

「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) ノード繊毛の回転軸が後方向へ傾く機構

繊毛の回転運動により左向き水流が生じるのは、ノードの繊毛が後方へ傾いて回転することが原因であることがわかった。そこで次の問題は、なぜノード繊毛の回転軸が後方向へ傾くのか?という疑問である。この点を明らかにするため、ノード繊毛をSEMで経時的に観察し、繊毛が形成される過程を追跡した(池内ら、未発表)。

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ている。種々な変異マウス胚に対して人工的な水流を与えた際の影響、カルシウムイオンチャンネルと考えられる *Pkd2* 変異マウスの症状、などはメカノセンサーモデルを支持した(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：ノードで明瞭な非対称な（左>>右）活性を示すエンハンサー（ANE）を欠失解析・変異解析し、左右性を与えるために必要な塩基配列を決定した。同時に、種々の変異マウスにおけるANEの活性の変化を調べ、左右性を与えているシグナルを明らかにした（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？：ノードで合成されたNodal蛋白質が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。拡散を直接可視化するため、Flag, Myc, EGFPなどの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) Nodalシグナルが及ぶ距離の制御：GDF1との相互作用

Nodal蛋白質は、発生の種々の局面で周辺の細胞へシグナルを伝えるが、長距離を隔てて働くためにはGDF1と相互作用することが必要であることがわかった。その原因（の一つ）は、Nodalが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である。GDF1との相互作用により拡散速度が変化する可能性は、否定的だった。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活性が遠距離まで及ぶように制御している（田中ら、未発表）。

5) 非対称な形態形成の機構

1. *Pitx2*の役割：Pitx2欠損マウスへ、種々のtransgeneを用いてPitx2の発現を回復させた。その結果、非対称な形態形成にはPitx2が継続して存在することが必要であることが判った（白鳥ら、投稿予定）。

2. 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。各遺伝子について、in situ hybridizationで発現を確認したが、明確に非対称な発現を示すクローンは得られなかった。さらに、スクリーニングを改良して探索を続けている。Pitx2発現細胞をenrichできるように、Pitx2 ASEでドライブされるEGFP(Venus) transgenicマウスを作製した。

3. Pitx2陽性細胞の運命：Pitx2陽性細胞の運命を追跡するため、Pitx2 ASEで制御されるCre transgenicマウスを作製した。

6) 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。「細胞運動の方向はいかにしてきめられているのか？」これまでの結果より（山本ら、Nature 2004）、Lefty1やCer1というNodal antagonistが原始内胚葉の移動が始まる前に非対称に発現し、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ている。次に、「なぜLefty1やCer1は非対称に発現するのか？」という疑問を明らかにするため、Lefty1やCer1遺伝子を探索し、非対称な発現を規定しているエンハンサー（AVE）を同定した（高岡ら、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

- 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* 23:1987-1997.
- Sakai, Y., Luo, T., McCaffery, P., Hamada, H., and Drager, U.C. (2004). CYP26A1 and CYP26C1 cooperate in degrading retinoic acid within the equatorial retina during later eye development. *Dev. Biol.* 276:143-157.
- Tanaka, S., Kamachi, Y., Tanouchi, A., Hamada, H., Jing, N., and Kondoh, H. (2004). Interplay of SOX and POU factors in regulation of the nestin gene in neural primordial cells. *Mol. Cell. Biol.* 24:8834-8846.
- Saijoh, Y., Oki, S., Tanaka, C., Adachi, H., Shen, M. and Hamada, H. (2005). Asymmetric expression of *Nodal* is induced by two *Nodal*-responsive enhancers conserved between mouse and human. *Dev. Dyn.* 232:1031-1036.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：3件）