

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生命システムの動作原理と基盤技術」
研究課題「生物の極性が生じる機構」

研究終了報告書

研究期間 平成18年10月～平成24年3月

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)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

A. 濱田チーム

マウスというモデル生物を用いて、左右と頭尾という2つの極性（非対称性）が生じる機構を調べるとともに、発生過程における体の極性の起源を実験生物学的に明らかにしようと試みた。具体的には、以下のような研究を遂行した。

① 左右の対称性が繊毛によって破られる機構

- ・ノードには2種類の繊毛があり、ノードの中心部には回転運動をする繊毛、辺縁部には動かない繊毛が存在する。前者の繊毛は水流を作る事が役割で、正常では200-300本の繊毛があるが、2本の回転する繊毛があれば対称性を破る事が出来る。一方、後者の繊毛は水流を感知する役割を持つ。
- ・水流の働き方は不明であるが、『水流が生じる物理的な力として認知される』ことを示唆する間接的な結果を得た。
- ・ノード繊毛の形成・機能に必要な新たな遺伝子を2-3つ同定した。正確な働きは未だ不明だが、変異マウスの表現型は、新たなメカニズムの存在を示唆している。

② 左右の極性の起源:前後の極性が、如何にして左右の極性へと変換されるか?

- ・ノード繊毛の回転軸が後方へ傾くことが左向きの水流を生じる原因であるが、なぜ繊毛の回転軸が後方へと傾くのか? 繊毛の基底部にある基底小体を経時観察したところ、平面内細胞極性という機構により、徐々に後側へ移動する事が判った。Dvl蛋白質自身もノード細胞の後側に局在しており、Dvlを介する平面内細胞極性機構が、ノードの繊毛を後側へ傾けていることが判った。
- ・ノード細胞へ極性を与えている前後の位置情報の実体は何か? ノードの前後で非対称に発現するWnt、あるいはWntが関与しない機構、両者の可能性を検討するために必要な実験系を準備した。

③ 左右非対称な形態形成機構

発生の初期に大動脈の近くに形成される6対の鰓弓動脈のうち、第6鰓弓動脈の右側が消失するため、大動脈弓は左側へアーチすることになる。なぜ片側の鰓弓動脈が消失するのかを調べた結果、左右性を決める遺伝子によって決められた血流動態が、血管のリモデリングを引き起こすことが明らかになった。

④ 前後(頭尾)の極性が決定される機構

Lefty1を発現する細胞を経時的に追跡できる系を用いて、①前後を決める細胞(DVE)は、遅くとも受精後4日目にすでに決定されていること、②DVEの役割は、自らが頭側へ移動することにより、遅れて生じるAVEを頭側へガイドすることを明らかにした。これらの結果から将来の頭尾方向を決める細胞は、従来の考えよりも早い時期に決められていることが判った。

⑤ 前後(頭尾)の極性の起源:どの時期まで遡ることができるのか?

着床前胚でのLefty1の発現パターン、その経時観察、発現制御機構などを調べた結果、胚盤胞の1-2個の細胞で、Nodalシグナル依存的に発現が開始されていることが判った。発現開始に関与するエンハンサー、Nodalシグナルに必要な種々の因子を更に解析することで、前後極性の起源に迫ることが出来ると確信できた。

B. 望月チーム

発生過程における体の極性の起源を理論生物学的に明らかにしようと試みた。具体的には、以下のような研究を遂行した。

① 遺伝子発現の揺らぎが安定な結果に変換される仕組み

ノードの左右両側での遺伝子発現は、初期には大きな揺らぎを示す。揺らぎが生じる原因と、揺らぎを吸収する機構を実験データと数理モデルの両面から明らかにした。

②胚盤胞での *Lefty1* の発現が一部の細胞に限局される機構

着床前胚での *Lefty1* の発現パターンを再現する数理モデルを構築することが出来た。その結果、*Nodal* と *Lefty* より構成される制御ループが自律的に働くことが示唆された。

(2) 顕著な成果

1. Yashiro, K., Shiratori, H, and Hamada, H. (2007). Haemodynamics determined by a genetic programme govern asymmetric development of the aortic arch. *Nature*, 450:285-288.

(平成19年11月、CREST広報)

概要: 心臓から出る大動脈弓は必ず左側へアーチしますが、発生の初期に大動脈の近くに形成される6対の鰓弓動脈のうち、第6鰓弓動脈の右側が消失することによって、左側へアーチする形をとることが知られています。本研究では、右側の第6鰓弓動脈が消失し、左側へアーチする大動脈弓ができる仕組みを突き止めました。

2. Hashimoto, M., Shinohara, K., Wang, J., Ikeuchi, S., Meno, C., Yoshida, S., Takada S., Hatta, K., Wynshaw-Boris, T., and Hamada, H. (2010). Planar polarization of the node cells determines the rotation axis of the node cilia. *Nat. Cell Biol.* 12:170-176. (平成22年1月、CREST広報)

概要: ノードと呼ばれる場所の繊毛は尾側(後側)に傾いて回転するため、左向き水流を生じ、これが左右対称性を破ります。ノード繊毛の回転軸が尾側へ傾く仕組みを調べた所、繊毛の基部に存在する基底小体と呼ばれる細胞小器官が、ノード細胞内において尾側へ偏って位置するためでした。

3. Takaoka, K., Yamamoto, M. and Hamada, H. (2011). Origin and role of distal visceral endoderm, a group of cells that determines anterior-posterior polarity of the mouse embryo. *Nat. Cell Biol.* 13(7):743-752. (平成23年5月、CREST広報)

概要: 蛍光たんぱく質や標識たんぱく質を用いて、母胎内外両方でマウス胚の細胞の運命・挙動を追跡する技術を開発しました。この技術を用いて、受精後3日目から6日目までのマウス胚を用いて将来の頭尾(前後)方向を決める細胞の由来を調べた結果、体の頭尾方向の非対称性が従来の知見よりも早い時期に決められていることを明らかにしました。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

マウス胚において、左右と頭尾という2つの極性（非対称性）が生じる機構を調べるとともに、発生過程における体の極性の起源を明らかにする。極性を制御する分泌性蛋白質の分子を可視化し、これらの分子が胚の中で非対称に分布されるダイナミクスを調べる。得られた現象を再現できる数理モデルを構築し、極性を生み出している原理を予測し、それを実験的に検証する。以上より、多細胞生物において極性が生み出される原理を解明する。

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

《研究を進めていく中での新展開から生まれた新たな研究計画や目標等、あるいは修正を行った点など、簡潔に記述してください。》

1. 『左右の対称性が破られる機構』：前後情報の実体とその翻訳機構については、最終年度で重要な糸口をつかむ事が出来たので、今後数年で概略を理解できると期待できる。また、この項目では、繊毛の形成機構・アンテナとしての機能について新たな発見があり、今後の広がりが見込める。

2. 『分泌後のシグナル分子の可視化』：いろいろな可視化方法を試みたが、残念ながら成功に至らなかった。重要な問題であるので、新たな技術を導入して挑戦したい。

3. 『単細胞生物の非対称性』：当初は、単細胞生物であるクラミドモナスが示す非対称性（眼点の位置など）を研究する予定であったが、マウスの研究テーマの意外な進展に伴い、同時に遂行する事が困難になったため断念した。

§ 3 研究実施体制

(1)「濱田」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
濱田博司	大阪大学大学院生命機能研究科	教授	H18.10～
白鳥秀卓	大阪大学大学院生命機能研究科	准教授	H18.10～
中村哲也	大阪大学大学院生命機能研究科	助教	H18.10～
高岡勝吉	大阪大学大学院生命機能研究科	助教	H18.10～
篠原恭介	大阪大学大学院生命機能研究科	学振特別研究員	H20.04～
川住愛子	大阪大学大学院生命機能研究科	D1～D3	H18.10～H23.09
吉場聡子	大阪大学大学院生命機能研究科	D1～D3	H18.10～
鍋島了	大阪大学大学院生命機能研究科	D1～D3	H18.10～
橋本昌和	大阪大学大学院生命機能研究科	D1～D3	H18.10～H22.06
Yanick Botilde	大阪大学大学院生命機能研究科	M1～D3	H18.10～
董楓嵐	大阪大学大学院生命機能研究科	D1～D3	H20.10～
松野真人	大阪大学大学院生命機能研究科	M1～D2	H19.09～H23.02
峰岸かつら	大阪大学大学院生命機能研究科	D1～D2	H22.04～
玉木亜衣	大阪大学大学院生命機能研究科	M1～M2	H20.04～H23.03
金田浩平	大阪大学大学院生命機能研究科	M1～D1	H21.04～
蘇 経賢	大阪大学大学院生命機能研究科	D1	H23.04～
松原健一	大阪大学大学院生命機能研究科	M1～D1	H21.04～
浅井泰子	大阪大学大学院生命機能研究科	M1～M2	H22.04～
村沢 誠	大阪大学大学院生命機能研究科	M1～M2	H22.04～
濱田陽子	大阪大学大学院生命機能研究科	技術員	H22.01～
井川弥生	大阪大学大学院生命機能研究科	技術員	H18.10～
西村博美	大阪大学大学院生命機能研究科	技術員	H18.10～
福本明美	大阪大学大学院生命機能研究科	技術員	H18.12～
三山和子	大阪大学大学院生命機能研究科	補助員	H18.10～
岡田由美子	大阪大学大学院生命機能研究科	補助員	H18.10～H22.03
田辺友枝	大阪大学大学院生命機能研究科	補助員	H18.10～

② 研究項目：生物の極性が生じる機構（実験生物学による検証）

(2)「望月」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
望月敦史	基礎生物学研究所、理論生物学	助教授	H18.10～
中里研一	基礎生物学研究所、理論生物学	CREST 研究員	H18.10～
藤田浩徳	基礎生物学研究所、理論生物学	研究員	H18.10～
今村寿子	基礎生物学研究所、理論生物学	研究員	H18.10～

② 研究項目：生物の極性が生じる機構（理論生物学による検証）

§ 4 研究実施内容及び成果

4. 1 左右の対称性が破られる機構(大阪大学 濱田グループ)

(1)研究実施内容及び成果

- A. ノード繊毛の運動: ノード繊毛の運動様式を観察したところ、ノード中心部の細胞 (Pit cell) の繊毛の大部分は回転運動をしているが、ノード脇の細胞 (Crown cell) の繊毛の大部分は回転していない事がわかった。前者の繊毛は水流を形成し、後者の繊毛は水流を感知する働きを持つと考えられた (Yoshida et al., submitted)。ノード繊毛の回転速度と水流速度の変化を調べた所、繊毛が回転を始めた早い時期で、水流速度が遅い時期に、ノードの両側での遺伝子発現が非対称になっておいた。また、繊毛形成が異常な種々の変異マウスを調べた所、最低で2本の回転する繊毛があれば、その位置に関係なく、左右の対称性を破る事が出来る事が判った。2本しか繊毛がない場合は、水流を検出する事は出来なかった。以上の観察より、ノードにおける水流は、なんらかの決定因子を運搬しているのではなく、回転運動に寄って生じる物理的な力が伝搬していると考えられた (Shinohara et al., submitted)。
- B. ノード繊毛の形成機構: ゲノム情報を利用して、繊毛を介する signaling に関与する因子を探索し、 ~ 10 の遺伝子を見出した。そのうちの3つについて解析を行った。変異マウスを作成した所、1つはノード繊毛の形成に必要 (Yanick et al., unpublished)、1つはノード繊毛を介するシグナリングに必要 (浅井ら、未発表)、最後の1つは精子の運動性に必要であった (Dong et al., unpublished)。
- C. 水流の働き: 嚢胞腎の原因遺伝子である Pkd2 は Ca^{2+} チャネルをコードするが、ノードの crown cell の繊毛に局在し、水流を感知していることが判った。また遺伝学的に、繊毛を局所的に形成させたところ、crown cell に存在する繊毛 (おそらく回転運動をしていない immotile cilia) が、水流を感知している事が明らかになった (Yoshida et al., submitted)。左右が逆転する変異マウス (inv) においては、ノードの水流の乱れにより、ノード両側の非対称な発現が変化し、これが側板での Nodal の発現を逆転させることが判った (Oki et al., *Development* 2009)。また、水流に反応する遺伝子としては、Cer12 と呼ばれる Nodal 抑制因子をコードする遺伝子が、最も早く反応する事が判った。すなわち、左向き水流を受けて、ノードの両側での Cer12 の発現が右 > 左となるため、左右均等に発現する Nodal の活性は右 < 左となり、このノードにおける Nodal 活性の非対称性が、側板での左側特異的な Nodal 発現を誘導する (Kawasumi et al., *Dev. Biol.* 2011)。

(2)研究成果の今後期待される効果

繊毛は、細胞分裂に依存しながら中心体に変化した基底小体から形成される。我々が同定した繊毛形成に必要な因子の研究から、細胞周期に依存した繊毛形成機構を明らかにする事が出来る。また、ノード繊毛を介するシグナリングに必要な因子の研究からは、繊毛が種々のシグナルをキャッチし、それを核へ伝える機構が明らかになると期待できる。

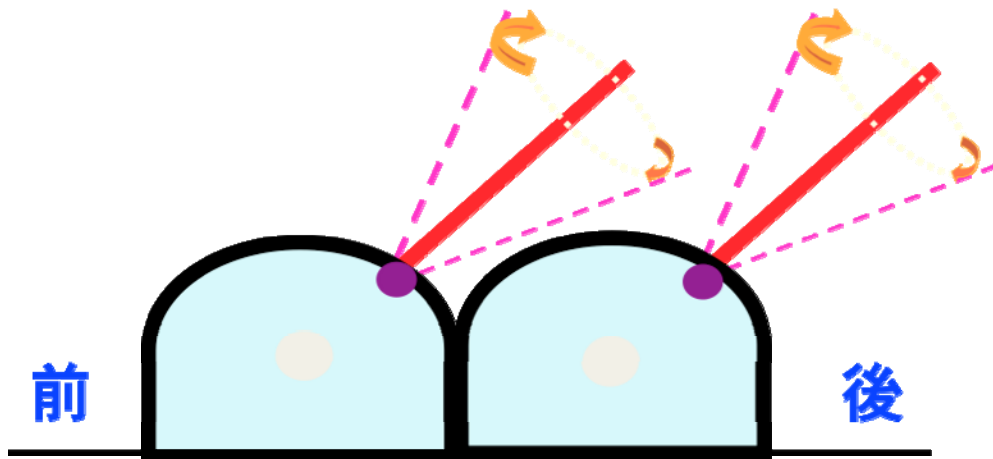
水流の働きを考えると、決定因子を運搬しているのか、あるいは水流が生じる物理的な力が重要なのかは、未だに決定的な答えがない。これまでに確立した実験系に加えて、さらに新しい生物物理的な実験系を開発すれば、明確な答えを出す事が出来る。

4. 2 左右の極性の起源(大阪大学 濱田グループ)

(1)研究実施内容及び成果

- A. 繊毛の回転軸が後方へと傾く機構: 一方向性に回転する繊毛運動が、左向きの水

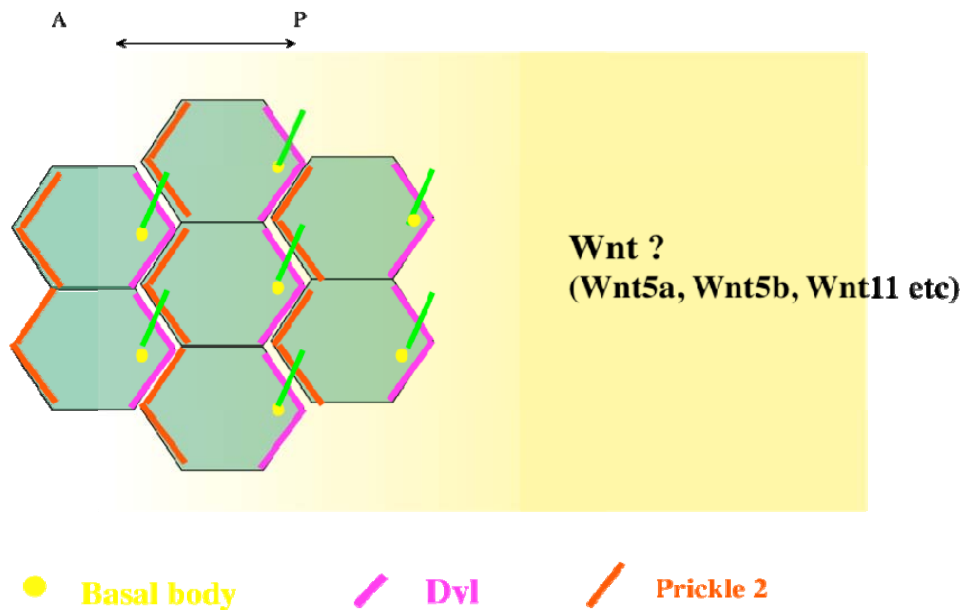
流(渦巻きではなく)を生じるのは、繊毛の回転軸が後方へと傾いているからである。



そこで、『なぜ繊毛の回転軸が後方へと傾くのか?』という疑問に取り組んだ。まず繊毛の基部にある基底小体をみると、繊毛を持つ細胞の後側に偏っており、このことが繊毛の後傾の原因となっていた。基底小体の位置を経時観察したところ、当初はランダムに位置しているが発生が進むに連れて後側へ移動する事が判った。細胞内の基底小体の位置は、平面内細胞極性(PCP: Planar Cell Polarity)と呼ばれる機構で決められており、PCP に必須な因子である Dvl を欠損すると、基底小体の位置がランダムになった。また、Dvl 蛋白質自身も、ノード細胞の後側に局在していた。以上より、Dvl を介する平面内細胞極性機構が、ノードの繊毛を後側へ傾けていることが判った(Hashimoto et al., *Nat. Cell Biol.* 2010)。

B. 左右の極性の起源となる前後位置情報:ノードの細胞に前後の極性を持たせる機構として、Wnt 依存性と Wnt 非依存性の2種類の機構が考えられる。

まだ結果を得るに至っていないが、以下のような実験系を準備した。まずは前者の機構を検討するため、ノード周辺で発現する non-canonical Wnt 因子を探索し、*Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt11* を同定した。とくに、*Wnt5a*, *Wnt5a* は、ノードの後方だけで発現し、その非対称は発現パターンから有力な候補と考えられた。手始めに *Wnt5a* 組換え蛋白質 (USCF の Karl Willert 氏より供与) 存在下でマウス胚を培養すると、ノード細胞の極性(基底小体の位置)が異常になった。この結果に勇気づけられ、*Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt11* それぞれの変異マウスを作成・導入した。各々の単独変異マウスを調べた所、ノード細胞は正常な前後極性を示したことより、機能的な重複が予想された。現在は、*Wnt11* を含めた多重変異マウスを解析している。さらに、以上の機能低下マウスと逆に、*Wnt5a* をノードの前後の両側で均等に発現するマウスを作成している。一方、Wnt に依存しない機構も考えられる。ショウジョウバエの細胞内極性機構から類推すると、カドヘリン用膜蛋白質の Dachsus が関与する可能性がある。そこで、マウスの Dachsus である *Dchs1*, *Dchs2* の変異マウスを作成した。(峰岸・橋本ら、未発表)。



細胞内極性に従い基底小体の位置が後ろへ移動する機構を知るため、他の細胞内極性因子(Prickl1/2 など)に注目し、それらの変異マウスを作成し、ノード細胞の基底小体の位置を調べる予定である。また、高圧電子顕微鏡を用いて、細胞骨格と基底小体との相互作用を観察しつつある(峰岸・橋本ら、未発表)。

(2)研究成果の今後期待される効果

準備は順調に進んでおり、前後の位置情報が左右の極性へと変換される機構が、明らかになると期待される。

4. 3 左右非対称な形態形成機構(大阪大学 濱田グループ)

(1)研究実施内容及び成果

A. 心臓から出る大動脈弓は必ず左側へアーチするが、発生の初期に大動脈の近くに形成される6対の鰓弓動脈のうち、第6鰓弓動脈の右側が消失することによって、左側へアーチする形をとることが知られている。なぜ片側の鰓弓動脈が消失するのかは不明だったが、その仕組みを明らかにしたすなわち、左右性を決める遺伝子(Pitx2)の働きにより、心臓から出る大血管が頭尾軸に沿って回転し、その回転の結果、左右対称に存在した第6鰓弓動脈の右側部分が細くなる。右側第6鰓弓動脈が狭くなった結果、そこに流れる血流が少なくなり、血管内皮細胞が受け取る増殖因子のシグナルが減少し、やがてアポトーシスを引き起こして右側第6鰓弓動脈が消失する。つまり、左右性を決める遺伝子によって決められた血流動態が、血管のリモデリングを引き起こすことが明らかになった(Yashiro et al, *Nature*, 2007)。

B. 心臓に連結する流出路(Outflow tract)が螺旋運動する仕組みを知るため、流出路において非対称に発現する Fgf10 に注目し、その非対称な発現制御機構を解析した結果、非対称な発現を規定する制御領域を決定した。流出路形成におけるFgf10の役割を理解するために、その制御領域を欠失する変異マウスを作成した(白鳥・松野ら、未発表)。

(2)研究成果の今後期待される効果

心臓の流出路の形成異常は、新生児に見られる心臓奇形の中で最も頻度が高い。流出路の螺旋運動を引き起こす細胞レベルでの仕組み、Fgf10の役割が判れば、心臓奇形の原因解明につながる。

4. 4 頭尾の極性の決定(大阪大学 濱田グループ)

(1)研究実施内容及び成果

体の頭尾の決定では、DVE/AVE と呼ばれる特殊な細胞の形成と移動が重要な役割を持つ。DVE/AVE が形成される際には、Nodal/Activin シグナルと BMP シグナルが拮抗し、両者のシグナリング間には互いを抑制する機構があり、前者が(+)後者が(-)な部位に DVE/AVE が形成されることが判った(Yamamoto et al., *J.Cell Biol.*, 2009)。正常胚では、先端部が唯一 Nodal/Activin シグナル(+), BMP シグナル(-)な場所である。また、レチノイン酸代謝酵素(CYP26)の研究より、正常な AVE の形成には母体由来のレチノイン酸を代謝不活性化する必要があることが判った(Uehara et al., *Genes & Dev*, 2009)。

(2)研究成果の今後期待される効果

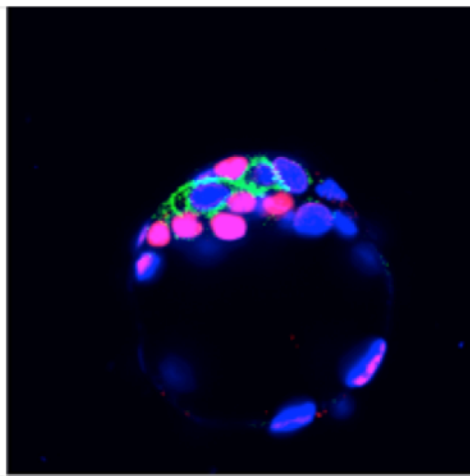
成熟した DVE/AVE 細胞が形成される機構は、徐々に明らかにできたが、これらの細胞の移動機構は、未だに不明である。

4. 5 頭尾の極性の起源:Lefty1 発現細胞の起源と運命(大阪大学 濱田グループ)

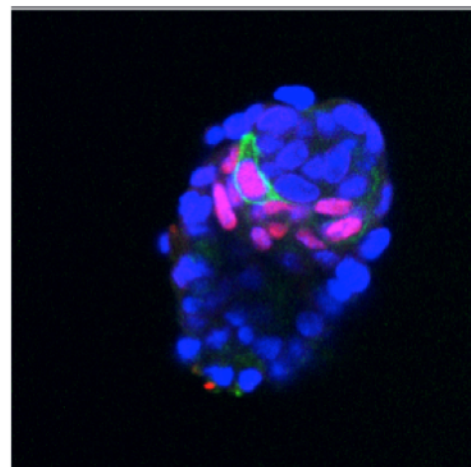
(1)研究実施内容及び成果

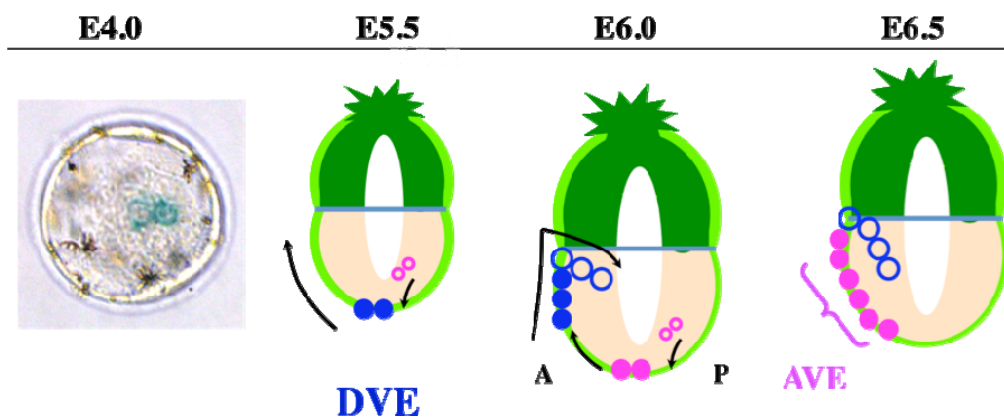
従来の研究では、頭尾方向のもととなる分子情報は受精後5日目の胚で予め存在しており、この情報をもとに頭部を誘導する細胞群「遠位臓側内胚葉(DVE)」が将来の頭側に移動し、「前側臓側内胚葉(AVE)」と名称を変え、AVEが近くの細胞へ頭部誘導シグナルを送ることで、頭尾方向が形成されると考えられてきました。本研究では、まず蛍光たんぱく質や標識たんぱく質を用いて、母胎内外両方でマウス胚の細胞の運命・挙動を追跡する技術を開発しました。この技術を用いて、受精後3日目から6日目までの胚において遺伝子 *Lefty1* (DVEとAVEの両方で発現する遺伝子)を発現する細胞の挙動を詳細に解析しました。その結果、①DVEになるべき細胞は、遅くとも受精後4日目にすでに決定されていること、②同じ細胞と考えられてきたDVEとAVEは、実は異なる由来の細胞であること、③また DVE 細胞だけを特異的に除去する実験より、DVEの役割は、自らが頭側へ移動することにより、遅れて生じるAVEを頭側へガイドすることなどを明らかにした。これらの結果から将来の頭尾方向を決める細胞は、従来の考えよりも早い時期に決められていることが判った。(Takaoka et al., *Nat. Cell Biol.* 2011)。

E3.5



E4.2





(2)研究成果の今後期待される効果

頭尾の極性に関する従来の概念を覆し、この分野の研究者に新たな方向を示唆する事が出来た。

4. 6 頭尾の極性の起源:着床前胚で発現する *Lefty1* の機能(大阪大学 濱田グループ)

(1)研究実施内容及び成果

着床前胚で *Lefty1* を発現した細胞が将来の DVE に寄与することが判ったが、その機能は不明である。*Lefty1*, *Lefty2* は隣接した遺伝子であり機能的に相補するため、両者を欠損するマウスを作製したところ、単独変異で見られなかったパターンニング異常がみられた(蘇、高岡ら、未発表)。着床前胚における新たな制御機構、*Lefty* の新たな役割を示唆しており、今後の進展が期待される。

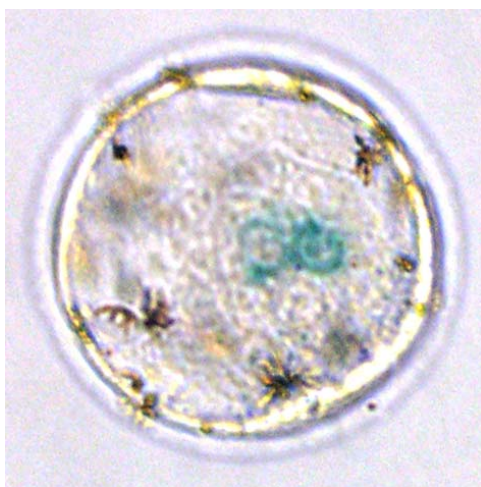
(2)研究成果の今後期待される効果

DVE 形成を介する前後のパターンニング機構や着床胚と子宮との相互作用に関して、新しい発見がもたらされると期待される。

4. 7 頭尾の極性の起源:*Lefty1* 発現制御機構(大阪大学 濱田グループ)

(1)研究実施内容及び成果

Lefty1 の発現は胚盤胞の1-2個の細胞で始まる。均一と思われる約20個の細胞(epiblast)の中で、なぜ1-2個の細胞だけが *Lefty1* を発現するのか？



これまでの *Lefty1* の転写制御機構を解析した結果より、Nodal-依存的、および Nodal-

非依存的な機構により誘導されることが判った。Nodal-依存的なエンハンサーは、詳細なマッピングと変異解析により、FoxH1 が結合する配列である事が判った。そこで、Nodal シグナル経路で働く因子 (Nodal, FoxH1, Cripto, Cryptic, ActR1, ActR2A, ActR2B など) について、in situ hybridization・抗体・BAC (LacZ) transgene などを利用して、着床前胚における発現パターンを調べている。現時点では、発現パターンは一樣であり、限局した発現は見られていない。一方、Nodal-非依存的なエンハンサーについては、現在の所 4kb 領域にマップする事が出来たので、今後詳細に解剖し、必要配列を特定する。得られたデータに基づき、胚盤胞における Lefty1 の発現パターンを再現できる数理モデルを構築し、発現制御機構を推察したい(高岡ら、未発表)。

(2)研究成果の今後期待される効果

生物学における非対称性の起源に関して、新しい概念を作る事が出来る。

4. 8 シグナル分子の拡散(大阪大学 濱田グループ)

(1)研究実施内容及び成果

細胞外へ分泌された Nodal, Lefty 蛋白質を可視化するための種々の検出方法を試みた。GFPとの融合蛋白質を蛍光で、あるいはmyc, flag-tagをつけたタンパク質を免疫染色で検出しようとしたが、成功しなかった。次に、分泌が亢進していると予想される変異マウスでの検出、signal/noise 比を改善するために改変型 Luciferase (Gaussia luciferase)との融合タンパク質にして、EMCCD カメラなどを用いた検出も試みたが、これも成功に至っていない。一方で、Nodal 蛋白質の分泌を制御する因子を同定した。この因子を欠損するマウス(左右パターンニングの異常を示す)を用いて、Nodal 蛋白質の分泌制御機構の解析を始めた(浅井、川住ら、未発表)。

(2)研究成果の今後期待される効果

細胞外へ分泌されたシグナル分子(とくに Nodal, Lefty 蛋白質)を可視化するためには、超感度の新たな技術の開発が必要である。今回の研究では成功へ至らなかったが、新たな挑戦への基盤として貴重な情報になる。

4. 9 遺伝子発現の揺らぎが安定な結果に変換される仕組み(理研 望月グループ)

(1)研究実施内容及び成果

ノードの左右両側での遺伝子発現は、初期には大きな揺らぎを示すが、揺らぎが生じる原因と、揺らぎを吸収する機構を明らかにする。前者としては水流速度の変化、後者としては二つの遺伝子が構成する制御ループが関与することが示唆されるので、この点を実験データと数理モデルの両面から明らかにしようと試みた(斎藤、中村ら、未発表)。

(2)研究成果の今後期待される効果

胚発生における遺伝子発現の揺らぎという現象に始まり、生物が持っている揺らぎに対する戦略と、揺らぎの意義を理解する事が出来る。

4. 10 胚盤胞での Lefty1 の発現が一部の細胞に限局される機構:(理研 望月グループ)

(1)研究実施内容及び成果

Lefty1 は胚盤胞の約20個の細胞(epiblast)のうちの、1-2個の細胞だけで発現する。この発現は Nodal シグナルに依存するため、Nodal シグナルで働く因子(リガンド、受容体、転写因子)の発現を調べた。調べた限りでは、これらの因子はすべての細胞で発現したので、すべての細胞が Lefty1 を発現する潜在能力を持っていると予想された。また、Lefty1 を発現する細胞を機械的に壊すと別の細胞が Lefty1 を発現し始めることより、細

胞間シグナリングの関与が示唆された。これらの実験データに基づいて、発現パターンを再現する数理モデルを構築することが出来た。その結果、NodalとLeftyより構成される制御ループが自律的に働くことが示唆された(斎藤ら、未発表)。

(2)研究成果の今後期待される効果

生物学における非対称性の起源に関して、新しい概念を作る事が出来る。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 16件)

1. Nakamura, T.,* Mine, N.,* Nakaguchi, E.,* Mochizuki, A., Yamamoto, M., Yashiro, K., Meno, C., Hamada, H. (2006). Generation of robust left-right asymmetry in the mouse embryo requires a self enhancement lateral inhibition system. (*equally contributed). *Dev Cell*. 11:495-504.
2. Takeuchi, J.K., Lickert, H., Bisgrove, B., Yamamoto, M., Chawengsaksophak, K., Hamada, H., Yost, J., Rossant, J., and Bruneau (2007). Integration of Notch signaling at the node by Baf60c initiates the left-right asymmetry cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:846-851.
3. Oki, S., Hashimoto, R., Otani, H., Shen, M., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2007). Sulfated glycosaminoglycan is necessary for Nodal signal transmission from the node to the left lateral plate in the mouse left-right patterning. *Development*, 134:3893-3904.
4. Yashiro, K., Shiratori, H, and Hamada, H. (2007). Haemodynamics determined by a genetic programme govern asymmetric development of the aortic arch. *Nature*, 450:285-288.
5. Tanaka, C., Sakuma, R., Nakamura, T., Hamada, H.*, and Saijoh, Y. (2007). Long-range action of Nodal requires interaction with GDF1. (*corresponding author). *Genes & Dev* 21:3272-3282.
6. Shiba, D., Yamaoka, Y., Hagiwara, H., Takamatsu, T., Hamada, H., and Yokoyama, T. (2008). Localization of the Inv protein in a distinctive intra-ciliary compartment requires the C-terminal ninein-homolog containing region. *J. Cell. Sci.* 122:44-54.
7. Yamamoto M., Beppu, X., Takaoka, K., Meno, C., Li, E., Miyazono, K., and Hamada, H. (2009). Antagonism between Smad1 and Smad2 signaling regulates formation of the distal visceral endoderm in the mouse embryo. *J. Cell Biol.* 184:323-334.
8. Uehara, M., Yashiro, K., Takaoka, K., Yamamoto M., and Hamada, H. (2009). Removal of maternal retinoic acid by embryonic CYP26 for correct *Nodal* regulation during early embryonic patterning. *Genes & Dev.* 23:1689-1698.
9. Oki, S., Kitajima, K., Belo, J.A., Yokoyama, T., Hamada, H.* and Meno, C.* (2009). Reversal of left-right asymmetry by aberrant Nodal signaling in the node of mouse embryos. (*corresponding authors). *Development*, 136:3917-3925.
10. Hashimoto, M., Shinohara, K., Wang, J., Ikeuchi, S., Meno, C., Yoshida, S., Takada S., Hatta, K., Wynshaw-Boris, T.,* and Hamada, H.* (2010). Planar polarization of the node cells determines the rotation axis of the node cilia. (*corresponding authors). *Nat. Cell Biol.* 12:170-176.

11. Furtado, M.B., Biben, C., Shiratori, H., Hamada, H. and Harvey, R. P. (2011). Characterization of *Pitx2c* expression in the mouse heart using a reporter transgene. *Dev. Dyn.* 240(1):195-203.
12. Floro, K.L., Artap, S.T., Preis, J.I., Sparrow, D.B., Fatkin D., Chapman, G., Furtado, M.B., Harvey, R.P., Hamada, H., Sparrow, D.B. and Dunwoodie, S.L. (2011). Loss of *Cited2* causes congenital heart defects by perturbing left-right patterning of the body axis. *Human Mol. Genetics.* 20(6):1097-1110.
13. Kawasumi, A., Nakamura, T., Iwai, N., Yashiro, K., Saijoh, Y., Belo, J.A., Shiratori, H. and Hamada, H. (2011). Left-right asymmetry in the level of active Nodal protein produced in the node is translated into the asymmetry in the lateral plate of mouse embryo. *Dev Biol.* 353:321-330.
14. Takaoka, K., Yamamoto, M. and Hamada, H. (2011). Origin and role of distal visceral endoderm, a group of cells that determines anterior-posterior polarity of the mouse embryo. *Nat. Cell Biol.* 13(7):743-752.
15. Shinohara, K.,* Kawasumi, A.,* Takamatsu, A., Yoshiba, S., Yanick, Y., Motoyama, N., Reith, W., Durand, B., Shiratori, H. and Hamada, H. (2012). Two rotating cilia in the node are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo. (*equally contributed) To be revised to *Nature Communic.* 3 : 622 doi: 10.1038/ncomms1624.
16. Kunitomo, K., Yamazaki, Y., Nishida, T., Shinohara K, Ishikawa, H., Okanou, T., Hasegawa, T., Okanou, T., Hamada, H., Noda, Tamura, A., T.,Tsukita, S. and Tsukita, S. (2012). Coordinated ciliary beating requires Odf2-mediated polarization of basal body via basal feet. *Cell.* 20:189-200.

(2) その他の著作物(総説、書籍など)

① 詳細情報

1. Takaoka, K., Yamamoto, M. and Hamada, H. (2007) Origin of body axes in the mouse embryo. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17:344-350. (review)
2. Hamada, H. (2008). Breakthroughs and future challenges in left-right patterning. *Dev. Growth Differ.* 50, S71-S78. (review)
3. Goldstein, R and Hamada, H. (2009). Shape and Polarity meet in Japan (meeting review). *Development* 136:2487-2492.
4. Hamada, H. (2010). Left-right asymmetry. In "*Heart Development and Regeneration*" edt. by N. Rosenthal and R. Harvey, Academic Press.
5. Hashimoto, M. and Hamada, H. (2010). Translation of anterior-posterior information into left-right polarity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* (review) 20:433-437.
6. Ajima, R. and Hamada, H. (2011). Wnt signaling escapes to cilia. *Nat. Cell Biol.* (News and Views), 13:636-637.
7. Takaoka, K. and Hamada, H. (2011). Cell specification and axis formation in the mouse embryo (review). *Development.* In press
8. Nakamura, T. * and Hamada, H. (2011). Lefty-right asymmetry: conserved or diverged. (review at a glance) *Development.* In press

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 0件、国際会議 14件)

1. Hamada, H. [The origin of body axes in the mouse embryo]. Workshop on regulation of pluripotency during life cycle. Baeza, Spain. 2007.10. 1-3.
2. Hamada, H. [Regulation of Nodal signaling range in the mouse embryo]. FASEB summer research conference on “TGFb superfamily: signaling and development” 2007.7.14-19. Tucson, Arizona, USA.
3. Hamada, H. [Long-range transfer of Nodal signal within the mouse embryo]. Okinawa Institute of Science and Technology. Gradient and Signaling: from chemotaxis to development. 2008.11.17-11.21, Okinawa.
4. Hamada, H. [The origin of body axes in the mouse embryo]. Mouse Genetics & Genomics: Development and Diseases. 2008. 10.29-11.02. Cold Spring Harbor, USA.
5. Hamada, H. [The origin of body axes in the mouse embryo]. (plenary) Frontiers in Developmental Biology. 2008.9.13-17. Giens, France.
6. Hamada, H. [The origin of body axes in the mouse embryo]. CDB Symposium 2009 on Shape and Polarity. 2009. March 23-25. Kobe, Japan.
7. Hamada, H. [The origin of body axes in the mouse embryo]. 7th TLL Symposium, 2009. Jan. 12-13. Singapore.
8. Hamada, H. [The origin of body axes in the mouse embryo]. 16th ISDB Congress (第16回国際発生生物学会) 2009年9月06-10. Edinburgh, UK.
9. Hamada, H. [The origin of body axes in the mouse embryo]. 1st Cold Spring Harbor Symposium on Organogenesis. 2010年4月27-5月1日. Cold Spring Harbor, USA.
10. Hamada, H. [Genetic basis of left-right patterning]. Shanghai, China. Developmental Dynamics Symposium in Shanghai. 2010年6月17-18日
11. Hamada, H. [The origin of body axes in the mouse embryo]. 日米合同発生生物学会. 2010年8月5-10日. Albuquerque, USA.
12. Hamada, H. [Genetics of left-right asymmetry in mammals]. The 12th International Congress of Human Genetics. Montreal Convention Center, Montreal, Canada. 2011 Oct. 11-15.
13. Hamada, H. [Sensing fluid flow for left-right patterning]. Cellular Development: Biology at the Interface (celebrating 10th Anniversary of Developmental Cell), at RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe. 2011. Sept. 29-Oct. 02
14. Hamada, H. [Fluid dynamics at the node, left-right development] Gordon Conference on “Cilia, Mucus & Mucociliary interaction”, at Ventula Beach Marriot, CA, USA. 2011. Feb 13-18.

② 口頭発表 (国内会議 14件、国際会議 3件)

1. 白鳥秀卓、濱田博司「マウス左右軸決定における転写因子 Pitx2 の発現制御と下流遺伝子の解析」遺伝情報 DECODE・冬のワークショップ(転写研究会共催)、2007年1月、湯沢ニューオータニホテル
2. 高岡勝吉、山本正道、白鳥秀卓、目野主税、Janet Rossant,西条幸男、濱田博司「前後軸の起源〜Lefty1 の発現制御機構から探る〜」遺伝情報 DECODE・冬のワークショップ(転写研究会共催)、2007年1月、湯沢ニューオータニホテル
3. 高岡勝吉、山本正道、白鳥秀卓、目野主税、Janet Rossant,西条幸男、濱田博司「前後軸の起源」第40回日本発生生物学会、第59回日本細胞生物学会合同大会、2007年5月、福岡国際会議場
4. 八代健太、白鳥秀卓、濱田博司「なぜ大動脈弓は左側にアーチを形成するのか?〜左右非対称な臓器形態への遺伝学的左右軸情報の情報転換

機構の一例」第43回日本小児循環器学会 サテライトミーティング第6回
心臓血管発生研究会、2007年7月4日～6日、京王プラザホテル、新宿、
東京

5. Katsuyoshi Takaoka, Masamichi Yamamoto, Hiroshi Hamada. Origin of Anterior-Posterior axis in the mouse embryo. The 1st Mouse Development Workshop. Jun. 2008, France
6. Masayuki Uehara, Kenta Yashiro, Masamichi Yamamoto, and Hiroshi Hamada. "Removal of maternal retinoic acid by embryonic CYP26 for correct *Nodal* regulation during early embryonic patterning". The 2008 meeting on Mouse Genetics & Genomics: Development & Disease. October 29 - November 2, 2008, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA,
7. 中村哲也「Generation of Robust Left-Right Asymmetry in the Mouse Embryo」第60回日本細胞生物学会大会、2008年6月29日～7月1日、パシフィコ横浜 口頭発表
8. 白鳥秀卓「マウスにおける左右非対称な器官形成機構の網羅的解析」第31回日本分子生物学会、第81回日本生化学会合同大会、シンポジウム、2008年12月、神戸ポートアイランド 口頭発表
9. 白鳥秀卓「左右非対称な *Fgf10* の発現の発生時期における発現領域の変化とその制御機構」遺伝情報 DECODE (転写研究会共催)・冬のワークショップ、2009年1月、湯沢グランドホテル 口頭発表
10. 高岡勝吉、山本正道、濱田博司「マウス胚における前後軸の起源」遺伝情報 DECODE (転写研究会共催)・冬のワークショップ、2009年1月、湯沢グランドホテル 口頭発表
11. 中村哲也「左右決定機構とその Robustness」定量生物学の会 第一回年会、2009年1月10日～12日、東京大学、口頭発表
12. 篠原恭介、高松敦子、橋本昌和、吉場聡子、川住愛子、岡本孝司、濱田博司「マウス初期胚ノード繊毛の定量解析」定量生物学の会 第一回年会、2009年1月10日～12日、東京大学、ポスター発表
13. 高岡勝吉、濱田博司「マウス胚における前後軸の起源」第82回日本生化学会大会、シンポジウム、2009年10月21日～24日(金)神戸ポートアイランド
14. 中村哲也「How is Left-Right axis established robustly?」第82回日本生化学会大会、シンポジウム、2009年10月21日～24日(金)神戸ポートアイランド
15. 篠原恭介、高松敦子、橋本昌和、吉場聡子、川住愛子、濱田博司「マウス初期胚ノード繊毛の可視化計測」日本機械学会 流体工学部門会、2009年11月7日～8日、名古屋工業大学
16. 篠原恭介、高松敦子「マウス初期胚左右軸を決めるノード繊毛運動の協同性」定量生物学の会 第三回年会、2010年11月26日～28日、東京大学
17. Katsuyoshi Takaoka, 'Origin of Anterior-Posterior axis in the mouse embryos' From Oocyte to Embryo: Workshop on Early Mammalian Embryogenesis, September 07~08, 2010, Warsaw

③ ポスター発表 (国内会議 8件、国際会議 5件)

1. Tetsuya Nakamura, Naoki Mine, Etsushi Nakaguchi, Atsushi Mochizuki, Masamichi Yamamoto, Kenta Yashiro, Chikara Meno and Hiroshi Hamada. "Generation of robust left-right asymmetry in the mouse embryo requires a self-enhancement and lateral-inhibition system" The 7th International Conference on Systems Biology, 9-11 October 2006, Yokohama Japan
2. 八代健太、白鳥秀卓、濱田博司「*Nodal*→*Pitx2* 経路による心臓流出路の動的形態的变化が生み出す左右非対称な血行動態が、左側大動脈弓形態を生み

出す」分子生物学会 2006 フォーラム、2006 年 12 月 6 日～8 日、名古屋国際会議場

3. 山本正道、別府秀幸、高岡勝吉、目野主税、En Li、宮園浩平、濱田博司「遠位臓側内胚葉は BMP、ACTIVIN、ExE シグナルの相互作用により形成される」第 40 回日本発生生物学会、第 59 回日本細胞生物学会合同大会、2007 年 5 月、福岡国際会議場
4. Aiko Kawasumi, Naomi Iwai, Jose Antonio Belo, Tetsuya Nakamura, Hidetaka Shiratori, Hiroshi Hamada “Mechanisms of left-right asymmetric signal generation around the node” Frontiers in Developmental Biology meeting September 13-17 2008, France (優秀ポスター賞受賞)
5. Masakazu Hashimoto, Shingo Ikeuchi, Kyosuke Shinohara, Shigenori Nonaka, Anthony Wynshaw-Boris, and Hiroshi Hamada “Cell polarity in the node for basal body positioning and uni-directional nodal flow” The 2008 meeting on Mouse Genetics & Genomics: Development & Disease. October 29 - November 2, 2008, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA,
6. 篠原恭介,高松敦子,橋本昌和,吉場聡子,川住愛子,岡本孝司,濱田博司「マウス初期胚ノード繊毛の定量解析」定量生物学の会 第一回年会,2009年1月10日～12日、東京大学
7. 高岡勝吉、山本正道、濱田博司「マウス胚における前後軸の起源」第42回日本発生生物学会大会、2009年5月28～31日、新潟キメッセ
8. 高岡勝吉、山本正道、濱田博司「マウス胚における前後軸の起源」日本発生生物学会 秋季シンポジウム、2009年11月27日～29日、三島
9. 中村哲也,峯直樹,中口悦司,山本正道,望月敦史,目野主税,濱田博司「How is Left-Right axis established robustly?」日本発生生物学会 秋季シンポジウム、2009年11月27日～29日、三島
10. 篠原恭介,「左右軸決定におけるマウス初期胚ノード繊毛の協同性」定量生物学の会 第二回年会,2010年1月9日～11日、大阪大学
11. Masakazu Hashimoto, Shingo Ikeuchi, Kyosuke Shinohara, Shigenori Nonaka, Anthony Wynshaw-Boris, and Hiroshi Hamada. “Cell polarity in the node for basal body positioning and nodal flow” The 16th International Society of Developmental Biologists Congress, September 2-6, 2009, Edinburgh, Scotland
12. Aiko Kawasumi, Naomi Iwai, Jose Antonio Belo, Tetsuya Nakamura, Hidetaka Shiratori, Hiroshi Hamada. “Mechanisms of left-right asymmetric signal generation around the node” The 16th International Society of Developmental Biologists Congress, September 2-6, 2009, Edinburgh, Scotland
13. 高岡勝吉、山本正道、濱田博司「マウス胚における前後軸の起源」日本発生生物学会 第43回大会、2010年6月20日～23日、京都

(4)受賞・報道等

①受賞

該当無し

②マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)

1. 毎日新聞(平成19年11月18日)「血管の非対称性の仕組み解明」
2. 日経産業新聞(平成19年11月8日)「心臓の大動脈:左に反る仕組み解明」
3. 日経産業新聞(平成22年1月26日)「体の非対称性:胚繊毛の傾きが影響」
4. 朝日新聞(平成22年2月16日)「心臓は左の謎、突き止めた」
5. 朝日新聞(平成23年6月02日)「頭や臓器の位置決定解明」
6. 読売新聞(平成23年9月05日)「マウスの胚一受精4日目一頭の向き決定」

(5)成果展開事例

①実用化に向けての展開

- 本研究で使用・作成した試薬や遺伝子改変マウスは、リクエストに応じて国内や海外の研究室へ、ほぼ無条件で提供している。興味ある企業があれば提供する。

②社会還元的な展開活動

- 得られた成果の一部は、新聞発表、CREST のホームページ、研究室のホームページで紹介している。
- 本研究で使用・作成した試薬や遺伝子改変マウスは、リクエストに応じて国内や海外の研究室へ、ほぼ無条件で提供している。

§ 6 結び

○極性の起源に関する重要な疑問に挑戦する事ができ、その中で大きく進展できた例も幾つかあった。一方で、予想よりも時間を要したため、論文での公表に至らなかった成果もあるのは反省点である。

○研究の途上で、当初に予想しなかった現象を見出す事ができ、これらは公表には至っていないが、非常に重要な発見につながる可能性が高く、今後の展開に大きな期待が持てる。

○本研究には、マウスの飼育・管理など、継続的な仕事を行ってくれる研究補助員が必須であった。本プロジェクトで、そのような貴重な人材を継続して雇用する事が出来たのは、幸いであった。

○最後に、浜田研究室の集合写真(2011年4月)を添付します。

