

■原 著■ 2004 年度神奈川県大学総合理学研究所共同研究助成論文

アフリカツメガエル胚右側板中胚葉における Nodal シグナリングの活性化は内臓左右軸を逆転する

豊泉龍児¹ 茂木和枝^{2,4} 日野晶也¹ 小笠原 強^{1,3} 竹内重夫¹

The potentiation of Nodal signaling in the right lateral plate mesoderm
inverts the left-right specification of the internal organs.

Ryuji Toyozumi¹, Kazue Mogi^{2,4}, Akiya Hino¹,
Tsuyoshi Ogasawara^{1,3} and Shigeo Takeuchi¹.

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science

² Research Institute for Integrated Sciences, and

³ High-tech Research Center, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City Kanagawa,
259-1293, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: toyo-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: In *Xenopus*, multiple *nodal*-related genes are expressed during early embryogenesis. Among them, only *Xenopus nodal related-1* (*Xnr-1*) is expressed unilaterally in the left lateral plate mesoderm (LPM) at the late neurula-early tailbud stage. Early studies report that ectopic administration of *Xnr-1* in the right hemisphere at the cleavage stage alters the left-right specification of the heart and visceral organs, or else makes a secondary axis. However, because *Xnr-1* and other *Xnrs* function already at the blastula-gastrula stage, it is very difficult to evaluate the correct timing of the effects of excessively administered *Xnr-1* from such a method. To elucidate the essential role of *Xnr-1* within the left LPM, ectopic potentiation of Nodal signaling in the right lateral plate mesoderm was performed. Right-side injection of Nodal protein changed the laterality of *Xnr-1* and *Xenopus pitx2*, but *lefty*, and fully (more than 90%) reversed the situs of the internal organs. Polyethyleneimine-based gene transfer of *Xnr-1* mRNA in the right LPM also changed the laterality of *pitx2* and fully (more than 90%) reversed the situs of the internal organs. Taken together, the potentiation of *Xnr-1* signaling in the right LPM induces *pitx2* in the right side and fully inverts the left-right axis of the heart and visceral organs, suggesting that the right LPM can transduce Nodal signaling, and only the absence of the *Xnr-1* ligand silences the Nodal signaling in the right LPM. Normal left-right balance of *Xnr-1* signaling is needed for the normal left-right specification of the internal organs.

Keywords: *Xenopus laevis*, left-right asymmetry, neurula, *Xnr-1*, *pitx2*, microinjection

序論

TGF- β superfamily に属する分泌因子 Nodal は、脊椎動物の中内胚葉形成、頭尾軸形成、神経形成などの局面で重要な役割を果たす^{1,2)}。マウス胚やニトリ胚では、*nodal* は原条胚の node/organizer 領域において左側に偏って発現し、体節期胚の側板中胚葉においては左側のみで発現する³⁻⁵⁾。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 胚の *nodal* 相同遺伝子は、現在までに 6 種類が同定されているが、左右非対称な遺伝子発現を示すことが報告されているのは *Xnr-1*

のみである^{6,7)}。*Xnr-1* は、胞胚の植物極側やオルガナイザー領域の原口背唇部で発現した後、後期神経胚期から左側板中胚葉に発現し、右側板中胚葉には発現しない^{6,8)}。

上記の発現パターンと他の脊椎動物胚の *nodal* 相同遺伝子に関する知見から、*Xnr-1* はツメガエル胚の左右軸形成のプロセスで重要な役割を果たすと期待される。卵割期ツメガエル胚の右側割球に *Xnr-1* を発現するベクターを導入すると内臓逆位が生じる

ことが⁹⁾、*Xnr-1*が左右軸形成において機能していることの主要な根拠となっているが、この実験にはいくつかの問題点がある。

(i) *Xnr-1*の属するTGF- β superfamilyのリガンド-受容体間は広範な親和性を有し、その相互作用は複雑多岐にわたるため¹⁰⁾、過剰発現実験のみから*Xnr-1*の機能を調べることは出来ない。過剰発現した*Xnr-1*リガンドが、(左右性決定に関する)真の内在性リガンドである他のTGF- β superfamilyのリガンド(例えばActivin)の機能をmimicしている可能性が考えられる。一方、Vg1, Activinリガンドの右割球注射による過剰発現実験においても、*Xnr-1*同様に高頻度の内臓逆位を誘起するため¹¹⁾、これらのリガンドが、真の内在性左右軸決定因子*Xnr-1*の活性をmimicした可能性も考えられるためである。即ち、いずれのリガンドが本物であるかについて、過剰発現実験からは判断出来ないのである。

(ii) *Xnr* familyのリガンドはオルガナイザー形成や中胚葉分化に重要な役割を果たすため、過剰発現させた*Xnr-1*がオルガナイザー形成期の左右性決定機構に影響したのか、それ以降の発生段階の左右性決定機構に影響したのかについて、卵割期実験からは明らかにできない。

(iii) *Xnr-1*の過剰発現実験では高頻度で奇形や二次軸が生じることが報告されており^{8, 9, 12, 13)}、Sampathらの実験では奇形を逃れた胚の左右性について集計している⁹⁾。そのため、Sampathらの実験からは奇形を原因として派生的に内臓逆位が生じている懸念を払拭出来ない。

我々は、ツメガエル胚の左右軸形成機構を明らかにするためには、*Xnr-1*の果たす役割を、特に原腸形成後の神経胚を対象とした実験操作をもとに、多角的に検討する必要があると考えた。本研究は、右側板中胚葉に、Nodalタンパク質を過剰投与したり*Xnr-1* mRNAを遺伝子導入して異所的に発現させることで、左右側板間でのNodalシグナリングのバランスを無処理胚のそれと逆転させることを行った。これらの実験を通じて、*Xnr-1*の左側特異的な発現が、*Xnr-1*よりも後期に左側板特異的に発現する*lefty* (*antivin*), *pitx2*¹⁴⁻¹⁷⁾の発現の側性に及ぼす影響や内臓の左右性に及ぼす影響について調べた。本研究においては、上記の問題点のうち、(ii)と(iii)に対する考察を得ることを目的として、*Xnr-1*の原腸形成期までの発現に影響しない、神経胚期以降の胚の側板中胚葉の左右性分化に着目して実験を行った。尚、上記の問題点のうち、(i)については、*Xnr-1* mRNAに相補的なantisense oligonucleotideを用いて研究を行い、その予備的な結果について、文

献¹⁸⁾に報告している。

材料と方法

gonadotrophinを注射したアフリカツメガエル雌雄成体のペアから有精卵を得て、2細胞期から初期胚期までの間に2.5%チオグリコール酸溶液(pH8.4-8.6)で脱ゼリーし、15-26°Cで飼育して、初期神経胚期～後期神経胚期(stage 13/14~17/18)、神経管期(stage 19/20)、または初期尾芽胚期(stage 21-26)に達した段階で注射実験に用いた。発生段階の同定は、NieuwkoopとFaberの1967年の発生段階表に従った。

注射に用いた胚は、2本のピンセットで透明なchorionを除去し、10% Steinberg氏液を満たしたテラサキプレート(住友ベークライト製)のwellの中に並べた。Drummond社製の微量注射器『Nanoject』を用いて、胚を側面から見た時の中心にあたるポイントの皮下に、タンパク質溶液を微量注射した。テラサキプレートのwell内で、hair loopを用いて胚の側面中央を注射針に対して浅い角度を保つように押さえ、表皮に対して非常に浅い角度で注射針を刺すことで、溶液を主に表皮と側板中胚葉との間に注入することが出来た¹⁹⁾。

タンパク質溶液は、注射後に注射した側の左右にミスがないかをチェックする目的で、10:1の比率で生体染料である10% Nile Blue溶液(和光純薬製)と混合してから注射に用いた。組換え型マウスNodalタンパク質(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)は、0.2-200 μ g/mlの濃度で5または25nlを左もしくは右側板中央に注射した(胚が伸長して尾芽胚になるとやや前方に色素が位置する)。Nodalタンパク質の投与量は、0.001-10ngとした。注射位置は、神経胚を横から見て側板中央とした。注射胚が尾芽胚期に達してから、注射した側の左右を間違えていないかについてNile Blue色素のスポットをもとに判定した。対照実験として、分子量分画した1%ウシ血清アルブミン(BSA fraction V; Sigma社)を5nlまたは25nl注射した。

微量注射後、胚を0.1% BSAを満たした24穴のポリスチレン製浮遊培養用テストプレート(岩城硝子製)に1穴につき1匹ずつ静置し、発生段階41-42に達するまで18-26°Cで飼育した。内臓の左右性の判定は、主にstage 41-42で行い、内臓逆位率の算出方法は、文献²⁰⁾の方法に従った。腸管の左右性の判定の際には、臍臓の位置も参考にした。胚の前後軸、背腹軸に沿った形態形成に対する、注射したタンパク質の影響を調査するために、すべての胚について、dorso-anterior index (DAI; Kao and Elinson,

1988) を記録した。

比較のために、Activin B (ウシ組換えタンパク質、和光純薬)、fibroblast growth factor (FGF)-8 (マウス組換えタンパク質、R&D 社/ ヒト組換えタンパク質、Pepro Tech 社)、FGF-10 (マウス組換えタンパク質、R&D 社/ ヒト組換えタンパク質、Pepro Tech 社)、insulin-like growth factor (IGF)-I (ヒト組換えタンパク質、Pepro Tech 社)、IGF-II (ヒト組換えタンパク質、Pepro Tech 社)、platelet derived growth factor (PDGF) (ヒト組換え PDGF-AA, R&D 社)、vascular endothelial growth factor (VEGF) (ラット組換えタンパク質、R&D 社)、growth/differentiation factor (GDF)-6 (マウス組換えタンパク質、R&D 社)、GDF-8 (マウス組換えタンパク質、R&D 社)、BMP-3 (ヒト組換えタンパク質、R&D 社) の各タンパク質溶液も注入した。これらのタンパク質のうち、FGF-8 は 1 胚あたり 250 pico-gram (pg) あるいは 500pg で、他のタンパク質は 500pg 以上の投与量を注射した。

***Xnr-1* mRNA の神経胚側板細胞への導入**

Xnr-1 全長が挿入された pBluescript SK (恵与された cDNA) を、制限酵素 XhoI を用いて、37°C で 60 分間 incubate し 直鎖 DNA にした。これを template DNA として用いるため、1 μ g/ μ l に濃度を調整した。Capping された *Xnr-1* mRNA は、mMESSAGE mMACHINE™ (Ambion Co.) と T₃ polymelase を用いて、37°C で 60 分間、*in vitro* で合成した。合成された mRNA をエタノール沈澱として回収後、RNase-free 水 15 μ l に溶解した (ストック溶液の濃度は 0.85 μ g/ μ l となった)。

RNase-free の 1.5ml エッペンチューブを用意し、*Xnr-1* mRNA のストック溶液から 1.2 μ l を取り、5% glucose を含む Marc's Modified Ringer's solution (MMR; 0.1M NaCl, 2mM KCl, 1mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 5mM HEPES, 0.1mM EDTA, pH7.4) 8.8 μ l に溶解した。*Xnr-1* の mRNA の濃度は 1 μ g/10 μ l となった。

polyethyleneimine などのカチオン性物質を用いた遺伝子導入の場合、カチオン性物質に DNA/RNA を吸着させるため、両者の混合比が重要であるとされる。polyethyleneimine として、*in vivo*-jet PEI (Polytransfection 社) を用いた。*in vivo*-jetPEI 溶液の量と DNA/RNA の量のイオンバランスの値 (N/P 値) は、N/P=5-10 が最適とされ、Polytransfection 社プロトコルに記された DNA/RNA の量 (μ g) \times 3 \times (N/P 値) μ \div 150 の計算式より、N/P 値を 10 として添加する *in vivo*-jetPEI 溶液の最適量を割

り出した。1(μ g) \times 3 \times (10) \div 150 = 0.2 μ l。すなわち、1 μ g の RNA 量に対して *in vitro*-jetPEI 溶液を 0.2 μ l 添加すれば良いことが分かった (*in vivo*-jetPEI 溶液の原液は 150mM であった)。

in vivo-jetPEI 溶液 1 μ l を 49 μ l の MMR 溶液に溶解した。ピペッティングしてよく混合させた後に 10 μ l を取り、これを 1 μ g/10 μ l の *Xnr-1* mRNA 溶液中に添加して、ピペッティングしてよく混合した。*Xnr-1* mRNA 量と *in vivo*-jetPEI 溶液の量は N/P=10(最適値)となる 1 μ g と 0.2 μ l になった。*Xnr-1* mRNA 溶液の最終濃度は 1 μ g/20 μ l、すなわち 50mg/ml となり、沈澱を生じる濃度となる 500 μ g/ml よりも低濃度であった。この *Xnr-1* mRNA + *in vivo*-jet PEI 溶液を、室温で 15 分間 incubate した。再度よく混合してからテラサキプレートに *Xnr-1* mRNA - jetPEI 混合溶液を移した。

初期-後期神経胚の右側面あるいは左側面に、10-50nl ずつ混合溶液を注射して、14-15°C で overnight 培養した。翌日には注射胚は stage 24-28 になっていたため、その後は 24°C に温度を変更して培養した。stage 42 に到達したところで内臓の左右性を判定した。*in vivo*-jet PEI 溶液を用いた場合、DNA/RNA が細胞内に浸透するためには 12-48 時間が必要なので、注射直後の胚の培養温度は翌日までは 14-15°C と低く設定した。

Wholemount *in situ* hybridization

Xnr-1 の全長配列を含む cDNA は、Washington 大学の Randall T. Moon 博士から恵与された。*Xenopus lefty-related factor antivin (Xatv)* の cDNA は、Christopher V. E. Wright 博士から恵与された。*Xenopus pitx2c (pitx2)* の cDNA は、Salk 研究所の Juan Carlos Izpisua Belmonte 博士から恵与された。

Nodal タンパク質や *Xnr-1* mRNA を微量注射したことが、左側板における *Xnr-1* の発現にどのような影響を及ぼしたのかを知るために、微量注射実験に用いた胚を初期尾芽胚期まで培養し、digoxigenin で標識した *Xnr-1* に相補的な cRNA プローブを作成し、wholemount *in situ* hybridization を行った。プローブ作成には、*in vitro* transcription のためのキット (Riboprobe *in vitro* Transcription System; Promega Co.) と digoxigenin 標識 dUTP を含んだ dNTP 溶液 (DIG RNA Labelling Mix; Roche Co.) を用いた。また、*Xnr-1* の発現開始よりも後の発生段階において左側板中胚葉に発現する 分泌因子 *lefty*、転写因子 *pitx2* の mRNA 発現を、digoxigenin で標識した *lefty*、*pitx2* に相補的な cRNA を

プローブとして、同じく wholemount *in situ* hybridization 法で調べた。コントロール染色には、sense RNA probe を digoxigenin 標識して用いた。*Xnr-1*, *lefty* については、左右非対称に側板に発現する stage 24-26 の初期尾芽胚期で、*pitx2* については stage 28-30 の尾芽胚期で固定して染色した。

胚の固定は MEMFA (2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄ and 4% formaldehyde を含む 0.1M MOPS (pH 7.4 with NaOH)) を用いて 室温で 1 時間行い、TBST で洗浄後、メタノールで脱水し、-20℃のメタノール中で 染色に用いるまでストックした。wholemount *in situ* hybridization は、Harland (1991) の方法を微修正して用いた²¹⁾。cRNA プローブのハイブリダイズ後の洗浄は、胚の発生段階や用いるプローブによって SSC 溶液の stringency を変えて行った。BM purple 発色後は、0.1% Tween 20 を含むリン酸緩衝 saline (PBS-) で洗浄し、50% glycerol で透徹後、あるいは透徹せずに写真撮影した。染色後の胚は、4% ホルマリン/PBS-溶液で保存した。

結果

神経胚の右側面への Nodal タンパク質の注射は、内臓の左右性を高頻度で反転させ、左側板特異的な遺伝子発現を変化させる

Nodal タンパク質を 神経胚の片側の側板中央に注射することで、原腸形成や中胚葉誘導が行われた後の発生段階である 神経胚における左右性決定に Nodal シグナルの左右のバランスが関与するか否かについて調べた。2.5-5ng の Nodal タンパク質を stage 13-18 の神経胚の側面中央に皮下注射したところ、100%近い頻度で内臓逆位が誘起された (図 1, 表 1a)。

Nodal タンパク質を野生型の胚に注射することで 100%近い頻度で内臓逆位を誘起したという報告は、全脊椎動物を通じて 本研究が初めてのものである。一方で、神経胚の左側面に Nodal タンパク質を注射しても、内臓逆位は殆ど生じなかった (図 1, 表 1b)。左側に発現する遺伝子の側性は、投与された Nodal タンパク質の効果で変更された。図 2b, d は、100% 近い内臓逆位が生じる条件で Nodal タンパク質を右側面に投与した際の、遺伝子発現の左右性の変化を示したものである。*Xnr-1* と *pitx2* の側性は、Nodal タンパク質の右側への投与の結果、著しく変更され、右側に発現する胚が多くなったが、多くの胚では 左側での本来の発現も保持されていた。

Xnr-1 よりも *pitx2* の発現の方が、右側板の方に発現の強い側がシフトするケースが多かった (図 2d)。一方、左側板における *lefty* の発現は 右側に Nodal

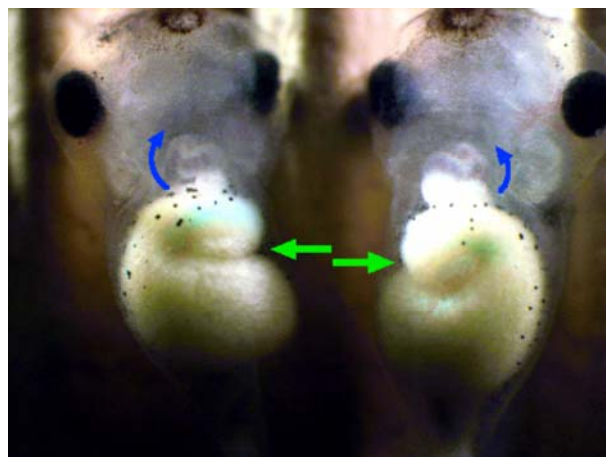


図 1. Nodal タンパク質の中期神経胚側板への皮下注射が内臓左右性に及ぼす効果。左胚は、左側板に 5ng の Nodal タンパク質を注射した後の stage 42 の胚内臓の左右性や形態は正常である。右胚は、右側板に Nodal タンパク質を同じ条件で注射した stage 42+ の胚で、左胚とは異なり、心臓と腸管の両方で逆位が観察される。

表 1. Nodal タンパク質を中期神経胚の左または右側面に注射した際の生存率と濃度依存的に生じた内臓逆位の発生率。

a. Nodal protein injection (5ng, right-sided injection)

stage	Survival of the injected embryos	Total incidence of L-R reversal	L-R reversal of both heart and gut	L-R reversal of heart-alone	L-R reversal of gut-alone
13-14	100 65/65	91 59/65	38 25/65	45 29/45	8 5/65
15-16	97 116/120	92 107/116	53 61/116	28 33/116	11 13/116
17-18	100 77/77	91 70/77	30 23/77	52 40/77	9 7/77
19-20	100 61/61	87 53/61	26 16/61	54 33/61	7 4/61
21-22	83 50/60	22 11/50	6 3/50	16 8/50	0 0/50
23-24	100 37/37	3 1/37	3 1/37	0 0/37	0 0/37
25-26	98 47/48	2 1/47	0 0/47	2 1/47	0 0/47

Upper, %. Lower, inverted/survived.

b. Nodal protein injection (stage 15-16)

Dose (ng)	5ng	2.5ng	1ng	0ng
	Upper, %. Lower, inverted/survived.			
Right	92 107/116	100 24/24	57 20/35	0 0/63
Left	2 2/86	0 0/24	0 0/24	-

90%以上の胚が、1-5ng の Nodal タンパク質注射を経ても、左右性判定時の 4 日胚まで生存していた。右側注射の場合には、心臓と腸管は、ともに高頻度で内臓逆位を示しており、Nodal のシグナル伝達経路が内臓器官の左右性を決めるメカニズムに関与していると考えられる。

タンパク質を注射しても変化しなかった (図 2d)。これらの観察結果にもとづき、右側面に皮下注射した Nodal タンパク質は 右側板において *Xnr-1* 発現を誘導し、誘導された *Xnr-1* が *pitx2* を更に誘導するとともに、Nodal タンパク質自体も直接 *pitx2* を右側板に誘導することで、内臓の左右性決定を再指定(respecify)したのであると考えられる。また、

Nodal の右側面への注射の結果、*Xenopus lefty* が右側に誘導されることは殆ど無かったにもかかわらず 100%の頻度で内臓逆位が誘導されたことから、意外にも、*lefty* は左右の向きの決定に必要な不可欠ではないことが明らかとなった。左側板に Nodal タンパク質を投与しても、上記の 3 遺伝子発現の側性には何も変化をもたらさなかった (図 2a, c)。

Xnr-1 mRNA の神経胚側板細胞への遺伝子導入

次に、5'キャッピングした *Xnr-1* mRNA とカチオン性脂質である polyethylene-imine (PEI) とを混和し複合体を形成させて、左または右側面皮下に微量注射し、胚細胞の活発な貪食能と PEI の proton sponge 効果を利用して、側板中胚葉細胞に遺伝子導入を行った。この場合にも、Nodal タンパク質の注射実験同様、右側に注射した場合に限り 内臓左右軸は最高 92%の胚で逆位となった (表 2a)。左側に *Xnr-1* mRNA を導入しても、殆ど逆位は生じなかった (表 2b)。PEI 単独投与の場合 (mRNA 0ng) にも *Xnr-1* mRNA と混合投与した場合にも、胚の外部形態は正常胚と見分けがつかない程度に正常であった。Nodal タンパク質を右側板に与えた場合よりも内臓逆位率が やや低いのは、mRNA の導入効率の問題や、側板細胞のタンパク質合成能力の限界が原因かもしれない (精製したタンパク質を投与する方が高濃度で作用させることができる)。それでも最高で 92%の胚に内臓逆位が誘起された。Nodal タンパク質の右側板注射実験において 発現の側性が最も変化した *pitx2* について、*Xnr-1* mRNA の遺伝子導入後に発現パターンを調査した。左側板に *Xnr-1* mRNA を導入した場合の *pitx2* 発現の側性は、正常胚と同じで殆ど左側のみに発現していた (表 2c)。ところが、右側板に *Xnr-1* mRNA を導入したところ、61%の胚で *pitx2* の発現が両側性のものとなり、17%の胚では右側のみの発現に切り替わっていた (表 2c)。

Nodal タンパク質の注射実験においては、Nodal タンパク質としてマウス胚のそれを用いたが、*Xnr-1* mRNA の右側板への導入によって同様の結果が得られたことから、ツメガエル胚に内在する *Xnr-1* タンパク質をリガンドとして受け入れ可能な Nodal シグナルの受容システムが右側板に備わっていることが強く示唆された。

Nodal 以外の様々な成長因子の注射実験

序論の項で述べたように、TGF-β superfamily に属するリガンドの間は、その数多くの type I (ALK), type II 受容体群と「多対多」の関係で結合する¹⁰⁾。

表 2. *Xnr-1* mRNA を神経胚期の左または右側板中胚葉に遺伝子導入した胚における、内臓逆位の発生率と *Xenopus pitx2* 遺伝子の発現パターンの変化。

Xnr-1 mRNA injection

a. Right

stage	neurula stage		
	13-14	15-16	17-18
dose (ng)	Upper, %.	Lower, inverted/survived.	
2-2.5	74 34/46	58 41/71	- -
1.25	92 22/24	88 14/16	19 4/21
0.5	- -	71 17/24	- -
0	0 0/40		

b. Left

stage	neurula stage	
	13-14	15-16
dose (ng)	Upper, %.	Lower, inverted/survived.
2	0 0/24	- -
1.25	4 1/23	
0	0 0/35	

c. Expression pattern of *Pitx2*

	Left	Bilateral	Right	Absence
Right injection	11% n=4/36	61% n=22/36	17% n=6/36	11% n=4/36
Left injection	91% n=21/23	0% n=0/23	0% n=0/23	9% n=2/23

神経胚期に、polyethyleneimine をキャリアとして、5'キャッピングした *Xnr-1* mRNA を側板中胚葉細胞に導入した。 a. 右側板に導入した場合、最高で 92%の胚に内臓逆位が生じた。表中の分母は生存胚数で、分子は逆位胚数。 b. 左側板に導入した場合、内臓逆位は殆ど生じなかった。 c. 板における *pitx2* の発現は、右側に *Xnr-1* mRNA を遺伝子導入した場合には高頻度で両側性の発現を示したが(上段)、左側に与えた場合には、殆ど左側のみに発現していた(下段)。

Nodal タンパク質の神経胚注射実験に関して、本章で得られた結果のリガンド特異性を知るために、TGF-β superfamily に属しながらも Nodal や Lefty とは異なるシグナル伝達経路を持つ GDF-6, BMP-3をはじめ、TGF-β superfamily に属さない他の family の成長因子について、神経胚側板に微量注射を行った。しかしながら、以下の 2 つを除いては、材料と方法の項に記した全ての成長因子タンパク質について、内臓逆位誘発活性は見いだせなかった。

そこで、反対に Nodal や Lefty に類似したシグナル伝達経路を持つとされる成長因子を、左または右側板に注射することにした。TGF-β superfamily の受容体は、type I 受容体と type II 受容体の heterotetramer としてリガンドと結合し、細胞内に

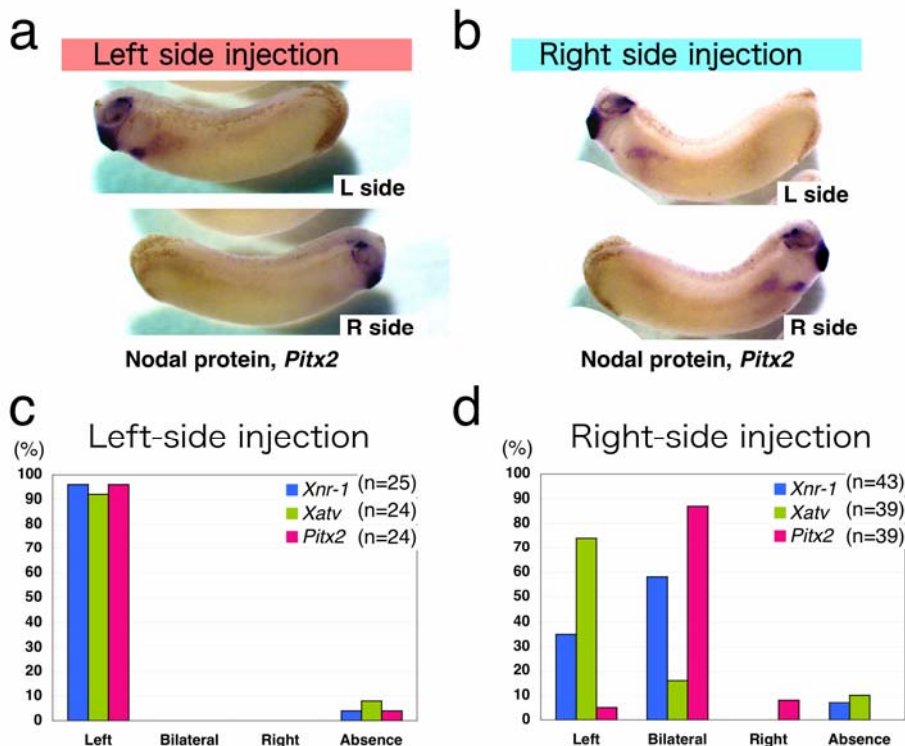


図2. Nodal protein の側板への注射が遺伝子発現の側性に及ぼす影響. a, c. 中期神経胚の左側板に Nodal protein を注射. *Xnr-1, lefty* (*Xatv*), *pitx2* (a) の発現の側性に变化はない. b, d. 中期神経胚の右側板に Nodal protein を注射. *Xnr-1* と *pitx2* (b) は右側に誘導されているが, *lefty* の発現は大半の胚で左側のみであり变化しなかった.

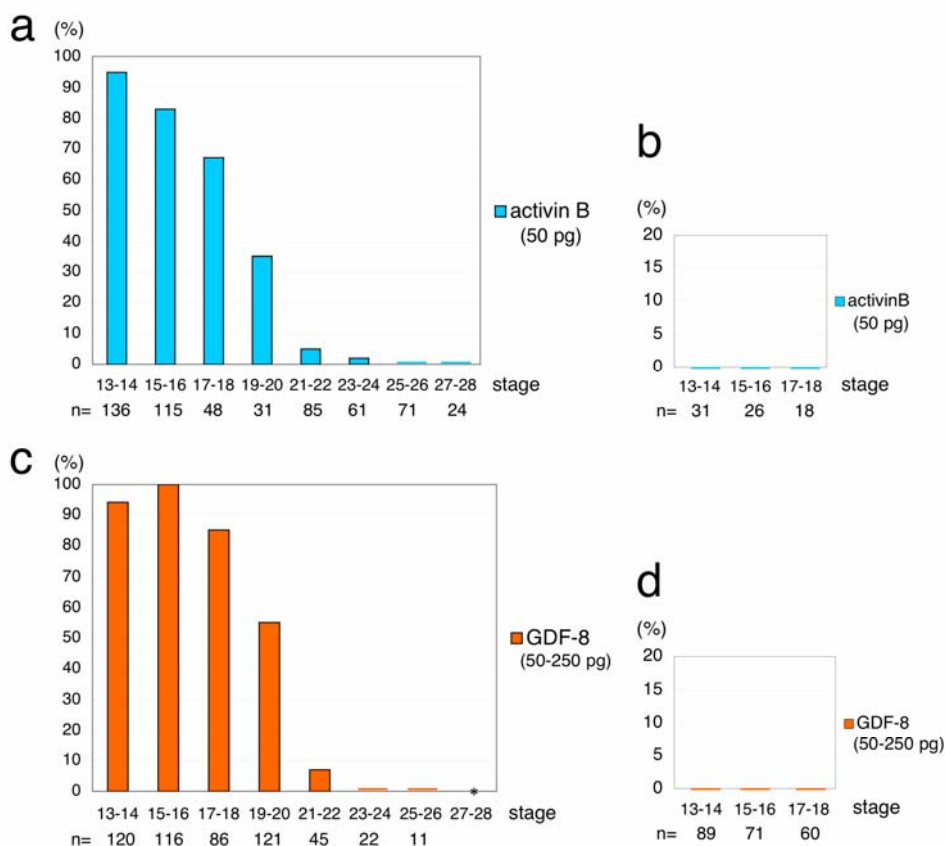


図3. ツメガエル神経胚/尾芽胚の右(a, c)または左側板(b, d)への Activin B タンパク質(a, b) ならびに GDF-8 タンパク質(c, d) の微量注射. Nodal に近いシグナル伝達経路を持つこれらのリガンドにおいては, Nodal タンパク質の微量注射の場合(表 1)と同じく 右側板に注射した場合には高い内臓逆位率を示し, 左側板への注射では殆ど内臓逆位を誘起しなかった. また, *Xnr-1* 発現後の発生段階である尾芽胚に内臓逆位を誘起することはなかった.

シグナルを伝えることが知られている^{10, 22)}。Nodal リガンドと Activin リガンドは Activin type II A, Activin type II B 受容体の双方に結合し、ALK-4 (type I 受容体のひとつ) 受容体も共有する^{23, 24)}。またマウスや zebrafish の Lefty は、Activin type IIB 受容体に結合することが明らかにされており^{24, 25)}、Activin type II A 受容体に結合することも示唆されている²⁴⁾。ツメガエル神経胚において、*activin subunit* (=inhibin- β chain) が左右非対称に発現するという報告はないが、ニワトリ原条胚では *activin β B chain* ならびに *activin type IIA receptor* が原条の右側に発現する^{3, 26)}。

これらの背景から、ツメガエル神経胚側板に Activin B タンパク質を注射したところ、右側に注射した場合にのみ、神経胚期を通じて高い内臓逆位誘発活性が観察された (図 3a)。左側に注射した場合には内臓逆位は生じなかった (図 3b)。次に、TGF- β superfamily の中で、Nodal や Activin とは異なる GDF family に属するが、Activin や Nodal と共通の Activin type II A ならびに Activin type II B 受容体を使ってシグナル伝達を行うとされる GDF-8²⁷⁾ を神経胚側板に注射した。Activin B タンパク質注射の場合と同様に、右側板に注射した場合には 高い内臓逆位誘発活性が観察されたが (図 3c)、左側板に同量を注射しても内臓逆位は観察されなかった (図 3d)。

これらの結果は、表 1 で示した、Nodal タンパク質の注射の結果に類似している。ツメガエル胚においては、上記のニワトリ胚の場合とは異なり、左右非対称に発現する TGF- β superfamily の受容体は知られていないが、右側に注射した Nodal タンパク質や *Xnr-1* mRNA は、Activin-B や GDF-8 と共有される受容体 (特に Activin type II 受容体) やその下流のシグナル伝達経路を通じて、左右非対称性に関与するカスケードを動かしていると推察される。

討論

ツメガエル胚の 6 つの *nodal* 相同遺伝子の中で、*Xnr-1* のみが左側板で発現する。文献 18) に記した、*Xnr-1* に相補的な Morpholino oligonucleotide の注射実験の結果、*Xnr-1* の左側板特異的な発現は、内臓器官の左右非対称な形態形成において、左右の向きを決めるのに際して必須の役割を担うことが強く示唆された。今回は、2 つの異なったアプローチを用いて、*Xnr-1* の左側特異的な発現の機能について調べた。Nodal タンパク質や *Xnr-1* mRNA の右側板注射胚における遺伝子発現の側性や、心臓や腸管の左右性の調査から、*Xnr-1* は、左右非対称性に関

連する *pitx2* 発現の側性を指示することを介して、内臓器官の左右非対称な向きや配置を決めるのに重要な役割を果たすことが強く示唆された。この実験結果は、文献¹⁸⁾の *Xnr-1* MO の結果を補完する。恐らく、Nodal シグナルの強い方が左側になり、反対側が右側になる形で、Nodal シグナルの左右のバランス (強弱の差) が左右の向きを決めると考えられる。先に *Xnr-1* シグナルを受け取った側が 反対側で *pitx2* 発現が開始されるのをブロックする、抑制的な分子メカニズムが 両側板間に存在している可能性がある。

側板中胚葉は、発生にともない前後軸に沿って拡張し、胚の側面の広い領域を占める。この「フィールド」の中で、*Xnr-1* の発現は、胚の後端から前方に向けて伝播し、側板の前方で *lefty* と *pitx2* の発現を誘導すると考えられる^{6, 14, 16)} (図 2b,d)。従って、原腸形成後の胚の後方から始まり、尾芽胚の側板前方における *pitx2* や *Nkx3* (*Xenopus bagpipe*²⁸⁾) の発現に先行する *Xnr-1* 発現の伝播は、初期の左右性の特異化 (specification) の情報を *pitx2* 発現の側性などの後期の情報に変換するのに必要な現象であると思われる。Nodal タンパク質や *Xnr-1* mRNA の右側面への皮下注射が、*Xnr-1* や *pitx2* の発現を右側板に誘導し、内臓器官の側性を完全に逆転させることを示した。この結果は、右側板が Nodal シグナル、なかでも *Xnr-1* シグナルを受容出来ることを証明している。この結果と符号する知見として、マウスやニワトリやゼブラフィッシュの体節期胚は *FAST* (*Forkhead Activin Signal Transducer; FoxH1*) を左右両側板で発現している²⁹⁾。FAST (*FoxH1*) は Nodal のシグナル伝達経路の必須の構成因子であり、左側板における *pitx2* の活性化に必須の転写因子であると考えられている³⁰⁻³²⁾。Nodal のシグナル伝達には、細胞膜上にアンカーされリガンド-受容体複合体に結合する EGF-CFC タンパク質が必要である^{1, 2, 33)}。EGF-CFC も、FAST 同様、両側板に発現し、左右非対称性決定のカスケードに関与する³⁴⁻³⁶⁾。

これらの知見と本研究の結果から、右側板では、*Xnr-1* というリガンドは発現していないが、シグナルを受け取る方のシステムは、右側板にも潜在的に備わっていることが強く示唆された。*Xnr-1* リガンドの不在が、右側板が解剖学的な左側組織に分化する specification を受けないことの原因となっていると考えられる。

左右軸研究の進展に伴い、左右性決定のメカニズムは様々な因子を含むことが解明されつつある。同じ脊椎動物の中でも、種が違えば 初期の左右性決定

のプロセスは異なり、初期発生の多様性を反映している^{37,38)}。例えば、相同遺伝子が、動物の違いで左右反対の側性を持っていたり、ある動物で左右非対称に発現する遺伝子が別の動物では左右対称に発現したりする例が次々と発見されており、左右性決定の分子メカニズムには脊椎動物内部にも多様性があり種固有の側面があると考えられている(*nkx3.2*, *sonic hedgehog*, *snail*, *FGF-8* など^{4,5,37)}。

一方、初期の左右性決定のメカニズムのバリエーションとは対照的に、*nodal-pitx2* 経路は、脊椎動物の全ての綱(class)で高度に保存されていると考えられている^{4,5,37,38)}。ツメガエル胚は多数の *nodal* 相同遺伝子を持っているが、今回の結果は、*Xnr-1*→*pitx2* 経路が ツメガエル胚の左右性決定において必要不可欠なものであり、左側板に発現する *nodal* が同じ左側に *pitx2* を誘導するという点において、他の脊椎動物と共通のルールを持っているとの見解を支持する。本研究で我々は、Nodal タンパク質や *Xnr-1* mRNA を原腸形成後の神経胚/尾芽胚に注射して、胚の左右性を解析した。そのようにして、原腸胚期までの初期発生における Nodal シグナリングとは区別して、左側板における Nodal シグナリングについて解析することが出来た。このアプローチは、オルガナイザー領域特異的な *nodal* の *hypomorph* やゼブラフィッシュ胚における *cyclops mutant* の解析などの方法に比べ、胚形成の特定の局面における *nodal* の機能を調べるのに優れている。何故なら、後者の方法では、左右性の異常の他にも様々な奇形が出るので、その左右性の異常に関する解釈が難しくなるからである³⁹⁻⁴¹⁾。

右側板中胚葉にのみ発現する遺伝子として、ニワトリ胚の右側板における *snail* の発現⁴²⁾や、マウス胚における *nkx3.2* の発現⁴³⁾が知られているが、これらの遺伝子はアフリカツメガエル胚では右側特異的に発現することはない。アフリカツメガエル胚においては、右側板特異的に発現する遺伝子は一つも知られていない。右側板での Nodal(*Xnr-1*) シグナルの活性化実験は、胚の物理的な右側を解剖学的な左側になるように分化させた時に、物理的な左側は反対側に分化、すなわち解剖学的な右側に分化することを余儀なくされるメカニズムがあることを示唆している。このアイデアを実証するには、両生類胚ではひとつも知られていない右側板特異的に発現する遺伝子を発見し、マーカーとして用いる必要がある。

Xnr-1 が左側板中胚葉において発現する直前に、背側後方、原腸蓋の内表面近くに小さな両側性の *Xnr-1* 発現が出現し、少なくとも stage 30 の尾芽胚期まで(左側板における *Xnr-1* 発現が終息するまで)、

この背側後方の発現が持続する^{6,8, 未発表データ}。この発現領域と重なるように、ツメガエル神経胚の原腸蓋の背側天井には繊毛が生えており、左右性決定に関与するモータータンパク質の *left-right dynein* が発現している⁴⁴⁾。マウス胚では後期原腸胚期のオルガナイザー領域(node)の腹側に生えた繊毛の回転運動が右から左への左右非対称な液流(nodal flow)を生じ、これが左側板中胚葉における *nodal* の非対称発現の原因となっていることが報告されている^{45,46)}。*Xnr-1* の背側後方の両側性の発現が産生する *Xnr-1* リガンドが、神経胚原腸後端における右から左への液流に運ばれ、これが左側板における *Xnr-1* 発現を autonomous に誘起する可能性が考えられる。我々は、微量注射法により、ツメガエル胚原腸内部に *dynein-ATP* 阻害剤であり繊毛運動を抑制するバナジン酸(NaVO_3)を注射したところ、27%の胚に内臓逆位が生じることを観察している(未発表データ)。今後は、液流 (nodal flow) をキーワードに *Xnr-1* の左右非対称な発現の誘導機構を追究する必要があると思われる。

謝辞

本研究は、本論文の著者全員による共同研究「脊椎動物胚の左右性決定機構における *nodal* 遺伝子の役割の研究」として神奈川大学総合理学研究所の助成のもとで行いました。所長ならびに所員各位に感謝いたします。

文献

- 1) Schier AF and Shen MM (2000) Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* **403**: 385-389.
- 2) Schier AF (2003) Nodal signaling in vertebrate development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**: 589-621.
- 3) Levin M, Johnson RL, Stern CD, Kuehn M and Tabin C (1995) A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* **82**: 803-814.
- 4) Hamada H, Meno C, Watanabe D and Saijoh Y (2002) Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 103-113.
- 5) Levin M (2005) Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review. *Mech. Dev.* **122**: 3-25.
- 6) Lowe LA, Supp DM, Sampath K, Yokoyama T, Wright CVE, Potter SS, Overbeek P and Kuehn M R (1996) Conserved left-right asymmetry of *nodal* expression and alterations in murine situs inversus. *Nature* **381**: 158-161.
- 7) Takahashi S, Yokota C, Takano K, Tanegashima K, Onuma Y, Goto J and Asashima M (2000) Two novel *nodal-related* genes initiate early inductive events in *Xenopus* Nieuwkoop center. *Development* **127**: 5319-5329.

- 8) Lustig KD, Kroll K, Sun E, Ramos R, Elmendorf H and Kirschner MW (1996) A *Xenopus nodal related* gene that acts in synergy with *noggin* to induce complete secondary axis and notochord formation. *Development* **122**: 3275-3282.
- 9) Sampath K, Rubinstein AL, Cheng AM, Liang JO, Fekany K, Solnica-Krezel L, Korzh V, Halpern ME and Wright CV (1998) Induction of the zebrafish ventral brain and floorplate requires cyclops/nodal signalling. *Nature* **395**: 185-189.
- 10) Massagué J, Blain SW and Lo RS (2000) TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**: 295-309.
- 11) Hyatt BA and Yost HJ (1998) The left-right coordinator: the role of *Vg1* in organizing left-right axis formation. *Cell* **93**: 37-46.
- 12) Jones CM, Kuehn MR, Hogan BL, Smith JC and Wright CV (1995) Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development* **121**: 3651-3662.
- 13) Yamamoto TS, Takagi C, Hyodo AC and Ueno N (2001) Suppression of head formation by *Xmsx-1* through the inhibition of intracellular nodal signaling. *Development* **128**: 2769-2779.
- 14) Cheng AM, Thisse B, Thisse C and Wright CV (2000) The lefty-related factor *Xatv* acts as a feedback inhibitor of nodal signaling in mesoderm induction and L-R axis development in *Xenopus*. *Development* **127**: 1049-1061.
- 15) Branford WW, Essner JJ and Yost HJ (2000) Regulation of gut and heart left-right asymmetry by context-dependent interactions between *Xenopus* Lefty and BMP4 signaling. *Dev. Biol.* **223**: 291-306.
- 16) Ryan AK, Blumberg B, Rodriguezesteban C, Yoneitamura S, Tamura K, Tsukui T, Delapena J, Sabbagh W, Greenwald J, Choe S, Norris DP, Robertson EJ, Evans RM, Rosenfeld MG and Belmonte JCI (1998) *Pitx2* determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* **394**: 545-551.
- 17) Schweickert A, Campione M, Steinbeisser H and Blum M (2000) *Pitx2* isoforms: involvement of *Pitx2c* but not *Pitx2a* or *Pitx2b* in vertebrate left-right asymmetry. *Mech. Dev.* **90**: 41-51.
- 18) 茂木和枝, 安積良隆, 竹内重夫, 豊泉龍児 (2003). 無尾両生類 *nodal* 遺伝子の左右非対称な発現の調節機構の解析ならびに有尾両生類 *nodal* 遺伝子のクローニング. 神奈川大学総合理学研究所年報 2002. pp. 11-36.
- 19) Toyozumi R, Mogi K and Takeuchi S (2000) More than 95% reversal of left-right axis induced by right-sided hypodermic microinjection of activin into *Xenopus* neurula embryos. *Dev. Biol.* **221**: 321-336.
- 20) Toyozumi R, Kobayashi T, Kikukawa A, Oba J and Takeuchi S (1997) Adrenergic neurotransmitters and calcium ionophore-induced *situs inversus viscerum* in *Xenopus laevis* embryos. *Dev. Growth Differ.* **39**: 505-514.
- 21) Harland RM (1991) In *situ* hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol.* **36**: 685-695.
- 22) Massagué J (1998) TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 753-791.
- 23) Reissmann E, Jornvall H, Blokzijl A, Andersson O, Chang C, Minchiotti G, Persico MG, Ibanez CF and Brivanlou AH (2001) The orphan receptor ALK7 and the Activin receptor ALK4 mediate signaling by Nodal proteins during vertebrate development. *Genes Dev.* **15**: 2010-2022.
- 24) Sakuma R, Ohnishi Yi-Y, Meno C, Fujii H, Juan H, Takeuchi J, Ogura T, Li E, Miyazono K and Hamada H (2002) Inhibition of Nodal signalling by Lefty mediated through interaction with common receptors and efficient diffusion. *Genes Cells* **7**: 401-412.
- 25) Meno C, Takeuchi J, Sakuma R, Koshiba-Takeuchi K, Ohishi S, Saijoh Y, Miyazaki J, ten Dijke P, Ogura T and Hamada H (2001) Diffusion of nodal signaling activity in the absence of the feedback inhibitor Lefty2. *Develop. Cell* **1**: 127-138.
- 26) Levin M, Pagan S, Roberts DJ, Cooke J, Kuehn MR and Tabin CJ (1997) Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo. *Dev. Biol.* **189**: 57-67.
- 27) Lee SJ and McPherron AC (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 9306-9311.
- 28) Newman CS, Grow MW, Cleaver O, Chia F and Krieg P (1997) *Xbap* a vertebrate gene related to *bagpipe*, is expressed in developing craniofacial structures and in anterior gut muscle. *Dev. Biol.* **181**: 223-233.
- 29) Hoodless PA, Pye M, Chazaud C, Labbe E, Attisano L, Rossant J and Wrana JL (2001) FoxH1 (Fast) functions to specify the anterior primitive streak in the mouse. *Genes Dev.* **15**: 1257-1271.
- 30) Weisberg E, Winnier GE, Chen X, Farnsworth CL, Hogan BL and Whitman M (1998) A mouse homologue of FAST-1 transduces TGF β superfamily signals and is expressed during early embryogenesis. *Mech. Dev.* **79**: 17-27.
- 31) Norris DP and Robertson EJ (1999) Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements. *Genes Dev.* **13**: 1575-1588.
- 32) Norris DP, Brennan J, Bikoff EK and Robertson EJ (2002) The Foxh1-dependent autoregulatory enhancer controls the level of Nodal signals in the mouse embryo. *Development* **129**: 3455-3468.
- 33) Minchiotti G, Parisi S, Liguori GL, D'Andrea D and Persico MG (2002) Role of the EGF-CFC gene *cripto* in cell differentiation and embryo development. *Gene* **287**: 33-37.
- 34) Yan YT, Gritsman K, Ding J, Burdine RD, Corrales JD, Price SM, Talbot WS, Schier AF and Shen MM (1999) Conserved requirement for EGF-CFC genes in vertebrate left-right axis formation. *Genes Dev.* **13**: 2527-2537.
- 35) Gaio U, Schweickert A, Fischer A, Garratt AN, Muller T, Ozcelik C, Lankes W, Strehle M, Britsch S, Blum M (1999) A role of the *cryptic* gene in the correct establishment of the left-right axis. *Curr. Biol.* **9**: 1339-1342.

- 36) Schlange T, Schnipkowitz I, Andree B, Ebert A, Zile MH, Arnold HH and Brand T (2001) Chick CFC controls Lefty1 expression in the embryonic midline and nodal expression in the lateral plate. *Dev. Biol.* **234**: 376-389.
- 37) Burdine RD and Schier AF (2000) Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation. *Genes Dev* **14**: 763-76.
- 38) Capdevila J, Vogan KJ, Tabin CJ and Izpisua Belmonte JC (2000) Mechanisms of left-right determination in vertebrates. *Cell* **101**: 9-21.
- 39) Feldman B, Gates MA, Egan ES, Dougan ST, Rennebeck G, Sirotkin HI, Schier AF and Talbot WS (1998) Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature* **395**: 181-185.
- 40) Feldman B, Dougan ST, Schier AF and Talbot WS (2000) Nodal-related signals establish mesodermal fate and trunk neural identity in zebrafish. *Curr. Biol.* **10**: 531-534.
- 41) Saijoh Y, Oki S, Ohishi S and Hamada H (2003) Left-right patterning of the mouse lateral plate requires nodal produced in the node. *Dev. Biol.* **256**: 160-172.
- 42) Isaac A, Sargent MG and Cooke J (1997) Control of vertebrate left-right asymmetry by a snail-related zinc finger gene. *Science* **275**: 1301-1304.
- 43) Schneider A, Mijalski T, Schlange T, Dai W, Overbeek P, Arnold HH and Brand T (1999) The homeobox gene *NKX3.2* is a target of left-right signaling and is expressed on opposite sides in chick and mouse embryos. *Curr. Biol.* **9**: 911-914.
- 44) Essner JJ, Vogan KJ, Wagner MK, Tabin CJ, Yost HJ and Brueckner M (2002) Conserved function for embryonic nodal cilia. *Nature* **418**: 37-38.
- 45) Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M and Hirokawa N (1998) Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* **95**: 829-837.
- 46) Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y and Hamada H (2002) Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* **418**: 96-99.