

初期中胚葉の組織化と分節化の分子基盤
Molecular bases of heart morphogenesis
and somite segmentation

相賀 裕美子 (Yumiko Saga)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授



研究の概要

本研究では、マウス発生過程で、最も初期に形成される心臓の発生分化に関わる遺伝子群 *Mesp1*, *Mesp2*, *Hesr1*, *Hesr2* の機能解析と沿軸中胚葉が体節を形成する分節メカニズム解明を目指した研究を並行して行った。特に分節境界の形成に転写因子 *Mesp2* と Notch シグナルの相互作用が重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究分野／科研費の分科・細目／キーワード

複合領域／基礎生物学・発生生物学／中胚葉・心臓・体節・Notch シグナリング・転写因子

1. 研究開始当初の背景・動機

発生過程における中胚葉性組織の機能は多岐にわたるが、その中でも最も初期に発生する心臓の形成に関与する分子機構は今後の再生研究の基盤としても、興味深い問題を多く含む。また後期に発生してくる沿軸中胚葉は体節を形成するが我々は体節形成に必須な転写因子 *Mesp2* の研究を展開しており、その遺伝学的研究は体節の分節化のメカニズム解明に非常に重要であるという確信があった。

2. 研究の目的

心臓の形成に関しては、bHLH 分子である *Mesp1*, *Mesp2*, *hesr1*, *hesr2* の心臓形成における機能とその作用機構を明らかにすること、また体節形成においては、*Mesp2* 遺伝子の上流・下流の解析を含めてその作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

我々は、基本的には、心臓、体節の形成機構に関する遺伝子の機能解析を個体レベルの解析を中心に進めた。主にノックアウトマウス・ノックインマウス・トランスジェニックマウスの作成とその解析を行なった。その過程で特に購入した備品は、組織の解析・観察のための実体顕微鏡とそのレンズ系、記録のためのデジタルカメラシステム、また組織レベルの解析のために、パラフィン包埋装置を購入している。また生体内における転写因子の発現を観察するために、レーザー顕微鏡観察用の組織培養システムを購入している。

4. 研究の主な成果

テーマ 1. 心臓形成に関わる研究

1) *Mesp1*, *Mesp2* のダブルノックアウト (dKO) マウスは胚性中胚葉を欠き、dKO 細胞は全く心臓細胞に寄与しない。そこで dKO マウス胚から ES 細胞を樹立し *in vitro* 培養系で、心筋細胞に全く分化できないことを明らかにした。さらにマイクロアレイ解析を行ない、*Mesp1*, *Mesp2* の下流遺伝子カスケードにある遺伝子群を同定した。

2) *Hesr1*, *Hesr2* の心臓形成に関わる研究
Hesr2 の単独 KO マウスは生後 10 日目までに、心拡大を伴ってほとんど死亡する。超音波画像診断装置を用いた解析で三尖弁と僧帽弁の部位で逆流波形を認め、三尖弁および僧帽弁の低形成による三尖弁閉鎖不全及び僧帽弁閉鎖不全であることを明らかにした。また *Hesr1/Hesr2* ダブルノックアウトマウスは胎生 10 日目までに胎生致死となり、単身心室様構造をとること、動脈の形成に異常があることを見出した。また *Hesr1* 及び *Hesr2* が *Tbx2* の発現を抑制することにより、房室境界領域の決定・維持に重要な働きをすることを明らかにした。

テーマ 2. 体節形成に関わる研究

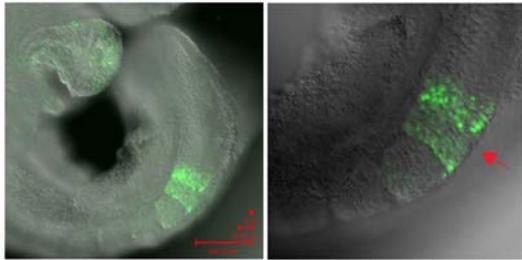
1) *Mesp2* の上流解析

Mesp2 転写因子は未分節中胚葉の前方端、分節境界の形成直前に発現が誘導され、その発現は 2 時間サイクルで on/off を繰り返す。すなわち、この遺伝子の発現が体節の分節する場所とタイミングを最終的に制御している。我々は、*Mesp2* 遺伝子のエンハンサーを絞り込み、*Tbx6* と Notch シグナ

ルが共役して始めて Mesp2 の誘導が起こることを明らかにした。

2) Mesp2タンパク質の機能解析

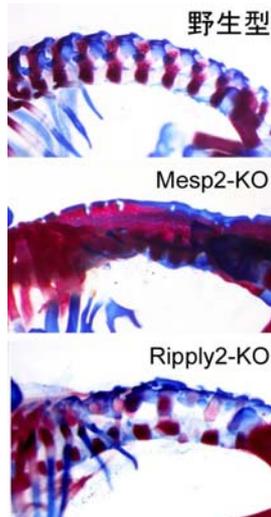
我々は、転写因子 Mesp2 と蛍光分子の融合タンパク質をノックインしたマウスを作成し、Mesp2 を生体内で可視化することに成功した (図参照)。その結果 Mesp2 の発現前方境界が体節の分節境界を規定することがわかった。また Mesp2 と Notch 活性を二重免疫染色することにより、Mesp2 の発現領域で Notch 活性が抑制され、その結果として Notch 活性化部位と不活性化部位の境界が形成されること、そしてその境界が Mesp2 の前方境界と一致することも明らかになった。



Mesp2 が将来の体節内の前方部分で発現することから、この発現により体節内の前後極性が確立することも明らかになった。従って、Mesp2 が発現し Notch 活性を抑制することが体節境界を決定し体節内の極性も決定することが証明された。

3) Mesp2 の下流解析

Mesp2 の下流遺伝子を同定し、その作用機序の解析を行なった。体節形成には、細胞の上皮化が必要であり、Eph-ephrin 系の細胞反発機構が関与が示唆されている。我々は、Mesp2 のノックアウトマウスで、この EphA4 の遺伝子発現が完全に消失することから、Mesp2 が EphA4 の発現を直接または間接的に制御していると考えた。そこで、マウス EphA4 遺伝子の発現制御領域を担うシス領域を同定し、さらにこのシス領域に Mesp2 が結合する可能性を示した。一方、我々は、Mesp2 ノックアウトマウスのマイクロアレイ



解析を行ない、ノックアウトマウスで著しく発現が減少するいくつかの遺伝子を同定した。その中の一つ Ripply2 は発現が Mesp2 と酷似しており、実際に Mesp2 によって正に制御されていた。しかし興味深いことにそのノックアウトマウスは Mesp2 と逆の表現形をしめし (図参照)、実はこの分子は Mesp2 の負の制御因子であることがわかった。したがって、Mesp2-Ripply2 の negative-feedback 系が体節の分節化を制御していることが明らかになった。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

心臓の形成に関わる重要な遺伝子として Mesp と Hesr は世界的にも認識されている。また体節形成における Mesp2 及び Notch シグナル系の解析成果は世界をリードしたものであり、その学術的意義に関しては日本はもとより世界的にも注目されている。

6. 主な発表論文

- (研究代表者は太字、研究分担者には下線)
Morimoto M, Sasaki N, Oginuma M, Kiso M, Igarashi K, Aizaki K., Kanno J, **Saga Y**. The negative regulation of Mesp2 by mouse Ripply2 is required to establish the rostral-caudal patterning within a somite. *Development*. 134:1561-1569, 2007.
Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, **Saga Y**. Hesr1/Hey1 and Hesr2/Hey2 regulate atrial-ventricular boundary formation in the developing heart through the repression of Tbx2. *Development* 134, 747-755, 2007
Watanabe Y, Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Endo M, Igarashi K, Aizaki KI, Kanno J, **Saga Y**. Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces abnormal heart morphogenesis in mouse. *Development* 133, 1625-1634, 2006
Yasuhiko Y., Haraguchi S., Kitajima S., Takahashi Y., Kanno J. **Saga, Y**. Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3651-3656, 2006
Morimoto M, Takahashi Y, Endo M. **Saga Y**. The transcription factor Mesp2 establishes segmental borders by suppressing Notch activity. *Nature* 435:354-359, 2005

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/MamDev/home-jh.tml>