

平成30年6月8日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2012～2016

課題番号：24113004

研究課題名（和文）シリア・中心体系を介する情報フローによる体の左右の決定

研究課題名（英文）Role of motile and immotile cilia in left-right symmetry breaking

研究代表者

濱田 博司（Hamada, Hiroshi）

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー

研究者番号：00208589

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 225,000,000円

研究成果の概要（和文）：体の左右の非対称性を生じる仕組みを明らかにした。とくに、左右対称性を破るノード繊毛について、1) いかにして正しく形成されるのか、2) いかにして運動性を獲得するのか、3) 他の繊毛と違ってなぜ回転運動をするのか、4) 繊毛の回転運動によって生じる液体の流れが、いかにして感知されるのか、を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have revealed how left-right asymmetry of our body is established during development. In particular, we have clarified the following questions about node cilia, cilia that break left-right symmetry: 1) how node cilia are formed correctly with posterior tilt, 2) how node cilia acquire motility, 3) why node cilia can rotate unlike other cilia such as those in the airway, 4) how embryos sense the uni-directional fluid flow that is generated by rotating cilia.

研究分野：生物科学

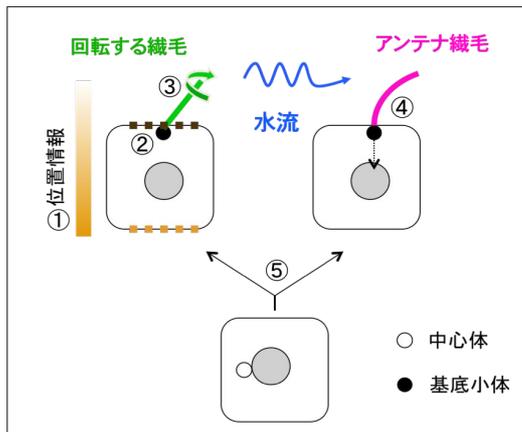
キーワード：発生制御 発生・分化 左右非対称性 繊毛 水流

### 1. 研究開始当初の背景

シリアは胚発生のさまざまな局面で極めて重要な役割を果たすが、体の左右非対称性においても中心的な役割を持つ。これまでの研究結果により、ノードには回転する繊毛と、回転せずにアンテナとして働く繊毛という2種類の繊毛があり、両者の働きによって左右対称性が破られる事が判っている。すなわち、ノードの中央部に位置し時計方向に回転する繊毛は、その回転軸が胚の後ろ方向へ傾いているため、左向きの水流を生じる。水流を生じる繊毛の回転軸が後傾するのは、繊毛細胞が前後に極性を持つために、基底小体が細胞の後側に位置するためである。しかし、繊毛細胞に対して前後の極性を与えている位置情報の本体は、明らかでない。一方、左向きの水流が感知されるためには、Ca<sup>2+</sup>チャネルである Pkd2 蛋白質が必要であるが、感知しているシグナルの実体が機械的シグナルか、化学的シグナルかは、不明である。体の左右を決定しているシリアに関する理解は、広くシリアの形成機構・シリアの構造と機能を知ることにつながる。

### 2. 研究の目的

体の左右非対称性は、ノードと呼ばれる部位に存在する一次シリアの回転運動が生じる左向きの水流により決定される(Nature 2002)。ノードの細胞は胚の前後に沿った極性を持ち、基底小体が細胞の後側に配置されるためシリアが後方へ傾くことで、左向きの水流が生じる(この水流は、ノード脇に存在する動かないシリア(アンテナ繊毛)によって感知されると考えられる。本研究では、ノード細胞の2種類のシリアを介する、細胞内及び細胞外への情報フローの伝達機構を明らかにする。具体的には、以下の点を明らかにする。



(1) ノード細胞へ前後の極性を与えている位置情報の実体を明らかにする。ノードの前後に沿って非対称に発現する Wnt に依存する機構の役割と、Wnt を介さない機構を検証する。

(2) 基底小体が細胞の後側へ移動する機構を明らかにする。ノード細胞において極性を

持って分布する細胞内極性タンパク質 (Dvl, Pickle など) の挙動と機能を明らかにする。

(3) シリアが運動性を失う種々の PCD モデルマウスを作成し、それを用いて、シリアの運動性に必要な微小管やダイニン構成蛋白質の、細胞質でのアセンブル、シリアへの輸送機構を解明する。

(4) ノードのシリアは必ず時計方向に回転するが、回転方向はどのように決められているのか? 月田との共同で、ノードシリアの超微細構造を観察し、シリアが時計方向に回転する仕組みを解明する。一部の繊毛が逆回転する Inv 変異マウス胚や、薬剤処理により繊毛が逆回転するマウス胚について、繊毛運動と構造の変化を調べる。また、ノード細胞の基底小体と細胞骨格との相互作用の有無を明らかにする。

(5) アンテナの役割を持つノード脇のシリアが水流を感知する機構、シリアを介する細胞内シグナルの伝達機構を解明する。Ca<sup>2+</sup>チャネル(Pkd2)がシリアに局在する事が水流の感知に必要なので(Yoshida et al., revised for publication)、シリアを経由する・シリア内の Ca<sup>2+</sup>シグナルを検出する。そして、Ca<sup>2+</sup>シグナルから標的遺伝子(Cer12)の制御に至る経路を解明する。水流シグナルによる Cer12 遺伝子の発現調節(左側での抑制)が、転写レベルでの制御なのか、あるいは転写後制御(とくに mRNA の崩壊)なのかを明らかにする。

(6) シリアの形成は細胞周期に厳密に依存し、シリアを有する細胞は G0 期の細胞である。ノード細胞の細胞周期に依存した基底小体・シリアの形成機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) ノード細胞へ前後の極性を与えている位置情報の実体: i) Wnt5a/5b と Sfrp が作る Wnt シグナルの濃度勾配(非対称な分布)が、極性を与えている実体であることをさらに確認するために、遺伝学的な手法で Wnt5a/5b や Sfrp の分布を逆転する。ii) Wnt5a/5b や Sfrp の転写制御機構を調べ、ノードの前後で非対称に発現する原因を明らかにする。iii) Dchs1,2 の変異マウスを解析し、Wnt 以外の機構が関与する可能性を検証する。

(2) 基底小体が細胞の後側へ移動する機構: i) PCP core 因子間の関係を知るために、各変異マウスで残りの因子の局在が変化するか否かを調べる。ii) Prickle1,2 の生化学的な働きを知るために、Tag をもつ Prickle を発現するマウスを作成し、Prickle と相互作用する因子を探索する。iii) ノード繊毛の基底小体と細胞骨格との相互作用を観察し、基底

小体が後方へと移動する機構を調べる。

(3) シリアが運動性を獲得する機構：シリアが運動性を失う種々の変異マウスを作成する。ダイニン複合体を細胞質から軸糸への運搬する因子 *Lrrc5* については、*Lrrc5* と相互作用する因子の機能を検討する。

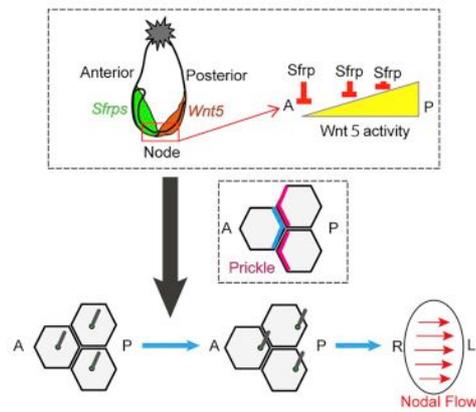
(4) 繊毛の回転能力・パターン・方向性が決められる機構：i) *Dnah9* (ダイニン蛋白質の1つ)と *Venus* の融合蛋白質を発現するマウスを作成し、ダイニン複合体が形成～軸糸へと輸送される過程をライブイメージングする。ii) 種々の異なるパターンの運動をする繊毛(ノード、気管上皮、脳室上皮、卵管上皮)の繊毛の微細構造を電子顕微鏡で検証し、構造的な相違点を洗い出す。iii) *Radial spoke* 構成因子について：変異マウスから種々の繊毛(気管上皮、脳室上皮、卵管上皮)を採取し、軸糸の超微細構造をクライオトモグラフィなどで明らかにし、運動と構造の相関を調べる。

(5) センサーシリアが水流を感知する機構：i) ノードの不動繊毛に  $Ca^{2+}$ センサー(*GCaMP6*)が局在するマウスにおいて、ノードでのカルシウムシグナルを観察する：左右非対称性はあるか、水流に依存するか、カルシウムチャンネル *Pkd2* に依存するか、などの点を検証する。念のために、*GCaMP6* とは異なる性質を持つ  $Ca^{2+}$ センサー(*Geco1*)を不動繊毛に局在させるトランスジェニックマウスも作成する。ii) 水流に正しく反応する  $Ca^{2+}$ センサーを発現するトランスジェニックマウスを用いて、繊毛に物理的な力を加えるだけで反応するか否かを検証する(これにより、不動繊毛が物理的な力に反応しているかどうかを検証することが出来る)。iii) 不動繊毛を持つ細胞が発現し *Cer12* mRNA に結合する蛋白質を探索し、水流に反応して *Cer12* mRNA が崩壊する機構を解明する。

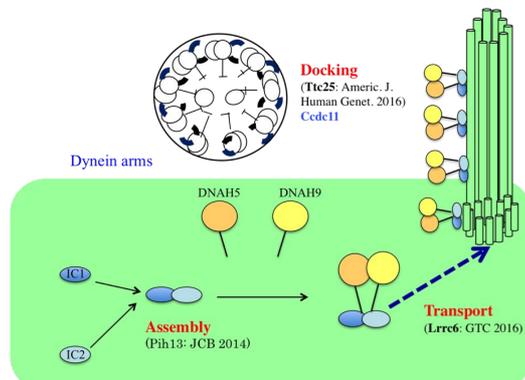
(6) 細胞周期に依存した基底小体・シリアの形成機構：細胞周期に依存した、*Qilin* 遺伝子の転写と *Qilin* 蛋白質の局在の変化を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) ノード細胞へ前後の極性を与えている位置情報は、*Wnt5a* 活性の濃度勾配：回転運動するノード繊毛は胚の後方に倒れているが、それは繊毛を持つ細胞が前後に沿った *Wnt5a* の濃度勾配を感知し、基底小体が細胞の後方へ位置するためであった(Minegishi et al., *Dev Cell* 2017: 下図)。

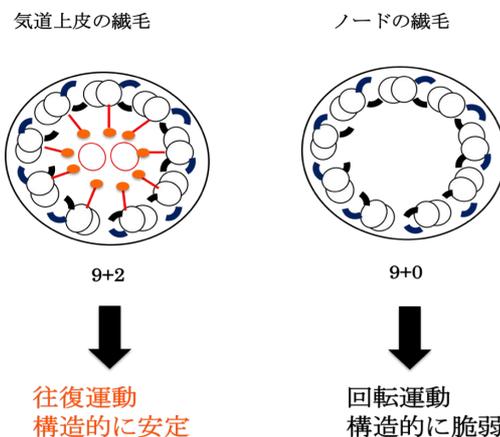


(2) ノード繊毛が運動性を獲得する機構：運動性を獲得するために必要な因子を複数同定した(*GTC* 2016; *Am. J. Hum. Genet.* 2016; *JCB* 2014)。Pih1d3 は細胞質においてダイニン複合体をアセンブルするために必要、*Lrrc6* はアセンブルされたダイニン複合体を繊毛基部へと運搬するために必要、*Ttc25* は、ダイニン複合体を微小



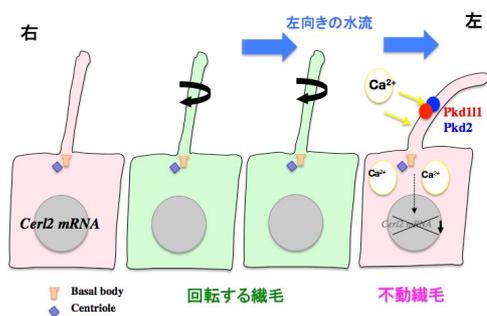
管に docking するために必要であった。

(3) ノードは、なぜ時計方向に回転運動をするのか：気道上皮や脳室上皮の繊毛は、平面的な往復運動を行う。一方で、ノード繊毛が回転運動するのは、ノード繊毛が radial spoke という構造を持たないことが一因であった(Shinohara et al., *Dev Cell* 2015)。また、radial spoke という構造を持たない事で、構造的に不安定になっていた。



(4) ノードにおける左向き水流は、ノード脇にある不動繊毛が Pkd2 (Ca<sup>2+</sup> チャネル) を介して感知していることが判った (Yoshida et al., *Science* 2012). 不動繊毛内における Ca<sup>2+</sup> の oscillation を検出する事ができた。この oscillation は、水流の有無や Pkd2 に依存していた (未発表)。

(5) 不動繊毛を介して水流を感知した細胞では、おそらく Ca<sup>2+</sup> の流入が起こることが引き金となり、Cer12 mRNA が崩壊し、その結果、Cer12 mRNA のレベルが左 << 右になる事が判った。さらにこの mRNA の崩壊は、3' UTR 配列を介している事の判った (Nakamura et al., *Nat. Commun.* 2012)。



(6) 母中心小体の遠位に局在する蛋白質 Cluap1 は、細胞分裂には必須ではないが、繊毛形成に必須であった (Botilde et al., *Dev Biol.* 2012)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

Minegishi K., Hashimoto, M., Ajima, R., Takaoka, K., Shinohara, K., Ikawa, Y., Nishimura, H., McMahon, A., Willert, K., Okada, Y., Sasaki, H., Shi, D., Fijimori, T., Otsuka, T., Igarashi, Y., Yamaguchi, T., Shimono, A., Shiratori, H. and Hamada, H. (2017). A Wnt5 activity asymmetry and intercellular signaling polarize node cells for breaking left-right symmetry in the mouse embryo. *Dev. Cell*, 40, 439-452. 査読有, doi.10.1016/j.devcel.2017.02.010.

Shinohara, K. and Hamada, H. (2017). Cilia in Left-Right Symmetry Breaking. *Cold Spring Harbor Laboratory Perspectives in Biology* 9,1-10. 査読有, doi.: 10.1101/cshperspect.a028282.

Wallmeier, J., Shiratori, H., Dougherty, G.W., Edelbusch, C., Hjeij, R., Loges, N.T., Menchen, T., Olbrich, H., Pennekamp, P., Raidt, J., Werner, C., Minegishi, K.,

Shinohara, K., Asai, Y., Takaoka, K., Griese, M., Memari, Y., Durbin, R., Kolb-Kokocinski, A., Sauer, S., Hamada, H. and Omran, H. (2016). TTC25 deficiency results in defects of the outer dynein arm associated machinery and primary ciliary dyskinesia with randomization of left/right body asymmetry. *Am. J. Hum. Genet.* 99(2):460-469. 査読有, doi.10.1016/j.ajhg.2016.06.014.

Inaba Y., Shinohara, K., Botilde, Y., Nabeshima, R., Takaoka, K., Ajima, R., Lamri, L., Takeda, H., Saga, Y., Nakamura, T. and Hamada, H. (2016) Transport of outer dynein proteins to ciliary axoneme requires a cytoplasmic protein Lrrc6. *Genes to Cells.* 21: 728-739. 査読有, doi: 10.1111/gtc.12380.

Shinohara, K., Chen, D., Nishida, T., Misaki, K., Yonemura, S. and Hamada, H. (2015). Absence of radial spokes in mouse node cilia is required for rotational movement but confers ultrastructural instability as a trade-off. *DevCell.* 35(2):236-246. 査読有, doi:10.1016/j.devcel.2015.10.001

Dong, F., Shinohara, K., Nabeshima, R., Botilde, Y., Asai, Y., Fukumoto, A., Hasegawa, T., Matsuo, M., Takeda, H., Shiratori, H., Nakamura T., and Hamada, H. (2014). Pih1d3 is required for cytoplasmic preassembly of axonemal dynein in mouse sperm. *J. Cell Biol.* Jan 20, 204:203-213. 査読有, doi: 10.1083/jcb.201304076.

Takamatsu, A.\*, Shinohara, K., Ishikawa, T. and Hamada, H. (2013). Hydrodynamic phase synchronization in mouse node cilia. *Physical Review Letters.* 110:248107, June 14, 2013. 査読有

Botilde, Y., Yoshida, S., Shinohara, K., Hasegawa, T., Nishimura, H., Shiratori, H. and Hamada, H. (2013). Cluap1 localizes preferentially to the base and tip of cilia and is required for ciliogenesis in the mouse embryo. *Dev. Biol.* Sep 1;381(1):203-12. 査読有, DOI:10.1016/j.ydbio.2013.05.024

Nakamura, T., Saito, D., Kawasumi, A., Shinohara, K., Asai, Y., Takaoka, K., Dong, F., Takamatsu, A., Belo, J.A., Mochizuki, A., and Hamada, H. (2012). Fluid flow and interlinked feedback loops establish left-right asymmetric decay of *Cer12* mRNA in the mouse embryo. *Nat.*

**Communic.**3:1322. 査読有,  
doi:10.1038/ncomms2319.

Yoshida, S., Shiratori, H., Kawasumi, A.,  
Shinohara, K., Sasaki, G., Belo, J.A.,  
Nonaka, S., Sasaki, H., Kuo, I., Ehrlich, B.,  
Pennekamp, P., Dworniczak, B., and  
Hamada, H. (2012). Cilia at the node of  
mouse embryos sense fluid flow for  
left-right determination via Pkd2. **Science**.  
(Oct)338:226-231. 査読有,  
doi:10.1126/science.1222538

〔学会発表〕(計 3 件)

Hiroshi Hamada, Left-right symmetry  
breaking in vertebrates, 2<sup>nd</sup> CU  
FPhS-RIKEN CDB Symposium, 2018.3.9,  
Bangkok, Thailand

Hiroshi Hamada, Role of immotile cilia  
in sensing fluid flow for left-right  
symmetry breaking, 2017 ASCB/EMBO  
Meeting, 2017.12.2, Philadelphia, U.S.A.

Hiroshi Hamada, Role of motile and  
immotile cilia in left-right symmetry  
breaking, ISDB 2017, 2017.6.18, Singapore,  
Singapore

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.nig.ac.jp/labs/NigPrjct/cilia-centrosome/planned/a02.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

濱田 博司 (Hamada Hiroshi )  
国立研究開発法人理化学研究所・  
多細胞システム形成研究センター・  
チームリーダー  
研究者番号 : 00208589

(2)研究分担者

広野 雅文 (Hirono Masafumi )  
法政大学・生命科学部・教授  
研究者番号 : 10212177

(3)連携研究者

連携研究者なし

(4)研究協力者

研究協力者なし