

博士論文

木ヤ胚初期発生過程における細胞分化  
メカニズムの解析

1999年3月

甲南大学大学院

自然科学研究科生命・機能科学専攻

千葉 章太



|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 目次                                | 1  |
| 第1章 要旨                            | 5  |
| 第2章 研究の背景                         | 8  |
| 2.1 細胞分化メカニズム                     | 9  |
| 2.2 ホヤの系統学的な位置                    | 10 |
| 2.3 ホヤ幼生の体と細胞系譜                   | 11 |
| 2.4 ホヤの分化決定因子                     | 12 |
| 2.5 ホヤ卵内に局在する分化に関わる因子             | 13 |
| 2.6 ホヤ決定因子分配メカニズム                 | 15 |
| 2.7 ホヤの卵細胞質再配置                    | 16 |
| 2.8 組織予定割球における決定因子の核への移行          | 18 |
| 2.9 組織特異的に発現する分子の発現カスケード          | 18 |
| 2.10 マーカーの必要性                     | 19 |
| 2.11 モノクローナル抗体法の利点                | 22 |
| 2.12 カタユウレイボヤとユウレイボヤの利点           | 23 |
| 2.13 本研究の目的                       | 24 |
| 第3章 モノクローナル抗体法を用いた細胞分化メカニズムの解析    | 26 |
| 3.1 緒言                            | 27 |
| 3.2 材料と方法                         | 30 |
| 3.3 結果：ホヤ脊索を認識するモノクローナル抗体の調製      | 35 |
| 3.3.1 脊索細胞の系譜                     | 35 |
| 3.3.2 モノクローナル抗体CiNot-1は脊索細胞を認識する  | 35 |
| 3.3.3 CiNot-1抗体はA系列由来の脊索細胞だけを認識する | 36 |



|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.4   | 結果：ホヤ核タンパク質分子に対する<br>モノクローナル抗体の調製         | 38 |
| 3.4.1 | 卵割期の核タンパク質を抗原として用いた<br>モノクローナル抗体の調製       | 38 |
| 3.4.2 | 免疫寛容                                      | 38 |
| 3.4.3 | モノクローナル抗体Nup-1,-2,-3,-4と-5は<br>ホヤ胚の核を認識する | 40 |
| 3.4.4 | Nup-4抗体はカタユレイボヤの<br>ポリユビキチンを認識している        | 43 |
| 3.5   | 考察  | 45 |
| 3.5.1 | CiNot-1抗体                                 | 45 |
| 3.5.2 | Nup-1, 2, 3, 4および5抗体                      | 45 |
| 3.5.3 | 分化マーカーと分化調節因子                             | 47 |
| 第4章   | ユレイボヤ胚組織特異的遺伝子の単離と解析                      | 48 |
| 4.1   | 緒言  | 49 |
| 4.2   | 材料と方法                                     | 50 |
| 4.3   | 結果  | 53 |
| 4.3.1 | 組織特異的に発現する遺伝子の単離                          | 53 |
| 4.3.2 | <i>CsEpi-1</i>                            | 53 |
| 4.3.3 | <i>CsEpi-2</i>                            | 55 |
| 4.3.4 | <i>CsMA-1</i>                             | 56 |
| 4.3.5 | <i>CsMu-1</i>                             | 57 |
| 4.4   | 考察  | 59 |
| 第5章   | ホヤ胚卵細胞質再配置における細胞骨格繊維分子の相互作用               | 63 |
| 5.1   | 緒言  | 64 |

|       |                                       |    |
|-------|---------------------------------------|----|
| 5.2   | 材料と方法                                 | 67 |
| 5.3   | 結果                                    | 71 |
| 5.3.1 | 2回の卵細胞質再配置における微小管と<br>マイオプラズムの挙動      | 71 |
| 5.3.2 | レーザー共焦点顕微鏡による微小管の詳細な観察                | 72 |
| 5.3.3 | 2回の卵細胞質再配置における微小繊維と<br>マイオプラズムの挙動     | 73 |
| 5.3.4 | p58とマイオプラズミンC1                        | 73 |
| 5.3.5 | p58とマイオプラズミンC1の局在は<br>細胞骨格繊維に依存する     | 74 |
| 5.3.6 | p58とマイオプラズミンC1は <i>in vitro</i> で結合する | 75 |
| 5.4   | 考察                                    | 76 |
| 5.4.1 | 卵細胞質再配置における細胞骨格繊維と<br>細胞質領域の関係        | 76 |
| 5.4.2 | 新月環領域に見られる微小管構造の機能                    | 76 |
| 5.4.3 | 決定因子は単一の分子というよりは<br>むしろ複合体として存在する     | 77 |
| 第6章   | 総論                                    | 80 |
| 6.1   | ホヤ細胞分化メカニズム                           | 81 |
| 6.2   | まとめ                                   | 85 |
|       | 謝辞                                    | 87 |
|       | 参考文献                                  | 89 |
|       | 図と表                                   |    |
|       | 論文リスト                                 |    |







本研究では、細胞分化メカニズムを(1)卵内における決定因子の局在化と予定割球への分配、(2)組織予定割球における決定因子の核への移行、(3)分化のための遺伝子カスケードの進行、の3つの局面に区別して解析することで、統括的に細胞分化メカニズムを理解することを目指した。同時に、カタユレイボヤとユレイボヤの各組織分化マーカーを多数調製し、その分化メカニズムの研究基盤を整えることを目指した。

第3章前半では、遺伝子カスケードに注目し、モノクローナル抗体法を用いて細胞の違いを生み出す分子の検索を行った。その結果、一部の脊索細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体CiNot-1を調製でき、形態的には均一な脊索細胞において発現している分子種に差異があることを示した。そして、CiNot-1を脊索における細胞系譜の分子マーカーとして確立した。

第3章後半では、決定因子の核への移行に注目し、卵割期の核タンパク質を認識するモノクローナル抗体を調製し、その中から分化の引き金を引く転写調節因子を見つけだそうとした。そのために免疫寛容法などを利用したが、期待されたほどの効果が得られず、転写調節因子は見つからなかった。そのかわり、卵割期の核を認識する5種類の抗体が得られた。そのエピトープは核と細胞質の両方に存在し、発生過程において独特の挙動を示す。この挙動は、特定の時期に核へ移行する転写調節因子の特性を知る上で興味深い。また、Nup-4 エピトープをコードするcDNAを単離したところ、ポリユビキチン遺伝子であった。

第4章では、カスケードの終盤で働く組織特異的遺伝子に注目した。尾芽胚期で発現する遺伝子を高頻度に持つライブラリーを作製し、そこから組織特異的に発現し、分化マーカーとして有用な遺伝子を一度に多数単離した。それらのうち、表皮細胞特異的に発現する2クローンと筋肉細胞特異的に発現する2ク

ローンについて詳細に解析を行った。そのなかでCsEpi-2は、ホヤzygotic遺伝子の中で最も早い8細胞期から発現が見られ、表皮細胞の分化が8細胞期ですでに始まっていることを明らかにした。CsMA-1はユレイボヤではじめて単離された筋肉アクチンであった。また、CsEpi-2以外は、カタユレイボヤ胚でもマーカーとして利用できることがわかった。

第5章では、卵細胞質再配置により決定因子が正確に局在することに注目し、筋肉細胞分化に関わることの知られているマイオプラズミンC1とp58の局在するメカニズムを細胞骨格繊維との関係を中心に解析した。その結果、局在に関与すると思われる新たな微小管の特異構造を発見した。また、2つの分子の局在はほぼ完全に一致し、その移動には細胞骨格繊維が関与していた。さらに*in vitro*でこの2つの分子が互いに結合できることも明らかにした。これらの結果は、決定因子の局在化と分配メカニズムを理解するうえで、重要な知見となった。

以上の結果をもとに、決定因子が複合体として機能するという仮説をたて、ホヤ細胞分化メカニズムの全体像を考察し論議した。



## 第2章 研究の背景

### 2.1 細胞分化メカニズム

多細胞生物を作り出す1個の出発細胞である受精卵は、個体発生の過程で卵割を繰り返して多くの未分化の娘細胞(割球)を作りだす。そこから形態的・機能的に質的な差を持った様々なタイプの細胞が生じる。そして、それらの細胞は特定の形態的・機能的な特徴を持った組織を形成し、最終的に1個体を形成する。こういった、分化はどのようにして引き起こされるのだろうか。分化した細胞は、それぞれの特徴である形態と機能を発現し、維持するために、特異的なタンパク質を合成している。タンパク質はmRNAから翻訳され、mRNAはDNAから転写される。しかし、分化した細胞でもゲノムは共通であることが、核移植の実験によって示されている。したがって、分化した細胞がそれぞれの型の細胞で特異的な遺伝情報を発現するためには、細胞型ごとに、何らかの方法によって発現すべき遺伝情報を選択(調節)しているはずである。このことから、細胞の分化はその遺伝情報の選択の結果であると考えることができる。そこで現在では細胞分化をゲノム中の特定の遺伝子群が発現した状態と考えることが一般的である。

では、初期発生において具体的にどのようなメカニズムが働いて細胞分化が起こるのだろうか。これらの探索にホヤは多くの利点を有しており、その利点を生かして研究が進められ、多くの知見が得られている。本研究では、このホヤを用いて、細胞分化メカニズムの様々なステップについて多角的に解析を行った。そして、そこから得られた情報をもとに一連の細胞分化メカニズムを理解することを試みた。



## 2.2 ホヤの系統学的な位置

原索動物尾索類のホヤは、幼生の時期にその尾部に脊索をもつことから、ヒトを含めた脊索動物の一員として注目されてきた。ホヤの幼生を構成する細胞型はきわめてシンプルである。ヒトの体が約200種類の細胞型からなるのに対して、ホヤ幼生では筋肉、脊索、神経索、内胚葉、間充織、脳、眼点、平衡器、体幹側細胞、表皮と数えるほどしかない(Conklin, 1905a, b)。しかし、ホヤは脊椎動物の基本的な細胞型をすべて揃えている。そして、ホヤの幼生の体のつくりはカエルのオタマジャクシと非常によく似ている。

また、現在までにホヤでは多くの遺伝子が単離、解析されており、その発現場所や塩基配列、アミノ酸配列の相同性が様々な動物との比較から、ホヤが脊椎動物に近い動物であるという示唆が多数得られている(Review; Chiba and Nishikata, 1998参照)。

例えば、アクチン遺伝子の解析から得られた結果がよい例である。ほ乳類では、アクチンの特定の位置でのアミノ酸の使われ方によって、筋肉(骨格筋+心筋)型アクチンと細胞質(細胞骨格)型アクチンを区別することができる(Vandekerckhove and Weber, 1978; 1979)。その位置のアミノ酸を比較することでウニやショウジョウバエのアクチンはすべて脊椎動物のいわゆる細胞質型アクチンであるという結果が得られる。つまり、アクチンの基本型は細胞質型アクチンであり、脊椎動物の進化にともなって筋肉型のアクチンが生じたと考えられる。ホヤでは現在までに、幼生および成体の筋肉アクチンがシロボヤ(Kovilur *et al.*, 1993)、エボヤ(Beach and Jeffery, 1992)、マボヤ(Kusakabe *et al.*, 1991)、モルグラ オカルタとモルグラ オキュラータ(Kusakabe *et al.*, 1996)から単離されている。また、細胞骨格アクチンがマボヤ(Araki *et al.*, 1996)から単離

されている。これらホヤのアクチンのアミノ酸配列はKusakabe *et al.* (1991; 1992; 1996)、Araki *et al.* (1996)とKovilur *et al.* (1993)により、ほ乳類の筋肉型アクチンと細胞質型アクチンのアミノ酸配列と比較されている。その結果、幼生および成体の筋肉アクチンは、脊椎動物の骨格筋アクチンにほぼ一致し、細胞骨格アクチンは脊椎動物の細胞骨格アクチンにほぼ一致する。このことから、ホヤがショウジョウバエやウニよりも脊椎動物に近い動物であることは分子的に明かである。

また、マウスにおいてヘテロ突然変異体が短尾の表現型を示す*T*ミュータントの原因遺伝子である*Brachyury (T)*遺伝子(Herrmann *et al.*, 1990)は同じ脊椎動物であるアフリカツメガエル(Smith *et al.*, 1991)とゼブラフィッシュ(Schulte-Merker *et al.*, 1992)からもそのホモログが単離されている。*Brachyury (T)*遺伝子の発現パターンは脊椎動物においてよく保存されている。はじめ中胚葉形成領域を中心に比較的広い領域で発現し、やがてその発現は脊索と尾芽に残る。一方、*Brachyury (T)*遺伝子のホヤでのホモログである*As-T*と*Ci-Bra*は、ホヤ幼生の予定脊索細胞でのみ発現する(Yasuo *et al.*, 1993; Corbo *et al.*, 1997)。脊椎動物の脊索で発現する遺伝子がホヤにおいても脊索で発現することは、ホヤ幼生の脊索が脊椎動物の脊索と相同であるという分子的証拠となっている。

## 2.3 ホヤ幼生の体と細胞系譜

先に述べたように、ホヤ幼生は構成する細胞型が脊椎動物と比較して少ない。この細胞型の少なさは、ホヤ幼生を構成する全組織の分化メカニズムを解析することを可能にしている。では、これらの各細胞は初期発生過程でどのように分裂し、どのような細胞型に分化するのだろうか。このことを一目でわか



るようにしたのが細胞系譜である。ホヤの細胞系譜は、Conklinが初期発生各ステージのすべての割球を同定しそれらに名前をつけたことから始まる(1905a)。その後、Ortolani (1955)によりさらに調べられた。さらにその後Nishida (1987)によって、西洋ワサビの過酸化酵素を割球標識物質として細胞内に顕微注入し、各割球が将来幼生のどの組織に分化するかを追跡するという方法で調べられた。その結果、原腸胚期である110細胞期までの各割球の細胞系譜が詳細に調べられている。

ところで、胚のそれぞれの部域に関して、正常発生においてそれぞれが将来幼生のどの組織に分化するかを、その部域の予定運命という。受精卵はすべての細胞になる予定運命を持っているが、卵割が進むにつれてその予定運命は各割球に分配され、最終的には各割球はたったひとつの予定運命だけを持つようになる。このたったひとつの予定運命だけを持ったとき、その割球の運命はその組織に限定されたという。ホヤでは、各割球の予定運命の限定は非常に早く起こり、110細胞期までにはほとんどすべての割球の予定運命が限定されることがわかっている(Nishida, 1987)。このことは、先述の細胞型の少なさと併せて、ホヤ組織分化メカニズムを個々の細胞レベルで解析することができるという非常に大きな利点となっている。

## 2.4 ホヤの分化決定因子

ホヤ受精卵には5つの明確に区別できる細胞質領域が存在することが知られている。フタスジボヤでは、これらの細胞質領域は、色で区別することができる。Conklin (1905a)は、これらの各細胞質領域が決まった組織予定割球に分配されて行くことを報告し、そのうちのひとつ、筋肉細胞に受け継がれる細胞質

領域をマイオプラズムと呼んだ。このときから、ホヤ卵内には組織分化決定因子が存在すると考えられてきた。

しかし、決定因子が存在することを明確に示す実験は、Nishida (1992)による細胞質移植実験での筋肉細胞分化決定因子に関する実験まで待たなければならなかった。Nishidaは、電氣的に融合する方法を用いて、8細胞期胚から単離してきた筋肉を決して作らない割球に卵の様々な部分から切り取った細胞質を移植した。その結果、マイオプラズムの部域には筋肉分化を引き起こす能力のあることが示され、筋肉細胞分化決定因子が確かに存在していることが示された(Nishida, 1992)。また、同様の実験手法を用いて内胚葉(Nishida, 1993)や表皮(Nishida, 1994a)の決定因子も、それぞれの細胞に受け継がれる卵細胞質中に確かに存在していることが示された。さらに前後軸の決定(Nishida, 1994b)や、原腸陥入(Nishida, 1996)に関する因子も卵細胞質中の特定の領域に局在していることが示されている。

## 2.5 ホヤ卵内に局在する分化に関わる因子

これまでに決定因子の実体を探るべく、様々な努力がなされてきた。例えば、筋肉細胞分化決定因子についてはマイオプラズムの単離や(Jeffery, 1985; Nishikata *et al.*, 1987; Nishikata, 1991)、決定因子を含む卵片の作製(Marikawa *et al.*, 1994; 1995)など、様々な努力がなされている。その結果、筋肉細胞分化に重要な役割を持つ分子が、現在までにいくつか単離されている。そのうちの2つがp58 (58 kDa protein)とマイオプラズミンC1である。p58はマイオプラズムの領域に局在する分子であり、ブタの中間径フィラメントを認識するモノクローナル抗体NN18によって認識される分子である(Swalla *et al.*, 1991)。有尾種のモ



ルグラ オキュラータと無尾種のモルグラ オカルタを掛け合わせて作製したハイブリッド胚は、いくつかの段階の尾を持った幼生に発生する。このときp58の発現量は、この尾が小さくなるに従って減少する。このことから、p58は筋肉細胞を含む尾部の形成に重要な役割を果たしていると考えられている(Jeffery and Swalla, 1992)。一方、モノクローナル抗体法により単離されたマイオプラズミンC1は、マイオプラズムに局在する、分子量が約40 kDaで、等電点は約5のタンパク質分子であることがわかっている(Nishikata *et al.*, 1987; Nishikata, 1991)。また、そのcDNAの塩基配列から推測されるアミノ酸配列の検索結果から、マイオプラズミンC1はヘプタッドリピートを持ち、 $\alpha$ -helix coiled-coil構造をとっていることが推測されることから、マイオプラズミンC1は卵内で他の分子と結合していることが推測されている(Nishikata and Wada, 1996)。マイオプラズミンC1抗体を卵内に顕微注入すると、卵は筋肉細胞を分化しなくなることから、マイオプラズミンC1は筋肉細胞分化に重要な役割を果たしていると考えられている(Nishikata *et al.*, 1987)。さらに、マイオプラズミンC1はTriton X-100を含む抽出液で卵を処理しても、卵内に残るため、卵内では細胞骨格と強く結合していることが示唆されている(Nishikata and Wada, 1996)。これらのことからマイオプラズミンC1は卵内で、筋肉分化に重要な因子をマイオプラズムの細胞骨格繊維につなぎ止めるような役割を果たしているのではないかと考えられている(Nishikata and Wada, 1996)。

また、決定因子を含む卵片(Marikawa *et al.*, 1994; 1995)に多く含まれているmRNAとして*posterior end mark (pem)* (Yoshida *et al.*, 1996)が単離されている。*pem* の1細胞期における局在パターンはマイオプラズムのそれと一致し、16細胞期以降の卵割期には後極に局在するようになる。この*pem* はmRNAの顕微注入による過剰発現の結果から、前後軸の決定に関与していることが示唆されて

いる(Yoshida *et al.*, 1996)。さらに、Satou and Satoh (1997)によって、*pem*と同様の局在パターンを示す*pem-2*, -4, -5 と-6 mRNAがユウレイボヤから単離されている。また、マボヤからも卵内で後極に局在するmRNAとして、*HrWnt-5* が単離されている(Sasakura *et al.*, 1998)。残念ながら、これら卵内に局在する母性因子が決定因子として直接機能しているとは考えられず、決定因子の分子の実体は不明である。

## 2.6 ホヤ決定因子分配メカニズム

では、決定因子が正確に目的の割球で細胞分化の引き金を引くためには、どのようなメカニズムが必要だろうか。上述のように、いくつかの組織分化決定因子は、卵内の細胞質領域に正確に局在することがNishidaによって証明されている(例えば、1992)。決定因子は、受精後起こる2回の卵細胞質再配置によって、複雑であるが再現性のある動きをしながら卵内の正確な位置に局在し、その後卵割が進んでも決定因子は正確に分化の引き金を引くべき組織予定割球に分配される。

ところで、ホヤ胚の卵割パターンは複雑であるが、どの個体においてもまったく同一であり、不変である。この卵割パターンの不変性は、決定因子を胚の適切な割球へと正確に分配するために、非常に重要な性質であると考えられる。

つまり、決定因子が正確に分配されるために必要なメカニズムには、1)決定因子を卵細胞質再配置によって卵内の正確な位置に局在させ、2)卵割の際、引き金を引くべき割球に決定因子を正確に分配することが必要である。



## 2.7 ホヤの卵細胞質再配置

ホヤ卵は卵細胞質再配置によって、受精直後から第一卵割までの間に細胞質を2回ダイナミックに移動させる。この動きによって卵内の母性因子は正確に卵内の特定の細胞質領域に局在する。この卵細胞質再配置による局在メカニズムは、その領域にシロボヤでは黄色い色素が集中し、ユウレイボヤでは黒い顆粒が集中していることから、マイオプラズムの領域についてその分配様式が解析され、分子的にも詳細な解析が行われてきた。

マイオプラズムは、未受精卵の時期には動物極以外の卵表層に局在している。受精後すぐに、アクチン繊維が関与する"cortical contraction"と呼ばれる卵表層の収縮運動によって1回目の卵細胞質再配置が起こり(Sawada and Osanai, 1981)、その働きによって、マイオプラズムは植物極付近の卵表層に移動する。その後マイオプラズムは、2回目の卵細胞質再配置によって後極に移動し、新月環を形成する。そして第一卵割が起こり、2細胞期の後ろ側に局在し、その後卵割が進んでいくと、マイオプラズムは正確に予定筋肉割球に分配されて行く。

卵細胞質再配置でのマイオプラズムの移動には、細胞骨格繊維が関与していることが、阻害剤を用いた実験からも明らかになっている。Zalokar (1974)、Reverberi (1975)やSawada and Osanai (1981)はサイトカラシンB処理により1回目の卵細胞質再配置でのマイオプラズムの移動が阻害されることを示し、この移動にアクチンが関与していることを示した。また、Zalokar (1974)はコルヒチン処理により2回目の卵細胞質再配置でのマイオプラズムの移動が阻害されることを示し、この移動にチューブリンが関与していることを示した。加えて、マイオプラズムの領域は、中間径フィラメントを含めた細胞骨格繊維が複雑に集

まっていることが、Jeffery and Meier (1983)による電子顕微鏡での観察によって示されており、Sardet *et al.* (1994)は、これらの細胞骨格繊維の集合が"cytoplasmic domain"を形成しており、それら細胞骨格繊維間の連絡も重要であるという考え方を提唱している。

ホヤ卵内の微小管は発生過程を通して形態を様々に変化させ、実に複雑な様相を示す。未受精卵から最初の卵割までのホヤ卵内に存在する微小管の挙動は、Sawada and Schattenによって詳細に観察されている(1988)。ホヤ1細胞期に存在する微小管の主だった構造として、精子星状体、減数分裂紡錘体と第一卵割の分裂装置がある。精子星状体は、受精後1回目の卵細胞質再配置によって植物極側に移動した精子から放射状に発達した微小管である。精子星状体は、2回目の卵細胞質再配置の時期には後極の卵表層に移動する。その後、さらに卵の中央に向かって移動しながら微小管を卵全体に発達させる。減数分裂紡錘体は、未受精卵のときには、動物極の卵表層で分裂方向を動植軸に垂直な方向に向けて存在している。受精後、1回目の卵細胞質再配置の時期に減数分裂紡錘体は、動物極の卵表層に位置したまま次第に分裂方向を動植軸方向に向ける。そして、減数分裂紡錘体は、第一極体の放出過程、第二極体の放出過程に従い変化していく。減数分裂紡錘体は第2卵細胞質再配置の時期に、雌性前核上の星状体にその形態を変えながら卵の中央に移動する。雌性前核は、時を同じくして卵の中央に移動してきた雄性前核と核融合し、その融合核を中心に分裂装置が観察されるようになる(Sawada, 1988、Sawada and Schatten, 1988, 1989)。また、ホヤ卵内にはさらに、微小管のネットワークが存在することが明らかになっている。例えば、Sardet *et al.* (1992)により未受精卵における微小管の存在が卵切片上で観察されており、Sawada and Schatten(1988)も卵母細胞にcytoplasmic fine latticeworkが存在することを示している。しかし、これらの構



造の時間的、空間的挙動は不明である。また、2回目の卵細胞質再配置において微小管は、マイオプラズムの挙動に重要な役割を果たすことが知られているにも関わらず、マイオプラズムの移動に直接関係のあると思われる構造は示されていない。

## 2.8 組織予定割球における決定因子の核への移行

正確に組織予定割球に分配された決定因子は、分化の開始される直前に細胞質から核へ移行して分化の引き金を引くと考えられる。また、決定因子は、特定の組織予定割球だけに存在し、分化の引き金を引く直前にだけ核内に存在していればよいので、おそらくホヤ卵内で微量にしか存在していないと思われる。また、分化の引き金を引く時期は常に限定されており、その時期まで決定因子の機能は抑えられていると考えられる。

ところで、決定因子が正確に目的の割球で分化の引き金を引くためには、卵内で正確に局在し、卵割期の予定割球に正確に分配され、分化の引き金を引く直前だけに細胞質領域から核内に移行しなければならない。このどの過程がかけても細胞分化は正確に起こらない。このことから決定因子は単一の分子というよりも、多くの分子からなる複合体として考えられる。そこで、本研究では、これらの複合体を決定因子複合体と呼び、決定因子を転写調節因子と考え、研究を進めた。

## 2.9 組織特異的に発現する分子の発現カスケード

これまでに述べた、分化の引き金を引くメカニズムも重要であるが、その

後、細胞に形態的・機能的差をもたらす膨大な数の特定の遺伝子がどのようにうまく発現してくるかも興味深い問題である。

ところで、各組織で分化の引き金が引かれる時期は、組織特異的遺伝子の発現と細胞系譜から推測できる。現在単離されている遺伝子の中で、各組織で最も早い時期に発現している遺伝子は、表皮では8細胞期(第4章参照)、内胚葉では16細胞期(Shimauchi *et al.*, 1997; Corbo *et al.*, 1997)、筋肉細胞では32から64細胞期(Satou *et al.*, 1994; Chiba *et al.*, 1998; Araki *et al.*, 1996)、脊索細胞では64細胞期から発現することがわかっている(Yasuo *et al.*, 1993; 1994; Corbo *et al.*, 1997)。これらの遺伝子の発現時期は、各組織において予定運命の限定される時期か、その1細胞周期前の時期であることがわかっている。このことから、分化の引き金が引かれる時期はこれらの遺伝子が発現している直前だと考えられる。また、決定因子は、ゲノム中の組織分化のマスター遺伝子の発現を開始するためにその調節領域に結合し、分化の引き金を引くと考えられる。決定因子によるマスター遺伝子の発現により、分化をコントロールする調節遺伝子から組織としての特徴をつくる構造遺伝子まで、数多くの遺伝子からなる複雑な遺伝子カスケードが開始されるに違いない。

## 2.10 マーカーの必要性

分化した細胞は、形態的・機能的に質的な差を持っている。この差異は形態マーカーとして古くから分化メカニズムの解析に利用されてきた。一方、細胞分化は、ゲノム中の特定の遺伝子群が差次的に発現する過程であると考えられている。つまり、組織特異的なmRNAやタンパク質分子が発現していれば、その細胞は分化したといえる。これら組織特異的なmRNAやタンパク質分子の発



現は、分子マーカーとして細胞分化メカニズムの解析に広く利用されている。これらのマーカーは、たとえ正常な幼生の形態をとどめていない場合でも、その発現から、組織分化を分子レベルで証明でき、非常に有効なものである。この特徴を利用してこれまでも、卵割阻害胚を用いた研究や、割球解離実験などのホヤ胚における分化メカニズムの研究にも用いられてきた。

例えばマボヤでは、様々な組織の構造タンパク質のマーカーが単離されている(Mita-Miyazawa *et al.*, 1987)。そのうちのひとつ、筋肉細胞の分化マーカーであるMu-2はNishida(1992)によって細胞質融合実験に用いられており、卵細胞質中のマイオプラズムの領域を他の筋肉細胞にならない割球と融合させるとその割球はMu-2を発現し、筋肉細胞に分化することが示された。一方、遺伝子マーカーでは、例えば*HrEpiA*と*HrEpiB*遺伝子はマボヤの表皮に特異的に発現するマーカーとして分化メカニズムの解析に用いられている。それにより、マボヤの表皮細胞は自律的に分化できることを明確に示した(Ueki *et al.*, 1994)。

ところで、もしホヤ幼生を構成しているすべての組織に対して組織特異的マーカーが単離されていれば、すべての組織の分化メカニズムを解析できるだけでなく、他の利用法もある。例えば、割球の予定運命を変更するような実験を行ったときにも、その結果は分子的な視野で検証できる。ホヤにおいては複数のマーカーを用いて、このような割球の予定運命が変更されたことを分子的に証明した例は未だ見られない。しかし、アフリカツメガエル胚を用いた研究においては、この手法が広く利用されている。例えば、アフリカツメガエルの*wnt*遺伝子のひとつである*Xwnt3a*は、正常な幼生では初期神経胚期の神経外胚葉に発現することが知られている。McGrew *et al.*, (1995)は、*Xwnt3a* mRNAを過剰発現させた胚における胚の神経系マーカー(*XAG1*(セメント線マーカー)、*XANF2*(脳下垂体マーカー)、*OtxA*(前脳マーカー)、*En2*(中脳マーカー)、

*Krox20*(後脳マーカー)と*Xlhbox6*(神経索マーカー))の発現を統一的に調べた。それらの胚において、より前側神経系マーカーである*XAG1*, *XANF2*, *OtxA*, *En2*の発現が減少し、中間の*Krox20*の発現は変わらず、より後ろ側の神経系のマーカーである*Xlhbox6*の発現量が増加することを示した。つまり、*Xwnt3a* mRNAが後ろ側の神経系の分化に関与していることを分子的に証明した。このように、数多くのマーカーを利用することで、分化メカニズムの解析手段の幅を大きく広げることができる。多くの分化マーカーを利用した研究は、組織の数の少ないホヤにおいてこそ非常に有効な解析手段となる。

ホヤ幼生を構成している組織の分化メカニズムの解析は、筋肉(例えば、Jeffery and Swalla, 1992; Tanaka and Nishikata, 1994)、表皮(例えば、Nishida, 1994; Ueki and Satoh, 1995; Nishikata *et al.*, 1987)、神経(例えば、Nishida, 1991; Okamura *et al.*, 1994)、内胚葉(例えば、Nishida, 1993)、体幹側細胞(Nishikata and Satoh, 1991)および脊索細胞(例えば、Nishikata, 1990; Yasuo and Satoh, 1993; Nakatani and Nishida, 1994)において詳細に行われている。これらの分化メカニズムの解析にも分化マーカー法は有用な手段として利用されてきた。現在までに、組織特異的に発現する遺伝子(Review; Chiba and Nishikata, 1998参照)やモノクローナル抗体による構造タンパク質のマーカー(例えば、Nishikata *et al.*, 1987)が単離、調製され、これらは各割球の分化メカニズムの解析に利用されている。しかし、ホヤ幼生を構成する組織マーカーは、そのすべてがまだ揃っていない。また現在、カタユレイボヤとユレイボヤにおいてはその数が不十分である。そのため今後、研究を進めるためにはさらに分子マーカーを単離することが必要である。

また、組織を区別するための組織特異的マーカー以外にも有用なマーカーがある。例えば、ホヤのアルカリフォスファターゼの発現は、脊索細胞がA系列



とB系列とで異なる分子種を発現している証拠となっている(Whittaker, 1977; 1990; Bates and Jeffery, 1987)。しかし、2つの系列から分化した脊索細胞は、形態的には均一であり、分子的にもモノクローナル抗体Not-1やAs-T、Ci-Braなどが共通に発現している。系列の異なる脊索細胞は、別の役割があるのだろうか。この問題の解決には、系列の異なる脊索細胞を区別できる脊索細胞マーカーが必要である。

## 2.11 モノクローナル抗体法の利点

先に示した構造タンパク質のマーカーは、ホヤでは主にモノクローナル抗体で調製されている。モノクローナル抗体の特徴のひとつは、単一のエピトープ(抗原決定基)によって抗原分子を認識し、的確に抗原分子の挙動を解析できることが挙げられる。このことから構造タンパク質分子のマーカーを認識するモノクローナル抗体は、分化メカニズムの解析の道具として最適である。さらに加えて、粗製抗原からでも、その未知の分子の持つ特質を指標にしてスクリーニングを行うことによって、的確に目的の分子を認識する抗体を調製できることも大きな利点である。分化の引き金を引く転写因子のように、卵内に微量にしか存在しないと考えられる分子に対する特異抗体の調製も、スクリーニングの方法次第で可能にすることができる。また、スクリーニングにより一度に複数種の抗体を作ることも可能であり、例えば、多くの種類のホヤ分化マーカーを調製しようとしたとき、今回のように尾芽胚期に存在しているすべてのタンパク質を抗原として用いてモノクローナル抗体を調製すれば、スクリーニングによってすべての組織に対するマーカーを一度に調製することも可能である。このように、モノクローナル抗体法の利用価値は大変高い。

## 2.12 カタユウレイボヤとユウレイボヤの利点

現在、発生学の分野で、多くのホヤがそれぞれの特徴を生かして研究に用いられている。マボヤは、古くから日本国内において研究が進められており、分化マーカーも多く調製されている(Satoh, 1994参照)。また、マボヤはその卵の大きさから胚操作が容易であり、Nishida(例えば、1992)による細胞質移植実験などはマボヤを用いて行われている。一方、カタユウレイボヤとユウレイボヤもマボヤに匹敵するほど多くの研究が世界中で行われている。カタユウレイボヤとユウレイボヤは、配偶子の採取が通年可能である。つまり、常に生きているホヤの卵を扱うことができ、研究に非常に適している。

また、先の段落で紹介したp58はカタユウレイボヤ卵内にも同様に存在していることがわかっているし、マイオプラズミンC1はカタユウレイボヤから単離されている。さらに、*pem*や*pem-2*, -4, -5 と-6は、ユウレイボヤから単離されている。このように卵内に局在するホヤの母性因子の多くは、カタユウレイボヤとユウレイボヤから単離されている。これらの局在分子は、その細胞分化や形態形成における役割はもちろん、卵内での局在メカニズム解析のためのマーカーとしても有用である。一方、カタユウレイボヤとユウレイボヤにも欠点がある。マーカー分子の量的不足である。この問題点の解消も本研究の目的のひとつである。

一方、ホヤにおける遺伝子の機能解析の手段は非常に乏しい。単離したホヤ遺伝子の機能解析の手段として、顕微注入や電気穿孔法による遺伝子の過剰発現、外来遺伝子の導入や機能阻害(例えば、Yoshida *et al.*, 1996; Yasuo and Satoh, 1998; Corbo *et al.*, 1997)やアンチセンスオリゴによる機能阻害(Swalla and Jeffery, 1996; Olsen and Jeffery, 1997)があるが、これらの手法はどの遺伝子にも有効で



あるとは限らない。現在、ホヤ胚形態形成に重要な役割を果たすと推測される遺伝子を単離し、その機能を解析するという手順の研究が盛んに行われているが、後述するように効果のない場合も多い(第4章参照)。ホヤ胚における遺伝子の機能解析は、これらの方法で効果のあった遺伝子のみを扱うか、新たな手法を開発するしかないのである。

そこで、突然変異体を調製し、その原因遺伝子を解析するという遺伝学的手法をホヤでも新たに取り入れ、機能面からホヤ初期発生に重要な役割を果たす遺伝子を新たに単離する方法が考えられている。カタユレイボヤとユレイボヤは、世代時間が2.5から3カ月と短く、配偶子の採取も通年可能な種である。加えて、カタユレイボヤは継代飼育にも成功している。これらの点において、カタユレイボヤとユレイボヤは、遺伝学的手法の導入が可能なホヤとして現在非常に注目されている。

### 2.13 本研究の目的

本研究は、カタユレイボヤとユレイボヤを用いて、分化メカニズムの様々なステップについて多角的に解析を行い、そこから得られた情報をもとにホヤ胚における分化メカニズムを理解することを目的とする。具体的には、3章の前半では、モノクローナル抗体法を利用して組織特異的に発現している構造タンパク質マーカーを調製する。また、調製したモノクローナル抗体を用いて、細胞分化によって引き起こされるカスケードに関わる分子種の特性を明らかにする。3章の後半では、同じくモノクローナル抗体法を利用して、分化の引き金を引く転写調節因子を見つけるために、卵割期に存在する核タンパク質に対する抗体の調製を行う。4章では、組織特異的に発現するマーカー遺伝子

を単離する。また、これらの遺伝子の初期発生での挙動や塩基配列などの分子的特質を調べ、細胞分化によって引き起こされるカスケードに関わる分子の特性を明らかにする。5章では、決定因子分配メカニズムのうち、卵細胞質再配置による決定因子局在メカニズムに注目し、細胞分化に重要な因子が第一卵割までに正確に局在するメカニズムを、筋肉細胞分化に関わるマイオプラズムを手がかりに解析する。これらの研究から得られた情報をもとに、細胞質の局在メカニズム、転写調節因子による分化開始メカニズム、組織特異的に発現するmRNAや構造タンパク質の発現にいたる遺伝子カスケードを分化メカニズムに必須の一連のステップとして捉え、統括的に分化メカニズムを議論する。



### 第3章 モノクローナル抗体法を用いた細胞分化メカニズムの解析

#### 3.1 緒言

分化の引き金を引かれた各割球は、まず各組織間で差次的にmRNAを転写する。そして、これら差次的に発現したmRNAから組織特異的に発現する構造タンパク質が翻訳され、各組織はそれぞれ特異的な構造を持つようになる。つまり、これら組織で差次的に発現するmRNAや、組織特異的な構造タンパク質が発現すれば、各割球はその組織に分化したと言える。このような分子は分化マーカーと呼ばれ、分化メカニズムの解析に非常に有用な道具として活用されている(例えば、Nishikata *et al.*, 1987; Ueki *et al.*, 1994)。ホヤ幼生を構成している組織の分化メカニズムの解析は様々な組織で詳細に行われており、ホヤ分化メカニズムの解析にも、分化マーカーは有用な道具として利用されてきた。しかし、ホヤ幼生を構成する組織のマーカーは、そのすべてが揃っているわけではない。またその数においても、カタユレイボヤとユウレイボヤでは不十分である。そこで、組織分化マーカーをこれらのホヤで、できる限り多数調製する必要があると考えた。

構造タンパク質分子のマーカーは、その挙動をモノクローナル抗体によって認識できる。モノクローナル抗体は単一のタンパク質分子を認識でき、的確に抗原分子の挙動を解析することができる。このことから、構造タンパク質分子のマーカーを認識するモノクローナル抗体は、分化メカニズムの解析の道具として最適である。第3章では、モノクローナル抗体法を用いて分化マーカーを調製しようと考えた。

ホヤ幼生の脊索細胞は、マウス*Brachyury (T)*遺伝子のホヤでのホモログである*As-T*や*Ci-Bra*が単離、解析されている。それらの転写産物が予定運命の限定された脊索細胞でのみ発現することから、ホヤ幼生の脊索は脊椎動物の脊索



と相同であることが分子的に示された。このことから、ホヤ自体の脊索細胞分化メカニズムだけでなく、脊椎動物の起源を探る上でも、その分化メカニズムが注目されている(Yasuo and Satoh, 1993; 1994; Corbo *et al.*, 1997)。加えて、脊索細胞の分化に誘導が必要なことが胚細胞の単離と再結合実験によって示され(Nishida 1992; Nakatani and Nishida, 1994)、脊索細胞分化メカニズムのより詳細な解析が求められている。これらの解析に多くのマーカー分子が利用できれば、解析が容易になるはずである。さらにアルカリフォスファターゼの発現は、脊索細胞がA系列とB系列とで発現する分子に違いがあることを示している(Whittaker, 1977; 1990; Bates and Jeffery, 1987)。しかし、2つの系譜から分化した脊索細胞は、形態的には均一であり、さらに、分子的にもNot-1や*As-T*、*Ci-Bra*などが共通に発現している。系譜の異なる脊索細胞は、別の役割があるのだろうか。この問題の解決には、系譜の異なる脊索細胞を区別できる分子の解析が必要であると考えられる。

本実験で調製されたハイブリドーマ(1G9)の産生するモノクローナル抗体(CiNot-1)は脊索細胞の系譜の違いを認識し、両者に分子的な差異があることを示した。

モノクローナル抗体の特徴は先にも述べたが、単一のタンパク質分子を認識することが可能であり、的確に抗原分子の挙動を解析することができることにある。さらに加えて、粗製抗原からでも、その未知の分子の持つ特質を指標にしてスクリーニングを行うことによって、的確に目的の分子を認識する抗体を調製できることも大きな利点である。この利点を利用して、恐らく卵内に微量にしか存在しないと考えられる、分化の引き金を引く因子に対するモノクローナル抗体の調製を試みた。

各組織の分化の引き金が引かれる時期は、組織特異的に発現する遺伝子の発現時期から、表皮では8細胞期、内胚葉では16細胞期、筋肉細胞では32から64細胞期、脊索細胞では64細胞期だと考えられる。これらの時期に各組織予定割球の細胞質に分配されていた決定因子は、核内に入り込み転写活性化を行うと考えられる。そこでこの分化の引き金を引く分子の同定を目的として、初期卵割期の核内に存在する分子を認識するモノクローナル抗体を調製することにした。本実験で用いた64細胞期胚は筋肉、脊索細胞の分化が始まっていると推測される時期であり、核の数もそれ以前のステージよりは増え、核の単離を行うのに適している。また、Matthew and Sandrock(1987)は、サイクロフォスファミドによる免疫寛容法を用いたモノクローナル抗体調製法により、目的でない分子も多く混在する抗原分子から出発し、効率的に目的のモノクローナル抗体を調製することに成功している。この手法は本実験にも有効な手段であると思われる。本実験では、特定の割球の核内を認識するような抗体は調製できなかったが、多くの核内を認識するモノクローナル抗体を調製することができた。その結果、1)エピトープの異なる5種類の核タンパク質分子の初期発生における挙動を解析できた。2)ポリユビキチンタンパク質の挙動を明らかにできた。



### 3.2 材料と方法

#### ホヤとホヤ胚

カタユウレイボヤは、東北大学農学部附属海洋生物資源教育研究センター、広島大学理学部附属臨海実験所と神戸商船大学付近の湾内にて採集した。成体は13℃、常明で維持した。卵は成体の輸卵管から直接採取した。精子は輸精管から採取し、必要なものには水酸化ナトリウムで活性化した。受精卵は16℃で発生させた。この温度下で受精卵は約1時間後に第一卵割が起こり、幼生の孵化は約20時間後に起こる。

#### 免疫感作

組織特異的マーカー抗体：抗原には孵化した幼生を0.9% 塩化ナトリウム溶液に懸濁、超音波破碎し、10,000 × g 10分の遠心を行い、その上清を用いた。マウスはBALB/c系統の雌を用い、前出の抗原を4度にわたって注射した。

初期卵割期の核を認識する抗体：K. Kusakabeの方法(私信)に基づき改良を加えた。64細胞期胚と未受精卵は、ホモジナイズバッファー(10 mM Tris, 1 mM EDTA, 12.5% sucrose, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 7.5)中でダウンスホモジナイザーを用いて細胞膜を破碎した。このとき核膜は破碎されずに残っていることを確認している。回収した破碎していない核は核抽出液(10 mM Hepes, 0.1 mM EDTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.42 M NaCl, 25% glycerol, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 7.9)で3時間以上処理し、内部の核タンパク質を抽出した。抽出した核タンパク質液はバッファー(20 mM HEPES, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.1 M KCl, 20% glycerol, 1 mM PMSF, 2 mM DTT, pH 7.9)中で12時間以上透析を行いこれを抗原

とした。マウスはBALB/c系統の雌を用い、腹腔内に抗原を注射した。免疫寛容にはサイクロフォスファミド(Sigma, St Louis, MO, USA)を免疫抑制剤として、未受精卵抗原での免疫感作の10分後、24時間後、48時間後の3回にわたって投与し、未受精卵の試料に対する抗体の産生を抑えた。投与のタイミングおよび投与量(100 mg/kg)はMatthew and Sandrockの方法に従った(1987)。免疫抑制を行ったマウスに、64細胞期の胚から抽出した核タンパク質を注射した。アジュバントにはムラミルペプチド(GERBU ADJUVANT 10; GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg, Germany)を用いた。免疫寛容のスケジュールについては表3.1に示す。

#### 抗体の調製

抗体の調製は、Mita-Miyazawa *et al.*の方法(1987)に基づき若干の改良を加えて調製した。ハイブリドーマの調製にはマウスSp2を用い、PEG#4000 (Nacal Tesque, Kyoto, Japan)を用いて細胞融合を行った。ハイブリドーマの選択にはHAT培地を用い、クローニングはマイクロピペットを用いて、単一細胞を単離することで行った。

#### 固定と免疫組織染色

観察に用いた胚はメタノール：酢酸(8:2)液もしくは100%メタノールで20分、その後、100%エタノール中で20分固定した。胚切片は、ポリエステルワックス(Steedman, 1957; BDH Chem., Poole, England)に包埋した後、4 μmで作製した。各切片はカバーガラスに貼り付けた後、脱ワックスを行いPBSで洗浄した



後、抗体反応を行った。ホールマウント胚は、固定後の胚をPBSで洗浄した後、抗体反応を行った。抗体反応は、0.1% blocking reagent (Boehringer Mannheim, Heidelberg, Germany)で1時間処理し、抗体を含む培養上清に移した。2次抗体にはBODIPY-FL conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)とFITC conjugated anti-mouse IgG (Cappel, North Carolina, USA)を用いた。封入は、切片での観察には90%グリセロールを用いて封入した。ホールマウント胚での観察にはサリチル酸メチルを用いて胚を透明化して封入した。また退色防止剤として1 mg/ml DABCO (1,4-diazabicyclo-[2.2.2] octane; Sigma)を用いた。

#### 顕微鏡観察

スクリーニングと胚切片の観察にはBSH-RFC落射蛍光顕微鏡(Olympus, Tokyo, Japan)と1X-FLA倒立型落射蛍光観察装置および1X70倒立型研究用顕微鏡(Olympus)を、ホールマウント胚を用いた観察にはリアルタイムレーザー共焦点顕微鏡INSIGHT (Meridian, Tokyo, Japan)を使用し、INSIGHT-IQソフトウェア (Meridian)を使用し、SFP (Simulated Fluorescence Process)による立体再構築を含む解析を行った。観察画像のプリントにはColor Video Printer UP-7100 (SONY, Tokyo, Japan.)を使用した。

#### 卵割阻害胚

阻害する時期に達した胚は、2  $\mu$ g/mlのサイトカラシン Bを含む海水中で処理した。この濃度では、胚は細胞質分裂が阻害され、核分裂は遂行する(Satoh and

Ikegami, 1981)。また卵割阻害処理は、同一バッチのコントロール胚が初期尾芽胚に達するまで継続的に行った。

#### 電気泳動とウエスタンブロット

Laemmli (1970)の方法に従い、初期、中期尾芽胚を50 mM EDTAを含む20 mMリン酸バッファー(pH 7.2)溶液中で超音波破碎したものを試料として用いた。これらにSDSを含むサンプルバッファー(0.0625 M Tris-Cl; pH 6.8, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.5  $\mu$ M PMSF, 2.3% SDS)を等量加え泳動した。泳動したタンパク質はニトロセルロースメンブレンに転写し、一次抗体にCiNot-1抗体を含む培養上清を、二次抗体にAlkaline phosphatase-goat anti-mouse IgG+A+M (H+L) (Zymed, San Francisco, CA, USA)を用いた。発色にはX-リン酸(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; Wako)とNBT(nitroblue tetrazolium; Wako)を用いた。

#### グリコペプチダーゼ F処理

グリコペプチダーゼ F処理には、初期、中期尾芽胚を50 mM EDTAを含む20 mMリン酸バッファー(pH 7.2)溶液中で超音波破碎したものを試料として用いた。グリコペプチダーゼ F (Wako)を加えた試料と加えない試料は、どちらも37℃で終夜処理した後、電気泳動とウエスタンブロットを行った。



### cDNAライブラリーの作製とクローンの単離

total RNAは卵巣からguanidin isothiocyanate法(March *et al.*, 1985)に従い作製した。Poly(A)+RNAの精製にはOligotex-dT30 beads (Japan Roche, Tokyo, Japan)を使用した。cDNAライブラリーはλ ZAP XR (Stratagene, La Jolla, CA, USA)発現ベクターで作製した。スクリーニングには抗体を含む培養上清を用いた。単離したcDNAはpBluescript KS+ (Stratagene)にクローン化し、以後の解析に用いた。塩基配列の決定にはdye primer cycle sequencing kit (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)と島津DNAシーケンサ(Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いた。

### 3.3 結果：ホヤ脊索細胞を認識するモノクローナル抗体の調製

#### 3.3.1 脊索細胞の系譜

ホヤ幼生の脊索細胞は40細胞からなり、幼生の尾部中央に一直列に並んでいる。その表面は脊索鞘(notochordal sheath)でおおわれている(Miyamoto, 1985)。脊索の背側には神経管があり、腹側には内胚葉索、そして、両側面には筋肉細胞がある。40個の脊索細胞のうち前側から32個の脊索細胞は、8細胞期の胚のA4.1割球対由来であり、後ろ側の8個の細胞はB4.1割球対由来である(Nishida and Satoh, 1985; Nishida, 1987)。A4.1割球対から生ずる子孫割球(細胞)はA系列の割球(細胞)と呼ばれ、B4.1割球対から生ずる子孫割球(細胞)はB系列の割球(細胞)と呼ばれる。A系列割球のうち16細胞期のA5.1とA5.2割球対、32細胞期のA6.2とA6.4割球対、64細胞期のA7.3とA7.7割球対が予定脊索割球である。64細胞期での4つの予定脊索細胞はすでに運命が限定されており、その後3回の卵割を経て32個の脊索細胞に分化する。一方、B系列では16細胞期のB5.1割球対から110細胞期のB8.6細胞までの一組の割球対が予定脊索細胞である。予定運命の限定は110細胞期に起こり、その後2回分裂し、最終的に幼生の時期には8個の脊索細胞に分化する。

#### 3.3.2 モノクローナル抗体CiNot-1は脊索細胞を認識する

本実験では、カタユレイボヤ幼生の各組織を認識するモノクローナル抗体を調製するべく、幼生を抗原としてハイブリドーマを調製し、免疫組織染色によりスクリーニングを行った。そのうちのひとつのハイブリドーマクローン



(1G9)は初期尾芽胚期において脊索細胞を強く認識する抗体を産生することがわかったので、その挙動を詳細に解析することにした。また、このクローンの産生する抗体が認識する抗原分子をCiNot-1と名づけた。CiNot-1抗体を用いた免疫組織染色の結果、CiNot-1は初期尾芽胚期から発現することがわかった(図3.1a)。初期尾芽胚では、CiNot-1抗体の染色は、脊索細胞と脊索鞘に見られた。しかし、幼生尾部の後端ではそれらの染色は見られなかった。中期尾芽胚以降は、脊索と脊索鞘に加えて、脳胞、神経管、内胚葉索や神経細胞にもCiNot-1抗体で染色される細胞が見られる。しかし脊索、脊索鞘、神経管と内胚葉索の染色は初期尾芽胚同様、尾部後端には見られなかった(図3.1b)。

CiNot-1抗体を用いたウエスタンブロットの結果、高分子量にスミアなバンドが検出された。このバンドは、グリコペプチダーゼF処理により分子量が若干低下することから、CiNot-1は、高分子量の糖タンパク質であると思われる。

### 3.3.3 CiNot-1抗体はA系列由来の脊索細胞だけを認識する

先に述べたように、ホヤ脊索細胞は前側から32個のA系列と後ろ側の8個のB系列の細胞群からなる。今回調製したモノクローナル抗体CiNot-1は、尾部の後ろ側の脊索細胞を認識しない。これは、細胞系譜の違いと一致しているのではないかと考えた。そこでまず、尾芽胚期でCiNot-1抗体によって染色される脊索細胞の数と染色されない脊索細胞の数を数え、細胞系譜との関連を調べることにした。

中期尾芽胚では、CiNot-1抗体によって染色される前側の脊索細胞の数は32個を超えることが無かった。一方、染色されない後ろ側の脊索細胞の数は8個を下回ることが無かった。これらの数はそれぞれ、A系列、B系列の脊索細胞

の数と一致している。初期尾芽胚期では、正確にその脊索細胞の数を数えることは困難であるが、5つ以上の後ろ側の脊索細胞が染色されない(図3.1a)。これらの結果から、CiNot-1は、A系列の脊索細胞にのみ発現していると推測される。

次に、卵割阻害胚を用いてCiNot-1と脊索細胞の細胞系譜との関係を調べた。卵割阻害胚は、阻害した時期の胚の形態を維持したまま、マーカー分子は正常胚での発現時期と同じ時期に発現することが知られている。本実験では、同一バッチのコントロール胚が初期尾芽胚に達した時点で卵割阻害処理を終え、同時に固定している。正常胚でのこの時期のCiNot-1抗体の染色は、脊索細胞と脊索鞘にのみ観察される(図3.1a)。つまり、卵割阻害胚で観察されたCiNot-1抗体の染色は正常胚において脊索特異的に発現するもののみを観察している。

32細胞期で卵割を阻害した胚では、動物極側の4個の割球でCiNot-1抗体の染色が見られたものが最も多かった(図3.1c)。CiNot-1抗体の染色が見られたこれらの割球は、その数と場所からA6.2とA6.4割球対であることがわかった。一方、B系列の予定脊索割球にはCiNot-1抗体の染色は見られなかった。また、同様の実験を8、16、64/76と110細胞期についても行ったが、CiNot-1抗体の染色はA系列の予定脊索割球にのみ見られ、B系列の予定脊索割球には見られなかった。

CiNot-1抗体によって染色される脊索細胞の数と染色されない脊索細胞の数を数えた結果と卵割阻害胚の結果から、CiNot-1は、脊索細胞ではA系列の細胞にのみ発現する分子であることがわかった。つまり、脊索細胞の細胞系譜の違いは、CiNot-1の発現の有無によって区別できる。



### 3.4 結果：ホヤ核タンパク質分子に対するモノクローナル抗体の調製

#### 3.4.1 卵割期の核タンパク質を抗原として用いた

##### モノクローナル抗体の調製

まず64細胞期から抽出した核タンパク質を抗原としてモノクローナル抗体を調製したところ、スクリーニングを行った357ウェル中、胚の核を認識している抗体が1クローンだけしか得られなかった(表3.1、No. 1)。この感作で核を認識する抗体を調製できる確率が低いのは、感作抗原に核タンパク質以外の分子が多すぎるためであると考えた。そこで、より効率よく抗体を調製するために、免疫寛容法を利用し、これら共通に存在する分子に対する抗体の産生を抑制することにした。

#### 3.4.2 免疫寛容

マウスへの感作の方法を表3.1に示す。まず、未受精卵から抽出した核タンパク質を用いて合計3回の免疫寛容を行い、その後64細胞期胚から抽出した核タンパク質で免疫感作を行った(表3.1、No. 2)。スクリーニングを行った273ウェル中、64細胞期胚の核と細胞質を認識している抗体を産生するクローンが5クローン得られた。64細胞期胚の核とテスト細胞を認識している抗体を産生するクローンが2クローン得られた。そして、64細胞期胚の核と細胞質とテスト細胞を認識している抗体を産生するクローンが9クローン得られた。しかし、どれも抗体価は低かった。そこで、マウスへの感作の効果を高めて抗体価の高い抗体を調製するために感作方法を腹腔内への注射から尾部静脈への注射に変更

し胚の核のみを認識する抗体を調製しようと試みた(表3.1、No.3, No.4, No.5)。

64細胞期の核タンパク質抗原の投与回数をNo. 2と同じにし、最後の抗原を尾部静脈に投与しハイブリドーマを調製した。225ウェルに対してスクリーニングを行った結果、胚の核と細胞質とテスト細胞を認識する抗体を3クローン、胚の核を主に認識するモノクローナル抗体を2クローン調製することができた(表3.1、No. 3)。しかし、これらの抗体はいずれも抗体価が低かったため、以後の解析を行わなかった。そこで、抗体価の高い抗体を産生すべく、効果の見られた尾部静脈への投与についてその投与の回数を増やした(表3.1、No. 4, No. 5)。その結果、腹腔内への投与回数を同じにし、尾部静脈への投与回数を倍にしたものは、産生できた胚の核を認識している抗体の数はNo. 3の時よりも減少してしまった。しかし、免疫組織染色で核と細胞質とテスト細胞を認識し、核内の染色が明確な抗体を1クローン産生することができた。また64細胞期胚の核タンパク質抗原の投与をすべて尾部静脈に行ったNo. 5は、今回行った細胞融合において最も多くの胚の核を認識する抗体を調製することができた。スクリーニングの結果、No. 5ではスクリーニングを行った479ウェル中、胚の核を主に認識する抗体を産生しているクローンを1クローン得られた。64細胞期胚の核と細胞質を認識している抗体を産生するクローンが2クローン得られた。64細胞期胚の核とテスト細胞を認識している抗体を産生するクローンが3クローン得られた。そして、64細胞期胚の核と細胞質とテスト細胞を認識している抗体を産生するクローンが13クローン得られた。そのうち、10クロンの64細胞期胚の核と細胞質とテスト細胞を認識している抗体は抗体価が高く、免疫組織染色で反応性が核内であること明確に識別できた。

本実験の結果、初期発生過程の特定の割球の核を認識している抗体は得られなかったが、64細胞期胚の核と細胞質とテスト細胞を認識し、胚の核内を明確



に染色する12クローンの抗体が得られた。これらのモノクローナル抗体は、ホヤ胚初期発生における核タンパク質の挙動を解析できるものであると考え、これらの抗体の認識する抗原分子の特質を詳細に解析した。

### 3.4.3 モノクローナル抗体Nup-1,-2, -3, -4と-5はホヤ胚の核を認識する

今回調製したハイブリドーマの産生する、胚の核を認識し、抗体価の高い12のモノクローナル抗体は、免疫組織染色とウエスタンブロットによる解析結果から、5種類のエピトープ(抗原決定基)を認識していることがわかった。そこで、各抗体の認識するエピトープをそれぞれNup-1, -2, -3, -4および-5と名づけ、以下の解析を行った。また、各エピトープを認識した複数の抗体は、免疫組織染色とウエスタンブロットの結果が同様に区別が付かなかったので、同一の抗体として扱った。

Nup-1: 尾芽胚期ではNup-1抗体は胚全体の核内で比較的大きな顆粒様の構造を認識していた(図3.2c, 矢印)。また、Nup-1抗体は細胞質領域にも染色が見られ、特に細胞境界に強い染色が見られた(図3.2c)。テスト細胞にもNup-1抗体による染色が見られた(図3.2c)。卵巣では卵核胞内の核小体に非常に薄い染色が見られ(図3.2a, 矢頭)、ろ胞細胞やテスト細胞にも染色が見られた(図3.2a)。卵割期では、Nup-1抗体は尾芽胚期と同様に比較的大きな顆粒様の核内構造を認識した(図3.2b, 矢印)。また尾芽胚期と同様、細胞境界に強い染色が見られた(図3.2b)。卵割期もNup-1抗体はテスト細胞内の分子を認識していた。

以上から、Nup-1は初期発生において顆粒様の分子にみられ、核内と細胞境界に多く存在する分子に存在するエピトープであることがわかった。また、ウエスタンブロットの結果からNup-1は100 kDaから25 kDaまでの中程度の分子量

の分子に存在するエピトープであった(図3.2m, lane 1)。

Nup-2: 尾芽胚期ではNup-2抗体は胚全体の核内で繊維状の構造を認識していた(図3.2f, 矢印)。卵巣では卵核胞中の核小体に染色が見られ(図3.2d, 矢頭)、ろ胞細胞やテスト細胞にも染色が見られた(図3.2d)。卵割期では、核膜付近にNup-2抗体による染色が見られた(図3.2e, 矢印)。また、細胞質領域にNup-2抗体による薄い染色が見られ、テスト細胞にも染色がみられた(図3.2e)。次に、Nup-2分子の胚全体での挙動を調べるために、64細胞期胚を用いてホールマウント染色を行った。その結果、この抗体はこの時期のすべての割球の核を認識していることがわかった(図3.2i, 矢印)。また、分裂期の割球では中心体周辺部および、二つの中心体の中間(染色体が存在すると思われる位置)にも染色がみられた(図3.2i, 矢頭)。

以上から、Nup-2は初期発生において繊維状の構造として核膜の周辺に多く存在し、分裂期には中心体周辺とその2つの中心体の中間に存在している構造のエピトープであることがわかった。ウエスタンブロットの結果、Nup-2抗体は少なくとも74kと37kの2本のバンドを認識していた(図3.2m, lane 2)。

Nup-3: 尾芽胚期では核膜周辺にNup-3抗体による弱い染色がみられ、細胞質とテスト細胞にも抗体の染色が見られた。卵巣では、卵核胞内にNup-3抗体による強い染色が見られた(図3.2g, 矢印)。卵核胞中の核小体にはNup-3抗体による染色は見られなかった(図3.2g, 矢頭)。Nup-3抗体による染色は卵巣の細胞質中とテスト細胞にも見られるが、卵核胞内の染色と比較して明らかに弱い染色であった(図3.2g)。卵割期では、Nup-3抗体は核膜周辺の繊維状の分子を認識し(図3.2h, 矢印)、細胞質領域にもNup-3抗体による強い染色が見られた(図3.2h)。また、テスト細胞にもNup-3抗体による薄い染色が見られた(図3.2h)。

以上から、Nup-3は卵巣の卵核胞で多く存在し、初期発生過程の胚にはあま



り存在していない分子のエピトープであることがわかった。ウエスタンブロットの結果から、Nup-3抗体は170 kDa以上の高分子量の分子、22 kDaの分子と21 kDaの分子を認識していた(図3.2m, lane 3)。

Nup-4: Nup-4抗体は、尾芽胚期と卵割期の核内構造を認識していた(図3.2k, l, 矢印)。Nup-4抗体による核内の染色性は、核ごとに差異があり、染色度の弱い核での染色パターンはNup-2抗体のそれと非常によく似ており、繊維状の構造を染色していた。しかし分裂中期の割球では、中心体周辺部および二つの中心体の中間の染色が、非常に薄い、あるいは認められず、Nup2抗体による染色とは、パターン、染色度共に異なっている(図3.2k)。また卵巣中では、Nup-4抗体の染色は、細胞質とテスト細胞に比較的強い染色が見られ(図3.2j)、卵核胞と核小体には比較的弱い染色が見られた(図3.2j, 矢印, 矢頭)。

以上から、Nup-4は初期発生において繊維状構造を認識している。ウエスタンブロットの結果、Nup-4エピトープを持つ分子は80 kDaより高分子量のバンドと27 kDaのバンドとして検出された(図3.2m, lane 4)。今回得られたハイブリドーマの産生する抗体のうち6個が免疫組織染色の結果とウエスタンブロットの結果がほぼ同一であった。

Nup-5: 今回得られたハイブリドーマの産生する抗体のうち3つの抗体はNup-5エピトープを認識していた。これらの抗体の免疫組織染色でのパターンはNup-4と同じであった。しかし、ウエスタンブロットの結果、Nup-5抗体は、Nup-4のバンドパターンとは異なる100 kDa以上の高分子量のバンドと21 kDaのバンドを認識していたため、Nup-5はNup-4とは異なるエピトープであると考え(図3.2m, lane 5)。

#### 3.4.4 Nup-4抗体はカタユレイボヤのポリユビキチンを認識している

次に前出のNup-4抗体のひとつである15H2抗体を用いてNup-4エピトープをもつ抗原分子をコードしている遺伝子を単離した。

λ ZAP XRにより作製したカタユレイボヤ未受精卵cDNAライブラリーから15H2抗体を用いてスクリーニングを行った。その結果、約360,000コロニーのクローンから190個の陽性クローンが得られた。これらのクローンはインサートの長さで2種類に区別できた。この2種類のインサート長のクローンからそれぞれ3クローンずつを用いて塩基配列を決定したところ、各3クローンは同一クローンであった。そこで、得られた2クローンについて解析することにした。

インサート長の長いクローンは1つのopen reading frame (ORF)を含む全長723 bpの断片であった。また、インサート長の短いクローンも1つのORFを含む全長462 bpの塩基配列をコードしていた(図3.3)。さらにこのクローンと相同性の高い分子を検索したところ、どちらのクローンも既知のユビキチンタンパク質と相同性が高かった。また、アミノ酸レベルでは様々な生物と90%以上の高い相同性があることがわかった。さらにインサート長の長いクローンはユビキチンタンパク質を3つタンデムに連結したかたちでコードしていた。一方、インサート長の短いクローンはユビキチンタンパク質を2つタンデムに連結したかたちでコードしていることがわかった(図3.3, 下線部分)。このことから、今回単離された遺伝子はカタユレイボヤのポリユビキチン遺伝子であることがわかった。そこでこれらの遺伝子をそれぞれインサート長の長いクローンを*Ci-Ubi1*、インサート長の短いクローンを*Ci-Ubi2*と名づけた。

ウエスタンブロットにおいても他種の動物のユビキチンタンパク質は8.5 kDa



であるのに対してNup-4抗体が認識するバンドは27 kDa、130 kDaと高分子量のスメアなバンドである(図3.2m, lane 4)。このことから、Nup-4抗体はマルチユビキチン化されたタンパク質分子を認識していると考えられる。

### 3.5 考察

#### 3.5.1 CiNot-1抗体

今回調製したモノクローナル抗体CiNot-1は、初期尾芽胚期では脊索マーカーとして利用できる。さらにCiNot-1は、形態的に均一なA系列とB系列の脊索細胞をその染色の有無によって明確に区別できるマーカーとしても利用できる。脊索細胞がA系列とB系列とで異なる分子を発現しているという結果は、ホヤのアルカリフォスファターゼが後ろ側の脊索細胞にのみ発現するという結果を支持するものである(Whittaker, 1977; 1990; Bates and Jeffery, 1987)。CiNot-1とアルカリフォスファターゼの結果はA系列の脊索細胞とB系列の脊索細胞が、それぞれ別の役割を持っている可能性を示唆する。しかし、CiNot-1もアルカリフォスファターゼも、脊索細胞での役割は今のところ不明である。これらの分子の役割は非常に興味深いものである。

#### 3.5.2 Nup-1, 2, 3, 4および5抗体

分化の引き金を引く因子は、卵割期には各因子が引き金を引くべき割球に分配され、分化決定の起こる時期に細胞質から核内に移行する。このような分子は卵内に極微量にしか存在しないことが推測され、単離は非常に困難であろうと想像される。モノクローナル抗体法は、微量にしか存在しない分子を認識する抗体も、スクリーニング次第で調製することが可能であり、非常に有効な手段である。今回、微量にしか存在しない分子に対してさらに効率よくモノクローナル抗体を調製するべく、免疫寛容法を利用した。胚の核のうち、特定組織



あるいは時期のみを認識する抗体を調製するためには、さらなる改良が必要である。しかし、免疫寛容の効果により核内の分子を免疫組織染色で明確に染色できる抗体を12個調製することができた。

Nup-4抗体の認識しているエピトープを持つ抗原分子は、cDNAクローン単離の結果、ユビキチンであることがわかった。また、cDNAライブラリーからの抗体スクリーニングの結果、得られたクローンはどれもポリユビキチンをコードするものであったことから、Nup-4はカタユレイボヤ、ポリユビキチンのみが持つエピトープを認識しており、モノユビキチンは認識しないものと考えられる。またNup-4抗体により、マルチユビキチン化タンパク質の初期発生における卵内の挙動を明らかにすることができた。ユビキチンは多くの生物で普遍的に存在している分子である。しかしユビキチン化されたタンパク質を分解することが知られているプロテアソームの多用な機能を考えあわせると(例えば、Omura *et al.*, 1991)、ホヤ卵内において、マルチユビキチン化タンパク質の挙動を調べることで細胞分化に関わる新たな知見を得られることも期待される。

また、Nup-3抗体は特に卵巣の卵核胞をよく認識している。ホヤ卵巣の卵核胞には表皮細胞分化決定因子が含まれていることが示唆されており(Jeffery and Capco, 1978)、この抗原分子が、表皮細胞分化メカニズムに関与する可能性もある。しかし、Nup-4とNup-3エピトープを持つ核タンパク質の機能の解析にはさらに多くの実験が必要である。

ところで、現在ホヤ核内に存在する分子で解析されているものは非常に少ない。これまでホヤで単離されている分子はシロボヤのヒストンH3とH4 (Ishaq *et al.*, 1993)、マボヤのHgv2 (Fujiwara and Satoh, 1990; Fujiwara *et al.*, 1993)のみである。今回解析した核タンパク質分子は、ホヤ胚における核内分子の挙動を知る有効な情報となり得る。

### 3.5.3 分化マーカーと分化調節因子

分化の引き金を引く因子は、分化の開始される直前に細胞質から核内に移行し、分化の引き金を引く。この因子は、おそらくゲノム中の組織分化のマスター遺伝子の調節領域に結合し、マスター遺伝子の発現を開始させる。また、このマスター遺伝子は分化カスケード下流の遺伝子の転写を調節する。それによって発現した分子はさらに下流の分子の発現を調節する。そして、最終的に多くの組織特異的な構造タンパク質を発現していく。つまり、分化調節因子の解析を進めれば、必ず分化マーカーとなる組織特異的に発現する構造タンパク質の発現にたどり着く。また逆に、分化マーカーの発現メカニズムを解明しようとした場合、その上流で働く分子の解析が必要となる。その上流の分子の発現を調節している分子を解析していくと、最終的には必ず分化調節因子にたどり着くだろう。分化メカニズムの解析のためには、そのどちらの特質も理解すべきであり、両方向からのアプローチは分化メカニズムの1つである分化カスケードの解明のための有効な手段であると考えられる。



## 第4章 ユレイボヤ胚組織特異的遺伝子の 単離と解析

### 4.1 緒言

分化の引き金を引かれた各割球は、ゲノム中の特定の遺伝情報の差次的発現により組織を特徴づけるタンパク質をコードするmRNAを転写させる。そして、組織特異的構造タンパク質を翻訳し、特異的な構造を持つようになる。前述のように、モノクローナル抗体によって認識される構造タンパク質マーカーは各割球がどの組織に分化したのかを分子的に解析することのできる有効な道具であり、ホヤにおいても有効に利用されている。また、割球間で差次的に発現するmRNAもマーカーとして分化メカニズムの解析に広く活用されている(第2章2.9参照)。一方、ホヤ幼生を構成しているすべての組織に対して組織特異的マーカーが単離されていれば、すべての組織の分化メカニズムを解析できる。それだけでなく、分化メカニズムの解析手段の幅を大きく広げることができる。例えば、割球の予定運命を変更するような実験を行ったとき、その変更後の運命が何であったのかを分子的な視野で検証できる(第2章2.9参照)。

第3章でも述べたが、多くの組織に対するマーカー分子を一度に得ようとする場合、モノクローナル抗体法は、粗製抗原からスクリーニングを行うことによつて的確に単離できるので大変有効な方法である。一方、マーカー遺伝子を単離する方法も、ライブラリーからクローンを単離することで、単一の分子に対するマーカーを一度に多数単離することが可能である。第4章では、この手法を用いて多くの組織特異的マーカー遺伝子を単離した。そのうち筋肉細胞特異的遺伝子2クローン、表皮細胞特異的遺伝子2クローンについて詳細に解析を行った。これらの遺伝子はマーカーとして利用できるばかりでなく、ホヤ分化メカニズムに新たな知見をもたらすことができた。



## 4.2 材料と方法

### ホヤとホヤ胚

ユウレイボヤは、東京大学海洋研究所附属大槌臨海研究センターの湾内にて採集した。成体は常明で卵成熟させた。卵は成体の輸卵管から直接採取し、ミリポアフィルター海水で洗い、輸精管から採取した精子を媒精した。受精卵は50 µg/ml ストレプトマイシンを含むミリポアフィルター海水中で16℃で発生させた。この温度下で受精卵は約1時間後に第一卵割が起こり、幼生の孵化は約20時間後に起こる。

### RNAの単離とcDNAライブラリーの作製

total RNAは受精卵と尾芽胚からacid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform法(Chomczynski and Sacchi, 1987)に従い作製した。ポリA RNAの精製にはOligotex-dT30 beads (Japan Roche)を使用した。受精卵cDNAライブラリー(FE-ライブラリー)と尾芽胚期ライブラリー(TB-ライブラリー)はZAP-cDNA synthesis kit (Stratagene)を用いてUniZAP XR発現ベクターで作製した。TB-ライブラリーからFE-ライブラリーを引いた尾芽胚期特異的cDNAサブトラクテッドライブラリー(TB-FE ライブラリー)の作製は、Satou and Satoh (1997)の方法に従って作製した。

### サブトラクテッドライブラリーのスクリーニングと塩基配列の決定

スクリーニングにあたり、まずランダムに選択した100個のクローンについてポリA側から部分的な塩基配列を決定した。塩基配列から、重複したクローンを除き、残ったクローンについてdigoxigenin標識されたアンチセンスRNAプローブを用いてホールマウント*in situ*ハイブリダイゼーションを行い、組織特異的に発現しているクローンを選択した。試料には尾芽胚と原腸胚を用いた。

塩基配列の決定には、dye primer cycle sequencing FS ready reaction kitとABI PRISM 377 DNA sequencer (Perkin Elmer)を用いた。

### ノザンプロットハイブリダイゼーション

ポリA RNAの調整は前述の方法と同様に行った(RNAの単離とcDNAライブラリーの作製参照)。制限酵素により断片化したRNA約1.5 µg をアガロースゲルにて泳動し、Hybond-N(+)メンブレン(Amersham, Buckinghamshire, UK)に転写した。<sup>32</sup>PでランダムにラベルしたDNAプローブを40℃条件下で16時間、6 x SSPE, 0.5% SDS, 5 x Denhardt's solution, 100 µg/ml salmon sperm DNAと50% formamideを含む溶液中でメンブレンと反応させた。反応後2 x SSC, 0.1% SDS溶液と0.2 x SSC, 0.1% SDS溶液中で60℃条件下で各2回ずつ洗い、X線フィルムに感光した。

### ホールマウント*in situ* ハイブリダイゼーション

RNAプローブはDIG RNA labeling kit (Boehringer Mannheim)を用いて作製した。方法はSatou and Satoh (1997)の方法に従った。ネガティブコントロールと



してセンスプローブも同様に作製し、そのシグナルはどのセンスプローブの場合もバックグラウンドレベルであることを確認している。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 組織特異的に発現する遺伝子の単離

今回作製したTB-FE ライブラリーは約90,000クローンを含んでいる。そのうち無作為に選択した100クローンについて、ポリA側の部分的な塩基配列を決定した。これまでに何らかの形ですでに解析の行われているエロンゲーションファクター、 $\beta$ チューブリンおよび細胞骨格アクチンをコードしていたクローンについては以後の解析をとりやめた。また重複していた6種類のクローンに関しては、1クローンのみの解析を行うことにした。こうして選ばれた90クローンについて尾芽胚期と原腸胚期の胚を用いて、*in situ*ハイブリダイゼーションにより組織特異的に発現する遺伝子を含むクローンを選択した。その結果表4.1の様に、尾芽胚期において筋肉細胞で特異的に発現するクローンを2クローン、表皮細胞で特異的に発現するクローンを9クローン単離した。さらに間充織細胞で特異的に発現するクローンを4クローン、脳・神経索(神経系)細胞で特異的に発現するクローンを2クローン、脊索細胞で特異的に発現するクローンを3クローンを単離した。それらのうち、まず表皮細胞で特異的に発現するクローンおよび、筋肉細胞で特異的に発現するクローン(それぞれ*CsEpi-1*と*CsEpi-2*および、*CsMA-1*と*CsMu-1*)の解析を行った。それらの結果を以下に記す。

#### 4.3.2 *CsEpi-1*

まず、*CsEpi-1*の塩基配列を決定した。*CsEpi-1*は741アミノ酸をコードする1



つのopen reading frame (ORF)を含み全長2653 bpであった(図4.1)。またC末端側に2つのポリA付加シグナルを含んでいた。*CsEpi-1* のアンチセンスプローブを用いたノザンプロットの結果、1細胞期ではシグナルは検出されず、尾芽胚期の約3 kbの転写産物が検出された。つまり、*CsEpi-1* はzygoticに発現する遺伝子である(図4.2a)。また、この転写産物の長さは、今回単離したクローンの長さとはほぼ一致することから、今回単離したクローンは転写産物の全長を含むものであると考えた。

次に塩基配列から*CsEpi-1*のアミノ酸配列を予測したところ、C末側にP-type trefoil domainが3つ見つかった(図4.1)。そこで、ヒト(Podolsky *et al.*, 1993 and Jakowlew *et al.*, 1984)、ブタ(Tomasetto *et al.*, 1990)、アフリカツメガエル(Hoffmann, 1988 and Hauser *et al.*, 1992)で単離されているtrefoil proteinファミリー、およびそれらに見られるコンセンサス配列(Hoffmann and Hauser, 1993)と*CsEpi-1*のアミノ酸配列とを比較した(図4.3a)。ところで、P-type trefoil domainは6つのシステイン残基がジスルフィド結合により、3つのループを形成することがわかっている(図4.3b; Thim, 1989)。この6つシステイン残基は*CsEpi-1*でもほぼ同じ位置で存在していた(図4.3a)。また、他のtrefoil proteinファミリーで保存されているアミノ酸残基の多くも*CsEpi-1*で保存されていた。

ホールマウント*in situ* ハイブリダイゼーションの結果、*CsEpi-1*のシグナルは、原腸胚期では検出されず、最初のシグナルの検出は神経胚期からであった(図4.4a, b)。神経胚期では*CsEpi-1*のシグナルは表皮細胞にのみ検出され(図4.4b)、尾芽胚期でのシグナルも表皮で強く見られた(図4.4c)。表皮での強いシグナルは、内部の様子を観察しにくくさせるので、*in situ*ハイブリダイゼーションを尾芽胚期の切片で行った。その結果、*CsEpi-1*のシグナルは表皮特異的であり、他の組織には検出されないことが明かとなった(図4.4d)。また、*CsEpi-*

*1*のプローブは、カタユウレイボヤ胚を用いた*in situ*ハイブリダイゼーションでも尾芽胚期で表皮細胞に特異的なシグナルを示した(図4.5a)。

#### 4.3.3 *CsEpi-2*

*CsEpi-2*の塩基配列を決定したところ、C末端側にポリA付加シグナルを1つ含む、ORFを持たない全長1618 bpの配列であった(図4.6)。*CsEpi-1* のアンチセンスプローブを用いたノザンプロットの結果、1細胞期ではシグナルは検出されず、尾芽胚期の約1.7 kbの転写産物が検出された。つまり、*CsEpi-2* はzygoticに発現する遺伝子である(図4.2b)。また、この転写産物の長さは、今回単離したクローンの長さとはほぼ一致することから、今回単離したクローンは転写産物の全長を含むものであると考えた。

ホールマウント*in situ* ハイブリダイゼーションの結果、*CsEpi-2*の最初のシグナルが検出されるのは8細胞期からであった。また8細胞期でのシグナルは、その割球の子孫細胞のほとんどが表皮細胞に分化する動物極側のa4.2とb4.2割球対でのみ検出されており、将来表皮細胞に分化しない植物極側のA4.1とB4.1割球対には*CsEpi-2*のシグナルは検出されなかった(図4.7a)。原腸胚期では、そのシグナルはすべての予定表皮割球に検出され、それ以外の割球には検出されなかった(図4.7b)。尾芽胚期では、分化した表皮細胞を特異的に認識していた(図4.7c)。また、*in situ*ハイブリダイゼーションを尾芽胚期の切片で行った結果、*CsEpi-2*のシグナルは表皮特異的であり、他の組織には検出されなかった(図4.7d)。カタユウレイボヤ胚での*in situ*ハイブリダイゼーションではシグナルは検出されなかった。

また、*CsEpi-2*はその塩基配列中に十分な長さのORFが見られず、その機能がタンパク質としてではなくRNAにあるのではないかと考えた。そこで、Mfold



(ver. 2.3; Zuker, 1989; Zuker and Jacobson, 1995)という核酸の二次構造予測プログラムを使用して、塩基配列をもとにRNAの二次構造を予測した。その結果を図4.13aに示すが、何らかの機能を示唆するような特徴的な構造は見いだされなかった。

#### 4.3.4 CsMA-1

このクローンは以下に報告する解析の結果、ユウレイボヤ筋肉アクチンであることがわかったので、マボヤ筋肉アクチン遺伝子の名称にならってCsMA-1と名づけた。まず、CsMA-1の塩基配列を決定した。CsMA-1は、378アミノ酸をコードする1つのORFを含み、全長1300 bpであった(図4.8)。またC末端側に1つのポリA付加シグナルを含んでいた。CsMA-1のアンチセンスプローブを用いたノザンプロットの結果、1細胞期ではシグナルは検出されず、尾芽胚期で約1.3 kbの転写産物が検出された。つまり、CsMA-1はzygoticに発現する遺伝子である(図4.2c)。また、この転写産物の長さは、今回単離したクローンの長さとはほぼ一致することから、今回単離したクローンは転写産物の全長を含むものであると考えた。また、CsMA-1はアミノ酸レベルでホヤの筋肉アクチン遺伝子と高い相同性が見られた。

ところでは乳類では、アクチンのアミノ酸配列上特定の位置のアミノ酸の使い方によって骨格筋アクチンと細胞骨格アクチンを区別することができる(Vandekerckhove and Weber, 1978; 1979)。また、Kusakabe *et al.* (1991)、Araki *et al.* (1996)とKovilur *et al.* (1993)は、これらの位置のアミノ酸を比較することでホヤの筋肉アクチンと細胞骨格アクチンを区別できることを示している。そこでCsMA-1がどちらのタイプのアミノ酸をコードしているのかを既知のホヤ筋肉

アクチン(ScTB12 (エボヤ); Beach and Jeffery 1992, HrMA2/4 (マボヤ); Kusakabe *et al.*, 1991, SpMA1 (シロボヤ); Kovilur *et al.*, 1993)と細胞骨格アクチン(HrCA1 (マボヤ); Araki *et al.*, 1993, CsCA1 (ユウレイボヤ); Satou, 私信)と比較した。その結果、CsMA-1では19アミノ酸のうち15アミノ酸は筋肉アクチン型のアミノ酸だったので、筋肉型アクチンとした(図4.9)。

ホールマウント*in situ* ハイブリダイゼーションの結果、CsMA-1の最初のシグナルの検出は64細胞期からであった(図4.10a)。64細胞期でのシグナルは非常に弱い。B7.4割球対とB7.8割球対の2つの予定筋肉割球対にのみ検出された(図4.10a矢印)。原腸胚期では、CsMA-1のシグナルは予定筋肉割球にのみ検出された(図4.10b)。神経胚期では、CsMA-1のシグナルは筋肉細胞にのみ検出され(図4.10c)、尾芽胚期でのシグナルも筋肉細胞で強く見られた(図4.10d)。また、CsMA-1のプローブは、カタユウレイボヤ胚を用いた*in situ* ハイブリダイゼーションでも尾芽胚期で筋肉細胞に特異的なシグナルを示した(図4.5b)。

*in situ* ハイブリダイゼーションの結果とアミノ酸配列から、今回単離したCsMA-1はユウレイボヤの筋肉アクチンであることがわかった。

#### 4.3.5 CsMu-1

CsMu-1の塩基配列を決定したところ、C末端側にポリA付加シグナルを1つ含む、ORFを持たない全長1364 bpの配列であった(図4.11)。CsMu-1のアンチセンスプローブを用いたノザンプロットの結果、1細胞期ではシグナルは検出されず、尾芽胚期の約1.4 kbの転写産物が検出された。つまり、CsMu-1はzygoticに発現する遺伝子である(図4.2d)。また、この転写産物の長さは、今回単離したクローンの長さとはほぼ一致することから、今回単離したクローンは転写産物の



全長を含むものであると考えた。

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、*CsMu-1* のシグナルは、64細胞期では検出されず(図4.12a)、最初のシグナルの検出は原腸胚期からで、植物極側の2つの割球対であった(図4.12b, 矢印)。神経胚期では *CsMu-1* のシグナルは筋肉細胞にのみ検出され(図4.12c)、尾芽胚期でのシグナルも筋肉細胞で強く見られた(図4.12d)。また、*CsMu-1* のプローブはカタユレイボヤ胚を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションでも、弱いながらも、尾芽胚期で筋肉細胞に特異的なシグナルを示した(図4.5c)。

*CsMu-1* もその塩基配列中に十分な長さのORFが見られないので、*CsEpi-2* と同様にRNAの二次構造を予測した。その結果を図4.13bに示すが、*CsMu-1* も何らかの機能を示唆するような特徴的な構造は見いだされなかった。

#### 4.4 考察

本研究では、組織特異的に発現するマーカー遺伝子をすべての組織に対してできるだけ多くの単離することを目指した。そのために、尾芽胚期から1細胞期のmRNAを引いたサブトラクテッドライブラリーを作製し、その中から、無作為に100クローンを抽出して解析した。この中でエロンゲーションファクターや、細胞骨格アクチンなど、ホヤにおいて組織特異的に発現しないことがわかっているクローンは、3クローンしか単離されなかった。この結果は、サブトラクトを行わなかったライブラリーから無作為に選択した場合に比べ、格段に少ない(Y. Sasakura and K.W. Makabe, 私信; Y. Satou, 私信)。また、今回ノザンプロット解析を行った4クローンすべてにおいて、1細胞期でのシグナルは見られなかった。これは今回作製したサブトラクテッドライブラリーが、1細胞期で発現しているRNAをうまく取り除くことができたものであることを示している。

今回の解析では、尾芽胚期において筋肉細胞を特異的に認識するクローンを2クローン、表皮細胞を特異的に認識するクローンを9クローン単離した。また、間充織細胞を特異的に認識するクローンを4クローン、脳・神経索(神経系)細胞を特異的に認識するクローンを2クローン、脊索細胞を特異的に認識するクローンを3クローン一挙に単離することができた。これまで組織特異的に発現する遺伝子を単離する主な方法は、ひとつひとつの組織について他の生物で組織特異的に発現する遺伝子のホモログを単離していくというものであった。今回の様にサブトラクテッドライブラリーを作製し、そこから無作為に1つずつ解析する方法は一見無駄の多い方法のように思われる。しかし、これまでの方法に比べ短時間に多くの組織特異的マーカーを得ることができ、はるかに効率的であることがわかった。今回は、詳細に解析のできた表皮細胞と筋



肉細胞の4つのマーカー遺伝子の解析結果のみを報告したが、他の組織のマーカー遺伝子も現在解析中である。

CsEpi-1は、そのアミノ酸配列からホヤのtrefoil proteinファミリーであることがわかった。trefoil proteinファミリーは現在までに脊椎動物でしか単離されておらず、CsEpi-1は無脊椎動物ではじめて単離された遺伝子である。ただ、最近群体性のホヤであるミサキマメイタボヤからもtrefoil proteinファミリーが単離されているようである(K. Kawamura, 私信)。ところで、このtrefoil proteinファミリーのうち、アフリカツメガエルから単離されているxP2はその表皮に分泌されている粘素と呼ばれる物質を構成しているもののひとつであることが報告されている(Hauser *et al.*, 1992)。一方ホヤ遊泳幼生や幼若体も、表皮から粘液状の物質を分泌しており、ホヤにおいてもCsEpi-1タンパク質がこの粘液状の物質を構成している可能性が考えられる。この疑問の解決には抗体の調製等、タンパク質レベルでの解析が必要である。

CsEpi-2の最初の発現は8細胞期である。これは、表皮細胞で最も早いzygotic遺伝子の発現であるだけでなく、現在まで知られているホヤのどの組織特異的に発現するzygotic遺伝子よりも早い発現である。8細胞期の動物極側の2つの細胞は予定表皮細胞であるが、その運命は限定されておらず、一部の脳、神経索、筋肉細胞の予定運命を含んでおり、表皮の予定運命の限定される最初のステージは、16細胞期のb5.3割球対である(Nishida, 1987)。しかし、ホヤにおいて運命が限定される以前に組織特異的遺伝子の発現が始まることは珍しいことではない。例えば、マボヤの筋肉アクチンであるHrMA4の発現は運命が限定される64細胞期よりも早い32細胞期から始まる(Satou *et al.*, 1995)。CsEpi-2の結果は、ホヤ表皮細胞分化が8細胞期で既に始まっていることを示している。

CsMA-1は、ユウレイボヤではじめて単離された筋肉アクチン遺伝子であ

る。ホヤの筋肉アクチン遺伝子はマボヤ、エボヤ、シロボヤ、モルグラ オカルタ、モルグラ オキュラータで単離されている。また、マボヤからは8種類、エボヤからは4種類単離されている(Review: Chiba and Nishikata, 1998参照)。しかし、それぞれの種で単離された筋肉アクチンが他の種のどの筋肉アクチンと対応しているのかは不明なものが多い。今回単離したCsMA-1は、ホヤで単離されたどの筋肉アクチンともアミノ酸レベルで非常に高い相同性を示したが、その中でも特にエボヤのScTB12と最も相同性が高く、次いでマボヤのHrMA-4と相同性が高かった。しかし、これらの遺伝子がCsMA-1のオーソログかどうかは、遺伝子座の決定を待たなければならないだろう。ところで、HrMA4の最初の発現は32細胞期であり(Satou *et al.*, 1995)、ScTB12は原腸胚期からその発現が開始される(Beach and Jeffery, 1992)。今回単離したCsMA-1は64細胞期から発現が開始されることがわかった。つまり、ホヤの筋肉アクチンの発現時期は種によって異なっている。これが種間の違いによるのか、遺伝子の違いによるのかは不明である。この問題は大変興味深い問題であり、種間での各筋肉アクチンの対応づけは今後重要な課題である。

CsEpi-2とCsMu-1は、それぞれのクローンについてインサート長の異なる複数のクローンでその全長の塩基配列を決定した。しかし、いずれのクローンにも十分な長さのORFが見られず、タンパク質に翻訳されているとは考えにくい。しかし、それらのクローンの塩基配列中にはポリA 付加シグナルが含まれている。また、ノザンブロット解析でも尾芽胚期でこれらのmRNAが確実に発現していることが示され、CsEpi-2とCsMu-1のmRNAが転写されていることは明らかである。そこで、これらのクローンがmRNAとして機能しているのではないかと考え、二次構造を予測したが何らかの機能を示唆するような特徴的な構造は見いだされなかった。CsEpi-2とCsMu-1がどのような役割を果たしてい







## 5.1 緒言

マイオプラズムは、受精後2回の卵細胞質再配置を経て新月環と呼ばれる領域を形成し、その後予定筋肉割球に正確に分配されていく(Conklin, 1905a)。そのマイオプラズムの領域には、筋肉分化を積極的におし進める筋肉細胞分化決定因子が存在することが示されている(Nishida, 1992)。しかし、決定因子の分子の実体は現在のところまだわかっていない。

勿論その決定因子の機能は、細胞分化に重要であるが、もうひとつ、その決定因子を適切な細胞に運び、そこでの確な時期に機能できるようにする、決定因子分配メカニズムも、ホヤ細胞分化に必要不可欠だと考えられる。ホヤ卵では卵細胞質再配置という、受精直後から第一卵割までの間の細胞質のダイナミックな移動が知られている。特に、マイオプラズムの挙動は詳しく解析されており、複雑であるが再現性のある動きをすることがわかっている。マイオプラズムは、未受精卵の時期には、動物極以外の卵表層に局在している。受精後すぐに、1回目の卵細胞質再配置が起こり、微小繊維の働きによってマイオプラズムは植物極付近の卵表層に移動する。その後マイオプラズムは、2回目の卵細胞質再配置によって後極に移動し、新月環を形成する。そして第一卵割が起こり、マイオプラズムは正確に予定筋肉割球に分配されて行く。

卵細胞質再配置でのマイオプラズムの移動には細胞骨格繊維が関与していることが阻害剤を用いた実験から明らかになっている(Zalokar, 1974; Reverberi, 1975; Sawada and Osanai, 1981)。加えて、マイオプラズムが、中間径フィラメントを含めた複雑な細胞骨格繊維の集まりである"cytoplasmic domain"を形成しており(Sardet *et al.*, 1994)、それら細胞骨格繊維間の連絡も重要であることが示唆されてきた。一方、アフリカツメガエルの卵においても受精後に行われる、"subcortical rotation" は、その回転に卵表層下に存在する微小管のレールが重要

であることが明らかになっており、その詳細もよく観察されている(Houliston and Elinson, 1991; Schroeder and Gard, 1992)。

ホヤ卵内の微小管は発生過程を通して形態を様々に変化させ、実に複雑な様相を示す。卵細胞質再配置の時期にホヤ卵内に存在する微小管の挙動は、Sawada and Schattenによって詳細に観察されている(1988; 1989)。また、ホヤ卵内にはさらに、cytoplasmic fine latticework (CFL)とよばれる微小管のネットワークが存在することが知られている。しかし、CFLの時間的、空間的挙動は不明である。また、2回目の卵細胞質再配置において微小管は、マイオプラズムの挙動に重要な役割を果たすことが知られているにも関わらず、マイオプラズムの移動に直接関係のあると思われる構造は示されていない。

マイオプラズムを構成している分子は、現在までにいくつか同定、単離されている。そのうちの2つがp58とマイオプラズミンC1である。p58は分子量約58 kDaの分子である。この分子はブタの中間径フィラメントを認識するモノクローナル抗体NN18によって認識される分子である(Swalla *et al.*, 1991)。さらに、p58は尾部領域の形成に重要な役割を果たしていると考えられている(Jeffery and Swalla, 1992)。一方、モノクローナル抗体法により単離されたマイオプラズミンC1は、マイオプラズムに局在する筋肉分化に重要な役割を担っている分子のひとつである(Nishikata *et al.*, 1987; Nishikata, 1991)。マイオプラズミンC1は分子量が約40 kDaで等電点は約5の分子であることがわかっている(Nishikata, 1991)。また、そのcDNAの塩基配列から推測されるアミノ酸配列からマイオプラズミンC1は、卵内で他の分子と結合していることが推測されている(Nishikata and Wada, 1996)。さらに、マイオプラズミンC1はTriton X-100を含む抽出液で卵を処理しても卵内に残ることから、卵内では細胞骨格と強く結合していることが示唆されている(Nishikata and Wada, 1996)。これらのことからマイオプラズミ



ンC1は、卵内で筋肉分化に重要な因子をマイオプラズムの細胞骨格繊維につなぎ止めるような役割を果たしているのではないかと考えられている(Nishikata and Wada, 1996)。

本実験では、多重染色法を用いて、微小管、微小繊維、p58とマイオプラズミンC1の卵細胞質再配置における相互関係を解析した。その結果、p58とマイオプラズミンC1はどちらも微小繊維と微小管の重合阻害剤によってその移動が阻害されることが示された。また、p58とマイオプラズミンC1の挙動がぴったり一致することが示された。さらにレーザー共焦点顕微鏡による詳細な観察の結果、2回目の卵細胞質再配置において、マイオプラズムの領域に、新たに微小管の特異的な構造を見いだした。この構造は、マイオプラズムの後極への移動と新月環の形成に重要な役割を果たしている可能性を示すものであった。また、*in vitro* interaction assayによりp58とマイオプラズミンC1はお互いに結合することが示され、p58とマイオプラズミンC1がホヤ卵内で複合体を形成しているという考えを支持した。

## 5.2 材料と方法

### ホヤとホヤ胚

カタユレイボヤとユレイボヤは、東北大学農学部附属海洋生物資源教育研究センター、広島大学理学部附属臨海実験所と神戸商船大学付近の湾内にて採集した。成体は13℃、常明で維持した。卵は成体の輸卵管から直接採取した。精子は輸精管から採取し、必要なものには水酸化ナトリウムで活性化した。カタユレイボヤの受精卵は18℃で発生させた。ユレイボヤの受精卵は16℃で発生させた。この温度下で受精卵は約1時間後に第一卵割が起こり、幼生の孵化は約20時間後に起こる。

### 細胞骨格繊維重合阻害剤による処理

微小管の重合阻害剤であるグリセオフルピンは、1  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で処理した。この濃度での処理で、微小管は免疫組織染色では検出されなくなる(図5.5B, E)。微小繊維の重合阻害剤であるサイトカラシンBは2  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で処理した。この濃度で完全に細胞質分裂は阻害できる(Satoh and Ikegami, 1981)。1回目の卵細胞質再配置の試料は、卵を各重合阻害剤入りの海水中で受精させ、10分後に固定した。2回目の卵細胞質再配置の試料は、受精後10分間正常海水中で発生させた後、各重合阻害剤入りの海水に置き換え新月環の形成される50分後に固定した。



## 抽出卵の作製

観察する卵を固定する時期が1回目の卵細胞質再配置以前の卵は受精前に、それ以後の時期で固定して観察する卵は受精後に、それぞれ1%チオグリコール酸ナトリウムと0.1%アクチナーゼEを含む海水中でコリオンを除去した。卵は観察するステージまで0.9%寒天シャーレ上で飼育した。目的のステージまで発生させた卵を、前処理としてCa<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free sea water (460 mM NaCl, 9 mM KCl, 32 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM EGTA)中に移し、その後、抽出バッファーで抽出した。コリオンを除去した卵の一部は、抽出を行わずそのまま0.9%寒天シャーレ上で発生させ、正常に卵割を行うことを確認している。抽出バッファー(30 mM KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 0.2 mM PMSF, 2% Triton X-100, 20% glycerol, 25 mM imidazol, pH 6.9)はSawada *et al.*によって微小管観察に用いられたものを改変した(1988)。抽出は室温で1時間から1.5時間行った。発生は抽出バッファーで抽出を開始した直後に停止している。

## 固定と免疫組織染色

観察に用いた卵は100%メタノールで20分処理した後、100%エタノール中で固定した。胚切片は、ポリエステルワックス (Steedman, 1957; BDH Chem.)に包埋した後、4  $\mu$ mで作製した。ファロイジン染色用の卵は1.6%ホルムアルデヒド (Polyscience, Inc., Warrington, PA. USA)を含む海水中で固定した。レーザー共焦点顕微鏡による観察に用いた卵は、メタノール:DMSO (4:1)溶液中で4℃、16時間以上で固定した。その後、100%メタノールに移し、-20℃で保存した。それぞれの方法で固定した卵はPBT (0.05% Triton X-100を含むリン酸バッファー)で洗浄した後、0.1% blocking reagent (Boehringer Mannheim)で1から2時間処理

し、その後抗体染色を行った。包埋には90%グリセロールを用いた。また退色防止剤として1 mg/ml DABCO (1,4-diazabicyclo-[2.2.2] octane; Sigma)を用いた。

BHS-RFC顕微鏡は落射蛍光顕微鏡 (Olympus)を用いた。フィルムはFujichrome 100Dを用いた。

## 抗体

本研究に用いた抗体及び染色試薬を以下に記す。

anti- $\alpha$  tubulin monoclonal antibody (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada), monoclonal Anti Tubulin mouse IgM (Transformation Research, Massachusetts, USA.), anti-neurofilament 160 monoclonal antibody (clone NN18; BioMakor, Rehovot, Israel) anti-myoplasmin-C1 monoclonal antibody (Nishikata *et al.*, 1987), anti-myoplasmin-C1 rabbit serum (Nishikata and Wada, 1996), HRP-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM (H+L) (American Qualex, San Clement, CA, USA), FITC-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM (H+L) (American Qualex), FITC-conjugated goat anti-mouse mouse IgG (Cappel), BODIPY-FL conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) (Molecular Probes), rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM (Caltag, California, USA), biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma)とExtrAvidin-TRITC conjugate (Sigma), Rhodamin-phalloidin (0.04  $\mu$ g/ml; Sigma), diamidinophenylindol (DAPI; 0.2  $\mu$ g/ml)。

## レーザー共焦点顕微鏡による観察

リアルタイムレーザー共焦点顕微鏡INSIGHT (Meridian)を使用し、INSIGHT-IQソフトウェア (Meridian)を使用し、SFPによる立体再構築を含む解析を行った。観察画像のプリントにはColor Video Printer UP-7100 (SONY, Tokyo, Japan.)を使用した。



# GST-myoplasmin-C1融合タンパク質の作製と*in vitro* interaction assay

glutathion S-transferase (GST)-マイオプラズミンC1融合タンパク質の精製は Nishikata and Wadaの方法に従った(1996)。*in vitro* interaction assayのためにまず GST-マイオプラズミンC1融合タンパク質をGST結合レジンである Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Sweeden)に結合させた。次に、融合タンパク質の結合しているレジンにカタユレイボヤ卵巣タンパク質の可溶画分(卵巣タンパク質)を加えた。その後、レジンを軽い遠心で回収し、上清は素通り画分として以後の解析に用いた。回収したレジンには、10倍量以上のPBSで洗った。再び回収したレジンには、Laemmli SDSサンプルバッファーを加えて結合していたタンパク質を可溶化した(結合画分)。卵巣タンパク質、素通り画分と結合画分はそれぞれSDS-PAGEを行い、Hybond N (+) ニトロセルロースメンブレンに転写し、ウェスタンブロット解析に用いた。抗体にはanti-tubulin 抗体と anti-neurofilament 160抗体を用いた。

## 5.3 結果

### 5.3.1 2回の卵細胞質再配置における微小管とマイオプラズムの挙動

最初に、卵細胞質再配置の時期のマイオプラズムと微小管の関係を明らかにするために、チューブリン抗体とマイオプラズミンC1抗体を用いて二重染色を行った。図5.1Aで示すように未受精卵では、マイオプラズミンC1の染色は、動物極以外の卵表層にみられた(図5.1A矢頭)。一方、微小管の染色は卵全体にメッシュ状に見られた。しかし、このメッシュ状の微小管は、マイオプラズムの存在する箇所には存在していなかった(図5.1A矢頭)。また、卵内各所に微小管のスポットが見られた。図5.1Aでは見られないが、第一減数分裂中期の分裂装置にも抗体の染色が見られた。1回目の卵細胞質再配置と2回目の卵細胞質再配置の間の時期である受精後25分後では、微小管の染色は雌性前核の周囲と、植物極側に存在する発達中の精子星状体に見られた。そして放出された第一極体に見られた(図5.1B)。この時期には微小管のメッシュ状の構造は消え、発達した精子星状体が目立った構造として観察された(図5.1B)。マイオプラズミンC1による染色は、この時期にも植物極側に見られた(図5.1B矢頭)。2回目の卵細胞質再配置の後半の時期である受精後45分後には、マイオプラズミンC1抗体による染色は、卵後極で新月環状に局在した(図5.1C, D)。チューブリンの抗体では大きく発達して卵のほぼ全体に広がった精子星状体の微小管がはっきり染色された(図5.1C)。さらに、マイオプラズムの存在している後極の卵表層にもチューブリン抗体によって明確に染色される微小管の集まりが観察された(図5.1D)。この微小管は精子星状体と連続しているようにみられた(図5.1D)。

この卵表層の微小管とマイオプラズムとの関係を調べるために、Triton X-100を含む抽出バッファーで抽出したユレイボヤ卵を用いて、ホールマウン



ト標本での抗チューブリン抗体による観察を行った。ユウレイボヤでは、マイオプラズムの領域には'subcortical granules (SCGs)'と呼ばれる暗く見える色素顆粒が存在している(図5.1E; Sawada and Osanai, 1981)。図5.1Fで微小管の染色はSCGの局在と一致しており、卵表で植物極に向かって曲がっている様子がわかる。また、卵後極側からみた観察像では、染色は明確ではないが、卵後極表層で平行にのびた微小管が観察された。SCGのいくつかはこの微小管の近傍に見られ微小管との関わりが示唆された(図5.1G)。

### 5.3.2 レーザー共焦点顕微鏡による微小管の詳細な観察

チューブリン抗体染色を行ったホールマウント標本をレーザー共焦点顕微鏡を用いて観察した。未受精卵では、卵のほぼ全体の細胞質中に、二重染色でも明らかになったメッシュ状の微小管が観察された。しかし、植物極側の卵表層と動物極側の雌性前核付近にはその構造は見られなかった(図5.2A)。この構造は卵母細胞で報告されたcytoplasmic fine latticework(CFL)と似ていた。2回目の卵細胞質再配置では、星状体の一部の微小管が卵表層に達したところで特定の方向へまわり込んでいるのが観察された。レーザー共焦点顕微鏡での観察では、卵の抽出の際に極体をはがれ落ちてしまっているため、卵の極性はわからない。星状体の様子を図5.1Fと比較して検討した結果、星状体から後ろ側へ伸びた後極の微小管がマイオプラズムに沿ってカーブし、植物極側へまわり込んでいることがわかった。つまり図5.1Dで見られたマイオプラズムの卵表層下に見られた微小管の染色は、星状体の微小管と連続した構造であることが明らかとなった。

### 5.3.3 2回の卵細胞質再配置における微小繊維とマイオプラズムの挙動

次に、第一卵割までの微小繊維の挙動をアクチンを染色するrhodamine-phalloidinを用いて観察した(図5.3)。また、観察には抽出を行っていないユウレイボヤ卵を用いた。

未受精卵では、動物極の雌性前核付近を除いたすべての卵表層にphalloidinの染色がみられた(図5.3A-C)。受精直後から1回目の卵細胞質再配置にかけて、マイオプラズムは卵表層のアクチンのバスケット様の構造により、植物極方向に絞り出されるように移動することが知られている(Sawada and Osanai, 1984; 1985)。図5.3D-Fではこのアクチンのバスケット様の構造が明確に染色され、Sawada and Osanaiの報告を確認できた。一方Jeffery and Meier (1983)は、2回目の卵細胞質再配置における微小繊維が、卵後極のマイオプラズム表層部分においてのみ観察されると報告している。しかし、今回の観察では、この時期の微小繊維は卵全体の表層に存在していた(図5.3G-I)。

### 5.3.4 p58とマイオプラズミンC1

次に、マイオプラズムの構成分子であるp58とマイオプラズミンC1の関係を二重染色によって調べた(図5.4)。p58 (図5.4A, D)とマイオプラズミンC1(図5.4C, F)は、ともにマイオプラズムの構成分子であり、マイオプラズムと挙動を共にする。その染色像を重ね合わせてみると、1回目、2回目の卵細胞質再配置のどちらもまったく一致しており、染色が均一な黄色に見えた(図5.4B, E)。また、マイオプラズム以外の領域でも粒状の染色を示し、その多くは黄色く、p58とマイオプラズミンC1が同様に共存していることを示していた。しかし、緑色が



強く見える染色(図5.4B, E矢印)や赤色の強い染色がみられる粒子もあり(図5.4B, E矢頭)、この分子の局在が完全に一致するわけではないことを示した。このことはまた、今回のマイオプラズムの部域での黄色く見える染色が両方の抗体のクロスコンタミネーションではないことを示している。これらの結果は、p58とマイオプラズミンC1が卵内のマイオプラズムの領域で複合体を形成し、その複合体形成は空間的にも調節されていることを示唆している。

### 5.3.5 p58、マイオプラズミンC1の局在は細胞骨格繊維に依存する

ところで、マイオプラズミンC1とp58はTriton X-100抽出卵でも抽出されず卵内に存在することから細胞骨格繊維と比較的強く結合していることが示唆されている(Nishikata and Wada, 1996)。そこで、アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシンBとチューブリンの重合阻害剤であるグリセオフルピンを用いて、p58とマイオプラズミンC1の卵細胞質再配置における局在メカニズムを明らかにすることにした。p58もマイオプラズミンC1の結果もまったく同一の結果が得られたので、ここではマイオプラズミンC1の結果のみを示す(図5.5)。

1回目の卵細胞質再配置の時期にグリセオフルピン処理を行った卵では、コントロールと同様に、p58とマイオプラズミンC1の植物極側への局在が正常に行われた(図5.5A, B)。それに対し、サイトカラシンB処理を行った卵では、p58とマイオプラズミンC1は植物極側へ移動しなかった(図5.5C)。次に2回目の卵細胞質再配置の時期にだけサイトカラシンB処理を行った卵では、p58とマイオプラズミンC1は、コントロールと同様に新月環の領域に局在が見られた(図5.5D, F)。それに対し、グリセオフルピン処理を行った卵では、p58とマイオプラズミンC1の新月環形成は阻害されていた(図5.5E)。

これらの結果から、p58とマイオプラズミンC1の移動には1回目の卵細胞質再配置時には微小繊維が、2回目の卵細胞質再配置時には微小管がそれぞれ関与していることが明かとなった。それにより、マイオプラズムの移動メカニズムが直接あるいは間接的に両分子の移動に関わっていることが示された。また、これらの細胞骨格繊維の重合阻害がp58やマイオプラズミンC1の局在パターンを大きく変えることがなかった。p58とマイオプラズミンC1複合体の形成およびそれらのマイオプラズムでの局在化の保持には、これらの細胞骨格繊維が関与していないようである。

### 5.3.6 p58とマイオプラズミンC1は*in vitro*で結合する

p58とマイオプラズミンC1の局在パターンが卵内で完全に一致することは、先に述べた通りである。では、この2つの分子は卵内で結合しているのだろうか。そこで、GST-マイオプラズミンC1融合タンパク質(Nishikata and Wada, 1996)を用いて*in vitro* interaction assayを行った。GST-マイオプラズミンC1融合タンパク質へ結合した画分にはCBB染色による明確なバンドは検出されず、結合したタンパク質が微量であることがわかる(図5.6, lane 3)。チューブリン抗体を用いたウエスタンブロットでは、ホヤ卵巣の全タンパク質や素通り画分に見られるチューブリンやアクチンのバンドが結合画分に検出されない。それに対し、p58抗体を用いたウエスタンブロットでは、図5.6, lane 9に示すように、GST-マイオプラズミンC1融合タンパク質と結合していたp58が検出された。この結果は、p58が*in vitro*でGST-マイオプラズミンC1融合タンパク質と結合できることを示しており、p58とマイオプラズミンC1がホヤ卵内で複合体を形成しているという考えを支持している。



## 5.4 考察

### 5.4.1 卵細胞質再配置における細胞骨格繊維と細胞質領域の関係

本研究でホヤ卵細胞質再配置の時期の細胞骨格繊維の詳細な観察を行った結果、Sawada and Schatten (1988) によってモルグラ オシデンタリスの卵母細胞で記載されたCFLと似た構造がカタユレイボヤ未受精卵中で観察された。これらは同一の構造であると考えられる。カタユレイボヤのCFLはマイオプラズムの領域では観察されない。また、CFLは受精後、精子星状体の発達と共に消えることがわかった。しかし、CFLの役割の解明にはさらなる検討が必要である。

2回目の卵細胞質再配置の時期の微小繊維は、卵表層に均一に存在していた。これは、マイオプラズムの領域に局在していることを示したJeffery and Meier (1983)の記載とは異なる。しかし、今回の我々の観察結果と、T. Sawadaの観察結果とは一致している(私信)。また、微小繊維の重合阻害剤を用いた実験により、2回目の卵細胞質再配置でのマイオプラズムの挙動には微小繊維が関与しないことが示されており (Zaloker, 1974; Sawada and Schatten, 1989)、今回の我々の観察結果は、これと矛盾しない。

### 5.4.2 新月環領域に見られる微小管構造の機能

今回の観察で、2回目の卵細胞質再配置の時期に精子星状体から連続した微小管は、マイオプラズムの領域で新月環に沿って緩やかなカーブを描きながら卵表層に達して植物極方向に折れ曲がっているという新たな知見が得られた。

この時期のマイオプラズムの移動に微小管は重要な役割を果たしている。この構造はマイオプラズムの領域にだけ観察される。卵細胞質再配置の時期において、新月環形成以外の時期のマイオプラズムの領域にはこの微小管の構造は見られない。これらのことから、この新たな微小管構造は、マイオプラズムの新月環形成に重要な役割を果たすのではないかと推測している。

ところで、この微小管構造は、精子星状体から発達した微小管が卵表層に達して一定方向に曲がっている。この点で、アフリカツメガエルの受精卵で観察される"subcortical rotation"のために必要な卵内の微小管構造 (Houliston and Elinson, 1991)と形態的に類似していた。アフリカツメガエル卵で観察されるこの微小管は、卵表層の長く太い顕著なレールの様の構造へとつながっているが (Schroeder and Gard, 1992)、ホヤの卵表層の微小管はあまり目立たない。また一方で、アフリカツメガエルの卵はsubcortical rotationにより卵細胞質を回転させ、この回転により背側情報の活性化が起こると考えられている。これは、ホヤが2回目の卵細胞質再配置による細胞質領域の移動で、分化に重要な因子を正確に局在させることとよく似ている。このことは、初期発生に重要な因子を移動させるメカニズムに種を超えて同様のメカニズムが存在することを示唆しており、普遍的なメカニズムとしてカタユレイボヤでのこの微小管構造の機能解析は大変興味深い。

### 5.4.3 決定因子は単一の分子というよりはむしろ複合体として存在する

マイオプラズミンC1は、その塩基配列からN末端とC末端にヘプタットリピートを持っており、このことからマイオプラズミンC1は卵内で他の分子と結合すると考えられている(Nishikata and Wada, 1996)。一方、p58もアミノ酸配列中



にヘプタッドリピートを持ち、この分子も他の分子と結合していると考えられている(B.J. Swalla and W.R. Jeffery, 私信)。本実験の結果から、*in vivo*では、マイオプラズミンC1とp58の局在は1回目と2回目の卵細胞質再配置のどちらもマイオプラズムの領域においては完全に一致していた。さらに、*in vitro*でこの2つの分子は結合できることがわかった。以上から、マイオプラズミンC1とp58はホヤ卵内でヘテロダイマーを形成しているのではないかと考えている。

マイオプラズミンC1は筋肉細胞分化に重要な分子であり、p58も筋肉細胞を含む尾部形成に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、これらの分子は免疫組織染色の結果から卵割期の核内に移行しないことがわかっており、転写調節因子ではない。では、マイオプラズミンC1とp58はどのような分子なのだろうか。

p58を認識するモノクローナル抗体NN18は、ブタでは中間径フィラメントを認識する抗体である。また、マイオプラズミンC1も以前の結果から卵内で細胞骨格繊維と強く結合していることが知られている(Nishikata, 1991; Nishikata and Wada, 1996)。また、ホヤ卵内の電子顕微鏡観察の結果から、マイオプラズムの領域はdeep filamentous lattice (DFL)と呼ばれる中間径フィラメントを含む3次元の格子構造が存在することがわかっている(Jeffery and Meier, 1983)。さらに、マイオプラズムの領域は"cytoplasmic domain"を形成しており、それら細胞骨格繊維間の連絡も局在に重要であるという考え方が、Sardet *et al.*によって提唱されている(1994)。一方で、鳥類の赤血球ではビメンチン中間径フィラメントの領域は、安定した結合で、細胞内の核を細胞膜の細胞骨格繊維につなぎ止めてる役割を果たしていることが知られている(reviewed by Lazarides, 1987)。これらのことを考えあわせ、マイオプラズミンC1とp58は、中間径フィラメントのような構造と機能を果たしているのではないかと考えている。

一方、マイオプラズム内に存在する決定因子が正確に目的の割球で分化の引き金を引くためには、転写調節以外にも別な調節も必要である。決定因子は、正確な位置に保持され、卵細胞質再配置で正確な場所に移動し、分化の引き金を引く時期に細胞質から核内へ移行させる必要がある。この役目をたったひとつの分子がすべてに行っているとは考えにくい。つまり、細胞分化決定因子は単一の分子で働くと言うよりはむしろ複合体を形成し、それぞれの分子が密接に関与しながら細胞分化を引き起こしていると考えている。マイオプラズミンC1とp58はその特質と分子的性状から、細胞骨格繊維と結合していると考えられている。同時に、筋肉細胞分化の引き金を引く転写調節因子と直接的、あるいは間接的に結合して複合体全体をつなぎ止めておく役割が推測されている。マイオプラズミンC1とp58は、これらの筋肉細胞分化での重要性から、この決定因子複合体の構成分子であると考えている。



## 第6章 総論

### 6.1 ホヤ細胞分化メカニズム

本研究で、細胞分化メカニズムの多角的な解析を行うことにより、様々な知見が得られた。最後に、今回新たに得られた知見と現在までに知られている知見をもとに、ホヤ細胞分化メカニズム全体を考察したい。

筋肉細胞分化に重要な分子は決定因子を含めた複合体を構成していると考えている。その複合体を構成する分子のうち、2つはマイオプラズミンC1とp58であると考えている。これら2つの分子は互いに結合しながら一方では細胞骨格繊維と結合し、他方では決定因子と直接的、あるいは間接的に結合しているであろう。そうすることで、マイオプラズミンC1とp58は、卵細胞質再配置において自らを含めた決定因子複合体を卵内の正確な位置に局在させる役割を持っていると考えている。最近、マイオプラズミンC1はそのC末端側でp58と結合し、マイオプラズミンC1自身とは結合しないという結果も出ており、複合体の具体的な構造が次第に明らかになりつつある(Y. Shibata *et al.*, 私信)。このほかの筋肉細胞分化決定因子複合体を構成する分子には、複合体が発生過程で担うべき役割から考えて、1)転写因子そのもの、2)その複合体への保持に関わる分子、3)卵内での移動に関わる分子、4)転写因子の複合体からの放出に関わる分子などが存在すると考えている。

筋肉細胞分化決定因子複合体は、複合体を維持しながら、1回目の卵細胞質再配置では、微小繊維と結合して卵の植物極側に移動すると考えている。また2回目の卵細胞質再配置では、今回新たに観察された微小管の構造によって、卵の後極に局在し、新月環を形成すると考えている。

2回の卵細胞質再配置が完了すると、引き続き卵割期に入る。卵割期でも決定因子複合体は正確に目的の割球に分配されることがわかっている。卵割期に



予定組織割球に正確に分配されるメカニズムの解明は、研究の難しさからほとんどわかっていない。しかし、卵割パターンの不変性は、決定因子を胚の適切な割球へと正確に分配するために、非常に重要な性質であると考えられる。また、ホヤでは8細胞期から64細胞期の後ろ側の割球で不等分裂が起こることが知られており(Conklin, 1905a)、この不等分裂に重要な役割を果たす

CAB(centrosome attracting body)という構造が見つかった(Hibino *et al.*, 1998)。しかし、決定因子複合体とCABとの関係は現在のところ不明である。

さて、決定因子複合体を構成している分子をこれからどのようにして単離していくかということは、今後の重要な問題である。今回GST-マイオプラズミンC1融合タンパク質を用いて複合体の再構築を行っている。この方法で確かにp58がマイオプラズミンC1と結合できることが証明されたが、結合したタンパク質量は微量であった。この再構築複合体を用いてモノクローナル抗体を調製することも可能であろう。また、最近ではマイオプラズミンC1に結合する新たな分子を探す努力がされており、その結果いくつかの複合体を構成している新規の分子が同定されようとしている(Y. Shibata *et al.*, 私信)。

また、今回調製したモノクローナル抗体Nup-1から-5は、いずれも卵割期の細胞質と核内の両方に存在する分子のエピトープを認識していた。この特質は、分化の起こる直前に転写調節因子として核内に入る分子にも当てはまる特質である。そこで、Nupエピトープを持つ分子を徹底的に同定し、それらの分子的特徴を比較することによって、核局在、細胞質局在両方の性質を持つために必要な分子内の配列を同定することも可能ではないだろうか。さらに、既に知られている核内移行シグナルとの比較により、決定因子を核内に移動させる分子を同定するといった試みも、あながち遠回りな方法ではないだろうと考える。

また、他の組織の細胞分化決定因子も、決定因子分配メカニズムが果たさなくてはならない役割は、筋肉細胞分化決定因子と同様であり、複合体の中には、1)転写因子そのものと、2)その複合体への保持に関わる分子、3)卵内での移動に関わる分子、4)転写因子の複合体からの放出に関わる分子などが存在すると考えている。

しかし、各複合体はそれぞれ特定の場所に移動し、特定の時期に分化の引き金を引かなければならない。そこで、これらの複合体を構成している分子は性質は似ているが、別の分子であると考えている。

他の組織の細胞分化決定因子複合体を構成している分子の同定には、卵内全体から各細胞質領域に局在する分子を見つけ、そこから複合体を構成する分子を見つけてくる方法が考えられる。また、筋肉細胞の決定因子複合体を構成している分子の性質と非常によく似た性質の分子を徹底的に同定し、その中から、他の領域で局在する分子を見つけだす方法なども考えられる。このどちらも不可能ではないと考える。

さて、各割球に正確に分配されてきた決定因子複合体は、分化の引き金を引く直前に転写調節因子を核内に送り込む。そして、細胞分化のマスター遺伝子の転写調節を行う。その結果、分化をコントロールする調節遺伝子から組織としての特徴をつくる構造遺伝子まで、数多くの遺伝子からなる複雑な遺伝子カスケードが開始される。

今回調製したモノクローナル抗体CiNot-1の結果から、A系列の脊索細胞とB系列の脊索細胞は異なる分化メカニズムが働いていると考えている。この分化メカニズムの違いはCiNot-1やアルカリフォスファターゼのカスケードをたどっていくことで解析できるだろう。また、CsEpi-2は8細胞期から発現が始まっており、表皮細胞はこの時期には既に分化が始まっていることを示した。これは



現在ホヤで単離されている表皮特異的に発現するmRNAの中で最も早く発現するmRNAである。*CsEpi-2*の発現カスケードの上流で転写調節因子を探すことは、他のどの表皮特異的遺伝子からスタートするより早く表皮細胞分化のマスター遺伝子にたどり着くだろう。一方、遺伝子カスケードの下流で働く遺伝子は、遺伝子導入などによる過剰発現や機能阻害で解析できる。例えば*Ci-Bra*の過剰発現により、脊索細胞で発現し、*Ci-Bra*の下流で働く遺伝子が数多く単離されてきている(K. Hotta *et al.*, 私信)。遺伝子過剰発現や機能阻害実験の性質上この手法がすべての遺伝子に対して利用できるとは限らないが(第1章参照)、成功した場合には大変有効なアプローチである。

最後に、本研究のもう一つの目的として、カタユレイボヤとユレイボヤのマーカ分子の整備があった。今回、モノクローナル抗体としてのCiNot-1、表皮細胞特異的遺伝子としての*CsEpi-1*, *CsEpi-2*、筋肉細胞特異的遺伝子としての*CsMA-1*, *CsMu-1*を詳細に解析した。その結果、これらのすべてがマーカとして細胞分化メカニズムの解析に利用できるものであった。また、まだ未解析であるが、間充細胞特異的遺伝子としてのクローン40, クローン68や脳・神経索細胞特異的遺伝子としてのクローン32, クローン74など、多くのマーカ遺伝子の単離にも成功した。その結果、多くの組織のマーカを揃えることができた。今後これらのマーカを組み合わせ、割球の予定運命を変更するような実験も可能となった。既に今回得られたマーカのいくつかは、いくつかの研究室でホヤの分化メカニズムの研究に利用されはじめている。しかし、まだすべての組織のマーカが揃ったわけではない。今回解析に用いたサブトラクテッドライブラリーには解析できるクローンがあと89,900クローン残っている。すべての組織のマーカを揃えることはこのライブラリーの一部を順次解析することで可能であると考えている。

## 6.2 まとめ

今回明らかになったことをもとに、ホヤ胚初期発生過程における細胞分化メカニズムをまとめると、図6.1のようになる。ホヤ胚では、ほとんどの組織で、それぞれの分化をつかさどる決定因子が存在する。決定因子は複合体を形成しながら受精後決定因子の局在化と予定割球への分配メカニズム(緑)により各組織の予定割球へと正確に分配される。その直後に、決定因子は様々な分子と相互作用しながら核へと運ばれる(黄:核への移行メカニズム)。そこで、決定因子は転写因子として働き、それぞれの組織分化に必要な遺伝子カスケード(青)を開始させ、分化が起こると考えられる。今回明らかにした新たな分子や構造(赤字)は、「決定因子の局在化と予定割球への分配メカニズム」、「決定因子の核への移行」、「組織分化の遺伝子カスケード」という3つのステップにおいてそれぞれ重要なものであった。筋肉細胞分化では、決定因子の局在化と予定割球への分配メカニズムに関与する分子とその関係、ならびに新たな構造を明らかにできた。核移行に関しては明確な証拠は得られなかったものの、その解析の糸口となるいくつかの核抗原の特質を明らかにできた。遺伝子カスケードに関与する2つの分子の挙動と特質を新たに明らかにした。これらの結果により、少なくとも筋肉細胞分化においては、この3つのステップを踏んで分化が起こることを支持した。

筋肉細胞分化以外での決定因子の局在化と予定割球への分配メカニズムは、本研究では直接的には明らかにしていない。しかし、決定因子の局在が起こる1細胞期の卵の中での細胞質の動きは、互いに制約を受けるはずである。その意味で、どの組織の決定因子の局在にあたっても、何らかの共役したメカニズムが存在すると考えられる。つまり、今回明らかにした筋肉分化に関わる決定



因子の局在化と予定割球への分配メカニズムが、他の決定因子のそれにも密接に関わっていると考えている。ホヤ胚組織分化メカニズムを、発生という時間軸に沿って縦断した見方をする事で、ホヤ胚の多くの組織で、上述の3つのステップからなる分化メカニズムが働いていると考えることができる。

本論文ではさらに、分化マーカーとして、遺伝子カスケードに関わる新規遺伝子を、主だった組織で取り揃えることができた。そして、少なくとも筋肉、脊索、表皮については、その基本的な発現の解析を終えた。この様にすべての組織にわたる分化マーカーを揃えることで、ホヤ胚の組織分化メカニズムを各組織ごとに横断的に解析することができる。

ホヤ胚における組織分化を縦、横に多角的に解析した今回の結果の最も重要な点は、ホヤ胚全体の組織分化メカニズムを「決定因子の局在化と予定割球への分配メカニズム」、「決定因子の核への移行」、「組織分化の遺伝子カスケード」という3つのステップとして統一的に理解できることを示し、さらにそれに関わる具体的な分子を列挙できたことである。

本研究の結果、ホヤ分化メカニズムの各ステップにおいて新たな知見を得ることができ、分化メカニズム全体の理解の大きな一助となった。しかし、本章で論じた通り、ホヤ細胞分化メカニズムにはまだまだ不明な点が多い。今後この不明点が一つでも多く解析されることを期待したい。

## 謝辞

本研究を行うにあたりご協力いただきました以下の皆様に感謝いたします。

本研究について終始適切なご指導とご助言をいただき、さらに本論文の精読と批評をしていただきました、指導教授の甲南大学理学部、園部治之教授と、指導教員の西方敬人助教授にお礼申し上げます。

実験材料の採集にご協力頂きました、広島大学理学部附属臨海実験所、道端齊教授、宇山太郎講師、安保徳之氏および実験所の皆様にお礼申し上げます。

実験材料の採集にご協力いただきました、東北大学農学部附属海洋生物資源教育研究センター、木島明博教授、阿部勝夫氏およびセンターの皆様にお礼申し上げます。

実験材料の採集にご協力いただきました、神戸商船大学、緒方一彦教授にお礼申し上げます。

実験材料の採集にご協力いただきました、東京大学海洋研究所附属大槌臨海研究センター、宮崎信之教授、都木靖彰助手、天野雅男助手、盛田孝一氏およびセンターの皆様にお礼申し上げます。

ミエローマ細胞Sp2株を提供していただいた、京都大学理学部、久保田洋助教授にお礼申し上げます。

試料作成のためのホヤ核タンパク質抽出の方法についてご助言していただきました、北海道大学大学院理学研究科、日下部岳広助手にお礼申し上げます。

試料作成のための卵抽出液の改良についてご助言していただきました、山口大学医学部、沢田知夫教授にお礼申し上げます。

第4章の研究で、ご指導および長期にわたる快適な実験環境の提供をしてい



ただきました、京都大学理学部、佐藤矩行教授にお礼申し上げます。また、多くのご助言をいただきました、同、真壁和裕助手、高橋弘樹助手および、分子発生研究室の皆様にお礼申し上げます。

阪神大震災の際、研究室の復興に多大なる援助をしていただいた多くの皆様に感謝すると共にすべての援助していただいたすべての方の御名前を記載しないことをお詫び申し上げます。

最後に、本論文を御校閲いただき、ご助言していただきました、甲南大学理学部、田中修教授、宮澤敏文教授、重松利彦教授、玉置克之教授、中村運教授にお礼申し上げます。

## 参考文献

- Araki, I., Saiga, H., Makabe, K.W. and Satoh, N. (1994). Expression of *AMD1*, a gene for a MyoD1-related factor in the ascidian *Halocynthia roretzi*. Roux's Arch. Dev. Biol. 203: 320-327.
- Araki, I. and Satoh, N. (1996). cis-Regulatory elements conserved in the proximal promoter region of an ascidian embryonic muscle myosin heavy-chain gene. Dev. Genes Evol. 206: 54-63.
- Araki, I., Tagawa, K., Kusakabe, T. and Satoh, N. (1996). Predominant expression of a cytoskeletal actin gene in mesenchyme cells during embryogenesis of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Dev. Growth Differ. 38: 401-411.
- Bates, W.R. and Jeffery, W.R. (1987). Alkaline phosphatase expression in ascidian egg fragments and andromerogons. Dev. Biol. 119: 382-389.
- Beach, R.L. and Jeffery, W.R. (1992). Multiple actin genes encoding the same  $\alpha$ -muscle isoform are expressed during ascidian development. Dev. Biol. 151: 55-66.
- Chiba, S. and Nishikata, T. (1998). Review; Genes of the ascidian: An annotated list as of 1997. Zool. Sci. 15: 625-643.
- Chiba, S., Satou, Y., Nishikata, T. and Satoh, N. (1998). Isolation and characterization of cDNA clones for epidermis-specific and muscle-specific genes in *Ciona savignyi* embryos. Zool. Sci. 15: 239-246.
- Conklin, E.G. (1905a). The organization and cell-lineage of the ascidian egg. J. Acad. Nat. Sci. Phila. 13: 1-119.
- Conklin, E.G. (1905b). Organ forming substances in the eggs of ascidians. Biol. Bull. 8: 205-223.
- Corbo, J.C., Levine, M. and Zeller, R.W. (1997). Characterization of a notochord-specific enhancer from the *Brachyury* promoter region of the ascidian, *Ciona intestinalis*. Development 124: 589-602.
- Deno, T. and Satoh, N. (1984). Studies on the cytoplasmic determinant for the muscle cell differentiation in ascidian embryos: An attempt at transplantation of the myoplasm. Dev. Growth Differ. 26: 43-48.
- Fujiwara, S., Kawahara, H., Makabe, K.W. and Satoh, N. (1993). A complementary DNA for an ascidian embryonic nuclear antigen Hgv2 encodes a protein closely related to the amphibian histone-binding protein N1. J. Biochem. 113: 189-195.



- Fujiwara, S. and Satoh, N. (1990). An 83-kDa embryonic-type nuclear antigen is detected within the germinal vesicles of oocytes of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Roux's Arch. Dev. Biol. 199: 207-211.
- Hauser, F., Roeben, C. and Hoffmann, W. (1992). xP2, a new member of the P-domain peptide family of potential growth factors, is synthesized in *Xenopus laevis* skin. J. Biol. Chem. 267: 14451-14455.
- Hermann, B.G., Labeit, S., Poustka, A., King, T.R. and Lehrach, H. (1990). Cloning of the *T* gene required in mesoderm formation in the mouse. Nature. 343: 617-622.
- Hibino, T., Nishikata, T. and Nishida, H. (1998). Centrosome-attracting body: a novel structure closely related to unequal cleavages in the ascidian embryo. Dev. Growth Differ. 40: 85-95.
- Hoffmann, W. (1988). A new repetitive protein from *Xenopus laevis* skin highly homologous to pancreatic spasmolytic polypeptide. J. Biol. Chem. 263: 7686-7690.
- Hoffmann, W. and Hauser, F. (1993). The P-domain or trefoil motif: a role in renewal and pathology of mucous epithelia? Trends Biochem. Sci. 18: 239-243.
- Houliston, E. and Elinson, R.P. (1991). Patterns of microtubule polymerization relating to cortical rotation in *Xenopus laevis* eggs. Development 112: 107-117.
- Ishaq, A.I., Rizvi, S.B., Wells, D.E. and Tomlinson, C.R. (1993). A characterization of the H3 and H4 histone genes from the ascidian *Styela plicata*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 194: 775-783.
- Jakowlew, S.B., Breathnach, R., Jeltsch, J.M., Masiakowski, P. and Chambon, P. (1984). Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. Nucleic Acids Res. 12: 2861-2878.
- Jeffery, W.R. (1985). Specification of cell fate by cytoplasmic determinants in ascidian embryos. Cell 41: 11-12.
- Jeffery, W.R. and Capco, D.G. (1978). Differential accumulation and localization of maternal poly(A)-containing RNA during early development of the ascidian, *Styela*. Dev. Biol. 67: 152-166.
- Jeffery, W.R. and Meier, S. (1983). A yellow crescent cytoskeletal domain in ascidian eggs and its role in early development. Dev. Biol. 96: 125-143.
- Jeffery, W.R. and Swalla, B.J. (1992). Factors necessary for restoring an evolutionary change in an anural ascidian embryo. Dev. Biol. 153: 194-205.
- Kovilur, S., W., J.J., Beach, R.L., Jeffery, W.R. and Tomlinson, C.R. (1993). Evolution

- of the chordate muscle actin gene. J Mol Evol 36: 361-365. 36: 361-365.
- Kusakabe, T., Makabe, K.W. and Satoh, N. (1992). Tunicate muscle actin genes: structure and organization as a gene cluster. J. Mol. Biol. 227: 955-960.
- Kusakabe, T., Suzuki, J., Saiga, H., Jeffery, W.R., Makabe, K.W. and Satoh, N. (1991). Temporal and spatial expression of a muscle actin gene during embryogenesis of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Dev. Growth Differ. 33: 227-234.
- Kusakabe, T., Swalla, B.J., Satoh, N. and Jeffery, W.R. (1996). Mechanism of an evolutionary change in muscle cell differentiation in ascidians with different modes of development. Dev. Biol. 174: 379-392.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- Lazarides, E. (1987). From genes to structural morphogenesis: The genesis and epigenesis of a red blood cell. Cell 51: 345-356.
- March, C.F., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., Grabstein, K., Conlon, P.F., Hopp, T.P. and Cosman, D. (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. Nature. 315: 641-647.
- Marikawa, Y., Yoshida, S. and Satoh, N. (1994). Development of egg fragments of the ascidian *Ciona savignyi*: the cytoplasmic factors responsible for muscle differentiation are separated into a specific fragment. Dev. Biol. 162: 134-142.
- Marikawa, Y., Yoshida, S. and Satoh, N. (1995). Muscle determinants in the ascidian egg are inactivated by UV irradiation and the inactivation is partially rescued by injection of maternal mRNAs. Roux's Arch. Dev. Biol. 204: 180-186.
- Matthew, W.D. and Sandrock, J.A.W. (1987). Cyclophosphamide treatment used to manipulate the immune response for the production of monoclonal antibodies. J. immuno. Meth. 100: 73-82.
- McGrew, L.L., Lai, C.-J. and Moon, T. (1995). Specification of the anteroposterior neural axis through synergistic interaction of the Wnt signaling cascade with *noggin* and *folliculin*. Devl. Biol. 172: 337-342.
- Mita-Miyazawa, I., Nishikata, T. and Satoh, N. (1987). Cell- and tissue-specific monoclonal antibodies in eggs and embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Development 99: 155-162.
- Miyamoto, D.M. and Crowther, R.J. (1985). Formation of the notochord in living



- ascidian embryos. J. Embryol. Exp. Morphol. 86: 1-17.
- Nakatani, Y. and Nishida, H. (1994). Induction of notochord during ascidian embryogenesis. Dev. Biol. 166: 289-229.
- Nishida, H. (1987). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage. Dev. Biol. 121: 526-541.
- Nishida, H. (1991). Induction of brain and sensory pigment cells in the ascidian embryo analyzed by experiments with isolated blastomeres. Development 112: 389-395.
- Nishida, H. (1992a). Regionality of egg cytoplasm that promotes muscle differentiation in embryo of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. Development 116: 521-529.
- Nishida, H. (1993). Localized region of egg cytoplasm that promote expression of endoderm-specific alkaline phosphatase in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Development 118: 1-7.
- Nishida, H. (1994a). Localization of egg cytoplasm that promotes differentiation to epidermis in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Development 120: 235-243.
- Nishida, H. (1994b). Localization of determinants for formation of the anterior-posterior axis in eggs of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Development 120: 3093-3104.
- Nishida, H. (1996). Vegetal egg cytoplasm promotes gastrulation and is responsible for specification of vegetal blastomeres in embryos of ascidian *Halocynthia roretzi*. Development 122: 1271-1279.
- Nishida, H. and Satoh, N. (1985). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. II. The 16- and 32-cell stages. Dev. Biol. 101: 440-454.
- Nishikata, T. (1991). Characterization of antigenic polypeptides recognized by monoclonal antibodies specific to the myoplasm of eggs of the ascidian *Ciona intestinalis*. Dev. Growth Differ. 33: 459-468.
- Nishikata, T., Mita-Miyazawa, I., Deno, T. and Satoh, N. (1987). Monoclonal antibodies against components of the myoplasm of eggs of the ascidian *Ciona intestinalis* partially block the development of muscle-specific acetylcholinesterase. Development 100: 577-586.
- Nishikata, T. and Satoh, N. (1990). Specification of notochord cells in the ascidian embryo analyzed with a specific monoclonal antibody. Cell Differ. Dev. 30: 43-53.

- Nishikata, T. and Satoh, N. (1990). Specification of notochord cells in the ascidian embryo analyzed with a specific monoclonal antibody. Cell Differ. Dev. 30: 43-53.
- Nishikata, T. and Satoh, N. (1991). Expression of an antigen specific for trunk lateral cells in quarter embryos of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. J. Exp. Zool. 258: 344-352.
- Nishikata, T. and Wada, M. (1996). Molecular characterization of myoplasmin-C1: a cytoskeletal component localized in the myoplasm of ascidian eggs. Dev. Genes Evol. 206: 72-79.
- Okamura, Y., Ono, F., Okagaki, R., Chong, J.A. and Mandel, G. (1994). Neural expression of a sodium channel gene requires cell-specific interactions. Neuron. 13: 937-948.
- Olsen, C.L. and Jeffery, W.R. (1997). A forkhead gene related to *HNF-3 $\beta$*  is required for gastrulation and axis formation in the ascidian embryo. Development 124: 3609-3619.
- Omura, S., Fujimoto, T., Otaguro, K., Matsuzaki, K., Moriguchi, R., Tanaka, H. and Sasaki, Y.J. (1991). Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. J. Antibiot. (Tokyo). 44: 113-116.
- Ortolani, G. (1971). Sul cell-lineage delle ascidie. Boll. Zool. 38: 85-88.
- Podolsky, D.K., Lynch-Devaney, K., Stow, J.L., Oates, P., Murgue, B., Debeaumont, M., Sands, B.E. and Mahida, Y.R. (1993). Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. J. Biol. Chem. 268: 6694-6702.
- Reverberi, G. (1975). On some effects of cytochalasin B on the eggs and tadpoles of the ascidians. Acta Embryol. Exp. 2: 13-158.
- Sardet, C., McDougall, A. and Houlston, E. (1994). Cytoplasmic domains in eggs. Trends Cell Biol. 4: 166-172.
- Sardet, C., Speksnijder, J. and Terasaki, M. (1992). Polarity of the ascidian egg cortex before fertilization. Development 115: 221-237.
- Sasakura, Y., Ogasawara, M. and Makabe, K.W. (1998). *HrWnt-5*; a maternally expressed ascidian *Wnt* gene with posterior localization in early embryos. Int. J. Dev. Biol. 42: 573-580.
- Satoh, N. (1994). Developmental Biology of Ascidians. Cambridge Univ. Press., Cambridge.



- Satoh, N. and Ikegami, S. (1981). A definite number of aphidicolin-sensitive cell-cyclic events are required for acetylcholinesterase development in the presumptive muscle cells of the ascidian embryos. *J. Emb. Exp. Morph.* 61: 1-13.
- Satou, Y., Kusakabe, T., Araki, I. and Satoh, N. (1995). Timing of initiation of muscle-specific gene expression in the ascidian embryo precedes that of developmental fate restriction in lineage cells. *Dev. Growth Differ.* 37: 319-327.
- Satou, Y. and Satoh, N. (1997). *posterior end mark 2 (pem-2)*, *pem-4*, *pem-5*, and *pem-6*; Maternal genes with localized mRNA in the ascidian embryo. *Dev. Biol.* 192: 467-481.
- Sawada, T. (1988). The mechanism of ooplasmic segregation in the ascidian egg. *Zool. Sci.* 5: 667-675.
- Sawada, T. and Osanai, K. (1984). Cortical contraction and ooplasmic movement in centrifuged or artificially constricted eggs of *Ciona intestinalis*. *Roux's Arch. of Dev. Biol.* 193: 127-132.
- Sawada, T. and Osanai, K. (1985). Distribution of actin filaments in fertilized eggs of the Ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 111: 260-265.
- Sawada, T.-o. and Osanai, K. (1981). The cortical contraction related to the ooplasmic segregation in *Ciona intestinalis* eggs. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 190: 208-214.
- Sawada, T.-o. and Schatten, G. (1988). Microtubules in ascidian eggs during meiosis, fertilization, and meiosis. *Cell Motil. Cytoskel.* 9: 219-230.
- Sawada, T.-o. and Schatten, G. (1989). Effects of cytoskeletal inhibitors on ooplasmic segregation and microtubule organization during fertilization and early development in the ascidian *Molgula occidentalis*. *Dev. Biol.* 132: 331-342.
- Schatten, G., Simerly, C. and Schatten, H. (1985). Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 4152-4156.
- Schroeder, M.M. and Gard, D.L. (1992). Organization and regulation of cortical microtubules during the first cell cycle of *Xenopus* eggs. *Development* 114: 699-709.
- Schulte-Merker, S., Ho, R.K., Herrmann, B.G. and Nusslein-Volhard, C. (1992). The protein product of the zebrafish homologue of the mouse *T* gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. *Development* 116: 1021-1032.

- Shimauchi, Y., Yasuo, H. and Satoh, N. (1997). Autonomy of ascidian *fork head /HNF-3 $\beta$*  gene expression. *Mech. Dev.* 69: 143-154.
- Smith, J.C., Price, B.M.J., Green, J.B.A., Weigel, D. and Herrmann, B.G. (1991). Expression of a *Xenopus* homolog of *Brachyury (T)* is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* 67: 79-87.
- Steedman, H.F. (1957). Polyester wax. A new ribboning embedding medium for histology. *Nature.* 179: 1345.
- Swalla, B.J., Badgett, M.R. and Jeffery, W.R. (1991). Identification of a cytoskeletal protein localized in the myoplasm of ascidian eggs: localization is modified during anural development. *Development* 111: 425-436.
- Swalla, B.J. and Jeffery, W. R. (1996). PCNA mRNA has a 3' UTR antisense to yellow crescent RNA and its localized in ascidian eggs and embryos. *Dev. Biol.* 178: 23-34.
- Tanaka, K.J. and Nishikata, T. (1994). Specification in the primary lineage of ascidian muscle cells analyzed with a specific monoclonal antibody. *Mem. Konan Univ., Sci. Ser.* 41: 89-97.
- Thim, L. (1989). A new family of growth factor-like peptides. 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett.* 250: 85-90.
- Tomasetto, C., Rio, M.C., Gautier, C., Wolf, C., Hareuveni, M., Chambon, P. and Lathe, R. (1990). hSP, the domain-duplicated homolog of sP2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J.* 9: 407-414.
- Ueki, T. and Satoh, N. (1995). Sequence motifs shared by the 5' flanking regions of two epidermis-specific genes in the ascidian embryo. *Dev. Growth Differ.* 37: 597-604.
- Ueki, T., Yoshida, S., Marikawa, Y. and Satoh, N. (1994). Autonomy of expression of epidermis-specific genes in the ascidian embryo. *Dev. Biol.* 164: 207-218.
- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1978). Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 1106-1110.
- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1979). The complete amino acid sequence of actin from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow skeletal muscle. A protein-chemical analysis of muscle actin differentiation. *Differentiation.* 14: 123-133.



- Whittaker, J.R. (1977). Segregation during cleavage of factor determining endodermal alkaline phosphatase development in ascidian embryos. J. Exp. Zool. 202: 139-154.
- Whittaker, J.R. (1980). Acetylcholinesterase development in extra cells caused by changing the distribution of myoplasm in ascidian embryos. J. Embryol. Exp. Morph. 55: 343-354.
- Whittaker, J.R. (1990). Determination of alkaline phosphatase expression in endodermal cell lineages of an ascidian embryo. Biol. Bull. 178: 222-230.
- Yasuo, H. and Satoh, N. (1993). Function of vertebrate T gene. Nature. 364: 582-583.
- Yasuo, H. and Satoh, N. (1994). An ascidian homolog of the mouse *Brachyury* (*T*) gene is expressed exclusively in notochord cells at the fate restricted stage. Dev. Growth Differ. 36: 9-18.
- Yasuo, H. and Satoh, N. (1998). Conservation of the developmental role of *Brachyury* in notochord formation in a urochordate, the ascidian *Halocynthia roretzi*. Dev. Biol. 200: 158-170.
- Yoshida, S., Marikawa, Y. and Satoh, N. (1996). *posterior end mark*; a novel maternal gene for a localized factors. Development 122: 2005-2012.
- Zalokar, M. (1974). Effect of colchicine and cytochalasin B on ascidian eggs. Roux's Arch. Dev. Biol. 175: 243-248.
- Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. Science 244: 48-52.
- Zuker, M. and Jacobson, A.B. (1995). 'Well-determined' regions in RNA secondary structure prediction: analysis of small subunit ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 23: 2791-2798.

## 図と表



図3.1 CiNot-1抗体によるカタユレイボヤ胚ホールマウント染色。(a) 正常初期尾芽胚。中央の脊索細胞(NA)と脊索鞘細胞(Ns)までにCiNot-1抗体による染色が見られる。胚の後端の脊索鞘細胞にCiNot-1抗体による染色が見られない(小さい矢頭)。CiNot-1抗体による染色が見られる脊索細胞と見られない脊索細胞の境界を矢頭で示した。Hは胚の体幹部を、Tは胚の尾部を示す。(b) 正常中期尾芽胚。尾部の先端をvで示した。脊索細胞(NA)および内胚葉索(Es)、神経管(Nc)、脳(B)といくつかの神経細胞にCiNot-1抗体による染色が見られるが矢頭より後ろ側では、どの組織も染色されていない。(c) 32細胞期以降の卵割を阻害した卵割阻害胚を用いたCiNot-1抗体による免疫組織染色の結果。植物極側から見たもの。前側で一列に並んだ4つの割球でCiNot-1抗体による染色が見られる(矢頭)。これらの割球は細胞の数と位置から判断してA6.4とA6.2割球対であり、後ろ側にあるB系列の予定脊索細胞は染色されていない。

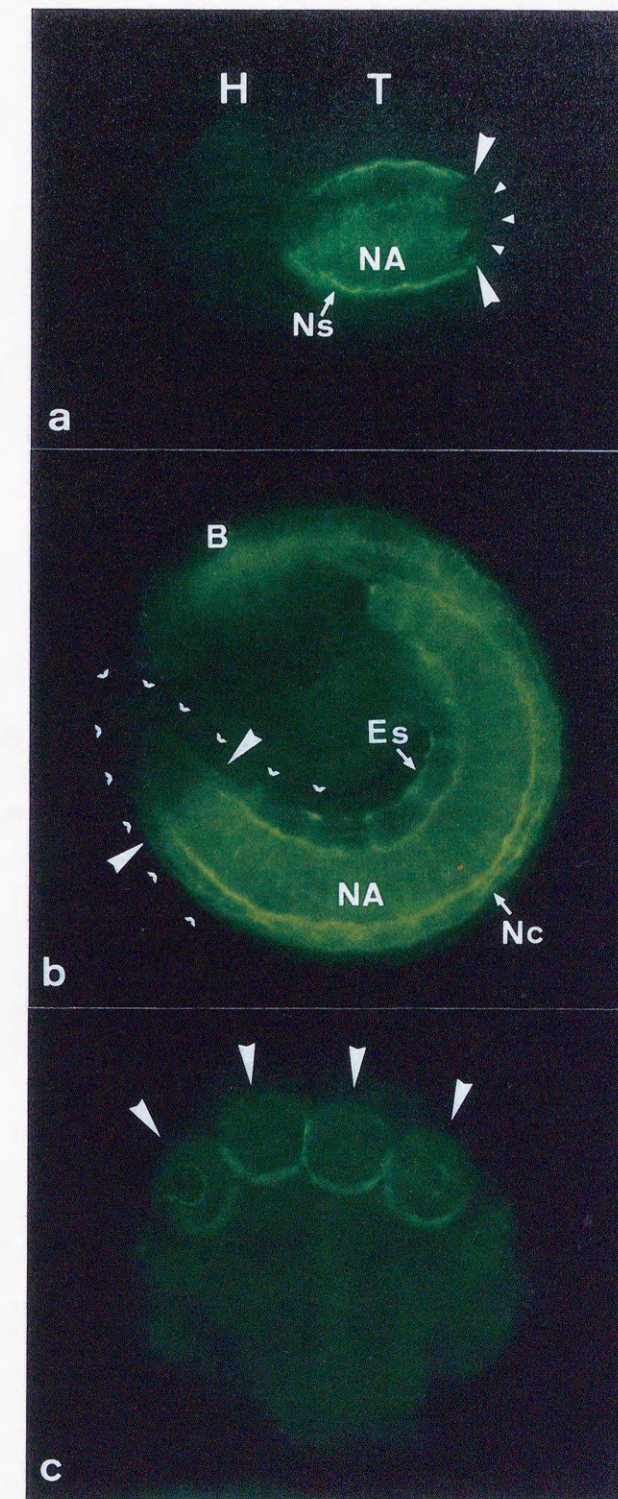




表3.1 細胞融合に用いたマウスへの免疫寛容の方法とその回数の比較。  
カッコ内は抗原の投与方法を示す。腹腔は腹腔内、静注は尾部静脈への投  
与を示す。

| 64細胞期 |                         |
|-------|-------------------------|
| 未受精卵  |                         |
| No.1  | 3回 (腹腔) —               |
| No.2  | 3回 (腹腔) 3回 (腹腔) —       |
| No.3  | 3回 (腹腔) 2回 (腹腔) 1回 (静注) |
| No.4  | 3回 (腹腔) 2回 (腹腔) 4回 (静注) |
| No.5  | 3回 (腹腔) — 5回 (静注)       |



表3.2 ホヤ胚核を認識するモノクローナル抗体調製結果の比較。No.1からNo.5まで、5回の細胞融合における結果を示す。これらは表3.1と対応する。

|      | 主に核 | 核・細胞質 | 核・テスト細胞 | 核・細胞質・テスト細胞 | 細胞質 | テスト細胞 | 細胞質・テスト細胞 | 染色なし | スクリーニングを行ったクローンの数 |
|------|-----|-------|---------|-------------|-----|-------|-----------|------|-------------------|
| No.1 | 0   | 0     | 0       | 1           | 156 | 67    | 43        | 90   | 357               |
| No.2 | 0   | 5     | 2       | 9           | 77  | 68    | 24        | 88   | 273               |
| No.3 | 2   | 5     | 0       | 3           | 72  | 55    | 13        | 75   | 225               |
| No.4 | 1   | 2     | 3       | 1           | 193 | 98    | 59        | 119  | 476               |
| No.5 | 1   | 2     | 3       | 13          | 129 | 136   | 120       | 75   | 479               |



図3.2 核タンパク質を認識する抗体Nup-1, -2, -3と-4の免疫組織染色の結果とそれぞれのウエスタンブロットの結果。(a-c) Nup-1抗体による染色結果。(d-f, i) Nup-2抗体による染色結果。(g, h) Nup-3抗体による染色結果。(j-l) Nup-4抗体による染色結果。(a, d, g, j) 卵巣での各抗体による染色結果。卵巣内のGVを白い矢印で示した。また、GV内の核小体を白い矢頭で示した。(b, e, h, k) 卵割期での各抗体による染色の結果。胚の核を白い矢印で示した。(c, f, l) 尾芽胚期での各抗体による染色の結果。胚の核を白い矢印で示した。(i) Nup-2抗体によるホールマウント染色の結果。胚の核を黒い矢印で示し、分裂期の中心体付近および染色体付近が染色されている(白い矢頭)。各スケールバーの長さの50  $\mu$ mの長さを示している。(m) Nup-1, -2, -3, -4と-5のウエスタンブロットの結果。lane 1から5はそれぞれNup-1, Nup-1, -2, -3, -4と-5抗体による結果を示す。各バンドの分子量を左に記した。

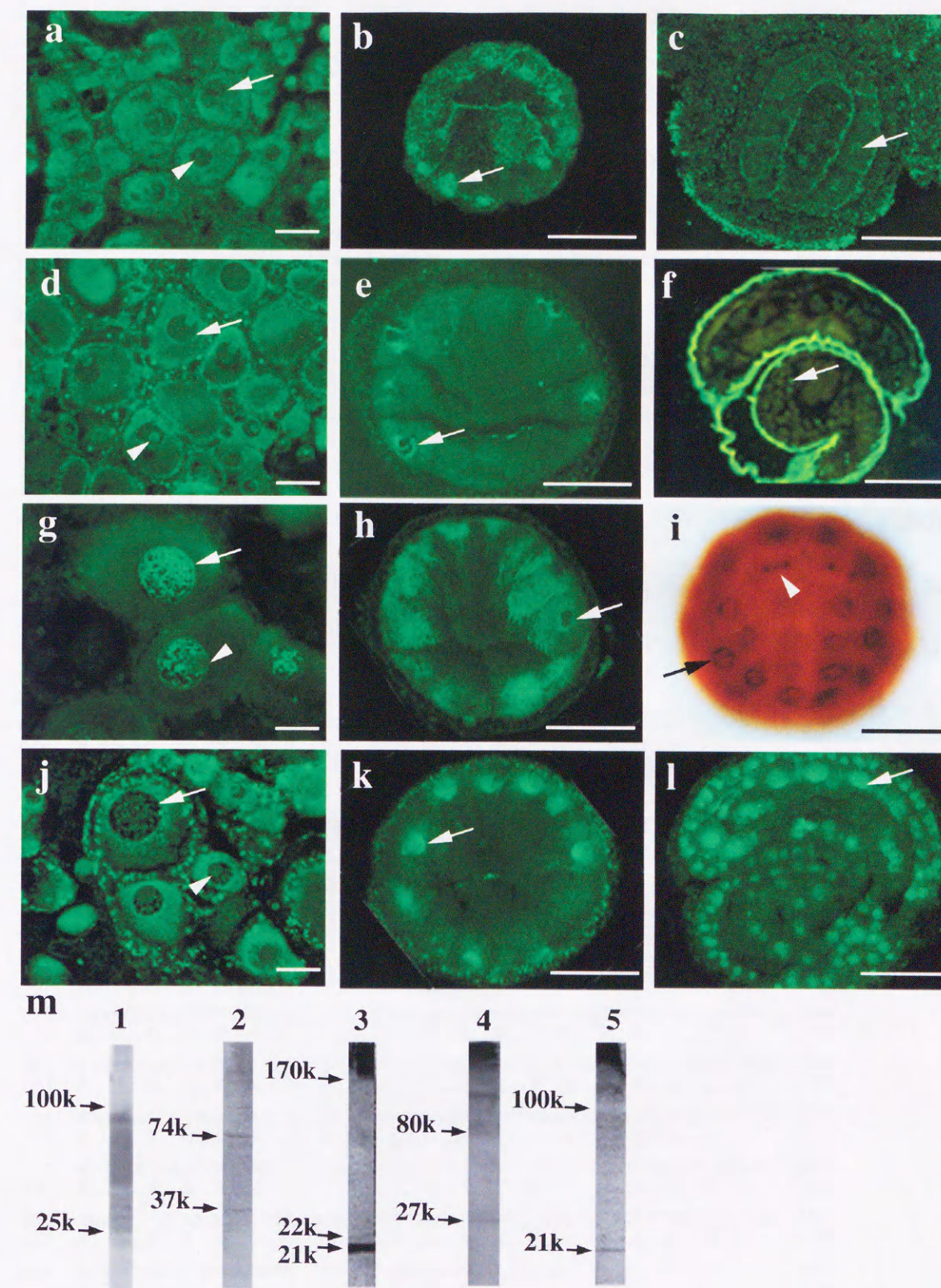




図3.3 *CiUbi-1*と*CiUbi-2*の塩基配列と予想されるアミノ酸配列。各遺伝子の塩基配列を上段に、そこから予想されるアミノ酸配列を下段に記した。cDNAの全長は*CiUbi-1*は723bpで240アミノ酸を含んでいた。*CiUbi-2*は462bpで153アミノ酸を含んでいた。アスタリスクは終止コドンを示す。各アミノ酸配列中でユビキチンタンパク質と相同性の高い部分を下線で示した。*CiUbi-1*には3つのユビキチンタンパク質が連続して存在しており、*CiUbi-2*には2つのユビキチンタンパク質が連続して存在していることから、これらの遺伝子はカタエウレイボヤのポリユビキチン遺伝子であることがわかった。

### *CiUbi-1*

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 1   | AGAACTTATATTTACGAAACGcGTTTTATTCTGCGTTGCAAGAATTAATATATTACAAA   | 60  |
| 1   | R T Y I Y E T R F I L P L Q E L I Y Y K                       | 20  |
| 61  | ATGCAGATCTTTGTGAAAACCTTTGACTGGAAAGACCATAACTCTTGAAGTTGAGGCATCT | 120 |
| 21  | M Q I F V K T L T G K T I T L E V E A S                       | 40  |
| 121 | GACTCTATTGACAACGTCAAGGCTAAGATCCAAGACAAAGAAGGAATCCCACCAGATCAG  | 180 |
| 41  | D S I D N V K A K I Q D K E G I P P D Q                       | 60  |
| 181 | CAACGTCTTATCTTCGctGGTAAGCAGCTTGAAGATGGACGCACACTGAGCGATTACAAC  | 240 |
| 61  | Q R L I F A G K Q L E D G R T L S D Y N                       | 80  |
| 241 | ATCCAGAAAGAGTCTACTCTTCACTTGGTTCTTCGTCTCAGAGGAGGAATGCAAATCTTT  | 300 |
| 81  | I Q K E S T L H L V L R L R G G M Q I F                       | 100 |
| 301 | GTCAAAACTTTGACAGGAAAGACCATCACTCTTGAAGTTGAGGCATCGGACTCTATTGAC  | 360 |
| 101 | V K T L T G K T I T L E V E A S D S I D                       | 120 |
| 361 | AACGTCAAagCCAAGATCCAAGACAAAGAAGGAATCCACCAGATCAGcAACGTCTTATC   | 420 |
| 121 | N V K A K I Q D K E G I P P D Q Q R L I                       | 140 |
| 421 | TTGCTGGTAAGCaGCTTGAAGATGGaCGTactGAGCGATTACAACATCCAAAAAGAG     | 480 |
| 141 | F A G K Q L E D G R T L S D Y N I Q K E                       | 160 |
| 481 | TCTACTCTTCACTTGGTTCTTcgtCTCAGAGGAGGAATGCAAATCTTTGTcAAAACTTTG  | 540 |
| 161 | S T L H L V L R L R G G M Q I F V K T L                       | 180 |
| 541 | acAGGAAAGACTaTCACTCTTgaAGTTGAGGCTTCTGATTCTATTGACAACGTCAAGCTA  | 600 |
| 181 | T G K T I T L E V E A S D S I D N V K L                       | 200 |
| 601 | AgaTTCAAGaCaAAGAAGGATACCCCCAGATCagcaACGTCTTATTCTtcGCTGGTAAG   | 660 |
| 201 | R F K T K K D T P Q I S N V L F F A G K                       | 220 |
| 661 | CagCTtgAAGACGGACgcACACTGAGCGATTaCAaCATCCAGAAGgtCTACTCTTCACT   | 720 |
| 221 | Q L E D G R T L S D Y N I Q K S L L F T                       | 240 |
| 721 | TAG   | 723 |
|     | *   |     |

### *CiUbi-2*

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 1   | ATGCAAAATTTTGTCAAAACCTTTGACTGGAAAGACTATCACTCTTGAAGTTGAGGCATCT | 60  |
| 1   | M Q I F V K T L T G K T I T L E V E A S                       | 20  |
| 61  | gaCTCTatTGACAACGTCAAAGCCAAGATCCAAGACAAAGAAGGAATCCCCCAGATCAG   | 120 |
| 21  | D S I D N V K A K I Q D K E G I P P D Q                       | 40  |
| 121 | CAACGTCTTATCTTCGCTGGTAAGCAGCTTGAAGATGGACGCACACTGAGCGATTACAAC  | 180 |
| 41  | Q R L I F A G K Q L E D G R T L S D Y N                       | 60  |
| 181 | ATCCAAAAAGAGTCTCacGcTTCACTTGGTTCTCGTCTCAGAGGAGGAATGCAAATCTTT  | 240 |
| 61  | I Q K E S H A S L G S R L R G G M Q I F                       | 80  |
| 241 | GTCAAAACTTTAACTGGAAAAACCATCACTCTTGAAGTTGAGGCATCTGACTCTATTGAC  | 300 |
| 81  | V K T L T G K T I T L E V E A S D S I D                       | 100 |
| 301 | AATGTCAAAGCCAAGATCCAAGACAAAGAAGGAATCCCCCAGATCAGCAACGTCTCATC   | 360 |
| 101 | N V K A K I Q D K E G I P P D Q Q R L I                       | 120 |
| 361 | TTGCTGGTAAGCAGCTTGAAGACGGACGCACACTGAGCGATTACAACATCCAGAAGGAG   | 420 |
| 121 | F A G K Q L E D G R T L S D Y N I Q K E                       | 140 |
| 421 | TCTACTCTTCACTTGGTTCTTCGTCTCAGAGGAGGAATCTAA                    | 462 |
| 141 | S T L H L V L R L R G G I *                                   | 153 |



表4.1 今回解析を行った100クローンのうち、*in situ*ハイブリダイゼーションを行った結果得られた尾芽胚と原腸胚において組織特異的に発現していたクローンの数。

尾芽胚を用いた*in situ* ハイブリダイゼーションの結果  
得られた組織特異的に発現していたクローン

|       |                   |        |
|-------|-------------------|--------|
| 筋肉    | CsMA-1、CsMu-1     | 計2クローン |
| 表皮    | CsEpi-1、CsEpi-2 他 | 計9クローン |
| 間充織   | クローン 40、68 他      | 計4クローン |
| 脳、神経索 | クローン 32、74        | 計2クローン |
| 脊索    | クローン 34、43、81     | 計3クローン |

表4.1 今回解析を行った100クローンのうち、*in situ*ハイブリダイゼーションを行った結果  
得られた尾芽胚と原腸胚において組織特異的に発現していたクローンの数



図4.1 *CsEpi-1*の塩基配列と予想されるアミノ酸配列。塩基配列を上段に、そこから予想されるアミノ酸配列を下段に記した。cDNAの全長は2653bpで741アミノ酸からなるタンパク質をコードする単一のORFを持つ。アスタリスクは終止コドンを、2つのポリA付加シグナルをアンダーラインで示す。推測される3つのP-type trefoil domeinを黄色で示した。

|      |  |      |
|------|--|------|
| 1    | GTTGAATTGGCTAGTTAGTGAGAGGACGAGAGGTAGAATGAAGACTTGCTTAATCCTCTGTTCTGCTGCTGTAACAGCTTATATTGCCGA | 90   |
| 1    | M K T C L I L C F V L V T A Y I A D  | 18   |
| 91   | TGCCAAGCTCTCACCACCTTATGATGTGGATAATGAAGTTCTCCTTGTTCTCCTCGTATCAGCACAAAGGAGAAACATTAAACCAAC    | 180  |
| 19   | A N V S P P Y D V D N E V L L V F S L V S A Q R R N I N P T                                | 48   |
| 181  | CGATGTAATCGACATGATTTTCCCAAGTTAATGGACAACTCTAGACCTCACTGAGCGGATGCAAGTTGATCTTCTGTCACGCCGG      | 270  |
| 49   | D V I D M I F P T L M D N S L D L T R A M Q V D L L V H A G                                | 78   |
| 271  | TTTACCCGGAACCTTCCCATGCAACACTGAATGAGATCTTCCAATGATGGCACAGATGGTAAAGGTGTTGAGGCCAAGTCATGAC      | 360  |
| 79   | F T R E L S H A T L N E I L P M M A H D G K G V Q S Q V M T                                | 108  |
| 361  | TTTGCTTCTACTCTCGAGGCAATTCTGCAGAAAAGCAAGGGTTTCAGCCCAACCTGTCGCAAGACGAGGATCTGTTCTTCATTGGT     | 450  |
| 109  | L L L L S R Q F C R K D K G F S P T C P Q D E D T V L P L V                                | 138  |
| 451  | TGCAATGCAAGACCTCTGCGATGATGAACATGATATCTACAGCATAGTCAGTCGCAAGACGATATGTGTCGATGAACGAACA         | 540  |
| 139  | A M Q D P R G C M N N D I Y S D S P V A E S D M C R C N E Q                                | 168  |
| 541  | AGGAGACGCCATGTTCTGGCTTACACTTTTCGAGCGCTTCTCAGCACAGTGGATACAGCCCAACCGCTTGGTGTCAATGCCAC        | 630  |
| 169  | G D A M F W L T L F E R F S R T V D T T P Q T A L V F N A T                                | 198  |
| 631  | CAGCAACCGAAGCGAGAGAGTTGTACCAACCAACTTCCATTCTTATGATGATGATTTGGATGACATGCAATGATGATGAT           | 720  |
| 199  | S N R T E E R V V P N Q L P I L M M M I L D D M Q C N G T L                                | 228  |
| 721  | GAGTCGAACGAGGCGATTGTAGTGACCCCGTAAACAGAGGGCCCAAGCAGCTTTACTTCAATACGCTGTCATCAGATGAAGT         | 810  |
| 229  | S S N Q G S C R C T R V T E G H Q A A L L Q Y A V T S D E V                                | 258  |
| 811  | CCAAGCTAGTCTAACCCGAGCAACGGGCGCAGTGAGAGCGCTTTCGGTTCACCGTTCACGACAGTCAGCAACACTCACAGATTA       | 900  |
| 259  | Q A S L T P E Q R A A V R A A F G S P V P R Q S A T L T D Y                                | 288  |
| 901  | CATTTTCTCGAGCATGGCTGGTACAAGCAGCCCAAAATGCTTCTCTCTCGCAAAACCAAGGAGAGTACGTCATGTCATGTCGAGACA    | 990  |
| 289  | I F S S M A G T S S P Q M L S L L A N Q G E S R D V M L R Q                                | 318  |
| 991  | GCTGATTATGCAAGTTTGGTCTTGACACAGTATGGTCCACATCTTTTGAACGGTGATTTGGTAAACGACGTCATGAAGTTGCTT       | 1080 |
| 319  | L I M S S F G L D T S M V H I L L N G G F G N D A N K V A L                                | 348  |
| 1081 | GATCAATACATGACAAACATCGGCGCCATGACCATCTATCCTCCCTCTTCTTCAAGTTGACAAAGGAAGAATTTTTCATCAG         | 1170 |
| 349  | I N Y M T N I G A I D H S I L P L L L Q V D K G R E F F I S                                | 378  |
| 1171 | CAGTCTTATTGAGATGGTGAATCAATCCGCTGATGGTATGATGCTTTCGACAGCAAGAGGCGGACACAAACACAACTCTGGA         | 1260 |
| 379  | S L I Q S G R I N P L M G M I V L A Q Q G G A T Q T Q L L D                                | 408  |
| 1261 | TTACATTACGAAGCAATTGCTGGTTCATCAACCCGGCTTACTTTGAGAGCTTGAACCGACCTTACATCCCGCTCTTCGCTGCGAT      | 1350 |
| 409  | Y I T E A I A G S S N P A Y F E S L T R P Y I P A L P S G I                                | 438  |
| 1351 | TTTCCCTGGCTCCCACTACTTCGCAATTTGAAGCCCTCGGCTCAACCTGTGCGCTCCATGACTTGAGAAACCGGATCGACTG         | 1440 |
| 439  | F P G S Q L Y F A H F E A L G V N T C A L H D L R N R I D C                                | 468  |
| 1441 | TGGTACGTTGGTATCAGCGCTGCCAATGTGAGGTCAACCTTACTGCTGTGACAAACCAATCTTCTTACCGTACTGAAGTACGAA       | 1530 |
| 469  | G Y V G I S A A E C E V T P Y C C Y N P I F L T D T E V R N                                | 498  |
| 1531 | TGCAACCGCAACTCAATTACATCAGCAACTGCTGTTCCATGGTCTACTACACGTTTCTTCTTACTACAACCTATATTACATGGA       | 1620 |
| 499  | A T G N S I T S A T A V P W C Y Y N V F F I Y Y N L Y Y M E                                | 528  |
| 1621 | AGTAAAGAAACCAACAAATTTGCGTCCGAGTCAGTGCCTTCTGCTATTCAAGTATGGTCTTACACTTGACCATCCCTCTACCATCT     | 1710 |
| 529  | V K K P T K F A S P V Q C L R L F K Y G L T L D P S L Y H L                                | 558  |
| 1711 | GTACGATCCAGCAACCAACAGTAGCGTTGGAAGATTGGTGAACCGAGATACGAATGCGGATCCAGGTGTGACTGAGTTCACCTG       | 1800 |
| 559  | Y D P A N P T S S V G R L V N P R Y E C G F P G V T E F H C                                | 588  |
| 1801 | CGTTGCCATCCGGGATGTTGCTGGGATGCAAACTCCCATTCAGAGTTCCTCAATGTTTCAACCGAAGCGGCAAGAACTTAGATT       | 1890 |
| 589  | V A I R G C C W D A N S P F R V P Q C F Q P N G P K N L D F                                | 618  |
| 1891 | TAACTTCAACAACTTCCAGTCGCTTACCAATCTCCAAACGGATCATGTAAACATCAACCGATATAGCATTCTTATGTTACTATGGAAG   | 1980 |
| 619  | N F N N I P V A Y Q S P N G S C N I N R Y S I P M L Y Y G R                                | 648  |
| 1981 | AACTGCTTGCATTACTTTCGCTAATTACATTGACGGTTACAACATCTATCCCTCTTACAGATTAGCTGCTTACTAAATAGG          | 2070 |
| 649  | T A C H Y S F A N Y I D G Y N I L S L P N R L D C L T K L G                                | 678  |
| 2071 | TTGTTGCTACGAAACGACGAACGGTGGTGGCAATACCCATGGTACGAGATGTTATAAGCGAGAGGAAGGACGATTGCCGGTTT        | 2160 |
| 679  | C C Y E N D E R V V A Q Y P M V P R C Y K R E E G T I A G L                                | 708  |
| 2161 | GCCCGGTGTAGGGCTCTAATCAGAAAGTGAACGGGAGATGTTCAATCCCTATACCTCCGTTACCCACCAACACCCACCCCAAC        | 2250 |
| 709  | P G V G A L I R S G T G D S S I P I P P G Y P N T P P P P                                  | 738  |
| 2251 | CGGGAAGAAATAGATTCTTTATCTTAAATCTTGTAAATTCGAGACCTCGAGACAGGAGTCCCTATTATCGTTTTTTTGTATAC        | 2340 |
| 739  | G K K *  | 741  |
| 2341 | GAATGCCATGAGCACACGGAACCCGACAGTAATATTGGACATAGTGTAAAGTATGATTTTGAAATTTGAAATCTATAGATTATTTA     | 2430 |
| 2431 | TTTTCGCTTGTGGATTCTGCTTTGAACGGCCAATGATGTAATATTGACACGAATTGTACTTTGCGTTTATTAACGTTTATTAATC      | 2520 |
| 2521 | TTTCCCTAATAATCTGAGCTTACTAAACTATGGTGAACAAAGCCGACTAACCCGCTATTGTTATGTAATAAAGTTGTATACAGTTT     | 2610 |
| 2611 | TTTTGAATAATATGTAGGACTAAAAAATAAAAAAAAAA   | 2653 |



図4.2 ユウレイボヤ1細胞期(FE)および尾芽胚期(TB)ポリA<sup>+</sup> RNAに対するノザンプロットの結果。(a) メンブレンに転写したポリA<sup>+</sup> RNAのエチジウムブロマイド染色像 (b) *CsEpi-1*, (c) *CsEpi-2*, (d) *CsMA-1*, (e) *CsMu-1*。各レーンには1.5  $\mu$ gのポリA<sup>+</sup> RNAを泳動している。各プローブには<sup>32</sup>PでランダムにラベルしたDNAプローブを用いた。

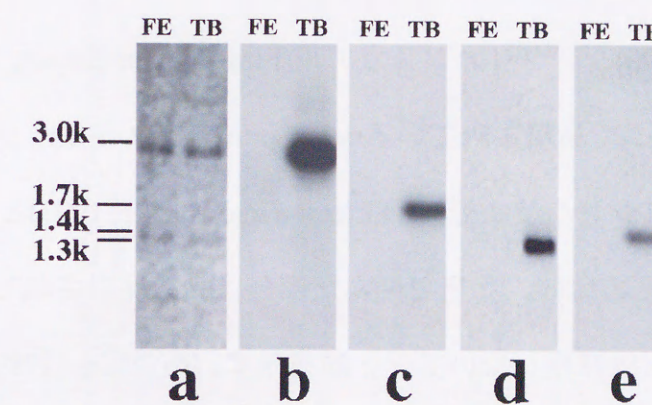




図4.3 CsEpi-1と他の動物で単離されたtrefoil proteinファミリーとの比較。(a) ヒト(hITF; Podolsky *et al.*, 1993 and pS2; Jakowlew *et al.*, 1984)、ブタ(PSP; Tomasetto *et al.*, 1990)、アフリカツメガエル(FIM-A.1; Hoffmann, 1988 and xp2; Hauser *et al.*, 1992)で単離されているtrefoil proteinファミリー、およびそれらに見られるコンセンサス配列(Hoffmann and Hauser, 1993)とCsEpi-1のアミノ酸配列との比較。赤色で囲んだ部分は良く保存されている領域を示す。ダッシュは存在しないアミノ酸を示す。(b) Thim (1989)によるtrefoil ファミリータンパク質の2次構造モデル。丸で囲んだCはジスルフィド結合により、3つのループを形成するシステイン残基を示す。

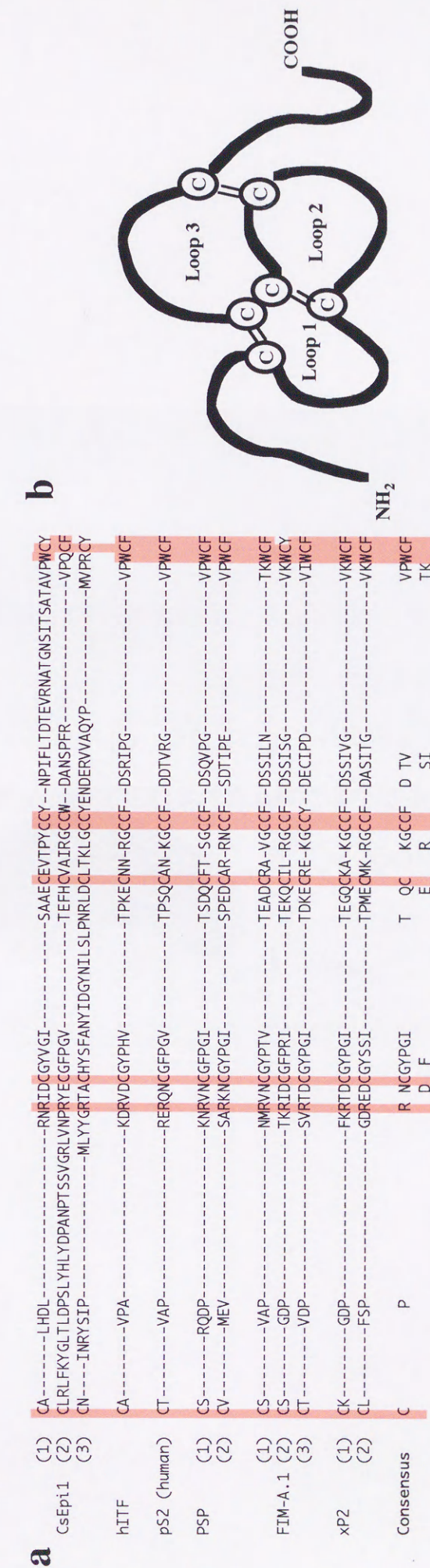




図4.4 *CsEpi-1*の発現パターン。(a) 原腸胚期。動物極側からの観察像。シグナルは検出されない。(b) 神経胚期。表皮細胞にシグナルが検出される。(c) 尾芽胚期。表皮細胞にシグナルが検出される。(d) 尾芽胚期の切片による観察。表皮細胞にのみシグナルが検出される(矢印Epi)。A: 前側、P: 後ろ側。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。

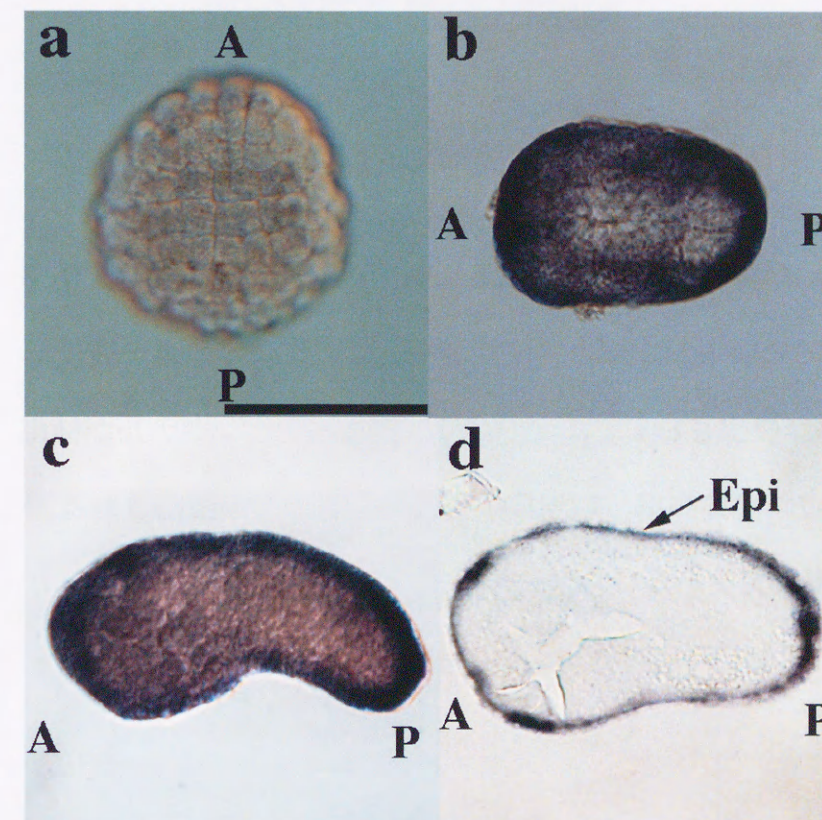




図4.5 カタユウレイボヤ胚を用いた*in situ*ハイブリダイゼーション。尾芽胚期での発現パターン。(a) *CsEpi-1*。尾芽胚期の切片による観察。表皮細胞にのみシグナルが検出される。(b) *CsMA-1*。筋肉細胞にシグナルが検出される。(c) *CsMu-1*。尾芽胚期。筋肉細胞に弱いシグナルが検出される。  
A: 前側、P: 後ろ側。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。

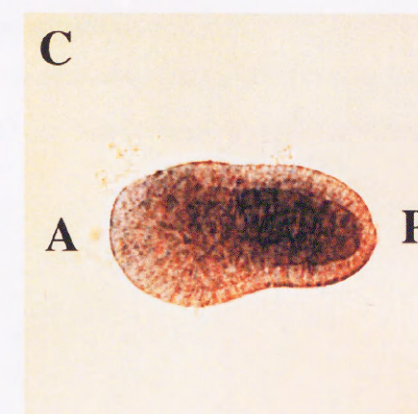
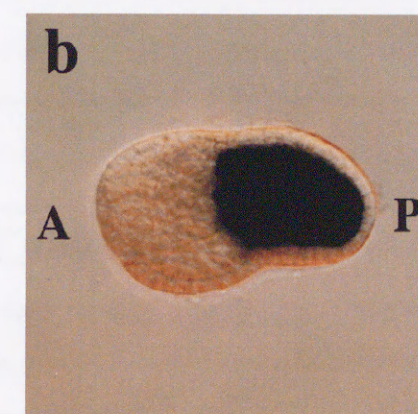
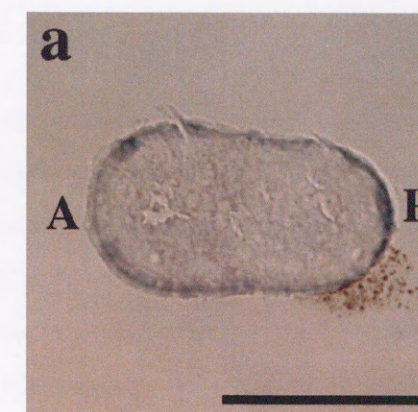




図4.6 *CsEpi-2*の塩基配列。cDNAの塩基配列の全長は1618bpで、十分な長さのORFは見つからなかった。ポリA付加シグナルをアンダーラインで示す。

```

1  CAGAACTGTGTTTCCAAATCCACAGTCTGTATAGCCTAGGCTCTGGTGCTCTCGAGGGCGGGAATACGCTTAACGTACCTACAGCCAGT  90
91  CCCCACTTATAAACTACGTAGCCTGTTATGCTTATATGCAATATTGTAATTGTACCGTTGCGCTTATCGGAGTCAAAGTGAATAATAA  180
181 AGCTAAACTGCTACCGTCTACCTTGTAAGTCAAACAGTTATTATATTAATAAGCAGCCGCTACAATTGGTGAATACCCGTAAACGTG  270
271 GTTGAAGTCAGCAACCTTCCGATGCCTAACGTTACCTATGCTGCTTATTGGACACCTTAATATTATTTGTTTTCAAGTATTTATCTCC  360
361 AAAAGAAACAGCTTCACGATCCTCTACGTCAACGACGGAATAAACACCGGCGTCATGTCGTGAATCGAAGCGTTTTGTCAaGCCAAG  450
451 CCCAAATCCGCGTCAACCAACCAAGGTGTGTCTATTTCAAAGTACCGTCCGACCACGGTCACCTTAACGCGACCTTAGCAAGAAAAGG  540
541 CGCTAACTAACTGTTGGAGCGAACTACGCATAACAACCAACAGATTTACACCCCCACTCATGTCAGTGGAGGAGGTCCAATTTAACC  630
631 TGGTATTCGCGGATGGCTGGCAGACACAAATTGAACGGAACATCAATCTCAACAACCTCTGAAATTTCTACAAGAACAACCTCCGGAAG  720
721 TTTCACTGCTGGTCCGACGAAGGAGGCGGTTCAATCGATAAGAGTACAACAGGACTGTCTATATACCCAGGTGCGCCTAAGTCTACAA  810
811 GTCTGTTTTATATTGCCTGGGCCAATTATCGAAGGCCTGGATTACACGGCGTCTCTGCTACCCGAGCAAGAAGCTCTCCGAGGCGCGAC  900
901 TGTGGTGCTTCAATAAGCATAAAATCCAACAGGAATTTGTCTCCATCCGACCACGATGGAGACCGTCTAATTTTCGTGCTCAAGGAA  990
991 CGATGGACGAATATTACCTGGGTGCTCGAAACGAACTGTTGACTCTTTATCGGGAAGGCCGAACCTCAAAGTATCCACGGGCGAAC  1080
1081 TTTAATTCAAATTATTCAAACCCGAAAAAAGGAGGTATGTCGTATACCGACATTGGCTGTTAGCGAAATCGTTCCAAGAAGACTACAA  1170
1171 GGAACAAAGGAGTCTCTAAATGACGAAGAAGATCTAAATTCAGATGCGATCAACGCAACTTCTAAATTTAACGTGCGGAGATAATCCA  1260
1261 TTGTATCGAGCGCAAAATAATCTATTGTGCGTTTTTAGATATTCTGCATCGCATTTTTTCCCTTGGAGCCAAATCGCATATAAAGACA  1350
1351 TCATTTTCATCAGAGAGAGACACAGACAGAGATGCTAGGCCTACAGAAGTGTGTTTCCAAATCCACAGTCTGTATAGCCTAGGCTCTGGT  1440
1441 GCTCTCGAGGGCGGGAATACGCTTAACGTACCTACAGCCCGTCCCCACTTATAAACTACGTAGCCGTTATGCTTATATCCATTATTG  1530
1531 TATTTGCACCGTTGCGCTTATCGGACCCAATATAATAAGCAAACTGCTACCCGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  1618

```



図4.7 *CsEpi-2*の発現パターン。(a) 8細胞期。植物極側の2つの割球対(a4.2とb4.2割球対)の核にシグナルが検出される。(b) 原腸胚期。動物極側からの観察像。すべての予定表皮割球にシグナルが検出される。(c) 尾芽胚期。表皮細胞にシグナルが検出される。(d) 尾芽胚期の切片による観察。表皮細胞にのみシグナルが検出される。A: 前側、P: 後ろ側。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。

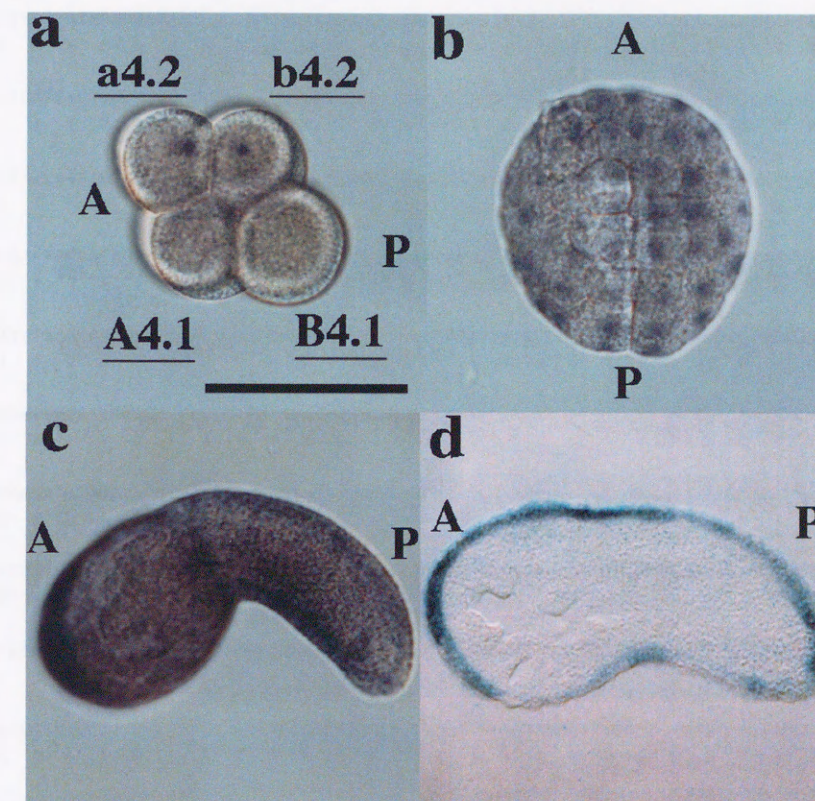




図4.8 *CsMA-1*の塩基配列と予想されるアミノ酸配列。塩基配列を上段に、そこから予想されるアミノ酸配列を下段に記した。cDNAの全長は1300 bpで378アミノ酸からなるタンパク質をコードする単一のORFを持つ。アスタリスクは終止コドン、ポリA付加シグナルをアンダーラインで示す。塩基配列とアミノ酸配列から*CsMA-1*は既知の筋肉アクチンと相同性が高いことがわかった。

```

1  TCAACACAAGAACCTCGGTCGCTAACTTTGAAAGTGAAGTGTGCGGACTCAGAAGAAGATCAAACCGCTTTGGTGTGCGACAACGGGTCA  90
1  M S D S E E D Q T A L V C D N G S 17

91  GGATTGGTTAAGTCTGGTTTCGCCGGAGATGACGCACCTCGCGCCGTCTTCCCATCCATTGTTGGACGACCACGTCATCAGGGGGTCATG  180
18  G L V K S G F A G D D A P R A V F P S I V G R P R H Q G V M 47

181  GTCGGTATGGGCCAGAAAGACAGCTACGTTGGCGACGAAGCTCAAAGCAAGAGAGGCATCCTCACTCTCAAAACCCCATCGAACACGGT  270
48  V G M G Q K D S Y V G D E A Q S K R G I L T L K Y P I E H G 77

271  ATCATCACTAACTGGGACGATATGGAAGATCTGGCACCACACCTTTTACAACGAGCTCCGAGTTGCACCAGAGGAACACCCAACCTCTG  360
78  I I T N W D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P T L 107

361  CTAACCGAAGCCCACTTAACCCCAAGCGAACAGAGAAAGATGACGCAATCATGTTTGAACATTCAATGTGCCAGCGATGTACGTA  450
108  L T E A P L N P K A N R E K M T Q I M F E T F N V P A M Y V 137

451  GCAATCCAAGCGTGCTTTCTCTCTACGCTTCTGGCCGTACCACAGGTATCGTTATGGATGCCGGTGACGGTGTTCACACAAGTTCCA  540
138  A I Q A V L S L Y A S G R T T G I V M D A G D G V S H N V P 167

541  ATCTACGAGGGTTATGCGCTCCCTCACGCCATCGCCCGGTTGGATTAGCTGGACGAGATCTCACTGATTACTTGATGAAGATTCTCACC  630
168  I Y E G Y A L P H A I A R L D L A G R D L T D Y L M K I L T 197

631  GAGAGAGGATATTCTTCGTCACAACCGCTGAACGCGAAATCGTTGAGACATCAAAGAAAAGCTTTGCTACGTTGCTCTTGATTTTGAG  720
198  E R G Y S F V T T A E R E I V R D I K E K L C Y V A L D F E 227

721  CAAGAAATGGCGACCGCTGCATCTTCTACGTCATTGGAGAAAAGCTATGAGCTTCTGATGGTCAAGTAATTACGATCGGAAACGAGAGA  810
228  Q E M A T A A S S T S L E K S Y E L P D G Q V I T I G N E R 257

811  TTCAGATGCCCGAGAAACGCTCTTCCAACCTTCTTTCATCGGAATGGAATCCGCTGGAATCCACGAAACCACTACAACCTCCATCATGAAG  900
258  F R C P E T L F Q P S F I G M E S A G I H E T T Y N S I M K 287

901  TGCACATCGACATCCGCAAGGATCTCTACGCCAACAACGTTCTcTCCGGAGGTACCACCATGTACCCTGGTATCGCGACAGGATGCAG  990
288  C D I D I R K D L Y A N N V L S G G T T M Y P G I A D R M Q 317

991  AAGGAGATCACTGCTCTTGCTCCAAGCACTATGAAGATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGAGGAAATACTCCGATGGATTGGAGGTTCC  1080
318  K E I T A L A P S T M K I K I I A P P E R K Y S V W I G G S 347

1081  ATCCTCGCATCTTTATCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCACCAAGCAAGAATACGACGAAGCCGGTCCATCCATCGTCCACAGAAAATGC  1170
348  I L A S L S T F Q Q M W I T K Q E Y D E A G P S I V H R K C 377

1171  TTCTAAATCAATGAATTTAATGAAGTTTTATAAGTTTTTATTTCTGATTTCACCAAGGGCATTGTACTGTGTTGACATTTAAAAI  1260
378  F *

1261  AAACCTTTCTTCACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1300

```



| Accession | Position | Sequence                              | Score |
|-----------|----------|---------------------------------------|-------|
| CsMA-1    | 1        | M-SDGEEDQALVVDNGSGGVKSGFAGDDAPRAVFP   | 59    |
| ScTB12    | 1        | M-SDGEEDQALVVDNGSGGVKSGFAGDDAPRAVFP   | 59    |
| HrMA2/4   | 1        | M-SDGEEDQALVVDNGSGGVKSGFAGDDAPRAVFP   | 59    |
| SpMA1     | 1        | MEDDQDEEQALVVDNGSGGVKAGFPDAPRAVFP     | 60    |
| CsCA      | 1        | M--D--DD-VFALVVDNGSGGVKAGFAGDDAPRAVFP | 56    |
| HrCA1     | 1        | M-CD-ED-VFALVVDNGSGGVKAGFAGDDAPRAVFP  | 57    |
|           |          | * * .. *.*,*****.* **.*.*****.*****   |       |
| CsMA-1    | 60       | EAQSKRGILTLKYP                        | 119   |
| ScTB12    | 60       | EAQSKRGILTLKYP                        | 119   |
| HrMA2/4   | 60       | EAQSKRGILTLKYP                        | 119   |
| SpMA1     | 61       | EAQSKRGILTLKYP                        | 120   |
| CsCA      | 57       | EAQSKRGILTLKYP                        | 116   |
| HrCA1     | 58       | EAQSKRGILTLKYP                        | 117   |
|           |          | *****.****.*****.*****.*****          |       |
| CsMA-1    | 120      | EKMTQIMFETFN                          | 179   |
| ScTB12    | 120      | EKMTQIMFETFN                          | 179   |
| HrMA2/4   | 120      | EKMTQIMFETFN                          | 179   |
| SpMA1     | 121      | EKMTQIMFETFN                          | 180   |
| CsCA      | 117      | EKMTQIMFETFN                          | 176   |
| HrCA1     | 118      | EKMTQIMFETFN                          | 177   |
|           |          | *****.*****.*****.*****.*****         |       |
| CsMA-1    | 180      | RDLLAGRDLTDYLMKILTERGYSF              | 239   |
| ScTB12    | 180      | RDLLAGRDLTDYLMKILTERGYSF              | 239   |
| HrMA2/4   | 180      | RDLLAGRDLTDYLMKILTERGYSF              | 239   |
| SpMA1     | 181      | RDLLAGRDLTDYLMKILTERGYSF              | 240   |
| CsCA      | 177      | RDLLAGRDLTDYMMKILTERGYSF              | 236   |
| HrCA1     | 178      | RDLLAGRDLTDYLMKILTERGYSF              | 237   |
|           |          | *****.*****.*****.*****.*****         |       |
| CsMA-1    | 240      | EKSVELPDGQVITIGNERFRCPE               | 299   |
| ScTB12    | 240      | EKSVELPDGQVITIGNERFRCPE               | 299   |
| HrMA2/4   | 240      | EKSVELPDGQVITIGNERFRCPE               | 299   |
| SpMA1     | 241      | EKSVELPDGQVITIGNERFRCPE               | 300   |
| CsCA      | 237      | EKSVELPDGQVITVGNERFRCPE               | 296   |
| HrCA1     | 238      | EKSVELPDGQVITVGNERFRCPE               | 297   |
|           |          | *****.*****.*****.*****.*****         |       |
| CsMA-1    | 300      | NVLSGGTTMPYGIADRMQKEITALAPSTMKIKI     | 359   |
| ScTB12    | 300      | NVLSGGTTMPYGIADRMQKEITALAPSTMKIKI     | 359   |
| HrMA2/4   | 300      | NVLSGGTTMPYGIADRMQKEITALAPSTMKIKI     | 359   |
| SpMA1     | 301      | NVLSGGTTMPYGIADRMQKEITALAPSTMKS       | 360   |
| CsCA      | 297      | NVLSGGSTMFPGISDRMQKEITALAPPTMKIKI     | 356   |
| HrCA1     | 298      | NVLSGGSTMFPGISDRMQKEITALAPPTMKIKI     | 357   |
|           |          | *****.*****.*****.*****.*****         |       |
| CsMA-1    | 360      | ITKQEYDE                              | 378   |
| ScTB12    | 360      | ISKQEYDE                              | 378   |
| HrMA2/4   | 360      | ISKQEYDE                              | 378   |
| SpMA1     | 361      | ITKQEYDE                              | 379   |
| CsCA      | 357      | ISKQEYDE                              | 375   |
| HrCA1     | 358      | ISKQEYDE                              | 376   |
|           |          | * *****                               |       |



図4.10 *CsMA-1*の発現パターン。(a) 64細胞期。植物極側の2つの割球対(B7.4とB7.8割球対)の核にシグナルが検出される(矢印)。これらの割球対は予定筋肉割球である。(b) 原腸胚期。植物極側からの観察像。予定筋肉割球にシグナルが検出される。(c) 神経胚期。筋肉細胞にシグナルが検出される。(d) 尾芽胚期。筋肉細胞にシグナルが検出される。A: 前側、P: 後ろ側。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。

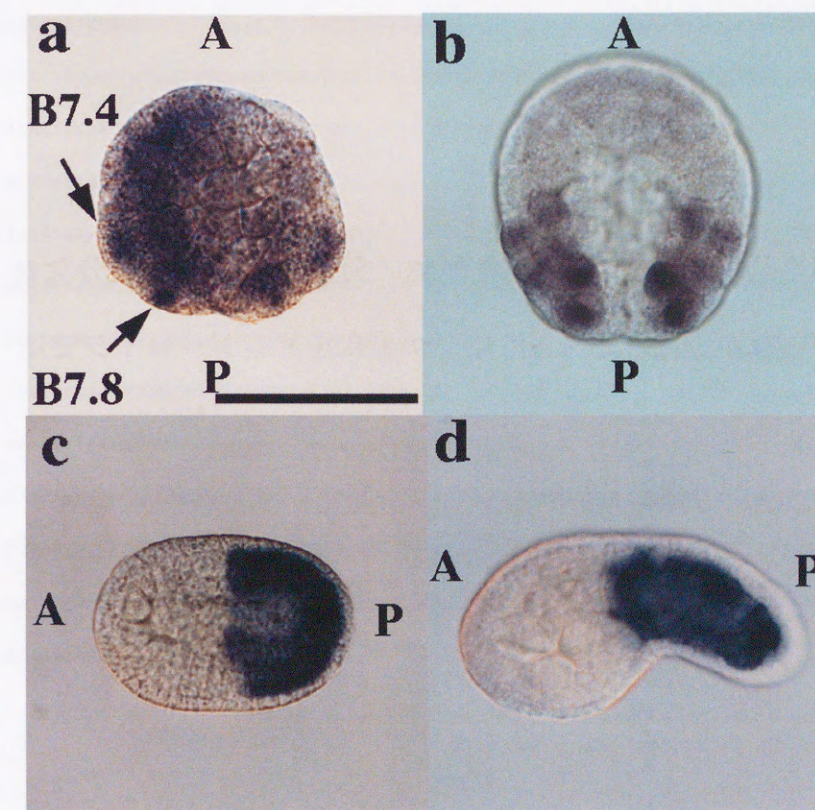




図4.11 *CsMu-1*の塩基配列。cDNAの塩基配列の全長は1364 bpで十分な長さのORFは見つからなかった。ポリA付加シグナルをアンダーラインで示す。

|      |   |      |
|------|---|------|
| 1    | GGTTTAGTGGAGGTTCCGCTGTCAGTCGAGTTGAGTTCCACACCATGTGGGTACATATGGAGTCGGAACAGAGTTTTATGTACTAGCTAT  | 90   |
| 91   | AGACGGCAGCGGACCTGGGACATGGTCCCGGCAACCAAGACTCTTTGAAAAAACCTGGCCCCACAATTGGTGACCACCCGACGTGAT     | 180  |
| 181  | ATGAACCTGCAACCTTCCGATGAAAGAAAAATAAGCTGAAGCAAGATTGTGACCAAGTTCGCCGAGAAATTTCTTCTGTTGTCAAACCC   | 270  |
| 271  | AAGTCAATGCCTCCATTTTGGAGATCTCACAATCAAGCTGAAGCCTGCCGACAAGAACGCCAAAAACTCGCCACAATGATCATTAT      | 360  |
| 361  | CCAGTTGGCATTATGGTTCTGGAACAAAACGTGACAATTCACAACAATTTAAAGATATAACTGACGCTGATCTACTGCAAAACATTTGACG | 450  |
| 451  | AACACTGCGATACGGATATTTACAACATTAAAGAAAGGTTAGTGGTTTGTGCACCCTAGGCGATTTAACCCAAGCATTATTCGTCGCTT   | 540  |
| 541  | TGTTTGCTGAATACAGCTTTATTTGTGTGTTATACTACGAGTCTAAAGGCAAAAACCTGGCCTTGTCTATCGCCAGAGTGCGCGGTTTT   | 630  |
| 631  | ATATATAGTACGCGTGTGGAATTTGCCACGCTTCCTGGTTTACCCCTTCACCTTAAATACAAGAGCTGGCTCTCTTGTGTAACCATTTTC  | 720  |
| 721  | ACCTTGAATGGATCAATGAAATGGCAATCAGTCTTATTACTCTTTAAAGCAGGCAATGCCAAATATACGAGTAACCTGCAAAGTCCTTG   | 810  |
| 811  | GTCACACGCCTTATCACTGACAATCGGCATTGTGCAGAACGTTTTTATACTTTTTGCGTCCTCTTATGTTCAATAATGCTTGGTTTAACA  | 900  |
| 901  | TTCGGCCTACAGCATAACCACTAACCATGTTTATCCTTGCTTGATTATGTTCTTATTATTGCTTTTATTGCATACTCTAGGGCCTAGCCC  | 990  |
| 991  | TTAAGTTTGAAAACGATTTTCAGATTTTGTACAGATTCTAATTCTGACCATTGAAACTCATATCTTAAATGTGGGGAAAGCAAGGTGT    | 1080 |
| 1081 | GTAGCAGTTTTGAAATTATATTTGCAAAAACGCAATTTATTTTATTAATCGACGCCAACTGTGTTCTGTTTAACTTATGACGTC        | 1170 |
| 1171 | ATTGACACTTATCACCTCATGACGCCATTGACACCTAAAGCAGTTGTTTTATCTACGTCATATTTTGCTTCATAAAGCGTTGTGCGATT   | 1260 |
| 1261 | ACATACACACAGAGATATATAGAGACATAGA <u>ACTTAATAAAGA</u> ATATATCTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA | 1350 |
| 1351 | AAAAAAAAAAAAA   | 1364 |



図4.12 *CsMu-1*の発現パターン。(a) 64細胞期。シグナルは検出されない。(b) 原腸胚期。植物極側からの観察像。予定筋肉割球にシグナルが検出される(矢頭)。(c) 神経胚期。筋肉細胞にシグナルが検出される。(d) 尾芽胚期。筋肉細胞にシグナルが検出される。A: 前側、P: 後ろ側。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。

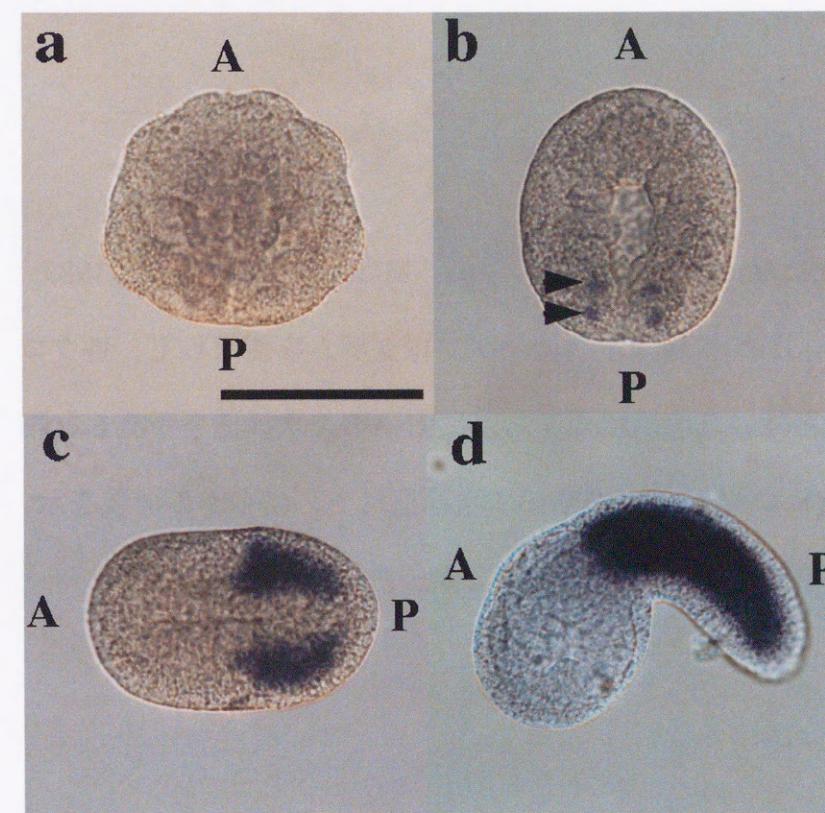




図4.13 *CsEpi-2*と*CsMu-1* の二次構造の予測。Mfold (ver. 2.3; Zuker, 1989; Zuker and Jacobson, 1995)核酸二次構造予測プログラムを使用して、各クロームのポリA部分を除いた塩基配列をもとにRNAの二次構造を予測した結果。(a) *CsEpi-2*。(b) *CsMu-1*。どちらの二次構造にも、何らかの機能を示唆するような特徴的な構造は見いだされなかった。

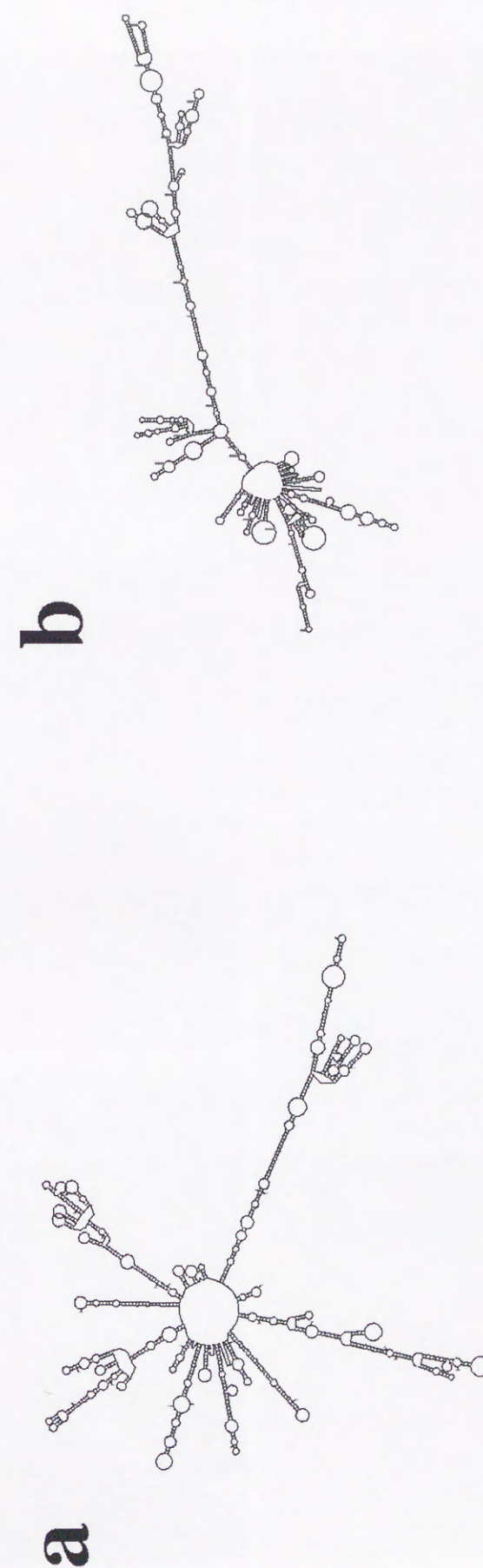




図5.1 卵細胞質再配置におけるマイオプラズムと微小管の挙動。(A-D) 抗 $\alpha$ チューブリン抗体(黄緑)とマイオプラズミンC1モノクローナル抗体(赤)を用いた二重染色によるカタユレイボヤ卵の切片での観察。(A) 未受精卵。(B) 受精後15分。(C) 新月環形成時の卵。(D) Cの高倍率での観察像。矢頭はマイオプラズムの領域を示し、Aでの矢印は微小管を示す。(E-G) 2回目の卵細胞質再配置におけるユウレイボヤ抽出卵を抗チューブリンモノクローナル抗体による染色し(茶色)、ホルマウントで観察した。(E-F) 胚の側面から卵の後ろ側の半分を観察した。矢印で示したところに分裂装置の中心体が見られる。EとFは同一の卵を絞りを変えて観察したもの。(E) 絞りを絞った観察像。Subcortical granules (SCG)によって黒く見える部分がマイオプラズムである(矢頭)。(F) Eと同一の胚で絞りを開いた観察像。中心体から発達した微小管が緩やかなカーブを描きながら後極の卵表層に達している(白い矢頭)。(G) 新月環形成時の卵の後極側からの観察像。微小管が卵表層に沿って平行に伸びているのがわかる(白い矢印)。いくつかのSCGは微小管の非常に近いところに存在していた(白い矢頭)。各スケールバーは50  $\mu$ m。

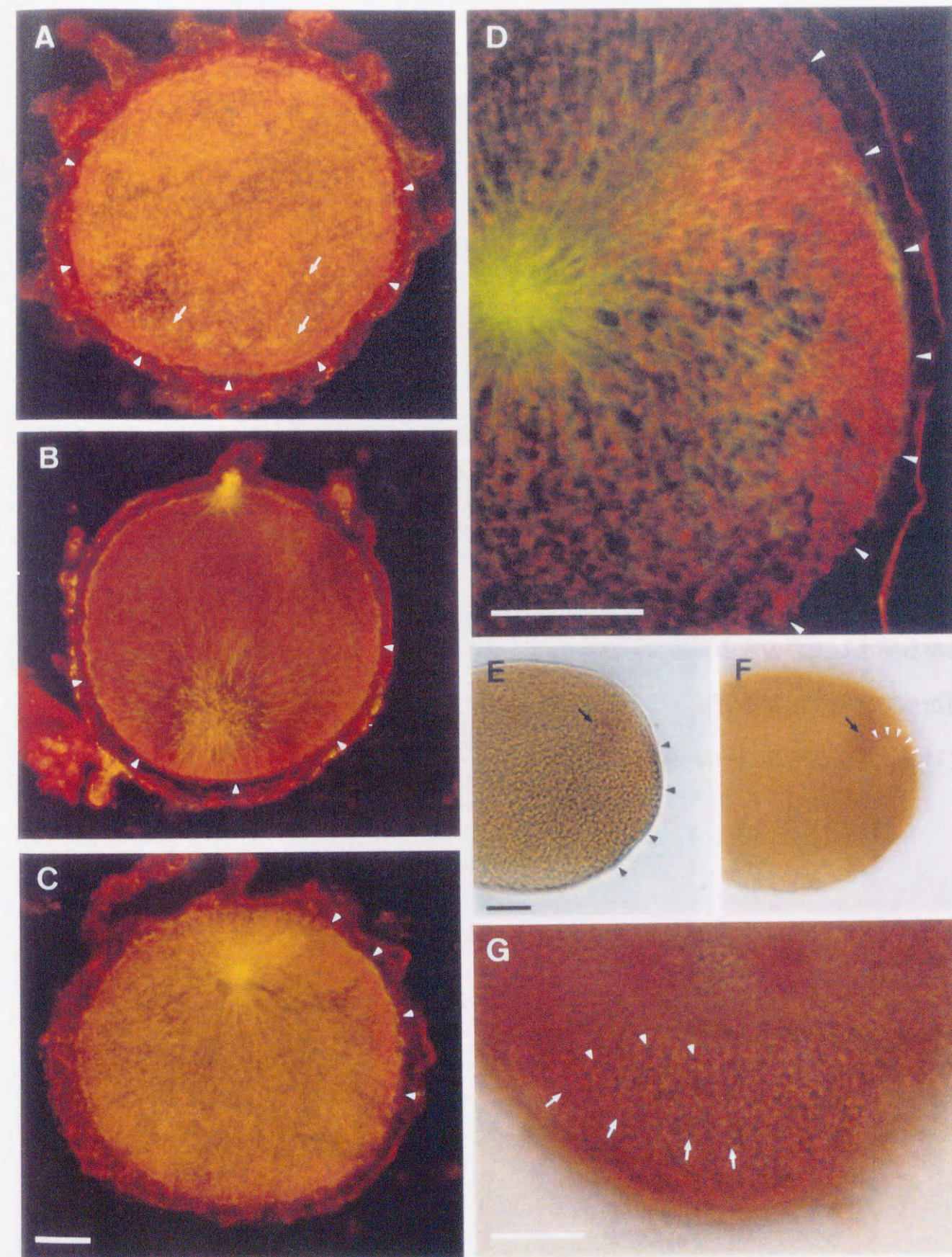




図5.2 レーザー共焦点顕微鏡による卵細胞質再配置における微小管の挙動の観察。(A) 未受精卵。マイオプラズムの部域の卵表層を点で示した。(B) 新月環形成時の卵の側面からの観察像。像は卵の後ろ側半分を観察している。焦点面を $1\mu\text{m}$ ごとにずらした15枚の観察像をSFP (Simulated Fluorescence Process)により立体再構築を行った。多くの微小管が中心体付近から発達して卵の後ろ側の表層に向かっている。卵の後ろ側の表層に向かって発達した微小管は、一定の方向にカーブしながら卵表層に達していた。各スケールバーは $50\mu\text{m}$ 。

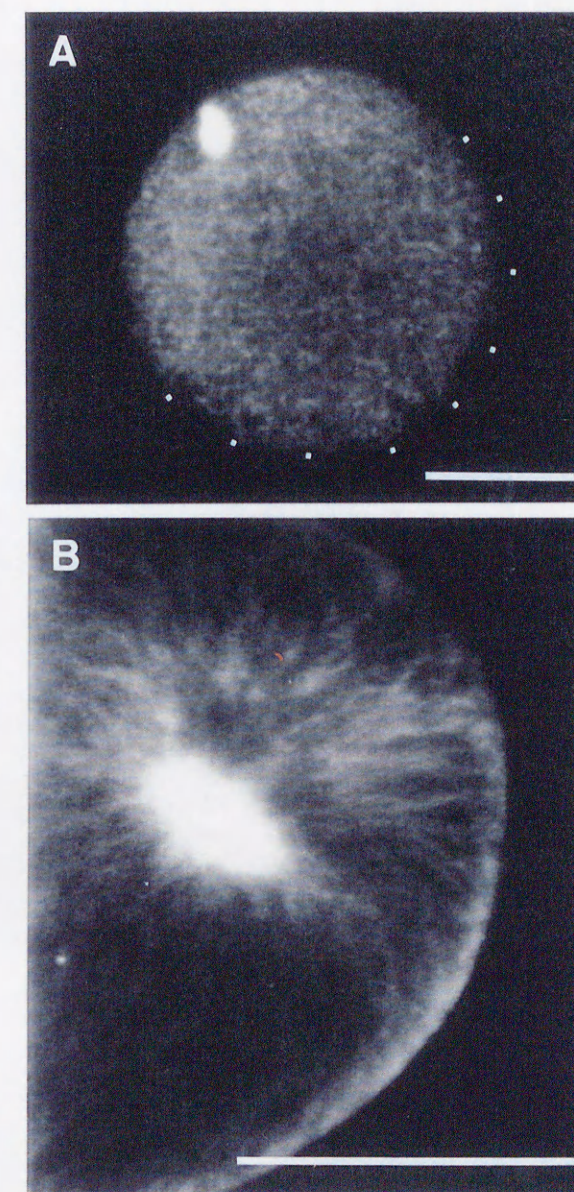




図5.3 卵細胞質再配置におけるマイオプラズムと微小繊維の挙動。ユウレイボヤ卵のホールマウントでの観察。(A, D, G)は透過光による観察像。マイオプラズムの領域に存在するSCGが観察される(矢頭)。(B, E, H) Rhodamin-phalloidin (赤)の染色。アクチンの染色を白い矢頭で示す。(C, F, I) Rhodamin-phalloidin (赤)とDAPI (青)を用いた二重露光による撮影像。(A-C) 未受精卵。(D-F) 1回目の卵細胞質再配置の時期。(G-I) 2回目の卵細胞質再配置の時期。スケールバーは50  $\mu\text{m}$ 。

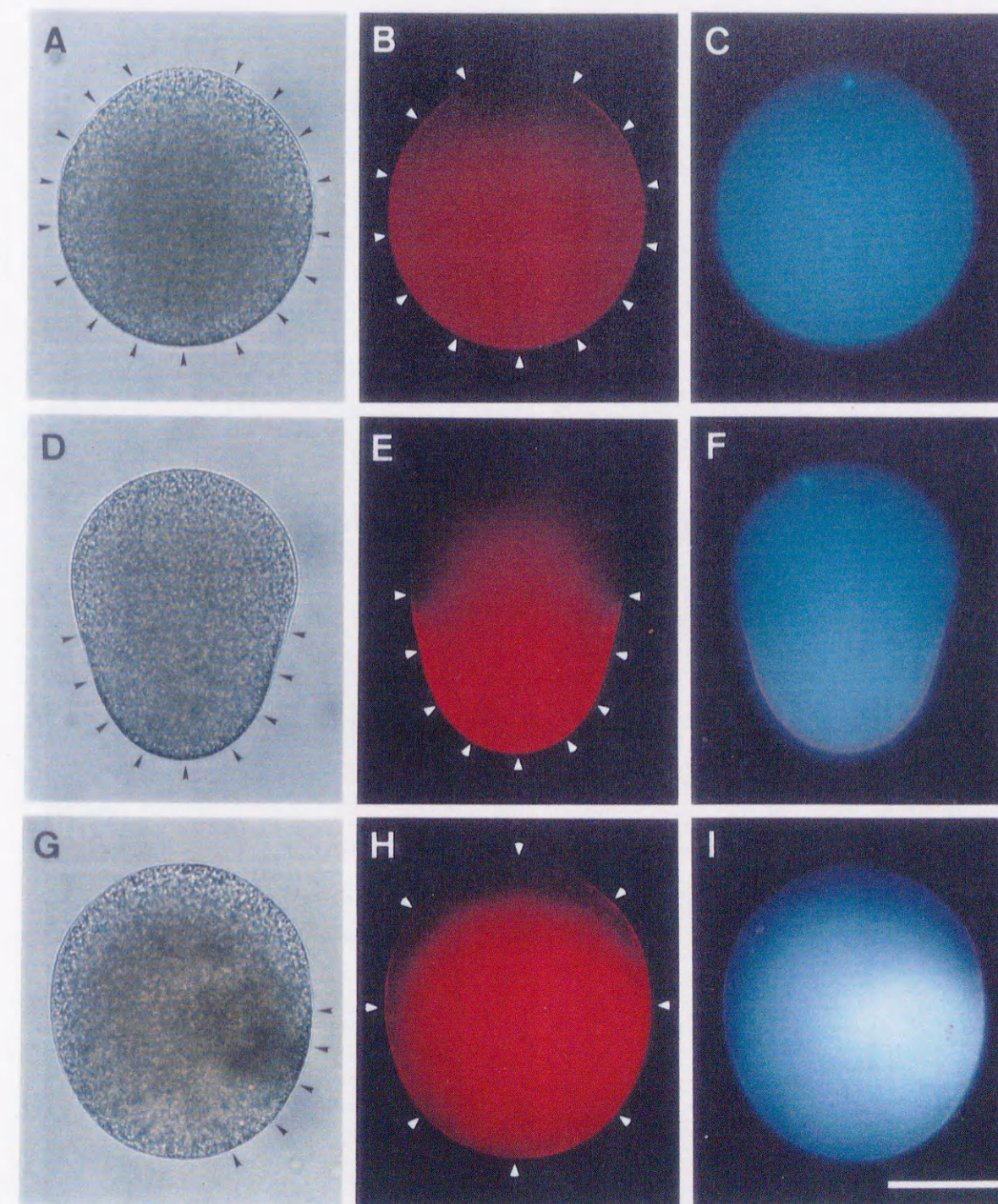




図5.4 マイオプラズミンC1とp58の二重染色。カタユウレイボヤ卵切片を抗p58抗体(緑)およびウサギ抗マイオプラズミンC1抗血清(赤)で二重染色を行った。(A-C)1回目の卵細胞質再配置の時期。(D-F) 2回目の卵細胞質再配置の時期。(A, D) 抗p58抗体のみによる染色像。(C, F) ウサギ抗マイオプラズミンC1抗血清のみによる染色像。(B, E) それぞれAとC、DとFの二重露光像。マイオプラズム以外の部分では、点状の染色に赤っぽいもの(矢頭)や緑っぽいもの(矢印)など色合いの違いが見られるものがある。スケールバーは50  $\mu\text{m}$ 。

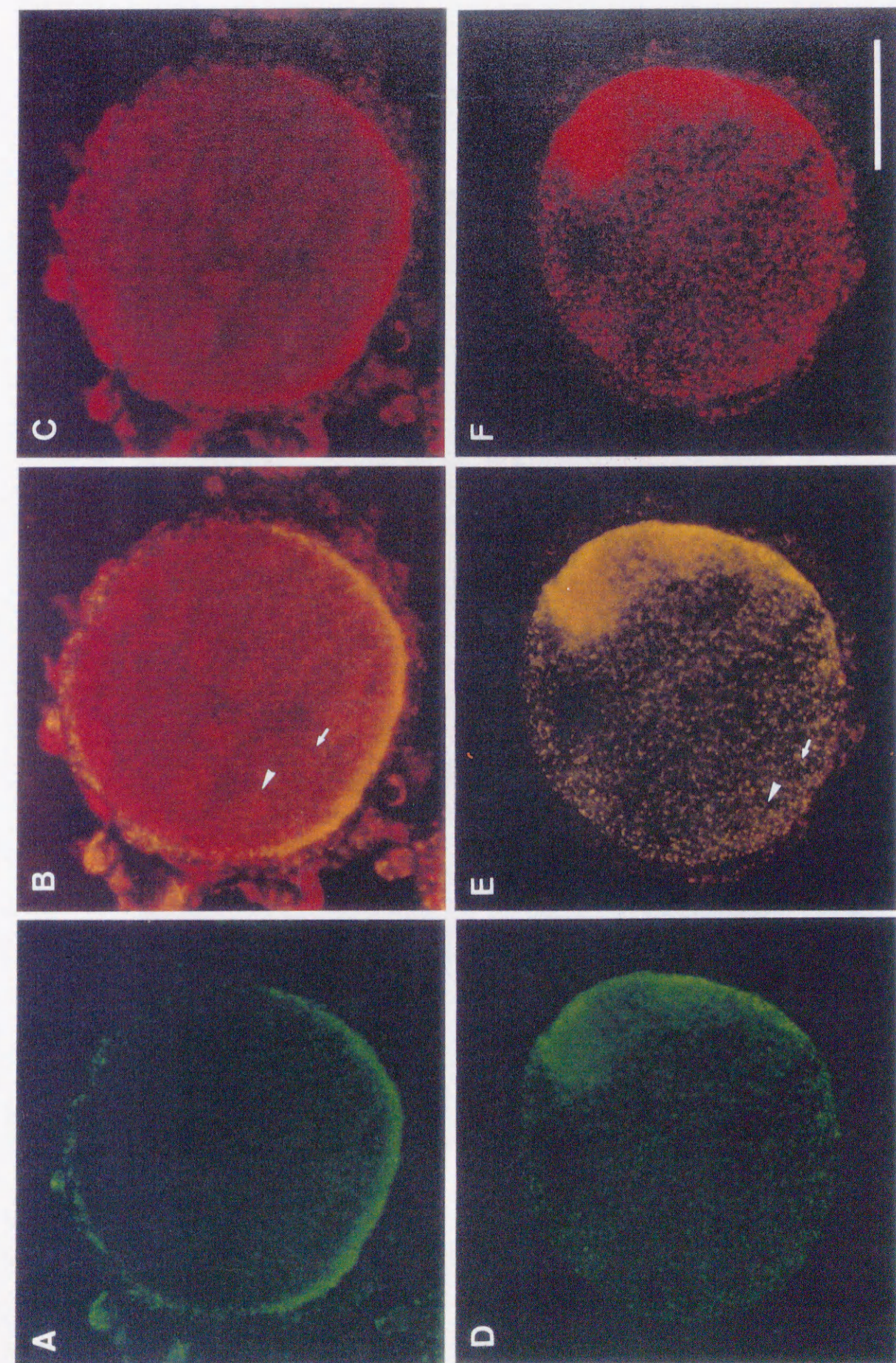




図5.5 細胞骨格繊維の重合阻害剤で処理した卵のマイオプラズミンC1と微小管の挙動。(A-C) 1回目の卵細胞質再配置が完了している受精後5分経過した卵の観察像。(D-F) 新月環形成時の卵の観察像。すべての観察像で、抗チューブリン抗体による染色は緑色で、ウサギ抗マイオプラズミンC1抗血清による染色は赤色で、DAPIによる染色は青色で観察される。(A, D) コントロール。(B, E) グリセオフルビン処理胚。(C, F) サイトカラシンB処理胚。マイオプラズミンC1の位置を矢頭で示した。スケールバーは50  $\mu\text{m}$ 。

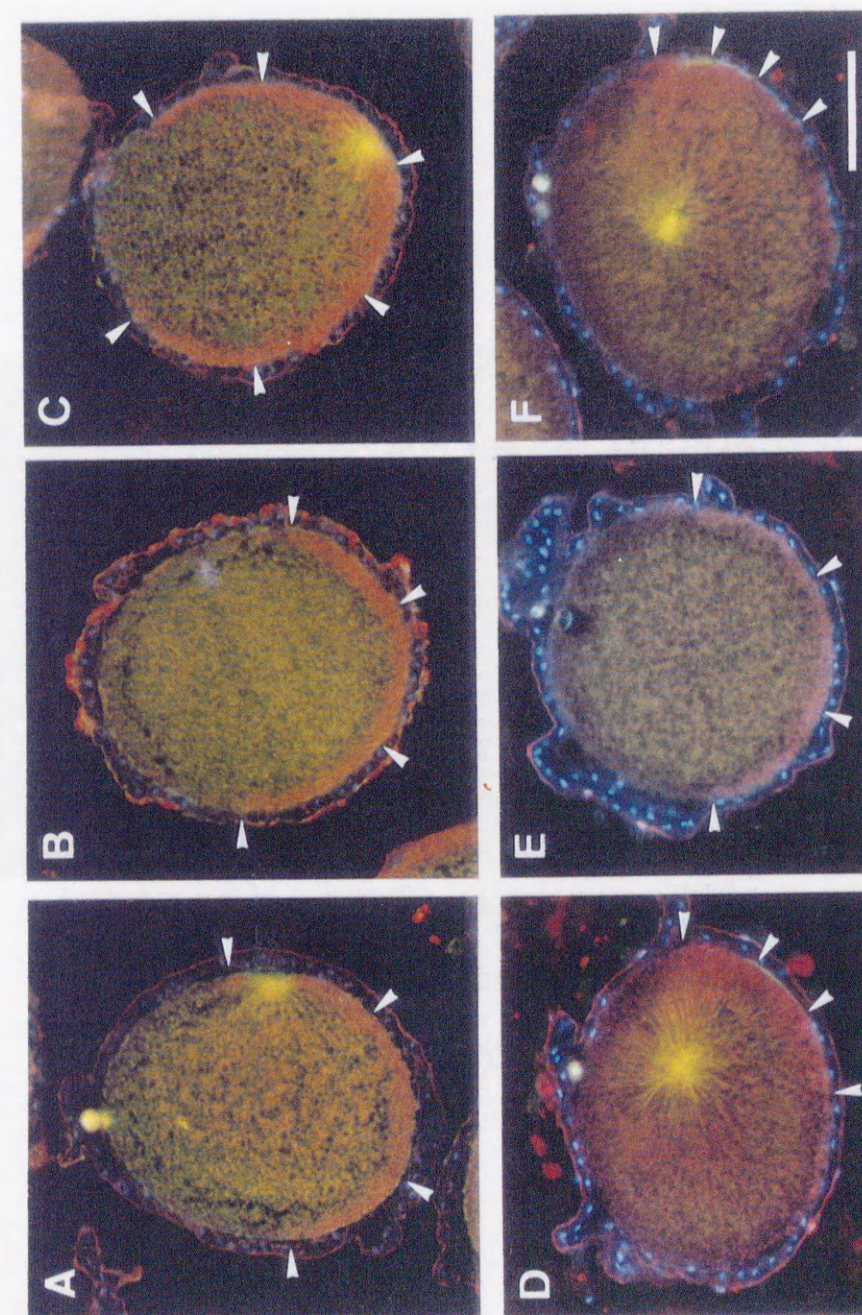




図5.6 GST-myoplasmin-C1融合タンパク質を用いた*in vitro* interaction assayの結果。卵巣タンパク質(レーン1, 4, 7, 10)、素通り画分(レーン2, 5, 8, 11)、結合画分(レーン3, 6, 9, 12)は、それぞれSDS-PAGEを行い、Hybond N (+) ニトロセルロースメンブレンに転写し、ウエスタンブロット解析を行った(レーン4-12)。レーン1-3はSDS PAGEを行ったゲルのCBB染色。結合画分にはほとんどタンパク質が見られない。レーン4-6は抗チューブリン抗体を、レーン7-9は抗アクチン抗体を、レーン10-12は抗p58抗体を用いて抗体反応を行った。矢頭はチューブリンの位置を、白抜きの矢頭はアクチンの位置を、矢印はp58の位置をそれぞれ示している。レーン9に見られるバンドは抗アクチン抗体によるアーティファクトである。分子量はレーン1の左側に示した。

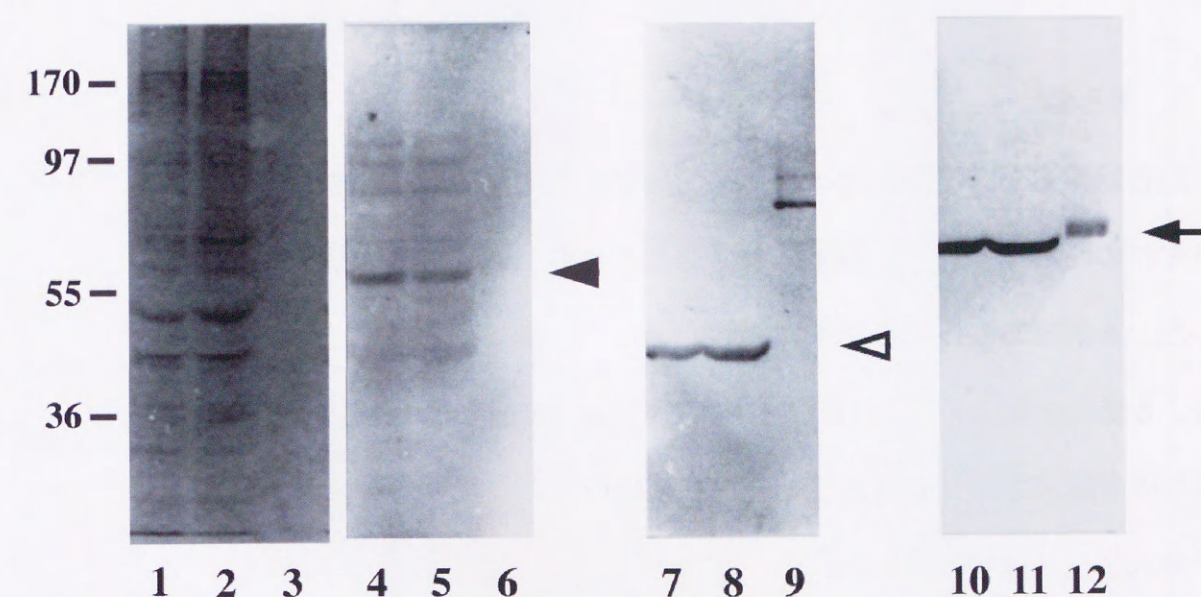
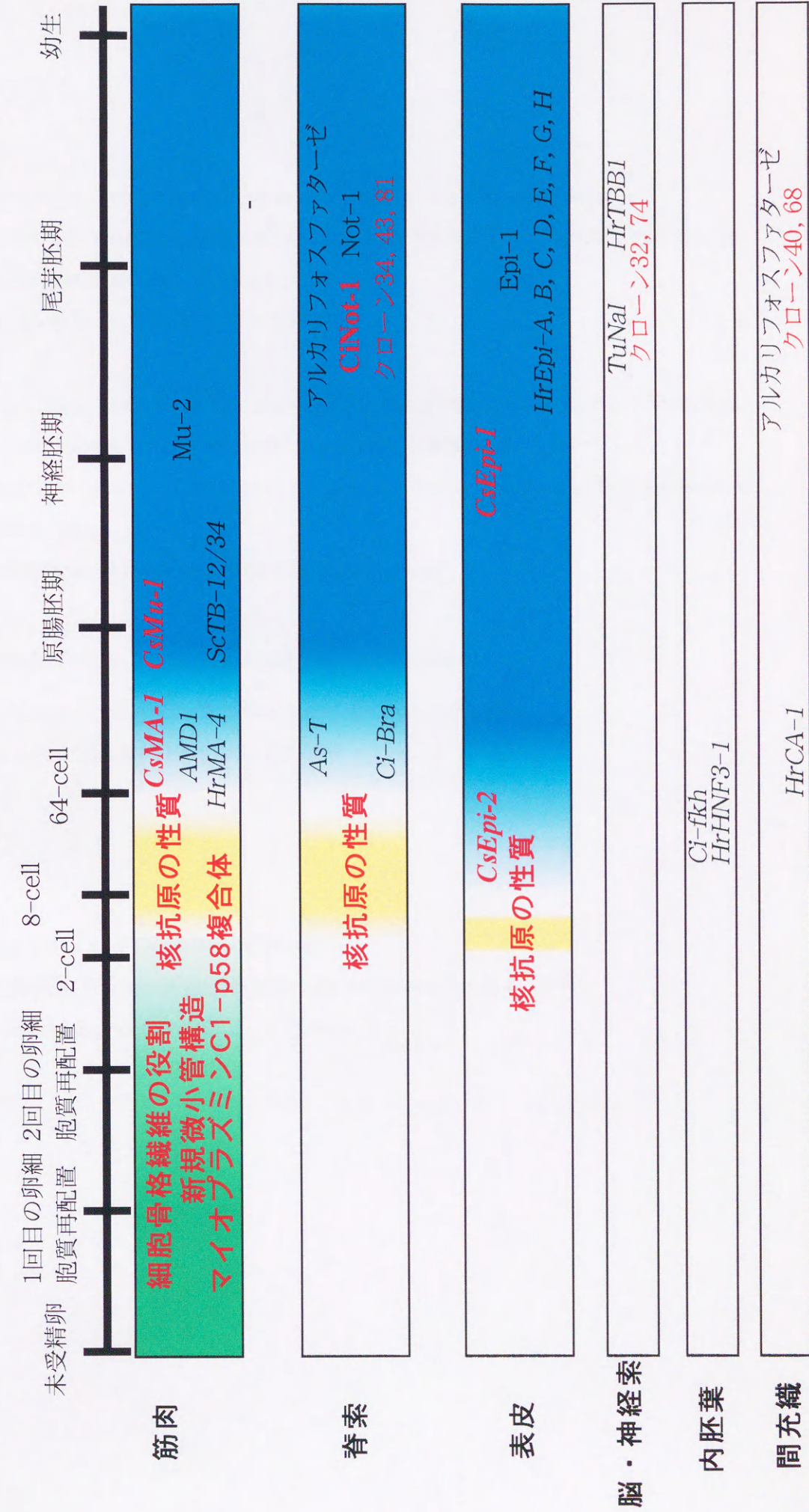




図6.1 まとめ

ホヤ胚各組織ごとの細胞分化メカニズムを発生時間軸にそって示し、それぞれの時期において、細胞分化に関わる分子や構造の重要なものを示した。本研究でわかった結果は赤字で示した。細胞分化メカニズムのうち、本論文で用いた3つの着眼点それぞれを、決定因子の局在化と予定割球への分配メカニズムは緑色で、核への移行メカニズムは黄色で、遺伝子カスケードは青で示した。

## まとめ





## 論文リスト

### 副論文リスト

- 1 Shota Chiba, Yutaka Satou, Takahito Nishikata, and Noriyuki Satoh  
Isolation and characterization of cDNA clones for epidermis-specific and muscle-specific genes in *Ciona savignyi* embryos.  
Zoological Science (1998) 15 : 239-246
- 2 Shota Chiba, Yuko Miki, Kazunori Ashida, Michiko R. Wada Kimio J. Tanaka, Yumiko Shibata, Rinna Nakamori and Takahito Nishikata  
Interactions between cytoskeletal components during myoplasm rearrangement in ascidian eggs.  
Development Growth and Differentiation *in press*.
- 3 Kimio J. Tanaka, Shota Chiba and Takahito Nishikata  
Two distinct cell types identified in the ascidian notochord.  
Zoological Science (1996) 13: 725-730

### 参考論文リスト

- 1 Shota Chiba and Takahito Nishikata  
[REVIEW] Genes of the ascidian: An annotated list as of 1997.  
Zoological Science (1998) 15 : 625-643



# 学会発表リスト

- 1 千葉章太、西方敬人（甲南大・理・生物）  
ホヤ卵マイオプラズミンC1の局在化における微小繊維の関与  
日本動物学会第65回大会、名古屋、1994年10月
- 2 千葉章太、西方敬人（甲南大・理・生物）  
ホールマウント染色によるカタユウレイボヤ卵内に局在する微小管ネットワークの観察  
日本発生生物学会第28回大会、名古屋、1995年5月
- 3 千葉章太（甲南大・理学部・生物）  
第2回ホヤ遺伝子ミーティング「As-Genes (<http://160.247.74.14/as-genestitle.html>)」ホヤに関する遺伝子データベースAs-Genes活動報告  
日本動物学会第67回大会、札幌、1996年9月
- 4 千葉章太<sup>1</sup>、佐藤ゆたか<sup>2</sup>、西方敬人<sup>1</sup>、佐藤矩行<sup>2</sup>（<sup>1</sup>甲南大・理・生物、<sup>2</sup>京都大、院理、動物）  
ユウレイボヤ(*Ciona savignyi*)尾芽胚の各組織に特異的に発現する遺伝子の単離  
日本動物学会第68回大会、奈良、1997年10月

## 副論文（3部）



