

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ックスを調べる。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・生命機能研究科、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、理論生物学、准教授)
- 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

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(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: i) 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。まずは前者の機構を検討するため、ノード周辺で発現する Wnt 因子を探索し、*Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt11* を同定した。*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。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 (峰岸・橋本ら、未発表)。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* に注目した。今年度に得られた結果は、ノード細胞の繊毛が水流のセンサーとして働いていることを示唆した (吉場ら、投稿準備中)。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つの遺伝子について、変異マウスを作成・解析した。そのうちの一つはノード特異的に発現し、変異マウスではノード繊毛が消失するとともに Hedgehog シグナリングの異常が示唆された (Botilde, Y.ら、未発表)。コードされる蛋白質の働きを調べるための実験系を用意した。iv) ノードの両側で、*smad2/3* のリン酸化レベルが非対称であることより、*Nodal mRNA* の発現は対称だが、活性化された Nodal 蛋白質の量が非対称であることが判った (Kawasumi et al., Submitted)。v) ノードでは、遺伝子発現の揺らぎを吸収して非対称な発現を安定に生じるために、2つの遺伝子から構成される制御ループが働くことを明らかにした。得られた実験データをもとに、現象を再現できるモデルの構築を行った。(中村ら:望月、濱田グループの共同研究)。

①-2. 頭尾(前後)の極性の決定: i) DVE と AVE の役割: 細胞除去実験や経時観察より、DVE は visceral endoderm 全体の細胞移動を誘導することにより、後から生じる AVE の移動をガイドしていることが判った (Takaoka et al., revised)。ii) DVE の細胞移動の機構: 胚の遠位～近位に沿って異なる発現を示す増殖因子の探索を始めた。

②極性の起源

②-1. Lefty1 発現細胞の特性・運命: 胚盤胞で *Lefty1* の発現を開始した細胞が、将来 DVE (頭側を決める細胞) へ寄与することを、多数のマーカーを利用した実験系により確認した。(Takaoka, K. et al. Revised)。Lefty1 を発現する細胞の特性を知るため、Lefty1 陽性細胞を単離する方法を確立した。

②-2. 胚盤胞の Lefty1 の発現が一部の細胞に局限される機構: *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(望月、濱田グループの共同研究)。

②-3. 桑実胚期における細胞系譜決定機構: *Lefty1* 遺伝子の 5' 上流域 9.5 kb をもつ transgene は、桑実胚期のマウス胚の約半数の細胞のみで発現される。発現の変化を retrospectively に解析したところ、4細胞期の2つの細胞だけが発現を開始していることが判った。また、この Transgene(遺伝子領域)は、♂由来のときだけ発現することより、imprinting を受けることも判った(高岡ら、未発表)。

③非対称な形態が生じる機構

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。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)。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Furtado, M.B., Biben, C., Shiratori, H., Hamada, H. and Harvey, R. P. (2010). Characterization of *Pitx2c* expression in the mouse heart using a reporter transgene. *Dev. Dyn.* 240(1):195-203.(DOI: 10.1002/dvdy.22492)
2. Lopes Floro, K.L., Artap, S.T., Preis, J.I., Sparrow, D.B., Fatkin, D., Chapman, G., Furtado, M.B., Harvey, R.P., Hamada, H. and Dunwoodie, S.L. (2010). Loss of *Cited2* causes congenital heart defects by perturbing left-right patterning of the body axis. *Human Mol. Genetics.* 20(6):1097-1110. (DOI: 10.1093/hmg/ddq554)
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.* in press.
4. 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.* in press. (DOI:10.1016/j.ydbio.2011.03.009)