

「生物・発生・分化・再生」  
平成12年度採択研究代表者

濱田 博司

(大阪大学大学院生命機能研究科 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) 左向きノード流が生じる機構

繊毛の回転運動によりいかにして左向き水流が生じるのか? : 繊毛の構造と運動をreal time で精密に観察できる系を開発した。その結果、ノードの繊毛が後方へ傾いて回転していることがわかった。この回転軸の傾きが左方向の水流を作り出している事が示唆され、これを証明するために、人工的繊毛をつくり左向き水流を再現できるかどうか試みている(野中・吉場ら、投稿予定)。

#### 2) ノード流の働き

「ケモセンサーモデル: 水流が何らかの分子を左側へ運んでいる」、あるいは「メカノセンサーモデル: ノードの細胞が液体の流れを感知している」という二つの可能性が考えられ、各々を実験的に検証した。ノードの繊毛を欠損する変異マウス胚に人工的な水流を与えると、水流の方向に依存して左右が決定された。一方、正常な繊毛や水流があるがある種のイオンチャンネルを持たない変異マウス胚は、人工的な水流に反応しなかった。まだ明確な結論は出せないが、これらの結果はメカノセンサーモデルを支持している(吉場ら、未発表)。

### 3) ノードから側板へのシグナルの伝達機構

目的：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こと。

1. ノードで生じる非対称なシグナルの実体：左右非対称な遺伝子発現は、ノード（の周囲）で始まる。ヒトLEFTY1のエンハンサー(ANE)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明瞭な非対称な（左>>右）活性を示す。欠失解析でANEエンハンサーを解析し、エンハンサーとしての最小単位を約250bpに限局することが出来た。各種の変異マウス中でANEの活性を調べたところ、その左右性は*iv*や*inv*で変化した。従って、ノード流によりANEの左右性が決定されていることがわかった（川住ら、未発表）。

2. *Nodal* 蛋白質は、ノードから側板へ直接拡散するのか？：ノードで対称に発現する*Nodal*蛋白質は直接左側板へ拡散するのか、あるいは途中でその活性がリレーされるのか？ 直接左側板へ拡散することを示唆するいくつかの間接的な証拠を得た。ノードで合成された*Nodal* 蛋白質を直接可視化するため、EGFP-*Nodal* 融合蛋白質、あるいはFlag-tagが付いた*Nodal* 蛋白質をノードで発現するトランスジェニックマウスを作製した（沖ら、未発表）。

### 4) 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* 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側板における*Nodal*発現の左右性を調べた。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）をすべて再現できる数理モデルを作製した。これらの結果により、反応拡散システムの関与が強く示唆された（中村ら、投稿予定）。

### 5) *Nodal* シグナルが及ぶ距離の制御：GDF1との相互作用

TGFβ因子の一つであるGDF1は側板の両側で発現されているが、これまでの解析により、*Nodal*のSignalingに必須である可能性が示唆されている。今年度は、GDF1の作用機構を、生化学的・遺伝学的に調べた。その結果、GDF1は*Nodal*蛋白質と相互作用すること、*Nodal*はGDF1とヘテロダイマーを作ることにより、活性を著明に上昇することを明らかにした。従って、GDF1は*Nodal*と相互作用しその活性を増加することにより、*Nodal*活性が及ぶ範囲を制御していると示唆された（田中ら、未発表）。

### 6) 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。哺乳類以外の脊椎動物（Zebrafish, Xenopus, Chick）の*Pitx2*遺伝子を調べたところ、マウスと同じように*Nodal/FoxH1*で発現が誘導され、*Nkx2*により維持されていることがわかった。

2. *Pitx2*の役割：*Pitx2*の非対称な発現を規定するエンハンサーASEを欠損するマウス

スを解析すると、予想どおりPitx2の非対称な発現が消失し、それとともに多くの臓器で左右の異常が認められた（白鳥ら、投稿予定）。

3. Pitx2によって制御される遺伝子の探索； Pitx2のASEエンハンサーを欠損する（非対称な発現のみを欠損する）マウスを利用して、Pitx2によって制御される遺伝子を系統的に探索した。その結果、発現が低下／消失する遺伝子が30個、発現が上昇／出現する遺伝子が約20個、見つかった（未発表）。これらの候補遺伝子について、その発現をin situ hybridizationで確認する準備を始めた。

#### **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移動することによって確立される。「細胞運動をひきおこすdriving forceは何か?」、「細胞運動の方向はいかにしてきめられているのか?」という問題に挑戦した。Lefty1やCer1というNodal antagonistの発現を注意深く調べたところ、原始内胚葉の移動が始まる前に、これらの発現が非対称になっているのを見出した。そこで、囊胚期以前という小さな胚に対して局所的に遺伝子を導入する新しい方法を開発し、Lefty1やCer1の働きを検証した。その結果、これらのNodal antagonistは原始内胚葉の細胞分裂を抑制することにより、細胞の移動方向を決めていることがわかった（山本ら、Nature 2004）。

### 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

- Juan, H., Yashiro, K., Okazaki, Y., Yukio Saijoh, Hayashizaki, Y., Hamada, H. (2004). Identification of a novel left-right asymmetrically expressed gene in the mouse belonging to the BPI/PLUNC superfamily. *Dev. Dyn.* 229:373-379.
- Yamamoto, M., Saijoh, Y., Perea-Gomez, A., Shawlot, W., Behringer, R., Ang, S.-L., Hamada, H. and Meno, C. (2004). Nodal antagonists regulate migration of the visceral endoderm along the future antero-posterior axis of the mouse embryo. *Nature* 428:387-392.
- Yashiro, K., \* Zhao, X.,\* Uehara, M., Yamashita, K., Nishijima, M.,

Nishino, J., Saijoh, Y., Sakai, Y., and Hamada, H. (2004). Regulation of retinoic acid distribution is required to establish the proximo-distal patterning and outgrowth of the developing limbs. (\* equally contributed). *Dev Cell* 6:411-422.

- Nishino, J., Yamashita, K., Hashiguchi, H., Fujii, H., Shimazaki, T. and Hamada, H. (2004). Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension. *EMBO J* in press

(2) 特許出願

国内 1件、 国外 0件