

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21247034

研究課題名（和文） Nodal と Lefty による胚のパターニング

研究課題名（英文） embryonic patterning by Nodal and Lefty

研究代表者

濱田 博司（HAMADA HIROSHI）

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：00208589

研究成果の概要（和文）：

1. 前後を決定する DVE 細胞の由来と役割を明らかにした。
2. 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た。
3. レチノイン酸応答配列が、発生のごく初期での Nodal 発現を制御している。
4. Nodal 活性を抑制する Cer12 がノード流に最も早く反応していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

1. We have clarified the origin and role of DVE in anterior-posterior patterning.
2. We have identified a number of FoxH1 target genes in the mouse embryo.
3. A retinoic acid-responsive enhancer regulates Nodal expression at the pre-gastrulation stage.
4. Cer12 is the earliest responding gene to the nodal fluid flow.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2010 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
総計	25,500,000	7,650,000	33,150,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学、発生生物学

キーワード：胚発生、Nodal シグナル、Lefty、胚葉形成、体軸形成

## 1. 研究開始当初の背景

TGFβ 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：哺乳動物における頭尾は、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確立する。遺伝学的な手法などを用いて、DVE/AVE 細胞の由来・形成される機構を明らかにする。DVE/AVE細胞の形成・細胞移動に必須である *Nodal* シグナルの作用機構を知るため、下記の(2)の方法により5.5 日胚で発現する *FoxH1* 標的遺伝子を探索し、その機能を明らかにする。

5. 5日胚で形成されたDVEを蛍光蛋白質で標識できるマウス（作製済み）を用いて、経時観察などにより、DVEの移動様式やその後の運命を調べる。(2) *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の探索・同定：*Nodal* シグナルは、転写因子 *FoxH1* によって核へと伝えられる。マウスとヒトで保存された *FoxH1* 結合配列 ATT(A/C)(A/C)ACA を持つ遺伝子を、マウスゲノム中に網羅的に探索した結果、約200個の遺伝子を同定した。今後各遺伝子について、野性型マウスにおける発現や *FoxH1* 変異マウスでの発現の変化の有無を調べる。さらには遺伝子改変マウスを作製して、胚のパターニングにおける役割を解析する。(3) レチノイン酸シグナルによる *Nodal* 遺伝子の発現制御：レチノイン酸を分解する三つの酵素（CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1）を欠損するマウスを調べたところ、囊胚形成前にパターニングの異常を示し、やがて複数の体軸を形成するに至る。その原因を追跡したところ、*Nodal* の発現異常が原因であった。すなわち、受精後6日目には胚の後方に限局すべき *Nodal* の発現が、CYP26A1/B1/C1欠損胚では胚全体へと拡

大していた。*Nodal* 遺伝子の近傍にレチノイン酸に応答するエンハンサー (RARE) を探索した所、哺乳類で高度に保存されたRAREが見つかった。今後は、*Nodal* 遺伝子に見出されたRARE配列(RAREn)の役割を調べる。(4) Cer11, Cer12による *Nodal* シグナルの制御：*Nodal* シグナルの活性や及ぶ範囲は胚の空間において極めて厳密に制御されているはずであるが、その制御機構は不明である。*Nodal* のシグナル範囲を抑制する因子の候補として、Cer2/Danteが考えられる。Cer2は、左右決定の局面においてノードで *Nodal* と共発現し、その蛋白質は *Nodal* と相互作用し *Nodal* の活性を抑制する事が知られている。しかし、Cer2の正確な作用機構は不明である。本研究では、Cer2の作用機構 (*Nodal* 蛋白質の翻訳後修飾・分泌・活性の、どのステップで抑制するのか?) を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) Cre を用いた遺伝学的標識法により、*Lefty1* を発現する細胞の系譜・DVE/AVE の起源を調べる。

(2) 転写因子 *FoxH1* の標的遺伝子の候補について、その発現パターンや変異マウスにおける発現の変化を調べる。

(3) RAREn 配列が反応するリガンドを同定し、RAREn を欠損する変異マウスを作成。表現型を解析する。

(4) ノード脇の crown cell における Cer12 タンパク質の局在、*Nodal* や GDF1 との相互作用を調べる。

## 4. 研究成果

(1) 胚盤胞で *Lefty1* を発現する細胞の運命を、CreERT2 による遺伝学的標識や経時観察により追跡したところ、受精後 5.5 日の DVE へと寄与する事が判った。また、同様

の方法で 6.0 日以降に出現する AVE は、これまでの考えとは異なり、DVE とは別の由来であった。DVE 細胞を除去すると、AVE が形成されたが、胚の遠位に留まったままで遊送しなかった（文献④、⑤）。これにより、頭尾の極性が胚盤胞期まで遡ることが判った。

(2) マウスゲノムにおいて、保存された FoxH1 結合配列を持つ約 150 の遺伝子について、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、これまでに 3 個の遺伝子が卵細胞～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。また、これらの遺伝子を条件的に欠損させることができる変異マウスを作製・入手した（未発表）。

(3) Nodal 遺伝子中の RAREn は母体由来のレチノイン酸に反応する。胚のレチノイン酸代謝酵素が欠損するとレチノイン酸濃度が上昇し、Nodal 遺伝子の過剰な発現を引き起こし、発生初期で致死になる（文献⑩）。RAREn を欠損するマウスを作成した（現在解析中）。Nodal 遺伝子に lacZ をノックインした BAC、および RAREn を失った BAC を用いて、RAREn に依存する発現部位を 2 カ所同定した（どちらも脳の特定の部位）。

(4) Cerl2 の発現パターンを経時的に観察した結果、水流に対して最も早く反応している遺伝子である事がわかった。左側のノード脇の細胞が水流に反応することで、Cerl2 mRNA の分解が促進されていた。すなわち、Cerl2 の左<右非対称な発現は、転写後のレベルで制御されていることになる。また、

Cerl2 の左<右非対称な発現が、ノードの両側での Nodal の活性を左>右にしていた（文献①、②、③、⑥、⑨）。

#### 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 14 件）

① Nakamura, T., Saito, D., Kawasumi, A., Shinohara, K., Asai, Y., Takaoka, K., Dong, F., Takamatsu, A., Belo, J.A., Mochizuki, A., and Hamada, H. (2012). Fluid flow and interlinked feedback loops establish left-right asymmetric decay of *Cerl2* mRNA in the mouse embryo. Nat.Communic.3:1322.

doi:10.1038/ncomms2319. 査読有

② Yoshiba, S., Shiratori, H., Kawasumi, A., Shinohara, K., Sasaki, G., Belo, J.A., Nonaka, S., Sasaki, H., Kuo, I., Ehrlich, B., Pennekamp, P., Dworniczak, B., and Hamada, H. (2012). Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. Science. 338:226-231. 査読有

③ Shinohara, K.,\* Kawasumi, A.,\* Takamatsu, A., Yoshiba, S., Botilde, Y., Motoyama, N., Reith, W., Durand, B., Shiratori, H. and Hamada, H. (2012). Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo. (\*equally contributed) Nature Commun. 3 : 622 査読有

④ Takaoka, K. and Hamada, H. (2012). Cell specification and axis formation in the mouse embryo (review). Development. 139:3-14. 査読有

⑤ Takaoka, K., Yamamoto, M. and Hamada, H. (2011). Origin and role of distal visceral endoderm, a group of cells that determines anterior-posterior polarity of the mouse embryo. Nat. Cell Biol. 13(7):743-752.

⑥Kawasumi, A., Nakamura, T., Iwai, N., Yashiro, K., Saijoh, Y., Belo, J.A., Shiratori, H. and Hamada, H. (2011). Left-right asymmetry in the level of active Nodal protein produced in the node is translated into the asymmetry in the lateral plate of mouse embryo. *Dev Biol.* 353:321-330. 査読有

⑦ Hashimoto, M. and Hamada, H. (2010). Translation of anterior-posterior information into left-right polarity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* (review) 20:433-437. 査読有

⑧ Hashimoto, M., Shinohara, K., Wang, J., Ikeuchi, S., Meno, C., Yoshida, S., Takada S., Hatta, K., Wynshaw-Boris, T., and Hamada, H. (2010). Planar polarization of the node cells determines the rotation axis of the node cilia. *Nat. Cell Biol.* 12:170-176. 査読有

⑨Oki, S., Kitajima, K., Belo, J.A., Yokoyama, T., Hamada, H.\* and Meno, C.\* (2009). Reversal of left-right asymmetry by aberrant Nodal signaling in the node of mouse embryos. (\*corresponding authors). *Development*, 136:3917-3925. 査読有

⑩ Uehara, M., Yashiro, K., Takaoka, K., Yamamoto M., and Hamada, H. (2009). Removal of maternal retinoic acid by embryonic CYP26 for correct *Nodal* regulation during early embryonic patterning. *Genes & Dev.* 23:1689-1698. 査読有

⑪Yamamoto 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

[学会発表] (計 20 件)

①Tetsuya Nakamura, Daisuke Saitoh, Kyosuke Shinohara, Dong Felang, Aiko Kawasumi, Atsuko Takamatsu, Jose Antonio Belo, Atsushi Mochizuki,

Hiroshi Hamada. “Asymmetric Flow is Converted to a Degradation of *Cer12* and Amplified by Interlinked Feedbacks Robustly in a Left-Right Axis of the Mouse Embryo” CDB Symposium; Quantitative Biology, 2012. 2. 26, RIKEN Kobe, Japan. ポスター発表

②中村哲也、川住愛子、Owen Tampilin, 斉藤大助、篠原恭介、高松敦子、望月敦史、濱田博司

「弱い水の流れを大きな左右非対称性に変換するしくみ」 定量生物学の会第4回年会、2012. 1. 7~9, 名古屋大学、ポスター発表

③中村哲也、斉藤大助、Owen Tampilin、川住愛子、篠原恭介、高松敦子、望月敦史、濱田博司「哺乳類が高い Canalization を達成する機構」 GSC セタミーティング 2011, 2011. 8. 25, 横浜理化学研究所、口頭発表&ポスター発表

④Katsuyoshi Takaoka, Masamichi Yamamoto, Hiroshi Hamada 「Origin and role of distal visceral endoderm, a group of cells that determines anterior-posterior polarity of the mouse embryo」 第44回発生生物学会、2011. 5. 18~21, 沖縄コンベンションセンター

⑤Botilde Yanick, 吉場聡子, 濱田博司 “ECLP regulates cilia formation and cilia-related signals in mouse embryo” 第44回発生生物学会、2011. 5. 18~21, 沖縄コンベンションセンター、ポスター発表

⑥吉場聡子, 白鳥秀卓、川住愛子、篠原恭介、Jose Belo、中井淳一、野中茂紀、佐々木洋、Ivana Kuo, Barbara Ehrlich、Petra Pennekamp、Bernd Dworniczak、濱田博司

“Polycystin-2 mediates flow-derived signal to establish left-right asymmetry

at the edge of the node”. 第 44 回発生生物学会、2011. 5. 18～21, 沖縄コンベンションセンター、ポスター発表

⑦川住愛子、中村哲也、岩井なおみ、八代健太、西條幸男、Jose Belo、白鳥秀卓、濱田博司 “Left-right asymmetry in Smad2/3 phosphorylation in the node of mouse embryo is translated into (correlates with) asymmetry in the lateral plate” 第 4 4 回発生生物学会、2011. 5. 18～21, 沖縄コンベンションセンター、ポスター発表

⑧Katsuyoshi Takaoka, Hiroshi Hamada ‘Origin of Anterior-Posterior axis in the mouse embryos’ From Oocyte to Embryo: Workshop on Early Mammalian Embryogenesis 2010. 9. 7～8, Warsaw, Poland

⑨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」日本発生生物学会 第 4 3 回大会、2010. 6. 20～23, 京都

⑩篠原恭介、高松敦子、橋本昌和、吉場聡子、川住愛子、濱田博司 「マウス初期胚ノード繊毛の可視化計測」日本機械学会 流体工学部門会、2009. 11. 7～8, 名古屋工業大学

⑪Aiko Kawasumi, Naomi Iwai, Jose Antonio Belo, Tetsuya Nakamura, Hidetaka Shiratori, Hiroshi Hamada “Mechanisms of left-right asymmetric signal generation around the node” The 16th International Society of Developmental Biologists Congress. 2009. 9. 2～6, Edinburgh, Scotland

⑫Masakazu Hashimoto, Shingo Ikeuchi, Kyosuke Shinohara, Shigenori Nonaka, Anthony Wynshaw-Boris, and Hiroshi Hamada. “Cell polarity in the node for basal body positioning and nodal flow” The

16th International Society of Developmental Biologists Congress.

2009. 9. 2～6, Edinburgh, Scotland

⑬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」第 4 2 回日本発生生物学会大会 2009. 5. 28～31, 新潟トキメッセ

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱田 博司 (HAMADA HIROSHI)  
大阪大学・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・生命機能研究科・准教授  
研究者番号：90362590