

「生命活動のプログラム」
平成7年度採択研究代表者

濱田 博司

(大阪大学細胞生体工学センター 教授)

「左右軸の位置情報の伝達・確立の分子機構」

1. 研究実施の概要

本研究の目標は、マウス・ニワトリ・カエルなどの種々の脊椎動物を用い、左右の位置情報の確立・伝達機構を解明する事であった。これまでに、左右非対称に発現するシグナル分子 (*lefty -1*, *lefty -2*) を同定し、左右決定における役割を解明した。これらの遺伝子が非対称に発現される機構を解明するとともに、Lefty蛋白質の作用機構の一端を明らかにした。一方、左右の初期決定に関与する *inv* 遺伝子を同定した。これらより、左右軸形成の初期から最終的な形態形成に至る全貌に近い将来解明できる。

2. 研究実施内容

1) 左右軸決定における *lefty* の役割

lefty -2 欠損マウスは、左右の決定よりも囊胚形成時期に胚性致死になり、この遺伝子が左右の決定のみならず中胚葉形成に必須であることが判った (Meno et al., 1999)。Lefty2 (およびLefty1) は、Nodal signaling の antagonist として働くことで、Nodal が作用する場所と時間を厳密に制限していることが判った。一方、左右決定における *lefty -2* の役割を確認するため、*lefty -2* の非対称な発現を制御しているエンハンサー (ASE) を欠失させたマウスを作製した。このマウスでは予想通り囊胚形成は正常であったが、*lefty -2* の非対称な発現が失われ、それに伴い種々の左右の異常が認められ、左右決定における重要性が確認された (Meno et al., 投稿中)。

2) *lefty* や *nodal* 遺伝子は、どのような機構で左側だけに発現されるのか?

lefty -2 と *nodal* は左側特異的なエンハンサー (ASE) により制御されているが、このASE配列に特異的に結合する転写因子をクローニングしたところ、FAST と呼ばれる転写因子であった。FAST自身は両側性に発現していた。FAST蛋白質が活性化される機構を調べた結果、Nodal タンパク質自身によってFAST蛋白質が活性化され、その結果、*lefty -2* と *nodal* が左側に発現されると想像された (Saijoh et al., 2000)。すなわち、Nodal タンパク質は *nodal* 遺伝子自身を正に制御するとともに、feedback inhibitorである *lefty2* の発現を誘導している事になる。*nodal* と

lefty2間に成立するこのような関係は、この二つのシグナル因子が反応拡散システムを形成している可能性を示唆している。反応拡散システムはこれまでは理論的なモデルに過ぎなかったが、nodal-leftyは生物界における反応拡散システムの最初の具体例かもしれない。

それでは、「nodal 遺伝子の最初の発現はいかにして引き起こされるのか？」

そこで、nodal遺伝子近傍にASEとは別の左側エンハンサーが存在する可能性を検討した。その結果、第二の左側特異的なエンハンサー（LSE）を同定した（西條ら、未発表）。

3) Lefty, Nodal によって誘導される転写因子Pitx2の機能と発現制御機構

Pitx 2 は非対称に発現されるシグナル分子によって活性化され、非対称な形態を誘導している転写因子だと予想される。そこで、Pitx 2 の種々の欠損マウス(null 欠失、conditional, enhancer deletion など)を作製し、左右の決定における役割を検証している。一方、Pitx 2 遺伝子の発現調節機構を2)と同様な方法で解析した結果、左側特異的なエンハンサー（ASE）を見出した。ASEの解析の結果、Pitx 2 遺伝子の非対称な発現は、まずNodal蛋白質からのシグナルによりFAST/Smad2を介して開始され、その後Nodal蛋白質が消失すると別の機構（転写因子）により維持されることが判った（白鳥ら、投稿準備中）。

4) Nodal, Lefty タンパク質の作用機構

Nodal に対して反応するレポーターアッセイ系を用いて、Nodalと Lefty蛋白質の作用機構を調べた。その結果、NodalはALK4/ActRIIを受容体とし、Smad/FASTを介してシグナルを伝える事が判った。一方、LeftyはALK4/ActRII受容体に競合的に結合することにより、Nodal の作用を抑制することが示唆された（佐久間ら、投稿準備中）。

5) *inv* 遺伝子の役割

inv の原因遺伝子をPositional Cloning により単離した。得られた遺伝子が*inv* 変異マウスに見られた症状を完全に回復することが出来たことより、*inv* 遺伝子そのものであることが確認された（Mochizuki et al.,1999）。一方、廣川信隆博士らとの共同研究により、*inv* 変異マウスではnodal flow（nodeにおける右から左方向への水流）が異常であることが判り（Okada et al. 1999）、*inv* 遺伝子の機能を解析するための大きな手がかりが得られた。*inv*とGFPの融合遺伝子（*inv*-GFP）は*inv* 変異をrescueしたので、*inv* 遺伝子と同様に機能すると示唆された。そこで、*inv*-GFPをもつtransgenic マウスを作製し、INVタンパク質の個体レベル・細胞レベルでの挙動を調べつつある。（渡辺ら、未発表）。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Saijoh, Y., Adachi, H., Mochida, K., Ohishi, S., Hirao, A., and Hamada, H. (1999) Distinct transcriptional regulatory mechanisms underlie left-right asymmetric expression of *lefty-1* and *lefty-2*. *Genes Dev.* 13:259-269.

Adachi, H., Saijoh, Y., Mochida, K., Ohishi, S., Hashiguchi, H., Hirao, A., and Hamada, H. (1999) Determination of left-right asymmetric expression of *nodal* by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a *lefty-2* enhancer. *Genes Dev.* 13:1589-1600.

Okada, Y., Nonaka, S., Tanaka, Y., Saijoh, Y., Hamada, H., and Hirokawa, N. (1999). Abnormal *nodal* flow causes *situs inversus* in *iv* and *inv* mutant mice. *Mol. Cell* 4:459-468.

Nishino, J., Mochida, K., Ohfuji, Y., Shimazaki, T., Meno, C., Ohishi, S., Matsuda, Y., Fujii, H., Saijoh, Y., and Hamada, H. (1999). GFR β 3, a putative coreceptor of Artemin, is required for the migration and survival of the superior cervical ganglion. *Neuron*. 23: 725-736.

Meno, C.,* Gritmann, K.,* Ohfuji, Y., Heckscher, E., Ohishi, S., Mochida, K., Shimono, A., Kondoh, H., Talbot, W., Robertson, E.J., Schier, A.F. and Hamada, H. (1999). Mouse *Lefty2* and zebrafish *Antivin* are feedback inhibitors of *Nodal* signaling during vertebrate gastrulation. (* equally contributed) *Mol. Cell* 4: 287-298.

Saijoh, Y., Adachi, H., Sakuma, R., Yeo, C.-Y., Yashiro, K., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Yashiro, K., Kawabata, M., Miyazono, K., Whitman, M. and Hamada, H. (2000). Left-right asymmetric expression of *lefty2* and *nodal* is induced by a signaling pathway that includes a transcription factor FAST2. *Mol. Cell* 5:35-47.

Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Tao, H., Thisse, B., Thisse, C., Wright, C.V.E., Hamada, H., Ohuchi, H., and Noji, S. (2000). Asymmetric expression of *antivin/lefty1* in the early chick embryo. *Mech. Dev.* 90:115-118.

Funayama, N., Sato, Y., Matsumoto, K., Ogura, T., and Takahashi, Y (1999). Coelom formation: binary decision of the lateral plate mesoderm is controlled by the ectoderm. *Development* 126:4129-4138.