

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	QIU HANTIAN
論文題目	Studies on the mechanism of ciliary protein localization and the molecular basis of ciliopathies (繊毛タンパク質の局在機構および繊毛病の分子基盤の解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>動物のほとんどの細胞には、繊毛という細胞膜から突出するアンテナ状のオルガネラが存在する。繊毛膜にはさまざまな受容体やイオンチャネルが局在し、外部刺激の受容やヘッジホッグなどのシグナルの伝達に参与する。繊毛の異常は、嚢胞腎、網膜変性、病的肥満、多指など多様な重篤症状を呈する「繊毛病」と総称される遺伝性疾患を引き起こす。</p> <p>受容体等のタンパク質の繊毛内での輸送は、IFT (intraflagellar transport) 装置によって媒介される。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から構成される。IFT-B複合体はキネシン2と共役して、繊毛内でのタンパク質の順行輸送を担い、IFT-A複合体はダイニン2と共役して繊毛内逆行輸送を担う。しかし、IFT装置と繊毛タンパク質との相互作用や機能的な関連性、繊毛病の分子基盤には不明点が多い。そこで、繊毛内タンパク質輸送機構を解明し、繊毛病の発症機構の理解につなげるために、以下の研究を行った。</p> <p>第一章 ホスホイノシチドホスファターゼINPP5Eの繊毛膜への局在機構</p> <p>繊毛病ジュベール症候群の原因遺伝子によってコードされるINPP5Eは、繊毛膜に局在するホスホイノシチドホスファターゼであり、繊毛膜に存在するPI(4,5)P₂を脱リン酸化してPI(4)Pへと変換する。繊毛膜をPI(4)Pが豊富な環境にすることによって、さまざまなタンパク質の繊毛膜への局在を制御すると考えられている。しかし、INPP5E自体の繊毛局在機構が不明だったので、以下の研究を行った。</p> <p>まず、著者はCRISPR/Cas9システムを用いてINPP5Eノックアウト (KO) 細胞を樹立して表現型を解析した。INPP5E-KO細胞において、IFT88 (IFT-B複合体のサブユニット) やIFT140 (IFT-A複合体のサブユニット) は繊毛内一様に蓄積する異常を示し、ヘッジホッグシグナル依存的に繊毛から排出されるGPCRであるGPR161が繊毛から全く排出されなくなった。これらの結果から、INPP5Eは、繊毛膜でのPI(4,5)P₂からPI(4)Pへの変換を介して、IFT装置の運動を制御することが示唆された。</p> <p>INPP5Eは、C末端付近に存在する繊毛局在化配列 (CTS) を介して、ARF-ARLファミリーに属する低分子量GTPaseのARL13Bと相互作用できること、ARL13B-KO細胞ではINPP5Eが繊毛に局在できなくなることが、所属研究室の先行研究でわかっている。ARL13B-KO細胞とINPP5E-KO細胞の表現型を比較すると、繊毛内のIFT88やIFT140の蓄積の程度が異なることが分かった。また、ARL13Bと相互作用できないINPP5E(ΔCTS)変異体をINPP5E-KO細胞で発現させると、INPP5E(ΔCTS)は繊毛内に局在できないにもかかわらず、IFT装置の異常な蓄積やGPR161の排出不全を回復させた。これらの結果から、INPP5Eの機能に関して、INPP5Eが恒常的に繊毛に局在することは決定的な要因ではないと考えられた。</p> <p>INPP5EとARL13Bの相互作用がない場合に、INPP5Eは繊毛内に進入できても、繊毛膜に保持されない可能性がある。そこで著者は、ラパマイシンにより制御可能な化学誘導性二量体形成法 (FKBP-FRB実験系) を用いて、INPP5Eの繊毛局在を人為的に制御する実験を行った。その結果、INPP5EはCTSを介してARL13Bと結合しなくても、またARL13B自体が存在しない場合でも、繊毛内に進入することはできるが、INPP5EとARL13Bとの間の相互作用がなければ、繊毛膜上に留まることができないことが明らかになった。</p> <p>以上の結果から、INPP5EのARL13Bとの結合は、INPP5Eが繊毛膜にとどまるためには必須であるが、繊毛内への進入にとっては必須ではないことが示された。</p> <p>第二章 ダイニン2複合体中間軽鎖DYNC2LI1の変異に起因する繊毛病の分子基盤</p>			

ダイニン2複合体は、繊毛内タンパク質輸送においてIFT装置の繊毛先端から根元への逆行輸送のモーターとして働いている。ダイニン2複合体の11種類のサブユニット（重鎖DYNC2H1、中間軽鎖DYNC2LI1、中間鎖WDR34、WDR60、軽鎖DYNLL1/2、DYNLRB1/2、DYNLT1/3、CTEX1D2）のうち、下線で示すダイニン2複合体に特異的な5つのサブユニットは、繊毛病のSRTD（短肋骨性胸郭異形成症）、JATD（窒息性胸郭異形成症）の原因遺伝子によってコードされている。先行研究によって、DYNC2LI1の複合ヘテロ接合性変異（1-317とP120S、Δ302-332とL117V、および1-207とT221I）が、短肋骨多指症候群（SRPS、SRTD15）の原因であることが報告されている。これら3種類の複合ヘテロ接合性変異に起因する病態の分子基盤を解明するために、以下の研究を行った。

まず、著者はDYNC2LI1の野生型および各変異体とダイニン2の他のサブユニットとの相互作用を共免疫沈降法によって調べた。DYNC2LI1(T221I)を除くすべての変異体に関して、DYNC2H1およびWDR60との相互作用が減弱したのに対して、DYNC2LI1のいずれの変異もWDR34との相互作用には影響を及ぼさなかった。

次に著者は、DYNC2LI1-KO細胞に各変異体を安定発現させるレスキュー実験を行い、それらの表現型を調べた。DYNC2LI1(1-317)、DYNC2LI1(Δ302-332)、およびDYNC2LI1(1-207)の三つの欠失変異体は、DYNC2LI1-KO細胞の繊毛形成不全やIFT装置の異常な繊毛内蓄積などの表現型をレスキューできなかった。一方、DYNC2LI1(P120S)、DYNC2LI1(L117V)、およびDYNC2LI1(T221I)の三つの点変異体は、いずれもDYNC2LI1-KO細胞の異常な表現型をレスキューした。さらに、繊毛病患者の遺伝子型を模倣して、DYNC2LI1ヘテロ接合体の組合せを共発現させた細胞の表現型を解析した。その結果、DYNC2LI1(1-317)とDYNC2LI1(P120S)の組合せ、およびDYNC2LI1(Δ302-332)とDYNC2LI1(L117V)の組合せを共発現させた細胞では、異常な表現型がレスキューされないことがわかった。

以上の結果から、短肋骨多指症候群の患者で見られるDYNC2LI1の複合ヘテロ接合性変異が、繊毛機能の異常を引き起こす分子基盤であることを明らかにすることができた。

※ 学位授与された方の「論文内容の要旨」、「論文審査結果の要旨」（審査教員作成）は、学位授与日から3ヶ月以内に京都大学学術情報リポジトリに掲載され公開されます。学位申請を行う方は掲載を承認されたものとします。

(論文審査の結果の要旨)

細胞においてアンテナの様な役割を果たす繊毛には、さまざまな受容体やイオンチャネルが局在し、外部刺激の受容やヘッジホッグなどのシグナルの伝達に参与する。繊毛の異常は、嚢胞腎、網膜変性、病的肥満、多指など多様な重篤症状を呈する「繊毛病」と総称される遺伝性疾患を引き起こす。本論文では、繊毛膜タンパク質の局在機構、および繊毛内タンパク質輸送を担うIFT (intraflagellar transport) 装置の機能を調べることによって、繊毛内タンパク質輸送機構を解明して、繊毛病の発症機構の理解につなげるために以下の研究を行った。

第一章では、繊毛病ジュベール症候群 (JBTS) の原因遺伝子によってコードされるホスホイノシチドホスファターゼINPP5E/JBTS1の繊毛膜局在機構について研究を行った。

まず、著者はCRISPR/Cas9システムを用いてINPP5Eのノックアウト (KO) 細胞を樹立して表現型を解析した。INPP5E-KO細胞において、IFT88 (IFT-B複合体のサブユニット) やIFT140 (IFT-A複合体のサブユニット) は繊毛内一様に蓄積する異常を示し、ヘッジホッグシグナル依存的に繊毛から排出されるGPCRであるGPR161が繊毛から全く排出されなくなった。これらの結果から、INPP5Eは、繊毛膜でのPI(4,5)P₂からPI(4)Pへの変換を介して、IFT装置の運動を制御することが示唆された。

INPP5Eは、C末端付近に存在する繊毛局在化配列 (CTS) を介して、ARF-ARLファミリーに属する低分子量GTPaseのARL13B/JBTS8と相互作用できること、ARL13B-KO細胞ではINPP5Eが繊毛に局在できなくなることが先行研究でわかっている。ARL13B-KO細胞とINPP5E-KO細胞の表現型を比較すると、IFT88やIFT140の繊毛内への蓄積の程度が異なることがわかった。また、ARL13Bと相互作用できないINPP5E(ΔCTS)変異体をINPP5E-KO細胞で発現させると、INPP5E(ΔCTS)は繊毛内に局在できないにもかかわらず、IFT装置の異常な蓄積やGPR161の排出不全を回復させた。これらの結果から、INPP5Eの機能に関して、INPP5Eが恒常的に繊毛に局在することは決定的な要因ではないと考えられた。

INPP5EとARL13Bの相互作用がない場合に、INPP5Eは繊毛内に進入できても、繊毛膜に保持されない可能性がある。そこで著者は、ラパマイシンにより制御可能な化学誘導性二量体形成法 (FKBP-FRB実験系) を用いて、INPP5Eの繊毛局在を人為的に制御する実験を行った。その結果、INPP5EはCTSを介してARL13Bと結合しなくても、またARL13B自体が存在しない場合でも、繊毛内に進入することはできるが、INPP5EとARL13Bとの間の相互作用がなければ、繊毛膜上にとどまることができないことが明らかになった。

以上の結果から、INPP5EのARL13Bとの結合は、INPP5Eが繊毛膜にとどまるためには必須であるが、繊毛内への進入にとっては必須ではないことが示された。

第二章では、繊毛内タンパク質輸送においてIFT装置の繊毛先端から根元への逆行輸送のモーターとして働くダイニン2複合体のサブユニットDYNC2LI1について研究を行った。ダイニン2複合体の11種類のサブユニットのうちで、DYNC2LI1を含む5つのダイニン2特異的なサブユニットの変異は、繊毛病のSRTD (短肋骨性胸郭異形成症)、SRPS (短肋骨多指症候群) やJATD (窒息性胸郭異形成症) を引き起こすことが知られている。先行研究によって、DYNC2LI1の複合ヘテロ接合性変異(1-317とP120S、Δ302-332とL117V、および1-207とT221I)が、SRPSの原因であることが報告されている。これら3種類の複合ヘテロ接合性変異に起因する病態の分子基盤を解明するために研究を行った。

まず、著者はDYNC2LI1の野生型および各変異体とダイニン2の他のサブユニットとの相互作用を共免疫沈降法によって調べた。DYNC2LI1(T221I)を除くすべての変異体に関して、ダイニン2複合体の他のサブユニットであるDYNC2H1およびWDR60との相互作用が減弱したのに対して、DYNC2LI1のいずれの変異もWDR34との相互作用には影響を及ぼさなかった。

次に著者は、DYNC2LI1-KO細胞に各変異体を安定発現させるレスキュー実験を行い、それらの表現型を調べた。DYNC2LI1(1-317)、DYNC2LI1(Δ302-332)、およびDYNC2LI1(1-207)の三つの欠失変異体は、DYNC2LI1-KO細胞の繊毛形成不全やIFT装置の異常な繊毛内蓄積などの表現型をレスキューできなかった。一方、DYNC2LI1(P120S)、DYNC2LI1(L117V)、およ

びDYNC2LI1(T221I)の三つの点変異体は、いずれもDYNC2LI1-KO細胞の異常な表現型をレスキューした。さらに、SRPS患者の遺伝子型を模倣するようなDYNC2LI1のヘテロ接合体の組合せを共発現させた細胞の表現型を解析したところ、DYNC2LI1(1-317)とDYNC2LI1(P120S)の組合せ、およびDYNC2LI1(Δ 302-332)とDYNC2LI1(L117V)の組合せを共発現させた細胞では、異常な表現型がレスキューされないことが明らかになった。

以上の結果から、SRPSの患者で見られるDYNC2LI1の複合ヘテロ接合性変異が、繊毛機能の異常を引き起こす分子基盤であることを明らかにした。

以上、著者は、繊毛タンパク質INPP5Eの繊毛膜局在機構を明らかにし、DYNC2LI1の変異（ヘテロ接合性変異）に起因する繊毛病の分子基盤を解明した。これらの研究成果は、繊毛タンパク質の局在や繊毛病発症の理解につながるものである。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和3年8月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降