

| | |
|--------------|--|
| Title | Two-step regulation of left-right asymmetric expression of Pitx2 : initiation by Nodal signaling and maintenance by Nkx2 |
| Author(s) | 白鳥, 秀卓 |
| Citation | |
| Issue Date | |
| Text Version | none |
| URL | http://hdl.handle.net/11094/43787 |
| DOI | |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

| | |
|------------|--|
| 氏名 | 白鳥秀卓 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 第 16839 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 医学系研究生体制御医学専攻 |
| 学位論文名 | Two-step regulation of left-right asymmetric expression of <i>Pitx2</i> : initiation by Nodal signaling and maintenance by <i>Nkx2</i> . (<i>Pitx2</i> の左右非対称な発現の2段階制御: Nodal からのシグナルによる発現の開始と <i>Nkx2</i> による発現の維持) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 濱田 博司 (副査) 教授 仲野 徹 教授 近藤 寿人 |

論文内容の要旨

【目的】

脊椎動物は心臓など多くの左右非対称な器官を持っている。また、いくつかの左右非対称に発現する遺伝子も知られている。しかし、この遺伝子発現が左右非対称な形態形成にどうつながるのかはまだよく分かっていない。私は、現在知られている左右非対称に発現する遺伝子の中で最も発生が進んだ時期まで発現が見られ、左右非対称な形態形成に深く関与している *Pitx2* に注目し、その転写制御機構を明らかにすることで、遺伝子発現と形態形成を結ぶ手がかりにしようと考えた。

Pitx2 は、ホメオボックスを持つ転写因子である。*Pitx2* の左右非対称な発現は、*nodal* や *lefty-2* と同様にマウス 8 日胚の左側側板中胚葉で開始する。これまでに、*nodal* や *lefty-2* がシグナル因子 Nodal により発現制御されることや、ニワトリ胚やアフリカツメガエル胚を用いた Nodal の異所発現実験による *Pitx2* の誘導が報告されており、*Pitx2* の発現は Nodal によって間接的または直接的に開始されることが示唆されていた。また、*Pitx2* は、*nodal* や *lefty-2* が数時間の一過性な発現で消失する一方、9 日、10 日胚の器官形成期になっても、側板中胚葉由来の肺や腸管など左右非対称な形態をとる器官原基の左側で発現を持続することから、Nodal 消失後の発現維持機構の存在が予想された。本研究では、*Pitx2* のエンハンサーを探索し、解析することで、このような *Pitx2* の左右非対称な発現の開始と維持に関する制御機構の解明を試みた。

【方法ならびに成績】

本研究では、主にトランスジェニックマウスの手法を用いて実験を行った。*Pitx2* 遺伝子内の様々なゲノム断片を *lacZ* レポーターに結合したコンストラクトを作製し、これらをマウス受精卵へ注入してトランスジェニック胚を作製した。そして *Pitx2* の左右非対称な発現が観察される 8~10 日胚において、*lacZ* 遺伝子の発現を X-gal 染色により調べ、エンハンサー活性の指標とした。

全長 41kb にわたる領域を調べた結果、*Pitx2* と同様に 8~10 日胚の左側発現を誘導するエンハンサー (asymmetric enhancer: ASE) がイントロンに存在することが分かった。さらに欠失解析を行い、ASE を約 600bp の領域にマッピングした。

ASE の塩基配列を調べたところ、Nodal からのシグナル伝達に関わる転写因子 FoxH1 の結合配列を 3 ヶ所発見し

た。その3ヶ所全てに点変異を導入し、FoxH1が結合できないようにしたコンストラクトでは、8日胚、10日胚ともに左側発現が消失した。逆に、FoxH1結合配列のみを6つつなげたコンストラクトでは、8日胚の左側側板中胚葉での発現を観察できた。しかし、10日胚における器官左側での発現は観察されなかった。これらの結果から、FoxH1結合配列が*Pitx2*の発現開始に必要な十分な領域であることが明らかとなった。また、FoxH1結合配列は10日胚の左側発現にも必要であるが、FoxH1結合配列だけでは発現を維持できないことも明らかになった。

次に、発現維持に必要な配列を探索するため、ASE内の欠失解析を行った。その結果、5'側100bpを欠失させるとほとんどの器官原器で左側発現が消失することが分かった。この100bpの塩基配列を調べたところ、心臓などで発現している転写因子Nkx2-5の結合配列が存在していた。この配列に点変異を導入したコンストラクトでは、8日胚の左側側板中胚葉での発現は観察されるが10日胚の左側発現はほとんど無くなり、Nkx2-5結合配列が*Pitx2*の左側発現の維持に必要な配列であることが分かった。

【総括】

実験結果から、*Pitx2*の左右非対称な発現の制御機構について、私は次のようなモデルを考えた。*Pitx2*の左側発現は、胚の左側特異的なNodalからのシグナルによりFoxH1がASEに結合することで開始する。FoxH1が結合したASEは、DNA構造の変化などによって、Nkx2-5結合配列に発現維持に働く転写因子が結合できる性質を獲得する。*nkx2-5*が発現する組織は*Pitx2*より狭い領域であることから、発現維持にはNkx2-5だけでなく他のNkx2ファミリーの転写因子も働いていると考えている。このように、NodalやFoxH1の一過性な発現が消えても、Nkx2がASEに結合することで*Pitx2*の左側発現は維持される。同時期にNkx2は胚の右側でも存在しているが、右側ではFoxH1がASEに結合しなかったため、Nkx2はASEに結合できず*Pitx2*は発現しない。

すなわち、*Pitx2*の左右非対称な発現は左側特異的なNodalシグナルにより開始され、発現が開始された細胞だけが左右対称な転写因子Nkx2によって発現を維持されるという2段階によって制御されていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

脊椎動物における左右の非対称性の形成は、胚発生中の重要なイベントであり、多くの遺伝子とその形成過程で働くことが知られている。しかし、それら遺伝子間の情報伝達機構については未解の部分が多く、その解明は重要な課題であった。

本研究は、より発生後期まで長時間発現を持続するという特徴を持ち、左右非対称な形態形成に深く関わる*Pitx2*の発現制御機構を解明した。解析では、非常に高い技術と多くの時間を要するトランスジェニックマウスを使用して、多くの実験を行っている。その結果、*Pitx2*の左右非対称な発現は左側特異的に働いているNodalからのシグナルにより開始されること、そして、発現が開始した細胞特異的にNkx2によって維持されるという2段階制御を提示しており、左右の非対称性の形成メカニズムの解明に大きな貢献をしたといえる。また、これらの知見は、*Pitx2*の機能解析など、今後の左右非対称な形態形成の研究の手がかりにもなると考えられ、その研究意義は大きい。さらに、マウス以外にもアフリカツメガエルの*Pitx2*の発現制御機構についても解析しており、*Pitx2*の2段階制御を脊椎動物に共通のメカニズムとして示唆した点も評価できる。

また、本研究で提示された開始と維持の2段階制御のメカニズムは、左右軸形成の一場面にとどまらず、発生生物学に広く応用できるものであると考えられる。よって、本研究は非常に意義あるものであったとし、ここに学位論文に値すると認める。