

4. 両生類の原腸形成運動と頭部構造の形成

橋本主税（主任研究員）、原田綾乃（奨励研究員）

國本拓也（阪大院生）、守 翔子（研究補助員）

はじめに

脊椎動物の発生過程を見ると、受精から卵割を経て原腸胚に至る過程の様式は種によってかなり異なっているが、咽頭胚の形を見ると脊椎動物種を越えて高度に保存されているように見える。受精卵やそれに続く卵割の様式が異なるということは、卵形成過程に違いがあるということであろう。これは最初の脊椎動物が誕生したときから長い時間を経てゲノムに変異が蓄積し、その結果としての差異と考えられる。これに対して咽頭胚の形態が保存されていることは、形づくりの過程でその形態へと誘導されやすい未知なる何かがあるのかもしれないが、ゲノムへの変異は中立に導入されるとすれば、咽頭胚とは異なる形へと導くいかなる変異も進化の過程では淘汰されて後世まで残り得なかったと考えても良いのかもしれない。

咽頭胚期は、発生過程で見ると頭部構造が形成された時期である。頭部構造は脊椎動物を定義づける構造とされ、頭部構造の大部分を形成する神経堤細胞を獲得したものが脊椎動物であるという考え方もできる¹⁾。したがって、咽頭胚の形が脊椎動物の間で高度に保存されていることはある意味では理に合っているのだろう。この意味において、進化の過程で神経堤細胞を獲得したときに脊椎動物が出現したと考えることはあながち間違えてはいないと思える。

私たちは、個体発生過程において神経堤細胞がどのように誘導されるのかを知ることで進化の過程で神経堤細胞がどのように獲得されたのかを知る足がかりにならないかと考え研究を進めている。脊椎動物では高度に保存されているものの、無脊椎動物ではその存在が見当たらないP2Y受容体遺伝子ファミリーのいくつかは、ツメガエルの初期発生過程で頭部形成に重要な領域に発現することが知られている²⁾。今年度は、この遺伝子ファミリーのうちP2Y4に注目してツメガエル頭部形成に関する機能を解析した。この遺伝子は頭部オーガナイザー・頭部神経領域および神経堤・プラコード領域で発現が見られ、頭部形成のさまざまな過程で機能していることが示唆された。

私たちは、ツメガエルの神経堤の誘導に決定的に重要な遺伝子として Xhairy2 を見いだしている³⁾。Xhairy2 は CDK inhibitor である p27 の発現を抑制し、未分化外胚葉細胞の細胞周期を G0 ではなく増殖状態に維持することで多分化能を維持し神経堤細胞へと誘導すること、Xhairy2 の機能阻害により、p27 の異所発現が起こり、神経堤細胞の誘導が阻害されることが明らかとなった。神経堤細胞はその性質から、初期発生のある程度後期になるまで多分化能を維持しなければならない細胞である。逆に言えば、発生の初期に何か他の細胞運命を辿ってはならない細胞ともいえる。Xhairy2 の知見を踏まえると、細胞周期を適切に制御することにより分

化・未分化の調節を行ない、未分化性を維持し続けさせられた細胞が神経堤になったのかもしれない。この点を解析するために、今年度は細胞周期、特に G1・G0・S 期の調節と神経堤細胞の誘導に何らかの関連があるかどうかについて解析を始めたところである。

脊椎動物の発生過程を見ていると、原腸形成運動に入る直前までの形態は直感的にはかなり多様に感じられるが、原腸形成運動が完了し神経板が生じてから以降、咽頭胚に至る形づくりの過程は互いに似ている。原腸形成運動とは細胞の「民族大移動」のようなドラスティックな形態変化の過程であり、この動きによってそれまでの差異を補正・吸収し、脊椎動物に共通の形を作り上げているのかもしれない。私たちは、このような視点から脊椎動物を脊椎動物たらしめる発現現象として原腸形成運動を考え、その脊椎動物種間での普遍性と多様性を求めてきた結果として、両生類の原腸形成運動の新しいモデルを提出し、そこから脊椎動物に共通する原腸形成モデルの構築を試みてきた⁴⁾。今年度は、両生類の背側構造の形成に必要な十分な初期原腸胚の領域を決定することを試みたところ、羊膜類（特に鳥類）の原腸形成過程と比較することで面白い共通性が見いだされることがわかった。

結果と考察

P2Y4 受容体の頭部形成過程における役割

P2Y 受容体は、細胞外に放出されたヌクレオチドによって活性化され、細胞の増殖や分化、移動などに関与していることが明らかになっているが初期発生過程における機能はほとんど明らかになっていない⁵⁾。アフリカツメガエルの P2Y 受容体は、6つのサブタイプが明らかになっており、私たちはその中でも最も相同性の高い3つのサブグループに注目している。すでに *P2Y1* と *P2Y11* は予定頭部領域での発現を確認しており、機能阻害実験から頭部形成に関わっていることを明らかにしている。脊椎動物は、進化の過程で神経堤細胞やプラコードといった特殊な細胞集団を獲得することで無脊椎動物にはない複雑な頭部構造を有することができたと言われており⁶⁾、脊椎動物間における P2Y 受容体の保存性の高さと P2Y 受容体が頭部形成過程に重要であることから、私たちは P2Y 受容体の出現と脊椎動物の頭部構造の獲得に関係性があるのではないかと期待し研究を進めている。

本研究では、*P2Y1* と *P2Y11* と同じサブグループに含まれる *P2Y4* に特に注目した機能解析を行っており、昨年度までの研究結果からは、人工ヌクレアーゼ TALEN を用いて *P2Y4* のノックアウトを行なった個体は頭部全体が萎縮した表現型を示し、頭部形成過程に *P2Y4* が必要であることを明らかにした。さらに、初期発生過程における *P2Y4* ノックアウトの影響を調べると、神経堤細胞やプラコード、神経マーカー遺伝子の発現が初期神経胚期で低下しており、頭部形成が進行する初期の段階で *P2Y4* 欠損の影響が生じていることが考えられ、今年度はさらに詳細な解析を行なった。

P2Y4 の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーションによって調べると (図 1), 胞胚期から帯域に発現が確認でき (図 1a), 原腸形成期では予定神経外胚葉やその内側に接しているオーガナイザー領域に強い発現が確認できた。また, 腹側では内側に陥入する

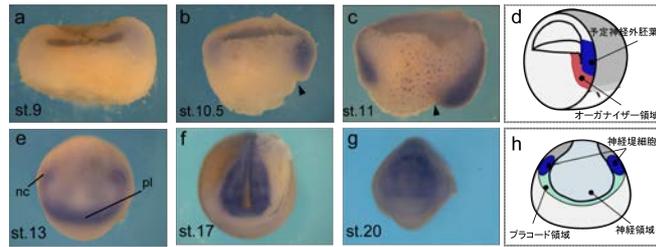


図 1 *P2Y4* の発現パターン
胞胚期 (a), 原腸胚期 (b, c), 原腸胚期の発現パターン of 模式図 (d), 神経胚 (e-g), 神経胚における発現パターン of 模式図 (h). 矢じり, 原口.

involuting mesoderm にも局在が見られた (図 1b, c)。初期神経胚期では, 表皮と神経の境界部分から生じる神経堤細胞やプラコード領域に強い局在が見られ (図 1e), その後も神経褶や神経組織に局在していた (図 1f, g)。神経誘導が進行する予定神経外胚葉やオーガナイザー領域での発現, また頭部構造の大部分を構成する神経堤細胞やプラコードにおける発現は, *P2Y4* が頭部形成過程において重要な時期や領域に発現していることが示された (図 1d, h)。

ノックアウト胚では, 初期神経胚から神経マーカーや神経堤マーカーの発現が低下していたため, 原腸形成期における神経誘導への影響が考えられた。そこで, 原腸形成期のオーガナイザー

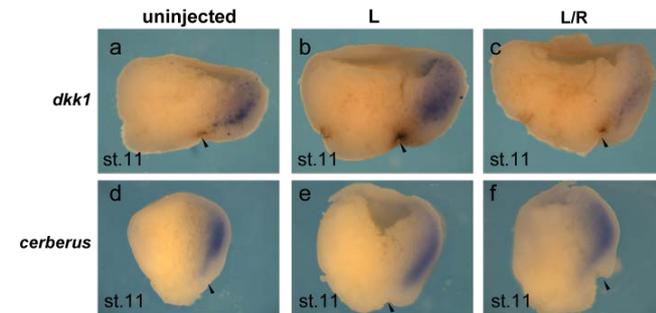


図 2 *P2Y4* ノックアウト胚はオーガナイザー遺伝子の発現が低下する中期原腸胚期における頭部オーガナイザー遺伝子, *dkk1* (a-c) と *cerberus* (d-f) の発現. 矢じり, 原口.

遺伝子の発現を調べると, ノックアウト胚において中期原腸胚期に *dkk1* (図 2c) や *cerberus* (図 2f) の発現が低下することが明らかとなった。その一方で, BMP のアンタゴニストである *chordin* や *noggin* については, 明らかな発現の変化は見られなかった。これらの結果は, *P2Y4* がオーガナイザー遺伝子の発現に寄与することを示唆しており, それを支持する結果として次のような結果も得られている。4 細胞期の腹側に *P2Y4* mRNA をインジェクションすることで *P2Y4* の過剰発現を促し, 上に述べたようなオーガナイザー遺伝子の発現を胞胚期で調べると (図 3), 正常胚では *dkk1* や *cerberus* の発現は見られないが (図 3a, c), *P2Y4* の過剰発現によ

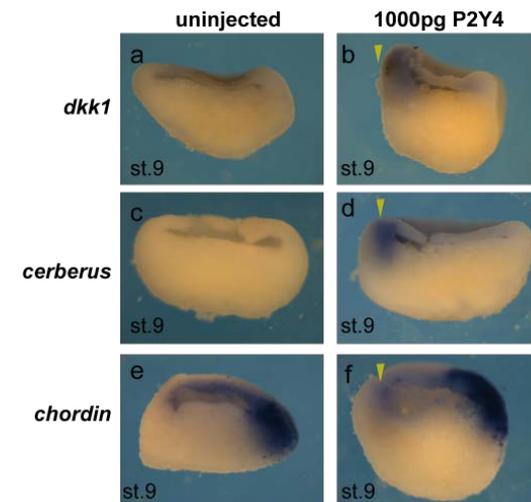


図 3 *P2Y4* は異所的に頭部オーガナイザー遺伝子を誘導できる

コントロール胚 (a, c, e) と 4 細胞期で腹側の割球に *P2Y4* mRNA をインジェクションした胚 (b, d, f) の *dkk1* (a, b) と *cerberus* (c, d), *chordin* (e, f) の発現比較. 矢じり, インジェクション側.

って異所的な発現が引き起こされることが分かった (図 3b, d, 矢じり)。また, *chordin* の発現については, *P2Y4* の過剰発現による異所的な発現は生じておらず, ノックアウト胚で示された結果と矛盾がなかった。以上のような結果は, オーガナイザー領域に発現している *P2Y4* が Wnt アンタゴニストとして知られている *dkk1*⁷⁾ や *cerberus*⁸⁾ の発現に必要であり, 頭部オーガナイザー形成において重要な役割を持つことが明らかとなった。これまでの結果から, *P2Y4* の機能を失うことによってオーガナイザー領域が正常に機能しなくなったことで, 神経誘導が不十分となり頭部構造が萎縮すると考えられる。神経誘導時の *P2Y4* の発現は, オーガナイザー領域だけでなく予定神経外胚葉にも局在が見られているため (図 1b, c), 予定神経外胚葉における *P2Y4* の働きについても解析を進めていく必要がある。さらに, 神経胚期に神経堤細胞やプラコード領域に特に強い局在が見られるようになり, これら細胞集団の細胞のコンピテンスや維持, 分化にも関連する可能性が考えられる^{3,9)}。

ここまでは, 頭部形成に関する結果を記してきたが, *P2Y4* はさらに形態形成運動にも関与しているという結果も得ることができた。*P2Y4* ノックアウト胚では, 頭部の萎縮に加え原口が閉じきれず開いたままで発生が進行し *spina bifida* 様の表現型も多く見られていた。これについては, 中胚葉マーカーである *brachyury* (*bra*) の発現を原腸形成期で調べると (図 4), コントロール胚と比べて (図 4a, b) ノックアウト胚では, 原口から胚内部へ入り込む部分が陥入できず原口の閉鎖が遅れ, convergent extension によって伸長する脊索が見られな

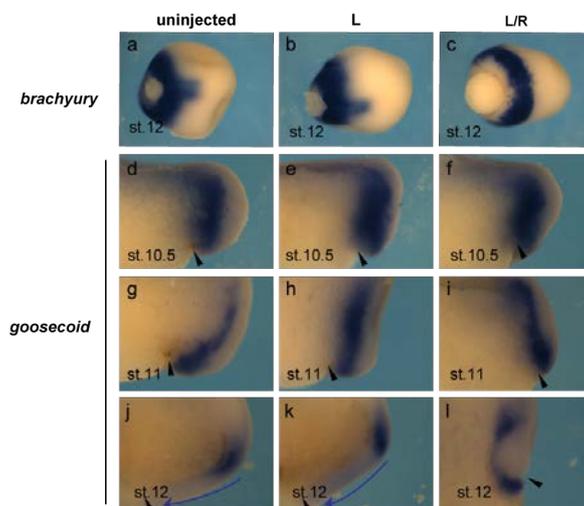


図 4 *P2Y4* ノックアウト胚は原口の閉鎖が完了しない *brachyury* の発現パターンより (a-c), 内側に入る中胚葉が陥入できていないことが示された。 *gooseoid* の発現パターンより (d-l), 原口周辺部の内側へ入り込む動きが中期原腸胚期以降停止した (i, l)。

かった (図 4c)。そこで, 前脊索中胚葉マーカー, *gooseoid* (*gsc*) の発現によって, 原口付近の陥入する中胚葉への影響を調べた (図 4d-l)。初期原腸胚期では, コントロールとの差は生じていなかったが (図 4d-f), 中期原腸胚期では原口から内側に入り込む前脊索中胚葉が原口から胚の外側へ残ったままになっており (図 4i), その後は脊索中胚葉の convergent extension も進行していなかった (図 4l)。 *bra*, *gsc* どちらについてもノックアウト胚とコントロール胚では, 発現量の差は見られなかったことから, 中胚葉誘導に影響はないが, mesoderm involution や convergent extension といった形態形成運動に大きく影響することが示唆された。

これまで述べてきたように, 本研究では *P2Y4* は神経誘導の際にオーガナイザー形成に必要であり, 頭部形成過程に重要な受容体であることが明らかとなった。さらに, 形態形成運動との関

連も示されており、初期発生過程で複数の機能を持つことが示唆された。今後は神経誘導時の予定神経外胚葉やオーガナイザー領域での発現、神経堤細胞やプラコードに見られる強い局在など、時空間的な発現パターンの変化やそれに伴う機能を詳細に解析することで P2Y 受容体の初期発生過程における役割や意義を明らかにすることができると期待している。

神経堤細胞の誘導と細胞周期の関係

頭部の神経が作られるためには、プラコードと神経堤と呼ばれるこれらの領域が必要である。そして、この 2 つの領域は表皮と神経の間、つまり、表皮でも神経でもない境界領域から発生することが知られている。本研究室では頭部神経構造のかたちづくりに着目し、今年度は Geminin と Xhair2 という 2 つの遺伝子を通して、説明することを試みた。

細胞はある程度の大きさになると、分裂し、また、成長をする。細胞内では G1 期 (DNA 合成準備)→S 期 (DNA 合成)→G2 期 (分裂準備)→M 期 (分裂準備) のように、染色体を増やし、2 つに分けるといことがされている。この一連の流れを細胞周期というが、一般には細胞分裂と細胞分化は同時に起こることはないと考えられている。Geminin は S 期に起こる染色体の複製において重要な働きをしていることが知られている。Geminin 欠損マウスを作成すると受精後 2~3 日で細胞増殖ができなくなり死んでしまい¹⁰⁾、ツメガエルでは、Geminin の強制発現により非神経表皮で神経マーカー遺伝子を発現させることができるという報告がある¹¹⁾。ツメガエル胚にお

ける Geminin の発現を in situ hybridization 法を用いて調べたところ、尾芽胚期で頭部、頭部から尾までの軸に沿って発現していることを確認した。これは先の神経マーカー遺伝子を発現させることも踏まえると、頭部構造を形成する際の細胞周期に Geminin が関わっていることが考えられる。さらに、私たちは Geminin のアンチセンスモルフォリノ (MO) を設計し、ツメガエル胚の顕微注入を行なった。Geminin には H と L の 2 種類が存在し、それぞれ単独で顕微注入したところ、GemininH-MO では頭部構造が形成されていない胚を得る事ができた (図 5)。一方、

GemininL-MO を顕微注入した胚では大きな変異はみられなかった。

本研究室で研究してきた Xhair2 遺伝子も MO を顕微注入すると、頭部の形成異常がみられた。この 2 つの遺伝子に共通するのは細胞周期に関わる因子であるということである。Geminin は染色体の複製に関わる因子であり、Xhair2 は細胞周期に関わる p27 の発現を抑える働きがあるという点である³⁾。Geminin に関してはクロマチンリモデリングタンパク質として知られる Brg1

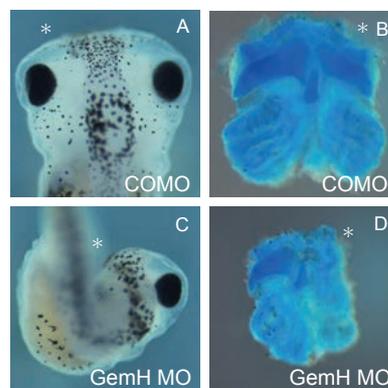


図 5 GemininH MO を顕微注入した胚では頭部の形成が不完全になる
ツメガエル胚の左頭部に GemininH MO を顕微注入したところ、頭部が形成されなくなった (C、D)。* は顕微注入した側を示す

をアンタゴナイズすることで未分化な状態を維持することが報告されており¹²⁾、Xhairy2にも同じ働きを持つのか調べることにした。

細胞を初期化する遺伝子として、山中ファクター(*Oct3/4*、*sox2*、*klf-4*、*c-Myc*)が知られているが¹³⁾、ツメガエルでは *Oct3/4* のかわりに POU91 がマーカーであるとされている¹⁴⁾。これらは未分化な状態を維持にも関わる遺伝子で本研究ではこの遺伝子の未分化性の指標として用いた。ツメガエルの胞胚腔の屋根の組織は、外胚葉(表皮または神経)の予定運命を有し、この領域を切り出して培養すると丸いかたちをした不整形表皮になるが、アクチビンなどを作用させることで中胚葉へと分化して伸長するなど、さまざまな誘導因子に対する応答能を維持している。本研究では4細胞期の4つの割球に *Xhairy2* の活性を強めた *Xh2bEn* mRNA を顕微注入し、胞胚期である stage 8 でアニマルキャップを切り出し、stage 12 までそのまま培養した。これらを4つの未分化性マーカーで発現を確認したところ、どれも発現が上昇していることから(図6)、*Xhairy2* はアニマルキャップにおいても未分化性の維持に関わることが考えられる。

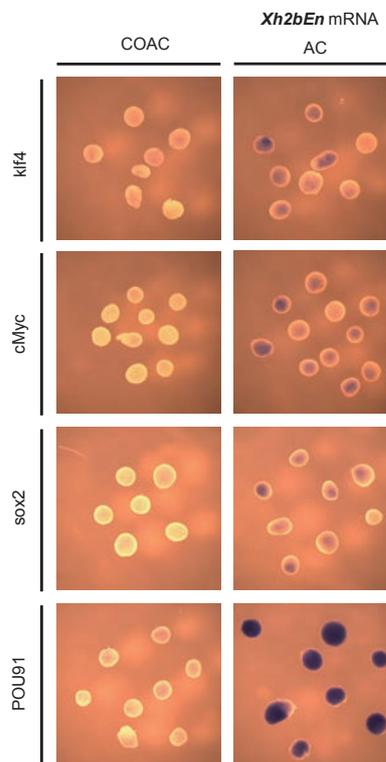


図6 *Xhairy2* は *klf4*、*cMyc*、*sox2*、POU91 の発現をあげる4細胞期の4割球に *Xhairy2* を顕微注入し、stage 8 のツメガエル胚からアニマルキャップを切り出し、stage 12 で固定した。4種類の遺伝子の発現が上昇している事を確認した。

細胞周期のイベントには現在知られているだけでも多くの因子が複雑に関与している。本年度の結果はまだ予備実験の域を出ず、細胞周期と頭部形成との関係について語ることはできないが、Geminin の機能を制御するような *cdh1* や *em1* などの機能阻害あるいは強制発現胚で頭部形成過程に影響が見られるものもあり、今後は他の因子とともに互いの関係について丁寧に見て行く必要がある。

アフリカツメガエルの背側構造の形成に必要な最小領域

両生類の原腸形成運動は初期原腸胚の表層に存在するオーガナイザーが原口から胚内部に陥入し、動物極方向へ胞胚腔の屋根をさかのぼっていく^{15, 16)}。そして、そのさかのぼっていく最前方部が原腸胚中期から後期にかけて胞胚腔の屋根に存在している予定神経外胚葉に到達することにより動物極において頭部を形成するとされてきた¹⁷⁾(このオーガナイザーと予定神経外胚葉の二つの組織の物理的接触の確立を ACE と呼ぶ)。しかし、私たちの研究によってこのさ

かのぼり運動は実際起こっていないことが明らかになった。そして、従来考えられてきたよりも早い初期原腸胚期 (stage 10.25) に赤道領域で ACE が起こり、頭部をつくることが証明され¹⁸⁾、新たな原腸形成モデルを提唱した⁴⁾。さらに、ACE 時の胞胚腔の屋根を除去して発生させた胚は中枢神経系・完全な頭部・セメント腺・中軸中胚葉・体節中胚葉のような背側構造だけでなく側面の表皮も形成することが確認され、胞胚腔の屋根は腹部表皮の一部になるだけであることも示した⁴⁾。

そこで、私たちは ACE 時の胞胚腔の屋根以外の領域でもツメガエルの背側構造の直接的には貢献しない領域があると予想し、背側構造の形成に必要な十分な領域を定義することを試みた。(以下ここでは、脳・眼・セメント腺を含む完全な頭部・中軸中胚葉・体節中胚葉・神経管などの構造を合わせ持つ状態を「完全な背側構造」と呼ぶ。)

まず、図 7a のように ACE 時に「胞胚腔の屋根」を「胞胚腔の床」水準で切除し、上下逆さまにして胚の帯域 (原口から赤道までの最外層) を段階的に除去した。胞胚腔の屋根を取り除いた胚を植物極側から見たとき (図 8b)、図 7c・d で示したように ACE 時に約 500 μm となっている原口はその

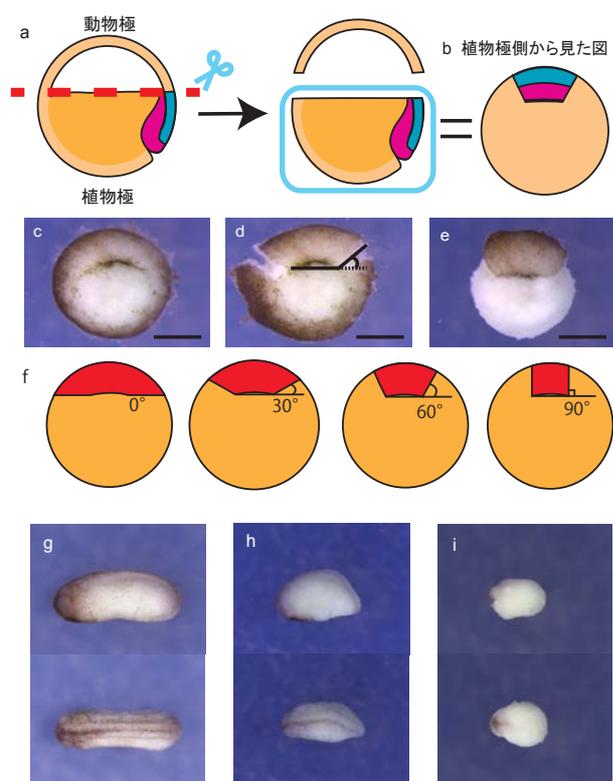


図 7 ACE 時の最外細胞層の段階的な除去の結果。

ACE 時の胞胚腔の屋根を赤い破線に沿って除去し (a)、その胚を切断面を下にして植物極側から見た図。模式図 (b) の実物は c であり、d のように原口の両端を結ぶ直線と切れ目の角度を定め、原口を含む領域を残して残りの最外細胞層を除去した (e)。赤で示した領域が残るように、切れ目の角度を約 0°・30°・60°・90° として原口を含まない最外細胞層をそれぞれ除去した胚 (f)。コントロール胚 (g)、f の 60° と 90° の胚を発生させた尾芽胚 (h・i)。g・h・i の上段は胚の側面、下段は背側から撮影。スケールバーは 500 μm。

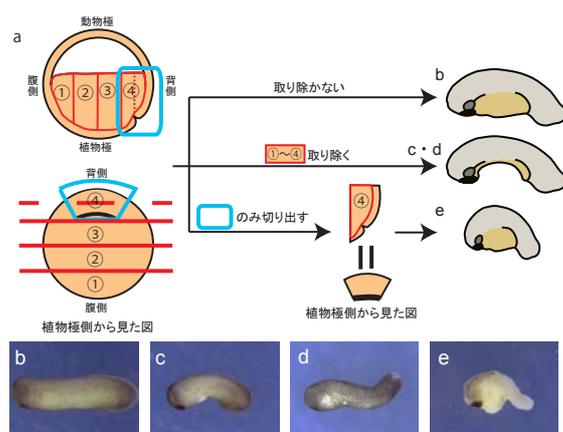


図 8 ACE 時の内胚葉の段階的な除去による発生結果と marginal zone と内胚葉の最小領域単体での発生結果。

胚を断面から見たとき、4等分にした内胚葉を腹側から段階的に除去し、尾芽胚まで発生させた (a)。コントロール胚 (b)、①+②+③を除去した胚 (c)、①+②+③+④の赤い破線の腹側半分を除去した胚 (d)。内胚葉の④を含んだ領域と接する最外細胞層の最小領域のみを切り出した胚様体。

まま残し、原口の両端を結ぶ直線と定めた角度で切れ目を入れ、原口を含む領域以外の最外細胞層を除去した (図 7e, f)。すると、切れ目の角度が $0^\circ \cdot 30^\circ \cdot 60^\circ$ のときまでは、残した領域が尾部方向に伸長することで背側構造がつくられ、また側面の表皮も確認することができた (図 7h)。しかし、 90° のとき、残した最外細胞層が 60° のときまでのように伸長することはなく神経褶の形成も見られなかった。さらに発生が進むと背側の構造や側面の表皮は作られず、セメント腺もコントロール胚より小さくなっており眼のような頭部の構造がみられないので、 60° のときの赤で示した領域を最外細胞層の最小領域とした。次に、背側構造の形成に必要な胚内部における最小領域を決定するために、いくつかの段階に分けて内胚葉を除去することにした。ACE 時に図 8a のように胚の断面から見て内胚葉を 4 等分にして腹側から 1/4 ずつ除去し、尾芽胚まで発生させた結果、①+②+③を除去した個体は、腹部組織を欠損し正常胚より小さくなってしまいが、コントロール胚と同様に完全な背側構造をもっていた (図 8b, c)。それに加え、内胚葉の④の赤い破線の腹側半分を除去した胚でも頭部・背側構造・側面と腹部表皮を確認することができたため (図 8d)、ACE 時の内胚葉に関しては現在、背側の約 1/4 の領域を背側

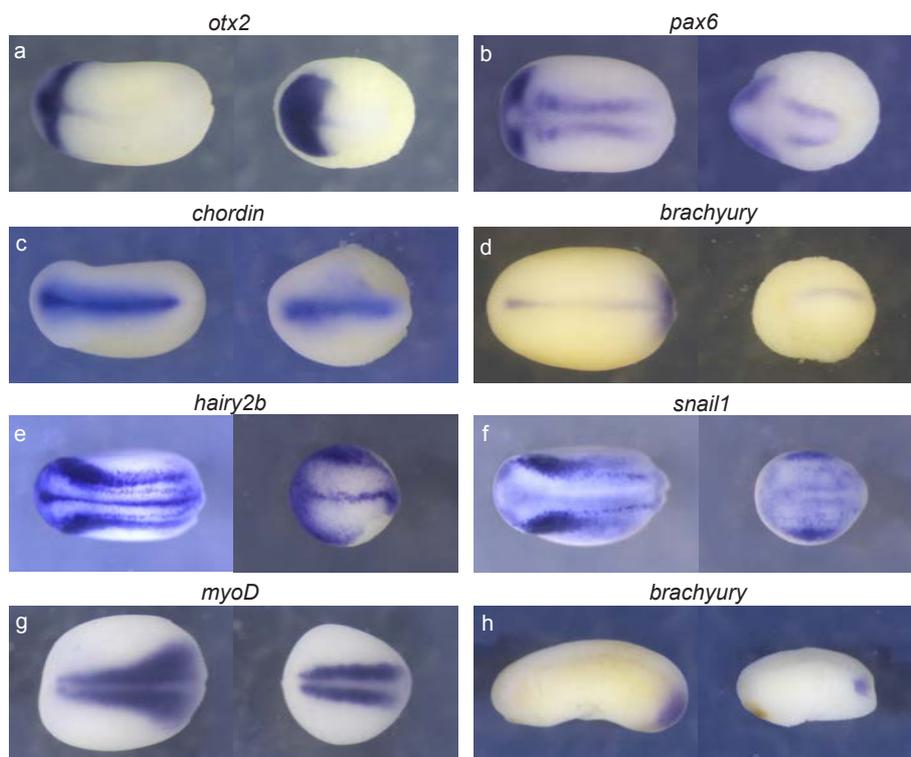


図 9 Whole mount in situ hybridization (WISH) 法による ACE 時の最外細胞層の最小領域と内胚葉のみを残した胚の背側構造の遺伝子発現。

stage15 における神経マーカー (*otx2, pax6*)・脊索マーカー (*chordin, brachyury*)・神経堤マーカー (*hairy2b, snail1*)・体節マーカー (*myoD*) の発現 (a ~ g)、stage25 における尾部マーカー (*brachyury*) の発現 (H)。a ~ g は胚の背側から、h は側面から撮影したものである。

構造の形成に必要な最小領域とした。これまでの結果から最小領域以外の最外細胞層と内胚葉は背側構造の形成に積極的に関与しておらず、定義した最小領域さえあればツメガエル胚の背側構造を形成できることがわかった。実際に、最外細胞層と内胚葉の最小領域のみを持つ胚様体にもセメント腺・や眼・尾部にかけての構造形成に十分であろうことがわかる (図 8e)。

続いて、ここまで最小領域が背側構造を形成しているのが外部形態をもってしか確認されていないので、内胚葉が背側構造の形成に直接的には貢献しないこと踏まえて、図 7f の切れ目の角度が 60° の時の最外細胞層の最小領域と内胚葉のみを持ったツメガエル胚を用いて背側構造の内部器官がどこまでつくられているか調べた。ACE 時の胞胚腔の屋根を切除し、内胚葉と最外細胞層の最小領域を残して発生をさせた尾芽胚(stage 25)の横断切片では、現在までに神経管や脊索の構造を確認することができたがその他の構造は未確認であるので、再度切片を作製し調べる予定である。次に、in situ hybridization 法により様々なマーカーを用いて神経胚(stage 15)においてどのような遺伝子が発現しているのか調べたところ、神経マーカー (*otx2*¹⁹, *pax6*²⁰)・脊索マーカー (*chordin*²¹, *brachyury*²²)・神経堤マーカー (*hairy2b*²³, *snail1*²⁴)・体節マーカー (*myoD*²⁵) の発現が確認でき、背側構造の形成に必要な種々の遺伝子発現がみられた (図 9a~g)。また、尾芽胚(stage 25)においても尾部マーカー (*brachyury*) の発現を観察することができた (図 9h)。したがって、最小領域さえあれば完全な頭部・中枢神経系・中軸中胚葉・体節中胚葉のような背側構造から尾部まで形成することが明らかになった。

両生類と鳥類の原腸形成過程は比較することができるか？

両生類の原腸形成運動機構は立体的にかたちづくりが行われていると考えられてきたことや頭尾の背側構造の形成方向が鳥類と逆であることから今まで異なるものとされてきたが、新たな両生類の原腸形成モデルによって、両者が比較できる可能性が示唆されている⁴⁾。鳥類であるニワトリの卵は大部分が背側構造の形成に関与しない卵黄で、胚の動物極のごく一部だけで頭部から尾部へと平坦に背側構造を形成するということが知られている (図 10a, b)。両生類の新モデルによれば鳥類と同様に平坦に頭部から尾部へと平坦に背側構造を形成するという点で見かけの動きが共通していることがわかる。これまでの結果から両生類の内胚葉は背側構造の形成に積極的に関与していないことが示されているので、もし両生類と鳥類の原腸形成機構が同じだと仮定するならば、両生類の内胚葉は背側構造の形成に積極的に関与していない鳥類の卵黄に相当すると考えられる。このことが正しいのであれば、両生類も内胚葉の上で頭部から尾部へと平坦に背側構造を形成すると考えられる。そこで、両生類と鳥類の原腸形成過程を動きの見点から比較するために、ACE 時に胞胚腔の屋根を除去した胚の内胚葉 (卵黄) はそのまま最外細胞層の最小領域のみを残した胚 (図 7f の切れ目の角度が 60° の時) を発生させ観察した。

すると、まさにトリのように内胚葉（卵黄）上を尾部へと平面的に背側構造を形成するので、両者の原腸形成運動は動きの観点から比較可能であると考えられる（図 10b, d）。

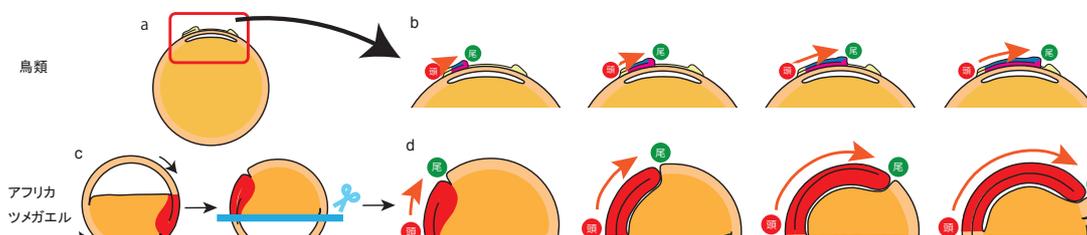


図 10 鳥類（上段）とアフリカツメガエル（下段）の原腸形成過程のモデル図による比較。

鳥類胚の断面図 (a) の動物極を拡大した部分における原腸形成過程 (b)。アフリカツメガエル胚を上下逆さまにした個体 (c) を青の直線において胞胚腔の屋根を除去した胚 (d)。アフリカツメガエル胚の赤で示した領域は最小領域である。

おわりに

神経堤細胞の誘導と細胞周期の関係はまだ解析を始めたばかりであるために直接的には何も議論はできないが、S 期への以降を制御する Geminin の機能阻害実験で頭部形成が抑制されたことや、cdh1 や emi1 などが頭部神経堤の形成に影響があることを示す結果も得られており、今後の結果が期待される。さらに、P2Y ファミリーに属する受容体は哺乳類細胞において細胞周期の制御に関与しているとの報告もあり、P2Y 受容体遺伝子のいくつかは神経堤細胞に発現が認められることなどからも、細胞周期との関与が予想される。今後は G1/G0 期の調整に関与する遺伝子群の神経堤誘導における働きを解析していきたい。また、今年度の結果から、背側構造を形成できる最小領域を定義し、鳥類と鳥類-様の発生をさせたツメガエル胚の原腸形成過程との比較によって両者の原腸形成機構が比較可能であるという仮説をより支持できる結果が得られた。今後は、全く異なるとされてきた魚類であるゼブラフィッシュなど真骨魚類の原腸形成運動との比較も視野に、最終的に鳥類や魚類を含む脊椎動物全般の原腸形成機構について統一的な説明ができるようにしていきたいと考えている。

参考文献

- 1) Ota, K. G., Kuraku, S., Kuratani, S., 2007. Hagfish embryology with reference to the evolution of neural crest. *Nature* 446, 672-675
- 2) Harata, A., Nishida, H., Nishihara, A., Hashimoto, C., 2016. Purinergic P2Y receptors are involved in *Xenopus* head formation. *CellBio* in press
- 3) Nagatomo, K. I., Hashimoto, C., 2007. *Xenopus hairy2* functions in neural crest formation by maintaining cells in a mitotic and undifferentiated state. *Dev Dyn.* 236, 1475-1483

- 4) Yanagi, T., Ito, K., Nishihara, A., Minamino, R., Mori, S., Sumida, M., Hashimoto, C., 2015. The Spemann organizer meets the anterior-most neuroectoderm at the equator of early gastrulae in amphibian species. *Dev. Growth, Differ.* 57, 218-231
- 5) Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Knight, G. E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K. A., Weisman, G. A., 2006. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 58, 281-341
- 6) Gans, C., Northcutt, R. G., 1983. Neural crest and the origin of vertebrates: a new head. *Science* 220, 268-273
- 7) Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C., Niehrs, C., 1998. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357-362
- 8) Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., De Robertis, E. M., 1999. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397, 707-710
- 9) Murato, Y., Hashimoto, C., 2009. *Xhairy2* functions in *Xenopus* lens development by regulating *p27^{xicl}* expression. *Dev Dyn.* 238, 2179-2192
- 10) Hara, K., Nakayama, I. K., Nakayama, K., 2006. Geminin is essential for the development of preimplantation mouse embryos. *Genes Cells* 11, 1281-1293
- 11) Kroll, K. L., Salic, A. N., Evans, L. M., Kirschner, M. W., 1998. Geminin, a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation. *Development* 125, 3247-3258
- 12) Yang, V. S., Carter, S. A., Hyland, S. J., Tachibana-Konwalski, K., Laskey, R. A., Gonzalez, M, A., 2011. Geminin escapes degradation in G1 of mouse pluripotent cells and mediates the expression of Oct4, Sox2, and Nanog. *Curr. Biol.* 21, 692-699
- 13) Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676
- 14) Morrison, G. M., and Brickman, J. M., 2006. Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. *Development* 133, 2011-2022

- 15) Nakatsuji, N., Gould, A. C., Johnson, K. E., 1982. Movement and guidance of migrating mesodermal cells in *Ambystoma maculatum* gastrulae. *Journal of cell science*. 56, 207-222
- 16) Winklebauer, R., Nagel, M., 1991. Directional mesoderm cell migration in the *Xenopus* gastrula. *Dev. Biol.* 148, 573-589
- 17) Vogt, W., 1929. Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit örtlicher Vitalfärbung. II. Teil Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren. *Wilhelm Roux Arch. Entwickl. Mech. Org.* 120, 384-706
- 18) Koide, T., Umesono, K., Hashimoto, C., 2002. When does the anterior endomesoderm meet the anterior-most neuroectoderm during *Xenopus* gastrulation? *Int. J. Dev. Biol.* 46, 777-784
- 19) Biltz, I. L., Cho, K. W., 1995. Anterior neuroectoderm is progressively induced during gastrulation: the role of the *Xenopus* homeobox gene orthodenticle. *Development*. 121, 2933-2943
- 20) Hirsch, N., Harris, W. A., 1997. *Xenopus* Pax-6 and retinal development. *J Neurobiol.* 32, 45-61
- 21) Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L. K., De Robertis, E. M., 1994. *Xenopus chordin*: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 79, 779-790
- 22) 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
- 23) Tsuji, S., Cho, K. W., Hashimoto, C., 2003. Expression pattern of a basic helix-loop-helix transcription factor *Xhair2b* during *Xenopus laevis* development. *Dev. Genes Evol.* 213, 407-411
- 24) Sargent, M. G., Bennett, M. F., 1990. Identification in *Xenopus* of a structural homologue of the *Drosophila* gene *snail*. *Development* 109, 967-973
- 25) Hopwood, N. D., Pluck, A., Gurdon, J. B., 1989. MyoD expression in the forming somites is an early response to mesoderm induction in *Xenopus* embryos. *EMBO J.* 8, 3409-3417