

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 年度～ 2010 年度

課題番号：21890221

研究課題名（和文）ゼブラフィッシュを用いた Inv 細胞内局在機能の解明

研究課題名（英文）Ciliary localization of Inv regulates in vivo function

研究代表者

福井 一 (FUKUI HAJIME)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80551506

研究成果の概要（和文）：

ゼブラフィッシュを用いて繊毛分子である Inv の細胞内局在と生体での機能の関連について検討した。Inv はカルモジュリン結合領域である IQ ドメインを 2 つ有するため、この機能について検討した。その結果、IQ ドメインを欠失する Inv は繊毛に局在せず、Inv 異常により引き起こされる嚢胞腎や左右異常を改善できなかった。以上から、Inv はカルモジュリン依存的な細胞内局在制御がなされ、これが生体内での機能に必要であることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed about the linkage between Inv function and cellular localization by using zebrafish. Inv has two calmodulin binding motifs (IQ domains), and we assessed about function of IQ domains. As a result, we found IQ domain deleted Inv could not localize to the cilium, and could not rescue the inv mutated phenotypes, including kidney cyst and left-right defect. In conclusion, cellular-ciliary localization of Inv was regulated by calmodulin binding, and it indicates that calmodulin dependent Inv localization requires in vivo functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：細胞生物学・発生生物学

科研費の分科・細目：医歯薬学・解剖学一般（含組織学・発生学）

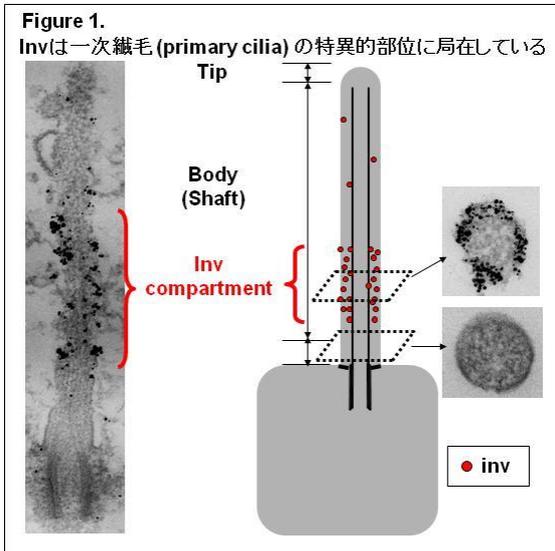
キーワード：ゼブラフィッシュ・繊毛

1. 研究開始当初の背景

(1) 一次繊毛 (primary cilia) は、細胞膜より頂端側に突出した構造をもつオルガネラであり、多くの細胞は一次繊毛を有する。近年、繊毛に存在する分子群が同定され、その分子群の異常により内臓逆位、多発性嚢胞

腎、多指症などに陥ることが明らかとなってきた。これらの中でも多発性嚢胞腎疾患は 500 人に一人の割合で発症する遺伝子疾患であるが、分子機序は明らかになっていない。Inv はヒト 2 型若年性ネフロン癆 (NPHP2) の原因遺伝子である (Yokoyama T *et al*, Science, 1993)。これまでに我々は Inv が繊毛

基部 (Inv compartment) に局在することを明らかにしてきた (Figure 1. Shiba D *et al.* J Cell Sci, 2009)。また *inv* 遺伝子中に繊毛内局在を制御する領域を見出した (Figure 3) が、*Inv* の生体内での作用機構は不明であった。



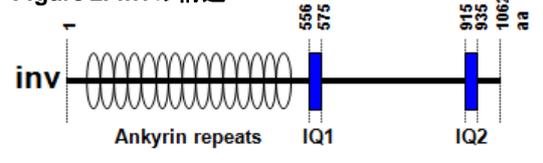
(2) ゼブラフィッシュは母体外で発生がおこり、初期発生過程をリアルタイムで観察可能である。また、多くの分子生物学的・細胞生物学的手法が確立しているため、生体レベルでの解析が容易なモデル動物である。ゼブラフィッシュにおいて *Inv* 発現を抑制すると、嚢胞腎を引き起こすことが報告されており (Otto EA *et al.*, Nat Genet, 2003)、ヒト腎疾患モデルとしての有用性が示されている。そこで、ゼブラフィッシュをモデル動物として用い、*Inv* 一次繊毛・細胞内の局在の視点から、一次繊毛が有する生理的機能の解析を行うことが可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*in vitro* レベルで見出された *Inv* 繊毛内特異的局在についての知見を生体レベルに応用し、細胞内での *Inv* 局在と生理的機能との関連性を解明することである。

Inv は他の分子と相互作用できると考えられるアンキリンリピート配列やカルモジュリン結合配列 (IQ ドメイン) などを有し、これらは種間でよく保存されている (Figure 2)。カルモジュリンは種々の生理機能に重要な役割を持つことから、本研究では特に IQ ドメインに着目し、*Inv* の機能を検討した。

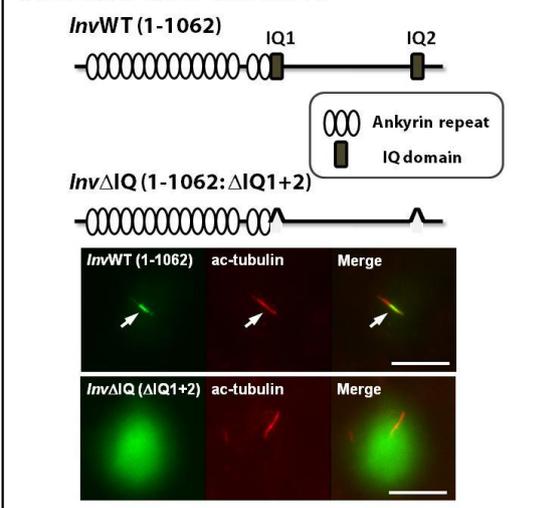
Figure 2. *inv* の構造



3. 研究の方法

マウス *inv* 遺伝子はヒト 2 型若年性ネフロン癆 (NPHP2) の原因遺伝子であり、嚢胞腎を引き起こす (Phillips CL *et al.*, JASN, 2004)。ゼブラフィッシュに対し、*inv* 発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド-モルフォリノ (MO) を初期胚へ注入すると嚢胞腎が引き起こされる。このことから、*Inv* による腎機能の制御はゼブラフィッシュでも保存されていると考えられる。また、*Inv* は 2 つの IQ ドメインをもつことから、この領域が *Inv* 機能に関与する可能性を考え、IQ ドメインを欠失した変異体を作製したところ、マウス腎臓由来上皮細胞株を用いた検討から、この変異体では *Inv* の局在が繊毛に移行しないことを見出した (Figure 3)。

Figure 3. IQ ドメインを欠失する *Inv* は繊毛内に局在しない (矢印は繊毛に局在する *Inv* を示す)



これらのデータをふまえ、以下の研究方法を定めた。

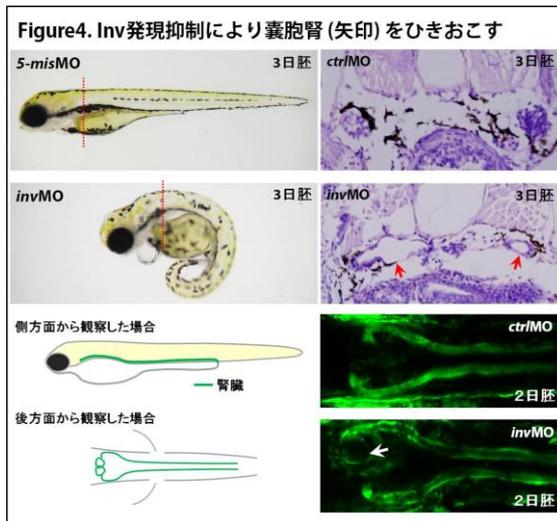
(1) ゼブラフィッシュにおける腎異常表現型の明確な評価基準

(2) 細胞内局在の異なる *Inv* による生体レベルでの機能解析

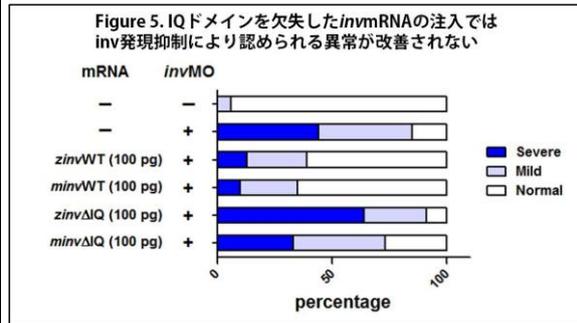
(3) 蛍光分子を繋いだ *Inv* の生体での細胞内局在の検討

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュにおいて、*inv* 発現の抑制により、体軸の屈曲・腎臓の嚢胞化・左右軸の異常などが認められた (Figure 4 上左部)。しかし、外表面からの観察では本研究対象である腎臓形態の検討は困難であり、切片作製によってのみ腎臓形態の詳細観察が可能であった。切片による観察は個体を固定するため一時点での観察にとどまり、さらに多くの手間を要するために個体観察で得られる有益な情報を失ってしまう。そこでより効率的に検討できる代替手法を考え、我々は改変型 Tol2 トランスポゾンを用いてゼブラフィッシュ腎臓で蛍光発現するトランスジェニックラインを作製した (Figure 4 下部)。このトランスジェニックラインを用いた検討により、*inv* 発現を抑制した際におこる腎嚢胞化をリアルタイムかつ明確に観察可能となった。腎臓の形態異常は繊毛機能と強く関連することが知られており、腎異常表現型の有無を簡便かつ大量に観察できるこのラインを用いて、繊毛機能評価への応用が可能であると考えられた。



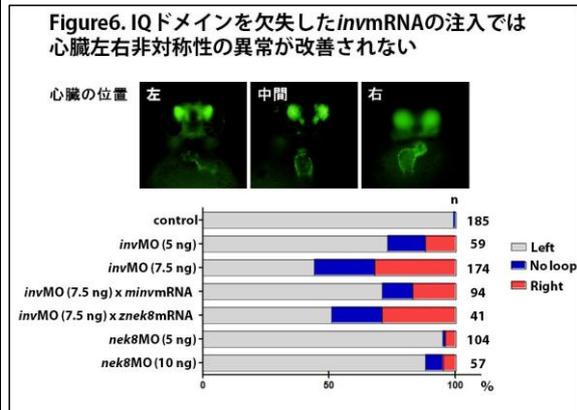
(2) マウス腎臓由来の上皮細胞株を用いた検討から、IQドメインを欠失した *Inv* 変異体では *Inv* の局在が繊毛に移行しないことを見出した (Figure 3) ので、この異常について個体レベルでの検討を行った。前述のように、*Inv* 発現を抑制した個体では腎嚢胞化が観察されたが、野生型 *inv*mRNA を初期胚へ注入するとこの異常は改善された。次に、IQドメインを欠失した *inv*mRNA を注入すると、*inv* 発現抑制でみられる異常は改善されなかった (Figure 5)。



また、*Inv* はカルモジュリンと結合できるが、IQドメインを欠失した *Inv* 変異体はカルモジュリンと結合できなかった。

なお、ゼブラフィッシュ野生型では2日胚の段階で心臓が左側に位置し左右非対称性を示すが、*inv* 発現抑制個体では心臓が右側に位置する逆位置の個体が有意に多く観察された。しかも、IQドメインを欠失した *Inv* 変異体ではこの異常は改善されなかった (Figure 6)。

以上から、カルモジュリン-IQドメイン依存性の *Inv* 繊毛局在が腎臓形態形成に必要であるのみならず、心臓の左右位置決定も制御することが示唆された。



(3) 蛍光分子を繋いだ *Inv* により、マウス腎臓由来の上皮細胞株における *Inv* 局在が検討できるが、ゼブラフィッシュ個体内での局在は不明である。そこで、蛍光分子を繋いだ *Inv* の mRNA を作製し、初期胚へ注入することで、細胞内の局在を検討できると考えた。しかしその結果、蛍光発現は観察できず、局在は不明であった。我々は、注入された *Inv* の量が少ないか、細胞内で速やかな分解をうけている可能性を考え、注入量を増やして検討した。しかし、mRNA は個体全体で強制発現してしまうために非特異的な影響による個体の形態異常が観察され、蛍光発現が観察できなかった。

現在、我々は腎臓や側腺といった繊毛が多く分布する器官で特異的発現するプロモーターを用いて、そのプロモーター下流に蛍光分子を繋いだ *Inv* が発現される方法によって、*Inv* の個体内局在を解明しようとしている。この手法により *Inv* 発現量を増大できるだけでなく、mRNA 注入でみられるような非特異的な影響が起こりにくくなり、詳細に検討できると考えている。

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 2 件)

1) Fukui Hajime, Hanaoka Ryuki, Kawahara Atsuo
Non-canonical activity of seryl-tRNA synthetase is involved in vascular development.
Circulation Research 104;1253-9,2009. 査読有

2) Mitsui Seika, Torii Kan, Fukui Hajime, Tsujimura Kunio, Maeda Akira, Nose Mitsuhiko, Nagatsu Akito, Mizukami Hajime, Morita Akimichi
The herbal medicine compound farcarindiol from *Notopterygii Rhizoma* suppresses dendritic cell maturation.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 333 954-60,2010. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1) 福井 一、花岡 龍毅、川原 敦雄、望月 直樹 *ゼブラフィッシュ Seryl-tRNA synthetase (SARS) は血管新生を制御する機能をもつ*
第 61 回日本細胞生物学会大会 2009 年 6 月 3 日 名古屋国際会議場

2) Hajime Fukui, Dai Shiba, Takahiko Yokoyama
Ciliary localization is required for in vivo function of *Inv*
第 115 回解剖学会全国学術集会 2010 年 3 月 (岩手)

3) Ryouzuke Ikeda, Hajime Fukui, Dai Shiba, Takahiko Yokoyama
Functional analysis of ciliary protein *Nek8* in zebrafish
第 116 回 解剖学会全国学術集会 2011 年 3 月 (抄録開催) *The Journal of Physiological Sciences* 61(suppl): s104(2011)

4) Hajime Fukui, Dai Shiba, Takahiko Yokoyama
Ciliary localization of *Inv* is essential for in vivo function and is regulated by its IQ domain
第 116 回 解剖学会全国学術集会 2011 年 3 月 (抄録開催) *The Journal of Physiological Sciences* 61(suppl): s274 (2011)

5) Takahiko Yokoyama, Noriyuki Sugiyama, Dai Shiba, Hajime Fukui, Kana Nakata
Renal cystic diseases as a ciliopathy
第 116 回 解剖学会全国学術集会 2011 年 3 月 (抄録開催) *The Journal of Physiological Sciences* 61(suppl): s78(2011)

[その他]

繊毛研究会の企画・立案：
繊毛研究の分野が世界的に広がりを見せていることをふまえ、国内における繊毛研究者の研究交流・議論の場をつくることを目的とし、繊毛研究会を発足した。
第 1 回は基礎生物学研究所（岡崎）にて開催し、第 2 回は第 63 回細胞生物学会（北海道）にてサテライトシンポジウムの形式で開催する。

ホームページ：
http://www.geocities.jp/cilia_club/index.html

当研究室ホームページによる情報発信：
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anat2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 一 (FUKUI HAJIME)

京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：80551506