

大阪大学細胞生体工学センター 教授

濱田 博司

「左右軸の位置情報の伝達・確立の分子機構」

## 1. 研究実施の概要

### (1) 研究目標

体が正しく作られるための設計図の最も基本になるのは、三つの体軸（頭尾、背腹、左右）の決定である。脊椎動物は、心臓・脾臓・胃など多くの左右非対称な臓器を有するが、これは胚発生の過程でどのような機構（分子）で決定されているのか？ 左右軸決定の機構は、発生学の領域において未だ殆ど手を付けられていない問題であり、数年前までその分子機構は全く不明であった。我々は最近、lefty と呼ぶ胚の左側半分のみで発現される新規 TGF $\beta$  superfamily を同定した (Meno et al. 1996)。様々な点から Lefty は左右軸の決定で中心的役割を果たす Morphogen であると予想され、左右軸を決定している遺伝子プログラムを解明するための絶好の突破口となると予想された。本研究では、lefty を突破口として、左右の位置情報の伝達・確立機構を分子レベルで明らかにしようとした。具体的な研究目標は以下の通りである。

1) 遺伝学的手法によって、左右軸決定における lefty の役割を調べる。2) Lefty の持つ誘導活性・作用機構を解析する。3) Lefty 蛋白質に対する受容体を同定し、位置情報の伝達機構を解析する。4) lefty 遺伝子自身の発現制御領域を解析し、左右非対称な発現をもたらす機構を決定する。

### (2) 実施した研究内容

左右非対称な形態は、大きく分けて4つのステップを経て生じると考えられる (図1): 1. ノードにおける非対称性の出現、2. ノードから側板へのシグナルの伝達、3. 左の側板でのシグナル因子 (Nodal, Lefty) の発現、4. Nodal によって誘導される転写因子 Pitx2 を介した非対称な形態形成。我々のこれまでの研究は、主にシグナル因子の役割りや発現制御についてなされてきた。

#### 2つの類似した lefty 遺伝子 (lefty-1, lefty-2) の存在

当初単離した lefty は 単一の遺伝子と思われたが、その後の解析により、マウスにおいては2つの類似した遺伝子が存在することが判り、lefty-1, lefty-2 とした。二つの遺伝子は同一染色体に隣接していた。両者ともに左側に非対称に発現するが、発現部位が異なった；lefty-1 は主に予定神経底板、lefty-2 は主に側板中胚葉 (Meno et al., 1996; Meno et al., 1997)。

#### 左右の決定における lefty 1, lefty-2 の役割

lefty -1, lefty -2 それぞれを欠損するノックアウトマウスを作製し、それら変異マウスの形質を解析した (近藤壽人博士らとの共同研究)。lefty -1 欠損マウスの解析の結果、i) この遺伝子が確かに左右の決定に必須であること、ii) そしてその役割は、他の左右決定因子が正中線を越えて拡散することを防ぐためのバリアーとして働くこと、iii) 体の左

を決定する因子は Nodal であること、などが判った (Meno et al., 1998)。一方、lefty-2 変異マウスは過剰な中胚葉を形成し、発生初期に致死となった。この結果より、Lefty2 は Nodal の antagonist として働いていることが示唆された (Meno et al., 1999)。

#### Nodal, Lefty 蛋白質の作用機構

Nodal, Lefty 蛋白質の作用機構を生化学的に解析した結果、Nodal は ALK4, ActRIIA/B を受容体としてシグナルを transduce するが、Lefty は ActRIIA/B に競合的に相互作用することにより Nodal のシグナルをブロックすることが判った (佐久間ら、未発表)。

#### Nodal によって誘導される転写因子 Pitx2

Pitx2 と呼ばれるホメオドメインをもつ転写因子は非対称な臓器の原基に広く発現されており、Nodal あるいは Lefty2 の作用を仲介している重要な転写因子である事が予想された (Meno et al., 1998; Yoshioka et al., 1998; 野地澄晴氏らとの共同研究)。そこで、Pitx2 の誘導機構を知るため、Pitx2 遺伝子の発現制御領域を Transgenic mouse の系で探索した。その結果、Pitx2 の非対称な発現は Nodal によって直接誘導された後 Nkx2 と呼ばれる転写因子によって維持されていることが判った (Shiratori et al., 2001)。

#### lefty-1, lefty-2, nodal の左右非対称な遺伝子発現の制御機構

lefty は、どのような機構で左側だけに発現されるのか？ この点を知るため、これまでトランスジェニック・マウスの実験系を用い、lefty-1, lefty-2, nodal という三つの遺伝子の発現制御領域を解析した。その結果、lefty-2 と nodal は左側特異的なエンハンサーにより制御されているが、lefty-1 は右側特異的なサイレンサーにより制御されていることが判った (Saijoh et al., 1999; Adachi et al., 1999)。また、lefty-2, と nodal については、左側特異的なエンハンサーを狭い範囲 (350 bp, 250 bp) に決定した。両者のエンハンサーには 10 bp の共通配列が 2 カ所づつ存在し、変異解析などの結果、この塩基配列が必要かつ充分であることがわかった。この塩基配列を認識する転写因子を、酵母 Two-hybrid 法を用いてクローニングした。得られた転写因子 FAST は、確かに lefty-2 と nodal の制御に関与することが判明した (Saijoh et al., 2000)。

#### ヒト lefty 遺伝子

ヒトの lefty 遺伝子を探索した結果、二つの機能的遺伝子と一つの偽遺伝子を同定した。マウスと同様に、これらの遺伝子は同一染色体に隣接していた。各々の転写制御領域の解析の結果、一方が lefty-1、他方が lefty-2 に相当する事が判った (Yashiro et al., 2000)。

#### inv 遺伝子のクローニング (分担者の横山尚彦ら)

inv と呼ばれる変異マウスは、ほぼ 100% の頻度で内臓逆位を示し、その原因遺伝子は左右決定の初期に作用すると想像されている。Positional Cloning により、その原因遺伝子の候補を単離した。さらに、得られた遺伝子を inv 変異マウスへ導入すると、inv 変異マウスに見られた症状を完全に回復することが出来た。従って、得られた遺伝子が inv 遺伝子そのものであることが証明できた (Mochizuki et al., 1999)。一方、廣川信隆博士らとの共同研究により、inv 変異マウスでは nodal flow (node における右から左方向への



## 2 . 主な研究成果 ( 発表論文 )

### 1. 論文発表 ( 国内 0 遍、海外 2 0 編 )

Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, Y., Yokoyama, M., Toyoda, Y. and Hamada, H. (1996). Left-right asymmetric expression of the TGF $\beta$ -family member *lefty* in developing mouse embryo. *Nature* 381:151-155.

Meno, C., Ito, Y., Saijoh, Y., Matsuda, Y., Tashiro, K. and Hamada, H. (1997). Two closely-related left- right asymmetrically-expressed genes, *lefty-1* and *lefty-2*: Their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos. *Genes Cells*. 2:513-524.

Tonegawa A., Funayama N., Ueno N., and Takahashi Y. (1997). Mesodermal subdivision along the medio-lateral axis in chicken controlled by different concentrations of BMP-4. *Development* 124 1975-1984.

Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H. and Hamada, H. (1998). *lefty-1* is required for left-right determination as a regulator of *lefty-2* and *nodal*. *Cell*. 94:287-297.

Yoshioka, H., Meno C., Koshiba, K., Sugihara, M., Itoh, H., Ishimaru, Y., Inoue, T., Ohuchi, H., Semina, E.V., Murray, J.C., Hamada, H. and Noji, S. (1998) *Ptx2*, a bicoid homeobox gene, is involved in a Lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell*. 94:299-305.

Mochizuki, T., Saijoh, Y., Tsuchiya, K., Shirayoshi, Y., Takai, S., Taya, C., Yonekawa, H., Yamada, K., Nihei, H., Nakatsuji, N., Overbeek, P., Hamada, H., Yokoyama, T. (1998). Cloning of *inv*, a gene that controls left-right asymmetry and kidney development. *Nature* 395:177-181.

Tonegawa A. and Takahashi Y. (1998) Somitogenesis Controlled by Noggin. *Dev. Biol.* 202 172-182.

Saijoh, Y., Adachi, H., Mochida, K., Ohishi, S., Hirao, A., and Hamada, H. (1999) Distinct transcriptional regulatory mechanisms underlie left-right asymmetric expression of *lefty-1* and *lefty-2*. *Genes Dev.* 13:259-269.

Adachi, H., Saijoh, Y., Mochida, K., Ohishi, S., Hashiguchi, H., Hirao, A., and Hamada, H. (1999) Determination of left-right asymmetric expression of *nodal* by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a *lefty-2* enhancer. *Genes Dev.* 13:1589-1600.

Nishino, J., Mochida, K., Ohfuji, Y., Shimazaki, T., Meno, C., Ohishi, S., Matsuda, Y., Fujii, H., Saijoh, Y., and Hamada, H. (1999). GFR $\alpha$ 3, a putative coreceptor of Artemin, is required for the migration and survival of the superior cervical ganglion. *Neuron* 23: 725-736.

Meno, C.,\* Gritmann, K.,\* Ohfuji, Y., Heckscher, E., Ohishi, S., Mochida, K., Shimono, A., Kondoh, H., Talbot, W., Robertson, E.J., Schier, A.F. and Hamada, H. (1999). Mouse Lefty2 and zebrafish Antivin are feedback inhibitors of Nodal signaling during vertebrate gastrulation. (\* equally contributed) *Mol. Cell* 4: 287-298.

Okada, Y., Nonaka, S., Tanaka, Y., Saijoh, Y., Hamada, H., and Hirokawa, N. (1999). Abnormal nodal flow precedes *situs inversus* in *iv* and *inv* mutant mice. *Mol. Cell* 4:459-468.

Funayama, N., Sato, Y., Matsumoto, K., Ogura, T., and Takahashi, Y. (1999). Coelom formation: binary decision of the lateral plate mesoderm is controlled by the ectoderm. *Development* 126:4129-4138.

Saijoh, Y., Adachi, H., Sakuma, R., Yeo, C.-Y., Yashiro, K., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Yashiro, K., Kawabata, M., Miyazono, K., Whitman, M. and Hamada, H. (2000). Left-right asymmetric expression of *lefty2* and *nodal* is induced by a signaling pathway that includes a transcription factor FAST2. *Mol. Cell* 5:35-47.

Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Tao, H., Thisse, B., Thisse, C., Wright, C.V.E., Hamada, H., Ohuchi, H., and Noji, S. (2000). Asymmetric expression of *antivin/lefty1* in the early chick embryo. *Mech. Dev.* 90:115-118.

Yashiro, K., Saijoh, Y., Sakuma, R., Sakai, Y., Tomita, N., Matsuda, Y., Okada, S., Monden, M. and Hamada, H. (2000). Distinct transcriptional regulation and phylogenetic diversity of human *LEFTY* genes. *Genes Cell*. 5:343-357.

Osada, S., Saijoh, Y., Frisch, A., Yeo, C.-Y., Adachi, H., Watanabe, M., Whitman, M., Hamada, H., and Wright, C.V. (2000). Activin/Nodal responsiveness and asymmetric expression of *Xenopus nodal*-related gene converge on a FAST-regulated module in intron 1. *Development*. 127:2503-2514.

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., Shiratori, H., 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.

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 signaling during antero-posterior patterning and node formation in the mouse. *Genes & Dev.* 12:1242-1256.

## 2. 口頭発表

招待、口頭講演（国際学会のみ：国内 4件、海外 9件）

Hamada, H. Determining the left-right polarity. International Congress on Developmental Biology (July 12-15, 1997, Snow Bird, Utah, USA).

Hamada, H. Molecular basis of left-right asymmetry in mammals. The 12th Workshop on Japan-France Cooperative Cancer research Program "Oncogene in Development" (October 1-3, 1997, Utsunomiya, Japan)

Hamada, H. Determination of left-right asymmetry. The 12th Rinshoken International Conference (October 27-29, 1997, Tokyo, Japan)

Hamada, H. Molecular basis of left-right asymmetry. 4th International Kyoto Life Science Symposium (Nov. 6-7, 1997 Kyoto, Japan)

Hamada, H. Function and transcriptional regulation of *lefty* genes. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Handedness and Asymmetry. (November 16-19, 1997, Cold Spring Harbor, USA)

Hamada, H. Role of retinoic acid-catabolizing P450 in development. 12th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. (July, 20-24, 1998, Montpellier, France)

Hamada, H. Molecular basis of left-right asymmetry. Mouse Molecular Genetics (Sept. 01-04, 1998 Cold Spring Harbor, USA)

Hamada, H. TGF $\beta$  signaling in left-right determination of body. US-Japan Cancer Program Workshop on Developmental Regulators and Cancer (Feb. 8-10, 1999, Maui, Hawaii, USA)

Hamada, H. Molecular basis of left-right asymmetry in mammals. Hot Spring Harbor Symposium (Feb. 20-21, 1999 Fukuoka, Japan)

Hamada, H. The role of nodal-lefty loops in embryonic patterning. HFSP Meeting on Axis Formation (May, 2000, Strasbourg, France)

Hamada, H. Dissection of genetic pathway determining left-right asymmetry. SDB meeting in Colorado (June 9-12, 2000, Denver, USA)

Hamada, H. Dissection of genetic pathway determining left-right asymmetry. UCSF Friday Symposium on Organogenesis (June 4, 2000, San Francisco, USA)

Hamada, H. The role of nodal-lefty loops in embryonic patterning. Gorlin Conference on Dysmorphogenesis (September 31-October 02, 2000, Minneapolis, USA)

ポスター発表（国際学会のみ：国内 0件、海外 6件）

## 3. 受賞等

受賞：大阪科学賞（濱田博司、平成12年11月）