

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18543

研究課題名(和文) 基底小体へと伸長するユニークな膜構造のシリア位置制御における役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of the function of membrane invagination in ciliary positioning

研究代表者

根岸 剛文 (Negishi, Takefumi)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教

研究者番号：30726576

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)：ほとんど全ての多細胞生物においては、細胞の向きが決まっている「極性」を持った細胞が存在している。この細胞内に生じた位置情報である細胞極性は、細胞分裂の方向制御など様々な生命現象に用いられる。細胞表面に毛の様に形成されるシリア(繊毛)の位置も多くの生物において細胞極性によって決められている。シリアの位置制御は、哺乳類の左右の確立や脳機能に必要であることが知られ、動物にとって重要である。本研究では、海産脊索動物であるカタユレイボヤの表皮細胞において、極性を持ち細胞後方から前方へと伸びるユニークな膜構造がシリアの位置制御に関与することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかにした膜構造を介したシリア位置の制御様式にはPlanar Cell Polarity (PCP)経路が関与している。PCP経路のシリアの位置制御への関与は、マウスやアフリカツメガエルで報告がある。ホヤを用いた本研究によりその機能が脊索動物全体で保存されていることを明らかにした。また、本研究で示した様に膜構造が引張りによりシリア位置の制御に働くことは他の研究では示されておらず、新しいシリア位置制御様式を提唱することができた。シリアの位置決定は発生生物学分野のみならず、医学研究において重要な役割を持つため、本研究により幅広い分野にインパクトをもたらすことができた。

研究成果の概要(英文)：Almost all multicellular organisms have the cells with "polarity" in which they are oriented. The cell polarity, which is the geometrical information of the cell, is used for various life event including the orientation of mitotic cell division. The positioning of cilia is also determined by the cell polarity in many organisms. Positional control of cilia is important for animals, as it is known to be necessary for left-right establishment and brain function in mammals. In this study with the marine chordata *Ciona robusta* (*Ciona intestinalis* type A), we found that a unique membrane structure, which is invaginated from the posterior to the anterior part of the cell is involved in cilia positioning in the epidermal cells.

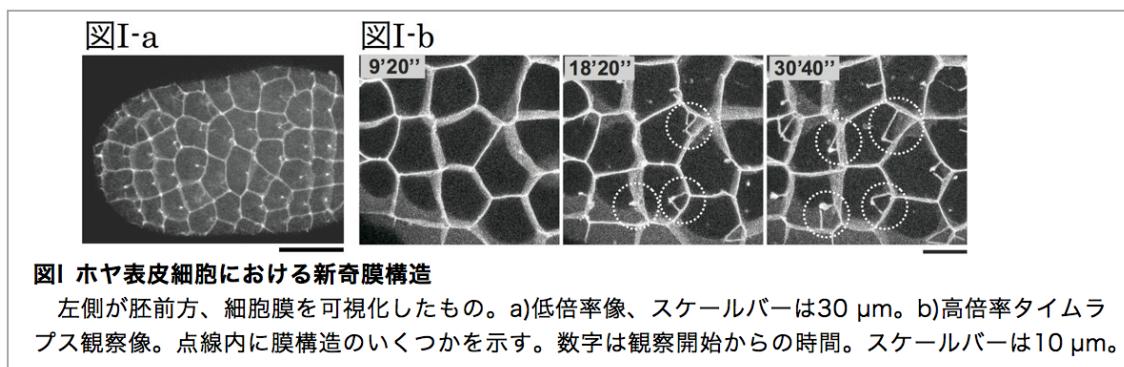
研究分野：発生生物学

キーワード：シリア 中心体 細胞膜

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

表皮を含む上皮細胞では Planar Cell Polarity (PCP) 経路因子によって制御された極性が存在することは非常によく知られている。この細胞内に生じた位置情報は、様々な生命現象に用いられる。その中でも重要な現象の一つがシリアの位置決定である。アフリカツメガエルの後期原腸腔上皮 (gastrocoel roof plate)、ゼブラフィッシュのクッパー胞やマウスの脳上皮やノードでは、PCP 因子がシリアの位置決定に寄与し、さらに左右軸決定に関わることが明らかにされている。脊索動物の仲間であるホヤ (カタユウレイボヤ・マボヤ) の表皮細胞においても、PCP 因子の関与は未だ不明であるが、後方へ偏ったシリアが観察されている。さらにマボヤを用いた研究において、このシリアが胚を回転させ、左右軸の決定に関わることが明らかにされている。このようにシリアによる左右軸の確立は種を超えた普遍的なものと考えられる。また、一方で、シリアは単細胞生物であるクラミドモナスから哺乳類に至る極めて多様な生物に見られる構造である。このような多様化にシリア位置決定の細胞・分子メカニズムが対応しているかを明らかにしていくことは、大きな課題だと考えられる。そこで、本研究では、私がカタユウレイボヤで見出した新奇な膜構造がシリアの位置を決めていると考え、本研究計画を着想した。カタユウレイボヤ胚における新規な膜構造は分裂期間中に細胞の後方から中心体へと伸長し (図 I 参照)、さらにこの中心体はシリア形成時に基底小体を形成していた。しかしながら、この膜構造の形成メカニズムや機能は明らかにされておらず、新奇な膜構造のシリアにおける機能を明らかにすることで、全く新しいシリア形成位置の制御様式が明らかできると考えた。



2. 研究の目的

本研究では、膜構造の(1)極性化メカニズム、(2)シリア位置への役割、(3)胚発生における役割の3点を明らかにすることでシリア形成位置の新しい制御様式とその役割を見出すことができると考え、研究を行った。それぞれ具体的には、(1)新奇膜構造の極性化メカニズム：シリアの後方化には膜構造の前後に沿った極性が重要であると考えており、その確立メカニズムを明らかにする。(2)新奇膜構造のシリアの後方化における役割：膜構造の極性が乱されたとき、シリアの形成位置や動きにどのような影響があるかを明らかにすることで、新奇膜構造がシリアにどのような役割を持っているかを明らかにする。(3)新奇膜構造のシリア位置のコントロールを介した胚発生に持つ役割：上記(2)で明らかにしたシリアの異常が胚発生へどのような影響があるかを明らかにし、新奇膜構造のシリアの位置決定を通じた胚発生における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

新奇膜構造の極性化メカニズムの解明のために、本研究では PCP 経路因子の一つである Dishevelled (Dsh) に注目した。Dsh の機能を解析するために本研究では、タンパク質の合成を Dsh 特異的に阻害するモルフォリンノアンチセンスオリゴ (*Dsh* MO) を用いた。*Dsh* MO を未受精卵に注入し、その胚において膜構造およびシリアの形成を観察した。膜構造の可視化法として膜結合ドメインを携行標識した PH-GFP または PH-tdTomato の発現、シリアの可視化法としてシリアに局在するタンパク質を蛍光標識した Arl13b-GFP の発現、またはアセチル化チューブリン抗体を用いた免疫染色を行った。新奇膜構造のシリアの後方化における役割を明らかにするために、*Dsh* MO 注入胚において、シリアの位置及び動態を観察した。さらに新奇膜構造を介したシリア位置のコントロールが胚発生にどのような役割を持つか、特に左右軸の確立への役割を明らかにするため、膜構造の形成が異常になった胚において、カタユウレイボヤの左側マーカーである *Nodal* の発現を in situ hybridization により解析した。また、ホヤでは左右軸の確立に神経胚期におこる神経胚回転が重要であることが明らかにされており、この回転と膜構造、シリア位置及び左右軸確立の関係を、in situ hybridization とライブイメージングを組み合わせて解析した。

4. 研究成果

(1) 新奇膜構造の極性化メカニズムの解析

カタユレイボヤの表皮細胞で見つかった膜構造は後方から前方へ伸長が見られた。多くの動物の上皮系細胞で見られる極性はPCPがその成立に関わっており、本研究でもPCP因子の一つであるDshに注目した。Dshの機能阻害のため*Dsh* MOを未受精卵に注入し、得られた胚において膜構造の極性を観察したところ、コントロール胚では後方から前方に中心体に向かい膜構造が伸長するのに対し、*Dsh* MO注入胚では、前方からの膜構造の伸長も見られ、極性が大きく乱されていた(図II参照)。正常胚においては中心体が後方へ引き寄せられ、中心体の複製後に前後軸に沿って紡錘体の極が並び、結果として前後軸方向への分裂が起こる。一方で、*Dsh* MO注入胚では、中心体の位置が細胞中央となり、分裂方向もランダムになった。これらのことから、この新奇の膜構造の極性の確立にはDshが関与していると考えられる。また、膜構造の形成メカニズムは今のところ不明であるが、微小管の重合阻害剤であるノコダゾールにより膜構造の形成が阻害されたこと、さらに電子顕微鏡を用いた観察において膜構造の先端と中心体の間に微小管が多く見られたことから、モータータンパク質を含む微小管結合タンパク質がこの膜構造の形成に関わっていると考えられる。以上の結果をまとめ、新規な膜構造の発見を論文として発表した。さらに現在までに、膜構造の先端に α -、 β -、及びP120カテニンタンパク質が局在できることを明らかにした。これらのタンパク質はほとんど全ての多細胞生物の細胞膜に局在し、微小管の配向を含む様々な役割を持つことが知られており、今後これらの因子が膜構造の形成に関与していることが明らかになれば、細胞分裂の方向やシリアの位置の制御に関する新たな知見が持たされることが期待できる。



(2) 新奇膜構造のシリアの後方化における役割の解明

カタユレイボヤの表皮細胞では、膜構造が形成される時期に細胞の後方位置にシリアの形成も報告されている(Thompson et al. 2012 Dev. Biol.)。本研究では、PH-tdTomatoとAr113bの共発現によるライブイメージング、及び電子顕微鏡による観察により、膜構造の伸長先の中心体がシリアの基底小体を形成していることを明らかにした。さらに前述の通り、PCP経路因子であるDshがこの膜構造の極性形成に関わっているため、*Dsh* MOを未受精卵に注入し、機能阻害実験を行った。*Dsh* MO注入胚においては、前述の通り中心体が細胞中央に位置しており、さらにシリアの位置も細胞中央に変化していた。このことからPCP経路を介した膜構造の極性がシリアの位置に関与していることを明らかにした。PCP経路がシリアの位置決定に関わることは、マウスやアフリカツメガエルで報告があり(Antic et al. 2010 PLOS One, Hashimoto et al. 2010 Nat. Cell. Biol.)、その機能が少なくとも脊索動物全体で保存されていることを明らかにすることができた。またシリアの動態に関しては、シリアの形成時期が神経胚回転の時期と同じであるため、その解析が難しく現在までにその詳細は明らかにできていない。別グループにより、カタユレイボヤの表皮細胞のシリアはマウスのノードのものと異なり波状に動いていることが報告されており(Yamada et al. 2019 Dev. Biol.)、この膜構造による細胞内位置とこの運動の関係を明らかにすることで、新しいシリア動態の制御メカニズムを明らかにできる可能性がある。

(3) 新奇膜構造のシリア位置のコントロールを介した胚発生に持つ役割の解明

本研究ではこれまでにカタユレイボヤの表皮細胞では中心体及びシリアの基底小体へと伸長する膜構造が形成されること、この膜構造が中心体の位置の制御を介し細胞分裂の方向を決定していることを明らかにした。さらにこの膜構造の伸長先である中心体がシリアの基底小体となるため、この膜構造がシリアの位置も制御していることも明らかにした。また、この膜構造の極性はPCP経路因子であるDshにより確立されることも明らかにしている。この膜構造およびシリアが形成される時期は、カタユレイボヤの左右軸の確立に重要な神経胚回転の時期と一致していることから膜構造がシリアの位置を介し神経胚回転を引き起こすことで、左右軸の確立に関与している可能性が高いと考えられた。そこで、まず*Dsh* MO注入によりシリア位置が細胞中央になった胚において神経胚回転がどのような影響を受けるかを観察した。正常胚では、胚の前後軸を軸として反時計回りの回転を示すが、*Dsh* MO注入胚においては、多少の胚の摂動は見られるものの正常胚のような反時計回りの回転は見られなかった。このことから、Dshが膜構造の極性を介したシリア位置の制御により神経胚回転に関わっていると考えられる。またDshは表皮細胞の極性形成以外にもカタユレイボヤの脊索の形成に関わっており、Dshの

機能阻害胚では、尾部の伸長が異常になる。そこでこの尾部の形態異常が神経胚回転に影響を与えているかを確認するために、脊索の運命決定に関わる *Brachyury* (*Bra*) の機能阻害を *Bra* MO の注入により行った。*Bra* MO 注入胚では、膜構造の極性、及びシリア位置が正常胚と同じであることを確認した後、神経胚回転を観察した。その結果、*Bra* MO 注入胚では、正常胚と同様に反時計回りの神経胚回転が見られた。このことから、*Dsh* MO による神経胚回転の異常は表皮細胞の極性が乱れたことによる可能性が高いと考えられる。続いて、*Dsh* MO 注入において、カタユウレイボヤの左側に発現する *Nodal* mRNA の *in situ* hybridization による検出を試みた。しかしながら、*Dsh* の機能阻害胚の形態が正常胚と異なるため、*in situ* hybridization 用固定胚では胚の左右の判別が難しく、現在までに明確な結果を得ることができていない。今後は、胚の左右を蛍光または化学標識することで *Dsh* MO 注入胚で左右の判定を可能にし、*Dsh* が神経胚回転を介し、左右の確立に関わっているかを明らかにできると考えている。また、興味深いことに、神経胚回転はカタユウレイボヤやマボヤを含めたホヤ全般で広く見られる現象であるが、マボヤとカタユウレイボヤではその様式に相違点が存在する。マボヤでは神経胚回転は胚の体勢を、最終的に胚左側を下にするように反時計回りに回転する。すなわち、その回転角は 360 度を超えることがない。一方で、カタユウレイボヤではシリアが形成されている間、反時計回りの回転が続き、その回転角は 360 度を超える。マボヤでは、神経胚回転後の胚の体勢が左右軸の確立に重要であるが、カタユウレイボヤでは、神経胚回転がどのように胚の左右を確立するか明らかではない。本研究で、回転中の胚をいくつかの時点で固定し、*Nodal* mRNA の *in situ* hybridization を行ったところ、回転中の胚においても *Nodal* が胚左側で発現していた。このことから、カタユウレイボヤでは、回転運動そのものが胚の左右の確立に関わっていると考えられる。マウスのノードでは、シリアの回転運動による水流がマウス胚の左右軸を確立することが知られている (Nonaka et al. 1998 Cell)。今後、カタユウレイボヤにおいて神経胚回転の摂動実験を行い、回転運動がマウスノードにおける水流と同様に胚左右軸の確立に関わっていることを示すことで、新たな左右軸決定メカニズムを提唱できると考えている。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 上野 直人, 鈴木 誠, 根岸 剛文	4. 巻 29
2. 論文標題 動物発生のバイオメカニクス	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 バイオエンジニアリング講演会講演論文集	6. 最初と最後の頁 1A32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1299/jsmebio.2017.29.1A32	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 Negishi, T., Miyazaki, N., Murata, K., Yasuo, H. Ueno, N.	4. 巻 5
2. 論文標題 Physical association between a novel plasma-membrane structure and centrosome orients cell division.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 e16550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.7554/eLife.16550	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 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 7件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Takefumi Negishi
2. 発表標題 A novel membrane structure orchestrates centrosome positioning during embryogenesis
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 根岸剛文
2. 発表標題 胚発生中における細胞分裂の制御について
3. 学会等名 第9回分子モーター討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野直人, 鈴木誠, 根岸剛文
2. 発表標題 動物発生のバイオメカニクス
3. 学会等名 日本機械学会 第29回バイオエンジニアリング講演会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naoto Ueno, Takefumi Negishi
2. 発表標題 Membrane dynamics of ascidian embryo controls the orientation of cell division
3. 学会等名 Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takefumi Negishi, Naoto Ueno
2. 発表標題 Membrane invagination-mediated posterior ciliary positioning is involved in the neurula rotation related to establish left-right asymmetry in ascidian embryo
3. 学会等名 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biology(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naoto Ueno, Takefumi Negishi
2. 発表標題 A novel membrane invagination controls oriented cell division in ascidian embryo
3. 学会等名 18th International Congress of Developmental Biology(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takefumi Negishi, Naoto Ueno
2. 発表標題 Membrane invagination-mediated posterior ciliary positioning is involved in the neurula rotation in <i>Ciona intestinalis</i>
3. 学会等名 9th International tunicate meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ulla-Maj Fiuza, Takefumi Negishi, Alice Rouan, Hitoyoshi Yasuo, Patrick Lemaire
2. 発表標題 A Nodal and Ephrin signalling relay drives the transition between apical constriction and apico-basal shortening during ascidian endoderm invagination
3. 学会等名 9th International tunicate meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 根岸剛文, 上野直人
2. 発表標題 カタコウレイボヤ胚で見出された膜構造によるシリア位置制御の役割の解明
3. 学会等名 日本動物学会平成29年度東北支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takefumi Negishi, Naoyuki Miyazaki, Kazuyoshi Murata, Hitoyoshi Yasuo, Naoto Ueno
2. 発表標題 Investigation of the molecular mechanism underlying the formation and polarization of membrane invagination that determines cell division plane of ascidian epidermal cells
3. 学会等名 22nd Conference of Zoology and 87th meeting of the Zoological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 上野直人, 鈴木誠, 根岸剛文
2. 発表標題 動物発生のバイオメカニクス
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 根岸剛文, 宮崎直幸
2. 発表標題 3D-SEMを用いた新奇な構造の解析
3. 学会等名 日本動物学会第87回沖縄大会(招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 根岸剛文
2. 発表標題 カタコウレイボヤ神経胚の表皮細胞にみられる繊毛の特徴と機能の解析
3. 学会等名 第3回ホヤ研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 根岸剛文, 宮崎直幸, 村田和義, 安尾仁良, 上野直人
2. 発表標題 Investigation of the molecular mechanism underlying the formation and polarization of membrane invagination in ascidian epidermal cells
3. 学会等名 JSDB Special Symposium
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takefumi Negishi, Hiroki Nishida	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 421
3. 書名 Asymmetric Cell Division in Development, Differentiation and Cancer	

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞分裂方向のコントロールに関わる"による"と伸びる新しい細胞内構造を発見 http://www.nibb.ac.jp/press/2016/08/10-2.html
--

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