

メダカ変異体を用いた繊毛運動障害症候群の新規原因遺伝子の機能解明

Functional analysis of a medaka novel gene responsible for primary ciliary dyskinesia

代表研究者	東京大学	武田洋幸	University of Tokyo	Hiroyuki Takeda
協同研究者	東京大学	島田敦子	University of Tokyo	Atsuko Shimada

Summary

Cilia/flagella are highly conserved organelles that play diverse roles in cell motility and sensing extracellular signals. Motility defects in cilia/flagella often result in primary ciliary dyskinesia (PCD). However, the mechanisms underlying cilia formation and function, and in particular the cytoplasmic processes involved in dynein arm assembly, are only poorly understood. Here we report a novel gene, *kintoun* (*ktu*), involved in this cytoplasmic process. This gene was first identified in a medaka mutant, and found to be mutated in PCD patients from two affected families as well as in the *pf13* mutant of *Chlamydomonas*. In the absence of Ktu/PF13, both outer and inner dynein arms are missing or defective in the axoneme, leading to a loss of motility. Biochemical and immunohistochemical studies show that Ktu/PF13 is one of the long-sought proteins involved in pre-assembly of dynein arm complexes in the cytoplasm before IFT loads them for the ciliary compartment.

(はじめに)

繊毛・鞭毛は真核細胞の表面から突出した毛状の細胞小器官で、2つの中心微小管（中心対微小管、**central pair**）と9本の周辺微小管（二連管、**doublets**）で構成されている（9+2構造）。運動性の繊毛では、周辺微小管の片側に、モーターとして機能するダイニンアーム（外腕と内腕）が結合し、それらが隣接する微小管と滑り運動を行うことで、推進力を産み出す有効打が生まれる（**Figure 1D**）運動性の繊毛・鞭毛は細胞の移動、物質の移動を担う小器官であり、幅広い生命現象に関わっていることがわかっている。最近では特に発生過程での役割が注目されている。例えば、左右軸形成において、運動性繊毛が胚の尾部で左向き水流を生みだし、その流れが左右軸情報に変換される。このように様々な現象に関与する繊毛に関連して、その形成や機能の異常によって引き起こされる遺伝病が知られている。代表的なものは、多発性嚢胞腎（**polycystic kidney disease, PKD**）と繊毛病

(primary ciliary dyskinesia, PCD) である。両者とも複数の原因遺伝子がすでに単離されているが、200 種類以上のタンパク質で構成される繊毛の形成過程や関連する遺伝病の全体像はまだ謎である。従ってモデル生物を用いた順遺伝学的アプローチが期待されていた。

(研究目的)

メダカは日本で開発された実験動物で、そのゲノム配列も我々を含む日本チームにより解読され (Kasahara et al., Nature 2007)、生命科学の分野で注目を集めている。私たちはこのメダカを用いて、脊椎動物のからだづくりを支配する重要な遺伝子群を研究している。この目的のために、単離したメダカ突然変異体一つ、*kint-oun* (*ktu*) が本研究の対象とする。*ktu* は内臓逆位 (内臓器官の位置が左右逆転する) を起こす変異体として単離された。表現型の詳しい解析の結果、この変異体では鞭毛や細胞の表面にある繊毛の運動機能が低下し、その結果多発性嚢胞腎、受精能の低下、といった Kartangener 症候群とに類似した症状を示すことが判明した。ゲノム情報を駆使することで、最近この *ktu* 変異体の原因遺伝子の同定に成功した。*Ktu* は単細胞生物、昆虫からほ乳類まで保存されている機能未知のタンパク質であった。この新規遺伝子の機能解析を通して、繊毛運動異常に起因するヒトの症候群および普遍的な鞭毛形成の分子メカニズムを明らかにする。

(研究結果と考察)

I. メダカ左右軸突然変異体 *kintoun*

繊毛の異常は初期発生において左右軸形成異常という表現型として現れることが期待された。そして今回の研究対象となったメダカ突然変異体は左右非対称に配置される内臓 (左側に心臓、右側に肝臓など) の位置がランダムとなる典型的な左右軸喪失変異体として単離されたものである (Figure 1A)。興味深いことに、このメダカ左右軸変異体は成長の過程で必ず腎臓肥大を発症し、腹部がふくれる。腎臓肥大のため背筋が曲がった成魚の姿が、孫悟空が空を飛ぶために乗る筋斗雲 (きんとうん) に似ていることから、この変異体は *kintoun* (以下 *ktu*) と命名された (Figure 1B)。腎臓肥大は組織学的観察により、ヒト遺伝病の PKD と同様に腎細管が嚢胞化するものであった (図 1B)。PKD は、ヒトで 1,000 人に一人程度という高頻度で発症する。これまでに *PC1*、*PC2* をはじめとした多くの原因遺伝子が特定されている。主要な発症機構は以下のように考えられている。ほ乳類の腎細管上皮細胞には細胞あたり一本の非運動性の繊毛 (primary cilia) が生えており、原尿の流速を感知するセンサーとして機能している。繊毛基部の膜上には Ca イオンのチャンネルである *PC2* とそれと結合した *PC1* 存在し、繊毛へのメカニカルな刺激に反応して、Ca イオンの細胞内流入が起こる。繊毛形成の異常や *PC1*、*PC2* の欠損により、センサーとしての機能がなくなると、理由ははっきりしていないが上皮細胞が異常増殖して扁平化する。PKD は一端発症すると効果的な治療法はなく、発症の原因解明や治療法の開発が急がれている。従って、メダカ *ktu* 変異体はヒトの多発性嚢胞腎を研究する動物モデルであり、現在メダカ変異体での発症過程の詳細な解析を行っている。

一方、*ktu* 変異体の表現型の原因は繊毛・鞭毛が運動性を失っていることに起因していることも判明した。つまり左右軸形成の初期段階で必要なノード流が起こらず、内臓配置がランダムになっているのである。また変異体雄精子の運動性も著しく低下していた。電子顕微鏡の観察により、*ktu* 変異体では繊毛・鞭毛の形成 (数や長さ) は正常であるが、運動に不可欠なダイニン腕 (外腕と内腕) が欠損していることを突き止めた (Figure 1C, D)。

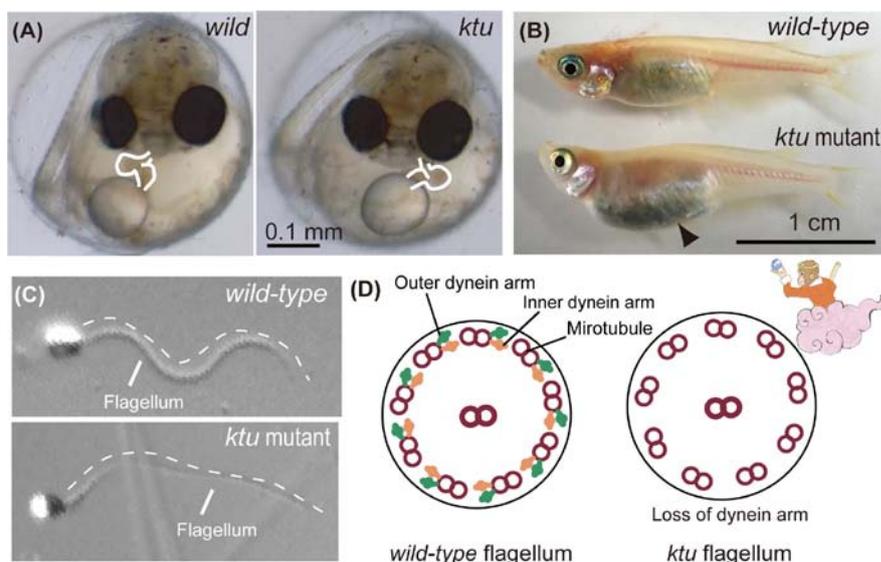


Figure 1. PCD-like phenotypes of medaka *ktu* mutant. (A) The heart (outlined) of wild-type and *ktu* embryos at 3 days postfertilization. (B) External appearance of wild-type and *ktu* adult fish (3-month old). The arrowhead indicates the expanded belly. (C) Snapshots of high-speed videos of swimming sperm from wild-type and *ktu* adults, showing a defective beating pattern in mutant sperm. (D) Schematic illustrations of cross section of flagella from wild-type and *ktu* sperm. In the absence of *Ktu*, both outer and inner dynein arms are missing or defective in the axoneme, leading to a loss of motility.

II. *Ktu* は新規タンパク質

我々は2007年に解読されたゲノム情報を活用して *ktu* 変異体の原因遺伝子同定に成功した。変異を起こしていた遺伝子はヒトを含めた脊椎動物、昆虫、そして単細胞生物（クラミドモナスなど）まで、繊毛・鞭毛を持つ生物に広く存在する普遍的な遺伝子であった。しかも、これまで全く知られていない新規のタンパク質をコードしていた。メダカで 588 アミノ酸からなる *Ktu* は機能を推定させるようなドメインはなく、N末端が生物種間で比較的保存されていた。

III. *Ktu* とヒト繊毛病そしてノックアウトマウス

生物種間で保存されている遺伝子は、ヒト遺伝病の原因遺伝子でもある場合が多い。*ktu* 変異体の表現型から、*ktu* はヒト PCD の原因候補と考えられた。PCD は PKD と異なり、運動性繊毛の異常によって起こることが知られている。その主な症状は、気管支の拡張、男性不妊や内臓逆位である。また、内臓逆位を併発した場合（内臓配置がランダムになるので 50% の確率）はカルタゲナー（Kartagener）症候群ともよばれている。気管支拡張は、気管上皮には運動性の繊毛があり、繊毛が運動性を失うと呼吸によって流入する異物を排出できず、繰り返し炎症が起きるためである。PCD について、すでに複数の原因遺伝子が単離されているが、多くの場合それらはダイニン腕の構成タンパク質をコードするものであった。そこで、PCD の研究で著名なフライブルグ大学（ドイツ）Heymut Omran 博士との共同研究を行った。Omran 博士が収集したゲノム DNA リソースを調べ結果、PCD を発症する 112 家系中 2 家系で *KTU* 遺伝子の変異が見つかった。また、その患者さんの繊毛・鞭毛は、メダカ同様ダイニン腕の形成不全により、その運動性は完全に喪失していた。

さらに国立遺伝学研究所・相賀裕美子教授と共同で *ktu* ノックアウトマウスが作成され、

その表現型はヒト繊毛病と同一であることも判明した。

IV. Ktu とクラミドモナス PF13

話はさらに単細胞生物へと展開する。クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) は緑藻類の単細胞鞭毛虫で、2本の鞭毛をビートさせて活発に泳ぎまわる。クラミドモナスは鞭毛の分野で中心的なモデル生物であり、遺伝学、生化学的解析のリソース (変異体、抗体など) が充実している。既に鞭毛の運動異常の変異体が多数単離されている。D. R. Mitchell (SUNY Upstate Medical University, NY)、神谷律博士 (東京大学) との共同研究により、その中の一つ *pf13* が *ktu* のクラミドモナス相同遺伝子の変異体であることを突き止めた。*pf13* 変異体は 30 年近く前に単離されたもので、その表現型は最も重篤で鞭毛がほぼ完全に麻痺して動かなくなる。電子顕微鏡による詳細な観察の結果、*pf13* の軸糸ではダイニン外腕の大部分と内腕一部が欠失していることが示された。これらは脊椎動物の表現型と同一であり、Ktu/PF13 の機能が単細胞生物から多細胞生物のヒトまで保存されていることを示している。

V. Ktu/PF13 の作用機序

Ktu/PF13 の機能解析の最初として、まずタンパク質が軸糸ではなく細胞質中に存在することを確認した。しかし、細胞質中に存在する Ktu/PF13 がどのようにダイニン腕形成に関与するかは依然として不明であった。クラミドモナスを用いた生化学的解析がその答えを与えてくれた。クラミドモナスではダイニン腕は細胞質中で組み立てられて、細胞質中にプールされていることが示されていた。そしてそれらは、必要に応じて繊毛・鞭毛基部の基底小体 (basal body) に運ばれ、その周辺で鞭毛内輸送 (intraflagellar transport, IFT) システムのカーゴとしてキネシンモーターに結合し、繊毛・鞭毛内へ運ばれる。そこで *pf13* 変異体でのダイニン腕形成の状態を生化学的に調べた。その結果、Ktu/PF13 の作用ポイントは細胞質で起こるダイニン腕の組み立て、とくに中間鎖ダイマーと重鎖の複合体形成過程であると結論づけた。

さらに我々は、マウス精巣抽出物を用いて Ktu と相互作用するタンパク質を免疫沈降とマスマクトロメトリーを用いて網羅的に調べた。その結果、相互作用する主要なタンパク質の一つとして Hsp70 が同定された。Hsp70 は有名な分子シャペロンである。Hsp70 をはじめとする分子シャペロンは、タンパク質の安定化、ホールディング促進、分解抑制などの一般的な機能を持っている。現在我々は、Ktu は Hsp70 の持つ一般的機能をダイニン腕形成過程によびこむ co-chaperone ではないかと考えている。以上まとめると、今回の研究により、Ktu と Hsp70 の存在下で、ダイニン腕の細胞質での複合体形成が促進されるという、ダイニン腕形成の新しいメカニズムが明らかとなった (Figure 2)。

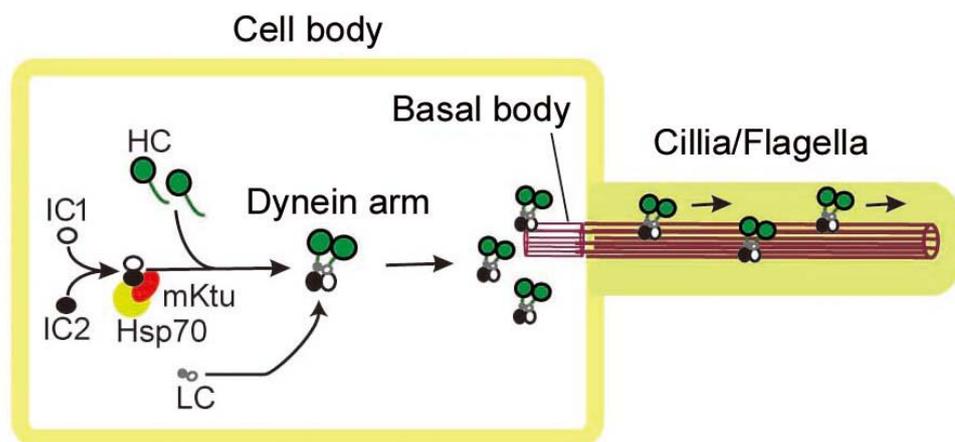


Figure 2. A proposed role of Ktu in dynein arm assembly

Ktu is required in the cytoplasm for pre-assembly of dynein arm complexes before they become assembled at their destined functional sites within the axoneme.

mKtu, mouse Kintoun; HC, dynein heavy chain; IC, dynein intermediate chain;

LC, dynein light chain; Hsp70, heat-shock protein 70

VI. まとめ

以上のように、メダカ左右軸変異体から始まった研究はヒト遺伝病の原因遺伝子の特定につながった。さらに運動性繊毛を有する単細胞生物からほ乳類までひろく保存された遺伝子の発見、および細胞質中のダイニン腕形成過程に光を当てる研究へと発展した。繊毛・鞭毛の形成は、IFTを中心に研究が大きく進展している。一方で、ダイニン腕形成過程は実態はこれまでほとんどわかっていなかった。現在、Ktu/PF13と相互作用するタンパク質の網羅的解析を進めており、ダイニン腕形成過程の理解が進むものと期待される。今後も小型魚類を用いた遺伝学は、基礎的な発生学研究にとどまらず、生命科学の広い分野に貢献していくものと期待している。

研究発表

口頭発表

1. H. Takeda: A mutant medaka fish identifies a novel cytoplasmic protein responsible for human primary ciliary dyskinesia. (シンポジウム講演) 第42回日本発生生物学会年会 2008年5月、徳島
2. H. Takeda: A mutant medaka fish identifies a novel cytoplasmic protein responsible for human primary ciliary dyskinesia. (Symposium) Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology, September 2008, Giens, France.
3. H. Takeda: A mutant medaka fish identifies a novel cytoplasmic protein responsible for human primary ciliary dyskinesia. (Plenary lecture) The 8th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, November 2008, Busan, Korea.
4. 武田洋幸: 左右軸から繊毛形成まで: メダカ変異体を用いた遺伝学的解析. (シンポジウム講演) 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同年会、2008年12月、神戸。

誌上発表

Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T., Loges, N. T., Hagiwara, H., Zhang, Q., Leblond, G., O'Toole, E., Hara, C., Mizuno, H., Kawano, H., Fliegau, M., Yagi, T., Koshida, S., Miyawaki, A., Zentgraf, H., Seithe, H., Reinhardt, R., Watanabe, Y., Kamiya, R., Mitchell, D. R. & **Takeda, H.** Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature* 456, 611-6. (2008).