

■原 著■

器官培養系を用いたアフリカツメガエル幼生腸管の形態形成の研究

秋永 薫^{1,3} 安積良隆^{1,2} 茂木和枝¹ 豊泉龍児^{1,2}

In Vitro Approach to Decode the Mechanisms of Coiling Morphogenesis of *Xenopus* Larval Gut

Kaoru Akinaga^{1,3}, Yoshitaka Azumi^{1,2}, Kazue Mogi¹ and Ryuji Toyozumi^{1,2}

¹ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: akky0323biolaboratory@gmail.com

Abstract: *Xenopus laevis* is a good model organism for the study of gut morphogenesis during larval development. Because its larva has a very translucent abdominal epidermis, we can make noninvasive observations consistently during gut coiling morphogenesis for a long time. Recently, we developed an *in vitro* organ culture system that can recapitulate the early gut looping morphogenesis of *Xenopus* larvae. With a combination of *in vivo* and *in vitro* experiments, we have tried to elucidate the mechanisms of *Xenopus* larval gut coiling morphogenesis. In this study, we first observed the distribution of phosphorylated myosin (p-myosin) in the larval gut. Myosin-positive filamentous structures, which might correspond to gut smooth muscle cells, aligned in the transverse direction on the gut surface in the duodenum. Next, the cellular meshwork of the p-myosin-positive cells was organized by their circular and longitudinal orientations. Anisotropic twisting of the meshwork was observed at the center of the coiled gut. A pharmacological approach using a gut organ culture system suggested that contraction by actomyosin interaction is essential for gut coiling morphogenesis. Administration of inhibitors for myosin II ATPase and Rho-kinase significantly perturbed gut looping *in vitro*. Finally, we examined whether cell-to-cell communication by Wnt signaling is involved in the gut coiling. Administration of Wnt inhibitors also prevented successful gut looping. Taken together, we propose that reciprocal contraction by peristaltic movement of the nascent gut smooth muscle cells is needed for proper gut coiling morphogenesis in anuran amphibians.

Keywords: intestinal smooth muscle, myosin, actin, Wnt signaling, organ culture

序論

後生動物の様々な動物種において、種固有の左右非対称な器官形態がみられる。脊椎動物の内臓諸器官は左右非対称な配置や形態を示す。左右軸の向きは先行して決定される背腹軸、頭尾軸の情報をもとに決定され、後期胚期から幼生期にかけて、頭尾軸、背腹軸、左右軸の三つの体軸を参照しつつ内臓諸器官の左右非対称な形態とその左右極性が確立する。個々の内臓器官の左右非対称性の決定においては、持続的に左側板で発現する転写因子 *pitx2* が左右極性の確立に関与しており、その上流因子である成長

因子の *nodal* や *pitx2* をノックアウトまたはノックダウンすると内臓逆位の頻度が高くなり、器官によっては左右相称化が生じることが報告されている¹⁻³⁾。

本研究は、最もダイナミックに左右非対称な形態形成を行う腸管のぜんまい巻きの形態形成をテーマとする。当初は左右相称に形成される腸管が、胚発生の進行に伴って如何なる分子群が働くことで loop を描きそして腹腔内でコンパクトに種固有の複雑なコイル状のパターンで折りたたまれていくのかについて解明することを目的として行う。

細胞骨格構成分子が腸管の左右非対称性の確立に関与している場合が知られている。myosin ファミリーに属する myosin I がショウジョウバエの腸管および雄性生殖器の左右非対称性の確立に関与していることが知られている。ショウジョウバエが持つ3種類の myosin I のうち、Myo31DF が後腸の左右非対称性の確立に関与している⁴⁾。一方で、腸管の loop 形成の方向を決めるメカニカルな機構に、腸間膜の関与が報告されている。ニワトリ胚やマウス胚の腸管の loop 形成の左右性については、腹腔と腸管の背側を接続する背側腸間膜において、その左右で細胞の大きさが変わることによって腸管の loop 形成の方向が決定され、これは腸間膜の左側特異的に持続的に発現する転写因子 *pitx2* の制御下にある⁵⁾。一方、ゼブラフィッシュ胚においては、腸管の loop 形成の方向は左右の側板中胚葉 (LPM) の非対称な遊走により決定され、この LPM の遊走に細胞外マトリクスの構成因子である laminin が関与している⁶⁾。しかしながら、これらの研究をつなぎ合わせて、腸管における腸管の loop 形態形成を実現する機構を統合的に理解する状況には至っていない。*nodal* => *pitx2* の左側での発現を軸とした脊椎動物胚の左右極性の遺伝的カスケードの理解が進んでいる。しかし、器官の loop 形成に関わる力の発生機序と力の発生の主体の理解が充分進んでいるとは云えない。

各器官において、左右軸の位置情報を基に前駆細胞や器官原基の構成細胞が決まった方向性を維持して細胞増殖や細胞移動をすることで器官固有の左右非対称な形態を形成していく過程については不明な点が多い。この問題を解明するにあたり、幼生期のツメガエルの腸管は、腹側から見て反時計回りに loop 形成していく過程が観察でき、実験処理の左右極性や loop 形態への影響を容易に判定できる利点がある。本論文はツメガエル初期幼生の形態形成期の腸管において actomyosin の収縮が積極的に関与していると予想し、ツメガエル幼生の正常発生における myosin の分布について調査した。更に、筆者らの独自の *in vitro* 器官培養系を用いて、この予想を検証した。筆者らは、*in vitro* でツメガエル幼生腸管が loop 形態形成を示す実験系を構築した⁷⁾。この実験系において、幾つかの特異的な阻害剤を投与することで、腸管の loop 形態形成がどのように変化するかを調査すると共に、腸管平滑筋の配向性の変化についても調査した。最後に、どのような誘導因子が腸管の loop 形態形成に影響を及ぼしているのかを調査する端緒として、様々な器官形成系で多彩な役割を果たす Wnt シグナル伝達経路が腸管の loop 形態形成に関与しているのかについて調査した。

得られた実験結果をもとに、ツメガエル幼生の腸管の loop 形態形成の分子機構について考察した。

材料と方法

実験動物

本研究では実験動物として両生類無尾目ピパ科のアフリカツメガエル *Xenopus laevis* を使用した。本研究における利点として、初期のツメガエル幼生の腹側では黒色素が少なく非侵襲的に腸管を観察することができる点が挙げられる。ツメガエルの受精卵は、成体にヒト絨毛性 gonadotropin を雄 300 units、雌 500 units を皮下注射して得た。得られた受精卵はチオグリコール酸ナトリウム (pH=8.6) により脱ゼリーを行い、10% Steinberg 氏液により洗浄し、16°C または 24°C の恒温器内で飼育し、目的の発生段階まで飼育し、後期胚や初期幼生を実験に使用した。発生段階は Nieuwkoop & Faber (1967) の発生段階表に従って同定した⁸⁾。

免疫染色

免疫染色は以下の方法で行った。免疫染色で使用するサンプルは 4% パラホルムアルデヒド/PBS (-) で固定し、100%メタノールに置換した。メタノール下降系列により PBST にサンプルを置換後、Blocking を行い、一次抗体をサンプルに反応させた。一次抗体反応後、PBST で洗浄し、Blocking 後に二次抗体反応を行った。二次抗体反応後、サンプルを PBST で洗浄後、PBS (-) に置換し、蛍光実体顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡 (以下 CLSM) で観察を行った。

一次抗体として、平滑筋 actin の免疫染色には anti-alpha-Smooth Muscle actin (SM-actin) mouse monoclonal antibody (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA)、リン酸化 myosin 軽鎖の免疫染色には anti-phospho-Myosin Light Chain 2 (Ser19) rabbit polyclonal antibody (Cell signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA)、予備実験での骨格筋の免疫染色には 12/101 mouse monoclonal antibody known to recognize skeletal muscle (provided by the Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB]) の3種類を使用した。

蛍光標識二次抗体として、Alexa Fluor 488 - AffiniPure Fab Fragment goat anti-Mouse IgG H+L (ThermoFisher Scientific Co., Waltham, Massachusetts, USA) と Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, DyLight 594 (ThermoFisher Scientific Co.) を使用した。

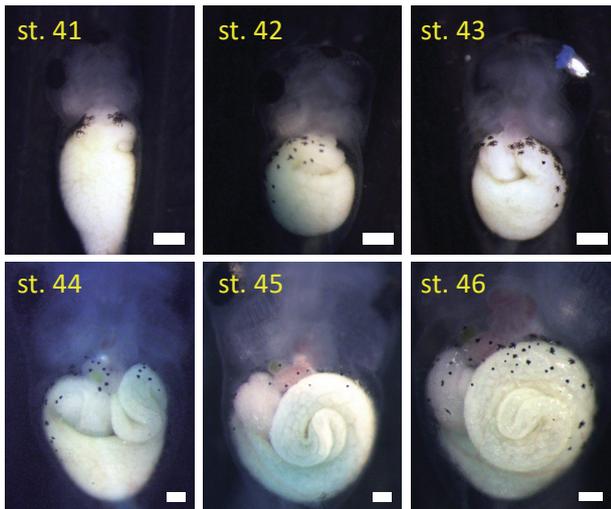


図 1. アフリカツメガエル初期幼生腸管の巻きの形態形成. stage 41-46 の正常発生している幼生の腹面から見た腸管の巻きの様子. 発生段階の同定は, Nieuwkoop & Faber (1967) に従った⁸⁾. stage 44 以降は, 腸管がぜんまいのように回転しながら伸長しつつ巻き, 長細い腸管が腹腔内にコンパクトに収まる. 上段の scale bar は 400 μm , 下段の scale bar は 200 μm である.

器官培養

ツメガエルの単離腸管の器官培養は以下の方法で行った. 腸管の coiling が開始される直前の st. 41 のツメガエル胚からウェッセルとピンセットを用いて腸管を単離した. 単離した腸管は抗生物質 (ペニシリン=ストレプトマイシン) を添加した 70% CO_2 -independent medium (Gibco) に投入し, 24°C の恒温器内で 1 日培養した. 培養した腸管の形態を looping, U-shape, No loop の 3 種の形態基準で排他的に判定した. 培養液には, actomyosin の収縮を阻害する薬剤をそれぞれ 1 種類ずつ, 0.01–0.1 μM (\pm) Blebbistatin (1,2,3,3a-tetrahydro-3a-hydroxy-6-methyl-1-phenyl-4H-pyrrolo[2,3-b]quinolin-4-one; 非筋 myosin II ATPase 阻害剤⁹⁾、50 μM Y-27632 (*trans*-4-[(1*R*)-1-Aminoethyl]-*N*-4-pyridinyl-cyclohexanecarboxamide dihydrochloride; 細胞運動に関与する Rho-kinase の阻害剤¹⁰⁾ を調整し, 単離腸管の形態への影響を調べた. 同時に, 同腹由来で同じ温度履歴で培養した幼生の培養腸管を対照群として利用した. 一方, Blebbistatin の単離腸管への投与に関しては培養液として HBSS with 10 mM HEPES を使用した.

ツメガエルの腸管のぜんまい巻きの形態形成に Wnt signaling が関与しているのかを調べるために, 以下の実験を行った. 単離腸管の組織培養系を利用し, Wnt signaling を阻害する 10 μM Wnt C-59 (4-(2-Methyl-4-pyridinyl)-*N*-[4-(3-pyridinyl)-phenyl]-benzeneacetamide; Wnt ligand の分泌阻害剤で Wnt

受容体下流の細胞内 3 経路全てを阻害する)¹¹⁾ 処理を行い, 腸管の形態への影響を上記の 3 基準で判定した. さらに, wholemount の st. 38–39 のツメガエル胚に 10 μM Cardionogen-1 (6-Cyclohexyl-3-(2-furanyl)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4] thiadiazole; Wnt 古典経路阻害剤)¹²⁾ で浸漬処理を行い, 対照群が stage 46 に到達した段階で腸管の形態の判定を行った.

統計的判定

腸管の器官培養の系において, 実験群とその同腹幼生の対照群とに対して有意水準 1% または 0.1% で, 2X2 分割表の検定を行った. その際, それぞれの群で looping が成功した例数に対して U 字止まりか looping しない例数を比較した.

結果

ツメガエル幼生腸管の正常発生

ツメガエル初期幼生の腸管は, 当初はほぼ直線状であるが, 腹側からみて次第に C 字を描くように腹側臍臓を C 字の中を含むようなかたちで湾曲する (stage 42; 図 1). やがて腹側臍臓は腸管の捩れ運動に伴い幼生の左脇腹中央から右脇腹前方に向かって大移動し, 最初に括れて細くなる腸管領域である十二指腸と隣接するようになる (stage 43). その直後から, 腹側左前方領域の腸管が細く括れながら反時計回りに回転運動をしつつ, 薇 (ぜんまい) のような形状の長細い腸管をコンパクトに体腔内に収めていく形態形成運動を行う (stage 44 以降).

リン酸化 myosin フィラメントの格子形成

ツメガエルの腸管において actin と相互作用する myosin がどのように分布するのかについて, 抗リン酸化 myosin 抗体を用いた蛍光免疫染色を行ったツメガエル正常幼生を蛍光実体顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡で観察した (図 2).

蛍光実体顕微鏡による観察では, リン酸化 myosin 軽鎖は stage 41-46 で腸管全体に分布しており, 我々が以前調査した SM-actin の漸増する分布とは分布の仕方がやや異なっていた⁷⁾. 腸管のリン酸化 myosin 軽鎖をより高精細に観察するために, 共焦点レーザー顕微鏡で stage 41-46 までの腸管の coiling が行われる発生段階のツメガエル幼生を用いて観察した. stage 41-42 までのツメガエル幼生の腸管では, リン酸化 myosin 軽鎖のシグナルはフィラメント状の分布を示さなかった. stage 43 幼生の腸管では, リン酸化 myosin 軽鎖のシグナルは十二指腸領域で腸管に対して横断方向にフィラメント状の分布を示した

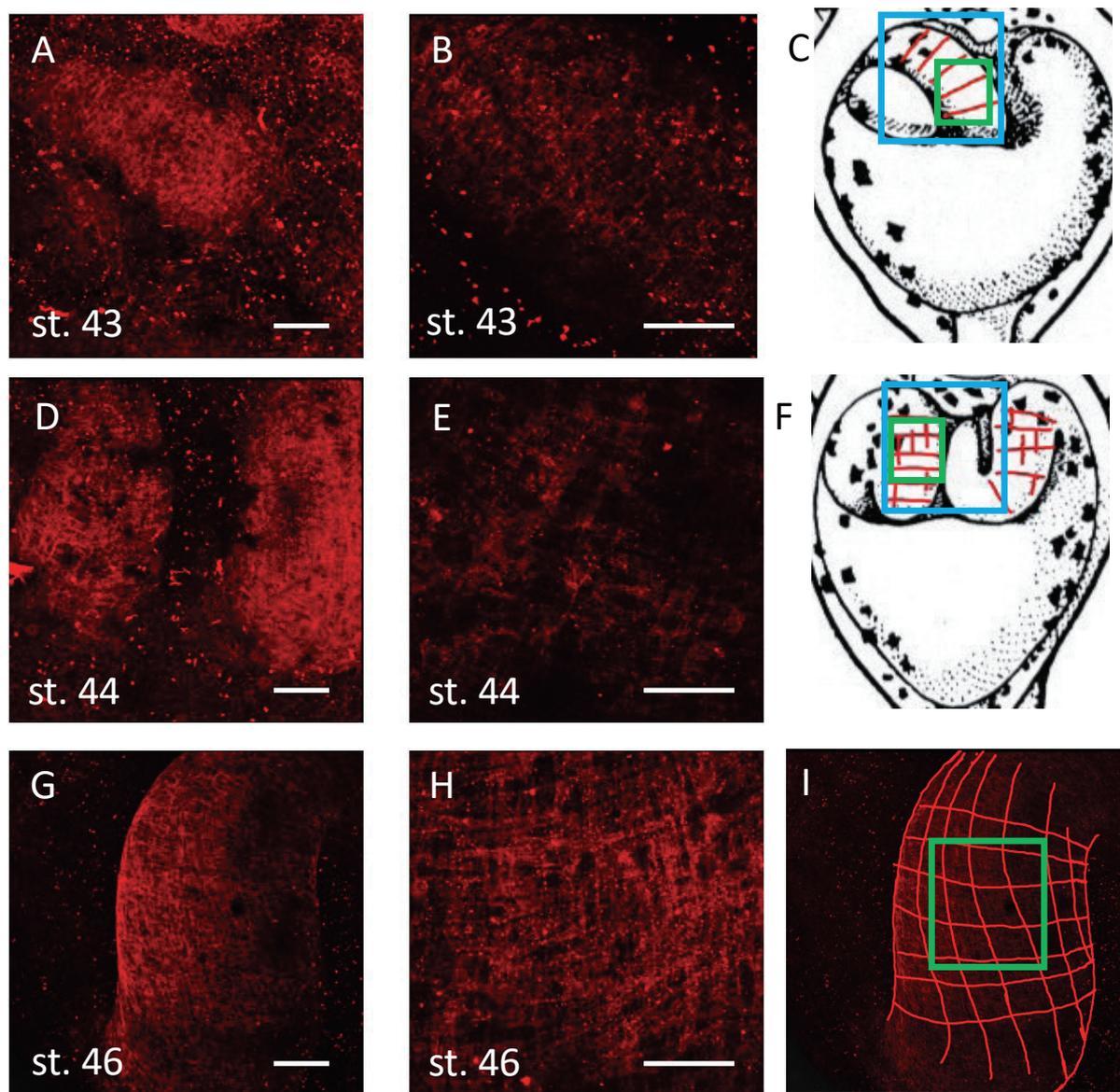


図 2. 腸管における抗リン酸化ミオシン抗体陽性細胞の発生段階依存的な分布の変化. 抗リン酸化ミオシン抗体を用いた蛍光免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡による観察を組み合わせることによって、陽性細胞の染色像の 3D 再構築を行った. A–C) stage 43 の幼生腸管においては、他の領域に先行して、十二指腸領域において腸管の長軸と直交する陽性細胞の配向性がみられた. D–F) stage 44 の幼生腸管においては、十二指腸領域と coiling の中心領域において、腸管に横断する方向に加えて長軸方向にも陽性細胞の配向性がみられた. G–I) stage 45-46 の幼生腸管においては、陽性細胞の格子状の編み目が組織されており、巻きの中心領域では格子状の編み目に捩れがあった. 2C の水色の枠の領域は 2A の視野を、緑色の枠の領域は 2B の視野を示す. また、2F の水色の枠の領域は 2D の視野を、緑色の枠の領域は 2E の視野を示す. A, D, G の scale bar は 100 μm であり、B, E, H の scale bar は 40 μm .

(図 2A, B; それぞれ 2C の青と緑の□で囲まれた領域). stage 44 幼生の腸管では、リン酸化 myosin 軽鎖のシグナルは一部の loop 領域で格子状に分布し始めていた (図 2D, E; それぞれ 2F の青と緑の□で囲まれた領域). stage 45 幼生の腸管では、リン酸化 myosin 軽鎖のシグナルは格子状に配向し、なおかつ coiling の中央部分では、腸管の長軸方向に沿って捩じれていた。ツメガエル stage 46 幼生の腸管では、リン酸化 myosin のフィラメント状のシグナルが腸管の coiling の中央で顕著に長軸方向に捩じれて配向していた (図 2G–I; I は G のフィラメントをトレー

ス像で、H は I の緑の□で囲まれた領域を撮影)。これらのフィラメント状のシグナルは、我々が以前報告した幼生腸管の平滑筋特異的 actin の観察結果⁷⁾と比較参照すると、腸管平滑筋の分布を表していると思われる。以上の抗リン酸化 myosin 抗体の免疫染色の結果から、腸管の巻きの形態形成に actomyosin の収縮が必要である可能性が示唆された。

actomyosin の収縮に対する Blebbistatin 処理の影響

筆者らはこれまでの研究で、stage 41 の loop 形成

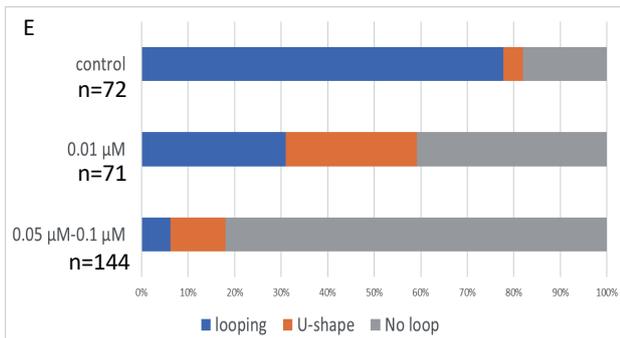
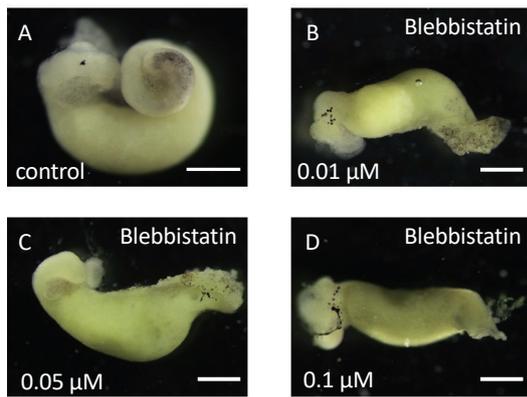


図 3. myosin II ATPase 阻害剤である Blebbistatin は, *in vitro* の単離腸管培養系において loop 形態形成を阻害した. scale bars, 500 μm. A) 図 4 の実験群と同じ温度で同じ時間培養した同腹対照群の単離腸管の loop 形態形成を示す. B-E) Blebbistatin は濃度依存的に loop 形態形成を阻害し, loop しない単離腸管の頻度が増加した.

直前の腸管を単離し, *in vitro* で stage 43 の loop 形成中期相当の形態まで loop 形成を再現する培養系を作出した. この実験系では, 単離腸管は組織自律的に looping するところが面白い. 一般的な細胞培養では 5% CO₂ (炭酸ガス) を用いて培養液を細胞増殖や機能発揮に最適な弱アルカリ性に保つ. 今回は普通の大气中で長期間 pH を弱アルカリに保つ, CO₂-independent medium (Gibco ブランド, ThermoFisher 社) を用いて, 両生類体液の浸透圧に合わせてこれを 70% に希釈することで, 比較的簡易なセットアップで腸管の loop 形態形成を再現することが出来た. stage 41 で切り出すところが要諦で, これよりも早い発生段階では, 未熟な表皮組織と側板中胚葉 (腸管を被う平滑筋の起源組織) との分離が悪く, 腸管原基を体表面の表皮からきれいに分離することが出来なかった.

腸管の looping に actomyosin の収縮が関与しているのか調べるために, *in vitro* の腸管の器官培養系を用いて単離腸管に Blebbistatin を投与した (図 3). 対照群においては, 腸管が looping しているサンプルの頻度が多数であった (n=56/72: 図 3A). 0.01 μM Blebbistatin 処理群では, 対照群と比較して U-shape や No loop を示すサンプルの頻度が増加し

た (n=49/71: $p < 0.001$: 図 3 B). 0.05 μM Blebbistatin 処理群の腸管では U-shape や No loop を示すサンプルが殆どであった (n=72/72: $p < 0.001$: 図 3C). 0.1 μM Blebbistatin 処理群でも腸管は U-shape や No loop の頻度が対照群と比較して増加した (n=63/72: $p < 0.001$: 図 3D).

ツメガエル幼生単離腸管に対する ROCK の効果

actin 細胞骨格は Rho kinase (ROCK) により細胞内に集積することが知られている¹³⁻¹⁴). 今までの観察結果では腸管において平滑筋特異的 SM-actin が高度に配向していることから, この SM-actin の配向に ROCK が関与していると予想した. そこで我々は ROCK の機能を阻害する Y-27632 を単離腸管に投与した. その結果, 対照群では n=47/60 で腸管が looping を示し, n=9/60 で腸管が U 字形を示し, n=4/60 で腸管が No loop であった. 一方, 50 μM Y-27632 処理群では全ての腸管の looping が完全に停止していた (n= 57/57: $p < 0.01$: 図 4C). 対照群と実験群の単離腸管を抗 SM-actin 抗体を用いた免疫染色に供した. その結果, 実験群の単離腸管では対照群に較べて SM-actin のフィラメント形成の成功率が低かった. 対照群では n=17/23 で腸管に SM-actin フィラメントが生じており, 50 μM Y-27632 処理群では n=13/21 で SM-actin フィラメントは見られなかった (図 4B-B'). これらの結果から ROCK が腸管の SM-actin フィラメントの形成に関与していることが示唆された.

以上の *in vitro* 器官培養系を用いた実験結果からも, 腸管の coiling に actomyosin の収縮および適切な配向が必要であることが示唆された.

ツメガエル幼生単離腸管に対する Wnt 経路阻害剤の効果

分泌因子 Wnt がツメガエルの消化管で発現していることが先行研究で報告されている¹⁵). 腸管の形態形成に Wnt シグナルが関与していると予想し, 単離した腸管において Wnt シグナルを阻害した場合に腸管の looping に影響を与えるのかを検討した. 阻害剤として Wnt シグナルの下流 3 経路全てを阻害する Wnt C-59 で単離した腸管を処理した. その結果, 対照群では n=49/60 で腸管の looping を示し, n=9/60 で腸管が U 字形を示し, n=2/60 で腸管は No loop を示した (図 5A, G). 10 μM Wnt C-59 処理群においては n=26/60 で腸管は looping を示し, n=28/60 で腸管が U 字形を示し, n=6/60 で腸管は No loop を示した (図 5B-D, G). この投与実験では対照群に比べて実験群で腸管の looping に支障をきたすサンプ

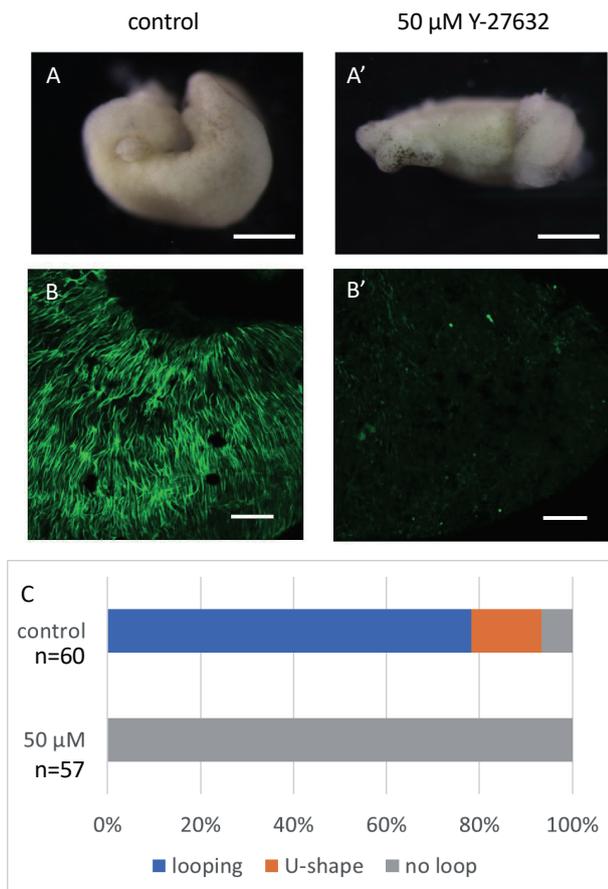


図 4. ROCK(Rho kinase)の阻害剤 Y-27632 の投与は、単離腸管の loop 形態形成を強力に阻害した。A, B は同腹対照群の単離腸管, A' と B' は投与群の単離腸管を示す。A', C) Y-27632 を投与しながら単離腸管を 1 日培養した後は、腸管は全く巻かなかった。B, B') 平滑筋特異的な SM(smooth muscle)-actin に対する免疫染色の結果。Y-27632 は SM-actin の発現を抑制し、その配向性が失われた標本が多かった。scale bar は A, A' では 500 μm, B, B' では 100 μm。

ルの頻度が上がった ($p < 0.01$)。この結果から、腸管の形態形成に Wnt シグナルが関与している可能性が示唆された。さらに、Wnt-C59 を投与したサンプルを用いて抗 SM-actin 抗体による免疫染色を行った。その結果、対照群は $n=8/12$ で腸管に SM-actin フィラメントが形成されていたが、10 μM Wnt C-59 処理群では $n=9/12$ で SM-actin フィラメントは形成されていなかった (図 5E, F)。この結果から、腸管の SM-actin フィラメントの形成に Wnt シグナルが関与する可能性が示唆された。

Wnt シグナルを構成する 3 種類の受容細胞内下流経路の中で古典経路 (Wnt/ β -catenin 経路) を阻害する Cardionogen-1 を用いてツメガエル後期尾芽胚期から wholemout で浸漬処理を行った。10 μM 処理群の多数の幼生で腸管の異常な looping を示した ($n=95/143$)。その中で、一部の個体の腸管では腸管の巻きに左右非対称性を示さない個体が生じた

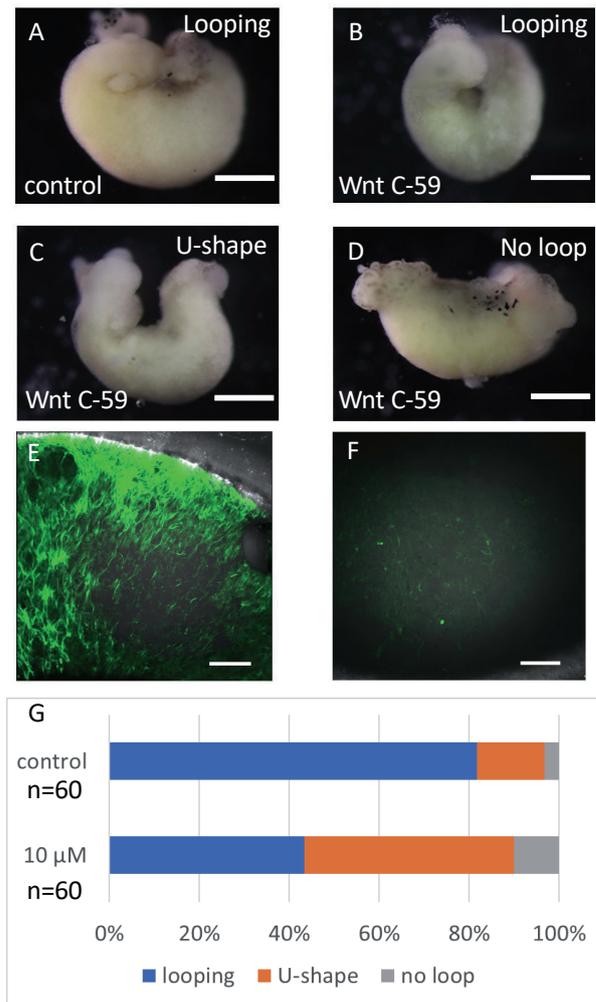


図 5. Wnt シグナル伝達経路特異的阻害剤である Wnt-C59 は単離腸管の loop 形態形成を阻害した。A) 図 5 の実験群と同じ時間培養した同腹対照群の単離腸管の loop 形態形成を示す。B-D, G) 10 μM Wnt-C59 を含む培養液中で 1 日培養した単離腸管においては、対照群と比べて loop 形態形成の成功率が大幅に低下した。E, F) *in vitro* の単離腸管培養系では、SM-actin 陽性細胞の腸管の円周方向の配向性は認められたが、10 μM Wnt-C59 存在下では配向性が認められず、SM-actin の発現量も大幅に低下した。図 5A-D の scale bar は 500 μm, E, F は 100 μm。

($n=44/143$; 図 6B)。この結果から、腸管の形態形成に Wnt シグナルの古典経路が関与している可能性が示唆された。さらに、Cardionogen-1 処理したサンプルを抗-smooth muscle actin 抗体 (抗 SM-actin 抗体) で免疫染色を行ったところ、対照群では腸管全体にシグナルが見られたが、10 μM 処理群では SM-actin が分布しない領域が生じていた (図 6E, F)。この結果から、腸管平滑筋の分布に Wnt シグナルの古典経路が関与している可能性が示唆された。

討論

脊椎動物の腸管は、消化吸収を担う消化管上皮構造と高度に組織化し蠕動運動を担う平滑筋による筋構造を有する。発生過程において腸管の消化管上皮が

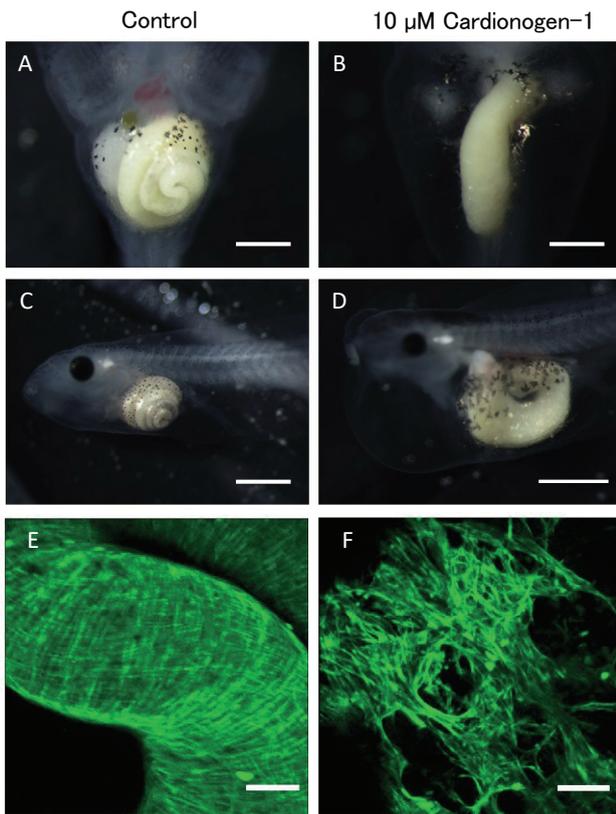


図 6. Wnt シグナル伝達経路のうち古典経路特異的阻害剤である *cardionogen-1* のツメガエル初期幼生への投与は腸管のぜんまい巻きの形態形成を阻害した。A-D) *cardionogen-1* に浸漬しながら 2 日間培養した幼生 (B, D) においては、同腹対照群 (A, C; stage 46) に比べて腸管の腹側からみて円周方向の巻きが大幅に低下し、背腹方向にのみ蛇行した。E, F) 抗-SM-actin 抗体を用いた免疫染色の結果から、*cardionogen-1* 投与によって捩れを伴った腸管平滑筋の格子状の配向が大幅に乱れた。E は対照群、F は *cardionogen-1* 投与群。scale bar は、それぞれ、A, B では 500 μm , C, D では 1 mm, E, F では 50 μm 。

その面積を拡充する際には、腸管は伸長しつつ、かつ同時に固有のパターンで巻いて折りたたまれ、左右非対称な形態形成を行う。筆者らは、高い透明性をもつアフリカツメガエル初期幼生を用いて、「幼若な腸管の形態形成にはその平滑筋の actomyosin 系の時空間的に制御された収縮活性が必要である」との作業仮説をもとに実験研究を行った。

筆者らの先行研究として、平滑筋特異的 actin (SM-actin) の分布と配向を可視化するために、wholemount のツメガエル幼生をサンプルとして抗-SM-actin 抗体による免疫染色を行った。その結果、ツメガエル初期幼生の腸管において SM-actin の発現領域が発生段階依存的に拡大していくことを見出した。さらに、腸管の長軸 (伸長方向) に直交する円周方向に腸管平滑筋がまずは配向し、次いで腸管の軸に沿った長軸方向に腸管平滑筋が配向することも発見した⁷⁾。こうして生成された腸管平滑筋がつくる縦横の格子には、腸管の巻きの中心のみで異方性

(anisotropy) を示す捻じれが生じることも新たに発見した⁷⁾。今回は、SM-actin と相互作用し物理的な力を発生する myosin の配向を、SM-actin と同様に免疫染色により可視化した。活性化した状態の myosin を検出する抗リン酸化 myosin 軽鎖抗体を用いた免疫染色により、ツメガエル正常胚の myosin については、SM-actin の場合と同様に、腸管においてまず横断方向にリン酸化 myosin 陽性細胞が配向し、次いで腸管の軸に沿った長軸方向にリン酸化 myosin 陽性細胞が配向した (図 2A-F)。リン酸化 myosin 陽性細胞の縦横の格子にも、抗-SM-actin 抗体で染めた場合と同様に、腸管の巻きの形態形成の中心のみで異方性を示す捻じれが生じていた (図 2G-I)。SM-actin ならびにリン酸化 myosin に対する 2 つの抗体で染まった細胞は、共に腸管平滑筋細胞であると思われる。これら二つの相互に符合する発見は、捩れを伴った機械的な力が腸管の左右非対称な巻きの形態形成に関与していることを示唆している。

我々の先行研究において、myosin II ATPase の阻害を通じて actomyosin の相互作用を阻害する Blebbistatin をツメガエル後期胚から初期幼生にかけて投与した。その結果、腸管は巻きの形態形成の程度が弱まるか、左右相称に背腹方向のみに蛇行し螺旋状には巻かなくなった⁷⁾。しかしながら、この wholemount の実験系では Blebbistatin 投与による他の組織への影響が副次的に腸管の巻きの影響をもたらして腸管の形態形成が阻害されたにすぎないとの虞があった。そこで今回筆者らは *in vitro* で腸管の巻きの形態形成を評価するモデル培養系の作出を行い、Blebbistatin を投与した。器官培養系での Blebbistatin 投与によっても著しく腸管の loop 形成が妨げられた結果からは Blebbistatin の wholemount への投与の系でも腸管平滑筋がその標的になっていたことが示唆され、腸管平滑筋の収縮は腸管の loop 形成に必要であることが示唆された。

筆者らの先行研究において、独自の腸管外植体培養系において薬剤投与実験を行った。actin 重合阻害剤 CK-666、myosin light chain kinase 阻害剤 ML-9、calmodulin アンタゴニスト W-7 の 3 薬剤をそれぞれ投与することで actomyosin の収縮を阻害し、外植体への影響を評価した。いずれの薬剤投与群でも、巻きの形態形成を行う外植体の頻度が対照群に比べて有意に低下した (いずれも $p < 0.01$)⁷⁾。今回、actin 細胞骨格の集積に関与する ROCK に特異的な阻害剤 Y-27632 を投与した単離腸管は全く巻かなかった (図 4)。この結果は、*in vitro* の器官培養系で Blebbistatin を投与した結果と符合する。従って、二つの実験を考え合わせると、腸管のぜんまい巻き

の形態形成において actomyosin の関与は非常に強く示唆されたといえる。

そこで次に筆者らは、actomyosin の作用の上流に位置する、腸管の巻きを司る細胞間シグナル伝達経路を探索することにした。筆者はここでツメガエル後期胚・幼生期・変態期の腸管においてリガンドや関連分子が発現している分泌因子 Wnt のシグナル伝達経路に注目した¹⁶⁻²¹⁾。Wnt リガンドの分泌を阻害する阻害剤 Wnt C-59 を単離腸管に投与したところ、腸管が巻く頻度が低下した。また、Wnt シグナルの受容細胞内 3 経路のうち古典経路 (canonical pathway) のみを阻害する Cardionogen-1 を wholemount の幼生に投与したところ、ツメガエル幼生の腸管の巻きは弱まるか、停止した。これらの結果から、腸管の巻きの形態形成に Wnt シグナル伝達経路、特に古典経路が関与していることが示唆された。ROCK は Wnt の主要な下流因子のひとつとして知られている²²⁻²³⁾。図 4 の実験結果において、Y-27632 投与で腸管の loop 形成は劇的に止まったので、今後は、腸管の形態形成において ROCK が Wnt の下流因子として機能するのかについて様々な角度から研究したいと考えている。

本研究は、(1) リン酸化 myosin を発現する腸管平滑筋の分布の *in vivo* での観察、ならびに、(2) 阻害剤投与を組み合わせた腸管外植体の *in vitro* 器官培養系 ... の二つの実験を有機的に組み合わせることでツメガエル初期幼生の腸管の形態形成の機構を解析した。得られた一連の実験結果から、腸管が巻き始める初期幼生期のツメガエル腸管では actomyosin の相互作用依存的に腸管が loop し、折りたたまれて巻くことが判った。腸管平滑筋が時空間依存的に格子状に配向し、そして振れることが、腸管の coiling を駆動することも判った。*in vitro* での実験系が構築できるようになり阻害剤実験が成立していること背景としては、ツメガエル幼生においては、巻きの形態形成はかなりの程度、腸管自律的に行われることが挙げられるであろう。

まとめると、初期幼生期での actomyosin の相互作用により生じる収縮力が、筋肉性器官である腸管の正常な巻きのパターンの確立に不可欠であることが本研究により明らかとなった。Nascone-Yoder らの研究グループは、ツメガエル幼生の消化管上皮の細胞間に発生する力が消化管の伸長に寄与すると主張している²⁴⁾。今後は、腸管平滑筋の収縮力ならびに消化管上皮の発生する力の大きさや方向性の測定などを通して、我々の実験結果と Nascone-Yoder らの研究とを包含した説明原理の構築が求められる。

今後の展望

今後の展望としては、actomyosin の蛋白質の合成と収縮の力が、時空間的にどのように制御され、遺伝的に種固有の折りたたみパターンにつながる loop 形態形成に統合されていくのかを解明することを目的に実験研究を行う必要がある。また、アフリカツメガエルは代表的なモデル両生類であるが、アフリカツメガエル幼生で知見が得られた腸管の loop 形態形成のメカニズムが無尾目両生類一般にとってどこまで保存されていて、適用可能なのかについて、本邦の在来種などの非・モデル無尾目の幼生を用いて明らかにしていきたい。更には、脊椎動物において最も再生力の強い有尾目のアホロートルやイモリの幼生の腸管は無尾目幼生ほどは巻かないが、遺伝的に決まった一定のパターンで湾曲することを踏まえて、有尾目の腸管の左右非対称な形態形成と無尾目のそれとの共通点と相違点を比較発生学的手法で明らかにしていきたい。

謝辞

本研究は、神奈川大学共同研究奨励助成金の助成を受けた研究課題「アフリカツメガエル幼生腸管のループ形態形成の研究」(2019 年度 No. 2; 2019 年度-2021 年度)による共同研究として実施されましたので、ここに感謝いたします。

図 1 の写真を撮影して下さった豊泉研卒研究生(当時)の嶽内あや氏に感謝いたします。ツメガエルの wholemount 免疫染色の技法のプロトコルを伝授して下さった横浜市立大学の内山英穂教授、小林剛氏(当時)に感謝いたします。また、我々の研究活動にご支援をいただきました神奈川大学総合理学研究所所長川本達也教授ならびに所員各位に感謝いたします。本研究の遂行にあたり、数々のご助言を賜りました泉進名誉教授、小谷享教授ならびに大平剛教授に深謝いたします。

文献

- 1) Hamada H, Meno C, Watanabe D and Saijoh Y (2002) Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat. Rev. Genet.* 3(2): 103-113.
- 2) Toyozumi R, Ogasawara T, Takeuchi S and Mogi K (2005) *Xenopus nodal related-1* is indispensable only for left-right axis determination. *Int. J. Dev. Biol.* 49(8): 923-938.
- 3) Toyozumi R and Mogi K (2018) Left-right specification in the embryonic and larval development of amphibians. In *Reproductive and Developmental Strategies* (Kobayashi K, Kitano T, Iwao Y, Kondo M, eds.) Springer. pp. 635-664.
- 4) Okumura T, Sasamura T, Inatomi M, Hozumi S, et al. (2015) Class I myosins have overlapping and specialized functions in left-right asymmetric

- development in *Drosophila*. *Genetics*. **199**(4): 1183-1199.
- 5) Davis NM, Kurpios NA, Sun X, Gros J, et al. (2008) The chirality of gut rotation derives from left-right asymmetric changes in the architecture of the dorsal mesentery. *Dev. Cell* **15**(1): 134-145.
 - 6) Hochgreb-Hägele T, Yin C, Koo DE, Bronner ME and Stainier DY (2013) Laminin β 1a controls distinct steps during the establishment of digestive organ laterality. *Development* **140**(13): 2734-2745.
 - 7) Akinaga A, Azumi Y, Mogi K and Toyozumi R (2021) Stage-dependent sequential organization of nascent smooth muscle cells and its implications for the gut coiling morphogenesis in *Xenopus* larva. *Zoology* **146**: article no. 125905.
 - 8) Nieuwkoop PD and Faber J (1967) *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis*. Elsevier Science Publishing Co. pp. 1-258.
 - 9) Kovács M, Tóth J, Hetényi C, Málnási-Csizmadia A and Sellers JR (2004) Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J. Biol. Chem.* **279**(34): 35557-35563.
 - 10) Nakamura Y, Hashimoto R, Amano M, Nagata K, et al. (2000) Localized phosphorylation of vimentin by rho-kinase in neuroblastoma N2a cells. *Genes Cells*. **5**(10): 823-837.
 - 11) Proffitt KD, Madan B, Ke Z, Pendharkar V, et al. (2013) Pharmacological inhibition of the Wnt acyltransferase PORCN prevents growth of WNT-driven mammary cancer. *Cancer Res.* **73**(2): 502-507.
 - 12) Ni TT, Rellinger EJ, Mukherjee A, Xie S, et al. (2011) Discovering small molecules that promote cardiomyocyte generation by modulating Wnt signaling. *Chem. Biol.* **18**(12): 1658-1668.
 - 13) Kosako H, Yoshida T, Matsumura F, Ishizaki T, et al. (2000) Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene*. **19**(52): 6059-6064.
 - 14) Wei Q and Adelstein RS (2002) *Pitx2a* expression alters actin-myosin cytoskeleton and migration of HeLa cells through Rho GTPase signaling. *Mol. Biol. Cell.* **13**(2): 683-697.
 - 15) Damianitsch K, Melchert J and Pieler T (2009) XsFRP5 modulates endodermal organogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **329**(2): 327-337.
 - 16) Zorn AM, Butler K and Gurdon JB (1999) Anterior endomesoderm specification in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and TGF-beta signalling pathways. *Dev. Biol.* **209**(2): 282-297.
 - 17) Pilcher KE and Krieg PA (2002) Expression of the Wnt inhibitor, sFRP5, in the gut endoderm of *Xenopus*. *Gene Expr. Patterns* **2**(3-4): 369-372.
 - 18) McLin VA, Rankin SA and Zorn AM (2007) Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development* **134**(12): 2207-2217.
 - 19) Zhang T, Guo X and Chen Y (2013) Retinoic acid-activated Ndr1a represses Wnt/ β -catenin signaling to allow *Xenopus* pancreas, Oesophagus, Stomach, and Duodenum Specification. *PLoS One* **8**(5): e65058.
 - 20) Ishizuya-Oka A, Kajita M and Hasebe T (2014) Thyroid hormone-regulated Wnt5a/Ror2 signaling is essential for dedifferentiation of larval epithelial cells into adult stem cells in the *Xenopus laevis* intestine. *PLoS One* **9**(9): e107611.
 - 21) Dush MK and Nascone-Yoder NM (2019) Vangl2 coordinates cell rearrangements during gut elongation. *Dev. Dyn.* **248**(7): 569-582.
 - 22) Katoh M and Katoh M (2020) Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation. *Int. J. Mol. Med.* **45**(2): 279-297.
 - 23) Rogers S and Scholpp S (2022) Vertebrate *wnt5a* - at the crossroads of cellular signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.* **125**: 3-10.
 - 24) Reed RA, Womble MA, Dush MK, Tull RR, et al. (2009) Morphogenesis of the primitive gut tube is generated by Rho/ROCK/myosin II-mediated endoderm rearrangements. *Dev. Dyn.* **238**(12): 3111-3125.