

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790198

研究課題名(和文) 嚢胞腎発症を決定する繊毛から核へ移行する新規シグナル複合体の解析

研究課題名(英文) Analysis of ciliary protein complex that determines renal cyst developments

研究代表者

芝大(SHIBA, DAI)

独立行政法人宇宙航空研究開発機構・有人宇宙ミッション本部・主任研究員

研究者番号：50360722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：一次繊毛は細胞表面から突出する細胞内小器官であるが、近年の解析により 1000 種以上の蛋白が局在する事が明らかになってきた。Inv/Nphp2 は内臓逆位とともに嚢胞腎を発症する inv マウスの責任遺伝子産物であり、ヒトにおいては、2 型若年性ネフロン癆(NPHP2)の原因遺伝子でもある。本研究において、分子レベル、尿細管細胞内・ゼブラフィッシュ生体内において、Nphp2/Invは他の繊毛蛋白であるNphp9/Nek8と分子レベルで他の因子の介在なしに直接結合し、尿細管繊毛基部において正常な尿細管形態維持に協調的役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Primary cilia have diverse functions in cell signaling pathways, including mechano sensation and hedgehog signaling. More than 1000 proteins are now identified to localize in the cilium. Nephronophthisis (NPHP) is an autosomal recessive cystic kidney disease. Among 12 reported Nphp gene products, Inv/Nphp2 and Nek8/Nphp9 are localized to the proximal segment in the primary cilium. However, the functional relationships are unknown. This study focused on phenotype analysis of nek8 knockdown embryos and the genetic relationship between nek8 and inv in zebrafish. Knockdown of nek8 produced pronephric cysts. Simultaneous knockdown of nek8 and inv synergistically increased the incidence of these defects. Interestingly, nek8 mRNA rescued inv morphant phenotypes, although inv mRNA could not rescue nek8 morphant phenotypes. These results suggest that Nek8 acts downstream of Inv function.

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：一次繊毛 腎臓 嚢胞 メカノストレス 前庭機能 シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

一次繊毛は細胞表面から突き出した細胞内小器官であり、その欠失や機能異常により、嚢胞性腎疾患や内臓逆位などの遺伝性疾患が引き起こされる。腎尿細管上皮細胞の一次繊毛には、Ca<sup>2+</sup> チャネルが局在し、効率的に尿流れ刺激を感知する機能があると想定されている。Ca<sup>2+</sup> 流入異常が嚢胞腎の原因であることが 2003 年に報告されたが、最近の研究で、Ca<sup>2+</sup> 流入不全だけでは腎嚢胞化を説明できないと考えられている。現在、繊毛から細胞体(核)への Ca<sup>2+</sup> 以外の情報伝達系が嚢胞化に関与すると想定されている。

繊毛と核の両方に局在する蛋白 Gli ファミリー(転写因子)がシグナル分子の候補として解析されているが、Gli 欠失マウスでは内臓逆位や嚢胞腎を発症しないため、腎尿細管上皮細胞では、Gli 以外の繊毛核へのシグナル分子の関与の可能性が想定される。

inv (inversion of embryonic turning) マウスは内臓逆位とともに嚢胞腎を発症する変異体として我々の研究室で作出し原因遺伝子を同定したマウスである (Yokoyama T Science, 1993, Mochizuki T Nature, 1998)。これまでに、Inv 蛋白の繊毛移行機構を明らかにしたが (Shiba D J. Cell Sci., 2009, Shiba D Cytoskeleton, 2010) Inv の分子機能は明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

Inv 蛋白は蛋白相互作用ドメインであるアンキリンリピートを有するので、他蛋白の足場として機能すると想定される。また、Inv にはカルモジュリン結合配列 (IQ ドメイン) があり、カルシウムイオン濃度による分子機能変化が期待される。

従って、Inv 蛋白が繊毛から核へ移行する際に、他の蛋白 (Nek8) を同時に輸送している可能性が考えられる。そこで、以下の仮説を検証することを目的とした。

#### 仮説 1)

Inv と Nek8 は生体内で強調して機能している

#### 仮説 2)

Inv には繊毛と核へ移行するシグナル配列が存在する。特に IQ ドメインがその機能を担うかどうか検証する。

#### 仮説 3)

繊毛から核へ Inv が移行する際に、Inv は結合した Nek8 を核へ運び、Nek8 が核で機能する。

#### 仮説 4)

繊毛内には Inv と結合する分子が他にも存在する

### 3. 研究の方法

上記仮説を培養細胞 (マウス上皮細胞) および動物個体 (ゼブラフィッシュ) を利用し解析する。実験手法として、遺伝子クローニング、ウェスタンブロットティング、顕微鏡イ

メージング、アンチオリゴノックダウン法を利用した。

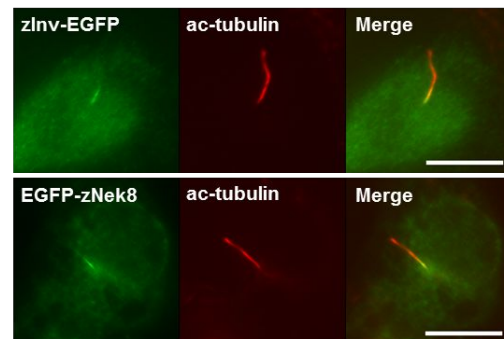
更に、Inv と結合する分子を同定するために、生体レベルで繊毛を効率的に回収するため、マウス内耳 (前庭組織) を回収する系を構築した。

### 4. 研究成果

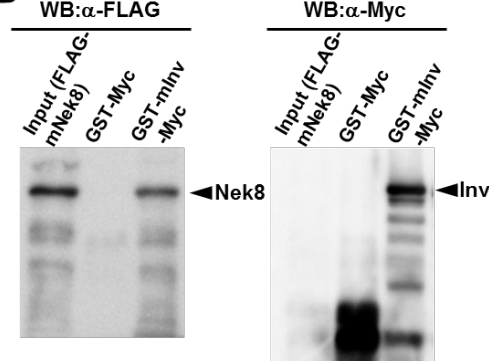
#### (1)

まず、ゼブラフィッシュ Inv (zInv) と Nek8 (zNek8) をクローニングし、哺乳類発現 pEGFP ベクターに挿入した。これを以前の研究で樹立したマウス腎尿細管細胞 (invL2-7; Dai2 細胞) にトランスフェクションし、細胞内局在を調べた。A に示すように、繊毛 (赤色) 基部に GFP 蛍光 (緑色) が観察され、細胞内局在はマウス Inv と同様であることが分かった。さらに、in vitro でタンパク結合が存在することを大腸菌で両タンパクを発現させ解析した。それぞれ Inv, Nek8 でプルダウンした試料をウェスタンブロットで調べた。両タンパクが直接結合する能力があることを明らかにした (B)。

#### A



#### B

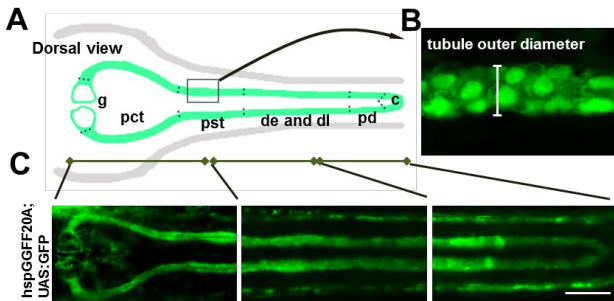


#### (2)

次に、生体内でこれら 2 種タンパクが相互作用することを示すために、ゼブラフィッシュ生体内で機能解析できる実験系を構築した。

構築に当たっては、ゼブラフィッシュ尿管が EGFP 蛍光で光り、外からの顕微鏡観察で尿管を簡便に識別できるゼブラフィッシュトランスジェニックラインを作成した。

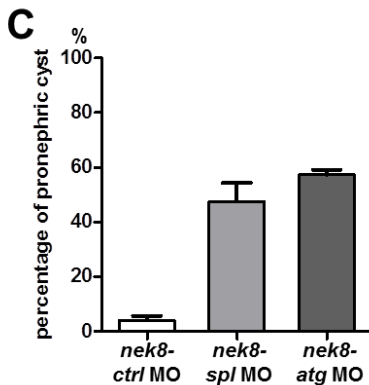
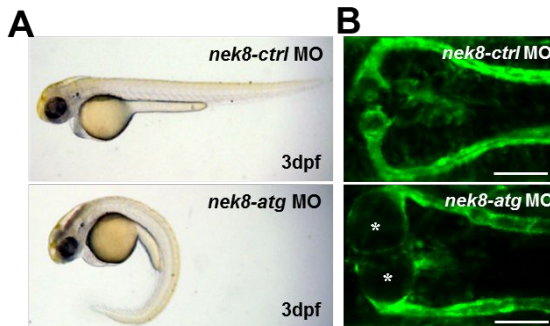
下図 A,B,C に示すように、糸球体から近位尿細管、遠位尿細管、集合管が左右で1本ずつ識別できた。野生型では、尿細管の内腔は判別しづらいので、縦断面の管の基底膜から基底膜の距離（幅）を解析基準とした。



(3)

樹立した尿細管イメージング用 GFP ゼブラフィッシュ個体(受精卵)に *Inv*, *Nek8* のモルフォリーノ (MO) オリゴをマイクロインジェクタを用いて注入した。

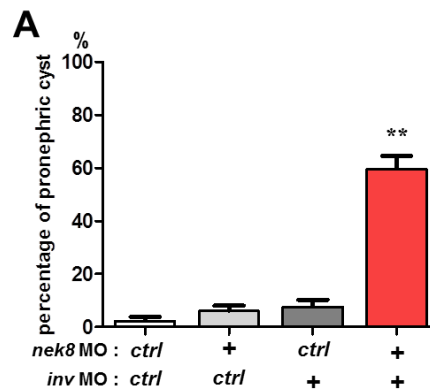
明視野観察では体軸の湾曲が顕著に観察され (A) 一方蛍光観察では、糸球体 (図中\*) 近位尿細管の拡張が観察された (B)。コントロール MO の注入では拡張は観察されなかった。定量結果を C に示す。



(4)

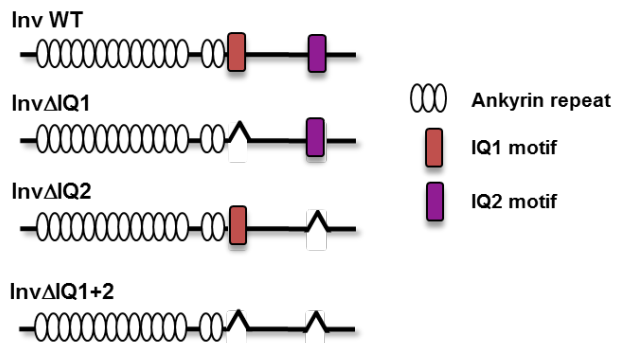
次に、2種の MO を同時添加した場合の相乗作用について解析した。単独投与と同様に樹立した尿細管イメージング用 GFP ゼブラフィッシュ個体(受精卵)に *Inv*, *Nek8* の MO オリゴをマイクロインジェクタを用いて注入した。

それぞれ単独投与では嚢胞形成を引き起こさない濃度において、2重投与を行ったところ、顕著な嚢胞形成促進効果が見られた。データまとめを A に記す。以上の結果から、分子レベル、尿細管細胞内・ゼブラフィッシュ体内において *Inv*, *Nek8* は分子レベルで直接結合 (他の因子の介在はない) し、尿細管絨毛基部において嚢胞腎形成 (正常な尿細管形態維持) に協調的役割を担っていることが明らかとなった。



(6)

次に、*Inv* の細胞内局在と細胞内カルシウム流入の関係を解析を進めるために、*Inv* 内部に存在するカルシウム結合タンパクカルモジュリン認識配列 (IQ ドメイン) の欠失コンストラクトを PCR 法を用い構築した。クローニング後 EGFP 発現ベクターにサブクローニングを行った。構築した発現ベクターについてその模式図を示す。

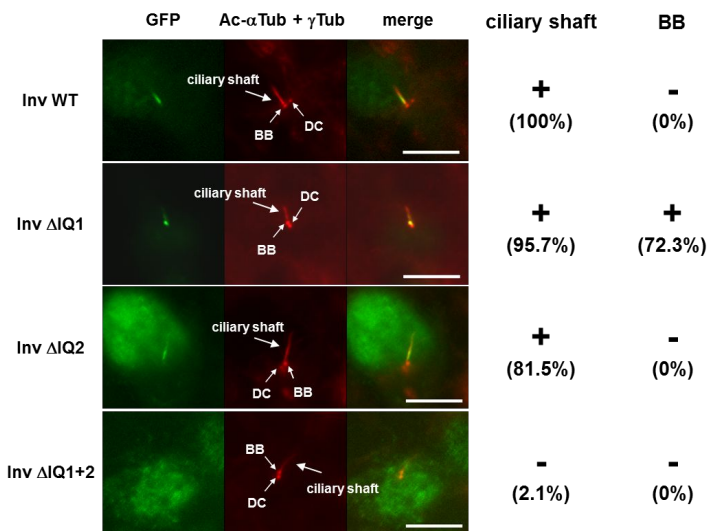


(7)

構築したミュータント遺伝子産物の細胞内局在を解析するために、以前の研究で樹立したマウス腎尿細管細胞 (*invL2-7*; *Dai2* 細胞) にトランスフェクションし、細胞内局在を調

べた。

驚いたことに、IQ ドメインを欠失した遺伝子産物は繊毛内へ効率的に輸送されていないことが分かった（下図）。繊毛内（ciliary shaft）、繊毛基部（BB）として典型例写真とともに定量データを示す。IQ ドメインを両方欠失した遺伝子産物は細胞質内では非常に不安定で蛍光が十分に観察されない場合もあった。また、今回の結果に示さないが、当初予想したように、IQ ドメインを両方欠失した遺伝子産物は、核へ輸送されているようであった（data not shown）。



( 8 )

ここまで、尿管細胞/組織にフォーカスを絞ることで解析を簡便にし、より詳細な解析が可能となったが、より解析手法を増やし、効果的に Inv 相互作用因子を調べるための実験系が必要と考えられた。そのため、繊毛を有し、尿管と同様にメカニカルストレスを感知するシステムを構築している内耳前庭（平衡機能）に着目した。機能している遺伝子群を解析するため内耳の卵形嚢・球形嚢を回収する実験系（組織回収系）構築を目指した。遺伝子解析を行うため、広く使われている C57BL/6J マウスを用い、顕微鏡下で内耳解剖・試料取得を行った。尿管細胞（腎組織）・前庭組織の繊毛遺伝子のエピゲノム情報を整理する基盤を整えた。

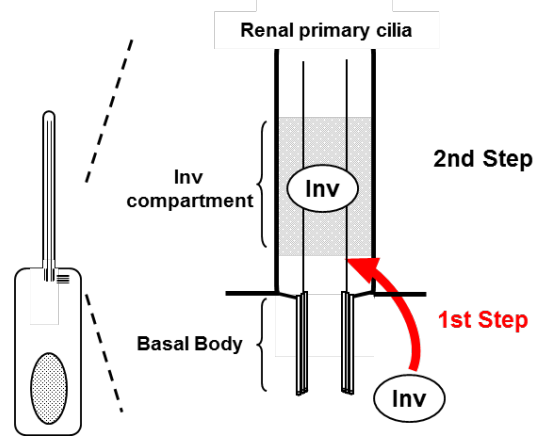
( 9 )

以上の結果から、分子レベル、尿管細胞内・ゼブラフィッシュ生体内において Inv, Nek8 が分子レベルで他の因子の介在なしに直接結合し、尿管繊毛基部において正常な尿管形態維持に協調的役割を担っていることを明らかにした。

当初 Inv は繊毛-核間をシャトリングする機能を有し、その機能発現に「細胞内カルシウムイオン濃度変化」が関与すると考え実験系

を考えたが、Inv 分子内のカルシウムイオン調節領域（カルモジュリン結合ドメイン:IQドメイン）解析を進める中で、IQドメインが繊毛へのタンパク分子エントリーに必須であるという新たな発見につながった。概略図を次図に示す。細胞質から繊毛内の輸送に”IQドメイン”が必須であるという新たな輸送機構の提示となる。

繊毛蛋白、中心体蛋白にはカルモジュリン結合ドメインを有する物も多く、繊毛の進展にこのマシナリーが強く関与している可能性が想定される。カルモジュリン蛋白そのものも中心体に存在するため、繊毛からのシグナルカスケードが繊毛基部（中心体）で複雑に制御されているシナリオが考えられる。



## 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2件)

The ciliary protein Nek8/Nphp9 acts downstream of Inv/Nphp2 during pronephros morphogenesis and left-right establishment in zebrafish.

Fukui H, Shiba D, Asakawa K, Kawakami K and Yokoyama T.

FEBS Lett. 586(16):2273-9, 2012.

Deficiency of NOX1/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form oxidase leads to pulmonary vascular remodeling.

Iwata K, Ikami K, Matsuno K, Yamashita T, Shiba D, Ibi M, Matsumoto M, Katsuyama M, Cui W, Zhang J, Zhu K, Takei N, Kokai Y, Ohneda O, Yokoyama T, Yabe-Nishimura C.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014 Jan;34(1):110-9.

〔学会発表〕(計4件)

A three-step process of Nphp3 ciliary localization.

Dai Shiba, Kana Nakata, Hajime Fukui, Daisuke Kobayashi and Takahiko Yokoyama.

CILIA 2012-1st International Scientific

Conference, London, 16-18 May, 2012  
抄録 CILIA 2012 Conference Book, 44 (2012)

The ciliary protein Nek8/Nphp9 acts downstream  
of Inv/Nphp2

Dai Shiba, Hajime Fukui, Kazuhide Asakawa,  
Koichi Kawakami and Takahiko Yokoyama

The American Society for Cell Biology Annual  
Meeting, The Moscone Center, San Francisco,  
CA, December 15-19, 2012

抄録 The American Society for Cell Biology,  
Annual Meeting Program, L9 (2012)

The ciliary protein Nek8/Nphp9 acts downstream  
of Inv/Nphp2

芝大、福井 一、横山 尚彦

第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、  
香川、2013 年 3 月 28-30 日

An attempt to isolate novel ciliary genes using  
whole mount in situ hybridization expression  
database

小林 大介、芝大、横山 尚彦

第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、  
香川、2013 年 3 月 28-30 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

芝大 (DAI SHIBA)

宇宙航空研究開発機構 (JAXA)・有人宇宙

ミッション本部・主任研究員

研究者番号：50360722

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：