

ツメガエル初期胚における Wnt シグナリングの細胞生物学的研究

Cell biological analysis of Wnt signaling in early *Xenopus* embryos

2015 年 3 月

本村 恵理子

第 1 章 序論	5
1-1 オーガナイザーの発見	5
1-2 オーガナイザーの形成	5
1-2-1 受精による卵の表層回転	5
1-2-2 中胚葉誘導説を支持する実験的根拠	6
1-2-3 植物極側背側決定デターミネントによる自律的形成を支持する実験 的根拠	7
1-3 Wnt/ β -catenin 経路と Wnt 作用に関する一般的なモデル	10
1-4 Wnt8 mRNA 注入によって形成される二次軸	10
1-5 PBE を用いた実験系	11
1-6 研究の目的	11
1-6 本論文の概要	13
第 2 章 材料と方法	15
2-1 卵の準備	15
2-2 胚の培養液	15
2-3 精子の準備	15
2-4 人工授精とゼリー層の除去	16
2-5 植物極側切除胚の作成	16
2-5 プラスミドと mRNA 合成	17
2-6 マイクロインジェクション	17
2-7 RT-PCR	18
2-8 免疫組織化学的方法によるタンパク質の検出	19
2-9 組織化学的染色と whole mount <i>in situ</i> hybridization	19
2-10 割球解離実験	20
2-11 Wnt/Frzb 注入割球の組み合わせ胚作成	20

第 3 章 様々な mRNA 注入による背側化と Wnt タンパク質の局在の結果と考察	21
3-1 Wnt8 mRNA の注入による背側化と Wnt8 タンパク質の局在	21
3-2 Wnt8-KDEL mRNA の注入による背側化と Wnt8-KDEL タンパク質の局在	22
3-3 ΔSP-Wnt8 は胚を背側化しなかった	22
3-4 免疫組織化学的染色の前のメタノール処理の有無による Wnt タンパク質の局在	23
3-5 Frzb mRNA の共注入による背側化と Wnt タンパク質の局在	24
3-6 ニワトリ Wnt3a mRNA の注入, および Frzb mRNA との共注入による背側化とタンパク質の局在	25
3-7 Wnt8-KDEL mRNA と Frzb mRNA の共注入による阻害と Wnt8-KDEL タンパク質の局在	26
3-8 Wnt mRNA 注入胚の割球解離による背側遺伝子の発現と Wnt タンパク質の局在	26
3-9 Wnt8 mRNA と Frzb mRNA を個別に注入した割球による組み合わせ胚の背側化	28
3-10 組み合わせ胚を用いたレポーターアッセイ	29
第 4 章 Wnt8 により誘導される <i>chordin</i> の発現結果と考察	30
4-1 中胚葉誘導と <i>chordin</i> の細胞自律的な発現	30
4-2 反転胚の植物極側細胞質デターミナントによる <i>chordin</i> の発現	30
4-4 Wnt タンパク質による <i>chordin</i> の発現と <i>nβ-gal</i> を用いた注入割球追跡	31
第 5 章 従来のモデルと本研究により新規に提案するモデル	33
参考文献	34
謝辞	40

图表	41
----------	----

第1章 序論

1-1 オーガナイザーの発見

オーガナイザー（形成体）の概念は、イモリを用いた移植実験により提唱された (Spemann and Mangold, 1924). 色素の量が異なる 2 種のイモリをもちいて、その初期原腸胚の原口背唇部を切り取り、宿主となる別の初期胚へ移植すると、もう一つの体軸が形成された. この二次胚の組織は大部分が宿主由来であったことから、この原口背唇部は、本来体軸を形成する運命にない細胞群へ作用することによって、正常な体軸と同等の体軸形成を導くという意味を込めて「形成体：オーガナイザー」と命名された.

その後 90 年間にわたり、オーガナイザー研究は盛んに行われ、マウス、ニワトリやゼブラフィッシュなど他の脊椎動物にも、二次軸を誘導する能力を持つ領域があることが発見された (Lemaire and Kodjabachian, 1996; Shih and Fraser, 1996). オーガナイザー形成機序の形態学的、分子生物学的な知見の大半は、ツメガエル (*Xenopus laevis*) を実験材料に用いた研究により報告されている.

1-2 オーガナイザーの形成

1-2-1 受精による卵の表層回転

ツメガエル卵には、未受精卵の状態では卵黄顆粒が少ない動物極側と大きな卵黄顆粒に富む植物極側との動植物軸がある. また、卵は表層、

滑り層と内部細胞質塊の 3 つに分けられる。卵は精子の侵入により表層直下の微小管の配列が形成され、侵入点と動植物軸をとる面を中心に、表層が精子侵入点側では植物極側へ、その反対側では動物極へ向かって上昇する。この受精に伴い起こる現象によって、将来の背腹が決定されることが分かっている (Gerhart *et al.*, 1989)。

1-2-2 中胚葉誘導説を支持する実験的根拠

① Nieuwkoop (1973) は初期胚の動物極側の予定外胚葉を植物極側の予定内胚葉と組み合わせて培養すると、予定外胚葉が中胚葉へと分化したことから、植物極側内胚葉から動物極側内胚葉への何らかの誘導が行われていると報告した。

② Dale ら (1987) は、もっと早い卵割期の 32 細胞期の胚を用いた組み合わせ実験を行っている。32 細胞期の胚は、理想的に動物極から植物極へ A 段から D 段までの 4 段に分かれており、最も背側の割球を 1、最も腹側割球を 4 と呼びそれぞれの割球が識別できる。Dale らはこの動物極側の A 段と、植物極側 D 段の背側から腹側のそれぞれ一割球とを組み合わせ培養したところ、最も背側の植物極側割球との組み合わせからは、77% で背側中胚葉が形成され、最も腹側の植物極側割球との組み合わせからは、84% で中間から腹側の中胚葉が形成された。このことから、腹側の植物極側組織は腹側中胚葉を、背側植物極側の組織は将来オーガナイザーとなる背側中胚葉を誘導すること、つまり、中胚葉誘導の因子には背腹の質的な差があることが示された。

③ 中村ら (1970) は、卵割期の様々なステージで C1 割球または C1 割球由来の領域を単離培養後、どの組織へと分化したのかを報告している。32 細胞期で単離した場合、中胚葉組織へはほとんど分化しないが

128 細胞期以降の単離では、そのほとんどが脊索や筋節などに分化していることが報告されている。

これらの実験により、外胚葉予定領域が内胚葉との接触によって、実験的な系において中胚葉になりうることを、さらに、オーガナイザー領域の細胞が自律的に中胚葉組織へ分化する能力を獲得するのは 128 細胞期以降であることから、正常発生でも、オーガナイザー形成は卵割期の植物極内胚葉からの連続的な細胞間相互作用、つまり、誘導によってできると思われた。ツメガエル胚におけるオーガナイザーの形成メカニズムにおいて、この「中胚葉誘導」仮説は、従来より、主流を占めてきた (Gimlich and Gerhart, 1984; Slack, 2012; Smith, 1993)。しかしながら、次節に述べる様に中胚葉誘導によってではなく、卵細胞内に最初から存在する因子（細胞質デターミナント）によってオーガナイザーが形成されるというアイデアもまた提出されている。

1-2-3 植物極側背側決定デターミナントによる自律的形成を支持する実験的根拠

- ① 影浦 (1990) は、32 細胞期の胚を用いて 1 個の割球を別の胚の同じ段と腹側割球と入れ替えて発生させたときの二次軸形成能を確認している。二次軸形成能は植物極背側赤道にある予定オーガナイザー領域 C1 割球で 96% と最も高く、背側植物極側の割球 D1 からの働きかけがなくても、すでに 32 細胞期にはオーガナイザー形成能は確立されている事が示された。
- ② Lemaire ら (1994) は、正常胚を 32 細胞期から継続して解離させ、

その後オーガナイザー関連遺伝子である *gooseoid* の発現を解析したところ、解離された細胞（細胞間相互作用を無くした細胞つまり、植物極側割球からの誘導を受けない場合）でも、*gooseoid* 発現することを報告している。

③ 長野ら（2000）は、32 細胞期の割球を、D 段と ABC 段をそれぞれ背腹に分けて培養し、その後オーガナイザーで発現することが知られている *siamois* と *chordin* の発現を解析したところ、背側の割球は単独でもそれら背側遺伝子が発現することを報告した。また、植物極側細胞の D 段細胞も背側遺伝子が発現していることから、元々この部分にもオーガナイザーの一部が含まれているのではないかという事が示された。さらに、32 細胞期の背側細胞 D1 割球を腹側の割球を D4 の位置に移植し、その後様々な時期で移植部位の上部のみを切り出し培養を行っている。この実験で、どの時期に切り出した外食体からどのような組織が出来ているかを調べ、自律的に発現した背側遺伝子による背側構造の誘導が起こる時期を調べている。その結果、切り出し時期が移植後 5 時間から 5.5 時間以上の時期（MBT; Midblastula transition, 卵割期が終わり、接合子由来の遺伝子の転写が開始される時期にあたる）以降に切り出した外植体では体節や胴尾などの背側構造が誘導されていることを報告している。このことから、オーガナイザーとなる領域の細胞は MBT 以降に自律的に背側化することが示唆された。

④ 勝本ら（2004）は、オーガナイザーの形成、つまり背側構造・体軸の形成には何が必要かを検討している。1 細胞期の表層回転が起こる前に植物極側を取り除き、20-40% 取り除いた原腸陥入はするが体軸を持たない卵片 GNE (gastrulating nonaxial embryo) と、60% 以上と大きく取り除いた原腸陥入をしない永久胞胚となる卵

片 PBE (permanent blastula-type embryo) とを作製し実験を行っている。これらの卵片の母性由来中胚葉因子である VegT mRNA の発現を解析したところ、正常胚で植物極から動物極にかけて勾配をもって局在する VegT mRNA は、植物極側を 60% 以上切除した PBE ではほぼ発現していないことが報告された。この PBE に、1 細胞期の背側デターミナントを含むと考えられる最も植物極にある細胞質と、オーガナイザーが出来る領域（帯域）の細胞質を抜き取り、少し位置をずらして注入することで、頭部に特徴する目やセメント線、胴尾構造を持つ体軸が形成された。また同様に、中胚葉因子である VegT mRNA を PBE に注入し、勾配を形成させ、さらに背側デターミナントを代替すると考えられている Wnt8 mRNA と VegT mRNA を共注入すると、体軸が形成されることを報告している。

これらの実験は、次のようにまとめることができる。

- 予定オーガナイザー領域の細胞はその背側化に下方からのシグナルを必要としない (Kageura, 1990).
- 割球解離によって細胞間相互作用をなくしてもオーガナイザー遺伝子は発現する (Lemeire and Gurdon, 1994).
- オーガナイザーとなる領域の細胞は MBT 以降に自律的に背側化し、オーガナイザーの細胞になる (Nagano *et al*, 2000).
- 体軸の形成には細胞質デターミナントの帯域への移動が必要である (Katsumoto *et al*, 2004).

そこで、坂井らは、受精卵の植物極にある背側デターミナントが表層回転によって一方向に運ばれ、VegT mRNA (母性由来中胚葉因子) の適切な濃度の領域（帯域）と混ざり合ったところでオーガナイザーが形成される

というモデルを提出している (Sakai, 1996; Katsumoto *et al.*, 2004; Sakai, 2008). ここでは, オーガナイザー領域の細胞が, 卵割期の終わり (MBT) 以降に背側の植物極側割球が単独で背側遺伝子を発現し, オーガナイザーは細胞内の因子によって自律的に形成されると主張している.

1-3 Wnt/ β -catenin 経路と Wnt 作用に関する一般的なモデル

前述した細胞質デターミナントによる背側形成モデルは, 分子レベルでは次のように説明される. デターミナントによるオーガナイザー形成には分子レベルで Early Wnt 経路が重要な役割を果たす (Moon, 2005a; Moon, 2005b). 従来, Wnt は分泌性因子で, Wnt タンパク質はいったん細胞外へ放出され, 細胞表面にある Frizzled-LRP 複合体と結合して機能すると考えられてきた. このモデルは, Wnt タンパク質が細胞表面に局在することにより支持されてきたが, その観察は Wnt が背側化に働くと考えられる時期より遅い時期 (原腸陥入の直前) に行われている (Yang-Snyder *et al.*, 1996). そこで, 本研究では Wnt が背側化に働く時期, つまりは背側化が起こると予想される卵割期の終わり, 4000 細胞期 (MBT) に Wnt タンパク質の細胞内の局在を観察することとした.

1-4 Wnt8 mRNA 注入によって形成される二次軸

これまでに背側デターミナントの正体に迫る研究は多く行われ, その候補として β -catenin (Rowning *et al.*, 1997; Larabell *et al.*, 1997), Wnt11 (Tao *et al.*, 2005), Dishevelled (Itoh *et al.*, 2005) などが挙げられているが, いずれにおいても決定的な実験的根拠は示されておらず, その正体はいまだわかっていない. ツメガエルの Wnt8 はその mRNA を胚の腹

側帯域に注入すると、ほぼ完全な二次軸を形成することや (Smith and Harland, 1992; Christian *et al.*, 1992), β -catenin の上流で働くことから (Heasman *et al.*, 1994; Moon, 2005a; Moon, 2005b) 背側デターミナントを代替して働いていると考えられる。正常胚において、Wnt8 はオーガナイザー領域を除く帯域 (つまり、腹側および側方帯域) で発現しており (Christian *et al.*, 1991), また母性由来の発現ではないことから、これが背側デターミナントであるとは考えにくい。しかし、これに似た何かの因子が背側化のカスケードにおいて働く可能性はおおいにありそうなことであり、その作用機序を知ることはゼノパスの初期発生メカニズムを解明する上で有用であると考えられる。

1-5 PBE を用いた実験系

本研究では、ツメガエル受精卵の植物極側を表面積比で 60% 以上除去することにより得た、体軸形成、背側遺伝子の発現をしない卵片である PBE (Permanent Blastula-type Embryo) をレシピエントとして様々な mRNA の注入実験を行った。この卵片はオリジナルな実験系であり、PBE はそれ自体、背側遺伝子、中胚葉遺伝子を全く発現しないので (Katsumoto *et al.*, 2004; Fujii *et al.*, 2002; Fujii *et al.*, 2008), 正常胚やアニマルキャップを用いた実験系と比べて遺伝子発現を解析するとき、検出された背側遺伝子発現が、注入された因子由来であることが確実に示される。また、PBE は、大きな卵黄顆粒を含まないため、共焦点レーザー顕微鏡による細胞内のタンパク質の観察が容易である。

1-6 研究の目的

ツメガエルの Wnt8 を含む、Wnt ファミリーはシグナルペプチドを持つ分泌性のタンパク質で、線虫からヒトの生物界全体で非常に広く存在し、胚発生、器官再生、幹細胞の増殖や発がんなど様々な生物学的な過程において重要な役割を担うシグナル伝達のプレーヤーとして働く。従来、Wnt タンパク質は細胞外に分泌され、細胞表面の Frizzled-LRP 複合体と結合し機能すると考えられてきた (Moon, 2005a; Moon, 2005b)。ゼノパス胚においても Wnt8 タンパク質が細胞表面に局在することが報告されている (Yang-Snyder *et al.*, 1994)。一方で、オーガナイザー形成が細胞間相互作用を必要としない報告 (Lemaire and Gurdon, 1994; Nagano *et al.*, 2000) があることから、細胞表面 (細胞間) での Wnt シグナリングというアイディアには深刻な疑問が投げかけられる。

坂井らはこれまでに細胞質背側デターミナントによる細胞自律的なオーガナイザーの形成をツメガエル *Xenopus laevis* (Sakai, 1996; Nagano *et al.*, 2000; Katsumoto *et al.*, 2004; Sakai, 2008) とイモリ *Cynops pyrrhogaster* (Doi *et al.*, 2000) で報告しており、この背側デターミナントを代替して働くと考えられる Wnt8 タンパク質が分泌されて細胞間相互作用によって働く、つまりオーガナイザーが誘導により形成されるという従来のモデルは、坂井らが提出してきたモデルと大きく異なる。Wnt8 が背側デターミナントと同じような性質を持っていると仮定すると、これが存在する細胞の隣の細胞に誘導的作用を及ぼすと考えることは、これまでの Wnt について考えられてきた作用機序から考えると問題ないが、背側デターミナントが細胞内で働くというアイディアとは矛盾する。

そこで、本研究では Wnt8 タンパク質が細胞のどこで働いているのかを調べた。これまでも、いくつかの報告で Wnt タンパク質の局在は調べられているが (Yang-Snyder *et al.*, 1996)、その時期は後期胞胚期であり、Wnt が働き始めると予想される時期 (MBT; 4000 細胞期) よりもか

なり遅いため、その局在が必ずしも Wnt タンパク質が働いている場所を示してはいないのではないかと考えられる。そこで、本研究では Wnt タンパク質の観察を MBT (4000 細胞期) におこなった。更には、Wnt8 に小胞体貯留シグナル KDEL を付加した mRNA コンストラクト作製し、細胞外に分泌できないフォームにした際の Wnt8 の背側化能力を確認した。また、Wnt の阻害因子である Frzb (Leyns *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997) をもちいて、背側化を阻害した際の Wnt タンパク質と Frzb タンパク質の局在も調べた。

1-6 本論文の概要

本論文では、ツメガエルの初期胚に様々な Wnt mRNA と注入割球トレーサー (lineage tracer) を注入し、Wnt タンパク質の細胞内局在を調べた。さらに、Wnt8 タンパク質による背側化が、mRNA 注入細胞でのみ起こっているのかを調べる為にオーガナイザーから分泌される神経誘導因子 *chordin* の発現を whole mount *in situ* hybridization により検出した。本研究では、これらの実験により Wnt タンパク質が、従来より考えられている細胞外ではなく、細胞内で働いている実験的証拠を示した。

第 1 章では、既に報告された研究、ツメガエル初期胚の背側化、canonical Wnt/ β -catenin 経路と本研究の内容について概説した。これまでに坂井らは、オーガナイザーは細胞質デターミナントによって細胞自律的に形成されることを提唱してきた。Wnt8 は β -catenin の上流で働くことから細胞質背側決定デターミナントを代替すると考えられている。一方、従来より Wnt タンパク質は細胞表面で働くと考えられてきた。しかしながら、Wnt8 が背側デターミナントの代替となるのならば、Wnt8 タンパク質

は細胞内で自律的に働いているという仮説が正しいのではないかと考えた。

第 2 章では、方法と材料について詳細に記述した。

第 3 章では、mRNA 注入胚の背側化、遺伝子発現と Wnt タンパク質の局在の結果について説明した。Wnt8 タンパク質は Wnt8 mRNA が注入された細胞の小胞体に局在することが分かった。また、小胞体貯留型 Wnt8 (Wnt8-KDEL) でも背側化を誘導することが出来ることが分かった。更には、阻害因子 Frzb によって背側化を阻害されたとき、Wnt8 タンパク質は細胞の周辺に局在していることが分かった。その他のコンストラクト注入による結果を詳細に説明し、考察した。

第 4 章では、Wnt8 mRNA 注入胚の *chordin* の発現について記述した。正常胚もしくは体軸を形成しない卵片に Wnt8 mRNA とトレーサーとして n β -gal mRNA を共注入し、lacZ と *chordin* の発現を調べた。*chordin* は、ほとんどの細胞で mRNA 注入細胞を示す lacZ の発現細胞と一致していたが、完全に重なる場合と、狭い範囲ではあるが注入領域の隣の領域（細胞）にも発現する場合とがあった。この結果により、Wnt8 タンパク質が mRNA が注入された細胞とその周囲の細胞でも背側化に働き *chordin* の発現を誘導していることが分かった。Wnt8 が細胞自律的に *chordin* の発現を誘導しているかは更なる検証が必要であることが示唆された。

第 5 章では、上記の Wnt タンパク質の局在と *chordin* の発現結果に基づき、本論文で提案するモデルと従来のモデルとを比較した。Wnt8 タンパク質は小胞体でレセプターと結合することによって細胞内で背側化の

シグナルを核へ伝えるモデルを提案した.

第2章 材料と方法

2-1 卵の準備

ツメガエル (*Xenopus levis*) は静岡県浜松市の浜松生物教材より購入後, 18°Cで飼育した. 産卵させる前日に, 動物用胎盤性性腺刺激ホルモンゴナトロピン (あすか製薬, 日本) を 250 単位皮下注射し, 卵を準備した.

2-2 胚の培養液

本研究でのほぼ全ての培養は 10% Modified Steinberg's solution (MS)で行った. 100% MS の組成は 58.2 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 0.34 mM Ca (NO₃)₂, 0.83 mM MgSO₄, 3.0 mM Hepes-NaOH buffer , pH7.4.

2-3 精子の準備

雄のツメガエルをクラッシュアイスの中に 30 分ほど入れ仮眠させた. 十分に眠った事を確認してから氷上で解剖し, 精巣を切り出した. 摘出後は速やかに良く冷えた 190% MS (+ 50 mg/l gentamicin) に入れ, 顕微鏡下でピンセットを用いて精巣表面の血管からなるべく血液を抜き, その後 4°Cで保存, 毎日培養液を交換し 2-3 週間までを目安に媒精に用いた.

2-4 人工授精とゼリー層の除去

ケースに少し卵がこぼれ始めたメスカエルの体を軽く拭いた後、腹部を軽く押し、シャーレに適量を産卵させた。精巣をクラフトナイフで少量切り出し、190% MS 中でピンセットを用いて手早く良くつぶし、精子懸濁液を準備した。精子懸濁液に 10% MS を適量加え、それをピペットで卵にかけてながらシャーレの底に均一になるように丁寧にひろげ、その 2-5 分後 10% MS でシャーレをすこしずつ満たし受精させた。卵は精子懸濁液をかけた 20-25 分後、1% チオグリコール酸ナトリウム (pH9-10) で卵のゼリー層を除去し、10% MS で 3 回洗った。

2-5 植物極側切除胚の作成

卵黄膜はピンセットで除去した。剥皮した胚は、垂直軸（動植軸）に 90° 傾け、ガラス棒（直径 300-350 μm 、長さ 2 cm）を動物極側と植物極側とを分けるようにおいた。胚はガラス棒の自重でゆっくりと分離され、両卵片が完全に分離した後、それぞれの卵片の長短軸の長さを測り、その表面積を計算した。PBE においては植物極側を 60% 以上切除したものを、採用した。除去率の計算式は以下の通りである。

$$\text{除去率 (\%)} = 100 (Vl \times Vs) / (Al \times As) + (Vl \times Vs)$$

植物極側組織の長径 : Vl, 植物極側組織の短径 : Vs, 動物極側組織の長径 : Al, 動物極側組織の短径 : As

全ての操作は、底を 2% 寒天 (10% MS で溶解) で覆ったプラス

ティックディッシュに 10% MS (+ 50 mg/l gentamycin) を満たした中で行った。卵片の作成は媒精時を 0 とし、第一卵割を 1 としたタイムスケールで 0.2 から 0.5 の間に細胞質の除去を行った。

2-5 プラスミドと mRNA 合成

プラスミドと mRNA 合成については、成田知弘博士 (元川崎医科大学) に下記の条件で合成を依頼し、これを実験に用いた。

Xwnt8-HA は、cDNA に HA エピトープタグ配列 (5'-tatccatac gatgtaccagattacgca-3'; YPYDVPDYA) を、Christian ら (1993) によって報告された myc エピトープタグと同じ位置に挿入し、PCR を用いて合成した。cDNA は PCS2+ にサブクローニングした。

Xwnt8-HA-KDEL は、PCR を用いて合成した。cDNA は、C 末端にスペーサー配列 (5'-agatcgtacaag-3'; RSYK) および KDEL 配列 (5'-aaggacgagctg-3') を付加し、pCS2+ にサブクローニングした。シグナルペプチド (2nd-QNTTLFILATLLIFCPFFTASA-23th a.a.) を欠損させた Δ SP-Xwnt8-HA は、インバース PCR 法を用いて合成した。mRNA のキャッピングは mMessage mMachine SP6 kit (AM1340; Ambion, USA) を用いて合成した。

2-6 マイクロインジェクション

マイクロピペットはガラスキャピラリー管を一度手で引いたのち、再度プーラーで引いた。インジェクション針は、マイクロマニピレータに固定した。マイクロインジェクションは、ポリエチレンチューブでツベルクリンシリンジにつなぎ、シリンジによる空気圧を利用して行った。免

疫染色においては、4-8 細胞期の PBE の一つの割球に、mRNA を注入した。注入した mRNA は、Xwnt8-HA mRNA (250 pg), Xwnt8-HA-KDEL mRNA (250 pg), cWnt3a1-HA mRNA (250pg), cWnt3a2-HA mRNA (250pg) と VegT mRNA (15 pg) である。注入時に、lineage tracer として 0.1% Dextran, Alexa Fluor® 647; 10,000 MW, Anionic, Fixable (Invitrogen, USA) を共注入した。組織化学的染色と whole mount *in situ* hybridization においては、16-32 細胞期の胚に Xwnt8 mRNA を 5 pg と、トレーサーとして核局在型 β -galactosidase (n β -gal) mRNA を 100 pg 注入した。

2-7 RT-PCR

Stage 10.5 (室温 20°Cにおいて原腸陥入が始まってから 30 分後) の PBE3 個から、total RNA を SV total RNA Isolation System (Promega Corpolution, USA) を用いて抽出した。Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare UK Ltd., England) を用いて total RNA 3.1 μ g から cDNA を作製した。それぞれの PCR は、cDNA 1 μ l に対して Takara Taq (TAKARA BIO, 日本) を 0.25 units 用い、primer をそれぞれ 10 μ M, 2.5 mM dNTPs を PCR Buffer にくわえ全量 10 μ l にした。PCR primer は

ODC upstream : 5'-GCAAAGCCATTGTGAAGACTCTCTCCATTC-3'

ODC downstream : 5'-AAGCTTTGCATTCGGGTGATTCCTTGCCAC-3'

siamois upstream : 5'-AGACATGACCTATGAGGCTG-3'

siamois downstream : 5'-AGTCAGTTTGGGTAGGGTAGG-3'

Xnr3 upstream : 5'-TAATCTGTTGTGCCGATCCA-3'

Xnr3 downstream : 5'-ATCAATGTTGCCCTTTTCA-3'

解離温度は 95°C, アニーリング温度は *ODC* は 65°C, *siamois* と *Xnr3* は 58°C とし, 伸長反応温度 72°C で各 30 秒行った. PCR 後, 6% アクリルアミドゲルで泳動し, 撮影した.

2-8 免疫組織化学的方法によるタンパク質の検出

4000 細胞期の間期と思われる時期に MEMPFA (0.1 M MOPS (pH7.4), 2.0 mM EGTA, 1.0 mM MgSO₄, 4% paraformaldehyde) で固定後 100% メタノールで保存した. PBE は OTC compound (ファインテックジャパン, 日本) に包埋しクリオスタットを用いて厚さ 8 μm に薄切後, スーパーフロストスライドガラス (松浪硝子工業, 日本) に張りつけた. 切片は 1% skim milk/ PBS で 1 時間処理した後, 一次抗体 Rat anti-HA antibody (11-867-423-001; Roche, Germany), Mouse anti-PDI antibody (ab12225; abcam, UK) を 4°C, 1 晩反応させた. 二次抗体 Anti-Rat IgG Alexa 448 antibody (A21208; Invitrogen, USA), Anti-Mouse IgG Alexa 594 antibody (A11032; Invitrogen, USA) を室温, 2 時間で反応させた. 観察は, 共焦点レーザー顕微鏡 (Leica, TCS SP2; Nikon, A1) で行った.

2-9 組織化学的染色と whole mount *in situ* hybridization

実験胚は stage 9 になったところで MEMPFA で室温, 30 分間固定した. その後, PBS で 3 回洗い, staining solution (0.1M PO₄²⁻ buffer (pH 6.3), 20 mM K₃Fe (CN)₆, 20 mM K₄Fe (CN)₆, 2 mM NaCl₂, 1 mg/ml X-gal, 0.02% Nonidet P-40) 中で, 4°C, 一晩反応させた. 再度 MEMPFA で室温, 2 時処理し酵素反応を止めて, whole mount *in situ* hybridization までに -20°C, 100% メタノール中で保存した.

whole mount *in situ* hybridization は Sive *et al.* (2000) を一部変更した条件で行った.

2-10 割球解離実験

4細胞期にmRNAを注入したPBEを8細胞期または512細胞期以降の様々なタイミングで解離液modified low Ca Stearn's solution (74.6 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 0.63 mM Na²HPO₄, 0.14 mM KH₂PO₄, 1.9 mM Na₂SO₄, 0.5 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 0.1% bovine serum albumin (BSA), 0.1% dimethyl sulfoxide, pH 8.3) に浸し, 解離させた. その後4000細胞期で免疫染色を, stage 10.5でRT-PCRを行った.

2-11 Wnt/Frzb 注入割球の組み合わせ胚作成

4細胞期の2つのPBEにそれぞれWnt8 mRNAとFrzbのmRNAを注入し, 解離液で割球を解離した. 別々のコンストラクトを注入した2種類の細胞を組み合わせた後, 10% MSの培養液に置換し, 細胞を結合させた. 培養液は水流が胚にあたらない様に少しずつ十分な時間をかけて置換した.

第3章 様々な mRNA 注入による背側化と Wnt タンパク質の局在の結果と考察

3-1 Wnt8 mRNA の注入による背側化と Wnt8 タンパク質の局在

Wnt8 による背側化を確認する為に 4-8 細胞期の PBE (permanent blastula type embryos; 受精後表層回転が起こる前に, 背側デターミナントと maternal 中胚葉因子の VegT を多く含む植物極側を切り取った胚) の一割球へ, Wnt8-HA mRNA, VegT mRNA, lineage tracer としての Alexa Fluor 647 dextran を注入した (図 1-A). この注入胚は神経胚期 (stage 17) において突起 (proboscis) を形成しており (図 1-B), 原腸胚期 (stage 10.5) において背側中胚葉遺伝子の *siamois* や *Xnr3* を発現していた (図 1-C). PBE そのもの, もしくは Wnt8 mRNA, VegT mRNA 単独の注入では突起の形成は見られず, 背側中胚葉遺伝子の発現も無いため, PBE の背側化には中胚葉因子の VegT mRNA と Wnt8 mRNA の共注入が必要であることが分かった (図 1-B, C).

つぎに, Wnt タンパク質が背側化に働くと予想される 4000 細胞期に固定し, 免疫染色後, 共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ, 観察胚全てにおいて Wnt8-HA タンパク質は Alexa Fluor647 dextran で示される mRNA の注入領域とよく一致し, 非注入領域の細胞にはまったく発現していないかった (図 1-D). このことは, 注入された Wnt8-HA mRNA 由来の Wnt タンパク質が mRNA 注入細胞でのみ存在している事を示している.

Wnt8-HA タンパク質の局在を示す蛍光は細胞内で核の周辺に強く, 細胞内で網目状に分布しており, 小胞体に特異的なタンパク質 PDI (protein disulfide isomerase) の分布と良く一致していた (図 1-E). この結果により Wnt8 タンパク質が背側化に働くのは, 細胞外ではなく細胞内

であることが示唆された。しかしながら、これらの結果は、これまでに報告されている細胞表面に Wnt タンパク質が局在しているというこれまでの報告 (Yang-Snyder *et al.*, 1996) と大きく異なった。Yang-Snyder らによる実験では、正常胚のアニマルキャップを用いて stage 9 (後期胞胚) で観察していることから、内在性の Wnt 阻害因子 Frzb の影響、もしくは実際に Wnt8 タンパク質が背側化に作用していない時期の局在を見ている可能性がある。

3-2 Wnt8-KDEL mRNA の注入による背側化と Wnt8-KDEL タンパク質の局在

小胞体貯留シグナル KDEL を付加したコンストラクト (Wnt8-HA-KDEL) を作製し、細胞内に留まるようにした Wnt8 の背側化能力やタンパク質の局在を調べた。Wnt8-HA-KDEL mRNA と VegT mRNA の共注入により、胚は Wnt8 mRNA を注入時と同様の突起を形成し、*siamois* と *Xnr3* を発現した (図 2-A, B)。さらに、Wnt8-KDEL タンパク質の局在も、PDI タンパク質の局在と良く一致していた (図 2-C)。KDEL によって小胞体に留められた Wnt8 タンパク質によって背側化が起こったことは、Wnt8 タンパク質が細胞表面ではなく、細胞内で働いていることを強く示唆した。

3-3 Δ SP-Wnt8 は胚を背側化しなかった

さらに、細胞外に分泌するためのシグナルペプチドを欠損させた Wnt8 mRNA (Δ SP-Wnt8 mRNA) コンストラクトを作製し、PBE へ注入した。この Wnt8 タンパク質は細胞外への分泌に必要なシグナルペプチドを

持たないため、合成後小胞体へと局在せず細胞質にとどまることから、背側化は起こらないと予想された。

Δ SP-Wnt8 mRNA を注入したところ、胚は突起を形成せず（図 3-A）、背側遺伝子の発現もない（図 3-B）ことから背側化能がないことが分かった。また、 Δ SP-Wnt8 タンパク質は PDI タンパク質で示される小胞体の局在とは一致せず、注入細胞の細胞質に局在した（図 3-C）。 Δ SP-Wnt8 タンパク質は水溶性であるデキストラン(lineage tracer)と同様の局在を示し、核と細胞質に局在することが分かった。このことから、シグナルペプチドが欠損していることで、細胞内輸送の経路に乗れず、つまりは小胞体に局在できないことから、背側化が起こらなかったと考えられる。この結果により、胚の背側化には Wnt8 タンパク質の小胞体への局在が重要であることが示唆された。

3-4 免疫組織化学的染色の前のメタノール処理の有無による Wnt タンパク質の局在

本研究での実験サンプルは固定後一晩以上もしくは、免疫染色を行うまでの期間、100% メタノール中、 -20°C で保存した。Wnt タンパク質が主に細胞膜に局在しているとする過去の報告では、免疫染色を行う際に固定後メタノールで処理しておらず（Yang-Snyder *et al.*, 1996）、これは本研究のプロトコルと異なる。このことから、過去の報告では細胞膜の透過処理（permeabilization）が十分でなく、小胞体に局在する Wnt タンパク質を特異的に検出できていなかったのではないかと考えられた。そこで、固定後メタノールで処理をせずに免疫染色を行った結果、Wnt8 タンパク質は主に細胞の表面（細胞と細胞の境界）で検出された。これまでに得られた細胞内の強い染色はなく、その蛍光はかなり弱く検出された（図 4-A、

B). さらに、トレーサーによって示される mRNA が注入された細胞のみならず、その隣の非注入細胞表面にも Wnt8 タンパク質が局在していることが分かった。次に、Wnt8-KDEL タンパク質についても同様にメタノール処理を行わず検出したところ、Wnt8-KDEL タンパク質は細胞内に局在し、細胞の表面には検出されなかった (図 4-C, D)。

これらの透過処理の有無による免疫組織化学的実験の結果から、Wnt8 タンパク質は小胞体と細胞表面の両方に局在することが明らかとなった。しかしながら、背側化能をもつ Wnt8-KDEL は細胞表面には検出されなかったことから、Wnt8-KDEL タンパク質は細胞外に分泌されず、細胞内とどまり、背側化を引き起こしていること、つまりは細胞表面に局在する Wnt8 タンパク質は背側化には働いていないことが強く示唆された。

3-5 Frzb mRNA の共注入による背側化と Wnt タンパク質の局在

Wnt8 mRNA は Frzb mRNA との共注入によってその背側化が阻害されることがわかっている (Lyns *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997)。そこで Wnt8 の背側化が阻害されたときのタンパク質の局在を調べた。その結果、背側化は阻害され PBE に突起は形成されず (図 5-A), *siamois*, *Xnr3* の発現もなかった (図 5-B)。このとき、Wnt8 タンパク質の染色は非常に弱く、PDI で示される小胞体とも局在が一致しないことから、主に細胞の周辺に局在していると考えられた (図 5-C)。また、Alexa Fluor647 dextran で示される mRNA 注入領域外の細胞表面にも Wnt8 タンパク質は局在していた (図 5-D)。そこで、Frzb タンパク質の局在を検出したところ、同様に mRNA 注入領域とその外にも広い範囲で局在していることが分かった (図 5-E)。Frzb は Wnt に比べ拡散性が高く、Wnt の局在は Frzb の共局在に

よりその拡散領域を拡大すること (Mii and Taira, 2009; Mii and Taira, 2011), また Wnt と分泌型 Frizzled 関連タンパク質 (sFRPs) ファミリーである Frzb は結合特異性が高いことも報告されている (Shibata *et al.*, 2005).

このことから、分泌性のタンパク質である Frzb によって Wnt8 もまた細胞外に輸送され、連れ出されていることが考えられた。即ち、Frzb は Wnt8 の小胞体での局在を阻害することによって、背側化を阻害するものと考えられる。

(注) この実験で用いる PBE は背側の遺伝子を発現せず、注入 mRNA 由来の発現とそれによって引き起こされるカスケードを確認する事ができる。そのため、本実験で得られたタンパク質の局在や遺伝子発現は注入 mRNA 由来のものであり、内在性の Wnt8 や Frzb によるものということは否定される。

3-6 ニワトリ Wnt3a mRNA の注入、および Frzb mRNA との共注入による背側化とタンパク質の局在

Wnt mRNA として、ゼノパスでよく知られた背側化因子の Wnt8 以外に、二つのスプライシングバリエントがあるニワトリ Wnt3a (cWnt3a) を用いた。cWnt3a には C 末端にシグナルペプチドをもち背側化能のある cWnt3a2 と、シグナルペプチドを持たず胚を背側化しない cWnt3a1 がある (Narita *et al.*, 2007)。これらについても同様に実験、細胞内局在からその働きかたについて検討した。

cWnt3a2 mRNA の注入によっても PBE は背側化 (図 6-A,B) し、その時の cWnt3a2 タンパク質は、ゼノパス Wnt8 タンパク質と同様に小胞

体に局在した (図 6-C). 一方で, cWnt3a2 mRNA は Frzb mRNA の共注入によって背側化を阻害されず, このときの cWnt3a2 タンパク質は細胞内の小胞体に局在しており, cWnt3a2 の局在は Frzb によって変更されないことが分かった (図 6-E). 一方, cWnt3a1 タンパク質は小胞体ではなく, ゼノパス Δ SP-Wnt8 と同様に細胞質と核に分布していた (図 6-D: ゼノパス Δ SP-Wnt8 については図 3-C を参照). cWnt3a を用いた実験からも小胞体内に Wnt タンパク質があることが背側化に重要であることが示唆された.

3-7 Wnt8-KDEL mRNA と Frzb mRNA の共注入による阻害と Wnt8-KDEL タンパク質の局在

小胞体に留まる Wnt8-HA-KDEL によっても背側化が起きたことは, Wnt が細胞の外ではなく細胞内で働いていること強く示唆した. そこで次に, Wnt8-HA-KDEL mRNA と Frzb mRNA を共注入した. この実験では, Wnt8 は KDEL によって小胞体内に強制的にとどめられることから, Frzb によっても背側化は阻害されないと予想した. しかし結果は, 胚は突起を形成せず, 背側遺伝子の発現も確認できなかった (図 7-A, B). しかし, この時の Wnt8-KDEL タンパク質は細胞内の小胞体に局在していた. そこで, Frzb タンパク質の分布も見ると, Wnt8-KDEL タンパク質と共に小胞体に局在していた (図 7-C). このことから, Frzb は Wnt8 と共局在することでその背側化が阻害され, Wnt8 の局在を細胞の外へ変更させずとも, 細胞内でその働きを阻害していることが分かった. このことから, Wnt は細胞内で背側化に働いていることが強く示された.

3-8 Wnt mRNA 注入胚の割球解離による背側遺伝子の発現と Wnt タンパク

質の局在

これまでに得られた結果より, Wnt8 が細胞内で自立的に背側化に働いている事が強く示唆された. そこで, Wnt mRNA 注入胚の割球を解離することにより細胞間相互作用をなくす実験を行った.

その結果, Wnt8 による背側化 (*siamois*, *Xnr3* の発現) が, 正常胚を解離した場合 (図 8-A レーン 2) と, β -catenin 注入胚を解離した場合 (図 8-A 4 レーン) で発現しているものの, Wnt8 mRNA と VegT mRNA を共注入した胚と cWnt3a2 mRNA と VegT mRNA を共注入した胚は割球解離により, その発現が完全に阻害されることが分かった (図 8-A レーン 6 と 8). 正常胚や β -catenin mRNA を注入した PBE を解離しても背側遺伝子発現は全く阻害されなかったことから, Wnt 注入胚の細胞解離での背側遺伝子発現の阻害は, 非特異的な阻害ではないと考えられた. また, 継続的な解離胚と 1000 細胞期から一時間のみの解離した胚の Wnt8 タンパク質の局在を調べたところ, 一時間解離した胚は Wnt8 タンパク質が細胞の中にいくらか局在しているものの細胞周辺に大きい粒状に局在していることが分かった (図 9-C). また, このときの背側遺伝子も発現していないことから, 短時間の解離でも背側化が阻害されていることが分かった (図 9-B). 8 細胞期から継続的に解離した胚 (細胞) の Wnt8 タンパク質は検出できなかった (data not shown). しかしそれは, 免疫組織化学の手法的な問題がある可能性があり, 再度実験検討する必要があるが, おそらく細胞内にはほとんど局在していないと予想される.

本来 Wnt は分泌性のタンパク質であり, 細胞外へと分泌される際にタンパク質の小胞輸送の経路を移動する. 解離胚の Wnt タンパク質が細胞のなかから外へと局在が変更していることから, Wnt タンパク質は細胞内 (小胞体内) にあるときに胚を背側化し, 細胞外に分泌された Wnt は背

側化には働かないのではないかと考えられた。

3-9 Wnt8 mRNA と Frzb mRNA を個別に注入した割球による組み合わせ胚の背側化

Wnt8 mRNA と隣り合う細胞に Frzb mRNA を注入することで Wnt の背側化が阻害されることが報告されており，これは，細胞外に分泌され背側化に働く Wnt を，同様に細胞外に分泌された Frzb が阻害したと考えられてきた (Wang *et al.*, 1997)．一方，本研究では，細胞外に分泌された Wnt は背側化に働かないと考えているが，過去の研究の結果は cytoplasmic bridge を介した注入 mRNA のリークによるもの (Landesman *et al.*, 2000) と考えることもできた．そこで，我々は cytoplasmic bridge によるリークを起こさない方法で Frzb による Wnt8 の阻害が起こるかを調べた．まず，先の卵割が起きた時を 0 とし次の卵割が起きるまでを 1 としたタイムスケールで，0.6 から 0.8 を Early, 0.9-1.0 を Late とし，それぞれ，隣り合った細胞に Wnt8 mRNA と Frzb mRNA を注入した．その結果，Early のタイミングでは 53% の PBE が突起を形成し背側化したのに対して，Late のタイミングでは 88% が背側化した (図 9-A)．このことから，早い段階でのインジェクションには，cytoplasmic bridge によるリークがあることを考慮しなければならないことが示された．

次に，2つの PBE にそれぞれ Wnt8 mRNA と Frzb mRNA を注入し，低 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ の解離液 (Iwao *et al.*, 2005) で割球を解離した．2種類の細胞を組み合わせた後，普通の培養液に移し，割球を結合させた (図 9-B)．この方法により，Wnt8 mRNA と Frzb mRNA 注入割球を隣り合わせで組み合わせさせた結果，胚は突起を形成し背側化した (図 9-C)．この結果も

また, Wnt が細胞内で働いていることを示した.

3-10 組み合わせ胚を用いたレポーターアッセイ

Wnt 注入細胞の隣の細胞に背側で初期に発現する遺伝子 *siamois* promoter に reporter を入れた DNA コンストラクトを注入した. 背側化が隣り合う細胞に及んでいなければ, reporter は発現しないことが予想された.

前述の組み合わせ胚の実験系を用いて Wnt8 mRNA と *siamois* の reporter DNA (-833p Sia-Luc) を同じ割球に共注入, もしくは別々の割球に注入し隣り合うように組み合わせ, これらの胚の Wnt8 によってアクチベートされる *siamois* の活性をルシフェラーゼ活性で検出した (Fan and Sokol, 1995). その結果, Wnt8 mRNA と reporter を共注入した Donor 割球を Host 細胞と組み合わせた胚 (Type B) と, 組み合わせせず同一割球に注入した胚 (Type D) に比べると, 別々の割球に注入し隣り合うように組み合わせた胚 (Type A) はルシフェラーゼ活性が著しく低いことが分かった. このことから, Wnt8 は隣り合う細胞の -833p Sia-Luc を活性化しないことが分かった (図 10). このことは, Wnt8 が mRNA 注入細胞内で自律的に背側化を引き起こしている事を明確に示している.

第4章 Wnt8 により誘導される *chordin* の発現結果と考察

4-1 中胚葉誘導と *chordin* の細胞自律的な発現

Wnt8 による背側化が、mRNA 注入細胞でのみ起こっているのかを調べる為にオーガナイザー領域から分泌される神経誘導因子 *chordin* の発現と局在を調べた (Sasai *et al.*, 1994). ゼノパスの受精卵は、植物半球の内中胚葉デターミネントと植物極の背側デターミネントの2つのデターミネントを持ち、それらは帯域で交差し、MBT 以降に細胞自律的にオーガナイザー形成を引き起こす (Nagano *et al.*, 2000; Katusmoto *et al.*, 2002; Sakai, 2008). *chordin* は MBT 以降の早い段階で、オーガナイザー領域(帯域)で発現することが報告されている (Nagano *et al.*, 2000).

4-2 反転胚の植物極側細胞質デターミネントによる *chordin* の発現

植物極側細胞質デターミネントによる自律的な *chordin* の発現を確認する実験を行った。表層回転が起こる前に受精膜を取り除き動植物極の上下を反転させて発生させた。胞胚期の反転胚は、動物極側の細胞は本来の動物極側の細胞より大きく、植物極側(上の方、白い領域)から原腸陥入が起こることが確認された(図 11-A)。正常胚と比較して反転胚の動物極側細胞は割球のサイズが著しく大きいことから、反転したことによって、植物極側から動物極側にかけて卵黄顆粒が移動していると考えられた。次に、反転させた胚の *chordin* は、どこで発現しているのかを whole mount *in situ* hybridization によって調べた。様々な角度で反転した胚は、どの胚も植物極側(上の方で白い領域)で *chordin* の発現があり (top view), 下半球と元々動物極側(色素顆粒で茶に示される)での発現は確認できな

った (bottom and inner view). その発現は反転していない胚と比べて発現領域が広く発現量は増大していた (図 11-B).

chordin はオーガナイザー領域 (帯域) で発現することが知られている. 反転することによって, 卵内のない中胚葉細胞質デターミナントの分布が変わり, 植物極半球全体がオーガナイザー領域となり *chordin* の発現領域が広がったことが考えられる (図 11-C). この結果から, デターミナントによる細胞自律的な背側化が *chordin* を発現している事が示唆された.

4-4 Wnt タンパク質による *chordin* の発現と *nβ-gal* を用いた注入割球追跡

ツメガエル胚の GNE (gastrulating nonaxial embryos; 背側デターミナントを含まず, VegT mRNA を含む帯域をもつ) を用いた. GNE は原口を形成し, 内中胚葉関連遺伝子を発現するが背側構造を形成せず, また背側遺伝子の発現もない (Sakai, 1994; Fujii *et al.*, 2002; Fujii *et al.*, 2008). GNE の 16 細胞期の一割球に Wnt8 mRNA とトレーサーとして核局在型β-galactosidase (*nβ-gal*) mRNA を共注入, または隣り合う別々の割球にそれぞれを注入し, stage9 (原腸陥入の 2 時間前) で固定し, lacZ の組織化学的染色を行った後, whole mount *in situ* hybridization によって *chordin* の発現をみた (図 12-A). 先に染色した lacZ の発現パターンを撮影し, その後 *chordin* の発現パターンと比較した.

chordin の発現は概ね Wnt8 mRNA 注入領域を示す lacZ の発現領域とよく一致していたが, 完全に重なる場合 (図 12-B) と, 注入領域に隣接した部位にも検出される場合 (図 12-C) とがあった. 完全に重なる場合は, mRNA 注入細胞を示す lacZ により赤染色で示される細胞と, whole mount *in situ* hybridization によって紫に染められた *chordin* の発現細胞

のパターンが良く一致する (図 12-B, 黒矢尻). しかし, 赤い領域で示される mRNA の注入細胞とその細胞で発現する *chordin* の発現は良く一致しているものの, 一部その周辺に弱い発現が見られる胚もあった (図 12-C, 白矢尻).

このことは, Wnt8 mRNA が注入された細胞だけでなく, その周囲の細胞でも背側化に働き *chordin* を発現していることを示している. これは, 細胞外に分泌された Wnt8 タンパク質が背側化に作用していることを否定できず, Wnt8 が細胞自律的に *chordin* を発現しているかは更なる検証が必要であることが示唆された. しかしながら, *chordin* 自身による autoregulation により, Wnt mRNA 注入領域の外にその発現が広がっている可能性があること. さらに, *chordin* の発現が始まるとごく初期は現在の whole mount *in situ* hybridization の方法では検出が難しいと考えられることから, 本実験で得られた *chordin* の発現は, おそらく Wnt による細胞の背側化によって発現した *chordin* のみを正確には捉えていない可能性がある.

第5章 従来のモデルと本研究により新規に提案するモデル

従来, Wnt は分泌性因子であり, 細胞外へ放出され, 細胞表面にある Frizzled-LRP 複合体と結合して機能すると考えられてきた (Moon, 2005a; Moon, 2005b) (図 13-A). このモデルは, Wnt タンパク質が細胞表面に局在することにより支持されてきたが, 本研究では, これを否定する結果となった. そこで, 新規の Wnt シグナリングモデルを提案する (図 13-B). 提案するモデルは, 細胞内の小胞体内にある Wnt タンパク質は同じく小胞体膜にあるレセプターと結合することにより, 細胞内で核にそのシグナルを伝える (小胞体膜の内側は, 細胞膜の外側と同等である) というモデルであり, Wnt8 タンパク質はその mRNA が注入された細胞内の小胞体に局在し, 隣り合う細胞には検出されなかったことを説明できる.

シグナルトランスダクションは多くの多細胞生物で見つかっており, 細胞間の情報伝達の方法の一つである. また, 大きな研究分野であるが, これまでに細胞内でシグナルトランスダクションが起こるというアイデアは考慮されてこなかった. 一方で, 単細胞の真核生物である酵母において, 小胞体を介したシグナリングが報告されており (Pahl, 1999), 進化の過程において保存された細胞内での細胞自律的なシグナリングは, 細胞間相互作用を介した複雑なシグナル伝達同様に, 高次に形成される胚発生の基礎を支える非常にシンプル且つ重要な伝達系であると考えられる.

参考文献

- Christian, J.L., McMahon, J.A., McMahon, A.P. and Moon, R.T. (1991): Xwnt-8, a *Xenopus* Wnt-1/int-1-related gene responsive to mesoderm-inducing growth factors, may play a role in ventral mesodermal patterning during embryogenesis. *Development* **111**, 1045-1055.
- Christian, J.L. and Moon, R.T. (1993): Interactions between Xwnt-8 and Spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of *Xenopus*. *Genes & development* **7**, 13-28.
- Christian, J.L., Olson, D.J. and Moon, R.T. (1992): Xwnt-8 modifies the character of mesoderm induced by bFGF in isolated *Xenopus* ectoderm. *The EMBO journal* **11**, 33-41.
- Dale, L. and Slack, J.M. (1987): Regional specification within the mesoderm of early embryos of *Xenopus laevis*. *Development* **100**, 279-295.
- Doi, J.Y., Niigaki, H., Sone, K., Takabatake, T., Takeshima, K., Yasui, K., Tosuji, H., Tsukahara, J. and Sakai, M. (2000): Distribution of dorsal-forming activity in precleavage embryos of the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*: effects of deletion of vegetal cytoplasm, UV irradiation, and lithium treatment. *Developmental biology* **223**, 154-168.
- Fan, M.J., Gruning, W., Walz, G. and Sokol, S.Y. (1998): Wnt signaling and transcriptional control of *Siamois* in *Xenopus* embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America **95**, 5626-5631.
- Fujii, H., Nagai, T., Shirasawa, H., Doi, J.Y., Yasui, K., Nishimatsu, S., Takeda, H. and Sakai, M. (2002): Anteroposterior patterning in *Xenopus* embryos: egg fragment assay system reveals a synergy of dorsalizing and posteriorizing embryonic domains. *Developmental biology* **252**, 15-30.
- Fujii, H., Sakai, M., Nishimatsu, S., Nohno, T., Mochii, M., Orii, H. and Watanabe, K. (2008): VegT, eFGF and Xbra cause overall posteriorization while Xwnt8 causes eye-level restricted posteriorization in synergy with chordin in early *Xenopus* development. *Development, growth & differentiation* **50**, 169-180.
- Gerhart, J., Danilchik, M., Doniach, T., Roberts, S., Rowning, B. and Stewart, R. (1989): Cortical rotation of the *Xenopus* egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development. *Development* **107 Suppl**, 37-51.
- Gimlich, R.L. and Gerhart, J.C. (1984): Early cellular interactions promote embryonic axis formation in *Xenopus laevis*. *Developmental biology* **104**, 117-130.
- Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., Garner-Hamrick, P., Gumbiner, B., McCrea, P., Kintner, C., Noro, C.Y. and Wylie, C. (1994): Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* **79**, 791-803.
- Itoh, K., Brott, B.K., Bae, G.U., Ratcliffe, M.J. and Sokol, S.Y. (2005): Nuclear localization is required for Dishevelled function in Wnt/beta-catenin signaling. *Journal of biology* **4**, 3.

- Iwao, Y., Uchida, Y., Ueno, S., Yoshizaki, N. and Masui, Y. (2005): Midblastula transition (MBT) of the cell cycles in the yolk and pigment granule-free translucent blastomeres obtained from centrifuged *Xenopus* embryos. *Development, growth & differentiation* **47**, 283-294.
- Kageura, H. (1990): Spatial distribution of the capacity to initiate a secondary embryo in the 32-cell embryo of *Xenopus laevis*. *Developmental biology* **142**, 432-438.
- Katsumoto, K., Arikawa, T., Doi, J.Y., Fujii, H., Nishimatsu, S. and Sakai, M. (2004): Cytoplasmic and molecular reconstruction of *Xenopus* embryos: synergy of dorsalizing and endo-mesodermalizing determinants drives early axial patterning. *Development* **131**, 1135-1144.
- Landesman, Y., Goodenough, D.A. and Paul, D.L. (2000): Gap junctional communication in the early *Xenopus* embryo. *The Journal of cell biology* **150**, 929-936.
- Larabell, C.A., Torres, M., Rowning, B.A., Yost, C., Miller, J.R., Wu, M., Kimelman, D. and Moon, R.T. (1997): Establishment of the dorso-ventral axis in *Xenopus* embryos is presaged by early asymmetries in beta-catenin that are modulated by the Wnt signaling pathway. *The Journal of cell biology* **136**, 1123-1136.
- Lemaire, P. and Gurdon, J.B. (1994): A role for cytoplasmic determinants in mesoderm patterning: cell-autonomous activation of the gooseoid and *Xwnt-8* genes along the dorsoventral axis of early *Xenopus* embryos. *Development* **120**, 1191-1199.

- Lemaire, P. and Kodjabachian, L. (1996): The vertebrate organizer: structure and molecules. *Trends in genetics* : TIG **12**, 525-531.
- Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S. and De Robertis, E.M. (1997): Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* **88**, 747-756.
- Mii, Y. and Taira, M. (2009): Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range. *Development* **136**, 4083-4088.
- Mii, Y. and Taira, M. (2011): Secreted Wnt "inhibitors" are not just inhibitors: regulation of extracellular Wnt by secreted Frizzled-related proteins. *Development, growth & differentiation* **53**, 911-923.
- Moon, R.T. (2005a): Wnt/beta-catenin pathway. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2005**, cm2.
- Moon, R.T. (2005b): Wnt/beta-catenin pathway. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2005**, cm1.
- Nagano, T., Ito, Y., Tashiro, K., Kobayakawa, Y. and Sakai, M. (2000): Dorsal induction from dorsal vegetal cells in *Xenopus* occurs after mid-blastula transition. *Mechanisms of development* **93**, 3-14.
- Nakamura, O., Takasaki, H. and Mizohata, T. (1970): Differentiation during Cleavage in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the Japan Academy* **46**, 694-699.
- Narita, T., Nishimatsu, S., Wada, N. and Nohno, T. (2007): A Wnt3a variant participates in chick apical ectodermal ridge formation: distinct biological activities of Wnt3a splice variants in chick limb development. *Development, growth & differentiation* **49**,

493-501.

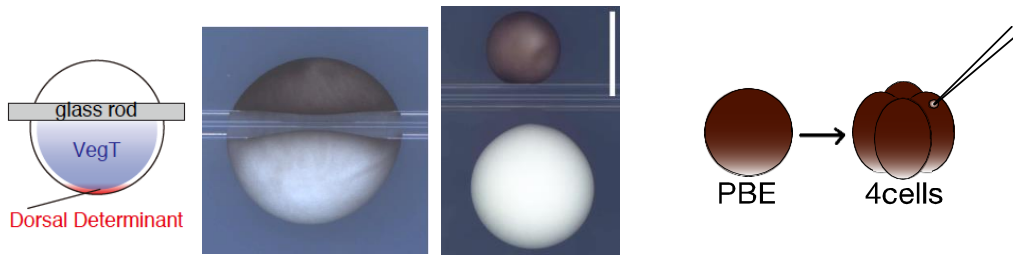
- Nieuwkoop, P.D. (1973): The organization center of the amphibian embryo: its origin, spatial organization, and morphogenetic action. *Advances in morphogenesis* **10**, 1-39.
- Pahl, H.L. (1999): Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiological reviews* **79**, 683-701.
- Rowning, B.A., Wells, J., Wu, M., Gerhart, J.C., Moon, R.T. and Larabell, C.A. (1997): Microtubule-mediated transport of organelles and localization of beta-catenin to the future dorsal side of *Xenopus* eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 1224-1229.
- Sakai, M. (1996): The vegetal determinants required for the Spemann organizer move equatorially during the first cell cycle. *Development* **122**, 2207-2214.
- Sakai, M. (2008): Cell-autonomous and inductive processes among three embryonic domains control dorsal-ventral and anterior-posterior development of *Xenopus laevis*. *Development, growth & differentiation* **50**, 49-62.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L.K. and De Robertis, E.M. (1994): *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* **79**, 779-790.
- Shibata, M., Itoh, M., Hikasa, H., Taira, S. and Taira, M. (2005): Role of crescent in convergent extension movements by modulating Wnt signaling in early *Xenopus* embryogenesis. *Mechanisms of development* **122**, 1322-1339.
- Shih, J. and Fraser, S.E. (1996): Characterizing the zebrafish

- organizer: microsurgical analysis at the early-shield stage. *Development* **122**, 1313-1322.
- Sive, H.L., Grainger, R.M. and Harland, R.M. (2000): Early development of *Xenopus laevis*: a laboratory manual.
- Slack, J.M. (2009): *Essential developmental biology*.
- Smith, J.C. (1993): Mesoderm-inducing factors in early vertebrate development. *The EMBO journal* **12**, 4463-4470.
- Smith, W.C. and Harland, R.M. (1992): Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* **70**, 829-840.
- Spemann, H. and Mangold, H. (1924): Über induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Development Genes and Evolution* **100**, 599-638.
- Tao, Q., Yokota, C., Puck, H., Kofron, M., Birsoy, B., Yan, D., Asashima, M., Wylie, C.C., Lin, X. and Heasman, J. (2005): Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **120**, 857-871.
- Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F.P. and Moos, M., Jr. (1997): Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* **88**, 757-766.
- Yang-Snyder, J., Miller, J.R., Brown, J.D., Lai, C.J. and Moon, R.T. (1996): A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Current biology : CB* **6**, 1302-1306.
- 片桐千明 (1998): 両生類の発生生物学. 北海道大学図書刊行会.

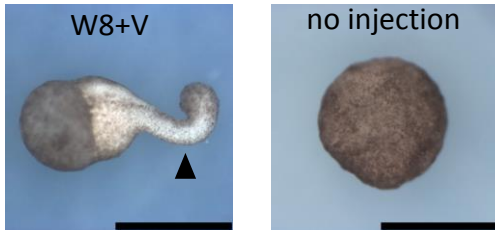
謝辞

本研究は、著者が鹿児島大学大学院理工学研究科博士後期課程在学中に、同大学理学部の坂井雅夫博士の指導のもとに行ったものである。研究を進めるにあたり、共同研究により多くの実験を一緒に行ってくださいました元川崎医科大学の成田知弘博士、本テーマに一緒に取り組んでくださった奈須雄也さん、沢山のご助言ご指導くださいました川崎医科大学の西松伸一郎博士、発生生物学会におきまして沢山のアイデアやアドバイスをくださいました先生方、本学位申請にあたりご指導いただきました鹿児島大学の内海俊樹博士、塔筋弘章博士、笠井聖仙博士、熊本高等専門学校の前木純也博士に厚くお礼申し上げます。

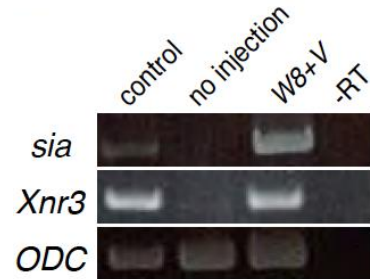
A



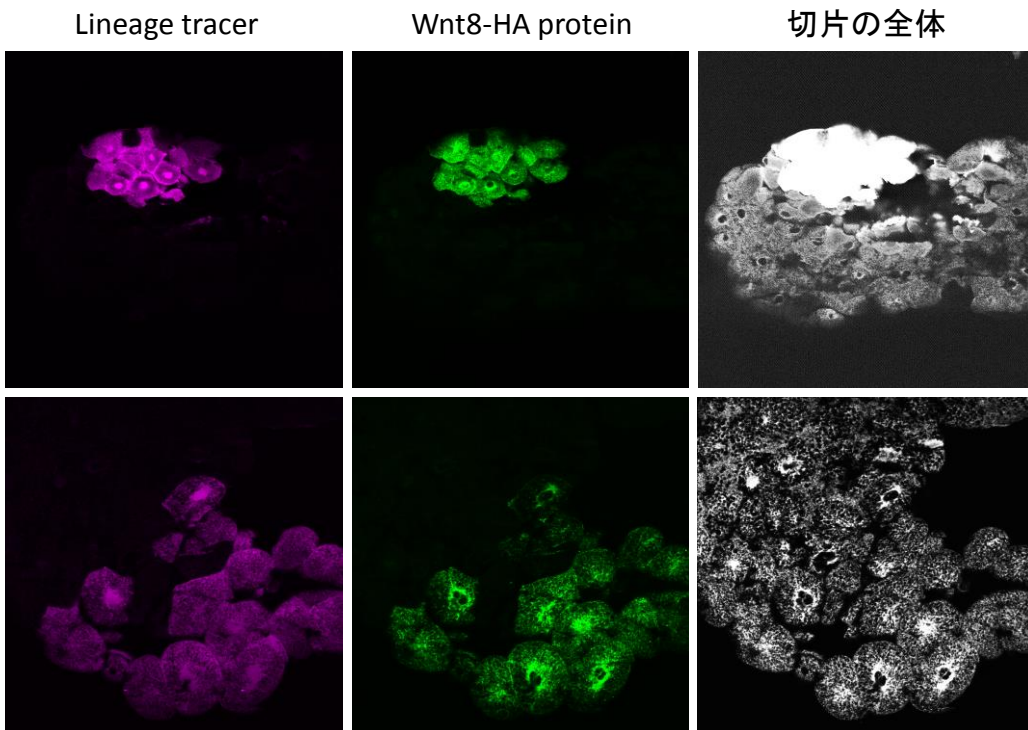
B



C



D



E

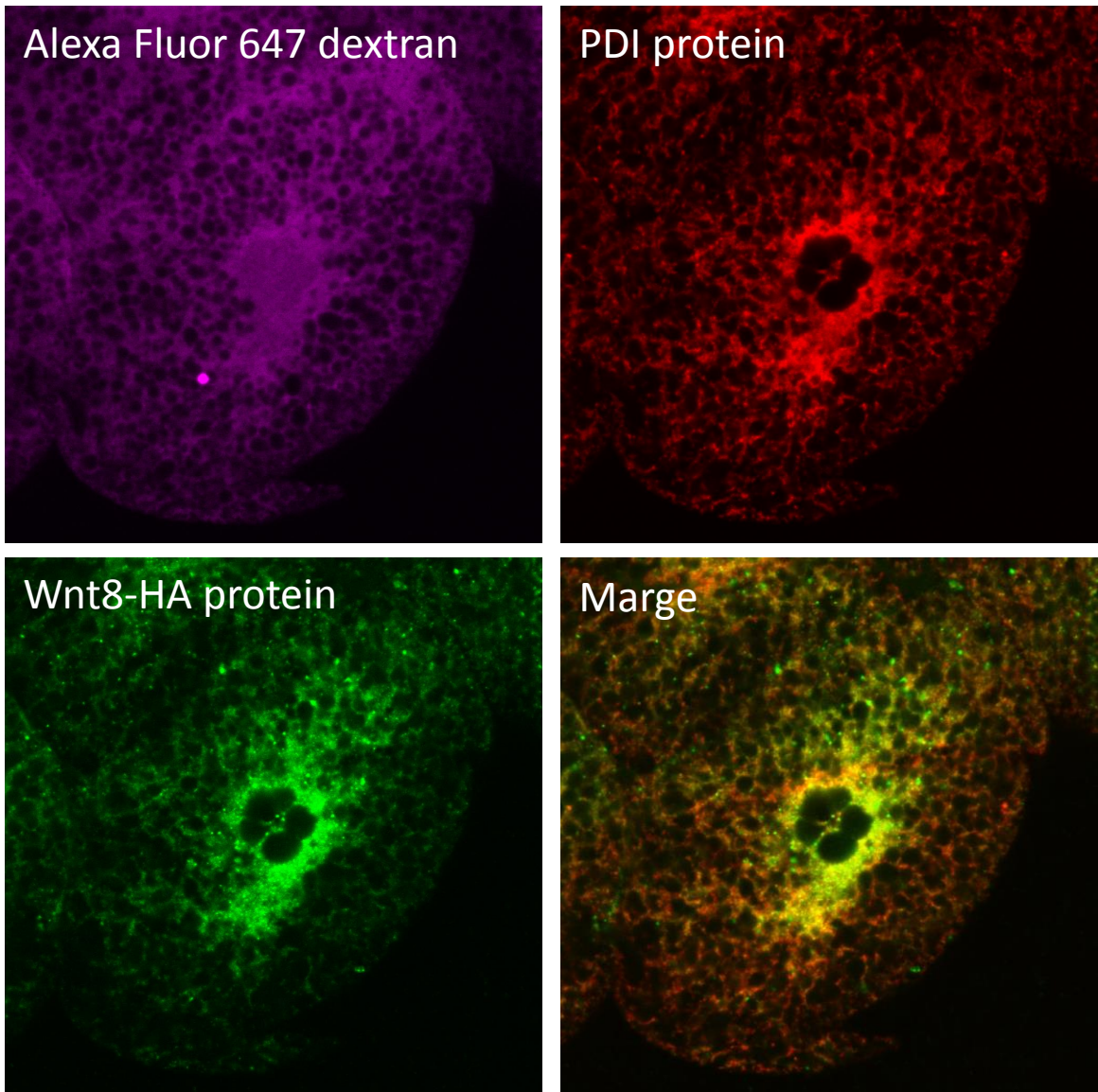


図 1 Wnt8 mRNAの注入による背側化とWnt8タンパク質の局在

- A) 4-8細胞期のPBE (permanent blastula type embryos; 背側デターミネントとmaternal内中胚葉因子のVegTを多く含む植物極側を切り取った胚)の一割球へ、Wnt8-HA mRNA (250 pg)、VegT mRNA (15 pg)、0.1% Alexa Fluor 647 dextranを注入した。
- B) stage 17における実験胚の形態。Wnt8 mRNA注入PBEが背側化した際に特徴的な突起を形成した。矢尻; 背側化により形成された突起
- C) stage 10.5におけるRT-PCR結果。Wnt8 mRNA注入胚は背側遺伝子*siamois*と*Xnr3*を発現していた。ODCはローディングコントロール。
- D) 4000細胞期にMEMPFPAで固定し、免疫染色を行った。桃; Alexa Fluor 647 dextran、緑; Wnt8-HA protein、白黒画像は組織切片全体を示す。Wnt8-HA proteinはAlexa Fluor 647 dextranが示す注入細胞でのみ局在していた。
- E) Alexa Fluor 647 dextran (桃)、Wnt8-HA protein (緑)、PDI protein (赤)、Marge; Wnt8-HA proteinとPDI proteinを重ねた。Wnt8-HA proteinとPDI proteinの局在は良く一致していた。

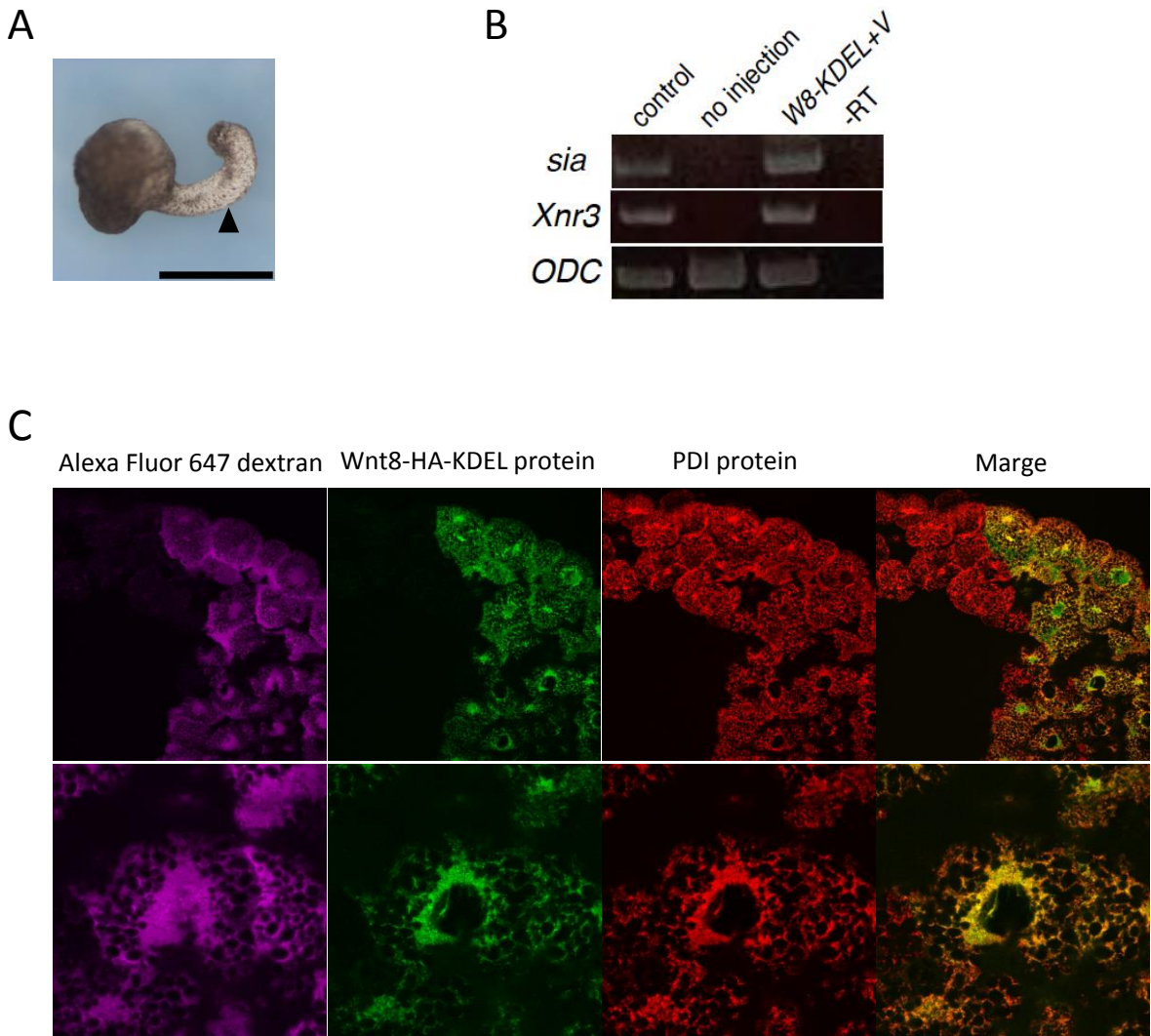


図 2 Wnt8-KDEL mRNAの注入による背側化とWnt8-KDELタンパク質の局在

- A) stage 17における実験胚の形態。Wnt8-HA-KDEL mRNA注入PBEが背側化した際に特徴的な突起を形成した。矢尻;背側化により形成された突起
- B) stage 10.5におけるRT-PCR結果。注入胚は背側遺伝子*siamois*と*Xnr3*を発現していた。*ODC*はローディングコントロール。
- C) Alexa Fluor 647 dextran (桃)、Wnt8-HA-KDEL protein (緑)、PDI protein (赤)、Merge; Wnt8-HA-KDEL proteinとPDI proteinを重ねた。Wnt8-HA-KDEL proteinとPDI proteinの局在は良く一致していた。

注入量: *Wnt8-HA-KDEL* (250 pg)、*VegT* (15 pg)、0.1% Alexa Fluor 647 dextran

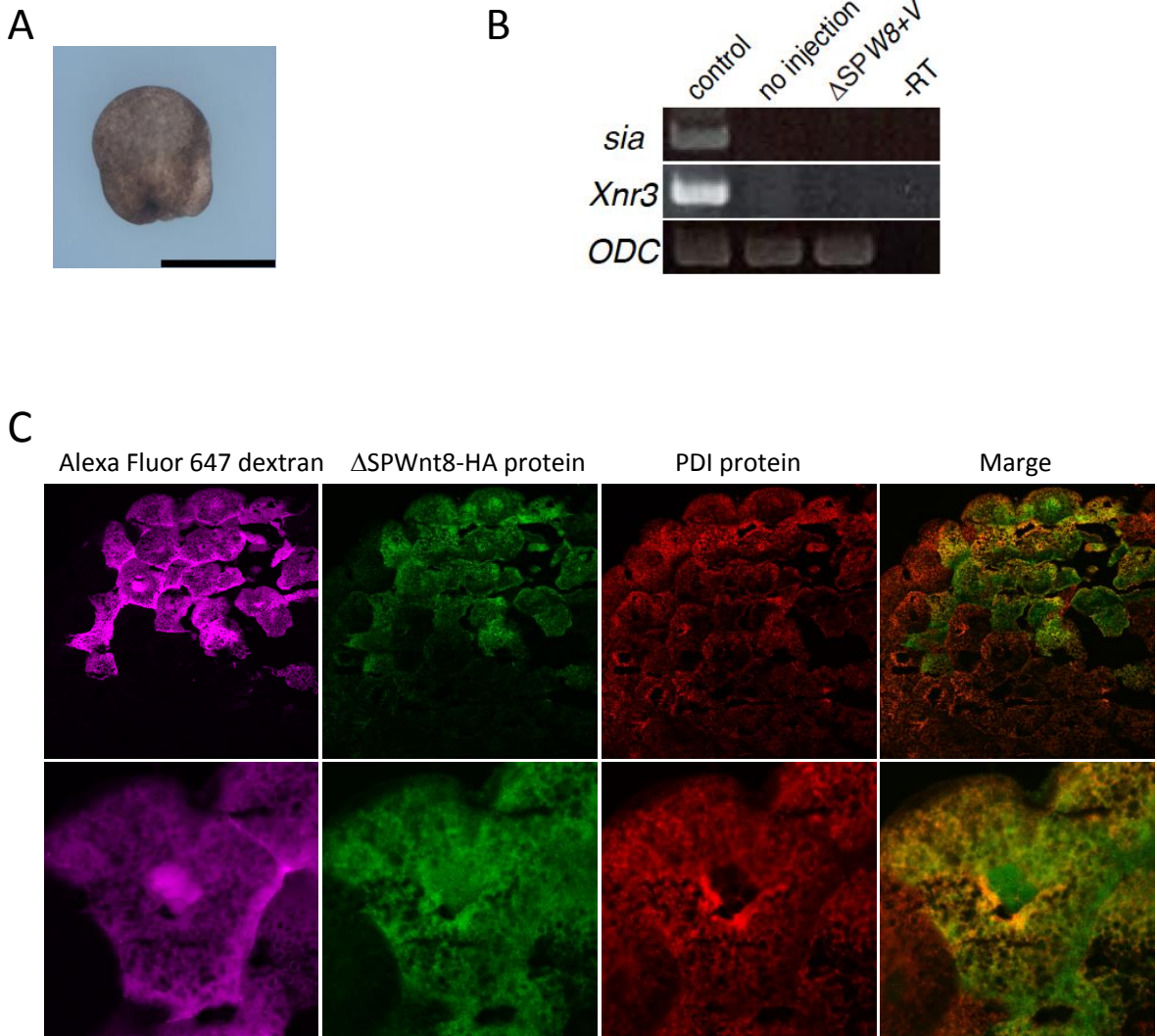


図 3 ΔSPWnt8 mRANの注入による背側化とΔSPWnt8タンパク質の局在

- A) stage 17における実験胚の形態はPBEが背側化した際に特徴的な突起を形成しなかった。
 B) stage 10.5におけるRT-PCR結果。注入胚は背側遺伝子*siamois*と*Xnr3*を発現しなかった。*ODC*はローディングコントロール。
 C) Alexa Fluor 647 dextran (桃)、ΔSPWnt8-HA protein (緑)、PDI protein (赤)、Merge; ΔSPWnt8-HA proteinとPDI proteinを重ねた。ΔSPWnt8-HA proteinはAlexa Fluor 647 dextranの局在と良く一致していた。

注入量: ΔSPWnt8-HA (250 pg)、*VegT* (15 pg)、0.1% Alexa Fluor 647 dextran

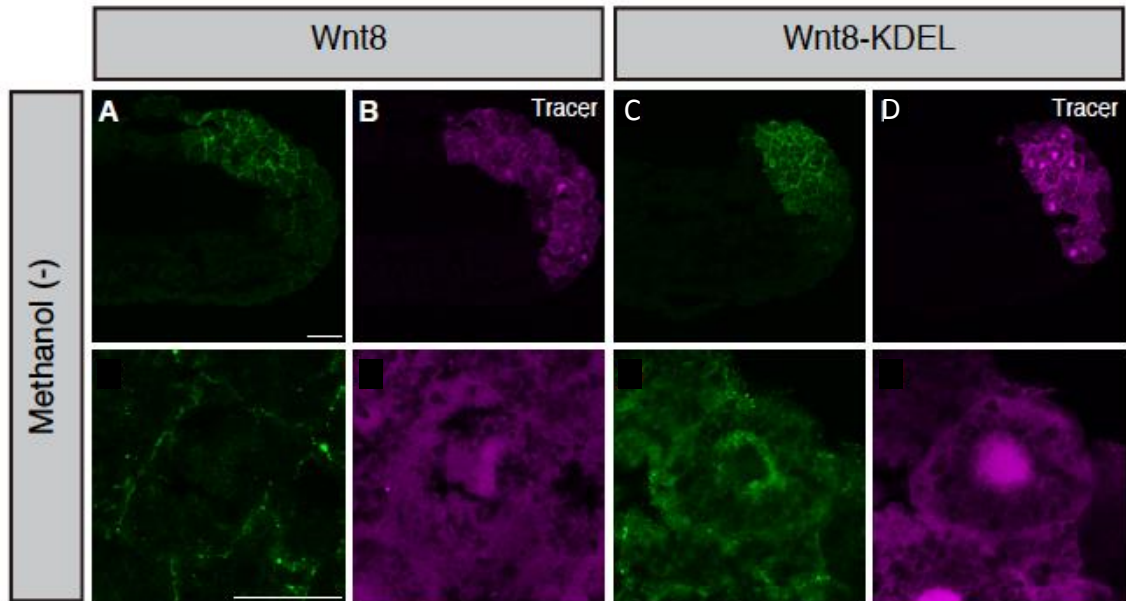


図4 免疫組織化学的染色の前メタノール処理の有無によるWntタンパク質の局在

注入胚は固定後、メタノールに保存せずPBS中に保存し、免疫組織化学的染色を行った。

- A) Wnt8-HA protein
- B) Alexa Fluor 647 dextran
- C) Wnt8-HA-KDEL protein
- D) Alexa Fluor 647 dextran

Wnt8-HA proteinは主に細胞の表面(細胞と細胞の境界)で検出された、Wnt8-HA-KDEL proteinは細胞内に局在し、細胞の表面には検出されなかった。

注入量: Wnt8-HA (250 pg)、Wnt8-HA-KDEL (250 pg)、VegT (15 pg)、0.1% Alexa Fluor 647 dextran

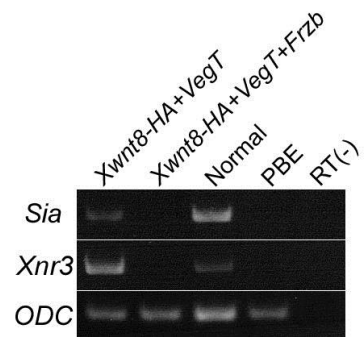
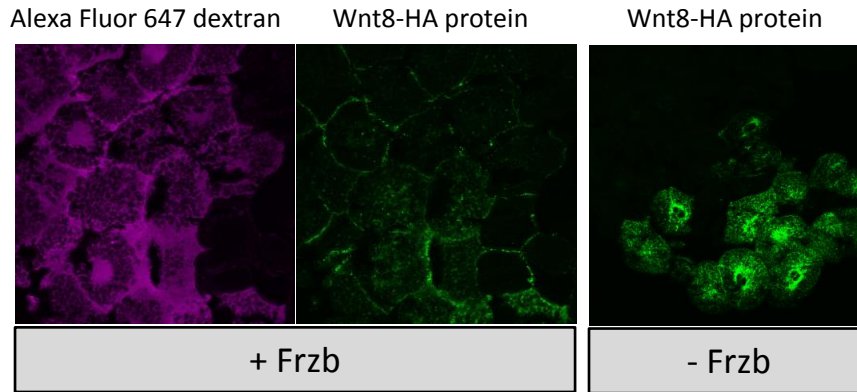
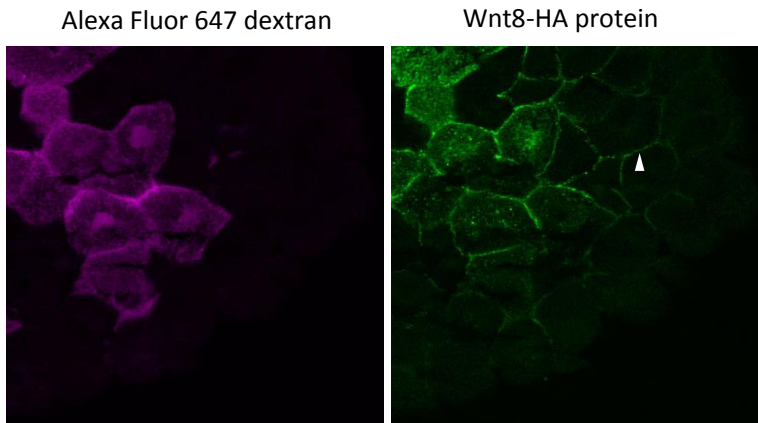
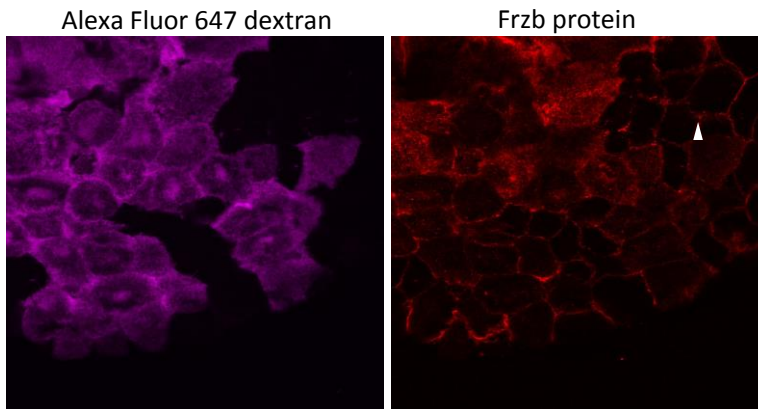
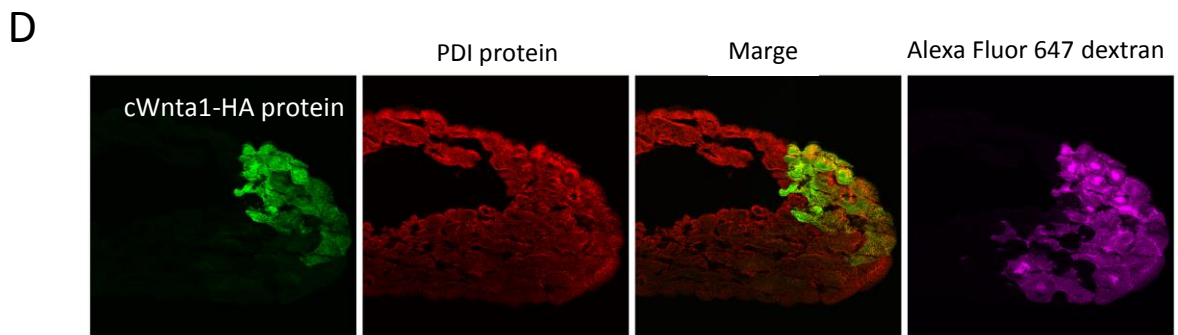
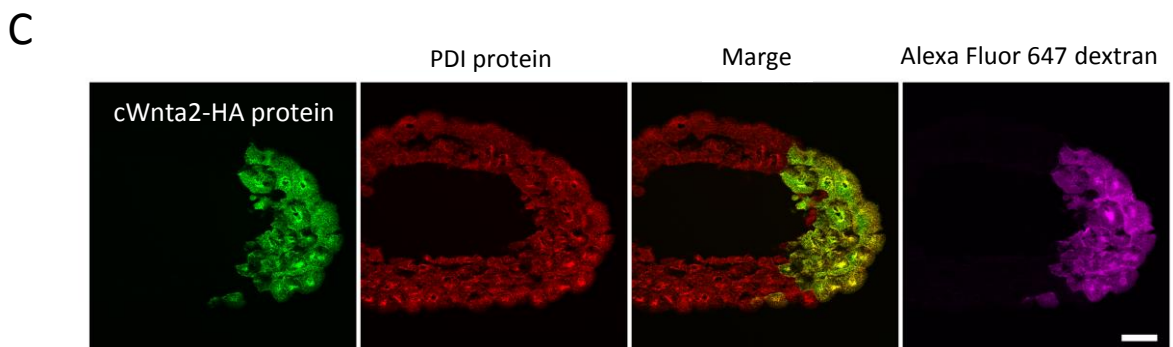
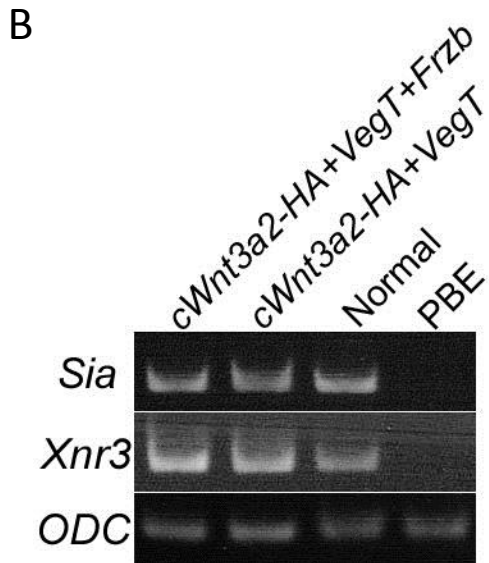
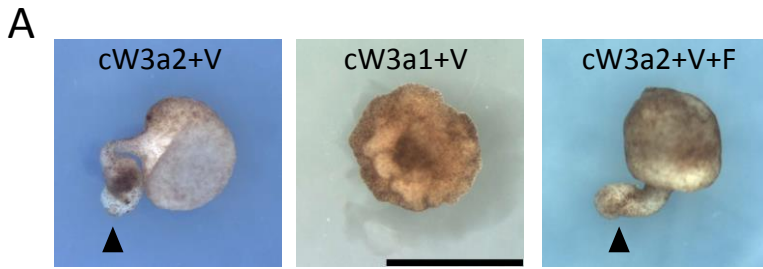
A**B****C****D****E**

図 5 Frzb mRNAの共注入による背側化とWntタンパク質の局在

- A) stage 17における実験胚の形態。Wnt8 mRNAとFrzb mRNAを共注入したPBEが背側化した際に特徴的な突起を形成しなかった。
- B) stage 10.5におけるRT-PCR結果。Wnt8 mRNAとFrzb mRNA注入胚は背側遺伝子*siamois*と*Xnr3*を発現しなかった。ODCはローディングコントロール。
- C) Alexa Fluor 647 dextran (桃)、Wnt8-HA protein (緑)。Wnt8-HA proteinは主に細胞の境界で検出された。
- D) Alexa Fluor 647 dextran (桃)、Wnt8-HA protein (緑)。矢尻: mRNA注入領域の外のWnt8-HA proteinを示す。Wnt8-HA proteinはmRNA注入細胞の隣り合う細胞の境界でも検出された。
- E) Alexa Fluor 647 dextran (桃)、Frzb protein (赤)。矢尻: mRNA注入領域の外のFrzb proteinを示す。Frzb proteinはWnt8-HA proteinと同様にmRNA注入細胞の隣り合う細胞の境界で検出され、その拡散領域はWnt8-HA proteinより広がった。

注入量: *Wnt8-HA* (250 pg)、*VegT* (15 pg)、*Frzb* (1000 pg)、0.1% Alexa Fluor 647 dextran



E

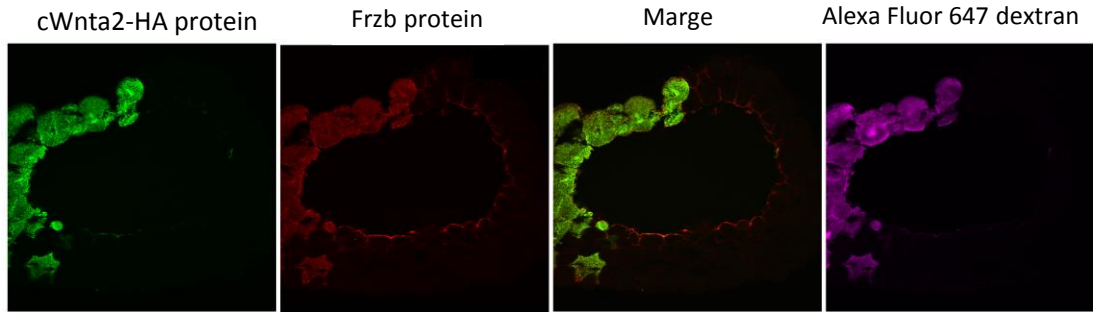


図 6 ニワトリWnt3a mRNAの注入、およびFrzb mRNAとの共注入による背側化とタンパク質の局在

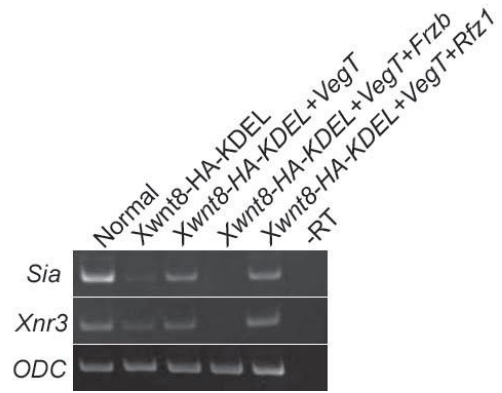
- A) stage 17における実験胚の形態。cWnt3a2-HA mRNAを注入したPBEと、cWnt3a2-HA mRNAとFrzb mRNAを共注入したPBEは背側化した際に特徴的な突起を形成した。cWnt3a1-HA mRNA注入したPBEは突起を形成しなかった。矢尻：背側化により形成された突起
- B) stage 10.5におけるRT-PCR結果。cWnt3a2-HA mRNAを注入したPBEと、cWnt3a2-HA mRNAとFrzb mRNAを共注入したPBEは背側遺伝子*siamois*と*Xnr3*を発現しており、cWnt3a1-HA mRNA注入したPBEは発現していなかった。*ODC*はローディングコントロール。
- C) Alexa Fluor 647 dextran (桃)、cWnt3a2-HA protein (緑)、PDI protein (赤)、Marge; cWnt3a2-HA protein + PDI protein。cWnt3a2-HA proteinはPDI proteinの局在と良く一致していた。
- D) Alexa Fluor 647 dextran (桃)、cWnt3a1-HA protein (緑)、PDI protein (赤)、Marge; cWnt3a1-HA protein + PDI protein。cWnt3a1-HA proteinはAlexa Fluor 647 dextranの局在と良く一致していた。
- E) Alexa Fluor 647 dextran (桃)、Frzb protein (赤)、Marge; cWnt3a2-HA protein + Frzb protein。Frzb proteinは小胞体でcWnt3a2-HA protein共局在していた。

注入量: cWnt3a2-HA (250 pg)、cWnt3a1-HA (250 pg)、VegT (15 pg)、Frzb (1000 pg)、0.1% Alexa Fluor 647 dextran

A



B



C

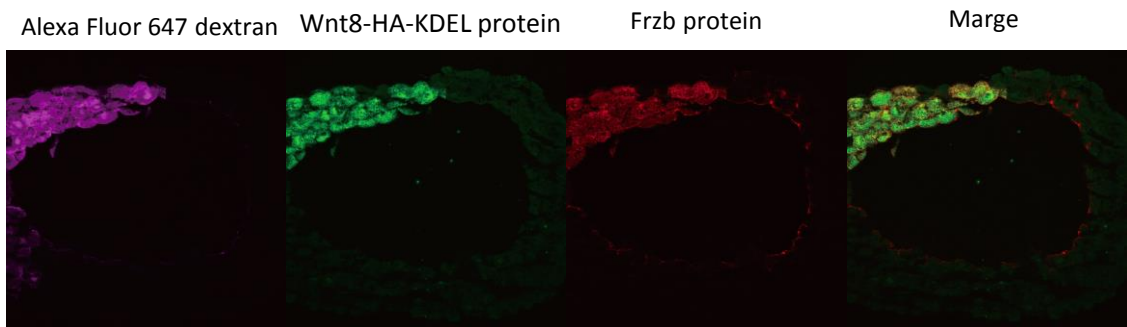
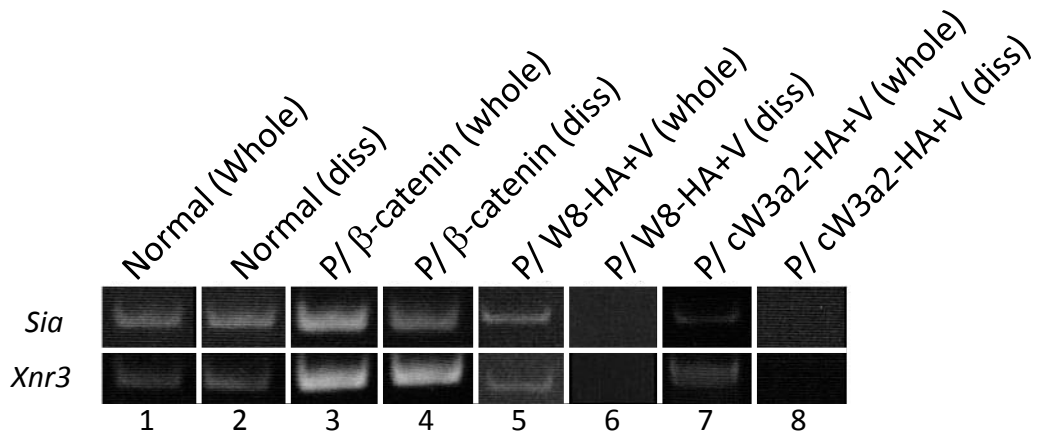


図 7 Wnt8-KDEL mRNAとFrzb mRNAの共注入による阻害とWnt8-KDELタンパク質の局在

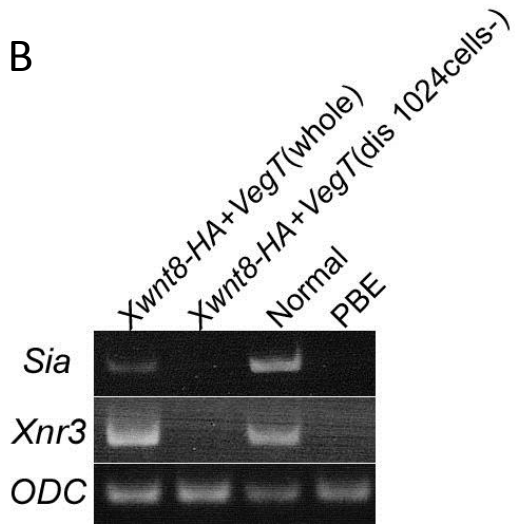
- A) stage 17における実験胚の形態。Wnt8-HA-KDEL mRNAとFrzb mRNAを注入PBEが背側化した際に特徴的な突起を形成しなかった。
- B) stage 10.5におけるRT-PCR結果。Wnt8-HA-KDEL mRNAとFrzb mRNAを注入したPBEは背側遺伝子*siamois*と*Xnr3*を発現していなかった。*ODC*はローディングコントロール。
- C) Alexa Fluor 647 dextran (桃)、Wnt8-HA-KDEL protein (緑)、Frzb protein (赤)、Marge; Wnt8-HA-KDEL protein + Frzb protein。Frzb proteinは小胞体でWnt8-HA-KDEL protein共局在していた。

注入量: Wnt8-HA-KDEL (250 pg)、VegT (15 pg)、Frzb (1000 pg)、0.1% Alexa Fluor 647 dextran

A



B



C

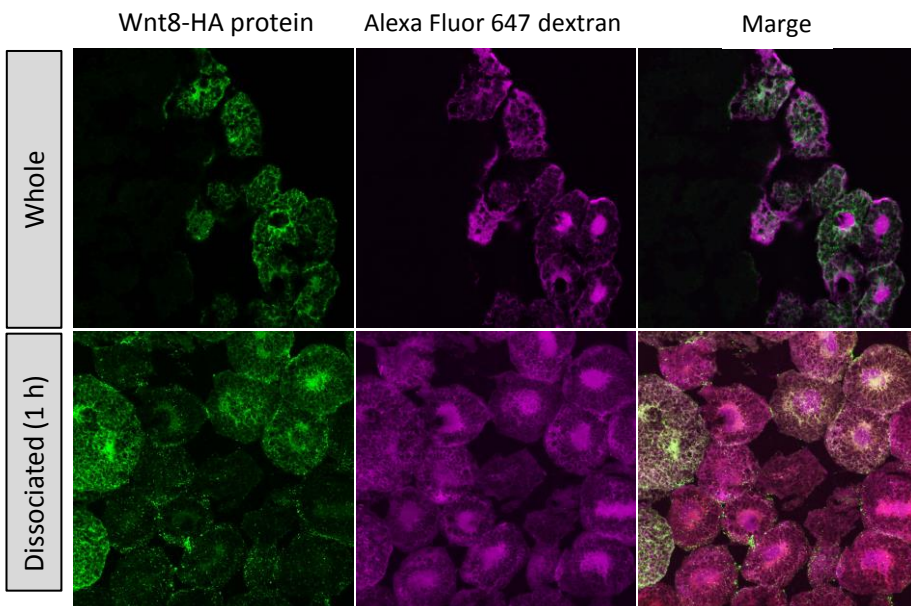
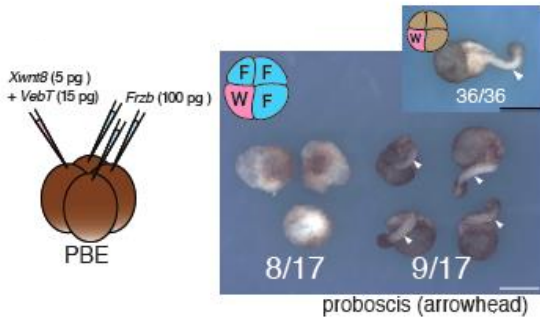
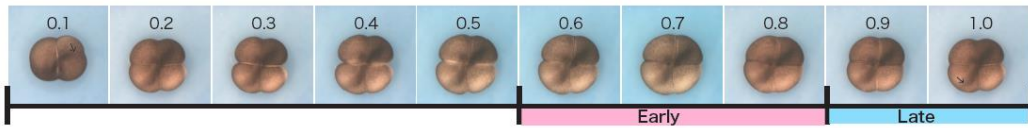


図 8 Wnt mRNA注入胚の割球解離による背側遺伝子の発現とWntタンパク質の局在

- A) stage 10.5におけるRT-PCR結果。注入胚(Whole胚もしくは、8細胞期から継続して解離した胚: diss)の背側遺伝子*siamois*と*Xnr3*の発現、*ODC*はローディングコントロール。正常胚と β -catenin mRNA注入胚は割球解離をおこなっても、*siamois*と*Xnr3*の発現していた(レーン2と4)。Wnt8 mRNAとcWnt3a2 mRNAを注入したPBEは割球解離によって、背側の遺伝子は発現しなかった(レーン6と8)。注入量: *β -catenin* (100pg)、*Wnt8-HA* (250 pg)、*VegT* (15 pg)
- B) stage 10.5におけるRT-PCR結果。注入胚(Whole胚もしくは、1024細胞期から短時間解離した胚)の背側遺伝子*siamois*と*Xnr3*の発現。1024細胞期から短時間解離した胚でも背側の遺伝子は発現しなかった。
- C) Alexa Fluor 647 dextran (桃)、Wnt8-HA protein (緑)、Merge; Wnt8-HA protein + Alexa Fluor 647 dextran。Wnt8-HA proteinはmRNA注入された細胞に発現していたが、主に細胞の周辺に強い顆粒状の局在を示した。

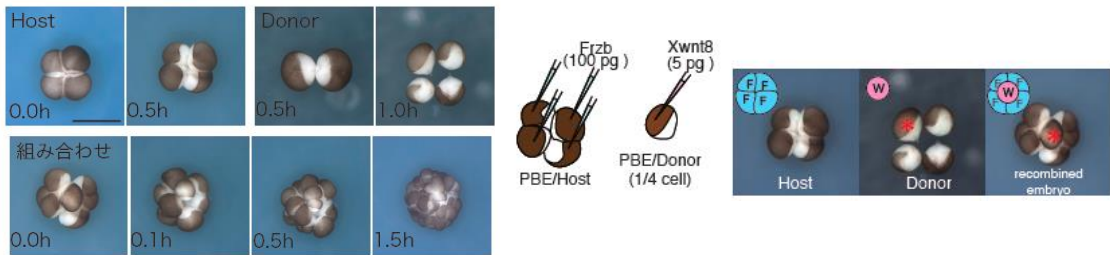
注入量: *Wnt8-HA* (250 pg)、*VegT* (15 pg)、0.1% Alexa Fluor 647 dextran

A



Type	Timing	Dorsalization
A	early	53% (9/17)
B	late	88% (15/17)

B



C



Type	Host	Donor	Dorsalization
C			100% (15/15)
D			94% (17/18)
E			0% (0/16)

W:Xwnt8(5pg)+VegT(15pg), F:Frzb(100pg)

図 9 Wnt8 mRNAとFrzb mRNAを個別に注入した割球による組み合わせ胚の背側化

- A) 先の卵割が起きた時を0とし次の卵割が起きるまでを1としたタイムスケールで、0.6から0.8をEarly、0.9-1.0をLateとし、それぞれ、隣り合った細胞にWnt8 mRNAとFrzb mRNAを注入した。Earlyのタイミングでは53%のPBEが突起を形成し背側化したのに対して、Lateのタイミングでは88%が背側化した。
- B) 2つのPBE (Host, Donor)にそれぞれWnt8 mRNAとFrzb mRNAを注入し、解離液で割球を解離。それぞれ2種類の細胞を組み合わせた後、培養液に移し、割球を結合させた。
- C) Wnt8 mRNA注入割球とFrzb mRNA注入割球の組み合わせ胚は、94%が背側化の指標となる突起を形成した。

注入量: *Wnt8* (5 pg)、*VegT* (15 pg)、*Frzb* (100 pg)/1割球あたり

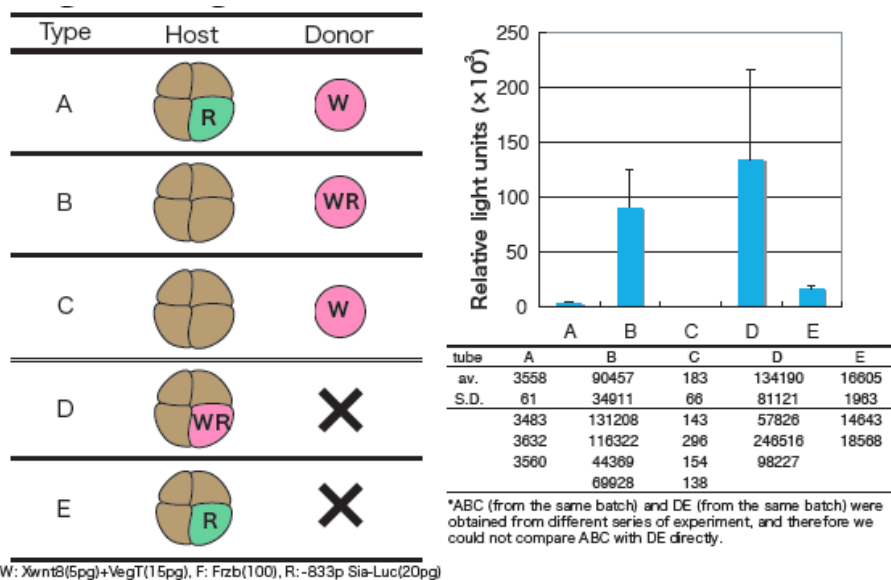
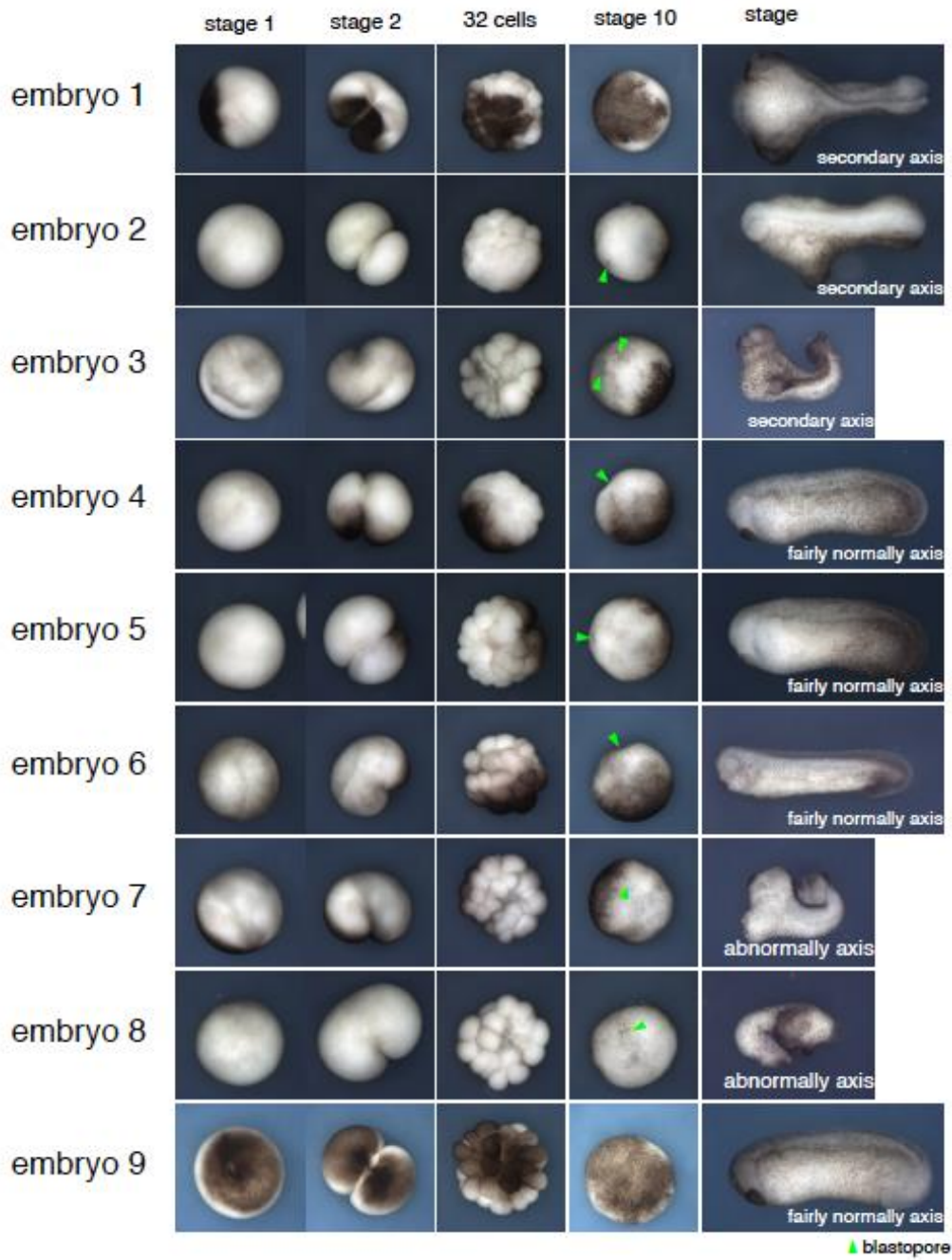
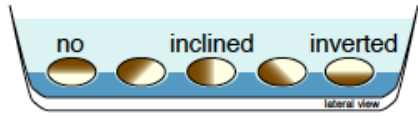


図 10 組み合わせ胚を用いたレポーターアッセイ

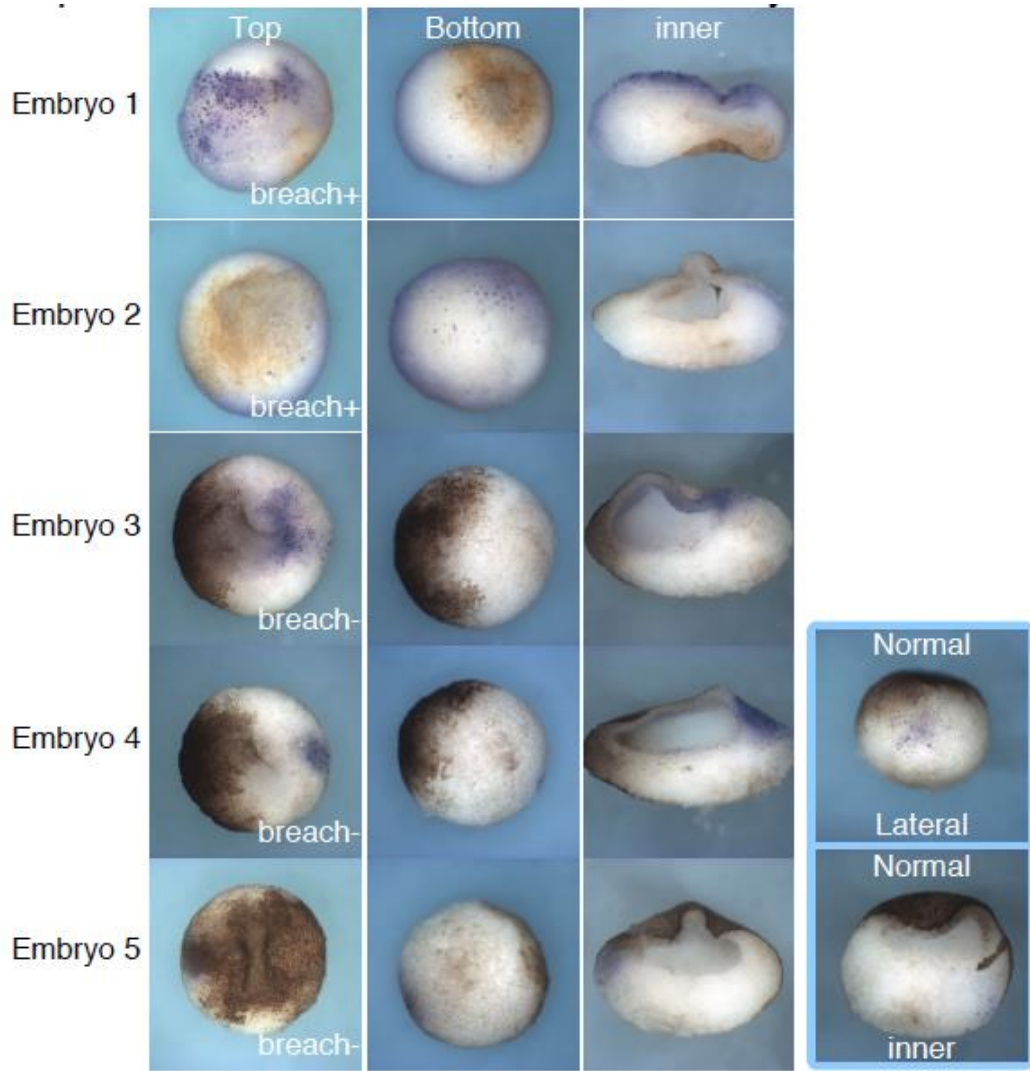
2つのPBE (Host, Donor) にそれぞれ Wnt8 mRNA と Frzb mRNA を注入し、解離液で割球を解離。それぞれ2種類の細胞を組み合わせた後、培養液に移し、割球を結合させた。Wnt8 mRNA と reporter を共注入した Donor 割球を Host 細胞と組み合わせた胚 (Type B) と、組み合わせせず同一割球に注入した胚 (Type D) に比べると、別々の割球に注入し隣り合うように組み合わせ胚 (Type A) はルシフェラーゼ活性が著しく低かった。

注入量: Wnt8 (5 pg)、VegT (15 pg)、Frzb (100 pg)/1割球あたり、-833p Sia-Luc (20 pg)

A



B



C

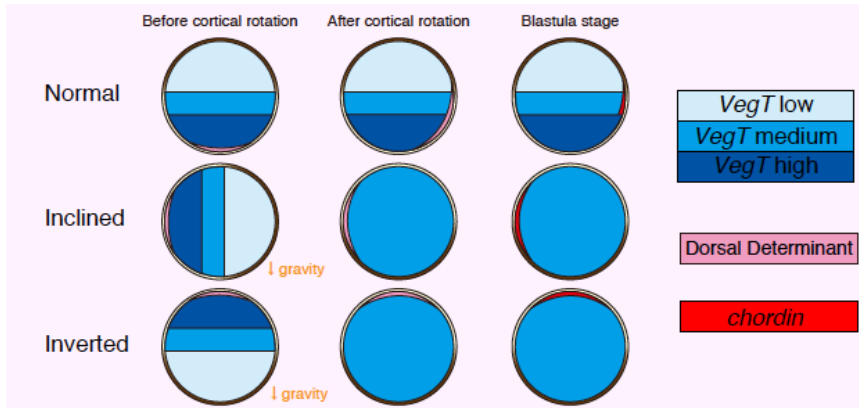
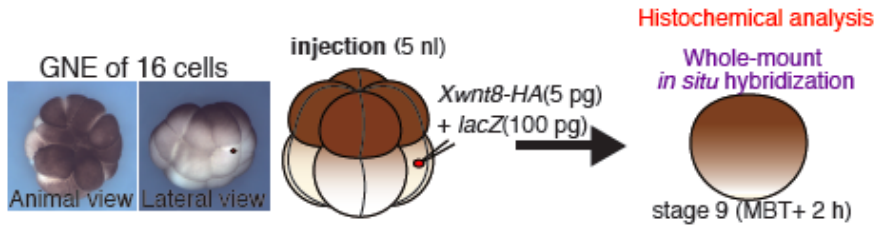


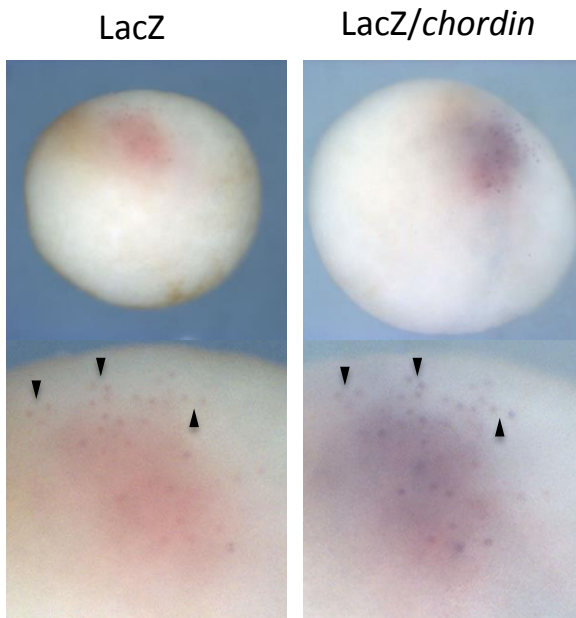
図 11 反転胚の植物極側細胞質デターミネントによる*chordin*の発現

- A) 表層回転が起こる前に受精膜を取り除き動植物極の上下を反転させ、逆さま(inverted)もしくは傾けて(inclined)発生させた。矢尻は原口を示す。傾ける角度によって、正常胚と同等の体軸を胚(embryo4, 5, 6)と二次軸を形成する胚(embryo1, 2, 3)、異常な形態を示す胚(embryo7, 8)が得られた。全ての胚で、原口は上方向に形成された。Embryo9は傾けなかった胚。
- B) 反転胚は原腸陥入3時間前に固定し、whole mount *in situ* hybridizationで*chordin*の発現を解析した。反転胚は元の植物極側(上の方で白い領域)で*chordin*の発現していた。その発現は反転していない胚と比べて発現領域が広く、発現量は増大していた。
- C) 反転による*chordin*の発現領域拡大の解釈。VegT(青)、背側デターミネント(桃)、*chordin*(赤)。反転することによって、卵内の内中胚葉細胞質デターミネント(VegT mRNA)の分布が変わり、植物極半球の広い範囲がオーガナイザー領域となり*chordin*の発現領域が広がったことが考えられる。

A



B



C

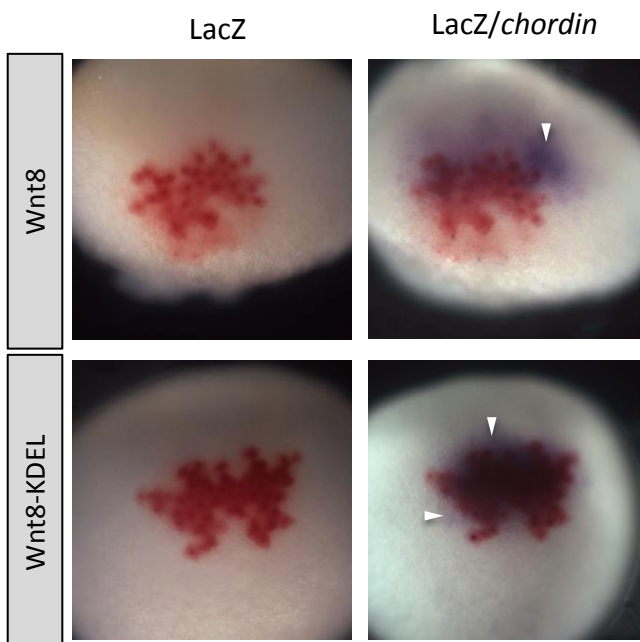


図 12 Wntタンパク質による*chordin*の発現と*nβ-gal*を用いた注入割球追跡

- A) 16細胞期GNEの1割球にWnt8 mRNAと*nβ-gal* mRNAを共注入、stage9で固定し、組織化学的染色でlacZを検出後、*chordin*の発現をwhole mount *in situ* hybridizationで検出した。
- B) lacZ(赤) : 発現している細胞はmRNA注入細胞を示す。lacZ/*chordin*(紫) : lacZを検出胚の*chordin*の発現。矢尻は発現のパターンが一致する一部を示す。
- C) Wnt8 mRNA、Wnt8_KDEL mRNAを注入した胚のlacZ染色と*chordin*の発現。矢尻は発現のパターンが一致しない箇所を示す。赤い領域で示されるmRNAの注入細胞細胞とその細胞で発現する*chordin*の発現は良く一致しているものの、一部その周辺に弱い発現が見られる胚が得られた。

注入量: Wnt8(5 pg)、VegT (15 pg)、*n-βgal*(100 pg)

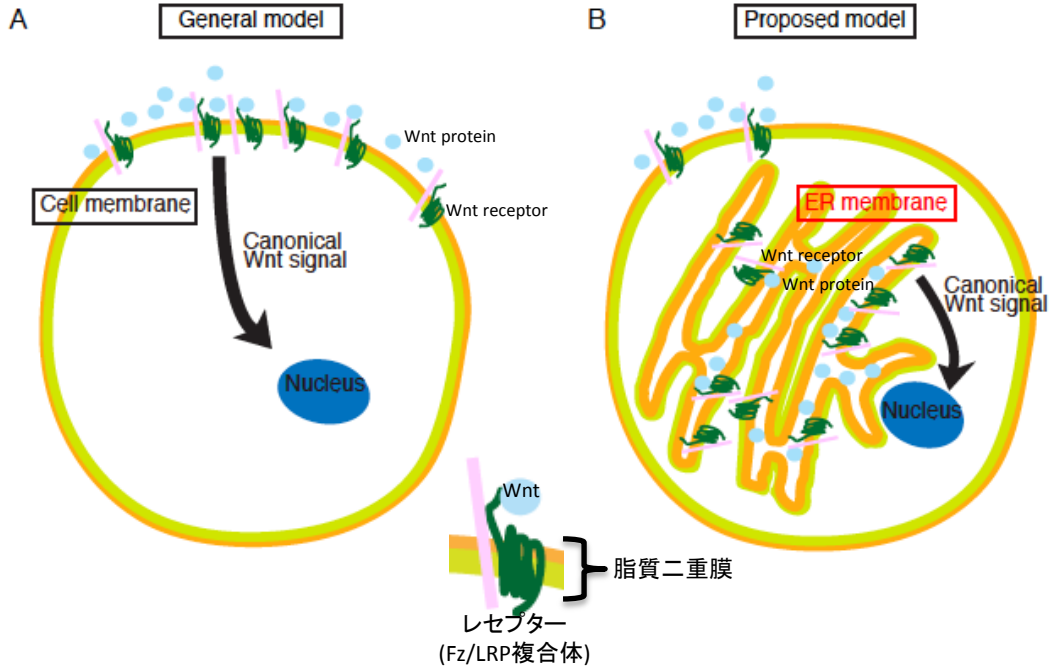


図 13 従来のモデルと本研究により新規に提案するモデル

- A) 従来のモデル。細胞外に分泌されたWntが細胞内の核へとそのシグナル伝える。
- B) 新規のモデル。小胞体膜の内側は、細胞膜の外側と同等であり、細胞内の小胞体内にあるWntタンパク質は同じく小胞体膜にあるレセプターと結合することにより、細胞内で核にそのシグナルを伝えるというモデルである。このモデルではWnt8タンパク質はそのmRNAが注入された細胞内の小胞体に局在し、隣り合う細胞には検出されなかったことを説明できる。