124　繊毛内タンパク質輸送と繊毛病の分子メカニズムの解明	加藤　洋平

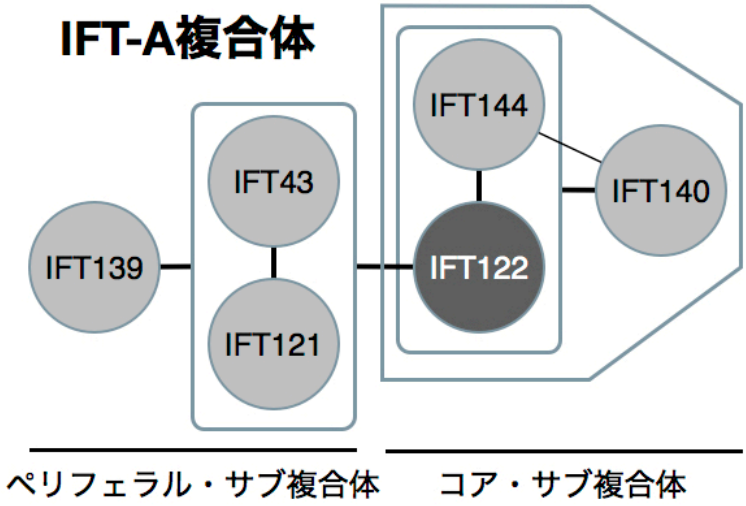
【目的】一次繊毛は細胞のアンテナとして機能するオルガネラであり、その異常は多様な重篤症状を呈する繊毛病を引き起こす。一次繊毛の形成や機能の維持には繊毛内タンパク質輸送（Intraflagellar transport: IFT）が基盤となっている。本研究では、IFT-A 複合体のサブユニットの 1 つである IFT122 に着目し、IFT122 の繊毛内タンパク質輸送における機能を解明すること、および、IFT122 の変異が繊毛病の一種である頭蓋外胚葉異形成（Craniectodermal dysplasia: CED）を引き起こすメカニズムを解明することの 2 つを目的として研究を行った。

【方法】Visible immunoprecipitation（VIP）アッセイを用いて、IFT122 と IFT-A サブユニットの相互作用を解析した。CRISPR/Cas9 システムを用いて、IFT122 ノックアウト（KO）細胞を樹立し、その表現型解析を行った。CED の原因となるアミノ酸変異を導入した IFT122 変異体を用いて相互作用解析とレスキュー実験による表現型解析を行なった。

【結果】IFT122 は IFT-A 複合体のコア・サブ複合体とペリフェラル・サブ複合体をつなぐというハブとしての役割を果たしていることを分子レベルと細胞レベルで解明した。IFT-A 複合体のサブユニットである IFT139 や IFT144 の KO 細胞では、繊毛長は短くなるものの繊毛は形成できるのに対して、IFT122-KO 細胞では繊毛がほとんど形成されないことから、繊毛形成において IFT122 が極めて重要であることが示唆された。

一方、CED 型 IFT122 変異体は他の IFT-A サブユニットとの相互作用が消失または減弱することにより、IFT-A 複合体を正常に形成できなくなった。その結果、繊毛内の逆行輸送が異常になり、CED の発症につながると考えられる。

IFT-A 複合体の相互作用マップ



124. 繊毛内タンパク質輸送と繊毛病の分子メカニズムの解明

加藤　洋平

京都大学 大学院薬学研究科 生体情報制御学分野

Key words：一次繊毛，繊毛病，繊毛内タンパク質輸送，IFT 複合体

緒　言

一次繊毛は細胞のアンテナとして機能するオルガネラであり、その異常は多様な重篤症状（嚢胞腎、網膜変性、骨形成異常、病的肥満、精神遅滞、内臓逆位、多指、不妊など）を呈する繊毛病を引き起こす。一次繊毛の形成や機能維持において基盤となっているのは、繊毛内に受容体等を輸送する繊毛内タンパク質輸送（Intraflagellar transport: IFT）システムである（図 1）。IFT システムを司る IFT 装置は IFT-A 複合体、IFT-B 複合体、BBSome 複合体、およびモータータンパク質のキネシン-2 とダイニン-2 から構成されており、合計 40 種類以上のタンパク質から成る巨大で複雑な分子マシンである。この分子マシンの詳細な機能解明が繊毛病の病態解明や治療機会提供へ繋がるが、このように複雑な対象にアプローチする方法がこれまでは限られていたため、IFT 装置の動作原理についてはほとんどわかっていなかった。

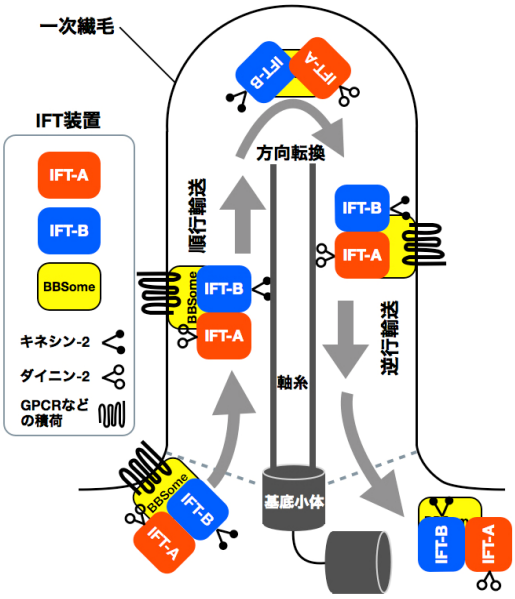


図 1. 繊毛内タンパク質輸送のモデル
IFT-A、IFT-B、BBSome 複合体およびモータータンパク質のキネシン-2 とダイニン-2 が IFT 装置を構成し、繊毛内の順行輸送と逆行輸送を媒介している。繊毛に局在する GPCR などの積荷タンパク質は、IFT 装置の働きにより繊毛内へ運ばれたり、細胞外へ排出されたりする。

これまでに私たちは『観るだけでわかるタンパク質間相互作用解析法：VIP アッセイ』（図 2 で詳述）を開発することで、16 サブユニットからなる IFT-B 複合体、6 サブユニットからなる IFT-A 複合体、8 サブユニットからなる BBSome 複合体の構築様式の全体像を解明することに成功している［1〜3］。

IFT-A 複合体を構成する 6 つのサブユニット（IFT43、IFT121、IFT122、IFT139、IFT140、および IFT144）をコードする遺伝子の突然変異は、繊毛病の一種である頭蓋外胚葉異形成（Cranioectodermal dysplasia: CED）を引き

起こすことが知られているが、どのようにして CED が引き起こされているのかについてはほとんど分かっていない。そこで本研究では、IFT-A 複合体のサブユニットの 1 つである IFT122 に着目し、IFT122 の繊毛内タンパク質輸送における機能を解明すること、および、IFT122 の変異が CED を引き起こすメカニズムを解明することの 2 つを目的として研究を行った。

方　法

1. VIP アッセイによるタンパク質間相互作用解析

IFT122 の CED 型変異体を作成し、VIP （Visible immunoprecipitation）アッセイ（図 2）とウェスタンブロット法を用いて IFT-A サブユニットとの相互作用を解析した。

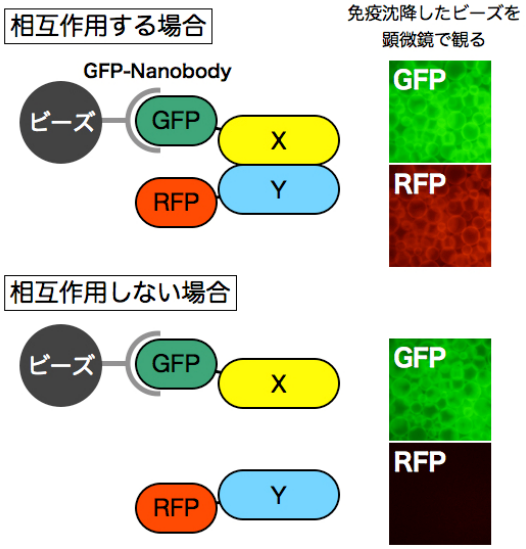


図 2. VIP アッセイの原理

GFP 融合タンパク質 X と RFP 融合タンパク質 Y を HEK293T 細胞に発現させ、抗 GFP-nanobody（ラクダ科動物由来の単鎖抗体）を用いて共免疫沈降を行う。タンパク質 X とタンパク質 Y が相互作用する場合は、免疫沈降した後のビーズを蛍光顕微鏡で観察すると、GFP と RFP の蛍光が観察される。一方、タンパク質 X とタンパク質 Y が相互作用しない場合は、RFP の蛍光は観察されない。このようにビーズを顕微鏡で観ることで相互作用の有無が判定できる。

2. 蛍光抗体法による一次繊毛の観察

繊毛形成や繊毛内タンパク質輸送への影響を調べる実験については、不死化ヒト網膜色素上皮細胞（hTERT-RPE1、以下 RPE1 細胞と呼ぶ）を用いた。RPE1 細胞を血清飢餓条件下で 24 時間培養し繊毛形成を誘導した後、蛍光抗体法によって繊毛関連タンパク質を染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

3. ゲノム編集による遺伝子ノックアウト（KO）細胞とレスキュー細胞の樹立および表現型解析

CRISPR/Cas9 システムと相同組換え非依存的修復機構を利用し、ドナーベクターを IFT122 遺伝子座にノックインすることで IFT122 の KO 細胞を樹立した［4］。さらに、野生型および CED 型の IFT122 をレンチウイルスベクターを用いて IFT122-KO 細胞に発現させ、それらのレスキュー細胞の表現型の変化を観察した。

結　果

1. CED 型 IFT122 変異体と IFT-A サブユニットとの相互作用解析

これまでの研究によって、IFT-A 複合体は IFT122、IFT140、IFT144 からなるコア・サブ複合体と IFT43、IFT121、IFT139 からなるペリフェラル・サブ複合体から構成されることがわかった［3］。これらのサブ複合体をつなぐ IFT122

は IFT-A 複合体のサブユニットの中でも中心的な役割を果たすことが予想された。また、CED の原因となる IFT122 の複数の変異が報告されている（図 3A）。これらの IFT122 変異体は IFT-A サブユニットとの相互作用に異常を生じているのではないかと予想し、VIP アッセイを用いて相互作用解析を行った。その結果、IFT122 の G436R、V443G、G513V 変異体では IFT43/IFT121/IFT139 との相互作用が著しく減弱していることがわかった。一方、W7C と S263F 変異体では IFT43/IFT121 との相互作用は保たれているが、IFT139 との相互作用が消失していることがわかった（図 3B，C）。

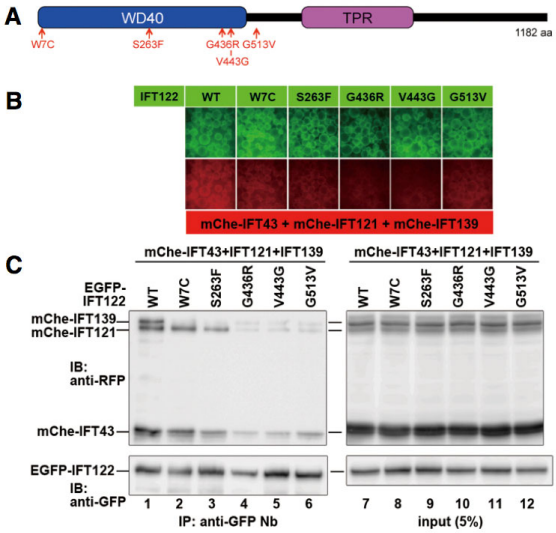


図 3. 頭蓋外胚葉異形成（CED）の原因となる IFT122 変異体と IFT-A サブユニットの相互作用解析

A）CED の原因となる IFT122 のアミノ酸変異。B, C）VIP アッセイとウェスタンブロッティングによる IFT122 と IFT43/IFT121/IFT139 の相互作用解析。

2. IFT122-KO 細胞の表現型解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて IFT122 遺伝子を KO した RPE1 細胞株を 2 株(#122-1-13 と#122-2-1)樹立した。これらの IFT122-KO 細胞を血清飢餓条件下で培養し、繊毛形成を誘導した後、繊毛マーカーである ARL13B とアセチル化チューブリンの抗体を用いて染色をした。蛍光顕微鏡を用いて繊毛形成の有無を観察したところ、IFT122-KO 細胞では一次繊毛がほとんど形成されないことがわかった（図 4）。

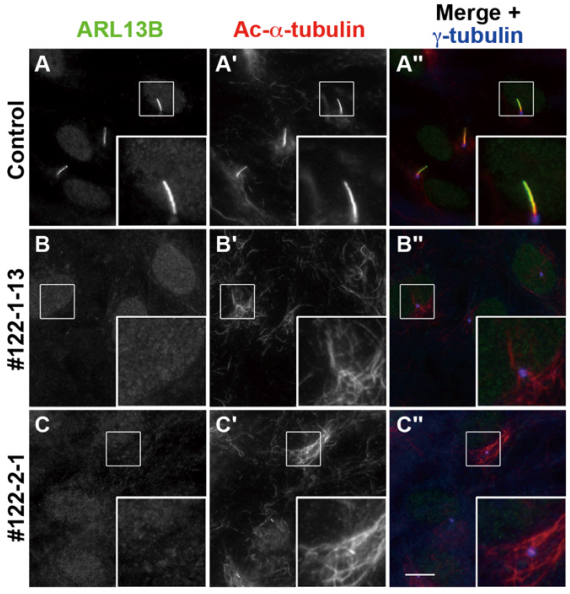


図 4. IFT122-KO 細胞の表現型解析

A）野生型の RPE1 細胞。B, C）IFT122-KO 細胞株。ARL13B と Ac-α-tubulin は共に一次繊毛のマーカーである。スケールバー：10 μm。

3. IFT122-KO 細胞を用いたレスキュー実験

IFT122-KO 細胞の繊毛形成不全という表現型が、CRISPR/Cas9 システムのオフターゲット効果によるものではないことを確かめるため、IFT122-KO 細胞に野生型（WT）の IFT122 を発現させて繊毛形成が回復するかどうかを調べた。EGFP-IFT122（WT）を発現させた細胞では一次繊毛形成が回復したことから、IFT122-KO 細胞の表現型はオフターゲット効果によるものではないことが裏付けられた（図 5B）。ここまでの実験結果から、IFT122 は繊毛形成において必須の遺伝子であることがわかった。次に CED 型 IFT122 変異体のうち、W7C と G513V の 2 種類を使ってレスキュー実験を行い、繊毛形成が回復するかどうかを調べた。その結果、2 種類の変異体ともに野生型と同程度に繊毛形成が回復することがわかった（図 5C", D"）。さらに、これらの IFT122 変異体レスキュー細胞では、繊毛の先端が膨らんでいるという異常に気がついた。この表現型は繊毛内タンパク質輸送に異常が生じているためではないかと予想し、IFT-B 複合体のサブユニットの 1 つである IFT88 の細胞内局在を観察した。すると、野生型の RPE1 細胞（図 5A'）や野生型の IFT122 レスキュー細胞（図 5B'）では IFT88 は繊毛の根本に多く局在しているのに対して、変異型の IFT122 レスキュー細胞では IFT88 が繊毛の先端に蓄積しているという異常が観察された（図 5C', D'）。これらの結果から、CED 型 IFT122 変異体レスキュー細胞では、繊毛内の逆行輸送が滞っていることが示唆された。

さらに、CED 型 IFT122 変異体のレスキュー細胞では、繊毛膜に局在する ARL13B が繊毛の先端に蓄積していること、ARL13B によって繊毛内へ運ばれる脱リン酸化酵素の INPP5E が繊毛内に局在しなくなっていること、ヘッジホッグシグナル伝達系の活性化によって繊毛内へと局在が変化する Smoothend（GPCR の一種）が繊毛内に局在できなくなっていることなども判明した［5］。

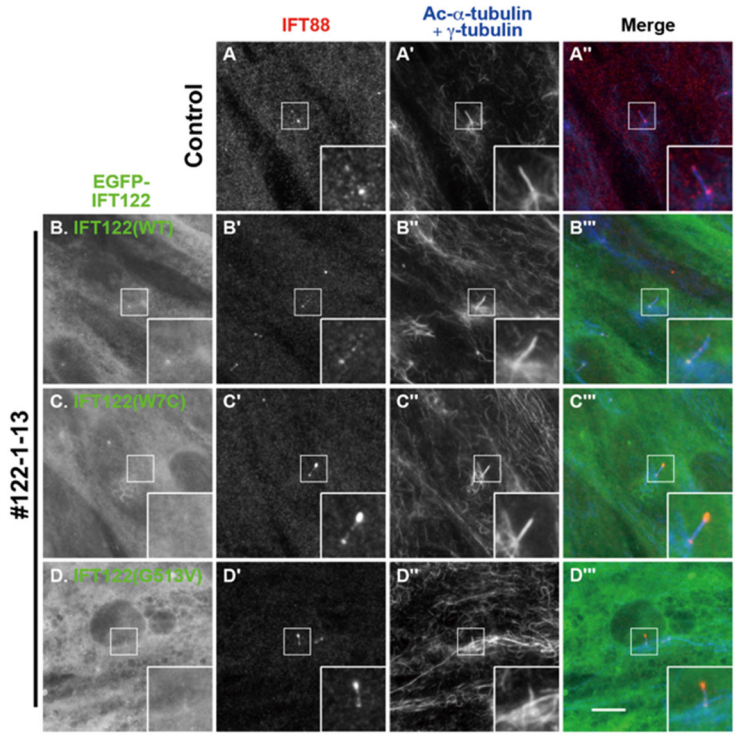


図 5. IFT122-KO 細胞を用いたレスキュー実験

A) 野生型の RPE1 細胞。B) IFT122-KO 細胞を野生型の IFT122 でレスキューした細胞。C, D) CED 型の IFT122 でレスキューした細胞。IFT-B 複合体のサブユニットの 1 つである IFT88、一次繊毛のマーカーの Ac-α-tubulin、基底小体のマーカーのγ-tubulin の抗体を用いて染色した。スケールバー：10 μm。

考　察

本研究ではVIPアッセイとKO細胞を用いた解析によって、IFT122がIFT-A複合体のコア・サブ複合体とペリフェラル・サブ複合体をつなぐというハブとしての役割を果たしていることを分子レベルと細胞レベルで解明した。IFT-A複合体のサブユニットであるIFT139やIFT144のKO細胞では、繊毛長は短くなるものの繊毛は形成できるのに対して［3]、IFT122-KO細胞では繊毛がほとんど形成されないことから、繊毛形成においてIFT122が極めて重要であることが示唆された。

CED型IFT122変異体とIFT-Aサブユニットとの相互作用解析の結果から、IFT122の変異によってIFT-Aサブユニットとの相互作用が消失または減弱し、IFT-A複合体が正常に形成できないことがCEDの原因となっていると考えられる。一方、IFT122-KO細胞にCED型IFT122変異体をレスキューした場合には、野生型IFT122をレスキューした場合と同様に一次繊毛形成が回復したが、繊毛タンパク質の逆行輸送に異常が認められた。このような繊毛内タンパク質の逆行輸送の異常がCEDの原因となっていることが示唆された。

本研究で用いたアプローチによって、今後はCED以外の繊毛病の分子メカニズムも解明していきたいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院薬学研究科教授の中山和久である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深謝いたします。

文　献

1) Katoh Y, Nozaki S, Hartanto D, Miyano R, Nakayama K. Architectures of multisubunit complexes revealed by a visible immunoprecipitation assay using fluorescent fusion proteins. J Cell Sci. 2015 Jun 15;128(12):2351–62. Epub 2015 May 11. PMID: 25964651 DOI: 10.1242/jcs.168740

2) Katoh Y, Terada M, Nishijima Y, Takei R, Nozaki S, Hamada H, Nakayama K. 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. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2016 May 20;291(21):10962–75. Epub 2016 Mar 15. PMID: 26980730 DOI: 10.1074/jbc.M116.713883

3) Hirano T, Katoh Y, Nakayama K. Intraflagellar transport-A complex mediates ciliary entry and retrograde trafficking of ciliary G protein-coupled receptors. Mol Biol Cell. 2017 Feb 1;28(3):429–39. Epub 2016 Dec 8. PMID: 27932497 DOI: 10.1091/mbc.E16-11-0813

4) Katoh Y, Michisaka S, Nozaki S, Funabashi T, Hirano T, Takei R, Nakayama K. Practical method for targeted disruption of cilia-related genes by using CRISPR/Cas9-mediated homology-independent knock-in system. Mol Biol Cell. 2017 Feb 8;28(7):898–906. Epub 2017 Feb 8. PMID: 28179459 DOI: 10.1091/mbc.E17-01-0051

5) Takahara M, Katoh Y, Nakamura K, Hirano T, Sugawa M, Tsurumi Y, Nakayama K. Ciliopathy-associated mutations of IFT122 impair ciliary protein trafficking but not ciliogenesis. Hum Mol Genet. 2018 Feb 1;27(3):516–28. PMID: 29220510 DOI: 10.1093/hmg/ddx421