

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01435

研究課題名(和文)形態の非対称性の起源

研究課題名(英文)Origin of morphological asymmetries

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・生命機能科学研究センター・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) 32,000,000円

研究成果の概要(和文)：私たちの体は、頭尾・背腹・左右という3つの極性(体軸)を持っている。このような形態の非対称性は、発生のどの時期において、どのような仕組みで生じるのか？本研究では、マウスの胚発生において、左右と頭尾の極性の起源を解明する。左右の極性については、対称性を破る働きをする繊毛の形成・運動動態の制御の機構と、繊毛運動が作り出す水流シグナルが受容される機構を明らかにする。一方、頭尾の極性や着床前胚における細胞分化の非対称性の起源については、卵細胞で発現する母性因子に注目する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体の極性の起源は発生生物学の基本命題である。左右の極性の起源には近年で大きな進展があったが、まだ多くの本質的な問題が残されている。頭尾の極性の起源については、他の生物では卵細胞に遡るが、哺乳動物では全く不明である。これらの問題を明らかにすることで、哺乳動物の体が形成される仕組みの理解に、大きな貢献をする。

研究成果の概要(英文)：Our body has three axes, anterior-posterior (A-P), dorso-ventral (D-V), and left-right (L-R) axes. How are these body axes (polarities) determined during development? In this study, we will study the origin of L-R polarity and that of A-P polarity. For the L-R polarity, we will examine roles of motile and immotile cilia and how the directional fluid generated by motile cilia is sensed by the mouse embryo. As for the A-P polarity, we will investigate roles of maternal factors in establishing the A-P polarity and in cell lineage specification during pre-implantation.

研究分野：発生生物学

キーワード：胚発生 左右非対称性 繊毛 頭尾軸 母性因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

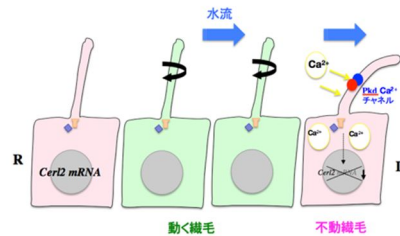
## 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでマウスをモデル動物として用いて、体の左右と頭尾という2つの方向性が決定される機構を研究してきた。左右が決定される機構については1995年以来、急速な進歩が見られた。しかし、いまだ多くの本質的な疑問が残る。本研究では、水流を作り出すノード繊毛の運動性を決める機構と、水流を感知する機構を明らかにする。一方、頭尾(前後)の方向性は、遠位臓側内胚葉(DVE)と呼ばれる細胞によって決まるが、胚盤胞における予定DVE細胞(Takaoka et al., *Nat. Cell Biol.*, 2011)はNodalシグナルによって誘導される(Takaoka & Hamada, in revision to *Nat. Commun.*)。Nodalシグナル因子の由来を遡ると卵細胞で発現していたので、本研究ではNodalなど卵細胞で発現する遺伝子の母性因子としての働きに注目し、とくに頭尾の極性の起源や着床前胚における細胞分化の非対称性の起源である可能性を調べる。

## 2. 研究の目的

### (1) 左右対称性が破られる機構(とくに繊毛の役割)

ノードには2種類の繊毛が存在する。ノードの中心部に位置するPit cellの繊毛は、時計方向に回転し左向き水流を作る(以下、動く繊毛)。Pit cellはノードの前後に沿って非対称に分布するWnt5活性により前後に沿った極性を持ち(Minegishi et al., in revision to *Dev Cell*)、そのために動く繊毛は後傾する。一方、ノードの脇に位置するCrown cellは、アンテナとして機能する動かない繊毛(以下、不動繊毛)を持つ(Yoshida et al., *Science* 2012)。この研究では、これら2種のノード繊毛に注目する。



ノードの繊毛が形成される機構(繊毛形成の新たな機構?): *Cluap1*は繊毛の形成に必須であるが(Botilde et al., 2015; Kato et al., 2016)、繊毛形成が誘導された時に*Cluap1*蛋白質が核周辺にvesicle状に存在した。今後はそのvesicleの意義を明らかにする。また、ノードの運動繊毛が、胚の後傾して形成される機構を明らかにする。

繊毛が運動性を獲得する機構: 繊毛の運動性に必要なモーターであるダイニン複合体は、細胞質で合成され、複合体へとassembleされ、軸糸へと運ばれ、最後に微小管へとDockingされる。これまで各ステップに必要な因子を同定して来たが全体像は不明である。繊毛が運動性を失うヒトの遺伝性疾患群(Primary ciliary dyskinesia)の中で、とくに体の左右性が異常になる疾患の原因遺伝子の機能をマウスにおいて詳しく調べる。とくに、*Ttc25*, *Ccdc11*, *Ccdc19*, *Wdr16*, *Wdr52*などについて変異マウスを作成し、ノードや他の繊毛の運動性を調べる。なかでも*Ccdc11*は、ノード繊毛の運動性だけに必要な因子だったので(井手、Wangら)、最優先で解析する。

ノード脇の不動繊毛が水流を感知する機構: 水流の正確な働きは不明である。水流が運搬する未知の分子を感知するのか、あるいは水流が生じる物理的な力を感知するのか? この点を明らかにするため、まずは水流に反応する $Ca^{2+}$ の検出を試みる。

不動繊毛が水流を感知すると、Crown cellに何が起こる?

水流の標的は*Cer12*と呼ばれる遺伝子である: 不動繊毛が水流に反応すると、左側のCrown cellにおいて*Cer12* mRNAが減少する。この減少は転写レベルの制御ではなく、*Cer12* mRNAの3'-UTRを介するmRNAの崩壊であり、 $Ca^{2+}$ の流入に依って誘導されると予想されるが、その分子機構は全く不明である。dsVenusのORFに*Cer12*の3'-UTR配列を加えたtransgeneを糸口に、*Cer12* mRNAが水流に反応して崩壊される機構を明らかにする。

## (2)母性因子が、頭尾の方向や細胞分化の非対称性の起源か？

母性因子としての Nodal シグナルの役割: Nodal は卵細胞を囲む顆粒膜細胞で発現し、卵細胞はそのシグナルを受ける。顆粒膜細胞特異的に Nodal を欠損させると(MKO: maternal knock-out)、着床前期で重篤な細胞分化の異常が認められた(右図を参照)。おそらく予定 DVE 細胞が正しく形成されていないと予想される。また Foxh1 や Smad2/3 (Nodal シグナルを伝える転写因子) を卵細胞特異的にノックアウトし、母性因子としての Nodal シグナルの役割を調べる。

Epigenetics を制御する因子の母性因子としての役割: 卵細胞における Nodal シグナルの標的を探索中であるが、これまでにヒストンのメチル化を調節する因子 (Psp1, Gse1) が同定された。そこで、Epigenetics を制御する既知の因子の中で卵細胞に発現するものを探し、母性因子としての役割を検証する。①~⑥の各々の研究目的について、まずは必要となる遺伝子改変マウスを作成し、そこから得られたマウス胚を用いて、形態学的・細胞生物学的解析を行う。

### 3. 研究の方法

①~⑥の各々の研究目的について、まずは必要となる遺伝子改変マウスを作成し、そこから得られたマウス胚を用いて、形態学的・細胞生物学的解析を行う。

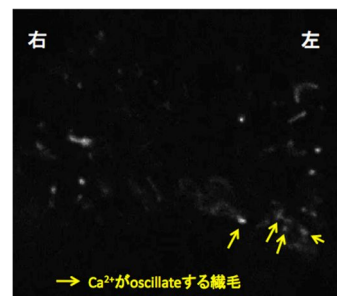
### 4. 研究成果

ノードの繊毛が形成される機構(繊毛形成の新たな機構?): ノードの動く繊毛が後傾する理由は、マウス胚の前後に沿った Wnt5 の勾配が引き金であった(文献2)。繊毛形成に伴って出現する Cluap1 分子を含む vesicle は、細胞内に存在し、繊毛形成によって誘導される未知のオルガネラであった(文献6)。

繊毛が運動性を獲得する機構: Ccdc11 の変異マウスでは、ノード繊毛は運動性を失ったが、他の繊毛は運動性を維持していた。運動性に必要なダイニンタンパク質は、ノード繊毛の軸系内から消失していたが、気道上皮の繊毛では軸系内に維持されていた。Ccdc11 タンパク質は、ノード繊毛ではその基部 (centriolar satellite) に存在したが、気道上皮の繊毛では軸系内で微小管に結合して存在していたことより、Ccdc11 は、ノード繊毛の基部でモータータンパク質を軸系内へと運搬させる役割を持つことが示唆された (Ide, Wang et al 投稿中)。Ccdc19, Wdr16, Wdr52 についても変異マウスを作成し、ノード繊毛、気道繊毛、精子の運動性を現在解析中である(未発表)。

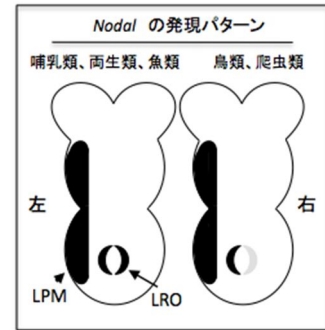
ノード脇の不動繊毛が水流を感知する機構: 不動繊毛中の  $Ca^{2+}$  をライブイメージングできるトランスジェニックマウスを作成し観察したところ、ノードの左後方部にある不動繊毛内で、水流や Pkd2 チャネルに依存した  $Ca^{2+}$  の流入を検出することができた。繊毛を介して流入した  $Ca^{2+}$  は、細胞内へ入り ER で増幅されると考えられた。この  $Ca^{2+}$  の流入を抑制したところ左右の決定が遅れたことより、左右非対称性を作るために必要な  $Ca^{2+}$  であることが判った(Mizuno et al, *Science Advances*, accepted)。胚が水流を感知する機構、すなわち水流が運搬する未知の因子を感知するのか、あるいは水流が生じる力学的刺激を感知するのかは不明だが、少なくとも理論的な解析では、後者の可能性が示唆された(文献4)。

不動繊毛が水流を感知すると、Crown cell に何が起こる?: 不動繊毛が水流を感知した際には、その細胞内の Cer12 mRNA が分解される。その mRNA 分解の機構を調べたところ、RNA 結合タンパク質である Bic1 が Cer12 mRNA の 3'-UTR 配列に結合し、さらに RNA 分解酵素の複



合体をリクルートすることで、Cer12 mRNA が分解されることが分かった(Minegishi et al., 投稿中)。

爬虫類や鳥類において左右対称性が破れる機構：爬虫類の左右が決定される場所(LRO)と時期を調べたところ、blastopore と呼ばれる場所が LRO であったが、そこには動く繊毛が存在しなかった。Nodal 遺伝子は、他の脊椎動物と同様に左側の側板中胚葉で発現していたが、動く繊毛と水流によって対称性を破る脊椎動物(哺乳類など)とは異なり、LRO ですでに非対称に発現していた。以上より、爬虫類(と鳥類)は、動く繊毛や水流に依存せずに、LRO で未知な機構で対称性を破っていることがわかった(文献7)。



母性因子としての Nodal シグナルの役割: 着胚盤胞期での、Nodal と Lefty1/2 の発現と発現した細胞の運命を調べたところ、Nodal を最初に発現した細胞が Lefty1 を発現し、将来 DVE 細胞になることが分かった。また、最初に Nodal を発現する細胞は、ランダムに選ばれていた(文献3)。

Epigenetics を制御する因子の母性因子としての役割: ヒストンのメチル化を制御する因子の1つである Gse1 について解析した。Gse1 を卵細胞特異的に欠損させると、正常な胚発生や出生の頻度が低下した。また Zygotic な変異マウスではすべて、胚発生の途中か出生直後に致死になった。以上より、Gse1 は母性因子として、また zygotic な因子としても、胚発生に重要であることが示唆された(Shimizu et al, unpublished)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinohara Kyosuke, Hamada Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Cilia in Left-Right Symmetry Breaking	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Perspectives in Biology	6. 最初と最後の頁 a028282 ~ a028282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/cshperspect.a028282	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 -
1. 著者名 Minegishi Katsura et al.	4. 巻 40
2. 論文標題 A Wnt5 Activity Asymmetry and Intercellular Signaling via PCP Proteins Polarize Node Cells for Left-Right Symmetry Breaking	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 439 ~ 452.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2017.02.010	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 Takaoka Katsuyoshi, Nishimura Hiromi, Hamada Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Both Nodal signalling and stochasticity select for prospective distal visceral endoderm in mouse embryos	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1492 ~ 1492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-01625-x	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 -
1. 著者名 Omori Toshihiro, Winter Katja, Shinohara Kyosuke, Hamada Hiroshi, Ishikawa Takuji	4. 巻 5
2. 論文標題 Simulation of the nodal flow of mutant embryos with a small number of cilia: comparison of mechanosensing and vesicle transport hypotheses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 180601 ~ 180601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsos.180601	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 -

1. 著者名 Nabeshima Ryo, Nishimura Osamu, Maeda Takako, Shimizu Natsumi, Ide Takahiro, Yashiro Kenta, Sakai Yasuo, Meno Chikara, Kadota Mitsutaka, Shiratori Hidetaka, Kuraku Shigehiro, Hamada Hiroshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Loss of Fam60a, a Sin3a subunit, results in embryonic lethality and is associated with aberrant methylation at a subset of gene promoters	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e36435 ~ 36435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.36435	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 -

1. 著者名 Lamri Lynda, et al.	4. 巻 24
2. 論文標題 Ciliogenesis-coupled accumulation of IFT-B proteins in a novel cytoplasmic compartment.	5. 発行年 2020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 -

1. 著者名 Eriko Kajikawa et al.	4. 巻 4
2. 論文標題 Nodal paralogues 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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 12件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Role of immotile cilia in left-right symmetry breaking
3. 学会等名 Gordon Research Conference: cilia, mucus, and mucociliary interactions (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Cilia in left-right symmetry breaking
3. 学会等名 Cold Spring Harbor China Meeting: cilia and centrosome (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Left-right symmetry breaking in the mouse embryo
3. 学会等名 International Society for Developmental Biology 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Role of immotile cilia in sensing fluid flow
3. 学会等名 ASCB/EMBO Special Interest Subgroup (Cilia:Traffic, Signals, Disease) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Motile and immotile cilia in left-right symmetry breaking
3. 学会等名 British Society of Developmental Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Imaging of ciliary motility and calcium influx in mouse embryo
3. 学会等名 EMBO Meeting on mouse embryo imaging (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Cilia-dependent and independent mechanisms for left-right symmetry breaking among vertebrates
3. 学会等名 EMBO Workshop: Molecular mechanisms of developmental and regenerative biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Cilia-dependent and independent mechanisms for left-right symmetry breaking among vertebrates
3. 学会等名 Indian Developmental Biology Society Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Cilia-dependent and independent mechanisms for left-right symmetry breaking among vertebrates
3. 学会等名 Hunter Meeting 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Role of Ca <sup>2+</sup> in sensing fluid flow for left-right symmetry breaking
3. 学会等名 FASEB, The Biology of Cilia and Flagella (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Role of Wnt signaling in positioning of the basal body
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Wnt signaling (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Readouts of fluid flow sensing by immotile cilia
3. 学会等名 Cold Spring Harbor China Meeting: cilia and centrosome (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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