

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15983

研究課題名（和文）基底小体を介するシグナル伝達の異常により惹起される嚢胞腎形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of renal cyst formation induced by abnormal signaling through basal body

研究代表者

松尾 和彦（MATSUO, KAZUHIKO）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：70599753

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）：一次繊毛の異常により惹起される腎嚢胞形成の分子機構は不明である。本研究では、一次繊毛基部（一次繊毛の外）に局在するkendrinnの遺伝子発現抑制により、嚢胞腎が形成される分子機構を明らかにするために研究をおこなった。申請者は、一次線毛内のINV-Cに局在するいくつかのタンパク質とkendrinnの相互作用を明らかにした。また、kendrinnの結合タンパク質の解析から新規の繊毛タンパク質を同定した。さらに、kendrinnの遺伝子破壊により、繊毛内タンパク質の局在が異常になる事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、一次繊毛外（基底小体）に局在するkendrinnが、一次線毛内のタンパク質の局在に寄与することで一次繊毛を介したシグナル伝達を調整している可能性が強く示唆される結果を得た。これは、嚢胞腎形成メカニズム解明へのマイルストーンとして意義深いと考えられる。悪化した腎機能を回復させることは困難であるが、本研究の成果をもとに嚢胞腎形成のメカニズム解明が進めば、病態の進行を防ぎ腎機能を悪化させない予防薬の開発や、新規治療薬の開発の一助となる事が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanism of renal cyst formation induced by abnormalities in primary cilia is unknown. This study was conducted to elucidate the molecular mechanism by which cystic kidneys are formed by suppression of gene expression of kendrinn, which is localized at the base of primary cilia (outside of primary cilia). The applicant has clarified the interaction of kendrinn with proteins localized to INV-C in the primary cilia. Analysis of kendrinn interaction proteins identified a novel ciliary protein. Furthermore, we found that genetic disruption of kendrinn causes abnormal localization of the protein in the primary cilia.

研究分野：細胞生物学

キーワード：中心小体 一次繊毛

1. 研究開始当初の背景

一次繊毛は細胞周期のG0期において細胞膜近傍に移動した中心小体(基底小体)を基に形成されることが知られている。一次繊毛内に局在する蛋白質の機能異常は、網膜変性や内臓逆位、多指症、水頭症、肥満などの全身性の症状を呈する遺伝性疾患である「繊毛病」として知られており、腎臓では多くの場合、嚢胞が形成される。ネフロン癆(NPHP)も繊毛病の1つであり、間質の線維化を伴う腎髄質に嚢胞が形成され、患者の多くは思春期までに末期腎不全に至る。

本研究に先立って、細胞周期を通して中心小体に局在するタンパク質 kendrin のノックアウトマウスが、嚢胞腎、内臓逆位、口蓋裂、多指症、心臓発生異常などの繊毛病の症状を示し胎生致死となることが報告された [Chen C.T., et al., Curr. Biol., 2014] つまり、一次繊毛内に局在しない kendrin の異常が繊毛病様の表現型を示していた。しかし、先行論文では心臓発生異常にのみ着目し、腎臓の表現型に関しては詳細な解析は行われていない。また、申請者は、樹立した kendrin-KO 細胞を用いて一次繊毛形成を誘導したところ、kendrin-KO 細胞では一次繊毛形成率が有意に減少する事を見出した。しかしながら、依然として 50%近い kendrin-KO 細胞で一次繊毛が形成されていた。また、kendrin-KO 細胞において一次線毛内のコンパートメントである INV コンパートメント (INV-C) に局在する NPHP 原因遺伝子産物 Nphp3 や Nphp16 の局在が減少している事が分かった。

上記より、一次繊毛外にある基底小体に局在する kendrin が、一次繊毛内におけるタンパク質の局在を制御する未知のメカニズムが存在するという可能性が考えられた。

2. 研究の目的

一次繊毛の異常により惹起される繊毛病は多様な病態を示す。嚢胞腎もその1つであるが、その分子病態機構は不明である。本研究は、kendrin 遺伝子破壊細胞株を用いて一次繊毛外に局在するタンパク質が、一次繊毛内のタンパク質局在を制御する新規のメカニズムがあるという仮説を基に、嚢胞腎形成の分子機構を明らかにする事を目的としている。特に、基底小体に局在する kendrin が一次繊毛内の INV-C に局在するタンパク質と如何に連関するのかを明らかにしたいと考えている。

3. 研究の方法

当初の研究計画では、下記3つの解析手法により研究目的を達成する予定であった。

Kendrin が INV-C タンパク質群と相互作用する可能性について検討。

➤ 免疫沈降法を使った NPHP 原因遺伝子産物との kendrin の相互作用の解析。

局所ビオチン標識法を用いた一次繊毛内タンパク質の解析。

➤ 野生型、または kendrin-KO 細胞において Cilia-BirA を用いた一次繊毛タンパク質のビオチン標識化による解析をおこなう予定から、高活性型ビオチンリガーゼ (TurboID) を kendrin と融合させた TurboID-kendrin を細胞内に発現させ一次繊毛に局在する kendrin 結合タンパク質の同定に変更した。

透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた kendrin-KO 細胞の一次繊毛の構造観察。

4. 研究成果

申請者は、kendrin の遺伝子破壊細胞を樹立し、一次繊毛内の特定 NPHP 原因遺伝子産物が局在する領域である INV-C において、この領域に特異的に集積する事が報告されているタンパク質 (Nphp3, Nphp16) の局在異常を見出した (図1)。そこで、kendrin が INV-C に局在するタンパク質と相互作用するかを免疫沈降法により解析をおこなったところ、このうちのいくつかのタンパク質と相互作用している可能性が考えられた (研究方法)。申請者は、当初 INV-C タンパク質の局在化に関与している可能性があるタンパク質リン酸化酵素 Nphp9/Nek8 が kendrin と相互作用し、他の INV-C タンパク質の局在化の制御に関与する可能性について検討した。しかし、Nphp9/Nek8 と kendrin との相互作用を見出すことはできなかった。

研究方法 に関して、一次繊毛局在型ビオチンリガーゼ (Cilia-

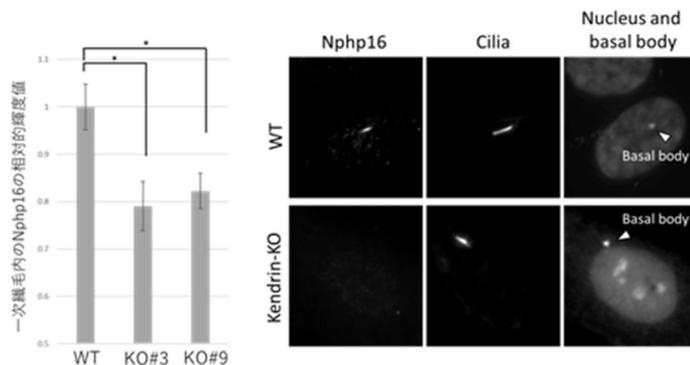


図1 kendrin-KOによりINV-Cタンパク質Nphp16の局在が減少する。

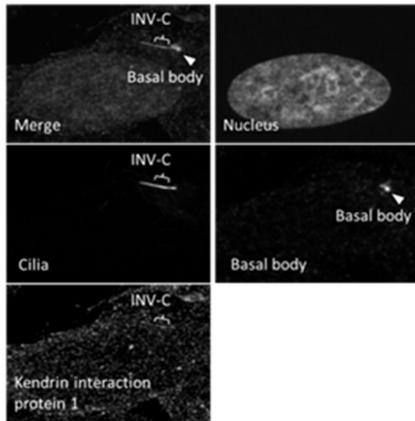


図2 新規kendrin結合タンパク質は一次線毛内に局在する。

TurboID-kendrin は中心小体に局在し、この周辺のタンパク質をビオチン化する事が、免疫蛍光染色より明らかになった。さらに、ビオチン化されたタンパク質の質量分析の結果、これまで一次線毛への局在が報告されていないタンパク質が kendrin の結合タンパク質として同定された(図2)。また、免疫蛍光染色をおこない、これらのうち数種類が一次線毛内に局在していることがわかった。現在は、これらのタンパク質が一次線毛形成や、一次線毛を介するシグナル伝達へ関与するのかなどを検討している。

研究方法 に関して、本研究をおこなっている最中に、TEM に設置されている CCD カメラが故障してしまった。そこで、フィルムで kendrin-KO における中心小体の構造観察をおこなったが、野生型と比較して明瞭な差異は見いだせなかった。現在は、中心小体を構成する様々な分子に関して免疫蛍光染色をおこない、超解像顕微鏡 (LSM900 Airyscan2) をもちいて構造異常があるか解析をおこなっている。

以上より、一次線毛外(基底小体)に局在する kendrin が、一次線毛内のタンパク質の局在に寄与することで一次線毛を介したシグナル伝達を調整している可能性が強く示唆される結果を得た(図3)。コロナ禍での緊急事態宣言やオンライン講義の準備などによる教育エフォートの増加、また開始当初に予期できなかったトラブルなどにより、本研究課題は研究の遂行が遅れてしまった。しかしながら、当初の研究計画で明らかにしたいと考えていた「基底小体に局在する kendrin が、一次線毛内のタンパク質の局在を制御する」新規の分子機構解明に迫るデータを得る事ができたことは、嚢胞腎形成メカニズム解明へのマイルストーンとして意義深いと考えられる。嚢胞腎形成のメカニズムは未だ詳細が不明であるが、本研究で得られた知見をもとに、この分子機構を一端が明らかにできるように引き続き研究をおこないたいと考えている。

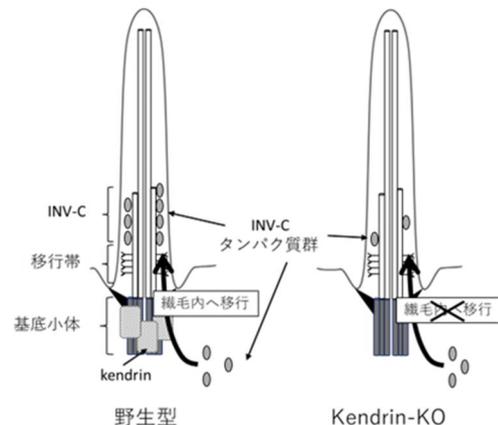


図3 kendrinによるINV-Cタンパク質の局在化制御

BirA(R118G)) により一次線毛タンパク質のビオチン標識化をおこない、野生型と kendrin 遺伝子破壊をおこなった細胞間で線毛内局在タンパク質の違いを解析する予定であった。しかしながら、Cilia-BirA(R118G) の発現プラスミド DNA を細胞に遺伝子導入したところ、Cilia-BirA(R118G) が一次線毛だけでなく細胞質にも局在する事がわかった。この状態では、一次線毛内のタンパク質だけでなく細胞質に局在する多くのタンパク質がビオチンラベルされる可能性があり、当初通りの研究計画を実行する事は出来ないと判断した。次に、Cilia-BirA(R118G) を用いた一次線毛タンパク質のビオチン化標識法の代替案として、kendrin にビオチンリガーゼを融合したタンパク質を発現させ、kendrin と相互作用する一次線毛タンパク質に関して検討をおこなった。ビオチンリガーゼに関しては、BirA(R118G) よりも活性が非常に高い TurboID を使用した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koki Ikemoto, Kosuke Hashimoto, Yoshinori Harada, Yasuaki Kumamoto, Michiyo Hayakawa, Kentaro Mochizuki, Kazuhiko Matsuo, Kenta Yashiro, Hitoshi Yaku, Tetsuro Takamatsu, Hideo Tanaka	4. 巻 51
2. 論文標題 Raman Spectroscopic Assessment of Myocardial Viability in Langendorff-Perfused Ischemic Rat Hearts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 65-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.21-00016	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 -

1. 著者名 Puppulin Leonardo, Hosogi Shigekuni, Sun Hongxin, Matsuo Kazuhiko, Inui Toshio, Kumamoto Yasuaki, Suzaki Toshinobu, Tanaka Hideo, Marunaka Yoshinori	4. 巻 9
2. 論文標題 Bioconjugation strategy for cell surface labelling with gold nanostructures designed for highly localized pH measurement	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07726-5	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松尾和彦 八代健太
2. 発表標題 一次繊毛タンパク質CEP290/NPHP6は、細胞運動と接着を制御する
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2018年～2019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
---------	---------