

博士論文番号：1481006

ゼブラフィッシュ胚側線形成時の
集団移動する細胞と周辺細胞との関係性

唐岩 藍翔梨

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 遺伝子発現制御研究室

(別所 康全 教授)

平成 30 年 3 月 15 日提出

目次

序論	3
材料と方法	14
結果	18
考察	32
謝辞	36
参考文献	37

序論

細胞の集団移動

生物の体には、特異的な機能を持つ器官が多数存在し、それらは、体の適切な場所に配置されている。例えば心臓や肝臓などは、それぞれ体内の左と右にずれた位置に1つ形成されているが、その器官前駆細胞は、初期胚では、左右に器官原基が出現し、その後、2つの原基が融合しながら、体内の適切な位置に再配置されている。この再配置に必要な現象が細胞移動である。細胞移動とは、アクチンなどの細胞骨格を利用して細胞が自ら動く現象のことで、細胞が1つで移動する単独移動と、いくつかの細胞が集団を形成しながら一緒に移動する集団移動の2つに大別される（図1）。

細胞の単独移動には、低分子量Gタンパク質RhoファミリーのCdc42, Rac, Rhoによる細胞骨格形成が関与することが知られている（Ridley et al., 1992; Etienne-Manneville et al., 2002）。細胞の進行方向に存在する膜ドメイン（leading edge）では、Cdc42が活性化され、その標的タンパク質Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP/WASP)が活性化し、アクチン核化形成因子Arp2/3と複合体を形成して、進行方向に向かったアクチン重合を促進することで糸状仮足が形成される。また、Racが活性化された場合は、Cdc42と同様に細胞のleading edgeで、標的タンパク質WASP like Verpolin-homologous protein (WAVE)を介し、Arp2/3と複合体を形成することで葉状仮足やラフリングの形成を促進する。一方、細胞の進行方向の逆側では、Rhoが活性化することにより、標的タンパク質であるRho-associated kinase (ROCK) とForminを介して、アクチンとミオシンの複合体からなるストレスファイバーと接着斑の形成が促進され、細胞の後方が細胞外基質から剥がされる。このように、細胞の進行方向では糸状仮足と葉状仮足が形成されることにより細胞が進行方向に伸長していき、反対方向ではストレスファイバーが収縮し、接着斑と細胞外基質との接着がはがれるため、細胞は糸状仮足と葉状仮足のある方向へ移動できる（Etienne-Manneville et al., 2002）（図1A）。また、細胞が突起を伸ばす方向を決めるメカニズムとしては、走化性因子であるケモカイン、FGF、VEGFの濃度勾配に沿って移動することが知られている（Friedl et al., 2009; Reig et al., 2014; Scarpa et al., 2016）。これらのシグナル以外にも方向性を決める因子として、細胞外基質が挙げられる。細胞外基質の一種であるFibronectinが阻害されると、移動方向が定まらなくなることから、Fibronectinと細胞接着分子Integrinとの接着斑の形成が移動方向決定に関与することが示唆されている（Scarpa et al., 2016）。さらに、上皮系の細胞を、

コラーゲンコートしたポリアクリルアミド上（硬さの濃度勾配が存在する）で培養すると、ポリアクリルアミドの濃度が高い方へ（つまり硬い方へ）細胞が移動していくことから、細胞には細胞外基質の硬さに対する嗜好性があることも明らかにされている（Lo et al., 2000）。

一方、集団移動では複数の細胞が集まって移動する（図 1B）。この集団移動は、様々な多細胞生物の発生過程でよく見られ、ショウジョウバエの border cells、マウスの網膜やショウジョウバエの気管を用いた分枝形態形成、ゼブラフィッシュやアフリカツメガエルの神経堤細胞、そしてゼブラフィッシュのクッセル細胞、側線などをモデルとして、その仕組みが解析されている（Friedl et al., 2009; Matsui et al., 2015; Scarpa et al., 2016）。これらに共通した集団移動の特徴として、カドヘリンなどを介して細胞同士が接着していること、Rho ファミリーの活性の違いにより先頭集団と後方集団の役割が異なること、ケモカインや FGF などにより進む方向性が決まることなどがすでに報告されている（Friedl et al., 2009; Scarpa et al., 2016）。しかし、共通の特徴は持ちつつも、モデルごとに特徴的な様子が見られる。例えば、集団の細胞内で先頭集団が常に決まっている場合もあれば（気管形成や側線）、先頭集団と後方集団が頻繁に入れ替わる場合もある（border cells、神経堤細胞）。こういった先頭集団と後方集団が入れ替わるモデルでは、細胞同士は集団を形成してはいるが、接着と解離を繰り返しながら協調して集団移動している。これに対して、細胞同士がしっかりと接着している気管形成や側線形成時には、集団の細胞が 1 つの大きな細胞のようなふるまいを見せる。例えば気管形成時には、FGF シグナルを受け取った複数の細胞が糸状仮足や葉状仮足を形成し、これらの細胞が先頭集団となって移動方向が定められる（Friedl et al., 2009）。また、ガン浸潤過程では、ガン細胞群が正常組織に入り込み、基底膜を通過する時に集団移動することが報告されているが、この場合には、ガン細胞が細胞外基質を分解する MMP（Matrix metalloproteinase）を分泌し、細胞外基質をリモデリングしながら進行しており（Friedl et al., 2009）、上述した正常発生中の集団移動とは異なっている。

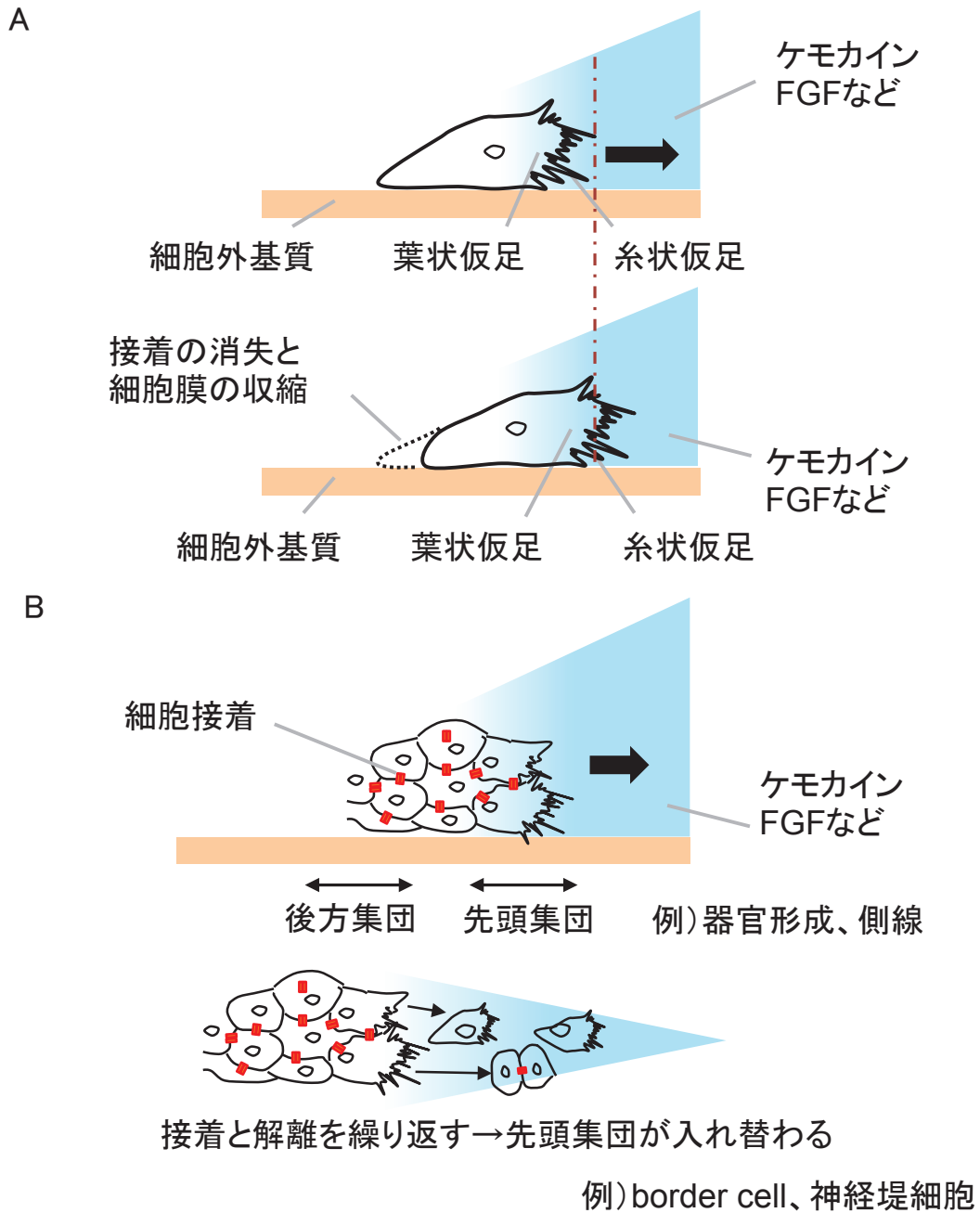


図 1 細胞の単独移動と集団移動の模式図

A) 細胞の単独移動時に使われるメカニズム。ケモカインや FGF を感知した側の細胞膜が糸状仮足や葉状仮足により伸び、反対側ではアクチンとミオシンの複合体からなるストレスファイバーと接着斑の形成が促進され、細胞の後方は細胞外基質から剥がされる。その結果、細胞は糸状仮足や葉状仮足が伸びている方向へ移動する。(B) 細胞の集団移動時に使われるメカニズム。集団移動時における共通の特徴としては、細胞同士がカドヘリンなどを介して接着していること、Rho ファミリーの活性の違いにより、集団の先頭と後方集団の役割が異なること、ケモカインや FGF などにより進む方向性が決まることが挙げられる。ただ、細胞同士が接着と解離を繰り返す場合は、先頭集団と後方集団が常に入れ替わる (下の図)。

以上のように、単独移動、及び集団移動において、個々の細胞、もしくは細胞集団が細胞骨格系を制御しながら移動することや、ケモカインや FGF により方向性が定められること、細胞外基質が細胞の移動に必要なことなどの分子機構についてはかなり理解が進んできている。しかし、形態形成時における移動する細胞と、細胞外環境との関係性については不明な点がまだ多く残っている。その主な要因は、移動する細胞の周囲には他の細胞も存在するなど、細胞外の環境がダイナミックに変化し、注目する環境を定めることが困難な点にあると考えられる。よって、細胞の集団移動のしくみを移動する細胞とその周囲の環境という観点から理解するためには、生体内で集団移動する過程をそのまま観察（ライブイメージング）し、さらにそれを操作する実験系が必要であると考えている。そこで本研究では、1) 胚体が透明であり、発生過程が比較的早く進行することから、細胞集団移動の全過程をライブイメージングできる点、2) トランスジェニックゼブラフィッシュを用いることにより、目的の細胞を可視化できることから、細胞レベルで空間的な位置関係を解析するのに適している点、3) 卵生のため、発生の途中で操作を加えやすい点、この3点の理由から、ゼブラフィッシュの側線に着目し、側線形成期における側線原基の細胞集団移動をモデルとした。

側線の機能と発生

側線とは、円口類や魚類、両生類の幼生といった水生動物が水流を感知するための感覚器官であり、自身の位置や周りの状況などを知るために非常に重要な感覚器官である (David et al., 2002, Venero Galanternik et al., 2016)。側線は、体表側面に並ぶ数個の受容器（以下、感丘）から成り、それぞれの感丘は、感覚細胞である有毛細胞とそれを取り囲む支持細胞によって構成されている。有毛細胞には感覚神経が投射しており、水流によって有毛細胞の感覚毛が揺れると、水流に由来する機械刺激が活動電位に変換され、感覚神経を介し中枢神経へと伝達されることで、水流や外敵の接近を感知できる (Gompel et al., 2001, David et al., 2002) (図 2C)。

本研究のモデルとして選んだゼブラフィッシュの成体では、側線は体表面全体に形成されているが (Ghysen et al., 2007) (図 2A)、側線の発生は、胚の側面に posterior lateral line (以下 PLL) と呼ばれる構造が形成されることから始まる (Ghysen et al., 2007) (図 2B)。PLL は、胚の背腹中心に沿って頭尾軸方向に直線状に形成されるのだが、PLL の元となる側線原基(後で詳しく述べる)が、

頭部から尾部まで集団移動することにより形成される（一次側線原基）（Ma et al., 2009）（図 2D, E）。一次側線原基の移動が完了すると、二次側線原基の移動が始まり、受精後約二ヶ月で全身に側線が張り巡らされる（Ghysen et al., 2007）。本研究では、PLL を細胞集団移動のモデルとして用いた。

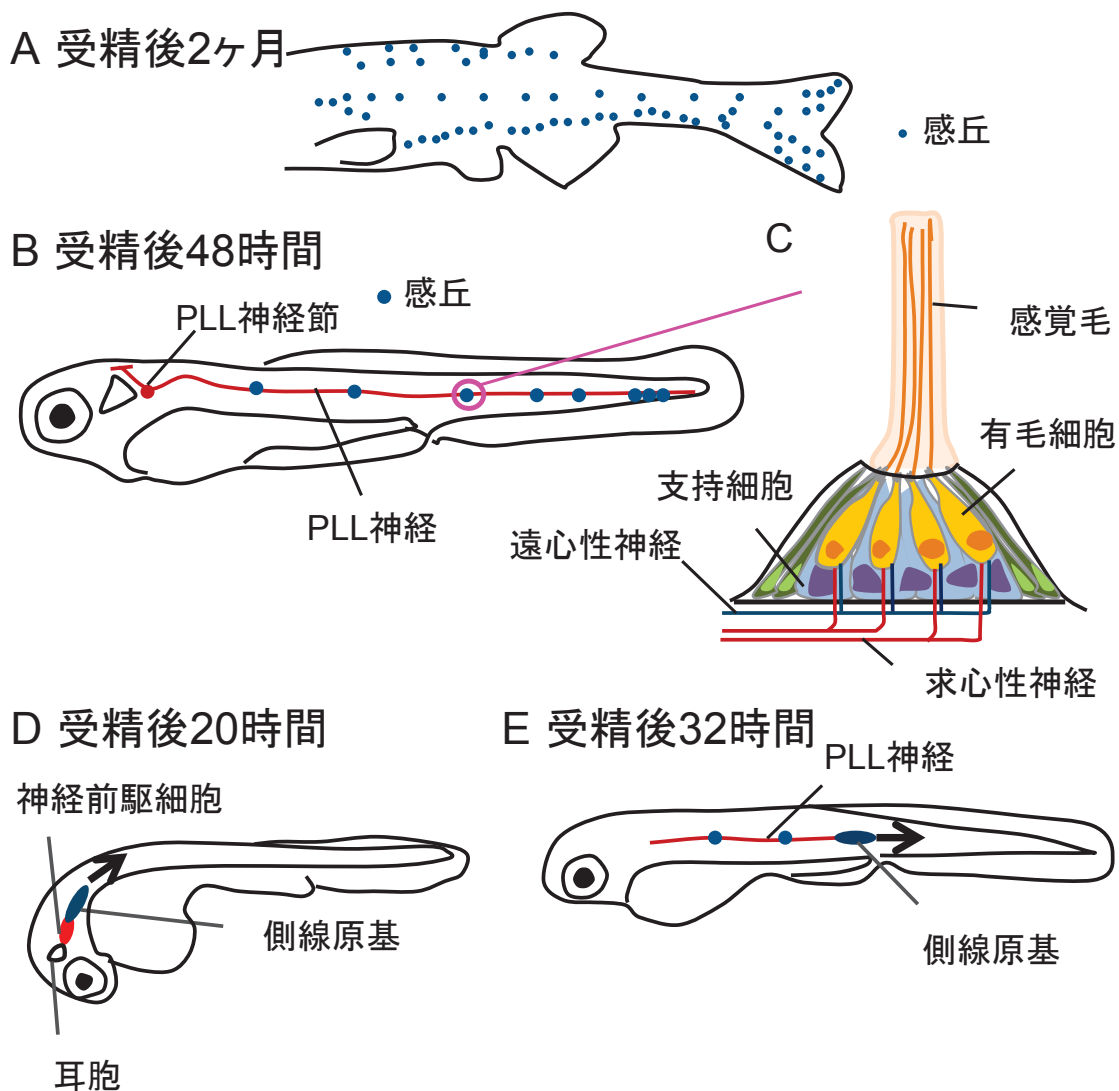


図 2 ゼブラフィッシュの側線形成

(A) 受精後 2 ヶ月のゼブラフィッシュの側線の様子。体全体に感丘（青）が張り巡らされている。(B) 受精後 48 時間の PLL の様子。神経（赤）と感丘（青）からなる PLL が体側面の背腹中心に形成されている。(C) 感丘の構造。感覚細胞である有毛細胞、その周囲にある支持細胞からなる。有毛細胞には求心性神経と遠心性神経が投射している（Ma et al., 2009）。(D) PLL の発生。受精後 20 時間頃、耳胞の後方から神経前駆細胞と側線原基が発生する。側線原基は尾側への集団移動を開始し、それに伴って神経軸索も尾側へと伸長する。(E) 受精後 32 時間の側線。yolk extension が終わる手前のところまで側線原基が移動し、2 つの感丘が形成され始めている。

PLL の形成は、受精後 18 時間頃に耳胞の近傍に側線を構成する細胞群が出現することから開始される (Ghysen et al., 2007; Mizoguchi et al., 2011)。その細胞群の耳に近い側の 10 数個の細胞は神経細胞の前駆細胞であり、それよりも後方にある未分化な細胞集団 (合計 100 個程の細胞) が、感覚細胞、支持細胞へ分化するので、ここでは、この 100 個の細胞群を側線原基と呼び、区別する。出現した側線原基は、受精後 20 時間の時期になると、尾側への集団移動を開始し、筋節を背側と腹側に隔てる水平筋節中隔 (Horizontal myoseptum, 以下 HMS) に沿ってほぼ一定のスピード ($\sim 150\mu\text{m}/\text{h}$) で直線的に移動する (Ghysen et al., 2007)。移動の過程では、3-5 体節おきに側線原基の細胞集団の一部 (20 個程度) の細胞 (集団移動する原基の移動方向とは逆側に存在する細胞) が移動を停止し、その場に定着する。その後、これらの細胞は有毛細胞や支持細胞へ分化し、受精後 5 日目までに機能する感丘が形成される (Mizoguchi et al., 2011)。側線原基が尾側の先端まで到達する受精後 48 時間には、合計 5 個の感丘が体側面に点々と形成され、尾の先端に近い部分では 2-3 個の感丘が近接して配置される (Gompel et al., 2001, Ghysen et al., 2007, Ma et al., 2009) (図 2B)。

側線原基の移動に伴い、側線神経細胞が集合してできる神経節から、側線原基に向けて神経軸索の伸長が起こる。側線原基の一部が停止してその場に定着するときには、そこに投射する軸索も移動を停止する (Shoji et al., 1998, Yee et al., 1999, Gilmour et al., 2004, Ma et al., 2009)。これが繰り返り起こることで、すべての感丘に神経軸索が投射する状況が確立される。

側線原基の移動制御と感丘の形成に関わるシグナル

側線原基の尾側への移動、及び感丘の形成に関わるシグナルとして Wnt/ β -catenin、FGF、そしてケモカインシグナルが挙げられる。

側線原基では、移動方向の後ろ側に存在している細胞が移動を先に停止し、感丘を形成していくことからわかるように、移動方向に対する集団の前後で分化度合いが異なり、それに由来して、細胞の形態も異なっている。すなわち、集団の先頭は、未分化性が高く間葉系細胞の形態をとるのに対し、後方は上皮細胞様の形態をとる。この細胞の分化の違いは、側線原基内で Wnt と FGF の逆方向性の濃度勾配が形成されることにより規定されることが知られている (Aman et al., 2008; Ma et al., 2009; Chitnis et al., 2012; Nogare et al., 2017)。移動方向に対して前側に存在する細胞集団では、Wnt シグナルが活性化され未分化性が維持されている。それと同時に、FGF シグナルの抑制因子 Sef の誘導が行

われるため、前側の細胞集団では、FGFシグナルの活性化が起こりにくい状況が維持される。一方、Wntシグナルの活性が及ばない後方領域では、FGFシグナルが活性化され、分化の方向へ細胞運命の転換が開始される。これと同時に、WntのantagonistであるDkk1の発現がFGFに依存して起こるので、WntとFGFシグナルの相反関係が移動中、ずっと維持される（Chitnis et al., 2012）（図3）。

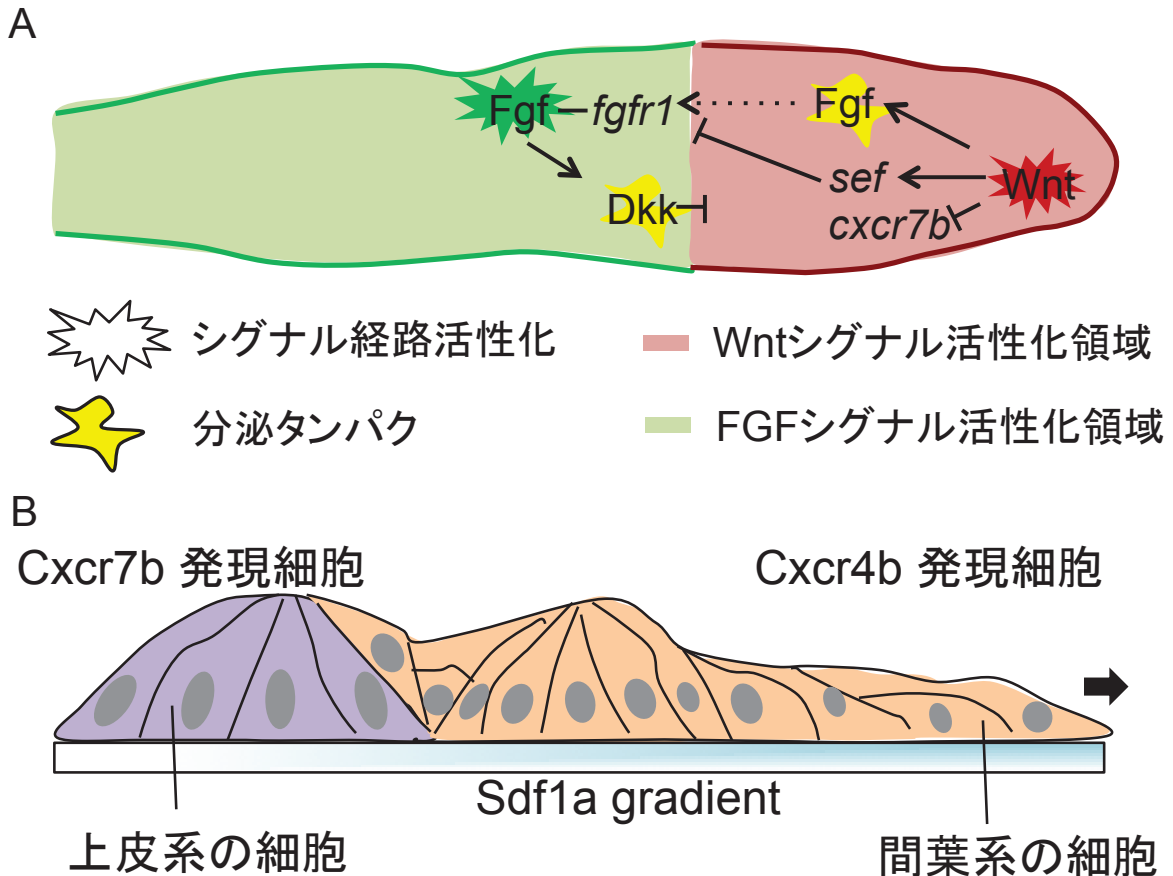


図3 側線原基内のWnt,FGFシグナルの活性領域とCxcr4b,Cxcr7bの発現領域

(A) 側線原基の先頭集団ではWntシグナル経路、後方集団ではFGFシグナル経路が活性化している。また、先頭集団ではWntによりcxcr7bの発現が抑えられる（Aman et al., 2009; Nogare et al., 2017）。(B) 側線原基内のCxcr4bとCxcr7bの発現分布。先頭集団では、Wntによりcxcr7bの発現が抑えられているため、Cxcr7bの発現は後方集団に限られる（Aman et al., 2009; Nogare et al., 2017）。

また、側線原基の集団移動にはケモカインシグナルが関与することが報告されている（Aman et al., 2008; Ma et al., 2009; Chitnis et al., 2012; Nogare et al., 2017）。リガンドであるsdf1aがHMSに沿って発現し、レセプターであるcxcr4b

と *cxcr7b* が側線原基の先頭集団と後方集団でそれぞれ発現する (David et al., 2002; Dambly-Chaudiere et al., 2007)。これらの発現領域の決定には、前述した Wnt と FGF シグナルの逆相関した濃度勾配が関与している (Ma et al., 2009)。

Cxcr7b は *Sdf1a* のデコイレセプターとして働くため、*Sdf1a* と結合すると細胞内に取り込まれ、側線原基の後側では *Sdf1a* の量が減少し、*Sdf1a* の濃度勾配が作られる (Chitnis et al., 2012)。また、*Sdf1a* と *Cxcr7b* が結合してもケモカインシグナルは活性化されず、原基の前側でのみ *Cxcr4b* と *Sdf1a* が結合し、ケモカインシグナルが活性化することになるため、側線原基は一方向へ (尾部方向へ) 移動できると考えられている (Dambly-Chaudiere et al., 2007; Chitnis et al., 2012; Dona et al., 2013) (図 3B)。

実際に、*sdf1a* や *cxcr4b* のアンチセンスモルフォリノによってケモカインシグナルの入力を阻害した場合、感丘に投射している神経軸索を観察することにより、側線原基の移動が間接的に解析され、側線原基は、多くの胚では尾の先まで移動せず、途中までしか移動しないことが示唆された (David et al., 2002; Li et al., 2004; Dambly-Chaudiere et al., 2007; Dona et al., 2013)。しかし、こうした側線形成不全が起こっている胚であっても、HMS に沿って側線が配置されており (Li et al., 2004)、側線原基の移動方向の決定にはケモカインシグナルでは不十分であり、近接する HMS が関与する可能性が示唆されている。

そこで本研究では、生体内における細胞集団移動のしくみを理解するために、集団移動する細胞として側線原基、その周囲の環境として HMS に注目することにした。

側線原基の移動と HMS

HMS は、魚類や両生類の幼生に存在する背側と腹側の筋節を分断する中隔構造である (Kimmel et al., 1995)。ゼブラフィッシュの場合は、受精後 30 時間以降の胚で、V 字を横に連ねたように形成される筋節の中央に直線状に形成された中隔構造があり、解剖学的に HMS と呼ばれている (図 4A)。ここでは、V 字型の筋節の中央にどのように HMS が形成されるかを概説するため、その前駆細胞が存在する時期から順に説明する。ゼブラフィッシュでは、筋節のもととなる体節は胚の尾部に存在する未分節中胚葉が 30 分周期で括れ切れることで形成される。1 つの体節は、約 100 個の細胞で構成されており、大まかに 2 つの細胞 (体節の周囲に存在する上皮細胞と内部の間葉細胞) に大別される。体節の周囲に存在する上皮細胞層の中で、脊索に接するように並んでいる細胞

は、脊索から分泌される Sonic hedgehog (Shh) を高濃度に受け取るため、Adaxial 細胞と呼ばれる遅筋前駆細胞へ分化し、その中でも体節内の頭側にある一部の細胞が、HMS を構成する細胞の 1 つである Muscle pioneer cells (以下 MP 細胞) へと分化する (図 4B) (Wolff et al., 2003; Ochi et al., 2007; Nguyen-Chi et al., 2012)。

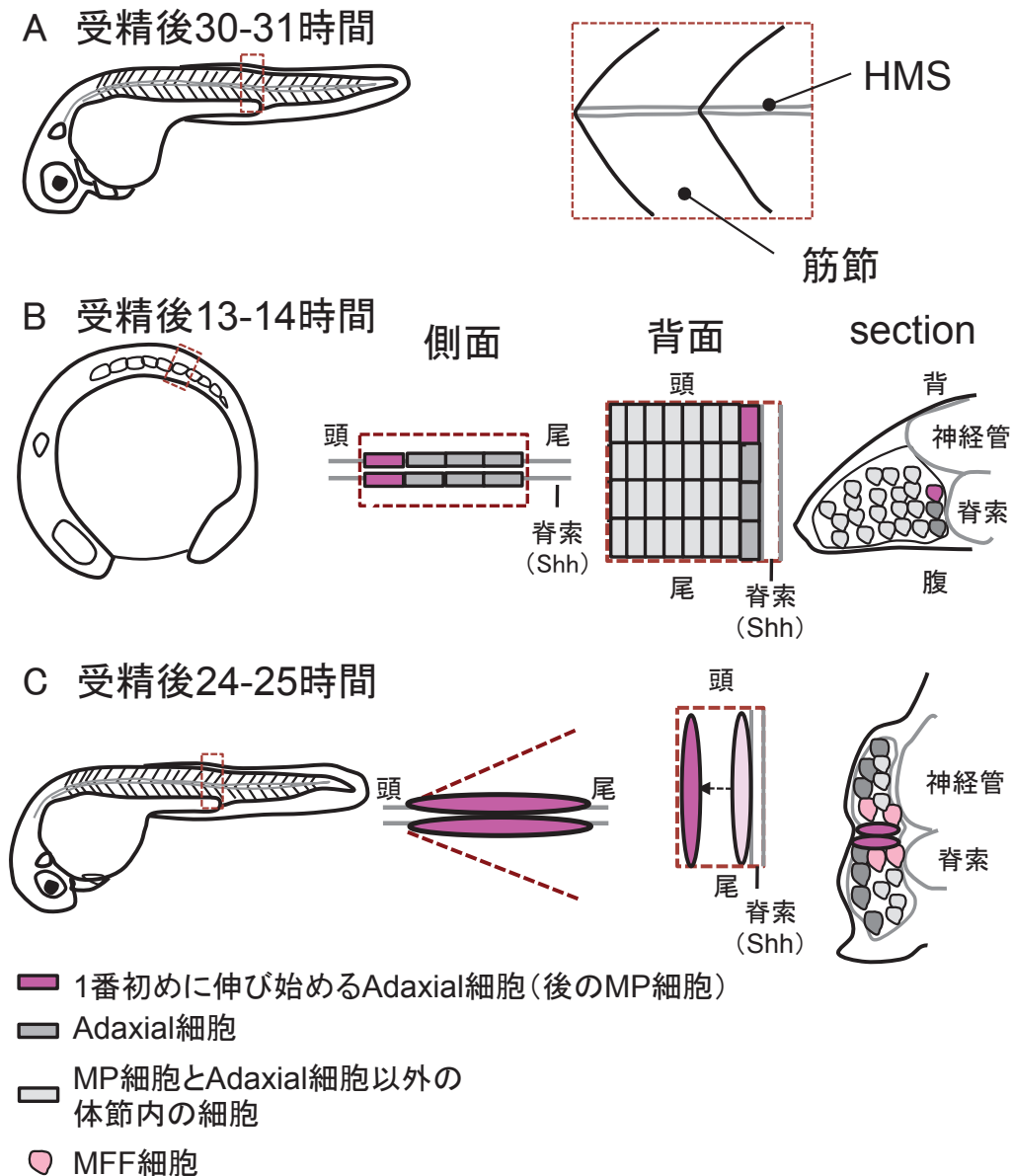


図 4 HMS の形態形成

(A) 受精後 30 時間胚を側面から見た模式図。HMS は、筋節を背側と腹側に分断する中隔構造。(B) 受精後 13-14 時間胚を側面、背面、section から見た模式図。(C) 受精後 24-25 時間胚を側面、背面、section から見た模式図。MP 細胞の形態的な変化に伴い、立方体様をしていた体節は V 字型の筋節へと変形する。MFF 細胞が MP 細胞に近接するように再配置される。

受精後 13 時間胚では、10 個の体節が形成されているのだが、全ての体節内において、上皮細胞の形態を示していた MP 細胞が、1-2 時間の間に棒状に伸びた形態へと変わり、この形態的な変化と相関して立方体様をしていた体節も V 字型の筋節へと変形する (Hatta et al., 1991; Felsenfeld et al., 1991)。その後、棒状に伸びた MP 細胞は、体節の内部を体の中から外へ向かう方向へ移動し (Hatta et al., 1991; Felsenfeld et al., 1991) (図 4C)、最終的には (受精後 30 時間)、V 字型の頂点を結ぶ線上に MP 細胞が並び、HMS と呼ばれる中隔構造が明視野でも観察できるようになる (Hatta et al., 1991)。また、Adaxial 細胞に近接するが、Adaxial 細胞よりも 1 層体節内部にある一部の体節細胞は、脊索から遠位に位置することになるため、Adaxial 細胞よりは少量の Shh に曝され、Medial fast fiber 細胞 (MFF 細胞) に分化する (Wolff et al., 2003; Ochi et al., 2007)。この MFF 細胞も体節-筋節変換の間に起こる細胞の再配置過程で、MP 細胞に近接するように再配置され、HMS を中心に脊腹方向へ放射状に伸びる筋繊維を構成する。この MFF 細胞もケモカイン *sdf1a* を発現することが報告されていることから (Meyers et al., 2013)、MP 細胞だけでなく、MFF 細胞も、側線原基の移動に関与する可能性が示唆されている。

側線原基の移動と Shh 変異体

HMS が側線形成に関わることは、ケモカイン *sdf1a* の発現だけではなく、Shh シグナルに関連した変異体の解析からも示唆されている。

受精後 48 時間胚で、HMS が明視野で観察できない変異体が複数得られ (van Eeden et al., 1996)、その原因遺伝子が同定された結果、その多くが Shh シグナル経路に関連した遺伝子に変異があることが明らかになっている (表 1)。

表 1 HMS に異常を持つ変異体と側線形成の関連性

変異体名	原因遺伝子	側線の移動に関する解析	参考文献
<i>you (you)</i>	<i>scube2</i>	有	Svetic et al., 2007
<i>you-too (yot)</i>	<i>gli2a</i>	有	Whitfield et al., 1996
<i>sonic-you (syu)</i>	<i>shha</i>	有	Whitfield et al., 1996
<i>chameleon (con)</i>	<i>dispatched</i>	有	David et al., 2002
<i>u-boot (ubo)</i>	<i>prdm1</i>	無	-
<i>choker (cho)</i>	<i>meox1</i>	有	Svetic et al., 2007

Shh シグナル経路に関わる遺伝子に変異があるもの (上から 4 列目まで) と、遅筋と速筋の分化をはじめとした体節内の細胞の分化に関係する遺伝子に変異があるもの (上から 5 列目と 6 列目) とが存在する (van Eeden et al., 1996)。

前述した HMS の形成過程と合わせて考えると、いずれの Shh シグナル経路に関連した遺伝子の変異体で起こる HMS の欠損は、Shh シグナル経路が MP 細胞や MFF 細胞の前駆細胞で活性化されなかったためであると考えられる (Wolff et al., 2003; Ochi et al., 2007)。Shh シグナル経路に関連した遺伝子の変異体の多くで、側線原基の移動がどう変化するかについては解析されていないが、Shh の受容体である *smoothened* の変異体、*smu* (*slow-muscle-omitted*) では、感丘のポジションについては解析されている (David et al., 2002)。*smu* 変異体は、*smoothened* の膜貫通ドメインに挿入された点変異によりシグナルが下流に伝達されず、下流遺伝子の発現が低下している変異体であり (Varga et al., 2001)、側線全体の位置が野生型よりも腹側にずれており、感丘やこれに投射する感覚神経も腹側に曲がっていることから、側線原基の移動方向が *smoothened* 変異体では正常に定まっていなかったと予想される。この原因として、Shh シグナル経路が阻害され、MP 細胞と MFF 細胞が正常に分化できなかったために、HMS の形成が起らず、側線原基の移動方向が異常になった可能性が考えられる。

しかしながら、上記のような変異体ゼブラフィッシュを用いた解析では、側線発生開始前から全身で Shh シグナル経路が不活性化されているため、HMS 以外の組織における異常や欠損が 2 次的に作用している可能性がある。また、上記の報告では、移動中の側線原基を経時的には観察していないため、側線の湾曲の原因が、原基自体の移動能の低下によるものなのか、あるいは、HMS が存在しないことによるものなのかを区別することができない。そもそも、側線原基と HMS の位置関係については、体側面から得られた 2 次元画像のみをもとにして議論されており、移動中の側線原基が HMS を構成する細胞群である MP 細胞や MFF 細胞と 3 次元的にどのような位置関係にあるか (MP 細胞や MFF 細胞の間に挟まれているのか、MP 細胞や MFF 細胞の上に存在するのか、間になにか挟まれているのか等) についても報告されていない。

そこで本研究では、1) 側線原基、および HMS を構成する MP 細胞と MFF 細胞の 3 次元的な位置関係を明らかにすること、2) 任意の場所で MP 細胞と MFF 細胞を欠損させる系を確立すること、3) この系を用いて MP 細胞及び MFF 細胞形成不全が側線原基の移動に与える影響を明らかにすることにより、ゼブラフィッシュの側線原基の集団移動のメカニズムを解明し、3D 環境中で起こる集団移動における、動く細胞に対する周囲に存在する細胞をはじめとした環境の役割を理解することを目指した。

材料と方法

ゼブラフィッシュの飼育

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は、人工海水 (RO 水に塩濃度 0.03%になるように塩を混ぜたもの、水温 28.5°C) を用い、明期 14 時間、暗期 10 時間の条件下で飼育した。性成熟期後の雄と雌は異なる水槽で隔離飼育し、これの交配によって受精卵を得た。交配の際には、暗期に入る数時間前に、小型の水槽に底部が網状の水槽を重ねて雌を入れ、さらにもう一段の網底水槽を重ねて雄を入れた。こうして隔離された雌雄が同一水槽にある状態で、一晚飼育した。次の明期に雄と雌を混合することで産卵させ、卵を回収した。回収した受精卵は、飼育水 (人工海水、メチレンブルー $3\times 10^{-5}\%$) を入れ 28.5°C にて飼育した。受精後 24 時間以降の胚を観察する場合は、胚の色素形成を阻害するために、 $3\times 10^{-3}\%$ となるように PTU (1-phenyl2-thiourea、東京化成) を飼育水に添加した。発生段階は Kimmel らの発生段階表に従った (Kimmel et al.,1995)。

ゼブラフィッシュ受精卵へのマイクロインジェクション

マイクロインジェクションに用いたガラス管は、NARISHIGE ガラス管 (G-1) 1×90mm をブラー (PC-30, NARISHIGE) でひいた後、使用直前にガラス管の先端をカッターで切断して使用した。マイクロインジェクションは、FemtoJet (Eppendorf) を用いて、実体顕微鏡下で行った。受精卵を得た後、その発生ステージが 1-2 細胞期のうちに、数本の溝をつけた 1%アガロースゲルに受精卵を並べ、インジェクションを行った。インジェクション量は、受精卵 1 個につき平均 5nl であった。インジェクション後、飼育水に受精卵を移し、28.5°C のインキュベーター内で飼育した。

本研究では、側線原基を可視化するために、原基で発現することが知られている *Claudinb1* (以下 *Cldnb1*) のプロモーターの支配下で、lifeact-RFP (F アクションに結合する蛍光タンパク質) を発現するプラスミド DNA [*Cldnb1*:lifeact-RFP] (若狭瑞帆 修士論文 2015) を各受精卵に導入した。

免疫染色

抗アセチル化チューブリン抗体の場合：ゼブラフィッシュ胚を 4% PFA/PBS で 4°C、8-12 時間固定した。その後、PBS で 2 回洗浄し、100% MeOH によって

脱水した後、-30℃で一時的に保存した。実験に使用する際は、PBS に置換後（50% MeOH/PBS→25% MeOH/PBS→PBS×2 各 5 分）、1% Triton in PBS で 20 分間室温静置し（×2）、MABDT（10×マレイン酸 buffer 50ml、20% Triton 2.5ml、Dimethyl sulfoxide（以下 DMSO）5ml、超純水 442.5ml）で洗浄した。2% FBS/MABDT で最低 1 時間ブロッキングした後、抗アセチル化チューブリン抗体（Sigma, T6793）を 1:400 になるよう 2% FBS/MABDT で調整し、4℃で 8 時間以上インキュベートした。その後、MABDT で 10 分 6 回洗浄し、2 次抗体（anti α -mouse 647）を 1:1000 になるよう、2% FBS/MABDT で希釈し、4℃で 8 時間以上インキュベートした。その後、MABDT で 10 分 6 回洗浄し、Hoechst 入り（1:1000）4% PFA/PBS で固定した。

MF20 の場合:ゼブラフィッシュ胚を 4% PFA/PBS で 4℃、8-12 時間固定した。その後、PBS で 2 回洗浄し、1% Triton in PBS で 20 分間室温静置後、PBS-Triton（10×PBS 50ml、20% Triton 2.5ml、超純水 447.5ml）で洗浄し（5min×2）、2% FBS/PBS-Triton で最低 1 時間ブロッキングした後、ミオシン重鎖に対する抗体である MF20（Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB, 1-ea）を 1:50 になるよう 2% FBS/PBS-Triton で調整し、4℃で 8 時間以上インキュベートした。その後、PBS-Triton で 10 分 6 回洗浄し、2 次抗体（anti α -mouse 647）を 1:1000 になるよう、2% FBS/ PBS-Triton で希釈し、4℃で 8 時間以上インキュベートした。その後、PBS-Triton で 10 分 6 回洗浄し、Hoechst 入り（1:1000）4% PFA/PBS で固定した。

In vivo での側線原基の移動過程ライブイメージング

本研究で阻害剤実験、及びライブイメージングに用いたゼブラフィッシュの系統は以下に示す通りである。

MP 細胞及び MFF 細胞マーカーである転写因子 *Engrailed1b* のプロモーター下に GFP、もしくは RFP を発現するようにしたトランスジェニックゼブラフィッシュ *Tg[Eng1b:GFP]*, *Tg[Eng1b:RFP]*（Kimura et al., 2014）を、自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター基礎生物学研究所より提供を受けた。側線原基のライブイメージングには、側線原基マーカーである転写因子 *Claudin1* のプロモーター下に、F-actin を標識する *lifeact-GFP* を発現するようにしたトランスジェニックゼブラフィッシュ *Tg[Cldnb1:lifeact-GFP]*（若狭瑞帆修士論文 2015 年参照）を用いた。

ライブイメージングする場合、28.5°Cで飼育した受精卵を、目的の発生段階においてコリオンを除去し、胚が動くのを防ぐためにトリカイン（東京化成、トリカイン 400mg、tris (pH9.5) 2ml、超純水 98ml で stock を調整し、使用時に飼育水にて目的の濃度に希釈した）を用いて麻酔を行った後、ガラスボトムデイッシュ（35mm、greiner bio-one）にマウントした。マウントは、65°Cで融解させた 1% low melting agarose gel（Nacalai tesque）（in 飼育水）に埋没させ目的の部位が撮影できるようにオリエンテーションを調節した。Time lapse 動画の撮影には、共焦点レーザー顕微鏡（ZEISS、LSM 710 or 700）を用いた。

ゼブラフィッシュ胚の阻害剤処理

阻害剤として、Cyclopamine（コスモ・バイオ、LKT laboratory）の stock solution（DMSO に溶かし、stock を 10mM とした）を 0.03%塩水（塩濃度が 0.03%になるように超純水で希釈）で 300 μ M に希釈し、処理は 3 時間行った。

受精後 13 時間でゼブラフィッシュ胚のコリオンをピンセットで剥き、受精後 14 時間のときに飼育水で well を満たした 24well plate へ胚を移した（10 個体/well）。受精後 15 時間のときに 0.03%の塩水で希釈した阻害剤を 500 μ l 添加し、28.5°Cに設定したインキュベーター内へ入れ、3 時間後に洗浄した。洗浄は、飼育水で満たした 10cm dish へ胚を移し、穏やかに dish を回し、この過程を 3 回繰り返すことにより行った。洗浄後、胚の色素形成を阻害するために、 3×10^{-3} % となるように PTU を飼育水に添加し、目的の stage まで 28.5°Cに設定したインキュベーター内へ入れた。

ゼブラフィッシュ胚へのフェムト秒レーザー照射

本研究では、共焦点レーザー顕微鏡とフェムト秒レーザーシステムを組み合わせることにより、MP 細胞と MFF 細胞のみを取り除くことを試みた。

レーザー照射時に胚が動くのを防ぐために、1 細胞期の受精卵にバンガロトキシンをコードする mRNA（神経筋接合部のシナプス後膜（筋肉側）のニコチン性アセチルコリン受容体と結合し、アセチルコリンの結合を妨げる）、及び側線原基マーカーである *Cldnb1:lifeact-RFP* のプラスミド DNA（若狭瑞帆 修士論文 2015 年参照）を injection した。その後、28.5°Cのインキュベーター内に入れておき、受精後 22 時間頃に *Eng1b:GFP* の蛍光が陽性の胚を選び、ピンセットでコリオンを剥き、胚の色素形成を阻害するために、 3×10^{-3} %となるように

PTU を飼育水に添加した。再び 28.5°C のインキュベーター内に入れ、受精後 31 時間頃にガラスボトムディッシュ (35mm、greiner bio-one) にマウントした。マウント方法は、3%メチルセルロース (オートクレーブしたメチルセルロース (Nacalai teque) 及び超純水を混ぜて液体状にしたもの) をガラスボトムディッシュに薄く塗り、胚の右側が下になるように行った。用いたフェムト秒レーザーパルス光源には、再生増幅器付きフェムト秒チタンサファイヤレーザーシステム (Solstice, Spectra Physics, 800nm, 1kHz) を用いた。フェムト秒パルスは、凸レンズと凹レンズからなるビームコリメーターによりビーム径を最適化し、倒立共焦点顕微鏡 (Olympus, IZ71+FV300) に導入した。1kHz のフェムト秒レーザーパルス列から、1/32s のゲートタイムを持つメカニカルシャッター (SIGUMAKOKI, Σ-65GR) により単発パルスを切り出した。レーザー強度は、ND フィルターの透過率及び半波長板と偏光子により 300nJ/pulse に調節した。顕微鏡内に導入したフェムト秒レーザーを、対物レンズ (×40, NA 0.8) を通し集光することで、他の細胞に損傷を与えることなく、深さ 40µm 付近にある GFP 陽性の MP 細胞及び MFF 細胞特異的なアブレーションを行った (山田壮平 博士論文 2017 年参照)。レーザーアブレーション後、共焦点レーザー顕微鏡を使って、ライブイメージングを行い、原基の挙動を観察した。

統計解析

有意差検定は Student's T-test を用いて行った。結果には、mean ± s.d. のエラーバーをつけた。

結果

側線原基は MP 細胞の上に存在する

これまで、側線原基と HMS（特に MP 細胞と MFF 細胞）との位置関係については、体側面から得られた 2 次元画像のみをもとに判断されており、側線原基と MP 細胞、及び MFF 細胞との 3 次元的な位置関係については明らかになっていなかった。そこで本研究では、まず初めにこれらの位置関係を調べることにした。そのために、MP 細胞と MFF 細胞の両方で発現する *Eng1b* プロモーターの支配下で、GFP を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ *Tg[Eng1b:GFP]* 胚（受精後 36 時間）を用いて核染色を行い、側線原基の可視化を試みた（図 5）。

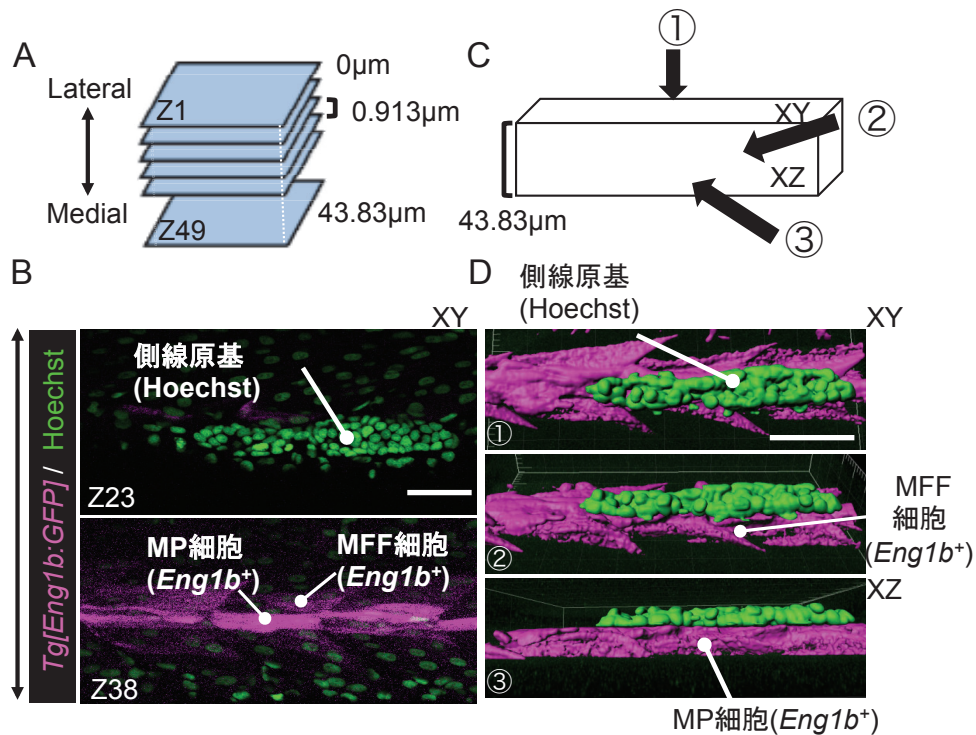


図 5 側線原基と MP 細胞、MFF 細胞の位置関係

(A,B,D) *Tg[Eng1b:GFP]*ゼブラフィッシュ同士を掛け合わせて得られた胚を核染色して観察した。(A) 共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影したときの Z 面に対する情報。表層面から GFP の蛍光が見えなくなる 43 μ m の深さまで撮影を行った。(B) 表層面から数 μ m-20 μ m 付近に、多くの細胞が集まっている側線原基（緑）が存在していた。さらに 15 μ m ほど進むと、体節 1 つ分の前後の長さ（58 μ m）に伸びている MP 細胞（マゼンダ）、及びその周りには矢じり型をした MFF 細胞（マゼンダ）が存在していた。(C) 3D 立体構築に対する観察方向。(D) B の画像から側線原基、MP 細胞、MFF 細胞を抽出した画像を IMARIS ソフトで立体構築した画像。①から②、②から③はそれぞれ XZ 方向に 45°回転させている。Scale bar: 50 μ m

その結果、体表面から数 μm の所に多くの細胞が集まっている側線原基が存在し、その場所からさらに $15\mu\text{m}$ ほど内側へ進んだところに、GFP 陽性の MP 細胞が体節 1 個に相当する長さ ($58\mu\text{m}$) で頭尾軸に伸びた細長い形態を示した (図 5B)。また、*Eng1b* の発現が MP 細胞よりも弱いために (Ochi et al., 2007; Nguyen-Chi et al., 2012) GFP の蛍光が MP 細胞よりも弱く検出される MFF 細胞は、MP 細胞に隣接する場所に矢じりのような形をして存在していた (図 5B)。さらに 3 者の細胞の位置関係を 3 次元的に解析するために、側線原基を抽出した画像と MP 細胞、及び MFF 細胞の画像を準備し、IMARIS (BITPLANE scientific solutions) ソフトで立体構築した。XY 面、及び XZ 面で側線原基と MP 細胞、MFF 細胞との位置関係を見てみると、側線原基の直下に、頭尾軸方向に長く伸びる MP 細胞、そしてその周りに矢じり型の MFF 細胞が存在することがわかった (図 5D)。

これらの結果から、側線原基は MP 細胞よりも体表面側に存在し、側線原基の真下に MP 細胞と MFF 細胞が存在することが明らかとなった。

HMS 構造を途中の筋節から欠損させる系の確立

HMS 構造が側線原基の移動に関与しているかを調べるために、途中の筋節から後方の HMS 構造を欠損させることを試みた。過去の研究から、HMS 構造を構成する MP 細胞と MFF 細胞が Adaxial 細胞や体節内の細胞から分化するには、脊索からの Shh が必要であることが明らかになっている (Wolff et al., 2003; Ochi et al., 2007)。そのため、任意のタイミングで Shh シグナル経路を阻害することで、任意の場所から MP 細胞及び MFF 細胞の形成を阻害できるのではないかと考えた。この可能性を検証するために、本研究では、Shh シグナル経路の阻害剤、Cyclopamine の投与を行った。Cyclopamine は植物由来のアルカロイドで、Shh シグナル経路の受容体の 1 つである Smoothed (7 回膜貫通タンパク質) に直接結合することにより Smoothed の構造を変え、Shh シグナル経路を阻害することが報告されている (Chen et al., 2002)。本実験では、側線原基や胚体への影響を抑えるために、一過的に投与することにした。具体的には、MP 細胞の発生途中である体節形成期 (受精後 15-18 時間) の *Tg[Eng1b:GFP]* 胚に 3 時間 Cyclopamine を投与し、MP 細胞と MFF 細胞が形成されるかを調べた。その結果、Cyclopamine の処理前に形成されたと考えられる 15 番目までの筋節には、Control 胚 (Cyclopamine の溶媒である DMSO 処理を行った胚) と同様に、GFP 陽性の MP 細胞と MFF 細胞が正常に形成されていたが、Cyclopamine の処理後

に形成された筋節では、GFP 陽性の MP/MFF 細胞の両方とも消失していた（図 6B-Cyclo）。

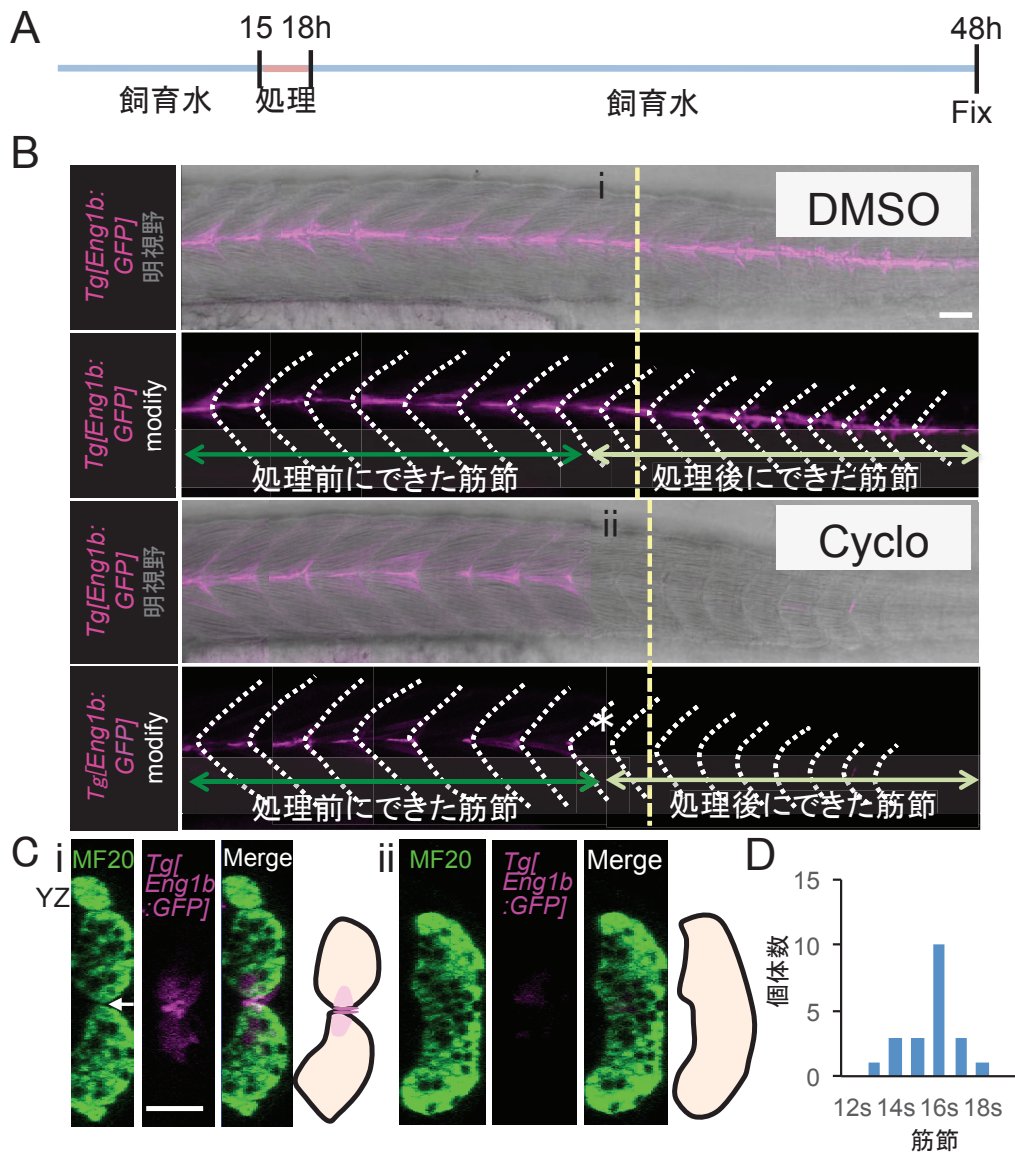


図 6 一過的な Cyclopamine 投与による MP/MFF 細胞への影響

(A) Cyclopamine の投与実験のタイムコース。(B) Cyclopamine の溶媒である DMSO 処理胚 (DMSO)、Cyclopamine 処理胚 (Cyclo) における MP 細胞と MFF 細胞の存在。Cyclopamine 処理前にできた体節由来の筋節では、DMSO 処理胚と同様に MP 細胞 (マゼンダ) と MFF 細胞 (マゼンダ) が正常に形成されていたが、処理後にできた体節に由来する筋節では、MP 細胞、MFF 細胞の両方とも消失していた (*)。Scale bar: 50 μ m

(C) DMSO 及び Cyclopamine 処理胚における遅筋、及び速筋両者のミオシン重鎖を染色できる MF20 (緑) による免疫染色像。DMSO 処理胚では、筋節が背側と腹側にはっきりと分かっているが (i 白矢印)、Cyclopamine 処理胚では、背側と腹側の筋節の分断は認められず、背腹の筋節が融合していた (ii)。Scale bar: 25 μ m (D) MP 細胞、及び MFF 細胞の消失位置。16 番目の筋節で GFP の蛍光が消失する胚が最も多かった (21 個体の内 10 個体)。

また、MP 細胞と MFF 細胞の存在の有無により、背側と腹側の筋節の HMS 中隔構造による分断が、どのように変化しているのかを調べるために、遅筋、及び速筋両者のミオシン重鎖を染色できる抗体 (MF20) を用いて免疫染色を行った。Control 胚では、いずれの筋節も背側と腹側でくっきりと分かれており、それらの間に MP 細胞と MFF 細胞の存在が確認できたことから、正常な HMS 構造が出来ていることがわかった (図 6C-i 白矢印)。これに対して、Cyclopamine 処理胚で、MP 細胞と MFF 細胞が消失している筋節では、背側と腹側の筋節の分断は認められず、背腹の筋節が融合していることが明らかになった (図 6C-ii)。また、MP 細胞、及び MFF 細胞が消失する筋節の位置を操作した胚ごとに調べて個体数を調べたところ、16 番目の筋節から MP 細胞と MFF 細胞が消失している個体が一番多かった (21 個体中 10 個体) (図 6D)。

以上の結果から、Cyclopamine の一過的な処理により、MP 細胞及び MFF 細胞を途中の筋節から除去することができ、それに伴い、筋節を背側と腹側に分ける HMS の構造を消失させる系が確立できたと考えた。

HMS 構造は側線原基の移動に関与している

HMS 構造が側線原基の移動に関与するかを調べるために、HMS 構造がある筋節とない筋節間で、側線原基の挙動が変化するかを調べることにした。そのために、側線原基を可視化できる *Tg[Cldnb1:lifeact-GFP]* と、MP 細胞と MFF 細胞を可視化できる *Tg[Eng1b:RFP]* を交配し、上記したように Cyclopamine を処理し、HMS 構造の有無により、側線原基の移動がどのように変化するかを調べた。Cyclopamine の溶媒である DMSO を処理した Control 胚の場合では、いずれの筋節にも MP 細胞と MFF 細胞が存在し、HMS 構造が存在しているので、側線原基の挙動は、未処理胚と同様に、直線状に移動する様子が観察された (図 7A)。しかし、Cyclopamine 処理胚では、Cyclopamine 処理前にすでに形成されていた筋節上 (MP 細胞と MFF 細胞が存在し、HMS 構造ができていた) を側線原基が通過するときは、Control 胚と同様に、頭側から尾側に向かって直線的な移動であったが (図 7B)、Cyclopamine 処理により MP 細胞と MFF 細胞が消失し、HMS 構造が消失した筋節を通過するとき、側線原基の移動方向が背側や腹側へ変化しており、側線原基の移動の直線性が失われることが明らかになった (図 7C)。

以上の結果から、HMS 構造が側線原基の移動方向の制御に関与することが示唆された。

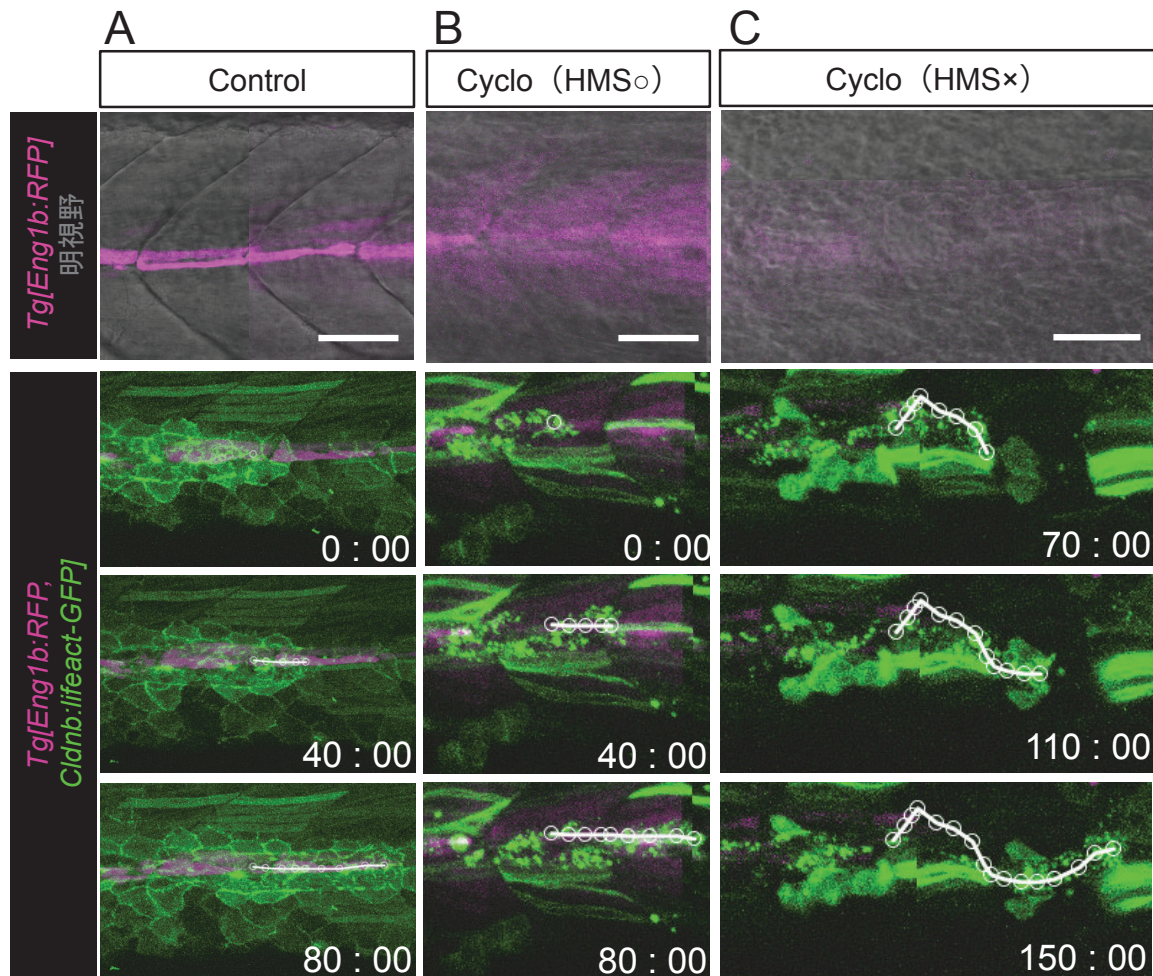


図 7 Cyclopamine 処理により HMS 構造を消失させたときの側線原基の挙動

(A) Cyclopamine の溶媒である DMSO 処理を行った Control 胚の処理前後の筋節では、直線状に移動する様子が観察された。(B) Cyclopamine 処理を行った胚の処理前の体節に由来する筋節 (Cyclo(HMS○)) では、Control 胚のときと同様に直線的な移動が見られた。(C) Cyclopamine 処理後の体節に由来する筋節では (Cyclo(HMS×))、直線的ではない移動が見られた。白線は、タイムポイントごとにプロットした側線原基の先頭 (白丸) の軌跡。Scale bar: 50 μ m

HMS 構造は側線原基の移動を直線方向にファインチューニングする

HMS 構造がない筋節を通る時に、側線原基の移動の直線性が失われた理由として、1) Cyclopamine が側線原基の移動自体に影響を与えた、2) Cyclopamine 処理により MP 細胞と MFF 細胞の分化が起こらず、HMS 構造ができなかったために、側線原基の移動に影響したという 2 つの可能性が考えられる。

1) の可能性を検証するために、Control 胚と Cyclopamine 処理前にできた HMS 構造がある筋節を通るときの側線原基の移動速度を比較した。Control 胚では平

均の速度が $1.19 \pm 0.41 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=4$) であったのに対し、Cyclopamine 処理前にできた HMS 構造がある筋節を通ったときの平均の速度は $0.98 \pm 0.14 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=4$) であり、両者に有意差は認められなかった (図 8B Control, HMS○)。この結果から、Cyclopamine 処理は側線原基の移動速度に影響を与えないと考えた。また、移動方向については次のように解析した。側線原基は、尾側に向かって水平方向に移動する。側線原基の移動の軌跡をプロットし、水平方向に対する角度を time point ごとに出し、ローズダイアグラムを作成した。Control 及び Cyclopamine 処理前にできた HMS 構造がある筋節を通る場合、どちらも ± 20 度の範囲内で尾側に移動しており、尾側方向へ直線的に移動していることがわかった (図 8C Control, HMS○)。この結果から、Cyclopamine の処理が側線原基の直線的な移動方向に影響しないことが示唆された。

次に 2) の可能性を検証するために、Cyclopamine 処理前にできた HMS 構造がある筋節を通るとき、及び、Cyclopamine 処理後にできた HMS 構造がない筋節を通るとき、側線原基の移動速度を比較した。その結果、HMS 構造がない筋節を通ったときの平均の速度は $0.89 \pm 0.13 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=4$) であり、速度は遅くなる傾向が見られたが、両者に有意差は認められなかった (図 8B HMS○, HMS×)。以上の結果から、HMS 構造は、側線原基の移動の速度に関しては大きな影響は与えないものと考えられる。移動方向についても上記と同様の方法でローズダイアグラムを作成すると、Cyclopamine 処理後にできた HMS 構造がない筋節上を通るときは、移動方向の範囲が水平方向に対して ± 180 度まで広がり、尾側方向への直線的な移動だけではなく、背側や腹側へも移動していることがわかった (図 8C HMS×)。

この結果から、側線原基は直線的に尾側の方向へ移動するだけではなく、他の方向にも進む性質を持っていること、そして、HMS 構造は側線原基の移動する方向を直線的に近づけるファインチューニング作用を持つことが示唆された。

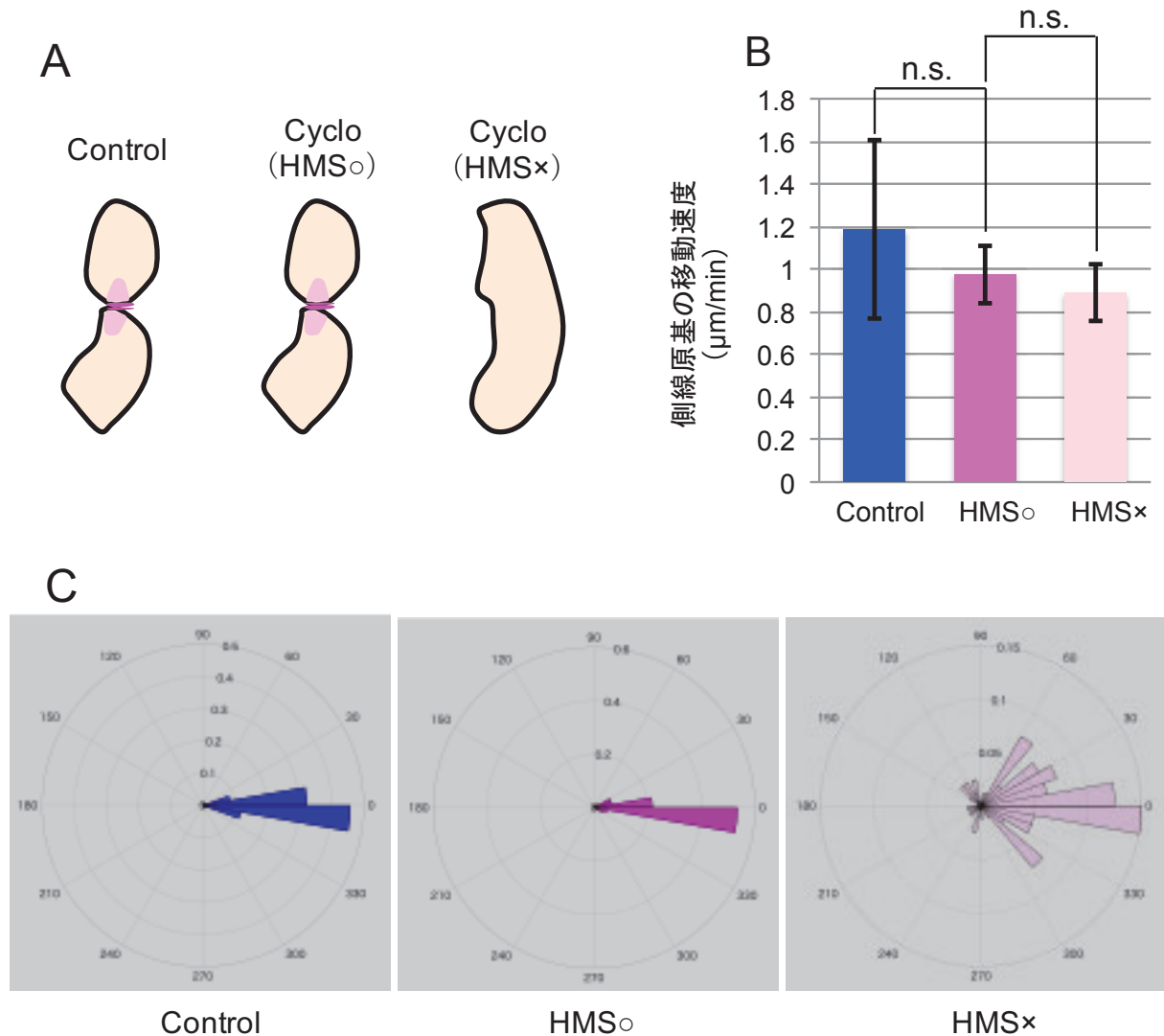


図8 Cyclopamine 処理により HMS 構造を消失させたときの側線原基の移動の変化

(A) DMSO 処理を行った胚の筋節 (Control)、体節形成期の途中から Cyclopamine 処理を行った胚の、Cyclopamine 処理前の体節由来の筋節 (HMS○)、そして処理後の体節に由来する筋節 (HMS×) それぞれにおける HMS 構造の模式図 (B) Control、HMS○、HMS×における側線原基の移動速度を比較した。Control: n=4, HMS○: n=4, HMS×: n=4. 平均値と s.d. (エラーバー) を示した。t 検定を行ったが、有意差は認められなかった (n.s.)。 (C) Control、HMS○、HMS×における側線原基の水平方向に対する移動方向の角度を time point ごとに出し、ローズダイアグラムを作成した。Control、及び HMS○における側線原基の水平方向に対する移動方向は、いずれも $\pm 20^\circ$ の範囲内におさまっていた。対して、HMS×における側線原基の水平方向に対する移動方向は、 $\pm 180^\circ$ にまで広がっていた。

タイムラプスでは、側線原基の移動の全体像 (初めから終わりまで) を観察できていないので、感丘に投射する神経軸索を可視化することで、側線原基の移動の全体像の間接評価を行うことにした。具体的には、MP 細胞と MFF 細胞

を可視化できる *Tg[Eng1b:GFP]* 胚を Cyclopamine 処理し、神経軸索の方向性を見るために抗アセチル化チューブリン抗体により染色し、観察した。

Control 胚の場合、DMSO 処理前後にできた筋節に関わらず、*Eng1b* のプロモーターに依存して発現する GFP の蛍光は MP 細胞と MFF 細胞で観察され、それに沿って、神経軸索が直線的に伸びている様子が観察された (図 9A)。しかしその一方で、Cyclopamine 処理をした胚では、Cyclopamine 処理前にできた筋節では MP 細胞と MFF 細胞に沿って神経軸索の直線的な伸長が確認できたが、処理後にできた筋節においては、MP 細胞と MFF 細胞の存在の程度によって、軸索の蛇行する様子に変化することが明らかになった (図 9 B, C)。Control 胚では筋節の表層面がくびれていることがわかり、HMS 構造ができていて、そして表層面のくぼみの部分に、MP 細胞と MFF 細胞が存在し、その部位に神経が投射しているのだが (図 9A, A')、Cyclopamine 処理胚では、筋節の表層面のくびれがない (つまり、HMS 構造ができていない) 状態で、MP 細胞と MFF 細胞が異所的に存在する場合は、その細胞を選択し神経軸索が投射している傾向が見られた (図 9B, B')。また、表層面のくぼみがなく、MP 細胞や MFF 細胞が完全に消失している筋節部分では、神経軸索の投射位置に決まりがなくなっているように見えた (図 9C, C')。

この傾向を詳しく調べるために、MP 細胞及び MFF 細胞の消失度に対する神経の湾曲率の割合を算出してみると (図 9D)、MP 細胞と MFF 細胞が異所的に存在している場合 ($\Delta \times$)、湾曲する神経の割合は 30%であったのに対し、MP 細胞と MFF 細胞が完全に消失している場合、湾曲する神経の割合が 100%になったことから ($\times \times$)、MP 細胞と MFF 細胞の消失度に依存して、湾曲する神経の割合が高まることがわかった。

タイムラプスの結果、及び、神経軸索の投射の結果から、側線原基は直線的に移動するという性質だけではなく、他の方向にも移動するという性質を持っていること、そして、背側と腹側の筋節を隔てる HMS 構造の部位に直線状に MP 細胞群、及び MFF 細胞群が存在することにより、側線原基は直線的に尾側へ移動していることが示唆された。

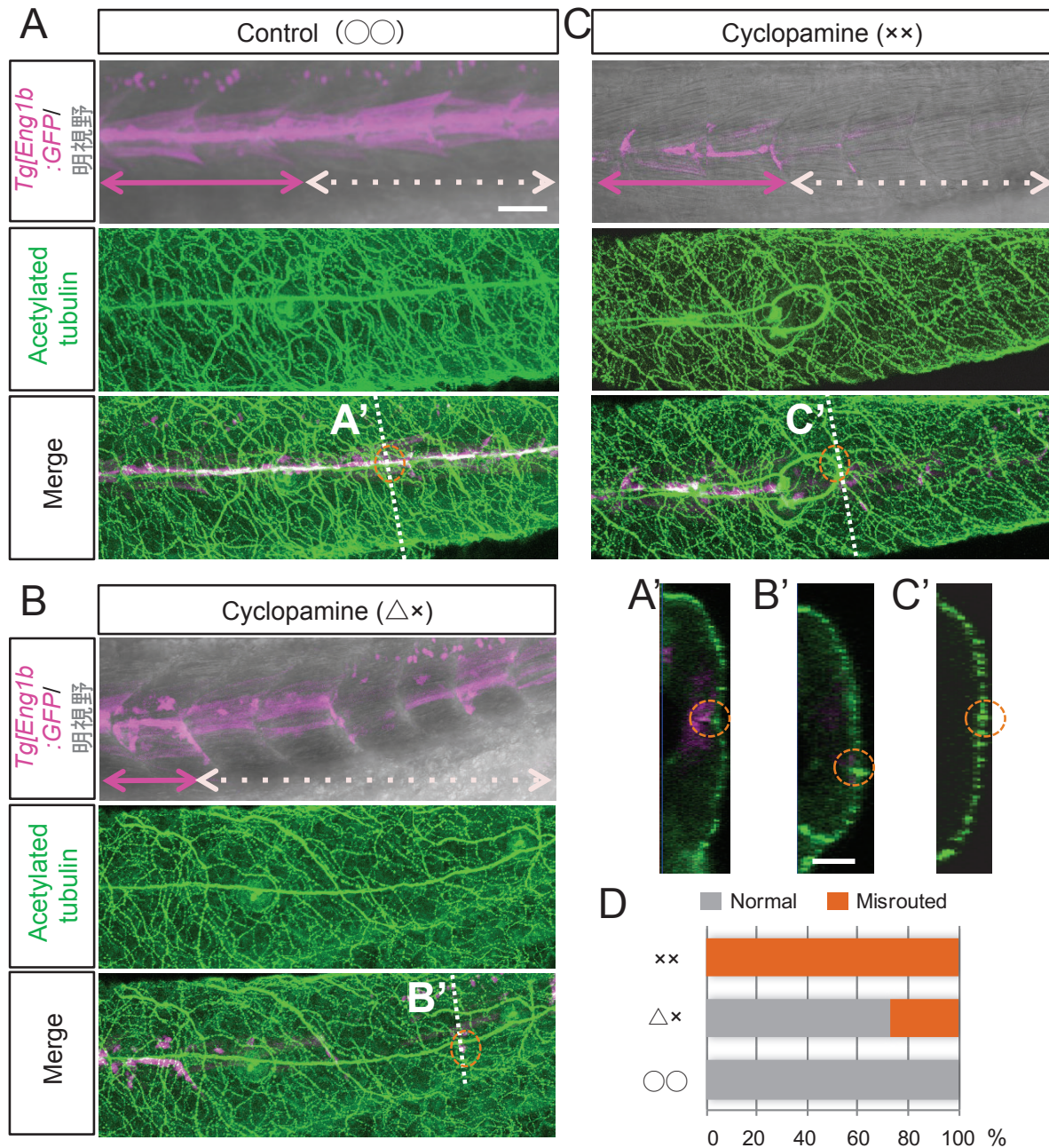


図9 神経軸索の投射による側線原基の移動の間接評価

(A) DMSO 処理を行った胚 (Control (○○))、(B) Cyclopamine 処理を行った胚の中で異所的に MP/MFF 細胞が形成されている胚 (Cyclopamine(△×))、(C) Cyclopamine 処理を行った胚の中で MP/MFF 細胞が形成されていない胚 (Cyclopamine(××))。記号の前側は MP/MFF 細胞が形成されているかを表しており、後ろ側は HMS 構造があるかを示している。○は形成されている、△は異所的に形成されている、×は形成されていないことを意味する。Scale bar: 50 μ m (A'-C')それぞれの yz 面。Scale bar: 25 μ m (D) A-C のそれぞれの表現系に対する神経の湾曲率の割合をグラフ化した。○○: n=28, △×: n=29, ××: n=53

MP 細胞と MFF 細胞をレーザー照射により消失させた場合、側線原基の直線的な移動は見られなくなる

上記の結果から、MP 細胞と MFF 細胞が正常に分化し、HMS 構造ができること、そしてその部位に MP 細胞と MFF 細胞が存在することにより側線原基は直線的に後方へ移動する可能性が考えられた。この可能性を検証するためには、HMS 構造ができてから MP 細胞と MFF 細胞を除去する系が必要となる。そこで、MP 細胞と MFF 細胞の発生が完了し、HMS 構造が完成した後、両者をフェムト秒レーザー照射により消失させ、側線原基の挙動を調べることを試みた。具体的には、MP 細胞と MFF 細胞を可視化できる *Tg[Eng1b:GFP]*ゼブラフィッシュ胚の 1 細胞期に、側線原基マーカーである *Cldnb1:lifeact-RFP* のプラスミド DNA を injection し、28.5°C のインキュベーター内で飼育した。その後、側線原基が移動を開始し、7-10 番目辺りの筋節を通過する時間帯（受精後 31 時間）に、yolk extension の終わりに位置する筋節（15-16 番目の筋節）から 4 個分の筋節内にある MP 細胞と MFF 細胞にフェムト秒レーザーを照射した。

まず、レーザー照射をした筋節で MP 細胞と MFF 細胞が除去できているかを GFP 蛍光が見られるか否かで確認したところ、レーザー照射をしていない筋節では MP 細胞と MFF 細胞の部位に GFP 蛍光が見られたのに対し（図 10A-XY i）、レーザー照射をした筋節では MP 細胞と MFF 細胞の部位に蛍光が確認されなかったことから、MP 細胞と MFF 細胞は除去できたと判断した（図 10A-XY ii）。そして、レーザー照射をした筋節で HMS 構造が維持されているかを確認するために、筋節が背側と腹側に分かれているかを MF20 で免疫染色を行い解析した。その結果、背側と腹側の筋節は分かれており、HMS 形成後に MP 細胞と MFF 細胞を除去しても、HMS 構造は維持されていることがわかった（図 10A-YZ ii 白矢印）。この状況下にある筋節を通過するとき、側線原基がどのように移動するかを調べるために、共焦点レーザー顕微鏡を用いてライブイメージングを行った。その結果、レーザー照射をしていない筋節を通過するときは、側線原基が直線的に移動していく様子が見られたが、レーザー照射により MP 細胞と MFF 細胞が完全に除去されている筋節を通過するときは、側線原基が、背側や腹側へ少しずれるが、Cyclopamine 処理胚の時のような大きな蛇行は観察されなかった（図 10B）。

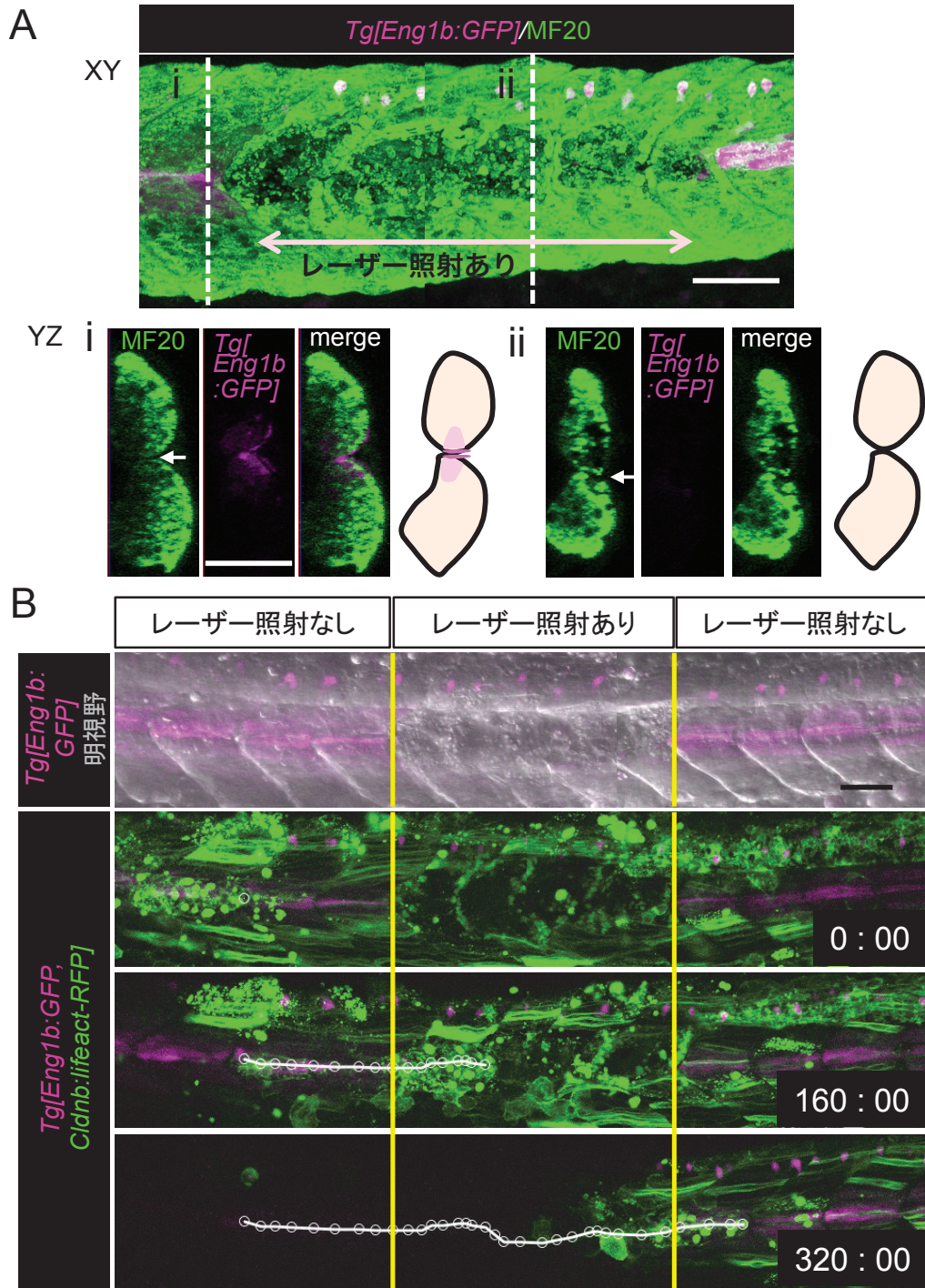


図 10 レーザー照射により MP 細胞と MFF 細胞を消失させたときの側線原基の挙動

(A) レーザー照射をしたときの筋節や HMS を含む環境の状態を見るために、MF20 抗体で免疫染色を行った。MP 細胞と MFF 細胞を消失させることができたが、HMS 付近にある筋節内部の細胞の一部も消失していた。ただ、このような状態であるにもかかわらず、背側と腹側の筋節は分かれていた (YZ ii 白矢印)。(B) MP 細胞と MFF 細胞の発生が完了してから両者をレーザー照射により消失させたときの側線原基の挙動。白線は、タイムポイントごとにプロットした側線原基の先頭 (白丸) の軌跡。n=4, Scale bar: 50 μ m

MP 細胞と MFF 細胞が側線原基の移動に及ぼす影響をさらに詳しく調べるために、MP 細胞と MFF 細胞がある筋節と、両方がない筋節間における側線原基の移動速度について比較した。まず、レーザー照射前の MP 細胞と MFF 細胞がある筋節では、側線原基の移動速度は $1.18 \pm 0.40 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=4$) であったのに対し、MP 細胞と MFF 細胞が完全になく筋節を通るときの移動速度は $0.87 \pm 0.55 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=4$) だったことから、レーザー照射前の筋節を通るときの移動速度よりも遅くなる傾向が見られたが有意差は認められなかった (図 11A)。

さらに側線原基の移動方向についても前記と同様の方法でローズダイアグラムを作成すると、レーザー照射前の MP 細胞と MFF 細胞がある筋節を通過するとき、側線原基の移動方向は水平方向に対し ± 20 度の範囲内でおさまっているのに対し (図 11B レーザー照射なし)、MP 細胞と MFF 細胞が完全になく筋節を通るときの側線原基の移動方向は、水平方向に対し ± 40 度の範囲に少し広がっていることがわかった (図 11B レーザー照射あり)。しかし、Cyclopamine 処理胚の HMS がない筋節における移動方向と比較すると、Cyclopamine 処理胚の HMS がない筋節における移動方向の方が角度の広がり方が大きく (図 8C, HMS \times)、レーザー照射胚ではその角度分布が小さいことが明らかになった (図 11B レーザー照射あり)。

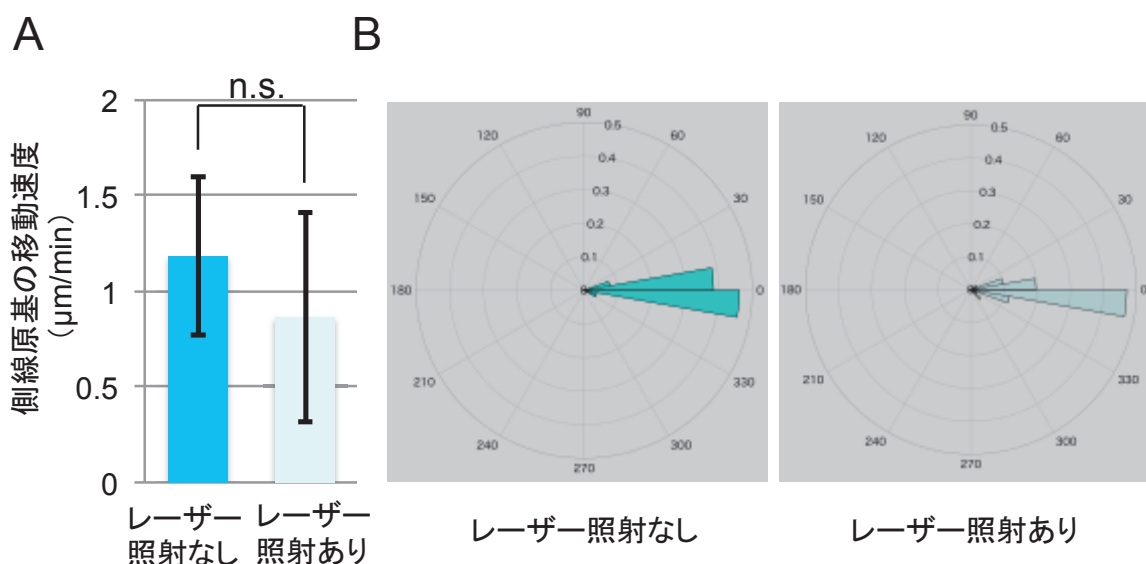


図 11 レーザー照射により MP 細胞と MFF 細胞を消失させたときの側線原基の移動の変化

(A) レーザー照射により HMS 形成後に MP/MFF 細胞をアブレートした時の側線原基の移動速度の平均値と s.d. (エラーバー) を示した。t 検定を行ったところ、両者で有意差は認められなかった (n.s.)。n=4 (B) レーザー照射により HMS 形成後に MP/MFF 細胞をアブレートした時の側線原基の水平方向に対する移動方向の角度を time point ごとに出し、ローズダイアグラムを作成した。

MP 細胞と MFF 細胞を消失させたことにより、側線原基の移動が水平方向に対して直線的ではなくなるかを、側線原基に投射する神経軸索の伸長方向を調べることにより、間接的に評価することにした。

レーザー照射を行っていない胚では、MP 細胞をつないだ線と重なるように神経軸索は形成されていたが (n=3) (図 12A)、レーザー照射を行った胚においては、MP 細胞をつないだ線とずれている部分があった (n=5) (図 12A 矢頭)。MP 細胞を結ぶ線上から神経軸索がどれだけずれたかを、MP 細胞をつないだ線と神経軸索をたどる線が作り出す領域の面積を測定することで調べた (図 12B)。レーザー照射を行っていない胚の場合、面積は $203.24\mu\text{m}^2$ であったのに対し、レーザー照射を行った胚においては $441.37\mu\text{m}^2$ であり、レーザー照射により MP 細胞と MFF 細胞を消失させたことで、側線原基の移動の直線性が失われたことがわかった ($P < 0.05$) (図 12C)。

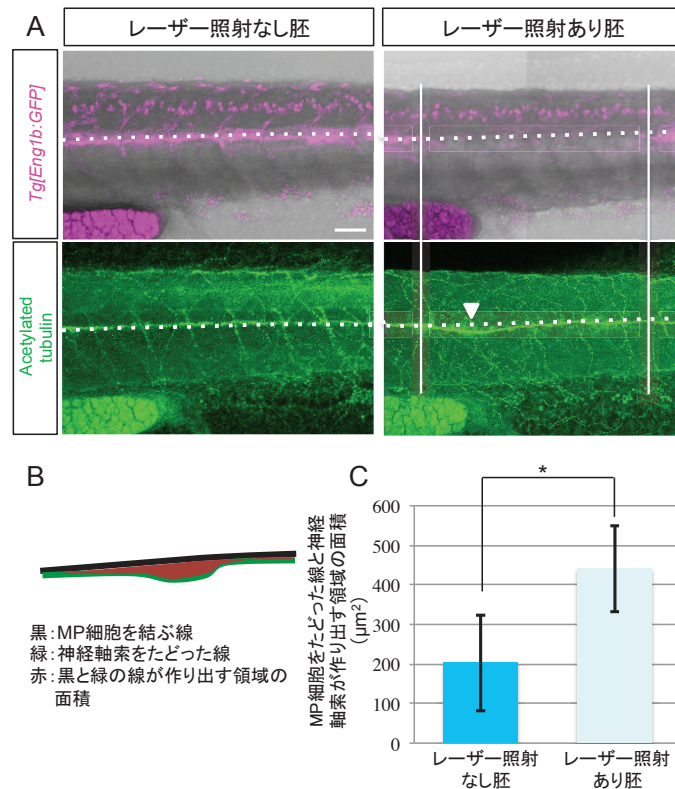


図 12 神経軸索の投射による側線原基の移動の間接評価

(A) 白色の点線は、連続して並ぶ MP 細胞をたどった線を表している。レーザー照射を行った場合、MP 細胞をたどった線状から少し外れている箇所が見られた (矢頭)。

(B) 神経軸索をたどる線と、MP 細胞を結ぶ線が作り出す領域の面積 (赤の部分)。

(C) 神経軸索をたどる線と、MP 細胞を結ぶ線が作り出す領域の面積を測定した結果。平均値と s.d. (エラーバー) を示した。レーザー照射なし胚: n=3, レーザー照射あり胚: n=5, Student's T-test *P<0.05. Scale bar: $50\mu\text{m}$

以上の結果から、HMS の構造が構築された後、MP 細胞及び MFF 細胞を消失させた場合、側線原基の移動の直線性は多少失われるが、その表現系は非常にマイルドであることが明らかになった。

タイムラプスの結果、水平方向に対する側線原基の移動方向のローズダイアグラム、そして MP 細胞を結ぶ直線と神経軸索をたどる線がつくりだす領域の面積の結果から、HMS の構造が構築された後、MP 細胞及び MFF 細胞を消失させた場合、側線原基は多少直線的な移動をしなくなるが、基本的には直線的に移動することが示された。

Cyclopamine 処理胚の結果、及びレーザー照射胚の結果から、MP 細胞と MFF 細胞が正常に分化し、HMS 構造を作ること、そして、HMS ができた場所に、MP 細胞と MFF 細胞が存在することにより、側線原基は直線的に移動することが示唆された。

考察

これまで、HMS に沿って発現するケモカイン *sdf1a* をノックダウンした場合でも、側線が体側面の中心にできること、そのときに HMS ができていることから、側線が体側面の中心に形成されるには HMS が必要であることが示唆されていたが (Li et al., 2004)、これの実証はされていなかった。そこで本研究では、薬剤投与、および、レーザーアブレーションを用いることで、HMS を構成する MP 細胞と MFF 細胞を一部の筋節から消失させる実験系を確立し、側線原基の移動における役割を解析した。その結果、MP 細胞と MFF 細胞の分化過程を阻害し、HMS の構造が形成されずに背腹の筋節が正常に分断されなかった部分を側線原基が移動するときは、直線的な移動様式が失われることが明らかになった。また、HMS 構造が構築された後、MP 細胞と MFF 細胞を消失させた際にも、側線原基の直線的な移動は影響をうける傾向にあったが、概ね正常であることが明らかになった。以上の結果は、側線原基の直線的な移動には、MP 細胞と MFF 細胞の正常な分化により形成される HMS 構造、そして HMS ができている場所に MP 細胞と MFF 細胞が存在することが必要であることを示唆している (図 13)。したがって、本研究は、器官形成において細胞が正しく移動するには、胚発生期の細胞の正常な分化とそれに伴う器官形成 (本研究では HMS) が、後に形成される直線的な側線の形成に大きく寄与することを示唆しており、異なる器官間相互作用 (本研究では、側線原基と HMS をはじめとした細胞外環境) の重要性を示唆できたと考えている。

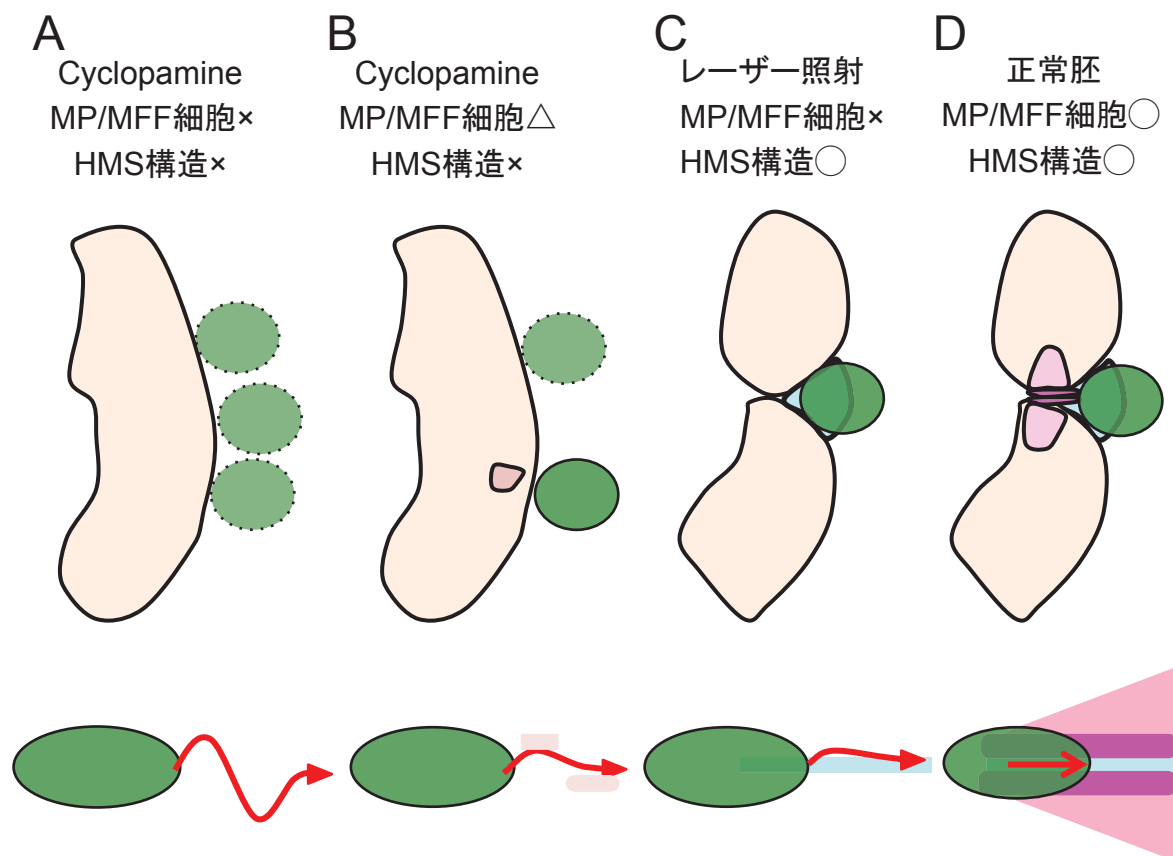


図 13 側線原基の直線的な移動のモデル

側線原基が直線的に移動するモデル。MP 細胞と MFF 細胞の発生が正常に起こっていない筋節では、HMS 構造ができず、筋節が背側と腹側に分かれていない (A)。この場合、側線原基は分かれている場所を通ることができず、移動する場所が安定しない。その結果、直線的な移動が見られなくなる。しかし、HMS 構造ができていない状態でも MP 細胞と MFF 細胞が異所的に分化している場合には (B)、その細胞を選択する可能性が高くなるため、MP 細胞と MFF 細胞が分化する位置に依存して側線原基は移動すると考えられる。そのため、側線原基の直線的な移動が少し回復する。一方、MP 細胞と MFF 細胞が正常に分化し HMS 構造ができてから両細胞を除去した場合 (C)、筋節は背側と腹側に分かれているため、そのくぼみを側線原基が移動している可能性が考えられる。そのため、側線原基の直線的な移動がより回復している傾向が見られた。MP 細胞と MFF 細胞が正常に発生している筋節では、筋節が背側と腹側に分かれており、くぼみの部分に MP 細胞と MFF 細胞が存在する (D)。このとき、側線原基はくぼみ部分、そして MP 細胞と MFF 細胞を選択して移動するため、尾側に向かって直線的に移動すると考えられる。

Cyclopamine 投与による MP 細胞及び MFF 細胞を途中の筋節から欠損させる系

本研究では、Cyclopamine を一過的に投与することで、MP 細胞と MFF 細胞の分化が阻害され、背腹の筋節を分断する HMS 構造の形成を阻害することに

成功した。しかし、本来、Cyclopamine の可逆性を利用して、投与している間のみの HMS の形成を阻害することで、HMS が有→無→有の状況を作り、その上を側線原基がどのように移動するかを調べたかったのだが、Cyclopamine を一過的に投与したにもかかわらず、投与後に形成された以降にできた筋節全てで MP 細胞と MFF 細胞の消失が観察されるという予期せぬ HMS 形成不全が起こっていた。これは、Cyclopamine の組織内残存率が高いことに由来すると考えられる。今後もし HMS が有→無→有の状況を作り出すことを行うには、Cyclopamine 以外の Shh シグナルの阻害剤で、組織内残存率が低いものを選び、研究を行う必要があると考えている。

薬剤処理による MP 細胞と MFF 細胞の除去、及びフェムト秒レーザーによる MP 細胞と MFF 細胞の除去

Cyclopamine 処理により、MP 細胞と MFF 細胞の分化過程を阻害すると、HMS の構造が形成されず、背腹の筋節が正常に分断されなかった。そしてその部分を側線原基が移動するときは、側線原基の直線的な移動が起こらなくなった。それに対し、HMS 構造が構築された後、レーザー照射により MP 細胞と MFF 細胞を消失させても、側線原基の直線的な移動は若干影響をうけるが、概ね正常であることが明らかになった。この違いがなぜ生じるかについての答えは本研究では出すことができていないが、MP 細胞と MFF 細胞の除去するタイミングが2つの実験で大きく異なるため、そこにこの問いに答えるヒントが隠されていると考えている。

Cyclopamine 処理をして MP 細胞と MFF 細胞を消失させると、その筋節では背側と腹側の筋節の分断が起こらず、背腹の筋節が融合しており、HMS の構造による明確な背と腹の違いが、側線原基が通る付近で認められていない。これに対して、レーザー照射によって MP 細胞と MFF 細胞を除去した場合、筋節の背腹の分断については辛うじて維持されているように見える。よって、MP 細胞と MFF 細胞の分化が終わり、側線原基が移動する直前に両者を取り除いた場合は、側線原基の移動に必要な環境はまだ維持されており、側線原基の移動が大きく影響を受けなかったのではないかと考えている。その環境要因としては、周辺細胞から分泌される液性因子や細胞外基質の分布、組織の空間構造、などの複合的なものと考えられる。これを同定することは非常に難しいが、正常胚の HMS 付近に存在する細胞群を採取し、RNA シーケンスや MS 解析によって候補因子を選び、コントロール胚、Cyclopamine 処理胚、レーザーアブレーション

ヨシ胚の3つで、候補因子の局在がどのように変化するかを調べることで同定できるのではないかと考えている。

HMS と側線

側線は、水生動物である円口類、魚類、そして両生類の幼生（及び成体に変態後も水の中で暮らす一部の両生類）に見られる感覚受容器である (Braun et al., 1997; Pichon et al., 2004; Piotrowski et al., 2014)。どの種においても、感覚細胞である有毛細胞、それを支持する支持細胞からなる感丘が頭部と体に存在している (Braun et al., 1997)。しかし、側線のでき方、特に PLL のでき方が種ごとに異なる。HMS がなく、筋節が背と腹に分かれていない円口類の場合 (Currie et al., 2001; Kusakabe et al., 2005)、頭部付近に数個の感丘が形成されるが、PLL に相当する体側部の側線は形成されない (Braun et al., 1997)。一方、HMS があり、筋節が背と腹に分かれているサメなどの軟骨魚類、及び本研究で用いたゼブラフィッシュが属する真骨魚類（ゼブラフィッシュが含まれる骨鰐上目、サケやカマスが属する原棘鰭上目、メダカやマグロが属する棘鰭上目）では、側線原基が頭部から尾部に向かって HMS に沿って移動し、その途中で数個の感丘が定着し、側線が形成される (Pichon et al., 2004; Gillis et al., 2012; Ghysen et al., 2012; Piotrowski et al., 2014)。一方、四足動物の先祖である肉鰭綱は、HMS は見られないのだが筋節は背と腹に分かれており (Hammond et al., 2009)、肉鰭綱から派生したと言われている両生類では HMS は存在し、筋節は背と腹に分かれているのだが、側線は背と腹の分かれ目に沿っては形成されない (Pichon et al., 2004; Shook et al., 2004)。これらのことから、側線原基の移動に、HMS が必ず必要というわけではなく、進化の系譜ごとに、利用する外環境が異なっている可能性が示唆される。つまり、水の中に存在する多数の種類（真骨魚類の仲間）では、筋節を分けている HMS の部分が側線原基の移動に必要な外環境を含み、しかも、体の全体に感丘を配置するのに合理的であったものと考えられる。一方、円口類や両生類では、側線原基が移動するときには、HMS 以外の外環境を利用して移動しているため、分布が異なると考えられる。よって、外環境を同定する過程では、ゼブラフィッシュ以外の生物種においても候補因子の分布と、感丘やそれに投射する神経軸索の局在を解析することでヒントが得られるかもしれないと考えている。

謝辞

奈良先端科学技術大学院大学での4年間に渡る研究生活を支えてくださった全ての方々に感謝いたします。博士後期課程から入学を希望した私を迎えて下さり、研究の場を提供して下さった別所康全教授、後期課程から研究を始め、ただでさえ時間のない状況で途中から研究テーマを変えたいという私に、基礎から丁寧に教えて下さいました松井貴輝准教授、朝ミーティングなどでいつも鋭い指摘をして下さった中畑泰和助教、研究だけではなく就職活動のことなどもアドバイスして下さいました北川教弘助教に感謝いたします。

アドバイザー委員として幅広い視点からの助言を下さいました、加藤順也教授、石田靖雅准教授に感謝いたします。

阻害剤実験についてアドバイスを頂きました笹井紀明准教授、ゼブラフィッシュのTg作成のことなどでアドバイス頂きました浦崎明宏助教にはこの場をお借りして感謝申し上げます。ありがとうございました。

遺伝子発現制御研究室の皆様には4年間大変お世話になりました。研究員である秋山隆太郎さんには、文章の書き方や図の組み立て方など多くの点でお世話になりました。先輩である二反田康秀さん、田原直幸さん、石川寛さんには研究への取り組み方、マウス・ゼブラフィッシュの扱い方、イメージング系について多くのことを教えて頂きました。Won Kah Loonさん、Kenny Lischerさん、石嶋帆之介さん、若狭瑞帆さんには解析のことやTgゼブラフィッシュの管理などをはじめ、多くの点で支えて頂きました。技術補佐員の横内舞子さんにはゼブラフィッシュのシステム管理をはじめ、実験の部分で助けて頂きました。秘書の田野美佐さんには事務手続きのことなどでいつも助けて頂きました。皆様に感謝いたします。

また、遺伝子発現制御研究室の修士課程で卒業した皆様をはじめ、他の研究室に所属する皆様には、研究生活だけではなく、生活面においても私におつきあい下さり本当に感謝しております。

そして同じ研究室だった同期の山田壮平くんをはじめ同期生には、本当にお世話になりました。山田くんには研究室を卒業して、物質科学創成科学研究科の特任助教になってからもフェムト秒レーザーの実験をお手伝い頂き、誠に感謝しております。

最後に、どんな時でもあらゆる面で支えてくれた家族に感謝の気持ちでいっぱいです。長い間学生生活を送ることを許して頂きありがとうございました。

参考文献

Aman, A., & Piotrowski, T. (2008). Wnt/beta-catenin and fgf signaling control collective cell migration by restricting chemokine receptor expression. *Developmental Cell*, 15(5), 749-761.

Braun Christopher B. and Northcutt R. Glenn. (1997). The lateral line system of hagfishes (craniata: Myxinoidea). *Acta Zoologica*, 78(3), 247-268.

Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K., & Beachy, P. A. (2002). Inhibition of hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to smoothed. *Genes & Development*, 16(21), 2743-2748.

Chitnis, A. B., Nogare, D. D., & Matsuda, M. (2012). Building the posterior lateral line system in zebrafish. *Developmental Neurobiology*, 72(3), 234-255.

Currie, P. D., & Ingham, P. W. (2001). Induction and patterning of embryonic skeletal muscle cells in the zebrafish. *Fish Physiology*, 18, 1-17.

Dambly-Chaudiere, C., Cubedo, N., & Ghysen, A. (2007). Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: Antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC Developmental Biology*, 7, 23-213X-7-23.

David, N. B., Sapede, D., Saint-Etienne, L., Thisse, C., Thisse, B., Dambly-Chaudiere, C., et al. (2002). Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: Role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), 16297-16302.

De Arcangelis A., Georges-Labouesse E. (2000). Integrin and ECM functions: Roles in vertebrate development. *Trends in Genetics*, 9(16), 389-395.

Dona, E., Barry, J. D., Valentin, G., Quirin, C., Khmelinskii, A., Kunze, A., et al. (2013). Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient. *Nature*, *503*(7475), 285-289.

Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, *420*(6916), 629-635.

Felsenfeld, A. L., Curry, M., & Kimmel, C. B. (1991). The fub-1 mutation blocks initial myofibril formation in zebrafish muscle pioneer cells. *Developmental Biology*, *148*(1), 23-30.

Friedl, P., & Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology*, *10*(7), 445-457.

Ghysen, A., & Dambly-Chaudiere, C. (2007). The lateral line microcosmos. *Genes & Development*, *21*(17), 2118-2130.

Ghysen, A., Dambly-Chaudiere, C., Coves, D., de la Gandara, F., & Ortega, A. (2012). Developmental origin of a major difference in sensory patterning between zebrafish and bluefin tuna. *Evolution & Development*, *14*(2), 204-211.

Gillis, J. A., Modrell, M. S., Northcutt, R. G., Catania, K. C., Luer, C. A., & Baker, C. V. (2012). Electrosensory ampullary organs are derived from lateral line placodes in cartilaginous fishes. *Development (Cambridge, England)*, *139*(17), 3142-3146.

Gilmour, D., Knaut, H., Maischein, H. M., & Nusslein-Volhard, C. (2004). Towing of sensory axons by their migrating target cells in vivo. *Nature Neuroscience*, *7*(5), 491-492.

Gompel N., Cubedo N., Thisse C., Thisse B., Dambly-Chaudiere C., Ghysen A. (2001). Pattern formation in the lateral line of zebrafish. *Mechanisms of Development*, *105*, 69-77.

- Hammond, K. L., Baxendale, S., McCauley, D. W., Ingham, P. W., & Whitfield, T. T. (2009). Expression of patched, prdm1 and engrailed in the lamprey somite reveals conserved responses to hedgehog signaling. *Evolution & Development*, *11*(1), 27-40.
- Hatta, K., Bremiller, R., Westerfield, M., & Kimmel, C. B. (1991). Diversity of expression of engrailed-like antigens in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, *112*(3), 821-832.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish *Developmental Dynamics*, *203*, 253-310.
- Kimura, Y., Hisano, Y., Kawahara, A., & Higashijima, S. (2014). Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Scientific Reports*, *4*, 6545.
- Kusakabe, R., & Kuratani, S. (2005). Evolution and developmental patterning of the vertebrate skeletal muscles: Perspectives from the lamprey. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *234*(4), 824-834.
- Li, Q., Shirabe, K., & Kuwada, J. Y. (2004). Chemokine signaling regulates sensory cell migration in zebrafish. *Developmental Biology*, *269*(1), 123-136.
- Lo, C-M., Wang, H-B., Dembo, M., and Wang, Y-l. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biological Journal*, *79*, 144-152.
- Ma, E. Y., & Raible, D. W. (2009). Signaling pathways regulating zebrafish lateral line development. *Current Biology : CB*, *19*(9), R381-6.
- Matsui, T., Ishikawa, H., & Bessho, Y. (2015). Cell collectivity regulation within migrating cell cluster during kupffer's vesicle formation in zebrafish. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *3*, 27.

Meyers, J. R., Planamento, J., Ebrom, P., Krulewitz, N., Wade, E., & Pownall, M. E. (2013). Sulf1 modulates BMP signaling and is required for somite morphogenesis and development of the horizontal myoseptum. *Developmental Biology*, 378(2), 107-121.

Mizoguchi, T., Togawa, S., Kawakami, K., & Itoh, M. (2011). Neuron and sensory epithelial cell fate is sequentially determined by notch signaling in zebrafish lateral line development. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(43), 15522-15530.

Nguyen-Chi, M. E., Bryson-Richardson, R., Sonntag, C., Hall, T. E., Gibson, A., Sztal, T., et al. (2012). Morphogenesis and cell fate determination within the adaxial cell equivalence group of the zebrafish myotome. *PLoS Genetics*, 8(10), e1003014.

Nogare, D. D., & Chitnis, A. B. (2017). A framework for understanding morphogenesis and migration of the zebrafish posterior lateral line primordium. *Mechanisms of Development*, 148, 69-78.

Ochi, H., & Westerfield, M. (2007). Signaling networks that regulate muscle development: Lessons from zebrafish. *Development, Growth & Differentiation*, 49(1), 1-11.

Pichon, F., & Ghysen, A. (2004). Evolution of posterior lateral line development in fish and amphibians. *Evolution & Development*, 6(3), 187-193.

Piotrowski, T., & Baker, C. V. (2014). The development of lateral line placodes: Taking a broader view. *Developmental Biology*, 389(1), 68-81.

Reig, G., Pulgar, E., & Concha, M. L. (2014). Cell migration: From tissue culture to embryos. *Development (Cambridge, England)*, 141(10), 1999-2013.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. & Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rat regulates growth factor-induced membrane. *Cell*, 70, 401-410.

Scarpa, E., & Mayor, R. (2016). Collective cell migration in development. *The Journal of Cell Biology*, 212(2), 143-155.

Shoji, W., Yee, C. S., & Kuwada, J. Y. (1998). Zebrafish semaphorin Z1a collapses specific growth cones and alters their pathway in vivo. *Development (Cambridge, England)*, 125(7), 1275-1283.

Shook, D. R., Majer, C., & Keller, R. (2004). Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, *xenopus laevis* and *xenopus tropicalis*. *Developmental Biology*, 270(1), 163-185.

Svetic, V., Hollway, G. E., Elworthy, S., Chipperfield, T. R., Davison, C., Adams, R. J., et al. (2007). Sdf1a patterns zebrafish melanophores and links the somite and melanophore pattern defects in choker mutants. *Development (Cambridge, England)*, 134(5), 1011-1022.

van Eeden, F. J., Granato, M., Schach, U., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., et al. (1996). Mutations affecting somite formation and patterning in the zebrafish, *danio rerio*. *Development (Cambridge, England)*, 123, 153-164.

Varga, Z. M., Amores, A., Lewis, K. E., Yan, Y. L., Postlethwait, J. H., Eisen, J. S., et al. (2001). Zebrafish smoothed functions in ventral neural tube specification and axon tract formation. *Development (Cambridge, England)*, 128(18), 3497-3509.

Venero Galanternik, M., Lush, M. E., & Piotrowski, T. (2016). Glypican4 modulates lateral line collective cell migration non cell-autonomously. *Developmental Biology*, 419(2), 321-335.

Whitfield, T. T., Granato, M., van Eeden, F. J., Schach, U., Brand, M., Furutani-Seiki, M., et al. (1996). Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. *Development (Cambridge, England)*, 123, 241-254.

Wolff, C., Roy, S., & Ingham, P. W. (2003). Multiple muscle cell identities induced by distinct levels and timing of hedgehog activity in the zebrafish embryo. *Current Biology : CB*, 13(14), 1169-1181.

Yee, C. S., Chandrasekhar, A., Halloran, M. C., Shoji, W., Warren, J. T., & Kuwada, J. Y. (1999). Molecular cloning, expression, and activity of zebrafish semaphorin Z1a. *Brain Research Bulletin*, 48(6), 581-593.