

器官形成における間充織 - 上皮転換と低分子量Gタンパク質
Rho ファミリーの役割：ニワトリ体節分節をモデルとした解析

仲矢 由紀子

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子発生生物学講座

(安田 國雄 教授)

平成16年8月6日提出

要旨

発生初期において組織や器官が形成される際には、個々の細胞が増殖や遊走、さらに凝集といった過程を通じて、その位置や形態をダイナミックに変化させ、近隣の細胞と相互作用する。特に、細胞が上皮と間充織という形態的に異なった2つの状態を移行する現象、上皮-間充織相互転換 (EMT/MET) は、形態形成あるいは器官形成過程において重要なプロセスであり、これらは時間的・空間的な秩序のもとで制御されていると考えられている。例えば、中胚葉陥入 *mesoderm ingression*、神経管からの神経堤 *neural crest* の遊走は、*in vivo* において上皮細胞から間充織細胞への転換 (EMT) が起こる典型例であり、また体節や腎管の形成には、間充織細胞から上皮細胞への転換 (MET) が関わっていることが知られている。このような3次元の器官構築の際に起こる細胞のダイナミックな形態変化を制御するメカニズムについて、これらが細胞レベルでどのように調節されているかという問題は、個体の形づくりを理解する上で重要であると考えられている。

脊椎動物では、初期発生過程において体の前後軸に沿った繰り返し構造が認められるが、これらは、すべて体節中胚葉の分節パターンを基盤としている。この分節構造は、前体節中胚葉と呼ばれる組織の前方側から、体節が順にくびれ切れることにより形成される。その際、間充織細胞から成る一続きの組織の中で次の分節境界の前側に位置する細胞が、間充織から上皮細胞へと形態変化 (MET) を起こし、その結果として球状の体節ができあがる。本研究は、この体節分節が3次元の器官形成に関わる MET を理解するための優れた組織であると考え、ニワトリ初期胚の体節中胚葉の分節化を利用して、*in vivo* における細胞の間充織-上皮転換 (MET) 機構を解明することを目的とした。その理由としては、1) 体節中胚葉が上皮細胞と間充織細胞の2種類の細胞から成る単純構造であり、2) 分節化は、MET が胚の前方から後方へと連続的かつ周期性をもって繰り返され、3) この間、細胞の増殖や遊走がほとんど認められず、規則的な細胞の形態変化および極性変化を経時的に観察することが可能である、という3点が挙げられる。さらに、この MET が、代表的な細胞骨格タンパク質であるアクチンの動的な再構築を伴うことから、これらの制御メカニズムは、アクチン細胞骨格の再構築を介して細胞形態を制御する分子群が関係する可能性が考えられた。その候補分子としては、低分子量Gタンパク質 Rhoファミリー (Rho, Rac, Cdc42) が挙げられる。Rhoファミリーは、主としてアクチン細胞骨格の再編成が関与する細胞機能を制御することが、培養細胞を用いた数多くの研究から知られているが、*in vivo* において、これらがどのような組織や細胞をターゲットとして機能するかについてはほとんど明らかにされていない。本研究ではこれら分子に着目し、分節化への役割について検討した。

最初に、研究を進めていくにあたり、体節中胚葉組織への外来遺伝子導入が必須

となることから、すでにニワトリ胚の頭部外胚葉に対して汎用されている *in ovo* エレクトロポレーション法に改良を加え、体節中胚葉に特異的かつ、効率のよい遺伝子導入を可能にした。この方法を用いて、RhoA, Rac1, Cdc42 のそれぞれ野生型 (WT-)、恒常的活性型 (CA-)、不活性型 (DN-) の合計 9 種類の遺伝子を体節中胚葉に GFP 遺伝子と共導入した。その結果、Rac1 と Cdc42 について興味深い結果が得られた。コントロール実験として体節内に GFP のみを導入した場合、GFP は体節構成細胞の 30~60%の細胞にモザイク状に発現した。分節化を遂げた正常体節は、表面が上皮細胞に覆われた球状を呈しており、内部には間充織細胞が存在している。モザイク状の GFP 発現細胞は、形成された体節の表面を覆う上皮細胞領域と内部の間充織領域の両方に均一に分布した。WT-Cdc42 を体節に導入した場合、遺伝子を発現した細胞は、コントロール実験と同様に体節の上皮および間充織領域の両方にランダムに存在していた。興味深いことに、CA-Cdc42 を強制発現させた細胞は、間充織領域にのみ認められ、逆に Cdc42 を阻害すると細胞はほぼすべて上皮化するという相補的な結果が得られた。これらの結果から、正常な分節化過程において、Cdc42 の活性化レベルが低い場合は上皮化へ、高い場合は間充織形態の維持、というように Cdc42 の活性化レベルに応じて細胞形態が制御される可能性が考えられた。また Rac1 について同様に解析した結果、CA- Rac1 および DN-Rac1 発現細胞のいくつかは、上皮領域において認められたが、主として体節内部の間充織領域に優先的に存在した。さらに CA-Rac1 発現細胞においては N カドヘリンの発現量の増加や細胞内分布が異常になり、DN-Rac1 発現細胞においては F アクチンの重合が異常であった。これらの結果から、本来の体節分節において、Rac1 は細胞骨格やカドヘリンの分布を制御して上皮化に関与しており、これには Rac1 の活性化レベルが厳密に調節されることが必要であると考えられた。次に分節化過程における Rac1 の活性化を検出するために GST 融合タンパク質沈降法を試みた結果、体節板を含む組織から活性型 Rac1 が検出された。これにより正常な分節化過程において、実際に Rac1 が活性化されている可能性が強く示された。最後に、分節化には様々な転写因子が関与することが知られており、とりわけ bHLH 型転写因子 Paraxis は、上皮化に必要であることがノックアウトマウスを用いた研究から報告されている。本研究において、Paraxis をトリの体節細胞に過剰発現させると上皮化を促進させることが明らかになった。さらにこの上皮化作用は、Paraxis と DN-Rac1 を共導入することにより中和されることから、Paraxis の上皮化作用は、Rac1 シグナルを必要とすることを見いだした。体節分節をモデルとして得られたこれら Cdc42 と Rac1 の特異的な機能は、多くの形態形成過程でみられる細胞の上皮-間充織相互転換 (EMT/MET) を理解する糸口となり、曳いては、ほとんどの細胞種に普遍的に存在するにもかかわらず、器官形成における役割が未だ明らかにされていない Rho ファミリー分子の機能解明を促すものになると期待される。

目次

第1章 序論.....	1
発生初期における器官・形態形成と間充織—上皮相互転換.....	1
EMT/MET のメカニズムはどこまで明らかにされているのだろうか?	2
MET 研究のモデルシステムとしての SOMITOGENESIS.....	6
RHO ファミリーはアクチンの再構築を介して細胞形態を制御する	10
本研究の目的.....	14
第2章 結果.....	15
エレクトロポレーションによる体節中胚葉組織への遺伝子導入法の確立.....	15
体節形成における低分子量 GTPASES RHO ファミリーの役割	16
■ コントロール実験.....	17
■ 体節形成過程における <i>Cdc42</i> 変異体の影響.....	18
■ 体節形成過程における <i>Rac1</i> の影響.....	23
■ <i>EM index</i>	24
RAC1 の恒常的活性化は N-CADHERIN の集積と上皮極性に影響する	25
DN-RAC1 および CA-CDC42 発現細胞におけるアクチンの重合能の違い	28
RAC1 および CDC42 発現細胞では細胞死が起こっていない.....	31
正常な体節形成過程における内在性 RAC1 および CDC42 の活性化.....	33
異なった DEVELOPMENTAL CONTEXT における CDC42 と RAC1 の役割.....	35
RHOA の機能は、中胚葉形成期に必要なかもしれない.....	38
RAC1 シグナリングと体節形成関連遺伝子の発現.....	39
転写因子 PARAXIS による上皮化は RAC1 シグナリングを介する	40
第3章 考察.....	42
体節分節は MET 研究の新規 IN VIVO モデルである.....	42
体節形成時の MET における RAC1 と CDC42 の異なった役割.....	44
予期せぬ出来事 ---分節化過程では細胞のソーティングが起こっている? ---	45
RAC1 と CDC42 の活性化を特異的に調節する分子.....	47
胚の発生過程における RAC1 と CDC42 の機能	49
今後の展望.....	50

第4章 材料および方法	51
実験動物	51
体節および未分節中胚葉（体節板）への遺伝子導入(図 25)	51
プラスミド	53
ニワトリ胚の免疫染色	54
ファロイジン染色	55
体節細胞の初代培養	55
TUNEL 法	56
IN SITU ハイブリダイゼーション	56
GTP 結合型 RAC1 の検出	58
謝辞	61
参考文献	62

第1章 序論

発生初期における器官・形態形成と間充織—上皮相互転換

ほとんどの生物種において胚の細胞は、形態学的見地から上皮性epithelialか間充織性mesenchymalとみなすことができる。上皮はシート状の細胞であり、基底膜上に配置され、各細胞は隣の細胞と特別な結合装置で結合しており、先端—基底膜方向の極性を示す。これに対して、間充織は疎な細胞外基質の中に埋まっている散在性の星状細胞集団として存在する(図1A)。上皮細胞と間充織細胞は、内・中・外胚葉すべてから派生しており、細胞骨格のダイナミクスや接着性の違いにより多様な器官を構築する立役者である。そして、胚の発生初期における器官形成過程においては、個々の細胞が増殖や遊走、さらに凝集といった挙動を通じて、その位置や形態を変化させ、近隣の細胞と相互作用する。この過程において、上皮と間充織間を移行する上皮—間充織相互転換は、形態形成あるいは器官形成を統治する基本的かつ重要なプロセスであると考えられている。例えば、その典型たる例を挙げると、羊膜類におけるepiblastが、mesenchymal mesodermに転換する中胚葉陥入mesoderm ingressionや、表皮外胚葉からの神経堤細胞neural crest cellの形成(Locascio and Nieto, 2001; Nieto, 2002; Nieto et al., 1994)、さらに心臓の弁形成(Timmerman et al., 2004)は、細胞が上皮を離れてバラバラになるか、あるいは、間充織様の細胞塊として移動するEMTの例である(図1B)。そして、このEMTは、発生初期における形態形成に対して重要であるだけでなく、癌の進行cancer progression中に起こる転移や浸潤に直接的に関与しており、近年、特殊な癌細胞株を用いた研究からEMTの機構や関連する分子について解析が行われてきた(Lozano et al., 2003; Price and Collard, 2001; Thiery, 2002)。一方、間充織—上皮転換 (MET) もまた、様々な器官形成の際に見られる。例えば羊膜類の腎臓(後腎)の形成は、尿管芽ureteric budと呼ばれる組織が中間中胚葉由来の間充織細胞に向かって成長、分枝し、最終的に上皮のチューブ(管)を作ることが知られている。この過程においては、間充織は凝集してクラスターを形成した後、上皮に転換して管構造を形成する(Stark et al., 1994)。そして、体節形成の際には、未分節組織の間充織細胞が上皮細胞へと形態を変化させ、最終的に上皮細胞で包まれた球形の体節が産まれる(Gossler and Hrabe de Angelis, 1998)(図1C)。このようにEMT/METは、多様性に富んだ組織・器官が構築されるために時間的・空間的に厳密に調節されている。これらの分子メカニズムを細胞レベルで理解することは、発生生物学の分野において、大変意義深いことであると考えられる。

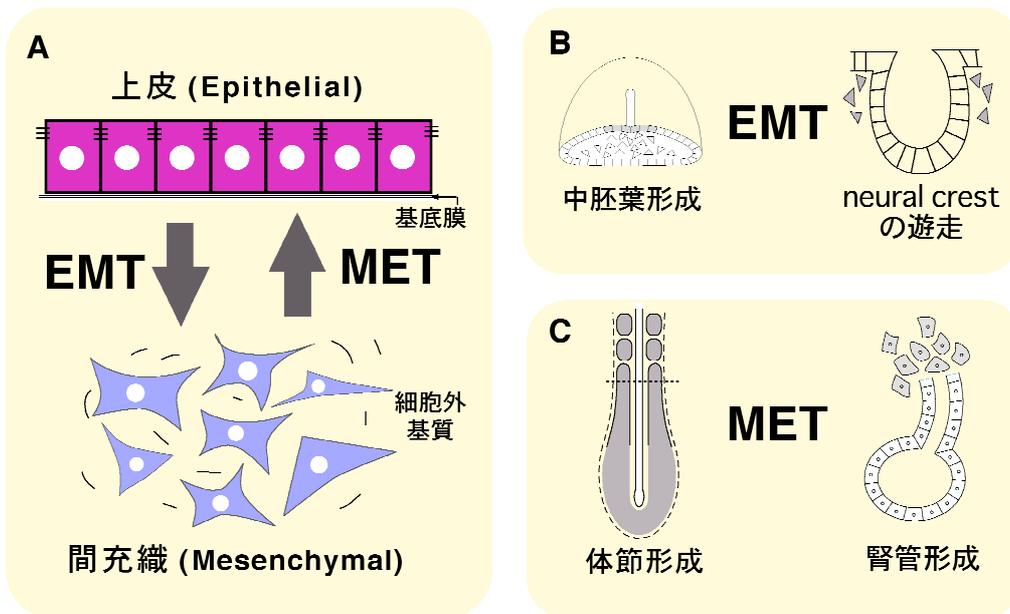


図1 発生初期の器官形成過程における上皮—間充織相互転換

A:上皮はシート状の細胞であり顕著な先端—基底方向の極性を示す。これに対して間充織は散在性の星状細胞集団である。BおよびC: 発生初期における EMT と MET の例。

EMT/MET のメカニズムはどこまで明らかにされているのだろうか？

培養細胞における EMT

このような背景から、近年、EMT/MET に関わる分子メカニズムについての知見が蓄積されつつある。ことに EMT に関しては、上皮系の株細胞であるイヌの腎上皮細胞 Madin-Darby canine kidney (MDCK)細胞が繊維芽細胞のコンディショニングメEDIUMで培養した場合、移動性の繊維芽細胞様に形態を変えるという発見 (Stoker and Perryman, 1985)をきっかけとして、それ以来、MDCK 細胞等のほ乳類上皮細胞、あるいは特殊な癌細胞株を用いて、EMT の分子メカニズムに迫る報告が多数なされている。これらは、細胞の形態的な変化に加えて、上皮マーカーの E-cadherin や $\beta 4$ -integrin 等の発現が低下し、代わりに間充織マーカーの vimentin, fibronectin, α smooth muscle actin の発現が上昇するという実験的証拠から EMT と定義づけているようであり、これによって、他の細胞の形態変化を伴う現象とは区別されている。例えば、細胞の scattering という現象では、上皮と間充織マーカー分子の発現に変化が認められない。つまり、EMT 研究では、E-cadherin の発現量の変化を中心にして、これを導き出す細胞外からのシグナルが最終的に核に伝達されるメカニズムについて終始していると言っても過言ではない。これらの知見の大半は、Transforming growth factor β (TGF β)を含む各種細胞増殖因子による細胞外シ

グナルと、E-cadherin の転写制御に関するものである(Thiery, 2002; Thiery, 2003)。TGF- β シグナリングと E-cadherin の転写制御について以下の報告がある。

■ TGF- β signaling と EMT について

ほ乳類の上皮細胞株や特殊な癌細胞株を用いた研究から、TGF- β は Ras signaling と協調して EMT を惹起することが知られている。例えば、Ras が恒常的に活性化状態であるマウスの上皮細胞を TGF- β で刺激すると、紡錘形の間充織様形態に変化する。これらの細胞では、E-cadherin、 β 4-integrin の発現が低下すると同時に、vimentin の発現が顕著に上昇する。この EMT には、TGF- β の下流で Raf/ MAPK pathway が関連している(Janda et al., 2002)。また、腫瘍細胞株を用いた実験では、1) TGF- β signaling 系の転写因子 Smad2 の活性化が細胞遊走を惹起すること、2) 転写因子は核で機能を発揮するが、H-ras が Smad2 の核での蓄積に必要であることが示されている。このことから、Smad2 と H-ras は協調して EMT に関与し、腫瘍の浸潤、転移に関わる可能性が示されている(Oft et al., 2002)。さらに、表皮由来の上皮細胞においても、TGF- β /Smad によって EMT が誘発されるが、この時、Notch シグナリング系の Hey1 (hairy/enhancer-of-split 関連 bHLH 型転写抑制因子) と Notch リガンドの 1 つである jagged1 の発現が誘導される。さらに、TGF- β /Smad による EMT は、HEY1 と JAG1 の RNA silencing 実験により阻害されることが明らかにされた(Zavadil et al., 2004)。in vivo EMT における TGF- β /Smad および Notch シグナリングの機能については後述する。

■ E-cadherin の発現調節/Snail, E2A products, SIP1 の役割

E-cadherin の発現調節は、特異的な転写因子の同定により説明されている。特に、Snail ファミリーという zinc-finger を持つ転写抑制因子群のメンバーによる E-cadherin 発現調節機構が、培養細胞のみならず様々な生物種において非常によく研究されている(Nieto, 2002)。Snail ファミリーの中核である Snail は、E-cadherin プロモーターの E-box を介して E-pal element に特異的にかつ強く結合し、E-cadherin の転写を抑制することが報告されている(Batlle et al., 2000)。実際に、マウス浸潤性癌細胞株においては、この Snail の発現が認められ、E-cadherin の発現は欠失しているが、上皮性を保つ細胞株では Snail の発現は認められないが、E-cadherin は発現する。他の Snail ファミリーである Slug もまた、E-cadherin のプロモーター領域の E-pal element に結合し、E-cadherin 転写を抑制する(Bolos et al., 2003)。このように、Snail や Slug による E-cadherin の転写抑制は、EMT に大きく貢献し、癌の浸潤、転移などに関わる可能性が提唱されている(Bolos et al., 2003; Cano et al., 2000)。Snail ファミリー以外に E-cadherin の転写を抑制する因子としては、zinc-finger protein で

ある Sip1 がある。この転写因子は、TGF- β とチロシンキナーゼレセプターシグナリングにより調節されている(Comijn et al., 2001)。さらに、転写調節因子 E2A は、遺伝子産物として E12/E47 (bHLH 型転写因子) をコードしている。この E12/E47 が、EMT が起きる際に E-cadherin の E-pal element に結合して転写を抑制することが示された(Perez-Moreno et al., 2001)。この E-cadherin 転写制御については、別のグループから TGF- β シグナルを絡めたメカニズムが報告された(Kondo et al., 2004)。TGF- β シグナルが入らない場合、E12/E47 は Id (Inhibitor of differentiation) タンパク質とダイマーを形成し、不活化されている。一方、Id タンパク質の発現は TGF- β により劇的に抑制される。このため、E12/E47 は Id タンパク質とのダイマー形成が不可能となり、E-cadherin の転写抑制に機能を発揮する。

In vivo における EMT

in vivo における EMT 研究は、そのほとんどが neural crest cell の遊走や中胚葉形成時に起こる現象に集中しており、事実、これに関わる因子がいくつか同定されている(Locascio and Nieto, 2001; Nieto, 2002)。その中で、Snail ファミリーが重要な役割を持つことが知られているが、例えば、Snail のノックアウトマウスでは、中胚葉形成不全になる(Carver et al., 2001)。興味深いことに、ニワトリでは Slug が Snail に代わり同様の機能を果たしている(Bolos et al., 2003; del Barrio and Nieto, 2002)。

トリ胚において、Slug は neural crest および epiblast から遊走した中胚葉細胞において発現しており、それぞれの形成過程に関与することが示唆されている(Nieto et al., 1994)。この Slug をトリの神経管に強制発現させると neural crest cell が過剰に形成されたことから、この時の EMT に Slug が関わることを示唆されている。さらに、neural crest cell では、RhoB の発現が上昇しており、RhoB の機能が細胞遊走の引き金となる可能性が考えられた(del Barrio and Nieto, 2002; Liu and Jessell, 1998)。

TGF- β から Notch へのシグナリングは、in vivo においては、心臓の弁が形成される際にみられる EMT で役割を持つ。この時の EMT は TGF- β で誘発されるが、Notch シグナリング系の RBPj κ の変異マウスでは、本来心臓の弁となる細胞集団において、snail 発現が正常マウスと比較して減少しており、VE-cadherin が細胞間に発現し続けている。これらの細胞では、細胞間接着が異常に強固になった結果、EMT が正確に起こらない。また、心臓全体において、TGF- β 2 の発現も低下した(Timmerman et al., 2004)。

培養細胞における MET

EMT に関する研究が蓄積されていく中、MET に関わる分子メカニズムの解明は、かなり遅れをとっている。in vitro の培養細胞を用いた実験系でさえ、極性も形態もランダムな間葉系細胞が、秩序だった上皮形態に変化する様子を観察することは困難であるのか、MET 研究を飛躍的に前進させる実験システムは確立されていない。最近、E-cadherin に変異が導入された腸の上皮細胞株を使った実験で、上皮極性獲得への新たな分子メカニズムが報告された(Baas et al., 2004)。LKB1 (セリン/スレオニンキナーゼ)とこれを活性化して核から細胞質への運搬に関与する STRAD というアダプタータンパク質は、E-cadherin に変異が導入されたためにランダムな極性を持つ腸由来の細胞において、上皮極性の獲得に関与し、しかも細胞間接着や細胞基質間接着がなくても、この株細胞に上皮極性を形成させる、という驚異的な内容である。しかし、この報告には MET に関する記載はなく、本来上皮細胞であったものが、接着分子(E-cadherin)に変異が導入されることで極性を失い、それが然るべき因子の導入により回復した、ということなのかもしれない。しかし、このような研究を基本として、培養細胞による MET 研究の実験系が立ち上がることを期待したい。

In vivo における MET -Wnt signaling と腎臓形成-

in vivo における MET は、前述したように、発生過程の腎臓にみられるような管形成時に起こる。この現象では、腎管から派生した尿管芽 ureteric bud と呼ばれる組織が中間中胚葉由来の間充織に向かって成長、分枝する過程において、これら間充織は凝集してクラスターを形成した後、上皮に転換して管構造を形成する。1994年の Stark らの報告では、Wnt-4 のノックアウトマウスでは、チューブができる前の間充織の凝集がほとんどおこらないことから、Wnt-4 が腎臓形成時の MET 誘発因子として作用すると議論している(Stark et al., 1994)。この表現型に関わる分子メカニズムは未だ明らかではないが、培養細胞では、Wnt4 signaling は、 β カテニンの細胞内蓄積を介して転写因子 TCF を活性化する β カテニン経路が関わっている可能性が示された(Lyons et al., 2004)。

このように、初期発生や癌の進行に関わる EMT/MET を統御するメカニズムについて知見は集まりつつあるが、これら解明には未だ混沌とした部分が多く残っている。特に、脊椎動物における EMT/MET は、研究がほとんど進んでいない。この現状について説明するとすれば、発生中の組織や器官を in vivo で 1 つ 1 つのユニットとして分けて実験することは困難である。反対に組織を取り出し in vitro で維持しながら実験することは、昨今コラーゲンカルチャーにより 3次元での培養が可能

になってきた(Bissell et al., 2003)。しかし、これが真に *in vivo* を反映しているわけではない。つまり、EMT/MET という問題を直接アドレスできる可能な実験系がほとんど見あたらないのである。また、EMT/MET は文字どおり細胞形態の変化を伴うことから、必ずや細胞骨格系のタンパク質がダイナミックに再構築されているはずである。しかしながら、前述した TGF- β や Ras、Notch 等々の核に伝えられたシグナルが、細胞骨格の再構築に関連する分子に伝わることを証明した報告はほとんどなされていない。近年では遺伝学を駆使した *Drosophila* や遺伝子の過剰発現や RNA interference(RNAi)による遺伝子のノックダウンが可能である *Zebrafish* や *Xenopus* といったモデル動物を使って、発生初期の gastrulation にみられる EMT を論じている報告が増えている(Barrios et al., 2003; Smallhorn et al., 2004; Yamashita et al., 2004)が、いずれも組織レベルで説明されており、細胞レベルで EMT 分子メカニズムが理解されているわけではない。このような背景から、本研究の目的は、*in vivo* において EMT/MET メカニズムを細胞レベルで解析することにある。

MET 研究のモデルシステムとしての Somitogenesis

すべての脊椎動物には、その初期発生過程において体の前後軸に沿った繰り返し構造が認められる。特に体幹部におけるくり返し構造（分節構造）は、将来の脊椎骨や肋骨、脊髄神経に代表されるようなからだの基本構造に対する青写真となることから、からだ作りの過程において、最も基本的な現象の一つとして扱われるべきものと思われる(Christ and Ordahl, 1995; Takahashi, 2004)。体節自体は脊椎骨、肋骨および骨格筋を形成する。

ニワトリの場合、この分節構造は、発生初期の原腸陥入により形成される中胚葉のうち、前後軸に沿って神経管の両側に長く伸びる組織（前体節中胚葉、若しくは体節板とも呼ばれる）を起源とし、図 2 に示すように、体節と呼ばれる左右対称に対をなした集塊が、体節板の前側より順番にくびり切られることによって、幾何学的な構造が作られていく。これを分節化と言う。

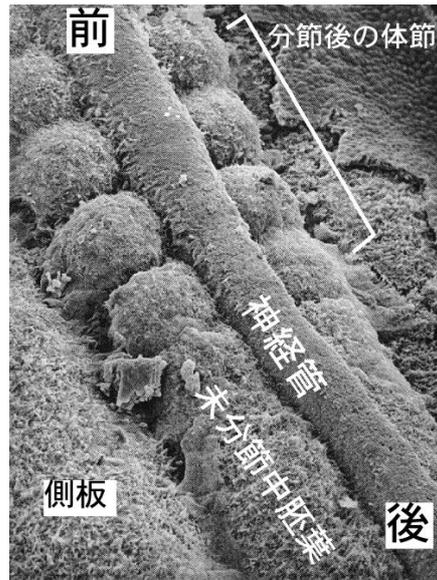


図2 ニワトリ初期胚の体節および前体節中胚葉（体節板）

走査型電子顕微鏡でみたニワトリ胚背側表面を示す。中央に分節性のない神経管と、その両側に節状に対になった体節が認められる。その後ろ側には、まだ分節していない前体節中胚葉（体節板）がある。(Gilbert SF, *Developmental Biology* 5th Ed: 2000 より改変)

ニワトリ胚における体節中胚葉は、分節直後の体節間境界を挟んでその前側と後側では細胞の形態が異なっている。前側が上皮構造を示すのに対して、境界を越えた後側の体節板では間充織構造を示している(図3)。分節化は、形態学的には、一続きの間充織様の体節板の前端から1体節分の間隔をあけた部位を境界線として、その前側に位置する細胞が上皮様細胞へとその形態を瞬間的に変化させる。つまり、この時にMETが起こる。その結果として上皮細胞に囲まれた一定の大きさの細胞塊が分離していく(Gossler and Hrabe de Angelis, 1998)。また、興味深い事実として、体節はある一定の周期(ニワトリ胚では約90分)で規則正しく形成されることが挙げられる。本研究は、このような特徴を持つ体節分節が3次元の器官形成に関わるMETを理解するための優れた組織であると考え、ニワトリ初期胚の体節中胚葉の分節化を新規の*in vivo*モデルシステムとして、細胞の間充織-上皮転換(MET)機構を解明することを目的とした。その理由としては、1) 体節中胚葉は、同じ細胞(胚盤葉 blastoderm)を起源とする上皮細胞と間充織細胞の2種類の細胞から成る単純構造であり、2) 分節化は、METが胚の前方から後方へと連続的かつ周期性をもって繰り返される。3) この間、細胞の増殖や遊走がほとんど認められないので(Primmatt et al., 1989)、細胞の形態変化あるいは極性変化を経時的に観察することが可能である、という点が挙げられる。

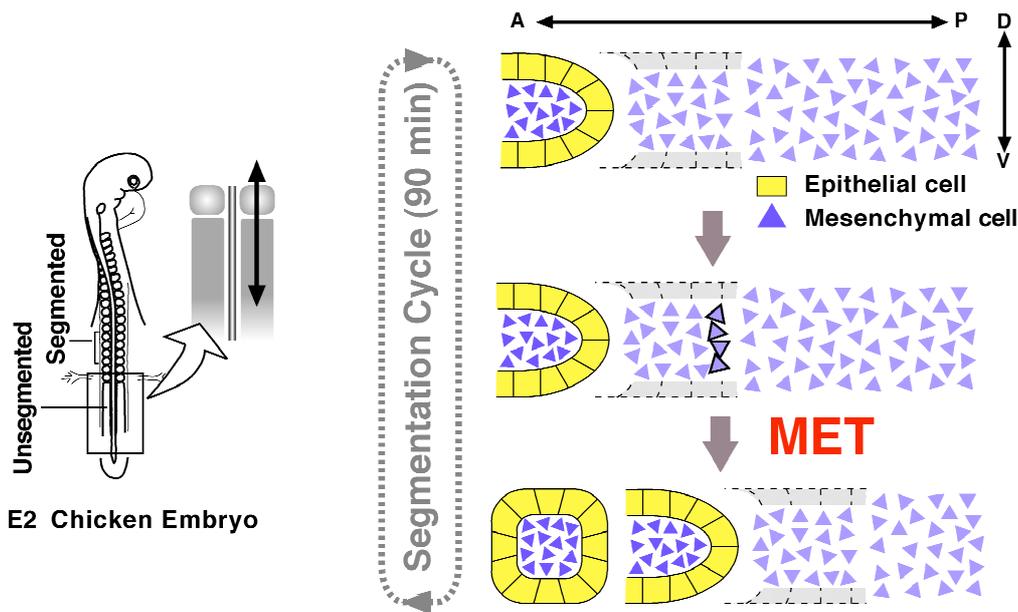


図3 ニワトリ体節中胚葉の分節化過程（模式図）

分節化過程においては、間充織様の体節板の前端から1体節分の間隔をあけた部位を境界線として、その前側に位置する間充織細胞(黒囲み△)がMETを起こし、結果として上皮細胞で覆われた体節ができあがる。ニワトリ胚の体節は、約90分周期で前側から規則正しく形成される。

いったいどのような機構が働いて、分節時に起こる細胞の形態変化あるいは極性変化を制御しているのだろうか？近年、体節分節はダイナミックな遺伝子発現の変化が繰り返されていることが明らかになった(Bessho and Kageyama, 2003; Pourquie, 2001; Saga and Takeda, 2001; Takahashi, 2004)。一方、これらの遺伝子発現が90分間でオン/オフを繰り返したとしても、それらが実際に翻訳され機能をもつタンパク質となるまでには、この時間で充分かどうかについて議論が残っている。体節形成過程における、間充織が上皮化するという細胞形態の変化(MET)に焦点をあてるとすれば、これらは瞬時に起こるので、例えば遺伝子の転写や翻訳を介さない情報伝達系による細胞骨格系タンパク質の再編成が影響する可能性が考えられた。体節中胚葉の縦切片をアクチンフィラメントと特異的に結合するファロイジンを用いて染色すると、上皮細胞の頭頂側が強く染まっており、間充織のアクチンフィラメントの分布とは明らかに異なっていることがわかる(図4)。これらのことは、電子顕微鏡を用いた詳細な解析からも明らかにされている。例えば、上皮構造をとる細胞群では、アクチン繊維の束からなるストレスファイバーが頭頂側に観察され、円柱状の細胞形態を示している。また、微小管は細胞の長軸方向にそって伸長しており、基底面-核-ゴルジ体という上皮的極性が認められる。このような上皮細胞の特徴に対

して、体節板の間充織細胞は、細胞間接着部位がまばらに見られる程度で、細胞形態も特徴的ではない(Murakami et al., 1989)。このように、分節時に MET を起こす細胞では、アクチンフィラメントのダイナミックな変化が起こり、これが間充織から上皮へと細胞の形態変化を導いている可能性が強い。図 4 に示すファロイジン染色像において、「0」位より前側の細胞（まさに分節が起ころうとしている領域）では、いくつかの細胞において、アクチン集積が徐々に進行している様子が見える。この変化は何が引き金となって起こり、どのような分子群が関わっているのだろうか？最有力候補としては、アクチン細胞骨格の再編成を介して、細胞形態を制御することが知られている低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーが挙げられる。

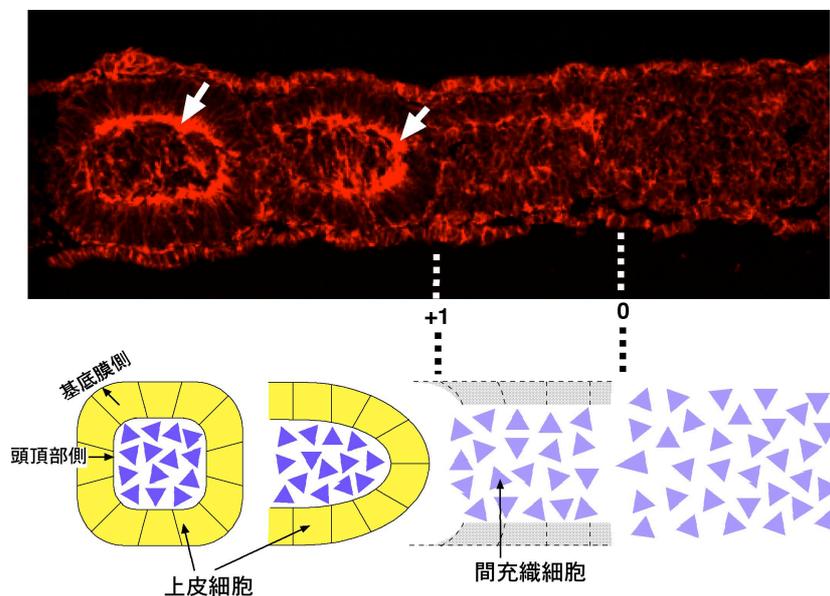


図 4 ニワトリ体節中胚葉のファロイジン染色像

ニワトリ 2 日胚体節中胚葉の縦切片を Alexa Fluor 568 phalloidin で染色し F アクチンの集積を観察した。F アクチンは、体節の上皮細胞の頭頂部側（矢印）に集積するが、間充織組織ではこのような特徴的な集積はみられない。下図：模式図

Rho ファミリーはアクチンの再構築を介して細胞形態を制御する

■ 低分子量 G タンパク質 Rho ファミリー

低分子量Gタンパク質 Rho ファミリーは、Rho、Rac、Cdc42をはじめ、ほ乳類では20種類のメンバーが報告されており、主として細胞骨格や細胞接着の制御を通じて細胞の形態調節、極性の獲得、運動、エンドサイトーシス、小胞輸送等に関わるGタンパク質である(Etienne-Manneville and Hall, 2002)。これらは、三量体Gタンパク質と同様にGTP結合活性型とGDP結合不活性型の間でサイクルしている(図5A)。通常Gタンパク質は、GDP-GTP交換因子(GEF: guanine nucleotide exchange factor)により活性型になり、それぞれに特異的な標的タンパク質に結合し機能を発揮する。また、GTPases活性化因子(GAP: GTPase activating protein)により内在性のGTPase活性が促進され、GTPを水解して不活性型になる。また、不活性型の時は、それを特異的に認識して結合するGDI(GDP dissociation inhibitor)と複合体を形成し、細胞質に局在することが知られている。Rhoファミリーは、時間的、空間的にその活性が制御されており、それには前述のGEFとGAPあるいはGDIが重要な役割を果たしている。つまり、細胞膜上の受容体にリガンドが結合するとシグナルはGEFに伝えられ、Rhoファミリー分子がGTP結合型(活性型)となる。この活性型は、しかるべき時間内に標的タンパク質と相互作用して、その後は不活性化される。さらに、これらの過程が細胞膜近傍で行われるために、RhoファミリーメンバーのC末端から4番目のアミノ酸残基システインが、ファルネシル基やジェラニルジェラニル基などの脂肪酸でファネシル化されており、この脂質修飾により、細胞膜に直接結合できると考えられている(Adamson et al., 1992)。

■ Experimental manipulation

現在までに、個々のRhoファミリーGTPaseの生物学的な活性について、様々な方法で研究されているが、一般的に用いられている道具 tool としては、バクテリアの毒素並びに各メンバーの恒常的活性型および不活性型変異体がある。Rac1に関して例を挙げると、Rac1の12番目のGlnをValに置換した変異体、同様に61番目のGlyをLeuに置換した変異体は、両者ともにRacが内在的に持つGTPase活性およびGAPによるGTPases活性を妨げることで、恒常的にGTP結合型として存在する。反対に、Rac1の17番目のThrをAsnに置換した変異体を細胞内に発現させた場合、この変異体と内在性のRacがGEFとの結合を競合する。その結果、下流の標的に結合できないGEF-RacN17Tの複合体が形成される(Feig, 1999)。以上の恒常的活性型および不活性型変異体を活用することにより、現在に至るまでRhoファミリーの生物学的な機能について莫大な数の知見が報告されている。最近ではRNAiテクニックを使って、内在性のRhoファミリーの機能を阻害する試みがある

が(Dalpe et al., 2004; Noritake et al., 2004)、まだまだその報告は少ない。

■ アクチン細胞骨格に対する機能

Rho ファミリーの機能は、繊維芽細胞などの培養細胞のアクチン細胞骨格に対する作用の研究を発端として始まった。その中で Rho はストレスファイバー、Rac はラメリポディアとメンブレンラッフリング、Cdc42 はフィロポディア形成を引き起こす(Kozma et al., 1995; Nobes and Hall, 1995; Ridley and Hall, 1992a; Ridley and Hall, 1992b) (図 5B)。加えて、これら 3 種類の GTPases は、焦点接着 focal adhesion と呼ばれる細胞基質間接着の形成に関わっている(Hotchin and Hall, 1995; Nobes and Hall, 1995)。このようなアクチンを基本とした構造体や接着装置は、様々な細胞反応に貢献している。細胞表面における Rac によるラメリポディアや integrin 接着複合体の形成は、membrane protrusion を導き、これは細胞移動に対して不可欠なものである(Small et al., 2002)。Rac によるアクチン重合までのメカニズムは、多大な関心が集まるところである。近年、多大な数の標的タンパク質が同定されているが、その中において、IRSp53、PI-5-kinase、p65PAK が de novo のアクチンの核化 nucleation を触媒する Arp2/3 複合体にシグナルを伝え、ラメリポディア形成につながる新しいアクチンの枝分かれ構造を形成することが明らかになった(Condeelis, 2001)。IRSp53 は、Rac と WASP ファミリーに属する WAVE/Scar の両方と相互作用して、Rac 活性を WAVE/Scar に伝える(Miki et al., 2000)。尚、運動中の細胞の先端でみられる integrin 接着複合体の形成メカニズムは、ほとんど未解明である。一方、Cdc42 によるアクチン重合は、Cdc42 に特異的標的タンパク質である N-WASP を介して行われる。N-WASP は Cdc42 結合依存的に Arp2/3 複合体を活性化してアクチン繊維形成を促し、結果としてフィロポディア形成を引き起こす(Miki et al., 1998; Takenawa and Miki, 2001)。Cdc42 によるフィロポディアは、安定した方向性のある細胞移動に必須であると考えられていることから、遊走中の細胞に方向性を持たせることに一役かっている。例えば、マクロファージは chemotactic factor の濃度勾配に応じて遊走することが知られているが、Cdc42 が阻害された時には細胞移動の方向性は失われる(Allen et al., 1998)。

以上のように、Rho ファミリーメンバーにより形成されたそれぞれの特徴的なアクチン構造体は、細胞の運動性に大きく影響する。細胞は Rac と Cdc42 によるラメリポディアとフィロポディアによって細胞の先端端で膜の伸展を促進する。続いて先端端で接着分子を介した新しい細胞外基質への接着斑 Focal Adhesion の形成を行い、細胞の後方部では RhoA-Rho キナーゼによるアクトミオシンの収縮作用により細胞後部の牽引を起こすことにより前進する。これは、RhoA、Rac、Cdc42 とそれらの標的タンパク質の連携した動きが速やかな細胞運動を推進した結果である。

これら *in vitro* の細胞培養系でみられる Rho ファミリーの機能は、*in vivo* においてはどのように発揮されているのだろうか？最もクリアーな実験系として、*Drosophila* における成長円錐のガイダンスにおける Rho ファミリーの役割が遺伝学的な解析から報告されている。これによると、Rac1 は成長円錐が正しいターゲットを見つけるのに必要であることが明らかになった(Ng et al., 2002)。さらに、Rac1 の機能を阻害すると *Drosophila* 卵巣 ovary の border cell の migration が異常になる(Murphy and Montell, 1996)。

細胞運動のみならず、Rho ファミリーは上皮細胞における細胞間接着、上皮極性の構築などにも影響をもたらす(Braga, 2000; Braga, 2002)。細胞間接着の中で特にタイトジャンクション(TJ)およびアドヘレンスジャンクション(AJ)は、上皮細胞の頭頂部-基底部軸に沿った極性を特徴づけるための重要な細胞間結合装置である。TJ は最も頭頂側に存在する膜ドメインで、イオンや分子の通過を制御している。AJ は、TJ よりも基底膜側に位置しており、アクチンフィラメントが密に結合する細胞間接着であり、細胞同士の選択的接着を担い、形態形成などに大きく寄与する。これまでに Rho, Rac, Cdc42 は、カドヘリンを介した細胞接着を調節していることから、AJ の形成に重要であることが明らかにされている(Braga, 2002; Fukata and Kaibuchi, 2001)。例えば、ケラチノサイトへの不活性型 Rac1 のマイクロインジェクションは、細胞間接着部位におけるカドヘリンとアクチンの集積を減少させる(Braga, 1997)。また、活性型 Rac1 を stable に発現させた MDCK 細胞では、細胞間接着部位に E-cadherin、アクチン、 β catenin がそれぞれ過剰に集積することが報告されている(Takaishi et al., 1997)。Cdc42 においても Rac と同様に細胞間接着部位における役割が報告されている(Kodama et al., 1999)。さらに、最近では cadherin やこれと協調して AJ 形成に関わる nectin が、Rac や Cdc42 を活性化することも報告された(Kawakatsu et al., 2002; Nakagawa et al., 2001)。Rac や Cdc42 のこのような機能は、*in vivo* のどのような現象に寄与するのであろうか？また、前述した Rac と Cdc42 によるラメリポディアやフィロポディア形成がこのような細胞間接着の形成に役割を持つらしい(Ehrlich et al., 2002)。線虫の表皮細胞の sealing や *Drosophila* における dorsal closure においても、細胞から現れるラメリポディアやフィロポディアが観察されている(Jacinto et al., 2001; Raich et al., 1999)。

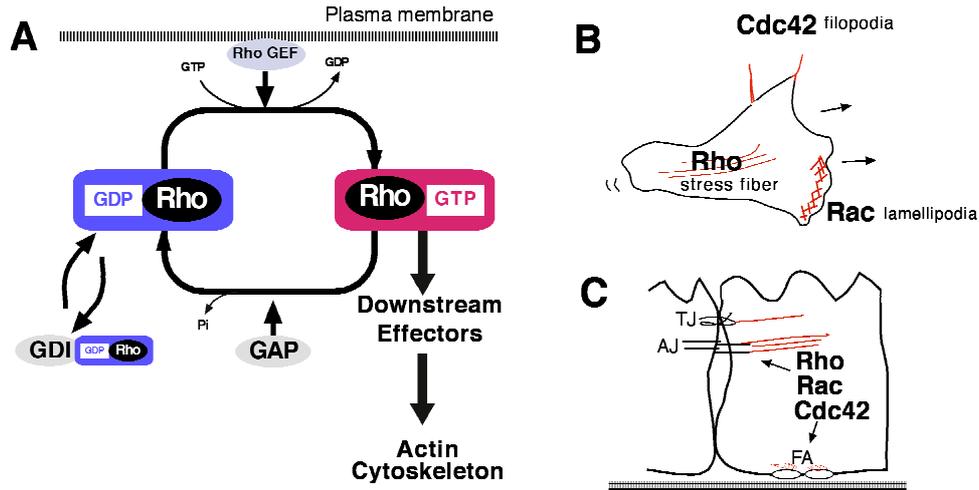


図5 Rho ファミリーの活性化機構とアクチン細胞骨格に対する機能（培養細胞）

A: Rho ファミリーの活性化機構（概念図）。Rho ファミリーは GTP を結合した活性化状態と GDP を結合した不活性化状態がある。GTP 結合型のみが様々な標的因子と結合し細胞内のシグナル伝達を制御する。B および C: Rho ファミリーは主にアクチン細胞骨格を介して細胞形態や、細胞間接着、細胞基質間接着を制御する。

■ アクチン細胞骨格に依存しない機能

Rho ファミリーの機能としては、アクチン細胞骨格に対する機能解析に集中していたが、近年、微小管 microtubules に対する役割が明らかになってきた(Fukata et al., 2003; Wittmann et al., 2001)。微小管もまた、細胞移動や細胞極性の維持に重要であるが故に、Rho ファミリーがこれの脱重合過程に影響する可能性は大きい。Rho の活性化は、微小管の安定性を調節し、これには標的タンパク質の mDia が関与することが明らかにされた(Ishizaki et al., 2001)。Rac は p65PAK を介して microtubule destabilizing protein である stathmin を不活化し、微小管の伸長に関わっている(Daub et al., 2001)。Cdc42 は、Par6/PKC と複合体の活性化を介して微小管や中心体の極性を調節する。この際、微小管のプラス端で GSK-3 を不活化する(Etienne-Manneville and Hall, 2003)。これら微小管に関わる機能が、in vivo においてどのような場面で発揮されるのかについては、今後の課題となっている。

細胞骨格タンパク質に関わる機能の他、Rho ファミリーは遺伝子の転写調節にも関わっている。例えば Rac と Cdc42 は、種々の培養細胞において、JNK および p38MAP kinase pathway を活性化し、c-jun などいくつかの遺伝子の発現を制御している(Coso et al., 1995)。Drosophila では Drac1 と Dcdc42 が mis-shapen(PAK-like)や hemipterous(JNK kinase)を介して dorsal closure に影響することが報告されている

(Glise and Noselli, 1997; Su et al., 1998)。

以上、Rho ファミリーに関する知見を述べてきたが、ここに記載したものは、氷山の一角にすぎない。Rho ファミリーメンバーのアクチン細胞骨格の調節作用は、酵母から哺乳類まで種を超えて保存されている。さらに、*in vitro* の培養細胞を用いた研究により、標的タンパク質や活性化を担う GEF の同定など、大量の知見の蓄積がある。このような状況下において、生物学に携わる人達の興味は、ほとんどすべての細胞に普遍的に存在することが予想される Rho ファミリーが、器官や組織が構築される際にどのような役割を持つか？ということに終始するのではないかと考えられる。昨今では、*Drosophila* や線虫の遺伝学を駆使した知見も増えつつあるが、脊椎動物の発生過程における Rho ファミリーの機能に関しては、ほとんど明らかにされていないのが現状である。

本研究の目的

本研究は、トリ胚発生初期に見られる体節形成過程を新規 *in vivo* モデルシステムとして、間充織—上皮転換(MET)を統御する分子メカニズムの解明を目的とした。体節形成時に MET を起こす細胞では、アクチンの再構築が行われている。そこで、アクチンに対して調節作用を持つ Rho ファミリーメンバー、Cdc42 と Rac1 に着目し、これら分子の MET における役割を解析した。*in ovo* エレクトロポレーション法により、Cdc42 と Rac1 の変異体を未分節中胚葉の間充織細胞に強制発現させ、それぞれの活性が変化した細胞が、分節化を通じて間充織細胞の形態を維持するのか、それとも上皮細胞へと転換するのかについて着目した。その結果、体節形成時の細胞の上皮化には、Cdc42 の活性化レベルが重要であること、Rac1 も細胞骨格やカドヘリンなどの分布を制御して、細胞の上皮化に関与する証拠を得た。

第2章 結果

エレクトロポレーションによる体節中胚葉組織への遺伝子導入法の確立

動物細胞へのさまざまな遺伝子導入は、それら遺伝子の機能を知る上で有用な手段である。ニワトリ胚への応用としては、1998年に村松らが、リポフェクション法よりも効率のよい遺伝子導入法として、エレクトロポレーション法による遺伝子導入法を報告した(Muramatsu et al., 1998)。その後、百瀬らにより様々な改良が加えられ、管状構造の神経管や閉鎖された組織空間を持つ眼胞等、組織内腔に遺伝子溶液を注入することで、より限局した組織への遺伝子導入が可能となってきた(Momose et al., 1999)。本研究においては、分節化に伴う間充織—上皮転換のしくみを解明する上で、特に体節板を構成する間充織組織への遺伝子導入が必須の技術となる。そこで、体節中胚葉において、特に未分節の間充織組織へ高効率で外来遺伝子を導入するために、百瀬らの方法を一部改変した(Yasuda et al., 2000)(仲矢, 高橋, 2002)。

その方法としては、最初に、未分節の間充織組織に、直接的に遺伝子を導入することを試みたが、この方法は遺伝子発現効率が著しく低いことから、実用化にはほど遠いと考えられた。そこで、次に示す方法により遺伝子を導入した。ニワトリ初期胚において、将来体節中胚葉を形成する細胞群は、ヘンゼン結節後方より原始線条 primitive streak を腹側に向かって通過した後、外側（側方）に向かって移動し、神経管の両側でシート状の構造をとることが明らかにされている(Catala et al., 1996; Psychoyos and Stern, 1996)。そこで、本実験では、細胞移動が活発に行われているステージ 7-9 のニワトリ胚を用いて、原始線条付近に位置する細胞（予定体節細胞）へ遺伝子を導入した。遺伝子としては、発現が確実に可視化できる Green fluorescent protein (GFP) を使用した。発現ベクターとしては、とにかく強力に発現させたいことを考慮して、トリにおいて組織を選ばず発現させることができる CAG プロモーター(CMV-IE エンハンサーおよび chicken β アクチンプロモーター)を持つ pCAGGS 発現ベクターを用いた。材料と方法の項に記載した図 25 に示すように、胚を+と-の電極で挟み、電圧が 5 - 7V、25 msec 毎に 3 回の条件で電気パルスを加えた(0 hr, 図 6A)。その後、遺伝子の発現を実体顕微鏡下で経時的に観察した。その結果、約 12 時間後に胚の尾部において GFP シグナルが認められた(図 6B)。24 時間後では、GFP を発現している細胞が、体節および体節板に認められた(図 6C)。さらに 48 時間後まで発生を進行させた結果、GFP シグナルが認められる体節は、一定の大きさで左右が乱れることもなく正常に分節化を繰り返していた(図 6D)。

本法により遺伝子を導入された個体の中には、図 6D のように体節中胚葉と同時

に神経管へ遺伝子が導入されているものも含まれており、体節中胚葉に局限した遺伝子導入は、実際には困難であった。一方、側板中胚葉組織への遺伝子導入の例は、ほとんど見られなかった。様々な改善点が残されているが、本方法は、体節中胚葉の未分節組織（体節板）への外来遺伝子の導入が可能であり、分節化に関与すると考えられている様々な遺伝子の機能を解析するためのよい方法であると考えられた。

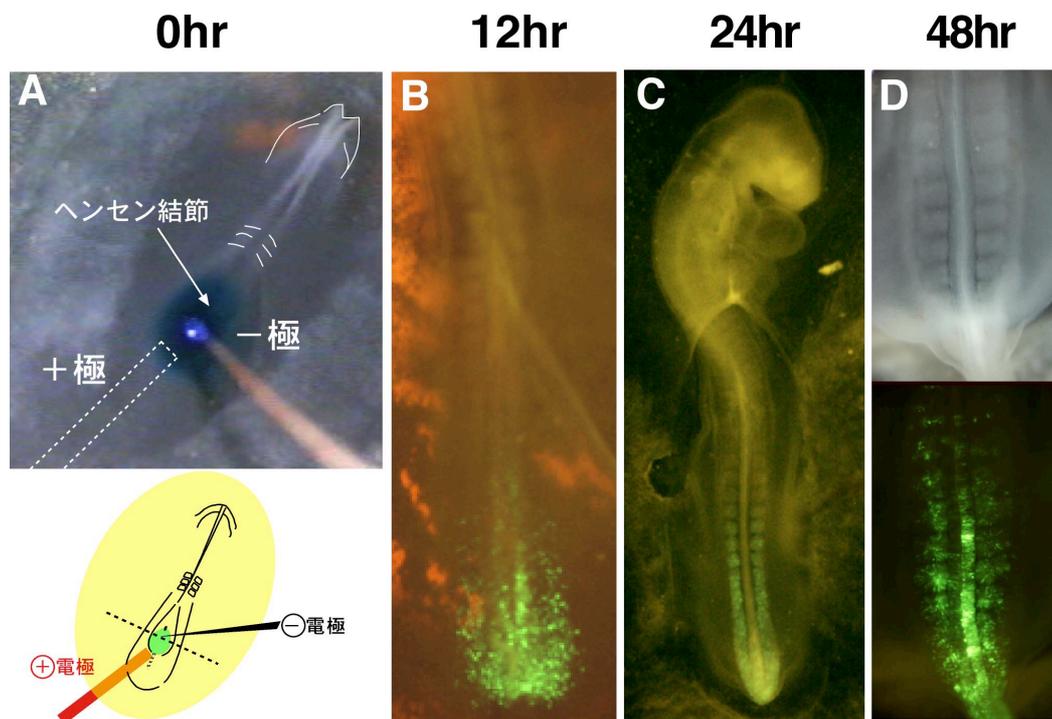


図6 エレクトロポレーションによる体節中胚葉への外来遺伝子導入
 エレクトロポレーションによりニワトリ体節中胚葉へ GFP 遺伝子を導入した。A: 0 時間(遺伝子導入直後) B: 12 時間後 C: 24 時間後。GFP を発現している細胞が、体節および体節板に認められた。D: 48 時間後、GFP を発現した体節は、左右乱れることなく正常に分節化を繰り返していた。

体節形成における低分子量 GTPases Rho ファミリーの役割

上記エレクトロポレーション法を用いて、体節分節を *in vivo* のモデルシステムとして、アクチン細胞骨格を制御することが知られている低分子量 GTPases Rho ファミリーメンバー (RhoA, Rac1, Cdc42) が、3次元で起こる間充織—上皮転換にどのような役割を持つか解析した。

■ コントロール実験

GFP 遺伝子を発現した細胞は、体節を構成する間充織細胞と上皮細胞の両方にランダムに分布する

コントロール実験として、pCAGGS-GFP のみをトリ胚に導入した場合、先に述べたように、エレクトロポレーション後 24 時間において、GFP 発現細胞はすでに形成された体節と体節板に認められた(図 7A)。この遺伝子導入胚について、遺伝子のトランスフェクション効率および体節内における遺伝子発現細胞の分布を詳細に解析するために、縦切片を作製した。図 4 の模式図に示す様に、体節は内部の間充織細胞群 somitocoel の周囲を上皮細胞群が覆う形態を示す。GFP 遺伝子は、体節中胚葉を構成する細胞にパラパラとモザイク状に発現しており、これらは、全体のおよそ 30-60%の細胞にあたること明らかになった。また、形成された体節において、GFP 発現細胞は体節表面の上皮細胞とその内部の間充織細胞の両方に均一に分布していた(図 7B)。今後の実験においても同様に、導入遺伝子発現細胞の分布に着目し、解析を進めた。

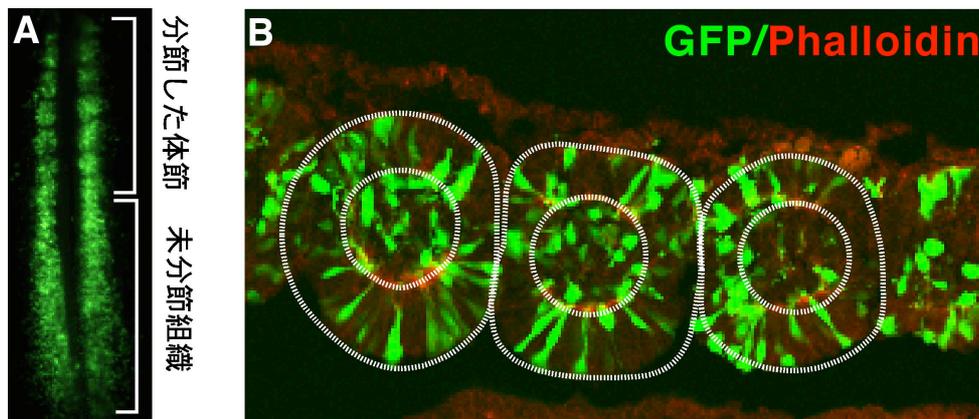


図 7 GFP 遺伝子を発現した細胞は体節の間充織細胞と上皮細胞の両方にランダムに分布する

ニワトリ体節中胚葉へ GFP 遺伝子のみを導入した。A: 24 時間後の体節中胚葉(whole)。GFP を発現している細胞が、分節した体節ではロゼッタ状に観察される。B: 体節中胚葉の縦切片像を示す。GFP 発現細胞は、形成された体節表面の上皮細胞とその内部の間充織細胞の両方に均一に分布していた。切片像の方向は、左：頭側、右：後側となる。

■ 体節形成過程における Cdc42 変異体の影響

恒常的活性型 Cdc42 発現細胞は、体節の間充織領域に存在する

体節形成における Cdc42 の機能について検討するために、ヒト Cdc42 の野生型 (WT-Cdc42)、恒常的活性化型(CA-Cdc42, V12)および不活性型(DN-Cdc42, N17)をそれぞれ予定体節中胚葉細胞に GFP 遺伝子と共発現させた(図 8)。それぞれの遺伝子の発現は、遺伝子に付加した 3 コピーの HA-tag に対する免疫染色により確認した。その結果、WT-Cdc42 遺伝子発現細胞は、図 7 の GFP コントロール実験と同様に、体節構成細胞においてモザイク状に発現し、形成された体節の上皮と間充織領域の両方にランダムに分布していた(図 8A、上段)。また、共導入した GFP を発現する細胞のほとんどが、抗 HA 抗体に対してポジティブの細胞であった。従って、共導入した GFP と機能遺伝子は、ほぼ同一の細胞において発現することが確認された(図 8A、上および中段)。これに対して、CA-Cdc42 を予定体節中胚葉細胞に発現させた場合、遺伝子発現細胞は体節板においては均一に発現したが、形成された体節では、大部分が内部の間充織領域に存在した(図 8B、矢印)。新しくできた体節内部の細胞は、体節形成が起こる際にも、上皮には転換せずに間充織形態を維持している。CA-Cdc42 を導入した細胞が間充織に集まった結果から、Cdc42 が正常な分節化過程において、間充織形態の維持に関わる可能性が考えられた。

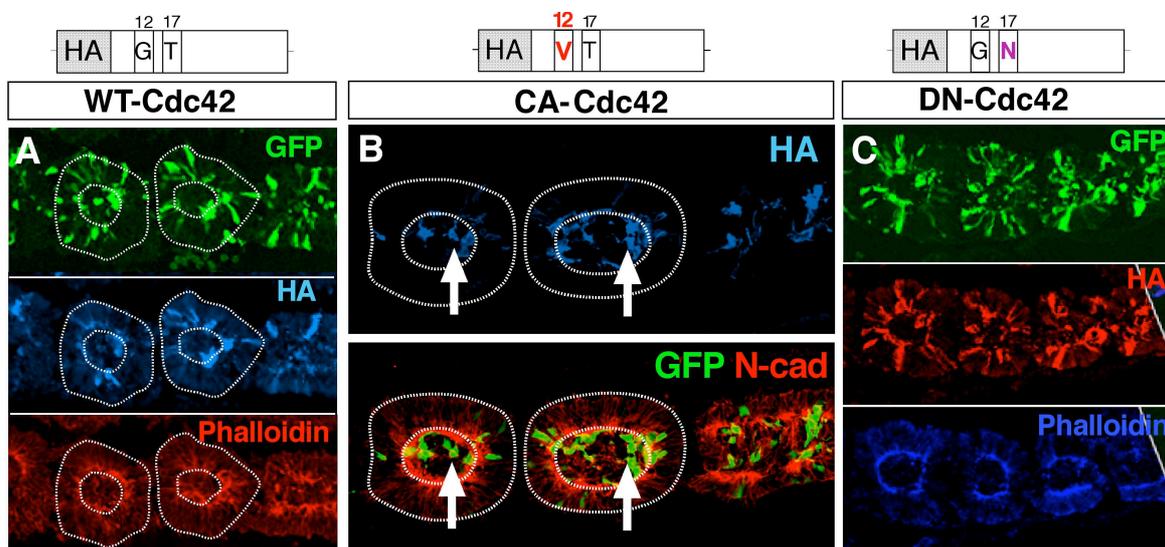


図 8 体節中胚葉に導入された Cdc42 の野生型あるいは変異型発現細胞の分布

エレクトロポレーションにより、体節中胚葉の細胞へ野生型(WT)Cdc42 および変異型(CA, DN) Cdc42 遺伝子を導入した。A: WT-Cdc42 発現細胞は、形成された体節の上皮と間充織領域の両方にランダムに分布していた。B: CA-Cdc42 発現細胞のほとんどは、体節の内部の間充織領域で検出された。C: DN-Cdc42 発現細胞は、主に体節の上皮領域側に存在する傾向がみられた。

内在性の Cdc42 シグナリングを阻害すると、上皮細胞になる

次に、Cdc42 の不活性型を GFP と共に体節中胚葉に導入した。その結果、遺伝子を発現する細胞は、どちらかと言えば、体節の上皮領域に集まる傾向が認められた(図 8C)。しかしながら、個体によっては、明らかに上皮領域と間充織の両方に DN-Cdc42 細胞が認められる場合もあり、EM index (これに関しては、後述する) を算出した結果、標準偏差にばらつきが生じ、統計上 GFP コントロールと有意な差は認められなかった(図 13)。そこで、別の方法により Cdc42 阻害を試みた。その方法を図 9 に示す。本実験では、Cdc42 の特異的標的タンパク質である N-WASP を活用した。序論で述べたように、細胞外からの刺激により活性化された Cdc42 は、N-WASP の GBD/CRIB 領域を介して物理的に結合し、アクチンの重合作用、特にフィロポディア形成に役割をもつことが知られている(図 9 左)(Miki et al., 1998; Takenawa and Miki, 2001)。この N-WASP の GBD/CRIB モチーフの大過剰量を細胞内に発現させた場合、これが内在性の Cdc42 (活性型 Cdc42) を奪い取ることで、細胞内における Cdc42 シグナリングが阻害されることが期待された(図 9 右)(Honda et al., 2003; Ono et al., 2000)。

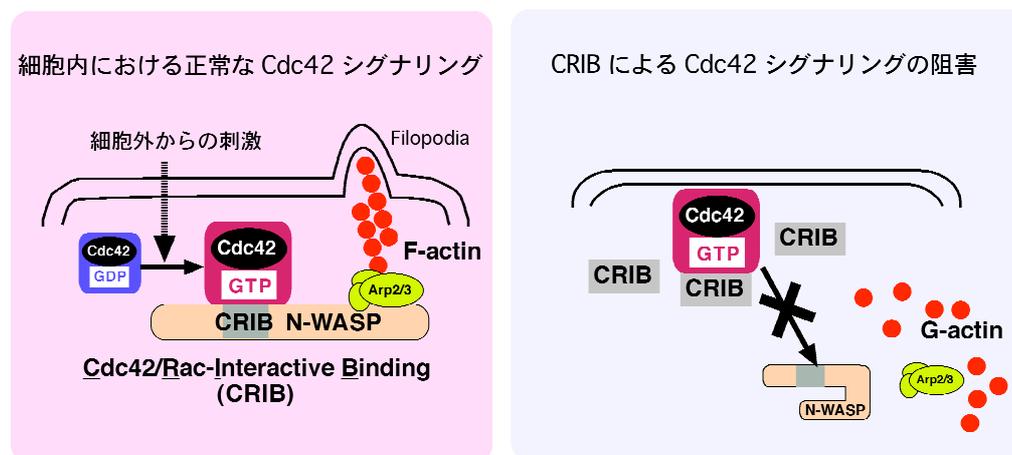


図 9 N-WASP CRIB による Cdc42 シグナリング阻害の模式図

左：正常細胞における Cdc42 シグナリング。GTP 結合型 Cdc42 は、N-WASP の GBD/CRIB 領域を介して結合する。これにより活性化された N-WASP に Arp2/3 complex などのアクチン核化に必要な分子が集まり、結果としてフィロポディアが形成される。右：細胞内に N-WASP CRIB 領域を過剰発現させた場合、内在性の Cdc42 シグナリングは阻害されると期待される。

実際に N-WASP の GBD/CRIB 発現コンストラクトを作製するにあたり、当初は GBD/CRIB 領域のおよそ 20 アミノ酸のみが発現する DNA コンストラクトを作製した。これを体節中胚葉に発現させた結果、GFP コントロールと有意な差は認められなかった(未発表データ)。そこで、*in vitro* で WASP の GBD/CRIB に結合するタンパク質を調べた研究(Rudolph et al., 1998)で使用した WASP 断片を参考にして N-WASP 断片を再びサブクローニングした。つまり、GBD/CRIB 領域を含む 162 番目から 270 番目のアミノ酸をコードする領域を PCR で増幅した DNA 断片(N-WASP CRIB)を 6 コピーの myc tag 付きの pCAGGS 発現ベクターにサブクローニングした。まず、この N-WASP CRIB が体節形成における CA-Cdc42 の表現型に影響するかどうか検討した。図 10A に示すように、CA-Cdc42 発現細胞は体節の間充織領域に認められた。これに対して、N-WASP CRIB が共導入された細胞は、体節の間充織と上皮にランダムに分布した。この結果は、CA-Cdc42 によって引き出された間充織細胞に集中する表現型を中和したことを示している(図 10B)。さらに興味深いことに、内在性 Cdc42 シグナリングを阻害するために N-WASP CRIB を単独で強制発現させた結果、体節板においては均一に遺伝子発現細胞が存在したのに対して、形成後の体節では N-WASP CRIB 発現のほとんどが上皮に存在する、という劇的な表現型が観察された(図 10D)。これに対して、図 10E は、GBD/CRIB 領域の 208 番目のアミノ酸に変異を入れた変異体(N-WASP CRIB (H208D), 図 10C) を同様に発現させた結果である。この DNA は、GBD/CRIB 領域に変異が入っているために、この部位への Cdc42 結合が阻害されることが明らかにされている(Miki et al., 1998)。この N-WASP CRIB(H208D)を発現した細胞は、GFP コントロールと同様に体節上皮と間充織にランダムに分布し、N-WASP CRIB で見られた表現型とは全く異なっていた(図 10E)。従って、N-WASP CRIB による表現型(上皮化)は、正常胚に存在しないタンパク質を発現させたが故にみられる非特異的な現象ではなく、Cdc42 の阻害により特異的に起こり得る現象であると考えられた。

細胞の上皮化と Cdc42 阻害の関係について、さらに別の方法を用いて検証した。N-WASP は、アクチン核化 nucleation に重要な役割を持つ Arp2/3 複合体と直接結合し、さらに活性化することが報告されている(Takenawa and Miki, 2001)。全長 N-WASP の GBD/CRIB 領域の 208 番目のアミノ酸に置換を導入した N-WASP-H208D の強制発現は、活性型 Cdc42 により誘発された糸状仮足を阻害することが知られている(Miki et al., 1998)。そのメカニズムは明らかにされていないが、おそらく細胞内の Cdc42 シグナリングがオンになっても、過剰発現した N-WASP-H208D が細胞内に存在する Arp2/3 複合体等の因子やアクチンを吸収してしまい、Cdc42 のシグナルがアクチンまで伝わらないのかもしれない。

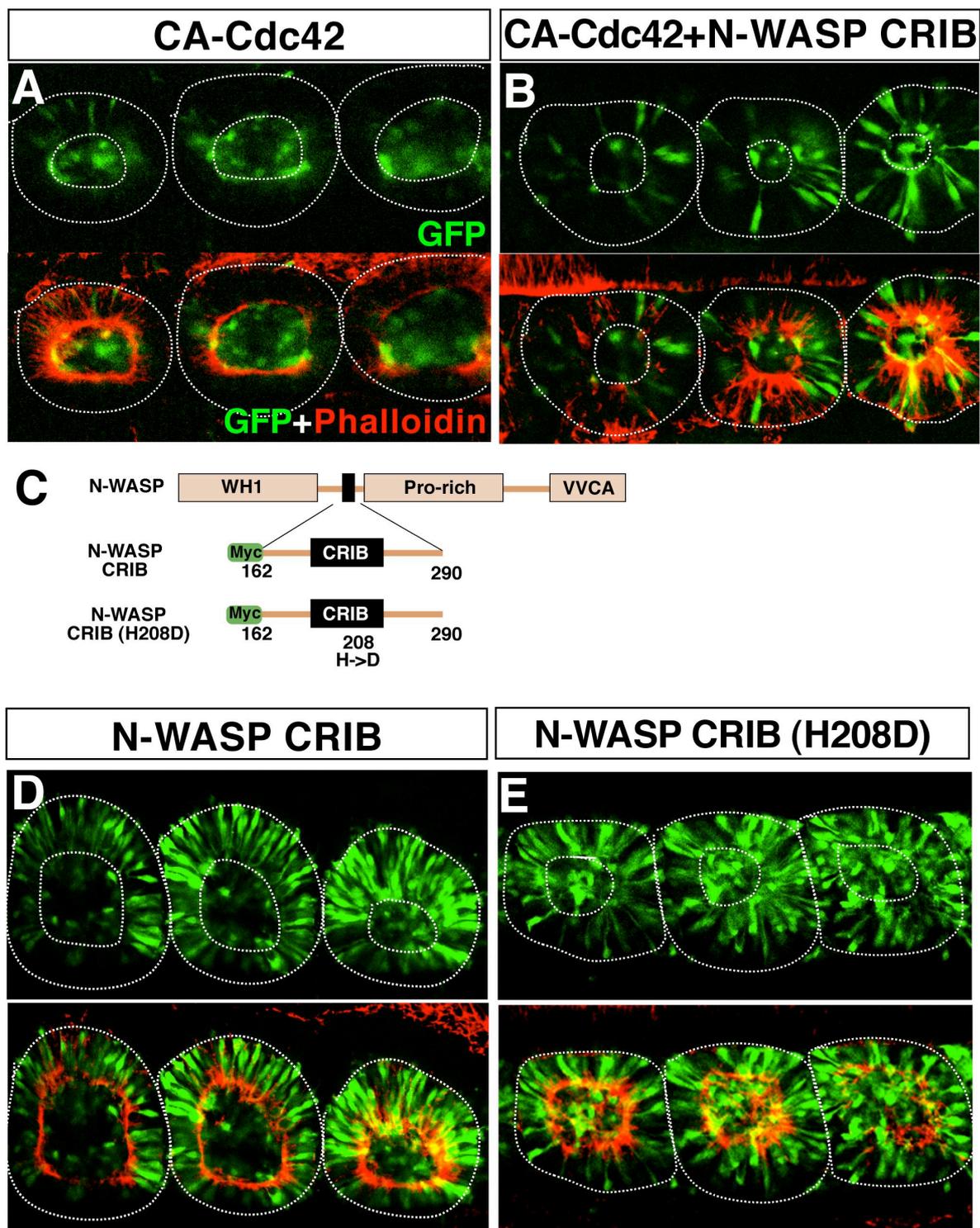


図 10 N-WASP CRIB の強制発現により体節細胞は上皮化する

N-WASP-CRIB を利用して Cdc42 シグナルを阻害し、体節形成過程における影響をみた。A:CA-Cdc42 発現細胞は、体節の間充織領域に認められた。B:N-WASP-CRIB を CA-Cdc42 と共発現させた結果、CA-Cdc42 の表現型(A)は中和された。C: N-WASP CRIB とその変異体のダイアグラム。D: N-WASP CRIB を発現した細胞のほとんどは、体節の上皮領域において認められた。

E: N-WASP CRIB(H208D)を発現する細胞は、体節の間充織と上皮領域の両方に存在した。A,B,D, E は共焦点顕微鏡による水平の光学切片像。左：前側

N-WASP-H208D を体節中胚葉に過剰発現させる前に、前述の N-WASP CRIB の場合と同様に、CA-Cdc42 の表現型に対する影響を検討した。N-WASP-H208D もまた、CA-Cdc42 発現細胞が間充織に集まる表現型を中和した(図 11A, B)。さらに、N-WASP H208D を単独で発現させた場合、遺伝子発現細胞は上皮に分布した(図 11C)。N-WASP CRIB の結果も併せて、分節化過程において、Cdc42 シグナリングの阻害は、間充織細胞を上皮化へと導く可能性が考えられた。

以上を要約すると、Cdc42 の変異体および阻害タンパク質を強制発現させた実験から、Cdc42 が恒常的に活性化された場合、体節細胞は間充織になり、内在性の Cdc42 シグナルを阻害すると上皮細胞になるという、裏表がとれた非常に理解しやすい結果が得られた。これらから考えられることは、正常な分節化過程において、Cdc42 の活性化のレベルが、細胞の形態を上皮あるいは間充織と、どちらかを選択することに重要な役割を持つことを示唆している。

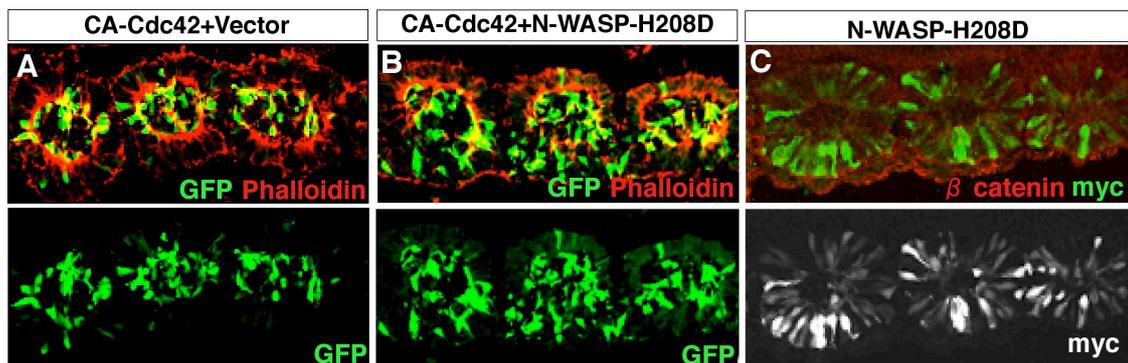


図 11 N-WASP-H208D の強制発現による影響

N-WASP GBD/CRIB 領域の 208 番目のアミノ酸に置換を導入した変異体(N-WASP-H208D) (Miki et al., 1998)により Cdc42 シグナルの阻害を試みた。各遺伝子発現細胞の分布については、共導入した GFP のシグナルを指標として判断した。A: CA-Cdc42 発現細胞は、体節の間充織領域において優先的に認められた。B: N-WASP-H208D と CA-Cdc42 を共導入した場合、体節形成過程における CA-Cdc42 の表現型が中和される結果となった。C: N-WASP H208D を単独で発現させた場合、遺伝子発現細胞のほとんどは上皮に分布した。

■ 体節形成過程における Rac1 の影響

Cdc42 と同様に、Rac1 を強制発現させた体節中胚葉において、遺伝子発現細胞の分布に着目した解析を行った。体節に WT-Rac1 を強制発現させた場合、遺伝子発現細胞の分布は、コントロール実験と比較して明らかな違いは認められなかった(図 12A)。これに対して、DN-Rac1(N17)および CA-Rac1(V12)を発現した体節細胞は、背腹軸に対して中間部に存在し、主に体節内部の間充織領域で認められた(図 12B, C)。特に、DN-Rac1 発現細胞は、図 12C に示すような、間充織に局在する例もあった。加えて、CA-Rac1 を発現する細胞は、上皮領域にも存在していたが、細胞形態は正常な上皮と比較して異常であるように思われた(図 12B)。これらの結果は、Rac1 の活性を変化させると正常な上皮細胞になれないことを反映していると考えられた。従って、Rac1 は体節形成過程における細胞の上皮化(MET)に何らかの役割をもつことが示唆された。Cdc42 の場合と異なって活性型と不活性型で表裏の結果が得られていないが、これには以下の理由が考えられた。低分子量 G タンパク質は、細胞内では GTP 結合型と GDP 結合型がサイクルしてその活性が制御されている。本実験で Rac1 活性が恒常的に活性化すると、正常な上皮形態が保てない結果は、この分子における GTP 結合型と GDP 結合型の正しい制御が体節細胞の上皮化に必要であることを裏付けている。

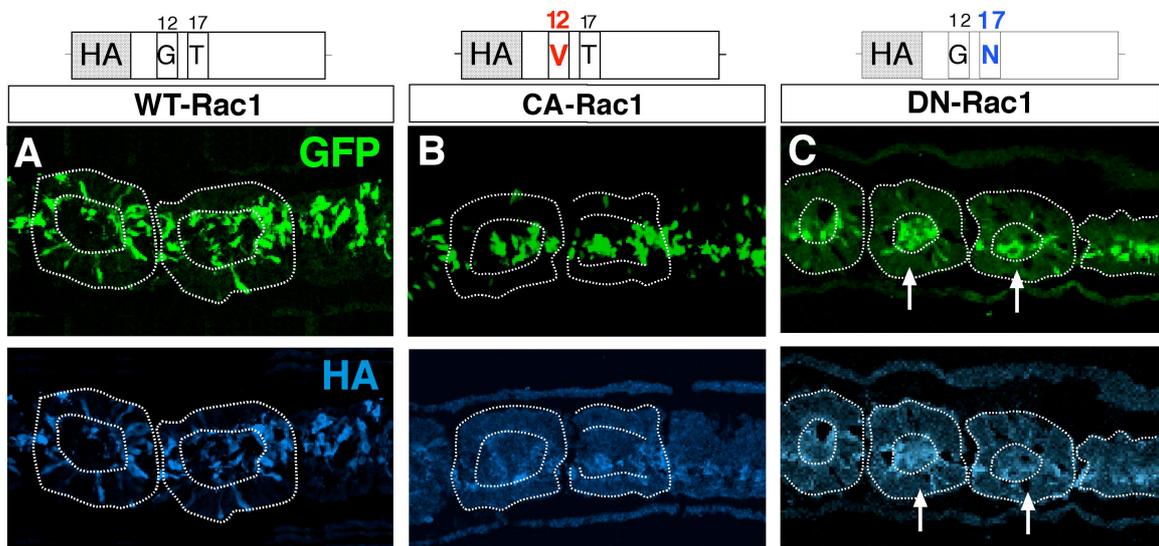


図 12 体節中胚葉に導入された Rac1 の野生型あるいは変異型発現細胞の分布

エレクトロポレーションにより、体節中胚葉の細胞へ野生型(WT)Rac1 および変異型(CA, DN)Rac1 遺伝子を導入した。A: WT-Rac1 発現細胞は、体節の上皮と間充織領域の両方にランダムに分布した。(下段) HA 染色。B および C: CA-Rac1(B)あるいは DN-Rac1 発現細胞は、体節の背腹軸の中間部に存在し、体節の間充織領域において優先的に分布する傾向が認められた。

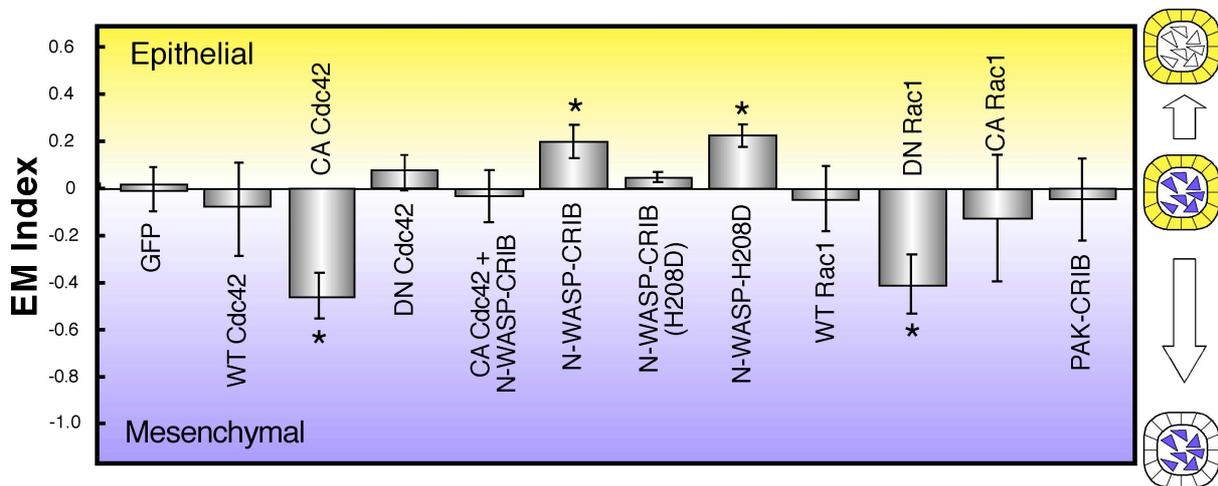
■ EM index

エレクトロポレーションにより種々の外来遺伝子を発現させた体節細胞の分布が間充織あるいは上皮に偏る傾向を、Epithelial-Mesenchymal index (EM index)として算出した(図 13)。機能遺伝子が導入された体節 1 個分において、*上皮化指数を算出し、それを GFP コントロール実験における上皮化指数で割る。GFP コントロールを「0」として表示するために、得られた値からさらに 1 を引いた値を EM index としている。実際には下の計算式になる。

*体節上皮に存在する GFP 発現細胞の数を、体節全体（上皮+間充織）に存在する GFP 発現細胞の数で割った数を「上皮化指数」とする。

$$\text{EM Index} = \frac{\text{DNA}(E/E+M)}{\text{GFP}(E/E+M)} - 1$$

それぞれの遺伝子が発現した体節の EM index を算出し(n=15)、統計解析を行い student t-test により有意差の有無を検定した。コントロール GFP をゼロとした場合、グラフ上部（黄）のカラムは上皮化傾向を下部（紫）のカラムは間充織化傾向を示している。その結果、CA-Cdc42 および DN-Rac1 は間充織へ、N-WASP-CRIB, N-WASP-H208D は明らかに上皮化傾向を示した(図 13)。また、DN-Cdc42 は標準偏差が大きいため、GFP コントロールと有意差はなかった。



$$\text{EM Index} = \frac{\text{DNA}(E/E+M)}{\text{GFP}(E/E+M)} - 1 \quad E: \text{Number of epithelial cell} \quad M: \text{Number of mesenchymal cell}$$

This value (EM Index) was compared with that of GFP-control, which was set as zero.

* p<0.0001 against GFP, p values were analysed by student t-test

図 13 体節中胚葉に強制発現させた種々の外来遺伝子における EM Index

Rac1 の恒常的活性化は N-cadherin の集積と上皮極性に影響する

EM index は Rac1 あるいは Cdc42 遺伝子の強制発現により、遺伝子を発現する体節細胞が、間充織細胞から上皮細胞に転換するのか、あるいは間充織細胞として維持されるかを反映している。さらに、細胞の形態や極性、アクチンの重合能や接着分子の局在等を明らかにし、遺伝子を発現する細胞の性質を詳細に解析した。最初に着目したのは、CA-Rac1 発現細胞である。図 12B に示すように、CA-Rac1 発現細胞のいくつかは体節の上皮領域に位置している。しかし、明らかに細胞形態は異常であり、これらが正常な上皮極性を形成している可能性は低い。そこで、N-cadherin および ZO-1 の局在を指標にして、CA-Rac1 細胞が正常な上皮極性を構築しているかどうかについて、正常胚の体節上皮細胞と比較した。N-cadherin は形成された体節上皮細胞の adherens junction (AJ) に特異的に局在するが、間充織細胞では限局した集積はみられないことが報告されている (Duband et al., 1987)。さらに、N-cadherin 染色パターンは、上皮細胞の頭頂側に集積する Phalloidin 染色パターンとほぼ同一である (図 4, 14A)。CA-Rac1 発現細胞は、形成された体節の間充織領域 (図 14B) あるいは上皮領域 (図 14C) にも存在するが、いずれの場合においても N-cadherin が細胞全体を取り囲むように膜近傍に過剰に集積しており、本来の体節上皮細胞で見られるような細胞の頭頂側にあたる部分は確認できなかったことから、正しい上皮極性が形成されていないものと考えられた (図 14B, C, D)。体節の間充織領域に集まる傾向を持つ DN-Rac1 あるいは CA-Cdc42 発現細胞は、正常胚と比べて N-cadherin の集積に有意な違いは認められなかった (図 14E, F)。

さらに図 14C では、CA-Rac1 を発現した細胞が 2 つの体節にまたがって存在しており、体節間の溝 (境界) が不明瞭であった。恒常的な Rac1 活性は、N-cadherin の過剰な集積をもたらし、細胞間接着が強固になっているのかもしれない。Rac1 の活性化が正確に調節されることは、体節間境界の形成・維持においても重要であるかもしれない。この可能性は、体節形成過程において正確な上皮化が境界の維持に必要であると報告があることから支持される (Burgess et al., 1996)。

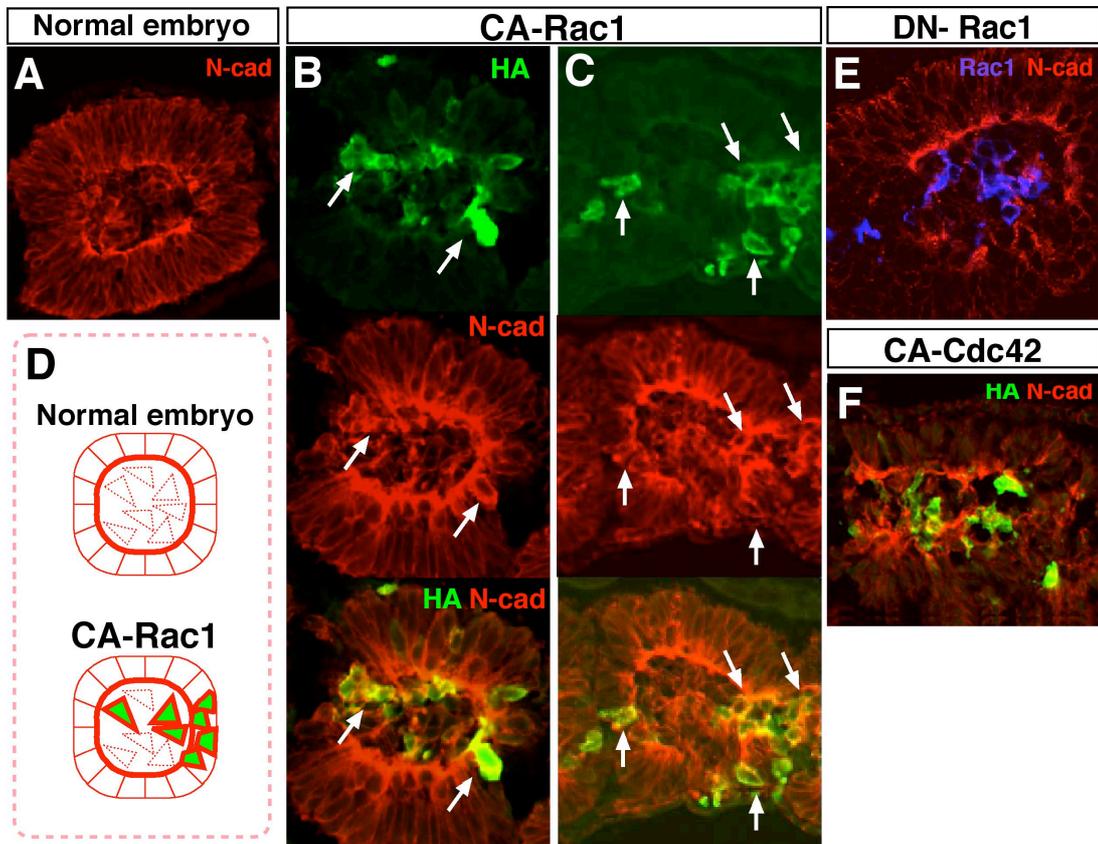


図 14 Rac1 の恒常的活性化は N-cadherin の集積と上皮極性に影響する

CA-Rac1 発現細胞および DN-Rac1, CA-Rac1 発現細胞における N-cadherin の集積を正常胚の体節細胞と比較した。凍結切片を N-cadherin ポリクローナル抗体で染色し、体節の縦切片を 63 倍レンズにて観察し画像を取得した。A: N-cadherin は形成された体節上皮細胞の AJ に特異的に局在するが、間充織細胞では限局した集積はみられない。B および C: CA-Rac1 発現細胞は、形成された体節の間充織領域(B)あるいは上皮領域(C)に存在する。いずれの場合においても N-cadherin が細胞全体を取り囲むように膜近傍に過剰に集積していた。E および F: DN-Rac1(E)あるいは CA-Cdc42(F)発現細胞は、正常胚と比べて N-cadherin の集積に有意な違いは認められなかった。

ZO-1 は tight junction(TJ)に局在する裏打ちタンパク質であり、上皮極性を示す有用なマーカーの 1 つである。正常胚の体節細胞では、N-cadherin よりも狭い領域で細胞の頭頂側で強く染色される(図 15A)。この ZO-1 について、体節の上皮領域に存在する CA-Rac1 発現細胞 (矢印) に着目すると、その発現パターンは正常上皮でみられるパターンとは異なり、本来頭頂側にあたる箇所において発現がほとんど認められなかった(図 15B)。従って、上皮領域に位置する CA-Rac1 発現細胞は、正常な上皮極性を構築した細胞である可能性はほとんどないものと考えられた。一方、間充織に存在する CA-Cdc42 細胞は、正常胚と比較して ZO-1 の染色パターンに有意な差は認められなかった(図 15C)。CA-Rac1 発現細胞が示す N-cadherin および ZO-1 の発現パターンから、正常な上皮極性が構築されるためには、体節形成過程において Rac1 活性が正確に調節されることが必要であることが考えられた。

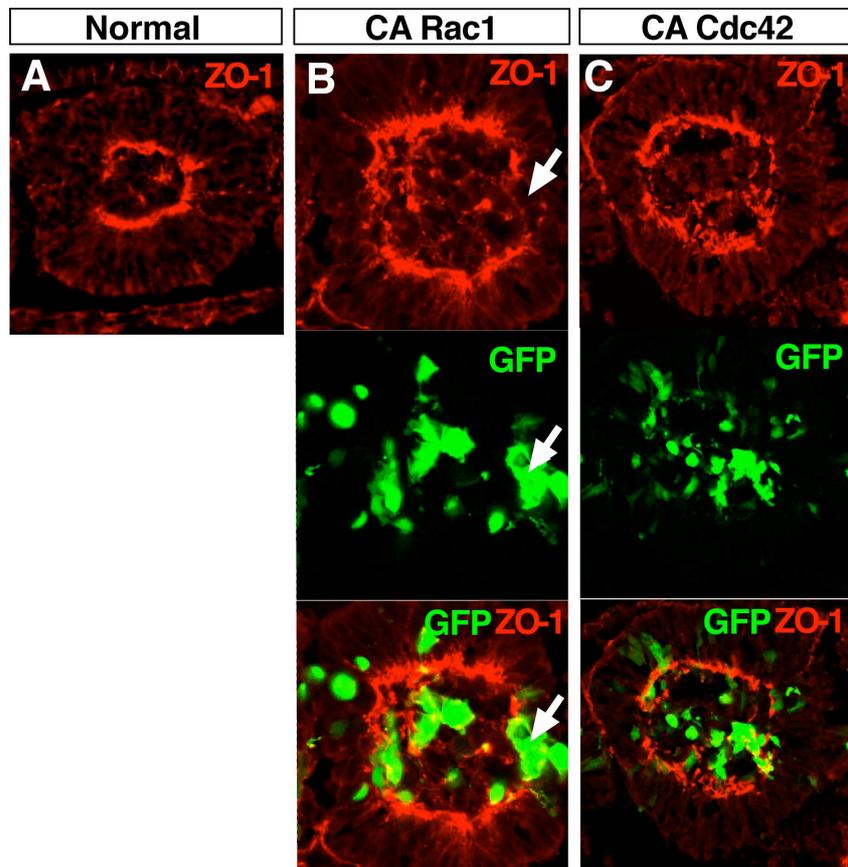


図 15 CA-Rac1 発現細胞では、ZO-1 の限局した発現が認められない

A: 正常胚の体節細胞では、ZO-1 は、細胞の頭頂部側で強く染色される。B: 上皮領域に位置する CA-Rac1 発現細胞では、本来頭頂側になるべきところで ZO-1 の発現がほとんど認められない。C: CA-Cdc42 発現細胞では、正常胚と比較して ZO-1 の発現に有意な変化は認められなかった。

DN-Rac1 および CA-Cdc42 発現細胞におけるアクチンの重合能の違い

MDCK 細胞等の培養細胞を用いた実験では、Rac1 と Cdc42 は adherens junction(AJ) へアクチンや E-cadherin をリクルートする等、上皮極性構築の際には、両者がほぼ同様の機能を持つことが報告されている(Fukata and Kaibuchi, 2001; Takaishi et al., 1997)。予想を裏切って、本研究では Cdc42 と Rac1 のそれぞれ活性型と不活性型を発現した細胞が、体節形成過程において、体節内の間充織領域に集まるという同様の表現型を示す結果となった(図 13)。両細胞間における、本質的な違いはあるのであろうか？そこで、Cdc42 と Rac1 の最も重要な標的の一つであるアクチン重合作用の違いについて検討した。組織切片では、個々の細胞内のアクチン重合を詳細に解析することが困難であることから、遺伝子を発現した体節細胞をさらに初代培養して両者を比較した。この初代培養法は、体節の形状をほとんど損なわないまま培養皿に接地させている。CA-Cdc42 および DN-Rac1 発現細胞は、体節内部の間充織領域に存在することから、細胞を観察する時期としては、体節上皮細胞が体節の塊からほとんど遊走したと考えられる培養開始からおよそ 24 時間後を選択した(図 16A)。

コントロール実験である GFP のみが導入された体節細胞では、10%の血清を含む培養液で培養した場合、ストレスファイバーが形成され、フィロポディア様の突起や、メンブレンラフリングが観察され、fibroblast 様の形態を呈するものが数多く認められた。一方 DN-Rac1 を発現した体節細胞を同一の条件で初代培養した場合、ストレスファイバーや突起はほとんど認められず、形態的には丸みを帯びたものが多数観察された。これに対して CA-Cdc42 発現細胞は、メンブレンラフリングは認められなかったが、いくつかの細胞では突起様構造を形成し、ストレスファイバーもまた観察され、形態的にはコントロール実験の細胞と近い fibroblast 様の細胞が多数認められた(図 16B, C)。分節化過程において、DN-Rac1 あるいは CA-Cdc42 発現細胞は、間充織領域に存在する傾向があるという点においては、同じ表現型であると言える。しかし、DN-Rac1 は明らかにアクチン重合が阻害されており、これが原因となって上皮細胞に転換できない性質を持つ可能性が考えられた。これに対して、CA-Cdc42 発現細胞は、アクチン重合作用はほぼ正常で、fibroblast 様の形態を呈しており、積極的に間充織細胞としての性質を維持していることが考えられた。以上のことから、強制発現の実験において DN-Rac1 あるいは CA-Cdc42 発現細胞はそれぞれ間充織領域に集まるが、そのような表現型を示す理由は全く異なっている可能性が考えられた。

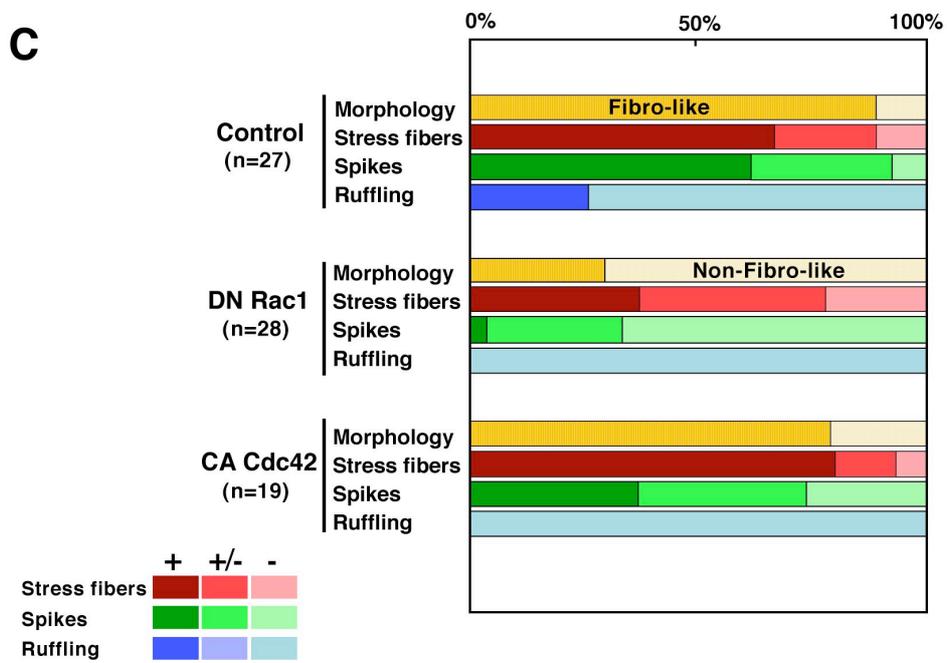
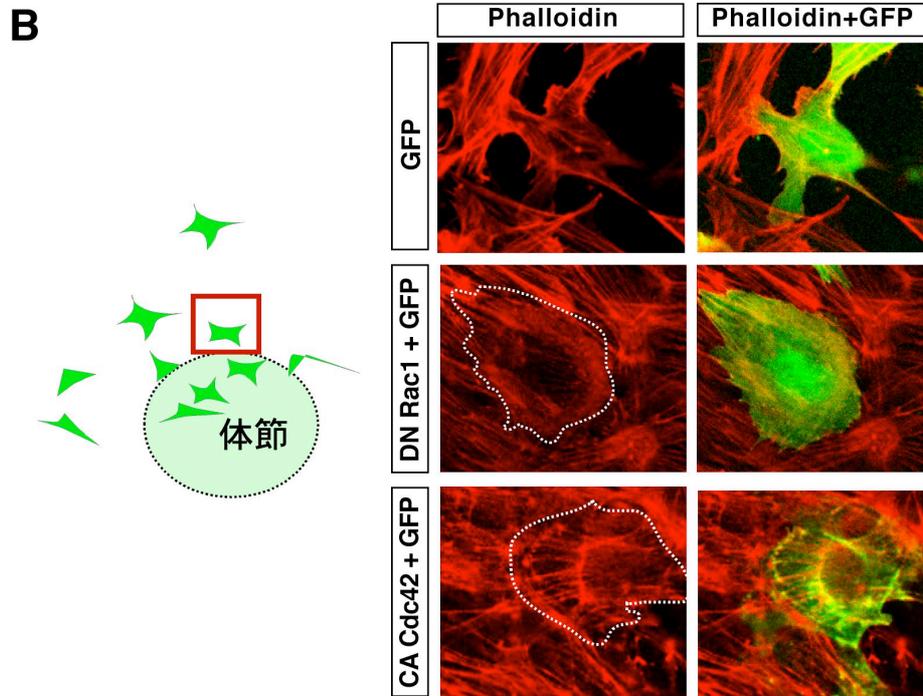
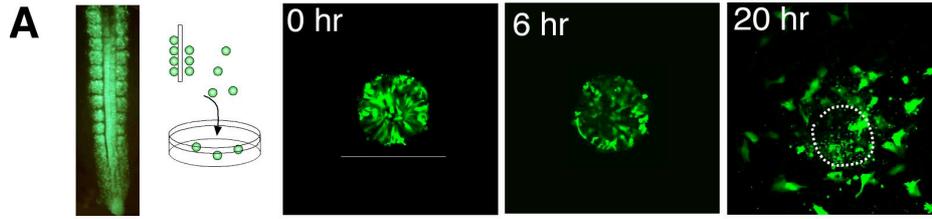


図 16 体節細胞の初代培養

GFP, DN-Rac1 あるいは CA-Cdc42 発現する体節の初代培養を行った。培養開始から 24 時間後、細胞を固定し、Alexa Fluor 568 phalloidin で染色した。A: 遺伝子を発現した体節をバラバラにして、培養皿で培養した。培養開始後 20 時間では、体節表面を占める上皮細胞は、ほとんど遊走していた。B: Phalloidin による F アクチン染色。(上段)GFP のみを発現している細胞(緑)は、ストレスファイバーや突起が形成され、さらにメンブレンラップリングが観察された。(中段) DN-Rac1 を発現した体節細胞の場合、ストレスファイバーや突起はほとんど認められず、形態的には丸みを帯びたものが多数観察された。(下段)CA-Cdc42 発現細胞では、突起様構造およびストレスファイバーが観察された。C: GFP, DN-Rac1 あるいは CA-Cdc42 を発現する体節細胞について、1)細胞形態 2)ストレスファイバー 3)突起構造 4)メンブレンラップリングの 4 つのカテゴリーに分類し、これらの表現型を持つ細胞のパーセントを示した。GFP, DN-Rac1, n=30 CA-Cdc42, n=12

ところで、予備的な実験ではあるが、ストレスファイバーや突起状のアクチン繊維を形成できない DN-Rac1 発現細胞が、過剰量のアクチンが細胞内に発現した場合には、上皮細胞へ転換できる可能性が示された。図 17A に示すように、DN-Rac1 を発現する細胞は、主として間充織領域に存在している。いくつかの細胞は上皮領域にも認められるが、形態的には正常な上皮であるとは言い難い。DN-Rac1 と GFP-actin を共導入すると、図 17B に示すように、体節の上皮領域において遺伝子発現細胞がはっきりと認められ、これらは美しい上皮細胞形態を示していた。図 17C に記した cofilin は、F アクチン切断活性をもつタンパク質で、この活性はリン酸化により調節され、リン酸化が起こると活性は消失する(図 17C 上)。Rac1 の活性は、PAK(p21 activated kinase)→LIM キナーゼを介して cofilin の F アクチン切断活性を抑制していると考えられている。DN-Rac1 が発現する細胞では、下流にシグナルが伝わらないために、cofilin が F アクチン切断活性を発揮していることが推測できる。図 17B に示す結果は、細胞内の cofilin が飽和するほど大過剰のアクチンが存在している可能性、および、他の Rho ファミリータンパク質が大過剰のアクチンを使用して Rac1 の機能を補っている可能性が考えられる。しかしながら、本実験で得られた結果について、きちんと説明するためには cofilin の変異体を使用するなど、さらなる検討が必要である。

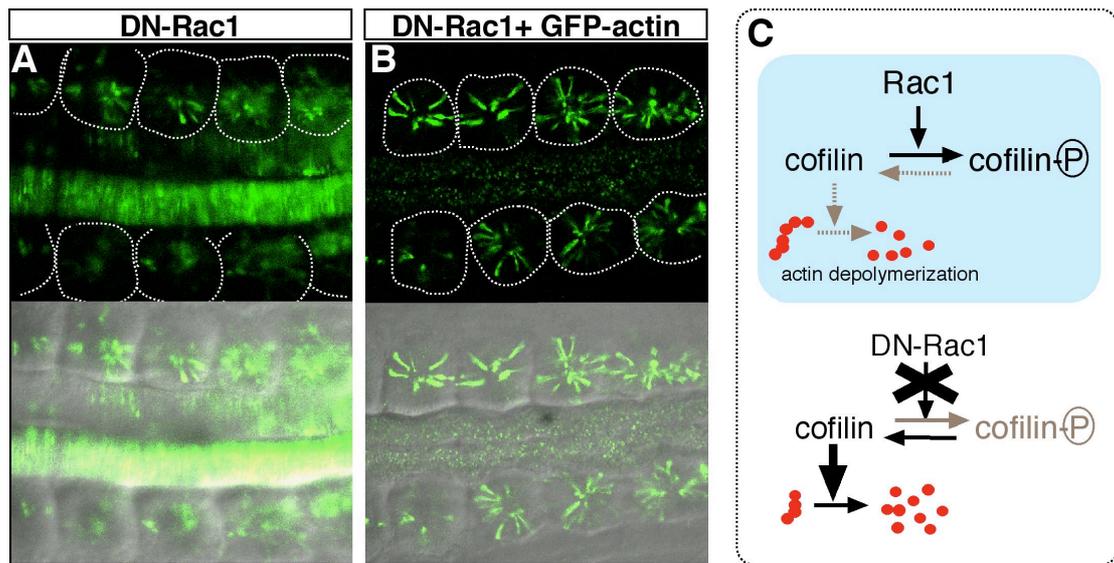


図 17 DN-Rac1 発現細胞は、アクチンが大量供給されると上皮へ転換する

DN-Rac1 を発現する細胞は、主として間充織領域に存在している。いくつかの細胞は上皮領域にも認められるが、形態的には正常な上皮であるとは言い難い。DN-Rac1 と GFP-actin を共導入すると、図 17B に示すように、体節の上皮領域において遺伝子発現細胞がはっきりと認められ、これらは美しい上皮細胞形態を示していた。C: Rac1 の下流では、cofilin の F-アクチン切断活性が抑制されている（詳しくは本文参照）。

Rac1 および Cdc42 発現細胞では細胞死が起こっていない

本研究における遺伝子過剰発現の実験系では、遺伝子の発現量、翻訳されたタンパク量を厳密に調節することが困難であり、内在的に存在する各タンパク質と比較して過剰量のタンパクが発現していることが予想される。各実験において、個々の遺伝子を過剰に発現させられた細胞が、細胞死を起こしている可能性は否定できない。そこで、TUNEL 法により細胞死の有無を検討した。本法は、ターミナルトランスフェラーゼ(TdT)という酵素が、FITC 標識された dUTP を断片化された DNA の遊離 3'-OH に標識することで細胞死が検出可能である。本法により、ポジティブコントロールとして用いたマウス乳腺組織では、対比染色として用いた DAPI 染色が染まらない核において FITC シグナルが観察された(図 18B)。一方、遺伝子導入から 24 時間後の胚の体節において DN-Rac1 あるいは CA-Cdc42 を発現した細胞 (RFP ポジティブの細胞)は、DAPI 染色により核が染まり、形態的にも正常な核と有意な差は認められず、しかも細胞死を反映する FITC シグナルは検出されなかった(図 18A)。以上の結果より、DN-Rac1 あるいは CA-Cdc42 が過剰発現された細胞は、遺伝子導入から 24 時間後においては、細胞死は起こっていないものと考えら

れる。それ故に、これら遺伝子を導入した際にみられる表現型は、遺伝子が強制発現された細胞が、体節形成過程において細胞死を起こした結果、体節の間充織領域に細胞が押し込められているわけではない。

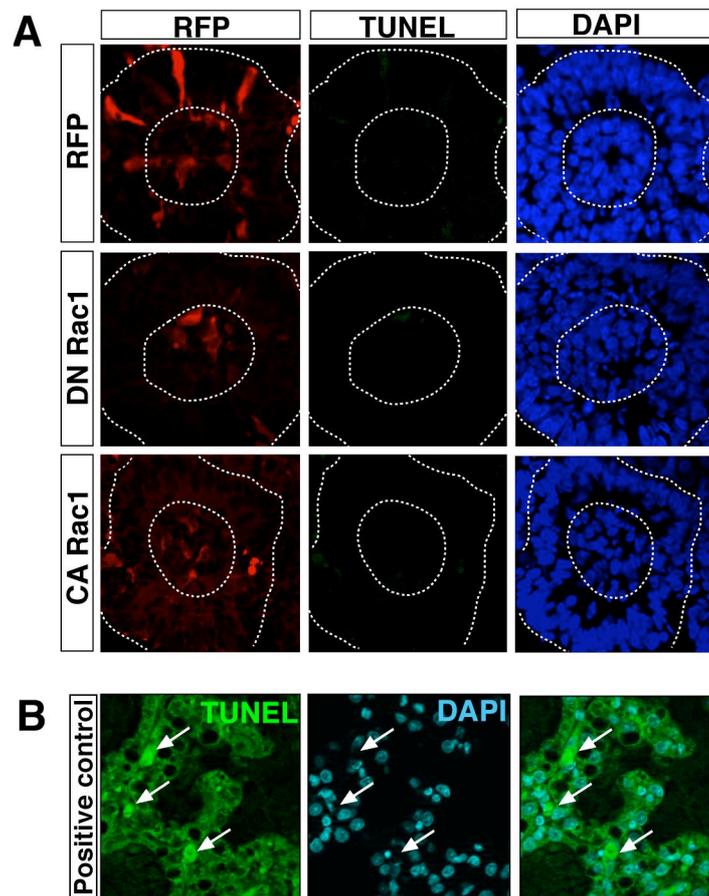


図 18 DN-Rac1 および CA-Rac1 発現細胞は細胞死を起こさない

DN-Rac1 あるいは CA-Cdc42 を発現した細胞における細胞死の有無を TUNEL 法により確認した。A: RFP(dsRed2)および RFP と共導入した DN-Rac1 あるいは CA-Cdc42 を発現する細胞は、細胞死を起こしていない。また、DAPI 染色においても断裂化された DNA は認められなかった。B: 本実験系のポジティブコントロール。マウス乳腺組織では、所々で細胞死が起こっている (矢印)。

正常な体節形成過程における内在性 Rac1 および Cdc42 の活性化

これまでの実験結果から、正常な分節化過程にみられる細胞の形態変化には、Cdc42 と Rac1 がそれぞれ関与することが確からしい。特に、図 10 で示した N-WASP-CRIB によって引き起こされた上皮化現象は、内在性の Cdc42 の関与を示す結果であるかもしれない。In vitro の binding assay によると、Rac1 や RhoA は、N-WASP-CRIB とは結合しない(Rudolph et al., 1998)。他の Cdc42 サブファミリーメンバーである、TC10 が N-WASP に結合する報告(Aspenstrom et al., 2004; Neudauer et al., 1998)があるが、TC10 が N-WASP の CRIB 領域に特異的に結合するかどうかについては、議論が残っている。一方、本実験で使用した Rac1 の不活性型(DN-Rac1N17)は、Rac1 を活性化する GEF と結合してシグナルを阻害する。しかし、この GEF が Rac1 に特異的であるかは証明されておらず、他の Rho ファミリーメンバーである Rho や Cdc42 に対しても活性化作用を持つ可能性もある。そこでニワトリ胚の体節中胚葉における Rac1 の活性化について検討した。

最初に、ニワトリ Rac1 の mRNA を whole mount in situ hybridization により検出した。ニワトリでは、cRac1A および cRac1B がヒトのホモログとして同定されている(Malosio et al., 1997)。ニワトリ孵卵後 6 から 10 日において、cRac1B mRNA が神経組織、とりわけ神経性網膜で特異的に発現することに対して、cRac1A の mRNA は神経やその他多くの組織のいたるところに発現する(Malosio et al., 1997)。分節化が起こる孵卵後 2 日目の胚における cRac1A の mRNA は、胴体部分に遍在しており、Malosio らの報告からも予想がつく発現パターンであった。同時に Cdc42 について mRNA の発現を調べた結果、こちらも cRac1A 同様に胴体全体で発現していた(図 19A)。次に、体節中胚葉の凍結切片を作製して cRac1 タンパク質に対する免疫染色を行った。図 19B に示すように、cRac1 のシグナルは形成された体節の上皮細胞の頭頂部側に集積していた。MDCK 細胞においては、Rac1 タンパク質が adherence junction に集積することが、Rac1 活性化の指標であると報告されている(Fukata and Kaibuchi, 2001; Takaishi et al., 1997)。

最後に、GST 融合タンパク質を用いた免疫沈降 pull down assay により、活性型 Rac1 の検出を試みた。内在性の活性型 Rac1 の検出は技術的に困難であることから、本実験では、EGFP を融合した EGFP-WT-Rac1 を導入したトリ胚の未分節組織を材料とした。Rac1 の標的タンパク質である PAK(p21-activated kinase)の CRIB 領域を GST に融合させた GST-CRIB をビーズに固定し、前述の EGFP-WT-Rac1 を発現させた組織、およそ 45 体を集めて溶解した溶液と混合した。ビーズに結合したタンパク質を SDS で溶出して、SDS-PAGE で展開後、EGFP に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。その結果、EGFP 融合 GTP 結合型 Rac1 (活性型 Rac1) に特異的な 48kDa の位置にバンドが検出された(図 19C, lane1)。このバンド

は、ポジティブコントロールである EGFP-CA-Rac1 を発現させた組織(lane2)、あるいは、CA-Rac1 を stable に発現した MDCK 細胞(lane4)を材料として pull down した時のバンドと同じ分子量の位置であった。また、本実験系において、GST のみをビーズに固定した場合には、GTP 結合型 Rac1 は検出されていない(lane 3 および 5)。さらに、EGFP-WT-Rac1 を発現した材料について、pull down を施す前のバンド(lysate: GTP および GDP 結合型 Rac1 を示す)と GTP 結合型 Rac1 のバンドの面積をデンシトメーターにより計算した。これを EGFP-CA-Rac1 の場合と比較した結果、未分節組織において、少なくとも 4%程度の GDP 結合型が GTP 型に転換されている可能性が示された。以上のことから、正常胚の未分節中胚葉組織には Rac1 活性が存在し、分節化過程における MET に貢献している可能性が示された。

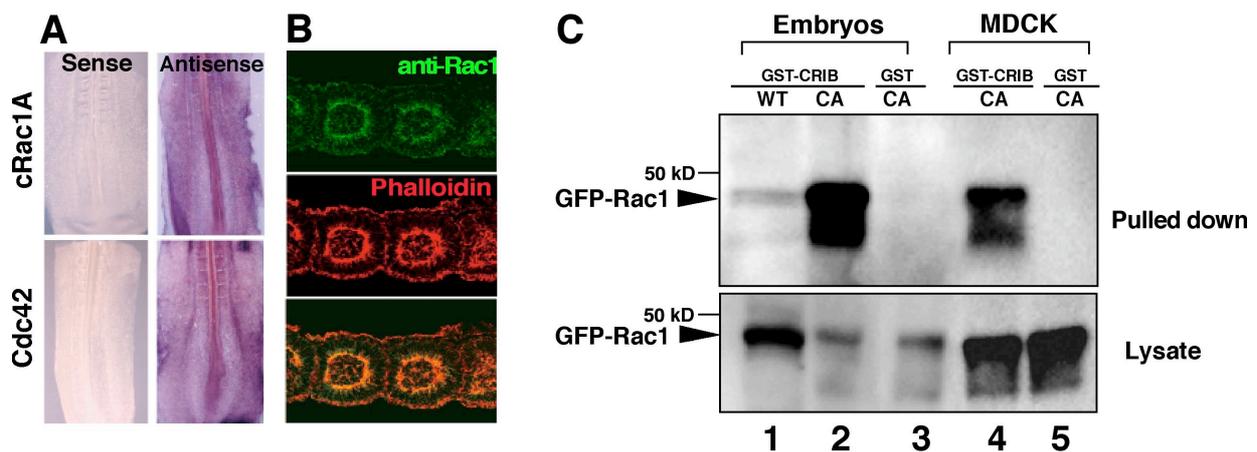


図 19 cRac1A の mRNA およびタンパク質並びに GTP 結合型 EGFP-Rac1 の検出

ニワトリ胚における Rac1 の活性化を 3 種類の方法で検討した。A: cRac1A および Cdc42 の mRNA を whole mount in situ hybridization により検出した。B: 抗 Rac1 抗体による免疫染色。cRac1 タンパク質は体節上皮細胞の頭頂側に集積する。C: GST 融合タンパク質を用いた pull-down assay による GTP 結合型 EGFP-Rac1 の検出。エレクトロポレーションにより各遺伝子を発現させた未分節中胚葉を含む組織抽出液と GST-CRIB を混ぜ合わせ、免疫沈降を行った。免疫沈降産物は、SDS-PAGE により展開した後、EGFP に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

Lane1)トリ胚, EGFP-WT-Rac1, Lane2)トリ胚, EGFP-CA-Rac1(GST-CRIB), Lane3) トリ胚,EGFP-CA-Rac1(GST), Lane 4)MDCK cell, EGFP-CA-Rac1 (GST-CRIB), Lane 5)MDCK cell, EGFP-CA-Rac1(GST)

異なった developmental context における Cdc42 と Rac1 の役割

これまで、体節中胚葉の分節化にともなう MET に焦点をあてて研究を進めてきた。しかし、MET や EMT は当然この時にのみにおこる現象ではない。ニワトリでは、発生 of 極めて早い時期に上皮構造の epiblast が原始線条 primitive streak を通り越して中胚葉や内胚葉となる際に上皮から間充織への転換(EMT)が起こる。また再三述べてきたが、体節中胚葉の分節化過程では、未分節の間充織組織が MET を起こし、上皮細胞で覆われた球状の体節を形成する。しかしその後発生が進むと、成熟した体節では、上皮構造は背側だけで維持され、これらはやがて皮筋節となる。そして腹側の上皮細胞は、再度、EMT を行い、硬節へと分化する。このような異なった発生段階でみられる EMT/MET は、すべて同じメカニズムで制御されているのか、それとも、時期特異的な分子が関与するのだろうか、さらにそれぞれの時期において、細胞はどのような目的で形態を変化させているのだろうか等、数々の疑問が湧いてくる。本実験では、これらの問題に答えるために、異なった developmental context の際に起こる細胞の形態変化において、Cdc42 と Rac1 は何らかの役割を持つか検討した。

まず、中胚葉陥入期の EMT における Cdc42 と Rac1 の役割について調べた。従来のエレクトロポレーション法により Cdc42 のシグナルを阻害する N-WASP-CRIB および不活性型 Rac1(DN-Rac1N17)をそれぞれ導入し、およそ 6~7 時間後に胚を固定し、胚の尾部における横切片を作製した。図 20A の上段に示すように、GFP のみを発現した細胞は、epiblast と中胚葉領域の細胞の両方に存在した。またイラストに示すように、GFP 発現細胞は腹側に向かって正常に遊走している様子が窺える(コントロール実験)。次に、N-WASP-CRIB あるいは DN-Rac1 を導入した胚を観察した。遺伝子の発現は、myc あるいは HA-tag の免疫染色で検出した。N-WASP-CRIB あるいは DN-Rac1 を発現した細胞もまた、epiblast と中胚葉領域の細胞の両方に存在しており、コントロール実験と同様に epiblast から間充織に転換し、腹側に向かって陥入していく様子が観察された(図 20A)。従って、Cdc42 や Rac1 の機能が失われていても、epiblast は EMT を起こし、正常に中胚葉が形成されることが考えられた。

次に、体節腹側細胞の硬節への分化過程でおこる EMT に対する Cdc42 の役割について調べた。N-WASP-CRIB を体節中胚葉へ導入した場合、遺伝子発現細胞は体節の上皮細胞となる(図 10D)。それからさらに発生を進ませた場合、一度 N-WASP-CRIB の発現によって強制的に上皮細胞と転換させられた細胞達は、硬節細胞(間充織)へ形態変化できるのだろうか? 実験手順としては、コントロール実験として GFP のみを、あるいは GFP と N-WASP-CRIB を従来のエレクトロポレーションにより導入後、約 48~50 時間発生させた胚の横切片を作製した。また、N-WASP-CRIB の発現は myc に対する免疫染色で確認した。コントロール実験では、GFP を発現した細胞が背側の皮筋節および腹側の硬節においてランダムに存在した(図 20B, 上)。一方、N-WASP-CRIB を発現する細胞は、驚いたことに、コントロールと同様に背側の皮筋節および腹側の硬節において観察された。つまり、体節が形成される際に、一度強制的に上皮細胞にならされた細胞が、この時期においては上皮形態を維持するのではなく、間充織細胞へ転換していた(図 20B)。従って、硬節への分化過程において、Cdc42 の機能が失われていても正常に EMT は起こりうる可能性が示唆された。以上は、予備的な実験結果であり、これだけで、断定的な結論を導くことはできない。それぞれの実験では、遺伝子導入後の時間経過が短いあるいは長すぎることが原因で、細胞のふるまいを変化させるだけのタンパク質発現量が得られていない可能性は否定できない。しかし、これらの実験結果を素直に解釈するとすれば、中胚葉陥入期、あるいは硬節への分化過程におきる EMT に関しては、Cdc42 および Rac1 の関与は少ないかもしれない。

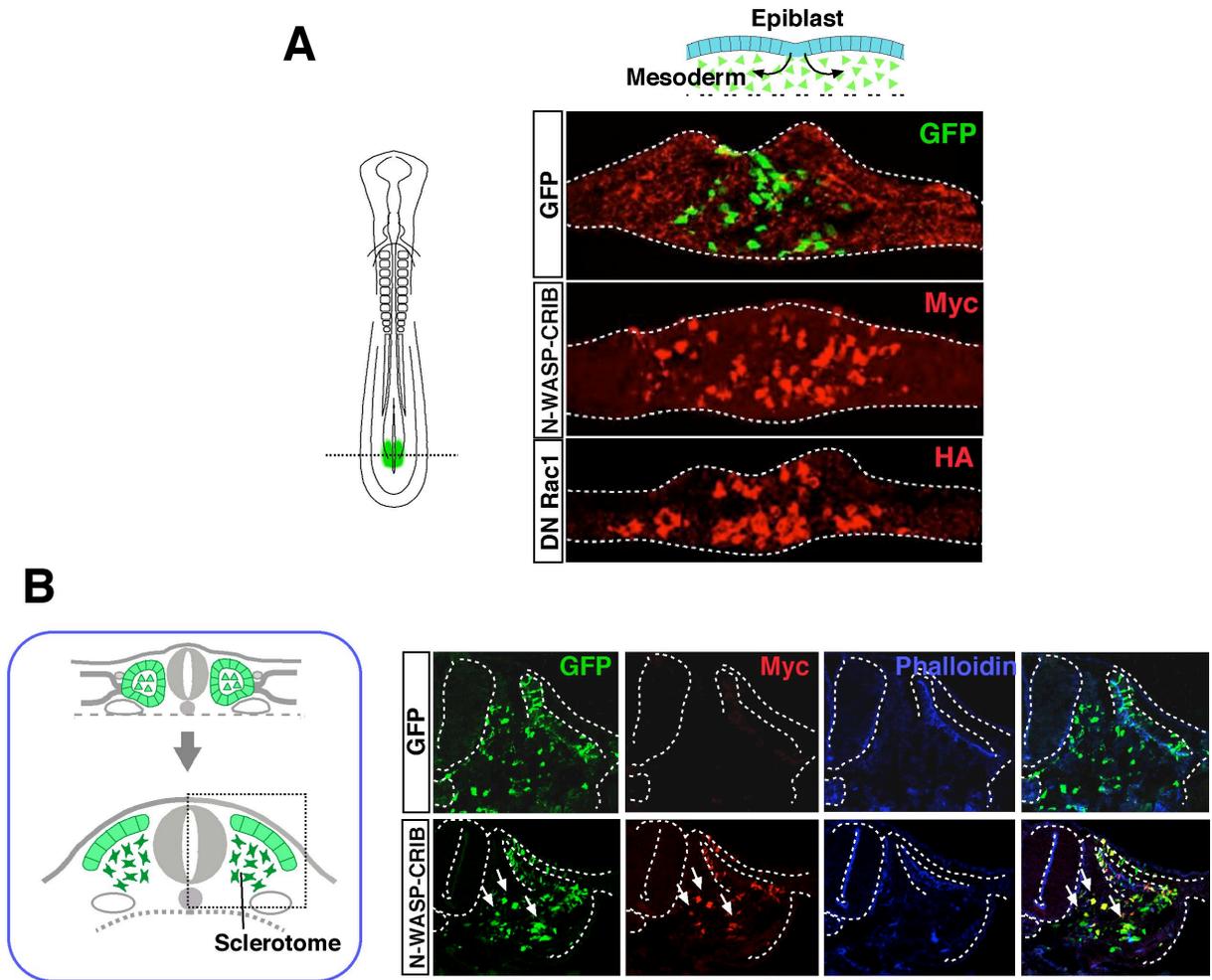


図 20 Cdc42 および Rac1 は中胚葉形成および硬節への分化過程に起こる EMT に影響を及ぼさない

中胚葉形成および硬節への分化過程に起こる EMT に対する Cdc42 および Rac1 の役割について検討した。A: エレクトロポレーション後 6~7 時間経過した胚の横切片像。N-WASP-CRIB あるいは DN-Rac1 を発現した細胞(myc および HA ポジティブ細胞)は、epiblast と中胚葉領域の細胞の両方に存在しており、epiblast から間充織に転換して腹側に向かって陥入していく様子が観察された。B: エレクトロポレーション後 48~50 時間経過した胚の横切片像。N-WASP-CRIB を発現した細胞(myc ポジティブ細胞)は、硬節の間充織細胞群の中に認められた (矢印)。

RhoA の機能は、中胚葉形成期に必要であるかもしれない

RhoA の野生型と変異体について、Cdc42 や Rac1 と同様に体節中胚葉になる運命の細胞群へ導入し体節形成への影響をみた。その結果、WT-RhoA および CA-RhoA を発現する細胞は、遺伝子導入後 24 時間後の体節中胚葉において、ほとんど検出できなかった(図 21)。一方 DN-RhoA を発現する細胞は、コントロール GFP と同様に分節した体節および未分節中胚葉において発現が認められた。本研究で汎用した遺伝子導入法は、将来体節中胚葉になる運命の epiblast に遺伝子を入れる方法であることから、RhoA は、epiblast が中胚葉細胞へ形態変化する時の EMT に何らかの影響をおよぼすか、RhoA を過剰に発現する中胚葉細胞は細胞分裂が阻害されている可能性が考えられた。RhoA は細胞死を誘導することが報告されている。本実験系において、TUNEL 法により細胞死を確認するほか、体節形成時の EMT に対する RhoA の役割を検討するためには、Tet-ON システムを用いて、体節中胚葉になってからの細胞に RhoA を発現させる必要性が考えられた。いずれも今後の課題である。

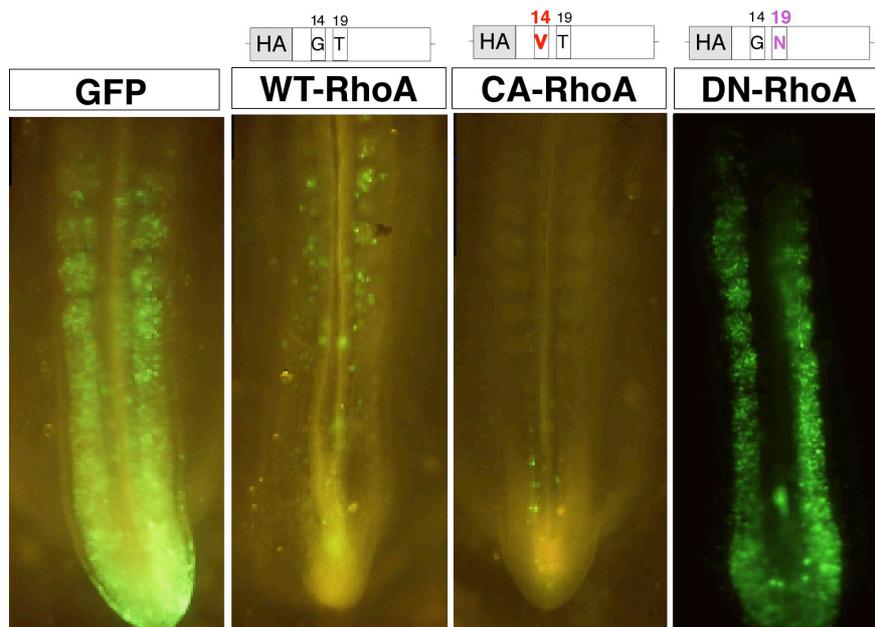


図 21 予定体節中胚葉細胞への RhoA 遺伝子の導入

エレクトロポレーション法により予定体節中胚葉細胞へ RhoA 遺伝子を導入し、24 時間後に観察した。それぞれの写真は体節中胚葉全体を示す。上：頭側 下：尾側
GFP のみを発現する細胞は、分節した体節および未分節中胚葉において検出された。これに対して、WT-RhoA および CA-RhoA を発現する細胞は、体節中胚葉においてほとんど検出されなかった。DN-RhoA を発現する細胞は GFP 発現細胞と同様に体節中胚葉において観察された。

Rac1 シグナリングと体節形成関連遺伝子の発現

分節化を支配する分子機構の理解は、体節中胚葉における様々な遺伝子発現の報告と、これらの機能解析から、近年急激に加速されている(Bessho and Kageyama, 2003; Pourquie, 2001; Saga and Takeda, 2001; Takahashi, 2004)。未分節組織は形態的には一様であるが、分子レベルではさまざまなことが起こっているらしい。その中核となるのは Notch シグナル伝達機構である。Notch1 のノックアウトマウスが体節中胚葉の分節パターンに異常がみられたことから(Conlon et al., 1995)、Notch 関連遺伝子が分節化に必要であることが明らかにされてきた。これらは、分節化過程において、MET を起こす前に起こる分節境界の形成に直接関わっていると考えられている(Sato et al., 2002)。Rac1 の機能は多岐にわたり、アクチンに対する機能の他、c-jun やその他の遺伝子発現を調節することが報告されている。そこで、体節形成に重要な Notch 関連遺伝子、Lunatic fringe(L-fringe)および Delta1 の発現に Rac1 が関わっているかどうか検討した。正常胚(コントロール)と DN-Rac1 を導入した胚の体節中胚葉組織における、L-fringe および Delta1 の mRNA 発現を whole mount in situ hybridization により調べた。その結果、L-fringe および Delta1 の発現パターンは、DN-Rac1 発現個体とコントロール個体の間において有意な違いは認められなかった(図 22)。従って、Rac1 シグナリングは体節形成に重要な役割を持つ L-fringe および Delta1 の発現調節には関わっていないことが明らかになった。

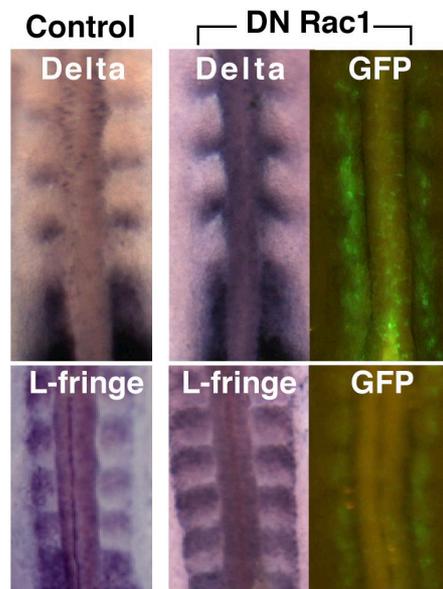


図 22 DN-Rac1 発現胚における L-fringe および Delta1 の mRNA 発現パターン

whole mount in situ hybridization による L-fringe および Delta1 の mRNA 発現パターンを示す。DN-Rac1 発現胚における両遺伝子の発現パターンは、正常胚と比較して有意な差は認められなかった。

転写因子 **Paraxis** による上皮化は **Rac1** シグナリングを介する

分節化は大きく分けて2つのステップから成り立っている。最初に次に分節する境界 **intersomitic gap** が形成され、その後、境界前側の間充織細胞が上皮へと形態を変化させる。そして、この2つのステップは、全く独立したものであると理解されている。それは、**bHLH** 型転写因子をコードする **paraxis** のノックアウトマウスが、体節の分節境界は形成されるが上皮化が起こらない、という表現型を示すことから明らかになった(Burgess et al., 1996) (図 23A)。**paraxis** は、この特異な表現型から体節の上皮化に不可欠であることが予想されているが、ターゲット遺伝子も同定されておらず、機能も上皮化へのメカニズムも依然としてベールに包まれたままである。そこで、**paraxis** と **Rac1** の間に何らかの関係があることを期待し解析を行った。まず、ニワトリの **paraxis** 遺伝子の全長をクローニングし、これを体節中胚葉に強制発現させた。その結果、**paraxis** 遺伝子を発現した細胞は優先的に上皮領域に存在した(図 23B)。次に、**paraxis** と **DN-Rac1** を共発現させ、**Rac1** シグナルが阻害された細胞では **paraxis** による上皮化が起こるかどうか検討した。その結果、両遺伝子を発現する細胞は、体節の間充織と上皮領域の両方に認められ、**Paraxis** 単独導入による表現型は中和された(図 23C)。これらの結果を **EM index** として算出した場合、**paraxis** 単独発現細胞は上皮に、**DN-Rac1** 単独発現細胞は間充織になる傾向が示された。**paraxis** と **DN-Rac1** 共発現する細胞は、それぞれの単独発現による **EM Index** を平均した値を示し、どちらかと言えば間充織細胞になる傾向が示された(図 23E)。以上の結果から、**paraxis** の上皮化作用は **Rac1** シグナリングを介して遂げられる可能性が考えられた。

この両者の関係をさらに追究するために、**Rac1** が **paraxis** の発現調節に関わるかどうか検討した。切片 **in situ hybridization** 法により、**CA-Rac1** あるいは **DN-Rac1** を発現した胚において、**paraxis** の mRNA 発現の変化を調べた。その結果、**Rac1** を活性化させても、逆に阻害しても **paraxis** の発現には変化が認められなかった(図 23F)。この結果から、**Rac1** が **paraxis** の発現を調節する可能性は低く、むしろ **paraxis** が **Rac1** を活性化する因子の発現調節に関わる可能性が考えられた。

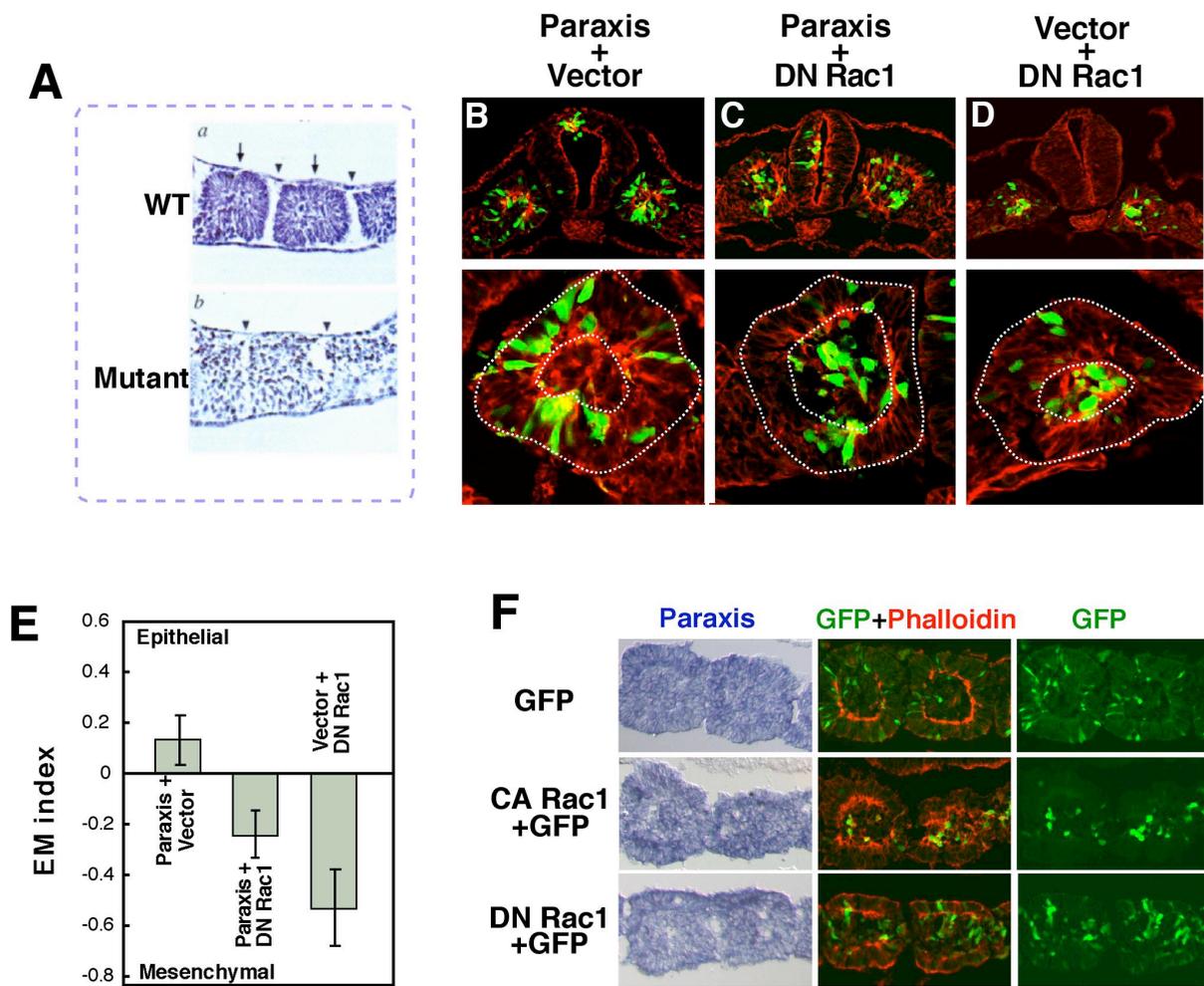


図 23 paraxis による上皮化作用は、Rac1 シグナリングを介する

A: paraxis のノックアウトマウスでは分節境界は形成されるが、上皮化がおこらない(Burgess et al., 1996)。B, C, D: 体節中胚葉へ paraxis と DN-Rac1 の共導入は、paraxis の上皮化を阻害した。
 E: B, C, D 各実験の EM index を示す。F: paraxis の mRNA 発現を切片 in situ hybridization により調べた。Rac1 の活性化レベルが変化しても paraxis mRNA レベルは変化しない。

第3章 考察

発生初期における器官形成 organogenesis は、段階を経た複雑なプロセスを伴っている。例えば、発生のかかなり早い時期では、均一な細胞集団の中で、将来の頭、体、手足を作るにしかるべきパターンが現れる。この時期では、領域の特異化 regional specification が起こっている。特異化により分類された細胞は、一生涯同じ性質を保ち続けているわけではない。細胞は、組織や器官が形成される際に特定の遺伝子の働きによって生じるタンパク質により、特異的な性質を持つ細胞へと分化 cell differentiation する。さらに細胞は、性質が変わるだけでなく、自身のサイズを大きくし、増殖させる。あるいは、細胞骨格を介してその形態をダイナミックに変化させることにより運動性を獲得する。個々の細胞は、様々な軸に沿って存在しているが、この軸の形成や維持は、組織や器官の正常な活動に必要であり、細胞極性という言葉で説明されている。このような細胞あるいは組織としての動きは、時間とともに着々と変化を遂げ、やがて3次元的な器官が構築し、生物個体を完成させる。本研究は、器官形成に至る様々なプロセスの中で、細胞の形態変化と極性形成を統御する上皮-間充織相互転換(EMT/MET)に着目し、このメカニズムについて、トリ胚を用いた *in vivo* 実験で直接的に評価し、その重要性を明らかにすることを目的とした。

体節分節は MET 研究の新規 *in vivo* モデルである

本研究では、体節分節を使って新規の実験システムを発展させることにより、細胞骨格の制御に関わることが知られている Rac1 と Cdc42 が、脊椎動物の発生過程における MET に重要かつ異なった役割を持つことを証明した(図 24)。この実験系の特徴の1つとしては、遺伝子導入された細胞が体節内で間充織領域と上皮領域にランダムに分布することを利用し、これにより Rac1 と Cdc42 の変異体の強制発現によって起きる影響が容易に評価できることが挙げられる。

近年、さまざまなモデル動物が用いられており、その中においても哺乳類であるマウスは、他のモデル動物よりもヒトに近いことから、その発生には特別な関心が寄せられてきた。事実、ノックアウトマウスからの知見は、調べたい遺伝子の *in vivo* における機能を如実に反映していると考えられてきた。最近では、ただ単純に loss-of-function するだけでなく、トランスジェニック技術やコンディショナルジェンターゲットング技術を用いて、調べたい組織あるいは時期特異的な遺伝子阻害はもちろん過剰発現も可能となっており、これら遺伝子工学の発展により得られる情

報は貴重なものであると考えられている。Rac1 や Cdc42 についてもノックアウトマウスが作製され、これらが胎生致死であることから、Rac1 や Cdc42 は実際に発生過程に重要であることを示している(Chen et al., 2000; Sugihara et al., 1998)。しかしながら、これら分子は器官を構成する細胞で普遍的に存在し、細胞骨格を調節することで細胞の形態制御に関わっている。現在までに報告されている Rac1 や Cdc42 変異マウスの知見からは、発生過程において、どのような種類の細胞が、あるいはどのような種類の組織・器官形成が Rac1 や Cdc42 のターゲットであるかについてはほとんど情報を得ることができない。その他のモデル生物では、無羊膜類(frogs and fish)の研究から convergent extension の過程における細胞の極性変化および細胞のふるまいにおいて、Rho ファミリーの重要性が証明されてきた(Shook and Keller, 2003)。Rac と Cdc42 の機能は、in vitro の培養細胞を用いた実験系では、これら両方の分子が上皮構造形成に関わっていると報告されている(Braga, 2002; Jamora and Fuchs, 2002)。しかし、2次元での実験系と細胞外マトリックスが複雑な構造を構築する in vivo の実験系では、細胞のふるまいはかなり違っていることが知られている(Bissell et al., 2003; Schmeichel and Bissell, 2003)。

本研究では、ニワトリ体節中胚葉へ特異的に遺伝子導入することを可能とした。本方法で工夫した点の1つは、発生初期の中胚葉形成が果敢に行われている時期(ステージ7-9)のトリ胚を用いて、将来体節中胚葉になる運命を持つ細胞に遺伝子を導入したことである。これら細胞はヘンゼン結節後方の原始線条 primitive streak に位置している。マイナス電極(タングステン)をできるだけ細く研ぎ、遺伝子を導入したい細胞集団に限局して電荷がかかるようにした。また、胚が電気ショックにより損傷することを回避するために、プラス電極は卵黄側に沈めて電気抵抗が大きくなるように調節した。GFP 遺伝子を導入した場合、24時間後において、GFP を発現した細胞が体節および体節前駆組織を形づくる細胞群の中に見いだされ(図6C)、体節はその後も一定の大きさで左右乱れることなく正常に形成された(図6D)。しかし、この方法には留意すべき点があり、それは試したい遺伝子が中胚葉形成過程に影響するかどうかを考えて表現型を観察することである。原腸陥入の際にすでに影響を及ぼす遺伝子の場合、BD Tet-ON™ Gene Expression System (クロンテック社)等を使って、体節中胚葉に細胞が移動してから遺伝子発現を誘導させるなどの工夫が必要である。

エレクトロポレーション法と体節分節を使った新規の実験システムは、細胞レベルでの MET メカニズムの解析を可能にした。このことにより、脊椎動物における Rac と Cdc42 の役割、しかも今までのマウスの報告からは得られなかった3胚葉形成後の器官形成に関わる役割において新たな見識を加えることができた。

体節形成時の MET における Rac1 と Cdc42 の異なった役割

本研究において、Cdc42 の活性型を発現する細胞と不活性型、あるいは内在性の Cdc42 シグナルを阻害するタンパク質(N-WASP CRIB あるいは N-WASP-H208D)を発現する細胞は、それぞれ体節の間充織領域と上皮領域に限局して存在することが明らかにされた。つまり、体節細胞に高レベルの Cdc42 を強制発現させた場合は上皮細胞になり、低レベル Cdc42 あるいは Cdc42 が阻害されている場合は、間充織形態が維持されていた(図 8, 10, 13)。これらの結果から、正常な体節形成過程では、Cdc42 の活性化レベルが、体節細胞の中で MET を起こす細胞、あるいは MET を起こさずに間充織のまま維持される細胞、という 2 種類の細胞のふるまいを決定している可能性が考えられた(図 24)。細胞極性(上皮極性を意味する)は、aPKC(atypical protein kinase C)と呼ばれるタンパクリン酸化酵素と PDZ タンパク質である PAR-3 および PAR-6 の三者複合体の働きにより制御されていることが明らかにされている(Ohno, 2001)。この時 Cdc42 は、Par6 と結合して aPKC のキナーゼ活性を上昇させることが見いだされた(Ohno, 2001; Yamanaka et al., 2001)。さらに一連の研究から、この複合体(aPKC-PAR 複合体)は線虫受精卵、Drosophila 上皮細胞、神経芽細胞の極性形成に関与することが明らかになってきた(Doe and Bowerman, 2001; Muller, 2000; Tabuse et al., 1998)。本研究の結果は、トリ胚体節分節をモデルシステムとして得られたものであり、脊椎動物の形態形成過程での上皮構築における Cdc42 の新しい役割を明らかにしたと考えている。

Rac1 に関しては、Cdc42 の場合と異なって、Rac1 の活性型(CA-)型と不活性 (DN-)型では、発現細胞の分布において相補的な表現型は得られなかった。それぞれの発現細胞は背腹軸に対して中間の位置で主に間充織領域に存在し、いくつかの細胞では上皮領域に存在していた(図 12, 13)。さらに特記すべき点は、CA-Rac1 発現細胞のうち、体節の上皮領域に存在する細胞の形態は、本来の上皮細胞形態とは異なっていた。このように Rac1 の活性を変化させることで正常な上皮になれないという事実は、体節形成過程の MET に、Rac1 の機能が必要であり、更にその活性は適したレベルで維持される必要があることを示唆している(図 24)。Rac1 の活性化レベルの重要性は、以下の結果からもまた確認された。上皮領域に存在する CA-Rac1 発現細胞では、N-cadherin が過剰に集積しており(図 14)、上皮極性を示すマーカー分子 ZO-1 が本来発現すべき頭頂側に集積していなかった(図 15)。従ってこれらは正常な上皮細胞であるとは言い難い。間充織領域に存在する DN-Rac1 細胞は、初代培養系で観察したところ、アクチン重合が異常であった(図 16)。このように Rac1 活性化レベルが正常でない細胞は、形成された体節の中で上皮領域あるいは間充織領域に存在しても、それらは、正常な上皮細胞でもなく、正常な間充織細胞でもないのかもしれない。非常に狭い範囲での Rac1 活性化が細胞の organization に重要

であるという知見は、*drosophila* のトラキア形成(Chihara et al., 2003)や MDCK 細胞(Hordijk et al., 1997)で報告されている。Rac1 の活性を下げるとトラキア形成の際にみられる上皮細胞のダイナミックな rearrangement が阻害され、トラキアの形態は異常になる。また、Rac1 活性を過剰に上昇させると、上皮構造が乱れ、E-cadherin は頭頂部に集積することはない(Chihara et al., 2003)。本研究において、体節中胚葉に WT-Cdc42 あるいは WT-Rac1 を過剰発現させた場合、これらの表現型にはコントロール実験(GFP のみ発現させた場合)と有意な違いは認められなかった。GTPase の活性型(GTP 型)と不活性型(GDP 型)のスイッチングに影響する GEF や GAP のような分子は、GTPases に比べて十分量が存在することが示されている(Schock and Perrimon, 2002; Settleman, 2001)。従って、本実験のような強制発現系においても野生型は GDP 型と GTP 型の比率を変化させることなく存在しているのでコントロール実験との違いが見られないのかもしれない。

本研究から得られた結果においてさらに強調したいことは、体節形成時の MET においては、Cdc42 と Rac1 がそれぞれ相補的な役割を持つ、ということである。培養細胞を用いた実験系では、Cdc42 と Rac1 が類似した機能を持つことを支持する報告が多い。例えば AJ 構築には、Rac も Cdc42 も共に重要である(Braga, 2002; Jamora and Fuchs, 2002)。神経の成長円錐の退縮応答は Cdc42 と Rac1 がともに抑制されて起こる(Shamah et al., 2001)。しかし、生化学的な解析では、Cdc42 と Rac1 がシグナリング経路を共にする場合もあり、異なる場合もある(Braga, 2002; Etienne-Manneville and Hall, 2002; Schock and Perrimon, 2002; Van Aelst and Symons, 2002)。このような実験結果の多様化は、それぞれの実験で使用した細胞や実験条件に依存している可能性が高い。本研究で得られた結果は、初期発生過程における細胞の動的な変化に対する Rho ファミリー分子の機能について、新しい概念を提案している。

予期せぬ出来事 ---分節化過程では細胞のソーティングが起こっている?---

本研究で予想外だったことは、形成される体節境界の近傍に位置する予定上皮細胞と間充織細胞の間では、細胞のソーティングが起こっている可能性が考えられたことである。例えば、CA-Cdc42 発現細胞は、体節が形成される前には体節板において前後軸に沿ってランダムに存在していた。しかし、CA-Cdc42 発現細胞は、遺伝子が発現していない細胞との間でそのポジションを再び配置し、その結果、CA-Cdc42 は間充織側へ、遺伝子を発現していない細胞は上皮側に存在している可能性が考えられた。実は、体節細胞が次の分節境界で再配置されることは、正常な分節過程においても起こりうる現象である(Kulesa and Fraser, 2002)。CA-Cdc42 発現細胞

による能動的な再配置は、CA-Cdc42 に特有のフィロポディア形成に関連しているかもしれない。図 16 に示すように、CA-Cdc42 を発現した体節細胞は初代培養系において、細胞の運動性を示すフィロポディア様構造を持つ。本実験では、体節を構成する全細胞に遺伝子を強制発現させることは不可能であることから、遺伝子発現細胞は正常な細胞（遺伝子を発現していない細胞）との間で位置を再配置し、その性質を顕示するのであろう。体節の全細胞に遺伝子を過剰発現させるために、DN-Rac1 等の発現アデノウイルスを未分節中胚葉に感染させることも試みたが、その感染効率はエレクトロポレーションによる遺伝子導入時のトランスフェクション効率よりも低かった。ウイルス液のタイターを向上させることも困難であったため、この試みについては諦めざるをえなかった。

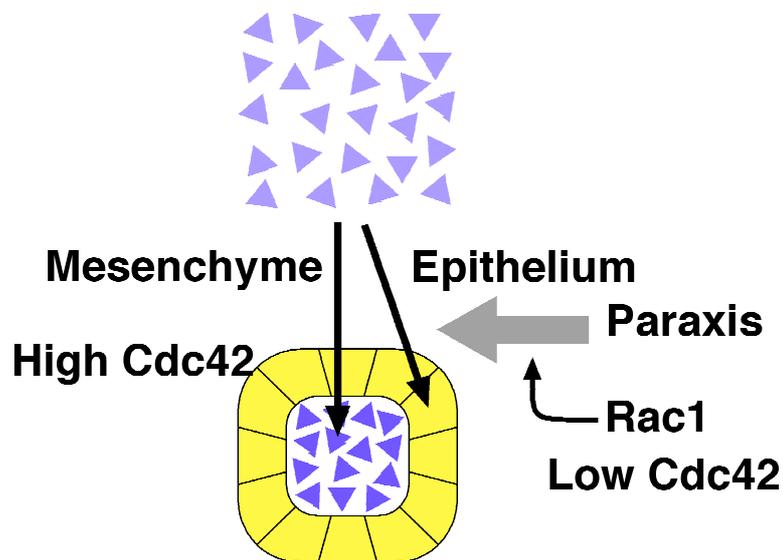


図 24 正常な体節形成過程における Cdc42 と Rac1 の機能（モデル図）

正常な体節形成過程においては、Cdc42 の活性化レベルが、体節細胞を上皮あるいは間充織の形態のどちらを選択するかを決めるために重要であると考えられた。Cdc42 の活性化レベルが低い場合は上皮へ転換し、高い場合は間充織のまま維持されている。また上皮化に関しては、Rac1 の厳密に調節された活性化レベルが必要であり、さらに Rac1 の機能は paraxis による上皮化に関与することが考えられた。

Rac1 と Cdc42 の活性化を特異的に調節する分子

Notch 関連分子

本研究では、体節分節について「これほど理路整然とした組織は他にはない」と考え、MET 研究のモデルシステムとして位置づけている。「理路整然」とは、形態が繰り返し構造を持つからであるが、実は分節化は依然としてわかったようでわからない発生現象であるように思われる。それ故、発生学に携わる人々を魅了し続けているのだろう。ニワトリでは、90 分周期に分節化が起こるが、このように一定のリズムを持って 1 つずつ新しい形が作られていく現象に対して「Clock and Wave Front」モデルが提唱され、熱い議論が集中している。このモデルは、分節時計 (segmentation clock) と分節時計の振動を止める機構により成り立っているが、最近では、これを制御するような分子の探索が行われ、Notch シグナリング系の因子が重要な役割をもつことが明らかにされてきた (Bessho and Kageyama, 2003; Pourquie, 2001)。さらに、上皮化が体節形成の最後を飾るとするならば、その最後を導くためには、未分節の中胚葉組織から体節が分離しなければならない。この時に現れる溝は分節境界と呼ばれるが、この形成機構については当研究室の佐藤らが、胚の移植実験により分節境界の誘導活性 (セグメンター活性) を見だし、この活性は Lunatic fringe と Notch によって調節されていることを報告した (Sato et al., 2002)。本研究において、Rac1 の不活性型変異体、DN-Rac1、を発現させた体節中胚葉において、L-fringe (L-fringe) と Delta1 の発現パターンを調べた結果、正常胚のものとの差異は認められなかった (図 22)。従って、Rac1 の機能は、体節形成時の上皮化において発揮されるものの、分節時計や体節形成後の前後極性に対しては影響をもたないことがわかった。

MET は、分節境界が形成されてから、その前側に位置する細胞で起こる。従って、MET の引き金は、分節境界の後側の細胞に発現する分子あるいは分泌されるタンパク質である可能性が高い。最も直接的に Rac 活性を上昇させ Cdc42 活性を低く保つ key player は、前述した Notch signaling に含まれているかもしれない。

Eph family receptor tyrosine kinase と ephrin

Eph ファミリーとそのリガンドである ephrin はそれらが相互作用した時に細胞間反発現象を引き起こすことが知られている (Holder and Klein, 1999)。分節境界が形成される際も細胞反発現象が起こっていると仮定すると、確かに EphA4 は分節境界より後方の細胞で発現を開始している (Suetsugu et al., 2002)。EphA レセプターからの細胞内シグナルは、アクチン細胞骨格と通じているらしい。このことは、EphA レセプターが Rho ファミリーの GEF である ephexin に結合することから推測できる。この EphA レセプターがリガンドと結合した時にはこの ephexin を介して RhoA

を活性化する一方で Rac/Cdc42 を抑制する(Shamah et al., 2001)。現在のところ、体節特異的に発現する Rho family の GEF は報告されていないので(Schmidt and Hall, 2002)、前述の EphA4 のシグナルが Rac や Cdc42 に伝わる証拠は何も得ていないが、この下流に GEF が存在する可能性は残っている。また、Eph とそのリガンド ephrin の接触面での限局したアクチン細胞骨格の制御が注目されている(Marston et al., 2003)。リガンド ephrin 自身も細胞膜に固定されており、細胞内にシグナルが発生することが明らかにされているので、このシグナルが Rho ファミリーに伝達される可能性もまた考えられた。

Wnt 関連分子

体節の上皮化は、体節中胚葉を背側から覆うようにして存在する外胚葉の影響を受けることが報告されている(Correia and Conlon, 2000)。マウスの未分節中胚葉組織を神経管、脊索、腸、外胚葉のそれぞれと共培養すると、外胚葉と共培養した場合にのみ体節の上皮化が観察された。興味深いことに、中胚葉組織だけを培養した場合において、いくつかの例では体節の境界は形成されていた。Paraxis の実験結果の項でも述べたように、分節境界の形成と体節の上皮化は別々の現象であることがここでも証明された。外胚葉から分泌する因子で体節の上皮化に関わることが予想される分子としては Wnt-6 がある。Wnt-6 は外胚葉において発現しており、これを発現した細胞(NIH3T3)を、外胚葉が除去された箇所へのせると、体節は正常に形成されることが示された(Schmidt et al., 2004)。Wnt signaling は、Drosophila による平面内極性 planar cell polarity(PCP)形成に関係しており、その下流において Rho ファミリーがアクチンの再構築を担っていることが知られている。上皮化における Wnt6 と Rac1 の関係は直接的ではないのかもしれないが、リンクする可能性は十分に考えられる。

paraxis

paraxis ノックアウトマウスは、体節の上皮化が起こらないが体節間の境界は正常にできるという表現型を示し、最終的には体節から派生する構造が奇形となることが報告されている(Burgess et al., 1996)。この報告から、paraxis が体節の上皮化に対して必須の因子であると考えられてきた。本研究では、得られた実験結果(図 23)より、paraxis による上皮化作用は Rac1 のシグナリングを必要とする と推測している。Rac1 シグナルが paraxis に及ぼす影響についてさらに解析を進めた結果、DN-Rac1 発現胚において、paraxis mRNA の発現パターンは正常であった(図 23F)。従って、paraxis は、GEF や GAP さらに GDI のような Rac1/Cdc42 の活性型、不活性型のスイッチングレギュレーター の発現を調節している可能性が考えられた。

EMT に関連する因子

TGF- β や Snail ファミリーの snail や slug については、in vivo EMT に重要であることが報告されている。例を挙げると、slug はトリ胚における neural crest cell の形成に役割を持つことが報告されている(del Barrio and Nieto, 2002)。トリ胚においては、Snail および Slug の発現は認められるが(Sefton et al., 1998)、これらが体節形成過程における MET に関与するかどうかについては、明らかにされていない。

胚の発生過程における Rac1 と Cdc42 の機能

本研究では、体節中胚葉の分節化にともなう MET に焦点をあてて研究を進めてきた結果、Rac1 と Cdc42 はそれぞれ体節形成過程に役割を持つことを明らかになった。しかし、個体発生という長い目で考えた時には、体節中胚葉の分節化は、将来骨や筋肉となるまでの単なる通過点である。胚は時間とともにその形態を着々と変化させており、それに伴って細胞達は形態を変化させ続けているのである。発生生物学を学ぶ人間にとり、ある発生段階で見えてくる側面が、発生過程を通じて普遍的なものなのか、そうでないのかについては非常に興味深い問題である。そこで、中胚葉陥入期の EMT および硬節の形成過程での EMT に着目した。図 20 に示すように、それぞれのステージで Rac1 と Cdc42 の機能が阻害されたと思われる細胞のふるまいに着目した。しかし、Cdc42 や Rac1 の機能が失われていても、epiblast は EMT を起こし正常に中胚葉が形成される。また、実験のシステム上、体節形成期に一度強制的に上皮細胞にならされた細胞(N-WASP CRIB 発現細胞)が、硬節の形成過程においては上皮形態を維持するのではなく、正常発生と同様に間充織細胞へ転換していた。硬節への分化過程において、Cdc42 の機能が失われていても正常に EMT は起こりうる可能性は強い。なぜ、Rac1 や Cdc42 の機能が発生段階に応じて変化するのだろうか？これは EMT と MET の違いによるものなのだろうか？

1つの可能性として、GEF の存在がある。一部の Rho ファミリーGTPases は除かれるが、Rac1 や Cdc42 は mRNA レベルでは時期や組織にほとんど無関係に遍在していると考えられている。低分子量 GTPases の特徴は、GTP 結合型になった時にのみ発揮される。これには GTPases を活性化する GEFs の存在が大きく関わってくる。事実、GEFs の特異的な発現は、発生過程において、時間的空間的な Rho ファミリー分子の活性化調節に重要である。例えばマウス E15 cerebral cortex では、Rac1、Rac1 特異的な GEF である Sif and Tiam-like exchange factor(STEF)および Tiam1、さらに Rac1 シグナルの下流分子の c-jun N-terminal kinase がそれぞれ発現 (タンパク質レベル) している。その発現領域を注意深く観察すると、Rac1 は cortex 全体

で発現しているのに対して、STEF および Tiam1 は *critical plate* および *intermediate zone* という 2 層で特異的に発現している。そして、c-jun N-terminal kinase は *intermediate zone* のみで発現しており、この層で Rac1 が GTP 結合型になっている可能性が考えられた(Kawauchi et al., 2003)。

マウスにおいては、60 種類以上の GEF が同定されている。しかし、これらが発生過程においてどのように調節された役割を持つかについては、ほとんど明らかにされておらず、また、体節形成過程における GEF の発現は報告されていない(Schmidt and Hall, 2002)。予備的な実験ではあるが、ニワトリにおいて RhoA は中胚葉形成期に何らかの影響を持つ可能性がある(図 21)。今後研究が進展し、ニワトリにおける GEF がいくつか同定されれば、中胚葉や硬節形成期における Rho ファミリーの役割について説明できるのかもしれない。

今後の展望

近年までの Rho family に関する報告は、培養細胞のみならずモデル動物の *Drosophila* や線虫による研究においてもそのほとんどが、恒常的活性化型(CA)と不活性化型(DN)の過剰発現系での評価である。DN-Rac1 の強制発現により引き出された影響は、loss-of-function Rac 変異体の表現型とほとんど類似しているが、厳密には一致していない部分もある(Hakeda-Suzuki et al., 2002)。本実験システムにおいても DN 型 CA 型を用いて評価しているが、今後 RNAi の手法を使って内在する遺伝子を阻害した場合に同じような結果が得られるかどうか、それは予想がつかないことでもあるが、おそらく現在得られた結果が再現できるものと信じている。また、Rho ファミリーの機能を知る上で、いつ、どこでこれらが活性化されているかを実際に観ることが大事である。あるいは、その活性化のレベルを定量できる手段があれば、尚望ましい。活性化型を特異的に認識する抗体が世に存在しないために、この問題はなかなか解決できないが、標的タンパク質や上流の GEF を探索し、それらの抗体を使って間接的に証明したい。

最後に、本研究は、EMT/MET が器官形成過程において重要な現象であると考え、だからこそ、トリ胚を用いた *in vivo* 実験で、その重要性を直接的に明らかにしたいと考えてきた。もちろん培養細胞を用いて EMT/MET メカニズムを知ることは可能であろう。今後も挑戦する問題に対して *in vitro* と *in vivo* の実験系でそれぞれの利点を引き出し、細胞生物学と発生生物学の間の架け橋となるような位置づけで研究を続けていきたいと考えている。

第4章 材料および方法

実験動物

ニワトリ受精卵は、城山鶏園より購入した。これらを 38.5°C に設定し、内部を加湿したインキュベーターで孵卵し、各実験に適した段階まで発生を進行させた。本論文中に記す発生段階は、Hamburger and Hamilton (Hamburger and Hamilton, 1951) の発生段階表に従った。

体節および未分節中胚葉（体節板）への遺伝子導入(図 25)

ニワトリ胚への遺伝子導入は、百瀬らの方法 (Momose et al., 1999) を改変したエレクトロポレーション法により行った (Sato et al., 2002; Yasuda et al., 2000) (仲矢, 高橋, 2002)。受精卵は、約 24-29 時間孵卵し、ステージ 7-9 まで発生させた後、卵殻に穴をあけ、注射針で卵白を約 3ml 抜いた。さらに卵殻上方に眼科用ハサミで小窓を開け、胚を可視するために黒インクを Hanks' solution (140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.34 mM Na₂HPO₄, 10 mM Hepes, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, pH 7) を用いて 1:5 の割合で希釈し、実体顕微鏡下でガラスキャピラリーを用いて胚と卵黄の間に注入した。次に、タングステンニードルでビテリン膜を破り、ヘンゼン結節の位置を確認し、2% Fast Green を含む DNA 溶液 (10 mg/ml 機能分子発現ベクター : 10 mg/ml pCAGGS-GFP 発現ベクター = 4:1) を、ガラスキャピラリーを用いて原始線条上に滴下した。電極は、プラス極側は白金線 ($\phi = 0.3 - 0.5$ mm) を、マイナス極側はタングステン針 ($\phi = 0.5$ mm) を加熱した亜硝酸ナトリウムでさらに細く研いで使用した。プラス極はマニピュレーターを操作して胚と卵黄の間に挿入し、マイナス極はホルダー (市販のシャープペンシル) に取り付け、ヘンゼン結節より後側の原始線条周囲の細胞の直上に位置するように手で固定した。DNA 溶液が拡散しないうちに、遺伝子導入装置 (ELECTRO SQUARE PORATOR, T820, BTX) のフットスイッチを操作し、5 - 7V、25 msec 毎に 3 回の条件でパルスを加えた。その後、電極をはずし、卵殻に開けた穴にビニールテープを貼り、38.5°C で目的の発生段階に至るまで発生を進行させた。

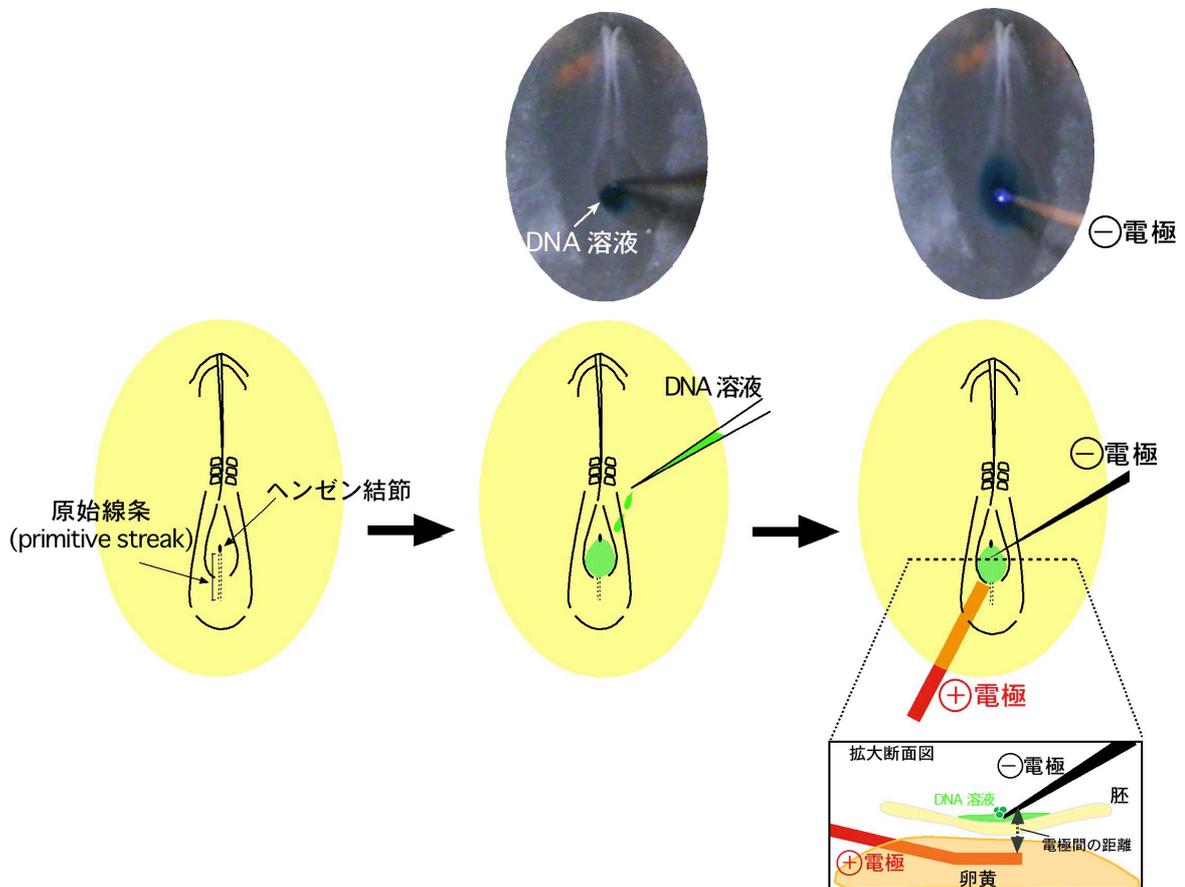


図 25 エレクトロポレーションによる体節中胚葉への遺伝子導入法

エレクトロポレーションによる体節中胚葉への遺伝子導入の手順を示した。ステージ 8 のニワトリ胚と卵黄の間に黒インクを注入し、ヘンゼン結節の位置を確認する。次に、ビテリン膜を破り、DNA 溶液を原始線条上に滴下する。

+極はマニピュレーターを操作して卵黄と胚の間に挿入し、-極をヘンゼン結節より後方の細胞上に設置した後パルス(電圧：5-7V、25 msec 毎に puls 3 回)をかけた。

下図：図点線に沿った断面を示す。

プラスミド

体節中胚葉へ導入した各遺伝子は、pCAGGS 発現ベクター (Niwa et al., 1991) にサブクローニングした。

■ Rho family (RhoA, Rac1, Cdc42) 発現ベクター

pEF-BOS 発現ベクターに組み込まれた Rho family メンバーの RhoA, Rac1, Cdc42 のそれぞれ野生型 (WT-)、恒常的活性化型 (CA-)、不活性型 (DN-) (Kuroda et al., 1998) は、それぞれ *Xba* I で切断した後、アルカリフォスファターゼ処理を行った pCAGGS 発現ベクターに、サブクローニングした。pCAGGS-EGFP-WT-Rac1 および pCAGGS-EGFP-DA-Rac1 は、pEGFP-C1-WT-Rac1、pEGFP-C1-DA-Rac1 (以上、貝淵博士から供与いただいた) を鋳型とした PCR 反応で得た DNA 断片を pCAGGS 発現ベクターにサブクローニングした。使用したプライマーは、上流側 (5'-ATG ATA TCA TGG TGA GCA AGG GC-3')、下流側 (5'-ACG ATA TCT TAC AAC AGC AGG CA -3') であり、DNA ポリメラーゼとしては Takara Ex Taq™ (Takara) を使用した。得られた各 PCR 産物は *EcoRV* で切断し、pCAGGS 発現ベクターの *EcoRV* 部位に挿入した。

■ N-WASP-CRIB および N-WASP-CRIB-H208D 発現ベクター

pCAGGS-N-WASP-CRIB および pCAGGS-N-WASP-CRIB-H208D は、N-WASP あるいは N-WASP-H208D (Miki et al., 1998) の CRIB ドメインを含む 162 から 290 番目のアミノ酸を発現する DNA 断片(およそ 400bp)を、6×myc-tag が組み込まれた pCAGGS 発現ベクターにサブクローニングした。これらの DNA 断片は、順鎖プライマー ; 5'-CCG AAT TCT GAT ATA AAA AAT CCA GAA ATC ACA-3'、逆鎖プライマー ; 5'-TAC TCG AGC TAA GGA GGA GGA GGT GGC CCT CCC CTT-3' を用いて、pEF-IRES-GFP N-WASP WT もしくは pEF-IRES-GFP N-WASP H208D を鋳型にした PCR 反応で増幅した。得られた断片は、*EcoRI* および *XhoI* で切断され、pCAGGS-6×myc 発現ベクターの *EcoRI* / *XhoI* 部位に挿入された。

■ N-WASP-H208D 発現ベクター

pCAGGS-N-WASP-H208D は、pEF- N-WASP H208D-IRES-GFP を *EcoRI* と *XhoI* で消化した後、6×myc-tag が組み込まれた pCS2+発現ベクターにサブクローニングした。その後、*Clal* と *XbaI* で消化したものに対して平滑化し、これを pCAGGS 発現ベクターの *EcoRV* 部位に挿入した。

■ PAK-CRIB 発現ベクター

pCAGGS-PAK-CRIB は、pRK5-myc-PAK (Dr. Hall より 供与いただいた)を鋳型にして、CRIB ドメインを含む 57 から 141 番目のアミノ酸が発現するように、N 末端側プライマー ; 5'-CTG AAT TCC ATT TTA CCT GGA GA-3'、C 末端側プライマー ; 5'-ATC TCG AGT CAT TTC TGG CTG TTG G-3'を用いて PCR 反応により DNA 断片を増幅した。PCR 産物を *EcoRI* および *XhoI* で切断し、pCAGGS-6×myc 発現ベクターの *EcoRI* / *XhoI* 部位に挿入した。

■ IQGAP1 発現ベクター

pCAGGS-myc-IQGAP1 は、pEF-myc-IQGAP1 (貝淵先生より 供与いただいた) の *pvuI* で消化し、エタノール沈殿した。これをさらに *XbaI* で消化した後、pCAGGS 発現ベクターの *XbaI* 部位にサブクローニングした。

■ Paraxis 発現ベクター

chicken paraxis の全長は、利根川らによりクローニングされた 3'側 UTR を含む paraxis の断片 (Tonogawa and Takahashi, 1998)を鋳型として、PCR 反応により増幅して得られた。使用プライマーとして、N 末端側 (5'-GTG AAT TCA TGG CTT TCA CCA TGC TGC GTC CCA TGG CTG CCC GCG TGC TTT ACC CCG AC-3')、C 末端側 (5'-AAC TCG AGT CAT CTC CGA TTC CCT CGC A-3')を使用した。得られた PCR 産物 (全長 chicken paraxis) は *EcoRI* および *XhoI* で切断され、pCAGGS 発現ベクターの *EcoRI/XhoI* 部位にサブクローニングされた。

ニワトリ胚の免疫染色

ニワトリ胚は、4% パラホルムアルデヒド/ Hanks' 溶液を用いて 4°C で一晩固定した。続いて、10%、20%、30% シュクロースで脱水し、O. C. T. Compound (Tissu-Tek[®]) で包埋し、液体窒素により凍結した。凍結切片は、クリオスタット (Cryo-Star HM560, MICROM)により作成した。強制発現させた遺伝子の発現は、抗 myc ポリクローナル抗体 (Anti-Myc-tag Serum (Rabbit), MBL)あるいは抗 HA 抗体 (Anti- [HA]-fluorescein, mouse monoclonal, Clone 12CA5, Boehringer Mannheim) で検出した。体節における N-cadherin の発現は抗 N-cadherin ポリクローナル抗体 (竹市雅俊博士、理研 CDB)、ZO-1 の発現は抗 ZO-1 マウスモノクローナル抗体, T8-754 (古瀬幹夫博士、京都大学)、Rac1 の検出は、抗 Rac1 抗体 clone 23A8 (mouse monoclonal, Upstate)を用いて検出した。いずれの抗体の場合においても、ブロッキングは非働化 10% lamb serum / HBSS により室温で 1 時間行った。1 次抗体は 0.2% Triton X-100/ 0.2% BSA/ Hanks' 溶液に希釈

した後、それぞれ 4°C で一晩反応させた。抗体の洗浄は、Hanks'-T (0.1% TritonX-100/Hanks') で、10 分間行い、この操作を 3 回繰り返した。2 次抗体としては、Alexa Fluor 647 goat anti-mouse IgG, Alexa 647 goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG, Alexa 568 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) をそれぞれ 0.2% Triton X-100/0.2% BSA/ Hanks' 溶液に希釈した後、室温で 1 時間反応させた。

ファロイジン染色

■ ホールマウント胚のファロイジン染色

ニワトリ胚は 4% パラホルムアルデヒド (PFA) / Hanks' により室温で約 15 分間固定した後、Hanks' で洗浄した。その後、胚をエッペンチューブに移し、さらに Alexa Fluor 568 phalloidin (Molecular Probes) を Hanks' で 20U/ml の濃度に希釈した溶液を加え、4°C で一晩反応させた。洗浄は、1ml Hanks' で 2 時間毎に 3~4 回行った。続いて、胚をガラスボトム Dish (Hole: 14mm, PLL-Coat, Matsunami) に移し、FLUOVIEW FV500 共焦点顕微鏡 (OLYMPUS) を使って光学切片像を得た。

■ 凍結切片のファロイジン染色

免疫染色の項に記した方法によりニワトリ胚を固定、脱水後、凍結切片を作製した。切片を貼り付けたスライドガラスを Hanks' で 5 分間 3 回洗浄した後、ファロイジン (5-10 U/ml) を、室温で 30 分間反応させ、その後 Hanks' で 3 回洗浄した。尚、用いたファロイジン溶液は、抗体との多重染色により標識される色素との兼ね合いから、Alexa Fluor 568 phalloidin, Alexa Fluor 488 phalloidin, Alexa Fluor 647 phalloidin (molecular probes) の 3 種類の中から任意のものを使用した。

体節細胞の初代培養

体節細胞の初代培養は、エレクトロポレーション施行より約 24 時間後、共導入した GFP の蛍光シグナルが体節中胚葉において検出可能であったニワトリ胚を用いた。胚は CMF (140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.34 mM Na₂HPO₄, 10 mM HEPES) で洗浄した後、体幹部を切り取り、1.25% Pancreatin (GIBCO/BRL)/CMF のドロップ内で約 20 分間処理した。実体顕微鏡下で組織が緩んできたことを確認してから、タングステンニードルを用いて強制発現された遺伝子が発現する個々の体節を切り出した。続いて、DH10 (DMEM と HAM F12 を等量に混ぜ、さらに 10% FBS を含む) のドロップを 3 個用意し、切り出した体節をガラスキャピラリーによりドロップ内に移す操作を 3 回繰り返して、Pancreatin による消化作用を停止させた。体節の培養はガラスボトム Dish を用いて行った。中心部のガラス部分を DH10 でコーテ

ィングした後、バラバラにした体節をガラスキャピラリーで Dish 内に移した。この時、体節が培養 Dish に接着できるように、過剰のメディウムは用いず、体節とともに持ち込まれた 10%FBS と、ごく少量 DH10 で 37°C のインキュベーター内に 2-3 時間、静置した。この間、培養液が蒸発し乾燥するのを防ぐために、ガラス外周のプラスチック部に数個の DH10 のドロップを置いた。位相差顕微鏡で、体節が底面に接着していることを確認した後、1ml の DH10 をゆっくりとガラス部分に添加し、約 24 時間培養した。

TUNEL 法

アポトーシスを起こした細胞の検出は、In situ Apoptosis Detection Kit (Takara) を用い、手順としては、付属のプロトコールに準じて行った。遺伝子を発現させたニワトリ胚凍結切片に付着している OTC コンパウンドを除くためにスライドガラスを PBS で洗浄した後、酵素反応液の浸透をよくする Permeabilisation Buffer 0.1ml をスライドガラス上にのせ、氷上で 2-5 分反応させた。PBS で洗浄し、続いて、予め氷冷したターミナルトランスフェラーゼ (TdT) 溶液をスライド上にのせ、湿潤箱中で 37°C、60 分間反応させた。その後、PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行い、反応を停止させ、コンフォーカルレーザー顕微鏡で観察した。

In situ ハイブリダイゼーション

■ 各種 RNA プローブ

In situ ハイブリダイゼーションで使用した RNA プローブは、実際に以下のプライマーを用いた RT-PCR 法により得られた cDNA から digoxigenine (DIG) 標識のアンチおよびセンスプローブを作製した。また、ニワトリ L-fringe および Delta 1 の RNA プローブ (946bp) は、当研究室の佐藤より (Sato et al., 2002)、Paraxis は利根川より供与された (Tonegawa and Takahashi, 1998)。

cRac1A; 5'-GTC ATC TAG AAT GCA GGC CAT CAA GTG TG-3' (forward),

5'-AGA CGT CGA CGG CAT TGA ATG TGA TGC TCC-3' (reverse), 647 bp

Cdc42; 5'-CTG AAT TCG ACT TCA GCT ATG CAG ACG-3' (forward),

5'-ATC TCG AGA GGG ACG TTC ATA GCA GCA-3' (reverse), 594 bp

■ ホールマウント in situ ハイブリダイゼーション法

ホールマウント in situ ハイブリダイゼーションは、基本的に Henrique の方法 (Henrique et al., 1995) に準じて行った。ニワトリ胚は、4% PFA/MEM (100mM MOPS pH7.4, 2mM EGTA, 1mM MgSO₄ · 7H₂O)/PBS で一晩固定した。固定された胚を PBT (0.1% Tween20/PBS) で洗浄した後、25%, 50%, 75%, 100% のメタノールで漸次脱水した。続いて、proteinase K (20 μg/ml) で 15 分間処理した後、胚を 0.2% グルタルアルデヒド/4% PFA で再固定した (室温、20min)。その後、胚を PBT で 2 回洗浄し、ハイブリバッファー (ULTRAhybTM, Ambion) が入ったエッペンチューブに移し、68°C で 1 時間、プレハイブリダイゼーションを行った。あらかじめ 80°C で 5 分間熱処理を施した DIG 標識の RNA プロブを含むハイブリダイゼーション溶液中で 68°C、一晩 hybridize した。その後の洗浄は、50% ホルムアミド、5×SSC、1% EDTA、0.2% Tween-20、0.5% CHAPS を含む洗浄バッファーを用いて 68°C で 30 分ごと、3 回行った。さらに、MABT (0.1M マレイン酸 (pH 7.4), 0.15M NaCl, 1% Tween-20) で、少なくとも 3 回洗浄し、2% BBR (Boehringer Blocking Reagent, Roche)/MABT でブロッキングを行った。その後、alkaline phosphatase-conjugated 抗 DIG 抗体 (Roche) をブロッキング溶液で 2000 倍に希釈し、胚に対して 4°C で一晩反応させた。抗体反応を終えた胚は、MABT で数回の液交換を行いながら、5 時間以上厳しく洗浄し、最後に NTMT (100mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0.1% Tween-20) 中に移された。アルカリフォスファターゼ活性は、発色基質 : 0.45 mg/ml NBT (nitroblue-tetrazolium chloride, Roche) と 0.175 mg/ml BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase, Roche) を含む NTMT による発色で検出された。発色反応の停止後、胚を 0.1% グルタルアルデヒド/4% PFA 溶液で固定し、実体顕微鏡にて観察した。

■ 切片 in situ ハイブリダイゼーション

切片 in situ ハイブリダイゼーションは、Yoshida, et al. の方法 (Yoshida et al., 1996) に準じて行った。ニワトリ胚は、4% PFA/MEM (100mM MOPS pH7.4, 2mM EGTA, 1mM MgSO₄ · 7H₂O)/PBS で一晩固定した後、凍結切片を作製した。スライドガラスを PBT (0.1% Tween20/PBS) で洗浄した後、proteinase K (1 μg/ml) で処理 (37°C、7 分) し、切片を 4% PFA/PBS で再固定した (室温、20min)。その後、スライドガラスを PBT で 2 回洗浄し、ハイブリダイゼーション溶液 (50% formamide, 6×SSC, 0.5% SDS, 0.1mg/ml tRNA, 0.1mg/ml ヘパリン) で、65°C で 1 時間、プレハイブリダイゼーションを行った。次にあらかじめ 90°C で 5 分間熱処理を施した DIG 標識の RNA プロブを含むハイブリダイゼーション溶液中で 65°C、一晩、ハイブリダイゼーションした。その際、ハイブリダイゼーション溶液乾燥するのをふせぐために、シリコンコートをしたカバーガラスをスライドガラス上に載せた。がその後の洗浄は、50% ホ

ルムアミド、5×SSC、1% EDTA、0.2% Tween-20、0.5% CHAPS を含む洗浄バッファーを用いて 65°C で 30 分ごと、3 回行った。さらに、MABT (0,1M マレイン酸(pH 7.4), 0,15M NaCl, 1% Tween-20) で、少なくとも 3 回洗浄し、2% BBR (Boehringer Blocking Reagent, Roche)/MABT でブロッキングを行った。その後、alkaline phosphatase-conjugated 抗 DIG 抗体(Roche)をブロッキング溶液で 2000 倍に希釈し、胚に対して 4°C で一晩反応させた。抗体反応を終えた胚は、MABT で数回の液交換を行いながら、5 時間以上厳しく洗浄し、最後に NTMT(100mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0.1% Tween-20)中に移された。アルカリフォスファターゼ活性は、発色基質 : 0.45 mg/ml NBT(nitroblue-tetrazolium chloride, Roche)と 0.175 mg/ml BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase, Roche)を含む NTMT による発色で検出された。発色反応の停止後、胚を 0,1% グルタルアルデヒド/4% PFA 溶液で固定し、実体顕微鏡にて観察した。

GTP 結合型 Rac1 の検出

■ 大腸菌を用いた融合タンパク質の発現と精製

GST および GST-CRIB の精製は、名古屋大学の貝淵研究室で行った。pGEX-4T-1-GST および pGEX-4T-1-GST-CRIB を大腸菌に形質転換させた。シングルコロニーを 2 ml の LB 培地(1% Bact-tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl, 0.5% 5N NaOH, 2% グルコース, 100 mg/ml アンピシリン)に植菌し、10 時間以上培養した。続いて、150 ml の LB 培地、さらに 500 ml の LB 培地と順にスケールアップしていき、最終的には O. D.₆₀₀ が 0.8-1.0 になるまで振とう培養した。その後、0.1 M IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)で 4 時間誘導をかけた。その後、遠心分離により集めた大腸菌を超音波破碎機で破碎し、超遠心機(Beckman)で遠心分離した(回転数は 100,000G)。次からの操作は、4°C に設定された低温室で行った。超遠心で得られた上清は、あらかじめ Glutathione Sepharose™4B beads (Amersham biosciens)を詰めて平衡化したカラムに通した。カラムを洗浄バッファー(20mM Tris-HCl pH8.0(@4°C), 1mM EDTA, 1mM DTT, 10 μg/ml Leupeptin, 10 μM APMSF)で 5 回洗浄した後、GST 融合タンパク質は、溶出バッファー(20mM Tris-HCl pH8.0(@4°C), 1mM EDTA, 1mM DTT, 10 μg/ml Leupeptin, 10 μM APMSF, 10mM GSH)5ml で溶出した。さらに一晩透析を行った。

■ GST 融合タンパク質沈降法

GST 融合タンパク質沈降法は、Nakagawa らの方法(Nakagawa et al., 2001)に準じて行った。精製した GST 融合タンパク質(GST および GST-CRIB)を Glutathione Sepharose™4B beads と混合し、4°Cで 1 時間インキュベートした。Beads は TEDM (20mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0, 5mM MgCl₂, 1mM DTT)で洗淨し過剰なタンパク質を除いた。この Beads と以下の手順で準備した胚あるいは MDCK 細胞の溶解物を混合し、さらに、4°Cで 1~2 時間インキュベートした。

■ ニワトリ胚

ニワトリ胚に遺伝子 (pCAGGS-EGFP-WTRac1) を導入してからおよそ 20 時間後、体節中胚葉に GFP シグナルが検出された胚を選別した。即座に、これらの胚について、新しくできた体節 3 個分と体節板を含む組織を切り出す作業を低温室で行った。切り出した胴体部分およそ 70-80 個をエッペンチューブに集め、Lysis バッファー (50mM Tris-HCl pH7.4, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 1% NP-40, 10 μg/ml Leupeptin, 10 μg/ml aprotinin, 10 μM APMSF) 0.5 ml でホモゲナイズした。その後遠心分離し、得られた上清を GST 融合タンパク質が結合したビーズと混ぜ合わせた。

■ MDCK 細胞

CA-Rac1 を stable に発現する MDCK 細胞は、貝淵博士より供与いただいた。細胞は、10% Bovine Calf Serum (Hyclone) 含む DMEM(SIGMA)で、100 mm ディッシュ(Corning)にほぼコンフルエントになるまで培養した。氷上にディッシュを置き、培養液を捨てた後 HBSS で 2 回洗淨した。続いて Lysis バッファーを 0.7 ml 加え、細胞をスクレーパーで素早くかき集めエッペンチューブに移した。その後遠心分離し、得られた上清を GST 融合タンパク質が結合したビーズと混合した。

上記のニワトリ胚あるいは CA-Rac1 発現 MDCK 細胞の細胞溶解液と混合したビーズは、lysis バッファーで 3 回洗淨後、1×SDS サンプルバッファー(60 mM Tris-HCl pH6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.25% bromophenol blue, 5% メルカプロエタノール)を 45 μl 添加し、99°Cで 10 分間熱処理を行い、ビーズに結合しているタンパクを溶出した。

■ SDS PAGE およびウエスタンブロットティング

上記のサンプルは 10%アクリルアミドゲルで展開した後、PVDF 膜に転写した。1% スキムミルク/TBS でブロッキング後、1000 倍希釈した anti-GFP 抗体(Clone 7.1 and 13.1, Roche)と 4°C一晩反応させた。1 次抗体を洗った後、再度 1%スキムミルク/TBS でブロッキングし、続いて 2 次抗体 (Anti-mouse Ig, Horseradish peroxidase linked whole

antibody (from sheep), Amaersham Biosciences)と室温で1時間反応させた。シグナルは、ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit (Amaersham Biosciences) を用いて検出した。

画像の取得

抗体染色を施した体節細胞および組織切片は、共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM 5 PASCAL; Carl Zeiss, FLUOVIEW FV500; OLYMPUS) で観察し、蛍光画像を取得した。

謝辞

本研究で用いた Rho ファミリー (RhoA, Rac1, Cdc42) の野生型および変異体発現コンストラクトは、貝淵弘三博士 (名古屋大学)、黒田真也博士 (東京大学) から、N-WASP 野生型および変異体発現コンストラクトは竹縄忠臣博士 (東京大学) から、WASP-CRIB および p21 activated kinase(PAK)-CRIB は、Alan Hall 博士からいただきました。ZO-1 モノクローナル抗体は古瀬幹夫博士 (京都大学) からいただきました。貴重な遺伝子や抗体を、快く分与くださったこれらの方々に、心より感謝いたします。また、竹市雅俊博士 (理研 CDB) には、N-cadherin ポリクローナル抗体を供与頂きました上に、貴重なご助言を度々いただきました。また、中川誠人博士 (奈良先端大)、則竹淳さん (名古屋大学) には GST 融合タンパク質の精製や pulldown assay について教えていただきました。Original の論文が受理された時に、まるで自分のことのように喜んでくださったことに対して、本当に頭が下がる思いでした。竹内恒成博士は、共焦点顕微鏡の原理や操作方法を教えていただきました。私がバイオイメージングに興味を持つようになったのは、この時があったからだと考えています。

本研究をまとめるにあたり、多くの方にお世話になりました。高橋淑子先生 (理研 CDB) には、奈良先端大に入学以来、発生学を学ぶにあたり、視野を世界に広げるスケールの大きい考え方を学びました。先生の存在に時には震え、時にはサイエンスのおもしろさを共有できたことに対して有り難く思う次第です。研究室の佐藤有紀博士並びに末次里奈子技官には、トリ胚の操作や切片の作り方などを親切に教えていただきました。片桐友二技官には、研究の最終段階で多大なご尽力をいただきました。嘉新五希さんには、この博士論文を仕上げるにあたりお手伝いいただきました。そして斉藤大介博士、河西利治技官、田所竜介さん、秘書の明楽さん、小柳さん、内山さんをはじめ、CDB パターン形成研究チームの皆様は、辛い時には励まし暖かく接してくださいました。今度は私が皆様のお役にたてるようにしたいと思います。心より感謝いたします。奈良先端大の安田研究室の元スタッフ並びに卒業された皆様、井上邦夫博士、影山裕二博士、吉田智則博士、前川真吾博士、坂上起世博士、越智陽城博士には、分子生物学的手法を教えてください、研究に関する有意義なディスカッションに時間を費やしていただきました。本当にありがとうございました。そして、このような有意義な研究生活の場を与えてくださったのは安田國雄博士です。果てなく続くサイエンスに対する好奇心を持つ姿勢を見せていただき、自分もそうありたいと考えています。ありがとうございました。

最後に、生まれてから 40 年あまりの間、破天荒な人生を歩む私を、経済的、精神的に支えてくれた両親と 2 人の兄、そして多くの友人達に感謝します。

参考文献

- Adamson, P., Marshall, C. J., Hall, A., and Tilbrook, P. A. (1992). Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem* *267*, 20033-20038.
- Allen, W. E., Zicha, D., Ridley, A. J., and Jones, G. E. (1998). A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol* *141*, 1147-1157.
- Aspenstrom, P., Fransson, A., and Saras, J. (2004). Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* *377*, 327-337.
- Baas, A. F., Smit, L., and Clevers, H. (2004). LKB1 tumor suppressor protein: PARtaker in cell polarity. *Trends Cell Biol* *14*, 312-319.
- Barrios, A., Poole, R. J., Durbin, L., Brennan, C., Holder, N., and Wilson, S. W. (2003). Eph/Ephrin signaling regulates the mesenchymal-to-epithelial transition of the paraxial mesoderm during somite morphogenesis. *Curr Biol* *13*, 1571-1582.
- Batlle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* *2*, 84-89.
- Bessho, Y., and Kageyama, R. (2003). Oscillations, clocks and segmentation. *Curr Opin Genet Dev* *13*, 379-384.
- Bissell, M. J., Rizki, A., and Mian, I. S. (2003). Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr Opin Cell Biol* *15*, 753-762.
- Bolos, V., Peinado, H., Perez-Moreno, M. A., Fraga, M. F., Esteller, M., and Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* *116*, 499-511.
- Braga, V. (2000). Epithelial cell shape: cadherins and small GTPases. *Exp Cell Res* *261*, 83-90.
- Braga, V. M. (2002). Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol* *14*, 546-556.
- Burgess, R., Rawls, A., Brown, D., Bradley, A., and Olson, E. N. (1996). Requirement of the paraxis gene for somite formation and musculoskeletal patterning. *Nature* *384*, 570-573.
- Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* *2*, 76-83.

Carver, E. A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K. F., and Gridley, T. (2001). The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* *21*, 8184-8188.

Catala, M., Teillet, M. A., De Robertis, E. M., and Le Douarin, M. L. (1996). A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development* *122*, 2599-2610.

Chen, F., Ma, L., Parrini, M. C., Mao, X., Lopez, M., Wu, C., Marks, P. W., Davidson, L., Kwiatkowski, D. J., Kirchhausen, T., *et al.* (2000). Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr Biol* *10*, 758-765.

Chihara, T., Kato, K., Taniguchi, M., Ng, J., and Hayashi, S. (2003). Rac promotes epithelial cell rearrangement during tracheal tubulogenesis in *Drosophila*. *Development* *130*, 1419-1428.

Christ, B., and Ordahl, C. P. (1995). Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl)* *191*, 381-396.

Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsvan, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., and van Roy, F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* *7*, 1267-1278.

Condeelis, J. (2001). How is actin polymerization nucleated in vivo? *Trends Cell Biol* *11*, 288-293.

Conlon, R. A., Reaume, A. G., and Rossant, J. (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* *121*, 1533-1545.

Correia, K. M., and Conlon, R. A. (2000). Surface ectoderm is necessary for the morphogenesis of somites. *Mech Dev* *91*, 19-30.

Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J. C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., and Gutkind, J. S. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* *81*, 1137-1146.

Dalpe, G., Zhang, L. W., Zheng, H., and Culotti, J. G. (2004). Conversion of cell movement responses to Semaphorin-1 and Plexin-1 from attraction to repulsion by lowered levels of specific RAC GTPases in *C. elegans*. *Development* *131*, 2073-2088.

Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A., and Hall, A. (2001). Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J Biol Chem* *276*, 1677-1680.

del Barrio, M. G., and Nieto, M. A. (2002). Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development* *129*, 1583-1593.

- Doe, C. Q., and Bowerman, B. (2001). Asymmetric cell division: fly neuroblast meets worm zygote. *Curr Opin Cell Biol* 13, 68-75.
- Duband, J. L., Dufour, S., Hatta, K., Takeichi, M., Edelman, G. M., and Thiery, J. P. (1987). Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. *J Cell Biol* 104, 1361-1374.
- Ehrlich, J. S., Hansen, M. D., and Nelson, W. J. (2002). Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell* 3, 259-270.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2003). Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* 421, 753-756.
- Feig, L. A. (1999). Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol* 1, E25-27.
- Fukata, M., and Kaibuchi, K. (2001). Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 887-897.
- Fukata, M., Nakagawa, M., and Kaibuchi, K. (2003). Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol* 15, 590-597.
- Glise, B., and Noselli, S. (1997). Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in *Drosophila* morphogenesis. *Genes Dev* 11, 1738-1747.
- Gossler, A., and Hrabe de Angelis, M. (1998). Somitogenesis. *Curr Top Dev Biol* 38, 225-287.
- Hakeda-Suzuki, S., Ng, J., Tzu, J., Dietzl, G., Sun, Y., Harms, M., Nardine, T., Luo, L., and Dickson, B. J. (2002). Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature* 416, 438-442.
- Hamburger, V., and Hamilton, H. (1951). A series of normal stages in the development of chick embryo. *J Morphol* 88, 49-92.
- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., and Ish-Horowicz, D. (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787-790.
- Holder, N., and Klein, R. (1999). Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development* 126, 2033-2044.

Honda, T., Shimizu, K., Kawakatsu, T., Fukuhara, A., Irie, K., Nakamura, T., Matsuda, M., and Takai, Y. (2003). Cdc42 and Rac small G proteins activated by trans-interactions of nectins are involved in activation of c-Jun N-terminal kinase, but not in association of nectins and cadherin to form adherens junctions, in fibroblasts. *Genes Cells* 8, 481-491.

Hordijk, P. L., ten Klooster, J. P., van der Kammen, R. A., Michiels, F., Oomen, L. C., and Collard, J. G. (1997). Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science* 278, 1464-1466.

Hotchin, N. A., and Hall, A. (1995). The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol* 131, 1857-1865.

Ishizaki, T., Morishima, Y., Okamoto, M., Furuyashiki, T., Kato, T., and Narumiya, S. (2001). Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat Cell Biol* 3, 8-14.

Jacinto, A., Martinez-Arias, A., and Martin, P. (2001). Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol* 3, E117-123.

Jamora, C., and Fuchs, E. (2002). Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 4, E101-108.

Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H., and Grunert, S. (2002). Ras and TGF[β] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* 156, 299-313.

Kawakatsu, T., Shimizu, K., Honda, T., Fukuhara, T., Hoshino, T., and Takai, Y. (2002). Trans-interactions of nectins induce formation of filopodia and Lamellipodia through the respective activation of Cdc42 and Rac small G proteins. *J Biol Chem* 277, 50749-50755.

Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2003). The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *Embo J* 22, 4190-4201.

Kodama, A., Takaishi, K., Nakano, K., Nishioka, H., and Takai, Y. (1999). Involvement of Cdc42 small G protein in cell-cell adhesion, migration and morphology of MDCK cells. *Oncogene* 18, 3996-4006.

Kondo, M., Cubillo, E., Tobiume, K., Shirakihara, T., Fukuda, N., Suzuki, H., Shimizu, K., Takehara, K., Cano, A., Saitoh, M., and Miyazono, K. (2004). A role for Id in the regulation of TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ*.

- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* *15*, 1942-1952.
- Kulesa, P. M., and Fraser, S. E. (2002). Cell dynamics during somite boundary formation revealed by time-lapse analysis. *Science* *298*, 991-995.
- Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M., Fujii, K., Nakamura, T., Ookubo, T., Izawa, I., Nagase, T., Nomura, N., Tani, H., *et al.* (1998). Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science* *281*, 832-835.
- Liu, J. P., and Jessell, T. M. (1998). A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development* *125*, 5055-5067.
- Locascio, A., and Nieto, M. A. (2001). Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration. *Curr Opin Genet Dev* *11*, 464-469.
- Lozano, E., Betson, M., and Braga, V. M. (2003). Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays* *25*, 452-463.
- Lyons, J. P., Mueller, U. W., Ji, H., Everett, C., Fang, X., Hsieh, J. C., Barth, A. M., and McCrea, P. D. (2004). Wnt-4 activates the canonical beta-catenin-mediated Wnt pathway and binds Frizzled-6 CRD: functional implications of Wnt/beta-catenin activity in kidney epithelial cells. *Exp Cell Res* *298*, 369-387.
- Malosio, M. L., Gilardelli, D., Paris, S., Albertinazzi, C., and de Curtis, I. (1997). Differential expression of distinct members of Rho family GTP-binding proteins during neuronal development: identification of Rac1B, a new neural-specific member of the family. *J Neurosci* *17*, 6717-6728.
- Marston, D. J., Dickinson, S., and Nobes, C. D. (2003). Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat Cell Biol* *5*, 879-888.
- Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y., and Takenawa, T. (1998). Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* *391*, 93-96.
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* *408*, 732-735.
- Momose, T., Tonegawa, A., Takeuchi, J., Ogawa, H., Umesono, K., and Yasuda, K. (1999). Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ* *41*, 335-344.

- Muller, H. A. (2000). Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from *Drosophila*. *Dev Dyn* 218, 52-67.
- Murakami, R., Suzuki, M., Fujii, K., and Yamaoka, I. (1989). Organization of actin filaments and Zonula adherens during somitogenesis in the chick embryo. *Dev Growth Differ* 31, 123-130.
- Muramatsu, T., Nakamura, A., and Park, H. M. (1998). In vivo electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals (Review). *Int J Mol Med* 1, 55-62.
- Murphy, A. M., and Montell, D. J. (1996). Cell type-specific roles for Cdc42, Rac, and RhoL in *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* 133, 617-630.
- Nakagawa, M., Fukata, M., Yamaga, M., Itoh, N., and Kaibuchi, K. (2001). Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J Cell Sci* 114, 1829-1838.
- Neudauer, C. L., Joberty, G., Tassis, N., and Macara, I. G. (1998). Distinct cellular effects and interactions of the Rho-family GTPase TC10. *Curr Biol* 8, 1151-1160.
- Ng, J., Nardine, T., Harms, M., Tzu, J., Goldstein, A., Sun, Y., Dietzl, G., Dickson, B. J., and Luo, L. (2002). Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature* 416, 442-447.
- Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 155-166.
- Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G., and Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264, 835-839.
- Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-199.
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Noritake, J., Fukata, M., Sato, K., Nakagawa, M., Watanabe, T., Izumi, N., Wang, S., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. (2004). Positive role of IQGAP1, an effector of Rac1, in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact. *Mol Biol Cell* 15, 1065-1076.
- Oft, M., Akhurst, R. J., and Balmain, A. (2002). Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nat Cell Biol* 4, 487-494.

Ohno, S. (2001). Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 13, 641-648.

Ono, Y., Nakanishi, H., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takahashi, K., Miyahara, M., Satoh-Horikawa, K., Mandai, K., and Takai, Y. (2000). Two actions of frabin: direct activation of Cdc42 and indirect activation of Rac. *Oncogene* 19, 3050-3058.

Perez-Moreno, M. A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M. A., and Cano, A. (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 276, 27424-27431.

Pourquie, O. (2001). Vertebrate somitogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 311-350.

Price, L. S., and Collard, J. G. (2001). Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: implications for tumour cell invasion. *Semin Cancer Biol* 11, 167-173.

Primmitt, D. R., Norris, W. E., Carlson, G. J., Keynes, R. J., and Stern, C. D. (1989). Periodic segmental anomalies induced by heat shock in the chick embryo are associated with the cell cycle. *Development* 105, 119-130.

Psychoyos, D., and Stern, C. D. (1996). Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo. *Development* 122, 1523-1534.

Raich, W. B., Agbunag, C., and Hardin, J. (1999). Rapid epithelial-sheet sealing in the *Caenorhabditis elegans* embryo requires cadherin-dependent filopodial priming. *Curr Biol* 9, 1139-1146.

Ridley, A. J., and Hall, A. (1992a). Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 57, 661-671.

Ridley, A. J., and Hall, A. (1992b). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.

Rudolph, M. G., Bayer, P., Abo, A., Kuhlmann, J., Vetter, I. R., and Wittinghofer, A. (1998). The Cdc42/Rac interactive binding region motif of the Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) is necessary but not sufficient for tight binding to Cdc42 and structure formation. *J Biol Chem* 273, 18067-18076.

Saga, Y., and Takeda, H. (2001). The making of the somite: molecular events in vertebrate segmentation. *Nat Rev Genet* 2, 835-845.

Sato, Y., Yasuda, K., and Takahashi, Y. (2002). Morphological boundary forms by a novel inductive event mediated by Lunatic fringe and Notch during somitic segmentation. *Development* 129, 3633-3644.

Schmeichel, K. L., and Bissell, M. J. (2003). Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J Cell Sci* *116*, 2377-2388.

Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* *16*, 1587-1609.

Schmidt, C., Stoeckelhuber, M., McKinnell, I., Putz, R., Christ, B., and Patel, K. (2004). Wnt 6 regulates the epithelialisation process of the segmental plate mesoderm leading to somite formation. *Dev Biol* *271*, 198-209.

Schock, F., and Perrimon, N. (2002). Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* *18*, 463-493.

Sefton, M., Sanchez, S., and Nieto, M. A. (1998). Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development* *125*, 3111-3121.

Settleman, J. (2001). Rac 'n Rho: the music that shapes a developing embryo. *Dev Cell* *1*, 321-331.

Shamah, S. M., Lin, M. Z., Goldberg, J. L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R. L., Corfas, G., Debant, A., and Greenberg, M. E. (2001). EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* *105*, 233-244.

Shook, D., and Keller, R. (2003). Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* *120*, 1351-1383.

Small, J. V., Stradal, T., Vignat, E., and Rottner, K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* *12*, 112-120.

Smallhorn, M., Murray, M. J., and Saint, R. (2004). The epithelial-mesenchymal transition of the *Drosophila* mesoderm requires the Rho GTP exchange factor Pebble. *Development* *131*, 2641-2651.

Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., and McMahon, A. P. (1994). Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* *372*, 679-683.

Stoker, M., and Perryman, M. (1985). An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J Cell Sci* *77*, 209-223.

Su, Y. C., Treisman, J. E., and Skolnik, E. Y. (1998). The *Drosophila* Ste20-related kinase misshapen is required for embryonic dorsal closure and acts through a JNK MAPK module on an evolutionarily conserved signaling pathway. *Genes Dev* *12*, 2371-2380.

Suetsugu, R., Sato, Y., and Takahashi, Y. (2002). Pax 2 expression in mesodermal segmentation and its relationship with EphA4 and Lunatic-fringe during chicken somitogenesis. *Mech Dev* *119 Suppl 1*, S155-159.

Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A., and Katsuki, M. (1998). Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* *17*, 3427-3433.

Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kemphues, K. J., Miwa, J., and Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* *125*, 3607-3614.

Takahashi, Y. (2004). Shaping up of the *chic* chick: boundary formation shared between somitogenesis and brain development. *Int J Dev Biol in press*.

Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H., and Takai, Y. (1997). Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* *139*, 1047-1059.

Takenawa, T., and Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* *114*, 1801-1809.

Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* *2*, 442-454.

Thiery, J. P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* *15*, 740-746.

Timmerman, L. A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertran, E., Perez-Pomares, J. M., Diez, J., Aranda, S., Palomo, S., McCormick, F., Izpisua-Belmonte, J. C., and de la Pompa, J. L. (2004). Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* *18*, 99-115.

Tonegawa, A., and Takahashi, Y. (1998). Somitogenesis Controlled by Noggin. *Dev Biol* *202*, 172-182.

Van Aelst, L., and Symons, M. (2002). Role of Rho family GTPases in epithelial morphogenesis. *Genes Dev* *16*, 1032-1054.

Wittmann, T., Hyman, A., and Desai, A. (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol* *3*, E28-34.

Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Kitamura, K., Maniwa, R., Nagai, Y., Yamashita, A., Hirose, T., Ishikawa, H., and Ohno, S. (2001). PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells* *6*, 721-731.

Yamashita, S., Miyagi, C., Fukada, T., Kagara, N., Che, Y. S., and Hirano, T. (2004). Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature* 429, 298-302.

Yasuda, K., Momose, T., and Takahashi, Y. (2000). Applications of microelectroporation for studies of chick embryogenesis. *Dev Growth Differ* 42, 203-206.

Yoshida, N., Urase, K., Takahashi, J., Ishi, Y., and Yasugi, S. (1996). Mucus-associated antigen in epithelial cells of the chicken digestive tract: Developmental change in expression and implications for morphogenesis relationships. *Dev Growth Differ* 38, 185-192.

Zavadil, J., Cermak, L., Soto-Nieves, N., and Bottinger, E. P. (2004). Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *Embo J* 23, 1155-1165.

仲矢由紀子、高橋淑子,ニワトリ胚体節中胚葉への遺伝子導入法
図・写真で観る発生再生実験マニュアル、105-110 (2002)