

Title	Sulfated glycosaminoglycans are necessary for Nodal signal transmission from the node to the left lateral plate in the mouse embryo
Author(s)	沖, 真弥
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48919">https://hdl.handle.net/11094/48919</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	おき 沖 真 弥
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 2 1 6 3 7 号
学位授与年月日	平成 19 年 12 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Sulfated glycosaminoglycans are necessary for Nodal signal transmission from the node to the left lateral plate in the mouse embryo. (マウス胚においてノードから左側板中胚葉への Nodal シグナル伝達には硫酸化グリコサミノグリカンが必要である)
論文審査委員	(主査) 教授 濱田 博司  (副査) 教授 近藤 寿人 教授 仲野 徹

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [ 目 的 ]

マウス胚の左右非対称性は、受精後 7.5 日のノードにおける左向き水流で決定される。この時期に、TGF- $\beta$ スーパーファミリーの分泌因子をコードする *Nodal* はノードで発現する。続いて受精後 8.2 日に LPM (側板中胚葉) の左側に非対称に発現し、のちの左右非対称な臓器形態形成を導く。2003 年に申請者らは、ノードの *Nodal* が左側 LPM の *Nodal* 発現に必要であることを示した (Saijoh, Y., et al. 2003. *Dev Biol*; 業績目録 3)。すなわち、ノードの *Nodal* 発現を欠く変異マウス胚は、LPM の *Nodal* を発現し得ないことを明かした。しかしここでは、ノードの *Nodal* がいかんして LPM の *Nodal* 発現を導くのか、特にその発現誘導機構が直接的か間接的かは不明のままであった。別の局面における研究で、*Nodal* は分泌されたのちに拡散し、遠く離れた細胞にシグナルを伝えることや、*Nodal* は自己発現誘導能を有することが示されている。それでは、ノードの *Nodal* も左側 LPM に直接拡散し、自己発現を誘導するのであろうか? もしもそうならば、どこを通過して、何によって運搬されるのであろうか? これらの疑問を解決すべく、主論文において以下の研究を行った。

#### [ 方法ならびに成績 ]

まず、ノードの *Nodal* による LPM の *Nodal* 発現誘導機構は直接的か、間接的かを問うために、ノードと LPM において発現する *Cryptic* (*Nodal* シグナルの伝達に必要な不可欠な共受容体をコードする) に着目した。もし間接的機構であるならば、ノードの *Nodal* はノードの *Cryptic* を介して、二次的なシグナルリレー生み出し、LPM にシグナル伝達すると予想される。一方で、もし直接的な拡散機構であれば、ノードの *Cryptic* は必要なく、LPM のそれだけで十分と予想される。そこで、ノードにおける *Cryptic* を発現せず、LPM だけで *Cryptic* を発現するマウスを作出したところ、LPM の *Nodal* 発現は正常であった。この結果は、LPM の *Nodal* 発現はノードの *Cryptic* を必要としないことを示し、直接的拡散による誘導機構仮説に矛盾しない。そこで免疫染色により拡散する *Nodal* を可視化する実験を試みたが、その検出はできなかった。おそらく技術的な問題、または検出感度の問題によるものと思われる。

それではノードで分泌された *Nodal* は、そこから離れた LPM にどのように運搬されるのであろうか？ショウジョウバエにおける実験では、分泌されたシグナル分子は硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) に結合し、それが長距離拡散のための足場として働くことが実証されている。そこで申請者は、*Nodal* も硫酸化 GAG 依存的に運搬されるのではないかと仮定し、以下の検証を行った。

硫酸化 GAG は直鎖状の多糖を基本骨格とし、多くの硫酸基が付加された酸性多糖である。左右軸形成期にマウス胚で合成される硫酸化 GAG は、主にヘパラン硫酸 (HS) とコンドロイチン硫酸 (CS) であることが報告されており、両者は糖鎖の基本骨格や硫酸化パターンの違いにより分類される。まずアフィニティーカラムアッセイにより、硫酸化 GAG に対する *Nodal* 蛋白質の結合能を調べた。その結果、*Nodal* はヘパラン硫酸 (HS) には結合しないが、コンドロイチン硫酸 (CS) には結合することを示した。

次に免疫染色により、硫酸化 GAG の局在を免疫染色で調べた。その結果、CS、HS ともに、外胚葉の基底膜に局在すること、またその分布がノードから LPM まで連続的であることを示した。

最後に硫酸化 GAG の必要性を検証するべく、硫酸化 GAG の合成を阻害する実験を行った。CS、HS 両者の合成を阻害する *chlorate* 存在化で胚を培養したところ、ノードの *Nodal* 発現は正常だが LPM の *Nodal* を発現しないことが明らかになった。また、CS のみの合成を阻害する *p-nitrophenyl xyloside* 存在化で胚を培養しても、同様の結果が得られた。

#### [ 総 括 ]

上記の結果より、マウス胚左右軸形成時におけるノードの *Nodal* は、LPM へ直接拡散し、そこで自己発現を誘導するという仮説に矛盾しない結果を得た。また、LPM への *Nodal* シグナル伝達には、硫酸化 GAG が必要であることが実証された。これらは、ノード-LPM 間の基底膜に分布する GAG 鎖が足場となり、*Nodal* 蛋白質が LPM まで運搬されるという仮説を支持する。特にアフィニティーアッセイと *p-nitrophenyl xyloside* による培養実験より、CS が中心的な役割を担うと考えられる。今後、拡散する *Nodal* を可視化する実験系を構築することにより、より確実な検証が期待される。

### 論文審査の結果の要旨

申請者はマウス胚の左右軸形成において重要な働きをする、*Nodal* という分泌因子に着目して研究を行った。*Nodal* はノードで発現し、その後、側板中胚葉の左側で発現するが、「側板中胚葉の *Nodal* 発現がどのように誘導されるのか？」は申請者の解析までは謎のままであった。

申請者はまず、遺伝子組み換えマウスの実験により、ノードで分泌された *Nodal* は側板中胚葉に直接拡散し、そこで自身の発現を誘導することを明らかにした。それではノードの *Nodal* はどのように運ばれるのか？を次に検証するために、硫酸化グリコサミノグリカンに着目した。

申請者は、ノードから側板中胚葉まで硫酸化グリコサミノグリカンが連続的に分布すること、*Nodal* は硫酸化グリコサミノグリカンに結合性を示すこと、さらに硫酸化グリコサミノグリカンの合成を阻害すると側板中胚葉の *Nodal* が発現されないことを明らかにした。

これらの結果より申請者は、ノードの *Nodal* は硫酸化グリコサミノグリカンを足場として側板中胚葉まで拡散し、そこで自身の発現を誘導するのではないかと作業仮説を提案した。

本結果は、遠距離拡散してシグナルを伝える分泌因子の拡散機構を解明した一例として、極めて重要性が高く、博士 (医学) の学位授与に十分値する。