

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08215

研究課題名(和文) 嚢胞腎発症を制御する一次繊毛からのシグナル経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of signal pathways from primary cilia that control cystic kidney disease

研究代表者

中島 由郎 (Nakajima, Yoshiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30455430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ネフロン癆の責任遺伝子産物(NPHP)は、主に細胞内小器官である一次繊毛に局在する。一次繊毛が発信するシグナルは、最終的に細胞増殖、細胞極性、細胞分化などを制御すると考えられている。本研究では、繊毛からのシグナル伝達に関わると考えられる分子群の解析を行い、その結果、NPHP16であるANKS6が一次繊毛INVコンパートメント以外にルートレットに蓄積していることを明らかにした。さらに嚢胞腎関連タンパク質であるBICC1やANKS3もルートレットに局在が確認され、これらがANKS6とともに巨大な複合体を形成して腎臓の形態維持に関与していることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嚢胞腎関連遺伝子であるANKS6, BICC1, ANKS3の局在、結合能などを詳細に解析した結果、BICC1-ANKS3-ANKS6は一次繊毛ルートレットに局在し、巨大な複合体を形成していることを明らかにした。その結果、これまで数多く報告されてきたが未解明な点が多かった嚢胞腎関連遺伝子間の相互作用の理解に貢献できたと思う。

研究成果の概要(英文)：The nephronophthisis protein (NPHP) is mainly localized to the primary cilia, which are intracellular organelles. Signals transmitted by primary cilia are thought to regulate cell proliferation, cell polarity, cell differentiation, and so on. In this study, we analyzed a molecular complex thought to be involved in signal transduction from cilia. As a result, it was revealed that ANKS6, which is NPHP16, is accumulated in the ciliary rootlet in addition to the primary cilia INV compartment. Furthermore, BICC1 and ANKS3, which are cystic kidney-related proteins, were also confirmed to be localized in the rootlet, suggesting that they form a large complex with ANKS6 and are involved in the maintenance of renal morphology.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ネフロン癆 一次繊毛 NPHP ANKS6(NPHP16) BICC1 ANKS3 ルートレット

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一次繊毛は、細胞表面から突出した細胞内小器官であり、一次繊毛の欠失や機能異常は、嚢胞性腎疾患、内臓逆位、網膜色素変性、多指症など多様な病態を呈し、近年これらは繊毛病 (Ciliopathy) と呼ばれている。嚢胞腎をはじめこれらの病態には、細胞増殖、細胞極性、細胞分化などの異常がみられる。よって一次繊毛の欠失や機能異常が細胞増殖、細胞極性、細胞分化の破綻をひき起こすことによって病態につながると考えられる。しかし、細胞増殖、細胞極性、細胞分化に関わる因子は主に核や細胞質に局在することから、これらを制御するために一次繊毛から細胞質や核へシグナルが発信されていると推測される。

嚢胞腎を伴うネフロン癆に着目し、ネフロン癆モデルマウスの作製、解析を行ってきた。一次繊毛の基部に位置する Inv コンパートメント)には、いままでのところ 20 種類あるネフロン癆責任遺伝子産物 (NPHP) のうち 4 種類 (INV/NPHP2、NPHP3、NEK8/NPHP9 および ANKS6/NPHP16) の局在が確認されている。申請者は、NPHP 間の相互作用を解析し、Inv コンパートメントが一次繊毛における情報発信の場である可能性を示唆した。よって一次繊毛の下流に存在するシグナル経路を明らかにすることがネフロン癆の発症機序の解明につながるという研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

一次繊毛の Inv コンパートメントでは、ANKS6 が NEK8 によってリン酸化され、細胞質に移行すると想定される。しかし、ネフロン癆モデルマウスでは ANKS6 のリン酸化が阻害される。また ANKS6 の結合タンパク質である BICC1 は細胞質の Processing body (P-body) に局在し、Biccl の欠損や変異は NPHP と同様の病態を示す。従って ANKS6 は一次繊毛と P-body とを結ぶ重要なシグナルメディエーターであると同時にネフロン癆の発症に関与している可能性が高い。そこで、下記の仮説を検証することを本研究の目的とした。

仮説1. ANKS6が一次繊毛から細胞質のP-bodyに移行している

ANKS6 は一次繊毛 Inv コンパートメントだけでなく RNA の分解・保存に関わる細胞質顆粒である P-body に局在することを申請者は明らかにした。さらに ANKS6 の結合タンパク質 BICC1 は P-body に局在するが、一次繊毛には局在が認められていない。よって ANKS6 が一次繊毛から細胞質の P-body に移行している可能性があり、これを検証する。

仮説2. ANKS6のリン酸化状態がP-bodyの形成およびBICC1の機能に影響を与える

BICC1はRNA結合タンパク質で、そのRNA抑制機能によってcAMP経路を抑制しており、Bicclの変異はcAMPの産生が亢進するために嚢胞腎を悪化させると考えられている。ネフロン癆モデルマウスの腎臓ではANKS6のリン酸化が抑制されることを申請者は見出した (Nakajima et al., Kidney Int. 2018)。よってANKS6と嚢胞形成の関連性を探るために、ANKS6のリン酸化状態がP-body の形成およびBICC1との相互作用に影響を及ぼすかどうかを検証する。

一次繊毛と P-body との関連性は国内外を含めて現在まで報告がなく、上記の仮説が立証できれば一次繊毛が P-body を介して RNA 分解制御を行っているという新しい概念の確立につながると期待される。

### 3. 研究の方法

上記の仮説を証明するために ANKS6 の細胞内動態を検出できる *in vitro* の系の構築を検討した。使用した細胞はすでに樹立されているマウス近位尿細管上皮細胞株を用いた。

ANKS6-BICC1-ANKS3 の複合体解析

共焦点顕微鏡または超解像顕微鏡を使用して各タンパク質の詳細な細胞内局在を解析した。複合体解析では、マウス腎臓組織のタンパク質抽出液をショ糖勾配遠心法によって分画し、そこからウェスタンブロット法や免疫沈降法を行った。

### 4. 研究成果

ANKS6 の細胞内動態を解析するために Kikume Green-Red を利用したラベリング法の構築を行った。これは紫外光を照射することで緑から赤に蛍光を変化させることができる Kikume Green-Red を利用したもので、繊毛に紫外線を照射することで、繊毛に局在すると想定される ANKS6-Kikume Green-Red の蛍光を変化させることで ANKS6 の繊毛外への移行を追跡するシステムである。

まず ANKS6 の N 末端に Kikume Green-Red を連結させたコンストラクトを構築し、これを尿細管上皮細胞株に導入した。しかし、Kikume Green-Red-ANKS6A を発現する安定発現株を得ることができなかった。これは ANKS6 の過剰発現が尿細管上皮細胞株に対して毒性を示してしまったためであった。このように本研究の目的のひとつであった ANKS6 の細胞内動態の解析は今後の課題となった。

一方、ANKS6 にはいくつかの結合因子が報告されている。ANKS6 は C 末端にタンパク質間相互作用に関わる SAM ドメインを C 末端に有し、同じく SAM ドメインを持ち、囊胞腎関連遺伝子産物である BICC1 と ANKS3 は ANKS6 との結合が *in vitro* 実験で確認されている。ANKS6 と異なり、BICC1 と ANKS3 は繊毛局在が明らかになっていなかったことから、これらの細胞内局在を詳細に観察した。

その結果、マウス腎臓では BICC1 と ANKS3 の繊維状のシグナルが細胞内に観察された。このシグナルを一次繊毛及びルーレットとの共局在を調べた結果、BICC1 と ANKS3 はルーレットの構成タンパク質であるルーレットインとマージする像が得られた (図 1A)。

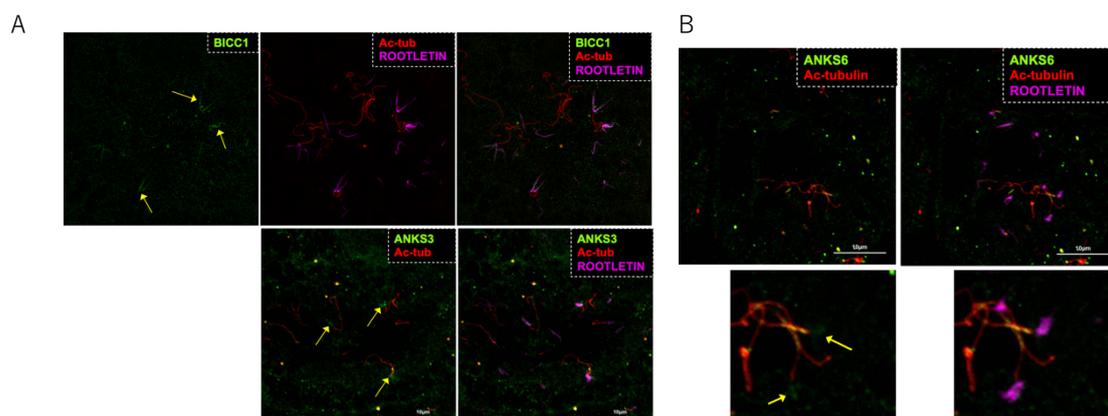


図 1 BICC1、ANKS3、ANKS6 は一次繊毛ルーレットに局在する。Acetylated alpha tubulin (Ac-tub)。

同様に ANKS6 もこれまでに報告されてきた一次繊毛 Inv コンパートメントにおける強いシグナルだけでなくルーレットインとマージする弱いシグナルが得られた (図 1B)。これらの結果から、ANKS6 をはじめ BICC1、ANKS3 は繊毛ルーレットに局在し、複合体を形成していることが示唆された。

次に BICC1-ANKS3-ANKS6 複合体をショ糖密度勾配遠心法によって解析した。マウス腎臓の組織抽出液をショ糖密度勾配遠心法によって分画し、各画分をサンプルとしてウエスタンブロット法を行った。BICC1、ANKS3、ANKS6 は低分子画分から高分子画分まで幅広く存在しており、リボソーム画分よりも巨大な複合体を形成していることが示唆された (図 2)。

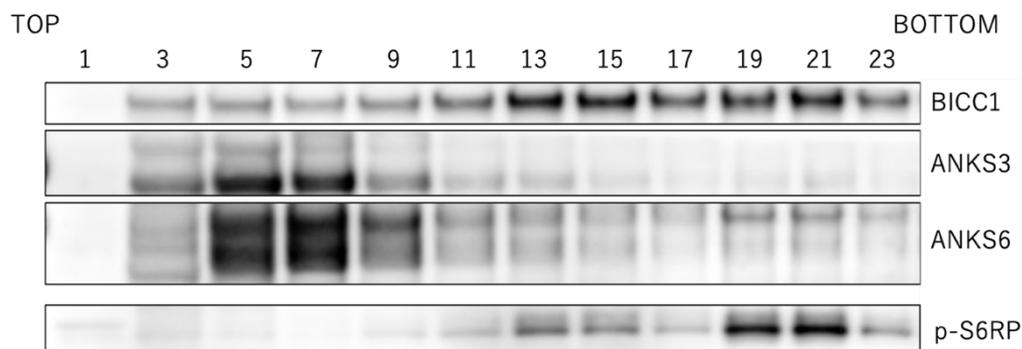


図2. BICC1、ANKS3、ANKS6は低分子から高分子の画分に広く存在する。  
p-S6RP(phosphorylated S6 ribosomal protein)

さらに複合体をショ糖密度勾配遠心法と免疫沈降法によって解析した。BICC1 抗体を用いた免疫沈降ではルーレットインとの結合が認められた (図 3)。

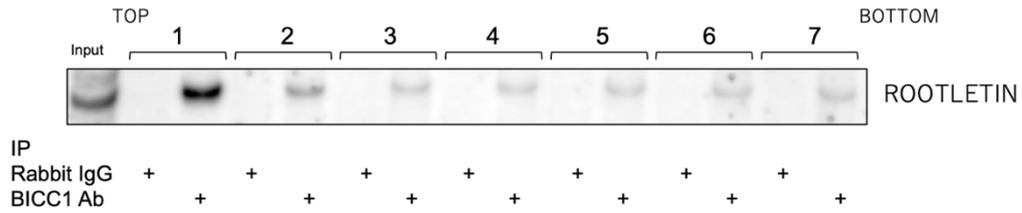


図3. BICC1はROOTLETINと結合する。1は 超遠心後のfraction No.3-5を混合したもの。同様に2はNo. 6-8、3はNo. 9-11、4はNo. 12-14、5はNo. 15-17、6はNo. 18-20、7はNo. 21-23を混合して免疫沈降に使用。

ANKS3 抗体、ANKS6 抗体を用いて免疫沈降を行うと低分子側では ANKS6 と ANKS3 との結合は認められたが、ANKS6 及び ANKS3 と BICC1 とのクリアな結合は観察できなかった(図 4)。一方、高分子側では ANKS3 及び ANKS6 は BICC1 との結合が確認された(図 4)。

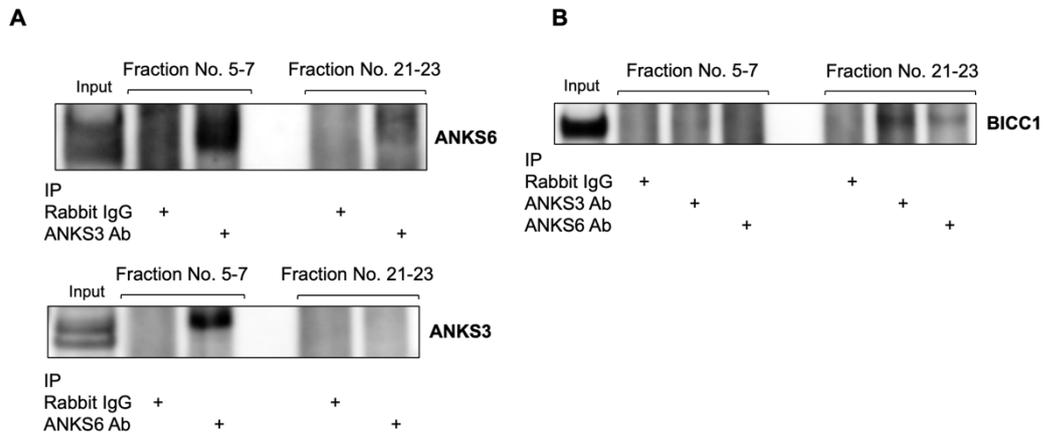


図4. 低分子側(No.5-7)ではANKS3とANKS6の結合が強く観察された(A)。 BICC1、ANKS3、ANKS6は高分子側(No.21-23)で複合体を形成する(B)。

以上の結果から、これまで *in vivo* での複合体形成が明らかにされていなかった BICC1-ANKS3-ANKS6 複合体を検出することができた。今後、BICC1-ANKS3-ANKS6 複合体にはルートレティン以外にどのような因子が含まれているのか網羅的な解析を準備している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 1. 中島由郎, 松尾一彦, 八代健太
2. 発表標題 多発性嚢胞腎タンパク質BICC1の機能解析
3. 学会等名 日本解剖学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島由郎
2. 発表標題 Identification of BICC1-ANKS3-ANKS6 complexes ciliary localization
3. 学会等名 日本解剖学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------