

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440094

研究課題名(和文) 繊毛の構造的・機能的多様性を生み出す分子メカニズム

研究課題名(英文) Study of the structural and functional diversities of vertebrate cilia

研究代表者

成田 啓之(NARITA, Keishi)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：50452131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：繊毛の構造と機能に関連する新規遺伝子を見出し、KOマウスを作出してその表現形を解析した。顕著な異常が見られた組織を電子顕微鏡で解析したところ、繊毛表面の脂質二重膜構造、軸系の配置および数などが乱れており、また繊毛内部に異常な小胞も認められた。これら形態学的な異常に伴い繊毛の機能低下も認められた。この新規分子は繊毛の形成時に機能していると推測された。この遺伝子の変異によるヒトの疾患は報告されていないが、ゲノムのSNP解析により、この遺伝子の機能を損なうようなSNPが存在していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：A novel gene involved in the proper formation of vertebrate cilia was identified and characterized. The knockout mouse demonstrated a severe phenotype after birth due to defects in ciliogenesis. Transmission electron microscopy of the affected organs revealed that the integrity of axonemal arrangement and number were lost in the null mutant. Although there is no clinical report related to this gene, SNP analysis suggested the existence of SNPs that would lead to the loss of function of this gene.

研究分野：細胞生物学

キーワード：繊毛

1. 研究開始当初の背景

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。このように我々のからだを構成する細胞が様々な性質の繊毛を生み出す分子機構に関しては、今なお不明な点が多く残されている。

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衣細胞 (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衣細胞、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、我々のからだに見られる繊毛の構造的・機能的多様性について分子細胞生物学的な解析を行った。

- (1) 新規繊毛関連遺伝子の機能解析
- (2) プタ脈絡叢が持つ繊毛の構造解析
- (3) 繊毛のアンテナ機能解析に供するトランスジェニックマウス作出

3. 研究の方法

(1) 逆転写-PCR 解析：成獣マウスの各臓器・組織から total RNA を抽出し、そこから 2 μg をとり逆転写反応を行った。そして得られた cDNA を PCR 解析に用いた。半定量的 PCR 解析を行うために、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH が同一条件下で同程度増幅されるように cDNA サンプルの濃度を調節した。

(2) 遺伝子改変マウスの作出：以前作成・選抜した CRISPR/Cas9 発現プラスミドを、

山梨大学発生工学センターの若山教授・長友啓明特任助教の協力を得て人工受精卵にマイクロインジェクションし、翌日発生の進んだ接合体を偽妊娠マウスの卵管膨大部に移植して産仔を得た。得られたマウスは遺伝子型を確認するとともに近交系へ戻し交配を行い、表現形の解析を行った。

(3) マウス組織切片作成、RNA in situ ハイブリダイゼーション・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) 初代培養上衣細胞が持つ繊毛の動態解析：新生児マウスより得た初代培養上衣細胞をガラスボトムディッシュに用意し、Allied GE680 CCD カメラを装備した倒立位相差顕微鏡を用いて繊毛の動画を毎秒 175 コマの速度で取得した。得られた画像データは TI Workbench および Image J ソフトウェアを用いて解析した。繊毛運動の振幅の解析に関しては、径 1 μm の蛍光マイクロビーズを培地に添加し、運動繊毛に付着したビーズの軌跡を蛍光顕微鏡で撮影・測定することによって定量的なデータを得た。

(5) 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。STEM を用いたクライオ電子線トモグラフィーは理化学研究所横浜キャンパスの仁田亮上級研究員、重松秀樹上級研究員らの協力を得ておこなった。

4. 研究成果

(1) 新規繊毛関連遺伝子の機能解析：これまでの独自の解析によって見出した新規繊毛関連遺伝子 Rik について、マウスの各臓器・組織における発現の有無を逆転写 PCR (RT-PCR) 法で解析した。半定量的な条件で PCR を行ったところ、運動繊毛を持つ細胞が多く存在する上衣細胞 (初代培養; EPD)、肺 (Lung)、精巣 (Testis) で Rik の発現を検出することができた (図 1)。一方、脳 (Brain)、肝臓 (Liver)、腎臓 (Kidney)、脾臓 (Spleen) では Rik の発現を検出することができなかった。上衣細胞は脳内に存在するが、その数は神経細胞や他のグリア細胞の数に比べて非常に少ないため、脳全体から抽出した RNA を解析に用いた場合は Rik の発現検出には至らなかったものと考えられる。卵管 (Oviduct) での Rik の発現は検出できなかったが、繊毛上皮を有しており上記の傾向に基づく発現が予想されるので検証を継続中である。

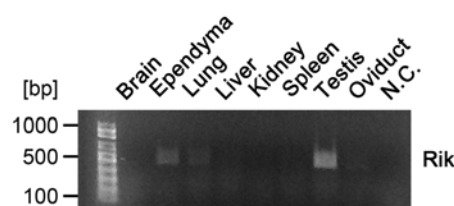


図 1. マウスの各臓器・組織における新規繊毛関連遺伝子 Rik の発現.

Rik の遺伝子発現レベルが最も高い精巣に関しては RNA in situ hybridization を行ってその発現領域を検討した。その結果、Rik の発現は精細管内部で起こっており、特に強い発現が見られたのは精子が減数分裂を終えて鞭毛形成を行う領域であることを見出した (図 2)。以上の知見から、この遺伝子が運動繊毛の形成に関与していることが推測された。

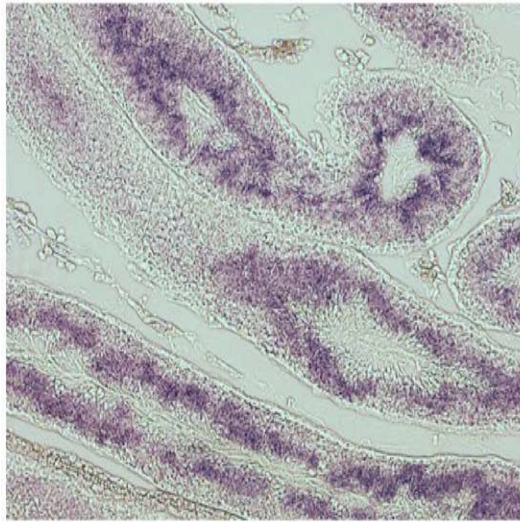


図 2. 精巣組織切片を用いた Rik の RNA in situ ハイブリダイゼーション(アンチセンスプローブを使用)。

次に Rik タンパク質に対するウサギポリクローナル抗体を作成し、その特異性および感度について評価を行った。得られた抗体は 293 細胞に強制発現した Rik-FLAG タンパク質を特異的に認識でき、また免疫沈降に使用したところ Rik-FLAG タンパク質を濃縮することができた (図 3)。しかしながら内在性の Rik タンパク質をウェスタンブロットおよび免疫染色で特異的に検出することはできなかった。内在性の Rik タンパク質の免疫沈降には使用できる可能性があり、Rik との結合分子を探索するプルダウンアッセイへの利用を検討中である。

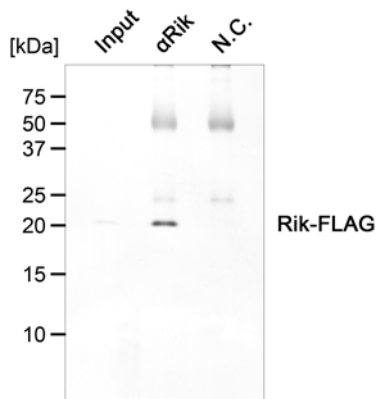


図 3. Rik-FLAG 強制発現系を用いたウサギ抗 Rik ポリクローナル抗体の評価。

以前作成・選抜した CRISPR/Cas9 プラスミドをマウス受精卵に注入し、Rik ノックア

ウトマウスを作成した。そして得られた産仔の遺伝子型を解析するとともに近交系への戻し交配を行った。Rik ゲノムの切断標的配列近傍の遺伝子変異を調べたところ、3 系統の変異を確認した。ヘテロ変異体の雌雄を交配して得られた産仔の遺伝子型はメンデルの法則に従っており、Rik の機能喪失に伴う胎生致死は起こっていないことが示された。また産仔には内臓逆位・錯位も確認できず、Rik がノド繊毛の形成および機能に必須ではないことがわかった。

出生後のマウスの表現型解析によって、Rik のホモ変異体が水頭症を呈することを見出した (図 4)。その程度には個体差があり、離乳前から頭蓋冠の変形が顕著で早期に死亡するものから、一見正常であるが脳切片で脳室拡大を認めるものまで様々であった。

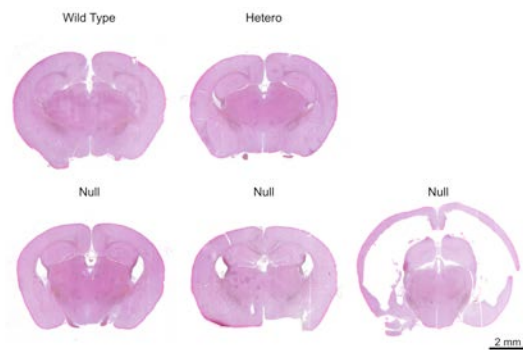


図 4. Rik ホモ変異体は水頭症を呈する。

第三脳室を免疫染色して観察すると、ホモ変異体では上皮細胞の運動繊毛が随所で失われるとともに、残った繊毛も直立したものが多く、運動機能の低下が強く示唆された (図 5)。

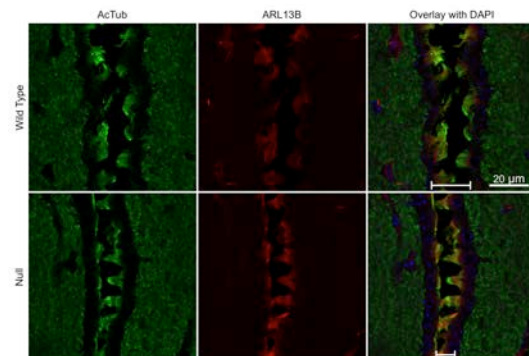


図 5. 野生型 (上段) と Rik ホモ変異体 (下段) の第三脳室の免疫染色像 (緑、アセチル化チューブリン; 赤、Arl13B)。ホモ変異体では随所に繊毛形成不全が見られ、左右の脳室壁の間隔が狭まっている。

上皮細胞の繊毛運動の低下に関しては初代培養系を用いてさらに解析を行い、蛍光マイクロビーズを用いた画像解析およびハイスピードビデオ顕微鏡撮影によって、振幅の減少が顕著に見られることを見出した (図 6)。

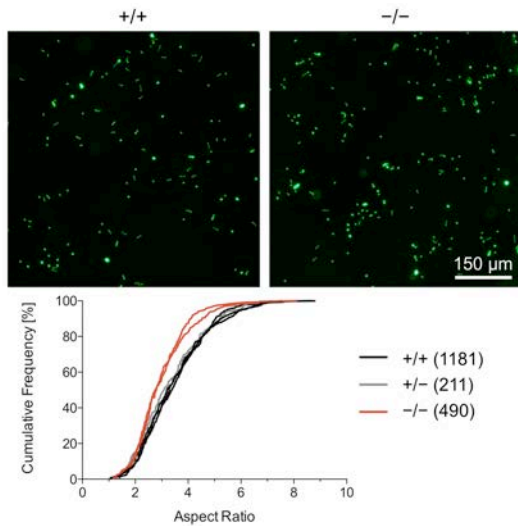


図 6. 蛍光マイクロビーズを用いた初代培養上皮細胞の運動繊毛の振幅解析.

次に Rik ホモ変異体の脳を固定し、第三脳室壁の上皮細胞が持つ運動繊毛を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。大多数 (およそ 7 割) の繊毛には異常が見られなかったが、その一方で脂質二重膜が大きく歪み、ダブルレット微小管の配置および数が著しく乱れている繊毛が 3 割ほど散在していた (図 7)。こうした構造の異常は基底小体および繊毛基部には認められず、Rik が運動繊毛内部の構造安定化に寄与している可能性が示唆された。

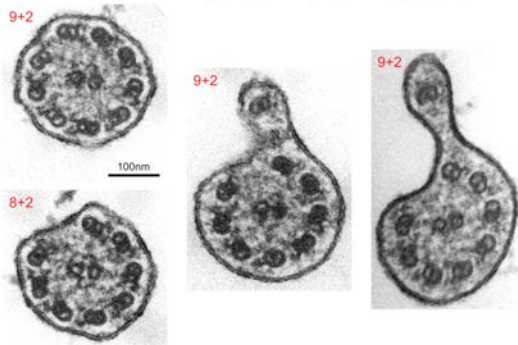


図 7. Rik ホモ変異体の第三脳室壁で見られた運動繊毛の透過型電顕像.

また、Rik のホモ変異体は水頭症に加えて雄性不妊も呈することを見出した。精巣の組織切片をとって広く用いられているアセチ

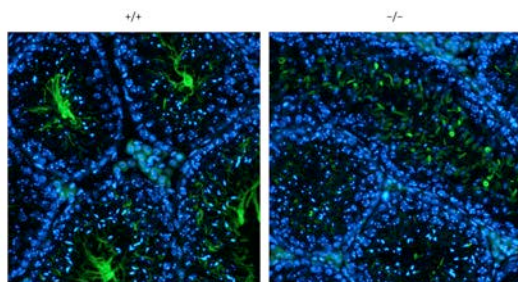


図 8. 野生型 (左) と Rik ホモ変異体 (右) の精巣の免疫染色像 (緑、アセチル化チューブリン; 青、DAPI)。

ル化チューブリン (繊毛マーカー) に対する抗体を用いて免疫染色したところ、精子の鞭毛形成不全が著しく、鞭毛軸糸に替わって精子の形態形成時に一過性に現れるマンシエット微小管が異常なアセチル化を受けていた (図 8)。

また精巣から精巣上部へと輸送された精子を回収して走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察したところ、野生型では完成した精子を認める一方で、ホモ変異体では鞭毛が著しく短い奇形精子のみで、その数も野生型に比べ少なかった (図 9)。またこれら奇形精子には鞭毛運動が全く認められなかった。

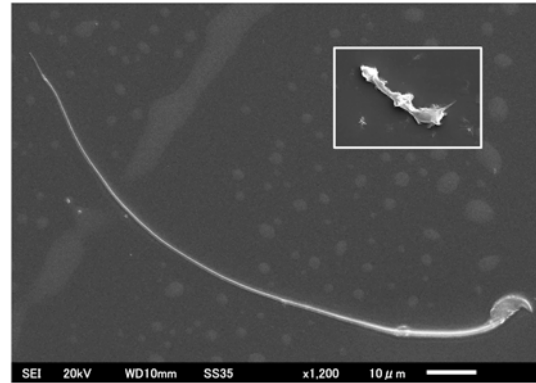


図 9. 野生型および Rik ホモ変異体 (挿入図) の精巣上部から回収した精子の走査型電顕像.

(2) ブタ脈絡叢が持つ繊毛の構造解析: 研究代表者は以前脈絡叢の繊毛プロテオーム解析を論文に報告しているが、より精製度の高い繊毛を調製して、9+0 型繊毛内部の詳細な構造解析を目指した。精製に用いるブタ組織の量を増やし、また精製に用いる密度勾配をスクロースから Optiprep に変更するなど検討を重ねた結果、以前と比較して精製度を高めることができた (図 10)。

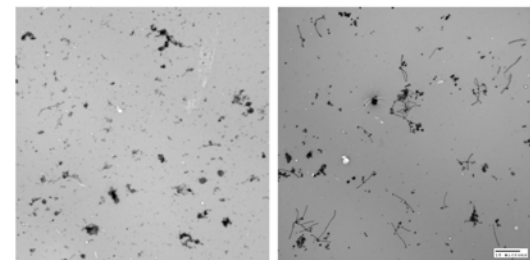


図 10. ブタ脈絡叢から精製した繊毛のネガティブ染色像. 従来の方で精製した試料 (左) では夾雑物の中に繊毛を数本認めるのみであるが、新しい方法で精製した試料 (右) は夾雑物の量が減り、繊毛の濃度が高まった。

このようにして得られた試料をホルムアルデヒドで固定したのち、理化学研究所横浜キャンパスに持ち込み仁田亮上級研究員、重松秀樹上級研究員らの協力を得て STEM を用いたクライオ電子線トモグラフィーを

実施した。その結果、穏やかな脱膜処理によって脂質二重膜を部分的に除去された 9+0 型繊毛の軸糸に取り囲まれた内部に、一般的な透過型電子顕微鏡観察では見られない様々な大きさの粒子が存在している様子が認められた (図 11)。



図 11. クライオ電子線トモグラフィによって立体再構築したブタ脈絡叢の精製繊毛。

構造解析用に調製した精製繊毛試料の一部をとりプロテオーム解析を行った結果、以前のデータに比べて夾雑物として同定されたミトコンドリアタンパク質の種類および量は減る一方で、既知の繊毛関連分子をより多く同定することができた。またデータの中には他にも多くの構造タンパク質およびシグナル伝達分子が見出され、今後繊毛の機能を研究する上で重要な情報が得られた。

(3) 繊毛のアンテナ機能解析に供するトランスジェニックマウス作出：全身の細胞に繊毛局在性カルシウムセンサータンパク質を発現するトランスジェニックマウスの作出を試みた。カルシウムセンサータンパク質 G-GECO1.0 を繊毛に局在させるための配列として、5HT6 と NPHP3[1-203]の2種類をN末端に融合させた発現コンストラクトを作成し、それぞれ人工受精卵にマイクロインジェクションした。しかしながらどちらも偽妊娠マウスの卵管への移植後に胎生致死を引き起こし、計画した遺伝子改変マウスは得られなかった。カルシウムセンサータンパク質を強制的に繊毛内部へ送り込むことにより、本来の繊毛内部におけるカルシウムイオンの動態が擾乱した可能性がある。繊毛内のカルシウムイオンを介したシグナル伝達がマウスの発生期に極めて重要であることを示唆する知見と考える。

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)

- ①. Keishi Narita and Sen Takeda. Cilia in the choroid plexus: their roles in hydrocephalus and beyond. *Front Cell Neurosci* (査読有) 9:39, 2015
doi:10.3389/fncel.2015.00039
- ②. Keishi Narita, Syohei Sasamoto, Schuichi Koizumi, Shizuka Okazaki, Hideki Nakamura, Takafumi Inoue and Sen Takeda. TRPV4 regulates the integrity of the blood-cerebrospinal fluid barrier and modulates transepithelial protein transport. *FASEB J* (査読有) 29(6):2247-59, 2015
doi: 10.1096/fj.14-261396
- ③. Takafumi Inoue, Keishi Narita, Yuta Nonami, Hideki Nakamura and Sen Takeda. Observation of the ciliary movement of choroid plexus epithelial cells ex vivo. *J Vis Exp* (査読有) 101:e52991, 2015
doi: 10.3791/52991
- ④. Toru Odate, Sen Takeda, Keishi Narita and Toru Kawahara. 9 + 0 and 9 + 2 cilia are randomly dispersed in the mouse node. *Microscopy (Oxf)* (査読有) 65(2):119-26, 2016
doi: 10.1093/jmicro/dfv352

[学会発表] (計7件)

- ①. 成田啓之、長友啓明、竹田扇. 新規繊毛関連遺伝子ノックアウトマウスの解析. 日本解剖学会. 2017年3月27日. 長崎大学坂本地区キャンパス(長崎県長崎市)
- ②. 成田啓之、竹田扇. 山梨大学における肉眼解剖学実習の現状と課題. 日本解剖学会. 2017年3月27日. 長崎大学坂本地区キャンパス(長崎県長崎市)
- ③. 成田啓之、長友啓明、若山照彦、竹田扇. 新規繊毛関連遺伝子ノックアウトマウスの表現型解析. 日本解剖学会中部地方会. 2016年10月9日. 信州大学松本キャンパス(長野県松本市)
- ④. 成田啓之、竹田扇. 新規繊毛関連遺伝子の機能解析. 日本解剖学会. 2016年3月25日. ビッグパレット福島(福島県郡山市)
- ⑤. Keishi Narita, Shohei Sasamoto, Schuichi Koizumi, Shizuka Okazaki, Hideki Nakamura, Takafumi Inoue,

and Sen Takeda. Regulation of the blood-cerebrospinal fluid barrier functions by TRPV4. 日本神経科学学会. 2015年7月28日. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

- ⑥. Keishi Narita, Shohei Sasamoto, Schuichi Koizumi, Shizuka Okazaki, Hideki Nakamura, Takafumi Inoue, and Sen Takeda. Regulation of the blood-cerebrospinal fluid barrier permeability by TRPV4. 日本解剖学会. 2015年3月21日. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- ⑦. 成田啓之、笹本祥平、小泉修一、竹田扇. TRPV4による血液脳脊髄液関門の機能調節. 日本解剖学会中部地方会. 2014年10月11日. 金沢大学宝町キャンパス (石川県金沢市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 啓之 (NARITA, Keishi)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：50452131