

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770209

研究課題名(和文) 超高压電子線トモグラフィー法によるマウス胚ノード繊毛構造と回転方向制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on mechanism of rotational movement of node cilia in the mouse embryo by ultra high voltage electron microscopy

研究代表者

篠原 恭介 (SHINOHARA, Kyosuke)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：20527387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの臓器は左右非対称な形態を示すがこれは繊毛運動が作り出す水流により決まる事が知られている。本研究ではこの繊毛の運動と構造の関係性を明らかにした。マウス胚ノード繊毛は時計回りに回転運動するが、これに微小管を安定化させるタキソールを処理すると方向が一定しない回転運動になる事が観察された。さらに電子線トモグラフィーによって繊毛内の微小管配置を解析した所、通常規則正しい微小管の配置がタキソール処理により乱れる事が観察された。実験データで得られた繊毛構造を元にコンピューターシミュレーションを行った所、微小管の規則正しい配置が一方向への安定な回転運動を行う上で必須である事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Determination of left-right asymmetry in mouse embryos is established by a leftward flow that is generated by clockwise rotation of node cilia. Here we show exposure to the microtubule-stabilizing drug paclitaxel/Taxol markedly changes the motion pattern and ultrastructure of node cilia. In general, the node cilia show clockwise rotation. However, Taxol-treated node cilia show rotation in the random direction. We next analyze ultrastructure of node cilia by electron tomography. the node cilia harbor a regular arrangement of nine doublet microtubules, but taxol treatment randomizes the arrangement: a couple of microtubules move from the peripheral to the center of axoneme. To clarify relation between motion and structure of cilia, we carry out computer simulation of ciliary motion based on the electron tomography data. The computer simulation reveals that the regular arrangement of doublet microtubules is essential for stable unidirectional rotation of the node cilia.

研究分野：細胞生物学

キーワード：繊毛

1. 研究開始当初の背景

私達ヒトを始めとする脊椎動物の体の臓器は左右非対称な形態を持っている。ヒトに最も近いモデル生物マウスにおいては受精後 8 日目の胚でこの非対称性が作られる。最初のきっかけは胚中央にあるノードとよばれる細胞群で発生する水流が作ると考えられている。ノード細胞は長さ 2-5 μm の繊毛と呼ばれる微小管から構成される小器官を持ちこの繊毛が時計回りに回転運動する。これにより将来の体の左側から右側へ水流が発生しこの水流がこの時期以前にノード脇で左右対称である遺伝子発現を非対称にすると考えられている。しかしながら、ノード繊毛が回転運動パターンを安定に維持するしくみについてはまだ知見が少なかった。

2. 研究の目的

本研究の目的はマウス胚ノード繊毛が安定に回転運動を維持するしくみを明らかにする事である。そのために繊毛の構造、特に微小管の配置に焦点を当て、解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 繊毛運動の観察

受精後 8 日目の胚を妊娠した雌マウスから回収した。回収した胚のノード細胞を含む領域をタングステン針を用いて分離し、観察用のスライドガラス表面にノード細胞が上を向く方向に置いた。ノード細胞表面における繊毛運動を油浸対物レンズ(100x)により観察した。撮影は CMOS 高速度カメラ (HAS-500, デイテクト)により 100 frames/sec の速度で行なった。

(2) 繊毛構造の観察

① 透過型電子顕微鏡

マウス 8 日胚を 2%PFA と 2.5%グルタルアルデヒドの混合溶液に入れ固定した。洗浄後、オスミウム溶液により 2 次固定を行った。エポキシ樹脂に包埋した試料を超薄切(試料厚さ 80 nm)する事で観察用の試料を作製した。観察は加速電圧 80 kV で行った。

② 超高压電子線顕微鏡(電子線トモグラフィ)

上記と同様のマウス胚試料から厚さ 1 μm の切片試料を作製した。加速電圧 2000 kV(大阪大学超高压電子線顕微鏡センター H-3000)によりノード細胞の観察を行った。試料の角度を 2°きざみで回転させ-60°から+60°までの範囲の角度の画像を撮影した。それぞれの角度の画像を元にコンピューター上で細胞の 3 次元構造の再構成を行った。

(3) 繊毛運動のコンピューターシミュレーション

電子線トモグラフィにより得られた繊毛の 3 次元構造の情報を元に繊毛運動のコンピューターシミュレーションを行った。微小

管・細胞膜・細胞質をそれぞれ計算格子の集合体として実装した。微小管の位置は実験データから得られた 3 次元構造を元に決定した。ダイニンによって発生する力による変形の伝播および繊毛先端の運動の軌跡を観察した。

4. 研究成果

(1) ノード繊毛の運動パターン

通常ノード繊毛は時計回りの回転運動を示すが、微小管を安定化させる薬剤である Paclitaxel/Taxol(タキソール)を処理すると繊毛の運動パターンが時計回りから、方向が定まらないランダムな回転運動に変化する事が観察された。このタキソールの効果は処理後 10 分後から観察され始めた。

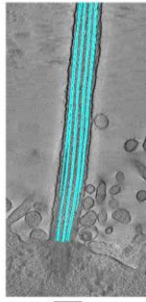
(2) ノード繊毛の構造と微小管の配置

この予想外の現象の原因を調べるため、次にノード繊毛の構造を通常の透過型電子線顕微鏡観察と超高压電子顕微鏡による電子線トモグラフィにより解析を行った。通常の電子顕微鏡観察によってノード繊毛断面の構造を解析した。コントロール培養下(DMSO)でのマウス胚における繊毛においては繊毛内に 9 本の微小管が等間隔に規則正しく並んでいた。これに対して 5 μm のタキソール下で培養したマウス胚では 9 本の微小管の配置の規則性が乱れており、本来構造がない軸系中央部に微小管が入ってくるトランスポジションという現象が観察された。繊毛運動の結果と同様に、この構造が変化する現象はタキソール処理後 10 分後から観察され始めた。さらにこの微小管の配置異常を詳しく調べるため、電子線トモグラフィにより繊毛の 3 次元構造を解析した。コントロール培養下では繊毛軸系内の微小管は根元から先端まで規則正しい等間隔の配置をとっていた。これに対してタキソール存在下で培養したマウス胚では繊毛軸系の途中から数本の微小管が軸系中央部に入り込んでいくのが観察された。繊毛の微小管にはダイニン腕という運動装置が決まった向きに結合しており、このダイニン腕が構造変化を起こすことで隣り合う微小管を滑らせる事がこれまでに分かっている。この事から繊毛微小管の配置の異常が運動パターンの異常を引き起こす原因である事が予想された。

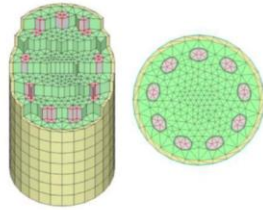
(3) ノード繊毛運動のコンピューターシミュレーション

次に繊毛運動パターンと繊毛構造の関係性を明らかにするために運動のコンピューターシミュレーションを行った。正常な微小管の配置を持つコントロール培養下のマウス胚ノード繊毛では、時計回りの回転運動が観察された。一方で、タキソール下で培養したマウス胚が持つノード繊毛では微小管の配

Tomography data



Mesh framework



Computer simulation

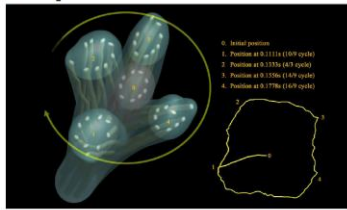


図 1 繊毛構造解析データにもとづく繊毛運動のコンピューターシミュレーション

置の異常によりダイニン腕の発生する力の伝播する方向が一定せず結果繊毛の運動パターンが乱れる事が観察された。これらコンピューターシミュレーションの結果とマウス胚の繊毛運動観察結果からノード繊毛が安定に一方方向に回転運動するためには微小管の規則正しい配置が必須である事が示唆された(図1)。

以降の項目は当初の研究計画にはなかったが本研究課題と強く関連する研究に進展があったため報告する。

(4) マウス運動繊毛におけるラジアルスポーク

マウス胚ノード繊毛は軸糸中央に構造を持たず9+0構造と呼ばれる配置を持つ。一方でマウス気管繊毛は軸糸中央に Central Pair とラジアルスポークとよばれる構造を持ち、これまでの緑藻類クラミドモナスやユニ精子の実験からダイニン腕の活性化の制御を行っていると考えられている。マウスにおけるラジアルスポークの役割を調べるためにラジアルスポークヘッド蛋白をコードする *Rsph4a* 遺伝子のノックアウトマウスを作製

した。通常マウス気管繊毛は平面内に方向性を持つ非対称打の運動パターンを示す。一方、今回作製した *Rsph4a* ノックアウトマウスの気管繊毛はマウス胚ノード繊毛と同様に時計回りの回転運動を示した。この事から中央構造の有無が回転運動と平面打運動の2つの運動パターンの切り替えに関与し、中央構造を欠損した気管繊毛の運動はノード繊毛の運動を模擬している事が示唆された。

(5) 気管繊毛に対するタキソールの効果：微小管配置を維持するしくみ

次にマウス気管繊毛に対するタキソールの効果を調べた。5 μM のタキソール存在下でマウス気管繊毛を2時間培養し繊毛運動の観察を行った所、薬剤の効果は見られず平面内打の運動パターンが維持されていた。観察後に試料を固定し透過型電子顕微鏡観察を行った所、コントロール培養下と同様に正常な9+2構造が維持されており繊毛構造にもタキソールの効果はみとめられなかった。最後に *Rsph4a* ノックアウトマウスの気管繊毛に対するタキソールの効果を調べた。5 μM のタキソール存在下で *Rsph4a* ノックアウトマウス気管繊毛を2時間培養し運動を観察した。コントロール培養下では大半の繊毛が時計回りの回転運動を示すのに対して、タキソール処理をした半数の繊毛は方向の定まらない乱れた回転運動を示した。観察後に試料を固定し透過型電子顕微鏡観察を行った所、半数の繊毛で微小管の配置異常であるトランスポジションが観察された。このタキソールの効果はノード繊毛に対する効果とよく似ているといえる。

以上のノード繊毛と気管繊毛の運動・構造に関する実験とシミュレーションにより、(i)マウス胚ノード繊毛が安定に回転運動するためには等間隔の規則正しい微小管配置が必須である事、(ii)マウス運動繊毛では中央のラジアルスポークにより規則正しい微小管配置を維持している事、(iii)ノード繊毛は中央構造体を持たないため摂動に対して構造および運動パターンが脆弱である事が示唆された。マウス胚は受精後8日目以前に確立された前後極性を元にして左右性を新しく獲得する。このためには繊毛は前後方向に対して直交する方向への運動様式である回転運動をする必要があったと考えられる。進化の過程でどのように繊毛が回転運動を獲得したのか今後の調査が期待される。

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 1 件)

① K. Shinohara *etal.*, "Unexpectedly fragile architecture of nodal cilia that

determine left-right asymmetry in the mouse embryo “, Cilia 2014, Nov18th-21th 2014, Paris, France.

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 恭介 (SHINOHARA, Kyosuke)

大阪大学大学院生命機能研究科・助教

研究者番号：20527387

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし