

博士学位論文審査要旨

氏 名	市 川 麗 子
学 位 の 種 類	博士（理学）
学 位 記 番 号	博甲第 284 号
学位授与の日付	2022 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文の題目	有尾目両生類幼生の外鰓における機能形態に関する研究
論 文 審 査 委 員	主査 神奈川大学 教授 豊 泉 龍 児 副査 神奈川大学 教授 泉 進 副査 神奈川大学 教授 大 平 剛 副査 神奈川大学 教授 小 谷 享

【論文内容の要旨】

【博士論文の構成】

市川麗子氏が執筆した本博士学位論文は、両生類の幼生期の呼吸器官である外鰓について、有尾目両生類を主な実験材料として実験研究した内容をまとめた博士論文である。動物学、中でも機能形態学の視点から、外鰓に生える繊毛の機能ならびに分岐形態形成(枝分かれしつつの外鰓の成長)について研究した、二章構成の博士論文となっている。

【博士論文の研究の背景】

後生動物は多数の組織細胞が集まって出来ている。からだの内部の組織細胞も、表皮細胞同様に呼吸する必要があるため、後生動物では呼吸器や循環器が進化してきた。両生類は生殖のために環境水が必要な脊椎動物であり、受精ならびに胚期から幼生期にかけての生活史の初期には淡水環境が必要になる。両生綱は 3 つの目からなり、それぞれ有尾目(イモリ、アホロートル、サンショウウオの仲間)、無尾目(蛙の仲間)、無足目(アシナシイモリの仲間)とよばれる。

両生類は胚期の後期から幼生期にかけて呼吸器官である外鰓を発達させる。3 つの目の全ての両生類の幼生で、外鰓が形成される。無尾目の外鰓は、おたまじゃくしの時期の初期にごく僅かな期間のみ維持される一過性の器官であるが、有尾目においては、幼生期の後期に至るまでのかなり長期間、外鰓が主要な呼吸器官として機能する。有尾目のアホロートルの仲間では、**neoteny** とよばれる幼形成熟個体において、終生外鰓が維持されることがある。有尾目の外鰓は、頭部後方腹側の鰓弓領域から 3 対のそれが、あたかも旅客機の主翼のような形状で突出する。これを **rachis** (pl. **rachises**) と呼ぶ。更に、**rachis** から細かい枝が後方腹側に分岐して形成される。これを **fimbria** (pl. **fimbriae**) と呼ぶ。

市川氏は、両生類への興味から、配属先の豊泉龍児研究室で飼育されていたイベリアトゲイモリ (**Iberian ribbed newt, *Pleurodeles waltl***) の幼生を観察し、非侵襲的に内部が透けて見える外鰓が、組織分化や形態形成の良い研究モデルになるのではないかと閃いた。イベリアトゲイモリは、前世紀の前半には、ヨーロッパの研究者によって両生類の比較発生学の研究対象として多用された時期があり、原腸形成運動などの初期発生の研究モデルとして、しばしば研究されてきた、古典的なモ

デル生物である。市川氏は、無染色組織を観察しやすいレリーフコントラストモードを備えた培養倒立顕微鏡や実体顕微鏡を用いた基礎的な観察を出発点として、イモリの外鰓に活発な繊毛運動があることを見出した。綿密な文献調査から、イモリの外鰓に繊毛が生えていること自体については古典的な文献があったが、その発生生理学的な意味については全く研究されていないことを知った。そこで外鰓の繊毛の研究を博士論文の出発点とした。

【第一章：有尾目両生類幼生の外鰓における繊毛細胞の役割に関する研究】

博士論文の第一章として、イモリの外鰓に生える繊毛の機能形態について研究した。まず、走査型電子顕微鏡を用いた高倍率観察と、繊毛特異的なマーカー蛋白質であるアセチル化チューブリン(acetyl-tubulin)に対する抗体を用いた蛍光免疫染色の技法から、イベリアトゲイモリの繊毛細胞は多繊毛細胞(multi-ciliated cell)とよばれる1個の細胞に多数の繊毛が生えるタイプの繊毛細胞であることを突き止めた。蛍光免疫染色に共焦点レーザー顕微鏡による蛍光3D画像の再構築などの技法を組み合わせ、イモリの外鰓の幹に相当する部分であるrachisesが伸長する発生段階では、rachisesの長軸と直交するように、繊毛が円環状に繰り返し分布することを発見した。そして、fimbriaeがrachisesから分岐し始めると、今度はfimbriaeの表面の繊毛が円環状に整列し、細枝状のfimbriaeの長軸に直交する円環状の配列を繰り返しつつ生えることも発見した。

繊毛は有効打と回復打を繰り返す往復運動をすることが多く、上皮の繊毛細胞の場合には、有効打は繊毛流(ciliary flow)とよばれる水流を生起することが、様々な動物の上皮組織において知られている。外鰓の多繊毛細胞の繊毛打の方向を、1000 fpsのハイスピードカメラを装着したレリーフコントラストモードの培養倒立顕微鏡で観察すると、rachisの繊毛打もfimbriaeの繊毛打も、それぞれ、付け根側から先端側に向かって有効打を打ち続けることが分かった。その極性のある繊毛打の結果として生成される繊毛流は、rachisの前方表面では、外鰓の表皮直下を走行する血管の血流の向きと対向流を成すことを見出した。繊毛流の高精度の検出にはpolystyreneビーズを懸濁した人工淡水や流体力学の分野で用いられるソフトウェア解析手法(PIV; particle image velocimetry)を用いた。対向流は、魚類の鰓システムにおいては、環境水中の溶存酸素を高効率で取り込む方式であることが知られているが、その有尾目版を発見したことになる。fimbriaeの生起する繊毛流も、その付け根側(幼生個体の頭側に相当)から先端側(幼生個体の尾側に相当)に向けて流れることを見出した。外鰓のまわりの水流が確かに繊毛運動が生起するものであることを実証するために、短時間エタノール溶液に幼生を浸漬して脱-繊毛状態にしたところ、外鰓まわりの水流が停止することを見出した。更に、切り出して外植体として培養した外鰓の周りにも、無傷(intact)な状態の外鰓と相同な繊毛流が生起することを見出した。

第一章の展開においては、比較発生学的な研究の拡張も行った。イベリアトゲイモリ幼生の外鰓について市川氏が独自に得た知見が、たまたまいベリアトゲイモリに適用される、いわばローカルルールであるのか、はたまた進化生物学的に保存された有尾目に共通するルールであるのかを検証するために、メキシコサンショウウオ(*Ambystoma mexicanum*)、クロサンショウウオ(*Hynobius nigrescens*)、カスミサンショウウオ(*Hynobius nebulosus*)、ヒダサンショウウオ(*Hynobius kimurae*)の4種の幼生を入手して、繊毛特異的なマーカー分子のacetyl-tubulinに対する抗体を用いた蛍光免疫染色実験やpolystyreneビーズ懸濁人工淡水を用いた繊毛流の調査を行った。その結果、イベリアトゲイモリと同様の特徴的な繊毛分布や繊毛打を、他の有尾目両生類幼生の外鰓も有していることが分かった。更に、ごく一時期形成される無尾目の幼生の外鰓についても、本質的には同じ繊毛分布と繊毛流が生成されることを、アズマヒキガエル(*Bufo japonicus formosus*)とカジカガエル(*Buergeria buergeri*)の2種の無尾目幼生(おたまじゃくし)を用いて突き止めた。

【第二章：有尾目両生類幼生の外鰓における形態形成に関する研究】

第一章の研究結果から、有尾目の外鰓はその表皮表面の微細構造である繊毛の分布や繊毛打の方向性を繊毛に調節することで、環境水中からの酸素取り込みの効率を極大化していることが強く示唆された。いうなれば、外鰓表皮の微細形態の機能形態学的な意味を解明するという成果を得た。そこで、市川氏は、表皮の繊毛分布の基盤となる、外鰓の盛んに分岐する形態形成の分子機構の解明にチャレンジすることを考えた。外鰓は、咽頭領域(鰓弓領域)から派生する、咽頭派生体(pharyngeal derivatives)である。発生生物学領域の文献を調査して、(1) この領域に発現することが無尾目ツメガエル後期胚で知られている、(2) 胚など分岐形態形成をする器官で発現し、機能することが知られている...の 2 条件を満たす分子として、ペプチド性の成長因子(細胞間コミュニケーション分子)である Wnt が挙げられることに気付いた。そこで、分岐形態形成する発生段階の外鰓を切り落として total RNA を得て、独自に PCR 用 primer pair を設計した上で、RT-PCR 法(reverse-transcription polymerase chain reaction, 特定配列の mRNA の発現を電気泳動法により検出する技法)によって、イベリアトゲイモリの Wnt family メンバーの ligand (受容体に結合するシグナル分子本体)の検出を試みた。NCBI (米国国立医学図書館の一部門)の遺伝子データベースに登録されていたイベリアトゲイモリの *wnt-5a*, *wnt-7a*, *wnt-10a* の検出を試みたところ、これらの 3 遺伝子の mRNA が共に外鰓に発現していることを見出した。そこで市川氏は、自身で作成した digoxigenin 標識 probe をもとに wholemount *in situ* hybridization (胚など、まるごとの個体や組織中での特定の配列をもった mRNA を検出する技法)を駆使して、これら 3 つの Wnt シグナルの ligand の局在(局所的な発現)の可視化を試みた。RT-PCR 法による結果と一致して、外鰓の起源組織である鰓弓や形成途中の外鰓やその近傍に *wnt-5a*, *wnt-7a*, *wnt-10a* が発現することが分かった。新知見である。

第二章の研究の展開については、Wnt シグナルの受容細胞において多様な細胞内経路が機能することが知られているが、外鰓の形成にかかわる最もコアな Wnt シグナル伝達経路の同定にチャレンジした。まず、薬理的なアプローチにより、Wnt シグナルが外鰓の形態形成に本当に機能することを実証する実験を行った。Wnt シグナルの ligand である Wnt の分泌を抑える Wnt 特異的な阻害剤 Wnt-C59 をイベリアトゲイモリ幼生、メキシコサンショウウオ幼生、カスミサンショウウオ幼生に投与した。その結果、外鰓の低形成や無形成が生じた。更に、上記の Wnt-C59 とは構造が異なる Wnt 分泌阻害剤である LGK-974 をイベリアトゲイモリ幼生に投与しても、外鰓の低形成や無形成が生じることを見出した。次に Wnt シグナルの受容細胞の細胞内で働く様々なエフェクター分子に対するシステムティックな阻害実験を行った。そして、Wnt 受容細胞の三つの細胞内経路(古典経路、PCP 経路(planar cell polarity [平面内細胞極性]経路)、Ca²⁺依存性経路)のうち、PCP 経路の下流で働くリン酸化酵素(kinase)である JNK (c-Jun N-terminal kinase)の作用機序の阻害剤である SP600125 の投与によって、外鰓の rachises (外鰓の幹の部分)は無傷のままであり同腹対照群の幼生とその太さや長さが変わらないにもかかわらず、fimbriae(分岐する細枝)の形成が特異的に妨げられることを見出した。つまり、市川氏は、Wnt 下流の細胞内リン酸化酵素である JNK とその下流の転写因子 c-Jun は、rachises の形成にはかかわらず、fimbriae の形成にのみ本質的に関与することを発見した。更に、JNK に対する抗体を用いた蛍光免疫染色法により、rachises の後方寄りに、rachises の付け根から途中まで JNK 陽性の索状組織が分布し(外鰓内部の筋層と思われる)、その索状組織の前端部は、丁度 fimbriae の一番先端の基部に位置していることを見出した。そして、JNK 阻害剤 SP600125 の投与によって、外鰓内部の JNK の発現は減弱した。

第 2 章の結果を俯瞰すると、市川氏はイベリアトゲイモリをはじめとした有尾目両生類の外鰓形

成において、Wnt 経路が *rachises* や *fimbriae* の形成に関与し、そのなかでも JNK 依存性の細胞内シグナル伝達経路が *fimbriae* の分岐形成に特異的に関与することを見出したと云える。比較進化学的な興味から市川氏は研究を更に深め、アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)、カジカガエル(*Buergeria buergeri*)、タゴガエル(*Rana tagoi*)の 3 種の無尾目幼生の咽頭領域(外鰓の起源組織)の形成についても Wnt 経路が関与することと、外鰓が退縮すると同時に形成される、おたまじやくしの鰓蓋の形成にも Wnt 経路が関与することの二つを強く示唆する実験結果も得ている。

【本博士論文の実験結果に基づく総考察】

市川氏の博士論文は、有尾目の外鰓について、第一章ではその表皮の微細構造のミクロな機能形態学的な研究を、繊毛形成と繊毛流をキーワードに行った。また第二章では、外鰓のマクロスケールの機能形態学的研究を、分岐形態形成をキーワードに行った。第一章の成果と第二章の成果をあわせて考察すると、無力な幼生期を強かに生き抜こうとする有尾目幼生の生存戦略が浮かび上がって見えてくると市川氏は総考察で述べている。即ち、有尾目幼生の呼吸器官である外鰓は、魚類の仔魚や稚魚のように徒に泳ぎ回ることによって捕食者に見つかることを避けるべく、いわば「ステルス戦略」の方向に進化したと提唱している。静止して水底で息を潜めつつ、外鰓の形態自体を Wnt 経路依存的に盛んに分岐させ、なおかつ多繊毛細胞の生成する繊毛打の方向を対向流を成すべく制御することで呼吸効率を高め、有尾目幼生が動かずにいても必要とする十分な酸素量を獲得する方向に進化したというのである。無尾目の後期幼生は、咽頭領域を鰓(ふいご)のように動かしながら、ゆっくりと遊泳することで、内鰓に環境水を取り込み、呼吸孔から呼吸水を吹き出す必要がある。一方で、有尾目両生類の幼生は、完璧に静止した状態で長時間水底に留まり続けることが出来る。両生類の自然誌を識る者ならば誰しも知っている、イモリ幼生やサンショウウオ幼生の生態や行動様式に、分子生物学的、発生生理学的な多様なテクニックを駆使して、分子機構のレベルでの理解と裏付けを与えたのが市川麗子氏の執筆した本博士論文であると云える。

市川氏は、総考察の項の後半では、両生類学の枠組みを越えて、真正後生動物(組織や体軸をもつ多細胞性動物)の呼吸器官の系統進化や、脊椎動物の呼吸器官の組織分化について、内外の研究状況と自身の研究結果を比較参照して、本博士論文が得た知見の意義についても総合的に考察している。

【論文審査の結果の要旨】

両生類の外鰓の正常発生や形態形成を扱った先行研究は極めて乏しい。その状況下で、本研究が外鰓の正常発生に関して理解を深める博士論文としてまとめたことは、両生類の動物学、なかでも動物発生学分野の進歩にとって喜ばしいことである。動物発生学分野では、正常発生上の新知見を記した論文は、未永く引用される。従って、第一章で記された繊毛配列や繊毛流に関する新発見は、今後の「外鰓学」において、現代と未来の研究者にとって基盤的な内容になると想定できる。

博士論文から読み取れる実験量は膨大で、課程博士の 5 年間の時間の中で、特に新型コロナの影響下での博士後期課程の 3 年間の様々な困難の中で、よく実験していることが分かる。一人の院生の個人研究としての本研究が、外鰓の分岐形態形成における Wnt 経路の関与の実証のみならず、その subcellular な player のリン酸化酵素 JNK の同定にまでたどり着いたことは、瞠目に値する。また、実験のアイデアや研究方針についても多角的、複合的な論証を意識して賢明な組み方をしていいる。引用文献は膨大で、外鰓について実験研究をしつつ、動物発生学、発生生理学、比較進化学の分野から幅広く文献を渉猟し、バランス良く精読していることが読み取れる。そして本博士論文

は、関連諸分野の研究の展開の中で、本研究の位置づけと新規性についての的確に記述していると読み取れる。今後の市川麗子氏の研究活動においては、進歩の速い繊毛研究についての細胞生物学的な教養を磨き、実験技術の絶え間ないバージョンアップが期待される。

第一章の研究内容は、世界の最大手の学術出版社である Springer 社から刊行されている *Zoomorphology* 誌に、市川麗子氏が第一著者の英文 *peer review paper* として 2020 年 2 月に出版された。*Zoomorphology* 誌は、動物形態学、進化発生学分野の老舗の雑誌で、約百年前の 1924 年 4 月創刊の学術雑誌である。そのような由緒ある学術雑誌に掲載されたことで、第 1 章の内容の重要性が忘れられずに後生に伝わるであろうことは意義深い。

第二章で述べられた、Wnt シグナル伝達経路が外鰓の分岐形態形成の分子機構に関与するとの内容は、分子生物学的なテクニックを駆使し、丁寧で多角的な切り口で複合的に実証されていて、いわば「外鰓の分子発生学の事始め」的な内容になっている。第二章で得られた実験結果については、市川麗子氏が今後も研究活動を継続し、なるべく早く学術雑誌に投稿することが望まれる。第二章の研究内容は、進歩の早い哺乳類の幹細胞生物学、なかでも肺オルガノイド形成(幹細胞から肺を器官構築する研究)の競争的な研究分野に対して、示唆に富む知見をもたらしている。

以上の論文審査結果から、本博士論文の執筆者である市川麗子氏が精深な学識と高度な研究能力を十分に備えていることを審査員全員が認め、合格と認定した。

(以上)