

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	ZHOU ZHUANG
論文題目	Molecular basis of Bardet-Biedl syndrome caused by defects of intraflagellar transport complex IFT-B (繊毛内タンパク質輸送複合体IFT-Bの欠陥に起因する繊毛病バルデー・ビードル症候群の発症の分子基盤)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>一次繊毛はヒトのほとんどの細胞がもつアンテナ状のオルガネラである。そこにはさまざまな受容体やイオンチャネルが局在し、外部刺激やヘッジホッグなどのシグナルを受容して伝達する。繊毛機能の破綻によって、多様な重篤症状を呈する繊毛病が発症する。繊毛病バルデー・ビードル症候群 (BBS) は、病的肥満、多指症、網膜変性、慢性腎障害などの症状を特徴とする。これまでに、22の遺伝子の変異がBBSの原因となることが報告されている。</p> <p>繊毛内タンパク質輸送を媒介するIFT装置は、IFT-A複合体、IFT-B複合体、BBSome複合体からなる超分子複合体であり、モータータンパク質のキネシン2とダイニン2によって順行輸送と逆行輸送が駆動される。BBS原因遺伝子によりコードされる8サブユニットからなるBBSomeは、IFT-B複合体と繊毛GPCRとの間のアダプターとして機能し、GPCRの繊毛からの排出を媒介する。その際に、LZTFL1/BBS17が、IFT-B複合体を構成するIFT25-IFT27二量体とBBSomeの間を連結すると考えられている。BBSomeのサブユニットの変異だけでなく、IFT74/BBS22やIFT27/BBS19などのIFT-Bサブユニットの変異によってもBBSが発症するが、その分子基盤は不明であった。そこで、繊毛内タンパク質輸送複合体IFT-Bの欠陥に起因するBBSの発症の分子基盤を解明するために、以下の研究を行った。</p> <p>第一章 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</p> <p>まず、観るだけでわかるタンパク質間相互作用解析法 (visible immunoprecipitation assay ; VIPアッセイ) と共免疫沈降法を用いて、IFT-B複合体を構成するIFT74-IFT81二量体が、別個の領域を介して、IFT22、低分子量GTPaseのRABL2、IFT25-IFT27二量体、IFT46-IFT52二量体に結合することを明らかにした。さらに、BBS患者で見られるIFT74のC末端欠失変異、IFT74(1-561)、およびIFT27の点変異、IFT27(C100Y)とIFT27(Y36C)によって、IFT74-IFT81二量体とIFT25-IFT27二量体の間の相互作用が失われることを見出した。</p> <p>次に、CRISPR/Cas9システムを用いて、IFT27ノックアウト (KO) 細胞とIFT74-KO細胞を樹立して表現型を解析した。IFT27-KO細胞は、BBSomeの繊毛内への異常蓄積に伴って、繊毛GPCRが繊毛から排出されない表現型を示した。一方、IFT74-KO細胞は繊毛をまったく形成できなかった。</p> <p>次に、野生型のIFT27とBBS型のIFT27変異体をIFT27-KO細胞に発現させて、細胞の表現型を比較した。野生型のIFT27をIFT27-KO細胞に発現させると、BBSomeの繊毛内への異常蓄積は解消され、GPCRは繊毛外へと正常に排出されるようになった。一方、BBS型のIFT27変異体をIFT27-KO細胞に発現させても、これらの異常は回復しなかった。さらに、野生型のIFT74をIFT74-KO細胞に発現させると、繊毛形成は回復するとともに正常細胞と同様の表現型を示すようになったのに対して、BBS型のIFT74変異体をIFT74-KO細胞に発現させると、繊毛形成はある程度回復したが、BBSomeの繊毛内への異常蓄積やGPCRの排出異常を示した。</p> <p>以上の結果から、BBS患者で見られるIFT27の点変異およびIFT74の欠失変異は、どちらもIFT25-IFT27二量体とIFT74-IFT81二量体の間の相互作用を失わせるとともに、BBSに特有の</p>			

繊毛異常を引き起こすことが明らかになった。IFT25-IFT27 二量体は IFT-B 複合体と BBSome との間の連結に関与することから、この連結の喪失が BBS における繊毛異常の原因であると考えられる。

第二章 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

第一章で、IFT-B 複合体を構成する IFT74-IFT81 二量体と他のサブユニット (IFT22、IFT25-IFT27、IFT46-IFT52) および低分子量 GTPase の RABL2 との相互作用を調べる過程で、BBS 患者で見られる IFT74 と IFT27 の変異によって、IFT74-IFT81 二量体と IFT25-IFT27 二量体の間の相互作用が失われることを見出した。さらに、IFT74-IFT81 上の IFT25-IFT27 結合部位は、RABL2 の GTP 結合型変異体、RABL2(Q80L)の結合部位と重複する可能性も見出した。先行研究によって、RABL2(Q80L)を正常細胞に発現させると、IFT27-KO 細胞と同様の繊毛異常を引き起こすことが報告されていた。これらのことから、RABL2(Q80L)が IFT25-IFT27 二量体と競合的に IFT74-IFT81 二量体に結合することが、BBS に特有の表現型異常を引き起こす可能性が考えられた。この可能性について検討するために、以下の研究を行った。

まず、EGFP-RABL2(WT)またはRABL2(Q80L)と一緒に、EGFP-IFT74+IFT81およびmCherry-IFT25+IFT27をHEK293T細胞に共発現させて、細胞のライセートを抗GFP抗体を用いて免疫沈降した。この免疫沈降物について、抗mCherry抗体および抗GFP抗体を用いてイムノブロッティングを行うことによって、RABL2(Q80L)の共存下では、IFT74+IFT81はIFT25+IFT27を共免疫沈降できないことが明らかになった。これらの結果から、IFT74-IFT81二量体へのIFT25-IFT27二量体とRABL2(Q80L)の競合的結合が証明された。

これまでの研究によって、GTP結合状態のRABL2は基底小体タンパク質CEP19に依存して繊毛基部の基底小体に局在し、IFT74-IFT81二量体と相互作用してIFT装置の繊毛内への進入を媒介することがわかっている。そこで、RABL2(WT)とRABL2(Q80L)を正常細胞およびCEP19-KO細胞に発現させて、細胞の表現型を比較した。RABL2(Q80L)を発現させると、正常細胞でもCEP19-KO細胞でも、BBSomeとLZTFL1の繊毛内への異常蓄積に伴って、繊毛GPCRの繊毛外への排出異常を引き起こした。一方、RABL2(Q80L)を正常細胞に発現させると繊毛内に局在できたが、CEP19-KO細胞に発現させた場合には局在できなかった。これらの結果から、RABL2(Q80L)はCEP19に依存的に繊毛内に進入するが、繊毛内への進入とBBSで見られる繊毛異常とは必ずしも相関しないことが明らかになった。

以上の結果から、RABL2(Q80L)がIFT74-IFT81二量体に結合すると、IFT-B複合体におけるIFT25-IFT27二量体とIFT74-IFT81二量体の間の相互作用を失わせることが明らかになった。IFT25-IFT27二量体はIFT-B複合体とBBSomeとの連結部位を構成することから、RABL2(Q80L)によるIFT-B複合体とBBSomeの間の共役の喪失が、BBSome依存的な繊毛GPCRの繊毛外への排出異常を引き起こすと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

細胞においてアンテナ様の役割を果たす一次繊毛には、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。繊毛病バルデー・ビードル症候群 (BBS) は、病的肥満、多指症、網膜変性、慢性腎障害などの症状を特徴とする。これまでに、22 の BBS 原因遺伝子が報告されている。

繊毛内タンパク質輸送を媒介する IFT 装置は、IFT-A 複合体、IFT-B 複合体、BBSome 複合体からなる超分子複合体であり、モータータンパク質のキネシン 2 とダイニン 2 によって順行輸送と逆行輸送が駆動される。BBS 原因遺伝子によりコードされる 8 サブユニットからなる BBSome は、IFT-B 複合体と繊毛 GPCR との間のアダプターとして機能して、GPCR の繊毛からの排出を媒介する。IFT-B 複合体の 16 サブユニットのうちで、IFT27/BBS19、IFT74/BBS22、IFT172/BBS20 だけが BBS 患者で変異していることが知られている。また、IFT-B と BBSome の連結に参与すると考えられる LZTFL1/BBS17 も BBS 患者で変異している。しかし、BBSome 以外のタンパク質の変異がどのようにして BBS を引き起こすのかの分子基盤は不明であった。そこで、繊毛内タンパク質輸送複合体 IFT-B の欠陥に起因する BBS の発症の分子基盤を解明するために、著者は以下の研究を行った。

第一章ではまず、タンパク質間相互作用解析によって、IFT-B 複合体を構成する IFT74–IFT81 二量体が、別個の領域を介して、IFT22、低分子量 GTPase の RABL2、IFT25–IFT27 二量体、IFT46–IFT52 二量体に結合することを見出した。さらに、BBS 患者で見られる IFT74 の C 末端欠失変異 IFT74(1–561)、および IFT27 の点変異 IFT27(C100Y)と IFT27(Y36C)によって、IFT74–IFT81 二量体と IFT25–IFT27 二量体間の相互作用が失われることを見出した。

次に、IFT27 ノックアウト (KO) 細胞と IFT74-KO 細胞を樹立して表現型を解析した。IFT27-KO 細胞は、BBSome の繊毛内への異常蓄積に伴って、繊毛 GPCR が繊毛から排出されない表現型を示した。一方、IFT74-KO 細胞は繊毛をまったく形成できなかった。IFT27-KO 細胞に野生型 IFT27 を発現させると異常な表現型は回復したが、BBS 型の IFT27 点変異体を発現させても異常な表現型は回復しなかった。IFT74-KO 細胞に野生型 IFT74 を発現させると繊毛形成は回復し、表現型は正常になった。一方、IFT74-KO 細胞に BBS 型の IFT74 欠失変異体を発現させると、繊毛形成はある程度回復したが、BBS の特有の異常、すなわち BBSome の繊毛内への異常蓄積に伴って、繊毛 GPCR が繊毛から排出されない表現型を示した。

以上の結果から、BBS 患者で見られる IFT27 の点変異および IFT74 の欠失変異は、どちらも IFT25–IFT27 二量体と IFT74–IFT81 二量体間の相互作用を失わせるとともに、BBS に特有の繊毛異常を引き起こすことが明らかになった。すなわち、IFT25–IFT27 二量体は IFT-B 複合体と BBSome との間の連結に参与することから、この連結の喪失が BBS における繊毛異常の原因であることが示唆された。

第二章では、第一章で見出された IFT74–IFT81 上の IFT25–IFT27 結合部位が RABL2 の GTP 結合型変異体 RABL2(Q80L)の結合部位と重複する可能性について検証した。タンパク質間相互作用解析を行うことによって、IFT25–IFT27 二量体と RABL2(Q80L)の IFT74–IFT81 二量体上の重複する領域への競合的結合が証明された。先行研究によって、RABL2(Q80L)を

正常細胞に過剰発現させると、BBS 特有の繊毛異常を引き起こすことが報告されていた。したがって、RABL2(Q80L)が IFT25-IFT27 二量体と競合的に IFT74-IFT81 二量体に結合することが、BBS に特有の繊毛異常を引き起こす可能性が示唆された。

一方、先行研究によって、GTP 結合型の RABL2 は基底小体タンパク質 CEP19 に依存して繊毛基部に局在し、IFT74-IFT81 二量体と相互作用して IFT 装置の繊毛内への進入を媒介することがわかっていた。そこで、RABL2(WT)と RABL2(Q80L)を正常細胞および CEP19-KO 細胞に発現させて、細胞の表現型を比較した。RABL2(Q80L)を発現させると、正常細胞でも CEP19-KO 細胞でも、BBSome と LZTFL1 の繊毛内への異常蓄積に伴って、繊毛 GPCR の繊毛外への排出異常を引き起こした。一方、RABL2(Q80L)を正常細胞に発現させると繊毛内に局在できたが、CEP19-KO 細胞に発現させた場合には局在できなかった。これらの結果から、RABL2(Q80L)は CEP19 に依存的に繊毛内に進入するが、繊毛内への進入と BBS で見られる繊毛異常とは必ずしも相関しないことが明らかになった。

以上、著者は、IFT-B複合体のサブユニットの変異に起因するBBS発症の分子基盤を明らかにし、そこから派生して、低分子量GTPaseのRABL2がIFT-B複合体の構築において果たす役割、そしてRABL2のGTP結合型変異体がBBS様の異常な表現型をもたらす機構を明らかにした。これらの研究成果は、繊毛内タンパク質輸送の異常と繊毛病発症の関連の理解につながるものであり、科学的・医学的に極めて重要である。

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4年8月25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