

国際共同研究事業 平成 3 1 年度実施報告書

令和 2 年 4 月 23 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者

所属機関・部局 京都大学・大学院薬学研究科
(ふりがな)
 職・氏名 教授・中山 和久 なかやまかずひさ

1. 事業名 国際共同研究事業 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 (全採用期間)
 平成 31 年 2 月 14 日 ~ 令和 4 年 2 月 13 日 (3 年 0 ヶ月)
4. 研究参加者 (代表者を含む)
 (1) 日本側参加者 2 名 (2) 相手国側参加者 2 名
5. 主要な物品購入状況 (単価 (一品又は一組) 若しくは一式の価格が 50 万円以上のものを購入した場合は記載)

物品名	仕様 型・性能等	数量	単価(円)	金額(円)	設置研究機関名	備考
Invitrogen 社 製・蛍光顕微 鏡	EVOS M5000 一式	1	3,470,040	3,470,040	京都大学	
浜松ホトニク ス社製・分光 装置	W-View Gemini 一式	1	2,019,600	2,019,600	京都大学	
カールツァイ ス社製・自動 フォーカス維 持装置	Definite Focus.2 一式	1	2,733,390	2,733,390	京都大学	

備考：本事業の委託費と他の経費とを合算使用の際は、合算使用した旨を備考欄に記載した上で、金額は本事業の委託費によるもののみ計上してください。

8. 研究実施状況

※ 申請書の内容及び当該年度実施計画書の「5. 本年度実施計画の概要」と対応させつつ、当該年度の研究の実施状況を簡潔に記入してください。年度途中で当初計画を変更した場合にはその内容及び理由も明記してください。

本年度の研究実施状況

本国際共同研究事業は、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を解明する。
 - 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し、TZ による IFT 輸送装置の制御機構を解明する。
 - 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機能の解明。
- 本年度は目的①と②に関して研究を行った。

① 私たちの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-A 複合体と IFT-B 複合体の間の相互作用に関与するサブユニットを同定することに成功した。さらに CRISPR/Cas9 システムを用いて、IFT 複合体間の相互作用に関与するサブユニットの遺伝子をノックアウト（KO）した細胞を樹立した。そして、KO 細胞と IFT 複合体同士が相互作用できなくなる変異体でレスキューした細胞の表現型を蛍光顕微鏡や全反射顕微鏡で観察することで、IFT-A/B 複合体同士の相互作用が繊毛内逆行輸送と GPCR の繊毛内移行に重要であることを明らかにした。この研究成果については論文投稿準備中である。

② 繊毛の TZ の構成タンパク質で、B9 ドメイン（B9D）という共通構造を有する B9D1、B9D2、MKS1 について、上記①と同様に相互作用解析を行い、MKS1-B9D2-B9D1 の順で 3 者複合体を形成すること、および MKS1 の B9D を含む領域が B9D2 と相互作用することを明らかにした。次に、CRISPR/Cas9 を用いて樹立した MKS1 と B9D2 の KO 細胞の表現型解析を行い、B9D タンパク質が繊毛膜タンパク質の繊毛内への保持に必要であることを見出した。この研究成果については論文投稿中である。

設備備品について

本年度の実実施計画書ではカールツァイス社製の倒立型蛍光顕微鏡 AxioObserver.7 の購入を予定していたが、別の研究費で購入できることになったため、本研究費では下記の設備備品を購入した。

Invitrogen 社製の蛍光顕微鏡 EVOS M5000 は、上記の研究実施状況で述べた VIP アッセイを行うために購入した。これまで VIP アッセイに使っていた顕微鏡（約 15 年前に購入）が老朽化していたため、本設備に置き換えることで実験データの質や再現性が向上した。

浜松ホトニクス社製の分光装置 W-View Gemini は、緑と赤の蛍光を 2 色同時に撮影するための光学装置である。この装置を既存の全反射顕微鏡に追加したことで、IFT 輸送装置の 2 色同時観察が可能になった。

カールツァイス社製の自動フォーカス維持装置 Definite Focus.2 は、ライブイメージング時の焦点ズレを自動補正するための装置である。この装置を既存の顕微鏡に取り付けたことで、長時間のタイムラプス撮影が安定してできるようになった。この設備を利用して、今後は繊毛形成や IFT 輸送装置の時空間的な制御メカニズムを明らかにしていく予定である。

国際協働について

イギリス側の研究者らとお互いの研究結果についてインターネットを介して定期的に議論し、意見交換を行いながら研究を進めた。本年度にイギリス側で採用した研究員が母国（バングラデシュ）に急遽帰国することになったため、新たな研究員を募集しなくてはならなくなった。その影響により、本年度に予定していたイギリスへの渡航とイギリス側研究者の来日がしばらく先送りになった。しかしその後、新型コロナウイルス感染症のパンデミックという想定外の出来事が起きてしまったため、本年度中に渡航することが不可能になってしまった。パンデミックが終息し渡航制限が解除されるまでは、インターネットを介してコミュニケーションを図る予定である。

9. 研究発表（平成31年度の研究成果）

【雑誌論文】 計（ 1 ）件 うち査読付論文 計（ 1 ）件

通番	共著の有無*	論文名、著者名等**
1	無	Nozaki, S., Castro Araya, R.F., Katoh, Y. & Nakayama, K. (2019) Requirement of IFT-B-BBSome complex interaction in export of GPR161 from cilia. Biol. Open, 8, bio043786.

【学会発表】 計（ 10 ）件 うち招待講演 計（ 1 ）件

通番	共著の有無*	標題、発表者名等**
1	無	Nakayama, K. & Katoh, Y. (2019) Molecular basis for protein trafficking within cilia and ciliopathies revealed by the visible immunoprecipitation (VIP) assay and CRISPR/Cas9 system. 2019 Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society. Heidelberg, Germany, Sep. 1-4
2	無	Katoh, Y., Kobayashi, T., Hirano, T. & Nakayama, K. (2019) IFT-A-IFT-B interaction is required for ciliary retrograde trafficking and ciliary GPCR import. FASEB Science Research Conference, The Biology of Cilia and Flagella. Snowmass Village, Colorado, USA, Aug. 4-7.
3	無	岡崎美聖, 加藤洋平, 中山和久 (2019) 一次繊毛トランジション・ゾーンを構成するB9ドメインタンパク質複合体の役割. 第92回日本生化学会大会. 横浜. 9月18日～20日.
4	無	野口達郎, 中村健太郎, 加藤洋平, 中山和久 (2019) 繊毛関連キナーゼCCRKの繊毛形成および繊毛機能の制御における役割. 第92回日本生化学会大会. 横浜. 9月18日～20日.
5	無	中村健太郎, 加藤洋平, 中山和久 (2019) 繊毛関連MAPK様キナーゼICKの繊毛内輸送機構とその役割. 第18回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム2019. 静岡. 9月7日～8日.
6	無	藤澤さやか, 野崎梢平, 邱 瀚田, 加藤洋平, 中山和久 (2019) ホスホイノシチド5-ホスファターゼINPP5Eの繊毛膜局在機構. 第18回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム2019. 静岡. 9月7日～8日.
7	無	古林拓也, 平野友章, 加藤洋平, 中山和久 (2019) IFT-A複合体とIFT-B複合体の相互作用による繊毛内逆行輸送とGPCRの繊毛内移行の調節. 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会合同年会. 神戸. 6月24日～26日
8	無	中村健太郎, 加藤洋平, 中山和久 (2019) 繊毛関連キナーICKの繊毛内輸送機構とその機能の解明. 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会合同年会. 神戸. 6月24日～26日
9	無	鶴見侑大, 加藤洋平, 濱田勇輝, 中山和久 (2019) ダイニン2 複合体中間鎖WDR34の繊毛内逆行輸送における役割. 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会合同年会. 神戸. 6月24日～26日
10	無	加藤洋平, 千葉秀平, 中山和久 (2019) 膨張顕微鏡法 (Expansion microscopy) を用いた一次繊毛の超解像観察. 第66回日本生化学会近畿支部例会. 京都. 5月25日

【図 書】 計（ 0 ）件

通番	共著の有無*	題名、著者名等**
1		

* 相手国研究代表者との共著（共同発表）がある場合は○、相手国研究代表者との共著であり謝辞等に事業名を明記

している場合は◎と記入。

- ** 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、論文名、著者名、掲載誌名、巻号や頁等、発表年（西暦）、学会発表の場合は標題、発表者名、学会等名、発表年（西暦）、著書の場合はその書誌情報、など（順番は入れ替わってもよい）。
- *** 足りない場合は適宜行を追加すること。

1. この報告書は、最終年度を除く毎年度提出してください。
2. 本会の事業報告等に記載するための適当な図・写真等があれば、説明を付して添付してください。
3. この報告書は、本共同研究の成果として本会ウェブサイトに掲載します。また、この報告書を本会の事業報告として刊行する場合、内容に影響しない範囲で修正を行うことがあります。
4. 知的財産権等の事情で本報告書の一部の公開を希望しない場合は、対応についてあらかじめ本会担当者に相談してください。