

神奈川県総合理学研究所2002年度共同研究報告書
申請区分:その他

D. 後口動物胚における原腸形成のメカニズムの研究

○研究組織

学内メンバー; 豊泉 龍児(生物科学科助手)、茂木-豊泉 和枝(総理研客員研究員)、
日野 晶也(生物科学科教授)、竹内重夫(生物科学科教授・責任者)
学外メンバー; 溝口元 (立正大・社会福祉・生命科学/教授)

【研究の目的】

受精卵が卵割を繰り返し、やがて、中空の上皮細胞のシートとしての胞胚が形成される。オルガナイザー領域(形成中心)とよばれる、体軸形成に関連した遺伝子の発現が活性化した領域が胞胚の一部に生じ、そこを中心にした形態形成運動の結果、外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉が形成され、胚誘導の連鎖の結果としての細胞分化と更なる細胞増殖の結果、胚発生が進行する。

このオルガナイザー領域に発現する数多くの遺伝子の中でも、胚の背側の決定と背側中軸中胚葉の形成に必要な分泌因子である TGF-beta superfamilyの仲間 (Nodalや Derriere, GDFなど)は、体軸の形成に主導的な役割を果たす。しかしながら、面白いことに、Nodalなどの背側中軸中胚葉誘導因子が働き過ぎないように、ブレーキの役割を果たすLefty(図1左)やCerberusもまた、オルガナイザー領域に局在することが近年発見された。これらはオルガナイザー領域で転写が活性化される分泌因子として、同じオルガナイザー領域で分泌されるもっとも重要な誘導因子であるNodalタンパク質とそのリセプターとの結合を、細胞外で競合的に阻害すると予想されている(図1右)。

LeftyはTGF-beta superfamilyに属し、同じファミリーの他のメンバー(2量体)とは異なり、おそらく単量体のデコイとして、Nodal受容体をNodalを相手に奪い合うことで、Nodalシグナルを負に制御する因子であることが、哺乳類のマウス胚を用いた解析から予想されている。本研究は、Nodalシグナルの調節機構を発生生理学的に解明することを目的として、Leftyタンパク質をツメガエル胚の胞胚腔に微量注射し、胚の形態形成に対する影響を調査した。

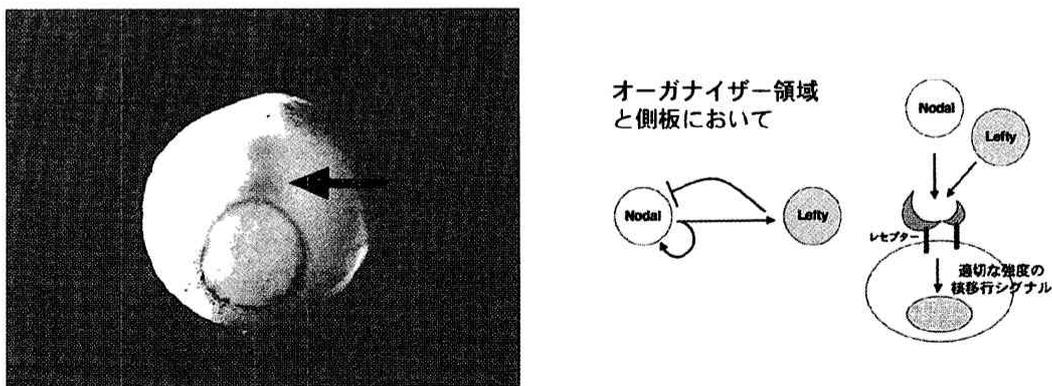


図1: ツメガエル初期原腸胚の原口背唇部におけるlefty mRNAの発現(左図矢印)と、LeftyのNodal抑制機序(右図)。単量体と推定されるLeftyはNodal受容体を塞ぐ。

【主要な実験結果】

胚1個あたり、6 nanogram(ng)のLeftyを胞胚腔に注射すると、前後軸方向の体軸の伸長が阻害され、両眼の間隔が著しく狭い例や、胚頭端部で単眼となる例が高頻度で観察された(図2)。

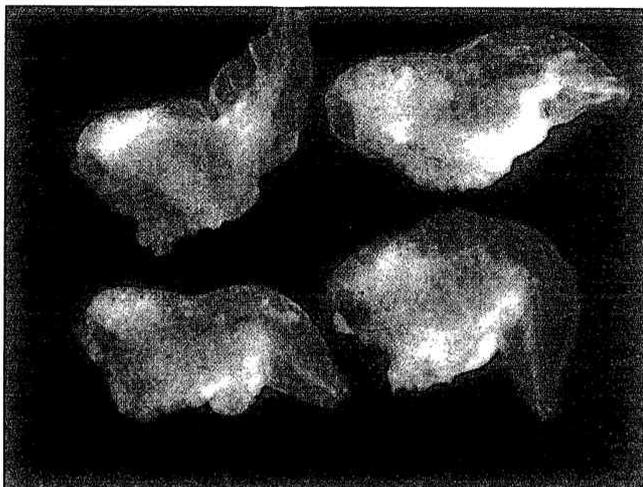


図2:

6ngのLefty蛋白質を胞胚腔に注射した後の3日胚。

体軸の伸長が阻害され、単眼奇形を生じている。

[写真撮影/
竹内研卒研究生 茂木美香氏]

*Nodal*や*Lefty*は、魚類、両生類、鳥類、哺乳類のいずれの脊椎動物においても、体節期胚の左側の側板中胚葉のみに発現し、右側の側板中胚葉には発現しないことが知られている。いわゆる左右非対称な発現が脊椎動物内で保存されている。側板中胚葉における*Nodal*の発現については、*Nodal*タンパク質による自己増幅的な発現制御が行われることが知られている。この側板における*Nodal*の発現の過熱を押さえる抑制因子として*Lefty*が左側で発現するとされる。この説明が完全であるならば、右側の側板中胚葉に*Lefty*タンパク質を微量注射しても、何の変化も生じないはずである。ところが、体節期胚の右側板中胚葉に6 ngの*Lefty*タンパク質を微量注射すると、約7割の注射胚で内臓逆位が生じることが分かった(表左)。この結果は、*Lefty*が*Nodal*のアンタゴニストであるとする従来の通説のみでは説明がつかない実験結果である。左側の側板中胚葉に同量の*Lefty*タンパク質を注射した場合にも、約7割の注射胚に内臓逆位が生じた。こちらの結果は、過剰量を投与された*Lefty*タンパク質が、胚の左側に分布する*Nodal*タンパク質の作用を競合阻害した結果であると考えられる(表右)。

表: 神経胚側板に*Lefty*タンパク質を注射することで得られた内臓逆位胚の比率(%)
発生段階別に集計した。(内臓逆位率の算出方法は、Mogi *et al.* 2003に従った。)

Right

stage	neurula stage		
	15-16	17-18	19-20
dose (ng)	Upper, %; Lower, inverted/survived		
6	72 36/50	62 29/47	72 18/25

Left

stage	neurula stage		
	15-16	17-18	19-20
dose (ng)	Upper, %; Lower, inverted/survived		
6	70 35/50	71 34/48	50 12/24

【考察と今後の展望】

両眼の間隔が狭くなったり、単眼となる表現型は、最前方の中軸中胚葉である脊索前板の形成不全によって生じることが、古くから知られている。また、Lefty胞胚腔注射胚が短軀となるのは、尾芽胚期に脊索の伸長運動がおこり体軸が急激に伸長するが、そのプロセスに障害が生じたためと考えられる。胞胚腔に注射したLeftyタンパク質は、従来から言われてきたようにNodalの働きを阻害した結果として、短軀や単眼の表現型をもたらしたと考えられる。今後、組織切片を作成し細胞像を観察したり、脊索特異的な分子マーカーで胚を染色することで、実際に脊索や脊索前板の形成が低形成となっていることをチェックする必要がある。今後の課題としては、Leftyの過剰投与が、原腸形成における細胞の運動性の変化をもたらしたのか、それとも背側中軸中胚葉の分化を阻害したのかを見極める実験を組む必要がある。

本研究の本筋に則った実験ではないが、右側板中胚葉にLeftyタンパク質を投与することが内臓の左右決定に大きな影響を与えるという意外な結果を得た。その解釈として2つの可能性がある。一つは、Leftyは、Nodalタンパク質が過剰量存在する場合にはその働きを抑制するが、Nodal遺伝子が全く発現していない状態では、Nodalの発現を誘導するという可能性である。もう一つの可能性は、Leftyには胚の右側組織の分化に関わるシグナル伝達経路を抑制する働きがあり、右側にLeftyタンパク質を注射した時には、右側板の右分化が抑制され、正常胚の中でのLeftyは(左側板に分布することで)左側板の右分化を抑制していた可能性である。Leftyタンパク質を右側側板に注射した胚で、Nodalやそのカスケードの下流に位置し左側決定を行う転写因子*Pitx2*の発現がどのように変化しているかについて、(特定の遺伝子のmRNA発現パターンを検出する方法である)*in situ* hybridization法を用いて調べることで、どちらの作業仮説が妥当であるのかを検討する必要がある。

いずれにせよ、Leftyは、ツメガエル原腸胚の形態形成や神経胚の左右性決定に深く関与し、両生類胚の初期発生に必要な分子であると考えられる。アンチセンス核酸法を用いて、Leftyタンパク質の合成をノックダウンさせたツメガエル胚を作出し、Loss-of-functionの方法論からも機能解析を掘り下げたい。また、脊椎動物の起源動物である棘皮動物胚(ウニ、ヒトデ)の仲間や、直接の祖先動物である原索動物(ホヤの仲間)の胚を材料に、Lefty相同遺伝子をクローニングし、その遺伝子発現パターンについて調べることは、意義深いと思われる。