

国際共同研究事業 令和 2 (2020) 年度実施報告書

令和 3 年 4 月 22 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[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

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 3 名

5. 主要な物品明細書 (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
独国 Implen 社製 微量分 光光度計	NanoPhotometer NP80 (液晶タッチ スクリーン搭載モデ ル)	1	1,496,000	1,496,000	京都大学	
英国 Global Life Sciences Solutions Operations 社 製 CCD イメ ージャー	Amersham ImageQuant 800 System 一式	1	3,399,000	3,399,000	京都大学	

※本事業の委託費と他の経費とを合算使用する際は、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で負担した額のみ記載してください。

※再委託先/共同実施先における支出である場合は、備考欄にその旨を記載してください。

7. 渡航実施状況

(1) 当該年度に相手国又は相手国以外の国を訪問した日本側参加者（委託費から支出した出張のみ記載。相手国以外の国における用務先には下線を付すこと。）

氏名	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)
計 0名 (延べ人数)		

* 旅行期間の欄の記入例：「6月10～19日」（旅行開始日～旅行終了日）

(2) 当該年度に受入れた相手国側参加者

氏名	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)
計 0名 (延べ人数)		

* 旅行期間の欄の記入例：「6月10～19日」（旅行開始日～旅行終了日）

8. 研究実施状況

※当該年度実施計画書の「5. 本年度実施計画の概要」の内容と対応させつつ、当該年度の研究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、それぞれの研究の実施状況がわかるように記載してください。

※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記載してください。特に、各費目の増減が研究経費の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、変更理由と費目の内訳を変更しても研究の遂行に支障がなかった理由を記載してください。

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。本年度は主に①と②に取り組んだ。

- 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。TZ による IFT 輸送装置の制御機構の解明。
- 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。

繊毛内タンパク質輸送装置（IFT 装置）は、繊毛タンパク質の順行輸送と逆行輸送に加えて、繊毛ゲートを越えるタンパク質の繊毛内への移行および繊毛外への排出も仲介している。IFT 装置は、IFT-A 複合体と IFT-B 複合体という2つのマルチサブユニット複合体から成るが、この2つの複合体がどのように協同して繊毛内タンパク質輸送を仲介しているのかについてはほとんどわかっていなかった。そこで、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スクリーニングした。その結果、IFT-A 複合体の IFT144-IFT122 と IFT-B 複合体の IFT88-IFT52 が複合体同士の相互作用を媒介していることを発見した。次に、IFT88 ノックアウト(KO)細胞に IFT-A 複合体との相互作用が減弱した IFT88($\Delta\alpha$)変異体を発現させると、IFT88-KO 細胞で見られた繊毛形成不全が部分的に回復した。しかし、IFT88($\Delta\alpha$)発現細胞では、IFT-A 複合体の繊毛内への侵入障害、IFT-B タンパク質の繊毛先端への異常蓄積、G タンパク質共役受容体(GPCR)の繊毛内移行障害が見られた。さらに、繊毛先端部に過剰に蓄積した IFT タンパク質は細胞外小胞として放出されていた。これらの表現型は IFT144-KO 細胞の表現型に類似していた。以上の観察結果から、IFT-A 複合体は IFT-B 複合体と協同することによって、繊毛先端からの逆行輸送だけでなく、GPCR の繊毛内移行も仲介していることが明らかになった (Kobayashi *et al.* (2021) *Mol. Biol. Cell*)。

上記と同様の手法を用いて、IFT 複合体とダイニン-2 の相互作用解析や KO 細胞の表現型解析も行った。これらの結果については来年度以降に論文として発表する予定である。

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-ノックアウト（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 *et al.* (2020) *Mol. Biol. Cell*)。

上記の研究と並行して、膨張顕微鏡法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 *et al.* (2020) *Mol. Biol. Cell*)。

国際協働について

本年度は新型コロナウイルス感染症の世界的な流行のため、本国際共同研究は大きく阻害されることになってしまった。日本では、二度の緊急事態宣言の発令によって研究活動が制限されることになり、一時的には研究がストップする事態となった。一方英国では日本以上の感染拡大に見舞われたために複数回のロックダウンが実施され研究活動は大きく制限された。このように本年度は英国への渡航ならびに英国側研究者の来日は不可能な状況になったため、メールやオンラインツールを利用してコミュニケーションを図ることに努めた。

設備備品について

本年度の計画では設備備品の購入を予定していなかったが、使用していた CCD イメージャー（約 17 年前に購入）が故障したため、新たに英国 Global Life Sciences Solutions Operations 社製 Amersham ImageQuant 800 System を購入した。この設備の導入により、生化学的な研究に必須であるウェスタンブロッティング法を用いたタンパク質の検出がより高感度に行えるようになった。

コロナ禍において研究室の滞在時間を極力短くする必要が生じたため、DNA やタンパク質の濃度などを迅速に測定することができる独国 Implen 社製 微量分光光度計 NanoPhotometer NP80 を購入した。この設備を用いることで、日常的に行っている DNA やタンパク質の定量を素早く行えるようになり、短時間で効率よく実験を進めることができるようになった。

新型コロナウイルス感染症の流行による影響から本年度の当初計画を変更し、消耗品の購入を減らして上記の設備備品を購入した。変更した理由として、2020 年 4 月の緊急事態宣言時には研究活動が一時的に完全に停止し、その後も研究室での活動が必要最小限に制限される時期が続いたことがあげられる。このような制限により、本年度の研究活動（実験作業量）は例年に比べて大幅に低下し、それに伴い実験に使用する消耗品の購入量も大幅に減少することが見込まれた。そこで、短時間で効率的に実験を行うことが可能な設備備品を購入し、限られた活動時間を有効利用する必要があると考えた。また、これらの設備はコロナ禍の終息後の研究活動を加速させることにもつながると考えられる。研究室での活動制限以外にも、学会や研究集会などが中止またはオンライン開催になり、研究者間の情報交換なども多大な制約を受けた。こうした困難な状況下において、研究活動に対するマイナスの影響を最小限に抑えるために計画を柔軟に変更しながら、本年度の研究遂行に最大限努めた。

9. 研究発表（当該年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計（ 7 ）件 うち査読付論文 計（ 7 ）件

通番	共著の有無*1	論文名、著者名等*2
1	無	Ishida, Y., Kobayashi, T., Chiba, S., Katoh, Y., and Nakayama, K. (2021) Molecular basis of ciliary defects caused by compound heterozygous IFT144/WDR19 mutations found in cranioectodermal dysplasia. <i>Hum. Mol. Genet.</i> 10.1093/hmg/ddab034
2	無	Qiu, H., Fujisawa, S., Nozaki, S., Katoh, Y., and Nakayama, K. (2021) Interaction of INPP5E with ARL13B is essential for its ciliary membrane retention but dispensable for its ciliary entry. <i>Biol. Open.</i> 10.1242/bio.057653
3	無	Kobayashi, T., Ishida, Y., Hirano, T., Katoh, Y., and Nakayama, K. (2021) Cooperation of the IFT-A complex with the IFT-B complex is required for ciliary retrograde protein trafficking and GPCR import. <i>Mol. Biol. Cell.</i> 32 , 45–56
4	無	Nakamura, K., Noguchi, T., Takahara, M., Omori, Y., Furukawa, T., Katoh, Y., and Nakayama, K. (2020) Anterograde trafficking of ciliary MAP kinase-like ICK/CILK1 by the intraflagellar transport machinery is required for intraciliary retrograde protein trafficking. <i>J. Biol. Chem.</i> 295 , 13363–13376
5	無	Okazaki, M., Kobayashi, T., Chiba, S., Takei, R., Liang, L., Nakayama, K., and Katoh, Y. (2020) Formation of the B9-domain protein complex MKS1-B9D2-B9D1 is essential as a diffusion barrier for ciliary membrane proteins. <i>Mol. Biol. Cell.</i> 31 , 2259–2268
6	無	Katoh, Y., Chiba, S., and Nakayama, K. (2020) Practical method for superresolution imaging of primary cilia and centrioles by expansion microscopy using an amplibody for fluorescence signal amplification. <i>Mol. Biol. Cell.</i> 31 , 2195–2206
7	無	Nakayama, K., and Katoh, Y. (2020) Architecture of the IFT ciliary trafficking machinery and interplay between its components. <i>Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.</i> 55 , 179–196

〔学会発表〕 計（ 9 ）件 うち招待講演 計（ 2 ）件

通番	共著の有無*1	標題、発表者名等*2
1	無	周壯、加藤洋平、中山和久 (2021) 繊毛内タンパク質輸送複合体 IFT-B の変異に起因する繊毛病バルデー・ビードル症候群 (BBS) 発症の分子基盤. 日本薬学会第 141 年会. WEB 開催. 3月26日～29日.
2	無	中山和久 (2020) 繊毛病の分子基盤:タンパク質間相互作用とゲノム編集に基づく解析. 第 59 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会. オンライン. 2020年12月7日～2021年1月6日.
3	無	中村健太郎、野口達郎、加藤洋平、中山和久 (2020) 繊毛先端に局在する MAPK 様キナーゼ ICK/CILK1 の繊毛内輸送機構と機能. 第 70 回日本薬学会関西支部大会. WEB 開催. 10月10日.
4	無	石田大和、古林拓也、加藤洋平、中山和久 (2020) 繊毛内タンパク質輸送複合体のサブユニット IFT144 の変異に伴う繊毛病の分子基盤. 第 19 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2020. WEB 開催. 8月29日.
5	無	中山和久 (2020) メンブレントラフィック研究から繊毛内タンパク質輸送研究へ:低分子量 GTPase に導かれて. 第 72 回日本細胞生物学会大会シンポジウム「細胞内物質輸送システム;温故知新」. 京都. 6月9日～11日.

6	無	古林拓也, 平野友章, 加藤洋平, 中山和久 (2020) 繊毛内輸送における IFT-A 複合体と IFT-B 複体の相互作用の役割の解明. 第 72 回日本細胞生物学会大会. 京都. 6 月 9 日～11 日.
7	無	石田大和, 古林拓也, 平野友章, 加藤洋平, 中山和久 (2020) IFT-A 複合体サブユニット IFT144 の変異に起因する繊毛病の分子基盤. 第 72 回日本細胞生物学会大会. 京都. 6 月 9 日～11 日.
8	無	加藤洋平, 岡崎美聖, 千葉秀平, 中山和久 (2020) 繊毛膜タンパク質に対する拡散障壁を構成する B9 ドメインタンパク質複体の役割. 第 72 回日本細胞生物学会大会. 京都. 6 月 9 日～11 日.
9	無	邱 瀚田, 野崎梢平, 藤澤さやか, 加藤洋平, 中山和久 (2020) INPP5E の繊毛膜への局在メカニズムの解明. 第 72 回日本細胞生物学会大会. 京都. 6 月 9 日～11 日.

【図 書】 計 (0) 件

通 番	共著の有無*1	題名、著者名等*2
1		

*1 相手国側参加者との共著（共同発表）がある場合は○、相手国側参加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。

*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、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）。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。