

アフリカツメガエルの原腸形成機構

橋本主税

JT生命誌研究館

脊椎動物の原腸形成期は、基本体制が確立し、未分化外胚葉が中枢神経系へと分化する時期である。原腸形成に関与する分子機構は脊椎動物を通して進化的に高度に保存されていることが知られており、アフリカツメガエル（以下ツメガエル）を含む両生類を用いた研究から多くの知見が蓄積されている。

原腸形成過程の制御には、オーガナイザーと呼ばれる領域の機能が決定的に重要であり、特にオーガナイザー内部の位置情報が、神経など他の組織の部域化と密接に関連があることが知られている⁽¹⁾。しかし、この原腸形成過程は個体発生過程の中でもきわめて重要なプロセスであるにもかかわらず、複雑な組織運動を伴う上に、組織自体も刻々と形を変えて様々に分化してゆくことから、胚の形態と分子の機能の相関を正確に理解することは非常に難しい。

本稿では、胚発生の知見の蓄積が多く、また様々な分子の機能が解明されているツメガエルの原腸形成過程を、原腸形成期に起こる「神経誘導と部域化」を指標として胚発生的見地から概観し、脊椎動物の原腸形成運動の仕組みを考えてみたい。

§

原腸形成過程

§

両生類において初期原腸胚の原口背唇部に位置するオーガナイザーは、別の胚の腹側に移植すると、「組織化(オーガナイズ)」された背側構造を形成させることができる領域であり、組織学的に見れば、中軸中胚葉と前方内胚葉となる組織を指す。図1に原腸形成過程において、これまで考えられてきたモデルを示した。原腸形成初期に、オーガナイザー組織が原口を通り胚の内部へと陥入を始め、その後、オーガナイザー由来の組織は胞胚腔の屋根を裏打ちしながら動物極方向へさかのぼっていく。先頭が動物極を過ぎた辺りでさかのぼりは停止する。オーガナイザーが形成された場所が将来の背側となり、さかのぼりの到達点が将来の頭部、さかのぼりの開始点が将来の尾部となることから、原腸形成過程を経ることで三体軸(頭尾・背腹・左右)の形成は完了することとなる⁽²⁾(図1)。

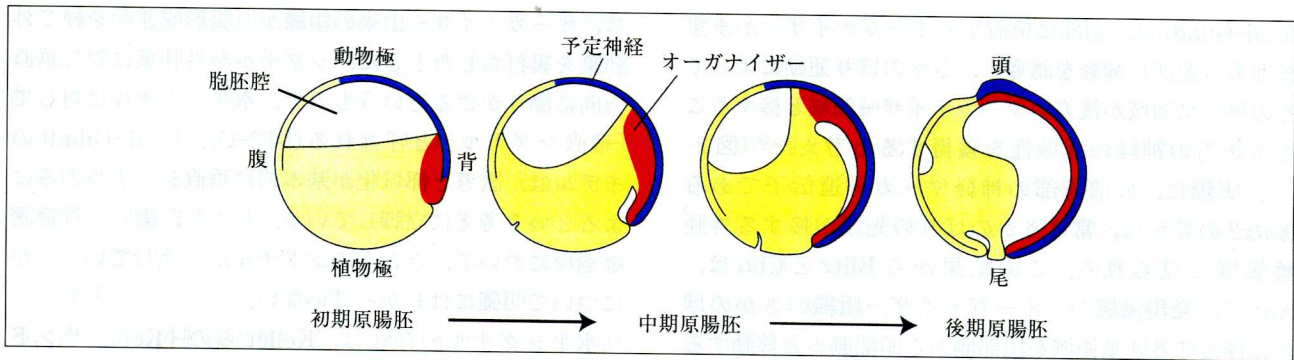


図 1 ■ ツメガエルの原腸形成運動

ツメガエルでは初期原腸・胞胚腔の屋根に相当する外胚葉に予定神経領域(青色)が存在し、その最も前方部分はオーガナイザー(赤色)から物理的に最も離れて位置する。原腸形成期に、オーガナイザー領域が胞胚腔の屋根を裏打ちしながら動物極側にさかのぼり、未分化外胚葉を神経へと誘導する。

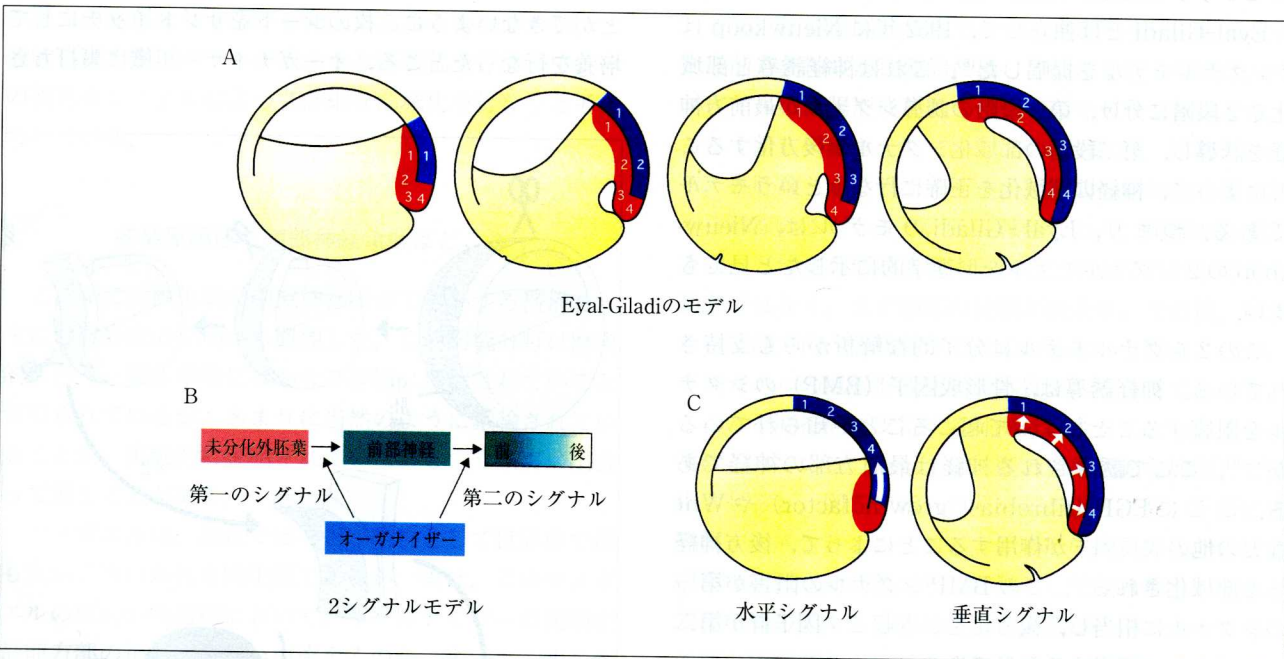


図 2 ■ 神経誘導と部域化の機構を示すモデル

(A) Eyal-Giladi のモデル：オーガナイザーによって誘導される神経領域は、オーガナイザーの位置に相当する。このモデルによれば、オーガナイザーの最も前方部は最前方神経領域を誘導し、原腸形成過程に伴ってその後方のオーガナイザーが接したときに少し後方の神経へと部域化され、さらに後方のオーガナイザーが接したときに接するオーガナイザーの部域に応じてさらに後方化する。

(B) 2シグナルモデル：神経の誘導と部域化には、オーガナイザーからの2種類のシグナルが必要である。最初のシグナルで未分化外胚葉は最前方部神経へと誘導され、2つ目のシグナルで後方神経へと部域化される。分子レベルでは、第一のシグナルは BMP の阻害因子であり、第二のシグナルは FGF などの成長因子であるといわれている。

(C) オーガナイザーから外胚葉層を水平方向に伝わるシグナルと、原腸形成が進んでオーガナイザーが予定神経外胚葉と物理的に接したとき垂直方向に伝わるシグナルを示す模式図。

§ 神経誘導・部域化機構を説明するモデル §

原腸胚において胞胚腔の屋根の部分に相当する未分化外胚葉は、オーガナイザーの働きにより神経へと分化誘導される。神経の誘導と部域化にはオーガナイザーからのシグナルが必須であるが、原腸形成と呼ばれる総合的な形態形成運動の過程で、どのように神経誘導と部域化が行なわれるのか厳密にはわかっていない。これまで

に、原腸形成運動の過程でオーガナイザーが神経を誘導し部域化する機構について、いくつかの興味深いモデルが提示されているので、代表的なものを紹介しよう。

1. Eyal-Giladi のモデル

胞胚腔の屋根をさかのぼるオーガナイザー組織の先端部分は、将来の頭部神経と接する領域であり、それに続く領域は少しずつ尾部方向の部域性をもつ。1954年に

Eyal-Giladi は、頭部に位置するオーガナイザーがまず最前方（頭部）神経を誘導し、さかのぼり運動によってその外胚葉領域が後方のオーガナイザー領域と接することで後方の神経の部域性を獲得すると考えた⁽⁹⁾（図2-A）。実際に、最前方部の神経マーカー遺伝子である *Xotx2* の発現は、常にさかのぼりの先頭が接する外胚葉領域に見られる。この結果から Blitz と Cho は、*Xotx2* の発現領域が、オーガナイザー組織のさかのぼりに伴って外胚葉領域を尾部側から頭部側へと移動すると結論づけ⁽⁹⁾、Eyal-Giladi のモデルが遺伝子発現においても証明されることとなったのである。

2. 2シグナルモデル

Eyal-Giladi とは独立して、1952年に Nieuwkoop は2シグナルモデルを提唱した⁽⁶⁾。これは神経誘導と部域化を2段階に分け、第一段階の誘導シグナルが最前方神経を誘導し、第二段階の部域化シグナルが後方化することによって、神経の部域化を正確に行なうというモデルである。つまり、Eyal-Giladi のモデルは、Nieuwkoop の2シグナルモデルを形態学的に示したと見てもよい。

この2シグナルモデルは分子的な解析からも支持されている。神経誘導は、骨形成因子（BMP）のシグナルを阻害することによって起こることが知られているが⁽⁶⁻⁸⁾、ここで誘導される神経は最前方部の神経である。ここに FGF（fibroblast growth factor）や Wnt などの他の成長因子が作用することによって、後方神経へと部域化される⁽⁹⁾。この BMP シグナルの阻害が第一のシグナルに相当し、後方化をひき起こす因子群が第二のシグナルに相当するわけである。

このように古典的実験発生学から提唱されたこれら2つのモデルは、近年の分子生物学的知見にも支えられ、両生類の神経誘導と部域化を説明するモデルとして一般に受け入れられてきた。

3. 水平シグナルと垂直シグナル

胚発生的な見地から、前述の2つとは別に神経誘導シグナルについて2種類のモデルが提唱されている⁽¹⁰⁾。1つ目は、初期原腸胚期に予定神経外胚葉に向けてオーガナイザーからシグナルが出されるというものである。この時期のオーガナイザーは外胚葉組織と直接は接しておらず、したがって、オーガナイザーから出たシグナルは予定神経外胚葉（胞腔の屋根の部分）を水平方向に移動しなければならない。そのためこのシグナルは「水平シグナル」と呼ばれている（図2-C）。2つ目

は、オーガナイザー由来の組織が原腸形成運動を経て外胚葉を裏打ちしたときに、シグナルが外胚葉に対し垂直方向に働きかけるというもので、水平シグナルに対して「垂直シグナル」と呼ばれる（図2-C）。Eyal-Giladi のモデルは、誘導と部域化が基本的に垂直シグナルのみによるという考えに立脚している。しかし、実際の神経誘導過程において、どちらのシグナルが機能しているのかについて明確にはわかっていない。

水平シグナルの存在は、Kellerらの「Keller サンドイッチ」と呼ばれる外植体を用いた独創的な研究によって証明された⁽¹¹⁾（図3）。まだオーガナイザーが潜り込む前の初期原腸胚から、外胚葉と中胚葉（オーガナイザー）をシートとして切り出し、両者が直接的に接することができないように二枚のシートをサンドイッチにして培養を行なったところ、オーガナイザー組織に裏打ちさ

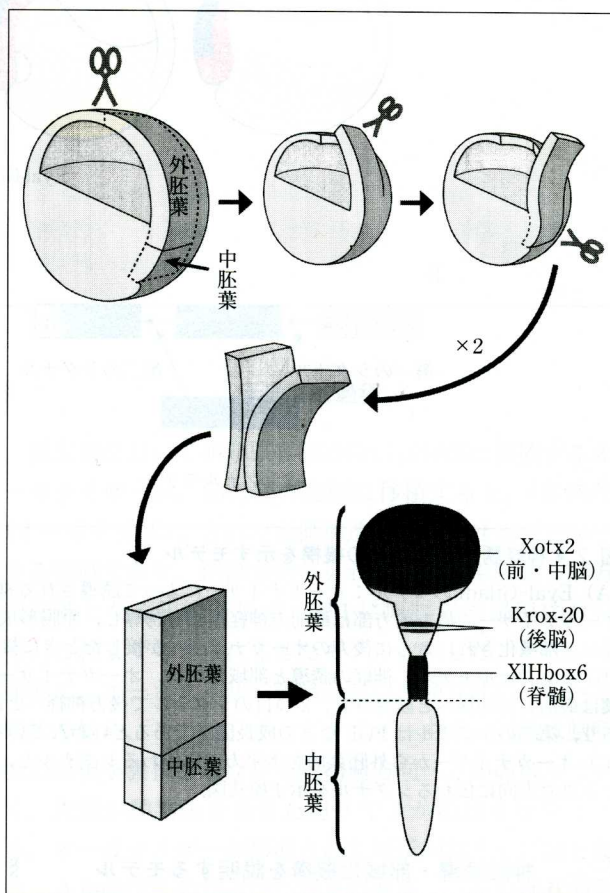


図3 ■ Keller サンドイッチ

初期原腸胚の予定神経外胚葉とオーガナイザーをシートとして切り出したものを2枚を、それぞれの領域が相応するように内面どうしを張り合わせ培養すると、神経やオーガナイザー特異的な形態形成運動（縮合伸長運動）が観察される。この外植体では神経領域に特異的な遺伝子が前後軸に沿って発現している。原理的に、外胚葉とオーガナイザーが接することがないことから、サンドイッチでの神経の誘導と部域化は水平シグナルによることがわかる。

れていない外胚葉に、正確に部域化された神経が誘導されたのである。この結果は、理論上、神経の誘導と部域化が水平シグナルのみによって行なわれたことを示す。しかし、水平シグナルの見地では、単にオーガナイザーからの距離の違いが神経の頭尾軸に沿った部域性に対応するため、誘導される神経の部域性は誘導する中胚葉（オーガナイザー）の部域性に相当するという事実を水平シグナルのみによって説明することは難しい。むしろ、直接的に外胚葉と接するオーガナイザーからの垂直シグナルのほうが神経の部域化をより簡潔に説明できると思える。現時点でこれらのモデルについての解釈は、まだまだ決まったところに落ち着いていない。水平シグナルのみによる部域化では、神経マーカーの発現が実際の胚での発現よりも広がる傾向にあることなどから、一般的には水平シグナルが大まかな部域化を行なって、その後垂直シグナルによって詳細な部域化を行なうと考えられている。

§ 初期原腸胚で頭部神経領域はどこ？ §

ここまで、両生類の中樞神経系ができあがる機構を、主に形態形成の立場から概観した。この研究分野は歴史的に古く、発生学的にはかなり詳細に理解されていると信じられているが、あまりに当然のように議論されていることが、実験的に証明されていないという事実に出会って驚くことがある。

ツメガエルは、現在ではモデル動物として世界中でも実験に用いられる両生類であるが、実は、このツメガエルの原腸形成過程において、オーガナイザーの先頭が最前方部の神経領域にいつ達するのか、まったく明らかとされていないのである。その時期は、教科書や論文では中期～後期原腸胚とされているが、その実験的根拠はまったく存在していなかった。

そこで筆者らは、簡単な染色実験でその時期を調べてみたところ、一般的に認められてきた考えとは大きく異なり、非常に初期の原腸胚においてすでにオーガナイザーの先端は神経の最前方部に達していることが判明したのである⁽¹²⁾(図4-A)。これが事実であれば、初期原腸胚における胞胚腔の屋根の部分には神経にはならないこととなる。この点を詳細に調べるために、胞胚腔の屋根の部分に染色した胚から Keller サンドイッチを作製したところ、初期原腸胚で胞胚腔の屋根の部分に位置していた外胚葉組織（サンドイッチで青く標識された領域）には神経マーカーは発現しておらず、逆に青い標識と完全にオーバーラップして表皮のマーカーであるケラチン

遺伝子の発現が確認できた(図4-B)。これらの結果から、原腸形成過程で起こるとされてきたオーガナイザーのさかのぼり運動自体が疑問視された。

上の結果から予想される頭部神経領域とその内側の組織を、ともに初期原腸胚において標識し、原腸形成完了後に標識の位置を解析したところ、筆者らが予想した通り標識は頭部領域に存在しており、内部組織の標識が外胚葉領域の標識と完全に接していた(図4-C)。これは、原腸形成過程を通じて、内部組織によるさかのぼり運動が行なわれないことを示している。

原腸形成運動を説明する新しいモデル

§ — まず先に頭の位置が決まる §

この、初期原腸胚ですでにオーガナイザーの先頭と予定最前方部神経が物理的に接しているという事実は、ツメガエルの原腸形成運動を今までのモデルとは異なるまったく新しい動きとして示している(図5)。結局のところ、外胚葉とオーガナイザーの組織間の相対的移動が認められないこととなり、それはすなわち、尾部から頭部方向へと体軸が形成されるというこれまで言われてきた動きではなく、まず頭部の位置が決まり、その後、頭部から尾部方向へと体軸ができあがるという動きこそが、ツメガエルの原腸形成運動の本質ということであろう。

これを間接的に支持する証拠は、今までもいくつか挙げられている。たとえば、胚の自由回転を抑制して発生させると、図5で示したモデルのように胚の下面に神経板が形成されるのである。原腸形成過程では非常に大規模な組織運動が起こり、結果として胚の重心も刻々と変化するので、もし胚の頭部の位置が一定であっても、外部の観察者からはオーガナイザーがさかのぼっているように見える。自由回転が抑えられたときに図のような動きをすることは、我々は現在まで胚自体の自由回転に影響された錯覚を見ていたのかもしれない。

またツメガエルでは、原口が閉まらず、したがって原腸陥入を起こさずに発生することがあり、この現象を実験的に起こさせることも可能である⁽¹³⁾。この場合、原口が閉じないために背中が完全に開いてはいるものの、完全な頭部構造をもつ胚として発生する。さらに、オーガナイザー組織による外胚葉上の移動を薬剤や抗体で阻害しても原腸形成運動は正常に進む⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。これらの結果は、オーガナイザー組織のさかのぼりによって原腸胚後期に頭部の位置が決まる、という今までのモデルではうまく説明できなかった。しかし、最初に頭部が決まり、後に尾部体軸が伸長するという新しいモデルならば矛盾なく説明できる。

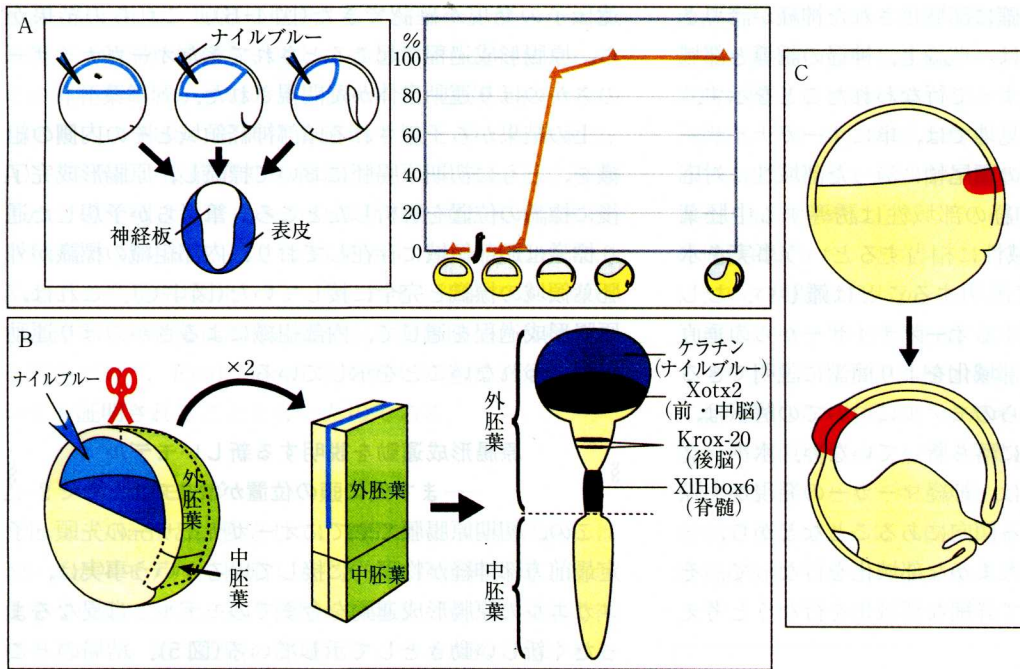


図 4 ■ 予定頭部神経とオーガナイザーの先端が接触する時期を決める実験

A: 胞胚腔の内表面をナイールブルーによって青色に染色して神経胚まで発生させる。予定神経外胚葉が胞胚腔の屋根に存在するときに染色を行なうと、神経板が青く染まる。しかし、予定神経外胚葉の内表面をオーガナイザー組織が覆ったときには、ナイールブルーが神経外胚葉に物理的に届かず、結果として神経板は染色されない。したがって、原腸形成期のどの時期に染色を行なうと神経板が染色されないのかを確認することで、オーガナイザーが頭部神経に到達する時期を知ることができる。グラフのように、非常に初期原腸胚においてすでに、予定神経外胚葉領域が、胞胚腔の屋根には存在しないことが示された。この時期は発生ステージで示すと 10.25 となり、形態学的には外胚葉とオーガナイザー組織の間に Brachet cleft と呼ばれる裂け目が形成される時期である。

B: A で示されたステージ 10.25 で胞胚腔の内表面をナイールブルーによって染色した胚を用いた Keller サンドイッチでは、胞胚腔の屋根の部分(ナイールブルーによって青く染まっている領域)には最前方部神経マーカー(*Xotx2*)ではなく、表皮マーカー(ケラチン)が発現する。また、青く染まった領域に隣接する外胚葉組織に *Xotx2* の発現が見られる。したがって、初期原腸(ステージ 10.25)胚の胞胚腔の屋根の部分は将来的にはすべて表皮となり、神経には分化しないことは明らかである。

C: 初期原腸胚で頭部神経がすでにオーガナイザーと接する位置にあるということは、オーガナイザーが胞胚腔をさかのぼることはないと考えられる。ステージ 10.25 の胚の予定頭部組織になると考えられる領域(赤色)を標識して原腸形成完了まで育てたところ、オーガナイザー由来の組織と外胚葉の標識はそれぞれ互いに接していた。オーガナイザーのさかのぼり運動があるとすれば、標識の位置は内と外の組織で前後にずれることが予想されるので、オーガナイザーのさかのぼり運動は見られないと、この結果から言える。

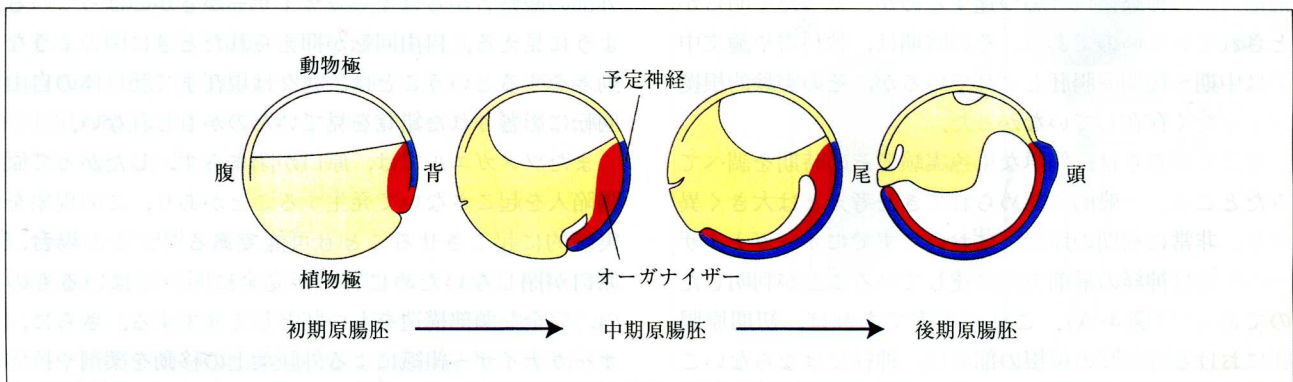


図 5 ■ ツメガエルの原腸形成運動の新しいモデル

オーガナイザーが胞胚腔内表面を滑ることなくツメガエルの原腸形成が完了するとすれば、原腸形成運動を表わすモデルはこのようになる。すなわち、予定頭部神経の最前方とオーガナイザー組織の先端は初期原腸胚においてすでに接しており、その後の体軸形成は「頭部から尾部方向」に起こる。この場合の神経組織は、初期原腸胚の帯域が縮合伸長運動によって中軸に集まってできるのであって、胞胚腔の屋根の部分はすべて表皮となる。

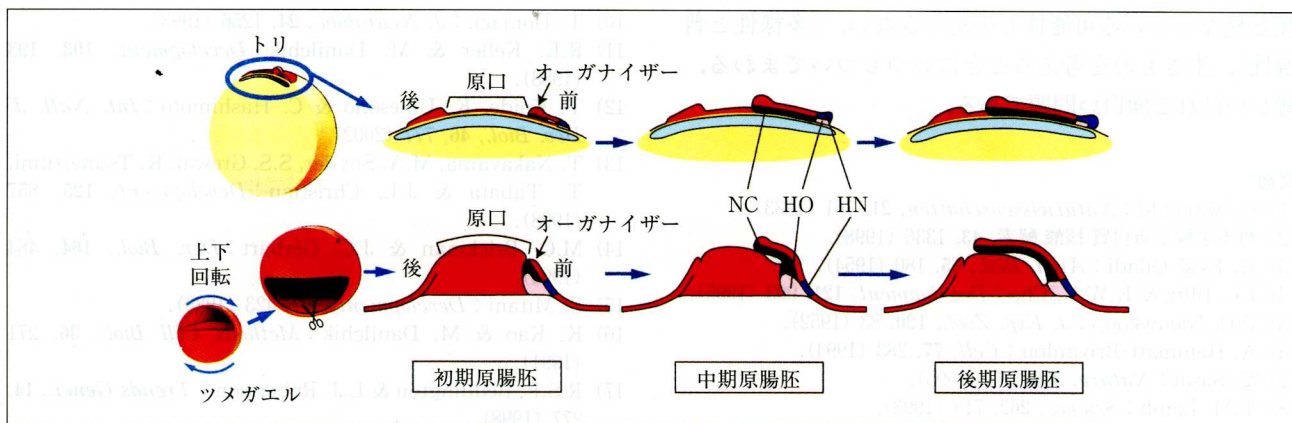


図 6 ■ ツメガエルとニワトリの原腸形成運動

ニワトリでは、頭部オーガナイザー(HO)が予定頭部神経外胚葉(HN)と初期原腸胚で物理的に接している。またオーガナイザーは、原口(原条)を閉じながら尾部方向へと移動し脊索(NC)を形成する。ツメガエル胚の上下をひっくり返して見てみると、原腸形成運動自体にニワトリとの共通部分があるように見える。この見地に立つと、ニワトリの胞胚腔とツメガエルの胞胚腔は機能的にまったく異なるものと認識できる。ニワトリなど多くの脊椎動物では卵の栄養(黄身)を使用後には胚体外に捨てることができるが、両生類では卵の栄養を胚体内にとどめて発生しなければならない。両生類の胞胚腔はこの目的のために保存されている構造なのかもしれない。

同様に、分子レベルで Eyal-Giladi モデルを証明したはずの *Xotx2* の発現の移動も、実は、*Xotx2* の発現が原腸形成期を通じて同じ領域に限定されているにすぎない。さらに、初期原腸胚において神経となるべき外胚葉は、すでに胞胚腔の屋根には存在しないわけであるから、Keller サンドイッチ自体の意味が失われることとなり、水平シグナルを強いて考慮に入れずとも、神経誘導と部域化の説明には垂直シグナルだけで十分となる。また、オーガナイザー活性とは背側化の活性であると言われてきたにもかかわらず、オーガナイザー活性が強い場合には頭部構造が強く誘導され、オーガナイザー活性が弱いと頭部構造から欠失していく。しかし、図5で明らかのように、オーガナイザーは一義的に前方組織を作る領域であるため、オーガナイザー活性は前方化活性とみなしてもよいかもしれない。

でも、両生類と同じく初期原腸胚で原口(原条)の最も前方にオーガナイザー(ヘンゼン結節)が存在する。またオーガナイザーのさらに前方部に予定頭部領域が存在するのである。オーガナイザーは原口を閉じながら後方へと移動し、その軌跡に沿うように中軸中胚葉を形成する。したがって、中軸中胚葉は頭尾軸に沿って尾部方向に形成されるわけだが、これまで両生類においてはオーガナイザーが頭部方向へと進んで中軸中胚葉を形成していると考えられていたことから、両者は直接的な比較が不可能なほど異なると思われていた。実際に、機能的に相同な組織は両者に存在するし、そこに発現する分子も相同であるにもかかわらず、形態形成過程がまったく異なると信じられてきた。しかし、今回示された新しいモデルに照らせば、ニワトリとツメガエルの原腸形成過程は本質的に互いに等しいことがわかる(図6)。

*

§ ニワトリとの比較 §
 — トリもカエルも原腸形成過程は相同

両生類の原腸形成運動をこのように見直した上で、他の脊椎動物種の原腸形成運動との比較をすることは興味深い。

マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュなど、他の脊椎動物種において頭部を誘導するオーガナイザー組織は、原腸形成の初期から予定頭部神経と物理的に接している⁽¹⁷⁾。両生類では、オーガナイザーの陥入とさかのぼりが完了するまでこの接触は起こらないとされてきたが、実は、ツメガエルでも初期原腸胚で両組織の接触が完了しているのである。

ニワトリの原腸形成過程を概観してみよう。ニワトリ

両生類の原腸形成過程を概観し、最近提示された新しいモデルを紹介した。これにより、脊椎動物の原腸形成過程が質的にかなり共通の動きにより成立しそうなのが示された。ニワトリの原腸形成過程では、始まりと終わりで胚の大きさが変化する。マウスにおいては体積比で何十倍にも大きくなるために、形態形成運動をその素過程として純粋に捉えることは困難である。もし、ツメガエルと他の脊椎動物の間にある程度の共通性が存在するのであれば、ツメガエルの形態形成を詳細に解析することによって、脊椎動物原腸形成運動の本質的な普遍性が見えるかもしれない。しかし、生きものは多様である。両生類のモデル動物であるツメガエルが、他の両生

類と異なっている可能性も否定できない。「多様性と普遍性」、生きものを考えるときにいつもついてまわる、難しいけれど面白い問題である。

文献

- 1) O. Mangold : *Naturwissenschaften*, 21, 761 (1933).
- 2) 橋本主税 : 蛋白質 核酸 酵素, 43, 1336 (1998).
- 3) H. Eyal-Giladi : *Arch. Biol.*, 65, 180 (1954).
- 4) I.L. Blitz & K.W.Y. Cho : *Development*, 121, 993 (1995).
- 5) P.D. Nieuwkoop : *J. Exp. Zool.*, 120, 83 (1952).
- 6) A. Hemmati-Brivanlou : *Cell*, 77, 283 (1994).
- 7) Y. Sasai : *Nature*, 376, 333 (1995).
- 8) T.M. Lamb : *Science*, 262, 713 (1993).
- 9) M. Kengaku & H. Okamoto : *Development*, 121, 3121 (1995).
- 10) T. Doniach : *J. Neurobiol.*, 24, 1256 (1993).
- 11) R.E. Keller & M. Danilchik : *Development*, 103, 193 (1988).
- 12) T. Koide, K. Umesonono & C. Hashimoto : *Int. Natl. J. Dev. Biol.*, 46, 777 (2002).
- 13) T. Nakayama, M.A. Snyder, S.S. Grewal, K. Tsuneizumi, T. Tabata & J.L. Christian : *Development*, 125, 857 (1998).
- 14) M.C. Brickman & J.C. Gerhart : *Dev. Biol.*, 164, 484 (1994).
- 15) S. Mitani : *Development*, 107, 423 (1989).
- 16) K. Kao & M. Danilchik : *Methods Cell Biol.*, 36, 271 (1991).
- 17) R.S.P. Beddington & E.J. Robertson : *Trends Genet.*, 14, 277 (1998).

お知らせ

公開シンポジウム 植物ハイテク：起業の方向と戦略

地球環境・食糧・資源のための植物バイオ第160委員会の産学連携活動や日本学術振興会未来開拓学術研究プロジェクトなどで取得(一部は申請中)してきました基盤特許等の産業シーズを、広く学界、産業界の研究者、技術者、企業活動企画者など、植物の産業利用活動に携わる諸氏諸兄に議論して頂くため、本シンポジウムを開催いたします。

主催：日本学術振興会産学協力研究委員会 地球環境・食糧・資源のための植物バイオ第160委員会

共催：関西文化学術研究都市地域知的クラスター推進本部、(財)地球環境産業技術研究機構

日時：平成15年11月21日(金) 午前10時～午後5時(午後5時半より懇談会)

会場：東京大手町サンケイプラザ(千代田区大手町1-7-2, 地下鉄大手町駅下車A4・E1出口直結) 主会場3F, ポスタ

一会場2F

内容：講演：①基盤特許の概要説明と産業利用の可能性(9題)、②植物ハイテク起業の戦略/展示：上記講演を含めたポスターの展示と個別相談

参加費：無料(資料代：1000円, 懇談会費：5000円)

問合せ先：〒630-0192 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科内

第160委員会公開シンポジウム 組織委員会事務局

Tel: 0743-72-5560, Fax: 0743-72-5569

E-mail: yokota@bs.aist-nara.ac.jp

プログラムおよび参加登録など、詳細はホームページ(<http://bsw3.aist-nara.ac.jp/sangaku/160C/index.html>)をご覧ください。