

トーク&ディスカッション 2023/12/10

7月31日 高校生物教員向けリカレント講座

高校の教科書(発生生物分野)に載っているあのモデルはどういう研究で支えられているのか？

～両生類の中胚葉誘導

からの補講

東京都立大学 福田公子

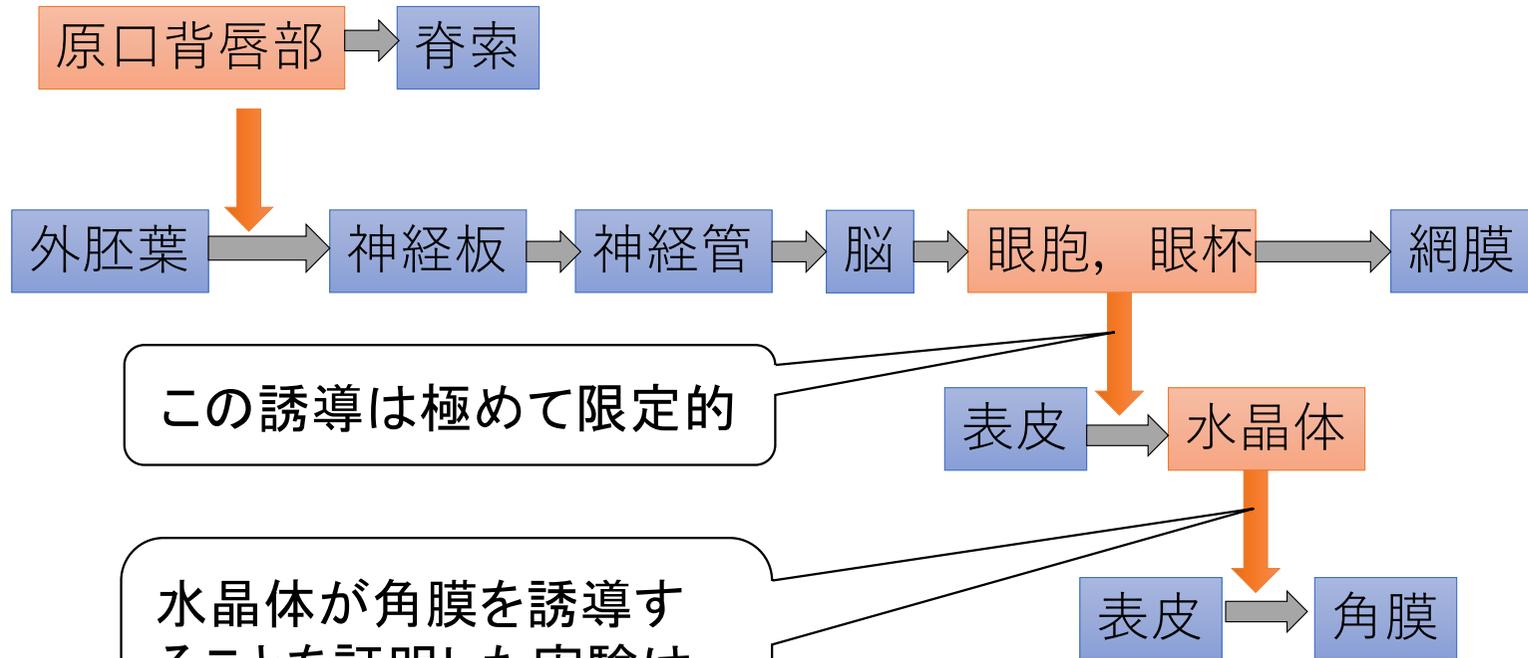
高校生物の教科書に載っていることはすべて論文に基づいている。

論文を(たくさん)読んでその知識をベースに教える
どの様にしてモデルが提唱されたのか追うことができる。

たくさん

教科書に書いてあること(のみ)をベースに教える
そのモデルがどの様な実験事実に支えられているのかは無視される。

誘導の連鎖

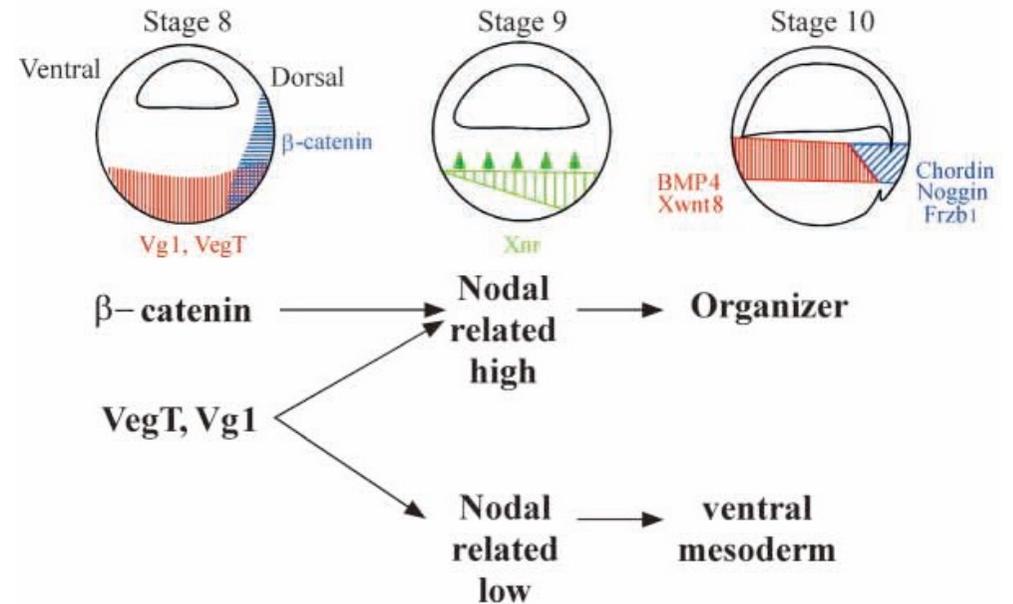
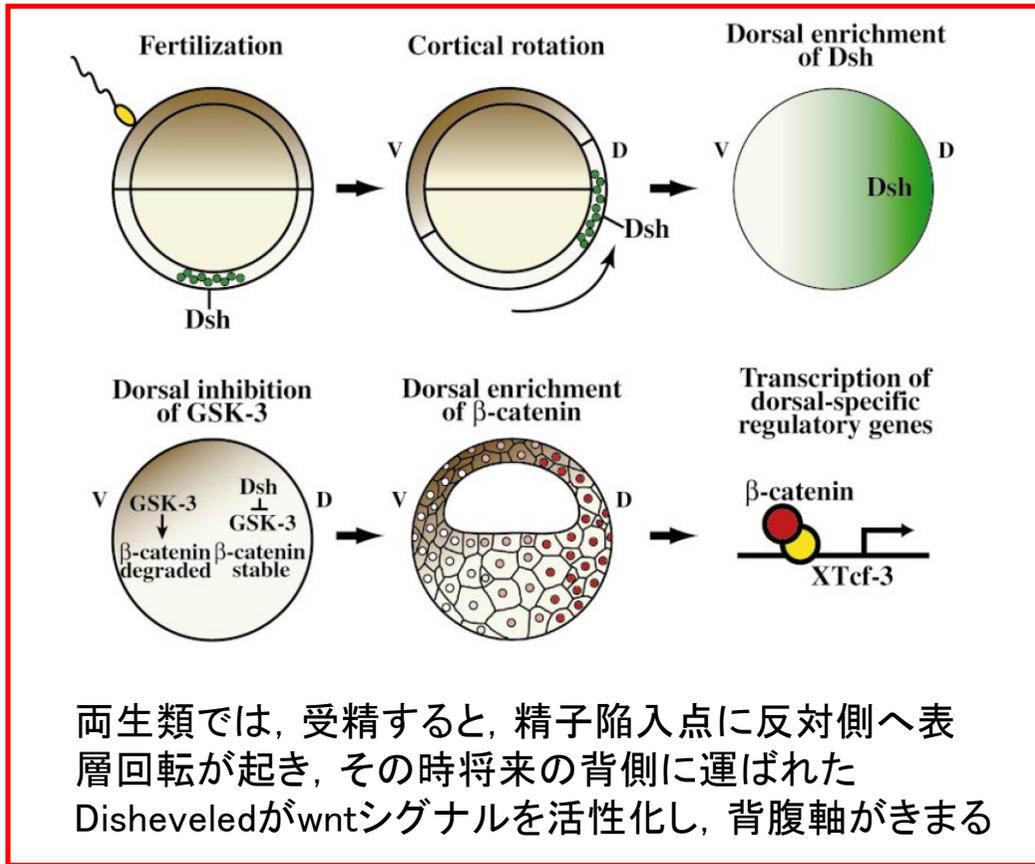


この誘導は極めて限定的

水晶体が角膜を誘導することを証明した実験はない(仮説)

発生分野の教科書の論文を紹介するプロジェクト

～両生類の中胚葉誘導



両生類の中胚葉誘導は植物局側に存在する母性因子 VegTと背側に存在する β -cateninとが協調して nodal の発現を誘導し、その nodal の濃度によって背腹の中胚葉が誘導される。

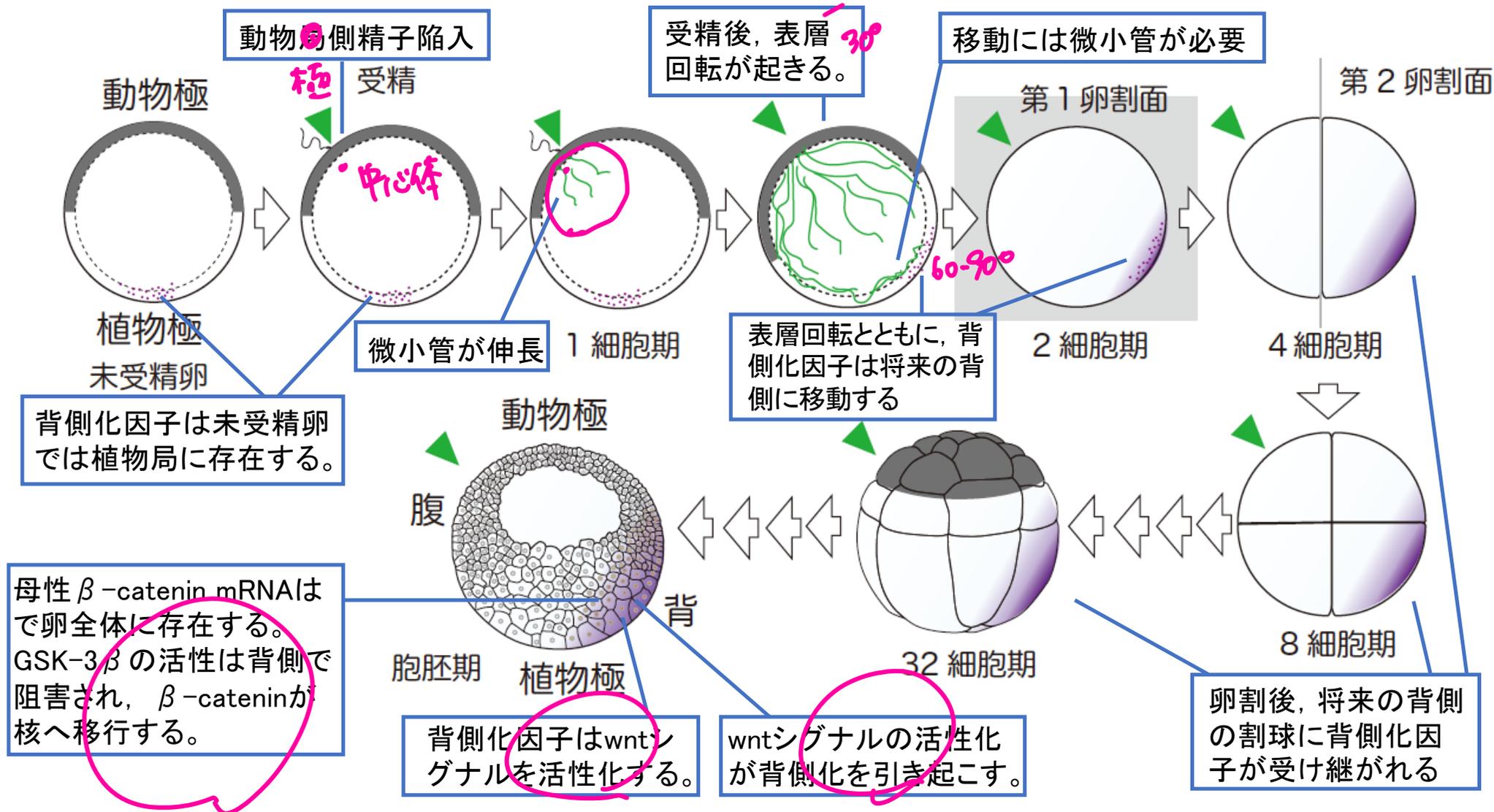
Establishment of the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation

Miller, J. R., Rowning, B. A., Larabell, C. A., Yang-Snyder, J. A., Bates, R. L., and Moon R. T.

Journal of Cell Biology 1999 Jul 26;146(2):427-37.
doi: 10.1083/jcb.146.2.427.

アフリカツメガエル胚では、背腹軸の決定は、背側へのディシェベルドの濃縮と一致しており、その濃縮は表層回転に依存している。

両生類の背側の決定機構ですでにわかっていたこと



Wntシグナルとその構成因子

Wntタンパク質 (リガンド)



Frizzled フリズルド (受容体)



Disheveled デイシェヴェルト



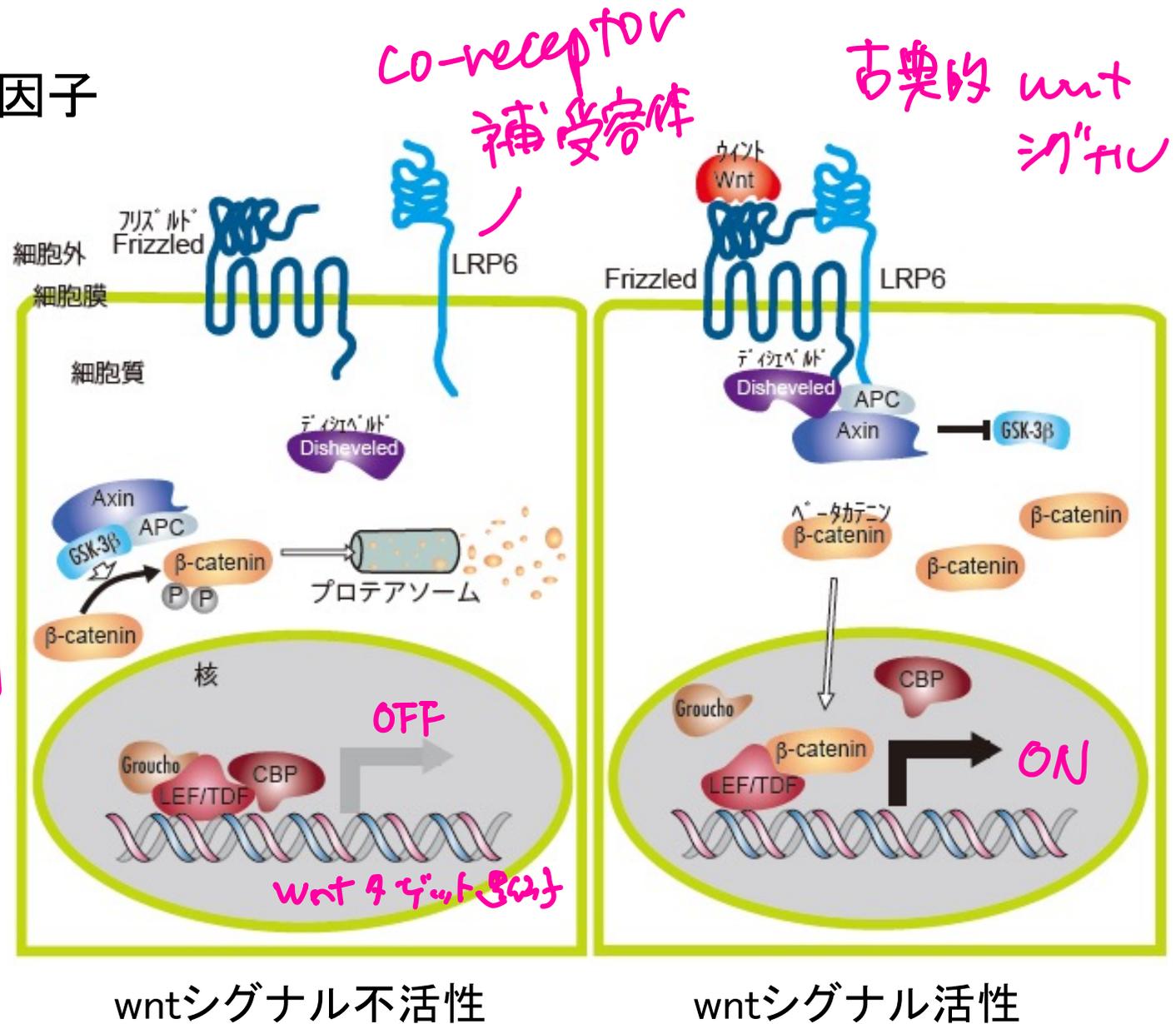
GSK3β (キナーゼ:リン酸化酵素)



β-catenin ベータカテニン



Wntシグナル応答遺伝子



背側の決定とwntシグナルは関わっている



- 腹側でwntシグナルをさまざまな方法で活性化すると2次軸ができる
(2次軸はもう一つ背側ができたことと同等)
- antisenseオリゴヌクレオチドを用いて母性の β カテニンを阻害すると胚は腹側化する。
- β カテニンは、背側の細胞の核に局在している。
- β カテニンの局在はGSK-3 β を強制発現すると抑制される。
 β カテニンの局在は背側でGSK-3 β が抑制されることで起こる。



胚の中で実際に背側化因子として働いているのは何かはわかっていなかった。

背側化因子の本体はDshである

背側化因子は以下の条件を満たすはず

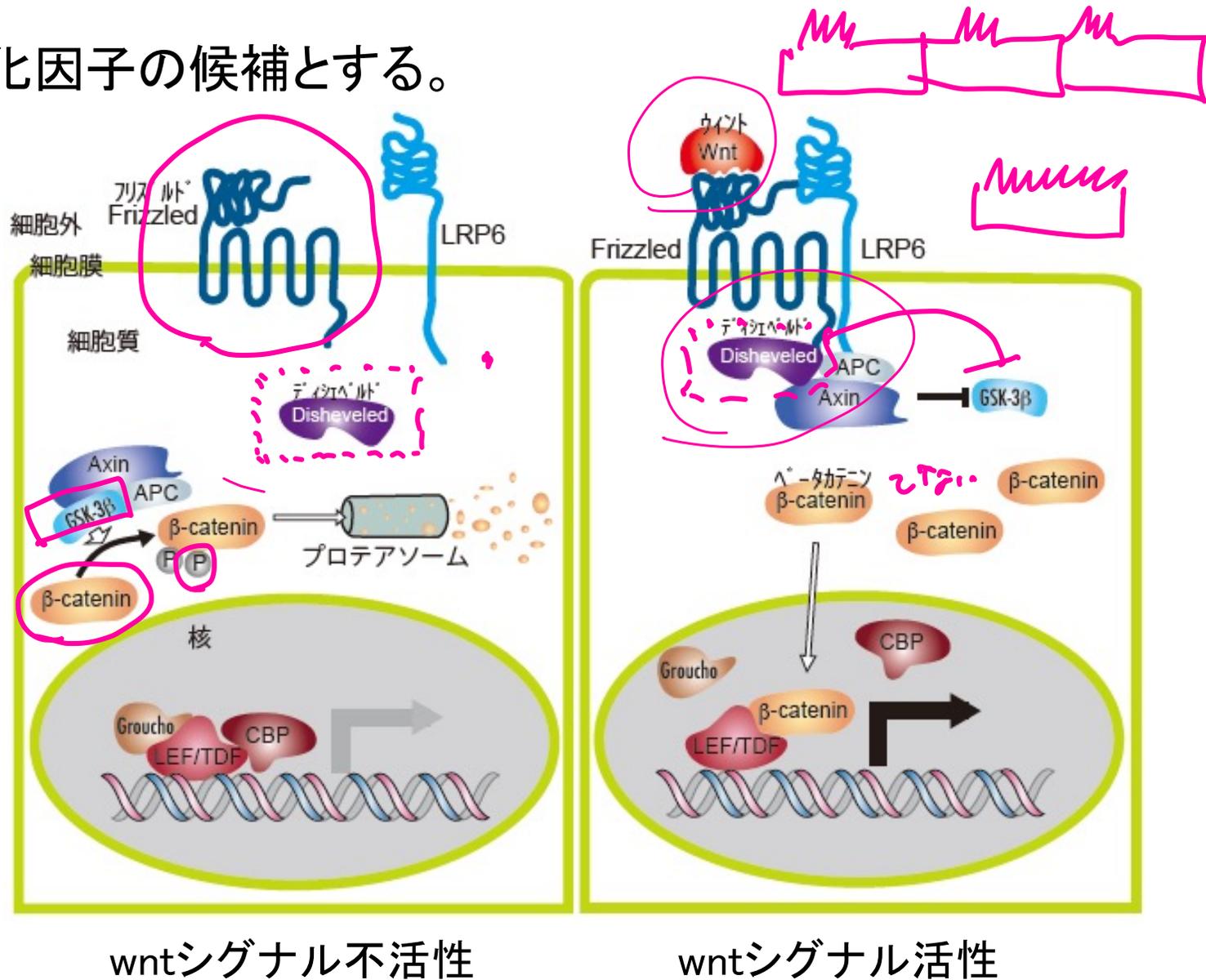
1. 未受精卵, 初期受精卵では植物~~局~~^極に存在する。
2. 表層回転時に伸長した微小管に運ばれ, 将来の背側に移動する。
3. その結果, 背側が多い。

4. GSK-3 β の活性を阻害し, wntシグナルを活性化できる。

この結果, 背側でのみGSK-3 β の活性が阻害され, Wntシグナルが活性化する。

4で候補因子を絞り, 候補因子が1, 2, 3を満たすかを証明する。

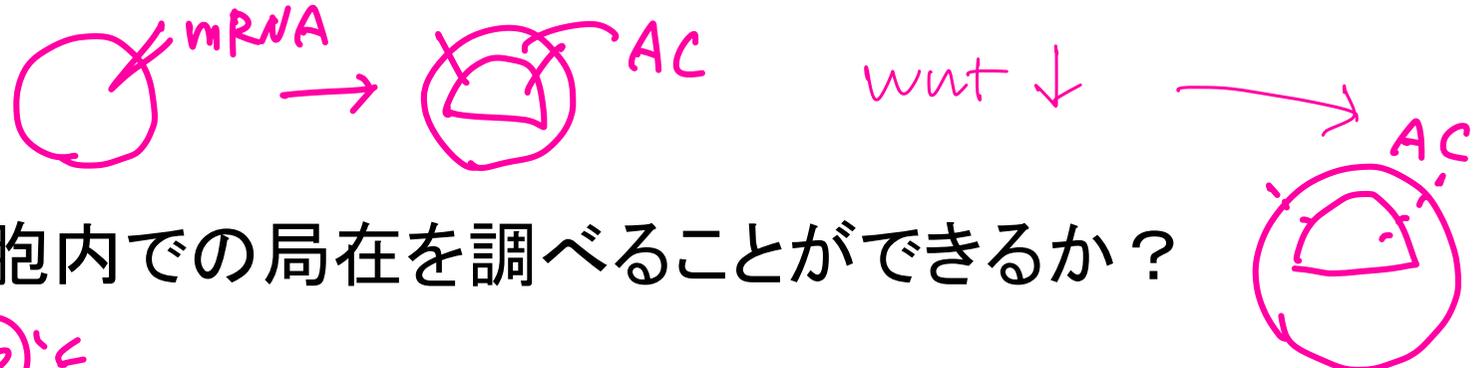
Disheveled (Dsh)を背側化因子の候補とする。



Disheveledタンパク質は以下の条件を満たすはず

- ・ 1. 未受精卵, 初期受精卵では植物局に存在する。
- ・ 2. 表層回転時に伸長した微小管に運ばれ, 将来の背側に移動する。
- ・ 3. その結果, 背側が多い。
- ・ 4. GSK-3 β の活性を阻害し, wntシグナルを活性化する。

この結果, 背側でのみGSK-3 β の活性が阻害され, Wntシグナルが活性化する。



Dshタンパク質の細胞内での局在を調べることができるか？

抗体 → (抗体) (抗体)

抗Dsh抗体で胞胚のアニマルキャップ(多細胞)を染色し、共焦点顕微鏡で観察



Dshは細胞内で0.4-1.0 μmの細胞小器官(小胞)および細胞質に拡散して存在している(A, B)

アニマルキャップにFrizzledを発現させると、抗Dsh抗体の染色は膜にもみられる(C)



この染色はDshに違いない。

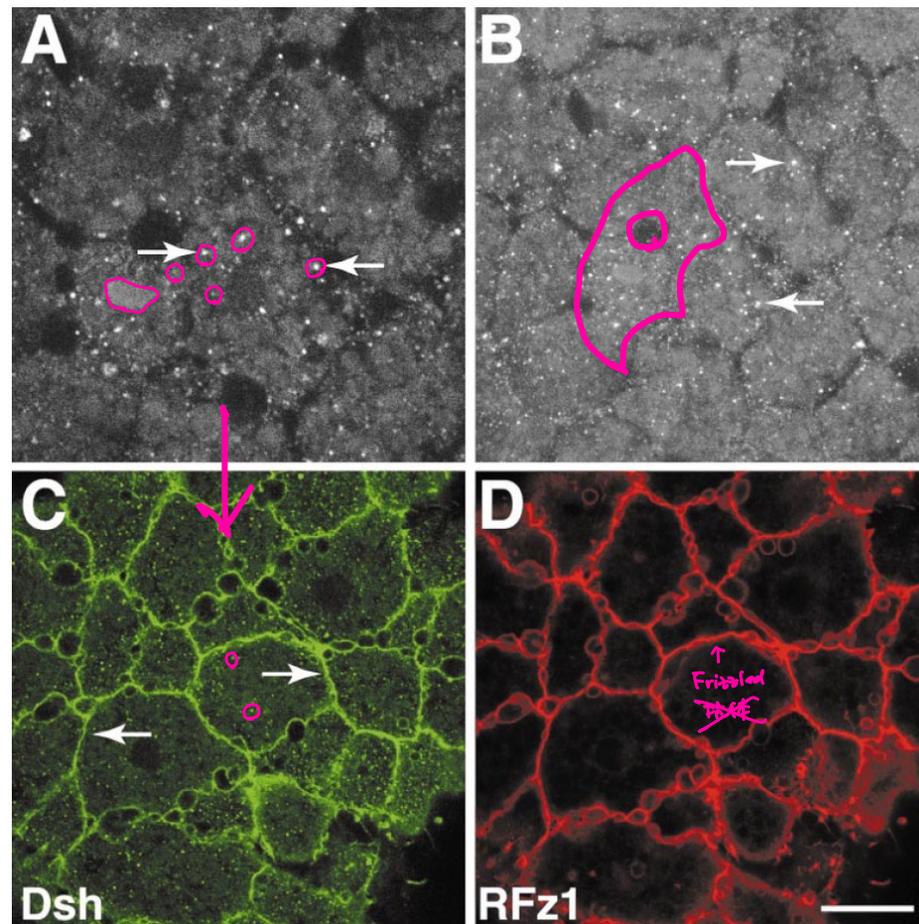


Fig. 1

|

下五

未受精卵, 初期受精卵では植物局に存在する

下五

Dshは, 受精直後は植物局付近に多い(データなし)

抗Dsh抗体で受精直後の卵を染色し, 共焦点顕微鏡で観察



animal capでの実験と同様に, Dshは0.6-1.2 μ mの小胞として存在。
植物局側の表層(cortex)に存在していた。

下五



表層回転時に伸長した微小管に運ばれ、将来の背側に移動する。



Dshは第1卵割直前(表層回転直後)で将来の背側に多い

2種類の抗Dsh抗体で1細胞期の第1卵割直前を染色し、細胞表面から4-8 μ mの深さを共焦点顕微鏡で観察

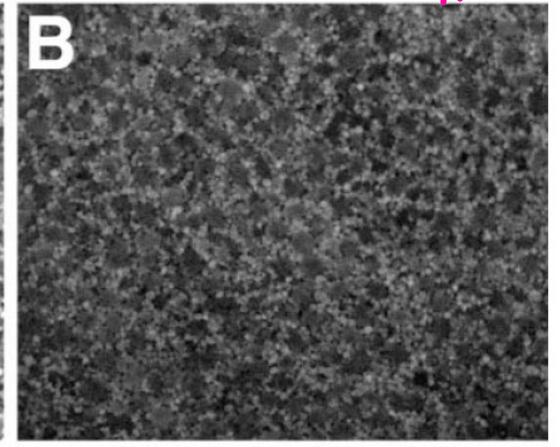
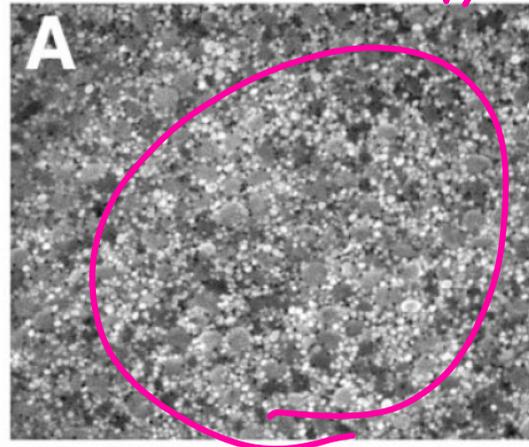


Dshは将来の背側に多い。



Dshは植物局側から将来の背側に運ばれたのではないか。

anti-Dvl-1



anti-XDsh

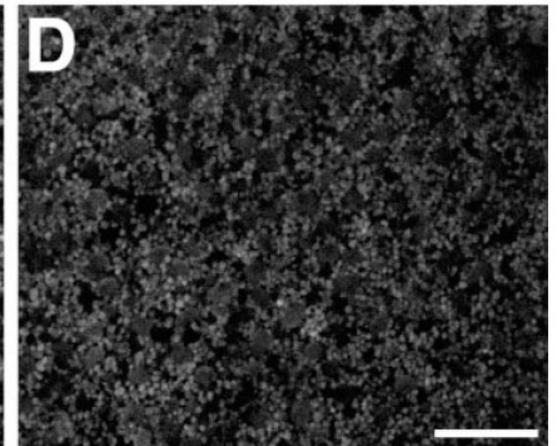
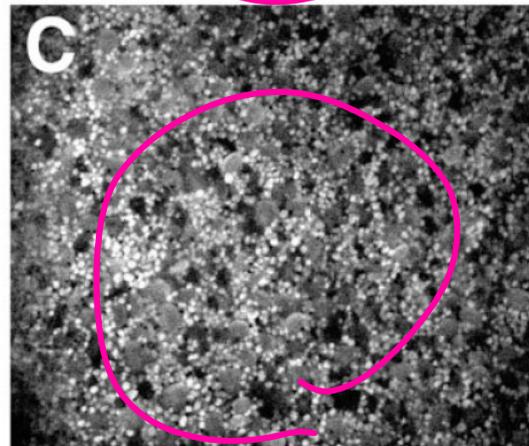


Fig. 2

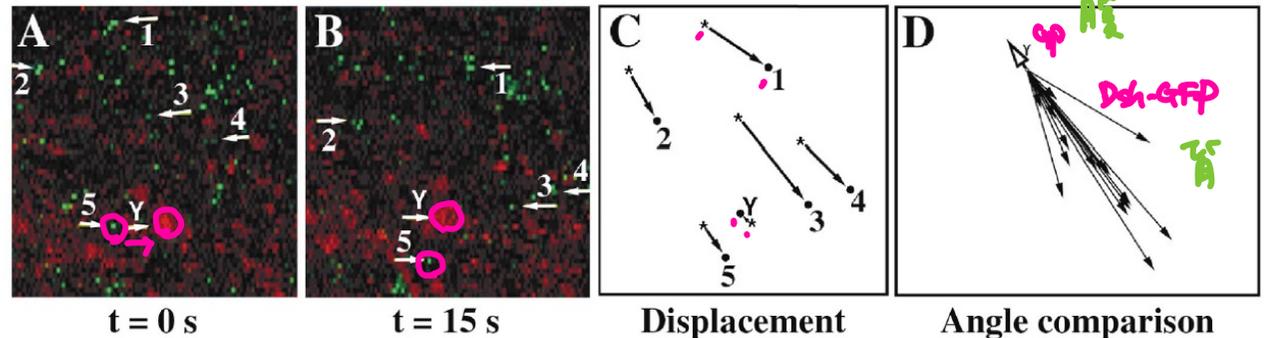


Dshは本当に背側に移動しているのか？

Dsh-GFPを未成熟卵細胞に注入
人工的に卵成熟させる 母性

Dsh-GFPは小胞に存在し、植物極
表層に多い

Fig. 3



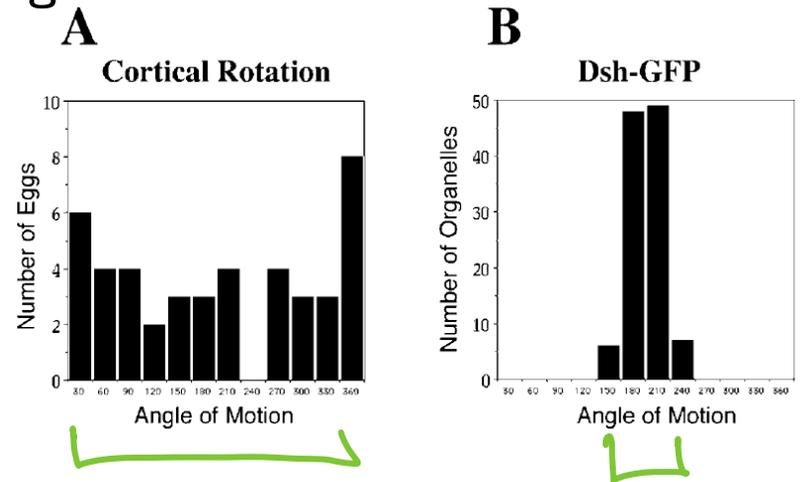
動物極を引っ掻き(受精の代わり), その後の
Dsh-GFPの位置を1.5秒ごとにビデオ撮影

卵黄(赤)に対してDsh-GFP(緑)は反対側に動く

卵黄の動く方向: 腹側方向

Dshは小胞のまま背側に向かって移動している

10767
Fig. 4



Dshは微小管によって運ばれるのか？

Fig. 5

Dsh-GFPを未成熟卵細胞に注入
人工的に卵成熟させ，動物極を引っ掻く(受精の代わり)

D₂O(重水)処理

(D₂O処理により，微小管は方向性なく，かつ時期も早く形成される。)



卵黄に対してDsh-GFP(緑)はランダムな方向に動く



Dsh-GFP小胞は微小管により，運ばれている。

→ 微小管

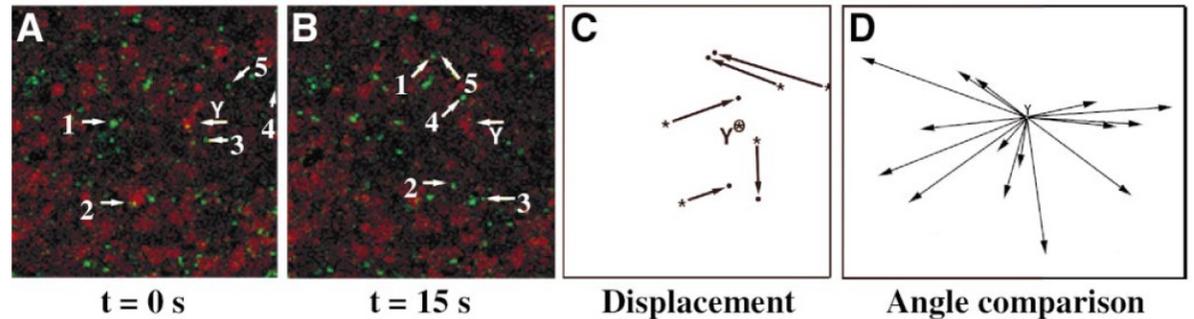
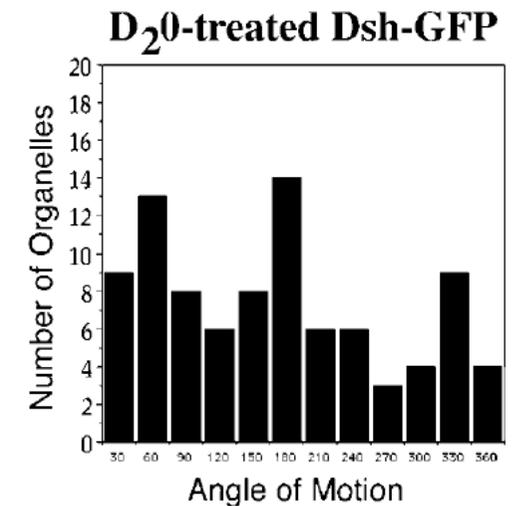


Fig. 4 C



その結果, Disheveledは背側で多い。

Dshタンパク質は胞胚(実際に背腹が決まる時期)に背腹のどちらで多いか。

免疫蛍光法, 顕微鏡観察では, 位置の特定はできても, 量の比較はしにくい

抗Dsh抗体で64-128細胞期の胚を背腹に分け, ウェスタンブロットでタンパク質の量を調べた。

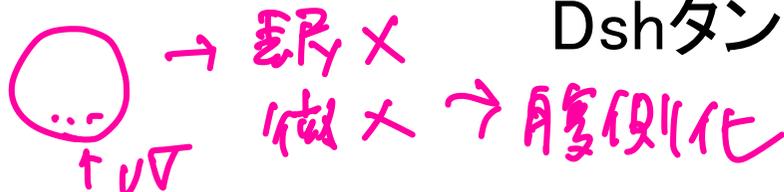


コントロール胚: Dshは背側に多い。

1細胞期初期に植物局にUVを照射した胚:
(UV照射は表層回転を障害し, 微小管の方向性を持った伸長を障害する)



Dshは背腹の両方に同じくらいある。

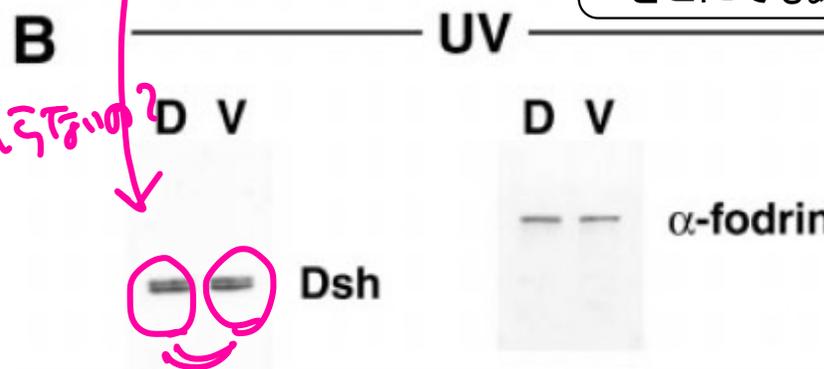


Disheveled V (circled and crossed out) D 背 → 背側で多い ↓

Fig. 6

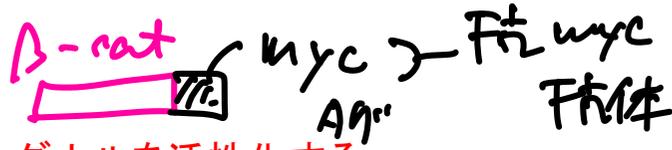


Fig. 7



細胞骨格タンパク質。どこにでもある

Dshタンパク質は胞胚では背側で多い。



GSK-3βの活性を阻害し, wntシグナルを活性化する。

β-cat 細胞質 ↑
核 ↓
wntシグナル ↑

Dshは, 両生類胚でwntシグナルを活性化させるか

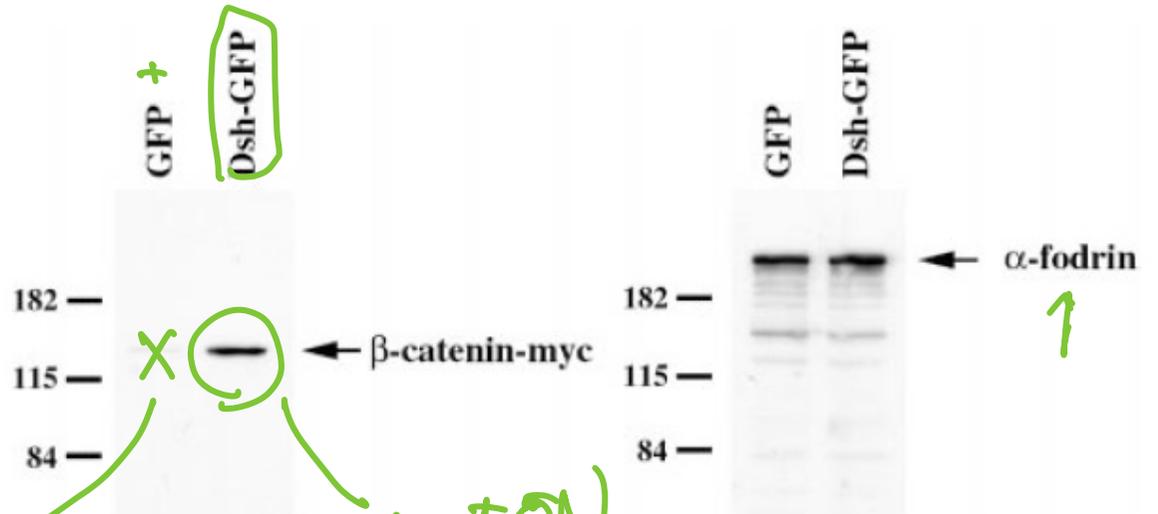
β catenin-myc RNA (25pg) + GFPまたはDsh-GFP RNA (1ng)を2細胞の両方の割球に注入

初期～中期胞胚まで育て, すり潰し, ウェスタンブロットで抗c-myc抗体でタンパク質量を調べた。



Dsh-GFP RNAと一緒に注入した時に, β catenin-mycタンパク質が増えた

Dsh は β cateninを安定化させ, wntシグナルを活性化できる。



分解 ← cut OFF
β-cat
cut ON

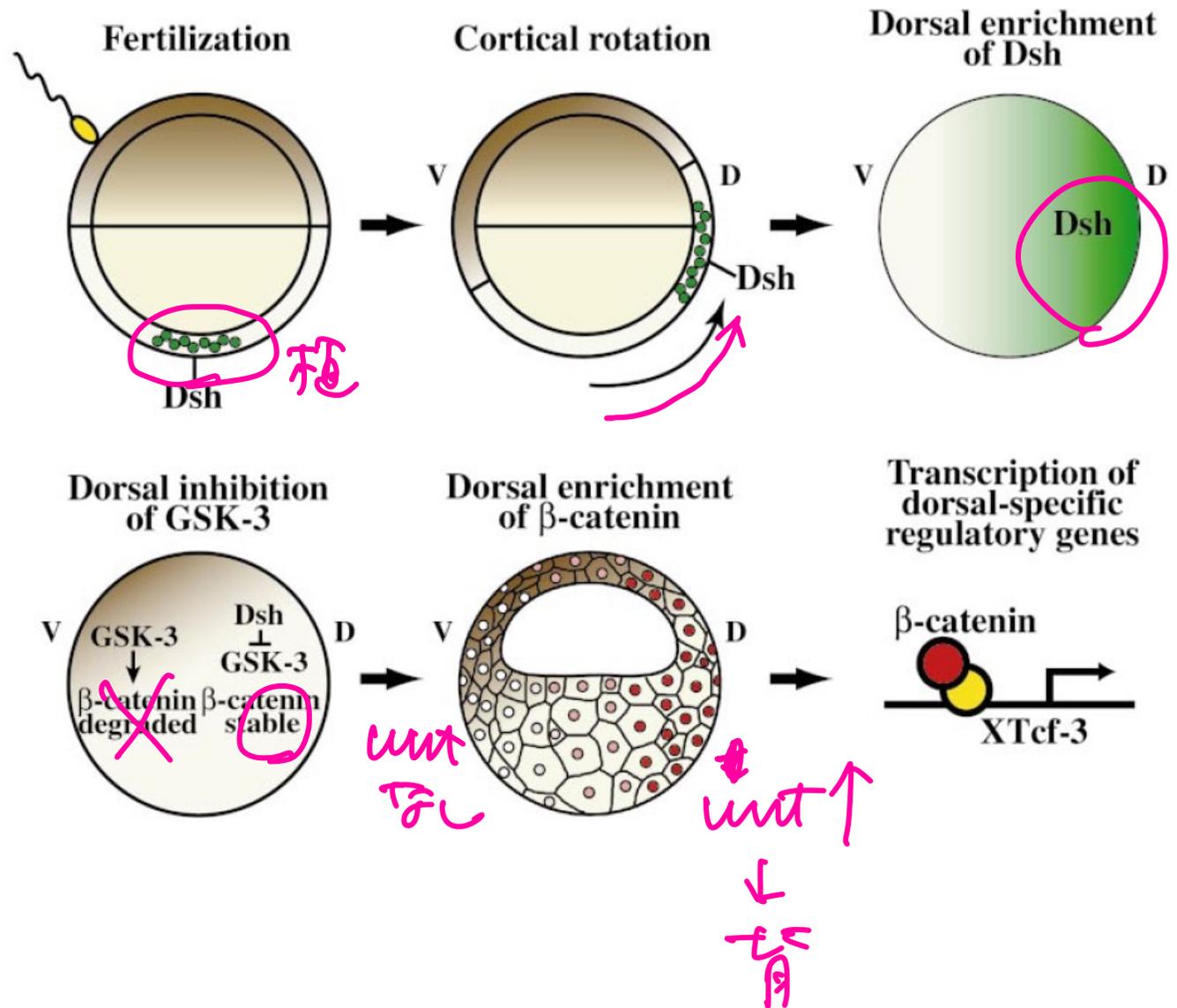
XenopusではDshタンパク質が背側化因子である。

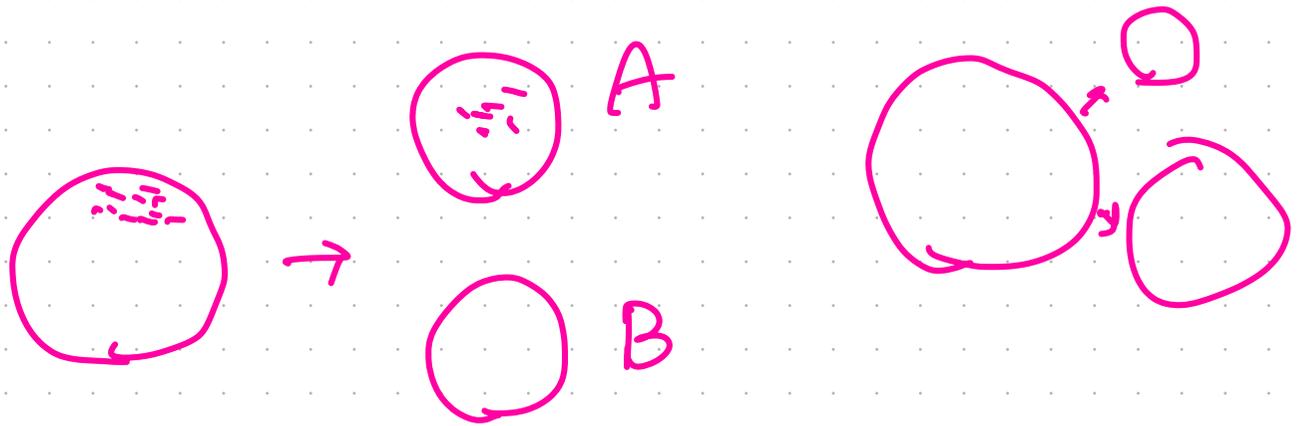
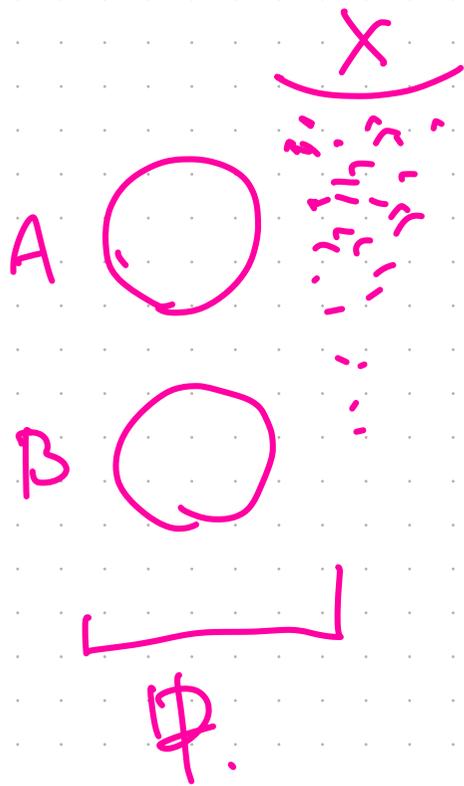
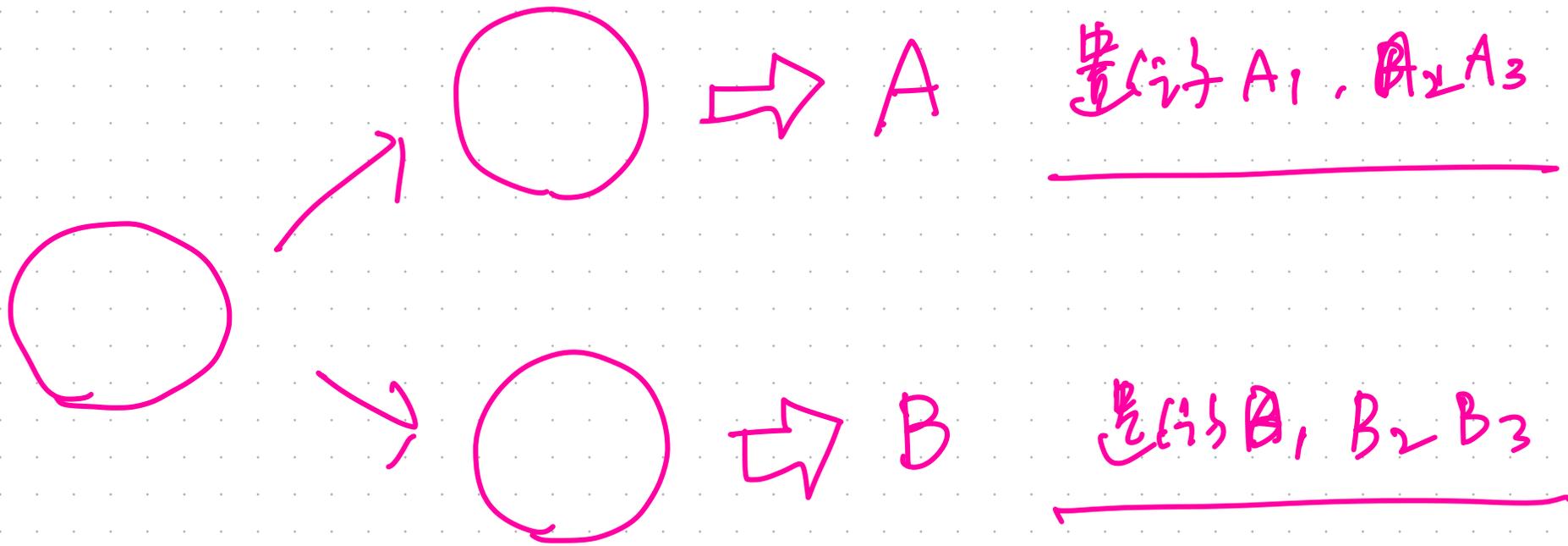
未受精卵，初期受精卵では植物局に存在する。

表層回転時に伸長した微小管に運ばれ，将来の背側に移動する。

その結果，背側で多い。

GSK-3 β の活性を阻害し，wntシグナルを活性化する。





① } 由于 Φ 的
 Drosophila 的 Φ