



Title	Inhibition of Nodal signaling by Lefty mediated through interaction with common receptors and efficient diffusion
Author(s)	佐久間, 壘
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/43756
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	佐久間 壘
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16840 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Inhibition of Nodal signaling by Lefty mediated through interaction with common receptors and efficient diffusion (Lefty は効率よく拡散し、Nodal 受容体への競合的相互作用により Nodal シグナルを抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 濱田 博司 (副査) 教授 近藤 寿人 教授 平野 俊夫

論文内容の要旨

【目的】

これまで、高等動物の発生過程において左右軸のパターン形成の分子機構はほとんど未解明の状況であったが、近年、TGF β スーパーファミリーに属する遺伝子、*nodal* と *lefty* がマウスの初期胚で一過性に左側のみに発現する事が示された。その後の遺伝学的な解析により Lefty は Nodal のフィードバック阻害因子であること、*lefty* と *nodal* は左右軸決定の他に中胚葉誘導・前後軸決定など胚の様々なパターン形成を担っていることが示された。また、Nodal は EGF-CFC タンパク (Cripto, Cryptic) の存在下、アクチビン受容体 (ActR II A, ActR II B, ALK4, ALK7) を介してシグナルを伝達することが報告されているが、Lefty の作用メカニズムの詳細は明らかとなっていない。本研究では Lefty による Nodal シグナル阻害のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法ならびに成績】

1. Nodal 受容体の同定

アフリカツメガエルのアニマルキャップを用いたルシフェラーゼアッセイにより、不活性型変異受容体の Nodal シグナル阻害効果を検討した。この結果、ActR II A, ActR II B, ALK4, ALK5 の各不活性型変異受容体により Nodal シグナルが抑制された。続いて不活性型変異受容体で抑制された Nodal シグナルへの正常受容体の過剰発現の影響を検討した。Nodal シグナルは ActR II A, ActR II B, ALK4 の過剰発現によりレスキューされたが、ALK5 の効果は認められなかった。以上より、Nodal シグナルは ActR II A, ActR II B, ALK4 を介することが示唆された。

続いて、Nodal や分泌型受容体の RNA を注入したアフリカツメガエルの卵母細胞から調製した培養上清を用いてタンパクレベルでの結合実験を行った。その結果、Nodal は分泌型 Cripto と結合したが、分泌型 ActR II と結合しなかった。以上より Nodal は Cripto と結合した後に ActR II, ALK4 と相互作用し、細胞内にシグナルを伝達することが示唆された。

2. Lefty の作用メカニズムの解明

まず、アニマルキャップを用いたルシフェラーゼアッセイにおいて Lefty1 と Lefty2 は共に Nodal シグナル阻害活性を示すことを確認した。続いて、Lefty の作用メカニズムを明らかにするために、Nodal 受容体の過剰発現による

レスキュー実験を行った。Leftyにより抑制されたNodalシグナルはActR IIの過剰発現によりレスキューされたが、CriptoやALK4の過剰発現の効果は認められなかった。以上から、LeftyはActR IIと相互作用することによりNodalシグナルを阻害することが示唆された。しかし、タンパクレベルでのLeftyとActR IIの直接的な結合は認められず、2者の相互作用のためには未知の共因子が必要であると考えられた。

3. *lefty*と*ActR II B*の相互作用の遺伝学的解析

*in vivo*におけるLeftyとActR IIの相互作用を検討するために、*lefty2*変異マウスに*ActR II B*変異を導入した。*lefty2*^{-/-}、*ActR II B*^{+/+}胚では過剰なNodalシグナルにより嚢胚形成の異常が起こり、中胚葉の過剰形成と頭褶の欠損が認められるが、*lefty2*^{-/-}、*ActR II B*^{-/-}胚では中胚葉の蓄積が減少し、小さい頭褶を形成した。また原条のマーカである*T*の発現は*lefty2*^{-/-}、*ActR II B*^{+/+}胚では側方に拡がり、前方に伸びていないが、*lefty2*^{-/-}、*ActR II B*^{-/-}胚は側方への拡がりが増減され、前方への伸長が認められた。以上のことは*ActR II B*変異の導入により*lefty2*^{-/-}の表現型が部分的にレスキューされた事を示しており、*in vivo*においてもLeftyはActR IIを介してNodalシグナルを抑制する事が示唆された。

4. Nodal、Lefty2の拡散性の検討

Nodal、Lefty2の成熟領域のN末側にGFPを融合させたGFP-Nodal、GFP-Leftyの発現ベクターを作製し、側板中胚葉における拡散の可視化を試みた。GFP発現ベクター(pCAGGS GFP、pCAGGS GFP-Nodal、pCAGGS GFP-Lefty2)とβガラクトシダーゼ発現ベクター(pCAGGS lacZ)を電気穿孔法によりニワトリの側板中胚葉に導入後、GFPの蛍光領域とβガラクトシダーゼによる発色領域を比較検討した。対照実験ではGFPとβガラクトシダーゼの領域は一致したが、GFP-NodalやGFP-Lefty2ではGFPの蛍光はβガラクトシダーゼの領域より拡がっていた。また、GFP-Lefty2はGFP-Nodalより遠方に拡散したことから、Lefty2はNodalより拡散速度が速い事が示唆された。

【総括】

本研究によりNodalはCriptoと結合し、さらにActR II、ALK4と相互作用する事により細胞内にシグナルを伝達する事、また、LeftyはActR IIと相互作用してNodalシグナルを抑制する事が示された。また、ニワトリの側板中胚葉においてGFP-Lefty2はGFP-Nodalより拡散速度が速い事が示された。以上のことから生体内においてLeftyは素早く拡散し、Nodal受容体の一つであるActR IIへ競合的に相互作用することにより、効果的にNodalシグナルを抑制する事が示唆された。

論文審査の結果の要旨

これまで、TGFβスーパーファミリーに属する遺伝子、*nodal*と*lefty*がマウスの初期胚で一過性に左側のみに発現し、その後の遺伝学的な解析によりLeftyはNodalのフィードバック阻害因子であることが示されてきたが、Leftyの作用メカニズムの詳細は明らかとなっていなかった。

本研究は、NodalはまずCriptoと結合し、さらにActR II、ALK4と相互作用して細胞内にシグナルを伝達すること、LeftyはActR IIと相互作用してNodalシグナルを抑制することを示した最初の報告である。また、GFPを利用した独創的な方法によりNodalとLefty2の拡散性についての大変興味深い知見を得ており、Leftyはその高い拡散性によりNodalより効率よくNodal受容体の一つであるActR IIへ到達し相互作用することにより、Nodalシグナルを効果的に抑制できることを示唆している。

以上により、本論文は高等動物の初期発生におけるLeftyの働きを分子レベルで理解する上で重要な知見を提示しており、学位に値するものと認める。