

平成 22 年 2 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590188
 研究課題名 (和文) 神経細胞の一次線毛の構造と機能に関する分子細胞生物学的研究
 研究課題名 (英文) Molecular Cell Biology of the Neuronal Primary Cilium - Elucidation of its Structure and Functions -

研究代表者

竹田 扇 (TAKEDA SEN)
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
 研究者番号：20272429

研究成果の概要： 神経系細胞の一次線毛をシナプス以外の新しい情報伝達システムとして捉え、どのような構造と機能を有しているかを解析した。この結果、線毛は9+0という感覚線毛の特徴である微小管構造を有し、その膜上にはセロトニン、ソマトスタチン、NPFFなどに対する受容体が局在することが明らかになった。また、線毛上の受容体へのリガンド刺激に依り細胞内のcAMP濃度に変化がもたらされ、神経の情報伝達系への影響が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
平成 20 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：神経細胞、一次線毛、情報伝達、G 蛋白質共役型受容体、カルシウム

1. 研究開始当初の背景

細胞は不断に変化する外部環境に応じて内部環境 (milieu intérieur) を一定に保つシステムを有しており、これを内部恒常性 (homeostasis) の維持と呼んでいる。変化する外部環境を感知する為のアンテナとして細胞は様々な仕掛けを有しており、その一つに線毛 (cilia) がある。一般に「線毛」といえば、気管支上皮や卵管上皮に存在するもので代表される様に、内部 (軸糸, axoneme) の微小管の構造が9+2の様式を有した動線毛が有名であり、これを従来型線毛 (conventional cil

ia) と呼んでいる。通常これらの線毛は鞭打ち運動を行ってmetachronal waveを作り、物質 (喀痰や卵子など) を特定の方向に輸送する働きをしている。一方、近年我々の研究により脚光を浴びるようになった一次線毛 (primary cilia) は軸糸の構造が9+0で中心の微小管を欠く。

一次線毛とは？

このタイプの線毛は、従来不動であるとされて来たが、我々が行った90年代末期からの一連の研究 (Nonaka et al., 1998; Takeda

et al., 1999, Okada et al., 2005) により一次線毛にも動くものがある事、またこのタイプの線毛が哺乳類（マウス）の発生初期に於いてからだの左右軸を決定するという極めて重要なイベントに関係している事が明らかとなった。更にこの時、線毛形成に於いて重要な役割を果たしている分子モーター蛋白質の機能を低下させた変異マウス (*Kif3* hypomorph mutant) を作成すると、*Kif3*のnull mutantとは異なり生まれてくるが、造精障害（男性不妊）、網膜視細胞変性、末梢神経障害、水頭症、肥満、多指症など多彩な症候を呈する事が明らかとなった（Takeda et al., 未発表）。これら何れの器官に於いても一次線毛或いはその誘導体が存在しており、症候の発現に一次線毛の形成異常或いは機能障害があることが推測される。特に神経系で見られる異常が神経細胞やグリア細胞に存在する一次線毛の異常に依って起こる事が予想され、その基礎的解析は脳の高次機能の解明に繋がる事が期待された。

2. 研究の目的

上記の変異マウスの表現型によく似た症状をもつヒトの線毛形成障害疾患としては Bardet-Biedl 症候群が比較的好く知られており、現在その原因遺伝子が線毛形成に関係するものであることが解明されつつあり (Mykytyn et al., 2001; Fan et al., 2004)、マウスを用いた遺伝学的研究も行われている。この症候群では精神遅滞、自閉傾向など高次神経機能の障害が特徴的であり、モデルマウスにおける行動解析でもその一端が解析されている (Nishimura et al., 2004)。しかしながら、申請者の変異マウスを含め他の何れの研究グループのマウスに於いてもかかる神経障害や精神遅滞が、一次線毛を枠組とした如何なるメカニズムに依って起こるかは殆ど解明されていない。本申請課題では、変異体マウスの斯様な多彩な症状の中から神経系の症状に着目し、最終的にはその異常の原因を分子細胞生物学的に明らかにし、ヒトの病態解明への足掛りにする事を企図する。

以上の目的の為には神経細胞に於ける一次線毛の形成がどの様に行われ、その膜上には如何なる受容体が発現され、その輸送動態がどの様に調節されているか、更には線毛の受容体に ligand を与えて活性化させた場合、神経細胞内でどの様なシグナル伝達が行われ神経細胞の機能を修飾するか、といった基礎的な問題を正常な神経細胞で解明していく必要がある。神経細胞の一次線毛自体は生体内で形態学的には古くから同定されているが (Dahl, 1963; Karlsson, 1966)、培養条件下でこれを正確に記述した報告はなく、ま

たその感覚器官としての機能に着目した研究も報告されていない。従って、本研究では神経細胞やグリア細胞の一次線毛の基本的性質に関する解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 培養神経細胞に於ける線毛の超微細形態の観察と、培養細胞の経時的蛍光染色に依る線毛形成のタイムコースの決定 (Step1)

- ① 脊椎動物生体内の様々な神経系細胞には線毛が存在する事が知られているが (Lafarga et al., 1980; Taxi, 1961; Peters et al., 1976)、培養神経細胞での正確な記述は報告されていない。ここでは、生体内でその存在が確認されていてかつ培養方法が確立されている海馬神経細胞に関して培養後の線毛形成のタイムコースを確定する。
- ② 培養を行ってから1週間に渡り毎日細胞を固定し、抗アセチル化チューブリン抗体で染色する。他に、 α 蛋白 (Fuchs & Schwark, 2004) や *inversin* (Watanabe et al., 2004) に対する抗体も用いて検討を行なう。
- ③ 線毛が完成する時期が定まったらその時点で電子顕微鏡用の固定を行い（通常の電顕用固定液にタンニン酸を加え、線毛内の蛋白質が可視化出来る様にする）、線毛の微細形態を観察する。ダイニンアームがなければ不動線毛、9+0であれば一次線毛である事が確定する。走査型電顕を用いて視覚的に認知し易い画像も取得する (Takeda et al., 1999)。

(2) 神経細胞の線毛形成過程のリアルタイムでの観察 (Step2)

- ① *invesin*は従来型線毛には存在せず一次線毛上にのみ存在する事が判っている分子である (Watanabe et al., 2003)。ここではまず *inversin*のEYFP融合蛋白質発現ベクターを作成する。
- ② ベクターはシークエンスを確認した後、電気的膜穿孔法で培養神経細胞に導入する。本法が上手くいくことは別の発現ベクターで確認済みであるが、代替手法として微量注入法 (Takeda et al., 1994; Tanaka et al., 1998) や *lipid transfection*を行う事も可能である。
- ③ 発現した細胞を用いて多点観察タイムラプス顕微鏡で経時的に線毛形成過程を記録する。培養開始から線毛形成開

始までの時間はStep1で決めてあるので、ここでは線毛形成開始からの時間経過を観察する。伸長の度合いは時間軸に沿って定量化する。

- ④ 線毛形成にばらつきがある場合には細胞によっては培養液の組成を変える事で最適化が可能である (Stylianov et al., 1990) のでこれを参考にして解決する。

(3) 神経細胞の線毛上の各種受容体の検索 (Step3)

- ① 神経細胞以外の細胞では一次線毛上に存在する受容体がある程度調べられている (Marshall and Nonaka, 2006)。神経細胞でもセロトニン (Brailov et al., 2000) やソマトスタチン (Händel et al., 1999) などのG蛋白質共役型受容体 (GPCR) が線毛上に存在する事が知られている。これらの情報を参考に培養細胞で免疫蛍光染色を行い各種受容体の一次線毛への局在を検討する。

(4) ECFP融合蛋白質として発現させた各種受容体の線毛上での動態の観察 (Step4)

- ① 上記のStep3で一次線毛に集積した受容体のECFP融合蛋白質発現ベクターを作製する。
- ② 受容体cDNAはPCRを用いて合成し、Clontech社のベクターに挿入する。PCRで用いるprimerは品質が安定しているInvitrogen社の外注品を使用する。
- ③ 受容体ECFP融合蛋白質発現ベクターとinversin-EYFP融合蛋白質発現ベクターを同時に電氣的穿孔法で導入した神経細胞で線毛形成過程と受容体の線毛へのtargetingの関係を調べる。
- ④ 受容体の種類に依る輸送速度の変化にも注目して定量化を行う。

4. 研究成果

(1) 培養海馬神経細胞に於ける一次線毛の構造解析

- ① 培養海馬神経細胞での一次線毛形成は培養開始後3日頃から開始され、7日では80%の細胞が、10日では90%以上がadenylate cyclase IIIで染色される構造を有するに至った。この構造を透過型電子顕微鏡で観察すると微小管の軸糸構造が9+0の一次線毛であることが判った。培養神経細胞に線毛様構造が形成される事はこれ迄に知られていたが、培養の神経細胞で軸糸構造の

超微細形態を明らかにしたという意味で大きな意義を有する。また、同時に脈絡叢上皮細胞の線毛も観察し、細胞1個当たり一本であるとされる一次線毛が多数存在していることを明らかとし、今後の一次線毛の研究でのモデル細胞系を確立した意義を有する。今後、線毛上の受容体を特異的に刺激する事で細胞内のカルシウム濃度がどの様に変化するか、また神経細胞の電気生理学的性質がどの様に変化するかを検討し、一次線毛が神経系の情報伝達系に与える影響を検討する。この解析により、神経系での新たな情報伝達系を提唱する事が可能となる。

- ② 培養海馬神経細胞にEGFP::GPCRを発現させ、線毛に特異的に輸送される事を示した。この結果はGPCRが線毛特異的に輸送される分子メカニズムの存在を示唆しており、今後の一次線毛の機能解析に一つの方向性を提示したといえる。

(2) 受容体輸送の解析

- ① 上記で行なった培養海馬神経細胞とPC12細胞から分化させた神経細胞でのEGFP::GPCRの輸送をリアルタイムで観察した。具体的にはGPCRの一つであるソマトスタチン受容体の動態を観察し、線毛内に輸送された受容体が遠位と近位の双方向性に移動する事が示された。今後、どの様なモーター蛋白質でこの輸送が行なわれているのか、或いはどの様な速度で運搬されているかを解析していく予定である。また、受容体のアゴニスト刺激に伴う輸送動態の変化も併せて解析する。
- ② 神経細胞に分化させたPC12細胞で受容体の強制発現を行なうと一次線毛の長さが長くなるという現象が観察された。これはバイオセンサーとしての一次線毛の感度を調節するメカニズムが受容体の発現とリンクしている可能性を示唆しており、今後の解析が期待される結果であった。

(3) 培養脈絡叢上皮細胞での受容体

- ① グリア細胞の一つに分類される脈絡叢上皮細胞での一次線毛上にある受容体を検索し、神経細胞の一次線毛との比較を行なった。脈絡叢上皮細胞の一次線毛にはNeuropeptide FF (NPFF) に対する受容体 (NPFFR) が線毛基部に集積している事が明らかになった。また、一部のNPFFRは線毛の軸部にも点在し、神経細胞の一次線毛の場合と同様の輸送が行なわれている事を示唆していた。

② NPFf を投与して脈絡叢上皮細胞の一次線毛を刺激すると細胞内の cAMP 濃度が低下した。線毛を除去した状態で同様の実験を行なうと、定常状態での細胞内 cAMP 濃度が上昇していた。また NPFf 投与を行なっても細胞内 cAMP の濃度低下は起こらず、NPFf に対する反応性が失われていた。更に、この時、脈絡叢上皮細胞を通じた基底側から頂側への水の輸送が増大している事が判った。従って、脈絡叢上皮細胞の一次線毛は NPFf を介して脳脊髄液の産生を抑制していると考えられ、「研究当初の背景」で述べた水頭症の発症には一次線毛の異常はその背景にある事が示された。これは、今後特発性水頭症等の治療法を開発する上での分子基盤を提供したといえる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Narita, K., Kawate, T., Kakinuma, N. and Takeda, S. Multiple primary cilia modulate the fluid transcytosis in choroid plexus epithelium. *Traffic*, 11, 287-301. 2010. (査読あり)
2. Misawa, T., Yoshimura, K., Narita, K. and Takeda, S. Visualization of receptor trafficking in neuronal primary cilia. *Neuroscience Res*, 65 (Suppl 1), S140,. 2009. (査読無し)

[学会発表] (計 4 件)

1. Misawa, T., Yoshimura, K., Narita, K. and Takeda, S. Visualization of receptor trafficking in neuronal primary cilia. 第 32 回日本神経科学学会大会 2009 年 9 月 17 日 名古屋
2. Narita, K., Kawate, T. and Takeda, S. バイオセンサーとしての一次線毛を介した脳脊髄液産生調節機構の分子機構 第 114 回日本解剖学会全国学術集会 2009 年 3 月 30 日 岡山
3. Narita, K., Kawate, T. and Takeda, S. Primary Cilia Act as Biosensors to Regulate Production of Cerebrospinal Fluid. 48th Annual Meeting of American Society for Cell Biology, December 17, 2008, San Francisco.

4. Narita, K., Kawate, T. and Takeda, S. Functional Analysis of Primary Cilium in Regulation of Cerebrospinal Fluid Production. 第 31 回日本神経科学学会大会 2008 年 7 月 9 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 扇 (TAKEDA SEN)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
研究者番号：20272429

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

成田 啓之 (NARITA KEISHI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号：50452131