

平成 23 年 6 月 15 日現在

機関番号：74415

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790295

研究課題名（和文）視細胞における繊毛を介したオプシン輸送機構の解析

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of opsin transport through cilium
in photoreceptor cells

研究代表者

大森 義裕 (OMORI YOSHIHIRO)

(財)大阪バイオサイエンス研究所・発生生物学部門・研究副部長

研究者番号：90469651

研究成果の概要（和文）：

網膜視細胞における、繊毛を介したオプシン輸送機構を明らかとするため、モデル動物の解析を行った。ゼブラフィッシュについては、スクリーニングによって得られた新規なゼブラフィッシュのオプシン輸送変異体の解析を行い、IFT 複合体 A がオプシンの輸送に重要であることが明らかとなった。また、繊毛キナーゼ Mak ノックアウトマウスの解析を行い、Mak は、繊毛の長さ制御、オプシンの輸送に関与し、視細胞の維持に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

To identify mutations that affect the photoreceptor development and maintenance, we performed early pressure screen using a GFP transgenic line of zebrafish. We showed four mutations which affect ciliary development in photoreceptors. We found that these mutations affect in the ciliogenesis of other sensory neurons including olfactory cells in the nasal pit and hair cells in the inner ear. We also showed that male germ cell-associated kinase, Mak, regulates retinal photoreceptor ciliary length and subcompartmentalization. Our results suggest that Mak is essential for ciliary protein transport, regulation of ciliary length, and is required for the long-term survival of photoreceptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：網膜・神経細胞・繊毛・ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

網膜の視細胞や内耳の有毛細胞などの感

覚神経細胞や、腎臓の上皮細胞などには、細胞の表面に繊毛が発達する。この繊毛には受

容体分子が局在し、細胞が外界の情報をキャッチする「アンテナ」として機能している。ヒトにおいて繊毛機能の不全は、失明、聴覚障害、腎機能の障害、糖尿病、臓器非対称性の異常などの疾患を引き起こすことが、近年明らかとなり注目されている(Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 8, 880)。

網膜の視細胞は、光を感知するセンサー細胞であるが、その光センサーとしての機能は、オプシン(光センサー分子)が視細胞の繊毛を通過して外節と呼ばれる繊毛の先端部に輸送されることで発揮される。オプシンの繊毛を介した輸送機構は、視細胞が光センサーとして働くことに必須であり、オプシンの異所的な局在は、網膜色素変性症などの視覚障害を引き起こすことが知られている(Lancet 2006, 368, 1795)。オプシンの輸送は繊毛内輸送(intraflagellar transport; IFT)と呼ばれる繊毛内の特殊な輸送機構を介して行われることが知られている(Nat Rev Mol Cell Biol. 2007, 8, 880)。しかし、小胞体で作られたオプシンなどの膜タンパクが、どのような機構で、繊毛へ選択的に輸送され繊毛内輸送に受け渡されるのかは、これまで不明である。

2. 研究の目的

申請者は、これまで、網膜の視細胞の発生・維持の機構解明を行ってきた(Omori et al., Nature Cell Biology 2008, 10, 437, Sato & Omori et al., Nature Neuroscience 2008, 11, 923, Omori et al., Current Biology 2006, 16, 945, Tsujikawa, & Omori et al., PNAS 2007, 104, 14819)。最近、申請者は、ゼブラフィッシュの繊毛において、Elipsa タンパクが小胞輸送と関係する Rab8、Rabaptin5 と複合体を形成し、繊毛内輸送への受け渡しを行うことを明らかにしてきた(Omori et al., Nature Cell Biology 2008, 10, 437, 実験医学 2008, 7 月, 1744)。このことで、小胞輸送と繊毛内輸送にかかわる分子が直接相互作用しうることが明らかとなったが、近年の研究から、繊毛内輸送と小胞輸送の間には、さらに多くのステップが関与していることが示唆されている。例えば、バルデービードル 症候群(Cell 2007, 129, 1201)の原因遺伝子(BBS)をはじめ20個あまりの遺伝子が、繊毛への輸送に関与していることが示されているが、それらの遺伝子産物間の相互関係は、未だほとんどわか

っていなかった(Development 2006, 133, 4131)。そこで、申請者は、これらの機能未知の繊毛関連分子を含めて、オプシンの輸送機構の分子メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

これまでに、視細胞特異的に GFP を発現するゼブラフィッシュを用いて、ENU を変異原とするスクリーニングを行い、視細胞が脱落する変異体を4系統見出している(GEP 226, 263, 305, 360)。これらの原因遺伝子をポジショナルクローニング法により、解析した。

さらに、視細胞の運命決定に重要である転写因子 Otx2 の下流遺伝子の解析を行った。Otx2 の網膜特異的なコンディショナルノックアウトマウス(CKO)では、視細胞がほとんど発達しない。このマウスを用いて、マイクロアレイ解析を行った(Omori et al., PLoS One 2011)。その結果、機能未知キナーゼである Mak が視細胞特異的に発現することを見出した。さらに、Mak のノックアウトマウスを用いて、Mak の視細胞における役割の解析を行った。

4. 研究成果

4種類の変異体のうち GEP263 について、IFT122 遺伝子の変異が原因となっていることを明らかにした。IFT122 は、繊毛内タンパク輸送複合体 A に含まれる分子である。GEP263 では IFT122 の変異により、視細胞では、オプシンの輸送が阻害され、外節の発達が不完全であることがわかった。また、IFT88 が繊毛の先端部分で蓄積していることがわかった。視細胞と同様に、鼻孔や内耳の感覚神経においても、同様な繊毛の異常が見られることがあきらかとなり、IFT122 がオプシンの輸送に重要な役割を行っていることが明らかとなった。他の3つの変異体についても、存在領域を絞り込み原因遺伝子の同定を行っている。他の変異体についても、鼻腔や、内耳有毛細胞において繊毛の異常が見られることがわかった。

Mak のノックアウトマウスでは、経時的な視細胞の脱落が観察された。これは、ヒトにおける網膜色素変性症と類似した表現型である。Mak のノックアウトマウスでは、本来外節に蓄積すべきオプシンが細胞体にも多量に存在していることを発見した。面白いことに、Mak 欠損マウスでは、視細胞の繊毛が異常に伸長していることを見出した。また、Mak 欠損マウスでは、IFT88 や IFT57, Kif3a などの、繊毛内輸送に関係する分子群が異常に蓄積していることがわかった。以上の結果から、Mak 欠損マウスでは、繊毛の過剰伸長のために、オプシン輸送が阻害され、視細胞

の脱落が引き起こされることが予想される (Omori et al., PNAS 2010)。このメカニズムは、網膜色素変性症を引き起こす新しい病理メカニズムとして興味深い。これらの研究成果は、網膜色素変性症の発症機構解明にむけて貢献したと考えられる。

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 9 件)

1. Omori, Y., Katoh, K., Sato, S., Muranishi, Y., Chaya, T., Onishi, A., Minami, T., Fujikado, T., & Furukawa, T., Analysis of transcriptional regulatory pathways of photoreceptor genes by expression profiling of the *Otx2*-deficient retina., *PLoS One*, 査読有, in press, 2011.
2. Omori, Y., Chaya, T., Katoh, K., Kajimura, N., Sato, S., Muraoka, K., Ueno, S., Koyasu, T., Kondo, M., & Furukawa, T., Negative regulation of ciliary length by ciliary male germ cell-associated kinase (Mak) is required for retinal photoreceptor survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 査読有, 107, 2010, 22671-22676.
3. Kanagawa, M., Omori, Y., Sato, S., Kobayashi, K., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Endo, T., Furukawa, T., & Toda, T., Post-translational maturation of dystroglycan is necessary for pikachurin binding and ribbon synaptic localization., *J Biol Chem.*, 査読有, 285, 2010, 31208-31216
4. Katoh, K., Omori, Y., Onishi, A., Sato, S., Kondo, M., & Furukawa, T., Blimp1 suppresses Chx10 expression in differentiating retinal photoreceptor precursors to ensure proper photoreceptor development. *J Neurosci*, 査読有, 30, 2010, 6515-6526
5. Sanuki, R., Omori, Y., Koike, C., Sato, S., & Furukawa, T., Panky, a novel photoreceptor-specific ankyrin repeat protein, is a transcriptional cofactor that suppresses CRX-regulated photoreceptor genes., *FEBS letter*, 査読有, 584, 2010, 753-758.

6. 大森義裕, 古川貴久, 織毛キナーゼ Mak と微小管結合タンパク質 RP1 による織毛の長さ調節機構, 細胞工学, 査読無, in press, 2010
7. 加藤君子, 荒木章之, 大森義裕, 古川貴久, 網膜視細胞の機能構築, 実験医学, 査読無, 29, 2011, 514-520.
8. 大森義裕, 古川貴久, 網膜の視細胞における織毛タンパク質の輸送機構と疾患, 細胞工学, 査読無, 28, 2009, 1036-1041.
9. 加藤君子, 大森義裕, 古川貴久, シナプスの高次構造をかたちづくる細胞外マトリックス蛋白質ピカチュリン, 蛋白質核酸酵素, 査読無, 54, 2009, 1166-1172.

[学会発表] (計 9 件)

1. 大森義裕, 織毛関連疾患モデルとしてのゼブラフィッシュ網膜視細胞変性、腎臓障害を特徴とする *elipsa* 変異体と Rab GTPase のつながり, 日本分子生物学会, 2010 年 12 月 8 日, 神戸ポートアイランド
2. 大森義裕, 視細胞の織毛形成異常と網膜色素変性症モデル動物, 第 3 回 RRM (Retina Research Meeting), 2010 年 12 月 4 日, 秋葉原コンベンションホール
3. 大森義裕, 織毛関連疾患モデルとしてのゼブラフィッシュ変異体の解析, 第 64 回日本臨床眼科学会, 2010 年 11 月 11 日, 神戸ポートピアホテル
4. 大森義裕, 古川貴久, 織毛キナーゼ Mak は網膜視細胞において織毛長を制御する, 包括脳ネットワーク 夏のワークショップ, 2010 年 7 月 28 日, ホテルさっぽろ芸文館
5. 大森義裕, Jarema Malicki, 古川貴久, 視細胞特異的に GFP を発現するゼブラフィッシュを用いた織毛関連ミュータントの単離と解析, 日本分子生物学会, 2009 年 12 月 10 日, パシフィコ横浜
6. 大森義裕, 感覚神経細胞のアンテナとして機能する織毛の形成機構, 頭部形成研究会 2009, 2009 年 11 月 17 日, ラフォーレ修善寺(静岡県・伊豆市)
7. Omori, Y., Gene expression profile of *Otx2*-deficient retina reveals different regulatory roles of *Otx2* and *Crx* in photoreceptor development and maturation, OIST international workshop the "Retina", 2009 年

11月11日, OIST シーサイドハウス(沖縄県恩納村)

8. Omori, Y., Malicki, J., & Furukawa, T., A Gfp-Based Genetic Screen Reveals Mutations Affect Ciliogenesis In Photoreceptor Cells., 国際ゼブラフィッシュミーティング, 2009年7月18日, Palazzo dei Congressi, Rome, Italy
9. 大森義裕, 視細胞特異的に GFP を発現するゼブラフィッシュを用いた繊毛関連ミュータントの単離と解析, 日本発生生物学学会, 2009年5月29日, 新潟朱鷺メッセ

[その他]

ホームページ等

<http://www.obi.or.jp/dept4/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森 義裕 (OMORI YOSHIHIRO)

財団法人大阪バイオサイエンス研究所

発生生物学部門・研究副部長

研究者番号: 90469651