

「生物の発生・分化・再生」  
平成12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)

## 「形態の非対称性が生じる機構」

### 1. 研究実施の概要：

「対称な形態から、いかにして非対称性が生じるのか？」すなわち「体の軸はいかにして形成されるのか？」この問題を解明するためには、左右非対称性よいモデルである。左右非対称性に発現する遺伝子 (*lefty, nodal*) が4年前に発見されたのを機に、左右非対称性の分子レベルでの解析が始まった。我々は、1996年に哺乳類で非対称性に発現する初めての遺伝子として*lefty*を報告して以来、これを糸口にして左右決定の機構を解析して来た。その結果、*Nodal, Lefty*などの非対称なシグナル因子の機能・役割・発現調節を明らかにした(しつつある)。しかしこれらの急速な進歩があったとはいえ、左右の決定機構についてはまだ全過程の一部が明らかになったのみである。今後は、「対称性はいかにして破られるのか?」、「非対称な形態形成はどのように遂行されるのか?」という本質的な問題を解決する必要がある。本研究では、主にマウスを用いて遺伝学的・生化学的解析アプローチでこれらの問題に挑戦する。

### 2. 研究実施内容：

#### 1) 左右の初期決定機構の解析

1. ノードにおける繊毛、水流の意義：少なくとも哺乳類においては、ノードの細胞の繊毛運動によって生じる左向き水流が、左右の区別の引き金になると提唱されている。そこで、ノードの繊毛の構造と運動を調べるための高速度撮影装置と電子顕微鏡のシステムを準備した(野中ら)。また、左向き水流によって不均等に分配されている未知の分子の候補について解析を始めた。
2. INV タンパク質の機能：左右の異常を示す多くの変異マウスの中でも、*inv*マウスは極めて特徴的であり、単純にノードの水流で説明することのできない。INVの機能を解明することは左右の決定機構を理解するためのブレイクスルーになると考え、GFPとINVの融合遺伝子をtransgeneとして持つトランスジェニックマウスを作製した。INVタンパク質の胚における局在、細胞内局在、発生に伴う変化などを調べ始めた。

## 2) ノードから側板へのシグナルの伝達機構：非対称な遺伝子発現の制御機構

ノードで生じた非対称性シグナルが側板へ伝わり、*nodal/lefty*の非対称な発現を誘導するに至る過程を解明する。具体的には、非対称に発現するシグナル因子(Nodal, Lefty)の発現制御機構を解析することにより、これらの遺伝子の発現を誘導しているシグナル経路を解明したい。

1. マウス*nodal*やヒト*LEFTY1*はノード(の周囲)において非対称な発現を示す。このような非対称な発現を制御しているエンハンサーをtransgenic法により決定した(*nodal*については200bpに限定し終わった。*LEFTY1*については、約1 kbの領域にマップした; Iwai et al., 未発表)。前者については、エンハンサー内のコアとなる塩基配列(4種類)をすべて決定した。それぞれの配列に結合する転写制御因子をYeast one-hybrid法でクローニングしつつある。
2. ノード周辺で生じたシグナル因子の非対称性は側板へ伝えられ、左側板において*nodal*の発現を誘導する。ここでは、左側板での*nodal*の非対称な発現を誘導している機構を知るため、*nodal*遺伝子の発現誘導を担うエンハンサーを探し、そのようなエンハンサー(LSE)を同定した。現在、0.4 kbの領域にマップし、エンハンサー活性に必須な配列を決定しつつある。(Saijoh et al., 未発表)。また、LSEを欠損する変異マウスを作製した。

## 3) シグナル因子Nodal, Leftyの機能・作用機構

1. Nodal, Lefty タンパク質の拡散性：lefty2の変異マウスの解析より、Nodal蛋白質が長距離に働くこと、LeftyはNodalが働く範囲を限定する役割を持つことが判った。また、GFP-Nodal, GFP-Lefty2蛋白質の挙動をニワトリ胚中で調べたところ、両者ともに長距離を拡散するが、Lefty2の方がより速く拡散することが判った(Meno et al., 投稿中)。Nodal, Leftyという二つのシグナル因子が、生物界における「反応拡散システム」の最初の例であることが更に強く示唆された。
2. Nodalシグナルの伝達機構；Nodalシグナルを伝える転写因子と予想されるFAST/FoxH1の役割を調べた。その結果、前後軸決定・頭部誘導・ノードの形成の局面において、この転写因子がNodalのシグナルを伝えていることが判った(Yamamoto et al., 2001)。

## 4) レチノインの役割

レチノイン酸は胚発生の種々な局面で重要な役割を果たすが、左右の決定においてもその重要性が指摘されている。そこで、レチノイン酸分解酵素CYP26を欠損し、活性型レチノイン酸濃度が上昇するようなミュータントマウスを作製した(Sakai et al., 2001)。このマウスにおける左右非対称な形態形成の異常を調べている。

## 5) 非対称な形態形成の機構

1. Pitx2の発現制御機構：Pitx2は、*nodal* や*lefty2*と同様に左側板で発現が開始されるが、*nodal*の発現が消失した後も左側板由来の組織において発現が維持される。Pitx2遺伝子の転写制御機構を2.と同様に解析し、発現の開始と維持の機構を明らかにした。即ち、Nodalシグナルによって発現が開始され、Nodalが消失した後はNkx2という転写因子によって発現が維持されることが判った (Shiratori et al., 2001)。
2. 転写因子Pitx2の役割；非対称な形態形成におけるPitx2の役割を知るため、Nodalシグナルを受け、左側特異的な形態形成を遂行する転写因子と言われていた。しかし、Pitx2を完全欠損するマウスは他の発生異常を伴うため、非対称性における役割 (Pitx2はすべての臓器の非対称性に関与するのか、あるいは一部の臓器だけなのか?)は明確ではない。この点を明らかにするため、Cre-loxP系を用いたconditional mutant、Pitx2遺伝子の非対称な発現を誘導するエンハンサー (ASE) を欠損するマウスを作製した。

## 6) 左右非対称に発現する遺伝子の系統的探索

マウス遺伝子チップ (2 - 5万種) を利用して、左右非対称に発現する遺伝子の系統的探索を開始した。また、Subtraction法により、左側特異的あるいは右側特異的に発現する遺伝子を探索した。二つの方法により多数の候補が得られ、それぞれについて解析中である。

## 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Shiratori, H., Sakuma, R., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Mochida, K., Nishino, J., Sakai, Y., Saijoh, Y., Whitman, M. and Hamada, H. (2001) Two step regulation of asymmetric Pitx2 expression: Initiation by Nodal signaling and maintenance by Nkx2. *Mol. Cell* 7: 137-149.

Sakai, Y., Meno, C., Nishino, J., Saijoh, Y., Rossant, J. and Hamada, H. (2001) CYP26/P450RA, a retinoic acid-inactivating enzyme, is required for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the anteroposterior axis within the mouse embryo.

*Genes & Dev.* 15: 213-225.