

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 5 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590358

研究課題名（和文） 繊毛病に関する繊毛打制御の分子機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the function of ciliopathy-related genes in the regulation of ciliary movement

研究代表者

堀 学 (HORI MANABU)

山口大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：00253138

研究成果の概要（和文）： ヒト繊毛病関連遺伝子をゾウリムシでノックダウンし、繊毛の運動や機能における影響を解析した。21種の遺伝子の影響を解析した結果、外腕ダイニンや軸糸中心装置を構成するタンパク質のノックダウンは、構造の欠損を引き起こし、著しい繊毛打頻度の低下や繊毛打波形に異常をまねくことがわかった。一方、シャルコー・マリー・トゥース病やネフロン癆などの原因遺伝子は、繊毛運動に直接影響を与えるのではなく、細胞機能に影響を及ぼすことが分かった。

研究成果の概要（英文）： In paramecia, we analyzed ciliary motility and sensory functions of cilia, which are gene-silenced orthologous genes related to human ciliopathy by RNAi. The knockdown of the gene encoding the axonemal proteins causes structural defects and unstable ciliary movement. Alternatively, the knockdown of the gene which does not encode the axonemal protein affects cellular function, but not ciliary movement.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：繊毛病、繊毛運動

1. 研究開始当初の背景

繊毛病の原因遺伝子は、徐々に特定されつつあるが、その遺伝子産物の機能欠損が繊毛にどのような影響を与えるのかということは、ほとんど解析されていない。そのため、多細胞生物に比べて、比較的容易に、かつ、繊毛の機能異常や繊毛打制御の分子機構を

詳しく解析できる優れた生物モデルが必要となる。

ゾウリムシは、古くから繊毛研究の材料として使われており、電気生理学をはじめとした繊毛・鞭毛研究の基礎となる多くの技術や知見が得られている。また、ゲノムデータベース、繊毛タンパク質データベースも構築されているため、RNAiにより繊毛タンパク質遺

伝子をノックダウンし、繊毛運動を解析することは容易である。そのため、ゾウリムシをモデルとして、ヒト繊毛病のオルソログ遺伝子をノックダウンし、繊毛運動に与える影響を解析することを計画した。

2. 研究の目的

繊毛病の研究は、原因（遺伝子）を特定することが重要であるが、その原因が繊毛にどのような影響を与えるのかということ解析することは、治療法の開発にとって不可欠である。そのため、ヒト繊毛病のオルソログ遺伝子をゾウリムシでノックダウンし、繊毛運動や繊毛機能へ与える影響を解析し、繊毛病治療の基礎となる知見を収集することを目的として行った。

3. 研究の方法

ヒトの繊毛病候補遺伝子と相同性を示すタンパク質をゾウリムシ繊毛プロテオームデータベースより検索し、ゾウリムシのオルソログ遺伝子を RNAi でノックダウンし、以下のような手法を用いて繊毛に与える影響について解析した。

解析の手法

- (1) 細胞表層シートや高速撮影装置による繊毛運動の3次元解析
- (2) 繊毛打制御に及ぼす生体膜の影響を電気生理学的に解析
- (3) 繊毛の電子顕微鏡による微細構造の解析

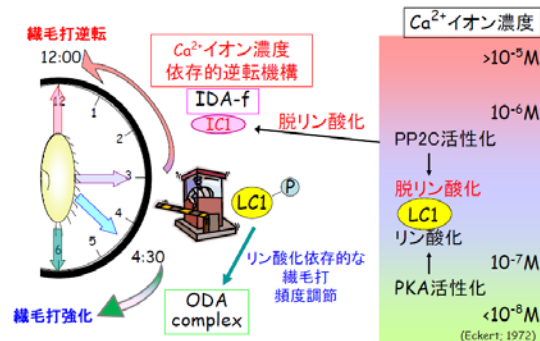
4. 研究成果

繊毛運動の異常が原因と考えられる繊毛病候補遺伝子 21 種の解析を行い、それらの遺伝子産物がどのように繊毛運動の制御に関与しているかを解析した。

(1) カルタゲナー症候群原因遺伝子 DNAH5, DNAH11, DNAI1 オルソログ遺伝子のサイレンシングは、いずれも外腕ダイニン複合体の欠如を引き起こすため、繊毛打頻度が低下するだけでなく、繊毛波形も消失し、効果的な水流を形成できなくなることがわかった。しかし、内腕ダイニン f サブユニットの欠損では繊毛運動の著しい低下は見られないことから、外腕ダイニンが繊毛運動を引き起こす主たるモーターの役割を果たしているため、疾病を引き起こす原因となるのではないかと考えられる。

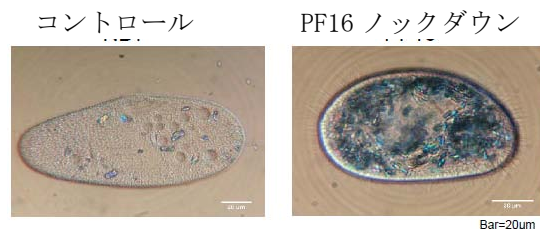
また、ゾウリムシでは、外腕ダイニン複合体の欠損が、繊毛運動の異常だけではなく、

脱分極刺激に対する反応に異常を引き起こすことがわかった。更なる解析の結果、ゾウリムシ外腕ダイニン軽鎖 LC1 は、脱分極反応を抑制する機能をもつため、外腕ダイニン複合体の欠損は、過剰な脱分極反応を示すようになる事がわかった (Kutomi et al., 2012)。



(2) 水頭症原因遺伝子 PF16 のサイレンシングは、中心装置の形成不良が起こり、繊毛運動の低下だけでなく、カルシウム性結晶の沈着が起こり致死となる事がわかった。

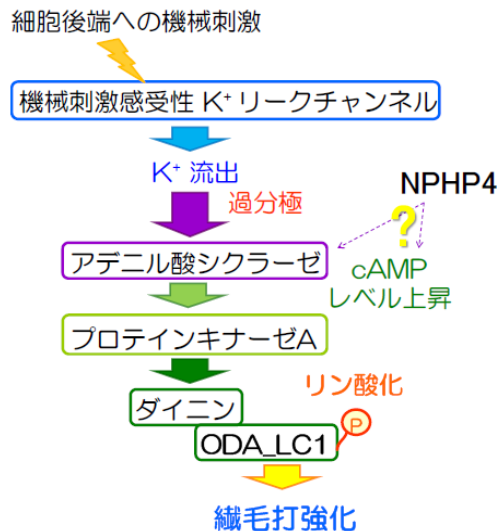
カルシウム性結晶の沈着は、サイレンシング後 48 時間で細胞後端から起こり始め、やがて細胞全体に沈着するため、致死に至るのではないかと考えられる。何故そのような結晶が沈着するのかは、解明できていないが、PF16 の欠損は、繊毛運動の不全だけでなく細胞が致死するため、疾病を引き起こす原因となると考えられる。



(3) シャルコー・マリー・トゥース病の原因遺伝子 Rab7 のサイレンシングは、サイレンシング後 24 時間以内に繊毛運動の異常による痙攣のような行動を示し、速やかに死滅する事がわかった。サイレンシング効果が現れてから、死滅するまでの時間が余りにも短すぎるため、繊毛運動に与える影響を詳細に解析できていないが、膜電位の異常が起こっている可能性が示唆された。

(4) ネフロンろう候補遺伝子 NPHP4 のサイレンシングは、細胞の機械刺激感受性が高くなり、過分極を起こしやすくなることがわかった。電気生理学的解析の結果、NPHP4 をサイレンシングした細胞では、膜の興奮が起こりやす

くなっているのではなく、細胞内 cAMP 濃度が上昇しやすくなっているのか、cAMP の分解が起こりにくくなっているということがわかった。ヒト腎臓において、機械刺激に対して高感受的になると、張力によって制御される細胞分裂方向に異常が生じ、嚢胞化がすすむのではないかと考えられる。(投稿準備中)



(5) OFD1, Rib72, 14-3-3 protein をはじめとする繊毛病原因遺伝子や、繊毛打制御に関与する酵素の遺伝子については、ノックダウンによって顕著な表現形質の変化を観察することができなかつた。これらの遺伝子の RNAi サイレンシングでは、分解されない ohnologue 遺伝子の mRNA がわずかに存在するため機能的なタンパク質がわずかに発現したため、機能の欠損が現れなかつたのではないかと考えられる。

今後は、電気生理を中心とした生理学的解析、及び、GFP 発現系による繊毛内局在性を明らかにしていくとともに、データの公開を促進する予定である。

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 4 件)

①Kutomi O, Hori M, Ishida M, Tominaga T, Kamachi H, Koll F, Cohen J, Yamada N, Noguchi M. Outer dynein arm light chain 1 is essential for controlling the ciliary response to cAMP in *Paramecium tetraurelia*. *Eukaryot Cell*. 査読有, vol. 11, 2012, pp. 645-653.

②Kutomi O, Takemura M, Kamachi H, Noguchi M. Estimation of effective concentrations of ATP-regenerating enzymes in cilia of *Paramecium caudatum*. *J Eukaryot Microbiol*, 査読有, vol. 59, 2012, pp. 49-53.

③Laligné C, Klotz C, de Loubresse NG, Lemullois M, Hori M, Laurent FX, Papon JF, Louis B, Cohen J, Koll F. Bug22p, a Conserved Centrosomal/Ciliary Protein Also Present in Higher Plants, Is Required for an Effective Ciliary Stroke in *Paramecium*. *Eukaryot Cell*, 査読有, vol. 9, 2010, pp. 645-655.

④Ishida M, Aihara MS, Allen RD, Fok AK. The native structure of cytoplasmic dynein at work translocating vesicles in *Paramecium*. *Eur J Cell Biol*, 査読有, vol. 90, 2010, pp. 81-92.

[学会発表] (計 15 件)

①太田 恵実・西田 隆佑・堀 学 ゾウリムシ nephrocystin-4 は過分極反応を調節している. 第 44 回日本原生動物学会, 2011 年 11 月 12 日~13 日, 奈良女子大学, 奈良市.

②久富 理・堀 学・野口 宗憲「ヒメゾウリムシ外腕ダイニン軽鎖 1 は cAMP による繊毛運動変化の制御機構に必須である」第 44 回日本原生動物学会, 2011 年 11 月 12 日~13 日, 奈良女子大学, 奈良市.

③池淵 馨・堀 学 軸糸ダイニン調節複合体 (DRC) の機能に関する研究. 第 44 回日本原生動物学会, 2011 年 11 月 12 日~13 日, 奈良女子大学, 奈良市.

④久富 理, 堀 学, 野口 宗憲 ヒメゾウリムシ繊毛運動の制御機構における外腕ダイニンの機能 第 6 回鞭毛・ダイニン機能研究会, 2011 年 10 月 1 日, 東京大学, 東京都.

⑤久富 理・堀 学・野口 宗憲 ヒメゾウリムシ繊毛タンパク質に及ぼす外腕ダイニン軽鎖サイレンシングの影響 第 82 回日本動物学会, 2011 年 9 月 21 日~23 日, 旭川市大雪クリスタルホール, 旭川市.

⑥Kutomi O, Hori M, and Noguchi M. The role of the outer dynein arm light chain 1 in regulation of the ciliary movements in *Paramecium tetraurelia*. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. 2011 年 5 月 31 日~6 月 5 日 名古屋国際会議場, 名古屋, 日本.

⑦久富 理・堀 学・井上 桂那子・野口 宗憲「ヒメゾウリムシ繊毛の波形の調節における外腕・内腕ダイニンの役割」第 43 回日本原生動物学会, 2010 年 11 月 6 日~7 日, 茨城大学, 水戸市.

⑧井上 桂那子, 堀 学 ゾウリムシの繊毛

打逆転機構に関する研究 第 43 回日本原生動物学会大会, 2010 年 11 月 6 日~7 日, 茨城大学, 水戸市.

⑨久富 理・堀 学・Cohen J.・Koll F.・野口 宗憲「外腕ダイニンはヒメゾウリムシの繊毛打頻度上昇に必要である」第 81 回日本動物学会, 2010 年 9 月 23 日~25 日, 東京大学, 東京都.

⑩Kutomi O, Hori M, Inoue K, Cohen J, Koll F, Noguchi M. Changes in the ciliary movements induced by some dynein gene silencing in *Paramecium*.

11th International Symposium on Spermatology, 2010 年 6 月 24 日~29 日, 沖縄コンベンションセンター, 宜野湾市.

⑪Hori M, Ishida M, Tominaga T, Cohen J, Koll F. Functional analysis of axonemal outer dynein in *Paramecium*. International Workshop Dynein2009, 2009 年 11 月 1 日~11 月 5 日, オルビスホール, 神戸市.

⑫Inoue K, Hori M, Ishida M, Tominaga T, Cohen J, Koll F. Functional analysis of axonemal inner dynein in *Paramecium*. International Workshop Dynein 2009, 2009 年 11 月 1 日~11 月 5 日, オルビスホール, 神戸市.

⑬Kutomi O, Hori M, Inoue K, Noguchi M. The effects of some dynein subunit gene silencing in the ciliary movements of *Paramecium*. International Workshop Dynein 2009, 2009 年 11 月 1 日~11 月 5 日, オルビスホール, 神戸市.

⑭久富 理・堀 学・井上 桂那子・野口 宗憲「ヒメゾウリムシの繊毛運動における軸糸ダイニン軽鎖・中間鎖の機能的研究」第 42 回日本原生動物学会, 2009 年 10 月 30 日~11 月 1 日, 石巻専修大学, 石巻市.

⑮久富 理・堀 学・野口 宗憲「ヒメゾウリムシ細胞表層シートを用いた繊毛運動の解析」第 80 回日本動物学会, 2009 年 9 月 17 日~19 日, 静岡グランシップ, 静岡市.

石田 正樹 (ISHIDA MASAKI)
奈良教育大学・教育学部・教授
研究者番号: 60293768

内藤 豊 (NAITOH YUTAKA)
徳島文理大学・薬学部・客員教授
研究者番号: 40091912

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 学 (HORI MANABU)
山口大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 00253138

(2) 研究分担者

野口 宗憲 (NOGUCHI MUNENORI)
富山大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 30019004

富永 貴志 (TOMINAGA TAKASHI)
徳島文理大学・薬学部・准教授
研究者番号: 20344046