

論文審査の結果の要旨

氏名 加村 啓一郎

本論文では、メダカ内臓逆位変異体 *abecobe (abc)* の表現型解析、原因遺伝子同定とその機能解析により、脊椎動物の左右性形成機構を明らかにしている。脊椎動物のからだは臓器の配置などに左右非対称性がみられる。その非対称性は、マウス初期胚の *node*（魚類では相同器官のクッペル胞 (KV)）上の繊毛運動による左向きの水流 (*nodal flow*) によって初めて生じる。しかし、*nodal flow* がいかにしてその下流の左右非対称な遺伝子発現につながるのかは、いくつかの仮説が提唱されているものの未だ不明である。それは、*nodal flow* のセンサー分子自体が不明であったからである。本論文は、*abc* の解析により、そのセンサーと思われる分子を明らかにした。

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、野生型で見られる左右非対称な遺伝子の発現パターンは *abc* においてはランダム化した。KV 内の水流を粒子注入により可視化すると、*abc* でも野生型と同様に *nodal flow* が確認できた。*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 KV 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。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を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、KV 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。in situ hybridization とモルフォリノアンチセンスオリゴ阻害実験の結果から、メダカにおいても *pkd2* は KV に発現し、左右性形成に関わっていることが示された。また、免疫共沈降実験の結果、Pkd111 と Pkd2 の相互作用が検出された。さらに、免疫染色の結果から、Pkd111 と Pkd2 は相互に依存して KV の繊毛に局在していることがわかった。

いわゆる“two-cilia model”では、node の中心にある繊毛はその動きに必要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 KV 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、KV 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、KV 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 KV 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、本論文では新たなモデル“dual-function cilia model”が提示された。それは、KV 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、KV 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。

論文提出者は、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 であることを初めて明らかにした。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であり、評価に値する。

なお、本論文は、小林大介氏、上原由佳氏、越田澄人氏、飯島典生氏、工藤明氏、横山尚彦氏、武田洋幸氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。