

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2007～2008

課題番号：19207016

研究課題名 (和文) Nodal シグナルによる胚発生の制御

研究課題名 (英文) Regulation of embryogenesis by Nodal signal

研究代表者

濱田 博司 (HAMADA HIROSHI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：00208589

研究成果の概要：

1. 胚の前後を決定する DVE/AVE と呼ばれる細胞の形成・移動は、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。
2. 発生の極早い時期においては、母体に由来する RA は胚の Cyp26 によって不活性化される。
3. Nodal シグナルを伝える転写因子 FoxH1 によって制御される遺伝子群を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2008 年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
年度			
年度			
年度			
総計	20,000,000	6,000,000	26,000,000

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：形態形成

1. 研究開始当初の背景

TGF β superfamily に属する Nodal と Lefty は胚発生の初期において極めて重要なシグナル因子であり、i)体の頭尾の決定、ii)左右の決定、iii)中胚葉の形成・パターンニング、iv)頭部形成などを制御する。Nodal 分子は signal transducer として、一方 Lefty は Nodal の feedback inhibitor として働く。二つの因子は、各局面において同じ（あるいは隣接した）部位で発現するが、Lefty による negative loop のため、Nodal シグナル

は時間と空間的に極めて厳密に制御され、限られた時間・限られた場所だけでシグナルが働くことになる。このような概略は遺伝学的なデータなどから知られているものの、i)-iv)の各局面における Nodal シグナルの正確な働き方は判っていない。

2. 研究の目的

(1) 体の頭尾の決定：Nodal シグナルによる細胞増殖・細胞移動の制御を解析する。一般的に、TGF β は細胞増殖を抑制しアポトー

シス引き起こす事が知られている。しかし、マウス初期胚においては逆に、Nodalは細胞増殖を促進している。この違いは、リガンドであるTGFβとNodalの差というよりも、反応する細胞の違いによってアウトプットが異なるためと予想する。そこで、正常マウスとNodalシグナル欠損マウスを用いて、受精後の1細胞期から囊胚期にいたる各時期において細胞増殖のパターンを調べ、Nodalシグナルの強度との相関を検討する。一方、体の頭尾は、DVE/AVEとよばれる内胚葉細胞が将来の頭側へ移動することで決まる。Nodalシグナルを欠く変異マウスでは、この細胞移動が起らない。DVE/AVEの細胞移動のメカニズムを、Nodalシグナルを糸口にして明らかにする。(2) 左右の決定：Nodalシグナルが及ぶ範囲は胚の空間において厳密に制御されているはずであるが、その制御機構は明らかでない。いくつかの可能性・機構が考えられるが、まず第一に、Nodalが他の分子(GDF1やGDF3)と相互作用するかどうか、もしするならば、相互作用によりNodalのシグナル範囲が変化するか否かを検証する。(3) 中胚葉の形成・パターンニング：Nodalシグナル量を、リン酸化Smad2特異的抗体などを用いてマウス胚で可視化し、Lefty2欠損マウスでの変化を調べる。また、Lefty2の原条での発現を制御するエンハンサー(0.7kb領域に同定済み：未発表)を解析し、発現制御機構を知る事によって、Nodal活性の勾配が生じる機構を明らかにする。(4) 頭部形成の局面におけるNodalシグナルの役割：頭部になるべく運命づけされた胚前方の外胚葉は、やがて近傍にやってくる中胚葉

転写因子FoxH1の発現を調べた所、脊索前板や神経管で発現していた(Botildeら、未発表)。そこで、FoxH1遺伝子を脊索前板や神経管で特異的に欠損させることで、検証する。

3. 研究の方法

(1) 受精卵から囊胚期に至る種々の時期において、細胞増殖とNodalシグナル強度との相関を検証する。

(2) Lefty2のエンハンサーを解析し、Nodalシグナルによる中胚葉の誘導とパターンニングの機構を知る。

(3) Nodal融合蛋白質が、分泌された後にノードから左側板へと拡散しているかどうかを、高感度イメージングで検証する。

(4) 発生後期・成体でのNodalシグナルの役割を探索する。

(5) Nodalシグナルを伝える転写因子FoxH1によって制御される遺伝子を同定し、その機能を調べる。

4. 研究成果

(1) BMP受容体欠損マウスは、AVEが正しく形成されないために前後の決定が異常になる。リン酸化Smad1, リン酸化Smad2のパターンを、正常胚とBMP受容体欠損胚と比較した。その結果DVEは、前者が(—)で後者が(+)の部位、即ち胚の最も遠位部に形成される事が判った。さらに、胚の前後を決定するDVE/AVEと呼ばれる細胞の形成・移動は、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(文献1)。

(2) Nodal蛋白質は、コンドロイチン硫酸と相互作用する。免疫染色法で調べたところ、コンドロイチン硫酸を含む蛋白質は、ノードと側板をつなぐ組織に検出された。コンドロイチン硫酸の合成を阻害したところ、側板で

の Nodal の発現が消失した事より、ノードから側板への Nodal 蛋白質の運搬が阻害されたと推測された。以上の結果より、ノードで合成された Nodal 蛋白質は、コンドロイチン硫酸を含む細胞外マトリックスに沿って側方へ運搬され、目的地の側板中胚葉で Nodal 遺伝子の発現を ON にすることがわかった (文献 2)。

(3) Nodal 蛋白質は、GDF1 蛋白質と相互作用し、その活性を著明に上昇する事が判った。GDF1 はノードにおいて Nodal と共発現され、Nodal-GDF1 の複合体が、側方へ運搬される。GDF1 ノックアウトマウスでは、Nodal の活性が低いため、側板での Nodal の非対称な発現が起こらない。以上の事より、Nodal 蛋白質が長距離を経て働く際には、Nodal は GDF1 と複合体を形成する必要があることが示唆された (文献 3)。

(4) Nodal シグナルを伝える転写因子 FoxH1 は、ATT(A/C)(A/C)ACA という 8 塩基配列を認識する。マウスゲノム全体において、保存された結合配列を持つ遺伝子を系統的に探索した結果、約 150 の遺伝子を同定した。各々の遺伝子について、Q-PCR や in situ hybridization 法で、正常胚での発現、FoxH1 欠損胚における発現などを調べたところ、現時点までに 5 個の遺伝子が囊胚期のマウス胚における標的遺伝子の条件を満たすことがわかった。それらの遺伝子について、lacZ をノックインした BAC、および FoxH1 結合配列を失った BAC を構築し、両者のトランスジェニックマウスを作製し、発現パターンに変化があるかどうかを調べつつある (未発表)。

(5) 発生後期や成体での Nodal シグナルの働きを知るために、Nodal, Lefty, FoxH1, の各遺伝子について、flox 変異マウス、Cre-ERT2 をノックインしたマウスを作製し

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 4 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) Oki, S., Hashimoto, R., Otani, H., Shen, M., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2007). Sulfated glycosaminoglycan is necessary for Nodal signal transmission from the node to the left lateral plate in the mouse left-right patterning. *Development*, 134:3893-3904. 査読有

(3) Tanaka, C., Sakuma, R., Nakamura, T., Hamada, H.*, and Saijoh, Y. (2007). Long-range action of Nodal requires interaction with GDF1. (*corresponding author). *Genes & Dev* 21:3272-3282. 査読有

(4) 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

[学会発表] (計 8 件)

(1) 中村哲也「左右決定機構とその Robustness」定量生物学の会 第一回年会, 2009年1月10日～12日、東京大学

(2) 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

(3) 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 ,

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

(5) 中村哲也 「Generation of Robust Left-Right Asymmetry in the Mouse Embryo」第 60 回日本細胞生物学会大会、2008 年 6 月 29 日～7 月 1 日、パシフィコ横浜

(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」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

(7) 白鳥秀卓、濱田博司 「マウス左右軸決定における転写因子 Pitx2 の発現制御と下流遺伝子の解析」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

(8) 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

[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

濱田 博司 (HAMADA HIROSHI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号：00208589

(2) 研究分担者

白鳥 秀卓 (SHIRATORI HIDETAKA)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授
研究者番号：90362590

(3) 連帯研究者

無し