

研究報告書

「繊毛が神経回路形成・維持・機能発現に果たす役割とその分子メカニズム」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 大森 義裕

1. 研究のねらい

繊毛は、細胞表面から突出した構造体で微小管を軸にもつ細胞内小器官である。クラミドモナスのような単細胞生物から、線虫、昆虫、脊椎動物に至るまで広く保存されている。脊椎動物では、精子の鞭毛や、気管上皮の繊毛などの「動く繊毛」が古くから研究されてきた。しかし、近年、神経細胞に存在する繊毛にはレセプター分子が局在し、「アンテナ」の役割を担っていることが明らかになり注目されている。中でも、神経細胞の繊毛は「動かない繊毛」の好例であり、その分子メカニズムには不明な部分が多い。神経細胞において繊毛機能は重要であり、神経細胞における繊毛機能の異常は神経変性疾患や、精神遅滞、摂食行動の異常による肥満・糖尿病を引き起こす。例えば、網膜における繊毛異常は、網膜色素変性症など失明に至る神経変性疾患を引き起こす。また、繊毛異常による疾患であるバルデー・ビードル症候群やアストロム症候群では、精神遅滞、肥満や糖尿病が見られる。これは、発生期の繊毛異常による脳の発達異常や、視床下部摂食中枢の繊毛の異常により過食を引き起こす可能性が考えられている。これらのことから中枢神経系における繊毛の障害が神経回路の形成に異常を引き起こすことが予想される。

本研究提案では、まず繊毛が神経回路の維持に果たす役割を解明するために、網膜における視細胞変性をモデルとして解析を行う。組織特異的ノックアウトマウスの解析やプロテオミクス解析、ゼブラフィッシュを用いた遺伝子ノックダウンなどの手法を用いて、繊毛が神経細胞の維持に果たす役割を解明する。また、神経回路形成に繊毛が果たす役割を解明するために、網膜を含む中枢神経系の発生をモデルに解析を行う。更に、神経回路における繊毛の異常が動物の行動にどのような影響を与えるかを調べるために、視床下部ニューロンにおける繊毛の機能と摂食行動に焦点を当てて解析を行う。本研究を進めることにより、神経回路における繊毛の異常が関与する視覚障害や肥満、糖尿病などの疾患に対する発症機構の解明や治療法の確立に寄与することが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

私たちは、網膜視細胞の運命決定因子である Otx2 の網膜特異的欠損マウスの網膜におけるマイクロアレイ解析から視細胞特異的な発現を示す機能未知キナーゼ Mak を同定した。さらに、私たちは、Mak が網膜において視細胞特異的に発現し、視細胞の繊毛の長さ制御に重要であることを見出した。また、Mak 欠損マウスでは網膜色素変性症などの網膜変性疾患に見られる進行性の視細胞脱落が観察された。このことから Mak が視細胞の繊毛形成に重要であり、視細胞の生存に必須な遺伝子であることがわかった。脊椎動物には Mak のパラログである ICK が存在し、ICK は発達期の中枢神経系に広く発現する。私たちは、全身で ICK を欠損するマウスと中枢神経特異的 ICK 欠損マウス、網膜特異的 ICK 欠損マウスの 3 系統を作成し解析を行った。これらの研究から ICK は繊毛形成に重要であり、Shh カスケードを介して網膜や脳の発達に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、私たちは ICK が、繊毛の先端に局在し、キネシンや IFT 複合体など繊毛内輸送に関係する因子の折り返し機構に必須であることを見出した。現在、繊毛機能による摂食行動の制御や肥満との関連について研究を進めている。

(2) 詳細

(1) 繊毛キナーゼ Mak は視細胞繊毛の長さ制御と視細胞の生存に必須である

繊毛は、細胞表面から突出した構造体で微小管を軸にもつ。繊毛には、レセプター分子が局在し、「アンテナ」の役割を担っている(図1)。

私たちは、網膜視細胞の運命決定因子である Otx2 欠損マウスの網膜における発現プロファイルの解析を行った(文献2)。網膜特異的 Otx2 欠損マウスでは、視細胞がアマクリン細胞に運命転換する。この解析から、機能未知キナーゼ Mak が Otx2 欠損網膜で発現が著しく

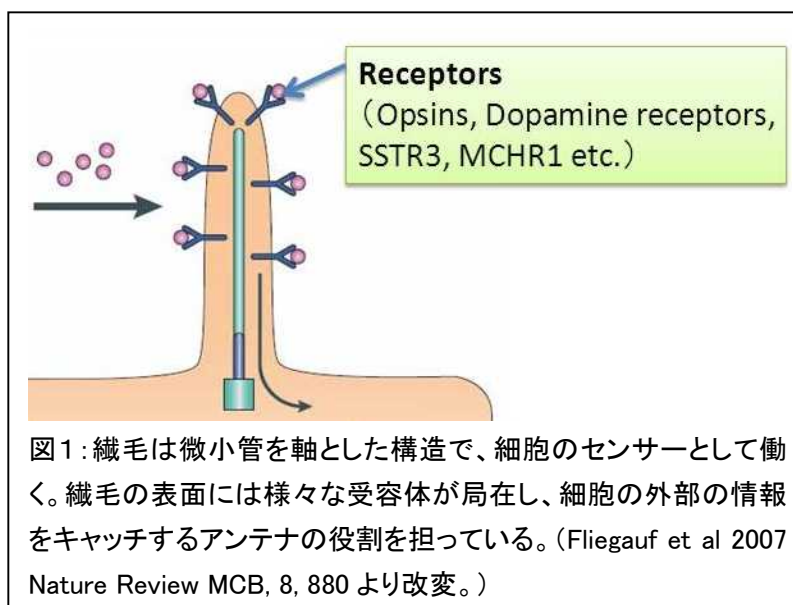


図1: 繊毛は微小管を軸とした構造で、細胞のセンサーとして働く。繊毛の表面には様々な受容体が局在し、細胞の外部の情報をキャッチするアンテナの役割を担っている。(Fliege et al 2007 Nature Review MCB, 8, 880 より改変。)

低下することを見出した。更に、in situ ハイブリダイゼーション解析により、Mak が網膜視細胞に特異的に強く発現することを見出した。Mak に対する抗体を作製し視細胞における局在を調べたところ、Mak は視細胞の繊毛に局在することがわかった(図2)。Mak の網膜における機能を調べるために、Mak 欠損マウスの網膜の免疫組織化学的解析を行ったとこ

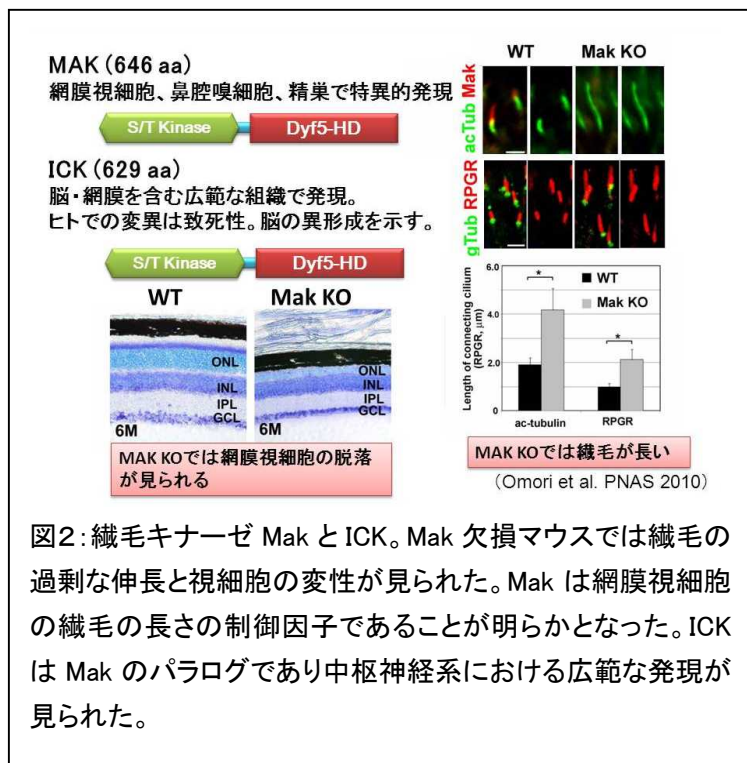
る、Mak 欠損マウスの視細胞では繊毛が過剰に伸長することが観察された(図2)。更に、Mak 欠損マウスでは、ヒトの網膜色素変性症に酷似した進行性の視細胞の脱落が見られた。これらのことから、Mak は視細胞の繊毛の長さを制御する因子であり、網膜色素変性症の発症に関与する可能性が示唆された。一方、網膜色素変性症の原因遺伝子がコードする RP1 蛋白質は微小管結合蛋白質であり、視細胞の繊毛に局在する。私たちは Mak がリン酸化するコンセンサス配列が RP1 に存在することを見出し、in vitro キナーゼアッセイにより Mak が RP1 をリン酸化することを明らかにした。RP1 の過剰発現は、繊毛を過剰に伸長させるが、Mak の発現により過剰な伸長が抑制された。視細胞では、Mak と RP1 のバランスにより、繊毛長を制御している可能性が示唆された(文献3)。

(2)ICK は網膜前駆細胞や神経前駆細胞の繊毛の形成を制御する

脊椎動物には、Mak のパラログである ICK が存在する。ICK の変異は、endocrine-cerebro-osteodysplasia (ECO)と呼ばれる繊毛関連疾患を引き起こす。

私たちは、in situ ハイブリダイゼーション解析とノザン解析により ICK の発現パターンを調べた。ICK は発生期中枢神経系に高い発現を示すことがわかった。ICK に対

する抗体を作製し、繊維芽細胞における局在を調べたところ、ICK は繊毛の先端部分に局在することが観察された。中枢神経系における ICK の機能を調べるために、ICK の遺伝子欠損マウスを作製し解析を行った。まず、ICK のキナーゼドメインをコードする exon3 を loxP 配列で挟み、Cre リコンビナーゼ依存的に ICK の機能を欠失するマウス(ICK flox マウス)を作製した。このマウスを用いて、3種類の ICK 遺伝子欠損マウスを作製した(図3)。まず、ICK flox マウスに CAG-Cre マウスを掛け合わせることで ICK を全身で欠損するマウス(ICK KO)を作出した。また、発生期の網膜において Cre を発現する Dkk3-Cre マウスを用いて、ICK を網膜で欠損するマウス(ICK Dkk3 CKO)を作製した。ICK flox マウスに発生期中枢神経系で Cre を発現する Nestin-Cre マウスを掛け合わせることで、ICK を中枢神経系で欠損するマウス(ICK Nestin CKO)を作製し解析を行った。



ICK を全身で欠如する ICK KO マウスは、周産期致死であった。また、多指、骨形成異常、肺の形成異常が見られた。これらは、Sonic hedgehog (Shh) や Indian hedgehog (Ihh) カスケードの異常を示すものと考えられる。更に、脳室の拡大、水頭症の症状が見られた。E15.5 において脳室表面に存在する繊毛が著しく減少していることがわかった。

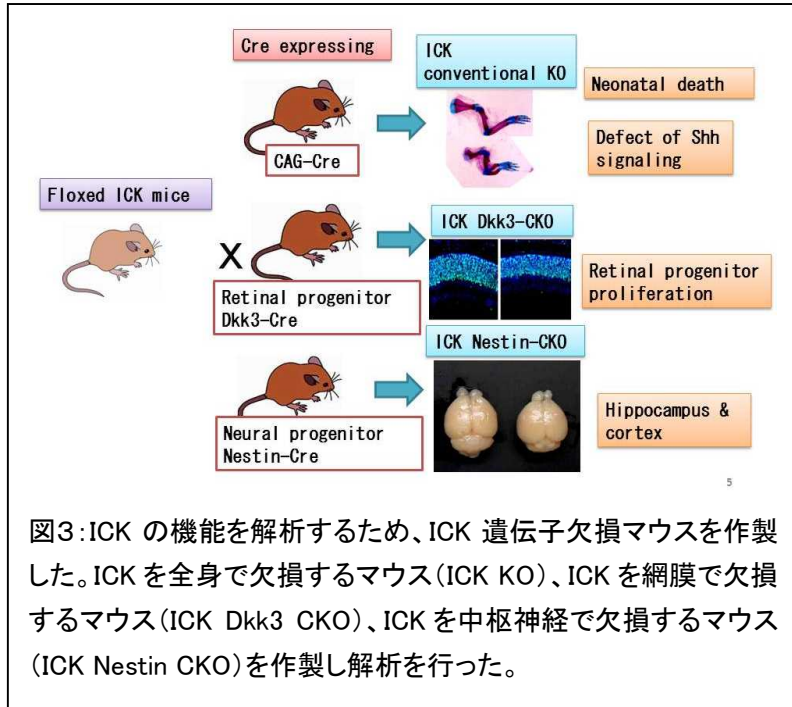


図3:ICK の機能を解析するため、ICK 遺伝子欠損マウスを作製した。ICK を全身で欠損するマウス(ICK KO)、ICK を網膜で欠損するマウス(ICK Dkk3 CKO)、ICK を中枢神経で欠損するマウス(ICK Nestin CKO)を作製し解析を行った。

さらに ICK KO の MEF を用いて ICK の繊毛形成への影響を調べた。意外なことに、ICK KO 由来の MEF では繊毛の長さが短くなることがわかった。この結果は、Mak KO では繊毛長が過剰であったことを考えると興味深い。さらに、繊毛に局在する Shh カスケードに関与する分子(Smo, Gli)などの局在の変化を精査した。ICK KO マウスの MEF では、Shh シグナルに依存した Shh 関連因子の繊毛における局在化に異常が見られることから、ICK は Shh シグナルに重要な働きをもつ因子であることが明らかとなった。

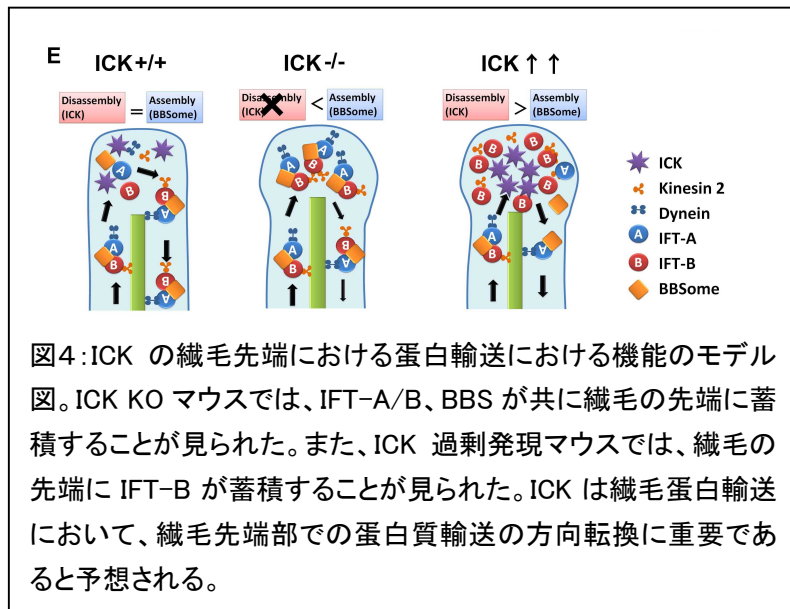
繊毛では、繊毛内輸送(intraflagellar transport, IFT)と呼ばれるキネシンとダイニンをモーターとする輸送機構が発達している。私たちは、ゼブラフィッシュ変異体の解析により、Kif3b, Kif3c, Kif17 などの複数のキネシンが組織により、役割分担を行い、正常な繊毛形成に重要な役割を果たしていることを証明した(文献1)。次に、私たちは、ICK による IFT 制御の可能性を探索した。ICK KO の MEF を使って、繊毛における IFT とその関連分子の局在を調べた。ICK KO マウスでは、IFT-A/B 複合体、BBS が共に繊毛の先端に蓄積することが観察された。逆に、ICK を過剰に発現させた細胞では、繊毛の先端に IFT-B 複合体のみが蓄積することが見られた。この結果と、ICK が繊毛の先端部分に局在することを考え合わせると、ICK は繊毛蛋白輸送において、繊毛先端部での蛋白質輸送の方向転換に重要であることが予想される(図4)。この時の分子メカニズムについても、解析を行った。ICK のリン酸化部位と予想される配列を IFT のモーター蛋白質である Kif3a の C 末端に見出した。さらに、ICK がこの部位をリン酸化することを in vitro キナーゼアッセイにより証明した。このリン酸化部位に対するリン酸化抗体を作成し、この抗体を用いて細胞内局在を観察したところ、リン酸化された Kif3a は繊毛の先端部分に局在することがわかった。ゼブラフィッシュを用いたレスキュー実験において、ICK リン酸化部位を含む Kif3a の C 末端領域の Ser/Thr 残基が繊毛形成に重要であることを見出している。これらの結果から、私たちは ICK が繊毛の先端において Kif3a をリン酸化するメカニズムを明らかにした。

生後の中枢神経系における ICK の機能を調べるため、ICK Dkk3 CKO と ICK Nestin CKO

の解析を行った。網膜特異的な ICK 遺伝子欠損マウスである ICK Dkk3 CKO は、外見上正常に生育した。しかし、ICK Dkk3 CKO マウスでは網膜の厚みが野生型よりも薄いことがわかった。また、網膜神経細胞の幹細胞である神経上皮の繊毛の数が減少していることを見出した。更に、網膜形成期における細胞分裂が少ないことが観察され、ICK は繊毛形成を通じて網膜形成期の細胞周期を制御している可能性が示唆された。

一方、中枢神経系で ICK を欠損する ICK Nestin CKO は小脳の未発達、運動失調をはじめとした表現型を示した。発達期の小脳や海馬において、繊毛形成不全が見られた。興味深いことに、成長した脳における繊毛の形成は、野生型と違いが見られなかった。また、

ICK Nestin CKO の成体脳における繊毛型 GPCR の繊毛への局在にも異常は見られなかった。このことから、ICK は中枢神経系の発生期の繊毛形成に重要ではあるが、発達後の繊毛の維持には重要ではないことが示唆された。これまでに、発生段階特異的に繊毛形成を制御する因子は知られておらず、ICK は新しいカテゴリーの繊毛形成因子と考えられる(文献4)。



3. 今後の展開

私たちの発見の後、複数の研究者によって、網膜色素変性症患者のゲノム解析により、Mak の遺伝子変異がヒトにおいても進行性の視細胞の脱落を引き起こすことが証明され、新しい網膜色素変性症の発症メカニズムとして注目されている。また、キナーゼである Mak や ICK の活性は、何らかのシグナルに制御されている可能性が考えられる。これらの繊毛キナーゼがどのようなシグナルの制御をうけて繊毛形成を制御しているのか、といった点を明らかにすることも今後の課題である。

一方、脳の神経細胞には繊毛が発達し摂食行動などに重要な働きをしていることが予想されているが、その機能はわかっていない。私たちは繊毛に局在するレセプターを複数同定しており、今後、繊毛が神経細胞においてどのような役割を担っているのかを明らかにしたい。

4. 評価

(1) 自己評価

私が、さきがけ研究をスタートさせたとき、3つの狙いがあった。1つは、繊毛形成の分子メカニズムを解明すること、2つめは、繊毛機能の神経回路形成への関与を明らかにすること、

3つめは、繊毛機能が動物の行動を制御する機構を解明することである。

1つめの課題に関しては、これまでの研究をさらに掘り下げ、Mak が視細胞の繊毛の長さ制御を行うことにより、視細胞の生存を制御する因子であることを突き止め、そのメカニズムの中で Mak が RP1 のリン酸化を直接行うことを証明した。また、Mak のパラログである ICK が繊毛内モーターである Kif3a をリン酸化し、繊毛内輸送において、繊毛の先端における折り返し機構を制御する仕組みを解明した。更に、Mak と相互作用する蛋白質群のプロテオミクス解析により Mak のリン酸化ターゲット候補蛋白質を同定し、現在解析を進めている。

2つ目の課題に関しては、ICK のコンディショナル・ノックアウトマウスの解析から、ICK が大脳皮質や小脳、網膜の正常な形成に必須の因子であることを見出し、ICK が shh カスケードにおいて重要な役割を果たしていることを明らかにした。同時に、ICK が神経系において発生段階特異的に繊毛形成を制御する因子であることを見出した。これまでに ICK 以外には、そのような性質を持つ繊毛形成因子の報告はなく、ICK は新しいカテゴリーの繊毛形成因子として重要になると考えている(論文リバイス中)。

3つ目の課題に関しては、摂食行動に関与する繊毛局在受容体を新たに見出し、遺伝子改変マウスを用いて解析をすすめている。

初めの2つのテーマについては、当初、思っていた以上に大きな展開となり、成果を上げることに成功したと考えている。2つ目のテーマが予想以上に時間がかかったため、3つ目のテーマについては、さきがけの期間内に完了することができなかつたのは残念であるが、近いうちに結果をまとめて発表ができるよう準備すすめている。

また、研究環境という意味では、さきがけの期間中に、私は新しいポジションを得ることができた。私のさきがけ研究がスタートした時点では、(財)大阪バイオサイエンス研究所の副部長であったが、2013年から大阪大学蛋白質研究所の准教授としてより充実した環境で研究を行っている。このことも、さきがけ研究のおかげであると大変感謝している。

今後は、さきがけ研究で得られた成果をもとに、さらに中枢神経系を中心とした繊毛研究を発展させたいと考えている。また、さきがけ研究から展開した研究成果をもとに、今後も関連学会における活動や、教育活動、一般市民への講演活動なども積極的に行いたい。

(2) 研究総括評価

神経細胞の繊毛にはレセプター分子が局在し、またその異常は各種の神経疾患・行動異常や肥満・糖尿病に関わることが認識されるようになってきたが、その分子メカニズムは不明であった。本研究では遺伝子改変マウスと遺伝子ノックダウンゼブラフィッシュを使って、プロテインキナーゼ Mak および ICK が神経細胞繊毛に局在し、その形態制御に重要であることを明らかにした。さらに Mak がリン酸化する分子を同定して解析を進めている。ICK についてもコンディショナル・ノックアウトマウスおよびゼブラフィッシュ変異体の解析により、繊毛内の分子輸送系への関わりを明らかにするとともに ICK が神経系において発生段階特異的に繊毛形成を制御することを見出した。これらは大きな成果と認められる。今後、両キナーゼ下流の分子メカニズムをさらに確立し、関係する神経回路を同定するとともに、キナーゼ上流のリセプター群との関係も明らかにしてゆくことにより、各種の神経繊毛関連疾患の治療・対処法に手掛かりが得られることが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Zhao C, Omori Y , Brodowska K, Kovach P, Malicki J. Kinesin-2 family in vertebrate ciliogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012,109(7):2388-2393
2. Omori Y , Katoh K, Sato S, Muranishi Y, Chaya T, Onishi A, Minami T, Fujikado T, Furukawa T. Analysis of transcriptional regulatory pathways of photoreceptor genes by expression profiling of the Otx2-deficient retina. PLoS One 2011,6(5):e19685
3. Omori Y , Chaya T, Katoh K, Kajimura N, Sato S, Muraoka K, Ueno S, Koyasu T, Kondo M, Furukawa T. Negative regulation of ciliary length by ciliary male germ cell-associated kinase (Mak) is required for retinal photoreceptor survival. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010, 107(52):22671-22676
4. Chaya T, Omori Y , Kuwahara R, Furukawa T, ICK is essential for cell type-specific ciliogenesis and the regulation of ciliary transport. EMBO J 2014 in press

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

総説等の出版物

大森義裕、「古くて新しいオルガネラ、「繊毛」研究の広がり」、バイオメディア 2014, 3月号 in press

大森義裕、細胞工学「一枚の写真館-ニューロンに生える繊毛:細胞のアンテナとしての機能」2012, 4月号 31(4) pp399

大森義裕、古川貴久「繊毛キナーゼ Mak と微小管結合タンパク質 RP1 による繊毛の長さ調節機構」細胞工学 2011, 30(5) 5月号 536-537

加藤君子、荒木章之、**大森義裕**、古川貴久、「網膜視細胞の機能構築」実験医学、2011, 29(4) 3月号, 514-520

著書

Omori Y, Furukawa T. Structure and development of the photoreceptor ribbon synapse. **Vertebrate Photoreceptors: Functional Molecular Bases** Springer Japan 2014 in press.

主な学会発表

(国際学会)

2013 年 6 月 27 日 Shiran Kaikan, Kyoto

The 8th International Symposium of the Institute Network, 招待講演

Yoshihiro Omori, Taro Chaya, Takahisa Furukawa

Functional role of ciliary kinases in cilia development and human disease

2013 年 6 月 18 日 Riken CDB, Kobe

The 25th CDB Meeting, Cilia and Centrosomes 招待講演

Yoshihiro Omori, Taro Chaya, Takahisa Furukawa

Ciliary Kinase ICK is required for Ciliogenesis in Neural Progenitor Cells and Hedgehog Signaling

2012 年 5 月 24 日 Institute of Child health, London

Cilia in development and disease

Yoshihiro Omori, Taro Chaya, Kimiko Katoh, Takahisa Furukawa

Photoreceptor degeneration caused by defects of a ciliary kinase

2011 年 11 月 13 日 Washington DC convention center

北米神経科学会 年会 2011

Yoshihiro Omori, Taro Chaya, Kimiko Katoh, Takahisa Furukawa

Antagonistic regulation of ciliary length by ciliary kinase Mak and RP1 is required for photoreceptor survival

(国内学会)

2013 6 月 21 日 京都国際会館

日本神経科学会大会 シンポジウム 招待講演

大森義裕、茶屋太郎、古川貴久

繊毛キナーゼ ICK は神経前駆細胞における繊毛形成とヘッジホッグシグナル伝達に重要である

Ciliary kinase ICK is essential for ciliogenesis in neural progenitor cells and Hedgehog signaling

2011 年 5 月 20 日 沖縄コンベンションセンター

日本発生生物学会、ワークショップ「Ciliary Biology」

オーガナイザー: 大森義裕、古川貴久

大森義裕、茶屋太郎、加藤君子、古川貴久

A ciliary kinase Mak and a microtubule-associated protein RP1 antagonistically regulate ciliary length in retinal photoreceptor cells