

2020 年度 修士論文

Ethanol による単眼症誘導の要因の
分子メカニズムの解明

Molecular mechanisms of ethanol-induced cyclopia

高知工科大学院
生命科学コース
1235035
今井 捷智

指導教員
蒲池 雄介 教授

目次

1. 要旨

2. 序論

3. 結果

1節.Shh経路阻害剤とエタノールの単眼症の発症率の比較

2節.エタノールとShh経路阻害剤が脊索前板の移動に与える影響

3節.エタノールとフォルスコリンが脊索前板の移動へ与える影響の濃度依

存性

4節.H-89のエタノール処理胚への影響(表現型) part1

5節.H-89のエタノール処理胚への影響(表現型) part2

6節.H-89のエタノール処理胚への影響(in situ hybridization)～tailbud期～

7節.H-89のエタノール処理胚への影響(in situ hybridization)～25hpf～

8節.Flamindo2を用いたcAMP活性の観察～EthanolとForskolinの比較～

9節.Flamindo2を用いたcAMP活性の観察～Ethanolの濃度による変化～

10節.PKIも用いたレスキュー実験

4. 考察

5. 材料と実験方法

6. 引用

7. 謝辞

1. 要旨

脊椎動物の眼の発生においては、眼原基（網膜原基）が脊索前板からのSonic Hedgehog (Shh)などの誘導シグナルによって左右の2領域に分かれる。この際、なんらかの要因により脊索前板と眼原基との相互作用に異常が生じると、眼原基の分離が起こらなくなり、単眼症となる。

本研究では、Shh経路阻害剤とエタノールの単眼症の発症率実験によりエタノールはShh経路の破綻ではなく、フォルスコリンと同様に脊索前板の移動の遅延という影響によって単眼症を発症していることを示す。フォルスコリンはアデニル酸シクラーゼに作用し、cAMPの濃度上昇をもたらすことでプロテインキナーゼA(PKA)を活性化させる。PKAは、非ペプチド阻害剤であるH-89や内在性のペプチド阻害剤であるPKIにより活性阻害を受ける。これらの阻害剤がフォルスコリンとエタノールによる単眼症をレスキューするかを調べたところ、両者で単眼症の発症率の低下が見られた。次に、細胞内のcAMP濃度に応じて蛍光強度が変化するFlamindo2を用いて、フォルスコリンとエタノール曝露の影響を観察したところ、フォルスコリンではFlamindo2の蛍光強度の顕著な低下が見られたが、エタノールにおいては大きな変化は見られなかった。

以上の結果より、フォルスコリンにおける単眼症はcAMP濃度の上昇によるPKAの活性化によるものであるが、エタノールにおける単眼症はcAMP非依存性の経路でPKAが活性化されることで脊索前板の移動が遅延することが原因となっている可能性がある。

2. 序論

正常な脊椎動物の眼の発生は、眼の原基が脊索前板からのShhなど誘導シグナルによる干渉により2つに分かれることにより形成される。しかし、単眼症を発症する胚では脊索前板と眼の原基の相互作用がなくなり眼の原基の分割が起こらなくなる。エタノールは単眼症を引き起こす催奇性因子として知られているが、エタノールの具体的な単眼症を引き起こすメカニズムは解明されていない (Blader and Strähle, 1998)

眼の原基の分離にShh経路の活性化が重要であることから、その阻害剤も単眼症を引き起こす催奇性因子として作用する。Shh経路阻害剤であるシクロパミンとSMOは、フォルスコリンはアデニル酸シクラーゼの活性を阻害することがわかっている。しかし、エタノールがこれらのシグナル経路にどのように関連するのか、あるいは全く別の経路で働くのかについては十分な理解が進んでいない。そこで本研究では、まず始めにShh経路阻害剤とエタノールによる単眼症との発症率の比較とこれらの化学物質が脊索前板の移動へ与える影響を調べた。

フォルスコリンはアデニル酸シクラーゼという膜タンパク質を活性化させ、cAMPの濃度を上昇させることでプロテインキナーゼA (PKA) の活性化を引き起こす (図1)。以前の研究では、フォルスコリンは、脊索前板の移動を阻害することはないという報告と (Blader and Strähle, 1998)、阻害する可能性があるという報告とがあった (Loucks et al, 2007)。

私はフォルスコリンの単眼症の発症メカニズムに関して重要であると考えられるcAMPの活性化やPKAの活性化に注目し、エタノールの作用機序の解明に努めた。まず、PKAの活性化を調べるため非ペプチド阻害剤であるH-89や内在性ペプチド阻害剤であるPKIを使用した (Murray, 2008)。非ペプチド阻害剤であるH-89に比べて内在性ペプチド阻害剤のPKIはPKAに対して特異性が高い阻害剤である。これらを用いてレスキュー実験を行った。次にcAMPの活性化を調べるためにcAMPの活性化に伴って蛍光強度が低下するFlamindo2を使用した (Odaka et al, 2014)。Flamindo2の蛍光強度を比較することによってcAMPに依存した経路であるかどうかを調べた。

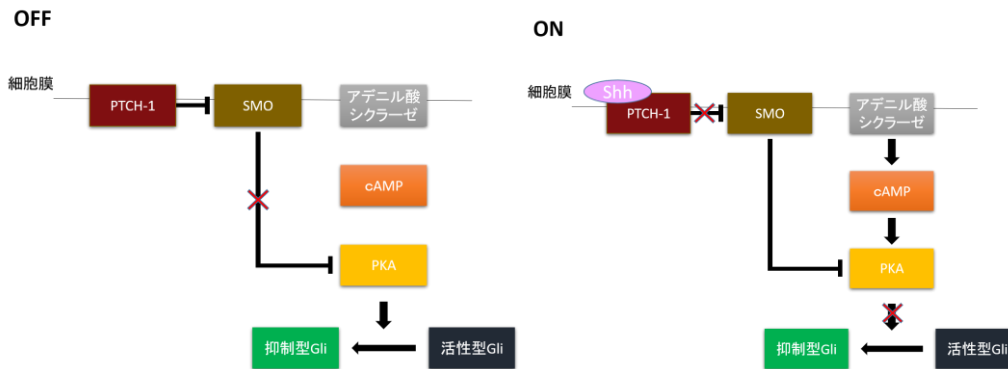
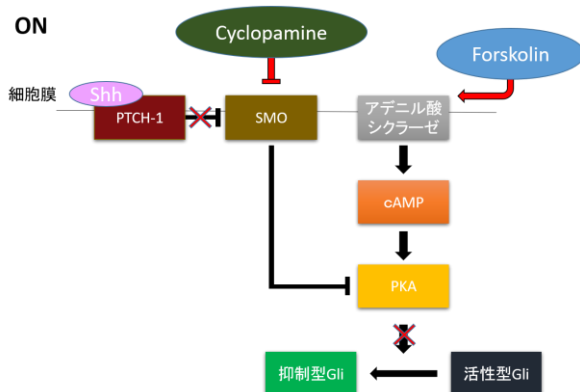


図1) Shh経路とその阻害剤

Shh経路が働かない時、PTCH-1がSMOを阻害する。そして、PKAを活性化させることによってGliがリプレッサーとして働くことによってShh応答遺伝子の発現を抑制する。そこにShhが働きかけることによってPTCH-1が抑制され、その結果SMOが活性化する。SMOはPKAを抑制する。PKAによる抑制が解除された結果、Gliが活性化することによってShh応答遺伝子の発現が行われる。



今回私が使用したShh経路阻害剤は2つある。1つめは、SMOを阻害するシクロパミンである。2つめは、アデニル酸シクラーゼを活性化させるフォルスコリンである。これらの阻害剤とエタノールの作用機序を比較することによって単眼症の分子メカニズムの解明に努めた。

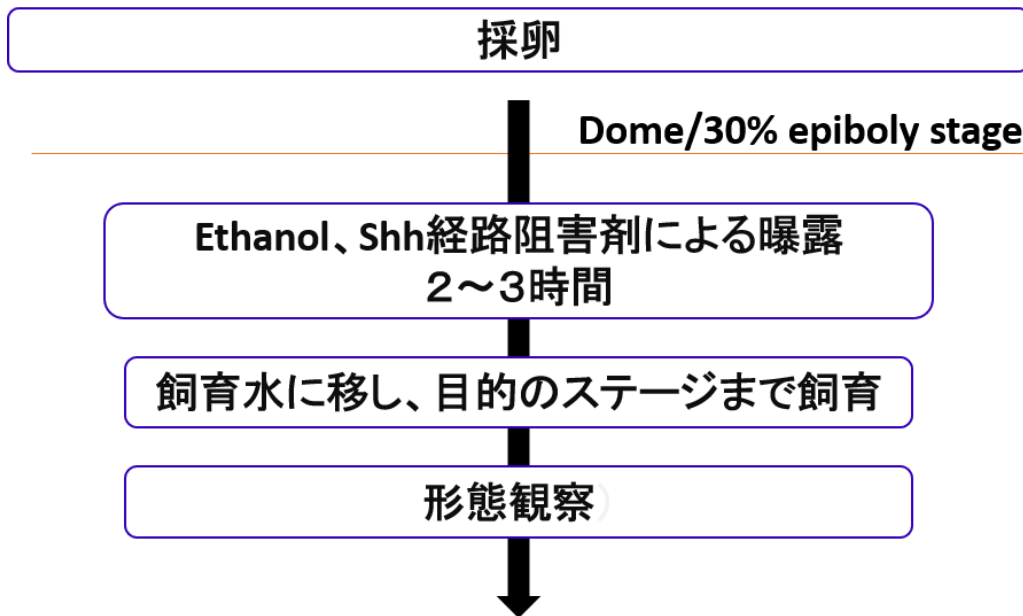
3. 結果

1節. Shh経路阻害剤とエタノールの単眼症の発症率の比較

初めにShh経路阻害剤とエタノールの単眼症発症率を調べた。条件は以下のもので行った。

使用した胚のステージ	阻害剤	暴露時間
Dome/30% epiboly stage	-	-
Dome/30% epiboly stage	3.0% エタノール	2h
Dome/30% epiboly stage	3.0% エタノール	3h
Dome/30% epiboly stage	200 μ M シクロパミン	2h
Dome/30% epiboly stage	300 μ M フォルスコリン	2h

実験方法は以下のように行った。



結果は以下のようになった。特に3.0% エタノールで3時間暴露した胚と300 μ M フォルスコリンで3時間暴露した胚において高い単眼症発症率になった。そして、興味深いことに200 μ M シクロパミンで3時間暴露した胚において単眼症の発症率が低かった。このことからShh経路が破綻することによって誘導される単眼症は今回の条件下では誘導されにくいということがわかった。また、

フォルスコリンはShh経路の破綻によって単眼症になるのではなく、他の要因によって単眼症を誘導していることが示唆された(図2)

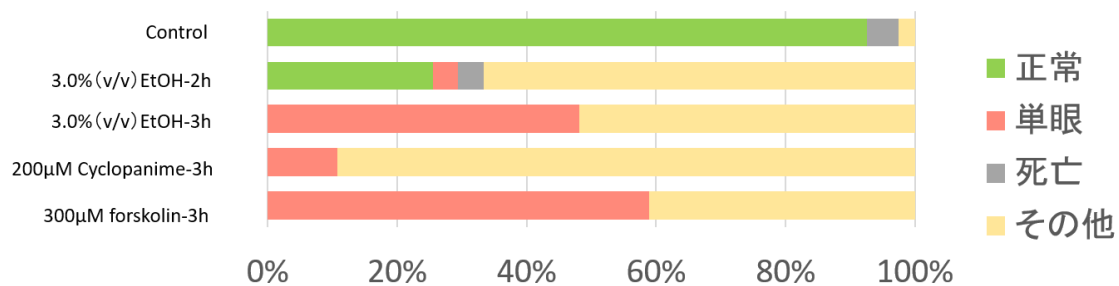


図2) Shh経路阻害剤とエタノールの単眼症の発症率の比較の結果

Shh阻害剤とエタノールで暴露した後、1日飼育し、単眼症の発症率をグラフ化した。

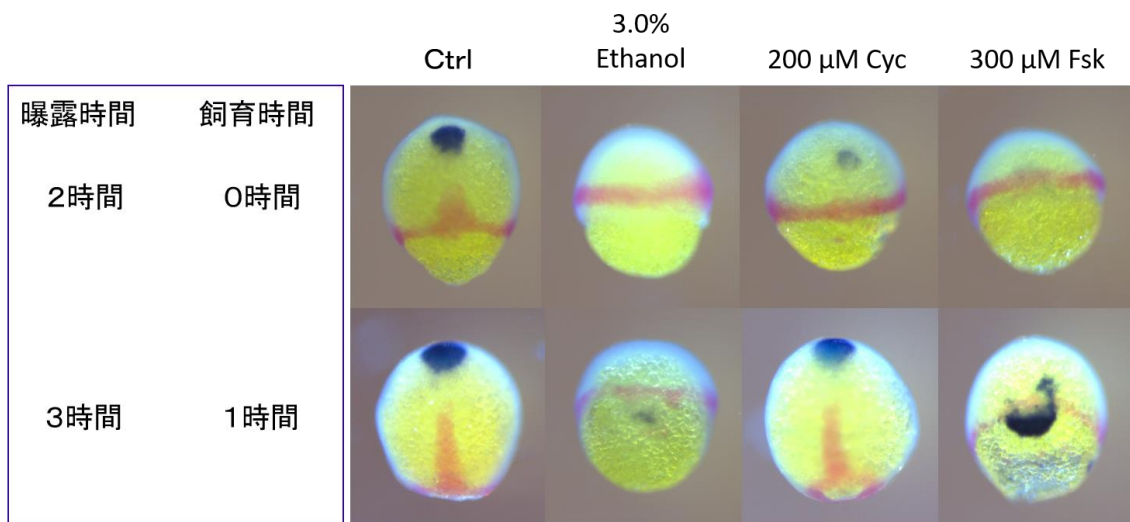
2節. エタノールとShh経路阻害剤が脊索前板の移動に与える影響

単眼症の発症率に違いがあることがわかった。次に私は*ctsl1b* (脊索前板のマーカ―) と*ntl* (脊索のマーカ―) 遺伝子プローブを用いてin situ hybridizationを行い、脊索前板と脊索の移動に注目して、それぞれの発現部位の観察を行った。

条件は以下のもので行った。

使用した胚のステージ	阻害剤
Dome/30% epiboly stage	-
Dome/30% epiboly stage	200 μ M シクロパミン
Dome/30% epiboly stage	3.0% エタノール
Dome/30% epiboly stage	300 μ M フォルスコリン

今回使用した阻害剤の中でエタノールとフォルスコリンで処理した胚で脊索前板の移動遅延が見られた。逆にシクロパミンで処理した胚では正常胚とあまり変化が見られないと言う結果になった。このことからエタノールはフォルスコリンと類似した方法で単眼症を誘導しているとわかった。つまり、エタノールはフォルスコリンによる単眼症の誘導にはShh経路の破綻ではなく脊索前板の移動遅延が関わっていることがわかった(図3)。



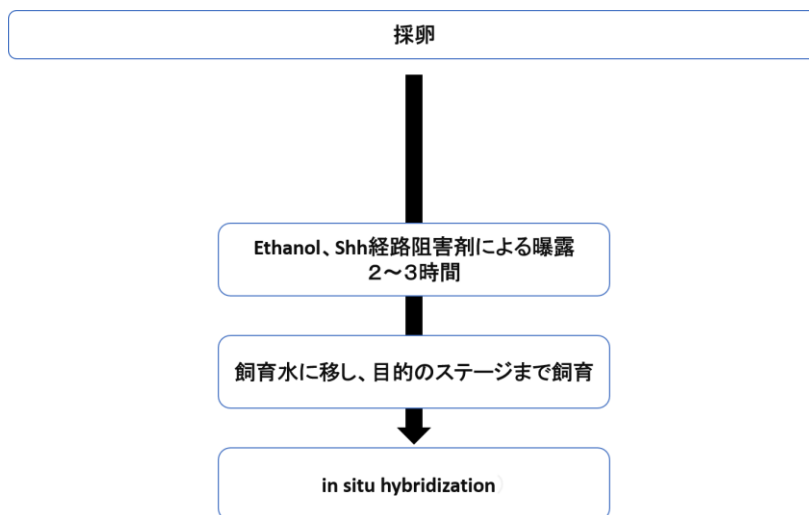
ctsl1b (*hgg1*): 脊索前板のマーカ―遺伝子
ntl: 脊索のマーカ―遺伝子

図3) エタノールとShh経路阻害剤が脊索前板の移動に与える影響の結果

3節. エタノールとフォルスコリンが脊索前板の移動へ与える影響の濃度依存性

エタノールとフォルスコリンが類似した方法で単眼症を誘導していることがわかった。そこで、この脊索前板の移動遅延に濃度依存性があるかを調べた。方法として以下の条件で暴露し、その後固定、in situ hybridizationを行った。

使用した胚のステージ	阻害剤	暴露時間
Dome/30% epiboly stage	-	-
Dome/30% epiboly stage	50 μ M フォルスコリン	2h
Dome/30% epiboly stage	100 μ M フォルスコリン	2h
Dome/30% epiboly stage	200 μ M フォルスコリン	2h
Dome/30% epiboly stage	300 μ M フォルスコリン	2h
Dome/30% epiboly stage	1.5% エタノール	2h
Dome/30% epiboly stage	2.0% エタノール	2h
Dome/30% epiboly stage	3.0% エタノール	2h



今回の結果から、エタノールの場合2.4%や2.0%、フォルスコリンの場合300 μ Mや200 μ Mで処理した場合において大きく脊索前板の移動遅延が観察できた。このことからこれら阻害剤による脊索前板の移動遅延には濃度依存性があるといえる(図4)

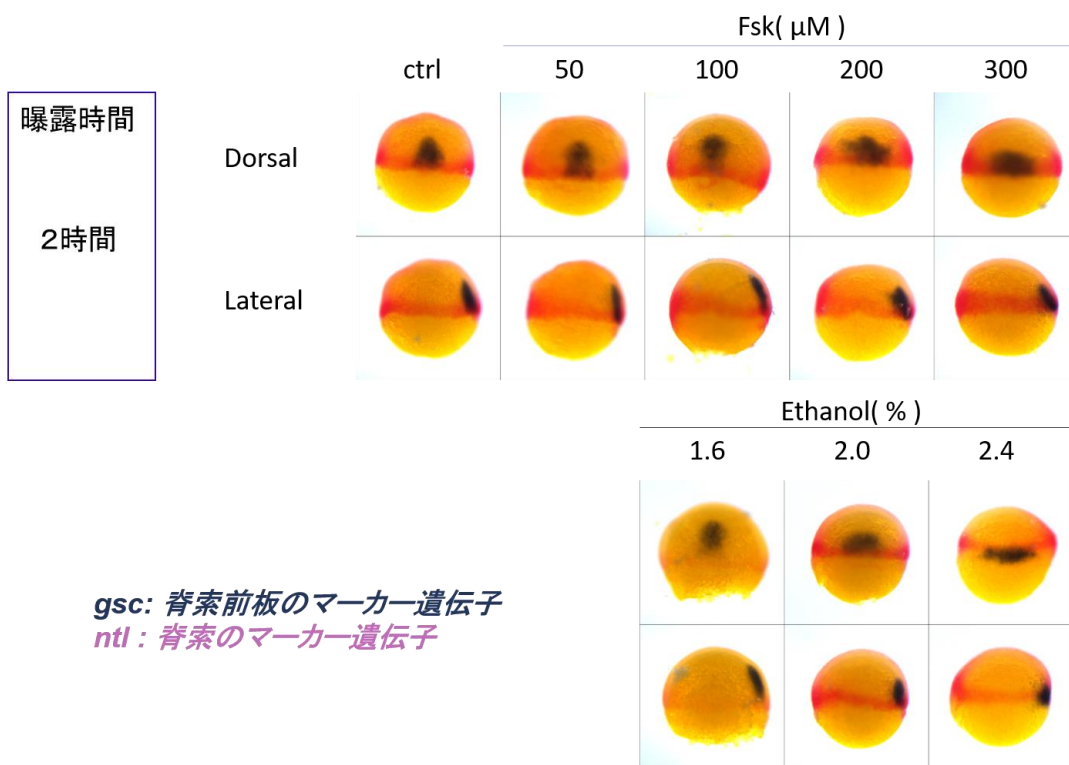


図4) エタノールとフォルスコリンが脊索前板の移動へ与える影響の濃度依存性の実験結果

4節. H-89のエタノール処理胚への影響(表現型) part1

実験5でエタノールとフォルスコリンで脊索前板の移動遅延には濃度依存性があることがわかった。次にフォルスコリンの作用機序を考える際にも最も重要なタンパク質因子であるPKAに注目した。この実験ではエタノール処理による単眼症はフォルスコリン同様にPKAの活性化を介して起こっているのかを調べるためにPKAの非ペプチド阻害剤であるH-89 (図5) を用い、エタノールとフォルスコリンとを組み合わせ処理しその表現型を観察した。もし仮にエタノールがフォルスコリン同様にPKAを介して単眼症を誘導している場合、H-89とエタノールを組み合わせ処理すると単眼症がレスキューできると推測される。

処理の条件は以下のもので行った。

No.	使用した胚のステージ	使用した ethanol の濃度	使用した forskolin の濃度	加えたH-89の濃度	処理した時間
①	Dome/30% epiboly	-	-	-	-
②	Dome/30% epiboly	-	300 μ M	-	3h
③	Dome/30% epiboly	2.4%		-	3h
④	Dome/30% epiboly	-	300 μ M	10 μ M	3h
⑤	Dome/30% epiboly	-	300 μ M	20 μ M	3h
⑥	Dome/30% epiboly	-	300 μ M	30 μ M	3h
⑦	Dome/30% epiboly	2.4%		10 μ M	3h
⑧	Dome/30% epiboly	2.4%		20 μ M	3h
⑨	Dome/30% epiboly	2.4%		30 μ M	3h
⑩	Dome/30% epiboly	-	-	10 μ M	3h
⑪	Dome/30% epiboly	-	-	20 μ M	3h
⑫	Dome/30% epiboly	-	-	30 μ M	3h

処理後飼育水に移して2日間観察した。

試薬は以下の表のように混合し、その溶液中で胚を培養した。

Substance (μ L)

No.	Red Sea salt	60mM Forskolin	20mM H-89
②	3980	20	0
④	3978	20	2
⑤	3976	20	4
⑥	3974	20	6

Substance (μ L)

No.	Red Sea salt	100% Ethanol	20mM H-89
③	3904	96	0
⑦	3902	96	2
⑧	3900	96	4
⑨	3898	96	6

Substance (μ L)

No.	Red Sea salt	20mM H-89
⑩	3998	2
⑪	3996	4
⑫	3994	6

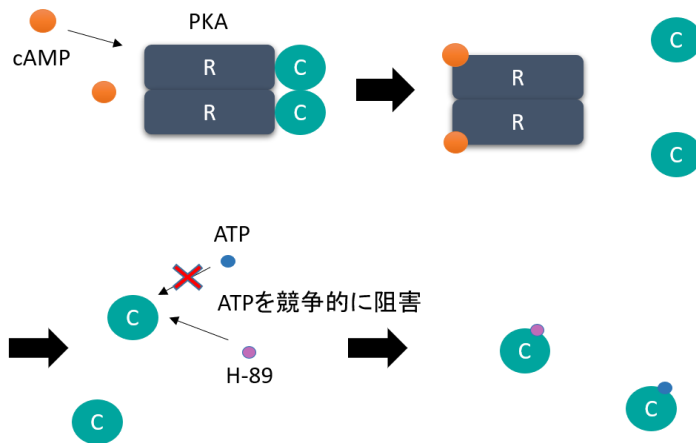
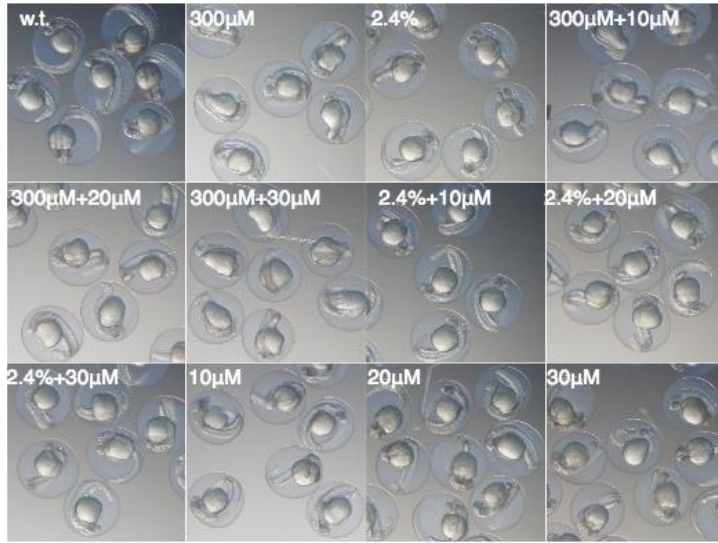


図5) H-89の働き

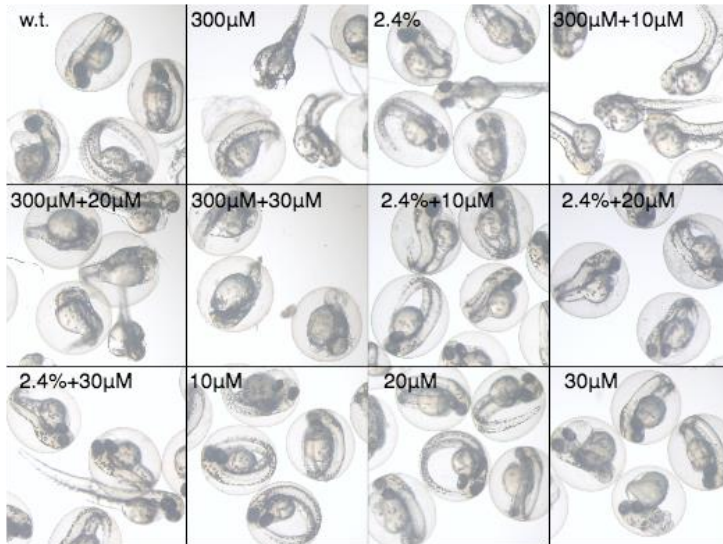
こちらの図はH-89の働きを表した図である。まず、PKAは調節サブユニットと触媒サブユニット2つずつからなる4量体を形成する。cAMPが結合することによって触媒サブユニットは遊離され、ATPと結合するのですがこの時、ATPと形状が似たH-89がATPを競争的に阻害する。

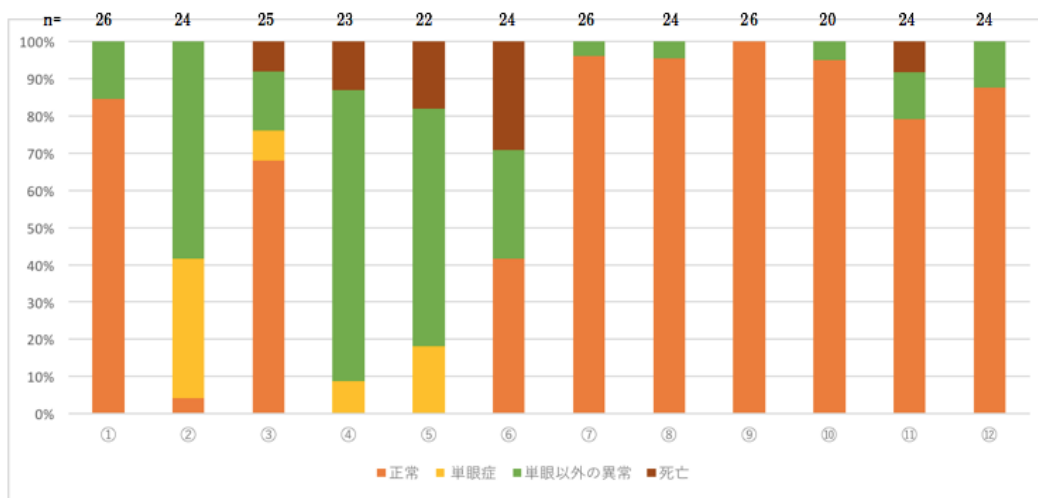
この実験ではEthanolによる単眼症の発症率が低かったが、その条件下におけるH-89によると考えられる単眼症の割合の減少が見られた。一方、Forskolinは単眼症よりもそもそも眼の発生が起こっていない胚が多く、またPKA阻害剤のH-89による効果も見られなかった。それどころかH-89の濃度が上昇すると胚の形態異常の程度が上昇している傾向がみられた(図7)。

i. 1日目



ii. 2日目





	正常	単眼症	単眼以外の異常	死亡
①	22	0	4	0
②	1	9	14	0
③	17	2	4	2
④	0	2	18	3
⑤	0	4	14	4
⑥	10	0	7	7
⑦	25	0	1	0
⑧	21	0	1	0
⑨	26	0	0	0
⑩	19	0	1	0
⑪	19	0	3	2
⑫	21	0	3	0

図7) 2日間の単眼症の発症率

5節. H-89のエタノール処理胚への影響(表現型) part2

4節の結果からエタノールへのH-89の効果をもう一度検証した。

条件は前回に加えて3% エタノールを追加し、さらに、下記の条件で処理する前にそれぞれの試薬で軽いWashを行うことで、胚を移すときの試薬の濃度の変化を最小限にした。

No.	使用した胚のステージ	使用したエタノールの濃度	加えたH-89の濃度	処理した時間
①	Dome/30% epiboly	-	-	-
②	Dome/30% epiboly	3.0%	-	3h
③	Dome/30% epiboly	2.4%	-	3h
④	Dome/30% epiboly	2.4%	10 μ M	3h
⑤	Dome/30% epiboly	2.4%	20 μ M	3h
⑥	Dome/30% epiboly	2.4%	30 μ M	3h

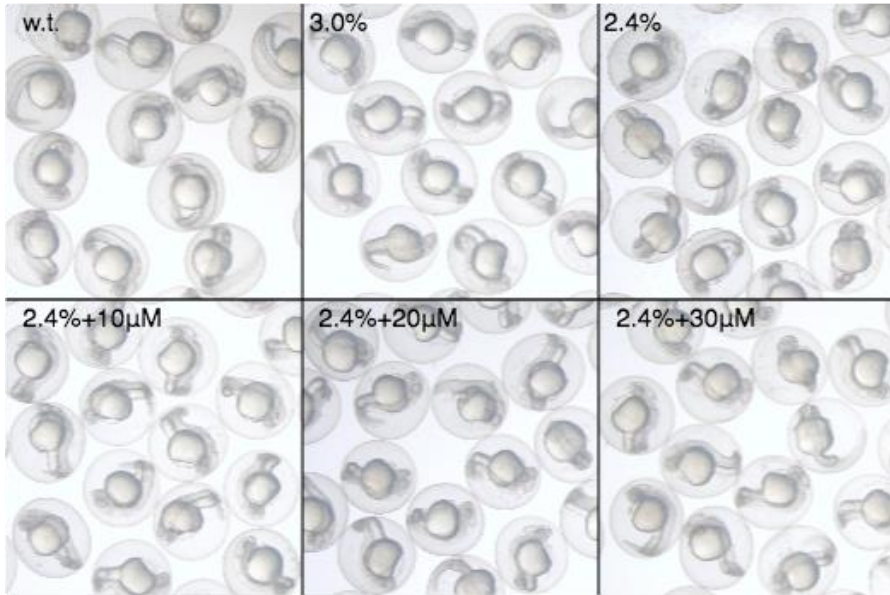
処理後飼育水に移して2日間観察した。

Substance (μ L)

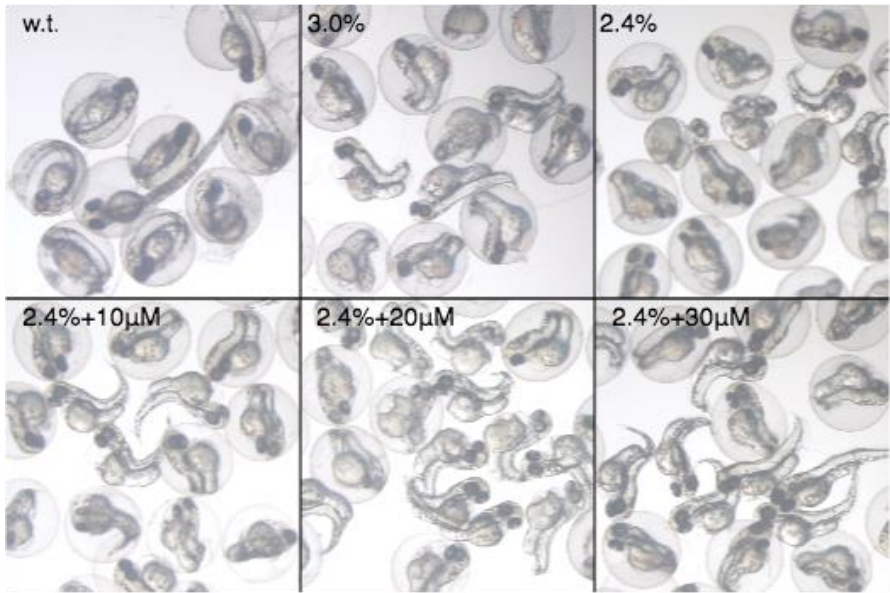
No.	Red Sea salt	100% Ethanol	20mM H-89
②	4850	150	0
③	4880	120	0
④	4887.5	120	2.5
⑤	4885	120	5
⑥	4882.5	120	7.5

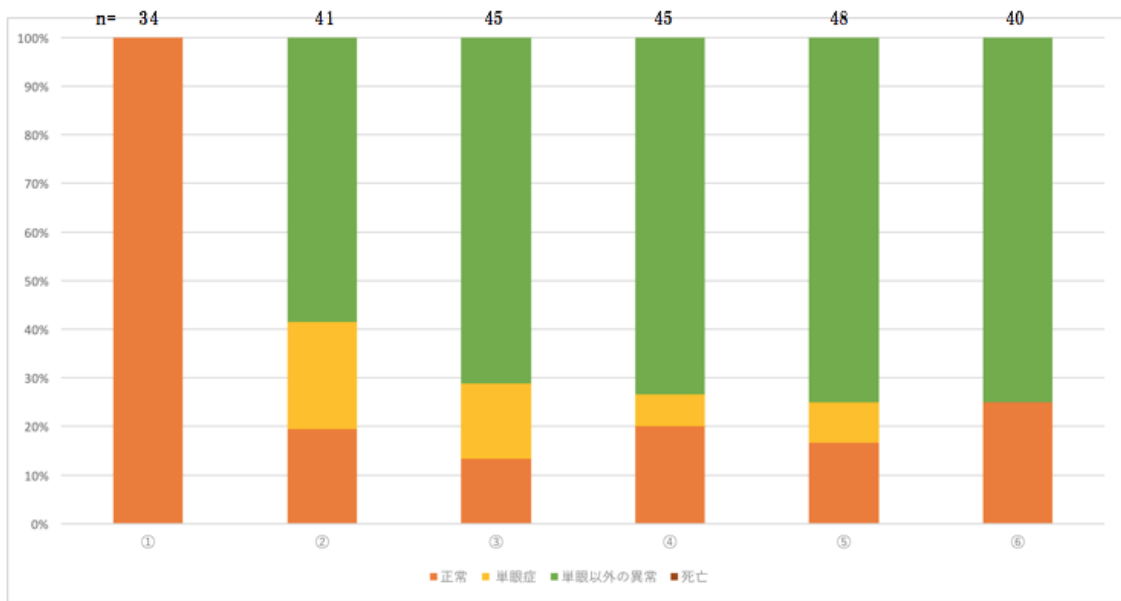
前回よりもはっきりとH-89によって単眼症発症率が低下しているのが観察された。加えてH-89の濃度が上昇するほどその効果が大きくなった(図8)。

i. 1日目



ii. 2日目





	正常	単眼症	単眼以外の異常	死亡
①	34	0	0	0
②	8	9	24	0
③	6	7	32	0
④	9	3	33	0
⑤	8	4	36	0
⑥	10	0	30	0

図8) 2日間の単眼症発症率

6節. H-89のエタノール処理胚への影響(in situ hybridization)～tailbud期
～

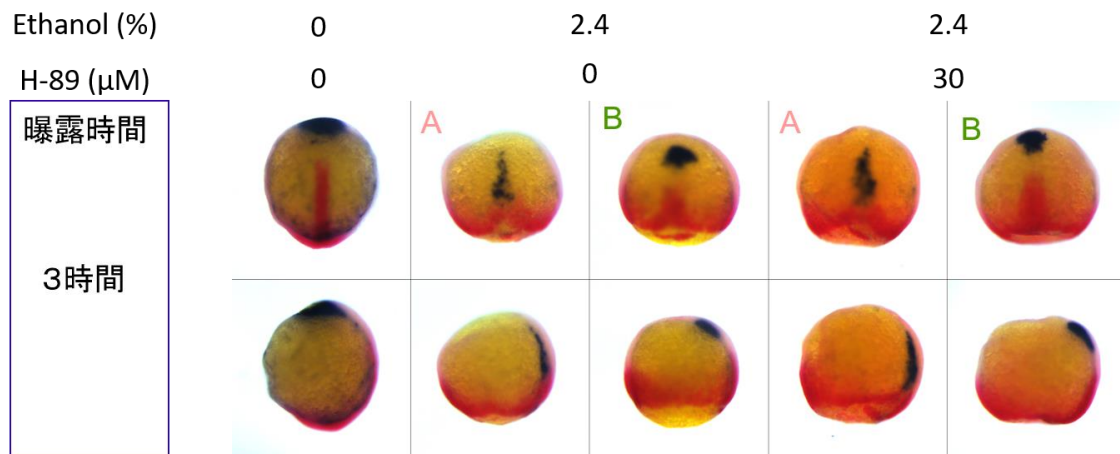
5節で単眼症の原因である脊索前板の移動遅延はPKAによる影響であることが示唆された。そこでエタノールとH-89を組み合わせて暴露した胚の脊索前板の移動の様子をin situ hybridizationを用いて観察した。

以下の条件で行った。

使用した胚のステージ	使用したethanolの濃度	加えたH-89の濃度	処理した時間
Dome/30% epiboly	-	-	-
Dome/30% epiboly	2.4%	-	3h
Dome/30% epiboly	2.4%	30 μ M	3h

暴露後、tailbud期まで飼育し、固定した。

この実験結果からH-89でPKAの阻害を行った胚は、脊索前板の移動遅延部分的に減少することが確認できた。このことからtailbud期における脊索前板の移動遅延はPKAの阻害によって緩和されることがわかった(図9)。



ctsl1b (*hgg1*): 脊索前板のマーカ-遺伝子
ntl: 脊索のマーカ-遺伝子

A: 脊索前板の移動が遅れていた胚
 B: 脊索前板が正常に移動していた胚

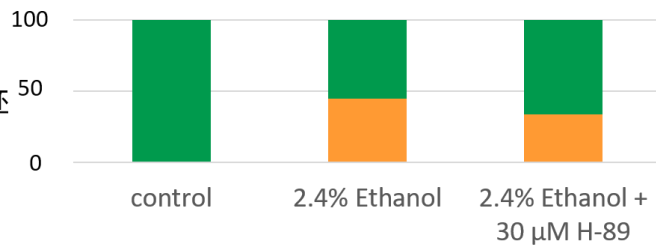


図9) H-89のエタノール処理胚への影響(in situ hybridization)の結果

H-89でPKAの不活性化を行い、in situ hybridizationを行った。そして、脊索前板の移動遅延がおこっている胚と正常に移動した胚のカウントし、グラフ化を行った。

7節. H-89のエタノール処理胚への影響(in situ hybridization)～25hpf～

前の実験を受けて、固定するステージを変更し行った。暴露後、25hpfまで飼育し、固定した。

以下の条件で行った。

使用した胚のステージ	使用したethanolの濃度	加えたH-89の濃度	処理した時間
Dome/30% epiboly	-	-	-
Dome/30% epiboly	2.4%	-	3h
Dome/30% epiboly	2.4%	30 μ M	3h

この実験結果からH-89でPKAの阻害を行った胚においてtailbud期における観察よりも大きく脊索前板の移動遅延の緩和が確認できた。このことから脊索前板の移動遅延はPKAの阻害によって緩和されることがわかった(図10)。これは、脊索前板の移動遅延にはPKAの活性化が直接関係していることを示唆している。

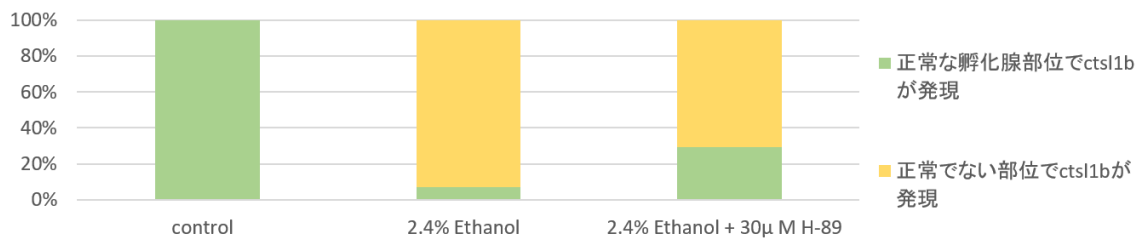
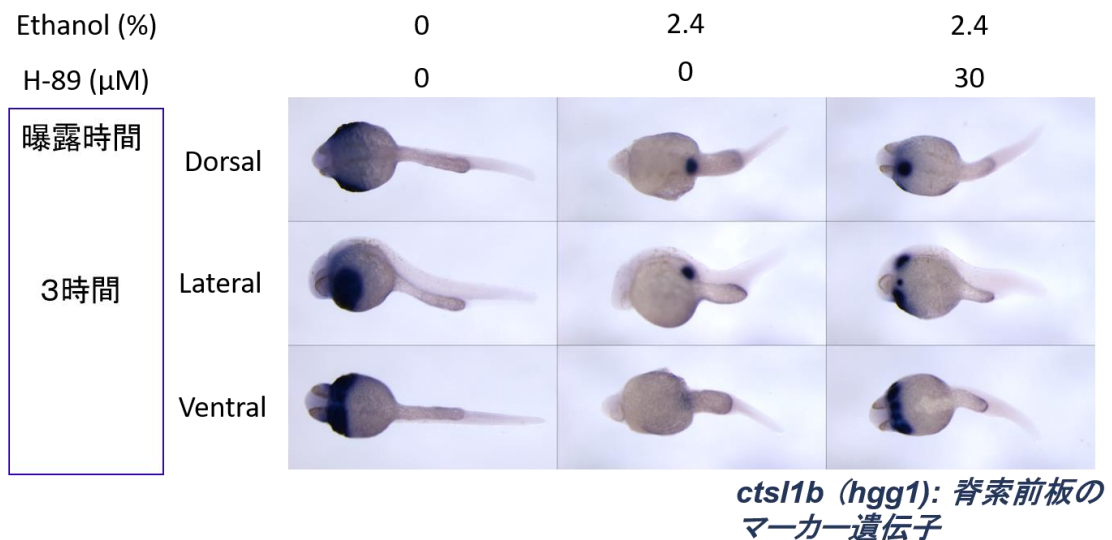


図10) H-89のエタノール処理胚への影響(in situ hybridization)～25hpf～の結果

25hpfにおいても同様にH-89でPKAの不活性化を行い、in situ hybridizationを行った。そして、脊索前板の移動遅延がおこっている胚と正常に移動した胚のカウントし、グラフ化を行った。

8節. Flamindo2を用いたcAMP活性の観察～EthanolとForskolinの比較～

前回の実験によってPKAの活性化によって脊索前板の移動遅延が起こっていることがわかった。次に、フォルスコリンにより影響を受けるcAMPに注目した。そこでcAMPに結合することによって蛍光強度が減少するFlamindo2（図11）を用いて、胚におけるcAMPの濃度変化を調べる実験を行った。

実験方法として、1細胞期の受精卵にFlamindo2をインジェクションし、その後エタノールとフォルスコリンで暴露し、Flamindo2の蛍光を観察した。

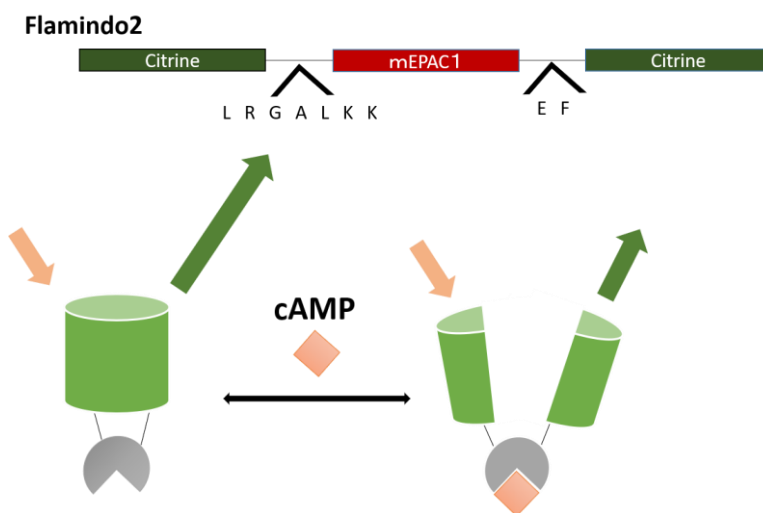


図11) Flamindo2の働き

Flamindo2は、cAMPと結合することによって蛍光強度が低下する。このことによって生きた細胞中のcAMPの濃度変化を観察することができる。

フォルスコリンを暴露させた胚では、Flamindo2の蛍光強度はでは実際に低下していること、つまりcAMPの濃度上昇が起こることが確認できた。しかし、処理胚において蛍光強度はあまり変化が見られなかった。このことから、エタノールによるPKAの活性化はcAMPの活性化からではなく、cAMP非依存的経路によるものであることが示唆された（図12）。

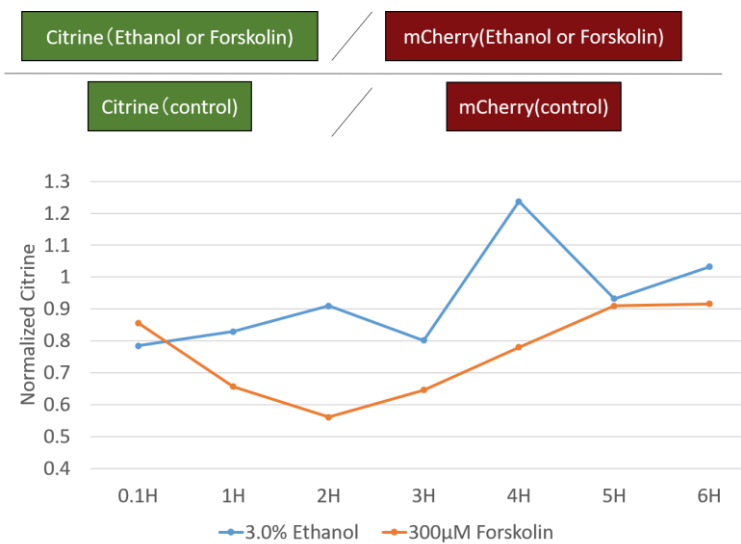
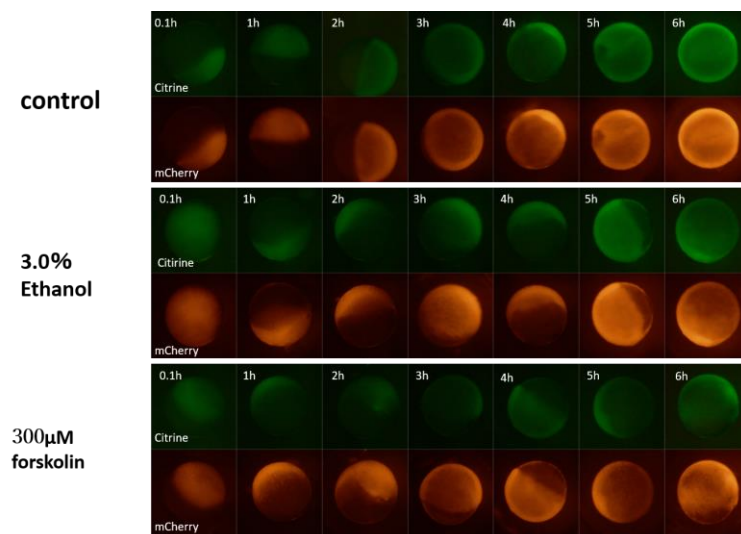
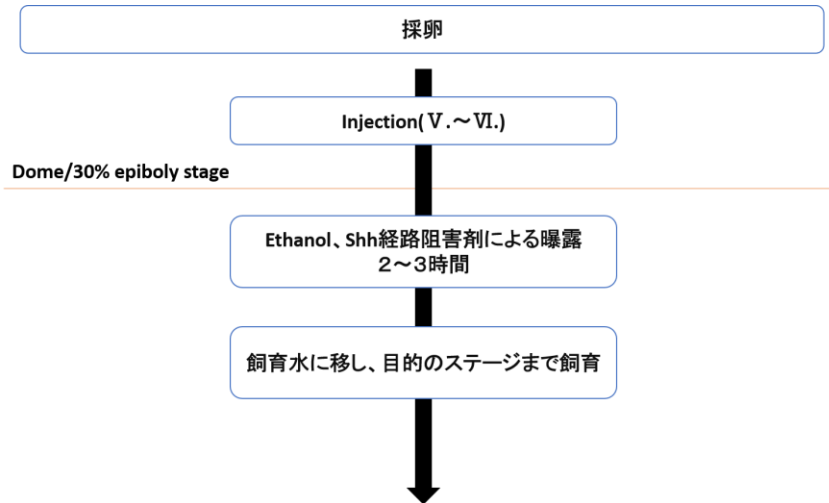


図12) Flamindo2を用いたcAMP活性の観察～EthanolとForskolinの比較～結果
 Flamindo2の蛍光を暴露開始から1時間おきにtailbud期まで蛍光観察を行った後、蛍光強度を標準化し、グラフ化した。

9節. Flamindo2を用いたcAMP活性の観察～Ethanolの濃度による変化～

8節の実験からエタノールにはcAMPの活性化を経由せずPKAの活性化を起していることが示唆されたが、エタノールの濃度が高い場合どのような影響が出るかを調べた。実験方法は8節と同じように行った。



結果、エタノールは濃度を上昇させてもFlamindo2の蛍光強度の上昇は見られなかった。このことからエタノールによるPKAの活性化にはcAMPの活性化に依存しないcAMP非依存的経路が関係していると考えられた(図13)。

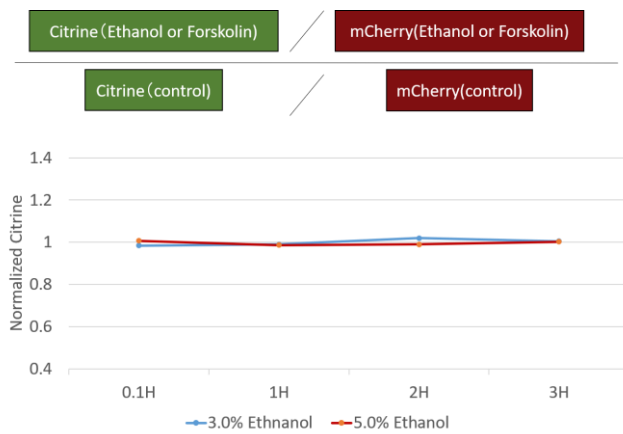
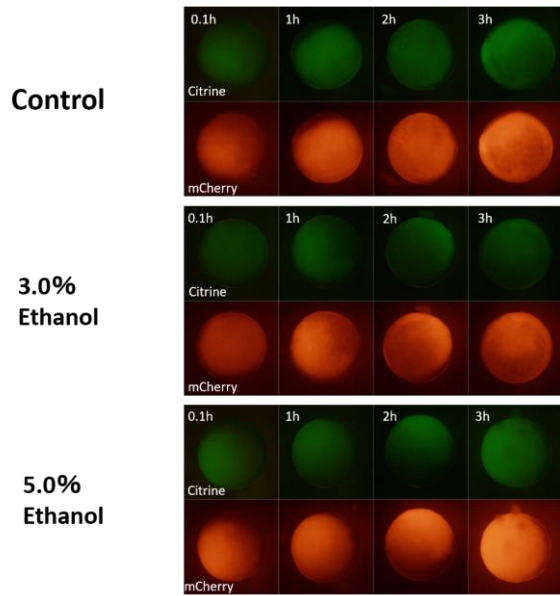


図13) Flamindo2を用いたcAMP活性の観察～Ethanolの濃度による変化～の結果
 Flamindo2の蛍光を暴露開始から1時間おきに暴露終了まで蛍光観察を行った後、蛍光強度を標準化し、グラフ化した。

10節. PKIを用いたレスキュー実験

フォルスコリンはcAMP依存的経路によって、エタノールはcAMP非依存的経路によってPKAの活性化を行っていることが前回の実験で示唆された。そこで、もう一度PKAの活性化に注目し、PKIという内在性ペプチドPKA阻害剤(図14)を用いてレスキュー実験を行った。このPKIはH-89と比べ、PKA阻害の特異性が高い阻害剤である。PKIによってPKAが阻害され、単眼症の発症率が低下した場合は、単眼症にPKAが関わっているという可能性が高まる。

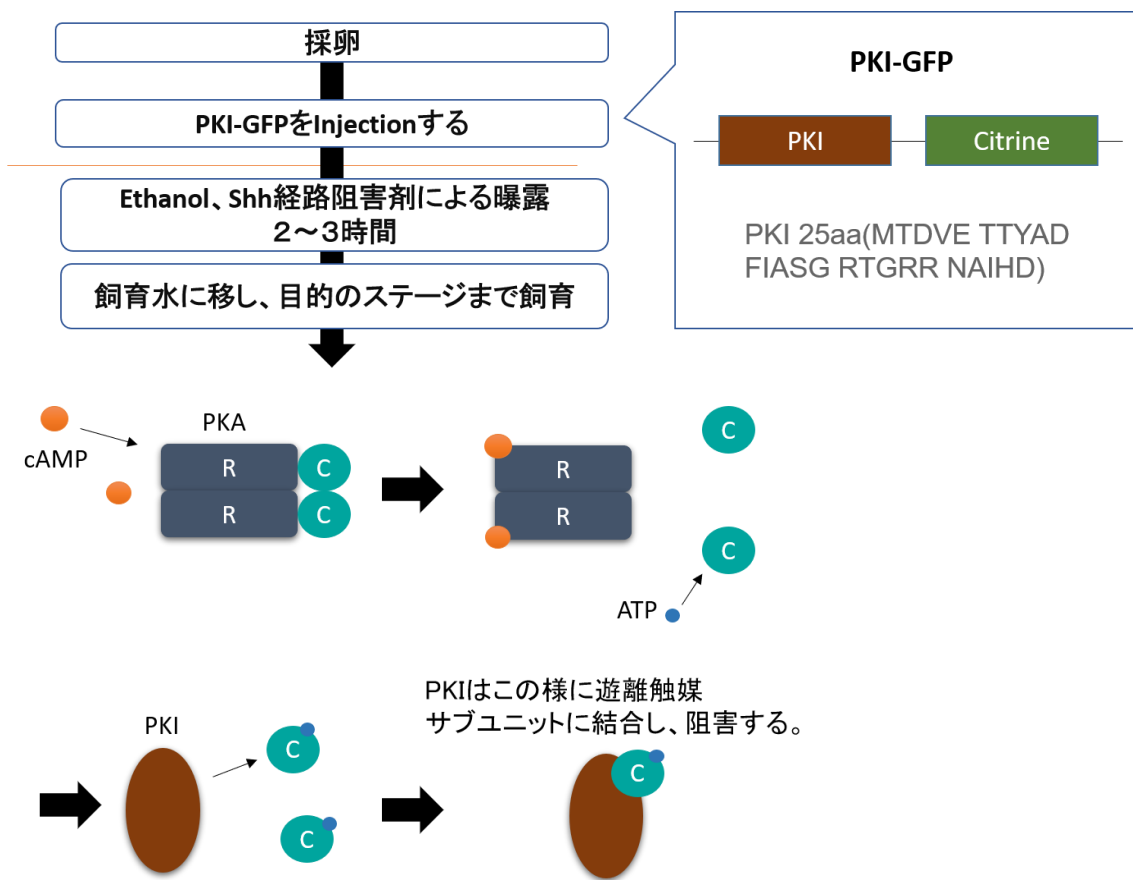


図14) PKIの働き

PKIはH-89と異なり、遊離した触媒サブユニットがATPに結合した後、結合することによってPKAを阻害する。

結果はH-89と同様、エタノールとフォルスコリンによる単眼症の発症率はPKIをPKIで阻害することによって低下した。このことから脊索前板の移動遅延によって引き起こされる単眼症はPKAの活性化が原因であることがさらに示された(図16)。

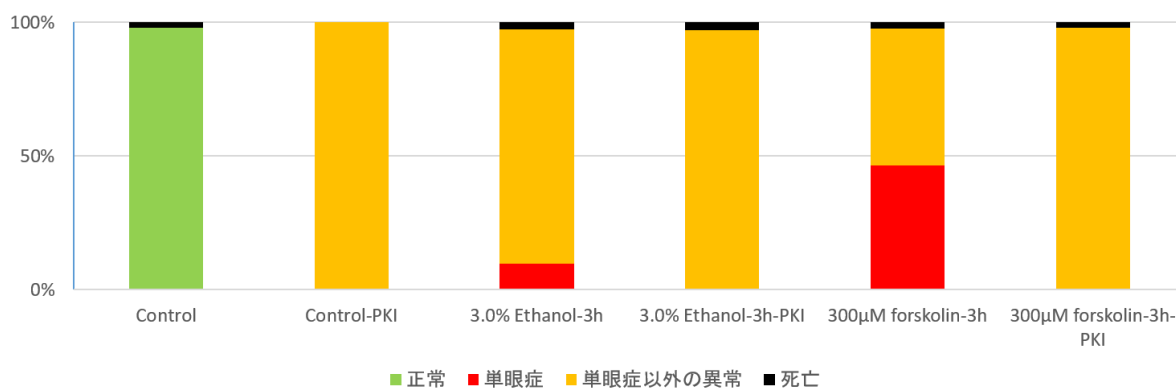


図16) PKIを用いたレスキュー実験の結果

PKIをインジェクションした胚を2日間飼育し、単眼症の発症率をグラフ化した。

4. 考察

単眼症は主に2つのメカニズムによって引き起こされる。1つめは、Shh経路の破綻による単眼症誘導である。これはシクロパミンやフォルスコリンがShh経路を阻害した際に生じる単眼の発症メカニズムに当てはまる。しかし、このShh経路の破綻による単眼症誘導は、実際にShhの発現が高まるエピボリー期の後期にShhが阻害されることが重要であることが考えられ、本研究で使用したステージではシクロパミンによる単眼症はほとんど見られなかった。2つめは、本研究でわかった脊索前板の移動遅延によって起こる単眼症誘導である。これはフォルスコリンやエタノールを早いステージの胚に暴露した際の発症メカニズムに当てはまる。そして、この脊索前板の移動遅延はPKAの活性化によるものだということがH-89とPKIによるレスキュー実験からわかった。したがって、PKAの活性化はエタノールとフォルスコリン処理のいずれの場合も起こっていると考えられる。しかし、PKAを活性化するシグナル経路のセカンドメッセンジャーであるcAMPの活性化の点において、Flamindo2の蛍光強度変化を調べた実験によってわかったことは、フォルスコリンは実際にcAMP依存的にPKAの活性化を起こしているが、エタノールではcAMP非依存的にPKAが活性化されている可能性である。今後は、PKAがどのようなメカニズムでエタノールにより活性化されているのかを調べることが重要である（図17）。

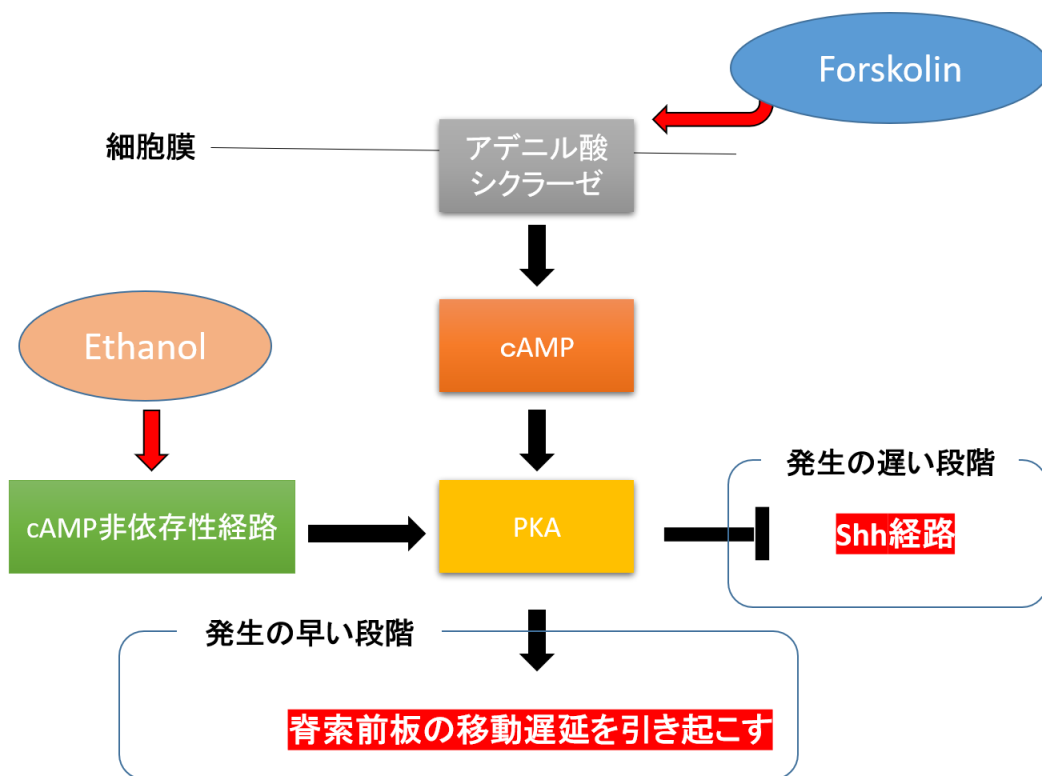


図17) 本研究でわかった単眼症の発症メカニズム

フォルスコリンの作用機序：アデニル酸シクラーゼを活性化→cAMPの活性化→PKAの活性化→脊索前板の移動遅延を引き起こす→単眼症

エタノールの作用機序：cAMP非依存的経路→PKAの活性化→脊索前板の移動遅延を引き起こす→単眼症

5. 材料と実験方法

1. in situ hybridization protocol

in situ hybridization の原理を (図 18) にまたこの手法で用いるプローブの調製方法を (図 19) に示す。具体的な手順を以下に記す。

fixation

1. Fix embryos in 4% PFA/HBS (4°C, 24hr or longer)
2. Dechorionate embryos
3. Wash the embryos in PBT 10min x 2
4. Dehydrate in 100% MeOH r. t. 10min
5. Replace with 100% MeOH
6. Stock at -20°C

Hybridization

Day1.

1. 75% MeOH/PBT r. t. 10min
2. 50% MeOH/PBT r. t. 10min
3. PBT r. t. 5min x4
4. Hyb⁽⁺⁾ w/o probe 70°C 3h
5. Hyb⁽⁺⁾ with probe 70°C o/n (probe ~250ng/mL)

Day2.

1. Hyb⁽⁻⁾ 70°C 30min
2. 75% Hyb⁽⁻⁾/2x SSCt 70°C 20min
3. 50% Hyb⁽⁻⁾/2x SSCt 70°C 20min
4. 25% Hyb⁽⁻⁾/2x SSCt 70°C 20min
5. 2x SSCt 70°C 20min
6. 0.2x SSCt 70°C 30min x2
7. 0.2x SSCt:MABt r. t. 10min
8. MABt r. t. 10min
9. Blocking solution r. t. 2-3hr

10. Antibody solution (Anti-DIG-AP:1/4000) 4°C o/n

Day3.

1. Blocking solution r. t. 1hr
2. MABt r. t. 15min x6
3. NTMT r. t. 10min x3
4. Color development 4°C 3.5hr (1mL including 0.45 μ L NBT, 3.5 μ L BCIP)
5. PBT r. t. 10min x3
6. 100mM glycine/DW (pH2.2)+Tween20 r. t. 30min
7. MABt r. t. 10min x2
8. Blocking solution r. t. 2-3hr
9. Antibody solution (anti-Flu-AP:1/4000) 4°C o/n

Day4.

1. Blocking solution r. t. 1hr
2. MABt r. t. 15min x6
3. NTMT r. t. 10min x3
4. Color development 4°C o/n FASTRED(SIGMA)

Day5

1. PBT r. t. 10min x3
2. 4% PFA/HEPES 4°C o/n

Day6

1. PBT r. t. 10min x2
2. アルミホイルを被せて4°Cで保存した

in situ buffer

PBT pH7.5

No.	Substance	Concentration
1	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	7mM
2	KH ₂ PO ₄	1.5mM
3	NaCl	137mM
4	KCl	2.7mM
5	Tween 20	0.1%

Hyb⁽⁺⁾

1	Formamide	50%
2	20x SSC	5x SSC
3	Heparin (50mg/mL)	100 μg/mL
4	Yeast tRNA or tRNA (10mg/mL)	100 μg/mL
5	10% Tween20	0.1%
6	10% CHAPS	0.1%
		+DW

Hyb⁽⁻⁾

1	Formamide	50%
2	20x SSC	5x
3	10% Tween20	0.1%
		+DW

2x SSCt

1	20x SSC	2x
2	10% Tween20	0.1%
		+DW

MABt

1	5x MAB	1x
2	10% Tween20	0.1%
		+DW

NTMT

1	5M NaCl	100mM
2	1M Tris-HCl pH9.5	100mM
3	1M MgCl ₂	50mM
4	10% Tween20	0.1%
		+DW

Blocking solution in MAB pH7.5

1	10% Blocking Regent	1.5%
2	10% Triton X-100	0.2%
3	10% Tween20	0.2%
		+DW

Antibody solution

1	Blocking solution	1mL
2	Anti-DIG or Flu-AP	0.25 μ L

Color development

1	NTMT	1mL
2	NBT	0.45 μ L
3	BCIP	3.5 μ L

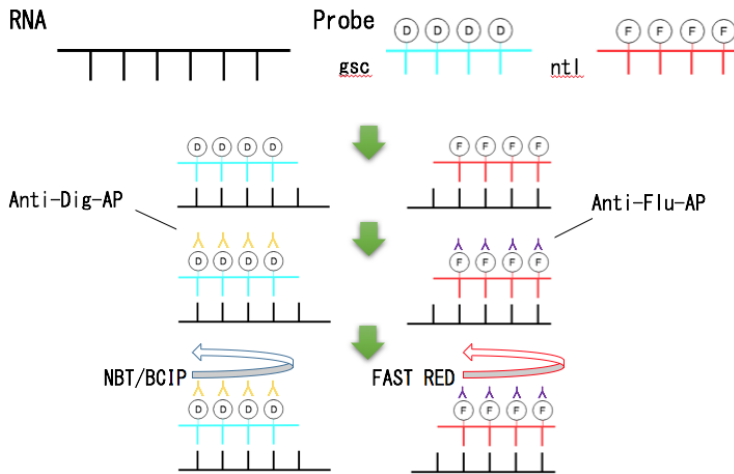


図18) in situ hybridizationの手順

in situ hybridizationとは調べたい遺伝子の発現領域を可視化できる方法である。手順は図の通りで、まずmRNAとDIGあるいはfluoresceinで標識したProbe RNAをハイブリダイゼーションさせる。次にそのProbeに取り込まれているDIGあるいはfluoresceinを識別できる抗体と反応させ、最後に酵素抗体反応を用いて発色反応を起こし染色する。今回は発色基質にNBT/BCIPとFAST REDを使用した。

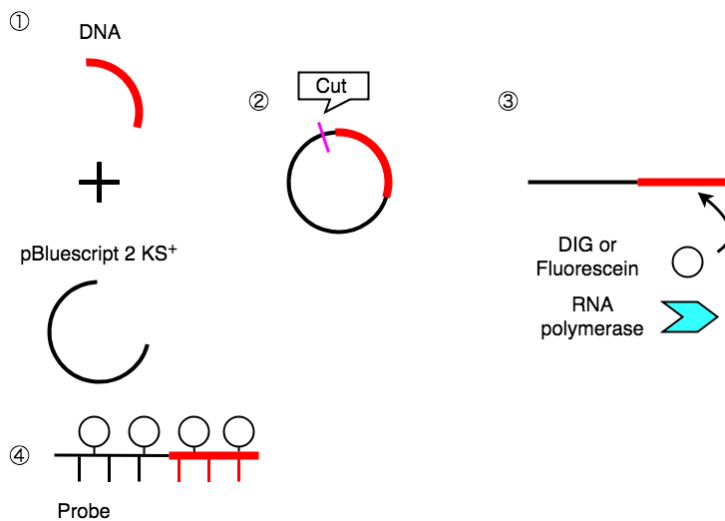


図19) probeの調製

Probeを調製するための鋳型を作るため、まず目的遺伝子のcDNAの一部とpBluescript 2 KS + をつなげプラスミドを作成する。次に、このプラスミドDNAを制限酵素で切断し直鎖状にする。この直鎖状のDNAを鋳型として、DIGあるいはfluoresceinとT3あるいはT7 RNA polymeraseで転写することでprobeを作る。

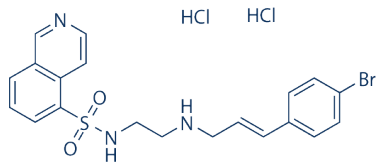


図20) H-89の分子構造

今回使用したH-89はCaymanのものを使用した。粉末のものを60 μ MになるようにDMSOで溶かした。

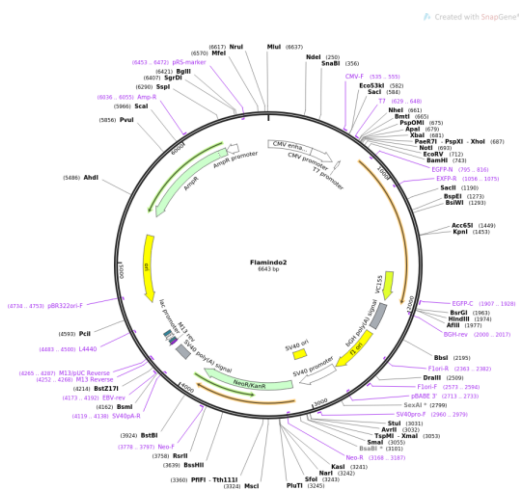


図21) Flamindo2の配列 (addgene参照)

PKI-EGFP

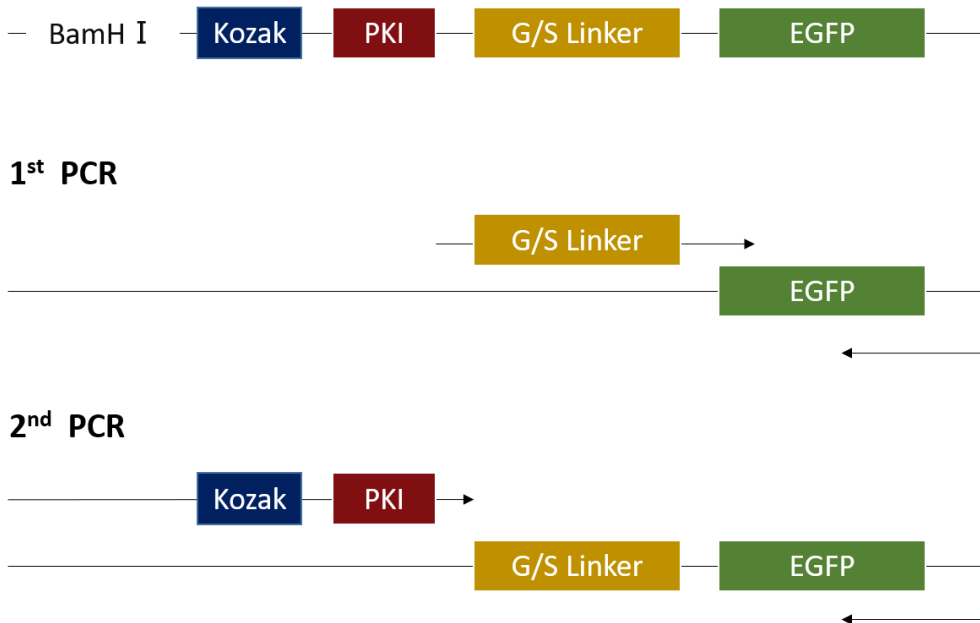


図22) PKI-EGFP融合タンパク質をコードするDNAの作成方法

今回使用したPKIはEGFPを共発現させることでPKIがインジェクションされているかを確認した。作成方法はまず、1st PCRにEGFPをテンプレートとし、フォワードプライマーにG/S Linkerを、リバースプライマーにEGFPの終止コドンから約20bpを使用した。2nd PCRに1st PCRの生成物をテンプレートとし、フォワードプライマーにKozak配列とPKIを、リバースプライマーにEGFPの終止コドンから約20bpを使用した。このように2回のPCRによって目的の配列を作成した。

GGG-BamHI-Kozak配列-PKI-XhoI-Gly/Ser rich linker (20bp) :

```
gggggatccaccATGACCGATGTGGAGACAACGTACGCAGACTTCATCGCTAGCGGAAGGACTGGCAGAC  
GCAACGCCATTACGACGGCTCGAGCGGTGGTGGCGG
```

図23) PKIの配列

7. 参考文献

Blader P. and Stähle U. 1998. Ethanol Impairs Migration of the Prechordal Plate in the Zebrafish Embryo. DEVELOPMENTAL BIOLOGY 201, 185-201.

Hammerschmidt M, Bitgood M J, McMahon AP. 1996. Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo,

Genes Dev

. 10(6), 647-58.

Loucks EJ. and Schwend T. and Ahlgren SC. 2007. Molecular changes associated with teratogen-induced cyclopia. Birth Defect Res (Part A) 79, 642-651.

Masazumi T, and Heisenberg, CP. 2012. Convergent extension: using collective cell migration and cell intercalation to shape embryos, *Development* 139, 3897-3904

Murray, AJ. 2008. Pharmacological PKA Inhibition: All May Not Be What It Seems. *Sci. Signal.* 1, re4

Odaka H, Arai S, Inoue T, Kitaguchi T. 2012. Genetically-Encoded Yellow Fluorescent cAMP Indicator with an Expanded Dynamic Range for Dual-Color Imaging. *PLoS One*,9: e100252. pmid:24959857

Sapio L. , Gallo M. , Illiano M. , Chiosi E. , Naviglio D. , Spina A. and Naviglio S. 2017. The natural cAMP elevating compound forskolin in cancer therapy: Is it time? *J. Cell. Physiol.* 232, 922-927.

Tada M. and Heisenberg C.P. 2012. Convergent extension: using collective cell migration and cell intercalation to shape embryos. DEVELOPMENT 139,3897-3904.

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり多大なるご指導とご鞭撻をいただきました蒲池 雄介教授には深く感謝申し上げます。また、アドバイスやご指導をいただいた先輩や採卵やサンプルの提供などサポートをしてくださった修士1、2年の皆様にも同様に感謝申し上げます。