

「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 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未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?」などの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の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., 2002)。繊毛の形態、位置、運動を精密に観察できる系を確立した。
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、また単純にノードの水流で説明することのできない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たところ、INVタンパク質は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 (Watanabe et al., 2003)。

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. ノードにおける*Nodal* の発現開始：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。そのうちの一つは、Notchシグナルを伝える転写因子であるRBPであった。NotchあるいはそのリガンドであるDeltaを欠損する変異マウスではノードでのNodal 発現が消失し左右の異常を呈した。従って、最初のNodalの発現はNotch シグナルで誘導されていることがわかった (Krebs et al., 2003 in press)。RBPとは別のコア配列に結合する転写因子をクローニングしたところ、ノードで特異的に発現する新しい転写因子であった。そのDNA 結合能が蛋白質のリン酸化で制御されていることが示唆された (岩井ら、未発表)。

2. ノードで発現されるNodal 蛋白質の役割 : Nodal のhypomorphic alleleをもつ変異マウスを解析したところ、NDEの活性が失われたことによりノードでの発現が消失していた。その結果、側板での非対称な発現も起こらなかった。この変異マウスへノードでNodalを特異的に発現するようなTransgeneを導入すると、左右性が回復した。以上の事より、ノードで発現されるNodal 蛋白質が側板の左右性を引き起こしていることがわかった (Saijoh et al., 2003)。
3. GDF1の役割 : TGF β 因子の一つGDF1はノードの両側で発現されており、その変異マウスでは側板の非対称性が失われる。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。各transgeneが、GDF1変異マウスの異常を回復するか否かを調べたところ、完全な回復には両者が必要であることがわかった。また、カエルを用いてGDF1の活性・作用機構を解析するアッセイ系を確立した (田中ら、未発表)。

3) 反応拡散システムによる左右非対称性の確立 : 数理モデルと胚操作による検証

Nodal とLeftyは、その蛋白質としての活性や発現の制御機構から、反応拡散システムを形成すると考えられる。我々は、「Nodal flowによって生じた小さな左右差が、Nodal/Leftyが形成する反応拡散システムによってexclusiveな左右差へと変換される」という仮説を考えた。これを検証するため、一方では、マウス胚へ種々の遺伝子を導入して、Nodal やLeftyの発現に対する影響を調べた。また一方で、これらの実験データ (正常胚・NodalやLeftyの変異胚・遺伝子導入された胚などにおけるNodal Lefty の発現パターン) を再現できる数理モデルを作製しつつある (大阪大学情報科学科、中口氏との共同研究)。現在までに得られたデータは、反応拡散システムの関与を強く示唆している。

4) 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としてVenus (理研、宮脇氏より供与) を選んだ。Nodal-VenusあるいはLeft-Venusの融合蛋白質を発現するマウスを作製した。近い将来融合蛋白質の挙動をリアルタイムで観察する際に必要となる、顕微鏡下での胚の培養と操作法を検討し、系を確立した。
2. 発現の制御 : まだ幾つかの重要な点が未解決のままである。NodalとLefty2の側板で

の非対称な発現は、Nodalシグナルによって誘導される。しかし、二つの遺伝子のNodal 蛋白質に対する感受性は異なり、Nodal遺伝子の方が感受性が高い（より少ないNodalシグナルで誘導される）ことが示唆された（目野ら、未発表）。

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

種々の変異マウスの形質より、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。この点を直接検証するために、マウス胚の側板へNodal発現ベクターを導入し、神経底板でのLefty1の発現を誘導するかどうかを調べた。その結果、側板で合成されたNodal 蛋白質が神経底板まで拡散し、そこでLefty1を誘導することがわかった（Yamamoto et al., 2003）。これにより、Nodal 蛋白質が遠距離を拡散することの決定的な証拠を得ることができた。

6) 非対称な形態形成の機構

Pitx2 の発現制御機構と機能：*Pitx2*の左右非対称な発現は、Nodalによって開始され、その後Nkx2によって維持される。種々の脊椎動物の*Pitx2*遺伝子を調べたところ、すべてNodal応答性配列（FoxH1結合配列）とNkx2結合配列からなるエンハンサー（ASE）を持っていた。このエンハンサーを欠損するマウスを作製したところ、予想通り*Pitx2*の非対称な発現が特異的に消失した。その結果、多くの腹腔内臓器において左右性が乱されたが、影響されない臓器も認められた。従って、腹腔内臓器の非対称な形態形成には、*Pitx2*依存のおよび非依存的なメカニズムで関与することがわかった（白鳥ら、未発表）。

7) 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（理研、林崎良英博士との共同研究）を利用して、左右非対称に発現する遺伝子を探索した結果、二つの遺伝子を同定した（右>>左が一つと、左>>右が一つ）。各々について、左右に異常を来す種々の変異マウスにおける発現パターンの変化を調べ、左右を決定する遺伝子経路における位置を明らかにした。（八代・候・白鳥ら、未発表）。また、新しい遺伝子チップ（Amersham）を用いて再度スクリーニングしたところ、新たに約50種類の左>右なクローン、5種類の右>左なクローンを得た。今後これらについてin situ hybridization で発現の左右性を調べることにした。

8) 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が、Nodal-Leftyはこのプロセスでも重要な働きをする。Lefty1とCerberusという二つのNodal antagonistが欠損すると、前後のパターニングが異常になることがわかった（Perea-Gomez et al, 2002）。すなわち、原条（体の後）が複数形成され、頭部が形成されない。また、原始内胚葉の移動にも異常が見られた（山本ら、未発表）。

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（大阪大学大学院生命機能研究科、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 (理化学研究所、発生・再生科学総合研究センター、チームリーダー)
- 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 (論文発表および特許出願)

(1) 論文発表

- Sakuma, R., Ohnishi, Y., Meno, C., Fujii, H., Juan, H., Miyazono, K., Li, E., and Hamada, H. (2002). Lefty inhibits Nodal signaling by interaction with a common receptor and by efficient diffusion. *Genes Cells* 7:401-412.
- Hamada, H., Meno, C., Watanabe, D., and Saijoh, Y. (2002). Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nature Rev. Genet.* 3: 103 -113.
- Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2002). Determination of left-right patterning by artificial nodal flow in the mouse embryo. *Nature* 418:96-99.
- Perea-Gomez, A., Vella, F., Shawlot, W., Qulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Meno, C., Pfister, V., Robertson, E., Hamada, H., Behringer, R., and Ang, S.L. (2002). Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks. *Dev. Cell* 3:745-756.
- Saijoh, Y., Oki, M., Ohishi, S., and Hamada, H. (2003). Left-right patterning of the mouse lateral plate requires Nodal produced in the node. *Dev. Biol.* 256:160-172.
- Yamamoto, M., Mine, N., Mochida, K., Sakai, Y., Saijoh, Y., Meno, C., and Hamada, H. (2003). Nodal signaling induces the midline barrier by activating *Nodal* expression in the lateral plate. *Development* 130:1795-1804.
- Watanabe, D., Saijoh, Y., Nonaka, S., Sasaki, G., Ikawa, Y., Yokoyama, T., and Hamada, H. (2003). The left-right determinant *Inv* is a component of the node monocilia and other 9+0 cilia. *Development* 130:1725-1734.

(2) 特許出願

2件