

高校教員研修会

「発生学におけるオーガナイザー実験体験講座」

平成20年10月4日（土）～10月5日（日）

於

独立行政法人 理化学研究所
発生・再生科学総合研究センター

主催

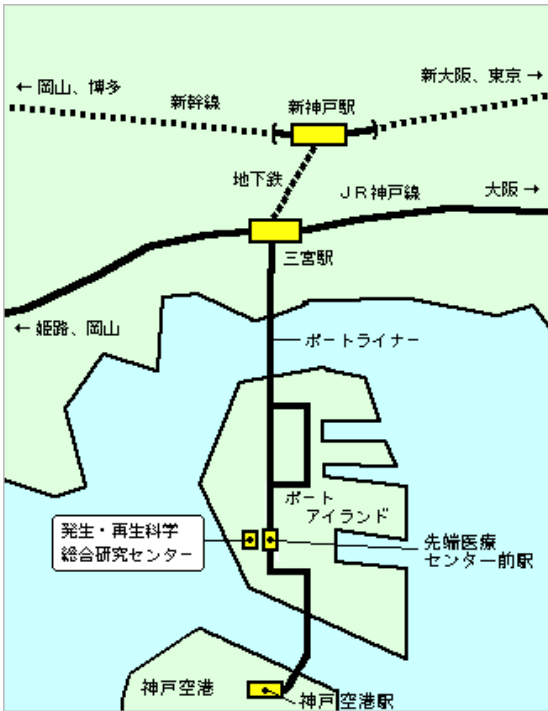
理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター
日本発生生物学会

連携

神戸市教育委員会

周辺案内図

■三ノ宮までのアクセス



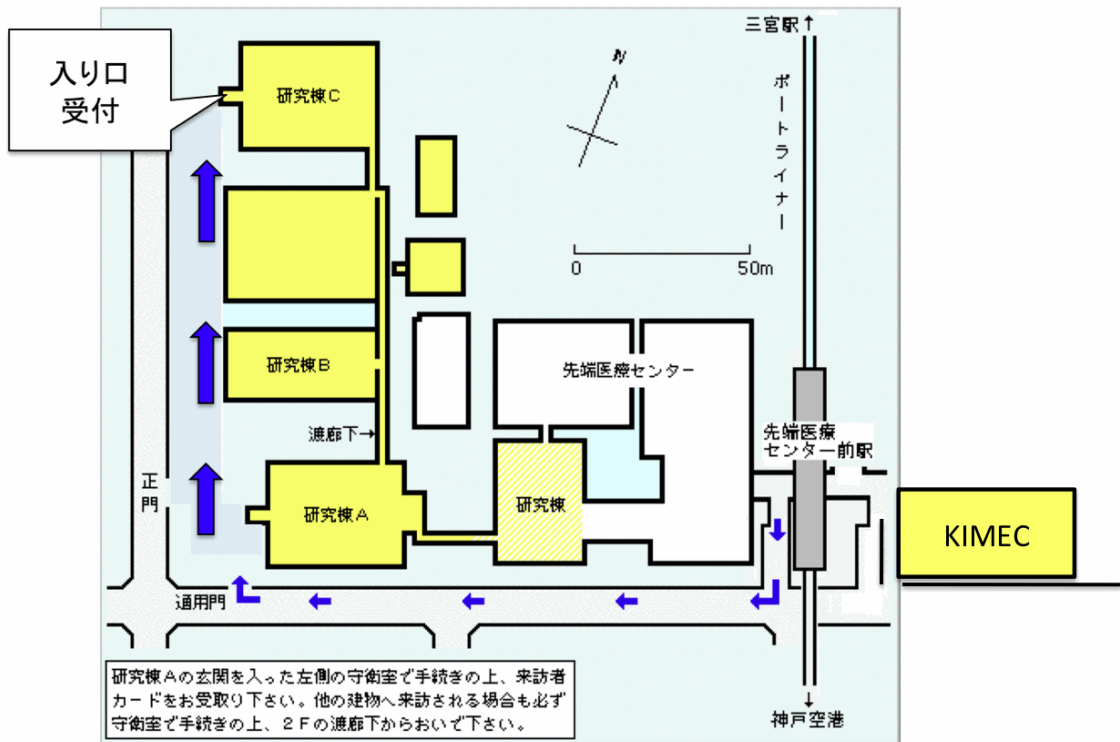
- <新幹線(新神戸駅下車)>
 - ・新神戸駅 → 三宮駅(神戸市営地下鉄) : 2分(200円)
- <JR線など>
 - ・三ノ宮駅(JR神戸線)下車 / 三宮駅(阪急電鉄・阪神電鉄)下車
- <空港からリムジンバス>
 - ・伊丹空港 → 三宮: 約40分(1,020円) / 関西空港 → 三宮: 約65~75分(1,800円)

■三ノ宮からCDBまでのアクセス

- ポートライナーをご利用
 - ・三宮駅 → 先端医療センター前駅(ポートライナー) : 12分(240円)
- 北埠頭行きではなく、神戸空港方面行きのポートライナーにご乗車ください。
 - ・改札を出て左方向の階段を降りて右(西)へ向かい、3つ目の建物が発生・再生科学総合研究センター(CDB)の研究棟Aです。: 徒歩3分

駅からタクシーをご利用

- ・新神戸駅 → CDB: 約25分(約2,500円)
- ・三宮駅 → CDB: 約20分(約2,200円)



※KIMEC1F にコンビニエンスストア、先端医療センター1F にカフェテリア(日曜休業)があります。ご利用ください。

日程表

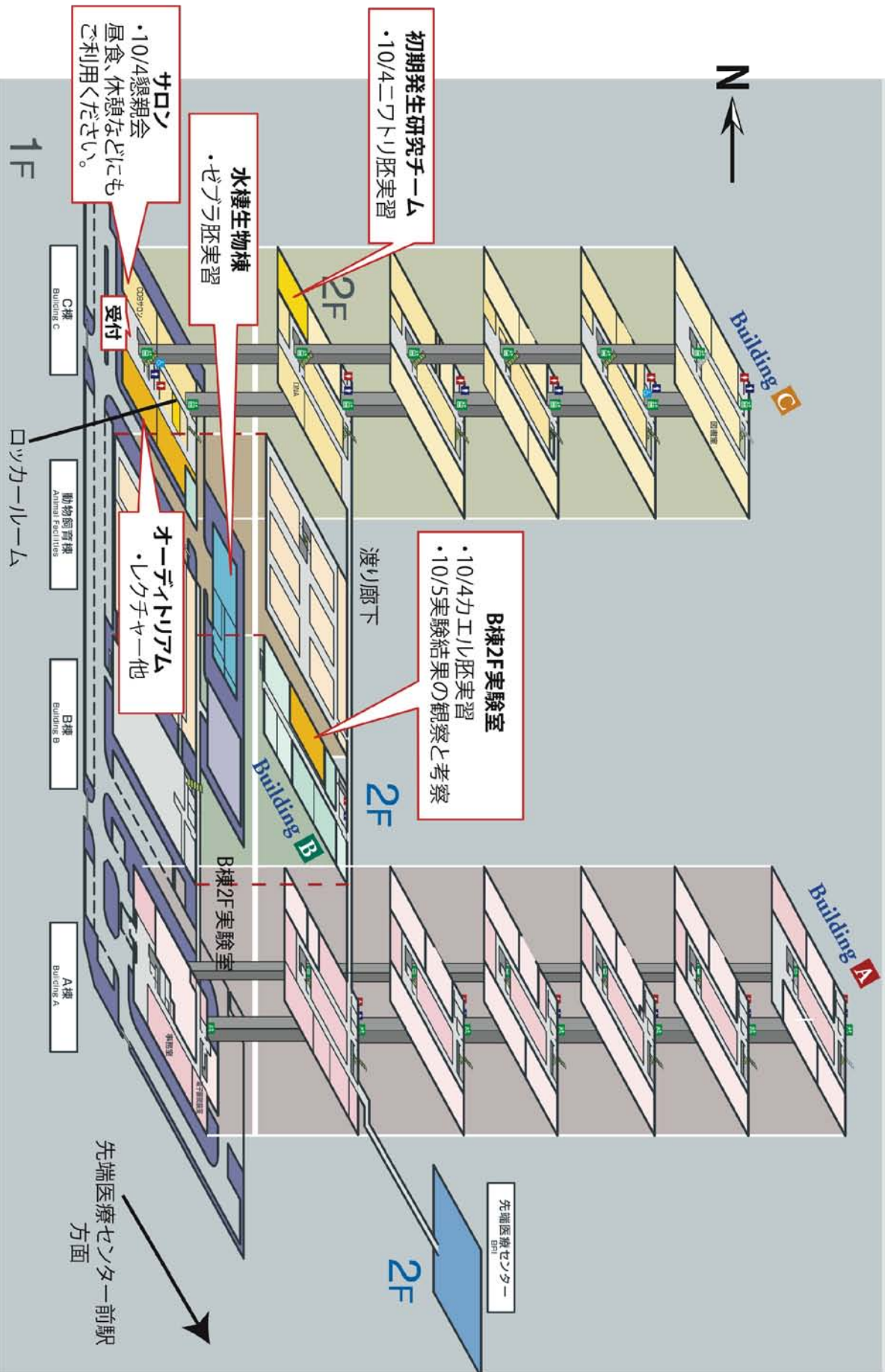
10月4日(土)

時間	内容	場所
9:30～	受付開始 ※受付でお名前の確認と懇親会費(¥2500)を集合致します。 <u>おつりのないようご注意ください。</u>	C棟1F
10:00～10:20	概要説明及びプログラム説明	C棟1F オーディトリウム
10:20～11:20	レクチャー1 「オーガナイザー研究の新展開」 東京大学大学院理学系研究科准教授 平良眞規先生	C棟1F オーディトリウム
11:20～11:30	休憩	
11:30～12:30	グループA ゼブラフィッシュ胚RNAインジェクション実験デモ	水棲動物棟
	グループB CDB施設見学	
12:30～13:30	昼食	
13:30～16:30	グループA カエル胚オーガナイザー移植実験	B棟2F実験室
	グループB ニワトリ胚オーガナイザー移植実験	C棟2F初期発生研究チーム実験室
16:30～17:00	休憩	
17:00～18:00	実践研究発表と討論	C棟 オーディトリウム
18:00～19:30	懇親会	C棟サロン

10月5日(日)

時間	内容	場所
10:00~11:00	レクチャー2 「幹細胞の発生生物学と応用」 発生・再生科学総合研究センター 丹羽仁史チームリーダー	C棟 オーディトリウム
11:00~12:00	グループA CDB 施設見学	
	グループB ゼブラフィッシュ胚 RNA インジェクション実験デモ	水棲動物棟
12:00~13:00	昼食	
13:00~13:40	ゼブラフィッシュ胚インジェクション実験 結果の観察と解説	B棟 2F 実験室 (注:水棲生物棟ではありません)
13:40~16:30	カエル胚及びニワトリ胚実習結果の観察と解説	B棟 2F 実験室
16:30~17:00	ディスカッション 「研究機関・大学と高校の教育連携」	C棟 オーディトリウム

CENTER FOR DEVELOPMENTAL BIOLOGY



注意事項

1. 研究が行われているため、指示のあった場所以外には出入りしないで下さい。
2. 貴重品は常に身につけ、ご自身の責任において管理してください。
3. 配布された名札は常に身につけてください。
4. 理研への出入りはC棟正面玄関からお願いします。
5. 見学・実習中などにけがをされた方、気分が悪くなられた方は、直ぐにスタッフにお知らせ下さい。特に鋭利な器具を使用しますので十分ご注意ください。
6. 当日連絡先は 078-306-3092（スタッフの携帯電話につながります）です。

その他、質問等ありましたらお気軽にお尋ね下さい。

昼食について

ポートライナー先端医療センター前駅東側にコンビニエンスストア、先端医療センター1Fにカフェテリアがありますのでご利用下さい（500～600円、日曜休業）。弁当等をご持参された方はC棟1Fサロンでお召し上がり下さい。

持参する物

- ・実習結果スケッチのための筆記用具

ロッカーについて

C棟1Fに鍵付きのロッカーを設置しております。荷物などを保管する際にお使いください。貴重品は各自の責任のもと管理してください。

Zebrafish 実習

RNA インジェクション実験

目的

脊椎動物の複雑な体が、たった1つの受精卵からどのようにして作り出されていくかは大変重要な問題です。この機構を理解するために多くのモデル動物が使われていますが、今回の実験実習に用いる小型熱帯魚ゼブラフィッシュは発生生物学の研究材料として世界中で広く使用されています。

今回は、オーガナイザー因子を含む発生過程に重要な役割を持つ分子の RNA を、マイクロインジェクション法を用いて直接ゼブラ受精卵に注入し、胚発生における各分子の役割を検討します。

ゼブラフィッシュ(Danio rerio)とは

ゼブラフィッシュは、脊椎動物のモデル実験動物として比較的最近登場した動物です。体長 5cm 程度の小型熱帯魚で、原産地はインド、分類学的にはコイ目コイ科ダニオ属に属し、コイやキンギョに近い魚です。成体の体表には紺色の縦縞があることから、ゼブラダニオという名前で熱帯魚愛好家に親しまれています。ペットショップで簡単に入手することが出来ます。

実験発生学の材料としてのゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュは、飼育が容易、多産（一度の産卵で、200 個程度）、世代交代時期が短い（約 3 ヶ月）という遺伝学的解析に適した特徴を持っています。さらに、母胎外で受精・発生し、その発生は早く、初期発生期間を通して胚が透明である等、実験発生学に適した特徴も備えています。実験発生学の材料として、胚に、DNA や RNA 等の遺伝子注入が簡単に行えます。また、蛍光色素を個別の細胞に注入することにより、標識した細胞がどのように移動してどのような細胞に分化していくかを調べることが出来ます（細胞系譜の解析）。さらに、細胞の分化能力、組織の誘導能を探るための、細胞・組織の移植によるキメラ個体を用いた解析が簡単です。

ゼブラフィッシュが研究に使われるようになった歴史

約 30 年前、当時ウイルス研究者であったオレゴン大学の George Steisinger は、研究対象を微生物から脊椎動物に変える目的で、遺伝学的研究が可能な脊椎動物を探していました。Steisinger は、“短い世代交代時期と多産”、“狭いスペースで大量に飼育できる”、を重視し、ゼブラフィッシュを選びました。また、同僚であった Charles Kimmel は、初期胚が透明で、発生の全期間にわたり組織・器官形成を観察でき、受精後 2・3 日で器官形成が完了することに注目しました。Steisinger と Kimmel らは、共同で γ 線照射による突然変異体の単離と、その変異体を使った実験発生学的解析を行い、ゼブラフィッシュの存在が遺伝学者や発生学者の間で知られるようになって来ました。そして、今から 12 年ほど前に、ゼブラフィッシュに大きな転機が訪れました。ショウジョウバエを用いた遺伝学で有名な Christiane

Nüsslein-Volhard (この業績で Wieschaous, Lewis とともに 1996 年ノーベル医学生理学賞を受賞) らは、ショウジョウバエで成功した遺伝学をヒトに応用できる脊椎動物で行うことを考えていました。当時、発生異常を示す突然変異体を多数単離するといった試みは、ショウジョウバエや線虫など無脊椎動物では行われていましたが、脊椎動物では時間と費用がかかり過ぎるという問題がありました。それを解決したのがゼブラフィッシュでした。

Christiane Nüsslein-Volhard (マックスプランク研究所、ドイツ) と Wolfgang Driever (マサチューセッツ総合病院、アメリカ合衆国、現フライブルグ大学) は、それぞれ水槽数千個規模で、初期発生の異常に関する突然変異体の大規模スクリーニングを行いました。二つのグループが行った方法は、遺伝子変異原として化学物質 ethylnitrosourea(ENU)を用いた、古典的な二世代スクリーニング法です。1996 年に、約 5 年間にわたるスクリーニングの成果を、1996 年 *Development* 誌の 123 巻ゼブラフィッシュ特別号の中で発表しました。

1996 年末までに、チュービンゲンとボストンのグループから、約 1700 の突然変異体が報告されました。胚発生のあらゆる過程(原腸形成、体節形成、中軸組織の形成、神経組織の領域化等)で異常を示す突然変異体が見つかっています。その中には、ヒトの遺伝病のモデルになるものも含まれています。例えば、ヒトの先天性心疾患に相当する心臓の変異体、目や聴覚器官の変異体も存在しています。このような初期発生で異常を示す変異体のスクリーニングは、胚発生が母胎内で進行する哺乳類では、極めて難しく、ゼブラフィッシュの特徴を生かした結果と言えます。脊椎動物の発生の基本的な機構は、動物種を超えて脊椎動物間で共通であることが、これまでの研究で示されています。従って、ゼブラフィッシュでの研究の成果は、ヒトを含めた脊椎動物の発生・遺伝の研究に直接応用できるものと思われます。

突然変異体が生ずる発生異常は、遺伝子異常が原因です。ゼブラフィッシュの遺伝子情報の大半は解明されており、変異体の責任遺伝子を同定することは簡単になってきています。これまで単離された変異体、またこれから単離される変異体の責任遺伝子が同定されることにより、脊椎動物の発生に必須の遺伝子の全貌が明らかになってくるものと思われます。また、ヒト疾患モデルの変異体の責任遺伝子が明らかになれば、さらに医学研究にも応用されていくことでしょう。

ゼブラフィッシュを用いた体軸形成研究

両生類同様ゼブラフィッシュもまた背側オーガナイザー部位が存在し、オーガナイザーを腹側に移植すると二次軸が形成されます(図1)。この部位で如何なる遺伝子が働き、オーガナイザーとして働いているのか、発生学者の興味を長年引きつけてきました。

※ この移植実験はゼブラ胚が小さいため極めて難易度の高い実験です。今回の実験実習では、オーガナイザー部位を移植するかわりに、一細胞期のゼブラ胚に非常に細いガラス針を用いて RNA を直接注入(インジェクション)し、オーガナイザー関連の遺伝子を導

入します。RNA を卵黄部のほぼ中心に注入すると、胚内で翻訳されタンパク質として機能します。

魚類・両生類では、受精卵植物極に存在する背側化決定因子（仮想分子）が、胚背側に移動し、Wnt 細胞内シグナルを介して、オーガナイザー誘導に必要な遺伝子を活性化すると考えられています。ゼブラフィッシュにおいては、Wnt/ β -catenin シグナルで制御されるホメオボックス遺伝子 *dharma/bozozok* と *nodal* 関連遺伝子 *ndr1/squint* が、協調的に作用し、オーガナイザーが誘導されると考えられています（図1）。

原腸胚になると、背側オーガナイザーからは多くの誘導シグナル分子が産生されます。その多くは腹側シグナルである BMP あるいは Wnt のシグナルを抑制する因子として働くことが分かっています。オーガナイザー分子 Chordin, Noggin は BMP 阻害因子として、Dickkopf1(Dkk1), Frzb1 は Wnt 阻害因子として機能します。背側オーガナイザーと腹側シグナルの拮抗作用により、中内胚葉の背腹軸が、外胚葉においては背側に神経外胚葉が、腹側に表皮が形成されるようになります（図2）。

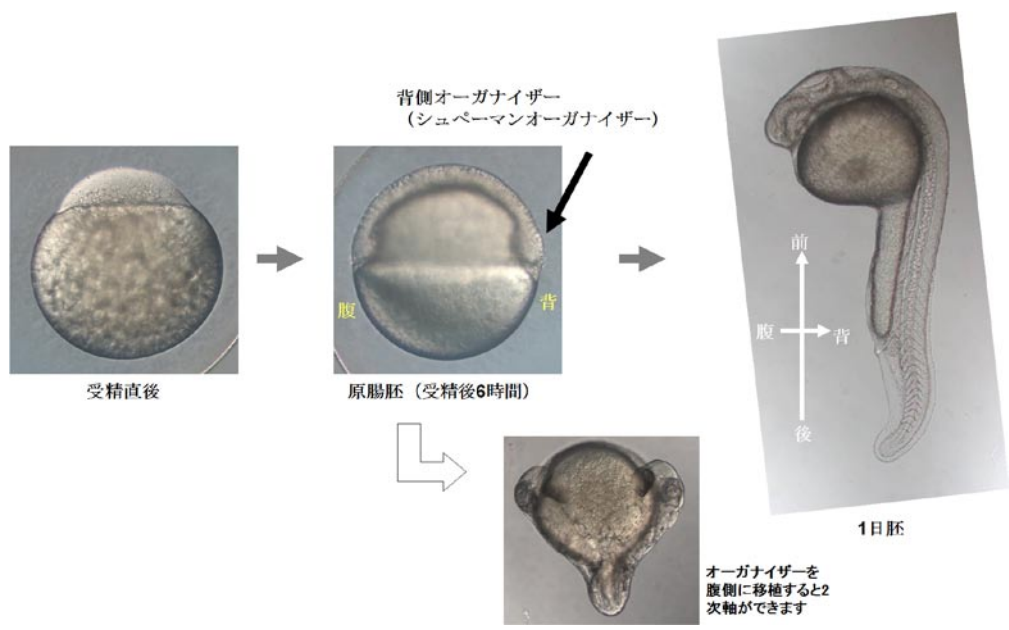


図1 オーガナイザーによる背側誘導

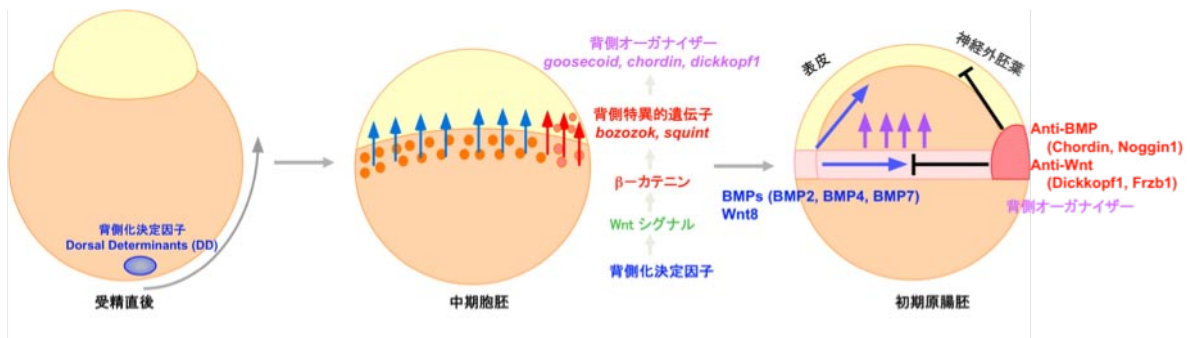


図2 ゼブラフィッシュ初期体軸(背腹軸)形成機構のモデル

体軸形成に異常を示す突然変異体

背側オーガナイザーを作る遺伝子に異常を有する変異体では、オーガナイザーに由来する脊索・脊索前板・神経底板といった中軸組織の形成異常が見られます。特に、*squint*, *cyclops*, *one-eyed pinhead* 等の *Nodal* シグナルの欠損した変異体では、脊索前板が欠損しているため、脊索前板からのシグナルによって分かれるはずの目が、分かれず、中央で融合している単眼症（サイクロプス）の表現型を示します。*bozozok* の強い表現型を示すものや、*bozozok* と *squint (nodal)* の両方が欠損した変異体では、背側オーガナイザーの活性が著しく低下しており、背側オーガナイザーによって誘導される頭部の神経系が全く出来なくなっています。

腹側化シグナルである **BMP** および **BMP** のシグナル伝達に関与する遺伝子の欠損した突然変異体では、非常に強い背側化表現型を示す。血球系組織など殆どの腹側組織がなくなり、尻尾も腹側構造が消失するため、伸びた構造をとれず、とぐろを巻いた状態になります。一方、背側化シグナルの欠損した変異体では、背側組織が減少し (*chordino* 変異体では、神経組織が縮小しています)、腹側組織である血球系組織が拡大し、尾びれの腹側部分が拡大しています。

<実習項目>

実験実習に用いる遺伝子

前述の遺伝子のうち、

- BMP：腹側誘導因子
- Chordin：BMPの阻害因子であり背側を誘導
- Antivin/Lefty1：Nodalのネガティブフィードバック因子
- Green Fluorescent Protein (GFP)：Control

の4種類のRNAを一細胞期のゼブラ胚にインジェクションし、胚発生の過程を観察する。

<注意事項>

- 1) 今回実験を行う水棲生物棟実験室は通常研究者が実験を行っている部屋であり、実験器具などの扱いには十分注意すること。また、サンプルや実験用具他指定された器具以外のものには出来るだけ触れないこと。
- 2) 希望者には保護眼鏡の貸し出し有り。使用器具は鋭利なものも含むため注意すること。希望者はスタッフ（中込）まで。

<実習日程>

グループ A

10/3	RNA 合成	} TA が行う (下記卵の準備の項参照)
10/4	実習開始前 産卵、受精、卵の回収	
10/4	11:30~12:30 RNA インジェクション実験 卵を 28°C でインキュベート	
10/5	13:00~ 実習結果観察	

グループ B

10/3	RNA 合成	} TA が行う (下記卵の準備の項参照)
10/5	実習開始前 産卵、受精、卵の回収	
10/5	11:00~12:00 RNA インジェクション実験 卵を 28°C でインキュベート	
10/5	13:00~ 実習結果観察 (グループ A の実験結果を参考)	

<卵の準備>

ゼブラフィッシュの産卵周期は明暗サイクルにより制御されており、照明開始時に交配及び産卵が行われる。今回用いるゼブラフィッシュは前日の夜、雌魚、雄魚を仕切りの入った水槽に入れ、翌朝11時に仕切りを除去して交配・産卵させた。（通常CDBの水棲生物棟ではスリットは用いず雌魚、雄魚を一つの水槽に入れ、9時～11時の間に交配・産卵を行う。今回は実習のスケジュールと卵の発生段階調整のため特別にスリットを用い採卵を行った。）産卵後は親魚が卵を食べてしまうので、卵を採取する際はネット或はガラス玉をしいた水槽の中でゼブラフィッシュを飼育する（図3）。得られた卵は、サイフォンとネットを用いて回収し、Embryo medium中にて28℃で保温する。

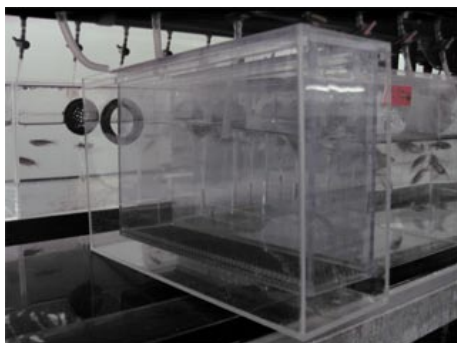


図3 左:卵採取用ネット付き水槽



図4 左:ガラス玉入り水槽(奥)と卵採取用のサイフォン、ネット(茶こし) / 右:卵の採取

<インジェクション実験>

1 細胞期（添付資料参照）のゼブラ胚卵黄部にガラス針を用いて RNA をインジェクションする。

1) in vitro transcription による RNA 合成

RNA polymerase 結合部位を持つプラスミドベクター（図 4）に目的遺伝子の mRNA をコードする配列（cDNA）を組み込み（ここでは Chordin、BMP、Antivin/Lefty1、GFP）、SP6 RNA polymerase を用いて RNA 合成を行う（図 5）。

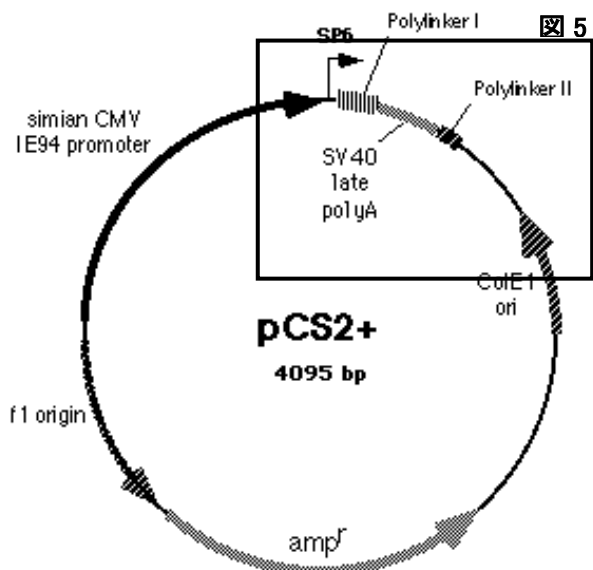


図 4 in vitro transcription に用いるプラスミドベクター

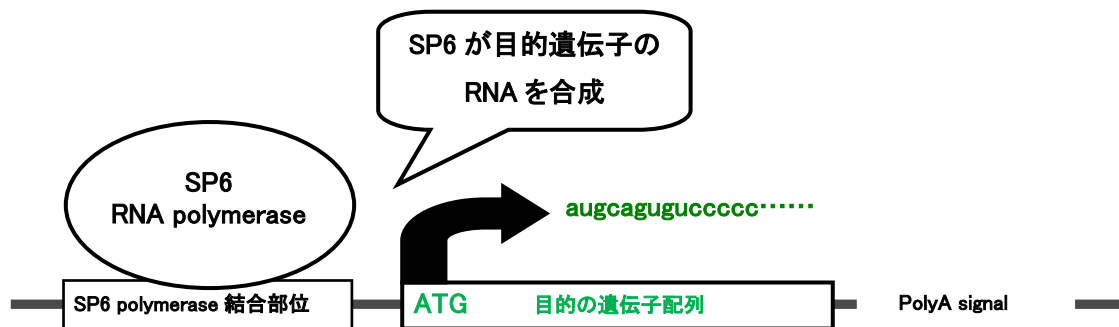


図 5 図 4 口部を拡大、詳細

合成した RNA は精製し、色素（フェノールレッド）入りの 0.2M KCl に融解する。色素を入れることによってインジェクションの際、RNA 溶液が見やすくなる。

2) RNA のインジェクション

インジェクションには写真 (図 6) の装置を使用する。RNA 溶液を入れたガラス針をゼブラフィッシュ胚の卵黄部に刺し、窒素を送り込んで RNA 溶液を胚内に送り出す。

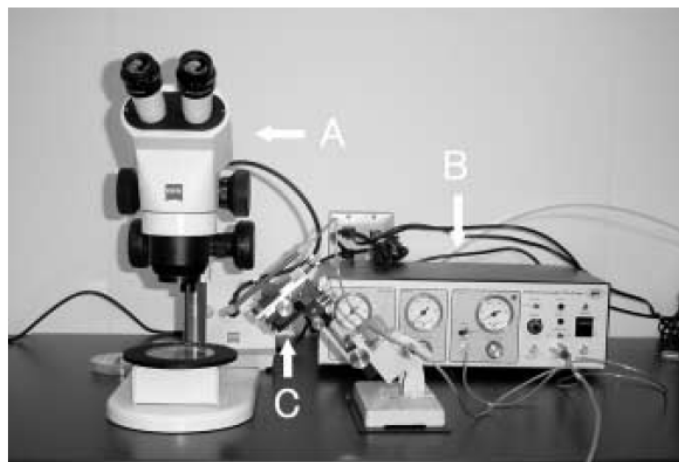
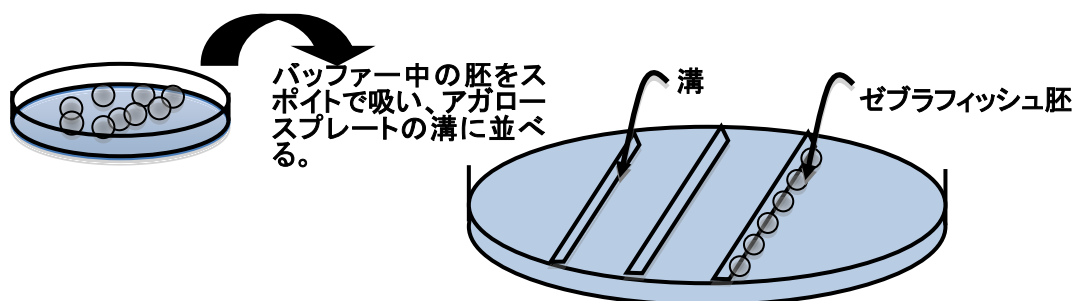


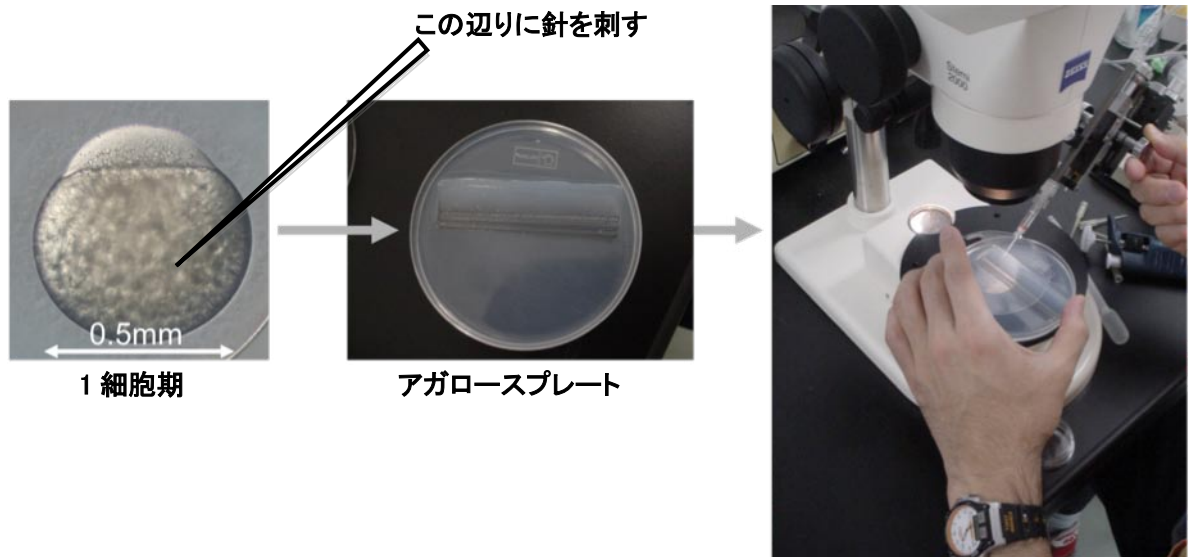
図 6 インジェクション装置

(A)実体顕微鏡、(B)マイクロインジェクター、(C)マニピュレーター

1. ガラス針をマニピュレーター (図 6C) の先にセットする
(鋭利なので取り扱いに十分注意する)
2. ガラス針をセットしたマニピュレーターの先に注射器用シリンジをセットする
3. ピペットマンを用いて RNA を 5~10 μ l 程度滴下する
4. 3 で用意した RNA 溶液にガラス針の先をあて、シリンジで適量吸う
5. マイクロインジェクターのペダルを踏み窒素を送り出し、顕微鏡下で針の先に一滴 RNA を出す。この滴の大きさ(直径)が顕微鏡(倍率 X50)の目盛りで 6.25 メモリ (125 μ m に相当) になったとき、その滴が 1nl になる。6.25 メモリになるようマイクロインジェクターの調節つまみで調節する。
6. ゼブラ胚をアガロース (寒天) プレーットの溝に並べる



7. マニピュレータの縦横、前後、上下を調節して針をゼブラ胚卵黄部に突き刺す



8. ペダルを踏み RNA 溶液を胚内に送り出す
 9. 針を抜く
 10. 20 個程インジェクションしたら胚をスポイトでバッファーを入れたシャーレに移し、インキュベーター (28°C) 内で保管。

<結果と考察>

考察する項目

- i) 正常胚（インジェクションを行っていない胚）をディスプレイ用顕微鏡に展示してあるので参考・比較しながら観察する。
 ii) インジェクションした遺伝子とその表現型を確認

インジェクションした遺伝子	胚の特徴
<i>bmp</i>	腹側化 血球系組織や尾びれ腹側の拡大
<i>chordin</i>	背側化 腹側組織（血球系組織など）の消失。 尻尾も腹側構造が消失するため、伸びた構造をとれず、とぐろを巻いた状態になる
<i>antivin/lefty1</i>	単眼症（サイクロプス） 目が分かれず中央で融合している
<i>EGFP</i>	Control

<参考資料>

使用する試薬

- Embryo medium

Stock #1

8.0 g NaCl

0.4 g KCl

in 100 ml dd H₂O

Stock #2

0.358 g Na₂HPO₄ Anhydrous

0.60 g KH₂PO₄

in 100 ml ddH₂O

Stock #4

0.72 g CaCl₂

in 50 ml ddH₂O

Stock #5

1.23 g MgSO₄·7H₂O

in 50 ml dd H₂O

Stock#1～5 を以下の分量で加える。

1.0 ml Hank's Stock #1

0.1 ml Hank's Stock #2

1.0 ml Hank's Stock #4

95.9 ml dd H₂O

1.0 ml Hank's Stock #5

Use about 10 drops 1 M NaOH to pH 7.2

使用前に NaHCO₃(0.035g/100ml)、0.1%Methylene blue(30ml 程度/100ml)を加える。

- SP6 RNA polymerase

Promega より販売、組み替え E.coli 由来

ゼブラフィッシュの新たな技術

ゼブラフィッシュの大規模スクリーニングの頃より、多くの研究者がゼブラフィッシュ

を用いることのメリットを認め、ゼブラフィッシュを研究材料として使うようになりまし
た。この数年、ゼブラフィッシュの研究は、国内外で増え続けています。さらに、この数
年でゼブラフィッシュ研究者から新しい技術が開発されています。

(1) アンチセンスモルフォリーノ：Stephan C. Ekker らは、Gene Tool 社と共同で、新しい
形のオリゴヌクレオチドであるモルフォリーノオリゴヌクレオチドが、ゼブラフィッシュ
の遺伝子の機能を調べる重要な道具になることを示しました(2000年)。RNA の鋳型にな
るように(アンチセンス)モルフォリーノオリゴヌクレオチドを作成し、胚に注入するこ
とにより、RNA から蛋白への翻訳を阻害したり、蛋白翻訳に入る前の RNA のプロセッシ
ングを阻害することが出来ます。遺伝子の機能を自由自在に抑えることが出来るようにな
ったわけです。

(2) トランスジェニックゼブラフィッシュ：ゼブラフィッシュの染色体に特定の遺伝子
を挿入する技術が開発されています。元々、DNA を胚に注入して、注入した遺伝子の挿入
された魚を選択する方法がありました。しかし、この方法では、良くて 10%程度の胚に次
の世代に受け継がれる遺伝子が挿入されるといった低い確率でした。遺伝学研究所の川上
らは、メダカで見つかったトランスポゾン(Tol2)を用いて高率に遺伝子導入フィッシュを
作成する方法を開発しています。

(3) 光る魚：最近、蛍光蛋白(GFP, mCherry 等)と遺伝子導入技術と組み合わせで、色んな
組織や細胞が蛍光で検出できる“光る魚”が作られています。とくに BAC などのように長
い染色体遺伝子領域を用いたトランスジェニックフィッシュは内在性の遺伝子発現を完全
に再現し、色んな遺伝子発現制御領域を用いることで色んな組織・細胞を蛍光蛋白で生き
たまま標識することが可能になりました。これらは、遺伝子発現の制御機構の解析に用い
られるだけでなく、これらの魚を用いた突然変異体の解析に用いられています。

(4) ねらって遺伝子を破壊する技術：ES 細胞を用いたマウスを用いた遺伝子破壊は有名
ですが、ゼブラフィッシュで特定の遺伝子を破壊する技術が開発されています。ひとつは
TILLING(Targeting Induced Local Lesions INGenomes)と一般に呼ばれる方法で、ランダムに変
異が入った状態の魚から、特定の遺伝子の変異を PCR で増幅し変異を検出する方法です。
さらに最近では、ZFN(Zinc Finger Nuclease)という人工的な DNA 切断酵素を作成し、遺伝子
を破壊する方法も報告されています。

このようにゼブラフィッシュを解析する技術は、年々高度になっています。

参考文献

日比正彦 細胞工学 Vol. 26, No. 10, 1142-1146 2007

村岡修、日比正彦 実験医学 Vol. 24, No. 11, 1658-1661, 2006

日比正彦 病理と臨床 Vol. 21, No. 7, 743-749 2003

村岡修 日薬理誌 Vol. 120, 96-100, 2002

日比正彦、清水貴史、橋本寿史、柳成林、山中庸次郎、平野俊夫 蛋白質核酸酵素 Vol. 45,

No. 17, 2720-2731 2000

日比正彦 細胞工学 Vol. 19, No. 11, 1634-1643, 2000

Muraoka O. et al., Nature Cell Biology, Vol. 8, No. 4, 329-338, 2006

Nojima H. et al., Mechanisms of Development, Vol. 121, 371-386, 2004

ゼブラフィッシュ胚インジェクション実験実習書は以下の方々のご協力のもと作成しました（敬称略）。

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 体軸形成研究チーム

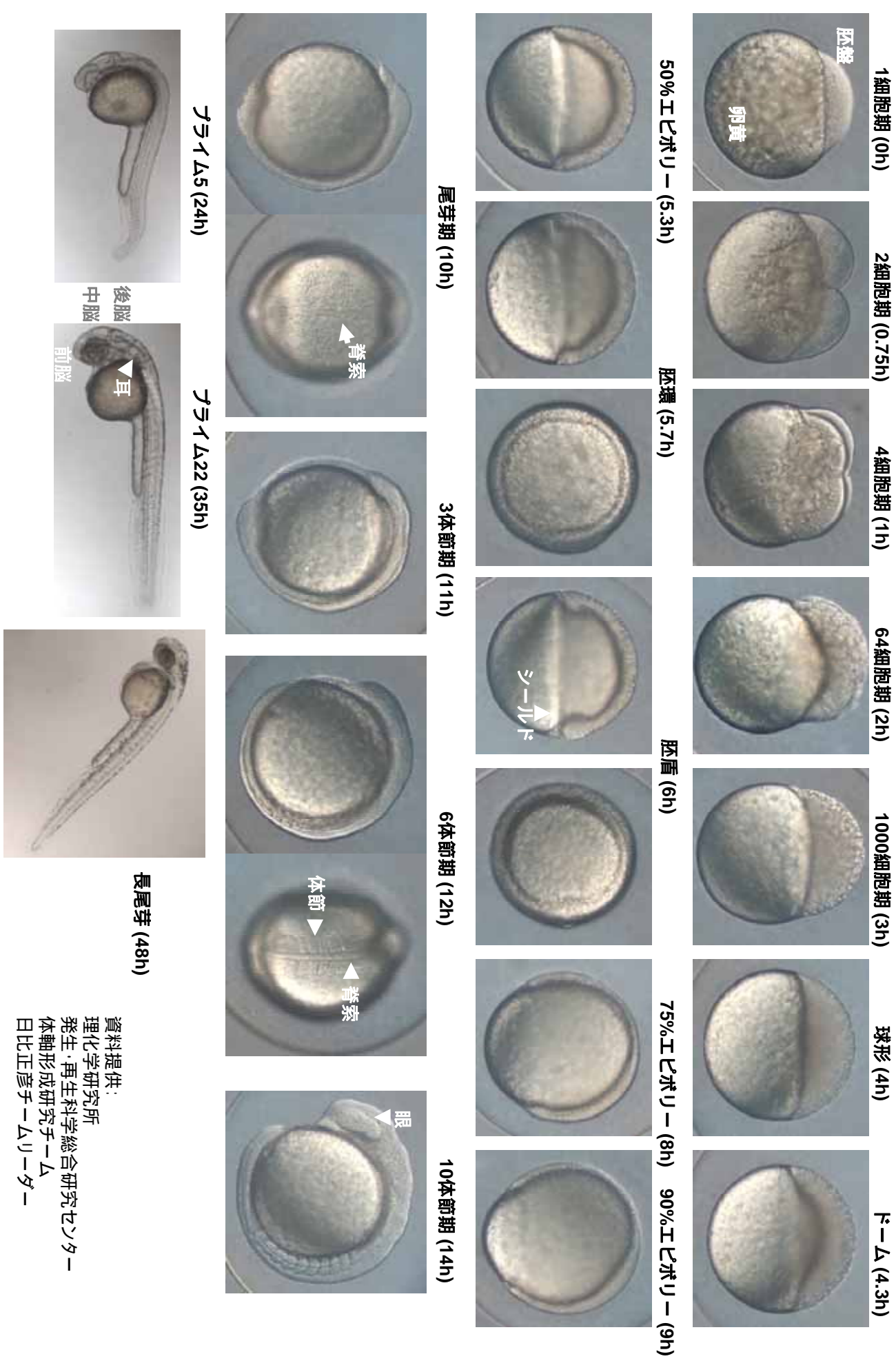
日比正彦

野嶋秀明

坂東可菜

文章や図などは全て体軸形成研究チームから提供していただきました。教材用としての転載は可能ですが、新聞や雑誌など公の場での公開はご遠慮ください。

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) の初期発生



資料提供：
理化学研究所
発生・再生科学総合研究センター
体軸形成研究チーム
日比正彦チームリーダー

Xenopus 実習

実習の目的

発生という現象は古くから多くの研究者を魅了し続けてきたが、近年、分子生物学的手法や遺伝学的手法により形態レベルから分子レベルに至る解析が可能となり、その詳細が明らかになりつつある。その結果、発生様式は一見千差万別のようなものであるが、そこに内在する分子機構はかなりの部分が共通であることが示されている。発生現象を解析するためのモデル生物として、線虫、ショウジョウバエ、ウニ、ホヤ、メダカ／ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル、ニワトリ、マウス、などが良く研究されている。それぞれのモデル生物の特徴を活かして、高次生命現象を如何に分子レベルで解き明かすかが現代の生物学の大きなテーマの一つである。本実習では発生学における金字塔となったシュペーマンとマンゴールドによるオーガナイザー移植実験を体験することを目的とする。具体的には、原腸胚よりピンセットを用いてオーガナイザー領域および陰性対照 (negative control) としてそれ以外の領域を切り出し、他の胚の胞胚腔に移植する。これを1日培養して外形の変化を観察し、どの様な構造ができたか（特に頭部、尾部の別）を判定する。

アフリカツメガエルについて

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は、中央及び南アフリカ原産の無尾両生類であり、後肢の3本の指の先に爪がある、舌を持たず耳の鼓膜は明らかでない。全体として体が扁平で生涯水中生活をするなどの特徴を持つ。またゴナドトロピン（生殖腺刺激ホルモン）の投与により、季節にかかわらず産卵することより、当初は女性の妊娠判定用の動物として養殖されていた。この特徴に加え、多量に産卵すること、2日程で尾芽胚になるなど発生速度が早いこと、水槽で幼生を成体にまで成熟させることができ、成体は何年も使用できること、卵の直径が1.2 mmと大きく実験発生的な手術が容易にできることなどの利点がある。またDNAやRNAなどを胚へ容易に顕微注入できることを利用して、遺伝子の機能解析が盛んに行われており、発生生物学の標準実験材料として国際的に広く用いられている。

成体を飼育するためには、浅く水を満たした水槽を用い、“陸”を作る必要はない。カエルが飼育槽から跳び出ることのないよう、水深は10cm以上に、飼育槽の壁は水面より15cm位の高さのあるものを使う。30Lの水に対して、雌では10個体、雄では15個体が標準である。飼育槽の水は必ずしも通気する必要はないが、水温を18-20℃に保つことが良質の卵を得るのに必要である。胚発生は14-24℃の間で正常に進行する。

アフリカツメガエルは長寿であり、水槽で飼育すると、15年以上も生きる。個体を識別する最も容易な方法は後肢の爪を切り落とすことであるが、この場合、爪は再生して来るので、成長期のカエルの場合は2カ月毎に、成体でも4カ月毎に爪を切る必要がある。

<実習項目>

オーガナイザーの移植による二次胚誘導実験：原腸胚期のオーガナイザー領域を切り取り、別の胚の胞胚腔に移植して二次胚の形成過程を観察する。

<注意事項>

- 1) 胚操作に用いるピンセットは先が非常に細いため過って床に落とすと先が曲がってしまい、2度と使えなくなるので（ただし、ごく小さな曲がりはやスリで削って修復可能である）取扱いには充分注意すること。また、目や手などに刺すなどの事故にも注意すること。
- 2) 希望者には保護眼鏡貸し出し有り。スタッフ（申込）まで。

<実習日程>

10/2	雌カエルにゴナドトロピン投与	} 前日までにTAが行う (参考1 卵の準備)
10/3	12:30 産卵、受精	
	13:30 産卵、受精	
	14:30 産卵、受精	
	14°Cでインキュベート	
10/4	9:00 卵の発生段階を確認 一部発生を送らせるために12°Cインキュベーターに移動	
	13:30 実験実習 オーガナイザー部位を胞胚腔に移植	
	発生を早めるために20°Cインキュベーターに移動	
10/5	13:30 実習結果観察	

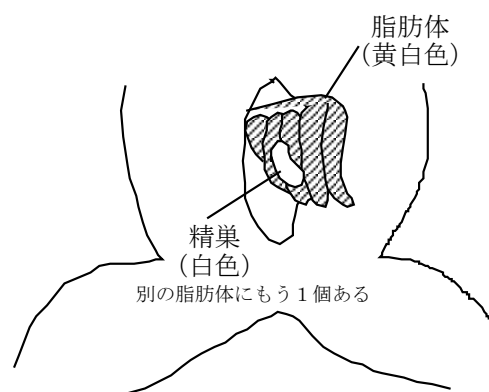
<参考 1 卵の準備>

産卵、受精

アフリカツメガエルの受精卵は他の両生類よりも発生が早く、受精後約 2 時間で卵割が始まり、10 時間で原腸胚になる。ある特定の発生段階で顕微注入実験や胚操作を行う場合は人工受精卵を用いた方が多数の胚の発生段階が揃っており都合が良い。発生過程の揃った胚を得ることは生化学的解析には特に重要な点である。

1. 精子懸濁液の調製

成熟した雄から一対の精巣を摘出し（右図参照）、1x De Boer's soln. で洗った後、1x De Boer's soln. で湿らせたキムワイプを入れた小型シャーレの上に置き、それを氷上に載せる。精巣の一部（数ミリ四方）をハサミで切り取り 0.5 ml の 1x De Boer's soln. 中で刻み懸濁する。残りは組織片のまま冷蔵保存する。約 1 週間程度保存できる。



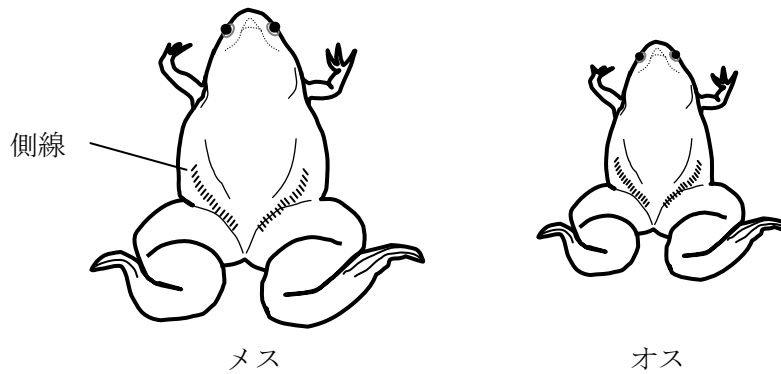
2. ゴナドトロピンの注射と採卵

ゴナドトロピン (gonadotropin, gonadotropic hormone, GTH ; 生殖腺刺激ホルモン) とは生殖腺を刺激するホルモンの総称で濾胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone, FSH) と黄体形成ホルモン (luteinizing hormone, LH) が主体である。ヒト絨毛膜性生殖腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin, hCG) が市販されている。

人工受精を行う前日に hCG を成熟した雌の側線付近の皮下に 300 units 注射し、飼育槽にいれる。飛び出さないように蓋はクリップでとめ、15-23°C で飼育する。15°C で 14 時間位、23°C で 9-10 時間で産卵を始める。なお、hCG の作用を増強するために 1、2 週間前に hCG を 50 units 注入すると良い (文献 2)。

産卵を開始したら、雌の下腹部や背中を両手の指で軽く押し、未受精卵をシャーレの 0.5x De Boer's soln. 中に集める。強く押しすぎると内出血してしまうので注意のこと。

【注意】カエルは非常に滑り易いので手から離れやすい。もし床に落とすと、床の汚れには寄生虫 (線虫) の卵があり、カエルはそれに感染してしまう。決して落とさないように。万が一落としてしまった場合は、水でよく洗ったのちトリパンプルーを入れた水に一晩置いてから飼育水槽に戻す。



3. 人工受精（媒精）

受精は 20 °C 前後で行う。ゼリー層に包まれた未受精卵をいれたシャーレから、De Boer' s soln. を除く。未受精卵 500 個に対し、精子懸濁液 2 滴程度を加えて 10 分静置する。更に 0.5x De Boer' s soln. を適量加えて 20 分程放置すると、受精卵は動物極側が上になるように回転する。受精卵と未受精卵の比から受精率を判定する。受精率を記録したら直ぐに脱ゼリーを行うか、0.1x Steinberg' s soln. 中に移し 14-24 °C で培養する。

【注意】塩濃度が高いと原腸陥入に異常を生じるため、胞胚期までに必ず 0.1x Steinberg' s soln. に置き換える必要がある。

4. 脱ゼリー

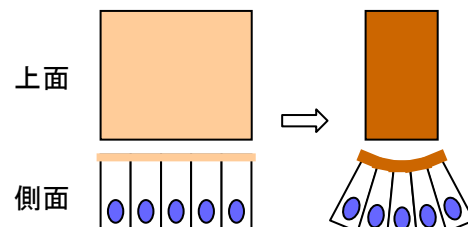
アフリカツメガエルの卵は粘着質のゼリー層に包まれている。受精卵の正常発生を観察するために、まずこのゼリー層を除く。受精卵の入ったシャーレの液を抜き、脱ゼリー用の 2% システイン溶液を注いだ後、受精卵をピンセットでシャーレの底から剥がしながらビーカー（100 ml）に移す。ときどき攪拌し、5 分後にゼリー層が溶けたのを確認したら、0.1x Steinberg' s soln. （または汲み置き水）で 4-5 回洗い（システイン溶液からでる硫化水素の匂いが無くなるまで）、脱ゼリー液を完全に除く。

＜移植実験＞

正常発生の観察

正常胚は実験室ディスプレイ用顕微鏡に常備してあるので、Nieuwkoop and Faber (1967)の発生段階の図（ページ末付録；文献1）を参考に随時観察する。胚の発生の速度は環境要因、特に温度によって敏感に変化し、14-24℃より高くても低くても発生異常を来たすので、実習室の温度には常に気をつける。移植実験に用いる胚は発生時期を調節するため14℃または12℃に保った状態であるが、正常胚は常温に置かれているため発生が早く進む。特に以下の項目に注目して観察する。

- i) 1細胞期：動物極側に白い斑点がある。卵胞 (germinal vesicle) が壊れた跡である。
- ii) 2細胞期：各割球の色素の分布に違いがあるか？
- iii) 4細胞期：各割球の色素の分布に違いが現れる。色素が薄く割球の大きさが小さい方が背側である（既に背腹軸は決定されたことになる）。
- iv) 胞胚期：動物極側と植物極側の細胞の大きさで stage 8 と stage 9 を見分ける。アニマルキャップの実験や原口形成開始の時間を予測するのに必要である。20℃では stage 9 になってから凡そ2時間後に原口の形成が始まる。
- v) 原腸胚期：原口が最初に形成されるのは背腹のどちら側か？ 原口の大きさと形状で発生段階を決める（発生段階表を参照）。
- vi) 神経胚期：背側や頭部に縞模様が現れる。縞は右図のような細胞の形態変化に対応している。縞模様に注目。



- vi) 尾芽胚期：ページ末の発生段階図を参考にして、眼の形と大きさ、鰓弓（さいきゅう）、セメント腺、耳胞の位置、前腎、ヒレなどの各発生段階の特徴をとらえてスケッチする。

2. オーガナイザー移植による2次胚の形成

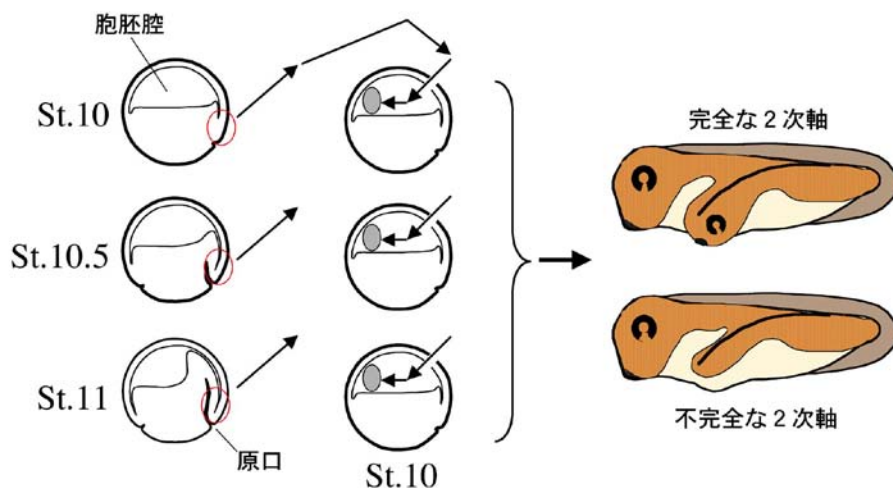
H. Spemann と H. Mangold (1924)は、原口背唇部の腹側への移植法 (transplantation method) による2次胚形成を見出し「オーガナイザー」の概念を提唱した。O. Mangold (1933) はオーガナイザー活性を測定する簡便な方法として原口背唇部を胞胚腔内に移植する方法 (implantation method; 別名 Einsteckung) を開発した。この実習では Einsteckung を試みる。

陥入してゆく中胚葉細胞は他の胚に移植されるとオーガナイザーとして2次胚の形成を誘導する力がある。原口背唇部を通して陥入する中胚葉細胞は時間と共に性質を変え、初期の胚ではおもに頭部を形成するが、後期の胚では胴尾部構造を形成する。従って、オー

ガナイザーを移植する際、どの発生段階の胚から、どの部分を、どの様な大きさに切り取り、どの発生段階の胚に移植したか、を記録しておくこと。また、胚操作を行ってからの時間、そのときコントロールの胚がどの発生段階まで進んでいるかも忘れずに記入すること。

オーガナイザー移植

1. stage 10-11 の胚を、0.5x Steinberg's soln. を入れたシャーレに移す。
2. 胚の卵黄膜を 2 本のピンセットを用いて除去する。
3. ピンセットを用いて、一方の胚の原口背唇部を切り出す。最外層（上皮層 epithelial layer）に強いオーガナイザー活性があるといわれているので、内側の細胞層はある程度除く。移植片が大きすぎると上手く行かないので注意。
4. 宿主側の胚の動物極領域の背側にピンセットで切り込みを入れる。小さすぎると移植の際に裂けてしまい、傷口が直りにくくなる。ある程度大きくても切り口が真直ぐできれいなものが良い。
5. 穴の上に切り出した原口背唇部をのせピンセットで胞胚腔に押し込む。奥（腹側）の方になるべく深く押し込むのがコツ。
6. 0.1x Steinberg's soln.（ゲンタマイシン入り）を入れた穴あきアガロースプレートに移す。移植片は stage 10, stage 10.5, stage 11 からそれぞれ切り取り、移植片の stage ごとに別々に培養する。原口背唇部の反対側の領域（腹側中胚葉）も陰性対照として同様に移植する。また、傷の影響も考えるために傷を付けただけのサンプルも作る（卵黄膜をとる際に傷ついてしまったものを用いるとよい）。未処理の兄弟胚も同様にプレートに移す。
7. 移植胚は各 20-25 個ずつグループ内で作成する。



<結果と考察>

考察する項目の例

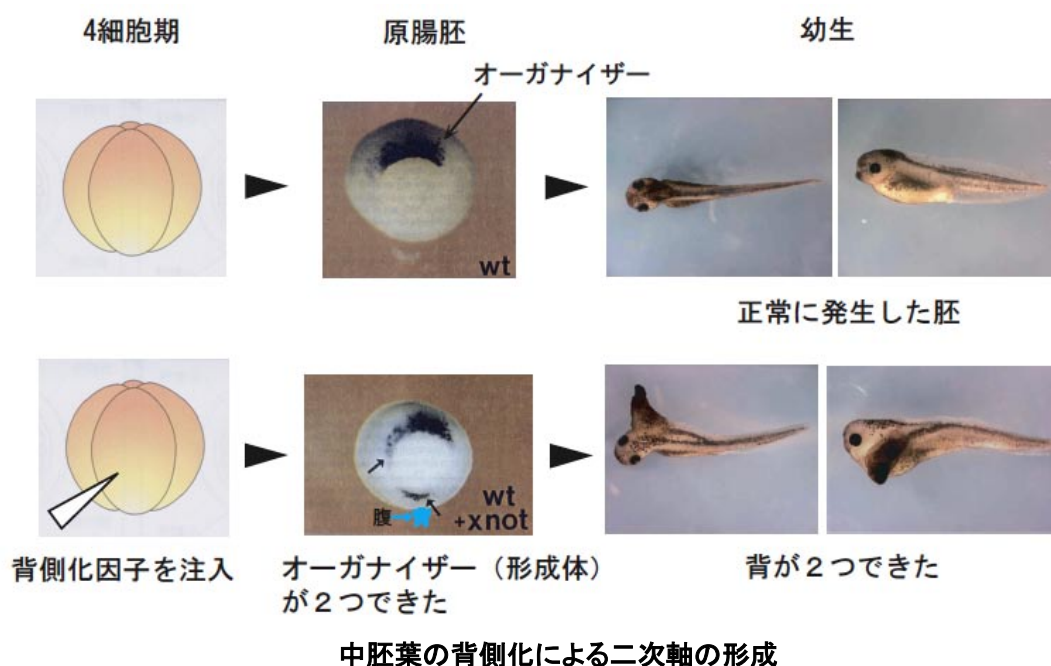
- i) 2次軸が形成された場合：どのような2次軸か。頭（セメント腺、目）、胴部、尾部（ヒレや尾芽様構造はあるか）に着目する。異所的な筋肉の形成が認められたか。2次軸に神経組織が形成されているか。またそれを調べるにはどのようにしたら良いか。
- ii) 2次軸が形成されなかった場合：原因は何か。移植片の量が十分でなかった、移植片が出てしまった、移植片にオーガナイザーが含まれていなかった、などの可能性を考える。
- iii) 宿主胚の発生が正常でなかった場合：原因は何か。0.1X Steinberg 液に入れたか、宿主胚と同じバッチの胚で移植していない胚の発生は正常だったか。
- iv) 胚が解離した場合：原因は何か。移植のための切り込みが閉じなかった、移植片が大きすぎた、バクテリアの増殖、などを考える。
- v) オーガナイザー活性をもつ遺伝子を同定するにはどのようにしたらよいか。
- vi) 移植片の発生段階によって誘導活性に違いがあったか。
- vii) オーガナイザー以外の領域を移植したものと比較して、明確な差が見られたか。

<参考資料>

オーガナイザー遺伝子のインジェクションによる二次軸の形成

オーガナイザー部位を誘導する遺伝子を4細胞期に直接インジェクションすることにより、移植した時と同様に二次軸を観察することが出来ます。下図は β -catenin を注入ししオーガナイザーを誘導する Wnt 経路を活性化した図です。

(資料提供：理化学研究所発生・再生科学総合研究センター細胞分化・器官発生研究グループ 荒巻敏寛)



使用する溶液の組成

1) hCG 溶液 (-20°C 保存)

ゴナトロピン 3000 (帝京臓器) 3000 units

0.6% NaCl 3 ml

(哺乳類では 0.9% NaCl が等張液であるが、カエルは 0.6%である)

2) Ca/K 100x 溶液

CaCl₂·2H₂O 0.64 g

KCl 0.96 g

DW to 100 ml

オートクレーブで滅菌する (長期保存のため)

3) 1x De Boer's Solution (soln.) (pH 7.2)

NaCl 6.4 g

Ca/K 100x 溶液 10 ml

NaHCO₃ 0.35 g

DW to 1000 ml

- 4) 0.5x De Boer's soln.
- 5) 10 M NaOH, 100 ml
- 6) 脱ゼリー液 (2%システイン溶液; 用時調整), 100 ml

システイン塩酸	2 g
DW	98.5 ml
10 M NaOH	1.5 ml (pH 7.9 になる)
- 7) 10x Steinberg's soln. (pH7.4), 500 ml

NaCl	17 g (0.58 M)
KCl	0.25 g
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.03 g
Tris	2.8 g
conc HCl	1.65 ml
Phenol Red	1.5 mg
DW	to 500 ml

オートクレーブで滅菌する
- 8) 0.1x Steinberg's soln., 5 L
- 9) 0.5x Steinberg's soln., 500 ml
- 10) 50 µg/ml ゲンタマイシン (抗生物質) in 0.1X or 0.5x Steinberg's soln.
- 11) MEMFA (0.1 M MOPS, pH7.4, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 3.7% formaldehyde)

10x MEM : ホルマリン : DW = 1 : 1 : 8

参考書

- 1) Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. (1967). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North Holland.
- 2) Sive, H., Grainger, R. M., and Harland, R. M. (1998) Early Development of *Xenopus laevis*: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 3) *Xenopus laevis: Practical uses in cell and molecular biology*, Methods in Cell Biology vol. 36 (ed. B. K. Kay and H. B. Peng) (1991), San Diego: Academic Press.
- 4) Hausen, P. and Riebesell, M. (1991) The Early Development of *Xenopus laevis*. Berlin: Springer-Verlag

この実習書は平良眞規先生が東京大学理学部の学生実習で使用されているものを一部改変し、作成致しました。

Chick 実習

Hensen' s node 移植実験

目的および背景

発生学実習とニワトリ胚

八杉 貞雄

発生学においては古くからニワトリ胚が観察、実験に用いられてきた。古くはアリストテレスがニワトリ胚の観察を行い、また中世のファブリキウスのニワトリ発生図は、その詳細な記載によって有名である。さらに、前成説と後成説に決着をつけたパンダー等の胚葉説は、ニワトリ胚の観察に基づいて立てられたものがある。ニワトリ胚がよく観察されたことはいうまでもなく、鶏卵が身近に存在して容易に入手できることによっている。

20世紀に入って、両生類を中心にした実験発生学が興隆した後も、ニワトリ胚は依然として重要な発生学の材料（モデル動物）であった。両生類で確立されたオーガナイザーの概念はニワトリ胚でも確立され、その後前後軸や左右軸の決定、始原生殖細胞の起原、各種器官形成における誘導作用の解析など、多くの研究にニワトリ胚が用いられてきた。近年では当然、分子的研究も盛んである。動物学的には、ニワトリ（鳥類）は哺乳類にも近く、ニワトリについて得られた知見は多くの場合哺乳類にも適用される。

現在ではニワトリ胚（鶏卵）は養鶏場に依頼すれば宅配便等で入手できる。38℃の孵卵器に入れば、特に転卵などしなくてもよく発生する。発生段階については、Hamburger and Hamilton (1951)の詳細な段階表（章末参考資料2）を参照して決定することができる。初期胚は卵から摘出して、New (1955)の方法あるいはその変法によって数日間は培養することができ、そのような胚に外科的手術を施すことが可能である。今回の実習でもそれを行う。

教育の現場では、あまり成長した胚を生徒に見せることは、嫌悪感をもつ生徒もいるかも知れないので、注意が必要である。2日胚ぐらいの、ようやく心臓が拍動を始めた胚は、透明で美しく、生徒におおいなる感動をもたらすので、教育上も有用な材料である。

ニワトリの胚葉形成とオーガナイザー領域 (Hensen's node)

ニワトリの卵は卵黄が極端に多く、胚になるのは胚盤といわれるごく一部である。この平面的な胚盤が卵割することから「盤割」と呼ばれている。盤割が進むと、胚盤の中央（正中線）に「原条」と呼ばれる溝ができ、胚盤葉上層の細胞が原条から胚盤葉下層との間に陥入する。これが中胚葉細胞（中葉細胞）となる。ゼブラフィッシュの場合は、盤割についてはニワトリと類似しているが、その後の細胞運動には大きな違いが見られ、むしろ両生類に似ている。両生類で発見された原口唇部のオーガナイザー活性は、他の動物種にも存在することが知られており、ニワトリ（鳥類）ではヘンゼン結節 (Hensen's node)、がオーガナイザーに相当する領域である。したがって、両生類同様に同領域を別の場所や胚に移植すると本来の神経系に加えて、二次的な神経系をもつ体軸が形成される。さらに

興味深いのは、このオーガナイザー活性は種を超えて作用しうること、例えばニワトリのヘンゼン結節をゼブラフィッシュに移植する、あるいはアフリカツメガエルの予定外胚葉に接触させることによって異所的に神経を誘導することができることが報告されている。これらのことは、神経誘導も液性因子が関与しており、その種を超えた作用は、保存された分子間相互作用に起因するものと考えられる。

<実習項目>

ニワトリ胚 Hamburger-Hamilton stages 3~4 (※) の胚を用いてオーガナイザー領域であるヘンゼン結節移植実験を行い、二次軸の形成を観察する。

※章末参考資料 2 参照。養鶏場より届いた有精卵を 38.5℃で 11~12 時間程度保温する。輸送中にも発生が進むため季節によって時間に誤差が生じるので、発生ステージを厳密に決定するためには実験前にステージを確認する必要がある。

<注意事項>

- 1) 実験を行う C 棟 2F 実験室は、通常初期発生研究チームの研究者が実験を行っている部屋であり、実験器具などの扱いには十分注意すること。また、サンプルや実験用具他、指定された器具以外のものには出来るだけ触れないこと。
- 2) 希望者には保護眼鏡の貸し出し有り。使用器具は鋭利なものも含むため注意すること。希望者はスタッフ（中込）まで。

<実習日程>

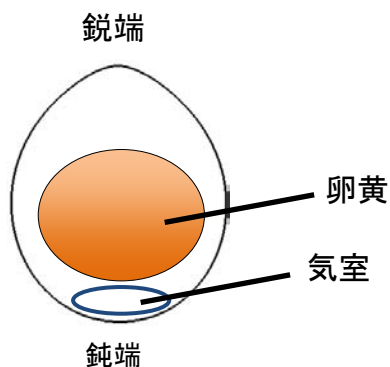
10/3	ニワトリ有精卵を農場より購入 38.5℃で保温	} TA が行う
10/4	実習開始前 胚の準備：卵から取り出して時計皿へ	
10/4	移植実験	
	移植後 38.5℃でインキュベート	
10/5	実習結果観察	

<胚の準備>

※ 移植実験用には TA が準備したものを用品ですが、実習の空き時間を利用してデモンストラクションを行います。

ホスト側胚の準備

1. 卵の鋭端(図 1)をピンセットでたたいて割り、上部 1 割程度殻を取り除く。
(注) 卵全体を割らないこと



※最初卵は鈍端を上
に保存されている。

図 1 卵内部

2. 卵黄の周囲をピンセットでなぞるようにして白身を取り除く (黄身は殻の中のまま)。取り除いた白身の一部をビーカーで保存しておく。粘度の低い部分 (水っぽい部分) を優先的に保存するとよい。後で使用するアルブミンプレートに利用する。
3. 周囲の白身を取り除いた卵黄を生理食塩水の中に静かに落とす (等張液なので黄身はきれいな球状になる : 図 2)

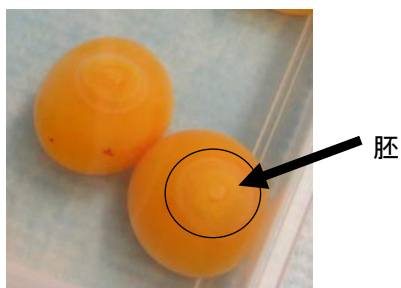
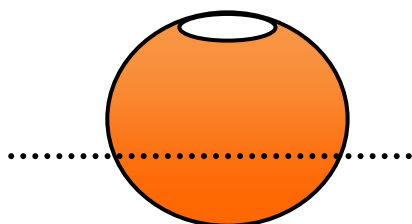


図 2 生理食塩水中の卵黄

4. 卵黄の赤道面から 0.5cm~1cm 程下部 (図 3 点線) をはさみで切る。



先の丸いピンセットで回転させながら周囲を切る



図 3-1 卵黄切断

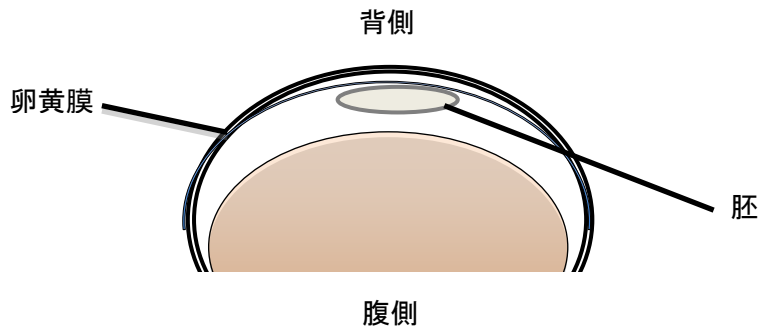


図 3-2 胚部拡大

5. 卵黄膜ごと胚をゆっくりゆっくり剥がし、生理食塩水中を泳がせながら胚の腹側が上になるように、水中に沈めた時計皿の上のせ、その上に更にガラスリングをのせる。胚と膜がはがれやすいので注意深く作業を行う。

上↑

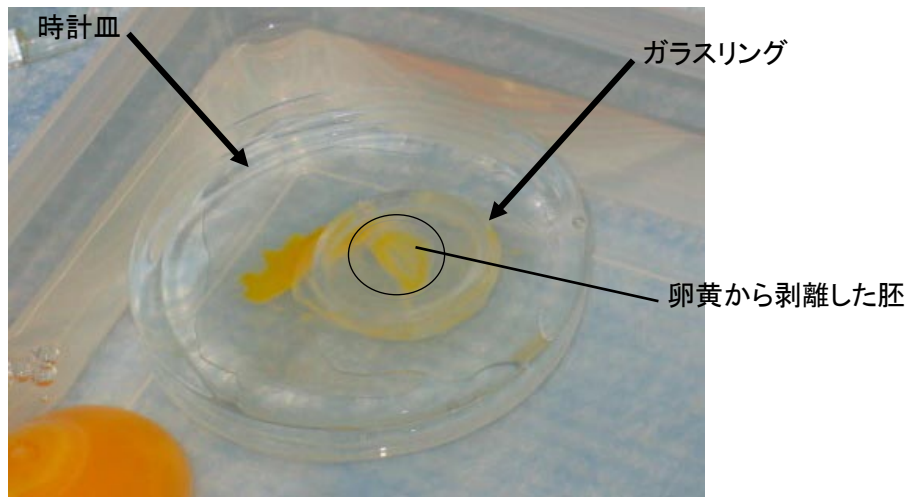


図 4 胚の向きと時計皿上の胚

6. 時計皿ごとバッファーから取り出し、膜についた余分な卵黄を除去する。リングの内側には水分を残したまま、ガラスピペットを使っリングより外側の水分を吸い取る。
7. 先の尖ったピンセットを使って、外側の膜を上からリングに巻き付ける(図 5-①)。更に内側の余分な膜をはさみで除去する(図 5-②)。

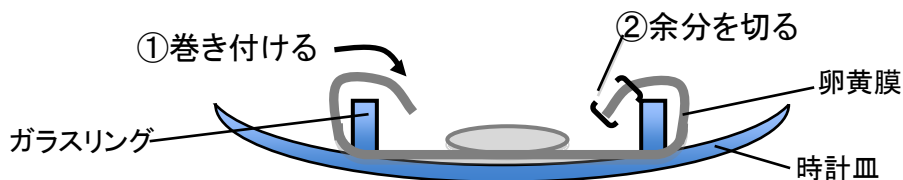


図 5 胚を整える

8. 移植実験へ

ドナー側胚の準備

ホスト側胚手順 5 まで同様。ただし時計皿、ガラスリングは用いず、バッファーを満たしたシャーレに保存しておく。ホスト側胚準備の際うまくガラスリングにはまらなかったものなどを利用し、足りなければ補う。

<移植実験>

操作は出来るだけ素早く行い、移植片を乾かさないうこと。移植片は軽く、浮いてくるので常にバッファーに浸してある状態に保つよう注意する。

1. 実体顕微鏡下でドナー側ヘンゼン結節（図 6）を切り抜く。

作業はバッファーを入れたディッシュ内で行い、先の鋭いツベルクリン用注射針を用いて注意深く移植片を切り抜く。

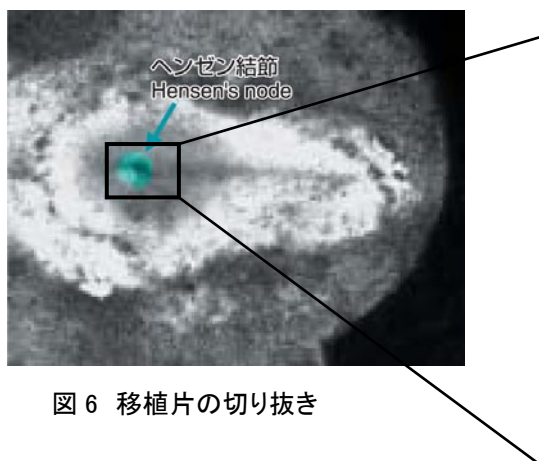


図 6 移植片の切り抜き

2. 宿主側の胚図 7□部の膜を針で一層剥離する。

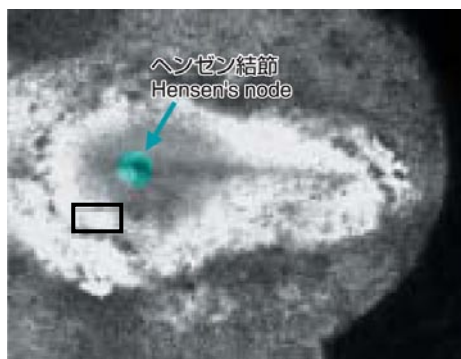
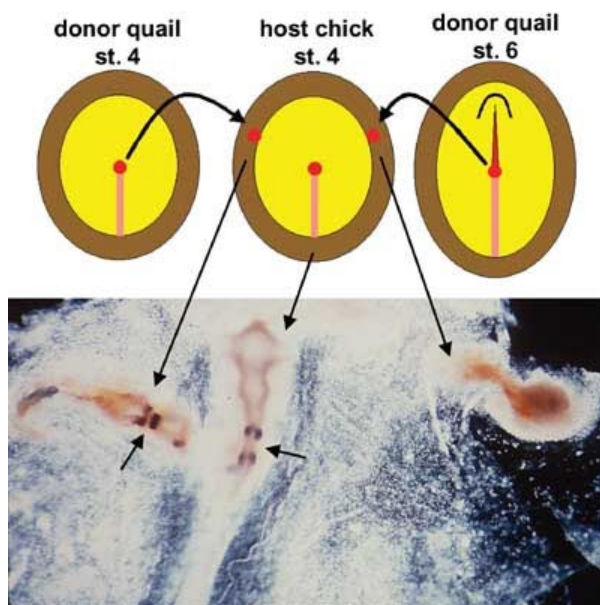


図 7

3. 1 で切り抜いた移植片をピペットで吸い、宿主側の皿に移す。
4. 膜と胚を傷つけないようにツベルクリン用注射針の先端で、移植片を 2 で剥離した場所に置き、少しだけ押し込む（押し込んで固定しないと移植片が浮いてきてしまう。ただし押し込みすぎるとうまく発生しないので注意。）
5. 移植片が移動しないようにガラスリング内側のバッファをガラスピペットで完全に除去する。
6. ピンセットでガラスリングをつかみ、移植した胚をアルブミンプレートに移す。移植片が動かないように静かに、スライドさせるように動かす。
7. アルブミンプレート湿度が保たれた容器に入れ、38.5°Cで翌日の観察まで保温する。



<http://www.anat.ucl.ac.uk/research/sternlab/Tutorial.htm>

<結果と考察>

考察する項目の例

- i) 2次軸が形成された場合：どのような構造がみられるか？
- ii) 2次軸が形成されなかった場合どのような原因が考えられるか：移植片の量が十分でなかった、移植片が出てしまった、移植片にオーガナイザーが含まれていなかった、などの可能性を考える。
- iii) オーガナイザー活性をもつ遺伝子を同定するにはどのようにしたらよいか。

<参考資料>

必要試薬、用具

ニワトリ生理食塩水

Pannet-Compton saline (胚の準備に使用)

Solution A 1L:

{	NaCl	121g
	KCl	15.5g
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	10.42g
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	12.7g

Solution B 1L:

{	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	2.365g
	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.188g

Mix 40ml soln. A and 60ml soln. B before use.

Tyrode' s saline (移植時に使用) 10X stock solution

{	NaCl	80g
	KCl	2g
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.71g
	NaHPO ₄ ·2H ₂ O	0.5g
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	2g
	Glucose	10g

Dilute 1:10 with distilled water before use.

アルブミンプレート

胚の準備の際卵白を保存し、シャーレに1.5ml ずつ分注する。

ツベルクリン用 27G 注射針

参考文献

Hamburger, V. and Hamilton, H. L. (1951) J. Morphol. 88, 49.

New, D. A. T. (1955) J. Embryol. Exp. Morphol. 3, 326.

スターン・ホランド著、八杉・西駕監訳「発生生物学必須テクニック」(1995)メディカルサイエンスインターナショナル

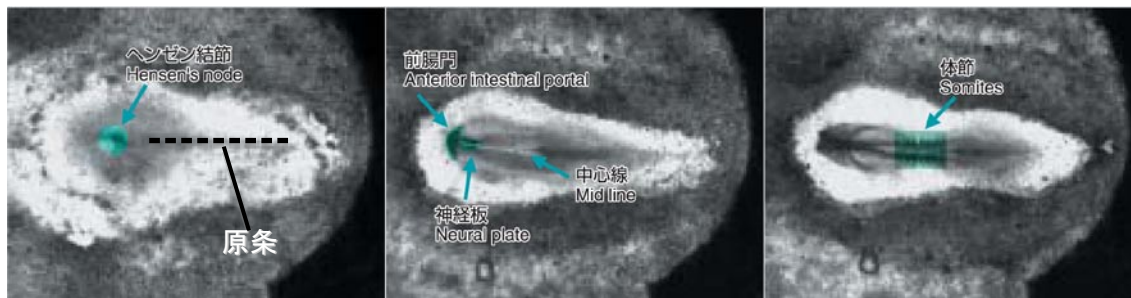
ウイルト・ヘイク著、赤坂・大隅・八杉監訳「ウイルト 発生生物学」(2006)東京化学同人

参考資料 1

ニワトリ胚の発生

資料提供：理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター

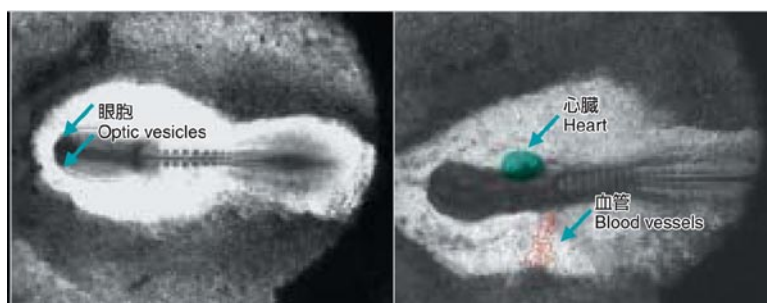
感覚器官発生研究チーム Raj Ladher



発生開始 0.75 日
胚発生の中心的役割を担うヘンゼン結節が後方に移動するに従って、身体の基本構造が形成されていく。

1 日
脊索および神経版の形成が見られる。また前腸門が後方に向かってダイナミックに閉じていく。

1.5 日
体節が 90 分毎に左右一対ずつ後方へ向かって形成されていく。体節は後の中胚葉組織の基本パターンとなる。



1.75 日
後に目を形成する一対の眼胞が前脳から誘導される。

2.5 日
卵黄への血管が発達すると同時に、心臓の鼓動が始まる。



2.75 日
頭を中心に身体が横向きに回転する。

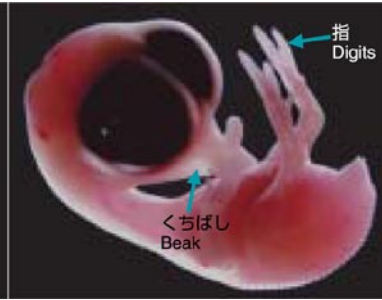
3 日
後に羽や脚になる肢芽が現れ、また耳胞や嗅板、鰓弓の形成が見られる。



4日
視神経の投射を受ける視蓋の形成が見られる。また肢芽や鰓弓が成長している。



5日
眼が色素を持つようになる。7日くらいから足と羽の構造がはっきりしてくる。

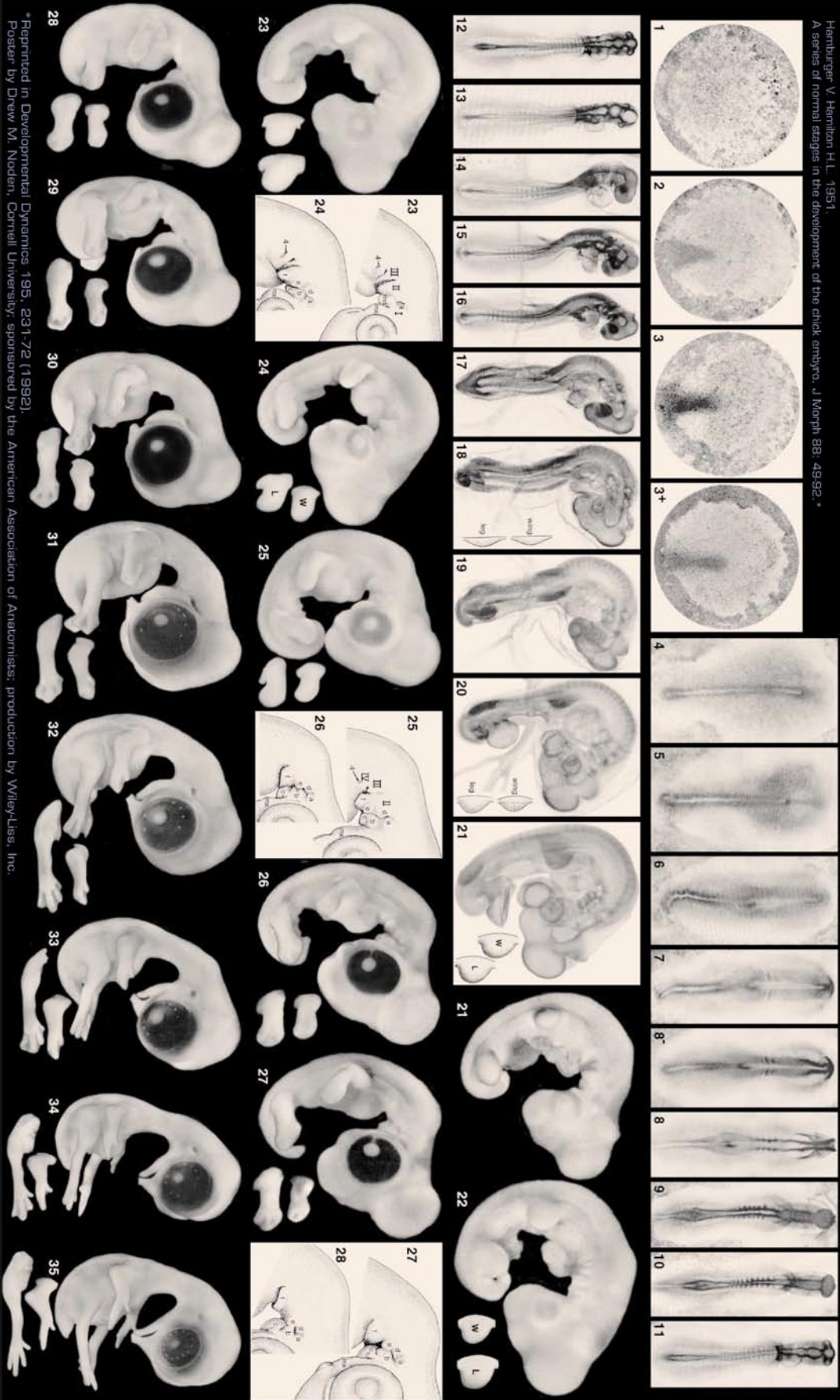


8-9日
くちばしの構造や、プログラム細胞死によって生じた指様の構造がはっきりと見える。

In Memory of Viktor Hamburger: 1900-2001

NORMAL STAGES OF CHICK EMBRYONIC DEVELOPMENT

Hamburger V, Hamilton H.L. 1951
A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph* 88: 49-92.*



*Reprinted in *Developmental Dynamics* 195, 231-72 (1992).
Poster by Drew M. Noden, Cornell University; sponsored by the American Association of Anatomists; production by Wiley-Liss, Inc.

DEVELOPMENTAL
DYNAMICS

WWW.INTERSCIENCE.WILEY.COM/DEVELOPMENTALDYNAMICS



The stage series of normal chick embryonic development is one of the most frequently cited and enduring biomedical articles ever published, and set the standards for avian species-specific stage series that have followed. The author of this paper, Viktor Hamburger, died in June, 2001, just a few weeks prior to his 101st birthday. In recognition of the tremendous importance of this stage series to countless research and teaching laboratories around the world, and in tribute to Prof. Hamburger's many contributions to developmental biology spanning seven decades, the editors and publisher of *Developmental Dynamics* commissioned this poster that accompanies this issue. Stages 1-35 (incubation days 0 through 9) were scanned from the original 1951 publication. Embryos have been resized and cropped for this poster format, and digitally enhanced to better highlight key features of each stage. Sketches of early limb bud and branchial (pharyngeal) arch development are also included; keys for these are in the original publication.

ニワトリ胚実習レジュメは以下の方々のご協力のもと作成しました（敬称略）。

東京都立大学名誉教授・帝京平成大学教授

八杉貞雄

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 初期発生研究チーム

Guojun Sheng

中澤文恵

眞昌寛

資料提供：理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 感覚器官発生研究チーム

Raj Ladher

文章や図などは上記皆様から提供していただきました。教材用としての転載は可能ですが、新聞や雑誌など公の場での公開はご遠慮ください。

企画・編集

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター

広報国際化室

南波直樹、中込咲綾