

2001-2002年度神奈川大学共同研究奨励助成(総合理学研究所付)による

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

茂木和枝、安積良隆、竹内重夫、豊泉龍児(責任者; 文責)

神奈川大学理学部総合理学研究所、生物科学科

【研究の背景】

ヒトの外形はほぼ左右対称であるが、その内臓器官の多くは脾臓のように左右非対称に配置されていたり、肺や大血管系のように分岐パターンが左右非対称であったりする。内臓の左右性には法則性があり、たとえば、殆どのヒトの心臓の心尖部はからだの左側に偏り、肝臓はいくつかの小葉に分葉しながら右側に偏って配置されている。ごく希に、内臓の左右性が、通常の場合とは異なり、左右逆転していることある。これを内臓逆位と呼ぶ。日本人4000人中、8人が内臓逆位であったという(前原勝矢, 1989)。内臓の左右非対称性が損なわれると、臓器は正常に働かない。多くの心奇形は、右胸心と呼ばれる循環器血流の左右性の異常を伴う。消化器系が部分的に内臓逆位を起こせば、胆道閉鎖による黄疸が出たり、腸捻転を起こしやすくなったりする。遺伝的、先天的な内臓逆位症(内臓錯位症)の場合には、大血管転位や無脾症、多脾症などのいくつかの症状が合併して生じることが多い。これらの例から、我々の内臓が正常に形成されて機能を発揮するためには、胚期におけるその左右性形成機構が正しく働かなければならないことが分かる。

脊椎動物の進化を考える上でも、内臓の左右性は欠かせない問題である。脊椎動物の起源動物であるとされる棘皮動物は、遊泳型の幼生から固着生活を送る成体型に変態するにあたり、原腸由来の幼生消化管の左側のみで成体原基を形成する。我々の直接の祖先動物である脊索動物のホヤの内部構造も左右非対称に形成される。脊椎動物のプロトタイプの体制を持つ頭索類ナメクジウオの頭部は、鰓裂の開き方などが著しく左右非対称になっている。これらの下等動物の例のように、脊椎動物のからだの構造の進化の問題は、左右非対称性の問題を考慮しつつ研究すべき問題である。

脊椎動物のからだの左右非対称性の研究は、現在大きな進展を見せており、いくつかのモデル動物で急速に新知見がもたらされている。我々は、脊椎動物発生学のモデル動物であるアフリカツメガエル胚を材料に、どのような分子機構によって内臓の左右性が実際に眼に見える左右非対称性として現れてくるのかについて、研究を行ってきた。アフリカツメガエル胚の内臓は、23℃の室温で飼育した場合、受精後4日目には心臓の血流の左右非対称性や、腸管や脾臓の左右非対称な形態形成を肉眼で容易に観察することが出来る。加えて、1年間を通して性腺刺激ホルモン注射で容易に大量の受精卵を得られるなどの特長があり、分子生物学的に左右非対称性の問題を解析するのにあたって、ツメガエル胚は好個の実験材料である。

1959年、HummelとChapmanは、内臓が50%の頻度で逆位を示す劣性突然変異を持つマウスを発見し、iv(*inversus viscerum*)系統と名づけた。この発見によって、内臓の左右性は、特定の遺伝子の支配する現象であることが決定的になった。さらに1993年、横山尚彦らは、tyrosinase mini-geneの挿入突然変異マウスを人工的に作出する過程で、ほぼ100%の頻度で内臓逆位を示すマウス劣性突然変異系統を偶然得て、これをinv(*inversion of embryonic turning*)系統と名づけた。inv変異マウスの原因遺伝子は、Mochizukiらによって同定され、ankyrinモチーフとcalmodulin結合部位を持つ細胞膜裏打ちタンパク質であることが分かっている(Mochizuki et al., 1998)。invタンパク質は初期胚内で一様に分布し、invマウスが何故、100%内臓逆位を示すのかについては、現在でもそのメカニズムは詳しくは分かっていない。しかしながら、iv, invの2系統のマウスの存在から、脊椎動物内臓の左右非対称性が遺伝子によって規定される現象であることが確実となり、その原因遺伝子の解明を通じて、左右軸研究に分子生物学的解析の糸口がもたらされた。

脊椎動物内臓の左右非対称な形態形成の分子機構の研究は、1990年代の半ばにもう一つの大発見によってブレイクスルーを得た。形態的には全く左右対称な初期胚内で左右非対称に発現する遺伝子の発見である。1995年、Levinらは、ニワトリ初期胚内で、*activin*, *activin receptor-type IIa*, *sonic hedgehog*, *nodal*, *HNF-3beta*の5つの遺伝子が左右非対称に発現することを報告した。*activin*, *nodal*は、TGF-beta superfamilyに属する細胞間シグナル分子であり、*activin receptor-type IIa*は、その細胞膜上の(heterodimerを形成する)受容体のsubunitである。Sonic hedgehogはTGF-betaとは全く異なったシグナルcascadeを持つ分泌性のシグナル分子であり、HNF-3betaは転写因子である。この論文とこの直後に相次いで発表された一連の"左右非対称発現遺伝子"の発見の報告から、脊椎動物の未だ左右対称な初期胚内で、ある未知の出発点から始まる一連のカスケードによって"玉突き状態に"からだの左と右で異なるシグナル伝達が生じ、左右のシグナルの差異が内臓器官の左右の向きを決めることが予想された (Capdevila et al., 2000; Hamada et al., 2002)。

その後、数年にわたる研究の結果から、脊椎動物間で、左右性に関して最も保存され、最も重要なシグナル伝達経路の存在が明らかにされた...体節期と呼ばれる時期に発現する*nodal*, *lefty*(*antivin*)は、体の左側組織だけで一過的に発現し、その相互作用が*Pitx2*と呼ばれるbicoid型ホメオボックス遺伝子である転写因子の左側特異的かつ持続的な発現を誘導する(2002年度「後生動物の原腸形成のメカニズムの研究」報告書の項参照)。この経路をより詳しく記述すると以下ようになる：*nodal*は左側板中胚葉で自分自身の発現を誘導すると共に、*lefty*を誘導する(Hamada et al., 2002)。*lefty*は*nodal*の発現が強くなりすぎないように働く*noda*抑制因子であることが分かっている(Schier and Hamada, 1999; Cheng et al., 2000)。*nodal*は更に*Pitx2*を誘導するが、この*Pitx2*は、心臓、胃、腸管等で実際に左右非対称な形態形成が開始された後まで、各臓器の左側で発現し続けるため、左右性決定の最終局面で主導的な役割を果たすと考えられている(Logan et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; Yoshioka et al., 1998; Campione et al., 1999; Schweickert et al., 2000)。*Pitx2*のknock outマウ

スの解析結果はその考えをほぼ支持している(Lu et al., 1999; Liu et al., 2001)。

【研究目的】

現在、問題となっているのは、*nodal*の発現以前の左右非対称シグナル伝達経路の、動物ごとにまちまちな多様性の問題である。たとえば、上述のニワトリ胚*sonic hedgehog*は、*nodal*の発現以前に、オルガナイザー領域の左側に偏って発現するが、マウス胚やツメガエル胚の*sonic hedgehog*の発現は、*nodal*発現以前には全く左右対称である。ニワトリ胚で最も早く左右非対称性を示す遺伝子として*activin betaB subunit*遺伝子が知られているが、これもマウス、ゼブラフィッシュ、両生類では左右対称に発現する。つまり、ニワトリ胚から得られた知見が、そのまま他の綱の脊椎動物にあてはまるとは限らないことが分かってきた。他方で、上述の*inv, iv*のマウス原因遺伝子が解明されたが、その遺伝子がコードするタンパク質の性状が、少なくともツメガエル胚の*inv*遺伝子の場合には、マウス胚のそれとは大きく異なっていることが分かった(Yasuhiko et al., 2001)。

そこで我々は、"左右性の分子機構において一番進化的に保存されていて大事なこと"として、*nodal*の左右非対称な発現に着目した。*nodal*遺伝子は上述のように、ペプチド性成長因子の大きなfamilyを形成するTGF-beta superfamilyに属する分泌性シグナル分子であり、さまざまな脊椎動物胚において、胚の左側側板中胚葉に一過的に左右非対称に発現する。*nodal*が左側に発現することとは、恐らく全脊椎動物の左右軸形成機構で共通のルールである。脊椎動物のみならず、我々の祖先動物であるホヤの幼生においても*nodal*遺伝子は胚の左側組織(ホヤの場合には表皮の左半分)に発現する。*nodal*は、マウスを始め、脊椎動物のオルガナイザー領域(原腸胚の軸形成、形態形成の中心領域)に発現する遺伝子でもある。*nodal*はオルガナイザー形成に必須の遺伝子であるため、*nodal*のknock outマウスは原腸胚期に胚性致死となる。そのため、原腸形成後の発生段階である体節期における*nodal*の左右非対称な発現の解析は、knock outマウスを用いたloss-of-functionの方法論からは難しいとされる。

マウスの*nodal*遺伝子は1つしか存在しないが、アフリカツメガエルの場合、現在6つの互いに構造的に類似した*nodal*遺伝子(*Xenopus nodal related-1~6*)が知られており(Takahashi et al., 2000)、そのうち*Xnr-1*のみが体節形成の始まる後期神経胚期に左右非対称に発現する(Lowe et al., 1996)。我々は*Xnr-1*遺伝子の左右非対称な発現が、どのようなメカニズムによって誘起されるのかについて、その分子機構の解明を行った。両生類胚の場合、ニワトリとは異なり、*Xnr-1*の発現以前に左右非対称に発現する遺伝子は、原腸形成以降には一つも知られていない。従って、どのような分子機構が*Xnr-1*の左側板特異的な発現を誘導するのかは、本研究の開始当初の段階では全く未知の問題であった。脊椎動物の初期左右性形成機構の比較生物学的な理解のためにも、ツメガエル胚の*Xnr-1*の発現開始機構の解明は重要であると、研究の開始にあたり我々は考えた。

【研究の主な成果とその展開】

我々は、まず、アフリカツメガエル胚における*Xnr-1*の発現が、左右性形成機構にとって必要不可欠なものであるか否かについて知るために、アンチセンス核酸法を用いて、左

側板特異的なXnr-1タンパク質の産生に対して翻訳阻害を行った。その結果、外部形態や器官形態はほぼ正常であったにもかかわらず、50%以上の高頻度で内臓逆位が生じたため、内臓の左右性決定にXnr-1タンパク質が必須の分子であることが分かった。

次に我々は、Xnr-1の発現を誘導する上流因子の探索を行った。当初はSubtraction法と呼ばれる、異なる2つの組織間で差次的に発現する遺伝子のクローニング手法を用いてXnr-1よりも早期に左右非対称に発現する遺伝子の探索を行ったが、検出することが出来なかった。そこで、本研究計画着手直前に得られていた側板中胚葉へのタンパク質注射の実験結果と、注射したタンパク質をコードする遺伝子の発現パターンとを対比し、両生類特異的TGF-betaであるTGF-beta5がXnr-1の上流因子であるとの作業仮説を立てた。

この仮説を検証するために、再びアンチセンス核酸法を用いて、TGF-beta5遺伝子の翻訳産物のみを減少させた。その結果、内臓逆位が誘起されると共に、Xnr-1、Pitx2の左側板特異的な発現が消失した。これら二つのことから、TGF-beta5がXnr-1の発現に必要であることが示唆された。TGF-beta5に対するアンチセンス核酸の注射の結果、網膜の分化が著しく抑制され、所謂フリーレンズ(眼のレンズのみがガラス玉のように存在する状態)が高頻度で形成された。両生類からはTGF-betaの仲間としてTGF-beta5と共にTGF-beta2が単離されている。TGF-beta2のアンチセンス核酸による翻訳阻害の結果、TGF-beta5よりは低頻度であるが内臓逆位と、眼の低形成が観察された(詳細は省略)。

三番目の実験としては、Xnr-1前駆体タンパク質の活性化機構に注目した。TGF-beta superfamilyに属するペプチド性シグナル分子は前駆体タンパク質の形で合成され、トランスゴルジネットワークに存在するSubtilisin-like proprotein convertase(SPC)の仲間によって活性化される。SPCの中でも、特に分子生物学的解析の進んでいるFurin(SPC1)のknock outマウスは、胚の左右非対称な大回転が行われず、Pitx2の遺伝子発現が両側性になることが報告されている(Constam and Robertson, 2000a)。また、同じくSPC familyに属するPACE4のknock outマウスでも、内臓の左右性の乱れが生じることが知られている(Constam and Robertson, 2000b)。ツメガエルNodalの場合にも、切断認識モチーフである-RXKR-領域に変異を導入し、SPCによって切断されなくなるようにするとNodalの生理活性が失われることが、*in vitro*のタンパク質切断実験や原腸胚期の中胚葉誘導の系で報告されている。Furinの仲間(Subtilisin-like proprotein convertase)の阻害剤として働く、ヘキサアルギニン(Hexa-(D)RRRRRR-NH₂)やDecanoyl-RVKR-chloromethylketoneの二つのペプチド性阻害剤をツメガエル初期～後期神経胚の側板に注射したところ、左側板に注射した場合にも、右側板に注射した場合にも、6割以上の注射胚に心臓逆位/内臓逆位が生じた。従って、Furinの仲間の酵素が左側板かその近傍組織で働くことが、神経胚の左側板特異的な*Xenopus nodal related-1*の発現、ひいては正常な左右性の決定に必要であることが示唆された。また、不明な点の多い両生類胚の右側決定のシグナル伝達経路に、右側板で機能するTGF-beta superfamilyのリガンドの、プロドメイン部分のプロセッシングによる活性化が関連していることが示唆された。

生物の左右非対称性というと、ヒトの脳の機能的な左右差が非常に大きな問題である。両生類の発生学は、この問題に生物学の立場から取り組む糸口を与えてくれる可能性がある

る。我々は本研究課題を遂行する途上で、脳の左右性の問題にも興味を覚え、これにも取り組んだ。

我々は、日本産のアカハライモリや*Rana*属のアカガエルなど日本産の無尾両生類の間脳手綱核が左右非対称な形態をしていることを以前報告している。興味深いことに、*nodal*, *lefty(antivin)*, *Pitx2*の3つの遺伝子は、小型硬骨魚のzebrafishにおいては、孵化前後の時期に、間脳の一部領域(手綱核の起源組織であるとも、副上生体の起源組織であるとも言われている)に左右非対称に発現することが知られている。両生類の脳には「利き脳(脳の左右の機能的分業)」があることがいくつかの実験から強く支持されている。我々は、このような背景から、脳機能の左右学の分子生物学の糸口を得るために、アカハライモリ*nodal*相同遺伝子のクローニングをdegenerate PCR法により行った。その結果、アカハライモリ*nodal*遺伝子の部分配列を得ることが出来、これの相同性検索の結果、両生類*Xnr-1*, zebrafish *cyclops(zebrafish ndr2)*, chick *nodal related-1*の各左側板特異的発現遺伝子に最も高い相同性を有し、*Cynr-1*と名づけた。

以上の結果について、その詳細を、下記の4章に整理して報告する。

第一部：ツメガエル胚*Xnr-1*遺伝子のアンチセンス法による機能阻害

第二部：ツメガエル胚*TGF-beta5*遺伝子のアンチセンス法による機能阻害

第三部：Proprotein convertase阻害剤の左右性への影響

第四部：アカハライモリ胚*nodal*相同遺伝子の単離

いずれの内容も更なる実験を加えてpeer review paperとして出版するべきであるが、幸い、第二部の内容に関しては、最近下記の発生学専門誌に掲載された。他の部分については、2003年4月現在も同時進行で取り組んでいる。

【研究成果発表: peer review paper】

Kazue Mogi, Madoka Goto, Eri Ohno, Yoshitaka Azumi, Shigeo Takeuchi and Ryuji Toyoizumi (2003). *Xenopus* neurula left-right asymmetry is respecified by microinjecting TGF-beta5 protein. *The International Journal of Developmental Biology* 47, 15-29.

【研究成果発表: 学会発表予定(2003年6月 日本発生生物学会第36回大会)】

茂木 和枝、竹内 重夫、豊泉 龍児

所属：神奈川大・理・総理研、神奈川大・理・生物科学科

演題名：ツメガエル神経胚の左右性決定には左右両側板でSubtilisin-like proprotein convertaseが必要である

第一部

ツメガエル胚*Xnr-1*遺伝子のアンチセンス法による機能阻害

【序論】

*nodal*遺伝子はTGF-beta superfamilyに属する成長因子(ペプチド性細胞間シグナル分子)をコードし、魚類、両生類、鳥類、哺乳類を通じて体節期の胚の左側板中胚葉に左右非対称に発現する。*nodal*遺伝子は、魚類では3種類、鳥類では1種類、哺乳類でも1種類が知られるが、無尾両生類のモデル動物であるアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の場合には不思議なことに6種類もの*nodal*相同遺伝子が存在する(Takahashi et al., 2000)。これらは*Xenopus nodal-related 1-6(Xnr1-6)*と呼ばれ、そのうち*Xnr-1*のみが後期神経胚期(体節形成期)に左側板特異的に発現する(Lowe et al., 1996)。この側板は中胚葉由来組織で、将来、内臓平滑筋などに分化する。脊椎動物のすべての*nodal*遺伝子は、マウス胚オルガナイザー領域であるnodeに名前の由来をもつように、各脊椎動物胚のオルガナイザー領域に発現する。マウス胚の*nodal*のknock out表現型は、胚葉形成の時期(原腸胚期)の胚性致死で、初期中胚葉形成の不全が原因である。即ち、*nodal*は中胚葉形成に必須の誘導シグナルを担う。*nodal*は原腸形成に必須の遺伝子であるために、その後の*nodal*の左右非対称な発現を、*nodal*遺伝子の機能喪失実験(loss-of-function)により解析することは困難である。従って、左右性形成機構の研究の進んでいるマウス胚やニワトリ胚では、*nodal*上流因子と予想される遺伝子を異所的に発現させた場合に*nodal*遺伝子の発現パターンが変化するかという方法論や、*nodal*遺伝子自身を(本来発現していない)右側板中胚葉に異所的に発現させた場合の、*nodal*より下流の転写調節因子の発現パターンの変動や内臓左右性の変化などを調べる方法論が主にとられてきた。最近、ようやく*nodal*のhypomorph(weak allele)がマウス胚で作出され、その解析が待たれている現状にある。

ツメガエル胚の*nodal*遺伝子は6つあり、中胚葉誘導におけるその生理活性は類似しているので、アンチセンス核酸法で*Xnr-1*のみの翻訳阻害を行った場合に、原腸形成に大きな影響なしに、左側板特異的な*nodal*の翻訳阻害(*Xnr-1*タンパク質の産生阻害)のみを成しえることが期待される。ツメガエル卵は全黄卵であり、直径約1ミリと、アンチセンス核酸を細胞質へ容易に導入出来る系を提供している。ペプチド骨格を持つ人工核酸であるMorpholino oligonucleotideはヌクレアーゼ耐性が強く、ゼブラフィッシュ胚を用いた研究では、4日間もアンチセンス阻害効果を保有していたとの報告もある。ツメガエル胚は、かなりモザイク的な発生運命を持ち、4-32細胞期の各割球の発生運命は詳細にmappingされている。しかも熱帯性のカエルであるので、発生の進行が早く、アンチセンス核酸注射後、左側板での*Xnr-1*発現まで1日しかかからない。

以上の背景から、4-8細胞期のツメガエル胚の各割球に、*Xnr-1* mRNAと相補鎖を形成し翻訳阻害を行う*Xnr-1* antisense Morpholino oligonucleotideを微量注射し、内臓の左右非対称性への影響を観察した。

【実験結果と考察】

ツメガエル野生卵は、動物極頂から丁度赤道付近まで黒い色素顆粒が卵表面直下に分布しており、いわば北半球を黒く塗りつぶした状態で産卵される。受精直後の表層回転と呼ばれる現象の結果として、動物極側の色素分布に背腹軸に沿った濃淡が形成され、『背側が色が薄く、腹側が色が濃い』状態に色素が分布する。従って、4細胞期や8細胞期の胚は、背腹の識別がつくので、注射因子を特定の割球に狙い打ちすることが出来るので、割球間で効果の差異が生じた場合に検出可能である。

ツメガエル*Xnr-1*遺伝子(GenBank ID; U29447)の開始コドンを含む5'側上流領域に相補的な配列を持つantisense Morpholino oligonucleotide(*Xnr-1* MO)を1mMの濃度で10nl、4細胞期または8細胞期の1割球に注射した。その結果、4細胞期と8細胞期のいずれの場合にも、左側割球に*Xnr-1* MOを注射した場合に45%以上の胚に内臓逆位を生じた。詳細な実験結果を図1-1に示した。腹側左割球に注射した場合には、4-8細胞期を通じて、61%以上の胚に内臓逆位を生じた。一方で、右側割球に*Xnr-1* MOを注射した場合には、4-8細胞期のどの右側割球に注射した場合にも、16%以下の胚に内臓逆位を誘起した。2項検定の結果、実験結果に左右性があることが、有意水準0.1%で検出された(詳細は省略)。

以上の左右性の集計は、『心臓または腸管が内臓逆位を示した』胚を内臓逆位胚として集計したものである。これとは別に、心臓または腸管について、isomerism、即ち器官形態が左右非対称性を示さず左右相称であったものを、集計した。興味深いことに、*Xnr-1* MOを8細胞期の背側植物極側左割球に注射した場合にも、同右割球に注射した場合にも、22-36%の頻度で心臓のisomerismが観察された。腸管のisomerismは観察されなかった。*Xnr-1* MO注射胚は、このような心臓isomerismを示すことがあったが、胚の外形はおおむね正常であった。従って、同定されただけで6種類ある*Xenopus nodal*関連遺伝子には機能的な重複(redundancy)が存在するために、原腸形成/胚葉形成については*Xnr-1*蛋白質の欠落による影響は残り5つの遺伝子産物の働きによって補われたと考えられる。しかしながら、側板におけるNodal蛋白質の作用は、*Xnr-1*単独で担われることが知られているので、*Xnr-1* MOが効果的に作用し、内臓逆位が誘起されたと考えられる。

以上の結果から、*Xnr-1* MOの注射の結果、内臓の左右性決定のメカニズムが失われ、心臓や腸管の左右の向きがランダム化したと考えられる。従って、ツメガエル胚側板において左側のみを発現する*Xnr-1*遺伝子のコードする蛋白質は、ツメガエル胚の左右性決定において必須の機能を有していると結論された。他の脊椎動物における*nodal*遺伝子の機能としては、左右非対称な器官の向き(左右性)に影響を与えることは知られていても、左右非対称な内臓の器官形態そのものに影響を与えることは知られていなかった。しかしながら、本研究で領域特異的な*Xnr-1*蛋白質の合成阻害を詳細に行った結果、背側植物極側割球に*Xnr-1* MOを注射した時には心臓isomerismが高頻度で観察されたので、*Xnr-1*シグナルが器官形態に影響を及ぼしうることが示された。

最近、*nodal*遺伝子が中枢神経系形成に関与することが示されつつあるので、後述の脳神経系の左右非対称性について、*nodal*遺伝子のMorpholino oligo.を注射した胚について調査することは興味深いと思われる。しかしながら、ツメガエル胚の脳神経系は現在の

ところ、形態的な左右非対称性がないとされるので、このアイデアの実施にあたっては、日本にも生息する*Rana*属のカエルなどの*noda*相同遺伝子をcloningする必要があるだろう(第四部参照)。

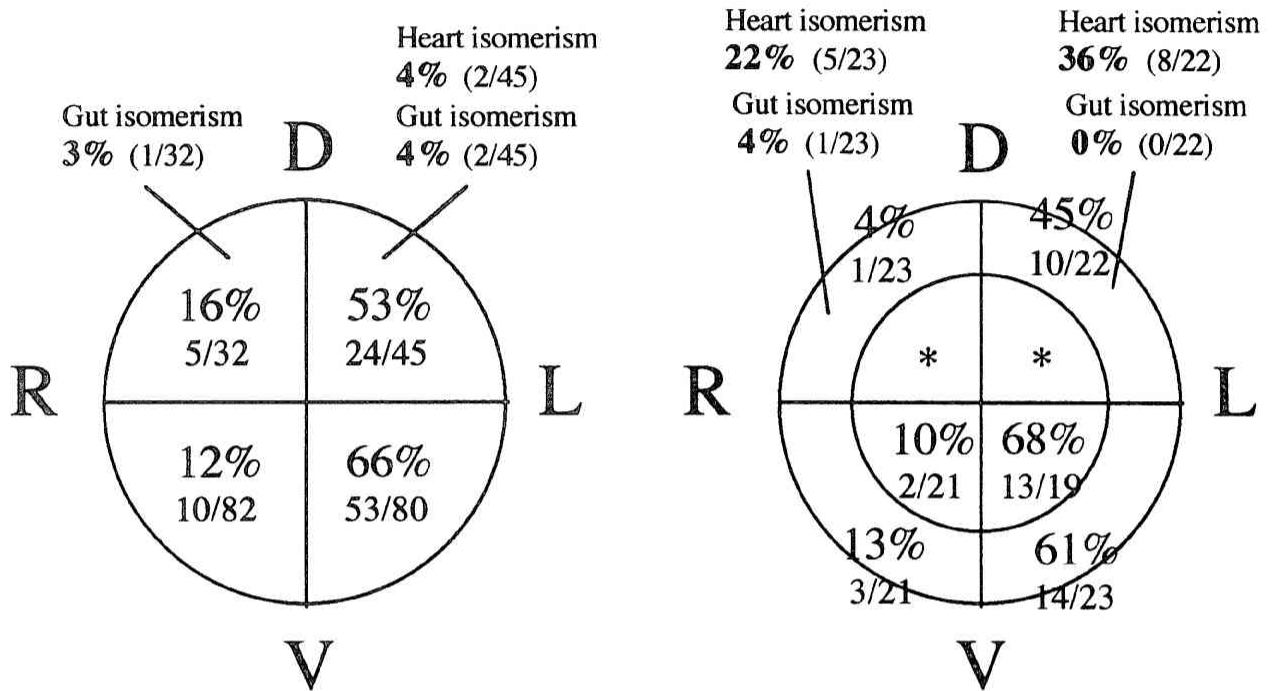


図1-1:

*Xnr-1*遺伝子に対するantisense Morpholino oligonucleotide (MO)を注射した胚の内臓逆位率の集計。4細胞期または8細胞期の各割球に*Xnr-1* MOを注射したところ、左側割球に注射した場合に限り、高頻度で内臓逆位胚を得た。また、背側植物局側左割球注射の場合には、心臓が左右相称な形態を示すケースがしばしば観察された。腹側割球注射の場合には、左右いずれに注射しても心臓や腸管が左右相称な形態を示すことはなかった。D, 背側: V, 腹側: L, 左側: R, 右側。いずれの図も、動物極側から見た図(8細胞期の割球で半径が大きい方が植物局側割球)。

【実験方法】

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の成体雄に150-200 unit, 成体雌に400-600 unitの生殖腺刺激ホルモンを注射し、飼育水を満たしたケージで交配させて有精卵を得た。2.5%チオグリコール酸溶液によって脱ゼリーした卵割期胚を、(滑り止めの)テラサキプレート上に並べた。*Xenopus nodal related-1*遺伝子(GenBank ID; U29447)の翻訳開始コドンを含む5'側の塩基配列に相補的な配列である5'-ACA GGA CTG CTG TCA GAA ATG CCA T-3'を配列にもつ、antisense Morpholino oligonucleotideを超純水に1mMの濃度で溶かし、これを4-8細胞期胚のひとつの卵割球に10nl(nano-liter)注射した。注射はDrummond社製微量注入器"Nanoject"で行った。注射後の胚を、4%Ficollを溶かした10%Steinberg溶液を満たした24穴プレートの1穴に1胚ずつ無菌的に静置し、18-26°Cで培養した。1日培養後にFicollを含まない10%Steinberg溶液に注射胚を移し飼育を継続した。stage 41-42の4日胚の段階で、Toyoizumi et al. (1997)の方法に従って心臓と腸管の左右性を判定した。腸管の左右性の判定にあたっては腹側腓臓の位置も参考にした。内臓逆位率は、心臓または腸管が逆位を示した胚を生存胚数で割り算した比率を百分率で示した。

第二部

ツメガエル胚TGF-beta5遺伝子のアンチセンス法による機能阻害

【序論】

TGF-beta5遺伝子は、TGF-beta superfamilyに属するリガンドである。TGF-betaの仲間には、当初はその名の通り、細胞の形質転換因子、細胞の増殖抑制因子として発見された。TGF-betaは、炎症や創傷治癒、細胞死などさまざまな生理現象や病態に関わる多機能分子として研究が進められてきたが、初期胚におけるTGF-betaの研究はあまり進んでいない。初期胚の形態形成や分化誘導の分野では、同じTGF-beta superfamilyに属するActivin, BMP, Nodal, Leftyなどの分子については詳しい機能解析が進められているが、現時点でのTGF-betaの初期発生における研究は、初期胚内でのmRNA発現パターンなどの研究にとどまっている。ツメガエルTGF-beta5は両生類に特有のTGF-betaであるとされ、ヒトで知られるTGF-beta1, beta2, beta3の成熟領域に対してアミノ酸レベルで、それぞれ76%, 66%, 69%の相同性を持つ。1990年にクローニングされ(Kondaiah et al., 1990)、2000年にその発現パターンが報告された(Kondaiah et al., 2000)。TGF-beta5は原腸胚の後期から発現が開始され、つづく神経胚最初期には脊索の全長に発現し、すぐにその発現は脊索後端部先端に限局し、その後、尾芽胚後期まで尾端部での発現が持続する。後期神経胚期からは沿軸中胚葉、ついで体幹中央部の体節に分節的に発現する。器官形成期である尾芽胚期には、鰓弓領域、眼(後に眼杯の内周部とレンズ)、嗅板などに発現する。

TGF-beta5蛋白質をツメガエル神経胚の右側板中胚葉近傍に皮下注射すると、ほぼ100%の頻度で内臓逆位が生じることが分かった(2001年度総合理学研究所年報)。このことは、TGF-beta5がツメガエル胚左右軸形成の主要な伝達経路をtriggerしうることを示している。左右側板中胚葉へのTGF-beta5の注射後の胚の*nodal*(*Xnr-1*), *Pitx2*の詳細な発現パターンの解析から、*Xnr-1*は、TGF-beta5の注射後、(正常な*Xnr-1*発現タイミングである)後期神経胚期から注射した側の側板で発現を開始することも分かった(Mogi et al., 2003)。即ち、*Xnr-1*の発現を開始させる何らかの計時機構を経由して、異所的なTGF-beta5の投与が、異所的な*Xnr-1*の発現を開始させていることになる。TGF-beta5の最初の発現領域である神経胚期の脊索後端部は、体節期のマウス胚のnodeの相同領域に隣接している。マウス胚のnodeにはmonociliaと呼ばれる特殊な微細構造を持つ繊毛が1細胞に1本ずつ生えており、これの回転運動がnodeの腹側表層での<右から左への>液流を生む。この液流が存在しないKIF-3ノックアウトマウス胚や、液流の非常に弱い*iv, inv*マウス胚の解析から、この右から左への液流が内臓左右性の成立に必須のものであることが明らかとなった(Nonaka et al., 1998; Nonaka et al., 2002)。この繊毛内部に存在するleft-right dyneinタンパク質は、マウスのみならず、鳥類、両生類、魚類でも、その繊毛の生えている領域に局在することが最近示され(Essner et al., 2002)、マウス以外の脊椎動物の胚においても、胚体内もしくは腹側領域でのmonociliaによる液流が、内臓

の左右性成立機構に影響していることが示唆されている。TGF-beta5は分泌因子であり、脊索後端部でmRNAが産生されていることから、両生類アフリカツメガエル胚では、TGF-beta5が液流に乗って左側板中胚葉の*Xnr-1*の発現をtriggerする(図2-1)という作業仮説を持った。この仮説を検証するために、TGF-beta5の転写開始点付近と相補的な配列を持つMorpholino oligonucleotideをツメガエル卵割期胚の各割球に注射した。

【実験結果と考察】

内在性のTGF-beta5シグナル伝達経路がツメガエル胚の左右性決定に関与するか否かを検討するために、4細胞期の背側1割球に、1mMのTGF-beta5 MOを5nl注射した。このTGF-beta5 MOはTGF-beta5遺伝子(GenBank ID; J05180)の開始コドンを含む5'側最上流の塩基配列と相補的な配列を持つ核酸アナログであり、ヌクレアーゼに対する耐性が非常に強いものであるため、内在性のTGF-beta5の蛋白質合成を阻害することが予想される。

このTGF-beta5 MOを注射した胚においては、初期尾芽胚において、本来左右両側で発現すべき体節のTGF-beta5の発現が、注射した側のみで阻害されていることが分かった。沿軸中胚葉におけるTGF-beta5発現のautoregulatory loopが、Morpholino oligo.によってTGF-beta5蛋白質合成が阻害されているために、停止しているものと考えられた(図2-2)。

4細胞期背側右割球にTGF-beta5 MOを注射した場合には、3%の胚のみが内臓逆位を生じた(n=2/79)。それとは対照的に、4細胞期背側左割球にTGF-beta5 MOを注射した場合には、30%(n=29/97)の胚で内臓逆位が生じた(図2-3; 表2-1)。4細胞期の腹側1割球に注射した場合には、左右性への影響はなかった。その理由として、TGF-beta5の発現領域が主に背側組織にあることが挙げられる。

TGF-beta5 MOの注射は、背側左割球に注射した場合にのみ、ツメガエル胚の左右非対称な遺伝子発現に大きな影響を与えた(図2-4)。4細胞期背側右割球に注射した場合には、大半の胚は左側板における*Xnr-1*の発現を保持していた(93%; n=43/46)。一方、背側左側割球にTGF-beta5 MOを注射した場合には、40%の胚だけが*Xnr-1*の左側発現を保持し、50%(n=21/42)の胚では、左右両側板から*Xnr-1*の発現は消えていた。*Pitx2*の場合にも、TGF-beta5 MOの注射によって同様の影響を受けた。4細胞期背側左割球にTGF-beta5 MOを注射した場合には、75%(n=30/40)の胚で左側板の*Pitx2*の発現が消失した。

TGF-beta5 mRNAは尾芽胚期には眼に発現する(Kondaiah et al., 2000)。我々の観察結果からも、TGF-beta5は、尾芽胚期にレンズとその周辺の網膜に発現することが分かった。この眼におけるTGF-beta5蛋白質の機能を阻害した結果だと思われるが、TGF-beta5 MOは非常に高頻度で注射した側の眼に小眼症、もしくは網膜の形成不全を誘起した。右背側割球に注射した場合には89%(n=70/79)、左背側割球に注射した場合には91%(n=88/97)の胚に、小眼症や網膜の形成不全の症状が生じ、その結果、背側から見て

色素性網膜の占める大きさが非常に小さくなった。しばしば、free lensと呼ばれる眼のレンズ組織のみが分化した幼生を得ることがあったが、*TGF-beta5* MOによって網膜の分化が非常に強く阻害された状態であると考えられた(図2-5)。これらの結果から、眼における*TGF-beta5*の発現は、網膜の形成に必要な因子であることが分かった。

対照実験として、2mMのヒト*globin*遺伝子に対するantisense MOやRNase-free水を4細胞期ツメガエル胚に注射したが、内臓の左右性や眼の形成に影響はなかった。これらの結果から、Morpholinoの化学的な性質や注射という物理的刺激が、内臓の左右性等に影響を与えたのではなく、*TGF-beta5*に相補的な配列が*TGF-beta5*蛋白質の合成を阻害し、内臓逆位を誘起したと判断される。

図2-1: 後期尾芽胚における*TGF-beta5* mRNAの発現(左図)と*TGF-beta5*蛋白質が左側板特異的に*Xnr-1*を誘導するとした作業仮説(右図)。*TGF-beta5*は脊索後端部に発現している。最新の論文によると、この部分で『右から左』の液流が生じていることが強く示唆されており(Essner et al., 2002)、この説が正しければ、分泌因子である*TGF-beta5*は胚の左側へむけて左右非対称に拡散しているはずである。

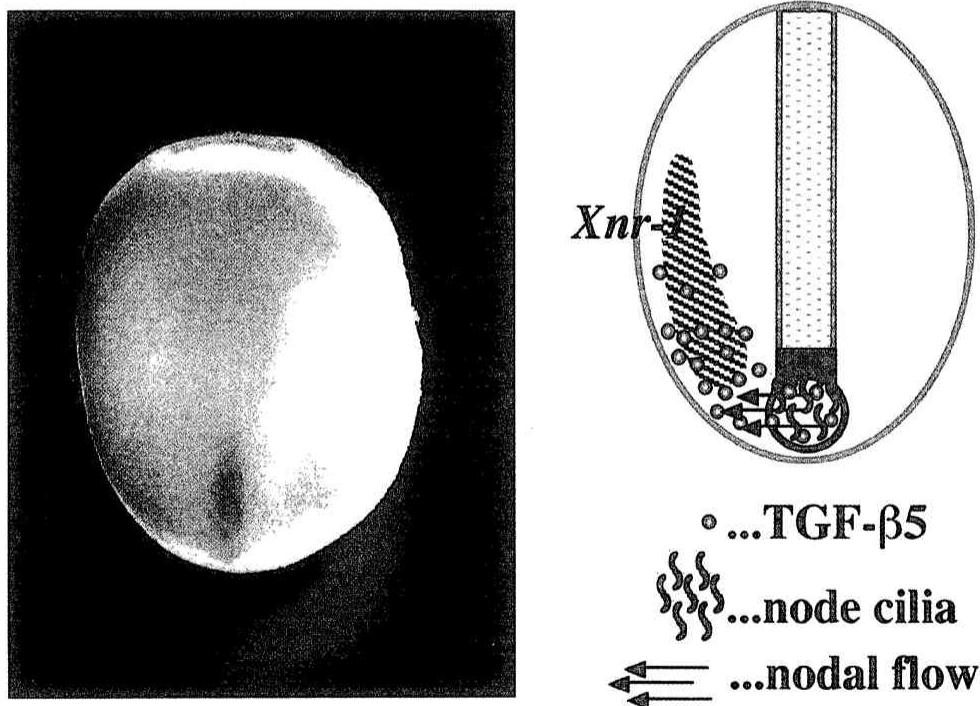


図2-2: 正常な尾芽胚における*TGF-beta5* mRNAの両側性の発現(左図)と、右側に*TGF-beta5* MOを注射した胚における右側での*TGF-beta5* mRNA発現の消失(右図)。*TGF-beta5* MOは*TGF-beta5*の発現を抑制している(次頁)。即ち確かに効いている。

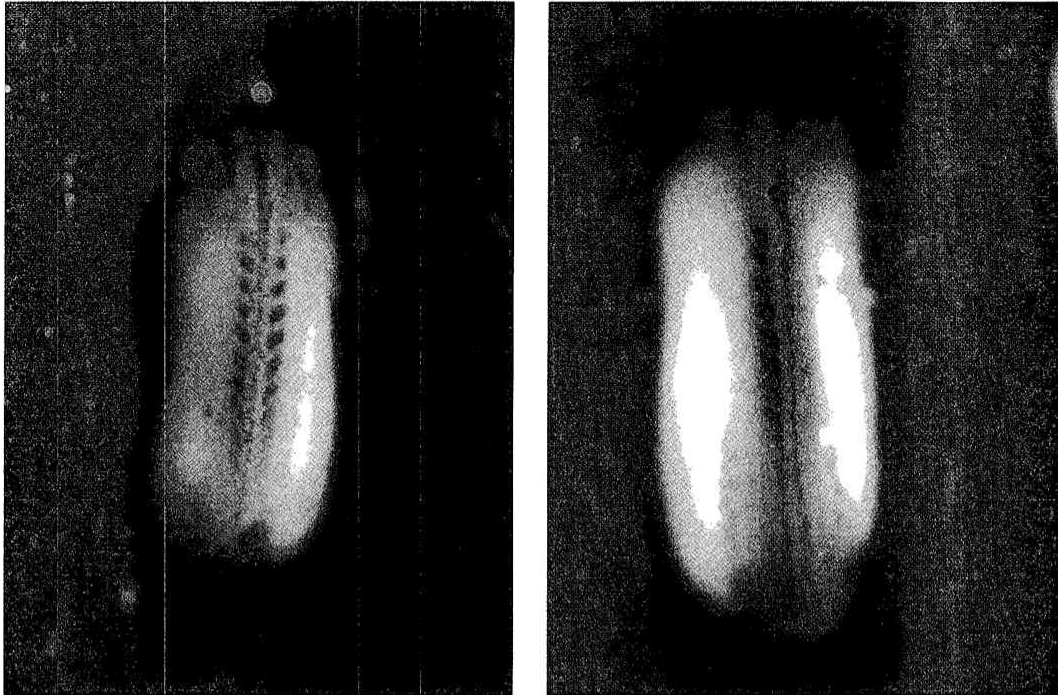


図2-3: *TGF-beta5* MO注射胚における、内臓の左右性。4細胞期の背側右割球に*TGF-beta5* MOを注射した場合には、内臓逆位はほとんど生じなかった(左図; 正位の例)。4細胞期の背側左割球に注射した場合には、高頻度で内臓逆位が生じた(右図; 心臓逆位を生じた例)。注射した側の眼の色素性網膜の形成が悪いことも観察された。

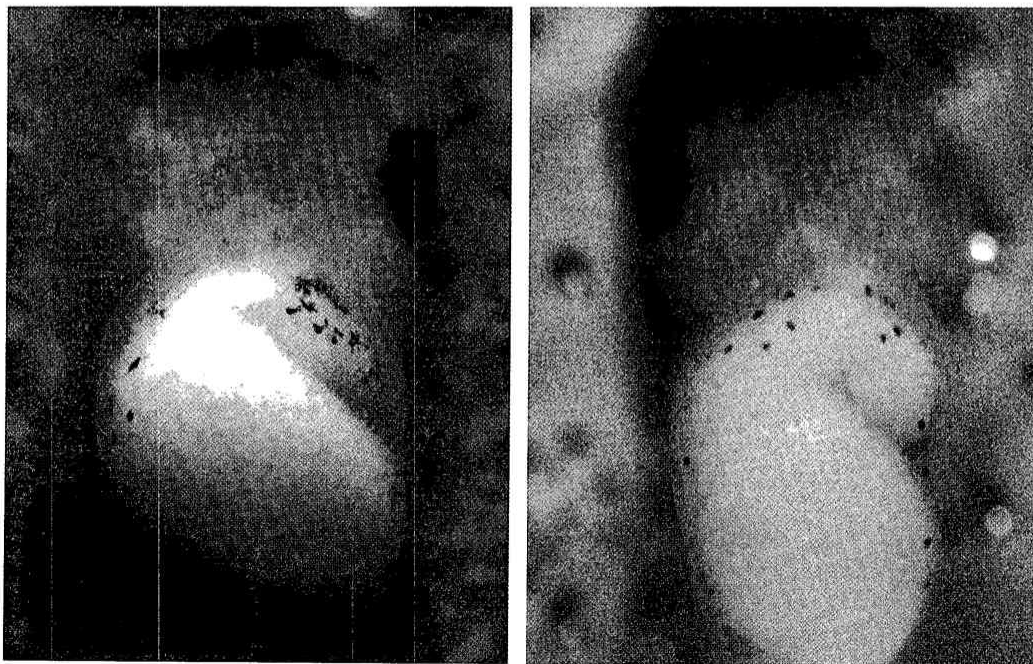


表2-1: *TGF-beta5* MOならびにcontrol MOを注射した胚の内臓逆位率。
TGF-beta5 MOを4細胞期の背側左割球に注射した時のみ高い内臓逆位率を示した。

<i>TGF-β5</i> MO	3% 2/79	30% 29/97
Control MO (human globin MO)	0% 0/70	2% 1/64
RNase-free water	0% 0/25	0% 0/43

図2-4: 4細胞期に*TGF-beta5* MOを注射した胚における*Xnr-1*, *Pitx2*の発現の側性。
 上段が右注射胚、下段が左注射胚。左注射胚の多くでは左側特異的な発現が消失した。

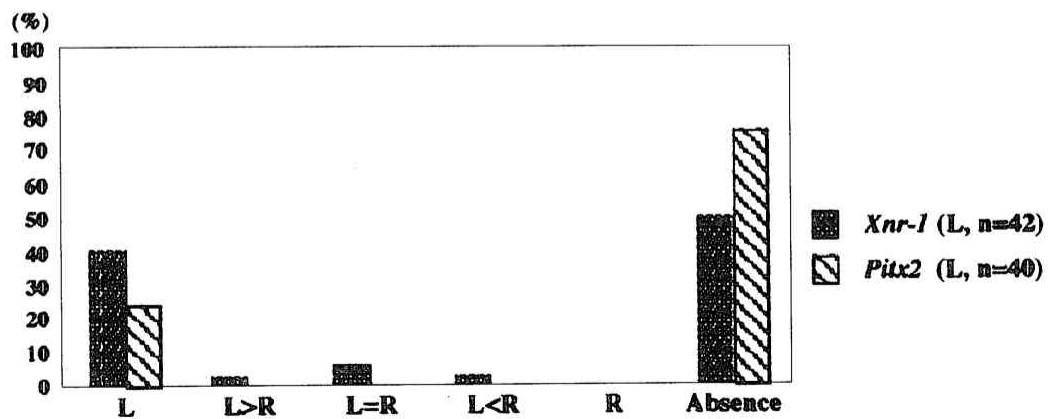
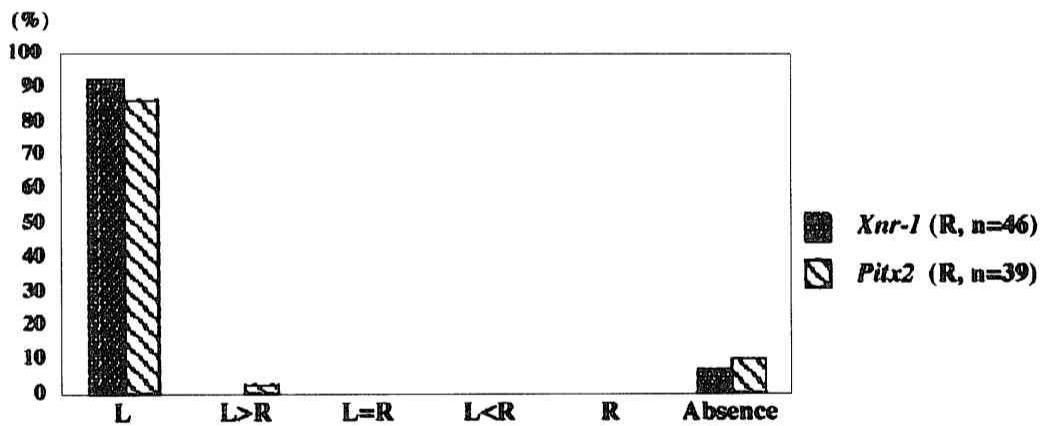
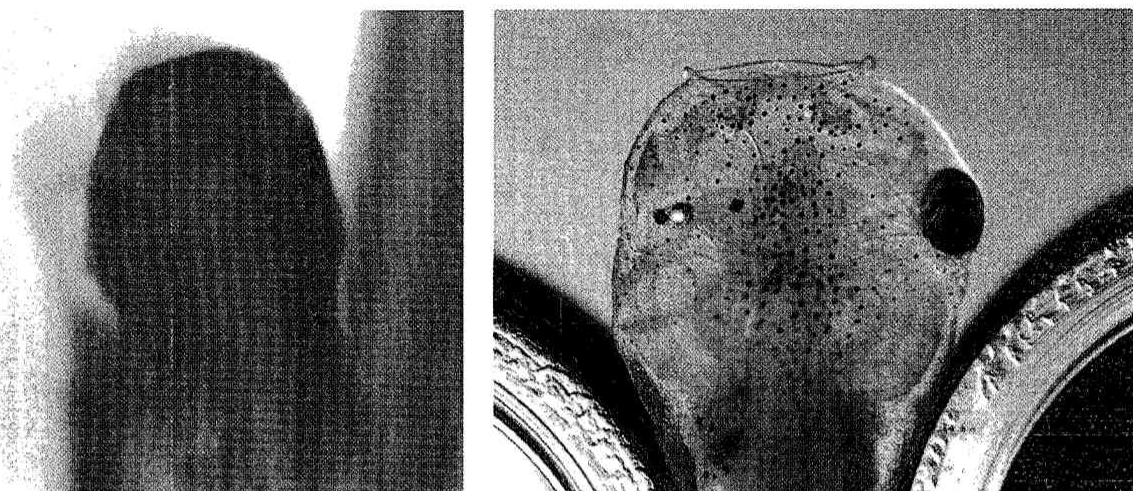


図2-5: 尾芽胚における *TGF-beta5* mRNAの眼における発現(左)と、*TGF-beta5* MOの注射による網膜の低形成(下)。MOを注射した左眼はほとんどレンズだけになっている。



【実験方法】

基本的には第一部と同じ方法を用いた。*TGF-beta5* mRNAの胚内での局在を検出するためのwhole-mount *in situ* hybridizationの方法は、Harlandの方法(1991)に若干の改良を加えた方法で行った。*TGF-beta5* cDNAのクローンはHarvard大学のDr. Douglas A. Meltonから恵与して頂いた。これをTE bufferで溶出し、Supergold competent cell(Stratagene社)に形質転換させて増幅、アルカリ溶出法で精製し鑄型とした。鑄型cDNAをlinealizerした後に、digoxigenin標識キット(Roche)を用いてUラベリングを行いながらRNA合成を行い、antisense鎖を鑄型probeとした。controlとして標識したsense RNA鎖を用いたがこれは染色されなかった。

野生胚や*TGF-beta5* MO注射胚をMEMFA溶液中で室温で1時間固定した。これをTBSTで洗浄後、メタノールで脱水し、Harlandの方法(1991)をもとにwhole-mount *in situ* hybridizationを行った。染色後の胚は、0.1%Tween 20を含むPBS-溶液で洗浄し、写真撮影を行った。写真撮影は、オリンパス製顕微鏡用デジタルカメラDP-12を用いて行った。

第三部

Proprotein convertase阻害剤の左右性への影響

TGF-beta superfamilyは、脊椎動物の胚発生のあらゆる局面で多彩な機能を発揮する分泌性リガンドのfamilyである。初期発生においては、中胚葉誘導や内胚葉の自立分化のカスケード、背腹軸形成や前後軸形成のカスケードで、Nodal, Activin, GDF, BMPなどのfamilyのメンバーが必須の役割を担う。これらの分子は、すべて前駆体タンパク質として分泌され、プロドメインにある-RXXR-モチーフのC端側で切断されて、生理活性を有する成熟型になることが知られている(松田と辻, 1997)。このRXXRモチーフを認識するエンドペプチダーゼとして、Subtilisin-like proprotein convertase(SPC)の仲間が知られている(Dubois et al., 1995; Cui et al., 1998)。現在、メンバーは8種類あるとされ、特にSPC1(Furin)は、最も早くクローニングされたファミリーメンバーでもあるので、深く解析されている(Thomas, 2002)。

FurinのmRNAは初期胚のオルガナイザー領域や側板、器官形成期には心臓や消化管に発現することが知られている。また、Furinのノックアウトマウスは左右性に異常を示す(前述; Constam and Robertson, 2000a)。SPC familyの他のメンバーであるPACE4のノックアウトマウスも左右性の乱れが生じる(Constam and Robertson, 2000b)。従って、マウス胚ではFurinをはじめとするSPC familyのメンバーが左右性に関与すると考えられている。ツメガエル胚-原腸胚の中胚葉誘導/背腹軸形成の研究分野では、中胚葉誘導因子であるNodalや腹方化因子のBMPの-RXXR-モチーフに人工的な突然変異を導入すると、元の生理活性が失われることが報告されている(Cui et al., 1998; Osada and Wright, 1999; Onuma et al., 2002)。従って、SPCが中胚葉誘導や背腹軸形成に関与するであろうことが示唆されている。しかしながら、マウス以外の脊椎動物でSPCが左右性に影響することを証明した報告はない。また、FurinやPACE4のknock outマウス胚の場合にも、これらの酵素の基質となり、マウス胚の左右性に影響を与えている前駆体タンパク質が何であるのかは、全く絞り込めていない状態である。更に、Furin KOマウスとPACE4 KOマウスとでは左右性の異常のパターンがやや異なるので、同じ基質(たとえばマウス胚に1種類しかないNodalタンパク質)が両KOマウスの左右性異常の原因とは断定できない。

アフリカツメガエル胚は外来遺伝子の発現が容易であるため、変異導入タンパク質を用いた生化学的なSPC機能の解析が容易であると考えられる。また両生類に関しては、そもそもSPCが左右性に関与するか否かも検討されていない。そこで我々は、神経胚期のアフリカツメガエル胚の左右性成立機構にSPCが影響しているか否かについて、SPCの認識モチーフを模倣したペプチドアナログである阻害剤2種類を微量注入することで検討した。

【実験結果】

NodalをはじめとするTGF-beta superfamilyのリガンドは前駆体蛋白質として分泌され、その-RXXR-モチーフ部位が、Furinなどのエンドペプチダーゼによる限定分解を受けて活性型に変換される。Furinの仲間(Subtilisin-like proprotein convertase; SPC)の阻害剤として働く、-RXXR-モチーフアナログであるDecanoyl-RVKR-chloromethyl-ketoneやヘキサアルギニン(H-(D)RRRRRR-NH₂)の二つのペプチド性阻害剤を1-500pgの投与量でツメガエル初期-中期-後期神経胚の側板に注射した。その結果、左側板に注射した場合にも、右側板に注射した場合にも、57%以上の注射胚に心臓逆位や腸管逆位が生じた(表3-1)。どちらの阻害ペプチド投与の場合にも、注射胚の形は左右性を除いては正常であり、生存率も高かった。従って、Furinの仲間の酵素が左側板かその近傍組織で働くことが、神経胚の左側板特異的な*Xenopus nodal related-1*の発現、ひいては正常な左右性の決定に必要であることが示唆された。また、全く未知である両生類胚の右側決定のシグナル伝達経路に、右側板で機能するTGF-beta superfamilyのリガンドの、プロドメイン部分のプロセッシングによる活性化が関連していることも示唆された。SPC阻害剤をstage 7-9の胞胚腔に注射した場合には、胚の伸長が顕著に阻害され、単眼奇形や心臓の低形成が高頻度に生じた(図3-1)。

表3-1:

a) Decanoyl-RVKR-chloromethylketoneの側板への微量注射による内臓逆位誘発率

Right

stage	neurula stage	
	13-14	15-16
dose (ng)	Upper. %: Lower, inverted/survived	
125	33 24/73	70 32/46
50	33 8/24	- -
1-5	4 3/72	- -

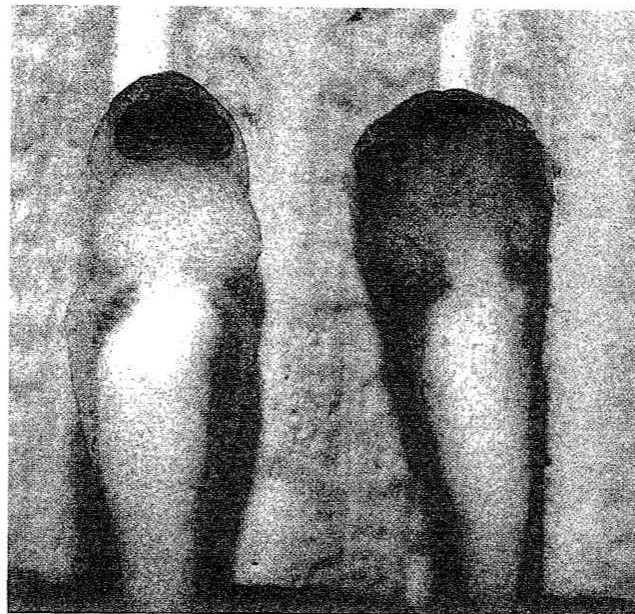
Left

stage	neurula stage	
	13-14	15-16
dose (ng)	Upper. %: Lower, inverted/survived	
125	45 29/64	36 17/47
50	60 15/25	- -
1-5	3 2/73	- -

b) ヘキサアルギニン(H-(D)RRRRRR-NH₂)の側板への微量注射による内臓逆位誘発率

Right				Left			
stage	neurula stage			stage	neurula stage		
	13-14	15-16	17-18		13-14	15-16	17-18
dose (ng)	Upper, %	Lower, inverted/survived		dose (ng)	Upper, %	Lower, inverted/survived	
500	-	100 19/19	-	500	-	57 12/21	-
250	53 34/64	83 39/47	48 23/48	250	30 20/66	49 23/47	33 16/48
100-125	24 23/96	25 18/72		100-125	19 23/121	17 8/48	
50	0 0/48	0 0/38		50	0 0/48	0 0/38	

図3-1: SPC inhibitor(ヘキサアルギニン)の胞胚腔注射による単眼奇形。
 左胚はヘキサアルギニン(25ng)注射胚、右胚は正常胚。単眼奇形は、一般に、脊索前板の形成不全により誘起される。胚の他の部分が比較的正常な状態にあるので、主に脊索前板をはじめとする背側前方組織が、SPC inhibitorの影響で特異的に形成不全を起こしていると考えられる。



【実験方法】

Toyoizumi et al. (2000)と同じ方法で、卵膜を剥いたstage 13-18のアフリカツメガエル神経胚の側面中央部の皮下に、ヘキサアルギニン(H-(D)RRRRRR-NH₂)もしくはDecanoyl-RVKR-chloromethylketoneの2種類のSPC inhibitorの水溶液を注入した。注射に際しては、生体染料のNile Blueを最終濃度1%で混和し、注射の左右性をチェックした。胞胚腔注射の場合には、卵膜のついた状態で微量注射した。

第四部

アカハライモリ胚*nodal*相同遺伝子の単離

20世紀の初頭には、両生類幼生/成体の間脳の一部が左右非対称性を示すことが知られていたが、その分子機構に関してはその後、約80年にわたり、全く手掛かりがなかった。間脳第三脳室の最も背側に位置する手綱核 *Nucleus habenularis* (*habenula*) という神経核は、特定の両生類で、一見して判別出来るほど著しく左右非対称であることが知られている。例えば、アカガエル科 *Rana* 属のウシガエルでは、左側が右側の(最大断面積にして) 2倍大きい(豊泉, 未発表)。ウシガエルの幼生並びに成体において、左側の手綱核は2室または3室に分室し中隔をもつが、右側は1室である。分子生物学的な解析に適したモデル動物である両生類ピパ科 *Xenopus* 属のアフリカツメガエルの手綱核は、残念ながら、幼生から成体に至るまで一生を通じて、左右対称な叢状構造を持つとされる。

1998年に、ゼブラフィッシュ *nodal* 遺伝子 (*cyclops*) が、体節期胚の間脳の一領域の左側のみに一過的に発現することが発見された (Rebagliati et al., 1998)。また、1999年にゼブラフィッシュ *lefty-1* (*antivin*) 遺伝子が、ほぼ同じ領域で、最初は左右両側に発現するが、その後一時的に左側のみに発現することも判明した (Thisse and Thisse, 1999)。更に、ほぼ同じ領域に、内臓左右軸決定の最終遺伝子と言われるゼブラフィッシュ *Pitx2* 遺伝子が、やはり左側のみに発現することも発見された (Bisgrove et al., 2000; Essner et al., 2000)。これらの遺伝子の発現領域は、当初は間脳手綱核の起源組織であるとされてきたが、現在では、上生体(松果体)の起源組織であるとの説が有力である。これらの遺伝子発現は、若い胚にごく一過的に発現するものであり、硬骨魚類成体の脳は、手綱核を含めてほぼ完全に左右対称である。一方、*Rana* 属のカエルやイモリの手綱核は、変態期を境に終生左右非対称なので、両生類手綱核の分子発生学的研究は、「脳の左右学」にゼブラフィッシュとは異なった寄与をすると期待される。アフリカツメガエル胚では、左右非対称に発現し『内臓の』左右軸形成に関与するとされる遺伝子としては、*nodal* (*Xnr-1*), *antivin*, *Pitx2* の3つが機能的に主な役割を果たすものとされ、いずれも胚の左側の側板で発現する。ところが、最も古くから脳構造が左右非対称であることが判明していた両生類であるが、脳神経系に左右非対称に発現する遺伝子は、未だにひとつも知られていない。我々は、材料として入手しやすく間脳手綱核が左右非対称性を示す、有尾両生類アカハライモリ胚を材料に、zebrafishでの知見をもとに胚期の間脳手綱核で左右非対称性を示す遺伝子の候補として *nodal* 相同遺伝子を想定し、その単離を試みた。

【材料と方法】

脊椎動物のNodalで保存されたアミノ酸配列や、Nodalと同じTGF-beta superfamilyに属するリガンドのアミノ酸配列をもとに、forward 6種類、reverse 6種類の degenerate primerを作成し、アカハライモリ原腸胚や同尾芽胚由来のtotal RNAを鋳型にしてdegenerate RT-PCRを行った。family間で保存された2つのアミノ酸モチーフ間で予想されるアミノ酸残基数は、ある程度の予測がつく。予想されたサイズのPCR増幅産物が得られた場合に、このバンドを切り出し、アガロースゲルからPCR産物を抽出した。(予想されたサイズと異なるサイズの増幅産物は、通常は非特異的増幅産物であるので、これは破棄した。)これをpGEM-T cloning vectorにligationさせた後に、Big Dye terminator kitを用いたcycle sequence法により、塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、DDBJやNCBIなどの遺伝子登録バンクのデータベースをもとにBLAST解析を行い、いくつかのカテゴリーに分類し、*noda*相同遺伝子であると思われるものをピックアップした。Genetyx Mac(ソフトウェア)を用いて、*noda*相同遺伝子の塩基配列の multiple alignmentを得て、配列整形により塩基配列決定を行い、推定アミノ酸配列を割り出した。

【実験結果】

初期原腸胚期(st. 11)のアカハライモリ胚を材料にtotal RNAを調製し、これを鋳型にしたdegenerate PCR法によりイモリ*noda*関連遺伝子をクローニングすることを行い、C末端側の262塩基の部分塩基配列を決定した。塩基配列決定には、*noda*相同遺伝子の cloneと思われた25個のcloneのうち、23個分のcloneを用いた。multiple alignmentを取った結果、これらが同一の遺伝子をコードしていることが分かった。多型と思われる場所が一カ所あった(25塩基目のW(A or T))が、推定アミノ酸配列に影響を与えない多型であった。塩基配列と、それから推定されるアミノ酸配列は、下記の通りとなった。

```
Sequence Size      : 262
Translation Position:  2 - 262;
Genetic Code       : Universal Code

      10      20      30      40      50      60
GATTGTGGATTTTGAGGAGATTGGWTGGGGCAGCTGGATCGTGTACCCCAAGAGGTACAA
I V D F E E I X W G S W I V Y P K R Y N

      70      80      90     100     110     120
TGCCTACAGATGCGAGGGGCTCTGCCCGACGCCAGTGGATGAAACATTCAGTCCCCTAA
A Y R C E G L C P T P V D E T F S P T N
```



```

      130      140      150      160      170      180
TCATGCATACATGCAGAGTTTGCTGAAGCTGTACCACCCAAACCGTGTGGAGTGCCCATC
H A Y M Q S L L K L Y H P N R V E C P S

      190      200      210      220      230      240
CTGTGTTCCAGTTAAGATGAGCCCACTTTCCATGCTGTACTACGAGAATGGCGAGGTGGT
C V P V K M S P L S M L Y Y E N G E V V

      250      260      270
CCTACGCCACCATGAGGACATG
L R H H E D M

```

この遺伝子をアカハライモリの学名をもとに *Cynops pyrrhogaster nodal-related 1* (*Cynr-1*)と名付けることにした。推定アミノ酸配列をもとにしたBLAST検索(BLASTx)の結果、*Cynr-1*はzebrafish *nodal related-2 (ndr2; cyclops*と同一)や、ツメガエルの6つの*noda*関連遺伝子のうちの*Xnr-1*と最も相同性が高く、*cyclops*とは79%、*Xnr-1*とも79%の相同性を推定アミノ酸配列レベルで有していた。*cyclops*、*Xnr-1*ともに左側板特異的に発現し、しかも*cyclops*は間脳の一部領域の左側の一過的に発現することが知られている。古くからの形態学的な知見と以上の結果から、*Cynr-1*がイモリ胚間脳手網核に左右非対称に発現する可能性が高いので、現在は*in situ hybridization*法を用いて*Cynr-1* mRNAの発現パターンを調べている。今後は、同じdegenerate primer pairを用いて、*Rana catesbeiana* (ウシガエル)の*nodal*のクローニングと、RACE法による*Cynr-1*のORF全長の塩基配列の決定を行う予定である。

【まとめと今後の展望】

無尾両生類アフリカツメガエル胚の左側板中胚葉に発現する*Xnr-1*遺伝子のコードする蛋白質は、ツメガエル胚内臓の左右非対称性の向きを決め、心臓形態に影響を及ぼすことを明らかにした。次に、左側板における*Xnr-1*発現の誘導機構にはTGF-beta5が関与することを明らかにした。*Xnr-1*遺伝子はTGF-beta5依存的に胚の左側板中胚葉でのみ発現し、TGF-beta5蛋白質の非存在下ではその発現が低下/消失する。更に、Subtilisin-like Proprotein convertase阻害剤を側板に注射した結果、非常に高頻度に内臓逆位が生じたことから、左側板における*Xnr-1*蛋白質はProprotein convertase依存的に活性化することが示唆された。また、有尾両生類にも*Xnr-1*に相同性の高い遺伝子が存在することが分かり、有尾両生類の脳神経系の左右非対称性に*nodal*が関与することが期待される。これらの結果から、*nodal*遺伝子の左側特異的な発現は、さまざまな階層の分子機構によって調節を受けることが予想され、Nodalリガンドを左側組織で働かせるメカニズムが両生類胚の左右非対称な形態形成の向きを決めると考えられる。

今後暫くは、引き続き両生類胚の*nodal*相同遺伝子の発現制御機構を解析対象にして、脊椎動物の左右性決定において主要な役割を果たすと思われる*nodal*関連のメカニズムを明らかにしていくことを考えている。更に時間があれば、下記のような*nodal*研究を、鳥類や両生類の発生学の立場から行いたいと考えている。

ニワトリ胚の*nodal*(*Cnr-1*)の研究は非常に有名で、左側の分子マーカーとしてこれのprobeを用いた*in situ* hybridizationが今でも盛んに行われているが、実はそのORF全長は単離されておらず、ゲノムからの転写調節の観点での*Cnr-1*の研究もなされていない。またニワトリのゲノムプロジェクトは家禽としての有用性にもかかわらず動いておらず、ニワトリ胚の*nodal*がいくつあるのかすら不明である。マウス(齧歯目)胚のオルガナイザーに左右非対称に発現する*HNF-3beta*は、スナグス(哺乳類食虫目)胚では左右対称であるという。ならば、鳥類のもうひとつの発生モデル動物であるウズラ(*Coturnix coturnix*)胚の*nodal*は、ニワトリ胚とは異なる発現パターンを示すのであろうか？一番下等な両生類であるピパ科のツメガエルの*nodal*と、より高等な日本のカエルの*nodal*との間で発現パターンや発現制御機構を比較した時に、どこが異なるのであろうか？興味とやりたいことは尽きないが、ここで一旦筆を置く。

参考文献

- Bisgrove, B.W., Essner, J. J. and Yost, H. J. (2000). Multiple pathways in the midline regulate concordant brain, heart and gut left-right asymmetry. *Development* 127, 3567-3579.
- Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., van Bebber, F., Lowe, L. A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M. R. and Blum, M. (1999). The homeobox gene *Pitx2*: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* 126, 1225-1234.
- Capdevila, J., Vogan, K. J., Tabin, C. J., and Izpisua Belmonte, J. C. (2000). Mechanisms of left-right determination in vertebrates. *Cell* 101, 9-21.
- Cheng, A. M., Thisse, B., Thisse, C. and Wright, C. V. (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.
- Constam, D. B. and Robertson, E. J. (2000a). Tissue-specific requirements for the proprotein convertase furin/SPC1 during embryonic turning and heart looping. *Development*. 127, 245-254.
- Constam, D. B. and Robertson, E. J. (2000b). SPC4/PACE4 regulates a TGFbeta signaling network during axis formation. *Genes Dev.* 14, 1146-1155.
- Cui, Y., Jean, F., Thomas, G. and Christian, J. L. (1998). BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J.* 17, 4735-4743.
- Essner, J. J., Branford, W. W., Zhang, J. and Yost, H. J. (2000). Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by *pitx2* isoforms. *Development* 127, 1081-1093.
- Essner, J. J., Vogan, K. J., Wagner, M. K., Tabin, C. J., Yost, H. J. and Brueckner, M. (2002). Conserved function for embryonic nodal cilia. *Nature* 418, 37-38.
- Dubois, C. M., Laprise, M. H., Blanchette, F., Gentry, L. E. and Leduc, R. (1995). Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J. Biol. Chem.* 270, 10618-10624.
- Hamada, H., Meno, C., Watanabe, D., Saijoh, Y. (2002). Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat Rev. Genet.* 3, 103-113.
- Harland, R. M. (1991). In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol.* 36, 685-695.
- Hummel, K. P. and Chapman, D. B. (1959). Visceral inversion and associated anomalies in the mouse. *J. Hered.* 50, 9-13.

- Kondaiah, P., Sands, M. J., Smith, J. M., Fields, A., Roberts, A. B., Sporn, M. B. and Melton, D. A. (1990). Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 265, 1089-1093.
- Kondaiah, P., Taira, M., Vempati, U. D. and Dawid, I. B. (2000). Transforming growth factor-beta5 expression during early development of *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 95, 207-209.
- Logan, M., Pagan-Westphal, S. M., Smith, D. M., Paganessi, L. and Tabin, C. J. (1998). The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* 94, 307-317.
- Lowe, L. A., Supp, D. M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C. V. E., Potter, S. S., Overbeek, P. and Kuehn, M. R. (1996). Conserved left-right asymmetry of *nodal* expression and alterations in murine *situs inversus*. *Nature* 381, 158-161.
- Liu, C., Liu, W., Lu, M. F., Brown, N. A. and Martin, J. F. (2001). Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity. *Development* 128, 2039-2048.
- Lu, M. F., Pressman, C., Dyer, R., Johnson, R. L. and Martin, J. F. (1999). Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* 401, 276-278.
- Mochizuki, T., Saijoh, Y., Tsuchiya, K., Shirayoshi, Y., Takai, S., Taya, C., Yonekawa, H., Yamada, K., Nihei, H., Nakatsuji, N., Overbeek, P. A., Hamada, H. and Yokoyama, T. (1998). Cloning of *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* 395, 177-181.
- 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.
- 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.
- Onuma, Y., Takahashi, S., Yokota, C. and Asashima, M. (2002). Multiple *nodal*-related genes act coordinately in *Xenopus* embryogenesis. *Dev. Biol.* 241, 94-105 (2002)
- Osada, S-I. and Wright, C. V. E. (1999). *Xenopus nodal*-related signaling is essential for mesendodermal patterning during early embryogenesis. *Development* 126, 3229-3240.
- Piedra, M. E., Icardo, J. M., Albajar, M., Rodriguez-Rey, J. C. and Ros, M. A. (1998). Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* 94, 319-324.
- Rebagliati, M. R., Toyama, R., Fricke, C., Haffter, P. and Dawid, I. B. (1998). Zebrafish nodal-related genes are implicated in axial patterning and establishing left-right asymmetry. *Dev. Biol.* 199, 261-272.

Ryan, A. K., Blumberg, B., Rodriguezesteban, C., Yoneitamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., Delapena, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S., Norris, D. P., Robertson, E. J., Evans, R. M., Rosenfeld, M. G. and Belmonte, J. C. I. (1998). *Pitx2* determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* 394, 545-551.

Schier, A. F. and Hamada, H. (1999). Mouse Lefty2 and zebrafish antivin are feedback inhibitors of nodal signaling during vertebrate gastrulation. *Mol. Cell* 4, 287-298.

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.

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.

Thisse, C. and Thisse, B. (1999). Antivin, a novel and divergent member of the TGFbeta superfamily, negatively regulates mesoderm induction. *Development* 126, 229-240.

Thomas, G. (2002). Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 753-766.

Toyoizumi, R., Kobayashi, T., Kikukawa, A., Oba, J. and Takeuchi, S. (1997). Adrenergic neurotransmitters and calcium ionophore-induced *situs inversus viscerum* in *Xenopus laevis* embryos. *J. Growth. Differ.* 39, 505-514.

Toyoizumi, 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.* 224, 321-336.

Yasuhiko, Y., Imai, F., Ookubo, K., Takakuwa, Y., Shiokawa, K. and Yokoyama T. (2001). Calmodulin binds to inv protein: implication for the regulation of inv function. *Dev. Growth Differ.* 43, 671-681.

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). Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* 94, 299-305.

前原勝矢 (1989).

『右利き・左利きの科学』

講談社 ISBN 4-06-132782-8 pp.192-193.

松田佳子・辻 明彦 (1997).

前駆体蛋白質の活性化とケキシンファミリー, プロセッシングプロテアーゼ

蛋白質核酸酵素増刊号 『プロテオリシス—蛋白質分解の分子機構とバイオロジー』

編集: 鈴木絃一・木南英紀・田中啓二, pp. 2355-2361.

堀 正美・三浦 洋・豊泉龍児・竹内重夫 (1999).
両生類の手綱核(*Nuclei habenulae*)の左右非対称性についての組織学的観察
神奈川大学総合理学研究所「年報'98」原報 pp. 73-84.

【謝辞】

本研究は、神奈川大学共同研究奨励助成『両生類初期胚における内臓左右軸決定機構の研究』の助成を得て、2001年4月から2003年3月にかけて2年間実施してまいりました。この場をお借りして、御礼申し上げます。また、本研究の実施に際しては、神奈川大学理学部総合理学研究所に丁寧なケアをして頂きました。総理研所長、所員の先生方、ならびに総理研事務局に感謝いたします。