

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770194
 研究課題名 (和文) マウスにおける左右非対称な器官形成機構の網羅的解析

研究課題名 (英文)
 Comprehensive analyses of left-right asymmetric morphogenesis in mouse
 研究代表者
 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

研究成果の概要

左右非対称な器官形成機構を解明する手がかりになる、以下の *Pitx2* の下流の分子機構を解明した。(1)肺や心臓の流出路で左右非対称に発現する *Fgf10* が、*Pitx2* によって直接的に制御されていること。(2)肢芽において *Pitx2* が発現している組織の同定と、非対称な神経繊維の形成に参与している可能性の示唆。(3)*Pitx2* の下流遺伝子として、静脈系で左右非対称に発現する新規遺伝子等の発見。(4)肢芽において、*Pitx2* が発現した細胞が、野生型に比べて *Pitx2* 変異マウスでは、広範囲に寄与すること。

交付額

(金額単位 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野 発生生物学

科研費の分科・細目 生物科学・発生生物学

キーワード 器官形成、左右非対称、遺伝子発現制御、*Pitx2*

研究開始当初の背景

ここ数年で解明されてきた左右軸形成機構の中で、最終段階である左右非対称な器官の形態形成の分子機構は不明な点が多い。マウスにおいては、私の報告を含め、心臓に関する解析が進み始めたただけであった

(Shiratori et al, 2006; Ai et al, 2006; Bajolle et al, 2006)。転写因子 *Pitx2* は、左右軸形成機構の上流からのシグナルを受け取り、各器官に分化する前の左側側板中胚葉 (左 LPM) で発現を開始し、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続

ける。そして変異マウスの解析から、*Pitx2* が左右非対称な器官形成を支配していることが明らかになっていた。本研究開始までに私は、*Pitx2* の左側特異的な発現が、イントロンに存在するエンハンサー(ASE)を介した Nodal シグナルによって開始し、*Nkx2* によって維持されるという段階制御されることを明らかにした(Shiratori et al, 2001)。さらに、*Pitx2* の左側特異的な発現のみが消失する *Pitx2* ASE 欠損マウスを作製し、*Pitx2* の左右非対称な器官形成における役割を明らかにした(Shiratori et al, 2006)。この *Pitx2* ASE 欠損マウスを利用し、*Pitx2* の下流の分子機構を解析することが、不明のまま残されている、左右非対称な形態形成機構を解明するために、最重要なことであると考えた。

研究の目的

Pitx2 の下流の分子機構を解明するために、私が作成した *Pitx2* ASE 欠損マウスを利用して、以下の一つの異なる視点から解析する。(1)器官形成機構の解析が進んでいる肺に注目し、その器官形成に関与する遺伝子を解析し、非対称な形態形成機構を解明する。

マウスでは、前腸の腹側から一次気管支が左右非対称に伸長し、さらに一次気管支の側面から伸長する二次気管支の数が左右で異なり、最終的に肺葉が左右非対称に形成する。気管支形成は気管支上皮と周囲の間葉組織の相互作用によるが、その左右非対称は、気管支上皮の伸長活性を持つ *Fgf10* が、一次および二次気管支伸長時に、*Pitx2* 発現中の間葉組織で左右非対称に発現した結果であると考えている。*Fgf10* は、一次気管支伸長時には左右対称な領域で非対称な強度で発現するが、二次気管支伸長時には左右非対称な

領域で発現する。*Pitx2* ASE 欠損マウスではこの *Fgf10* の発現の左右非対称性は無くなり、*Pitx2* による *Fgf10* の発現制御を示唆している。ただし、*Pitx2* による制御だけでは、*Fgf10* が二次気管支伸長時に個体差なく正確な場所でのみ発現する機構を説明できない。なぜ残された他の領域では発現しないのかについては、解明が不十分である。これまでの気管支伸長機構に関する研究の多くは非対称性決定以後を材料にしており、肺発生初期の遺伝子の発現様式は詳細に調べられていない。本研究では、*Fgf10* の一次および二次気管支伸長時における発現制御機構の解析を行い、*Pitx2* の関与を含めた、肺の左右非対称性形成機構を解明する。

(2)*Pitx2* の発現の非対称のみ明らかで、形態や機能的非対称性が不明である四肢の左右非対称性の解析。

Pitx2 の左右非対称なエンハンサーの活性を *LacZ* の発現で観察できる *Pitx2* ASE-*LacZ* トランスジェニック(Tg)マウスは、肢芽においても左側特異的な発現を示した。さらに RT-PCR では器官形成期の肢芽における *Pitx2* の mRNA の発現量が左右であった。また、*Pitx2* を含む BAC を用いて、その中の *Pitx2* のプロモーターの下流に *LacZ* を挿入した Tg マウス(*Pitx2* を含む 250kb の BAC を利用することで、より正確に *Pitx2* の発現を再現できている)でも、*Pitx2* ASE-*LacZ* Tg と同様の肢芽における左右非対称な発現を示した。これらのことから、*Pitx2* は肢芽においても左右非対称に発現していることを明らかにした。組織学的解析により、*Pitx2* ASE-*LacZ* Tg が筋肉、骨組織と間質の一部で非対称に発現していることも明らかにした。さらに、左右軸形成に必須な Nodal シグナルの伝達に必要な細胞外因子 Cryptic の欠損マウスでは、内臓器官同

様に肢芽の非対称な発現が消失し、ASE を介した Nodal シグナルによって制御されることも明らかにした。今後は、肢芽の形態的な非対称性を詳細に観察するとともに、非対称に発現する *Pitx2* の役割や、発現制御機構の解析を行う。その結果、四肢の左右非対称性やその意義を解明する。

(3)*Pitx2* の下流遺伝子のスクリーニングによる、器官の非対称性形成機構の網羅的な解析。

現在までに *Pitx2* が制御する遺伝子はいくつか同定されているが、全て *Pitx2* が左右対称に発現する下垂体原基や神経堤細胞などにおける下流遺伝子である(Kioussi et al, 2002; Quentien et al, 2002 など)。よって、左右非対称的な形態形成に関与する *Pitx2* の新規下流遺伝子を同定するため、*Pitx2* ASE 欠損マウスを使用し、野生型マウスと発現量に差のある遺伝子の探索を行った。本研究では、この探索によって得られた器官形成期に左右非対称に発現する遺伝子の機能解析を行う。その結果、網羅的に、左右非対称な器官形成機構を解明する。

(4)胚の左側と右側由来の各々の細胞が器官形成において、どのように寄与するのかを手がかりに、細胞生物学的に解析する。

左右非対称な器官形成において、胚の左側と右側由来の各々の細胞がどのように寄与するのかは重要な問題であり、正しく寄与することによって正常な器官は形成される。カエルの心臓やゼブラフィッシュの腸管では左右の細胞が入り組んで形成されていることが報告されているが(Ramsdell et al, 2005 and 2006; Horne-Badovinac et al, 2003)、マウスにおいては、心臓の AV cushion における私の報告しかない(Shiratori et al, 2006)。すでに作製している左側 LPM の細胞を特異的にマークする *Pitx2-Cre* Tg マウス、左右両側の

LPM の細胞を特異的にマークする *Cryptic-CreER*(Cre と Estrogen receptor の Fusion 蛋白質) Tg マウスを使用し、胚の左側と右側由来の細胞が各々の器官にどのように寄与するのかを解析する。さらに、*Pitx2* 変異マウスでの左側板中胚葉の細胞が寄与する領域の変化を解析し、*Pitx2* の役割を明らかにする手がかりとする。また、*Pitx2* が発現した細胞の系譜を追跡し、その細胞系譜と実際に *Pitx2* が発現する細胞領域を比較することで、*Pitx2* が発現した細胞が同じ細胞系譜でのみ発現を維持するのか 左側特異的発現が維持されている時期に、新規の細胞集団でも発現が開始するののかという *Pitx2* の器官形成期の発現制御機構やその意義を明らかにする。

研究の方法

(1)*Fgf10* の発現制御機構の解明

現在特定しつつある *Fgf10* の肺におけるエンハンサー中の左右非対称性を制御するシス配列を Tg マウスの手法を使って同定した。Tbx による発現制御を示唆する報告があることや、*Pitx2* による制御を予想していたので、これらの結合配列に点変異を導入してエンハンサー活性を調べた。

(2)四肢の左右非対称性の解析

形態学的に、野生型マウスの左右の比較、野生型マウスと *Pitx2* ASE 欠損マウスの比較を行った。本研究では、主に、四肢の主要成分である、骨・軟骨、筋肉、神経、血管について、*Pitx2-LacZ* Tg が発現している部位に注目して、非対称性を探索した。

(3)*Pitx2* の下流遺伝子のスクリーニングによる、器官の非対称性形成機構の網羅的な解析。

マイクロアレイを使って、野生型マウスと *Pitx2* ASE 欠損マウスの間で、発現量に差の

ある遺伝子を抽出した。抽出した遺伝子について、マウス胚での発現を観察した。

(4)左側と右側由来の細胞系譜の追跡

左 LPM 由来の細胞を追跡するための *Pitx2 ASE-Cre Tg* マウスや *Pitx2-CreER* を、*Cre* が発現した細胞の Lineage で *LacZ* を発現するレポーター *Tg* マウスと掛け合わせて実験した。レポーターの発現様式は、*Pitx2 ASE* 欠損マウス等の左右軸の変異マウスでも観察した。また、*Pitx2* が発現した細胞が同じ細胞系譜でのみ発現を維持するのか 左側特異的発現が維持されている時期に、新規の細胞集団でも発現が開始するのかという観点で、*Pitx2* が発現する細胞領域とも比較した。

研究成果

(1)*Fgf10* が肺原基に加え、心臓の流出路で左右非対称に発現していることを発見した。そして、その非対称性は *Pitx2* によって制御されていた。続いて、*Fgf10* の肺原基や心臓の流出路におけるエンハンサーとその発現の左右非対称性を制御する領域を同定した。その結果、*Fgf10* の肺原基と心臓の非対称な発現のためにほとんど同じ領域が必要なことが明らかになり、肺原基と心臓の両方の器官が同じ機構によって発現制御されていることが示唆された。次に、詳細な発現制御機構を解明するために、制御領域内の *Pitx2* 結合配列を探索した。その結果、種間で保存されている *Pitx2* 結合配列を発見した。そして、この配列が心臓の非対称な発現に必要であることを発見した。この結果は、*Fgf10* が、*Pitx2* によって直接的に制御されていることを示唆している。これまでに、*Pitx2* によって、直接的に左右非対称な発現を制御されている遺伝子は同定されておらず、*Pitx2* の下流シグナルを解明する手がかりとして、

大きな発見である。

(2)*Pitx2* は、肢芽の真皮、軟骨膜、軟骨、腱と筋組織中の *muscle connective tissue* で、左側特異的に発現していた。また、胚発生中の前肢の神経繊維で、左右非対称な領域を発見した。一方、*Pitx2* がこの非対称な神経の支配を受ける筋組織で特異的に発現していることを発見した。これらの発見は、マウスにおける四肢の形態や機能的左右非対称性、利き腕の確立機構の解明につながる発見である。

(3)*Pitx2* の下流遺伝子を探索するために、野生型と *Pitx2 ASE* 欠損マウスで発現量に差のある遺伝子を、マイクロアレイによって探索した。その結果、野生型で *Pitx2 ASE* 欠損マウスより発現量が多い遺伝子には、心臓特異的に発現する遺伝子群、*Pitx2 ASE* 欠損マウスで野生型より発現量が多い遺伝子には、細胞接着に関与する遺伝子群が多かった。これらは、*Pitx2* の下流遺伝子の候補であり、左右非対称な器官形成機構を解明する大きな手がかりとなった。

また、静脈系で左右非対称に発現する新規遺伝子を発見した。この遺伝子でコードされる蛋白質は、細胞内に局在する。これまで静脈系の左右非対称性の形成機能は不明であり、その解明の大きな手がかりとなる発見である。

(4)肢芽において、*Pitx2* が発現している細胞と左 LPM 由来の細胞を比較した結果、左 LPM 由来の細胞系譜でのみ発現を維持していることを発見した。また、*Pitx2* が発現した細胞は、野生型に比べて *Pitx2 ASE* 欠損マウスでは、広範囲に寄与することを発見した。この結果は、肢芽の左右非対称性や肢芽にお

ける Pitx2 の役割を解明する上で、大きな発見である。

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 1 件)
() Haemodynamics determined by the genetic programme govern asymmetric development of the aortic arch.

Kenta Yashiro, Hidetaka Shiratori, Hiroshi Hamada.

Nature. 450(7167), 285-8, 2007 査読有

[学会発表] (計 件)

() 白鳥 秀卓

「左右非対称な *Fgf10* の発現の発生時期における発現領域の変化とその制御機構」

遺伝情報 DECODE (転写研究会共催)・冬のワークショップ、 年 月 日、湯沢グランドホテル

() 白鳥 秀卓

「マウスにおける左右非対称な器官形成機構の網羅的解析」

第 回日本分子生物学会年会、第 回日本生化学会大会合同大会シンポジウム『左右非対称性の分子生物学』 年 月 日、神戸ポートアイランド

() 白鳥 秀卓

「左右非対称な臓器形成を支配する転写因子 Pitx2 の下流シグナルの解析」

遺伝情報 DECODE (転写研究会共催)・冬のワークショップ、 年 1 月 日、湯沢グランドホテル

[図書] (計 件)

() 白鳥 秀卓

秀潤社、「内臓器官の左右非対称な形態形成」細胞工学 2008 年 月号 特集「生物はなぜ

左右非対称なのか」 Vol.27(6), 588-593

[その他]

ホームページ等

<http://www.imcb.osaka-u.ac.jp/hamada/>

研究組織

() 研究代表者

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

() 研究分担者

無し

() 連帯研究者

無し