

学 位 論 文 題 名

Experimental Studies on the Mechanisms for Specification of
Ectodermal Teloblast Lineages in the Oligochaete Annelid
Tubifex with Special Reference to Cell Interactions

(環形動物イトミミズにおける外胚葉性端細胞系列の
発生運命決定機構に関する実験発生学的研究)

学位論文内容の要旨

動物の初期発生において、胚軸の決定及び細胞の多様性の創出は、細胞間の相互作用による機構と、細胞内因子の非対称な分配による機構によってもたらされることが知られている。しかしながら、モザイク的な発生を行う多くの無脊椎動物胚においては、初期発生過程での細胞間相互作用に関する知見は、ごく僅かなものに限られるのが現状である。本研究は、モザイク卵の典型として古くから知られている環形動物イトミミズ(*Tubifex*)を材料に、その胚発生の主要なプロセスを細胞 (組織) 間の相互作用という観点から、実験発生学的手法を用いて解析したものである。

論文の第一部では、外胚葉の左右相称性を創り出す端細胞の前駆細胞の分裂極性が、周囲の細胞との相互作用によって決定されることを明らかにした。第二部では、端細胞の発生運命が決定されるプロセスに、隣接する端細胞系列からの誘導が組み込まれていることを示した。また第三部では、外胚葉の分節化 (体節形成) が、外胚葉に自律的なプロセスと、それに続く中胚葉の存在に依存するプロセスから成り立っていることを明らかにした。

(I) 端細胞前駆細胞の分裂極性決定機構の解析

環形動物イトミミズの外胚葉組織は、その大部分が発生の早い時期に胚の左右両側に形成される 4 対の外胚葉性端細胞(ectoteloblasts N, O, P and Q)に由来する。左右の端細胞は、それぞれ左右の前駆細胞(NOPQ)の一連の規則的な分裂によって形成される。これらの端細胞は、発生運命が互いに異なるだけでなく、誕生する順序や位置も異なる。即ち、外胚葉性端細胞は胚の左右いずれの側でも背腹軸に沿って Q-P-O-N の順番で並んでおり、明らかに正中線を境に鏡像の配置をとる。このことは、外胚葉の左右相称性が NOPQ の分裂極性によって創り出されることを示唆する。

前駆細胞 NOPQ の分裂極性が内在的な要因によって決定される可能性を検討するために、NOPQ の移植実験を行った。誕生直後の左 NOPQ を胚の右側に移植したところ、移植された NOPQ は正常胚の右 NOPQ と同じ分裂パターンを示した。また、右 NOPQ を左側に移植すると、移植された NOPQ は正常胚の左 NOPQ と同じパターンを示した。このことは、左右いずれの NOPQ も誕生した時点では分裂極性が決定されておらず、予定極性の逆転が可能であることを示している。更に NOPQ の分裂極性が決定される時期を明らかにするために、誕生後の 3 つの発生段階 (早期、中期、後期) にある NOPQ について同様の移植実験を行った。その結果、NOPQ の (異

所的な) 移植部位への反応能は、時間の経過と共に次第に失われることが示された。

前駆細胞 NOPQ の分裂極性を決定する外的な要因を明らかにするために、3つの可能性[NOPQ 同士の相互作用、胚のもつ位置的な情報に対する応答、後方に隣接する中胚葉 (M) 端細胞との相互作用]を検討した。その結果、1) NOPQ 同士の接触によって NOPQ の分裂極性が誘導されること、2) NOPQ 同士の接触が無い状態でも、NOPQ は胚軸に沿った位置的な情報に基づいて極性化すること、そして 3) M 端細胞は、NOPQ の極性化シグナルの発信源ではないが、NOPQ の空間的配置の保持に貢献していることが明らかとなった。

(II) 端細胞の発生運命決定機構の解析

これまでに行われた細胞系譜の研究から、端細胞 N, O, P, Q それぞれは別個の発生運命をたどることが知られている。端細胞の発生運命決定に、隣接する端細胞系列間の相互作用が関与する可能性を検討するために、端細胞の除去実験を行った。端細胞を1個だけ残し、他の3個を除去した場合、“単独”にされた N, P, Q はそれぞれ予定された発生運命(N, P, Q)をたどった。これに対し、“単独”にされた O 端細胞及びその子孫細胞は、P 端細胞の表現型を示した。これは、O 端細胞が O 本来の発生運命をたどるためには、他からの働きかけが必要であることを示している。そこで、O 端細胞系列に働きかける細胞系列を特定するために、N, P, Q 端細胞をさまざまな組み合わせで除去した場合の O 端細胞の発生を追跡した。その結果、O 端細胞は P 端細胞と隣接した場合にのみ、O の発生運命をたどり、その他の端細胞と隣接した場合は全て P の発生運命をたどることが明らかとなった。以上の結果より、端細胞 N, P, Q の発生運命が誕生した時点で既に決定しているのに対し、O 端細胞は誕生直後、多分化能を有しており、隣接する P 端細胞系列からの誘導によって、発生運命が限定されると結論される。

(III) 外胚葉分節化機構の解析

イトミミズ胚の体節を構成する外胚葉組織は、その大部分が胚後方に位置する4対の外胚葉性端細胞から形成される胚帯(germ band)に由来する。外胚葉性端細胞は幹細胞(stem cell)としてふるまい、微小な細胞を前方へと放出し細胞列を形成する。胚帯は、それぞれの端細胞から形成される細胞列の集合体(束)である。端細胞をトレーサー標識する実験から、最初は連続した切れ目のない細胞層である胚帯が、時間の経過とともに一定の大きさの細胞集団へと分画化され、隣接集団間の境界が明瞭となることによって分節化が起こることが明らかとなった。この外胚葉の分節化が外胚葉に自律的なプロセスなのか、それとも中胚葉などの周囲の細胞、組織からの働きかけによるのかを検討した。その結果、外胚葉性胚帯全体を規則的な細胞集団へと分画化するためには、それを裏打ちする中胚葉が必要であることが明らかとなった。中胚葉を除去した場合、外胚葉は分画化されないばかりでなく、細胞塊が不規則に盛り上がった状態となり、背腹方向への広がりも観察されなかった。このような異常な細胞構成は、移植した中胚葉(前駆細胞)で裏打ちさせることによってほぼ完全に解消し、その領域の外胚葉には正常な分節化が誘導された。一方、個々の端細胞を標識し、その細胞列について追跡したところ、中胚葉が欠如した状態でもいずれの細胞列も「分断化」していることが明らかとなった。しかし、この分断によってできた細胞塊の間隔は不規則であり、正常胚でみられる同様の細胞塊の間隔よりも明らかに広がっていた。同様の細胞列の分断化は、端細胞を1個だけ残し、他の3組を除去した胚(中胚葉は正常)でも観察された。この場合には分断化による細胞塊の間隔は規則的であり、中胚葉の体節間隔とほぼ一致していた。以上の結果から、イトミミズ外胚葉の分節化は2つのプロセスから成り立っていると結論される。第一は外胚葉性端細胞から形成される細胞列の分断化である。これは

それぞれの細胞列に自律的に起こる。第二は分断化によって形成された細胞塊を統合して一定の区画にまとめるプロセスである。これは中胚葉に依存したプロセスである。

本研究によって、イトミミズ外胚葉の左右相称性を創り出すプロセス（端細胞前駆細胞の分裂極性の決定、端細胞の発生運命の決定および分節化）において、細胞間の相互作用が重要な役割を担っていることが明らかとなった。本研究の結果は、「モザイク卵」の発生研究が細胞質局在と細胞間相互作用の両面から行われる必要があることを強く示唆する。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 清 水 隆

副 査 教 授 山 下 正 兼

副 査 助 教 授 若 原 正 己

学 位 論 文 題 名

Experimental Studies on the Mechanisms for Specification of Ectodermal Teloblast Lineages in the Oligochaete Annelid *Tubifex* with Special Reference to Cell Interactions

(環形動物イトミミズにおける外胚葉性端細胞系列の
発生運命決定機構に関する実験発生学的研究)

動物の初期発生において、胚軸の決定及び細胞の多様性の創出は、細胞間の相互作用による機構と、細胞内因子の非対称な分配による機構によってもたらされることが知られている。しかしながら、モザイク的な発生を行う多くの無脊椎動物胚においては、初期発生過程での細胞間相互作用に関する知見は、ごく僅かなものに限られるのが現状である。中本章貴提出の学位論文は、モザイク卵の典型として古くから知られている環形動物イトミミズ(*Tubifex*)を材料に、その胚発生の主要なプロセスを細胞（組織）間の相互作用という観点から、実験発生学的手法を用いて解析したものであり、以下の諸点から評価される。

まず申請者は一連の細胞移植実験から、外胚葉の左右相称性を創り出す端細胞の前駆細胞(NOPQ)の分裂極性が、周囲の細胞との相互作用によって決定されることを明らかにした。更に申請者は綿密な実験と注意深い観察から、NOPQ細胞を極性化する位置情報が胚自体に存在することも明らかにしている。ついで申請者は、細胞の除去実験から、端細胞の発生運命が決定されるプロセスに、隣接する端細胞系列からの誘導が組み込まれているという注目すべき事実を明らかにしている。最後に申請者は、端細胞からつくられる外胚葉の分節化（体節形成）機構を解析し、細胞の移植と除去を組み合わせた巧妙な実験から、外胚葉の分節化が、外胚葉に自律的なプロセスと、それに続く中胚葉の存在に依存するプロセスから成り立っていることを明らかにしている。

以上の研究成果は、細胞の分裂極性が細胞間相互作用によって決定される事実の発見、端細胞の発生運命が誘導によって決定されることの発見、さらに外胚葉の分節化（体節形成）機構の解明など、無脊椎動物の発生機構研究の発展に寄与するところ極めて大きいと評価される。申請者に対する最終試験は、平成16年1月27日に多数の大学院担当教官の出席のもとに論文発表と質疑応答の形で行われ、満足すべき結果であった。したがって、審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認める。