

博士論文

ヒドラの足部形成活性化ペプチド、Hym-323 の機能解析

平成 11 年度

総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻

服藤 尚恵

## 目次

要旨	1
I 章 序論	4
II 章 材料と方法	10
1. 動物と飼育方法	10
2. ペプチドの化学合成	11
3. 飼育水中の Hym-323 の残存量の定量	11
4. バイオアッセイ	12
4-1. 再生実験	12
4-2. 側方移植	14
4-3. BrdUを用いた細胞の標識	15
5. マセレーション	16
6. BrdU 標識した細胞の検出	16
7. 外胚葉上皮と内胚葉上皮の分離	17
8. RNA の調整	18
9. 遺伝子の単離	18
10. 塩基配列の決定	20
11. ノーザンハイブリダイゼーション	20
12. サザンハイブリダイゼーション	21
13. <i>hym-323</i> 遺伝子を鋳型としたプローブの作成	22
14. Whole mount <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	23
15. Differential Display (DD)-PCR 法	24
III 章 結果	28
1. Hym-323 ペプチドの飼育液中における安定性	28
2. Hym-323 の機能解析	29
3. Hym-323 は、どの細胞に働きかけているのか (上皮ヒドラを用いた足部再生の実験)	33

4. Hym-323 の形態形成能への影響 (側方移植法) - - - - -	34
5. Hym-323 をコードする 遺伝子の単離と解析 - - - - -	35
6. <i>hym-323</i> 遺伝子の発現解析 - - - - -	37
7. Hym-323 処理により発現様式に変化がみられる 遺伝子の探索と解析 - - - - -	38
 IV 章 考察 - - - - -	 39
1. Hym-323 ペプチドの安定性 - - - - -	40
2. Hym-323 の機能と発現解析 - - - - -	41
2-1. 機能解析について - - - - -	41
2-2. Hym-323 前駆体タンパク質の一次構造 - - - - -	43
2-3. Hym-323 の機能と足部形成 - - - - -	44
3. 足部形成因子 - - - - -	45
4. ペプチド性分子と再生・パターン形成 - - - - -	46
 V 章 謝辞 - - - - -	 48
 VI 章 引用文献 - - - - -	 49
 VII 章 図と表 - - - - -	 55

## 要旨

腔腸動物の一種、淡水産チクビヒドラ (*Hydra magnipapillata*) の体は、二層の上皮組織が細長い袋状となった、その一端に頭、他端に足があるという単純な形態をしている。その体制は放射相称で頭-足 (上-下) の一次元軸である。ヒドラは、強く正確な再生能力を持つ。例えば、頭と足を切り除いても、元の頭-足軸に従って、必ず頭があった側からは頭を、足があった側からは足を、数日で再生する。この現象は、ヒドラの体に極性があることを示している。また、その再生体は、サイズは小さくなったものの形態的な違いはない。このヒドラにおける極性に関して、過去に多くの組織移植実験が行われた。そして、それらの結果から、ヒドラの体には頭と足からそれぞれ体軸に沿って勾配をなす形成能と抑制能とがあり、これらの勾配によって極性が作られているという位置情報モデルが提唱された。しかし、この勾配や極性の実体となる因子や分子機構については、近年、候補分子の単離や解析などが進み始めてはいるが、未だほとんど分かっていない。そこで本研究では、ヒドラにおける極性とパターン形成の機構を分子レベルで解明することを目的に、現在我々の研究室で行われているペプチド性情報分子の大規模スクリーニングの過程で単離されたペプチドの中から、形態形成に影響を与える分子を選び出し、その機能解析を行うことにした。実験に用いた Hym-323 は、アミノ酸 16 残基からなる新規ペプチド (KWVQGKPTGEVKQIKF) で、その配列はヒドラの形態形成因子として同定された神経ペプチド head activator と C 末側のアミノ酸配列が 50% 一致していた。また、スクリーニングの過程で行っている活性検定、即ちペプチドがヒドラの遺伝子発現に影響を与えるかどうかを Differential display-PCR 法を用いて検定する実験の結果は、ポジティブであった。よって、Hym-323 は情報分子であると考えた。

初めに、Hym-323 のペプチドの配列中に安定化に関与するような配列や、修飾され

たアミノ酸が見られなかったことから、飼育水中における安定性について調べた。その結果、安定性は比較的low、特に光に弱いことが分かった。次にこの点を考慮して、Hym-323 の機能解析を行った。Hym-323 の C 末側が、頭部再生促進や細胞増殖、神経分化促進活性を持つ head activator と相同性が高かったことから、まず頭部再生と細胞増殖、分化への影響について調べた。その結果、頭部再生や、上皮細胞や間細胞の増殖、神経細胞や刺細胞の分化などへの影響は検出できなかった。次に、Hym-323 の足部再生への作用を、2 種類の足部特異的マーカー、足部特異的ペルオキシダーゼ活性と、ヒドラの足盤細胞から分泌される粘性物質を特異的に認識するモノクローナル抗体 AE03 とを用いて異なった方法によって調べた。その結果、どちらの実験においてもHym-323 処理により、未処理の対照群と比べて有意な足部再生促進が見られた。また、ペルオキシダーゼ活性を用いて Hym-323 の濃度依存的な作用を調べたところ、 $10^{-9}\text{M}$  から  $10^{-6}\text{M}$  の範囲において、濃度依存的な活性の上昇が見られた。

ヒドラの形態形成における主要な役割は、上皮組織が担っているが、一部、間細胞系譜の細胞も関与していることが示唆されている。そこで、まず Hym-323 の足部再生の促進効果が、直接上皮細胞に働きかけた結果なのかどうかについて調べた。実験には、間細胞系譜の細胞を持たない上皮組織のみからなるヒドラ(上皮ヒドラ)を用いた。その結果、上皮ヒドラを用いた場合でも、正常ヒドラを用いた場合と同等な再生促進活性がみられた。よって、Hym-323 は直接上皮に作用していると考えた。しかし、間細胞を介する活性があるかどうかについては、今のところ分かっていない。

Hym-323 は上皮組織に働きかけて足部再生を促進していることから、ヒドラの体軸に沿った足部形成能の勾配に影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで、側方移植法を用いて調べることにした。Hym-323 処理個体から組織片を切り出し、未処理の個体の同じ位置へ移植した。その結果、ペプチド処理した移植片は、未処理の組織片と比べて、有意に異所的な足部形成の誘導率を上昇させた。従って、足部形成能の

勾配は Hym-323 処理によって高められ、そのため側方移植実験では、足部形成の誘導がみられたと考えられた。これまで行った一連の組織学的手法による機能解析の結果から、Hym-323 は直接上皮に作用し、細胞の持つ足部形成能を引き上げ、足部形成や再生の促進を誘導することが示唆された。

細胞内における Hym-323 の分布パターンやその作用経路について調べるために、まず *hym-323* 遺伝子の単離を行った。縮重プライマーを用いた PCR と nested PCR、それとライブラリーのスクリーニングにより、Hym-323 ペプチド前駆体タンパク質をコードするほぼ全長の *hym-323* cDNA を単離した。予想アミノ酸配列中には、C 末側の末端に Hym-323 が 1 コピーコードされていただけで、類似の配列や他の既知のペプチド配列などはみられなかった。また N 末側にシグナル配列らしき領域もみられなかった。次に、*hym-323* mRNA の空間的発現を、whole mount *in situ* hybridization 法とノーザンブロット解析を用いて調べた。その結果、体の両端の構造（触手や口丘の外胚葉組織と足盤）を除く全体で、かつ内外二層の上皮組織で一様に発現していることが分かった。このことから、Hym-323 は上皮細胞で常に合成されている、上皮性ペプチド (epitheliopeptide) であることが分かった。

以上の研究から、Hym-323 は上皮細胞で合成され、直接上皮に働きかけ足部形成の調節を行う形態形成因子である可能性が示唆された。

## I章 序論

多細胞動物における初期発生時の形づくりは、初めに前後軸や背腹軸などの極性が定まり、その情報の下、個々の細胞が、全体の中における自分の相対的な位置を認識し、増殖・移動・分化することで進んでいく。例えば、カエルやウニなどの卵では、動物極-植物極という卵軸が、受精後開始される形態形成に必要な軸の形成に重要な役割を果たしており、この極性に従って細胞の位置的配置は定まり、形が作られる。このような一連の現象を Wolpert (1969, 1971) は、位置情報の概念によって説明した。その概念とは、次の通りである。体内には様々な極性があり、それらは拡散性の物質による濃度勾配や酵素活性のような代謝活性の勾配によって作られている。そして、ある組織の一端から他端に向かう勾配の中で細胞は、特定の位置における勾配の価（位置価）を位置情報として受け取り、その場所に応じた挙動を取る。その結果、全体で調和ある形態が作りあげられる。

それでは、多細胞生物のパターン形成において重要な役割を担っているこれら極性は、どのような因子、または機構によって作られ、働いているのだろうか。初期発生において、極性の確立は形態形成を進めていく上で重要な過程である。そのため、これまで数多くの研究が行われてきた。その結果、例えばハエ胚の頭尾軸形成には bicoid (Driever and Nusslein-Volhard, 1998a, 1998b) が、背腹軸には dorsal (Roth et al., 1989) が、成虫原基では前後軸形成に Decapentaplegic (Dpp)(Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996; Capdevila and Belmonte, 1999; Podes and Ferguson, 1999) が、基部頂部形成にはWingless (Cadigan et al., 1998; Capdevila and Belmonte, 1999) が、またニワトリの肢芽の前後軸には Sonic hedgehog (Shh)(López-Martínez et al., 1995) などが関与することが分かってきた。これらの因子は、分泌性タンパク質であったり、多核性胞胚の時期に存在することにより、組織または細胞の中で勾配を作っている。その結果作られた濃度の違いが位置情

報となり、異なった遺伝子の発現調節が起こり、極性に沿った体の区分けが進むのである。これらの現象は、Wolpert (1969, 1971) が提唱した理論とよく一致している。また、軸の形成機構に関与している Dpp (TGF  $\beta$  family) や Wingless (wnt)、Shh (hh) などの因子とその機能は、生物界の広い範囲で保存されている (Capdevila and Belmonte, 1999)。

再生における極性やパターン形成の機構についても、初期発生と同様に位置情報理論によって合理的に説明することができる。そして、発生生物学や再生医学などの方面から、有尾両生類のイモリをはじめプラナリアやヒドラなど様々な生物を用いて、数多くの研究が行われてきた。しかし、その分子的なメカニズムについては、ようやく初期発生の過程で働いている遺伝子が、再生の過程においても関与していることが示唆されただけで、未だほとんど分かっていない。

腔腸動物の淡水産クビヒドラ *Hydra magnipapillata* は、非常に単純な体制をしている (図 1)。ヒドラの体は、それぞれ一層の外側にある外胚葉上皮 (ectodermal epithelial layer) と内側にある内胚葉上皮 (endodermal epithelial layer) からなる筒状をしており、その一端が頭部 (head)、他端が足部 (foot) となっている。そして頭部には、餌を捕獲し体内へ取り込むための触手 (tentacle) と口丘 (hypostome) があり、足部には基質に付着するための粘性物質を分泌する足盤 (basal disk) がある。また二層の上皮組織の間には中膠 (mesogleia) と呼ばれる細胞外基質からなる薄い層があり、形態の維持に関わっている。上皮細胞の隙間には、間細胞 (interstitial cell) と呼ばれる上皮細胞とは独立した系列の細胞が存在しており、これらは間幹細胞 (interstitial stem cell) とその派生細胞である神経細胞 (感覚神経や神経節細胞; nerve cell) ・刺細胞 (腔腸動物特有の刺を持つ細胞で、ヒドラには 4 種類存在する; nematocyte) ・腺細胞 (消化酵素を分泌する細胞; gland cell) ・生殖細胞 (germ cell, germ-line stem cell) からなる。ヒドラは、有性生殖も行うが、栄養状態の良い時は出芽により無性生殖で増殖する。出芽は、親の体の上から約2/3の領域(出芽帯; budding zone) で起こる。またヒドラでは、成体においても細胞分裂が、触手と足盤を除



く体全体で行われており、その結果、上皮細胞は常に頭部下域を中心にして両端に向かって移動(displacement)している。そして体の末端では、細胞が捨てられている(Campbell, 1967; David and Campbell, 1972; Bode, 1992)。この上皮細胞の移動とともに、分化した間細胞(神経細胞や刺細胞など)も移動し、末端で同様に捨てられていく。このため、ヒドラでは常にパターン形成を行い、形態の維持をしていると考えられている(Otto and Campbell, 1977; Bode, 1992)。

また、ヒドラの特徴として、強く正確な再生能力を挙げることができる。ヒドラから頭部と足部を切除すると、数日で残った胴体から元通りのヒドラが再生する。再生したヒドラは、サイズが小さくなったこと以外は切る前のヒドラと全く同じ形態をしており、区別することはできない。再生は、常に頭-足(上-下)軸という極性に従って行われる。そのため再生片では、必ず元あった頭部に近い側に頭部が、足部に近い側に足部が形成される。また、ヒドラにおける再生は、両生類や昆虫の成虫原基などでみられる傷面やその付近の細胞が集結・増殖・分化することにより失われた部分を補充する付加再生とは異なり、成体内の他の細胞の再配置・再分化によって補充する形態調節といわれている(Bosch 1998)。

このようなヒドラの頭-足軸に沿った極性は、側方移植実験により形態形成能の勾配としても検出されている(図 2)(Bode and Bode, 1984)。ヒドラの触手の直下にある組織(ホスト; ポジション a)を他のヒドラの体腔部分(ドナー; ポジション c)に移植する。すると、移植片と移植先との位置の違いから、そこに新たな頭-足軸が形成される。その結果、新たな頭部が誘導され、それは外に向かって伸長する(図 2A)。逆に、ホストの体腔下部(ポジション c)の組織をドナーの体腔上部(ポジション a)に移植すると、今度は足-頭軸が形成され、足盤が誘導されて外へと伸長する(図 2B)。このような移植実験を、ヒドラの頭-足軸に沿って順に細かく行っていくと、頭から足へと勾配をなす頭部形成能と抑制能を、また足部から頭部にかけては、足部形成能と抑制能をみることが

できる(図2)。これらの知見は、WebsterとWolpert (1966) や MacWilliams (1970) らが提唱したように、ヒドラの中には位置情報理論と一致する形態形成能の勾配があり、それが定常状態や再生における形態形成に働いていることを示唆している。

ヒドラにおけるこれらのパターン形成は、主に上皮組織がその役割を担っている(Sugiyama and Fujisawa, 1979)。例えば、ヒドラから間細胞を全て取り除き、上皮組織のみからなる「上皮ヒドラ」を作成する(Campbell, 1976)。この上皮ヒドラにおける形態形成や再生能力などは、正常ヒドラと同じで違いはみられない。また、この上皮ヒドラに再び間細胞を移植する手法があり、これを用いて様々な株由来の上皮組織と間細胞とを組み合わせた「キメラヒドラ」を作ることができる(Marcum and Campbell, 1978b; Sugiyama and Fujisawa, 1978; Wanek and Campbell, 1982)。例えば、正常型 105 株と通常より体長が長い突然変異系統 maxi 型と短い mini 型のヒドラを用いて、上皮組織が 105 株由来で間細胞が maxi 型由来、または mini 型由来、あるいはその逆の上皮組織が maxi 型由来、または mini 型由来で間細胞が 105 株由来のキメラヒドラが作成できる。そして、これらキメラヒドラを観察すると、その形態は全て上皮組織の株型と同じであった(Marcum and Campbell, 1978b)。このことからキメラヒドラの形態形成は、上皮組織の情報に従っていると考えられる。しかし、その後、間細胞の関与を示唆する結果が報告された。それは次の通りである。頭部再生不良型変異体 reg-16 株から間細胞を取り除き reg-16 上皮ヒドラを作成すると、その再生能力は上昇し正常ヒドラとほぼ同じ程度に回復した。この結果は、間細胞が再生に何らかの関与をしていることを意味している(Sugiyama and Wanek, 1993)。よって現在では、ヒドラの形態形成において、上皮細胞が主要な役割を担ってはいるものの、間細胞も部分的に関与していると考えられている。

これまで述べてきたようなヒドラが持つ、シンプルな体制や再生能力などにおける特徴は、極性やパターン形成、再生能力などの研究を行うのに適しており、有力な実

験材料であることを示している。

ヒドラにおける極性の形成機構やその実体についても、他の生物と同様に多くの研究が行われてきた。その結果、これまでに頭部形成促進活性や出芽促進活性、細胞増殖活性を持つ head activator (HA; Schaller, 1973; Schaller and Bodenmüller, 1981; Javois and Tombe, 1991; Schaller et al., 1996; Hobmayer et al., 1997) や、足部形成促進活性を持つ pedin と pedibin/Hym-346 (Hoffmeister, 1996; Takahashi et al., 1997; Grens et al., 1999) など、形態形成に影響を及ぼす因子が単離された。これらは、全てアミノ酸 25 残基未満のペプチド分子である (Schaller and Bodenmüller, 1981; Hoffmeister, 1996; Takahashi et al., 1997)。また、構造は未決定だが頭部形成抑制因子と足部形成抑制因子も単離されている (Schaller et al., 1979)。

位置情報理論における拡散性や、これまでに腔腸動物から単離された因子などの知見から、生物の極性やパターン形成にペプチド分子が関与している可能性が考えられた。実際に、ペプチド性低分子の生体内における働きは、神経ペプチドのサブスタンスP (Kishi et al., 1996)、ペプチドホルモンの甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (Burgus et al., 1970; Nair et al., 1970)、バソプレッシン (Naro et al., 1997) や副甲状腺ホルモン関連ペプチド (Weir et al., 1996) のように、生体機能の調節だけではなく細胞の分化・増殖にも及んでいる。また、カエルでは、甲状腺ホルモンによって変態が促進される (Gudernatsch, 1912)。このようなペプチド分子の作用は、脊椎動物に限らず無脊椎動物においてもみられる。例えば、ウニの外腸胚形成ペプチド (Suyemitsu, 1991) やカイウミヒドラの LW amide による変態促進などである (Leitz et al., 1994)。我々の研究室では、ヒドラのペプチド性シグナル分子を網羅的に解析することを目的に、ペプチド分子の大規模スクリーニングを行っている (Takahashi et al., 1997)。その結果、これまでにイソギンチャクから単離されていたカイウミヒドラの変態を促進する LW amides をはじめ、形態形成活性を示す pedin や pedibin/Hym-346、神経細胞の分化を促進する新規神経ペ

チド Hym-355 や抑制する PW family などが単離・同定された (Takahashi et al., 1997; Takahashi et al., 2000)。この結果は、大規模スクリーニングがペプチド性シグナル分子を正しく単離していること、また新規の因子を得ることができる可能性がある手法であることを意味している。

本研究では、ヒドラにおける極性の形成と維持機構を分子レベルで解明することを目的に、極性または形態形成に関与する因子を大規模スクリーニングの過程で単離されたペプチドの中から探し出し、その機能解析を行った。研究に用いた Hym-323 は、アミノ酸 16 残基からなる新規ペプチド分子で、その配列は HA と C 末側のアミノ酸配列が 50% 一致していた (Takahashi et al., 1997)。また大規模スクリーニングでは、単離されたペプチドが情報分子かどうかの判定基準を、ペプチド処理により遺伝子の発現パターンが変化することとしており、その検出には Differential display(DD)-PCR 法を用いている。Hym-323 はこの結果がポジティブであった。そこで、様々な機能解析を行ったところ、Hym-323 処理によって足部形成が活性化されることを見いだした。また、Hym-323 をコードする遺伝子の単離を行い、空間的発現についても解析した。その結果、*hym-323* mRNA は、ヒドラの両端の構造、即ち触手や口丘と足盤、を除く体全体の上皮で一様に発現していることが分かった。これらをもとに、最後に Hym-323 の作用経路について考察する。

## II 章 材料と方法

### 1. 動物と飼育方法

実験には、特記しない限り淡水産の腔腸動物である日本産チクビヒドラ (*Hydra magnipapillata*) の正常型、105 系統 (Sugiyama and Fujisawa, 1977) を用いた。飼育は、 $18 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12 時間明・12 時間暗に日周調節した恒温室で行った。飼育水は、mM solution [1mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1mM KCl, 0.1mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM Tris-Cl, pH 7.6] (Sugiyama and Fujisawa, 1977) を使用した。ヒドラの個体数によって 500ml、200ml、50ml のガラスビーカーまたは面積 900cm<sup>2</sup> の平らなスチロール製トレイを使い分けた。餌は、毎日または週に 3 回のペースで、新しく孵化したブラインシュリンプ幼生を与えた。飼育水の交換は、給餌の有無に関わらず毎日行った。また、餌を与えた場合は、給餌後約 4 時間後に行った。

st.1 のヒドラ (下記参照) の採集は、給餌後の飼育水交換時に行った。

ヒドラは、親子体から離れた後の成長と出芽の状態に従って 3 段階に分けた。その区分は、以下の通りである。st.1 : 24 時間以内に親個体から離れた若い個体。st.2 出芽を始めたばかりの若い個体。st.3 : 盛んに出芽を行っており、出芽帯には新しいポリプが 2 個体以上いるもの。

一部の実験には、上記 105 系統由来の上皮ヒドラを用いた。上皮ヒドラは、正常系統のヒドラをコルヒチンで処理することで作成できる (Campbell, 1976)。これは、ヒドラの間幹細胞の増殖速度が、他の細胞と比べて速いため、コルヒチン処理により選択的に死滅するからである。間幹細胞の消失により、それから分化する神経細胞、刺細胞、生殖細胞も全て無くなる。その結果、上皮細胞と腺細胞 (間細胞系譜の細胞だが、自己増殖能を持っている) のみからなる「上皮ヒドラ」ができる。

上皮ヒドラは、自力捕食能力がないため、餌は強制給餌法 (forced-feeding) により毎日与えた (Marcum & Campbell, 1978a; Nishimiya-Fujisawa and Sugiyama, 1993)。また飼育水には、抗生物質のリファンピシン (Gruppo Lepetit) とカナマイシン (明治製薬) とを最終濃度 50mg/l になるように加えたものを使用した。それ以外の飼育条件は、正常型 105 系統と同じである。

## 2. ペプチドの化学合成

ペプチド合成は、島津製作所 PSSM-8 型合成機を用いて、

Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) 合成法により行った。脱保護はトリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid; TFA) を用いて行った。合成したペプチドは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製し凍結乾燥させた後、-25℃のフリーザーで保存した。

また全ての実験には、必要に応じてミリQ 精製水 (MILLIPORE) に溶かした合成ペプチドを使用した。

## 3. 飼育水中の Hym-323 の残存量の定量

次に挙げた 3 つの条件について Hym-323 の飼育水中の残存量を調べた：1) ヒドラ飼育室の照明に使用されている、天井設置型の白色蛍光灯下 (通常光下)、2) 遮光下、3) 遮光下で、かつヒドラ (st.3 のヒドラ 10-20 匹/10ml) 存在下。10<sup>-6</sup>M に飼育水で希釈した合成ペプチド水溶液 10ml を直径 6cm の浅型シャーレ (Falcon) に入れたものを、各条件・各処理時間 (結果の項参照) 毎に 2 枚ずつ作製した。終了後、溶液中の残存量は下記の方法で定量した。水溶液 20ml 全てを回収し、TFA を最終濃度 0.1% になるように加え、Sep-Pak Classic C18 (逆相) Cartridge (MILLIPORE) により脱塩した。溶出液は、濃縮遠心機 (Tommy) により液量が 500 μl 以下になるまで濃縮し、逆相カラム (TSK-GEL ODS-

80TS; Tosoh) を用いた HPLC にかけて、Hym-323 を分離した。残存 Hym-323 量は、波長 220 nm での吸光度を測定し定量した。

#### 4. バイオアッセイ

バイオアッセイは、特記しない限り全て飼育条件と同じ温度・飼育水で行った。ヒドラへのペプチド処理は、以下のように行った。直径 6cm の浅型シャーレに飼育水 10ml を入れ、 $10^{-3}$ M の合成ペプチド  $10\mu\text{l}$  加え (最終濃度  $10^{-6}$ M)、その中にヒドラを 10-20 匹入れた。溶液の交換は、24時間以内に行った (詳細は、各実験の説明の項目を参照のこと)。対照としては、 $10\mu\text{l}$  のミリQ 精製水を飼育水 10ml に加えたものを用いた。また、アッセイは全て遮光下で行った。

##### 4-1. 再生実験

###### (1) 頭部再生実験 (図 3-A 参照)

st.1 の段階で回収したヒドラを、24 時間絶食させた後、体軸と直交するように上下 2 等分に切り分けた。下側半分を、Hym-323 存在下、あるいは非存在下で 100 時間再生させ、その間、実体顕微鏡を用いて形態変化を観察した。ペプチド処理は、24 時間毎に新たに行った。再生頭部の指標には、触手の膨らみが 2 個以上形成された場合と、再生した触手の数とを用いた。また、1 回の実験には st.1 ヒドラを 30 匹用い、これを 3 回繰り返して行った。

###### (2) 足部再生実験

再生足部の検出には、2 種類の足部特異的マーカー、足部特異的ペルオキシダーゼ活性 (Hoffmeister and Schaller, 1985) と、足盤の細胞が分泌する粘性物質を特異的に認識す

るモノクローナル抗体 AE03 (MAb AE03; Amano et al., 1997; MAb AE03は小早川博士のご厚意によりいただいた)を用いた。ヒドラの足盤には、周囲の基質に付着するために粘性物質を分泌する細胞があり、この細胞は、同時に強いペルオキシダーゼの活性を持っている (Burnett, 1966; Lentz, 1966; Davis, 1973; Hoffmeister and Schaller, 1985)。また、ペルオキシダーゼの酵素活性は、足部の再生過程において、足部の形成にともなって上昇する (Schmidt and Schaller, 1976; Hoffmeister and Schaller, 1985)。よって、足部特異的ペルオキシダーゼの酵素活性と、粘性物質を認識する MAb AE03 は、足部の再生を調べるのに都合の良いマーカーである。

i) 足部特異的ペルオキシダーゼ活性をマーカーに用いた実験 (図 5-A 参照) : st.1 の段階で回収したヒドラを 24 時間絶食させた後、体軸と直交するように上下 2 等分に切り分けた。上半分を回収し、Hym-323 存在下、あるいは非存在下で一定時間再生させた。ペプチド処理は、24 時間毎に新しいペプチドを含む飼育水と交換し行った。また、再生中、餌は与えなかった。実験は、足部再生実験、濃度依存的な効果を調べた実験とともに、各条件毎にヒドラの上半分を 20 個体分使用し、4 回ずつ繰り返して行った。足部特異的ペルオキシダーゼの酵素活性の発色・測定は、Hoffmeister and Schaller (1985) の方法に従って行った。24 穴プレートに再生中の個体を 20 匹ずつ回収し、飼育水を除いた後、発色用溶液 [0.1M citrate buffer (pH4.5), 0.1% 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-sulfonic acid)diammonium salt (ABTS; Sigma), 0.003% 過酸化水素水] を 1 ml ずつ加え、暗所で 25°C 30 分間発色させた。その後、発色停止液 40mM アジ化ナトリウム (NaN<sub>3</sub>) を 10 μl ずつ加えた。基質に用いた ABTS は、酵素反応により水溶性の着色物を生成するので、発色用溶液の波長 415nm における吸光度を測定した (Ubest-30 型分光光度計; 日本分光)。



ii) MAb AE03 をマーカーに用いた実験 (図 6-A 参照) : st.1 ヒドラを回収し、48 時間飼育した後 (そのうち最後の 24 時間は絶食させた)、その中から st.2 のヒドラを集め、Hym-323 処理を 24 時間行った。その後、足盤から出芽域の間の中央部分 3 分の 1 の組織片を切り出し、飼育水を交換し、引き続き Hym-323 処理を行い 15°C で 40 時間再生させた。処理用飼育水の交換は 24 時間毎に行った。固定及び抗体染色は、David et al. (1991) の方法に従って行った。再生片は、2% ウレタンで数分間処理し弛緩させた後、Lavdowsky 固定液 [エタノール:ホルマリン:酢酸:濾過水=50:10:4:40] で室温 30 分間または 4°C で一晩固定した。これ以降の操作は、全て室温で行った。PBT [150mM NaCl, 10mM リン酸緩衝液 (pH7.2), 0.25% TritonX-100] で 10 分間、液を交換し更に 15 分間洗浄した。ブロッキング溶液 [PBS (150mM NaCl, 10mM リン酸緩衝液 (pH7.2)), 5% bovine serum albumin (BSA), 0.25% TritonX-100, 0.1% NaN<sub>3</sub>] で 30 分間処理した後、MAb AE03 と 1 時間インキュベートし、PBT で 15 分間 2 回洗った。これ以降の作業は遮光して行った。抗体希釈液 [PBS, 0.55% Tween 20, 0.1% NaN<sub>3</sub>] で 1/100 に希釈した FITC 標識抗マウス抗体 (Amersham) と 1 時間反応させた。PBS で 30 分間 2 回洗った後、バッファー希釈グリセリン [グリセリン:PBS=3:1] でマウントし、蛍光顕微鏡 (Nicon Microphoto -FX 顕微鏡) で B2 フィルターブロックを用いて観察した。

#### 4-2. 側方移植

側方移植法は、Sugiyama (1982) と Grens et al. (1999) の方法に従って行った (図 8-A)。移植する組織を供給するヒドラをドナー、移植を受けるヒドラをホストと呼ぶ。まずヒドラをペプチドで 3 日間、5 日間、6 日間、または 7 日間前処理した。その間、餌は毎日与え、ペプチド処理は、給餌後 1 時間目と、6 時間目の 2 回行った。その後、前処理を行った個体の中から st.2 のポリプを選びドナーとして用いた。移植実験は、以下

のように行った。ドナーのポジション 2 (図 8-A 参照) の組織をドーナツ状に切り出し、更に 3 等分した。そのうちの一片を、切り出した位置と同じ st.2 ホスト(未処理のヒドラ) のポジション 2 に移植した。その後、ペプチド処理は行わず、また餌も与えず 11 日間飼育し、移植片とその周囲の形態とを観察した。全ての個体を生かしたまま観察するために、足部の形成は、移植片の先端が空気の泡を保持するかどうかで判断した。上述したように、ヒドラの足盤の細胞は粘性物質を分泌しており、周囲の基質への付着、あるいは移動のための空気の泡を保持することが出来る。

#### 4-3. BrdUを用いた細胞の標識

Hym-323 処理による細胞増殖と細胞分化への影響を調べるために、DNA 前駆物質チミジンのアナログである 5-ブロモデオキシウリジン (BrdU) を用いた細胞標識を行った。標識は、2mM BrdU を含む飼育水中にヒドラを入れ、更に同液を腔腸内に注入することで行った。1 回の実験には、st.1 ヒドラを 10 匹用い、これを 3 回繰り返した。ペプチド処理は  $10^{-6}$ M で 48 時間行った。この時、ペプチド溶液の交換は、24 時間目に 1 度行った。なお、実験中に餌は与えなかった。

(1) 細胞増殖への影響 (パルス標識、図 4-A 参照) : ヒドラを、ペプチド処理を行った 48 時間のうち、最後の 1 時間、BrdU でパルス標識した。その後、マセレーション法 (David, 1973) を用いてヒドラの体を単細胞に解離すると同時に固定した。その後、抗 BrdU 抗体を用いて標識細胞を検出した。マセレーション法と、抗 BrdU 抗体を用いた染色の方法は、後述する。

(2) 細胞分化への影響 (パルス・チェイス、図 4-B 参照) : ヒドラを、ペプチド処理の 48 時間のうち、初めの 1 時間を BrdU で標識した。その後、飼育水で BrdU を洗い流し、

引き続きペプチド処理を行った。処理終了後の固定・染色は、(1)と同様に行った。

## 5. マセレーション

細胞種、細胞数の定量的測定は、マセレーション法 (David, 1973) を用いて行った。ヒドラを、直径 1cm のプラスチックのサンプルカップ (サンプルテック) に入れ、ヒドラ 1 匹当たり約 40  $\mu$ l の細胞解離液 (マセレーション液)[酢酸:グリセリン:水=1:3:13] を加え、約 20 分間放置した。その後、サンプルカップを穏やかに振とうさせ組織を単細胞に解離し、細胞解離液と等量の 9% ホルマリンを加えて固定した。このうち 50  $\mu$ l をゼラチンコートしたスライドガラス上に 1  $\mu$ l の 1% Tween 20 と共に均一になるよう約 1.5cm<sup>2</sup> に拡げ、一晩自然乾燥させた。

ゼラチンコートしたスライドガラスの作製は、次の通り行った。洗浄し乾燥させたスライドガラスを、99.5% エタノール中で脱脂し風乾した。これを、加熱溶解後冷却した 0.5% ゼラチン (Merck) / 0.005% クロム硫酸カリウム溶液に浸した後、取り出して乾燥した。

## 6. BrdU標識した細胞の検出

マセレーション法によりスライドガラス上にひろげた解離細胞中の、BrdU 標識細胞の検出は、抗 BrdU 抗体 (Becton/Dickinson) と Vectastain ABC Kit (VECTOR)、ALKALINE PHOSPHATASE SUBSTRATE KIT I (VECTOR) を用いて行った。作業は説明書に従い、全て室温で行った。スライドガラスごと細胞を PBS で 5 分間 2 回洗浄した後、3N HCl に 30 分間浸した。PBS で 5 分間、更に 10 分間 2 回洗浄し、次に PBS-0.05% Tween で 15 分間洗浄した。2 滴/5ml PBS に希釈した Yellow-label ブロッキング溶液で 60 分間処理した後、抗体希釈液 PBTween-NaN<sub>3</sub> [PBS (pH7.2), 0.5% BSA, 0.5% Tween20, 0.1%

NaN<sub>3</sub>] で 30 倍に希釈した抗 BrdU 抗体と 30 分間反応させた。PBS で 5 分間、更に 15 分間 2 回洗浄した。1 滴/10ml PBS に希釈した Blue-label ビオチン化抗体で 30 分間処理し、再度 PBS で 5 分間、更に 10 分間 2 回洗浄した。ABC 試薬 [使用 30 分前に Orange-label と Brown-label をそれぞれ 2 滴ずつ 10ml PBS に加えよく混和したもの] で 30 分間処理した後、PBS で 10 分間 2 回洗浄した。発色反応は、ALKALINE PHOSPHATASE SUBSTRATE KIT I の reagent 1、2、3 を各 2 滴ずつ加えた 10ml 0.1M Tris-Cl (pH8.2) に浸し約 10 分間行った。その後、0.1M Tris-Cl (pH8.2) ですすぎ発色反応を停止した。また、観察には位相差顕微鏡 (×400) を用いた。

## 7. 外胚葉上皮と内胚葉上皮の分離

ヒドラの外胚葉上皮と内胚葉上皮の分離は、Bode et al. (1987) の方法に従って行った。下記の 3 種類の溶液を作製し、これらを等量ずつ混合し、pH4.5 (A solution) と pH2.5 (B solution) に調整した。溶液の混合は使用直前に行った。

- (1) 1%プロカイン水溶液 [procaine-HCl (Wako Pure Chemical Industries Ltd)]
- (2) mM solution (Sugiyama and Fujisawa, 1977)
- (3) DM solution (Gierer et al., 1972) [3.6mM KCl, 6mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 6mM クエン酸ナトリウム, 6mM ピルビン酸ナトリウム, 12.5mM TES (N-tris(Hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid), 6mM ブドウ糖, pH6.9]

外・内胚葉の分離には、st.3 ヒドラの頭部直下と出芽域の直上を切断し、シリンダー状の体腔部分のみを用いた。外胚葉組織は以下の方法で回収した。A solution で 4℃ 5 分間、B solution で 4℃ 1 分 30 秒間処理し、4℃ の DM solution へ移した。その後、容器ごと 18℃ へ移した。数分後、外胚葉組織が体軸方向へ収縮しているのが見られるので、ピンセットを用いて単離した。内胚葉組織の回収は、以下の方法で行った。A solution

で 4℃ 5 分間、B solution で 4℃ 6 分間処理し、4℃ の DM solution へ移した。その後、容器ごと 18℃ へ移し、数分後、外胚葉上皮のシート状構造が崩壊しているのが見られるので、これをパスツールピペットでピペッティングして取り除き、内胚葉組織を回収した。

## 8. RNA の調整

全 RNA の調整は基本的には、酸性チオシアン酸グアニジン-フェノール-クロロホルム抽出法 (AGPC法; Chomczynski and Sacchi, 1987) に従って行った。48 時間絶食させた後、できる限り飼育水を取り除いたヒドラに直接 Solution D [5.5M チオシアン酸グアニジン, 25mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0), 0.5% サルコシル, 0.2 M 2-メルカプトエタノール] を加えた。溶解後、15 分の 1 量の 3M 酢酸ナトリウム (pH4) と等量のフェノール、3 分の 1 量のクロロホルム/イソアミルアルコール [クロロホルム:イソアミルアルコール =49:1] を加えてよく攪拌し、氷中に 15 分間置いた。15,000×g で 20 分間 4℃ で遠心後、水層を回収しイソプロパノール沈澱を行った。再度 Solution D に溶解し、イソプロパノール沈澱を行った。沈澱した RNA は、RNase-free 滅菌水に溶解した。

## 9. 遺伝子の単離

Hym-323 コーディング遺伝子の単離は、下記の 3 段階の戦略により行った。

### (1) short PCR

Hym-323 のアミノ酸配列から縮重プライマーをデザインし PCR を行った。縮重プライマーは、ペプチドの両端 (N末端側から 1-6 番目のアミノ酸残基・C末端側から 16-10 番目のアミノ酸残基) に相当する、

5'-AA(G/A)TGGGTNCA(G/A)GGNAA-3'と

5'-AA(T/C)TT(G/A/T)AT(T/C)TG(T/C)TTNAC-3'とを用いた。Nは、4種類のヌクレオチドのいずれかである。PCRの鑄型に用いた1st strand cDNAは、以下の方法で合成した。AGPC法により48時間絶食させたヒドラから抽出した全RNAを鑄型とし、oligo-dTプライマーで、AMV reverse transcriptase (Roche Diagnostics GmbH)を用いて37℃で合成した。PCR反応は、94℃15秒、55℃30秒、68℃30秒を30回繰り返した。PCR産物は、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動により分離した。シグナルのあるなしに関わらずプライマーの真上の部分を切り出し、MERmaid Kit (BIO 101)を用いてDNAを精製し、TA cloning kit (Invitrogen)を用いてクローニングした。クローンの塩基配列を377 DNA Sequencing system (PE Applied Biosystems)を用いて決定し、予想アミノ酸配列がHym-323の配列と一致するものを探した。

(2) nested PCR法を用いた3'領域のcDNA断片の単離。

(1)により確定した塩基配列(アミノ酸配列PTGEに対応)をもとに、3'側単離用のプライマーをデザインした(#1: 5'-TNCA(A/G)GGNAAACCAACAG-3'、#2: 5'-CA(A/G)GGNAAACCAACAGGA-3')。(1)で決定した配列長では、プライマー全長には不足だったため、5'側は縮重したままとした。鑄型にUni-ZAPII (Stratagene)を用いて構築したヒドラ105 cDNAライブラリー(Yum et al., 1998)を用い、nested PCRを行った。1st PCRは#1プライマーとM13 Forward (-40) primerを用い、95℃で1分間処理した後、94℃30秒、56℃30秒、68℃3分を40回繰り返す、その後72℃で5分間伸長反応を行った。2nd PCRは、鑄型として1st PCR産物を1/50に希釈して用いた。プライマーは、#2プライマーとM13 Forward (-40) primerよりクローニングサイトに近いT7 promoterを用い、1st PCRと同じ条件で行った。その後、(1)と同じ方法で、PCR産物をクローニングし塩基配列を決定した。

### (3) ライブラリーのスクリーニング

Hym-323 コーディング遺伝子全長を得るために、(2) のステップにより単離した約 170bp をプローブとして、Uni-ZAPII (Stratagene) を用いて構築したヒドラ 105 cDNA ライブラリー (Yum et al., 1998) のスクリーニングを行った。スクリーニングは、 $4-5 \times 10^5$  クローンのファージに対して行い、 $^{32}\text{P}$  標識 DNA プローブを用いた。

## 10. 塩基配列の決定

DNA Sequencing Kit (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction) (PE Applied Biosystems) を用い、説明書にしたがってサイクルシーケンス反応を行った後、DNA をエタノール沈澱により回収した。DNA 配列は、377 DNA Sequencing system (PE Applied Biosystems) を用いて決定した。

## 11. ノーザンハイブリダイゼーション

ヒドラ全体・頭部・胴体部・足部・外胚葉上皮・内胚葉上皮・上皮ヒドラからそれぞれ AGPC 法により抽出した全 RNA を用いて行った (切り分けた領域や組織については図 10-C 参照)。実験は、基本的には Sambrook et al. (1989) の方法に従った。

1 レーンあたり  $5 \mu\text{g}$  の RNA サンプルを  $3 \mu\text{l}$  の RNase-free 滅菌水に溶かし、ホルムアミド  $5 \mu\text{l}$  と  $20 \times$  ノーザン用バッファー [ $0.8\text{M}$  MOPS-NaOH (pH7.0),  $0.2\text{M}$  酢酸ナトリウム,  $20\text{mM}$  エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)]  $0.5 \mu\text{l}$ 、ホルムアルデヒド液  $1.75 \mu\text{l}$  を加え、これを  $90^\circ\text{C}$  で 2 分間加熱後急冷した。このサンプルに色素溶液 [ $40\%$  ショ糖,  $0.25\%$  プロモフェノールブルー (BPB)]  $2 \mu\text{l}$  と  $1\text{mg/ml}$  エチジウムブロマイド (EtBr)  $1 \mu\text{l}$  を加え、ホルムアルデヒド変成ゲルで泳動した。泳動用バッファーは  $20 \times$  ノーザン用バッファーを  $1/20$  に希釈して用いた。泳動終了後、ゲルは滅菌水で 10 分間 3 回洗った。ナイロ

ンメンブレン (Hybond-N+; Amersham) への転写は、0.05N 水酸化ナトリウム (NaOH) を用いて 2-3 時間行った。メンブレンは、2×SSC [0.3M NaCl, 30mM クエン酸三ナトリウム (pH7.0)] で数分間すすいだ後、UV stratalinker1800 (STRATAGENE) を用いて UV クロスリンクを行った。プレハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション溶液 [50%ホルムアミド,

5×SSPE, 5×Denhardt's reagent, 0.1% SDS, 5 μg/ml hering sperm DNA] を用いて 42°C で 2 時間以上行った。ハイブリダイゼーションは、熱変性させた <sup>32</sup>P 標識 DNA プローブを新しいハイブリダイゼーション溶液に加え、42°C で 16 時間以上行った。シグナルの検出は、イメージングプレート (Fuji film) に感光し、BAS-2000 (Fuji film) で行った。

## 12. サザンハイブリダイゼーション

実験は、基本的には Sambrook et al. (1989) の方法に従った。

(1) ゲノム DNA の抽出：ゲノム DNA の抽出には、5 日間絶食させたヒドラを用いた。できる限り飼育水を取り除いたヒドラに、直接 DNA extraction buffer [150mM NaCl, 10mM Tris-Cl (pH7.5), 10mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1mg/ml Proteinase K] を体積の約 10 倍加え、室温で 10 分間緩やかに振とうした。その後、55°C で 3 時間インキュベートし、更に 37°C で一晩処理した。次に、等量のフェノールを加え室温で 10 分間緩やかに振とうした後、2,000×g で室温 10 分間遠心し、上層を回収した。上層の水溶液は、再度フェノール抽出と遠心とを行い上層を回収した。回収した上層の溶液に、等量のイソプロパノールを加え DNA 沈澱を行った。沈澱した DNA は、数 ml の TE [10mM Tris-Cl (pH7.5), 1mM EDTA (pH8.0)] に、4°C で一晩かけて溶解した。

(2) 電気泳動：初めに、ゲノム DNA の制限酵素による切断を行った。制限酵素は、



*Bam*HI、*Eco*RI と *Hind*III の 3 種類を用いて、37°C で一晩行い、その後エタノール沈澱により濃縮した。泳動は、1% アガロースゲル、1×TAE バッファー [0.04M Tris, 0.04M 酢酸, 1mM EDTA (pH8.0)] を用い、BPBがゲルの約 3 分の 2 に達するまで行った。また、1 レーンあたり、ゲノム DNA 3  $\mu$ g 用いた。その後、EtBr を用いてゲルを染色し、泳動の様子を確認した。

(3) メンブレンへの転写：泳動が終了したゲルは、変性溶液 [1.5M NaOH, 0.5M NaCl] に浸し、室温で 30 分間緩やかに振とう処理した。その後、ナイロンメンブレンへの転写は、0.4M NaOH を用いて約 16 時間行った。メンブレンは、2×SSC ですすいだ後、UV stratalinker1800 を用いて、UV クロスリンクを行った。プレハイブリダイゼーション以降の作業は、ノザンプロット解析の時と同様に行った。

### 13. *hym*-323 遺伝子を鋳型としたプローブの作成

<sup>32</sup>P 標識 DNA プローブは、Random Primer DNA Labeling Kit (TaKaRa) を用いて作成した。合成反応は説明書に従った。ライブラリーのスクリーニング用プローブの鋳型には、nested PCR により単離した *hym*-323 cDNA を、またノーザンプロット解析とサザンプロット解析には、ライブラリーのスクリーニングにより単離した *hym*-323 cDNA を用いた。

ディゴキシジェニン (DIG) 標識 RNA プローブは、Roche Diagnostics GmbH 社のプロトコールに従った。鋳型には、*hym*-323 cDNA を組み込んだプラスミド DNA を制限酵素 *Bam*HI または *Xho*I で切り、直鎖状にしたものを用いた。

#### 14. Whole mount *in situ* ハイブリダイゼーション

Grens et al. (1996) の方法に従って行った。48 時間絶食したヒドラを、2% ウレタンで室温1分間処理し弛緩させた後、4% ホルムアルデヒドで 4℃ 一晩固定した。ヒドラを 100% エタノールに移し室温 10 分間静置し、75% エタノール/25% PBT [PBS (0.15M NaCl, 0.08Mリン酸水素二ナトリウム, 0.021Mリン酸二水素ナトリウム), 0.1% Tween 20] で 5 分間、50% エタノール/50% PBT で 5 分間、25% エタノール/75% PBT で 5 分間、最後に PBT で 10 分間 3 回洗浄した。次に、10  $\mu$ g/ml Proteinase K/PBT で室温 12 分間処理した後、速やかに 4mg/ml glycine に移し、さらに液を交換して 10 分間処理した。PBT で 5 分間 2 回洗ってから、0.1M triethanolamine (TEA) で室温 5 分間 2 回処理し、0.1M TEA/2.5  $\mu$ l/ml acetic anhydride で穏やかに振とうしながら室温 5 分間 2 回処理した。再び、PBT で 5 分間 2 回洗った後、4% ホルムアルデヒド/PBT で室温 1 時間再固定した。PBT で 5 分間 3 回洗浄し、新しい PBT へ移し 80℃ 30 分間処理した。50% PBT/50% ハイブリダイゼーション溶液 (HybS) [50% ホルムアミド, 5 $\times$ SSC, 200  $\mu$ g/ml tRNA, 0.1% Tween 20, 0.1% CHAPS, 1 $\times$ Denhardt's reagent, 100  $\mu$ g/ml heparin] で室温 10 分間、HybS で室温 10 分間処理した後、新しい HybS に交換し、プレハイブリダイゼーションを 55℃ 2 時間行った。ハイブリダイゼーションは、熱変性させた DIG 標識 RNA プローブを最終濃度 0.2ng/ml になるよう新しい HybS に加え、55℃ で 3 日間行った。

終了後、100% HybS、75% HybS/0.5 $\times$ SSC、50% HybS/1 $\times$ SSC、25% HybS/1.5 $\times$ SSC で 55℃ 5 分間ずつ処理した後、2 $\times$ SSC/0.1% CHAPS で 55℃ 30 分間 2 回処理した。MAB [100mM maleic acid, 150mM NaCl (pH7.5)] へ移し室温 10 分間 2 回処理し、MAB-B [MAB, 1% BSA] で室温 1 時間処理した。ブロッキング溶液 [MAB-B, 20% sheep serum, 0.008% NaN<sub>3</sub>] で 4℃ 2 時間処理した後、1/2000 に希釈した抗 DIG 抗体で 4℃ 一晩処理

した。MAB で室温 1 時間 8 回洗浄し、液を交換し 4℃ で一晩おいた。発色は、NTMT [100mM NaCl, 100mM Tris-Cl (pH9.5), 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween20] で室温 5 分間 2 回処理した後、NTMT/1mM levamisole で室温 5 分間処理し、BM-purple (Roche Diagnostics GmbH) へ移し、遮光し 37℃ で 1 時間行った。発色反応の停止は、100% エタノール 10 分間処理で行った。3.7% ホルマリンで室温 30 分間再固定した後、脱水しキシレンを用いて透明化し、Permount (FisherChemical, Fisher Scientific) でスライドガラス上にマウントした。

## 15. Differential Display (DD) -PCR法

DD-PCR 法は、基本的には Liang and Pardee (1992) の方法に従って行った。

### (1) Hym-323 処理試料の作成

試料の作成には、st.3 のヒドラを用いた。ペプチド処理を行った後、0 時間後と 2 時間後、6 時間後に、ヒドラの頭部直下と出芽域の直上を切断し、シリンダー状の体腔部分のみを回収し、AGPC 法に従って全 RNA を抽出した。

### (2) 鋳型 RNA の調整

AGPC 法により全 RNA を抽出した後、混入している DNA を除去するために DNase I (Roche Diagnostics GmbH) 処理を行った。酵素反応液の組成は、以下の通りである。

0.6 μg/μl 全 RNA

1 unit/μl RNase インヒビター

0.1M 酢酸ナトリウム (pH5.0)

5mM 硫酸マグネシウム

0.2unit/ $\mu$ l DNase I, RNase-free

酵素反応は、37°C で 30 分間行った。終了後、反応液を 80°C で 10 分間加熱した。フェノール/クロロホルム抽出を 1 回行った後、エタノール沈澱し RNA を回収した。

### (3) 第 1 鎖 cDNA の合成

第 1 鎖 cDNA の合成は、First-strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia) を用いて行った。合成反応は、3  $\mu$ g 全 RNA と 400ng/ $\mu$ l one-base anchored primer [(T)<sub>12</sub>G] を用い、説明書に従って行った。反応終了後、反応液を 95°C で 5 分間処理した後、滅菌水を加えて 100  $\mu$ l にし -25°C で保存した。

### (4) PCR 反応

プライマーは 19 種類の random 10mer (OPERON) と one-base anchored primer [(T)<sub>12</sub>G] を組み合わせて用いた。反応液の組成は、下記の通りである。

10 $\times$  Taq buffer [670mM Tris-Cl (pH8.8), 166mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4.5% Triton X-100,

0.2% gelatin]	10 $\mu$ l
100ng/ $\mu$ l one-base anchored primer [(T) <sub>12</sub> G]	10 $\mu$ l
20ng/ $\mu$ l random 10mer	10 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub>	5.5 $\mu$ l
[ $\alpha$ - <sup>33</sup> P]-dATP	1 $\mu$ l
Taq DNA polymerase	1 $\mu$ l

上記の混合液に滅菌水を加えて全量を 100  $\mu$ l とした。反応液 27  $\mu$ l に 3  $\mu$ l 第 1 鎖 cDNA を加えよく混合した後、3 本に分注した。PCR 反応は、以下の条件で行った。

94°C で 5 分間おいた後、94°C 30 秒、40°C 1 分、72°C 30 秒を 40 回繰り返し、最後に

72°C で5分間伸長させた。

また、実験に用いた19種類の random 10mer (OPERON) の配列を、以下に記す。

code	5' to 3'
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-05	AGGGGTCTTG
OPA-06	GGTCCCTGAC
OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-08	GTGACGTAGG
OPA-09	GGGTAACGCC
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-12	TCGGCGATAG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-14	TCTGTGCTGG
OPA-15	TTCCGAACCC
OPA-16	AGCCAGCGAA
OPA-18	AGGTGACCGT
OPA-19	CAAACGTCGG
OPA-20	GTTGCGATCC

#### (5) PCR 反応物のシーケンスゲルによる解析

PCR 反応物は、6% アクリルアミド変性ゲルを用いて電気泳動し解析した。PCR 反応終了後、各サンプルに 15 $\mu$ l の Loading dye [0.05% BPB, 0.05% キシレンシアノール, 95% ホルムアミド] を加え、そのうち 3 $\mu$ l を取り熱変性し、泳動した。電気泳動は

1950V でキシレンシアノールのシグナルがゲルの先端に達するまで行った。泳動終了後、ゲルは濾紙に付着させて乾燥させた。シグナルの検出は、イメージングプレート (Fuji film) を用い、BAS-2000 (Fuji film) で行った。

#### (6) ゲルからの DNA 回収

時間経過とともに、発現様式に変化が見られたバンドに含まれる cDNA の回収を行った。目的のシグナルを濾紙とともに切り取り、細かく刻んでから 100  $\mu$ l の TE バッファに浸し、4 $^{\circ}$ C で一晩静置し溶出させ溶液ごと回収した。

#### (7) 回収 cDNA の再増幅とクローニング

回収した cDNA は、(4) と同じ条件で再増幅した後、電気泳動によりサイズの確認を行った。この時、H.A.-Yellow (TaKaRa) を用いた AT 含量による分離も同時に行った。その後、TA cloning Kit (Invitrogen) を用いてクローニングした。

### III 章 結果

#### 1. Hym-323 ペプチドの飼育液中における安定性

Hym-323 の配列中に、N 末端ピロ化や C 末端アミド化などのペプチドを安定化するような修飾や配列は見られなかった (表 1)。また、Hym-323 は光化学的に不安定なトリプトファン残基 (W) を持つ。そこで、バイオアッセイ条件を検討するために、飼育液中における Hym-323 の安定性を調べた。調べた項目は次の 2 つである：1) 光の影響と 2) ヒドラ自体の影響。実験条件毎に、バイオアッセイに用いた直径 6cm の浅型シャーレに、 $10^{-6}$ M の合成ペプチドを含む飼育液 10ml 入れたものを 2 枚ずつ作成し、18°C で一定時間放置した後、溶液中に残存している Hym-323 を回収し、HPLC を用いて定量した。

(1) 光の影響：ペプチドを含む飼育水を入れたシャーレを通常光下 (方法の項参照) に 24 時間置き、残存ペプチド量を定量した。0 時間の Hym-323 量は、遮光下、及びヒドラ存在下の結果から約 1000 pmol と考えられる (表 2) ので、24 時間で約 6% に減少したことになる。一方、遮光下では 24 時間後に約 23% が残存していた。従って、遮光した水溶液中の残存 Hym-323 量は、遮光しなかった対照 (通常光下) の残存量より、約 3.6 倍多いことが分かった (表 2)。

(2) ヒドラの影響：st.3 のヒドラをペプチドを含む飼育液中に入れ、0 時間後、6 時間後、12 時間後、24 時間後のペプチドの量について調べた。表 2 に示したように、ヒドラを加えることによりペプチドの飼育液中の残存量は対照と比べて 12 時間以降では、6-7 分の 1 に減少していることが分かった。また、処理の過程でシャーレに吸着する量、および回収過程で失われた量を考慮すると、バイオアッセイの条件では、24 時間後のペプチド量は、加えたペプチド量 (20nmol) の約 30 分の 1 の 640pmol になっていると思

われた。

これらの結果を考慮して、ヒドラのペプチド処理は遮光した状態で行い、24時間以内にペプチドを含む飼育液を交換することにした。

## 2. Hym-323 の機能解析

Hym-323 は、ヒドラを用いたペプチド性シグナル分子の大規模スクリーニングの過程で単離・同定された (Takahashi et al., 1997)。また、Hym-323は、ヒドラを処理すると遺伝子発現に影響を与えることから、シグナル分子と判定された。そこで本研究では、以下に述べる一連のバイオアッセイを行い Hym-323 の機能を探索した。その結果、足部形成の促進能が見いだされたので報告する。

### (1) 頭部再生実験

Hym-323 のアミノ酸配列は、head activator (HA; Schaller and Bodenmüller, 1981) と C 末側 10 残基のうち 5 残基が一致していた (表 1)。HA は、ヒドラから単離された 11 残基からなる神経ペプチドで、頭部再生促進活性や、細胞増殖・神経分化促進活性を持つ (Schaller and Bodenmüller, 1981; Schaller et al., 1996)。

初めに、Hym-323 にも頭部再生促進活性があるかどうかを調べた。st.1 のヒドラを体幹の真ん中で上下に切り分け、下半分をペプチド存在下で再生させた (図 3-A)。本研究では、時間経過に伴う再生端の形態の変化を観察し、触手の膨らみが 2 ヶ所以上見られたときを頭部が再生したと判断した。また、頭部再生に伴う触手数も数えた。再生した触手の数も再生の指標として用いたのは、105 系統における触手の数は平均 6 本であるが、頭部再生不良型の変異体 reg-16 では平均 5 本と減少していることから、形態形成への影響は再生速度ではなく触手の数に現れる可能性もあると考えたからである。



その結果、Hym-323 処理ヒドラと未処理の対照群との間に、再生速度やまた形成された触手数の違い (データは示していない) を含めた形態的な違いは見られず、Hym-323 処理による頭部再生への影響は検出できなかった (図 3-B)。

## (2) 細胞増殖・分化への影響

マセレーション法によりヒドラの組織を、細胞に解離・固定した後、顕微鏡で観察すると、全ての細胞種、即ち、外胚葉上皮、内胚葉上皮、腺細胞、神経細胞、大型の間細胞 (間幹細胞と分化運命が決まったばかりの細胞)、刺細胞と刺細胞前駆体細胞 (細胞質間架橋で結ばれた nest と呼ばれるクラスターを形成しており、4 細胞、8 細胞、16 細胞、32 細胞の 4 タイプが見られる) を、区別することができる。そこで、この方法を用いて、Hym-323 の細胞増殖や間細胞分化への影響を、BrdU パルス標識、またはパルス・チェイスなどによって調べた (図 4、また、実験の方法の項も併せて参照のこと)。

i) 細胞増殖への影響: ヒドラの上皮細胞、そして大型の間細胞と腺細胞は、常に細胞分裂を行っている。また刺細胞前駆体細胞も、限られた回数ではあるが細胞分裂能をもつ。間幹細胞が刺細胞の分化経路に入ると 2-5 回の同調分裂を行い、娘細胞は 4 個、8 個、16 個、及び 32 個の細胞からなる nest を形成する。このうち、4 個の細胞からなる nest (4s) は、刺細胞分化経路で最初に形態的に同定できる細胞型である (David and Gierer, 1974)。間幹細胞から 4s に至るまでには約 2 日かかり、その後 4s は約 18 時間の細胞周期を経て 8 個の細胞からなる nest へと移行する。

上皮組織、大型間細胞、4s、及び腺細胞の増殖に対する Hym-323 の影響を調べるために、ヒドラをペプチド処理 48 時間の最後の 1 時間 BrdU でパルス標識し、その後、単細胞に解離し標識指標 (labeling index) を調べた (表 3)。その結果、ペプチド処理ヒドラと未処理ヒドラの間で、これらの細胞の標識指標に統計的な差は見られなかった。よって、Hym-323 はヒドラ細胞の増殖へは何の影響も与えないと考えられた。

ii) 神経細胞と刺細胞への分化に対する影響：神経細胞と刺細胞は、間幹細胞からそれぞれ分化する細胞分裂能をもたない、最終産物である。間幹細胞から神経細胞への分化には16時間以上必要とする (David and Gierer, 1974)。従って、神経分化への Hym-323 の影響の測定は、定量的に十分な数の BrdU 標識された神経細胞が現れる48時間後に、神経細胞の標識指標を調べることにより行った。もし、Hym-323 処理により、間幹細胞の神経細胞への分化運命の割合や、その決定が影響を受けていたり、また分化速度が変化していれば検出できるはずである。一方、刺細胞分化への Hym-323 の影響は、4s の総数と上皮細胞の総数との比で測定した。間幹細胞から4sまでの分化過程にある細胞で、Hym-323 の影響を受けていれば、4s の数は BrdU 標識、未標識に関係なく変化するはずである。一方、上皮細胞は i) の結果から Hym-323 の影響を受けていなかったため、その数は一定である。結果は、表 4 に示したように、神経分化、刺細胞分化のいずれの場合においてもペプチド処理と未処理個体間において差はみられなかった。よって、Hym-323 は刺細胞、神経細胞の分化には影響を与えないと考えられた。

### (3) 足部特異的ペルオキシダーゼ活性を用いた足部再生実験 (足部再生率の経時的变化)

次に、Hym-323 の足部再生への影響について調べた。足部マーカーとして、足部特異的ペルオキシダーゼ活性 (Hoffmeister and Schaller, 1985) を用いた。足部特異的ペルオキシダーゼ活性は、足部の再生に伴って上昇するため、生化学的なよい足部マーカーである (Hoffmeister and Schaller, 1985)。回収した st.1 ヒドラを24時間絶食した後、上下に2等分し、上半分(頭を含む方)を  $10^{-6}$ M のペプチド存在下で0時間、24時間、48時間再生させた (図 5-A)。その後、各再生時間毎に20匹ずつ回収し、足部特異的ペルオキシダーゼの活性を測定した。その結果、測定したどの時間においても、ペプチド処理を行ったヒドラの方で、未処理のヒドラより高い酵素活性が見られた(図 5-B)。よっ

て、Hym-323 は、ヒドラの足部再生を促進活性をもつと考えられた。

#### (4) 足部特異的ペルオキシダーゼ活性を用いた足部再生実験 (Hym-323の濃度依存的な作用)

Hym-323 の濃度依存的な作用について、(3) の実験と同様に、足部特異的ペルオキシダーゼ活性を用いて調べた。ペプチドの処理濃度は  $10^{-9}\text{M}$  から  $10^{-5}\text{M}$  の範囲で行い、再生時間は、処理個体と未処理の個体との酵素活性差が明確にみられた 27 時間とした。その結果、図 5-C に示したように、 $10^{-9}\text{M}$  から  $10^{-6}\text{M}$  の間では足部再生が濃度依存的に上昇していた。しかし、更に濃度を上げた  $10^{-5}\text{M}$  では、逆に酵素活性は低下した。以上の結果から、今回調べた濃度範囲では、 $10^{-6}\text{M}$  が最も効果があることが分かった。よって、バイオアッセイに用いる濃度としては、 $10^{-6}\text{M}$  が最適処理濃度であると考えた。

#### (5) モノクローナル抗体 (MAb) AE03を用いた足部再生実験

Hym-323 の足部再生への影響を検証するために、(4)とは異なる足部マーカーとして、足盤を特異的に認識する MAb AE03 (Amano et al., 1997) を用いることにした。st.2 のヒドラを 24 時間ペプチドで処理した後、初めは、体腔部の様々な箇所では体軸と直交するように切り分け実験を行っていたが、MAb AE03 の感度が低いためか、Hym-323 の再生への影響を上手く検出できなかった。次に、足柄の部分を用いたところ、ペプチド処理による影響が、明確に検出できた。よって、この実験では、足柄の部分を用いることにした。実験は下記のように行った。足柄を体軸に直角に 3 等分し、その中央部分を切り出した (図 6-A)。切り出した組織片は、引き続きペプチド処理を行い  $15^{\circ}\text{C}$  で 40 時間再生させた。再生を  $15^{\circ}\text{C}$  で行ったのは、 $18^{\circ}\text{C}$  より再生速度が緩やかになり、その結果 Hym-323 による影響が安定して検出できたためである。再生 40 時間後組織片を固定し、新たに形成された足盤を AE03 を用いて免疫組織化学的に検出し、足部再生率を

調べた。その結果、足部特異的ペルオキシダーゼ活性を用いて測定した実験結果と同様に、未処理の組織片と比べて、明らかな Hym-323 処理組織片における足部再生率の上昇が見られた (図 6-B、-C)。これは、統計学的にも有意な差であった。(4) の結果と今回の結果とは、ともに Hym-323 が足部の再生を促進していることを示唆している。

### 3. Hym-323 は、どの細胞に働きかけているのか (上皮ヒドラを用いた足部再生の実験)

ヒドラの形態形成において、上皮組織が主要な役割を担っている (Sugiyama and Fujisawa, 1979)。一方で、間細胞系譜の細胞も、一部ではあるが再生に関与している (Sugiyama and Wanek, 1993)。そこで、Hym-323 処理による足部再生促進は、直接、形態形成において主要な役割を担っている上皮に作用した結果なのか、それとも間細胞系譜の細胞を介して働いた結果なのかについて調べることにした。実験は、上皮ヒドラを用いて行った。上皮ヒドラとは、腺細胞を除く間細胞系譜の細胞 (間幹細胞、神経細胞、刺細胞及びこれらの前駆体細胞など) をいっさい持たない二層の上皮組織のみからなるヒドラのことである (Campbell, 1976)。上皮ヒドラにおける再生、出芽等の形態形成能力は正常である。また間細胞を上皮ヒドラに再導入すると、約 3 週間で正常ヒドラに戻ることから上皮細胞に異常はないと考えられる。もし Hym-323 が、直接上皮に働きかけ足部再生を促進しているのであれば、上皮ヒドラを Hym-323 で処理した場合においても、正常ヒドラを用いた時と同様に、足部再生の促進が見られるはずである。

上皮ヒドラを、Hym-323 で 3 時間前処理した後、上下に 2 等分するように切り分けた (図 7-A)。上半分を引き続きペプチドで処理し、18°C で 30 時間再生させた。足部の再生は、AE03 を用いて検出した。その結果、上皮ヒドラを用いても、正常ヒドラの時と同様に Hym-323 処理による足部形成の促進が見られた (図 7-B、-C)。上皮ヒドラの再生は、正常ヒドラに比べてやや遅い。そのため、この実験条件下では、前述の再生

実験とは異なり、AE03を用いて問題なく差が検出できたと思われる。よって、Hym-323は直接上皮に作用していると考えられた。

#### 4. Hym-323の形態形成能への影響(側方移植法)

Hym-323は上皮に直接作用し足部再生を促進するが、細胞増殖や分化には影響を及ぼさなかった。そこで足部再生の促進の理由として、MacWilliamsら(1970)が提唱したような足部形成能(図2参照)をHym-323が高めている可能性が考えられた。そこで、この可能性を調べるために、側方移植を行った(図2-B)。普通、ドナーのある位置の組織片を切り出して、ホストの同位置に側方移植しても、形成能に差がないため、移植片はホスト組織に吸収されて何も起こらない。しかし、Hym-323処理によりドナーの足部形成能が上昇していれば、同位置への移植であっても足部形成能に差が生じ、異所的な足部が誘導されることが期待された。

3から7日間ペプチドで前処理したヒドラのうち、st.2の個体のみをドナーとして用いた。ドナーのポジション2(図8-Aを参照)の組織を切り出し、同じ位置であるホストのポジション2に移植した。その後、ペプチド処理は行わず、移植片の形態を11日間観察した。その結果、前処理の日数(3日間、5日間、6日間、7日間)に関わらず、ペプチド処理を行った組織は、未処理組織に比べてホスト上に有意に高い比率で異所的な足部を誘導した。図8には、3日間処理の結果を示す。また、頭部の誘導は見られなかった。この結果は、Hym-323処理により、ホスト個体の足部形成能が上昇したことを示している。

## 5. Hym-323 をコードする 遺伝子の単離と解析

### (1) Hym-323 遺伝子のクローニング

Hym-323 をコードする遺伝子の単離を行った。クローニングは、以下の 3 段階で行った：i) short PCR、ii) nested PCR 法を用いた 3'側ポリ A 配列までの単離、iii) cDNA ライブラリーのスクリーニング。

まずペプチドの配列に対応する断片を得るために short PCR を行った。ペプチドの配列は 16 残基と非常に短い、両端のアミノ酸配列に対応する 17mer の上流側センス、下流側アンチセンスプライマーをデザインしても、プライマーに挟まれた領域が 13bp あることから、縮重プライマーを用いて PCR を行った (方法の項参照)。PCR 産物をアガロースゲルで分離しても、増幅産物の予想される泳動後の位置はプライマー直上のため、プライマーと産物との区別はできないと思われた。実際に泳動したところ、産物のシグナルは検出できなかった。しかし、目測でプライマー直上の予測される位置を切り出し、ゲルからの精製を行った後、TA クローニングキットを用いて遺伝子をクローニングした。それらクローンの塩基配列の決定を行ない、予想アミノ酸配列がペプチドの配列と一致するクローンを単離した。

次に、より長い cDNA 断片を単離するために、nested PCR 法を用いて 3'側ポリ A 配列までの単離を行った (方法の項参照)。i) で決定した 13bp の塩基配列を基に 2 種類の 3'側単離用上流側プライマーをデザインした。上記の PCR で決定した配列長ではプライマーの長さとしては短かったので、5' 側は縮重したままとし、3' 側のみ特異的な配列になるようにデザインした。できる限り非特異的な増幅を防ぐために下流側のプライマーも M13 Forward(-40)primer と T7 promoter の 2 種類を用いた。最初の PCR には外側のプライマーを組み合わせ、鋳型には 105 cDNA ライブラリーを用いた。2 度目の PCR には内側のプライマーを組み合わせ鋳型には最初の PCR 産物の一部を用いた。上

記と同様に PCR 産物をクローニング後、ペプチド配列と一致するクローンを探し、ペプチド領域から 3' 側ポリ A 配列までの約 170bp の cDNA 断片を単離した。

最後に、nested PCR 法により得られた約 170bp の cDNA 断片をプローブに用いて cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。5×10<sup>5</sup> クローンをスクリーニングした結果、2 個のポジティブクローンを得た。2 個のクローンのうち片方は、インサートが短かく全長ではなかった。もう一方のクローンのインサートは約 400bp あり、ノーザンブロット解析 (後述) の結果からほぼ全長と思われた。

## (2) Hym-323 遺伝子の一次構造の解析

ライブラリーのスクリーニングで単離した約 400bp の全塩基配列を決定した。翻訳領域は、186bp で、予想アミノ酸は 62 残基だった (図 9-A)。ノーザンブロット解析の結果から、ほぼ全長であると思われた (図 9-B)。塩基配列、予想アミノ酸配列、ペプチド部分のみのアミノ酸配列について、それぞれ BLAST (Altschul et al., 1997) のプログラムに従ってデータベースの検索を行ったが、類似性のあるものは見つからなかった。また、前駆体タンパク質の配列の中に、大規模スクリーニングで同定された他のペプチド配列や、HA (head activator) の配列も見られなかった。

予想タンパク質の N 末側に典型的なシグナル配列 (von Heijne, 1983) は見られなかったが、疎水性アミノ酸の含有率は高かった。Hym-323 ペプチドは、C 末側の末端に 1 コピー、コードされており、繰り返しや類似の配列などは見られなかった。ペプチド配列の C 末側の隣は停止コドンとなっていた。また、ペプチド配列の N 末側上流はスレオニン (T) であった。腔腸動物におけるペプチド合成経路のなかに、スレオニン残基の後ろ (C 末側) での切断が報告されていることから (Grimmelikhuijzen et al., 1996)、スレオニンと N 末端のリジン (K) との間で切断され、Hym-323 が生成されると考えられた。よって、一次構造から予想されるペプチド配列は、ヒドラから単離したペプチドと一

致しており、単離ペプチドの配列に欠損や修飾はないと思われた。また、*hym-323* 遺伝子は、Hym-323 ペプチド前駆体タンパク質をコードしていると考えられた。

また、サザンハイブリダイゼーションを行ったところヒドラゲノム中に、*hym-323* 遺伝子は1コピーであることが示唆された(データは示していない)。

## 6. *hym-323* 遺伝子の発現解析

Hym-323 の *in vivo* における空間的発現パターンを whole mount *in situ* ハイブリダイゼーション法とノーザンブロット解析を用いて調べた。

Whole mount *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、*hym-323* 遺伝子は、触手と口丘の外胚葉上皮、足盤を除く体全体で一様に発現していた(図 10-A)。外胚葉上皮細胞では発現に極性が見られ、細胞の基部側半分で発現しており、頂部側での発現は検出できなかった。一方、内胚葉上皮では一様に発現していた(図 10-B)。

Whole mount *in situ* ハイブリダイゼーションの結果を、ノーザンブロット解析を用いて検証した。ヒドラを様々な部域・組織に分け、それぞれから全 RNA を抽出し、*hym-323* 遺伝子全長をプローブとしてノーザンブロット解析を行った。部域への切り分けは図 10-C に示したように、触手の直下、出芽域の直上、出芽域の直下の3ヶ所で行い、出芽域を除いて、上から頭部(H)、胴体部(BC)そして足部(F)を得た。内外上皮は胴体部を塩酸プロカイン処理して分離させ、それぞれの上皮組織を回収した。また、間細胞系譜を持たない上皮細胞からのみなる上皮ヒドラも用いた。図 10-D に解析結果を示す。ヒドラ全体(W)、頭部のみ(H)、胴体部のみ(BC)、足部のみ(F)、外胚葉上皮のみ(Ecto.)、内胚葉上皮のみ(Endo.)、間細胞を持たない上皮ヒドラの全て(Epi. hydra)で均一な mRNA の発現を検出した。また mRNA はサイズ・発現量ともに、部域やヒドラによる違いは見られなかった。この事から whole mount *in situ* ハイブリダイゼーション



ンの解析結果と同様に、*hym-323* mRNA はヒドラ組織のほぼ全域で一様に発現していると考えられた。

以上の結果は、Hym-323 は常に二層の上皮細胞で生成されていることを示しており、従って Hym-323 は上皮ペプチド (epitheliopeptide) と考えられた。

## 7. Hym-323 処理により発現様式に変化がみられる遺伝子の探索と解析

Hym-323 が、直接、足部再生に働いているのかどうかを分子生物学的に調べるために、Hym-323 処理によって影響を受ける遺伝子の単離を試みた。下流遺伝子の単離は DD-PCR 法を用いて行った。Hym-323 処理の条件は、ペプチド性シグナル分子の大規模スクリーニングで行ったアッセイ条件を参考にし、ヒドラを  $10^{-6}$ M のペプチドで 0 時間、2 時間、6 時間処理した。その後、方法の項で述べたように 19 種類の random primer を用いて DD-PCR を行った。その結果、8 種類のプライマーで遺伝子の発現パターンに変化が見られた (データは示していない)。その変化が見られたシグナルのうち、27 本のバンドについて cDNA 断片の回収を行った。

これまでに、16 種類について再増幅を行い、アガロースゲルによる増幅産物のサイズの確認とクローニングを行った。また、そのうち 1 種類については塩基配列の決定を行い、ホモロジー検索を行ったが、既知のものとの相同性はなかった (データは示していない)。

#### IV 章 考察

ヒドラの体はシリンダー状で、一端が頭、他端が足という単純で一次元的な軸構造をしている。ヒドラは、強い再生力を持っており、体の一部分から全身を再生する。この再生のパターンは常に正確で、もとの頭部に近い側から頭が、もとの足部に近い側から足が形成される。この再生でみられる極性は、位置情報のモデル、例えば Gierer と Meinhardt (1972) によって提唱された頭部から頭部形成物質と抑制物質が、足部から足部形成物質と抑制物質が、それぞれもう一端に向かって勾配をなしているモデルや、Müeller (1996) によって提唱された頭部からのホルモン様因子を受け取るレセプターの密度に勾配が形成されるモデルによって合理的に説明することができる。この極性形成因子の候補として、これまでにヒドラから HA (Schaller, 1973, 1975, 1976a,b,c; Schaller et al., 1979; Schaller and Bodenmüller, 1981; Hoffmeister and Schaller, 1987; Javois and Tombe, 1991; Schaller et al., 1996; Hobmayer et al., 1997) や pedin (Hoffmeister, 1996)、pedibin/Hym-346 (Hoffmeister, 1996; Takahashi et al., 1997; Grens et al., 1999) が、また構造決定には到っていないが head inhibitor (Schaller et al., 1979; Hoffmeister and Schaller, 1987) や foot activator (Grimmelikhuijzen and Schaller, 1977; Grimmelikhuijzen, 1979; Schaller et al., 1979; Hoffmeister, 1989)、foot inhibitor (Schaller et al., 1979) が単離された。構造が決定された因子は、全て短いペプチド分子であった。しかし、これら分子の生体内における機能やその作用経路などについては不明な点が多く、また他に形態形成に関与する因子がある可能性も考えられた。そこで、極性、あるいはパターン形成に関与する因子を含むペプチド性シグナル分子をヒドラから網羅的に単離するために、我々の研究室では大規模なスクリーニングを行っている (Takahashi et al., 1997)。本研究で機能解析を行った Hym-323 も、そのスクリーニングの過程で単離・同定されたペプチドである。

Hym-323 の解析を行ったところ、Hym-323 は、ヒドラの上皮細胞で合成される上皮

性ペプチドで、直接上皮細胞に作用し足部形成を活性化する新規の形態形成因子であることが示唆された。

### 1. Hym-323 ペプチドの安定性

腔腸動物にある多くの神経ペプチドは、N 末端のピロ化や、N 末端から 2 番目、または 2 番目と 3 番目のアミノ酸がプロリン残基であること、また C 末端のアミド化により、それぞれアミノペプチダーゼあるいはカルボキシペプチダーゼ耐性である (Grimmelikhuijzen et al., 1996)。しかし、Hym-323 の N 末側や C 末側には、これら修飾されたアミノ酸が見られなかった。また、Hy-323 は光化学的に不安定なトリプトファン残基をもつ。そこで、Hym-323 処理条件を検討するために、飼育室の通常光下での安定性とヒドラ存在下での安定性について調べた (表 2)。遮光下では、Hym-323 は 24 時間でもとの約 23% に減少していたのに対し、通常光下では約 6% にまで減少していた。この結果は、遮光下でも安定性は比較的低い、光の存在下ではより低く、光感受性が高いことを示していた。従って、ヒドラのペプチド処理は遮光して行った。また、ヒドラが存在している状態では更に不安定となり、同じ 24 時間でももとの 3% にまで減少した。これは、主としてヒドラから分泌されたペプチダーゼ活性によると考えられるが、ヒドラにペプチドが吸着した可能性もある。

Hym-323 の生体内の濃度は大規模スクリーニングの抽出結果より 15fmol/hydra 以上 (高橋私信) と推測されたので、本実験に用いた  $10^{-6}$ M は処理直後は生体濃度の約 70 倍、24 時間後は約 2 倍と考えられた。従って、12 または 24 時間毎の処理は妥当であったと考える。また処理濃度についても、図 5-C から適当であると判断した。外から加えた Hym-323 が、実際どの程度ヒドラに取り込まれるのか、また取り込まれたペプチドが生体内でどのくらい安定であるのかは現在のところ不明である。生体内では、なん

らかの保護により安定化している可能性も考えられる。いずれにしても生体内におけるペプチドの情報分子としての機能には、その生産と放出、分解のバランスが重要であると思われる。

## 2. Hym-323 の機能と発現解析

### 2-1. 機能解析について

#### (1) Hym-323 は、足部再生を特異的に促進する

Hym-323 の C 末側のアミノ酸配列が、頭部再生促進、有糸分裂促進及び神経分化の誘導活性を持つと報告されているヒドラの神経ペプチド HA (Schaller, 1973; Schaller and Bodenmuller, 1981; Javois and Tombe, 1991; Schaller et al., 1996; Hobmayer et al., 1997) と一部共通していた (Takahashi et al., 1997)。そこで、初めに Hym-323 の頭部再生、細胞増殖、神経細胞及び刺細胞分化への影響を調べた。しかし、Hym-323 には、これらいずれに対する影響もみられなかった (表 3、表 4、図 3)。次に、足部再生に対する影響について 2 種類の足部マーカー、足部特異的ペルオキシダーゼ活性と MAb AE03 とを用いて、それぞれ異なった方法で調べたところ、どちらの実験においても足部再生の促進活性が見られた (図 5 と図 6)。これらの結果から、Hym-323 は足部再生を特異的に促進する活性を持つと考えられた。

#### (2) Hym-323 は直接上皮に作用する

上皮ヒドラやキメラヒドラを用いた実験により、ヒドラにおけるパターン形成では、内外二層の上皮組織が主要な役割を担っており、間細胞の関与は部分的であることが示されている (Sugiyama and Fujisawa, 1979; Sugiyama and Wanek, 1993)。そこで Hym-323 は、上皮細胞へ直接作用し足部形成を促進しているのか、それとも間細胞を介して作

用しているのかについて、間細胞を持たない上皮組織のみからなるヒドラ(上皮ヒドラ)を用いて調べた。その結果、上皮ヒドラにおいても足部再生の促進がみられたことから(図7)、Hym-323は直接上皮に作用していることが示唆された。しかし、Hym-323が間細胞を介して作用するかどうかについては、この実験からは分からない。

### (3) 位置情報への Hym-323 の作用

足部再生が促進する理由として、増殖による細胞の補充や足部特異的上皮細胞の分化速度の亢進、あるいは形態形成能の上昇などが考えられた。上記の結果から、Hym-323は細胞増殖促進能を持たないことが示唆された。また、足部上皮細胞(足盤)への分化速度の測定は、現在のところ技術的に困難である。そこで、もう一つの可能性である形態形成能の上昇について側方移植法を用いて調べた。その結果、Hym-323処理によりポジション2において足部形成能の上昇がみられた(図8)。ヒドラにおける足部形成能は足部から頭部に向かって勾配を作っていることから、Hym-323処理によってヒドラ全体における勾配が頭部側へと移動し、その結果ポジション2における形態形成能が上昇したと解釈できる(図2-B参照)。また、Hym-323の足部形成抑制能への影響についても、同様に側方移植法を用いて(図2-B参照)調べたが、対照群との違いはなく、影響は検出できなかった(服藤、準備的結果)。このことから、Hym-323は足部における形態形成能の勾配を調整する機能を持っているか、またはその勾配の実体と考えられた。

側方移植実験の結果では、未処理の対照においてもHym-323処理よりは低率ではあるが足部の誘導がみられた(図8)。これは、ポジション2が頭部に近い位置であることから、頭部形成抑制能は非常に強いが、足部形成抑制能が低いという性質を持っているためと考えられた。また、組織移植を行った場合、過去の実験結果より、移植片を中心に宿主側の組織とともに異所的な構造を形成することが分かっている。ペプチ

ド処理実験における異所的な足部形成においても、同様な現象が起こっていると思われる。

Hym-323 の作用時期などについては、次のように考えた。ペルオキシダーゼを指標とした足部再生実験では、再生中のペプチド処理だけで、効果がみられた。前処理のみの側方移植実験の結果と考え合わせると、Hym-323 は再生初期に作用すると考えられた。例えば、頭部再生における細胞の分化運命の決定は、切断位置によるが、再生開始後ほぼ 6-12 時間の間に行われる (MacWilliams, 1983; Ackermann and Sugiyama, 1985)。この時期は頭部形成抑制能が大きく低下し、頭部形成能が上昇する (Webster and Wolpert, 1966)。もし、足部再生における細胞の分化決定が、同様な過程の下行われているのであれば、Hym-323 の機能は、足部形成能を上昇させることにより、細胞の足部への運命決定を促していると考えられる。

## 2-2. Hym-323 前駆体タンパク質の一次構造

Hym-323 をコードしている遺伝子のクローニングを行い、Hym-323 を含む前駆体の cDNA クローンを単離した。Hym-323 は、予想前駆体タンパク質の C 末端に 1 コピー、コードされていた。

一般に神経ペプチドやペプチドホルモンの前駆体タンパク質の N 末側には疎水性のアミノ酸に富む、膜小胞体への移行シグナル配列が存在する (von Heijne, 1983)。そして前駆体タンパク質はゴルジ体の膜を通過し、分泌顆粒に梱包される間に限定分解され、多くは N 末端や C 末端に修飾を受ける。ヒドラの神経ペプチドも同様に生成されていると考えられている。しかし、予想 Hym-323 前駆体タンパク質配列の N 末側には、疎水性アミノ酸の含有率は比較的高いもののシグナル配列 (von Heijne, 1983) は見られなかった。このような前駆体タンパク質からのペプチド生成経路についてはほとんど分

かっていないが、最近ヒトの hematopoietic cell line において通常細胞質に存在する tyrosyl t-RNA 合成酵素が、細胞死の誘導により細胞外に分泌され、切断されてサイトカイン活性をもつことが報告された (Wakasugi and Schimmel, 1999)。ヒドラにも同様な経路があり、ペプチドが生成されているのかもしれない。また co-factor などが存在し、その働きにより移動・生成されることも考えられる。

神経ペプチドの遺伝子には、同様な作用を持つペプチドが複数コードされているものがある (Darmer et al., 1991; Leviev and Grimmelikhuijzen, 1995; Gajewski et al., 1996)。これまでに単離・同定された足部形成活性ペプチドは、Hym-323 を加えて 4 種類となり、またこれらをコードしている遺伝子については Hym-323 と pedibin/Hym-346 (Takahashi ら未発表; Hoffmeister 私信) がほぼ全長、pedin/Hym-330 (Hatta ら未発表; Hoffmeister 私信) は断片が単離されている。これらは全て上皮性ペプチドであった。そこで上皮性ペプチドにおいても、神経ペプチドと同じように、同一の遺伝子上に多数のペプチドがコードされているのかどうか、予想アミノ酸配列を調べた。しかし、既知ペプチドや類似の配列は見られなかった。従って、これらペプチドは、独立した遺伝子にコードされていると結論した。

### 2-3. Hym-323 の機能と足部形成

これまでの結果から、Hym-323 は上皮組織で合成され、何らかの経路を経て直接上皮に作用し足部形成を活性化させる形態形成因子であることが示唆された。しかし、Hym-323 の作用には極性があるのにも関わらず、*hym-323* の発現パターンに局在は見られなかった。Hym-323 がどのような経路を通過して機能しているのかについては、以下のような可能性が考えられた。(1) 生成されたペプチドが、局在している。(2) ヒドラの組織は成体においても常に入れ替わっており、そのためパターン形成を継続して行っ

ている状態にあると考えられる (Bosch, 1998)。また、常に再生能力を保持している。これらから、HA (Schaller, 1976c) で報告されているように、Hym-323 も常に細胞内に蓄積されており、体の両端の最終分化領域や物理的に傷害を受けた領域でのみ放出され機能している。(3) Hym-323 の活性には他の因子が必要で、その因子がモルフォゲンである、または局在している。(4) Müller (1996) によって提唱された、分泌性因子に局在はないが、レセプターに局在があり領域によって活性が異なるというモデルのように、Hym-323 のレセプターに局在がある。

実際にどのような機構が働いているのかについては、現在行っている抗 Hym-323 抗体を用いたペプチドの発現様式の解析や、Hym-323 下流のシグナルの解析、足部形成の解析によって明らかになるとと思われる。

### 3. 足部形成因子

これまでに、足部形成に関与する因子として Grimmelikhuijzen (1977, 1979) や Hoffmeister ら (1989) によって foot activator が、単離された。彼らが単離した foot activator は、構造は未決定であるが、分子量 500-1500 Da、有糸分裂促進活性を持ち、足盤の mucus 細胞や神経細胞の分化促進活性などの性質を持った分子である (Schaller et al., 1979; Hoffmeister, 1989)。Hym-323 は有糸分裂の促進や神経細胞の分化の促進活性を持たないことから、彼らが単離した foot activator とは別の足部形成因子であると思われた。

本研究を含め、これまでに足部形成活性を示す因子は、foot activator (Grimmelikhuijzen and Schaller, 1977)、pedin (Hoffmeister, 1996)、pedibin/Hym-346 (Hoffmeister, 1996; Takahashi et al., 1997; Grens et al., 1999) の 4 種類となった。それでは、これらの因子の間に相互作用などの関係はあるのだろうか。Hym-323 と pedibin/Hym-346 は、どちらも



Foot Activator Responsive Metalloprotease 1 の遺伝子発現を抑制した (Kumpfmüller et al., 1999)。また、ヒドラを Hym-323 と pedibin/Hym-346 の両方で同時に処理を行っても、片方のみの処理の場合と足部再生の速度はほとんど変わらなかった (服藤, 準備的結果)。よって、Hym-323 と pedibin/Hym-346 とは、同じ経路で働いている可能性、例えば Hym-323 の下流に、あるいは上流に pedibin/Hym-346 があり、同一カスケード内で働いている可能性が考えられた。

また、ヒドラの形態形成は形態調節といわれており、細胞増殖は必要ではない (Bosch, 1998)。現在、単離されているペプチドの作用にも細胞増殖促進活性を持つ pedin と pedibin、持たない Hym-323 の 2 タイプがあった。このことから、もしかするとヒドラの再生やパターン形成には、細胞増殖を伴う付加形成の経路と細胞の再配置と分化による形態調節の経路の両方があり、それぞれは独立して機能しているのかもしれない。とすると、Hym-323 と他の因子とは、機能解析による表現型は同じであるが機能環境や状況は異なっている可能性も考えられる。

#### 4. ペプチド性分子と再生・パターン形成

ヒドラにおける形態形成の機構について、これまでに数多くの組織学的研究が行われたが、その現象を説明する実体、遺伝子などについての分子レベルでの研究は始まったばかりで情報は少ない。今後、足部形成を含めたヒドラにおける形態形成機構のカスケードに関する知見が蓄積されるとともに、Hym-323 の機能に関する多くの疑問も解けるのではないだろうか。

これまでに多細胞生物の極性やパターン形成に関与する分子として、三胚葉性動物では主に TGF $\beta$  family を初めとする多くのタンパク質の分子が、進化上古い腔腸動物のグループからはペプチド分子が主に同定された。この機能分子におけるサイズの違

いは、神経伝達物質における議論、即ちペプチド分子は祖先型であり、進化の過程で古典的伝達物質が使われるようになった (Grimmelikhuijzen et al., 1996) というのと同じような進化によってもたらされた違いなのだろうか。しかし、ヒドラから単離されたペプチド分子 HA は、ホ乳類からも単離されており、神経芽細胞の増殖活性を持っている (Bodenmüller and Schaller, 1981; Schaller et al., 1987a,b)。また、ヒドラにおいても TGF- $\beta$  1 と相同性のある hydra metalloproteinase 1 が単離されており、頭部再生と細胞増殖に関与している (Yan et al., 1995)。今後、腔腸動物において、より多くのタンパク分子の機能が、また三胚葉性動物におけるペプチド分子の機能が明らかとなり、お互いに比較ができるようになれば、このようなパターン形成におけるシグナル分子の進化も明らかになるのではないかと思われる。さらに、ヒドラなどが持つ再生能力についても解明できるかもしれない。

## V章 謝辞

本研究を行うにあたり、忍耐強く研究の御指導、御助言をして下さった藤澤敏孝先生に心から感謝するとともに、御礼申し上げます。有り難うございました。また、色々な御助言、御世話をして下さい下さった発生遺伝研究部門の清水裕先生、服田昌之先生、小委員会のメンバーとなり様々な機会に御助言を下された小原雄治先生、城石俊彦先生、桂勲先生、広海健先生、林茂生先生をはじめ遺伝学研究所の諸先生方にも深く感謝いたします。様々な御助言とともにモノクローナル抗体を下された九州大学の小早川義尚先生、ペプチドの合成と有益な示唆をして下さった広島大学の松島治先生と森下文浩先生、本論文には含まれていませんでしたが、快く抗体作成の場と御指導を引き受けて下さった山梨医科大学の手塚英夫先生をはじめとする動物実験施設の先生方、そして、プライマーを快く分譲して下さい下さった織井秀文先生と柴田典人さんと彦坂智恵さん、抗ペプチド抗体実験の御指導、御助言をして下さった福岡女子大学の小泉修先生、石巻専修大学の杉山勉先生にもこの場を借りて御礼申し上げます。また、この三年間の研究生活を送るにあたり、大変御世話になった岸本康之さん、廉勝植さん、高橋俊雄さん、藤澤千笑さん、深見裕伸さん、渡辺たつのさん、川原昌子さん、増島育子さん、故杉本典男さん、林内明美さん、そして望月一史さんをはじめとする総合研究大学院大学の学生の皆さんにも感謝します。本当に有り難うございました。

## VI 章 引用文献

- Achermann, J., and Sugiyama, T. (1985). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. X. Morphogenetic potentials of a regeneration-deficient strain (reg-16). *Dev. Biol.* **107**, 13-27.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3389-3402.
- Amano, H., Koizumi, O., and Kobayakawa, Y. (1997). Morphogenesis of the atrichous isorhiza, a type of nematocyst, in *Hydra* observed with a monoclonal antibody. *Dev. Genes Evol.* **207**, 413-416.
- Bode, H. R. (1992). Continuous conversion of neuron phenotype in hydra. *Trends. Genet.* **8**, 279-284.
- Bode, H. R., Heimfeld, S., Chow, M. A., and Huang, L. W. (1987). Gland cells arise by differentiation from interstitial cells in *Hydra attenuata*. *Dev. Biol.* **122**, 577-585.
- Bode, P. M., and Bode, H. R. (1984). Patterning in hydra. In "Pattern Formation: A Primer in Developmental Biology" (G. M. Malacinski and S. V. Bryant, Eds.), pp. 213-241. Macmillan Publishing Co., New York.
- Bodenmüller, H., and Schaller, H. C. (1981). Conserved amino acid sequence of a neuropeptide, the head activator, from coelenterates to humans. *Nature* **293**, 579-580.
- Bosch, T. C. G. (1998). Hydra. In "Cellular and Molecular Basis of Regeneration: From Invertebrates to Humans" (P. Ferretti and J. Géraudie, Eds.), pp. 111-134. Wiley, Sussex, UK.
- Burgus, R., Dunn, T. F., Desiderio, D., Ward, D. N., Vale, W., and Guillemin, R. (1970). Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor. *Nature* **226**, 321-325.
- Burnett, A. L. (1966). A model of growth and differentiation in hydra. *Am Naturalist* **100**, 165-190.
- Cadigan, K. M., Fish, M. P., Rulifson, E. J., and Nusse, R. (1998). Wingless repression of *Drosophila frizzled 2* expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing. *Cell* **93**, 767-777.
- Campbell, R. D. (1967). Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. II. Patterns of tissue movement. *J. Morphol.* **121**, 19-28.
- Campbell, R. D. (1976). Elimination of hydra interstitial and nerve cells by means of colchicine. *J. Cell Sci.* **21**, 1-13.
- Capdevila, J., and Belmonte, J. C. I. (1999). Extracellular modulation of the Hedgehog, Wnt and TGF- $\beta$  signaling pathways during embryonic development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 427-433.

- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step methods of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Darmer, D., Schmutzler, C., Diekhoff, D., and Grimmlikhuizen, C. J. P. (1991). Primary structure of the precursor for the sea anemone neuropeptide Antho-RFamide (<Glu-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2555-2559.
- David, C. N. (1973). A quantitative method for maceration of hydra tissue. *Wilhelm Roux's Arch.* **171**, 259-268.
- David, C. N., and Campbell, R. D. (1972). Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. I. Epithelial cells. *J. Cell Sci.* **11**, 559-568.
- David, C. N., and Gierer, A. (1974). Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. III. Nerve and nematocyte differentiation. *J. Cell Sci.* **16**, 359-375.
- David, C. N., Fujisawa, T., and Bosch, T. C. G. (1991). Interstitial stem cell proliferation in hydra: Evidence for strain-specific regulatory signals. *Dev. Biol.* **148**, 501-507.
- Davis, L. E. (1973). Histological and ultrastructural studies of the basal disk of hydra. *Z. Zellforsch.* **139**, 1-45.
- Driever, W., and Nüsslein-Volhard, C. (1998a). A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell* **54**, 83-93.
- Driever, W., and Nüsslein-Volhard, C. (1998b). The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell* **54**, 95-104.
- Gajewski, M., Leitz, T., Schloßherr, J., and Plickert, G. (1996). LWamides from Cnidaria constitute a novel family of neuropeptides with morphogenetic activity. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **205**, 232-242.
- Gierer, A., and Meinhardt, H. (1972). A theory of Biological pattern formation. *Kybernetik* **12**, 30-39.
- Gierer, A., Berking, S., Bode, H., David, C. N., Flick, K., Hansmann, G., Schaller, H. and Trenkner, E. (1972). Regeneration of hydra from reaggregated cells. *Nature New Biol.* **239**, 98-101.
- Grens, A., Gee, L., Fisher, D. A., and Bode, H. R. (1996). *CnNK-2*, an NK-2 homeobox gene, has a role in Patterning the basal end of the axis in hydra. *Dev. Biol.* **180**, 473-488.
- Grens, A., Shimizu, H., Hoffmeister, S. A. H., Bode, H. R., and Fujisawa, T. (1999). The novel signal peptides, Pedibin and Hym-346, lower positional value thereby enhancing foot formation in hydra. *Development* **126**, 517-524.
- Grimmelikhuijzen, C. J. P. (1979). Properties of the foot activator from hydra. *Cell Differ.* **8**, 267-273.

- Grimmelikhuijzen, C. J. P., and Schaller, H. C. (1977). Isolation of a substance activating foot formation in hydra. *Cell. Differ.* **6**, 297-305.
- Grimmelikhuijzen, C. J. P., Leviev, I., and Carstensen, K. (1996). Peptides in the nervous systems of cnidarians: structure, function, and biosynthesis. *Int. Rev. Cytol.* **167**, 37-89.
- Gudernatsch, J. F. (1912). Feeding experiments on tadpoles. I. The influence of specific organs given as food on growth and differentiation. A contribution to the knowledge of organs with internal secretion. *Wilhelm Roux's Arch. Entwicklungsmech. Org.* **35**, 457-483.
- Hobmayer, E., Holstein, T. W., and David, C. N. (1997). Stimulation of tentacle and bud formation by the neuropeptide head activator in *Hydra magnipapillata*. *Dev. Biol.* **183**, 1-8.
- Hoffmeister, S. A. H. (1989). Action of foot activator on growth and differentiation of cells in hydra. *Dev. Biol.* **133**, 254-261.
- Hoffmeister, S. A. H. (1996). Isolation and characterization of two new morphogenetically active peptides from *Hydra vulgaris*. *Development* **122**, 1941-1948.
- Hoffmeister, S. A. H., and Schaller, H. C. (1985). A new biochemical marker for foot-specific cell differentiation in hydra. *Roux's Dev. Bio.* **194**, 453-461.
- Hoffmeister, S. A. H., and Schaller, H. C. (1987). Head activator and head inhibitor are signals for nerve cell differentiation in hydra. *Dev. Biol.* **122**, 72-77.
- Javois, L. C., and Tombe, V. K. (1991). Head activator does not qualitatively alter head morphology in regenerates of *Hydra oligactis*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **199**, 402-408.
- Kishi, H., Mishima, H. K., Sakamoto, I., and Yamashita, U. (1996). Stimulation of retinal pigment epithelial cell growth by neuropeptides in vitro. *Curr. Eye Res.* **15**, 708-713.
- Kumpfmüller, G., Rybakine, V., Takahashi, T., Fujisawa, T., and Bosch, T. C. G. (1999). Identification of an astacin matrix metalloprotease as target gene for *Hydra* foot activator peptide. *Dev. Genes Evol.* **209**, 601-607.
- Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H., and Cohen, S. M. (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* **381**, 387-393.
- Leitz, T., Morand, K., and Mann, M. (1994). Metamorphosin A: a novel peptide controlling development of the lower metazoan *Hydractinia echinata* (Coelenterata, Hydrozoa). *Dev. Biol.* **163**, 440-446.
- Lentz, T. L. (1966). The cell biology of hydra. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Leviev, I., and Grimmelikhuijzen, C. J. P. (1995). Molecular cloning of a preprohormone from sea anemones containing numerous copies of a metamorphosis-inducing neuropeptide: A likely role for dipeptidyl aminopeptidase in neuropeptide precursor processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11647-11651.

- Liang, P., and Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-971.
- López-Martínez, A., Chang, D. T., Chiang, C., Porter, J. A., Ros, M. A., Simandl, B. K., Beachy, P. A., and Fallon, J. F. (1995). Limb-patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of Sonic hedgehog cleavage. *Curr. Biol.* **5**, 791-796.
- MacWilliams, H. K. (1983). *Hydra* transplantation phenomena and the mechanism of *Hydra* head regeneration. II. Properties of the head activation. *Dev. Biol.* **96**, 239-257.
- MacWilliams, H. K., Kafatos, F. C., and Bossert, W. H. (1970). The feedback inhibition of basal disc regeneration in hydra has a continuous variable intensity. *Dev. Biol.* **23**, 380-398.
- Marcum, B. A., and Campbell, R. D. (1978a). Development of hydra lacking nerve and interstitial cells. *J. Cell Sci.* **29**, 17-33.
- Marcum, B. A., and Campbell, R. D. (1978b). Developmental roles of epithelial and interstitial cell lineages on hydra: Analysis of chimeras. *J. Cell Sci.* **32**, 233-247.
- Müller, W. A. (1996). Pattern formation in the immortal *Hydra*. *Trends. Genet.* **12**, 91-96.
- Nair, R. M. G., Barrett, J. F., Bowers, C. Y., and Schally, A. V. (1970). Structure of porcine thyrotropin releasing hormone. *Biochemistry* **9**, 1103-1106.
- Naro, F., Donchenko, V., Minotti, S., Zolla, L., Molinaro, M., and Adamo, S. (1997). Role of phospholipase C and D signaling pathways in vasopressin-dependent myogenic differentiation. *J. Cell. Physiol.* **171**, 34-42.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G., and Basler, K. (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357-368.
- Nishimiya-Fujisawa, C., and Sugiyama, T. (1993). Genetic analysis of developmental mechanisms in Hydra. XX. Cloning of interstitial stem cells restricted to the sperm differentiation pathway in *Hydra magnipapillata*. *Dev. Biol.* **157**, 1-9.
- Otto, J., and Campbell, R. (1977). Tissue economics of hydra. Regulation of cell cycle, animal size and development by controlled feeding rates. *J. Cell Sci.* **28**, 117-132.
- Podos, S. D., and Ferguson, E. L. (1999). Morphogen gradients: new insights from DPP. *Trends. Genet.* **15**, 396-402.
- Roth, S., Stein, D., and Nüsslein-Volhard, C. (1989). A gradient of nuclear localization of the *dorsal* protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* **59**, 1189-1202.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor Press, N. Y.
- Schaller, H. C. (1973). Isolation and characterization of a low-molecular-weight substance activating head and bud formation in hydra. *J. Embryol. Exp. Morph.* **29**, 27-38.

- Schaller, H. C. (1975). Head activator controls head formation in reaggregated cells of hydra. *Cell. Differ.* **4**, 265-272.
- Schaller, H. C. (1976a). Action of the head activator as a growth hormone in hydra. *Cell. Differ.* **5**, 1-11.
- Schaller, H. C. (1976b). Action of the head activator on the determination of interstitial cells in hydra. *Cell. Differ.* **5**, 13-20.
- Schaller, H. C. (1976c). Head regeneration in *Hydra* is initiated release of head activator and inhibitor. *Wilhelm Roux's Arch.* **180**, 287-295.
- Schaller, H. C. and Bodenmüller, H. (1981). Isolation and amino acid sequence of a morphogenetic peptide from hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 7000-7004.
- Schaller, H. C., Druffel-Augustin, S., and Dubel, S. (1989a). Head activator acts as an autocrine growth factor for NH15-CA2 cells in the G2/mitosis transition. *EMBO J.* **8**, 3311-3318.
- Schaller, H. C., Hermans-Borgmeyer, I., and Hoffmeister, S. A. H. (1996). Neuronal control of development in hydra. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 339-344.
- Schaller, H. C., Hoffmeister, S. A., and Dubel, S. (1989b). Role of the neuropeptide head activator for growth and development in hydra and mammals. *Development* **107**, Suppl., 99-107.
- Schaller, H. C., Schmidt, T., and Grimmelikhuijzen. (1979). Separation and specificity of action of four morphogens from hydra. *Wilhelm Roux's Arch.* **186**, 139-149.
- Schmidt, T., and Schaller, H. C. (1976). Evidence for a foot-inhibiting substance in hydra. *Cell Differ.* **5**, 151-159.
- Sugiyama, T. (1982). Roles of head-activation and head-inhibition potentials in pattern formation of *Hydra*: Analysis of a multi-headed mutant strain. *Amer. Zool.* **22**, 27-34.
- Sugiyama, T., and Fujisawa, T. (1977). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. I. Sexual reproduction of *Hydra magnipapillata* and isolation of mutants. *Dev. Growth Differ.* **19**, 187-200.
- Sugiyama, T., and Fujisawa, T. (1978). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. V. Cell lineage and development of chimera hydra. *J. Cell Sci.* **32**, 215-232.
- Sugiyama, T., and Fujisawa, T. (1979). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. VII. Statistical analyses of developmental-morphological characters and cellular compositions. *Dev. Growth. Differ.* **21**, 361-375.
- Sugiyama, T., and Wanek, N. (1993). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. XXI. Enhancement of regeneration in a regeneration-deficient mutant strain by the elimination of the interstitial cell lineage. *Dev. Biol.* **160**, 64-72.



- Suyemitsu, T. (1991). The positions of the disulfide bonds in exogastrula-inducing peptide D (EGIP-D) purified from embryos of the sea urchin, *Anthocidaris crassispina*. *Zoo. Sci.* **8**, 505-509.
- Takahashi, T., Koizumi, O., Ariura, Y., Romanovitch, A., Bosch, T. C. G., Kobayakawa, Y., Mohri, S., Bode, H. R., Yum, S., Hatta, M., and Fujisawa, T. (2000). A novel neuropeptide, Hym-355, Positively regulates neuron differentiation in *Hydra*. *Development* (in press).
- Takahashi, T., Muneoka, Y., Lohmann, J., de Haro, M. S., Solleder, G., Bosch, T. C. G., David, C. N., Bode, H. R., Koizumi, O., Shimizu, H., Hatta, M., Fujisawa, T., and Sugiyama, T. (1997). Systematic isolation of peptide signal molecules regulating development in hydra: LWamide and PW families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1241-1246.
- von Heijne, G. (1983). Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* **133**, 17-21.
- Wakasugi, K., and Schimmel, P. (1999). Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* **284**, 147-151.
- Wanek, N., and Campbell, R. D. (1982). Roles of ectodermal and endodermal epithelial cells in hydra morphogenesis: Construction of chimeric strains. *J. Exp. Zool.* **221**, 37-47.
- Webster, G., and Wolpert, L. (1966). Studies on pattern regulation in hydra. I. Regional differences in time required for hypostome determination. *J. Embryol. Exp. Morph.* **16**, 91-104.
- Weir, E. C., Philbrick, W. M., Amling, M., Neff, L. A., Baron, R., and Broadus, A. E. (1996). Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10240-10245.
- Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J. Theor. Biol.* **25**, 1-47.
- Wolpert, L. (1971). Positional information and pattern formation. *Curr. Top. Dev. Biol.* **6**, 183-224.
- Yan, L., Pollock, G. H., Nagase, H., and Sarras Jr., M. P. (1995). A  $25.7 \times 10^3$  Mr hydra metalloproteinase (HMP1), a member of the astacin family, localizes to the extracellular matrix of *Hydra vulgaris* in a head-specific manner and has a developmental function. *Development* **121**, 1591-1602.
- Yum, S., Takahashi, T., Hatta, M., and Fujisawa, T. (1998). The structure and expression of a prohormone of a neuropeptide, Hym-176 in *Hydra magnipapillata*. *FEBS letters* **439**, 31-34.

## VII 章 図と表

表 1 ヒドラのパターン形成に影響を及ぼすペプチド、及びそのアミノ酸配列のリスト

Head activator (HA) は、ヒドラの頭部形成・出芽・神経細胞の分化を促進する神経ペプチドである (Schaller and Bodenmüller, 1981; Schaller et al., 1996)。Pedibin と pedin は、足部再生を促進する分子として、*Hydra vulgaris* から Hoffmeister によって単離された (1996)。Hym-323、Hym-346、Hym-330 は、*Hydra magnipapillata* からペプチド性シグナル分子の大規模スクリーニングの過程で単離・同定された (Takahashi et al., 1997)。Hym-346 と pedibin、Hym-330 と pedin との配列は、C 末端の"E"の有無を除き一致している。Hym-346 の活性は pedibin と同じである (Grens et al., 1999) が、Hym-330 の活性は、pedin と異なるようである (Hatta, 私信)。

表 1 ヒドラのパターン形成に影響を及ぼすペプチド、及びそのアミノ酸配列のリスト

Name	Source	Sequence
<b>Head activator</b>	<i>Hydra vulgaris</i>	pEPPGGSKVILF
<b>Hym-323</b>	<i>Hydra magnipapillata</i>	KWVQGKPTGEVKQIKF
<b>Hym-346</b> <b>Pedibin</b>	<i>Hydra magnipapillata</i> <i>Hydra vulgaris</i>	AGEDVSHELEEKEKALANHS AGEDVSHELEEKEKALANHSE
<b>Hym-330</b> <b>Pedin</b>	<i>Hydra magnipapillata</i> <i>Hydra vulgaris</i>	EELRPEVLPDVS EELRPEVLPDVSE

表2 Hym-323ペプチドの安定性

Time (h)	Under the light	In the dark	
	- Hydra (pmol)	- Hydra (pmol)	+Hydra (pmol)
0	no data	1030	1100
6	no data	no data	156
12	no data	283	47
24	65	231	32

表3 Hym-323 の細胞増殖への影響

Hym-323 (M)	BrdU labeling index (%)			
	Epithelial cells	Interstitial cells <sup>1)</sup>	Nematoblasts (4s) <sup>2)</sup>	Gland cells
0	9.9±2.3	41.6±3.5	80.6±5.7	4.1±1.6
10 <sup>-6</sup>	10.7±1.0	37.5±2.8	83.8±4.1	2.5±2.0

Values are the mean ± s.d. For each cell type 3 samples of 10 animals each were analyzed for both treated and controls. Animals were not fed for 3 days at the time of examination.

1) Interstitial cells consisted of single and pairs of large interstitial cells.

2) Nematoblasts in a cluster of 4 cells.

表4 Hym-323 の神経細胞・刺細胞分化への影響

Hym-323 (M)	BrdU labeling index of nerve cells (%)	<u>Total no. of 4s</u>
		<u>Total no. of epithelial cells</u>
0	21.6±2.3	0.021±0.012
10 <sup>-6</sup>	24.3±2.1	0.025±0.015

Values are the mean ± s.d. For each cell type the sample size was 3 of 10 animals each for both treated and controls. Animals were not fed for 3 days at the time of examination.

4s: clusters of 4 nematoblasts.

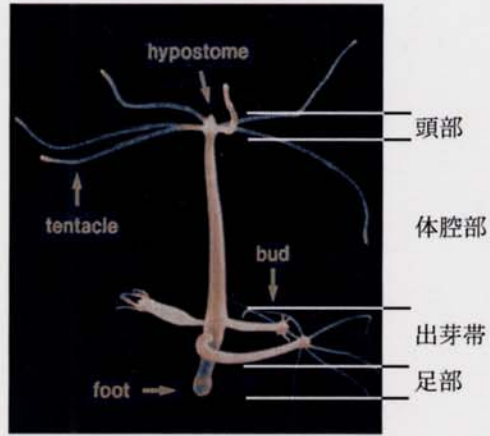
## 図 1 ヒドラの体制

**A** 淡水産チクビヒドラ *Hydra magnipapillata* (写真は Nishimiya-Fujisawa and Sugiyama (1993) より改作)。ヒドラは、上から頭部・体腔部・出芽帯・足部の領域に大きく分けられる。

**B** ヒドラの体制を模式的に示した。ヒドラ全体の断面図を示す。外側の一層が外胚葉上皮、内側一層が内胚葉上皮である。筒状の体の上端が頭部で、冠状に並ぶ触手と、その内側に口丘がある。下端は足部で、先端の外胚葉上皮は、円盤状に並び、粘性物質を分泌する足盤を形成する。これにより、ヒドラは周囲の物に付着する。頭部と足部の間には、体腔部と出芽帯がある (図A を参照)。また体の内側は空洞 (腔腸) となっており、ここで口から取り込んだ食物の消化・吸収を行う。(図は、岸本博士論文 (1995) より改作)。

**C** 図 B 中の四角い囲いの中を拡大した。外胚葉上皮と内胚葉上皮の間には、中膠と呼ばれる細胞外基質の薄い層がある。また、外胚葉上皮細胞の隙間には、間細胞とその派生細胞 (刺細胞・神経細胞・生殖細胞) が、内胚葉上皮細胞の中には腺細胞が、多数存在している。

A



B

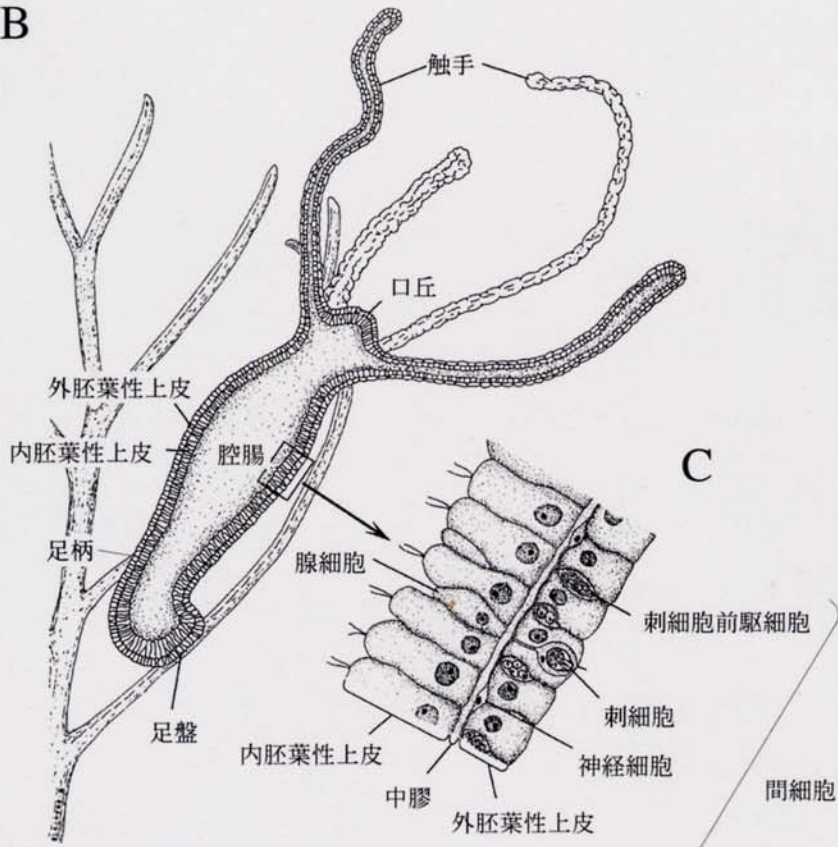


图 1



図 2 ヒドラ組織側方移植法による頭部形成能 (A-1) と抑制能 (A-2)、足部形成能 (B-1) と抑制能 (B-2) の測定

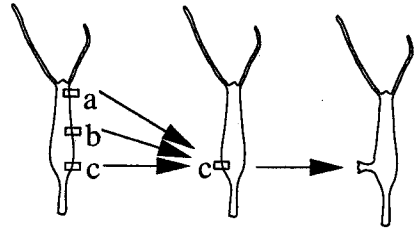
**A-1** 頭部形成能の測定：組織提供個体 (ドナー) の a、b、c の位置から組織を切り出し、それぞれを異なった受容個体 (ホスト) の c の位置に移植する。移植片の頭部形成率は、およそ a が 100%、b が 50%、c が 0% となる。このことから、頭部形成能は、頭部から足部に向かって勾配を形成していることが分かる (グラフの実線 (一))。

**A-2** 頭部形成抑制能の測定：ドナーの a の位置の組織を、異なったホストの a、b、c に、それぞれ移植し、移植片の頭部形成を抑制する割合を測定する。およそ a が 100%、b が 50%、c が 0% である。従って、頭部から足部に向かって頭部形成抑制能の勾配が見られる (グラフの破線 (…))。

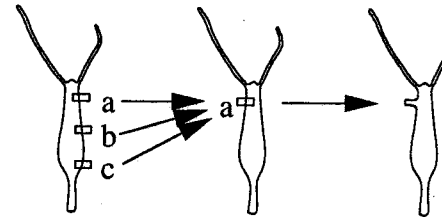
**B-1** 足部形成能の測定：ドナーの a、b、c の位置から組織を切り出し、それぞれを異なったホストの a の位置に移植する。移植片の足部形成率は、およそ a が 0%、b が 50%、c が 100% となる。このことから、足部形成能は、足部から頭部に向かって勾配を成していることが分かる (グラフの実線 (一))。

**B-2** 足部形成抑制能の測定：ドナーの c の位置の組織を、異なったホストの a、b、c に、それぞれ移植し、移植片の足部形成を抑制する割合を測定する。およそ a が 0%、b が 50%、c が 100% である。従って、足部から頭部に向かって足部形成抑制能の勾配が見られる (グラフの破線 (…))。

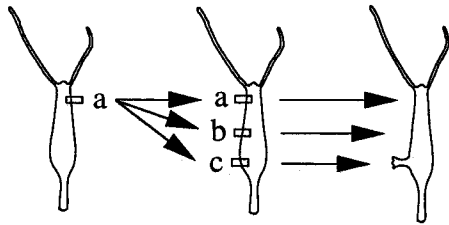
A-1 頭部形成能の測定



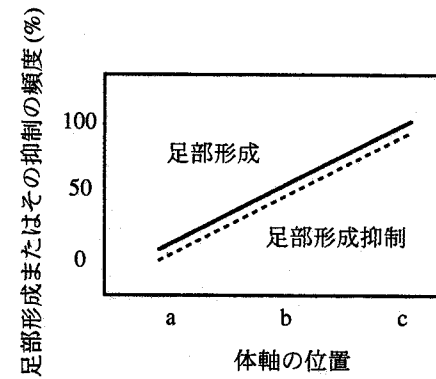
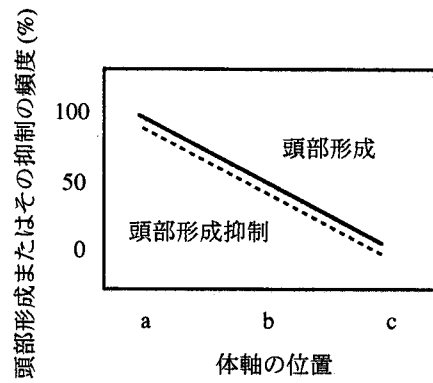
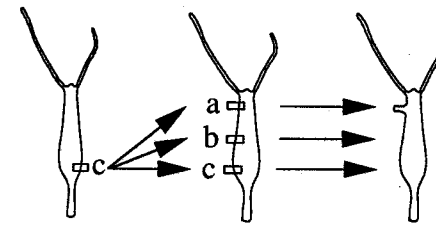
B-1 足部形成能の測定



A-2 頭部形成抑制能の測定



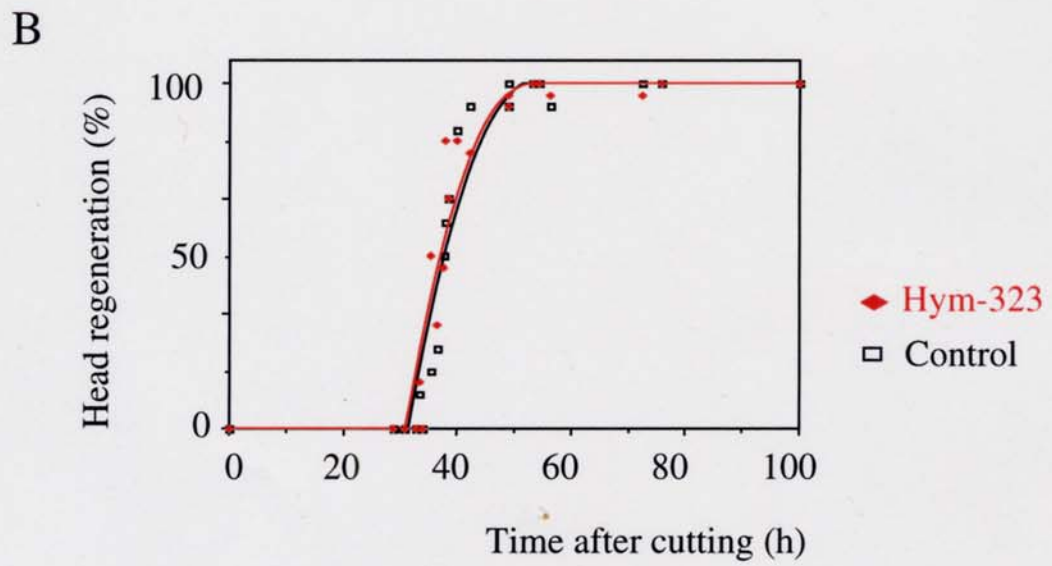
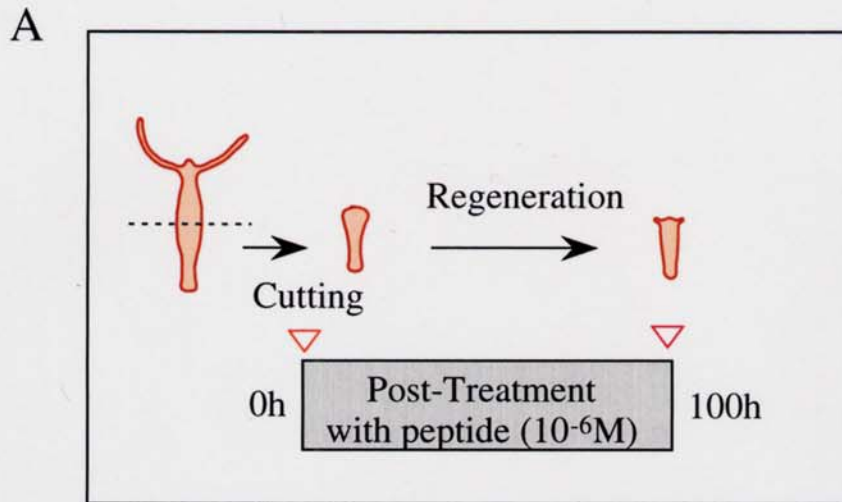
B-2 足部形成抑制能の測定



**図 3 Hym-323 の頭部再生への影響**

**A** 頭部再生実験の手順を模式的に示した。st.1 ポリプを 2 分の 1 に切り分け、下半分をペプチド存在下で 100 時間再生させた。再生先端部分の観察は、顕微鏡下で経時的に行った。

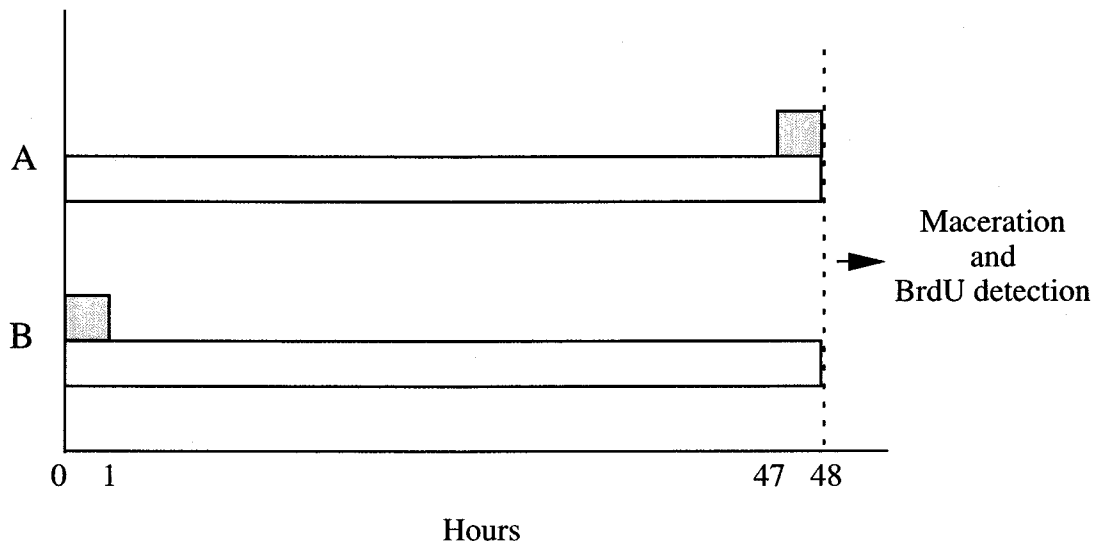
**B** 頭部再生の結果。触手の芽が 2 ヶ所以上形成したときを頭部が再生したと判断した。頭部再生個体数を、百分率で示した。(◆) は、Hym-323 で処理した個体群の頭部再生率を、(□) は、未処理の対照群における頭部再生率を示している。





**図 4 BrdU パルス標識とパルス・チェイス実験の模式図**

**A BrdU パルス標識** : Hym-323 の細胞増殖への影響を調べるために、ペプチド処理 48 時間のうち最後の 1 時間、BrdU 標識した。その後、ヒドラをマセレーション法により単細胞に解離、固定し、抗 BrdU 抗体を用いて標識細胞を検出した。

**B パルス・チェイス実験** : Hym-323 が神経細胞、及び刺細胞の分化に影響するかどうかを調べるために、ペプチド処理 48 時間のうち最初の 1 時間、BrdU で標識した。引き続きペプチドで処理し、48 時間目に A と同様の操作を行った。神経細胞については、全神経細胞のうち BrdU で標識されていたものの割合を示した。刺細胞の分化に関しては、標識、未標識に関係なく全ての 4s を数え、表皮細胞との比を計算した (本文参照)。



 BrdU labeling  
 Hym-323 treatment

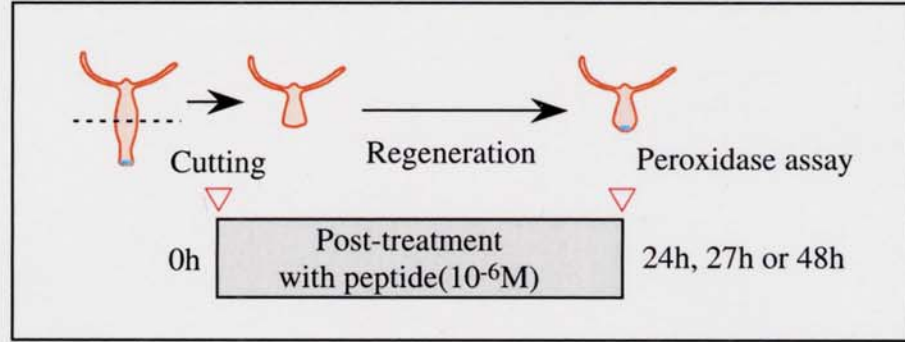
**図 5** 足部特異的ペルオキシダーゼ活性を用いて調べた Hym-323 の足部再生への影響

**A** 実験方法の模式図。 st.1 ヒドラを真ん中で上下に切断し、上半分の足部再生を、Hym-323存在下と非存在下とで再生させ調べた。足部形成の指標には、足部特異的ペルオキシダーゼ活性を用いた。

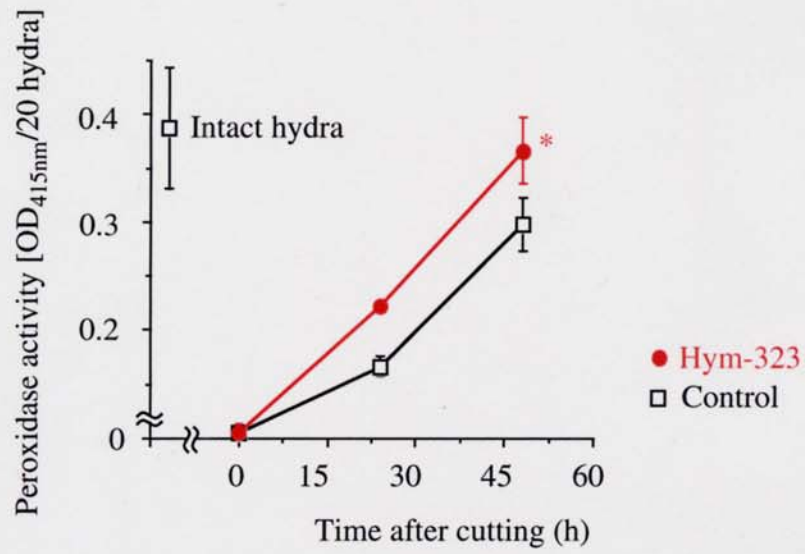
**B** 結果。足部の再生 24 時間と48 時間の活性を示した。(●)は、Hym-323 で処理した個体群を、(□) は、未処理の対照群を示している。また、(\*)は、t 検定の値が 0.05 未満であったことを示している。エラーバーは標準誤差を示す。

**C** Hym-323 の処理濃度依存的な効果。再生を開始してから27時間後、足部特異的ペルオキシダーゼ活性により調べた。(\*)は、t 検定の値が 0.05 未満であったことを示している。また、エラーバーは標準誤差を示す。

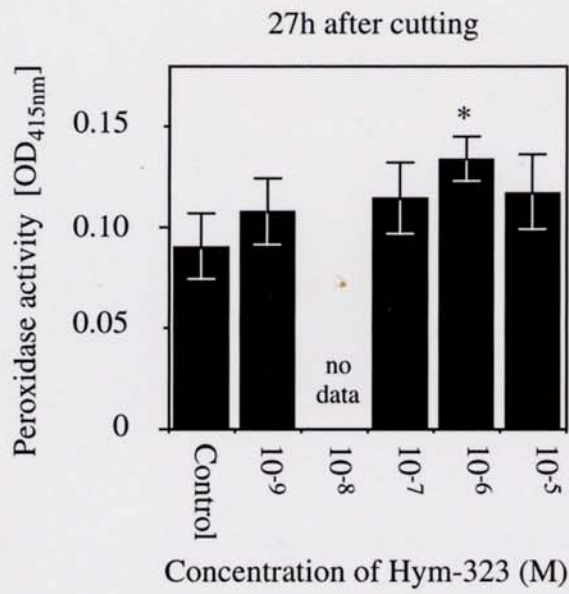
A



B



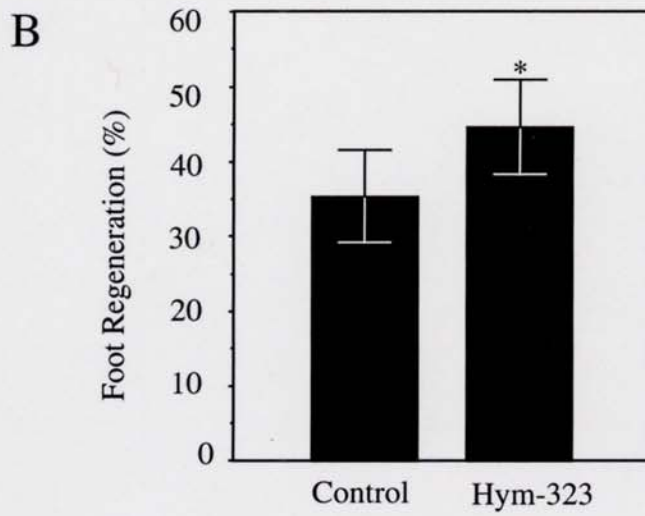
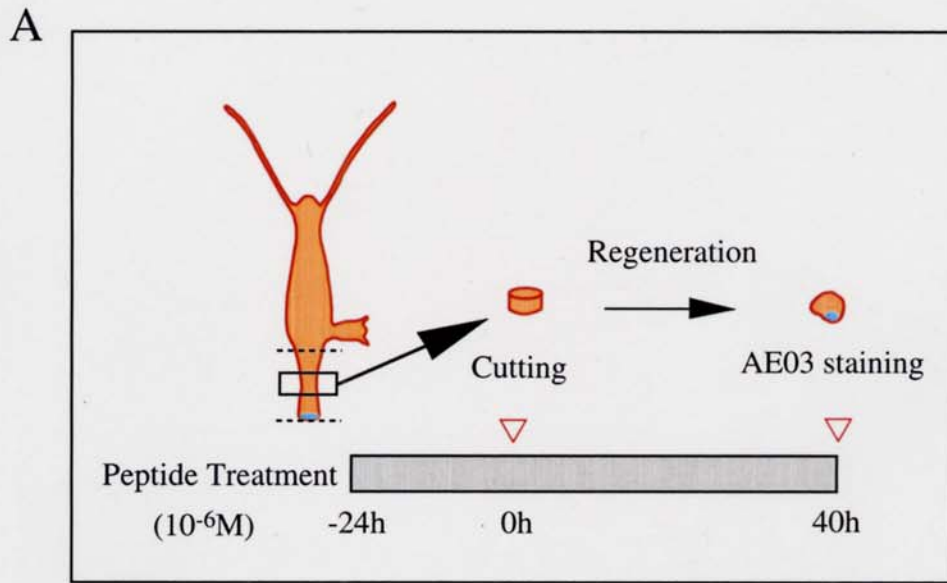
C





**図 6** MAb AE03 を用いて調べた Hym-323 の足部再生への影響

- A** 実験方法の模式図。st.2 のヒドラの足柄を 3 等分し、真ん中の組織の足部形成を、MAb AE03 を用いた抗体染色で検出した。Hym-323 処理は切断前 24 時間から再生開始後 40 時間まで行った。
- B** 結果。再生開始後40時間目の足部再生率を示した。(\*) は、t 検定の値が 0.05 未満であったことを示している。また、エラーバーは標準誤差を示す。
- C** 上記の実験を行った個体数と足部再生個体 (MAb AE03 陽性組織) 数、及び図 B の結果を数値で示した。



**C**

	No. of AE03 positive tissues	No. of tissue examined	% of AE03 positive tissues
Control	63	173	36.4
Hym-323	79	176	44.9

## 図 7 Hym-323 の上皮ヒドラにおける足部再生への影響

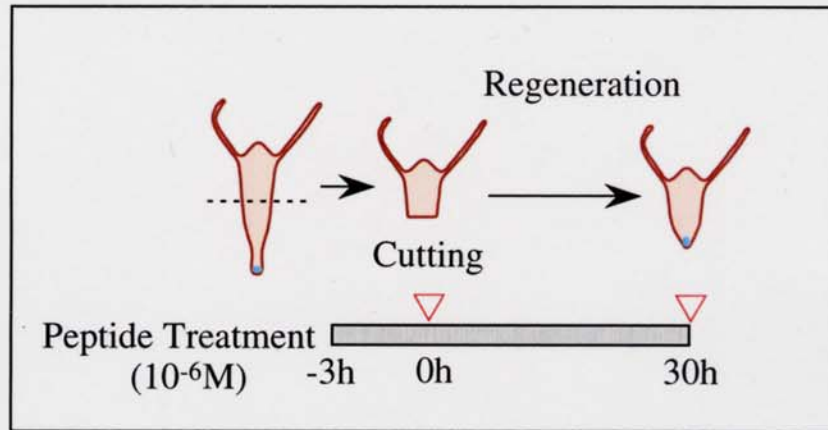
Hym-323 の作用する標的細胞が上皮細胞かどうかを調べるために、上皮ヒドラを用いて足部再生への影響を調べた。再生足部は、MAb AE03 を用いた抗体染色で検出した。

**A** 実験方法の模式図。上皮ヒドラを上下半分に切断し、上半分の足部再生を調べた。ペプチド処理は、再生前に 3 時間、再生開始後から足部再生を検査するまでの 30 時間行った。

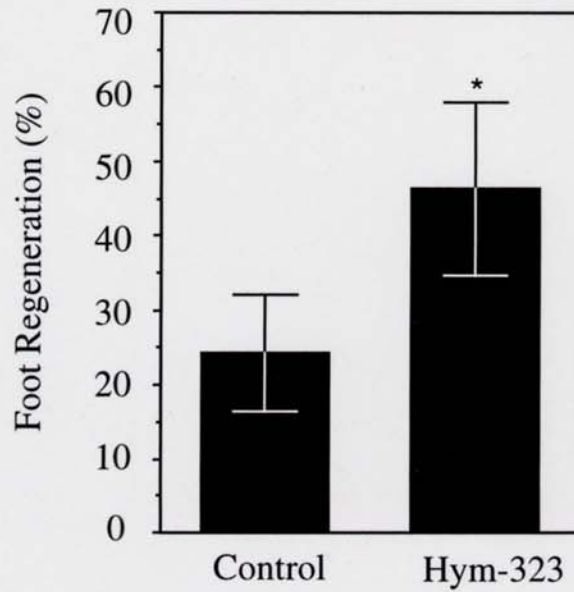
**B** 結果。上皮ヒドラにおける足部再生率 (全実験個体中、足部を再生した個体の頻度) を百分率で示した。(\*) は、t 検定の値が 0.05 未満であったことを示している。また、エラーバーは標準誤差を示す。

**C** 図 B を数値化したもの。実験を行った個体数と足部再生個体数、及びその頻度を示した。

A



B



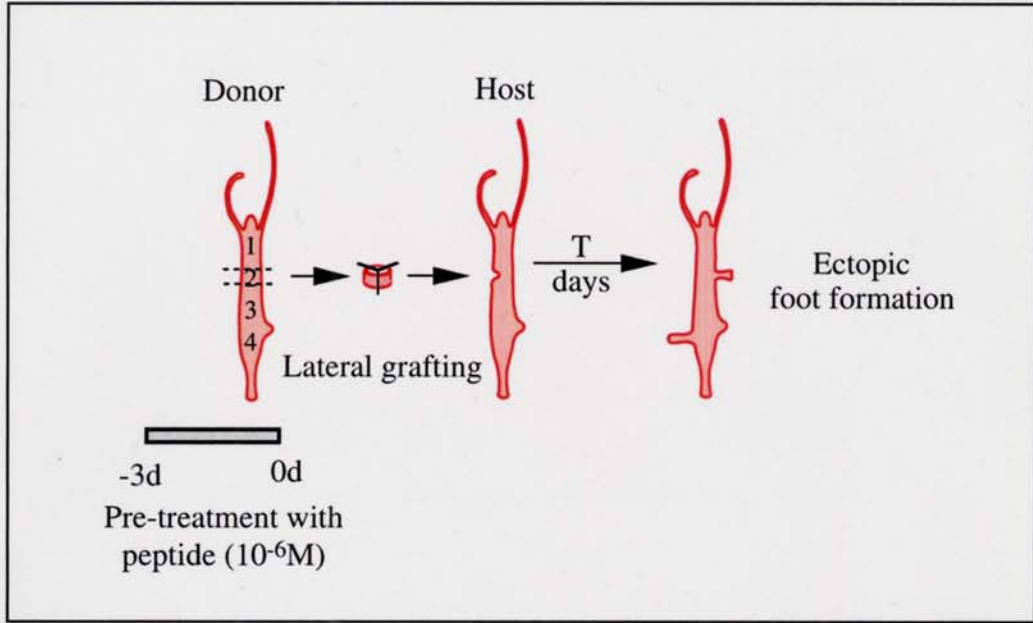
C

	No. of AE03 positive tissues	No. of tissue examined	% of AE03 positive tissues
Control	17	70	24.3
Hym-323	31	67	46.3

**図 8** 側方移植法を用いて調べた Hym-323 の足部形成能への影響

- A** 実験方法の模式図。頭-足軸に沿った足部形成能が、Hym-323 処理により変化するかどうかを検出するために、側方移植を行った。ドナー個体を 3 日間 Hym-323 で処理した後、ポジション 2 の組織を切り出し、未処理のホストのポジション 2 に移植した。その後、11 日間、移植片の様子を観察した。
- B** ホストのポジション 2 における足部形成率の変化。全移植個体数のうち、異所的に形成された足部をもつ個体の頻度を足部形成率とした。(■) は、Hym-323 で処理した移植片を持つ個体群を、(□) は、未処理の組織片を持つ対照群を示している。
- C** 図 B を数値化したもの。移植後、11 日目までの全移植個体数と異所的な足部を形成した個体数、及びその頻度を示す。

A



B



C

	Total no. of grafted polyps	No. of polyps that produced an ectopic foot at each day after lateral grafting (%)				
		3	5	7	9	11
Control	91	1 (1.1)	3 (3.2)	6 (6.6)	6 (6.6)	7 (7.7)
Hym-323	90	2 (2.2)	6 (6.7)	12 (13.3)	14 (15.6)	14 (15.6)

図 9 *hym-323* の塩基配列と予想されるアミノ酸配列、及びノーザンブロット解析

A *hym-323* の塩基配列と予想されるアミノ酸配列。Hym-323 ペプチドは、C 末に 1 コピー、コードされていた (赤の太字)。ペプチドは、その配列の N 末側上流、スレオニン残基 (T) (青の太字) の後ろでペプチダーゼによって切断され、生合成されると思われる (Grimmelikhuijzen et al., 1996)。(\*) は停止コドンを示している。また、予想ポリ A 配列付加シグナルをアンダーライン (□) で示した。

B ノーザンブロット解析の結果。全 RNA を 5  $\mu$ g 泳動し、プローブには、 $^{32}$ P で標識した *hym-323* 全長を用いた。

A

GATTCGGCACGAGAAACAGTTCTATTTGTGTTAATAAGGTTTCAAATTAAGACTAATACA  
ATGGTAGCATACTGGAGACAAGCTGGCTTGAATTATTTGCAGTTTTCACGTATTGCTTCT  
M V A Y W R Q A G L N Y L Q F S R I A S  
AATACCCTTCGAAAATGCCTAAAACCAGAATATCAGACAGAACTATTATGAAGCCTAGC  
N T L R K C L K P E Y Q T E T I M K P S  
TCAGGATTAAACTAACGAAATGGGTTCAGGAAAACCAACAGGAGAAGTCAAGCAAATT  
S G L K L T K W V Q G K P T G E V K Q I  
AAGTTTAAATATTTTCATATTGTATTGACTTTTAACTGCATTAAAGTTTATATGCTTGCAA  
K F \*  
ATATTTAGTTTTTCATTACATTTTTTGTACTAGTAGATAATATAAATAGTCTTACAAAAA  
CTCAATAAAATCTCTCTATACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

B

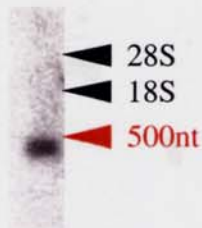
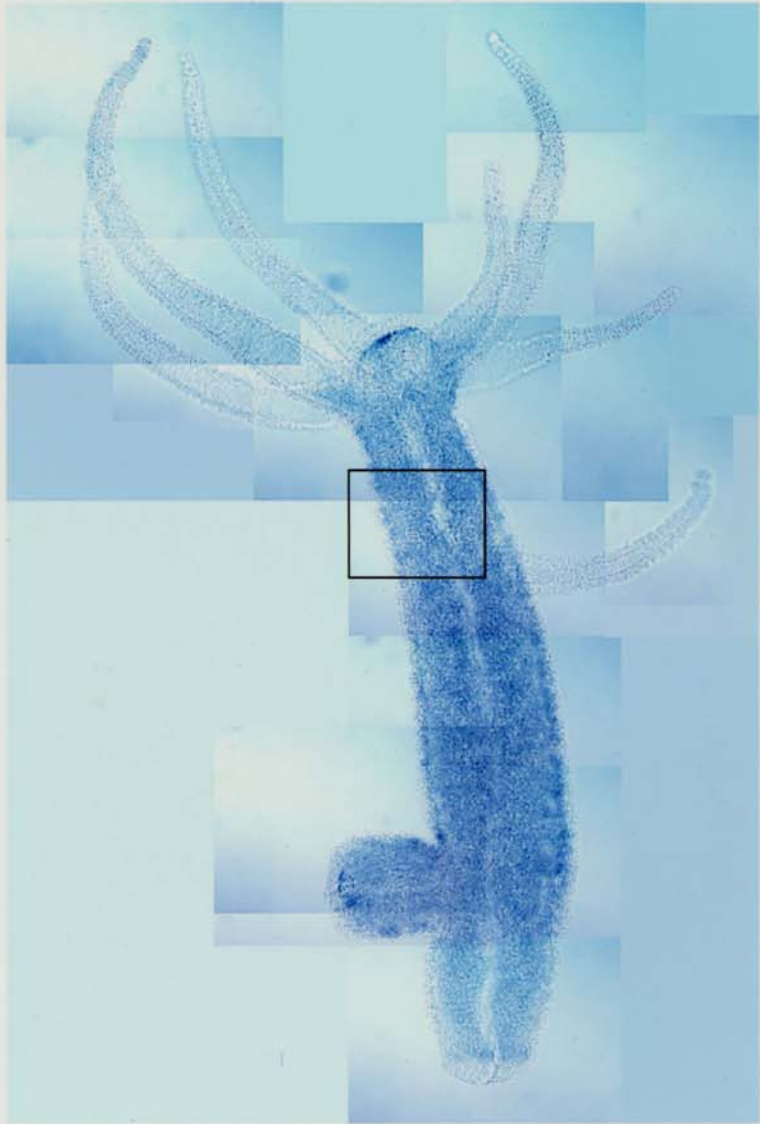




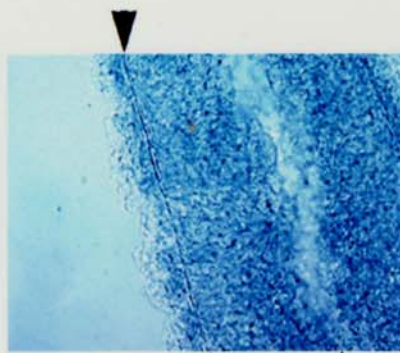
図 10 *hym-323* の空間的発現解析

- A Whole mount *in situ* hybridization 法を用いた *hym-323* の発現パターン。
- B 図 A 中の四角い囲いの領域を拡大した。矢尻 (▼) は、中膠の位置を示している。中膠から向かって左側が外胚葉上皮、右側が内胚葉上皮である。
- C ノーザンブロット解析で用いた領域を模式的に示した (図 1 も併せて参照のこと)。
- D ノーザンブロット解析。左側から、ヒドラ全体 (W)・頭部 (H)・体腔部 (BC)・足部 (F)・外胚葉上皮 (Ecto.)・内胚葉上皮 (Endo.)・上皮ヒドラ (Epi. hydra) を示してある。各試料から抽出した全 RNA を各レーン 5 $\mu$ g 泳動し、プローブには、<sup>32</sup>P で標識した *hym-323* 全長を用いた。下段は、コントロールとして上段と同じメンブレンを用いて、EF1 $\alpha$  mRNA を検出した。

A



B



Ecto. ▲ Endo.

图 10-1

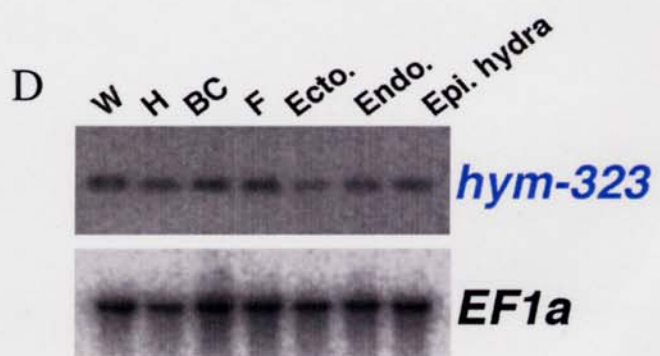
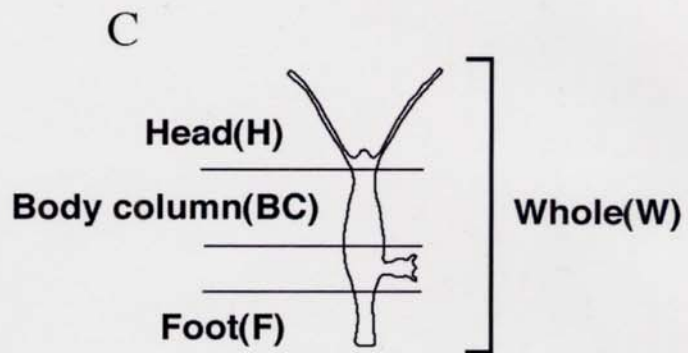


图10-2