

Title	顕微注入法を用いたクモ胚の頭部体節形成機構の解析
Author(s)	金山, 真紀
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27643
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

動率 14679

博士論文

# 顕微注入法を用いた

クモ胚の頭部体節形成機構の解析

## 平成22年度



### 大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻博士後期課程

### 要旨

多くの動物は体軸に沿って繰り返し構造を持っている。しかし、この繰り 返し構造を形成する仕組みには、動物によって違いがある。

節足動物の形づくりにおける体節形成の仕組みには2つの様式が知られてい る。1つは同時にほとんどの体節を形成する様式(同時型)である。この様式 はショウジョウバエの研究によってもっともよく特徴づけられている。それは 多核性の環境を利用し転写因子の濃度勾配を用いる方法である。もう1つは 次々と付け加える様式(付け加え型)である。多くの節足動物は、細胞化され た環境で連続的に後方から体節を付け加える様式を持つことが知られている。 後者のような細胞環境において、どのように細胞が運動し遺伝子の発現パタン が変化するのかについては、まだ理解が進んでいない。

近年、オオヒメグモ胚を用いた研究から、その発生において細胞と細胞のコ ミュニケーションの重要性が指摘されてきた。そこで私はオオヒメグモ胚を用 いて、細胞化された環境で達成される体節形成過程についての研究を行なった。

本研究では、より動的な視点から詳細に解析を進めるために、外来の物質を 直接胚へ注入する顕微注入法の開発を行なった。16 核期の胚の段階で蛍光デキ ストランを注入すると、1 つの核を含む周りの一定の細胞質領域にとりこまれ、 周りの領域に漏れることなく受け継がれた。このことからクモ胚の16 核期では すでに細胞化が完了し、細胞環境が早期に形成されていることが示唆された。 この顕微注入によって一部の細胞に物質を導入できることから、細胞運動の追 跡の向上、局所的な遺伝子機能の解析が期待された。

私はこの顕微注入法を応用し、クモ胚における頭部体節形成過程の仕組みを 細胞運動と遺伝子の機能の2つの側面から解析した。その結果、クモ胚の頭部 において、新規の体節形成様式を発見した。これは付け加え型のうちの一つの バリエーションと考えられた。

オオヒメグモの頭部では、ショウジョウバエのセグメントポラリティ遺伝子 hedgehog の相同遺伝子である At-hh のストライプ状の発現が前方から後方へ波 のように移動した。顕微注入法を用いた細胞の標識実験により、この At-hh の発 現の移動は、前方の細胞が At-hh の発現をやめて後方の細胞が At-hh を発現する ようになることで起きることがわかった。この At-hh のストライプが太くなると ともに中央から At-hh ネガティブな領域が現れ、分割された。この分割が2回繰 り返されることで、2つの頭部体節が一つずつ形成された。この At-hh のストラ イプの移動と分割に特徴づけられる体節形成過程は、細胞の割り込みによる収 斂伸長の細胞運動を伴っていた。

次に、この頭部体節形成過程における分子機構を解析するために、オオヒメ グモの EST ライブラリーを利用し、将来の予定頭部外胚葉領域に発現する遺伝 子を探索しつつ、他の動物種で極・体節形成に重要とされる因子の相同遺伝子 を選んだ。選ばれた遺伝子に対して、胚全体で遺伝子機能を阻害する parental RNAi (pRNAi)によって頭部に異常が現れるかどうかを調べた。その結果、ショ ウジョウバエのペアルール遺伝子 odd-paired の相同遺伝子(At-opa)とギャップ遺 伝子 orthodenticle の相同遺伝子(At-otd)とが候補因子として見つかった。この At-opa と At-otd に対して、pRNAi と局所的に遺伝子の機能を阻害する embryonic RNAi を行ない、At-hh ストライプの発現に現れる表現型を調べた。At-opa に対 する RNAi の結果より、At-opa は At-hh のストライプの分割に関与していること が示唆された。また、At-otd に対する RNAi の結果からは、At-otd は At-hh の移 動だけでなく At-hh の発現の維持に必要であることが示唆された。これらのこと から、At-hh ストライプの発現変化のダイナミクスは、At-otd や At-opa といった 転写因子がHedgehog シグナルを制御することによって生み出されていると考え られた。さらに、ショウジョウバエのセグメントポラリティ armadillo 相同遺伝 子 At-arm の機能解析から、Wg/Wnt シグナルの関与も考えられた。

以上の結果は、ショウジョウバエの胴体部体節形成過程では階層構造状のカ スケードネットワークを形成するギャップ、ペアルール、セグメントポラリテ ィ遺伝子が、クモ胚の頭部体節形成過程ではフィードバック機構をもつネット ワークを形成していることを示唆している。このオオヒメグモの解析システム は、細胞環境における遺伝子発現のパタン形成の仕組みを理解するためのより よいモデルとなりうる。

### 目次

### はじめに p.4-5

第1章

第2章

オオヒメグモ胚における顕微注入法の開発 p. 6-19 序論………p.6-8 材料と方法……p.9-13 結果…………p.14-15 考察…………p.16-19 結論…………p.19 オオヒメグモ胚の頭部体節形成機構の解析 p.20-42 序論…………p.20-21 材料と方法……p.22-27

材料と方法……p.22-27 結果………p.28-36 考察………p.36-42 結論………p.42

表 p.43

図 p.44-60 図の説明 p.61-70 参考文献 p.71-80 謝辞 p.81

### はじめに

生物の発生過程では繰り返し同じ構造を作る方法がよく見られる。繰り返し 構造を生み出すために、遺伝子発現パタンの変化と細胞運動とがどのような仕 組みによって制御されるのかは、非常に重要な問題である。その中でも、動物 の体節形成の過程において現れる繰り返し構造は、様々なモデルシステムにお いてよく研究されてきた(Tauz, 2004; Peel et al., 2005; Blair, 2008; Dequéant and Pourquié, 2008)。

体節形成についてもっとも研究されてきているのはショウジョウバエである。 ショウジョウバエの発生における体節形成は、多核性胞胚の環境を利用した転 写因子の濃度勾配の形成によってほとんど同時に行なわれる(同時型)。この体 節形成は、母性効果、ギャップ、ペアルール、セグメントポラリティ遺伝子の 階層構造からなるカスケードネットワークによって達成されている(St Johnston and Nüsslein-Volhard, 1992; Rivera-Pomar and Jäckle, 1996)。一方で多くの節足動物 では、細胞環境で次々と後方へ体節を形成する様式(付け加え型)が知られて おり(Liu and Kaufman, 2005; Peel et al., 2005; Damen, 2007)、その祖先型には脊 椎動物と類似した仕組みがあるのではないかと考えられている(Stollewerk et al., 2003)。節足動物では、これら①同時型と②付け加え型の2つの体節形成の様式 が知られている。

脊椎動物においても、多くの体節形成の研究が蓄積されている。脊椎動物の 体節形成 (somitegenesis) では、節足動物の付け加え型のように、後方の未分節 中胚葉 (presomitic mesoderm)の前端部から次々と区切られて体節が形成される。 この現象では、体節形成に関わる遺伝子群がダイナミックにその発現を振動す ることで制御されていると考えられている (Saga and Takeda, 2001; Porquié, 2003; Dequéant and Pourquié, 2008)。このダイナミックな遺伝子発現がパタンを形成す る際には、細胞の運動や分裂が起こっている。この2つの現象が協調する仕組 みを解明するため、リアルタイムイメージングや数理モデルによる検証が行な われている (Horikawa et al., 2006; Masamizu et al., 2006; Uriu et al., 2010)。しかし、 細胞が運動しつつ遺伝子の発現パタンが変化する仕組みについては、まだ理解 されていない部分が多い。

近年のオオヒメグモ胚を用いた研究の発展によって、その発生においては細 胞外におけるシグナル分子による、細胞と細胞の相互作用が、軸形成や細胞の 運命決定に重要な役割を担っていることが示唆されてきた(Akiyama-Oda and Oda, 2006, 2010; Oda et al., 2007; McGregor et al., 2008; Oda and Akiyama-Oda, 2008)。さらに、クモの頭部では将来の頭部外胚葉においてショウジョウバエの体節形成遺伝子の相同遺伝子がダイナミックにその発現パタンを変化させていることがわかってきた(Pechmann et al., 2009, Akiyama-Oda and Oda, 2010)。

ショウジョウバエの体節形成は、多核性環境における遺伝子のシグナルカス ケードが中心であり、細胞間相互作用の環境が失われている。一方で、脊椎動 物の体節形成は、その多数の細胞の種類と複雑な体の作りによって、ややアク セシビリティに欠ける。細胞の振る舞いと遺伝子発現パタンの変化の関係を把 握しながらも、よりシンプルに解析できる系として、私はオオヒメグモ胚の頭 部形成過程をモデルにできるのではないかと考えた。また、オオヒメグモが節 足動物門の中でも昆虫から系統的に離れた鋏角類であること(Friedrich and Tautz, 1995; Giribet et al., 2001; Hwang et al., 2001; Regier et al., 2010)を考慮すれば、得 られるモデルから節足動物門の理解が進み、脊椎動物と節足動物を結びつける 知見を導けるかもしれない。

オオヒメグモの特長として、①年中、定期的に卵を得ることができること、 ②卵嚢に産みつけられた卵は全て同調的に発生すること、③オイルにつけるだ けで生きたまま胚の観察が可能であること、④親に二本鎖 RNA(dsRNA)を注 入することで行う parental RNAi による遺伝子の機能解析が可能である (Akiyama-Oda and Oda, 2006)ことがあげられる。細胞間相互作用の観点からさら に研究を発展させるには、これらの特長に加えて技術的な向上が求められた。

私はオオヒメグモ胚に直接物質を導入する顕微注入法の開発を行なった。その結果、蛍光デキストランの顕微注入によって、オオヒメグモ胚が少なくとも 16 核期には細胞化を完了していることを示した。外来の蛍光タンパクの mRNA を注入することで、細胞運動の観察技術を向上させた。また、dsRNA の注入に よって局所的に遺伝子の機能を阻害することが期待できた。これらは第1章で 議論する。この顕微注入法を主に用いて、オオヒメグモ胚における頭部体節の 形成機構を解析した。その結果、新規の体節形成様式を頭部の体節形成過程に おいて発見した。それは付け加え型のバリエーションの一つと考えられた。こ の頭部の体節形成過程におけるダイナミックな遺伝子発現パタンの変化が細胞 環境で起こる仕組みについて、2章で議論する。

### 第1章 オオヒメグモ胚における顕微注入法の開発

### 序論

発生生物学の発展を支えてきたのは、マウス、ツメガエル、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、線虫等のモデル実験動物である。こうした代表のモデル生物の特長として、短い生活環、その維持のしやすさ、胚へのアクセスのしやすさなどが挙げられる。その中でも DNA や RNA、蛍光色素等の外来の物質を胚へ直接導入する顕微注入の技術は有用性が高い。モデル生物では、DNA 注入による遺伝子の組み換え、モルフォリノアンチセンスオリゴや mRNA の注入によって遺伝子の機能解析が行なわれている。また、高分子物質や蛍光タンパクの導入による細胞標識を用いて、細胞運動の追跡とその観察が行なわれている。最近ではモデル生物以外でもこうした技術を用いて、初期の胚発生における細胞運動をより詳細に解析した例が報告され始めた(Nakamura et al., 2010)。

オオヒメグモ (Achaearanea tepidariorum) は、近年注目を集めている生物で ある (Oda and Akiyama-Oda, 2008)。このオオヒメグモの研究を加速させた技術 の一つに、parental RNAi(pRNAi)がある。この方法は dsRNA を母親に注入する ことによって、産まれてくる卵における目的遺伝子の機能を抑制する方法であ る。多くの昆虫や節足動物で積極的に用いられ、オオヒメグモでも開発された (Brown et al., 1999; Peel et al., 2005; Akiyama-Oda and Oda, 2006)。この pRNAiの メリットは、産まれるほとんど全ての卵にその影響を及ぼすことができる点と、 むらなく一つの胚全体にその影響を与えることができる点である。 しかし、 デメリットとして、pRNAi ではその影響は後期になるほど弱くなること、母体 に影響を与える場合機能解析ができないこと、一部の細胞への機能解析はでき ないことがあげられる。特定の細胞が発現する遺伝子が周りに与える影響や、 さらに細胞の振る舞いとの関係は重要な観点である。しかし、方法・技術的な 限界から、遺伝子の発現パタンと細胞の関係を詳細に解析した例はショウジョ

オオヒメグモ胚では、細胞と細胞の関係がその体づくりに重要な役割を果た していることから、新たな方法の開発が求められていた。そこで、本章におい て、私はオオヒメグモ胚における顕微注入を試みた。そのためには、オオヒメ グモ胚における初期胚の状態を知る必要があった。

ウバエをのぞいた節足動物では今までにほとんど報告されていなかった。

初期胚発生の研究においてもっとも研究されているのがショウジョウバエ (Drosophila melanogaster) である。ショウジョウバエにおける発生のパタン形 成は、多核性胞胚期における細胞質内での転写因子遺伝子の拡散かもしくは輸 送に依存している(Frigerio et al., 1986; Driever and Nüsslein-Volhard, 1988; Gregor et al., 2007; Spirov et al., 2009)。ショウジョウバエでは、細胞化は約6,000核にな って初めて起こり、その卵割様式は表割を示す(Turner and Mahowald, 1976)。 胞胚期の前とその間における多核性胞胚の環境は、ショウジョウバエタイプの 発生様式において重要であると考えられている。同様に、トリボリウムや他の 昆虫においても、早期発生における胚のパタン形成に、転写因子が重要な役割 を果たしていることが報告されている (Schröder, 2003; Pultz et al., 2005; Shinmyo et al., 2005; Lynch et al., 2006)。ショウジョウバエ以外の昆虫において、分子の拡 散や輸送がどれだけ関わっているのかについては、ほとんどわかっていない。 しかし、バッタの一種であるSchistocera gregariaの細胞化は胞胚形成が完了する 前に非同調的に起こっている(Ho et al., 1997)。さらに六脚類の中には、全割を 示しており、多核性胞胚期を欠いているものがある(Jura and Krysztofowicz, 1992; Grbic et al., 1996)。甲殻類においては、全割はより一般的であることが知られて おり、Amphipodの持つ卵割様式は不等全割様式である(Gerberding et al., 2002; Wolff and Scholtz, 2002)。この胚発生では、細胞運命が早くに限定されることが 顕微注入をもとにした細胞追跡によって観察されている。クモと同じ鋏角類の ダニの一種であるTetranychus urticaeでは、細胞化は4細胞期までに完了してい  $\mathcal{Z}$  (Dearden et al., 2002).

多くの種類のクモ胚を用いた観察が、胚発生の形態的な側面から光学顕微鏡 や電子顕微鏡を用いて記述されてきた(Montgomery, 1909; Holm, 1940; Rempel, 1957; Seitz, 1966; Kondo, 1969; Suzuki and Kondo, 1994a, b, 1995; Akiyama-Oda and Oda, 2003)。多くの昆虫のように、クモの卵は多くの卵黄を含み、エネルギド (energids, 核とそれを包む少量の細胞質の一つの単位)の分裂を伴って発生す る。その分裂するエネルギドは最初に卵奥深くのの中心部にあり、そのあと卵 の表面に移動しとどまる。その卵の表面とは、ペリプラズムと呼ばれる領域の 存在する細胞質の薄い層である。光学顕微鏡では割球の溝は確認できないが、 透過型電子顕微鏡(TEM)による観察では、細胞膜が卵割期には卵の内部へ陥 入していることが分かっている(Kondo, 1969; Suzuki and Kondo, 1995)。このこ とから、クモの卵の卵割様式は、特殊な全割型(specialized type of total cleavage) であると提唱されている。オオヒメグモ(Achaearanea tepidariorum)と近縁種であるヒメグモ (Achaearanea japonica)の形態的な記述では、この種の胚は最初の4回の核分裂は多核性であり、それから後に細胞化が完了することを示唆している (Suzuki and Kondo, 1995)。しかし、クモ胚において、細胞質が区画化されるもしくは細胞膜が細胞同士の分子の拡散を制限するといった、実験的な証拠はなかった。

本章では、① オオヒメグモ胚における細胞化の時期について実験的な証拠 を得ること、② ①の知見をもとに、顕微注入によって初期クモ胚の細胞に様々 な分子を導入したこと、について報告する。

### 材料と方法

### 動物とその発生段階

オオヒメグモ(*Achaearanea tepidariorum*)は25 C°で明15時間と暗9時間のサイクルで飼育した。オオヒメグモ胚のステージは(Akiyama-Oda and Oda 2003; Yamazaki et al., 2005)に準じた。

### タイムラプス顕微鏡観察と画像解析

タイムラプス顕微鏡観察のために、卵を産む瞬間を直接観察することで、卵 が産まれてからの正確な時間を確定した。卵は産まれてから(after laying egg, AEL と表記)最初の数時間以内はブリーチに対して影響を受けやすいため、Fig. 1A と B の卵はコリオンを溶かしていない。AEL5 時間より後の卵は、50%のブ リーチでコリオンを溶かした。その後蒸留水で数回リンスし、ブリーチを除去 した。蒸留水をのぞいた後、くぼみのついたスライドグラス上に両面テープを 貼ったものに胚を移した。その上からハロカーボンオイル 700 (Sigma-Aldrich) をかけた。胚は生きたまま、25±1°C で以下の機材を用いて観察された。カラー CCD カメラ (C7780-10, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)を設置した実体 顕微鏡 (SZX12, Olympus)もしくは MetaMorph version 6.1(Universal Imaging)によ って制御される冷却 CCD カメラ (CoolSNAP HQ; Roper Scientific)を設置した のlympus BX50 の顕微鏡を用いた。画像は5分もしくは10分ごとに撮影された。 動画を作成するために、Image J version 1.37 と QuickTime Pro version 7.64 で処理 した。

### 顕微注入

顕微注入のために、卵を 50 %のブリーチでコリオンを溶かした。その後蒸留 水で数回リンスし、ブリーチを除去した。蒸留水をのぞいた後、くぼみのつい たスライドグラス上に両面テープを貼ったものに胚を移した。その上からハロ カーボンオイル 700 (Sigma-Aldrich)をかけた。顕微注入用の針を作製するため、 ガラスキャピラリー (Hirschmann Laborgeräte) を(PN-3; Narishige)の牽引器で引 いた。針の先はスライドグラスの角で使う前に折った。Rhodamine B isothiocyanate の結合したデキストラン (RITC-デキストラン)(*Mr* 70,000; Sigma-Aldrich)かもしくは Fluorescein isothiocyanate の結合したデキストラン (FITC-デキストラン)(*Mr* 500,000; Sigma-Aldrich)を 1.0 もしくは 2.0 µg/µl で用いた。10 ml のプラスティックシリンジをインジェクターとして用いた。空気圧は 手動で制御した。注入したデキストラン溶液の量は 50 から 300 pl であった。 RITC-デキストランもしくは FITC-デキストランがクモの発生に毒性の影響を与 えることはなかった。胚は蛍光顕微鏡を取り付けた Olympus SZX12 の実体顕微 鏡下で観察した。画像はカラー CCD カメラ(C7780-10, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)で取得され、Adobe Photoshop CS2 ソフトウェアで処理された。

### 胚の染色

<u>固定</u>

FITC-デキストランを注入された卵は適切なステージまで発生させた後、固定 した。固定の前にオイルをのぞくために胚をヘプタンで洗った。 オオヒメグ モの卵は(Akiyama-Oda and Oda, 2003; Akiyama-Oda and Oda, 2006)の以前報告 された方法に従って次のように固定した。

2 x PEM 液 (200 mM PIPES, 2 mM EDTA, 4 mM MgSO4 pH 6.9)

固定液 (100 mM PIPES, 1 mM EDTA, 2 mM MgSO4 pH 6.9, 5.5% formaldehyde) 卵をウォッチグラスに移し、100%ブリーチで卵のコリオンを除去した。コリ オンの除去後、水で卵を 5回以上洗い、可能な限り水をウォッチグラスからの ぞいた。固定液とヘプタン 3 ml の 2層の入ったバイアル瓶を作成し、卵をバイ アル瓶に入れ、 2層の間に移した。150-200 rpm で 30分以上バイアル瓶を激し く振った。その後4℃で一晩振った後、固定液とヘプタンをできる限り除去し た。1 x PEMt (1 x PEM + 0.1% Tween 20)で卵を洗った。メタノール/1 xPEMt 混 合液シリーズ (25%, 50%, 75%, 95%, 100%) に、メタノールの濃度が順に濃く なるように、洗った卵を約30分ずつ入れてメタノール置換を行なった。メタノ ール置換後、ウォッチグラスで観察しながら、ピンセットでビテレン膜を胚か らのぞいた。最後に100%エタノールで置換し、使用まで-20℃で保存した。

### プ<u>ローブの作製</u>

下記の Whole-mount *in situ* hybridization で用いた RNA プローブは以下の方法 で作製した。T7 プロモーター、または SP6 を含むプラスミドに入った目的遺伝 子の断片を、プラスミドの特異的な配列で PCR 反応によって増幅した。プラス ミドに合わせて、T7 RNA poly Plus (Ambion)もしくは SP6 RNA Poly Plus (Ambion)の RNA polymerase を用いて増幅断片から RNA を合成した。合成の際 に DIG (DIG RNA Labeling Mix, Roche)もしくは FITC(FITC Labeling Mix, Roche) が修飾された UTP を含む dNTP を混合し、2 時間以上 37 °C でインキュベートし た。0.5 M EDTA をいれて反応をとめ、tRNA を加えた。エタノール沈殿により 精製した後、ハイブリダイゼーション液 (50 %ホルムアミド, 5 x SSC, 50  $\mu$ g/ $\mu$ l へ パリン, 0.1 % Tween20) に溶解した。

### Whole mount in situ hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) は以前の報告 (Lehman and Tauz, 1994; Akiyama-Oda and Oda, 2006) を参考にして行なった。手順は以下の通りである。 固定した卵を 1.5 ml チューブに移し、100 %エタノールで 4-5 回洗った。1:1 = キ シレン: エタノール 混合液でリンスし、混合液で 3 分静置した。 100 %エタノ ールで 5 回リンス、100 %メタノールで 2 回リンスした後、1:1 = メタノール: 1xPBST (140 mM NaCl, 7 mM NaHPO4•12H2O, 3 mM NaH2PO4•2H2O, 0.1% tween20)、ホルムアルデヒド 5%の混合液を入れ、5 分間おだやかに振盪させた。 PBST でリンス 5 回のあと、4  $\mu$ l/ml Proteinase K を含む PBST で 4 分間静置した。 PBST でリンス 2 回、4 回洗った後、ホルムアルデヒド 5 %の PBST 溶液を入れ、 25 分おだやかに振盪した。ホルムアルデヒドをのぞくため、PBST でリンスを 5 回行なった。1:1 = PBST: ハイブリダイゼーション液にて 10 分間おだやかに振 盪した。ハイブリダイゼーション液で洗った後、ボイルしたサケの精子の DNA(Salmon Sperm DNA, sspDNA) (invitrogen,100  $\mu$ g/ml) を含むハイブリダイゼ ーション液にて 55 °C 90 分間、プレハイブリダイゼーションを行なった。

RNA プローブ1µlを含む 100µlの sspDNA (100µg/ml) + ハイブリダイゼーション液を 80 ℃ 5 分インキュベートした後、1 分間氷冷したものを用意した。このプローブ調整液にプレハイブリダイゼーションを行なった卵を移し、55 ℃ で 一晩 (15-18 時間) ハイブリダイゼーションを行なった。翌日、プローブ調整液 を除去し、ハイブリダイゼーション液で 1 回洗った。ハイブリダイゼーション 液を入れ、55 ℃ で 1 時間インキュベートした。その後 55 ℃ インキュベートし ながら、15-25 分ごとに液を 4 回交換した。1:1 = PBST : ハイブリダイゼーショ ン 液で 2 回、15 分間おだやかに振盪させた。さらにおだやかに振盪させながら 5 回、10 分ごとに PBST で液を交換した。液を除去した後、アルカリフォスファ ターゼの付いた抗体(後述) で 90 分間以上おだやかに振盪した。振盪を続けな がら、4回10分ごとにPBSTで液を交換した。アルカリフォスファターゼ染色液(APB液とする、100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris pH 9.5, 0.1 % Tween20)で卵を洗った後、卵を24穴のマイクロプレート (IWAKI) に移した。 もう一度 APB 液で卵を洗い APB 液をのぞいた後、発色基質(後述)を含む APB 液を入れ、適切な発色になるまで室温で放置した。発色が十分でない場合、4℃ にて一晩発色させた。

その後、PBST で3回洗い、後固定処理(PBST+5%ホルムアルデヒド)を30 分以上行なった。アルカリフォスファターゼ不活性化液 (glycine 375 mg/ 50 ml, 0.1% Tween20, 1 N HCl により pH 2.2 に調整)により、1時間以上室温でインキ ュベートした後、PBST/エタノール(PBS + Tween 0.1%: エタノール = 1:1)液で 5分インキュベート、その後100%エタノールで5分以上、インキュベートした。 卵黄の白色化を確認後、再び PBST/エタノール液により5分インキュベートし、 PBST で3回洗い、置換した。

以下は発色のプローブ、基質の詳細である。digoxigenin(DIG)ラベルされたプ ローブを用い、アルカリフォスファターゼの付いた anti-DIG 抗体 (Roche, 1:1000 dilution)でインキュベートした。発色基質には NBT/BCIP (Sigma) を用いた。次 に、FITC-デキストランを検出するために、ペルオキシダーゼの結合した anti-FITC 抗体(Roche, 1:500 dilution)によってインキュベートした。その後、PBST で洗った後、3,3'-diaminobenzidine(DAB)を胚に浸透させた。その後、H2O2 を加 えて反応させた。適度に発色させたあと、PBST で洗い、発色をとめ、後固定処 理を行なった。サンプルはカラー CCD カメラ (C7780-10, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)を設置した実体顕微鏡 (SZX12, Olympus)もしくは、微分干渉 像を得るために Carl Zeiss Axiophot 2 顕微鏡で観察した。

### mRNA の準備

オオヒメグモ胚を用いて、mRNA を導入し機能させられるかを検証するため、 以下の過程のように作られたプラスミドを用いた。 配列 MAKI<u>PPKKKRK</u>VED をコードする HindIII-BamHI DNA 断片 (53bp)、これは SV40 T antigen 核移行シ グナル (Nuclear Localization Signal, NLS, 下線部)を含んでいる。 この DNA 断 片をプラスミド pBluescript II+ の Hind III と BamHI 部位の間に挿入した。 こ のプラスミドを pBS-NLS とした。green fluorescent protein (GFP)をコードする DNA 断片を作製するために、pQB125 (Quantum)を NheI で切り、Klenow 処理す ることで平滑末端とした。それから XbaI で切った。これらの断片は、平滑処理 された BamHI 部位と pBS-NLS XbaI 部位に、pBS-NLS-GFP を作製するために挿 入された。HindIII-EcoRI 断片がこのプラスミドから単離され、EcoRI 末端は平 滑処理された。そして出来上がった断片は pSP64 poly(A) vector (Promega) の HindIII と HincII 部位の間に挿入された。こうしてできたプラスミドを pSP64-NLS-GFP-polyA とした。このプラスミドを EcoRI 部位で切断し、それを in vitro 転写のための鋳型として用いた。 Capped Sense mRNA は mMESSAGE mMACHINE SP6 Kit (Ambion)を用いて合成した。

*nls-gfp* mRNA(0.5 µg/µl)と RITC-デキストラン(1.0 µg/µl))の終濃度の混合液を顕 微注入のために用いた。クモの胚発生において、*nls-gfp* mRNA が毒性の影響を 及ぼすことはなかった。

### <u>結果</u>

オオヒメグモ Achaearanea tepidariorum における初期胚発生ステージの定義

顕微注入を行うためには、まず初期胚の状態を詳細に知る必要がある。オオ ヒメグモにおける初期胚の発生段階を決定し、定義するために、タイムラプス 観察を行なった。発生段階を正確に定義するために、母グモが卵を産んだ瞬間 から、卵を採取し観察した。AEL1時間では、卵の表面に多角形の構造が観察さ れた (Fig. 1A)。 さらに一時間経つと、その構造は徐々に消え、卵黄塊が不規 則な構造物として現れた (Fig. 1B)。AEL8時間までに、卵の内部深くに位置し ているエネルギド (energid) が実体顕微鏡下でわずかに観察された (Fig. 1C, D)。 AEL9時間あたりになると、エネルギドは卵の表面に向かって卵黄塊の間を移動 し、明瞭さを増した(Fig. 1E-H, L-O)。タイムラプス微分干渉顕微鏡によって、少 なくとも5回目の分裂(約10時間)まで、エネルギドは同調した卵割によって その数を増やしたことがわかった。4回目、5回目、6回目の卵割は約1時間周 期であった。7回目の卵割に、エネルギドの分裂は非同調的になっているよう に見えた (Fig. Fig. 1P-S)。

16 核期(AEL約9時間)で、エネルギドは卵の表面と中心のおよそ中間地点 に位置していた(Fig. 1E, L)。64 核期(AEL約11時間)までに、エネルギドの 多くはちょうど卵表面下に位置していた(Fig. 1G, N)。この時、エネルギドの分 布は完全に一様であるというわけではなかったが、卵における極性を示すもの は観察できなかった。AEL14時間あたりになると、胚は胚の表面とビテレン膜 との間に大きなスペースを形成しながら、収縮を始めた。この収縮は胞胚が形 成されたことの印なのかもしれない。この収縮に続いて、細胞の密な集団が胞 胚上に現れ、一つの極を形成した。さらにこの極に向かって細胞が収斂運動を 始め、将来の胚盤を形成し始めた(Fig. 1J, K)。

このエネルギドもしくは核の数は、128 核期までの胚をステージングするのに 有用な指標となった。64 核期は stage 2 の始まりに相当した(Akiyama-Oda and Oda, 2003)。Stage 2 は胞胚期(blastoderm stage)であり、胞胚の細胞が収斂運動を始 める時には終期を迎えるものと定義できる。64 核期の前の卵割期は前胞胚期 (preblastoderm stage)と呼ぶことにする。これは以前の報告で定義された stage 1

に相当するものである(Akiyama-Oda and Oda, 2003)。

### 16 核期の胚における RITC-デキストランの顕微注入

次に、エネルギドが見えるようになる時期である16 核期のオオヒメグモ胚に、 蛍光物質である RITC-デキストランを注入した。 針先を卵のより中心部分に入 れた場合、標識された細胞は注入した胚にはほとんど見つからなかった。反対 に、注入箇所を卵の表層部分にした場合、標識された細胞が注入した胚に頻繁 に観察された。従って、表層に注入した胚を主に実験に用いた。RITC-デキスト ランの導入とその動向に異なったパタンが観察されたので、以下のようにそれ を三つに分類した。

Class I. デキストランの幾分下が一つのエネルギドに入り、残りが周りの卵黄 塊の間に浸透した (Fig. 2A-C)。この浸透は入り組んだ境界内に留まった (Fig. 2B, やじり)。このようなデキストランの動向パタンは実験間でばらつきがあり、注 射針の針先をいかに作製するかに依存していると思われる。典型的には、蛍光 色素を付けたデキストランを注入した胚のうち、30-40%がこの Class I のパタン を示した。

ClassII. RITC-デキストランは注入部分から拡散しなかった(Fig. 2J-L)。しか し、デキストランはエネルギドにとりこまれなかった。

ClassIII. RITC-デキストランは注入部分からすぐに拡散し、卵の中心部分へ広 がった (Fig. 2M-O)。エネルギドにとりこまれたデキストランはなかった。

Class I のパタンが観察された胚では、蛍光標識されたエネルギドの増殖が観 察された。 この増殖は全体のエネルギドの数に比例していた (Fig. 2D-F)。 RITC-デキストランは、元の標識されたエネルギドの周りの領域、もしくは、そ れに由来するエネルギド付近のエネルギドには漏れなかった。 厳密な標識が のちの発生においても維持されていた。注入された胚が early stage 5 にまで発生 した時、蛍光標識された細胞の数は約 100 であり、これは early stage 5 の胚盤に おける表層細胞全体 (1405 ± 98, n=5)の約7%にあたる。これらの観察から、 16 核期の胚は一つのエネルギドを含む区画から成っていることが示唆された。 これらの区画は割球、すなわち細胞であると考えられた。

32-, 64-, 128 核期の胚に RITC-デキストランを注入した場合、同様に一つの細胞にとりこませることができた(Fig. 3; データには示さない)。これらの場合、 Class I の確率は 80-90%を示した。以上の結果より、オオヒメグモ胚の胞胚は独立した細胞から成っていることが確かめられた。

### nls-gfp mRNA の胚への顕微注入

クモ胚において外来タンパクの発現が可能かどうかを確かめるために、NLS と GFP を融合した mRNA (*nls-gfp* mRNA)を RITC-デキストランとともに注入した。 *nls-gfp* mRNA を 32 核期に注入したとき、GFP の蛍光が注入から 2 時間以内で観 察された。期待されたように、その蛍光は核に局在し、細胞を数えることに役 に立った(Fig. 4A-F)NLS-GFP と RITC-デキストランは同じ細胞内で観察され た。このことは *nls-gfp* mRNA も NLS-GFP タンパクも、RITC-デキストランも周 りの細胞に漏れなかったことを意味している。 NLS-GFP の蛍光は、後期の発 生段階になると徐々にその強度が弱まった。その蛍光は stage 9 (クモの体節形 成から歩脚付属肢が出現する時期、AEL 約 65 時間)まで観察できた。

### 32 核期の胚の細胞追跡

オオヒメグモ胚は、クムルスが胚盤の周縁部に到達する stage 5 の終わりまで に様々な細胞タイプを生み出す(Akiyama-Oda and Oda, 2003; Oda et al., 2007)。 stage 5 の間、胚盤の上皮細胞下では細胞の増殖が観察される。これらの細胞は 内胚葉細胞(endoderm cell) とされている。その中にはクムルス (cumulus) と 呼ばれる突起物の一部である間充織細胞(mesenchymal cell)の集団が含まれて おり、cumulus mesenchymal (CM)細胞と呼ばれている(Akiyama-Oda and Oda, 2003)。これらの内胚葉細胞の起源を追跡するために、32 核期の胚に FITC-デキ ストランを注入し mid stage 5 まで発生させた。蛍光標識された細胞が移動する クムルスにとりこまれている胚が確認できた(Fig. 5A-C)。固定後、この胚を CM 細胞のマーカー遺伝子である *At-decapentaplegic (At-dpp)* (Akiyama-Oda and Oda, 2003)、FITC-デキストランと DNA で染色した(Fig.5D-F; データには示さ ない)。染色によって、胚盤の中心から移動した CM 細胞と、胚盤細胞の中心と その近くに位置する表層の上皮細胞は、ともに 32 核期にはひとつの細胞から由 来していることが示された。このことは CM 細胞の運命は 32 核期のあとに限定 されていることを示唆している。

このような蛍光標識による細胞の追跡によって、他の細胞群の運命について も明らかにすることができる。32 核期に FITC-デキストランを注入した他の胚 では、少なくとも4つのタイプの細胞が標識された。胚盤の周縁部から離れた 位置にある内胚葉細胞、*At-orthodenticle(At-otd)* (Akiyama-Oda and Oda, 2003)を発 現する細胞としない細胞、そして非胚盤領域にある表層細胞の4つが見つかっ た (Fig. 5ZG-I)。この観察は内胚葉性の細胞は胚盤の周縁部領域から表層下に潜 り込み、胚盤の表層下を移動するといった以前の解釈と一致していた (Oda et al., 2007)。胚盤周縁の内胚葉の運命は 32 核期よりもあとに限定されることが示唆 された。

### <u>考察</u>

### オオヒメグモ胚の細胞化について

前胞胚期と胞胚期において、オオヒメグモ胚では、核分裂もしくはエネルギ ドの分裂時には割球の溝が確認できず、いつ細胞化が起きているのかについて は不明であった。近縁種であるヒメグモ胚では、透過型電子顕微鏡を用いて細 胞膜が卵内部へ入り込んでいることが観察されており、特殊全割(specialized type of total cleavage)と見なされていた(Kondo, 1969)。本研究による顕微注入 の実験データは、これらの事実を強く支持するものとなった。16 核期の胚に RITC-デキストランを注入した時、その拡散が制限されたことから、一つのエネ ルギドを含む区画が存在することが明らかになった。この区画は一つの割球で あると考えられる。RITC-デキストランの分子量は 70,000 であり、これは約 200 塩基の一本鎖 RNA や、約 640 残基のタンパク質に相当するものである。外来的 にクモ胚胞胚期に導入した NLS-GFP タンパクは 252 アミノ酸残基である。これ はショウジョウバエの多核性胞胚期における体節形成遺伝子の転写因子と同等 の大きさである。このことから、16 核期かそれ以前は、胚は多核性胞胚ではな く、むしろ独立した細胞から成っていることが示唆された。

本研究では、16 核期よりも早い時期への顕微注入が試みられたが、安定した 結果を得ることはできなかった。その原因として、①8 核期より早い段階では、 核の観察が困難であり、いつ顕微注入できたのかに関して的確に発生段階を特 定することが難しいこと、②AEL1-2 時間の胚は、ビテレン膜がブリーチ処理に よって非常に影響を受けやすく、顕微注入の成功率が非常に低いことがあげら れる。16 核期以前に顕微注入した個体のうち、成功した例を示す(Fig. 5J, K)。 導入した FITC-デキストラン(*Mr* 500,000)が様々な濃度で領域を形成して細胞に とりこまれていた。これは細胞化が完了しておらず、注入したところから拡散 したことを示しているのかもしれない。

### 注入されたデキストランの挙動について

注入されたデキストランは必ずエネルギドもしくは細胞にとりこまれるとい う訳ではなかった。ヒメグモ胚の TEM 観察では、細胞膜と卵黄塊の間にあるペ リプラズム領域は、厚さ 10 µm よりもうすい (Suzuki and Kondo, 1995)。本研究 の結果は、以下のことを示唆しているのかもしれない。すなわち、16 核期にお いては、ペリプラズムの領域のいくつかは、表層へ移動するエネルギドを含ん だ細胞領域とつながっている。しかし、このペリプラズムには、エネルギドを 含む細胞領域ではなく、卵の内腔の中心部分とつながっている領域がある、と いう考えである。これは注入されたデキストランの挙動のうち、 class III を説 明しうる。加えて、ペリプラズムのスペースが小さいために、顕微注入の針先 が卵黄塊に刺さった場合も考えられる。これは class II を説明しうる。現時点で は、エネルギドが動いてくる、もしくは、既に到達している部分のペリプラズ ム内に注入するのが適切であると考えている。しかし、直接エネルギドを狙う ことは細胞にダメージを与える危険性があるので、すべきではない。

32 核期における細胞の運命

32 核期の一つ細胞は異なる胚層に属する様々な細胞タイプになることが、32 核期の細胞標識により、明らかになった(64 核期でも同様の傾向が見られるが、 データでは示していない)。このことは、32 核期よりあとに細胞の運命が限定さ れることを示している。本研究では示していないが、このような細胞標識によ る細胞系譜は発生生物学ではきわめて重要である。CM 細胞等の内胚葉、中胚葉 性の移動する細胞が、胚盤期以降にどのように運命が限定されてゆくのかを記 載することが期待できる。

### 顕微注入における応用法と課題

オオヒメグモを含む多くの節足動物では、パタン形成の間の細胞の増殖や再 配列運動の仕組みはほとんど理解されていない。しかし、今回のオオヒメグモ 胚を用いた顕微注入により、観察を向上させることで、理解をより深めること ができると考えられる。 蛍光タンパク質である NLS-GFP mRNA を外来より注入 し、発現させることができた。次章でも記述するが、GFP とは異なる別種の蛍 光タンパク質でもいくつか同様に発現させることができた(Oda、私信)。さら に、外来の mRNA を導入しタンパクの産生を誘導させることによって、遺伝子 機能解析の幅が広がるだろう。mRNA の導入と同様に、dsRNA やアンチセンス モルフォリノオリゴ等の遺伝子機能を抑制する物質を胚の細胞に導入すること で、局所的な遺伝子の機能解析も期待できる。これらの方法は従来の pRNAi と 簡単に組み合わせることができる。しかし、現時点では蛍光タンパク質以外の mRNA の導入実験においては、タンパクを十分量発現させることに対し、よい 結果を得られていない。通常、転写因子や分泌タンパクは、産生と分解のサイ クルが早い。導入された mRNA が正常に機能しても、不安定な機能性タンパク 質はすぐに分解されている可能性がある。オオヒメグモ胚で安定した過剰発現 系等を構築するには、mRNA の導入だけでなく、プラスミド DNA の導入や目的 遺伝子の断片をゲノムへ組み込む技術を開発することが求められる。今のとこ ろ 16 核期より早期の発生段階で安定した顕微注入は困難である。より早い時期 に物質を導入しより広い範囲に物質を導入することが、次の課題である。

### <u>結論</u>

オオヒメグモ胚に対する解析方法の向上を図るため、私は本章で顕微注入法 が効果的に利用できることを示した。この技術によって、あいまいだったオオ ヒメグモ胚の細胞化の時期について、16 核期もしくはそれ以前であることを示 した。このことから、オオヒメグモ初期胚では細胞間コミュニケーションによ るパタン形成が重要であることが支持された。また顕微注入法によって細胞運 動や遺伝子の機能解析に新たな展開が期待できた。次章では、オオヒメグモ胚 における細胞間コミュニケーションや細胞運動の役割を議論するために、この 顕微注入法を主に用いて行なった頭部の体節形成過程における細胞運動の追跡 実験、局所的に遺伝子の機能を阻害する実験について述べる。

### 第2章 オオヒメグモ胚の頭部体節形成機構の解析 <u>序論</u>

動物の体節形成の仕組みは様々なモデルシステムにおいて研究されてきた (Tauz, 2004; Peel et al., 2005; Blair, 2008; Dequéant and Pourquié, 2008)。

中でも節足動物の体節形成の仕組みは、大きく分けて2つの様式が知られている。一つは同時に体節を分割する様式(同時型)である。この様式においてもっとも代表的な例はショウジョウバエの胞胚期における体節形成である。もう一つは後方から次々と付け加える様式(付け加え型)である。これは前者よりも多くの動物で見られる。このような連続的な体節形成は、クモを含む多くの節足動物の腹部体節を形成する過程に見られる(Liu and Kaufman, 2005; Peel et al., 2005; Damen, 2007)。

ショウジョウバエ胚における同時型の体節形成は多核性胞胚の環境で起こる。 この体節形成は、母性効果、ギャップ、ペアルール、セグメントポラリティ遺 伝子から成るカスケードネットワークによって制御されている(St Johnston and Nüsslein-Volhard, 1992; Rivera-Pomar and Jäckle, 1996)。しかし、この機構だけで ショウジョウバエの体節形成が達成されているわけではない。大顎(mandible) とそれより前側の頭部体節は、セグメントポラリティ遺伝子のネットワークが 胴体部と異なっており(Gallitano-Mendel and Finkelstein, 1997)、さらにペアルール のパタンを欠いた遺伝子ネットワークによって形成されることが知られている (Crozatier et al., 1999; Peel, 2004)。胴体の体節形成が終わり、細胞化した後でさ えも、頭部体節におけるセグメントポラリティ遺伝子の発現ストライプの数は 増加する。このショウジョウバエにおける頭部体節は母性効果遺伝子の Bicoid とそのターゲット遺伝子であるギャップ遺伝子、例えば、orthodenticle (otd)によ って制御されている(Cohen and Jürgens, 1990; Finkelstein and Perrimon, 1994; Gao et al., 1996; Gao and Finkelstein, 1998)。同様に、他の昆虫や昆虫以外の節足動物に おいても、頭部領域において、セグメントポラリティ遺伝子の発現するストラ イプの数が時間ごとに増加することが観察されている(Patel et al. 1989; Nagy and Caroll, 1994; Chipman et al., 2004; Farzana and Brown, 2008; Pechmann et al., 2009)。しかし、節足動物における頭部体節形成の機構はほとんど理解されてい ない。

私は、オオヒメグモ胚における頭部の体節形成過程を解析するために、まず クモにおける体節領域を定義した。クモ胚の体は、頭部、胸部(歩脚領域)、腹 部の三つの領域に分かれている。頭部領域は鋏角(Chelicerae, Ch)と触肢 (Pedipalps, Pp)と呼ばれる2つの付属肢とそれより前側の頭葉部分に分かれ、 胸部は歩脚(walking legs)と呼ばれる4つの付属肢を持っている(Fig. 6A)。昆 虫とは異なり、クモの頭部と胸部は形態学的には区別されず、一般的には頭胸 部もしくは前体部と呼ばれている。しかし、本研究においては頭部と胸部の領 域での体節形成の仕組みはそれぞれ異なることが示唆されたので、これらの領 域を分けて定義した。

次に、私はオオヒメグモ胚の胚盤の縁に着目した。この胚盤の縁と縁から幅 3-5細胞の領域は将来の頭部外胚葉にあたる領域である(Fig. 6A)。この胚盤周 縁部分が胚盤から胚帯期へと転換する際の様子を、遺伝子発現のパタンと細胞 運動の面から観察し、解析を行なった。次に、これまでの研究からオオヒメグ モ胚の胚盤期に、胚盤の縁やその周縁部に特異的に発現する遺伝子がいくつか 知られている(Akiyma-Oda and Oda, 2003, 2010; Pechmann et al., 2009; Schwager et al., 2009)ことを利用した。オオヒメグモESTライブラリーより胚盤の縁に特異 的に発現する遺伝子を探索することに併せて、他の動物種で知られている極・ 体節形成に関わる因子をESTライブラリーから選び、その遺伝子の発現の観察 とpRNAiによる表現型の解析を行なった。そこで候補に選ばれた遺伝子の発現 と機能について詳細な解析を行なった。

### 材料と方法

### 動物とその発生段階

第1章の材料と方法に準ずる。Fig. 8 における early stage 7 は、原口が閉じて クムルスが出現する直前の late stage 4 から 16 時間経過した胚の段階を指す。 parental RNAi に用いた胚は全てこの発生段階に基づく。

### mRNA の準備

胚帯期における細胞の挙動を観察するために、NLS-tdEosFP mRNA を合成した。これは以下のように作成されたプラスミドを用いた。 pCN3-Flag1-tdEosFP(Molecular Biotechnology)から由来する DNA フラグメントが 第1章で示した pSP64-NLS-GFP プラスミドと置き換えられたものである。この プラスミドを NotI で切断し、それを in vitro 転写のための鋳型として用いた。 Capped Sense mRNA を mMESSAGE mMACHINE SP6 Kit (Ambion)を用いて合成 した。

### タイムラプス観察と画像解析

卵を 50 %のブリーチでコリオンを溶かした。その後蒸留水で数回リンスし、 ブリーチを除去した。蒸留水をのぞいた後、くぼみのついたスライドグラス上 に両面テープを貼ったものに胚を移した。その上からハロカーボンオイル 700 (Sigma-Aldrich)をかけた。NLS-tdEosFP の mRNA 最終濃度 0.25 µg/µl, ビオチン デキストラン(Sigma) 1.0 µg/µl の混合液で顕微注入を行なった。その後、胚盤期 において NLS-tdEosFP の緑色の蛍光を確認した後、赤色蛍光への光転換のため に約 400 nm の光を一部の標識細胞に照射した。光転換のための照射は Axiophot2 の蛍光フィルター(Chroma No. 31022, BP 395±20)で 40 倍のレンズを用いて約 2 分間行なった。光転換された細胞群の振る舞いから、この照射によってクモ胚 の発生に異常が生じることはないと判断した。観察された胚をその後固定し、 mRNA の検出とビオチンデキストランの検出に用いた。

胚は生きたまま、25±1℃ で以下の機材を用いて観察された。共焦点顕微鏡 MICROSYSTEMS DM2500(Leica)によって、画像は5分もしくは10分ごとに 撮影した。撮影された画像をまず付属のアプリケーションである LAS AF version 2.21(Leica)によって処理した。その後、ImageJ version 1.37 によって、画像処理、

### parental RNAi

ESTライブラリーをもとに得られた*At-opa* cDNA(後述)のうち、1816 bp (nucleotide [nt] 83-1898)、465 bp (nucleotide [nt] 83-547) と879 bp (nt 1020-1898) 領 域を*At-opa*1、*At-opaF* と*At-opaH* dsRNA合成のためにそれぞれ用いた。コント ロールdsRNAとしてjellyfish *green fluorescent protein* (*gfp*) gene (Quantum)を用い た。*At-otd* cDNA のうち、480 bp(nt 1-480) と731 bp (nt 481-1201) の領域 (Akiyama-Oda and Oda, 2003) を*At-otdXSE*と*At-otdXE* dsRNAの合成のためにそれ ぞれ用いた。*At-arm* cDNAのうち、543 bp (nt 20-562)、603 bp (nt 563-1165)、537 bp (nt 1166-1702)の領域を*At-arm* dsR1、dsR2、dsR3としてそれぞれ用いた

(Akiyama-Oda and Oda, 私信)。*At-labial1* cDNA(Akiyama-Oda and Oda, 2010) のうち、543 bp (nt 20-562)、603 bp (nt 563-1165)、537 bp (nt 1166-1702)の領域を、 *At-lab* dsR1、dsR2、dsR3としてそれぞれ用いた。 dsRNA の合成と反応は(Niimi et al., 2005; Akiyama-Oda and Oda, 2006)に準じた。dsRNA は1.5-2.0 µg/µl の濃度 で注入した。1-2 µl dsRNAの溶液を2-3日ごとに母親の各個体の腹部に注入した。 注入は、*At-opa*1、*At-opaF、At-otdX、At-otd XS、At-Arm* dsR1, 2, 3, さらに*At-lab* dsR1, 2, 3 dsRNAは4-5回(*At-opaF*, *At-otd*シリーズは5回)、*At-opaHとgfp* dsRNA は7回行われた。

### embryonic RNAi (eRNAi)

eRNAiは、胚に対して直接顕微注入することにより、dsRNAを局所的に細胞に 導入する方法である。顕微注入の方法は第1章の材料と方法に準ずる。各 dsRNA を FITC-デキストラン溶液と混合して、終濃度 0.25-0.4 µg/µl で 32-128 核期に胚 に注入した。dsRNA を注入した胚が late stage 5 に達した時、蛍光色素で標識さ れた細胞の存在、その位置と状態をそれぞれの胚で調べた。蛍光標識された細 胞が胚盤の表層細胞内に留まり、なおかつ実験的に必要な領域が標識された胚 だけをさらに分析した。手動制御によって注入するため、蛍光標識された細胞 における FITC デキストランの蛍光強度は様々であった。しかし、この強度の違 いにも関わらず、表現型の結果には影響を与えなかった。

### 胚の染色

### 固定

FITC-デキストランもしくはビオチンデキストランを注入した胚は実験で必要 なステージまで発生させた後、(Akiyama-Oda and Oda, 2003; Akiyama-Oda and Oda, 2006)で以前報告された方法に従って固定した。方法は第1章に準ずる。

### 染色

Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) は(Lehman and Tauz, 1994; Akiyama-Oda and Oda, 2006)を参考にして行なった。手順は第1章に準ずるが、 2 色目の発色に関しては以下の通りに行なった。1 色目を発色させるために、発 色基質 NBT/BCIP (Sigma)を含む APB 液を入れ、適切な発色になるまで室温で 放置した。発色が十分でない場合は 4°C で一晩発色させた。 その後、PBST で 3 回洗い、後固定処理 (PBST+5%ホルムアルデヒド)を 30 分以上行なった。ア ルカリフォスファターゼ不活性化液 (glycine 375 mg/ 50 ml, 0.1 % Tween20, 1 N HCl により pH 2.2 に調整)により、1 時間以上室温でインキュベートした後、 PBST/エタノール(PBS + Tween 0.1%: エタノール = 1:1)液で5 分インキュベー ト、その後 100%エタノールで5 分以上、インキュベートした。卵黄の白色化を 確認後、再び PBST/エタノール液により5 分インキュベートし、PBST で5 回洗 い、置換した。

mRNA を同時に検出する場合は、FITC ラベルされたプローブを用いた。1色 目の発色完了後、5回ほど PBST で胚を洗った。そのあと、anti-FITC 抗体(Roche, 1:200 dilution もしくは DAKO, 1:200 dilution)でインキュベートした。発色基質に は INT/BCIP(Roche)を用いた。ラベルした細胞の染色と WISH を組み合わせて2 重染色する場合、以下の2つの方法を用いた。

 ①ビオチン-デキストランを胚に導入した場合:単染色の手順を通常通り行い、 DIG ラベルプローブを可視化した。その後、ビオチンを検出するために、 VECTASTAIN Elite standard ABC kit (Vector)に付属のA液とB液をPBST に混合 した液内で 90 分以上インキュベートした。その後、PBST で洗った後、 3,3'-diaminobenzidine(DAB)を胚に浸透させた。その後、H2O2を加えて反応させ、 適度に発色させた。

②FITC-デキストランを胚に導入した場合:アルカリフォスファターゼの結合 した anti-FITC 抗体(Roche, 1:1000 dilution)によってインキュベートした後、赤色 の基質 Vector Red(vector)によって標識細胞を検出した。 核染色には 0.5 mg/ml DAPI (Sigma, 1:200 dilution)を用いた。

### 定量的 Real Time PCR

それぞれのmRNAのプールのためにQuickPrep Micro mRNA Purification Kit (GE Healthcare)を用いて、late stage からearly stage 6(クムルスが出現してから10 時間後の胚)の30個の胚を用意した。正常にクムルスが胚盤の縁まで移動した 胚のみを用いた。一本鎖の cDNAの合成と定量的Real-time PCRは(Akiyama-Oda and Oda, 2010)をもとに、以下のように行われた。ランダムプライマー(Invitrogen) とSuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen)を用いて、cDNAを合成した。 cDNA 合成反応においてreverse transcriptaseなしのコントロール実験では 全て の場合において特異的な産物は見られなかった。 Standard curvesはlate stage 5の 野生型胚のcDNAの希釈シリーズを用いて作製された。mRNAの相対量はsecond derivative maximum法によって計算された。プライマーの組の塩基配列は以下の ものを用いた。

At-opa,

forward GCGGGTTATGGATCGATGCT reverse GGTAATGGCACTCTCATGTGACT At-dpp, forward CCGCATGAGAATTATGGACTGC, reverse CGACTTGATTCCACCTATGAGG At- $EF1\alpha$ forward CTGTACCAGGAGACAATG, reverse ATCTGACCAGGATGGTTC At- $\alpha$ -cateninforward ATGCAGCTCGTATATTGG, reverse CACCCTCTTGTAGAGCAA

### At-opa cDNAの全長解読、系統樹の作成

Zicファミリーに属するショウジョウバエのodd-paired相同遺伝子に類似した 遺伝子が、ESTクローン(At\_eW\_022\_A24を含む)として複数見つかった。その うち、At\_eW\_022\_A24のcDNAの塩基配列を利用した。SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech)とEx Taq polymerase (Takara)を用いて5' RACE PCRを 行ない、5'側の同一読み枠の終止コドンを含む領域をクローニングした。5' RACEに用いた配列は、

5'- CGGAGAAGTGGTTCAGCATATCGAC -3'である。

このopa相同遺伝子の候補因子のcDNAのアミノ酸配列を、MEGA4.0(Tamura et al., 2007)に付属するClustalWにより、他の動物種のZic ファミリー遺伝子、Ci/Gliファミリー遺伝子、Lmd/GLISファミリー遺伝子とアライメントした。さらにCLC sequence viewer(CLC BIO)によって、保存されたアミノ酸配列部分を一部修飾した。そのアライメント配列から、系統樹をNJ法(Saitou and Nei, 1987)によってMEGA 4.0(Tamura et al., 2007)で作成した。ブートストラップ値を得るためのリサンプリング回数は1000である。この結果から、このopa相同遺伝子の候補因子を、At-opaとした。

用いたタンパク質の受付番号は以下の通りである: At-Opa (AB605264), Bf-Zic (AB231866.1), Dm-Opa (NP\_524228.2), Dr-Zic1 (NP\_571008.1), XI-Zic1 (BAA33406.1), Mm-Zic1 (AAH60247.1), Hr-ZicN (BAC23063.1), At-Ci (AB605263), Dm-Ci (AAF59373.2), Tc-Ci (EFA01291.1), Bf-Gli (CAB96572.1), Mm-Gli (AAC09169.1), XI-Gli2 (AAD28180.1), Dr-Gli (NP\_840081.1), Dm-Lmd (AAN13923.1), Dm-Sugarbabe (AAF58441.1), Dm-GLIS3 (AAI29174.1) Mm-GLIS1, (CAM23304.1), Dm-Snail (AAF53463.1), At-Snail (BAD44735.1)

種の省略の詳細は以下の通りである: At, Achaearanea tepidariorum; Bf, Brachiostoma floridae; Dm, Drosophila melanogaster; Dr, Danio rerio; Hr, Halocynthia roretzi; Mm, Mus musculus; Tc, Tribolium castaneum; Xl, Xenopus laevis;

### At-opa イントロンプローブ作製のためのゲノム DNA のクローニング

EST クローン At\_eW\_022\_A24 の cDNA 断片から DNA プローブを作成した。 これを用いて、オオヒメグモのλファージゲノムライブラリーをスクリーニング した。ポジティブになったクローンから、DNA 断片を抽出し、EcoRI で処理し た。ファージの持つ EcoRI 配列と, クローン内の内在的な EcoRI 部位で処理さ れた推定断片が得られた。EcoRI 処理した pBlueScript II (SK-)ベクターにライゲ ーションした。cDNA で判別している領域から塩基配列を読むことで、イントロ ンの配列を特定した。 5 つのジンクフィンガードメインアミノ酸残基のうち、 第 3 番のヒスチジン残基から 2 つ目のアミノ酸であるグリシンに対応する塩基 配列 GGT よりあとから(5'RACE PCR で得られた塩基配列を含む塩基配列のうち、977bp 部分よりあと)、cDNA の塩基配列とは異なる配列が続いた。イントロンの保存配列である GT/AG の法則に従えば、これより2塩基前の GT からがイントロンの配列と考えられた。さらにこの推定イントロン部位が、同じ鋏角類のサソリで単離された *Pi-zic* のもつ部位と同一であることを確認した

(Aruga et al, 2006)。RNA プローブの作成のために、解読した配列部分を用いて PCR することによって pCR2 vector に TA クローニングした。T7 プロモーター を用いてプローブを作製、pre-mRNA を検出した。

### <u>結果</u>

### 胚盤期から胚帯期への転換期における At-hh の発現変化

第1章で示したように、オオヒメグモ胚の細胞化は16核期か、それ以前に完 了している。したがって、全ての体節形成は、細胞環境で行われている。At-hh は early stage 5 では At-otd とともに胚盤の縁において、幅 1-2 細胞で共発現して いる (Fig. 6B, C, Akiyama-Oda and Oda, 2010)。非胚盤領域側の細胞では At-hh の みポジティブな細胞も見られた。At-otd の初期の発現は At-hh に依存している (Akiyama-Oda and Oda, 2010)。この縁の細胞は late stage 5 になると、胚盤の内側 へと潜り込むことが、細胞の固定観察やマーカー遺伝子発現から示唆されてい た(Montgomery, 1909; Oda et al., 2007)。本研究では、縁の細胞を標識することで 追跡に成功した(Fig. 7)。確かに、縁の細胞のいくつかは、中胚葉細胞のマーカ ー遺伝子である At-twist を発現する細胞へと分化し、胚盤下へ移動していた(Fig. 7D, F)。このように、late stage 5 から 6 にかけて縁の細胞の移動があるにも関わ らず、At-hh と At-otd の発現は、stage 5 の終わりまで縁に留まっていた。stage 6 の間、At-otd の発現領域は、現れる前後軸にそって大きくなった。At-hh のスト ライプは、縁から離れた位置に観察されるようになり、At-otd 発現領域の後端部 に位置していた (Fig. 6D-F)。

そこで、At-hh 発現がダイナミックに移動していることを証明するために、蛍 光物質の顕微注入によって、細胞追跡と標識実験を行なった。stage 5 胚盤期に おいて、幅 2-4 細胞分縁から離れた領域に、FITC-デキストランをとりこませた (Fig. 6G)。この時点では、At-hh の発現はまだ縁 1-2 細胞列分に限定されている ため、At-hh の発現と標識細胞は重なっていないと見なせるはずである。この標 識した胚を発生させ、early stage 7 において固定し、At-hh の発現を観察した。す ると、その At-hh の発現は標識領域を越えていた (Fig. 6H, I)。これらの結果は、 At-hh の発現が特定の表層細胞に固定されないことを示している。すなわち、stage 5 から stage 6 の間、前方で At-hh を発現していた細胞がその発現をやめて、後方 の細胞が At-hh を発現するようになると考えられた。

胚帯期の頭部体節形成における At-hh の発現変化。

クモの頭部における体節形成の過程を、遺伝子発現の変化から観察するため に、同じ卵嚢からの卵の発生がほぼ同調的に行われることを利用した。early stage 7から、stage 8の間、2時間置きに同じ卵嚢由来の卵を固定することで、At-hh, At-otd, At-Deformed の発現を観察した(Fig. 8)。At-Dfd の発現は胸部の歩脚領域に 対応する遺伝子マーカーとなる。early stage 7 では、この At-Dfd 発現領域は At-otd の発現とちょうど補完的に発現していたが、stage 8 ではその2つの発現領域の 間にネガティブな領域が現れた (Fig. 8C, C', I, M-R)。At-hh ストライプの変化を 注意深く観察したところ、At-otd の発現領域と重なる At-hh ストライプ部分が広 がって太くなり、すぐに At-hh ネガティブな領域が現れた。すなわち、口が開い たような (open mouth) パタンを示した。様々な At-hh の open mouth パタンを観 察すると、At-hh の発現は太くなった At-hh のストライプの中央の領域から消え ていくように見えた (Fig. 8S-U)。これらのパタンは2-4 時間のタイムポイント で固定された胚で観察された。このパタン変化を分割 (split) と名付けた。

この分割された前側のストライプは *At-otd* ポジティブであったが、残りのス トライプはネガティブになった。この *At-otd* ポジティブな前側の体節がさらに もう一度分割することで、頭部外胚葉に3つの *At-hh* のストライプが形成された と言える。すなわち、*At-otd*, *At-Dfd* の領域の間に *At-hh* ネガティブな領域が2 つ挿入された。この2つの体節はそれぞれ Pp、Ch に対応する領域になった。

頭部領域と違って、胸部体節においては、*At-hh*ストライプの分割は見られな かった。歩脚 L1-3 に対応する 3 つのストライプは stage 7 から stage 8 にかけて ほとんど同時に形成された(Fig. 8E, F, K, L)。歩脚 L4 に対応する *At-hh*ストラ イプは *At-Dfd* 発現領域の後端部に位置していた。さらに、*At-hh*のストライプは 腹部の体節にも見られた。尾葉の中心において、*At-hh*の発現の ON-OFF を繰り 返すことによって、体節が形成されているように見えた(Fig. 8A-L)。

### 頭部形成過程における細胞運動と遺伝子発現のダイナミクス

さらに、細胞レベルでの頭部形成過程を特徴づけるために、生きた胚の頭部 領域における細胞の運動と増殖を追跡した。核移行シグナルをつけた蛍光タン パク NLS-tdEosFP (Nuclear Localization Signal and td-EosFP)の mRNA を顕微注入 によって導入し、予定頭部外胚葉の細胞を標識した。late stage 5(クムルスが縁 に到達し、胚外領域が形成され始める直前)から、固定するまでの 14.5 時間の 間におけるデータ取得が行われ、以下の結果を得た。タイムラプス画像のうち 代表的な画像を Fig. 9A-D に示す。

### 1、細胞の分裂と再配列運動

細胞分裂のタイミングを解析すると、規則正しく起こっている訳ではなく、 近接する細胞の分裂期は近い傾向にあるが、それ以外目立った規則性はないこ とがわかった(Fig. 9G)。細胞数がほぼ二倍になる2つの増殖期の間に、細胞分 裂がほとんど起こらない時期が約4.5時間続いた。この時期があるにも関わらず、 標識された領域の細胞の数において、その縦横比は時間とともに増加した(Fig. 9B, C, F)。これは典型的な収斂伸長運動(convergent extension)の動きがあるこ とを示唆している。ここでは実際に細胞の再配列運動が見られた(Fig. 9B-C)。

### <u>2、ダイナミックな At-hh の発現変化</u>

このリアルタイムの観察のあと、10 分以内にすぐに固定し、*At-hh* の転写産物 を検出した。結果として、観察された標識クローンが 2 つの *At-hh* のストライプ にまたがっていた (Fig. 9E)。このことから、*At-hh* ネガティブな領域の出現が、 他の細胞層から *At-hh* ネガティブな細胞が供給されるわけではないことが示さ れた。

9:30 の時点では標識された細胞の全体数は(n=64)となり、固定した 14:30 の時 点では約 2 倍の(n=117)であった。固定した胚とタイムラプス画像をさかのぼっ て観察することで、将来の At-hh ネガティブな領域となる四隅を標識した。する と 9:30 の時点の四隅を標識した領域の細胞数は、約 15 個であった。14:30 の固 定した時点で現れる At-hh ネガティブな細胞数は(n=22)であった。このことは、 At-hh ネガティブな領域で細胞が特異的に増殖するわけではないことを示してい た。At-hh ネガティブな領域が現れるのは、At-hh の発現が抑制されることによ ると説明されうる。

さらに、タイムラプス画像から *At-hh* を発現している細胞の由来をさかのぼっ て追跡した。すると、ある *At-hh* ネガティブな細胞と *At-hh* ポジティブな細胞が、 同じ親細胞由来であるものが見つかった (Fig. 9E')。この2つの細胞は、最終的 には約 2-3 細胞離れた位置にいたことからも、これらの結果は、*At-hh* のストラ イプの発現がダイナミックに変化していることを支持している。

### 頭部体節形成に関わる因子のスクリーニングとその表現型

オオヒメグモ胚の EST ライブラリー(Akiyama-Oda and Oda, 私信)とその塩 基配列に対する BLAST の結果を利用して、頭部体節形成過程に関わると考えら れる候補遺伝子を探索した。ショウジョウバエとその他の動物における体節形 成因子や極形成に関わる因子等の相同遺伝子と推測されたものを選び、pRNAi による表現型の解析を行なった。それと並行して、将来の予定頭部外胚葉の形 成領域になる胚盤の縁とその付近に発現する遺伝子を探索し、選ばれた候補因 子に対して pRNAi を行なった。これらの解析した遺伝子群は(表1)に示した。 そこの解析の結果、Zic ファミリーであるショウジョウバエ odd-paired の相同遺 伝子、At-opa を同定した。At-opa は、late stage 5 における At-hh RNAi と正常胚 の比較によるマイクロアレイ(Oda、私信)によっても検出された遺伝子である。 At-hh RNAi 胚ではその At-opa の発現が低下した(Fig. 12A, B)。このことからも、 At-opa の発現は Hh シグナルに支配されていることが考えられた。

### <u>At-opa</u>

EST クローンの At\_eW\_022\_A24 が Zic ファミリーの分子群と BLAST でヒットした。このクローンは5つのジンクフィンガードメインを持っていた。ショウジョウバエ odd-paired を含む複数の動物種の Zic ファミリーのタンパクのアミノ酸配列に加えてアライメントを行なった。Zic ファミリーに類似した構造を持つショウジョウバエ cubitus interruptus とその相同遺伝子 At-ci とともに、他の動物種の Ci/Gli ファミリー、Lmd/GLIS ファミリーとアミノ酸配列を比較した。その結果、この At\_eW\_022\_A24 が Zic ファミリーに属することを示した。これより、At\_eW\_022\_A24 のクローンから得られた遺伝子を At-opa とした。この分子の特徴は Fig. 10 に示す。

次に、*At-opa* pRNAi によって得られた表現型を解析した。*At-opaF* dsRNA で 処理した親由来の胚は、最終的に Ch と Pp の欠失が見られた。頭葉の未発達と、 歩脚の異常が併せて観察された(Fig. 11A-C)。 Ch と Pp の表現型をもとにして、 最終的な表現型の分類を次のように行なった。 class I; normal, class II; No Ch (Ch 無し), and class III; No Ch-Pp (Ch と Pp の両方がない) (Fig. 11H)。 Class III の 表現型は、全ての個体で頭葉の未発達が観察された。 同様に、*At-opaH* dsRNA

(At-opaF dsRNA とは異なる領域で合成された dsRNA) でも同様の表現型が得

られた。歩脚の表現型は、Ch や Pp の欠失が見られたからといって必ず得られ る表現型ではなかった。しかし、Ch, Pp の異常が見られた胚ほど、歩脚に異常 の見られる傾向があった。これらの個体の表現型の詳細は(Fig. 11J)に示した。 *At-en と At-wnt16* の転写産物を染色したところ、L2 もしくは L4 の歩脚に *At-wnt16* ストライプの重複が観察された(Fig. 11D-G). この結果は *At-opa* RNAi によってセグメントポラリティの表現型が現れることを示唆している。しかし、 最終的な表現型の現れる stage 9 の段階では *At-opa* RNAi の効果が期待できない ことから、この表現型が直接的な結果か、二次的な結果かを判断することはで きない。胚帯期から基本的な体節形成が終わる発生後期の表現型を解析するの は現段階ではきわめて困難である。

At-opa の発現が RNAi 処理胚で低下していることを確認するために、以下の 実験を行なった。ここではクムルスが出現してから 10 時間後に、クムルスが縁 に到達し、胚外領域が形成される直前である胚を一つの卵嚢から選んで用いた。 まず、dsRNA 処理の効果を検証するために、定量的 Real-time PCR を行い At-opa 転写産物の相対量を測定した。この定量については、実際に得られた表現型と 組み合わせて行っている(Fig. 11I)。全ての At-opaH と At-opaF のサンプルで は、コントロール胚と比較して、At-opa 転写産物の低下が確認された。次に、gfp もしくは At-opa dsRNA で処理した胚において At-opa の発現を観察した。(Fig. 11K-N)。 At-opa dsRNA を注入した場合、At-opa の転写産物のシグナルの低下 が見られた。 gfp dsRNA の場合では正常と比較して変化は見られなかった(Fig. 11K, L)。 At-opa に対して RNAi 処理した胚では、At-opa 転写産物は細胞質では ほとんど検出されずに、核内に点状に検出された(Fig. 11M, N)。この結果はコン トロール胚に比べて、At-opa dsRNA で処理した胚では、At-opa の転写は行われ ているが、細胞質では不安定であることを示唆している。 以上の結果から、 At-opa を注入した母親由来の胚を、"At-opa RNAi 胚"とした。次に、At-opa の発現と機能を、parental RNAiと embryonic RNAi によりさらに詳しく解析した。

At-opa の発現パタン

*At-opa*の発現パタンを詳細に調べると、early stage 5 では胚全体にその発現が 見られた(Fig. 12C)。late stage 5 ではその将来の頭部外胚葉を含む胚盤の縁あた りに強く発現していた。相対的に*At-otd* と *At-hh* ストライプの発現する頭部領域 で強い発現が見られた (Fig. 12D, E)。胚帯が形成されるにつれて、将来の歩脚 領域にもストライプ状の体節パタンが現れた (Fig. 12F-K)。明らかに、この *At-opa*の発現のストライプは*At-hh*ストライプのL1-L3 領域よりも早くに現れて いた。

### At-opa pRNAi と eRNAi による At-hh ストライプに対する影響とその表現型

At-opa における頭部体節の異常の原因を調べるため、より若い At-opa pRNAi 胚の解析と embryonic RNAi (eRNAi) による解析を行なった。 pRNAi 胚では、 At-hh ストライプが胚帯の前端部から移動しその発現が太くなるものの、分割で きなかった (Fig. 13G, H, I)。At-opa の機能が At-hh ストライプの分割に特異的に 機能していることを検証するため、At-opa pRNAi 胚で頭部前端部マーカー遺伝 子 At-otd, At-six3-1 の発現を調べた(Fig. 13L-O)。コントロール胚と変わりなく At-opa RNAi 胚でも At-otd, At-six3-1 の発現は頭部前端部に発現した。さらに、 eRNAi によって At-opa dsRNA をとりこませた領域では、At-hh の分割ができず、 At-hh のストライプがメガネ型になった (Fig. 14E, J)。頭部体節の領域で eRNAi を行なった領域では、At-opa の発現のシグナルが著しく減少したことからその 活性が低下していることが示唆された (Fig. 14S-V)。 これらのことから、At-opa は頭部形成過程における At-hh のストライプの分割に特異的に関与しているこ とが示唆された。

*At-opa* のイントロンプローブを用いて pre-mRNA を検出すると、*At-opa* のストライプの発現は *At-opa* pRNAi 胚で乱されていた(Fig. 13P-S)。すなわち、このストライプ状の発現は *At-opa* の活性に依存していることが示唆された。この結果は、*At-opa* の発現制御にはフィードバック効果が存在することを暗示している。

### At-otd eRNAi による At-hh ストライプにおける表現型

次に、頭部形成過程における *At-otd* と *At-hh* の関係性を探るために、*At-otd* に 対する eRNAi を行なった。 *At-otd* に対する pRNAi によって *At-hh* ストライプ が胚帯の前端部に留まり発現変化できないことが分かっており、本研究でも確 認した(Fig. 13D, E, F, Pechmann et al, 2009)。*At-otd* eRNAi によって dsRNA が胚盤 の縁の細胞にとりこまれた場合、局所的に同様の異常を引き起こすことができた(Fig. 14B, G)。興味深いことに、胚盤の縁から幅 2-3 細胞離れた領域、すなわち将来の頭部外胚葉となる細胞群に At-otd dsRNA がとりこまれた場合、その領域で At-hh のストライプの発現は消え、2つに分断された(Fig. 14C, H)。その後、分断された At-hh のストライプは独立して分割した(Fig. 14D, I)。対照的に、歩脚領域や腹部の体節に At-otd dsRNA がとりこまれた場合、At-hh の発現に影響は無かった(Fig. 14K, L)。 頭部体節の領域で At-otd に対する eRNAi を行なった領域では、At-otd の発現のシグナルが著しく減少したことから、その活性が低下していることが示唆された(Fig. 14O-R)。これらの結果は、胚盤期から胚帯期へ転換する際、At-otd は At-hh のストライプが移動する状態へと移行するのに必要であり、かつダイナミックな At-hh の発現を維持するのに必要であることを示唆している。

さらに、*At-otd と At-opa* の関係を検証するため、*At-otd* eRNAi によって、*At-opa* の発現がどのように変化するかを調べた。すると、*At-otd* dsRNA がとりこまれ た領域では、*At-hh* の第一分割部分に相当する *At-opa* のストライプは分割されな いが、その発現は維持されていることがわかった(Fig. 14M, N)。この結果は、 *At-otd* eRNAi 処理によって *At-hh* の発現が維持されないこととは対照的であった。

### At-opa pRNAi と At-otd pRNAi の収斂伸長運動への影響

上記の表現型に加え、*At-opa* pRNAi 胚と *At-otd* pRNAi 胚では胚帯の軸方向への伸長が 6-10 時間遅延した (Fig. 13J, K)。このように、*At-opa* と *At-otd* は頭部体節のパタン形成に関与しているだけでなく、同時に収斂伸長運動にも関与しているのかもしれない。

### At-labial1 pRNAi & eRNAi

At-lab1 は胚盤期には縁に発現し、さらに胚帯期には Pp の体節内の後端部に、 表層細胞と内部の細胞に発現していることから(Akiyama-Oda and Oda, 2010)、 頭部形成過程に必要な候補因子としてあげられた。 At-lab1 dsRNA で処理した 胚では、その胚帯伸長の遅延が見られた(Fig. C, E は D, F よりも約 6 時間発生 が遅れた胚である)。At-hh や At-otd の転写産物の発現領域を観察すると、コン
トロール胚では*At-hh*の発現の移動(Fig. 15C, G, K)や、*At-otd*(Fig. 15E, I, M) の発現の広がりがそれぞれ観察された。一方、*At-lab* dsRNA で処理した胚では、 そのダイナミックな発現変化が行われていなかった(Fig. 15D, H, L, F, J, N)。こ の RNAi の表現型は dsR2, dsR3 の断片で処理した場合、2週間以降に産まれた 卵嚢の中のほぼ全ての胚で観察された。しかし、このような発生の遅延は見ら れたのにも関わらず、形態的には正常胚と変わらずに完了した。今回 *At-lab* の 機能解析では、dsRNA の最大注入回数は4回である。この回数を 6-7 回に増や すことによって、pRNAi の効果をさらに検証するべきだろう。

*At-lab1* dsRNA をとりこませた領域では、*At-hh*の分割ができず、*At-hh*のスト ライプがメガネ型になった (Fig. 15Q, U)。At-lab dsRNA では、*At-hh*の発現変化 に対して、頭部前端部にクローンができた場合の*At-hh*ストライプの振る舞いに 関しては確認できていない。*At-lab1* がどのように *At-hh*の発現変化に影響しう るのかについては、今後解析を進める必要がある。

#### At-arm eRNAi

これまでの eRNAi の結果は、ショウジョウバエ相同遺伝子である体節形成遺 伝子によって、頭部形成過程が制御されていることを示している。ショウジョ ウバエでは、Hh シグナルと Wingless(Wg)/Wnt シグナルが互いに制御し合い体節 形成に働く。Opa はこの Wg の活性に必要であることが知られている(Benedyk et al., 1994; Swantek and Gergen, 2004; Merzdorf and Sive, 2006)。このことと、ショ ウジョウバエペアルール相同遺伝子である At-opa が At-hh ストライプのダイナ ミクスに関与していることを考慮すると、Wg/Wnt シグナルの関与を検証する必 要性が考えられた。parental RNAi による Wg/Wnt シグナル活性を調べた例はあ る(McGregor et al., 2009)が、頭部の体節形成過程に関与しているかどうかにつ いてはわかっていない。特定の細胞に dsRNA を導入する eRNAi の特長を生かす には分泌タンパクではなく細胞にとどまるタンパクを標的にすれば、効果が得 られると考えた。そこで、Wg/Wnt シグナルを伝える仲介因子である Arm/β -catenin に着目した。*At-arm* dsRNA が頭部外胚葉領域にとりこまれた場合、*At-hh* の分割が阻害され、メガネ様のストライプが形成された(Fig. 15O, R)。頭部前 端部に At-arm dsRNA がとりこまれた場合、At-hh のストライプの移動は起こら なかった(Fig. 15P, S, T)。発生を進めた段階で観察すると、分断された At-hh ス

トライプはそれぞれ独立に分割したが、dsRNA がとりこまれた領域では、もは や At-hh のストライプは前端部から変化しなかった。これらのことから、Wg/Wnt シグナル経路も、At-hh の発現変化に関わり、頭部体節の形成に必要であること が考えられた。ただし、この結果は、At-arm dsRNA が At-arm の持つ細胞接着 の機能にも影響を及ぼしている可能性がある。実際に、顕微注入した胚の中に は、dsRNA を取り込んだ細胞は、細胞表面にとどまらずに内部へ潜り込んでい くものが見られた。表層に残った細胞は通常の細胞の形態と差異のないように 観察されることから、本研究で解析した例では、細胞の異常ではないと考えて いる。この dsRNA の効果の確証を得るためには、①細胞の頂端部に存在する At-Arm タンパクに異常がないことを確認すること、②WgWnt シグナル経路であ る核内の At-Arm タンパクの減少を確認することが必須である。

なお、*At-arm* pRNAi 処理胚では、2週間以降に母親が卵を産まなくなった (dsR2, dsR3 の2種類の dsRNA で確認)。かろうじて産まれた卵の形態について 記載する(Fig. 15A, B)。stage 2 になると、細胞と細胞の境界に異常が生じた。 最終的には胚盤を形成できずに、内部の卵黄が漏れ出て固まりになった。*At-arm* pRNAi 処理では、母体に影響を与えてしまうため、産卵に異常を及ぼすのだろ う。さらには、細胞の接着にも影響を与えてしまうのかもしれない。

### 考察

本章では、クモ胚における新たな実験手法である顕微注入法を用いて、パタ ン形成の仕組みを解明することを目的とした。細胞追跡に重要な蛍光タンパク の mRNA を導入し、頭部体節形成過程の細胞の運動を観察することができた。 局所的に遺伝子の機能解析を行なうことができる eRNAi の特性を生かした実験 系を組むことができた。その結果、頭部体節形成過程では、付け加え型の体節 形成のバリエーションの一つである新たな様式、"分割"の仕組みを浮かび上が らせることができた。 At-hh のストライプ状の発現のダイナミックな変化を Fig. 16 にまとめた。At-hh の発現変化は、①胚帯前端部からの移動、② 2 段階の分割 に大きくわけられる。この変化は細胞のダイナミックな収斂伸長運動と連動し て行なわれるものだった。

### <u>At-hh ストライプの移動について</u>

顕微注入による標識実験によって、*At-hh*のストライプの波のような移動が、 特定の細胞群の分裂や移動ではなく、*At-hh*を発現していた前方の細胞がその発 現をやめ、後方の細胞が*At-hh*の発現を新たに始めることで起きることが分かっ た(Fig. 6, 9)。このストライプ移動のためには、細胞から細胞へ*At-hh*の発現変化 を誘導する仕組みが必要となる。

*At-otd* pRNAi, eRNAi の結果から、*At-hh* の発現変化は *At-otd* の 2 つの機能が必要であることがわかった。その胚帯前端部からの移動と、*At-hh* の発現の維持である(Fig. 13, 14)。 *At-hh* pRNAi の結果から、*At-otd* の発現は Hh シグナルに依存していることがわかっている(Akiyama-Oda and Oda, 2010)。さらにこの頭部体節形成過程においても *At-hh* が単なる体節のマーカーではなく、*At-otd* の転写に関わっていると考えられる結果が得られている。実際に Hh シグナルの仲介役であるショウジョウバエ *cubitus interruptus(ci)*の相同遺伝子に対する eRNAi を頭部領域で行うと、*At-otd* eRNAi に似た表現型を得ることができた(Akiyama-Oda, Adf)。

以上の結果と分泌タンパクである Hh の性質を考えると、At-hh のストライプ の移動の仕組みの一つとして、次のモデルが考えられる。Hh シグナルがとなり の細胞で At-otd を活性化させる。次に At-otd はその細胞で At-hh の発現をさらに 活性化させることによって、At-otd と At-hh の発現領域はともに後方へと広がる ことができる (Fig. 16B)。この仕組みによって、At-hh の発現をストライプ状に するには、より前方の At-hh の発現が抑えられなければならない。At-hh のスト ライプの変化に関わる因子をさらに探索し、解析することが必要である。

### At-hh ストライプの分割について

顕微注入法は細胞の追跡実験と WISH による転写産物の検出とを組み合わせ ることを可能にした(Fig. 9E, E')。これによって、*At-hh*ストライプの分割によ ってできる *At-hh*ネガティブな領域の細胞は、別の細胞層から供給されることや、 *At-hh*ネガティブな細胞へと積極的に分裂することによるものではないことがわ かった。このことから、この *At-hh*のストライプの分割はダイナミックな遺伝子 発現の変化によって生じていると考えられる。そのネガティブな領域を広げる 役割として、細胞の分裂や細胞の再配列運動による収斂伸長運動があるのだろ う。 At-opa, At-otd eRNAi で処理した領域では、At-hh のストライプの分割ができな かった。At-hh の発現は2つに分断されたストライプがそのまま独立して分割の ステップに進んだ (Fig. 14D, I)。これはAt-hh のストライプの移動が、自己複製 型の波であることを暗示している。この分断されたストライプは、それぞれ端 が閉じた形で、中央からネガティブな領域が現れた。At-opa, At-otd eRNAi の結 果は、At-hh のストライプの分割の仕組みが、At-hh の発現の有無もしくはその 変化の遅れを感知しながら行なわれていることを示唆している。正常胚では、 クムルスの移動により胚盤の対称性が破れて現れる胚外領域が将来の背側にな る。この領域では、At-hh、At-otd の発現が抑えられた状態になる。この背側の At-hh ストライプが途切れる部分付近では、腹側のストライプよりも分割が遅れ るために open mouth パタンを示す (Fig. 8)。このように、正常胚における背側 と似た状況が、eRNAi によって腹側にも生み出されているのだろう。

*At-hh*のストライプが、単に横一列に分断されるのではなく、腹側の中央から ネガティブな領域ができて分割されることも、数理生物学の観点から興味深い。 このような波が中央から割れてできる自己複製型の波は、グレイ・スコットモ デル (Pearson, 1993; Reynolds et al., 1994; 三村昌泰, 2006)のような反応拡散方 程式によって記述されている。これらの数理モデルの確立によって、分子生物 学的な遺伝子の機能解析からでは見えてこなかった分子間のネットワークや細 胞の挙動について、推測できることが重要である。数理モデルの利点を生かし、 *At-hh*のストライプの変化がどのような仕組みで起きるのかについて、解析を進 めたい。

At-otd, At-opa といった保存された転写因子群が遺伝子発現のパタンを自己制 御するためにその Hh シグナルの活性とモルフォゲンの産生の仲介役を果たし ているのかもしれない(Fig. 16C)。2つ以上のモルフォゲンのシグナルの反応が、 波のダイナミクスを作り出すのに必須である(Turing, 1952; Kondo and Miura, 2010)ことを考えると、Hh シグナル系ともう一つのモルフォゲンが存在すると考 えられる。At-arm の eRNAi では、前端部近くで影響を与えた場合、At-hh ストラ イプが移動できなくなったこと (Fig. 15) から、一つの候補因子として Wg/Wnt シグナル系が考えられる。ショウジョウバエの体節形成や、eye-disc におけるセ グメントポラリティ遺伝子のネットワークでは Hh シグナルと Wg シグナルが密 接に関わっている (Royet and Finkelstein, 1996; Domínguez and Casares, 2005; Blanco et al., 2009)。このことからもオオヒメグモ胚の頭部体節の形成過程にお ける Wg シグナルの解析は重要であろう。もっとも、Hh シグナルを制御する因 子は多く、その機構は複雑である(Ingham and McMahon, 2001; Lum and Beachy, 2004; Ingham and Placzek, 2006)。お互いがお互いを制御し合って生み出される *At-hh* の移動やその分割を、今回示したような遺伝子の機能解析のみから理解す るのは困難である。数理生物学の観点からのシミュレーションも非常に重要と 考えられる。

### At-opa の役割

Zic ファミリーに属するショウジョウバエ odd-paired 相同遺伝子の At-opa は、 オオヒメグモの頭部体節形成に関与していることが本研究から示唆された。シ ョウジョウバエではペアルール遺伝子として知られている(DiNardo et al, 1987; Benedyk et al, 1994; Swantek and Gergen, 2004)。一方で、Zic ファミリーは脊椎動 物では神経管や脳のパタン形成に必要である(Elms et al., 2003; Aruga, 2004; Grinberg and Millen, 2005)。Zic ファミリー遺伝子が節足動物のクモと脊椎動物 で、発生段階の頭部形成過程に必要であることは、進化の観点から興味深い。

次に At-hh の発現の制御機構の点から At-opa の機能を考えたい。At-hh の発現 抑制による At-hh ストライプの分割に必要であるが、このストライプの分割は At-opa ノックダウンによって特異的に抑制されていた(Fig. 13G, L-O)。このこと は、At-Opa タンパクが At-hh の発現を負に制御する因子であることを示すもの なのかもしれない(Fig. 16C)。 At-otd の eRNAi では At-opa の発現自体に影響は なかったが、そのパタンがメガネ様になった。このことから、At-hh のストライ プの発現と At-opa のストライプの発現には、その制御機構に違いがあることが 示唆された。Zic ファミリーは様々なシグナルネットワークの制御因子として知 られ、Wnt シグナルや Hh シグナルを制御することが知られている (Aruga, 2004; Grinberg and Millen, 2005; Merzdorf and Sive, 2006; Merzdorf, 2007)。At-opa がオオ ヒメグモ胚の頭部体節過程において、Hh や Wg/Wnt シグナルネットワークにお いて、どのような役割を果たしているのかは、今後の解析が期待される。

### <u>クモ胚における3つの体節形成の仕組みの違い</u>

クモ胚では、腹部における付け加え型の体節形成、胸部における同時型の体 節形成、さらに頭部には付け加え型のバリエーションの一つである分割型、こ の3つの体節形成が存在することが示唆された。 クモの腹部の体節形成の状況は典型的な付け加え型の体節形成であり、脊椎 動物の体節形成 (somitegenesis) にも似た仕組みがあると考えられている (Stollewerk et al., 2003; Liu and Kaufman, 2005; Peel et al., 2005; Damen, 2007)。こ の仕組みは本研究で明らかになった頭部の体節形成とは異なっていると考えら れる。腹部の体節形成は、尾葉部分の *At-hh* ストライプの発現の波を ON-OFF を繰り返しているように見える。一方で、頭部の体節形成の違いは、波のピー クを末端から一つずつ生み出すことでストライプパタンを作るのか、もしくは 存在するピークの中心から2つにわけることでストライプパタンを作るのか、 という違いがあることが考えられる。今後、腹部の体節形成過程における細胞 運動の追跡と、遺伝子発現の変化についても同様に解析が進められることが期 待される。

At-opa の胸部の発現変化が、同時的に体節のパタンを形成すること、またその pRNAiのセグメントポラリティ様の表現型は、クモ胚の胸部ではショウジョ ウバエのような同時型の体節形成が行なわれることを暗示している。ショウジ ョウバエギャップ遺伝子の hunchback 相同遺伝子、At-hb の pRNAi によって L3 をのぞく歩脚体節が欠失するといったギャップ様の表現型が得られる (Kanayama、未発表; Schwager et al., 2009)。このことも、クモ胚の胸部では ショウジョウバエの持っている遺伝子ネットワークの一部が存在しているのか もしれない。しかし、ショウジョウバエの多核性胞胚の環境とは異なり、クモ 胚では細胞環境においてその同時的な体節形成を達成していることになる。ク モ胚では、分泌タンパク At-hh が胚盤期にそのシグナルを胚盤全体に伝えており、 そのシグナルは前後のパタン形成に必要であることが示唆されている

(Akiyama-Oda and Oda, 2010)。このような細胞を越える分泌因子の働きが、歩 脚領域の胸部体節の遺伝子発現を制御しているのかもしれない。胚盤期におけ る Hh シグナルの情報が胚帯期に受け継がれているのか、もしくは胚帯期に別の 因子が積極的に関与しているのかについては、これから解析が期待される。

### 胚帯伸長における細胞運動と頭部体節形成に必要な遺伝子機能の関連

At-otd, At-opa pRNAi 胚では、約6時間以上、扇形の形のまま発生が遅延した (Fig. 13J, K)。体節形成遺伝子が収斂伸長運動に影響を与えている可能性が考 えられる。これは、ショウジョウバエのペアルール遺伝子が細胞の割り込み運 動に影響を与える知見と類似している(Irvine and Wieschaus, 1994; Zallen and Wieschaus, 2004)。これらの dsRNA を取り込んだ表層の細胞自体は、表層に維持 され、その形状に異常は認められなかった。この遅延が起こるのは RNAi が細胞 に対してどのような影響を与えている結果なのかを調べるために、dsRNA を取 り込んだ細胞の挙動について、詳細な解析を行う必要がある。コントロールと 比較して、その領域が縦に並ぶ再配列のスピードに影響が出ているのかどうか、また細胞の分裂に異常がないかを検証するべきである。ショウジョウバエや他 のモデル生物では、planar cell polarity に関わる遺伝子群が、細胞の運動を伴う収 斂伸長運動に関与していることが知られている(Veeman, 2003; Kiefer, 2005; Johns and Cohen, 2007)。このことから、pRNAi 胚、または dsRNA を取り込んだ 細胞でこれらの遺伝子群に影響があるのかどうかを検証するべきである。

### 節足動物の頭部における体節形成過程の進化

本研究で示したような分割様式の体節形成は、クモだけに見られるのだろう か。昆虫の頭部の体節形成過程は、*hh や wg* といったセグメントポラリティ遺 伝子によって観察できる(Farzana and Brown, 2008; Miyawaki et al., 2004)。その 経過を追ってみると、細胞化された段階で2つの *hh*の発現ストライプが頭部前 方の左右に発現している。フタホシコオロギの場合、このストライプが約3時 間でそれぞれ2つのストライプに分かれ、左右で計4本になる。ショウジョウ バエにおいても、一つの *hh* ストライプが 3 つに分かれることが知られている

(Mohler, 1995)。しかし、その hh の発現変化がどのような仕組みで起きている かはほとんど理解されていない。本研究で得られた知見は、昆虫にも保存され ている可能性がある。

Hox 遺伝子の発現部位の比較から、昆虫とクモにおける体節が、どことどこ に対応するかが示されている(Damen et al, 1998; Hughes and kaufman, 2002)。ク モ鋏角(Cheliderae)と触肢(pedipalps)は、それぞれ antennal segment と intercalary segment に相当すると考えられている。これをそれぞれ deutcerebral (第二) (antennal と Cheliceral)と tritocerebral (第三) (intercalary と pedipalpal) segment と呼び、末端の部分は Protocerebral (第一)もしくは ocular region と呼ぶことが 提唱されている (Scholz and Edgecombe, 2006)。この呼称を用いれば、クモ胚で は、第二と第三体節を形成するために 2 回の分割を行っているのに対し、昆虫 ではクモ胚の第三体節の形成過程が短縮され、第二だけの分割を行っているよ うに見える。実際、昆虫頭部の体節形成過程では、第三体節における hh の発現 は、他の頭部体節より後期に出現する。この昆虫の第三体節は、クモのような 付属肢を伴わず、形態的にもその形をなしていない。節足動物門における頭部 の体節形成の過程を比較することは、形質の進化の過程を読み取ることの代表 例になる。クモ胚の体節形成の過程を探ることは、どのような発生プログラム の変化が形質の変化をもたらしたかを解明する手がかりとなるであろう。

### 結論

新しい体節形成の様式をオオヒメグモの頭部の体節形成過程で見つけること ができた。それは*At-hh*の遺伝子発現が広がり、中央から抑制されて2つに分か れるという分割型であった。

顕微注入法による蛍光タンパクの導入は、細胞運動のオオヒメグモの胚にお ける頭部体節形成過程の細胞運動の観察を可能にした。特に WISH との組み合 わせによって、細胞分裂や細胞の移動が遺伝子の発現パタンの変化に対して影 響を与えるというよりもむしろ、細胞間で遺伝子の発現パタンが変化すること が必要であることを示した。今後はより広い範囲の細胞運動を追跡することが 求められる。さらに、dsRNA の注入による局所的な遺伝子の機能阻害によって、 *At-otd* が *At-hh* の移動だけでなく、その発現を維持するのに必要であることがわ かった。ここに遺伝子の発現パタンのダイナミックな変化には細胞間の分子ネ ットワークが必要であることを示した。

クモ胚が頭部、胸部、腹部と、すくなくとも3つの体節形成の仕組みを備え ていることにも注目したい。このことは体節形成の仕組みについて多様性と進 化を理解することに、クモ胚が優れた系になることを示している。さらに、本 研究で示した顕微注入法は胸部や腹部の体節形成だけでなく、軸形成や細胞の 移動について解析するための重要な手段となるだろう。

±	1
衣	
~	_

ESTライブラリーcDNA塩基	縁もしくはその付近に特	pRNAi で表現型は見られた
配列の Clone ID 、遺伝子名,	異的に発現があったか	か(それは頭部か?)
クローニングした者		(/は未解析)
At-O085 (dorsal)	No	No
At_eW_y20_5 /argos	No	No
not2 (Floating head)	No	Ambiguous
not5	No	No
otd	Yes	Yes(頭部)
eS7_001_D12(hunchback)	Yes	Yes (頭部ではない)
At_eW_022_A24	Yes	Yes(頭部)
(zic/odd paired)		
even-skipped(金山)	No	· /
atonal(金山)	No	/
At_eW_013_A08 (pax2)	No	
snail (Yamazaki et al., 2005)	Yes	No
fkh	Yes	No
hairy(秋山-小田、小田)	Yes	No(小田)
labial	Yes	Yes(解析中)
armadillo	No	No egg
At_eW_021_M03/ prickle	No	No
eS6_d1_08f_A03/odz	No	No
es6_d1_08f_G06/ Jagged	No	No
stardust (At-O098)	No	No
At_eW_010_A16/ BicD	No	/
At_eW_021_L15/discs large	No	/
AteWeS7_SB_006_H09	No	/
AteWeS7_SB_009_A09	No	/
AteWeS7_SB_015_H01	No	/
(nonmuscle myosin II)		
AteWeS7_SB_011_B04/ piwi	No	1
AteWeS7_SB_006_H09	No	/
At_eW_020_G18 (piwi)	No	/
At-O024_p_vasa (Vasa)	No	No





















Α		ZF	1			ZF2		
	At-Opa	CLWIDPDQMPPKKPC	NKIFQTMHEIVSHIA	VEHVGGPECT	-HTCCWQECPR	NGRPFKAKYKL	VNHIRVHTGEK	FPCPF
	Bf-Zic	PGLVPPGGR.T.		1 	ΓΑ.F.VG.S. Α.F.KD	DA		A H
	Mm-Zici	.KE.ELANS	DRE.YS.NQL.D.VT	. D HDQAL	DY.KD.T. I.F.E	E-KS.Q E.K	· · · · · · · · · · · · · · · · ·	I . L .
	Dr-Zic1	.KE.ELANS.		QS	I.V.E I.F.EG.	E.K	1	
	Dm-Ci	.HRS	RIE.I.QD.L.K. N	ND. IQTNKKA	FV. R. KD. S.	GEKQ.M.	. V . M . R	NK.T. HK.T.
	Bf-Gli Mm-Gli	.H.DGD.	S.E.D.QDQL.H. N	ND. IH. EKKE-	FV.R.DG.S.	EQK Q.M.	. V.M.R	HK.T.
	XI-GII2	.H.DG	S.E.D.QDQL.HN	ND. IH. EKKE-	FV.RS.	EQK Q.M.	. V.M.R	HK.T.
	Dm-Lmd	.R.TG	DEE.PHQQAF.E.E	KC. DVRKGE	D-FS.F.LD	RYK. N.R.	LI.MS	NK
	Mm-GLIS1 Dr-GLIS3	.R.V	CAAYEQQE.L.R.E	KS. IDQRKGEL	D-F.F.AG.V.	RYK. N.R	LI.MS	NK.M.
	Dm-Snail At-Snail	DE	Q.MYS.SMGLSKR	QF.CPAA.N-	QEKKTHS.EE	C.KLYTTIGA.	КМТ	L. KC
		752		754			765	
	A4 0 ===	<u> </u>	* *	<u>464</u>	* *	* *	<u>2F3</u>	*
	Dm-Opa	PGCGKVFARSENLKIHKRTH	ITGEKPFKCEYAGCDR	K F A N S S D R K K F R	1S-HVHTSDKPY	NCKIRGCDKSY	THPSSLRKHMK-	VHG
	Hr-ZicN	.N		R R	Т-ҮТ. STS	AVQK	L.	-M.E
	XI-Zic1			R R	M	LM	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	E
	At-Ci Dm-Ci	ES.AYS.LT.L.S. F. F.AYS.LT.L.S.	YTFPSK	A.S.AA.	QNRT.SNT	A AP T. R.	.DV.1	Г Г
	Tc-Ci Bf-Gli	E V. AYS. L T. L. S. E N. AYS. L T. L. S.	YTPSK	A.S.AA A.S.AA.	QNRT. SNE	V AP T. R.	.DV.1	ſ
	Mm-Gli XI-Gli2	E R . SYS . L T . L . S . E F . AYS . L T . L . S .	YMQESK	A.S.AA A.S.AA.	QNRT.SNE	VLPT.R.	.DV.1	r
	Dr-Gli1 Dm-Lmd	EN.AYS.LT.L.S.		A.S.AA A.SA.	QNRT. SNE	1PT.R. A.QLPT.R.	.DV.1	 A
	Dm-Sug Mm-GLIS1	HL.E.S.S.AI.S. ES.A.S.LL.S.	SYSFEQK	AYSF A. <mark>S</mark> A	T-RT. SME Q-RT.LDT	M VA Q. R. A.Q. P S. R.	.DV.1	FK.S
	Dr-GLIS3 Dm-Snail	EQ.A.S.LL.S. .IA.S.PWL.QG.I		A . S A S DR . NLRA .	Q-RT.VDT Q-QT.VDV.K.	A.Q.QG.R. A.QVHF	.DV.S SRM.L.NSSS	SS
	At-Snall	NLA.S.PWL.QG.I	A.PH.S./	ADR.NLKA.	L-QT.SDV.K.	S.NAS.TF	SRM.L.L.NDC	GCGA
			M	0	670			
			Dunt Dunt	ma ma				
		В	ind 1ST	IS3 /				
			$\sum $	/ /		N <sub>2</sub> .		
			$\setminus$	/	4.2			
			Y	/	Ĩ	<sup>b</sup>		
		<	PEC	/	/	0.4		
		Tc.	100	95		O'BF-ZI	5	
		Dm-C	1		99 10	O At-C	Dpa	
			11 -1			Dra		
		Dr-G				X		
		un Gli	4.0 1			Zic		
		hu.				->		
				100				
				/\	(			
				/		4		
				/			3	
				A	D			
				t-Sn	n-SI			
				lail	nail			
		-	0.1					

# Fig. 11-1

*gfp* pRNAi







*At-opa* pRNAi

Iomai

*At-opa* pRNAi





F





control

At-opa RNAi









control

At-otd eRNAi







0 At-arm eRNAi P

At-hh FITC-dextran

At-hh FITC-dextran



At-lab1 eRNAi

At-hh FITC-dextrar



第1章の図

### Fig. 1

オオヒメグモにおける AEL1 時間からの早期胚発生ステージ。(A, B) 実体顕 微鏡で観察した胚。この胚はブリーチ処理によるコリオンの除去を行っていな い。(A)は AEL1 時間、(B)は AEL2 時間の胚。(C-K)実体顕微鏡によって観察し た別の胚。AEL(C)7 (D) 8 (E) 9 (F) 10 (G) 11 (H) 12.5 (I) 14 (J) 20 (K) 30 時間の時点 の画像を示す。この画像の胚はコリオンが除去されている。エネルギドがかす かに AEL 約 8 時間で見え始め、時間が経過するにつれて増加する。核の数や発 生段階をパネル上に示している。(L-S) 微分干渉顕微鏡で観察した胚。(L)16 核 期、(M)32 核期、(N)64 核期、(O)128 核期の画像を示す。N の中の枠が P-S で拡 大されている。この図は、2つのエネルギドが非同調的に分裂することを示し ている。注目すべき 2 つのエネルギドに数字がつけられている。エネルギド1 が 2 よりも早くに分裂していることがわかる。スケールバー: 100 μm。

**Fig. 2** 

16 核期における RITC-デキストランの顕微注入結果。 16 核期に RITC-デキ ストランを注入した胚を(A, D, G, J, M) 白色光、(B, E, H, K, N)赤蛍光によって実 体顕微鏡下で観察した。画像は注入後から15分以内に撮影した(A-C, J-O)。A-C と同一の 128 核期と stage 5 の時期の胚を撮影した。重ねた図は(C, F, I, L, O)で (A-I) 注入された RITC-デキストランの振る舞いが Class I だった胚。 ある。 (A-C) RITC-デキストランのいくらかは一つのエネルドに浸透し (矢で示す)、残 りは、周りの卵黄塊の間にある空間に浸透した。 RITC-デキストランが卵の内 部に入らないことがわかる。RITC-デキストランの分布は入り組んだ境界内に留 まった(やじりで示す)。これは区画が存在していることを示している。卵内部 に注入し損ねた RITC-デキストランをアスタリスクで示してある。 (D-F) RITC-デキストランが8つの娘細胞内に顕著に見えるが、他のエネルギドには見られ なかった。卵黄塊の間にあるシグナルはこのステージまでにはかなり小さくな っていることが分かる(E と B を比較のこと)。(G-I) RITC-デキストランは胚盤 において約 100 個の表層細胞に観察された。(J-L) 注入された RITC-デキストラ ンの振る舞いが Class II だった胚。RITC-デキストランは注入した部位から拡散

しなかった。(M-O) 注入された RITC-デキストランの振る舞いが Class III だった 胚。RITC-デキストランはすぐに卵の中心部へと拡散した。卵内部に注入し損ね た RITC-デキストランをアスタリスクで示してある。スケールバー: 100 μm。

### Fig. 3

64 と 128 核期における RITC-デキストランの顕微注入結果。64 核期(A-D)と 128 核期 (E-H)の RITC-デキストランを注入した胚を、白色光(B, D, F, H) と赤 蛍光(A, C, E, G) によって実体顕微鏡下で観察した。画像は注入してから 15 分 以内 (A, B, E, F) と、stage 5(C, D, G, H)において撮影された。B, D, F, H は重ね 合わせた像である。RITC-デキストランはすぐに一つのエネルギドにとりこまれ、 それから娘細胞に受け継がれた。約 16 細胞、10 細胞が C と G の図においてそ れぞれ標識された。スケールバー: 100  $\mu$ m。

### Fig. 4

32 核期における RITC-デキストランと *nls-gfp* mRNA の顕微注入の結果。RITC-デキストランと *nls-gfp* mRNA の混合液を 32 核期に注入した胚を、それぞれ赤 (A, D, G)、緑(B, E, H) の蛍光と白色光 (C, F, J)によって実体顕微鏡によって観 察した。画像は 128 核期 (A-C)、stage 5 (D-F)と stage 8 (G-J)で撮影された。C, F, J は緑蛍光と白色光を検出した画像を重ねたものである。枠で囲まれた領域が B と E において拡大され重ねられている。RITC-デキストランと NLS-GFP の蛍光 が同じ細胞内で検出され、さらに NLS-GFP は核内に移行し濃縮されている。F における細い矢と太い矢はそれぞれクムルスと胚盤の縁を示している。a, anterior (前方); p, posterior (後方); ex, extraembryonic area (胚外領域)。スケー ルバー: 100  $\mu$ m。

### Fig. 5

32 核期の胚における一つの細胞を追跡したもの。(A-F) 32 核期において FITC-デキストランを注入した胚を、mid stage 5 において、固定するまえ(A-C)と固定 し染色した後(D-F)に観察した。それぞれ、白色光(A)蛍光(B)重ねた画像(C) が示されている。 矢は移動するクムルスの位置を示している。平たくマウント された胚には *At-dpp* 転写産物(青)と FITC-デキストラン(茶)が染色されている (D-F)。D における枠が E, F で拡大されている。E では焦点を表面に合わせて いる。F では焦点を内部の *At-dpp* を発現する CM 細胞(小さな矢)に合わせて いる。FITC-デキストランのシグナルは表層と胚盤の中心あたりの細胞(大きな 矢)と CM 細胞の両方に検出された。(G-I)32 核期に FITC-デキストランを注入 した胚を、mid stage 5 に固定した後に *At-otd* 転写産物(青)と FITC デキストラ ン(茶)を染色したものを観察した。胚盤(gd)と非胚盤(non-gd)領域の境界を ふたつの大きな矢で示した部分が、HとIで拡大されている。H では焦点を上皮 の表層細胞層に合わせている。I では内部の層に合わせている。FITC-デキスト ランが *At-otd* ポジティブな細胞と *At-otd* ネガティブな表層細胞、非胚盤領域の 表層細胞,さらに胚盤表皮下に位置する内部の内胚葉細胞で検出された。(J,K)16 核期以前に FITC-デキストランを注入した late stage 4 の胚。白色光(K)、緑蛍光 (J) でそれぞれ観察している。FITC-デキストランの蛍光強度の異なる領域が形 成されていることに注目。何核期に FITC デキストランを注入したかは把握でき ていない。スケールバー: A-D, G, J, K 100 µm; E, F, H, I, 20 µm。

第2章の図

Fig. 6

(A)第2章における全体の図の時間軸に対応したオオヒメグモの胚発生の図。 絵のクモの赤い領域はオオヒメグモ胚における RITC-デキストランによる標識 実験(Oda,私信)を示している。クムルスとは反対側の、胚盤の縁から2-3 細 胞離れたところの部位が、鋏角(Ch)、触肢(Pp)となる。(B-I)FITC-デキストラ ンの導入による細胞標識実験。*At-hh*ストライプの発現変化は波のように前方か ら後方へ移動する。(B, C) early stage 5 における *At-hh*(青)と*At-otd*(赤)の転写産物 の染色。C は B の DAPI 染色による DNA。*At-hh* と *At-otd* の発現は、胚盤の縁で 検出される。(D, E, F) early stage 5 からおよそ 12 時間経過した胚。*At-hh*のスト ライプが前端部から離れた位置に検出されている。D, E は F の胚帯前端部の枠 の拡大図。E は D の DAPI 染色による DNA。(G) early stage 5 における FITC-デキストランをとりこませた胚の縁の拡大図。(H, I) G の胚を発生させ、early stage 7 まで発生させてから固定したもの。*At-hh* 転写産物(青)、FITC-デキスト ランによって標識された領域(赤)。H は I の胚帯の前端部の枠の拡大図。標識 された細胞が *At-hh*を発現している。a, anterior(前方); p, posterior(後方); ex, extraembryonic area (胚外領域); Ch, chelicerae (鋏角); Pp, pedipalps (触肢); L1、 L2、L3、L4、(それぞれ歩脚1、2、3、4)。 スケールバー: 50 µm。

**Fig. 7** 

胚盤の縁の細胞の追跡実験。胚盤の縁の細胞には中胚葉細胞になるものがい る。(A-D)顕微注入により、NLS-tdEosFP mRNAを導入し胚盤の縁の細胞を標 識して観察したタイムラプス画像。約400 nm の青外線照射により、標識領域の 中央部分(縁から細胞 2-3 列分)が緑色から赤色の蛍光に変換されている。白い 点は胚盤の縁もしくは胚帯の前端部を示す。やじりは stage 5 の時点で縁から 2-3 細胞列に位置していた赤い標識細胞のいくつかを示す。縁から入り込んで表層 細胞下に散らばっていることがわかる。括弧は縁から約細胞 5 列あたりの緑の 標識領域を示す。この領域は潜り込まず、表層に残っていることがわかる。(E-I) (D)の胚を 15 分以内に固定し、染色した胚。中胚葉細胞のマーカー遺伝子 *At-twist*(*At-twi*)(青)の転写産物と NLS-tdEosFP と同時に注入されたビオチン-デキストラン(茶)の染色。I の枠が E-H に拡大されている。アスタリスクは内部 に潜り込んだ標識細胞のうち、*At-twi*ポジティブになっているもののいくつかを 示す。白い点は胚帯の前端部を示している。スケールバー: 100 μm。

Fig. 8

胚帯期における At-hh ストライプが分割する様子を示した連続写真。 early stage 7 (胚盤期に原口が閉じてから、16 時間後としている)より、一つの卵嚢 から、2時間ごとに固定した。固定した胚では、At-hh, At-otd, At-Dfd のそれぞ れの転写産物が二重染色された。(A-F, A'-D', F, S-U) At-hh (青)と At-otd (赤) の転写産物の染色。(A'-D', F')は(A-D, F)における枠を拡大したもの。それぞれ の図の右端にある青と赤のバーはそれぞれ At-hh と At-otd の発現領域を示してい る。それぞれの画像の右端の発現領域の長さに対応している。発生が進むにつ いて、At-hh のストライプが広くなり (B')、中央からその発現が消えていく(C') ように見える。(D')ではさらに 2 回目の分割のために、2 つあるうちの前側の At-hh ストライプの発現領域が広がっている。early stage 7(A, A', G, M)、2 時間後 (B, B', H, N)、4 時間後(C, C', I, O)、6 時間後(D, D', J, P)、8 時間後(E, K, Q)、10 時間後(F, F', L, R)の胚をそれぞれ固定している。(S-U) At-hh のストライプの口 が開くパタンが現れ始める過渡期の胚。At-hh ネガティブな領域が様々な形で見

え始めている。early stage 7 から(S)2 時間、(T, U)4 時間の時に固定した胚。(G-L) At-hh(青)と At-Dfd(赤)の転写産物の染色。At-Dfd の発現は将来の歩脚領域 L1-L4 に相当する部分に発現している。At-hh と At-Dfd の近接する発現の間に、 At-hh ネガティブな領域が現れるのがわかる。(M-R) At-otd(青)と At-Dfd(赤) の転写産物の染色。At-otd と At-Dfd の発現の間に体節が挿入される。 点は将 来の歩脚 L4 に相当する At-hh の発現を指す。やじりは変化する頭部の At-hh ス トライプを示す。スケールバー: 100 μm。

### Fig. 9

頭部体節形成過程の細胞運動と At-hh ストライプの発現変化の関係。 NLS-tdEosFP mRNA の顕微注入によって細胞の標識を行なった。頭部体節形成 領域における細胞運動を観察し、タイムラプス共焦点顕微鏡画像を取得した。 (A-D) NLS-tdEosFP mRNA の注入によって標識した細胞のタイムラプス画像。右 側の細胞の標識が、青外線照射によって緑色から赤色の蛍光に変換されている。 late stage 5 の撮影開始から(A)0 時間、(B)5 時間後、(C)9.5 時間後、(D)14 時間 20 分後の胚。大きな点は胚帯前端部を示している。点線による枠は標識細胞群の 縦横比の変化を表しており、(F)において細胞数の縦横比を数えるのに使用され た。代表的に〇が付けられた細胞では、割り込みによる再配列運動が見られる。 矢とやじりは、それぞれが示す細胞を追跡している。 (E)タイムラプス画像取得 後、10 分以内にその胚を固定し、染色したもの。At-hh(青)の転写産物と、 NLS-tdEosFP mRNA と同時に注入されたビオチン-デキストラン(茶)の染色。 Eの時点で*At-hh*のストライプが2つに分割されて現れるネガティブな領域にア スタリスクがつけられている。タイムラプスをさかのぼることで、Eのアスタリ - スクのそばにある細胞に対応させた形で A-C の図へアスタリスクが修飾されて いる。(E') Eの図を拡大した図。(A-C)においてやじりと矢印で追跡した細胞を 示している。これらの細胞は分裂後 At-hh ポジティブな細胞とネガティブな細胞 に分かれていることがわかる。(F) 標識した細胞数の変化と、その細胞数による 縦横比をグラフにしたもの。(A-D)における白い点線の枠内にある細胞数の縦幅 (Length、緑)と横幅(Width、赤)の変化をグラフにしている。14.5 時間目で は、標識細胞を、頭葉部分の細胞(I)、前側の At-hh ポジティブな細胞(II)、新た に出現したAt-hhネガティブな細胞(Eにおいてアスタリスクで示されている領 域) (III)、後ろ側の At-hh ポジティブな細胞(IV)、胴体の歩脚領域にある細胞(V)、

の5つの領域にわけてその数を示している。III の細胞群が増えることで全体の 細胞数が増えているわけではないことに注目。5:00-9:30 間の細胞分裂がほとん ど起こらない時期に、その縦横比の割合は増加している。(G) 観察 0 時間から 5 時間前の間の、細胞分裂の時期を色わけによって示したもの。近接する細胞で はその分裂時期が近いように見える。緑の時期に相当する細胞が散らばってい ることから、規則性があるようには見えない。スケールバー: A-E, 100 µm; E', 20 µm。

**Fig. 10** 

オオヒメグモにおける At-opa cDNA の分子的な特徴。系統樹作製に用いられ たジンクフィンガードメイン領域と系統樹を示す。(A)系統樹に用いた領域のア ライメント配列。保存された領域は点で、ギャップはハイフンで示されている。 赤いアスタリスクはジンクフィンガードメインのシステイン残基とヒスチジン 残基を示す。(B) 5 つの C2H2 によるジンクフィンガードメインのアミノ酸残基 を用いて作製した NJ 法による系統樹。分岐点の数字はブートストラップ値(%) を示す。種の省略の詳細は以下の通りである: At, Achaearanea tepidariorum; Bf, Brachiostoma floridae; Dm, Drosophila melanogaster; Dr, Danio rerio; Hr, Halocynthia roretzi; Mm, Mus musculus; Tc, Tribolium castaneum; Xl, Xenopus laevis;

**Fig. 11** 

At-opa pRNAiによって得られるその表現型と、その妥当性、特異性の検証。 (A-C) stage 9に到達した gfp dsRNA を注入した母親由来の正常胚(A)と、At-opa dsRNA を注入した母親由来の代表胚 class: No Ch(B)と class: No Ch Pp(C)を示す。 DAPIによる DNA の染色と、At-en の転写産物の染色をしている。括弧は Ch, Pp の異常が見られる部分、矢は胴体の歩脚領域に異常が生じた部分を示している。 B は At-opaF、C は At-opaH の dsRNA をそれぞれ注入した母親由来の胚を用いて いる。(D-G) At-en(赤) At-wnt16(青)の転写産物を染色したもの。(D, E) gfp dsRNA を注入した母親由来のコントロール胚。E は D の枠を拡大した図。(F, G)At-opaF dsRNA を注入した母親由来のコントロール胚。E は D の枠を拡大した図。(F, G)At-opaF dsRNA を注入した母親由来のコントロール胚。E は D の枠を拡大した図。(F, G)At-opaF

に異所的な発現が検出されたものがいた。その胚では L1 側の At-en の発現領域 がコントロール胚よりもL2 側に近かった。(H)一つの卵嚢の中の、normal. No Ch, No Pp の表現型の相対数。(I) 定量的 Real-time PCR による late stage 5 における At-opaF, At-opaH dsRNA を注入した親由来の胚と、コントロール胚での At-opa の発現相対量の比較。At-opa dsRNA を注入した親由来の胚では、正常胚と比較 して At-opa の発現量の低下が見られる。dpp の発現量はクムルスの形成が正常 に行われ、胚盤形成に異常がないことを示している。ハウスキーピング遺伝子 として、EF-1αを1として相対定量を行っている。n=2、第2章の材料と方法を 参照。ここで示した棒グラフの個体名は H と対応しており、それぞれ同じ卵嚢 由来の卵を用いて実験を行なっている。(J)(H)で示された表現型の一つ一つの個 体について、歩脚領域の異常を加えたグラフ。Ch, Pp が異常になるからといっ て歩脚の異常が見られるわけではない。Ch, Pp が正常で、L3-L4 だけが異常にな るケースはない。(K-N) early stage 6 の gfp dsRNA を注入した母親由来の正常胚 (K, L)と、At-opa dsRNA を注入した母親由来の胚(M, N)を示す。L, N はそれ ぞれ K, M の枠を拡大したもの。At-opa pRNAi の影響を受けた胚では、At-opa の 細胞質の発現が低下し、点状の発現が見られる。これは、細胞質では mRNA が 不安定だが核内の転写は起こっていることを示唆している。アスタリスクはク ムルスの位置を示す。 スケールバー: 100 µm。

### **Fig. 12**

*At-opa*の発現パタン。 その発現は Hh シグナルに依存している。(A) late stage 5 における *gfp* pRNAi 胚。*At-opa* の発現は将来の頭部外胚葉を含む胚盤の縁の周 りに発現している。(B) late stage 5 における *At-hh* pRNAi 胚。*At-opa* の発現は検 出されない。(C) early stage 5 における野生型の胚。*At-opa* の発現は胚盤全体に ランダムに発現している。(D-K) 胚帯伸長期における *At-opa* の発現。Fig. 8 の時 間軸に対応している。E と G をのぞいて、Fig. 8 の胚と同じ卵嚢由来の胚である。(D, F、H-K) *At-opa*(赤)、*At-hh*(青)の転写産物を二重染色したもの。(E, G) *At-opa* の転写産物を二重染色したもの。early stage 7(D, E)、2 時間後(F, G)、4 時間後(G)、 6 時間後(I)、8 時間後(J)、10 時間後(K)の胚をそれぞれ固定している。スケール バー: 100  $\mu$ m。

• 67 •

At-otd, At-opa に対する parental RNAi (pRNAi) で処理された胚の胚帯伸長時に (A-K)コントロールとしての gfp (A-C)、At-otd (D-F, K)、At-opa おける表現型。 (G-I, J)に対する pRNAi 胚において、At-hh(青)と At-Dfd(赤)の転写産物を染 色したもの。B. C は A の枠を拡大したもの。C は B の DAPI 染色による DNA。 E,FはDの枠を拡大したもの。FはEのDAPI染色によるDNA。H,IはGの枠 を拡大したもの。IはHのDAPI染色によるDNA。E, F, H, I内の括弧はAt-hhの ストライプの位置を示す。At-otd pRNAi 胚では At-hh の発現は胚帯前端部の縁に あるのに対し、At-opa pRNAi 胚では胚帯前端部の縁から離れた部位にある。 At-otd pRNAi で At-hh のストライプの移動は妨げられるが、At-opa pRNAi では At-hhのストライプは移動できる。コントロール胚は(Fig. 8)における6時間目に 相当する。その一方で、At-opa, At-otd pRNAi 胚はそれよりも6時間以上経過し た胚であることに注意。(J, K) A のコントロール胚と同じに AEL の時間に固定 された At-opa pRNAi(J), At-otd RNAi(K)胚。それにも関わらず、形態的にはまだ (Fig. 8)の0時間目(early stage 7)に相当している。 (L-O) At-opa RNAi 胚における 頭部領域のマーカー遺伝子は正常に発現する。(L, N)コントロール胚と(M, O)At-opa pRNAi 胚。At-otd (青)と At-hh (赤) の転写産物を染色したもの (L, M)。 At-six3-1(青)と At-hh(赤)の転写産物を染色したもの (N, O)。(P-S) At-opa pRNAi 胚での、イントロン領域から作製されたプローブを用いた pre-mRNA の検出。(P. Q)コントロール胚と(R, S)At-opa pRNAi 胚。P, R の枠はそれぞれ、Q, R に拡大さ れている。コントロール胚では At-opa の活性がストライプ状に検出されるのに 対して、At-opa pRNAi 胚では、そのパタンが乱れている。スケールバー: A-O. 50 μm; P-S, 100 μm

#### **Fig. 14**

*At-otd*, *At-opa* に対する embryonic RNAi (eRNAi)で処理された胚の胚帯伸長時 期における *At-hh* ストライプの表現型。(A-L) *At-hh* 転写産物(青)と各 dsRNA と同時に注入された FITC-デキストラン(赤)の染色。コントロールとして *gfp* dsRNA をとりこませた胚(A, F)、*At-otd* dsRNA を胚帯の前端部にとりこませた胚 (B, G)、胚帯前端部から離れた領域にとりこませた胚(C, D, H, I)と、胴体の歩脚 領域と腹部の体節にとりこませた胚(K, L) *At-opa* をとりこませた胚(E, J)。A, B, C, D, E, K の画像におけるそれぞれの頭部体節の表現型は、F, G, H, I, J, L に拡大さ

れている。At-otd dsRNA が縁にとりこまれた場合はAt-hhの発現が縁に留まって いる(B)のに対し、離れた領域にとりこませると、At-hhの発現は維持されなくな る(C)。そして2つに分断された At-hh のストライプは独立に分割する(D)。At-opa eRNAi では At-hh の発現は維持されるが、分割できない(E)。(M, N) At-otd dsRNA をとりこませた場合のAt-opaの発現。Mは二重染色前のAt-opa(青)のRNAプロ ーブで染色した胚を示す。NはdsRNAを同時に注入したFITC-デキストラン(赤) を染色した後の胚を示す。白い矢は dsRNA がとりこまれた領域を示す。At-opa のストライプ状の頭部体節の発現はAt-otd eRNAiによって分割されない。しか し、At-opaの発現自体は維持される。(O-R)At-otd eRNAiによる At-otd の発現の 低下。(O, P)gfp dsRNA をとりこませたときの At-otd の発現。(Q, R)At-otd dsRNA をとりこませたときの At-otd の発現。コントロールと比較して、頭部体節にお けるその発現のシグナルが低下している。O,Qは二重染色前のAt-otd(青)のRNA プローブで染色した胚を示す。P. R は dsRNA を同時に注入した FITC-デキスト ラン(赤)を染色した後の胚を示す。 (S-V) At-opa eRNAi による At-opa の発現 の低下。(S, T)gfp dsRNA をとりこませたときの At-opa の発現。(U, V)At-opa dsRNA をとりこませたときの At-opa の発現。コントロールと比較して、頭部体 節におけるその発現のシグナルが低下している。S,Uは二重染色前のAt-opa(青) の RNA プローブで染色した胚を示す。T, V は dsRNA を同時に注入した FITC-デキストラン(赤)を染色した後の胚を示す。白いやじりは dsRNA がとりこま れた領域を示す。スケールバー: A-E, K, M, N, O-V 100 μm; F-J, L, 20 μm。

,  ${
m Fig}_{i}\,15$  , where i is the set of the set

and a second second

*At-labial1 と At-arm* に対する pRNAi、eRNAi のそれぞれの結果。(A, B) *At-arm* pRNAi 処理した母親由来の胚。得られた 128 核期を過ぎた胞胚(A)と産まれてから3日目の卵(stage 7-8 に相当する)(B)。(A)一つ一つの細胞が離れ飛び出して見える。細胞の間に透明な領域が見える。Fig. 2D と比較せよ。(B)内部の卵黄が飛び出し、細胞が塊を形成して形をなさなくなる。この卵嚢を形成した母親個体はこの後卵を産まなくなった。(C-N)*At-lab1* pRNAi 処理して得られた胚は、頭部体節形成が遅延する。*At-hh*(青)の転写産物(C, D, G, H, K, L)と*At-otd*(青)の転写産物(E, F, I, J, M, N)を染色したもの。(C, E, G, K, I, M)は early stage 5 から17-18 時間経過したコントロール胚。G, K は C の拡大図。K は G の DNA。I, M は E の拡大図。M は I の DNA。(D, F, H, J, L, N)は *At-lab1* dsRNA を注入した母

親由来の胚。H,LはDの拡大図。LはHのDNA。J,NはFの拡大図。NはJの DNA。コントロール胚が固定されたタイミングよりも約6時間遅く固定してい る。コントロール胚ではAt-hhの発現が前端部から離れ、At-otdの発現は広がり、 前端部ではそのシグナルが弱く検出される。それに対してAt-lab1の注入の影響 を受けた胚では、At-hhの発現は前端部に留まり、At-otdの発現の広がりも見ら れない。(O,P)At-armのdsRNAをとりこませた胚におけるAt-hhストライプの 表現型。胚盤の縁から離れた位置に入った場合(O)と胚盤の縁にとりこまれた場 合(P)。どちらもAt-hhのストライプの分割ができない。縁に入った場合は、そ のAt-hhのストライプが適切に移動できない。(Q)At-lab1のdsRNAをとりこま せた胚におけるAt-hhストライプの表現型。dsRNAのとりこまれた領域では、 At-hhのストライプは分割できない。At-hhの発現が弱くなっているように見え るが、さらに検証が必要である。

### **Fig. 16**

第2章の結果のまとめとモデル図。(A) At-hh のストライプの発現変化と、 eRNAi との関係。青色はAt-hh のストライプを示す。緑色は標識した細胞領域を 示す。その標識領域の形状を時間経過とともに細く表すことで、細胞の再配列 による収斂伸長の動きを示している。赤いアスタリスクはAt-otd がAt-hh に重な るストライプを示す。(B) At-hh と At-otd の発現領域が移動する仕組みの一つを 説明するモデル。産生された Hh タンパクは細胞を越えて移動できる分泌タンパ クである。この Hh が隣の細胞に作用し、otd を活性化する。Otd は hh の転写を 活性化するので、さらにとなりの細胞に otd の発現を広げる。Hh を制御する因 子はより多様であるため、仕組みはより複雑であることが考えられる。(C) Hh シグナルと otd, opa のネットワークのモデル図。Hh シグナルは胚盤期において、 otd, opa の発現を活性化する。そのあと、otd は Hh を維持するために機能し、opa はその hh の発現を調整する負の制御因子として機能する。

1. 6.19

an the state of the state of the
## 参考文献

- Akiyama-Oda, Y., and Oda, H. (2003). Early patterning of the spider embryo: a cluster of mesenchymal cells at the cumulus produces Dpp signals received by germ disc epithelial cells. Development 130, 1735-1747.
- Akiyama-Oda, Y., and Oda, H. (2006). Axis specification in the spider embryo: *dpp* is required for radial-to-axial symmetry transformation and *sog* for ventral patterning. Development 133, 2347-2357.
- Akiyama-Oda, Y., and Oda, H. (2010). Cell migration that orients the dorsoventral axis is coordinated with anteroposterior patterning mediated by Hedgehog signaling in the early spider embryo. Development 137, 1263-273.
- Aruga, J. (2004). The role of Zic genes in neural development. Mol Cell Neurosci 26, 205-221.
- Aruga, J., Kamiya, A., Takahashi, H., Fujimi, T.J., Shimizu, Y., Ohkawa, K.,
  Yazawa, S., Umesono, Y., Noguchi, H., Shimizu, T., Saitou, N., Mikoshiba, K.,
  Sakaki, Y., Agata, K., and Toyoda, A. (2006). A wide-range phylogenetic analysis of Zic proteins: implications for correlations between protein structure conservation and body plan complexity. Genomics 87, 783-792.
- Benedyk, M.J., Mullen, J.R., and DiNardo, S. (1994). odd-paired: a zinc finger pair-rule protein required for the timely activation of engrailed and wingless in Drosophila embryos. Genes Dev. 8, 105-117.

Blair, S.S. (2008). Segmentation in animals. Curr Bio 18, 991-995.

Blanco, J., Seimiya, M., Pauli, T., Reichert, H., and Gehring, W.J. (2009). Wingless and Hedgehog signaling pathways regulate orthodenticle and eyes absent during ocelli development in Drosophila. Dev Biol *329*, 104-115.

- Brown, S.J., Mahafrey, J.P., Lorenzen, M.D., Denell, R.E., and Mahafrey, J.W. (1999). Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. Evol Dev 1, 11–15.
- Chipman, A.D., Arthur, W., and Akam, M. (2004). Early development and segment formation in the centipede, Strigamia maritima (Geophilomorpha). Evol Dev 6, 78-89.
- Cohen, S.M., and Jürgens, G. (1990). Mediation of Drosophila head development by gap-like segmentation genes. Nature *346*, 482-85.
- Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibnsouda, S., and Vincent, A. (1999). Head versus trunk patterning in the Drosophila embryo; collier requirement for formation of the intercalary segment. Development *126*, 4385-394.
- Damen, W.G., Hausdorf, M., Seyfarth, E.A., and Tautz, D. (1998). A conserved mode of head segmentation in arthropods revealed by the expression pattern of Hox genes in a spider. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 10665-670.
- Damen, W.G.M. (2007). Evolutionary Conservation and Divergence of the Segmentation Process in Arthropods. Dev Dyn 236, 1379-1391
- **Dearden, P.K., Donly, C., and Grbić, M.** (2002). Expression of pair-rule gene homologues in a chelicerate: early patterning of the two-spotted spider mite Tetranychus urticae. Development *129*, 5461-472.
- Dequéant, M.L., and Pourquié, O. (2008). Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. Nat Rev Genet 9, 370-382.
- **Domínguez, M., and Casares, F.** (2005). Organ specification-growth control connection: new in-sights from the Drosophila eye-antennal disc. Dev Dyn 232, 673-684.

- Driever, W., and Nüsslein-Volhard, C.(1988) A gradient of bicoid protein in Drosophila embryos. Cell 54, 83-93.
- **DiNardo, S., and O'Farrell, P.H.** (1987). Establishment and refinement of segmental pattern in the Drosophila embryo: spatial control of engrailed expression by pair-rule genes. Genes Dev 1, 1212-1225.
- Elms, P., Siggers, P., Napper, D., Greenfield, A., and Arkell, R. (2003). Zic2 is required for neural crest formation and hindbrain patterning during mouse development. Dev Biol 264, 391-406.
- Finkelstein, R., and Perrimon, N. (1990). The orthodenticle gene is regulated by bicoid and torso and specifies Drosophila head development. Nature *346*, 485-88.
- **Farzana, L., and Brown, S.J.** (2008). Hedgehog signaling pathway function conserved in *Tribolium* segmentation. Dev Genes Evol. *218*, 181–192.
- Frigerio, G., Burri, M., Bopp, D., Baumgartner, S., and Noll, M. (1986). Structure of the segmentation gene paired and the Drosophila PRD gene set as part of a gene network. Cell 47, 735-746.
- Friedrich, M., and Tautz, D. (1995). Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods. Nature *376*, 165-67.
- Gallitano-Mendel, A., and Finkelstein, R. (1997). Novel segment polarity gene interactions during embryonic head development in Drosophila. Dev Biol 192, 599-613.
- Gao, Q., Wang, Y., and Finkelstein, R. (1996). Orthodenticle regulation during embryonic head development in Drosophila. Mech Dev 56, 3-15.

- Gao, Q., and Finkelstein, R. (1998). Targeting gene expression to the head: the Drosophila orthodenticle gene is a direct target of the Bicoid morphogen. Development 125, 4185-193.
- Giribet, G., Edgecombe, G.D., and Wheeler, W.C. (2001). Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. Nature 413, 157-161.
- Grinberg, I., and Millen, K.J. (2005). The ZIC gene family in development and disease. Clin Genet 67, 290-96.
- Ho, K., Dunin-Borkowski, O.M., and Akam, M. (1997). Cellularization in locust embryos occurs before blastoderm formation. Development 124, 2761-68.
- Holm, Å. (1940). Studien über die Entwicklung und Entwicklungsbiologie der Spinnen. Zoologiska Bidrag, Uppsala 19, 1-214.

- Horikawa, K., Ishimatsu, K., Yoshimoto, E., Kondo, S., and Takeda, H. (2006). Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock. Nature 441, 719-723.
- Hooper, J.E., and Scott, M.P. (2005). Communicating with Hedgehogs. Nat. Rev. Mol Cell Biol 6, 306-317.
- Hughes, C.L., and Kaufman, T.C. (2002) Hox genes and the evolution of the arthropod body plan. Evol Dev 4 459-499
- Hwang, U.W., Friedrich, M., Tautz, D., Park, C.J., and Kim, W. (2001). Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. Nature 413, 154-157
- Ingham, P.W., and McMahon, A.P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. Genes Dev. *15*, 3059-3087.

- Ingham, P.W., and Placzek, M. (2006). Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. Nat Rev Genet 7, 841-850.
- Irvine, K.D., and Wieschaus, E. (1994). Cell intercalation during Drosophila germband extension and its regulation by pair-rule segmentation genes. Development *120*, 827-841.
- Jones, C., and Chen, P. (2007). Planar cell polarity signaling in vertebrates. Bioessays 29, 120-132.
- Jura, C., and Krzysztofowicz, A. (1992). Initiation of embryonic development in Tetrodontophora bielanensis (Waga) (Collembola: family) eggs: meiosis, polyspermy, union of gametes and first cleavage. International Journal of Insect Morphology and Embryology 21, 87-94.
- Kiefer, J.C. (2005). Planar cell polarity: heading in the right direction. Dev Dyn 233, 695-700.
- Kondo, A. (1969). The fine structure of the early spider embryos. Science Reports of the Tokyo Kyoiku Daigaku Section B 14, 47-67.
- **Kondo, S., and Miura, T.** (2010). Reaction-diffusion model as a framework for understanding biological pattern formation. Science *329*, 1616-620.
- Lehmann, R., Tautz, D. (1994). In situ hybridization to RNA. Methods in Cell Biology 44, 575-598.
- Liu, P.Z., and Kaufman, T.C. (2005) Short and long germ segmentation: unanswered questions in the evolution of a developmental mode. Evol Dev 7, 629-646
- Lynch, J.A., Brent, A.E., Leaf, D.S., Pultz, M.A., and Desplan, C. (2006). Localized maternal *orthodenticle* patterns anterior and posterior in the long germ wasp Nasonia. Nature *439*, 728-732.

Lum, L., and Beachy, P.A. (2004). The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. Science 304, 1755-1759.

- Masamizu, Y., Ohtsuka, T., Takashima, Y., Nagahara, H., Takenaka, Y., Yoshikawa, K., Okamura, H., and Kageyama, R. (2006). Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 1313-18.
- Merzdorf, C.S., and Sive, H.L. (2006). The zic1 gene is an activator of Wnt signaling. Int J Dev Biol 50, 611-17.
- Merzdorf, C.S. (2007). Emerging roles for zic genes in early development. Dev Dyn 236, 922-940.
- McGregor, A.P., Pechmann, M., Schwager, E.E., Feitosa, N.M., Kruck, S., Aranda, M., and Damen, W.G. (2008). Wnt8 is required for growth-zone establishment and development of opisthosomal segments in a spider. Curr Biol 18, 1619-623.
- Miyawaki, K., Mito, T., Sarashina, I., Zhang, H., Shinmyo, Y., Ohuchi, H., and Noji, S. (2004). Involvement of Wingless/Armadillo signaling in the posterior sequential segmentation in the cricket, Gryllus bimaculatus (Orthoptera), as revealed by RNAi analysis. Mech Dev 121, 119-130.
- Mohler, J. (1995). Spatial regulation of segment polarity gene expression in the anterior terminal region of the Drosophila blastoderm embryo. Mech Dev 50, 151-161.
- Nakamura, T., Yoshizaki, M., Ogawa, S., Okamoto, H., Shinmyo, Y., Bando, T., Ohuchi, H., Noji, S., and Mito, T. (2010). Imaging of transgenic cricket embryos reveals cell movements consistent with a syncytial patterning mechanism. Curr Biol 20, 1641-47.

- Niimi, T., Kuwayama, H., and Yaginuma, T. (2005). Larval RNAi applied to the analysis of postembryonic development in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. J. Insect Biotechnol. Sericology 74, 95-102.
- Oda, H., Nishimura, O., Hirao, Y., Tarui, H., Agata, K., and Akiyama-Oda, Y. (2007) Progressive activation of Delta-Notch signaling from around the blastopore is required to set up a functional caudal lobe in the spider *Achaearanea tepidariorum*. Development 134, 2195-2205
- Oda, H., and Akiyama-Oda, Y. (2008). Differing strategies for forming the arthropod body plan: lessons from Dpp, Sog and Delta in the fly Drosophila and spider Achaearanea. Dev Growth Differ 50, 203-214.
- Patel, N.H., Kornberg, T.B., and Goodman, C.S. (1989). Expression of engrailed during segmentation in grasshopper and crayfish. Development *107*, 201-212.

**Pearson, J.E.** (1993). Complex patterns in a simple system, Science 261, 189-192.

A second second

Peel, A. (2004). The evolution of arthropod segmentation mechanisms. Bioessays 26, 1108-1126

**Peel, A.D., Chipman, A.D., and Akam, M.** (2005). Arthropod segmentation: beyond the Drosophila paradigm. Nat Rev Genet *6*, 905-916

- Pechmann, M., McGregor, A.P., Schwager, E.E., Feitosa, N.M., and Damen, W.G. (2009). Dynamic gene expression is required for anterior regionalization in a spider. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 1468-472.
- Pultz, M.A., Westendorf, L., Gale, S.D., Hawkins, K., Lynch, J., Pitt, J.N., Reeves,
  N.L., Yao, J.C., Small, S., Desplan, C., and Leaf, D.S. (2005). A major role for zygotic hunchback in patterning the Nasonia embryo. Development 132, 3705-3715

- Regier, J.C., Shultz, J.W., Zwick, A., Hussey, A., Ball, B., Wetzer, R., Martin, J.W., and Cunningham, C.W. (2010). Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. Nature 463, 1079-083.
- **Rempel, J.G.** (1957) The embryology of the black widow spider, Latrodectus mactance (Fabr.). Canadian Journal of Zoology *35*, 35-74.
- Reynolds, W.N., Pearson, J.E., and Ponce-Dawson, S. (1994). Dynamics of self-replicating patterns in reaction diffusion systems. Pysical Review Letters 72,1120-1123.
- Rivera-Pomar, R., and Jäckle, H. (1996). From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps. Trends Genet. 12, 478-483.
- Royet, J., and Finklestein, R. (1996). hedgehog, wingless and orthodenticle specify adult head development in Drosophila. Development. 122, 1849-1858
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol and Evol 4, 406-425.
- Seitz, V.K.-A. (1966) Normale Entwicklung des Arachniden-Embryos Cupiennius salei Keyserling und seine Regulationsbefähigung nach Röntgenbestrahlungen. Zoologisches Jahrbuch der Anatomie Band 83, 327-447.
- Scholz, G., and Edgecombe, G.D. (2006) The evolution of arthropod heads; reconciling morphological, developmental and palaeontological evidence. Dev Genes and Evol 216, 395-415
- Schröder, R. (2003). The genes orthodenticle and hunchback substitute for bicoid in the beetle Tribolium. Nature 422, 621-625.

- Schwager, E.E., Pechmann, M., Feitosa, N.M., McGregor, A.P., and Damen, W.G. (2009). hunchback functions as a segmentation gene in the spider Achaearanea tepidariorum. Curr Biol 19, 1333-340.
- Shinmyo, Y., Mito, T., Matsushita, T., Sarashina, I., Miyawaki, K., Ohuchi, H., and Noji, S. (2005). caudal is required for gnathal and thoracic patterning and for posterior elongation in the intermediate-germband cricket *Gryllus bimaculatus*. Mech Dev 122, 231-39.
- St Johnston, D., and Nüsslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo. Cell 68, 201-219.

A second s

- Stollewerk, A., Schoppmeier, M., and Damen, W.G. (2003). Involvement of *Notch* and *Delta* genes in spider segmentation. Nature 423, 863-865
- Suzuki, H., and Kondo, A. (1994a) Changes at the egg surface during the first maturation division in the spider *Achaearanea japonica* (Bos. et Str.). Zool Sci 11, 693-700.

energi de la companya de la companya

Suzuki, H., and Kondo, A. (1994b) The second maturation division and fertilization in the spider *Achaearanea japonica* (Bos. et Str.). Zool Sci 11, 433-439.

Suzuki, H., and Kondo, A. (1995). Early embryonic development, including germ-disk stage, in the Theridiid spider Achaearanea japonica (Bös. et Str.). J Morphol. 224, 147-57.

and the second second second

- Swantek, D., and Gergen, J.P. (2004). Ftz modulates Runt-dependent activation and repression of segment-polarity gene transcription. Development 131, 2281-290.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol and Evol 24,1596-1599.

Tautz, D. (2004). Segmentation. Dev Cell 7, 301-312.

of the cellular blastoderm. Dev Biol 50, 95-108.

**Turing, A.M.** (1952) The chemical basis of Morphogenesis. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, *237*, 37-72.

**Turner, F.R., and Mahowald, A.P.** (1976). Scanning electron microscopy of Drosophila embryogenesis. 1. The structure of the egg envelopes and the formation

Uriu, K., Morishita, Y., and Iwasa, Y. (2010). Random cell movement promotes synchronization of the segmentation clock. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 4979-984.

Veeman, M.T., Slusarski, D.C., Kaykas, A., Louie, S.H., and Moon, R.T. (2003). Zebrafish prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. Curr Biol 13, 680-85.

Wolff, C., and Scholtz, G. (2002). Cell Lineage, axis formation, and the origin of germ layers in the amphipod crustacean Orchestia cavimana. Dev Biol 250, 44-58.

Yamazaki, K., Akiyama-Oda, Y., and Oda, H. (2005). Expression patterns of a *twist*-related gene in embryos of the spider *Achaearanea tepidariorum* reveal divergent aspects of mesoderm development in the fly and spider. Zool Sci 22, 177-185.

Zallen, J.A., and Wieschaus, E. (2004). Patterned gene expression directs bipolar planar polarity in Drosophila. Dev Cell *6*, 343-355.

邦文文献

三村昌泰著(2006). 非線形・非平衡現象の数理④ パターン形成とダイナミクス 東京大学出版会

## 謝辞

JT 生命誌研究館の小田広樹研究員の研究室(細胞・発生・進化研究室)に在 籍し、大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻の大学院生として、博士前期課 程から約5年間、ご指導頂きました。

小田広樹研究員主任および大阪大学招へい准教授には、研究が不安定だった 私にも、日頃の研究全般を通してご指導頂きました。この5年間で得た研究に 対する姿勢や考え方は、社会にも生かしていけるものと深く感じています。秋 山ー小田康子研究員には日頃の研究、技術、論文作成全般に関して、多くのご指 導を頂きました。小田夫妻の公私にわたるご支援に感謝いたします。野田彰子 研究補助員には、研究に関する備品管理、実験補助等を行なって頂きました。 研究面だけでなく、日常の生活においてもいつもあたたかな心遣いをしてくだ さいました。先輩である春田知洋さんには、日頃の実験や議論に際していつも ご助言とご意見を頂きました。同研究室の博士前期課程1年の西口茂孝さんは、 日々の研究生活をともに過ごせる貴重な友人として、またお互いの研究の議論 からも多くの刺激を頂きました。 JT生命誌研究館研究員の大阪大学橋本主税 招へい教授には、博士論文主査として多大にご協力いただきました。かたちの 会での議論等、多くの面でご教授いただきました。 大阪大学西田宏記教授に は、博士後期課程一年目の副専攻研究室でのインタラクティブセミナーでの議 論、さらには博士論文審査の副査として研究と論文作成に示唆を与えて頂きま した。 大阪大学の藤本仰一准教授、松浦弘典研究員には、インタラクティブ セミナーにおける副専攻研究室に配属の折、お世話になりました。数理学の観 点から発生生物学を研究する視点を頂きました。違った視点からの論理思考は 難しいものもありましたが、多角的な視点を持つ研究の重要性に気づかされま した。 JT生命誌研究館の皆様から研究の場を与えていただき、多くのご支援 を頂きました。

本研究を支えてくださった全ての皆様方に深く感謝申し上げます。有り難う ございました。

