

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18390248
 研究課題名（和文）メダカ変異体の中腎性多発性嚢胞腎症における新規遺伝子 *pc/glis3* の役割
 研究課題名（英文）Roles of a novel gene *pc/glis3* on polycystic kidney disease of medaka mesonephroic model mutant
 研究代表者
 若松 佑子（Wakamatsu Yuko）
 名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授
 研究者番号：20026800

研究成果の概要：

多発性嚢胞腎症はヒトにおいて最も罹患率の高い遺伝病の一つである。本研究では多発性嚢胞腎症を発症するメダカ突然変異体を材料として研究を行った。分子遺伝学的解析の結果、この変異体の原因遺伝子は *glis3* であることが明らかとなった。*glis3* は脊椎動物に広く保存されているジンクフィンガー型転写因子をコードする遺伝子であった。本遺伝子を欠損するノックアウトマウスは、メダカ変異体と同様、嚢胞腎を発症することを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2007 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：遺伝子、発生・分化、内科、腎臓、膵臓、繊毛

1. 研究開始当初の背景

多発性嚢胞腎症は腎尿細管および集合管に多数の嚢胞を生じる遺伝病である。ヒト嚢胞腎症患者の 90% は *PKD1* もしくは *PKD2* の突然変異を持つことが知られる。これらの遺伝子の産物とともに腎尿細管上皮の繊毛に存在することが明らかとなっている。また、他の嚢胞腎症モデル動物の解析から、嚢胞腎症の原因となる遺伝子は繊毛の構造や機能に関与することが示されている。研究開始当初は、このような理由から、嚢胞腎症と繊毛異常の関係がクローズアップされ、新規な嚢胞

腎症遺伝子の単離が盛んに行われていた。我々は、メダカ突然変異体をヒト遺伝病のモデル生物として利用し、嚢胞腎症の原因機序の解明に取り組んできた。本研究に先立って、メダカ *pc* 変異体の原因遺伝子がジンクフィンガー型転写因子をコードする *glis3* 遺伝子領域内にあることを連鎖解析により示した。

2. 研究の目的

本研究では、メダカ多発性嚢胞腎症変異体 *pc* の原因遺伝子である *glis3* の嚢胞腎症の発症機序における役割を明らかにすることを目

的とした。また、*glis3* 遺伝子がメダカだけでなく、哺乳類においても嚢胞腎症の原因となるか否か調べるため、*Glis3* ノックアウトマウスを作製し、表現型を解析した。

3. 研究の方法

(1) *pc* 変異体の *glis3* 遺伝子領域の解析
変異体ゲノム DNA から fosmid ライブラリーを作製し、当該領域を含むクローンを単離した。このクローンの内部の塩基配列を決定した。

(2) 尿流の測定

蛍光色素をメダカ孵化仔魚の血管に顕微注入し、蛍光が腎系球体、尿細管および尿管を経て膀胱に達するまでの時間を測定した。

(3) 繊毛長の測定

抗アセチル化チューブリン抗体を用いて蛍光免疫染色したメダカ孵化仔魚の尿細管上皮の繊毛を共焦点レーザー顕微鏡で観察して、その長さを測定した。

(4) *Glis3* タンパク質の細胞内分布の解析

マウス尿細管上皮細胞株 Dai1 細胞に *Glis3*-GFP 融合タンパク質を発現させて、細胞内局在を蛍光観察した。

(5) *Glis3* ノックアウトマウスの作製

理化学研究所神戸 CDB との共同研究により、*Glis3* エキソン 5 をネオマイシン耐性遺伝子人置換したノックアウトマウスを作製した。

(6) マウスの組織学と臨床学的検査

ホモ接合体新生児の腎臓および膵臓を組織学的に調べた。グルコース負荷試験およびインスリン感受性試験を行った。

4. 研究成果

(1) *pc* 変異体の *glis3* 変異の同定

メダカ *glis3* 遺伝子のイントロン 4 に、10kb を超えるトランスポゾン様配列が挿入されていることを見いだした。*pc* 変異体で特異的に検出される異常な *glis3* mRNA はエキソン 5 より 3 側の配列を欠損していることが明らかとなった。これにより、*pc* 変異体では *Glis3* タンパク質にみられる 5 つのジンクフィンガーのうち 4 つが欠失することが予想された。

(2) *glis3* mRNA の発現様式

メダカ腎臓において *glis3* mRNA は尿細管および尿管の繊毛上皮細胞に特異的に発現していた (図 2A)。 *pc* 変異体においても同様に発現が見られたが、*glis3* mRNA の 3 領域の発現は検出できなかった (図 2B)。

また、膵臓において、インスリン発現細胞において発現がみとめられた (図 2C, D, E)。

(3) *glis3* アンチセンスノックダウン

アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたノックダウンによって *Glis3* 機能欠損個体の表現型を調査したところ、*pc* 変異体と同様に、孵化仔魚の腎尿細管に嚢胞を形成することが確かめられた。これにより、*pc* 変異体の原因遺伝子が *glis3* であることが証明された (図 2F, G)。

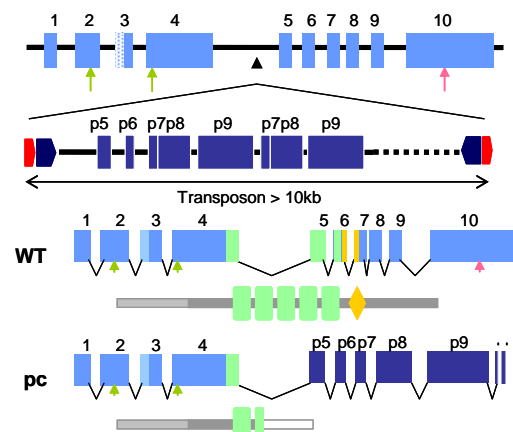


図 1 メダカ *glis3* 遺伝子

(4) *pc* 変異体における尿流の減弱と繊毛

魚類において尿細管内の尿流は、上皮に生えている運動性の繊毛により作られることが知られ、尿の滞留が嚢胞の形成を引き起こすと考えられている。そこで、メダカ *pc* 変異体における尿流を測定したところ、野生型に比べて顕著に減弱していた。この原因を明らかにするため、*pc* 変異体尿細管上皮の繊毛の運動性を調べた。*pc* 変異体と野生型の間に繊毛の運動に顕著な違いは認められなかった。そこで、両者の繊毛の長さを測定したところ、

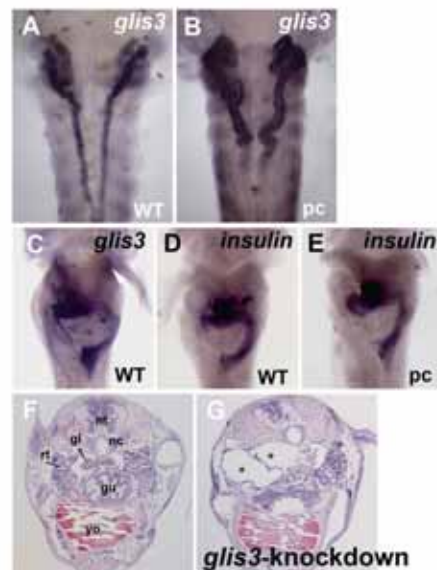


図 2 メダカ *glis3* の発現と機能欠損の表現型

変異体で有意に繊毛が短縮していた。このこ

とが尿流減弱の直接的な原因ではないかと考えている。

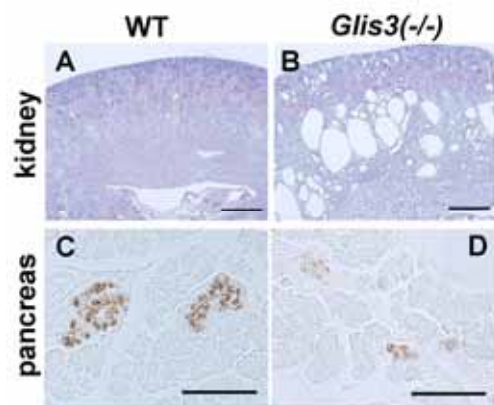
(5) Glis3 タンパク質の繊毛局在

Glis3 タンパク質の細胞内局在を調べた結果、Glis3 は繊毛および核に局在することが明らかとなった。このことは、Glis3 タンパク質が繊毛から核へのシグナル伝達的一端を担う可能性を示唆している。

(6) Glis3 ノックアウトマウスの表現型

ホモ接合体は生後9日以内に死亡した。腎臓には多数の嚢胞が認められ、同時に、高血糖も顕著だった。またホモ接合体はグルコース耐性がなく、インスリンの投与によって高血糖が緩和されたことから、Glis3 の欠損によってインスリン産生が異常になっていることが示唆された。免疫組織化学によって、Glis3 ホモ接合体においてはインスリン産生細胞が正常に発生しないことを見出した。

図3 Glis3 ノックアウトマウスの表現型



(7) 考察

繊毛が尿細管内の尿流を感知するという哺乳類での仮説が魚類でも正しいとすると、Glis3 は感知した情報を核に伝える役割を持つと想像できるが、Glis3 の機能欠損は情報伝達異常の結果として繊毛長の短縮につながることで、メダカ pc 変異体では繊毛運動によって作られる尿流の減弱化がおこったと考えている。

マウスにおいて Glis3 の変異が嚢胞腎症だけでなく、糖尿病を引き起こすことが明らかとなった。このことは、ヒト Glis3 が新生児性糖尿病の原因遺伝子であるという報告と一致した。一方、メダカ pc 変異体において、glis3 の発現は膵臓にも検出されたものの、インスリン産生細胞の形成に異常は認められなかった。魚類の栄養依存性は哺乳類のそれとは異なることから、進化的な成り立ちの違いによって、Glis3 変異のもたらす結果が異なるものと想像している。さらに、pc 変異体で糖尿病を発症しないことは、嚢胞腎症特異的なモデル生物として pc 変異体が有効な

研究材料として利用できることを意味している。

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 3 件)

Watanabe, N., Hiramatsu K., Miyamoto R., Yasuda K., Suzuki N., Oshima N., Kiyonari H., Shiba D., Nishio S., Mochizuki T., Yokoyama T., Maruyama S., Matsuo S., Wakamatsu Y., and Hashimoto, H. (2009) A murine model of neonatal diabetes mellitus in Glis3-deficient mice. *FEBS.*, in press. 査読有

Watanabe, N., Kato, M., Suzuki, N., Inoue, C., Fedorova, S., Hashimoto, H., Maruyama, S., Matsuo, S., and Wakamatsu, Y. (2009) Kidney regeneration through nephron neogenesis in medaka. *Dev. Growth Dif.*, 51: 135-143. 査読有

Fedorova, S., Miyamoto, R., Harada, T., Isogai, S., Hashimoto, H., Ozato, K., and Wakamatsu, Y. (2008) Renal glomerulogenesis in medaka fish, *Oryzias latipes*. *Dev. Dyn.*, 237: 2342-2352. 査読有

[学会発表](計 9 件)

橋本寿史、若松佑子：Glis3 欠損マウスおよびメダカと繊毛、第8回 PKD 研究会、2008年12月21日、東京

Hashimoto, H., Miyamoto, R., Watanabe, N., Ozato, K., Kubo, Y., Koga, A., Jindo, T., Narita, T., Naruse, K., Ohishi, K., Nogata, K., Shin-I, T., Asakawa, S., Shimizu, N., Miyamoto, T., Mochizuki, T., Hori, H., Takeda, H., Kohara, Y., and Wakamatsu, Y.: Polycystic kidney disease in medaka pc mutant is caused by a mutation in gli-similar3 (glis3) gene. The 4th Aquatic Animal Models of Human Disease Conference. 2008. Jan. 31. 2008, North Carolina, USA

橋本寿史、若松佑子：腎疾患モデルとしてのメダカ、サテライトワークショップ「多分野で活躍する小型魚類」、第41回日本発生物学会年会、2008年5月27日、徳島

橋本寿史、渡辺直樹、若松佑子：メダカおよびマウスにおける pc/GLIS3 突然変異の表現型、第7回 PKD 研究会、2007年9月8日、東京

Watanabe, N., Katou, M., Hashimoto, H., Ozato, K., and Wakamatsu, Y.: Kidney regeneration through nephron neogenesis in medaka, 第40回日本発生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会、2007年5

月 28 日、福岡

橋本寿史、宮本理恵子、渡辺直樹、久保優子、古賀章彦、神藤智子、成田貴則、成瀬清、大石加寿子、野方恵子、新井理、小原雄治、武田洋幸、堀寛、若松佑子：多発性嚢胞腎を発症するメダカ *pc* 変異体の原因遺伝子の同定、日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」コンファレンス&サイエンティフィック エキジビション、2006 年 12 月 8 日、名古屋
橋本寿史、若松佑子：メダカ多発性嚢胞腎変異体原因遺伝子 *pc* の機能解析、第 6 回 PKD 研究会、2006 年 9 月 2 日、小樽
宮本兼玄、橋本整司、望月俊雄、小池隆夫、橋本寿史、尾里建二郎、若松佑子：多発性嚢胞腎メダカの開発、第 6 回 PKD 研究会、2006 年 9 月 2 日、小樽
渡辺直樹、宮本理恵子、古賀章彦、尾里建二郎、若松佑子、橋本寿史：メダカ多発性嚢胞腎原因遺伝子 *pc* の変異領域の同定とアンチセンスオリゴによるノックダウン、日本発生物学会第 39 回大会、2006 年 6 月 1 日、広島

研究者番号：70190410

橋本 寿史 (Hashimoto Hisashi)
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター
- 助教

研究者番号：30359757

[産業財産権]

出願状況 (計 2 件)

名称：多発性嚢胞腎モデル小型魚類及びその利用

発明者：橋本寿史、若松佑子、望月俊雄、宮本兼玄

権利者：国立大学法人名古屋大学

種類：特許権

出願番号：特願 2007-198207

出願日：2007 年 7 月 30 日

国内外の別：国内

名称：多発性嚢胞腎疾患関連遺伝子及びその利用

発明者：若松佑子、橋本寿史

権利者：国立大学法人名古屋大学

種類：特許権

出願番号：PCT/JP2006/310862

出願日：2006 年 5 月 31 日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若松 佑子 (Wakamatsu Yuko)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター

- 教授

研究者番号：20026800

(2) 研究分担者

松尾 清一 (Matsuo Seiichi)

名古屋大学・大学院医学研究科・教授