

発表番号 48 (0333)

生理食塩水中に含まれる各種イオンが初期胚発生に見られる
形態形成運動に及ぼす影響の解析
(培養液中に含まれる NaCl 濃度が両生類の原腸胚形成運動に及ぼす影響)

助成研究者：駒崎伸二（埼玉医科大学医学部解剖学教室）

共同研究者：高野和敬（埼玉医科大学医学部解剖学教室）

細胞外液に含まれる NaCl が初期胚発生における形態形成運動に及ぼす影響を明らかにするために、両生類の原腸胚から取り出した胚組織や胚細胞を用いて、培養液中に含まれる NaCl の作用を解析した。ここでは、胚細胞の運動性と粘着性、そして、胚細胞の細胞内の Ca^{2+} イオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に対して、培養液中の NaCl が及ぼす作用を解析した。

培養液中の NaCl 濃度を 60 mM から 100 mM に増加させると、胚細胞が基質に対して粘着して伸展する反応が促進され、外胚葉の湾曲運動が抑制された。一方、培養液中の NaCl 濃度を 60 mM から 40 mM に減少させると、胚細胞の運動性と粘着性について、その逆の反応が見られた。培養液中の 100 mM NaCl を NaBr や $NaNO_3$ に置き換えても同じような作用が観察されたが、NaCl を塩化コリンで置き換えると、その作用は観察されなかった。

培養液中の NaCl 濃度を変化させた際に見られる胚細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を画像解析した。NaCl 濃度を 60 mM から 100 mM に増加させると、 $[Ca^{2+}]_i$ が増加し、60 mM から 40 mM に減少させると、 $[Ca^{2+}]_i$ が減少した。NaCl 濃度を 100 mM に増加させた際に、培養液から Ca^{2+} イオンを除いても、 $[Ca^{2+}]_i$ の増加が観察された。一方、小胞体の Ca^{2+} イオンポンプ阻害剤の Thapsigargin で処理した胚細胞では、NaCl 濃度の増加に伴う $[Ca^{2+}]_i$ の増加は観察されなかった。

40 mM の NaCl を含む培養液に Ca^{2+} -ionophore A23187 ($1 \mu M$) を加えると、外胚葉組織の湾曲運動が抑制され、解離胚細胞の粘着性が促進された。また、100 mM の NaCl を含む培養液中に BAPTA ($5 \mu M$) を加えると、外胚葉組織の湾曲運動が促進され、解離胚細胞の粘着性が抑制された。

以上の結果から、培養液中の Na^+ イオン濃度の変化が $[Ca^{2+}]_i$ の変化を引き起こし、その結果として、胚細胞の運動性や粘着性に影響を及ぼすことが示唆された。

7

助成番号 0333

生理食塩水中に含まれる各種イオンが初期胚発生に見られる形態形成運動に及ぼす影響の解析

(培養液中に含まれる NaCl 濃度が両生類の原腸胚形成運動に及ぼす影響)

助成研究者： 駒崎伸二 (埼玉医科大学・医学部・解剖学教室)

共同研究者： 高野和敬 (埼玉医科大学・医学部・解剖学教室)

研究目的

動物の初期胚発生の過程では、細胞外液に含まれるイオンが発生に及ぼすさまざまな影響が指摘されている。しかしながら、イオンが初期胚発生に及ぼす影響のメカニズムについては、依然として不明な点が多い。今回の研究では、胚の培養液や胚の内部を満たしている細胞間液の主要な構成成分で、細胞の生理機能に重要な役割を果たしている Na^+ イオンについて、それが初期胚発生の過程に及ぼしている影響とそのメカニズムを解析した。ここでは、とりわけ初期胚発生の過程で重要な役割を果たしている形態形成運動に Na^+ イオンが及ぼす作用と、そのメカニズムについて明らかにすることを目的とした。

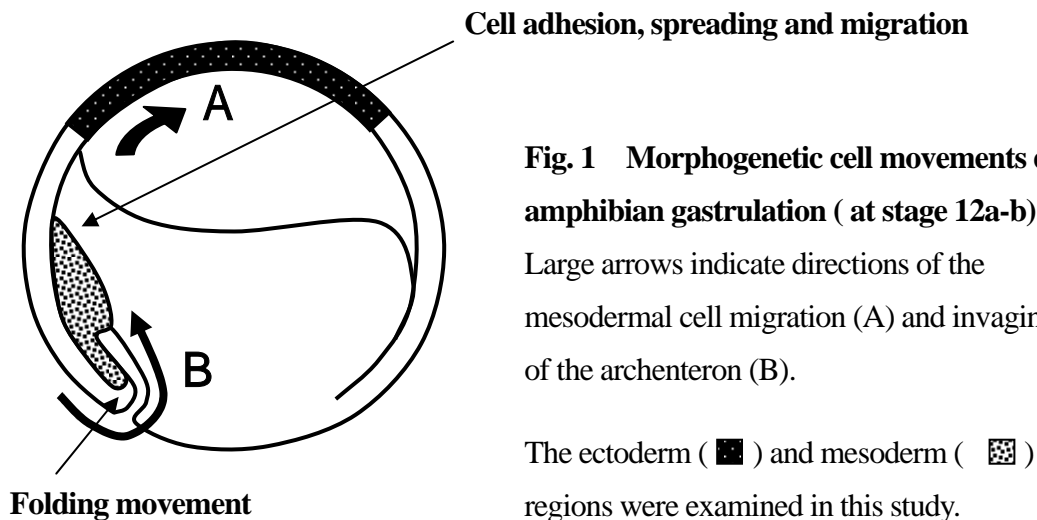
今回の研究では、この種の実験に適している両生類の初期胚を実験材料として用いた。淡水中で発生する両生類の胚の場合でも、その初期胚の内部を満たしている胞胚腔液は、成体の生理食塩水に近いイオン組成と濃度に保たれている。この両生類の胚、胚組織、胚細胞などを、培養液中の NaCl 濃度を変化させて培養すると、発生の異常、中枢神経系の分化促進 (1、2) そして胚細胞の運動性 (3) や粘着性 (4) の変化など、さまざまな影響を受けることが知られている。これらの中で、培養液中の NaCl 濃度に影響されて外胚葉が中枢神経系組織へ分化するのが促進される現象については、NaCl 濃度の変化により影響される胚細胞内の pH の変化が原因の 1 つとして指摘されている (5)。一方、培養液中の NaCl 濃度の増加が、胚細胞の運動性や粘着性の変化を引き起こす原因については依然として不明であるが、その可能性の 1 つとして、培養液中の NaCl 濃度の変化が細胞内の pH の変化だけでなく、胚細胞内の他の変化、たとえば、細胞内 Ca^{2+} イオン濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の変化を引き起こして、胚細胞にさまざまな影響を及ぼしている可能性が考えられる。

そこで、今回の研究では、培養液中の NaCl 濃度の変化が、胚細胞の形態形成運動に及ぼす影響と、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に及ぼす影響とを調べ、それらの間の関連性について検討した。ここで研究材料として用いた原腸胚は、初期胚発生の過程において最も活発な形態形成運動が見られる時期であり、この原腸胚形成は動物の体の基本体制を構築する上で最も重要なできごとである。原腸胚形成の際には、いくつかの種類の種類が重要な役割を果たしており、ここで扱っている予定外胚葉の湾曲運動 (折りたたみ運動) や胚細胞の粘着性は、原腸胚形成において重要な役割を果たしている現象

である。

研究方法

日本産イモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の胚を材料として用いた。イモリの受精卵は、ヒトの胎盤性の性腺刺激ホルモン (プベローゲン、三共エール薬品) を、イモリメスの腹腔に注射 (50~100 単位を2回) して産卵させた。ここで用いられた胚のステージは、Okada と Ichikawa (6) のイモリの発生段階表により決められた。イモリの初期原腸胚の基本構造と、今回の研究で調べた胚の各部位について Fig. 1 に示した。



培養液中の NaCl 濃度が、胚の発生に及ぼす影響については、胚の光学切片を観察して解析した。そして、胚組織の運動性と胚細胞の粘着性に及ぼす影響の解析については、タイムラプス撮影した画像をもとに行なった。胚細胞や組織片の分離は、両生類の胚の培養液として一般に用いられている Steinberg's 液を一部改変した培養液 (60 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 12 mM MgSO_4 , 3 mM HEPES, pH 7.5) を用いて行なった。胚細胞の解離は、0.2 mM の GEDTA (同仁化学) を含んだ Ca^{2+} , Mg^{2+} -free の培養液で行なった。ここでは、培養液中の NaCl 濃度を 40mM、60mM (培養液をそのまま)、100 mM にした培養液を、それぞれ 40Na-Medium、60Na-Medium、100Na-Medium 液として示した。胚細胞の基質に対する粘着性と運動性の測定の際には、プラスチックシャーレ (Falcon dish, No.1008, Becton Dickinson Lab.) を用いた。

培養液中の NaCl が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に及ぼす影響は、Fig. 2 に示した方法により培養液を灌流して、細胞内の Ca^{2+} イオン濃度画像解析装置 (ARGUS-50CA、浜松ホトニクス) を用いて測定した。この際には、胚組織や胚細胞を 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Fura-2-AM (同仁化学) を含む 60Na-Medium にて約 30 分間 (20) 処理して、Fura-2-AM を胚細胞内に導入した。Fura-2-AM を胚細胞内に導入後、胚細胞や胚組織を 60Na-Medium で洗浄後、約 30 分間放置 (20) しておいてから測定した。

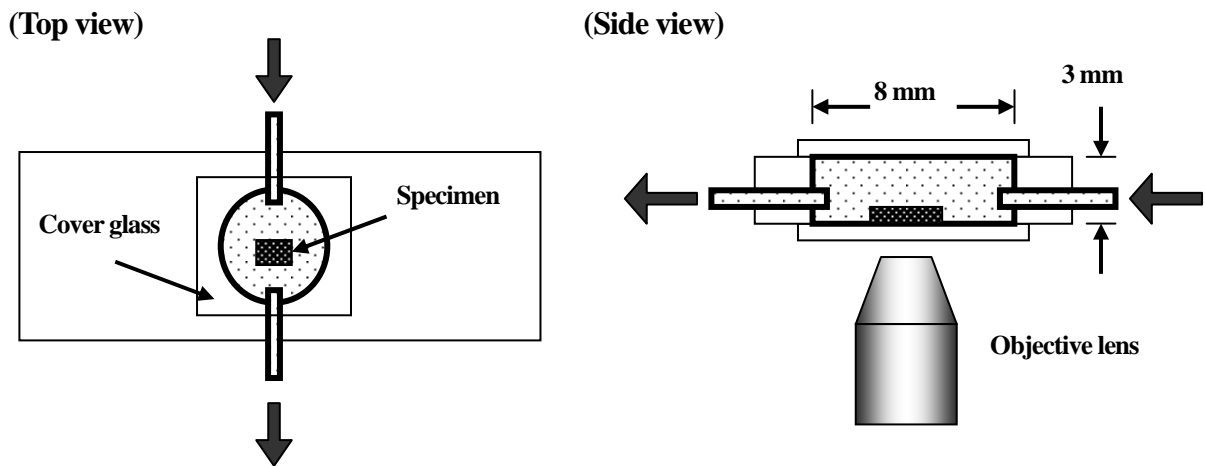


Fig. 2 Perfusion of culture medium and measurement of $[Ca^{2+}]_i$ in the embryonic cells.

結果

原腸胚形成に及ぼす影響

後期胞胚 (Stage10) を 40Na-Medium、60Na-Medium、100Na-Medium 液中で 30 時間 (20 の淡水中で発生させた胚は、ほぼこの時間で原腸陥入を完了する) 培養して、NaCl 濃度の変化が原腸陥入運動の際に見られる形態形成運動に及ぼす影響を調べた。その結果、それぞれの培養液とも、胚の発生の進行には顕著な違いは見られなかったが、100Na-Medium 液中で培養した胚では、その他の培養液中で培養したものとは比べて、陥入口付近の中胚葉組織の層が肥厚していた (写真は示していない)。

初期原腸胚から分離した外胚葉の湾曲運動に及ぼす影響

胚から分離した外胚葉 (上皮構造からなる) は、60Na-Medium 液中では Basal 側に湾曲運動 (あるいは、折れ曲がり運動) をすることが知られている (Fig. 3)。この湾曲運動に対する NaCl 濃度の影響を調べた結果、40Na-Medium 液中で培養したものには、60Na-Medium 液中で培養したものよりもより強い湾曲運動が引き起こされた。一方、100Na-Medium 液中で培養した外胚葉では、湾曲運動が見られずに平らな状態のままであった。また、この作用は、NaCl を NaBr や $NaNO_3$ に置き換えた培養液でも同じように観察されたが、NaCl を塩化コリンに置き換えた培養液では観察されなかった。



Fig. 3 Effects of NaCl on folding movement in the isolated ectoderm.

A. 40Na-Medium. B. 60Na-Medium. C. 100Na-Medium

初期原腸胚の胚細胞の粘着性に及ぼす影響

外胚葉と中胚葉から胚細胞を解離して、NaCl 濃度を変えた培養液中で培養した場合、それらがシャーレに粘着して伸展する性質にどのような変化が見られるか調べた。20℃にて30分間培養して観察した結果、外胚葉細胞と中胚葉細胞ともに培養液中のNaCl濃度の増加に比例して、基質に対する粘着性の増加が見られた (Fig. 4)。その変化は外胚葉細胞でより顕著であった。

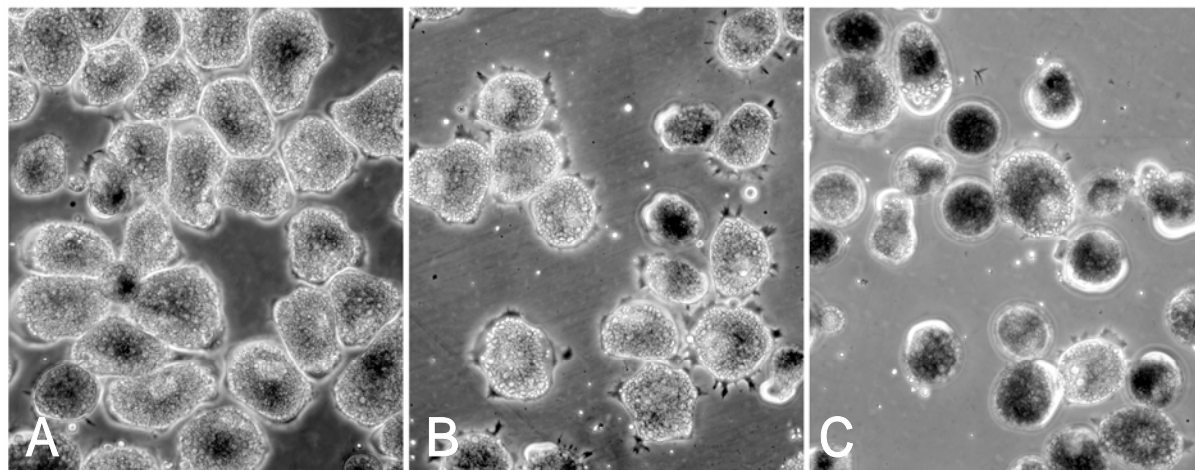


Fig. 4 Effects of NaCl on embryonic cell adhesion.

Embryonic cells were dissociated from the ectoderm and cultured in the medium of 100Na-Medium (A), 60Na-Medium (B) and 40Na-Medium (C) for 30 min at 20℃.

胚細胞内のCa²⁺イオン濃度に及ぼす影響

初期原腸胚から分離した外胚葉と中胚葉の組織や、外胚葉から解離した胚細胞について、培養液中のNaCl濃度を变化させた場合に[Ca²⁺]_iにどのような変化が見られるか解析した。その際には、60Na-Medium液を基準として、それを40Na-Mediumと100Na-Medium液に変化させた時の[Ca²⁺]_iの変化を測定した。100Na-Medium液の灌流により、外胚葉と中胚葉組織ともに[Ca²⁺]_iの上昇が観察された (Figs. 5)。また、発生過程で淡水と接している外胚葉組織について、40Na-Medium液の灌流による影響を調べたところ、[Ca²⁺]_iの下降が観察された。

100Na-Medium液の影響により、[Ca²⁺]_iが上昇するメカニズムを明らかにするために、予定外胚葉から解離した胚細胞を用いて以下のようないくつかの実験を行なった (Figs. 6)。まず、胚細胞の[Ca²⁺]_iの上昇が細胞内からのCa²⁺イオンの遊離によるものなのか、あるいは、細胞外液から細胞内へのCa²⁺イオンの流入によるものかについて調べた。その結果、細胞外液からCa²⁺イオンを除去した100Na-Medium液の灌流でも胚細胞内の[Ca²⁺]_iの上昇が観察された。また、小胞体のCa²⁺ポンプの阻害剤であるThapsigarginで処理すると、100Na-Medium液の影響による[Ca²⁺]_iの上昇は観察されなかった。

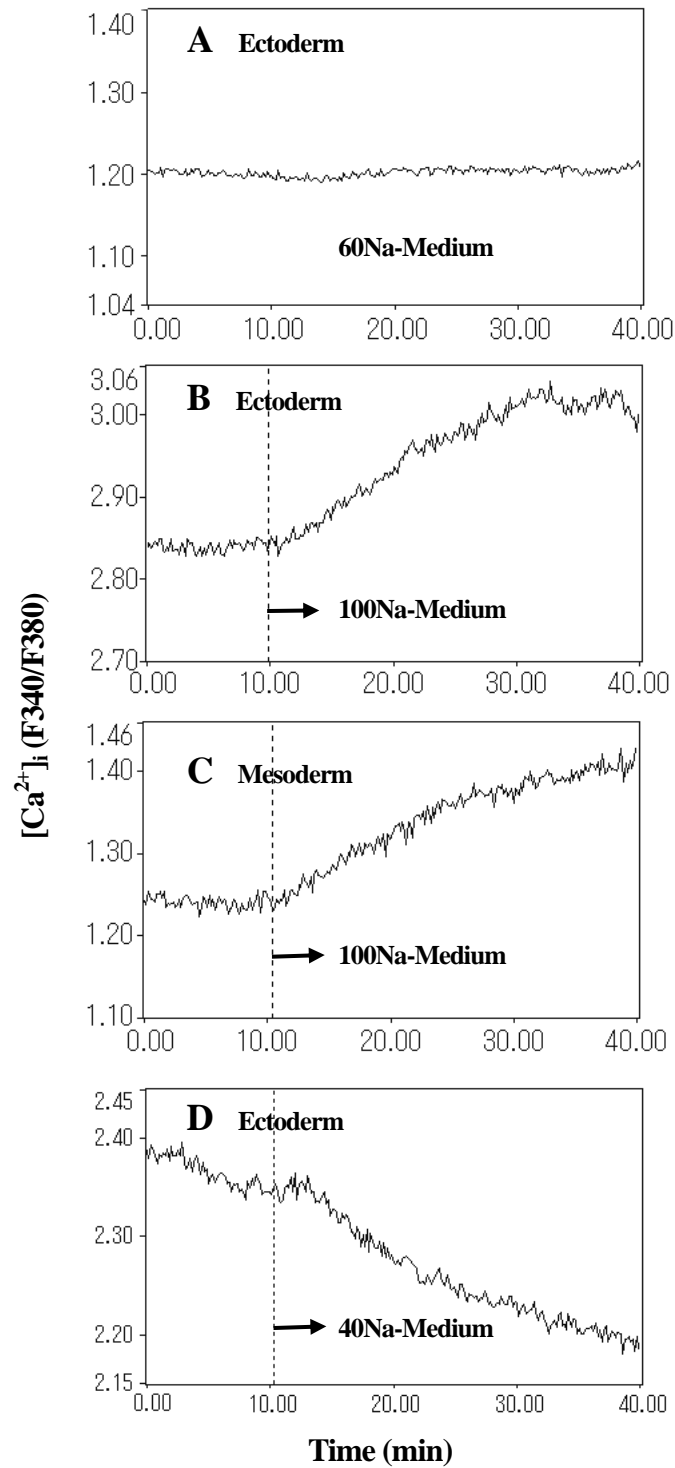


Fig. 5 Influence of NaCl on $[Ca^{2+}]_i$ in isolated tissues.

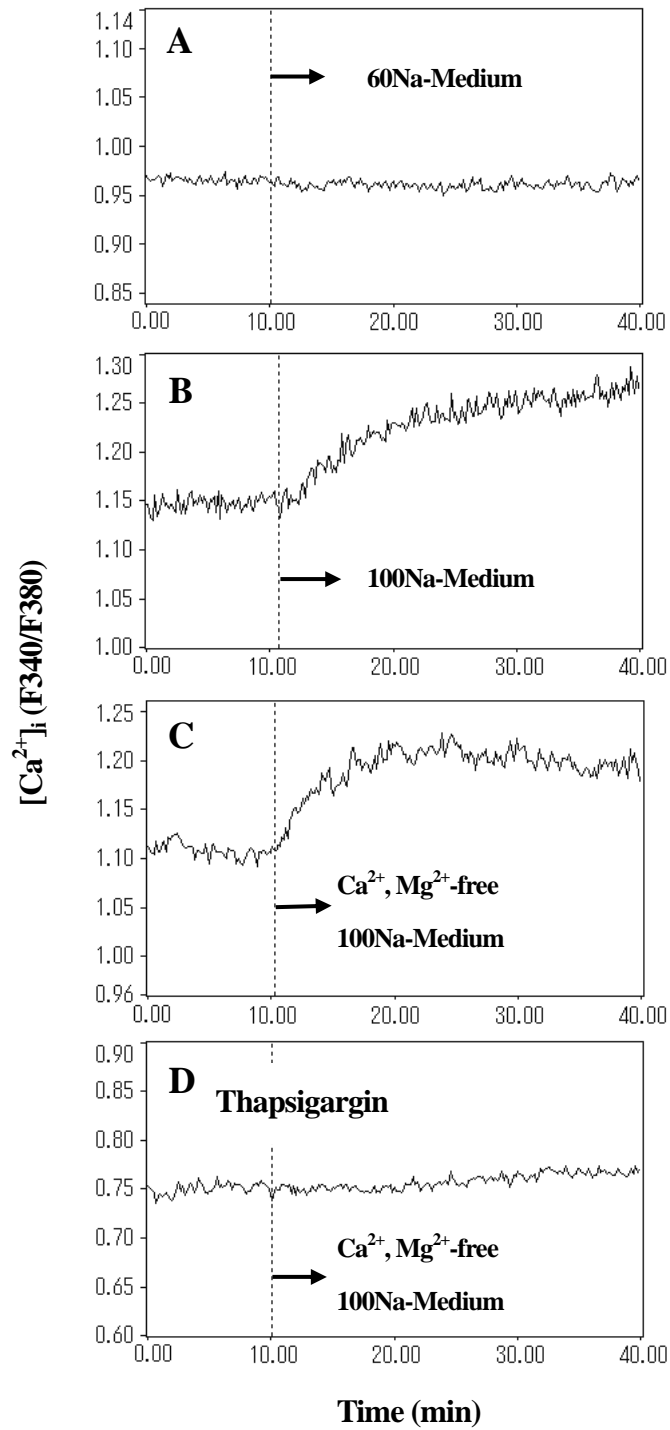


Fig. 6 Influence of NaCl on $[Ca^{2+}]_i$ in the dissociated ectodermal cells.

細胞内Ca²⁺イオン濃度の変化が胚細胞の運動性や粘着性に及ぼす影響

細胞膜のCa²⁺透過を引き起こすCa²⁺-ionophoreと、Ca²⁺イオンのキレート剤であるBAPTAを用いて胚細胞内の[Ca²⁺]_iを変化させたときに、外胚葉組織の湾曲運動と、外胚葉と中胚葉から解離した胚細胞の粘着性にどのような変化が観察されるか調べた (Fig. 7)。その結果、40Na-Medium液にCa²⁺-ionophoreを加えると、外胚葉組織の湾曲運動が抑制された。一方、100Na-Medium液にBAPTAを加えると、外胚葉組織の湾曲運動が促進された。また、40Na-Medium液にCa²⁺-ionophoreを加えると、解離胚細胞の粘着性が促進された。そして、100Na-Medium液にBAPTAを加えると、解離胚細胞の粘着性が抑制された。

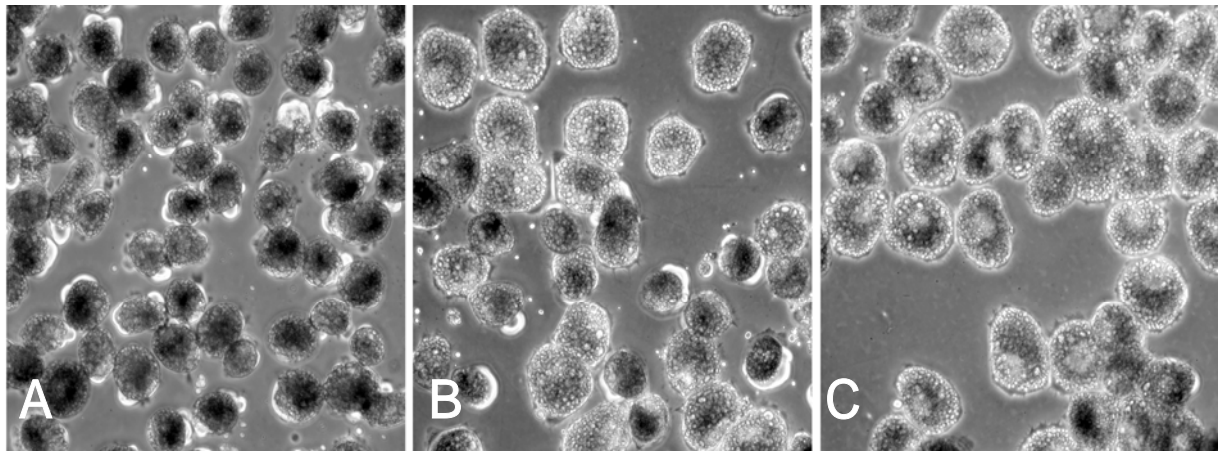


Fig. 7 Influences of Ca²⁺-ionophore (1μM) and BAPTA (5μM) on cell adhesion.

The dissociated ectodermal cells were cultured for 30 min at 20 °C in the 100Na-Medium containing BAPTA (A), 60Na-Medium (B) and 40Na-Medium containing Ca²⁺-ionophore (C).

考察

今回の研究では、培養液中のNaCl濃度を変化させると、その濃度に依存して胚組織の運動性や胚細胞の粘着性に変化が引き起こされることを明らかにした。そして、培養液のNaClの濃度に依存して胚細胞の[Ca²⁺]_iの変化が引き起こされることも明らかにした。さらに、Ca²⁺-ionophoreやBAPTAの作用により[Ca²⁺]_iを変化させた際に見られた変化から、NaCl濃度に依存した胚組織の運動性や胚細胞の粘着性の変化が、NaCl濃度に依存して引き起こされる胚細胞の[Ca²⁺]_iの変化と密接に関連していることを示した。

細胞内のCa²⁺イオンは、細胞内の2次情報伝達因子として、細胞のさまざまな生理機能の変化や遺伝子発現を引き起こし、胚細胞のさまざまな形態形成運動や細胞分化の制御に密接に関与している因子であることが広く知られている。それゆえ、今回の結果は、培養液中のNaCl濃度の変化に依存して引き起こされる胚細胞内の[Ca²⁺]_iの変化が、NaCl濃度に依存して引き起こされる胚組織の運動性や胚細胞の粘着性の変化を引き起こしている原因であることを強く示唆している。

培養液中の NaCl が、濃度依存的に胚細胞内の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を引き起こしているしくみについては、その詳細を今回の研究結果から説明することは難しい。しかしながら、今回の実験結果からは、NaCl の濃度依存的に引き起こされる胚細胞内の $[Ca^{2+}]_i$ の変化が細胞外液からの Ca^{2+} イオンの流入によるものではなく、胚細胞内に存在する Ca^{2+} 濃度調節機構が関与していると考えられる。たとえば、培養液中の NaCl 濃度に依存して胚細胞内に流入した Na^+ イオンが、 Ca^{2+} 貯蓄小胞に作用して、胚細胞内の $[Ca^{2+}]_i$ の調節に作用している可能性が指摘できる。

今回の結果は、細胞生物学的な問題の提起のみならず、発生生物学の研究上における大きな問題点も提起した。それは、両生類の胚組織や胚細胞を用いた研究において一般的に用いられている培養液(たとえば、Holtfreter の液や Steinberg の液)の NaCl 濃度は共通して約 60 mM である。一方、胞胚や原腸胚の内部を満たしている胞胚腔液の Na^+ イオン濃度は 70 - 100 mM (7) であり、それらよりも高い値である。つまり、実際の胚において胚細胞がさらされているイオン環境と、実験上で胚細胞がさらされるイオン環境の間には大きな差がある。しかも、この差は胚細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に変化を引き起こして、胚細胞の形態形成運動や細胞分化を含めたさまざまな現象に無視できない影響を及ぼしている可能性がある。しかしながら、この点については、今までまったく考慮されて来なかった、今回の結果はこの問題について、研究上の十分な考慮の必要性を提起した。

今後の課題

細胞外液の NaCl 濃度の変化により、胚細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の変化が引き起こされるメカニズムの詳細を明らかにする。そして、NaCl の濃度に依存して引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ の変化が、胚発生の形態形成運動や細胞分化現象にどのようなメカニズムで関与しているのかという点を解明するとともに、その発生学的な意義についても明らかにする。

引用文献

1. Barth, L. G. (1966) The role of sodium chloride in sequential induction of the presumptive epidermis of *Rana pipiens* gastrulae. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole, 131, 415-426.
2. Barth, L. G. and Barth, I. J. (1974) Ionic regulation of embryonic induction and cell differentiation in *Rana pipiens*. Dev. Biol., 39, 1-22.
3. Komazaki, S. (1993) Movement of an epithelial layer isolated from early embryos of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. I. Development of folding movement of the blastocoelic wall isolated from embryos before and during gastrulation. Develop. Growth Differ., 35, 461-470.
4. Komazaki, S. Effects of salts in promoting the adhesion of amphibian gastrula cells. J. Exp. Zool., 250, 40-48.
5. Sater, A. S., Alderton, J. M. and Steinhardt, R. A. (1994) An increase in intracellular pH during neural induction in *Xenopus*. Development, 120, 433-442.

6. Okada, Y. K. and Ichikawa, M. (1947) A new normal table of the development of *Triturus pyrrhogaster*. *Exp. Morphol. (Tokyo)*, 3, 1-6.
7. Gillespie, J. I. (1983) The distribution of small ions during the early development of *Xenopus laevis* and *Ambystoma mexicanum* embryos. *J. Physiol.*, 344, 359-377.

Influences of NaCl on cell movement and adhesion in amphibian embryonic cells

Shinji Komazaki (Department of Anatomy, Saitama Medical School)

Kazuriro Takano (Department of Anatomy, Saitama Medical School)

Summary

Influences of NaCl on cell movement and adhesion were examined in the embryonic tissues and cells isolated from the newt, *Cynops pyrrhogaster*, gastrulae. In addition, changes in concentration of intracellular free calcium ions ($[Ca^{2+}]_i$) in the embryonic cells were examined following treatment with various concentrations of NaCl in the culture medium.

Increase in concentration of NaCl in the culture medium from 60 mM to 100 mM suppressed a folding movement of the isolated ectoderm layer and promoted an adhesion of embryonic cells dissociated from the ectoderm and mesoderm. On the other hand, decrease in concentration of NaCl from 60 mM to 40 mM promoted the folding movement and suppressed the adhesion of the embryonic cells.

Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ in the embryonic cells showed that increase in concentration of NaCl in the culture medium from 60 mM to 100 mM raised the $[Ca^{2+}]_i$ both in the ectodermal and mesodermal cells. On the other hand, decrease in concentration of NaCl from 60 mM to 40 mM declined the $[Ca^{2+}]_i$ in the ectodermal cells. Treatment with the culture medium containing 100 mM NaCl without Ca^{2+} and Mg^{2+} ions had no effect on the $[Ca^{2+}]_i$. However, treatment with the culture medium containing 100 mM NaCl with thapsigargin abolished the increase in $[Ca^{2+}]_i$.

Treatment of Ca^{2+} -ionophore A23187 suppressed the folding movement of the ectoderm layer and promoted the adhesion of cells isolated from the ectoderm and mesoderm. BAPTA, a chelating reagent of Ca^{2+} ion, promoted the folding movement and suppressed adhesion of the embryonic cells.

These results showed that Na^+ ion in the culture medium influences $[Ca^{2+}]_i$ and behaviors in the tissues and cells isolated from amphibian gastrulae, and suggested close correlation between changes in the $[Ca^{2+}]_i$ and behaviors in the embryonic cells.