

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18687015

研究課題名 (和文) 頭部形成及び脳領域化における DVE/AVE 及び ADE の機能解明

研究課題名 (英文) Role of AVE/DVE in head formation

研究代表者

山本 正道 (YAMAMOTO MASAMICHI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・招聘研究員

研究者番号：70423150

研究成果の概要：

1) 前後のパターニングにおける BMP シグナルの役割

BMP 受容体のノックアウトマウスを解析したところ、体の前後の決定に必要な DVE/AVE と呼ばれる細胞が形成されていなかった。また、DVE/AVE は Nodal シグナル (+) と BMP シグナル (-) な場所に形成されることが判った。

2) Nodal シグナルの分布を、リン酸化 Smad 2 に特異的な抗体で見る事に成功した。そして、Smad1toSmad2 の間には拮抗的な関係がある事が判明した。

3) Actiivin も Smad2 を介して、DVE/AVE の形成に必須である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2007 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2008 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
年度			
年度			
総計	23,000,000	6,900,000	29,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：胚発生、Nodal シグナル、前後軸、Smad

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物における体の前後の極性は、DVE/AVE と呼ばれる細胞が、胚の遠位に形成されたのち、胚の片側 (将来の頭側) へ移動する事によって確立される。しかし、DVE/AVE が遠位に形成される機構、片側へ移動する機構は明確ではない。

## 2. 研究の目的

- (1) 前後の極性を決める細胞集団である DVE/AVE が形成される機構を知ること。
- (2) 頭部形成における AVE の役割を明らかにすること。
- (3) AVE 内における細胞の diversity を分析し、その意義を明らかにすること。

### 3. 研究の方法

(1) 胚における Nodal シグナル、BMP シグナルの空間的分布を知るため、DVE や AVE が形成される前後における、リン酸化 Smad1, Smad2 の局在を調べる。BMP 受容体を欠損する変異胚での DVE/AVE の形成を調べる。

(2) in situ hybridization により、種々の AVE マーカー(Lefty1, Cerl-1, Hex, Dkk-1 Lim1 など)の発現部位を比較しながら決定する。また、Lefty1, Cerl-1, Hex, Dkk-1 Lim1 の各遺伝子について、CreERT2 をノックインした allele をもつマウスをつくり、AVE でこれらの遺伝子を発現した細胞の運命を追跡する。

(3) Lefty1, Cerl-1, Hex, Dkk-1 Lim1 の発現部位を人為的に変えた時の、AVE 形成や頭部形成に対する影響を調べる。

### 4. 研究成果

(1) 胚の前後を決定する DVE/AVE と呼ばれる細胞の形成は Nodal シグナルと BMP シグナルの拮抗作用によって制御される。BMP 受容体ノックアウトマウスでは、発生初期に胚体外内胚葉の形成が以上になるために、AVE が形成されなかった。一方、組換え BMP 蛋白質を過剰に加えて胚を培養すると、AVE 形成が阻害された。マウス胚において Nodal signal と BMP signal を空間的に理解するため、抗体を用いてリン酸化 Smad2 とリン酸化 Smad1 の分布を調べた。その結果 DVE/AVE は、Nodal シグナルが陽性(リン酸化 Smad2 が陽性)かつ BMP シグナルが陰性(リン酸化 Smad1 が陰性)な部位である、胚の最も遠位部に形成されることが判った(文献1: Yamamoto et al., 2009)。また、両者のシグナルは、共通の受容体を競合

的に利用する事によって、生体内で互いに拮抗したバランスを保っている事が判った。

(2) 種々の AVE マーカー(Lefty1, Cerl-1, Hex, Dkk-1 Lim1 など)の発現部位を詳細に比較したところ、各々の発現部位が正確には一致しない事が判った。Lefty1, Cerl-1, Hex, Dkk-1 Lim1 の各遺伝子の BAC クローンに、CreERT2 をノックインした BAC を構築し、これらの BAC を持つトランスジェニックマウスを作製した。また、この発現部位の違いの意義を検証するために、Tet ON, OFF の系を利用して、人為的に発現部位を変換させたマウスを作製した(AVE の形成、その後の頭部形成へ与える影響に関する解析は、今後行う: 未発表)。また、各遺伝子の発現パターンを生きた胚で経時的に観察するために、GFP などのレポーターで標識したトランスジェニックマウスを作製した(未発表)。

(3) AVE は遠位から近位へ向けて移動する。この細胞移動の機構を知るために、まず胚の近位部で特異的に発現するシグナル分子を探索した。その結果、いくつかのシグナル因子が近位で発現する事が判った。各因子について、細胞移動に対する影響を見るために、発現ベクターを作製した(今後、胚の異所的な部位へ発現を導入し、AVE の移動へ与える影響を調べる)。それと同時に、各因子について、ノックアウトマウスの作製を開始した。

(4) Lefty1 の発現が、着床前胚から始まり、DVE 形成時期まで非対称な部位に維持される事を見出した。この非対称な発現は、単離した胚盤胞で確立される事より、子宮との相互作用は必要なかった。また、Lefty1 の発現を制御するエンハンサーを解析したところ、FoxH1 結合配列を2つ持っており、この結合

配列に変異を導入するとエンハンサー活性が消失した。以上のエンハンサー解析より、Lefty1 の非対称な発現は、Nodal シグナルに寄って転写因子 FoxH1 を介して誘導される事が判った (文献 2、3 : Takaoka et al., 2006; Takaoak et al., 2007)。Cre を用いた遺伝学的な方法を用いて、胚盤胞で Lefty1 を発現する細胞の運命を決定した。その結果、胚盤胞で Lefty1 を発現した細胞は、将来 DVE へと寄与する事が判った。(高岡ら、未発表)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) 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 査読有

(2) Takaoka, K., Yamamoto, M. and Hamada, H. (2007) Origin of body axes in the mouse embryo. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17:344-350. 査読有

(3) 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. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

(1) 高岡勝吉、山本正道、濱田博司「マウス胚における前後軸の起源」遺伝情報 DECODE (転写研究会共催)・冬のワークショップ、2009 年 1 月、

湯沢グランドホテル 口頭発表

(2) Uehara, M., Yashiro, K., Yamamoto, M., and Hamada, H. "Removal of maternal retinoic acid by embryonic CYP26 for correct *Nodal* regulation during early embryonic patterning". The 2008 meeting on Mouse Genetics & Genomics: Development & Disease. October 29 - November 2, 2008, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA

(3) Takaoka, K., Yamamoto, M., Hamada, H. Origin of Anterior-Posterior axis in the mouse embryo The 1st Mouse Development Workshop Jun. 2008, France 口頭

(4) 山本正道、別府秀幸、高岡勝吉、目野主税、En Li、宮園浩平、濱田博司「遠位臓側内胚葉は BMP、ACTIVIN、ExE シグナルの相互作用により形成される」第 40 回日本発生生物学会、第 59 回日本細胞生物学会合同大会、2007 年 5 月、福岡国際会議場

(5) 高岡勝吉、山本正道、白鳥秀卓、目野主税、Janet Rossant、西条幸男、濱田博司「前後軸の起源」第 40 回日本発生生物学会、第 59 回日本細胞生物学会合同大会、2007 年 5 月、福岡国際会議場

(6) 高岡勝吉、山本正道、白鳥秀卓、目野主税、Janet Rossant、西条幸男、濱田博司「前後軸の起源〜Lefty1 の発現制御機構から探る〜」遺伝情報 DECODE・冬のワークショップ(転写研究会共催)、2007 年 1 月、湯沢ニューオータニホテル

(7) 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, **ポスター発表**

(8) 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, ポスター発表

[その他]  
ホームページ  
<http://www.imcb.osaka-u.ac.jp/hamada/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 正道 (YAMAMOTO MASAMICHI)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・招聘研  
究員  
研究者番号 : 70423150

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し