

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	大谷 拓史
学位授与の条件	学位規則第 4 条第① 2 項該当		
論文題目			
<p>Increase in extracellular osmotic pressure causes primary cilia shortening and loss dependently on F-actin and microtubule excessive formation (細胞外浸透圧の増加は F-アクチンおよび微小管の過剰形成依存的に一次繊毛の短縮および消失を引き起こす)</p>			
論文審査担当者			
主査	教授	今泉 和則	印
審査委員	教授	藤原 祐一郎	
審査委員	准教授	齋藤 敦	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>一次繊毛は多くの哺乳動物細胞において細胞表面から突き出ているアンテナのような構造である。その構造は個体の発生や恒常性の維持における機械刺激や化学刺激の受容を担っている。一次繊毛の柱をなす軸糸は 9+0 配列の微小管でできている。一次繊毛は細胞膜直下に局在している中心体の上に構築される。中心体は一次繊毛の形成や繊毛内輸送に必要な中心体周辺物質 (PCM) と呼ばれるタンパク質群に覆われている。本研究の目的は細胞外の浸透圧の上昇, すなわち高浸透圧刺激に対する一次繊毛および PCM の形態学的応答と, その分子メカニズムを調べることである。</p> <p>申請者はマウス腎臓集合管上皮から樹立された細胞株である mIMCD-3 細胞を用い実験を行った。異なる高さの浸透圧条件に細胞を 3 時間暴露した後, 細胞を固定し, 一次繊毛の膜局在タンパク質 ARL13B に対する抗体で染色した結果, 一次繊毛が浸透圧レベル依存的・時間依存的に短縮・消失することが見出された。高浸透圧条件下での一次繊毛の形態学的変化をさらに観察するために, 申請者は蛍光タンパク質で標識した ARL13B を生理的レベルで安定発現するロックイン細胞を用いタイムラプスライブイメージングを行った。蛍光標識された一次繊毛は高浸透圧刺激曝露後 1 時間程度長さを維持したが, 2 時間程度経過すると急速に短縮し始め 3 時間後にほとんど消失した。申請者はさらに一次繊毛の短縮と消失が細胞外浸透圧の急激な上昇によって引き起こされたアーチファクトである可能性を排除するために, 細胞外浸透圧を段階的に上昇させる実験を行った。細胞外浸透圧の段階的上昇によっても一次繊毛の短縮と消失が観察された。</p> <p>次に申請者は PCM を構成する 2 つのタンパク質, γ-チューブリンと ODF2 をマーカーとし浸透圧上昇による PCM の変化を調べた。これら 2 つのタンパク質は細胞外浸透圧を 3 時間上昇させることによって, 浸透圧レベル依存的・時間依存的に中心体周辺から消失した。一方, 細胞抽出物のウェスタンブロット解析では, 高浸透圧刺激曝露下でも 2 つのタンパク質の総量は対照群と同レベルに維持されていることが示された。さらに, 透過型電子顕微鏡による超微細形態観察により, 細胞外浸透圧の上昇による中心体のコア構造, すなわち中心小体の分解は起きていないことが示された。これらの結果から, 細胞外浸透圧の上昇による PCM タンパク質の消失は, PCM の中心体からの離散によって引き起こされたことが示唆された。申請者はさらに 3 時間の高浸透圧刺激曝露後に等張圧に戻す実験を実施し, 一次繊毛の短縮および消失, PCM の中心体からの離散のいずれもが可逆的な現象であることを示した。</p> <p>申請者は最後に薬理学的アプローチを用いて, 細胞外浸透圧の上昇による一次繊毛の短縮と消失の分子メカニズムを調べた。申請者は特に細胞骨格の関与に着目し, 微小管とアクチン線維について調べた。アクチン線維を蛍光標識ファロイジン, 微小管を抗チューブ</p>			

リン抗体で染色することで、細胞外浸透圧の上昇によって細胞質内にアクチン線維および微小管の過剰形成が起こることが示された。申請者は微小管の過剰形成を阻害するために微小管重合阻害剤の一つノコダゾールを使用し、高浸透圧刺激によって引き起こされた一次繊毛の短縮・消失、および PCM の中心体からの離散がノコダゾール処理によって有意に抑制されることを示した。同様にアクチン重合阻害剤であるラトランクリン A を用いて高浸透圧刺激によるアクチン線維の過剰形成を阻害することで、一次繊毛の短縮・消失、および PCM の中心体からの離散が抑制されることを示した。これらの結果は、浸透圧の上昇によるアクチン線維と微小管の過剰形成が、高浸透圧刺激による一次繊毛の短縮と消失、および PCM の中心体からの離散に寄与していることを示唆している。

以上の一連の実験から申請者は、細胞外浸透圧の上昇がアクチン線維と微小管の過剰形成に依存する一次繊毛と PCM の可逆的な形態学的変化を引き起こすことを明らかにした。一次繊毛と PCM のこれらの可逆的な形態学的応答は、幅広い尿浸透圧の変化に曝される腎臓集合管上皮における細胞外浸透圧変化に対する細胞応答の制御機構に関与している可能性も考えられ、今後の *in vivo* 実験によるさらなる発展が期待できる点で高く評価できる。

よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。