

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659089

研究課題名(和文) 繊毛特異的カルシウム測定および流入系の確立

研究課題名(英文) Establishment of calcium influx and detection system in the cilia

研究代表者

横山 尚彦 (Yokoyama, Takahiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70191525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：繊毛からカルシウム流入系および検出系作製のため、複数の繊毛局在シグナルをchannel-rhodopsin およびcameleon YC3.6に結合させたコンストラクトを作製した。光刺激によるカルシウム流入を誘導するために、channel-rhodopsinを導入した細胞に蛍光にて光刺激を行ったが、残念ながらカルシウムの流入は認められなかった。Channel-rhodopsinを利用してカルシウム流入をさせるためには、初期のカルシウム流入を増幅する装置が必要と思われる。

研究成果の概要(英文)：To establish a system that can get an influx of calcium and detect calcium in the cilia, we made channel-rhodopsin and cameleon(YC3.6) constructs linked to several cilia localization signals. These signals include Arl13B, Fiblocystin C-terminal and nphp3 N terminal. YC3.6 linked NPHP3 N-terminal and Arl13B with palmitoylation site successfully located to the cilia. Channel-rhodopsin linked to Arl13B also located to the cilia without palmitoylation site, suggesting that membrane protein such as channel-rhodopsin does not require palmitoylation to be localized to the cilia. We gave photo-stimulation to cells introduced channel-rhodopsin. Unfortunately, calcium was not detected in these cells. To get effective calcium influx, an amplifier system may be required.

研究分野：医歯薬学

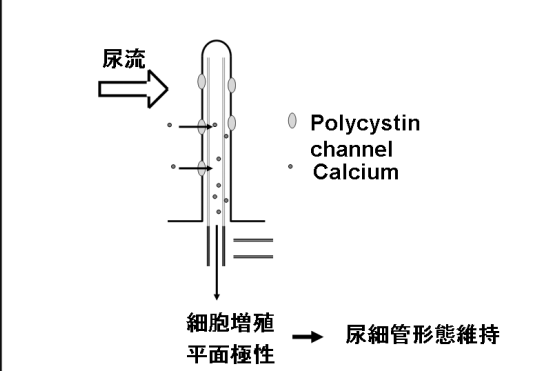
科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：繊毛 カルシウム

1. 研究開始当初の背景

繊毛は細胞より突出した毛状の構造物である。繊毛の機能異常は、嚢胞腎、多指症、肥満、水頭症、内臓逆位など様々な病態を合併することが明らかとなってきた。そして、繊毛および繊毛蛋白の異常によって生じる病態をまとめて ciliopathy 繊毛病といわれる。繊毛機能異常による病態は、繊毛が細胞内シグナル伝達に参与しており、細胞内シグナル伝達に異常が生じることにより引き起こされると想定されている。多発性嚢胞腎では、細胞増殖・平面極性の異常が観察される。常染色体優性多発性嚢胞腎の原因遺伝子産物 polycystin-1, -2 複合体はカルシウムチャンネルであり、polycystin 複合体からのカルシウムにより細胞増殖・平面極性制御され、さらに、尿管管径が保持されていると考えられている(図)。

図① 尿流による尿管形態維持機構(仮説)



しかしながら、繊毛からのカルシウムがどのように細胞増殖・平面極性制御に機能しているか、繊毛特異的にカルシウム流入を制御する系が存在せず、解析ができなかった。

2. 研究の目的

本研究においては、繊毛特異的カルシウム流入による細胞反応を検討するため、繊毛特異的カルシウム流入・測定系の確立を目的とする。そのため、様々な繊毛標的シグナルを用いて、繊毛特異的にカルシウム測定コンストラクトおよびカルシウム流入コンストラクトと作製を目標とした。

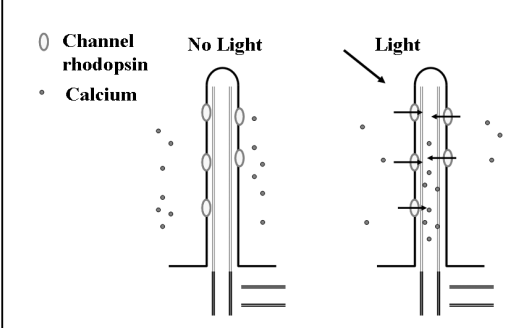
具体的に以下の2項目である。

- 1) Yellow cameleon (YC3.60)を上記繊毛特異的ベクターにより繊毛に発現させる。
- 2) Channel-rhodopsin を繊毛特異的に発現させ、繊毛特異的にカルシウム流入をさせる。

そして、YC3.60 と channel-rhodopsin-2 ベクターを利用して、繊毛からのカルシウム流入を任意に操る系(図)に示すように、光

による繊毛からのカルシウム流入を制御しようとすることを最終的な目的とした。

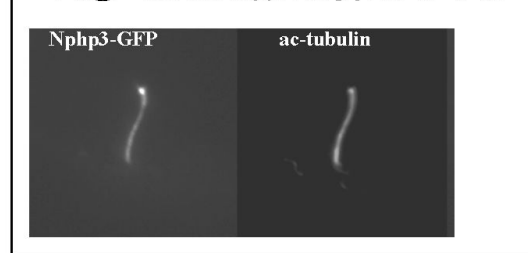
図② Channelrhodopsinを利用した繊毛カルシウム流入システム



3. 研究の方法

繊毛特異的カルシウムチャンネル発現系作成のためには、繊毛特異的蛋白発現ベクターが必要である。我々は、繊毛蛋白の一つである nephrocystin-3 の様々な欠失株を作成し、繊毛局在を決定する領域を探索していた。その結果、そのN端が必要十分であることを見出した。GFP 単独では、細胞質に GFP シグナルは観察されるが、図に示すように、Nphp3 のこのN末 201 アミノ酸領域に GFP を融合させたものを細胞に導入すると繊毛全長に局在することが明らかとなった。この繊毛特異的ベクターを用いてさまざまな蛋白を繊毛特異的に発現させることが可能である。

図③ NPHP3繊毛局在シグナル



繊毛特異的カルシウム流入系の確立のために、channel-rhodopsin を繊毛特異的に発現させるため、Nphp-3 以外に以下の繊毛標的ベクターを試みた。現在、繊毛標的ベクターとして可能性があるシークエンスが判明しているのは、fibrocystin, Arl13B である。fibrocystin C 末は Dr. Yoder より分与された。

(1) 繊毛特異的カルシウム計測系
カルシウム流入系の確立のために cameleon

(YC3.60)に繊毛局在シグナルを結合させたコンストラクトを作製した。

繊毛局在シグナルとしては fibrocystin C 末, Nphp-3 N-末, Arl13B の繊毛標的シグナルを yellow cameleon の N-端もしくは C-端を結合させたコンストラクトを作製し、この融合蛋白が繊毛へ輸送されるか否かについて検討した。

Nphp3 の繊毛局在のためには、第 2 アミノ酸がグリシンであることが必要であることが、我々の研究で明らかになっており、これはミリストイル化が Nphp3 繊毛局在シグナルのため必要なことを示している。そこで、YC3.60 をミリストイル化もしくはパルミトイル化をおこなって繊毛局在に関して検討した。ミリストイル化およびパルミトイル化のためのシグナルは PCR にて増幅をしてコンストラクトに結合させた。

(2) 繊毛カルシウム流入系

上記の繊毛標的シークエンスと channel-rhodopsin と EYFP の融合蛋白を結合させ、実際に channel-rhodopsin と EYFP の融合蛋白が繊毛へ局在するかを検討した。channel-rhodopsin と EYFP の融合蛋白を導入するための細胞として、腎臓尿細管上皮細胞を用いた。

channel-rhodopsin と EYFP の融合蛋白が機能しているかどうかを検討するために、channel-rhodopsin を活性化させるため、光を当ててカルシウム流入を確認する。カルシウム流入は Fura2 を細胞に取り込ませ、channel-rhodopsin を導入した細胞に光を当てることによりカルシウム流入が引き起こされるかどうかを調べた。

導入細胞としては、SV40 にて不死化をさせたマウス尿細管上皮細胞を用いた。導入はジーンジュース (Novagen) を用いた。

4. 研究成果

YC3.6(cameleon)は CFP-YFP が結合したコンストラクトである。融合コンストラクトとしては、以下のコンストラクトを作製した。

YC36-FibroC

YC36-Arl13B
pYC36-hArl13B
mYC36-hArl13B

YC36-nphp3
pYC36-nphp3
mYC36-nphp3

Nphp3-YC36

mouseArl13B-YC36

Ch-Rh-yfp-nphp3
Ch-Rh-yfp-FibroC

nphp3-Ch-Rh-yfrp

(p:palmitoylation, m:myristoylation)

YC3.60 において、N-末に繊毛局在シグナルを結合させた時に繊毛局在を示したのは、N-末に palmitoylation site を結合させた Arl13B (pYC36-hArl13B)および NPHP3-N 末を結合させたコンストラクト(Nphp3-YC36)であった。Palmitoylation の代わりに myristoylation site を結合させたコンストラクト(mYC36-hArl13B)は繊毛局在は認められなかった。

一方、nphp3 繊毛局在シグナルを YC3.60 の N 末に付けた場合はパルミチル化(pYC36-nphp3)、ミリストイル化(mYC36-nphp3)を加えても、繊毛局在は確認出来なかった。また、YC36-FibroC でも繊毛局在は確認出来なかった。

Channel-rhodopsin に関しては、C-末に Arl13B を結合させたコンストラクトは繊毛局在を示した。この時に palmitoylation site は必要でなかった。

Channel-rhodopsin に fibrocystin C 末を結合させたコンストラクト(Ch-Rh-yfp-FibroC)にても繊毛局在を確認出来た。

Channel-rhodopsin は膜貫通蛋白であるのに対して、cameleon は細胞質蛋白である。Arl13B 結合において channel-rhodopsin は繊毛局在を示したのに対して、YC3.60 は palmitoylation site をさらに結合させなければ繊毛への移行を観察出来なかった。palmitoylation 化は結合したパルミチン酸が膜に挿入されると考えられる。従って、繊毛蛋白が繊毛へ行く条件の一つには、膜と相互作用が必要であることが考えられる。しかしながら、同じ膜挿入をもつパルミチル化とミリストイル化でも、palmitoylation site を結合させた Arl13B (pYC36-hArl13B)では繊毛局在を示したのに対して、myristoylation site を結合させたコンストラクト(mYC36-hArl13B)は繊毛局在は認められなかった。これは、パルミチル化とミリストイル化で膜との関係の仕方が異なる事によると考えられる。

光刺激によるカルシウム流入を誘導するために、channel-rhodopsin を導入した細胞に蛍光にて光刺激を行ったが、残念ながらカルシウムの流入は認められなかった。

今後、繊毛へのカルシウム流入系、検出系を機能させるにあたっての問題であるが、Channel-rhodopsin を利用してカルシウム流入をさせるためには、初期のカルシウム流入を増幅する装置が必要と思われる。

また、作製されたコンストラクトを細胞に導入して結果に基づいて、fibrocystin, Nphp-3, Arl13 の繊毛標的シグナルに yellow cameleon を結合させたコンストラクトを導入した細胞を作製し、FRET が機能するか否かを検討する。Yellow cameleon は400~440nm 励起にてCFP からYFP へのエネルギーのトランスファーを確認する必要がある。繊毛局在シグナルを結合させたコンストラクトにおいて FRET が実際におこるかどうかが、また、その効率についての検証が必要となる。

実際に光刺激でカルシウムを増幅して繊毛から流入された系が出来たとしたら、繊毛標的シグナルにより効率的に繊毛へ輸送される channel-rhodopsin と EYFP コンストラクトおよび yellow cameleon コンストラクトが確認されたならば、それらを導入した細胞において、光刺激により繊毛よりカルシウムが流入したかどうかについて検討する必要がある。課題の一つは、光刺激を行ったときのカルシウム流入を YFP にて検出するが、この検出系が YFP の波長であるため、channel-rhodopsin と EYFP 融合蛋白を発現させていると邪魔をする可能性がある。したがって、EYFP にかわり、さらに長波長の蛍光タンパク質を検討する必要性が生じてくる可能性がある。

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4件)

Fukui H, Shiba D, Asakawa K, Kawakami K, Yokoyama T. The ciliary protein Nek8/Nphp9 acts downstream of Inv/Nphp2 during pronephros morphogenesis and left-right establishment in zebrafish. FEBS Lett. 査読あり 2012 Jul 30;586(16):2273-9.

Adachi T, Sugiyama N, Gondai T, Yagita H, Yokoyama T. Blockade of Death Ligand TRAIL Inhibits Renal Ischemia Reperfusion Injury. Acta Histochem Cytodhem 査読あり 2013 161-170

小林大介, 横山尚彦 繊毛は身体の「右と左」を決める: 京都府立医科大学雑誌 査読なし 2013. 6 371-375.

茂田昌樹、横山尚彦 繊毛運動を制御する分子メカニズム The Lung perspective 秋季号 査読なし 57-60

[学会発表](計4件)

Shiba D, Nakata K, Fukui H, Kobayashi D and Yokoyama T. A three step process of Nphp3 ciliary localization. CILIA2012 1st International Science Conference 2013.5.16-18 London

横山尚彦 繊毛病としての嚢胞性腎疾患 第21回嚢胞性腎疾患研究会(招待講演) 2013.9.21 杏林大学

横山尚彦 繊毛/繊毛蛋白異常と嚢胞性腎疾患 第119回解剖学会総会(解剖学会/生理学会合同シンポジウム) 2014.3-27-29 自治医科大学

辻琢磨、横山尚彦 一次繊毛の微細構造と繊毛病の関係 第119回解剖学会総会 2014.3-27-29 自治医科大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

横山 尚彦 (YOKOYAMA takahiko)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70191525

(2)研究分担者

なし()

研究者番号:

(3)連携研究者

芝 大 (SHIBA dai)
独立行政法人・宇宙航空研究開発機構有人宇宙ミッション本部・宇宙環境利用センター・主任研究員
研究者番号: 50360722