

「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？」この問題を解明するためには、左右非対称性がよいモデルである。左右非対称に発現する遺伝子 (*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、水流の働き:哺乳類においては、繊毛運動によりノードに左向き水流が生じていることが知られている。ノードの水流の重要性を知るため、ノードの水流の方向や速度を人為的に変化させる実験系を開発したところ、水流が方向や速度依存性に左右を決定していることがわかった (Nonaka et al.)。

2. INV タンパク質の機能: *inv* 変異マウスは左右が逆転する唯一のミュータントであり(他のミュータントでは左右がランダムになる)、また単純にノードの水流で説明することのできない唯一のミュータントである。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、INV タンパク質の胚における局在、細胞内局在を調べたところ、ノードの繊毛を含む9+0繊毛に特異的に局在することが判った。(渡辺ら)。

#### 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

1. マウスの *nodal* は、*nodal* や *lefty2* が側板中胚葉の左側で発現するよりも前に、ノードで非対称な発現を示す。*nodal* 遺伝子のノード特異的エンハンサー (NDE) については、そのコア配列(合計6種類もある)を決定し、酵母 One hybrid 法により、各々のコア配列に結合する転写因子のクローニングを試みた。コア配列の一つに結合する転写因子をクローニングしたところ、ノードで特

異的な発現を示す新規な転写因子であった(岩井ら)。

2. GDF1 の役割:TGF 因子の一つ GDF1 はノードの両側で発現されており、ノード流によって分配されている因子の候補であるが、側板の両側でも発現されている。GDF1 がノードと側板のどちら(あるいは両方)で機能するのかを明らかにするため、各々の場所で GDF1 を発現するトランスジェニックマウスを作製した。また、GDF1 の活性・作用機構を知るためのアッセイ系を確立した(田中ら)。

### 3) シグナル因子 Nodal, Lefty の機能と制御

#### 1. Nodal, Lefty タンパク質の生体における挙動(拡散性など):

種々の GFP variant について感度を比較し最適な GFP を選んだ。この GFP との融合蛋白質を発現するマウスを作製するため、nodal, lefty1 遺伝子に GFP を Knock-in することを開始した。

2. 発現の制御:いくつかの重要な点が未解決のままである。今回は、左側板での nodal の非対称な発現を誘導している機構を調べた。非対称な発現の開始を担うエンハンサー(LSE)を同定し、0.4kb の領域にマップし、いくつかのコア塩基配列を決定した。また、このエンハンサーの役割を知るため、LSE を欠損するマウスを解析した(西條ら)。

#### 4) 左右を分離するバリアー(Midline barrier)の形成機構・作用機構

1. Lefty1 の Midline barrier としての作用機構:Lefty1 は、左右を分離する Midline barrier として働くことが知られている。すなわち、Lefty1 を欠損するマウスは midline barrier の機構を失い、その結果左側相同(体の両側が左の形態をとる症状)を示す。しかし Midline barrier としての正確な作用機構は依然として不明である。最近、Lefty1 と ActRII(Nodal の typeII 受容体)の両者を欠損すると、Lefty1 変異マウスで見られた左側相同が消失し、正常な左右非対称性を回復することが判った。Lefty1 の Midline barrier としての作用機構を明らかにする上で糸口となる(目野ら)。

2. midline における lefty1 の誘導機構:種々の変異マウスを利用した移植実験の結果、lefty1 の midline(神経底板)での発現は、Nodal-FAST のシグナル経路で誘導されていることが示唆された(山本ら)。これらのことより、lefty1 欠損マウスにおいてバリアーがなくなるために左から右へ漏れ出していた因子は、Nodal そのものであると示唆された。さらに transgenic assay を用いて、midline における lefty1 の発現を規定しているエンハンサーを同定し、deletion 解析により必要不可欠な配列を決定した(峯ら)。

### 5) 非対称な形態形成の機構

Pitx2 の発現制御機構と機能: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。12年度までの transgenic assay を用いた解析から、Pitx2 の非対称な発現は ASE と呼ばれるエンハンサーによって制御されていることが予想された。13年度は、ASE を欠損するマウスを作製したところ、予想通り非対称な発現のみが消失した。その結果、多くの腹腔内臓器において左右性が乱されていた(白鳥ら)。

### 6) 左右非対称に発現する遺伝子の系統的探索

左右非対称性を生む遺伝子経路の主要部分(nodal/lefty-Pitx2)は判明したが、多くの未知な遺伝子の関与が予想される。事実、[nodal/lefty----Pitx2]と独立して働く別の経路の存在が示唆されている。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探索した

(理研、林崎良英博士との共同研究)。遺伝子チップにより得られた候補遺伝子について in situ hybridization を行い、現在までに、右側特異的に発現する新規遺伝子が一つと左側特異的に発現する新規遺伝子が一つ得られた。左右が逆転する inv 変異胚では、両者の遺伝子ともに発現が逆転していた。今後は、他の変異マウス(約10種が available)における発現パターンの変化を調べることにより、遺伝子経路における位置を決定する。また、異なる stage の RNA を用いて、さらにスクリーニングを継続する(八代、候ら)。

#### 7) 前後軸決定の機構

前後の決定は、胚の遠位にある原始内胚葉が将来の前方へと移動することによって確立される。Nodal-Lefty はこのプロセスでも重要な働きをする。胚の前後の区別が明瞭になる以前の時期で、*lefty1* は anterior visceral endoderm(AVE)に発現し、一方 *nodal* は epiblast と AVE に発現する。Nodal のシグナルを伝える転写因子 FoxH1 が欠損すると、遠位原始内胚葉の細胞移動ができなくなり正しい前後の決定ができなくなることが判った(Yamamoto et al., 2001)。一方、*Lefty1* と *Cerberus* という二つの Nodal antagonist が欠損すると、遠位原始内胚葉が正しい方向へ移動できなくなることがわかった(S.L. Ang 博士らとの共同研究)。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 濱田グループ

- ① 研究分担グループ長名:濱田博司(大阪大学細胞生体工学センター、教授)
- ② 研究項目:マウスを用いた非対称性が生じる機構の解析

#### (2) 近藤グループ

- ① 研究分担グループ長名:近藤 滋 (徳島大学総合科学部、教授)
- ② 研究項目:数理モデルによる解析

### 4. 主な研究成果の発表

#### (1) 論文発表(平成13年4月より)

- Yamamoto, M., Meno, C., Sakai, Y., Shiratori, H., Mochida, K., Ikawa, Y., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2001) A transcription factor FoxH1/FAST mediates Nodal signals during antero-posterior patterning and node formation in the mouse. *Genes & Dev.* 12:1242-1256.
- Meno, C., Takeuchi, J., Sakuma, R., Koshiba-Takeuchi, K., Ohishi, S., Saijoh, Y., Miyazaki, J., ten Dejike, P., Ogura, T., and Hamada, H. (2001). Diffusion of Nodal signaling activity in the absence of the feedback inhibitor Lefty2. *Dev. Cell* 1:127-138.
- Juan, H. and Hamada, H. (2001) The role of *nodal-lefty* regulatory loops in embryonic patterning of vertebrates. *Genes Cells* 6:923-930.
- Hamada, H., Meno, C., Watanabe, D., and Saijoh, Y. (2002). Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nature Rev. Genet.* 3: 103 -113.

#### (2) 特許出願

国内 1 件、 国外 0 件