

論文の内容の要旨

論文題目

Analysis of the mechanism of left-right axis formation
using the medaka mutant *abecobe*

(訳)

メダカ内臓逆位変異体 *abecobe* を用いた左右性形成機構の解析

氏名 加村 啓一郎

脊椎動物のからだは外見上左右対称なつくりをしている。しかし、その内部を覗いてみると、臓器の配置は左右非対称である。脊椎動物の左右性形成の過程は、マウスを中心とした先行研究より、大きく3つのstepに分けられる。(step 1) 対象性の破れ: マウスでは、まず初期胚に見られる node において初めて対称性の破れが起こる。node 表面には繊毛が生えており、回転運動する。その運動によって node に左向き水流 (nodal flow) が生じる。(step 2) 左右非対称な遺伝子発現: step 1 で生じた水流の非対称性が、シグナルとして伝わり、左側特異的に遺伝子が発現する。今までに *Nodal* や *Lefty* といった遺伝子が知られており、これらの遺伝子はマウスに限らず、種を超えて高く保存されている。(step 3) 左右非対称な器官形成: step 2 で生じた左側特異的な遺伝子のシグナルが、転写因子 *Pitx2* を介して左右非対称な個々の器官形成へとつながる。具体的には、脳内の手綱核や、心臓、消化器官の配置などに左右性が見られる。マウスの node に相当する器官としてメダカでは体節形成期に形成されるクッセル胞が知られ、マウスと同様に繊毛の回転運動により nodal flow が生じている。nodal flow は、ウサギ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュでも確認されており、多くの種に共通した仕組みであると考えられる。しかし、step 1 と step 2 をつなぐ過程、すなわち nodal flow がどのように左右非対称な遺伝子発現へとつながるのかという過程は不明であり、nodal flow のセンサーとして現在2つのモデルが提唱されて

いる。1つ目は、「メカノセンサー説」である。nodeには動く繊毛と動かない繊毛の2種類があるという“two-cilia model”に基づき、動かない繊毛が直接的、機械的に水流を感知しているとしている。2つ目は「ケモセンサー説」であり、水流によって左側に片寄ったモルフォゲンを受容することによって、受容体が間接的、化学的に水流を感知しているとしている。変異体の遺伝子発現パターン、流体学的シミュレーション、モルフォゲン候補の探索などから、それぞれのモデルを支持するデータが提示されているが、現時点で結論は得られていない。それは、今までセンサー分子自体が不明であったからである。そこで、本研究ではそのセンサー分子を同定することを目的とした。解析には、当研究室でENU突然変異誘発によって得られたメダカ内臓逆位変異体 *abecobe* (*abc*, 図1)を使用した。

*abc*はホモ変異体の約半数の胚において、心臓のルーピングの向きおよび肝臓・胆嚢の配置が左右逆転した。また、*southpaw* (*Nodal* 相同遺伝子)ならびに *lefty* は野生型では体節形成期にそれぞれ側板中胚葉で左側特異的に発現する遺伝子であるが、*abc*においてその発現パターンはランダム化した。さらに、これらの遺伝子の上流ではたらく *charon* は、野生型ではクッペル胞の右側で強く非対称に発現するのに対し、*abc*ではその発現が左右対称になっていた。そこで、*charon*の上流であるクッペル胞内の水流を粒子注入により可視化した。すると、*abc*でも野生型と同様に *nodal flow* が確認できた。これらの結果から、*abc* 遺伝子は *nodal flow* (step 1) と左右非対称な遺伝子発現 (step 2) の間で働くことがわかった。

*abc*の positional cloning の結果、*pkd111* においてナンセンス変異を確認した。また、*abc*の別 allele でもトランスポゾン様配列の挿入による *pkd111* での変異を確認した。さらに、モルフォリノアンチセンスオリゴ阻害実験および mRNA によるレスキュー実験の結果と合わせ、*abc*の原因遺伝子は *pkd111* であると結論付けた。*pkd111*とは、11回膜貫通型のタンパク質 (2742 aa) をコードする、機能未知の遺伝子である。in situ hybridization の結果、*pkd111*はクッペル胞上皮特異的に発現していた。

*Pkd111*は *Pkd1*ファミリーの1つである。そこで、*Pkd1*からその機能を類推した。PKD (Polycystic Kidney Disease)は腎臓が肥大する病気であり、腎臓では尿細管液の流れを繊毛で感知している。*Pkd1*は繊毛上でメカノセンサーとして働いており、*Pkd1*が尿細管液の流れを感知すると、複合体を形成する *Pkd2* (Ca^{2+} チャネル)を通して細胞内に Ca^{2+} が流入する。また、マウスやゼブラフィッシュでは *Pkd2*の機能欠損により内臓逆位が生じることが報告されており、また、マウスの node の繊毛に *Pkd2*が局在することも知られていた。一方、*Pkd1*のノックアウトマウスでは内臓逆位は生じず、node の繊毛にも局在していな

い。そのため、左右性形成における Pkd2 のパートナーは今まで不明であった。以上の事実から、クッペル胞内でも左右性形成において腎臓と類似の現象が生じていると仮定すると、Pkd111 が Pkd2 と複合体を形成することにより nodal flow のセンサーとして働いていると考えられる。そこで、まず、メダカにおける *pkd1* と *pkd2* の発現を in situ hybridization で調べた。その結果、期待通り、体節形成期において *pkd1* の発現はほとんど検出できなかった一方、*pkd2* は胚全体にほぼ一様に発現していた。また、*pkd2* のモルフォリノアンチセンスオリゴ阻害実験においても内臓逆位が生じたことから、メダカにおいても *pkd2* が左右性形成に関わっていることが示された。そこで次に、Pkd111 と Pkd2 の相互作用の有無を調べた。Myc と FLAG をそれぞれ付けたメダカ Pkd111 C 末側断片と Pkd2 全長を HEK293T 細胞に導入し、免疫共沈降をおこなった。その結果、Pkd111C 末と Pkd2 の相互作用を検出した。また、クッペル胞における Pkd2 の細胞内局在を免疫染色により調べたところ、Pkd2 は野生型においては繊毛上に局在するが、*abc* ではその局在が失われていた。なお、細胞質における Pkd2 の局在は *abc* でも変化なく存在した。そこで、Pkd111 に対する抗体を作製し、クッペル胞における Pkd111 の細胞内局在も確認した。すると、やはり野生型においては繊毛に局在するものの、*pkd2* のノックダウン胚においてはその局在が失われていた。これらの結果から、Pkd111 と Pkd2 は相互に依存してクッペル胞の繊毛に局在していることがわかった。

“two-cilia model” では、node の中心にある繊毛は、その動きに必須なダイニン重鎖である Left-right dynein (Lrd) を持つ一方、node の周縁にある繊毛は Lrd を持たないため動けず、nodal flow のセンサーとして機能していると考えられていた。そこで、Pkd111 はクッペル胞の周縁にある動かない繊毛に局在することによってセンサーとして働いていると考え、Pkd111 の免疫染色をおこなった。しかし予想に反して、Pkd111 は、周縁の繊毛のみならず、クッペル胞の全ての繊毛に局在していた。さらに、Lrd についても免疫染色をおこなったところ、やはり全ての繊毛で染色が確認され、周縁の繊毛においても Lrd が存在することがわかった。実際に、クッペル胞の繊毛の動きをライブイメージングで観察したところ、確かに周縁の繊毛も動いていることが確認できた。

以上の結果より、Pkd111 と Pkd2 はクッペル胞の繊毛上で複合体を形成して、nodal flow のセンサーとして働いていることが示唆された。また、それらの繊毛は全て動く繊毛であることも示された。これらの結果は今までの“two-cilia model”にはあてはまらず、私は新たなモデルを提示した (図 2)。それは、クッペル胞の繊毛は 1 種類であり、同時に以下の 2 つの役割を担っている、というものである。すなわち、クッペル胞の繊毛は (1) 回転運動によって nodal flow を作ると同時に、(2) 繊毛上の Pkd111 と Pkd2 を介して nodal flow を感知していると考えられる。これを “dual-function cilia model” と名付けた。

今後の課題としては、大きく 2 点挙げられる。1 点目は、Pkd111 がメカノセンサーとし

で働いているのか、ケモセンサーとして働いているのかという問題である。Pkd1 ファミリーには、腎臓でメカノセンサーとして働く Pkd1 以外にも、舌で酸味受容体として働く Pkd113 や精子で先体反応に関わる PKDREJ などが知られており、Pkd111 も多様なセンシングメカニズムのうちの1つを担っていると考えられる。ただし、動く繊毛の上で機能しているという結果から考えると、nodal flow の方向を機械的に感知することは難しく、現時点ではケモセンサーの可能性が高いと考えている。2点目は、dual-function cilia がメダカ以外の種でも保存されているのかという問題である。本研究と同時期に、マウスにおいても Pkd111 の解析がおこなわれており、マウスでも Pkd111 は Pkd2 と相互作用して左右性形成に関わっていることが示された (D. Norris (MRC Harwell)、私信)。この結果より、Pkd111 と Pkd2 の複合体を介した nodal flow のセンシングメカニズムは種を越えて保存されていると考えられる。しかし、マウスにおいては Pkd111 の局在観察がおこなわれていないため、動く繊毛との関係性は不明なままであり、dual-function cilia の保存性については今後の課題となる。

本研究において、私は、メダカ内臓逆位変異体 *abecobe* の解析を基にして、長年不明であった左右性形成における Pkd2 のパートナーが Pkd111 であることを明らかにした。さらに、Pkd111 と Pkd2 の複合体が動く繊毛に局在することを示すことによって、nodal flow のセンシングメカニズムに“dual-function cilia model”という新たなモデルを提示することができた。これらの結果は、脊椎動物の左右性形成機構の解明に大きな進展をもたらすと共に、今後の研究の方向性を示すものとなった。

図1 メダカ内臓逆位変異体 *abecobe* (5日胚)

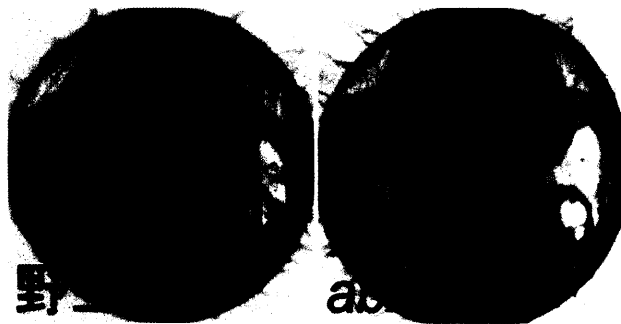


図2 nodal flow の作用機序 (dual-function cilia model)

