

研究終了報告書

「一次繊毛由来微粒子の多次元動態と制御」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：池上 浩司

1. 研究のねらい

内因性微粒子として細胞から放出される細胞外小胞が基礎生命科学や医学などの幅広い分野で非常に大きな注目を集めている。一方で細胞外小胞は非常にヘテロな集団であり、大きさ、組成、物性、細胞内での形成過程、細胞からの放出メカニズムなどが異なるものが混在している。また、近年は巨大タンパク質複合体や細胞からの廃棄物なども次々と同定され、細胞外微粒子の多様性は増すばかりである。本研究では、研究代表者が研究対象としてきた細胞表面に一本のみ生える一次繊毛を軸に、一次繊毛から放出される細胞外微粒子、さらには一次繊毛に関連する細胞外微粒子も視野に入れ、広義の一次繊毛関連細胞外微粒子について、それらの動態を多次元的に捉えて理解し、その放出や生理作用の制御につながる基礎知見と基盤技術を確立することである。この研究のねらいを実現するために本研究では、1)アーチファクトを排除した細胞外小胞解析系の確立、2)一次繊毛由来細胞外微粒子の物性解析、標的細胞への取り込み、生理作用解明、3)一次繊毛関連細胞外微粒子の探索と放出機構の解明、の3つに分けて細胞を用いた実験を中心に研究を展開した。さらに環境因子による一次繊毛関連細胞外微粒子の放出変化を探索し、将来的な動態制御につながる知見を得ることを発展目標とした。

2. 研究成果

(1)概要

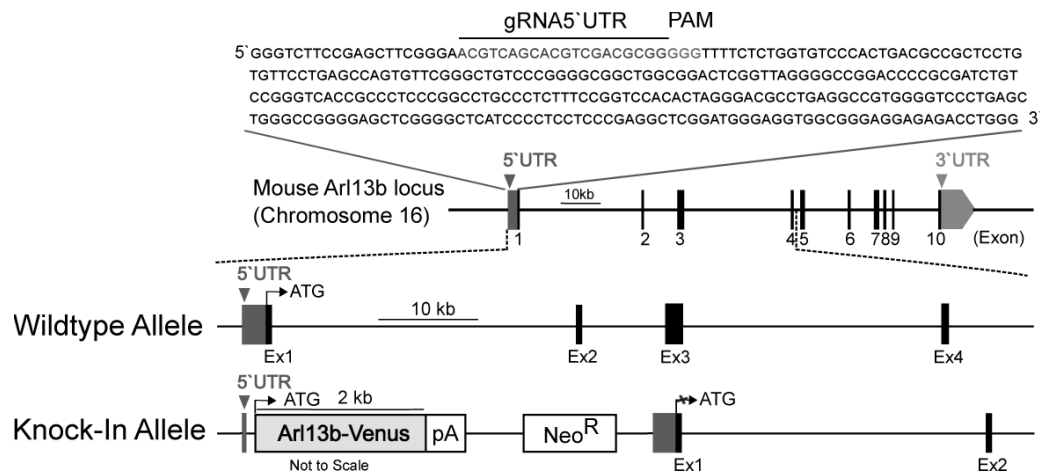
一次繊毛由来細胞外微粒子に加えて一次繊毛に関わる新しい細胞外微粒子を発見同定した。これら広義の一次繊毛関連細胞外微粒子について、1)正確な動態解析を可能にするアーチファクトフリーのアッセイ系の確立、2)細胞外微粒子の物性理解および放出メカニズムの同定、3)細胞外微粒子の標的細胞への取り込みと生理作用の解明、に関する成果を得た。さらに、将来的な動態制御に向けて一次繊毛関連細胞外微粒子の放出に影響を及ぼす細胞外環境因子の同定にも成功した。

(2)詳細

研究テーマ A「アーチファクトを排除した細胞外微粒子解析系の確立」

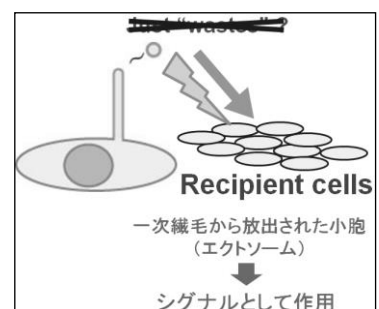
細胞生物学研究で広く一般的に使用されている蛍光タンパク質やペプチドタグを融合させた解析対象タンパク質の過剰発現系は、異常なレベルで対象タンパク質が発現されることによる様々なアーチファクトを生じうる。特に細胞外小胞の解析に使われるような膜局在性のタンパク質の過剰発現などでは、細胞内膜輸送系に多大なストレスがかかり、発現細胞が異常な形態になったり細胞死を引き起こしたりすることが多い。これら強制発現の影響は即座に不必要な細胞外微粒子の放出につながり、細胞外微粒子の研究において解析結果をFALSEにするアーチファクトの原因となる。また本研究で題材にする一次繊毛についてもマーカー分子の強制発現により一次繊毛の形態が極めて異常になることが知られており、一次繊毛関連細胞

外微粒子の放出に対するアーチファクトが懸念される。本テーマでは、これら細胞生物学研究で長らく問題になっていた解析系に対し、解析対象タンパク質の 5' UTR に標識タンパク質の発現ユニットを薬剤耐性遺伝子とともに CRISPR/CAS9 システムを用いてノックインすることで(下図)、高確率(50~80%)且つ短期間(最短1か月)で過剰発現によらない内在プロモーターを介した生理学的レベルの発現を安定的に保つ細胞株を樹立することができる一連のシステムを構築した(主要成果リストの1)。本技術の確立により、テーマ B~D において過剰発現による異常な細胞外微粒子放出による高いバックグラウンドを排除した S/N 比の高いアクセシ系を実現することができた。



研究テーマ B「一次繊毛由来細胞外小胞の放出制御と生理作用」

一次繊毛由来細胞外微粒子の放出は血清刺激に依存すると報告されていたが、本研究において血清刺激に関係なく恒常的に細胞から放出されていることが明らかとなった。さらに一次繊毛から放出された細胞外微粒子の物性も研究開始時には不明であったが、生化学的手法および超解像顕微鏡法により一次繊毛由来細胞外微粒子が細胞外小胞であること、その大きさなどが明らかとなった。一次繊毛関連タンパク質のノックアウト細胞を樹立し、一次繊毛由来細胞外小胞の放出に寄与する分子を探索し、放出を増加させる分子群、放出を減少させる分子群が明らかになった。研究テーマ A で確立した手法で一次繊毛を蛍光標識した細胞から得た一次繊毛由来細胞外小胞を未標識の野生型レシピエント細胞に投与することでレシピエント細胞への蛍光一次繊毛由来細胞外小胞の取り込みを検出できた。さらに一次繊毛由来細胞外小胞を含む培地と含まない培地で一次繊毛由来細胞外小胞を産生放出できないノックアウトレシピエント細胞を培養することで、一次繊毛由来細胞外小胞の有無によりレシピエント細胞の活動が変化することを見出した(右模式図)。また一次繊毛由来細胞外小胞の有無により一次繊毛由来細胞外小胞非産生放出ノックアウトレシピエント細胞のタンパク質発現が変化することも見出した。個体レベルの解析については、培養細胞から放出された一次繊毛由来細胞外小胞含有濃縮物をニワトリ胚に注入、あるいはニワトリ胚における局所ノックアウトによる一次繊毛由来細胞外小胞産生放出経路の阻害を試したが、in vitro で観察された細胞活動の変化に合致する発生生物学的現象を捉え



ることはできなかった。以上のとおり本テーマについては、一次繊毛由来細胞外小胞の放出に関わる分子群と *in vitro* における小胞のシグナル伝達作用の一端が解明できた。

研究テーマ C「一次繊毛関連新規細胞外小胞の発見」

細胞から恒常的に放出されている細胞外微粒子について、一次繊毛の有無によるプロテオームの変化をオミクス解析した結果、一次繊毛由来細胞外微粒子にくわえて一次繊毛に依存して産生放出される細胞外微粒子の存在を発見できた。複数の遺伝子についてノックアウト細胞株を樹立して詳細に解析した結果、発見された一次繊毛関連細胞外微粒子の産生と放出は一次繊毛の有無に極めて強く依存することが明らかになった。この一次繊毛関連細胞外微粒子の物性を生化学的に検証した結果、細胞外小胞であることも明らかになった。一次繊毛関連細胞外小胞の物性、放出様式を更に詳しく解析し、小胞の大きさ、脂質組成の一部、放出経路の一端が明らかになった。オミクス解析の結果を参考に一次繊毛関連細胞外小胞の放出に関わる分子に見当をつけ、ノックアウト細胞株を用いた検証実験から一次繊毛関連細胞外小胞の放出メカニズムに関わる重要な知見を得た。異なる細胞種やマウス個体を用いて細胞種や組織による放出の差異を検証した結果、一次繊毛関連細胞外小胞の放出は特定の組織・器官に特徴的なものである可能性が示唆された。

研究テーマ D「一次繊毛関連細胞外微粒子の放出に影響を及ぼす細胞外環境因子の同定」

一次繊毛由来細胞外微粒子の放出を変化させる細胞外環境因子を探索し、放出を促進する環境因子を同定した。

3. 今後の展開

本研究では一次繊毛由来細胞外微粒子の物性、放出様式、放出に関与する分子群、生理作用の一端が明らかとなった。さらに放出を変化させる環境因子も明らかになりつつあり、今後は発見内容を個体レベルに拡大させ、個体内における一次繊毛関連細胞外小胞の放出制御とレシピエント組織の挙動変化を突き止める研究に発展させていく。*in vitro* から *in vivo* に実験系を移す前に、エクソソームに比べて放出量が非常に少ない一次繊毛由来細胞外小胞を特異的に濃縮する方法の確立も必要であり、既に着手している。濃縮方法が確立されれば本研究において良好な結果が得られなかったニワトリ胚を用いた発生生物学実験にも再チャレンジできると考えている。一次繊毛関連細胞外小胞については物性や放出メカニズムの一端が明らかになっているものの、その生理作用は完全に未知であり、今後は生理作用や放出そのものの意義も含めて細胞生物学的研究、その後に個体レベルの *in vivo* 研究に発展させていく。これら広義の一次繊毛関連細胞外小胞に関する知見を蓄積させながら、環境因子によって変化する放出や組成および内容物の変化を更に深く突き詰め、本さきがけ領域が目標としていた「微粒子の制御」に発展させていく。

4. 自己評価

研究提案時の目的は研究機関変更に伴う大きな環境変化もあり変更を余儀なくされたが、新しい一次繊毛関連細胞外小胞の発見が期せずして早期に実現したこと、主宰することになった研究室のハードリソースが充実していたなどの幸運も重なり、新環境を生かした研究体制を

組めたと感じている。一方で、異動に伴う教育業務や学内業務の増加もあり、自身の手で実験を行うことがかなり難しくなり、自らの手でハンドルすべき個人研究としては自身の過去の体感と比べて少し物足りないものになってしまったと反省している。しかしながら、講座制の研究室を主宰する PI として、スタッフ研究者 3 名の協力と本研究費で雇用した 2 名の補助者の実験サポートを得られたことで、実質的には個人研究として一人で手を動かすよりも失敗も含めて多くのことにチャレンジできたように思う。研究早期に確立したアーチファクトを排除した解析系については、本研究に限らず実験生命科学全般に波及し、実験系のパラダイムシフトを促す効果も期待でき、プレプリントとして公開できた点は良かったと感じている。事実、プレプリント公開後に複数の問い合わせを受けたり出版社のブログで紹介されたり、また学会発表後にも問い合わせを受けたりしており、強制過剰発現により生み出された“数多のアーチファクト”が新しい実験系で改められて様々な生命現象の正しい理解に繋がることを期待している。研究本体の成果は学会などでは発表しつつあるものの、原著論文としては未だ原稿の状態であり、この点は自身に大きな不満を感じている。新型コロナウイルス支障対策のための延長期間に原著論文として公表するべく、より一層の推進が必要である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1 件

1. Ijaz F, Ikegami K. Knock-in of labeled proteins into 5' UTR enables highly efficient generation of stable cell lines. BioRxiv. doi: 10.1101/2020.08.03.234252.

概要: 一次繊毛は繊毛マーカーを過剰発現すると変形や異常伸長などのアーチファクトを生じる。これらのアーチファクトは細胞外小胞の放出にも多大な影響を及ぼす危険性があり、本論文ではそれらのリスクを限りなくゼロにするノックイン細胞を高確率かつ短時間で樹立する手法を確立した。本手法は本研究テーマに限らず細胞生物学ひいては実験生命科学全般に波及する基礎技術となることが期待できる。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件(特許未公開)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【出版物】

1. 池上浩司, 瀬藤光利. 繊毛由来小胞に特異的なタンパク質をいかにして捉えるか. 実験医学 36, 968-969, 2018.
2. Ijaz F, Ikegami K. Live cell imaging of dynamic behaviors of motile cilia and primary cilium. Microscopy 68, 99-110, 2019.
3. 池上浩司. 一次繊毛を光学顕微鏡で観ると見えるもの. 顕微鏡 54, 85-90, 2019.
4. 中里亮太, 吉川慧, 池上浩司. 線毛由来小胞の放出機構と機能. 腎と透析 87, 692-696, 2019.

- Ikegami K, Ijaz F. Current understandings of the relationship between extracellular vesicles and cilia. The Journal of Biochemistry. doi: 10.1093/jb/mvaa112.