

Blastomere-Specific Genes of the 16-cell Sea Urchin Embryo

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-11-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Yamaguchi, Masaaki メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00052840

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



KAKEN
1996
38

金沢大学

ウニ16細胞期胚の割球特異的に発現する遺伝子の解析

(課題番号 07836006)

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金(基盤研究C)研究成果報告書

平成9年3月

研究代表者 山口正晃
金沢大学理学部助教授



8000-55238-8

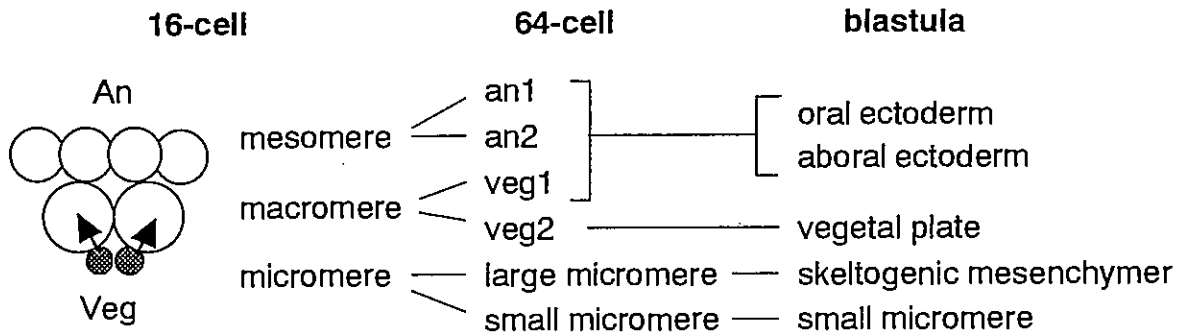
金沢大学附属図書館

受精した卵は卵割をくり返し細胞の数を増加させるとともに、それぞれの細胞は異なった細胞へと分化していく。このような胚発生における細胞分化あるいは領域の特殊化の最初のステップは体軸の決定である。胚はその軸を決定するために、ある動物は未受精卵のなかにすでに存在している非対称性（極性）を利用する。また、べつ動物は精子の侵入点あるいは第一卵割面のような受精のときにもたらされる外界からの合図を使う。この軸の情報はつぎに卵割による細胞質の分割と割球間の相互作用をとおして、異なる領域あるいは細胞を作り出していく。

ウニの初期発生における細胞運命の決定に関して、スウェーデンのRunnströmが提唱した二重勾配説が長いあいだ支持されてきた。かれによれば、ウニ卵の動物極と植物極はそれぞれの極の形態形成の中心であり、それぞれ動物極化物質と植物化物質を拡散させることによって、二重の勾配を作る。この両極からの勾配の相互作用（バランス）によって、正常な発生が進行すると考えた。Runnströmの弟子であるHörstadiusは、ウニ胚の割球分離一再結合実験によってウニ卵の勾配的性質を明らかにし、この二重勾配説を強く支持し、そして流布させた。しかし、この説はふたつの大きな弱点を抱えていた。一つは、物質的な証拠が得られなかったことである。Runnströmが想定した動物極化物質と植物極化物質をウニ卵から精製しようとした試みは、いずれも成功しなかった。もう一つは、動物極性そのものの存在に対する疑問である。多くの実験事実、植物極から動物極におよぶ影響の存在を実証したが、その逆の影響、動物極が植物極側の運命を制御する実験事実がなかったのである。

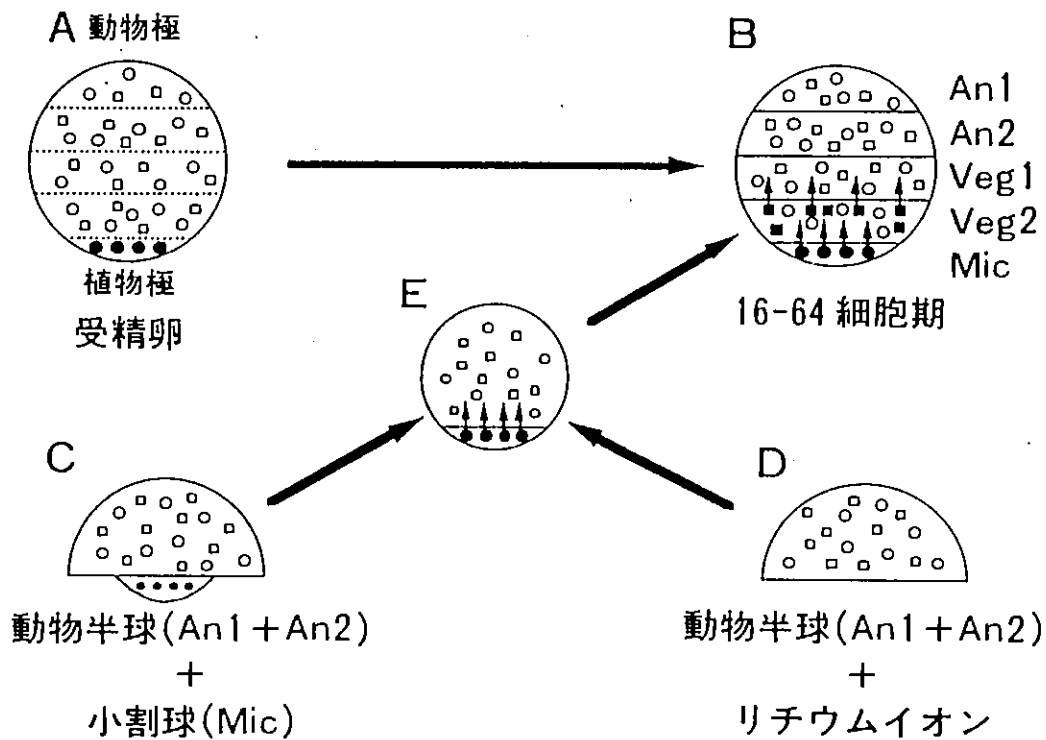
1980年代の後半、アメリカのDavidsonを中心として、ウニ胚の細胞分化に対して新しい研究の流れが生まれた。彼らは古典的な発生研究者が指標とした形態に加えて、モノクローナル抗体と遺伝子発現という分子指標を用いて、古典的な実験結果を再検討した。そして1989年、Davidsonは二重勾配説に代わる新しいモデルを提唱した。かれによれば、（1）ウニ未受精卵の植物極域はあらかじめ特殊化している。（2）この植物極域は卵割によって16細胞期胚の小割球を作る。したがって、16細胞期胚において、植物極の小割球だけが自律的に分化が決定している。（3）しかし、その小割球決定因子は小割球だけに局在しているのではなく、他の割球にも不活性型として存在している。たとえば、リチウムイオン処理はその因子を活性化する。（4）小割球から誘導的なシグナルが放出され、受容体を介して隣接する割球(veg2)を植物板(内胚葉)にプログラムする。（5）つぎに、veg2割球が新たな誘導分子を作り、その動物極側に隣接するveg1割

Development of Sea Urchin Embryo



Davidson' Model

- (1) 16細胞期に小割球だけが自律的に分化決定
- (2) 小割球決定因子は中, 大割球にも不活性型として存在
(たとえばLi⁺はその因子を活性化)
- (3) 小割球からの誘導シグナルによってveg2はvegetal plateにプログラム
- (4) vegetal plateからのシグナルがveg1をectodermにプログラム



球の発生運命をコントロールする。(6)同様に、veg1割球が作り出す新たな誘導分子が、より動物極側の割球の運命を調節する、という。二重勾配説との大きな違いは、動物極からの影響を考えず、植物極からの割球間のシグナル伝達とその結果としての転写因子の活性化あるいは不活性化ということで、細胞運命の決定を説明していることである。

このDavidson説は、今世紀前半に行なわれた古典的な実験結果をかなりよく説明している。Hörstadiusは、分離下中割球に小割球を結合して培養すれば、完全なプルテウス幼生を生じると報告している。Davidson説は、この現象を次のように説明する。小割球から放出される誘導分子が隣接する中割球の膜表面にある受容体を介して作用し、中割球の中で不活性型として存在していた転写因子を活性化することによって、正常発生では外胚葉に分化する中割球の子孫細胞の一部を内胚葉へと誘導する。またvon Ubischは、動物半球をリチウムイオンで処理すると、プルテウス幼生を生じると報告している。

Davidson説によれば、リチウムイオンは動物半球の切断面に作用し、その近傍にある不活性型の転写因子(小割球決定因子)を活性化することによって、動物半球のその部分に小割球と同じ特性を与える、ということでこの現象を説明できる。しかし、現在のところDavidson説が要求する小割球決定因子そして小割球が放出する誘導分子の本体はいずれも明らかにされていない。

Davidson説によれば、ウニ胚の細胞運命決定の分子機構を明らかにするための目標は、小割球の分化決定因子、小割球からの内胚葉誘導分子、そしてリチウムイオンが活性化するもの、という分子群に限られてくる。本研究は、二つのアプローチからこれらの分子を検索した。一つはエルトリエータによって16細胞期胚の大、中、小割球を分離し、小割球とその系譜細胞に特異的に発現する遺伝子、中割球系譜細胞においてリチウムイオン依存的に発現する遺伝子を差次的にスクリーニングすることによって、目標とする分子を明らかにするという道である。具体的には、3つの方法、differential screening法、differential display法、subtraction PCR法、を行ない、複数の遺伝子断片を単離した。二次スクリーニングとして、各割球(系譜細胞)から抽出したRNAを逆転写したcDNAをプローブとしてサザン解析を行ない、発現に差の認められる10クローンを得た。現在、これらの遺伝子の胚における発現の局在を、in situハイブリダイゼーション法によって確認している。もう一つのアプローチは、expression cloning法である。16細胞期胚の中割球の一つに卵巣、受精卵、16細胞期胚あるいはリチウムイオン処理胚から抽出したpoly(A+) RNAを注入し、その細胞が骨片を作るあるいは隣接する細胞を原腸に誘導することを指標として、小割球決定因子と小割球から出される内胚葉誘導分子を明らかにすることを試みた。しかし、いずれのRNAにもその活性はみられなかった。

(1) 研究課題 ウニ 1 6 細胞期胚の割球特異的に発現する遺伝子の解析
課題番号 0 7 8 3 6 0 0 6

(2) 標題 平成 7 年度～平成 8 年度科学研究費補助金（基盤研究 C）
研究成果報告書

(3) 研究代表者 山口正晃 （金沢大学理学部助教授）

(4) 研究分担者 木下 勉 （関西学院大学理学部助教授）

(5) 研究経費 平成 7 年度 1, 5 0 0 千円
 平成 8 年度 8 0 0 千円
 計 2, 3 0 0 千円

(6) 研究発表

ア 学会誌等

1. Yamaguchi, M., and Ohba, Y.
Transcripts Containing the Sea Urchin Retroposon Family 1 (SURF1) in Embryos of the Sea Urchin *Anthocidaris crassispina*. （投稿中）
2. Fujita, Y., Iijima, M., Nakajima, Y., Yamaguchi, M., and Amemiya, S.
Development of the Sand Dollar *Peronella japonica*. （準備中）

イ 口頭発表

1. 藤田恭啓, 中島陽子, 梶原薫, 雨宮昭南, 山口正晃
走査型電子顕微鏡によるヨツアナカシパンのウニ原基形成の観察
日本動物学会大 6 7 回大会（平成 8 年 1 0 月）
2. 山口正晃
ウニ 1 6 細胞期胚の割球特異的に発現する遺伝子の検索
フォーラム「形成中心」（平成 8 年 1 2 月）

3. 藤田恭啓, 山口正晃

ヨツアナカシパンのウニ原基形成過程

第15回赤根崎シンポジウム (平成8年12月)

ウ 出版物

なし

研 究 成 果

1. Differential Screening法によるウニ16細胞期胚の割球特異的に発現する遺伝子の検索 (論文1)

ウニ16細胞期胚の割球特異的に発現する遺伝子を検索するため、ムラサキウニ16細胞期胚の大きさの異なる3種の割球、大、中、小割球をエルトリエータによって分離した。エルトリエータによる割球分離は、山口らの方法に従った(参考論文、Yamauchi, M., Kinoshita, T., and Ohba, Y. (1994))。それぞれの割球からLi/urea法によってtotal RNAを抽出し、oligo (dT)カラムクロマトグラフィーによってpoly(A+) RNAを精製した。そのpoly(A+) RNAを鋳型として、逆転写したcDNAをそれぞれの割球のプローブとして、ムラサキウニ16細胞期胚のcDNAライブラリーを差次的にスクリーニングした。約20,000クローンに対して、各プローブが与えるシグナルの強さを比較した結果、中割球プローブ特異的に見える2クローン、F6とF9、を単離した。イメージングアナライザーを用いたノーザン法によって、それらの局在性を確認した。胚内に均一に存在していると考えられているヒストンmRNAで標準化すると、F6、F9ともに小割球と比較して、中割球に2~3倍高濃度で存在していることが示唆された。つまり、いずれの転写物も動物半球により多くあるらしい。F6とF9の一部の塩基配列を決定し、データベースを検索した結果、F6はEGFリピートをもつfibroperinと86%相同であり、F9はmetallothionein Aと84%相同であることが明らかになった。埼玉大学の末光研究室がウニ胚のEGFリピートをもつ遺伝子をすでに単離していたので、問い合わせしてみたところ、彼らのものとは異なることがわかった。そこで、F6を末光研究室へ送り、共同研究することになった。

一方、植物極側の小割球プローブ特異的に見える4クローン、B5、C2、D7、K4、も単離した。制限酵素による解析から、B5とC2、D7とK4はそれぞれ同一であった。ノーザン法によってそれらの局在を調べたところ、いずれも多数のシグナルを与え、反復配列を含んでいることを示唆した。そこで、D7の全塩基配列、C2の一部の塩基配列を決定した。D7はopen reading frameを持っていないかったが、D7とC2は共通の配列を含んでいた。その配列は、アメリカのウニ*Stroglyocentrotus purpuratus*から同定されたレトロポゾンファミリーSURF1と62%相同であった。SURF1はtRNA由来の反復配列で、RNA polymerase IIIによって転写される。ところが、D7とC2はいずれもpoly(A)付加シグナル

(AATAAA) と poly(A) tail をその末端に持っている。この構造的特徴は、D7 と C2 が RNA polymerase II によって転写されることを示唆している。

RT-PCR法によってD7とC2の発現を調べたところ、(1) いずれも maternal RNA として未受精卵に存在すること、(2) いずれも 16 細胞期胚において均一に存在するらしいこと、(3) C2 は発生過程で常に存在するが、D7 は卵割期以降減少することが明らかになった。

2. ウニ胚のリチウムイオンに対する感受期

リチウムイオンが動物の発生に劇的な影響を与えることは古くから知られていた。たとえば、リチウムイオンはカエル胚に対して背方化を、ウニ胚に対して植物極化を引き起こす。最近まで、リチウムイオンは情報伝達経路の一つである PI3 経路に作用すると考えられていた。ところが、1996年 Melton は、リチウムイオンは glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) を阻害することによって、転写因子 β -catenin の核への移行を可能にするという分子機構を明らかにし、リチウムイオンの作用がにわかにクローズアップされてきた。リチウムイオンに対するウニ胚の感受期は発生の比較的初期であることは知られていたが、厳密な胚期はこれまで調べられていなかった。そこで、バフンウニ胚を用いて、4 時間ずつリチウムイオンのパルス処理を行ない、外腸胚形成を植物極化の指標として、その感受期を求めた。その結果、受精後 4 – 8 時間に明瞭な感受期があった (図 1)。さらに 2 時間のパルス処理で調べたところ、受精後 4 – 6 時間にしぼられた。この時間は、16 細胞期から 64 細胞期に相当し、Davidson 説において細胞運命が決定されるとされる胚期と一致した。また、リチウムイオン処理を間充細胞胚から原腸胚期に行なうと、その後の幼生の腕の伸長を抑制することから、リチウムイオンは植物極化とは異なる作用も持つことが明らかになった。

3. Differential display 法によるウニ 16 細胞期胚の割球特異的に発現する遺伝子の検索

ウニ胚の細胞分化の分子機構を解く鍵となる小割球決定因子、小割球から出される内胚葉誘導分子、そしてリチウムイオンが活性化する因子を明らかにするため、小割球及びその系譜細胞、そしてリチウムイオン処理した中割球系譜細胞に特異的に発現する遺伝子を differential display 法によって検索した。バフンウニ 16 細胞期胚の大、中、小割球をエルトリエータによって分離し、それぞれの割球から、あ

るいは海水中で1-2時間培養したそれぞれの割球系譜細胞からtotal RNAを抽出した。それらのtotal RNAを鋳型としてRT-PCRを行ない、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって約3,000のDNA断片を差次的に解析した。その結果、小割球とその系譜細胞特異的あるいはリチウムイオン依存的に見える約120のDNA断片を単離した。それらのDNA断片をアガロースゲル電気泳動した後ナイロン膜にブロッティングし、各割球（系譜細胞）から抽出したRNAを逆転写したcDNAをプローブとして、サザン解析を行なった。その結果、小割球とその系譜細胞に特異的と思われる一つのDNA断片を検出した（図2）。また、subtraction PCR法によって、割球間で発現に差のある遺伝子を増幅したPCR産物をプローブとして、同様にサザン解析したところ、さらに9個のDNA断片も得た。現在、これらの遺伝子の発現の局在性を確認するため、in situハイブリダイゼーション法の準備を進めている。これまで、小割球とその初期の系譜細胞に特異的に発現する遺伝子は、全く単離されていないので、結果が待たれる。

4. Subtraction PCR法によるウニ16細胞期胚の小割球とその系譜細胞特異的に発現する遺伝子および中割球にリチウムイオン依存的に発現する遺伝子の検索

バフンウニ16細胞期胚の大、中、小割球をエルトリエータによって分離し、分離直後の小割球と中割球、分離後1時間あるいは2時間培養した小割球と中割球系譜細胞、分離後1時間あるいは2時間リチウムイオン処理した中割球からpoly(A⁺) RNAを抽出した（図3）。それらのRNAを鋳型として、発現に差のある遺伝子を、Clontech社のPCR-Select cDNA Subtraction Kitを用いたsubtraction PCR法によって検索した。まず、発現に差のある遺伝子を増幅できるかを確認するため、ポジティブコントロール実験を行なった。差を引くdriverとして、ヒト骨格筋のpoly(A⁺) RNAを鋳型として合成したcDNAを用いた。また、目的の遺伝子を特異的に発現しているtesterとして、driver cDNAに0.2%の ϕ X174/Hae III DNAを加えたものを用い、この ϕ X174/Hae III DNA（特異的に発現している遺伝子の代用）を検出する条件を検討した。その結果、図4に示してあるPCR条件で、 ϕ X174/Hae III DNAを増幅、検出することが可能であることがわかった。

つぎに、その条件を用いてバフンウニの割球特異的に発現する遺伝子の検出を試みた。実験1では、testerとして小割球、driverとして中割球、実験2では、testerとして小割球の系譜細胞、driverとして中割球の系譜細胞、そして実験3で

は、testerとしてリチウムイオン処理した中割球系譜細胞、driverとして中割球系譜細胞を用いた。実験1と2は、小割球決定因子と小割球から出される内胚葉誘導分子を、実験3は、リチウムイオンが活性化する遺伝子を明らかにすることをねらっている。PCRの結果、いずれの実験においても、発現に差があるように見えるDNA断片がスミア状のバックグランドの中に検出された。そこで、増幅したDNAを精製した後、再びPCRを行ない、アガロースゲル電気泳動法で解析した。その結果、図5で示すように、実験1において、小割球に特異的なDNA断片1種、実験2において、小割球系譜細胞に特異的な断片2種、そして実験3において、リチウムイオン依存的な断片1種が明瞭に検出された。現在、これらのDNA断片をアガロースゲルから精製、単離する作業を進めている。

5. Expression Cloning法による小割球決定因子と小割球から出される内胚葉誘導分子の検索

小割球決定因子あるいは小割球から出される内胚葉誘導分子のmRNAを含むpoly(A+) RNA分画をウニ卵あるいは胚の割球に注入し、in vivoで翻訳させ、その産物の活性を追うことによって、目的の遺伝子を単離するexpression cloning法を検討し、試みた。バフンウニ卵は直径約100 μ mで、その体積は約500 plである。一つの卵中のpoly(A+) RNA量は、50~100 pgであるので、卵におけるpoly(A+) RNA濃度は0.1~0.2 mg/mlと推定される。一方、微小注入に関して、注入量の限界は、卵の体積の1~2%、注入するRNA溶液の濃度は、高濃度では粘性が高くなるため、10 mg/ml程度が限界である。この限界量を注入すると、卵内での外来のpoly(A+) RNA濃度は0.1~0.2 mg/mlとなり、内在のpoly(A+) RNA濃度に匹敵する計算になる。したがって、試みる価値があると判断し、バフンウニの成熟期の卵巣、受精卵、16細胞期胚からpoly(A+) RNAを抽出し、蛍光色素とともに微小注入した。小割球決定因子と内胚葉誘導分子の活性として、それぞれ、注入された中割球が骨片形成細胞になる、そして、注入された中割球に隣接する中割球子孫細胞に原腸を誘導する、ということを指標とした。2種類の実験を行なった(図6)。ひとつは、16細胞期胚の中割球の一つにRNAを注入し、そのまま、あるいは動物半球を分離してから培養した。もうひとつは、未受精卵にRNAを注入してから受精し、16細胞期になったとき、その中割球の一つを取り出し、別の16細胞期胚の動物半球と組み合わせて培養した。しかし、いずれのRNAにも指標とした活性は検出されなかった。現在のところ、活性が検出されないことに関して、目的の

RNAの量が少なすぎる可能性が高いと考えている。ホヤの場合、すでに予定運命が決まっている割球の運命を変更するには、非常に多量のRNAを注入しなければならないという。ウニの16細胞期胚の中割球は、単独で培養すると、予定運命どおりに外胚葉性の胞胚になる。その運命を変更するには、今回注入した量では不十分なのかもしれない。ただし、小割球から出される内胚葉誘導分子については、次に述べるように、RNA抽出した胚期に問題があったと思われる。

6. エルトリエータによって単離した小割球の原腸誘導能と原腸誘導分子の発現時期

顕微鏡下のマイクロマニピュレーションによって、ウニ16細胞期胚の小割球を取り出し、動物半球と組み合わせて培養すると、動物半球から原腸が誘導される。エルトリエータによって分離した小割球にも同様の誘導能があるかどうかを検討した。受精膜を除去したバフンウニ胚を、受精2時間後にローダミン(0.5 μ g/ml)で30分間蛍光標識し、さらに16細胞期まで飼育した。標識した16細胞期胚からエルトリエータによって小割球を単離した。残りの16細胞期胚は、Ca²⁺、Mg²⁺-欠除海水(CMFSW)あるいはCa²⁺-欠除海水(CFSW)の中で氷冷保存した。この1回目の単離終了後1時間たってから、2回目の小割球の単離を行なった。単離した小割球はすぐに海水に移し、実体顕微鏡下においたagar coatシャーレの上で、ガラス針で小割球を移動させて、4つずつまとめた。このようにして作った4つ組の小割球の上に、蛍光標識していない16細胞胚から単離した動物半球(8つの中割球)をのせて再構成胚を作成した。以降、この再構成胚をAnimal cap+4 micromeres(A+4M)とし、1回目に単離した小割球を用いて作った再構成胚をA+4M(fr.1)、CMFSWで保存後2回目に単離した小割球を用いて作ったものをA+4M(fr.2)、そしてCFSWで保存後2回目に単離した小割球を用いて作ったものをA+4M(fr.2*)と呼ぶ。

実験を6回行ない、約170の再構成胚を作った。14 $^{\circ}$ Cで3日飼育した後、(1)ローダミン陽性の小割球子孫細胞が幼生内に存在するか、すなわち、再構成胚が計画通り作成されているか、(2)骨片が形成されているか、(3)原腸が誘導されているか、を検定した。原腸誘導に関して、蛍光顕微鏡と光学顕微鏡による形態観察と、消化管分化のマーカー酵素であるアルカリ性フォスファターゼ(AP)の組織化学的染色によって検定した。

Table1に示したように、A+4M(fr.1)の再構成胚実験では、62再構成胚のうち5

0個体が生存し、この50個体全てが再構成に成功していた。骨片形成は40個体(98%)で観察され、原腸は形態的に40個体(80%)、組織化学的にも81%の個体において誘導されていた。これは、エルトリエータによって単離した小割球が、マイクロマニピュレーションによって単離した小割球と同じように、原腸誘導能を保持していることを示している。

一方、2回目に単離した小割球を用いた再構成胚の場合、CMFSW中で保存したA+4M(fr.2)では、原腸誘導されたものは形態的に18%、AP活性で28%の個体に限られた。それに対して、CFSW中で保存したA+4M(fr.2*)では、形態的に93%、AP活性で100%の個体で原腸の誘導が観察され、1回目に単離した小割球を用いた再構成胚と遜色ない原腸誘導能を持つことが明らかになった。したがって、16細胞期胚をCFSW中で保存し、何回もエルトリエータによって小割球を単離することによって、原腸誘導能を持つ多量の小割球を得ることが可能である。

つぎに、小割球の原腸誘導能がいつ発現するかを明らかにするため、A+4M(fr.1)再構成胚から様々なステージで小割球子孫細胞を除去し、残った動物半球の子孫細胞が原腸を形成するかを調べた。Table2で示すように、受精後8-9時間のあいだに再構成胚から小割球子孫細胞を除去した胚(A+4M-Md(8-9h)と以降表わす。()内は除去した時間を示す。)10個体を作り、3日後全て生存していたが、原腸を形成したものは、形態的にも、AP活性においても全く認められなかった。同様に、受精後15時間までに小割球子孫細胞を除去した胚は、いずれも原腸を形成しなかった。これは、受精後15時間までの接触では原腸を誘導できないことを示している。ところが、受精後16-17時間に除去した胚では、3例中3例とも原腸を形成した。つまり、小割球からの原腸誘導シグナルは、受精後15時間以降にだされることを意味している。図7のバフンウニ発生タイムテーブルに示すように、この胚期は孵化胞胚に相当し、Davidson説における内胚葉誘導の胚期、16-64細胞期、よりもはるかに遅いことになる。小割球子孫細胞から中割球子孫細胞に対して出される原腸誘導シグナルと、正常発生において小割球から大割球に対して出されるシグナルとは、別物である可能性も考えられる。小割球子孫細胞から動物半球の細胞に出される原腸誘導シグナルは生理的でないとしても、その活性はウニ胚の調節能を理解するうえで、鍵となる現象であることは間違いない。したがって、その分子機構を明らかにすることは、発生学の緊急の課題である。

前に述べたように、expression cloning法によって、小割球から出される内胚葉誘導分子を中割球子孫細胞に原腸を誘導するという活性を追うことで単離しようと

試みたが、その活性は、卵巣、受精卵、16細胞期胚から抽出したいずれのRNAにも検出されなかった。その原因として、微小注入した目的RNAの量が少なすぎた、と解釈していた。しかし、今回の再構成胚からの小割球子孫細胞除去実験の結果は、むしろ、RNA抽出する胚期に問題があったことを強く示唆している。エルトリエータによって大量に小割球を単離し、正常胚が孵化胞胚に発生する時間まで培養した後、その子孫細胞からRNAを抽出して、そのRNAを16細胞期胚の中割球の1つに微小注入することで、隣接する中割球子孫細胞に原腸を誘導するかを、つぎのバフンウニのシーズンに確認する予定である。