

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06824

研究課題名（和文）新規遺伝子Hoatzinを介した運動繊毛形成機構の解析

研究課題名（英文）Study of motile ciliogenesis in vertebrates using Hoatzin knockout mouse

研究代表者

成田 啓之（Narita, Keishi）

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：50452131

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：新規運動繊毛関連分子HOATZINの分子機能解明を目指し結合タンパク質の探索を行った結果、有力候補としてチューブリンや熱ショックタンパク質、解糖系酵素などを同定した。その後の解析の結果、HOATZINは解糖系酵素のプロセッシングに関与する分子シャペロンとして機能している可能性が考えられた。野生型マウスの未成熟な多繊毛上皮細胞を透過型電顕観察した結果、従来精子細胞でのみ記述されていた特殊な繊毛形成機構が多繊毛上皮細胞でもひろく機能している可能性を見出した。CFAP70の機能解析を行った結果、これが運動繊毛のODA基部にあってその機能を調節する軸系結合タンパク質であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの研究成果の学術的意義は脳の恒常性維持、呼吸器の免疫機能、そして生殖に極めて重要な役割を果たしている運動繊毛がどのようにして作られ機能しているかについて、その一端を明らかにしたという点にある。社会的意義としては運動繊毛の異常が原因で生じる水頭症や呼吸器感染症、そして不妊の原因解明と根本的治療法開発につながるという点が挙げられる。

研究成果の概要（英文）：To understand the molecular function of HOATZIN, a novel protein involved in motile ciliogenesis in vertebrates, HOATZIN-interacting proteins were enriched from testis lysate by immunoprecipitation and identified by shotgun proteomics. The identified molecules included tubulins, heat shock proteins, and glycolytic enzymes. The subsequent analyses suggested that HOATZIN might function as a molecular chaperone to process ENO4, one of the glycolytic enzymes, into mature form.

Transmission electron microscopy of immature multiciliated epithelia from wild-type mouse trachea, oviduct and brain ventricle, strongly suggested that cytosolic ciliogenesis, an “extraordinary” mode of ciliogenesis described only in elongating spermatids, takes place in these epithelia. Characterization of mouse CFAP70 and its Chlamydomonas homolog FAP70 revealed that it is a novel axoneme-binding protein that localizes at the base of the outer dynein arm and regulates ciliary motility.

研究分野：細胞生物学

キーワード：運動繊毛

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

運動繊毛は真核生物が細胞表面に形成する突起構造の一種である。微小管からなる基底小体および軸系という骨格構造を持ち、軸系上に配置されたモータータンパク質の働きにより鞭打ち運動を行っている。運動繊毛はヒトでは気道や卵管の上皮細胞、脳室の上皮細胞、精子などが有し、その機能不全は慢性呼吸器疾患、水頭症、不妊症などの原因となることから医学上重要視されている。しかしその形成機構、特に精子鞭毛形成機構に関しては未だに不明な点が多い。研究代表者はこれまで脳室を裏打ちする上皮系細胞をモデルとし、脊椎動物における繊毛の構造的・機能的多様性を解析してきた。

*Hoatzin* は研究代表者が以前実施した脳室上皮のトランスクリプトーム解析をきっかけに注目した遺伝子である。*Hoatzin* は脊椎動物のみが獲得した遺伝子で、既知のドメインを持たない 19 kDa のタンパク質をコードしている。これまでの解析により、*Hoatzin* が運動繊毛を有する組織で強く発現していること、*Hoatzin* ホモ変異型マウスが水頭症(軽度~重度)および造精機能障害を呈すること、変異型マウスの脳室上皮細胞および精子細胞において軸系の超微細構造が乱れること、その一方で気道繊毛上皮細胞では *Hoatzin* 欠損の影響がほとんど見られないこと、などを確認している。HOATZIN の分子機能の詳細は未解明であるが、これまでの予備的知見を基に、完成した運動繊毛の構造タンパク質として機能するのではなく運動繊毛の形成過程に関わっているのではないかと予想した。

また研究代表者は、以前幼弱な野生型マウスの脳室壁を構成する上皮細胞を透過型電子顕微鏡で観察した際、繊毛数本の軸系を含む細胞突起や脂質二重膜が附着し一組になった運動繊毛など、特異な繊毛関連構造を偶然見出している。これらは形成途中の繊毛を捉えた像と考えられたが既存のモデルで説明できるものではなく、これまで知られていない繊毛形成機構が上皮細胞で機能していると考えた。

### 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では哺乳類の運動繊毛形成機構を明らかにすべく、*Hoatzin* 変異型マウスおよび未成熟な野生型マウスを用いた種々の解析を行った。また *Hoatzin* と同様にトランスクリプトーム解析をきっかけに注目した機能未知の遺伝子 *Cfap70* の解析も行った。

- (1) 新規繊毛関連遺伝子 *Hoatzin* の機能解析
- (2) 未成熟な多繊毛上皮細胞の透過型電子顕微鏡解析
- (3) 繊毛関連遺伝子 *Cfap70* の機能解析

### 3. 研究の方法

(1) ショ糖密度勾配遠心法に基づく精巣抽出物の分画：精巣組織の破碎とそこから得られた抽出物のショ糖密度勾配遠心法に基づく分画は文献に従いおこなった (Nachury et al. Cell 129, 1201-13, 2007)。

(2) 免疫沈降産物のショットガンプロテオミクス：ウサギ抗 HOATZ ポリクローナル抗体のアフィニティ精製は文献に従いおこなった (Olmsted. J Biol Chem 256, 11955-7, 1981)。そして磁気ビーズ (Dynabeads Protein G) に精製抗体をクロスリンクし、得られたビーズ 50  $\mu$ l を免疫沈降実験に使用した。免疫沈降は、上記の方法(1)に従い得られたショ糖密度勾配分画のうち HOATZ を含むもの (#3-8) をプールし、3 回に分けて磁気ビーズと 3 時間 4 の条件で転倒混和することでおこなった。その後ビーズをバッファーで洗浄し、沈降産物を 0.1 M グリシンバッファー (pH2.8) で溶出し回収した。得られた沈降産物のショットガンプロテオミクス解析は東京大学医科学研究所疾患プロテオミクスラボラトリーの尾山大明教授および秦裕子技術専門員の協力を得て文献に従いおこなった (Contu et al. J Cell Sci 130, 2843-53, 2017)。

(3) マウス組織切片作成、ウェスタンブロット、免疫染色：これらの実験は一般的な方法に従いおこなった。

(4) 電子顕微鏡解析：透過型電子顕微鏡を用いた超微細構造の解析は一般的な方法に従いおこなった。

(5) クラミドモナス変異体の作出と鞭毛の機能解析および構造解析：これらの実験は山梨大学医学部解剖学講座構造生物学教室の小田賢幸教授および久保智広講師の協力を得ておこなった。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規繊毛関連遺伝子 *Hoatzin* の機能解析

これまでの解析により、*Hoatzin* が運動繊毛を有する組織で強く発現していること、*Hoatzin* ホモ変異型マウスが水頭症(軽度~重度)および造精機能障害を呈すること、変異型マウスの脳室上衣細胞および精子細胞において軸系の超微細構造が乱れること、などを確認している。ここでは HOATZIN の分子機能解明を目指し種々の解析を行った。

まず精巣抽出物(野生型・*Hoatzin* 変異型)に含まれるタンパク質をショ糖密度勾配遠心法で分画し、繊毛形成に必須な輸送体として知られる IFT 複合体および BBSome に *Hoatzin* 変異が及ぼす影響を調べたが、いずれの輸送体も顕著な変化を認めなかった。このことから HOATZIN はこれら輸送体とは直接関係しない機能を担っていることが考えられた。

次に、自作のウサギ抗 HOATZIN ポリクローナル抗体をアフィニティ精製・濃縮し、また検出試薬の感度を高めることで、内在性 HOATZIN をウェスタンブロットで特異的に検出することを可能にした。この抗体を用いて精巣抽出物に含まれる HOATZIN を免疫沈降し、共沈したタンパク質をショットガンプロテオミクスで網羅的に探索した結果、HOATZIN 結合タンパク質の有力候補としてチュプリンや熱ショックタンパク質(HSPA1L、HSPA4L)、解糖系酵素(GAPDH、ENO4)などを同定した。

最後に *Hoatzin* 変異型マウスにおける ENO4 の挙動の変化を検討した。ENO4 の推定分子量は約 70 kDa であるが、野生型マウスの完成精子では約 60 kDa となっており、前駆体である前者がプロセッシングを受け成熟型の後者に変換されていると考えられた。精巣抽出物に含まれる ENO4 を解析したところ、*Hoatzin* 変異型では野生型に比べ ENO4 前駆体の量が多くなっており、このプロセッシングが滞っていることが考えられた。*Hoatzin* 変異に伴う ENO4 前駆体の増加は初代培養上衣細胞でも確認できた。

以上の知見を総合することにより、HOATZIN は解糖系酵素のプロセッシングに関与する分子シャペロンとして機能している可能性が考えられた。

##### (2) 未成熟な多繊毛上皮細胞の透過型電子顕微鏡解析

以前幼若な野生型マウスの上衣細胞において偶然見出した2種類の特異な繊毛関連構造について、その特徴や出現頻度、普遍性などを検討すべく解析を行った。1つ目の「束状の運動繊毛」は複数の運動繊毛が電顕レベルで密着しているものである。3週齢マウスの脳室壁を詳細に観察したところ、そのほとんどは2本の束だが、中には3~5本の束も存在した。計6000本の繊毛横断面を数えて束の出現頻度を計算したところ、およそ5%と算出された。その密着部には偶然できたとは考えにくい特徴的なひだ構造を持つものもあり、多繊毛の形成途中に生じた一過性の構造と思われた。しかし同様の束は1週齢マウスの気管および4週齢マウスの卵管では見つけることはできなかった。上衣細胞に特異的に出現する構造なのかもしれない。

2つ目の「複数の運動繊毛軸系を含む突起」は出現頻度が上記の束よりもさらに低く、3週齢マウスの上衣細胞では1枚の超薄切片をくまなく観察して1, 2個あるかどうかという程度であった。同様の構造は1週齢マウスの気管および4週齢マウスの卵管でも見つけることができた。このような突起に含まれる軸系は不完全な構造をしていることがあり、軸系の組み立てがその場で行われているかのように見えるなど、既存の繊毛形成機構の概念を覆す可能性を示すものであった。

繊毛は一般に compartmentalized ciliogenesis という機構に従って作られ、これまで唯一の例外として精子鞭毛形成における cytosolic ciliogenesis が記述されていた。本解析では cytosolic ciliogenesis と同様の機構が多繊毛上皮に広く用いられている可能性を示す知見が得られた。

##### (3) 繊毛関連遺伝子 *Cfap70* の機能解析

*Cfap70* はヒトからクラミドモナスに至る様々な真核生物が持つ遺伝子である。CFAP70 タンパク質はクラミドモナス鞭毛プロテオームの構成分子として見出されているが、その詳細については不明である。上述の IFT 複合体の構成タンパク質と同様に TPR ドメインを有していることから IFT との関連を想定し解析を行った。

*Cfap70* は *Hoatzin* と同様に運動繊毛を有する組織に特異的に発現しており、抗 CFAP70 抗体を用いてこれら組織を免疫染色すると運動繊毛内部にシグナルを認めた。しかしその免疫染色パターンは IFT 複合体に典型的な粒子状パターンとは異なった。ブタ気管粘膜から粗精製した運動繊毛の多段階抽出実験でも、CFAP70 は IFT 複合体と異なり軸系に強く結合しているという結果を得た。

次に初代培養マウス上衣細胞を用いて強制発現実験を行ったところ CFAP70 は予想通り繊毛に局在したが、その繊毛局在性に重要なのは TPR ドメインを含む C 末端領域ではなく N 末端領域であった。上衣細胞の CFAP70 をノックダウンしたところ繊毛打頻度が減少した。

鞭毛虫クラミドモナスの CFAP70 ホモログである FAP70 をノックアウトした変異体では外腕ダイニン(ODA)の機能阻害が見られ、クライオ電子線トモグラフィー解析によって FAP70 の N 末端領域が ODA の基部にあることが示された。

以上の結果から、CFAP70 は運動繊毛の ODA 基部にあってその機能を調節する軸系結合タンパク質であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Narita Keishi, Takeda Sen	4. 巻 1 Dec
2. 論文標題 Ultrastructural evidence for an unusual mode of ciliogenesis in mouse multiciliated epithelia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfaa074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sawada Masato, Matsumoto Mami, Narita Keishi, Kumamoto Natsuko, Ugawa Shinya, Takeda Sen, Sawamoto Kazunobu	4. 巻 10
2. 論文標題 In vitro Time-lapse Imaging of Primary Cilium in Migrating Neuroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e3823
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.3823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Narita Keishi, Nagatomo Hiroaki, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Takeda Sen	4. 巻 23
2. 論文標題 Discovery of a Vertebrate-Specific Factor that Processes Flagellar Glycolytic Enolase during Motile Ciliogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.100992	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Obata Fumiko, Narita Keishi	4. 巻 17
2. 論文標題 Hypercholesterolemia negatively influences morphology and molecular markers of epithelial cells within the choroid plexus in rabbits	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fluids and Barriers of the CNS	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12987-020-0175-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Mami, Sawada Masato, Garcia-Gonzalez Diego, Herranz-Perez Vicente, Ogino Takashi, Bang Nguyen Huy, Quynh Thai Truc, Narita Keishi, Kumamoto Natsuko, Ugawa Shinya, Saito Yumiko, Takeda Sen, Kaneko Naoko, Khodosevich Konstantin, Monyer Hannah, Garcia-Verdugo Jose Manuel, Ohno Nobuhiko, Sawamoto Kazunobu	4. 巻 39
2. 論文標題 Dynamic Changes in Ultrastructure of the Primary Cilium in Migrating Neuroblasts in the Postnatal Brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 9967 ~ 9988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1503-19.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shamoto Noritoshi, Narita Keishi, Kubo Tomohiro, Oda Toshiyuki, Takeda Sen	4. 巻 7
2. 論文標題 CFAP70 Is a Novel Axoneme-Binding Protein That Localizes at the Base of the Outer Dynein Arm and Regulates Ciliary Motility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 124 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells7090124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Itoh M, Ide S, Iwasaki Y, Saito T, Narita K, Dai H, Yamakura S, Furue T, Kitayama H, Maeda K, Takahashi E, Matsui K, Goto YI, Takeda S, Arima M	4. 巻 40
2. 論文標題 Arima syndrome caused by CEP290 specific variant and accompanied with pathological cilium; clinical comparison with Joubert syndrome and its related diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain & development	6. 最初と最後の頁 259-267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2017.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Sen, Narita Keishi	4. 巻 142
2. 論文標題 Transport Across the Choroid Plexus: How to Culture Choroid Plexus Cells and Establish a Functional Assay System	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuromethods	6. 最初と最後の頁 163 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8946-1_9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Keishi Narita, Sen Takeda
2. 発表標題 Ultrastructural evidence for an unusual mode of ciliogenesis in mouse multiciliated epithelia
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成田 啓之、長友 啓明、秦 裕子、尾山 大明、竹田 扇
2. 発表標題 脊椎動物にのみ保存された新規繊毛関連分子Hoatzinの機能解析
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keishi Narita, Hiroaki Nagatomo, Hiroko Kozuka-Hata, Masaaki Oyama, and Sen Takeda
2. 発表標題 Hoatzin is a vertebrate-specific gene involved in motile ciliogenesis by mediating the processing of flagellar glycolytic enzyme
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keishi Narita, Hiroaki Nagatomo, Sen Takeda
2. 発表標題 Functional characterization of a novel cilia-related gene, Hoatzin, unveils the presence of distinct, tissue-specific mechanisms for motile ciliogenesis
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 成田 啓之, 社本 憲俊, 久保 智広, 小田 賢幸, 竹田 扇
2. 発表標題 新規外腕ダイニン調節分子CFAP70のドメイン機能解析
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	久保 智広  (Kubo Tomohiro)  (70778745)	山梨大学・大学院総合研究部・講師	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------