

氏名・(本籍)	さとう みか 佐藤 美香		
学位の種類	理学博士		
学位記番号	理博第 1102 号		
学位授与年月日	平成元年 1 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 生物学専攻		
学位論文題目	ヒドラ解離細胞再集合体を用いた無構造系からのパターン形成の研究		
論文審査委員	(主査) 教授 竹内 拓司      教授 小西 和彦 教授 沢田 康次 助教授 井出 宏之		

## 論 文 目 次

第一章 序 論

第二章 材料と方法

第三章 実験結果

第一節 解離細胞再集合に於ける頭部構造の形成

第二節 モノクローナル抗体 TS-19 による解離細胞再集合体の再生初期過程の解析

第三節 組織片混入再集合体の再生

第四節 数値計算によるシミュレーション

第四章 討 論

第五章 要 約

謝 辞

引用文献

図 表

付 録

# 論文内容要旨

## 第一章 序論

生物に於ける構造はどのようにして形成されるのか、これは発生生物学の重要課題のひとつである。本論文では、この課題へのひとつの巨視的レベルでのアプローチとして、単純な一次的体制と強い再生力を持ち、また、体軸上の位置が細胞分化や形態形成に重要な役割を果たすことが知られている、淡水産刺胞生物ヒドラの解離細胞再集合体(野田, 1971 ; Gierer et al, 1972) を用いた実験を行った。

ヒドラ体幹部から組織切片を取り出した場合、頭部構造、神経細胞分布、刺細胞分化パターン等は、既存の軸に沿って再構成される。しかし、解離細胞再集合体は、細胞を解離後ランダムに混合、機械的に再集合させた系であるので、その初期状態は、無軸・無構造であり、体軸は新規に確立されねばならない。より対称性の高い状態から、どのような過程を経て体軸が構成されるのか、また、どのようにその一次的な体軸上に各パターンが再構成されて行くのか、これらを探る目的のために、解離細胞再集合体は優れた系である。

本論文では、頭部構造パターン形成に注目し、一旦攪乱を受けた頭部パターンが再構成される過程について、その機構を探る研究を行った：インタクトのヒドラでは、頭部構造は体軸の一極である口丘とそれを取り囲む数本の触手からなっている。解離細胞再集合体からの頭部再生の際に、口丘と触手との相関がどのようにして生じて来るのか、その過程が再集合体の構成細胞の由来やその細胞の状態にどのように依存するのかについて調べた。

## 第二章 材料と方法

### 第三章 実験結果

#### 3-1 解離細胞再集合体に於ける頭部構造の形成

- (1) 再生過程定常期での総触手数は再集合体の表面積に比例関係を持つ。この事から、様々なサイズの再集合体に共通のパラメーターとして、再集合体の表面積が採用された。
- (2) 定常状態での触手のほとんどが口丘周囲に局在する触手（口丘触手）である事、口丘数に表面積依存性がある事、一口丘あたりの口丘触手数に定常値が存在する事から、定常状態に於ける触手数の表面積依存数は、口丘を介した間接的な関係であると考えられる。
- (3) 口丘周囲に局在せず、かつ、口丘への反応性も持たない胴部触手が、再生過程中出现するが、その後定常期へ至る過程で、選択的に胴部へ吸収され消滅する。一方、口丘触手は増加し、結果的に、触手分布は口丘の周囲に限定される。
- (4) 頭部由来の組織を含む再集合体では、再生過程中間期での触手の半数が胴部触手であり、これらは表面積に直接の比例関係を持っている。
- (5) 頭部由来の組織を含まない再集合体では胴部触手はほとんど形成されず、触手は初めから

口丘周囲に局在する傾向を持ち、定常状態へ達する時間も短い。しかし、細胞解離前に再生時間を与える事により、再生時間に応じた胴部触手数が増大が観察される。

### 3-2 モノクローナル抗体 TS-19 による、解離細胞再集合体の再生初期過程の解析

触手上皮細胞上に抗原を持つモノクローナル抗体 TS-19 (Bode, et al, 1988) を用いて、頭部由来の組織を含まない胃域から作られた再集合体 (G), 頭部から作られた再集合体 (H), 24 時間再生時間を与えられた胃域部から作られた再集合体 ( $RG_{24}$ ) の三種類の再集合体について、再生初期過程を調べた。

- (1) TS-19 結合性はすべてのタイプの再集合体で、触手形成以前に観察された。TS-19 結合域は個々の TS-19 (+) 細胞の集合であり、各細胞の境界は明確である。
- (2) 再生開始後 6 時間で、再集合体 H 及び  $RG_{24}$  で部分的 TS-19 結合域が観察され、蛍光強度として測定される一細胞当たりの抗原密度の、細胞間の分散が大きい。しかし、再集合体 G では、この時期は全域で結合性は見られない。
- (3) 再集合体 G では、空洞化期にかけて、蛍光強度が指数関数的に増大し、H 及び  $RG_{24}$  に比べ蛍光強度は低いものの、ほぼ全域での TS-19 結合性を観察できる。
- (4) TS-19 (+) 細胞が、口丘出現前の触手を中心とした非触手部で観察された。
- (5) 胴部触手・口丘触手間での TS-19 結合性の定性的・定量的差はなかった。
- (6) 未完成口丘に TS-19 結合性が観察された。

### 3-3 組織片混入再集合体の再生

組織片を混入させた再集合体を用いて、周囲よりも頭部形成能の高い既存の構造が再集合体再生に与える影響を調べた。

- (1) 再集合体 (“基質部”) の由来した組織よりも位置的に頭部に近い組織片 (“種”) を混入した場合、組織片における頭部形成時期は、解離細胞再集合体部での頭部形成時期よりも早い。再生開始後 5 日を過ぎるまで “基質部” での頭部構造形成が抑制される場合も観察された。
- (2) (1) の組織片混入再集合体で形成された最終的な口丘数も、対照 (“基質部” のみの再集合体) に於ける口丘数に比べ、低く抑えられる傾向が見られた。
- (3) 再集合体の由来した組織と同位値の組織片を混入した場合、“基質部” での頭部構造形成時期の遅れは観察されなかった。

### 3-4 数値計算によるシミュレーション

反応拡散モデルのひとつである Mac Williams (1982) の式を、解離細胞再集合体系に適用し、シミュレーションを行った。前節 (1~2) で得られた結果が、頭部形成活性因子・阻害因子の相互作用による現象として説明可能か、検証を試みた。ここで、頭部形成活性因子及び阻害因子は、各々、頭部形成能勾配及び頭部形成阻害能勾配 (何れも、移殖実験からその存在を知る事ができる。ピークはともに頭部にある。) を成立させている物質 (複数であってもよい) と考える事ができる。

- (1) 実験結果第二節に於ける再集合体 G の、TS-19 結合性の初期変化 (再生開始後 30 時間でみ

られた蛍光強度の全部域的上昇)は、頭部形成活性因子値の全域的な上昇として、今回のシミュレーションで表現される。

- (2) 今回の計算条件下では、頭部を含む再集合体を想定した計算では、頭部を含まない再集合体を想定した計算に比べ、頭部形成活性因子値のローカルピーク数が多く、かつ、その持続時間が長かった。
- (3) 解離前に再生時間を与えられた組織由来の再集合体を想定した計算の結果は、“頭部を含む再集合体”の計算結果と類似する。
- (4) 今回の計算条件下では、頭部形成活性因子値の最終的ピーク数は、三種類の計算間でかわらなかった。

#### 第四章 討 論

実験結果から得られる考察及び本論文の結論を以下に述べる。

- (1) ヒドラの一次的体制を乱した状態、つまり、解離細胞再集合体では、頭部構造数はその表面積に比例する。つまり、形態的制約がない場合は、細胞層を二次元方向に伝わる情報により、その数の決定が行われる事が示唆される。
- (2) 定常状態の再集合体上の触手は、インタクトのヒドラと同様に数・位置ともに、口丘に支配されている。しかし、頭部を含む再集合体及び再生時間を与えられた組織から作られた再集合体の、再生過程に現れる胴部触手は、表面積に直接の比例関係を持ち、かつ口丘周辺に局在しない。従来、“頭部構造”として口丘と一体の構造とみなされていた触手は、一時的には、口丘と独立に形成される事が可能であることがわかった。
- (3) 解離以前の再生時間の増大に応じて、その組織から作られた再集合体の形成する胴部触手数が増大する。この事は、再生過程に現れる胴部触手形成は、その再集合体の持つ頭部形成能の初期レベルの高低に関連する事を意味している。特に、TS-19 結合性の結果から、再集合体上での頭部形成能レベルの空間的ゆらぎ（換言すれば、頭部形成能勾配を構成する物質の、濃度の空間的ゆらぎ）の振幅の大きさが、多数の胴部触手の形成に関与していると思われる。
- (4) 将来の頭部が形成される位置は、元頭部に近い由来の細胞の、分布の偏りが影響を与える可能性が強い。
- (5) Berking (1979), Bode (1987, 1988) は、実験から、頭部再生時の頭部形成能勾配中で、最終的なピークレベルでは口丘に、ピークよりもわずかに下がったレベルでは触手に特殊化するという、ステップ方式の解釈が行われているであろう事を示した。口丘触手数と胴部触手数の再生過程での時間発展の違い、その位置の違い、実験結果第三節の結果、及び反応拡散モデルを用いたシミュレーションの結果から、次の事が考えられる：胴部触手は、頭部形成能勾配を構成する物質濃度のローカルピークに対応して形成される。これに対し、口丘触手は、周囲から突出した最終的なピーク（口丘に対応する）の中腹、触手形成レベル部分に対応して形成される。

## 論文審査の結果の要旨

ヒドラの再生は、多細胞生物のパターン形成のモデルとして古くから使われてきた。この再生では、切り出した組織片に既に存在する軸に沿って、パターンが再構成される。しかし最初にこの軸が存在しない場合、つまり解離細胞で集合体を作り発生させたとき、どのようにして軸が形成され、パターンが再構成されて行くのかについては、ほとんど研究がない。本論文は、再集合体でのパターン形成、特に口丘、触手という頭部構造の形成過程を明らかにし、その過程が、構成細胞の由来にどのように依存するかを明らかにしものである。

胴部由来の解離細胞再集合体が頭部形成過程の定常状態に入った時の総触手数、総口丘数は共に再集合体の表面積に依存するが、この触手のほとんどが口丘周囲に局在する触手（口丘触手）である事、一口丘当たりの口丘触手数に定常値がある事から、口丘触手の数と位置は口丘に支配されている事がまず明らかになった。

一方、頭部を含む再集合体で一時的に出現する胴部触手は口丘とは独立に形成され、この胴部触手形成能は再集合体構成細胞の頭部形成能レベルに関連することが明らかになった。

触手に特異的な抗体 TS-19 の結合性は、触手形成以前のすべてのタイプの再集合体で認められたが、頭部形成能の高い細胞を含む再集合体では、結合性に関して細胞間に大きな分散が見られた。

これらの実験結果および反応拡散モデルを用いたシミュレーションの結果から、胴部触手は、頭部形成能に関連する物質濃度のローカルピークに対応して形成されるのに対して、口丘触手は閾値を越えたピーク（口丘に対応）の中腹部分に対応して形成されると推定した。

これらの成果は、ヒドラのパターン形成に関する新しい知見であり、ヒドラのみならず他の多細胞体制の形成機構の解明についても大きな寄与をするものと考えられる。従って、この論文は、著者がこの分野において自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示しており、よって佐藤美香提出の論文は理学博士の論文として合格と認める。