

ツメガエル初期発生における遺伝子発現の解析

生物資源科学部 生物生産科学科

1年 田代 史晶

1年 黒澤 駿

1年 千葉 海大

1年 棟方 快徒

指導教員 生物資源科学部 応用生物科学科

助教 岩下 淳

要旨

アフリカツメガエル初期胚発生における、様々な発生段階の胚をサンプリングし、内分泌機構に関連するセクレトグラニン3 (sg III) mRNAの発現パターンを解析した。その結果以下の3点が明らかになった。

- ①ツメガエル胚発生におけるsg IIIは、未受精卵の段階から尾芽胚期までRT-PCRにより検出可能なレベルでmRNAが存在する。
- ②sg III mRNAの発現は神経胚期に一時的に減少し、尾芽胚期に再度増加するパターンを示す。
- ③未成熟卵におけるsg III mRNAの減少は、減数分裂の進行に影響を与えない。

序論

ペプチドホルモンなどの内分泌に重要なタンパク質群には、グラニンファミリーを構成するクロモグラニン (クロモグラニンAおよびクロモグラニンB)、セクレトグラニン (セクレトグラニン2およびセクレトグラニン3)、ならびに追加の関連タンパク質 (7B2、NESP55、proSAAS、およびVGF) などがある。ペプチドホルモンを分泌する内分泌細胞では、一般に、ホルモンはいったん分泌顆粒に蓄えられ、適切な分泌刺激を受けて細胞外に放出されるが、全てが放出されるのではなく、選択性が存在する。このペプチドホルモンが選択的に分泌顆粒へと輸送される機構について、様々な研究がなされているが、セクレトグラニンの関与が示唆されている。

内分泌細胞に広く発現している分泌蛋白であるセクレトグラニンは、内分泌細胞におけるホルモンの分泌顆粒への選別輸送過程に関与している。

これまでに様々な生物種でセクレトグラニンタンパク質群の発現が報告されている。脊椎動物の発生過程の研究によく用いられる生物種であるアフリカツメガエルにおいても、その発現が報告されている。¹⁾ しかしその機能など詳細は未だ解析されていない。我々は本実験でアフリカツメガエル胚におけるセクレトグラニン3 (sg III) の発現パターンおよび機能について解析を行った。

結果

① 人工受精

雌のアフリカツメガエル背部にゴナドトロピン (あすか製薬) 300単位を注射し、室温で12時間静置した (図1)。産卵させた卵を1X MBS、high saltで洗浄し、バッファーを完全に除去した。雄のアフリカツメガエルを麻酔後、精巣を摘出した。はさみを用いて精巣をホモジナイズした後、1X MBS、high saltを400 μ l加え混合した。産卵させた卵に精巣液を数的加えて10分室温で放置した。蒸留水を加えて受精させた。その後、23度で必要な発生ステージ (のう胚、神経胚、尾芽胚) まで発生させ、その過程を実体顕微鏡を用いて撮影した (図2、図3)。未受精卵、のう胚、神経胚、尾芽胚など各期の胚を複数サンプリングし、-30度で保存した。



図1 アフリカツメガエル (左が雌、右が雄)



図2 初期胚撮影装置



図3 アフリカツメガエルの初期胚

② ツメガエル胚からのRNA抽出とsg IIIのRT-PCR

凍結保存した胚 (5個) にRNA抽出用試薬Trizol reagent (invitrogen)を加えてホモジナイズした。クロロホルムを加えて混合した後、上層に含まれるtotal RNAをエタノールを用いて析出した。析出したtotal RNAにミリQ水を加え、一部をゲルで電気泳動した後、nanodrop装置を用いて定量した。

ツメガエル sg III に対応するプライマーを web service を利用して設計した。未受精卵、のう胚、神経胚、尾芽胚期の胚から抽出した total RNA を鋳型として RT-PCR を行った。RT-PCR の条件は以下の通りである。

その結果、sg III mRNA は少ないながら未受精卵から常に初期胚に存在した。受精後、のう胚期以降に増加した。sg III mRNA は神経胚期に若干の減少が見られるが、尾芽胚期に、のう胚期同様のレベルにまで回復した。

Sense primer xenopus sg3 170 60do

5' tgatagccgtgcaagtgaag 3'

Antisense primer xenopus sg3 Rev

5' atttgctctggttttgtgg 3'

PCR cycle
 50度 30分
 95度 15分

 94度 15秒
 50度 30秒
 72度 30秒
 45cycle

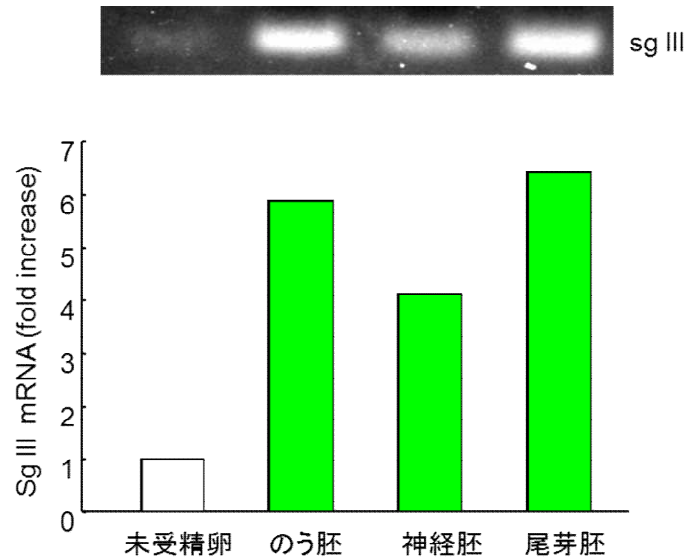


図4 sg III mRNA の RT-PCR による検出、定量

③ アンチセンス DNA マイクロインジェクションによる sg III mRNA の抑制が減数分裂に与える影響の解析

これまでの解析により、未成熟卵に sg III mRNA は存在することが明らかとなった。この結果は sg III が未成熟卵が成熟卵となり受精可能となる過程である卵減数分裂過程で機能する可能性を示している。この可能性を検証するため、未成熟卵におけるアンチセンス DNA による sg III mRNA の抑制を行った。センス DNA, アンチセンス DNA には RT-PCR に用いたプライマーを使用した。未成熟卵 1 個あたり 0.4pmol in 40nl のセンス DNA, アンチセンス DNA を nanoject II マイクロインジェクターを用いて注入し、12 時間 23 度で静置した (図 5)。その後、卵内の sg III mRNA を定量したところ、アンチセンス DNA の注入によって 5 割程度の減少が観察された (図 6)。

sg III に対するセンス DNA, アンチセンス DNA を注入した卵にプロゲステロンホルモンを 1 μ g/ml 加え減数分裂を開始した。減数分裂の進行は未成熟卵の動物極に出現するホワイトスポット (減数分裂に伴う卵核胞崩壊により色素が移動して発生する現象) により観察できる。プロゲステロン添加からホワイトスポット出現までの時間を計測して記録した。その結果、sg III に対するセンス DNA, アンチセンス DNA を注入した卵は、どちらもプロゲステロン添加後 280 分で 50% の卵に正常なホワイトスポットが観察され、減数分裂進行に要する時間に顕著な差は観察されなかった (図 7)。



図5 マイクロインジェクター

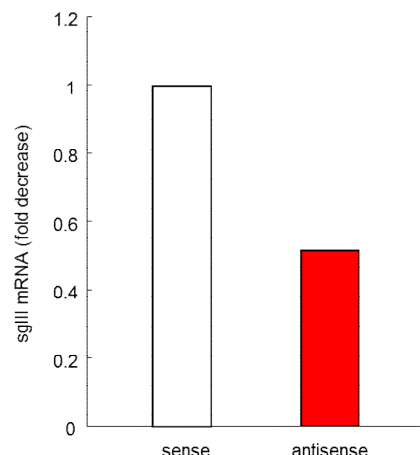


図6 アンチセンス DNA 注入による sg III mRNA の分解

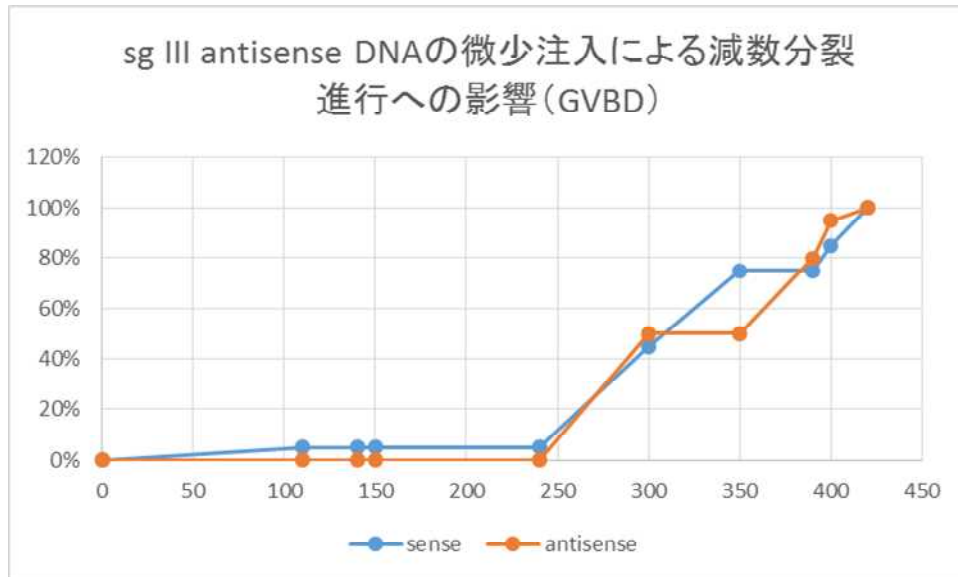


図7 sg III アンチセンス DNA の注入による減数分裂進行への影響
50%の卵にホワイトスポットが観察された時間を比較した。

考察

アフリカツメガエル未成熟卵はプロゲステロンホルモンの刺激により減数分裂を開始するが、この際卵核胞崩壊 GVBD に伴うホワイトスポットが動物極に出現する。減数分裂を終えた成熟卵（未受精卵）は受精により、分裂を再開し、のう胚、神経胚、尾芽胚期と発生を進める。本研究では、いまだ明らかになっていない sg III のツメガエル初期発生における発現と機能について解析を行なった。

最初にツメガエル初期胚発生における、各発生段階の胚をサンプリングし、内分泌機構に関連する sg III mRNA の発現パターンを解析した。その結果、ツメガエル胚発生における sg III mRNA は、未受精卵の段階から尾芽胚期まで RT-PCR により検出可能なレベルで mRNA が存在することが明らかとなった（図4）。しかし一定の mRNA 量が存在するのではなく、未成熟卵に蓄えられている母性 mRNA には、他の時期と比較して少量しか含まれていなかった。ツメガエル卵の発生では、中期胎胚期以降に mRNA が新たに転写されるが、受精後は sg III の発現は増加した。神経胚期に一時的に減少が観察されることがわかった。これらの結果は受精後に sg III が重要な働きを示す可能性を示している。

今回未成熟卵においても少量ながら sg III mRNA の発現が観察されたことから、この sg III mRNA をアンチセンス DNA を用いて分解し、減数分裂進行への影響を観察した。その結果 sg III mRNA の減少は、未成熟卵の減数分裂進行に影響を与えず、正常に進行することが明らかとなった（図6、7）。この結果は受精後に重要な働きを sg III が果たす可能性を示している。

今後は減数分裂および初期発生における sg III タンパク質の増減、特に受精後の初期発生における sg III の機能について、解析を行う予定である。

参考文献

- 1) The neuroendocrine proteins secretogranin II and III are regionally conserved and coordinately expressed with proopiomelanocortin in *Xenopus* intermediate pituitary. Holthuis JC, Martens GJ. *J Neurochem* 1996/06/01; 66 (6): 2248-56.