

過重力下で見られるアフリカツメガエル頭部形成異常の解析

徳島大・総合科学部 渡部稔、広島大・院理・両生類研 柳澤誠、古野伸明、柏木啓子、花田秀樹、東京都・老人研 新海正、鳥取大・医・生命科学 吉留賢、東京都・臨床研 久保英夫、鹿児島大・理 坂井雅夫、札幌医大・保健医療 藤井博匡、ISAS/JAXA 山下雅道、山陽女子短大・臨床検査 柏木昭彦

Analysis of head-defects in *Xenopus* embryos raised under hypergravity condition

Minoru Watanabe^a, Makoto Yanagisawa^b, Nobuaki Furuno^b, Keiko Kashiwagi^b, Hideki Hanada^b, Tadashi Shinkai^c, Satoshi Yoshitome^d, Hideo Kubo^e, Masao Sakai^f, Hirotsada Fujii^g, Masamichi Yamashita^h, and Akihiko Kashiwagiⁱ

^aIntegrated Arts and Sciences, The University of Tokushima, ^bInstitute of Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, ^cRedox Regulation Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, ^dDepartment of Biomedical Sciences, School of Life Science, Tottori University, ^eDepartment of Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, ^fFaculty of Science, Kagoshima University, ^gSchool of Health Science, Sapporo Medical University, ^hInstitute of Space and Astronautical Science, Japan Aerospace Exploration Agency, ⁱSanyo Women's College.

E-mail : minoru@ias.tokushima-u.ac.jp

Abstract: *Xenopus* embryos raised under hypergravity condition develop a variety of abnormalities. Among them, head-defects such as microcephaly and cyclopia are the most common. Normal head formation is regulated by Wnt signaling. Inhibition of Wnt signaling causes head-defects in embryos, and ectopic activation of Wnt signaling induces extra body axis with head. Embryos are most sensitive to hypergravity within 30 min after fertilization, and activation of endogenous Wnt signaling occurs at almost the same time by cortical rotation which is sensitive to gravity. These facts suggest that the target of hypergravity might be Wnt signaling. In order to investigate this possibility, Wnt signaling activity in embryos raised under hypergravity conditions was analyzed by the measuring the expression of the Wnt-target genes. Quantitative RT-PCR revealed that the expression of some of Wnt-target genes was reduced in these embryos. This result strongly suggests that Wnt signaling is the target of the hypergravity derived head-defects in *Xenopus* embryos.

Key words: *Xenopus*, hypergravity, head formation, Wnt signaling, Quantitative RT-PCR

1. はじめに

過重力がアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の初期発生に与える影響は、われわれのグループを含めいくつかの報告がなされている⁽¹⁻⁴⁾。これらの論文では、過重力下で発生させたアフリカツメガエル初期胚に生じるさまざまな異常が詳細に報告されている。しかし、過重力の影響がどのようなメカニズムでアフリカツメガエルの初期発生に影響を与えているかを検証した報告はまだない。今回の研究でわれわれは、過重力下で発生させた初期胚に高頻度で生じる単眼症や小頭症などの頭部異常の原因

を研究した。

アフリカツメガエルの初期胚は、受精後 30 分以内が過重力に対してもっとも感受性が高い⁽³⁾。また正常な頭部形成には Wnt シグナルの活性化が重要な機能を果たしていることが知られている。人工的に Wnt シグナルを阻害することにより頭部形成が抑制される^(5,6)。逆に初期胚で Wnt シグナルを異所的に活性化させると、正常な頭部を含む二次軸が誘導される^(7,8)。アフリカツメガエルの正常発生で内在性の Wnt シグナルは受精後 1 時間以内に表層回転という現象で活性化されることが知られており、

この表層回転は重力に感受性のあるプロセスである⁽⁹⁾。これらのことから、過重力によって引き起こされる頭部形成異常は、内在性の Wnt シグナルが抑制されるために引き起こされることが示唆された。そこで今回の研究では、過重力下で発生させた胚における内在性の Wnt シグナルの活性化の状態を調べた。

2. 過重力が頭部マーカー遺伝子の発現パターンに与える影響、および外部形態の定量的な評価

本研究では、まず過重力下で発生させた胚（以下、過重力胚）の頭部形成の異常を外部形態だけでなく頭部マーカー遺伝子の発現パターンでも調べた。頭部のマーカー遺伝子としては *Xotx*（前中脳、眼）を用いた。受精直後から 5G で発生させた初期胚が原腸胚期に達したとき過重力付加を止め、その後胚が尾芽胚期に達したときに固定し *Xotx* の発現を全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション法で調べた（図 1）。対照胚（1G）では、*Xotx* の発現は前中脳および眼で確認された（図 1A）。それに対し 5G 胚では、発現領域が前方にシフトしていることが観察された（図 1B）。これらの結果から、過重力胚では外部形態だけでなく、頭部マーカー遺伝子の発現パターンのにも頭部の形成が異常になっていることが示された。

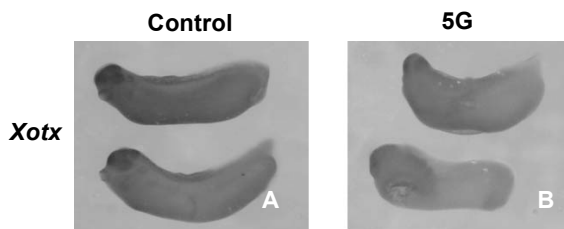


Fig. 1. Expression of head marker gene in control and 5G embryos.

次に過重力によって引き起こされる頭部の異常を定量的に評価するために、Kao と Elinson が提唱した DAI (Dorsoanterior Index) スコア⁽¹⁰⁾によって過重力胚を分類した。DAI は初期胚の背側化や腹側化の程度を表す指標として考え出されたもので、アフリカツメガエル初期胚の体軸構造の異常を表す指標として標準的に使われている。DAI 0 が頭部や背側構造を欠いた完全に腹側化した胚で、DAI 10 が逆に完全に背側化した胚を表し、DAI 5 が正常な胚である。対照胚、2G 胚、5G 胚が尾芽胚期に達したときに胚を固定し、各々のサンプルの DAI を測定した（図 2）。図 2 に示すように対照胚では DAI はすべての胚で 5 であるが、2G 胚、5G 胚となるにつれて DAI のスコアが低下してきた。このことは重力をかけるほど体の頭部（すなわち前方/背側）の形成が抑制されていることを表す。過重力胚に

DAI スコアを導入することで、胚の表現型をより定量的に表すことが可能になった。

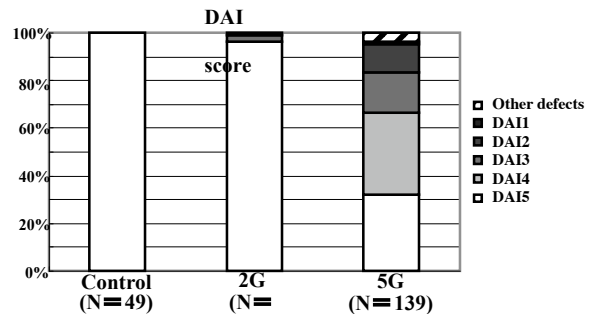


Fig. 2. DAI score of control, 2G, and 5G embryos.

3. 過重力胚における Wnt シグナルの活性化の状態

次に頭部形成に重要なはたらきをする Wnt シグナルの活性化の状態を過重力胚で調べた。Wnt シグナル伝達系では、 β -catenin タンパク質が中心的な役割を果たす^(6, 6)。Wnt シグナルにより安定化した β -catenin タンパク質は核へ移行し、そこで転写因子 TCF/Lef と結合し標的遺伝子の転写を行う。したがって標的遺伝子の発現量（mRNA の量）を測定することで Wnt シグナルの活性化の状態を調べることが可能である。今回われわれは Wnt シグナルの標的遺伝子として頭部形成に重要な機能を果たしている *Siamois* と *Xnr3* を選択し、これらの遺伝子の発現量を調べた。対照胚、5G 胚が原腸胚期（初期、中期、後期）に達したとき、胚を回収して RNA を抽出し、逆転写酵素で cDNA を合成した。そしてそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR 装置で定量的 RT-PCR を行った。内部標準遺伝子としてはアフリカツメガエルの初期発生過程ではほぼ同じレベルで転写されていることが知られている *ODC* 遺伝子を用いた。原腸胚初期の発現量を基準（100%）として、その後の mRNA の発現量を補正した。合計 3 匹のメス由来の初期胚についてそれぞれ実験を行った（図 3）。図 3 に示すように、メス 1 由来の初期胚では *Siamois*、*Xnr3* が、メス 3 由来の初期胚では *Xnr3* の発現が低下していた。それに対しメス 2 由来の初期胚では過重力胚における Wnt 標的遺伝子の発現に大きな変動は見られなかった。過重力に対する感受性は、母親であるメスによって個体差が大きいことが報告されている⁽³⁾。実際、メス 2 由来の初期胚は原腸胚期を過ぎ、神経胚—尾芽胚期に達しても頭部形成異常を示す胚の割合がメス 1、3 からの初期胚に対して少なかった。これらの結果は、過重力胚では内在性の Wnt シグナルの活性化が抑制され、頭部異常が生じたことを強く示唆する。

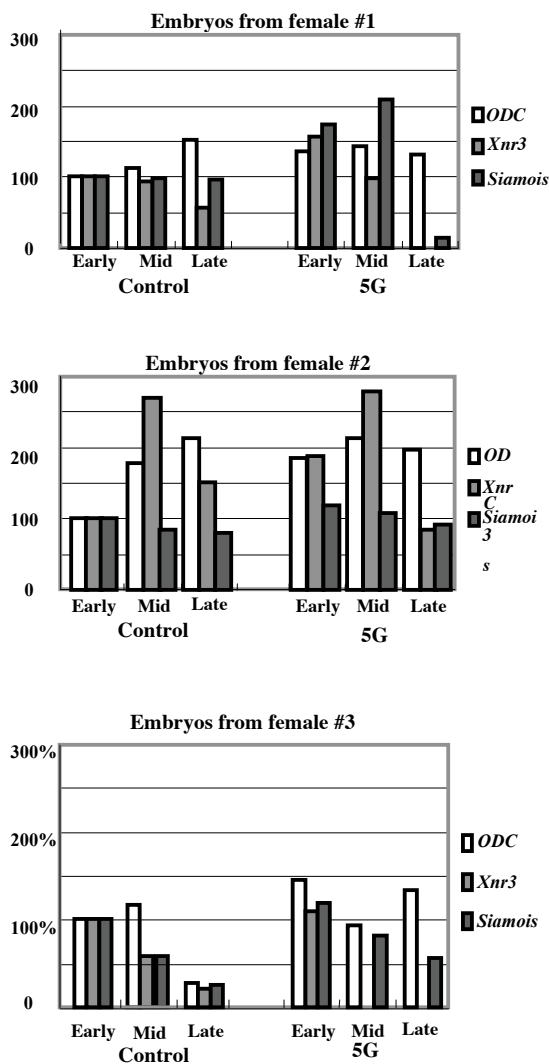


Fig. 3. Wnt-target gene expression in gastrula embryos from different females.

4. おわりに

今回われわれは、過重力胚で高頻度に観察される頭部異常の原因についての研究を行った。その結果、過重力胚では対照胚に比べ内在性の Wnt シグナルの活性化が抑制されていることがあきらかになった。Wnt シグナルはアフリカツメガエルの正常な頭部形成にとって中心的な役割を果たしていることが知られている。また受精後 Wnt シグナルが初期胚の中で表層回転により活性化されるタイミングは、胚が過重力に感受性が最も高い時期と重なる。さらに Wnt シグナルの活性化を行う表層回転は、微小管の重合により受精卵の植物極に存在する因子（本体は Wnt シグナルの活性化因子 Dsh タンパク質と考えられている⁽¹¹⁾)を将来の背側へ輸送するプロセスであり、重力に影響を受けることが知られている⁽⁹⁾。われわれの今回の実験の結果をこれまでの知見に重ねると、過重力と頭部形成異常に関して次のようなメカニズムが考えられる。



今回の実験では Wnt シグナルの活性化の状態を標的遺伝子 (*Siamois*, *Xnr3*) の発現で調べたが、今後は β -catenin タンパク質の安定化の状態や Dsh タンパク質の細胞内局在等を調べ、過重力による頭部形成異常の分子メカニズムに迫っていきたい。

参考文献

- (1) Neubert, J., Schatz, A., Bromeis, B. and Linke-Hommes, A. Effects of gravity on early development. *Adv. Space Res.*, 22, 265-271, (1998).
- (2) Kashiwagi, A., Hanada, H., Kashiwagi, K., Kubo, H., Shinkai, T., Fujii, H. and Kashiwagi, K. Effects of hypergravity on amphibian development. *Biol. Sci. Space*, 17, 215-216, (2003).
- (3) Kawakami, S., Kashiwagi, K., Furuno, N., Yamashita, M. and Kashiwagi, A. Effects of hypergravity environments on amphibian development, gene expression and apoptosis. *Comp. Biochem. Physiol., Part A* 145b, 65-72, (2006).
- (4) Shinkai, T., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Matsuda, K., Urano, S., Sato, H., Kubo, H., Furuno, N., Sakai, M., Watanabe, M., Yoshitome, S., Fujii H. and Yamashita, M. Effects of hypergravity on pituitary-target organs in the frog, *Xenopus laevis*. *Biol. Sci. Space*, 20, 40-43, (2006).
- (5) Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., Garner-Hamrick, P., Gumbiner, B., McCrea, P., Kintner, C., Noro, C. Y. and Wylie, C. Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell*, 79, 791-803, (1994).
- (6) Heasman, J., Kofron, M. and Wylie, C. Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach. *Dev. Biol.*, 222, 124-34, (2000).
- (7) Smith, W. C. and Harland, R. M. Injected Xwnt-8 RNA acts early in *Xenopus* embryos to promote formation of a vegetal dorsalizing center. *Cell*, 67,

753-65, (1991).

- (8) Sokol, S., Christian, J. L., Moon, R. T. and Melton D. A. Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell*, 67, 741-52, (1991).
- (9) Gerhart, J., Danilchik, M., Doniach, T., Roberts, S., Rowning, B. and Stewart, R. Cortical rotation of the *Xenopus* egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development. *Development*, 107, 37-51, (1989).
- (10) Kao, K. R. and Elinson, R. P. The entire mesodermal mantle behaves as Spemann's organizer in dorsoanterior enhanced *Xenopus laevis* embryos. *Dev. Biol.*, 127, 64-77, (1988).
- (11) Miller, J. R., Rowning, B.A., Larabell, C.A., Yang-Snyder, J.A., Bates, R. L and Moon, R.T. Establishment of the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation. *J. Cell Biol.*, 146, 427-37, (1999).