

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2016～2020

課題番号：16H02502

研究課題名（和文）繊毛運動モードの分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis of cilia beating mode.

研究代表者

吉川 雅英（Kikkawa, Masahide）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・教授

研究者番号：80272425

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 23,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、遺伝学とクライオ電子線トモグラフィーを用いて、脊椎動物であるゼブラフィッシュの繊毛が、どのように作られるのが、特に、そのモーター分子ダイニンの組み立て因子が解明された。また、繊毛を制御するカルシウムが繊毛のどこに結合して働くのが解明された。技術的には、遺伝子操作した脊椎動物からクライオ電子線トモグラフィーを可能にした点も特筆すべきである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ヒトの遺伝病である繊毛病の原因を、分子レベルから調べることができるようになった意義は大きい。特に、クライオ電子顕微鏡を使うことで、非常に複雑な繊毛（数百種類以上の部品でできていることが知られている）の中で、どのタンパク質がどこにあり、何をしているのが、の一端が解明できた。

研究成果の概要（英文）：Using genetics and cryo-electron tomography, this study elucidated how the cilia of the vertebrate zebrafish are made, especially the assembly factors for motor protein dynein. In addition, it was clarified where calcium, which controls cilia, binds to and works on cilia. It is also noteworthy that we enabled cryo-electron tomography from genetically engineered vertebrates.

研究分野：細胞生物学

キーワード：繊毛 クライオ電子顕微鏡 ゼブラフィッシュ ダイニン ゲノム編集

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

繊毛のダイニンは、幾つもの部品(中心微小管、ラディアルスポーク、N-DRC)によって、特定の場所・特定のタイミングで活性化されるように制御されている。これらの部品の構造基盤については直近の10年で飛躍的に進んだ。これは1980年代から神谷律をはじめとするクラミドモナス(単細胞の緑藻)の研究者が単離してきた数多くの繊毛関連変異体を、クライオ電子線トモグラフィ(Cryo-ET)で観察することで構造と機能を結びつけることができるようになったからである。

我々の研究室は幾つかの大きな貢献をしてきており、例えば繊毛の正確な96 nmの周期構造はCCDC39/40複合体によって決定される事を示した(Oda et al, *Science*, 2014)。これは真核生物において「ものさしタンパク質」が存在することを明らかにした初めての例である。他にも数多くのダイニンの制御に関連する部品を同定してきた。

2. 研究の目的

一方、こうした研究の過程で、単細胞生物であるクラミドモナスを使ってヒトの繊毛病を理解することの限界も見えてきた。ヒトを含む脊椎動物の繊毛は、様々な運動モードを持っている。例えば、体の左右非対称性を決定する繊毛は回転運動をする。精子の繊毛は対称的な正弦波で動くのに対し、ヒトの気管上皮や魚の臭板上皮は、非対称な動きをする。このように臓器によって異なる繊毛運動モードは、繊毛病が様々な臨床症状を示す原因となっていると考えられるが、一種類の繊毛しか持たないクラミドモナスではこのメカニズムの解明は出来ない。

そこで、我々は、ゼブラフィッシュをモデル生物として用い、クライオ電子線トモグラフィによる構造解析、及び、それによって、ダイニンがさまざまな繊毛運動モードを生むのではないかという仮説を検証することにした。

3. 研究の方法

繊毛ダイニンを欠損したゼブラフィッシュの作成

繊毛ダイニンの重鎖は、ゼブラフィッシュのゲノム上に13種類存在し、うち5種類は外腕ダイニン、8種類は内腕ダイニンであることが推測されている。また、ダイニンが繊毛の中に運ばれる前に、細胞質で組み立てるのに働いている因子として、ダイニン組み立て因子が4種類知られており、二つ以上のダイニン重鎖のセット(例えば外腕ダイニン)をノックアウトする目的で、これらについてもノックアウトを行う。具体的な遺伝子ノックアウトの方法としては、CRISPR/Cas9を用いた遺伝子編集、および、Zebrafish 国際リソースセンターから変異体を取り寄せ、ホモ変異体を作成した。

繊毛のクライオ電子線トモグラフィによる解析

クライオ電子線トモグラフィ(Cryo-ET)は、生体試料を急速凍結し、無染色のまま透過型電子顕微鏡で三次元構造を観察する手法である。これまで、我々の研究室ではクラミドモナスから生成した繊毛についてCryo-ETを用いた三次元構造解析を行い、50種類近くの分子の位置を決めてきた。

このCryo-ETを用いて、我々の研究室ではつい最近ゼブラフィッシュの精子の繊毛の観察に成功した。一匹のゼブラフィッシュの雄を殺すこと無く得られる精子で十分な構造解析をすることができ、大規模な培養が必要ない。また、マウスの精子の場合には、外側に分厚い軸糸周辺構造体が存在するために太さが1マイクロメートル近く有り、Cryo-ETによる構造観察が不可能だった。従って、遺伝子編集の出来るモデル生物での初めて精子のCryo-ET成功例になる。

4. 研究成果

“Systematic studies of all PIH proteins in zebrafish reveal their distinct roles in axonemal dynein assembly.”

Yamaguchi, H., Oda, T., Kikkawa, M., Takeda, H.
Elife 2018

運動性繊毛/べん毛の構築には、繊毛の中に輸送される前に軸糸ダイニンを細胞内で組み立てることが必要です。軸糸ダイニンにはさまざまなサブタイプがありますが、各ダイニンサブタイプの役割とそれらの組み立てプロセスは脊椎動物では解明されていませんでした。

ゼブラフィッシュのゲノム上には、PIHタンパク質ファミリーと呼ばれるタンパク質が4つあり、さまざまなダイニンサブタイプの組み立てに関与していると推測されていましたが、十分な

証拠はありませんでした。

そこで、4つすべてのPIH-タンパク質遺伝子：*pih1d1*、*pih1d2*、*ktu*、および *twister* のゼブラフィッシュ変異体を確立し、クライオ電子線トモグラフィーによって変異精子の軸系ダイニンの構造を分析しました。突然変異は特定のダイニンサブタイプを喪失を引き起こし、それは異常な精子運動性と相関していました。

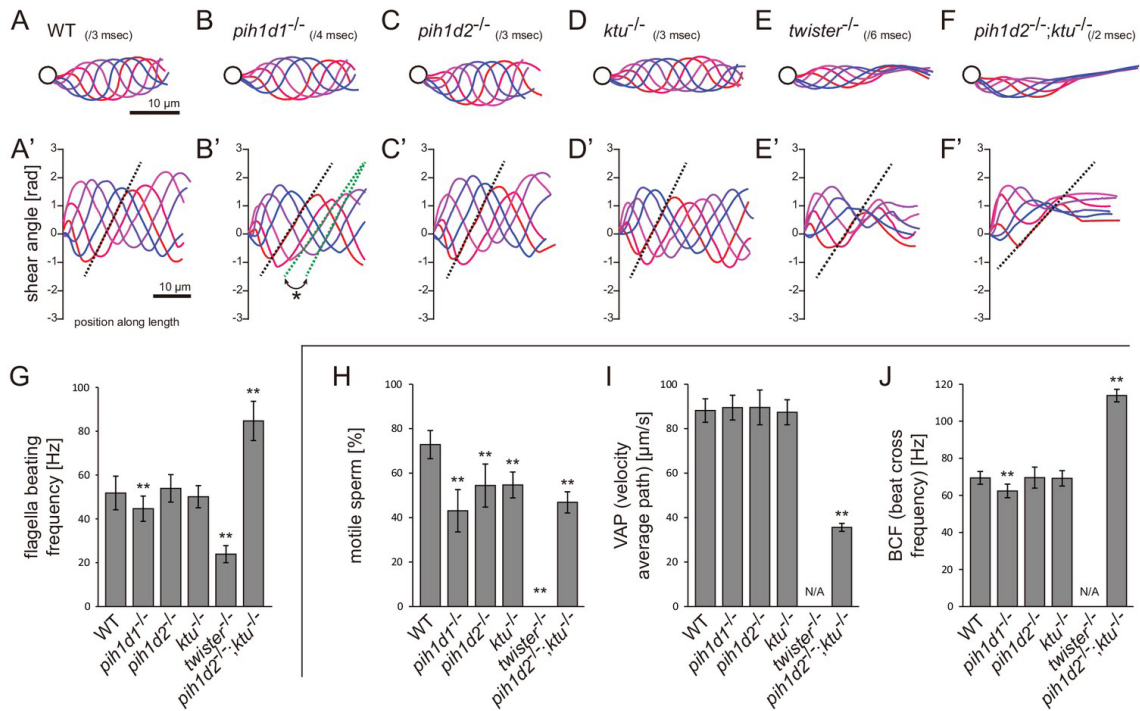
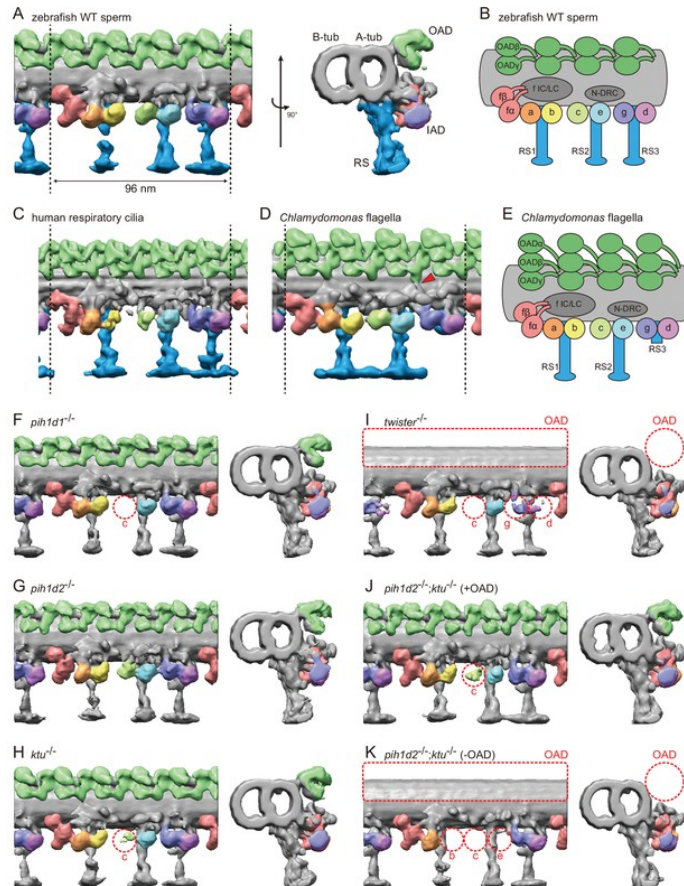


図1 PIH 遺伝子の突然変異は異常な精子運動を引き起こしました。

(A-F) 精子の波形 (G) 精子べん毛の拍動頻度 (H-J) 自由遊泳精子の運動性



また、クライオ電子線トモグラフィーで観察したゼブラフィッシュ製紙の構造。ダイニンサブタイプの臓器特異的な組成があることを見出下。このため、変異クッパー細胞の小胞繊毛が重度の運動障害を起していることが説明できる。

“Calaxin is required for cilia-driven determination of vertebrate laterality.”

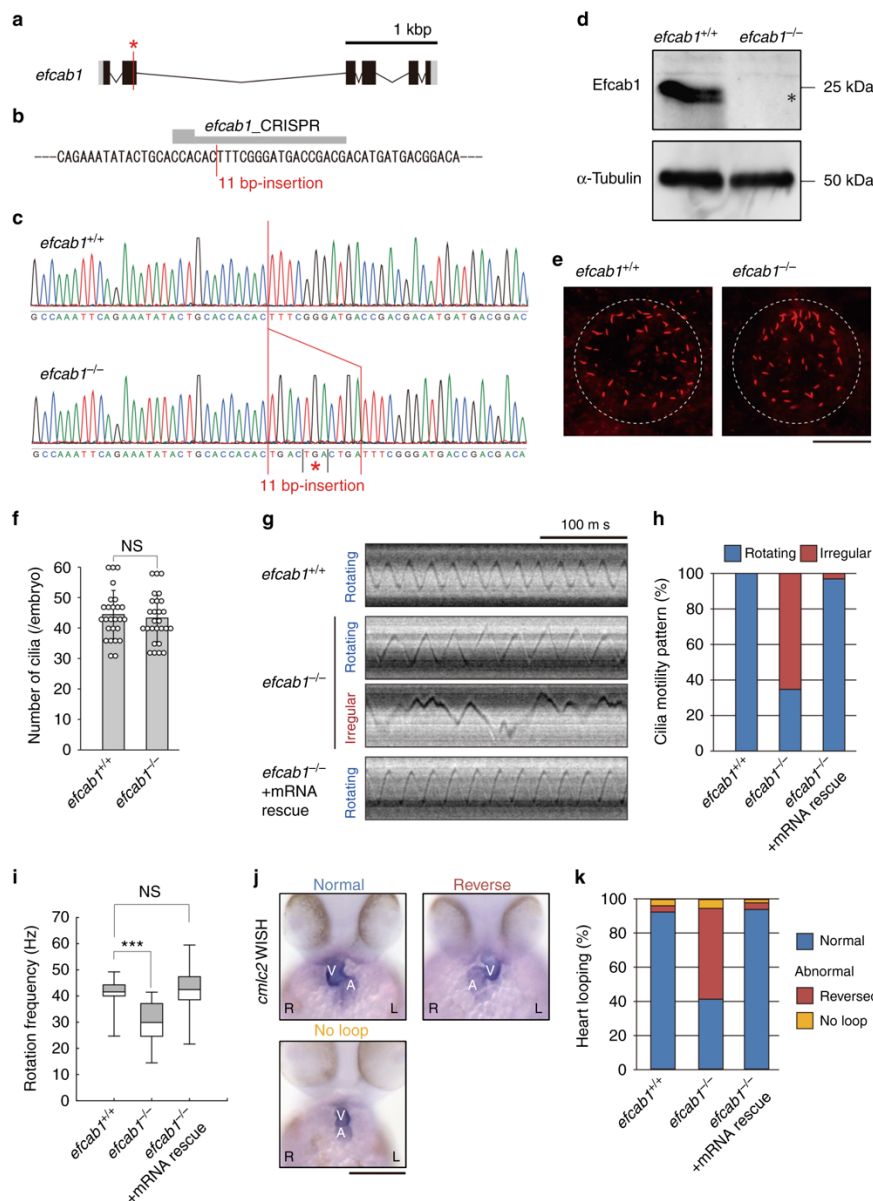
Sasaki, K., Shiba, K., Nakamura, A., Kawano, N., Satouh, Y., Yamaguchi, H., Morikawa, M., Shibata, D., Yanase, R., Jokura, K., Nomura, M., Miyado, M., Takada, S., Ueno, H., Nonaka, S., Baba, T., Ikawa, M., Kikkawa, M., Miyado, K., Inaba, K.

Commun Biol 2019 2:226

カラキシンは、べん毛と繊毛の動きを調節する Ca²⁺ 結合ダイニン関連タンパク質です。ホヤでは、カラキシンは精子の走化性に重要な役割を果たします。しかし、脊椎動物におけるカラキシンの機能については何も知られていませんでした。

そこで、我々は、カラキシンをコードする *Efcab1* にヌル変異を持つマウスが、水頭症、内臓逆位、気管繊毛と精子べん毛の異常な運動性など、原発性線毛機能不全の典型的な表現型を示すことを示しました。驚くべきことに、オスとメスの両方が生存可能であり、カラキシンの受精に必須ではないことを示しています。上皮多繊毛と精子べん毛の 9+2 軸糸構造は正常ですが、9+0 結節繊毛の形成は著しく破壊されています。ゼブラフィッシュでのカラキシンのノックアウトも、クッパー細胞の小胞繊毛の不規則な繊毛の鼓動により、内臓逆位を引き起こしますが、9+2 軸糸構造は正常なままであるように見えます。

本研究の中で、我々の研究室ではゼブラフィッシュの *efcab1* knock-out を作成し、そのフェノタイプを調べ、マウスの場合と同様であることを示した。



Mutation of zebrafish *efcab1* causes abnormal motility of Kupffer's vesicle cilia. a Genomic organization of zebrafish *efcab1*. Black boxes: exons. Gray boxes: untranslated regions. Red asterisk indicates the genome-editing target site. b CRISPR/Cas9 target sequence. c Sanger sequencing of *efcab1*^{+/+} and *efcab1*^{-/-} fish around the genome-editing target site. The 11 bp insertion in *efcab1*^{-/-} includes a stop

codon (red asterisk). d Immunoblot of testis lysate. The induced mutation deleted Efcab1 (asterisk). α -tubulin: loading control. e Kupffer's vesicle cilia were visualized by immunofluorescence staining with acetylated-tubulin antibodies. f Measurement of the number of Kupffer's vesicle cilia showed no significant differences between efcab1^{+/+} and efcab1^{-/-} fish. N (embryo) = 26 (efcab1^{+/+}) and 27 (efcab1^{-/-}). Values indicate mean \pm SD. g Typical kymographs of Kupffer's vesicle cilia in efcab1^{+/+}, efcab1^{-/-}, and mRNA-rescued efcab1^{-/-} fish. Kymograph patterns were categorized into two classes: rotating (blue) and irregular (red). h Ratios of each motility class. N (cilia) = 55 (efcab1^{+/+}), 72 (efcab1^{-/-}) and 65 (mRNA-rescued efcab1^{-/-}). i Rotational frequencies of Kupffer's vesicle cilia. Boxes correspond to the first and third quartiles, and whiskers extend to the full range of the data. N (cilia) = 55 (efcab1^{+/+}), 25 (efcab1^{-/-}) and 63 (mRNA-rescued efcab1^{-/-}). ***p < 0.001 vs. efcab1^{+/+} (Student's t-test). j Ventral views of 48 hpf embryos. Heart looping was visualized by whole-mount in situ hybridization of cmlc2. L, left; R, right; V, ventricle; A, atrium. k Directions of heart looping. N (embryo) = 108 (efcab1^{+/+}), 114 (efcab1^{-/-}), and 51 (mRNA-rescued efcab1^{-/-})

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamaguchi Hiroshi, Oda Toshiyuki, Kikkawa Masahide, Takeda Hiroyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Systematic studies of all PIH proteins in zebrafish reveal their distinct roles in axonemal dynein assembly	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e36979
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.36979	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 asaki, K., Shiba, K., Nakamura, A., Kawano, N., Satouh, Y., Yamaguchi, H., Morikawa, M., Shibata, D., Yanase, R., Jokura, K., Nomura, M., Miyado, M., Takada, S., Ueno, H., Nonaka, S., Baba, T., Ikawa, M., Kikkawa, M., Miyado, K., Inaba, K.	4. 巻 2
2. 論文標題 Calaxin is required for cilia-driven determination of vertebrate laterality.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0462-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 18件/うち国際学会 11件）

1. 発表者名 吉川雅英
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡と遺伝学で観る細胞構造
3. 学会等名 原子・分子・光科学（AMO）討論会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口博史
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたダイニン組み立て因子の機能解析
3. 学会等名 繊毛研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口博史
2. 発表標題 Systematic studies of all PIH proteins in zebrafish reveal their distinct roles in axonemal dynein assembly
3. 学会等名 Kuo Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川雅英
2. 発表標題 Combination of cryo-electron microscopy and genetics for studying eukaryotic cellular structures
3. 学会等名 2018 Kuo Symposium on 3D-EM of Macromolecules and Cells (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川雅英
2. 発表標題 Combination of cryo-electron microscopy and genetics for studying eukaryotic cellular structures
3. 学会等名 19th International Microscopy Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口博史
2. 発表標題 Cryo-electron tomography revealed zebrafish axonemal dyneins assembled by distinct PIH proteins
3. 学会等名 日本生物物理学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川雅英
2. 発表標題 Combination of cryo-electron microscopy and genetics for studying eukaryotic cellular structures
3. 学会等名 cilia2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川雅英
2. 発表標題 Combination of cryo-electron microscopy and genetics for studying eukaryotic cellular structures
3. 学会等名 2nd Stockholm-Tokyo Workshop (Multidisciplinary collaboration for sustainable development) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口博史
2. 発表標題 Structural analysis of zebrafish sperm flagella by cryo-electron tomography
3. 学会等名 2nd Stockholm-Tokyo Workshop (Multidisciplinary collaboration for sustainable development) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川雅英
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡と遺伝学で観る細胞構造
3. 学会等名 平成30年度 定量研シンポジウム 「生命を支える生体超分子の可視化と動態」 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川雅英
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡と遺伝学で観る細胞構造
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口博史
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡によるゼブラフィッシュ精子の構造解析およびダイニン組立因子の機能解析
3. 学会等名 第49回精子研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川雅英
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡による微小管とその関連モーターの分子機構
3. 学会等名 形態解析ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川雅英
2. 発表標題 日本におけるクライオ電子顕微鏡の現状と課題
3. 学会等名 生活習慣病とがんの代謝栄養メカニズム研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川雅英
2. 発表標題 Combination of cryo-electron microscopy and genetics for studying cilia
3. 学会等名 清華大学セミナー（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口博史
2. 発表標題 The function of PIH proteins in the vertebrate motile cilium
3. 学会等名 第17回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉川雅英
2. 発表標題 The molecular toolbox for building axonemal microtubules
3. 学会等名 Instruct Biennial Structural Biology Conference 2017（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉川雅英
2. 発表標題 Combination of cryo-EM and genetics for studying eukaryotic cilia
3. 学会等名 Frontiers in cryo-electron microscopy（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口博史
2. 発表標題 The function of PIH proteins in vertebrate motile cilium
3. 学会等名 Dynein2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口 博史
2. 発表標題 The function of PIH proteins in the vertebrate motile cilium
3. 学会等名 第54回生物物理学学会年会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山口 博史
2. 発表標題 The Function of PIH Proteins in the Vertebrate Motile Cilium
3. 学会等名 「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」研究領域 CREST 平成28年度領域会議
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 吉川雅英
2. 発表標題 The Molecular Toolbox for Building Axonemal Microtubules
3. 学会等名 Hotel Galvez（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉川雅英
2. 発表標題 繊毛・鞭毛の「構造遺伝学」
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口博史
2. 発表標題 The function of PIH proteins in the vertebrate motile cilium
3. 学会等名 第22回国際動物学会・第87回日本動物学会合同大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関