

鹿児島大学大学院理工学研究科 博士学位論文

細胞追跡によるアフリカツメガエル胚の
調節的発生の解析

(Clonal analyses on the regulative
development of *Xenopus* embryos)

2012年12月

古賀 正明

目次

第 1 章 序論	4
本研究の概要	7
第 2 章 材料および方法	9
2-1 胚操作	9
2-1-1 受精卵の獲得、胚の選抜と滅菌	9
2-2-2 割球の単離、除去と移植および細胞系譜トレーサーの注入	10
2-2 組織学	12
2-2-1 胚および組織の固定	12
2-2-2 組織切片の作成	12
2-2-3 キナクリン染色	13
2-2-4 可視化	13
2-3 追跡細胞の解析	14
2-3-1 右半胚におけるクローン分布の解析	14
2-3-2 動物極背側欠損胚外胚葉におけるクローン分布の解析	14
2-4 二重 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションと細胞追跡を組み合わせた全胚三重染色	15
2-4-1 RNA プローブの作成	15
2-4-2 全胚二重 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	16
2-4-3 二重染色の固定と胚の洗浄	17
2-4-4 細胞系譜トレーサーの免疫染色	17
2-4-5 野生型胚の色素の漂白	18
2-4-6 胚の透明化	18
2-5 <i>Xenopus</i> 無細胞系の加圧	18
2-5-1 卵抽出液と精子核の調整	18

2-5-2	加圧処理	18
2-5-3	核の形態調査	19
2-5-4	DNA 複製の測定	19
第 3 章	背腹軸形成を乱した胚における細胞追跡	21
3-1	4 細胞期右半胚における割球運命の変更	21
3-1-1	各右割球クローンは外胚葉の両側を正常胚におけるものと類似の背腹および頭尾パターンで占める	22
3-1-2	背側内中胚葉の前方部分は排他的に背側割球に起源する ..	23
3-1-3	腹側割球子孫は、三胚葉全てで腹側組織の多くを作る	25
3-1-4	尾芽胚各組織におけるクローン分布の変更	27
3-2	8 細胞期背側割球の隣に腹側割球を移植した胚での腹側割球子孫の運命変更	33
第 4 章	細胞間相互作用と頭尾軸に沿った遺伝子発現パターンの調節	37
第 5 章	細胞追跡による外胚葉形成の調節の解析	39
5-1	失われた予定中枢神経系は動物極腹側割球により補償される ..	41
5-2	表皮のクローナルドメインは正常胚におけるものに似る	43
第 6 章	細胞追跡に関する新しい方法の確立	45
6-1	細胞マーカーとしてのアフリカツメガエル雑種胚の利用	46
6-2	二重 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションと細胞追跡を組み合わせた全胚三重染色	46
6-2-1	二重 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションのための適切な条件	48
6-2-2	二重染色の固定と胚の洗浄	49
6-2-3	三重染色のための発色基質の順序	50
6-2-4	胚の漂白	52
6-2-5	分割した胚における三重染色	53

第 7 章 加圧による <i>Xenopus</i> 無細胞系での細胞周期制御機構の解析	54
第 8 章 総合考察	56
8-1 背腹軸の決定と調節	56
8-1-1 前方内中胚葉は高い自律分化能を示す	58
8-1-2 GRP を含む後方内中胚葉における腹側割球子孫の背側化	60
8-1-3 背側割球子孫の腹側化	62
8-1-4 右半胚での背腹中心線の変更と左側の補償	64
8-1-5 右半胚における細胞追跡データの信頼性	64
8-2 細胞間相互作用は背側中胚葉の頭尾軸に沿ったパターンを生み出す	66
8-3 予定中枢神経系欠損胚の外胚葉は予定表皮割球クローンの領域拡大により作られる	67
8-4 割球操作とクローン分布の変異	71
8-5 新たな細胞追跡法の開発	72
8-5-1 細胞マーカーとしてのアフリカツメガエル雑種胚	72
8-5-2 細胞追跡と二重 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションを組み合わせた全胚三重染色法	73
8-6 加圧は <i>Xenopus</i> 無細胞系での細胞周期制御を乱す	75
謝辞	77
参考文献	78
図表	88

第 1 章 序論

動物の発生は、細胞増殖と共に、胚内の特定領域に局在する細胞質因子による作用とこれに続く細胞間相互作用を伴って進行する。多くの後口動物の胚では、発生初期の割球を分離、欠損または再結合することにより細胞質因子の分布と量を見出した場合にも、正常胚と同様に完全なパターンを持つ胚へと発生できる。この現象は「調節」と呼ばれている (Gilbert, 2010)。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は、これらの実験形態学的実験により、調節的発生を可能とする割球の組成や方向性、各種割球を組み合わせたときに生じる奇形の分類が最も詳細に研究されている脊椎動物である (Gerhart, 1980; Cooke and Webber, 1985; Yamana and Kageura, 1987; Kageura, 1995)。正常発生と調節的発生のいずれでも完全なパターンを持つ胚へと発生を導く機構において、細胞質因子と細胞間相互作用がどのように貢献するかを明らかにすることは、発生生物学において、永く未解決で重要な問題である。

調節的発生における割球運命の追跡は、正常発生におけるものと比較することにより、細胞質因子と細胞間相互作用が発生にどのように関与するかについて非常に有益な情報を提供する。すなわち、もし正常発生と調節的発生で割球運命に変更が見られなければ、その割球の運命は細胞質因子の作用によって決定されることを意味する。一方、もし、正常発生と調節的発生で割球運命が異なっていれば、その割球の運命の決定に細胞間相互作用が関与することを示す。アフリカツメガエルの正常発生では、これまでに多くの細胞追跡研究が行われた (Jacobson and Hirose, 1978; Hirose and Jacobson, 1979; Jacobson, 1985; Masho and Kubota, 1986; Dale and Slack, 1987; Moody, 1987b, b; Moody and Kline, 1990; Bauer et al., 1994; Vodicka and Gerhart, 1995)。しかし、分離、欠損、組み合わせ胚につい

での研究は、これまでにほとんどなされていない。

アフリカツメガエルでは、細胞質因子の分布と卵剖面および胚軸には一定の関係がある。未受精卵は、動植物軸のみを持ち、放射相称であり、その植物極側には細胞質決定遺伝子 VegT および Vgl (reviewed in Gerhart, 2001; Heasman, 2006) が局在する。胚の背腹軸は、受精によって植物極側の表層に含まれる背決定因子が移動することで決定される (reviewed in Gerhart, 2001; Heasman, 2006)。つまり、背決定因子を含む植物極側表層は第一卵割までの間に、精子進入点とは逆向き、動物極方向に移動し、移動した側に将来オーガナイザーが生じることで背側が指定される。逆に、精子進入点側が、将来の腹側となる。第一卵剖面はこの背腹軸を通る面に形成される。これにより、胚は、はじめて左右対称性を獲得する。第2卵剖面は、第1卵剖面と直行して縦裂し、将来の背側および腹側の半分を分ける (Fig. 1A)。第3卵剖面は、動植物各半球を分ける (Fig. 1B)。主に動物極割球に由来する外胚葉 (Masho and Kubota, 1986; Dale and Slack, 1987; Moody, 1987a) は、エピボリーと呼ばれる被覆運動により中胚葉と内胚葉を徐々に覆い、原腸陥入終了期にはこれらを完全に覆うことで胚の三層構造が完成する。原腸陥入運動により内中胚葉が上下方向に再配置されて初めて、胚の上方が頭側、下方が尾側として頭尾軸が明確となる (reviewed in Gerhart, 2001; Heasman, 2006)。多くのデータは、発生過程において、初期に起きる出来事ほど細胞質因子の関与が大きく、後期に起きる出来事ほど細胞間相互作用が大きく寄与することを示唆している。

アフリカツメガエル幼生が持つ軸のうち、細胞質因子と細胞間相互作用に関する知見が最も蓄積しているのは、背腹軸に関するものである。背腹軸の決定においては、植物極および背側に局在する細胞質因子または母性シグナル系の交差によって、ニューコープセンターの一部 (Gerhart, 2001)、

オーガナイザー (Nagano et al., 2000; Sakai, 2008) または前方内中胚葉発生の初期段階 (Zorn et al., 1999) が細胞自律的に決定されるモデルが提案されている。一方、オーガナイザーはその植物極側に位置するニューコープセンターからの誘導により形成されるというモデルが、上記モデル以前に提出されている (Nieuwkoop, 1969a, b; Gimlich and Gerhart, 1984; Takano et al., 2007)。また、原腸胚期の背側および腹側で発現する遺伝子群による Chordin-BMP シグナルネットワークを介した細胞間相互作用による調節機構の解析が進展している (De Robertis, 2008, 2009)。しかし、母性細胞質因子の活性と細胞間相互作用がいかに関わり合い、背腹軸を調節するかについての詳細は、明らかではない。

原腸陥入開始期までに中内胚葉と区別される外胚葉の分化に細胞質因子と細胞間相互作用がどのように関わるかについては、背腹軸決定機構以上に不明な点が多い。また、比較的後期にその特徴が明らかとなる頭尾軸の決定には細胞間相互作用が大きく関与するものと考えられるが、この相互作用がどのようなものであるかに関する情報は少ない。

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 胚での細胞追跡には、これまで、顕微注入により細胞を比較的容易に追跡できる蛍光トレーサーと並び、遺伝マーカーを持つものとしてアルビノや *Xenopus borealis* の胚が用いられてきた。遺伝マーカーは、蛍光トレーサーでは追跡できない発生後期や成体に至るまでの細胞追跡が可能であるという利点を持つ。しかしながら、アルビノ胚では色素を持たない胚の内部組織は追跡できず、*Xenopus borealis* 胚は *Xenopus laevis* 胚よりも小さく、信頼性に問題があった。また、組織分化に関する情報を得るため、異なる分化形質を支配する遺伝子の発現を可視化する二重 *in situ* ハイブリダイゼーションが行われている。しかし、これを細胞追跡を行った同一胚で実施できる適切な方法が無

かった。

本研究の概要

本研究では、背腹軸（第3章）、中胚葉の頭尾軸（第4章）および外胚葉（第5章）の決定を乱すように、割球を単離、分離および移植した胚について割球の運命を追跡し、正常胚におけるものと比較した。その結果、前方背側内中胚葉は、正常胚および右半胚からの調節胚のいずれにおいても、背側割球子孫のみで構成されていた。このことは、この部分が背決定因子と植物極に局在する細胞質因子の組み合わせられた活性によって高い自律能を示し、この能力は正常胚および右半胚のいずれにおいても完全なパターンを持つ胚へと発生するために中心的な役割を果たすことが示唆された。右半胚における細胞間相互作用は、腹側割球子孫の背側化およびおそらくは背側割球子孫の腹側化によって背側内中胚葉の決定を制御し、背側中心線の位置をわずかに予定右側に変更した。この位置に応じて、腹側中心線の位置が決まることが示唆された。また、陥入時に最前方に位置する内胚葉を除く背側内中胚葉では、細胞間相互作用によって頭尾軸に沿った遺伝子発現秩序が形成され得ることが示された。中枢神経系 (Central nervous system, CNS) の予定割球を除去した胚では、CNSの補償と表皮の形成の多くは予定表皮割球により担われることが明らかとなった。

また、*Xenopus laevis* 胚と同じサイズを持つ *Xenopus* 雑種胚を細胞マーカーとして利用すること、細胞追跡と二重 *in situ* ハイブリダイゼーションを同一胚で行う方法について検討し（第6章）、上記研究の一部に適用してその有用性を実証した。

さらに、*Xenopus* 無細胞系に高圧を加えることで細胞周期制御機構を解析し、80 MPa の圧力が DNA 複製を抑制することを明らかにした（第7章）。

第 2 章 材料および方法

2-1 胚操作

実験の種類（第 3-6 章）毎に、用いた胚の脱ゼリーと滅菌法、培養液の種類、細胞系譜トレーサーの種類、濃度および注入量を Table 1 に示した。これらの諸条件は、実験の効率化、成功率の向上のために順次変更された。しかし、。いずれの実験においても正常胚での細胞追跡の結果は過去の報告（Hirose and Jacobson, 1979; Masho and Kubota, 1986; Dale and Slack, 1987; Moody, 1987b; Moody and Kline, 1990）に一致した（第 3, 5 章）ことから、これらの実験条件の相違が割球の追跡結果に質的に異なった影響を与えたとは考えられない。

2-1-1 受精卵の獲得、胚の選抜と滅菌

Xenopus laevis と *Xenopus borealis* の雄親および雌親は、九州大学理学部または当研究室で飼育したものをを用いた。これらの受精卵は、ヒト絨毛性ゴナドトロピンの注入（雄 100 -150 単位， 雌 200-300 単位）によって誘導される自然交接により得た。また、*X. laevis* と *X. borealis* の雑種胚は、Wolf and Hedrick (1971)の方法により、*X. laevis* 卵に対し *X. borealis* 精子を人工授精させることで得た。

胚は、2.5% チオグリコール酸ナトリウム (pH 9.0) または 2.5% L-cysteine hydrochloride monohydrate (pH 7.8-8.0) を用いて脱ゼリーし、水洗した。胚の滅菌には、二つの方法のいずれかを用いた。一方は、0.1% p-toluenesulphone chloramide（クロラミン T）を含む 100% スターンバーグ溶液で 2 分間実施後、胚を 100% スターンバーグ溶液で洗浄し、以降の培養を抗生物質無添加の培養液で行うものである。もう一方は、クロラミン T での滅菌を行わず、ゲンタマイシン硫酸塩を 50 µg/ml の濃度で添加

した培養液で胚を培養するものである (Table 1)。

胚は、底部を 2% 寒天で被覆し、10% 仔牛血清を含む 50% Leibovitz (L-15) 溶液 (L-15 FCS)、100% スターンバーグ溶液または 60% modified amphibian Ringer's solution (MR; Larabell et al., 1996) (Table 1) を満たしたシャーレに置き、これらから、規則的かつ対称的な卵割と色素のパターンを持つ 4、8、16 および 32 細胞期胚 (Fig. 1) を選抜した。同溶液中で、以下の割球操作および細胞系譜トレーサーの注入を実施した。

2-2-2 割球の単離、除去と移植および細胞系譜トレーサーの注入

割球を単離、除去した胚での細胞追跡実験では、割球操作を施した胚に対し、細胞系譜トレーサーの顕微注入を行った。一方、割球移植胚での細胞追跡実験では、ビテリン膜を除去した胚の移植すべき割球にトレーサーを注入した後、これを単離し、割球を除去した宿主胚に移植した。これらの操作は、実体顕微鏡または蛍光実体顕微鏡下で実施した。また、雑種胚の移植も、実体顕微鏡下で実施した。

ビテリン膜の除去は、平底の寒天培地上に置かれた胚に対して 2 組のピンセットを用いて行った。さらに、色素と卵割パターンにより背側を決定し (Fig. 1)、ガラス棒とヘアーループを用いて、割球を単離または除去した (Kageura and Yamana, 1983)。

細胞系譜トレーサーとして、100 mg/ml in 0.2N KCl の fluorescein-dextran-amine (FDA) (Gimlich and Braun, 1985)、0.5% in H₂O または 0.108% in H₂O の Dextran Oregon Green 488 (Molecular Probes, Eugene, USA,) を用いた。これらのトレーサーを注入した割球および注入量を、Table 1 に示す。注入には、先端径 2-5 μm の注入針を着装したマイク

ロインジェクター (Model IM-1: Narishige Sci. Lab.) または先端径 10 μm の注入針を装着した Nanoject II injector (Drummond Scientific Co.) を使用した (Table 1)。なお、ビテリン膜を除去していない正常胚への対照注入には、注入後の卵黄の流出を防ぐため、Ficoll PM400 (Pharmacia, GE Healthcare, Buckinghamshire, England) を 10% w/v の濃度で添加した培養液を用いた (Newport and Kirschner, 1982)。

32 細胞期動物極腹側 4 割球の 32 細胞期背側帯域割球除去無標識胚への移植は、培養液を満たした平底の 2% 寒天培地上で行った。移植は動植物軸に関するオリエンテーションを変えずに行い、その後、宿主胚の移植部を下側に向けて融合させた。一方、4 細胞期左腹側割球の右背側割球除去無標識胚への移植および *X. laevis* と雑種の右半胚の移植・融合は、培養液を満たしたシャーレの 2% 寒天穴に両胚片を同時に入れることで行った。穴に入れる際に、左腹側割球および二つの右半胚のうちいずれか一方の胚を動植物軸に対し 180° 回転させた。

トレーサーが注入された単離胚および割球の除去、移植胚は、いずれも、寒天穴に入れ、培養した。注入正常胚については、2% 寒天で被覆した組織培養プレート (Falcon-3034) または寒天穴に入れた。

卵割異常や対象割球からのトレーサーの漏れが認められた胚は、卵割期の蛍光実体顕微鏡観察および切片化後の蛍光顕微鏡観察により除いた。寒天穴に入れた胚はそのまま St. 8-10 (Nieuwkoop and Faber, 1967) まで培養し、培養液を徐々に 10% スタインバーグ溶液または 5% MR に交換した (Table 1)。半胚およびその対照胚については、St. 13-17 で標識割球子孫の分布をデジタル写真として記録した。

割球操作胚およびその対照胚は、後期原腸胚期 (動物極腹側割球の背側帯域割球との置き換え実験 (第 4 章))、ステージ 26/27 (尾芽胚期: 右半

胚実験 (3-1)、左腹側割球の右背側割球との置き換え実験 (3-2))、ステージ 32 (尾芽胚期: 動物極背側割球除去実験 (第 4 章)) およびステージ 47 (遊泳胚期: *X. laevis* と雑種のキメラ胚 (3-2)) にまで発生させた。尾芽胚については、正常な外形を持つ胚 (DAI 5, Kao and Elinson, 1988) を、キメラ胚については、双頭の胚を選抜した。

2-2 組織学

2-2-1 胚および組織の固定

トレーサーを注入した胚は、4% formaldehyde in 70% phosphate buffer (pH 7.0) または 10% formalin in Tris buffer (0.025M, pH 7.4) を用いて 4° C で 1 晩以上固定した。固定された胚は、70% phosphate buffer または 0.025M Tris buffer (pH7.4) で少なくとも 24 時間洗浄し、100% エタノール中で組織切片作成時まで -20° C で保存した。

キナクリン染色に供するキメラ胚およびステージ 55 の *X. laevis* と *X. borealis* および雑種幼生の数種の組織は、カルノア液で固定した。*in situ* ハイブリダイゼーションに用いる胚は、MEMFA (MOPS/EGTA/Magnesium/Sulfate/Formaldehyde) 固定液 (Harland, 1991) で 2 時間または一晩、常温で振とうしながら固定した。胚をエタノールシリーズで脱水し、必要であれば、75-100% エタノール中でカミソリを用いて半分に切り分けた。胚は 100% エタノール中で -85° C で保存した。-85° C 保存は、比較的長期間 (数週間) 保存において -20° C 保存よりバックグラウンドの発色を抑え、染色の過程で胚が壊れることも少なかった。

2-2-2 組織切片の作成

保存した固定胚は、エタノール:ブタノールシリーズに通し、パラフィン

(融点：51-53° C) またはパラプラスチック (McCormick Scientific) で包埋した。厚さ 4 μm (*X. laevis* と雑種のキメラ胚 (3-2))、7 μm (動物極背側割球除去実験(第 4 章)) および 10 μm (右半胚実験 (3-1)、左腹側割球の右背側割球との置き換え実験 (3-2)) で横断切片を作成し、キシレンで脱パラフィン化した。動物極背側割球除去実験(第 4 章)のサンプルについては、再水和して 0.5 $\mu\text{g/ml}$ の 4, 6-diamino-2-phenyl indole (DAPI: Wako Pure Chem. Instr. LTD.) で 2 分間カウンター染色し、再び脱水してキシレンで透徹した。*X. laevis* と雑種のキメラ胚については、再水和し、キナクリン染色に供した。封入には、MX (Matsunami Glass Ind., LTD.) を用いた。

2-2-3 キナクリン染色

固定した幼生組織は、スライドガラス上で 45% 酢酸により 10 分間処理し、カバーガラスをかけ、押しつぶした。押しつぶしたプレパラートをドライアイス上で凍結し、カバーガラスを除去した。プレパラートを 10 分間風乾し、エタノールシリーズで脱水した。

押しつぶし法により作成したプレパラートおよび組織切片は、再水和し、pH 7.0 の McIlvaine バッファー (Thiébaud, 1983) に 10 分間つけた。キナクリン染色は、(Thiébaud, 1983) の方法に従った。

2-2-4 可視化

全てのプレパラートは、フルオロセインのフィルターセットを持つ蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

2-3 追跡細胞の解析

2-3-1 右半胚におけるクローン分布の解析

各種の胚につき、5 バッチ以上の胚を解析した。解析に用いた横断切片は、胚の頭尾軸に沿い、以下の組織または位置を通る 11 レベルから選抜した (Fig. 2A)。1, 終脳; 2, 間脳, 第 1 鰓嚢よりも前方の咽頭内胚葉; 3, 網膜、セメント腺、中脳; 4, 耳胞、菱脳; 5, 前腎; 6, 7, 8, No. 5-9 間の間隔を等しくする位置; 9, 肛門; 10, No. 9 と 11 の中間の位置; 11, chordoneural hinge。各々の胚、レベルで、デジタル画像を記録した。11 レベルの各々について、典型的な図を描き、組織を格子で区分した (Vodicka and Gerhart, 1995; Fig. 2B (level 5))。下索のみは単一の格子で表し、他全ての組織は対称に格子を配置した。各格子での標識されたクローンの率を、写真から見積もった。各格子につき最低 6 個体、平均 8.2 個体からデータを取得した。各格子に対する率の平均値および標準誤差を求めた。調節胚では、右背側割球 (RD) と右腹側割球 (RV) クローンの率の平均値は互いに極めて相補的であり、両クローンの率の平均の合計は 96.6% の格子で 80-120% の範囲にあった。細胞の形態、切片上での細胞の重なり、その他の要素がもたらす率の評価における偏向を減じるため、率の平均値を次の通り標準化した。調節胚では、各格子での両クローンの率の平均値の合計を 100 とした。正常胚については、組織において対称に位置する格子での RD と RV クローンの率の平均値の合計を 100 (下索のみについては 50) とした。

2-3-2 動物極背側欠損胚外胚葉におけるクローン分布の解析

Fig. 3A の通り、胚の頭尾軸に沿った以下の 22 レベルから切片を選抜した。No. 8 と 18 の切片は、耳胞と肛門を通り、No. 1 から 8、No. 8 から

18 および No. 18 から 22 までの番号を通る切片間の距離は同一とした。番号をつけた切片の各々について、標識細胞の分布を写生器で描画した (Fig. 3B)。中枢神経系 (CNS) については、22 枚に加えて補充の描画を位相幾何学的解析 (Nieuwenhuys, 1974; Jacobson and Hirose, 1981) として知られる立体再構成図法に用いた。この方法によると、三次元の CNS は、二次元の図として表される。標識割球子孫で主に占められる領域は、この図中で大きな点を持つ領域として表現され、小数の細胞が散在する領域は、小さな点を持つ領域として示した (Fig. 3C)。

一方、表皮については、以下のように解析を行った。Fig. 3B は、Fig. 3D の実線を通る横断切片の描画である。切片は、表皮のクローナルドメイン (1 個の祖先割球に起源する子孫の分布域) を通っている。表皮のクローナルドメイン内では、表皮の染色および非染色両域が交互に見える。染色部分が主に占める切片表皮のクローナルドメインは、二つの矢印を持つ実線で示される (2 in Fig. 3D)。その実線で示される領域のうち、最も外側の二つの染色領域は、その両外側の染まっていない領域よりも短く、その両内側の染まっていない領域よりも長い。実線で示される領域の両外側に位置し、染まっている部分が散在する領域は、二つの矢印を持つ点線で示される (1, 3 in Fig. 3D)。矢印を持つ実線 (2) と点線 (1 と 3) で示される Fig. 3B 上の領域は、Fig. 3D の尾芽胚図において、大 (2) と小 (1 と 3) の点を持つクローナルドメインとして再構成される。

2-4 二重 *in situ* ハイブリダイゼーションと細胞追跡を組み合わせた全胚三重染色

2-4-1 RNA プローブの作成

RNA プローブ作成のため、p Δ *gsc* プラスミド (Cho et al., 1991) およ

び pXT1 プラスミドの *EcoRI* サイトと *BamHI* サイトで挟まれる領域を除き、*Xbra* 遺伝子 (Smith et al., 1991) の *BamHI* サイトより下流の全域で置き換えたプラスミドを用いた。*gsc* に対するビオチン標識およびフルオロセイン標識アンチセンスプローブと DIG 標識 *Xbra* プローブは、Biotin, Fluorescein および Digoxigenin (DIG) RNA Labeling Mix (Roche, Penzberg, Germany) を用い、メーカーの説明書に従い合成した。

2-4-2 全胚二重 *in situ* ハイブリダイゼーション

全胚二重 *in situ* ハイブリダイゼーションは、基本的に Jowett and Lettice (1994)、Knecht et al. (1995)、Sive et al. (2000) の方法により行った。サンプルに対し、異なった標識を施した *gsc* および *Xbra* プローブを同時にハイブリダイズした。二つのプローブのうち一方を、プローブに対するアルカリフォスファターゼ (AP) 標識 Fab 断片と基質を用いて検出した。次に、AP 活性を Sive et al. (2000) に記述されている二つの方法のいずれかで不活性化した。一つは、10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含むマレイン酸バッファー (MAB) で 65° C、10 分処理後、メタノールで脱水するというものである。もう一方は、1% ツイーン 20 を含む 0.1 M グリシン塩酸塩 (pH 2) で 40 分間処理するというものである。この 1 回目の AP 不活性化の後、もう一方のプローブのシグナルを別の Fab 断片と別の基質で検出した。Vector Black (Vector Black Alkaline Phosphatase Substrate KitII; Vector Laboratories, Burlingame, USA) を細胞系譜トレーサーの免疫染色 (後述) の基質として用いる場合、製造者の注意に従い、二重 *in situ* ハイブリダイゼーションおよびその後の全課程で使用するバッファーにはツイーン 20 を添加しなかった。プローブ濃度、抗体希釈率および AP 反応の基質濃度は予備実験により至適化した。ビオチ

ン標識 *gsc* プローブは、プローブ濃度と抗体希釈率が比較的低い組み合わせでは動物極側に強い非特異発色を生じるため、これらの組み合わせはいずれも比較的高いもの(プローブ：400-650 ng/ml、抗ビオチン-AP Fab 断片(Roche)希釈率：1:7000)とした。フルオロセイン標識 *gsc* プローブおよび DIG 標識 *Xbra* プローブは、400 ng/ml および 200 ng/ml で使用し、1:4000 希釈の抗フルオロセイン AP Fab 断片(Roche) および 1:2000 希釈の抗 DIG AP Fab 断片(Roche)で各々検出した。AP 反応のための基質濃度は、X-phosphate/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP, Roche)については 0.35 mg/ml (Knecht et al. 1995 の 2 倍の濃度) 5-bromo-6-chloro-3-indolyl phosphate (Molecular Probes、Biosynth の Magenta-phos に同じ) については 0.0875 mg/ml (Knecht et al. 1995 の半分の濃度) Nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt (NBT/BCIP, Roche)については、製造者の推奨濃度とした。

2-4-3 二重染色の固定と胚の洗浄

二重染色は、ブアン固定液(25% ホルマリン、5% 酢酸、70% 飽和ピクリン酸水)、ピクリン酸無しのブアン固定液(25% ホルマリン、5% 酢酸、70% 水)または MEMFA で固定した。固定後、サンプルを 0.1% ツイーン 20 を含む 70% エタノール-30% PBS または 0.1% ツイーン 20 を含む 50% エタノール-50% PBS で洗浄した。

2-4-4 細胞系譜トレーサーの免疫染色

細胞系譜トレーサー Dextran Oregon Green 488 は、以前の報告(Jones and Smith, 1998; Sive et al., 2000)に従い、抗フルオロセイン AP Fab 断片

(Roche) と Fast Red (Roche) または Vector Black を用いた免疫染色により検出した。胚を 1:6000 (Fast Red) または 1:10 000 (Vector Black) の Fab 断片希釈液でインキュベートし、基質製造者のマニュアルに従って反応した。ただし、Vector Black の場合には、6-2-3 で述べる通り、試薬濃度を調整した。

2-4-5 野生型胚の色素の漂白

三重染色胚を 50% エタノール-50% MAB で 5 分間 3-5 回洗浄した。野生型胚の色素の漂白は、過酸化水素を含む溶液 (1% H₂O₂、5% ホルムアミド、0.5 × sodium chloride/sodium citrate (SSC)) に胚をつけ、1.0-1.5 時間ライトボックスの蛍光灯の光を照射することで行った (Mayor et al., 1995)。

2-4-6 胚の透明化

BCIP、Magenta-phos および Vector Black で染色した胚は、漂白後、ピクリン酸無添加のブアン固定液で固定した。これらを MAB で 10 分間 4 回以上洗浄し、エタノールシリーズで脱水後、透明化液 BBBA (2:1 benzyl benzoate/benzyl alcohol) (Dent and Klymkowsky, 1989) につけた。

2-5 *Xenopus* 無細胞系の加圧

2-5-1 卵抽出液と精子核の調整

S 期卵抽出液と精子核の調整は、Murray (1991) の方法によった。

2-5-2 加圧処理

サンプルの加圧処理は以下の通り実施した。50-100 μl のアフリカツメ

ガエル卵抽出液またはその凍結保存液（凍結抽出液）のサンプルを、直径 5 mm のガラス管に挿入した。精子核は、10 倍量の EB バッファー (100 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM Hepes-KOH, pH 7.5) に懸濁した。ガラス管には EB バッファーを充填し、EB バッファーを含むガラス注射器に設置した。サンプルには、40-80 MPa の圧力を 23 ° C で 30 分間課した。減圧後、精子核調整用のサンプルについては、15% ショ糖を含む NIB (50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM spermine, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepstatin, 50 mM Hepes-KOH, pH 7.6) に加え、6,200 g で 5 分間 4° C で遠心した。

2-5-3 核の形態調査

核の形態を調査するため、卵抽出液と精子 (1 x 10⁶ 個/ml) の混合液を 150 分間 23° C、大気圧 (0.1 MPa) 下でインキュベートした。特定時間の 5 µl の試料を 5 µl の Hoechst 33258 (5 µg/ml) を含む固定バッファー (3% formaldehyde, 80 mM KCl, 15 mM NaCl, 50% glycerol, 15 mM Pipes, pH 7.2) と混合した。精子核を、蛍光顕微鏡で観察した。

2-5-4 DNA 複製の測定

DNA 複製を測定するため、biotin-16- dUTP (8 µM) を含む凍結抽出液 (50 µl) を精子核 (10⁶ 個/ml) と共に 23° C で 60 分間インキュベートした。15 µl の試料を 25% グリセロール含有の S バッファー (250 mM sucrose, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 2 mM β-mercaptoethanol, 50 mM Hepes-KOH, pH 7.5) (Murray, 1991) に加え、1,200 g で 15 分間、4° C で遠心した。精子核をポリ-L-リジンでコートしたカバーガラスに採取した。精子核を固定し、S バッファーで洗浄し、avidin-FITC で 30 分間、室温でインキュベートした。

その後、精子核を EB バッファーで洗浄し、propidium iodide (PI、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 5 分間染色後、EB バッファーで洗浄した。約 30 個の核当たりの FITC および PI の強度をイメージプロセッサー (ARGUS-20) で測定した。FITC の測定値は、PI の強度で標準化した。

第3章 背腹軸形成を乱した胚における細胞追跡

背腹軸形成を乱す割球組成とした右半胚(3-1)および割球移植胚(3-2)について、割球への Dextran Oregon Green 488 の顕微注入(3-1, 3-2)またはアフリカツメガエル雑種胚の割球移植(3-2)により、割球運命の追跡を実施した。

3-1 4細胞期右半胚における割球運命の変更

ここでは、4細胞期に単離された右半胚の割球運命を調査し、正常胚におけるものと比較する。背側割球は背決定因子を含み(reviewed in Moon and Kimelman, 1998; Gerhart, 2001; Sakai, 2008)、単離または異所的に移植したときに背軸を誘導するが、腹側割球は背決定因子の活性を持たないかわずかしか持たない(Kageura and Yamana, 1983; Cooke and Webber, 1985; Yamana and Kageura, 1987; Kageura, 1997)。このため、右背側割球(right dorsal blastomere, RD)と右腹側割球(right ventral blastomere, RV)から成る4細胞期右半胚(Fig. 4B)は、背決定因子の半分が除かれ、背腹軸形成が顕著に攪乱されている。しかし、この胚は、正常なパターンを持ち、外観上対称で、正常胚よりいくぶん細いものの、正常胚とほぼ同じ体長の幼生へと発生する(Kageura and Yamana, 1983; Fig. 4E-H)。ここでは、左半胚ではなく右半胚について解析を行い、原腸蓋板(gastrocoel roof plate, GRP)に由来する組織での割球子孫の分布も調査対象とした。なぜならば、イモリでは、2細胞期から後期神経胚期までの間に分離した場合、右半胚では心筒の逆向きループ化が起きるが、左半胚ではこれが起きない(Spemmann and Falkenberg, 1919; Takano et al., 2007)からである。また、その表面に生えた単繊毛の運動により左向きの流れを作り出すことで左右性の決定に重要な役割を果たすGRP (Schweickert et al., 2007)に

については、その左側半分の機能は側性マーカー遺伝子の片側発現に必須であるが右側半分の機能は必須ではない (Vick et al., 2009) ことにもよる。

RD または RV が Dextran Oregon Green 488 により標識された正常胚および半胚を、それぞれ W-RD, W-RV, RH-RD および RH-RV と呼ぶ (Fig. 4C-H)。正常な外観を持つ原腸胚/神経胚の外胚葉 (Fig. 5) および完全なパターンを持つ尾芽胚 (DAI 5, Kao and Elinson, 1988; Fig. 4E-H) の横断組織切片 (Figs. 2, 6, 8) を調査した (Koga et al., 2012)。

非注入右半胚では、正常なパターンを持つ DAI5 幼生は 60% から時によっては 90% 以上の頻度で生じ、それ以外の形態的特徴を持つものの大部分は小頭 (DAI 2-4) または陥入不良の個体であった。一方、頭部が大きい個体 (DAI >5) や無頭 (DAI 0, 1) の個体の率は非常に低かった。このことは、使用した胚に背決定因子が左右で偏って分布するものがほとんどなかったことを意味する。

3-1-1 各右割球クローンは外胚葉の両側を正常胚におけるものと類似の背腹および頭尾パターンで占める

後期原腸胚/初期神経胚期の正常胚の外胚葉では、RD および RV クローンの分布の多くは右側に制限された。RD クローンは、右側の頭部表皮および胴尾部での外縁を除く神経板の全域から成る背側領域を占めた (Fig. 5A, C)。RV クローンは、右側では、RD クローンと相補的に分布し、さらに左側表皮において最も腹側の領域にわずかに分布した (Fig. 5E, G)。

調節胚においても、RD クローンは胚の背側領域に分布した。それは、頭部表皮およびその多くが右側に位置し、左側にまで広がる神経板の全長にわたる領域から成り、しかも頭部側に広い両域である (Fig. 5B, D)。RV クローンは、相補的に、腹側/側方領域を両側で占めた。それは、頭部領域を

除く表皮の全域と神経板の左右の縁に沿った領域から成り、しかも左および後方に広い両域である (Fig. 5F, H)。これらの結果は、初期卵割期中に、最も腹側の RV 子孫は最も背側の RD 子孫の左側に接したことを意味する。

このように、RD および RV クローンのいずれも、正常胚とは異なり、右側および左側を広い両域で占めながら両側に分布した。しかしながら、いずれのクローンも、背腹、頭尾軸に関しては、正常胚におけるものに似た分布パターンを示した。つまり、RD クローンは背側および頭部側で広い両域を占めるのに対し、RV クローンは腹側および尾部側で広い両域を占めた。観察されたクローンの分布は、予測される二つの最も極端な割球運命の変更様式のいずれでもなかった。それらは、もし背側内中胚葉が背および植物極に局在する決定因子の細胞自律的活性で制御されるならば RD 子孫は胚の背側半分に参加し RV 子孫は腹側半分を作るというものと、もし左側の背側内中胚葉が右側のニューコープセンターによって誘導される (Nieuwkoop, 1969a, b; Nieuwkoop and Ubbels, 1972; Gimlich and Gerhart, 1984) ならば RD は胚の右側半分となり RV 子孫は左側半分になるというものである。

3-1-2 背側内中胚葉の前方部分は排他的に背側割球に起源する

正常および調節尾芽胚の横断組織切片 (Fig. 2) におけるクローンの分布 (Fig. 6, 8) を、定量的に調査し、三次元的に再構築した (Fig. 7)。これは、両胚種間での背腹、頭尾および左右軸に沿っての比較を可能とした。尾芽胚における結果の重要部分の理解を促すため、胚中でのクローン分布の概要のみをまず記す (3-1-2, 3)。各組織における詳しい分布については、それを示す図と調査したサンプル数と共に、3-1-4 小節に詳述する。調節

胚における割球運命は、どの個体においてもほぼ同様であったが、正常胚におけるものに比較してわずかに変異が大きかった。これは、格子ごとに調査した子孫細胞の率に対する標準誤差として示された (Table 2)。

正常胚において、RD 子孫は、前方内中胚葉に由来する第一鰓嚢より前方の内胚葉 (Fig. 7B)、第一鰓嚢レベルの最も腹側の内胚葉領域 (Fig. 7C)、肝臓 (Figs 6C, 7E) および脊索の先端部 (Fig. 7C) の右側で、高率で検出された。前方内中胚葉は、原腸陥入に際して最初に移動を開始する胚内領域である (Hausen and Riebesell, 1991)。RD 子孫は、上記の前方内中胚葉由来組織の左側でもある程度見られた。RD 子孫の多くは三胚葉のいずれについても背中線に沿って中央および右側領域に分布した (Figs. 6A-F, 7A-K)。RD 子孫は、前方ほど広い領域に高率で見られた。さらに、両側での分布が、脊索と下索の全域 (Figs. 6A-F, 7C-K)、前脳と中脳の腹側領域および網膜で見られた。頭尾軸方向への組織全長にわたる右側での標識が、内胚葉の背側部分、脊索に隣接する体節内領域 (Figs 6B-F, 7E-K) および CNS の腹側領域で確認された。右体節における染色領域の広さは、調節胚の右側の対応領域と似た。GRP を構成する細胞は脊索の腹側領域、下索および脊索に隣接する体節の中央部腹側領域に参入する (Shook et al. 2004; Fig. 260, P)。これらの組織については、脊索の腹側領域と下索では両側で標識が見られ、体節の中央領域では右側の標識が高率で見られたのに対し左側の標識はほとんど観察されなかった。肝臓、前方内胚葉、前方側板および心臓原器から成る胚の腹側領域および頭部間充織でも、右側で比較的高率の標識が観察された。

調節胚では、注目すべきことに、前方内中胚葉組織に由来する第一鰓嚢より前方の内胚葉 (Figs. 6M, 7B')、第一鰓嚢レベルの最も腹側の内胚葉領域 (Fig. 7C')、肝臓 (Figs. 6O, 7E')、および脊索の先端 (Fig. 7C')

のみが、左右のいずれも排他的に RD に由来することが確認された。これは、RD クローン分布パターンのうち、最も前方でのものである。つまり、RD 子孫の多くは、正常胚におけるものと同様に全胚葉で背側中心線に沿った領域に、後方に比較して前方で、広い領域に高率で分布した (Figs. 6M-R, 7A' -K')。これは、頭尾軸に着目すると、正常胚における分布パターンと同様である。しかし、左右軸に着目すると、RD 子孫は、正常胚とは異なり、左側よりも右側で広い両域に高率で分布するものの両側で見られた。上記の分布パターンは、内胚葉、体節、側板、中枢神経系および表皮で観察された。脊索および下索では、この分布パターンは頭尾方向についてのみ、見られた。頭尾軸方向への組織全長を通じての両側分布が、脊索、下索、脊索に隣接する両体節内領域および CNS の腹側領域で見られた。ただし、脊索および下索については、多くのレベルで左右間での分布の相違は検出されなかった。これらの組織は胚軸構造の構成物であり、最初の三組織は GRP からの派生物である脊索の腹側領域、下索、体節の中央部腹側領域 (Shook et al., 2004) を含む。脊索に隣接する両体節内の標識領域 (Fig. 6N-R) は、胚表面の細胞が移入する領域 (Fig. 4 in Shook et al., 2004) よりも背側に広がった。また、左側の標識領域は、いずれのレベルにおいても、右側の標識領域よりも狭く細胞量も少なかった。しかし、左側の標識領域は組織全域またはほぼ全域を調査した 9 個体全てで検出された。組織全長を通じての分布は、右側においても、下索直下の背側内胚葉、CNS および表皮の背側領域で見られた。両側での標識は、頭部間充織や胚の腹側部分、つまり頭部および胴部の内胚葉、前方側板および心臓原器で確認された。

3-1-3 腹側割球子孫は、三胚葉全てで腹側組織の多くを作る

正常胚の RV 子孫は、注目すべきことに、第一鰓嚢より前方の内胚葉 (Figs. 6G, 7M)、第一鰓嚢レベルの最も腹側の内胚葉領域 (Fig. 7N)、肝臓 (Figs. 6I, 7P) および脊索 (Figs. 6H-L, 7N-U, 8A, B) では見られなかった。RV クローンのお多くは、右側において、全胚葉で腹側組織の主要部分およびいくつかの背側組織の後方領域を占めた (Figs. 6G-L, 7L-V)。これらの領域は、背中線に沿った RD 子孫に富む領域以外の組織領域から成った。全ての胚葉に由来する組織で、後方であるほど分布域は広く、クローンの率は高かった。この分布パターンは、組織全長での標識が見られた体節、前腎原器、側板、CNS および表皮だけでなく、組織全長での標識が見られなかった内胚葉でも確認された。胴部レベルの下索では、RV 子孫が極低率ながらも観察された (Figs. 7Q, S, T, 8A)。このように、GRP の派生組織では、RV 子孫は、右体節の中央部ではある程度の率で見られたが、下索、脊索の腹側部および左体節の中央部では極めて低率であるか全く見られなかった。

調節胚では、重要なことに、RV 子孫は、第一鰓嚢より前方の内胚葉 (Figs. 6S, 7M')、第一鰓嚢レベルの最も腹側の内胚葉領域 (Fig. 7N')、肝臓 (Figs. 6U, 7P') および脊索先端部 (Fig. 7N') では見られなかった。RV クローンの分布パターンは、各組織で RD クローンのもものと相補的であった。RV 子孫のお多くは、背中線に沿った領域以外の部分に、頭尾軸についてみると正常胚と同様に、前方に比較して後方で広い領域に高率で分布した。しかし、左右軸についてみると正常胚とは異なり、右側よりも左側で広い領域に高率で分布した (Figs. 6S-X, 7L' -V')。この分布パターンは、組織全長での標識が両側で見られた体節、CNS および表皮と同様、組織全長での標識が見られなかった内胚葉および側板でも見られた。下索および先端部を除く脊索では、正常胚とは異なり、かなりの率の RV 子孫が観察された (Figs.

70' -U' , 8C-E) 。 GRP 起源の細胞が参入する脊索に隣接した体節の中央領域 (Shook et al., 2004) では、組織全長を通じ、RV の率が、調節胚および正常胚の右側におけるものより調節胚の左側におけるものの方が高かった。頭部間充織では、神経褶起源の RV 子孫 (Fig. 5F, H) が、ある程度の率で見られた (Fig. 7L' -O')。

3-1-4 尾芽胚各組織におけるクローン分布の変更

内胚葉性組織 調節胚において、最前方の内胚葉に由来する組織では、両側とも排他的に RD クローンにより占められ、RV クローンは見られなかった。これらの組織は、肝臓 (RD: n=9, Figs. 6O, 7E' ; RV: n=9, Figs. 6U, 7P')、第一鰓嚢よりも前方の内胚葉 (RD: n=7, Figs. 6M, 7B' ; RV: n=10, Figs. 6S, 7M') および第一鰓嚢レベルの最も腹側の内胚葉領域 (RD: n=8, Fig. 7C' ; RV: n=10-11, Fig. 7N') である。

下索とその下部の最背側内胚葉の右側部分での RD クローンの率は、頭尾方向の組織全長を通じ、正常胚におけるものと同様に (Figs. 6B-F, 7E-J (rectangles))、上記の内胚葉領域を除く内胚葉領域におけるものと同様かそれ以上であった (n=6-11, Figs. 6O-R, 7E' -J' (rectangles))。下索では、組織全域での RV クローンの率は正常胚におけるものより高く、両胚種間での相違は後方ほど顕著であった (n=7-10, Figs. 7P-U, P' -U' (rectangles), 8C, D)。下索下の最背側内胚葉では、各レベルで、調節胚の両側での RD クローンの率の合計と RV クローンのそれとの比は、正常胚右側での RD クローンの率に対する RV クローンの率の比とほぼ同じであった。

後方に向けて観察したとき、RV 子孫の内胚葉への参入がはじめて見られるのは、正常胚におけるものとは異なり、左側であり、そのレベルは正常

胚と同等もしくはいくぶん前方の第一鰓嚢（レベル 3）（Fig. 7N'）と第三鰓嚢（レベル 3-4 の間）のすぐ後方の間であった（n=10-11）。レベル 4 では、RV 子孫は正常胚と同様に両側の背側領域で見られたが、正常胚とは異なり、左側でより高率であった（n=7, Fig. 7O, O'）。さらに後方を観察するに伴い、RV 子孫の分布域は両側で腹側に広がり（Figs. 6T-X, 7O' -U'）、レベル 8 までは右側よりも左側の率の方が高かった（n=6-11, Figs. 6T-W, 7O' -S'）。レベル 9 およびそれより後方では、RV クローンは全域を高率で覆った（n=7-10, Figs. 6X, 7T' -U'）。

正常胚の最前方の内胚葉では、RD クローンのみが主に右側に分布し、RV 子孫は見られなかった。これには、肝臓（RD: n=10, Figs. 6C, 7E; RV: n=8, Figs. 6I, 7P）、第一鰓嚢およびこれより前方の内胚葉（RD: n=7, Figs. 6A, 7B, C; RV: n=10, Figs. 6G, 7M, N）が該当する。

下索およびその下部の最背側内胚葉の右側では、後方ほど率が低下するものの、組織全長を通じて RD 標識が見られた（n=6-11, Figs. 6C-F, 7D-K）。下索のほとんどは RD に由来した（n=7-10, Figs. 6C-E, 7E-J）が、胴部でごく低率の RV 子孫が観察された（n=6-8, Figs. 7Q-T, 8A）。

RV 子孫が最も前方で見られたのは、第二鰓嚢と第三鰓嚢のすぐ後方の間のレベルの右背側においてである（n=8, Fig. 7O）。後方に向けて観察を進めると、RV 標識は腹側に広がり（n=7-9, Figs. 6I-L, 7P-U）、これに対応して RD 標識域は狭くなった（Figs. 6C-F, 7E-K）。

脊索 調節胚の脊索先端部（レベル 3）は、RD 子孫のみで占められた（RD: n=8, Fig. 7C' ; RV: n=13, Fig. 7N'）。脊索の全域は主に RD に起源した（n=7-11, Figs. 6N-R, 7C' -K'）が、比較的 low 率（20% 未満）の RV クローンがレベル 4 の右側およびさらに後方のレベルの両側で認められた（n=6-11, Figs. 6T, W, 7O' -V', 8C-E）。脊索での調査を実施した 11

個体全ての胚で、RV 子孫が検出された。

正常胚では、脊索全域で RD 子孫のみが見られた (RD: n=7-11, Figs. 6A-F, 7C-K; RV: n=7-8, Figs. 6H-L, 7N-V, 8A, B)。全てのレベルで、両側での RD クローンの率の差はわずかであった (Fig. 7C-K)。

体節および前腎原基 調節胚では、RD クローンは両体節の全長で脊索に隣接する領域に比較的高率で参入した (n=7-12, Figs. 6N-R, 7D' -K')。これらの領域は、原腸胚期の表層細胞が移入する領域よりも背側方向に広がった (Figs. 6N-R; Fig. 4 in Shook et al., 2004)。また、両クローンは、両側の全ての格子で検出された (RV: n=6-11, Figs. 6N-R, T-X, 7D' -K', 0' -V')。

右側体節では、調節胚の全格子で RD クローンの率は正常胚のものより高く、RV クローンの率は正常胚のものより低かった (RD: n=7-12, Fig. D' -K'; RV: n=7-11, Fig. 0' -V')。いずれのクローンについても、両胚種間での各格子での率の差は後方で大きかった (Figs. 7D-K, 0-V, D' -K', 0' -V')。

調節胚の左体節においても、RD クローンは、脊索に隣接する領域において、組織全長またはほぼ全長を調査した 9 個体の全てで確認された。ただし、その率は右側におけるものより低く、領域もやや狭かった (n=7-12, Figs. 6N-R, E' -K')。RV 子孫は、左体節の多くの格子で主要な構成クローンであり (n=6-10, Fig. 70' -V')、その率は正常胚の右側体節 (Fig. 70-V) に比較して高かった。

前腎原器におけるクローン分布は、前方体節の腹側領域と同様に変更された。調節胚では、右側原器は正常胚のそれよりも高率の RD クローンによって占められ (n=9-11, Figs. 6C, 0, 7E, E')、左側原器は主に RV クローンに起源した (n=9-10, Figs. 6U, 7P')。

正常胚では、RD クローンは右側体節全長にわたり脊索に隣接する領域を占めた (n=8, Fig. 7E-K)。この領域もまた、表層の細胞が移入する領域よりも背側方向に広がった (Fig. 6B-F; Fig. 4 in Shook et al., 2004)。両子孫のほとんど全ては右側体節に分布し、両子孫は全ての格子で検出された (Figs. 6B-F, 7D-K; RV: n=7-11, Figs. 6H-L, 7O-V)。このため、この側では、脊索に隣接する格子での RV クローンの率は、各レベルで他の格子よりも低かった (Fig. 7P-V)。

右側の前腎原器は、そのレベルの体節の腹側領域と同様、少量の RD 子孫と共に主に RV クローンにより占められた (RD: n=6, Figs. 6C, 7E; RV: n=8, Figs. 6I, 7P)。いずれの割球子孫も、左側体節ではほとんど見られなかった。

側板および心臓原器 調節胚では、RD 子孫は前方腹側領域の両側に高率で参入した。RD クローンが 40% 以上の率で占める領域は、前方から正常胚におけるものよりもわずかに後方のレベル 7 にまで達した。これらのレベルでは、RD クローンに富む領域は、左側では腹側領域に限られたのに対し、右側では全域に及んだ (n=6-11, Figs. 6N-Q, 7D' -J')。RV クローンの率が高い領域は、右側より左側が高率である前方背側領域から、両側で率を上げながら後方全域にまで及んだ (n=7-11, Figs. 6T-W, 7O' -U')。

心臓原器の右側は正常胚と同様に主に RD に由来したが、左側は RV から 20-40% の率で起源した (RD: n=6, Figs. 6N, 7D' ; RV: n=8, Figs. 6T, 7O')。

正常胚では、RD 子孫は右側の前方腹側領域に高率で参入した。側板および心臓原器では、各クローンの多くは右側で見られた。レベル 6 およびさらに前方を観察するほど、40% 以上の RD クローンの領域は腹側に位置しながらも背方に拡大した (n=9-10, Figs. 6B-E, 7D-J)。対称的に、高率で

RV クローンを含む領域は、右側の前方背側部域から率を上げながら右側の後方全域にまで及んだ (n=7-9, Figs. 6H-K, 70-U)。

心臓原器の右側は、少量の RV 子孫と多くの RD クローンから成った (RD: n=9, Figs. 6B, 7D; RV: n=8, Figs. 6H, 70)。

頭部間充織 調節胚では、RD 子孫の率は RV 子孫の率よりも右側で高く、左側では低かった。また、右側での RD 子孫の率は、正常胚におけるものよりも高かった。いずれの側でも、RD クローンに対する RV クローンの率の割合は、正常胚におけるものと同様、レベル 1 と 4 の間で、ほとんど同じであった (RD: n=7-8, Figs. 6M, N, 7A' -D' ; RV: n=6-10, Figs. 6S, T, 7L' -0')。これらのレベルでは、調節胚での RD クローン両側での率の合計と RV クローンのそれとの割合は、正常胚におけるものと似た。

正常胚では、RD 子孫の率は、レベル 1 と 4 の間では両側で、RV 子孫の率よりも高かった。ただし、両子孫の多くは右側で見られた。右側では、これらのレベルの間で、RD クローンの率と RV クローンの率の割合はほとんど同じであった (RD: n=6-9, Figs. 6A, B, 7A-D; RV: n=7-8, Figs. 6G, H, 7L-0)。

中枢神経系 調節胚では、RD は右側全域および左側の腹側領域で主要な構成割球として頭尾軸に沿って分布した。右側では、RD 子孫は正常胚と同様のパターンで分布したが、正常胚におけるものより前方かつ背側により広く見られた。最も背側の格子では、RD 子孫の率は、組織を通じてより腹側に位置する格子におけるものよりいくぶん低く (n=7-12, Figs. 6M-R, 7A' -K')、いくらかの RV 子孫が見られた (n=6-14, Figs. 6S-X, 7L' -V')。前中脳においては、5% 以上の RV 子孫が腹側の格子においても検出された (n=6-14, Figs. 6S-X, 7L' -V')。これは、神経胚の調査では明らかではなかった (Fig. 5F, H)。

左側では、RD および RV 子孫は全格子で検出された。より前方かつ腹側の格子ほど、RD 子孫の率が高かった。このため、RD 子孫は、レベル 1 での背腹の格子および組織全長を通じて最も腹側の格子の主要な構成クローンであった (Figs. 6M-R, 7 A' -K')。

正常胚では、RD (n=6-10) および RV (n=6-8) クローンは、組織右側において頭尾方向全長で、各々主に腹側および背側領域に分布した。右側では、RD 子孫のほとんどと RV 子孫の全てが見られた。RD クローンは、全格子で検出され、脳、網膜、レベル 6 とこれより前方の脊髄、およびこれから続く脊髄の全長において、後方ほど背側での率を減じながらも主要な構成クローンとして観察された (Figs. 6A-F, 7A-K)。RV 子孫は組織全長を通じて見られたが、背側領域に制限され、前方よりも後方で率が高かった。また、いくらかの腹側格子でも少数の細胞が見られた (Figs. 6G-L, 7L-V)。

正常尾芽胚の左側では、RD 子孫の参入が、初期神経胚 (Fig. 5A, C) とは異なり、前中脳および網膜の腹側領域で認められた (Figs. 6A, B, 7A-C)。前中脳の背側領域および中脳よりも後方のいくつかの腹側格子でも、RD 子孫が 5% 未満の率で見られた (Figs. 6A-F, 7A-K)。

表皮 調節胚では、RV 子孫は表皮全域に分布した (n=7-12, Figs. 6S-X, 7L' -V')。右側では、両クローンの分布パターンは正常胚におけるものにかなり似た。80% 以上の RV 標識を示す格子は、後方腹側領域に位置した。比較的高い RD 率を示す格子は、主に前方背側に位置したが、正常胚におけるものより後方かつ腹側方向に及んだ (n=7-12, Figs. 6M-R, 7A' -K')。

左側では、RV 子孫は全域を覆った。さらに、80% 以上の率の格子は右側におけるものよりさらに前方にまで位置し、レベル 5 およびこれより後方の全域を占めた (Figs. 6S-X, 7L' -V')。レベル 1 の全域およびこれに続く頭部の腹側領域は、高率の RD を示す右側前方腹側領域から連続する領

域として、比較的低率の RD 子孫が見られた (Fig. 7A' -K')。

正常胚では、RV 子孫は表皮の右側全域に分布した。右側では、RD および RV 子孫のほとんどが分布した (Figs. 6A-L, 7A-V)。RD クローンがかなりの率で頭部の全域で検出され (n=6-10, Figs. 6A-F, 7A-K)、80% 以上の RV 標識が腹部および尾部の全域で見られた (n=7-8, Figs. 6G-L, 7L-V)。

左側では、散在する標識子孫が、RD のものについては前方腹側で (Figs. 6A-F, 7A-K)、RV のものについては胴尾部の腹側で (Figs. 6G-L, 7L-V) 見られた。

3-2 8細胞期背側割球の隣に腹側割球を移植した胚での腹側割球子孫の運命変更

Kageura and Yamana (1986) の割球移植実験では、背側割球によって腹側割球を置き換えた胚は重複胚を形成し、その二次胚の軸構造は移植された動物極背側割球により作られていることが示された。このことから、背側割球は新しいオリエンテーションに応じて発生することができないと結論される。一方、腹側割球の背側の位置への移植は、パターン形成に影響がなかった (Kageura and Yamana, 1986)。腹側割球が背側割球との相互作用により運命を変更するかどうかを明らかにするため、8 細胞期の背側割球の隣に腹側割球を移植し、子孫細胞を追跡した。この目的のため、二種の移植胚を作成した。

一方の移植胚は、8 細胞期 *X. laevis* 胚の左腹側割球を動物極側および植物極側割球のいずれも細胞系譜トレーサー Dextran Oregon Green 488 により標識し、これを無標識の 8 細胞期胚の 2 個の右背側割球と置き換えたものである (Fig. 9C)。この胚においては、移植された左腹側割球の背腹、左右のオリエンテーションは逆転している。この移植胚の多くは、正常な

パターンを持つ胚へと発生した (Fig. 9F)。

Fig. 9G-I は、上記の移植胚 (Fig. 9C) およびその対照胚である左腹側割球 (Fig. 9A) または右背側割球 (Fig. 9B) を標識した正常胚をステージ 27 (Fig. 9D-F) まで発生させ、横断切片化し、耳胞レベルの組織切片像を示したものである。Fig. 9G-I の比較から、右腹側割球の子孫は、宿主胚内で背側化されていることが明らかである。移植に用いた左腹側割球の子孫は、正常胚においては、腹側表皮のごく一部を除けば全てが左側に分布し、背側組織への参入は少なかった。つまり、脊索への参入が全く認められず、体節ではごくわずか、神経管では背側部でわずかな参入が見られるのみであった。間充織ではやや背側よりの領域に標識が見られ、内胚葉では背側部にわずかな参入があった。耳胞および表皮の左側では、大規模な参入が見られた (Fig. 9G)。一方、移植実験で除去される右背側割球子孫は、正常胚においては、ほとんどが右側に分布し、背側組織の多くを占めた。つまり、脊索の左右全域、右体節および右側間充織の全域、神経管の右半分とわずかな左腹側領域および心臓の右半分で標識が見られた。側板および内胚葉の右側全域、および表皮の右最背側部と最腹側部にも参入が見られた (Fig. 9H)。交換移植を受けた胚において、移植された左腹側割球の子孫は、脊索および神経管の右側領域、右体節の全域、右背側および側方の間充織を占めた。また、側板の右背側部、内胚葉の右背側および側方部、耳胞の背側領域、表皮の右背側および側方部でも見られた (Fig. 9I)。以上の結果は、左腹側割球が右背側割球と置き換えられたことで背側化され、本来の右背側割球がたどるべき運命の多くを実現するようにその運命が変更されたことを示している。

もう一方の移植胚は、核の染色性の異なる *X. laevis* および *X. laevis* と *X. borealis* の雑種胚 (6-1 参照) からそれぞれ 8 細胞期に右半胚を単

離し、両者を組み合わせたキメラ胚である (Fig. 10A)。この胚は正常な割球組成を持つが、割球の配置は極めて異常である。つまり、背側では動物極背側割球と植物極背側割球各 1 個が動物極腹側割球と植物極腹側割球各 1 個で置き換えられ、腹側でも逆に置き換えられている。このため、キメラ胚は 2 個の背側割球を「背側」のみではなく「腹側」にも持ち、2 個の腹側割球を「腹側」と同様に「背側」にも持つ。*X. laevis* の 2 個の右半胚でこの種のキメラを作成したとき、50 個体のうち 43 個体で双頭胚が得られている (Kageura and Yamana, 1986)。このキメラ胚での陥入は、ほとんどの場合、2 個の植物極背側割球の各々について、帯域下部の最も背側の部分で生じた (Fig. 10B)。これらの胚のほとんどは、鏡像対称な二つの背側が合わさった重複胚へと発生した (Fig. 10C)。

Fig. 11A-C は、上記のキメラ胚をステージ 47 (遊泳幼生期) まで発生させて得られた重複胚の横断切片をキナクリン染色し、異なる倍率で撮影したものである。Fig. 11B は、Fig. 11A で見られる二組の神経管と脊索のうち、右側に見えるものが拡大されており、Fig. 11C は、Fig. 11B の神経管の左右の両域の拡大図である。背軸構造の左半分の多くの核は、雑種胚由来であることを示す蛍光の輝点を示す。これに対して背軸構造の右半分では、輝点はほとんど見られない (Fig. 11B, C)。脊索はこの時期には空胞化しており、表面の薄い細胞質の層に少数の核が見られた。左半分の多くの核に輝点が見られたが、右半分には見られなかった。しかし、右側領域にも少数の輝点を持つ核が見られる。Fig. 11B はいくぶん低倍率であるため、神経管の細胞の核のいくらかは輝点の有無が判定できない。しかし、高倍率では、Fig. 11C のように、輝点の有無は容易に判定できる。以上の通り、脊索および神経管の主に左側は雑種胚の細胞から成っていたが、右側は *X. laevis* の細胞が優先的に占めた。重複胚は、Fig. 11A のように、二組の背

軸構造の間に共通の腹を持っている。二つの異なる細胞種によって占められる領域の境界は、背軸構造の各々の中央を通った。これは、二組の異なった両親（野生型の *X. laevis* と核小体欠損突然変異をヘテロで持つアルビノ）から得られた二個の 8 細胞期右半胚を融合させて作成したキメラにおいても見られた（景浦、未発表）。Fig. 11B の背軸構造では、左半分は雑種の細胞で作られた。一方、Fig. 11A で左側に見える背軸構造では、その関係は逆である。即ち、右半分は雑種細胞を含んでいた。このため、この結果は、背側割球の隣に置かれた腹側割球の子孫は、Fig. 11B, C の輝点を持つ細胞が背側化された腹側割球子孫なのか輝点を持たない細胞が背側化された腹側割球子孫なのかは分からないものの、確かに背側化していることを示している。

第 4 章 細胞間相互作用と頭尾軸に沿った遺伝子発現パターンの調節

32 細胞期正常胚の 4 個の背側帯域割球は原腸胚のオーガナイザーの大部分を構成する (Bauer et al., 1994; Vodicka and Gerhart, 1995) のに対し、4 個の動物極腹側割球のほとんどは、表皮に参入する (Dale and Slack, 1987; Moody, 1987b)。オーガナイザーを構成する細胞は、原腸陥入に伴う原口背唇部での旋回後、動物極方向に移動し、頭部オーガナイザーあるいは胴尾部オーガナイザーとして分化し、各々が *gsc* と *Xbra* 遺伝子を発現し、幼生の頭尾方向のパターニングに関与する (reviewed in Gerhart, 2001)。頭尾軸に沿った遺伝子発現パターンが細胞間相互作用により誘導されるかどうかを調査するため、これら 4 個の背側帯域割球を細胞系譜トレーサー Dextran Oregon Green 488 で標識した 4 個の動物極腹側割球で置き換えた (Fig. 12A)。胚を原腸胚後期まで発生させ、移植細胞における *gsc* と *Xbra* の発現パターンを調査した (Fig. 12B)。調査に当たって胚は、固定され、背中線に沿って切り分けられ、第 6 章で確立した三重染色法が適用された (Tables 3, 4)。原腸胚は、*gsc* に対しては BCIP (青紫)、*Xbra* に対しては NBT/BCIP (黒紫色)、Dextran Oregon Green 488 が注射された割球の子孫に対しては Fast Red (赤) (Fig. 12B) を用いて染色した。これは、*gsc* と *Xbra* の発現域は正常な後期原腸胚では互いに排他的であり、この発色基質の組み合わせがこれらの遺伝子発現パターンを検出するのに最も適切であるためである (6-2-3 を参照)。

この交換移植胚では、移植された動物極腹側割球起源の細胞は、背軸中胚葉の全域と背側外胚葉の一部の領域に参入した。ただし、予定肝臓などの最も前方の内中胚葉 (Hausen and Riebesell, 1991) では、参入が認められなかった。このことは、右半胚の肝臓で腹側割球子孫が見られなかった

という結果 (Figs. 6U, 7P') と一致する。互いに排他的な *gsc* と *Xbra* の発現域は、標識された背軸中胚葉細胞のほとんど全域に対応した。これらの遺伝子の空間的発現パターンは、正常胚のものに酷似した。即ち、*gsc* が前方で発現し、*Xbra* は後方で発現した (Fig. 12B)。本研究において、移植された予定表皮子孫において頭尾方向に秩序立った *gsc* と *Xbra* の発現パターンが観察されたことは、新しい知見である。さらにこれは、知る限り、無処理の胚細胞を用いた移植や組み合わせ実験において予定表皮に *gsc* が発現したことを示す最初の報告でもある。

第 5 章 細胞追跡による外胚葉形成の調節の解析

外胚葉形成における調節機構を明らかにするため、動物極背側 (AD) 割球を除去した胚 (Fig. 13C) について細胞追跡を行った。この胚を用いたのは、以下の四つの理由による。(1) 表皮と中枢神経系 (CNS) は主要な外胚葉性組織である。CNS の大部分 (脳の 88%、脊髄の 54%) は動物極背側割球に由来し、表皮の多く (66%) は動物極腹側割球に起源する。即ち、これらの組織は、その大部分 (79%) が動物極割球由来であり (Hirose and Jacobson, 1979; Masho and Kubota, 1986; Dale and Slack, 1987; Moody, 1987b, 1989)、AD 割球子孫はその体積の約 40% を占める (Dale and Slack, 1987)。(2) 卵割期の動物極側割球は卵割が進行するにつれて植物極側へと移動し、原腸陥入期を通じて中胚葉、内胚葉を包み込む。この運動はエピボリーと呼ばれる。エピボリーの間の外胚葉細胞の部域による運動性の違いは、非常に詳しく記載されており (Hausen and Riebesell, 1991)、背側の方が腹側よりも運動性が高い (Keller, 1978)。(3) 8 細胞期胚の予定外胚葉割球をできるだけ多く除いた胚のうち正常胚へと発生できるものは、動物極割球の半分を除いた胚であり、これ以上の個数の予定外胚葉割球を除くと中内胚葉が外胚葉から一部露出した奇形となる (Kageura and Yamana, 1984)。(4) CNS は、細胞追跡の研究が最も進んだ組織であり、2 細胞期から 512 細胞期までの研究が行われている (Jacobson and Hirose, 1978; Hirose and Jacobson, 1979; Jacobson and Hirose, 1981; Jacobson, 1983; Sheard and Jacobson, 1987)。

この欠損胚では、動物極腹側 (AV) 割球は、予定外胚葉割球のうち残された主要なものである。本章では、16 細胞期正常胚 (Fig. 13A, B) と欠損胚 (Fig. 13C) について、AV 割球に起源し、CNS と表皮に位置するクローナルドメイン (1 個の祖先割球に起源する子孫の分布域) を比較した結果を記

述する。16細胞期胚について調査したのは、表皮では正常胚においても16細胞期割球子孫の分布が明らかにされていなかったことによる。16細胞期割球の名称については、(Hirose and Jacobson, 1979)の命名法に従った(Fig. 13B)。

全てのAD割球を除去した胚は、正常胚の90%以上の体長を持ち、完全なパターン(DAI 5)を持つ調節胚へと発生した(Fig. 13D)。この率は、注射を行わなかった胚では65%、トレーサー注入した胚では24-26%であった。標識割球は多くの組織に参入したが、ここではCNSと表皮における結果のみをそれぞれFigs. 14, 15およびFigs. 16, 17に示す。同種の割球については左右割球間でクローナルドメインに有意な差が認められないことから、以下の説明では左右を区別しない。また、左側割球に注入したものとして図示する。

同種の割球に由来する胚毎のクローナルドメインは、CNS、表皮のいずれにおいても、わずかに異なった。また、標識細胞と非標識細胞の混合が、全ての胚で見られた(Fig. 13E, F)。クローナルドメインの変異は、調節胚におけるもの(C, D in Figs. 14-17)が正常胚におけるもの(A, B in Figs. 14-17)より大きかった。しかし、調節胚でのクローナルドメインの変異はランダムなものではなく、正常胚におけるものにかかなり近い程度で制限が課せられていた。このことは、各々の胚についてのクローナルドメインの例(A, C in Fig. 14-17)および全調査胚についての平均化された標識細胞の分布として示される(B, D in Figs. 14-17)。

ビテリン膜の有無により、正常胚CNSおよび表皮におけるV1.2クローナルドメインの位置の相違は認められなかった(データ略)。このため、正常胚はビテリン膜を持つ胚について解析した。調査胚数を、本文冒頭の括弧内に図表の番号と共に示す。

5-1 失われた予定中枢神経系は動物極腹側割球により補償される

正常胚の CNS では、V1.1、V1.2 子孫の分布はいずれも注入側に限られ、しかもその領域は、V1.1 子孫は最前方部、V1.2 子孫は神経管及び脳の背側領域と、非常に限られたものであった。一方、調節胚では、CNS のほとんどは V1.1 および V1.2 のクローンで占められた。調節胚 CNS における V1.1 および V1.2 の子孫は、いずれも前方から後方に渡り、各々腹側及び背側部分に位置した。Figs. 14, 15 の A, C に図示する個体毎のクローナルドメインは、3 個体とした。

V1.1

正常胚 (n=5, Fig. 14A, B) 5 個体のうち 4 個体で、少量の標識細胞が終脳 (telencephalon) の注入側の背側部または側方部で見られた (Fig. 14A の左側および中央個体がその例)。このような標識は Hirose and Jacobson (1979) または Jacobson and Hirose (1981) では報告されていないが、Moody (1987a) では 9 個体のうち 1 個体で報告されている。これら 4 個体のうち 2 個体では、少量の標識細胞が神経管の背側領域で見られた (Fig. 14A の左側個体がその例)。このような散在的な標識もまた、以前に報告されている (Jacobson and Hirose, 1981; Moody, 1987a)。

調節胚 (n=5, Fig. 14C, D) 全ての調節胚でこの割球のクローナルドメインは脳から脊髄まで腹側中心線に沿って分布した。4 個の胚の脳では、標識領域は注入側だけでなく非注入側にも見られた。この 4 個の胚の前脳及び中脳の注入側では、標識細胞は、3 個体 (Fig. 14C の左側個体がその例) ではそのほぼ全域を、1 個体では腹側及び側方領域を占めた (Fig. 14C の中央個体)。非注入側での標識は、前脳および中脳の腹側部から背側部にかけて、胚により異なった分布を示した。残りの 1 個体 (Fig. 14C の右側個体)

では、標識細胞は注入側のみで見られ、脳の側方及び背側領域に位置した。標識細胞の列が腹側中心線に沿って後方にどの位置まで伸びるかは、個々の胚でいくらか異なった。3 個の胚では、この細胞列は脳から脊髄の後端まで続いた (Fig. 14C の中央および右側個体がその例)。2 個の胚では、この列は脊髄の中央及び後方部で消失した (Fig. 14C の左側個体がその例)。

V1.2

正常胚 (n=6, Fig. 15A, B) 全ての胚で、標識は同側で見られた。4 個の胚で標識細胞は峽 (isthmus) よりも後方で見られ、菱脳 (rhombencephalon) と脊髄の背側領域に限られた (Fig. 15A の中央個体がその例)。残りの 2 個では、上記領域に加え、中脳の背側領域で少数の標識細胞が見られた (Fig. 15A の右側および左側個体がその例)。これら 2 個のうち 1 個 (Fig. 15A の左側個体) では、注入側の間脳 (diencephalon) と終脳の背側領域でも、わずかな標識が確認された。この標識のパターンは、過去の報告に一致する (Hirose and Jacobson, 1979; Jacobson and Hirose, 1981; Moody, 1987a)。

調節胚 (n=5, Fig. 15C, D) 調節胚では正常胚におけるものと同様に、CNS の注入側背側部で、後端から前方へ伸びた標識細胞の帯が見られた。この帯状のクローナルドメインの幅は正常胚におけるものに比較して腹側方向に広がった。また、この帯は、多くの正常胚では菱脳 または中脳 (mesencephalon) で見られなくなったのに対し、調節胚では全ての胚で前端にまで達した。4 個の胚で、標識は注入側のみで見られた。そのうち 3 個体では、脊髄の後方部では全域が標識され、標識領域の腹側の縁は前方ほど徐々に脳の背側の縁に近づいた (Fig. 15C の右側個体がその例)。4 個のうち残りの 1 個では、CNS の背側領域のみがほぼ全域標識された (Fig. 15C の中央個体)。1 個体 (Fig. 15C の左側個体) では、標識細胞は注入側全域で

見られただけでなく、非注入側の脳と脊髄の腹側領域でも確認された。その標識領域の非注入側の背側の縁は、後端側ほど腹中線に近づいた。

5-2 表皮のクローナルドメインは正常胚におけるものに似る

正常胚表皮において、V1.1、V1.2 クローンのいずれも、子孫の分布の多くは注入側に限られ、V1.1 クローンは肛門を除く体の腹側部全域に、V1.2 クローンは V1.1 クローンよりも背側の領域に分布した。調節胚表皮におけるクローナルドメインの位置は、いずれも正常胚におけるものと非常に似た。図示する個体毎のクローナルドメインは、V1.1 についてはいずれの胚でも 3 個体 (Fig. 16A, C)、V1.2 についてはいずれの胚も全調査個体 (正常胚 : 6 個体、Fig. 17A ; 調節胚 : 5 個体、Fig. 17C) とした。

V1.1

正常胚 (n=5, Fig. 16A, B) 全ての標本で、V1.1 のクローナルドメインは、注入側の体の最も背側部分および肛門を除く全域を占めた。肛門周囲の非染色領域の広さは、胚による相違がかなり大きかった。非注入側では、標識は、全ての胚で最も腹側の狭い領域に見られた。その領域は、吸着器から肛門の周囲にまで及ぶ範囲内であり、胚によって異なった。

調節胚 (n=10, Fig. 16C, D) 調節胚におけるこの割球のクローナルドメインは、正常胚におけるものと良く似た。全ての胚で、標識細胞は最も背側領域及び肛門周囲を除く注入側全域に分布した。正常胚におけるものと同様に、肛門周囲の非標識領域の広さは個体により大きく異なった。10 個体のうち 8 個体では、非注入側の頭頂部から肛門周囲までの狭い腹側領域に標識が見られた。ただし、その領域は個体により異なった。

V1.2

正常胚 (n=6, Fig. 17A, B) 全ての胚で、この割球のクローナルドメインは注入側のみに位置し、体の全長で背側領域およびこれに連なる尾の最腹側部に限って見られた。2 例では、頭部の背側部分が標識されなかった (Fig. 17A の左側から 3, 4 番目の個体)。これは、Masho and Kubota (1986) および Moody (1987a) の結果に一致する。ひれを含む背側領域では、標識領域は頭部から肛門部方向にかけて、その腹側の境界がひれの縁の方向に徐々に狭くなった。

調節胚 (n=5, Fig. 17C, D) 調節胚におけるこの割球子孫の分布パターンは、頭部の最も背側の両域を除き、正常胚におけるものと似た。全ての個体でクローナルドメインは注入側のみに位置し、体の全長で背側領域およびこれに連なる尾の最腹側部に限られた。また、ひれを含む背側領域では、標識領域は頭部から肛門部方向にかけて、その腹側の境界がひれの縁の方向に徐々に狭くなった。頭部の最も背側の両域は、全個体でこの割球クローンで占められた。これは、正常胚では 6 個体のうち 2 個体では見られなかったものである。

第 6 章 細胞追跡に関する新しい方法の確立

細胞追跡に関する新しい二つの方法について検討し、これを確立した。第一点は、アフリカツメガエル雑種胚を用いた細胞追跡法の開発である。Thiébaud (1983)は、キナクリンによって染色し、蛍光観察したとき、*X. borealis* の核は多数の輝点を持つのに対し、*X. laevis* のそれは均一に蛍光を発することで両者が区別できることを明らかにした。両者の胚は発生速度がほぼ同じであることから、キメラ胚を作成することにより、カエル成体に至るまでの細胞追跡のシステムとして利用可能である。しかし、*X. laevis* の卵の直径は、*X. borealis* のその約 1.2 倍であり、割球の大きさも両者で異なることから、両者の割球を結合させることでキメラを作成した場合、割球の配列が異常となり、実験の信頼性が正常胚におけるものと同様とは言えない。この卵の大きさの相違を解消するため、*X. laevis* の卵に対し、*X. borealis* の精子を受精させ、雑種胚を得た。雑種胚は、キナクリン染色により、*X. borealis* に似た多数の輝点を示し、*X. laevis* 胚と区別できた。雑種胚は第 3 章 3-2 のキメラ胚作成に利用し、有用性を実証した。

もう一点は、細胞追跡と二重 *in situ* ハイブリダイゼーションを同一胚で行う方法の開発である。細胞の分化を研究する場合、細胞追跡と並んで、二つの分化マーカー遺伝子に対する全胚二重 *in situ* ハイブリダイゼーションは、いろいろな動物胚で非常に有益な情報をもたらしてきた。しかし、細胞追跡と二重 *in situ* ハイブリダイゼーションを組み合わせる同一胚で行う信頼性ある方法は、アフリカツメガエルではこれまでに考案されていなかった。このための諸条件を至適化することで、これを可能とした。本法は、第 4 章の実験に適用し、その有用性を実証した。

6-1 細胞マーカーとしてのアフリカツメガエル雑種胚の利用

Fig. 18 は、キナクリン染色された *X. laevis*, *X. borealis* および雑種のステージ 55 幼生小腸の核を示す。*X. laevis* の核 (Fig. 18A) は均一な蛍光を発するが、*X. borealis* のもの (Fig. 18C) は、過去の報告 (Thiébaud, 1983) の通り、多数の輝点を示す。雑種の核は、*X. borealis* と同様の染色性を持ち、多数の輝点を示す (Fig. 18B)。このことは、雑種の細胞が *X. laevis* の細胞と区別可能であることを示す。Thiébaud (1983) は、*X. borealis* の赤血球の核が 17 から 21 個の輝点を持つことを報告している。本研究では、二匹の幼生 (ステージ 55) の胆嚢の髄質および一匹の幼生 (ステージ 55) の膵臓、肝臓、小腸、胸腺、皮膚について、約 450 個の核を調査した。多くの核は、1 個あたり 15 から 16 の輝点を示した。雑種幼生 (ステージ 55) では、一匹のこれらの組織について約 400 個の核を調査し、平均 12 から 15 個の輝点が観察された。雑種の核の輝点の数は、*X. borealis* のそれと比較して、若干少なかった。

以上のことから、この雑種の細胞が *X. laevis* の細胞と区別可能であることが明らかとなった。

6-2 二重 *in situ* ハイブリダイゼーションと細胞追跡を組み合わせた全胚三重染色

アフリカツメガエル胚を三重染色するため、二重 *in situ* ハイブリダイゼーションのための二つの染色と細胞追跡のための染色は、漂白に耐えるものである必要がある。アフリカツメガエルの野生型胚は色素をもつが、割球を操作する実験を行う際には、この色素は背腹軸を見分けるために不可欠なものである (Fig. 1)。ただし、この色素は、*in situ* ハイブリダ

イゼーションの染色を見るときに阻害要因となる。このため、過酸化水素と蛍光照射により、色素の漂白を行う (Mayor et al., 1995) ことは、手術や割球特異的な処理を施された胚について明瞭なシグナルを得るためには不可欠な操作である。このため、漂白によっても退色しない、呈色法による三重染色法について検討した。ニワトリにおいては、三重 *in situ* ハイブリダイゼーション (Brent et al., 2003) や *in situ* ハイブリダイゼーションと二重抗体染色 (Lopez-Sanchez et al., 2004) のための呈色法による三重染色法が報告されている。しかし、追跡に使用する分子や酵素反応および胚の相違により、これらの方法のアフリカツメガエルへの適用の可否は不明である。

アフリカツメガエルにおいて、Doniach and Musci (1995) は、三重 *in situ* ハイブリダイゼーションと細胞追跡を組み合わせた方法を報告した。彼らは、呈色法による三重 *in situ* ハイブリダイゼーションと蛍光トレーサーを顕微注入した細胞子孫からの蛍光を検出する方法を用いた。しかし、3つの遺伝子発現域を示す3色間の色コントラストは明瞭ではなく、二色間のいずれの組み合わせについても区別は明瞭ではなかった。さらに、分割または切片化したサンプルでの観察がないため、三つの遺伝子が追跡した細胞以外の細胞のみで発現していることを、明確に示すことができなかった。このため、Jowett and Lettice (1994), Knecht et al. (1995) および Sive et al. (2000) の二重 *in situ* ハイブリダイゼーション法および Jones and Smith (1998) の細胞追跡法をもとに、三重染色の至適化について検討した。本法では、*gooseoid* (*gsc*, Cho et al., 1991) と *Xenopus brachyury* (*Xbra*, Smith et al., 1991) プローブを二重 *in situ* ハイブリダイゼーションに使用した。両遺伝子プローブと細胞系譜トレーサーを検出するため、上記方法で用いられたアルカリフォスファターゼ (AP) 標識抗

体と発色基質を使用した。三重染色の高い色コントラストを達成するため、実験における個々のステップを至適化した。三重染色に断片化胚を使用したり、三重染色胚を透明化液中で観察したりすることにより、胚の内部の観察も可能となった。

6-2-1 二重 *in situ* ハイブリダイゼーションのための適切な条件

mRNA は壊れやすいため、細胞系譜トレーサーである Dextran Oregon Green 488 の検出以前に二重 *in situ* ハイブリダイゼーションを実施した。この細胞系譜トレーサーは、二重 *in situ* ハイブリダイゼーションの二回の発色後にも免疫反応を維持した。*gsc* の発現を検出するため、まず、単ハイブリダイゼーションでフルオロセインとビオチン標識プローブの使用について検討した。*gsc* の検出には、ビオチン標識は適したが、フルオロセイン標識は、*Xbra* の発現域と似た原腸胚期帯域での非特異発色を生じたことから、適さなかった。このため、二重 *in situ* ハイブリダイゼーションには、ビオチン標識 *gsc* プローブと DIG 標識 *Xbra* プローブを用いた。

このプローブの組み合わせでは、同時にハイブリダイゼーションする二つのプローブの検出順序は極めて重要である。ビオチン標識 *gsc* プローブを 2 回目の染色で検出すると、特に動物極側にごま塩様のバックグラウンドの非特異発色が生じる。しかし、このプローブを 1 回目の反応で検出した場合、三重染色のいずれの過程でもこの種の発色は見られなかった (Fig. 19)。このことは、1 回目の反応後の AP 不活性化がこのバックグラウンド発色を生じさせることを示唆する。一方、DIG 標識 *Xbra* プローブは、1 回目、2 回目のいずれの発色反応でもバックグラウンド発色を生じなかった。このため、ビオチン標識 *gsc* プローブは 1 回目の反応での検出のために使用

されなければならない。

二重 *in situ* ハイブリダイゼーションでの基質の組み合わせのために、一方のハイブリダイゼーションシグナル呈色後の AP 不活性化法を二種のものについて検討した。二つの AP 不活性化法に適する基質の組み合わせを Tables 3, 4 に要約した（いずれの表も細胞追跡の結果を含む）。10 mM EDTA を含む MAB で 65° C、10 分間処理後、メタノールで脱水する不活性化法を用いた場合、1 回目および 2 回目の反応には各々、BCIP と Magenta-phos, BCIP と NBT/BCIP の組み合わせが可能である（Magenta-phos と BCIP は不可）（Table 4）。Magenta-phos (Fig. 20)、NBT/BCIP のいずれも、メタノールに溶解しやすいため、1 回目の反応には使用できない。一方、BCIP 染色は、溶性が低いため、1 回目の反応に使用すべきである。BCIP の溶出を避けるため、メタノールでの脱水時間は 1 時間以内とする必要がある（Table 3）。AP 不活性化に 1% ツイーン 20 を含む 0.1 M グリシン塩酸塩（pH 2）で 40 分間処理する方法を用いた場合、1, 2 回目の反応に以下の基質の組み合わせが可能である。つまり、BCIP と Magenta-phos, BCIP と NBT/BCIP および Magenta-phos と BCIP である（Table 4）。2 回目の発色を弱くしないため、グリシン塩酸塩溶液は十分に洗浄する必要がある。MAB での 10 分間 4 回洗浄が勧められる（Table 3）。2 回目の DIG 標識プローブの検出感度を低下させないため、1 回目の染色後には固定は行わない（Table 3）。

6-2-2 二重染色の固定と胚の洗浄

細胞系譜トレーサーを可視化するための 3 回目の反応の前に二重染色を固定することは、1, 2 色目の染色が後の実験操作で減退しないようにするためにも、BBBA 中で透明化して観察するためにも重要である。二重染色の固定と胚の洗浄は、ピクリン酸を除いたブアン固定液で 1 晩固定し、0.1%

ツイーン 20 を含む 50% エタノール-50% PBS で数回（合計 1 時間以下）洗浄することが適切であった。ちなみに、Magenta-phos と NBT/BCIP で染められピクリン酸を含むブアン固定液で 2 時間固定された胚は、ピクリン酸を除くために 0.1% ツイーン 20 を含む 70% エタノール-30% PBS で一晩洗浄したところ、いずれの染色もかなり減じられた。この至適化された固定により、AP 不活性化もまた行われる (Fig. 21B) ことから、固定以外の AP 不活性化の操作は不要である。Fig. 21 では、2 時間固定後に残った AP 活性が Fast Red の発色として示されている。AP 活性は、ブアン固定液ではピクリン酸の有 (Fig. 21A) 無 (Fig. 21B) にかかわらず完全に不活性化されているが、MEMFA 固定ではわずかに残る (Fig. 21C)。

6-2-3 三重染色のための発色基質の順序

二重 *in situ* ハイブリダイゼーションと細胞追跡のための発色基質の順序を検討した。三種の発色基質 Magenta-phos、BCIP および NBT/BCIPのうち、二種を二重 *in situ* ハイブリダイゼーションに、Fast Red または Vector Black を細胞追跡に使用した。二重 *in situ* ハイブリダイゼーションに可能な六種の組み合わせのうち、三種については発色が阻害されるという情報がある (Sive et al., 2000) ことから、残りの三種についての検討を実施した。この検討は、透明化液に可溶性の Fast Red を細胞追跡に使用した場合について実施された。また、二重 *in situ* ハイブリダイゼーションに BCIP と Magenta-phos を使用したときに、透明化液に不溶性の Vector Black を細胞追跡に使用する方法についても検討した。検討した全ての場合について、二重 *in situ* ハイブリダイゼーションと細胞追跡の染色の間で色の変化などの悪影響は見られなかった (Table 4, Fig. 19)。基質の組み合わせのうち、一つのみが、一種の AP 不活性化に不適であった (6-2-1

に記載)。三重染色のための発色基質の順序に関する詳細は、Table 4 に要約した。

もし染色が重なる場合には、より初期の発色は後期の発色により薄くなる。この問題を回避するため、初期の反応では強く染め、後期の反応ではいくぶん反応を早めに切り上げることが重要である。特に、Fast Red や Vector Black の染色では、反応が強く出やすいため、染め過ぎないことが肝要である。サンプルは、染色のステップ毎に写真撮影しておくことが勧められる (Table 3)。

BCIP, Magenta-phos と Fast Red (Fig. 19A, B)、および Magenta-phos、BCIP と Fast Red の順序と組み合わせの場合、全ての色は明るい色調である。BCIP は調査した *in situ* 発色基質の中で Fast Red と最も好対照な色をなすが、Magenta-phos は室温反応では明赤紫色を示し、Fast Red とはいくぶん色コントラストが低い。このため、Fast Red で追跡された細胞との対比をより強く出したい方の遺伝子を BCIP で染め、Magenta-phos は Fast Red との対比をより明瞭にするため、37° C で長時間反応させてより青い紫色に呈色させる (Sive et al., 2000) べきである。

BCIP, NBT/BCIP と Fast Red の順序で染められた胚を Fig. 19C に示す。青紫色の NBT/BCIP 染色は、Magenta-phos よりも Fast Red に対して高いコントラストを示し、その強度は Magenta-phos や BCIP のものより強い。お互いが重なり合う部分では青紫色で強い NBT/BCIP 染色は青くて弱い BCIP 染色を隠してしまいがちだが、両方の染色が離れている場合には強い NBT/BCIP 染色は利点にもなる。BCIP は AP で強く染め、NBT/BCIP 染色は早めに切り上げるべきである。NBT/BCIP のバックグラウンドの発色を抑えるため、ポリビニルアルコール入りの AP バッファー (Sive et al., 2000) を用い、かつ (または) 低温で反応させた。数回の MAB および 0.1% ツイー

ン 20 を含む 50% エタノール-50% PBS 洗浄を行った後には、Fast Red 染色には悪影響は見られなかった (Fig. 19C)。

BCIP, Magenta-phos および Vector Black の順序で染め、漂白した胚を Fig. 19D に示す。3 色のいずれも透明化液中で観察可能である (Fig. 19E) ことから、胚内部の調査が可能である。このことは、三つの色を維持したままパラフィン切片を作成することができることを示唆する。Vector Black 染色は暗い黒褐色の色調を示し、BCIP や Magenta-phos の染色より強い染色性を示すため、重なりがある場合にはこれらを不明瞭にしやすい。透明化はまた、三つの染色の強度を弱める。このため、BCIP と Magenta-phos は十分に反応させなければならない。反応速度を遅くすることでバックグラウンドの発色を抑えるため、基質溶液の濃度は 1/5 が適切であった。さらに、野生型胚での Vector Black のバックグラウンド発色の強度をモニターするため、開始時からのアルビノ胚での平行実験が勧められる。何故ならば、Vector Black の黒褐色は、染色強度が弱ければ、野生型胚の色素の色と区別が困難であるためである。さらに、このバックグラウンド発色は、色素の漂白後に、Magenta-phos の染色といくぶん似たピンクがかった褐色を呈する。

6-2-4 胚の漂白

三重染色において、漂白に適切な時期を検討した。漂白を 3 回目の Fast Red (細胞追跡) 染色後に行った場合、Fast Red のバックグラウンド発色は弱く (Fig. 22, 中央のサンプル)、*in situ* および Fast Red 染色に及ぼす漂白の影響は見られなかった (Fig. 19A, B)。Vector Black を細胞追跡に用いたときにも同様の結果を得た (Fig. 19D)。一方、漂白を 2 回目の発色に続く固定後 (細胞追跡染色前) に行うと、3 回目の Fast Red 発色に対

して強いバックグラウンドの発色が生じた (Fig. 22, 左側のサンプル)。このため、色素の漂白は、3回目の発色後に行わなければならない。

6-2-5 分割した胚における三重染色

本研究の方法で胚の内部を調査するため、細胞系譜トレーサーを注入した正常野生型中期原腸胚を背中線で切り分け、三重染色を施した。Fig. 23に示す通り、*gsc* と *Xbra* の発現領域が青色 (BCIP) と紫褐色 (NBT/BCIP) で染められている。さらに、トレーサーを注入された細胞の子孫が赤色 (Fast Red) で示されている。3色目の発色後に切り分けた場合、胚内部での Fast Red の発色は不十分であった。

第 7 章 加圧による *Xenopus* 無細胞系での細胞周期制御機構の解析

Xenopus 無細胞系は、細胞周期の制御機構解析のための有用な実験系を提供する (Murray, 1991)。一方、高圧は、リボゾームタンパク質、DNA ポリメラーゼや ATP 合成酵素のような細胞活動に重要な役割を果たすオリゴマータンパク質を解離させることが明らかとなっている (Weber and Drickamer, 1983)。このことから、高圧は細胞活動に影響を与えると考えられる。事実、マウスの赤白血病細胞は、80 MPa の圧力下に置かれた後に常圧下で培養すると、細胞の増殖が有意に抑制される (Matsumoto et al., 1998)。これらの細胞は、S 期への進行が阻害され、G2 期に止まっている (Matsumoto et al., 1998)。S 期細胞の高圧感受性を理解するため、高圧が *Xenopus* 無細胞系での細胞周期進行に及ぼす影響について検討した (Takahashi et al., 2004)。

Xenopus 精子核を無細胞系でインキュベートした場合、Fig. 24A に示すように、精子核の形態は細胞周期の進行に応じて変化した。S 期の精子クロマチンの凝縮が 30 および 75 分に観察された。一方、M 期に対応する核膜の崩壊が 60 および 135 分に出現した。無細胞系の高圧感受性を調査するため、抽出液に 40, 60, および 80 MPa の圧力を課した。40 MPa の場合、精子核の細胞周期は非圧力処理のサンプルと同様に進行した。60 MPa では、精子核の形態変化は、観察される場合もそうでない場合もあった。80 MPa では、細胞周期に応じた変化は見られなかった (Fig. 24A)。

光学顕微鏡を用い、M 期核の出現とインキュベーション時間 (0-150 分) との関係进行调查した (Fig. 24B)。ほとんどの精子核は、無細胞系中で 60 および 135 分で M 期に達したが、80 MPa 処理した無細胞系中では、M 期核は生じなかった。一方、精子核を 80 MPa 処理し、無細胞系でインキュベー

トした場合、無処理の精子核と無処理の無細胞系の組み合わせの場合と同様に、精子核の形態変化が生じた。これらの結果は、卵抽出液は 80 MPa の圧力に感受性なのに対し、精子核は非感受性であることを示す。

細胞周期の進行の阻害の原因を明らかにするため、biotin-16-dUTP の核への取り込みを調査した (Fig. 25)。DNA 複製は、80 MPa 処理した凍結抽出液では阻害されたが、80 MPa 処理された精子核は非圧力処理の凍結抽出液中で複製した。このように、精子核の M 期への進行と DNA 複製の抑制とは対応した。

第 8 章 総合考察

本研究で割球運命を追跡した胚は、3-2 で述べた右半胚を二つ融合した胚 (Fig. 10) 以外は全て、完全なパターンを持つ胚へと発生したものである (Fig. 4F, H, 5B, D, F, H, 9C, 12B, 13D)。このため、本研究の実験結果は、正常発生と調節的発生のいずれにおいても完全なパターンを持つ胚を作る機構について示唆を与える。調節的発生における割球の運命は、どの実験系においても、正常発生におけるものと同様にいずれの個体についてもほぼ一定なものであった。

本考察では、まず、背腹軸、頭尾軸および外胚葉形成を乱す目的で作成した単離、欠損、移植胚における細胞追跡の結果について議論を行う (8-1, 2, 3)。また、割球操作とクローン分布の変異について議論する (8-4)。続いて、本研究で確立した細胞追跡法について議論する (8-5)。最後に、加圧による *Xenopus* 無細胞系での細胞周期制御機構の解析について、考察する (8-6)。

8-1 背腹軸の決定と調節

背腹軸の形成と調節機構を解析するため、右半胚 (Fig. 4B) および予定背側割球を予定腹側割球で交換移植した胚 (Figs. 9C, 10A) について、割球の運命を追跡した (第 3 章)。これらの胚の背側組織の調節には、二通りの説明がある。ひとつは、背側割球は、その運命がこの割球に含まれる背決定因子と植物極に局在する因子の細胞自律的な活性によって決まっており、置き換えられたか除去された背側割球が持つ予定域を補償するというものである。もう一方は、背側割球子孫の隣に位置するようになった腹側割球子孫が、細胞間相互作用によって背側化されて予定運命を変更し、置き換えられたか除去された背側割球がもつ予定域を補償するというものである。

このことに関連し、本研究の結果が下記 4 項目を意味することを、以後のセクションで議論する。(1) 右半胚において、胚の前方背側内中胚葉(前方内中胚葉)は高い自律分化能を持つ。つまり、前方内中胚葉の自律能は、正常発生、調節的発生のいずれにおいても、完全なパターンの胚を形成する上で中心的な機構の一部を成す(8-1-1)。(2) 腹側割球子孫は、その隣に位置することになった背側割球子孫との細胞間相互作用によってその運命を変更して GRP を含めた背側組織へと分化することが可能である。このことは、右半胚での側性の制御においても重要な意味を持つかも知れない(8-1-2)。(3) 右半胚における背側割球子孫は、腹側割球子孫との相互作用によっておそらく腹側化され、非注入側の体節に参入する。これは *adaxial cells* の発生と関連するかも知れない(8-1-3)。(4) 右半胚では、背腹の中心線はわずかに右側に変更され、それに対応して腹側中心線は大きく右側に変更された(8-1-4)。

また、右半胚でのデータの信頼性について、本小章の最後で議論する(8-1-5)。

正常胚、調節右半胚のいずれにおいても、後期原腸胚/初期神経胚の外胚葉における割球子孫の分布(Fig. 5)は、前中脳の腹側領域を除き、尾芽胚における分布(Figs. 6, 7)とほとんど一致した。このことは、調節のほとんどは原腸胚後期までに完了していることを意味する。右半胚での実験結果を要約するため、発生過程における RD および RV クローン分布の推移を、詳しい調査を行った尾芽胚のデータをもとに、既報の原腸胚および神経胚の運命図(Keller et al., 2003; Shook et al., 2004)上に推定した(Fig.26)。この推定は、上記の結果ならびに原腸胚後期/神経胚初期の調節胚における予定組織の位置が正常胚におけるものと同じであるとの仮定に基づく。

8-1-1 前方内中胚葉は高い自律分化能を示す

本研究の右半胚での結果は、正常発生だけでなく調節的発生においても、前方内中胚葉はより後方の背側内中胚葉よりも高度に自律的に形成されることを示した。調節胚では、肝臓(Figs. 60, U, 7E', P' (level 5))、第一鰓嚢水準の最も腹側内胚葉領域(Fig. 7C', N') (level 3)および第一鰓嚢よりも前方の全ての内胚葉領域(Figs. 6M, S, 7B', M' (level 2))および脊索の最も先端部(Fig. 7C', N' (level 3))すなわち前方内中胚葉に起源する組織は、排他的に RD に由来し、RV 子孫が参入しないことが確認された。しかし、より後方の背側内中胚葉や CNS では RV 子孫が見られた(Figs. 6S-X, 7L' -V')。正常胚においてもまた、これらの前方内中胚葉起源の組織では、RD 子孫のみが見られ、RV 子孫は検出されなかった(Figs. 6A, C, G, I, 7B, C, E, M, N, P)。このように、高度に自律的とは、ここでは、背側割球子孫はそれらの間では相互作用しても腹側割球子孫とは相互作用しない、ということの意味する。前方内中胚葉は、胞胚腔の内壁を前方に収束伸長する最初の胚内領域であり、この領域内に前述の組織に対する予定組織が上記の順序で一列に並んでいる。前方内中胚葉の前端は、外胚葉における将来の口の部分を通り過ぎ、最終的に体の腹側に到達し、肝臓へと分化する(Hausen and Riebesell, 1991)。

前方内中胚葉が排他的に RD に起源することは、以下の原因のいずれかまたはそれらのある組み合わせによるものと考えられる。つまり、(1) 細胞自律的な組織分化が RD 子孫で起きた、(2) 収束伸長が RD 子孫よりも RV 子孫で顕著であったかより初期に起きた、(3) RV 子孫の作用による RD 子孫の腹側化(次の小項目で議論する)が前方内中胚葉特異的遺伝子を発現する RD 子孫内の領域を最終的に RV 子孫から離れた領域に位置させた、というものである。

肝臓と第一鰓嚢より前方の内胚葉が RD のみに由来することは、これまでの割球や胚片の単離および移植実験では示されなかった。これらの結果は、母性の Wnt/ β -catenin と TGF- β シグナル系が前方内中胚葉発生の初期過程を決定するという Zorn et al. (1999) の提案に一致する。また、これらの結果は、予定オーガナイザー割球が動物極腹側割球で置き換えられた場合、最も前方の内胚葉では動物極腹側割球子孫が見られなかったという第 4 章の結果 (Fig. 12, Koga et al., 2007) とも合う。しかし、これらの組織での結果は、前方内胚葉 (part 3 in Fig. 5 Gerhart, 2001) が胚表面の背側内胚葉が分泌する Xnr3 タンパクを介した細胞間相互作用に依存して生じるという Gerhart (2001) のモデルとは必ずしも一致しない。また、Sakai とその共同研究者のモデル (2000, 2008) はこの内胚葉の分化には言及していない。このため、これらの結果は、Gerhart のモデル (2001) よりもむしろ Zorn et al. のモデル (1999) を支持する。

右半胚からの調節胚において脊索の先端部が RD のみに起源した (Fig. 7C', N' (level 3)) ことはまた、脊索前板も RD から排他的に由来し、高い自律能を持つことを示唆する。何故なら、脊索前板の巻き込みは前方脊索のそれに先立つ (Hausen and Riebesell, 1991) からである。脊索先端と脊索前板は、Gerhart のモデル (2001) で Nieuwkoop center のうち細胞自律的に生じる部分の一部 (part 1 in his Fig. 5) である胞胚の背側帯域細胞集団に由来する。Sakai とその共同研究者のモデル (Nagano et al., 2000; Sakai, 2008) では、これらの組織は細胞自律的に分化するオーガナイザーから由来する。一方、これらの組織が Zorn et al. のモデル (1999) がその対象とする *XHex* および *cerberus* を発現する前方内中胚葉の一部であるかどうかは不明である。別の実験条件下では、背決定因子を持たない細胞からも細胞間相互作用によって脊索前板や脊索先端部が誘導されるかも知

れない。事実、予定オーガナイザー割球を背決定因子を受け継がない動物極腹側割球で置き換えた胚 (Fig. 12A) から発生した後期原腸胚では、動物極腹側割球子孫は脊索前板マーカー遺伝子の *gooseoid* (Artinger et al., 1997) を発現した (Fig. 12B, Koga et al., 2007)。ただし、この実験では、動物極腹側割球子孫から最終的に分化した脊索前板や脊索先端部が生じたかどうかについては明らかではない。

後方背側内中胚葉の形成もまた、背側および植物極に局在する細胞質因子の細胞自律的活性に著しく依存するようである。なぜなら、脊索や下索では、調節胚における RD クローンの率は正常胚におけるものより高かった。また、体節、前腎原基、前方側板および心臓原器では、調節胚右側における RD クローンの率が正常胚におけるものと同程度以上であり、かつ調節胚左側でのこれらの RD クローンの率は正常胚右側での RV クローンの率よりも高かった。調節胚において、左体節における RD 子孫は、脊索における RV クローンより体積が多いようであった。これらの結果は、細胞自律的な内中胚葉形成は前方内中胚葉の予定域ばかりでなく予定脊索と予定体節の一部でも起きたことを示唆する。

以上のことから、本研究の実験結果は前方内中胚葉 (Zorn et al., 1999) や背側内中胚葉 (Nagano et al., 2000; Gerhart, 2001; Sakai, 2008) における自律的分化を強調するモデルに部分的に合うものの、これらのモデル単独では適切には予見できず、より広汎かつ統一的なモデルの確立が求められる。

8-1-2 GRP を含む後方内中胚葉における腹側割球子孫の背側化

腹側割球子孫は、背側割球子孫との相互作用によって背側化され、背軸

構造の形成に参加することが示された。背軸構造とは、脊索、下索、体節、背側内胚葉、CNSを指し、神経胚期のGRPも含まれる。これらのことは、背側割球子孫の隣に腹側割球子孫が位置するように割球を配置された胚が調節的に発生するためには、腹側割球子孫の背側化が調節機構の必須部分を成すことを意味する。右半胚の上記背軸組織ではいずれも、腹側割球子孫は前方よりも後方で高率で見られ(Figs. 6S-X, 7L'-V')、より後方で著しく背側化されることが明らかとなった。

正常胚の脊索には腹側割球子孫は参入しない(Figs. 6H-L, 7N-V)のに対し、胚操作を行った場合には参入が見られた。これは、*X. laevis* および *X. laevis* と *X. borealis* の雑種胚(6-1)からそれぞれ8細胞期に右半胚を単離し、両者を組み合わせたキメラ胚で初めて報告された(Koga et al., 1986, Fig. 11)。このことは、8細胞期に左腹側割球を別の胚の右背側割球で交換移植した胚(Fig. 9C)についても、耳胞レベルで再確認された(Fig. 9F, I)。定量調査を実施した右半胚の脊索では、腹側割球子孫は、その先端部を除き最も腹側の部分を含む全域である程度の率で検出された(Figs. 70'-U', 8C-E)。以上の結果は、他の実験系での報告(Stewart and Gerhart, 1990; Domingo and Keller, 1995)や背側帯域に移植された腹側割球子孫がオーガナイザーのマーカ遺伝子を発現する(Fig. 12B, Koga et al., 2007)という結果に一致する。また、右半胚での結果は、脊索の腹側割球子孫は原腸胚期の深層ばかりでなく表層からも由来する(Shook et al., 2004)ことを示唆する。

右半胚の下索では、腹側割球子孫は正常胚におけるものよりもかなり高率で検出された(Fig. 7P-U, P'-U')。脊索との隣接領域を含む体節、最も背側の内胚葉領域およびCNSでは、調節右半胚左側の腹側割球子孫の率は、正常胚および調節胚での右側の対応領域における率よりもかなり高か

った (Fig. 70-V, 0' -V')。

調節右半胚の GRP の左側には、左右および背腹のオリエンテーションをほぼ逆にして再配置された RV 子孫が、正常胚および調節胚の GRP 右側におけるものより高率で参入すると推定される。このため、右半胚の左側 GRP での RV 子孫の率は正常胚左側 GRP での左腹側割球子孫の率よりも高い (Figs. 260-R) と考えられる。この推定は、上述の結果と以下に述べる過去の知見から導かれる。: *Xenopus* の GRP (Figs. 260, P の内面) は、脊索の腹側部分 (赤紫色)、下索 (灰色) および体節 (黄色) の予定域から成る。GRP は、原口上部の表層内胚葉に起源する lateral endodermal crests (LECs) (黄緑色) と原口下部表層に由来する内胚葉 (緑色) によって順次挟まれている。後に、予定下索は脊索直下で融合し、LECs は卵黄に富む内胚葉の最も背側領域の両側を作る (Shook et al., 2004)。

上に記した右半胚 GRP 左側での細胞系譜が正常胚におけるものと異なることは、反時計回りのキラリティーを持つ表層のアクチン配列 (Danilchik et al., 2006) や背決定因子のような母性因子が正常胚とは異なった利用をされることをもたらす。このことは、マーカー遺伝子の片側発現のために必須である GRP 左半分の機能 (Vick et al., 2009) の阻害をもたらすかも知れない。特に 2 細胞期に分離されたイモリ右半胚ではさらに、心筒ループ化の逆転 (Spemann and Falkenberg, 1919; Takano et al., 2007) を、神経胚期に単離された右半胚 (GRP の左半分はおそらくひどく損傷している) の場合とほぼ同じ率で生じさせる (Takano et al., 2007) かもしれない。この可能性については、さらに検討する価値がある。

8-1-3 背側割球子孫の腹側化

右半胚においては、RD 子孫の腹側化もまた、背側組織の左側で起きたよ

うである。特徴的なことに、RD子孫は両側体節内の脊索に隣接する領域にかなりの率で参入することが、組織のほぼ全体を調査した9個体全てで確認された(Figs. 6N-R, 7D' -K')。この領域は原腸胚期の表層中胚葉が参入する領域(Fig. 4 in Shook et al., 2004) よりもいくぶん背側に広いことから、この領域のRD子孫は表層ばかりでなく深層からも由来することが示唆される。この領域の左側でのRD子孫の分布は、予定右体節の一部よりもむしろ未決定の予定脊索がその運命を左体節へと変更したことにより、RD子孫が腹側化したものであることを示唆する。なぜならば、本研究で見られた分布は、Oelgeschläger et al. (2003)が *chordin* に対するアンチセンスオリゴマーを顕微注入した胚のオーガナイザーを切り出して別の原腸胚のオーガナイザーと置き換えたときに特異的に見られたオーガナイザーの子孫細胞の分布に似ているためである。

右半胚の左体節におけるこれらのRD子孫の多くは、adaxial cellsとして調節に重要な役割を果たすかも知れない。これは、ゼブラフィッシュにおけるものと同様に、予定脊索の近くの両側予定体節内のRDクローンに富む細胞集団(Fig. 26E, F, I, J; Hirsinger et al., 2004)が、予定脊索と共にadaxial cellsとして頭尾軸に沿って収束伸長し(Figs. 7M, N; Glickman et al., 2003)、遅筋繊維に分化する(Devoto et al., 1996)ことと関わりと考えられる。この可能性は、*Xenopus*での以下の実験結果と一致する。原腸胚期の表層細胞に由来し、ゼブラフィッシュのadaxial cellsのサブタイプであるmuscle pioneer cellsと同様に体節の水平隔膜に位置する細胞(Shook et al., 2004)は、本研究で観察された脊索に隣接する体節中央領域でのRD子孫の分布域の一部を成す。また、遅筋細胞はステージ28には最も後方の体節の中央部で検出される(この時期にはより前方では遅筋細胞はまだ分化していない)(Grimaldi et al., 2004)。この可能性につ

いてはさらに検討する必要がある。

8-1-4 右半胚での背腹中心線の変更と左側の補償

これまでの議論と原腸胚での割球子孫の分布の推定図 (Fig. 26C-N) から、4 細胞期右半胚における予定背側中央線 (Fig. 26B、青矢印) は、正常胚におけるもの (Fig. 26A、青矢印) よりもわずかに予定右側に変更されたと推定される。予定背側中心線の変更は、予定前方内中胚葉領域とそれより後方の内中胚葉の予定域ではわずかに異なるものと考えられる (Fig. 26B では正確には表現されていない)。何故なら、前方内中胚葉に由来する組織は排他的に RD クローンから成るのに対し、それより後方の内中胚葉は両方のクローンから構成されているためである (Figs. 6M-X, 7A' -V')。

調節胚においては、RV クローンは、腹側組織を両側で優先的に占めた (Figs 5F, H, 6S-X, 7L' -V')。またこのクローンは、前方内中胚葉を除く左側の全域を、それに対応する正常胚および調節胚の右側領域と同等以上の率で補償した (Figs 7L-V, L' -V')。これらの左右間での RV クローンの率の相違は、全ての組織で前方かつ/または背側領域ほど高く、補償のために減じられた右側での RV クローンの率は背側前方域で高かった。

このため、4 細胞期半胚の予定腹側中心線 (Fig 26B, 赤線) の位置は、RV 上に引かれ、それは正常胚の予定腹側中心 (Fig 26A, 赤線) よりも RD に近いと推定される。予定腹側中心線の右方向へのずれ (Fig 26A, B, 赤線) は、背側中心線のそれ (Fig 26A, B, 青線) よりも明らかに大きい。

以上のことは、背側中心線の決定は腹側中心線の決定に優先するが自律的には決まらず、腹側中心線は背側中心線の位置に応じて調整されることを意味する。

8-1-5 右半胚における細胞追跡データの信頼性

本研究の結果は、調査した調節右半胚が第一卵割面の傾き (Black and Vincent, 1988; Danilchik and Black, 1988) により背決定因子の半分以上を含む半胚から発生した胚を高頻度で含むという可能性を排除する。右半胚が完全なパターンを持つ胚へと発生する率は、トレーサーを注入しない場合には通常 60-80% であり、これは右半胚と左半胚がほぼ同じ率で調節できるとする Kageura and Yamana (1983) の結果とほぼ同率であった。この率はバッチによっては 90% 以上にも達したが、正常胚以上の大きさの頭部を持つ胚 (DAI >5) や頭部を持たない胚 (DAI 0, 1) の率はいずれも非常に低かった。また、前方内中胚葉に関する結果は、調査した胚では全て同一であった。さらに、本研究で使用した規則的で対称的な卵割と色素のパターンを示す正常胚では、Figs. 5A, C, E, G に示される通り、第一卵割面は背腹軸をかなり正確に分けた。尾芽胚でもまた、両クローンの分布の大部分は右側に制限された (Figs. 6A-L, 7A -V)。ただし、前中脳の腹側領域、脊索および下索では、左右間での細胞の混合 (Jacobson and Hirose, 1978; Hirose and Jacobson, 1979; Klein, 1987; Cleaver et al., 2000; Shook et al., 2004) により、RD 子孫の両側分布が見られた。これら全ての結果は、自然交配により得た胚では第一卵割面が背腹軸を分けることを示した Klein (1987) の結果に極めて近いものである。

前脳と中脳の腹側領域におけるクローンの分布が正常胚、調節胚のいずれについても後期原腸胚期/初期神経胚期と尾芽胚期の間で一致しなかった (Figs 5, 7) ことは、いずれの胚においても両側間での細胞混合が後期神経胚期以降に起きたことを示唆する (Jacobson and Hirose, 1978)。

Dextran Oregon Green 488 を用いた本研究の右半胚での実験の信頼性は、fluorescein-dextran-amine や horseradish peroxidase を用いた過去の研究と同水準であると考えられる。何故ならば、本研究の正常胚の結果が過

去の正常胚の研究結果 (Jacobson and Hirose, 1978; Hirose and Jacobson, 1979; Masho and Kubota, 1986; Dale and Slack, 1987; Moody, 1987a) と本質的に一致するからである。ただし、いずれの胚種についても対応する左側割球クローンについては調査していないため、トレーサー注入がクローン分布に及ぼす影響の程度は明らかではない。

8-2 細胞間相互作用は背側中胚葉の頭尾軸に沿ったパターンを生み出す

頭尾軸形成機構を解析するため、32 細胞期の予定オーガナイザー割球 (背側帯域 4 割球) をトレーサーで標識した動物極腹側 4 割球と交換移植した (Fig. 12A)。この胚を原腸胚後期まで発生させ、移植割球子孫の追跡と二つの遺伝子発現パターンの調査を同一胚について実施した (6-2 参照)。正常胚では、動物極腹側割球の背側中胚葉への参入は尾部でわずかに認められるのみで、頭部では全く認められない (Dale and Slack, 1987; Moody, 1987b; Vodicka and Gerhart, 1995)。また、動物極腹側割球子孫には正常発生では *gsc* は発現せず (Vodicka & Gerhart 1995)、動物極腹側割球は 8 または 32 細胞期に他の胚の腹側に移植しても軸形成能を示さない (Kageura and Yamana, 1986; Kageura, 1990)。交換移植胚から発生した後期原腸胚 (Fig. 12B) では、移植割球子孫によって占められた背側中胚葉 (赤色部) に、正常胚におけるものと同様に、頭部側で *gsc* (青紫) が、尾部側では *Xbra* (暗紫色) が互いに排他的に発現した。これらのことは、移植された動物極腹側割球子孫での頭尾軸方向に順序立った *gsc* および *Xbra* の発現がこれらの細胞と予定オーガナイザー以外の宿主胚細胞との間の相互作用により誘起されたことを意味する。この結果の一つの解釈は、宿主胚に残された背側植物極割球子孫が *Chordin* のような BMP シグナルの阻害

因子を細胞外に分泌し、この因子を移植された腹側割球子孫が受容することでその細胞自身の Chordin 遺伝子発現の正の自動フィードバックループを開始 (Blitz et al., 2000; Vonica and Gumbiner, 2007) し、このことによりオーガナイザーが形成される。その後頭部オーガナイザーと胴尾部オーガナイザーが分化し、各々が *gsc* と *Xbra* を排他的に発現するというものである。ただし、本実験では、*gsc* と *Xbra* の発現量や持続期間、オーガナイザーで発現する他の遺伝子については調査していない。また、脊索や脊索前板などのオーガナイザーに由来する分化組織については調査していない。このため、これらの結果は完全なオーガナイザー形成を意味するものでは必ずしもない。また、頭尾軸方向に順序立った遺伝子発現が他の割球や組織の組み合わせ実験で誘導されるかも明らかではない。これらに関して、さらに研究が必要である。

8-3 予定中枢神経系欠損胚の外胚葉は予定表皮割球クローンの領域拡大により作られる

外胚葉形成における調節機構を解析するため、主要な予定 CNS 割球である動物極背側 (AD) 割球を除去した 16 細胞期胚から発生した調節胚と正常胚について、残された主要な予定外胚葉割球である動物極腹側 (AV) 割球 V1.1 および V1.2 のクローナルドメインを CNS と表皮において比較した (Figs. 14-17)。

CNS と表皮における両クローナルドメインの位相関係を理解するため、神経管形成が起きる前のステージ 14 (神経胚期) の外胚葉におけるクローナルオーガナイゼーションを、正常胚と調節胚について、本研究の結果と過去の報告 (Hirose and Jacobson, 1979; Jacobson and Hirose, 1981; Masho and Kubota, 1986; Kageura, 1995) から、推定した (Fig. 27)。この図で

は、クローナルドメイン間の細胞の混合（後述）は無視されている。正常胚では動物極割球によってその大部分が覆われる外胚葉は、調節胚においては、残された動物極割球である AV 割球のクローナルドメインによってそのほとんどが覆われた。調節胚では、調査した二つの AV 割球のクローナルドメインはいずれも、正常胚におけるものに比較して大きく拡大したが、拡大のパターンはかなり異なった。胚の中央側に位置する V1.1 割球のクローナルドメインは、AD 割球の除去により、特異的なパターンで正常胚に比較して背腹方向に引き延ばされた。正常胚では、V1.1 クローナルドメインは、肛門の周囲を除く腹側表皮を占め、CNS ではいくつかのサンプルで前脳のごく一部で見られるのみであった (Figs. 14A, B, 16A, B, 27A)。一方調節胚では、このクローナルドメインは、尾芽胚期 CNS の腹側部（神経胚期 CNS の中央部）を占めるべき D1.1 のクローナルドメインの多くを代替し、かつ表皮では正常胚とほとんど同じ位置を占めた。このクローナルドメインは、CNS と表皮におけるものが頭部で連結し、いずれの組織においても前方から後方にまで進展した (Figs. 14C, D, 16C, D, 27B)。このことは、欠損胚でのエピボリーの間に、このクローンの収束伸長が、正常胚と同様に予定腹側（表皮）で起きただけでなく、正常胚におけるものとは異なり予定背側（CNS）でも起きたことを意味する。一方、V1.2 のクローナルドメインも AV 割球の除去により背腹方向に拡大した。しかし、その拡大のパターンは V1.1 とは異なった。つまり、V1.2 クローナルドメインの CNS および表皮での位置とパターンは正常胚におけるものに良く似た。正常胚のほとんどでは、V1.2 クローナルドメインは、菱脳、脊髄の背側部分に位置し、表皮においても背側部分を頭尾全長にわたり占めた (Figs. 15A, B, 17A, B, 27A)。一方調節胚では、このクローナルドメインは、正常胚の外胚葉ではそのほとんどが CNS にしか位置しない D2.1 と D2.2 および D1.2 のクロー

ナルドメインの大部分を代替することに加え、正常胚におけるものと同様な CNS および表皮の領域にも位置した (Figs. 15C, D, 17C, D, 27B)。V1.1 および V1.2 のいずれのクローナルドメインにも覆われない肛門周囲の領域の広さは、両胚種間で差が小さいようであった (Figs. 16, 17, 27)。正常胚において CNS に少量参入する D2.1 の子孫は、調節胚では 5 個体のうち 1 個体で CNS に少量の参入が認められた以外は外胚葉では観察されなかった (未発表データ)。

外胚葉の約 40% の体積を占める AD 割球 (Dale and Slack, 1987) を除去した本研究の調節胚では、外胚葉調節に二つの極端な様式が想定される。一つは欠損胚における残りの予定外胚葉割球子孫が、エピボリーの際に正常胚におけるものよりも広がり、AD 割球のクローナルドメインが位置すべき領域をも覆うというものである。もう一方は、残りの予定中胚葉や内胚葉割球がその運命を変更し、外胚葉になるというものである。調節胚外胚葉の大部分が残された AV 割球のクローナルドメインによって覆われたという上記の結果 (Figs. 14-17, 27) は、この調節胚の外胚葉の補償様式は後者よりも前者に近いことを意味する。このことはさらに、外胚葉の決定が細胞質因子により大きく支配されている可能性を示唆する。

CNS と表皮におけるクローナルドメインが正常胚と調節胚とで異なる (Figs. 14-17, 27) 原因の多くは、原腸陥入に伴う中胚葉の配置の相違よりもむしろ、外胚葉形成の相違そのものに求められると考えられる。その理由のひとつは、本実験で除去された予定中胚葉および外胚葉を含む AD 割球 (Jacobson, 1985; Masho and Kubota, 1986; Dale and Slack, 1987; Moody, 1987b; Takasaki, 1987; Masho, 1988; Moody, 1989) は対称であるため、中胚葉および外胚葉の調節も対称に起き、中胚葉の移動方向は正常胚と調節胚間とで違いが無いことである。もう一つは、調節胚の体長は正常胚の

その 90% を超えており (Fig. 13D)、このことは正常胚と調節胚とで中胚葉細胞の移動距離の相違もまた小さいことを示す。

正常胚と調節胚の間で V1.1 と V1.2 のクローナルドメインの位置が異なること (Figs. 14-17, 27) は、16 細胞期までには予定外胚葉割球ではエピボリーの際の伸長方向と伸長程度に関する決定が起きておらず、予定外胚葉の伸長は 16 細胞期以降に胚の他の部分との相互作用により徐々に決定されることを意味する。腹側割球 V1.1 と V1.2 子孫のエピボリーの際の伸長方向は、AD 割球の除去により変更された。調節胚における V1.1 と V1.2 のクローナルドメインは、V1.1 割球と V1.2 割球とは左右軸に関して反対側に位置する背側各割球に由来するクローナルドメインをほぼ代替し、かつそれ自身が正常胚において位置するものとほぼ同様の領域を占めた (Figs. 14-17, 27)。このことは、AD 割球の除去により、V1.1 と V1.2 のクローナルドメインはいずれも背側方向に引き延ばされたことを示す。特に V1.1 の場合は、子孫細胞の延長方向が背腹軸に関して腹側の一方向のみから頭部をまたいで両方向に変わった点が V1.2 とは異なる。加えてこのことは、AD 割球とその子孫は正常胚において背側および側方に伸長するだけでなく、AV 割球子孫が背側方向に伸長することを阻止する上でも役割を果たすことを意味する。

正常胚における本研究での結果は、過去の CNS におけるクローナルドメインの調査結果 (Jacobson, 1985; Masho and Kubota, 1986; Moody, 1987a, b; Dale and Slack, 1987) と本質的に同一であった。Kageura et al. (1995) は、*X. laevis* 野生型-アルビノキメラの解析結果から、ステージ 14 正常胚外胚葉における 16 細胞期の個々の割球子孫の分布図を描いた。彼らの報告では、V1.2 に相当する A3 のクローナルドメインが表皮において背腹軸方向に関して最も幅広かったのは体の中央部 (胴部) であった。表皮での

このクローナルドメインの幅は胚の両端に進むに従い徐々に狭まり、クローナルドメインの腹側の端は予定表皮の背側の端に接近した。しかしながら、ステージ 32 での本研究の結果は、表皮での V1.2 クローナルドメインのもっとも幅広い領域は体の中央部よりもむしろ頭部領域であった。二つの研究結果の不一致が細胞追跡の方法、胚の調査時期またはクローナルドメインの評価法の違いのいずれによるのかは、不明である。

調節胚の CNS において V1.1 と V1.2 のクローナルドメインが各々腹側および背側に位置することを示す Fig. 14D と Fig. 15D のデータは、両クローンが前脳および中脳の背側および側方で互いに重なっており、互いのクローン間の混合がこれらの領域で起きたことを示唆する。このことは、これらの領域で標識および非標識細胞間の混合が観察されることで支持される (Fig. 13F)。一方、正常胚では、CNS での V1.1 と V1.2 のクローナルドメイン間の重なりはきわめてまれである (Figs. 14B, Fig. 15B)。これらのことから、Fig. 27 は、V1.1 と V1.2 のクローナルドメイン間の境界は調節胚では CNS を通っているが、正常胚ではそうではないことを示している。

8-4 割球操作とクローン分布の変異

定量的解析を実施した右半胚 (3-1) および動物極背側割球欠損胚 (第 5 章) における細胞追跡実験では、クローン分布の変異が評価された。これらの胚でのクローンの分布はいずれの個体についてもほぼ一定なものであった (Figs. 7, 14-17) が、クローン分布の変異は正常胚におけるものより調節胚におけるものの方がいずれも大きかった (Table 2, Figs. 14-17)。右半胚では、特に、定量解析の結果、右もしくは左側の全格子の標準誤差の平均値が正常胚右側におけるものよりも大きいこととして明示された (Table 2)。

これらの割球操作によるクローン分布の変異の増大は、おそらく、手術後から傷の修復までに追跡割球の初期の子孫の配置の変異が増大したことに起因するものと考えられる。何故ならば、正常胚ではビテリン膜の有無にかかわらず、CNS および表皮での V1.2 クローナルドメインには明瞭な相違が認められなかったからである(データ略)。つまり、割球の初期子孫の配置の変異増大は、ビテリン膜が除かれ、分離された胚が、異なるオリエンテーションで平坦な寒天プレート上に置かれ顕微注入後に寒天プレートの穴の中に入れられるまでの間に、自重により独自に変形したことでもたらされたものと推定される。動物極背側割球欠損胚では、表皮よりもむしろ CNS における分布の変異の方がいくぶん大きかった(Figs. 14-17)。これは、AV 割球がその背側卵割面で接着していた AD を取り除くことで、AV 割球の背側部分における割球配置の乱れが生じ、CNS でのクローナルドメインの変異を増大させたものと考えられる。しかしこの変異はランダムなものではなく、大きな制限が課せられていた。その制限は、おそらく主に手術後の残りの割球間の接着によるものであろう。

8-5 新たな細胞追跡法の開発

本研究では、二種の新しい細胞追跡法を確立し、胚の調節機構解析実験(3-2、第4章)にこれを用いて有用性を実証した。

8-5-1 細胞マーカーとしてのアフリカツメガエル雑種胚

3-2 での結果は、*X. levis* と *X. borealis* の組み合わせ(Thiébaud, 1983)に加え、*X. laevis* および *X. laevis* と *X. borealis* 間の雑種が細胞追跡にさらに優れた実験系であることを示した。雑種胚の示す実験結果(Fig. 11)は、Dextran Oregon Green 488 を注入して細胞を標識した実験結果(Fig.

9)と本質的に同一であった。*X. laevis* と雑種の組み合わせの利点は、*X. laevis* と *X. borealis* の組み合わせにおける異なった大きさの割球の組み合わせに由来する割球配置の混乱を回避することができるということである。また、Dextran Oregon Green 488 のような蛍光トレーサーでは追跡できない発生後期から成体におけるまでの細胞追跡も可能である。実際、本実験では、雑種胚を用いたキメラ胚は、蛍光トレーサーでは追跡が困難な St. 47 で解析された。これらのことは、キメラ作成への雑種胚の使用は、細胞系譜追跡実験において信頼性を向上させるものであることを示す。

8-5-2 細胞追跡と二重 *in situ* ハイブリダイゼーションを組み合わせた全胚三重染色法

本研究での検討により、アフリカツメガエル全胚に対する二重 *in situ* ハイブリダイゼーションと細胞系譜追跡のための新しい高コントラスト三重染色法が開発された (Tables 3, 4)。この方法は、胚表面 (Fig. 19A-D) のみでなく、分割 (Figs 12, 23) したり、透明化 (Fig. 19E) したりすることにより、胚内部の調査にも適用可能である。

本法を頭尾軸形成の解析に適用し、新しい知見を得た (Fig. 12)。このことは、本法が頭尾軸形成の解析に有用であることを実証するものである。さらに、このことは、胚葉や背腹および左右軸、さらに発生の他の局面においても本法が有効であることを強く示唆する。この方法は、もし遺伝子発現検出のプローブと細胞系譜トレーサーの検出の条件を単染色実験で最適化すれば、アフリカツメガエルでの他の遺伝子や他の細胞系譜トレーサーを注入した細胞の解析にも適用できると考えられる。

頭尾軸解析実験における信頼性は、*gsc* と *Xbra* mRNA と追跡細胞の分布域を検出する三つの染色領域の各々の信頼性に依存している。本研究の三

重染色での各々の染色は、正常胚において個々に染色を行ったものと同様に信頼性を持つと考えられる。これは、以下の三つの理由による。

(1) 正常な後期原腸胚において、*gsc* または *Xbra* プローブを用いた単 *in situ* ハイブリダイゼーションまたは細胞追跡における染色領域は、Fig. 19 の胚におけるものと同様である（データ略）。(2) 正常後期原腸胚における *gsc* または *Xbra* プローブを用いた単 *in situ* ハイブリダイゼーションでの染色領域は、もう一方のプローブでは染色されない（データ略）。(3) 正常初期原腸胚に対する単 *in situ* 染色では、ビオチン標識 *gsc* または DIG 標識 *Xbra* プローブによる染色域は、DIG 標識 *gsc* またはビオチン標識 *Xbra* プローブによる染色域と同一である（データ略）。

Doniach and Musci (1995)によるアフリカツメガエルでの三重 *in situ* ハイブリダイゼーションで色コントラストが低いことは、本実験の結果や Sive et al. (2000)に記載されていることにより説明できるようである。Doniach and Musci (1995)は、Magenta-phos を1回目の発色に、NBT と BCIP を三回目の発色に使用した。1回目の発色を Magenta-phos により行ったサンプルは、2回目、3回目の発色の前に AP 不活性化のため、メタノールに各々30分間つけられている。しかしながら、本研究の結果は、Magenta-phos の反応産物はメタノールで容易に溶出され、染色は薄くなることを示した (Fig. 20)。さらに、Sive et al. (2000)は、Magenta-phos と NBT/BCIP を1回目と2回目の発色に使用すると、2回目の反応は1回目のマゼンタ色を甚だしく変えることを指摘している。このため、Doniach and Musci (1995)の方法における発色基質の順序とメタノールでの AP 不活性化は、色相と Magenta-phos の染色強度を維持するために不適切であったと考えられる。アフリカツメガエルにおける本研究の方法とニワトリにおける Brent et al. (2003)の方法を比較すると、動物種により *in situ* ハ

イブリダイゼーションの染色性が異なることが分かる。本研究の方法では、ビオチン標識プローブは、1回目の反応ではうまく検出できたが、2回目の反応ではそうではなかった (Table 3)。しかし、Brent et al. (2003)の方法では、3回目の反応で検出されている。このことは、同じ方法であっても、他の動物胚には再実験するか方法の至適化を行うこと無しには必ずしも適用できるものではないことを示唆している。

本研究では、二種の RNA プローブと細胞系譜追跡トレーサーの全てのシグナルを検出するため、AP 反応と発色基質を用いた。しかし、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ (POD) (ただし、基質としての HistoMarkORANGE (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, USA) の利用は、漂白後に強いバックグラウンドの発色を生じるため不適) や蛍光分子などの他の検出系の利用は、染色領域の重なりを検出するのが難しいという技術的な困難を克服するために有効かも知れない。

8-6 加圧は *Xenopus* 無細胞系での細胞周期制御を乱す

DNA 複製の機構は、*Xenopus* の無細胞系を用いて詳しく調査されてきた。卵抽出液は、細胞周期を進行させるために必要な全ての活性を持つ。このため、外から加えられた精子核はタンパク質合成なしにその DNA を複製することができる (Blow and Laskey, 1988; Adachi and Laemmli, 1992)。事実、精子核はサイクロヘキシミド (10 mg/ml) を含む凍結抽出液中で DNA を複製する (データ略)。これらのデータは、高圧による複製の阻害はタンパク質合成と関係しないことを示唆する。DNA のライセンシングは、DNA 複製のために重要な出来事である。Minichromosome maintenance (MCMs) のようなライセンシング因子は origin recognition complex (ORC) および Cdc6 があらかじめ会合した DNA に結合する (Blow, 2001)。ライセンシング

の完了後、DNA ポリメラーゼを含む複製因子が DNA 上に補充される。これにより、DNA 上にタンパク質複合体が形成される。これらのタンパク質複合体がどのように圧力を受けるかを理解するために、さらなる研究が必要である。80 MPa の圧力が DNA 複製を阻害することで S 期細胞での DNA 複製に深刻な傷害を与えるという本研究での知見は、ガン細胞のような増殖細胞に高圧を加える応用の可能性を示唆する。

謝辞

坂井雅夫先生には、博士論文およびこれに含まれる論文の執筆に当たり、多大かつ丁寧なご指導を頂きました。このご努力に深く感謝を申し上げます。J. B. Gurdon 博士からは *X. borealis* を、K. W. Y. Cho と J. C. Smith 博士からは各々 *gsc* と *Xbra* を持つプラスミドを供与頂きました。橋本主税、弓削昌弘先生には、*in situ* ハイブリダイゼーションに対する技術的なアドバイスと支援、S. Moody, J. Gerhart, A. Grimaldi, K. Takano 博士、金田照夫、小早川義尚、山口武夫、野村一也先生には、一部の論文作成のご指導をいただきました。この研究の多くは、九州大学 山名清孝、住本英樹、武谷立先生、福岡大学理学部 景浦宏、山口武夫、寺田成之先生、同化学科 高橋仁氏そして地球圏科学科 発生生物学研究室に所属した中島拓郎、工藤友裕、渡邊昌司、濱田有紀、松尾慎太郎氏との共同研究の賜です。また、有島典子 古木秀平 内野亜沙美氏には、技術的な協力を頂きました。以上の方々に、この場を借りて深く感謝の意を表します。

参考文献

- Adachi, Y., Laemmli, U.K., 1992. Identification of nuclear pre-replication centers poised for DNA synthesis in *Xenopus* egg extracts: immunolocalization study of replication protein A. *J Cell Biol* 119, 1-15.
- Artinger, M., Blitz, I., Inoue, K., Tran, U., Cho, K.W., 1997. Interaction of gooseoid and brachyury in *Xenopus* mesoderm patterning. *Mech Dev* 65, 187-196.
- Bauer, D.V., Huang, S., Moody, S.A., 1994. The cleavage stage origin of Spemann's Organizer: analysis of the movements of blastomere clones before and during gastrulation in *Xenopus*. *Development* 120, 1179-1189.
- Black, S.D., Vincent, J.P., 1988. The first cleavage plane and the embryonic axis are determined by separate mechanisms in *Xenopus laevis*. II. Experimental dissociation by lateral compression of the egg. *Dev Biol* 128, 65-71.
- Blitz, I.L., Shimmi, O., Wunnenberg-Stapleton, K., O'Connor, M.B., Cho, K.W., 2000. Is chordin a long-range or short-range-acting factor? Roles for BMP1-related metalloproteases in chordin and BMP4 autofeedback loop regulation. *Dev Biol* 223, 120-138.
- Blow, J.J., 2001. Control of chromosomal DNA replication in the early *Xenopus* embryo. *EMBO J* 20, 3293-3297.
- Blow, J.J., Laskey, R.A., 1988. A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature* 332, 546-548.
- Brent, A.E., Schweitzer, R., Tabin, C.J., 2003. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* 113, 235-248.
- Cho, K.W., Blumberg, B., Steinbeisser, H., De Robertis, E.M., 1991. Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene gooseoid. *Cell* 67, 1111-1120.

Cleaver, O., Seufert, D.W., Krieg, P.A., 2000. Endoderm patterning by the notochord: development of the hypochord in *Xenopus*. *Development* 127, 869-879.

Cooke, J., Webber, J.A., 1985. Dynamics of the control of body pattern in the development of *Xenopus laevis*. I. Timing and pattern in the development of dorsoanterior and posterior blastomere pairs, isolated at the 4-cell stage. *J Embryol Exp Morphol* 88, 85-112.

Dale, L., Slack, J.M., 1987. Fate map for the 32-cell stage of *Xenopus laevis*. *Development* 99, 527-551.

Danilchik, M.V., Black, S.D., 1988. The first cleavage plane and the embryonic axis are determined by separate mechanisms in *Xenopus laevis*. I. Independence in undisturbed embryos. *Dev Biol* 128, 58-64.

Danilchik, M.V., Brown, E.E., Riepert, K., 2006. Intrinsic chiral properties of the *Xenopus* egg cortex: an early indicator of left-right asymmetry? *Development* 133, 4517-4526.

De Laat, A.M.M., Van Loon, L.C., 1983. The relationship between stimulated ethylene production and symptom expression in virus-infected tobacco leaves. *Physiol. Plant. Pathol.* 22, 261-273.

De Robertis, E.M., 2008. Evo-devo: variations on ancestral themes. *Cell* 132, 185-195.

De Robertis, E.M., 2009. Spemann's organizer and the self-regulation of embryonic fields. *Mech Dev* 126, 925-941.

Dent, J.A., Klymkowsky, M.W., 1989. Whole-mount analyses of cytoskeletal reorganization and function during oogenesis and early embryogenesis in *Xenopus*, in: Schatten, H., Schatten, G. (Eds.), *The Cell Biology of Fertilization*. Academic Press, New York.

Devoto, S.H., Melançon, E., Eisen, J.S., Westerfield, M., 1996. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development* 122, 3371-3380.

Domingo, C., Keller, R., 1995. Induction of notochord cell intercalation behavior and differentiation by progressive signals in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Development* 121, 3311-3321.

Doniach, T., Musci, T.J., 1995. Induction of anteroposterior neural pattern in *Xenopus*: evidence for a quantitative mechanism. *Mech Dev* 53, 403-413.

Gerhart, J., 1980. Mechanisms regulating pattern formation in the amphibian egg and early embryo, in: Goldberger, R.F. (Ed.), *Biological Regulation and Development*, Goldberger, R. F. ed. Plenum Press, New York, pp. 133-316.

Gerhart, J., 2001. Evolution of the organizer and the chordate body plan. *Int J Dev Biol* 45, 133-153.

Gilbert, S.F., 2010. *Developmental biology*, 9th ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

Gimlich, R.L., Braun, J., 1985. Improved fluorescent compounds for tracing cell lineage. *Dev Biol* 109, 509-514.

Gimlich, R.L., Gerhart, J.C., 1984. Early cellular interactions promote embryonic axis formation in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 104, 117-130.

Glickman, N.S., Kimmel, C.B., Jones, M.A., Adams, R.J., 2003. Shaping the zebrafish notochord. *Development* 130, 873-887.

Grimaldi, A., Tettamanti, G., Martin, B.L., Gaffield, W., Pownall, M.E., Hughes, S.M., 2004. Hedgehog regulation of superficial slow muscle fibres in *Xenopus* and the evolution of tetrapod trunk myogenesis. *Development* 131, 3249-3262.

Harland, R.M., 1991. In situ hybridization: an improved whole-mount method for

Xenopus embryos. *Methods Cell Biol* 36, 685-695.

Hausen, P., Riebesell, M., 1991. The early development of *Xenopus laevis*: An atlas of the histology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.

Heasman, J., 2006. Patterning the early *Xenopus* embryo. *Development* 133, 1205-1217.

Hirose, G., Jacobson, M., 1979. Clonal organization of the central nervous system of the frog. I. Clones stemming from individual blastomeres of the 16-cell and earlier stages. *Dev Biol* 71, 191-202.

Hirsinger, E., Stellabotte, F., Devoto, S.H., Westerfield, M., 2004. Hedgehog signaling is required for commitment but not initial induction of slow muscle precursors. *Dev Biol* 275, 143-157.

Jacobson, M., 1983. Clonal organization of the central nervous system of the frog. III. Clones stemming from individual blastomeres of the 128-, 256-, and 512-cell stages. *J Neurosci* 3, 1019-1038.

Jacobson, M., 1985. Clonal analysis and cell lineages of the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 8, 71-102.

Jacobson, M., Hirose, G., 1978. Origin of the retina from both sides of the embryonic brain: a contribution to the problem of crossing at the optic chiasma. *Science* 202, 637-639.

Jacobson, M., Hirose, G., 1981. Clonal organization of the central nervous system of the frog. II. Clones stemming from individual blastomeres of the 32- and 64-cell stages. *J Neurosci* 1, 271-284.

Jones, C.M., Smith, J.C., 1998. Establishment of a BMP-4 morphogen gradient by long-range inhibition. *Dev Biol* 194, 12-17.

Jowett, T., Lettice, L., 1994. Whole-mount in situ hybridizations on zebrafish

embryos using a mixture of digoxigenin- and fluorescein-labelled probes. Trends Genet 10, 73-74.

Kageura, H., 1990. Spatial distribution of the capacity to initiate a secondary embryo in the 32-cell embryo of *Xenopus laevis*. Dev Biol 142, 432-438.

Kageura, H., 1995. Three regions of the 32-cell embryo of *Xenopus laevis* essential for formation of a complete tadpole. Dev Biol 170, 376-386.

Kageura, H., 1997. Activation of dorsal development by contact between the cortical dorsal determinant and the equatorial core cytoplasm in eggs of *Xenopus laevis*. Development 124, 1543-1551.

Kageura, H., Eguchi, G., Yamana, K., 1995. The origin and development of retinal pigment cells and melanophores analyzed by *Xenopus* black-white chimeras. Develop Growth Differ 37, 157-166.

Kageura, H., Yamana, K., 1983. Pattern regulation in isolated halves and blastomeres of early *Xenopus laevis*. J Embryol Exp Morphol 74, 221-234.

Kageura, H., Yamana, K., 1984. Pattern regulation in defect embryos of *Xenopus laevis*. Dev Biol 101, 410-415.

Kageura, H., Yamana, K., 1986. Pattern formation in 8-cell composite embryos of *Xenopus laevis*. J Embryol Exp Morphol 91, 79-100.

Kao, K.R., Elinson, R.P., 1988. The entire mesodermal mantle behaves as Spemann's organizer in

dorsoanterior enhanced *Xenopus laevis* embryos. Developmental Biology 127, 64-77.

Keller, R., 1978. Time-lapse cinemicrographic analysis of superficial cell behavior during and prior to gastrulation in *Xenopus laevis*. J Morphol 157, 223-248.

- Keller, R., Davidson, L.A., Shook, D.R., 2003. How we are shaped: the biomechanics of gastrulation. *Differentiation* 71, 171-205.
- Klein, S.L., 1987. The first cleavage furrow demarcates the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* 120, 299-304.
- Knecht, A.K., Good, P.J., Dawid, I.B., Harland, R.M., 1995. Dorsal-ventral patterning and differentiation of noggin-induced neural tissue in the absence of mesoderm. *Development* 121, 1927-1935.
- Koga, M., 1999. Compensation for the lost prospective central nervous system by expansion of the prospective epidermis in the '16-Cell' embryos of *Xenopus laevis* lacking all animal dorsal blastomeres. *Zool Sci* 16, 225-236.
- Koga, M., Kageura, H., Yamana, K., 1986. Use of hybrids between *Xenopus levis* and *Xenopus borealis* in chimera formation: Dorsalization of ventral cells. *Dev Growth Differ* 28, 177-183.
- Koga, M., Kudoh, T., Hamada, Y., Watanabe, M., Kageura, H., 2007. A new triple staining method for double in situ hybridization in combination with cell lineage tracing in whole-mount *Xenopus* embryos. *Dev Growth Differ* 49, 635-645.
- Koga, M., Nakashima, T., Matsuo, S., Takeya, R., Sumimoto, H., Sakai, M., Kageura, H., 2012. High cell-autonomy of the anterior endomesoderm viewed in blastomere fate shift during regulative development in the isolated right halves of four-cell stage *Xenopus* embryos. *Dev Growth Differ* 54, 717-729.
- Larabell, C.A., Rowning, B.A., Wells, J., Wu, M., Gerhart, J.C., 1996. Confocal microscopy analysis of living *Xenopus* eggs and the mechanism of cortical rotation. *Development* 122, 1281-1289.
- Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V., Lawson, A., Chapman, S.C., Schoenwolf, G.C., 2004. Rapid triple-labeling method combining in situ hybridization and

double immunocytochemistry. *Dev Dyn* 230, 309-315.

Masho, R., 1988. Fates of animal-dorsal blastomeres of eight-cell stage *Xenopus* embryos vary according to the specific patterns of the third cleavage plane. *Dev Growth Differ* 30, 347-359.

Masho, R., Kubota, H.Y., 1986. Developmental fates of blastomeres of eight-cell-stage *Xenopus laevis* embryos. *Dev Growth Differ* 28, 113-123.

Matsumoto, M., Yamaguchi, T., Fukumaki, Y., Yasunaga, R., Terada, S., 1998. High pressure induces G2 arrest in murine erythroleukemia cells. *J Biochem* 123, 87-93.

Mayor, R., Morgan, R., Sargent, M.G., 1995. Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* 121, 767-777.

Moody, S.A., 1987a. Fates of the blastomeres of the 16-cell stage *Xenopus* embryo. *Dev Biol* 119, 560-578.

Moody, S.A., 1987b. Fates of the blastomeres of the 32-cell-stage *Xenopus* embryo. *Dev Biol* 122, 300-319.

Moody, S.A., 1989. Quantitative lineage analysis of the origin of frog primary motor and sensory neurons from cleavage stage blastomeres. *J Neurosci* 9, 2919-2930.

Moody, S.A., Kline, M.J., 1990. Segregation of fate during cleavage of frog (*Xenopus laevis*) blastomeres. *Anat Embryol (Berl)* 182, 347-362.

Moon, R.T., Kimelman, D., 1998. From cortical rotation to organizer gene expression: toward a molecular explanation of axis specification in *Xenopus*. *Bioessays* 20, 536-545.

Murray, A.W., 1991. Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol* 36, 581-605.

Nagano, T., Ito, Y., Tashiro, K., Kobayakawa, Y., Sakai, M., 2000. Dorsal induction

from dorsal vegetal cells in *Xenopus* occurs after mid-blastula transition. *Mech Dev* 93, 3-14.

Newport, J., Kirschner, M., 1982. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* 30, 675-686.

Nieuwenhuys, R., 1974. Topological analysis of the brain stem: a general introduction. *J Comp Neurol* 156, 255-276.

Nieuwkoop, P.D., 1969a. The formation of mesoderm in the urodelean amphibians. I. Induction by the endoderm. *Roux' Arch.* 162, 341-373.

Nieuwkoop, P.D., 1969b. The formation of mesoderm in the urodelean amphibians. II. The origin of the dorso-vegetal polarity of the endoderm. *Roux' Arch.* 163, 298-315.

Nieuwkoop, P.D., Faber, J., 1967. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin), 2 ed. North-Holland Publ. Co., Amsterdam.

Nieuwkoop, P.D., Ubbels, G.A., 1972. The formation of mesoderm in the urodelean amphibians. IV. Quantitative evidence for a purely ectodermal origin of the entire mesoderm and pharyngeal endoderm. *Roux' Arch* 169, 185-199.

Oelgeschläger, M., Kuroda, H., Reversade, B., De Robertis, E.M., 2003. Chordin is required for the Spemann organizer transplantation phenomenon in *Xenopus* embryos. *Dev Cell* 4, 219-230.

Sakai, M., 2008. Cell-autonomous and inductive processes among three embryonic domains control dorsal-ventral and anterior-posterior development of *Xenopus laevis*. *Dev Growth Differ* 50, 49-62.

Schweickert, A., Weber, T., Beyer, T., Vick, P., Bogusch, S., Feistel, K., Blum, M., 2007. Cilia-driven leftward flow determines laterality in *Xenopus*. *Curr Biol* 17,

60-66.

Sheard, P., Jacobson, M., 1987. Clonal restriction boundaries in *Xenopus* embryos shown with two intracellular lineage tracers. *Science* 236, 851-854.

Shook, D.R., Majer, C., Keller, R., 2004. Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Dev Biol* 270, 163-185.

Sive, H.L., Grainger, R.M., Harland, R.M., 2000. Early development of *Xenopus laevis* : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Smith, J.C., Price, B.M., Green, J.B., Weigel, D., Herrmann, B.G., 1991. Expression of a *Xenopus* homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* 67, 79-87.

Spemann, H., Falkenberg, H., 1919. Über asymmetrische entwicklung und situs inversus viscerum bei zwillingen und doppelbildungen. *Arch Entwickl Org* 45, 371-422.

Stewart, R.M., Gerhart, J.C., 1990. The anterior extent of dorsal development of the *Xenopus* embryonic axis depends on the quantity of organizer in the late blastula. *Development* 109, 363-372.

Takahashi, H., Yamaguchi, T., Koga, M., Kageura, H., Terada, S., 2004. DNA replication reaction in *Xenopus* cell-free system is suppressed by high pressure. *Cell Mol Biol Lett* 9, 423-427.

Takano, K., Ito, Y., Obata, S., Oinuma, T., Komazaki, S., Nakamura, H., Asashima, M., 2007. Heart formation and left-right asymmetry in separated right and left embryos of a newt. *Int J Dev Biol* 51, 265-272.

Takasaki, H., 1987. Fates and roles of the presumptive organizer region

in the 32-cell embryo in normal development of *Xenopus*

laevis. *Develop Growth Differ* 29, 141–152.

Thiébaud, C.H., 1983. A reliable new cell marker in *Xenopus*. *Dev Biol* 98, 245-249.

Vick, P., Schweickert, A., Weber, T., Eberhardt, M., Mencl, S., Shcherbakov, D.,

Beyer, T., Blum, M., 2009. Flow on the right side of the gastrocoel roof plate is dispensable for symmetry breakage in the frog *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 331, 281-291.

Vodicka, M.A., Gerhart, J.C., 1995. Blastomere derivation and domains of gene expression in the Spemann Organizer of *Xenopus laevis*. *Development* 121, 3505-3518.

Vonica, A., Gumbiner, B.M., 2007. The *Xenopus* Nieuwkoop center and Spemann-Mangold organizer share molecular components and a requirement for maternal Wnt activity. *Dev Biol* 312, 90-102.

Weber, G., Drickamer, H.G., 1983. The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Q Rev Biophys* 16, 89-112.

Wolf, D.P., Hedrick, J.L., 1971. A molecular approach to fertilization. II. Viability and artificial fertilization of *Xenopus laevis* gametes. *Dev Biol* 25, 348-359.

Yamana, K., Kageura, H., 1987. Reexamination of the 'regulative development' of amphibian embryos. *Cell Differ* 20, 3-10.

Zorn, A.M., Butler, K., Gurdon, J.B., 1999. Anterior endomesoderm specification in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and TGF-beta signalling pathways. *Dev Biol* 209, 282-297.

图表

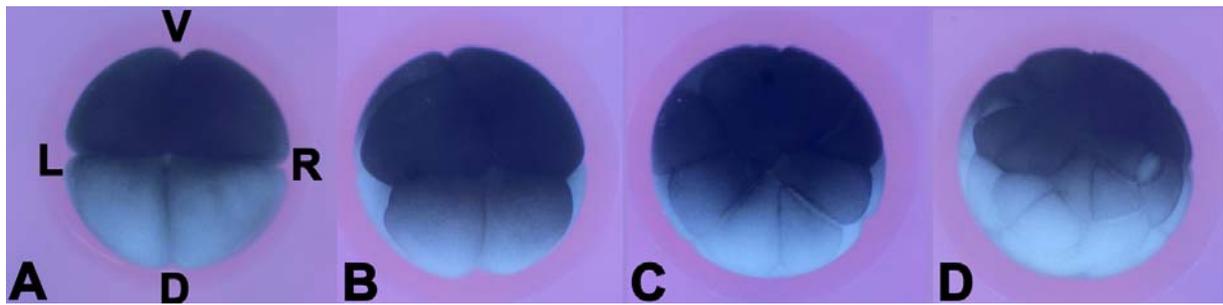


Fig. 1. Regular and symmetrical patterns of cleavage and pigmentation, and sides of normal embryos at the early cleavage stages. Animal pole views of the embryos at the 4- (A), 8- (B), 16- (C), and 32- (D) cell stages. D, dorsal; V, ventral; L, left; R, right.

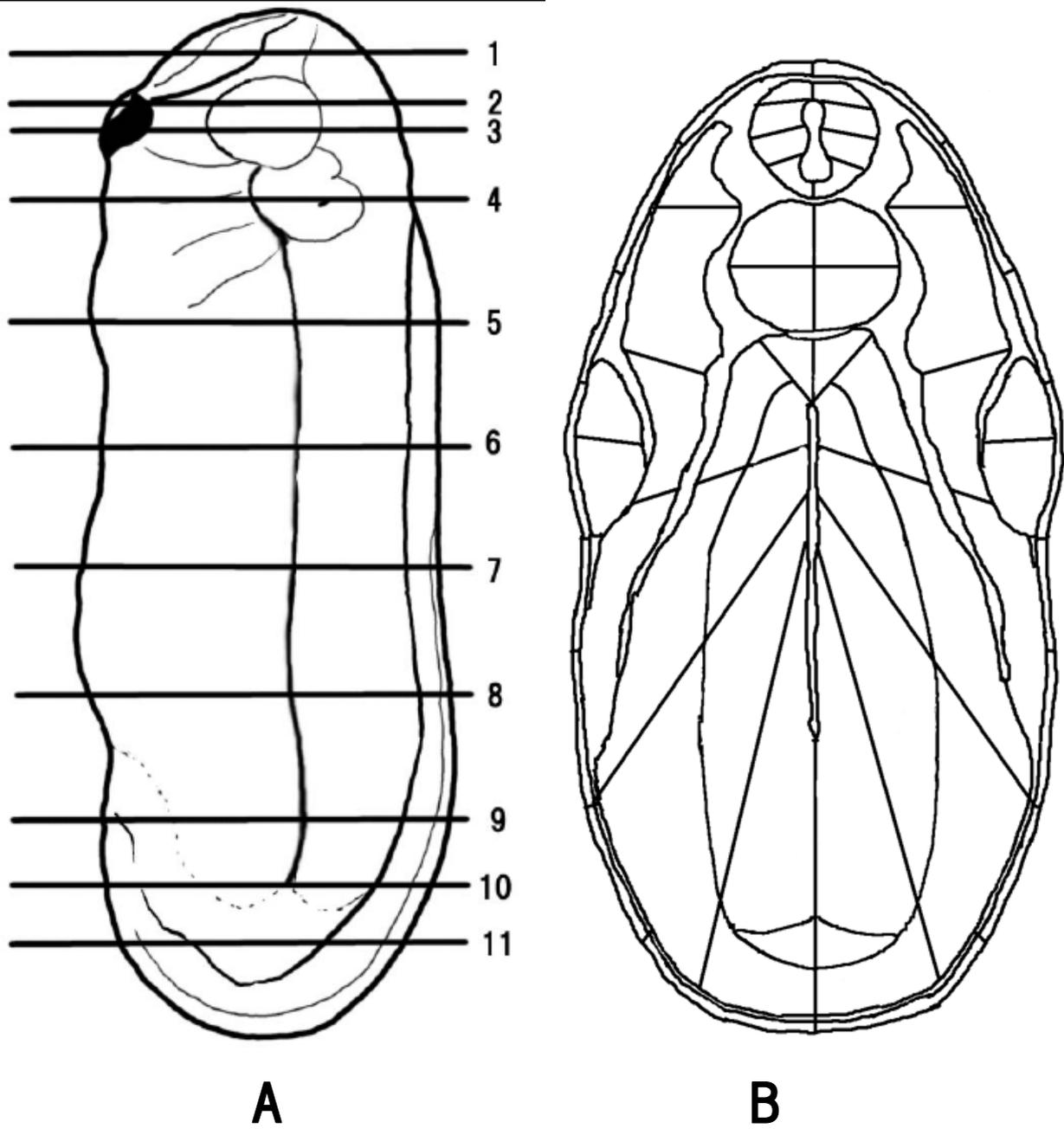


Fig. 2. Progeny distribution analysis for the overall body of the regulated larvae developed from the right halves and the normal larvae. (A) Levels of transverse sections analyzed along the anteroposterior axis of the tailbud larva. The numbered section cut through the following tissues or locations: 1, telencephalon; 2, diencephalon, pharyngeal endoderm anterior to the first visceral pouch; 3, retina, cement gland, mesencephalon; 4, ear vesicle, rhombencephalon; 5, pronephric anlage; 6, 7, 8, the intervals between sections 5 and 9 were all the same; 9, anus; 10, the position halfway between Nos. 9 and 11; 11, chordoneural hinge. (B) Symmetrically placed grids in the tissue of a standardized drawing at level 5. Only the hypochord has one grid, as it is observed as a single cell.

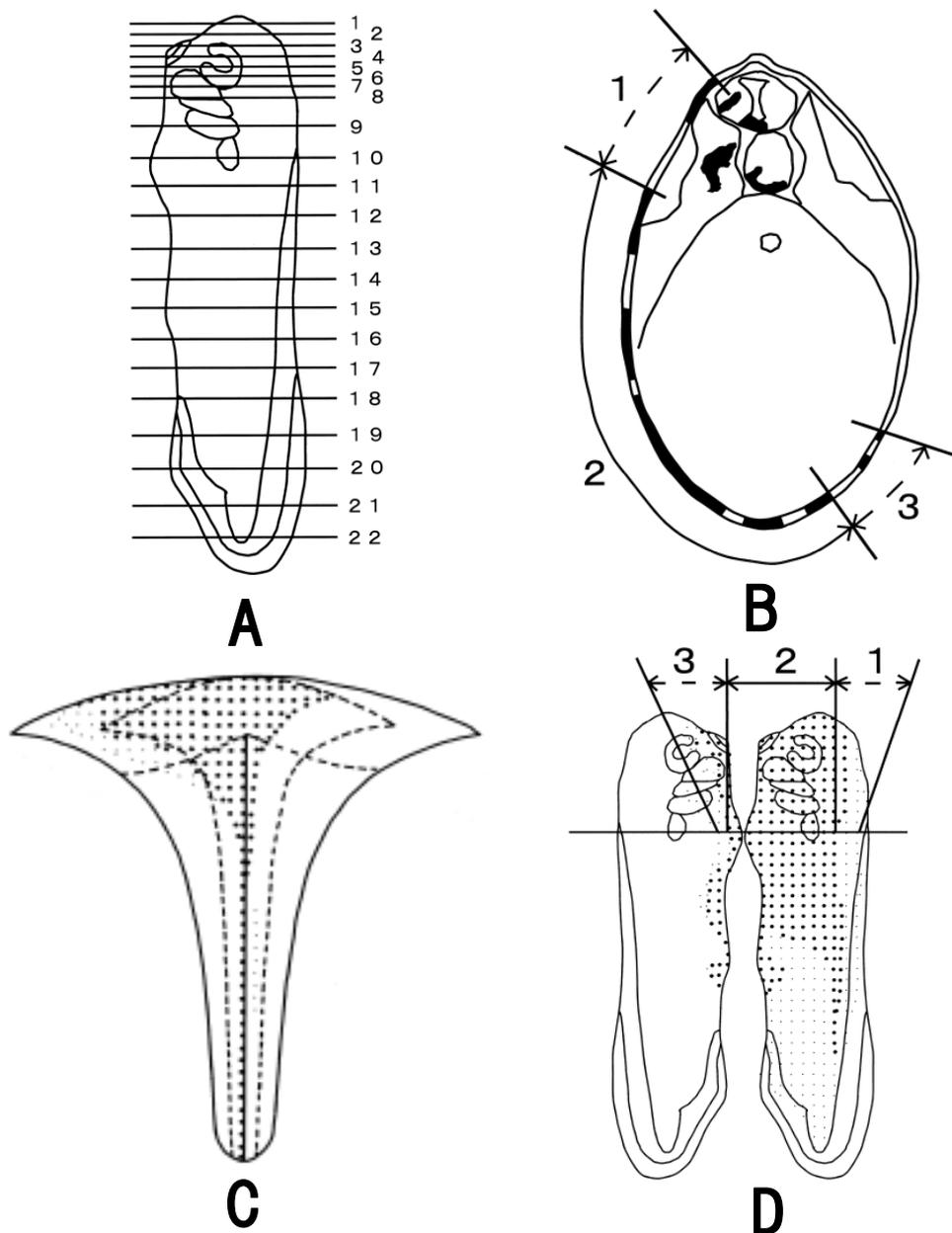


Fig. 3. Analysis on the ectodermal tissues in the regulated larvae developed from the embryos lacking all animal dorsal blastomeres and the normal larvae. (A) Illustration of a tailbud larvae (stage 32) and the positions of the analyzed transverse sections in an embryo. No. 8, section through the otocyst; No. 18, section through the anus. Within each of the three regions divided by No. 8 and No. 18, the intervals among the numbered sections were the same. The distribution of labeled cells in the central nervous system (CNS) and epidermis of a camera lucida drawing from the transverse section of an embryo (B) and the reconstructed clonal domain in the CNS (C) and epidermis (D). The regions where stained cells predominate or are a minor population are represented by large or small dots, respectively (C, D). The numbered epidermal area indicated with the solid and dashed lines with arrowheads in (B) and (D) correspond to each other, respectively. The solid line with arrowheads indicates the epidermal region where labeled cells predominate. In (B), the two outermost stained epidermal parts in this region are shorter than the unstained parts located on the outer side of these stained parts and are longer than the unstained parts located on the inner sides of these stained parts, respectively. In (D), the solid line intersects the region in the clonal domain, which is represented by large dots. The dashed lines with arrowheads show the epidermal regions with less incidence of labeled cells. In (D), the line intersects the region in the clonal domain, which is represented by small dots. See Fig.14 and 16 for the orientation and sides of views in (C) and (D), respectively.

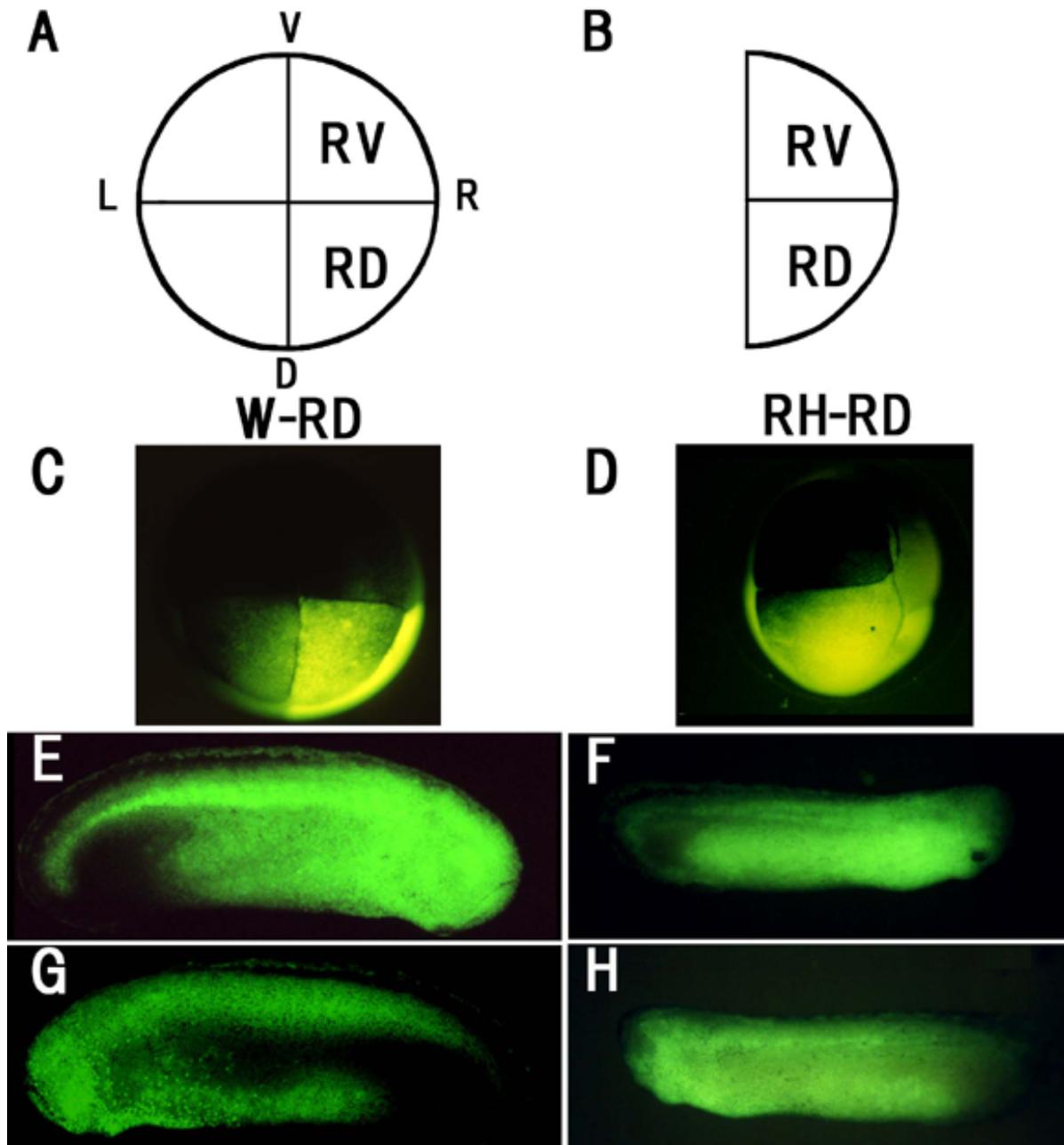


Fig. 4. Tracer injected blastomeres and the distributions of their descendants in normal and right half embryos. (A, B) Graphical representation of the animal pole view of a normal (A) and a right half (B) embryo at the 4-cell stage, and the nomenclature of the right blastomeres. (C-H) Distribution images of the descendants of the labeled 4-cell stage right dorsal blastomere in a whole (normal) embryo (C; 8-cell stage) and an identical whole tailbud larva (E, G; stage 26) (W-RD), and in a right half (RH) embryo (D; 8-cell stage) and an identical regulated tailbud larva (F, H; stage 27) (RH-RD). Note that the fluorescence seen in A-H is derived from not only the epidermis but also the inner tissues, due to the thinness of the epidermis at this stage. The magnification in E-H is the same, and the samples are viewed from the animal pole (C, D), right side (E, F) and left side (G, H). The orientations of the embryos in A-D are the same. Abbreviations: D, dorsal; V, ventral; L, left; R, right; RD, right dorsal; RV, right ventral.

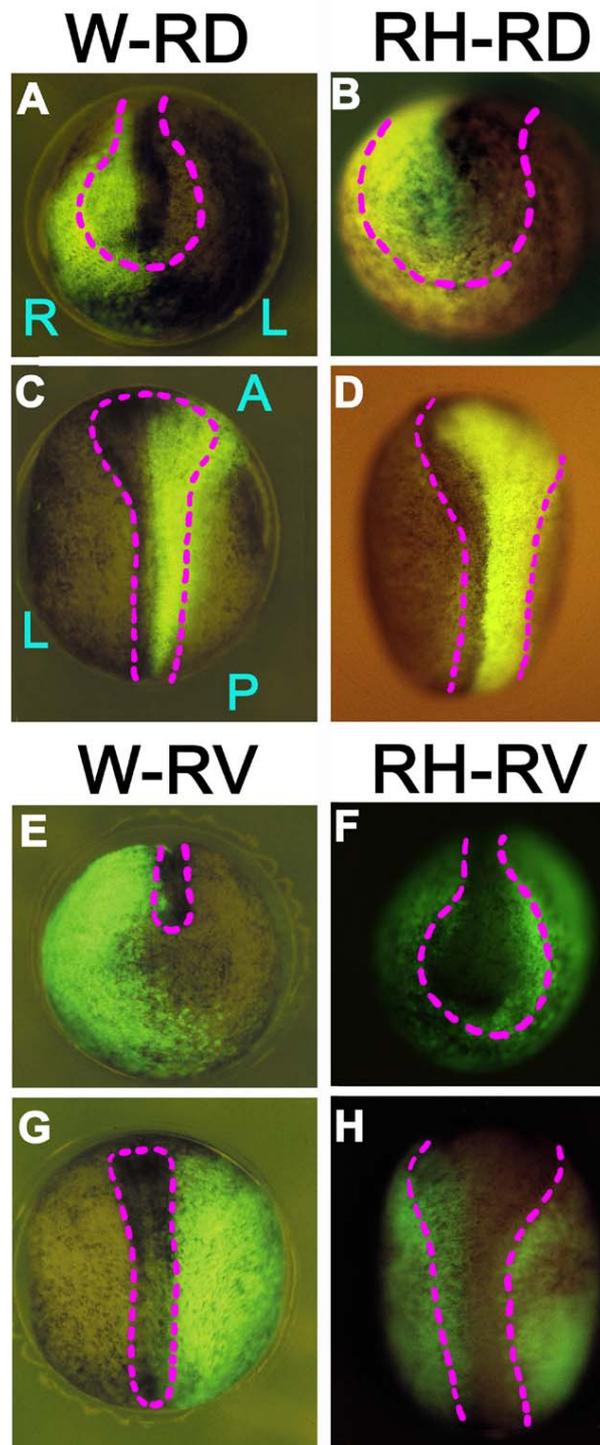


Fig. 5. Representative distributions of the labeled blastomere progeny in the ectoderm of regulated right half (RH) and normal embryos at the late gastrula or early neurula stage. (A, C) A right dorsal blastomere-labeled whole (normal) embryo (W-RD) at St. 15. (B, D) A right dorsal blastomere-labeled regulated RH embryo (RH-RD) at St. 13. (e, g) (E, G) A right ventral blastomere-labeled whole embryo (W-RV) at St. 18 and 17. A right ventral blastomere-labeled regulated RH embryo (RH-RV) at St. 15 and 14. The dashed lines indicate the margin of the neural plate or the top of the neural fold. Embryos are viewed from the anterior (A, B, E, F) and dorsal (C, D, G, H) sides. A, anterior; P, posterior; L, left; R, right.

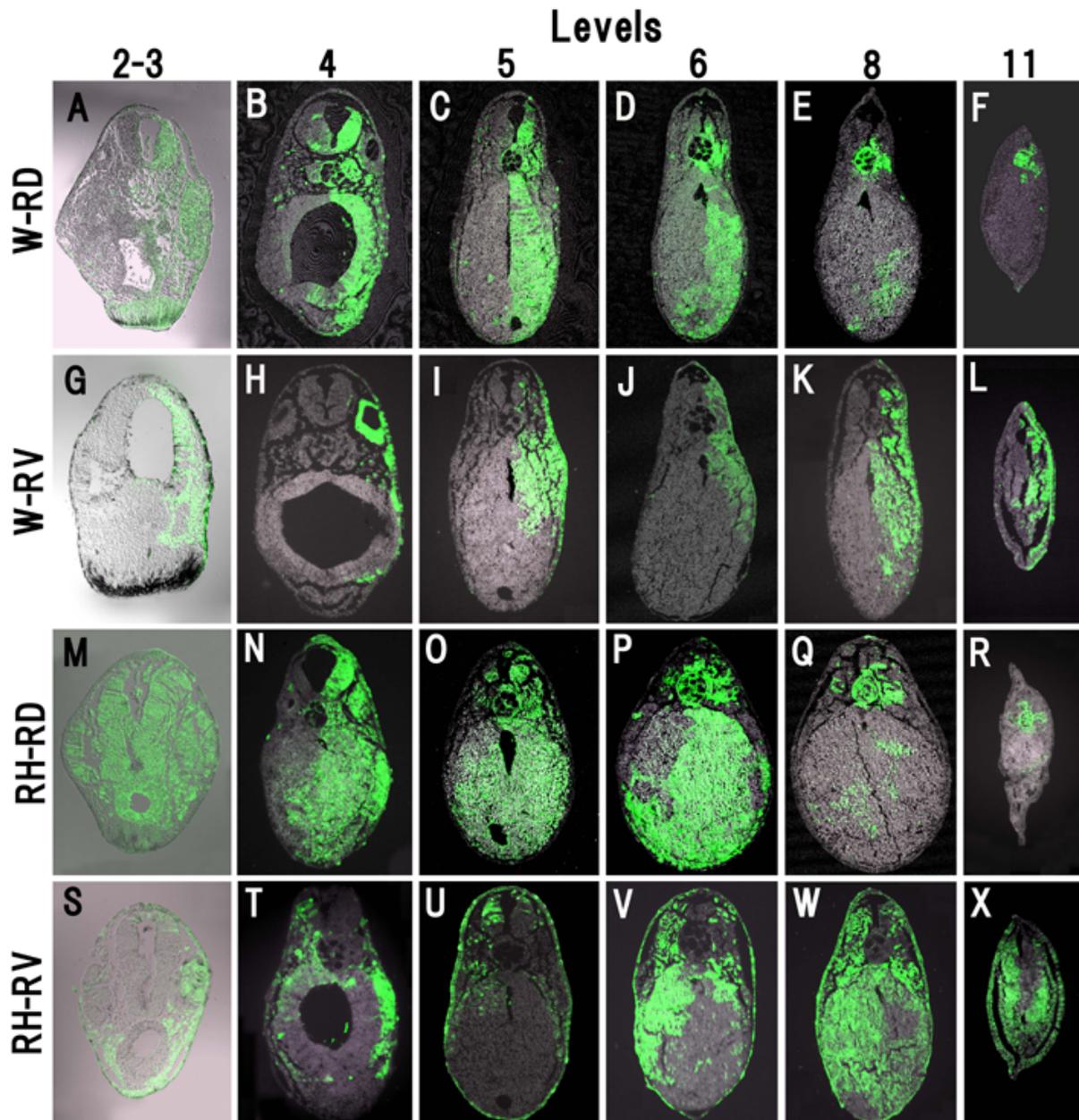


Fig. 6. Section images showing representative distributions of the labeled blastomere progeny in normal and regulated tailbud larvae from RH embryos. (A-F) The right dorsal blastomere-labeled whole (normal) larvae (W-RD). (G-L) The right ventral blastomere-labeled whole larvae (W-RV). (M-R) The right dorsal blastomere-labeled regulated larvae (RH-RD). (S-X) The right ventral blastomere-labeled regulated larvae (RH-RV). The numbers on the uppermost column indicate the analyzed section levels (Fig. 2). The right and the left sides in the panels coincide with those in the embryos, with the dorsal being the top and the ventral the bottom.

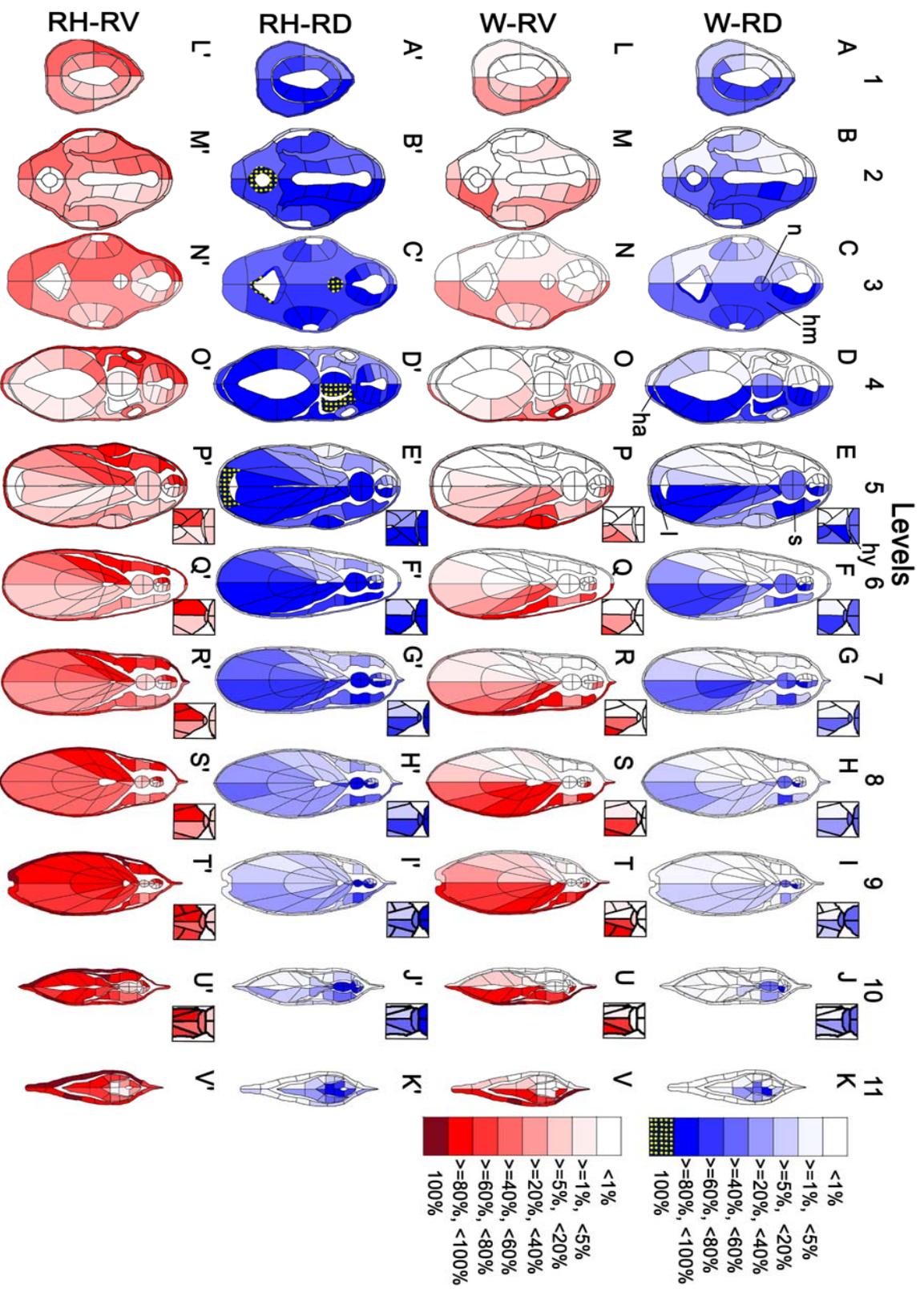


Fig. 7. Statistical distribution maps of the blastomere clones in normal and regulated tailbud larvae from RH embryos. Gradation in the blue or red color in the grid indicates the population percentage of the right dorsal or right ventral blastomere clone (the right upper corner of the figure). The numbers on the grid indicate the population percentage of the analyzed section levels (Fig. 2A). The rectangles in the upper right corner of the levels 5-10, show the magnified tissues around the hypochoerd. The abbreviations at the left end of the panel lines and the orientations of the embryos in the panels are the same as in Fig. 6. ha, heart anlage; hm, head mesenchyme; hy, hypochoerd; l, liver; n, notochord; p, pronephric anlage; s, somite.

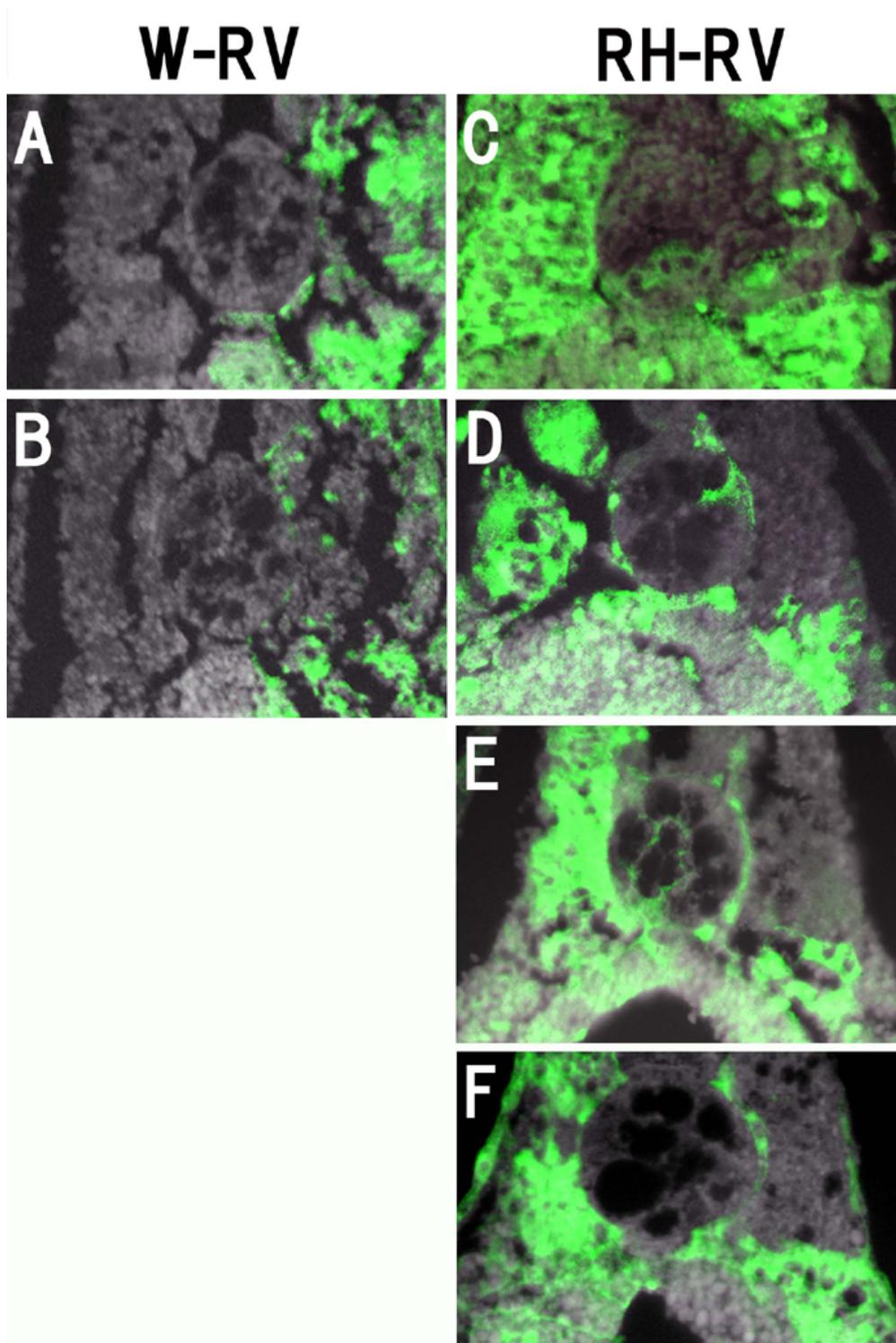


Fig. 8. Distribution of the right ventral blastomere progeny in the notochord and hypochord of the normal and regulated larvae. (A, B) The progeny distribution of the right ventral blastomere in an identical whole (normal) larva (W-RV). In the notochord, no descendants were seen in either section. In the hypochord, a descendant cell is seen at level 8 (A), but not at level 7 (B). (C-F) The progeny distribution of the right ventral blastomere in the regulated larvae (RH-RV). In the notochord, the descendants are distributed in the ventral (C), right (D), center and left (E) regions in three independent larvae, but were not seen in another larva (F). In the hypochord, a descendant cell is seen in C and D, but not in E and F. The orientations of the embryos are the same as in Fig. 6.

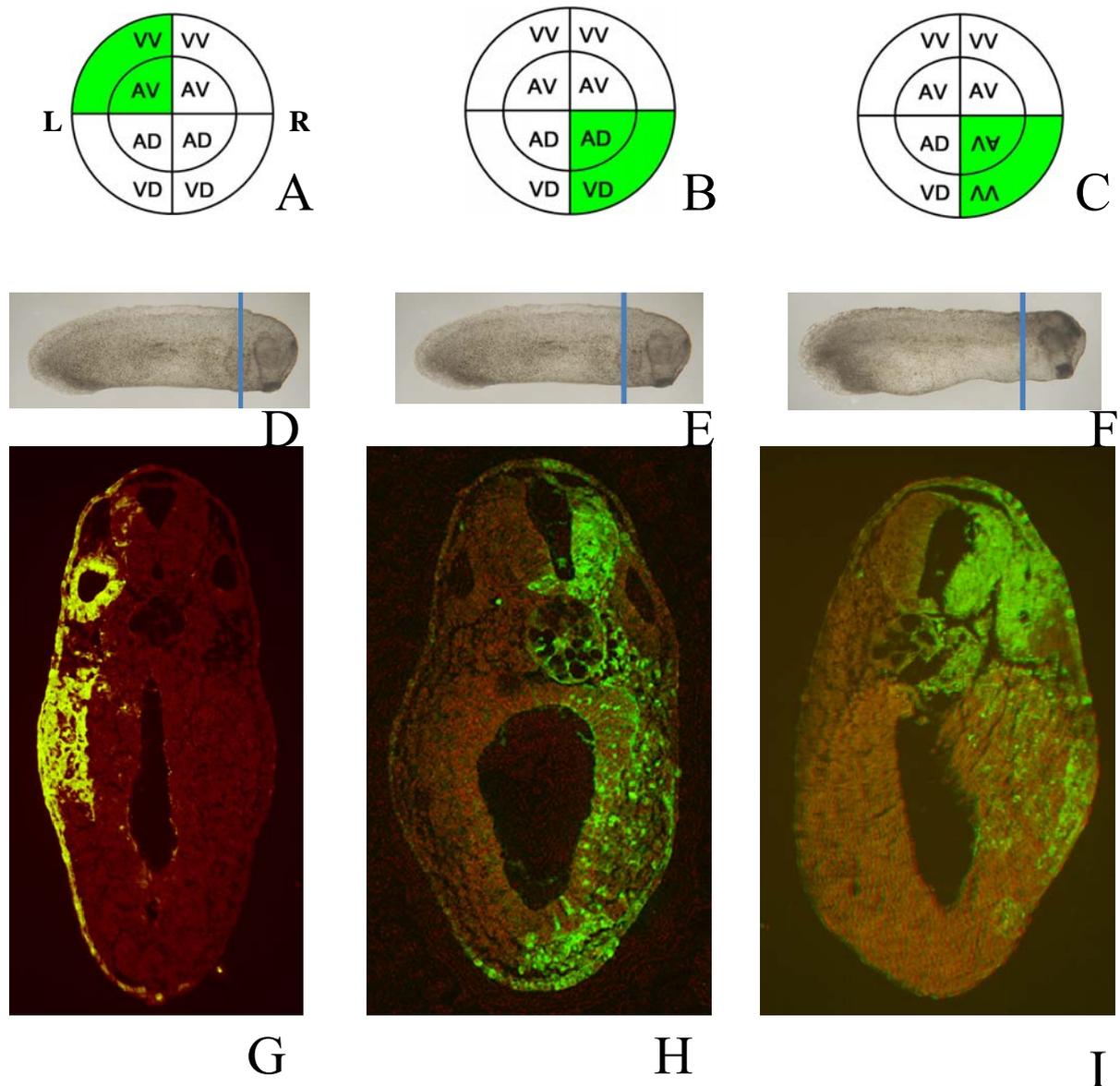


Fig. 9. Descendants of the ventral left blastomeres contribute to the dorsal axial structure, when these blastomeres were transplanted into the position of the dorsal right blastomeres at the 8-cell stage. (A-C) Schematic representations of the animal pole view for the cell tracing and transplantation. The ventral left (A) and dorsal right (B) blastomeres in normal embryos are injected with Dextran Oregon Green 488, while the labeled ventral left blastomeres were transplanted, with reversed the left-right and dorsoventral orientations, into the position of the dorsal right blastomeres in a host embryo (C). The vertical and horizontal lines and the inner circle in the figure represent the first, second and third cleavage planes, respectively. The dorso-ventral direction of the blastomere is shown by the direction of the letters. (D-F) Normally proportioned tailbud larvae developed from the embryos in A-C, respectively. (G-I) Distributions of the labeled blastomere progeny at the level of the ear vesicle, which are indicated with the solid lines in D-F. In the section in (I), the labeled ventral left blastomere progeny are distributed in the notochord, brain, somite, ear vesicle, epidermis, and endoderm, mostly on the right side, showing similar distribution pattern to the dorsal right blastomere progeny in the normal larva (H), but clearly different distribution pattern from the counterpart progeny in the normal larva (G). AD, animal dorsal; AV, animal ventral; VD, vegetal dorsal; VV, vegetal ventral; L, left; R, right.

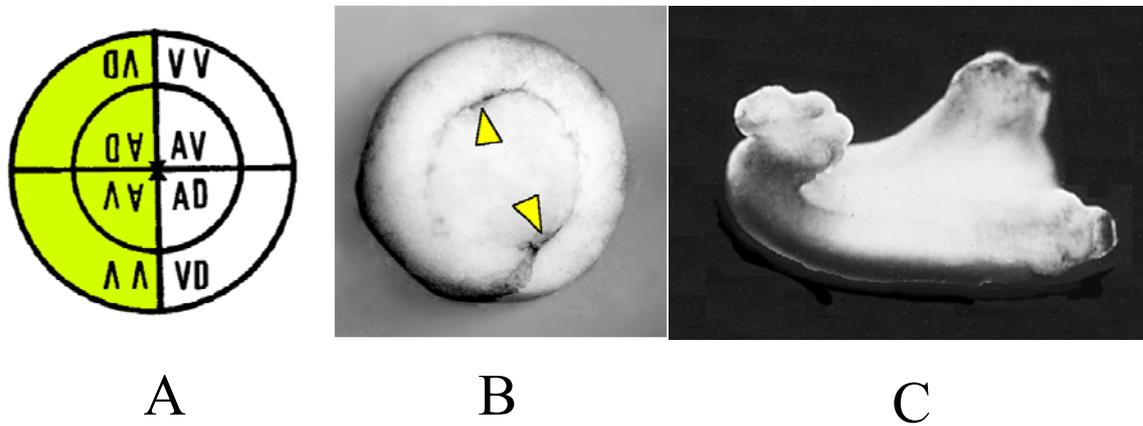
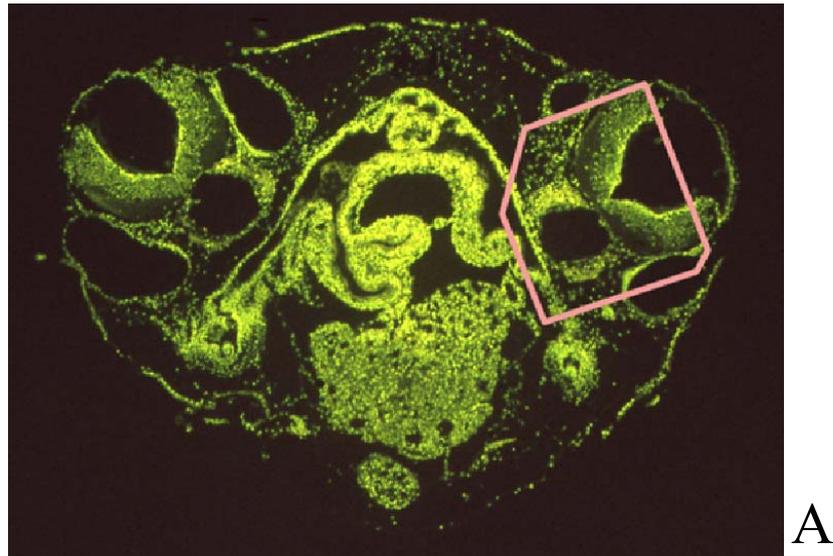
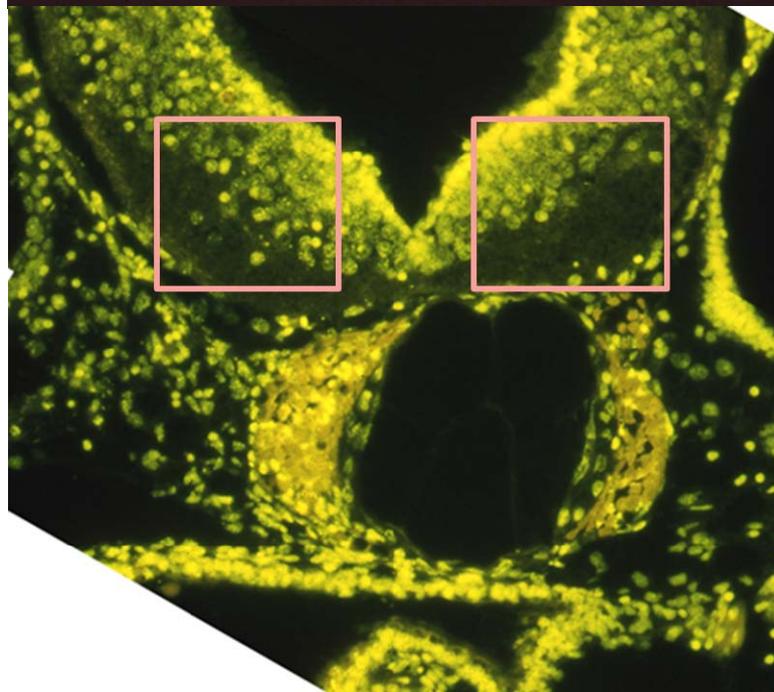


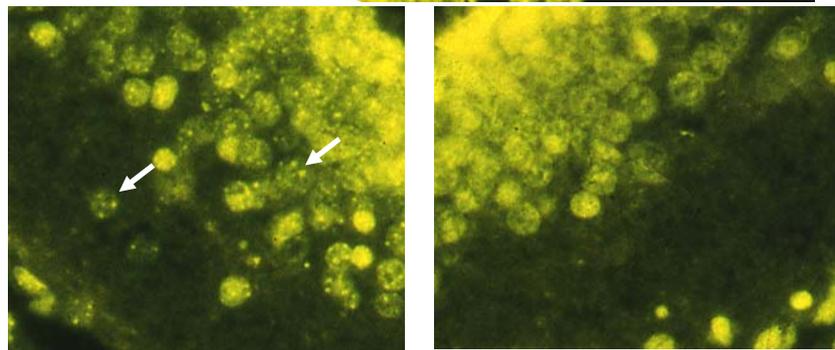
Fig. 10. Development of a chimera made by fusion of two right halves. (A) A schematic representation of a chimera (viewed from the animal pole, x). The left half of an 8-cell embryo was replaced by the right half of another 8-cell embryo, the dorso-ventral orientations of the two halves being opposite. This replacement was done between embryos of *X. laevis* and a hybrid between *X. laevis* and *X. borealis* (green). See Fig. 9. for the explanation of the drawing and abbreviations. (B) A vegetal view of a chimera invaginating at two subequatorial places close to the dorsal-most ends of dorsal blastomere progeny (arrow heads). (C) A mirror-symmetrical double-dorsal duplicated embryos developed from the embryo in A, B.



A



B



C

Fig. 11. Quinacrinely-stained transverse section of a chimeric double embryo. (A) A whole view field showing two sets of the notochord and neural tube. (B) A magnified view of the neural tube and notochord enclosed in a frame in A. The left half of the neural tube and that of the notochord consist mainly of cells with bright spots showing the hybrid cells. On the other hand, the right half is occupied mostly by cells without spots indicating *X. laevis*. The upper tissue, neural tube; the tissue having vacuoles, notochord. (C) The magnified views of the two parts in the neural tube enclosed by frames in B. The arrowheads indicate the cells with the bright spots.

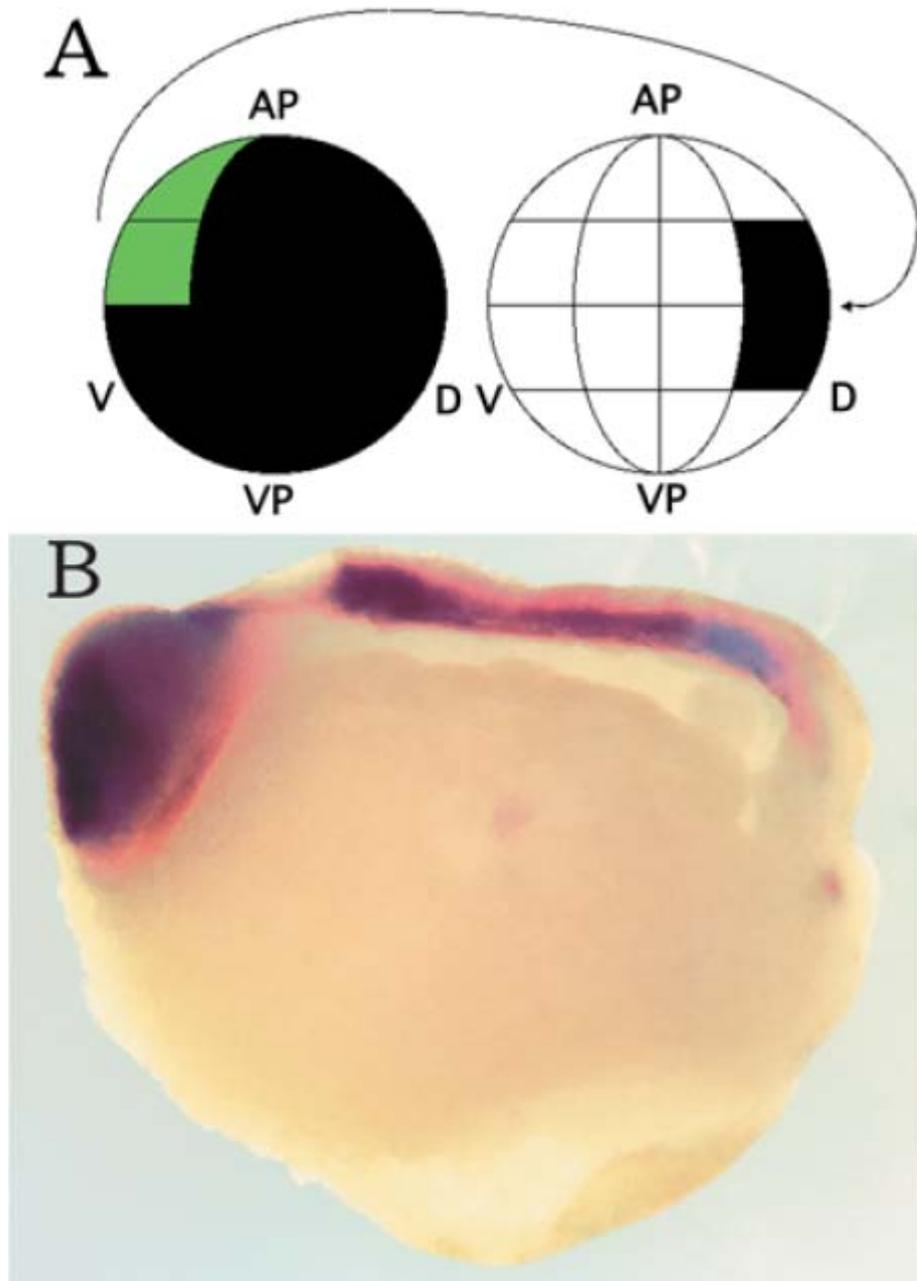


Fig. 12. Spatial gene expression patterns in *gsc* and *Xbra* in a blastomere-transplanted embryo. (A) Diagrammatic representation of a transplantation experiment (a left side view). The four dorsal marginal blastomeres (the main ancestor of the organizer) of a host 32-cell stage embryo were replaced by four Dextran Oregon Green 488-injected animal ventral blastomeres (the main ancestor of the epidermis) of another same stage embryo maintaining the original animal-vegetal orientation. AP, animal pole; D, dorsal; V, ventral; VP, vegetal pole. (B) Double *in situ* hybridization in combination with cell lineage tracing in a late gastrula recipient. The fixed embryo was cut along the dorsal midline, triple stained and bleached. The gastrula was stained for *gsc* with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) (bluish purple), for *Xbra* with 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT)/BCIP (dark purple) and for descendants of the Dextran Oregon Green 488-injected blastomeres with Fast Red (red). *gsc* and *Xbra* are mutually exclusively expressed in the traced cells deriving from the transplanted animal ventral blastomeres. The right side is the head, and the top is the dorsal.

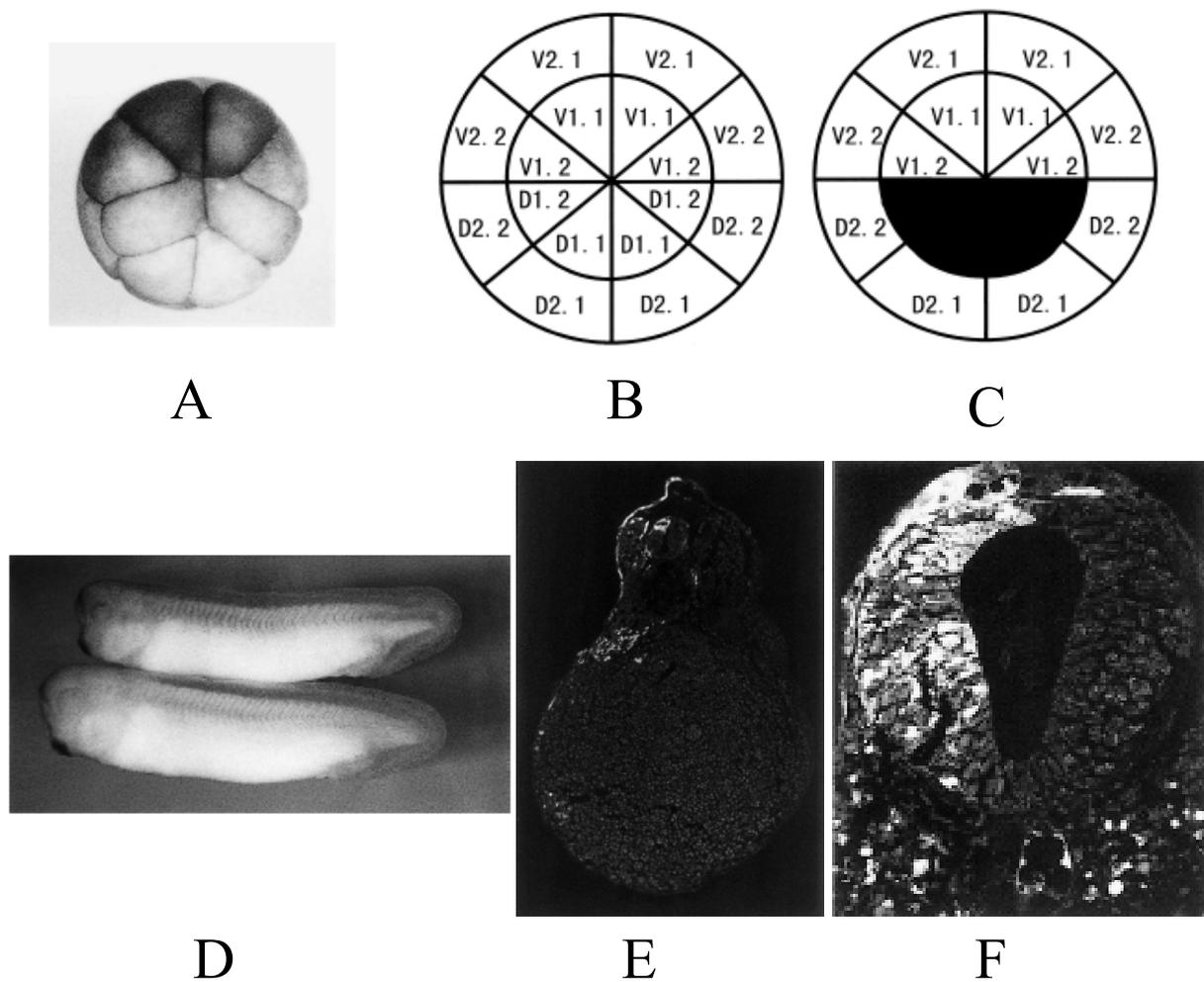


Fig. 13. Development of an embryo lacking all animal dorsal blastomeres and a normal embryo, and the distribution of the traced blastomere clone in the central nervous system (CNS) and epidermis. (A-C) Animal views of the 16-cell *Xenopus* embryos. The upper side is ventral and the lower one is dorsal. (A) A photograph of an embryo with typical pigmentation and cleavage patterns. The blastomere arrangement of the animal dorsal is somewhat different from that of animal ventral. Pigmentation is darker in ventral blastomeres than dorsal ones. (B) A diagram schematizing the composition of blastomeres of a normal 16-cell embryo. The vertical, horizontal, and oblique lines and the inner circle represent the first, second, fourth and third cleavage planes, respectively. (C) A diagram of an embryo lacking all animal dorsal blastomeres. Removed two D1.1 and two D1.2 blastomeres are represented by the filled-in areas. (D) A regulated embryo, derived from a defect embryo lacking all animal dorsal blastomeres (top) and a normal embryo (lower), at stage 32. The regulated embryo has a complete pattern with a body length leaching 90% or more of a normal one. (E, F) Progeny distributions of single blastomeres labeled with fluorescein-dextran-amine (FDA), in the views of whole (E) and the mesencephalon (F) of the transverse sections.

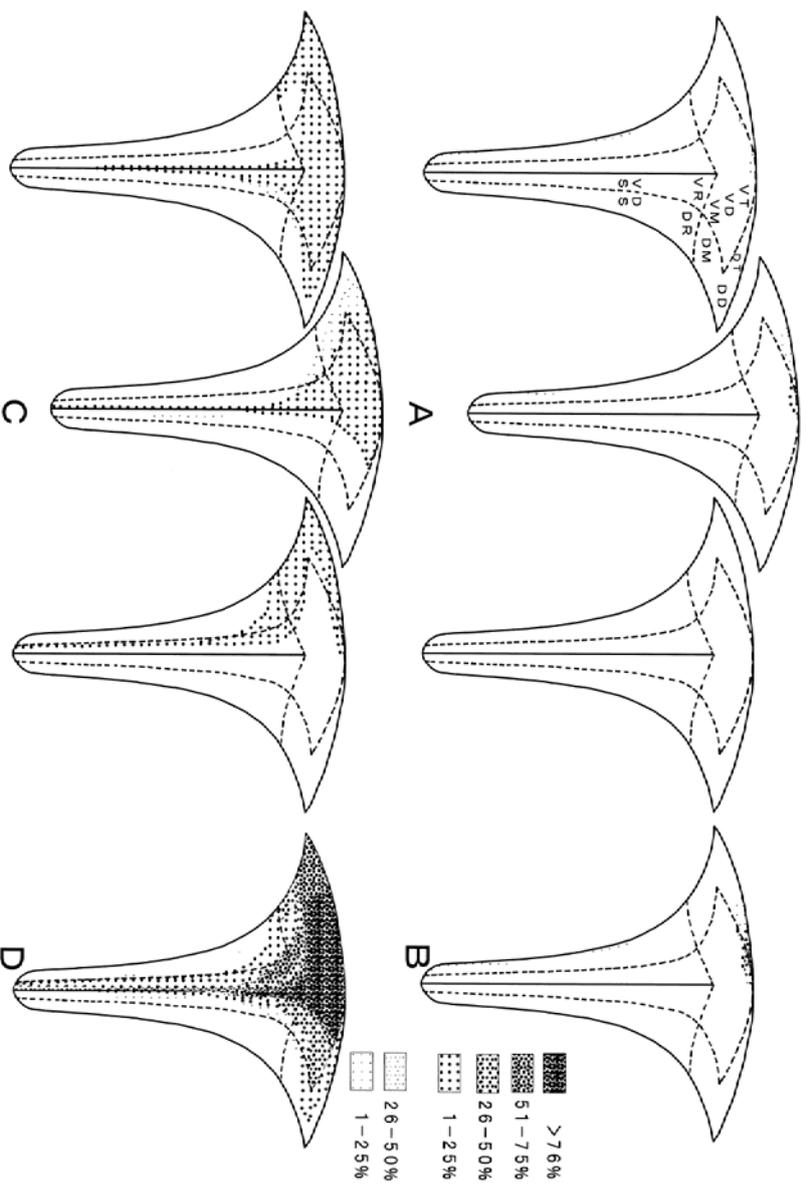


Fig. 14. Diagrams of the position of labeled cells arising from V1.1 in the CNS after Jacobson and Hirose (1981). (A) Distribution of labeled cells in individual normal embryos. (B) Appearance probability of labeled region in a normal embryo. (C) Distribution of labeled cells in individual regulated embryos. (D) Appearance probability of labeled region in a regulated embryo. Stippling in the CNS indicates the region in which labeled cells were found. The area with large dots represents the region occupied by a major volume of the descendants of the labeled blastomere. The area with small dots represents the region in which a minor volume of labeled cells was dispersed. The upper four and lower two rectangles in the right of the figure indicate the appearance probabilities of the labeled regions represented with the large and small dots, respectively. The overlapped region with both large and small dots is represented by the large dots only. The upper side is the rostral end and the lower side is the caudal end. D, diencephalon; DD, dorsal diencephalon; DM, dorsal mesencephalon; DR, dorsal rhombencephalon; DS, dorsal spinal cord; DT, dorsal telencephalon; M, mesencephalon; R, rhombencephalon; S, spinal cord; T, telencephalon; VD, ventral diencephalon; VM, ventral mesencephalon; VR, ventral rhombencephalon; VS, ventral spinal cord; VT, ventral telencephalon.

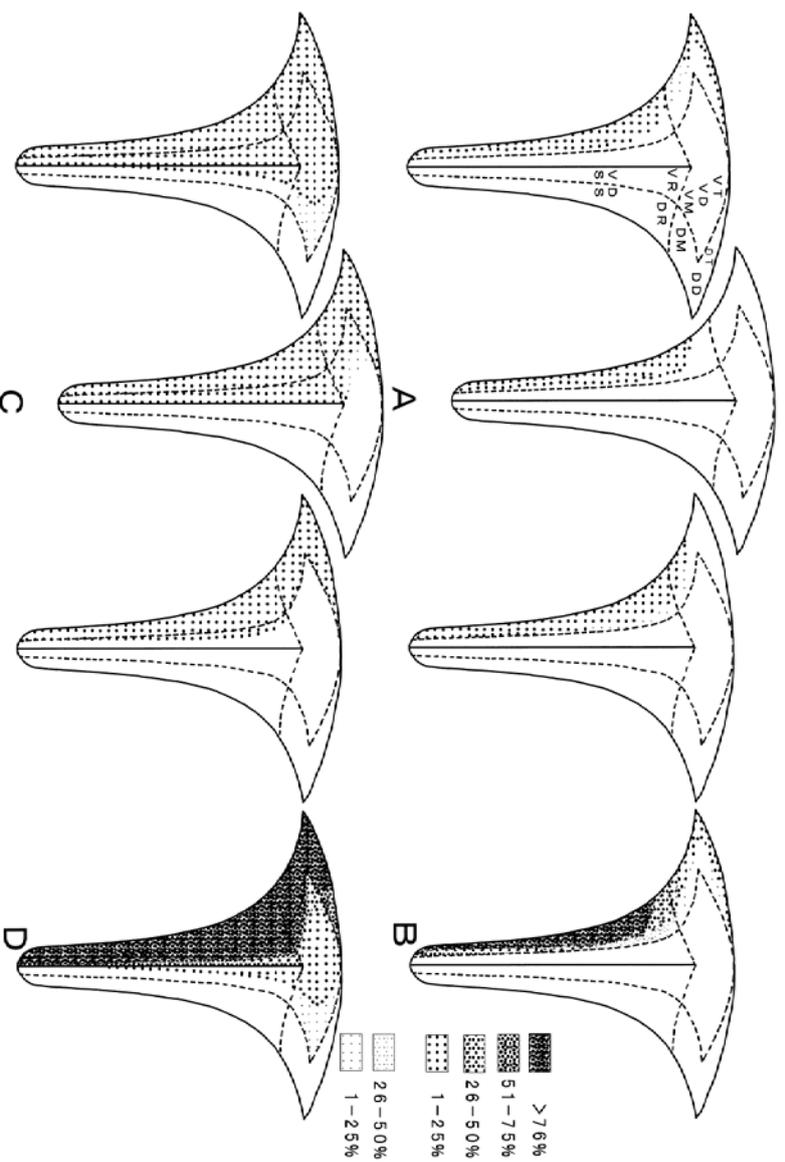


Fig. 15. Diagrams of the position of labeled cells arising from V1.2 in the CNS. (A) Distribution of labeled cells in individual normal embryos. (B) Appearance probability of labeled region in a normal embryo. (C) Distribution of labeled cells in individual regulated embryos. (D) Appearance probability of labeled region in a regulated embryo. See the legend of Fig. 14 for details.

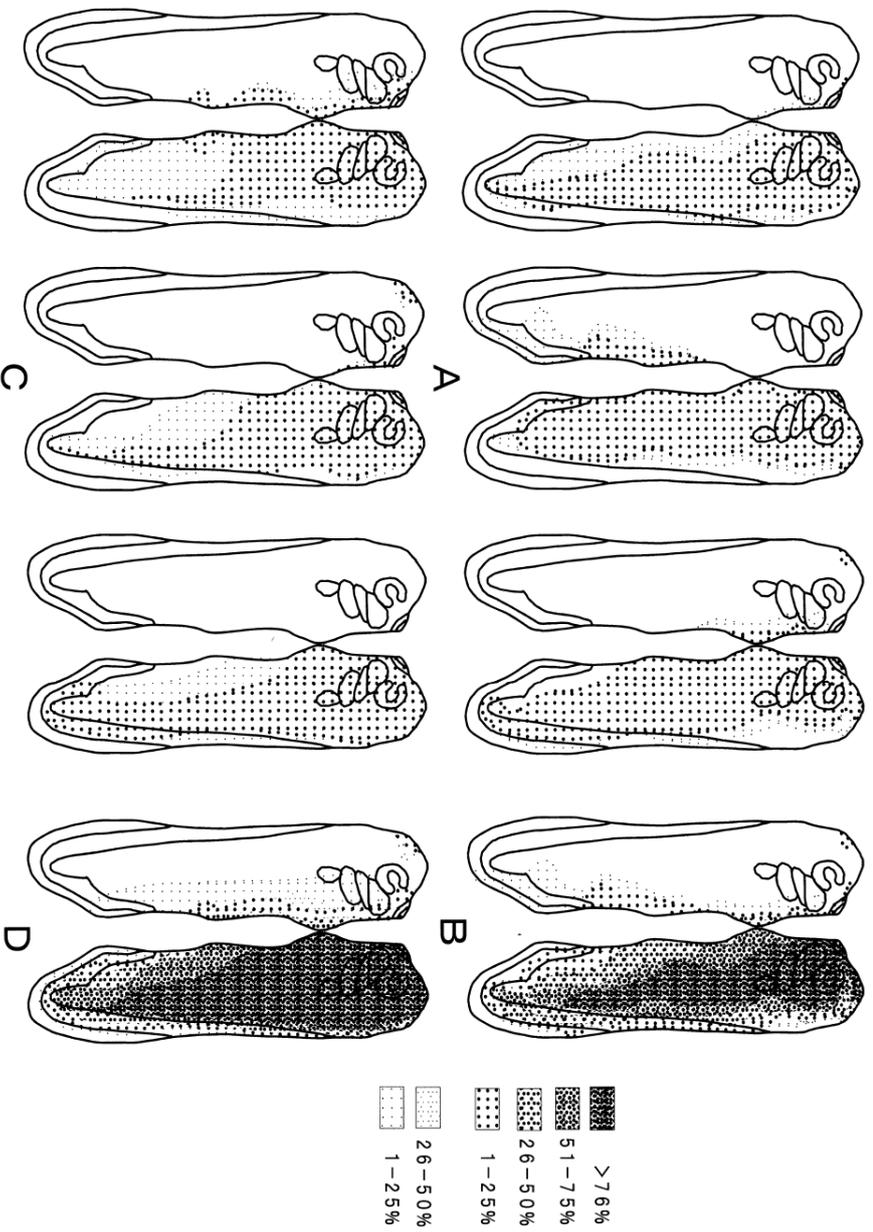


Fig. 16. Diagrams of the position of labeled cells arising from V1.1 in the epidermis. (A) Distribution of labeled cells in individual normal embryos. (B) Appearance probability of labeled region in a normal embryo. (C) Distribution of labeled cells in individual regulated embryos. (D) Appearance probability of labeled region in a regulated embryo. Stippling in the figures of the tailbud larvae indicates the regions in which labeled cells were found. See the explanation at Fig. 3 for the area with large and small dots. See the explanation at Fig. 14 for the upper four and lower two rectangles in the right of the figure.

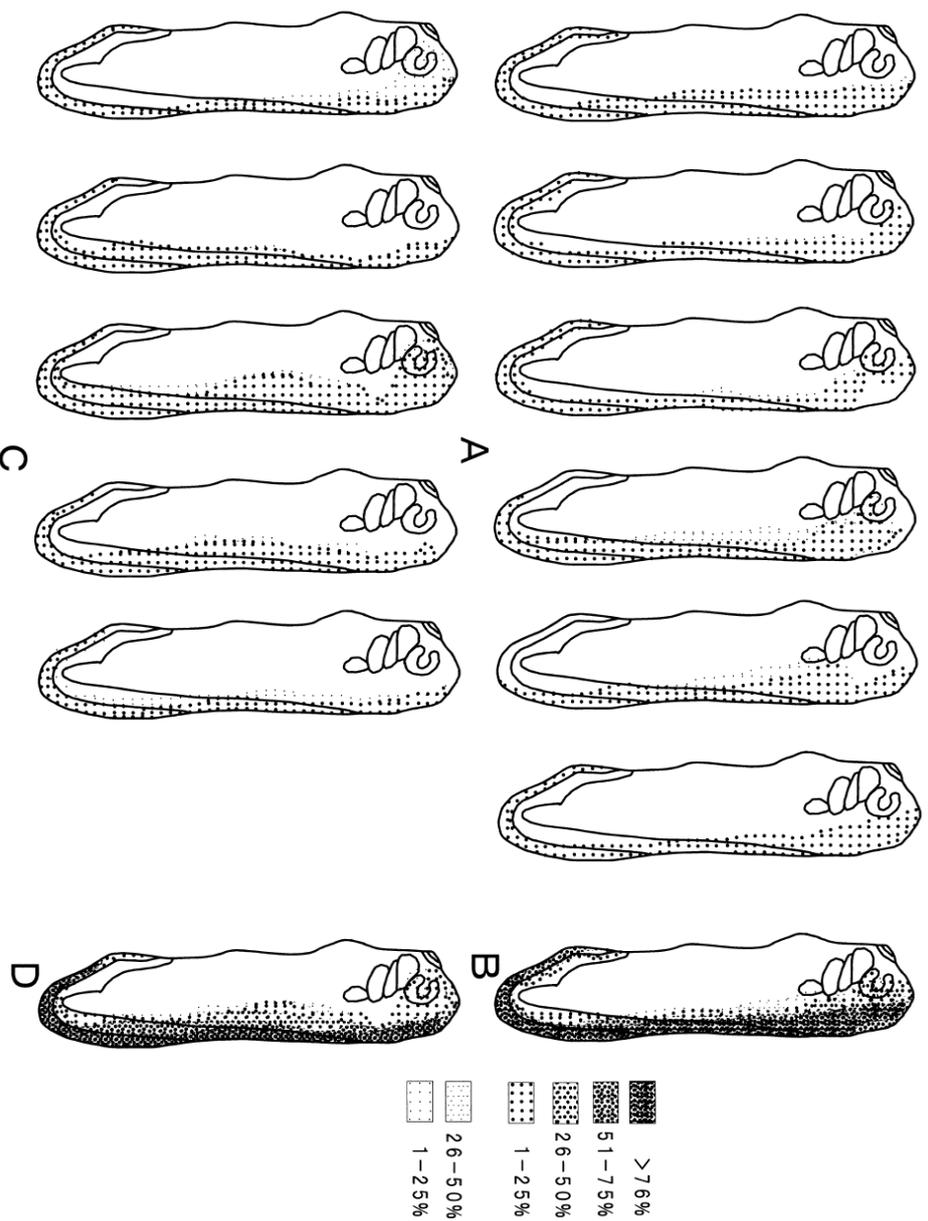


Fig. 17. Diagrams of the position of labeled cells arising from V1.2 in the epidermis. (A) Distribution of labeled cells in individual normal embryos. (B) Appearance probability of labeled region in a normal embryo. (C) Distribution of labeled cells in individual regulated embryos. (D) Appearance probability of labeled region in a regulated embryo. See the explanation at Fig. 3 for the area with large and small dots, and see the explanation at Fig. 14 for the upper four and lower two rectangles in the right of the figure.

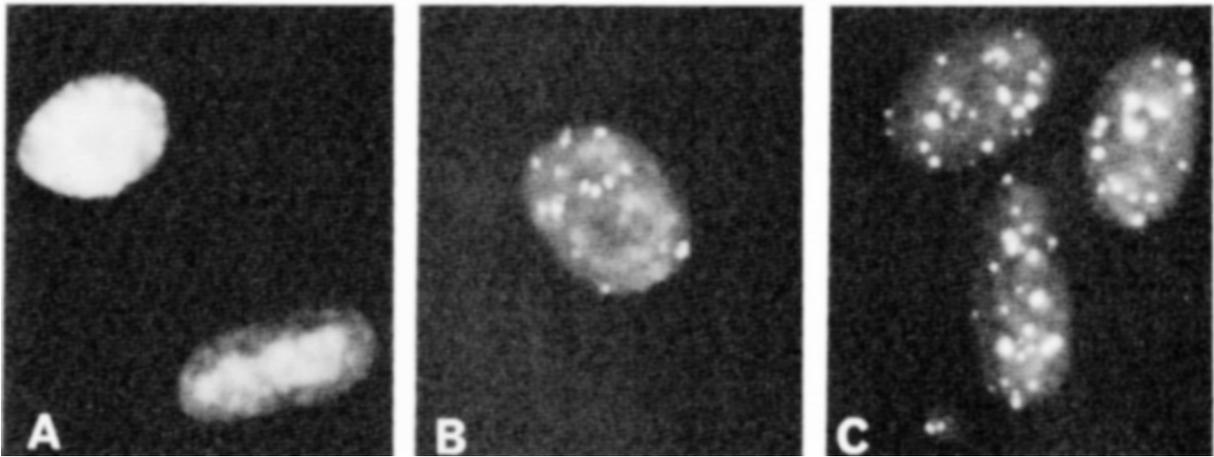


Fig. 18. Quinacrine-stained intestinal cell nuclei. Larvae were allowed to develop until stage 55. Pieces of the tissue were squashed and then stained with quinacrine. The cell nuclei of *X. borealis* (B) and a hybrid (C) show bright fluorescent spots, whereas those of *X. laevis* fluoresce only homogeneously (A).

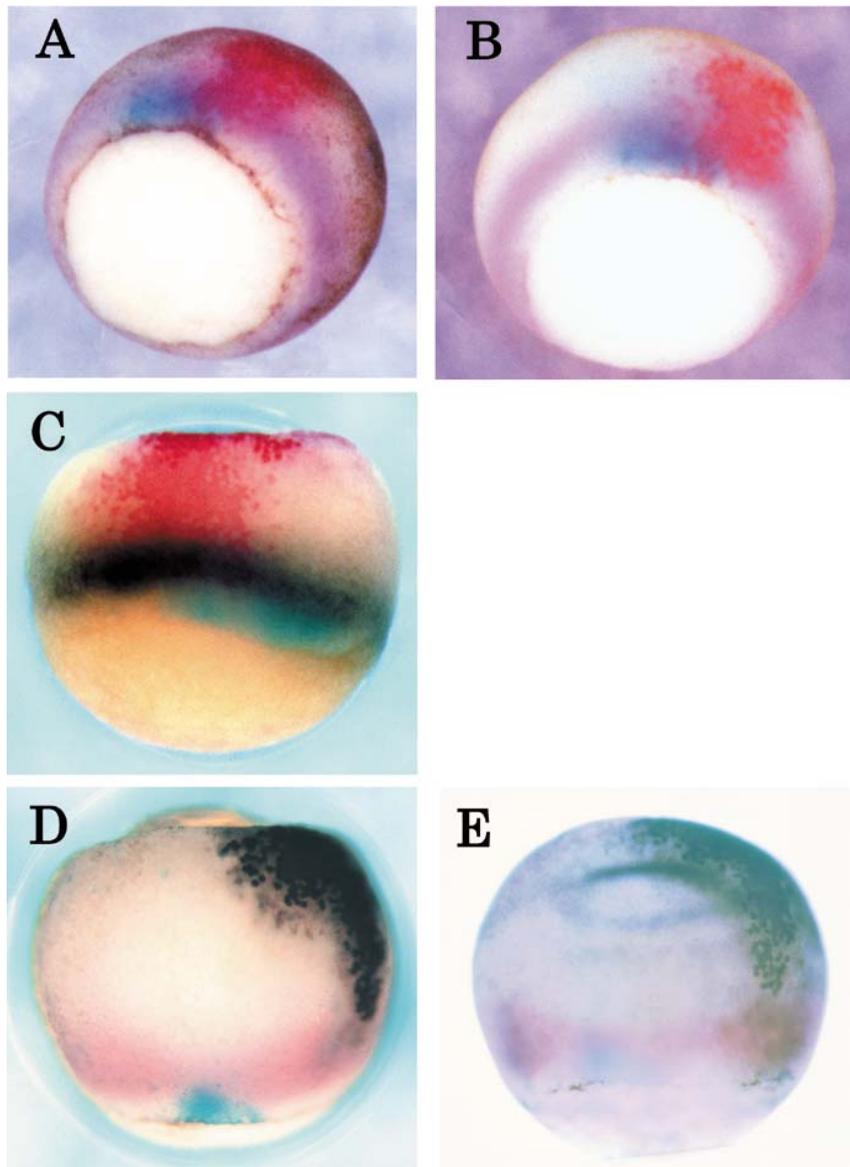


Fig. 19. Examples of triple stained early gastrula embryos by double *in situ* hybridization in combination with cell lineage tracing in a whole-mount *Xenopus* embryo. In all embryos, a biotin labeling for *gsc* and a digoxigenin labeling for *Xbra* were detected in the first and second reactions, respectively. Alkaline phosphatase activity remaining after the first chromogenic reaction was inactivated by immersion in 0.1 M glycine-HCl (pH 2) containing 1% Tween 20 for 40 min (A and B), or dehydration in methanol following an incubation at 65°C for 10 min in Maleic acid buffer (MAB) containing 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (C, D and E). Fixation of the embryos after the second reaction was carried out overnight with Bouin's fixative without picric acid. Cell lineage tracer was immunostained at the third reaction. (A) A whole-mount wild-type embryo, stained with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) first (blue, for *gsc*), 5-bromo-6-chloro-3-indolyl phosphate (magentaphos) second (magenta, for *Xbra*) and Fast Red third (red, for the lineage traced cells). The sample was photographed before bleaching. (B) An embryo identical to (A) after bleaching. (C) A whole-mount albino embryo stained with BCIP (blue, for *gsc*), 4-nitrobluetetrazolium chloride (NBT)/BCIP (dark purple, for *Xbra*) and Fast Red (red, for the lineage traced cells) in order. (D) A whole-mount wild-type embryo, sequentially stained with BCIP (blue, for *gsc*), Magenta-phos (magenta, for *Xbra*) and Vector Black (black, for the lineage traced cells) and bleached, in an aqueous solution. (E) An embryo identical to (D) in the clearing solution.



Fig. 20. Unfixed Magenta-phos stain easily dissolves in methanol. After overnight methanol incubation, the Magentaphos staining is greatly reduced in unfixed samples (the lower tier), but not in samples fixed with Bouin's fixative without picric acid (the upper tier). The embryos are non-bleached wild-type ones and are stained for *gsc* with Magenta-phos.

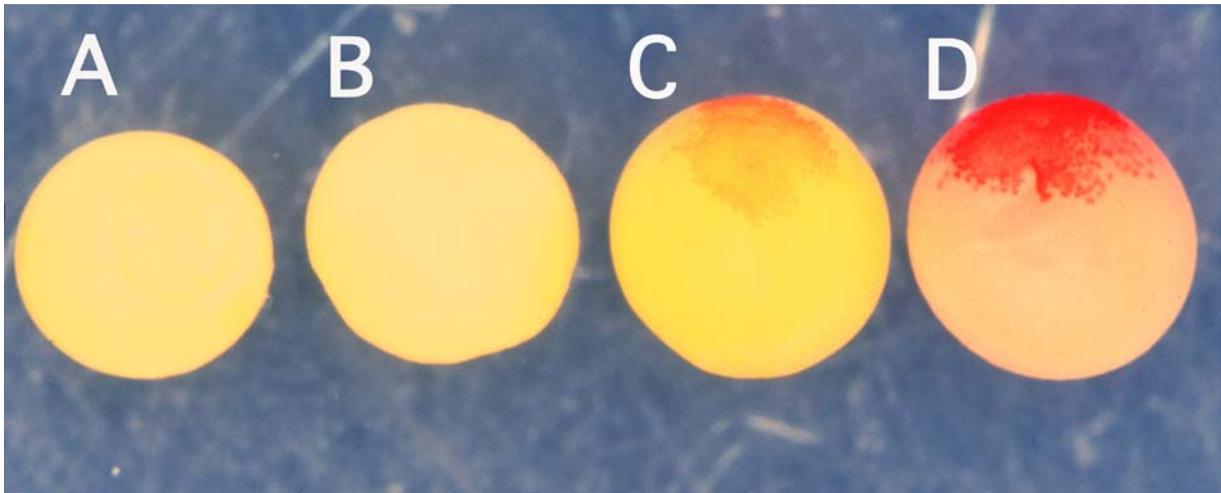


Fig. 21. Fixation for 2 h with Bouin's fixative inactivates alkaline phosphatase. The samples, which had been injected with Dextran Oregon Green 488, were reacted with alkaline phosphatase-coupled anti-fluorescein antibodies, and fixed for 2 h with Bouin's fixative containing picric acid (A), Bouin's fixative without picric acid (B) and MEMFA (C). The non-fixation control was sample (D). Remaining alkaline phosphatase activity was assayed using Fast Red. Alkaline phosphatase is inactivated completely in (A) and (B), while little activity remains in (C).

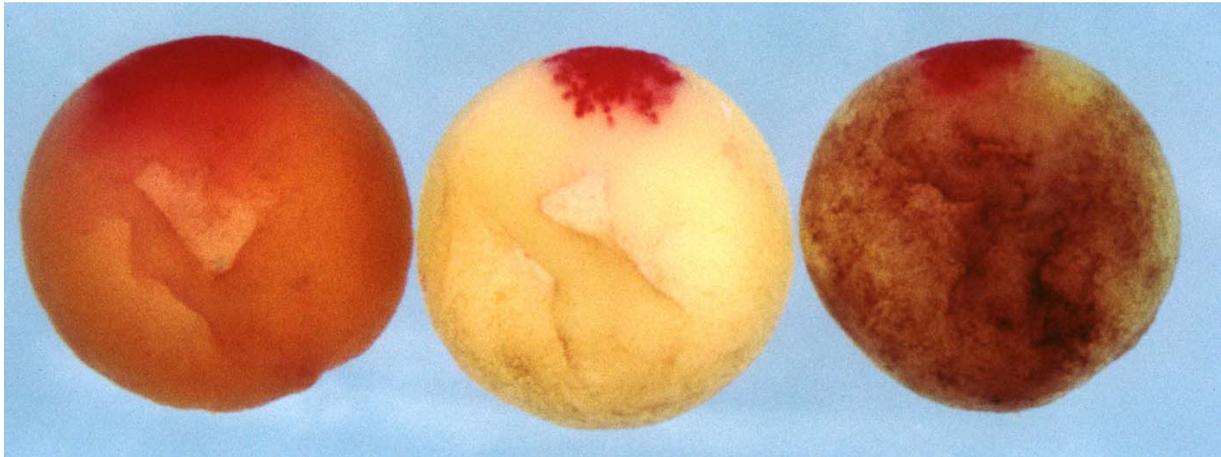


Fig. 22. Bleaching of the embryos should be carried out after the third staining. Bleaching after fixation following the second-round staining brings a strong background staining against a third Fast Red reaction (the left sample), while bleaching after the third staining results in almost no background staining (the middle sample). The right embryo is a non-bleached control. In all of the samples, Fast Red staining was carried out in the third-round reaction. Animal pole views. The stainings for double *in situ* hybridization are not seen from this direction.



Fig. 23. Double *in situ* hybridization in combination with cell lineage tracing in a hemi-sectioned embryo. A fixed wild-type normal middle gastrula was cut along the dorsal mid-line, triple stained and bleached. The embryo was stained for *gsc* with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) (blue), for *Xbra* with 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT)/BCIP (brown/violet) and for descendants of the cell lineage tracer-injected blastomeres with Fast Red (red).

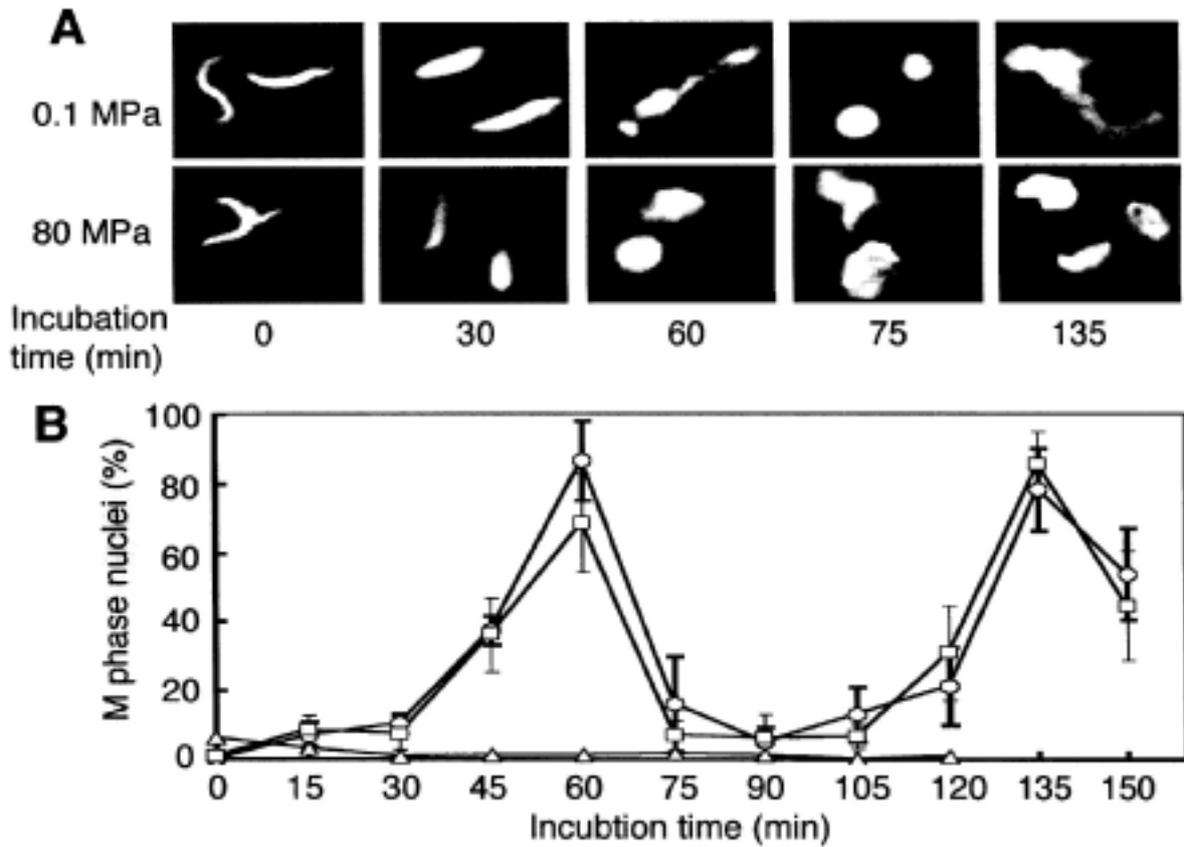


Fig. 24. Pressure effects on cell-cycle progression of sperm nuclei. (A) Sperm nuclei were incubated in pressure-untreated (0.1 MPa) or 80 MPa -treated cycling extracts at 23°C and atmospheric pressure. (B) Pressure effects on appearance of M-phase nuclei. Sperm nuclei were incubated at 23°C in pressure-untreated cycling extracts (○) and 80MPa-treated ones (△). On the other hand, 80 MPa-treated sperm nuclei (□) were incubated in pressure-untreated cycling extracts. Values are means \pm SD for three independent experiments.

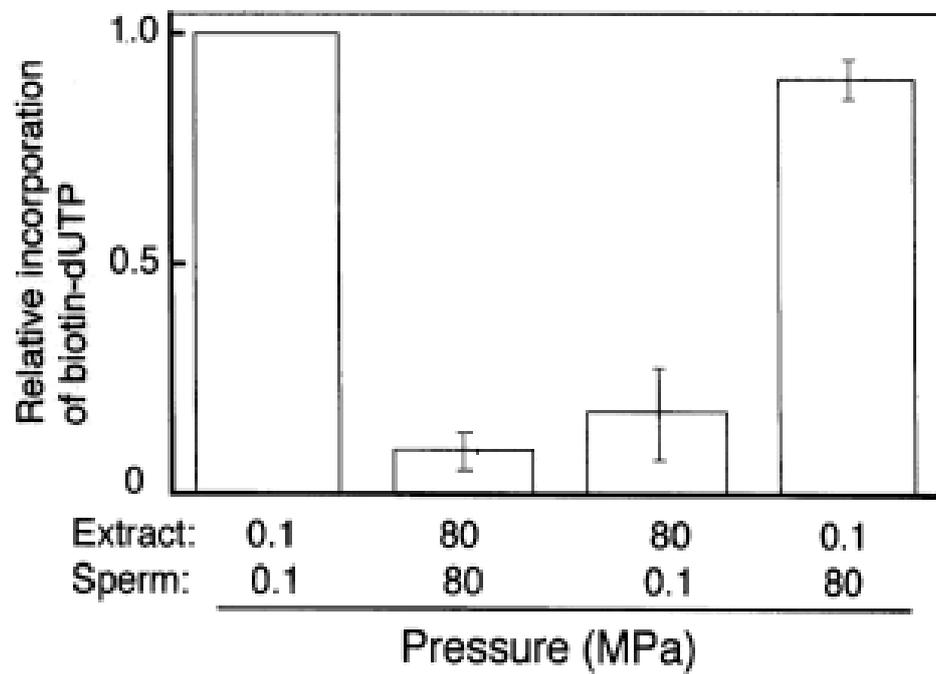
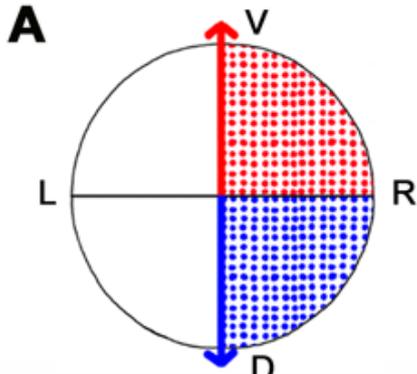


Fig. 25. Pressure effects on incorporation of biotin-16-dUTP into sperm nuclei. Relative amount of incorporated biotin-16-dUTP was estimated from fluorescence intensities of avidin-FITC and PI. Values are means \pm SD for three independent experiments.

Normal embryo



Right half embryo

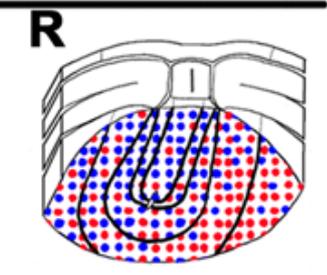
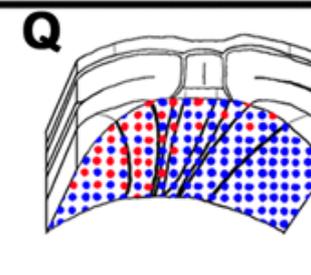
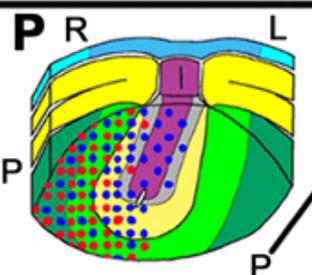
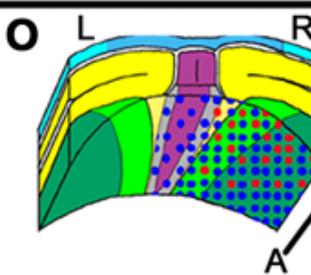
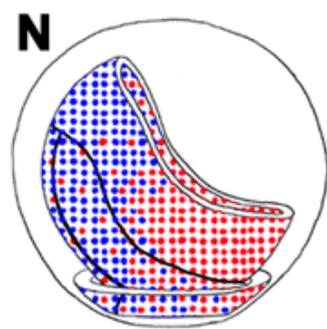
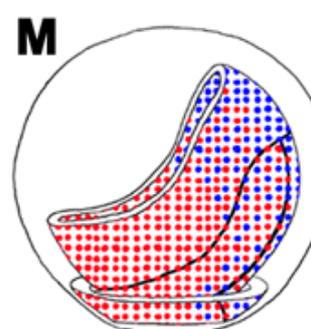
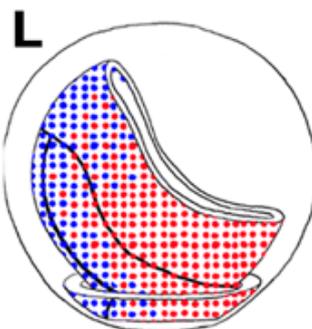
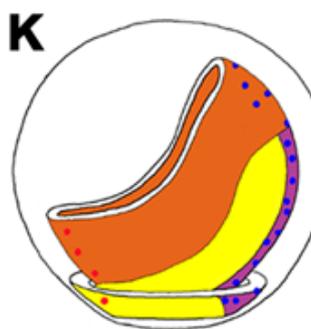
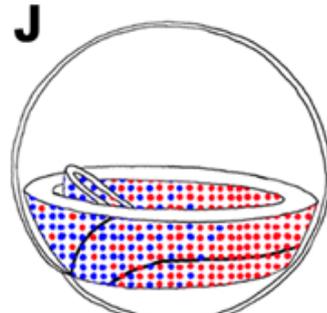
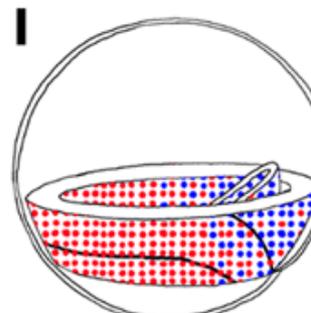
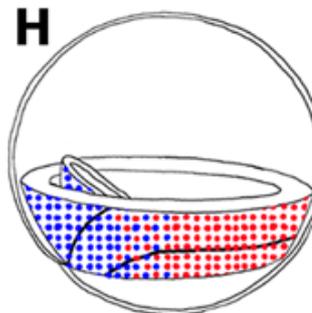
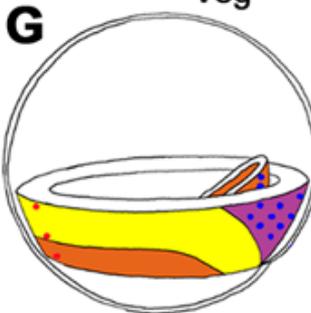
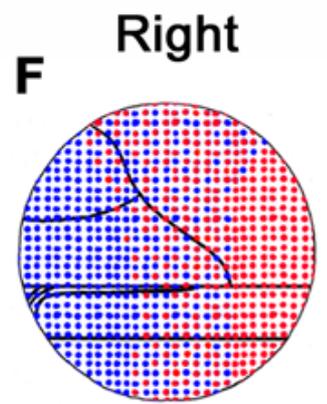
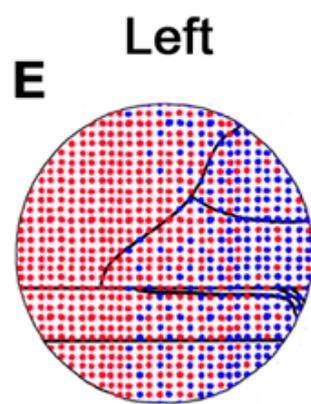
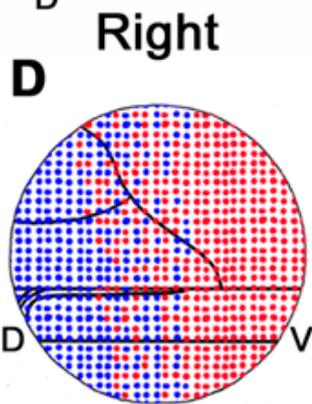
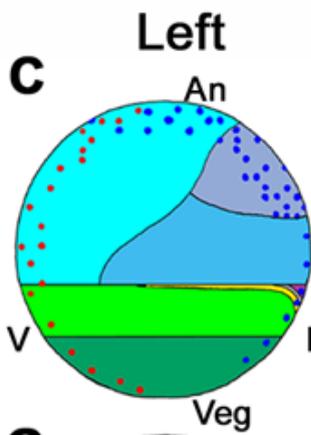
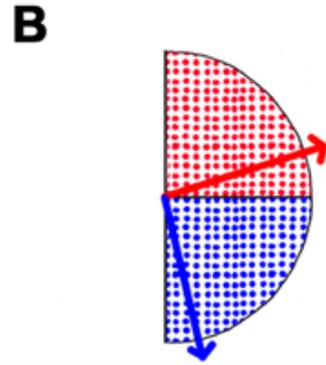


Fig. 26. Putative distributions of the 4-cell stage right blastomere clones projected on the previously proposed gastrula and neurula fate maps. The cell percentages of the right dorsal and right ventral blastomere clones in the region are represented as blue and red dots, respectively. The left and right halves of the panels in the figure show normal embryos, and a right half embryo or regulated right half embryos, respectively. (A, B) Animal views of a normal embryo (A) and a half embryo (B) at the 4-cell stage. The prospective dorsal and ventral midlines are represented with the blue and red arrowheads. (C-F) Superficial layers of the stage 10 embryos. (G-J) Views of the involuting marginal zone of the stage 10 embryos. (K-N) Views of the involuting marginal zone of the mid-gastrula stage embryos. The sides of the views in (C-N) are indicated on the upper line of the panel rows. (O-R) Views of the gastrocoel roof at stage 15, cut transversely into the anterior (O, Q) and posterior (P, R) segments. To make it easy to see the stipples, the marking of the prospective tissues with distinct colors was performed only for the views of the left side (C, G, K) and the gastrocoel roof (O, P) in the normal embryos. The bluish colors represent the presumptive ectoderm (cyan: epidermis, pale purple: anterior neural, sky blue: posterior neural ectoderm), the reddish and yellow colors represent the presumptive mesoderm (magenta: notochordal, yellow: somitic, orange: head, lateral and ventral mesoderm), the greenish and gray colors represent the presumptive endoderm (yellow-green: supra-blastoporal endoderm, green: sub-blastoporal endoderm, gray: hypochord). The clone distributions in the head and lateral mesoderm (orange) in the regulated embryo (M, N) are based on the assumption that the movement of the prospective heart and the anterior lateral plate toward the ventral midline progress symmetrically after the mid-gastrula stage. The fate maps in (C-F, O-R) and in (G-N) are quoted from Shook et al. (2004) and Keller et al. (2003). L, left; R, right; D, dorsal; V, ventral; An, animal; Vg, vegetal; A, anterior; P, posterior.

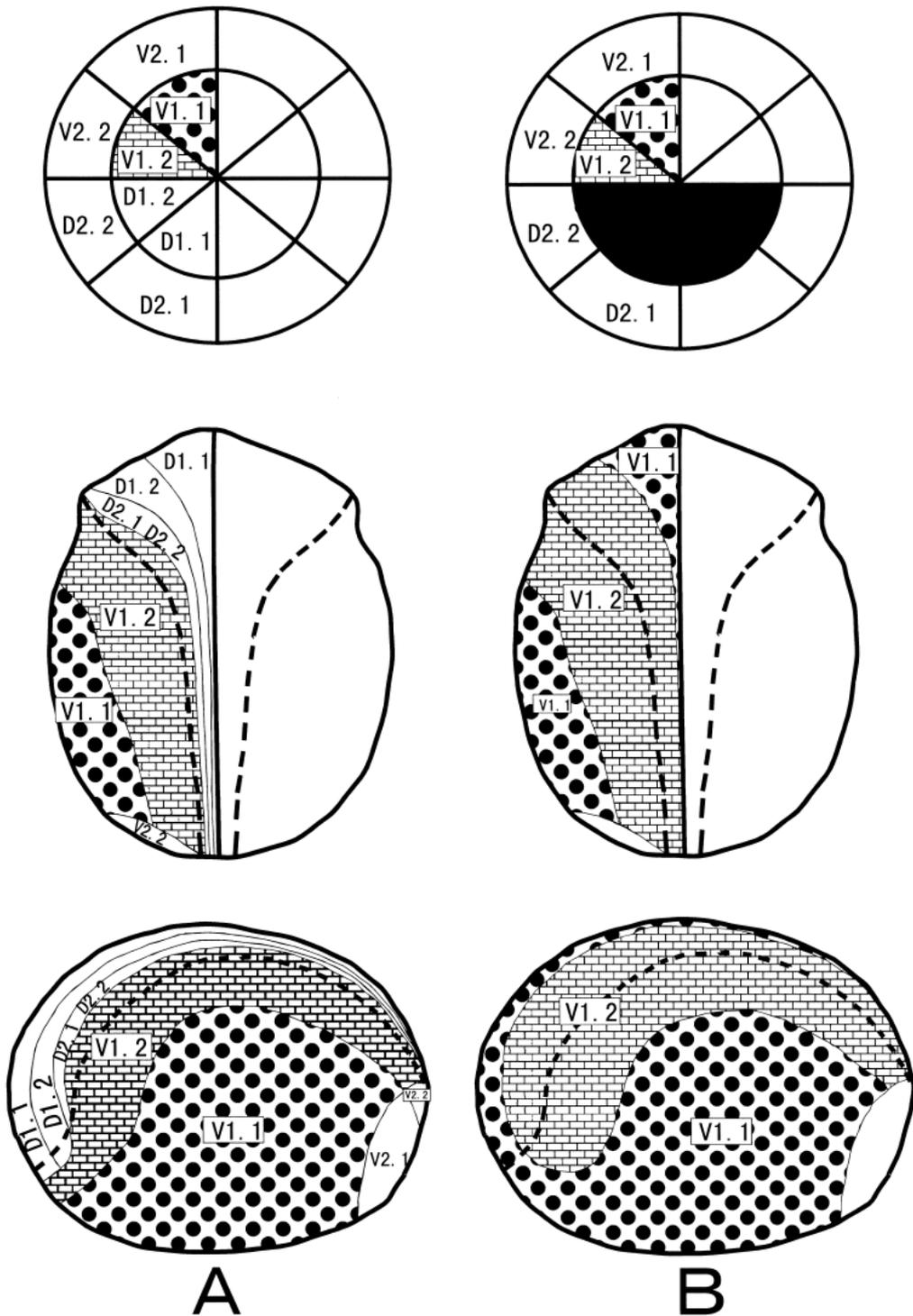


Fig. 27. Presumptive clonal organization of the ectoderm in stage 14 embryos. (A) A control embryo. (B) A regulated embryo derived from a defect embryo lacking all animal dorsal blastomeres. The upper illustrations show the diagrams schematizing the composition of blastomeres of two types of 16-cell embryos. The middle illustrations are dorsal views and the lower ones are lateral views. The dashed lines show the ridges of the neural folds.

Table 1. Experimental conditions of dejelly, sterilization, medium and microinjection.

Embryo type (Chapter - subchapter)	Reagent for dejelly	Reagent for sterilization	Medium for operation and microinjection	Cell lineage tracer		Injector type (Manufacturer)	Medium used thereafter healing	
				Reagent	Concentration			Volume (nl/cell) (cell stage)
Right half embryos (3-1)	L-cysteine hydrochloride monohydrate [†]	gentamicin sulfate [§]	60% MR ^{††}	Dextran Oregon Green 488	0.108% in H ₂ O	9.2 or 4.6 (4 or 8)	Nanoject II (Drummond)	5% MR
The embryos whose dorsal right blastomeres are re- placed (3-2)	L-cysteine hydrochloride monohydrate	gentamicin sulfate	100% Steinberg solution	Dextran Oregon Green 488	0.108% in H ₂ O	9.2 (4)	Nanoject II (Drummond)	10% Steinberg solution
Chimeras of the right halves of <i>X. laevis</i> and <i>Xenopus</i> hybrid (3-2)	sodium thioglycolate [‡]	p- toluenesulphone chloramide [¶]	L-15 FCS [‡]					10% Steinberg solution
The embryos lacking all animal dorsal blastomeres (5)	sodium thioglycolate	p- toluenesulphone chloramide	100% Steinberg solution	Fluorescein- Dextran-Amine	10% in 0.2N KCl	0.6 (16 or 32)	Model IM-1 (Narishige)	10% Steinberg solution
The embryos whose dorsal marginal blastomeres are replaced (4)	L-cysteine hydrochloride monohydrate	gentamicin sulfate	100% Steinberg solution	Dextran Oregon Green 488	0.5% in H ₂ O	0.5 or 0.25 (16 or 32)	Model IM-1 (Narishige)	10% Steinberg solution

[†]2.5% solution in H₂O (pH 7.8-8.0). [‡]2.5% solution in H₂O (pH 9.0). [§]50 µg/ml in the medium. [¶]Treatment with 0.1% solution in 100% Steinberg solution for 2 min.

^{††}Modified amphibian Ringer's solution (Larabell et al., 1996). ^{‡‡}50% Leibovitz medium supplemented with 10% fetal calf serum.

Table 2. The mean values of the standard errors for the measured progeny percentages in all the grids on the side.

Embryo type-labeled blastomere	Right side	Left side	Both sides
RH-RD	6.1	5.2	5.6
W-RD	5.4	2.1	3.7
RH-RV	7.7	6.7	7.1
W-RV	6.5	1.2	3.7

[†] Abbreviation: see the legend for Fig. 5.

Table 3. Experimental protocol and notes for the triple staining in a whole-mount *Xenopus* embryo

Experimental protocol	Notes
1. Microinject the cell lineage tracer Dextran Oregon Green 488 into the blastomere(s) of embryos. Allow to develop until appropriate stages.	Dextran Oregon Green 488: 0.5% in H ₂ O, 0.25 or 0.5 nL/blastomere at 16- or 32-cell stage embryos.
2. Fix with MEMFA fixative for 2 h or over night, shaking at room temperature.	After fixation, dehydrate the samples in an ethanol series.
3. Hemisection the embryos in 75–100% ethanol, if examination inside the embryos is necessary.	Store the 100% ethanol-immersed samples at –85°C.
4. Pre-hybridize the embryos in a hybridization solution for 4–6 h at 60°C with agitation in a hybridization oven.	
5. Hybridize the embryos simultaneously with a biotin-labeled <i>gooseoid</i> (<i>gsc</i>) probe (400–650 ng/mL) and a digoxigenin-labeled <i>Xenopus brachyury</i> (<i>Xbra</i>) probe (200 ng/mL) with agitation overnight (12–16 h) at 60°C in a hybridization oven.	Use higher concentration (400–650 ng/mL) of the biotin-labeled <i>gsc</i> probe compared to the digoxigenin-labeled <i>Xbra</i> probe (200 ng/mL).
6. First-round immunostaining for the biotin-labeled <i>gsc</i> probe [†] .	Use high dilution (1:7000) of anti-biotin-alkaline phosphatase (AP) Fab fragments to avoid background staining. See Table 2 for the chromogens.
7. Wash samples 3 times in MAB for 5 min	
8. Inactivate the AP activity by either of the following methods:	(1) Confine the dehydration time with the methanol to within 1 h to avoid decreasing the first BCIP staining. (2) Sufficient washing for glycine-HCl is needed after inactivation.
(1) Incubate in MAB containing 10 mM EDTA at 65°C for 10 min and dehydrate in methanol.	
(2) Incubate for 40 min in 0.1 M glycine-HCl (pH 2) containing 1% Tween 20.	See Table 2 for suitably ordered combinations of chromogens for the AP inactivation methods. <i>Do not</i> use fixatives, as they decrease the detection sensitivity for the DIG-labeled probe in the second reaction.
9. Wash samples more than four times in MAB for 10 min.	
10. Second-round immunostaining for the digoxigenin-labeled probe [†] .	Use a 1:2000 diluent of anti-digoxigenin-AP Fab fragments. See Table 2 for the chromogens.
11. Fix double stains overnight with Bouin's fixative without picric acid.	Fixation is sufficient for the inactivation of AP activity.
12. Wash the embryos several times for less than 1 h in total in 50% ethanol-50% PBS containing 0.1% Tween 20.	When a polyvinyl alcohol AP buffer is used for the second NBT/BCIP reaction, wash several times with MAB before this washing.
13. Third-round immunostaining for cell lineage tracer with Fast Red or Vector Black. ^{††}	Use a 1:6000 (Fast Red) or 1:10 000 (Vector Black) diluent of anti-fluorescein-AP Fab fragments. Use 1/5 strength substrate working solution and add the albino embryos from the starting process as the staining controls (Vector Black). Stop premature reactions. See Table 2 for the chromogens.
14. Wash samples three to five times in 50% ethanol-50% MAB for 5 min	
15. Bleaching of the pigment of the embryos.	Bleaching solution: 1% H ₂ O ₂ , 5% formamide, 0.5 × SSC. Required after the third staining.
16. Refix the stains with Bouin's fixative without picric acid. Wash the embryos with MAB more than four times for 10 min, dehydrate in an ethanol series, and clear the embryos in BBBA.	Only in the case of substrate combination of BCIP, Magenta-phos and Vector Black. Use samples with intense <i>in situ</i> stainings.

[†]When staining regions overlap, make a photo-record of each sample at each step. ^{††}When using Vector Black, do not use Tween 20 in any of the processes including hybridization. AP, alkaline phosphatase; BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; DIG, digoxigenin; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; MAB, Maleic acid buffer; MEMFA, MOPS/EGTA/Magnesium/Sulfate/Formaldehyde; NBT, 4-nitroblue tetrazolium chloride; PBS, phosphate-buffered saline; SSC, sodium chloride/sodium citrate.

Table 4. Ordered combinations of chromogens, the alkaline phosphatase (AP) inactivation methods after the first reaction and their compatibilities for triple staining

Chromogens used in each reaction			AP inactivation method	Suitable for triple staining?
First (<i>in situ</i>)	Second (<i>in situ</i>)	Third (lineage tracing)	after the first reaction	
BCIP	Magenta-phos	Fast Red	10 mM EDTA and methanol [†]	Yes [§]
Magenta-phos	BCIP	Fast Red	10 mM EDTA and methanol [†]	No [¶]
BCIP	NBT/BCIP	Fast Red	10 mM EDTA and methanol [†]	Yes ^{††}
BCIP	Magenta-phos	Fast Red	Gly-HCl [‡]	Yes [§]
Magenta-phos	BCIP	Fast Red	Gly-HCl [‡]	Yes [¶]
BCIP	NBT/BCIP	Fast Red	Gly-HCl [‡]	Yes ^{††}
BCIP	Magenta-phos	Vector Black	10 mM EDTA and methanol [†]	Yes [§]

[†]Incubation at 65°C for 10 min in MAB containing 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and dehydrated in methanol for 30–60 min. [‡]Incubation for 40 min in 0.1 M glycine-HCl (pH 2) containing 1% Tween 20. [§]Use 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) for the gene for a more intense contrast with Fast Red. 5-bromo-6-chloro-3-indolyl phosphate (Magenta-phos) should be reacted at 37°C for one to several days. [¶]Magenta-phos staining dissolves in the methanol but not in glycine-HCl. ^{††}Suitable for the investigation of separate gene expression domains, but not overlapping gene expression domains. 4-nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NBT/BCIP) has better color contrast to Fast Red than magenta-phos. BCIP should be fully reacted while NBT/BCIP staining should be stopped somewhat prematurely. Use polyvinyl alcohol AP buffer and/or incubate at a low temperature for NBT/BCIP staining to repress background staining.