The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	蛍光ライブイメージング法を用いたワカレオタマボヤ幼生期の形態形成の解析
Author(s)	岸, 香苗
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61505
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　岸 香苗　　）	
論文題名	蛍光ライブイメージング法を用いた ワカレオタマボヤ幼生期の形態形成の解析

論文内容の要旨

発生過程においては、細胞の分裂、移動、変形、成長、死などが適切に組み合わさることで複雑な器官・個体ができあがる。一方、細胞数が多く、発生に時間のかかる多くの動物においては、これらの現象の全体像を捉えることは難しい。

「これまで知られる中で最も単純な脊索動物」とも言われるワカレオタマボヤ(*Oikopleura dioica*)は、早い発生スピードと少ない細胞数、透明な体、という、個体発生の全体像を捉えるのに有利な特徴を備え、脊索動物の系で、1細胞から成体までの全細胞挙動を追跡することが可能だと考えられる。本研究ではまず、オタマボヤで細胞挙動を１細胞レベルで追跡するため、蛍光ライブイメージング法を確立した。そして、特にダイナミックな形態形成を行う幼生期(受精後3-10時間)の発生を観察し、いくつか興味深い現象を発見した。

まず、体全体で細胞移動現象を観察し、3種の長距離細胞移動を発見した。一つ目のOral gland前駆細胞は、4核をもつ1細胞が体幹部後方から前方に向かって移動し、左右に2核ずつ2細胞に分かれ、口の左右まで移動する。二つ目の内胚葉索は、脊索の右側の一列の細胞が、体幹部に向かって移動する。三つ目のSubchordal cell前駆細胞は、孵化時には体幹部にある2細胞で、内胚葉索と入れ替わるように、内胚葉索と同じ道を逆方向(尾部先端方向)へ移動する。

これらの細胞移動の制御メカニズムを知るため、切除実験を行った。すると内胚葉索は、少なくとも移動時には体幹部必要としないことがわかった。一方、Subchordal cell 前駆細胞は、尾部後端からのシグナルに従って移動していることが示唆された。今後、これらの動きの制御メカニズムをより深く調べることで、細胞移動制御に関する新たな知見をもたらすことが期待される。

次に、複雑なパターンの形成過程をとらえるため、表皮の形態形成に着目した。体幹部表皮は単層上皮であり、左右対称に個体差なく細胞が並んでいる。この形態形成過程について、1細胞レベルでの記載を行うため、まず成体表皮の細胞に名前を付け、アトラスを作成した。次にパターン形成時に個々の細胞がどのような挙動を取るのか観察した。

細胞が列をなすFol領域では、背腹方向の細胞分裂を繰り返しながら列を形成していくようすが観察された。細胞分裂の方向やタイミングもほぼ左右鏡像対称であることもわかった。そして、表皮のパターン形成にも個体差はないこと、細胞移動や細胞死より、細胞分裂の方向と回数、タイミングの制御が重要であることが示唆された。

さらに、これらの細胞の由来を調べるため、Kaedeを使って2細胞期(それぞれの子孫細胞は、おおむね体の左右片側を形成する)の片側の細胞をラベルし、細胞の系譜解析を行った。すると、体の右側にありながら左割球の由来を持つ細胞、あるいはその逆が多く観察された上、そのパターンには個体差がなかった。つまり、左右割球の子孫細胞境界と、表皮の左右境界が一致しないことが示された。

細胞移動・上皮のパターニングという現象における新たな脊索動物モデル系の提供、および、ワカレオタマボヤの発生に関する将来の研究展開の重要な基盤を提供する。

In morphogenetic process, appropriate coordination of cell devision, migration, growth and death contribute to making complex animal bodies. The appendicularian, *Oikopleura dioica*, is a simple planktonic tunicate. It has rapid growth speed, short life cycle (five days at 20℃), small number of cells (less than 3000 cells in juvenile) and a transparent body. We consider that it would be possible to describe every cell behavior from one cell to adult using this "simplest chordate". Using time-lapse imaging of larval development, some interesting morphogenetic processes were observed.

First, three cell populations exhibit long-distance migration. (i) A single multinucleated oral gland precursor migrates anteriorly within the trunk region and eventually separates into two cells on the left and right sides. (ii) Endodermal strand cells are collectively retracted from the tail into the trunk and form the rectum in adult trunk. (iii) Two subchordal cell precursors individually migrate out from the trunk to the tip of the tail. The migration of subchordal cell precursors starts when the endodermal strand cells enter the trunk, and follows the same path but in an opposite direction to the endodermal strand. Surgical removal of the trunk and the tail tip from the tail demonstrated that the endodermal strand cells do not require the trunk for migration, and that the subchordal cell precursors would be attracted by the distal part of the tail. This well-defined, invariant and traceable long-distance cell migration provides a unique experimental system for exploring the mechanisms of versatile cell migration in this simple organism with a chordate body plan.

Second, I observed and describe epidermal patterning during larval development. The trunk epidermis, called oikolpastic epithelium, is elaborate and patterned to secrete the complex house and food concentration filter within the house. It is subdivided into bilateral territories that are characterized by invariant number, sizes, and shapes of epitherial cells of monolayer. First, I determined nomenclature and named most of cells in adult epidermis. Second, I observed the patterining processes by time-lapse imaging. The pattern was not evident at hatching, and rapidly formed in 5 hours post hatching. Orientation of cell division, but not cell death or migration, is basically important factor for this patterining process.

Time-lapse imaging of the epidermal cells revealed some interesting and region specific pattern formation processes. (i) Fol region comprises of rows of aligned cells in the anterior lateral region. Cells were arranged into the rows by only D-V oriented cell divisions, and region boundary might be already formed before or just after hatching. (ii) Eisen region is a rosette that consists of large seven cells in the lateral region. The rosette was formed by cell migration and rearrangement without cell division at about 5 hpf. (iii) A pair of right and left big spherical cells in the anterior-ventral region of the trunk undergo successive asymmetric and unequal cell divisions in a stem cell manner. The smaller daughter cells move towards the ventral midline to generate a chain of cells, and the bigger one stays there gradually decreasing its size at every cell division. (iv) A row of cells along the dorsal midline: The divisions of cells on both sides of the midline show the mirror image left-right symmetry on the orientation and timing. (v) Labeling of a blastmere of the 2-cell stage embryo, which roughly gives rise to the left or right side of the body, revealed that the boundary of the descendant cells does not match with the midline of the trunk epidermis. These studies of oikolpastic epithelium patterning would provide an interesting model system to analyze cell behaviors in generation of elaborate and intricate 2D cellular pattern in an invariant way at a single cell level.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　岸　香苗　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	西田　宏記
	副 査　教 授	松野　健治
	副 査　准教授	木村　幸太郎

論文審査の結果の要旨

発生過程においては、細胞の分裂、移動、変形、成長、死などが適切に組み合わさることで複雑成体ができあがる。一方、細胞数が多く、発生に時間のかかる多くの動物において、これらの現象の全体像を捉えることは難しい。申請者は、早い発生スピードと少ない細胞数、透明な体などの利点を持つ脊索動物ワカレオタマボヤを用いて、細胞挙動を詳細に追跡することを目的に研究を行った。本論文は三部構成になっており、第一部では、ワカレオタマボヤでの蛍光ライブイメージング法を確立したこと、第二部では、体内を長距離移動する細胞を発見したこと、第三部では、細胞分裂を中心に表皮組織の形態形成過程の解析を行ったことをそれぞれ報告している。

ワカレオタマボヤで細胞挙動を1細胞レベルで追跡するため、蛍光ライブイメージング法を確立した。この手法を用い、幼生期の体全体で細胞移動現象を観察し、3種の長距離細胞移動を発見した。Oral gland 前駆細胞は、4つの核をもつ1細胞が体幹部後方から前方に向かって移動し、左右に分かれる。二つ目の内胚葉索は、尾部から体幹部に向かって吸い込まれるように移動する。三つ目の Subchordal cell 前駆細胞は、孵化時には体幹部にある2細胞で、内胚葉索と入れ替わるように、内胚葉索と同じ道を逆方向(尾部先端方向)に向かって移動する。これらの移動制御メカニズムを調べた結果、内胚葉索は移動時に体幹部を必要としないことや、Subchordal cell 前駆細胞は、尾部後端からのシグナルに従って移動していることが示唆された。これらの成果は、Developmental Biology 誌に論文として出版された。

次に、複雑なパターンを持ちながら個体差のない組織形成の全容をとらえるため、表皮の形態形成に着目した。ワカレオタマボヤ体幹部の表皮は、単層上皮であり、左右対称なパターンを持つ。このパターンは、領域ごとに細胞の大きさや形が異なるなど規則性に乏しく複雑である一方、個体差はほとんどない。複雑なパターンを個体差なく作り上げるために、どのような形態形成運動が起こっているのかを調べた結果、パターン形成過程にも大きな個体差はなく、細胞移動や細胞死ではなく、細胞分裂の方向と回数、タイミングの制御が重要であることを明らかにした。また、左右割球由来の子孫細胞の境界と、表皮の左右境界が一致しないことを示し、パターン形成には、細胞の系譜からの情報よりも、細胞の最終的な位置情報が重要である可能性が示唆された。

上記の研究は、細胞移動・上皮のパターニングという現象における新たな脊索動物モデル系の提供、および、ワカレオタマボヤの発生に関する将来の研究展開の重要な基盤を提供することになり、新奇性と学術的価値が高いと考えられる。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分に価値のあるものであると認める。