



Title	Blastopore gating mechanism to regulate extracellular fluid excretion
Author(s)	加藤, 壮一郎
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92182
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名(加藤壮一郎)	
論文題名	Blastopore gating mechanism to regulate extracellular fluid excretion (初期胚の体液排出を制御する原口の開閉機構)
論文内容の要旨	
<p>多細胞生物にとって細胞外体液は重要な構成要素であり、体液動態の制御は恒常性の維持に不可欠である。成体は体液動態を制御するために、一細胞レベルのミクロな経路（傍細胞輸送や経細胞輸送など）および多細胞レベルのマクロな経路（血管や尿道など）を利用するところが知られているが、特にマクロな経路に関しては、膀胱平滑筋の収縮と尿道括約筋の弛緩が排尿をもたらすように、器官や筋肉の精妙な協調によって体液の移動が時空間的に制御されている。それゆえ筋肉形成が未熟な初期胚は、主に細胞レベルの経路を利用して体液動態を制御すると考えられてきた。しかし興味深いことに、アフリカツメガエル初期胚は後期神経胚期に原口というマクロな経路から原腸内体液を胚外に排出することが報告されている（図1）。そこで本研究では、筋肉形成の未熟なツメガエル初期胚が原口の開閉を制御するしくみの解明に取り組んだ。</p> <p>はじめに原腸内体液を蛍光標識し体液排出時期を解析した結果、St. 20以降に起きることが明らかになった。さらに、早期に原腸内体液を除去したところ、左右軸に乱れが生じた。これらの結果から、原口の開閉制御が初期発生において重要であることが明らかになった。</p> <p>次に原口の開閉制御の要因として圧力に着目し解析を行った。はじめに原腸内液圧が発生に伴い上昇し、原口の耐圧上限値を越えることで原口が開く可能性を考え、排出前（St. 18）、排出直前（St. 20-21）、および排出中の原腸内液圧を測定したが、予想に反して全てのステージで原腸内液圧はほぼ一定であった。そこで、原口の耐圧上限値が発生に伴い低下し、一定の原腸内液圧を下回ることで原口が開く可能性を考え、フェノールレッド溶液の連続注入により人為的に加圧し、体液が排出され始める液圧（原口の耐圧上限値）を測定した。その結果、耐圧上限値は発生の進行に伴い低下することで開口することが判明した。</p> <p>そこで耐圧上限値をスリット間の接着が制御する可能性を考え、原口にアルミホイル薄片を挿入し、接面の物理的な分断が排出をもたらすか解析したが、挿入胚も野生胚と同様にSt. 20以降に体液を排出した。一方、先端を丸めたガラスニードルで排出前の原口を押し開いても、その後急速に閉鎖したことから、スリットを両側から押しあうことで原口が閉鎖している可能性を考え、スリット端点切断に伴う圧着解消時の接面形状解析および微小力測定プローブによる開口に必要な力の測定を行った。その結果、スリット間に物理的な押し合いが生じていること、押し合い力はSt. 18から St. 20-21にかけて減弱することが明らかになった。</p> <p>さらに、スリットの押し合いに、形態形成の駆動力として知られるアクトミオシンを介した上皮細胞頂端面の収縮が寄与する可能性を考え、免疫組織化学法により収縮の指標となるリン酸化ミオシン軽鎖（pMLC）の局在を解析した。その結果、pMLCは原口の背側端と腹側端に局在するが、排出期には腹側端のシグナルが減弱していた。さらに排出前の原口腹側端組織中に収縮阻害薬（Y27632）を注入すると、原口の早期開口が引き起こされた。</p> <p>一連の結果から、原口腹側端のアクトミオシン収縮解消がスリットの押し合いを低下させ、耐圧上限値を引き下げることで開口が引き起こされることが明らかになった（図2）。本研究は、アクトミオシンを利用した上皮細胞頂端面収縮が成体の括約筋と類似した役割を担うことで、筋肉や器官の未熟な初期胚もマクロな経路を介した体液移動を時間制御できることを示している。</p>	

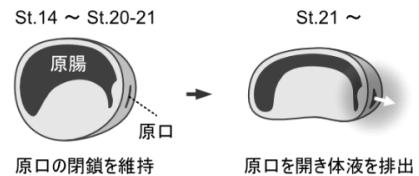


図1. ツメガエル胚の体液排出

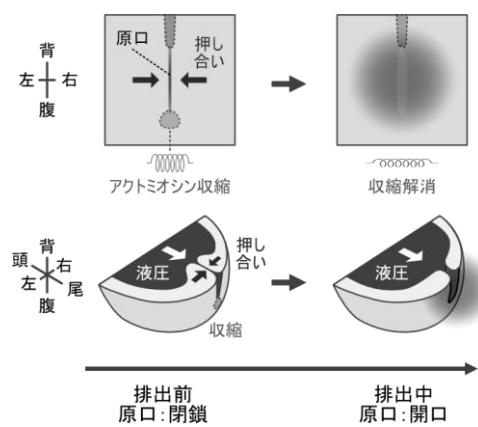


図2. ツメガエル胚の原口の開閉制御機構

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (加藤 壮一郎)		
論文審査担当者	(職)	氏名
	主査 教授	松野 健治
	副査 教授	橋本 主税
	副査 准教授	藤本 仰一

論文審査の結果の要旨

多細胞生物にとって細胞外体液は重要な構成要素であり、体液動態の制御は恒常性の維持などに不可欠である。アフリカツメガエル初期胚は、後期神経胚期に原口から原腸内体液を胚外に排出することが報告されていた。本博士論文では、アフルカツメガエル初期胚が原口の開閉を制御するしくみとその意義が解明された。

タイムラプスイメージングの結果、胚自身により制御される原腸内体液の排出時期が、左右軸形成において重要であることが示された。次に、原腸内体液排出の制御機構を理解することを目的とし、圧力に着目し解析が実施された。その結果、アフリカツメガエルの発生ステージを通じて、原腸内液圧はほぼ一定であることが明らかにされた。このため、原口の耐圧上限値が低下し、これが原腸内液圧を下回ることで原口が開き、体液が排出される可能性が予測された。そこで、耐圧上限値の変化を計測した結果、耐圧上限値は発生の進行に伴い低下することが判明した。この結果は、原口の耐圧上限値の低下が体液排出を引き起こすことを示唆している。

次に、耐圧上限値がどのように制御されているか解析するために、原口の接面（スリット）の形態が解析され、スリットにかかる押し合う力が耐圧上限値を規定していることが示唆された。さらに、スリットを押す力の発生要因について解析が行われ、アクトミオシン収縮を介した上皮細胞頂端面収縮が体液排出を時間的に制御していることが明らかにされた。

本博士論文の結果から、筋形成前の胚は、尿道や肛門における括約筋の代わりにアクトミオシン依存的な上皮頂端面収縮を利用することで、組織レベルの孔を介した体液排出の時間制御を行うことが明らかにされた。

本博士論文の成果は、胚発生における体液動態の制御機構とその機能を理解する上で先駆的なコンセプトを提唱しており、発生生物学の発展に寄与するものと判断される。また、本博士論文で方向された計測技術は、体液動態に関する研究の今後の発展に寄与するものであり、理学上貢献するところが大きい。よって、本博士論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。

加藤壮一郎氏の指導教員は神戸理研・多細胞システム形成研究センターの元チームリーダーである猪股秀彦であり、研究は理研で行われ、松野健治が主査を務めた。