

体の左右非対称性が生じる機構

濱田 博司

(大阪大学細胞生体工学センター 教授)

1. 研究目標

体が正しく作られるための設計図の最も基本になるのは、三つの体軸（頭尾、背腹、左右）の決定である。脊椎動物は、心臓・脾臓・胃など多くの左右非対称な臓器を有するが、これは胚発生の過程でどのような機構（分子）で決定されているのか？ 左右軸決定の機構は、発生学の領域において未だ殆ど手を付けられていない問題であり、数年前までその分子機構は全く不明であった。我々は最近、*lefty*と呼ぶ胚の左側半分のみで発現される新規TGF β superfamilyを同定した（文献1）。様々な点から*lefty*は左右軸の決定で中心的役割を果たすMorphogenであると予想され、左右軸を決定している遺伝子プログラムを解明するための絶好の突破口となると予想された。本研究では、*lefty*を突破口として、左右の位置情報の伝達・確立機構を分子レベルで明らかにしようとした。具体的な研究目標は以下の通りである。

- 1) 遺伝学的手法によって、左右軸決定における*lefty*の役割を調べる。
- 2) *Lefty*の持つ誘導活性・作用機構を解析する。
- 3) *Lefty*蛋白質に対する受容体を同定し、位置情報の伝達機構を解析する。
- 4) *lefty*遺伝子自身の発現制御領域を解析し、左右非対称な発現をもたらす機構を決定する。

2. 研究成果

左右非対称な形態は、大きく分けて4つのステップを経て生じると考えられる（図1）：1. ノードにおける非対称性の出現， 2. ノードから側板へのシグナルの伝達， 3. 左の側板でのシグナル因子（Nodal, *Lefty*）の発現， 4. Nodalによって誘導される転写因子*Pitx2*を介した非対称な形態形成。我々のこれまでの研究は、主にシグナル因子の役割りや発現制御についてなされてきた。

1) 2つの類似した*lefty*遺伝子 (*lefty-1*, *lefty-2*) の存在

当初単離した*lefty*は単一の遺伝子と思われたが、その後の解析により、マウスにおいては2つの類似した遺伝子が存在することが判り、*lefty-1*, *lefty-2*とした。二つの遺伝子は同一染色体に隣接していた。両者ともに左側に非対称に発現するが、発現部位が異なった；*lefty-1*は主に予定神経基板，*lefty-2*は主に側板中胚葉（文献1， 2）。

2) 左右の決定における*lefty1*, *lefty-2*の役割

lefty-1, *lefty-2*それぞれを欠損するノックアウトマウスを作製し、それら変異マウスの形質を解析した（近藤壽人博士らとの共同研究）。*lefty-1*欠損マウスの解析の結果、i) この遺伝子が確かに左右の決定に必須であること， ii) そしてその役割は、他の左右決定因子が正中線を越えて拡散することを防ぐためのバリアーとして働くこと， iii) 体の左を決定する因子はNodalであること，などが判った（文献3）。一方，*lefty-2*ヌル変異マウスは過剰な中胚葉を形成し、発生初

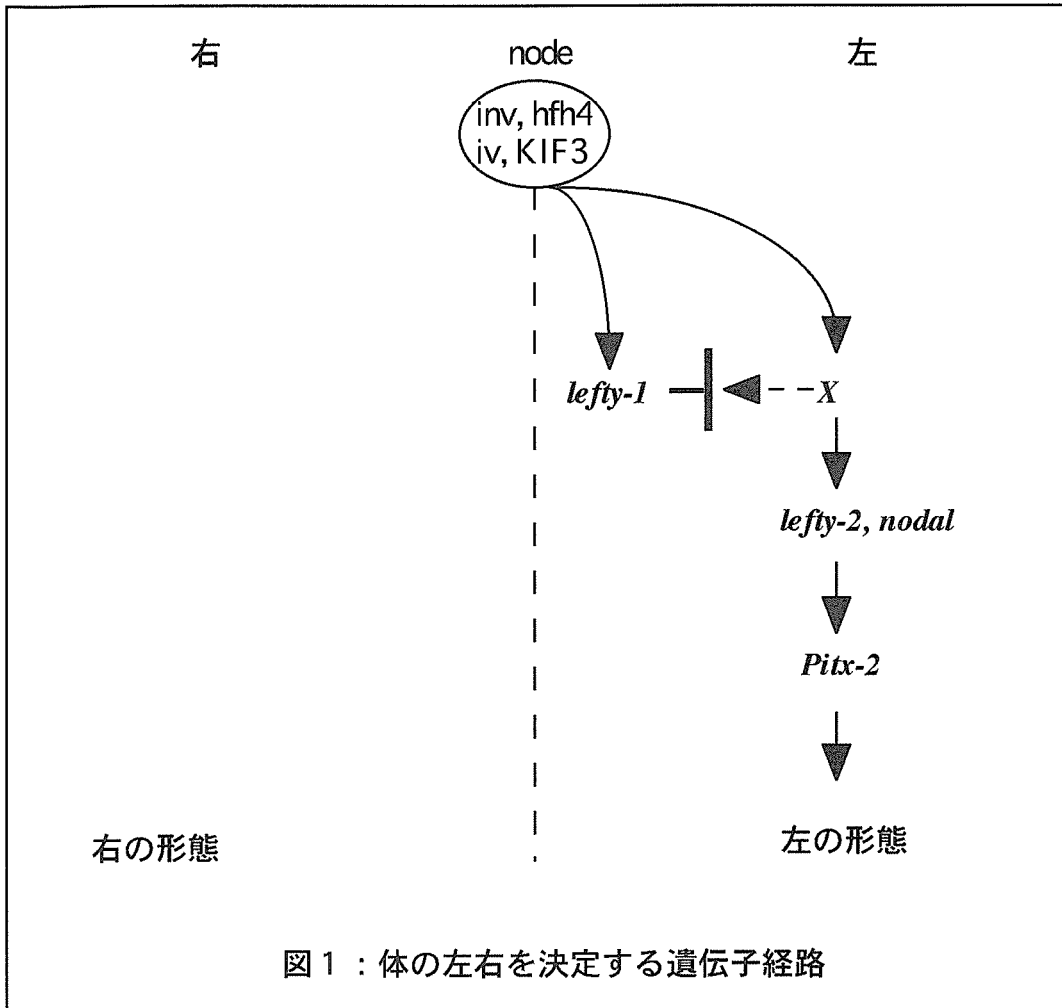


図1：体の左右を決定する遺伝子経路

期に致死となった。この結果より，Lefty2はNodalのantagonistとして働いていることが示唆された（文献8）。

3) Nodal, Lefty蛋白質の作用機構

Nodal, Lefty蛋白質の作用機構を生化学的に解析した結果，NodalはALK4, ActRIIA/Bを受容体としてシグナルをtransduceするが，LeftyはActRIIA/Bに競合的に相互作用することによりNodalのシグナルをブロックすることが判った（佐久間ら，未発表）。

4) Nodalによって誘導される転写因子Pitx2

Pitx2と呼ばれるホメオドメインをもつ転写因子は非対称な臓器の原基に広く発現されており，NodalあるいはLefty2の作用を仲介している重要な転写因子である事が予想された（文献4；野地澄晴氏らとの共同研究）。そこで，Pitx2の誘導機構を知るため，Pitx2遺伝子の発現制御領域をTransgenic mouseの系で探索した。その結果，Pitx2の非対称な発現はNodalによって直接誘導された後Nkx2と呼ばれる転写因子によって維持されていることが判った（文献14）。

5) lefty-1, lefty-2, nodalの左右非対称な遺伝子発現の制御機構

leftyは，どのような機構で左側だけに発現されるのか？ この点を知るため，これまでトランスジェニック・マウスの実験系を用い，lefty-1, lefty-2, nodalという三つの遺伝子の発現制御領域を解析した。その結果，lefty-2とnodalは左側特異的なエンハンサーにより制御されている

が、*lefty-1*は右側特異的なサイレンサーにより制御されていることが判った（文献6，文献7）。また、*lefty-2*，と*nodal*については，左側特異的なエンハンサーを狭い範囲（350bp，250bp）に決定した。両者のエンハンサーには10bpの共通配列が2カ所ずつ存在し，変異解析などの結果，この塩基配列が必要かつ充分であることがわかった。この塩基配列を認識する転写因子を，酵母Two-hybrid法を用いてクローニングした。得られた転写因子FASTは，確かに*lefty-2*と*nodal*の制御に関与することが判明した（文献10，文献15）。

6) ヒト*lefty*遺伝子

ヒトの*lefty*遺伝子を探索した結果，二つの機能的遺伝子と一つの偽遺伝子を同定した。マウスと同様に，これらの遺伝子は同一染色体に隣接していた。各々の転写制御領域の解析の結果，一方が*lefty-1*，他方が*lefty-2*に相当する事が判った（文献12）。

3. 今後の問題・展望

体の左右を決定する分子機構に関する研究は，ここ数年で急速に発展し，多くの重要な知識をもたらした。我々は，以上に述べた研究により，体の左右を決定する重要な局面を明らかにすることができた。今後は，左右の決定・非対称な臓器形成の全課程のさまざまな局面に焦点をあて，その制御機構を解明することにより，左右を決定する遺伝子プログラムの全体像に迫りたい。これにより，広く体軸が決定される機構についての，新しい原理が見つかることを期待する。

4. 文献

- 1) Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, Y., Yokoyama, M., Toyoda, Y. and Hamada, H. (1996). Left-right asymmetric expression of the TGF β -family member *lefty* in developing mouse embryo. *Nature* 381: 151-155.
- 2) Meno, C., Ito, Y., Saijoh, Y., Matsuda, Y., Tashiro, K. and Hamada, H. (1997). Two closely-related left-right asymmetrically-expressed genes, *lefty-1* and *lefty-2*: Their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos. *Genes Cells* 2: 513-524.
- 3) Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H. and Hamada, H. (1998). *lefty-1* is required for left-right determination as a regulator of *lefty-2* and *nodal*. *Cell* 94: 287-297.
- 4) Yoshioka, H., Meno C., Koshiba, K., Sugihara, M., Itoh, H., Ishimaru, Y., Inoue, T., Ohuchi, H., Semina, E.V., Murray, J.C., Hamada, H. and Noji, S. (1998) *Ptx2*, a bicoid homeobox gene, is involved in a Lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* 94: 299-305.
- 5) Mochizuki, T., Saijoh, Y., Tsuchiya, K., Shirayoshi, Y., Takai, S., Taya, C., Yonekawa, H., Yamada, K., Nihei, H., Nakatsuji, N., Overbeek, P., Hamada, H., Yokoyama, T. (1998). Cloning of *inv*, a gene that controls left-right asymmetry and kidney development. *Nature* 395: 177-181.
- 6) Saijoh, Y., Adachi, H., Mochida, K., Ohishi, S., Hirao, A., and Hamada, H. (1999) Distinct transcriptional regulatory mechanisms underlie left-right asymmetric expression of *lefty-1* and *lefty-2*. *Genes Dev.* 13: 259-269.
- 7) Adachi, H., Saijoh, Y., Mochida, K., Ohishi, S., Hashiguchi, H., Hirao, A., and Hamada, H. (1999) Determination of left-right asymmetric expression of *nodal* by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a *lefty-2* enhancer. *Genes Dev.* 13: 1589-1600.
- 8) Meno, C.,* Gritmann, K.,* Ohfuji, Y., Heckscher, E., Ohishi, S., Mochida, K., Shimono, A., Kondoh, H., Talbot, W., Robertson, E.J., Schier, A.F. and Hamada, H. (1999). Mouse Lefty2 and zebrafish Antivin are feedback inhibitors of Nodal signaling during vertebrate gastrulation. (*equally contributed) *Mol. Cell* 4: 287-298.

- 9) Okada, Y., Nonaka, S., Tanaka, Y., Saijoh, Y., Hamada, H., and Hirokawa, N. (1999). Abnormal nodal flow precedes *situs inversus* in *iv* and *inv* mutant mice. *Mol. Cell* **4**: 459-468.
- 10) Saijoh, Y., Adachi, H., Sakuma, R., Yeo, C.-Y., Yashiro, K., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Yashiro, K., Kawabata, M., Miyazono, K., Whitman, M. and Hamada, H. (2000). Left-right asymmetric expression of *lefty2* and *nodal* is induced by a signaling pathway that includes a transcription factor FAST2. *Mol. Cell* **5**: 35-47.
- 11) Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Tao, H., Thisse, B., Thisse, C., Wright, C.V.E., Hamada, H., Ohuchi, H., and Noji, S. (2000). Asymmetric expression of *antivin/lefty1* in the early chick embryo. *Mech. Dev.* **90**: 115-118.
- 12) Yashiro, K., Saijoh, Y., Sakuma, R., Sakai, Y., Tomita, N., Matsuda, Y., Okada, S., Monden, M. and Hamada, H. (2000). Distinct transcriptional regulation and phylogenetic diversity of human *LEFTY* genes. *Genes Cell* **5**: 343-357.
- 13) Osada, S., Saijoh, Y., Frisch, A., Yeo, C.-Y., Adachi, H., Watanabe, M., Whitman, M., Hamada, H., and Wright, C.V. (2000) . Activin/Nodal responsiveness and asymmetric expression of *Xenopus nodal*-related gene converge on a FAST-regulated module in intron 1. *Development* **127**: 2503-2514.
- 14) Shiratori, H., Sakuma, R., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Mochida, K., Nishino, J., Sakai, Y., Saijoh, Y., Whitman, M. and Hamada, H. (2001). Two step regulation of asymmetric *Pitx2* expression: Initiation by Nodal signaling and maintenance by *Nkx2*. *Mol. Cell* **7**: 137-149.
- 15) Yamamoto, M., Meno, C., Sakai, Y., Shiratori, H., Mochida, K., Ikawa, Y., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2001) A transcription factor FoxH1/FAST mediates Nodal signaling during antero-posterior patterning and node formation in the mouse. *Genes & Dev.* in press