

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790348
 研究課題名（和文） 明暗順応における視細胞繊毛でのタンパク質輸送機構の解析
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms of protein transport through photoreceptor cilia in light/dark adaptation
 研究代表者
 大森 義裕 (Omori Yoshihiro)
 大阪大学・蛋白質研究所・准教授
 研究者番号：90469651

研究成果の概要（和文）：

明暗順応における視細胞繊毛の蛋白質輸送機構の解析を行った。ゼブラフィッシュ変異体の解析から繊毛蛋白輸送には複数のキネシンが組織ごとに異なるサブセットを用いて機能していることが示された。また、繊毛キナーゼ Mak の遺伝子欠損マウスでは、外顆粒層にトランスデューシンの異常な局在が見られ、Mak がトランスデューシンの輸送に関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

We found that diversity of functional relationships between vertebrate ciliary kinesin motors, and our data shows that the repertoire of kinesin motors changes in some cilia during their differentiation. We also identified ectopic accumulation of transducin in the retinal outer nuclear layer of Mak deficient mice, suggesting the possibility that involvement of Mak in the molecular mechanism of transducin transport through cilia between the photoreceptor outer segments and inner segments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：網膜、視細胞、繊毛、IFT、ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

哺乳類や魚類を含む脊椎動物の視細胞では、外節と呼ばれる細胞器官に光センサー蛋白質であるロドプシンが集積し、光を感知する。暗い場所では、光センサーの感度を上げるために、光シグナル伝達に関与する蛋白質であるトランスデューシンを外節に集積させ、アレスチンを内節に移動させる。明るい場所では、逆にトランスデューシンを内節に移動させ、アレスチンを外節に蓄積することで、過剰な光刺激の入力をコントロールして

いる。このトランスデューシンやアレスチンの移動は、外節と内節を結ぶ細い管である「繊毛」を介して行われる (Trends in Cell Biology 2006,16,560-568)。

繊毛は、微小管を軸とした構造体で、微小管の束9本が繊毛の周りを囲んでいる9+0の構造を持つものと、その中心に2本の微小管の束が存在する9+2の構造を持つものがある。また繊毛は、モーターを持ち運動するタイプとモーターを持たず、運動をしないタイプのものが存在する。

網膜視細胞の繊毛は9+0の構造を持ち、ダ

イニンのモーターを持たない動かない繊毛であり、外節と内節を繋ぐ構造であるため結合繊毛 (connecting cilium) とも呼ばれる。

視細胞における繊毛を介した蛋白質輸送には繊毛内輸送機構 (Intraflagellar transport; IFT) と呼ばれるシステムが関与することが予想されるが、その分子メカニズムの全貌は明らかとなっていない (大森ら、細胞工学 2009,28,10月号,1036-41)。

IFT はべん毛虫をはじめとした単細胞生物からヒトを含めた脊椎動物まで高度に保存されている輸送システムである。繊毛の軸糸は微小管で構成されているが、繊毛内で輸送される蛋白質などの繊毛構成成分は微小管に沿って運ばれる。このとき繊毛の基底部から先端方向の輸送には、キネシンのモーターが用いられ、IFT 複合体 B と呼ばれる蛋白質複合体がキネシンと相互作用し積荷の輸送に必須の役割を果たす。この順行性輸送は、繊毛の先端部で折り返すが、繊毛の先端から基部へ向かう逆行性輸送は、ダイニンのモーターを用いて行われる。この逆行性輸送には IFT 複合体 A が必須であることがわかっているが、IFT とキネシン、ダイニンのモーターを制御する仕組みや積荷の受け渡しの機構は明らかになっていない。

また、正常な繊毛の形成自体にも IFT は必須である。IFT は、チューブリンや繊毛の膜蛋白質を初めとした繊毛の構成成分を輸送しており、繊毛の長さが IFT によって制御されている。IFT は繊毛を介した蛋白質輸送機構に重要であり、本課題では、この IFT による輸送経路を含めた明暗順応における繊毛を介した蛋白質輸送の分子メカニズムの探求を行った。

2. 研究の目的

私達は、これまでにゼブラフィッシュ変異体と遺伝子欠損マウスを用いて脊椎動物の繊毛形成について研究を行ってきた。これまでに、私達は、ゼブラフィッシュの視細胞変性変異体である Elipsa の原因遺伝子が IFT の構成要素であることを明らかにし、IFT が Rab8 と Rabaptin5 を介して相互作用することを見出した (Omori et al., Nature Cell Biology 2008,10,437, 実験医学 2008,26,1744-47)。この研究から、細胞内における小胞輸送と繊毛内輸送を繋ぐメカニズムの一端が明らかとなった。

また、細胞極性に関係する Crumbs が繊毛形成に重要であることを明らかにしてきた

(Current Biology 2006,16,945)。この研究から、繊毛の形成とアピカル側の細胞極性の形成因子との関連が明らかとなった。また、これらの研究から繊毛内における順行性輸送の分子メカニズムの全体像が明らかになりつつある。

私達は視細胞特異的発現を示す機能未知キナーゼである Mak の解析から、Mak 遺伝子欠損マウスが、ヒトの網膜色素変性症に酷似した進行性の視細胞変性を起こすこと発見し、Mak が網膜色素変性症原因遺伝子産物 RP1 をリン酸化し繊毛の長さ調節を行っていることを見出してきた (Omori et al. PNAS 2010, 107, 2267)。Mak に対する抗体を作製し、Mak の局在を調べたところ Mak は視細胞の繊毛に特異的に局在することがわかった。興味深ことに、Mak 遺伝子欠損マウスでは繊毛が過剰に伸長し、IFT88 やキネシンが繊毛内に蓄積することを見出している。Mak の研究から繊毛内における微小管結合タンパク質のリン酸化による制御が繊毛の形成に重要であることが明らかになりつつある。

最近、ヒトにおいて網膜色素変性症患者ゲノム中の MAK 遺伝子に変異が見られることが報告された。遺伝性疾患の発症メカニズム解明という観点からも Mak の機能解析が重要である。

本課題では、ゼブラフィッシュ繊毛変異体や Mak 欠損マウスの解析、Mak と相互作用する蛋白質のプロテオミクス解析を行うことにより明暗順応における繊毛を介した蛋白質輸送や繊毛形成の分子メカニズムを探る。本研究課題を展開することにより、感覚神経系の基礎医学的な知見を得ると共に、神経変性疾患や糖尿病、不妊などの繊毛関連疾患の病因解明に貢献することも期待される。

3. 研究の方法

GFP を視細胞で特異的に発現するゼブラフィッシュ系統を用いて ENU を変異原とする変異体のスクリーニングを行い視細胞の維持にかかわる変異体を同定した。変異体の解析はフォールマウント蛍光免疫染色法により行った。ゼブラフィッシュ胚をパラホルムアルデヒドにより固定を行った。蛍光免疫染色を行った後、低融点アガロースにゼブラフィッシュ胚を包埋し、コンフォーカル顕微鏡で観察を行った。GEP263 変異体の繊毛の観察には、大阪大学超高压電子顕微鏡センターとの共同研究により電子顕微鏡解析を行った。Mak 遺伝子欠損マウスの解析では、Mak 遺伝子欠損マウスを暗所に移動し、暗順応条件にした後、網膜を暗所において摘出し、4%パラホルムアルデヒドを用いて固定を行った。OTC コンパウンドを用いて凍結切片を

作製した。スライドガラスに切片を貼り付け、蛍光免疫染色法を行った。これらのサンプルはレーザーコンフォーカル顕微鏡により観察を行った。プロテオミクス解析は、繊毛形成能をもつ培養細胞 HEK293 に FLAG タグを付加した Mak を発現するベクターをリポフェクション法によりトランスフェクションを行い蛋白質を発現させ、細胞抽出液を抽出し、アフィニティービーズにより蛋白質の精製を行い電気泳動による展開を行った後、質量分析計を用いてペプチド断片の同定を行った。

4. 研究成果

私達は、これまでに、英国シェフィールド大学の Malicki 博士との共同研究で、視細胞維持に重要な遺伝子を探すため、ゼブラフィッシュの変異体スクリーニングを行い、jj203 系統を初めとしたゼブラフィッシュ視細胞欠損変異体を同定してきた。受精後 5 日の網膜において、jj203 系統では杆体視細胞が細胞死を起超す一方で、錐体視細胞は通常どおり生存していた。Kif3c の遺伝子ノックダウン実験により、杆体視細胞の生存には Kif3b が重要であり、錐体視細胞では Kif3b と Kif3c が機能重複した関係にあることが明らかとなった。また、意外なことに、線虫では繊毛輸送に重要な因子である Kif17 は、ゼブラフィッシュの視細胞では必須ではないことがわかった。一連の実験から、脊椎動物の繊毛蛋白質輸送には複数のキネシンが組織ごとに異なるサブセットを用いて機能していることが示された (Zhao, Omori et al., PNAS 2012)。

また、私たちは、ゼブラフィッシュ視細胞脱落変異体である GEP293 の表現型解析を行ってきた。これまでの研究で、GEP263 は繊毛の逆行性輸送複合体 (IFT-A) の構成要素をコードする遺伝子に変異が存在することを見出した。まず、鼻腔上皮の繊毛を電子顕微鏡観察したところ、GEP263 変異体では、鼻腔上皮の繊毛の先端が膨らんだ様子が観察された。この結果は、逆行性輸送が阻害されたために、繊毛局在蛋白などが繊毛の先端に蓄積したことの証明となる。これは、GEP263 視細胞の繊毛において IFT88 が蓄積していたことと一致する結果であった。また、電子顕微鏡観察により、GEP263 では視細胞外節の構造が未発達であることがわかった。

さらに、私達が以前同定した繊毛の長さ調節因子である Mak の遺伝子欠損マウスを用いて、暗順応条件下におけるトランスデューシンの輸送を観察した。野生型マウスの網膜では、明順応条件下では、トランスデューシンは細胞体の存在する外顆粒層に蓄積し、外節に局在するトランスデューシンは顕著に

減少する。野生型マウスを暗所に移し、暗順応条件下に置くと、トランスデューシンは視細胞外節に輸送され、視細胞の細胞体が存在する外顆粒層にはトランスデューシンの局在は著しく減少する。一方、Mak 欠損マウスでは、外節へのトランスデューシンの移動に異常をきたし、外顆粒層の一部の細胞体に明らかなトランスデューシンの局在が見られた。これらの細胞では、Mak の欠損により、トランスデューシンが外節に移動できず、細胞体に蓄積していると考えられる。この結果から、Mak がトランスデューシンの輸送に関与する可能性が示された。Mak は Kif3a や IFT 複合体 B の繊毛への局在に関与することがこれまでの研究から明らかになっており興味を持たれる (Omori et al PNAS2010)。さらに、Mak と相互作用する分子を検索する目的で、繊毛誘導能を持つ培養細胞に発現させ、相互作用する分子のプロテオミクス解析を行った。約 500 個の Mak と相互作用することが予想されるペプチド断片が得られた。これらのペプチド断片の情報は、今後、繊毛内輸送の分子メカニズム解析を行うにあたり繊毛関連蛋白質の同定に有用であると考えられる。これらの研究から網膜色素変性症などの繊毛機能に関係した疾患の診断や治療に繋がる可能性が期待される。

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 7 件)

- ① Omori Y, Arakil F, Chaya T, Kajimura N, Irie S, Terada K, Muranishi Y, Tsujii T, Ueno S, Koyasu T, Tamaki Y, Kondo M, Amano S, Furukawa T, Presynaptic dystroglycan-pikachurin complex regulates the proper synaptic connection between retinal photoreceptor and bipolar cells J Neurosci. 32, 6126-6137. (2012) 査読あり
doi: 10.1523/JNEUROSCI.0322-12.2012.
- ② Zhao C, Omori Y, Brodowska K, Kovach P, Malicki J. Kinesin-2 family in vertebrate ciliogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 109, 2388-2393. (2012) 査読あり
doi: 10.1073/pnas.1116035109
- ③ Mizuhashi K, Kanamoto T, Ito M, Moriishi T, Muranishi Y, Omori Y, Terada K, Tsujii T, Tani A, Komori T, Furukawa T, OBIF, an osteoblast induction factor, plays an essential role for bone formation in association with reduced osteoblastogenesis. Development, Growth and Differentiation. 54, 474-480. (2012) 査読あり

doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01333.x

- ④ 大森義裕. 一枚の写真館-ニューロンに生える繊毛：細胞のアンテナとしての機能.細胞工学. 31, 399. (2012) 査読なし
- ⑤ Omori Y, Katoh K, Sato S, Muranishi Y, Chaya T, Onishi A, Minami T, Fujikado T, Furukawa T. Analysis of transcriptional regulatory pathways of photoreceptor genes by expression profiling of the Otx2-deficient retina. PLoS One. 6, e19685. (2011) 査読あり
doi: 10.1371/journal.pone.0019685
- ⑥ 大森義裕, 古川貴久. 繊毛キナーゼ Mak と微小管結合蛋白質 RP1 による繊毛の長さ調節機構. 細胞工学. 30, 536-537. (2011) 査読なし
- ⑦ 加藤君子, 荒木章之, 大森義裕, 古川貴久. 網膜視細胞の機能構築. 実験医学. 29, 514-520. (2011) 査読なし

[学会発表] (計 5 件)

- ① 大森義裕. ICK is required for ciliogenesis in neural progenitor cells and Hedgehog signaling 日本分子生物学会大会 福岡 (2012 年 12 月 13 日)
- ② Yoshihiro Omori. Photoreceptor degeneration caused by defects of a ciliary kinase. Cilia in development and disease. London, UK. (2012 年 5 月 24 日)
- ③ Yoshihiro Omori. Antagonistic regulation of ciliary length by ciliary kinase Mak and RP1 is required for photoreceptor survival. 北米神経科学会, Washington DC, USA. (2011 年 11 月 13 日)
- ④ 大森義裕. 網膜視細胞における繊毛局在キナーゼ Mak と微小管結合蛋白質 RP1 による繊毛長の制御メカニズム. 日本細胞生物学会大会. 北海道. (2011 年 6 月 19 日)
- ⑤ 大森義裕. A ciliary kinase Mak and a microtubule-associated protein RP1 antagonistically regulate ciliary length in retinal photoreceptor cells. 日本発生生物学会大会. 沖縄. (2011 年 5 月 20 日)

[その他]

ホームページ等

http://www.protein.osaka-u.ac.jp/furukawa_lab/

6. 研究組織

1). 研究代表者

大森 義裕 (OMORI YOSHIHIRO)
大阪大学・蛋白質研究所・准教授
研究者番号：90469651