

■原 著■

両生類アフリカツメガエル幼生の正中鰭のサイズと形状は 環境水中のマグネシウム濃度に影響される

胡 継楠^{1,3} 豊泉龍児^{1,2}

Magnesium ion concentration in environmental water is effective for the
size and shape of *Xenopus* larval median fin

Jinan Hu^{1,3} and Ryuji Toyozumi^{1,2}

¹ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

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

Abstract: The median fin is a membranous structure that develops on both the dorsal and ventral sides along the midline in amphibian larvae and teleost fry for swimming. In anuran (frogs and toads) and urodelan (newts, axolotl, and salamanders) tailbud embryos, the median fin starts to expand along the midline. Importantly, the shape and size of the developing median fin are highly species-specific and stage-dependent, reminiscent of the fine tuning of genetic control to realize the species-specific morphology of the median fin. Here, we hypothesized that ionic composition of environmental water of the larval habitat is essential for adaptation and optimization of the developing fin morphology. Therefore, in the present study, using amphibian model organism *Xenopus laevis* embryos, by depleting the magnesium ions from culture saline, we reared *Xenopus* late-stage tailbud embryos for several days until the early larval stage, and morphometric analysis was performed to assess several parameters regarding global fin morphology and its individual epidermal cells. Magnesium-free treatment induced shortening of the early larval axial structure, and the effects on the ventral fin and its epidermal cells were significant. Based on these results, we discuss the possible mechanism that affects the fin morphology via sensing of the environmental magnesium concentration.

Keywords: *fin morphogenesis, epidermis, morphometry, tadpole larva, Xenopus laevis*

序論

正中鰭は魚類の仔魚やその他の水棲動物の幼生の体から突出した膜状の構造物で、背腹両面において頭尾軸の正中に沿って伸びている。両生類幼生においては、正中鰭は主たる遊泳器官として機能し、体の駆動、バランスや舵の役割を果たす¹⁾。正中鰭の形成は主に尾芽胚期から始まり、その形やサイズは種ごと、発生段階ごとに一定である。無尾目両生類のアフリカツメガエルの正中鰭の場合には、尾芽胚の段階で発達を始め、変態が始まるまで成長し、その後後退を始める。

無尾目両生類の正中鰭の構造は比較的単純で、竜骨のような構造に隆起した平らな表皮細胞で構成さ

れていて、二枚の表皮に挟まれた基部側の間隙は間葉細胞と細胞外マトリックスからなる。細胞は細胞外マトリックスに囲まれ、これによって骨格的な支持を提供する。鰭の外周側の周縁部は表皮2枚が融合して単層の上皮構造を形成する²⁾。その表皮は多繊毛細胞や粘液細胞など多くの細胞タイプで構成される。正中鰭に関連する重要な構造は尾芽である。尾芽は成長する尾の先端に位置する細胞の集まりであり、神経板の二つの領域と後方中胚葉領域の間の相互作用によってその形成が開始され、lunatic fringe と Notch を発現する背側領域と、Notch リガンド Delta を発現する腹側領域との相互作用に依存

して尾芽は形成される^{3,5)}。

両生類の胚発生において、尾芽と正中鰭の相互作用は、適切な幼生の形態形成において不可欠である。尾芽の発生と正中鰭の形成は胚発生の初期段階から同時に起こり、その相互連携が鰭の適切な形成とサイズ制御に重要な役割を果たす⁶⁾。アフリカツメガエル幼生の正中鰭は概ね背側膜鰭(以下、背鰭)と腹側膜鰭(以下、腹鰭)に区分され、それぞれの由来は異なる。背鰭の間充織はその直下にある神経堤細胞と背側体節細胞に由来し、これらによって誘導される。腹鰭の間充織は、主に中胚葉由来とされるが、一部は神経堤細胞にも由来するとされてきた^{6,7)}。一方、トランスジェニック個体を用いた最近の研究により、アフリカツメガエル幼生の尾芽領域における鰭の間充織は、神経堤ではなく完全に中胚葉から由来することが報告されている⁸⁾。正中鰭は尾芽から分化する細胞によって形成されるため、尾芽の発達は正中鰭の形成に直接影響を及ぼす。

尾芽の再生に関しては様々な研究があるにもかかわらず、正中鰭のサイズを制御する遺伝子カスケードや細胞挙動は完全には解明されていない。筆者らは、ツメガエルの初期発生には、環境水に溶け込んだ一定濃度の様々なイオンが必要な筈であると考えた。環境は常に変化しており、生物はそれに適応する必要がある。筆者らは、水棲動物にとってマグネシウム不足は水環境に由来する発生拘束要因の一つとなり得るであろうから、オタマジャクシがマグネシウム不足の環境変化にどのように適応しようとするかを理解することは、ヒトの発達医学にも役立つ知見をもたらすと考えた。本研究は、ヒトの低マグネシウム血症の病態解明の基礎医学的モデルを確立する第一歩として、マグネシウムイオン欠乏がツメガエル幼生の正中鰭のサイズや形状に及ぼす影響を調べ、鰭の形成を制御するメカニズムの一端を解明することを目指した。

材料と方法

実験材料

主な実験動物として野生型のアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の胚と幼生を用いた。

方法

1. 人工授精

適齢のツメガエル成体の1ペアを用意し、三日間絶食させて採卵に用いた。オスに400 unit、メスに600 unitの性腺刺激ホルモン gonadotropin を注射し、一晩放置して翌日に卵を得た。メルカプト酢酸ナトリウムで卵ゼリー層を除去して、神経胚に達した段

階で実験群と対照群を設けた。

2. Mg²⁺-free の 10% Steinberg 氏液での飼養

Mg²⁺-free の Steinberg 氏液と通常の Steinberg 氏液を調製して10倍希釈して飼育液とした。実験群は Mg²⁺-free の 10% Steinberg 氏液で2回洗浄し、6穴プレートの各 well に満たした Mg²⁺-free の 10% Steinberg 氏液中で飼養した。対照群は通常の 10% Steinberg 氏液中で飼養した。両群はイオン濃度を維持するため、毎日水替えをして、16°Cの恒温器中で飼養した。

3. ファロイジン染色

st. 43 に達したところで幼生の外形と筋節の拡大写真を撮って、4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定した幼生を PBST (PBS-Tween20) で5分間1回洗って、200 nM の Acti-stain™ 670 Phalloidin で1時間染色した。その後、1×PBS で5分間2回洗浄し、正中鰭細胞を共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss 製 LSM730) で光波長 680 nm で観察した。

4. 免疫組織化学染色

筋節を観察しやすくするために MF20 抗体を用いた間接法により、筋節を緑の蛍光に染めた。

st. 43 に達した幼生を4%パラホルムアルデヒドで固定して組織や細胞の形態を保持した。その後、一次抗体としてサルコメア構造の myosin heavy chain を認識するマウスモノクローナル抗体である MF20 を反応させた。一晩反応させて洗浄後、蛍光標識付きの anti-mouse IgG 二次抗体を追加し、再度一晩反応させて、洗浄した。最後に、筋節を共焦点レーザー顕微鏡で光波長 520 nm で観察した。

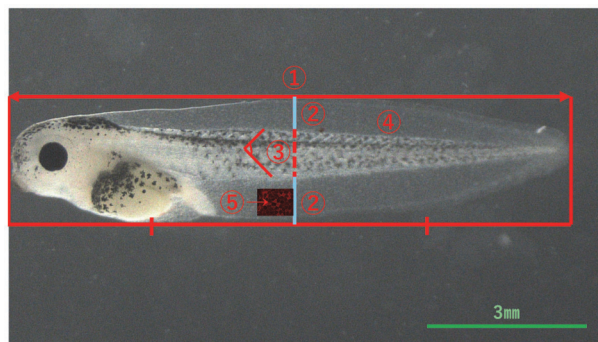


図1. ツメガエル幼生とその鰭の形態データの測定と検定。Image J で以下の①～⑤の数値を測定、計算した。①ツメガエル幼生の体長。②背鰭と腹鰭の高さ(水色の縦棒部分)。③「く」の字型の筋節のなす角。④左側面から見た外形の全体写真における鰭が占有する面積の割合。⑤鰭表皮細胞の面積を、鰭表皮細胞境界のファロイジン染色をもとに測定。測定データは、t-検定を用いて実験群と対照群の①～⑤の有意差の有無を検定した。

5. 鰭面積データの定量的解析

オープンソースの画像解析ソフトウェアである Image J でツメガエル幼生の体長、背鰭と腹鰭の高さ、「く」の字型の筋節のなす角、左側面から見た外形の全体写真における鰭が占有する面積の割合、鰭表皮細胞の面積を計測して、これらのパラメータについて、 t -検定を用いて実験群と対照群の有意差の有無を算出した (図 1)。

結果と考察

st.43 に達したツメガエル幼生は一定の運動能力を持っているが、 Mg^{2+} -free の Steinberg 氏液で飼養したオタマジャクシは対照群より運動能力が弱くなって、あまり遊泳しなかった。最初に、 Mg^{2+} -free 状態下での生存率を調査した。対照群の生存率は 1 日目で 56/60 (93%)、4 日目で 48/60 (80%)、6 日目で 41/60 (68%) であった。一方、 Mg^{2+} -free 処理した実験群の生存率は 1 日目で 56/60 (93%)、4 日目で 54/60 (90%)、6 日目で 26/60 (43%) であった。4 日目

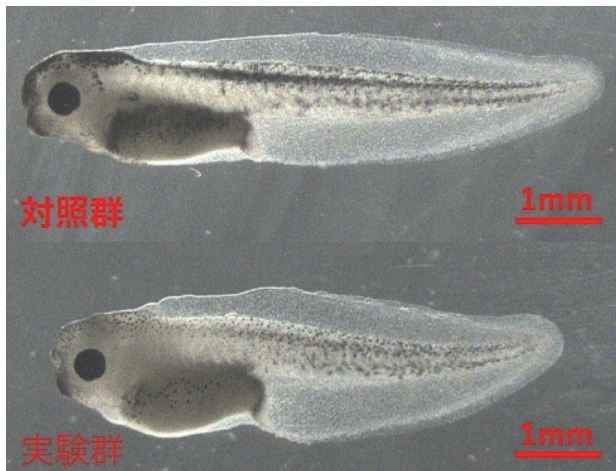


図 2. 後期尾芽胚期から Mg^{2+} -free の人工淡水 (10% Steinberg 氏液) で飼養した実験群 (下段) と同腹対照群 (上段) の左側面図。実験群では短躯となり、特に正中鰭の腹側の鰭の丈が高くなる現象が認められた。Scale bars, 1 mm.

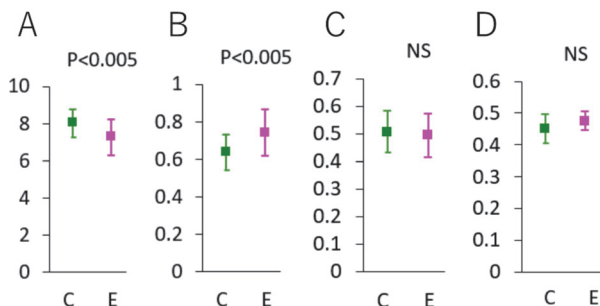


図 3. Mg^{2+} -free 人工淡水で飼育した実験群 (E) と同腹対照群 (C) の体長 (A, 縦軸の単位 mm), 腹鰭の高さ (B, 単位 mm), 背鰭の高さ (C, 単位 mm), 側面から見た総面積における鰭面積 (D, 背側鰭+腹側鰭) の割合。NS, 有意差なし ($P > 0.1$)。

までの実験群の生存率は対照群と較べて遜色はなく、体内に蓄積した Mg^{2+} イオンで生存が担保されたと考えられる。光学顕微鏡で観察した結果、実験群では色素細胞が減少し、実験群の体色は、体全体が対照群より白くなった。

側面から見ると、実験群の体は対照群よりより太く短い形状であった (図 2)。また、尾芽は実験群の方が比較的広がった。腹鰭では、対照群では滑らかな曲線をしていていたが、実験群の肛門の部分は凹んだ波状をしていた。撮影した写真をもとに Image J でツメガエル幼生の体長 (図 3A)、腹鰭の高さ (図 3B)、背鰭の高さ (図 3C)、側面から見た鰭の占有面積の割合 (図 3D)、個々の鰭表皮細胞の面積 (図 4) を測定して、データを有意水準 1% の t -検定で有意差を計算した。その結果、実験群の体長は対照群の体長より有意に短かった (実験群 7.25 ± 0.96 mm, 対照群 8.01 ± 0.76 mm; $P < 0.005$, それぞれ $n=60$, 図 3A)。実験群の背鰭の高さと個々の背鰭表皮細胞面積は対照群のそれらに対して有意差がなかったが、腹鰭では有意差があり、対照群より丈が高かった (実験群 0.74 ± 0.12 mm, 対照群 0.64 ± 0.09 mm; $P < 0.005$, 図 2、図 3B と図 4, それぞれ $n = 60$)。個々の腹鰭表皮細胞面積は対照群のそれより大きかった (実験群 $549.6 \pm 163.1(\mu m)^2$, 対照群 $292.2 \pm 96.2(\mu m)^2$; $n=$ それぞれ 100, $P < 0.005$, 図 4)。しかし、側面積に占める鰭の占有面積の割合には有意差がなかった (図 3D, $P > 0.1$)。

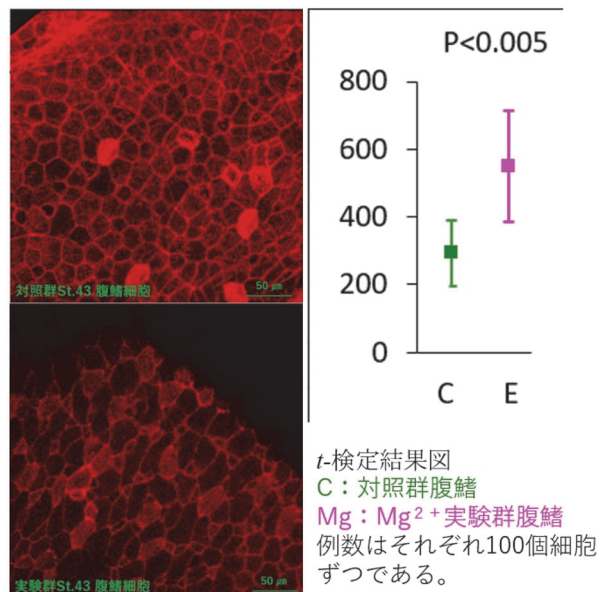


図 4. 後期尾芽胚期から Mg^{2+} -free の人工淡水 (10% Steinberg 氏液) で飼養した実験群の腹鰭細胞 (下段) と同腹対照群の腹鰭細胞 (上段) を、それぞれ蛍光標識 phalloidin で染色した染色像。焦点面は正中鰭の表皮に合っている。グラフの縦軸の単位は、 $(\mu m)^2$ 。Scale bars, 50 μm 。

更に、筋節の角度にも大きな差があり（それぞれ $n=20$ ）、実験群（平均値 102.3° ）の方が対照群（平均値 69.5° ）のそれより角度が開いていた（図5）。他に、実験群には様々な畸形が出た。一部のオタマジャクシの腹部には水泡が生じた。その中の腸管も正常に発生できず奇形になった。一部のオタマジャクシの鰭には欠陥や白濁した組織が出てきた。st. 43 前の実験群と対照群の死亡率は同程度に低かったが、st.43 を過ぎると、実験群の死亡率が急に上昇した。

以上の結果から、 Mg^{2+} -free 中で発生したツメガエル幼生では総じて短軀化という現象が起こったことがわかった。それが何に起因するのか、現時点のデータからは判断できない。以下に本研究の Mg^{2+} -free 処理の結果として引き起こされた鰭形態の著しい変化について、その原因について考察する。

ツメガエルの神経管の閉鎖について、TRPM チャネル (melastatin-related transient receptor potential channels) のファミリーに属する TRPM6, TRPM7 が関与することが報告されている。これらの分子は後期神経胚の radial intercalation (TRP6 が担当), mediolateral intercalation (TRP7 が担当) に関与しており、異所的な Mg^{2+} -ion transporter SLC41A2 の発現で神経管閉鎖不全から救済される^{9,10}。これに関連して、TRPM6 のホモ接合ノックアウトマウスは、高マグネシウム食で生存率が改善することも報告されている¹¹。ツメガエル原腸胚では、Wnt シグナルの非古典経路と TRPM7 とが協奏して、原腸形成時の収斂伸長運動 (convergent extension movement) を GTPase の Rac 依存的に制御していることが報告されており、そこに Mg^{2+} イオンが関与することが示唆されている¹⁰。筆者らは、腹側化因子 BMP-2, 4 (bone morphogenetic protein-2,4) によって誘導され、原腸胚や神経胚の初期中胚葉の腹側・後方マーカー遺伝子として知られ、尾芽の伸長や神経のパターンニングに関与することが報告されている *Xhox3* の発現が環境水中の Mg^{2+} -free に影響され、正しく前後軸に延長できない可能性も考えている¹²⁻¹⁴。そして、核マトリックスの laminin をコードする *lmbn1* 突然変異を持つオタマジャクシの尾は、野生型と比較して統計的に有意に短く、狭いことが報告されている¹⁵。従って、 Mg^{2+} イオンが適切な濃度範囲に収まることで *lmbn1* に依存する（ツメガエル幼生の鰭の細胞核に特徴的な）核の多分岐と適切な尾の形成と機能に必要なかもしれない。また、ツメガエルの原腸胚において、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor) とその受容体の PDGFA /PDGFR α シグナル伝達が阻害されると、中胚葉細胞の方向性が喪失され、中軸伸長の減少が引き起こされる^{16,17}。 Mg^{2+} -

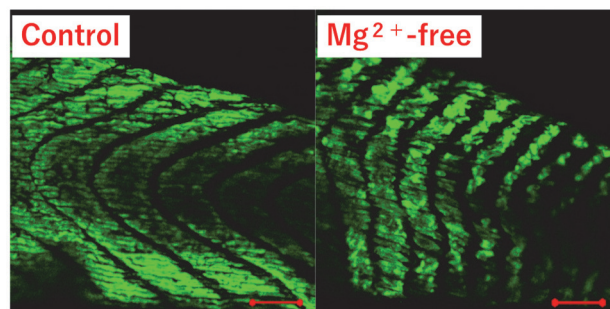


図5. 神経胚期から Mg^{2+} -free の人工淡水（10% Steinberg 氏液）で飼養した実験群（右図）と同腹対照群（左図）の左側面の筋節。横紋筋を認識する MF20 モノクローナル抗体を1次抗体とする、免疫染色の間接法で可視化した。実験群の筋節は、「く」の字型の筋節のなす角が開いていた。頭尾軸に平行な筋繊維群は多くの領域で形成されていて、一部の領域では崩れていた。Scale bars, 100 μ m.

free 処理によって、PDGF シグナルも影響を受けているのかもしれない。ツメガエルの尾芽の伸長、鰭および色素細胞の発達には Notch シグナルが必要と報告されている⁹。本実験で観察された色素の消失と短軀化は、Notch シグナルが阻害された現象に対応している可能性もある。

総じて、マグネシウム不足は細胞活性、および組織形成に必要なシグナル伝達経路に重大な影響を及ぼし、これが最終的に発達過程における短軀化へと繋がることを示された。マグネシウム不足の影響が背鰭よりも腹鰭に大きく出たのは序論で述べた両者の細胞系譜の違いに起因する可能性がある。腹鰭の形状の変化は表皮細胞の面積の増大に起因すると思われる（図2, 図3B, 図4）。低 Mg^{2+} イオン濃度の状況下では、鰭以外に様々な組織が影響を受けて正常に発生できなかった。特に腸管と筋節に大きな影響を与え、運動能力と死亡率に影響が出ることが分かった。

現在のデータを統合的に考えると、 Mg^{2+} 不足の環境で発生した幼生は頭尾軸方向に伸長する力が弱くなって、背腹軸方向に伸長する力が強くなることで強く示唆された。尾芽胚の伸長は脊索の伸長によって駆動される¹⁸⁻²¹。今後は脊索の伸長力に Mg^{2+} 濃度が影響するのかを検定したい。また、 Mg^{2+} -free 処理途中で通常の Steinberg 氏液に戻すと発生がどうなるかを試みる。更に、硬骨魚類、特に真骨魚類の仔魚の膜鰭の発生に、環境水中のマグネシウム濃度が影響するかについても検討したい。

謝辞

本研究を遂行する上で、示唆的な御助言を頂きました。豊泉研究室の加藤泰裕さん、中野潮李さん、金海香さん、吉本茉歩さんに感謝します。ツメガエル胚・幼生の wholemount 免疫染色の技法を教えてください。

いただきました、横浜市立大学の内山英穂教授、小林剛氏に感謝いたします。私たちの研究をご支援して頂きました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。

文献

- 1) 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.
- 2) Tucker AS and Slack JMW (2004) Independent induction and formation of the dorsal and ventral fins in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **230**(3): 461-467. doi: 10.1002/dvdy.20071
- 3) Tucker AS and Slack JM (1995) Tail bud determination in the vertebrate embryo. *Curr. Biol.* **5**(7):807-13. doi:10.1016/s0960-9822(95)00158-
- 4) Beck CW and Slack JM (1998) Analysis of the developing *Xenopus* tail bud reveals separate phases of gene expression during determination and outgrowth. *Mech. Dev.* **72**(1-2): 41-52. doi: 10.1016/s0925-4773(98)00015-x.
- 5) Beck CW and Slack JM (2002) Notch is required for outgrowth of the *Xenopus* tail bud. *Int. J. Dev. Biol.* **46**(2): 255-258. doi: 10.1387/ijdb.011489.
- 6) Garriock RJ and Krieg PA (2007) Wnt11-R signaling regulates a calcium sensitive EMT event essential for dorsal fin development of *Xenopus*. *Dev. Biol.* **304**(1): 127-140. doi:10.1016/j.ydbio.2006.12.020.
- 7) Garriock RJ, Warkman AS, Meadows SM, D'Agostino S, Krieg PA (2007) Census of vertebrate Wnt genes: Isolation and developmental expression of *Xenopus* Wnt2, Wnt3, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, and Wnt16. *Dev. Dynam.* **236**: 1249-1258.
- 8) Taniguchi Y, Kurth T, Medeiros D et al. (2015) Mesodermal origin of median fin mesenchyme and tail muscle in amphibian larvae. *Sci. Rep.* **5**: 11428.
- 9) Runnels LW and Komiya Y (2020) TRPM6 and TRPM7: Novel players in cell intercalation during vertebrate embryonic development. *Dev. Dyn.* **249**(8): 912-923. doi:10.1002/dvdy.182.
- 10) Komiya Y, Su LT, Chen HC, Habas R and Runnels LW (2014) Magnesium and embryonic development. *Magnes. Res.* **27**(1): 1-8. doi: 10.1684/mrh.2014.0356.
- 11) Walder RY, Yang B, Stokes JB, et al. (2009) Mice defective in Trpm6 show embryonic mortality and neural tube defects. *Human Mol. Genet.* **18**(22): 4367-4375. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp392>.
- 12) Ruiz i Altaba A (1990) Neural expression of the *Xenopus* homeobox gene Xhox3: evidence for a patterning neural signal that spreads through the ectoderm. *Development* **108**(4): 595-604. doi: 10.1242/dev.108.4.595.
- 13) Larkin K and Danilchik MV (1999) Ventral cell rearrangements contribute to anterior-posterior axis lengthening between neurula and tailbud stages in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **216**(2): 550-560. doi:10.1006/dbio.1999.9495.
- 14) Beck CW and Slack JM (1999) A developmental pathway controlling outgrowth of the *Xenopus* tail bud. *Development* **126**(8): 1611-1620. doi: 10.1242/dev.126.8.1611.
- 15) Arbach HE, Harland-Dunaway M, Chang JK and Wills AE (2018) Extreme nuclear branching in healthy epidermal cells of the *Xenopus* tail fin. *J. Cell Sci.* **131**(18): jcs217513. doi: 10.1242/jcs.217513.
- 16) Nagel M, Tahinci E, Symes K and Winklbauer R (2004) Guidance of mesoderm cell migration in the *Xenopus* gastrula requires PDGF signaling. *Development* **131**(11): 2727-2736. doi: 10.1242/dev.01141.
- 17) Nagel M and Winklbauer R (2023) Polarized contact behavior in directionally migrating *Xenopus* gastrula mesendoderm. *Int. J. Dev. Biol.* **67**(3): 79-90. doi: 10.1387/ijdb.230123rw.
- 18) Weliky M, Minsuk S, Keller R and Oster G (1991) Notochord morphogenesis in *Xenopus laevis*: simulation of cell behavior underlying tissue convergence and extension. *Development* **113**(4):1231-1244. doi: 10.1242/dev.113.4.1231.
- 19) Goto T and Keller R (2002) The planar cell polarity gene strabismus regulates convergence and extension and neural fold closure in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **247**(1):165-181. doi: 10.1006/dbio.2002.0673.
- 20) Ezin AM, Skoglund P and Keller R (2003) The midline (notochord and notoplate) patterns the cell motility underlying convergence and extension of the *Xenopus* neural plate. *Dev. Biol.* **256**(1):100-114. doi: 10.1016/s0012-1606(02)00130-6.
- 21) Goto T and Keller R (2021) Preparation of three-notochord explants for imaging analysis of the cell movements of convergent extension during early *Xenopus* morphogenesis. *Dev. Growth. Differ.* **63**(8):429-438. doi: 10.1111/dgd.12748.