

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02450

研究課題名(和文)核移動の左右極性をキューとする左右非対称性の新奇形成機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of left-right asymmetric nuclear migration as a novel cue for laterality formation

研究代表者

松野 健治 (Matsuno, Kenji)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：60318227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：からだの左右非対称性が形成される機構は、進化的に多様で、無脊椎動物においてはよく理解されていない。本研究では、ショウジョウバエの胚消化管の左右非対称性形成機構を明らかにすることを目的として研究を実施した。野生型胚の消化管を覆う筋肉細胞の核が、前後方向に整列し、密集して左右対称に並ぶことを示した。さらに、消化管の左右非対称性がランダム化する突然変異を用いた解析によって、核の整列が、消化管が左右非対称にするために必要であることを示した。核の密集配列は、Wntシグナル、LINC複合体に依存した。これらの研究によって、核が、その物理的な強度を利用して内臓の形態変化を制御していることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、細胞の核の役割は、遺伝子であるDNAを貯蔵することであると思われてきた。一方、核の物理的強度は細胞内小器官の中で一番高いことから、「建築資材」として機能する可能性も予測されていた。本研究では、細胞の核が整列して並ぶことが、内臓が左右非対称な形になるために必要なことを世界で初めて明らかにした。この結果から、硬い構造である核が整列することで、支柱のような役割を果たしていると考えられた。例えば、整列した核はテントのポールのように消化管の構造をささえながら、左右非対称な構造の変化を助けていることになる。この結果は、再生器官の形態を制御する技術として応用できることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms of left-right (LR) asymmetric development are evolutionarily diverged and not understood well in invertebrates. To address this, we studied mechanisms underlying the LR-asymmetric development of the embryonic gut in *Drosophila*. We revealed that nuclei in the visceral muscles of the embryonic gut densely align LR-symmetrically along the anterior-posterior axis. We also found that the LR symmetry of such collective nuclear arrangement is essential for the LR-asymmetric development of this organ. Collective nuclear behavior depends on Wnt signaling and LINC complex, which are required for the LR asymmetric development of the embryonic gut.

研究分野：発生生物学

キーワード：左右非対称性 核 形態形成 内臓筋 消化管 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

からだの左右非対称性は動物形態の基本的性質の一つである。そのため、左右非対称性の形成機構を明らかにすることは、発生学の重要な課題である。近年の国内外の研究成果を総合すると、左右非対称性の形成機構が進化的に多様であることがわかる。左右非対称性の形成機構は脊椎動物で研究が進んでいるが、脱皮動物、冠輪動物の左右非対称性形成機構についてはまだ不明な点が多い。

研究代表者は、未知の左右非対称性形成機構の解明を目指して、遺伝学的手法が駆使できるショウジョウバエの左右非対称性形成を世界に先駆けて解析してきた (*Nature*, 2006)。ショウジョウバエでは、多くの器官で、明瞭でステレオタイプな左右非対称性が観察される。その中でも、胚消化管は、発生過程で最初に左右非対称性を示す。研究代表者のこれまでの研究から、胚消化管の前半部と後半部では、異なる機構で左右非対称性が形成されることがわかっている。後半部消化管の左右非対称性は、後腸上皮細胞の細胞キラルリティによって形成され、これについては、研究代表者をはじめ (*Science*, 2011) 国内外のグループによる研究が進展している。これに対して、前半部消化管の左右非対称性については、細胞キラルリティとは異なる機構で形成されること、Wnt シグナルに依存して形成されることなどを除いて、ほとんど理解されていない (図 1)。

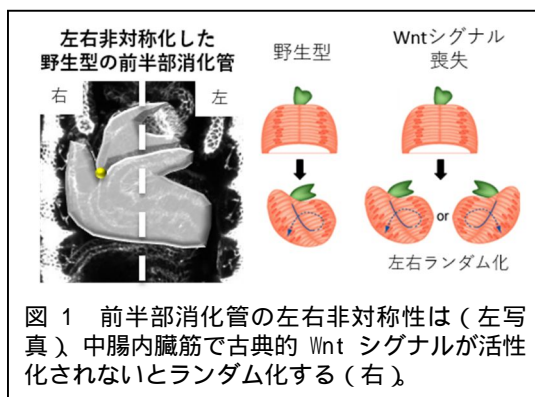


図 1 前半部消化管の左右非対称性は (左写真) 中腸内臓筋で古典的 Wnt シグナルが活性化されるとランダム化する (右)。

研究代表者のこれまでの研究から、ショウジョウバエ胚の前半部消化管の左右非対称性は、中腸環状筋の働きによって形成されることが示されている (図 1)。中腸環状筋は細長い 2 核細胞で、中腸上皮の管の両側に並ぶ。最近になって、研究代表者は、前半部消化管が左右非対称に変形する前に、中腸環状筋の腹側の核が、左右非対称に再配置される明らかにしていた。ラグビーボール形の核の長軸の正中線に対する角度が、右側と左側で異なることがわかっている。興味深いことに、Wnt シグナルが喪失する突然変異体では、このような核の配置の左右差が無くなる。ショウジョウバエでは、遺伝子発現やタンパク質の分布の左右非対称性はこれまでに発見されておらず、Wnt シグナル活性の左右差も検出されない。また、前半部消化管の左右非対称性形成には、細胞外の Wnt の濃度による制御は関係せず、中腸環状筋細胞で Wnt シグナルが活性化されることが必要であることが遺伝学的に示唆された。しかし、このような核の左右非対称な再配置が起こる機構や、その左右非対称性形成における機能は明らかにされていなかった。また、ミオシン II をコードする遺伝子の突然変異体においては、前半部消化管が左右相称化することがわかっている。したがって、これらの因子が核の左右非対称な再配置を制御している可能性があるが、その機能は不明であった。

2. 研究の目的

これまでの研究から、ショウジョウバエ胚の前半部消化管の左右非対称性は、中腸内臓筋によって決定され、その核の左右非対称な配置換え (ラグビーボール形の核の長軸の向きの左右非対称化) から始まることがわかっていた。しかし、核の配置の左右非対称性は、固定した胚の内臓筋核の向きにもとづいて議論されてきた。したがって、核の配置が左右非対称化する過程は不明である。また、核の向きの左右非対称化が前半部消化管の左右非対称化においてはたしている機構についても理解されていない。そこで、本研究の目的は、ショウジョウバエ胚の前半部消化管の内臓筋の核の再配置が左右非対称化するプロセスと機構と、前半部消化管の左右非対称性形成におけるその意義を理解することである。

3. 研究の方法

(1) 3次元タイムラプス撮影を用いた内臓筋の核の移動の解析
胚消化管 (中腸) の内臓筋の核の位置、動きをライブ観察する。GAL4/UAS システムを用いて、核局在型赤色蛍光タンパク質 (Redstinger) F-アクチンに結合する緑色蛍光タンパク質

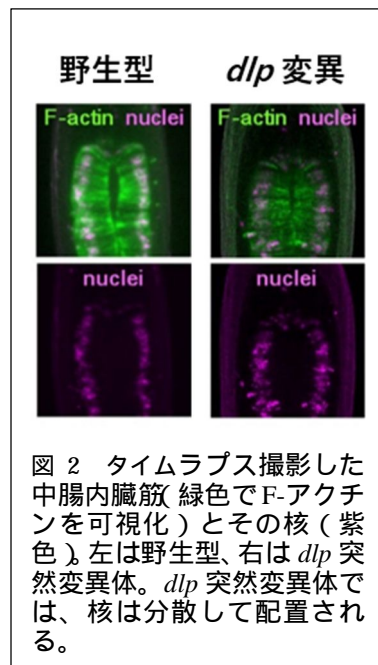


図 2 タイムラプス撮影した中腸内臓筋 (緑色で F-アクチンを可視化) とその核 (紫色)。左は野生型、右は *dlp* 突然変異体。 *dlp* 突然変異体では、核は分散して配置される。

(LifeAct-GFP)をコードする遺伝子を内臓筋細胞で特異的に発現させる。Redstinger によって核、LifeAct-GFP によって内臓筋細胞の輪郭を可視化し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 880, Carl Zeiss) を用いて 3 次元タイムラプス撮影する (図 2)。発生ステージ 13 の胚から、10 分ごとに 30 分間のタイムラプス映像 (T1 から T4) を取得する。

(2) サーフェース・モデルを用いた細胞核の位置の解析

(1)で取得した 3 次元タイムラプス映像をもとに、Imaris (Bitplane) を用いて 3 次元サーフェース・モデル化する (図 3)。サーフェース・モデル化した核の中心を、Imaris の Spot 機能を用いて 3 次元座標化し、これを核の位置と定義する (図 3)。Maya (Autodesk) を用いて、核の位置、移動を計測する。核と、中腸の正中線との距離を計測した。胚の大きさの個体差を考慮して、核と正中線の間の距離は、中腸の最大幅に対するパーセントとして算出して標準化した。

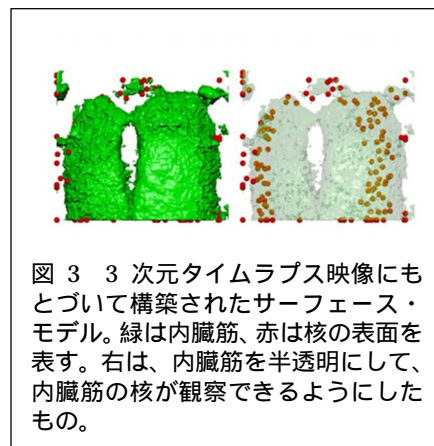


図 3 3 次元タイムラプス映像にもとづいて構築されたサーフェース・モデル。緑は内臓筋、赤は核の表面を表す。右は、内臓筋を半透明にして、内臓筋の核が観察できるようにしたもの。

(3) 核の分散度合の定量化

(2)で 3 次元座標化した核の位置をもとに、核の分散度合(分散度)を定量化する。左側と右側の内臓筋に分けた核の集団において、前後軸に沿って核を並べ、ある核と、一つ後ろの核の距離を計測する。胚の大きさの個体差を考慮して、核の間の距離は、中腸の最大幅に対するパーセントとして算出して標準化した。全ての核について、左側と右側に分けた核間の距離の平均を、胚ごとに算出する。10 個の胚についてこの値の平均を算出し、核の分散度の指数(核分散度指数)とした。核分散度指数が大きいと、核は分散して存在する (図 4)。

4. 研究成果

(1) 内臓筋の核は密集して配列する

中腸内臓筋における核の位置を解析するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いた三次元タイムラプス撮影法と、サーフェース・モデル化を利用した画像処理技術を開発した。その結果、野生型胚では、中腸内臓筋組織の核が前後軸に沿って密集して配列することを明らかにした (図 1 左)。核は、密集状態を保ちながら、相互に位置を変えて動いていることがわかった。このような核の密集移はこれまでに報告されておらず、本研究によって新規な核の動態が明らかになった。

本研究で開発したサーフェース・モデル化画像処理技術を用いて、核の位置、動きを定量化した。発生ステージ 13 の初めを T1 として、10 分間ごとの核の位置を T2、T3、T4 で計測した。その結果、いずれの時期においても、核の位置は、中腸正中線をはさんで左右対称であった。固定した胚で観察されていた内臓筋核の向きの左右非対称性は、本研究で実施したライブイメージングでは研究されなかった。これは、ライブで観察される核の動きによって、細胞核の向きを安定して検出できないためであると予測された。

前半部消化管の左右非対称性形成には、内臓筋細胞での Wnt シグナルの活性化が必要である。Wnt シグナルの構成因子である *Dally-like protein* (*dlp*) 遺伝子の突然変異では、中腸の左右非対称性がランダム化することがわかってきた。この時、タイムラプス映像によって、中腸内臓筋の核の分布域が広がっていることが観察された (図 2 右)。サーフェース・モデル化によって、核の分散度を、T1 から T4 において定量化した。野生型と比較して、統計的に有意な核の分散化が起こっていることがわかった (図 4)。核の分散化は、左側と右側の内臓筋で同等に起こっていた (図 4)。ま

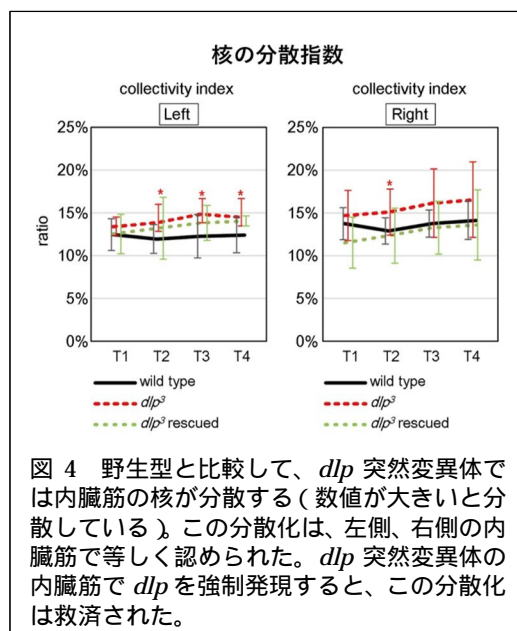


図 4 野生型と比較して、*dlp* 突然変異体では内臓筋の核が分散する (数値が大きいと分散している)。この分散化は、左側、右側の内臓筋で等しく認められた。*dlp* 突然変異体の内臓筋で *dlp* を強制発現すると、この分散化は救済された。

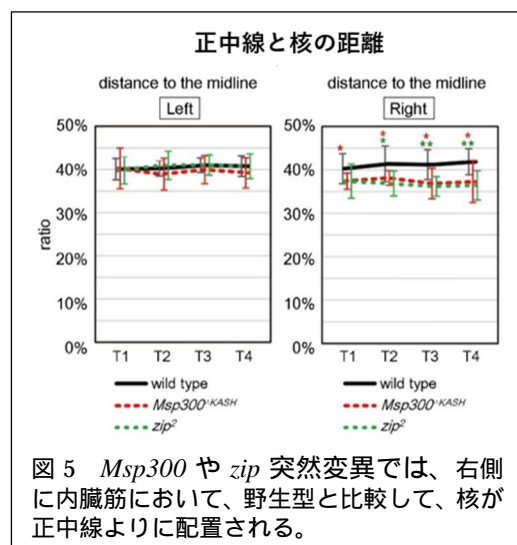


図 5 *Msp300* や *zip* 突然変異では、右側に内臓筋において、野生型と比較して、核が正中線よりに配置される。

た、*dlp* 突然変異体における核の分散化は、*dlp* を内臓筋で特異的に発現させることで救済された(図4)。これらの結果は、内臓筋における Wnt シグナルの活性化が核の密集移動に必要であり、これに依存して前半部消化管の左右非対称性が形成されると考えられた。

(2) 内臓筋の核の左右対称な配列は前半部消化管の左右非対称性形成に必要である

中腸内臓筋の核の密集化において、核膜と細胞骨格を連結する LINC 複合体が機能していると予測した。ショウジョウバエ LINC 複合体の構成因子である Msp300 (KASH) をコードしている遺伝子の突然変異体を解析したところ、前半部消化管が左右相称化した。これまでの研究から、MyosinII をコードする *zipper* (*zip*) 遺伝子の突然変異においても、前半部消化管の左右相称化が起こることがわかっていた。そこで、前半部消化管の左右非対称化が起こらないこれら2つの突然変異において、内臓筋の核の位置を調べた。その結果、両者の突然変異体の中腸内臓筋において、中腸の正中線と核の間の距離が左右非対称化することが明らかになった(図5)。*Msp300*、*zip* の突然変異体では、右側の内臓筋において、核が中腸の正中線より配置される(図5)。つまり、野生型では左右対称に配置される核が、これらの突然変異体では左右非対称性に配置されていた。

これらの結果から、核配置を左右相称化する力学的バランスが、中腸の左右非対称な形態変化を誘発していると予測された。

(3) 核は物理的な強度を利用して内臓の形態変化を制御している？

核は、オルガネラの中で最大で、最も硬いことが知られている。このため、核が、細胞や組織において、メカニカルな機能をはたしている可能性が検討されてきた。例えば、細胞のアメーバ運動において、運動方向に沿って核がピストンの様に働き、核が進行方向の細胞質に圧力をかけていることが示されている。本研究では、核が組織で密集して整列することで、支柱のような役割をはたしていると予測している(図6)。例えば、整列した核はテントのポールのように消化管の構造をささえながら、左右非対称な構造の変化を助けている可能性がある(図6)。

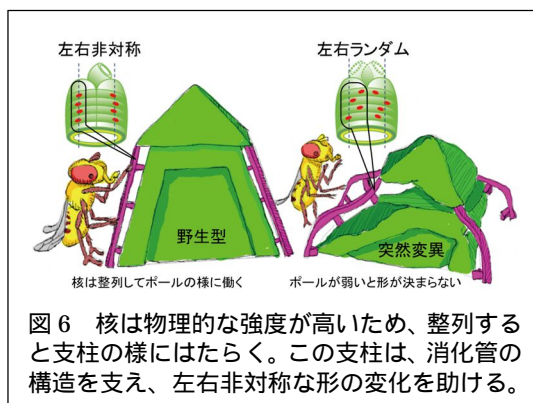


図6 核は物理的な強度が高いため、整列すると支柱の様にはたらく。この支柱は、消化管の構造を支え、左右非対称な形の変化を助ける。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shin, D., Nakamura, M., Morishita, Y., Eiraku, M., Yamakawa, T., Sasamura, T., Akiyama, M., Inaki, M. and Matsuno, K.	4. 巻 148
2. 論文標題 Collective nuclear behavior shapes bilateral nuclear symmetry for subsequent left-right asymmetric morphogenesis in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 in press
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 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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Dongsun Shin, Yoshitaka Morishita, Mototsugu Eiraku, Takeshi Sasamura, Mikiko Inaki, Kenji Matsuno
2. 発表標題 Left-right asymmetric nuclear migration in the visceral muscles breaks lateral symmetry of the embryonic gut in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 第52回日本発生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yi-Ting Lai, Tomiki Ishibashi, Mitsutoshi Nakamura, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Kenji Matsuno
2. 発表標題 Characterization of narigoma, a key regulator of anterior gut left-right asymmetry in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第52回日本発生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yi-Ting Lai, Tomiki Ishibashi, Mitsutoshi Nakamura, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Kenji Matsuno
2. 発表標題 A noncoding mutation, narigoma, reveals a key regulator of gut left-right asymmetry in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yi-Ting Lai, Tomoki Ishibashi, Mitsutoshi Nakamura, Katsushi Yamaguch, Shuji Shigenobu, Kenji Matsuno
2. 発表標題 Characterization of narigoma, a regulator of anterior gut left-right asymmetry in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第51回日本発生生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Dongun Shin, Yoshitaka Morishita, Mototsugu Eiraku, Takeshi Sasamura, Mikiko Inaki, Kenji Matsuno
2. 発表標題 Left-right asymmetric nuclear migration in the visceral muscles breaks lateral symmetry of the embryonic gut in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 第51回日本発生生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松山容子、川勝康弘、松野健治
2. 発表標題 ショウジョウバエ胚消化管の左右非対称性形成におけるSeptate Junctionの内臓筋での機能
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻 細胞生物学・松野研究室 http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/matsuno/index.html http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/matsuno/index.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
--	---------------------------	-----------------------	----

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