

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790154

研究課題名 (和文) 一次繊毛局在シグナル配列の同定

研究課題名 (英文) Identification of primary cilia localization signal

研究代表者

芝 大 (SHIBA DAI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：50360722

研究成果の概要：

一次繊毛は細胞表面から突出する細胞内小器官であるが、そこには 650 種以上もの蛋白が局在する。Inv は内臓逆位とともに嚢胞腎を発症する *inv* マウスの責任遺伝子産物である。人においては、2 型若年性ネフロン癆 (NPHP2) の原因遺伝子でもある。我々は、Inv がこれまで見出されていなかった一次繊毛基部領域に局在することを発見し、この領域を「Inv コンパートメント」と名づけた。また、Inv の一次繊毛局在は蛋白内部のアミノ酸領域 (C 末端側 60 アミノ酸) により制御されていることを明らかにした。この領域と相互作用する蛋白が一次繊毛への蛋白輸送を担っていると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

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：シグナル伝達、細胞・組織、一次繊毛、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

inv (inversion of embryonic turning) マウスは内臓逆位とともに嚢胞腎を発症する変異体として我々の研究室で作出し原因遺伝子を同定したマウスである (Yokoyama T *Science*, 1993, Mochizuki T *Nature*, 1998)。Inv タンパク質 (Inv) は一次繊毛基部に局在するが、その局在制御は未解明である。Inv と結合するタンパク質は Calmodulin, Dishevelled,

APC2 を初め数多く報告されているが、Inv の一次繊毛局在を制御する因子は同定されていない。

平成 17 ～ 18 年度若手研究 B (解剖学) 採択研究において、高解像度で腎尿細管上皮細胞の一次繊毛観察を行い、*inv* マウス一次繊毛のメカノセンサー機能を解析していた (Shiba D *Cell Struct. Funct.*, 2005)。研究開始当初には既に、この一次繊毛観察技術と下表 1 に示す本研究を実施するのに必要なマウ

ス細胞株および種々の *Inv*-GFP 発現ベクターを利用し、繊毛への蛋白質局在化に必須なアミノ酸領域を同定できる状態にあった。

表1. 研究当初の準備状況

マウス	<i>inv</i> マウス : 内臓逆位と嚢胞腎を併発 (国内外 3-4 研究室のみ保有)
	<i>inv</i> マウスに <i>Inv</i> -GFP 遺伝子を導入し、表現型が回復したレスキューマウス
樹立細胞株	<i>inv</i> マウス由来腎尿管上皮細胞 (5 クローン)
	<i>Inv</i> -GFP レスキューマウス由来腎尿管上皮細胞 (4 クローン)
	野生型マウス由来腎尿管上皮細胞 (対照実験用: 5 クローン)
発現ベクター	全長および部分配列 <i>Inv</i> -GFP

2. 研究の目的

細胞には細胞表面から突き出した一次繊毛という細胞内小器官が存在する。近年、一次繊毛が発生初期の左右非対称性を決定するためのノード流を生成することや、腎尿管における尿流れを感知するメカノセンサーとして機能することが報告され、一次繊毛は組織や細胞ごとに多様な役割を果たすことが明らかとなった (Hirokawa *N Cell*, 2006 / Singla *V Science*, 2006)。一次繊毛には 250 種以上のタンパク質の存在が報告されており、一次繊毛の多様な機能は、一次繊毛に局在するタンパク質の違いにより規定されると考えられる。

具体的な未解明課題として、以下の 3 点がある。

1. どのような局在タンパク質が一次繊毛機能を規定しているのか?
2. どのようにそれらのタンパク質局在が制御されているのか?
3. 局在制御機構は細胞種によって異なるのか?

本研究では、まず一次繊毛内へのタンパク質局在シグナルを同定することにより、一次繊

毛に多様な機能をもたらすメカニズムの解明への足がかりを構築する。

3. 研究の方法

繊毛への蛋白質局在化に必須なアミノ酸領域を同定するために、種々の *Inv*-GFP 発現ベクター (*Inv* の一部領域のみを有する遺伝子コンストラクトかもしくは一部領域を欠失している遺伝子コンストラクト) をマウス腎尿管細胞にトランスフェクションし GFP 蛍光が繊毛に存在するかないかを蛍光顕微鏡下で観察した。

種々の *Inv* 遺伝子コンストラクトは全長 *Inv* 遺伝子を鋳型にして PCR 法を用いて作成した。繊毛の可視化は抗アセチル化チューブリン抗体を用いた。

細胞写真はオリンパス社製 IX71 顕微鏡に CCD カメラを接続し MetaMorph により取得した。繊毛の直径が 0.25 μ m であるため、解像度の高い CCD カメラ (QE) 選択した。

繊毛局在化に必須なアミノ酸領域を同定した後は、データベースを用いてそのアミノ酸配列に相同な蛋白質を検索した。

4. 研究成果

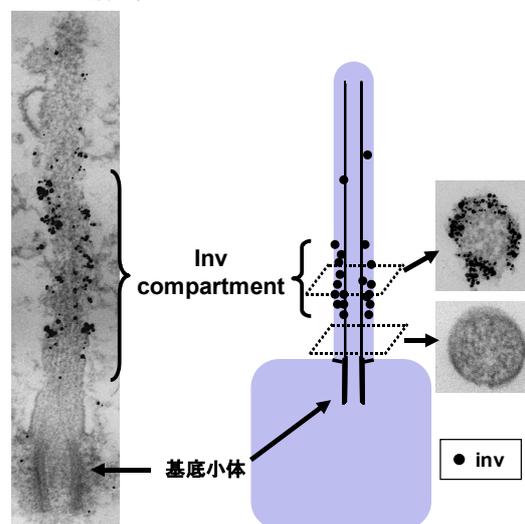


図1. 一次繊毛の免疫電子顕微鏡写真 *inv* 蛋白質は繊毛基部に局在する。

① *Inv* の繊毛内局在解析

GFP 融合 *Inv* 蛋白や抗 *Inv* 抗体を作成・利用し、*Inv* 蛋白質が繊毛基部に局在することを明らかにした (図 1)。これまで、繊毛構造は tip、body (shaft)、ciliary necklace、transitional zone、basal body に分けられることは知られていた。body (shaft) は一様な構造であると信じられており、電子顕微鏡レベルの観察で何らかの構造が存在するという報告はない。繊毛 body (shaft) 内に *Inv* のような分子の偏りが存在することを見出したのは初めての発見である。そこで我々は、*Inv* 蛋白

質が局在する繊毛基部領域を「Inv compartment」と名付けた

② 繊毛基部局在を制御する領域の絞込

種々の GFP 融合 Inv コンストラクトの繊毛内局在を下図 2 に示す。全長 Inv (1-1062) は観察した細胞すべてにおいて繊毛基部に局在した (N=101)。しかし、前半部 2/3 の遺伝子コンストラクト Inv (1-743) は繊毛局在能が弱く、観察した細胞の中で 27.2% (N=66) のみが繊毛に局在した。このとき、繊毛内局在は基部のみではなく全長に行き渡っていた。興味深いことに C 末端側コンストラクトである Inv (742-1062) は繊毛基部に強く局在した。以上の結果は、Inv の繊毛局在シグナルは Inv 分子内の少なくとも 2 つの領域に存在し、C 末端側に存在するシグナルは繊毛基部への局在を制御するものであることが強く示唆された。

そこで、Inv の C 末端側領域において一部欠失した遺伝子コンストラクトを作成し、どの領域が基部領域に必要であるかを解析した。作成した遺伝子コンストラクトは Inv (1-1062: ΔIQ2)、Inv (1-1062: ΔBR)、Inv (1-1002) である。このうち、Inv (1-1062: ΔIQ2) と Inv (1-1062: ΔBR) は繊毛基部に局在した。Inv (1-1002) は繊毛に局在したが、繊毛内局在は基部のみではなく全長に行き渡っていた。このことは Inv の C 末端 60 アミノ酸が繊毛基部局在に必須であることを示している。

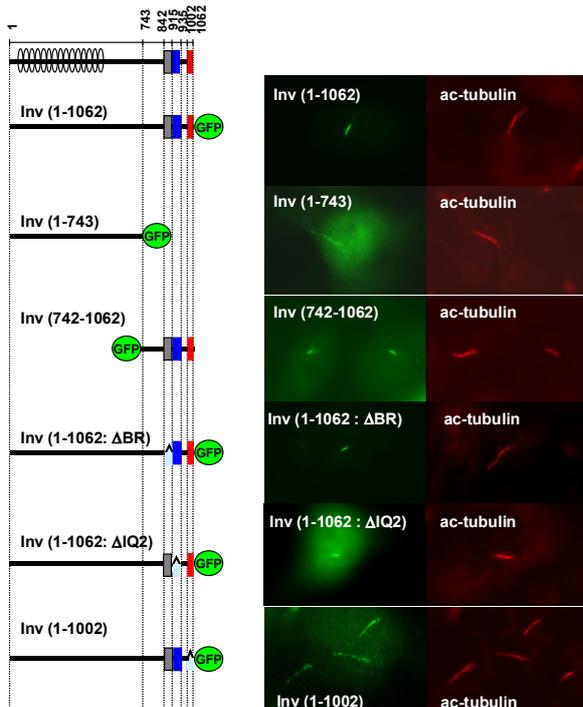


図2. 種々の Inv コンストラクトの繊毛内局在

③ C 末端 60 アミノ酸の相同蛋白の検索

データベースを利用し、C 末端 60 アミノ酸と相同性の高い蛋白質を検索したところ、母型中心小体に局在する Ninein が見出された (図 3)。そこで、Ninein の相同領域を PCR 法を用いてクローニングし細胞内局在を検証した。

興味深いことに、Inv(1001-1062) におよび Ninein(1875-2035) は母型・娘型中心小体の両方に局在した。この結果は、Inv(1001-1062) と相互作用する蛋白質は、相互作用蛋白を中心体へ運ぶ能力があることを示唆している。繊毛内で中心体側へ Inv 蛋白を輸送する蛋白が存在する可能性が考えられる。

		Amino acid	
Inv	Ninein	Mouse	SLERGLLETIH-LENEGLKKK 1921-1939
		Rat	SLERELETIH-LENEGLKKK 1936-1944
		Human	SLEQELETIH-LENEGLKKK 1937-1955
	Inv	Mouse	SVN-SLQSIH-LDNSGRSCK 1028-1045
		Rat	SVN-SLQSIH-LDSSGRSCK 1021-1038
		Human	SVS-NLQCIHLLENSGRSKN 1030-1048

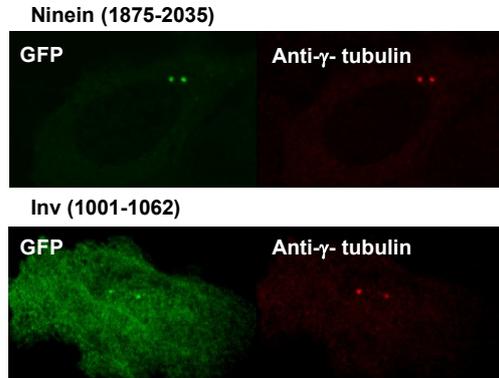


図3. Inv C末端の相同蛋白および細胞内局在

④ 繊毛基部での Inv 蛋白動態

繊毛基部領域で、Inv がどのような挙動を示すか FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) 法により解析した。図 4 に示すように、Inv は繊毛内で動的であった。

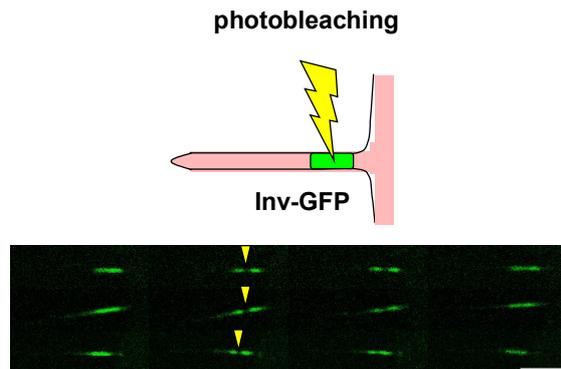


図4. Inv は繊毛基部で動的である

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 3 件)

① Shiba D, Yamaoka Y, Hagiwara H, Takamatsu T, Hamada H, Yokoyama T.

Localization of Inv in a distinctive intraciliary compartment requires the C-terminal ninein-homolog-containing region.

Journal of Cell Science 2009 122(Pt 1):44-54.

② Ibi M, Matsuno K, Shiba D, Katsuyama M, Iwata K, Kakehi T, Nakagawa T, Sango K, Shirai Y, Yokoyama T, Kaneko S, Saito N, Yabe-Nishimura C.

Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain.

The Journal of Neuroscience 28(38):9486-94, 2008.

③ Okumura H, Shiba D, Kubo T, Yokoyama T.

P2X7 receptor as sensitive flow sensor for ERK activation in osteoblasts.

Biochemical and Biophysical Research Communications 372(3):486-90, 2008. 2008 372(3):486-90.

[学会発表] (計 4 件)

① 芝大、横山尚彦.

Cilium localization signals of the inv protein

第59回日本細胞生物学会

2007年5月30日 (福岡)

② 芝大、横山尚彦.

Inv蛋白の一次繊毛局在ダイナミクス

第113回日本解剖学会全国学術集会

2008年3月29日 (大分)

③ 横山尚彦、芝大、杉山紀之.

繊毛—尿管形態の測定装置—

第 113 回解剖学会全国学術集会

2008年3月29日 (大分)

④ 芝大、横山尚彦.

一次繊毛内新規分子領域「Inv コンパートメ

ント」における分子動態解析

第114回日本解剖学会全国学術集会

2009年3月30日 (岡山)

6. 研究組織

(1)研究代表者

芝大 (SHIBA DAI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：50360722