS, Schroth J, Bielas SL, Marsh SE, Olvera J, Brancati F, Iannicelli M, Ikegami K, 他20名. CEP41 is mutated in Joubert syndrome and is required for tubulin glutamylation at the cilium. 2012. Nat Genet. 44, 193-199. 【査読有】  
DOI: 10.1038/ng.1078.

Berezniuk I, Vu HT, Lyons PJ, Sironi JJ, Xiao H, Burd B, Setou M, Angeletti RH, Ikegami K, Fricker LD. Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing  $\gamma$ - and  $\beta$ -tubulin. 2012. J Biol Chem. 287, 6503-6517. 【査読有】  
DOI: 10.1074/jbc.M111.309138.

Asakawa H, Ikegami K, Setou M, Watanabe N, Tsukada M, Fukuma T. Submolecular-scale imaging of  $\alpha$ -helices and C-terminal domains of tubulins by frequency modulation atomic force microscopy in liquid. 2011. Biophys J. 101, 1270-1276. 【査読有】  
DOI: 10.1016/j.bpj.2011.07.020.

[学会発表](計20件)

池上浩司, 瀬藤光利. 軸系微小管の翻訳後修飾と繊毛・鞭毛の構造・機能. 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014年3月28日, 栃木.

池上浩司, 政池知子, 西坂崇之, 瀬藤光利. ポリグルタミン化修飾酵素 TLL10 ノックアウトマウスの気道上皮繊毛運動解析. 第73回日本解剖学会中部支部学術集会, 2013年10月5日, 山梨.

池上浩司, 政池知子, 西坂崇之, 瀬藤光利. ポリグルタミン化修飾消失の進化的意義に関する考察. 第4回繊毛研究会, 2013年9月6日, 東京.

Kimura Y, Konno A, Ikegami K. Environmental stimulus-responsive behavioral plasticity is regulated by intraflagellar transport of sensory cilia. The 25th CDB Meeting, 2013年6月17-18日, 神戸.

Konno A, Hattori S, Matsuda C, Setou M, Ikegami K. Over-polyglutamylation causes the degeneration of ciliary photoreceptor cells. The 25th CDB Meeting, 2013年6月17-18日, 神戸.

Ikegami K, Masaike T, Nishizaka T, Setou M. Analyzing ciliary motility of tubulin modification-deficient mice with three-dimensional tracking microscopy. FASEB Science Research Conferences - The Biology of Cilia & Flagella, 2013年6月23-28日, アメリカ.

Ikegami K, Masaike T, Nishizaka T, Setou M. Three-dimensional analysis of airway cilia motility and the regulation of ciliary motility by tubulin poly-modifications. Gordon Research Conferences - Cilia, Mucus & Mucociliary Interactions, 2013年4月7-12日, イタリア.

池上浩司, 政池知子, 西坂崇之, 瀬藤光利. プリズム分光を用いた光学顕微鏡データの三次元化による気管上皮繊毛運動の解析. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013年3月30日, 香川.

紺野在, 服部紗由美, 松田千鶴, 瀬藤光利, 池上浩司. 網膜視細胞の維持におけるチューブリンポリグルタミン酸化レベルの適切な調節の重要性. 第83回日本動物学会, 2012年9月13-15日, 大阪.

池上浩司, 政池知子, 西坂崇之, 瀬藤光利. マウス気管上皮繊毛運動の三次元解析. 第3回繊毛研究会, 2012年6月8日, 東京.

紺野在, 服部紗由美, 松田千鶴, 瀬藤光利, 池上浩司. チューブリンポリグルタミン酸化の適切な制御は網膜光受容体の維持に重要である. 第3回繊毛研究会, 2012年6月8日, 東京.

Konno A, Hattori S, Matsuda C, Setou M, Ikegami K. Proper regulation of tubulin poly-glutamylation is essential for the

maintenance of retinal photoreceptor cells. 第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012 年 5 月 29 日, 神戸.

瀬藤光利, 池上浩司. グルタミン酸化修飾の機能. 第 76 回日本生化学会中部支部会・シンポジウム, 2012 年 5 月 26 日, 岡崎.

Ikegami K, Konno A, Hattori S, Matsuda C, Setou M. Severe ciliopathy-related phenotypes in mice with dysregulation of tubulin polyglutamylation. CILIA2012 Conference, 2012 年 5 月 16-18 日, イギリス.

池上浩司, 服部紗由美, 松田千鶴, 瀬藤光利. 脱ポリグルタミン酸化酵素 CCP1 欠損ミュータントマウスの網膜解析. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012 年 3 月 28 日, 甲府.

紺野在, 服部紗由美, 松田千鶴, 瀬藤光利, 池上浩司. 脱ポリグルタミン酸化酵素 CCP1 欠損マウス網膜における過剰ポリグルタミン酸化と網膜変性. 「修飾シグナル病」第二回公開シンポジウム, 2012 年 1 月 28 日, 東京.

池上浩司, 政池知子, 西坂崇之, 瀬藤光利. 気管上皮繊毛の三次元運動解析～ポリ修飾による運動制御解析に向けて～. 2012 年生体運動合同班会議, 2012 年 1 月 8 日, 茨城.

Ikegami K, Masaike T, Nishizaka T, Setou M. Three-dimensional analysis of airway cilia motility. 2011 Annual Meeting of ASCB, 2011 年 12 月 3 日, アメリカ.

池上浩司, 瀬藤光利. チューブリンポリグルタミン酸化修飾の生理学的意義に関する研究. 第 71 回日本解剖学会中部支部学術集会, 2011 年 10 月 16 日, 名古屋.

池上浩司, 瀬藤光利. アナログ翻訳後修飾酵素群の同定と哺乳類における役割. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 24 日, 京都.

#### 〔図書〕(計 1 件)

池上浩司, 新聞秀一, 瀬藤光利. 羊土社. 実験医学別冊「見つける、量る、可視化する! 質量分析実験ガイド」(杉浦悠毅、末松誠 [編]). 2013. pp.69-80.

#### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hama-med.ac.jp/mt/setou/ja/laboratory/ikegami/>

<http://researchmap.jp/KojiIkegami/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

池上 浩司 (IKEGAMI KOJI)  
浜松医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 20399687

##### (2) 研究分担者: なし

##### (3) 連携研究者: なし

##### (4) 研究協力者

紺野 在 (KONNO ALU)  
日本学術振興会 特別研究員 PD

Vu Thi Hang (VU THI HANG)  
浜松医科大学・技術補佐員

小川 美也 (OGAWA MIYA)  
浜松医科大学・技術補佐員