

過重力によって生じたアフリカツメガエル初期胚の頭部形成異常の解析 II

広島大・院理・両生研 柳澤誠、古野伸明、徳島大・総合科学部 渡部稔、広島大・院理・両生研 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、愛媛大・沿岸環境科学研究センター 鈴木賢一、ISAS/JAXA 山下雅道、山陽女子短大／広島工大 柏木昭彦

Molecular analysis of the head-defects in the *Xenopus* embryos raised hypergravity condition. II

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

^aInstitute of Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, ^bIntegrated Arts and Sciences, The University of Tokushima, ^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, ^hCMES, Ehime University, ⁱInstitute of Space and Astronautical Science, Japan Aerospace Exploration Agency, ^jSchool of Medical Technology, Sanyo Women's College.

E-mail : nfuruno@hiroshima-u.ac.jp

Abstract: Previously we showed that amphibian embryos raised under hypergravity conditions develop the various abnormalities, including head-defects such as microcephaly and cyclopia as the most common. We also showed that the expression of *Xag* (cement grand marker), and *Xotx2* (involved in fore- and midbrain and eye development) are suppressed in embryos under hypergravity. However, it is not known which region of the head is most sensitive to hypergravity, and if all regions of the head are affected by hypergravity. In the present study we investigated the effects of hypergravity on gene expression of *Xag*, *Xotx2* and *En2* (expressed in the region between midbrain and hindbrain) in tail-bud embryos of *Xenopus laevis* by whole-mount *in situ* hybridization (WISH). Double staining with *Xag* and *Xotx2* revealed that *Xotx2* expression was suppressed in embryos exposed to 5G, although the region expressed *Xag* was not changed. Furthermore, *En2* expression was not affected. These results strongly suggest that development of eye and fore- and midbrain is most sensitive to hypergravity and hypergravity does not affect the region posterior to the hindbrain.

Key words: *Xenopus*, hypergravity, head formation, gene expression

現在の地球は、温暖化や人口の増加により環境の悪化が起こっている。それを解決する1つの手段が宇宙空間、または他の惑星への移住である。人類が宇宙へ移住するための大きな問題の1つは地球とは異なる重力の影響である。よって、地球とは異なる重力環境でヒトが正常に生活できるかどうか、また、ヒト以外の動植物でも生活環境が正常に回るかどうか調べる事が重要である。両生類は宇宙環境が生物にどのような影響を与えるか調べるうえで適した動物であり、多くの実験がこの

動物を用いて行われている⁽¹⁻³⁾。今までに我々を含めていくつかのグループが、無尾両生類のツメガエルを用いて、過重力の初期発生や卵成熟に対する影響を調べて報告している⁽⁴⁻⁷⁾。これらの論文では、発生初期に過重力に曝露するときさまざまな異常が生じる事が報告されている。その異常の中で、単眼症や小頭症などの頭部異常が最も多く観察される。我々は、今までの一連の仕事から、その頭部形成の異常がWntシグナルが抑制される事で生じる事を報告した⁽⁸⁾。また、セメント腺のマーカー

である *Xag*⁹⁾、前脳、中脳や眼で発現する *Xotx2*¹⁰⁾ の発現を whole mount *in situ* hybridization (WISH)¹¹⁾ を用いる事により解析し、それらの発現が過重力によって抑制される事も示した。しかしながら、頭部の中でも、どの部位がより過重力に対して感受性が高いのか、また、形態的に頭部に異常が生じるのは間違いないが、頭部のすべてが過重力の影響を受けるのか、は明らかではなかった。そこで今回我々は、頭部のどの部分が過重力に対して感受性が高いのか、また、頭部すべてが過重力の影響を受けるのかどうかを、*Xag*、*Xotx2*、*En2*¹²⁾ のそれぞれの遺伝子発現を WISH で調べる事によって詳しく解析したので報告する。

1. *Xag*、*Xotx2* の発現に対する過重力の影響

今までの我々の実験から、過重力は、初期発生において頭部の形成に影響を与える事が明らかになっている。そこで今回我々は、頭部のどの部分が過重力に対して感受性が高いのかを *Xag*、*Xotx2* の発現を指標にして調べた。そのため、両生類研究施設で飼育され、今まで過重力の実験に使われたアフリカツメガエルを使用して実験を行った。メスカエルにホルモン注射する事によって未受精卵を産卵させ、それに媒精して人工受精を行った。媒精後すぐに、受精卵をスイングバケット式の過重力負荷装置にセットして、2G、5Gの過重力をかけた。コントロールの受精卵は、装置の近くにおいて約 21°C で発生させた。コントロールがステージ 11 に達した時期に装置を止めて尾芽胚まで発生させた。その後、胚を MENFA で固定して 100% エタノール中で保存した。

今まで *Xag*、*Xotx2* の発現を調べた時は、過重力の影響を強く受けた胚を使用していたが、頭部のどの部位が感受性が高いかどうかを調べるために、今回は過重力の影響が弱い胚を選んだ。その理由は、影響を強く受けた胚は、どちらの発現も抑制される可能性があるからである。影響が弱い胚を用いて、予備的に *Xag*、*Xotx2* の発現を WISH でそれぞれ単独で調べると、対照胚と比較して *Xotx2* の発現は明らかに下がっているにも関わらず、*Xag* の発現領域はほぼ正常であるという結果が得られた (data not shown)。しかしながら、これらの結果は、それぞれ別の胚を使って染色しているので、*Xotx2* の発現が下がっている胚で *Xag* の発現が正常であるという事を正確には意味しない。そこで我々は、1つの胚を用いて *Xag* をマゼンダフォスで赤に (矢頭で示す)、*Xotx2* を BM パープルで紫 (矢印で示す) に染める 2重染色法を用いて調べた。その結果を図 1 に示す。図 1 から分かるように、2重染色された胚では、*Xotx2* の発現が下がっているにも関わらず *Xag* の発現は対照胚とほぼ同じであった。これらの結果は、過

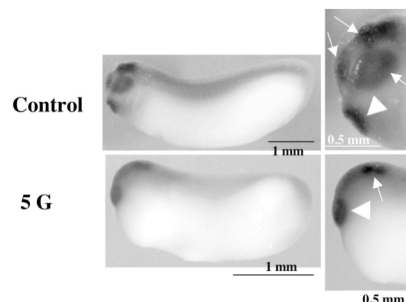


Fig. 1 Expression pattern of head marker genes, *Xag* and *Xotx2* in control and 5G treated embryos. Regions expressed *Xag* or *Xotx2* are indicated by an arrow head and arrows.

重力に対してもっとも感受性が高いのは、*Xotx2* の発現である事が示された。これらの事から、過重力は、頭部の形成に対して一様に影響を与えるのではなく、前脳や中脳、眼の発生が過重力に対して最も感受性が高い事が明らかになった。

2. *En2* の発現に対する過重力の影響

前の結果から、頭部は、過重力に対して一様に影響を受ける訳でなく、最も感受性が高いのは前脳や中脳、眼の発生である事が示された。今までの我々の結果から、過重力は頭部の形成に異常を与えるが、形態学的な観察では、頭部全体が影響を受けているのか、それとも頭部の一部しか影響を受けていないか判別は難しい。そこで、*Xag* や *Xotx2* の発現している領域のすぐ後方の中脳と後脳の境界部で発現する *En2* を用いてその領域が影響を受けるかどうか調べた。*En2* をプローブとして WISH を行ったのが図 2 である (図では、発色した紫色を白黒に変換しているため、対照胚の染色が 5G に比較して弱く見えるが、原図では、少し弱い程度でほとんど変わらないと判断される)。その結果、過重力を曝露した胚でも *En2* の発現は、対照胚とほとんど変わらなかった。この時、*En2* の発現部位が対照胚と比較して前方に移動して見えるのは、過重力の影響の為、*En2* の発現する部位より前方が縮小したため前方にシフトしたように見えていると考えられる。この結果から、頭部形成に対する過重力の影響は、主に中脳から前部の形成にある事が示唆された。

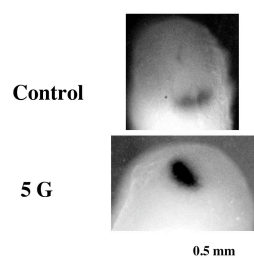


Fig. 2 Expression of *En2* in control and 5G treated embryos.

3. 終わりに

今までに我々は、過重力に曝露するとさまざまな異常が生じる事、また、その異常の中で、頭部形成の異常がもっとも良く観察される事を報告していた。また、その異常を遺伝子の発現レベルでも解析し、*Xag*や*Xotx2*の発現が抑制されている事も報告している。今回、我々は過重力に曝露した胚に高頻度に観察される頭部形成異常について、*Xag*や*Xotx2*、*En2*という頭部で発現される遺伝子をプローブとしてWISHを行い遺伝子レベルで詳しく解析した。その結果、過重力胚において、*Xotx2*の発現が抑制されているにも関わらず*Xag*の発現は対照胚とほとんど変わらなかった。この事は、頭部で、前脳や中脳、眼の発生が過重力に対してもっとも感受性が高い事を示唆する。また、中脳と後脳の境界で発現している*En2*の発現は、5Gで処理した胚と対照胚でほとんど変わらなかった。この結果は、後脳以後の部分は、過重力の影響をほとんど受けない事を示唆する。但し、今回は、過重力の影響が少ない胚を用いて実験しているので、影響の強く受けた胚ではどうか調べていきたい。また、さらに後方のマーカー遺伝子を用いて、過重力がそれらの発現に影響を与えないのかも確かめていきたい。

参考文献

- 1) Snetkova, E., Chelnaya, N., Serova, L., Saveliev, S., Cherdanzova, E., Pronych, S., Wassersug, R., Effects of space flight on *Xenopus laevis* larval development. *J. Exp. Zool.* 273, 21-32, (1995).
- 2) Wassersug, R. J., Yamashita, M. The mechanics of air-breathing in anuran laevae: implications to the development of amphibians in microgravity. *Adv. Space Res.* 25, 2007-2013 (2000).
- 3) Gualandris-Parisot, L., Husson, D., Foulquier, F., Kan, P., Davet, J., Aimar, C., Dournon, C., Duprat, A. M., *Pleurodeles waltl*, amphibian, Urodele, is a suitable biological model for embryological and physiological space experiments on vertebrate. *Adv. Space Res.* 28, 569-695, (2001).
- 4) Neubert J, Schatz A, Bromeis B, Linke-Hommes A., Effects of gravity on early development. *Adv Space Res.*, 22, 265-271, (1998).
- 5) Kashiwagi A, Hanada H, Kashiwagi K, Kubo H, Shinkai T, Fujii H, Kashiwagi K, Effects of hypergravity on amphibian development. *Biol. Sci. Space*, 17, 215-216, (2003).
- 6) Kawakami S, Kashiwagi K, Furuno N, Yamashita M, Kashiwagi A., Effects of hypergravity environments on amphibian development, gene expression and apoptosis. *Comp. Biochem. Physiol., Part A* 145b, 65-72, (2006).
- 7) Shinkai T, Kashiwagi A, Kashiwagi K, Matsuda K, Urano S, Sato H, Kubo H, Furuno N, Sakai M, Watanabe M, Toshitome S, Fujii H, Yamashita M., Effects of hypergravity on pituitary-target organs in the frog, *Xenopus laevis*. *Biol. Sci. Space*, 20, 40-43, (2006).
- 8) Watanabe, M., Yanagisawa, M., Furuno, N., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashita, N. and Kashiwagi, A. Analysis of head-defects in *Xenopus* embryos raised under hypergravity. *Space Utiliz. Res.* 25, 155-158, (2009).
- 9) Sive, H. L., Httori, K. and Weitraub, H. Progressive determination during formation of the nteroposterior axis in *Xenopus laevis*. *Cell*, 58, 171-180, (1989).
- 10) Kablar, B., Vignali, R., Menotti, L., Pamese, M., Andreazzoli, M., Polo, C., Giribaldi, M., G., Boncinelli, E. and Barsacchi, G. *Xotx* gene in the developing brain of *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 55, 145-158, (1996)
- 11) Harlamnd, R. M. In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Method Cell Biol.* 36, 685-695, (1991).
- 12) Itoh, K. and Sokol, S. Graded amounts of *Xenopus* disheveled specify discrete anteroposterior cell fates in prospective ectoderm. *Mech. of Dev.* 61, 113-125, (1997).