

「生命システムの動作原理と基盤技術」

平成 18 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

生物の極性が生じる機構

## 1. 研究実施の概要

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. 研究実施内容

（文中にある参照番号は 4. (1)に対応する）

### ①頭尾と左右の極性が生じる機構

①- 1. 左右の対称性が破られる機構：ノードの繊毛が後側へ傾く仕組みを知るため、平面内細胞極性（PCP:Planner cell polarity）を制御する分子 Dvl (Dvl1, Dvl2, Dvl3) に注目した。ノードにおける Dvl 蛋白質の機能・活性・細胞内局在の偏りを調べるために、Dvl:GF 融合蛋白質を発現するトランスジェニックマウスを用いて Dvl 蛋白質の細胞内局在を調べたところ、細胞内極性を見出すことは出来なかった。Dvl 欠損マウスでは、単独変異では胚発生の異常は認められなかったが、多重変異マウスでは重篤な発生異常を認めた（詳しくは、現在解析中）。基底小体を蛍光で標識したマウスを用いて、基底小体の位置の変化を経時的に観察したところ、発生が進むに連れて同一細胞内で一が変化していることが判った（橋本ら、未発表）。ノードの水流の働き方を知るため、Ca<sup>2+</sup>チャンネルと考えられる Pkd2 蛋白質に注目した。Pkd2 は胚全体に発現するが、種々な遺伝学的な回復実験により、左右の決定においてはノード細胞のみで充分であること

が判明した。また、Pkd2 蛋白質の働く場所、細胞内の局在を知るため、種々の遺伝子改変マウスを用意した。Pkd2 蛋白質は、ノード細胞において、繊毛のみならず細胞質にも局在していた（吉場ら、未発表）。ノードで作られた Nodal 蛋白質は、GDF1 と呼ばれる別の TGF $\beta$  因子とヘテロダイマーを形成し、左側板中胚葉へと運搬され、そこで Nodal 遺伝子の発現を誘導することが示唆された（論文 2、Oki et al., 2007; 論文 4、Tanaka et al., 2007）。

①- 2. 頭尾（前後）の極性の決定：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 の形成におけるが、Nodal/Activin シグナルと BMP シグナルの役割を明らかにした（Yamamoto et al., submitted）。AVE を種々の蛍光蛋白質で標識したトランスジェニックマウスを樹立し、AVE 細胞の移動を経時観察する系を確立した。これによって、AVE 細胞の動態を経時的に追跡することが可能となった。

①- 3. 非対称な形態が生じる機構：心臓から出る大動脈弓は必ず左側へアーチするが、発生初期に大動脈の近くに形成される 6 対の<sup>さい</sup>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が不明だったが、その仕組みを明らかにした（論文 3、Yashiro et al., 2007）。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。

## ②極性の起源

②- 1. Lefty1 発現細胞の運命：胚盤胞で Lefty1 の発現を開始した細胞は、将来どのような細胞へと寄与するのか？ Lefty1 陽性細胞を Venus で標識したトランスジェニックマウス、及び Lefty1 の制御領域で Cre を発現するトランスジェニックマウスを用いて調べたところ、Lefty1 の発現を開始した細胞は、将来の頭側（前側）を決める細胞へ寄与することが判った（高岡ら、未発表）。

②- 2. 胚盤胞で発現する Lefty1 の役割・意義：胚盤胞の一部の細胞で発現する Lefty1 の意義を知るため、胚盤胞の単一細胞へ遺伝子導入する方法（electroporation 法）を確立した。細胞へのダメージを抑えて、遺伝子を導入することが可能になった。

②- 3. Lefty1 発現誘導の機構：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？ Lefty1 の転写制御機構を解析したところ、Nodal/FoxH1 に依存する機構と、依存しない機構があることが判った（高岡ら、未発表）。

### ③シグナル分子のイメージング

細胞外へ分泌された Nodal, Lefty 蛋白質を可視化するための観察方法を模索しているが、現時点では成功していない。分泌が亢進していると予想される変異マウスで、検出を試みる。

### ④数理モデルによる極性決定機構の解析

左右決定におけるノードでの遺伝子発現の揺らぎ、胚盤胞における *Lefty1* の発現誘導パターンについて、実験データを収集し、これらの現象を再現できるモデルの構築を行った（中村、望月ら、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:濱田博司(大阪大学大学院、教授)

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研究分担グループ長:望月敦史(大学共同利用機関法人 自然科学研究機構、助教授)

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. 研究成果の発表等

### (1) 論文発表(原著論文)

[1] 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] 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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] Sugimura K, Shimono K, Uemura T, [Mochizuki A.](#) (2007). Self-organizing mechanism for development of space-filling neuronal dendrites. *PLoS Comput Biol.* 3(11):e212.