

普遍的な細胞小器官である“繊毛”の形状変化の 定量的解析へ向けたツールの作成

学習院大学 理学部 物理学科 教授 西坂 崇之

学習院大学 計算機センター 教授 横山 悦郎

学習院大学 自然科学研究科 物理学専攻 博士後期課程 加藤 孝信

【概要】

多くの生物細胞は、“繊毛”と総称される、長さ数ミクロン、太さ 200 nm の突出した細胞小器官を有する。特に“不動繊毛”と呼ばれる繊毛は、粘液の流れを感知するアンテナのような機能を持っていると考えられており、哺乳類の体軸形成過程、特に左右軸の決定において重要な役割を担う。この繊毛は、光の波長程度の直径しか持たないため、特殊な光学系を用いた顕微鏡を用いない限り観察することはできない。我々は、マウス初期胚のノード不動繊毛に対し、薄層斜照明法 (HILO)¹ を適用することにより、組織中の不動繊毛を高時間・空間分解能で観察することに成功した。その結果、周囲の溶液の流れに応じた不動繊毛の受動変形の定量的解析が可能となった。我々は、特に高周波領域での変形が“不動繊毛のアンテナとしての機能”にかかわっていると考えており、実際に左右の対称性を破る引き金となっているのか、詳しい検証実験を行っている。

【背景】

われわれ哺乳類はなぜ左側に心臓があるのだろうか。近年、数々の研究を通じて、哺乳類の発生過程において左右軸がいつ・どのように決まるのかということが明らかになってきた。マウス初期胚を使用した実験によると、受精卵の時期において非対称性は獲得していない。その後の発生段階において、受精後 4 日目以前に前後軸を決める遺伝子の発現² が起こり、その前後軸の情報を利用して受精後 7.5 日から 8 日にかけて“へそ”のあたりにある“ノード”という部位で左向きの粘液の流れ“ノード流”が起きることがわかってきた³ (図 1 a, b)。

このノード流を“不動繊毛”という細長い毛が感知することにより、左右が決定される^{4,5} (図 1 b)。“不動繊毛”とは、細胞の表面から伸びた長さが $\sim 5 \mu\text{m}$ 、太さが $0.2 \mu\text{m}$ 程の構造で、センサーのような機能を担っていると考えられている。では、“不動繊毛”はどのようにして流れを感知しているのだろうか (図 1 b, d)。ノードの左側の不動繊毛のイオンチャネル¹を介して、左側特異的にある遺伝子の発現が抑えられることが報告されている⁶。

¹ イオンチャネル 細胞膜に存在し、特定の陽イオンのみを選択的に透過する穴の開いた構造を持つたんぱく質の総称。特定の種類のチャネルは細胞内外の電位差に反応してイオンが通りやすい構造と通りにくい構造をとることが知られている。

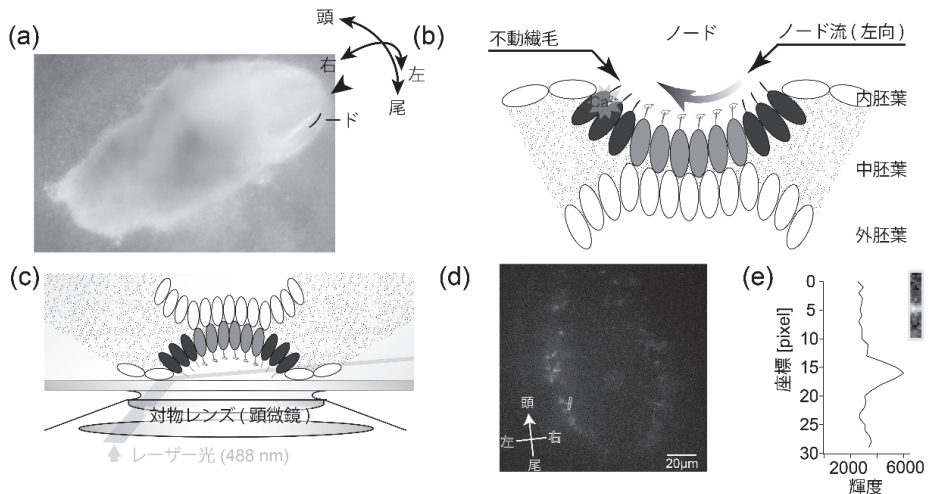


図1. マウス 7.5 日胚のノードの薄層斜光照明観察 (a) 妊娠 7.5 日の雌マウスから回収した初期胚。“へそ”あたりのくぼみ (矢頭) がノードを表す。(b) ノードの断面図。くぼみの周辺部に不動繊毛が生えている。また、ノードのくぼみの中には左向きノード流が存在することが知られている。(c) 薄層斜光照明法の模式図。顕微鏡のレンズの周縁部から斜め方向のレーザー光を入射させることにより、シート状の照明光 (励起光) を実現した。(d) 薄層斜光照明法によって観察したマウスノード。不動繊毛が蛍光を発する遺伝子組み換えマウスを用いている。画像中心がノードのくぼみで、周縁部に存在し中心に向けて伸びている白い棒状のものが不動繊毛を表す。(e) 不動繊毛の先端の座標の取得。縦軸が座標、横軸が輝度を表し、輝度が高くなっている部分が不動繊毛の位置を表す。この不動繊毛の中心座標の時間変化を、動画像の各フレームの輝度の重心解析を行うことにより取得した。

このことから、左側の不動繊毛において“不動繊毛が受動的な変形を課せられることにより、繊毛内部のカルシウム濃度が上昇することによって、流れが感知される”と考えられているが、その詳しいメカニズムは未だによくわかっていない。

我々は、生きたマウス初期胚の不動繊毛の動きを直接検出する為に、最適な光学顕微鏡システムを開発・適用した。その結果、ノード流の上流と下流、そしてノード流が無い変異体での不動繊毛の動きを定量化することに成功した。

【研究の内容と成果】

1. マウス初期胚の回収と条件検討

マウス初期胚は直径が ~ 0.4 mm 程度、長さが ~ 1 mm 程度の楕円体形状をしている(図 1 a)。これを子宮内から回収し生きたまま観察するには、高い技術が必要となる。我々は共同研究先である理化学研究所 多細胞システム形成研究センター 個体パターンニング研究チームにおいて、マウス初期胚の回収技術の習得及び、ライブイメージング^{*2}のノウハウを習得し

^{*2} ライブイメージング 生体内の特定の構造や遺伝子などを生きたままの状態でも可視化すること。通常、蛍光たんぱ

た。

特に、“左向きのノード流”を受けて不動繊毛が受動的に動いていると考えられるため、先行研究⁷を参考に、流れを妨げないような観察条件を検討した。

2. 不動繊毛の高速ライブイメージングシステムの構築

ノード不動繊毛の観察には一般的に共焦点顕微鏡³が用いられてきた。共焦点顕微鏡は高いS/N⁴で3次元像を撮影できる一方、撮影速度が比較的遅く、画像を1枚撮影するのに300ミリ秒から1000ミリ秒を要する。我々は、特に高周波領域での不動繊毛の変形が“不動繊毛のアンテナとしての機能”にかかわっていると考えているため、繊毛1本の動きを高速に撮影できる顕微鏡法の選定を行った。

高解像度型の微分干渉顕微鏡⁵と、ニポウディスク型共焦点顕微鏡、そして、薄層斜光照明法 (HILO) で比較を行ったところ、HILO が最適であることがわかった。HILO とは、～数十 μm のシート状の励起光を実現する方法で、不動繊毛のみに蛍光たんぱく質⁶を発現したマウスと組み合わせることにより、特定の焦点面付近の繊毛から発せられた蛍光だけを撮影できる (図 1 c)。さらに、光子1個を検出する性能を持つ超高感度カメラ、電子倍增型冷却 CCD カメラ (EM-CCD) を用いることによって、1枚わずか 29.5 ミリ秒で撮影することに成功した (図 1 d)。

3. 不動繊毛の形状変化の定量化プログラムの作成

我々は、撮影した動画像データに対して、画像解析を行うことにより、不動繊毛の微小な動きを検出することを試みた。まず、繊毛の位置を正確に検出するために、蛍光像の中心 (超局在) を求めることにより画像の1画素よりも小さい動きを検出可能な技術を応用した。具体的には、不動繊毛の蛍光像の輝度の重心を計算するプログラムを作成して、中心座標を求めた。

さらに、S/N を向上させるため、不動繊毛の先端付近の接線方向 (流れと垂直な方向) の動きのみに注目してシグナルを積算することを行った (図 1 e)。これらの工夫により、不動繊毛先端の動きのトラッキングに成功した (図 2 a)。

く質を発現するように遺伝子組み換えを行った生物に対し、蛍光顕微鏡を用いて励起光を照射することにより、注目したい構造や遺伝子を蛍光シグナルとして捉える。

³ 共焦点顕微鏡 サンプルのある一点のみを励起し、その一点から発せられた蛍光のみを走査しながら検出する顕微鏡。サンプル内の特定の点を順次走査してゆく為、高い解像度と低いノイズが特徴で3次元的な走査をすることにより立体像の取得も可能である。

⁴ S/N 信号対雑音比のこと。顕微鏡像の取得に限ると、取得したい蛍光シグナル (繊毛) と背景のノイズ (細胞自体が発する蛍光など) の比を表す。一般的に S/N が十分でないとき定量的な解析が難しくなる。

⁵ 微分干渉顕微鏡 複屈折と光の干渉の性質を用いることにより、サンプルの屈折率の違いを検出することができる顕微鏡。

⁶ 蛍光たんぱく質 励起光を照射すると蛍光を発するたんぱく質の総称。2008年にノーベル賞を受賞された下村先生が発見した緑色蛍光たんぱく質 (GFP) に代表される。

4. 不動繊毛の形状変化の定量化

我々はこのツールを利用して、ノード流の上流側（右側）、下流側（左側）、そしてノード流が存在しない変異体マウスの不動繊毛の動きを定量化した（図 2 a）。その結果、繊毛先端の接線方向の変位のうち、低周波数成分も含めた全体の変位は上流・下流で大きな違いは見られなかった（図 2 b）。一方高周波成分（7Hz 以上）では、上流・下流側ともに変異体よりよく動いているうえで、さらに下流の方が上流よりもよく動いていることがわかった（図 2 c）。これは、ノード流を受けた、下流側の不動繊毛が受動的に細かい動きをしていることを表す。

具体的に上流・下流で動き方にどのような違いがあるのかを明らかにするため、一定の時間内に特定の距離動いた回数をカウントした。その結果、29.5 ミリ秒間に 1 μm 動くような動きが、下流では上流の 6.2 倍多くみられることがわかった（図 2 d）。我々は、この動きの違いが左右非対称性を破る引き金となるシグナルなのではないかと考えている。

現在、“この動きの違い”が、本当に左右非対称性を破る引き金となるのか、異なる実験手法を用いて、詳細な検証を行っている。

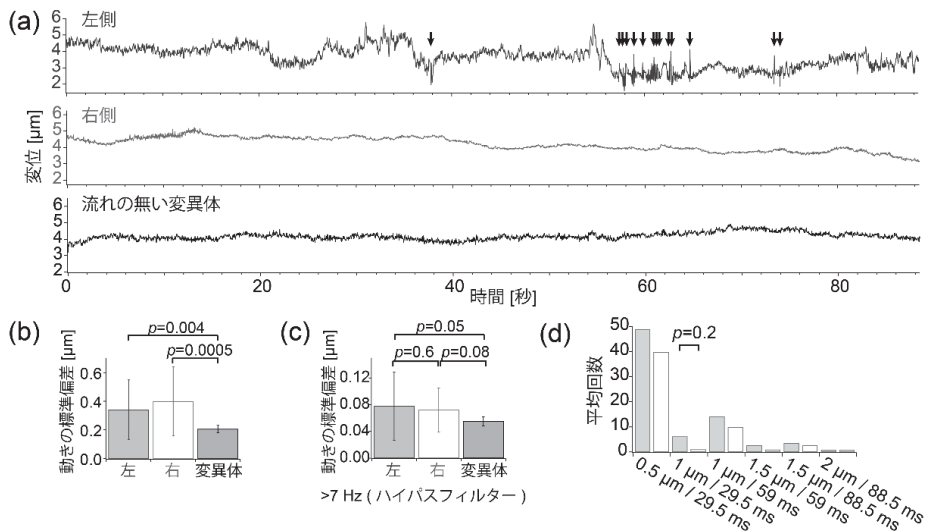


図 2. ノード不動繊毛の先端の動き (a) 上から、左側（流れの下流）、右側（上流）、流れの無い変異体の不動繊毛の動き。左側の不動繊毛は頻繁に受動的変形を行うことがわかった（矢印）。(b,c) 不動繊毛先端の動きの標準偏差。標準偏差が大きいほど、先端が良く動いていると考えられる。(b)全周波数帯域での標準偏差。(c)波形にハイパスフィルターを適用した後の 7 Hz 以上の周波数成分のみの標準偏差。(d) 88.5 秒間に繊毛が受ける受動的変形の回数。横軸は、“1 μm / 29.5 ms” が、29.5 ミリ秒間に 1 μm 動くような動きを表し、縦軸は、そのような動きが平均して何回測定されたかを表す（左, 右, 変異体: n = 32, 30, 2）。

【謝辞】

計算機センターのスタッフの方には、本研究費の執行に当たり、惜しめないサポートを頂きましたことを感謝いたします。また、共同研究先である理化学研究所 多細胞システム形成研究センター 個体パターンニング研究チームのみなさまの協力なしにはこの研究の遂行は不可能でした、大変感謝いたします。

【文献】

- 1 Tokunaga, M., Imamoto, N. & Sakata-Sogawa, K. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat Methods* **5**, 159-161, doi:10.1038/nmeth1171 (2008).
- 2 Takaoka, K., Yamamoto, M. & Hamada, H. Origin and role of distal visceral endoderm, a group of cells that determines anterior-posterior polarity of the mouse embryo. *Nat Cell Biol* **13**, 743-752, doi:10.1038/ncb2251 (2011).
- 3 Okada, Y., Takeda, S., Tanaka, Y., Izpisua Belmonte, J. C. & Hirokawa, N. Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* **121**, 633-644, doi:10.1016/j.cell.2005.04.008 (2005).
- 4 Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y. & Hamada, H. Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* **418**, 96-99, doi:10.1038/nature00849 (2002).
- 5 Nonaka, S. *et al.* Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* **95**, 829-837 (1998).
- 6 Yoshida, S. *et al.* Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. *Science* **338**, 226-231, doi:10.1126/science.1222538 (2012).
- 7 Shinohara, K. *et al.* Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo. *Nat Commun* **3**, 622, doi:10.1038/ncomms1624 (2012).