

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生命動態の理解と制御のための基盤技
術の創出」
研究課題「流れをつくり流れを感じる繊毛の力学動
態の解明」

研究終了報告書

研究期間 2013年10月～2019年3月

研究代表者:濱田 博司
(国立研究開発法人理化学研究所 個体パター
ニング研究チーム、チームリーダー)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

濱田グループと篠原グループは、繊毛が運動性を獲得する機構、種々の繊毛が示す運動パターンを決めている原理を明らかにしようとした。まずは、繊毛が運動性を獲得するために必要な因子を、複数同定した: Twister (Dong et al., *J. Cell Biol.*, 2014), *Lrrc6* (Inaba et al., *GTC* 2016); *Ttc25* (Wallmeier et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 2016)。とくに、*Ccdc11*(*Cfap53*)と呼ばれる因子が、ノード繊毛の運動性に特異的に必須であることを見出した。*Cfap53* 変異マウスでは、気道上皮・脳室上皮・卵管上皮の繊毛は、運動のパターンは変化するものの運動性を持っていた。しかし、ノード繊毛は完全に運動性を失っていた。なぜ、ノード繊毛だけが運動性を失うのかを、現在明らかにしつつある。次に、運動パターンを決める原理に迫った。気道繊毛は往復運動をするに対して、左右を決めるノード繊毛は回転運動をする。ノード繊毛が回転運動をする理由を調べたところ、他の繊毛と異なり、*radial spoke* という構造を持っていないことが原因である事が判った。すなわち、*radial spoke* を校正する蛋白質を欠損するマウスでは、ノード繊毛は正常に運動するが、本来なら往復運動をする気道繊毛が回転運動をするようになった (Shinohara et al., *Dev Cell* 2015)。気道の繊毛が往復運動をする理由、精子が特徴的な波打ち運動をする理由については、篠原グループが軸糸の構造的な特徴から、明らかにしようとしている。具体的には最先端の電子顕微鏡法であるクライオ電子線トモグラフィによって野生型マウスと運動パターン異常を示す変異マウスにおける運動繊毛のラジアルスポーク構造を決定しつつある。

回転するノード繊毛が左向き水流を作るのは、繊毛の回転軸が後傾しているためである。濱田グループと篠原グループが後傾する原因を調べたところ、マウス胚を取り巻く前後(頭尾)の情報(具体的には前後に沿った *Wnt5* の濃度勾配)をノード細胞が感知し、細胞が前後に沿った極性を持つことが原因であった (Minegishi et al., *Dev Cell*, 2017)。これにより、既存の位置情報を利用して対称性が破られる機構の全体像を明らかにする事ができた。

高松グループは、石川グループと共同で、マウス初期胚にあるノード繊毛の回転運動の同期現象について理論的枠組みを構築した。野生型マウスでは 200 本ほどの繊毛が回転して体液の流れを生成するが、ミュータントマウスを用いた実験から、近距離に位置する繊毛間では、その回転運動が同期する頻度が高かった。そこで、同期現象が初期の左右差決定に重要な役割を果たすと考え、なぜ同期できるのかについて、流体モデルと位相モデルを組み合わせ、流体中の繊毛回転の同期理論を新規に確立した。その結果、直感に反して、繊毛形状にばらつきがあったり、配置にゆがみがある方が格段に同期しやすいことが明らかとなった。この同期現象により、回転する繊毛が少ない時でも左右差決定を確実にしていることが示唆された (Okumura et al., *Physical Review E*, 2018)。

石川グループは、境界要素法・有限要素法コードを用いて、繊毛の固体力学および繊毛周りの流れの流体力学を解析する数値シミュレーションコードを開発し、繊毛運動の原理や不動繊毛が水流を感知する機構を明らかにしようとした。開発した計算コードを利用してノード繊毛の運動を解析したところ、ダイニンモータの駆動力が時間と共に隣の微小管へと伝播していくことで、繊毛軸糸の回転運動を再現することに成功した。次に、繊毛運動が誘起する流れ場の解析を行った。篠原グループ・濱田グループと共同し、少数繊毛が誘起する微弱な流れがセンサー繊毛に与える作用を定量的に解析した結果、ベシクル輸送説よりも機械刺激感受説の方が実験結果を説明しやすいことが示唆された (Omori et al., *Royal Society Open Science* 2018)。

一方で濱田グループは、不動繊毛が水流を感知する機構を、実験的に明らかにしようとした。

とくに、不動繊毛を介して流入する Ca^{2+} を検出し、この Ca^{2+} が対称性の破れにおける役割を明らかにしつつある。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 左右非対称性の起源: 既存の情報を利用して、対称性を破る。

概要:

体が持つ3つの方向性(頭尾、背腹、左右)のうちで、左右の方向性は最後に決まる。従って、左右の対称性を破るためには、頭尾や背腹という既存の位置情報が利用されると予想できるが、左右対称性を破るために必要な頭尾の位置情報の実体は不明であった。本研究では、その実体が頭尾に沿った **Wnt5** の濃度勾配であることを示した(Minegishi et al., *Dev Cell*, 2017)。これにより、既存の位置情報を利用して対称性が破られる機構の全体像を明らかにすることができた。

2. 体の左右非対称性を決めるノード繊毛が回転運動をする理由

概要:

ノード繊毛が回転運動をできるのは、軸系の微小管が円周に沿って規則的に配置し、中心部に radial spoke と呼ばれる構造を持たないことが原因である事を、変異マウスの作成・解析、電子顕微鏡による繊毛の 3次元計測とコンピューターシミュレーションにより明らかにした [Shinohara et al *Dev. Cell* (2015); Yu & Shinohara et al *Cellular. Physiol. & Biochem.* (2018)]。

3. ノード繊毛の運動が同期するしくみ

概要:

ノード繊毛の運動がなぜ同期できるのかについて、流体モデルと位相モデルを組み合わせる解析した結果、直感に反して、繊毛形状にばらつきがあったり、配置にゆがみがある方が格段に同期しやすいことが明らかとなった。この同期現象により、回転する繊毛が少ない時でも左右差決定を確実にしていることが示唆された(Okumura et al., *Physical Review E*, 2018)。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 固体力学および流体力学を解析する数値シミュレーションコードの開発

概要:

計算バイオメカニクスコードを用いることで分子モータの駆動力から微小管変形、細胞膜変形、繊毛流れまでのマルチスケール・マルチフィジックスの現象を解析し、左右差発現という生物学的機能のメカニズムを数値シミュレーションで検証した。この方法論は、他の生物の機能に対しても応用できると考えられ、生物学の分野にシミュレーションによる定量的な検証という新たなツールを提供し、イノベーションに寄与すると期待される(Omori et al., *Royal Soc. Open Sci.* 2018)。

<代表的な論文>

1. Shinohara, K., Chen, D., Nishida, T., Misaki, K., Yonemura, S. and Hamada, H. (2015). Absence of radial spokes in mouse node cilia is required for rotational movement but confers ultrastructural instability as a trade-off. *Dev Cell*. 35(2):236-246.

2. Okumura, K., Nishikawa, S., Omori, T., Ishikawa, T., Takamatsu, A.. Asymmetry in cilia configuration induces hydrodynamic phase locking, *Physical Review E*, Vol. 97, Iss. 3, 032411 (2018).

3. Omori T, Winter K, Shinohara K, Hamada H, Ishikawa T. Simulation of the nodal flow of mutant embryos with a small number of cilia: comparison of mechanosensing and vesicle transport hypotheses. *Royal Soc. Open Sci.* 5: 180601 (2018).

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「濱田」グループ

研究代表者: 濱田 博司 (国立研究法人 理化学研究所、センター長兼チームリーダー)

研究項目

- ・ ノード繊毛が運動性、回転運動パターンを獲得する機構
- ・ 不動繊毛が水流を感知する機構

② 「高松」グループ

主たる共同研究者: 高松 敦子 (早稲田大学理工学術院、教授)

研究項目: 流れをつくる細胞集団の運動パターン: 繊毛運動の協同性とその役割

- ・ 繊毛回転運動データの解析
- ・ 繊毛回転運動の同期理論の構築

③ 「石川」グループ

主たる共同研究者: 石川 拓司 (東北大学工学研究科 教授)

研究項目

- ・ 繊毛運動と繊毛流れのシミュレーションコードの開発
- ・ 篠原らの実験を再現するノード内流れのシミュレーション
- ・ センサー繊毛に作用する力学刺激の定量解析

④ 「篠原」グループ

主たる共同研究者: 篠原 恭介 (東京農工大学工学部生命工学科 テニュアトラック特任准教授)

研究項目

- ・ 繊毛が一方向に回転運動する機構の解明
- ・ 繊毛の運動パターンを決定するラジアルスポークの構造解析
- ・ 精子鞭毛の波打ち運動の形成原理の解明

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

濱田グループは、不動繊毛が物理的な刺激に反応するか否かを光ピンセットなどで検証するため、西坂崇之ラボ(学習院大学)と連携し現在も継続中。水流に反応して *Cerl2 mRNA* が崩壊する機構については、RNA の専門家である齊藤博英博士のラボ(京都大学)と共同研究を進めている。繊毛の運動性に必要な因子(ヒトの *primary ciliary dyskinesia* の原因遺伝子)については、ドイツの *Heymut Omran* 氏と連携中である。篠原グループは、繊毛運動の構造力学シミュレーションについて、北京理工大学の *Duanduan Chen* 博士と連携して研究を行った。マウス精子とウニ精子を用いた研究については、東京大学の真行寺千佳子博士と連携し研究を行った。また、クライオ電子顕微鏡による繊毛の構造解析については愛知教育大学の上野裕則博士と連携した。