

## 本論文の内容の要旨

### 論文題目

Complete loss of ciliary motility in *Ktu*-knockout mice; Insights into tissue-specific mechanisms for rotational polarity

(マウス *Ktu* 変異体を用いた繊毛の配向形成における  
繊毛の運動性の役割の解析)

氏名 松尾 萌

### 序論

繊毛は、環状に並んだ9本の周辺微小管と中央に2本の中心対微小管が配置された軸糸構造をもつ細胞小器官である。通常、繊毛は細胞周期の間期に、中心体の一つを基部として成長するものであり、脊椎動物のあらゆる細胞に生えている。しかし、回転や波動運動する構造に特殊化し、少数の器官にのみ存在する繊毛もある。これらの繊毛は、通常の不動の繊毛に対して運動性繊毛と呼ばれており、脳室上皮、気管、副鼻腔、輸卵管などに細胞あたり数十から数百本も存在する。また運動性繊毛の一つである鞭毛は精子の遊泳運動に不可欠なものである。運動性繊毛は、脳室内の髄液流の駆動や内臓の左右軸形成、卵の輸送など哺乳類の正常発生と生体維持に重要な役割を果たしている。繊毛の運動不全是、**primary ciliary dyskinesia (PCD)** とよばれる一連の症状を引き起こすことが知られており、気管支拡張症、慢性的な副鼻腔炎、不妊、水頭症、内臓逆位 (*situs inversus*) などが代表的な症状である。PCDは2万人に1人の確率で発症する遺伝性疾患である。

繊毛の運動不全是どのように**PCD**を引き起こすのか、その作用機序についてはまだ詳細には解明されていない。運動性繊毛の機能不全の原因は多様であるが、運動性の低下・喪失以外にも、繊毛の長さなど形態的な異常、細胞表面に生えている多数の繊毛の配向の乱れが原因となる。いずれの異常においても繊毛が協調して動くことができず、繊毛の作る流れが乱れたり停滞することによって、**PCD**が引き起こされると考えられる。繊毛の運動性と**PCD**の発生との関係は、これまで複数のノックアウトマウスにおいて報告されてきたが、繊毛の運動性が複数の器官で失われているノックアウトマウスを用いての解析は稀である。本研究では、繊毛の運動性不全是哺乳類の組織の形成や維持にもたらす影響を解明

するために、メダカ変異体から単離された Kintoun (Ktu) タンパク質に注目した。運動性繊毛に運動能力を付与するのは、繊毛を構成する微小管束の周囲に接着している軸系ダイニンである。クラミドモナスやメダカを用いた解析から、Ktu は細胞質に局在するが、その機能が失われた場合には繊毛の軸系ダイニン（主に外腕ダイニン）が大幅に減少することから、このタンパクは細胞質中で軸系ダイニンの複合体形成に関わると考えられている (Omran et al., 2008)。従って Ktu のノックアウトマウスを作成すれば、複数の軸系ダイニン種が欠損し、繊毛の運動性を完全に失った PCD の哺乳類モデルが得られると考えた。本研究では、Ktu の発現制御を *in vivo* と *in vitro* 実験系で調べるとともに、Ktu のノックアウトマウスの表現型を解析することによって、哺乳類の発生における運動性繊毛の役割および繊毛形成のメカニズムの一端を明らかにした。

## 結果と考察？

まず、マウス Ktu の発現様式が既に報告されているクラミドモナス PF13 やヒト KTU の知見と一致するかどうかをウェスタンブロッティング法と組織免疫染色法を用いて調べた。マウスの複数の臓器から抽出したタンパク質を用いてウェスタンブロッティングを行った結果、Ktu は運動性繊毛あるいは鞭毛を持つ器官である脳、気管支、輸卵管、精巣で発現が確認されたが、運動性繊毛を持たないその他の器官では確認できなかった。また、気管支と脳室壁に対して組織免疫染色を行った結果、Ktu は運動性繊毛を持つ細胞の細胞質全体に分布することがわかった。いずれも他の生物種で示された Ktu の発現の特徴と良く一致しており、マウスにおいても Ktu が運動性繊毛を持つ細胞でのみ発現することが裏付けられた。また Ktu は軸系ダイニン形成過程に関与するとされており、繊毛の形成過程に応じて細胞内局在が変化することが予想された。繊毛の発生過程に沿って細胞質内の Ktu の局在変化を詳細に観察する方法として、マウス気管支上皮細胞初期培養法 (MTEC) を用いた。まず、Ktu が運動性繊毛を誘導する最上位の転写因子 Foxj1 を発現する細胞でのみ細胞質全体で発現していたことから、MTEC においても Ktu の *in vivo* における発現は再現されていることを確認した。また軸系ダイニンの構成要素である DNAH5 に対するポリクローナル抗体を作成して免疫染色したところ、繊毛が生え始めた直後に DNAH5 は既に繊毛内に局在することがわかった。一方 Ktu は、これとほぼ同じ発達段階の繊毛を持つ細胞で既に細胞質全体で発現していた。さらに、繊毛が形成される前段階から Ktu は細胞質中に広く存在することも確認されたことから、繊毛形成前から Ktu が軸系ダイニンの形成のために発現を開始していることが明らかとなった。

次に 繊毛の運動性の喪失が個体・器官に与える影響 を調べるために、国立遺伝学研究所・発生工学研究室（相賀裕美子教授）と共同研究で Ktu ノックアウトマウスを作成し、その表現型解析を行った。Ktu ノックアウトマウス (Ktu<sup>-/-</sup>) では PCD の代表的な症状である左右逆位と水頭症が見られた。水頭症は生後 0 日 (P0) で確認され、側脳室の拡大はその後も進行し、生後 3 週間以内に死亡する個体が多かった。なお、Ktu<sup>-/-</sup>における水頭症

の発症時期は既に報告のある軸系ダイニン欠損ノックアウトマウスよりも数日早かった。また心臓、脾臓、胃などの器官の配置が鏡像対称になる左右逆位が約 40%の *Ktu*<sup>-/-</sup>個体で観察された。これらの表現型が繊毛の運動異常によるものかどうかを確認するために、気管支上皮と脳室の繊毛に対して外腕ダイニンの免疫染色を行った。その結果、繊毛の形状や細胞内の密度などは野生型と *Ktu*<sup>-/-</sup>で差がなかったが、*Ktu*<sup>-/-</sup>の繊毛からは外腕ダイニン重鎖 DNAH5 と中間鎖 DNAI1 のシグナルが失われていた。他の軸系ダイニン構成要素 DNAI2 および DNAH9 でも同様の結果が得られた。これらの結果より、クラミドモナスの *Ktu* ホモログ *pf13* 欠損株及びヒトの *KTU* 欠損患者同様に、マウスにおいても *Ktu* は軸系ダイニン（主に外腕ダイニン）の形成に必須であることがわかった。実際に気管支上皮細胞と側脳室の運動性繊毛の運動を観察したところ、*Ktu*<sup>-/-</sup>においては、どちらの器官でも繊毛の運動が全く見られなかった。これまでに報告されている軸系ダイニンのノックアウトマウスでは、繊毛の運動性は低下するものの、完全に欠失することではなく、水頭症の発症も *Ktu*<sup>-/-</sup>より遅れる (Ibanez-Tallon et al., 2002)。このことから繊毛の運動性低下の程度の違いが水頭症の発症時期に違いをもたらすと考えられた。以上より、*Ktu*<sup>-/-</sup>は典型的で重篤な PCD を発症し、繊毛の運動性の役割を詳細に解析するモデル系として有用であることがわかった。

繊毛の運動によって効果的に器官内に水流を発生させるためには、組織の発生過程で細胞からはえる複数の繊毛の運動方向を一方向に揃える必要がある。繊毛の方向は、まず繊毛の基部にある基底小体が細胞質内から浮上し、細胞のアピカル面に配置された後、発生が進む過程で一方向に揃う。繊毛運動の方向は、繊毛の基部に存在する basal foot の方向と対応することが知られている（図 1A）。これまでに basal foot の方向の決定には組織の平面極性(planar polarity) と繊毛の運動性の双方が関わることが報告されているが、いまだ知見が乏しく、種間および組織間で共通のメカニズムが存在するかどうかも分かっていなかった。例えば、マウスでは脳室上皮の繊毛の basal foot の方向の決定に繊毛の運動性が重要だと報告されているが (Guirao et al., 2010)、マウスの気管支では平面極性が強い影響を持つとされている (Vladar et al., 2012)。しかし、いずれの研究も繊毛の運動性のみが完全に喪失したノックアウトマウスを用いていないため、繊毛の運動性そのものの関わりの程度は不明であった。そこで繊毛の運動性が繊毛の配向決定をどのように支配しているかを明らかにするために、*Ktu*<sup>-/-</sup>の脳室壁と気管支上皮の繊毛を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察し、basal foot の方向を解析した。なお、平面極性を制御する PCP 経路の因子の一つである Vangl1 の細胞内局在を気管支上皮と脳室上皮細胞に対して組織免疫染色で観察した結果、*Ktu*<sup>-/-</sup>においても正常に細胞の後方に局在していた。このことから平面極性そのものは *Ktu*<sup>-/-</sup>でも正常に形成されることが確認された。次に繊毛の配向を basal foot の方向を指標として解析した結果、脳室上皮細胞においては一細胞内における basal foot の配向が乱れていることが判明した。この結果から、脳室では繊毛の配向の決定に繊毛の運動性が大きな役割を果たすことを裏付ける結果となった。同様に、気管支上皮の繊毛の basal foot の方向も観察

した結果、平均角に対する集中度はやや低下したが、細胞内の配向に大きな乱れはないことがわかった (図 1-B)。これらの結果から、**basal foot**の方向の決定における繊毛の運動性に対する依存度は、気管支と脳室で大きく異なることが示唆された。

## 結論

本研究の解析を通して、*Ktu*<sup>-/-</sup>が典型的な PCD の表現型を示すノックアウトマウスであることが明らかとなった。気管支上皮細胞と脳室上皮細胞双方で繊毛の運動性が完全に失われるノックアウトマウスは報告例がなく、*Ktu*<sup>-/-</sup>が PCD のモデル動物として有用であることが示された。また *Ktu*<sup>-/-</sup>を用いた解析により、運動性繊毛の配向の決定メカニズムにおける繊毛の運動性の役割が器官によって異なることが示された。すなわち、脳室では繊毛の運動性に依存するが、気管支では依存しないことが明らかとなった (図 1-C)。このような違いは、繊毛形成後に組織表面の形態が大きく変わる組織であるかを反映すると考えられる。脳室のように組織形態が大きく変わる組織では、繊毛形成後も繊毛運動が作る流れやそれ以外の細胞外の流れに応答しながら繊毛が方向を揃え続け、一方向の流れを維持する必要があるからだ。*Ktu*<sup>-/-</sup>を用いることにより、運動性繊毛の器官特異的配向メカニズムの理解が進むことが期待される。

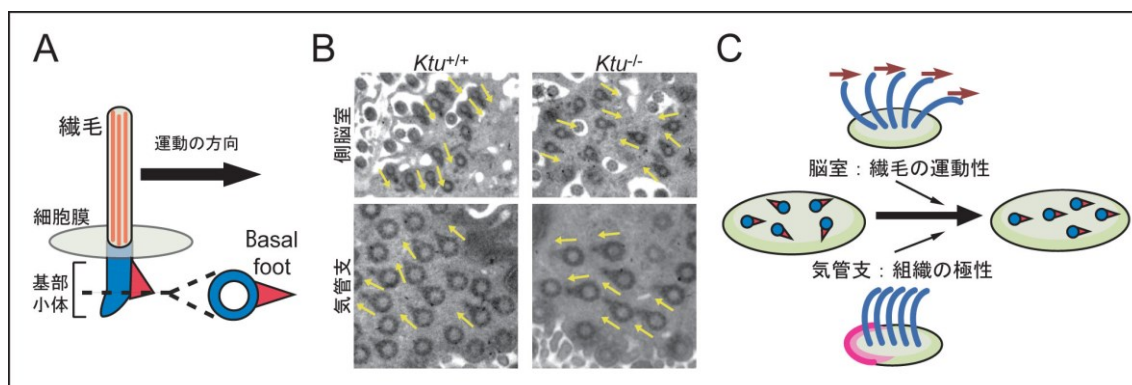


図 1. (A) 繊毛と基部の構造の模式図 (B) 側脳室壁と気管支上皮の繊毛の TEM 像。(黄色矢印: basal foot の方向) (C) 脳室と気管支で異なる basal foot 配向決定の仕組み。