

過重力はアフリカツメガエルの頭部形成(特に眼と脳)に特異的に影響を与える

広島大・院理・両生研 柳澤誠、古野伸明、徳島大・院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部 渡部稔、広島大・院理・両生研 柏木啓子、花田秀樹、東京都・老人研 新海正、いわき明星大・薬 吉留賢、東京都・臨床研 久保英夫、鹿児島大・理 坂井雅夫、札幌医大・保健医療 藤井博匡、愛媛大・沿岸環境科学研究センター 鈴木賢一、ISAS/JAXA 山下雅道、山陽女子短大/広島工大 柏木昭彦

Hypergravity specifically effects head formation in the *Xenopus* embryos raised under hypergravity condition

Makoto Yanagisawa^a, Nobuaki Furuno^a, Minoru Watanabe^b, Keiko Kashiwagi^a, Hideki Hanada^a, Tadashi Shinkai^c, Satoshi Yoshitome^d, Hideo Kubo^e, Masao Sakai^f, Hirotsada Fujii^g, Keinchi Suzuki^h, Masamichi Yamashitaⁱ, Akihiko Kashiwagi^j

^aInstitute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, ^bInstitute of Socio-Arts and Sciences, the University of Tokushima, ^cRedox Regulation Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, ^dDepartment of Pharmacy, Iwaki Meisei University, ^eDepartment of Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, ^fFaculty of Science, Kagoshima University, ^gSchool of Health Science, Sapporo Medical University, ^hCMES, Ehime University, ⁱInstitute of Space and Astronautical Science, Japan Aerospace Exploration Agency, ^jSchool of Medical Technology, Sanyo Women's College.

E-mail : nfuruno@hiroshima-u.ac.jp

Abstract: Our several lines of experiments showed that *Xenopus* embryos raised under hypergravity condition develop various phenotypes, including head-defects such as microcephaly and cyclopia and these defects would cause inhibition of Wnt signaling. In addition, we also showed that *Xotx2* (involved in fore-and mid brain and eye development) is the most sensitive region to hypergravity (compared to *Xag*). However, it is not clear whether regions behind the mid brain effect by hypergravity. In this study, we examined the effect of hypergravity on gene expression of *Xotx2*, *En2* (expressed in the region between midbrain and hindbrain), *Krox20* (hindbrain marker) and *HoxB9* (expressed posterior neural tissue) by whole-mount *in situ* hybridization (WISH). Detailed investigation of double staining with *Xotx2* and *En2* showed that *Xotx2* was strongly suppressed in embryos exposed to 5G, although the region expressed *En2* became slightly small. Furthermore, expression pattern of *Krox20* and *HoxB9* were not affected by hypergravity. These results suggest strongly that posterior region (behind the hindbrain) is not affected by hypergravity and development of eye and fore-mid brain is most sensitive in embryos exposed to hypergravity.

Keywords: *Xenopus*, hypergravity, head formation, WISH,

1. はじめに

ロシアで行われていた「MARS-500」が終了し、有人火星探査が現実味を帯びてきた。地球と火星を往復するには約 500 日かかり、宇宙船の中で自

給自足をすることが必要になる。そこで、食料となる動物や植物の生活環が宇宙環境の中で正常に回るかどうかを調べることは重要である。両生類は宇宙環境が生物に与える影響について調べるた

めに適した材料であり、これまでに多くの研究が行われている⁽¹⁻³⁾。我々は、モデル生物として多くの研究の蓄積があるアフリカツメガエルを用いて重力の影響についての研究を行っている。これまでに我々を含めていくつかのグループが、過重力がアフリカツメガエルの初期発生や卵成熟に与える影響について報告している⁽⁴⁻⁷⁾。これらの論文では、アフリカツメガエルの受精卵を過重力下で発生させると、初期胚に様々な異常が生じることが報告されており、その中でも、小頭症や単眼症などの異常が最も多い。我々はこの頭部形成の異常について継続して研究を行っており、これまでに、この頭部形成異常は頭部形成に必須の Wnt シグナルの活性が抑制されることで生じること⁽⁸⁾、さらに、頭部の中でも眼や前脳の領域が過重力に対する感受性が最も高いことを報告した⁽⁹⁾。しかし、頭部以外の領域について過重力の影響を調べた研究はまだない。そこで今回、我々は初期胚の前後軸のマーカー遺伝子を whole-mount *in situ* hybridization (WISH)⁽¹⁰⁾を用いることによって解析し、頭部以外の領域が過重力の影響を受けるかどうかを調べたので報告する。

2. *Xotx2*、*En2*の発現に対する過重力の影響

これまでの我々の研究から、過重力は初期胚の頭部形成に影響を与えることが明らかになっている。そして我々は、昨年、中脳と後脳の境界で発現している *En2*⁽¹¹⁾の発現領域は正常だということを報告した。しかし、例数を増やし、より詳細に解析した結果、*En2*の領域も過重力の影響を受けていることが明らかとなった。そこで今回は *Xotx2*と *En2*のどちらがより過重力の影響を受けやすいのかを調べるために、*Xotx2*、*En2*の2重染色法を用いて調べた。アフリカツメガエルは両生類研究施設で飼育され、これまでに過重力の研究に使われたものを使用した。メスカエルにホルモンを注射して未受精卵を産卵させ、それに媒精して人工受精させた。媒精後すぐに受精卵をスイングバケット式の過重力負荷装置にセットして、5Gの過重力をかけた。コントロールの受精卵は装置の近くで約21°Cで発生させた。コントロールがステージ11に達した時期に装置を止めて、尾芽胚まで発生させた。その後、胚を MENFA で固定して100%エタノール中で保存した。

今回は、眼・前脳・中脳のマーカーである *Xotx2*を magenta-phos で赤に、*En2*を BM purple で紫に染色した(図1)。図1に示すように、2重染色された胚では、*Xotx2*の領域がほとんど無くなっているにもかかわらず、*En2*の領域は若干減少しただけであった。この結果から、頭部形成に異常が生じた初期胚で、*En2*よりも *Xotx2*の方がより過重力の影響を受けやすいことが示された。また、*En2*の領域も減少していることから、やはり中脳・後脳の領域も多少は過重力の影響を受けていることが示された。

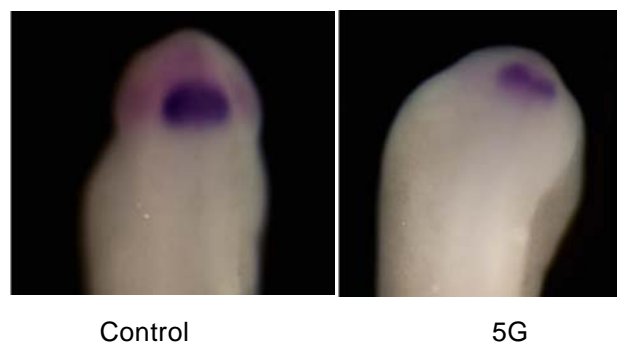


Fig. 1 Expression pattern of head marker gene, *Xotx2* (red) and *En2* (purple) in control and 5G treated embryos.

3. *Krox20*の発現に対する過重力の影響

前の結果から、中脳と後脳の境界は過重力の影響を受けていることが示された。そこで、次に、我々は後脳のマーカーである *Krox20*のプロープを用いてWISHを行った(図2)。その結果、*Krox20*の発現は対照胚と5G胚で差は見られなかった。この結果は、後脳は過重力の影響を受けていないことを示す。

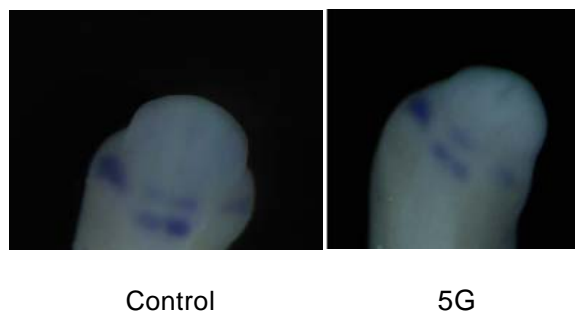


Fig. 2 Expression of *Krox20* in control and 5G treated embryos.

4. *HoxB9*の発現に対する過重力の影響

最後に、我々はさらに後方(尾部)の領域を調べるために、後部神経組織のマーカである *HoxB9* のプローブを用いて WISH を行った(図3)。その結果、*Krox20*と同様に *HoxB9*でも対照胚と5G胚で発現領域に差は見られなかった。これらの結果から、過重力はアフリカツメガエルの頭部形成に特異的に影響を与えるということが明らかとなった。

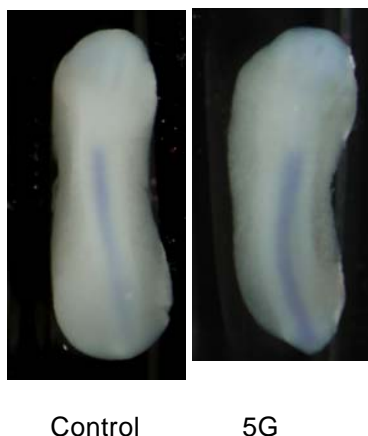


Fig. 3 Expression of *HoxB9* in control and 5G treated embryos.

5. 終わりに

今回、我々はアフリカツメガエルの初期胚の後部が過重力の影響を受けるかどうかを調べた。以上の結果から、初期胚の後部は過重力の影響を受けておらず、頭部が特異的に影響を受けることが明らかとなった。アフリカツメガエルの頭部形成

には Wnt シグナル、FGF、RA(レチノイン酸)などが関わっていることが知られている。我々はアフリカツメガエルの初期胚は受精後 30 分以内が過重力に対して最も感受性が高いことを報告している。アフリカツメガエルの場合、受精後約 30-40 分で受精卵の中では微小管の再配列に伴う表層回転という現象が起こる。この表層回転の結果、受精卵の中の Wnt シグナルが活性化され初期胚の将来の体軸が形成される。よって Wnt が受精卵の中で活性化されるタイミングと、受精卵が過重力に対する感受性の高い時期が一致することから、前に、我々は Wnt シグナルの標的遺伝子であり、頭部形成に関わっている *Siamois* と *Xnr-3* の発現量をリアルタイム PCR で調べ、*Xnr-3* の発現量が低下することを報告した。すなわち、アフリカツメガエルの初期胚で頭部形成が異常になる原因は、頭部形成に必須の Wnt シグナルが弱められたことが原因の一つである可能性が高い。さらに、この表層回転は重力に反応する現象であることも知られている。このことから、過重力によって頭部形成が異常になる理由は、この表層回転が正常に起こらないことによって引き起こされると考えられる。また、抑制する強さに応じて胚の頭部から異常が生じることが知られている。今回の研究で、尾部は過重力の影響を受けていなかった。つまり、表層回転が不完全に起こることで頭部形成の異常が起こるが、尾部は正常に形成されると考えられる。

参考文献

- 1) Snetkova, E., Chelnaya, N., Serova, L., Saveliev, S., Cherdanzova, E., Pronych, S., Wassersug, R., Effects of space flight on *Xenopus laevis* larval development. *J. Exp. Zool.* 273, 21-32, (1995).
- 2) Wassersug, R. J., Yamashita, M. The mechanics of air-breathing in anuran larvae: implications to the development of amphibians in microgravity. *Adv. Space Res.* 25, 2007-2013 (2000).
- 3) Gualandris-Parisot, L., Husson, D., Foulquier, F., Kan, P., Davet, J., Aimar, C., Dournon, G., Duprat, A. M., *Pleurodeles waltli*, amphibian, Urodele, is a suitable biological model for embryological and physiological space experiments on vertebrate. *Adv. Space Res.* 28, 569-695, (2001).
- 4) Neubert, J., Schatz, A., Bromeis, B., Linke-Hommes, A., Effects of gravity on early development. *Adv. Space Res.* 22, 265-271, (1998).
- 5) Kashiwagi, A., Hanada, H., Kashiwagi, K., Kubo, H., Shinkai, T., Fujii, H., Effects of hypergravity on amphibian development. *Biol. Sci. Space*, 17, 215-216, (2003).
- 6) Kawakami, S., Kashiwagi, K., Furuno, N., Yamashita, M., Kashiwagi, A., Effects of hypergravity environments on amphibian development, gene expression and apoptosis.

Comp. Biochem. Physiol., Part A 145b, 65–72, (2006).

- 7) Shinkai, T., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Matsuda, K., Urano, S., Sato, H., Kubo, H., Furuno, N., Sakai, M., Watanabe, M., Yoshitome, S., Fujii, H., Yamashita, M., Effects of hypergravity on pituitary-target organs in the frog, *Xenopus laevis*. *Biol. Sci. Space*. 20, 40–43, (2006).
- 8) Watanabe, M., Yanagisawa, M., Furuno, N., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashita, M., and Kashiwagi, A., Analysis of head-defects in *Xenopus* embryos raised under hypergravity. *Space Utiliz. Res.* 25, 155–158, (2009).
- 9) 柳澤誠, 古野伸明, 渡部稔, 柏木啓子, 花田秀樹, 新海正, 吉留賢, 久保英夫, 坂井雅夫, 藤井博匡, 鈴木賢一, 山下雅道, 柏木昭彦 : 過重力によって生じたアフリカツメガエル初期胚の頭部形成異常の解析 II. *Space Utiliz. Res.*, 27: 198–200 (2011)
- 10) Harland, R. M., In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Method Cell Biol.* 36, 685–695, (1991).
- 11) Itoh, K., and Sokol, S., Graded amounts of *Xenopus* dishevelled specify discrete anteroposterior cell fates in prospective ectoderm. *Mech. of Dev.* 61, 113–125, (1997).