

# アフリカツメガエル初期胚へのガラス板刺入による 対称な体節形成の阻害

野坂 裕子<sup>1)</sup>・岩坂 菜奈<sup>1)</sup>・景浦 宏<sup>1)</sup>・古賀 正明<sup>1)</sup> \*

(令和3年11月30日受理)

## Disturbance of the symmetrical somite formation by the glass plate insertion in early embryos of *Xenopus laevis*

Yuko NOSAKA, Nana IWASAKA, Hiroshi KAGEURA and Masaaki KOGA\*

(Received November 30, 2021)

### Abstract

To investigate the mechanism of the symmetric somite formation in *Xenopus*, we asymmetrically interrupted the somite formation by inserting a glass plate into the presumptive right somite along the meridian 90° away from the organizer at the late blastula or early gastrula stage. Among the tailbud larvae developed, the larva type which has the most prominent external deformation trait was the larva having multiple tail-like structures, which was an incidence with some percentage only in the blastula stage insertion. The analysis of the inner tissues of this larva type by serial sectioning revealed that most of the larvae have only one pair of somites, and the tail-like structures which do not have the somites but possess only the massive or scattered mesodermal cells at their base. Asymmetric features of the somites were observed at some percentages in this larva type; asymmetry of both the somite unit positions was observed in the area anterior to the notochord end, while in the area posterior to the notochord end, somite unit number was larger on the contra-insertion (left) side than the insertion (right) side. In all the larvae with multiple tail-like structures, conglutination of both somites or/and filling of some tissues between both somites at the dorsal or/and ventral position of the notochord was observed, but none of them was seen in the control larvae. These results indicate that the glass plate insertion induces the tissue connections between the somites and suggests that this induction relates to the disorder of the symmetrical somite formation. The results of this study also suggest a possibility that this experimental system is useful for analysis of the regulation mechanism of the symmetry.

**Keywords:** somite, symmetry, *Xenopus*, glass plate

### 1. はじめに

脊椎動物の骨格筋、脊椎骨や肋骨などを生む体節は、予定体節から左右対称な繰り返し構造として前後方向に順次形成される。一方、頭索動物の体節は、第5体節以降は非対称に形成される [1, 2]。脊椎動物、頭索動物のいずれの脊索動物亜門においても左右の非対称性を支配することが知られている *Nodal* 遺伝子の発現を頭索動物において阻害すると、左右の体節が対称に形成される [3, 4]。このことから、脊椎動物の体節が対称に生じるのは左右決定機構が体節形成におよぼす偏性に抗して体節形成が対称に進行することを保証する機構を持つためと考えられるが、この機構の多く

は不明である。

本研究では、体節の予定運命情報が蓄積しているアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 胚を用い、発生初期に外科的処理を施すことにより対称な体節形成を乱すことを試みた。アフリカツメガエル胚の予定体節は、原腸胚の帯域の側方から腹側領域にかけて左右対称に分布し、オーガナイザー側が将来の頭部-脊索近傍側、反オーガナイザー側が将来の胴尾部-背腹側に対応する [5-7]。このため、オーガナイザーから 90° 離れた右側方に位置する経線は、予定右体節を非常に大まかに頭部側と尾部側に分ける。この右側方の経線に沿ってガラス板を胞胚後期から原腸胚初期の特定時期に刺入し、右側予定体節の予定前方と予定後方の相

1) 福岡大学理学部地球圏科学科 〒814-0180 福岡県福岡市城南区七隈 8-19-1

Department of Earth System Science, Faculty of Science, Fukuoka University, Nanakuma, Johnan-ku, Fukuoka, 814-0180, Japan.

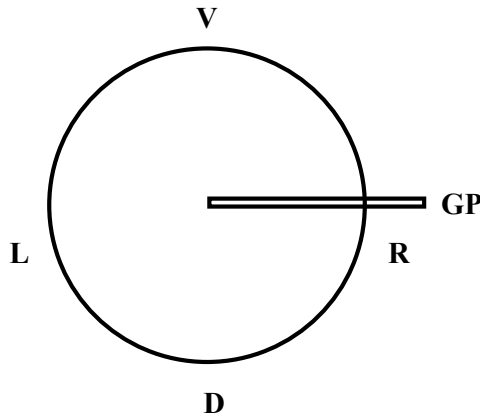
\*Corresponding author: M. Koga (e-mail: kogamasa@fukuoka-u.ac.jp)

相互作用を物理的に阻害した (Fig. 1).

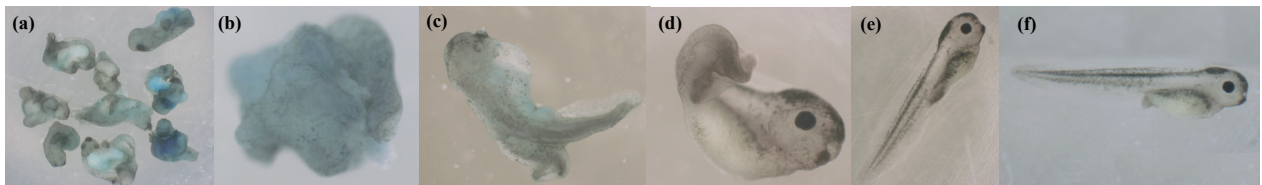
この刺入胚から発生した尾芽胚の背側中胚葉の形態は刺入時期によって大きな違いがみられ、尾状の突起または尾を三つ以上持つ胚 (以下、多尾胚と呼ぶ) は胞胚期に刺入した場合のみ生じた。これらの胚について生じた体節とその近傍に位置する背側中胚葉組織について連続切片観察によりそのパターンを解析したところ、体節に非対称性がみられ、左右体節間の組織のパターンは正常胚におけるものとは異なっていた。これらのことは、左右の予定体節間の相互作用が体節形成の対称性の調節に関与する可能性があることおよび本実験系が対称性の調節機構を解析する実験系の一つとして有用であることを示唆する。

## 2. 材料および方法

アフリカツメガエル胚の採取、脱ゼリー法、使用した培養液、寒天培地は、以前の方法 [8] によった。St. 8-9 胚へのガラス板刺入時の胚の方向性を知るため、ナイルレッドによる局所染色を実施した。色素と卵割が規則的な 8 細胞期胚を選抜し、10% フィコールを含む 100% PBS と 100% Modified amphibian Ringer (MR) [9] の等量混液で満たした寒天培地の穴に入れた。ナイルレッドの結晶を背側割球と腹側割球の境界部に置



**Fig. 1.** Graphical representation of the insertion of a glass plate into an embryo. Animal pole view. The glass plate is inserted into the right side of the embryo along the meridian 90° away from the organizer at the blastula or gastrula stage. GP, glass plate; L, left; R, right; D, dorsal; V, ventral.



**Fig. 2.** The tailbud larvae developed from the embryos inserted with a glass plate. (a) The tailbud larvae developed from the embryos inserted with the glass plate at St. 8-9. (b) A larva having multiple tail or tail-like structures and without eye. (c) A larva having multiple tail or tail-like structures and eyes. (d) A larva having two of tail or tail-like structures. (e) A larva having single tail. (f) A control larva without the insertion.

き、2-5 分間静置した後、60% MR で培養した (これにより、結晶は溶解、消失する)。ガラス板刺入に際し、胚からピテリン膜をピンセットにより除去したのち、その胚を寒天培地の穴に置いた。St. 8-9, 10-10.25, 11 [10] の時期に、オーガナイザーから 90° 右方向に離れた側方に動植物軸に沿ってガラス板 (日本電気硝子, G-Leaf, 厚さ 0.05mm) をピンセットで断割した小片を刺入し、右半分の背側部分 (予定体節の大まかな頭部側を含む) と腹側部分 (予定体節の大まかな尾部側を含む) の相互作用を物理的に阻害した (Fig. 1)。胚は 14°C で培養して傷の修復を促し、修復後なるべく早期に培養液を徐々に 5% MR におき換えて陥入を促し、St. 40 (尾芽胚) まで発生させた。

胚は固定したのちパラフィン包埋し、6-10 μm の厚さで水平連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施して写真撮影した。

## 3. 結果

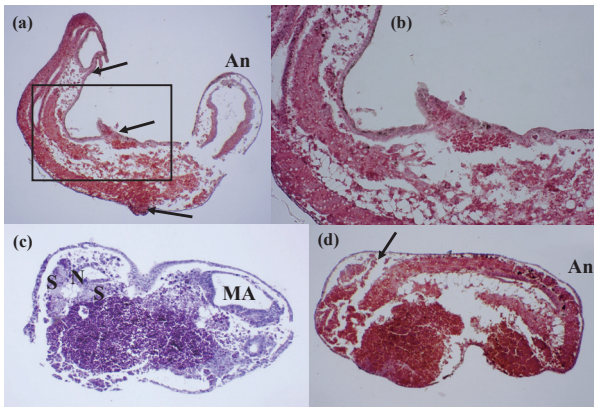
### 3.1 多尾胚の出現は胞胚期の刺入においてのみ見られる

ガラス板の刺入が背側中胚葉形成異常におよぼす影響を調査するため、胞胚後期から原腸胚初期にかけてガラス板を刺入して発生させた。得られた尾芽胚は、尾状突起の数および頭部形成程度 (眼胞の有無) によって分類した (Table 1, Fig. 2)。三つ以上の尾状突起または尾を持つ多尾胚は胞胚後期 (St. 8-9) での刺入においてのみ、40% の率で出現した (Fig. 2a, b, c)。これに対し、二つ (Fig. 2d) または一つ (Fig. 2e) の尾状突起または尾を持つ胚 (二尾胚, 単尾胚) は、胞胚後期 (St. 8-9) から原腸胚初期 (St. 11) にかけて刺入したいずれの場合にも得られた。二尾胚は胞胚後期刺入では 56% と高率であったが、原腸胚期の刺入ではその率は低かった (St. 10-10.25 刺入; 8%, St. 11 刺入; 25%)。逆に単尾胚は、胞胚後期刺入では低率 (14%) であったのに対し、原腸胚期の刺入では高かった (St. 10-10.25 刺入; 92%, St. 11 刺入; 75%)。眼胞がない胚は、胞胚後期刺入で生じた多尾胚についてのみ見られた。

そこで、大きく体節形成を乱したと期待される多尾

Table 1. Stage of the glass plate insertion and morphological classification of the developed tailbud larvae

Morphological classification of the larvae	St. 8-9 insertion		St. 10-10.25 insertion		St. 11 insertion	
	Number of larvae	Percent	Number of larvae	Percent	Number of larvae	Percent
Multiple tail or tail-like structures, and no eye	5	10	0	0	0	0
Multiple tail or tail-like structures, and eyes	15	30	0	0	0	0
Two of tail or tail-like structures, and no eye	0	0	0	0	0	0
Two of tail or tail-like structures, and eyes	28	56	2	8	2	25
Single tail, and no eye	0	0	0	0	0	0
Single tail, and eyes	7	14	23	92	6	75
Total	50		25		8	



**Fig. 3.** Dorsal axial structure in the larva having multiple tail or tail-like structures. (a) The larva has the main axis consisting of the notochord and the somites, and three tail-like structures (arrows). At the base of the two structures in the anterior (An) side, the mesdem is observed. (b) A magnified image corresponds to the rectangle in (a). (c) The notochord (N) and the somites (S) are observed outside the main axis (MA). (d) The somite outside the main axis connects to the somite of the main axis at the site indicated with the arrow.

胚 13 個体について、連続水平切片を作成して内部構造を解析した。解析したもののうち、8 個体では脊索と左右の体節からなる背軸構造（以後、主軸と呼ぶ）が 1 組のみ存在し (Fig. 3a, b), ほかに 5 個体では主軸以外に主軸よりも小さく不完全な軸性構造が見られた (Fig. 3c, d). このため、主軸について以下に詳述し、主軸以外の尾状突起の構造についてはその後に記述する。

### 3.2 体節の非対称性

ガラス板刺入による体節形成の対称性の攪乱効果が、二つの領域についてそれぞれ異質の特徴として観察された (Table 2, Fig. 4). 特徴のひとつは、脊索末端部よりも前方の領域において、体節の位置が非対称となること (Fig. 4a, b, 矢印) である。これは、眼胞の有無にかかわらず、半数程度の胚で見られた (Table 2; 赤, 紫色個体). 特徴のもう一つは、脊索末端より



**Fig. 4.** Asymmetry of the somites in the larvae having multiple tail or tail-like structures. (a) Asymmetry of the somite unit position is observed in the area anterior to the notochord end (arrow). Somite boundaries are indicated with solid lines. (b) In the area posterior to the notochord end, somite unit number was larger on the contra-insertion (left, L) side than the insertion (right, R) side (bracket), and also the same asymmetry as (a) is seen. (c) A non-insertion control larva.

**Table 2.** Symmetry of the somites and tissue connections between both somites in the glass plate inserted embryos

Morphological classification and individuals of the larvae <sup>1)</sup>	Symmetry of the somites		Tissue connections between both somites				Unconfirmed individuals
	The area anterior to the notochord end		The area posterior to the notochord end		Confirmed individuals		
	Individuals whose asymmetry cannot be confirmed <sup>2)</sup>	Individuals having asymmetry <sup>3)</sup>	Individuals whose asymmetry cannot be confirmed <sup>4)</sup>	Individuals having asymmetry <sup>3)</sup>	The area anterior to the notochord	The area at the notochord end	
Multiple tail or tail-like structures, and no eye, a-d	a, d	b, c	a, b, c, d		Dorsal and ventral area of the notochord	Dorsal and ventral area of the notochord	Ventral area of the notochord
Multiple tail or tail-like structures, and eyes, 1-9	1, 2, 3, 4, 6	5, 7, 8, 9	1, 9	2, 3, 4, 5, 8	Dorsal area of the notochord	Dorsal area of the notochord	1, 8, 9
Non-insertion control		5 individuals			Dorsal area of the notochord	Dorsal area of the notochord	5 individuals

<sup>1)</sup> Alphabets and numbers indicate individuals. <sup>2)</sup> Asymmetry of the somite position (red). <sup>3)</sup> Somite unit number is larger on the contra-insertion (left) side than the insertion (right) side (blue). Individuals that fit both criteria <sup>2)</sup> and <sup>3)</sup> are purple. <sup>4)</sup> Symmetry of the somites or poor histology (see text).

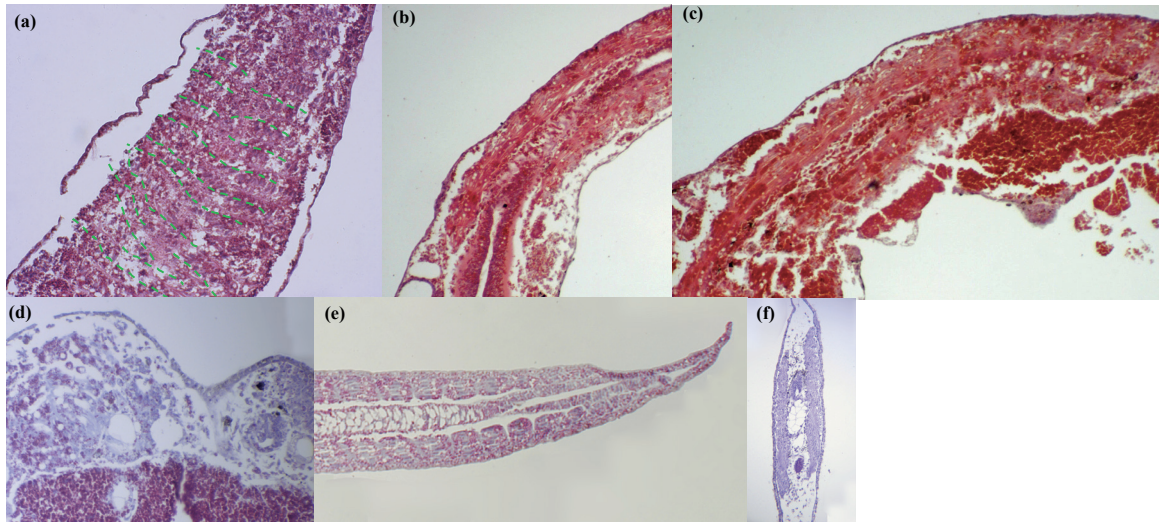
後方において、反刺入（左）側の体節数の方が刺入（右）側の体節数よりも多かった（Fig. 4a, b, 括弧）ことである。後者の非対称性は、眼胞あり胚の約半数（9個体中5個体（5/9））、眼胞がありかつ脊索末端部よりも前方で非対称性が見られた胚（Fig. 4b）についても約半数（3/5；Table 2の個体2, 3, 4）で観察された。しかし眼胞なし胚については、4個体のいずれについても非対称性の判定ができなかった（Table 2の個体a, b, c, d）。これは、脊索末端付近の尾部に顕著な折れ曲がりが生じたため、同一の水平切片断面に両体節が共には収まらなかったことによる。このため、頭部形成が大きく阻害されることと後方体節形成数が刺入側で少ないこととの間の因果関係は不明であった。

### 3.3 左右体節間の組織的連結

多尾胚では、左右体節間の組織的な連結が脊索の背側または腹側部で見られた。組織的な連結とは、脊索の背側での左右体節の癒合（Fig. 5a）あるいは脊索の背側（Fig. 5b, d）、腹側（Fig. 5c, d）において左右体節間を充填する組織の存在をさす。これらの連結のいずれかが、調査した多尾胚13個体の全て（つまり体節の非対称性が確認された全ての胚を含む）で見られたのに対し、非刺入対照胚ではどの個体においてもいずれの連結も見られなかった（Fig. 5e, f）（Table 2）。脊索の背側での左右体節の癒合については、左右の体節が頭尾軸に沿って同一位置で癒合しているものや互い違いに癒合しているものが混在した個体も確認された（Fig. 5a）。脊索の腹側での組織的な連結（7/13）は、脊索の背側での連結（2/13）よりも高頻度で観察された（Table 2）。また、同一個体で脊索の背側と腹側の両方で連結が確認できたのはおもに脊索末端部についてであり（5/13）、脊索末端部より前方で確認できたものはこれよりも少数であった（3/13）（Fig. 5d, Table 2）。以上のことは、胞胚期のガラス板刺入は左右体節間の組織的な連結を誘導する効果があることを示す。また、この効果は体節形成の対称性を乱すことと関係することを示唆する。

### 3.4 尾状突起の構造

連続切片観察により解析した多尾胚については、眼胞あり胚9個体中3個体、眼胞なし胚4個体中2個体では主軸以外に、脊索と左右の体節（Fig. 3c）、脊索と1つの体節（Fig. 3d）（いずれも主軸よりもいくぶん小型）を持つ尾状突起が胚あたり1つのみ見られた。これらの突起のうちあるものは、含まれる体節が主軸の体節と癒合していた（Fig. 3d）。これら以外の突起には、多くの場合その基部に塊状、散在性または上皮性の中胚葉組織の存在が認められた（Fig. 3a, b）。



**Fig. 5.** Filling with some tissues between both the somites. (a) Conglutination between the left and right somites at the dorsal site of the notochord. The somites conglutinate at the same position or alternately (dashed lines). (b) Filling with some tissues between both the somites at the dorsal position of the notochord. (c) The filling at the ventral position of the notochord. (d) The tissue connecting both the somites around the notochord (transverse section). (e) The filling is not seen in the non-insertion control larva. (f) Same as (e) (transverse section).

中胚葉を持つ突起数は、眼胞の有無に関わらず、3-6本であった。以上のことは、多尾胚は St. 10 以降の原腸胚期のガラス板刺入では生じなかった (Table 1) ことと合わせ、胞胚期には尾状突起を生じさせないための中胚葉の組織化に関する制御機構が働いており、ガラス板の刺入がこの制御機構を阻害したことを示唆する。

#### 4. 考察

本実験の結果、胞胚期のガラス板刺入は左右体節間の組織的な連結を誘導する効果があることが示され、この効果は体節形成の対称性を乱すことと関係することが示唆された。

##### 4.1 体節の非対称性

今回のガラス板刺入により生じた多尾胚では、体節について2つの特徴を持つ非対称性が見られた。ひとつは、脊索後端よりも前方での体節位置の非対称性 (Fig. 4a, b) である。現在有力な体節形成機構モデルは、レチノイン酸が前方から後方に向けて、FGF と Wnt がそれとは逆方向に量的勾配を作り、勾配が一定レベルを取る位置 (Wavefront) が発生 の 進 行 と 共 に 予 定 体 節 上 を 前 方 から 後 方 へ と 移 動 す る。そしてこの移動の間に、Delta/Notch signaling が作り出す一定周期の特定時期に Wavefront の位置に体節境界が形成されるというものである (Clock and Wavefront model) [11, 12]。しかし、レチノイン酸や FGF と Wnt の勾配がいつどのようにしてどのような形態で成立するかの知見はいかなる脊椎動物についても明らかにされてい

ない。このため、今回のようにその成立以前と予想される時期に予定成立域を非対称に乱した場合に勾配や Wavefront がどのように調節されるかを予想するために参考となるモデルも存在しない。本研究で体節の位置に非対称性が見られたことは、上記の勾配モデルに従えば、胞胚期のガラス板刺入により、体節形成期のこれらの勾配や Wavefront に非対称性が生じたことを示唆する。しかしながら体節の対称性のずれ幅は1体節長以下であり、あとで議論するとおり調節機構も相当程度機能していたものと考えられる。

特徴のもう一つは、脊索末端より後方において、反刺入 (左) 側の体節数の方が刺入 (右) 側の体節数よりも多かった (Fig. 4b) ことである。これについては、*X-Delta-2* 遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーション解析により原口周囲の *X-Delta-2* 発現域が変更されたことを示すデータを得ており (未発表)、この発現域の変更と深く関係するものと考えられる。尾端では尾芽中の祖先細胞から脊索と両側の体節が形成される。これを乱すと考えられる今回の実験系は、尾芽からの体節形成機構についても解析の材料を提供する実験系となることが期待される。

##### 4.2 体節間の組織的連結

調査した多尾胚では、全ての個体で左右体節間の組織的な連結が見られた (Table 2, Fig. 5)。連結様式の一つは、左右の体節が脊索の背側で癒合することである (Fig. 5a,b)。この原因としては、予定脊索細胞が体節へ運命転換したことや体節細胞の背側部分の成長の制御異常が考えられる。実際、ゼブラフィッシュの *floating head* 突然変異体では、予定脊索は体節に分

化する [13]. また, 別の連結様式は, 脊索の背側, 腹側において左右体節間を充填する組織が存在するというものである (Fig. 5d). この原因については, peri-notochordal basement membrane の形成異常, 脊索周囲に移動してきた硬節細胞の異常のいずれかまたはその複合的異常が可能性として考えられる.

#### 4.3 体節の非対称性と体節間の組織的連結の関係

多尾胚においては, 左右体節間の組織的な連結が生じた頻度の方が体節の非対称性を生じた頻度より高かった. このことから, 以下の一つの可能性が考えられる. つまり, 胚の背側中央部の組織を通じて (体節のずれ幅を1体節長以下とするほどの) 体節の対称性調節を含む調節機構が働き, このことと連動して組織的な連結が生じた. また, 調節能の限界を越えたときに体節に非対称性が生じたというものである. 事実, 体節形成を支配する Delta/Notch signaling の活性化は脊索細胞と引き替えに下索と floor plate 細胞を増やし [14–16], Mib-Jag1-Notch signaling は空胞化した脊索, peri-notochordal basement membrane や muscle pioneer cells の分化を制御する [17] ことが知られている. しかし, 左右予定体節間の組織分化制御に関与する分子的知見は限られており, この制御が体節の位置の制御とどのように関連するのかに関する知見はほとんど得られていない. 本研究の結果は, 体節の対称性調節に関与する領域としての予定左右体節の間の組織の重要性を示唆するものと考えられる.

#### 引用文献

- [1] Boorman, C.J. and S.M. Shimeld, *Bioessays*, **24**, 1004 (2002).
- [2] Minguillon, C. and J. Garcia-Fernandez, *Developmental Biology*, **246**, 455 (2002).
- [3] Soukup, V., et al., *Evodevo*, **6**, 5 (2015).
- [4] Bertrand, S., et al., *PLoS One*, **10**, e0136587 (2015).
- [5] Krneta-Stankic, V., A. Sabillo, and C.R. Domingo, *Dev Dyn*, **239**, 1162 (2010).
- [6] Lane, M.C., L. Davidson, and M.D. Sheets, *Dev Biol*, **275**, 356 (2004).
- [7] Dale, L. and J.M. Slack, *Development*, **99**, 527 (1987).
- [8] Koga, M., et al., *Dev Growth Differ*, **54**, 717 (2012).
- [9] Larabell, C.A., et al., *Development*, **122**, 1281 (1996).
- [10] Nieuwkoop, P.D. and J. Faber, “*Normal table of Xenopus laevis (Daudin)*” (North-Holland Publ. Co., 1967).
- [11] Oates, A.C., L.G. Morelli, and S. Ares, *Development*, **139**, 625 (2012).
- [12] Cooke, J. and E.C. Zeeman, *J Theor Biol*, **58**, 455 (1976).
- [13] Halpern, M.E., et al., *Development*, **121**, 4257 (1995).
- [14] Lopez, S.L., et al., *Development*, **132**, 1035 (2005).
- [15] Latimer, A.J., et al., *Development*, **129**, 2555 (2002).
- [16] Appel, B., et al., *Curr Biol*, **9**, 247 (1999).
- [17] Yamamoto, M., et al., *Development*, **137**, 2527 (2010).