様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　５ 月 ２９ 日現在

機関番号：８２４０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2018
課題番号：１７Ｋ１５１５３

研究課題名（和文）体の左右を決定づけるノード繊毛におけるカルシウム動態の可視化

研究課題名（英文）Visualization of ciliary Calcium that initiate Left-Right Asymmetry

研究代表者
水野　克俊（Mizuno, Katsutoshi）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：００７７７７７４

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）：本研究では、体の左右軸決定に関わるノードの不動繊毛でのCa2+動態の可視化を目指した。繊毛特異的にCa2+センサーGCaMP6を発現させ、繊毛Ca2+濃度変化を可視化することに成功した。また、細胞質Ca2+シグナルと繊毛Ca2+シグナルの関係性を解析した結果、細胞質、繊毛ともに非常に活発なCa2+濃度の振動を示すことが明らかとなり、細胞質のCa2+と繊毛とが密接に関係していることが明らかとなった。薬剤処理条件下で、左側特異的な、繊毛を由来とするCa2+の可視化にも成功した。これらの知見から、胚における対称性の破れに対して、Ca2+が重要な役割を有することが強く示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
左右軸の適切な決定は体の形作りの上で重要であり、重篤な病気となりうる繊毛病などの原因解明の観点からも医学的にも基礎的な知見の蓄積が必要とされる。左右軸の異常は先天異常へとつながることから、その機序の解明は先端医学においても基盤となり、社会的な貢献も大きい。左右の極性の起源に関してはここ二十年で急速に研究が進み、ヒトを含む多くの哺乳類で繊毛が決定的な役割を果たすことが示されてきた。一方で、繊毛と左右決定の機序に関しては依然として多くの疑問が残っている。本研究は、その中でも不明であった繊毛とカルシウム、左右決定との関わりを明確に直接的に答えたものであり、分野に大きな前進をもたらすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Left-Right (LR) asymmetry in mouse embryo is dependent on fluid flow generated by the movement of the nodal cilia. Ca2+ signals are essential for this process, however, the mechanisms were not clear. In our research, we tried to visualize and analyze the function of the ciliary Ca2+ for LR asymmetry. We generated mice that express Ca2+ indicator, GCaMP6 in embryonic cilia, and successfully observed Ca2+ transients. Also, we performed simultaneous observation of Ca2+ dynamics in cilia and in cytoplasm and detected Left-biased signal. Patterns of Ca2+ signals in mutants or embryos treated with drugs were disturbed. From those analyses, strong relationship between ciliary and cytoplasmic Ca2+ signals were suggested. We also observed the ciliary Ca2+ signal under the drug treatment to visualize direct ciliary Ca2+ influx. Position of cilia showing Ca2+ influx was biased to the left side of the node, suggesting that ciliary Ca2+ influx is responsible for the determination of LR asymmetry.

研究分野：発生生物学

キーワード：繊毛　カルシウム　左右

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９、ＣＫ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

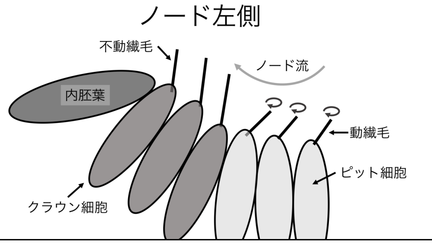


図 1. 不動繊毛によるノード流の感知

動物の体には、内蔵の配置等に見られるように左右非対称な構造が存在し、左右軸の適切な決定は体の形作りにおいてい必須の仮定である。ヒトを含む哺乳類を含む脊椎動物では、初期の繊毛が左右非対称性の形成に決定的な役割を果たす。マウスでは初期胚の腹側に一過的にみられるノードと呼ばれる組織表面上の繊毛の回転運動が左方向への流れを作り出し、左右性の初期決定が行われる [Nonaka *et al.*, Cell. 1998]。ノードには、中心部(ピット細胞)に見られる動繊毛、周縁部(クラウン細胞)に見られる不動繊毛の二種類の繊毛が生えており、動繊毛が流れを作り出し、不動繊毛が流れを感知する (図 1)。クラウン細胞の不動繊毛上には Pkd2 チャネルが局在しており、このチャネルの繊毛上での局在し下流の細胞体においてカルシウムシグナルを介した伝達系を介して左右の決定が行われることが示された[Yoshiba *et al.*, Science. 2012]。このとき、クラウン細胞の細胞質内においては、ノードの左右で異なる周波数をもつ カルシウム濃度の振動が生じることが観察されている [Takao *et al.*, Developmental Biology. 2013]。この下流において、Nodal シグナルの左右非対称な活性化が誘起され、マウスの形作りの上での左右対称性の破れが行われる。このように、繊毛への Pkd2 チャネルを介したシグナルおよびその下流の細胞質におけるカルシウムシグナルが左右の決定に必須であることがわかってきた。

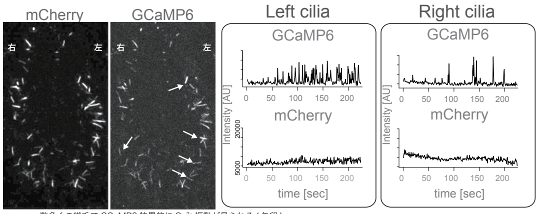
２．研究の目的

上記の不動繊毛による流れの受容とその後のカルシウムシグナル伝達は、(1)繊毛のよる流れの感知、(2)Pkd2 など繊毛上のカルシウムチャネルからのカルシウムの流入、(3)細胞質内の小胞体を介したカルシウム濃度の振動とそれによる左右非対称な Nodal の活性化の段階からなると考えられる。しかし、(1)の流れの感知のメカニズムは未だ不明であり、機械的刺激を感知するのか、化学的な刺激を感知しているのかは解っていない。さらに、繊毛におけるカルシウムシグナルが実際の左右決定に関わるならば、繊毛におけるカルシウム動態はノードの左右で異なると予測される。しかし、繊毛からのカルシウムの流入を明確に可視化した研究はなかった。本研究では、トランスジェニック技術を駆使し、繊毛内でのカルシウム動態の可視化を目指した。

３．研究の方法

繊毛内のカルシウム動態を観察するために、繊毛へのターゲティング配列である 5HT6 とカルシウムセンサーGCaMP6 を連結したコンストラクトを作製し、トランスジェニックマウスを作製した。さらに同じく $5HT_6$ 配列を有する mCherry を 2A ペプチドで連結し、二色で同繊毛をラベルできる ratio imaging を行えるラインとした (NDE4-hsp-5HT-GCaMP6-2A-5HT-mCherry)。また、繊毛でのカルシウムシグナルと細胞体でのカルシウムシグナルを区別し、別々に可視化するために繊毛を $5HT_6$-GCaMP6, 細胞体を異なるカルシウムセンサーである RGECO1 でラベルしたトランスジェニックマウスを作製した(NDE4-hsp-5HT-GCaMP6-2A-RGECO1)。これらのマウスを利用して、繊毛、細胞質におけるカルシウムシグナルの可視化を試みた。観察にはスピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡 CSU-W1 を利用し、左右が決定される時期である E7.5~E8 胚のノード領域の観察をフレーム間隔 0.25 秒程度の時間分解能での観察を行なった。これらの観察法を用いて、正常胚や Pkd2 変異体、ダイニン変異体でノード繊毛が不動である iv/iv 変異体、繊毛形成が見られない Kif3a 変異体などの胚を観察した。また、さまざまなカルシウムシグナルの阻害剤の存在下でのカルシウムシグナルの観察を試みた。これらの観察で得られた画像から、繊毛、細胞質でのカルシウムシグナルのパターンの定量化を行い比較を行なった。

４．研究成果



数多くの繊毛で GCaMP6 特異的に Ca^{2+} 振動が見られる (矢印)

図 2. ノード繊毛での Ca^{2+}動態可視化に成功

マウス胚のノード繊毛を観察を行なった結果、クラウン細胞上の不動繊毛は激しいカルシウムスパイクを示し、その振動数には左側が高い傾向を示した (図 2)。左右での偏りは、Pkd2 チャネルの変異体、繊毛の不動変異体(iv/iv)では観察されず、左右対称性の破れに関わるカルシウムシグナルを可視化している可能性が強く示唆された。同時に、クラウン細胞の細胞質の観察も行なったとこ

ろ、繊毛と細胞質におけるカルシウムスパイクは同期した変動を示すことが明らかとなった。これらの結果は、繊毛内でカルシウム濃度変化が観察されたとしても、そのカルシウムが細胞質からの拡散に由来するものなのか、繊毛上のチャネルからの流入なのかを区別する必要があることを示唆した。そこで、繊毛と細胞質におけるカルシウムシグナルを明確に区別するために、細胞質におけるカルシウム動態を阻害する薬剤の処理下での繊毛カルシウムの観察を試みた。その結果、一定数の繊毛由来カルシウムが存在することが明らかとなり、繊毛からのカルシウム流入の存在が示唆された。これらの繊毛由来カルシウム流入の位置を解析したところ、ノードの左側後方において特にスパイクを示す繊毛が多く存在することが明らかとなった（図 3)。この左側への偏りを示すカルシウム流入は Pkd2 変異体、繊毛不動変異体（iv/iv)では観察されなかった。ノードの左側後方、Nodal シグナルが最初期に示す非対称性なパターンが見られる位置であり、この繊毛を介するカルシウムシグナルが左右非対称性の形成に重要な役割を果たすことが強く示唆された。

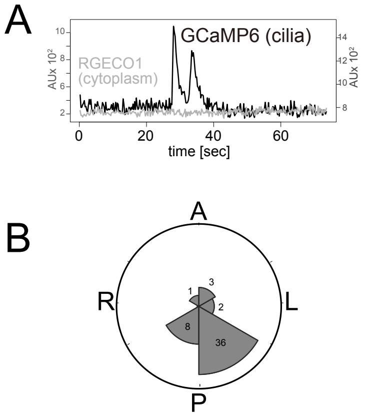


図 3. A. 細胞質 Ca^{2+}振動阻害下での繊毛 Ca^{2+}スパイク
B. 細胞質 Ca^{2+}阻害下で繊毛由来 Ca^{2+}流入は左側へ偏る

さらに、下流の細胞質におけるカルシウムシグナルの解析を行なったところ、正常な胚では左側で高い振動頻度を示す偏りが見られた。この偏りは Pkd2 変異体、iv/iv 変異体では見られなかった。これらの観察結果は以前の報告と一致する（Takao et al., 2013)。一方で、繊毛が形成されない Kif3a 変異体においても細胞内のカルシウム動態変化が観察され、一部の細胞体カルシウムシグナルは繊毛に非依存的であることがわかった。これらの結果から、左右で違いが見られない細胞質カルシウム動態変化に対して、繊毛を介した流れからの刺激入力があることにより左側で特に高い振動頻度を示すカルシウム濃度変化が生じ、左右対称性の破れが行われることが強く示唆された。さらに、様々なカルシウムシグナル阻害剤を用いた研究から、Nodal シグナルの左右非対称な活性化と、細胞質内のカルシウムシグナルが関係していることをさらに明確に示すことに成功した。

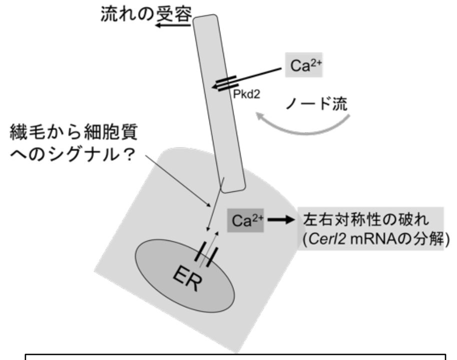


図 4.ノード繊毛での刺激受容とシグナル伝達のモデル図

これらの結果から、(1)流れの受容により繊毛からのカルシウム流入、(2)繊毛から細胞質へのシグナルが伝達、(3)細胞質内での小胞体（ER)を由来するカルシウム放出、(4)カルシウム濃度上昇によって引き起こされる *Cerl2* の左側特異的な分解、という流れで左右対称性の破れが引き起こされ、左右非対称な Nodal 活性化が行われるというモデルが考えられる。一方で、いくつかの課題はいまだに解決されていない。本研究では、ノード左側のクラウン細胞上の繊毛からのカルシウム流入、さらにはその下流のシグナル経路における細胞体カルシウム振動の左側特異的上昇の存在は明らかとなったが、これらの繊毛のカルシウムが左右対称性の破れに関して、決定的な役割を担うかどうかはいまだ明らかとなっていない。この疑問に答えるための実験を、現在遂行中である。さらに、流れからノード不動繊毛への刺激の実体は化学刺激である可能性、機械刺激である可能性などが考えられるが、この問題にも未だに決着がついていない。これらの問題に対する回答は将来への課題であり、これに答えるための研究を共同研究者と計画中である。これらの研究成果は複数の国内学会で報告した。現在、これらの成果をまとめた論文の投稿準備中である。

引用文献

(1) Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., and Hirokawa, N. 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, pp. 829–837. 1998

(2) Yoshiba, S., Shiratori, H., Kuo, IY., Kawasumi,A., Shinohara, K., Nonaka, S., Asai, Y., Sasaki, G., Belo, JA., Sasaki, H., Nakai, J., Dworniczak, B., Ehrlich, BE., Pennekamp, P., Hamada, H. Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. Science. 338, pp. 226–31. 2012

(3) Takao, D., Nemoto, T., Abe T., Kiyonari, H., Kajiura-Kobayashi, H., Shiratori, H., Nonaka, S.,

Asymmetric distribution of dynamic calcium signals in the node of mouse embryo during left-right axis formation. Dev. Biol, 376(1). 23-30. 2013

５．主な発表論文等
〔雑誌論文〕（計　0　件）

〔学会発表〕（計　4　件）
(1) 水野克俊、塩澤啓、濱田博司、 左右決定に関わるマウス胚ノード繊毛カルシウムシグナルの解析, 第 41 回日本分子生物学会年会ワークショップ繊毛が生み出すマルチスケールパターンを俯瞰する - 分子から組織・集団までのパターン形成 (招待講演)、パシフィコ横浜、 November 2018 (口頭発表)

(2) Katsutoshi Mizuno, Kei Shiozawa, Hiroshi Hamada, Visualization of ciliary Calcium influx that initiate mouse Left-Right asymmetry, Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th, タワーホール船堀 (東京)、Tokyo, June 2018 (ポスター発表)

(3) Katsutoshi Mizuno, Kei Shiozawa, Hiroshi Hamada, Visualization of Calcium dynamics that initiate left-right asymmetry in the node of mouse embryo, 兵庫県立こども病院-CDB 第 2 回ジョイントシンポジウム, 理研 CDB (神戸), December 2017 (ポスター発表)

(4) 水野克俊、塩澤啓、濱田博司、Visualization of Calcium dynamics that initiate left-right asymmetry in the node of mouse embryo, 第 8 回繊毛研究会、筑波大学下田臨海実験センター (静岡県下田市)、October 2017

(5) Katsutoshi Mizuno, Kei Shiozawa, Hiroshi Hamada, Visualization of Calcium dynamics that initiate left-right asymmetry in the node of mouse embryo, 50th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologist, タワーホール船堀 (東京), May 2017 (ポスター発表)

〔図書〕（計　1　件）
水野克俊. 体の左右非対称性決定におけるノード繊毛とカルシウムの機能, 羊土社, 実験医学・特集「一次繊毛の世界」, 2018 年 4 月号 Vol. 36, No.6, 950-954, 2018

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0 件）

○取得状況（計　0 件）

〔その他〕
ホームページ等
https://www.bdr.riken.jp/jp/research/labs/hamada-h/index.html
https://researchmap.jp/ kmizuno0213

６．研究組織

(1)研究分担者
該当しない

(2)研究協力者
該当しない

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。