

論文の内容の要旨

論文題目

The roles of PIH-family proteins in vertebrate motile cilia

(脊椎動物の繊毛運動性に関与する
PIH ドメインタンパク質ファミリーの機能解析)

氏名

山口 博史

[序論]

真核生物の繊毛・鞭毛は細胞表面から突出した細胞小器官であり、原生生物からヒトに至るまで保存されて存在する。脊椎動物では、繊毛・鞭毛の運動が多くの器官で正常発生と生体維持に重要な役割を果たしている（気管の異物除去、内臓の左右軸形成、卵の輸送、精子の運動など）。したがって、繊毛の運動不全は、気管支拡張症、内臓逆位、不妊などの疾患を含む PCD (primary ciliary dyskinesia; 原発性線毛機能不全症候群) の原因となる。

繊毛運動は、繊毛内のモータータンパク質である軸糸ダイニンが駆動する。鞭毛・繊毛の内部構造（軸糸）は、9つの周辺微小管が円筒状にならんだ構造を持ち、軸糸ダイニンは各周辺微小管上に結合する。軸糸ダイニンには主に8種類のサブタイプが存在し、OAD (outer arm dynein; 外腕ダイニン) と、a から g までの7種類の IAD (inner arm dynein; 内腕ダイニン) と呼ばれる。それぞれの軸糸ダイニンは複数のタンパク質から成る巨大な複合体である。単細胞緑藻類クラミドモナスを用いた研究からは、OAD が 15 以上のサブユニットから構成されることが知られている。

繊毛・鞭毛の構築に際して、これらの軸糸ダイニンはまず細胞質中で合成され、その後繊毛内へ輸送される。軸糸ダイニンのサブユニットは、細胞質中で予め組み立てられないと、繊毛内へ輸送されない。近年、この細胞質中での組み立てにはそれを助ける因子、DNAAF (dynein axonemal assembly factor) が必要であることが分かった。しかし、異なるサブタイプの軸糸ダイニンが細胞質中でどのように組み立てられているのか、また、それぞれの軸糸ダイニンサブタイプが繊毛運動にどのように寄与するのかについては、未だに明らかになっていない。

これまでに、クラミドモナスの2つのPIHタンパク質 (KTU/PF13, MOT48) がDNAAFとして異なる軸糸ダイニンサブタイプの組立を制御することが報告されている。しかし、酵母で発見されたPIHタンパク質 (Pih1) は、snoRNPやRNAポリメラーゼIIなどの複合体形成に関与しており、PIHタンパク質ファミリーの機能には不明な点が多い。そこで本研究では、小型魚類ゼブラフィッシュを用いて、脊椎動物の4種類のPIHタンパク質 (PIH1D1, PIH1D2, KTU/DNAAF2, TWISTER/PIH1D3) について変異体を作製し、包括的な機能解析を行った。PIH1D1, PIH1D2はこれまで繊毛・鞭毛に関連する解析が無く、これが初めての報告になる。KTU/DNAAF2, TWISTER/PIH1D3は既にPCDの原因遺伝子として知られるが、機能の詳細な比較は行われていなかった。本研究では、ゼブラフィッシュ精子にcryo-ET (cryo-electron tomography; 低温電子断層撮影法) を初めて適用し、作製した変異体の軸糸ダイニンサブタイプを観察した。その結果、各変異体で異なる軸糸ダイニンサブタイプが欠損することを発見し、各PIHタンパク質が異なる軸糸ダイニンサブタイプの構築に必要であることを明らかにした。

[結果と考察]

1. PIHタンパク質は運動性繊毛組織で発現する

ゼブラフィッシュのゲノムをBLAST検索した結果、4種類のPIHタンパク質遺伝子 (*pih1d1*, *pih1d2*, *ktu*, *twister*) を同定した。これらの遺伝子について発現解析を行った結果、すべてのPIHタンパク質遺伝子が運動性繊毛を有する組織 (クッセル胞、神経管底板、前腎管、精巣など) で発現することが分かった。また、組織間で発現するPIHタンパク質遺伝子の組合せに違いは観察されなかった。したがって、PIHタンパク質は運動性繊毛に関与することが示唆された。精子では、頭部と鞭毛を単離したところ、PIHタンパク質はすべて精子頭部のみ検出され、鞭毛中には検出されなかった。したがって、PIHタンパク質は鞭毛の構成タンパク質ではないことが分かった。既知のDNAAFは、これと同様に繊毛・鞭毛中ではなく細胞質中に局在することが分かっている。

2. PIHタンパク質遺伝子の欠損によって精子の運動不全が引き起こされる

ゲノム編集技術 (TALEN, CRISPR/Cas9) を用いて、各PIHタンパク質を欠損するゼブラフィッシュ変異体を作製した。まず、各変異体の精子の運動性を観察したところ、*pih1d1* 変異体では鞭毛打頻度が低下し、*twister* 変異体の精子は運動性を失っていた。一方、*pih1d2* 変異体と *ktu* 変異体の精子は野生型と変わらない運動性を示した。そこで、これらの遺伝子間の補償機能を疑い、*pih1d2;ktu* 二重変異体を作製した。*pih1d2;ktu* 二重変異体では、精子鞭毛の後方部分は運動性を失っていたが、前方部分では鞭毛打頻度が増加していた。したがって、4種類すべてのPIHタンパク質遺伝子が精子の正常な運動に必要であることが分かった。また、各変異体で精子は異なるタイプの運動異常を示しており、PIHタンパク質が精子運動に対してそれぞれ異なる機能を持つことが示唆された。

3. PIH タンパク質遺伝子の変異体ではそれぞれ異なる軸糸ダイニンが失われていた

変異体の精子鞭毛の構造を詳細に観察するために、cryo-ET を初めてゼブラフィッシュ精子に適用した。cryo-ET では、急速凍結によって試料を非晶質の氷の中に固定するため、分子の構造が保たれたまま試料を観察できる。また、異なる角度からの撮影像を逆投影することで、試料の三次元構造を解析できる。

野生型の精子軸糸の構造は、クラミドモナスなどの既知の軸糸と類似しており、8種類の軸糸ダイニンサブタイプ (OAD, IAD a-g) をゼブラフィッシュ軸糸構造に割り当てることができた。*pih1d1* 変異体では IAD c の構造の欠損に加えて、ウェスタンプロットティングで *Dnai1* (OAD サブユニット) の異常が観察された。*pih1d2* 変異体では、軸糸ダイニン構造の欠損は観察されなかったが、ウェスタンプロットティングで *Dnai1* の異常が観察された。*ktu* 変異体では IAD c の構造に欠損が観察された。*twister* 変異体では OAD, IAD c, d, g の構造の欠損が観察された。*pih1d2;ktu* 二重変異体では、運動性を失っていた後方部分で、OAD, IAD b, c, e の構造の欠損が観察された。したがって、PIH タンパク質遺伝子の欠損によって、それぞれ異なる軸糸ダイニンサブタイプが失われることが分かった。各変異体の精子の運動異常は、異なる軸糸ダイニンサブタイプの欠損を反映していると考えられる。

4. クッペル胞繊毛は精子とは異なる運動不全を示す

魚類クッペル胞は哺乳類のノードの相同器官であり、繊毛の回転運動が生み出す左向き水流が胚の左右軸を決定する。クッペル胞繊毛の運動性を観察したところ、*pih1d1* 変異体では繊毛の回転頻度が低下していた。*twister* 変異体と *pih1d2;ktu* 二重変異体では、繊毛は運動性を失っていた。*pih1d2* 変異体と *ktu* 変異体では、繊毛の回転頻度の低下に加えて、不規則な運動をする繊毛、運動性を失った繊毛が観察された。したがって、クッペル胞でもすべての PIH タンパク質遺伝子が繊毛の正常な運動に必要であることが分かった。興味深いことに、*pih1d2* 変異体と *ktu* 変異体では、精子の運動は正常なのに対し、クッペル胞繊毛は運動異常を示した。*pih1d2* 変異体と *ktu* 変異体の組織特異的な表現型は、組織間で異なる繊毛・鞭毛の構成を反映している可能性がある。

5. ゼブラフィッシュは組織間で異なる軸糸ダイニンサブタイプを持つ

DNAH (dynein axonemal heavy chain; 軸糸ダイニン重鎖) は軸糸ダイニンの最も巨大なサブユニットであり、各軸糸ダイニンサブタイプはそれぞれ異なる DNAH を持つ。組織間で繊毛・鞭毛の構成が異なるかどうか明らかにするために、ゼブラフィッシュ DNAH 遺伝子の発現解析を行った。精巣とクッペル胞を比較すると、*dnah8* (OAD サブユニット) と *dnah3* (IAD サブユニット) が精巣で特異的に発現していた一方で、*dnah11* (OAD サブユニット) はクッペル胞で特異的に発現していた。したがって、ゼブラフィッシュにおける組織特異的な軸糸ダイニンサブタイプの構成が示唆された。

[結論]

本研究から、脊椎動物の4種類すべてのPIHタンパク質（既知のKTU/DNAAF2, TWISTER/PIH1D3だけでなく、PIH1D1, PIH1D2も含む）が、それぞれ異なる軸糸ダイニンの構築に必要であることが明らかになった。特にOAD、IAD cは複合体形成にすべてのPIHタンパク質を必要とする複雑なプロセスを持つことが示唆された。一方、IAD a, fは本研究のいずれの変異体でも欠損せず、PIHタンパク質と独立した複合体形成を行うか、複数のPIHタンパク質によって複合体形成が補償されている可能性が考えられた。また、本研究から精子とクッペル胞繊毛で異なる軸糸ダイニンの組成が明らかになった。繊毛・鞭毛は器官で異なる運動パターンを示すため、器官特異的な軸糸ダイニン組成はこれと何らかの関係を持つ可能性が考えられた。

本研究では、cryo-ETを用いて初めてゼブラフィッシュ精子の詳細な構造解析を行った。これまで脊椎動物の繊毛・鞭毛でゲノム編集とcryo-ETによる詳細な構造解析を組み合わせた解析は行われていなかったため、今後はゼブラフィッシュ精子が新たな脊椎動物の繊毛・鞭毛モデルになることが期待される。