

学位論文の要旨

氏名	古賀正明
学位論文題目	細胞追跡によるアフリカツメガエル胚の調節的発生の解析

本論文は、割球の配置を変えられたアフリカツメガエル胚において割球の運命を追跡し、正常胚と比較することで、背腹、頭尾軸および外胚葉の決定と調節の機構を解析したものである。その中では、新しい細胞追跡法も確立した。また、高圧が細胞周期に及ぼす影響について検討した。

第1章では、本研究の背景について概説した。後口動物胚の多くは調節能力が高く、胚の一部分から正常な胚へと発生できる。この研究に有利なアフリカツメガエル胚について、調節胚と正常胚とで割球の運命を比較することにより、細胞質決定因子と細胞間相互作用の発生への関与について情報を得ることができる。

第2章では、材料と方法を説明した。割球の配置を変える操作に際し、割球にトレーサーを顕微注入するか別種の胚から割球を移植し、子孫細胞を追跡した。全胚または連続切片の顕微鏡観察により、子孫の分布を定量的に調査した。または、細胞追跡と共に、二重*in situ* ハイブリダイゼーションによって遺伝子の発現パターンを同時調査した。また、卵抽出液または精子核に高圧を負荷し、M期への核の移行を調査した。

第3章では、背腹軸の決定を乱した4細胞期右半胚および割球移植胚について、割球運命を追跡し、以下の4点を明らかにした。(1)背側割球子孫は、前方内中胚葉を排他的に占め、三胚葉の背側組織の両側に優先クローンとして参入した。(2)腹側割球子孫は、全胚葉の腹側組織の両側に主要クローンとして参入し、背側組織でも見られた。(3)右半胚で失われた左側は、主に腹側割球子孫によって補償された。(4)外胚葉における割球子孫の分布は、原腸胚/神経胚と尾芽胚におけるものとほとんど一致した。

第4章では、頭尾軸形成を乱した胚について、頭尾軸に沿った遺伝子発現パターンを調査した。将来背側中胚葉を作る予定オーガナイザー割球を標識した予定表皮割球で置き換え、原腸胚後期まで発生させた。標識子孫の分布と共に頭部および胴尾部オーガナイザーのマーカ遺伝子の発現パターンを調査した。標識子孫によって占められた背側中胚葉に、正常胚におけるものと同様に、頭部および胴尾部オーガナイザーのマーカ遺伝子が互いに排他的に発現することが判明した。

第5章では、外胚葉組織形成における調節機構を明らかにするため、予定中枢神経系(CNS)割球の欠損胚において細胞追跡を実施した。外胚葉の主要な予定割球である動物極割球は、主要予定CNS割球である背側割球と主要予定表皮の腹側割球から成る。動物極背側(AD)割球を16細胞期に除去した胚について、動物極腹側(AV)割球子孫の分布域をCNSと表皮において調査した。調節胚では、ADクローンの予定CNS領域は、AV割球によって補償されていた。AV割球はさらに、正常胚での予定域とほぼ同じ領域も覆っていた。

第6章では、新たな二つの細胞追跡法について述べた。一つは、発生後期までの細胞追跡が可能なキメラ胚作成への雑種胚の利用である。*X. laevis*卵と*X. borealis*精子から得た雑種胚の細胞は、*X. borealis*と類似の染色性によって*X. laevis*の細胞と区別でき、かつ*X. borealis*胚が持つ大きさの問題点を克服した。もう一つは、細胞追跡と二重*in situ*ハイブリダイゼーションを同一胚で行う方法の確立である。いずれも、第3、4章の実験で有用性を実証した。

第7章では、*Xenopus*無細胞系に高圧を課すことにより、細胞周期制御機構を解析した。卵抽出液に圧力を賦課した場合、低圧では精子核のM期への形態変化が見られたが、高圧ではこれが見られなかった。一方、精子核への高圧賦課では形態変化が見られた。biotin-16-dUTPの核への取り込みを調査した結果、精子核のM期への進行阻害とDNA複製の抑制とは対応した。

第8章では、上記結果に基づき、(1)背腹軸、頭尾軸、外胚葉形成における決定と調節機構、(2)新たな細胞追跡法および(3)加圧と細胞周期制御機構について考察した。結果は、以下のことを示した。(1)(A)胚の前方内中胚葉は高い自律分化能を持つ。(B)腹側割球子孫は細胞間相互作用によってその運命を変更して背側組織へと分化可能であり、これは後方であるほど顕著である。左右性決定に必須である原腸蓋板左側での細胞系譜の相違は、この決定に影響を与える可能性がある。(C)右半胚の背側割球子孫は、腹側割球子孫との相互作用によっておそらく腹側化され、非注入側の体節に参入する。この参入はadaxial cellsの発生と関係する可能性がある。(D)これらにより、右半胚の背側の中心線はわずかに予定右側方向にずれ、腹側中心線はこれに応じて決定される。(E)細胞間相互作用は、頭尾軸方向に順序立った背側中胚葉のマーカ-遺伝子発現を予定表皮割球子孫に誘導できる。(F)主要な予定CNS(AD)割球を除去した場合、外胚葉で失われたその予定域は、残りの予定外胚葉(AV)割球がエピボリーの際に正常胚におけるものより広がることで補償される(2)*Xenopus*雑種は、細胞追跡実験において、*X. borealis*よりも信頼性が高い。また、細胞追跡と二重*in situ*ハイブリダイゼーションを組み合わせた全胚三重染色法は、胚表面のみでなく、胚内部の調査にも適用可能である。(3)卵抽出液への高圧賦課の結果は、高圧が生体内でもDNA複製に影響を与えることで細胞分裂を停止させることを示唆する。

論文審査の要旨

報告番号	理工論 第 64号	氏名	古賀 正明
審査委員	主査	坂井 雅夫	
	副査	内海 俊樹	笠井 聖仙

学位論文題目 細胞追跡によるアフリカツメガエル胚の調節的発生の解析
(Clonal analyses on the regulative development of *Xenopus* embryos)

審査要旨

提出された学位論文及び論文目録等を基に学位論文審査を実施した。本論文はアフリカツメガエルの正常胚及び実験胚の初期の割球の細胞追跡を行うことで、胚の調節的発生の解析を行ったものであり、全文8章より構成されている。

第1章は序論である。調節胚の研究の意義、及びそこでの細胞追跡の重要性について述べられ、以降の研究の方針が示されている。

第2章は本研究で行われた実験の材料と方法が包括的に述べられている。

第3章は本論文の中核をなす部分であり、4細胞期に左側半分を除去した胚(右側半胚)の背側及び腹側の細胞(割球)の細胞系譜をlineage tracer (Oregon Green Dextran)注入により調べている。その結果、外見からは背側割球は主に右側の神経を形成し、腹側割球が左側の神経の多くを形成しているように見えるものの、内部を組織切片で観察すると、背側内中胚葉は主に背側割球から形成され、特に最前方の背側内中胚葉は完全に背側割球由来であることを示した。また、8細胞期背側割球の隣に腹側割球を移植した胚での腹側割球子孫の運命変更を明らかにした。これらにより、調節胚では、背側中核部分の自律的発生と、それによって誘導される元々の腹側細胞の背側への参加が全体としての胚のバランスの取れた発生を導くことを示した。

第4章は32細胞期の8個の動物側背側の割球のうち4個を動物側腹側の割球に入れ替え、移植されたこれらの割球の細胞系譜を調べたものである。移植された動物極腹側割球起源の細胞は、背軸中胚葉の全域と背側外胚葉の一部の領域に分化し、そこでの遺伝子発現パターンは正常胚のそれと同じであることを示した。

第5章は16細胞期の4個の動物側背側割球を除去した胚について腹側の動物側割球の細胞系譜を調べたものであり、失われた予定中枢神経系は、動物極腹側割球により補償されることを示した。

第6章は細胞追跡とmRNAの発現パターンを調べるin situ hybridizationの方法について述べたものである。特に、新しく開発した2種類のmRNAの発現パターンを調べるin situ hybridizationと蛍光物質に対する抗体を使用した発色反応を用いた細胞系譜の追跡を同時に行い、結果的に三重の異なる色素の発色による解析法が有効であることを示した。

第7章は無細胞系での細胞周期制御に対する圧力の影響について述べたものである。

第8章は総合討論であり、アフリカツメガエルの背腹軸がどのように形成されるかを議論している。

以上本論文は、アフリカツメガエル調節胚の様々な細胞の発生運命を詳細に調べた世界でも初めての研究であり、背側のオーガナイザーの中核的部分が自律的にのみ発生するなどの重要な知見を明らかにした。また、研究の過程で示された二種類の遺伝子のin situ hybridizationと細胞追跡の三重染色の方法は、今後の発生生物学研究に大きく寄与する。

よって、審査委員会は博士(理学)の学位論文として合格と判定する。

学 力 確 認 結 果 の 要 旨

報告番号	理工論 第 64号	氏 名	古 賀 正 明
審査委員	主 査	坂井 雅夫	
	副 査	内海 俊樹	笠井 聖仙

平成24年11月27日(火)13時30分から15時30分までに学位論文発表が実施された。PowerPointを使用し、研究の背景から実際の研究に至るまで、しっかりした構成で発表が行われ、それぞれのスライドも良く工夫されていた。約75分の口頭発表の後、以下に示すような質疑応答が行われた。

〔質問1〕背側の動物側割球は、正常発生では腹側割球が背側化するのを阻害していると考えられるのか？

〔回答1〕むしろ、正常発生での腹側割球はその能力の半分だけを使っていると考えられる。腹側割球は潜在的には腹側にも背側にも分化できるのだが、正常発生では腹側だけになっていると考えられる。

〔質問2〕16細胞期の背側動物側割球を取り除いた実験のときに、腹側の動物側割球が神経や表皮のほぼ全てを作るわけであるが、この場合、全体としては胚は正常なプロポーションを持っている。しかし、神経や表皮のボリュームは正常胚の半分になっているはずだが、実際に表皮が薄かったり神経管が小さかったりということはあるのか？

〔回答2〕ボリュームについての詳細な検討は行っていない。言えるのは、全体として正常に発生しているということだけである。

〔質問3〕背側の前方が元々の背側だけからできていたという結果は、オーガナイザーが細胞自律的にできるというモデルを支持しているということになるのではないか？

〔回答3〕背側動物側細胞を除去する実験では、元々の腹側動物側割球が前方内中胚葉にわずかながら参入していた。よって、今回の結果から、オーガナイザーが細胞自律的にできるということを断言する事はできない。今後さらに検討が必要である。

〔質問4〕3重染色の実験で、胚内部が染まっていた。これは固定するとき胚を半分に切るということであつたが、切った後にも固定を続けたのか、それとも、固定後、切断し、直ちに染色したのか？

〔回答4〕固定後、切断し、直ちに染色した。なお、切断しなければ、lineage tracerの抗体染色は内部にまで及ばなかった。おそらくは抗体が胚内部にまでは入って行かないものと考えられる。

〔質問5〕Oregon Greenは細胞内カルシウムを阻害する。これを注入することで細胞が死ぬことはないのか？

〔回答5〕これはデキストランに結合させてあるので、単体での作用とは違うかも知れない。現実問題としては、細胞に対する阻害的効果がない事は、細胞が正常に分裂していること、胚発生に阻害的効果がないことから確認している。

〔質問6〕多重染色実験で、プローブは中の方まで染みこむのか？

〔回答6〕プロナーゼKで処理することにより、中まで染みこむようにしている。

なお、語学力については、学位論文に関連のある外国語(英語)論文を与え、語学力の試験を行った。その結果、本人には外国語文献の十分な読解能力があることを確認した。また、英語論文作成能力があることは、本人が責任著者である英語論文が4編あることから確認した。よって審査委員会は、申請者が博士(理学)の学位を与えるに十分な学力と見識を有するものと判定した。