

平成21年 5月27日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18700300
 研究課題名（和文） 初期胚パターン形成のプリミティブモデルの開発と応用
 研究課題名（英文） A primitive model and some applicable experiments for understanding the pattern formation in early embryogenesis

研究代表者

水野 寿朗 (MIZUNO TOSHIRO)
 大阪市立大学・大学院理学研究科・講師
 研究者番号：70336759

研究成果の概要：動物の初期発生において胚形態やサイズが各種の発生様式の決定に与える影響を明らかにするため、下等脊椎動物の典型的な発生様式に対応するモデルを提案し、関連する実験系を開発して提示した。胞胚期の中胚葉形成に与える細胞密度が関連すること、原腸胚期以後の正常な胴尾部形成には一定の卵黄サイズが必要であること、さらに器官形成期の体節数決定に胚サイズが影響することが示唆され、巨視的な胚空間の役割が生物学的に意義付けられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	500,000	0	500,000
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：生体情報

1. 研究開始当初の背景

多細胞動物の多様性を認識するうえで形態学的な情報の占める位置は絶対的なものがある。そのため近年、発生過程におけるパターン形成や形態形成の視点から動物進化を理解することの重要性が再認識されるようになった。また各方面からの生物多様性についての興味の高まりにより、生物形態そのものの魅力もまた一定の価値を帯びつつある。

動物の形態形成に関わる遺伝子群やそれ

らの相互の制御関係は極めて共通性が高いことが知られつつある。しかし相同的な遺伝学的メカニズムはある場合には類似したパターンを作り、またある場面では新奇な形態を生み出すことがあるが、その違いの理由を一般化することは難しい。

一方、動物の卵や胚は成体に比べて単純とはいえ、それ自体が分類群ごとに極めて多様な形態をもち、パターン形成や組織構築といった発生様式にもそれぞれ独特のものがある。胚形態の多様さは主に卵のサイズと細胞

の密度の不均一性によって特徴づけられる。しかし、卵や胚の形態による物理的な制約が発生様式に与える影響についてはこれまでほとんど議論されていなかった。

2. 研究の目的

以上のように胚発生に関する遺伝子群に代表される微視的なメカニズムの解明が進む一方で、胚自身が持つ巨視的な物理的条件との関係を積極的に捉え、また評価するための枠組みが欠如していた。本研究の目的は、初期発生の典型的な発生様式に対応するモデルを提案し、またこれに関連する実験系を開発して提示することである。

胚発生様式を総合的に理解できるモデルは、様々なスケールの要素をバランス良く含まなければならない。多種類の生体分子の同時観察や操作が事実上困難であることを踏まえると、単に微視的な多数の未知要素を含むモデルは適切ではなく、微視的要素と巨視的な空間要素が相互に依存・制約する関係に注目することが重要である。

巨視的な要素はこれまであまり還元の対象とされておらず、実験・観察上の取り扱いが十分に洗練されていない。そのため巨視的な要素をうまく掬い出す適切な実験系とそれを可能にする胚操作の手法を開発する必要がある。

3. 研究の方法

(1) モデルの検討

モデルの対象は、胚の構造が比較的単純で、動物発生学的に基本的な現象であり、実験形態学的な概念や解釈の整備されている、胞胚期から原腸胚期にかけての下等脊椎動物の三胚葉形成を取り扱うこととした。

微視的な生体分子の相互作用を表現するものとして、反応拡散モデルを中心に構成した。現実に胚発生を制御する生体分子の種類は極めて多数であるが、特定の胚葉は複数の分子種の集合的な発現の挙動として理解されうる。よってこれらの近似として、モデルは二因子を持つ一次式で解析の容易なものとした。

これに胚の空間的な要素として細胞密度の概念を導入した。動物極-植物極軸は三胚葉形成に関わる極性として重要であるが、外見的に細胞数の密度や細胞質と卵黄の比率など、生体分子の発現と相互作用の活性に関わる巨視的要素が明らかに認められる。よって、反応拡散モデルの反応項に空間的な活性の勾配を与え、動植物極軸の空間構造を表現した。

実験形態学的概念として知られる細胞質

因子や細胞間相互作用は、微視的な生体分子の反応と胚操作による巨視的な空間構造の両面の要素を、パターン形成や将来の形質との対応を通じて類型化したものと考えられる。これらの知見との関連を理解するため、モデル上での仮想実験を行い、またモデルが持つ空間的性質について数理的解析を通じ考察した。

(2) 胚操作手法の開発

初期発生時の胚サイズを体系的に操作する方法を確立するため、材料として魚類のゼブラフィッシュ胚を用いた。後述の方法で胞胚のサイズの縮小、サイズの復元、さらにサイズの大型化を試み、これらの原腸形成期前後の形態形成を継時的に観察し、また原腸胚期以後の形質との関連について変異の出現を調べ、形態形成に対する胚サイズの意義を考察した。

胚サイズの縮小は、既知の細胞質因子の攪乱による影響を防ぐため、主に胞胚期胚で卵黄細胞のガラス針による切除を行った。これまで卵黄細胞の全除去などは試みられていたが、胞胚サイズを比較的自由に調節できる部分切除の方法は報告されていなかった。

胚サイズの復元および大型化は、基本的に共通の手法に則って行った。第1の方法として、培養細胞や一部の海産動物卵で行われているポリエチレングリコール (PEG) と電気刺激による細胞融合法を応用した。核を含まない卵黄細胞の断片を作成して最大で2-3時間程度維持し、これを適宜の胚の卵黄細胞に融合し付加できる条件を見いだした。これにより、1個の大型細胞である卵黄細胞のサイズを比較的自由に扱うことが可能となった。第2の方法として、非親水性の油脂(流動パラフィンなど)を胚の卵黄細胞に注入し、胚サイズの復元を試みた。

形態形成運動の観察は、直接観察とタイムラプス撮影を併用して行った。本研究課題で準備した顕微鏡撮影システムにより、原腸形成や尾芽伸長の過程を長時間にわたり追跡することが容易となった。

4. 研究成果

(1) 胞胚の形態と中胚葉形成

胞胚-原腸胚期のパターン形成の問題として三胚葉形成に注目し、モデルの空間的な構造は両生類胚を基本とした。両生類の胞胚は細胞密度の連続的な勾配を持ち、動物極側が植物極側に比べて高い。三胚葉のうち中胚葉は胞胚の中緯度域に由来し、胞胚期に徐々に特異化されると考えられている。この特異化の機構は実験形態学的な知見を根拠として、胚誘導と細胞自律性の二つの考え方

がある。胚誘導による説は、動物極側組織と植物極側組織の外植体の接着 (Nieuwkoop 結合体) から生じる異所的な中胚葉性組織を根拠としている。細胞自律性による説は、予定中胚葉域の外植体や関連する細胞質因子の局在から説明されている。また、それぞれの説を支持する分子発生的な研究報告がある。

反応拡散モデルの拡散項を空間的に均一とし、反応項を動物植物極軸に沿った細胞密度を反映した連続的な勾配をもつものとする、あるパラメータ幅において構成因子が中胚葉特異化を模した挙動を示すことが知られていた (図 1)。また、これらのモデルは仮想的な胚操作実験により、胚誘導すなわち細胞間相互作用による中胚葉形成と、細胞質因子によるものとの双方を再現するものであった。

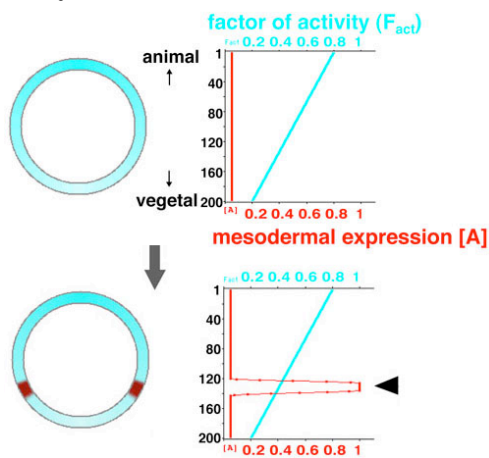


図 1 モデル上での予定中胚葉域

実際の胚操作では用いる移植片の大きさを正確に指定することは難しいが、モデルでは詳細な検討が可能である。外植体と作製その再接着を可能な組合せすべてについて検討すると、予定中胚葉域が失われた場合には、可能な限り本来の予定域に近い動物極側の組織で中胚葉域を形成する傾向がみられた (図 2)。

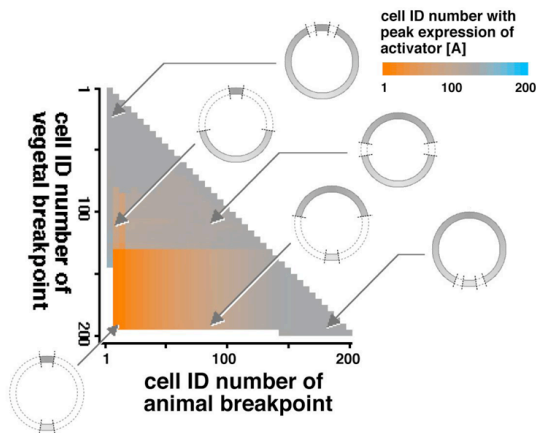


図 2 モデル上で可能なすべての Nieuwkoop 結合体の挙動

線形解析により反応項の定性的性質を調べたところ、正常胚モデルは解の振舞いの異なる三つの領域をもち、そのうち中緯度域は鞍点型の、また動物極側は結節型の不安定性を持つことが確認された。中緯度域の不安定性は細胞自律的な中胚葉形成に、また動物極側の不安定性は Nieuwkoop 結合体の胚誘導に対する反応能に寄与すると思われた。胚誘導と細胞自律性という二つの冗長なメカニズムが、ひとつの連続的な勾配から導き出される点が興味深い。

一方、このモデルは中胚葉形成するまでの挙動が初期値により不安定で、特に動物極付近は摂動に弱い印象があり、これは解析の示す不安定性の帰結として理解できる。実証的な観点からするとこの不安定性はモデルの弱点ともとれるが、実際の胞胚の動物極付近の面積は赤道域に比べ相対的に狭いため過度の不安定性は抑制されている可能性がある。そのため動物極付近の細胞の性質はモデルの価値を評価するうえで重要と考えられる。

脊椎動物の中胚葉形成の分子発生的なメカニズムは極めて共通性が高いとされるが、まったく形態の異なる胚の中でその働きがどのように保証されているのかについては良く理解されていない。たとえば、魚類胚の中胚葉形成は卵黄細胞からの誘導とされるにも関わらず、両生類胚での植物極側を性格付けるとされる相同分子が卵黄細胞側に局在しないなど、不可解な点が残されている。本モデルは両生類胚を意識したデザインだが、Nieuwkoop 結合体の細胞の配置は、魚類の正常な胞胚と良く似ている。特に、予定中胚葉域が巨大な卵黄細胞と隣接する細胞領域に現れることが重要である。本モデルは魚類胚の中胚葉形成を画一的な誘導現象とは異なる視点から解釈する余地を与えている。

胚発生をモデル化するにあたり、現実の転写調節因子ネットワークを模したモデルがあり得るが、基礎とする分子データを計算機上に移す際の恣意性が弱点となる。また胚の大きさや卵黄物質の分布状況など、所与の環境の重要性が見逃されがちである。一方で本研究では、詳細な分子的メカニズムはブラックボックスと捉えている。未知の要素を含む分子的相互作用を将来の特定の形質に対応づけて理解し、空間的な環境の意義を積極的に捉え、細胞質因子や誘導といった実験形態学的な概念との整合性を見いだしていく方向性が、今後必要になると思われる。

(2) 胞胚のサイズと胴尾部形成

既述の通り、実験形態学的手法から多くの細胞質因子や細胞間相互作用の存在について示唆が得られてきた一方で、胚サイズや組織の形状の変更について意識されることは

稀であった。

下等脊椎動物の胞胚は多くの場合球形に近く、各胚葉の予定原基の相対的な位置関係も似通っている。材料に用いたゼブラフィッシュは魚類胚の特質として、細胞の大きさが均一であり、盤割のため植物極側の大きな卵黄細胞が実質的に胞胚の形状を支配している。卵黄細胞は核を持つ部位が限られており、核にダメージを与えること無く胚サイズを操作する上で非常に都合が良い。

微細なガラス針を用いることで、胞胚期の卵黄細胞の一部を非破壊的に取除くことが可能であった。胞胚期に卵黄細胞の一部を除かれた胚は、後の胴尾部の形態形成に異常が生じることが明らかとなった。異常胚の胴尾部は本来直線的に伸長すべきところを背側に反り返った形態となった(図3)。異常の程度は卵黄細胞の除去率と関連しているが、直径の約3割以内の除去であればほぼ正常な

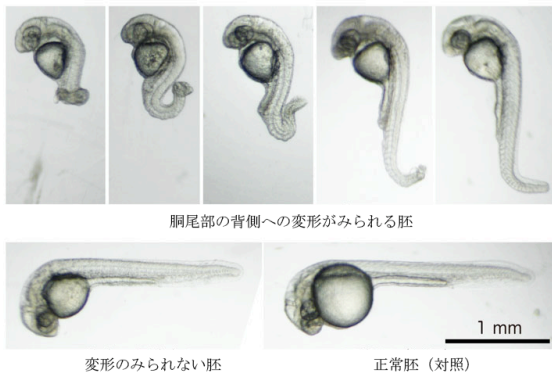


図3 胞胚期での植物極側卵黄細胞除去による胴尾部の異常

形態となった(図4)。

小型胚の発生過程を継時的に観察すると、被覆運動には滞りが無いが、卵黄閉鎖はむしろ正常胚よりも早期に生じ、胚盤縁辺域の拡大・縮小過程が正常胚と異なるタイミングで進行した。これは小型化した胚の下、細胞運動が正常な速度で進行したためと思われた。卵黄閉鎖後、正常胚の胴尾部は卵黄細胞に貼付く形で形成を始めるが、小型胚では総じて背側に突出する異常な形態を示した。これらの観察をふまえると、胴尾部の変形は各胚葉の予定域の空間配置が正常な細胞運動の結果として著しく変形した結果、背腹パターン等に異常を来したものと考えられた。しかし一部の小型胚は胴尾部の伸長に伴い徐々に正常な形態へと移行し、可塑的な修復が起こりうると思われた。

興味深いことに、卵黄細胞の一部を除去した胚は他の卵黄細胞の再移植(細胞融合)によって卵黄サイズを回復させると容易に救出できることが分かった。移植する卵黄細胞の由来や時期に特に制約は見られない。そのため胞胚期の卵黄細胞と胴尾部形成との関係は、初期卵割期に見られるような特異な細胞質因子による決定ではなく、物理的な空間

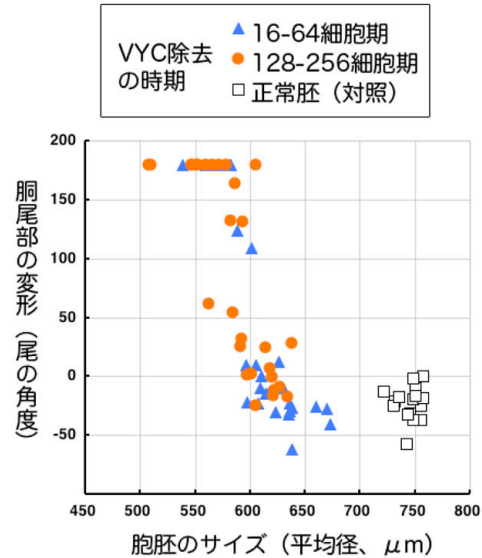


図4 胞胚サイズと胴尾部の変形の対応

サイズによる調節現象とみるのが理に適っている。

この点を厳密に確認するためには、胚サイズの回復に用いた卵黄細胞の断片による栄養的な環境変化の影響を排除する必要がある。また、同様の手法で胞胚を大型化した場合に逆のタイプの胴尾部異常が生じるのかも興味深い。残念ながら流動パラフィンなどの注入は死亡率が高く、再現性や簡便性の観点から有効な方法を得るには至っていない。また、大型化した卵黄細胞は被覆運動の妨げとなり観察の進展は乏しかった。

胚サイズの縮小に伴う異常と可塑的な修復現象は、最終的に正常な形態を担保しつつ、新奇な形態の出現の可能性をもたらしている。この多形発生的な状況は近縁種間にみられる形態的多様性との関連から興味深い。

(3) 胚サイズと体節を中心とする器官形成

原腸胚期以後の複雑な器官形成について、胚サイズといった物理的環境はどのように位置づけられるだろうか。形態学的に類似した近縁種同士は、一部の形質の違いが類別の決め手となることが少なくない。これを単に遺伝学的な変化の帰結と捉えるとそれ以上の一般化は困難だが、胚自身の空間のあり方から整理することはできないだろうか。

体節は脊椎動物胚の器官原基の一つで、胴尾部の傍軸器官として、また将来の椎骨や筋節の原基として重要である。また明瞭な繰り返し構造をもつ代表的な計数形質である。ゼブラフィッシュでは、正常胚の体節数は30(±1以内)である。正常胚の体節の配置を詳細に観察すると、体の前半部の前肛門領域では個体差が無く、極めて安定した計数形質であることが確かめられた。前肛門領域の体節は将来の胸椎に対応する原基であり、分類学的な形質として重要である。

このようなゼブラフィッシュ胚について、これまでと同様の方法で胞胚期に胚サイズを小型化すると、前肛門領域の体節数の変化は無いことが分かった。つまり、器官形成の過程で個々の体節サイズは正常胚より小型に調節されていた。

一方、PEG と電気刺激により卵割期の胚を2個融合し、大型の胚を作製すると、前肛門領域の体節数が増加する傾向が見られた。このことは、体節のサイズをより大型に調節する能力には限界があり、胚サイズの大型化によって胸椎数も増加する可能性がある。

胚を大型化する実験系は発展途上であるため今後より厳密な確認が必要であるが、これらの現象は形態の多様化について興味深い予測をもたらす。すなわち胚の大型化によって少なくとも体節数については形態変異の出現する可能性があり、必ずしも体節形成に直接関連する遺伝学的なメカニズムが変異している必要は無い。なおこの項は修士課程大学院生の研究による。

(4) 展望

動物の進化を考えると、共通性の高い遺伝学的メカニズムのもとでいかにして多様な形態が出現したかを説明することは容易ではない。しかし胚は、外部からの操作に対しその状況次第で強靱性と脆弱性の両面性を持ち、同じ遺伝学的背景を持ちながら異なる形態形成を行うことがある。実験形態学の胚操作はもともとは特定の分子的背景の期待される細胞や組織の攪乱を意図したものであったが、実際には胚細胞の置かれた物理的環境をも操作している。胚の細胞密度や胚サイズといった物理的環境の変化は進化の過程で遺伝学的にも生じうるが、例えば栄養要求性の変化による卵巣の肥大化や卵黄蓄

積能の変化、あるいは排卵時期の変化といった、形態形成のメカニズムとしては意外で、なおかつ多様な分野に及ぶものである。本研究はプリミティブな形ながら、胚形態そのものと形態形成との関連についてコンセプトを示したものであり、側面的視点から進化的多様性の出現メカニズムについて示唆するものである。将来、古典的な実験形態学的知見についての再解釈や、他の未解決の形態形成問題への足がかりとして、より洗練された形での発展が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

①水野寿朗、ゼブラフィッシュ胚の卵黄サイズと胴尾部形成過程、2008年度日本魚類学会年会、2008年9月21日、松山

②水野寿朗、中胚葉形成の数理モデル、日本動物学会北海道支部第518回支部講演会、2007年3月9日、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 寿朗 (MIZUNO TOSHIRO)

大阪市立大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：70336759

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし