

「生命活動のプログラム」  
平成7年度採択研究代表者

濱田 博司

(大阪大学細胞生体工学センター 教授)

## 「左右軸の位置情報の伝達・確立の分子機構」

### 1. 研究実施の概要

本研究の目標は、マウス・ニワトリ・カエルなどの種々の脊椎動物を用い、左右の位置情報の確立・伝達機構を解明する事であった。これまでに、左右非対称に発現するシグナル分子 (*lefty -1*, *lefty -2*)を同定し、左右決定における役割を解明した。これらの遺伝子が非対称に発現される機構を解明するとともに、Lefty 蛋白質の作用機構の一端を明らかにした。一方、左右の初期決定に関与する *inv* 遺伝子を同定した。これらより、左右軸形成の初期から最終的な形態形成に至る全貌が近い将来解明できる。

### 2. 研究実施内容

#### 1) 左右軸決定における *lefty* の役割

*lefty -1*, *lefty -2* それぞれを欠損するノックアウトマウスを作製しその形質を解析した。 *lefty -1* 欠損マウスの解析の結果、i) この遺伝子が確かに左右の決定に必須であること、ii)そしてその役割は、他の左右決定因子が正中線を越えて拡散することを防ぐためのバリアーとして働くこと、iii)体の左側を決定しているのは、*nodal* と *lefty -2* である事などが判った。一方、*lefty -2* 欠損マウスは、左右の決定よりも囊胚形成時期に胚性致死になり、この遺伝子が左右の決定のみならず中胚葉形成に必須であることが判った。そこで、左右決定における *lefty -2* の役割を知るため、*lefty -2* の非対称な発現を制御しているエンハンサーを欠失させたマウスを作製した。このマウスでは、予想通り囊胚形成は正常であったが、*lefty -2* の非対称な発現が失われ、それに伴い種々の左右の異常が認められ、左右決定における重要性が確認された。

#### 2) *lefty* や *nodal* 遺伝子は、どのような機構で左側だけに発現されるのか？

この点を知るため、これまでトランスジェニック・マウスの実験系を用い、*lefty -1*, *lefty -2*, *nodal* という三つの遺伝子の発現制御領域を詳細に解析した。その結果、*lefty -2* と *nodal* は左側特異的なエンハンサーにより制御されているが、*lefty -1* は右側特異的なサイレンサーにより制御されていることが判った。また、*lefty -2*

と *nodal* については、左右非対称な発現に必要十分なエンハンサーを狭い範囲に決定する事が出来た。この左側特異的エンハンサー配列に特異的に結合する転写因子をクローニングしたところ、FAST と呼ばれる転写因子であった。FAST 自身は両側性に発現していた。FAST 蛋白質が活性化される機構を調べた結果、左側特異的な未知の TGFb 因子によって FAST 蛋白質が活性化され、その結果、 *lefty -2* と *nodal* が左側に発現されると想像された。

### 3) Lefty, Nodal によって誘導される転写因子 Pitx2 の機能と発現制御機構

Lefty や Nodal 蛋白質は、受容体を経たシグナルにより、Pitx 2 と呼ばれる homeobox を持つ転写因子を誘導することが判った。即ち、Pitx 2 は非対称に発現されるシグナル分子によって活性化され、非対称な形態を誘導している転写因子だと予想される。そこで、Pitx 2 の欠損マウスを作製し、左右の決定における役割を検証している。また、Pitx 2 遺伝子の発現調節機構を 2) と同様な方法で解析した結果、左側特異的なエンハンサーを見出した。Nodal 蛋白質からのシグナルが、このエンハンサーを活性化することにより、Pitx 2 遺伝子の発現が誘導されることが判った。

### 4) *lefty -1*, *lefty -2* は異なる/同じ役割・活性を持つのか?

*lefty -1*, *lefty -2* 各々の欠損マウスの解析から、左右の決定において二つの遺伝子が異なる役割を持つことが示唆された (*lefty -2* は体の左を決定する因子、一方 *lefty -1* は *lefty -2* を制御する因子)。しかし、この違いは発現部位の違いによりのものであり、二つの蛋白質は同じ活性を持つと予想される。この点をより直接的に検証するため、二つの遺伝子の coding 領域を置換したマウスを作製した。現在、このマウスの形質を解析中である。

### 5) *inv* 遺伝子の役割

*inv* と呼ばれる変異マウスは、ほぼ 100% の頻度で内臓逆位を示し、その原因遺伝子は左右決定の初期に作用すると想像されている。Positional Cloning により、その原因遺伝子の候補を単離した。さらに、得られた遺伝子を *inv* 変異マウスへ導入すると、*inv* 変異マウスに見られた症状を完全に回復することが出来た。従って、得られた遺伝子が *inv* 遺伝子そのものであることが証明できた。一方、廣川信隆博士らとの共同研究により、*inv* 変異マウスでは nodal flow (node における右から左方向への水流) が異常であることが判り、*inv* 遺伝子の機能を解析するための大きな手がかりが得られた。

## 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H. and Hamada, H. (1998). *lefty-1* is required for left-right

- determination as a regulator of *lefty-2* and *nodal*. *Cell* 94:287-297.
- Yoshioka, H., Meno C., Koshiba, K., Sugihara, M., Itoh, H., Ishimaru, Y., Inoue, T., Ohuchi, H., Semina, E.V., Murray, J.C., Hamada, H. and Noji, S. (1998) *Ptx2*, a bicoid homeobox gene, is involved in a Lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* 94:299-305.
- Mochizuki, T., Saijoh, Y., Tsuchiya, K., Shirayoshi, Y., Takai, S., Taya, C., Yonekawa, H., Yamada, K., Nihei, H., Nakatsuji, N., Overbeek, P., Hamada, H., and Yokoyama, T. (1998). Cloning of *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* 395:177-181.
- Saijoh, Y., Adachi, H., Mochida, K., Ohishi, S., Hirao, A., and Hamada, H. (1999) Distinct transcriptional regulatory mechanisms underlie left-right asymmetric expression of *lefty-1* and *lefty-2*. *Genes Dev* 13:259-269.
- Adachi, H., Saijoh, Y., Mochida, K., Ohishi, S., Hashiguchi, H., Hirao, A., and Hamada, H. (1999) Determination of left-right asymmetric expression of *nodal* by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a *lefty-2* enhancer. *Genes Dev* 13:1589-1600.
- Meno, C., \*Gritmann, K., \*Ohfuji, Y., Heckscher, E., Ohishi, S., Mochida, K., Shimono, A., Kondoh, H., Talbot, W., Robertson, E.J., Schier, A.F. and Hamada, H. (1999). Mouse Lefty2 and zebrafish Antivin are feedback inhibitors of Nodal signaling during vertebrate gastrulation. (\*equally contributed) *Mol. Cell* 4; 287-298.
- Okada, Y., Nonaka, S., Tanaka, Y., Saijoh, Y., Hamada, H., and Hirokawa, N. (1999). Abnormal nodal flow precedes *situs inversus* in *iv* and *inv* mutant mice. *Mol. Cell* 4; 459-468.