

国際共同研究事業 共同研究報告書

令和 5 年 4 月 27 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]
京都大学・大学院薬学研究科
[職・氏名]
教授・中山和久
[課題番号]
JPJSJRP 20181701

1. プログラム名 英国との国際共同研究プログラム(JRPs-LEAD with UKRI)

2. 研究課題名

(和文) 繊毛内タンパク質輸送複合体とモータータンパク質の機能的相互作用

(英文) Functional interplay of ciliary trafficking complexes and motor proteins

3. 共同研究実施期間(全採択期間)

平成 31 年 2 月 14 日 ~ 令和 5 年 3 月 31 日 (4 年 2 ヶ月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

University of Bristol, Professor, David Stephens

5. 委託費総額(研究経費+業務委託手数料等、返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		30,019,000 円
内訳	1年度目執行経費	1,650,000 円
	2年度目執行経費	9,900,000 円
	3年度目執行経費	9,900,000 円
	4年度目執行経費	8,569,000 円
	5年度目執行経費	円
	6年度目執行経費	円

6. 共同研究実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	2 名
相手国側参加者等	3 名

7. 研究の概要・成果等

(1)研究概要(全期間を通じた研究の目的・実施状況)

本研究は、繊毛内タンパク質輸送(IFT)複合体とモータータンパク質の機能的相互作用を解明することを目的としており、具体的な研究目標は以下の4つである。

- ① IFT 輸送装置を構成する、ダイニン-2、キネシン-2、IFT-A 複合体、IFT-B 複合体、および BBSome 複合体間の相互作用様式と機能の解明。
- ② 繊毛のトランジションゾーン(TZ)を構成するタンパク質間の相互作用様式および各 TZ タンパク質の機能の解明。
- ③ IFT 輸送装置の構築における時空間的な制御メカニズムの解明。
- ④ IFT 輸送装置の構築と局在化に関与する、アクチンおよび微小管関連の新規タンパク質の機能の解明。

目的①に関する成果

繊毛内での双方向のタンパク質輸送は、IFT-A 複合体および IFT-B 複合体、キネシン-2 およびダイニン-2 複合体という二つのモータータンパク質を含む繊毛内タンパク質輸送(IFT)装置により実現されている。ダイニン-2 複合体は、積み荷として繊毛先端まで輸送された後、モーターとして逆行性輸送を駆動する。しかしながら、IFT 複合体がどのようにしてダイニン-2 複合体を積み荷として認識しているかについては、未だ解決されていない。

本研究では、当研究室が開発したタンパク質間相互作用解析法である VIP アッセイを用いて、IFT 複合体とダイニン-2 複合体との相互作用に関与するサブユニットを同定することを目指した。また、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術を活用し、IFT 複合体やダイニン-2 の変異による繊毛病発症の分子基盤の解明を試みた。

ダイニン-2 複合体と IFT-B 複合体の相互作用について、当研究室が開発した VIP アッセイと英国側のプロテオミクス技術を組み合わせて検討した。その結果、ダイニン-2 からは WDR60 と DYNC2H1-DYNC2LI1 二量体、IFT-B からは IFT54 と IFT57 が相互作用に寄与することがわかった。さらに、ダイニン-2 サブユニットの WDR60 は、ダイニン軽鎖結合領域の N 末端にある保存領域を介して IFT-B サブユニットの IFT54 と相互作用していることを見出した。IFT54 結合部位を欠く WDR60 の N 末端欠損変異体を WDR60 ノックアウト(KO)細胞で発現させたところ、WDR60-KO 細胞の異常な表現型、例えば、繊毛の先端周辺やトランジションゾーンの遠位側に IFT 装置が異常に蓄積するような表現型をレスキューすることができないことが判明した。しかし、IFT54 結合部位を欠損させた WDR60 コンストラクトは、繊毛の異常を大幅に回復させたことから、IFT 複合体とダイニン-2 複合体のドッキングは、IFT54 と WDR60 の相互作用だけに依存しているのではないことが示唆された。これらの結果は、ダイニン-2 と順行性 IFTトレインの現在のドッキングモデルと一致し、ダイニン-2 と IFT-B の複数のサブユニットが関与する広範な相互作用が、それらの接続に関与していることを示すものである(Hiyamizu, S., *et al.* (2023) *J. Cell Sci.*)。

ダイニン-2 サブユニットの WDR34 の変異による繊毛病発症の分子基盤について調査した。WDR34-KO 細胞において繊毛病型 WDR34 タンパク質を安定発現させることにより、WDR34 変異が繊毛の形成と機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。定量的プロテオミクス解析により、WDR34 の変異がダイニン 2 の複合体形成に影響を与えることが明らかになった。また、細胞の表現型観察により、WDR34 の変異が軸糸の開始と伸長、IFT タンパク質の局在、トランジションゾーンの機能、ヘッジホッグシグナルなどに、さまざまな影響を与えることが示された(Shak, C., *et al.* (2023) *J. Cell Sci.*)。

目的②に関する成果

トランジションゾーン(TZ)は繊毛の基部に存在する特殊な領域であり、繊毛の内部と外部を隔てるバリアとして

機能している。TZ は膜貫通型および可溶性の多くのタンパク質によって構成されている。MKS1、B9D1/MKS9、B9D2/MKS10 は、メッケル症候群(MKS : Meckel syndrome)の原因遺伝子によってコードされている可溶性の TZ タンパク質であり、共通して B9 ドメイン(B9D)を有している。私たちは、これらの B9D タンパク質が MKS1-B9D2-B9D1 の順で 3 者複合体を形成すること、これらの TZ への局在化は相互依存的であることを明らかにした。MKS1-KO 細胞と B9D2-KO 細胞の表現型解析から、B9D タンパク質は繊毛の形成に必須ではないが、正常な繊毛形成には必要であることが明らかになった。これらの KO 細胞を用いたレスキュー実験によって、B9D タンパク質複合体の形成が繊毛膜タンパク質に対する拡散障壁を構築するために不可欠であることが示された (Okazaki, M., *et al.* (2020) *Mol. Biol. Cell*)。

目的③に関する成果

一次繊毛は直径約 $0.3\ \mu\text{m}$ 、長さ約 $3\ \mu\text{m}$ の細胞表面から突出した小さなオルガネラである。この大きさは光の回折限界に近いので、超解像顕微鏡や電子顕微鏡を用いなければ、繊毛内の微細構造を観察することができない。この問題を解決するために、高吸水性ゲルを用いて生物試料を物理的に拡大する技術である膨張顕微鏡法 (Expansion microscopy) と超解像顕微鏡を組み合わせた実用的な超解像イメージング手法を開発し、一次繊毛と中心小体を高輝度かつ高分解能で観察できることを実証した (Katoh, Y., *et al.* (2020) *Mol. Biol. Cell*)。

上記の研究成果の他、目的①から③に関連する複数の論文を発表した (Ishida, Y., *et al.* (2022) *Mol. Biol. Cell*; Zhou, Z., *et al.* (2022) *Mol. Biol. Cell*; Zhou, Z., *et al.* (2022) *Hum. Mol. Genet.*; Qiu, H., *et al.* (2022) *Sci. Rep.*; Ishida, Y., *et al.* (2021) *Hum. Mol. Genet.*; Kobayashi, T., *et al.* (2021) *Mol. Biol. Cell* など)。ただし、目的④に関しては新規タンパク質の同定および機能解明には至っておらず、今後の課題として残された。

(2)学術的価値(本研究により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

これまでの研究では、ダイニン-2 複合体と IFT-B 複合体の相互作用が繊毛内輸送に必要であることが示唆されていたが、その具体的な分子メカニズムは不明であった。本研究では、ダイニン-2 サブユニットと IFT-B サブユニットの間に複数の相互作用があることを明らかにし、IFTトレインとダイニン-2 複合体のドッキングモデルを裏付ける重要な知見を提供した。

本研究では、WDR34 の遺伝子変異が繊毛の形成および機能にさまざまな影響を与えることを示した。これにより、繊毛病の原因となる遺伝子変異の機能的な影響についての理解が深まり、繊毛病の病態解明や遺伝子診断の向上に寄与する可能性がある。

(3)相手国との交流(本研究による国際共同研究の活性化や、両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果)

両研究室が互いの技術的な強みを活かして協力することで、より高度で精密な研究が可能となり、繊毛内タンパク質輸送および繊毛病の分子基盤に関する新たな知見を得ることができた。具体的には、当研究室の VIP アッセイによるタンパク質間相互作用解析と英国側の質量分析によるプロテオミクス技術が組み合わせられることで、より詳細なデータが得られ、研究の質が大幅に向上した。本国際共同研究の主な成果 2 報は、英国の科学誌 *Journal of Cell Science* 誌の *Cell Biology of Motors* 特集号に同時掲載され、世界中の研究者に広く認知されることとなった (Hiyamizu, S., *et al.* (2023) *J. Cell Sci.*; Shak, C., *et al.* (2023) *J. Cell Sci.*)。

(4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の広い意味での社会的貢献はどのようにあったか)

本研究によって、ダイニン-2 複合体と IFT-B 複合体の相互作用や繊毛病に関連する WDR34 の変異に関する新たな知見が得られた。本研究で得られた繊毛病の分子基盤に関する知見が今後の臨床応用に結びつくことで、繊毛病に対する新しい診断法、創薬、遺伝子治療法などの開発につながる可能性がある。

(5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取組、成果)

本研究に従事した若手研究者は、国際共同研究を通じて、専門知識や技術を習得することができた。また、異なる国の研究者と協力して研究を進める中で、異文化間のコミュニケーション能力やチームワークのスキルも向上させることができた。ただし、コロナ禍のため対面での交流ができなかったことは残念である。本研究に従事した英国側の博士研究員 2 人は、本国際共同研究の成果を基に新しい職に就くことができた。

(6)将来発展可能性(本事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

本研究によって、ダイニン-2 複合体と IFT-B 複合体の相互作用や繊毛病に関連する WDR34 の変異に関する新たな知見が得られた。これにより、繊毛病の分子基盤に関する理解が深まり、診断や治療法の開発に役立つことが期待される。また、本研究を基盤にして、繊毛病に関する新たな研究テーマを開拓し、共同研究をさらに発展させることも期待できる。

(7)その他(上記(2)～(6)以外に得られた成果があれば記載してください)

なし。

8. 今後の展望(今後の国際共同研究・協力体制の維持・発展に向けた展望について、具体性・実現可能性等を踏まえて、継続的に展開していくための計画を記載してください)

今後の共同研究を継続的に展開するため、オンラインツールを活用した研究進捗や成果の共有、新たな課題の議論、今後の研究計画の立案を行う。引き続き論文の共同執筆を行い、研究成果を学術誌や学術会議で発表する。本研究を基盤にした新たな研究テーマを開拓し、共同研究をさらに拡大する。

9. 最終年度実施状況

- ・ 最終年度実施計画書の「当該年度実施計画の概要」の内容と対応させつつ、最終年度のみの実施状況を簡潔に記載してください。再委託又は共同実施を行った場合は、それぞれの実施状況がわかるように記載してください。
- ・ 当該年度又は前年度(複数年契約を締結し繰越を行った場合)の各費目における増減が研究経費総額の 50% (この額が 300 万円を超えない場合は 300 万円)に相当する額を超えた場合は、その理由と費目の内訳を変更しても計画の遂行に支障がないと考えた理由を記載してください。

本国際共同研究は、絨毛内タンパク質輸送(IFT)複合体とモータータンパク質の機能的相互作用を解明することを目的としている。本年度は IFT 複合体とダイニン-2 複合体の相互作用およびダイニン-2 サブユニット WDR34 の変異による絨毛病発症の分子基盤の解明を目指して研究を行った。

絨毛内での双方向のタンパク質輸送は、IFT-A 複合体および IFT-B 複合体、キネシン-2 およびダイニン-2 複合体という二つのモータータンパク質を含む絨毛内タンパク質輸送(IFT)装置により実現されている。ダイニン-2 複合体は、積み荷として絨毛先端まで輸送された後、モーターとして逆行性輸送を駆動する。しかしながら、IFT 複合体がどのようにしてダイニン-2 複合体を積み荷として認識しているかについては、未だ解決されていない。

本年度は当研究室で開発したタンパク質間相互作用解析法である VIP アッセイを用いて IFT 複合体とダイニン-2 複合体との相互作用に関与するサブユニットを複数同定することに成功した。すなわち、ダイニン-2 からは WDR60 と DYNC2H1-DYNC2LI1 二量体、IFT-B からは IFT54 と IFT57 がダイニン-2-IFT-B 相互作用に寄与することが判明した。さらに、WDR60 は、ダイニン軽鎖結合領域の N 末端にある保存領域を介して IFT54 と相互作用していることを見出した。IFT54 結合部位を欠く WDR60 の N 末端欠損変異体を WDR60 ノックアウト(KO)細胞で発現させたところ、WDR60-KO 細胞の異常な表現型、例えば、絨毛の先端周辺やトランジションゾーンの遠位側に IFT 装置が異常に蓄積するような表現型をレスキューすることができないことが判明した。しかし、IFT54 結合部位を欠損させた WDR60 コンストラクトは、絨毛の異常を大幅に回復させたことから、IFT 複合体とダイニン-2 複合体のドッキングは、IFT54 と WDR60 の相互作用だけに依存しているのではないことが示唆された。これらの結果は、ダイニン-2 と順行性 IFT トレインの現在のドッキングモデルと一致し、ダイニン-2 と IFT-B 複合体の複数のサブユニットが関与する広範な相互作用が、それらの接続に関与していることを示すものである(Hiyamizu, S., *et al.* (2023) *J. Cell Sci.*)。

ダイニン-2 サブユニットの WDR34 の変異による絨毛病発症の分子基盤について調査した。WDR34-KO 細胞において絨毛病型 WDR34 タンパク質を安定発現させることにより、WDR34 変異が絨毛の形成と機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。定量的プロテオミクス解析により、WDR34 の変異がダイニン 2 の複合体形成に影響を与えることが明らかになった。また、細胞の表現型観察により、WDR34 の変異が軸糸の開始と伸長、IFT タンパク質の局在、トランジションゾーンの機能、ヘッジホッグシグナルなどに、さまざまな影響を与えることが示された(Shak, C., *et al.* (2023) *J. Cell Sci.*)。

本年度の当初の計画では、プロテオミクス解析によって IFT 輸送装置の構築および局在化に関与する、アクチンおよび微小管関連の新規タンパク質の同定を目指していた。しかし、残念ながら新規因子は同定できなかったため、IFT 輸送装置の構築と局在化に関与する、アクチンおよび微小管関連の新規タンパク質の機能の解明については今後の課題として残された。

11. 研究発表(最終年度において、本共同研究の一環として本事業による支援を受けたことを明示して発表したもの(発表予定のものを含む)について記載してください)

【雑誌論文】計(5)件 うち査読付論文 計(5)件

通番	共著の有無 ^{*1}	著者名、論文標題等 ^{*2}
1	○	Hiyamizu, S., Qiu, H., <u>Vuolo, L.</u> , Stevenson, N.L., <u>Shak, C.</u> , Heesom, K.J., Hamada, Y., Tsurumi, Y., Chiba, S., <u>Katoh, Y.</u> , <u>Stephens, D.J.</u> , and <u>Nakayama, K.</u> (2023) Multiple interactions of the dynein-2 complex with the IFT-B complex are required for effective intraflagellar transport. <i>J. Cell Sci.</i> 136 . jcs260462.
2	○	<u>Shak, C.</u> , <u>Vuolo, L.</u> , Uddin, B., <u>Katoh, Y.</u> , Brown, T., Mukhopadhyay, A.G., Heesom, K., Roberts, A.J., Stevenson, N.L., <u>Nakayama, K.</u> , and <u>Stephens, D.J.</u> (2023) Disease-associated mutations in WDR34 lead to diverse impacts on the assembly and function of dynein-2. <i>J. Cell Sci.</i> 136 . jcs260073.
3		Zhou, Z., Katoh, Y., and Nakayama, K. (2022) CEP19-RABL2-IFT-B axis controls BBSome-mediated ciliary GPCR export. <i>Mol. Biol. Cell.</i> 33 , ar126.
4		Ishida, Y., Tasaki, K., Katoh, Y., and Nakayama, K. (2022) Molecular basis underlying the ciliary defects caused by IFT52 variations found in skeletal ciliopathies. <i>Mol. Biol. Cell.</i> 33 , ar83.
5		Satoda, Y., Noguchi, T., Fujii, T., Taniguchi, A., Katoh, Y., and Nakayama, K. (2022) BROMI/TBC1D32 together with CCRK/CDK20 and FAM149B1/JBTS36 contributes to intraflagellar transport turnaround involving ICK/CILK1. <i>Mol. Biol. Cell.</i> 33 , ar79.

【学会発表】計(12)件 うち招待講演 計(1)件

通番	共著の有無 ^{*1}	発表者名、発表標題等 ^{*2}
1		Nakayama, K. (2023) Interactions of anterograde IFT cargoes with the IFT-B complex underlying ciliary functions. CSH Asia, Cilia & Centrosomes. Awaji, Feb. 28-March 3. (invited speaker)
2		Ishida, Y., Katoh, Y. & Nakayama, K. (2023) Molecular basis of skeletal ciliopathies caused by mutations in components of the IFT machinery. CSH Asia, Cilia & Centrosomes. Awaji, Feb. 28-March 3.
3		Katoh, Y., Zhou, Z. & Nakayama, K. (2023) Molecular basis of Bardet-Biedl syndrome caused by defects in the intraflagellar transport complex IFT-B. CSH Asia, Cilia & Centrosomes. Awaji, Feb. 28-March 3.
4		田崎晃司、石田大和、加藤洋平、中山和久 (2022) IFT-B 複合体サブユニット IFT81 の変異に起因する繊毛病の分子基盤. 第 95 回日本生化学会大会. 名古屋 11 月 9 日～11 日
5		周 壮、加藤洋平、中山和久 (2022) CEP19-RABL2-IFT-B による繊毛 GPCR の BBSome 依存的な繊毛外排出の制御機構. 第 95 回日本生化学会大会. 名古屋 11 月 9 日～11 日
6		村井理人、藤居大樹、加藤洋平、中山和久 (2022) BBS21/C8ORF37 の変異に起因するバルデー・ビードル症候群(BBS)発症の分子基盤. 第 95 回日本生化学会大会. 名古屋 11 月 9 日～11 日
7		冷水竣哉、邱瀚田、加藤洋平、中山和久 (2022) 繊毛内逆行輸送モーターのダイニン 2 複合体の IFT-B 複合体との相互作用に依存する順行輸送は繊毛機能にとって不可欠である. 第 21 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2022. 名古屋. 9 月 3 日～4 日

8		里田裕紀、野口達郎、藤居大樹、加藤洋平、中山和久 (2022) 絨毛内タンパク質輸送の制御における CCRK/CDK20、BROMI/TBC1D32、FAM149B1/JBTS36 の共役する役割. 第 21 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム 2022. 名古屋. 9 月 3 日～4 日
9		冷水竣哉、邱 瀚田、加藤洋平、中山和久 (2022) 絨毛内逆行輸送モーターのダイニン2複合体は IFT-B 複合体との相互作用によって順行輸送される. 第 74 回日本細胞生物学会大会. 東京. 6 月 28 日～30 日
10		石田大和、田崎晃司、加藤洋平、中山和久 (2022) IFT52 の変異に起因する骨格形成不全を伴う絨毛病の分子基盤. 第 74 回日本細胞生物学会大会. 東京. 6 月 28 日～30 日
11		周 壮、邱 瀚田、加藤洋平、中山和久 (2022) バルデー・ビードル症候群の原因となる IFT74-IFT81 と IFT25-IFT27 の間の共役異常. 第 74 回日本細胞生物学会大会. 東京. 6 月 28 日～30 日
12		里田裕紀、野口達郎、藤居大樹、加藤洋平、中山和久 (2022) CCRK/CDK20、BROMI/TBC1D32、FAM149B1/JBTS36 の共役による絨毛内タンパク質輸送の調節. 第 74 回日本細胞生物学会大会. 東京. 6 月 28 日～30 日

【図 書】 計(0)件

通番	共著の有無 ^{*1}	著者名、著書名等 ^{*2}
1		

*1 相手国側参加者との共著(共同発表)がある場合は○と記入。

*2 当該発表等を同定するに十分な情報を記載すること。例えば学術論文の場合は、著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年(西暦)、最初と最後の頁、掲載論文の DOI、学会発表の場合は発表者名、発表標題、学会等名、発表年(西暦)、発表地(国名、国外開催の学会の場合のみ)、図書の場合は著者名、著書名、出版社名、発行年(西暦)、総ページ数、ISBN、など(順番は入れ替わってもよい)。相手国側参加者との共著となる場合は、著者名が複数であっても省略せず、その氏名を記入し下線を付すこと。

*3 足りない場合は適宜行を追加すること。

12. 本事業による産業財産権の出願・取得状況(最終年度に出願又は取得したもの)

【出 願】 計(0)件

通番	産業財産権の名称、発明者、権利者、産業財産権の種類、番号、出願年月日、国内・外国の別
1	

【取 得】 計(0)件

通番	産業財産権の名称、発明者、権利者、産業財産権の種類、番号、取得年月日、国内・外国の別
2	

* 必要に応じて、欄を追加してください。