

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770183

研究課題名(和文) 繊毛の構造的・機能的多様性に関する研究

研究課題名(英文) Structural and functional diversities of mammalian cilia

研究代表者

成田 啓之(NARITA, Keishi)

山梨大学・医学工学総合研究部・講師

研究者番号：50452131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：1) 人体を構成するほとんどの細胞は繊毛を持つが、細胞1つ当たりの繊毛数を調節する分子機構を明らかにするため、トランスクリプトーム解析をもとに関連遺伝子を検索し、そこからshRNAを用いたノックダウン実験により興味深い新規遺伝子を1つ同定した。そしてこの遺伝子のノックアウトマウスを作出するためのCRISPR/Cas9プラスミドを構築した。2) あらゆる細胞・組織において繊毛の挙動をライブイメージング解析するためのツールを構築した。3) 脈絡叢上皮細胞の繊毛に見られる一過性の運動機能獲得現象を詳細に観察した。4) 脈絡叢上皮細胞におけるカチオンチャンネルTRPV4の繊毛局在性を検討し機能解析をおこなった。

研究成果の概要(英文)：1) We have investigated the molecular mechanism of ciliary number regulation in mammalian cells. Based on transcriptome analysis and the following knockdown experiments, we identified one novel gene of interest. We have constructed CRISPR/Cas9 plasmid to generate knockout mouse of this gene. 2) To monitor the cellular event of multiciliogenesis, we have generated lentiviral constructs to label the ciliary shaft and the basal body by fluorescent proteins. 3) We have investigated the unique functional transition of cilia in choroid plexus epithelial cells (CPECs) from the prenatal period. 4) We have analyzed the ciliary localization and functional significance of TRPV4 in CPECs.

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 多様性 TRPV4 イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 繊毛の多様性: 繊毛は細胞表面から突出する径 0.3 μm 、長さ 2-20 μm の細胞小器官で、微小管からなる基底小体および軸糸という骨格構造を持つ。繊毛はその構造的・機能的差異に基づき、9+2 型の軸糸を持ちプロペラとして機能する運動繊毛と 9+0 型の軸糸を持ちアンテナとして機能する一次繊毛に大別されている。運動繊毛は気道上皮細胞や精子に見られ、上皮系細胞では細胞あたり数百本も見られる。一方、一次繊毛は人体を構成するほぼ全ての細胞に存在しており、各細胞に 1 本である。

(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が、近年、気道上皮の典型的な運動繊毛が感覚機能を併せ持つことが見出され、既存概念に新たな一石が投げられている。実は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り、その詳細はよく知られた幾つかの限られた系を除き、解析が進んでいないのが実情である。また様々な繊毛の特徴を規定する分子機構にも未解明な部分が多く、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。

(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。脳室表面を広く覆う上皮細胞 (EPD) は運動繊毛を有しており、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) 形成されるという、極めて例外的な発現様式をとっている。研究代表者はこれまで、CPEC の一次繊毛が神経ペプチドを受容し、CSF 産生調節に関与していることを報告し、またこの繊毛のプロテオミクス解析とその後の機能解析によって、生後の発達に伴う運動繊毛から感覚繊毛への機能的遷移という新規な現象を見いだしている。また研究代表者は最近、運動繊毛を数百本持つ上皮細胞、一次繊毛を数十本持つ CPEC、運動繊毛を 1 本持つ精子、の 3 種類の細胞についてトランスクリプトームの比較解析を行った。その結果、繊毛数に比例して発現レベルが上昇している遺伝子群を同定し、また脳室系上皮細胞が嗅覚受容体を含む幾つかの受容体の特異的に発現していることを見いだしている。嗅覚受容体は一般に嗅細胞の繊毛上に局在しており、上皮細胞および CPEC においても同様に繊毛に局在している可能性は強い。これらの知見は繊毛数を規定する分子機構の解明へとつながる基盤であり、また脳室での嗅覚受容体を介した感覚機能という脳における繊毛の新機能を示唆している。

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) 繊毛数調節分子機構の解析

(2) 脳室系上皮細胞における繊毛局在性受容体の機能解析

3. 研究の方法

(1) DNA マイクロアレイ解析: 細胞 1 つあたりの繊毛数が相異なる上皮細胞 (百本以上)、脈絡叢上皮細胞 (数十本)、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。

(2) レンチウイルス実験: 標的遺伝子に対する shRNA を発現するレンチウイルスベクターは Thermo Fisher Scientific 社より購入した。組換えタンパク質を強制発現させるレンチウイルスベクターは理化学研究所・バイオリソースセンターの三好浩之サブチームリーダーより頂いた。これらウイルスベクターを一般的な方法に従いパッケージングし、得られたウイルス粒子を濃縮したのち培地に添加して上皮細胞などの培養細胞に感染させた。shRNA 発現ウイルスおよび cDNA 強制発現ウイルスに感染した細胞はそれぞれ puromycin、blasticidin を含む培地で選択したのち、各種の解析に用いた。

(3) リアルタイム PCR・ウェスタンブロット・免疫染色: これらの実験は一般的な方法に従って行った。

(4) 繊毛の動態解析および繊毛運動による細胞外液の動態解析: 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、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。細胞外液の動態解析は、径 1 μm の蛍光マイクロビーズを上皮細胞の培地に添加し、その動きを蛍光顕微鏡で連続撮影した。得られたデータは北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科の平塚祐一教授らによって作製、公開されているプログラムを用いて解析した。

(5) ゲノム編集コンストラクトの作製: 遺伝子改変動物作製のための CRISPR/Cas9 発現プラスミドは Addgene 社より購入した。また作製したコンストラクトは大阪大学・微生物病研究所・附属遺伝情報実験センターの伊川正人教授より分与頂いた系を用いてそのゲノム編集効率を評価した。

(6) 電子顕微鏡解析：透過型電子顕微鏡 (TEM) および走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた超微細構造の解析は一般的な方法に従って行った。

4. 研究成果

(1) 繊毛数調節因子の探索：我々はまず、運動繊毛を百本以上持つ上衣細胞 (EPD)、不動繊毛を 20 本程度持つ脈絡叢上皮細胞 (CPECs)、そして運動繊毛 (鞭毛) を 1 本持つ精子 (sperm)、の 3 種類の細胞についてトランスクリプトームの比較解析を行った (図 1)。そして繊毛数に比例して発現レベルが上昇している 312 の遺伝子群を同定した。

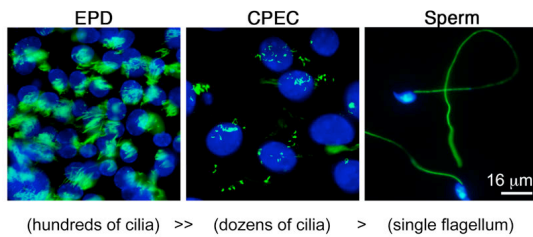


図 1. トランスクリプトーム解析による繊毛数調節遺伝子の探索

次にこの遺伝子群から文献情報などをもとに数種類を選抜し、それらの発現を抑制する shRNA レンチウイルスを作製し上衣細胞に感染させた。その結果、機能未知の新規遺伝子 Rik が繊毛数の調節もしくは繊毛形成に関与している可能性を見出した (図 2)。ノックダウンの効率はリアルタイム PCR で確認した。

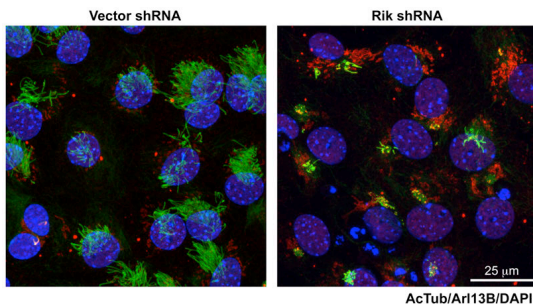


図 2. Rik は上衣細胞の繊毛形成に関与する

Rik shRNA によって繊毛の形成または数が低下した上衣細胞では、繊毛運動による細胞外液の流れが低下していた (図 3)。

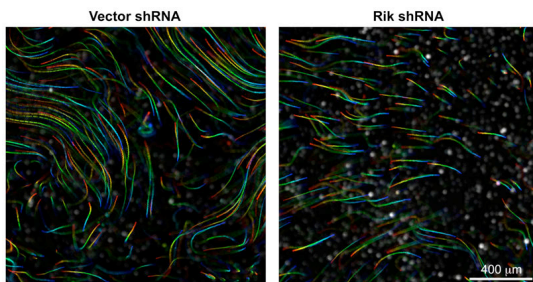


図 3. Rik の発現抑制により上衣細胞の繊毛運動によって生じる細胞外液の流れが低下する

また FLAG タグを付加した Rik タンパク質を上衣細胞に強制発現させてその細胞内局在を免疫染色で検討したところ、細胞質および繊毛内部に広く分布していることを見出した (図 4)。

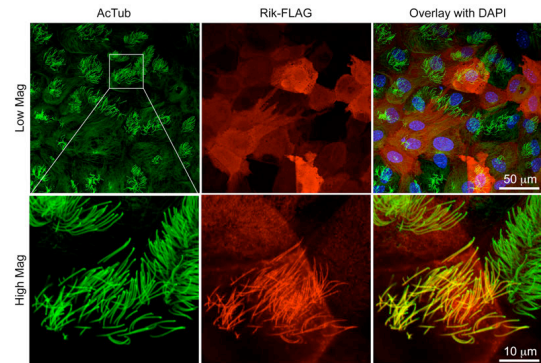


図 4. Rik-FLAG の細胞内局在の確認

Rik 遺伝子の機能を詳細に解析するためにはノックアウトマウスの作出が必要である。そこで Rik 遺伝子を選択的に切断する CRISPR/Cas9 システムを構築し、培養系を用いた評価を行った。その結果、高いゲノム編集効率を示すコンストラクトを選抜できた (図 5, 左下)。

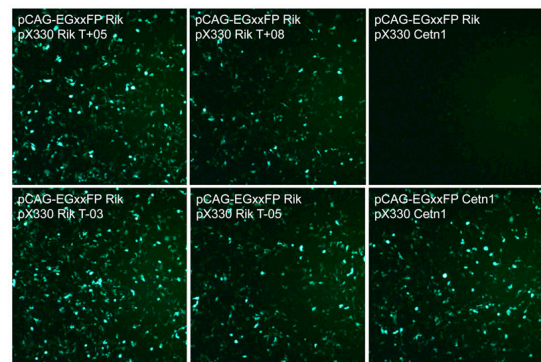


図 5. CRISPR/Cas9 システムを用いた Rik ノックアウトマウス作製コンストラクトの構築および機能評価

(2) 出生前後の発生期における CPECs 繊毛の解析：胎児期から生後 2 週までの期間において、CPECs 繊毛の運動機能の変化を、高速度ビデオ顕微鏡を用いて解析した。運動繊毛を持つ CPECs の数は脈絡叢の形成が始まる胎齢 12~13 日には確認できなかったが、胎齢 15 日以降徐々に増えていき、そのピークは出生前後であった (図 6)。

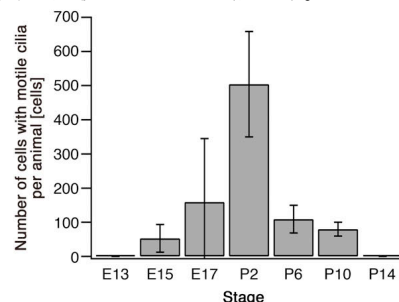


図 6. 運動繊毛を持つ CPECs 細胞数の時系列的変化

またその運動様式に関してはほとんどが往復運動であったが、回転運動をするものも混在しており、その割合は胎齢 17 日に極大値を示した (図 7)。

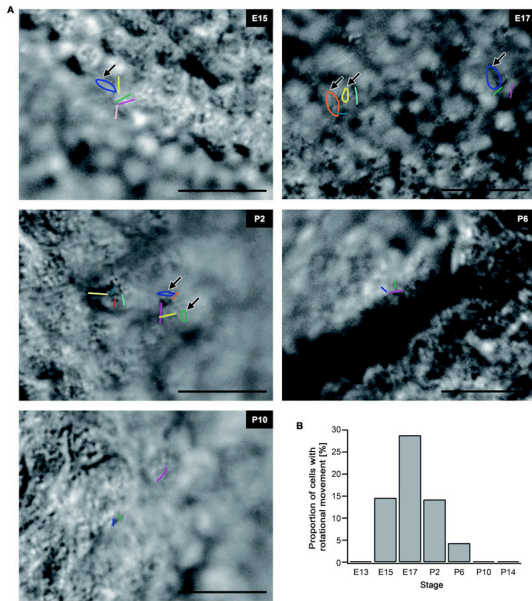


図 7. CPECs 繊毛の運動様式の変化

一方、細胞あたりの繊毛数を走査型電子顕微鏡で解析したところ、胎齢 13 日から生後 14 日に至るまではほぼ一定であった (図 8)。従って繊毛運動に関する上述の変化は、CPECs の繊毛が一過性に運動機能を獲得していることを意味していると考えられた。この生理的意義に関しては今なお不明であり、検討中である。

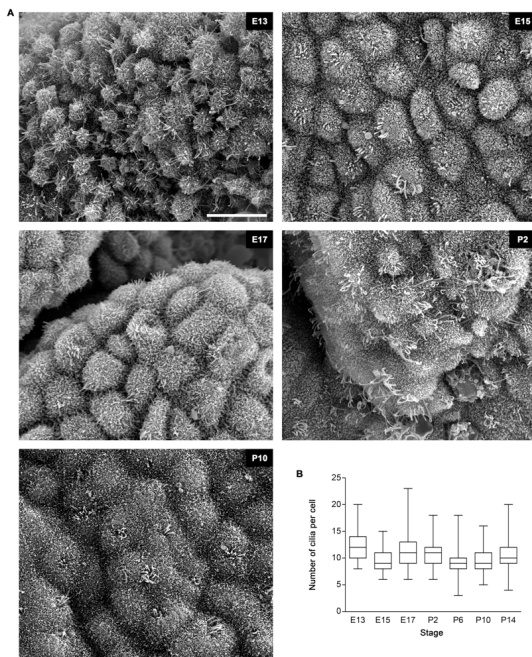


図 8. 脈絡叢上皮細胞が持つ繊毛数の経時的変化の解析

この一過性の繊毛運動機能獲得には *Dnahc11* の遺伝子発現調節が関与している可能性をリアルタイム PCR で見出している。

(3) 繊毛ライブセルイメージングのツール構築: CPECs が持つ 10~20 本の 9+0 型繊毛およびそれらを支える基底小体が細胞分裂の際にどのような挙動を示すのかを探るため、細胞が生きた状態で繊毛および基底小体をイメージングするための系を構築した。具体的には、繊毛をラベルする *Inv-EGFP* (緑) および *Arl13b-Venus* (黄緑)、基底小体をラベルする *Cetn2-mCherry* (赤)、そして G2/M 期に入った細胞の核をラベルする *AmCyan-hGeminin* (シアン) を発現するレンチウイルスベクターを作製した。これらをウイルス粒子にパッケージングし、感染させることで繊毛および中心小体を恒常的にイメージングすることが可能になる。その実用性を IMCD3 細胞株および初代培養 CPECs を用いて検討したところ、IMCD3 細胞では概ね期待通りの結果が得られた (図 9)。

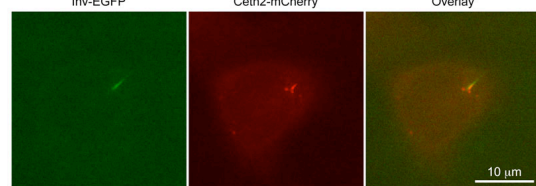


図 9. IMCD3 細胞が持つ一次繊毛のライブイメージング

一方 CPECs では (図 10)、IMCD3 細胞と比べて細胞分裂の頻度が非常に低く、更にウイルス感染が細胞障害を招きやすく多重感染が難しいこと、などが理由で解析は現在も継続中である (図 11)。

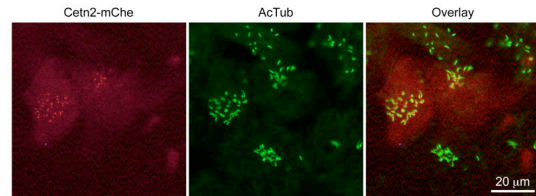


図 10. *Cetn2-mCherry* 発現レンチウイルスを感染させた CPECs

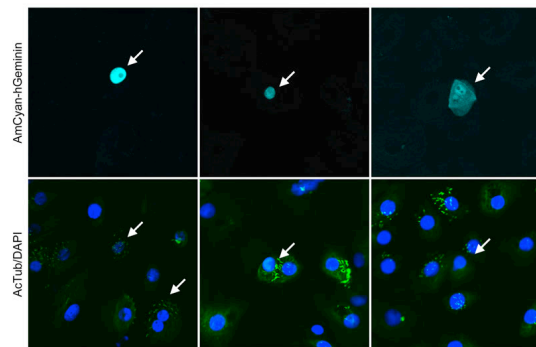


図 11. *AmCyan-hGeminin* 発現レンチウイルスを感染させた CPECs

また現在こうした解析を、動物個体を構成するあらゆる細胞へと展開させるために、これらのウイルスをマウス受精卵に感染させてトランスジェニックマウスを作出する試みも進行中である。

(4) CPECs における非選択的カチオンチャンネル TRPV4 の機能解析: TRPV4 は幾つかの細胞を用いた先行研究では繊毛に局在し、低浸透圧ストレスに伴う ATP 放出などに関与すると報告されている。TRPV4 は CPECs においても強く発現していることが知られているが、その繊毛局在性や生理機能はほとんど知られていない。そこでまず CPECs における TRPV4 の繊毛局在性を検討するために、免疫染色に用いる抗体の評価を行った。その結果、Abcam 社の抗体が反応性・特異性ともに優れていることが確認できた (図 12)。

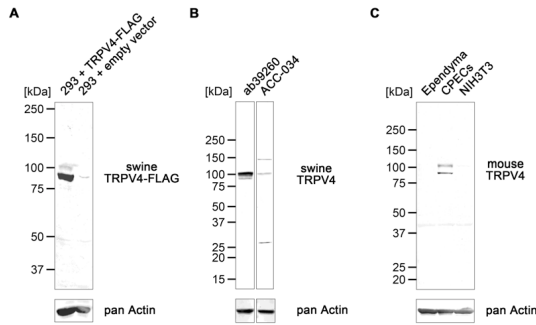


図 12. 抗 TRPV4 抗体の評価

この抗体を用いて脈絡叢組織の免疫染色をおこなったところ、当初の予想に反し、CPECs における TRPV4 は繊毛には局在せず、頂端側膜に広く分布していた (図 13)。

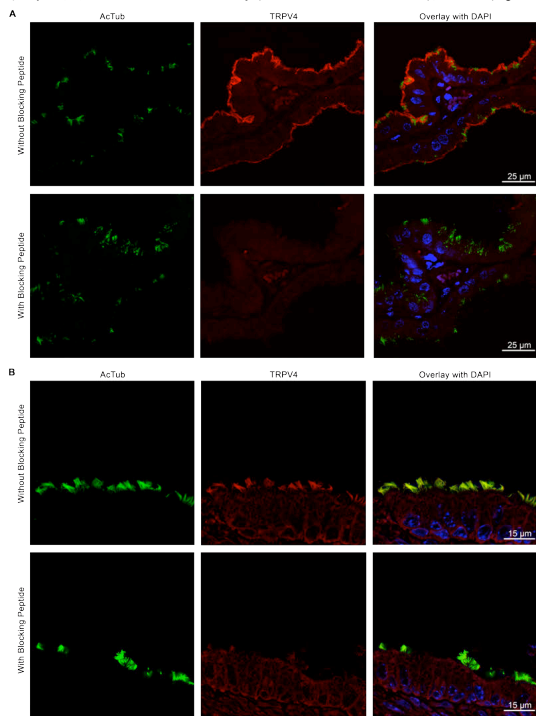


図 13. 脈絡叢 (上) と気道上皮 (下) で異なる TRPV4 の繊毛局在性

次に CPECs における TRPV4 の生理機能を探るため、細胞を TRPV4 特異的アゴニスト GSK1016790A で刺激した。TRPV4 活性化に伴いカルシウムイオンが細胞外から細胞内へ流入することが確認できた。またこれと同時に ~94 kDa タンパク質の Ser/Thr リン酸化が亢進することが見出された (図 14)。

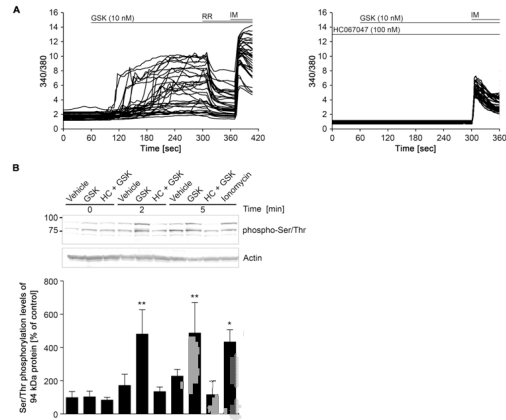


図 14. TRPV4 活性化に伴い引き起こされる細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの流入とタンパク質の Ser/Thr リン酸化

アゴニストによる刺激を持続させると、CPECs の上皮細胞層は崩壊した。そこで刺激後 5 分の時点で細胞骨格系の変化を見ると、細胞内アクチン線維の著しい減少が見られた (図 15)。

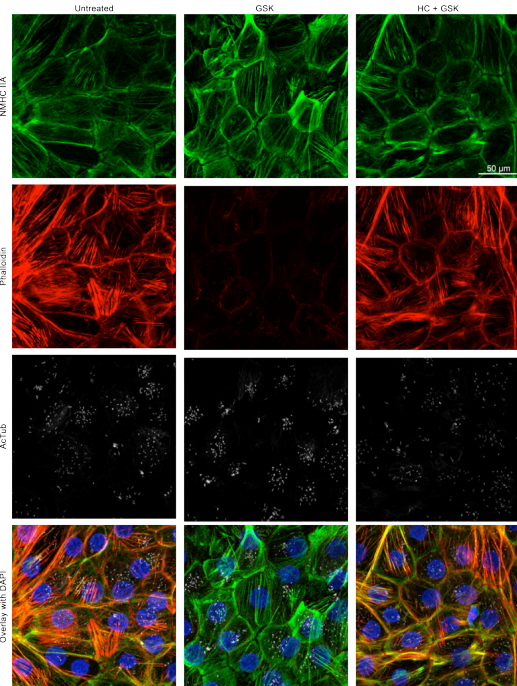


図 15. TRPV4 アゴニスト刺激によるアクトミオシン系の変化

TRPV4 の生理機能として、低浸透圧ストレスにより惹起される ATP シグナルへの関与を検討したが、関与を示す知見は得られな

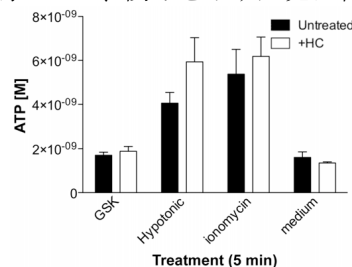


図 16. CPECs の ATP シグナル活性化に TRPV4 は関与していない

かった (図 16)。一方、定常状態における TRPV4 の活性を特異的アンタゴニスト HC067047 により阻害すると、頂端側に分泌される $\alpha 2$ マクログロブリンの量が低下した (図 17)。このことから、CPECs における TRPV4 は細胞接着結合を調節し、経上皮の物質輸送の調節に関与していることが示された。

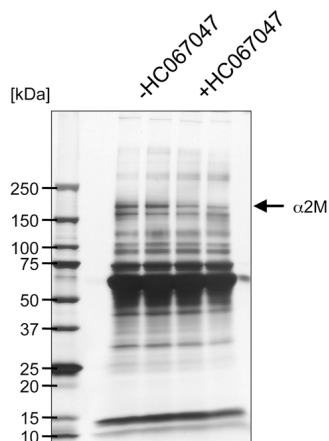


図 17. TRPV4 の阻害による CPECs の頂端側培地に含まれる $\alpha 2$ マクログロブリンの低下

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. Steven Su, Siew Cheng Phua, Robert DeRose, Shuhei Chiba, Keishi Narita, Peter N Kalugin, Toshiaki Katada, Kenji Kontani, Sen Takeda, and Takanari Inoue. Genetically encoded calcium indicator illuminates calcium dynamics in primary cilia. *Nature Methods* (査読有), **10**(11), 1105-7, 2013
doi:10.1038/nmeth.2647
- ②. Yuta Nonami, Keishi Narita, Hideki Nakamura, Takafumi Inoue, and Sen Takeda. Developmental changes in ciliary motility on choroid plexus epithelial cells during the perinatal period. *Cytoskeleton* (査読有), **70**(12), 797-803, 2013
doi: 10.1002/cm.21132

[学会発表] (計 3 件)

- ①. Keishi Narita, Shohei Sasamoto, Schuichi Koizumi, Shizuka Okazaki, Hideki Nakamura, Takafumi Inoue, and Sen Takeda. Loss of sensory cilia leads to downregulation of extra-ciliary TRPV4 function in epithelial cells. FASEB Meeting. Niagara Falls, NY (2013)

- ②. Keishi Narita, Shohei Sasamoto, Schuichi Koizumi, and Sen Takeda. Primary cilia regulate the function of extraciliary TRPV4 in epithelial cells. *The 52nd Annual Meeting of the American Society for Cell Biology*. San Francisco, CA (2012)
- ③. Keishi Narita, Shohei Sasamoto, Schuichi Koizumi, Shizuka Okazaki, Hideki Nakamura, Takafumi Inoue, and Sen Takeda. Primary cilia modulate extraciliary TRPV4 in choroid plexus epithelial cells. *The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society*. Nagoya (2012)

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