

氏名 岸 本 康 之

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第158号

学位授与の日付 平成7年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 ヒドラの外胚葉上皮組織エピボリーの機構

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 中 辻 憲 夫

教 授 桂 勲

助教授 城 石 俊 彦

助教授 林 茂 生

教 授 浅 島 誠（東京大学）

## 論文内容の要旨

ヒドラは単純な体制と、強い再生力を持ち、形態形成機構を研究するための理想的小動物である。ヒドラの体幹は細長い中空シリンダー状構造で、その組織は外側に連続して一層に並ぶ外胚葉上皮細胞の層と、内側に連続して一層に並ぶ内胚葉上皮細胞の層により構成されている。そして体幹の上部に頭部と、下部に足部が存在する。

このヒドラの頭部と足部をメスを用いて切断除去すると、残された体幹組織は新しい頭部と足部を5～6日の内に再生する。この再生過程において、まず傷口が修復され、一度壊された二層性上皮構造の連続性が回復される。そしてその後、この修復組織にパターン形成が起き、新しい頭部あるいは足部が形成される。本論分は、この二層性上皮構造の修復過程に注目し、その詳細な解析を行ったものである。上皮組織構造の形成と維持は、動物の形態形成全般を通じ、最も重要な基本過程である。簡単な体制と強い再生力を持つヒドラは、この過程の解析のために、優れたモデル系として利用できる。

本研究の第一段階は、ヒドラの二層性上皮形成の機構を調べるための手段として、新しいヒドラ再生系を開発したことである。麻酔薬プロカインを用いてヒドラ体幹組織を処理することによって、外胚葉上皮組織と内胚葉上皮組織に完全に分離することが可能になった。各上皮組織をそれぞれ一旦ばらばらの細胞に解離し、遠心沈降により再集合させ、外胚葉細胞集合体と内胚葉細胞集合体を作成した。両集合体は、それぞれ単独で維持すると、2～3日以内に崩壊し、死滅した。しかし両者を接触させると、強固な接着がすみやかに形成され、その後一連の形態形成過程が進行し、やがて完全なヒドラが再生した。

この再生の初期段階において、外胚葉集合体は徐々に薄い層となって内胚葉集合体の表面上に広がり、やがて完全に包み込み、外側に連続した外胚葉層と、その内側に内胚葉組織を持つ構造を形成した。そしてこの構造が、その後2～3日して完全なヒドラに再生することが分かった。

次に、この外胚葉集合体の広がり運動（エピボリー）における個々の細胞の運動に関し、詳細な解析を行った。蛍光色素DiIを用い、外、内胚葉集合体いずれか一方の表面の一部を標識した後、両者を接触させ、エピボリーにおける標識細胞集団の分布、個々の標識細胞の位置関係の変化を追跡した。その結果、エピボリーの進行中、内胚葉集合体の全体としての形はほとんど変化しないにもかかわらず、その表面上において活発な細胞再配置運動が起きていることがわかった。内胚葉集合体上の外胚葉集合体との接触表面にDiI標識内胚葉細胞が位置する場合、エピボリーの進行とともに、標識細胞集団の分布面積が拡大し、個々の標識細胞間の距離が拡大した。それに対し、非接触表面においては、DiI標識内胚葉細胞が集合体内部に潜り込む細胞運動が見られた。これらの結果は、エピボリーの進行中、内胚葉集合体の外胚葉集合体との接触表面においては、集合体表面に位置する細胞の間に集合体内部の細胞が割り込むように侵入する細胞再配置運動（cell intercalation）が進行し、内胚葉集合体の非接触表面においては、集合体表面細胞の潜り込み運動（cell ingress ion）が進行していることを示すものと考えられた。

最後に、エピボリーをバイオアッセイ系としてヒドラの形態形成に重要な分子の同定を試みた。その結果、ヒドラ細胞膜分画のトリプシン可溶化物がエピボリーを特異的に阻害することを発見した。予備的な生化学的実験の結果としては、可溶化物中の活性分子は、

透析膜を容易に通過し、6NHC1高温処理やプロナーゼ処理によっても不活化されないことから非ペプチド性の低分子であることが推定された。さらにトリプシン可溶化物を内胚葉集合体表面の小領域に作用させると、その領域にcell intercalationと同様の活発な細胞運動を誘導できることを見出した。これらのことから、この分子はエピボリーにおける外、内胚葉細胞間のシグナル分子として、cell intercalationを活性化する役割を持っている可能性が大きい。

以上の解析結果により、このヒドラの再生系におけるエピボリー運動を起こす駆動力は外、内胚葉間の接触面を通じてのシグナル交換によって誘導されるcell intercalationであるとするモデルを提出することができる。このようなエピボリーにおけるcell intercalationは、無秩序な細胞塊状のヒドラの上皮細胞が、規則正しく一層に並んだ構造を回復しようとする上皮形成過程の一段階であると考えられる。ヒドラのエピボリーをモデル系として上皮形成のしくみをさらに詳しく調べることにより、動物界全般にわたる上皮形成機構を見い出せる可能性がある。

## 論文の審査結果の要旨

岸本康之君の博士論文は、外胚葉と内胚葉の2単層上皮構造を持つヒドラを実験材料として用い、これら2種類の細胞群の間の組織再構成と形態形成運動に関する新たな実験系を用いた研究の結果を述べたものである。

岸本君はまずヒドラの外胚葉組織と内胚葉組織を麻酔薬プロカイン処理によって分離し、各々の組織を単細胞に一旦解離して作った再凝集塊を接触させたところ、2種類の組織細胞の間での形態形成運動が起こって外胚葉が内胚葉を取り囲み、やがてヒドラ個体が再生することを見いだした。この組織再構成系では2種類の組織細胞を別々に蛍光色素などによって標識することが可能で、外胚葉と内胚葉の配置換えなどの形態形成運動を解析する新たな実験系として用いることができた。

この場合に最も予想される形態形成運動の機構は、通常の上皮組織の傷修復で見られるように外胚葉細胞層が内胚葉細胞塊の表面を移動して最後に内胚葉組織を包み込む細胞運動である。これが正しいなら、外胚葉細胞層の外周部は内胚葉組織表面に対してずれながら移動するはずである。岸本君は内胚葉細胞をDiI色素で標識し、外胚葉細胞にFITC標識されたビーズを貪食させて区別する方法を考案して実験を行った結果、このふたつの組織の間でのずれ運動が起きるのではなく、両者の標識された接触部分の細胞がほぼ同じ速度で同じ方向に広がり包み込む形の移動を行うことを発見した。そこで、岸本君は当初の予想とは異なる形態形成運動機構を検討したのち、内胚葉と外胚葉の細胞が両組織の接触面に向かって移動して既に接触面に配置していた細胞の間に割り込む運動 (cell intercalation) がここでみられる再配置運動の機構であると考えた。

一方、このような実験系を用いて、形態形成運動に影響を及ぼす生体活性分子を検索したところ、ヒドラ細胞膜分画のトリプシン可溶化物が包み込み運動を可逆的に阻害することを見いだした。生化学的予備実験から、この活性の本体が非ペプチド性の低分子である可能性を推定した。またこれを内胚葉細胞塊に対して局所的に作用させることによって、この活性は細胞運動の阻害ではなく、積極的に細胞の割込運動を活性化する働きを持つらしいことが明かとなり、形態形成運動に重要な役割を果たしている可能性が現れた。

このような内容を含む博士論文の評価としては、研究の各段階において複数の実験方法を用いた結果の再確認や細かな対照実験を十分に行うなどの点で幾分詰めの甘さも見られるが、この研究は岸本君が当初の実験系の開発の段階から自分自身で新たに考えて進めてきたものであり、組織細胞の再配置機構の解析から、最後には形態形成運動を制御する新しい分子の同定に発展するかもしれない可能性を提示する段階まで独自に推進してきた点で、極めて独創性の高いものと考えられる。従って、審査委員は全員一致で十分に博士論文に値する内容であると判断した。