

Establishment of the Dorsal–Ventral Axis in *Xenopus* Embryos Coincides with the Dorsal  
Enrichment of Dishevelled That Is Dependent on Cortical Rotation

Jeffrey R. Miller, Brian A. Rowning, Carolyn A. Larabell, Julia A. Yang-Snyder, Rebecca L. Bates,  
and Randall T. Moon

Journal of Cell Biology 146 (2): 427–437 (1999)

**Abstract.** Examination of the subcellular localization of Dishevelled (Dsh) in fertilized *Xenopus* eggs revealed that Dsh is associated with vesicle-like organelles that are enriched on the prospective dorsal side of the embryo after cortical rotation. Dorsal enrichment of Dsh is blocked by UV irradiation of the vegetal pole, a treatment that inhibits development of dorsal cell fates, linking accumulation of Dsh and specification of dorsal cell fates. Investigation of the dynamics of Dsh localization using Dsh tagged with green fluorescent protein (Dsh-GFP) demonstrated that DshGFP associates with small vesicle-like organelles that are directionally transported along the parallel array of microtubules towards the prospective dorsal side of the embryo during cortical rotation. Perturbing the assembly of the microtubule array with D<sub>2</sub>O, a treatment that promotes the random assembly of the array and the dorsalization of embryos, randomizes translocation of Dsh-GFP. Conversely, UV irradiation of the vegetal pole abolishes movement of Dsh-GFP. Finally, we demonstrate that overexpression of Dsh can stabilize b-catenin in *Xenopus*. These data suggest that the directional translocation of Dsh along microtubules during cortical rotation and its subsequent enrichment on the prospective dorsal side of the embryo play a role in locally activating a maternal Wnt pathway responsible for establishing dorsal cell fates in *Xenopus*.

**Key words:** Dishevelled • green fluorescent protein • b-catenin • *Xenopus* • microtubules

(<https://rupress.org/jcb/article-pdf/146/2/427/1854866/9901105.pdf>)

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

**【要旨】**

*Xenopus* 受精卵における Dishevelled (Dsh) の細胞内局在を調べたところ、Dsh は表層回転後に胚の背側で増加する小胞様小器官に局在していることが明らかになった。Dsh の背側での濃縮は、背側細胞の発生運命の発現を阻害する処理である植物極への紫外線照射によって阻害され、Dsh の濃縮と背側細胞の発生運命の決定が関連づけられた。緑色蛍光タンパク質で標識された Dsh (Dsh-GFP) を用いて Dsh 局在性の動態を調べたところ、Dsh-GFP は小胞様小器官と会合し、表層回転時に微小管の平行配列に沿って胚の予定背側に向かう方向に輸送されることが示された。配列のランダムな集合と胚の背側化を促進する処置として、D<sub>2</sub>O で微小管配列の集合を乱すと、

Dsh-GFP の移動がランダムになる。逆に、植物極に紫外線を照射すると、Dsh-GFP は移動しなくなる。そしてまた、我々は Dsh の過剰発現がアフリカツメガエルで  $\beta$ -カテニンを安定化させることを明らかにした。これらのデータは、Dsh の表層回転中の微小管に沿った方向性をもった移動と、それに続く胚の予定背側での濃縮が、アフリカツメガエルの背側細胞運命の決定を制御する母性 Wnt 経路を局所的に活性化する役割を担っていることを示唆している。

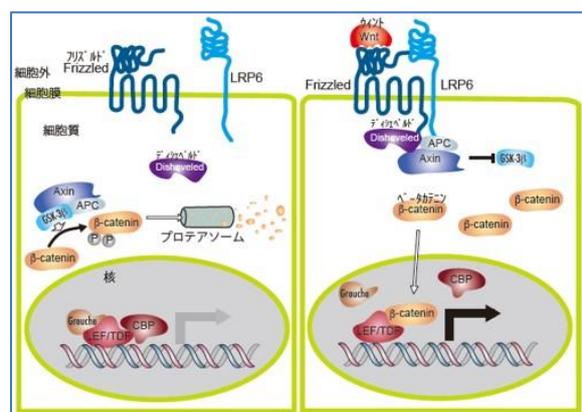
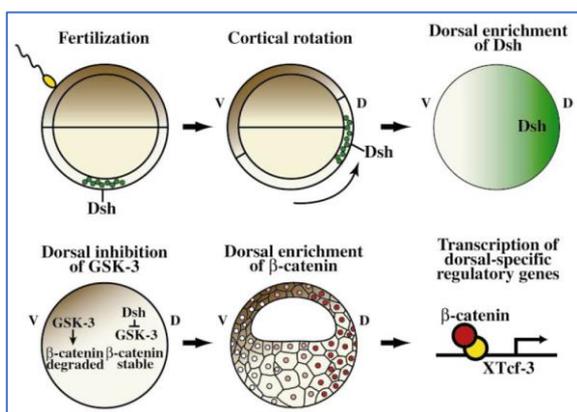
Key words: Dishevelled · green fluorescent protein ·  $\beta$ -catenin · *Xenopus* · microtubules

(訳 中道貞子)

【当日のスライドにてでくる用語解説】

(作成 中道貞子/赤字コメントは福田先生)

あまり、細かいことは必要だとは思いませんが、wnt シグナル中の役割は理解していただけると幸いです。



(上図は、福田先生資料より)

### \* Dishevelled ディシェベルド

(ウィキペディアより) <https://ja.wikipedia.org/wiki/Dishevelled>

Dishevelled (Dsh、哺乳類では Dvl) は、古典的・非古典的 [Wnt シグナル伝達経路](#) に関与する [タンパク質ファミリー](#) である。Dsh は [細胞質](#) に位置するリン酸化タンパク質であり、[Frizzled](#) 受容体の直接下流で機能する<sup>[1]</sup>。Dishevelled (髪が乱れた、もじゃもじゃした) という名称はハエでの発見時に由来するものであり、*dishevelled* 遺伝子の変異によって体や翅の毛が不適切な方向に生えることが観察される<sup>[2]</sup>。ゼブラフィッシュ、ツメガエル (*Xdsh*)、マウス (*Dvl1*, -2, -3)、ヒト (*DVL1*, -2, -3) など [脊椎動物](#) にもホモログが存在する。Dsh は正常条件下でも異常な条件下においても、組織や細胞内で複雑な Wnt シグナルを伝達する<sup>[2][3]</sup>。Wnt シグナル伝達経路の調節時には、[SPATS1 \(英語版\)](#) と相互作用すると考えられている<sup>[4]</sup>。

Dishevelled は胚と成体の双方において、[細胞分化](#) や [細胞極性](#) (細胞極性は基本的に非古典的 wnt シグナルによって制御されています。翅の毛の生え方もそうです。) から社会的行動 (社会的行動は知りません) までさまざまな重要な役割を果たす。

(註：ホモログ ある遺伝子や形態が共通の祖先に由来すること)

**\* Wnt ウィント** (ギルバート発生生物学 第10版 Scott F. Gilbert 監訳:阿形清和・高橋淑子  
メディカル・サイエンス・インターナショナル 2015年発行 より)

システインを多く含む糖タンパク質の傍分泌因子遺伝子ファミリー。この名前は、ショウジョウバエのセグメントポーラリティー遺伝子 *wingless* と、脊椎動物の相同遺伝子である *integrated* を統合して名付けられた。Wnt タンパク質は、昆虫や脊椎動物の四肢の極性の確立、幹細胞の増殖の促進、泌尿器生殖系の様々な発生段階に関与する。

(註:傍分泌 細胞が生産する生理活性物質が血流にのることなくその  
周辺の細胞に作用する方式の信号伝達)

補足: Wnt 経路 Wnt pathway (同上 ギルバート発生生物学より)

Wnt タンパク質が細胞膜状の Frizzled 受容体に結合することで始まるシグナル伝達カスケード。この結合により様々な異なる経路(“標準(canonical)”と“非標準(noncanonical)”経路)が活性化され、核内で Wnt 応答性の遺伝子の発現が活性化される。

**\*  $\beta$ -Catenin ベータ-カテニン** (同上 ギルバート発生生物学より)

カドヘリンの細胞内ドメインに結合して錨として働くか、Wnt に誘導される転写因子として働くタンパク質。どの動物門においても三胚葉の分化に重要である。

**\* GSK-3 $\beta$  グリコーゲン合成酵素キナーゼ**

(脳科学辞典より) <https://bsd.neuroinf.jp/wiki/GSK-3%CE%B2>

グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 (GSK) は、プロリン指向性セリン/スレオニンリン酸化酵素のひとつであり、最初にグリコーゲン合成酵素をリン酸化して不活化する酵素として見出された。そのうち GSK-3 $\beta$  は、Wnt, Shh (ソニック・ヘッジホッグ) などのシグナル伝達の制御に関与しており、胚発生における体軸形成や神経系の分化に重要な役割を果たしている<sup>[4]</sup>。

**\* Frizzled フリズルド**

(ウィキペディアより) <https://ja.wikipedia.org/wiki/Frizzled>

Frizzled (Fz) は非典型的 G タンパク質共役受容体 のファミリーであり、Wnt シグナル経路 や他のシグナル伝達経路の受容体として機能する<sup>[4]</sup>。Frizzled が活性化された際には、細胞質基質 に位置する Dishevelled が活性化される。

**\* プロテアソーム** (理化学研究所 研究成果(プレスリリースより)

[https://www.riken.jp/press/2014/20140306\\_3/index.html](https://www.riken.jp/press/2014/20140306_3/index.html)

**プロテアソーム**: 細胞質や核内の不要なタンパク質を分解する約 2.5MDa (直径 20nm、長さ 45nm の棒状分子) の巨大な酵素複合体。ポリユビキチン鎖により標識されたタンパク質を選択的に分解することで様々な生命現象を制御する。

**ユビキチン化**: タンパク質の翻訳後修飾に使われる小さいタンパク質を「ユビキチン」という。タンパク質分解、DNA 修復、転写調節、シグナル伝達など広範な生命現象に関わる。

「ユビキチンによるタンパク質の翻訳後修飾（ユビキチン化）」は、2004年のノーベル化学賞の受賞対象となった。複数のユビキチンが連結したユビキチン化（ポリユビキチン化）は、プロテアソームの分解シグナルとなる。

**\*共焦点顕微鏡** （福田公子先生作成資料）

原理を説明しているサイトを紹介します。

<https://www.olympus-lifescience.com/ja/support/learn/06/023/>

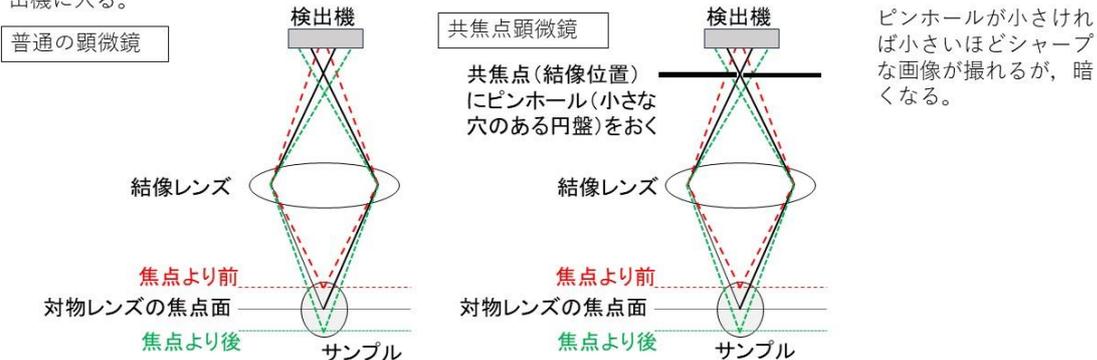
<https://www.hamamatsu.com/jp/ja/product/life-science-and-medical-systems/mems-confocal-unit/principle-of-confocal.html>

それでも知っている人にしかわからないので、ファイルを作ってみました。

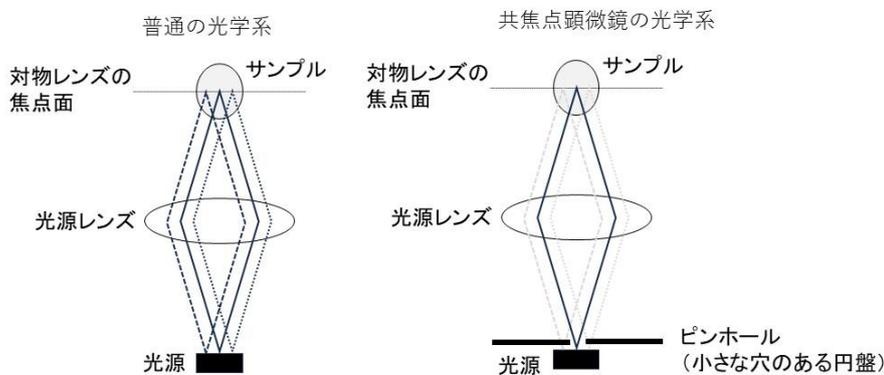
共焦点顕微鏡では、対物レンズの焦点面（ピントの合った面）の像だけの情報が得られる顕微鏡である。これによって、従来の顕微鏡では見ることができなかった、解像度の高い情報を得ることができ、細胞内の構造などの詳細が明らかになりました。

共焦点顕微鏡のキモ：どうやってボケ像を除去するか。

サンプルには厚みがあるので、対物レンズの焦点面以外に当たった光（ボケ像）が検出機に入る。



この共焦点系が働くためには、サンプルに当たる光が点である必要がある。そのためには、光源側にも共焦点光学系を作る必要がある。ピンホールを使えば点光源を作ることが可能であるが、従来のランプでは光が弱く、実用化できなかった。レーザー光源（非常に小さく点光源に近い上、強い）が使用可能になって初めて、共焦点顕微鏡も市場にでることになった。

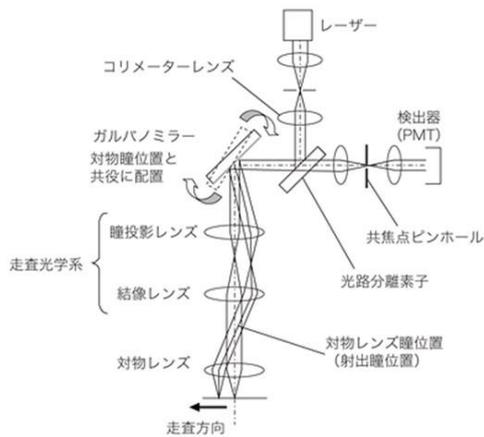


ランプは点光源ではないので、サンプルの焦点面にもさまざまな光（面）が当たる。

ピンホールでほぼ点にできる。

共焦点顕微鏡は本来1点しか見えません。

ですので、2次元の画像が欲しければ、サンプルをXY面で動かすか、光を走査して当てる必要があります。3次元の情報が必要な場合には、対物レンズを動かす必要がある。



最終的な共焦点顕微鏡は左の図のようになっています。ガルバノミラーを動かすことで、レーザー光源からの光をサンプルに対して走査することができます。瞳投影レンズはガルバノミラーが動いても、ちゃんと検出機に光が入るようにするためにあります。

レーザー光源 (励起光) →ピンホール→光路分離素子 (ダイクロックミラー: ある波長の光は反射し, その他は素通りさせる。ここでは, レーザー光源からきた波長の光を全反射) →ガルバノミラー (全反射) →走査光学系→対物レンズ→サンプル→ (ここで光の波長が変わる。蛍光) →対物レンズ→走査光学系→ガルバノミラー (全反射) →光路分離素子 (蛍光なので素通り) →共焦点ピンホール→検出機

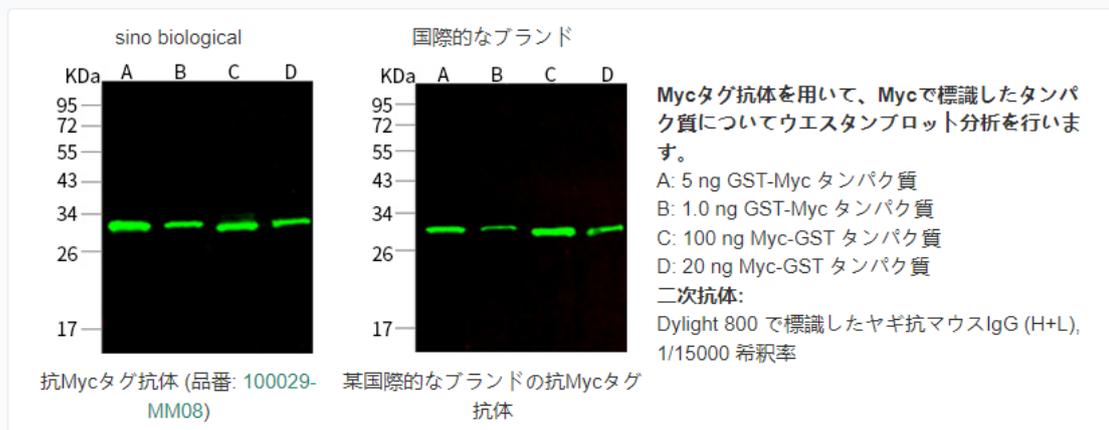
### \*Myc tag 抗体 (株式会社日本シノバイオロジカルより)

<https://jp.sinobiological.com/category/myc-tag-antibodies>

Myc タグ (アミノ酸配列: EQKLISEEDL) は、c-myc 遺伝子に由来するエピトープ (抗原タンパク質の内、抗体が結合する部位) タグで、10 個のアミノ酸を含み、分子量は 1.2 KDa です。組換え DNA 技術を用いて、Myc タグを目的のタンパク質の N 末端または C 末端に融合させることができ、それに続く目的のタンパク質の精製および検出を容易にします。抗 Myc タグ抗体は、標的タンパク質上の Myc タグと相互作用し、Myc タグ付き標的タンパク質を特異的に認識することができます。これにより、まだ特異的抗体がない標的タンパク質を首尾よく検出することができます。

### Myc tag 抗体の特徴

#### I C末端やN末端のMycタグを認識し、高感度



\*ウェスタンブロットとは？ (MOLECULAR DEVICES ウェブサイトより)

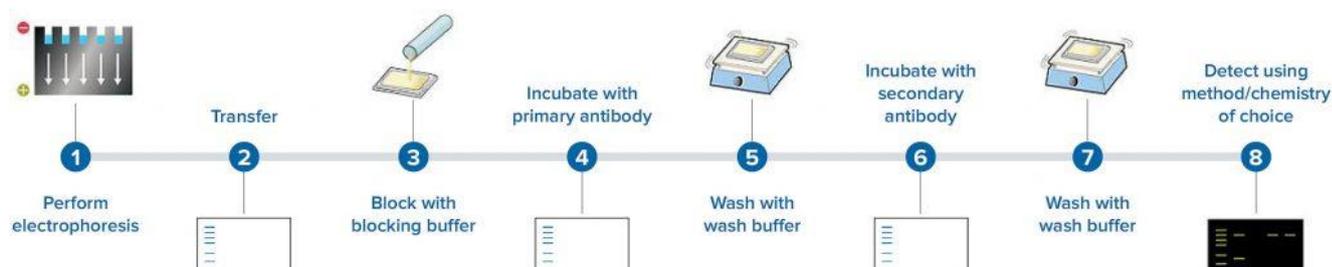
<https://www.moleculardevices.co.jp/applications/western-blot>

ウェスタンブロットは、タンパク質の検出と定量に使われる一般的な方法です。細胞溶解物などの複雑なタンパク質の混合物から、対象とする特定のタンパク質を分離して同定できます。ウェスタンブロットは、診断、バイオテクノロジー、分子生物学、プロテオミクスなどに適用されており、細胞のタンパク質発現レベルならびに大きさや他の性質の変化の評価において、幅広い信頼を得ています。

福田先生注：ウェスタンブロットは、標的とするタンパク質の抗体（一次抗体）がすでに存在する場合に使います。下の方法にもありますが、膜上にブロット（シミという意味です）させたたくさんのタンパク質に対して、抗原抗体反応を使って、目的のタンパク質のみを検出します。上のタグ付きタンパク質の検出にはタグに対する抗体で可能です。

ウェスタンブロット法：使用する二次抗体によって、考慮すべきウェスタンブロット法がいくつかあります。標的タンパク質の検出は、比色分析、化学発光、または蛍光により行われます。これらの方法について以下に記載します。それぞれの方法には検出用に異なる機器が必要です。例えば、化学発光は x 線フィルムまたはデジタルイメージング機器で検出でき、蛍光二次抗体には蛍光イメージャーが必要です。各タイプの検出法には利点と欠点があり、方法選択の際に考慮する必要があります。

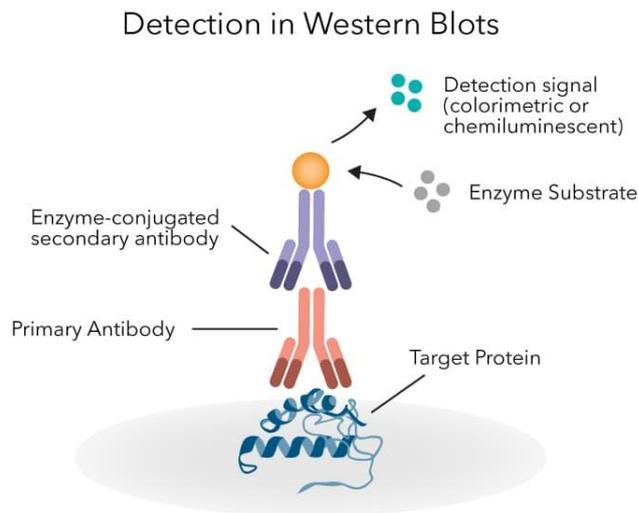
ウェスタンブロットのアッセイワークフロー：通常のウェスタンブロットアッセイに使われるステップは以下の通りです。



1. **電気泳動** - まず、ゲル電気泳動で、タンパク質を大きさによって分離します。
2. **転写** - タンパク質を、ブロッティングメンブレン（通常はニトロセルロース製または PVDF 製）に転写します。これを、対象のタンパク質に特異的な一次抗体を用いて精査します。
3. **ブロッキングバッファーでブロッキング** - 一次抗体（次の段階）が膜そのものに結合しないようにします。
4. **一次抗体と共にインキュベート** - 一次抗体を標的タンパク質に結合させます。
5. **ウォッシュバッファーで洗浄** - 結合していない一次抗体を洗い流します。
6. **二次抗体と共にインキュベート** - 一次抗体を認識して結合する二次抗体を加えます。この二次抗体は酵素または他の物質とコンジュゲートされており、ブロット上にバンドとして現れる対象タンパク質を検出できます。

7. ウォッシュバッファーで洗淨 - 結合していない二次抗体を洗い流します。
8. 選択した方法／化学的作用を用いて検出 - 標的タンパク質は、用いた二次抗体に応じて、比色分析、蛍光、または発光法で検出できます。

<参考図> <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/western-blot-qc-protocol>



【余談】 サザンブロッティングとノーザンブロッティング

<https://www.wdb.com/kenq/dictionary/southern-blotting>

### \*サザンブロッティング

サザンブロッティング (Southern blotting) とは、放射性同位体や酵素等で標識した短い DNA 配列をプローブ (探針) として、プローブと相補的な塩基配列を持つ DNA 断片を特異的に検出する手法です。

#### 目的と原理：

分子生物学的な実験を行う際、目的の塩基配列を増幅させたり、制限酵素によって切断しプラスミドに導入して発現させる等、様々な方法で DNA を扱います。その際、ある特定の DNA 配列に関して、サンプル中に存在しているのか、長い配列の中のどこに位置しているのか、配列が壊れているのか、維持されているのか等を把握しなくてはなりません。そのために、目的の塩基配列のみを特異的に検出する「サザンブロッティング」を行います。

具体的には、まず何らかの制限酵素で処理した DNA 断片をアガロースゲル (アクリルアミドの場合もある) で電気泳動した後に、ニトロセルロースやナイロンの膜 (メンブレン) へ、拡散もしくは吸引によって転写 (ブロット) します。転写後の膜に、検出したい DNA 配列と相補的な塩基配列をもつプローブ配列を結合 (ハイブリダイズ) させ、目的の DNA 配列のみを検出します。使用するプローブは通常、放射性同位体標識もしくは発色酵素標識されており、それぞれの標識に応じた検出方法があります。

## 由来と派生：

サザンブロッティング法は、開発者の エドウィン・サザン (Edwin M. Southern) の名にちなんで名づけられました。サザンブロッティングの開発後、目的の RNA のみを検出する方法、目的のタンパク質のみを検出する方法が開発されましたが、それらの実験手法は、サザン (南) ブロッティングから派生して、[ノーザン \(北\) ブロッティング](#)、[ウェスタン \(西\) ブロッティング](#)と名づけられ、汎用されています。

<https://www.wdb.com/kenq/dictionary/northern-blotting>

## \*ノーザンブロッティング

ノーザンブロッティング (Northern blotting) とは、特定の配列をもつ RNA 断片を検出する実験手法です。DNA 断片を検出する[サザンブロッティング](#) (開発者サザンの名前が由来) と同様の原理で検出する手法であるため、サザン (南) にちなんでノーザン (北) と名づけられました。

## 目的と原理：

研究対象である遺伝子の発現パターンや機能を調べる際、DNA から mRNA への転写段階での挙動を調べなくてはなりません。[サザンブロッティング](#)が、設計図である DNA の検出法であるのに対し、ノーザンブロッティングによる RNA の検出は、その遺伝子が実際に機能を発現するときの足跡を調べることとなります。生物が種によって、また発育段階によって多様な表現型を示すのは、DNA レベルの差異よりも mRNA への転写レベル、タンパク質への翻訳レベルで多様な制御を行っているためだと考えられており、その点で RNA の挙動分析は極めて重要であると言えます。

一般的には、細胞から核酸 (DNA+RNA) を抽出した後、サンプル中の RNA が分解しないよう、RNase を含まない DNase を用いて DNA のみを消化し、アガロース電気泳動等によって展開します。このゲルを拡散もしくは吸引によってメンブレン (膜) に転写 (ブロット) し、検出したい RNA 配列に相補的な配列を持つプローブ核酸を結合 (ハイブリダイズ) させることで標的 RNA の量、サイズを検出します。標識は放射性同位体 ([RI](#)) を用いた方法が一般的でしたが、最近ではジゴキシゲニン (DIG) 等の化学物質をプローブ核酸に結合させ、それに対する抗体を用いた非 RI 法が汎用されるようになってきました。

## 参加申込フォームに寄せられたコメント

- \* 高校生物において、発生分野の大項目が「生殖と発生」から「遺伝情報の発現と発生」に移ったことで、発生単独の大項目がなくなってしまった印象です。一方で、発生分野は過去の研究史を追うことで、研究における考え方や考察力を高めるよい教材とも思います。高校生物において、発生分野は今後どのような立ち位置が望ましいでしょうか。また、学会等から次期学習指導要領に対して、何かアクションはあるのでしょうか。
- \* 大学入試において、知識量より考察力に重点が置かれつつありますが、研究の現場では、考察するためにも知識が必要になる場面があると思います。今回の発生の分野においては、入試で測る知識量としてどんな内容が必要だと思われますか。例えばギャップ、ペアルール、セグメントポラリティ遺伝子の名前と順序など。やたら固有名詞がでてくるので困惑します。
- \* この単元について、いつも何をどの程度扱えば良いのかに悩んでいます。特に、遺伝子の部分が出てきてからはとても細かくて授業で扱う内容の勘所が難しいと感じています。また、HOX遺伝子も進化と関連がありますが、自身が深く理解できていないこともあり、面白みを伝えられません。この分野が進展してきた歴史的な背景を勉強したいなと思いつつ、中々手が出せていません。
- \* 大学受験の勉強に意識が傾いている高校生にとって、発生の分野はいまだに語句の暗記ばかりに目を奪われる傾向にあります。この流れを何とか変えていきたいと思う日々であります。
- \* 「学習のあり方」がどう変わるか、という学習者主語の問題提起が魅力的です。どう教えるか、ではないのが大切だと思います。参加される現場の先生方の声についても興味をもっています。
- \* 初歩的なところも含めて解説していただけるとありがたいです。