| | |
|---|---|
| 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 | |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

博士論文

平成 28 年度

# 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

**Imaging analyses of morphogenesis during larval development of the appendicularian, *Oikopleura dioica***

大阪大学

大学院理学研究科

生物科学専攻

岸　香苗

# 目次


要旨 5

第1章 序論 9

第2章 ライブイメージング方法の確立 11

2.1 序論 11

2.2 結果と考察 12

2.2.1 細胞の可視化方法の検討

2.2.2 観察方法の検討

第3章 長距離細胞移動の観察と解析 16

3.1 序論 16

3.2 結果 17

3.2.1 3 種の移動細胞の移動様式

3.2.1.1 Oral Gland 前駆細胞

3.2.1.2 内胚葉索と Subchordal Cell 前駆細胞

3.2.2 移動細胞の由来と将来の運命

3.2.3 切除実験

3.3 考察 28

3.3.1 3 種の移動細胞

3.3.2 内胚葉索の発生運命

3.3.3 Oral Gland と Subchordal cells

3.3.4 細胞移動のメカニズム

第4章 表皮の形態形成過程 32

4.1 序論 32

4.2 結果 33

4.2.1 Oikoplastic Epithelium の領域の定義

4.2.2 幼生の表皮のパターン形成過程

4.2.3 各細胞の姉妹関係

4.2.4 左右境界と領域境界について

4.3 考察 55

4.3.1 表皮細胞のアトラスとパターン形成過程

4.3.2 分裂回数と細胞の大きさ、細胞の分裂方向

4.3.3 幹細胞様の分裂

4.3.4 由来の左右非対称性

4.3.5 位置情報とパターニング

第5章 総括と今後の展望 59

第6章 材料と方法 61
6.1 ワカレオタマボヤの飼育
6.2 mRNA 合成用プラスミド
6.3 mRNA 合成
6.4 卵巣への mRNA インジェクション
6.5 FM-dye による細胞膜の可視化
6.6 Kaede による細胞標識
6.7 顕微鏡観察
6.8 顕微手術
6.9 画像解析
6.10 SYTOX Green 染色
6.11 成体表皮を平面上に展開したサンプル作成と DAPI・Phalloidin 染色
6.12 免疫抗体染色
6.13 Simi BioCell Viewer
第7章 引用文献 67
発表リスト 71
謝辞 74
Supplemental Material 75

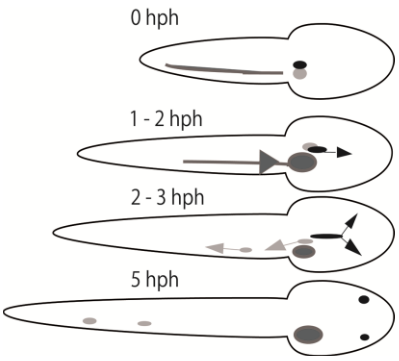
# 要旨

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・個体ができあがっていく。一方で、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、そして透明な体、という、顕微鏡観察によって個体発生の全体像を捉えるのに有利な特徴を備える。この生物を用いれば、脊索動物の系で、1 細胞から成体になるまでの全細胞挙動を追跡することが可能になると考えられる。受精後 3 時間で孵化するまでの胚発生期に関しては細胞系譜や核の動きなどの記載が行われてきた一方、それ以降の形態形成が完了するまでの幼生発生期である 7 時間は、ダイナミックな形態形成を行う時期でありながら、観察知見が少ない。本研究では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、幼生期の観察を行い、いくつかの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 つの核をもつ 1 細胞が細長くなって体幹部後方から前方に向かって移動し、内柱付近で左右に 2 核ずつの 2 細胞に分かれ、口の左右に存在する Oral gland 細胞となる。二つ目の内胚葉索は、孵化時には尾部の脊索の右側に位置しているが、孵化後 45 分頃、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。

これらの細胞移動、特に尾部内で起こる二つの細胞移動の制御メカニズムを知るため、体幹部を切除して、移動に対する体幹部の影響を調べたところ、内胚葉索は、①少なくとも移動時には体幹部からの働きかけを必要としない、②先端の細胞や体幹部の細胞によって引っ張られるわけでは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、これらの複雑な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。

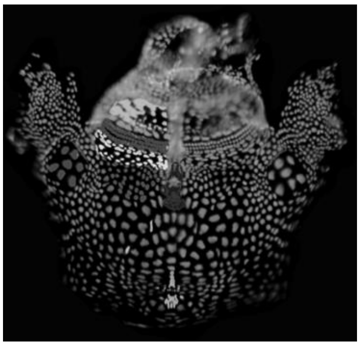


図：3 種の移動細胞

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(図)。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。

1 細胞レベルでの記載を行うため、完成した表皮の個々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、分裂方向やそのタイミングの観察を行った。

例えば決まった数の細胞が列状に並んでいる Fol 領域では、細胞が背腹方向の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。背側には正中線に沿って並ぶ一列の細胞があること、これらの細胞はもっぱら前後軸方向に分裂すること、さらに、この正中線を境にして、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。これらを含め、左右対称な表皮のパターン形成にも個体差はなく、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がわかった。



図：成体表皮の細胞核（DAPI 染色）。

この左右対称なパターンの由来を調べるため、Kaede を使って 2 細胞期(それぞれの割球の子孫細胞は、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て、細胞の系譜解析を行った。その結果、体の右側にありながら左割球の由来を持つ細胞、あるいはその逆の細胞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が示された。よって、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。

これらの結果は、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。

**主論文**：Kishi, K., Onuma T.A., Nishida, H. “Long-distance cell migrations during larval development in the appendicularian, *Oikopleura dioica.” **Dev. Biol.*** (2014) 395: 299-306.

**参考論文**：Wang, K., Omotezako, T., Kishi, K., Nishida, H., and Onuma, T. A. “Maternal and zygotic transcriptomes in the appendicularian, *Oikopleura dioica*: Novel protein-encoding genes, intra-species sequence variations, and trans-spliced RNA leader.” ***Dev. Genes Evol.*** (2015) 225: 149-59

## 英文要旨

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.

# 第１章　序論

「一細胞である受精卵から、複雑な組織や個体がどのように出来上がってくるか」を知ることは、多くの発生生物学者を引き付けてきた重要なテーマである。例えばこの疑問は、「どのような遺伝子が形態形成を制御するか」、という分子レベルの研究と、「細胞の分裂・移動・変形・成長・死など様々な細胞現象が、どのように組み合わさって体を作り上げるか」、という細胞レベルの疑問とにわけることができる。前者に対しては、様々な動物においてよく研究がなされているが、後者については、特に脊索動物の系では、その細胞数の多さ・発生時間の長さ・形態の複雑さ等の問題があるために、解析が遅れている。

本研究では脊索動物で細胞レベルの現象を詳細に観察するための系として、「これまで知られる中でもっとも単純な脊索動物である」とも言われるワカレオタマボヤ(*Oikopleura dioica*)を用いた。ワカレオタマボヤは、脊索動物門尾索動物亜門に属する海洋性の動物プランクトンである。脊索、内柱、背側神経系、鰓裂、筋肉で動く尾といった脊索動物の基本体制を備えながら、①世界中の海で採集可能である(Fenaux et al., 1998)、②20℃で飼育すると、受精後 3 時間で孵化、受精後 10 時間で成体と同様の形態まで発生し（3 時間から 10 時間までに期間を幼生期と呼ぶ、その後は幼若体と呼ぶ）、受精後 5 日で性成熟が完了する、という早い発生スピードと短い世代時間を持つ、③成体で約 3000 細胞という少ない細胞数と単純な体制を持つ(Nishida, 2008)、④一生を通じて体が透明である、⑤胚発生期の細胞系譜が分かっており、個体によらず一定である(Stach et al., 2008)、といった特徴を持っている。また、⑥人工海水を用い、研究室内で数年間の継代飼育が可能である(Spada et al., 2001; Fujii et al., 2008; Omotezako et al., 2013)、⑦ゲノムが解読されている(Seo et al., 2001; Denoeud et al., 2010)、⑧発生ステージごとのマイクロアレイデータが公開されている(Danks et al., 2013)、⑨核酸の卵巣顕微注入法、RNAi 法、および DNAi 法が確立されており、特定遺伝子の過剰発現や機能阻害が可能である(Omotezako et al., 2013, 2015）といった、研究基盤が整いつつある生物である。その短いライフサイクルから、遺伝学のモデル動物となることが期待される生物であると同時に、そのシンプルな体制と個体差の少ない発生を活かし、脊索動物の発生に関する単純なモデルとなることが期待されている生物でもある。この生物を用いれば、脊索動物において、1 細胞から成体になるまですべての細胞のふるまいを理解することも可能であると考えられる。

しかし、オタマボヤ類の形態形成過程に関する記載は、これまであまり多くない。孵化前の発生に関しては、体の透明性を活かしてノマルスキー顕微鏡で核等を見ることができ、これを継時的に観察することで、卵割期の細胞の形態や細胞系譜の記載など、形態形成の記載・研究が進んできた(Stach et al., 2008; Fujii et al., 2008)。加えて孵化後の幼生発生でも、神経系・消化管等の孵化時にははっきりしない器官が急激に形成されたり、尾部が大きく伸長したり、といったダイナミックな形態形成が起こっている。しかし、孵化後の幼生期に関する記載は乏しく、固定胚を用いた器官レベルの記載や、ステージごと、あるいは特定の組織ごとの形態の記載、一部の遺伝子発現解析にとどまっていた(Delsman, 1910,1912; Canestro et al., 2005; Kugler et al.,

2010)。そこで、本研究ではオタマボヤの幼生発生過程における形態形成過程を、ライブイメージング技術を用いて詳しく観察し、形態形成過程における細胞レベルでの現象を網羅的に記述することで、形態形成メカニズム解明の基盤確立を目指した。

本研究は、三つの章から成り立っている。まず、ワカレオタマボヤの胚や幼生で1細胞レベルの観察を可能にするため、ワカレオタマボヤにおいて蛍光ライブイメージングを行うための方法を確立した。細胞や組織の可視化方法として、mRNA 卵巣顕微注入法を応用し、蛍光融合タンパク質を胚で発現させる方法、および、顕微注入法を使わずに組織を可視化する方法を開発した。また、一匹の幼生を続けて観察するため、泳ぎに伴う動きを止めるためのマウント法の検討も行った。詳細は二章に述べる。

次に、この蛍光ライブイメージング法を用いて幼生期の体全体観察したところ、体内を長距離移動する細胞群を3種類発見した。孵化後1時間半ほどから、体幹部（オタマジャクシの尾部以外の部分を指す）の後方から前方に向かって4核を持つ1細胞が細長くなって動き、左右に分かれる動きをする oral gland 前駆細胞。孵化時は尾部に存在する一続きの細胞群が孵化後45分から2時間の間に、体幹部へと吸い込まれるように動く内胚葉索細胞。内胚葉索と入れ替わるように、別の2細胞が、孵化後2時間頃から孵化後4時間まで、内胚葉索と同じ道を逆方向に進む subchordal cell 前駆細胞、の3種類である。この時期に体内を大きく移動する細胞群はこれら3種類以外には観察されないこともわかった。体幹部や尾部を切除する実験によって、内胚葉索と subchordal cell 前駆細胞の移動メカニズムについてしらべ、内胚葉索も subchordal cell 前駆細胞も移動時には体幹部からの作用を必要としないこと、内胚葉索は前端の細胞がなくても移動ができること、subchordal cell は尾部先端から誘引を受けている可能性があることなどが分かった。詳細は3章で述べる。

さらに、より複雑な組織である体幹部表皮の形態形成運動の観察を行った結果、左右対称で個体差のない表皮パターンを作り上げるための個体差のない形態形成運動のようすが観察された。例えば、背腹方向の分裂を繰り返しながら細胞列を作る領域や、細胞がシートで移動する領域などが見つかっている。また、幹細胞様の分裂をする細胞など、脊索動物では初めて見られる細胞分裂様式も観察さた。さらに、細胞の標識を行うことによって、左右非対称な体幹部表皮においても、細胞は個体差なく、由来の左右非対称性を持つことが明らかになった。詳細は四章に述べる。

今後、これらの手法を応用することによって、ワカレオタマボヤの発生に関する理解はさらに進むこととなるだろう。また、今回得られた現象はいずれも非常にユニークでおもしろい現象であり、また、ほかの脊索動物、あるいは動物全体においてもはじめてみつかった現象もある。これらは、細胞移動や上皮の形態形成において、他にはないモデルを提供することになり、今回の研究を基盤として、今後様々なメカニズムが解明されていくことになると考えられる。

# 第２章　ライブイメージング方法の確立

## 2.1 序論

形態形成過程において、分裂・移動・配置換え・細胞死などの細胞現象がどのように組み合わさって体が出来上がるのか、という疑問の解決のためには、まず、実際に発生過程で細胞がどのようにふるまうのかを知る必要がある。そのためにはいくつかの手法があるが、最も直接的にその疑問にアプローチする方法として、「生きている胚を直接観察する」という手法がしばしば取られる。生きたままの細胞・組織・個体において、細胞の挙動を観察する手法を、生細胞イメージングまたはライブイメージングと呼び、さらにその中でも、特定の細胞、細胞小器官、タンパク質などを蛍光物質を用いて可視化し、生きたまま観察する手法は、蛍光ライブイメージング法と呼ばれている。オワンクラゲから緑色蛍光タンパク質 GFP が発見されて以降、蛍光ライブイメージング法は急速な発展を遂げてきた。発生学の分野においても、生きたまま細胞・個体を観察するライブイメージング､見たいものにラベルをした蛍光ライブイメージングは今や多くの生物で用いられる実験手法であり、形態形成運動の解析には必須となりつつある。その一方、特に脊椎動物においては、発生にかかる時間の長さ、細胞の多さ、透明度の低さなどいくつかの問題がある。

ワカレオタマボヤは、脊椎動物を含む脊索動物門に属していながら、①早い発生スピード②単純な体制と少ない細胞数③透明な体　という特徴を持っており、ライブイメージングに適した生物であるといえる。体の大きさも、卵の直径が 80 µm、幼生の太さも 50 µm ほどと小さい為、体全体を 1 個体で観察することも可能である。これまでワカレオタマボヤにおいては、ノマルスキー顕微鏡を用いた、透過光でのライブイメージングが行われ、孵化前の胚発生に関する様々な記載が行われてきた(Stach et al., 2008; Fujii et al., 2008)。一方で、孵化幼生は胚に比べ細胞が小さく、脊索など一部の大きな細胞を除いてはノマルスキー顕微鏡によって 1 細胞レベルの観察を行うことは難しい。また、幼生は胚と違って筋肉によって動く尾部を持ち、海水中を泳ぎ回るため、1 匹の発生を生きたまま継時的に観察することは困難であった。これらの要因から、孵化後に関する記載がこれまで乏しかったものと考えられる。

本章ではまず、ワカレオタマボヤの発生を 1 細胞レベルで観察するため、特定の細胞小器官を蛍光で可視化する方法を検討した。次に、泳ぎ回る幼生を観察するためのマウント方法を検討した。いくつかの方法を用途に合わせて組み合わせることによって、目的の現象を 1 細胞レベルで観察するための系を確立した。

方法及び材料に関しては、第 2 章から第 4 章まで重複する部分が非常に多い為、第 6 章にてまとめて述べる。

## 2.2 結果と考察

### 2.2.1 細胞の可視化方法の検討

特定の細胞小器官を可視化して観察を行うため、細胞小器官に局在するタンパク質またはペプチドと、蛍光タンパク質との融合タンパク質をコードする mRNA を卵巣に顕微注入し、胚に発現させた。mRNA 卵巣内顕微注入法はすでに確立された手法であったが(Omotezako et al., 2013)、その際に用いた H2B-EGFP/mCherry 以外の蛍光融合タンパク質でも観察が可能であるか、いつからいつまで観察が可能であるか、どのような条件であれば観察が可能か、などを調べることにした。用いたのは先行研究で注入マーカーとして用いられていた H2B-EGFP および H2B-mCherry(クロマチンに局在)、IBB-mCherry(核内に局在)、PH-YFP(細胞膜に局在)、Lifeact-EGFP(アクチン線維に局在)、MAP7-GFP および MAP7-mCherry(微小管に局在)の mRNA である。生まれた胚において、それぞれの細胞小器官に蛍光の局在がみられた。メスの多核体になっている卵巣に顕微注入して蛍光タンパク質を発現させるという方法をとることにより、一度の顕微注入で多くの蛍光タンパク質注入胚を得られるだけではなく、未受精卵から既に蛍光を観察することができることがわかった。IBB-mCherry、PH-YFP、Lifeact-EGFP は未受精卵から、MAP7-mCherry は二細胞期から、H2B-EGFP は少なくとも 16 細胞期から蛍光の局在を確認できた。

これらの胚を用いて、1 分ごとにタイムラプスムービーを撮影し、卵割期（受精後数分）から孵化まで（受精後 3 時間）の核や細胞膜の挙動を観察した（Fig. 2-1, Fig. S1)。その結果、過去の知見(核の動きの継時的追跡を行った Stach et al., 2008、卵割期の細胞を記載した Fujii et al., 2008)と同様に、原腸陥入する際の核の動きや脊索を作る際の細胞分裂の様子等が観察された。また、卵割期には、卵割直前に核が割球内を外側に向かって移動する様子も観察された(Fig. S1)。これらの蛍光融合タンパク質は、正しく細胞小器官に局在し、それを継時的に観察することができることが確認された。また、その蛍光は形態形成完了期（受精後 10 時間）まで観察できることもわかった。

これらの条件検討によって、核、細胞膜、微小管、アクチンといった主要な細胞構造を発生過程で可視化し、経時観察することが可能となった。mRNA 顕微注入法によって発現させた蛍光タンパク質は未受精卵から形態形成が完了するまで観察可能なため、形態形成過程の全容を解析するという今回の目的にも適している。

次に、mRNA 顕微注入法を使わなくても、単に海水中に溶かした色素をつかって特定の細胞小器官を可視化することができないか試みた。FM-dye(FM1-43：緑蛍光、FM-4-64：赤蛍光)は、生体膜に可逆的に結合して蛍光を発する色素であり、エキソサイトーシス・エンドサイトーシスなどの研究、シナプス小胞の動態の研究等で使われる(Betz et al., 1996)。ワカレオタマボヤにおいても、この色素に胚や幼生をつけるだけで細胞膜を可視化し、細胞膜の動きをとらえる

ことができた。卵巣インジェクションが不要であること、明るいこと、濃度調整が容易であるという利点があり、幼生期の細胞の動き、特に、表皮細胞の形の変化などを見るのに有効であった。しかし、各組織に一様に蛍光融合タンパク質を発現させる顕微注入に比べ、FM 液に露出している表皮・消化管は明るいが、それ以外の組織は相対的に暗くなりやすい。また、液につける時間が長くなると(2-3 時間以上)徐々に蛍光量が増し、全体が明るくなりすぎたり、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた小胞が光ることでバックグラウンドが増す、といった欠点もあった。

顕微注入法は技術習得に一定の時間を要すること、また、前日より準備が必要なことを考えると、簡便に細胞膜の可視化ができる FM-dye をワカレオタマボヤで使えるようになる意義は大きい。この FM-dye を用いた可視化は、主に、表面に露出した組織である表皮の観察に適している。今後、濃度条件をより詳細に検討することにより、蛍光量の余分な増大を抑えることも可能になると考えられる。一方、内部の組織、例えば神経系などは、PH-YHP あるいは Lifeact-GFP 等により細胞膜を可視化して観察する方が適していると考えられる。

このように、ワカレオタマボヤにおいて細胞構造を蛍光で可視化し、観察することが可能となった。一方で、特に幼生期のワカレオタマボヤは泳ぎ回るために、1 匹を継時観察するためには、幼生の不動化方法を検討する必要があった。

### 2.2.2 観察方法の検討

次に、尾部に筋肉を持ち泳ぎ回る幼生期において、同じ個体を継時的に観察する方法を検討した。いくつかの麻酔法(MS222、L-メントール等)を試したが、麻酔剤の中では、幼生が正常に発生しなかった。また、ポリ-L-リジンを用いて幼生をガラスに張り付ける方法では、尾部が動いてしまい幼生を静止させるには至らなかった。そこで、現在主に用いている観察方法は、①尾部を切断する方法　②低融点アガロース（LMP）に幼生を埋め込む方法　の 2 つである。

幼生は尾部の筋肉を使って泳ぐので、実体顕微鏡下で尾部をタングステンナイフで切断することによって、動きを止めることができる。尾部を切った幼生でも、体幹部において消化管、脳胞など、多くの器官が正常に出来上がってゆく様子を観察することができた(Fig. 2-1B)。この方法は、簡便なのでサンプルのロスが少なく、尾部がないために水流以外ではほとんど動かない、などの利点があり、体幹部の細胞挙動を見る際には有用な方法である。一方、尾部の細胞挙動を見ることができないという大きな欠点を持つ。さらに、尾部を切断すると 3 章で後述する「内胚葉索の短縮」が起こらず、消化管の一部(直腸付近)が失われてしまうという欠点もある。

尾部を残したまま観察する方法として試みたのが、LMP 内に埋め込む観察方法である(Fig. 2-1C)。海水中に溶かした LMP は、1%常温では固体だが、70～80℃で液状になり、30℃前後で再び固まる。この性質を利用し、ガラスボトムシャーレの底に数匹のワカレオタマボヤを置き、その上から冷ました LMP 約 200 µL をかけることにより、ワカレオタマボヤの周りを寒天で固め、動きを止めた。乾燥を防ぐため、その上からカバーガラスをかぶせた。1% LMP を使うと完全に動きが止めることができる。しかし尾部の伸長も妨げてしまうため、特に尾部が急激に伸

長する 1-4 hph (hours post hatching)の間は、寒天に埋めた 30 分～1 時間後に尾部が伸長できず死んでしまう場合が多い、という欠点がある。0.5% LMP を使うと、1% LMP よりも少し柔らかく、尾部はある程度伸長することができるが、動きを完全に止めることはできない。このため、寿命は少し伸びるが、1 細胞レベルでタイムラプスムービーを継時的に撮影するのは困難だった。よって、短時間の間、尾部が動かない状態で尾部内の細胞挙動を観察する際には、1% LMP で固める方法を用いた。

さらに、スライドグラス上にワセリンで土手を作り、尾部を切断した幼生をマウントし、カバーガラスをぎりぎりまで押し付けてからカバーガラスをずらすことで、試料をマウントする向きを任意に変えることも可能である。低融点アガロース(LMP)を、常温でも固まらない濃度(0.25%)に調整したうえでマウント剤として用いることで液の粘度をあげ、試料の回転を容易に行うこともできる(Fig.2-1D)。この回転方法は主に、尾部を切断した体幹部のみの個体と、切断した尾部の撮影に用いた。尾部を切断しない幼生の場合、海水中及び 0.25%LMP 中では動きを止めることができず、継時観察はできない。

このように、mRNA 卵巣顕微注入法や色素による細胞小器官の可視化と、尾部の切断または LMP を用いたマウント方法を組み合わせ、幼生期において 1 つの個体で特定の器官を継時的に観察することが可能となった。

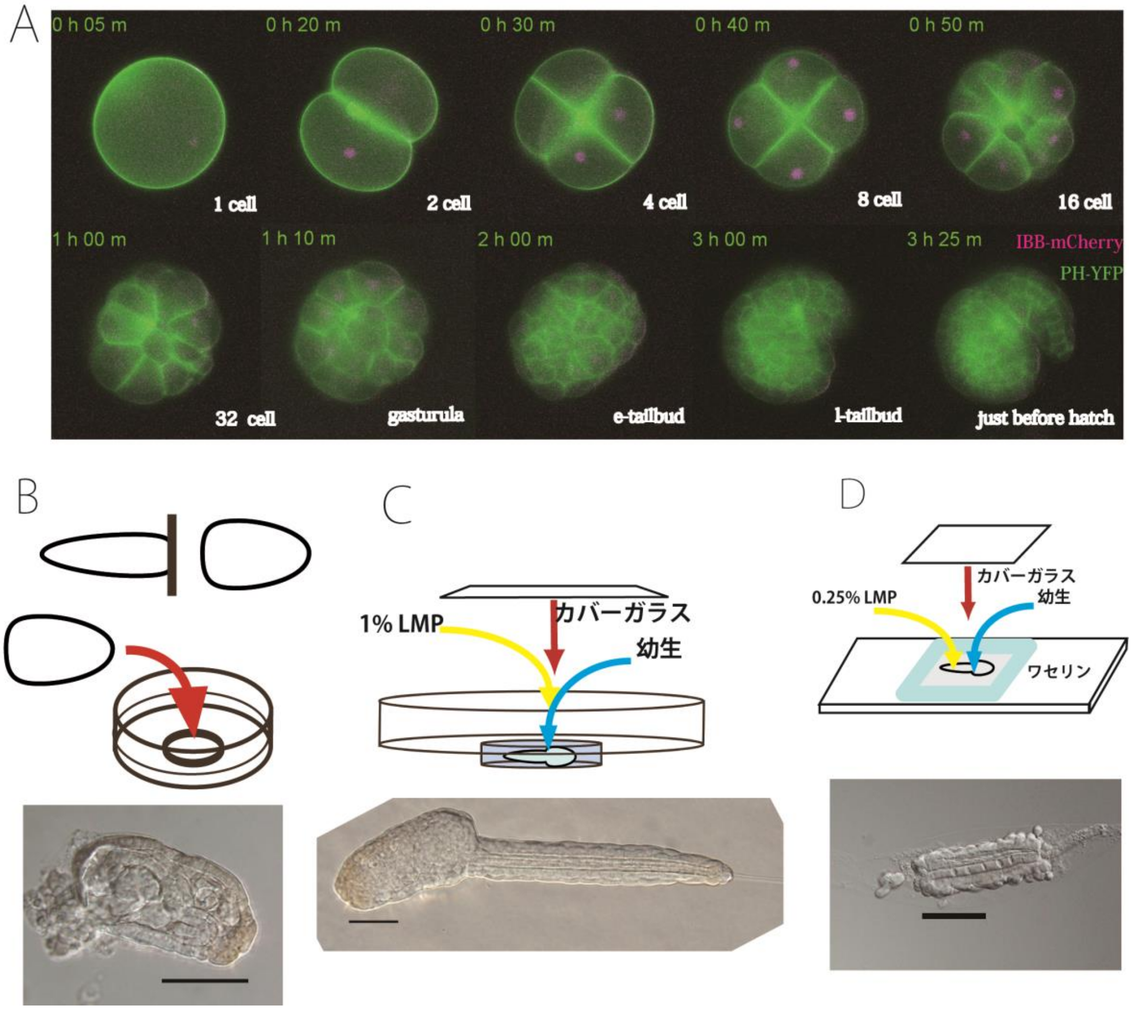



**Fig. 2-1. ライブイメージング法の確立**

A：胚発生のタイムラプスムービーからの抜粋。緑：PH-YFP(細胞膜)、マゼンタ：IBB-mCherry(核)。第一卵割前から孵化まで、蛍光を確認することができる。IBB-mCherry の蛍光が途中で見えなくなるのは、励起光が強すぎたことによる褪色であると考えられる。B:尾部を切断するマウント法の模式図。ここでは、ガラスボトムシャーレ内においているが、スライドグラスにマウントすることもある。　C:1% LMP を用いて完全に動きを固めてしまうマウント方法の模式図。　D：ワセリンと 0.25% LMP を併用したマウント方法の模式図。体幹部を切断した幼生など、動きの少ないサンプルが適する。スケールバーは 50 μm。

# 第３章　長距離移動細胞の観察と解析

## 3.1 序論

形態形成過程や免疫応答、癌の転移反応などで、細胞は個々に、あるいは集団で体内を大きく移動する(Yamaguchi et al.,2005; Friedl et al., 2008; Aman et al., 2010)。このうち形態形成期の細胞移動は、生物が正しく体を作るために必須の運動であり、これまで様々な研究者によって研究がなされてきた。よく研究が進んでいる長距離細胞移動の例としては、様々な生物の始原生殖細胞、魚類の後方側線細胞、脊椎動物の神経冠細胞等が挙げられる。胚発生過程では、始原生殖細胞がそれぞればらばらになって将来の生殖巣内まで移動することが、ショウジョウバエ、マウス、ゼブラフィッシュなど多くの生物で確認されている(Richardson and Lehmann, 2010)。魚類の後方側線細胞は神経系の細胞であり、neuromastと呼ばれる感覚器官を一定間隔で落としながら、頭部付近から尾部方向へと、細胞塊のまま体の側方を大きく移動していく細胞である(Ghysen et al., 2004)。また、脊椎動物の神経冠細胞(または神経堤細胞、neural crest)は、神経管の背側から細胞が全身へと移動し、神経系やそれ以外の様々な組織に分化することが知られている(Knecht and Bronner-Fraser, 2002)。これらの細胞移動に関しては、移動の記載、細胞内で動力を生み出すメカニズム、誘引物質の解析など、様々な解析が進められてきた。一方で、このような典型的な移動以外の細胞移動については、その存在も含めて研究が遅れている。

本研究では、第2章において述べた蛍光ライブイメージング法を用いて幼生期における発生過程を網羅的に観察した。その結果、体内を長距離移動する3種類の細胞群を発見した（Fig. 3-4も参照）。また、この３種以外には大きく移動する細胞は存在しないことがわかった。

① 孵化後1時間半ほどから、体幹部後方から前方に向かって4核を持つ細胞が細長くなって動き、左右に分かれる動きをするoral gland 前駆細胞

② 孵化時は尾部に存在する一続きの細胞が孵化後45分から孵化後2時間の間に、体幹部へと吸い込まれるように動く内胚葉索細胞

③ 内胚葉索と入れ替わるように、別の２細胞が、孵化後2時間頃から孵化後4時間まで、内胚葉索と同じ道を逆方向に進むsubchordal cell前駆細胞

の3種類である。いずれも、他の動物群では見られない特徴的な細胞移動である。

さらに、可変色蛍光タンパク質であるKaedeを用いた細胞運命のトレースを行い、内胚葉索が将来の成体の直腸を形成すること、subchordal cellと内胚葉索は別々の細胞であることを明らかにした。これらの細胞は、100年前にDelsmanによっても移動している可能性が指摘されていたが(Delsman, 1910,1912)、固定胚による観察結果であり実際に移動する様子をとらえた研究はなかった。本研究で継時観察が可能となったことによって、確かに移動していることを証明できた。また、現象のより詳細な部分がわかり、例えば「Oral gland前駆細胞は4核を含む1細胞が細長くなって体内を大きく動き、最終的に左右に2核ずつ分かれ2細胞になる」「内胚葉索とsubchordal cell前駆細胞は別々の細胞であり、同じ道を、時間をずらして逆方向に移動する」という動きをすることを明らかにした。さらに、体幹部や尾部を切除する実験を行い、内胚葉索と

subchordal cell前駆細胞の移動メカニズムについてしらべ、内胚葉索もsubchordal cell前駆細胞も、移動時には体幹部からの作用を必要としないこと、内胚葉索は前端の細胞がなくても移動ができること、subchordal cellは尾部先端から誘因を受けている可能性があることなどが分かった。今回見つかった長距離細胞移動についての制御因子などの解析を進めることによって、細胞移動研究のための新しい実験系を提供することが可能になった。

## 3.2 結果

### 3.2.1　３種の移動細胞の移動様式

#### 3.2.1.1 Oral gland 前駆細胞

幼生期に尾部を切断し、ノマルスキー顕微鏡で体幹部を観察すると、体幹部の後方から前方に向かって大きく動く細胞群が観察された(Fig. 3-1A, Fig. S2)。この細胞は、1.5 hph 前後の頃に体幹部後方、将来消化管を形成する内胚葉由来の細胞群の中から現れ、細長くなって将来左右2つの胃を形成する部分の隙間となる体腔部分を前方に向かって移動し、2 hph 頃に内柱後端付近に到達すると内柱にぶつかってつかえたかのように一度丸くなる。その後、二股の U 字形になって内柱の左右に分かれてより前方部、口付近まで伸び、その過程で中央部分のつながりが切れて二つの細長い細胞になり、それが 4 hph までに口付近に向かって縮むように丸くなる。最終的な位置と形が、5 日目の成体の oral gland 細胞と一致しているため、この移動細胞はこれ以降に細胞分裂をせず将来 oral gland となる前駆細胞であると考えられる。

Oral gland(口部腺)細胞は、成体では体幹部の腹側、口付近に内柱と表皮の間に左右対になって存在している、凡そ直径 50-60 μm の 2 細胞(それぞれ２つの核を含む)である(Fig. 3-1B,C)。オタマボヤ綱のうち、*Oikopleura* 属、*Stegosoma* 属、*Folia* 属に属するオタマボヤのみでみつかっており、oral gland を持つ種は必ず subchordal cell(脊索下細胞)と呼ばれる脊索の横にある細胞(群)も同時に持っていることが知られる(Fredriksson and Olsson, 1991)。顆粒を多く含む、突起を出すなど形の変化が大きい、細胞の周囲に小胞が確認される等の構造から、分泌に関与するのではないかといわれている(Fredriksson and Olsson, 1981)が、はっきりとした機能は分かっていない。SYTOX Green を用いて成体のワカレオタマボヤの DNA を染色すると、oral gland はほかの細胞に比べて直径が大きい 2 つの核を持つことが確認された(Fig. 3-1C)。

成体の Oral Gland 細胞が 2 核の細胞だが、この細胞が移動時にはどういう形態をとっているのかに興味が持たれた。それを調べるためにこの移動細胞を、H2B-EGFP で核を可視化して観察すると、細長くなっているときには、4 つの核が一列になって後方から前方へ移動すること、その後、2 核ずつ左右に分かれる様子が観察された(Fig. 3-1D,E, Fig. S3, S4)。この核は、一列に並んでいるときの前から 1 つ目と 3 つ目が右、2 つ目と 4 つ目が左に分かれた(n=4)。このことは、成体の oral gland が 2 つの核を持つことと一致している。さらに、細胞膜と核をともに可視化して共焦点顕微鏡下で移動中の細胞を観察すると、4 つの核の間に細胞膜が見られなかった(Fig. 3-1F、白矢頭)。このことから、4 つの核は 4 細胞ではなく、4 つの核を持つ 1 細胞が前

方に移動した後、左右に分かれ（細胞質分裂が起こり）、2核を持った2つの細胞になる可能性が高いことが分かった(Fig. 3-1H)。また、この細胞を高解像度で(x100 レンズを使用して)観察すると、特に二股に分かれた先端部分では、仮足のようなものを出して細胞が激しく動いている様子が観察された。このことから、これらの細胞は自ら動いている細胞であると考えられる。さらに、Lifeact-EGFP を用いてアクチン線維を可視化して観察すると、細胞移動期には細胞の前方(仮足のような構造が出ている付近)の細胞膜付近にアクチンが集積している様子が観察された。さらに、移動がほぼ終了し、oral gland 前駆細胞が 2 つの半月状の細胞になった 3 hph 頃から、oral gland 前駆細胞が表皮と接する部分付近のほぼ 1 点に、明確なアクチンの集積が観察された(Fig. 3-1G)。このアクチンの果たす役割は不明だが、oral gland 前駆細胞を正しい位置にとどめる役割がある可能性もある。成体の oral gland は細胞表面の一部を表皮層に突き出すような構造をしており(Fredriksson and Olsson, 1981)、その領域との関連性も今後調べる必要がある。

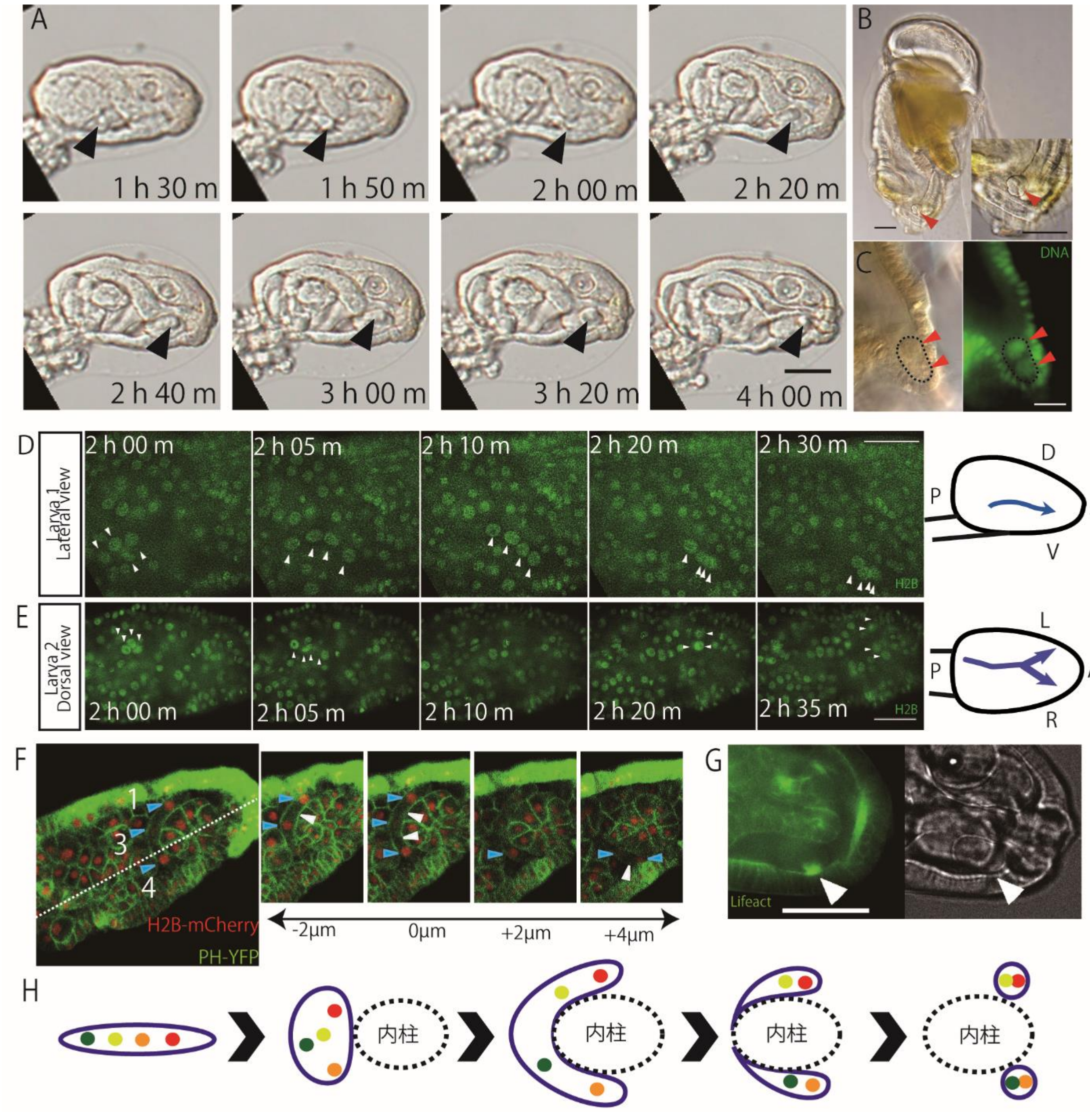



**Fig. 3-1：Oral gland 前駆細胞の移動**

A:孵化直後に尾部をつぶし、ノマルスキー顕微鏡で体幹部の右側から観察した幼生。画像右が前方、上が背側。体幹部後方から前方に向かって細胞が移動するのが観察された。黒矢頭は oral gland 前駆細胞。　B:成体のワカレオタマボヤの体幹部を、左側からノマルスキー顕微鏡で観察したもの。口の横に丸い細胞が存在している。　C：左はノマルスキー顕微鏡の像、右は SYTOX Green で成体のワカレオタマボヤの DNA を染色したもの。口付近を拡大し、oral gland を点線で囲んだ。2 つの大きな核が観察された。　D,E：　H2B-EGFP で核を可視化し、タイムラプスムービーを撮影した。D は右側から、E は腹側から撮影。画像中の右が前。白矢頭は oral gland 前駆細胞の核。4 つの核が 1 列になって移動し、左右に 2 つずつ分かれる様子が観察された。右端は模式図。青矢印が oral gland 前駆細胞の移動経路を示す。F:共焦点顕微鏡を用いて、2.5 hph に腹側から焦点面を少しずつ変えて撮影したもの。緑：PH-YFP(細胞膜)、赤：H2B-mCherry(核)。数字は、1 列になっている時に、前から数えた核の順番。点線は正中線。青矢頭が oral gland 前駆細胞の核。白矢頭は、核同士の間をマークしているが、どの焦点面でもその部分に細胞膜の蛍光は見られなかった。　G:3 hph に Lifeact(緑)でアクチンを可視化したもの。白矢頭部分にアクチンの集積が見られる。　H:腹側から見た oral gland 前駆細胞の移動の模式図。青い線が oral gland の輪郭、点線が内柱の輪郭、赤、橙、黄、緑の丸はそれぞれ前から数えて１，２，３，４番目の核を表す。　D：腹側、V:背側、A：前方、P：後方、L：左側、R：右側。赤矢頭は oral gland 細胞。時間はいずれも孵化からの時間。スケールバーは 50 µm。

### 3.2.1.2 *内胚葉索と subchordal cell 前駆細胞*

尾部をつぶすと、体幹部の発生は観察できるが尾部の発生は観察できない。これを解決するため、幼生を LMP 寒天に埋め込んでノマルスキー顕微鏡下でタイムラプスビデオを撮影し、尾部の発生を観察した。ワカレオタマボヤ孵化幼生の尾部は、典型的な脊索動物のものに比べると９０度回転しており、中央に脊索、その背側と腹側に筋肉、右側に内胚葉索、左側に神経索を持つ(Delsman, 1910; Stach et al., 2008)。尾部の発生を観察すると、内胚葉索が体幹部に向かって移動をはじめ、1 時間ほどですべて体幹部に入ってしまう様子が観察された(Fig. 3-2, Fig. S5, S6)

内胚葉索は一列に並んだ 16 個の細胞でできており、0.75 hph(すなわち孵化後 45 分)頃から体幹部方向へ移動を開始し、2 hph までにすべての細胞が体幹部に入る。内胚葉索が移動後は、内胚葉索のあった部分は空洞になっていた。H2B-EGFP で核を可視化して観察すると、脊索の右側にある細胞が一列になって繋がったまま一定の速さで体幹部に吸い込まれてゆく様子が観察された(Fig. 3-2B, Fig. S5)。

そのまま時間を追って観察を続けると、内胚葉索が体幹部に入りきった直後、2.5 hph 頃から 4 hph 頃にかけて、2 つの細胞が体幹部から尾部先端方向に向かって、内胚葉索が通った後の空洞になった道を、逆方向である尾部先端方向に向かって移動していくのが観察された(Fig. 3-2B、Fig. S6)。この 2 細胞は、二つの接触していない細胞であり、互いに距離を保ったまま尾部の先端付近まで移動し、互いに距離を保ったまま停止する。位置と細胞数から、将来は subchordal cell と呼ばれる細胞になると考えられる。Subchordal cell は、5 日目の成体においても 2 細胞のままで、尾部後方に間隔をあけてそのまま存在している。

subchordal cell は、oral gland の項に記したとおりオタマボヤ綱の一部の属にのみ存在している細胞である。ワカレオタマボヤの成体では細胞突起を多く持つ subchordal cell が尾部後方に間隔をあけて二つ存在しているが(Fredriksson and Olsson, 1991)、数や大きさは種によってばらばらであり、*Oikopleura albican* (Fredriksson and Olsson, 1991)では小さな複数の subchordal cell を持っていたり、*Oikopleura gaussica* グループ(Capitanio et al., 2003)では 4 個以上の細胞を持っていたりと、種内でも数が一定しない場合も多い。周囲の細胞と接触しており、その構造から筋肉の動きに関与するのではないかと示唆されているが(Fredriksson and Olsson, 1991)、oral gland と同様、具体的な機能は分かっていない。

subchordal cell 前駆細胞を高解像度で観察すると、移動している間、前方にも後方にも仮足のようなものを出して動いている様子が観察された。よって、subchordal cell 前駆細胞は自ら動いている細胞であると考えられる。一方、ひとつながりになって体幹部に吸い込まれていく内胚葉索細胞ではそのような仮足のような構造は見られなかった。

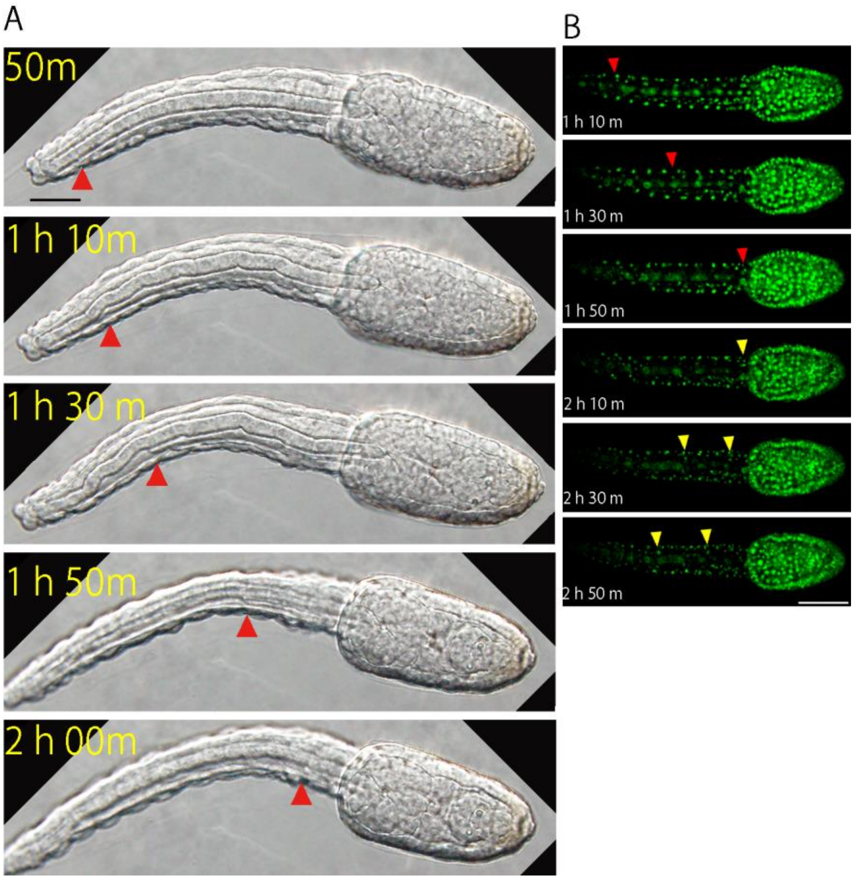



**Fig. 3-2：内胚葉索と subchordal cell 前駆細胞の移動**

A：ノマルスキー顕微鏡での観察。背側から観察している。脊索の右側にある内胚葉索は、孵化後 45 分頃から体幹部方向に向かって移動を開始し、1 時間半ほどですべて体幹部に入る。赤矢頭は、内胚葉索の後端を示す。　B:　H2B-EGFP で核を可視化して観察したもの。腹側から観察している。赤矢頭は内胚葉索の後端、黄矢頭は subchordal cell 前駆細胞を示す。内胚葉索がすべて体幹部に入った後、subchordal cell 前駆細胞は、同じ道を逆方向に移動する。　スケールバーは 50 µm。

### 3.2.2 移動細胞の由来と将来の運命

内胚葉索が体幹部に入った後に体幹部でどのような成体組織を作るのか、また、subchordal cell 前駆細胞の由来を確認するため、nls-Kaede を用いて細胞のトレース実験を行った。nls-Kaede は、紫外線照射によって緑から赤へと変化する蛍光タンパク質である Kaede（Ando et al., 2002）の N 末端に核移行シグナル nls を付加した蛍光融合タンパク質であり、過去にゼブラフィッシュで核への局在が確認されている（Kwan et al., 2012）。この mRNA を卵巣に顕微注入して生まれた胚・幼生を観察すると、核に局在する緑色の蛍光を確認できた(Fig. 3-3A)。また、UV の照射によってこの蛍光が赤色に変化することも確認した。さらに、顕微鏡の視野絞りの絞り具合を調節することによって、UV を当てる範囲を限定し、尾部または体幹部のみ蛍光色を変化させる方法も確立した(Fig. 3-3A)。

まず内胚葉索が体幹部に入った後どのような運命をたどるかを知るため、孵化直後に尾部にのみ UV 照射して蛍光を赤く変化させた。そのまま育てて 6 時間後に観察すると、体幹部の中では尾部と隣接する表皮の一部と、消化管の一部が赤くなっていた(Fig. 3-3B,n=7/7)。消化管の赤い部分を詳細に観察すると、すべての個体で直腸全体が赤くなっていた。また、一部の個体では直腸に加えて腸や胃の一部に赤い蛍光がみられた。これが個体差なのか、Kaede の色を変える際の操作の問題なのかはわからなかった。このことから、孵化時に尾部にあった内胚葉索は体幹部に入った後、成体の直腸付近（消化管の最後端部）を構成することが示された。

また、subchordal cell 前駆細胞は、体幹部に入っていた内胚葉索の一部が再び尾に戻ってくるのか、それとも別の細胞に由来するのかを調べるため、同様の方法で孵化直後に体幹部のみ赤く標識し、6 時間後に観察した。すると、subchordal cell は色が赤く変わっていた。このため、subchordal cell は、孵化幼生の尾部にあった内胚葉索の 2 細胞が再び尾部に侵入してくるのではなく、孵化時にすでに体幹部にある細胞に由来することが示された。さらに oral gland は、孵化直後に尾部を切除して観察を続けても正常に移動することから、孵化直後に体幹部にある細胞に由来すると考えられる。

以上の結果から、今回発見された移動細胞の動きをまとめると、Fig. 3-4 のようになる。1.5 hph 頃から 4 つの核を持つ oral gland 前駆細胞が、体幹部後方から前方に向かって移動を開始し、2 hph 前後に内柱にぶつかって左右に 2 核ずつを持った 2 細胞に分かれ、4 hph 頃までに移動を完了する。尾部では、0.75 hph から 2 hph 頃に内胚葉索が体幹部に吸い込まれるように移動し、その直後から 4 hph 頃まで、subchordal cell 前駆細胞が、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。

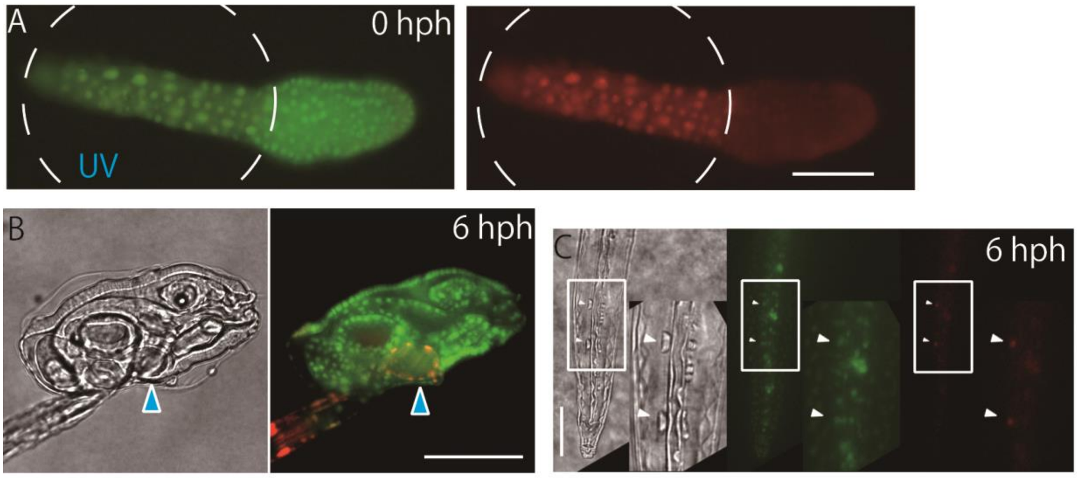



**Fig. 3-3　Kaede を用いた細胞運命のトレース**

A : 幼生全体で nls-Kaede を発現させたところ、核に局在する緑色の蛍光を観察できた。このうち、尾部のみに UV を照射すると(点線円部分)、照射部分の蛍光の色が緑から赤に変化するのを確認した。B : 孵化直後に尾部のみ蛍光色を変化させた個体を 6 時間後に観察したもの。孵化時に尾部のみ赤くした幼生では、尾部のほかに体幹部の直腸(青矢頭)と表皮の一部が赤くなっていた。C : 孵化時に体幹部のみ赤くした幼生の尾部内では、subchordal cell 前駆細胞が赤くなっていた。スケールバーは 50 μm。

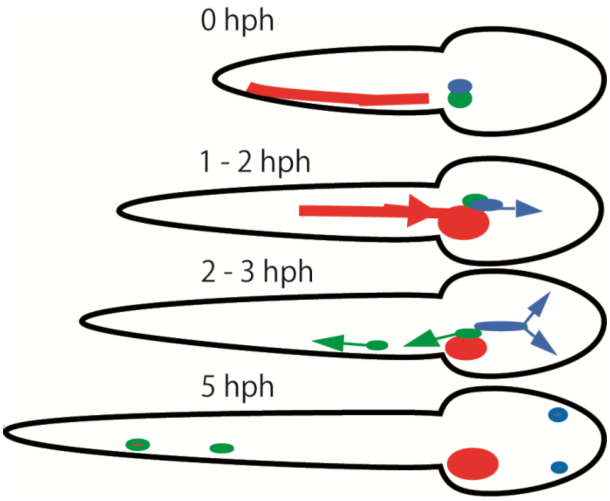



**Fig. 3-4: オタマボヤ幼生発生における 3 種の長距離移動細胞の模式図**

前方を右にし、背側から見た模式図。赤：内胚葉索。孵化時は尾部、脊索の右側に存在し、0.75 hph 頃から 2 hph 頃にかけて、体幹部へと移動する。緑：subchordal cell1 前駆細胞。内胚葉索と入れ替わるように、2 hph 頃から 4 hph 頃にかけて、内胚葉索とは由来の異なる二つの細胞が、体幹部から尾部先端方向へ移動する。青：Oral gland 前駆細胞。1.5 hph 頃から 4 hph 頃にかけて、体幹部の後方から前方に向かって移動し、左右に二つに分かれる。

### 3.2.3　切除実験

多くの細胞移動において、Fibroblast Growth Factor (FGF)やケモカイン等、拡散性のシグナル分子の勾配が、ケモアトラクタントとして細胞の移動方向の決定に重要な役割を果たしていることが知られている(魚類の後方側線細胞：David et al, 2002, Lecaudey et al., 2008、ハエのCaudal visceral mesoderm：　Kadam et al., 2012, いくつかの動物の始原生殖細胞：Raz, 2004 等)。今回、発見された細胞のうち、内胚葉索や subchordal cell 前駆細胞は、尾部と体幹部の間で見られる直線的な移動である。移動方向は内胚葉索が体幹部方向、subchordal cell 前駆細胞は尾部先端方向と決まっており、しかも 2 種類の細胞で方向は逆である。このような興味深い移動に関して、体幹部あるいは尾部先端部から、何らかのシグナルが出ており、移動の方向を決めているとすれば、そのシグナルの発生源である体幹部・尾部を切り取ると動きに何らかの変化が生じるはずである。孵化後の様々な時間に体幹部と尾部を切り離す切除実験を行い、尾部における細胞移動に体幹部や尾部先端部分がどのように関与しているかを調べた。

まず、内胚葉索の移動に体幹部がどのようにかかわるのかを調べるため、内胚葉索移動の様々な時期に体幹部と尾部を切り離した(Fig. 3-5A-C)。孵化直後に尾部から体幹部を切り離しても、内胚葉索は前方へと移動していくことが観察された(Fig. 3-5A; n=26/26)。内胚葉索細胞はさらに移動を続け、基本的には切断面から尾の外側へと出ていくことが観察された (Fig. 3-5A、黄矢頭)。よって、内胚葉索は少なくとも移動時には体幹部からの誘引作用を必要としないこと、そして、内胚葉索が体幹部内の何らかの細胞に引っ張られて引きずり込まれるのではないことが示唆された。次に、内胚葉索が半分ほど体幹部に入っている 1.5 hph で体幹部を切り離した。その状態でも、内胚葉索は正常通りに尾部付け根方向に移動した(Fig. 3-5B; n=10/10)。また、同じ時期に、体幹部と同時に尾部先端部を切除しても、内胚葉索は正常に動くことが観察された(Fig. 3-5C; n=6/6)。よって、移動時に尾部先端からの反発作用も必要がないことが示唆された。また、内胚葉索は先端部の細胞のみに移動能があるのではないことも示唆された。

次に、subchordal cell 前駆細胞の移動方向に体幹部や尾部先端がどのように関与するかを調べるため、subchordal cell が移動する時期に体幹部と尾部を切り離す実験を行った(Fig. 3-5D-F)。まず、2 つある subchordal cell 前駆細胞のうち、1 つ目のみが体幹部に入っている 2.5 hph に体幹部を切除し、2 つ目の subchordal cell 前駆細胞が 1 つ目の subchordal cell 前駆細胞の移動方向に及ぼす影響をみた。1 つ目の subchordal cell 前駆細胞は正しく尾部先端方向に移動し、体幹部を切っていないものと同じ先端から少し離れた位置で停止した(n=5/6)。停止の際に、停止位置付近で前後に行ったり来たりする運動も見られたが、最終的な停止位置には影響はなかった。ここから、1 つ目の subchordal cell 前駆細胞の移動方向や移動能力には、2 つ目の subchordal cell 前駆細胞は関与しないか、関与が非常に小さいことが示唆された。

次に、subchordal cell 前駆細胞が二つとも尾部に入った状態で体幹部を切除した。まず、二つの subchordal cell 前駆細胞が入った直後の 2.5 hph に体幹部を切除しても、多くは正常と同じ方向に、同じ位置まで移動し、停止する位置も尾部を切除しない正常幼生と同じであった

(n=9/10)。また、3 hph で体幹部を切除しても、正常と同じ方向・停止位置まで移動した(n=21/22)。よって、subchordal cell 前駆細胞は、移動時には体幹部からの反発作用を必要としないことが示唆された。体幹部を切除した幼生では、subchordal cell 前駆細胞が停止する時に細胞の形が前後(尾部の基部—先端方向)に通常より長く伸びる様子が観察されたが、これが体幹部を切除したことによって体幹部からの何らかのシグナルがなくなった影響なのか、傷をつけた影響なのか、尾部の伸長が阻害された影響なのかは判別できなかった。このように、体幹部を切除しても移動方向・停止位置はほぼ正常であることから、少なくとも移動時に体幹部から何らかの反発作用を受けている可能性は低いと考えられる。

次に尾部後端が subchordal cell 前駆細胞の移動に関与するかどうかを調べるため、尾部後端を切除する実験も行った(Fig. 3-5F)。2 つ目の Subchordal cell が尾部に入りかかった 2.5 hph に体幹部を残して尾部後端側半分ほどを切除すると、2 つ目の subchordal cell 前駆細胞が正しく尾部後端方向へ移動するもの(n=4/15)、本来とは逆に体幹部方向へ移動していくもの(n=6/15)、そして、移動をほとんどせずにその場にとどまるものが観察された(n=5/15)。一方、1 つ目の subchordal cell は、切り口付近に詰まってしまうものが多いが(n=11/15)、体幹部方向に戻っていくものもあった(n=2/15)。一つ目の可能性として、特に 2 つ目の subchordal cell 前駆細胞が正しく移動するには、尾部先端からの何らかの作用、具体的には誘引物質の作用が存在する可能性が考えられる。subchordal cell 前駆細胞を高解像度で観察すると、移動している間、前方にも後方にも仮足を出しながら動いている様子が観察されている。細胞を誘引している尾部後端の細胞がなくなってしまうと、方向性を失った細胞は、そのままその場にとどまったり、体幹部に戻ったり、またそのまま前方に動いたりとランダムな動きを見せた可能性がある。別の可能性として、2 つの subchordal cell 前駆細胞は、必ず距離をあけて移動し、距離を保ったまま停止することから、1 つ目の subchordal cell 前駆細胞が、2 つ目の細胞へ反発シグナルを出している可能性も考えられる。この場合、1 つ目の subchordal cell 前駆細胞が切り口付近という正常よりも手前の位置で停止してしまったことが、2 つ目の subchordal cell の移動方向に影響している可能性が考えられる。1 つ目の subchordal cell 前駆細胞が切り取られた尾部後端部の側に入っており、残った体幹部側に 1 つ目を含まない例(n=2/15)でも 2 つ目の subchordal cell の体幹部への後退は確認されているが、例数が少ないので今後より詳しく調べる必要がある。また、尾部後端部を切除した傷によって、subchordal cell 前駆細胞の移動に何らかの影響があった可能性も捨てきれない。

これらの結果から 2 つ目の subchordal cell 前駆細胞の移動方向には、尾部先端からの誘引物質が関与している可能性が示唆される。しかし、今回見られた移動方向の変化は尾部後端を切除した直接的な影響ではなく、1 つ目の subchordal cell 前駆細胞の影響や、傷の影響などを受けている可能性があり、実際には尾部先端からの誘引は受けておらず、別の細胞が方向性を決めている可能性も捨てきれない。

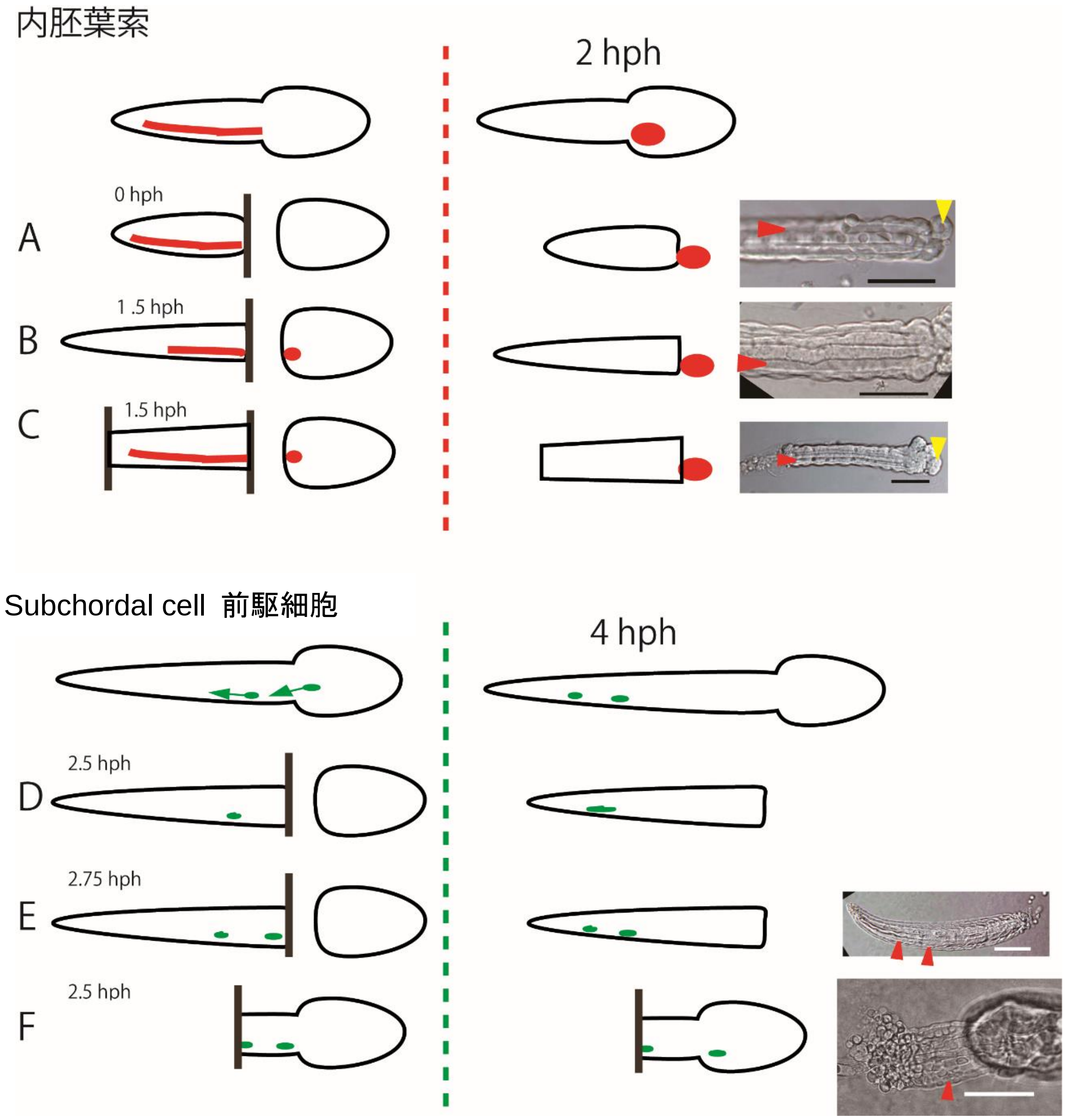



**Fig. 3-5:切除実験**

A-C:様々な時間に、体幹部・尾部先端部を切除して内胚葉索の動きに及ぼす影響を観察した。A:孵化後すぐに、体幹部を切除する、B：半ばまで内胚葉索が体幹部に入った状態の 1.5 hph で体幹部を切除する、C:1.5 hph に体幹部と尾部先端の両方を切除する、いずれの場合も、内胚葉索は正常通り前方に移動した。赤矢頭で示す側が内胚葉索側(脊索を挟んで反対側が神経索)、黄色矢頭が尾部の外に出た内胚葉索を示す。D-F：:様々な時間に、体幹部・尾部先端部を切除して subchordal cell 前駆細胞の動きに及ぼす影響を観察した。D：1 つ目の subchordal cell のみ尾部に入っている 2.5 hph に体幹部を切除する、E:2 つとも subchordal cell が尾部に入っている 2.75 hph に体幹部を切除する、F:2.5 hph に尾部先端を切除する。D、E の場合は正しく尾部先端方向に移動したが、F の場合は subchordal cell が正しく進むもの、移動せずその場にとどまるもの、体幹部に戻るものが観察された。赤矢頭は subchordal cell 前駆細胞を示す。スケールバーは 50 μm。

## 3.3 考察

### 3.3.1　3 種の移動細胞

孵化後のワカレオタマボヤをライブイメージング法を用いて観察することによって、孵化後に体内を大きく移動する細胞群が少なくとも 3 種類あることが分かった。①1 hph 頃に体幹部後方から前方に向かって移動を開始し、左右に二つに分かれ、内柱の左右、口付近で 4 hph 頃に停止する oral gland 前駆細胞、②孵化時は脊索の右側に一列に存在し、0.75 hph 頃から 2 hph 頃までに体幹部に吸い込まれるように移動する内胚葉索、③内胚葉索の移動終了直後の 2 hph 頃から、2 つの細胞が、内胚葉索と同じ道を逆方向に移動する、subchordal cell 前駆細胞、の 3 種類である。

これらの細胞については、約 100 年前に固定胚を用いて胚発生期と幼生期の発生をドイツ語で記載した Delsman の論文(1910,1912)にも言及がある。これらの論文で Delsman は、固定胚による観察から「内胚葉索は、完全に体幹部に入ってしまい、(確証はないが)内胚葉索の細胞由来である 2 つの細胞が、後ろに戻るように動いていく」「Oral gland は、内胚葉索の一部の細胞が、ソーセージ形になって、二つの胃・食道・咽頭の下にある体腔を埋めるように動き、内柱に至ると二つに分かれ、長く伸びてフォーク状になった後、真ん中で切れる様に分かれて半月状になる」と記述し、細胞移動の存在を示唆していた。今回、タイムラプスムービーを撮影した結果と Kaede を用いた運命トレースの結果として、Delsman が固定胚を用いた記載から推測した細胞移動が実際に起こっていることが明らかになったとともに、「Oral gland および subchordal cell は内胚葉索由来である」という記述が誤りであり、実際には内胚葉索ではなく、孵化時には既に体幹部に存在する細胞に由来することが明らかになった。また、様々な観察法を用いて多くの幼生の発生を見たが、長距離を移動する細胞はこの 3 種以外には観察されなかった。

### 3.3.2　内胚葉索の発生運命

尾索動物亜門ホヤ綱に属するマボヤ(Hirano et al., 2000)やユウレイボヤ(Nakazawa et al., 2013)では、内胚葉索が尾部から体幹部に移動し、変態後の成体の消化管を構成することが示唆されてきた。また、ユウレイボヤでは、尾部が短縮して変態することが知られているが、その尾部短縮前に内胚葉索が体幹部へ移動することが知られている。今回ワカレオタマボヤでも、Kaede を用いた運命トレースによって、内胚葉索は体幹部に吸い込まれるように移動することと、体幹部に入った後、成体の直腸付近を構成することが分かった。ワカレオタマボヤは尾索動物亜門オタマボヤ綱に属しているのでマボヤ・ユウレイボヤとは綱が異なっている。ホヤ綱では最終的に変態に伴い尾部全体が短縮するが、オタマボヤ綱では成体に至るまで短縮せず残っている。にも拘わらず、内胚葉索が尾部から体幹部に移動すること、その内胚葉索が成体の腸の後端

を構成することは共通の性質として存在しており、ホヤ綱・オタマボヤ綱において進化的に保存されていると考えられる。

### 3.3.3 Oral gland と subchordal cells

今回、発生中に体内を大きく移動する細胞として同定された oral gland と subchordal cell は、どちらの細胞も生理機能はわかっていないが、どちらも多くの小さな小胞を含む、ミトコンドリアを多く持つ、核が不定形である、といった共通の形態を持つことが知られている(Fredriksson and Olsson, 1981, 1991)。同じ論文には、成体のワカレオタマボヤの周囲の海水にニュートラルレッドを入れると、oral gland と subchordal cell の両方がニュートラルレッドを取り込んで赤くなるか両方ならないかのどちらかであり、片方だけ赤くなることはなかったと記されている。このことから、成体でのこの二つの細胞の機能や由来に何らかの関係がある可能性が示唆されている。さらに、oral gland を持つ種には必ず subchordal cell が存在し、どちらかだけ存在する種は現在でも見つかっていない。また今回示されたように、これらの細胞は発生中のほぼ同時期(oral gland は 1.5 – 4 hph、subchordal cell は 2 – 4 hph)に体幹部後方から前と後方向に向かって大きく体内を移動する。以上から、これら二つの細胞の間に何らかの関連性がある可能性が高い。たとえば、現在は未知だが似たような機能を持っているといったようなことや、同じ割球に由来していて似た遺伝子を発現している細胞が、体の前後にそれぞれ移動していくことで、体の前端付近と後端付近に似たような機能を持つ細胞を作ることのできるメカニズムになっている、等の可能性が考えられる。今後、孵化後の細胞系譜を細胞移動開始よりも前にさかのぼって調べることができれば、すでに分かっている孵化前の細胞系譜と合わせて、二つの細胞の由来を発生を遡って調べることが可能になるかもしれない。

### 3.3.4 細胞移動のメカニズム

今回、観察した 3 種の長距離細胞移動は、それぞれ異なった特徴を持っている。Subchordal cell 前駆細胞の移動は、単独細胞としての移動である。それに対し、内胚葉索の移動は、一列につながった細胞の移動であり、oral gland 細胞の移動は、4 つの核を含んだ多核体としての移動である。また、これら 3 種の細胞移動は、以下のような興味深い挙動を含んでいる。

① 内胚葉索と subchordal cell は、同じ道を逆方向に進む。

② 2 つの subchordal cell 前駆細胞は、接触せず、間隔をあけて尾部内を進み、間隔をあけて停止する。

③ Oral gland 前駆細胞は、4 つの核を含んでいるが、途中から、2 核ずつを含み左右に移動する 2 つの細胞にちぎれる。

このような細胞移動が、いったいどのようなメカニズムによって制御されているか、というのは非常に興味深い点である。

内胚葉索は、一列につながった細胞として体幹部に向かって移動する。これは、collective cell migration と呼ばれる、複数の細胞がかたまって移動する動きの例としてとらえることができる。尾部・体幹部の切除実験や高倍率での観察によって、内胚葉索は、①移動時に体幹部／尾部がなくても移動することができる　②体幹部の何らかの細胞に引っ張られ、体幹部に引きずり込まれているわけではない　③内胚葉索の前端細胞がなくても移動することができることがわかった。よって、内胚葉索の移動方向は、移動時にはすでに形成し終わっている誘引/忌避物質の勾配か、周囲の細胞外マトリックスからのシグナルによって方向を決められ、先端だけではなく内胚葉索の細胞全体が移動していることが示唆される。ただし、内胚葉索の移動時には、仮足形成が見られないので、筋肉などの周囲の細胞のなんらかの変形によって、内胚葉索が押し出されている可能性も否定できない。それらしい周囲の細胞の変形も、内胚葉索細胞自体の仮足も、高倍率の観察で見ることができていないので、現時点では「内胚葉索自体が動いているのか、周りの細胞の変形が原動力なのか」という問いに答えを出すことはできない。しかしいずれにしても、体幹部/尾部先端がなくても移動することができる内胚葉索の移動現象は非常に興味深い例であると考えられる。

次に、単独の細胞移動である subchordal cell は、同様の実験によって、①移動時には体幹部からの作用を必要としないこと　②2 つ目の subchordal cell は、1 つ目の subchordal cell の移動には大きくは関わらないこと(1 つ目から 2 つ目への関与があるかどうかは不明)　③尾部先端部を欠くことが、2 つ目の subchordal cell 前駆細胞の移動に影響する可能性があること　が示唆されている。また、内胚葉索とは異なり、subchordal cell は高倍率で観察すると仮足のようなものを、前後の両端に出しているのが観察されるため、自ら動いている細胞である可能性が高い。よって 2 つ目の subchordal cell の移動には、尾部先端からの誘引が関与している可能性がある。しかし、今回の実験においては、1 つ目の subchordal cell からの影響(2 つの subchordal cell 前駆細胞は必ず距離をあけて移動し、停止することから、1 つ目の subchordal cell から 2 つ目に対して何らかの忌避物質が出ている可能性がある)や、傷自体の影響の可能性を排除することはできなかった。今後、①1 つ目の subchordal cell から 2 つ目の subchordal cell に対する影響を見るため、1 つ目と 2 つ目の間で尾部先端を切除し、移動の様子を観察する　②移動の様子がおかしくなるのは切除したせい(傷をつけたせい)でおこったものでないことを示すため、尾部に傷をつけて移動の様子を観察する　③1 つ目の subchordal cell 前駆細胞の移動に、尾部先端部がどのように関与するか調べるため、切除する時間を早く、切除する範囲を小さくして、1 つ目の subchordal cell 前駆細胞の移動の変化を観察する　④より明瞭に体幹部や尾部の影響を見るため、尾部先端と体幹部両方を切除して動きを見る、といった切除実験をすると理解が深まるかもしれない。

また、多くの細胞移動において、細胞の移動方向は細胞誘引物質(ケモアトラクタント)や忌避物質(ケモリペレント)が見つかっている。例えば、魚類の後方側線細胞では、Chemokine 系の因子である Cxcl12α が拡散性の細胞誘引物質として、受容体 Cxcr4、Cxcr7 に結合することで、

細胞移動の方向性を決めていることや、同じ系で FGF が細胞誘引物質として働いていることがわかっている(David et al, 2002, Lecaudey et al., 2008)。尾部先端部分から誘引物質が出ている可能性を考え、既知の誘引物質に対して阻害剤処理を行い、移動に影響が出るか調べることも可能であろう。

ここでは挙げていないが、次のような現象も興味深く、解析を行う価値がある。Subchordal cell 前駆細胞が体幹部深部から尾部内に出ていくメカニズム、2 つの細胞が間をあけて移動し、間をあけて停止するメカニズム、oral gland 前駆細胞が前方に動くメカニズム、1・3 個目の核が右、2・4 個目の核が左に行って左右に二つに分かれるメカニズム、口付近で丸くなって停止するメカニズム、内胚葉索が仮足無しで一列に繋がって移動するしくみなど、興味深いがわかっていないことが多い。核、細胞膜、アクチン線維に加えて微小管の可視化(現在、初期胚ではMAP7-GFP を用いた微小管の可視化に成功している)も行って、細胞の挙動を調べることもできるだろう。また、線虫では発生過程の細胞移動に異常を示す様々な突然変異体が単離されており、細胞移動メカニズムの研究に貢献してきた（Hedgecock et al., 1987, Rella et al., 2016)。同様に、オタマボヤの生活環の短さを利用し、上記のような現象に異常を示す変異体をスクリーニングしてみることも有用であると考えられる。今後これらの点を調べることで、細胞移動に関する新たな知見がもたらされることが期待される。

# 第４章　表皮の形態形成過程

## 4.1 序論

生物の形態には複雑ではあるが単純な規則性（例えば繰り返しのような）がなく、しかも個体差のないパターンを持つ場合がしばしばある。このような複雑な構造を形成するしくみの理解は遅れている。オタマボヤ、特に Oikopleura 属の体幹部の表皮（Oikoplastic epithelium と呼ばれている）は、一層の上皮細胞からなり、特徴的な数、形、大きさの細胞からなるパターンを持っていることが知られている(Flood, 2004)。過去の観察から、個々の特徴的な領域には名前が付けられており、典型的な部分は種間でも保存されていることがわかっている。このパターンは、規則性に乏しい複雑なパターンでありながら、細胞の数や配置に個体差がほとんどない(Fig.4-1A-C)。例外的に個体差が見られる領域でも細胞数個のレベルである。このような表皮の複雑なパターンをもつ大きな理由として、体幹部表皮は、ワカレオタマボヤが餌である植物プランクトンをこしとるために必要な、セルロース製の摂餌フィルターを含むハウスの分泌を行う分泌細胞でもあることが挙げられる(Flood, 1998)。オタマボヤは非細胞性のハウスの中に住んでおり、ハウスはオタマボヤが餌をとるために必須である(Fig. 4-1D)。ワカレオタマボヤは、一日に数回、ハウスを脱ぎ捨て、常に新しいハウスを作り続ける必要がある(Sato et al., 2000)。この複雑な 3D 構造を、体幹部の表皮が分泌するのである。それぞれの表皮領域ごとにハウスのどの部分を分泌するかがきまっていると考えられている(Flood, 1998, Sagane et al., 2011)。線虫のようにパターンに乏しい表皮を持つ動物(Chisholm and Hsiao, 2012)、ショウジョウバエのように規則性を持って細胞が並ぶ動物(Hartini and DiNardo, 2001)、哺乳類や魚類のように規則性をもって毛やうろこが並ぶ表皮を作る動物(Duverger 2010)など、表皮形成にはいくつかのパターンがあるが、オタマボヤのように規則性に乏しく、かつ個体差のない複雑なパターンを持つ表皮細胞を持つ生物は、我々の知る限り他にはなく、ユニークな系であるといえる。複雑ではあるが規則性に乏しく、しかも個体差のないパターンを作り出すしくみを解析する系として、オタマボヤの表皮上で 2D に展開する細胞配置パターンは、解析しやすい適度な複雑性を持つと考え、まずその完成パターンの記載（各細胞に名前を付ける）を詳細に行い、次にその形成過程を主としてライブイメージングを用いて記載することにした。

ワカレオタマボヤ体幹部表皮においては、幼若体及び成体において、個々の細胞の Endocycling（細胞分裂や核分裂なしに DNA を増幅する）の解析(Ganot et al., 2002)や、領域ごとに発現が異なる遺伝子 ”Oikosin 遺伝子群”の発現解析(Thompson et al., 2001, Spada et al., 2001, Hosp et al., 2012)などが精力的に行われている一方で、特に幼生期におけるパターン形成過程に関しての研究はほとんどなされていない。表皮のパターンは、20˚C で飼育した場合、受精後 3 時間で孵化したときには明確なものは見られないが、受精後 10 時間で Tail Shift して最初のハウスを展開するまでに細胞の並びはほぼ成体と同様にまで完成する(Fig.4-2)。この過程で

のパターン形成の早さと美しさには目を見張るものがある。その後、個々の細胞が細胞分裂を伴わない DNA 合成(Endocycling)を何度も行うことで大きさを増していき、独特の形と大きさの細胞を形作ってゆく(Ganot et al., 2002)。つまり、表皮のパターン形成過程を追うには、孵化から Tail Shift までの 7 時間を観察すればよい。この短さは詳細な観察を行うためにとても有利であり、これは、mRNA 卵巣内顕微注入法を用いたライブイメージングが可能な時期でもある。

本研究ではまず、1 細胞レベルで形態形成の記載を行うに当たり、ワカレオタマボヤの表皮の各領域について、領域境界の再定義と、細胞の番号付けを行った。次に、各領域についてパターン形成過程を観察し、方向性を持った細胞分裂、細胞の移動、幹細胞様の分裂など、様々な現象を観察することができた。さらに、2 細胞期の片側の割球を標識し、それが将来表皮のどの部分を形作るかを調べる Clonal Organization 解析の結果、表皮は完全に左右対称なパターンを持っていながら、細胞系譜上の由来に関しては著しく左右非対称であることが示された。ワカレオタマボヤほど個体差がない由来の左右非対称性が観察されたのは、脊索動物においてはおそらくはじめてのことである。

ワカレオタマボヤのように規則性に乏しいが明確なパターンを示す上皮シートを持つような生物で、個々の細胞のふるまいを詳細に記載することは、ユニークな細胞の並びが形作られるしくみに関する研究のための貴重なモデルを提供することになると考えられる。

## 4.2. 結果

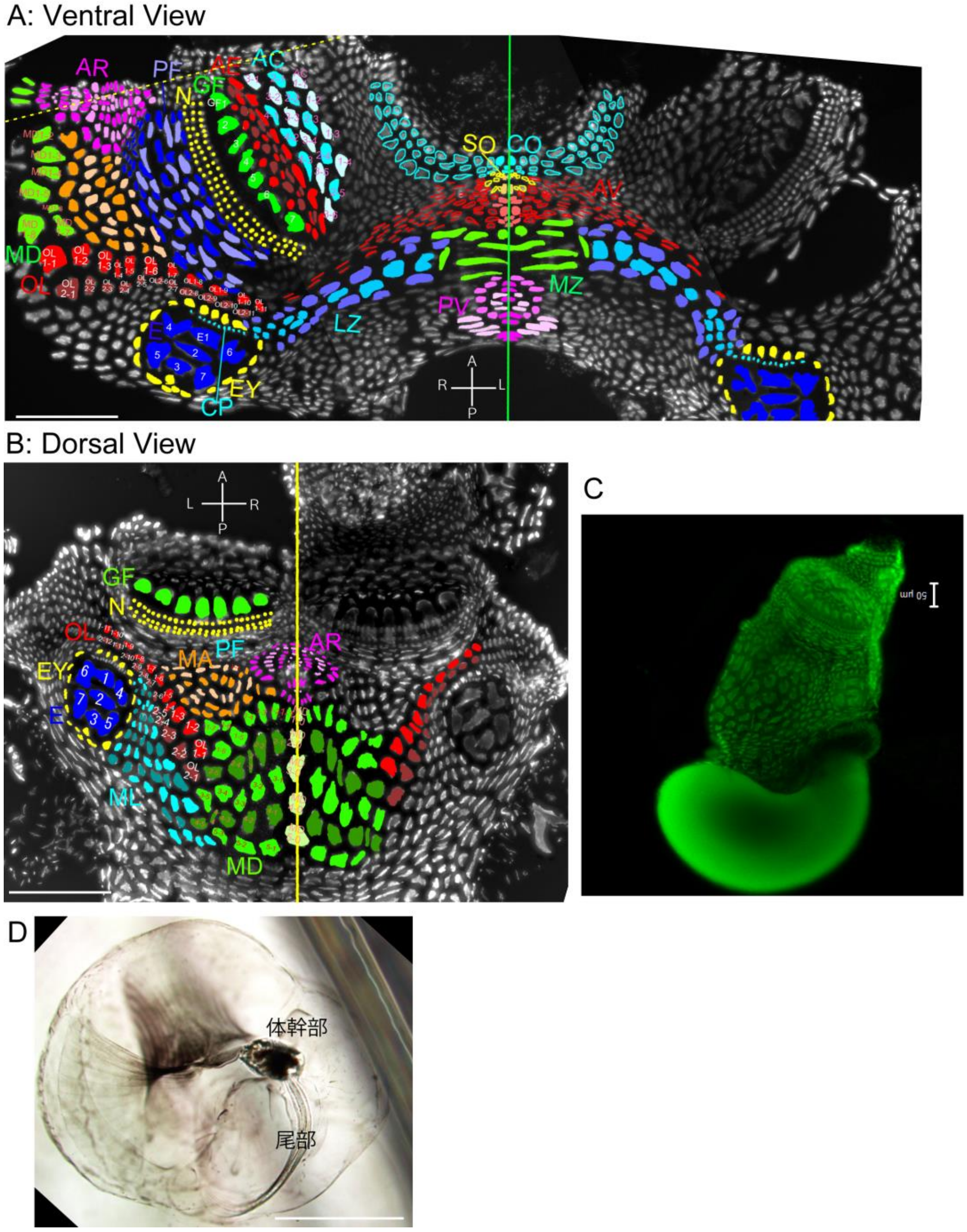
### 4.2.1 Oikoplastic Epithelium の領域の定義

ワカレオタマボヤの成体の表皮は、個体差のない複雑なパターンを持つことが知られている。産卵放精前の成体（Day5）の核や細胞膜を染色すると、体幹部表皮の背側でも腹側でも、複雑で左右対称な細胞配置パターンが見られる（Fig.4-1）。このパターンは雄と雌で同一である。また、細胞配置、細胞数、個々の細胞の形に関して個体差はほとんど見られず、厳密に決まっていると考えられる(n=3)。また、パターンの左右対称性も細胞レベルで守られており、その厳密さが伺える。よって、各細胞はただ表皮空間を適当に埋めているわけではないことがわかる。さらに、このパターンは、日本産のワカレオタマボヤでもノルウェー産のものでも同じ位置に同じ細胞が存在している(Fig.4-1, Spada et al., 2001)。このパターンは何となく領域に分けられることが認識できるが、多くの細胞は、細胞ごとにそれぞれ形や大きさが異なることから、それぞれが固有のものであるように見える。しかしながら、個々の細胞に分子レベルで異なったアイデンティティが付与されているのか､隣の細胞と形や大きさ以外に分子レベルで何らかの違いがあるかどうかは不明である。

過去の研究ではおおまかな領域境界しか決められておらず､これから行う細胞レベルの解析にとっては不十分であるため、あらたにそれぞれの領域の境界を細胞レベルで決定した。オタマボヤ綱の表皮パターンの形態的領域記載に関する先行研究(Reviewed in Flood, 2004)と、

Oikoplastic Epitheliumの特定の領域のみに発現しハウスの構成タンパク質であるOikosin群の発現領域(Hosp et al., 2012., Spada et al., 2001, Thompson et al., 2001)、そして本研究で明らかになった細胞分裂の境界(後述)を元に決定した(Fig. 4-1)。さらに、それぞれの領域の細胞ひとつひとつに番号を付けた（Fig.4-1、Fig. S7、S8、S9）。その番号は、頭文字-列番号-細胞番号、になっている。列番号は基本的に、前方から1,2,3…と順につけられており、細胞番号は正中線を0とし、そこから1,2,3…とつけていった。たとえば、Anterior Crescentの1列目の、背側から2番目の細胞は、AC1-2という名である。ただし、いくつかの領域についてはこのルールに則らず、独自の命名をしている。

各領域に関する記載、および細胞番号の付け方に関して、詳細を以下に示す。




## Fig.4-1 成体表皮の領域わけ

A, B:固定した成体(D5)の表皮（単層上皮）を腹側または背側の正中線で切り、展開し、DAPI によって核を染色したもの。 A:腹側。緑色の線は腹側正中線、黄色の点線は背側正中線。B: 背側。黄色の線は背側正中線。いずれの図も、2 つ以上の視野で撮影した画像を繋ぎ合わせて 1 枚にしたものに、疑似カラーをつけたものである。 *GF:Giant Fol、N : Nasse、AE : Anterior Elongated Cell, AC; Anterior Crescent, PF: Posterior Fol, E; Eisen Giant cell, EY; Eisen's Yard, CP; Chain of Pearl, MD; Mid-Lateral Field, AR; Anterior Rossete,* OL; Oblique line, MA; Martini, ML; Mid-Lateral Field, SO; Sensory Organ, CO; Circumoral Field, AV; Anterior Ventral Surface, MZ; Medial Zone of Medial Ventral Surface, LZ; Lateral zone of Medial ventral surface, PV; Posterior Ventral Surface をそれぞれ示す。スケールバー: 200 μm。 C : 固定した成体(D5)の体幹部の DNA を、SYTOX Green で染色したもの。右側から見ている。スケールバー : 50 μm。(古谷 卒業研究発表より)。(図中の 50 μm の字が上下反対になっている) D : 成体(D3)が分泌しているハウス。ハウスは透明なため、目に見えるようにするために海水中に墨汁を添加した。複雑な構造を持つフィルター構造が、体の周りを覆っているのが観察された。スケールバー : 1 mm。

#### 4.2.1.1. Fol region

表皮の前側方領域。背腹方向に沿った細胞列から構成されている。Fol region 内の各領域で細胞の並び方や細胞の大きさ、形が異なっている(Fig.4-3A, Fig. S8)。ハウスの Food-consentration filter を分泌するといわれている(Flood 1998)。Fol 領域は、AC1~4、AE1~5、GF、N1~3、PF1~9 の合計 22 列の細胞列からなっているが、それぞれの列間で細胞の大きさは大きく異なっており、そのことが特徴的な細胞のパターンを生み出している。以下に Fol region 内の各領域について詳細に記述する。

*Anterior Crescent: AC*　水色

AE の前方にある、大きな細胞。前方から、基本ルールに従って名がつけられている。六角形の細胞が並んでいる領域であり、Apical 側(体表の外側)に大きくせり出している。

*Anterior Elongated Cells: AE*　赤

GF と AC の間にある 5 列の細胞。AC や GF より細胞が小さい。AE1 列は AE 領域の中では比較的細胞が大きいが、前後で細胞の大きさはほぼ変わらない AC の各細胞に比較すると小さい為、AE に組み込むこととなった。AE5 列の細胞は GF 細胞の間にある。

*Giant Fol: GF*　　緑

7 つの大きな細胞が並ぶ。1 列のため列番号は設定せず、背側から、GF1 から GF7 までの番号を付けた。

*Nasse Cells : N*　黄

小さい細胞が３０個弱ずつ３列に規則正しく並ぶ。一列の細胞数は 25 個～30 個の間で個体差がある。それぞれの列を、前方から N1,N2,N3 と名付けた。個体差があることや、端の細胞の定義が難しいことから、個々の細胞には番号をふらない。

細胞の形は長方形である。他の列のように互い違いに（たとえば、AC1-1 と AC1-2 の間に AC2-2 があるように）並んでいるのに対し、Nasse 領域の細胞は、縦の 3 細胞も 1 列にまっすぐ並んでいる。

*PosteriorFol: PF*　　青

Nasse の後方にある細胞の列。　9 列ある。Posterior Fol の中でも横長の細胞を Posterior Elongated Cell と呼ぶ文献もあるが(Flood, 2004)、今回は区別せずに名を付けることにした。仮に区別する場合は、PF4,PF5 の各列がこの PE 領域に相当すると考えられる。

PF1 から PF3 までの各列は細胞が小さい。PF4 列の 5 細胞は細胞が大きく、また、幼生の核を生きたまま観察したときにその大きさからか少し薄く見えることが特徴の一つである。PF5 列と PF6 列も、Nasse と同様、互い違いになっておらず縦方向の 2 細胞もセットになって並んでいる。PF10 は列ではなく、Anterior Rossete と Posterior Fol の間の小さな細胞群をまとめ

てこう呼ぶことにした。

#### 4.2.1.2. Eisen Region

表皮の後側方腹側寄りに存在する特徴的な領域である。大きな 7 つの細胞からなる Giant Cell、その前方に小さな細胞が並んだ Chain Of Pearl 領域、この 2 領域の周囲を取り囲む Eisen's Yard 領域の 3 つのサブ領域からなっている。ハウスの Inlet Filter を分泌しているといわれている (Flood 1998)。

*Eisen Giant Cells: E*　　青

7 つの大きな細胞からなる。列番号は設定せず、中央 3 細胞を E1, E2, E3、背側を E4, E5、腹側を E6, E7 とする。この番号の付け方は変則的であるが、一部の Oikosin の発現(Spada et al., 2001, Hosp et al., 2012)が E1,E2,E3 と E4-E7 で異なっていることと、形態的にも中央 3 細胞(Eisen 3)と周辺 4 細胞(Eisen 4)が異なっていることから、先行研究(Ganot and Thompson, 2002)の名付けをそのまま採用した。

*Eisen's Yard: EY*　　黄

Eisen Giant Cells を取り囲む細胞。前後背腹に 5 細胞ずつある。もっとも前・背側の細胞を EY1, その後方の細胞を EY2 とし、そこから時計回りに EY20 まで名を付けた。EY7 は核を染めたときに 1 細胞だけ内側に入り込んでいるのが観察される。

*Chain of Pearl region: CP*　　水色

Giant Cells の前方に並ぶ小さな細胞。数は 10 個前後(9～13 個程度)で個体差がある。Nasse と同様、細胞が小さく数に個体差があることから、細胞番号は設定していない。

#### 4.2.1.3. その他側方の各領域と、背側領域

Fol 領域および Eisen 領域以外の、体幹部側方および背側正中上にある領域の定義も以下に示す。

*Mid-Dorsal Field: MD*　　緑

背側から後側方に位置する。ほかの領域にくらべて大きな細胞が並んでいる領域(Fig.4-1B)。後側方の多くの面積を MD 細胞が占める。正中線上の細胞には、前方から MD1-0 から MD5-0 までの名をつけ、そこから左右に細胞が並んでいる。左右に 2 個ずつある、細長い細胞 Leuckart Cells は、それぞれ、MD2-3 および MD5-6 という名がついている。特に MD2-3 は発生途中でも周囲に比べて縦に少し細長く、ランドマークの一つになりうる。

*Anterior Rossete : AR*　　桃

背側正中で、細胞がロゼット状に並んでいる領域。正中上の前方部で、三角形の細胞が 2 つ、

前後に向かい合うように並んでいる。この細胞をそれぞれ、AR1-0,AR2-0 と名付ける(Fig.S7A)。

AR2-0 の後方には、３つの大きな細胞が並んでおり、これがそれぞれ AR3-0,AR4-0,AR5-0 である。AR6-0,AR7-0,AR8-0,AR9-0 はいずれも細長い細胞である。AR10-0, AR11-0, AR12-0 は小さな３つの細胞だが、この３細胞が Anterior Rossete の中心となる細胞である。AR13 は、左右の AR13-1 と正中の AR13-0 の３細胞が横に並ぶ。同様に、AR14 から 16 までは、５細胞が横に並んでいる。中心の３細胞,AR10-0,AR11-0,AR12-0 の周りに４列の細胞が並んでロゼットを形成している。AR9-0 から AR13-1 に向かって並ぶ AR9-1,-2,-3、AR8-0 から AR14-2 に向かって並ぶ AR8-1 から AR8-5、AR7-0 から AR15-2 に向かって並ぶ AR7-1 から AR7-8、そして、AR6-0 から AR16-2 に向かって並ぶ、AR6-1 から AR6-10 である。AR17-0, AR17-1 は、周りよりも小さな３細胞である。AR18 の７つの細胞が、Anterior Rossete 領域の後端の細胞となる。

*Oblique Line : OL*　　赤

Mid-Dorsal Field から、Eisen Field の前方に向かって並ぶ２本の細胞の列。
MD1-8・MD2-5 の隣の細胞を OL1-1、その後方、MD2-5 と MD3-5 と隣り合う細胞を OL2-1 と定義し、以下、前方に向かって細胞番号が増えてゆくので、ルールからは外れている(Fig.4-1b)。特に OL1 の列は、いくつかの Oikosin が特異的に発現、もしくは発現しなくなっているので (Hosp et al., 2012)、何らかの特殊な機能を持っている可能性があるが、詳しいことは不明である。

*Martini region: MA*　　橙

Posterior Fol/Mid-dorsal/Anterior Rossete/Oblique Line に挟まれた領域。ルールに従って、前方から MA1 から 4 まで列番号が付いているが、実際には Fol と違い明確な列が形成されているわけではない。特徴的で、名付けのランドマークとなりうる細胞は、Anterior Rossete と隣りあう大きな細胞 MA４-１、MD の最も小さな細胞と前後に向かい合う MA4-5 の２つである。

*Mid-Laetral Field*　　水色

Eisen, Oblique Line, Mid-Dorsal に囲まれた三角系の領域。基本ルールに従い、前方から名前をつけている。後方に行くに従って細胞が大きくなる。ML 内では、ML4 列より 後ろは背腹に沿った列を形成しているが、その列は OL や MD の列の延長上にはない。

#### 4.2.1.4. 腹側領域

腹側は、背側と比較して、全体的に明確な構造に乏しく、多くの細胞には名前をつけていない。一方、正中上には明確なパターンが存在している。先行研究に従い領域わけを行い、正中周辺の細胞には名前をつけた(Fig.4-1, Fig. S8A,C)。領域わけの定義を以下に示す。

*Sensory Organ: SO*　　黄

Sensory Organ (SO)は、腹側前方部にある感覚神経を指す。SO 細胞は繊毛を持っているので(Bollner et al., 1986)、抗アセチル化 α-Tubulin 抗体で免疫抗体染色することができる(Fig.S7B)。これらの細胞は、表皮細胞に比べて深部（Basal 側）に陥入しているように見える。また、DAPI 染色をした際に明確な核はみられなかった。

この繊毛が染まっている SO 細胞の、周辺の表皮細胞 1 周分を SO 領域とした。正中上の細胞を前から SO1-1, 2-1 とし、その他の細胞には特に名前は付けなかった。

*Circumoral Field: CO*　　水色

口の開口部を取り囲んでいる細胞群。SO 領域のすぐ前方の列を CO1 列とし、口方向に CO2 列、CO3 列……とする。基本ルールとは名前の付け方が逆だが、明確な表皮と内胚葉の境界が不明なため、何列あるかが不明であり、やむを得ずこの方法を取っている。この領域は背側まで続いているが、AC 領域と CO1 との間を埋めている多数の小さな細胞には特に名前をつけなかった(この領域は、Flood 2004 においては CO 領域に組み込まれている)。

*Anterior Ventral Surface: AV*　　赤

SO よりも後方にある、比較的小さな細胞の集まった領域。正中上の細胞には、前方から AV1,AV2,…AV6 と名前を付けた。AV6 は正中上に 1 細胞だけだが、それ以外(AV1-5)は正中をまたいだ 2 細胞の列である。正中上以外の細胞には、細胞番号や列番号を付けなかった。

*Medial Ventral Surface*

横長の細胞の多い領域。AV 領域の後方に有り、比較的大きな細胞が並んでいる。以下の 2 つの領域に分けられる。

*Medial Zone: MZ*　　*緑*

腹側正中付近の大きな 13 個の細胞。MZ1-1 は、正中に丸い細胞が 2 つあり、その横に MZ1-2, MZ1-3 が並ぶ。MZ2-0 は正中上に 1 細胞ある横長の細胞である。その隣に縦に長い MZ2-1 がある。さらに、正中にそって 2 細胞ずつ MZ3-1、MZ3-2 がある。合計 13 細胞は、構造に乏しい腹側においては非常に目立つ特徴的な細胞のパターンとなっている。

*Lateral Zone: LZ*　　青

MZ より側方(背側)、3-4 列の細胞が並ぶ。AV や PV よりも細胞が大きい。前方から、LZ-1、LZ-2、LZ-3 の 3 列を定義。腹側から順に LZ1-1,LZ1-2,と番号を付けている。この 3 列ないし 4 列の細胞列は Eisen の上まで続いている。

*Posterior Ventral Surface: PV*　　桃

MV の後方の領域。この領域の後端の細胞は、内胚葉系の肛門および鰓穴と繋がっている。側

方領域は構造に乏しいため、腹側正中上およびその周辺のみ名前を定義する。MZ4 列のすぐ後ろから、正中上の細胞を PV1-0〜PV7-0 とした。PV3-0 の周辺 6 つのロゼット状の細胞を、前方から PV3-1 から PV3-3、PV1-0 から PV4-0 に向かって並ぶ細胞を、PV1-1〜PV1-6、PV6-0 から斜め前方に向かって並ぶ細長い細胞を PV6-1 から PV6-4 とそれぞれ定義した。

以上のように、体幹部表皮の主要な領域について、細胞一つ一つに固有の番号を定義した。Flood 2004 にて領域名が示されているが、今回、細胞に名前を付けていない領域は、以下の 6 つの領域である。

*Dorsal Mosaic* 、*Anterior Dorsal Field*

背側正中線上の、AR の前方部に相当する。左右の Fol 領域に挟まれた部分を Dorsal Mosaic と呼び、PF、MA、Dorsal Mosaic、AR に挟まれた三角形の領域を Anterior Dorsal Field と呼ぶ。細胞が小さく、並びに規則性が乏しいため、個々の細胞への命名が困難であると判断した。

*Ventral Mosaic*

Fol 領域の腹側の終点部分。腹側の AV 領域と接する。この部分も、Dorsal Mosaic と同様、細胞が小さく規則性に乏しい為、細胞には命名しなかった。

*Posterior Rossete(Lohman's cross)*、*Posterior Dorsal Field*、*Posterior Lateral Field*

背側から側方にかけての最後方部分。Posterior Rossete は正中上に、Posterior Dorsal Field はその後方に、Posterior Lateral Field はこれらの側方にある領域である。後方部は成体を開いた時に生殖巣と共に切り取られてしまうことが多く、明確に観察ができなかったため、今回は命名を行わなかった。

また、Nasse, Chain Of Pearl, および正中上と MZ,LZ を除いた腹側領域については、領域、または列の定義のみを行い、個々の細胞への命名は行わなかった。

以下ではこれまでに示した領域名と細胞名を使って議論を行ってゆく。

### 4.2.2 幼生の表皮のパターン形成過程

前述の通り、体幹部の表皮は、個体に依らない複雑なパターンを持っている。しかし、このパターンが出来上がってくる過程については、詳しいことはわかっていない。前節で完成された表皮の細胞配置パターンが明らかになった。次に、パターン形成のしくみを知るために、このようなパターンができあがってくる過程の詳細な記載を行うことにより基礎的なデータを提供することができ今後の研究に資するところが大きいと考え、幼生発生過程での表皮パターニング形成

過程のイメージングを行うことにした。

表皮細胞の分裂は、孵化の前後共に活発に起こっている。孵化直後(3 hpf = 0 hph)には一見したところ明確なパターンが見られないが、孵化後に分裂を繰り返すことにより、変態前(7-8 hpf = 4-5 hph)にはほぼすべての分裂を終了し、成体とほぼ同様のパターンを持つようになる(Fig. 4-2)。この間に体幹部表皮細胞の数は、孵化直前の約 300 個から 2400 個に増える。細胞によるが、孵化後 30 分以降に、０～4 回の細胞分裂が起こることがわかった。また、細胞分裂だけではなく、細胞移動や局所的な配置換えも起こっている。このような孵化後のパターニング現象に関して、それぞれの領域の形態形成過程で、個々の細胞がどのようにふるまうのか、タイムラプスムービーを撮影して調べた。以下の記述はそれぞれ、複数回の観察（少なくとも２回以上）に基づいている。その結果、いくつかの興味深い現象が起こっていることが明らかとなった。

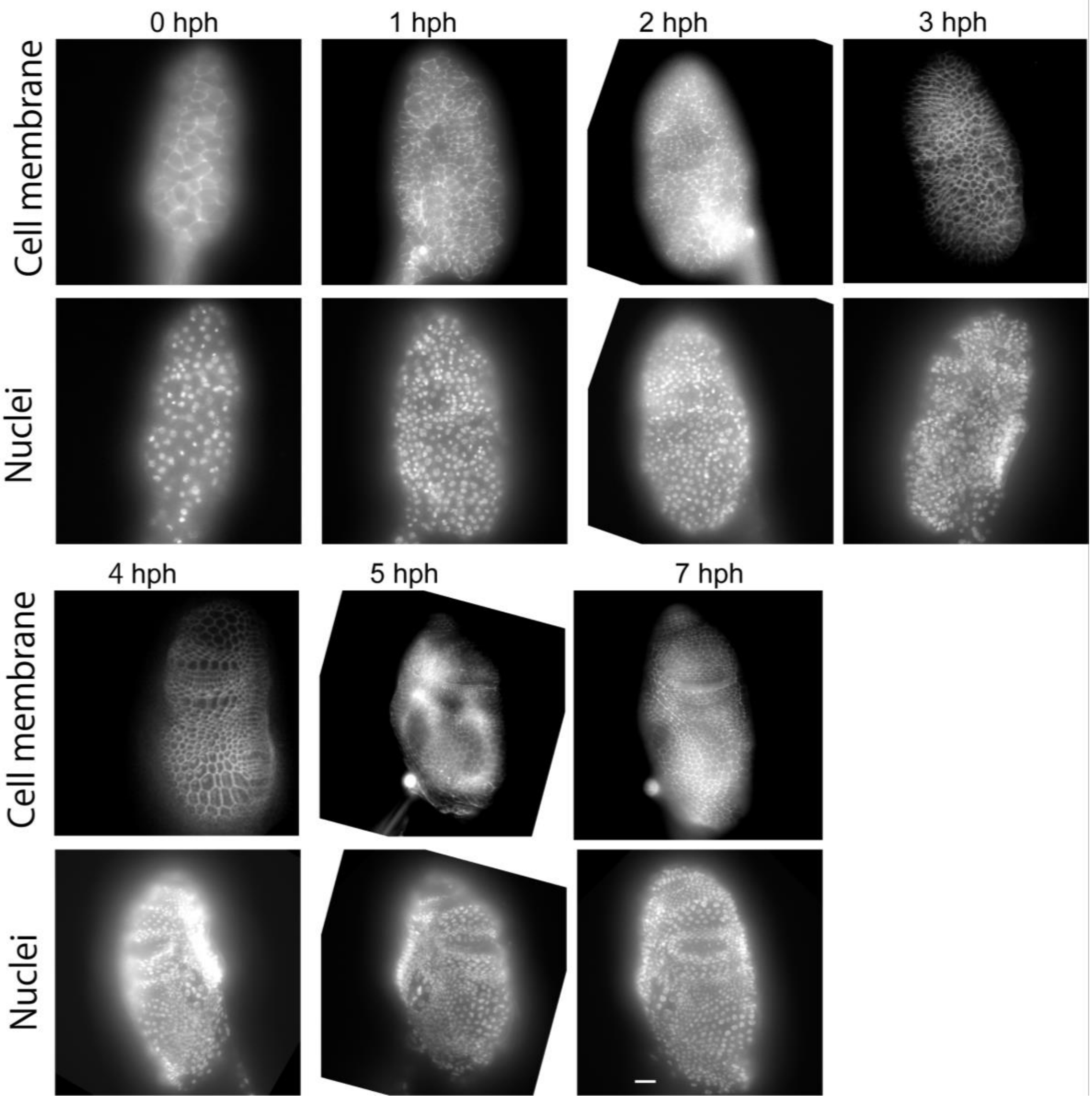



**Fig. 4-2: 幼生表皮の形態形成過程**

図に示す時期の幼生の DNA 及び細胞境界を可視化したもの。上段は細胞膜または細胞境界(0, 1, 2, 5, 7 hph は Phalloidin、3,4 hph は FM-1-43)。下段が核(DAPI)。孵化直後(0 hph)には明確なパターンは見られないが、徐々に細胞分裂が進み、5 hph までの 5 時間で、ほぼ成体と同様のパターンを形作る。いずれの写真も、右または左から観察したもの。上が前方(口側)。 スケールバー：10 µm。

#### 4.2.2.1. Fol region

4.2.1.1 にて詳述のとおり、背腹軸に沿った多くの細胞の列から構成される前側方の領域(Fig.4-3A)。孵化後は、例外もあるものの、背腹方向に沿った横方向の分裂を行う細胞が多い。特に GF と Nasse 領域についてはこの傾向が顕著である。以下にそれぞれの領域の形態形成について観察された詳細を述べる。

*Anterior Crescent*　水色

孵化後 1 時間の時点で、ほぼ分裂を完了しているため、観察時間中には 0-1 回の分裂が観察できる。周辺部よりも中央部の分裂のほうが早く終了する傾向にある。分裂完了後に局所的な配置換え（すなわち相対的な位置を少しだけずらす）を行い、最終的に Fig. 4-3A にあるように交互に規則正しく細胞が並ぶようになる。

*Anterior Elongated Cells*　赤

この領域の細胞は AC や GF よりも分裂回数が多く(孵化以降 2-3 回)、分裂の終了時刻も遅い(3 hph 前後)。成体になっても GF や AC より一回り細胞が小さい。この領域では、背腹方向だけではなく前後方向の分裂も見られる。

*Giant Fol*　緑

成体では、7 つの大きな細胞が並んでいる。最終分裂は孵化後 1 時間半頃に起こる。孵化後の分裂は、観察されている限りこの 1 回のみ。個々の細胞分裂は特に同調していないようである。Fig. 4-3B と C（緑細胞）にあるように GF2 と 3、4 と 5、6 と 7 がそれぞれ姉妹細胞である。GF1 のもう一つの姉妹細胞はどうなるのか不明である。

*Nasse Cell*　黄

小さい細胞が３０個弱ずつ３列に規則正しく列と行をなして並ぶパターンがどのようにしてできるかには興味が持たれた。わかったことは、単純である。この領域の細胞は、孵化後 30 分(30 mph, minutes post hatching)以降は全て背腹方向に分裂していて、3 列の間で他の列の細胞が混じりあうことはない（Fig.4-3b、c では紫、ピンク、オレンジ色の細胞)。つまり、30 mph 時点で 3 列それぞれの前駆細胞が存在している。N1、N2、N3 の母細胞は最初互い違いになるように並んでおり、これらが横方向に複数回連続した分裂を行い、列を形成する。このため、出来上がった列の由来細胞の境界は、N1 と N3 はほぼ同じ位置にくるが、N2 はずれている。3 hph 前後に一度同じくらいの大きさの細胞が揃ったあと、もう一度最終分裂して最終的な細胞の縦並びを形成する様子が観察される。分裂回数は 2 回から 3 回。

また、腹側の端の細胞は、3 hph までの間、一方向（背側方向）に向かって小さな細胞を複数回生み出す特殊な、幹細胞様の分裂を行う様子が観察される。生み出された細胞はその後 1 回分裂する。

*Posterior Fol*

分裂回数は、領域内でも列によって異なり、孵化以降 1 回から 3 回。最終分裂は背腹方向のものが多いが、一部例外もある。

PF4、PF5、PF6 の 3 列は、特徴的な横長の細胞が並んでいる。PF4 と PF5 が姉妹であり、最終分裂は PF5-4/5-5 の分裂を除き前後分裂である。つまり、PF4-1/5-1、PF4-2/5-2、PF4-3/PF5-3、PF4-4/5-6、PF4-5/5-7 がそれぞれ姉妹細胞であり、一つだけ横方向に分裂する PF5-4 と PF5-5 は姉妹細胞である。これらの細胞は、最終分裂が横方向の細胞が多い Fol 領域の細胞の中で縦分裂を行う珍しい細胞である。PF6-1 から PF6-7 は 1 つの細胞の由来であり、3 回続けて横方向に分裂する。

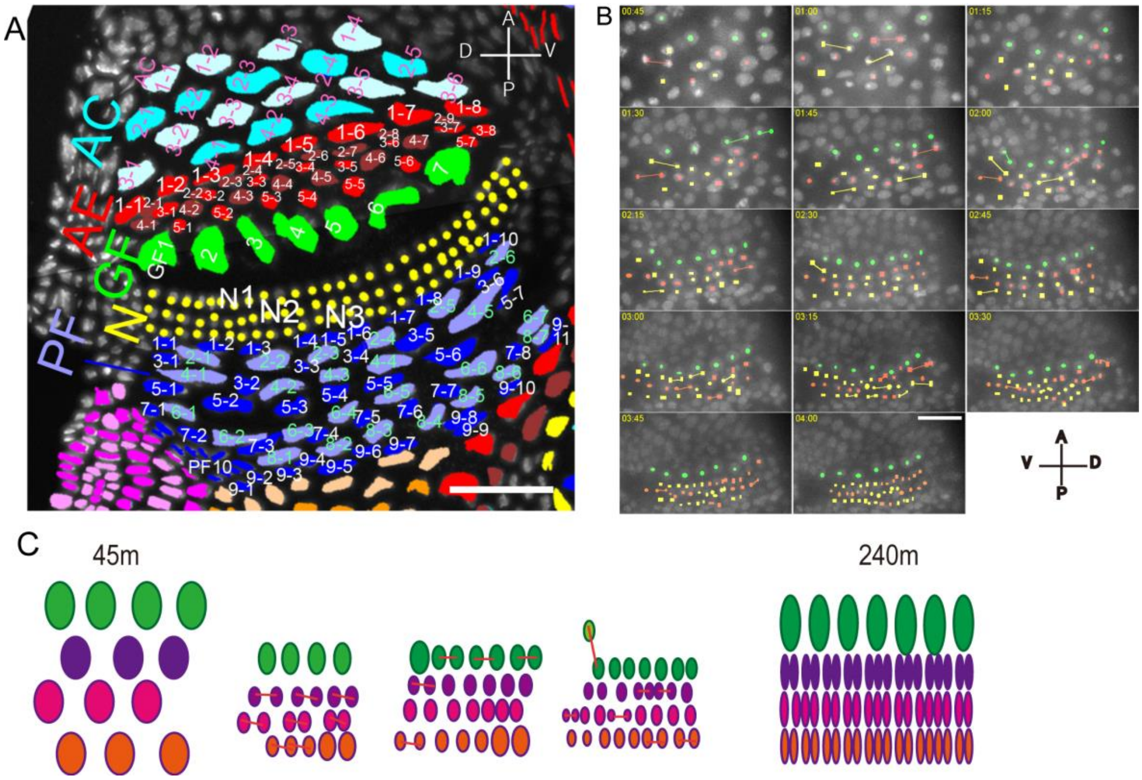



**Fig.4-3 Fol 領域の形態形成過程**

A: Fig.4-1A の拡大図. DAPI によって可視化した核に、疑似カラーを付けている。*GF:Giant Fol*、*N: Nasse*、*AE: Anterior Elongated Cell, AC; Anterior Crescent, PE; Posterior Elongated Cell, PF: Posterior Fol.* スケールバー: 100 μm　B: Fig.4-S2 の一部抜粋. 緑の点は GF cells を、オレンジおよび黄色の点は N1 と N3 の細胞を、四角は N2 の細胞を示す。GF と N の細胞は、孵化後は DV 方向にのみ分裂する。スケールバー: 10 μm.　C:GF および N 領域の細胞分裂の模式図。緑の丸は GF 細胞を、紫、桃、橙の丸はそれぞれ N1,N2,N3 の列を表す。

#### 4.2.2.2. Eisen Region

*Eisen Giant Cells*

40 mph 時点で既に最終分裂を終えている。一方、周囲の細胞分裂は続いてゆくため、周囲にくらべて細胞が大きいまま成体に至る。1 hph 時点では、腹側の 2 細胞 E6,E7 が、他の 5 細胞より前方にあり、E1 細胞と E7 細胞が接している。この E6,E7 細胞は 2 hph あたりから後方へと移動しはじめ、4 hph までに成体と同様のロゼット形になる（Fig.4-4A）。この際、周囲の細胞を押しのけるように移動するわけではなく、周囲の細胞も分裂をしながら共に移動している (Fig.4-4b,c)。

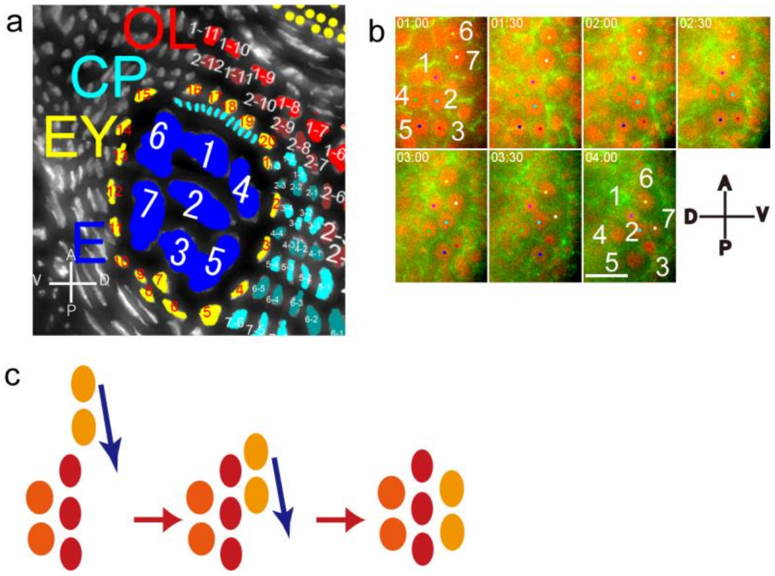



Fig.4-4 Eisen 細胞の形態形成

a：Fig.4-1Bの拡大図. DAPIによって可視化した核に、疑似カラーを付けている。*OL:Oblique Line*、*CP：Chain of Pearl,EY：Eisen's Yard, E:Eisen Giant Cells*をそれぞれ示す。スケールバーは 50 μm。 b：Fig.S4-3 の一部抜粋。図中の番号はそれぞれの細胞番号(例えば E1-E7)を示す。スケールバーは 10 μm。 c:細胞移動の模式図。黄色い丸は E6 および E7 細胞を示す。前方から後方に向かって、腹側の 2 細胞が移動してくる様子が観察された。

#### 4.2.2.3. その他側方領域の細胞

*Mid-Lateral Region*

Eisen と Oblique Line に挟まれた領域。孵化後に 1-3 回の分裂が見られる。最終分裂は、前方部分は背腹方向の分裂が多いが、後方部分は前後方向の分裂が多く見られる。

*Mid-Dorsal Region*

この領域の細胞分裂は、1 hph 頃までに多くが終了している(分裂回数は、孵化後 0-1 回)。分裂終了後、それぞれの細胞の形は六角形になってゆき、微少な配置の変化も見られる。

#### 4.2.2.4 背側正中線

背側正中上の細胞は、ほとんどが前後方向に分裂する(Fig.4-5)。一部の細胞は横方向にいったん分裂するが、その細胞はのちに前後方向に並び、2 つとも正中上に戻ってくる。正中線上には、30 mpf には既に明確な 1 列の細胞を観察することができる(Fig. 4-5A)。また、少なくとも 30 mph 以降、背側正中線をまたいで分裂したり、移動したりする細胞は見られない(Fig. 4-5B)。このことは、少なくとも 30 mph には既に背側正中線が確立されている可能性が高いことを示唆している。

正中の左右両側の細胞は、それぞれ決まった方向に分裂する様子が見られる。分裂方向は左右鏡像対称であり、細胞はランダムな方向に分裂しているわけではないことがわかる(Fig.4-5B)。特に分裂方向に偏りは見られず、背腹方向に分裂するものも前後方向に分裂するものも存在する。一方、分裂タイミングについては完全には左右対称ではなく、左右どちらかが数分早く分裂する様子も観察された(data not shown)。ただし、左右どちらかがどの個体でも必ず早い、といった傾向はみられなかった。

#### 4.2.2.5. 腹側の形態形成

腹側は、背側に比べて明確なパターンが少ない(Fig.4-1A)。発生後期(3 hph 以降)に、腹側の表皮全体が大きく前方に向かって移動していくのが観察される。これは、腹側に肛門および鰓穴が開く際に起こると考えられる。

腹側の形態形成において特筆すべき細胞は、SO 付近に左右ひとつずつ存在する、幹細胞様の分裂を行う細胞である(Fig.4-5c-e)。この細胞は、分裂によって大小大きさの異なる娘細胞を生み出す。必ず腹側の細胞の方が小さく、分裂したあとの細胞は腹側正中方向に移動してゆくのが観察される。また、この細胞は、細胞周期が 15-25 分ほどで、周囲の表皮細胞よりも短くなっている。これをくり返し、少なくとも 5 個の数珠つなぎになった小さな細胞列が幹細胞分裂によって作り出される（Fig.4-5e）。これらの細胞は腹側感覚神経（SO）となる可能性が高いが、この細胞が表皮、もしくは神経のどの部分を構成するかは確定的ではない。

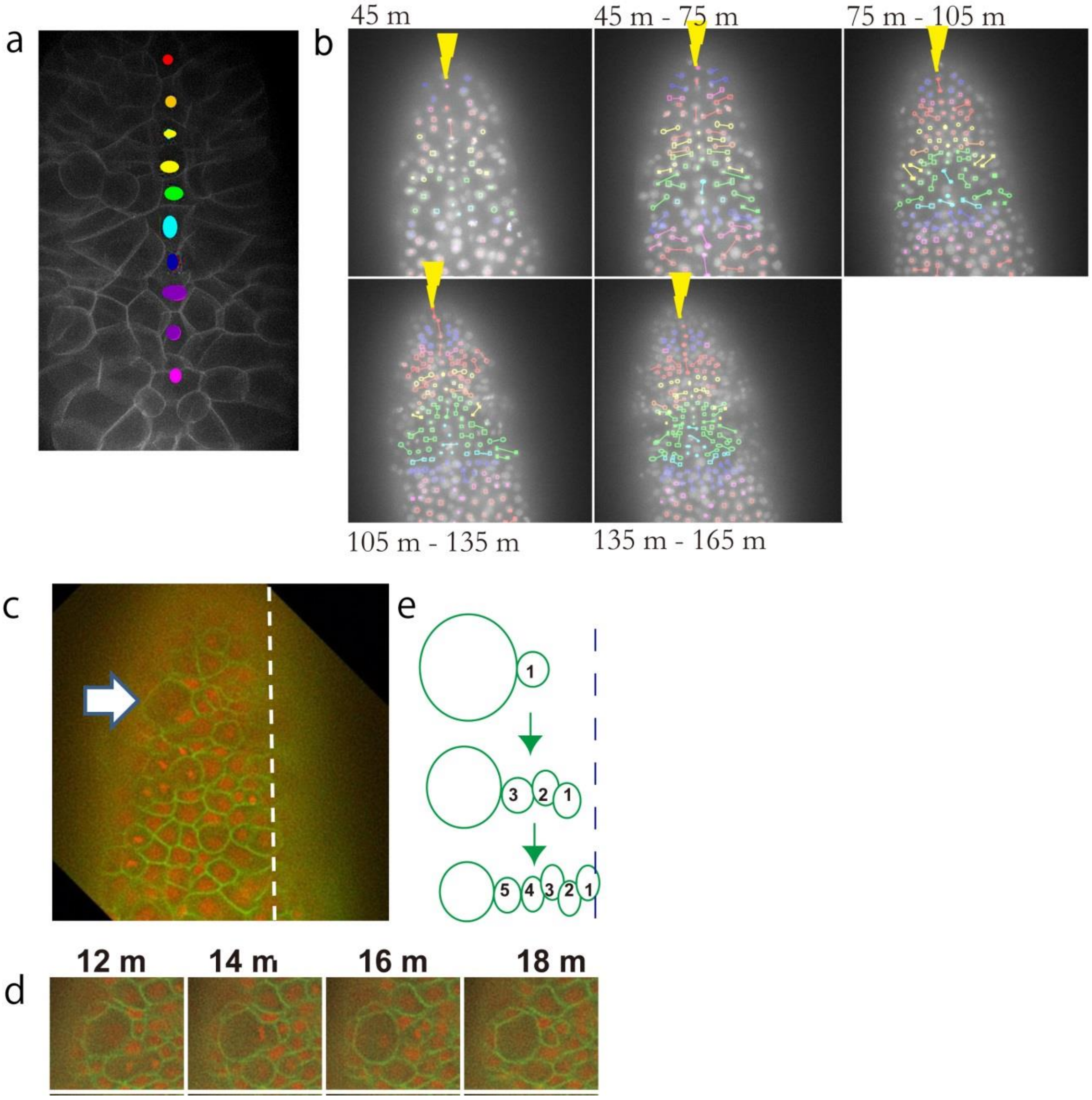



**Fig. 4-5** 背側および腹側の形態形成

a: 孵化後 30 分時点での背側正中線細胞。丸でマークした細胞は、正中線上の細胞を表す。細胞膜を FM1-43 で可視化している。この時期からすでに 1 列の正中線細胞が存在する。b: 背側正中線付近の細胞の細胞分裂の様子。それぞれの線は、図の上または下に示した時間(孵化からの時間)の間に分裂した細胞の分裂方向を示している。黄色の矢じりは正中線を示す。正中線の細胞を境に左右対称の分裂をしている様子が観察される。c: 1 hph の腹側の細胞。白い点線は腹側の正中線。緑は PH-YFP で可視化された細胞膜。赤は H2B-mCherry で可視化された核。白い矢印は、dにおいて拡大している、幹細胞様の分裂を示す細胞である。d: c の白矢印で示した細胞。時間は、c からの経過時間を示す。腹側正中方向に向かって小さな細胞が生まれている、不均等な分裂をしている様子が観察できる。E:d の不均等細胞分裂の模式図。紺の点線が腹側正中線を示す。腹側正中線方向に向かって、小さな細胞を生み出し続けている。

### 4.2.3. 各細胞の姉妹関係

表皮の主要な細胞において、細胞同士の姉妹関係を Fig.4-6 に示した。記しているのはおもに最終分裂の姉妹関係である。主に OL、MD、MA、PF の一部について記した。

表皮において､主要部分においては分裂方向や最終分裂の姉妹関係に個体差がない部分が多い。このことは､個体差のないパターンを作り上げる過程もまた大きな個体差なく行われていることを示唆する。ただし、成体でも細胞数の個体差がある Nasse や Chain of Pearl 領域などの非常に小さい細胞列でできている部分は細胞分裂回数にも個体差がある可能性が高い。Nasse における細胞の由来の個体差については、4.2.4 において詳述する。

一方、分裂のタイミングや、どの細胞が先に分裂するか、という細胞分裂順序には、個体によって少し差が見られる。分裂方向自体は正中線をはさんで左右対称だが、分裂タイミングは右と左で 1 から 5 分程度の差が見られることが多い。左右のどちらかが早いなどの法則性は特に見られない。これらのことから、分裂のタイミングに関しては分裂方向ほどの厳密な制御がなされていない可能性が示唆される。　元々、領域の設定に形態的特徴と遺伝子発現情報に加え、最終細胞分裂の情報を取り入れたということもあるが､最終分裂でできる姉妹細胞が二つの領域にまたがって存在するという例は、基本的に存在しなかった。例外は、 Oikosin の発現境界をもとに領域境界を決めている、OL および MD 前端の境界部分である。例えば、AR17 と MD1 列にまたがる細胞分裂(前後方向の分裂)や、OL2 列と ML 背側端にまたがる分裂 (背腹方向の分裂)が見られている。

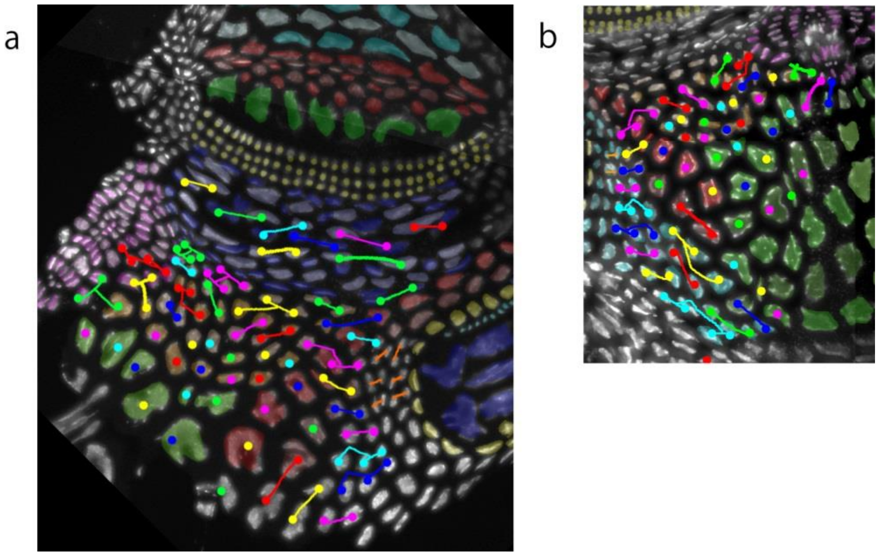



**Fig.4-6 各細胞の姉妹関係**

A: 体幹部側方の細胞同士の姉妹関係を示した。 B: 体幹部背側の細胞の姉妹関係を示した。細胞の色は Fig.4-1a と b に同じ。

### 4.2.4. 左右境界と領域境界について

背側の正中線上には、少なくとも孵化後 30 分から成体に至るまで、1 列の細胞列が存在している(Fig.4-5A)。4.2.2.3 および 4.2.3 において前述のとおり、この 1 列を境に、細胞の並び、細胞の形、細胞分裂方向、分裂タイミングはいずれもほぼ左右鏡像対称になっている。また、少なくとも孵化後の背側において、正中線を超えた細胞分裂や移動、配置換えはみられなかった。このため、孵化後かなり早いタイミング、もしくは孵化前より、背側正中線の 1 列の細胞は確立されていると考えられる。一方、腹側では、正中線上をまたいで二つの細胞が存在する部分（CO.SO,AV,PV）と、正中線上に一つ細胞がある部分（MZ、AV と PV の一部）が混在している。

一方、オタマボヤ綱と姉妹群をなすホヤ綱に属する、マボヤおよびカタユウレイボヤの細胞系譜解析に関する先行研究では、二細胞期の片側の割球に細胞標識を顕微注入する実験によって、二細胞期の一割球はおおむね幼生の体の右または左を作ることがわかっている。特に表皮においては、幼生の正中線と二細胞期の左右の割球の子孫境界が正確に一致する(Nishida and Satoh 1983)。ワカレオタマボヤにおいても、2 細胞期の 1 割球は、おおむね体の左または右を形成すると考えられている(Stach et al., 2008)。体幹部表皮においても、ホヤと同様になっているのだろうか。そうすると、オタマボヤの正中線上の一列の正中細胞は、左右どちらの割球に由来するのだろうかという疑問が湧いた。

そこで、UV の照射によって蛍光色が緑から赤に変化する可変色蛍光タンパク質 Kaede に核局在シグナルを付けたものである nls-Kaede を用い、二細胞期の右の AB 割球および左の AB 割球の子孫が表皮のどの部分を構成するかを調べる clonal organization analysis を行った。nls-Kaede を発現した胚の、二細胞期の片側の割球(AB(左割球)または AB(右割球))のみに UV を照射し、割球をラベルした(Fig.4-7a)。当研究室における先行研究（林 修士論文 2015）により、色を変えた赤い蛍光は隣の割球に移ることなく子孫割球に受け継がれ、形態形成完了（10 hpf）まで維持されることが分かっている。2 細胞胚を形態形成が完了するまで育て、表皮のどの部分が赤い蛍光を持っているかを調べた(Fig.4-7b)。

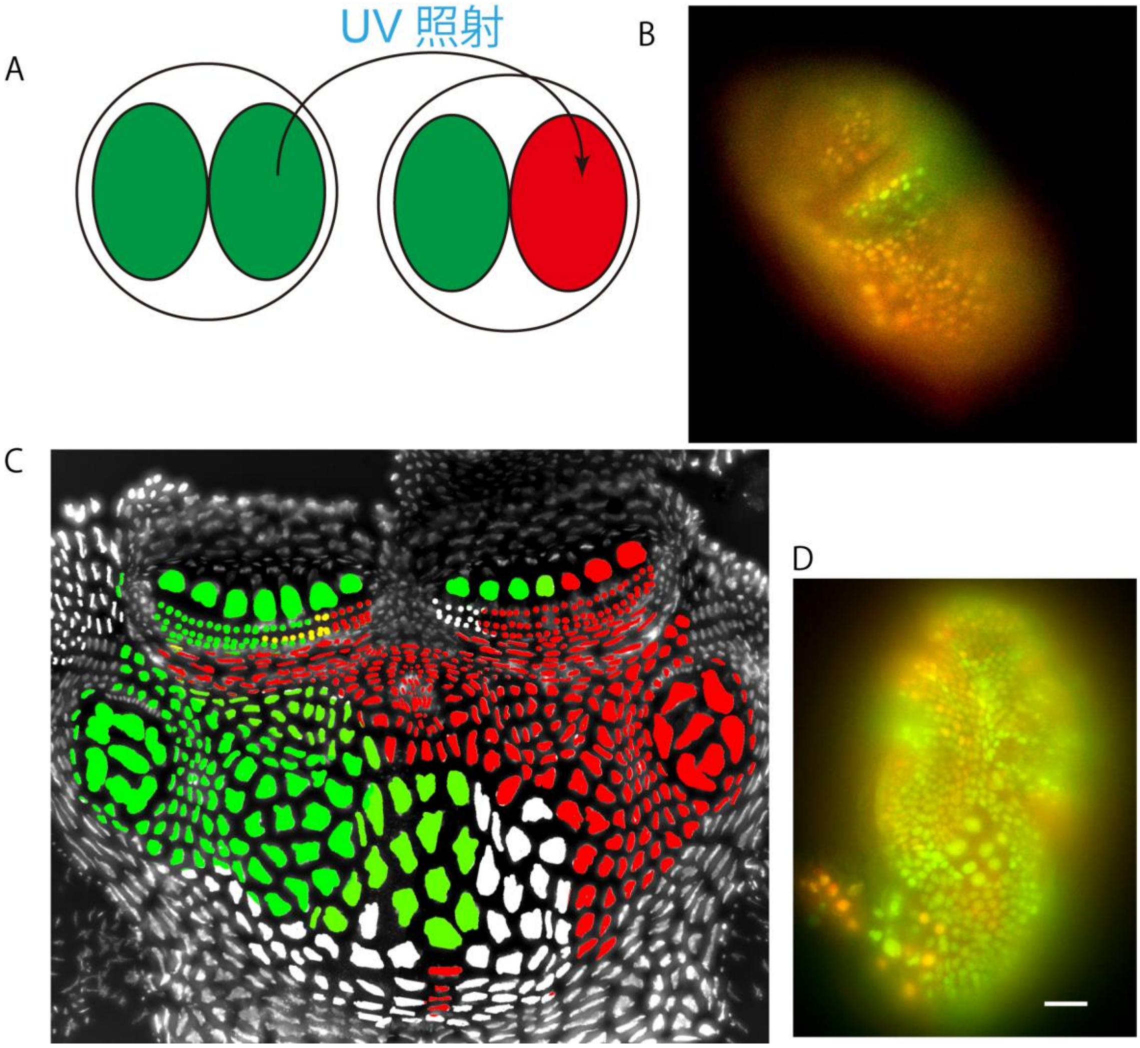



**Fig.4-7　2 細胞期に片側細胞をラベルして行った表皮の Clonal Organization 解析**

A: 2 細胞期の片側の割球に UV を当て、Kaede の蛍光を緑から赤に変えた。B: 実際の画像データ。7-10 hpf の個体の上から下までを z-stack を撮影して観察し、どの細胞が赤くなっているかを調べた。C: 結果。背側見た図。Fig.4-1b の図に疑似カラーを付けている。赤で塗った細胞は右 AB 割球由来、緑は左 AB 割球由来、黄色は個体差のあった細胞を示している。白い細胞は現状で由来がまだ不明。D：B とは別の個体を、左から観察した図。緑が左由来、赤が右由来。スケールバー：10 μm。

Fig.4-7c に、解析の結果を示す。右割球（AB 割球）由来の細胞を赤、左割球（AB 割球）由来の細胞を緑で塗り分けている。色が塗ってある領域は、3 例以上の個体で同じ由来を持っていることが確認された領域である。例数が少ない部分は色を塗っておらず、また、個体差の見られた領域は黄色で塗っている。驚いたことに、ホヤ類とは違い、2 細胞期の子孫の境界は表皮の正中線とは一致しないことがわかった。背側においては、Posterior Fol、Mid-Dorsal Field、Nasse 等の領域で、正中線の左側にありながら右割球由来の細胞が見られ、逆に、Giant Fol、Mid-Dorsal Field 等の領域では、体の右側にありながら左割球由来の細胞が見られた。背側の正中線の一列の細胞は、AB/AB 割球の子孫割球の両方を含んでいた。AR、PR 付近は AB(右)由来だが、間の MD、Anterior Mosaic（Fol 領域付近に相当する）領域は AB(左)由来だった。Eisen 等、体の側方にある細胞は、右側のものは右 AB 割球由来、左側のものは左 AB 割球由来を示す領域が多い。腹側においては、背側よりも大きく左右割球がまじりあっているのが観察された(Fig.4-7D)。Nasse を除いて、黄色で塗られている細胞はほとんどなく、細胞分裂パターンと同様、由来をマッピングした Clonal Organization にも個体差はほとんど見られなかった。

このように、ワカレオタマボヤの体幹部表皮においては体の正中線と、左右割球の子孫細胞の境界は一致しなかった。オタマボヤの初期卵割は、完全ではないが左右鏡像対称になっており、割球の名前も左右対称に命名されている。ところが、「左右逆側の割球に由来を持つ表皮領域」が散見されるということは、つまり、ワカレオタマボヤの完成された表皮は 1 細胞レベルで完全な左右対称の構造を持っていながら､左右の同じ領域が初期胚からの左右対称な細胞系譜に従って鏡像対称にできるという､単純な図式になっているわけではないことを示している｡例えば、右の Posterior Fol と左の Posterior Fol は、いずれも右の AB 割球由来であることから、オタマボヤの成体完成までの細胞系譜には､どこかに左右非対称な部分が存在するはずである｡つまり、ワカレオタマボヤの体幹部表皮は、「完成形態の左右対称性」を示しながら、「由来の左右非対称性」を持っていることが示された。

この由来の非対称性は、いつから観察されるのだろうか。先述のとおり、すくなくとも背側においては、孵化前または孵化後 30 分までに 1 列の正中線が定義され、その線を超える細胞分裂及び細胞移動は行われない(Fig.4-6)。さらに孵化後 1 時間以内の幼生においてすでに、赤と緑蛍光の細胞が正中線からはみ出している様子が観察された。以上のことからこの左右非対称性は、孵化以前に形成されている可能性が高いことが予想された。

孵化前の細胞系譜および核の動きのトレースは、すでに先行研究で行われている(Stach et al., 2008)。このデータを用い、左右割球(AB 由来割球および AB 由来割球)がいつから正中線を越えているのかを調べた(Fig.4-8)。結果、凡そ 100 細胞期(7 回目の分裂)までは、左右割球の子孫の境界面ははっきりしているが、次の分裂時(8 回目の分裂時)に、左右の割球が正中線上で混じり合うのが観察された(Fig.4-8 120 mpf と 145mpf)。その後、さらに左右境界に直交する向きに分裂を行うことによって、左右割球の境界はより複雑なものとなる。さらに、神経胚・尾芽胚頃までに、左右割球の境界面(胚軸の正中線)と、実際の体の正中線の間にずれが見られた。

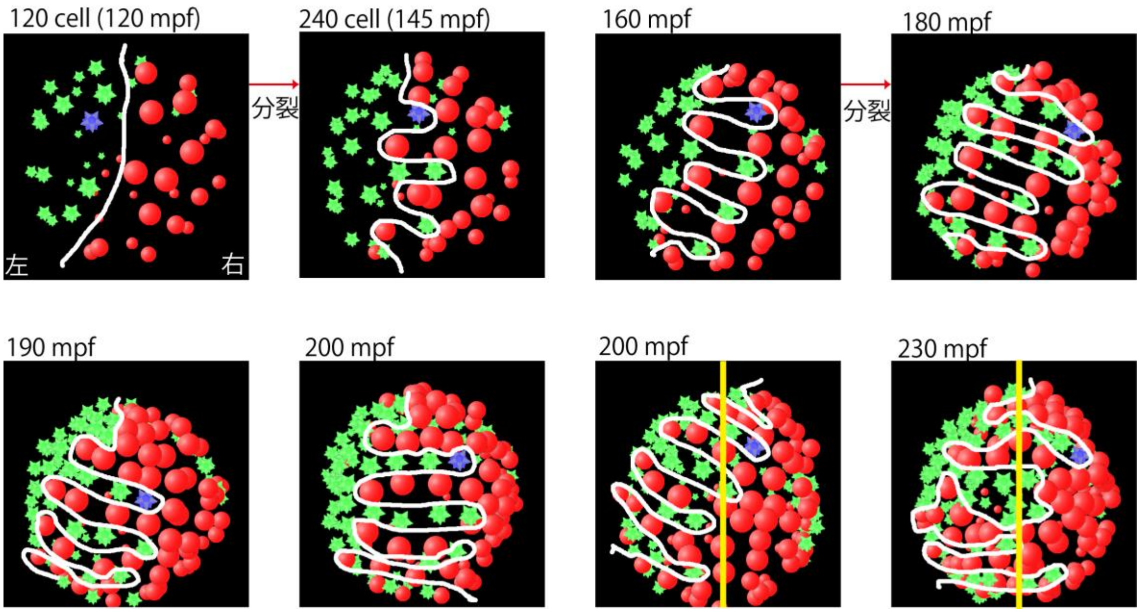



**Fig.4-8 孵化前の左右割球の子孫細胞**

SIMI BioCell を用いて、孵化前の左右割球の子孫細胞がどのような挙動を示すかを調べた。尾部を含めた表皮細胞の核のみを示す。手前の核ほど大きく表示されている。白い線は左右割球の子孫の背側半分の境界線を、黄色い線は実際の体の正中線を示す。また、いずれの図も上が前方になるような面から表示し、200 mpf の 1 枚目までは左右境界が手前に、200 mpf の二枚目からは体の背側が手前になる向きで表示した。赤・球は右割球(AB)、緑・星形は左割球(AB)の子孫割球の核の位置を示す。目印のため 120cell でマークした青い割球の子孫の片方を 230 mpf まで青く示している。データは Stach et al. 2008 のものを用いた。このデータは 15℃で飼育時にとられたもの(孵化まで 4 時間半)であり、20℃で飼育している本研究とは時間が異なっている。

## 4.3. 考察

### 4.3.1　表皮細胞のアトラスとパターン形成過程

個体差のない複雑なパターンができてくるしくみについて理解することは、発生学における重要な疑問の一つである。そのために本研究においては、細胞レベルで個体差のないワカレオタマボヤの体幹部表皮の形態形成過程を観察・解析した。まず、ワカレオタマボヤの表皮細胞について、過去の形態学的知見、遺伝子発現解析、そして形態形成過程の観察結果を組み合わせ、1 細胞レベルでの領域の再定義と、個々の細胞に対する命名を行った(Fig.4-1a)。これまでのワカレオタマボヤ体幹部表皮の研究においては、特に Fol 領域や Marini 領域、Anterior Rossete 領域などにおいて細かい領域境界が細胞レベルでみるとあいまいな部分も多くみられていた。また、個々の細胞に名前が付けられていたのは Eisen 領域と Fol 領域の Giant Cell のみであり、それ以外の細胞に個別の名前を定義したのは本研究が初めてである。ワカレオタマボヤの表皮の最大の特徴の一つが、細胞の配置、形態や数に個体差がないことが挙げられる。個体差のない細胞一つ一つに名前を付けた今回の研究は、今後のワカレオタマボヤの体幹部表皮の機能や発生、遺伝子発現の研究において基盤となり、研究室を超えた議論をするために大いに役に立つ枠組みを与えるものとなることが期待される。

また同様に、そのような複雑な表皮パターンが作り上げられる過程の記載を行った研究も、本研究がはじめてである。ワカレオタマボヤの表皮に関しては、それがハウス分泌細胞、つまりセルロースの分泌細胞であること(Sagane et al., 2011)、個々の領域特異的に発現する遺伝子(Oikosin 遺伝子群)に関する研究(Thompson et al., 2001, Hosp et al., 2012 等)、分裂を伴わない DNA 複製/増幅の研究など、形態形成以外にも様々な研究がおこなわれている。また、今後このパターンの形成メカニズムについても研究が進んでいくことになると考えられる。本研究で調べられた個々の細胞の姉妹関係や、特徴的な分裂方向・細胞移動の記載は、これらの幼生・成体を含めた表皮の研究においての基盤情報として役立つことが期待される。

### 4.3.2 分裂回数と細胞の大きさ、細胞の分裂方向

表皮細胞の孵化後の分裂回数は、領域 (細胞)によって異なっていた。たとえば、Mid-Dorsal 領域、Giant Fol、Eisen Giant Cell などの細胞は、孵化後 30 分以降は 1 回の分裂かもしくは 1 度も分裂しない。一方で Nasse や Mid-Lateral、Anterior　Rossete 領域の細胞は、細胞によっては 3 回以上の分裂を行うものもいる(Fig. 4-2,4-4,4-5)。この分裂回数と細胞の大きさは、多くの場合反比例している。つまり分裂回数が少ない細胞ほど、成体において細胞が大きくなっている。これは、単純に分裂回数が少ない分、細胞が小さくならなかった、ということのほか、分裂を早く終了する細胞においては、他の細胞がまだ分裂している段階から、細胞分裂を伴わない DNA の複製(エンドサイクリング)が起こっている(Ganot and Thompson, 2002)ことも、細胞

の大きさに差を生み、それによって複雑なパターンを生み出す要因であると考えられる。

さらに、細胞の大きさの差は必ずしも分裂回数だけで決まるものではないと考えられる。例えば MD2-3 は両隣の細胞に比べ最終形が細長く、細胞の表面積は小さくなっている。しかし、分裂回数や分裂終了タイミングは周囲の細胞と変わらない。何らかの機械的な力や分子的なシグナルが働くことで細胞の大きさや形が決まっている領域も存在することが示唆される。

一部の細胞（Eisen Giant Cells）を除き、表皮のパターン形成中には細胞の移動や大きな配置換えはほとんど起こっていない（隣接する細胞が変わることはあるが、分裂を伴わない数細胞以上の移動は、Eisen 以外では観察されていない）。一方、表皮のパターン形成においては、Fol 領域に代表されるように細胞分裂方向の制御が非常に重要な役割を果たしていることがわかった。細胞の分裂方向は、個体差なく正確に決まっているようであるが、それがどのようなしくみで行われているのかは、現状ではわからない。単に背腹方向に分裂するというようなものだけでなく、微妙な角度の違いを持って正確に個々の隣接細胞の分裂方向に違いをもたらすしくみは、現状では想像することができない。微小管のライブイメージング等を用いて観察すると、これに関して何か示唆が得られるかもしれない。

### 4.3.3 幹細胞様の分裂

腹側において、娘細胞同士の大きさが極端に異なり、小さな細胞を繰り返し数珠つなぎに生成していく細胞が観察された。そのような細胞分裂は「幹細胞様の分裂」と呼ばれる。また、今回発見された細胞と似たような、小さな娘細胞を次々に生み出すような分裂は、ハエの neuroblast (Hormem and Knoblich, 2012)や、環形動物の teloblast(Goto 1999)など、前口動物では報告がある。しかし、脊索動物においてはおそらく初めての報告であり、前口動物だけではなく後口動物においても、このような分裂を行う細胞が存在することが示された。

### 4.3.4 由来の左右非対称性

本研究では、成体でのパターンは完全に左右鏡像対称な組織であるワカレオタマボヤの体幹部の表皮が、その少なくとも一部の領域において、細胞系譜上の由来に関して左右非対称性を持っていることが示された(Fig.4-6)。この左右非対称性は、孵化前の胚発生期から既に生じている。少なくとも孵化後 30 分以降は、背側の正中線を超えるような細胞の移動や分裂は起こらないことから、成体において見られる左右への「浸食」は、胚発生期にすでに存在する非対称性を引きずったものであることが示唆される。ワカレオタマボヤにおいては、初期卵割時(2→4 細胞期)において、左右の割球の間で分裂方向に僅かなずれがあることが観察されており(Delsman, 1910; Nishida, 2008)、このずれを引きずって、子孫細胞の位置がずれ、その後の発生（細胞系譜）が非対称になっていく可能性がある。。

また、表皮だけではなく、ワカレオタマボヤの他の組織においても同様に、最終形態が左右対

称であるにもかかわらず、「由来の左右非対称性」の存在が観察されている(Stach et al., 2008, 林 修士論文 2015)。脊索・筋肉、といった尾部に左右対称に存在する組織においても、左割球由来の細胞と右割球由来の細胞がまじりあっており、その並びには個体差がない。さらに、体幹部の内柱の large glandular cells (GLC)と呼ばれる細胞は左右対称に存在するが、すべての細胞が左割球に由来する。このように、ワカレオタマボヤにおいては、多くの器官において、左右割球の子孫境界と、実際の正中線は一致しない。これは、ホヤ綱の幼生の発生様式とは大きく異なっている。

一方、オタマボヤのように左右割球の子孫境界と将来の正中線が完全には一致しない動物の例は散見される。例えば、細胞系譜が完全に記載されている線虫の表皮においても、ABpl と ABpr の子孫割球が作る細胞が異なるなど、細胞系譜に左右非対称性が見られる(Chisholm and Hsiao, 2012)。線虫の体の左右対称な構造も、左右対称でない複雑な細胞系譜によって作り出されることが知られている。両生類のアフリカツメガエルにおいては、左右割球の子孫細胞はおおむね体の左または右を形成するが、その境界は正中とは一致せず、個体により差があることが報告されている(Koga et al., 2012)。ただし、ワカレオタマボヤほど厳密な「個体差のない」「由来の左右非対称性」の報告は、脊索動物においてはおそらくはじめてのことであり、今後より詳細な研究がおこなわれることが期待される。

### 4.3.5 位置情報とパターニング

パターンを作る際、どのような情報を元にパターンを作り上げるか、ということについて、考えられることは二つある。一つは、個々の細胞が固有の性質を受け継いでおり、その情報をもとにパターンを作る、というもの（系譜・由来によってパターンを作っていく）。もう一つは、周囲の情報を感知し自らの位置を知り、位置情報を元にパターンを作っていくというものである。

私は、ワカレオタマボヤの表皮においては、後者の可能性が高いと考える。Posterior Fol は左右どちらも右割球の由来であるし、同じ細胞が並んでいるように見える Nasse や Giant Fol においても、左右の境界は領域の中で左や右にずれている。由来が異なっている左右の領域が、左右完全に対称な形態・細胞分裂を行うことを、その由来のみによって説明することは難しく、現実的ではない。おそらくある時期の表皮フィールド内の位置情報に従い、あれほど正確な左右対称なパターンを作ることが可能なのだと考えられる。

位置情報を作り、知る方法としては、正中線等の特定の細胞、ECM、内部にある細胞(神経系、内胚葉系等)といった周囲から何らかの接触性または分泌性のシグナルが出ている可能性、隣接する細胞同士で相互作用している可能性、その両方の組み合わせの可能性等が考えられる。正中線を中心として位置情報をもたらす何かの物質の勾配が存在するかもしれない。

今後、このパターン形成を司るものがなんであるかを調べるため、レーザーによる細胞除去実験を検討している。例えば、孵化前の胚において特定の表皮細胞を潰しても、表皮形成がうまくいく場合には、「由来ではなく、位置によって領域が決まっている」という説を補強することになる。また、どこかからシグナルが分泌されていた場合、その細胞を殺すことによってパターン

に影響が出ると考えられる。おそらく、複雑で個体差のないパターンの制御メカニズムは複雑であり、単純な実験によってどれほど細かいメカニズムに迫れるかは不明であるが、除去実験によって何らかの新たな知見は得られることが期待される。

本研究では、複雑であり単純な規則性がなく、しかも個体差のないパターン形成のメカニズムの解明に取り組んだ。本研究は記載的な研究ではあるが、細胞分裂の方向と回数の制御がオタマボヤ表皮のパターニング過程で重要であることが示唆されている。このことがメカニズムに関する重要な示唆であることは間違いなく、表皮形態形成の研究に対し大きな指針を提供できたと考えられる。この研究は、ワカレオタマボヤの表皮形成過程に関する基盤的な情報を一通り提供するものである。さらに、一部の表皮領域では、細胞移動や幹細胞様分裂が関与しており、このような現象もさらなる解析に値する。今後、本研究で得られた基本的な情報を元にして、複雑ではあるが単純な規則性がなく、しかも個体差のないパターン形成のメカニズムの解明が発展していくことを期待している。

# 第５章　総括と今後の展望

本論文では、「様々な細胞レベルの現象がどのように組み合わさって、体が形成されるのか」を、単純な脊索動物であるワカレオタマボヤで研究した。①ライブイメージング法の確立　②3種の移動細胞の発見　③表皮の形態形成過程の解析　という３つの研究を行った。

①　ワカレオタマボヤでライブイメージングをできるようにした。

1細胞レベルで形態形成の観察を行うことは、発生現象の理解にとって重要である。卵巣顕微注入法を応用し、蛍光融合タンパク質のmRNAを発現させることによって、ワカレオタマボヤの胚および幼生において蛍光ライブイメージングができるようになった。また、動き回る幼生を静止状態にして継時観察する方法も確立した。ワカレオタマボヤは、脊索動物でありながら、早い発生スピード、小さく単純で、かつ透明な体、というイメージングに適した特徴を持っているため、多くの生物に比べて、1細胞から成体まで、発生全体の観察が容易である。本研究で検討・最適化を行ったライブイメージングの方法は、今後この動物を研究していく上で、様々な形で役に立っていくことと考えられる。今後もこの手法を利用・応用することによって、様々な発生段階・組織の観察を行うことで、ワカレオタマボヤの、ひいては脊索動物の発生に関する理解が深まることが予想される。

②3種の移動細胞を発見した。

ワカレオタマボヤの幼生において、3種の移動細胞を発見した。この3種の細胞は、「4核を持つ1細胞が、2つに分かれる」「同じ道を逆方向に移動する」「2細胞が間をあけて移動し、間をあけたまま止まる」という、それぞれ、他の生物では見られないおもしろい特徴を備えた細胞移動である。これらの細胞移動は、ライブイメージング法の導入によって発見された知見でもあり、ワカレオタマボヤにおけるこの手法の有用性を証明した。Oral Gland前駆細胞は、合胞体の細胞移動としてだけではなく、核分配や特殊な細胞質分裂のモデルにもなりうる。

尾部の切断実験により、移動のメカニズムについていくつかの洞察が得られた。特に、Subchordal Cell前駆細胞は、移動時に尾部の先端部を必要とすること、そして、内胚葉索は移動時に体幹部や自身の先端の細胞を必要としないこと、の2点は興味深い。しかし、Oral Gland前駆細胞の移動に関しては実験を行っておらず、また、なぜ内胚葉索が移動できるのか、Subchordal Cellが間をあけて移動し、そのまま停止することができるのか、等、いずれも非常に興味深いが、依然として、移動メカニズムに関して多くの部分が不明のまま残っている。

③表皮の形態形成過程を解析し、基礎的な情報を記述した。

ワカレオタマボヤの表皮は、個体差のない複雑なパターンを持っている。この形態形成過程を生きたまま観察することによって、領域ごとに様々な形態形成を行う様子を観察できた。パターン形成には基本的に、細胞移動や細胞死ではなく、細胞分裂の方向と回数の制御が重要であるこ

とがわかった。ある部分では幹細胞様の細胞分裂が起こっていることもわかった。

また、2 細胞期の片側の割球を標識することによって、左右対称な組織における由来の左右非対称性について明らかにした。特に、個体差のない由来の左右非対称性に関する知見は、他の脊索動物では見られないユニークなものである。また、複雑なパターンを作るのに重要なものはその系譜上の由来よりも位置情報である可能性が高い、という示唆も行った。一方で、ではなにが位置情報を決めているのか、何がパターニングにとって重要なのか、という部分は不明点が多い。阻害剤による特定シグナルの阻害実験や、レーザーによる細胞除去実験法の確立によって、さらなる知見が得られることが期待される。

これらの結果は、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の重要な基盤となることが期待される。

# 6.材料と方法

## 6.1 ワカレオタマボヤの飼育

実験材料となるワカレオタマボヤ（*Oikopleura dioica*）は、兵庫県赤穂市坂越港、兵庫県相生市突崎湾において採取を行った。ひも付きバケツを用いて海水を採取し研究室に持ち帰った後、研究室において顕微鏡下でワカレオタマボヤの特徴（雌雄異体なので卵巣または精巣のどちらかのみをもつ、subchordal cell を 2 つ持つ等）をもとに選別した。その後、新たな採集は行わず、2016 年現在では研究室内で 4 年半ほど飼育を続けたものを使用している。

ワカレオタマボヤは Nishida(2008)、 Spada et al.(2001）、Omotezako et al. (2013)をもとに、一部に変更を加えて飼育した。飼育には、レイシーマリン(REI-SEA 社)および MARINE ART BR(富田製薬)の 2 種類の人工海水を組み合わせて使用した。効率的に次世代の個体を得る為に、受精後 5 日目の性成熟した個体をオスメス合わせて 60 匹以上、朝夕 2 回、5 L の人工海水の入ったボトルに集め、そのなかで自然交配によって受精させた。翌日、幼生が正常に成長している(ハウスを形成し遊泳している）ことを確認した後、ボトルから 5 mL 海水を採取し、その中に何匹が遊泳しているかを数え、その数に応じて、10 L のボトルに人工海水で 2 - 5 倍に希釈した。その後は 10 L バケツ内の個体密度に応じて人工海水で適宜 2 倍または 3 倍に希釈して適切な密度を維持し(10 L 中に受精後 3 日目の個体 200 - 250 匹)、受精後 4 日経って体が大きくなったところで、10L のボトルに 120 匹程度ワカレオタマボヤをピックアップし、成熟個体まで成長させた。この方法により海で採集した個体群を 4 年半以上安定的に飼育できている。

## 6.2 mRNA 合成用プラスミド

卵巣に顕微注入するため、蛍光融合タンパク質の mRNA を *in vitro* で合成した。

核の可視化には、当研究室で使用されてきた pSD-H2B-EGFP および pSD-H2B-mCherry を用いた(Omotezako et al., 2013)。このプラスミドは、ワカレオタマボヤ由来の Histone 2B と蛍光タンパク質 EGFP (緑)または mCherry (赤)を in frame でつなげたインサートを、マルチクローニングサイトの両端に *Xenopus laevis* の β グロビンの UTR 配列を持つ RNA 合成用ベクター pSD64TF ベクター(from Dr.T. Snutch, University of British Columbia, Canada)に組み込んだものである。

同様に核のマーカーとして、HTB(N)-IBB-mCherry も用いた。このプラスミドは、マボヤの Importin α の、Importin β 結合ドメイン(Importin Beta Binding domain :IBB)に、E3 リンカー(EAAAR という配列を三回繰り返したもの)をはさみ、赤色蛍光タンパク質 mCherry を繋げたインサートを、pBluescript のマルチクローニングサイトの両端にマボヤチューブリン β の UTR を組み込んだ RNA 合成用ベクターpHTB(N)に組み込んだものであり、当研究室に所属していた髙鳥直士博士(現首都大学東京)から譲り受けて使用した。

細胞膜の可視化には、pHTB(N)-PH-YFP を使用した。これは、ヒトの PH ドメインに YFP をつなげたものを、pHTB(N)ベクターに組み込んだものであり、Weil Medical College of Cornell University の Di Gregorio A.博士から譲り受けて使用した。

アクチン線維の可視化には、pSD-Lifeact-EGFP を作製して使用した。これを作製するために、$p^{CMV}$ Lifeact-TagRFP (Idibi)から、

Lifeact-XhoI　5'AAATTCTCGAGTCCACCATGGGTGTCGCAGATTTGAT3'

Lifeact-R　5'ACGTAGGGCCCTGGCGACCGGTGGATCC3'

の 2 つのプライマーを用いて Lifeact 部分のみ増幅した PCR 断片を、制限酵素 *Xho* I および *Apa* I で処理した。処理した断片と、同じ酵素で処理した pSD-H2B-EGFP ベクターを電気泳動し、Lifeact を含むバンドと、H2B を除いたプラスミドのバンドを切り出して、Gel Extraction kit (QIAGEN) を用いて精製し、それらを TaKaRa のライゲーションキットを用いて 16℃ overnight でライゲーションして作成した。

また、細胞の標識と追跡のために、pSD-nls-Kaede を用いた。これは、Utah University の Kristen K 博士から譲り受けた pCS2-nls-Kaede から nls-Kaede 部分を制限酵素 *Hind* III と *Not* I で切り出し、その断片と、同じ制限酵素で切断した pSD64TF ベクターを電気泳動し、lifeact-EGFP と同様の方法で、切り出し、精製し、ライゲーションすることで作成した。

微小管の可視化には、RN3-MAP7-GFP および HTB(N)-MAP7-mCherry を用いた。
RN3-MAP7-GFP は、Alex McDogall 博士から譲り受けたものをそのまま用いた。
HTB(N)-MAP7-mCherry は、RN3-MAP7-GFP から、

MAP7-FW AATATCACCGGATCCATGACGCACAGCGACCCA

MAP7-RV CAGAAGTTTTCTTGCTGCAGAGCCCTCAGGCGG

の 2 つのプライマーを用いて、MAP7 領域のみ増幅したものと、HTB(N)-IBB-mCherry から、

HTBVec-FW GCAAGAAAACTTCTGCCCGGGCT

HTBVec-RV GGATCCGGTGATATTTAGTGATTTGGCT

の 2 つのプライマーを用いて IBB ドメイン以外の領域を増幅したものを用意し、In Fusion HD Cloning kit(TaKaRa)を用いて In-Fusion 反応を起こし、もともと IBB の入っていた部分に MAP7 を組み込むことによって作成した。

## 6.3 mRNA 合成

pSD-H2B-EGFP、pSD-H2B-mCherry、pSD-Lifeact-EGFP は制限酵素 *Xba* I で、pSD-nls-Kaede は *Pst* I または *Sal* I で、HTB(N)-PH-YFP、HTB(N)-IBB-mCherry、HTB(N)-MAP7-mCherry は *Not* I で、それぞれ 37℃ overnight 処理、また、RN3-MAP7-GFP は *Sfi* I で 50℃ overnight で処理することにより、それぞれ直鎖化した。これをフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿によって精製した後、1 μg 以上の直鎖 DNA をテンプレートにして、pSD64TF ベクターのものは mMESSAGE mMACHINE SP6 kit (Amibion)、 HTB(N)ベクターおよび RN3 ベクターのものは mMESSAGE mMACHINE T3 kit (Amibion)で RNA 合

成を行った。その後、poly-A Tailing kit(Ambion) を用いて Poly-A シグナルの付加を行った。合成した mRNA は、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿を行った後、純水に溶かし、1μL ずつ分注し、-80℃で保管した。

## 6.4 卵巣への mRNA インジェクション

胚や幼生のライブイメージングを行うため、合成した mRNA を産卵前のメスの卵巣に顕微注入した。方法は(Omotezako et al., 2013)および表迫の修士論文に従って行った。注入用の針はガラス管(GDC-1、Narishige)をマイクロピペットプラー(P-97, SUTTER)で引いて作成した。ガラス針中に mRNA 液(目的の mRNA 終濃度 1-4 μg/μL と、色素として終濃度 1 mg/mL フェノールレッドを含む)を、マイクロピペットを用いて針の後端に入れ、針の中に液をつたわせることで針の先端に充てんした。さらにその後ろからシリコンオイルまたはミネラルオイルを充てんすることによって顕微注入用の針を作製した。

産卵前(およそ産卵 8-12 時間前)のメスのワカレオタマボヤを、卵巣の構造(精巣に比べて荒い構造が見られること、輸精管がないこと等)を元に選別し、6 穴プレート中に 1 匹ずつ入れた。次に、0.9% 寒天シャーレの上にワカレオタマボヤを 1 滴の海水とともにマウントした。その際、ワカレオタマボヤの動きを止め、顕微注入しやすくするため、海水はできる限り除いた。顕微注入は、実体顕微鏡(Olympus、SZX-16)下で、マイクロマニピュレーターを用いて行った。 mRNA を受け継ぐ卵の数を増やすため、1 匹につき 2 か所程度顕微注入した。注入後は、再び 6 穴プレート内に 1 匹ずつ戻してその中で飼育した。飼育時には、mRNA を注入したオタマボヤが水面にトラップされて死ぬのを防ぐため、1 つの穴に 1 つずつ、ヘキサデカノール(Sigma)の粒を浮かべた。約 8 時間後にオタマボヤは放卵するので、翌朝放卵された卵を、野生型の精子を用いて受精させ、その後の観察を行った。

ワカレオタマボヤの卵巣は多核体となっているため(Ganot et al., 2007)、卵巣に顕微注入された mRNA は卵巣内の一部に濃度勾配を持って拡散し、顕微注入を行った位置からの距離に依存した濃度の mRNA が個々の卵母細胞内に取り込まれ、取り込まれた mRNA の濃度に従った蛍光強度が観察される(Omotezako et al, 2013, 大内 修士論文 2010)。mRNA は一部の卵母細胞(多くても全体の 20%程度)にしか取り込まれない為、蛍光ライブイメージングを行う際には、未受精卵から 1 細胞期の時に、蛍光実体顕微鏡下で強く蛍光を発する胚を選別し、イメージングに用いた。

## 6.5 FM dye による細胞膜の可視化

細胞膜の可視化のために、FM 1-43 FX(緑蛍光)または FM4-64 FX(赤蛍光)(Invitrogen)を用いた。ストックは濃度が 1 μg/μL になるように水に溶かし、-20℃に保管した。使用時にはこのストック溶液を 10 ng/μL になるよう海水で 100 倍希釈した液 100 μL と、ワカレオタマボヤ入り海水 100 μL を混合することで、終濃度 5 ng/μL にし、その液につけたままマウントし、

DeltaVision 搭載顕微鏡で観察した。

### 6.6 Kaede による細胞標識

Kaede は、UV を当てると、蛍光の色が緑から赤に変化する蛍光タンパク質である(Ando et al., 2002)。この Kaede に核移行シグナル(Nuclear Localization Signal : nls)を付加した配列の mRNA を卵巣にインジェクションし、生まれた胚で発現させることで、細胞の標識に用いた。

BX-61 蛍光顕微鏡の視野絞りをしぼることで励起光のあたる範囲を調整し、3 章では孵化直後(0 hour post hatching; 0 hph)の幼生の尾部または体幹部のみに、4 章では 2 細胞期の片側の割球のみに 1 秒間 UV 光を照射し、Kaede の色を変化させた。この際、幼生はガラスボトムシャーレ中に入れ、対物レンズはノンカバー水浸レンズ(LUMPlanApo 40x/0.80 Water;OLYMPUS)を用いた。胚は動かず、また、幼生も孵化直後であればほとんど動かないので、麻酔をしたり寒天の中に埋め込んだりする必要はない。色を変化させた胚または幼生を別のシャーレに移して 20℃で発生させ、数時間後に観察し、ラベルした細胞（または、その子孫細胞）が、形態形成運動後にどこにあるかを追跡した。

### 6.7 顕微鏡観察

ノマルスキー微分干渉光学系を用いた観察には、BX61 顕微鏡(OLYMPUS)と、それに付属している UPlanSApo 40x/0.90、LUMPlanApo 40x/0.80 Water、UPlanApo 100x/1.35 Oil Iris (いずれも OLYMPUS)の 3 種類のレンズを用いた。顕微鏡の制御は、Lumina Vision (三谷商事)を用いて行った。蛍光観察には、DeltaVision 搭載顕微鏡(コーンズテクノロジー)、レンズは U-Plan S-Apo 20X/0.75、U-Apo 40X/1.35 Oil (いずれも OLYMPUS)を用いた。共焦点顕微鏡による観察には、顕微鏡は ZEISS LSM 710、レンズは Plan-Apo 40X/0.95 Korr を用いた。

初期胚でライブイメージングを行う際には、胚が転がったり流れたりして動くのを防ぐため、ガラスボトムシャーレ（IWAKI）のガラス部分に poly-L-lysine を塗布し、乾燥させたものを用いて胚をガラスに貼り付け、Deltavision 顕微鏡で観察した。

幼生でライブイメージングを行うときには、以下のいずれかの方法で幼生の動きを止める処置を行った。<u>ひとつめ</u>は、体幹部のムービーを撮影する際、尾部を切断またはつぶすことで動けなくする方法をとった。尾部をつぶすのには、サーマルプラーで引き伸ばしたガラス管(GD-1、Narishige)、または 0.5mm の太さのタングステン線を削って作成したタングステンナイフを用いた。タングステンナイフは、タングステン線を 0.5mm のシャープペンシルの先端に付けた状態で、紙やすりで先端をナイフのような形に削り、徐々に目を細かくして鋭い刀状のものを作製し、実験に用いた。尾部切断幼生は、ワセリンで土手を作ったスライドグラス上に海水とともにマウントし、カバーガラスをずらすことによって任意の向きから観察できるようにした。また、幼生を任意の向きに転がす際、0.25%Agarose XP (Nippon gene)と共にマウントしてマウント剤の粘度をあげ、より回転しやすくしていたこともある。

ふたつめは、低融点アガロース(Low Melting Point agarose; LMP) の中にオタマボヤを埋め込む方法である。人工海水(レイシーマリン、REI-SEA 社)に溶かした 1% Agarose XP (Nippon gene)は常温でゲル状固体であるが、70℃前後で液体になる。ガラスボトムシャーレ(IWAKI)の底に何匹かワカレオタマボヤの幼生を置き、70℃のオーブンで溶かした Agarose XP を再び凝固する直前に、幼生の上にかけることで、幼生の周りを寒天で固め、動きを制限した。この際、LMP よりも幼生を先に置くほうが、幼生の周りの寒天濃度が上がるため、確実に動きを止めることができた。以上のいずれかの方法でマウントした幼生を用いて、一定の時間間隔で写真を撮り、タイムラプスムービーを撮影した。

## 6.8 顕微手術

尾部での細胞移動メカニズムを調べるため、細胞移動期に体幹部を切除した。切除する際にはタングステンナイフを用いた。シャーレに傷がつくことと底に幼生がくっつくことを防ぐため、切除の際には底に 0.9% 寒天を敷いた海水入りのシャーレを用い、体幹部と尾部の付け根付近、または尾部後端付近、あるいはその両方を切除した。尾部にナイフを入れる際に筋肉が収縮していると切除時に尾部がぼろぼろになってしまうため、0.015% MS222 で麻酔をかけ、幼生の動きが完全に止まる瞬間を狙って切除した。切除した尾部は、マイクロピペット(P20)または手製のガラスピペットを用いて回収し、0.25% LMP 中にマウント後、回転させて尾部を腹側または背側から観察できるようにし、ノマルスキー顕微鏡下で動きを観察した。

## 6.9 画像解析

撮影した画像・動画は、ImageJ を用いて解析・編集を行った。スタックとして撮られた画像データを、時間と z 軸を含めた 4D にするには、Image>Hyper Stack から Hyperstack に変換した。また、矢印・矢頭を動画につけるために、Arrow Labelling Tools を用いた。図の編集には、Adobe Photoshop CS3 および Illustrator CS3 を用いた。切り開いた成体表皮の画像ついては、複数の視野で撮影した画像を ImageJ で 1 枚につなぎ合わせ、Photoshop で疑似カラーを付けた。

## 6.10 SYTOX Green 染色

SYTOX Green (Invitrogen)は、核酸に結合し、蛍光緑に染めることが可能な試薬であり、RNase と併用することで DNA (核)のみを染色することができる。成体の oral gland の核の数を確認するため、成体のワカレオタマボヤに対して SYTOX Green 染色を行った。まず、4% PFA、0.1 M MOPS、0.5 M NaCl、0.2% TritonX-100、5 mM EGTA の固定液中で、4℃ overnight でワカレオタマボヤの成体を固定した。これを、Solution A (0.5 M NaCl、10 mM Tris HCl (pH 8.0)、50 mM EDTA、0.1% Tween)で 10 分間×3 回洗浄した後、SolutionA に溶かした 100 µg/mL

RNase A で、37℃ 2 時間処理した。RNase 処理後、Solution A で 5 分間洗浄し、次に TN buffer (50 mM Tris-HCl(pH 7.4)、0.15 mM NaCl)で 10 分間×3 回洗浄した後、TN buffer に溶かした 5 µM S7020 SYTOX Green で 4℃ overnight で処理を行った。TN buffer で 10 分間×3 回洗浄して反応を止めた後、PBSTw に写し、VECTASHIELD(フナコシ)中にマウントした。この時スペーサーとして、ビニールテープを 3 枚重ねたものを用いた。

## 6.11 成体表皮を平面上に展開したサンプル作成と DAPI・Phalloidin 染色

D5 の成体を、4% PFA/0.1M MOPS/0.5M NaCl で 4℃ Overnight 固定した。PBSTr 中で 5 回洗浄し、イエローチップでピペッティングすることで、ハウス原基・表皮・内臓・尾部・生殖巣を切り離した。その後、PBSTr 中で、タングステンを削ってナイフ形にしたものと、ガラス管(GC-1、Narishige)をマイクロピペットプラー(P-97, SUTTER)で引いて作成した細いガラス針を両手に持ち、表皮の腹側または背側の正中付近を切り開いた。染色のためにガラスボトムシャーレ内に切り開いたサンプルを移し、Phalloidin-Alexa 488 (Life Technologies) in PBSTr (50 倍に希釈したもの) 100 µL 中に 1 時間ひたし、アクチン細胞骨格を染めた。その後 PBSTr で 1 回洗浄し、スライドグラス上に移して VECTASHIELD with DAPI (フナコシ)にマウントし、カバーガラスをかけた。マウント時にはガラス針とナイフを用いて、開いた状態でマウントできるようにサンプルの方向を整えた。マウント時のすスペーサーとしてワセリンを用いた。

## 6.12 免疫抗体染色

幼生または D5 の成体を 4% PFA/0.1M MOPS/0.5M NaCl で 4°C Overnight 固定した。PBSTr で 5 回洗浄した。Blocking Reagent(Roche) で常温 1 時間ブロッキング後、一次抗体（mouse IgG Monoclonal anti-α-acetylated-tubulin antibody(SIGMA-ALDRICH, T6793)を 1:500 に希釈したもの）で 1 時間反応させた。PBSTr で 5 回洗浄した後、再び 1 時間ブロッキング、二次抗体（Alexa 594 goat anti-mouse IgG (Invitrogen)を 1:500 で希釈したもの）および Phalloidin-Alexa 488 (Life Technologies) in PBSTr 中で常温 1 時間または 4°C overnight で染色した。PBSTr で 5 回洗浄した後、VECTASHIELD with DAPI にマウントした。

## 6.13 SIMI BioCell Viewer

孵化前の核の位置を調べるために、SIMI° BioCell Viewer (SIMI) (http://simi-biocell-viewer.software.informer.com/) を用いた。ワカレオタマボヤの細胞系譜データは、Stach et al. 2008 のものを用いた。細胞系譜図を基に、表皮系列以外の割球の表示を消した後、右割球(AB)の子孫細胞を赤・球に、左割球（AB）の子孫割球を緑・星形に色分けして表示した。

# 第７章　参考文献

Aman, A., Piotrowski, T., 2010. Cell migration during morphogenesis. Dev. Biol. 341, 20-33.

Ando, R., Hama, H., Yamamoto-Hino, M., Mizuno, H., Miyawaki, A., 2002. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 12651-6.

Bollner, T., Holmberg, K., Olsson, R., 1986. A Rostral Sensory Mechanism in *Oikopleura dioica* (Appendicularia) Acta Zool. 67, 235-241.

Betz, W.J., Mao, F., Smith, C.B., 1996. Imaging exocytosis and endocytosis. Curr. Opin. Neurobiol. 6, 365-71.

Canestro, C., Bassham, S., Postlethwait, J., 2005. Development of the central nervous system in the larvacean *Oikopleura dioica* and the evolution of the chordate brain. Dev. Biol. 285, 298–315.0

Capitanio, F.L., Daponte, M.C., Esnal, G.B., 2003. The classification of Antarctic appendicularians: the *Oikopleura gaussica* group. Antarctic Science 15, 476-482.

Chisholm, A.D., Hsiao, T.I., 2012. The *Caenorhabditis elegans* epidermis as a model skin. I: development, patterning, and growth. WIREs Dev. Biol. 1, 861–878.

Danks, G., Campsteijn, C., Parida, M., Butcher, S., Doddapaneni, H., Fu, B., Petrin, R., Metpally, R., Lenhard, B., Wincker, P., Chourrout, D., Thompson, E.M., Manak, J.R., 2013. OikoBase: a genomics and developmental transcriptomics resource for the urochordate *Oikopleura dioica.* Nucleic Acids Res. 41, D845-53.

David, N.B., Sapède, D., Saint-Etienne, L., Thisse, C., Thisse, B., Dambly-Chaudière, C., Rosa, F.M., Ghysen, A., 2002. Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 16297-302.

Delsman, H.C., 1910. Beitrage zur Entwicklungsgeschichte von *Oikopleura dioica.* Verh. Rijksinst. Onderz. Zee 3, 1-24.

Delsman, H.C., 1912. Weitere beobachtungen uber die entwicklung von *Oikopleura dioica.* Tijdschr. Ned. Dierk. Ver. 12, 199-206.

Denoeud, F., Henriet, S., Mungpakdee, S., Aury, J.M., Da Silva, C., Brinkmann, H., Mikhaleva, J., Olsen, L.C., Jubin, C., Cañestro, C., et al., 2010. Plasticity of animal genome architecture unmasked by rapid evolution of a pelagic tunicate. Science 330, 1381-5.

Fenaux, R., 1998. Anatomy and functional morphology of the appendicularia. In: Bone, Q. (Ed.), The Biology of Pelagic Tunicates, Oxford University Press, 25-34

Flood, P.R., Deibel, D., 1998. The appendicularian house. In: Bone, Q. (Ed.), The Biology of

Pelagic Tunicates, Oxford University Press, 105-124.

Flood, P.R., 2004. Toward Photographic atlas on special taxonomic characters of oikopleurid Appendicularia(Tunicata) In:Gorsky, G., Youngbluth, MJ., Deibel, D. (Ed.), Response of marine ecosystems to global change: ecological impact of appendicularians. Editions scientifique, 59-85

Fredriksson, G., Olsson, R., 1991. The Subchordal Cells of *Oikopleura dioica* and *O. albicans* (Appendicularia, Chordata) Acta Zoologica 72, 251-6.

Fredriksson, G., Olsson, R., 1981. The Oral Gland Cells of *Oikopleura dioica* (Tunicata Appendicularia) Acta Zoologica, 62, 195-200.

Friedl, P., Weigelin, B., 2008. Interstitial leukocyte migration and immune function. Nat. Immunol. 9, 960-9.

Fujii, S., Nishio, T., Nishida, H., 2008. Cleavage pattern, gastrulation, and neurulation in the appendicularian, *Oikopleura dioica*. Dev. Genes Evol. 218, 69-79.

Ganot, P., Bouquet, J.M., Kallesøe, T., Thompson, E.M., 2008. The *Oikopleura* coenocyst, a unique chordate germ cell permitting rapid, extensive modulation of oocyte production. Dev. Biol. 302, 591-600.

Ganot, P., Thompson, E.M., 2002. Patterning through differential endoreduplication in epithelial organogenesis of the chordate, *Oikopleura dioica.* Dev. Biol. 252, 59-71.

Ghysen, A., Dambly-Chaudière, C., 2004. Development of the zebrafish lateral line. Curr. Opin. Neurobiol. 14, 67-73.

Hartini, V., DiNardo S., 2001. Divide and conquer: pattern formation in *Drosophila* embryonic epidermis. Trends Genet. 17, 574-579.

Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., Hall, D.H., Stern B.D., 1987. Genetics of cell and axon migrations in Caenorhabditis elegans. Development 100, 365-382.

Hirano, T., Nishida, H., 2000. Developmental fates of larval tissues after metamorphosis in the ascidian, *Halocynthia roretzi*. II. Origin of endodermal tissues of the juvenile. Dev. Genes Evol. 210, 55-63.

Hosp, J., Sagane, Y., Danks, G., Thompson, E.M., 2012. The Evolving Proteome of a Complex Extracellular Matrix, the *Oikopleura* House. PLoS One 7, e40172. doi: 10.1371/journal.pone.0040172.

Kadam, S., Ghosh, S., Stathopoulos, A., 2012. Synchronous and symmetric migration of *Drosophila* caudal visceral mesoderm cells requires dual input by two FGF ligands. Development 139, 699-708.

Knecht, A.K., Bronner-Fraser M., 2002. Induction of the neural crest: a multigene process. Nat. Rev. Genet. 3, 453–461.

Kugler, J.E., Kerner, P., Bouquet, J.M., Jiang, D., Di Gregorio, A. 2011. Evolutionary changes in the notochord genetic toolkit: a comparative analysis of notochord genes in the ascidian *Ciona* and the larvacean *Oikopleura*. BMC Evol. Biol. 20, 11-21.

Kwan, K.M., Otsuna, H., Kidokoro, H., Carney, K.R., Saijoh. Y., Chien. C.B., 2012. A complex choreography of cell movements shapes the vertebrate eye. Development 139, 359-72.

Lecaudey, V., Cakan-Akdogan, G., Norton, W.H., Gilmour, D., 2008. Dynamic Fgf signaling couples morphogenesis and migration in the zebrafish lateral line primordium. Development 135, 2695-705.

Nakazawa, K., Yamazawa, T., Moriyama, Y., Ogura, Y., Kawai, N., Sasakura, Y., Saiga, H., 2013. Formation of the digestive tract in *Ciona intestinalis* includes two distinct morphogenic processes between its anterior and posterior parts. Dev. Dyn. 242, 1172-83.

Nishida, H., Satoh, N., 1983. Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. I. Up to the eight-cell stage. Dev. Biol. 99, 382-4.

Omotezako, T., Nishino, A., Onuma, T.A., Nishida, H., 2013. RNA interference in the appendicularian *Oikopleura dioica* reveals the function of the Brachyury gene. Dev. Genes Evol. 223, 261-7.

Raz, E., 2004. Guidance of primordial germ cell migration. Curr. Opin. Cell Biol. 16, 169-73.

Rella, L., Fernandes Póvoa E.E., Korswagen, H.C., 2016. The Caenorhabditis elegans Q neuroblasts: A powerful system to study cell migration at single-cell resolution in vivo. Genesis. 54, 198-211.

Richardson, B.E., Lehmann, R., 2010. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 37-49.

Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M., Wedlich-Soldner, R., 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. Nat. Methods 5, 605-7.

Seo, H.C., Edvardsen, R.B., Maeland, A.D., Bjordal, M., Jensen, M.F., Hansen, A., Flaat, M., Weissenbach, J., Lehrach, H., Wincker, P., Reinhardt, R., Chourrout, D., 2004. Hox cluster disintegration with persistent anteroposterior order of expression in *Oikopleura dioica*. Nature 431, 67-71.

Sagane, Y., Hosp, J., Zech, K., Thompson, E.M., 2011. Cytoskeleton-mediated templating of complex cellulose-scaffolded extracellular structure and its association with oikosins in the urochordate *Oikopleura*. Cell Mol. Life Sci. 68, 1611-22. doi: 10.1007/s00018-010-0547-8

Sato, R., Tanaka, Y., Ishimaru, T., 2000. House Production by *Oikopleura dioica* (Tunicata, Appendicularia) Under Laboratory Conditions. J. Plankton Res. 23, 415-423

Spada, F., Steen, H., Troedsson, C., Kallesoe, T., Spriet, E., Mann, M., Thompson, E.M. 2001. Molecular patterning of the oikoplastic epithelium of the larvacean tunicate *Oikopleura dioica*. J. Biol. Chem. 276, 20624-32.

Stach, T., Winter, J., Bouquet, J.M., Chourrout, D., Schnabel, R., 2008. Embryology of a planktonic tunicate reveals traces of sessility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105, 7229-34.

Takamura, K., Fujimura, M., Yamaguchi, Y., 2002. Primordial germ cells originate from the

endodermal strand cells in the ascidian *Ciona intestinalis*. Dev. Genes Evol. 212, 11-8.

Thompson E.M., Kallesøe, T., Spada, F., 2001. Diverse Genes Expressed in Distinct Regions of the Trunk Epithelium Define a Monolayer Cellular Template for Construction of the Oikopleurid House. Dev. Biol., 238, 260-73.

Tokioka, T., 1960. Studies on the distribution of appendicularians and some taliacians of the north pacific, with some morphological notes. Publications of the Seto marine biological laboratory 8, 351-44.

Yamaguchi, Y., Wyckoff, J., Condeelis, J., 2005. Cell migration in tumors. Curr. Opin. Cell Biol. 17, 559-64.

大内 一晃（2010）ワカレオタマボヤを用いた遺伝子導入系統作成に向けた技術開発．大阪大学大学院平成 21 年度修士論文.

表迫 竜也(2013) ワカレオタマボヤにおける RNAi 法の確立、および brachyury 遺伝子の機能解析．大阪大学大学院平成 24 年度修士論文.

林 桃子(2015) 脊索動物ワカレオタマボヤの左右非対称性の形成 : 2 細胞期胚の左右割球の標識追跡．大阪大学大学院平成 26 年度修士論文.

古谷 憲一（2011）オタマボヤ表皮細胞におけるパターン形成機構． 大阪大学理学部平成 22 年度卒業研究発表.

Simi BioCell Viewer http://simi-biocell-viewer.software.informer.com/ 2016 年 12 月 26 日閲覧

# 発表リスト

## 原著論文(査読有)

Kanae Kishi, Takeshi A. Onuma, and Hiroki Nishida.

Long-distance cell migrations during larval development in the appendicularian, *Oikopleura dioica.*

***Developmental Biology*** 2014 Nov 15; 395(2):299-306.

Wang, K., Omotezako, T., Kishi, K., Nishida, H., and Onuma, T. A.

Maternal and zygotic transcriptomes in the appendicularian, *Oikopleura dioica*: Novel protein-encoding genes, intra-species sequence variations, and trans-spliced RNA leader.

***Dev. Genes Evol.*** 2015 Jun; 225(3): 149-59. doi: 10.1007/s00427-015-0502-7.

## 日本語記事(査読なし)

岸香苗、西田宏記、小沼健

「実験動物紹介　ワカレオタマボヤ」比較内分泌学 Vol. 42 (2016) No. 157 p. 2-4

## 学会発表（国際学会）

○Kanae Kishi, Momoko Hayashi, Takeshi A. Onuma, Hiroki Nishida

「Morphogenesis and patterning of the trunk epidermis of the appendicularian, *Oikopleura dioica*」（口頭）

8th International Tunicate Meeting　2015 年 7 月 17 日　青森　青森県青森市文化会館

○Kanae Kishi

「Three long-distance cell migrations during larval development of Oikopleura dioica」（口頭＋ポスター)

Finnish-Japanese joint symposium on Morphogenesis and Signaling　2015 年 3 月 4 日　ヘルシンキ、ヘルシンキ大学

Kanae Kishi, Takeshi Onuma, ○Hiroki Nishida

「Long-distance cell migrations during　larval development in the appendicularian, Oikopleura dioica」(ポスター)

17th International Congress of Developmental Biology　2013 年 6 月　Cancún, Mexico

西田による発表

## 学会発表（国内学会/招待口演）

〇岸香苗、林桃子、小沼健、西田宏記

「ワカレオタマボヤ表皮の形態形成過程」(口頭＋ポスター)

第２回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会　2016年8月21日(日)　岡崎コンファレンスセンター

〇岸 香苗、小沼健、西田宏記

「ワカレオタマボヤ幼生期の蛍光ライブイメージング」(口頭)

日本動物学会第 84 回大会　2013 年 9 月 26 日　岡山・岡山大学　K5-2

## 学会発表（国内学会）

*2016*

〇Kanae Kishi, Momoko Hayashi, Takeshi Onuma, Hiroki Nishida

「Morphogenesis and patterning of the trunk epidermis of the appendicularian, *Oikopleura dioica*」(ポスター)

国際動物学会第 22 回大会＆日本動物学会第 87 回大会合同大会　2016 年 11 月 沖縄 OCC

*2015*

〇岸香苗、林桃子、小沼健、西田宏記

「脊索動物ワカレオタマボヤの表皮パターニングと系譜解析」(口頭)

日本動物学会 第 86 回大会 2015 年 9 月 17 日 新潟　朱鷺メッセ

〇Kanae Kishi

「Morphogenesis of the trunk epidermis of the appendicularian, *Oikopleura dioica*」（口頭)

National Tsing Hua University – Osaka University Life Science Student Activity Fair 2015　2015 年 9 月 2 日　大阪大学

〇Kanae Kishi, Takeshi Onuma, Hiroki Nishida

「Oikoplastic epidermal patterning in the trunk of the appendicularian, *Oikopleura dioica*」（口頭＋ポスター)

日本発生学会第 48 回年次大会　2015 年 6 月 3 日　つくば国際会議場

〇岸香苗

「ワカレオタマボヤを用いた形態形成過程のライブイメージング」(口頭)

第 4 回 Just Do it! の会　2015 年 6 月 1 日　つくば　産総研

〇岸香苗、小沼健、西田宏記

「ワカレオタマボヤ幼生の形態形成過程」（口頭)

日本動物学会近畿支部会　2015 年 5 月 16 日　奈良女子大学

*2014*

○岸香苗、表迫竜也、小沼健、西田宏記

「オタマボヤをもちいた発生学研究の近況 (2) ワカレオタマボヤ幼生期の形態形成運動の解析」(口頭)

ホヤ研究会 2014　筑波大学　2014 年 10 月 13 日

○岸香苗、小沼健、西田宏記

「ワカレオタマボヤ幼生期における長距離細胞移動メカニズム」(口頭)

日本動物学会 第 85 回大会　2014 年 9 月 13 日　仙台　東北大学川内キャンパス

○岸香苗

「ワカレオタマボヤ幼生期の長距離細胞移動メカニズム」(口頭)

日本発生生物学会 夏季ワークショップ　 2014 年 9 月 2 日　青森　浅虫臨海実験所

○Kanae Kishi

「Three long-distance migrations during larval development of Oikopleura dioica」 (口頭)

Bilateral OU-NTHU Life Science Conference 2014　 2014 年 5 月 16 日　台湾、台湾精華大学

*2013*

○Kanae Kishi, Takeshi Onuma, Hiroki Nishida

「Long-distance cell migrations during larval development in the appendicularian, *Oikopleura dioica*」

(口頭、ポスター)

日本発生生物学会 第 46 回大会　松江　2013 年 5 月 28-30 日　SW1-11、FT3-16、P-169

*2012*

岸香苗

「ワカレオタマボヤ発生のライブイメージング」

臨海若手の会　2012 年 9 月 17 日　三重・菅島臨海実験所

岸香苗、表迫竜也、小沼健、西田宏記

「ワカレオタマボヤの発生遺伝学研究の現状」

ホヤ研究会 2012　2012 年 6 月 1 日　京都大学

# 謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々にお世話になりました。

大阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻 発生生物学研究室の、西田 宏記教授、西野 敦雄助教(現・弘前大学 農学生命科学部 准教授)、熊野 岳助教(現・東北大学浅虫臨海実験所・教授)、今井 薫准教授、小沼 健助教をはじめとする皆様には多くのご助言、ご指導をいただきました。

西田教授には日々の議論から実験指導に至るまで幅広くご指導をいただきました。西野助教には、実験のやり方や議論の仕方などを一からご指導いただき、現在でも実験を行う上での礎となっています。熊野助教には、ライブイメージングの手法や結果の解釈に関して多くのご助言とご指導をいただきました。小沼助教には日々の生活から研究に対する姿勢まで多くのことをご指導いただきました。また、特に、本研究室の先輩である表迫 竜也博士には、実験手法や方法論、研究に対する心構えや、日々の生活面まで、多くのご指導・ご助言をいただきました。本研究室の後輩である林桃子様には、2 細胞期のラベリング実験に関してご助言や実験協力をしていただきました。飼育補助員である鈴木 幹恵様と萱原恵子様には、ワカレオタマボヤの飼育に関してご尽力いただき、安定した実験環境を整えて頂きました。その他の西田研究室のメンバーにも、研究面でも日常においても、様々な面でお世話になりました。本研究を進めることができたのはこれら全ての丁寧なご指導・ご助言・ご支援あってこそだと実感しています。心から感謝致します。

筑波大学・笹倉　靖徳教授には、低融点アガロースの使用法および幼生の観察方法についてご助言いただきました。心より感謝いたします。

The Technical University of Braunschweig の Ralf Schnabel 博士には、ライブイメージングに関するご助言および、SIMI BioCell Viewer の提供をいただきました。心より感謝いたします。

University of Bergen の Eric Thompson 博士と Yana Mikhaleva 博士には、ワカレオタマボヤの表皮研究において、多数のご助言を頂きました。心より感謝いたします。

PH-YFP のプラスミドをご提供いただいた、Weil Medical College of Cornell University の Anna Dr. Di Gregorio 博士、nls-Kaede のプラスミドをご提供いただいた Utah University の Kristen Kim Kwan 博士にも、心より感謝いたします。

また、本研究の一部は日本学術振興会特別研究員(DC1)の支援により行われました。心より感謝いたします。

最後に、研究生活をはじめ、大学・大学院での 9 年間の生活をサポートし、充実させてくださった家族、友人に感謝致します。

# Supplemental Material

Fig. S1-S6 の動画は、いずれも http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/nishida/kishi/ からダウンロードできる。

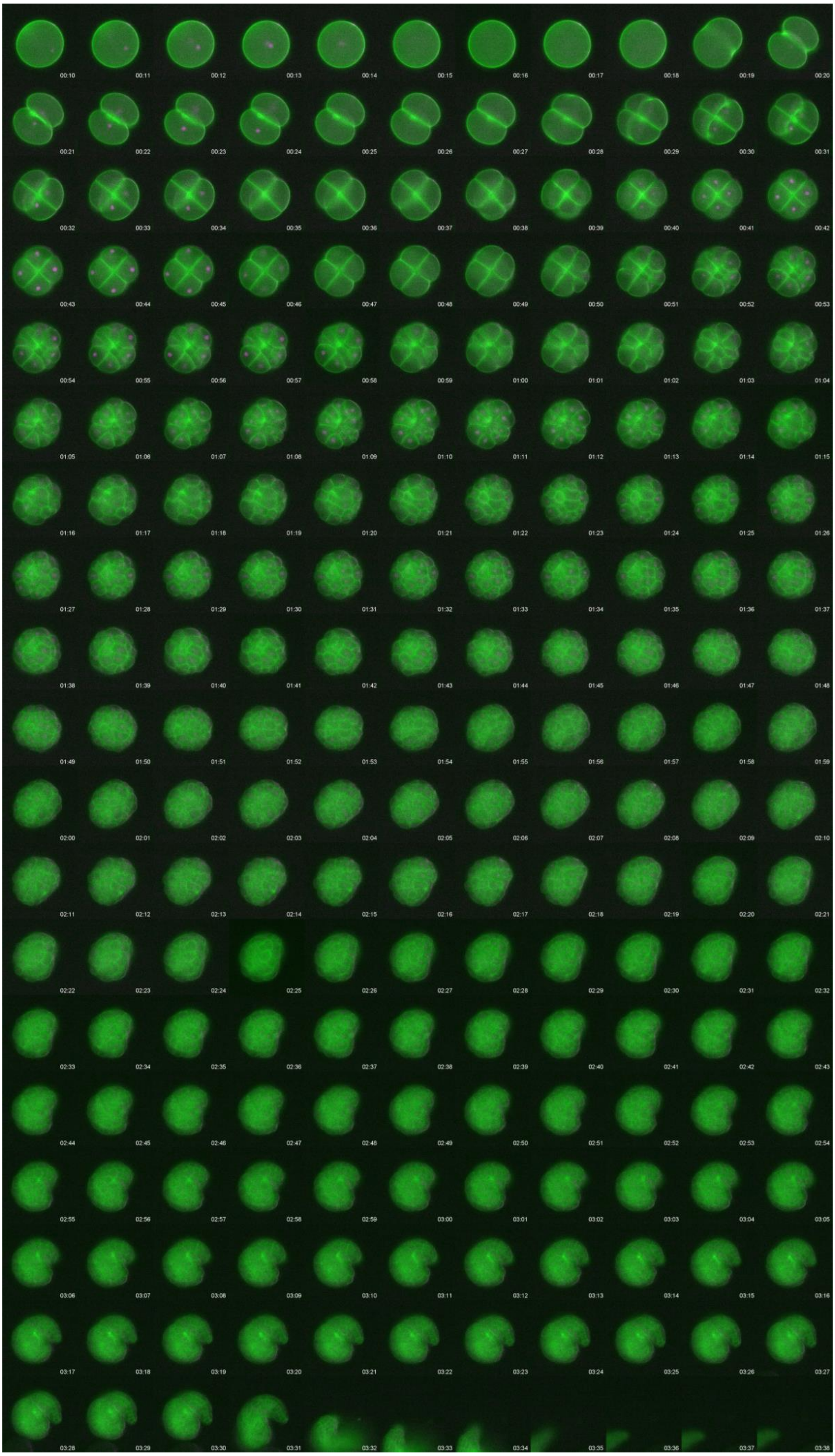


**Fig. S1：胚発生期のライブイメージング**

Fig. 2-1A に示した胚発生期に撮影したタイムラプスのすべての写真を、左上から右へと並べた。撮影開始は受精後 5 分、終了は受精後 3 時間半。1 枚/1 分。

緑：PH-YFP(細胞膜)

マゼンタ：IBB-mCherry(核)

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/nishida/kishi/ms1.avi

**Fig. S2：Oral gland 前駆細胞の移動**

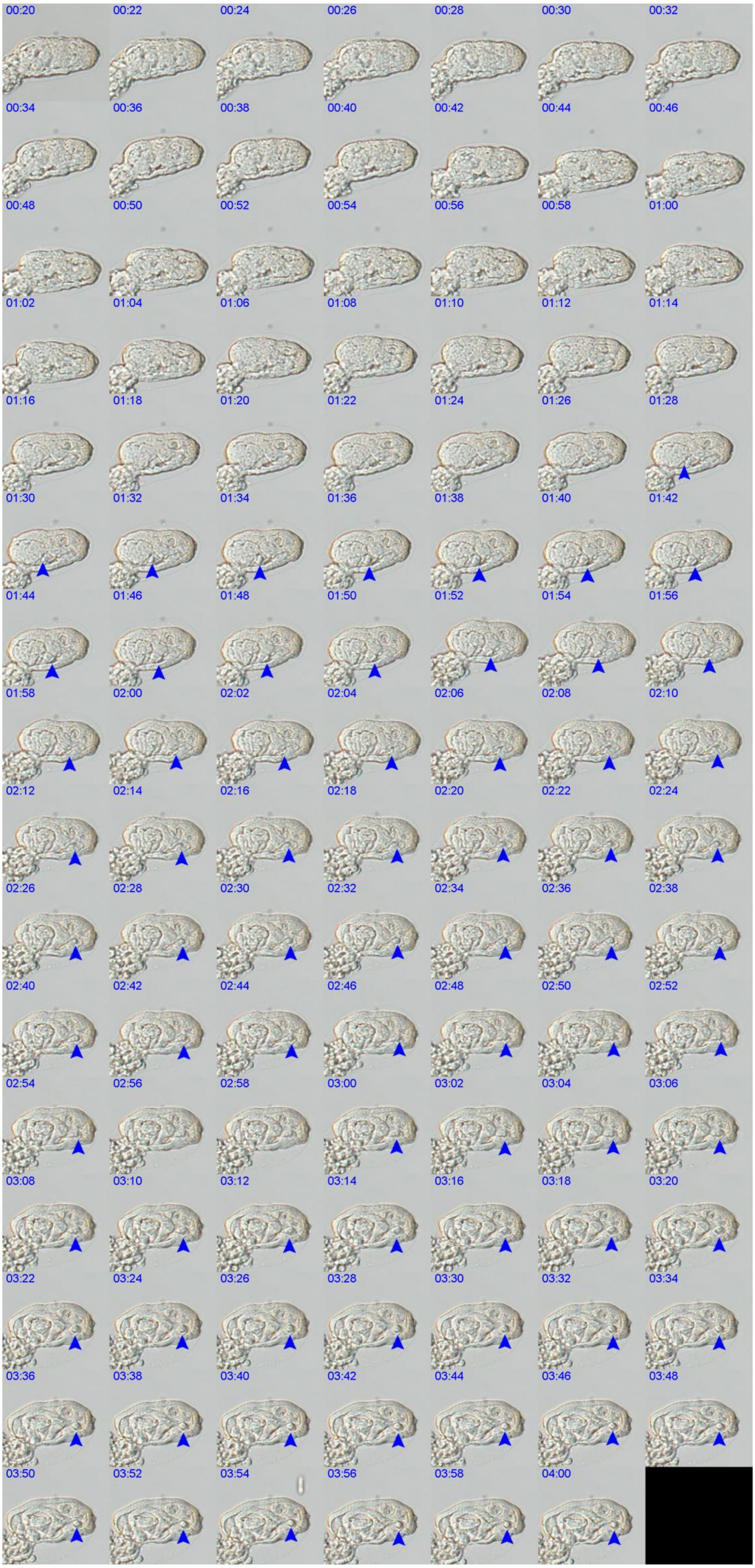
Fig. 3-1A に示したノマルスキー顕微鏡下で Oral gland 前駆細胞(青矢印)の動きをとらえたタイムラプスのすべての写真を、左上から右へと並べた。

撮影開始は 0.5 hph

終了は 4 hph、

枚/2 分。

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/nishida/kishi/ms2.avi



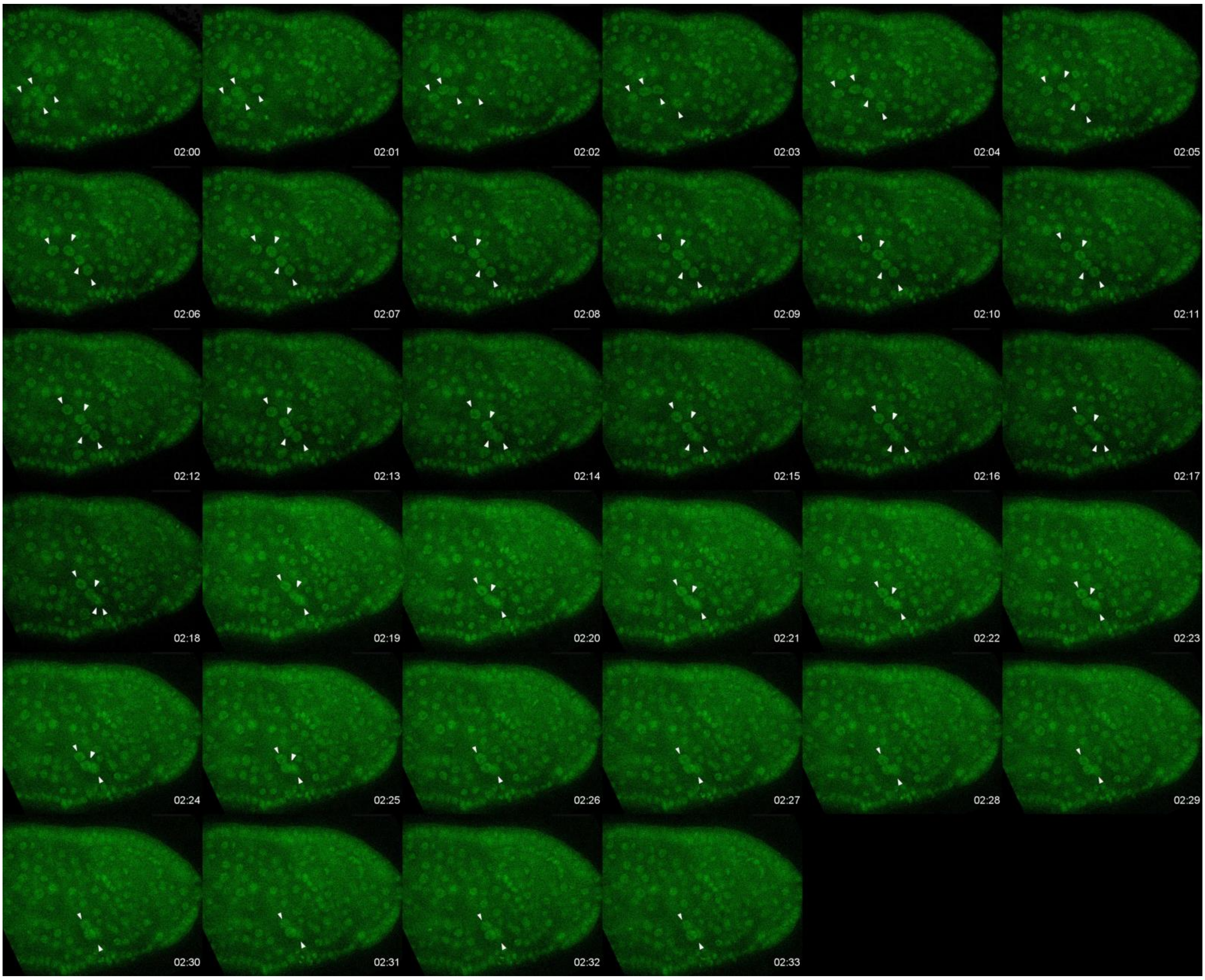



**Fig. S3：Oral gland 前駆細胞の移動-2**

Fig. 3-1D に示した H2B-EGFP で核を可視化して Oral gland 前駆細胞(白矢頭)の動きをとらえたタイムラプスのすべての写真を、左上から右へと並べた。右が前。撮影開始は 2 hph、終了は 2.5 hph、1 枚/1 分。

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/nishida/kishi/ms3.avi

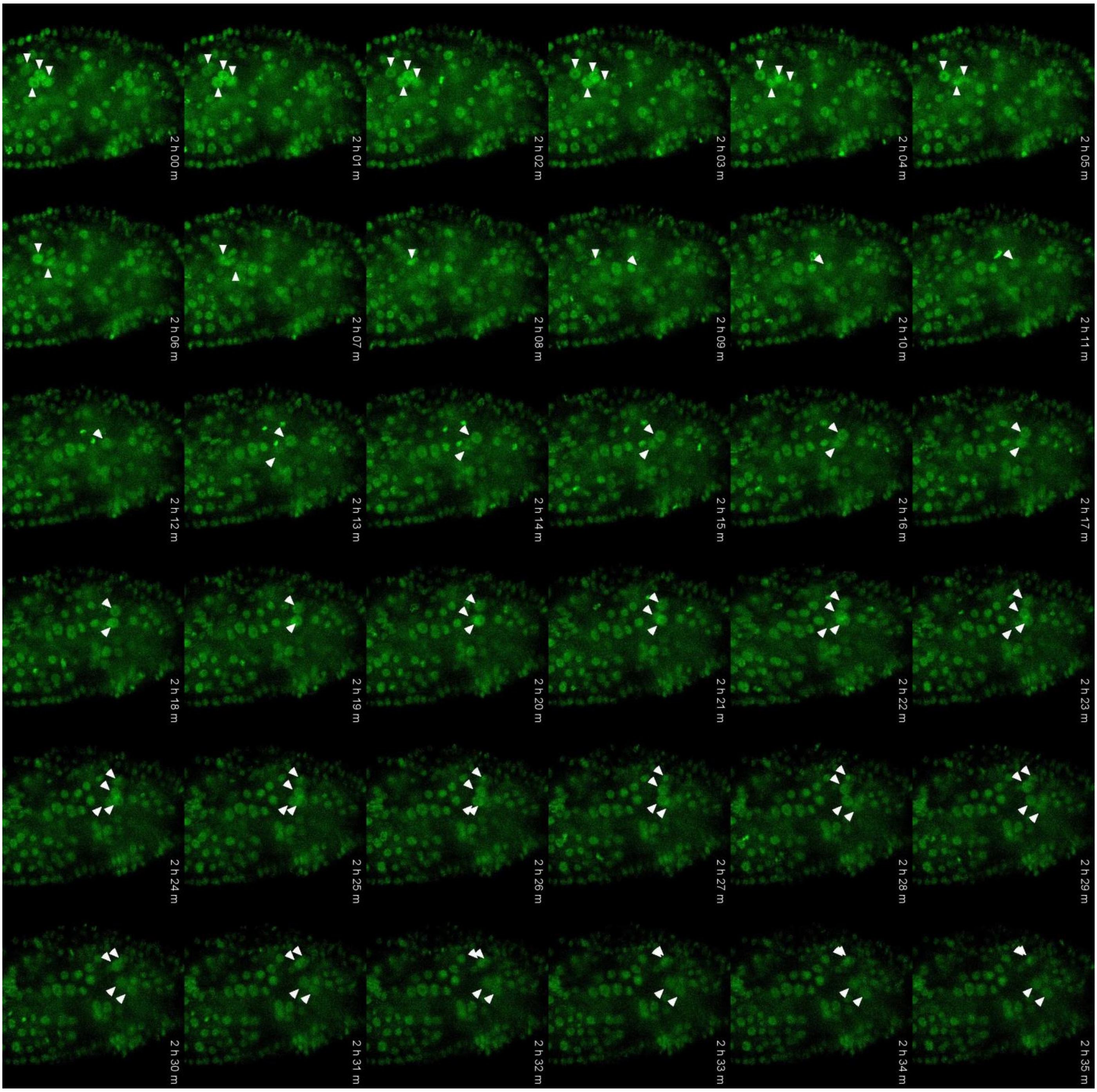



**Fig. S4：Oral gland 前駆細胞の移動-3**

Fig. 3-1E に示した H2B-EGFP で核を可視化して Oral gland 前駆細胞(白矢頭)の動きをとらえたタイムラプスのすべての写真を、左上から右へと並べた。上が前。撮影開始は 2 hph、終了は 2.5 hph、1 枚/1 分。

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/nishida/kishi/ms4.avi

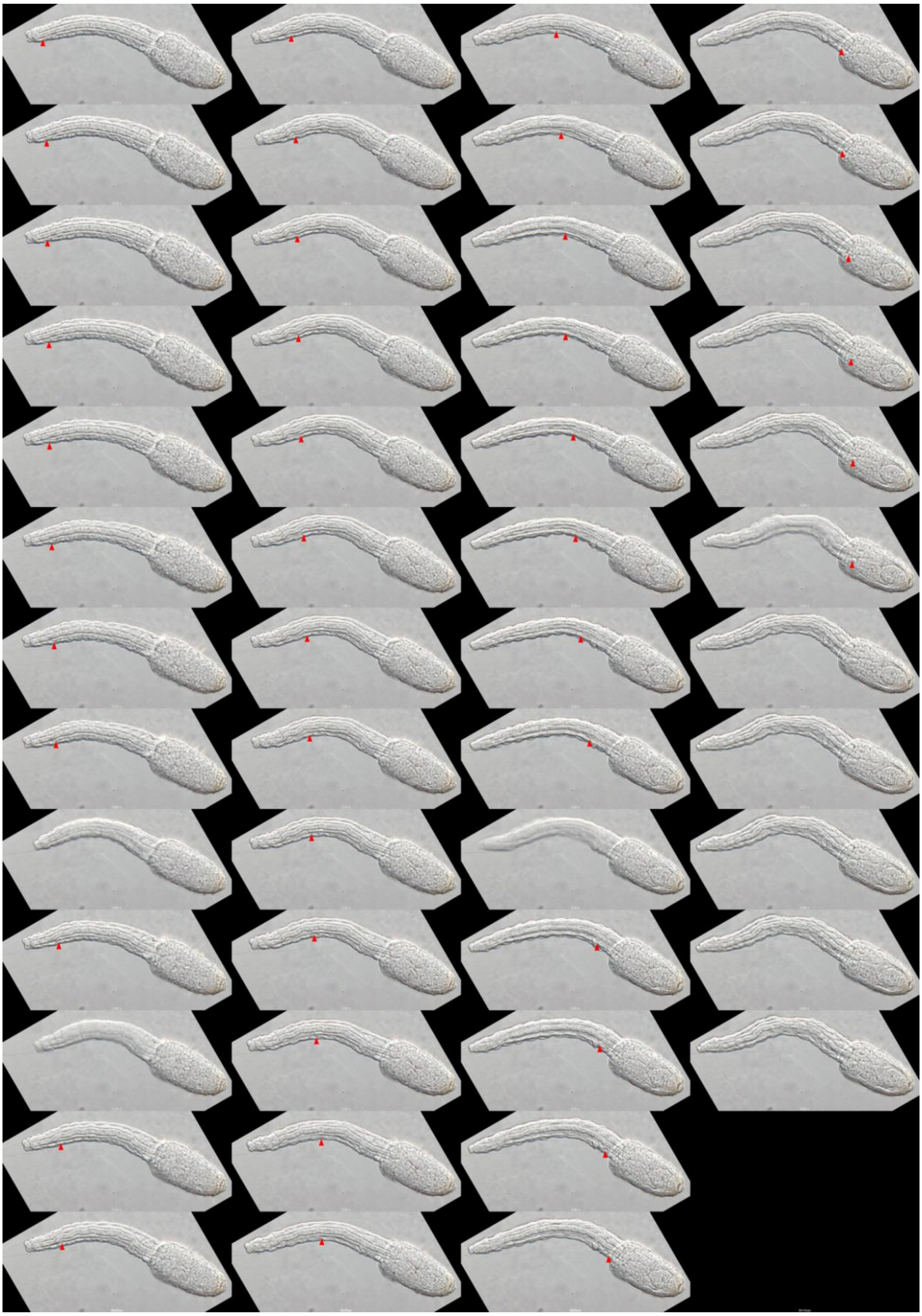


**Fig. S5：内胚葉索の細胞移動**

Fig. 3-2A に示したノマルスキー顕微鏡下で内胚葉索の動きをとらえたタイムラプスのすべての写真を、左上から下へ並べた。赤矢頭で内胚葉索の後端を示す。撮影開始は 0.75 hph、終了は 2.5 hph、1 枚/1 分。

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/nishida/kishi/ms5.avi

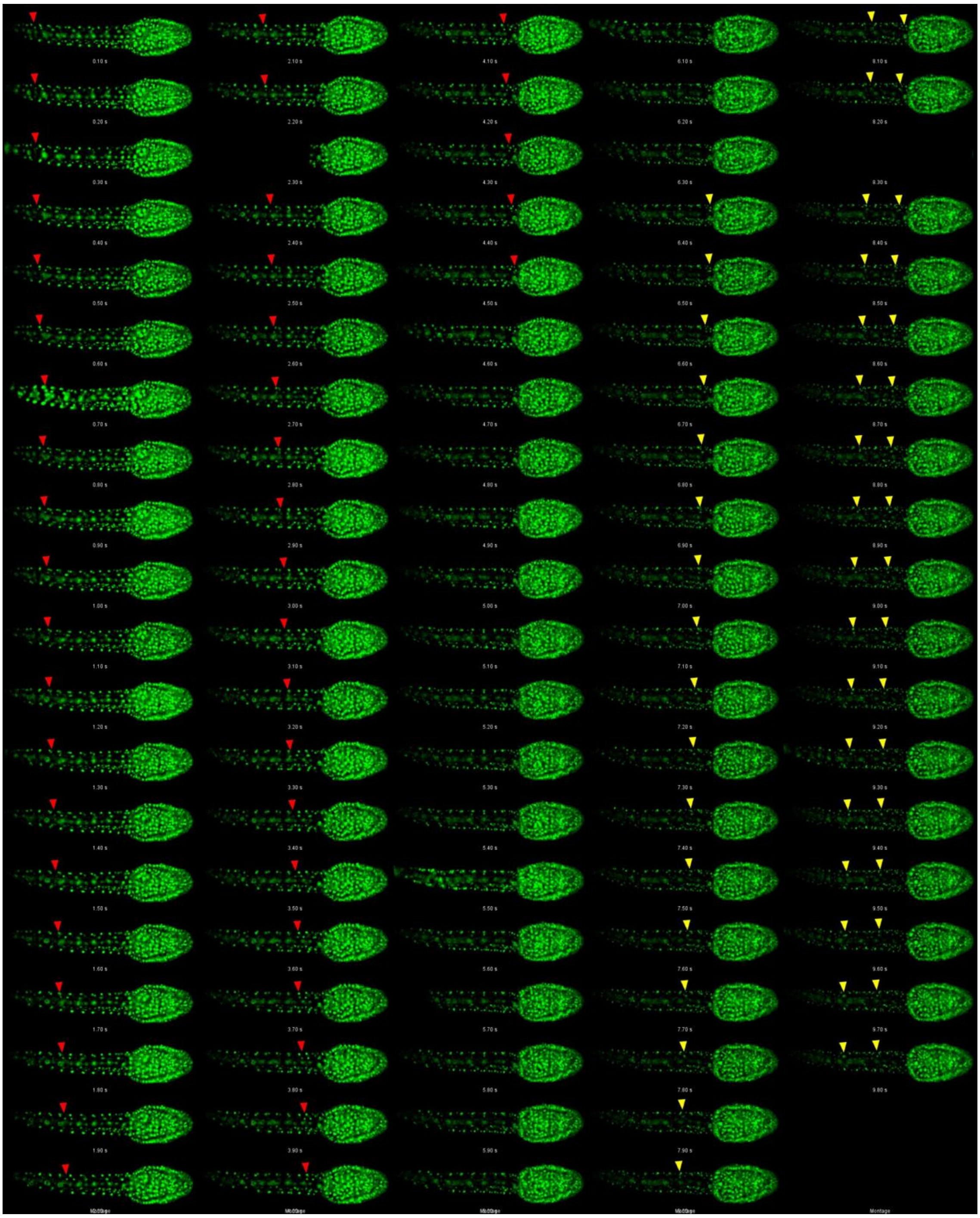


**Fig. S6：内胚葉索と Subchordal cell 前駆細胞の細胞移動**

Fig. 3-2B に示した H2B-EGFP で核を可視化して内胚葉索と Subchordal cell 前駆細胞の動きをとらえたタイムラプスのすべての写真を、左上から下へと並べた。赤矢頭は内胚葉索の後端、黄矢頭は subchordal cell 前駆細胞を示す。撮影開始は 1.25 hph、終了は 3 hph、1 枚/1 分。

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/nishida/kishi/ms6.avi

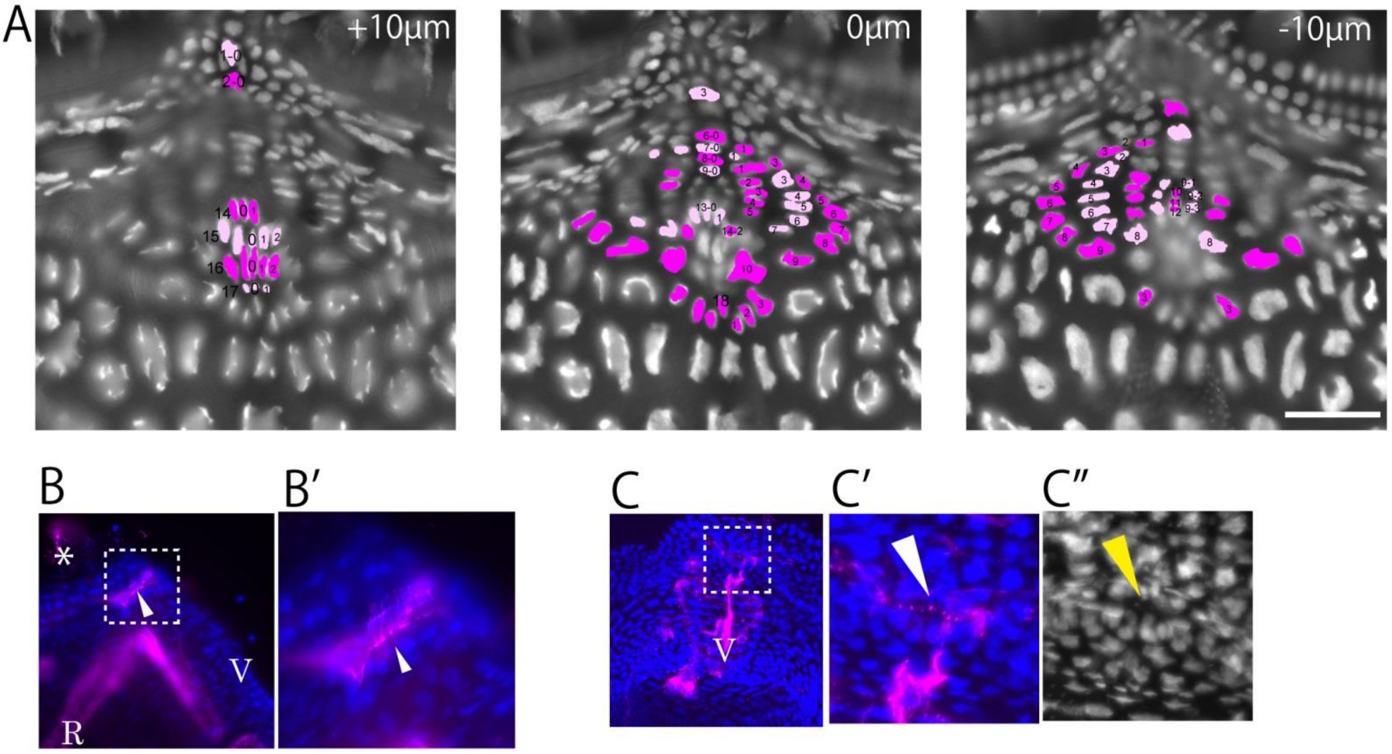



**Fig. S7　Anterior Rossete と、Sensory Organ Region**

A : Fig.4-1B の個体の、Anterior Rossete(AR)部分の拡大図。AR は背腹方向の凹凸が激しい為、Z 方向の視野を 10 µm ずつ上下にずらしたものを表示した。図中の黒字の数字は、細胞番号を示す。スケールバー : 50 µm。

B および C : Sensory Organ の神経細胞の位置を示す。マゼンタは繊毛(アセチル化チューブリンの抗体染色)、青は DNA(DAPI)を示す。 B : 右斜め腹側からみた写真。B'は、B 中の点線四角で囲った部分の拡大図。白矢じりは Sensory Organ の位置を示す。＊は口の位置を示す。横並びの繊毛が、腹側前方部に生えているのが観察される。　C : 腹側から見た図。C'および C"は、C 中の四角で囲った部分の拡大図。C"は DAPI のシグナルのみを表示している。白および黄色の矢じりは Sensory Organ の位置を示す。V : 腹側、R : 右側。

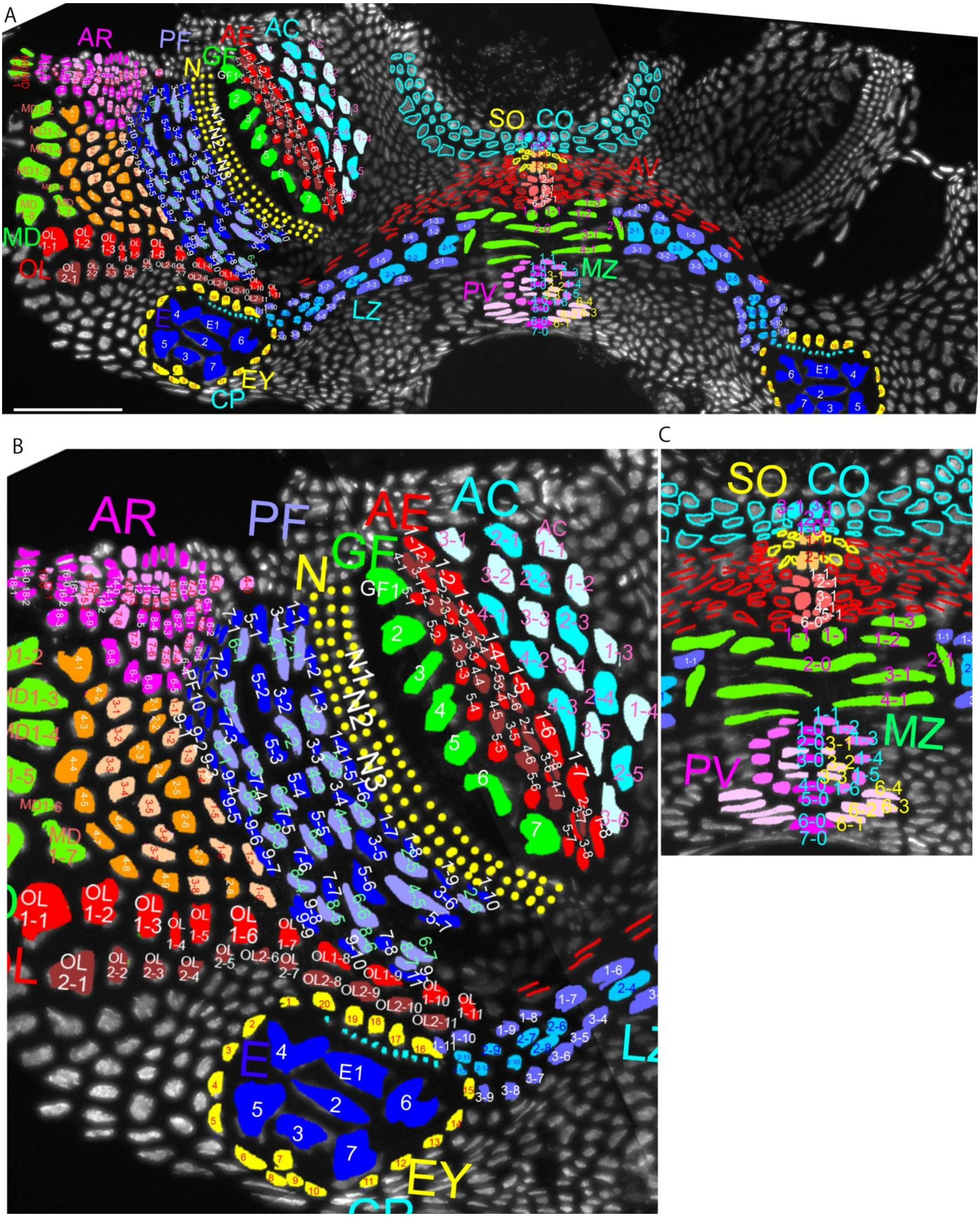



**Fig. S8　細胞番号(腹側)**

A：Fig.4-1A に細胞番号を書き足したもの。スケールバー：200 μm。B：A のうち、Fol 領域と Martini 領域の拡大図。C：A のうち、腹側正中部の拡大図。各領域の略は、Fig.4-1 および本文中の略に準ずる。

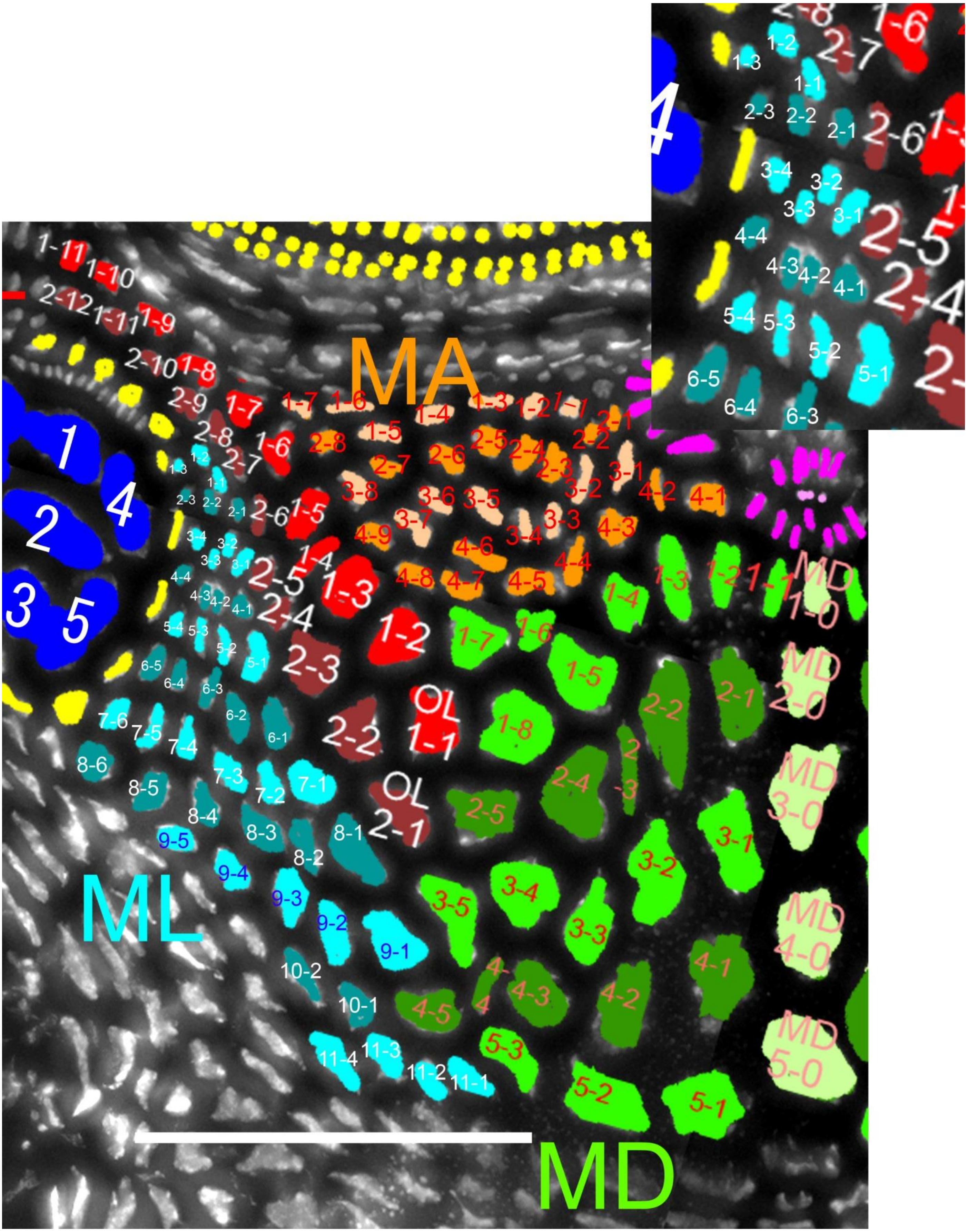



**Fig. S9　細胞番号(背側)**

Fig. 4-1B の左半分に細胞番号を書き足したもの。右上は、Mid-Lateral 領域の前方部の拡大図。スケールバー：200 μm。