

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14725

研究課題名(和文) 水流に応答して左右非対称にmRNAが減衰する機構の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism by which cells respond to Fluid flow.

研究代表者

峰岸 かつら (Minegishi, Katsura)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・リサーチフェロー

研究者番号：60568814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：左右非対称な形態形成は、初期胚のノードにおいて繊毛が回転することで生じる「左向き水流」が引き金となる。この水流という刺激が細胞へと伝達される仕組みは不明であった。最も早い発生段階での左右非対称な遺伝子発現はCer12と呼ばれる遺伝子でみられ、ノードの右側特異的に強く発現している。この左右非対称なCer12の発現は水流依存的にPkd2を介してmRNAが分解されることで生じる。我々はこの現象にCer12 3'-UTR内の200塩基が必要不可欠なことを明らかにした。加えて、この配列にRNA結合タンパク質Bicc1が結合すること、および、mRNAの分解にCCR4-NOTが関与していることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞に加わる機械的刺激による遺伝子発現の制御は発生、加齢、メタボリズム、循環器の維持など多岐にわたる生命現象に関与している。本研究は機械刺激が遺伝子発現の左右差をもたらすメカニズムについての研究であるが、左右非対称な形態形成の理解にとどまらず、広く生物学に影響を与える一般的な原理、機構へと発展する可能性を秘めている。例えば、今回解析したPkd2は腎臓上皮細胞の繊毛に局在し水流のセンサーとしてはたらくことが報告されており、その機能欠損が嚢胞腎を引き起こすことも知られている。このことから、我々はノードと腎臓細胞において類似した機械的刺激を変換する機構が存在しているのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：The left-right asymmetric morphogenesis of mammals is triggered by the leftward flow, which is generated by the rotating cilia on the node (E7.5). The mechanism by which flow stimuli is transmitted to the cell, was unknown.

Cer12 is known as the earliest gene that has left-right asymmetric expression pattern. Cer12 is expressed higher on the right side of node. This left-right asymmetric expression of Cer12 is generated by the left side specific degradation of mRNA of Cer12. The degradation of Cer12 is induced by fluid flow stimuli via cation channel Pkd2. In this research, I found that the most proximal 200 nucleotide region of the 3'-UTR is essential for the asymmetric mRNA decay. I also demonstrated that RNA binding protein Bicc1 bind to the region, and CCR4-NOT is involved in the degradation mechanism of Cer12. I expected that this study will lead the elucidation of the mechanism by which mechanical stimuli regulates gene expression.

研究分野：発生生物学

キーワード：左右非対称 器官形成 メカノセンサー RNA結合タンパク質 Nodal Cer12 Dand5 Pkd2

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

以前の研究から、哺乳類の形態の左右非対称性が、初期胚におけるノードにおける水流による細胞への機械刺激がトリガーとなっていることが示唆されている。近年、機械的な刺激による情報伝達が細胞骨格の再構築や遺伝子の転写・翻訳などに深く関わっていることが報告されている。しかし、機械的刺激がどのようにして遺伝子の転写・翻訳を制御しているかは不明な点が多い。我々は、繊毛が水流を感知して左右非対称性を決定する機構に焦点をあてた。

マウスの受精後 8 日目の胚において胚の凹んだノードとよばれる組織ができる。マウスのノードには動く繊毛、動かない繊毛の 2 種類が存在している。動く繊毛はノードの中心部の細胞 (ピットセル) 群に存在し、時計まわりに回転することで、ノード内に左向きの水流をつくりだす。一方、動かない繊毛はノードの脇に位置する細胞 (クラウンセル) 群に存在し、繊毛に局在するカルシウムチャンネル Pkd2 を介して水流を感知する機能を持っている (Yoshida *et al.*, Science 2012)。しかし、この水流という刺激が Pkd2 を介してどのように細胞へと伝達されるかは不明であった。最も早い発生段階での左右非対称な遺伝子発現は *Cerl2* と呼ばれる遺伝子で見られ、ノードの右側特異的に強く発現している。この左右非対称な *Cerl2* の発現は水流依存的に Pkd2 を介して mRNA が分解されることで生じる。我々は、この *Cerl2* mRNA の分解に 3'UTR が関与していること (Nakamura *et al.*, Nature Communications, 2012) に着目し研究を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究において、*Cerl2* の 3' -UTR 内の水流に応答する最小配列を特定し、その配列に結合する「RNA 結合タンパク」を同定することで、水流依存的に *Cerl2* の mRNA が分解される機構を明らかにする。これによって、細胞が水流に応答するメカニズムについて新たなモデルを提唱する。

### 3. 研究の方法

*Cerl2* mRNA 分解を 3' -UTR を介してモニターするために、ds (destabilized) Venus の ORF に *Cerl2* の 3' -UTR の配列をつなげた遺伝子をクラウンセルに特異的に発現させたトランスジェニック (Tg) マウス胚 (dsVenus-3' UTR) (図 1.a) を作製し、いくつかの変異体や人工的に水流を与えた際の Venus のクラウンセルでの非対称なパターンがどのように変化するかを検証した。さらに、3' -UTR 内の 200bp の領域に対して詳細な欠失解析を行い、*Cerl2* mRNA の L-R 非対称な発現に必要な 3' -UTR 内の配列をマッピングした。加えて、この配列に結合する RNA 結合タンパク質を同定し、*Cerl2* mRNA の分解のメカニズムを明らかにした。

### 4. 研究成果

本研究では以下の 7 点を明らかにすることで、水流の刺激 (機械刺激) が *Cerl2* の遺伝子発現を制御するメカニズムを解明した。

#### (1) *Cerl2* 3'UTR レポーターマウスはノードにおける *Cerl2* mRNA の非対称な分布を再現できた。

マウス胚のノードでは、クラウンセルにおける *Cerl2* mRNA の L-R パターンがダイナミックに変化する。初期段階 (early headfold stage) では、*Cerl2* mRNA は両側のクラウン細胞に分布し、zero-somite stage まで対称的な分布が確認できる。three-somite stage になると、*Cerl2* の mRNA は左側で減少し始め、L-R 非対称な分布 (R>L) となり、この非対称な分布は six-somite stage までは維持される。この左側での *Cerl2* mRNA の減少は、ノードにおける左向きの水流の増加と一致している (Kawasumi, A. *et al.*, Dev Biol, 2011) (Shinohara, K. *et al.* Nat Commun, 2012)。このような観察結果から、*Cerl2* mRNA は、zero-から 5-somite stage の間にノードの左側のクラウン細胞特異的に分解されることが示唆された。

まず、*Cerl2* mRNA の 3' -UTR がノードでの *Cerl2* の mRNA の分布パターン再現に十分かどうかを検証するために、NDE-Hsp-dsVenus-3' -UTR というトランスジーンを用いた。このトランスジーンは、*Cerl2* mRNA の 3' -UTR に対応する 1.2kb の DNA 配列に、不安定化した Venus (dsVenus) の ORF を連結したものである (図 1.a)。dsVenus-3' -UTR カセットの発現は、マウス Hsp68 プロモーターと、マウス *Nodal* のクラウンセル特異的エンハンサー (NDE) によって drive されている。予想通り、NDE-Hsp-dsVenus-3' -UTR トランスジ

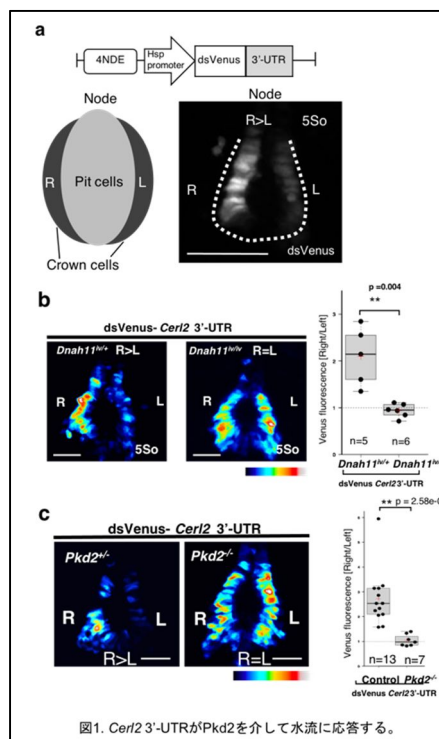


図1. *Cerl2* 3' -UTR が Pkd2 を介して水流に応答する。

エニック胚は、クラウンセルに特異的に dsVenus を発現した。dsVenus の mRNA と dsVenus の蛍光は、初期段階( early headfold stage )および zero-somite stage では対称に分布し、three-somite stage からは非対称な分布 (R>L) となり(図 1.a)、Cerl2 の mRNA のパターンを再現していた。

### (2) Cerl2 mRNA の 3'-UTR は Pkd2 に依存して水流に反応する。

NDE-Hsp-dsVenus-3'-UTR トランスジェニック胚の Venus の分布パターンが水流によって制御されているかどうかを調べるために、水流を持たない *iv/iv* (*Dnah11iv/iv*) 変異体胚にこのトランスジェニックを導入し、Venus のパターンを観察した。dsVenus パターンは調べたすべての胚で bilaterally equal (R=L) であった(図 1.b)。また、培養中のマウス胚に、人工的な逆向きの水流(右向きの水流)をあたえると bilaterally equal (R=L) の Venus のパターンがみられた。

Pkd2 は、Ca<sup>2+</sup>を含むカチオンイオンチャネルをコードしており、マウス胚の L-R パターニングに必要であることが知られていた。*Pkd2*<sup>-/-</sup>胚では、dsVenus パターンは bilaterally equal (R=L) であった(図 1.c)。Ca<sup>2+</sup>阻害剤であるタプシガルギンで処理したところ、Venus の L-R 非対称パターンが乱れた。これらの結果から、Cerl2 mRNA の 3'-UTR は Pkd2 を介して水流に反応していることが明らかになった。

### (3) Cerl2 mRNA の左右非対称性には 3'-UTR 近位部の進化的に保存された 200 塩基の領域が必要である。

Cerl2 mRNA の L-R 非対称性の生成に必要な 3'-UTR 内の配列を明らかにするために、まず、哺乳類の Dand5 遺伝子間で 3'-UTR (約 1.2kb) に相当する DNA 配列を比較した。その結果、5'末端の 200 塩基の領域が大きく保存されていることがわかった。この領域が左右非対称な遺伝子の発現に必要なかどうかを調べるために、NDE-Hsp-dsVenus-3'-UTR トランスジーンからこの領域を削除した(Δ200prox、図 2.a)。その結果、NDE-Hsp-dsVenus-3'-UTR 200prox トランスジーンでは、左右対称な Venus の分布が得られた(図 2.b)。一方、3'UTR の 3'末端から 200 塩基を欠失(Δ200dist)させても、dsVenus の非対称性は変化しなかった。さらに、5'末端の 200 塩基の領域(200prox)だけでも、非対称な dsVenus の分布が維持されていた(図 2b)。この結果を受けて、我々は CRISPR を用いたゲノム編集により、Cerl2 3'-UTR のこの近位 200 塩基の領域を欠損させた Cerl2 200prox マウス胚を作製した。WISH 解析の結果、Cerl2 200prox/200prox 胚では、側板中胚葉(LPM)での左側の Nodal 発現は失われていた(図 2c)。これらの結果から、3'-UTR の 200 塩基の領域が、クラウンセルにおける Cerl2 mRNA の左右非対称パターンに関与していることが示された。

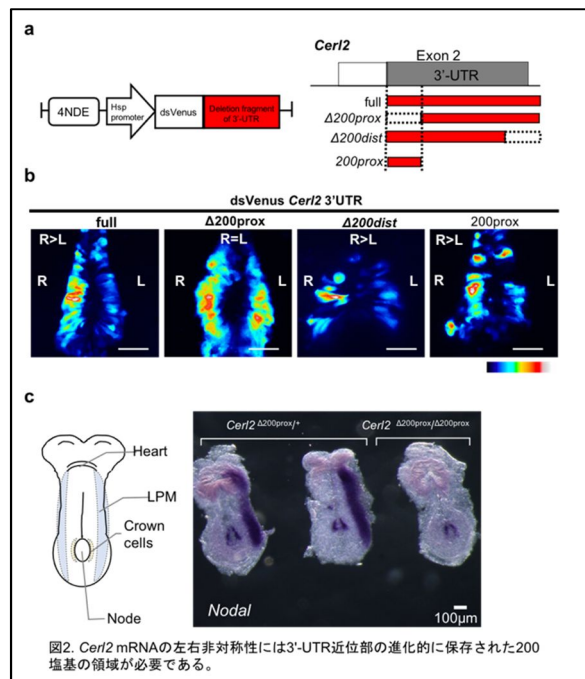


図2. Cerl2 mRNAの左右非対称性には3'-UTR近位部の進化的に保存された200塩基の領域が必要である。

### (4) 水流による Cerl2 mRNA の分解は RNA 結合タンパク質 Bicc1 に依存する。

我々はマウス胚のノードで特異的に発現している RNA 結合タンパク質 Bicc1 に着目した(図 3.a-d)。Bicc1 と Cerl2 の遺伝的相互作用の可能性を評価するため、NDE-Hsp-dsVenus-3'-UTR を導入した *Bicc1*<sup>ex1/ex1</sup> 胚を準備した。*Bicc1*<sup>ex1/ex1</sup> 胚は水流自体に影響を及ぼすことが以前から知られていたため、人工的な左向き流れを与えて状態で、この胚の Venus の蛍光を観察したところ左右対称 (R=L) であった(図 3.e-f)。つまり、Bicc1 が存在しないと水流応答性の Cerl2 mRNA の分解が阻害されることが示唆された。

### (5) Bicc1 が Cerl2 mRNA の 3'-UTR に結合することができる。

Collaborator の Daniel B. Constam, Benjamin Rothé (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL)) らによって、*in vitro* での RNA 免疫沈降(RIP)実験によって Bicc1 と Cerl2

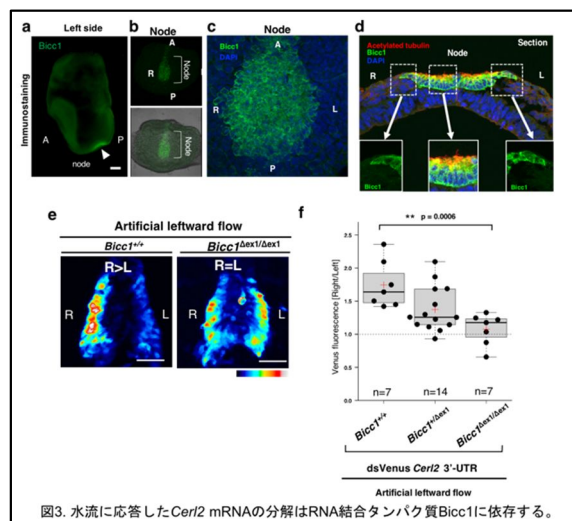


図3. 水流に応答したCerl2 mRNAの分解はRNA結合タンパク質Bicc1に依存する。



3'-UTR 200prox の領域と結合することが証明できた。

**(6) Biccl1 は Cerl2 の 3'-UTR にある保存された 8mer モチーフを特異的に認識する**

Collaborator の Hirohide Saito, Kaoru R. Komatsu( Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University ) らによって、Biccl1 が Cerl2 3'-UTR 近位部 200 塩基のどこに結合しているかを明らかにするために、FLAG タグ付き Biccl1 を発現させた 293FT 細胞のライゼートを用いてランダムな 20mer の RNA ライブラリーを用いた RNA Bind-n-Seq (RBNS) 解析が行われた。その結果、Biccl1 は GACR と YGAC 配列を優先的に認識することを示した。このことは、Cerl2 3'-UTR の近位部に位置する保存された GACGUGAC モチーフに特異的に結合することを示唆した。

**(7) Cerl2 の mRNA の分解に Ccr4-Not 複合体が必要である。**

ショウジョウバエでは、Biccl1 のオルソログが、Not3/5 サブユニットと直接結合して Ccr4-Not 複合体をリクルートすることで、mRNA の分解を制御していることが知られている (Chicoine, J. et al. Dev Cell, 207)。マウス胚のノードにおいて Biccl1 タンパク質と Cnot3 タンパク質の免疫蛍光染色を行なったところ、クラウンセルで共局在していることがわかった。また、HEK293T 細胞で共免疫沈降法を行ったところ、Biccl1 は、KH ドメインを介して CCR4-Not 複合体をリクルートしていることが示唆された。

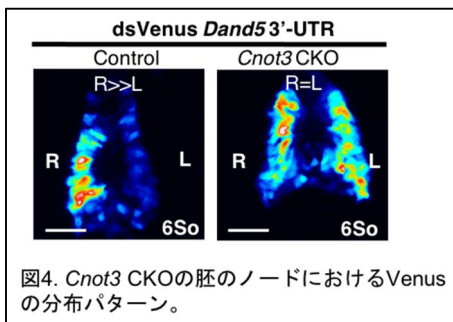


図4. Cnot3 CKOの胚のノードにおけるVenusの分布パターン。

Cnot3 がノードのクラウン細胞における Cerl2 mRNA の分解に寄与しているかどうかを調べるために、Cnot3<sup>lox/lox</sup> マウスと Noto<sup>CreERT2</sup> マウスを交配して Cnot3 コンディショナルノックアウト (CKO) マウス胚を作製した。Cnot3 CKO 胚の約半数 (n=7/13) では、Nodal mRNA は LPM では失われていた。次に、コントロールと CKO の胚で、Venus を観察したところ、左右非対称性が失われたり減少していた (図 4.)。これらの結果は、クラウンセルの Ccr4-Not 複合体が、ノードの流れに応じて Cerl2 mRNA を分解するのに関与していることを示した。

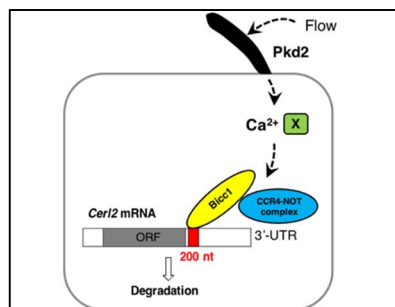


図5. 水流依存的に左側のクラウンセル特異的に Cerl2 mRNA が分解されるメカニズム。

(1)~(7)によって、水流にตอบสนองして、Pkd2 依存的に、Cerl2 3'UTR が結合する Biccl1 が Ccr4-Not 複合体をリクルートすることで Cerl2 mRNA を分解するということが明らかになった (図 5.)。本研究内容は複数の学会等で報告した。現在、これらの成果をまとめた論文を投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kajikawa Eriko, Horo Uzuki, Ide Takahiro, Mizuno Katsutoshi, Minegishi Katsura, Hara Yuichiro, Ikawa Yayoi, Nishimura Hiromi, Uchikawa Masanori, Kiyonari Hiroshi, Kuraku Shigehiro, Hamada Hiroshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Nodal paralogue underlie distinct mechanisms for visceral left-right asymmetry in reptiles and mammals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Ecology & Evolution	6. 最初と最後の頁 261 ~ 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41559-019-1072-2	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 該当する

1. 著者名 Teramoto Machiko, Sugawara Ryo, Minegishi Katsura, Uchikawa Masanori, Takemoto Tatsuya, Kuroiwa Atsushi, Ishii Yasuo, Kondoh Hisato	4. 巻 9
2. 論文標題 The absence of SOX2 in the anterior foregut alters the esophagus into trachea and bronchi in both epithelial and mesenchymal components	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 048728 ~ 048728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.048728	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 該当する

1. 著者名 Lamri Lynda, Twan Wang Kyaw, Katoh Takanobu A., Botilde Yanick, Takaoka Katsuyoshi, Ikawa Yayoi, Nishimura Hiromi, Fukumoto Akemi, Minegishi Katsura, Mizuno Katsutoshi, Hamada Hiroshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Ciliogenesis coupled accumulation of IFT B proteins in a novel cytoplasmic compartment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 731 ~ 745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12722	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 該当する

1. 著者名 峰岸かつら, 濱田博司	4. 巻 268(6)
2. 論文標題 平面内細胞極性 (PCP) がもたらす左右軸の決定機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ 細胞の極性化がもたらす生命現象	6. 最初と最後の頁 474-480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Gerard W. Dougherty, Minegishi Katsura et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 CFAP45 deficiency causes situs abnormalities and asthenospermia by disrupting an axonemal adenine nucleotide homeostasis module	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19113-0	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

1. 著者名 Mizuno Katsutoshi, Shiozawa Kei, Katoh Takanobu A., Minegishi Katsura, Ide Takahiro, Ikawa Yayoi, Nishimura Hiromi, Takaoka Katsuyoshi, Itabashi Takeshi, Iwane Atsuko H., Nakai Junichi, Shiratori Hidetaka, Hamada Hiroshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Role of Ca <sup>2+</sup> transients at the node of the mouse embryo in breaking of left-right symmetry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aba1195	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 峰岸 かつら
2. 発表標題 Mechanism that fluid flow establishes left-right asymmetric decay of Cer12 mRNA
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------