

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 6日現在

機関番号： 24303

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2009~2011

課題番号： 21590197

研究課題名 (和文) メダカ突然変異体 *jaodori* を用いた運動性繊毛の機能解析研究課題名 (英文) Characterization of the medaka (*Oryzias latipes*) primary ciliary dyskinesia mutant, *jaodori*.

研究代表者

小林 大介 (Kobayashi Daisuke)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号： 60376548

研究成果の概要 (和文)：

運動性繊毛（鞭毛）は脳室、気管上皮、精子などに存在し、その機能喪失は、水頭症、慢性気管支炎、男性不妊、内臓逆位などを引き起こす。これらの表現型は脊椎動物間で共通であり、モデル生物を使った研究が有用である。そこで運動性繊毛に異常を持つメダカ変異体 *jaodori* を用い、その原因遺伝子 *dynein axonemal intermediate 2 (dnai2)* の異常が繊毛運動に必須のモータータンパク質複合体であるダイニン腕の欠損を引き起こし、その結果左右軸決定に必須なクッペル胞内での水流の喪失、更には内臓逆位を引き起こしていることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Cilia and flagella are highly conserved organelles that have diverse motility and sensory functions. Motility defects in cilia and flagella result in primary ciliary dyskinesia (PCD). We isolated a novel medaka PCD mutant, *jaodori (joi)*. Positional cloning showed that *axonemal dynein intermediate chain 2 (dnai2)* is responsible for *joi*. In the *joi* mutant, cilia in Kupffer's vesicle (KV), an organ functionally equivalent to the mouse node in terms of left-right specification, are generated but their motility is disrupted, resulting in a LR defect. Ultrastructural analysis revealed severe reduction in the outer dynein arms in KV cilia of *joi* mutants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：発生遺伝学

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：発生・文化、運動性繊毛、ダイニン

1. 研究開始当初の背景

運動性繊毛は細胞の表面に毛のように突出し、その運動が周囲の液体を流動させることによりその生理機能を発揮している細胞

小器官である。脊椎動物において、運動性繊毛は多様な生理機能を担っており、その運動能喪失は様々な異常を引き起こす (Zariwala et al., *Annu Rev Physiol*, 2007)。ヒトでは繊毛運動障害症候群 (Primary ciliary

dyskinesia, PCD) と呼ばれる遺伝性疾患が知られており、繊毛運動の喪失により、水頭症（脳室内の細胞表面にある運動性繊毛の機能不全により脳脊髄液の循環に異常が生ずることによる）、男性不妊（精子鞭毛の運動異常による）、慢性気管支炎/肺炎（気管上皮の運動性繊毛の異常により異物を排出できずに慢性的な感染症を引き起こすことによる）、内臓逆位（発生途上に生じ、左右軸を決定する器官であるノードの繊毛運動が失われることによる、魚類ではクッペル胞がノードに相同な器官として知られている）といった症状を呈することが知られている。PCDの原因遺伝子の同定により、これまでに繊毛の運動に必要な幾つかのタンパク質が同定されてきた。しかしながらヒトを用いた解析では実験的な制約が大きく、詳細な解析を行うのは難しい。先行研究により、運動性繊毛の異常に起因する、水頭症、男性不妊、内臓逆位といった表現型は脊椎動物間で共通であることが知られており（図 1）、モデル生物を使った研究が有用であると考えられる。そこで近年モデル動物として注目されているメダカの突然変異体を用いることで、脊椎動物における運動性繊毛の機能解析を試みた。

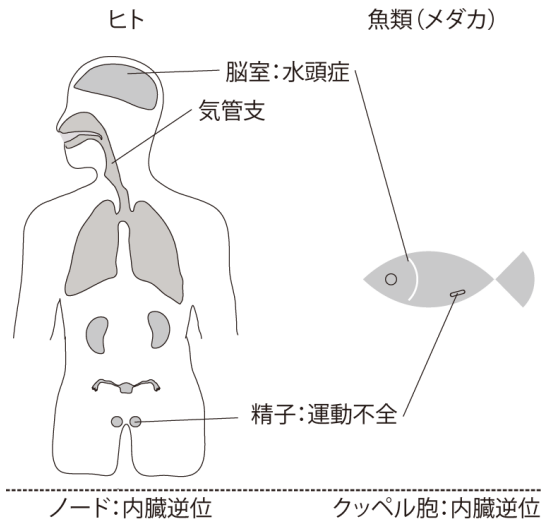


図 1 ヒトと魚類で共通する運動性繊毛の存在する器官と繊毛運動異常に起因する表現型。

2. 研究の目的

当研究室で内臓逆位変異体として単離したメダカ突然変異体 *joi* は、ポジショナルクローニングの結果、繊毛・鞭毛の運動を担うダイニン腕（図 2）構成タンパク質の一つである *dynein intermediate chain 2 (dnai2)* をコードする遺伝子に変異を生じていた。この遺伝子は運動繊毛の研究が進んでいる単細胞生物のクラミドモナスの運動能異常突然変異体の原因遺伝子の一つとして報告さ

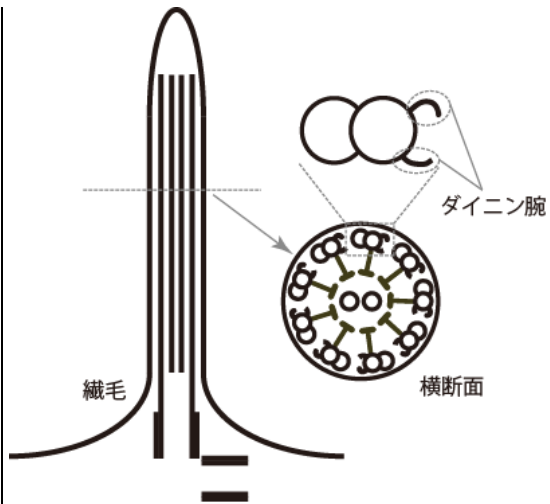


図 2 運動性繊毛の模式図。外周の 9 個の周微小管にモータータンパク質複合体であるダイニン腕を持つ。

れていたが、PCDの原因遺伝子としての報告はなされていなかった。そこで *joi* の解析を行うことで脊椎動物における *dnai2* の機能を明らかにすることを目的とした。また *joi* のホモ接合型個体は、内臓逆位という PCD で共通の表現型を示す一方（図 3B, D）、胴尾部の屈曲という PCD では見られない表現型を示した（図 3F）。この特徴的な表現型がどのような機構で引き起こされるかを明らかにすることも目的として解析を行った。

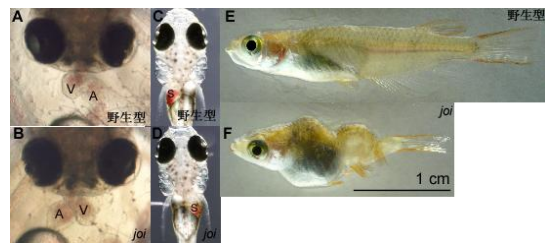


図 3 *joi* 変異体の表現型。(A, B) *joi* 変異体胚(B)では心臓のルーピングが野生型胚(A)と逆転している個体が観察される。A: 心房、V: 心室。(C, D)野生型胚(C)では体の左側に形成される脾臓 (S) が *joi* 変異体(D)では右側に形成される個体が観察される。(E, F) *joi* 変異体 (F) では成長するに従い、胴尾部の著しい屈曲が観察される(E)は同腹の野生型。

3. 研究の方法

内臓逆位変異体として単離したメダカ突然変異体 *joi* の表現型解析を中心として研究を行った。研究は大きく分けて 2 つのステップに分けて行った。始めに *joi* 遺伝子の欠損がもたらす繊毛異常の解析を中心に解析を

行い、その後胴尾部の屈曲に至るメカニズムを組織・形態学的手法により解析した。

① *joi* 遺伝子の欠損がもたらす繊毛異常の解析

joi 変異体原因遺伝子である *dnai2* が軸糸ダイニン腕を構成するタンパク質をコードしていること、内臓逆位が観察されること、更には繊毛を染色する抗アセチル化チューブリンに対する免疫染色の結果から、繊毛自体は形成されていることから考えて、クッペル胞の繊毛に運動異常があると予想された。そこで実際に、クッペル胞内における水流の形成が阻害されているかについて蛍光ビーズの顕微注射により水流を可視化し、繊毛運動の評価を行った。更に、繊毛運動能の異常が、どのような繊毛の構造異常に基づくのか、透過型電子顕微鏡を用いて、その微細構造の解析を行った。

② 体軸の屈曲に至るメカニズムの解析

体軸の屈曲を引き起こす要因として、骨形成（維持）の異常、筋肉の異常、神経の異常が考えられる。そこで、*joi* 変異体においては、これらの何れが（もしくはその複合）原因で湾曲が起こるのか、組織学・形態学的手法により解析を行った。

また、初期の左右軸決定の異常も、体軸の屈曲に至る要因の一つとして考える。そこで、*joi* の原因遺伝子である *dnai2* に対するアンチセンスオリゴを用いて、初期の左右軸決定を阻害した場合の、成魚における体軸異常の評価と、変異体胚を野生型 *dnai2* mRNA を用いて左右軸決定の時期のみでレスキューを行った胚の、成魚における野生型胚の体軸異常の評価を行い、初期の左右軸決定の異常が、成魚にける体軸の屈曲に至る要因であるか否かについて検討した。

4. 研究成果

①内臓逆位は *dnai2* 遺伝子の変異により引き起こされるダイニン腕の欠損に由来する。

野生型胚に *dnai2* に対するアンチセンスオリゴを導入すると、*joi* 変異体と同様に左右軸のランダムイズが観察された。そこでこの胚を用い、クッペル胞内の水流を観察したところ、野生型で観察されるクッペル胞内の水流が失われていた（図 4B）。更にこのクッペル胞内の水流の喪失に至る機構を調べるために、透過型電子顕微鏡による繊毛微細構造の観察を行ったところ、ダイニン腕の欠損が観察された（図 4D）。これらのことから、*dnai2* の機能喪失はダイニン腕の欠損を引き起こし、その結果繊毛が運動能を失うことによりクッペル胞内の水流が失われ、左右軸の決定機構に異常を来していることが明らかとなった。

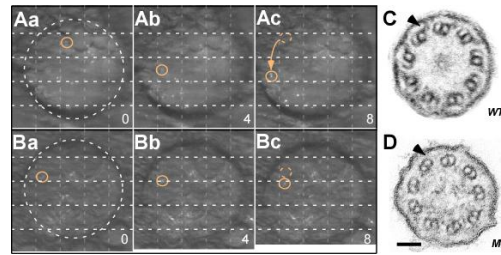


図 4 (A, B) クッペル胞内の水流。クッペル胞内に導入した蛍光ビーズ（オレンジの○）が野生型 (A) では移動が観察されるのに対し、*dnai2* の機能阻害胚 (B) では移動が観察されない。右下の数字の単位は秒。(C, D) クッペル胞繊毛の透過型電子顕微鏡による横断面像。野生型 (C) ではダイニン外腕（鏟）が観察されるのに対し、*dnai2* の機能阻害胚 (D) ではダイニン外腕が欠けている。スケールバー：50 nm。

② 体軸の屈曲は、初期の左右軸決定の異常とは異なった機構で発症する。

体軸の著しい屈曲異常は、本来均等であるべき左右および背腹軸の発達バランスの異常に起因すると考えられる。そこで、*joi* で観察された初期胚における繊毛運動能阻害に起因する左右軸決定の異常が、成魚で観察される体軸の屈曲異常の原因であるか否かを調べるために、アンチセンスオリゴを用いて初期胚における *dnai2* の機能を阻害した。その結果、胚においては変異体の表現型を再現したが、同個体を成魚まで育てたところ、体軸の屈曲異常は観察されなかった。また変異体胚を野生型の *dnai2* mRNA を用いてレスキューしたところ、孵化時には左右軸決定の異常は回復し、野生型とまったく区別がつかなくなったにもかかわらず、成長するにしたがって体軸の著しい屈曲異常を示した。以上のことから、体軸の著しい屈曲異常は発生初期の左右軸異常とは異なった機構で引き起こされることが明らかとなった。また体軸の屈曲異常に伴って観察される堆骨の融合に関して、成長段階を追って観察を行った。その結果、初期の堆骨形成過程では、堆骨の一つ一つの形成には異常が観察されなかった。また成魚の組織切片の観察からも、骨、筋肉の明らかな異常は観察されなかった。

以上のことから、*joi* 変異体で観察される体軸の屈曲は、初期の左右軸決定とは無関係で、その後の成長期における何らかのアンバランスによって引き起こされるものと考えられる。また組織切片の観察から、骨や筋肉といった組織に一次的な異常は観察されないことから、これらをコーディネートする、上位の機構に破綻を生じていることが示唆された。

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 Kobayashi D, Iijima N, Hagiwara H, Kamura K, Takeda H, Yokoyama T. (2010) Characterization of the medaka (*Oryzias latipes*) primary ciliary dyskinesia mutant, *jaodori*: Redundant and distinct roles of dynein axonemal intermediate chain 2 (dnai2) in motile cilia. Dev Biol, 347, 62-70.

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.08.008>

② Kobayashi D, Takeda H. (2012) Ciliary motility: components and cytoplasmic preassembly mechanism of the axonemal dyneins. Differentiation, 8, S23-S29.

DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2011.11.009>

[学会発表] (計 4 件)

① 小林 大介、飯島 典生、加村 敬一郎、武田 洋幸、横山 尚彦 The novel medaka mutant *jaodori* is a candidate of primary ciliary dyskinesia fish model (メダカ繊毛変異体 *jaodori* の解析)
日本発生物学会 第 42 回大会
2009 年 5 月 30 日
朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟市)

② 小林 大介、飯島 典生、萩原 治夫、加村 敬一郎、武田 洋幸、横山 尚彦.
メダカには 2 つの dynein axonemal intermediate 2 遺伝子が存在する。
第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会
2010 年 3 月 28 日 岩手県民会館 (盛岡市)

③ 小林 大介、飯島 典生、萩原 治夫、加村 敬一郎、武田 洋幸、横山 尚彦
Characterization of the medaka (*Oryzias latipes*) primary ciliary dyskinesia mutant, *jaodori*: Redundant and distinct roles of two dynein axonemal intermediate chain 2s (dnai2s) in motile cilia
第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会
東日本大震災のため誌上開催 (Journal of Physiological Sciences の抄録号)

④ Daisuke Kobayashi, Norio Iijima

Haruo Hagiwara, Keiichiro Kamura, Hiroyuki Takeda, and Takahiko Yokoyama. Characterization of the medaka (*Oryzias latipes*) primary ciliary dyskinesia mutant, *jaodori*: Redundant and distinct roles of two dynein axonemal intermediate chain 2s (dnai2s) in motile cilia

第 44 回日本発生物学会大会

2011 年 5 月 19 日

沖縄コンベンションセンター (沖縄市)

[図書] (計 2 件)

① Daisuke Kobayashi (分担執筆, Editors: Masato Kinoshita, Kenji Murata, Kiyoshi Naruse, Minoru Tanaka), O, Wiley-Blackwell, Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols 2009, 419

② Kobayashi D., Takeda H. (分担執筆, Takeda H, Naruse K, Tanaka M), Springer, Medaka: Model for Organogenesis, Human Disease, and Evolution, 2011 387.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 大介 (Kobayashi Daisuke)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 60376548

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: