

繊毛内タンパク質輸送の破綻による繊毛病発症の基盤

京都大学大学院・薬学研究科・生体情報制御学分野
中山 和久

1. 研究目的

繊毛は動物のほぼすべての細胞に存在し、多様な外部シグナルを受容するアンテナとして働く。繊毛内で機能するタンパク質の輸送 (intraflagellar transport; IFT) は、IFT-A、IFT-B、BBSome などの繊毛内タンパク質輸送複合体がキネシン2やダイニン2のようなモータータンパク質と共役することによって媒介される。IFT-B 複合体はキネシン2と共役して順行性の繊毛内タンパク質輸送を媒介し、IFT-A 複合体はダイニン2と共役して繊毛内逆行輸送を媒介する (参考文献5)。繊毛内タンパク質輸送の異常や繊毛形成の異常は、多様な症状を呈し、繊毛病と総称される多くの遺伝性疾患を引き起こす (Bardet-Biedl 症候群 (BBS) ; Joubert 症候群 (JBTS) Meckel 症候群 (MKS)、短肋骨胸郭異形成症 (SRTD) など)。本研究では、繊毛病原因遺伝子の産物と繊毛内タンパク質輸送複合体が連動して機能する機構、および原因遺伝子産物間の相互作用や機能的な関連性を明らかにすることによって、繊毛病の発症の分子基盤の解明を目指す。

一方、次世代DNAシーケンシングの普及によって、繊毛病を含むさまざまな遺伝病の原因遺伝子が次々に同定されている。しかし現状では、各原因遺伝子産物の機能の解析は進んでいない。本研究では、私たちが独自に開発した相互作用解析法や改良型KO細胞作製法などを駆使して、網羅的に繊毛病原因遺伝子の産物について解析することによって、ポストゲノム時代の遺伝病原因遺伝子の研究手法に新たなパラダイムを提唱するものである。

2. 方法

IFT-A複合体、IFT-B複合体のサブユニット間の相互作用などについては、私たちが以前に開発した『観るだけでわかるタンパク質間相互作用解析法 ; visible immunoprecipitation (VIP) アッセイ』 (参考文献2) を用いて特定した。VIPアッセイにより特定した相互作用については、通常の共免疫沈降法-ウェスタンブロット法によって確認した。IFT-A複合体やIFT-B複合体のサブユニットの遺伝子のノックアウト (KO) 細胞は、

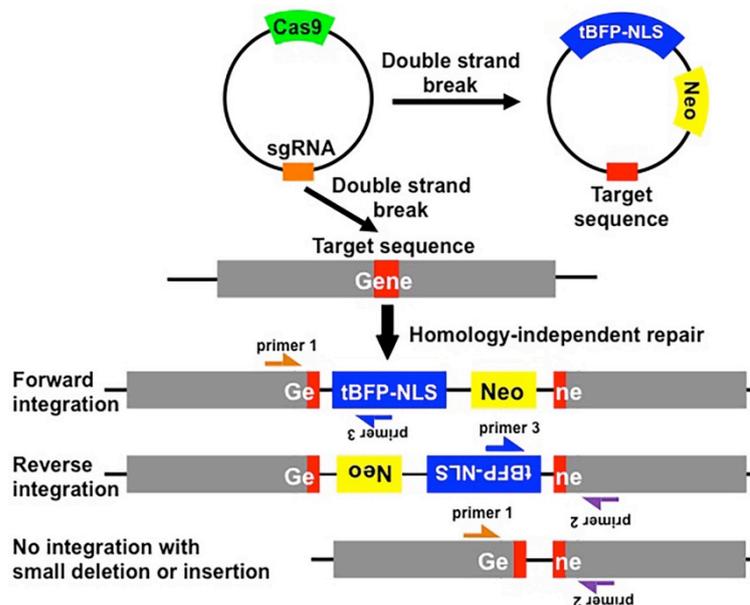


図1 独自に改良したCRISPR/Cas9法の概要

hTERT-RPE1細胞に対して私たちが独自に改良したCRISPR/Cas9法 (図1 ; 発表論文1) を適用して樹立した。正常hTERT-RPE1細胞、およびKO細胞にタンパク質を発現させる場合には、以前に報告しているレンチウイルス発現ベクター (参考文献1) を用いて行った。免疫蛍光抗体法による細胞の染色は、以前に報告した方法 (参考文献1、4) により行った。

3. 結果 研究成果

繊毛研究に頻用されるヒト網膜色素上皮由来のhTERT-RPE1細胞では、相同遺伝子組換えが起こりにくく、相同遺伝子組換えを基盤とする通常のCRISPR/Cas9法では、KO細胞の作製効率が極めて悪かった。そこで、非同相末端結合による修復を利用したノックイン法によって、hTERT-RPE1細胞において高効率で遺伝子をKOする手法を確立した（図1; 発表論文1）。この方法を用いて、IFT-B複合体を構成するサブユニット（IFT88およびIFT20）をKOすると繊毛が全く形成されなくなり、野生型IFT88をレンチウイルスベクターを用いて発現させると、IFT88-KO細胞の繊毛形成が回復することを確認した（発表論文1）。IFT88とIFT20は、16サブユニットからなるIFT-B複合体の中核をなすサブユニットであること（参考文献3）から、IFT-B複合体が構築されないために、繊毛内の順行輸送がまったく起こらないことによって、繊毛の形成が障害されたと考えられる。

IFT-A複合体は7つのサブユニットからなる（図2; 参考文献4）。上記のCRISPR/Cas9法を用いて、IFT-A複合体の中核をなすサブユニットの一つIFT122をKOすると、繊毛はほぼ形成されなくなった。このKO細胞に、野生型IFT122をレンチウイルスベクターを用いて発現させると、繊毛形成は回復するとともに、繊毛内のタンパク質輸送は正常に行われるようになった（発表論文3）。

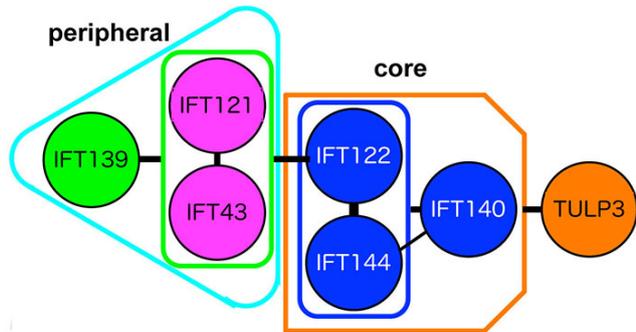


図2 IFT-A複合体の構築様式

IFT122の遺伝子に様々な点突然変異が起こることによって、繊毛病の一種CED（Cranioectodermal dysplasia; 頭蓋外胚葉性異形成症; Sensenbrenner症候群ともいう）を発症する。CED型の様々な変異を有するIFT122とIFT-A複合体を構成する他のサブユニットとの相互作用をVIPアッセイ、およびウエスタンブロット法を用いて調べると、IFT122の変異によって特定のサブユニットとの相互作用が失われることがわかった。特に、すべてのCED型変異に共通して、IFT139サブユニットがIFT-A複合体に組み込まれなくなることが判明した（発表論文3）。

IFT122-KO細胞にCED型変異を有するIFT122を発現させると、繊毛形成はほぼ回復した。しかし、IFT-A複合体が媒介する繊毛内の逆行性タンパク質輸送は回復せず、IFT-B複合体が繊毛の先端に異常に蓄積するとともに、繊毛膜に局在するGPCRが繊毛内に蓄積したままになった（発表論文3）。これらの結果から、IFT122の変異に起因する繊毛病CEDは、不完全なIFT-A複合体が形成されることによって、繊毛の形成自体は起こるものの、繊毛内の逆行性タンパク質輸送が障害されるために発症することが裏付けられた。

4. まとめ

本研究によって、VIPアッセイを用いたタンパク質間相互作用解析、改良型CRISPR/Cas9法を用いて作製したKO細胞の表現型解析、KO細胞に野生型や繊毛病型変異を有するタンパク質を発現させることによる解析を組み合わせることによって、繊毛病発症の分子基盤を明らかにできることが証明された。同様の解析は、他の繊毛病の原因遺伝子に関しても進行中であり、今後さらに繊毛病の分子基盤が明らかになると考えられる。さらに、このような研究手法は他の遺伝性疾患に対しても適用可能であることから、ポストゲノム時代の遺伝性疾患研究のパラダイムを提唱できたと考える。

5. 発表論文

- 1) Katoh, Y., Michisaka, S., Nozaki, S., Funabashi, T., Hirano, T., Takei, R. & **Nakayama, K.** (2017) Practical method for targeted disruption of cilia-related genes by using CRISPR/Cas9-mediated, homology-independent knock-in system. *Mol. Biol. Cell*, **28**, 898-906.

- 2) Nishijima, Y., Hagiya, Y., Kubo, T., Takei, R., Katoh, Y. & **Nakayama, K.** (2017) RABL2 interacts with the intraflagellar transport-B complex and CEP19 and participates in ciliary assembly. *Mol. Biol. Cell*, **28**, 1652-1666.
- 3) Takahara, M., Katoh, Y., Nakamura, K., Hirano, T., Sugawa, M., Tsurumi, Y. & **Nakayama, K.** (2018) Ciliopathy-associated mutations of IFT122 impair ciliary protein trafficking but not ciliogenesis. *Hum. Mol. Genet.*, **27**, in press.

参考文献

- 1) Takahashi, S., Kubo, K., Waguri, S., Yabashi, A., Shin, H.-W., Katoh, Y. & **Nakayama, K.** (2012) Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J. Cell Sci.*, **125**, 4049-4057.
- 2) Katoh, Y., Nozaki, S., Hartanto, D., Miyano, R. & **Nakayama, K.** (2015) Architectures of multisubunit complexes revealed by a visible immunoprecipitation assay using fluorescent fusion proteins. *J. Cell Sci.*, **128**, 2351-2362.
- 3) Katoh, Y., Terada, M., Nishijima, Y., Takei, R., Nozaki, S., Hamada, H. & **Nakayama, K.** (2016) Overall architecture of the intraflagellar transport (IFT)-B complex containing Cluap1/IFT38 as an essential component of the IFT-B peripheral subcomplex. *J. Biol. Chem.*, **291**, 10962-10975.
- 4) Hirano, T., Katoh, Y. & **Nakayama, K.** (2017) Intraflagellar transport-A complex mediates ciliary entry and retrograde trafficking of ciliary G protein-coupled receptors. *Mol. Biol. Cell*, **28**, 429-439.
- 5) **Nakayama, K.** & Katoh, Y. (2018) Ciliary protein trafficking mediated by IFT and BBSome complexes with the aid of kinesin-2 and dynein-2 motors. *J. Biochem.*, **163**, in press.