

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440124

研究課題名(和文)Pitx2の下流の分子機構と左右非対称な形態変化の解析

研究課題名(英文)Analysis of the molecular mechanisms downstream of Pitx2 and left-right asymmetric morphogenesis.

研究代表者

白鳥 秀卓 (SHIRATORI, Hidetaka)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90362590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：左右非対称な器官形成について、以下の分子機構を明らかにした。
(1)内臓と同様に四肢においてもPitx2によって制御される左右非対称性が存在することを明らかにした。左右非対称な脳機能によって支配されていると報告されているヒトの利き腕に関して、四肢の左右非対称な形態も関与する可能性を提唱した。
(2)細胞外因子であるLR1の左右非対称な器官形成における役割を明らかにできたと共に、細胞外環境の必要性を示唆できた。

研究成果の概要(英文)：About left-right asymmetric morphogenesis in visceral organs and limb, I discovered the following molecular mechanisms:

(1)In the limb, Pitx2 regulates left-right asymmetric morphogenesis. It was suggested that asymmetric morphogenesis may be involved in human handedness.

(2)LR1, a extracellular matrix factor, is involved in left-right asymmetric morphogenesis. It was suggested that the extracellular matrix is important for the left-right asymmetric morphogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：左右非対称 器官形成 Pitx2 四肢形成 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

ここ数年で、私の解析を含めて左右軸形成機構は解明されてきた。左右軸形成の最終段階である内臓器官の左右非対称な形態変化については、脊椎動物では転写因子 *Pitx2* が左右非対称に形成するほとんどの器官原基の左側で発現し、重要な役割をしている。しかし、その下流の分子機構や形態変化の理解は部分的で、左右非対称な形態形成を説明することができる器官はまだ無かった。

2. 研究の目的

本研究では、左右非対称な器官形成における細胞外環境が関与する新規分子機構を明らかにして、*Pitx2* の下流の左右非対称な形態形成機構を解析する。また、細胞レベルでの形態変化を合わせて解析することで、器官の左右非対称な形態形成を説明できるようにするための大きな一歩となる。

内臓器官の左右非対称な形態に加えて、*Pitx2* が支配する四肢の左右非対称性の解析を行ない、脳機能と並んで(関連して)左右非対称性の決定機構が不明である利き腕の決定機構の解明の大きな一歩とする。

(1)私は、内臓器官に加えて、外見は左右対称に見える肢芽においても、*Pitx2* が左右非対称に発現していることを発見した(図)。この肢芽における左右非対称な発現のエンハンサーを同定し、エンハンサーの塩基配列や活性が哺乳類内で保存されていることも明らかにした。さらに、*Pitx2* 発現細胞は他の細胞より細胞増殖が抑制されていることを明らかにし、内臓と同様に四肢においても *Pitx2* によって制御される非対称性が存在することが分かった。しかし、組織レベルでの形態の非対称性は検出できず、マウスにおける四肢の非対称な組織形態やその意義は不明である。本研究では、四肢の非対称性を明らかにして、その意義を解明する手がかりを得ることを目的とした。

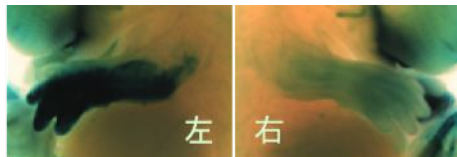


図 前肢における *Pitx2* の左側特異的な発現

(2)左右非対称な器官形成を制御する細胞外環境の解明

私は、細胞外マトリックス因子 *LR1* が左右非対称に発現することを発見した。さらに、*LR1* 変異マウスが内臓形態の左右性に異常を示すことを明らかにした。これらの結果から、*LR1* の左右非対称な器官形成における役割について、私は2つの仮説を立てた。*LR1* が *Pitx2* の発現を制御する左右軸決定シグナ

ルの上流の分泌因子 *Nodal* の拡散を制御する。*LR1* が左右非対称な細胞の形態や移動を制御する。

本研究では、左右軸形成における *LR1* の役割を明らかにし、*LR1* と相互作用する細胞外マトリックス因子の解析も行ない、左右非対称な器官形成における細胞外環境の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)*Pitx2* の非対称な発現が支配する四肢の非対称性の解析

神経の走行と神経投射について、左右非対称性や *Pitx2* 変異マウスにおける異常を探索する。

・神経の走行：*Thy1-YFP* マウスで標識される運動神経と感覚神経、*Hb9-GFP* マウスで標識される運動神経の、左右の違いや野生型と変異マウスの違いを観察する。

・神経投射：*Pitx2* 発現細胞や *Pitx2* 発現細胞が寄与する組織周辺に逆行性のトレーサーを投与し、投射する神経の細胞体が存在する領域を確認する。右肢の左に相当する部位、*Pitx2* 変異マウスの同様の部位にもトレーサーを投与し、左右の違いや野生型と変異マウスの違いを解析する。

Pitx2 変異マウスにおける行動異常の探索。

Pitx2 ヌル欠損マウスや *Pitx2* の左右非対称な発現だけ欠損させたマウスは心臓奇形等によって胎仔期や生後すぐに死亡してしまうため、肢芽特異的な *Pitx2* 欠損マウスを作成する。

肢芽特異的な *Pitx2* 欠損マウスの行動解析については、ヒトのように利き腕を判定する適当な方法がマウスでは確立されていないので、エサをとる行動時に左右どちらの前肢を使うのかに加え、前肢の左右の使い方に注目しながら RIKEN が推奨する網羅的表現型解析法である Modified SHIRPA 法に準じて行動解析を行ない、野生型と *Pitx2* 変異マウスで異なる行動を探索する。

(2)左右非対称な器官形成を制御する細胞外環境の解明

細胞外マトリックス因子 *LR1* 変異マウスにおける *Pitx2* の発現を観察し、左右軸形成機構の中の *Pitx2* の上流あるいは下流のどちらで *LR1* が働くのか確認する。

・*LR1* 変異マウスにおける *Pitx2* の発現が異常で、*LR1* が *Pitx2* の上流で働く場合

Nodal など上流遺伝子の発現を確認し、左右軸形成機構のどの局面に異常があるのか特定する。この結果次第であるが、*LR1* の発現様式と *LR1* が細胞外マトリックスの構成成分であることから、分泌因子である *Nodal* の拡散が異常になった結果 *Pitx2* の発現が異常になる可能性を予想している。その可能性が示唆された場合は、*Nodal* の拡散を可視化する実験系を構築する。具体的には、

LSE-GFP-Nodal Tg マウス(Nodal のエンハンサー-LSE によって Nodal と GFP の融合蛋白を発現する。この融合蛋白が Nodal と同じ活性を持つことは確認済み。)を作成し、GFP を検出することで Nodal の拡散を可視化する。

・LR1 変異マウスにおける *Pitx2* の発現が正常な場合

Pitx2 変異マウスにおける LR1 の発現を調べ、LR1 が *Pitx2* の下流因子であるのかどうか確認する。LR1 が *Pitx2* の下流因子でない場合は、LR1、*Pitx2* の 2 重変異マウスを作成し、LR1 と *Pitx2* の間の協調的な役割について解析する。

LR1 発現領域の細胞形態や細胞移動の観察、LR1 以外の細胞外マトリックス因子の免疫染色によって、組織・細胞レベルでの異常を解析する。

4. 研究成果

(1)*Pitx2* の非対称な発現が支配する四肢の非対称性の解析

マウス発生中の四肢において *Pitx2* が左右非対称に発現していること、エンハンサーがヒトでも保存されていること、左側特異的に *Pitx2* を発現する細胞は四肢の背尾側に偏って存在し、*Pitx2* 自身を介して他の細胞より細胞増殖が抑制されていることを明らかにした。これらの結果をまとめて、雑誌論文と学会で発表した。四肢の組織レベルでの形態の左右非対称性は検出できず、意義は不明であるが、内臓と同様に四肢においても *Pitx2* によって制御される左右非対称性が存在することを明らかにした。左右非対称な脳機能によって支配されていると報告されているヒトの利き腕に関して、四肢の左右非対称な形態も関与する可能性を提唱した。

(2)左右非対称な器官形成を制御する細胞外環境の解明

Pitx2 は頭尾軸に沿って左側側板中胚葉の全域で発現するが、細胞外マトリックス因子 LR1 の変異マウスでは、*Pitx2* の mRNA 胚の後方の発現が減弱していた。この異常を確認するために、*Pitx2*-LacZ トランスジーン の発現変化を調べた結果、LR1 変異マウスにおける発現の減弱をより明確に確認できた。このことから、LR1 が左右軸決定シグナル因子である Nodal の拡散に必要である可能性を示唆できた。

また、LR1 変異マウスで左右非対称な形態異常を示す腸管原基において、LR1 と相互作用する細胞マトリックス因子のタンパク量が減っていることも明らかにした。

LR1 の左右非対称な発現は一過性で、器官形成期には左右対称に発現する。LR1 変異マウスで観察された左右非対称な形態異常が、LR1 の左右非対称な発現が無くなったことによることを証明するために、以下の 2 種類のマウスを作成し、解析を行った。LR1 変異

マウスに左側側板中胚葉特異的に LR1 を発現するトランスジーンを導入して、形態異常をレスキューするマウス。同定済みの左右非対称な発現に必要な塩基配列に点変異を導入したマウス。その結果、前者のマウスの表現型は LR1 変異マウスと異なり、後者のマウスが LR1 変異マウスと同様の左右非対称な形態異常を示し、以下のことを明らかにできた。

細胞外マトリックスやその構成因子である LR1 が左右非対称な形態形成に必要であること。トランスジーンの実験結果から同定していた LR1 の左右非対称な発現に必要な塩基配列が、生理的に必要であること。さらに、この塩基配列は左右非対称に発現する Nodal により活性化される転写因子の結合配列であることから、Nodal による LR1 の発現制御が必要であることも明らかにした。

また、野生型にこの LR1 トランスジーンを導入したマウス(左側側板中胚葉特異的に LR1 を過剰発現するマウス)でも異常が見られた。この結果から、左側側板中胚葉において LR1 の発現量が厳密に調節されることが、左右非対称な形態形成に必要であることが分かった。

LR1 変異マウスの解析は B6/129 系統で行ってきたが、B6 純系に近い系統で解析したところ表現型が重度になった。よって、B6 系統への戻し交配を進め、表現型の解析を行った。その結果、新生仔を解剖して内臓を観察した結果、腸ループ、血管系、脾臓の大きさ、腎臓・腎静脈の位置、肝臓の分葉構造等の左右非対称な器官形成における LR1 の役割を詳細に理解でき、LR1 の必要性を確実にできたとともに、B6 系統を使うことで今後の解析が効率的になった。新生仔で異常がある組織については、器官発生期の形態異常や各器官形成に必要な分子の異常を探索した。

LR1 変異マウスで観察される腎臓の左右非対称性の異常を詳細に解析するために、腎臓、腎静脈、腎動脈の左右非対称な形成過程を観察した。その結果、腎動脈の左右非対称性が初めに確立され、続いて左右対称にできた腎臓と腎静脈が左右非対称に位置変化することが分かった。

本解析によって、細胞外因子である LR1 の左右非対称な器官形成における役割を明らかにできたと共に、細胞外環境の必要性を示唆できた。また、腎臓の左右非対称性の形成過程を明らかにすることができた。これらの結果は、左右非対称な器官形成機構を解明するための大きな一歩となったと共に、今後の解析の大きな手がかりとなった。

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5件)

A Wnt5 Activity Asymmetry and Intercellular

Signaling via PCP Proteins Polarize Node Cells for Left-Right Symmetry Breaking.
Minegishi K, Hashimoto M, Ajima R, Takaoka K, Shinohara K, Ikawa Y, Nishimura H, McMahon AP, Willert K, Okada Y, Sasaki H, Shi D, Fujimori T, Ohtsuka T, Igarashi Y, Yamaguchi TP, Shimono A, Shiratori H, Hamada H.
Dev Cell. 13;40(5):439-452. 2017 査読有
DOI: 10.1016/j.devcel.2017.02.010.

TTC25 Deficiency Results in Defects of the Outer Dynein Arm Docking Machinery and Primary Ciliary Dyskinesia with Left-Right Body Asymmetry Randomization.
Wallmeier J, Shiratori H, Dougherty GW, Edelbusch C, Hjejij R, Loges NT, Menchen T, Olbrich H, Pennekamp P, Raidt J, Werner C, Minegishi K, Shinohara K, Asai Y, Takaoka K, Lee C, Griese M, Memari Y, Durbin R, Kolb-Kokocinski A, Sauer S, Wallingford JB, Hamada H, Omran H.
Am J Hum Genet. 4;99(2):460-9. 2016 査読有
DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.06.014.

Single-Cell Expression Profiling Reveals a Dynamic State of Cardiac Precursor Cells in the Early Mouse Embryo.
Kokkinopoulos I, Ishida H, Saba R, Ruchaya P, Cabrera C, Struebig M, Barnes M, Terry A, Kaneko M, Shintani Y, Coppen S, Shiratori H, Ameen T, Mein C, Hamada H, Suzuki K, Yashiro K.
PLoS One. 15;10(10):e0140831. 2015 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0140831

Self-regulated left-right asymmetric expression of Pitx2c in the developing mouse limb.
Shiratori H, Yashiro K, Iwai N, Oki S, Minegishi K, Ikawa Y, Kanata K, Hamada H.
Dev Biol. 395, No.2 PP. 331-41. 2014 査読有
DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.09.002

TGF β signaling in establishing left-right asymmetry.
Shiratori H, Hamada H.
Semin Cell Dev Biol. 32:80-4. 2014 査読有
DOI: 10.1016/j.semdb.2014.03.029

〔学会発表〕(計2件)

峰岸 かつら, 橋本 昌和, 安島 理恵子, 五十嵐 康伸, 篠原 恭介, 白鳥 秀卓, 濱田 博司
Wnt5a/5b と Wnt のインヒビターの非対称な分布がノードの細胞極性を決めている
第 38 回日本分子生物学会年会
2015 年 12 月 04 日
神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

白鳥秀卓, 濱田博司
マウス発生中の四肢における Pitx2 の左右非

対称な発現
第 37 回日本分子生物学会年会
2014 年 11 月 26 日
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.kyoto-su.ac.jp/faculty/professors/nls/shiratori-hidetaka.html>

https://www.kyoto-su.ac.jp/graduate/g_s/kyoin/shiratori.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

白鳥 秀卓 (SHIRATORI, Hidetaka)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号 : 9 0 3 6 2 5 9 0

(4)研究協力者

濱田 博司 (HAMADA, Hiroshi)
峰岸 かつら (MINEGISHI, Katsura)
井川 弥生 (IKAWA, Yayoi)