

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32513

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657141

研究課題名(和文) 器官形成における運動性繊毛による機械刺激受容機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of mechanical signal sensing by motile cilia in vertebrate organogenesis

研究代表者

越田 澄人 (Koshida, Sumito)

秀明大学・人文社会・教育科学系・教授

研究者番号：40342638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の腎臓は、恒常性維持にかかわる重要な器官であり、その多くの機能は尿細管を構成する上皮細胞が担っている。ヒトやマウスにみられる多発性嚢胞腎(PKD)は、原尿の流れという機械刺激の受容機構の異常に起因する遺伝性疾患であり、尿細管や集合管の上皮細胞の増殖や扁平化によって生じることが報告されている。我々は、PKDを発症するメダカ突然変異体kintoun(ktu)を用いた実験発生学的解析を行い、魚類の尿細管上皮細胞に生えている運動性繊毛が細胞自律的な嚢胞形成に関与する可能性を明らかにした。さらに、Ktuタンパク質と相互作用する分子の中で、機能阻害によってPKDを発症するものを新たに見出した。

研究成果の概要(英文)：Polycystic kidney disease (PKD) is a serious congenital disease in vertebrates, in which epithelial cells in renal tubules abnormally proliferate and become flattened in shape leading to development of numerous cysts in the entire kidney. In this study, we analyzed the medaka mutant kintoun (ktu) that develops PKD. We revealed that renal epithelial cells of ktu mutant were flattened before beginning of urine flow. Cell transplantation experiments showed that ktu seemed to cause this morphological change in a cell-autonomous manner. To further understand the function of Ktu, we identified Ktu-interacting proteins and analyzed the roles of these proteins, especially in the developmental events requiring motile cilia in zebrafish.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞・組織 発生・分化 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

繊毛は、細胞表面より突出した細胞小器官で、原生動物から脊椎動物まで幅広い生物種にみられ、運動性の付与や恒常性の維持、個体の正常発生などの多様な生命現象において極めて重要である。繊毛は、一般に、その特徴によって2種類に分けられている。機械刺激や化学刺激に対するセンサーとして働く感覚繊毛と、運動性を持つことによって細胞外液に流れを作り出す働きを持つ運動性繊毛が知られている。構造や局在する分子の共通性から、これらの繊毛には進化的な関係があると考えられている。感覚繊毛には、細胞外刺激に対する受容体が局在し、腎臓における原尿の流れの検出やソニックヘッジホッグシグナルの受容が有名である。一方、運動性繊毛には、モータータンパク質である軸系ダイニンが配置され、気管支における異物の排除や、ほ乳類や魚類などのノードに相当する領域で左向き水流を作り出し左右軸が生じさせることが知られている。繊毛の構造や機能の異常は、様々な疾患を引き起こすことも良く知られている(センサー異常:腎臓肥大を呈する多発性嚢胞腎(PKD)、運動性異常:内臓逆位・男性不妊などを呈する繊毛病(PCD、カルタゲナー症候群))。

このように重要な繊毛の研究について、その構成タンパク質の網羅的探索からヒト遺伝病まで、世界的に新たな展開を見せている。しかしながら国内では、このような世界的潮流が十分に認識されず、器官形成における繊毛の役割に関する研究実績は乏しい。

2. 研究の目的

申請者は、ヒトを含めた脊椎動物に普遍的な発生・疾患の分子機構を明らかにするために、メダカ突然変異体の順遺伝学的スクリーニングを行い、左右軸形成に異常を示す *kintoun* (*ktu*) 変異体および *abecobe* (*abc*) 変異体を得た。解析の結果、それぞれの原因遺伝子 (*ktu* と *abc*) は、繊毛に運動性を付与する軸系ダイニンの形成に必須な分子と (Nature, 2008 (Article)に報告)、感覚繊毛上の機械刺激受容体として報告されている分子に高い相同性をもつ分子(申請当時は未発表)をコードしていた。その後の解析で、*ktu* 変異体は繊毛の運動性異常が主たる欠陥であるにもかかわらず、腎管の機械刺激受容異常の症例である PKD を発症することや、機械刺激受容体と同様な構造を持つ *abc* 遺伝子産物が運動性繊毛に局在していることを見出した(申請当時は未発表)。これらのことは、これまで細胞外液の流れを作り出すだけだと考えられていた運動性繊毛が、外界からの機械刺激の感知という新たな機能も併せて持っている可能性を示している。

本研究では、運動性繊毛が細胞外環境の機械刺激の受容を行っていることを、メダカ突然変異体を用いた実験発生学・細胞生物学的な解析により明らかにする。さらに、動い

ている繊毛自身が、どのようにして細胞外環境からの機械刺激を感知しているのかという、これまでほとんど研究されていないシグナル伝達の分子メカニズムに迫りたいと考えている。

3. 研究の方法

(1)メダカ突然変異体 *ktu* の尿細管における正常発生と形成異常の詳細な観察
腎臓発生に異常をもつメダカ突然変異体 *ktu* の発生過程の尿細管上皮細胞を可視化するために、FoxA2 プロモーターの制御下で EGFP 発現するトランスジェニック系統を用いた。*ktu* 変異体のステージ 28~39 (受精後 3 日胚~7 日胚) の胚を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。前腎管腔は、撮影したデータを画像解析ソフト image J を用いて 3 次元立体構築し、計測した。

(2)メダカ突然変異体 *ktu* を用いた細胞移植実験

細胞外環境からの機械刺激が器官形成に大きな影響を及ぼす *in vivo* モデル系として、左右軸形成におけるクッセル胞上皮細胞と多発性嚢胞腎 (PKD) を発症する腎管上皮細胞を用いる。マウスにおいては、これらに相当する組織の上皮細胞には、感覚繊毛を持つ細胞が存在し、細胞外液の流れ(機械刺激)を感知していると考えられている。

全身で GFP を発現する系統として *ktu*^{-/-};Tg(beta-actin:GFP) を作製し、これをドナーとして、胞胚期に細胞を野生型の胚の周縁部(予定中胚葉領域)に移植した。移植したモザイク胚は *ktu* 変異体で尿細管の扁平化がみられる受精後 27 日以降まで育て、切片を作製し GFP に対する抗体染色を行った。

4. 研究成果

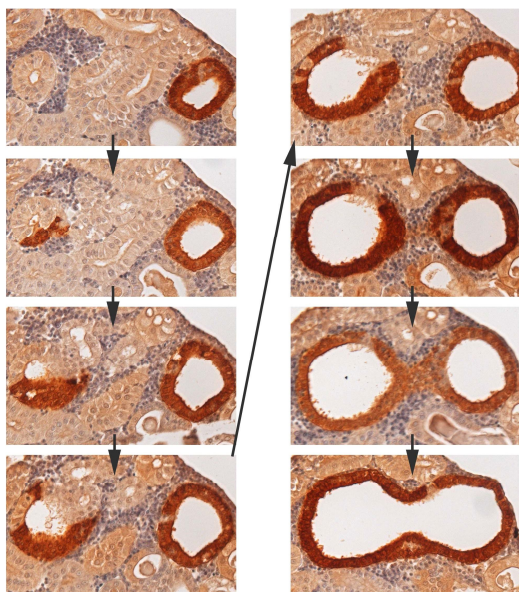
(1)メダカ突然変異体 *ktu* の尿細管における正常発生と形成異常の詳細な観察
共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブ観察法により、*ktu* 変異体における前腎形成過程を追跡したところ、前腎形成において前腎前端部の屈曲のタイミングや度合いには野生型と比べて大きな差は無かった。次に、*ktu* 変異体における前腎管径の変化についてライブイメージングをおこなった。その結果、ステージ 28 では管腔サイズは野生型と大きな差は無かったのに対し、ステージ 31 になると前腎前端において管径が野生型の 3 倍程度に拡大することが明らかとなった。更に、ステージ 35-36 になると管径拡張領域はより後方まで拡大し、最終的に前腎管全体に管径拡張が広がっていた。

また、*ktu* 変異体の前腎管構成細胞の形状を観察したところ、ステージ 36 から細胞の扁平化がみられた。このことより、*ktu* 変異体における細胞の扁平化は管径の拡張が起こる時期よりも遅いステージにならないと

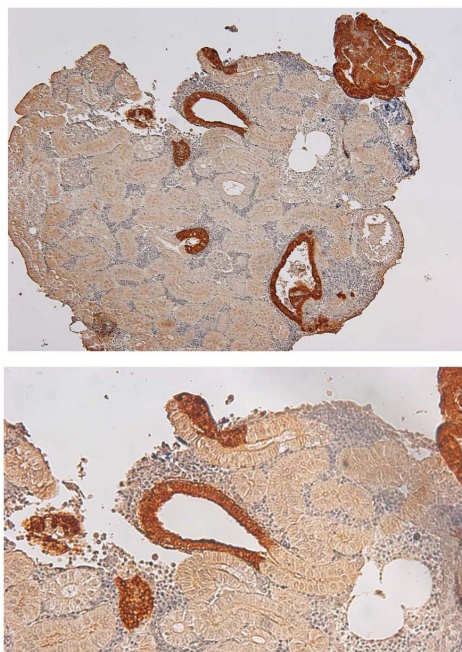
起こらないことが明らかになった。

(2) メダカ突然変異体 *ktu* を用いた細胞移植実験による細胞自律的な病変

ktu 変異体の細胞を野生型胚に移植したキメラ個体を作製し、隣接する野生型細胞と同じ細胞外液の流れにさらされた変異体細胞について、扁平化などの形態異常を示すかやこの細胞で構成される尿細管の管腔拡大について検討した。移植後2カ月の腎臓に生じた嚢胞に変異体由来の細胞が多く存在する傾向が観察された(図: 茶色く染色されたものが変異体由来の細胞。ひとつながりの管であっても変異細胞で構成される部分の管腔が顕著に拡大している)。



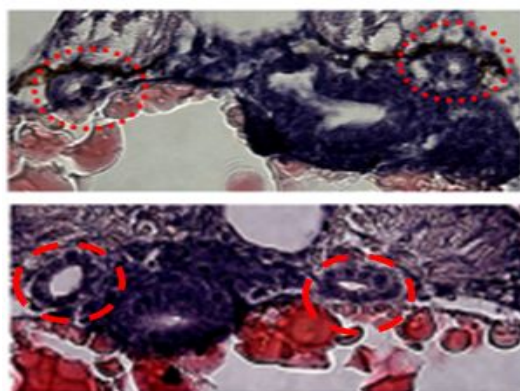
さらに、正常細胞と変異細胞の両方から構成される局所的な部位を観察すると変異細胞のみが異常な形態を示していることが観察された(図)。



これらの結果から、*ktu* 変異体における嚢胞形成は管全体の圧力や流れの異常ではなく、むしろ運動性繊毛が運動しない変異細胞の細胞自律的な機能によると考えられる。したがって、尿細管上皮細胞に生えている繊毛の運動性が細胞自律的に嚢胞形成に関与することが示唆された。

(3) *Ktu* 相互作用分子の機能解析

PKD を発症するメダカ突然変異体 *ktu* を用いた実験発生学的解析によって、魚類の尿細管上皮細胞に生えている繊毛の運動性が細胞自律的に嚢胞形成に関与する可能性を明らかにしてきた。この結果から、正常な *Ktu* タンパク質が、管腔内の原尿の流れ刺激を受容するのに重要な役割を果たしていることが推測された。そこで、Yeast two-hybrid screening によって同定した *Ktu* タンパク質と相互作用する分子のうち、刺激を受容する膜ドメインの構築に関与する可能性をもつ2つの候補遺伝子について、ゼブラフィッシュを用いて検討を行った。ゼブラフィッシュにおいて、モルフォリノオリゴを用いた *ktu* の KD では、心臓の位置が左右ランダムになる異常と尿細管の拡張が観察された。これらの異常はいずれもこれまでに報告されている運動性繊毛に異常をもった場合に観察される表現型と一致している。次に2つの候補遺伝子について KD を行ったところ、いずれの場合も左右性の異常がみられ、左右軸形成にかかわる新たな遺伝子を2つ同定することができたといえる。さらに、これらの候補遺伝子の機能阻害胚における腎臓の表現型についても検討したところ、1つの候補遺伝子の機能阻害で、受精後3日胚の尿細管が拡張していることが明らかになった(図: 上段は正常な尿細管、下段が機能阻害胚)。



この遺伝子が PKD 発症にかかわることはこれまでに報告されていない。この遺伝子は、発生中の生体内で非常に広範囲に発現している。このような遺伝子は、機能欠損が起こると発生の早期に他の部域で重篤な奇形を生じ、腎臓形成への関与が十分に検討されていないと考えられる。今後、この候補遺伝子を含めて、運動性繊毛の機能に関わる遺伝子の

尿細管上皮細胞での機能を詳細に調べること
で運動性繊毛と機械刺激受容の関係につ
いて理解が深まることが期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

越田 澄人 (KOSHIDA SUMITO)

秀明大学・学校教師学部・教授

研究者番号: 4 0 3 4 2 6 3 8

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし