The mode and molecular mechanisms of the migration of presumptive PGC in the endoderm cell mass of Xenopus embryos

Xenopus胚の内胚葉細胞塊における推定PGCの移動様式とその分子機構

我々は、7-40期のXenopus胚の内胚葉細胞塊における推定始原生殖細胞（pPGC）の移動様式を調査した。また、その移動の基盤となる分子についても、細胞化学的および免疫細胞学的に検討した。第6期胚の生殖質保有細胞にフルオレセイン・デキストラン・リジン（FDL）を注入し、pPGCと体細胞の相対位置を調べることにより、第7〜23期の胚のpPGCと第24期より遅い胚のpPGCはそれぞれ内胚葉細胞塊を受動的および能動的に移動すると推定された。この仮定は、能動的な細胞移動に不可欠なF-actinが、後期のpPGCには認められるが、前期のpPGCには全く認められないという観察結果から支持された。また、マウスやゼブラフィッシュの方向転換するPGCに見られるCXCケモカイン受容体4（CXCR4）のような分子（おそらくXenopus CXCR4（xCXCR4））は、後期のpPGCにしか検出されなかった。したがって、F-actinとxCXCR4、そしておそらくF-actinの形成に不可欠なβ1-integrinとcollagen type IVが、内胚葉細胞塊のpPGCの活発な移動に関与していると考えられる。

Introduction

ほぼすべての動物種において、生殖細胞の前駆体は、初期胚の、将来の生殖腺稜から離れた部位で生じることがよく知られている。これらの細胞は、発生の過程で、元の場所から将来の生殖腺隆起部へ移動する。

Xenopus 胚の発生過程における生殖細胞の転位に関する記述的研究が数多く報告されている (Blackler 1958; Ikenishi & Kotani 1975; Whitington & Dixon 1975; Kamimura et al. 1976, 1980)．これらの検討により，受精卵の植物皮質領域で生殖形質を受け継いだ初期開裂胚の植物細胞 (Czolowska 1969) あるいは生殖形質保有細胞 (GPBC) が生殖細胞前駆体となることが明らかにされた．胚盤胞初期（7期）までは植物極付近のGPBCの子孫、すなわち推定始原生殖細胞（pPGC）が、胚盤胞後期（9期）には植物極と胚盤胞底の間の領域で見つかった。また，原腸陥入後は，推定内胚葉細胞塊の中央部にpPGCが観察され，尾芽中期（28期）まで残存した（Kamimura et al.1976）。その後、内胚葉の深部から表層へと移動し、33/34期には側方や背側に、そして若齢オタマジャクシ期には内胚葉の最上部背側に位置した（Stage 40）。その後、摂食期（46期）まで内胚葉塊から背側腸間膜を経て生殖器隆起に移動する。しかし、特に若いオタマジャクシ期までの内胚葉細胞塊における生殖細胞の移動の詳細な性質については、ほとんど知られていない。

Xenopus の初期胚において，系統トレーサーを注入したある細胞から子孫細胞が転位する様子を追跡することが可能である．32 個の細胞からなる胚の単一 GPBC に fluoresceindextran lysine (FDL) を注入すると (stage 6)、FDL を持つ子孫細胞、あるいはほとんどが少数の pPGC と多数の体細胞内胚葉が、stage 18 および 23 の胚の内胚葉塊に単一のクラスタを形成していた (Ikenishi & Tanaka 1997)。したがって、様々な発生段階の胚の標識されたpPGCと標識された体内内胚葉細胞の相対的な位置を調べることによって、生殖細胞の転位の性質を調べることが可能であると思われる。すなわち、後述するように活発に移動する細胞の特徴を示す標識pPGCが、ある段階において内胚葉細胞塊中の標識体細胞群から離れていた個々の細胞として見つかった場合、それは活発に移動する状態にあったこと、あるいは活発に移動した結果、外れたことを示す可能性がある。また、標識されたpPGCがクラスターに残っている場合は、まだ静止状態か受動的な移動である可能性がある。

一般に、移動する細胞におけるインテグリンやF-アクチンなどの分子、および細胞外マトリックス（ECM）環境は、細胞の移動に必須であると考えられている（Martin et al.2002）。インテグリンが特定のECMリガンドを認識して結合し、細胞内シグナル伝達経路の活性化やF-アクチンの形成につながるシグナルを伝達し、細胞の移動に必要な細胞力を伝播させるとする考えである。最近、PGCの細胞膜上のstromal cell-derived factor 1 (SDF-1) またはCXC chemokine receptor 4 (CXCR4) の受容体が生殖器隆起への方向転換に重要な役割を果たすことがゼブラフィッシュとマウスで報告されている (Doitsidou et al. 2002; Ara et al. 2003)。この受容体のXenopusホモログであるxCXCR4はすでにクローニングされ、神経系と背側板で豊富に発現していることが示されているが（Moepps et al. 2000）、pPGCの移動への関与はまだ明らかにされていない。また、Xenopusの生殖細胞の移動に関与する分子については、中膜細胞のフィブロネクチンが背側中膜から生殖隆起部へのPGCの移動に関与している（Heasman et al.1981）以外、詳細な研究はなされていない。この分野の研究で得られる情報が少ないのは、内胚葉塊の生殖細胞を同定するのが難しいことと、その数が少ないことが一因である。

本研究では、7-40期の胚の内胚葉細胞塊におけるpPGCの移動挙動を調べ、その移動に関与する分子について検討することを試みた。すなわち、40期までの間、pPGCがいつ、どのように内胚葉細胞塊の最上部背側に向かって活発に移動するのかを明らかにしたいと考えた。この目的のために、6期胚の単一GPBCにFDLを注入し、標識されたpPGCと同じGPBC由来の体細胞の内胚葉細胞塊における位置を、様々な発生段階の胚で調べました（Fig. 1）。また、細胞移動に関与することが知られている分子についても、これらのステージの胚のpPGCとその周囲の体細胞を中心に、細胞化学的あるいは免疫細胞学的に検討した。

Materials and Methods

Embryos

Xenopus の受精卵は、性成熟した雄と雌に性腺刺激ホルモンを注入して得たものを、Nieuwkoop & Faber (1967) に従って段階的に処理した。10%ホルトフレッター溶液 (60 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 0.9 mM CaCl2, 2.4 mM NaHCO3; pH 8.0) 中の 1.5% cysteine-HCl (pH 8.0) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) で処理しゼリーを除去、滅菌蒸留水で2回洗浄し、使用まで10%ホルトフレッター溶液中で保存した。

Microinjection

マイクロインジェクションは、基本的に以前に記載した方法と同じ方法で行った（Ikenishi & Tanaka 1997）。フルオレセイン・デキストラン・リジン（FDL; Molecular Probes, Eugene, OR, USA）をスタインバーグ生理食塩水中で 100 g/L の濃度で約 4.7 nL を 32 細胞胚（ステージ 6）の「暗部」（Ikenishi & Nakazato 1986）を持つ単一の GPBC に Nanoliter Injector (World Precision Instruments, Serasota, FL, USA) で注入した（図 1）．注入後正常に開裂し，胚盤胞後期（第9期）に滲出物がない胚のみを 10%ホルトフレッター液に移し，以後飼育した。

Figure1

第6期胚のfluoresceindextran lysine (FDL) 注入、単一生殖質保有細胞 (GPBC) の子孫細胞の挙動を示す実験の概要。7-40期の胚において、FDL標識した推定始原生殖細胞（pPGC）と体細胞の内胚葉細胞塊における相対的位置関係を検討した。GPBCに由来する生殖細胞は、7-40期の胚ではpPGCとし、41期以降の胚ではPGCとした。pPGCとPGCのおおよその位置は、胚の模式図上の赤丸で示されている。

Location of FDL-labeled pPGC and somatic cells

フルオレセイン・デキストラン・リジン注入胚は，7, 9, 10, 12, 18, 24, 28, 33/34, 40 期に Dent 固定剤 (Dent & Klymkowsky 1989) で固定し，脱水後，既報のようにポリエステルワックスに埋め込んだ (Ikenishi & Tanaka 1997)．12 以下のステージの胚の pPGC は，核に隣接する粒状の細胞質または胚珠を有することで同定した (Ikenishi & Kotani 1975; Whitington & Dixon 1975)．以下のステージの胚におけるpPGCは、XVLG1タンパク質に特異的な2L-13抗体を用いて免疫細胞学的に同定した（Komiya et al. 1994）、次いでCy3標識抗マウスIgG（全分子、希釈度1：200；Chemicon International, Temecula, CA, USA）を用いて、体節内胚葉細胞では決して観察されない（Ikenishi & Kotani 1975）pPGCの核周辺領域の卵黄を含まない粒状の細胞質はCy3で強く染色されるように、免疫細胞学的に同定された。したがって、FDL標識pPGCは、蛍光顕微鏡やレーザー共焦点顕微鏡では、フルオレセイン・イソチオシアネート（FITC）陽性細胞やCy3陽性細胞として認識された。標識されたpPGCが標識細胞のクラスター内にあるか外にあるかは、連続切片の検査により決定した。

Rhodamine-phalloidin (R-P) stain

F-アクチンの細胞化学的検出のため，ステージ8，10，12，18，23，24，26，28，33/34および40の胚を固定し，R-P (R-415; 15 000 U/L in Tris buffered saline (TBS); Molecular Probes) で染色し，前記のようにレーザー共焦点走査顕微鏡で調べた (Tanaka & Ikenishi 2002)．

Antibody production against Xenopus collagen type IV

Xenopusオタマジャクシ由来のcDNAライブラリーを用いて、この領域に対する特異的プライマー（フォワード；5'-ACTGATGAAGCCAATGTG-3'、リバース；5'-CTGGAAGGTCTGGTCAATAG-3'）でポリメラーゼ鎖反応（PCR）により、他の型のコラーゲンと共通しないXenopusコラーゲンIV型α2鎖（BM261438）のC端領域をコードするDNA断片を取得した。DNA断片を有する発現ベクター（pBAD/Thio-TOPO; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を含むアラビノース誘導大腸菌（LMG194）の溶解液を凍結融解による変性条件で可溶化し、超音波処理と15 000 g, 10分の遠心分離を行った。上清をNi-NTAアフィニティークロマトグラフィー（Qiagen, Hilden, Germany）で精製し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で15%ゲルを通して分離した。クロマトグラフィーにより溶出した上清の数画分に検出された、チオレドキシンとコラーゲンの一部との融合タンパク質の予測分子サイズに相当する37kDaのバンドを抗体作製のための抗原とした。抗体作製の手順は、基本的に以前の研究（Yamakita et al.2004）と同様であった。Xenopus embryos のコラーゲンは通常の方法では可溶化・抽出できないため、37 kDa バンドに対する抗血清または同じラットの免疫前血清の反応性をイムノブロッティングにより検討した。

Immunocytology

細胞移動に関与する分子の分布は、主にpPGCと内胚葉塊を対象に、以下のような抗体で調べた。2L-13（1-4 mg/L）とウサギ抗アクチン（ポリクローナル抗体、希釈率1：40、Sigma Chemical）、ラット抗Xenopusコラーゲン（ポリクローナル抗体、1：25）、ウサギ抗ラミニン（ポリクローナル抗体、1: 30、Sigma）またはヤギ抗マウスCXCR4（ポリクローナル抗体、1：50、Abcam、ケンブリッジ、ケンブリッジシャー、英国）抗体、抗アクチンおよびマウス抗Xenopus β1-インテグリン（8C8；1：2、Gawantka et al. 1992）抗体、または抗アクチンおよびマウス抗Xenopusフィブロネクチン（6D9；1：200、ドイツ、ウルム大学、Dr D. Wedlichからの贈り物）を、ステージ8〜40の胚のポリエステルワックス切片（8μm厚）に塗布した。2L-13、抗インテグリン、抗フィブロネクチン抗体との反応、抗アクチン、抗ラミニン抗体との反応は、それぞれCy3標識抗マウスIgG、FITC標識抗ウサギ血清（Sigma）で追跡された。抗コラーゲン抗体と抗CXCR4抗体との反応は、それぞれFITC標識、抗ラットIgG（シグマ）および抗ヤギIgG（シグマ）でフォローした。2L-13 抗体、抗インテグリン抗体、抗フィブロネクチン抗体、抗アクチン抗体、抗ラミニン抗体、抗 CXCR4 抗体の陰性対照は、それぞれマウス骨髄腫細胞（P3-U1）の培養上清、市販のウサギ IgG（和光）、市販のヤギ血清（和光）であった。抗コラーゲン抗体の陰性対照として、抗体作製に用いたラットの前免疫血清を使用した。ポリエステルワックス切片の免疫反応は、基本的に以前の研究（Tanaka & Ikenishi 2002）で詳述した方法と同じ方法で行った。抗体と反応した標本は、蛍光顕微鏡（Olympus BH with epifluorescence optics, Olympus Kogaku, Tokyo, Japan）またはレーザー共焦点顕微鏡（Olympus Flouview, Olympus Kogaku）により観察した。

In situ hybridization

ステージ10、18、22、25、28、35、40の胚のポリエステルワックス切片におけるxCXCR4 RNAのin situハイブリダイゼーション解析は、基本的に以前に記載したように行った（Yamakita et al.2004)。ジゴキシゲニンで標識したアンチセンスおよびセンス RNA プローブは、直線化した xCXCR4 cDNA から調製した (Moepps et al. 2000)。pPGC は、2L-13 抗体染色が in situ ハイブリダイゼーションで用いたものと同じ切片で適用できなかったため、先に述べた (Ikenishi & Kotani 1975) ように核周辺領域に粒状の細胞質を持つことによって識別しなければならなかった。

Results

FDLを注入した胚の内胚葉細胞塊におけるFDL標識pPGCと体細胞の相対位置

様々なステージの注入胚において、pPGCと、単一でFDL注入したGPBCに由来する体細胞の相対的位置を調査した。pPGCは、材料と方法に記載された基準に従って同定された。図3，4，5，6，7，8，9の24〜40期の胚の内胚葉細胞塊におけるFDL標識および非標識pPGCの位置に関しては、内胚葉細胞塊の5つの異なる部分を示す胚の図式的横断面（図2）を参照する。

Fig2

胚の横断面図であり、内胚葉細胞塊の5つの異なる部分を示す。図3-9の24-40期の胚の内胚葉細胞塊におけるpPGCの位置については、この図面を参照されたい。dは背側部、lは外側部、c-dは中心-背側部、c-vは中心-腹側部、vは腹側部である。

7-23期の胚では、フルオレセイン・デキストラン・リジンで標識したpPGCと体細胞（主に内胚葉細胞）が単一のクラスターを形成していた（図3A-C）。すなわち、クラスターを形成する標識されたpPGCと体細胞は、第7期では植物表面に、第9期までは胚盤胞の底と植物極の間に位置していた。標識細胞のクラスターは、第10期では植物体表面から胚盤胞のほぼ底部まで、第12期では卵黄栓または内胚葉細胞塊の中心部に広がり、第23期まではその中心部に留まっていた。24期以降、標識pPGCは内胚葉細胞塊の背面中央部あるいは側面部に多く観察され（図3D）、腹側にある標識体細胞群から分離していた。その多くは球状で、個々の細胞として認められた。33/34期では主に側方や背側に局在し（図3E）、40期では内胚葉細胞塊の最上部背側に集積していた。このように、標識されたpPGCの位置は、先行研究（池西・小谷 1975; 上村ら 1976, 1980）の対応するステージのものとほぼ一致した。

Fig3

Location of FDL-labeled, pPGC (arrows) and somatic endoderm cells derived from single FDL-injected GPBC of a stage 6 embryo. pPGC were identified by the criteria described in Materials and Method. ap, animal pole; b, blastocoel; e, epidermis; gc, gut cavity; no, notochord; nt, neural tube; s, somite; vp, vegetal pole.

FDL標識されたpPGC（矢印）および第6期胚の単一FDL注入GPBCから得られた体内内胚葉細胞の場所。ap, 動物極b, 胚軸； e, 表皮； gc, 腸腔； no, ノトコード； nt, 神経管； s, 体節； vp, 植生極.(A) FDLを注入した7期の胚。FDLで標識された細胞の小さなクラスターが胚の植物表面に位置している。バー：200μm (A') (A)の光学顕微鏡写真．胚の植生域に2つのpPGCが存在することがわかる．左側（矢印）と右側のpPGCは、それぞれFDLを注入したGPBCと未注入のGPBCに由来することが分かった。挿入図：pPGCの領域の高倍率。pPGCには卵黄を含まない粒状の細胞質あるいは生殖原形質が容易に確認できる。バー：50μm (B) FDLを注入した第10期の胚。標識細胞のクラスターが植物表面から胚盤胞のほぼ底部まで伸びている。B') (B)の光学顕微鏡写真。pPGC（矢印）はクラスター内に存在する。挿入図：pPGCの高倍率写真。pPGCの核周辺部には粒状の細胞質が観察される。バー：50μm (C) FDLを注入した18期の胚。FDL標識細胞のクラスターが胚の内胚葉細胞塊の中央部に位置している。隣接する切片では、より多くの標識細胞からなる大きなクラスターが観察されたため、この図ではクラスターの端が見えている。Bar, 50 µm (C') (C)の胚を2L-13抗体で免疫染色したもの。3つの細胞（矢印）の細胞質がはっきりと抗体で染まっていることから、これらの細胞はpPGCであることがわかる。(C') (C)と(C')を合成した画像。3つのpPGCのうち2つ（矢印）と体細胞内胚葉がクラスターを形成している。(D) FDLを注入した24期の胚。内胚葉細胞塊の中心背側部分（図2参照）にあるFDL標識細胞（矢印）が、標識細胞のクラスターから分離しようとしているところ。Bar, 200 µm (D') 2L-13抗体で染色した(D)の胚。細胞の核周囲の細胞質（矢印）が強く抗体で染まっているため、この細胞はpPGCと同定される。D'）は、（D）と（D'）を合成した画像。(e) FDLを注入した33/34期の胚。FDL標識細胞（矢印）が内胚葉細胞塊の背側部分（図2参照）に個々の細胞として認められ、標識体内胚葉細胞群から明確に分離している。E'の胚は2L-13抗体で染色されている。FDLで標識された細胞（矢印）は、核周囲の細胞質が陽性であることから、pPGCであることがわかる。核の位置は空いているようだ。 E'）（E）と（E'）を合成した画像である。(A)と(B)では上が動物側、下が植物側、(C-E)では上が背側、下が腹側である。

Cytochemical and immunocytological detection of molecules involved in cell migration

～細胞移動に関与する分子の細胞化学的および免疫細胞学的検出～

F-アクチン ローダミンファロイジン陽性細胞は、8-23期の胚のpPGCを含む内胚葉塊のどの細胞にも観察されなかった。少数のR-P陽性細胞は、24期に内胚葉細胞塊の中心-背面部分に初めて認められ、その後33/34期まで細胞塊の側面または背面部分に認められた（Fig. 4）。これらは球状であったが、陰性体細胞である内胚葉細胞は、以前報告したように多角形であった (Kamimura et al. 1976, 1980)。R-P陽性細胞の内胚葉細胞塊における位置と細胞形状は、上記のpPGCのそれと類似していた。しかし、40期の内胚葉細胞塊では、前述のように多くのpPGCが集積している最上部背側部分でも、この陽性細胞はほとんど見られなかった。一方，F-actin は 24 期以降の胚の表皮で顕著であった（Fig.4）．

Fig4

33/34期の胚の横断面をローダミン-ファロイジン（R-P）で染色したもの。F-アクチンを含むR-P陽性細胞（矢印）は通常球状で、胚の内胚葉細胞塊の背側部分（図2参照）に見られる。表皮細胞 (e) も R-P で染色されている。上は背側、下は腹側。バーは50μm。

Actin

R-P 染色の標本では生殖細胞特異的タンパク質や Xenopus vasa-like gene 1 (XVLG1) (Komiya et al. 1994) タンパク質が保存できないため，R-P 陽性細胞が pPGC であることを確認するために，胚のポリエステルワックスセクションについて抗 Actin と 2L-13 抗体の二重染色を実施した．23期までの胚では，アクチンがpPGCの細胞膜付近にびまん性に存在していた。これは、23期までのpPGCではF-アクチンがほとんど検出されなかったことを考えると、細胞骨格系のアクチンと思われる。アクチンは、24期以降では中心背側にある一部のpPGCの核近傍の卵黄を含まない粒状の細胞質で、33/34期では胚の内胚葉細胞塊の外側または背側にあるpPGCの領域で明確に検出された（Fig. 5A）。40期の胚の内胚葉細胞塊における最上部背側のpPGCでは、同じ胚領域のpPGCにF-アクチンが存在しないことに伴い、検出されなくなった（Fig. 5B）。また、調べたすべてのステージの胚で、体節内胚葉細胞の細胞膜の近傍に検出された。24-33/34期の胚に関しては、抗アクチン抗体で核周辺に強い蛍光を示すpPGCの分布は、R-P陽性細胞の分布とやや類似していた。

Fig5

ステージ28（A）とステージ40（B）の胚の横方向、ポリエステルワックス切片について、抗アクチンと2-L-13抗体による二重染色を行ったもの。(A-A") と (B'-B") の核の位置は空いているように見える。 (A) 胚の内胚葉細胞塊の背面中央部（図 2 参照）の内胚葉細胞（矢印）の核を囲む細胞質内にアクチンを表す強い蛍光を観察することができる。(A') 同様の部位がpPGCに特異的な2L-13抗体でも染色され、この細胞がpPGCであることがわかる。(A") (A)と(A')を合成した画像。偶然の染色が黄色で見られ、核周囲の細胞質に一部重なりがあることが分かる。(B) 胚の内胚葉細胞塊（図1参照）の最上部背側にある細胞やpPGC（矢印）の核周辺細胞質では、アクチンの蛍光が検出されない。(B') pPGCの核周辺細胞質は2L-13抗体で強く染色されている。(B") (B)と(B')を合成した画像。pPGCに重なりが見られないことから、40期胚のpPGCにはもはや十分な検出可能なアクチンが存在しないことが示唆される。上部が背側、下部が腹側。gc, 腸腔；no, notochord；s, 体節。バー：50μm。

Integrin

β1-integrinの分布は、抗Xenopus β1-integrin抗体と抗actin抗体による二重染色で調べた。pPGCの同定には、2L-13抗体の代わりに、抗アクチン抗体を使用した。。；また、図5(A)に示すように、内胚葉細胞塊のpPGCにのみ、核周囲のアクチンの強い蛍光が認識された。

β1-integrinは，以前報告したように，8-12期の胚のすべての細胞の細胞膜に観察された（Gawantka et al.1992）．12-40期では内胚葉細胞の細胞膜に、12-32期ではpPGCの細胞膜にかすかに観察された（図6A,B）。また、ステージ8-32ではpPGCの核周囲の細胞質に明瞭に存在していたが（図6B）、ステージ33/34以降は同領域に微弱に検出されるようになった。一方、インテグリンは、外胚葉および中胚葉誘導体の細胞膜に、胃捻転期以降顕著に存在し（図6A）、18期には歯状体、体節、側板中胚葉で、23期以降にはこれらの組織および神経管で明確に検出されるようになった。

Fig6

第26期胚の横断面における抗β1インテグリン抗体と抗アクチン抗体による二重染色。(A) インテグリンは細胞膜にかすかに検出され、内胚葉細胞（矢印）、おそらく内胚葉細胞塊の中心背側部分（図2参照）のpPGCの核を取り巻く細胞質で顕著に検出される。神経管（nt）、ノトコルド（no）、体節（s）の細胞でも顕著である。(B) (A)の細胞の部分の高倍率写真。インテグリンは細胞膜にかすかに局在し、pPGCの核周囲の細胞質には中程度に局在している。(B') ほぼ同じ領域の細胞が抗アクチン抗体で染色されているので、図5で述べたようにpPGCであろう。 (B") (B) と (B') を合成した画像である。pPGCの核周囲の細胞質に重なりがあることが明瞭である。核の位置が空いているように見える。上は背側、下は腹側。バー、(A)では200μm、(B)では50μm。

XCXCR4 protein

xCXCR4 の分布は、抗マウス CXCR4 抗体および 2L-13 抗体による二重染色で調べた。ポリエステルワックス切片による観察では、抗CXCR4抗体で認識される分子は、24期以降の胚では少数のpPGCの細胞質全体に検出されたが（図7A）、40期の胚ではどのpPGCでもほとんど観察されなかった。一方、8-23期の胚では、内胚葉細胞だけでなく、どのpPGCでもほとんど観察されなかった（Fig. 7B）。一方、33/34期以降の胚の眼球では、器官内のxCXCR4 RNAの豊富さ（Moeppsら、2000）と一致し、40期の表皮では明確に観察された。

抗 CXCR4 抗体で検出された分子が xCXCR4 であることを確認するため、xCXCR4 用リボプローブを用いて胚のポリエステルワックスセクションについて、先に述べたように in situ ハイブリダイゼーションを行った (Yamakita et al. 2004)。ステージ 25 および 28 の胚の内胚葉塊の細胞のうち、xCXCR4 RNA はアンチセンスプローブで pPGC、特にその核にはっきりと検出されたが（図 7C）、ステージ 22 より若い胚の pPGC およびステージ 35 および 40 の胚では、ほとんど検出されなかった。センスプローブでは、8-40期の胚のpPGCを含む内胚葉細胞ではシグナルが検出されなかった（Fig. 7D）。pPGCにおけるxCXCR4 RNAの出現・消失の時期が、pPGCにおいて抗CXCR4抗体で検出された分子とほぼ一致していることを考慮すると（表1）、この分子はxCXCR4である可能性が高いことがわかる。

Fig7

(A,B) 胚の横断面における抗CXCR4抗体と2L-13抗体による二重染色。(A) 抗CXCR4抗体で認識される分子（おそらくXenopus CXCR4）は、33/34期胚の内胚葉細胞塊の背側部分（図2参照）の内胚葉細胞（矢印）の細胞質全体にほぼ検出される。(A') (A)の細胞（矢印）の核周囲の細胞質が2L-13抗体で強く染色され、この細胞がpPGCであることを示している。(A") (A)と(A')を合成した画像。xCXCR4はpPGCの細胞質全体に見られ（矢印）、2L-13抗体で認識されたXVLG1タンパク質は核周辺に顕著に見られる。xCXCR4はより背側に位置するpPGC（矢印）には検出されないため、必ずしもpPGCに存在しない。上は背側、下は腹側。B）23期胚のpPGCを含む内胚葉細胞塊の中央部には、抗CXCR4抗体で染色された内胚葉細胞は存在しない。(B'）5つの細胞（矢印）の核周囲の細胞質が2L-13抗体で染色され、それらがpPGCであることを示している。(B") (B)と(B')を合成した画像。23以下のステージでは、pPGC（矢印）にはxCXCR4が全く観察されない。上は背側、下は腹側。バー：50 µm。(C,D) xCXCR4のリボプローブを用いた第28期胚のポリエステルワックス切片のin situハイブリダイゼーション。アンチセンスプローブでは内胚葉細胞塊の外側部分（図2参照）にある3つのpPGC（矢印）の核にxCXCR4 RNAが顕著に認められる（C）のに対し、センスプローブでは（C）の隣接部分のpPGC（矢印）にほとんど検出されない（D）。pPGCは核周辺に粒状の細胞質を持っているため、容易に同定できる。バー：20μm。

Table1

c.m, 細胞膜； cy, 細胞質または生殖質； s.e.c., 体内胚葉細胞； -, バックグラウンドレベル； ±, 陽性の場合は非常に弱い； +, 弱い； ++, 中くらい；, +++, 強い； N.D. 決定していない。

この分子は、抗マウス CXCR4 抗体で認識された。\*コラーゲンは、Xenopus collagen type IVの融合タンパク質に対する抗血清で検出された。

ラミニンは、いずれのステージの胚においても、pPGCSおよび体内内胚葉細胞にはほとんど検出されなかった。

Collagen

IV 型コラーゲンの分布を、コラーゲンに対する抗血清と 2L-13 抗体を用いた二重染色で調べた。抗血清は、免疫ブロッティングにより、チオレドキシンと Xenopus collagen type IV のα2鎖の C 末端領域の融合タンパク質に相当する大腸菌溶解液の 37 kDa バンドと特異的に反応することが確認された（図 8A）。

コラーゲンは主にステージ10-28のpPGCの核周辺細胞質で検出されたが、体内内胚葉細胞では全く検出されなかった（図8B-C）。ステージ23では、pPGCの細胞膜近傍で異常に認識された（図8B）。第23期以降はノトコルドの外表面で検出され、第18期以降は表皮の外表面で、第40期は二層表皮の内層と外層の間の細胞間隙で顕著であった。

Fig8

(A) CBB染色（レーン1）とXenopusコラーゲンタイプIVの融合タンパク質のイムノブロット。融合タンパク質を免疫したラットの抗血清は、融合タンパク質の予測サイズ（チオレドキシンの151アミノ酸とIV型コラーゲンの192アミノ酸）に相当する37kDaタンパク質バンド（レーン2）と反応し、同じラットの免疫前血清は全く反応しない（レーン3）。このように、Xenopus胚の染色が陽性であることから、エピトープは融合タンパク質のチオレドキシンではなく、コラーゲンに存在することが確認された。(B) 23期胚の横断面を抗血清と2L-13抗体で二重染色したものである。胚の内胚葉細胞塊の腹側にある細胞（矢印）の核周辺領域と細胞膜近傍に Xenopus collagen type IV が検出された。それらの細胞の核周囲領域は2L-13抗体で染色され、pPGCであることが確認された(B')。(C) 26期胚の横断面を抗血清と2L-13抗体で二重染色したもの。コラーゲンは通常、胚の背面中央部にあるpPGC（矢印）の核周辺細胞質で認識される（図2参照）。pPGCの核周囲の細胞質は2L-13抗体で染色されている（C'）．核の位置は空洞のようである。上は背側、下は腹側。バー、50μm。

Fibronectin

フィブロネクチンの分布は、抗フィブロネクチン抗体と抗アクチン抗体による二重染色で調べた。抗アクチン抗体は、上記と同様の理由で内胚葉細胞塊のpPGCを特定するために使用された。

フィブロネクチンは、8-24期の胚のpPGCや体細胞では観察されなかった。26期に初めてpPGCの細胞質に現れ（図9A）、発生とともに徐々に増加し、40期で顕著になった（図9B）。これらのステージでは、内胚葉細胞の細胞質や外表面には全く検出されなかった。しかし、フィブロネクチンは26期以降、表皮、神経管、ノトコルド、体節で観察され、33/34期以降、表皮とノトコルドで顕著になった（図9B）。

Fig9

26期（A）および40期（B）胚の横断面における抗フィブロネクチン抗体と抗アクチン抗体による二重染色。(A) フィブロネクチンは、胚の内胚葉細胞塊の中心背側部分（図2参照）の多くの細胞（矢印）またはpPGCの細胞質で最初に検出される。(A') これらのpPGCは抗アクチン抗体でも強く染色される。(A") (A)と(A')を合成した画像。pPGCが部分的に重なっているのがわかる。(B)胚の内胚葉細胞塊の背側部分（図2参照）のpPGC（矢印）の核周囲の細胞質にはフィブロネクチンが豊富に存在する。(B') 40期の背側最上部のpPGCは抗体で染色されることはなかったが、pPGC内の細胞質は例外的に抗アクチン抗体で染色されている。(B") (B)と(B')を合成した画像。フィブロネクチンの分布は、アクチンの分布とやや似ている。核の位置は空いているようだ。上は背側、下は腹側。eは表皮、noはノトコード、sは体節。(A)と(B)のバー、100μm。

Laminin

ラミニンの分布は、抗ラミニン抗体と2L-13抗体による二重染色によって調査された。

ラミニンは、調べたどのステージの胚のpPGCや内胚葉細胞にも認められなかった（データは示していない）。しかし、18より後のステージでは、神経管、ノトコルド、側板中胚葉およびそれらの誘導体の細胞の外表面に認められた（データは示していない）。また、26期以降の体節の細胞外表面や28期以降の二層式表皮の内層にも出現した（データ未掲載）。

細胞移動に関与する分子の分布に関する結果は、表1にまとめられている。コントロール抗体、ウサギIgG、マウス骨髄腫細胞の培養上清、ラット免疫前血清で処理した胚の切片では染色は観察されなかった（データは示していない）。

Discussion

胚盤胞からオタマジャクシに至る発生段階において、Xenopus胚の内胚葉細胞塊におけるpPGCの移動の様式や分子機構については、ほとんど知られていない。したがって、ある段階でのpPGCの移動が能動的なのか受動的なのか、またその移動にどのような分子が関与しているのかについては、まだ解明されていないのが現状である。

本研究では、7-23期の胚において、FDL標識pPGCは常に同じGPBC由来の標識体細胞と一つのクラスターを形成していることが確認された（図3A-C）。とりわけ、7期の植物表面で小さなクラスターを形成していた標識pPGCと体細胞が、9期にはその場所を内部に移し、分裂によって細胞数を増やしていることは興味深い。このようなpPGCの移動は、中胚葉の初期退縮と内胚葉の内向き急増につながる植物細胞塊の活発な移動が胃形成の前半に起こることが報告されているにもかかわらず、pPGCを含む植物細胞の内向き移動が胃形成前にすでに起こった可能性を示唆している（Winklbauer & Schürfeld 1999）。そうでなければ、pPGCはまだ植物表面に残っていることになる。胃捻転期以降、内胚葉細胞塊の中央部には通常、標識された、pPGCと体細胞内胚葉細胞の一つのクラスタが見られ、23期までそこに留まっていた。それらのpPGCは体細胞内胚葉細胞と同様に外形が多角形であった。しかし、24期以降の標識pPGCは、この時期に標識体細胞の一群が観察される腹側部から離れた内胚葉細胞塊の中心背側、外側、背側部に個々の細胞として見られることが多かった（図3D,E)。また、これらの細胞は基本的に球状であった（Ikenishi & Kotani 1975; Kamimura et al 1976, 1980）。標識された pPGC の相対位置と細胞形状を考慮すると、9 期までの胚の pPGC は植物細胞の内方移動の結果、内部に転位した可能性があり、10-23 期の pPGC は同じ GPBC 起源の内胚葉細胞とともに、形態形成運動により受動的に転位したと考えるのが妥当であろう。一方、24期以降の胚のpPGCは、同じ起源の内胚葉細胞とは別に、横方向あるいは背側方向へ能動的に移動していると考えられる。このことは、後述の24期以降の胚のpPGCに、能動的移動と方向性移動にそれぞれ必須と考えられるF-actinとCXCR4様タンパク質（おそらくxCXCR4）が出現していることと整合的であると思われる。

一般に、細胞の移動には、細胞膜上のインテグリン、活発に移動する細胞の細胞質内のF-アクチン、そしてECM環境が必須であると考えられている（Martin et al.2002）。実際、ショウジョウバエの極細胞やPGCの前駆体の活発な移動にはF-アクチンが必要であること（Callaini et al 1995）、β1-インテグリンを欠損させた変異マウス胚ではPGCが生殖隆起に移動できないこと（Anderson et al 1999）などが報告されている。また、Xenopusやマウス胚におけるPGCの背側腸間膜から生殖器隆起部への移動には、フィブロネクチン (Heasman et al. 1981; Fujimoto et al. 1985) やラミニン (Garcia-Castro et al. 1997; Bendel-Stenzel et al. 1998) などのECMが重要な役割を果たすことが明らかとなってきている。また、鳥類やマウスのPGCの移動には、コラーゲンタイプIVが関与していることが報告されている（Urvenら1989；Garcia-Castroら1997）。最近、PGCの細胞膜上のSDF-1またはCXCR4の受容体が生殖器隆起への方向転換に重要な役割を果たすことがゼブラフィッシュとマウスで報告されている（Doitsidouら、2002; Araら、2003)。本研究では、23期まではpPGCを含む内胚葉細胞で全く検出されなかったF-actinが、24-33/34期の内胚葉細胞塊ではR-P染色により少数の細胞で示された（Fig.4）。これらのステージのR-P陽性細胞の形状や位置は、Xenopus vasaタンパク質に特異的な2L-13抗体で同定した対応するステージのpPGCの形状とよく一致したため、R-P陽性細胞はpPGCと思われた。2L-13 抗体で同定された pPGC の数に比べて R-P 陽性 pPGC の数が少ないのは、pPGC の状態、つまり移動期の pPGC のうち固定時に移動したばかりのものは F-actin を持っているために染色されるためであると考えられる。ゼブラフィッシュでは、個々に移動するPGCは移動モードと休止モードを交互に繰り返すことが示唆されている（Reichman-Fried et al.2004）。また、β1-integrinは、18-28期の体内内胚葉細胞ではほとんど検出されないにもかかわらず、12-32期のpPGCの細胞膜で認識された（表1）。また、コラーゲンは10-28期のpPGCでは常に核周囲の細胞質に検出されるにもかかわらず、23期ではpPGCの細胞膜近傍に異常に検出された（図8）。一方、フィブロネクチンはステージ26-40でpPGCの核周辺細胞質に検出されたが、細胞膜近傍には検出されず（図9）、ラミニンはpPGCに全く検出されなかった。さらに、ECMに含まれるこれらの分子は、調べたすべてのステージで内胚葉細胞にはほとんど検出されなかった。抗マウスCXCR4抗体で認識される分子（おそらくxCXCR4）も、連続切片の観察により、24-33/34期の胚では、すべてではなく、ごく少数のpPGCの細胞質全体に検出された（図7）。このことは、前述のpPGCのF-actinにおいても同様であると思われる。

注目すべきは、上記のステージにおいて、インテグリン、xCXCR4、コラーゲン、フィブロネクチンがそれぞれpPGCの細胞質内に豊富に存在していたことである（表1）。De Strooperら（1991）は、細胞質中のβ1-インテグリンは未熟な形態であるが、成熟すると同時に細胞膜に挿入され、α-インテグリンと会合することを報告している。同様に、細胞質内のxCXCR4も遅かれ早かれ細胞膜に輸送されるのだろう。一方、pPGCに貯蔵されているコラーゲンやフィブロネクチンは細胞外に分泌され、その後の発生段階での内胚葉細胞塊のpPGCの移動、43より後の段階での背側腸間膜から性器隆起部へのPGCの移動にそれぞれ関与している可能性がある。これは、Xenopusの腸間膜細胞上の移動経路に見られるフィブロネクチンは、おそらく腸間膜細胞自体から分泌されているのではないかという以前の研究（Heasman et al. これらのことから、pPGCの外表面のコラーゲンとその細胞膜のインテグリンが、第24期以降の内胚葉細胞塊におけるpPGCの活発な移動に必須なF-アクチンの形成に関与している可能性が推測される。そして、xCXCR4は、pPGCでF-actinが認識されたのと同じステージでpPGCでも検出されたことから、内胚葉細胞塊の最上部背側へのpPGCの方向性、最終的には生殖器隆起への移動に関与している可能性があることであった。したがって、40期の胚の背側最上部に集積するpPGCにこれらの分子がないことは、pPGCが背側中胚葉を通過して生殖器隆起部へ活発に移動するのを再開するまでの間、一時停止していたことを示しているのかもしれない。

本研究では、xCXCR4がXenopus pPGCの活発な移動期において存在することを初めて示唆した。しかし、ゼブラフィッシュやマウスにおけるSDF-1（Doitsidou et al. 2002; Ara et al. 2003）のようなリガンドが、Xenopusにおける生殖器隆起へのpPGCの方向性移動に関与しているかどうかはまだ不明である。Xenopusの生殖細胞移動の分子機構に関する全容を解明するためには、xCXCR4のリガンドに関するさらなる研究が必要であろう。