

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440123

研究課題名(和文) 初期胚において多繊毛細胞の分化・成熟・機能を制御する新規シグナル伝達経路の同定

研究課題名(英文) Identification of signaling pathways regulating multiciliate cell differentiation, maturation and function in early embryos

研究代表者

日下部 杜央 (KUSAKABE, Morioh)

京都大学・生命科学研究科・講師

研究者番号：80378843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多繊毛細胞は脊椎動物の様々な器官の上皮に存在し、数百本の運動性繊毛により上皮表面に沿った液流を引き起こす。我々は、Rasシグナル経路によって転写抑制を受ける分子として以前同定していたmab21-13が、多繊毛細胞分化とイオノサイト分化の初期段階に必須の因子であることを示した。また、MAPKキナーゼファミリー分子ERK7がアクチン制御分子CapZIPのリン酸化を介して繊毛形成を制御することを示した。

研究成果の概要(英文)：Multiciliate cells, which are found in epithelia of various organs in vertebrates, generate extracellular fluid flow along epithelial surfaces by several hundreds of motile cilia. In this study, we show that mab21-13, which has been identified as a Ras-repressed gene in our previous study, is required for early specification of multiciliate cells and ion-transporting ionocytes. Moreover, we find that an atypical MAPK member, ERK7, regulates ciliogenesis by phosphorylating the actin regulator CapZIP.

研究分野：生物学

キーワード：アフリカツメガエル シグナル伝達 多繊毛

1. 研究開始当初の背景

多繊毛細胞は数百本の運動性繊毛により上皮表面に沿った液流を作り出す機能を持ち、ヒトにおいては気管内での異物排除、脳室内での体液循環、卵管内での卵子の移動に関与する (Fliegau M, Benzing T, Omran H. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 880-893 (2007))。多繊毛細胞の機能不全は喘息・水頭症・不妊等の病気に関連することが示唆されており、多繊毛細胞形成機構の解析は医学的にも重要である。両生類を代表するモデル生物であるアフリカツメガエルの初期胚の表皮も多繊毛細胞を有しており、多数の繊毛が同調して動く点も哺乳類と共通する。アフリカツメガエル胚は、遺伝子の過剰発現やノックダウン、組織移植、ライブイメージングが比較的容易であり、多繊毛細胞研究の良いモデル系となると考えられている (Werner ME, Mitchell BJ. *Genesis* 50, 176-185 (2012))。

我々はこれまで、アフリカツメガエル初期胚外胚葉 (アニマルキャップ) において FGF/Ras 経路により発現制御を受ける遺伝子を複数同定し、それらの発生過程における役割を解析してきた (Araki T, Kusakabe M, Nishida E. *J. Biol. Chem.* 286, 6760-6768 (2011); Takahashi C, Suzuki T, Nishida E, Kusakabe M. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 393-402 (2012))。それらのうち機能解析を進めていなかった遺伝子 mab21-13 は、MAB21 ドメインを持つ機能不明のタンパク質をコードする。我々は最近、mab21-13 がアフリカツメガエル胚表皮の多繊毛細胞とイオノサイト (イオン等の低分子を吸収・排出することによって体液のホメオスタシスを維持する細胞) に発現すること、そして mab21-13 のノックダウンにより多繊毛細胞のマーカー遺伝子である alpha-tubulin、イオノサイトのマーカー遺伝子である ael や pendrin 等の発現が顕著に減少することを見出した。この結果は多繊毛細胞とイオノサイト分化の分子機構を解明するうえでの手がかりとなる。

また、最も新しく同定された MAP キナーゼファミリー分子 ERK7 は線虫・ハエからヒトまで進化的に保存されているが、その生理機能はどのモデル生物においても不明であった。我々は、アフリカツメガエルの ERK7 ホモログが、胚表皮の多繊毛細胞に特異的に発現することを見出した。さらに ERK7 のノックダウン実験を行なうと、繊毛の数が減って運動性が消失し、最終的には胚が崩壊した。この予備的結果は、多繊毛細胞の分化・成熟・機能を制御する分子機構を解明するための手がかりとなる。

2. 研究の目的

初期胚表皮において多繊毛細胞の分化・成熟・機能を制御する新規分子として、最近

我々が独自に見出した、mab21-13 および MAP キナーゼファミリー分子 ERK7 が駆動するシグナル伝達経路を同定する。さらに、多繊毛細胞の分化・成熟・機能を制御する新規シグナル分子を探索し、それらが駆動する新規シグナル伝達経路を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究においては、主たる実験系としてアフリカツメガエル初期胚表皮を用いる。アフリカツメガエル初期胚表皮の多繊毛細胞は胚表面に露出しているため、体内深部に存在する哺乳類の多繊毛細胞と比べ観察しやすいのが利点となる。4細胞期の腹側割球にモルフオリノオリゴをマイクロインジェクションすることによって、初期胚表皮において特定のシグナル分子の発現を抑制し、多繊毛細胞等の分化・成熟・機能に対する効果を調べる。多繊毛細胞の分化については、マーカー遺伝子である alpha-tubulin、Multicilin、Foxj1 の発現等を指標にして評価する。多繊毛細胞の成熟については、種々の繊毛構成因子の蛍光による可視化もしくは抗体染色等によって評価する。多繊毛細胞の機能については、蛍光ビーズを用いた液流の可視化等により評価する。また、特定のシグナル分子の発現抑制による効果が別のシグナル分子の過剰発現や抑制でキャンセルされるかどうか検討する等により、シグナル分子が機能する順番を決定する。さらに、マウスの気道上皮の初代培養系において多繊毛細胞分化の過程を再現できることが知られている (You Y, Brody SL. *Methods Mol. Biol.* 945, 123-143 (2013); Vldar EK, Brody SL. *Methods Enzymol.* 525, 285-309 (2013)) ことから、適宜この実験系を用いて、同定したシグナル経路の機能が哺乳類の多繊毛細胞においても保存されているかどうかについても検討していく。

4. 研究成果

これまで我々は、アフリカツメガエルの mab21-13 が初期胚表皮において多繊毛細胞とイオノサイトに発現しており Notch 経路により発現抑制を受けること、そして mab21-13 の機能を阻害すると多繊毛細胞とイオノサイトの形成が阻害されることを見出していた。そこで、mab21-13 の機能阻害が多繊毛細胞やイオノサイトの初期の分化過程を阻害するかどうか whole mount in situ hybridization と qPCR によって検討したところ、原腸胚中期において多繊毛細胞初期分化のマーカー遺伝子である Multicilin と Foxj1、そしてイオノサイト初期分化のマーカー遺伝子である Foxi1 の発現がそれぞれ低下していることがわかった。したがって、遅くても

原腸胚中期までには mab21-13 が多繊毛細胞やイオノサイトの初期分化に必須となることがわかった。

さらに、マウス気道上皮細胞の初代培養系において、mab21-13 の shRNA による発現抑制によって多繊毛細胞の数が減少することを示す予備の結果をこれまで得ていたが、多繊毛細胞以外の細胞については調べていなかった。そこで、mab21-13 が多繊毛細胞の形成に特異的に必要なのか、それとも細胞一般の増殖や生存に必要なのかが判別できなかった。そこでマウス気道上皮細胞の初代培養系の細胞集団において多数派を占める細胞である基底細胞の数に影響がないか検討した。基底細胞のマーカである p63 の抗体染色を行ない、p63 陽性細胞の数を調べたところ、mab21-13 の shRNA によってほとんど影響を受けなかったことがわかった。したがって、mab21-13 の shRNA による細胞数減少は多繊毛細胞特異的であることが示唆された。さらに、Notch シグナルが哺乳類とアフリカツメガエルの両方において多繊毛細胞の分化を負に制御することが知られていたため、マウス気道上皮細胞における Notch シグナルと mab21-13 の関係について検討したところ、Notch の常時活性型を過剰発現すると mab21-13 のマウスホモログの発現が抑制される結果を得た。したがって、マウスにおいてもアフリカツメガエル胚と同様に、mab21-13 が Notch の下流で多繊毛細胞分化を制御することが示唆された。以上の結果、および過去の我々の結果を統合することによって、mab21-13 が Notch シグナルの下流において多繊毛細胞分化とイオノサイト分化の双方を制御することを提唱し (図 1)、論文として発表した (Takahashi C, Kusakabe M, Suzuki T, Miyatake K, Nishida E. Nature Commun. 6, 6017 (2015))。

加えて我々は、アフリカツメガエルの MAPK ファミリー分子 ERK7 の機能を阻害すると、アクチン骨格依存的な基底小体 (繊毛の根元の構造体) の細胞頂端部への局在が阻害され、多繊毛細胞の繊毛の数や長さが著しく減少することをこれまで見出していた。そこで蛍光ビーズを用いて多繊毛細胞が駆動する液流の速さを測定したところ、ERK7 の機能阻害胚では液流の速さが激減しており、繊毛の本来の機能が果たされていないことがわかった。また、ゼブラフィッシュにおいて Wnt 経路の下流で繊毛形成を制御することが報告されていたアクチン制御分子 CapZIP に着目して解析を進め、ERK7 の機能阻害胚における多繊毛の形成阻害が、CapZIP のリン酸化模倣変異体である CapZIP 6E の過剰発現によって部分的にレスキューされることを見出した。したがって ERK7 が部分的には CapZIP のリン酸化を介して、繊毛形成を制御することが示唆された。

また、アフリカツメガエル胚において、繊毛細胞分化のマスター転写因子である Foxj1

の過剰発現によって ERK7 の発現が誘導され、Foxj1 のノックダウンによって ERK7 の発現が抑制されるが、Foxj1 の発現量は ERK7 の過剰発現やノックダウンによって殆ど影響を受けなかった。さらに、初代培養マウス気道上皮の多繊毛細胞分化の過程において、Foxj1 の下流で機能する既知の遺伝子と同様に、ERK7 の発現のピークが Foxj1 の発現のピークに遅れることもわかり、ERK7 は Foxj1 の下流で機能することが示唆された。加えて、多繊毛細胞以外の繊毛細胞として、アフリカツメガエル胚の左右軸を決定する原腸腔蓋板領域の繊毛細胞 (多繊毛細胞と異なり 1 本の運動性繊毛のみを有する) に着目し、ERK7 のノックダウンによって繊毛の極性および左右軸の決定に異常が生じることもわかった。

以上の結果、そして過去の我々の結果を統合することにより、Foxj1 によって誘導された ERK7 が、Wnt シグナルの下流因子 Dishevelled と協調して CapZIP をリン酸化することで繊毛形成を制御する、というモデルを提唱し (図 1)、論文として発表した (Miyatake K, Kusakabe M, Takahashi C, Nishida E. Nature Commun. 6, 6666 (2015))。

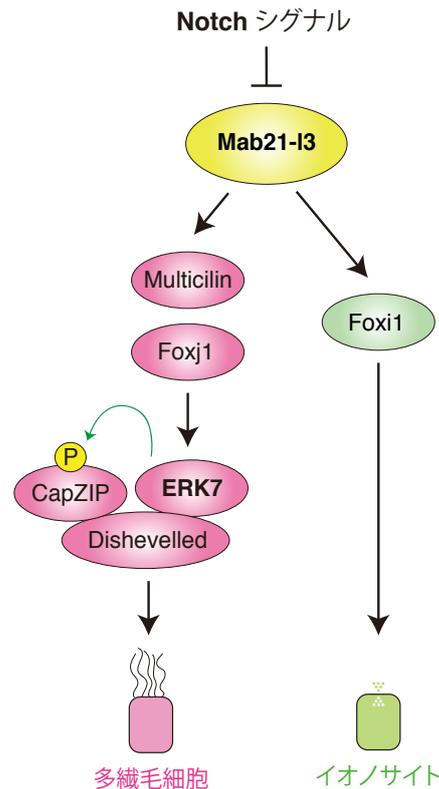


図 1 mab21-13 および ERK7 の作用機構

さらに、ERK7 による繊毛形成の分子機構を詳細に明らかにするため、酵母ツーハイブリッド法によって同定していた ERK7 結合候補分子およびその近縁分子の解析を行なった。ERK7 結合候補近縁分子のアフリカツメガエル初期胚における発現パターンをホールマ

ウント in situ hybridization によって調べたところ、表皮や体節等の様々な組織において発現が観察された。さらに、ERK7 結合候補近縁分子に対するモルフォリノオリゴをアフリカツメガエル初期胚にインジェクションすると、繊毛の形成が阻害されたことを示す表現型が得られた。このようなモルフォリノオリゴによるノックダウンによる表現型が特異的であることを示すために、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集の実験系の立ち上げを行なったが、ゲノム編集効率が低いため実験系を改善する必要があることがわかった。

さらに、ERK7 とは別の機能不明キナーゼ分子のモルフォリノオリゴをアフリカツメガエル初期胚にインジェクションすると、表皮形成不全が観察された。この表現型は mab21-13 のノックダウンによる表現型と類似しており、多繊毛細胞やイオノサイト分化への関与が期待された。しかしながら、この機能不明キナーゼ分子の発現パターンは多繊毛細胞やイオノサイト特異的ではなかった。そこでノックダウン胚の表現型を詳しく検討したところ、表皮全体の細胞接着に異常が見られることが判った。さらに、ノックダウンによって発現変動する遺伝子群をマイクロアレイにより同定し、これらの遺伝子群についてプロモーター解析を行なうことによって、キナーゼの下流で働くと予想される候補転写因子を同定し、アフリカツメガエル胚と哺乳類培養細胞の両方の系を用いて機能解析を進めた。

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、全て査読あり)

① Miyatake K, Kusakabe M, Takahashi C, Nishida E. ERK7 regulates ciliogenesis by phosphorylating the actin regulator CapZIP in cooperation with Dishevelled. *Nature Commun.* 6, 6666 (2015). DOI: 10.1038/ncomms7666

② Takahashi C, Kusakabe M, Suzuki T, Miyatake K, Nishida E. mab21-13 regulates cell fate specification of multiciliated cells and ionocytes. *Nature Commun.* 6, 6017 (2015). DOI: 10.1038/ncomms7017

[学会発表] (計 5 件)

① Morioh Kusakabe, Chika Takahashi, Eisuke Nishida
A Notch-repressed gene mab21-13 is a key

regulator for cell fate specification of multiciliated cells and ionocytes.
BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)
神戸ポートアイランド、神戸、日本
2015 年 12 月 1 日-4 日
ワークショップ「Emerging of molecular bases that regulate context-specific Notch signaling」
招待講演 (発表日: 2015 年 12 月 2 日)

② Chika Takahashi, Morioh Kusakabe, Toshiyasu Suzuki, Koichi Miyatake and Eisuke Nishida
Xenopus mab21-13 is required for cell fate specification of multiciliated cells and ionocytes.
15th International Xenopus Conference
Pacific Grove, California, USA
August 24-28, 2014
ポスター発表 (発表日: 2014 年 8 月 26 日)

③ Koichi Miyatake, Morioh Kusakabe, Chika Takahashi, Eisuke Nishida
ERK7, a novel regulator of ciliogenesis, is required for basal body migration
15th International Xenopus Conference
Pacific Grove, California, USA
August 24-28, 2014
ポスター発表 (発表日: 2014 年 8 月 26 日)

④ 宮竹功一、目下部杜央、高橋知佳、西田栄介
ERK7 は Dishevelled と協調して CapZIP をリン酸化することで繊毛形成を制御する
第 6 回シグナルネットワーク研究会
慶應義塾大学医学部・東京・日本
2014 年 5 月 9 日-10 日
口頭発表 (発表日: 2014 年 5 月 10 日)

⑤ 高橋知佳、目下部杜央、鈴木俊康、宮竹功一、西田栄介
mab21-13 はイオノサイトと多繊毛細胞の細胞運命決定に重要な制御因子である
第 6 回シグナルネットワーク研究会
慶應義塾大学医学部・東京・日本
2014 年 5 月 9 日-10 日
口頭発表 (発表日: 2014 年 5 月 9 日)

[その他]
ホームページ等
<http://www.signal.lif.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

目下部 杜央 (KUSAKABE, Morioh)
京都大学・大学院生命科学研究所・講師
研究者番号: 80378843