

「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

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:

i) ノードの繊毛が後側へ傾く仕組みを知るため、平面内細胞極性を制御する分子 Dvl(Dvl1, Dvl2, Dvl3)に注目した。基底小体の位置の変化を経時的に観察したところ、最初はランダムに位置しているが、やがて細胞の後方へ位置することが判った。Dvl 多重変異マウスでは、基底小体がランダムに配置されたままで、方向性を持った水流が失われていた。Dvl 蛋白質の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、明確な細胞内極性を示した。以上のことより、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ることが判った (Hashimoto, M., *et al.* 4月に投稿予定)。ii) ノードの水流の働き方を知るため、Ca²⁺チャンネルと考えられる Pkd2 蛋白質に注目した。種々な部位に変異を持つ Pkd2 遺伝子による遺伝学的な回復実験を行った結果、チャンネル機能が必須であることが判明した。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)。iii) 繊毛を介するシグナリングに関与すると予想される3つの遺伝子を同定し、各々について変異マウスを作成した。そのうちのひとつでは、Nodal の非対称な発現が消失しており、繊毛を介するシグナリングの異常が示唆された (Botilde, Y.ら、未発表)。iv) 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.*, Submitted)。

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 の形成される際には、Nodal/Activin シグナルと BMP シグナルが拮抗し、前者が (+) 後者が (-) な部位から DVE/AVE が形成されることが判った(文献2:Yamamoto *et al.*, J. Cell Biol. 2009)。DVE と AVE の運命系譜を CreERT2 や経時観察で追跡したところ、DVE の殆どの細胞は AVE へは寄与せず、AVE は DVE とは別に生じることが判った。これは教科書を覆す重要な知見である(Takaoka *et al.*, 4月に投稿予定)。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化する必要があることが判った(Uehara *et al.*, To be revised to Genes & Dev)。

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 の制御領域で Cre-ERT2 を発現する BAC トランスジェニックマウスを用いて調べたところ、Lefty1 を発現する細胞には2種類あることが確定した。最初に発現した細胞は将来 epiblast へ、続いての発現を開始した細胞は DVE(頭側を決める細胞)へ寄与することが判った。

②-2. 胚盤胞で発現する Lefty1 の役割・意義:

Lefty1 と Lefty2 は隣接し、良く似た発現様式を示し機能的に相補する。着床前〜着床中胚における Lefty2 の発現を調べた所、Lefty1 と同様な発現を示した。そこで、Lefty、Lefty2 を同時に欠損する変異マウスの作製を計画し、目的のヘテロマウスを作成することが出来た。

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、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。Nodal 変異胚や FoxH1 変異胚では、Lefty1 の発現はすべて消失することより、胚盤胞における最初の Lefty1 の発現が、次の DVE へ寄与する細胞での発現に必要なことが示唆された(以上の結果は、Takaoka, K. *et al.*, 4月に投稿予定)。

②-4. 発生初期(着床前〜囊胚形成前期)における Cer1 の発現とその意義:

Lefty1 と同様に Nodal 抑制因子である Cer1 の発現を解析し、発現制御に必要なエンハンサーを決定した(高岡ら、未発表)。

③シグナル分子の分泌制御と分子のイメージング

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。

④数理モデルによる極性決定機構の解析

引き続き、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;高岡、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(基礎生物学研究所、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. 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.
2. 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.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 3 件)