

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23761

研究課題名(和文) ノード不動繊毛はメカノセンサーか否か：顕微操作とカルシウムイメージングによる検証

研究課題名(英文) Are the immotile nodal cilia in the mouse embryo mechanosensors?: experimental tests using micromanipulation and calcium imaging

研究代表者

加藤 孝信 (KATOH, TAKANOBU A.)

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・研究員

研究者番号：80844935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類において心臓が左側に位置するといった「体の左側と右側の違い」は、発生の初期段階で決まる。これまでの研究から、初期胚に一過的に現れる“ノード”という部位に存在する、「ノード不動繊毛」という細胞小器官からのシグナルが左右軸を決定する最初のステップであることが解っている。しかし、ノード不動繊毛が「物理的な刺激」を感知しているメカノセンサーなのか、それとも「化学的な刺激」を感知しているケモセンサーなのかはよくわかっていなかった。本研究では、光ピンセット技術とカルシウムイメージング技術を駆使することによって、ノード不動繊毛がメカノセンサーとしてはたらいっていることを強く示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、ノード不動繊毛において変形による化学状態変化を明確に示した研究は報告されていない。本研究による成果は、十年來にわたる“ノード不動繊毛はメカノセンサーであるか否か”という論争に決着をつける重要な報告である。特に、ノード不動繊毛の異常は繊毛病と総称される病態の原因となっており、本研究で得られた知見は医学的・社会的に非常に意義があるものである。さらに、本研究で開発した顕微鏡技術はノード不動繊毛だけにとどまらず様々なサンプルに適用可能である。

研究成果の概要(英文)：The "difference between the left and right sides of the body", such as the heart being on the left side in mammals, is determined in the early stages of development. From previous studies, it has been found that the signal from the organelle "nodal immotile cilia", which exists in the "node" that appears transiently in the early embryo, is the first step to determine the left-right axis. However, it was not clear whether the nodal immotile cilia were mechanosensors that sensed "physical stimuli" or chemosensors that sensed "chemical stimuli." In this study, we applied the technologies of the optical tweezers and the calcium imaging to nodal-immotile cilia, and obtained results that strongly suggest nodal-immotile cilia is mechanosensors.

研究分野：生物物理学

キーワード：左右体軸形成 ノード不動繊毛 光ピンセット メカノセンサー カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

我々の内蔵は左右非対称に形づくられている。この「体の座標系」はどうやって決まっているのだろうか？

本研究は、体軸形成のうちの左右軸決定機構に関する研究である。哺乳類において心臓が左側に位置するといった“体の左側と右側の違い”は、初期胚に一過的に現れる“ノード”というくぼんだ部位から始まる。ノードは直径約 100 μm のおわん状の形状をしており、そのくぼみの底部に存在する動繊毛が、ノード流と呼ばれる左向きの一方向性の流れを生み出している (図 1; Okada *et al.*, Cell. 2005)。この流れをノード周縁部の細胞に存在するノード不動繊毛が感知する (Nonaka *et al.*, Nature. 2002)。ノード不動繊毛とは、直径がわずか 200 nm 程度・長さが数ミクロンの細胞から生えた毛のような細胞小器官で、細胞のアンテナのようなはたらきをすることが知られている (Nauli *et al.*, Nat Genet, 2003)。下流 (左) 側の不動繊毛のみで、繊毛に局在するカルシウムチャネル Pkd2 が開口し、カスケードが活性化されることにより非対称な遺伝子発現が起こることが知られている (図 1; Yoshiba *et al.*, Science. 2012)。しかし、この一連のプロセスの中で「ノード不動繊毛はどのように水流を感知しているのか」という重要な未解明問題が 1 つ残されていた。

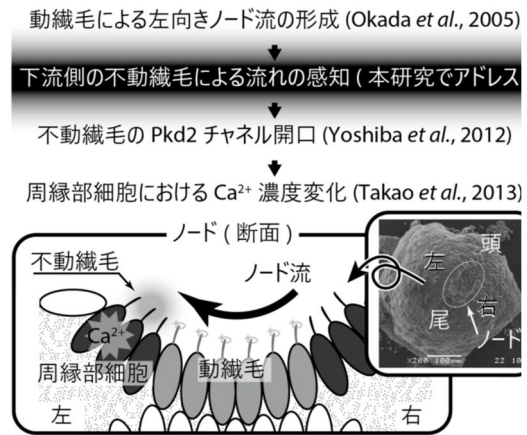


図 1. ノード不動繊毛によるノード流の感知

2. 研究の目的

これまでの研究から、ノード不動繊毛には Pkd111/Pkd2 複合体というノード流を感知してカチオンを流入させるフローセンサーがあることは確実視されている (図 2)。しかし、ノード不動繊毛上でこの複合体はどのようにして流れを感知しているのだろうかはよくわかっていない。本研究では、

「ノード不動繊毛は、流れの“物理的な刺激”を感知しているメカノセンサーなのだろうか (図 2)、それとも流れによって運ばれてくる“化学的な刺激”を感知しているケモセンサーなのだろうか？」

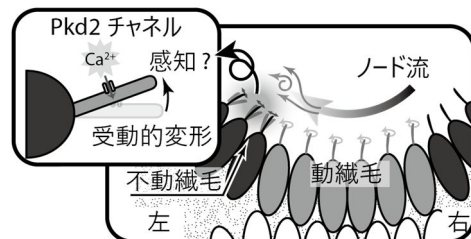


図 2. 不動繊毛の受動変形による水流の感知

という問いに答えることを目的に、光学顕微鏡を駆使して生物物理的なアプローチをとった。

3. 研究の方法

本研究では、水流を与えずにメカニカルな力のみを与える唯一の方法である“光ピンセット”を用いて検証を行った。光ピンセットとは、集光したレーザー光によって溶液中の微小な物体を捕捉する技術で、開発者のアーサー・アシュキンは 2018 年にノーベル物理学賞を受賞している。研究代表者はこれまで光ピンセットを用いた 3 次元力測定技術を確立し [文献 1]、マウス気管繊毛の 3 次元マニピュレーションを実現している [文献 2]。この方法をマウスノード不動繊毛に応用した。

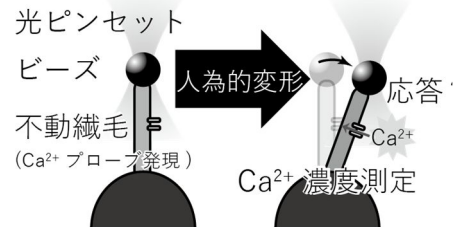


図 3. 不動繊毛のマニピュレーション

ノード不動繊毛先端に、ポリスチレンビーズを付着させることにより、光ピンセットを適用できる (図 3)。これによって光を使って非接触でノード不動繊毛の形状を人為的に変化させて物理刺激を与えることが出来る。さらに所属する研究室で作成された、GCaMP6 というカルシウムプローブを発現させた遺伝子組換えマウス [文献 3] を用いると、共焦点顕微鏡を用いて輝度を

測定することによって、繊毛内部のカルシウム濃度をモニターすることが可能となる。このマウスの一次繊毛に対して光ピンセットにより物理的な刺激を与えたときに、繊毛内カルシウム濃度が上昇するか否かを観察した。

4. 研究成果

研究代表者は光ピンセットによるマニピュレーションとカルシウム濃度の同時測定を可能とする顕微鏡光路を構築した。さらにノード不動繊毛の先端にポリスチレンビーズを付着する技術の開発に成功した。これによって、世界で初めてノード不動繊毛のマニピュレーションおよびカルシウム濃度の同時測定に成功した。さらに、ノード流を欠失した *iv/iv* ミュータントマウスを用いた実験を行うことにより、「ノード流非依存的に光ピンセットによるメカニカルな刺激のみで 10 回に 4 回ほどの頻度で繊毛内カルシウム濃度上昇が起きる」ことを明らかにした (図 4; 加藤ら、第 57 回日本生物物理学会年会で発表)。これは、ノード不動繊毛が機械的な刺激に反応してカルシウム濃度変化を見せることを示す。

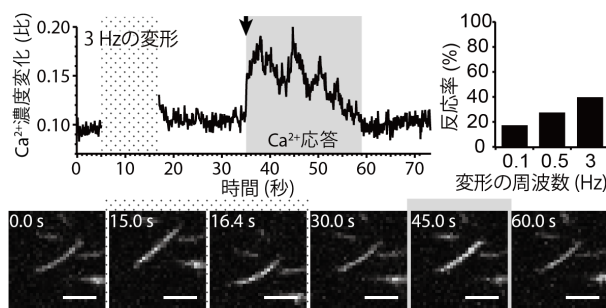


図 4. ノード不動繊毛の変形と Ca²⁺濃度変化

これは、ノード不動繊毛が機械的な刺激に反応してカルシウム濃度変化を見せることを示す。

さらに現在、予備的ながら、その下流シグナルである *Cerberus-like2* (*Cer12*) mRNA の分解が機械刺激によって活性化されることを示唆する結果を得ている (加藤ら、第 58 回日本生物物理学会年会で発表, Data not shown)。 *Cer12* は *Nodal* のアンタゴニストであり、その mRNA の左側特異的な崩壊が左右非対称な遺伝子発現に関与することが知られている (Nakamura *et al.*, Nat Commun. 2012)。

これらの結果は、マウスノード不動繊毛がメカニカルな刺激に反応するメカノセンサーとして左右軸決定に関与することを示唆しており、当初の目的であった「メカノセンサーであるか否かを明らかにする」という問いにある程度答えることが出来た。現在これら結果に関して追加の検証実験を行い論文化を目指している。特に、この現象が左右軸決定に関与するシグナル経路に関わるものであるかを多方面から厳密に検証してゆく予定である。

<引用文献>

[文献 1] **Takanobu A. Katoh**, Shoko Fujimura, Takayuki Nishizaka, 3-D Single Particle Tracking Using Dual Images Divided by Prism: Method and Application to Optical Trapping, Handbook of Photonics for Biomedical Engineering, Springer, pp. 755-766, 2017

[文献 2] **Takanobu A. Katoh**, Koji Ikegami, Nariya Uchida, Toshihito Iwase, Daisuke Nakane, Tomoko Masaike, Mitsutoshi Setou, Takayuki Nishizaka, Three-dimensional tracking of microbeads attached to the tip of single isolated tracheal cilia beating under external load, Scientific Reports, 8(1), 15562, 2018

[文献 3] Katsutoshi Mizuno, Kei Shiozawa, **Takanobu A. Katoh**, Katsura Minegishi, Takahiro Ide, Yayoi Ikawa, Hiromi Nishimura, Katsuyoshi Takaoka, Takeshi Itabashi, Atsuko Iwane, Junichi Nakai, Hidetaka Shiratori, Hiroshi Hamada, Role of Ca²⁺ transients at the node of the mouse embryo in breaking of left-right symmetry, Science Advances, 6(30), eaba1195, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 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 ²⁺ 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 -

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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takanobu A. Katoh
2. 発表標題 Tracking and manipulation of a cilium by the 3-D tracking microscopy and optical tweezers
3. 学会等名 日本生物物理学会 第58回年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takanobu A Katoh, Katsutoshi Mizuno, Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Mechanical stimuli to a cilium activate mRNA decay in a mouse nodal crown cell
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 加藤 孝信
2. 発表標題 Defocus imaging法によるSERCA1aのAドメインの角度変化検出と、マウス初期胚ノードにおけるPkd2チャネルを介した機械刺激依存的mRNA分解
3. 学会等名 第46回生体エネルギー研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤孝信
2. 発表標題 3次元位置検出顕微鏡と光ピンセットを用いた“繊毛1本”のトラッキングとマニピュレーション
3. 学会等名 第9回分子モーター討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanobu A Katoh, Katsutoshi Mizuno, Hiroshi Hamada
2. 発表標題 Are the immotile nodal cilia in mouse embryo mechanosensors?: Ca ²⁺ signaling response after mechanical stimulation by optical tweezers.
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Takanobu A Katoh's Website https://sites.google.com/view/katoh/research?authuser=0

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