

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650112

研究課題名(和文)マウス胚ノード基底小体の周縁方向極性の解析

研究課題名(英文)Circumferential asymmetry of mouse nodal cilia

研究代表者

野中 茂紀(Nonaka, Shigenori)

基礎生物学研究所・時空間制御研究室・准教授

研究者番号：90435529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類発生ではノード繊毛の運動が作り出す左向き水流が将来の左右を決定する。この繊毛は時計回りに回転運動するがその角速度は左右非対称である。これが粘性抵抗による受動的なものか、繊毛構造に基づく能動的なものなのか、左右性の起源という観点から興味ある問題である。そこで繊毛基部にある基底小体の方向性を、そのマーカーとされるODF2の局在を調べることで決定しようとした。しかしODF2の局在が予想外のパターンを示したため所期の目的は達せられなかった。一方、母娘中心子の方向性に関してはランダムで、上記の粘性抵抗説を弱いながら支持する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In mammalian development, leftward fluid flow generated by nodal cilia is crucial to future left-right asymmetry. The cilia beat in rotational pattern with different angular velocity between leftward and rightward phases, and the cause of the difference is not determined, manifestation of viscous resistance or active control based on the ciliary structure. That's why we tried to find out circumferential orientation of the cilia, by determining basal foot and mother/daughter centrioles at the base of the cilia. Unfortunately, the reported marker of basal foot, ODF2, exhibited unexpected staining pattern and we couldn't determine their exact orientation, while the orientation of the two centrioles (mother or daughter) seemed random, suggesting the viscous resistance model.

研究分野：発生生物学

キーワード：繊毛 左右性 発生生物学

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の発生における左右性は、マウスでは発生 7.5 日に一時的に作られるノードと呼ばれる構造において、一次繊毛が時計回りに回転運動し、左向き水流を作ることによって決まる。この回転運動は、中心軸が細胞表面に対して垂直ではなく胚後方に傾いていることで左向き水流を発生させることがわかっている(Okada et al, 2005; Nonaka et al, 2005)が、同時に、繊毛が左に向かう瞬間と右に向かう瞬間で角速度が変わる。左に速く右に遅いというパターンを示す。このパターンが、繊毛が受ける粘性抵抗の結果にすぎないとすれば、ノードの細胞自身は左右の極性を持たず、左右非対称は繊毛のキラリティーと背腹軸・頭尾軸の非対称から *de novo* に生まれると考えることができる。しかし能動的な繊毛打パターンとして水流の生成に大きく関わっていることを示唆する報告もある (Takamatsu, 2012)。もしこちらの主張が正しいなら、非対称の起源はより手前に遡ることになる。

## 2. 研究の目的

研究背景で述べた説のどちらが正しいか検証するために、ノードの繊毛構造に何らかの左右非対称が存在するか調べることにした。

一般的な鞭打ち運動をする繊毛には基部の基底小体に *basal foot* と呼ばれる突起がひとつ付属しており、その方向は繊毛の有効打の向きと一致することが知られている。一方で、一次繊毛には *basal foot* が複数あることが知られており、ノード細胞には以前調べた限り 2 個あった。そこで、*basal foot* の方向を指標にすることにした。

つまり、マウス胚ノードの全体において、繊毛の円周方向極性と体軸との関係を見出すことを企図した。

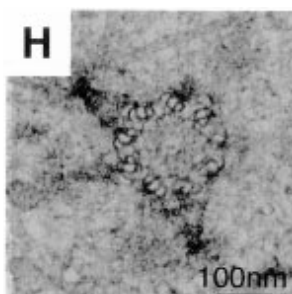


図 1 : ノード繊毛の *basal foot* は 2 個ある

## 3. 研究の方法

研究開始時には *SBF-SEM* (シリアルブロック連続切片走査電顕法) によってノード全体の *basal foot* の方向性を調べることを計画し、この技術に詳しい生理学研究所の村田和義博士と打ち合わせ、さらにトレーニングコースを受講して実験方法を習得した。しかしその結果わかったことは、基本的に現行の *SBF-SEM* で行われているのは膜構造をよく可視化するための染色方法であり、微小管等の構造を見るにはあまり向いていない、ということだった。

そこで、超解像光学顕微鏡と抗体染色を組み合わせる方法に変更した。顕微鏡メーカー各社は 100 nm 程度の分解能を持つ超解像顕微鏡を販売していて、この分解能だと基底小体のどちら側に *basal foot* があるかを知ることがぎりぎり可能である。ちょうど都合なことに、各社のデモや近隣の研究室に導入された製品を利用することができた。

ノード繊毛の基部にある基底小体は細胞の中心体と共通であり、中心体は母娘 2 個の中心子を持つが、一次繊毛は母中心子からのみ生えることがわかっている。そこで母娘中心子と *basal foot* をそれぞれ  $\gamma$ -tubulin と *ODF2* といったマーカーで抗体染色し、超解像共焦点顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

(1) 過去に撮った電顕写真から *basal foot* は母中心子にのみ見られると考えていたが、予想外なことに、多数の細胞を観察すると多くの場合、*ODF2* 交代のシグナルは母中心子にも娘中心子にもみられることがわかった。つまり研究計画の前提である、*basal foot* の位置から繊毛の円周方向極性の情報を取り出すというスキームが崩れてしまった。念のため *basal foot* に局在するという文献報告のある他のタンパク質、*centrin-1*、*galectin*、 $\epsilon$ -tubulin についても抗体染色を行ったが、これらは *basal foot* らしき染色パターンは見いだせなかった。結局、*basal foot* の向きから繊毛の周縁方向極性を見出すことはできなかった。ただし、使用した抗体など技術的な問題によって、抗体のシグナルが正しく

basal foot の分布を反映していない可能性は残されている。これについては、今後もより追求して、具体的には ODF2 の他の抗体による染色、あるいは当初計画していた SBF-SEM によって微小管構造をきれいに見る方法が開発されることを待って、検証を続けていきたい。

(2) 一方で、 $\gamma$ -tubulin 染色は 2 つの中心子をきれいに可視化した。母子どちらかかは区別できないまでも、もし中心体の向きが体軸に対して一定の方向性をとるならば、両者の為す角度に何らかの傾向が見える可能性がある。しかし調べた限り、ノード繊毛が左向きの水流を作り始める late headfold 期から左右非対称な遺伝子発現が見られる 2 体節期まで、発生ステージにかかわりなく、明らかな方向性の偏りは見られなかった。この結果は、先の研究背景に書いた、「繊毛が受ける粘性抵抗による受動的なもの」という仮説を弱いながらも支持するものである。

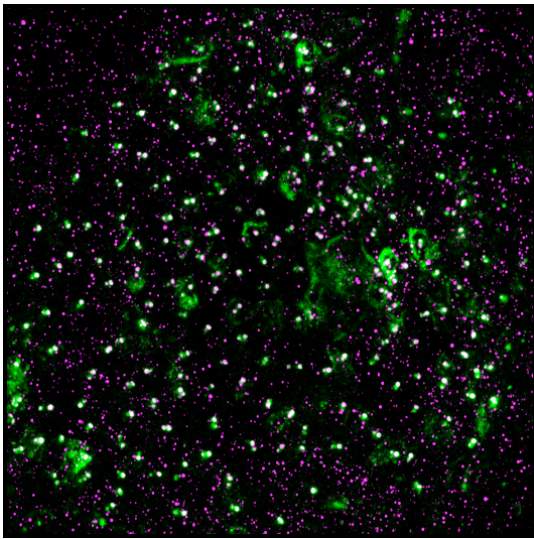


図 2 : 2 体節期胚のノード染色写真  
(緑 :  $\gamma$ -tubulin、マゼンタ : ODF-2)

#### 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 4 件)

① 丸山篤史, 野中茂紀 (2015) 「立体観察やライブイメージングを目的とした広視野二光子励起光シート顕微鏡」 光学/日本光学会, Vol.44 No.1. 30-34 (査読無)

② Nakai, Y., Ozeki, M., Hiraiwa, T., Tanimoto, R., Funahashi, A., Hiroi, N., Taniguchi, A., Nonaka, S., Boilot, V.,

Shrestha, R., et al. (2015). High-speed microscopy with an electrically tunable lens to image the dynamics of in vivo molecular complexes. Rev Sci Instrum 86, 013707. (査読有)

DOI: 10.1063/1.4905330

③ Oshima, Y., Imamura, T., Shintani, A., Kajiura-Kobayashi, H., Hibi, T., Nagai, T., Nonaka, S., and Nemoto, T. (2014). Ultrasensitive Imaging of  $Ca^{2+}$  Dynamics in Pancreatic Acinar Cells of Yellow Cameleon-Nano Transgenic Mice. International Journal of Molecular Sciences 15, 19971-19986. (査読有)

DOI: 10.3390/ijms151119971

④ Maruyama, A., Oshima, Y., Kajiura-Kobayashi, H., Nonaka, S., Imamura, T., and Naruse, K. (2014). Wide field intravital imaging by two-photon-excitation digital-scanned light-sheet microscopy (2p-DSLM) with a high-pulse energy laser. Biomed Opt Express 5, 3311-3325. (査読有)

DOI: 10.1364/BOE.5.003311

[学会発表] (計 20 件)

① 野中茂紀 「生物学者が光学顕微鏡に期待するもの ~なぜライトシート顕微鏡は成功したか~」 第 11 回バイオイメージングフォーラム, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市), 2017 年 2 月 14 日

② 野中茂紀 「Application of light-sheet microscopy to cell and development biology (光シート顕微鏡の生物学応用とその改良)」 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場 (茨城県つくば市), 2016 年 11 月 26 日

③ 野中茂紀 「Application of light-sheet microscopy to cell and development biology」 3rd International Workshop on Image Sensors and Imaging Systems (IWISS2016), 東京工業大学田町キャンパス (東京都港区), 2016 年 11 月 18 日

④ 野中茂紀 「光シート顕微鏡の改良と発生学・細胞生物学への応用」 日本光学会年次学術講演会, 筑波大学東京キャンパス文京校舎 (東京都文京区), 2016 年 11 月 1 日

⑤ 野中茂紀 「光シート顕微鏡の改良と発生学・細胞生物学への応用」 第 25 回日本バイオイメージング学会学術集会, 名古屋市立大学薬学部宮田専治記念ホール (愛知県名古屋市), 2016 年 9 月 5 日

⑥ 野中茂紀「Visualization of gastrulating mouse embryo using light-sheet microscopy」Janelia Workshop on Imaging Mouse Development, HHMI Janelia Research Campus (米国バージニア州アッシュバークン市), 2016年6月29日

⑦ 野中茂紀「光シート顕微鏡の生物学応用とその改良」レーザー学会学術講演会, 名城大学天白キャンパス(愛知県名古屋市), 2016年1月11日

⑧ 野中茂紀「光シート顕微鏡の未来」第38回分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会ワークショップ, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市), 2015年12月1日

⑨ 野中茂紀「目で見る胎生期の発生学—イメージングサイエンス入門」第22回ヘルスカウンセリング学会学術大会特別講演, 明海大学浦安キャンパス(千葉県浦安市), 2015年9月26日

⑩ 野中茂紀「発生における左右の始まり」第6回Molecular Cardiovascular Conference II, ヒルトン福岡シーホーク(福岡県福岡市), 2015年9月5日

⑪ 野中茂紀「Advanced Imaging of the Light Sheet Microscope」第38回神経科学学会大会ランチョンセミナー, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 2015年7月28日

⑫ 野中茂紀「光シート顕微鏡の生物学応用と最近の展開」第67回細胞生物学会大会・レーザ顕微鏡研究会共催シンポジウム, タワーホール船堀(東京都江戸川区), 2015年7月2日

⑬ 野中茂紀, 伊集院敏「共焦点顕微鏡用ライトシートモジュール, ライカ DLS for TCS SP8」第48回日本発生物学会大会ランチョンセミナー, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2015年6月3日

⑭ 野中茂紀「光シート顕微鏡の生物学応用と最近の展開」日本学振振興会光エレクトロニクス第130委員会研究会, 東京理科大学森戸記念館(東京都新宿区), 2015年5月22日

⑮ 野中茂紀「光シート顕微鏡技術による生体まるごとの広視野・高速イメージング」第120回日本解剖学会全国学術集会・第92回日本生理学会大会合同大会, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 2015年3月23日

⑯ 野中茂紀「光シート顕微鏡による生体丸ごとイメージング」第52回生物物理学会年

会シンポジウム, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2014年9月27日

⑰ 野中茂紀「光シート顕微鏡の発生・細胞生物学への応用とその改良」東北大学光操作研究会・技術検討会, 東北大学片平キャンパス(宮城県仙台市), 2014年8月18日

⑱ 野中茂紀「光シート顕微鏡の原理と発生・細胞生物学への応用」第23回細胞生物学ワークショップ, 未来ICT研究所(兵庫県神戸市), 2014年8月8日

⑲ 野中茂紀「The initial left-right determination by nodal flow.」The 9th FENS Forum of Neuroscience シンポジウム, Milano Congressi(イタリア・ミラノ市), 2014年7月4日

⑳ 野中茂紀「高パルスエネルギーレーザーにより実現した広視野な2光子光シート顕微鏡」日本顕微鏡学会第70回記念学術講演会, 幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市), 2014年5月12日

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野中 茂紀(NONAKA, SHigenori)  
基礎生物学研究所・時空間制御研究室・准

教授

研究者番号：90435529

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

谷口 篤史 (TANIGUCHI, Atsushi)