

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06644

研究課題名(和文) 一次繊毛形成過程における中心体新規機能領域の解析

研究課題名(英文) Super-resolution imaging analysis of the novel actin structure found on the centrosome during ciliogenesis.

研究代表者

千葉 秀平 (Chiba, Shuhei)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60572493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膨張顕微鏡技術と超解像顕微鏡の併用から実現した卓越した分解能をもつマルチカラー超解像イメージング技術を駆使することで初めて発見に至った中心体近傍に新規のアクチン骨格について、繊毛小胞との同時観察から繊毛形成におけるその構造変化ならびに繊毛形成に与える影響を検証した。本研究ではさらに、この技術を繊毛構築過程での繊毛関連分子の空間配置解析にも適用した。現時点で中心体近傍のアクチン構造の構築と機能を制御する分子システムを明らかにすることはできていないが、この手法の開発により、これまで不明な点が多く残されていた繊毛関連分子の詳細な空間配置を繊毛構築段階と関連付けて解析することが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

繊毛は機械的・化学的刺激などの細胞外環境を受容するアンテナとして働く。その構造や機能の異常は発生期の形態異常、嚢胞性腎疾患、網膜変性を複合的に呈する遺伝性疾患(繊毛症)の発症と密接に関連しており、繊毛構築を制御するシグナル経路の解明は医学的に早急な解決が望まれる研究命題である。本研究で焦点を当てる中心体近傍のアクチン構造は現時点で繊毛機能に与える影響は不明であるが、未知のアクチン構造の働きの理解により一次繊毛にとどまらず、紡錘体構築や細胞移動時の極性形成、免疫シナプス形成など、中心体とアクチンの相互作用が鍵を握ると想定される細胞活動での中心体制御機構の理解に繋がる可能性も考えられる。

研究成果の概要(英文)：Expansion microscopy (ExM) is a novel superresolution (SR) technique that uses a swellable hydrogel that enables the physical expansion of specimens. In this study, we applied ExM to observe ciliary and centriolar proteins and compared the acquired images with those obtained using structured illumination microscopy. We also established multi-color SR imaging with the outstanding optical resolution achieved by the combinatorial use of ExM and airyscan microscopy. Using this imaging technique, we analyzed a novel actin skeleton found in the vicinity of the centrosome and examined its role in ciliogenesis. Although we could not find the molecular systems that control the centriolar actin structures, ExM-Airyscan made it possible to analyze the spatial arrangement of cilia-associated molecules during ciliogenesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次繊毛 繊毛病 繊毛小胞 膨張顕微鏡 超解像イメージング サブオルガネラスケール アクチン
細胞骨格 トランジションゾーン

1. 研究開始当初の背景

一次繊毛は脊椎動物細胞の大半が細胞表層に形成する微小突起で、間期中心体の母中心小体由来する基底小体、そこから伸長した微小管骨格の軸系、軸系を取り囲む繊毛膜を構成要素とする。繊毛膜にはCa²⁺透過型チャネルや各種液性因子の受容体が高密度に局在しており、繊毛は機械的・化学的刺激などの細胞外環境を受容するアンテナとして働くことが知られる。その構造や機能の異常は発生期の形態異常、嚢胞性腎疾患、不妊、網膜変性を複合的に呈する遺伝性疾患(繊毛症)の発症と密接に関連しており、繊毛の構造や機能の構築を制御するシグナル経路の解明は医学的にも重要な研究命題である。

一次繊毛の構築過程の概要を図1に示す。細胞周期が血清飢餓や細胞接触、軟基質条件によってG1期からG0期に移行すると、中心体を構成する2つの中心小体(娘、母中心小体)のうち、母中心小体の遠位部のDistal appendages(DA)には、ゴルジ体やリサイクリングエンドソーム由来の小胞(PCV: Preciliary vesicle)が集積する。その後、小胞どうしが融合し、Ciliary vesicle(CV)が形成されると、CV直下の基底小体遠位側からは軸系が伸長し、押し上げられた小胞膜(Ciliary sheath)が最終的には細胞膜と融合することで、一次繊毛が形成される(図1)。近年、PCVの表面に局在するMyosinVa(MyoVa)の欠損や分岐したアクチン線維の形成に寄与するアクチン制御因子の発現抑制がCVの成熟を著しく阻害することが明らかになった。さらに単離精製した中心体が*in vitro*でアクチン重合活性を保持することも報告され、中心体近傍のアクチン動態制御が繊毛形成と関連する可能性が示唆されている。アクチンは生体内タンパク質で最も存在量が豊富で、多様な制御因子がその重合状態と機能を制御する。しかしながら、中心体近傍で局所的に機能を発揮するアクチン構造やその調節因子の存在は詳しく解析されておらず、細胞質に存在するアクチン繊維から発せられる強大なバックグラウンドシグナルの中では、微細なオルガネラである中心体(200×500nm)近傍から発せられる微弱シグナルを可視化するのは困難な状況である。

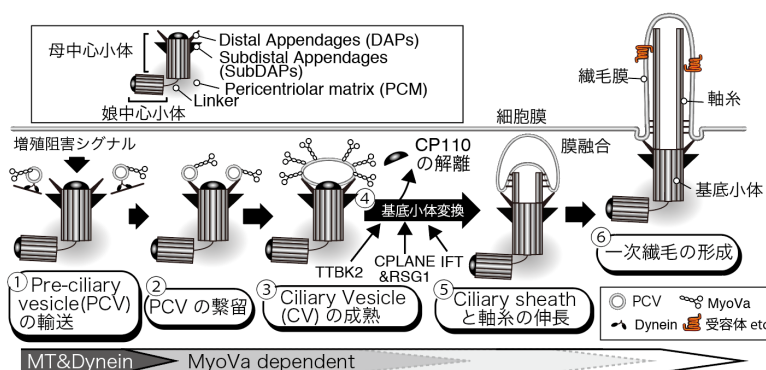


図1. 繊毛構築過程の概要: 中心体の構造と各機能領域の名称を示した(左上)。①飢餓や細胞接触、軟基質条件(増殖阻害シグナル)になると、微小管(MT)とDyneinの働きでPCVが中心体へと運ばれる。②PCVはDAPsを介して繫留され、③CVが成熟すると、④TTBK2の集積、CP110の解離、CPLANE複合体やRSG1、IFT複合体の集積が起こる(基底小体変換)。⑤軸系伸長により伸長した膜構造(Ciliary Sheath)が細胞膜と融合し、⑥繊毛が形成される。

2. 研究の目的

申請者は、Boydenらが開発した膨張顕微鏡法(ExM: Expansion microscopy)(Nat. Biotech. 34, 987-992, 2016)を最適化し、超解像顕微鏡との併用によって30nm(x, y)×100nm(z)の分解能もつ超解像イメージング技術を確認することに成功した。本研究は独自に構築した超解像イメージング技術によって、新たに発見に至った母中心小体遠位末端(Distal end)を重合起点とする未報告のアクチン構造について繊毛形成過程での役割とその機能制御機構の解明を目的とする。加えて、本研究ではこのイメージング技術をもとに、基底小体やトランジションゾーンといった一次繊毛に関連する機能領域で機能を発揮する分子の空間配置解析を詳細に明らかにし、

関連遺伝子の欠損や機能異常を端緒とするこれらの分子の局在や空間配置の変動性の理解から、織毛症の発症に繋がる織毛内環境破綻の分子メカニズムを明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

① 超々解像イメージング技術による一次織毛、中心体・基底小体の観察

一次織毛や基底小体は一般的な光学顕微鏡の分解能の限界である 200nm に近接する大きさであることから、こうした狭小領域の近傍で機能を発揮する分子の正確な空間配置を解析するのは至難の技である。このような細胞内微細構造を対象とした解析には、誘導放出抑制 (Stimulated Emission Depletion; STED) 顕微鏡法や単一分子局在化顕微鏡法 (Single-Molecule Localization Microscopy; SMLM) などの卓越した分解能をもつ超解像顕微鏡システムが有効である。ところが、こうした光学システムは、いずれも導入コストが高額であることから、現状、誰でも気軽に超解像イメージングを行える状況にはなっていない。そこで、本課題では Boyden らが開発した ExM が一次織毛や基底小体の観察に適用できるかを検証した。ExM は試料を高吸水性のポリマー中で 4 倍に膨張する

方法であり、試料を物理的に超解像化するという逆転の発想に基づくイメージング技術である。ExM により試料を膨張させることで、一般的な光学顕微鏡でも最大約 70nm の実質分解能で観察可能である。まず、本課題では ExM を用いることで、一次織毛関連構造や関連分子の空間配置解析を高い分解能で行うことが可能かを検証した。さらに、これを、超解像顕微鏡法と組み合わせることで更なる分解能の向上が実現できるかを検証した。

② 中心体近傍のアクチン構造の形成を担う分子基盤とその役割の解明

既存の報告より、中心体近傍には、アクチン繊維の存在が予想されたが、蛍光ファロイジンやアクチン抗体 (Ac-15) を用いた超解像観察では、中心体近傍で明確なアクチン構造の形成は確認することができなかった。ところが、Lower dimer と呼ばれる高次構造を形成する β -actin を特異的に認識する Monoclonal 抗体である 1C7 を用いて観察を行ったところ、親中心小体の遠位側末端 (Distal end) に強いシグナルを確認することができた (図 3)。一方で、Distal end や DA などの母中心小体の機能領域は近位分子が相対的に遠位側にある分子の局在を制御する階層構造をなす多分子複合体であると想定されており、特定の機能領域が他の機能領域の構築を制御する機能領域間クロストークの実体が明らかになってきて

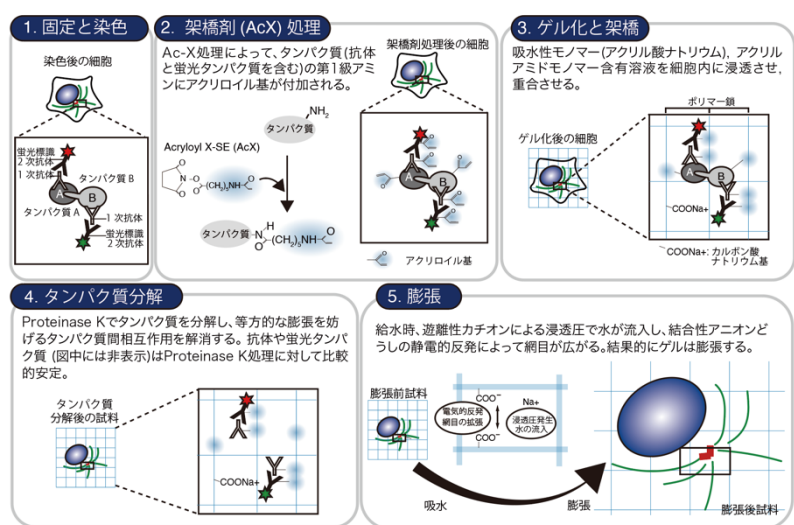


図 2. ExM のワークフローと基本原理
ExM は①固定と染色、②架橋剤処理、③ゲル化と架橋、④タンパク質分解、⑤膨張の 5 つのステップからなる。Step 2 で Ac-X [Acryloyl-X, SE, 6-((acryloyl) amino) hexanoic Acid, Succinimidyl Ester] 由来のアクリロイル基がタンパク質の第 1 級アミノ基に転移させる。

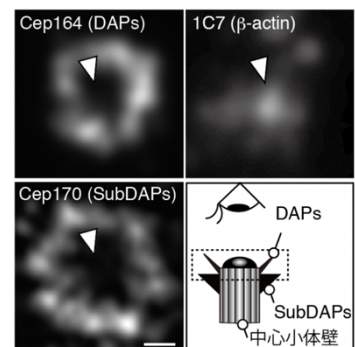


図 3. ExM-Airyscan の併用による中心体近傍アクチン構造の可視化：膨張後の中心体を真上から観察。DA (DAPs) と SA (SubDAPs) は中心小体壁から外側に放射状に配向している。矢頭はアクチン構造の位置を示す。Scale bar は 500nm

いる(図4)。この点を考慮し、本研究ではDistal end 構成因子やDA 構成因子の機能抑制細胞について、マウスモノクローナル抗体 1C7 抗体を用いて可視化された中心体近傍のactin 構造への影響を検証することで、この構造の足場となる中心体領域の決定を目指した。さらに、これらの細胞について、MyoVa を指標としたPCV の繫留とCV 成熟への影響についても解析を行った。

③ 繊毛構築における中心体近傍アクチン構造の普遍的役割の解析

アフリカツメガエルの胚の体表面の多繊毛細胞やマウス気管上皮多繊毛細胞など、高度に頂底極性を確立した細胞では、中心体がアピカル側の細胞膜に移動し、繫留されることで繊毛が形成される。この過程で、中心体または基底小体は近位領域のアクチン構造を介してアピカル面へと移動することが知られている。一方で、頂底極性が未成熟な線維芽細胞やヒト網膜色素上皮細胞株 (RPE1 細胞) では、繊毛形成の際に中心体の移動を前提とせず、中心体近傍に集積した小胞の直下で軸糸を伸長することで一次繊毛を構築する(図1)。そこで、本研究ではRPE1 細胞の母中心体遠位末端に観察されたアクチン構造がマウス腎髄質内層集合管(IMCD3)細胞株やイス腎臓尿管上皮(MDCK)細胞株の中心体遠位末端にも存在するのかを検証する。これにより、このアクチン構造が繊毛形成過程で普遍的役割(膜成分の繫留を仲介する)を担うか判断する。

4. 研究成果

① 超々解像イメージング技術による一次繊毛、中心体・基底小体の観察

一次繊毛関連分子の空間配置解析にExMが有効であるかを検証した。RPE1細胞について、繊毛膜に局在することが知られるARL13Bと中心体・基底小体構成分子であるFOPの特異的な抗体を用いて染色した膨張前後の試料を調製し、落斜型蛍光顕微鏡で観察した。この結果、非膨張試料では、FOPは単なる二つのドットとして、ARL13Bはこのうち一つのドットを起点とする線状のパターンで観察された。これに対して、膨張後の試料では、FOPはリング状、ARL13Bは鞘状のパターンとして観察された(Katoh et al., 2020)。膨張試料の観察像は、非膨張試料をSIMで観察した画像と比較しても遜色はなかった(Katoh et al., 2020)。

次に、ExM法と超解像顕微鏡との併用により、分解能の向上が実現できるかを検証した。実験では、DAの構成分子であるCEP83, CEP89, SCLT1, FBF1, CEP164, ANKRD26の各分子を対象とし、未膨張試料のSIMでの撮像結果と膨張試料のAiryscan撮像結果を比較した(図5)(Katoh et al., 2020)。未膨張試料のSIM画像では各DA構成分子は母中心体遠位側で固有の径をもつリングパターンを呈する。その一方で、膨張試料のAiryscan画像ではいずれの分子もおおよそ9個のドット状のパターンとして、中心体遠位側の同一円周上に局在する様子が可視化された(図5)。

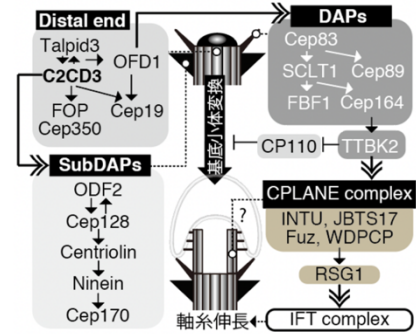


図4. 中心体上各機能領域(間)の構築ヒエラルキー (→)は機能領域間の制御を示す。

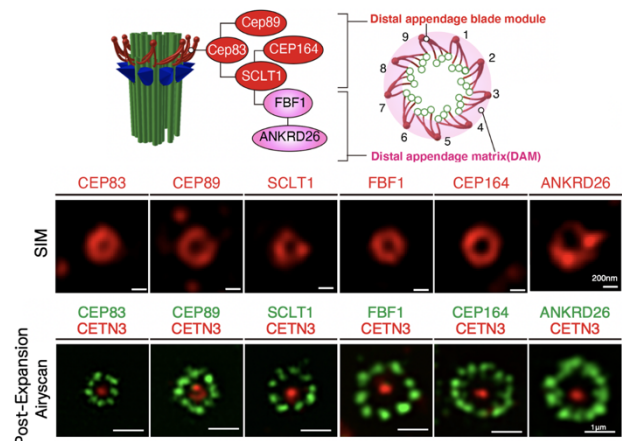


図5. 膨張顕微鏡法と超解像顕微鏡の併用による中心体関連分子の空間配置解析 膨張前の試料をSIMで観察すると、DA構成分子はリングパターンで観察される(写真上段)が、膨張後のAiryscan画像からは各DA構成分子がドット状の局在パターンとして可視化される。

さらに DA 分子が描くリングの直径を未膨張の試料の STORM や STED 解析で算出された当該分子のリングの直径と比較したところ、膨張後試料の実測値を膨張係数である 4 で割った値といずれも大差のないものであった。以上の結果は、ExM と Airyscan を組み合わせた解析は STED や STORM に匹敵する分解能で分子の空間配置を観察可能であり、ある程度、等方性を保ったまま試料を膨張性すること可能であることを示している。Airyscan 超解像顕微鏡は 4 つのレーザー光源が利用可能なことから、ExM 法との組み合わせることで、STORM や STED に匹敵する分解能で複数の対象分子の空間配置解析が可能になるという解析上のメリットを持ち合わせている。そこで申請者は、一次繊毛の形成に伴って中心体近傍で成長する膜構造の形状から繊毛形成の段階を分類し、繊毛内輸送 (IFT: Intraflagellar transport) 装置で順行輸送装置の構成成分の一つである IFT88 の局在を観察した (図 6) (Katoh et al., 2020)。その結果、繊毛構築前には DA 構成分子の CEP164 が中心体の遠位側で示す 9 つのドットの隙間を縫う形で同一円周上に局在する様子が確認された。IFT88 は軸系の形成に伴って繊毛内に進入した後 (図 6, a-d)、軸系が急速に伸長する時には軸系先端に局在するようになり (図 6, e)、成熟した繊毛では軸系の先端と基部に顕著な局在パターンを示すことが明らかになった (図 6, f)。このような高い分解能で繊毛構築過程における分子の空間配置を行った例はなく、ExM を活用することで、一次繊毛の形成過程やそこで機能する分子に関する理解が進み、繊毛の構造や機能の異常に起因する繊毛病の発症の分子基盤の解明に繋がることが期待される。

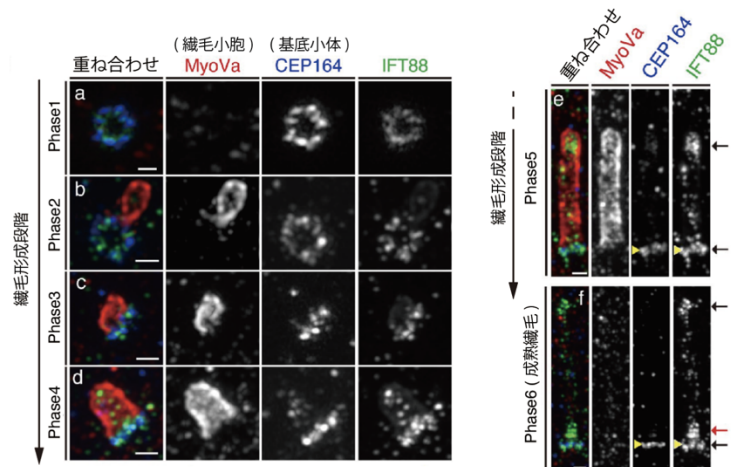


図 6. 膨張顕微鏡法と超解像顕微鏡の併用による一次繊毛構築過程での関連分子の空間配置解析: 繊毛構築過程を繊毛小胞のマーカである MyoVa (赤) を用いて可視化. IFT88 は中心体近傍へ集積後、軸系の伸長に伴って繊毛内へと移動する様子を捉えた。

② 中心体近傍のアクチン構造の形成を担う分子基盤とその役割の解明

ExM と超解像顕微鏡の併用による超々解像イメージング法をもとに中心体近傍にアクチン細胞骨格が構築されるか否かを検証した。この結果、Distal appendage 構成分子やその他の繊毛形成関連分子について、siRNA を用いたノックダウン細胞やゲノム編集によるノックアウト細胞を構築し、母中心小体近傍に観察されたアクチン構造の構築や繊毛形成初期に母中心小体近傍に構築される繊毛小胞 (Ciliary vesicle: CV) の形成に与える影響を検証した。観察の結果、着目した DA 構成分子の発現抑制細胞では母中心小体の遠位部分に PCV の集積は認められたが、いずれも CV の形成は阻害された。そこで、中心体近傍に観察されたアクチン構造の形成に対する影響について検証したが、この場合はいずれの抑制細胞でもアクチン構造自体への影響は見出すことができなかった。

③ 繊毛構築における中心体近傍アクチン構造の普遍的役割の解析

RPE1 細胞の母中心体遠位末端に観察されたアクチン構造が IMCD3 細胞や MDCK 細胞の中心体遠位末端にも存在するのかを検証した。ExM-Airyscan を用いた解析の結果、どちらの細胞株でも上述のアクチン構造が認められたが、現状はこのアクチン構造を特異的に阻害する条件を見つけられておらず、今後、CRISPR-Cas9 を用いた中心体関連分子のノックアウト細胞株を併用しながら、趣旨とする繊毛形成過程でのアクチン骨格の役割を明らかにしていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujisawa Sayaka, Qiu Hantian, Nozaki Shohei, Chiba Shuhei, Katoh Yohei, Nakayama Kazuhisa	4. 巻 10
2. 論文標題 ARL3 and ARL13B GTPases participate in distinct steps of INPP5E targeting to the ciliary membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.058843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishida Yamato, Kobayashi Takuya, Chiba Shuhei, Katoh Yohei, Nakayama Kazuhisa	4. 巻 30
2. 論文標題 Molecular basis of ciliary defects caused by compound heterozygous <i>IFT144</i>/<i>WDR19</i> mutations found in cranioectodermal dysplasia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 213 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okazaki Misato, Kobayashi Takuya, Chiba Shuhei, Takei Ryota, Liang Luxiaoxue, Nakayama Kazuhisa, Katoh Yohei	4. 巻 31
2. 論文標題 Formation of the B9-domain protein complex MKS1?B9D2?B9D1 is essential as a diffusion barrier for ciliary membrane proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 2259 ~ 2268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E20-03-0208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Katoh Yohei, Chiba Shuhei, Nakayama Kazuhisa	4. 巻 31
2. 論文標題 Practical method for superresolution imaging of primary cilia and centrioles by expansion microscopy using an amplibody for fluorescence signal amplification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 2195 ~ 2206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E20-04-0250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kashihara Hiroka, Chiba Shuhei, Kanno Shin ichiro, Suzuki Koya, Yano Tomoki, Tsukita Sachiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Cep128 associates with Odf2 to form the subdistal appendage of the centriole	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 231 ~ 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 千葉秀平、加藤洋平、中山和久
2. 発表標題 超解像イメージングを駆使した一次繊毛トランジション・ゾーンの構築様式の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 中山和久、加藤洋平、千葉秀平
2. 発表標題 繊毛形成と繊毛内タンパク質の輸送基盤
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 加藤洋平、岡崎美聖、千葉秀平、中山和久
2. 発表標題 繊毛膜タンパク質に対する拡散障壁を構成するB9ドメインタンパク質複合体の役割
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Imaging cilia below the diffraction limit
<https://blogs.zeiss.com/microscopy/en/superresolution-cilia-centrioles/>

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
研究協力者	加藤 洋平 (Katoh Yohei)		
研究協力者	中山 和久 (Kazuhisa Nakayama)		

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
---------	---------