

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00472

研究課題名(和文) 脊椎動物における左右対称性の破れ：繊毛依存的機構と非依存的機構

研究課題名(英文) Left-right symmetry breaking in vertebrates: cilia-dependent and independent mechanisms

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) 33,600,000円

研究成果の概要(和文)：2つの異なる脊椎動物を用いて、体の左右非対称な形態が生じる仕組みを解明しようとした。繊毛が生じる水流に依存するマウスにおいては、その水流を感知する機構を解明した。すなわち、ノードの左側の不動繊毛が水流が生じる力学刺激を、メカノセンサーであるイオンチャネルを介して感知する。その結果、Ca²⁺が流入し、RNA結合蛋白質Bicc1を介して標的mRNAを分解する。繊毛に依存しない爬虫類や鳥類においては、Nodal遺伝子がノードで非対称に発現することで体の非対称性が誘導される。Nodal遺伝子の転写を制御するエンハンサーを探索し、ノードで非対称な発現をもたらすエンハンサーを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

左右非対称性を決める水流が感知される機構が解明された点は、学術的に大きな意義を持つ。とくに、『水流は左右を決める分子を運搬するのか、それとも力学刺激として感知されるのか?』という長年の疑問に答えを出せたことは大きな進展であった。一方で、繊毛や水流に依存せずに対称性を破る鳥類や爬虫類では、その機構は不明であったが、Nodalの非対称な発現を規定するエンハンサーを同定できたことで、重要な糸口を得ることができた。

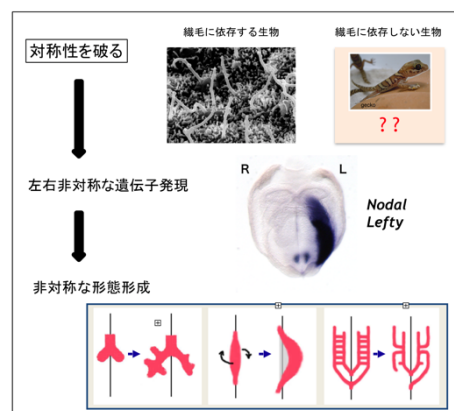
研究成果の概要(英文)：We aimed to understand the mechanism that brings left-right (L-R) asymmetry of body, by using two different vertebrates. In the mouse that depends on the cilia-generated fluid flow at the node, the flow is sensed by immotile cilia as mechanical force via a mechanosensor ion channel. As the result, Ca²⁺ enters node cells on the left side, and degrades the target mRNA via an RNA-binding protein Bicc1. Immotile cilia can sense the direction of the fluid flow because the ion channel protein is preferentially localized to the dorsal side of immotile cilia on left and right sides. In reptiles and birds, which do not depend on cilia or flow at the node, Nodal expression is L-R asymmetric at the node. We have searched for a transcriptional enhancer of Nodal gene, and have identified an enhancer responsible for L-R asymmetric expression at the node.

研究分野：発生生物学

キーワード：左右非対称性 繊毛 Nodal 生物多様性 メカノセンサー

1. 研究開始当初の背景

私たちの体は、頭尾・背腹・左右という3つの極性（体軸）を持っているが、このような形態の非対称性は、どのような仕組みで生じるのか？ なかでも左右非対称性が生じる機構は90年台半ばまで不明のまま残されていたが、左右非対称に発現する遺伝子が発見された事を糸口に研究が進展し理解が深まった。しかし、脊椎動物においてさえ、未だ重要な疑問が多く残されている。例えば『対称性を破る一方向性の水流は、どのような機構で感知されるのか？』など。また、左右非対称性の研究が多彩な生物において為されるにつれ、『多細胞生物において、非対称性を生み出す機構のどこまでが共通で、何が異なるのか？』が大きな疑問となっている。申請者は、これまでマウスにおける機構を研究してきたが、本研究では新たに爬虫類や鳥類も研究対象とし、脊椎動物において保存されている機構と、保存されていない多様な機構を明らかにしたい。

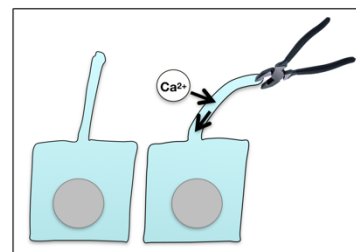


2. 研究の目的

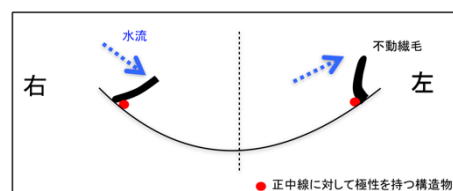
(1) 繊毛を用いて左右対称性を破る機構：マウス

①動繊毛が後傾する機構：時計方向に回転する繊毛が左向き水流を作るためには、繊毛の基部に位置する基底小体が細胞の後方へ移動する。ノードの細胞が、細胞内平面極性(PCP)の情報を受けて基底小体が細胞の中心から後方へと移動させる機構を明らかにしたい。

②不動繊毛が水流を感知する仕組み：物理的な力学刺激を感知しているのか？ノード脇に存在する不動繊毛が水流を感知するが(Yoshida et al., Science 2012)、その機構は不明である。そこでまずは、感知する際のCa²⁺の関与の有無を明らかにする。さらに、水流に対する反応を引き起こすのが、水流によって運搬される未知の分子か、あるいは水流によって生じる機械的な刺激かを明らかにしたい。



③不動繊毛の構造:水流の方向を感知する機構：不動繊毛が水流の力に対して反応するならば、なぜ左右の繊毛は異なる反応をするのか？ 気道繊毛のbasal footのような構造が、左右対称に勝つ正中線に対して極性を持って存在すれば、方向性を感知できる。そこで不動繊毛にそのような構造を探索する。

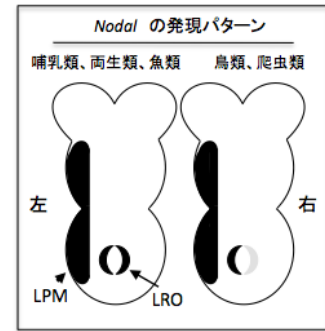


④水流を感知することで細胞内で起こる反応、Ca²⁺による mRNA の崩壊機構：不動繊毛が水流を感知すると、細胞内では Cer12 と呼ばれる遺伝子の mRNA が崩壊する。この崩壊は水流の方向に依存するのでノードの左側の細胞で起こる。Ca²⁺の流入によって、Cer12 mRNA が崩壊する分子機構を解明する。

(2) 繊毛に依存せずに左右対称性を破る機構：鳥類、爬虫類

⑤鳥類型 Nodal 遺伝子の発現制御：鳥類や哺乳類は、魚類・両生類・哺乳類とは異なり、

ノードに動く繊毛・水流を持たず、Cer12 遺伝子失っているが、LRO（左右対称性が破れる胚の部位）での Nodal の発現が R<<L であった（右図）。これが、繊毛を持たなくても左右非対称性を生み出せる理由である (Kajikawa et al., *Nature Ecology & Evolution*, 2020)。本研究では、鳥類や哺乳類の Nodal 遺伝子が、LRO で非対称な発現をする機構を明らかにしたい。



3. 研究の方法

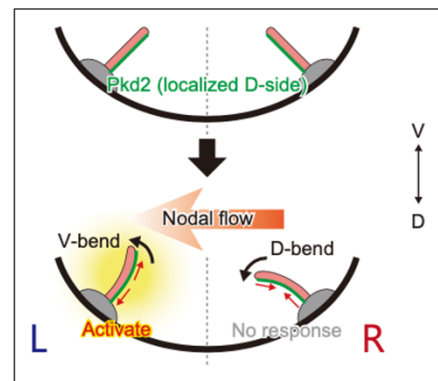
①—④については、まずは必要となる遺伝子改変マウスを作成し、得られたマウス胚を用いて、形態学的・細胞生物学的解析を行う。②については、光ピンセットなどの生物物理学的手法を用いる。③については、TEM, FIB-SEM などによって細胞内の構造を観察する。⑤については、ニワトリ胚へのエレクトロポレーション法を用いる。

4. 研究成果

(1) 繊毛を用いて左右対称性を破る機構：マウス

①動繊毛が後傾する機構：動繊毛の基底にある基底小体は、最初はノード細胞の中心部に位置しているが、やがて細胞の後方へと移動する。基底小体が移動する機構を調べた結果、この移動には細胞平面極性のコア蛋白質である Dchs1, 2 が関与すること、細胞内のアクチンや微小管という細胞骨格に依存することがわかった。また、基底小体から細胞の basal 側に向かって伸びる微小管は、細胞の後側より垂直に伸びるが、細胞の前側では水平に伸びていた。この微小管の配向の非対称性が、基底小体を細胞の後ろ側へ動かしていると考えられた (Sai et al, *Development* 2022).

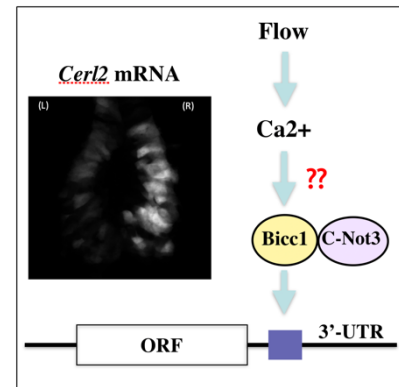
②不動繊毛は水流がもたらす物理的な力を感じ取る：まずは、Ca²⁺の関与の有無を検証した。不動繊毛に Ca²⁺センサー蛋白質 (GCaMP6) を発現するマウス胚で Ca²⁺の発火を観察した。その結果、ノードの左側の不動繊毛において、水流依存的・Pkd2 チャンネル依存的に Ca²⁺の流入が認められた (Mizuno et al, *Sci. Adv.* 2020)。次に、光ピンセットなどの生物物理学的手法を用いて、不動繊毛が機械的な刺激に反応するか否かを検証した。不動繊毛の左向き水流に対する反応を関したところ、左側の不動繊毛は背側に向かって曲がり、右側不動繊毛は腹側に向かって曲がっていることがわかった。そこで、光ピンセットにより不動繊毛に対して背側方向の力を加えたところ、Ca²⁺の流入と Cer12 mRNA の崩壊が誘導された。この反応は、水流の存在と Pkd2 チャンネルに依存していた。このことから、ノードの不動繊毛は力学的刺激に反応するメカのセンサーであることがわかった (Kato et al., *Science* 2023)。



③不動繊毛が水流の方向を感じ取る機構：なぜ左側の不動繊毛だけが左向きの水流に反応するのかを検討した。不動繊毛の根本に極性を持った構造物(気道繊毛の basal foot のような)があるか否かを、FIB-SEM で調べたが、そのような構造は見つからなかった。次に、力学刺激に反応するチャンネルである Pkd2 の繊毛内局在を調べたところ、両側の不動繊毛において、正中線に面した側に有意に局在していることが判明した。不動繊毛が水流に対して非

対称に曲がっていることと合わせて考え、この *Plkd2* の極性を持った局在が、不動繊毛が水流の方向を感知する原因であると示唆された(Kato et al., *Science* 2023)。

④水流を感知することで mRNA が崩壊される機構：
Cerl2 mRNA の 3'非翻訳領域にある、脊椎動物間で保存された配列が、この mRNA の崩壊に関与していた。この保存された配列を欠損する変異マウスを作成したところ、*Cerl2* mRNA の崩壊が起こらず、その結果 *Nodal* の非対称性が失われた。この配列に結合する RNA 結合タンパク



質を探索し、*Bicc1* という因子が有力な候補として浮かんだ。*Bicc1* が認識する配列を決定したところ、GACGAU という配列が、保存された領域内にあったこと、*Bicc1* 変異マウスでは *Cerl2* mRNA の崩壊が起こらないことから、*Bicc1* が関与することが明らかとなった。さらに、*Bicc1* は *Ccr4* と呼ばれる RNA 崩壊活性を持つ複合体と相互作用した。以上より、不動繊毛が水流を感知すると Ca²⁺が流入し、*Bicc1* と *Ccr4* が *Cerl2* mRNA の 3'側の非翻訳領域に結合し、崩壊させること分かった(Minegishi et al, *Nat. Commun.*, 2021)。

(2) 繊毛に依存せずに左右対称性を破る機構：鳥類、爬虫類

⑤鳥類型 *Nodal* 遺伝子の発現制御：ニワトリ *Nodal* 遺伝子の近傍にある transcriptional enhancer を、ニワトリ胚へのエレクトロポレーション法で探索した。その結果、遺伝子の 3'側に、LPM の左側での発現を誘導するエンハンサーと、ノード(LRO)の左側で発現をもたらすエンハンサーを同定した。前者のエンハンサーは、他の動物と同様に転写因子 *FoxH1* の結合配列を持っており、エンハンサー活性には *FoxH1* が必須であった。一方、後者の LRO 特異的エンハンサーを詳細に mapping したところ、両側で活性を持つエンハンサーと右側の活性を抑制するサイレンサーとの組み合わせであることが示唆された。両側性エンハンサーを 7bp までに mapping し、結合する転写因子を同定した。サイレンサー配列へ結合する転写因子を探索中である (Kajikawa et al, 投稿準備中)。

⑥爬虫類の左右非対称性：スッポン胚での *Nodal* の発現を調べていた過程で、脳の一部で非対称に発現していた。*Nodal* だけでなく、*Lefty*, *Pitx2* も非対称に発現していた。この脳での非対称な発現派、アメリカミドリガメ胚では見られたが、マダガスカルササクレヤモリ胚では見られなかったことから、爬虫類の中でもカメに特徴的な現象と考えられた (Kajikawa et al., *Front. Cell Dev. Biol.* 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Iida, H., Furukawa, Y., Teramoto, M., Suzuki, H., Takemoto, T., Uchikawa, M., & Kondoh, H.	4. 巻 25(4)
2. 論文標題 Sox2 gene regulation via the D1 enhancer in embryonic neural tube and neural crest by the combined action of SOX2 and ZIC2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 242-256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12753	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 Teramoto, M., Sugawara, R., Minegishi, K., Uchikawa, M., Takemoto, T., Kuroiwa, A., Ishii, Y., & Kondoh, H	4. 巻 9(2)
2. 論文標題 The absence of SOX2 in the anterior foregut alters the esophagus into trachea and bronchi in both epithelial and mesenchymal components	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology open	6. 最初と最後の頁 bio048728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12753	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 Wakamatsu, Y., & Uchikawa, M	4. 巻 63(1)
2. 論文標題 The many faces of Sox2 function in neural crest development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, growth & differentiation	6. 最初と最後の頁 93-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12705	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 Mizuno, K., Shiozawa, K., Katoh, A. Minegishi, K., Ide, T., Ikawa, Y., Nishimura, H., Takaoka, K., Itabashi, T., Iwane, A., Nakai, J., Shiratori, H. and Hamada, H.	4. 巻 6
2. 論文標題 Role of asymmetric Ca ²⁺ transients at the node of the mouse embryo in left-right symmetry breaking	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 Dougherty GW, Mizuno K, Menchen T, Ikawa Y, et al.	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 Nat. Commun.	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 Ide, T., Twan, W.K., Lu, H., Ikawa, Y., Lim LX, Henninger, N., Nishimura, H., Takaoka, K., Narasimhan, V., Yan, X., Shiratori, H., Sudipto, R., Hamada H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Cfap53 regulates cilia-specific motility patterns through differential localization and role in transport and docking of axonemal dyneins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009232	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 Minegishi, K., Rothe, B., Komatsu, K.R., Ono, H., Ikawa, Y., Nishimura, H., Kato, T.A., Kajikawa, E., Sai, X., Miyashita, E., Takaoka, K., Bando, K., Kiyonari, H., Yamamoto, T., Saito, H., Constam, D., and Hamada, H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Flow-induced decay of Dan5 mRNA for left-right symmetry breaking involves Bicc1-Ccr4 RNA degradation complex.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 4071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24295-2	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 該当する

1. 著者名 Maerker, M., Getwan, M., Dowdle, M.E., McSheene, J.C., Gonzalez, V., Pelliccia, J.L., Hamilton, D.S., Yartseva, V., Tingler M., Minegishi, K., Vick, P., Giraldez, A.J., Hamada, H., Burdine, R.D., Sheets, M.D., Schweickert, A. and Blum, M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Bicc1 and Dicer regulate left-right patterning through post-transcriptional control of the Nodal-inhibitor Dand5.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 5482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25464-z	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, X., Ikawa, Y., Nishimura, H., Mizuno, K., Kajikawa, E., Shiratori, H., Takaoka, K., Hamada, H.* and Minegishi, K.	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 dev200315
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 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 Kajikawa, E., Miki, T., Takeda, M., Kiyonari, H. and Hamada, H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Left-Right Asymmetric Expression of the Nodal-Lefty-Pitx2 Module in Developing Turtle Forebrain.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front. Cell Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 929808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.929808.	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 . Kato, A. T., Omori, T., Mizuno, K., Sai, X., Minegishi, K., Ikawa, Y., Nishimura, H., Itabashi, T., Kajikawa, E., Hiver, S., Iwane, A., Okada, Y., Nishizaka, T. and Hamada, H.	4. 巻 379
2. 論文標題 Immotile cilia mechanically sense the direction of fluid flow for left-right determination.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 66-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abq8148.	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0件

〔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
研究分担者	清成 寛 (Kiyonari Hiroshi) (40721048)	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 (82401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	内川 昌則 (Uchikawa Masanori) (80346147)	大阪大学・生命機能研究科・助教 (14401)	

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			
スイス	EPFL			
シンガポール	National University of Singapore			
ドイツ	University of Hohenheim	University of Munster		