

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06753

研究課題名(和文) 左右決定におけるノード繊毛由来カルシウムの機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of nodal cilia derived calcium influx in left-right symmetry breaking

研究代表者

水野 克俊 (Mizuno, Katsutoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：00777774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウスやヒトの体の左右決定には、発生途中に一過的に形成されるノードに存在する繊毛が必須である。ノードに存在する動繊毛が形成する流れをノードの縁に存在する不動の繊毛が感知することで、左右対称性の破れがおき、シグナル伝達を開始される。本研究では、ノード不動繊毛、さらに細胞体において左右非対称なカルシウムシグナルが存在すること、さらに繊毛におけるカルシウムシグナルの阻害が左右決定に影響を及ぼすことを初めて示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体の左右決定は内蔵逆位、内臓錯位などの原因となり、重篤な心臓病の原因ともなることから、医学的に重要である。一方で、これまで、繊毛が流れを感知するメカニズムなど、不明な部分が多く残されている。特に、繊毛による物理的シグナルの感知とカルシウムシグナルの関係は、これを否定する論文が報告されるなど、決定的な証拠は得られていなかった。本研究では、これまで観測されてこなかった左右決定に関わる繊毛内でのカルシウム濃度変化を初めて、イメージングにより捉えることに成功した。これは、上記の理由から、今後の繊毛研究において重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：The Left and Right in human body is determined by the function of nodal cilia. Immotile cilia sense extracellular signals but if Ca<sup>2+</sup> plays a role in flow sensing had been unclear. Here, I examined the role of ciliary Ca<sup>2+</sup> in the flow sensing that initiates the breaking of left-right (L-R) symmetry in the mouse embryo. Intraciliary and cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> transients were detected in the crown cells at the node. These Ca<sup>2+</sup> transients showed L-R asymmetry. It was also shown that cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> transients could leak into the cilioplasm and it was necessary to distinguish between ciliary Ca<sup>2+</sup> influx and cell bodied derived Ca<sup>2+</sup> transients in cilia. I could show the existence of ciliary Ca<sup>2+</sup> influx in the absence of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> transients with drug treatment. Furthermore, suppression of intraciliary Ca<sup>2+</sup> transients delayed L-R symmetry breaking. These results indicate cilium-derived Ca<sup>2+</sup> transients in crown cells in the initiation of L-R symmetry breaking.

研究分野：細胞生物学

キーワード：繊毛 ダイニン 左右 カルシウム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動物の体には、内臓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必須である。ヒトを含む哺乳類を含む脊椎動物では、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その流れを感知する (図1)。クラウン細胞の不動繊毛上には Pkd2 チャンネルが局在しており、このチャンネル

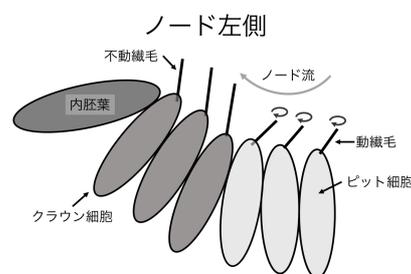
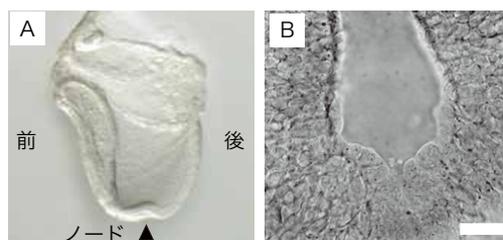


図1. 不動繊毛によるノード流の感知

を介して左右の決定が行われる [Yoshida *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 チャン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。一方で、繊毛におけるシグナルの実体や感知のメカニズムは不明である点が多い。繊毛内におけるカルシウムシグナルの存在を疑問とする論文が報告されている他 [Delling *et al.*, *Nature*. 2016]、繊毛が感知するシグナルが物理的なものであるか化学的なものであるかは長年不明であった。

### 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)繊毛による流れの感知、(2)Pkd2 など繊毛上のカルシウムチャン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。このとき、繊毛内と細胞体でカルシウム動態を比較し、それぞれの関係性を解析した。さらに繊毛特異的にカルシウムシンクとして働くタンパク質を発現させ、左右の決定機構に影響が生ずるかどうかを検討した。

### 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 5HT<sub>6</sub> 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<sub>6</sub> 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<sub>6</sub>-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、左右が決まる時期である 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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のに加え、繊毛特異的なカルシウムのキレートを行うためのラインとして、ノード繊毛特異的に Parvalbumin (Pv) を発現させたもの (NDE4-5HT6-Parvalbumin) を準備し、カルシウム動態の緩衝効果を狙った。これらの観察で得られたデータから、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。さらにノードでの左右対称性の破れを直接的に観察するために、左右対称性の破れにおける最も最初のシグナルである流れ刺激に応答した *Dand5/Cer12* mRNA の分解を可視化するためのライン (NDE4-dsVenus-Cer12-3'UTR; Minegishi *et al.*, 2021) を利用した。また、理化学研究所の加藤孝信基礎科学特別研究員とともに、光ピンセットを用いて直接的に繊毛に対し物理的な刺激を与え、*Dand5* の mRNA 上の流れを感知するエレメントによる分解が誘起されるかどうかを直接的に観察した。

#### 4. 研究成果

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繊毛内でのカルシウム振動を可視化することに成功した (図 2)。その振動数には左側が高い傾向を示した (図 3)。左右での偏りは、*Pkd2*<sup>-/-</sup> 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ことが明らかとなった。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ために、細胞質カルシウム動態を阻害する薬剤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

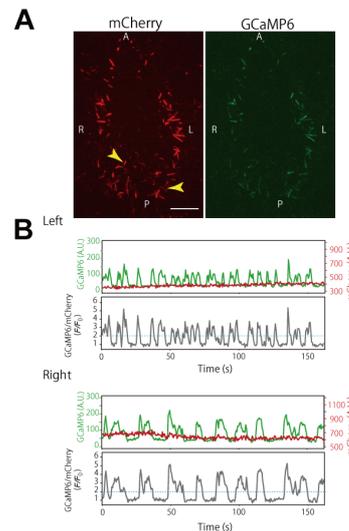


図 2. 繊毛内 Ca<sup>2+</sup> 動態の可視化

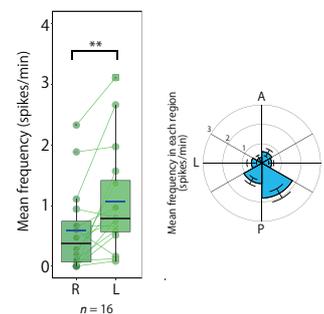


図 3. 左右非対称な繊毛内 Ca<sup>2+</sup> 動態

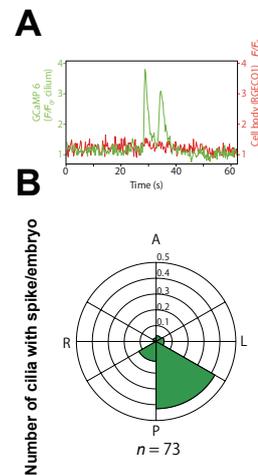


図 4. 細胞内からの Ca<sup>2+</sup> 流入を伴わない繊毛特異的 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇の可視化

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 4)。この左側への偏りを示すカルシウム流入は *Pkd2*<sup>-/-</sup> 変異体、繊毛が不動な *iv/iv* 変異体では観察されなかった。ノードの左側後方は Nodal シグナルが最初期に示す非対称的なパターンが見られる位置であり [Kawasumi *et al.*, *Dev. Biol.*, 2011]、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。

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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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。さらに、ノード不動繊毛特異的にカルシウムシンクタンパク質である Pv を発現させ、その後の流れによる mRNA 分解をモニターしたところ、左右非対称な mRNA 分解が Pv の発現によって有意に遅くなることが判明した。流れの感知による mRNA の分解は最も早い左右非対称なシグナルの一つであり、この結果は、繊毛内のカルシウムシグナルが左右対称性の破れに直接的に関わっていることを示すものである。

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 *Cer12* 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。

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かった。これらの問題に対して答えるため、加藤孝信理化学研究所基礎生物学特別研究員との共同研究を行い、光ビーズによる直接的な物理的的刺激をノード不動繊毛に与え、それによって mRNA の分解が行われることを確認した。これは *Pkd2* チャンネルとその相互作用相手である *Pkd1L1* に依存するシグナルであると考えられ、物理的な刺激が繊毛上のチャンネルを直接的に活性化し、その後のシグナル伝達を開始することを示した初めての知見である [Katoh *et al.*, *Biorxiv*, 2022]。また、PCP シグナルによって微小管ネットワークが再構築され、ノード動繊毛が細胞後方へと移動するメカニズムについても論文を報告した [Sai *et al.*, *Development*, 2022]。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Gerard W. Dougherty, Katsutoshi Mizuno, 他25名, Ide T, Twan WK, 他9名, Aviram M, Kaiser T, Memari Y, Dzeja PP, Dworniczak B, Ueffing M, Roepman R, Bartscherer K, Katsanis N, Davis EE, Amirav I, Hamada H, Omran H.	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 eaba1195
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 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 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 -

1. 著者名 Lanri 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 Sai Xiaorei, Ikawa Yayoi, Nishimura Hiromi, Mizuno Katsutoshi, Kajikawa Eriko, Katoh Takanobu A., Kimura Toshiya, Shiratori Hidetaka, Takaoka Katsuyoshi, Hamada Hiroshi, Minegishi Katsura	4. 巻 149
2. 論文標題 Planar cell polarity-dependent asymmetric organization of microtubules for polarized positioning of the basal body in node cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.200315	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 Katoh Takanobu A., Omori Toshihiro, Mizuno Katsutoshi, Sai Xiaorei, Minegishi Katsura, Ikawa Yayoi, Nishimura Hiromi, Itabashi Takeshi, Kajikawa Eriko, Hiver Sylvain, Iwane Atsuko H., Ishikawa Takuji, Okada Yasushi, Nishizaka Takayuki, Hamada Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Immotile cilia of the mouse node sense a fluid flow?induced mechanical force for left-right symmetry breaking	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biorxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.04.11.487968	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤 孝信 , 大森 俊宏 , 水野 克俊, 石川 拓司, 濱田 博司
2. 発表標題 左右軸決定における、マウスノード不動繊毛への機械刺激依存的な Cer12 mRNA 分解の活性化
3. 学会等名 日本生物物理学会 第59回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 孝信 , 大森 俊宏 , 水野 克俊, 石川 拓司, 濱田 博司
2. 発表標題 左右軸決定における、マウスノード不動繊毛への機械刺激依存的なCer12 mRNA分解の活性化
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takanobu A Katoh, Katsutoshi Mizuno, Hiroshi Hamada1
2. 発表標題 繊毛への機械刺激依存的な、マウスノードクラウン細胞におけるmRNA分解
3. 学会等名 日本生物物理学会 第58回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Katsutoshi Mizuno, Takanobu A. Kato, Kei Shiozawa, Hiroshi Hamada.
2. 発表標題 Functional analysis of intraciliary Calcium signal in mouse Left-Right symmetry breaking.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Cilia & Centrosome. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsutoshi Mizuno, Kei Shiozawa, Hiroshi Hamada.
2. 発表標題 Functional analysis of intraciliary Calcium signal in mouse Left-Right symmetry breaking.
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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