

繊毛・鞭毛における新規なタンパク質メチル化修飾の機能解析

Functional analysis of novel protein methylation in cilia and flagella

(日本動物学会推薦)

代表研究者	福井大学	水野 克俊	University of Fukui	Katsutoshi MIZUNO
協同研究者	福井大学	水野 なつみ	University of Fukui	Natsumi SHIMIZU-MIZUNO
	福井大学	折坂 誠	University of Fukui	Makoto ORISAKA
	筑波大学	稲葉 一男	University of Tsukuba	Kazuo INABA
	福井県立大学	伊藤 貴文	Fukui Prefectural University	Takafumi ITOH

Cilia and flagella are evolutionarily conserved organelles essential for eukaryotic cells, including multicellular organisms. Cilia and flagella are composed of more than 500 proteins, however, the mechanisms underlying their assembly and disassembly remain poorly understood. We previously reported that ciliary proteins in *Chlamydomonas* undergo characteristic protein methylation (Mizuno and Sloboda, 2017), and that methylation is enhanced during ciliary resorption, suggesting a functional role in ciliary dynamics. However, whether this phenomenon is conserved in mammals has remained unclear. In this study, we investigated protein methylation in mammalian sperm and cilia, focusing on protein arginine methyltransferases (PRMTs). Immunoblotting and immunostaining revealed that multiple PRMTs localize not only to sperm flagella but also to the sperm head. Proteomic analysis using LC-MS/MS identified methylated proteins associated with both flagellar and acrosomal structures, implicating methylation in cytoskeletal organization, motility, and fertilization. Similar localization patterns were observed in ascidian sperm, suggesting evolutionary conservation. In mammalian cells, methylated proteins and PRMTs showed distinct localization patterns depending on ciliary type, including ciliary basal enrichment and punctate distribution along motile cilia. These findings indicate that protein methylation plays diverse and conserved roles in ciliary structure and function, providing new insights into extranuclear methylation and its relevance to development and disease.

研究目的

繊毛・鞭毛は真核生物において広く保存され、多細胞動物においても欠かせない機能を有する。繊毛・鞭毛は 500 以上のタンパク質種からなる複雑な細胞小器官だが、その構築/脱構築メカニズムに関しては詳しくわかっていない。以前に申請者は、緑藻クラミドモナスにおいて繊毛・鞭毛を構成するタンパク質群が特徴的なタンパク質メチル化修飾を受けていることを初めて発見した (Mizuno and Sloboda, 2017)。クラミドモナスは繊毛を除去後の再生、あるいは刺激を与えて繊毛を吸収させることで、繊毛の構築と脱構築を検討できる。我々の解析により繊毛の脱構築時に繊毛構成タンパク質のメチル化が亢進し、繊毛におけるタンパク質メチル化の重要な機能が示唆

された。一方でこの現象が哺乳類を含めた真核生物に普遍的かは不明であった。近年、申請者は、マウスを材料とした研究を開始した。申請者の研究により、哺乳類の細胞でメチル化タンパク質が繊毛基部あるいは繊毛に沿って斑点状に局在することが明らかになった。さらに精子においては、鞭毛にとどまらず精子の頭部先体部位において非常に特徴的な染色が観察された。一方で、実際にメチル化を受けるタンパク質やメチル化の機能は明らかになっていなかった。タンパク質メチル化はこれまで、ヒストンや DNA に対する修飾について着目して研究が行われてきたが、一方で核外タンパク質のメチル化研究は立ち遅れている。繊毛や鞭毛における翻訳後修飾は、運動あるいは繊毛の構築や脱構築における重要

な機能が予測される。また、精子頭部先体付近の局在は受精における機能を示唆する。本研究では、一次繊毛、運動性繊毛、精子を対象として、タンパク質修飾による精子/繊毛という巨大構造体の構築メカニズムを明らかにし、タンパク質メチル化の新たな機能を明らかにすることを目指した。

研究経過

(1) 精子におけるタンパク質メチル化の解析

まず、我々はマウスの精子を対象として、タンパク質メチル化の研究を試みた。特に、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 (PRMT) に着目した。これまで、複数種の PRMT が精巣において発現していることは知られたが、精子の形成、成熟が完了した精子における解析は進んでいなかった。我々がウエスタンブロットおよび免疫染色で、タンパク質の発現と局在を検討した結果、複数種の PRMT が精子鞭毛および精子頭部先体に局在していた。加えて、非対称アルギニンジメチル化修飾を受けるタンパク質が精子頭部先体部および鞭毛に局在していることが明らかとなった。これらの修飾を受けるタンパク質を同定するため、トリプシン消化したペプチドを修飾抗体により濃縮後、LC-MS/MS により網羅的に同定を行った。その結果、鞭毛構成タンパク質や先体構成タンパク質群として、興味深いタンパク質のリストを得ることに成功した。その中でも、細胞骨格系制御とタンパク質メチル化の関係性が示唆された。現在は、PRMT の flox マウスを作成することで、コンディショナルノックアウトマウスの作成を行い、精子局在性 PRMT の機能解析を行うことを目指すとともに、ゲノム編集を通じてタンパク質修飾部位に変異が生じた場合の構造に対する効果を検証するため、実験に取り組んでいる。

また、動物界において精子におけるこれらの修飾が保存されているかを検討するため、比較的単純な構造の精子を有する海産動物カタユレイボヤを用いて、同様の修飾の解析を行った。精子における PRMT の局在やタンパクアルギニンジメチル化タンパク質のホヤ精子における局在も確認され、これらのタンパク質の機能が進化的に保存されていることが示唆された。現在は、ホヤ精子を用いて、修飾ペプチドの免疫沈降と質量分析による同定に取り組んでいる。

(2) 繊毛におけるタンパク質メチル化の解析

繊毛においては、これまでクラミドモナスにおいて、繊毛上に斑点上に鞭毛内輸送に関連したスポット状に PRMT およびアルギニンジメチル化タンパク質が局在することを示していた (Mizuno and Sloboda, 2017)。今回我々は、線維芽細胞 NIH/3T3 を用いて不動一次繊毛および運動性を有する卵管上皮繊毛における PRMT およびメチル化タンパク質の局在を検討した。その結果、クラミドモナスで見られたような斑点状の PRMT およびメチル化タンパク質の局在は不動一次繊毛では確認されなかったが、繊毛の基部において、PRMT およびメチル化タンパク質特徴的な局在が観察された。繊毛基部は繊毛構成タンパク質のゲートとして内部に運び込まれる荷物の選別が行われる箇所であり、この局在はこの機能と関係する可能性もあり興味深い。また、運動性を有する多繊毛である卵管繊毛においては、繊毛基部での局在が観察されなかった一方で、繊毛に沿った斑点状のメチル化タンパク質の局在が確認された。これらの斑点状の局在は繊毛内における輸送とメチル化修飾が関係していること可能性も考えられる。以上の結果は、繊毛の運動性あるいは単繊毛/多繊毛性に応じて、メチル化タンパク質や PRMT の局在に違いがある可能性を示唆していた。そこで、運動性を有し単繊毛性を有するバフンウニ胚上皮繊毛で同様に局在の検討を行った所、繊毛基部への局在、および繊毛に沿った斑点状の局在が確認された。これは同じく運動性と少数繊毛（二繊毛）である緑藻クラミドモナスの知見と一致していた。これらの知見は、アンテナとしての機能を有する一次繊毛の進化などとの関連からも興味深い。現在は、緑藻クラミドモナスおよび哺乳類細胞一次繊毛を用いて、これらの繊毛におけるタンパク質修飾の実体を明らかにするため、TurboID を利用した近接標識法と質量分析を利用した解析に取り組んでいる。

考察

まとめ

少数の運動性繊毛/鞭毛を有する精子や緑藻、ウニ上皮繊毛、さらに非運動性の一次繊毛および運動性多繊毛上皮において、それぞれ異なる局在が認められた。このことは、これらの修飾の機能が進化的に保存されている可能性を示すとともに、タンパク質メチル化が繊毛の構築や運動性に重要な役割を担うことを示唆する。

また精子では、当初想定していた鞭毛に加え、頭部の先体にも特徴的な局在が観察された。この結果は、タンパク質メチル化が鞭毛の形成や運動のみならず、受精過程にも関与する可能性を強く示している。

これらの知見は、核外領域においてもタンパク質メチル化が重要な機能を持つことを裏付けるものである。加えて、哺乳類に限らず多様なモデル生物を用いた解析から、繊毛の進化過程におけるタンパク質メチル化の関与も示唆された。今後は、精子および繊毛構成タンパク質のメチル化に関するプロテオーム解析を進めるとともに、ノックアウトマウスの作製やゲノム編集による機能阻害実験を通じて、タンパク質メチル化およびPRMTをはじめとするメチル基転移酵素が、繊毛・鞭毛の細胞骨格構造や精子先体の形成、さらには運動活性化や受精にどのように寄与するのかを詳細に解析していく予定である。これらの研究により、これまで十分に検討されてこなかった繊毛・鞭毛におけるタンパク質メチル化の機能を体系的に明らかにし、その進化的意義を検証するとともに、上皮繊毛や精子の構造・運動と疾患との関連についても新たな知見が得られることが期待される。

研究の発表

1. **水野克俊**, 寺尾和香菜, 加藤諒大, 藤田聡, 伊藤貴文, 山田雅己. 細胞内 pH 変化に応答した神経細胞遊走の可逆的方向転換「Kibisu-gaeshi」の分子機序. 第 48 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表). パシフィコ横浜. 2025 年 12 月
2. 芝田宙, **水野克俊**, 伊藤貴文, 山田雅己. 近接依存性標識法を用いた神経細胞内 KPNA/importin a のタンパク質相互作用解析. 第 48 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表). パシフィコ横浜. 2025 年 12 月
3. **水野克俊**, 水野なつみ, 柴小菊, 稲葉一男, 伊藤貴文, 折坂誠, 山田雅己. マウス精子における核外タンパク質メチル化の機能解析. 第 98 回日本生化学会大会 (ポスター発表). 国立京都国際会館. 2025 年 11 月
4. **Katsutoshi Mizuno**, Natsumi Shimizu-Mizuno, Tomohiro Kubo, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Makoto Orisaka, and Masami Yamada. Analysis of the Role of Protein Methylation in Ciliary Function. Joint Meeting of JSCB 77th/JSDB 58th (Poster Presentation). Winc Aichi (Nagoya). 2025 July.
5. 寺尾 和香菜, **水野克俊**, 加藤 諒大, 藤田 聡, 伊藤 貴文, 山田 雅己. 細胞内 pH 変化に依存した神経細胞遊走の可逆的な方向転換. (Kibisu-gaeshi) の分子レベルでの機序解析. 日本生化学会北陸支部第 43 回大会 (口頭発表). 金沢大学. 2025 年 6 月
6. 水野なつみ, **水野克俊**, 柴 小菊, 稲葉 一男, 山田 雅己, 折坂 誠, 吉田 好雄. マウス精子において非ヒストンタンパク質翻訳後修飾が果たす役割について. 第 43 回日本受精着床学会総会・学術講演会 (ポスター発表). 名古屋マリオットアソシアホテル. 2025 年 8 月
7. 水野なつみ, **水野克俊**, 柴 小菊, 稲葉 一男, 山田 雅己, 折坂 誠, 吉田 好雄. マウス精子における非ヒストンタンパク質翻訳後修飾の解析. 第 66 回日本卵子学会学術集会 (ポスター発表). 広島コンベンションホール. 2025 年 5 月
8. **水野克俊**, 水野なつみ, 柴小菊, 稲葉一男, 折坂誠, 山田雅己. 繊毛・鞭毛構成タンパク質におけるメチル化の解析. 2025 年生体運動研究合同班会議 (口頭発表). グランシップ静岡. 2025 年 1 月
9. **水野克俊**, 水野なつみ, 柴小菊, 稲葉一男, 折坂誠, 山田雅己. 真核生物一次繊毛および運動性繊毛・鞭毛構成タンパク質メチル化の解析. 第 95 回日本動物学会 長崎大会 (口頭発表). 長崎大学文教キャンパス. 2024 年 9 月
10. **水野克俊**, 水野なつみ, 久保智広, 柴小菊, 稲葉一男, 折坂誠, 山田雅己. 繊毛・鞭毛におけるタンパク質メチル化の解析. 第 47 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表). 福岡国際会議場/マリンメッセ福岡. 2024 年 11 月
11. 寺尾和香菜, **水野克俊**, 加藤諒大, 伊藤貴文, 藤田聡, 山田雅己. 神経細胞移動の可逆的な方向転換 (Kibisu-gaeshi 現象) に関わるアクチンダイナミクスの解析. 第 47 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表). 福岡国際会議場/マリンメッセ福岡. 2024 年 11 月
12. **水野克俊**, 寺尾和香菜, 加藤諒大, 伊藤貴文, 藤田聡, 山田雅己. 細胞内 pH に依存する神経細胞の可逆的な動態変化の分子機序. 第 97 回日本生化学会大会 (ポスター発表). パシフィコ横浜. 2024 年 11 月
13. **水野 克俊**, 加藤 諒大, 寺尾 和香菜, 伊藤 貴文, 藤田 聡, 山田 雅己. 第 76 回日本細胞生物学会

大会（口頭発表）. つくば国際会議. 2024 年 7 月.

14. 久富 理、**水野 克俊**、山田 雅己. 第 76 回日本細胞生物学会大会（ポスター発表）. つくば国際会議場. 2024 年 7 月

誌上発表

1. Makoto Orisaka, Aya Shirafuji, Natsumi Shimizu-Mizuno, Miki Uesaka, Yuko Fujita, **Katsutoshi Mizuno**, Masayuki Fujita, Yumiko Miyazaki, Toshimichi Onuma, Hideaki Tsuyoshi, Tetsuya Mizutani, Benjamin Tsang, and Yoshio Yoshida. Negative Impacts of Ovarian Endometrioma on Preantral Follicle Development: Implications for Endometriosis-Related Infertility. *Frontiers in Endocrinology*. In press. 2026.
2. Aya Shirafuji, Makoto Orisaka, Natsumi Shimizu-Mizuno, Miki Uesaka, Yuko Fujita, **Katsutoshi Mizuno**, Masayuki Fujita, Yumiko Miyazaki, Toshimichi Onuma, Hideaki Tsuyoshi, Tetsuya Mizutani, Yoshio Yoshida. Pro-inflammatory cytokines disrupt in vitro preantral follicle development by targeting granulosa and theca cell functions. *Frontiers in Endocrinology* 16. 1667019 2026
3. **Katsutoshi Mizuno**, Masaki Sugahara, Osamu Kutomi, Ryota Kato, Takafumi Itoh, Satoshi Fujita, Masami Yamada. Direct Observation of Importin α Family Member KPNA1 in Axonal Transport With or Without a Schizophrenia-Related Mutation. *Journal of Biological Chemistry* 301.108343. 2025