

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 05 月 21 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770190

研究課題名（和文）線毛の機能獲得の分子機構とその多様性

研究課題名（英文）Structural and functional variations of vertebrate cilia.

研究代表者

成田 啓之（NARITA KEISHI）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・講師

研究者番号：50452131

研究成果の概要（和文）：

研究代表者は本研究課題を通して以下の成果を得た。(1) ブタ脈絡叢上皮細胞（CPEC）の一次繊毛プロテオームを解析した。(2) 新生児マウス CPEC の繊毛の観察によって、この繊毛が出生前後の一時期に運動することを見いだした。(3) 運動している時期の CPEC には 9+0 型の一次繊毛に加えて 9+2 型の繊毛や非典型的な繊毛が混在していることを見いだした。(4) DNA マイクロアレイなどを用いて細胞あたりの繊毛数を規定していると予想される遺伝子群を同定した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we obtained the following results. (1) Proteomic analysis of unique, multiple 9+0 cilia in choroid plexus epithelial cells (CPECs) identified 868 proteins. (2) Live imaging of mouse choroid plexus revealed that neonatal CPEC cilia could beat vigorously, and the motility waned and was lost within 1-2 weeks. (3) Ultrastructural analysis revealed the presence of not only 9+0 but also 9+2 and atypical ciliary subtypes in neonatal CPEC. (4) A set of candidate genes that would regulate ciliary number per cell was identified based on DNA microarray analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：繊毛・脈絡・上皮細胞・プロテオミクス・ライブセルイメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 繊毛の分類：繊毛は細胞表面から突出する径 0.5 μm 、長さ 2-20 μm の細胞小器官で、その構造的・機能的差異に基づき従来型繊毛 (conventional cilium) と一次繊毛 (primary cilium) に分類される。従来型繊

毛は 9+2 の微小管骨格を持ち、運動繊毛 (motile cilium) とも呼ばれ、鞭打ち運動を行い、ヒトでは気道上皮細胞や精子に見られる。一方、一次繊毛は 9+0 の微小管骨格を持ち、ヒトではほぼ全ての細胞に存在しており、様々な受容体を局在させて感覚器としての

機能を担っている。また細胞1つあたりの数も、従来型繊毛は上皮系細胞で数百本も見られるのに対し、一次繊毛は1本のみと大きく異なっている。

(2) 現在の大きな課題：上記の枠組みはこれまで広く受け入れられてきた。しかし最近、気道上皮の典型的な従来型繊毛が感覚機能を持つことが報告され、既存概念に新たな一石が投じられている。そもそも従来型繊毛と一次繊毛の特徴を規定する分子機構には未解明な部分も多く、例えば繊毛の数を規定する分子機構などはほとんど知られていない。また一言に繊毛の感覚機能と言ってもその受容刺激は細胞に応じて様々である。繊毛に局在する受容体の多様性、すなわち繊毛の機能特化の分子機構を理解するには、繊毛を構成する分子の網羅的解析が必要であるが、このような解析はこれまで数例しか報告されていない。

(3) 繊毛解析モデルとしての脳室系上皮細胞：脳には脳脊髄液 (CSF) のホメオスタシスに関与する2種類の脳室系上皮細胞が存在する。このうち髄腔内表面を覆う上衣細胞 (EPD) は従来型繊毛を発現しており、その鞭打ち運動が CSF 循環に重要であることはよく知られている。一方、脈絡叢において CSF 産生および CSF 中への様々な生理活性物質分泌を担っている脈絡叢上皮細胞 (CPEC) は一次繊毛を持つが、これは1つの細胞から多数 (20 本以上) 形成されるなど、極めて例外的な発現様式をとっている。この事実はこれまでほとんど認知されておらず、その機能解析は現在、研究代表者が世界にさがけて行っている。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では以下の3つの目標を設定し、繊毛の機能獲得とその多様性の分子細胞生物学的基盤を多角的に解析した。

(1) プロテオミクス解析による一次繊毛の特徴と多様性の分子レベルでの検討

(2) ライブセルイメージングによる一次繊毛数調節機構の解析

(3) 遺伝子発現差異解析による脈絡叢上皮細胞と上衣細胞の特性を規定する新規遺伝子群の探索

3. 研究の方法

(1) 一次繊毛の単離・精製：まず新鮮なブタの脳から得た脈絡叢組織を、1 mM ジブカイン塩酸塩を含む溶液中で1分間震盪した。これにより遊離した一次繊毛を分画遠心法とショ糖密度勾配超遠心分離法を組み合わせ精製した。こうして得られた分画を、抗アセチル化 α チューブリン抗体を用いたウェスタンブロット解析と電子顕微鏡観察に

よってスクリーニングし、一次繊毛が濃縮されている分画を同定した。

(2) プロテオミクス解析：まず総タンパク量 13 μ g の一次繊毛濃縮サンプルを 5–20% ポリアクリルアミドゲル中に一次展開し、そのゲルをタンパク質のサイズに従い4スライスに切断した。次に各スライスに含まれたタンパク質を還元アルキル化反応・トリプシン消化したのち抽出・濃縮した。得られたサンプルの液体クロマトグラフ質量分析機を用いた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准教授らの協力を得て行い、分子を同定した。最後に同定された分子に関する情報を HomoloGene、Blastp、MitoProtein、Ciliaproteome などのデータベースを用いて収集・検討した。

(3) リアルタイム PCR・ウェスタンブロット：プロテオミクス解析の結果を検証するために、マウス由来の3種類の細胞 (CPEC、EPD、線維芽細胞株 NIH3T3) をそれぞれ培養して total RNA を抽出し、cDNA を調整した。そしてリアルタイム PCR によって種々の注目遺伝子の各細胞における発現レベルを比較定量した。ウェスタンブロットは一般的な方法に従って行った。

(4) 繊毛の動態解析：繊毛運動の高速度ビデオ顕微鏡解析は早稲田大学理工学術院 先進理工学部の井上貴文教授らの協力を得て行った。新鮮な脈絡叢組織をマウスから剖出し、Leibovitz L-15 培地の入ったガラスボトムディッシュに移した後、直ちに Olympus IX70 倒立位相差顕微鏡で撮影を行った。そして繊毛の動画を Allied GE680 CCD カメラを用いて毎秒 200 コマの速度で取得し、TI Workbench ソフトウェアを用いて解析した。同様の解析を、Efhc1 ノックアウトマウス (理化学研究所 脳科学総合研究センター 神経遺伝研究チームの山川和弘チームリーダーより提供していただいた) 由来の脈絡叢、および初代培養マウス上衣細胞を用いて行い、比較対象とした。

(5) 電子顕微鏡解析：透過型電子顕微鏡を用いた繊毛の軸系構造の解析は一般的な方法に従って行った。

(6) DNA マイクロアレイ解析：細胞1つあたりの繊毛数が異なるマウス脈絡叢上皮細胞 (数十本)、上衣細胞 (百本以上)、精子 (一本) からそれぞれ total RNA を抽出し、Toray 3D Gene チップを用いて遺伝子発現レベルの網羅的解析を行った。そして3つのサンプルの結果を比較し、細胞あたりの繊毛数と発現レベルが比例している遺伝子群を抽出した。

4. 研究成果

(1) 脈絡叢上皮細胞の繊毛プロテオーム解析：我々はまず食肉用に屠殺された生後約6ヶ月のブタ CPEC から繊毛を遊離・濃縮し、繊毛上に存在するタンパク質群を同定した。繊毛は脳から剖出した脈絡叢組織をジブカイン含有培地中で穏やかに攪拌することで遊離させることができた (図 1 A)。それを分画遠心分離法とショ糖密度勾配を用いた平衡沈降法を組み合わせ濃縮し、液体クロマトグラフ質量分析機を用いて解析を行った結果、合計 1115 個の分子を同定した。そこから各種データベースを用いてミトコンドリア由来の分子などを除外し、最終的に 868 個の分子を CPEC の繊毛プロテオームとし

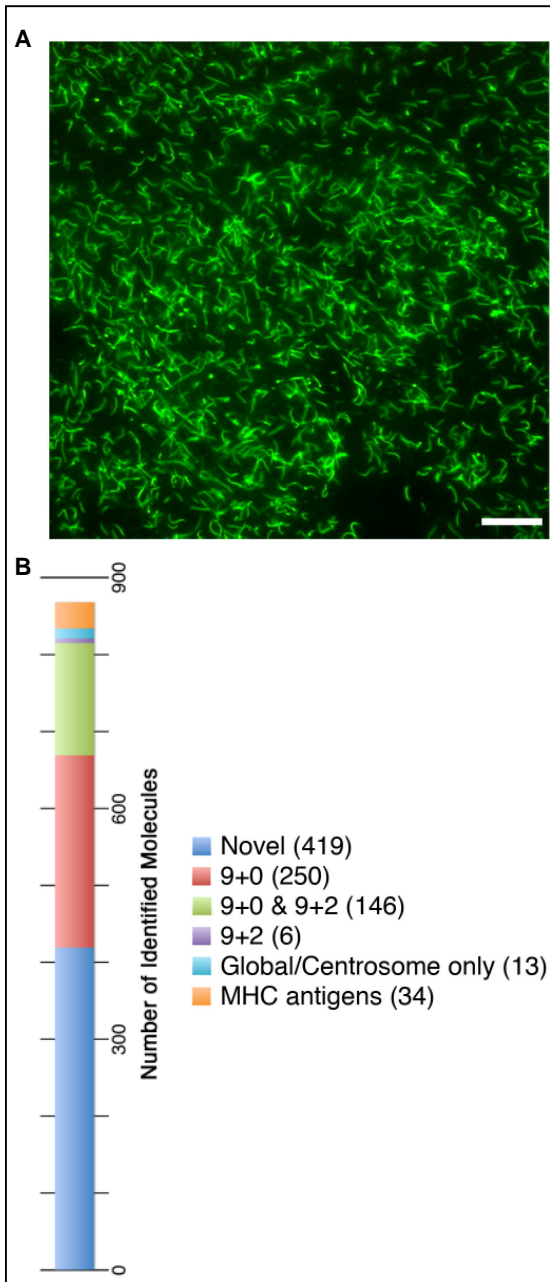


図 1. ブタ CPEC の繊毛プロテオーム解析.

た。同定された分子の具体的な例としては、繊毛軸系の主要構成分子であるチューブリンのほか、繊毛内輸送に関わる IFT81 と IFT122、基底小体や繊毛基部への局在が知られる ODF2、CEP290、CEP110、SEPT3、IPO4、IPO5、および繊毛の膜状に局在する ANXA1、ANXA2、ANXA4、ANXA7、ANXA11 などがあった。このプロテオームを他のグループによって既に報告されている繊毛プロテオームと比較すると、約半数が既に繊毛への存在が知られているもの、残り半数が今回の解析によって初めて繊毛への存在が示唆されたものであった (図 1 B)。

(2) 脈絡叢上皮細胞の繊毛プロテオームには運動繊毛の構成分子が含まれている：興味深いことに、今回のプロテオームには DPCD、RSPH4A、および RSPH9 といった、9+2 型繊毛の運動機能に関与することが知られている分子が含まれていた。運動機能を持たない 9+0 型の繊毛プロテオームになぜこれら分子が見いだされたのか、その原因を明らかにするために、まずマウス由来の CPEC を用いて、これら分子の mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR で定量解析した。比較対象として、典型的な 9+2 型繊毛を持つ EPD、典型的な 9+0 型繊毛を持つ NIH3T3 も同時に解析した (図 2 A)。EPD および CPEC の初代培養の品質確認として、それぞれのマーカー遺伝子としてよく知られた CD24 および TTR の発現レベルも比較した。その結果、CPEC における Dpcd、Rsph4a および Rsph9 の発現レベルは、ネガティブコントロールとして用いた NIH3T3 よりも有意に高く、ポジティブコントロールとして用いた

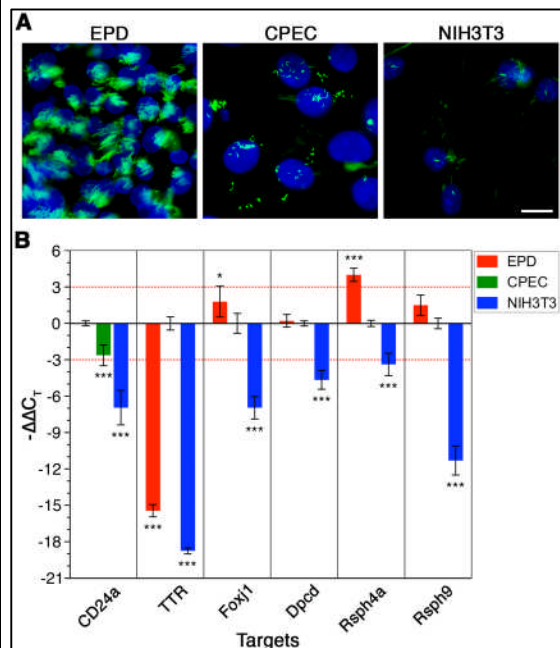


図 2. CPEC における Dpcd、Rsph4a および Rsph9 の発現確認.

EPD と同等か、これら2つの細胞の間となることが確認された (図2B)。また **Rsph9** に関してはウェスタンブロットおよび免疫染色も行い、その遺伝子産物が **CPEC** 繊毛に局在していることも確認した (図3)。以上の結果により繊毛プロテオームの信頼性が確認された。

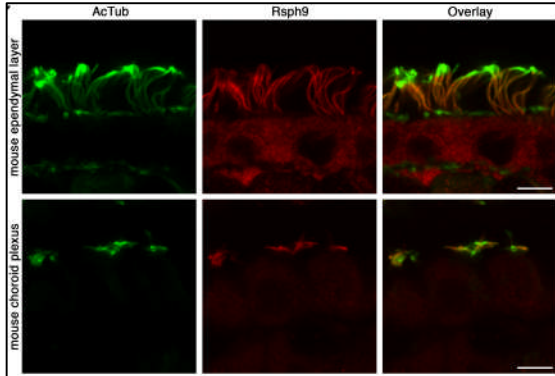


図3. 成獣マウスの EPD (上) および CPEC (下) における **Rsph9** の繊毛局在性の確認.

(3) 脈絡叢上皮細胞の繊毛は出生直後の一時期に運動する：我々は以前、生後約6ヶ月のブタ **CPEC** をライブセルイメージングによって観察したことがあるが、繊毛運動を確認できたことはなかった。同様の結果がマウスにおいても得られ、生後約6ヶ月のブタの発達段階に相当する生後約1ヶ月の若年期、およびそれ以降の時期の **CPEC** においては **Rsph9** が関与するような繊毛運動は確認できず、その機能は不明であった。

しかし、より若いマウスの脈絡叢を観察したところ、新生児マウスでは **CPEC** の繊毛が活発に運動していることが見出された。興味深いことに **CPEC** の繊毛運動は一過性を示し、出生前後をピークとして、その後2週間くらいの間に徐々に衰えることが明らかになった。これは脳脊髄液の循環を担う **EPD** の繊毛が、生後2~3週間かけて徐々に運動機能を獲得していくのと全く異なる様式であった (図4)。この一過性の繊毛運動の生理機

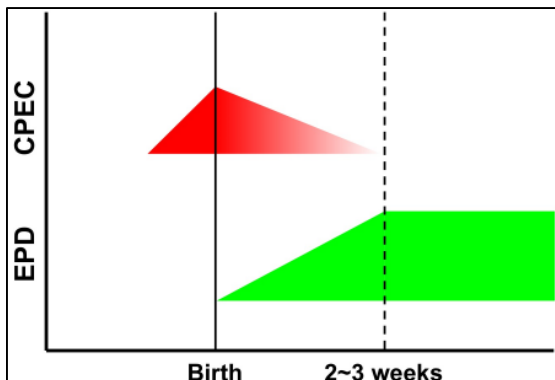


図4. **CPEC** と **EPD** における繊毛運動の変化を表した模式図.

能に関して、我々は **EPD** が成熟する前に **CPEC** の繊毛が脳脊髄液の循環を担っているのではないかと考えた。しかし、蛍光ビーズを培地に加えた観察では、**CPEC** の繊毛運動によって細胞外液の流れが生じる様子は確認できなかった。現時点でその生理的意義は不明である。

我々は更に、高速度ビデオ撮影によって繊毛の動態を詳細に解析した (図5)。その結果 **EPD** の 9+2 型繊毛と比較して、新生児 **CPEC** の繊毛運動は以下のような特徴を有していることが明らかとなった。

- ① 繊毛運動の周波数が低く、振幅も小さい (図5,6)
- ② 1つの細胞が持つ繊毛の運動方向が定まっていない (すなわち planar cell polarity が見られない) (図5)
- ③ 往復運動だけでなく回転運動もまれに見られ、加えて不動の繊毛も混在している (図5)

このような違いがある一方で、**Efhc1** ノックアウトマウスを用いた解析では、**EPD** につ

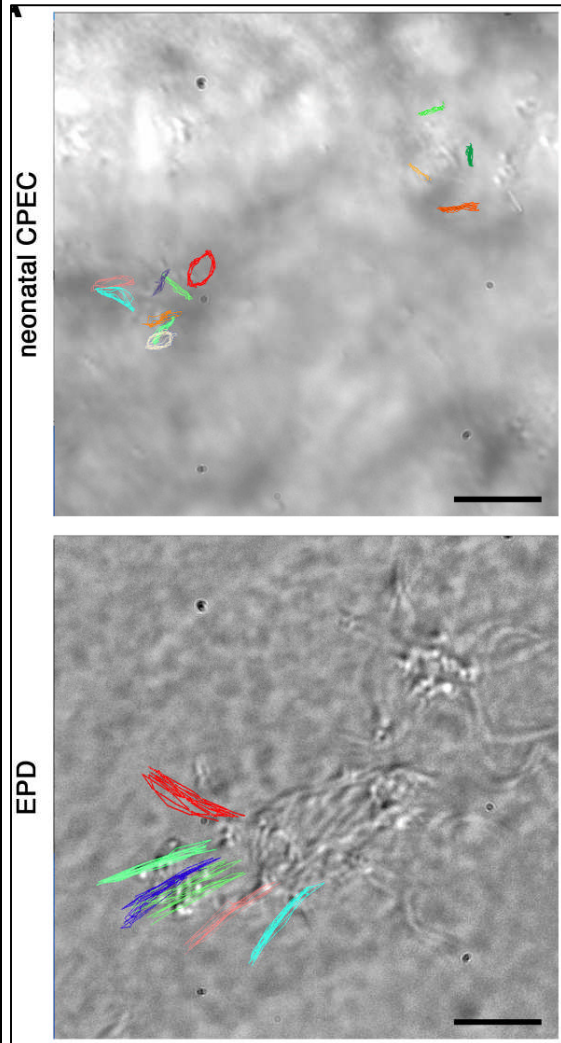


図5. 高速度ビデオ撮影による新生児マウス **CPEC** と **EPD** の繊毛動態解析.

いて過去に報告されたのと同様に、CPECの繊毛運動の周波数も低下していた（図6）。これらの知見を総合すると、新生児 CPEC と EPD の繊毛運動には互いに様々な違いが見られるものの、ある共通の分子機構が存在すると考えられた。ここで我々が特に興味深を持ったのは③の性質で、これは異なる繊毛サブタイプが混在している可能性を示唆していると考えられた。

(4) 新生児脈絡叢上皮細胞には 9+0 型、9+2 型および非典型的な繊毛サブタイプが混在する：我々は以前、生後約6ヶ月の若年期におけるブタ CPEC の繊毛軸糸構造を観察し、9+0 型およびその亜型のみしか観察できな

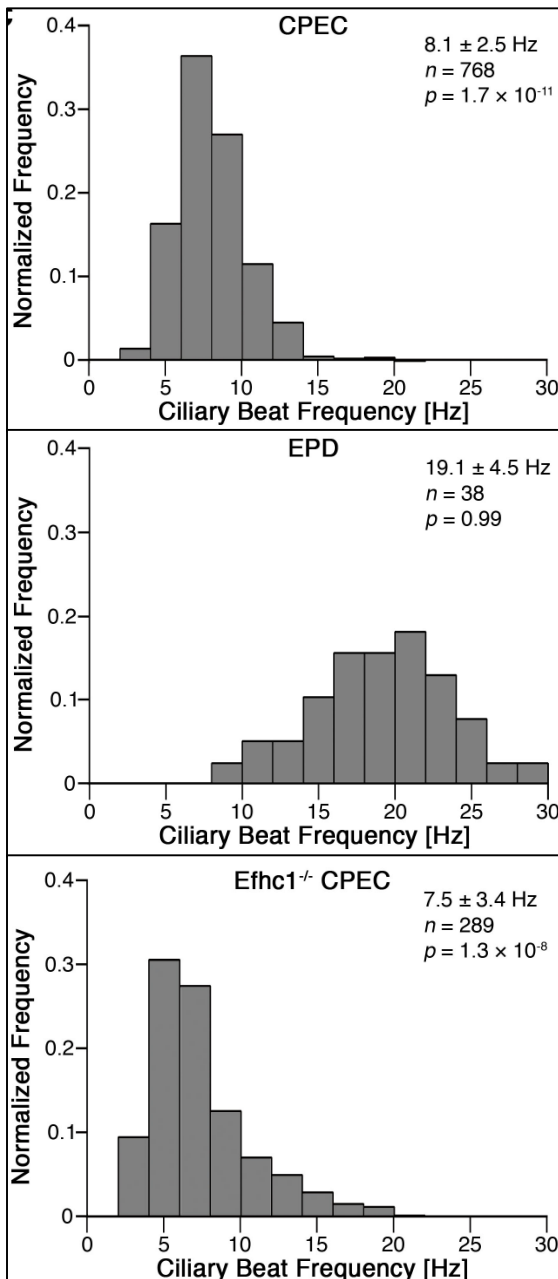


図6. CPEC、EPD および Efhc1 ノックアウト CPEC の繊毛動態周波数の比較。

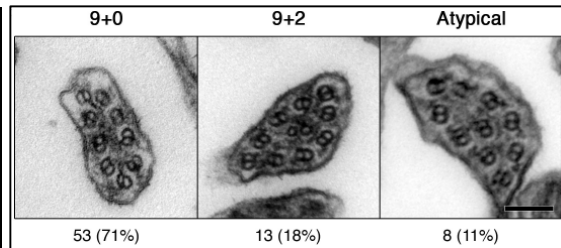


図7. 新生児マウス CPEC の繊毛軸糸構造の解析。

ったことを報告している。しかし出生直後の動物の CPEC 繊毛軸糸構造はこれまで観察したことがなかった。そこで新生児マウス CPEC を固定し、透過型電子顕微鏡でその繊毛軸糸構造を観察した。その結果、大部分は以前観察したものと同様に 9+0 型の繊毛であったが、9+2、あるいは9+1型とも呼ぶべき非典型的な繊毛（9つの outer doublet microtubule に加えて、中心にも2連の doublet microtubule が1つ存在している）が顕著な割合で混在していた（図7）。

(5) 繊毛数を規定していると予想される遺伝子群の検索：最後に、我々は細胞1つあたりの繊毛数がそれぞれ異なる CPEC（数十本）、EPD（百本以上）、精子（一本）からそれぞれ total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現レベルの網羅的比較解析を行った。その結果、細胞あたりの繊毛数と発現レベルが比例している312の遺伝子群を抽出した。

以上まとめると、(1)～(4)の研究成果により、これまで全く知られていなかった CPEC 繊毛の分化と成熟に関する新知見を得ることができた。すなわち、この繊毛は胎児期に 9+2 型の運動繊毛として形成され、その後繊毛が成熟するにつれて中心微小管対および運動機能を徐々に失い、9+0 型の不動線毛と変化していくという可能性を示唆する結果となった。興味深いことに、カエルの嗅神経の繊毛においても未成熟な時期には運動しており、その後成熟に伴って運動が減弱していくことが報告されており、今回見出された現象は CPEC のみならず他の細胞が持つ繊毛の分化にも共通するような根本的な現象であることも予想された。

また(5)の研究成果により、脈絡叢上皮細胞の繊毛分化・成熟過程を分子レベルで明らかにしていくための基盤を得ることができた。今後、この細胞で明らかになった繊毛の分化・成熟機構が、嗅細胞など他の細胞にも共通して見いだせるかを検討する方針である。

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 5 件）

- ① Keishi Narita, Hiroko Kozuka-Hata, Yuta Nonami, Hiroko Ao-Kondo, Toshimitsu Suzuki, Hideki Nakamura, Kazuhiro Yamakawa, Masaaki Oyama, Takafumi Inoue, and Sen Takeda. Proteomic analysis of multiple primary cilia reveals a novel mode of ciliary development in mammals. *Biology Open* (査読有), in press, (2012)
- ② 竹田扇、成田啓之. 神経系細胞の一次繊毛に見られるセンサー機能. *Clinical Neuroscience* (査読無), **30**(4), 465-8, (2012)
- ③ Sen Takeda, Keishi Narita. Structure and function of vertebrate cilia, towards a new taxonomy. *Differentiation* (査読有), **83**(2), S4-11, (2012)
- ④ Keishi Narita, Hiroko Kozuka-Hata, Hiroko Ao-Kondo, Masaaki Oyama, Sen Takeda. Unique property of choroid plexus epithelium primary cilia. *The Journal of Physiological Sciences* (査読無), **61**(Supplement 1), S271, (2011)
- ⑤ Keishi Narita, Masashi Hisamoto, Tohru Okuda, Sen Takeda. Differential neuroprotective activity of two different grape seed extracts. *PLoS One* (査読有), **6**(1), e14575, (2011)
(<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0014575>)

〔学会発表〕（計 6 件）

- ① 成田啓之、秦裕子、野波祐太、近藤裕子、中村英樹、尾山大明、井上貴文、竹田扇. プロテオミクス解析が明かした脈絡叢上皮細胞の繊毛多様性. 第 117 回日本解剖学会. 2012 年 3 月 26 日 山梨大学
- ② Keishi Narita, Hiroko Kozuka-Hata, Yuta Nonami, Hiroko Ao-Kondo, Masaaki Oyama, Takafumi Inoue, Sen Takeda. Structural and functional transition of choroid plexus epithelial cilia revealed by proteomic analysis. 第 51 回米国細胞生物学会. 2011 年 12 月 4 日 Colorado convention center, Denver, CO
- ③ Shohei Sasamoto, Keishi Narita, Sen Takeda. Putative function of TRPV4 on the choroid plexus primary cilia.

第 34 回日本神経科学学会. 2011 年 9 月 17 日 パシフィコ横浜

- ④ Keishi Narita, Hiroko Kozuka-Hata, Yuta Nonami, Hiroko Ao-Kondo, Masaaki Oyama, Takafumi Inoue, Sen Takeda. Proteomic analysis of choroid plexus epithelial primary cilia revealed its functional transition. 第 34 回日本神経科学学会. 2011 年 9 月 17 日 パシフィコ横浜
- ⑤ Keishi Narita, Hiroko Kozuka-Hata, Hiroko Ao-Kondo, Masaaki Oyama, Sen Takeda. Functional transition of choroid plexus epithelial primary cilia revealed by proteomics analysis. 第 63 回日本細胞生物学会. 2011 年 6 月 28 日 北海道大学
- ⑥ Keishi Narita, Hiroko Kozuka-Hata, Hiroko Ao-Kondo, Masaaki Oyama, Sen Takeda. Proteomic analyses of cilia to explore its diversity and differentiation. 第 50 回米国細胞生物学会. 2010 年 12 月 12 日 Pennsylvania convention center, Philadelphia, PA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 啓之 (NARITA KEISHI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・講師

研究者番号：50452131

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし