

Title	Long-range action of Nodal requires interaction with GDF1
Author(s)	田中, 千夏
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49037">https://hdl.handle.net/11094/49037</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>〉</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	田中千夏
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 21820 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Long-range action of Nodal requires interaction with GDF1 (Nodal が long-range に働くには GDF1 との相互作用が必要である)
論文審査委員	(主査) 教授 浜田 博司 (副査) 教授 近藤 寿人 教授 宮崎 純一

### 論文内容の要旨

#### 〔 目 的 〕

脊椎動物の体は、外見上は左右対称だが、内部臓器の形態や配置などは左右非対称である。このような左右非対称な形態が発生段階において獲得される過程では、側板中胚葉の左側で *Nodal* が発現することが重要である。この左側特異的な *Nodal* の発現には、ノード周辺での *Nodal* の発現が必要だが、左側板中胚葉での *Nodal* 発現開始に至るメカニズムについては不明である。

GDF1 (growth/differentiation factor1) は、*Nodal* と同じ TGF $\beta$  スーパーファミリーに属する 1 因子である。*Gdf1* は、左右軸形成時のマウス胚でノード周辺と側板中胚葉にて左右対称に発現する。*Gdf1* ノックアウトマウスは左側板中胚葉での *Nodal* の発現を欠くこと、また *Gdf1* は *Nodal* と重複した発現領域を持つことから、GDF1 は左側板中胚葉での *Nodal* 発現に至る過程において何らかの機能を持つことが考えられる。本研究では、*Nodal* の機能との関係に注目して、左右軸形成時における GDF1 の役割について検討した。

#### 〔 方法ならびに成績 〕

*Gdf1* の発現部位のうち、ノード周辺と側板中胚葉それぞれの機能を検討するため、各領域で *Gdf1c* DNA を発現するトランスジェニックマウスを作成した。その結果、*Gdf1*<sup>-/-</sup> 胚で側板中胚葉のみ *Gdf1* の発現を回復させても、左側板中胚葉での *Nodal* の発現は見られなかったが、ノード周辺の *Gdf1* の発現を回復させると、左側板中胚葉で弱いながらも *Nodal* の発現が誘導されていた。このときの *Nodal* の発現部位は、胚の遠位側に限局したものであった。*Gdf1*<sup>-/-</sup> 胚でノード周辺、側板中胚葉両方の部位で *Gdf1* の発現を回復させると、左側板中胚葉で *Nodal* が発現し、その発現領域は左側板中胚葉全域に広がっていた。

GDF1 分子の活性について検討するため、*Nodal* シグナル応答性レポーターを用いた、ツメガエル胚アニマルキヤップルシフェラーゼアッセイを行ったところ、GDF1 は単独では活性を示さないが、*Nodal* と共発現させると *Nodal* の活性を強く増強することが分かった。GDF1 と *Nodal* の分子間相互作用について検討するため、Flag tag を付加した Flag-*Nodal*、Flag-GDF1 を作成し、ツメガエル卵母細胞培養上清を用いて免疫沈降を行ったところ、GDF1 と *Nodal* は結合し、ヘテロダイマーを形成していることが示唆された。培養上清中の *Nodal* と GDF1 の活性について、ツメ

ガエル胚アニマルキャップシフェラーゼアッセイにて検討したところ、GDF1 と Nodal を共に発現する卵母細胞より調製した培養上清は高い Nodal 活性を示したが、GDF1 単独、Nodal 単独では活性を示さなかった。

Nodal の活性が及ぶ範囲に対して、GDF1 が与える影響について調べるため、Nodal シグナル応答性 LacZ レポーターを用いたレポーターアッセイを行った。このアッセイでは、32-64 細胞期のツメガエル胚の 1 つの割球にレポーターを、その隣の割球もしくは 1-2 個離れた割球に Nodal、GDF1 の mRNA を inject し、アニマルキャップにおけるレポーターの反応を  $\beta$ -gal 染色にて観察した。その結果、レポーターの隣の割球に mRNA を inject した際には、Nodal のみ、Nodal と GDF1 の co-injection どちらもレポーターの反応が見られたが、レポーターとは離れた割球に mRNA を inject した際には、Nodal と GDF1 の co-injection の場合でのみレポーターが反応した。

左右軸形成時のマウス胚において同様に検討するため、リポフェクション法による遺伝子導入実験を行った。野生型胚の右側板中胚葉にリポフェクション法により Nodal を異所発現させると、神経底板の右側で *Lefty1* の発現が異所的に誘導される。*Gdf1*<sup>-/-</sup> 胚の右側板中胚葉に *Gdf1* と Nodal を異所発現させると、同様に *Lefty1* の発現が誘導されたが、Nodal 単独の異所発現では *Lefty1* の誘導は起こらなかった。これらの実験結果より、Nodal が long-range に働くためには GDF1 が必要であるということが示唆された。

#### [ 総 括 ]

GDF1 は、単独では活性を示さないが、Nodal と共発現させると Nodal の活性を強く増強する。GDF1 と Nodal は、培養上清中でヘテロダイマーを形成し、またこれにより上清中の Nodal 活性も大きく上昇していた。

ツメガエルのアニマルキャップを用いた実験、またマウス胚を用いた実験では、GDF1 が存在すると、Nodal は離れた領域へシグナルを送ることができた。Nodal は GDF1 とヘテロダイマーを形成することによりその活性が大きく上昇するが、これにより Nodal シグナルの及ぶ範囲が広がっていると考えられる。

左右軸形成時のマウス胚では、*Gdf1* がノード周辺と側板中胚葉で発現している。ノードの *Gdf1* は、Nodal が左側板中胚葉で発現を開始する為に必要であり、また Nodal が発現領域を左側板中胚葉全域に広げるためには側板中胚葉での *Gdf1* の発現が必要であることが分かった。GDF1 はそれぞれの領域で Nodal とヘテロダイマーを形成することで Nodal の活性を増強し、Nodal シグナルの及ぶ範囲を広げていることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

TGF $\beta$  スーパーファミリーに属する因子である Nodal は、脊椎動物の左右軸形成に重要な役割を持っている。本論文では、Nodal シグナル制御に関わる因子の候補として、GDF1 の機能に注目した。Nodal と同様 TGF $\beta$  スーパーファミリーの 1 因子である GDF1 は、それ自体は活性を持たないが、Nodal と共発現させると Nodal の活性を強く増強することが分かった。また、GDF1 と Nodal は結合してヘテロダイマーを形成し、それにより上清中の Nodal 活性は大きく上昇していた。GDF1 が Nodal シグナルの及ぶ範囲に影響を与えている可能性について検討したところ、ツメガエル胚、また左右軸形成時マウス胚のどちらも、GDF1 が共発現している場合のみ、Nodal は long-range に働くということを示した。本論文は、GDF1 の生体内での役割について初めて示しただけでなく、脊椎動物間で保存された重要な役割を持つ Nodal の活性の制御、またその結果 Nodal シグナルの及ぶ範囲の制御機構について明らかにした重要なものであり、博士（医学）の学位授与に値すると思われる。