

戦略的創造研究推進事業  
発展研究 (SORST)

研究終了報告書

研究課題  
「体の極性の起源と対称性が破られる機構」

研究期間：平成17年11月 1日～  
平成19年 3月31日

濱田 博司  
(大阪大学、教授)

## 1. 研究実施の概要

### 1-1 基本構想：

一様な細胞集団の中に極性（将来の体の軸）を生み出すことは、初期発生の重要な現象である。とくに子宮への着床が必要な哺乳類の場合、体の極性は発生の比較的遅い時期に生じると考えられる。すなわち、ある時期まで対称な形態の中に非対称性を生み出す必要がある。左右非対称性についてはノードにおける水流が糸口が対称性が破ると考えられているが、前後（頭尾）軸については、対称性が破られる機構や極性の起源は全く不明である。本研究では、左右と前後（頭尾）という2つの体軸を題材にして、対称性が破られる機構を明らかにするとともに、体の極性が発生のどれほど早い時期まで遡ることができるのかを検証する。本研究で明らかになるのは発生学・生物学の極めて基本的な仕組みであるが、新しい医療技術の発展の基盤知識として寄与することが期待される。また、過去の経験から考えると、本研究を遂行するためなかで、新たな技術の開発につながる可能性も大きい。

### 1-2 実施：具体的には、以下の問題に取り組んだ。

①頭尾軸に沿った対称性が破られる機構：将来の前後を決定するLefty1, Cer1の非対称な発現の制御機構、

左右の対称性が破られる機構：ノードの纖毛の傾きが生じる機構、ノードの水流の働き方、安定な非対称性が確立される機構

②左右の対称性が破られる機構：ノードの纖毛の傾きが生じる機構、ノードの水流の働き方、安定な非対称性が確立される機構

③非対称性の由来：非対称性は、胚発生のいつ・どこまで遡ることができるのか？：着床前などのごく早い時期でのLefty1の非対称な発現の意義、

### 1-3 研究成果

#### ①頭尾軸に沿った対称性が破られる機構

①-1. Lefty1, Cer1 の非対称な発現の動態：BACを用いて、遠位臍側内胚葉（DVE）をHex-Venus で標識、Lefty1, Cer1 陽性細胞を各々DsRed2, ECFP で標識するトランスジェニック（Tg）マウスを作製した（図1、図2）。DVEでのLefty1, Cer1の発現の動態を観察したところ、Lefty1, Cer1の発現はDVEが移動する前から非対称である事が判った。

①-2. Lefty1, Cer1 の非対称な発現を規定している転写制御機構：Lefty1, Cer1 のDVEでの発現を規定しているエンハンサー（AVE）を同定した。Lefty1のエンハンサーは0.5 kb の領域にマップされ、転写因子FoxH1の結合配列が必須である事より、Nodal シグナルで誘導されている事が判った（図3：Takaoka et al., Dev Cell, 2006）。Cer1のエンハンサーは1.0 kb の領域にマップされた。

①-3. Nodal シグナル経路で働く因子の発現・活性の非対称性：Nodal シグナル経路で働

く種々の因子の発現や活性自身に非対称性がある可能性を検討した。Nodal, FoxH1やCo-receptorのCriptoなどの発現をin situ hybridizationで調べた限りでは、発現に非対称性は認められなかった。今後、他の因子の発現についても調べる必要がある。

## ②左右の対称性が破られる機構

### ②-1. ノードの纖毛は、なぜ後ろに傾く？

- 時間経過にともなうノード纖毛の形成を、SEMや免疫染色（acetylated tubulin,  $\gamma$  tubulin抗体）で追跡した。ノード纖毛の長軸が傾く原因は、細胞内で纖毛が生える位置が後ろへ偏在している事が原因である事がわかった（図4：池内ら未発表）。
- ノード纖毛の軸が傾く現象には、細胞内極性（PCP: Planar cell polarity）が関与する可能性が大いに考えられる。そこで、PCP経路で主要な役割を持つ因子Dvl注目し、Dvl1,2,3を欠損するマウスを得て、これらの変異マウスにおける纖毛を調べるために、二重、三重変異マウスを作製した。また、マウス胚（とくにノード）におけるDvlタンパク質の局在を調べるため、Dvl-GFPをノードで発現するTgマウスを得た。

### ②-2. ノード流の働き？ Chemosensor or Mechanosensor？

- Pkd2はSensor？, もしそうならChemosensor or Mechanosensor？：Pkd2欠損マウスは、人工的な水流に反応しなかったので、Pkd2が非対称シグナルのSensorとして機能していることが示唆された。Tgマウスを用いたレスキュー実験によりPkd2がノードで必要である事が判った（吉場ら、未発表）。Pkd2タンパク質の細胞内局在を明らかにするため、Pkd2としての機能を持つPkd2-GFP融合タンパク質を探査し、活性を持つPkd2-GFP融合タンパク質を発現するTgマウスを得ることができた。
- ノード流に反応するエンハンサーが活性化される機構：ヒトLEFTY1のエンハンサーANEは、ノードの両側で左>右の非対称な活性を示し、またノード流に反応する（図5：川住ら、未発表）。ANEの活性に必要な塩基配列を同定した。

### ②-3. 安定な左右非対称性が確立されるメカニズム

## ③非対称性の由来：非対称性は、胚発生のいつ・どこまで遡ることができるのか？

### ③-1. 着床前胚におけるLefty1陽性細胞のIdentify

現在の常識では、受精後5.5日頃に起こるDEVの将来の頭側への移動が、最も早期に起こる体の極性の非可逆的な決定である。しかし我々は、非対称性がもっと早い時期に生じているという予想外のデータを得た（Takaoka et al., Dev Cell in press）。すなわち、Lefty1陽性細胞を標識するTgマウス（LacZ及びDsRed2）を観察していたところ、DVEの時期（受精後5.5日）以前にもLefty1が発現していた。受精後4日胚の原始内胚葉や着床前胚のICMにおいて発現が見られたが、驚くことにいづれの場合も一部の細胞に偏り非対称に発現していた。

## 2. 研究構想

2-1 研究開始時の目標：①左右について：ノードの纖毛の傾きが生じる機構やノードの水流の働き方、②前後について：将来の前後を決定するLefty1, Cer1の非対称な発現の制御機構、③起源について：着床前などのごく早い時期でのLefty1の非対称な発現の意義、などを明らかにすることを目標にした。

2-2 研究計画の概要：具体的には、以下の問題を解明することを目指した。

①頭尾軸に沿った対称性が破られる機構：将来の前後を決定するLefty1, Cer1の非対称な発現の制御機構、

左右の対称性が破られる機構：ノードの纖毛の傾きが生じる機構、ノードの水流の働き方、安定な非対称性が確立される機構

②左右の対称性が破られる機構：ノードの纖毛の傾きが生じる機構、ノードの水流の働き方、安定な非対称性が確立される機構

③非対称性の由来：非対称性は、胚発生のいつ・どこまで遡ることができるのか？：着床前などのごく早い時期でのLefty1の非対称な発現の意義、

## 2-3 新展開から生まれた目標

○最初の非対称性が生じる機構を解明すること。

○左右が確立される際に生じる遺伝子発現の揺らぎとその意義を知ること。

○前後を決定する細胞移動の仕組みを理解すること。

## 3. 研究内容

### ①頭尾軸に沿った対称性が破られる機構

①-1. Lefty1, Cer1 の非対称な発現の動態：BACを用いて、遠位臓側内胚葉（DVE）をHex-Venusで標識、Lefty1, Cer1 陽性細胞を各々DsRed2, ECFPで標識するトランスジェニック（Tg）マウスを作製した（図1、図2）。DVEでのLefty1, Cer1の発現の動態を観察したところ、Lefty1, Cer1の発現はDVEが移動する前から非対称である事が判った。

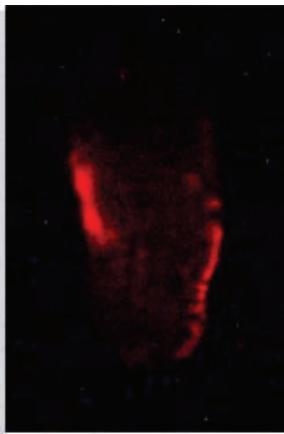
①-2. Lefty1, Cer1 の非対称な発現を規定している転写制御機構：Lefty1, Cer1 のDVEでの発現を規定しているエンハンサー（AVE）を同定した。Lefty1のエンハンサーは0.5 kbの領域にマップされ、転写因子FoxH1の結合配列が必須である事より、Nodal シグナルで誘導されている事が判った（図3：Takaoka et al., Dev Cell, 2006）。Cer1のエンハンサーは1.0 kbの領域にマップされた。

①-3. Nodal シグナル経路で働く因子の発現・活性の非対称性：Nodal シグナル経路で働く種々の因子の発現や活性自身に非対称性がある可能性を検討した。Nodal, FoxH1やCo-receptorのCriptoなどの発現をin situ hybridizationで調べた限りでは、発現に非対称性は認められなかった。今後、他の因子の発現に付いても調べる必要がある。

&lt;図1&gt;



&lt;図2&gt;



&lt;図3&gt;

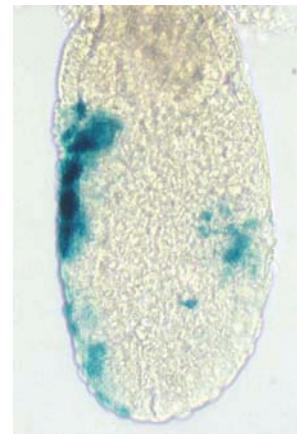


図1：Lefty1-DsRed2 Tg マウス胚、図2：Hex-Venus Tg マウス胚、図3：Lefty1-AVE-LacZ Tg マウス胚。いずれも、受精後6.5日マウス胚を側方から見ている。この時期にはDVEはすでに将来の頭側（写真の向かって左側）へ移動している。従って、Transgene は頭側（写真の向かって左側）の臓側内胚葉で発現している。より早い時期（受精後5.5日）では、胚の遠位で発現する。なお、写真の向かって右側での比較的弱い発現はAnterior Definitive Endoderm (ADE)。これらの遺伝子はいずれもADEでも発現する。

## ②左右の対称性が破られる機構

### ②-1. ノードの纖毛は、なぜ後ろに傾く？

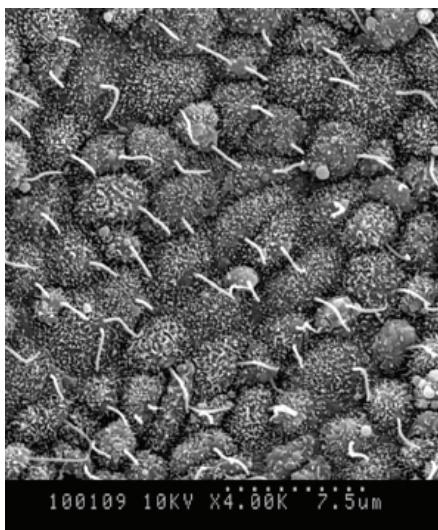
- 時間経過とともにノード纖毛の形成を、SEMや免疫染色（acetylated tubulin,  $\gamma$  tubulin抗体）で追跡した。ノード纖毛の長軸が傾く原因是、細胞内で纖毛が生える位置が後ろへ偏在している事が原因である事がわかった（図4：池内ら未発表）。
- ノード纖毛の軸が傾く現象には、細胞内極性（PCP: Planar cell polarity）が関与する可能性が大いに考えられる。そこで、PCP経路で主要な役割を持つ因子Dvl注目し、Dvl1,2,3を欠損するマウスを得て、これらの変異マウスにおける纖毛を調べるために、二重・三重変異マウスを作製した。また、マウス胚（とくにノード）におけるDvlタンパク質の局在を調べるため、Dvl-GFPをノードで発現するTgマウスを得た。基底小体の変化を経時的に観察するため、基底小体タンパク質をGFPで標識したTgマウスを作製した（橋本ら、未発表）。

### ②-2. ノード流の働き？ Chemosensor or Mechanosensor ?

- Pkd2はSensor？, もしそうならChemosensor or Mechanosensor？： Pkd2欠損マウスは、人工的な水流に反応しなかったので、Pkd2が非対称シグナルのSensorとして機能していることが示唆された。Tgマウスを用いたレスキュー実験によりPkd2がノードで必要である事が判った。Pkd2タンパク質の細胞内局在を明らかにするため、Pkd2としての機能を持つPkd2-GFP融合タンパク質を探索し、活性を持つPkd2-GFP融合タンパク質を発現するTgマウスを得ることができた（以上、吉場ら未発表）。
- ノード流に反応するエンハンサーが活性化される機構：ヒトLEFTY1のエンハンサーA

NEは、ノードの両側で左>右の非対称な活性を示し、またノード流に反応する（図5：川住ら、未発表）。ANEの活性に必要な塩基配列を同定し、このエンハンサーを活性化しているシグナルを同定した。

図4



後 左

図5

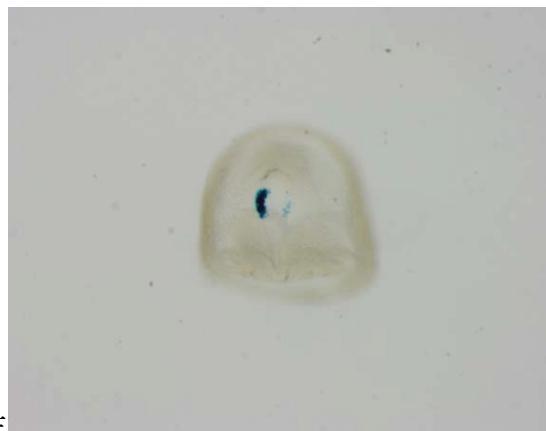


図4：2体節期マウス胚のノードの纖毛のSEMで見ている。写真の右下が胚の後側、左上が胚の前側。ほとんどの纖毛は、細胞の後側から生えている。

図5：X-gal で染色したANE-LacZ Tg 胚。ノードの発色は非対称：左>右。

### ②-3. 安定な左右非対称性が確立されるメカニズム

マウス胚への種々の操作と、得られた結果を再現する数理モデルを構築する事により、安定な左右差が生じる機構を調べた。その結果、安定な左右非対称性を確立するためには、NodalとLeftyという二つの拡散性因子からなる反応拡散システムが、最初に生じた僅かな左右差を、明確な左右差へと変換している事が判った（Nakamura et al., 2006）。

### ③非対称性の由来：非対称性は、胚発生のいつ・どこまで遡ることができるのか？

#### ③-1. 着床前胚におけるLefty1陽性細胞のIdentify

現在の常識では、受精後5.5日頃に起こるDEVの将来の頭側への移動が、最も早期に起こる体の極性の非可逆的な決定である。しかし我々は、非対称性がもっと早い時期に生じているという予想外のデータを得た（Takaoka et al., Dev Cell in press）。すなわち、Lefty1陽性細胞を標識するTgマウス（LacZ 及び DsRed2）を観察していたところ、DVEの時期（受精後5.5日）以前にもLefty1が発現していた。受精後4日胚の原始内胚葉や着床前胚のICMにおいて発現が見られたが、驚くことにいずれの場合も一部の細胞に偏り非対称に発現していた。

#### 4. 研究実施体制

##### (1) 体制：研究グループは一つ

###### 濱田グループ

- ① 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 総括、極性の起源と対称性が破られる機構に関する研究

##### (2) メンバー表

###### ① 濱田グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
濱田博司	大阪大学	教授	非対称性に関する総括	H17.11-H19.3
白鳥秀卓	大阪大学	助教授	Pitx2 の機能と発現	H17.11- H19.3
山本正道	大阪大学	助手	体の前後の決定機構	H17.11- H19.3
八代健太	大阪大学	助手	非対称な器官形成	H17.11- H19.3
上原雅之	大阪大学	大学院生	左右の確立とレチノイン酸の役割	H17.11- H19.3
沖真弥	大阪大学	大学院生	Nodal シグナルの伝達機構	H17.11- H19.3
田中千夏	大阪大学	大学院生	GDF1 の作用機構	H17.11- H19.3
中村哲也	大阪大学	大学院生	Nodal, Lefty 蛋白の挙動	H17.11- H19.3
間宮聰	大阪大学	大学院生	非対称な形態形成とレチノイン酸	H17.11- H19.3
前田貴子	大阪大学	大学院生	着床前胚の非対称性	H17.11- H19.3
川住愛子	大阪大学	大学院生	Noda 1 遺伝子の発現制御機構	H17.11- H19.3
吉場聰子	大阪大学	大学院生	ノード流の働き	H17.11- H19.3
池内進吾	大阪大学	大学院生	ノードの纖毛が傾く機構	H17.11-H18.3
高岡勝吉	大阪大学	大学院生	前後の非対称が生じる機構	H17.11- H19.3
中村京子	JST	技術員	非対称性に関する研究の支援	H17.11- H19.3
大石祥子	JST	技術員	非対称性に関する研究の支援	H17.11- H19.3
井川弥生	JST	技術員	非対称性に関する研究の支援	H17.11- H19.3
山下公代	JST	技術員	非対称性に関する研究の支援	H17.11- H19.3
坂本晴代	JST	技術員	非対称性に関する研究の支援	H17.11- H19.3
西村博美	JST	技術員	非対称性に関する研究の支援	H17.11- H19.3
三山和子	JST	補助員	非対称性に関する研究の支援	H17.11- H19.3
田邊友枝	JST	補助員	非対称性に関する研究の支援	H17.11- H19.3
政岡佑季	JST	補助員	非対称性に関する研究の支援	H17.11- H19.3
岡田由美子	大阪大学	技術補佐員	非対称性に関する研究の支援	H17.11- H19.3
錦織聰子	JST	研究補助員	事務全般	H17.11- H19.3
Yanick Botilde	大阪大学	大学院生	非対称な器官形成の機構	H18.04- H19.3-
鍋島了	大阪大学	大学院生	カルシウムシグナルの役割	H18.04- H19.3-
橋本昌和	大阪大学	大学院生	ノード纖毛が後方へ傾く機構	H18.04- H19.3-
村松慎介	大阪大学	大学院生	FoxH1 の標的遺伝子の探索	H18.04- H19.3-

## 5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

該当なし

(2) 招聘した研究者等

該当なし

## 6. 主な研究成果

(1) 論文発表 (国内 0 件、海外 8 件)

1. Kobayashi, S., Isotachi, A., Mise, N., Yamamoto, M., Fujihara, Y., Kaseda, K., Nakanishi, T., Ikawa, M., Hamada, H., Abe, K. and Okabe, M. (2006). Comparison of gene expression between male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the X-linked gene, RhoX5/Pem at preimplantation stages. *Curr. Biol.* 16:166-172.
2. Takaoka, K., Yamamoto, M., Shiratori, H., Meno, C., Rossant, J., Saijoh, Y. and Hamada, H. (2006). Mouse embryo is autonomously patterned for antero-posterior polarity at implantation. *Dev Cell.* 10:451-459.
3. Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M., Rossant, J., Hamada, H. and Koopman, P. (2006). Retinoic acid regulates entry of germ cells into meiosis in the mouse ovary. *Science* 312:596-600.
4. Shiratori, H. and Hamada, H. (2006). Left-right axis in the mouse: from its origin to organogenesis. *Development* 133; 2095-2104.
5. Shiratori, H., Yashiro, K., Shen M., and Hamada, H. (2006). Conserved regulation and role of Pitx2 in situs-specific organogenesis. *Development*. 133:3015-3025.
6. 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.
7. 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.

8. Prall, OW, Menon, MK., Solloway, MJ., Zaffran, S., Bajolle, F., Watanabe, Y., Biben, C., McBride, JJ., Robertson, BR., Chaulet, H., Stennard, FA., Wise, N., Shiratori, H., Hamada, H., Black, BL., Saga, Y., Robertson, EJ., Buckingham, ME., Harvey, RP. (2007). Nkx2-5-dependent negative feedback loop affecting Bmp2/Smad1 balances cardiac progenitor cell specification and proliferation and is a molecular target in congenital heart disease. *Cell* 128:947-959.

(2) 口頭発表（内容が重複しているものは除く。国際学会発表を優先。）

“発表者（所属）、タイトル、学会名、場所、月日等。”

①招待、口頭講演（国内 3 件、海外 2 件）

Hamada, H. 2006.8.30-31. TGF $\beta$  in development. Tsukuba, Tsukuba Symposium on Signal Transduction and Disease

Hamada, H. 2006.7.24-28. Awaji, Japan, 9<sup>th</sup> International Conference on Limb Development and regeneration. [Origin of body axes in the mouse embryo] (plenary)

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” Japanese-Korean Joint Meeting for Mathematical Biology, 16-18 September, 2006, Kyusyu, Japan

Hamada, H. 2006.5.19-20 Utah, USA, Symposium on Developmental Dynamics, [Origin of body axes in the mouse embryo]

Yashiro, K., Shiratori, H. and Hamada, H. The hemodynamics created by left side specific Pitx2 regulates the asymmetric morphogenesis of aortic arch. Mouse Molecular Genetics Meeting 2006. Aug 30- Sep 3, 2006, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA

②ポスター発表（国内 4 件、海外 3 件）

Tetsuya Nakamura, Naoki Mine, Etsushi Nakaguchi, Masamichi Yamamoto, Yukio Saijoh, Chikara Meno and Hiroshi Hamada. “Generation of robust asymmetry for left-right patterning in the mouse embryo requires a reaction-diffusion system” CDB Symposium 2006 “Logic of Development”, 10-12 April, 2006, Kobe, Japan

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

Hidetaka Shiratori, Hiroshi Hamada Conserved regulation and role of Pitx2 in situs-specific morphogenesis of visceral organs. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006, June 19-23, Kyoto, Japan,

Takaoka, K., Yamamoto, M., Shiratori, H., Meno.C., Rossant., J. Saijoh Y., and Hamada, H. The mouse embryo autonomously acquires anterior-posterior polarity at implantation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006, June 19-23, Kyoto, Japan,

H. Shiratori, M. Shen H. Hamada Conserved regulation and role of Pitx2 in situs-specific morphogenesis of visceral organs. SDB 65th Annual Meeting, 2006. June 17-21, Ann Arbor, MI. USA

Yamamoto, M., Beppu, H., Takaoka, K., Miyazono, K., Meno, C., and Hamada, H. BMP signal in visceral endoderm plays a role in anteroposterior axis formation by specifying DVE and regulating Nodal signal in the mouse embryo. 4<sup>th</sup> ISSCR Annual Meeting, 2006, June 29-July 1, Toronto, Canada,

Takaoka, K., Yamamoto, M., Shiratori, H., Meno.C., Rossant., J. Saijoh Y., and Hamada, H. The Mouse Embryo Autonomously Acquires Anterior-Posterior Polarity at Implantation. Mouse Molecular Genetics Meeting 2006. Aug 30- Sep 3, 2006, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA ,

(3)特許出願 (国内　　件、海外　　件)  
該当なし

## 7. 結び

短期間であったが、概ね当初の目標を達成する事は出来た。幸い、平成18年11月からスタートしたCRESTに採択されたので、本研究の中から生まれた新たな問題を引き続き研究していきたい。



(平成19年1月：来訪したRossant 博士とともに)