

機関番号：13902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770145

研究課題名(和文)哺乳類繊毛・鞭毛の機能多様性に基づく最先端構造解析

研究課題名(英文)The structural analysis of cilia and flagella in mammalian cell

研究代表者

上野 裕則 (UENO, HIRONORI)

愛知教育大学・教育学部・講師

研究者番号：70518240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：ほとんどの真核細胞は繊毛・鞭毛と呼ばれる細胞小器官を持っている。近年の研究によって、繊毛・鞭毛を構成する全蛋白質が報告されたが、繊毛の機能や構造は存在する組織によって多様であり、その構造学的な違いは良く分かっていない。本研究課題では特に、マウスの様々な組織・器官に存在する繊毛・鞭毛に着目し、電子顕微鏡を用いた3次元構造解析を行った。その結果、気管繊毛と精子の鞭毛の3次元構造が明らかとなり、機能の違いと構造の関連性が解明されると期待している。また、繊毛構造の異常は様々な病気に関与しており、繊毛疾患(Ciliopathies)の原因解明や治療法の開発などに向けた基礎的な研究となる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cilia and flagella are microtubule (MT)-based organelles that extend from the surface of eukaryotic cells. Recently, all of the components of human cilia are reported by a comprehensive proteomic analysis of isolated ciliary axonemes. However, cilia and flagella have the different functions depending on the locating tissues and organs. In this research, we focused on the three dimensional structure of cilia and flagella, respiratory cilia, sperm flagella using cryo electron tomography. We found some differences in the three dimensional structures of respiratory cilia and sperm flagella. Since defects in ciliary and flagellar activity in mammalian tissues and organs lead to a number of diseases called ciliopathies, we hope that our structural data are utilized in the treatment of diseases.

研究分野：生物物理

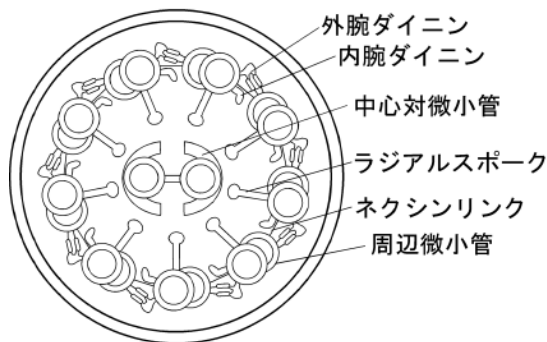
科研費の分科・細目：構造

キーワード：繊毛 鞭毛 クライオ電子線トモグラフィ法

1. 研究開始当初の背景

近年、真核生物の「繊毛・鞭毛」と呼ばれる細胞小器官が、外部流体を形成するために周期的に運動したり、目的の場所に移動するための駆動力(エンジン)としてだけでなく、外部からの化学・力学的な環境変化を感知するための「細胞のアンテナ」でもある事が分かってきている。この繊毛、鞭毛は哺乳類では気管上皮細胞、精子、輸卵管、脳室上皮細胞、腎尿細管、初期発生胚(ノード)、血管内皮細胞などに存在しており、それぞれ異物排除、発生、生殖、恒常性(生理機能の維持)など重要な役割を果たしている。これら繊毛・鞭毛運動の異常は呼吸器疾患による感染症、水頭症、不妊症、内臓逆位などの原発性線毛機能不全症(PCD: Primary Ciliary Dyskinesia)と総称される様々な疾患の原因となる。そのため一言に繊毛・鞭毛といっても、分布する器官・組織に応じた多様な機能をもっており、その分子機構や構造も様々である。たとえば、気管上皮細胞に存在する繊毛は周波数約 15 Hz で回転運動を行い、その内部構造は一般的な 9+2 構造である(下図繊毛構造の模式図)。

① 繊毛構造の模式図

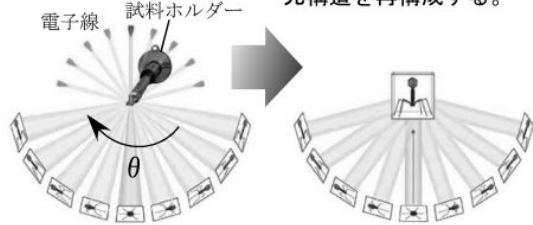


一方、精子の鞭毛は同じ 9+2 構造であるが、鞭毛打頻度は約 20 Hz ほどで、運動波形は 2 次元平面上で正弦波のような振幅運動を示す。また、多くの細胞に存在する 1 次繊毛 (Primary Cilium) は、ダイニン分子(モーター蛋白質)や中心対微小管構造のない非運動性の 9 + 0 構造であると言われている。私はこのような運動性の違いは、繊毛内に存在するダイニン分子などの構造物の配置や、対称性に違いがあるのではないかと考えた。

本研究では繊毛・鞭毛の運動性や機能の違いに着目し、それぞれの詳細な構造をクライオ電子線トモグラフィー法による最先端構造解析を行い、その運動性や役割の違いを構造と結び付ける(図 クライオ電子線トモグラフィー法について)。現在までにウニ精子鞭毛の構造、クラミドモナスの鞭毛の構造が明らかとなっているが、哺乳類の繊毛・鞭毛構造は未解明であった。

② クライオ電子線トモグラフィー法について

様々な角度から電子線を当て、傾斜情報を取得。バックプロジェクションにより傾斜情報から 3 次元構造を再構成する。



2. 研究の目的

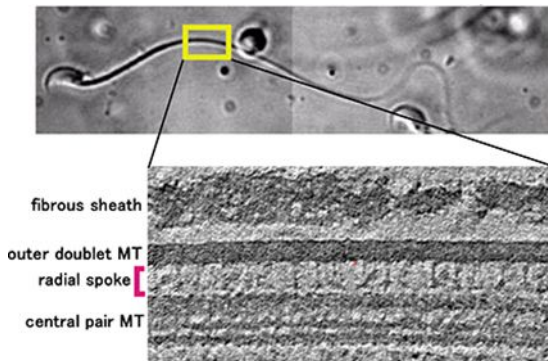
近年、繊毛のプロテオミクス解析によって、約 300 種類の繊毛・鞭毛構成蛋白質が明らかになったが、私達ヒトを含む哺乳類の繊毛・鞭毛は、分布する器官・組織によって運動周波数や波形が異なり、運動せずにセンサーとして特化したものもある。本研究ではこのように様々な組織・器官に存在する繊毛・鞭毛の運動性の違いや多様な機能に着目し、それぞれの繊毛・鞭毛をクライオ電子線トモグラフィー法を用いて詳細な 3 次元構造の違いを調べ比較することにより、機能や運動性と構造の間に関連があるかどうかを調べる。

3. 研究の方法

10~14 週齢のオスのマウスの気管、精巣上体尾部を回収し、光学顕微鏡下で運動性をチェックした。その後、界面活性剤 (NP-40) を用いて繊毛・鞭毛の膜を除いた。繊毛・鞭毛内の構造をより良く観察するためには、この除膜操作により繊毛・鞭毛の膜が完全に除去されていなければならない。そのため、界面活性剤の種類、濃度などの検討が必要であった。本研究では、NP-40 という界面活性剤を 2% で用い、2 回ほど除膜作業を行なうことによって、細胞膜(繊毛膜)が除去されることが分かった。これは負染色法(ネガティブステイニング法)によって確認することが出来た。除膜の条件が確定し、取り出した気管繊毛や精子 (dry sperm の状態: dry sperm というのは活性を持った精子を高濃度で保管する事であり、こうすることで数日の保存であれば可能である) を九州大学、もしくは名古屋大学へ輸送した。名古屋大学には Leica 社製 EMGP があり、それを用いて除膜した気管繊毛・精子鞭毛を液化エタンで凍結した。九州大学ではマニュアルプロットングによって凍結サンプルを作成した。取り出した精子は、その日のうちに凍結サンプルを作り、FEI 社製の電子顕微鏡 (Tecnai Polara) を用いて凍結サンプルの傾斜情報の収集を行った。傾斜は約 65 度 ~ -65 度で行ったが、各サンプルによって傾斜角度は多少異なる。

4. 研究成果

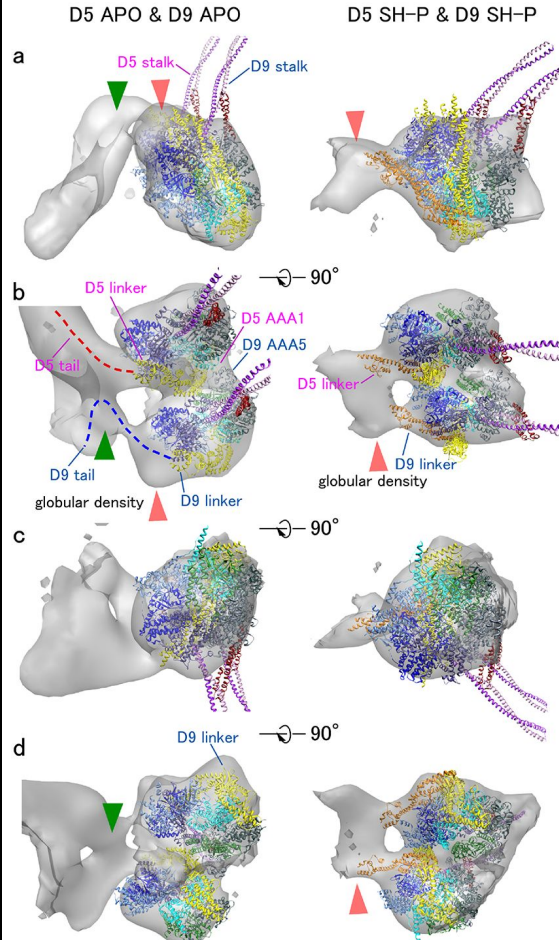
九州大学・生体防御医学研究所に設置してある電子顕微鏡 (FEI 製 Tecnai Polara) 及び名古屋大学の同機種を用い、加速電圧 300kV で複数の繊毛・鞭毛の傾斜画像シリーズを得ることに成功した。撮影の際、傾斜角度やフォーカスのずれを緻密に調整することによって、より詳細な3次元構造を得ることに成功した。マウス精子鞭毛に関しては研究開始当初得られたものよりもさらに詳細な3次元構造を得ることが出来た。その結果、基本的な内部構造は気管の繊毛とそれほど変化はないものの、細かな構造に違いがあることが分かった。また、精子鞭毛には軸系構造の周辺部に存在する Outer Dense Fiber や Fibrous Sheath と呼ばれる精子鞭毛に特有な構造も詳細に確認することが出来た。精子鞭毛のラジアルスポークは気管繊毛で観察されたものと同様、96nm 周期中に3本あることが分かり、その一部の構造の中には気管繊毛と異なる構造があることが観察された。下図は本研究によって明らかにされたマウス精子鞭毛の3次元構造の一部である。



気管繊毛の内部構造に関しては、画像解析法を工夫し、特に外腕ダイニンのみに着目することによって、より詳細な構造を解明することに成功した。また、1mM ATP と 50 μ M バナジン酸を加え、実際にモータータンパク質・ダイニン (本研究では繊毛内に複数あるモータータンパク質の1つ外腕ダイニンに着目した) が力を発生する際、どのような構造変化をしているかを可視化することにも成功した。その結果、ストーク構造は少し角度変化しているものの、依然微小管のマイナス端方向に傾いていることが観察された。この結果は、先行研究での2次元の電子顕微鏡構造解析と一致している。一方、リンカー構造はヌクレオチド有り無しの条件で大きく構造変化していることが分かり、大きな角度変化が観察された。このことが微小管の滑り運動に関与していることが示唆された。

ダイニンの加水分解サイクルでは、ADP/Pi 状態では力発生の前の状態と考えられているため、本研究で観察された、両方の頭部が微小管のマイナス端方向に移動している状

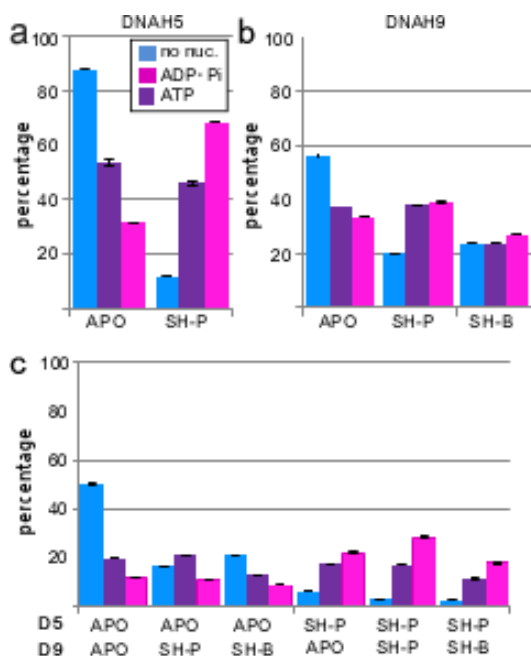
態が力発生の前の状態であると考えた。また、ヌクレオチドのない状態は、力発生後の状態であるため、微小管のマイナス端側にある各頭部がヌクレオチドのない状態へと戻る際に微小管をプラス端方向へ移動させる事が示唆された (下図参照)。



図の説明: 図の APO は ATP のない状態、SH-P は ATP とバナジン酸によって構造変化を起こし、繊毛の基部側 (Proximal end) に移動した状態を示している。D5 は外腕ダイニンの1つ DNAH5 を示しており、軸系構造の内側にある。一方、D9 はもう片方の頭部 DNAH9 を示しており、軸系構造の外側に存在している。
* 但し、軸系の外側にある頭部は複数のダイニン重鎖が含まれているとの報告があり、DNAH9 以外の重鎖が含まれている可能性がある。

このような構造変化が繊毛内のどの部分で起こるのかを可視化するため、各構造変化の位置を単離した粒子情報を基に解析し、各頭部ごと独立に繊毛内部構造に当てはめた。その結果、ATP とバナジン酸の両方を添加した条件では、各頭部の微小管のマイナス端方向への移動は各頭部独立に行っており、2つの頭部間では相関関係は見られなかった。しかし、2つ頭部が両方とも微小管のマイナス端方向へシフトしている割合は最も多かつ

た。ATP とバナジン酸を両方添加したものは ATP が加水分解され、ADP/Pi の状態でリン酸がバナジン酸に置き換わり、その後の反応が停止することが知られている。このことから両方の頭部が繊毛の基部側に移動しているものが、2 頭の軸系ダイニンの力発生前の状態を反映しているという考えは妥当であると判断した。下図はそれぞれの構造変化がどのような割合で繊毛内にあるかを記録したものである。DNAH9 の頭部では、SH-P に加え、SH-B という構造変化も検出できた。SH-B は隣接する周辺微小管の方へ頭部が移動するというものであり、本研究で初めて軸系内で確認された。



一次繊毛に関しては、NIH3T3 細胞を培養し、一次繊毛の存在を確認し、単離方法や回収方法を改善した。今後の 3 次元構造解析によって気管繊毛や精子鞭毛との違いが解明されるものと期待される。

本研究によって、世界で初めての気管繊毛構造の 3 次元構造解析に成功し、さらに繊毛内モータータンパク質の構造を詳細に解析することに成功した。繊毛内のモータータンパク質の運動機構は未だ証明されておらず、本研究ではじめて力発生のメカニズムの一部を解明することができた。また、マウス精子鞭毛の 3 次元構造も世界で初めての研究成果である。繊毛と鞭毛の運動性の違いを構造的に解析した研究はこれまでになく、本研究はそのさきがけとなった。今後さらに詳細な解析を続けることによって、その違いが明瞭となることを期待している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

上野 裕則、ブイ フイ、石川 尚、石川 拓司、山口 隆美

気管繊毛内外腕ダイニンの 3 次元構造とヌクレオチド依存的構造変化

日本機械学会 第 26 回 バイオエンジニアリング講演会 (招待講演)

2014 年 01 月 11 日 ~ 2014 年 01 月 12 日
東北大学片平キャンパス (宮城県仙台市青葉区)

上野 裕則

An alternative force generation of dimeric dynein in cilia revealed by cryo-electron tomography

International Workshop Dynein2013 (招待講演)

2013 年 10 月 31 日 ~ 2013 年 11 月 03 日
KOBE FASHION MUSEUM (兵庫県神戸市東灘区)

上野 裕則、ブイ フイ、石川 尚、石川 拓司、山口 隆美

気管繊毛外腕ダイニンの 3 次元構造とヌクレオチドによる構造変化

65 回 日本細胞生物学会

2013 年 06 月 19 日 ~ 2013 年 06 月 21 日
ウインクあいち 愛知県産業労働センター (愛知県名古屋市中村区)

[図書](計 1 件)

Hironori Ueno

Flow on the surface of the tracheal lumen by ciliary motion of asymmetric axonemal structures

Visualization and Simulation of Complex Flows in Biomedical Engineering

Springer 240 (219-235), 2013

[その他]

ホームページ等

<http://souran.aichi-edu.ac.jp/profile/ja.aMjxJpSqPncT7QTNV7XELA==.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 裕則 (UENO, Hironori)

愛知教育大学 教育学部 講師

研究者番号: 70518240