

ウニ胚における予定内胚葉組織の食道・胃・腸への割り振り

Allocation of presumptive endodermal tissue to esophagus, stomach, and intestine in the sea urchin embryo

吉永亮介¹ 小南哲也²

Ryousuke Yoshinaga¹ and Tetsuya Kominami²

¹ 愛媛大学理学部生物学科

Department of Biology, Faculty of Science, Ehime University, 2-5 Bunkyo-cho, Matsuyama, 790-8577, Japan

² 愛媛大学理工学研究科環境機能科学専攻

Department of Environmental Function Science, Graduate School of Science and Engineering, Ehime University, 2-5 Bunkyo-cho, Matsuyama, 790-8577, Japan

Abstract

Recent studies have uncovered the gene regulatory network that operates in the process of endoderm specification in the sea urchin embryo. However, it is still unknown how the presumptive endodermal tissue is allocated to three parts of digestive tract (esophagus, stomach, and intestine). In this study, early stage embryos were treated with chemicals that disturb the signaling involved in the endoderm specification, and the change in volumes of three parts of the digestive tract was monitored. The obtained results showed the existence of a mechanism that allocates the presumptive endodermal tissue to the esophagus and stomach at a constant volume ratio. It was also found that Notch signaling is involved in the specification process of intestinal cells, and that the intestinal cells were specified independently of the esophagus and stomach at a later stage. Further, whole-mount *in situ* hybridization revealed that Endo16, a specific marker of the vegetal plate, was expressed irrespectively of the vegetal plate formation; Endo16 expressing cells newly appeared at the base of the archenteron after the vegetal plate had invaginated into the blastocoel. Based on these results, a model for the allocation of presumptive endodermal tissue to three parts of the digestive tract is presented.

Key words: endoderm, gastrulation, sea urchin, signaling, specification

はじめに

三胚葉性の動物では、原腸陥入というダイナミックな形態形成の過程を経て外胚葉、中胚葉、及び内胚葉が生じる。ウニ胚は透明なこと、全ての部位が単層の上皮構造からなること、同調した胚が多量に得られることなどから、原腸陥入のモデル系として、数多くの研究で用いられてきた (Kominami & Takata, 2004, 2007)。

ウニ胚では原腸陥入開始に先立ち、植物極側から胞胚腔内に一次間充細胞 (PMC) が移入する (Wu *et al.*, 2007)。このとき、植物極付近の細胞は PMC の移入によって生じた隙間を埋めようと動き、胚の植物極側は平たくなり、肥厚する。やがて、この肥厚した細胞層 (植物極板) は胞胚腔の内部へ折れ曲がり、切り株状

の腸原基を形成する (一次陥入)。その長さは、胞胚腔の高さの 1/3 程度である。一次陥入終了後しばらく原腸の長さに変化は見られないが、この間、原腸先端に二次間充細胞 (SMC) が出現する。一部の二次間充細胞は動物極の頂板まで仮足を伸ばしてアンカーし、その仮足を収縮することによって腸原基を引き上げる (Gustafson & Kinnander, 1956; Dan & Okazaki, 1956; Hardin, 1988)。この引き上げの力と、原腸構成細胞の再配列 (Ettensohn, 1985; Hardin, 1989) によって原腸は細長くなり、やがて頂板まで達する (二次陥入)。さらにプリズム期に至るまで、予定内胚葉組織は原口を通過して徐々に胞胚腔内へと巻き込まれる (Logan & McClay, 1997; Martins *et al.*, 1998; Ransick & Davidson, 1998)。この過程は三次陥入と呼ばれる。また、一次陥入と二次陥入では食道と胃の前半の領域までが陥入し、三次陥入で胃の後半と腸を構成する細胞が陥入することが明

2011年10月6日 受理

らかにされている (Takata & Kominami, 2001).

では、原腸陥入により胚内部へと陥入し、消化管を構築する細胞は、どのようにして決定されるのだろうか。ウニ胚の中・内胚葉の specification (specification というのは“文化の方向付け”という意味であるが、適切な日本語がないので、本論文では英語で表記する) には、Wnt や Delta/Notch を介したシグナルが関与していることが知られてきた。Wnt8 は 16 細胞期以降小割球及びその子孫細胞から分泌され、その後 *veg2* 系列の細胞でも発現が見られるようになり、内胚葉系列の細胞の specification に関わる (Wikramanayake *et al.*, 2004)。また、Wnt6 や植物極側の卵表層が内胚葉組織の specification に重要であることも報告された (Croce *et al.*, 2011)。一方、Delta/Notch を介したシグナルは、外胚葉と内胚葉の境界の位置決定に働くことが示唆されている (Sherwood & McClay, 2001)。

ところで、アメリカ産のウニ、*Lytechinus variegatus* では、原腸陥入開始直前の植物極板の詳細な fate map が作成されている (Ruffins & Ettensohn, 1996)。ただ、これは植物極板のある位置を占める細胞が、将来何になるかを示したものであり、必ずしも原腸陥入が始まる前にすべての予定内胚葉が specify され、食道、胃、及び腸を構成する細胞が決定されていることを示すものではない。予定内胚葉がどの時期に specify されるのか、specify された予定内胚葉がどのような仕組みで食道、胃、及び腸の各領域に割り振られるのかについては、ほとんど知見が得られていない。

そこで本研究では、Wnt シグナル経路を阻害して内胚葉組織の減少を引き起こす硫酸亜鉛や、その反対に Wnt シグナルを強めて内胚葉組織の増加を引き起こす塩化リチウムでバフンウニ胚を処理してみた。また、Delta/Notch シグナル伝達経路を阻害する DAPT (Cheng *et al.*, 2003) でも胚を処理した。そして、食道、胃、及び腸の体積の変化が引き起こされるかどうか、引き起こされるなら、それら相互の体積の比率はどう変化するかを調べた。さらに、硫酸亜鉛と塩化リチウム処理胚ではホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、植物極板のマーカー遺伝子とされている Endo16 (Nocente-McGrath *et al.*, 1989) の発現パターンを観察し、予定内胚葉の食道、胃、及び腸域への割り振りの仕組みを解明することを試みた。

材料と方法

[材料]

材料としたバフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) は松山市梅津寺海岸で採集したもので、使用するまでは 15 °C の循環水槽で保持した。

[海水]

自然海水をミリポアフィルター (孔径 0.45 μm) で濾過し、細菌の繁殖を抑制するためにペニシリン (100 units/ml) とストレプトマイシン (50 $\mu\text{g/ml}$) を加えた。これを MFSW (Milli-pore filtered seawater) と略記する。

[卵・精子の採取と媒精、及び受精膜の除去]

雌個体の体腔内に 0.5 M KCl を注入し、放出された卵を MFSW で 3 回洗浄し、未受精卵を得た。一方、雄個体の腹側半分をハサミで取り除き、精巢を取り出して dry sperm を得た。

管ピンに未受精卵を懸濁し、受精膜の硬化を防ぐために、1 mM となるようアミノトリアゾールを加えた (Showman & Foerder, 1979)。次に dry sperm を MFSW で希釈して精巢懸濁液を作成し、これを適量管ピンに加え、軽く攪拌して受精させた。10 分後、孔径 80 μm のナイロンメッシュに受精卵を通し、受精膜を除去した。その後、受精膜の破片や精子などを除去するために MFSW で 3 回洗浄した。得られた胚は 18 °C で培養した。

[硫酸亜鉛・塩化リチウム処理]

硫酸亜鉛は 100 mM に、塩化リチウムは 500 mM となるよう蒸留水に溶かし、ストック液とした。使用直前に、硫酸亜鉛は 0.2 mM に、塩化リチウムは 30 mM になるようストック液を MFSW で希釈し、処理液を作製した。これらの溶液を用い、胚を受精後 1-5、3-7、5-9、7-11、9-13、及び 11-15 時間でパルス処理した。処理を開始する際は、手回し遠心器で胚を集め、上澄みを捨てて処理液を加えた。処理を終了する際、硫酸亜鉛処理では、胚を手回し遠心器で集めて処理液を捨て、残存する Zn^{2+} を完全に除去するために、0.1 mM EDTA-OH を含む MFSW で 3 回洗浄した。さらに同溶液中に 2 時間置き、その後 MFSW に戻した。塩化リチウム処理胚は、処理終了時に MFSW で 3 回洗浄した。

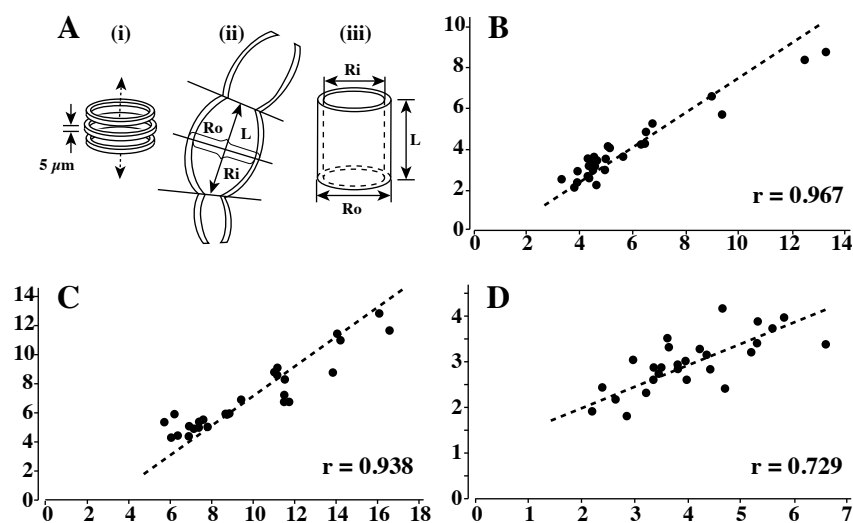


Figure 1 円筒として求めた体積と積分法で求めた食道・胃・腸の体積の相関

受精後 36 時間の後期プリズム期で、消化管の大きさが異なる 27 個体を選び、同一の個体において、二つの方法(本文参照)で、食道・胃・腸の体積を求めた。L: 長さ、Ri: 内径、Ro: 外径。横軸: 円筒として求めた体積(ピコリットル, pl)。縦軸: 積分法で求めた体積(pl)。A: 測定方法を示す模式図, B: 食道, C: 胃, D: 腸。各図右下に示した r の値は相関係数。いずれにおいても強い相関が見られる。A-C 中の点線は近似直線。

[DAPT 処理]

DAPT (Sigma, MO) をジメチルスルホキシド (DMSO) に 10 mM となるよう溶かし、ストック液とした。これを使用直前に MFSW で $5 \mu\text{M}$ に希釈し、受精後 10-24, 24-36, 及び 10-36 時間で胚を処理した。処理を開始する際は、胚を手回し遠心器で集め、上澄みを捨てて処理液を加えた。処理を終了する際は、胚を MFSW で 3 回洗浄した。

[食道, 胃, 及び腸の体積の計測]

食道と胃, 及び胃と腸の間にくびれが形成されてしばらく経過した後期プリズム期(受精後 36 時間)に、胚を側面から観察し、消化管に焦点を合わせ写真を撮影した。これを用い、結果の最初に述べる方法で食道, 胃, 及び腸の体積を計測した。

[*In situ* ハイブリダイゼーション]

Shoguchi *et al.* (2002) に従い、胚の固定、及びホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなった。なお、プローブ作製には Endo16 の部分配列をもつ HP00041 (AU272583) を用いた。

結果

[プリズム期胚における食道・胃・腸の体積の測定]

プリズム期胚の消化管の三つの部域、すなわち食道,

胃, 及び腸は、長軸に沿ってほぼ回転対称である (Fig. 1A-i)。今、一定間隔で(例えば $5 \mu\text{m}$ 毎), この長軸に沿って垂直な切片をとり、各切片の外径と内径を測定する。そして、外円の面積から内円の面積を減じ、これに切片の厚さ ($5 \mu\text{m}$) を乗じると、この部分の実体積が近似できる。これらの体積を足し合わせると (Fig. 1A-ii), かなり正確に各部域の体積を求めることができる (Kominami, 1984)。ただし、このような積分法では膨大な手間と時間が要求される。

そこで、より簡便に体積を近似的に求めることができないうかが検討した。まず、各部域の境界の中央を直線で結んだ直線の長さを縦の長さとする。そして、最も横幅のある部分で垂線を引き、垂線に沿って外径と内径を測定した。食道・胃・腸の各部域は円筒であるとし、Figure 1A-ii に示した L, Ro, Ri の値を用い、それぞれの体積を算出した (Fig. 1A-iii)。もちろん、このようにして求めた値は実際の体積より大きくなる。

Figure 1B-D は、それぞれ食道・胃・腸の各部域について、横軸に円筒として求めた体積、縦軸に積分法で求めた体積をプロットしたものである。食道・胃・腸いずれについても、統計的に有意な高い相関が見られた (Fig. 1B-D)。以降、円筒として得られた値に、各部についての相関図から得られた直線の傾き(食道: 0.656, 胃: 0.717, 腸: 0.402) を掛けることで、体積を近似した。以降、これを簡便法と呼ぶ。

[硫酸亜鉛処理による食道・胃・腸の体積変化]

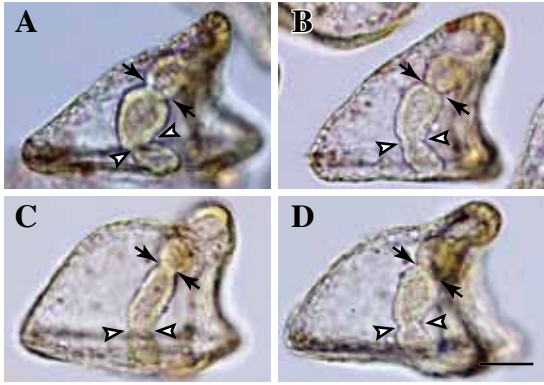


Figure 2 硫酸亜鉛パルス処理胚の形態（受精後 36 時間）

A: 対照胚, B: 1-5 時間処理, C: 5-9 時間処理. D: 9-13 時間処理. 特に 5-9 時間処理した場合, 消化管の体積の顕著な減少が見られる (C). 写真中の矢印は食道と胃の境界を, 白い矢頭は胃と腸の境界を示す. D 中の右下のスケールは 50 μm を示す.

動物極化, すなわち内胚葉組織の減少を引き起こすことが知られている硫酸亜鉛 (0.2 mM) で, 受精後 1-5, 3-7, 5-9, 7-11, 9-13, 及び 11-15 時間において 4 時間のパルス処理を行い, 食道と胃, 及び胃と腸の間のくびれが形成されしばらく経過した時期の胚を観察した (Fig. 2). 受精後の早い時間帯に硫酸亜鉛で処理した胚では, 消化管が対照胚に比べ, 細くなっているように見えた. 特に, 受精後 5-9 時間に処理したものでその傾向が顕著であった (Fig. 2C).

処理胚で見られた消化管の大きさを対照胚と比較するため, 食道, 胃, 及び腸それぞれの体積を簡便法で求めた (Fig. 3). 正常胚の食道域の体積は 5.5 pl であった. これに対し, 受精後 1-5, 3-7, 5-9, 及び 7-11 時間に処理した胚では体積の有意な減少が見られた. 特に, 受精後 5-9 時間に処理した胚では, 2.9 pl と正常胚に比べ, 約半分の大きさとなった. これに対し, 受精後 9-13, 11-15 時間処理した胚では, 統計的に有意な体積の変化は見られなかった (Fig. 3A). 胃については, 受精後 1-5, 3-7, 5-9, 7-11, 及び 9-13 時間に処理した胚で体積の有意な減少が見られた (Fig. 3B). 特に 5-9 時間で処理したものでは対照胚に比べ, 約 2/3 まで減少していた.

一方, 腸の体積は, 全ての時間帯の処理胚で有意な体積の変化は見られなかった (Fig. 3C). この結果は, 腸の specification には Wnt が関与していないことを示唆する.

次に, 食道, 胃, 及び腸相互の体積の比率を求め, 対照胚と比較してみた. すると, 食道 / 胃は, どの時間帯に処理した胚でも, 統計的に有意な差ではなかった (Fig. 3D). つまり, 食道や胃の体積が減少しても, その体積比は一定に保たれるということが分かった.

腸 / 胃については, 受精後 5-9 時間処理した胚において有意な差が見られた (Fig. 3E). 腸 / 食道を対照胚と比較したとき, 受精後 3-7, 及び 5-9 時間に処理した

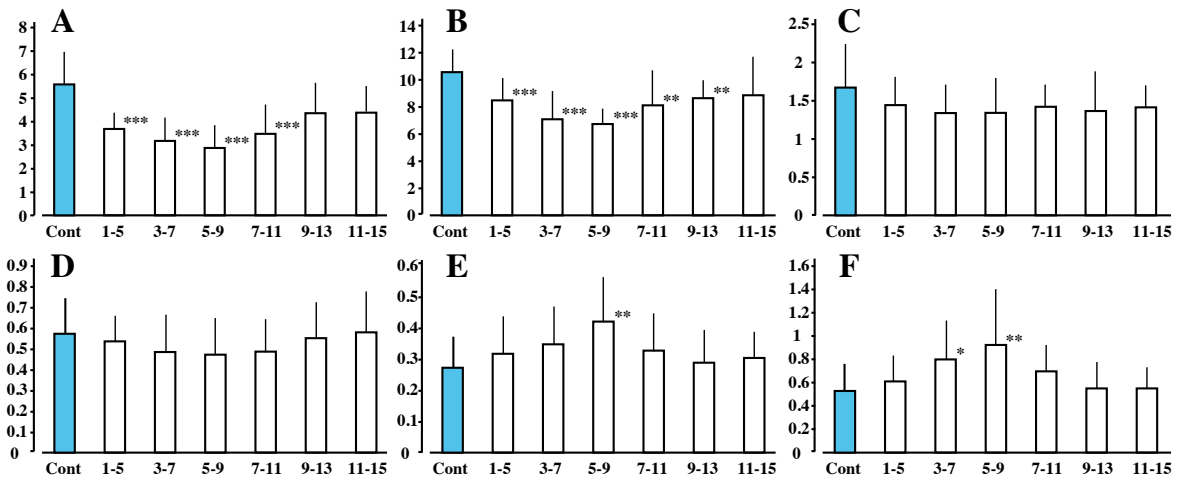


Figure 3 硫酸亜鉛でパルス処理された胚における食道, 胃, 及び腸の体積とそれらの体積比

受精後の様々な時間帯に 0.2 mM の硫酸亜鉛で 4 時間のパルス処理を行い, 受精後 36 時間の後期プリズム期に胚を側面から観察し, 食道, 胃, 及び腸の体積を簡便法で測定した. 横軸:パルス処理の時間帯. 縦軸:A-C は体積 (pl). D-F は体積比. A: 食道, B: 胃, C: 腸. D: 食道 / 胃. E: 腸 / 胃. F: 腸 / 食道. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. 付随する細い縦線は標準偏差を示す. サンプル数は 15.

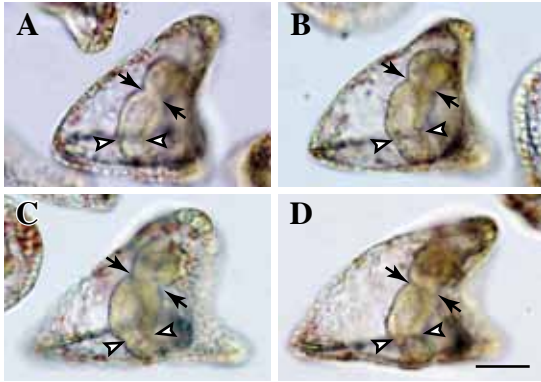


Figure 4 塩化リチウムパルス処理胚の形態（受精後 36 時間）

A: 対照胚, B: 1-5 時間処理, C: 5-9 時間処理, D: 9-13 時間処理. 特に 5-9 時間処理した場合, 消化管の体積の顕著な増加が見られる (C). 写真中の矢印は食道と胃の境界を, 白い矢頭は胃と腸の境界を示す. D 中の右下のスケールは 50 μm を示す.

胚において有意な増加が見られた (Fig. 3F). これらは, 処理によって胃や食道の体積が減少するのに対し, 腸の体積はほとんど変化しないことによる. つまり, 胃と腸, あるいは食道と腸の体積を一定の比率に保とうという働きはない, と考えられる.

[塩化リチウム処理による食道・胃・腸の体積変化]

植物極化, つまり内胚葉組織の増加を引き起こすことが知られている塩化リチウム (30 mM) で受精後 1-5, 3-7, 5-9, 7-11, 9-13, 及び 11-15 時間に 4 時間のパルス処

理を行い, 後期プリズム期の胚を観察した (Fig. 4). 対照胚 (Fig. 4A) に比べ, 受精後 1-5, 及び 5-9 時間に処理した胚ではいずれも原腸が大きくなっているように観察された (Fig. 4B, C). また, これらの胚では消化管の壁が厚くなっているように観察された.

そこでこれらの処理胚において, 簡便法を用い, 食道, 胃, 及び腸それぞれの体積を計測した (Fig. 5). 食道の体積について (Fig. 5A), 受精後 5-9 時間処理した胚では, 対照胚 (3.9 pl) に比べ, 7.8 pl と増加が顕著であり, 約 2 倍となった. もちろんこの増加は統計的に有意な差であった. 受精後 7-11 処理した胚でも, 有意な増加が見られた. 胃の体積は (Fig. 5B), 受精後 5-9 時間処理した胚では, 対照胚での体積が 6.4 pl であるのに対し, 12.0 pl と約 2 倍までに増加していた. 受精後 7-11, 及び 9-13 時間で処理した胚でも有意な増加が見られた. 胃は食道に比べ, やや後の発生段階まで塩化リチウムの影響を受けて, 体積が増加するように思われた.

一方腸については, どの時間帯の処理胚においても, 統計的に有意な体積の変化は認められなかった (Fig. 5C). この結果も, 腸の specification には Wnt が関与していない, という前述の結果を支持する.

塩化リチウム処理胚においても, 食道, 胃, 及び腸相互の体積の比率を求め, 対照胚と比較してみた. 食道 / 胃では (Fig. 5D), 硫酸亜鉛処理胚と同様, いずれの時間帯の処理においても統計的に有意な差は認めら

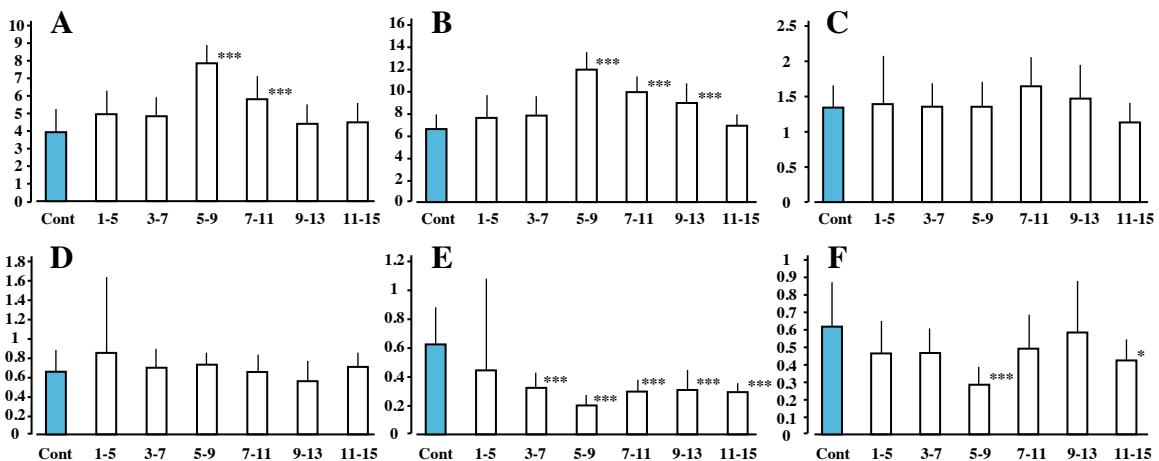


Figure 5 塩化リチウムでパルス処理された胚における食道, 胃, 及び腸の体積とそれらの体積比

受精後の様々な時間帯に 30 mM の塩化リチウムで 4 時間のパルス処理を行い, 受精後 36 時間の後期プリズム期に胚を側面から観察し, 食道, 胃, 及び腸の体積を簡便法で測定した. 横軸: パルス処理の時間帯. 縦軸: A-C は体積 (pl). D-F は体積比. A: 食道, B: 胃, C: 腸. D: 食道 / 胃. E: 腸 / 胃. F: 腸 / 食道. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. 付随する細い縦線は標準偏差を示す. サンプル数は 15.

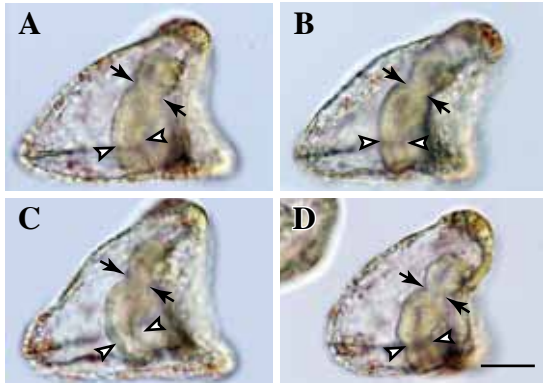


Figure 6 DAPT 処理胚の形態 (受精後 36 時間)

A: 対照胚, B: 10-24 時間, C: 24-36 時間, D: 10-36 時間処理胚。受精後 36 時間の胚を側面から写真撮影した。特に 10-36 時間処理した場合、顕著な腸の体積の減少が見られる (D)。写真中の矢印は食道と胃の境界を、白い矢頭は胃と腸の境界を示す。D 中の右下のスケールは 50 μm を示す。

れなかった。すなわち、食道や胃の体積が増加するときでも、その体積比は一定に保たれるということが分かった。

腸 / 胃 (Fig. 5E) は、受精後 3-7, 5-9, 7-11, 9-13, 及び 11-15 時間処理した胚で大幅な減少が見られ、全て統計学的に有意な差であった。特に受精後 5-9 時間処理した胚で最も減少していた。腸 / 胃 (Fig. 5F) についても、受精後 3-7, 及び 5-9 時間処理した胚で統計的に有意な減少が見られた。これらの結果から、塩化リチウム処理胚においても、胃と腸、あるいは食道と腸の体積を一定の比率に保とうという働きはないことが分かった。

[DAPT 処理による食道・胃・腸領域の体積変化]

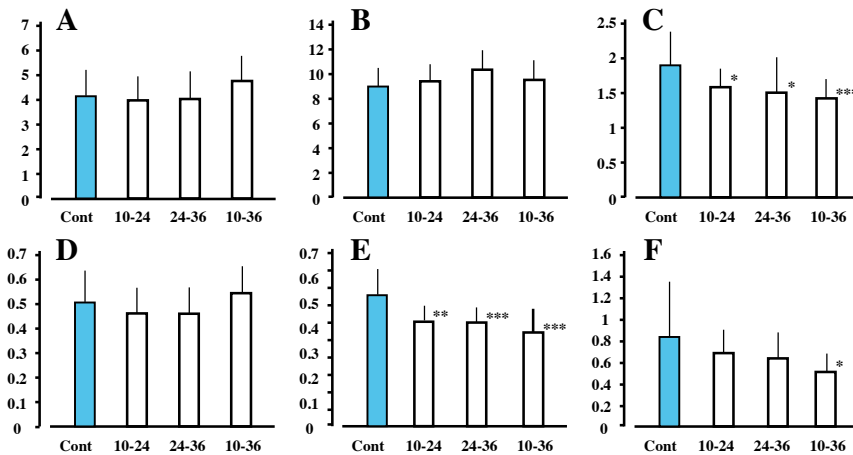


Figure 7 DAPT 処理における消化管各領域の大きさ、及び相互の比率

受精後 10-24, 24-36, 及び 10-36 時間に 1 mM の DAPT で処理を行い、食道、胃、及び腸の体積を簡便法で測定した。横軸：パルス処理の時間帯。縦軸：A-C は体積 (pl)。D-F は体積比。A: 食道の体積 (pl)。B: 胃の体積 (pl)。C: 腸の体積 (pl)。D: 食道の体積 / 胃の体積。E: 腸の体積 / 胃の体積。F: 腸の体積 / 食道の体積。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ 。付随する細い縦線は標準偏差を示す。サンプル数は 15。

Notch シグナルの伝達経路を阻害する DAPT で、受精後 10-24, 24-36, 10-36 時間の三つの時間帯に胚を処理した (Fig. 6)。受精後 10-24, 及び 24-36 時間に処理した胚の形態は、対照胚とほとんど変わらなかった (Fig. 6B, C)。受精後 10-36 時間に DAPT 処理した胚では、後口腕の伸びなどに多少の遅れが見られたが、他の形態的特徴に顕著な差は見られなかった (Fig. 6D)。

DAPT 処理胚の食道、胃、及び腸の体積を簡便法で測定し、対照胚と比較した (Fig. 7)。食道と胃の体積は、どの時間帯の処理でも統計的に有意な変化は認められなかった (Fig. 7A, B)。ところが、腸の体積 (Fig. 7C) は、いずれの時間帯の処理胚においても統計的に有意な減少が見られた。

DAPT 処理胚の食道、胃、腸の体積の比率を対照胚と比較してみた。食道 / 胃 (Fig. 7D) は、DAPT 処理胚においても一定に保たれていた (Fig. 7D)。これに対し、腸 / 胃は、受精後 10-24, 24-36, 10-36 時間処理した胚で減少し、いずれも有意な差であった (Fig. 7E)。また、受精後 10-36 時間処理した胚で減少が最大となった。腸 / 食道については、受精後 10-36 時間処理した胚では統計的に有意な減少が見られた (Fig. 7F)。

[硫酸亜鉛及び塩化リチウム処理胚における Endo16 の発現]

硫酸亜鉛と塩化リチウムによる処理で、最も体積の増減が大きかったのは受精後 5-9 時間であった。この時間帯で処理した胚を、原腸陥入開始後の様々な時期で固定し、中・内胚葉のマーカーである Endo16 の発現領域を調べた (Fig. 8)。

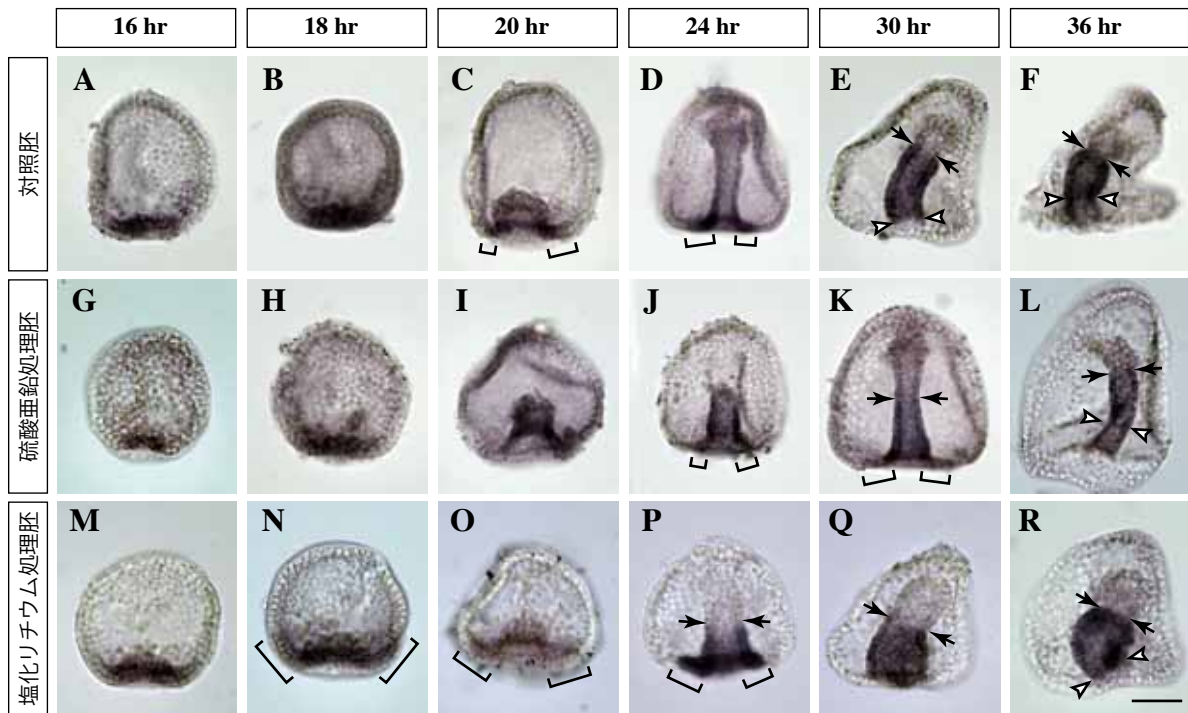


Figure 8 対照胚, 硫酸亜鉛処理胚, 及び塩化リチウム処理胚における Endo16 の発現パターン

受精後 5-9 時間, 0.2 mM の硫酸亜鉛, あるいは 30 mM の塩化リチウムで胚を処理し, 原腸陥入開始後の様々な時間で固定し, *in situ* ハイブリダイゼーションを行った. A-F: 対照胚. G-L: 硫酸亜鉛処理胚. M-R: 塩化リチウム処理胚. A, G, M: 16 hr. B, H, N: 18 hr. C, I, O: 20 hr. D, J, P: 24 hr. E, K, Q: 30 hr. F, L, R: 36 hr. 矢印は食道と胃の境界を, 白い矢頭は胃と腸の境界を示す. ブラケットは原口基部に広がった Endo16 発現領域を示す. R の右下のスケールは 50 μ m を示す.

受精後 16 時間頃, 対照胚, 及び処理胚のいずれにおいても植物極板で発現が見られたが, 対照胚に比べ, 硫酸亜鉛処理胚では発現領域が小さく, 塩化リチウム処理胚では大きくなっていった (Fig. 8A, G, M). 受精後 18 時間頃, 対照胚及び硫酸亜鉛処理胚では 16 時間とほぼ同様の発現パターンが観察された (Fig. 8B, H). しかし塩化リチウム処理胚では, 胞胚腔内へ折れ曲がった植物極板と, 植物極側の未陥入領域でも, 発現が観察された (Fig. 8M, ブラケット).

一次陥入が終了した受精後 20 時間頃, 対照胚でも原腸基部の未陥入部分での発現が見られるようになった (Fig. 8C). 一方, 硫酸亜鉛処理胚ではそのような原腸基部での発現は見られなかった (Fig. 8I). これに対し, 塩化リチウム処理胚では, 受精後 18 時間の胚と同様, 陥入部以外での発現が見られた (Fig. 8O).

受精後 24 時間, 原腸先端が動物極の頂板に達する頃, 対照胚では, 原腸全体とその基部で発現が見られた (Fig. 8D). この時期, 硫酸亜鉛処理胚では対照胚に比べて陥

入にやや遅れが見られるが, 陥入した原腸全体とその基部で発現が見られた (Fig. 8J). 一方, 塩化リチウム処理胚では, 陥入の遅れはほとんどないように観察された. また, 原腸の下半分ほどにしか発現が見られなくなっていた (Fig. 8P). しかし, 原腸基部での発現領域はまだ認められ, また強く発現していた.

受精後 30 時間頃の対照胚では, 予定食道域での発現が弱くなっていった (Fig. 8E). 硫酸亜鉛処理胚では, 食道領域での発現が少し弱くなっているように観察された (Fig. 8K). これらに対し, 塩化リチウム処理胚では, 原腸の下半分でのみ発現が見られ, 食道領域では発現は見られなくなっていた (Fig. 8Q).

受精後 36 時間後の対照胚では, 腸での発現が少し弱くなったように観察された (Fig. 8F). 一方, 硫酸亜鉛処理胚では, 予定腸領域での発現の弱まりは観察されなかった (Fig. 8L). 塩化リチウム処理胚では, 腸での発現が少し弱くなっているのが観察された (Fig. 8R).

なお, 対照胚と塩化リチウム処理胚では, 受精後 30

時間以降、原腸基部の未陥入部分での発現は見られなかった (Fig. 8E, F, Q, R). また、硫酸亜鉛処理胚でも、受精後 36 時間頃になると、原腸基部での発現は見られなくなった (Fig. 8L).

考察

[予定内胚葉組織の specification と Wnt シグナル]

ウニ胚の内胚葉組織の specification には Wnt8 が大きく関わっている (Wikramanayake *et al.*, 2004). Wnt8 は 16 細胞期に小割球で発現が認められるようになり、発生の進行につれてその発現領域は、*veg2*, *veg1* の子孫細胞へといった具合に徐々に動物極側へ広がる。このようにして specify された予定内胚葉は植物極板を形成し、この領域が原腸陥入を経て消化管へ分化するとされている。すなわち、陥入が始まる前に予定内胚葉組織は specify されており、食道・胃・腸を構成する細胞も決められているとの考えが一般的である。

ウニ胚の内胚葉形成は硫酸亜鉛で弱められ、その反対に塩化リチウムでは強められることが古くから知られてきた。本研究では、胚をそれぞれ硫酸亜鉛、及び塩化リチウムで受精後 1 時間から 15 時間まで、2 時間おきに 4 時間のパルス処理を行った (Fig. 2, 3, 4, 5). その結果、いずれの処理においても、受精後 5-9 時間で処理した場合に、食道と胃の体積の減少・増加が最大となった (Fig. 3A, 3B, 5A, 5B). 硫酸亜鉛処理胚においては食道の体積が約 1/2 (Fig. 3A), 胃の体積は約 2/3 に減少した (Fig. 3B). 塩化リチウム処理では、食道の体積が約 2 倍 (Fig. 5A), 胃の体積は約 1.9 倍に増加した (Fig. 5B). すなわち、胃よりも食道の方で、体積の増減の割合がやや高い傾向が見られた。また、両方の処理で、胃の方が食道よりも影響を受ける時間帯が後まで続いていた (Fig. 3A, 3B, 5A, 5B).

一方、受精後 1-15 時間での硫酸亜鉛、あるいは塩化リチウムによる 4 時間のパルス処理は、腸の体積影響しなかった (Fig. 3C, 5C). これは、腸へと分化する予定内胚葉組織の specification に Wnt が関与していないことを示す。

なお、最初に述べたように、受精後 24 時間までに起こる一次陥入と二次陥入では、食道と胃の前半の領域

が陥入し、三次陥入によって胃の後半と腸の領域が陥入する (Takata & Kominami, 2001). これらのことから、発生の初期 (受精後 11 時間頃) までの Wnt のシグナルは、二次陥入までに陥入する食道及び胃の前半の領域の specification に働くのではないかと考えられる。

[Delta/Notch シグナルと予定内胚葉組織の specification]

Notch のドミナントネガティブや活性型 mRNA の強制発現実験などから、Delta/Notch を介したシグナル伝達が、ウニ胚の SMC の specification において極めて重要な役割を果たしていることが知られた (Sherwood & McClay, 1999). 一方、Notch は、その異所的発現実験などにより、外胚葉と内胚葉の境界の位置決定に働くことも示された (Sherwood & McClay, 2001). さらに近年、Notch の細胞外領域を修飾する Fringe の発現を阻害すると、中胚葉のみならず、原腸形成も著しく抑制されることから、Delta/Notch を介したシグナル伝達は内胚葉組織の specification にも深く関わっていることが示唆されている (Peterson & McClay, 2005).

北米産のウニ *Strongylocentrotus purpuratus* において、Notch のリガンドである Delta は、受精後 12 時間まで小割球の子孫細胞で発現しているが、受精後 18 時間頃になると *veg2* の子孫細胞で発現するようになる (Oliveri, *et al.*, 2002). *S. purpuratus* の胚は低温で飼育されるため、単純な比較はできないが、バフンウニに比べその発生には約 1.5 倍の時間を要するようである。従って、*S. purpuratus* における受精後 18 時間というのは、バフンウニの 10-12 時間頃に相当すると考えられる。

そこで、受精後 10 時間以降 Delta/Notch シグナル伝達を阻害する DAPT で胚を処理し (Fig. 6), 形成された消化管の各部の体積を計測した (Fig. 7). 対照胚に比べ、食道と胃では有意な増減は見られなかったのに対し (Fig. 7A, B), 腸の体積は全ての処理時間帯で有意に減少していた (Fig. 7C). つまり、Delta/Notch シグナル伝達経路は、孵化の頃から二次陥入終了後までの長い期間にわたり、内胚葉の specification に関与していることが明らかになった。得られた結果より、最終的な外胚葉と内胚葉の境界が決定される時期はプリズム期であろうと思われる。

[食道、胃、及び腸の体積相互間の比率]

硫酸亜鉛処理胚と塩化リチウム処理胚で、消化管各部の体積の比率を求めたところ、食道/胃については、どの時間帯で処理したものでも有意差は見られなかった (Fig. 3D, 5D). この結果は重要で、予定内胚葉を食道と胃領域へと一定の比率で割り振るための何らかの仕組みがあることを示唆する。

なお、先に述べたように二次陥入までに陥入するのは、食道と胃の前半を構成する細胞である。Figure 3, 5, 及び7では食道/胃の体積比を算出したが、これを食道の体積と胃の半分の体積との比としても、同じ結果になる。また、胃の体積は食道の体積の約2倍である (e.g. Fig. 3). 従って、前のパラグラフの”予定内胚葉を食道と胃領域へと一定の比率で”というのは、”予定内胚葉を食道と胃の前半がほぼ同じ体積となるように”と言い換えることができるのではなかろうか。

一方、腸/胃の体積比、あるいは腸/食道の体積比については、処理の時間帯によっては有意な差が見られた (Fig. 3E, F, 5E, F). これは、予定内胚葉組織の食道と胃への割り振りは、腸への割り振りとは独立して行

われていることを示す。正常発生において、食道と胃の境界が見られ始めるのは受精後28時間頃であり、胃と腸のくびれが見られ始めるのは受精後32時間頃である。この時間的なズレは、食道、胃、及び腸への割り振りのタイミングの違いを反映しているものと思われる。

[塩化リチウム処理胚での Endo16 の発現]

Endo16 の mRNA は、受精後16時間頃から植物極板で認められるようになる (Fig. 8A). 原腸が伸長し、その先端が頂板に達して二次陥入が終了する頃、Endo16 の発現は原腸全体に見られる (Fig. 8D). 食道と胃の間のくびれが形成されて (受精後28時間) しばらくすると、食道での発現が弱くなる (Fig. 8E, F). 受精後32時間頃には、胃と腸の間のくびれが形成され始めるが、受精後36時間頃になると食道での発現は消失し、腸での発現も少し弱くなる (Fig. 8E).

注目すべき点は、一次陥入が終了する頃 (受精後20時間, Fig. 8C), 生じた腸原基の基部付近に、Endo16 の

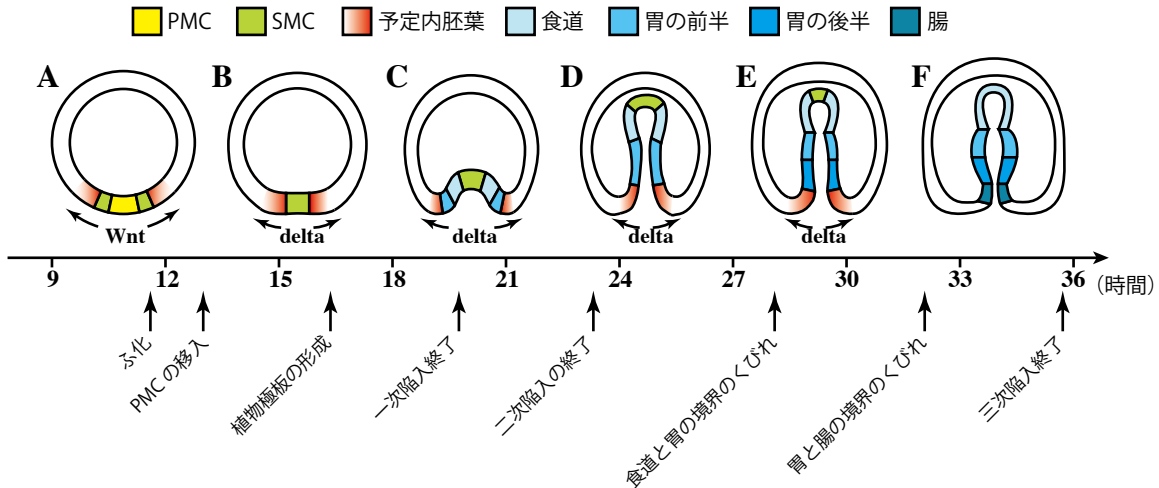


Figure 9 パンフウニ初期発生における予定内胚葉の specification と食道、胃、及び腸への割り振りのモデル

A: 受精後11時間頃。ふ化前までに、小割球、或は植物極よりの *veg2* 由来細胞からの Wnt により植物極板を構成する予定内胚葉細胞が specify される。B: 受精後15-16時間頃。ふ化後小割球は胞胚腔内に移入し (以降、図では省略)、植物極板が形成される。C: 受精後20時間頃。植物極板の内側への折れ曲がりにより、太く短い腸原基が形成される。この頃までには、予定内胚葉細胞から食道、及び胃の前半を作る細胞が決定されると考えられる。D: 受精後24-25時間頃。一次陥入により胞胚腔内へ陥入した細胞群が細長い原腸を構成するようになる。この後、原腸先端の SMC の大多数が胞胚腔へと移入し、後に体腔嚢などを形成する一群の細胞のみが残る。E: 受精後29-30時間頃。原腸先端が頂板に達した後でも、原腸基部では Endo16 を発現する細胞が新たに出現する。F: 受精後34時間頃。受精後36時間までには、すべての予定内胚葉が陥入し、消化管が形成される。なおこの頃原腸先端の SMC は、体腔嚢や食道の周りの筋繊維の形成 (図では省略) にもない原腸では見られなくなる。なお、植物極板形成後の予定内胚葉細胞の specification には delta/Notch シグナルが関与していると考えられる (B-E).

強い発現が新たに見られ始めるということである。このような発現は、受精後 24 時間、二次陥入が終了した頃でも見られた (Fig. 8D)。このことは、塩化リチウム処理胚で一層顕著である。すなわち、受精後 18 時間の対照胚では、胞胚腔内へ折れ曲がった植物極板だけで Endo16 の発現が見られるが (Fig. 8B)、同時期の塩化リチウム処理胚では、さらにその周辺にまで発現領域が広がっていた (Fig. 8N)。このような、まだ陥入はしていないが Endo16 を発現している領域は、30 時間、36 時間と発生が進むにつれ、消化管の後端として陥入するように観察される。このように、Endo16 の発現は植物極板の形成・陥入後も時間とともに広がることから、Endo16 の発現と植物極板の形成とは必ずしも一致しないことが明らかになった。

受精後 24 時間の塩化リチウム処理胚では、形成されている原腸の上半分で Endo16 の発現がすでに消失していた (Fig. 8P)。この領域は、二次間充細胞の集団と予定食道域である。なぜ塩化リチウム処理胚で、この領域での Endo16 の消失が早く起こるのかは不明であるが、Wnt シグナルが食道と胃の細胞の分岐にも何らかの役割を果たしていることが推測される。

塩化リチウム処理胚においては、一次陥入で胞胚腔内へと折れ曲がる植物極板の外周で、Endo16 を発現する細胞が受精後 18 時間頃に新たに出てくる (Fig. 8N)。その後この領域は、三次陥入の過程を経て、胃の後半と腸を形成するように観察される (Fig. 8O-R)。従って、予定内胚葉組織の食道と胃の前半への振り分けの仕組みは、植物極板が形成される受精後 16 時間頃、つまり植物極板の中で働いているものと考えられる。

[硫酸亜鉛処理胚における Endo16 の発現と原腸陥入]

硫酸亜鉛と塩化リチウムが最も影響を及ぼす時期である受精後 5-9 時間は、第 7 卵割から第 9 卵割頃で、色素細胞などの二次間充細胞が specify される時期 (Kominami, 1998, 2000) と重なる。バフンウニ胚において原腸陥入の引き金を引くのは植物極付近で円周状に出現する瓶型細胞であると考えられており (Nakajima & Burke, 1996; Kimberly & Hardin, 1998)、この瓶型細胞は色素細胞であることが示唆されている (Takata & Kominami, 2004)。実際、受精後 5-9 時間硫酸亜鉛で処理した胚では色素細胞がほとんど分化せず (データは

示していない)、陥入の遅れが見られた (Fig. 8J)。

ただし、この遅れは 2-4 時間程度であると考えられる。というのも、受精後 30 時間の硫酸亜鉛処理胚においても、陥入した消化管原基の上部 1/3 で Endo16 の発現が弱くなっているからである (Fig. 8K)。そして受精後 36 時間の処理胚では、陥入した領域以外での Endo16 の発現は見られなくなる。この頃までには、硫酸亜鉛処理胚においても陥入は完了しているものと思われる。従って、消化管各部の体積について、受精後 36 時間以降で測定する限り、処理による発生の遅れを考慮する必要はないと考えられる。

今回、塩化リチウムや硫酸亜鉛で処理された胚で Endo16 の発現を観察したが、原腸陥入開始後であっても Endo16 発現部位の拡大が起こっていた。このような、原腸陥入開始後に Endo16 を発現した細胞も、内胚葉へと分化すべく、二次陥入終了以降、胞胚腔内へと陥入した。バフンウニ胚においても、Endo16 は陥入のために必要不可欠の分子であると考えられる (Romano & Wray, 2006)。Endo16 は、その上流域に転写調節のための多くの "モジュール" をもつ (Romano & Wray, 2003)。一方、転写因子をコードする Brachyury は、予定陥入域の上皮で発現する (Gross & McClay, 2001)。その発現部位や発現のタイミングから、Brachyury が Endo16 の上流因子の一つである可能性も考えられる。

[まとめ]

以上の結果から、バフンウニ胚において、予定内胚葉領域の食道、胃、及び腸への振り分けは、Figure 9 に示すような過程を経て起こると考えられる。まず受精後 11 時間頃までに Wnt によって、食道と胃の前半を形成する領域が specify される (Fig. 9A)。その後、Delta/Notch シグナルが関与しつつ、時間経過とともに、胃の後半と腸へと分化する予定内胚葉組織が徐々に specify される (Fig. 9B-E)。この specification は、おそらく受精後 30 時間あたりまでは継続していると考えられる (Fig. 7C, 8E)。

Wnt により早期に予定内胚葉組織として specify された領域は一次陥入と二次陥入を経て食道と胃の前半を形成する (Fig. 9D)。なお、遅くとも二次陥入が終了する受精後 24 時間頃までには、食道と胃の体積をある一定の比 (ほぼ 1:2) とするような仕組みが働くものと思

われる。この仕組みは植物極板で働いている可能性がある。一方、Delta/Notch シグナルの関与で specify された予定内胚葉領域は、三次陥入によって胚内部へと陥入し、胃の後半と腸を形成する (Fig. 9F)。ただし、胃領域と腸領域の境界がいつどのようにして決められるのかについての知見は得られなかった。これについては今後の課題である。

謝辞

本稿の作成にあたり、愛媛大学理工学研究科生物環境科学講座の高田裕美博士、及び村上安則博士には貴重なご助言を頂いた。心より謝意を表する。

引用文献

- Cheng, H. T., Miner, J. H., Lin, M., Tansey, M. G., Roth, K. & Kopan, R. 2003. Gamma-secretase activity is dispensable for mesenchyme-to-epithelium transition but required for podocyte and proximal tubule formation in developing mouse kidney. *Development* **130**, 5031-5042.
- Croce, J., Range, R., Wu, S. Y., Miranda, E., Lhomond, G., Peng, J. C., Lepage, T. & McClay, D. R. 2011. Wnt6 activates endoderm in the sea urchin gene regulatory network. *Development* **138**, 3297-3306.
- Dan, K & Okazaki, K. 1956. Cyto-embryological studies of sea urchins. III. Role of secondary mesenchyme cells in the formation of the primitive gut in sea urchin larvae. *Biol. Bull.* **110**, 29-42.
- Ettensohn C. A. 1985. Gastrulation in the sea urchin embryo is accompanied by the rearrangement of invaginating epithelial cells. *Dev. Biol.* **112**, 383-390.
- Gross, J. M. & McClay, D. R. 2001. The role of Brachyury (T) during gastrulation movements in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Dev. Biol.* **239**, 132-147.
- Gustafson, T. & Kinnander, H. 1956. Microaquaria for time-lapse cinematographic studies of morphogenesis in swimming larvae and observations on sea urchin gastrulation. *Exp. Cell Res.* **11**, 36-51.
- Hardin, J. 1988. The role of secondary mesenchyme cells during sea urchin gastrulation studied by laser ablation. *Development* **103**, 317-324.
- Hardin, J. 1989. Local shifts in position and polarized motility drive cell rearrangement during sea urchin gastrulation. *Dev. Biol.* **136**, 430-445.
- Kimberly, E. L. & Hardin, J. 1998. Bottle cells are required for the initiation of primary invagination in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* **204**, 235-250.
- Kominami, T. 1984. Allocation of mesendodermal cells during early embryogenesis in the starfish, *Asterina pectinifera*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **84**, 177-190.
- Kominami, T. 1998. Role of cell adhesion in the specification of pigment cell lineage in embryos of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Dev. Growth Differ.* **40**, 609-618.
- Kominami, T. 2000. Establishment of pigment cell lineage in embryos of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Dev. Growth Differ.* **42**, 41-51.
- Kominami, T. and Takata, H. 2004. Gastrulation in the sea urchin embryo: a model system for analyzing the morphogenesis of a monolayered epithelium. *Dev Growth Differ.* **46**, 309-326.
- Kominami, T. & Takata, H. 2007. The sea urchin embryo - a model system for analyzing a variety of cellular activities in early development. In "Sourcebook of model system for biomedical research" M. Conn ed., pp. 85-90. Humana Press Inc. Clifton, NJ.
- Logan, C. Y. & McClay, D. R. 1997. The allocation of early blastomeres to the ectoderm and endoderm is variable in the sea urchin embryo. *Development* **124**, 2213-2223.
- Martins, G. G., Summers, R. G. & Morrill, J. B. 1998. Cells are added to the archenteron during and following secondary invagination in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Dev. Biol.* **198**, 330-342.
- Nakajima, Y. & Burke, R. D. 1996. The initial phase of gastrulation in sea urchins is accompanied by the formation of bottle cells. *Dev Biol.* **179**, 436-446.
- Nocente-McGrath, C., Brenner, C. A. & Ernst, S. G. 1989. Endo16, a lineage-specific protein of the sea urchin

- embryo, is first expressed just prior to gastrulation. *Dev. Biol.* **136**, 264-272.
- Oliveri, P., Carrick, D. M. & Davidson, E. H. 2002. A regulatory gene network that directs micromere specification in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* **246**, 209-228.
- Peterson, R. E. & McClay, D. R. 2005. A Fringe-modified Notch signal affects specification of mesoderm and endoderm in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* **282**, 126-137.
- Ransick, A. & Davidson, E. H. 1998. Late specification of *veg₁* lineages to endodermal fate in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* **195**, 38-48.
- Romano, L. A. & Wray, G. A. 2003. Conservation of Endo16 expression in sea urchins despite evolutionary divergence in both cis and trans-acting components of transcriptional regulation. *Development* **130**, 4187-4199.
- Romano, L. A. & Wray G. A. 2006. Endo16 is required for gastrulation in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Dev. Growth Differ.* **48**, 487-497.
- Ruffins, S. W. & Ettensohn, C. A. 1996. A fate map of the vegetal plate of the sea urchin (*Lytechinus variegatus*) mesenchyme blastula. *Development* **122**, 253-263.
- Sherwood, D. R. & McClay, D. R. 1999. LvNotch signaling mediates secondary mesenchyme specification in the sea urchin embryo. *Development* **126**, 1703-1713.
- Sherwood, D. R. & McClay, D. R. 2001. LvNotch signaling plays a dual role in regulating the position of the ectoderm-endoderm boundary in the sea urchin embryo. *Development* **128**, 2221-2232.
- Shoguchi, E., Tokuoka, M. & Kominami, T. 2002. *In situ* screening for genes expressed preferentially in secondary mesenchyme cells of sea urchin embryos. *Dev. Genes Evol.* **212**, 407-418.
- Showman, R. M. & Foerder, C. A. 1979. Removal of the fertilization membrane of sea urchin embryos employing aminotriazole. *Exp. Cell Res.* **120**, 253-255.
- Takata, H. & Kominami, T. 2001. Shrinkage and expansion of blastocoel affect the degree of invagination in sea urchin embryos. *Zool. Sci.* **18**, 1097-1105.
- Takata, H. & Kominami, T. 2004. Behavior and differentiation process of pigment cells in a tropical sea urchin *Echinometra mathaei*. *Dev. Growth Differ.* **45**, 473-483.
- Wikramanayake, A. H., Peterson, R., Chen, J., Huang, L., Bince, J. M., McClay, D. R. & Klein, W. H. 2004. Nuclear beta-catenin-dependent Wnt8 signaling in vegetal cells of the early sea urchin embryo regulates gastrulation and differentiation of endoderm and mesodermal cell lineages. *Genesis* **39**, 194-205.
- Wu, S. Y., Ferkowicz, M. & McClay, D. R. 2007. Ingression of primary mesenchyme cells of the sea urchin embryo: a precisely timed epithelial mesenchymal transition. *Birth Defects Res. C. Embryo Today* **81**, 241-252.