

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06307

研究課題名(和文)ウニの後胚発生機構の研究

研究課題名(英文)Study on the post-embryonic development of the echinoids

研究代表者

美濃川 拓哉 (Minokawa, Takuya)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：60400305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、幼生とはなにか、成体とはなにか、成体を形作るしくみとはどのようなものか、という後胚発生に関連する問題を、【1】正常発生における成体原基の形成過程と構造の解析と、【2】再生・出芽実験系を利用した胚発生と後胚発生の機構的関連の理解、の2課題に注目して検討した。【1】については消化管の構造解析を行った。その結果、幼生から成体への変態期における消化管の形態変化に新たな特徴を発見した。【2】については幼生の再生実験系を用いて、幼生構成細胞が後胚発生に関与するかどうかを検証した。幼生は、その消化管の大部分を失っても、欠損部を再生し、機能的・構造的に正常な消化管を再構築できることを確かめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、これまで理解の進んでいなかった間接発生型動物における幼生と成体の発生生物学的理解を深めることに貢献する。我々、脊椎動物は本研究で取り扱うタイプの幼生(一次幼生)をその生活史に持たない。しかし、脊椎動物の祖先が一次幼生を持つ祖先型動物から進化した可能性は極めて高い。我々の進化を考えるうえで、幼生とはなにか、成体とはなにか、という本研究の追求する疑問は、我々自身の進化を考える上で極めて重要であるだけでなく、社会における生物学的世界観の充実の素材のひとつとして意義深い。

研究成果の概要(英文)：The present study deals the questions related to post-embryonic development, such as what is a larva, what is an adult, and what is the mechanism that forms an adult. We focus on the following two topics: [1] Formation process and structure of adult rudiment in normal echinoid development, and [2] Understanding the mechanical relationship between embryonic and post-embryonic development using the regeneration experimental system. For [1], We have discovered a new feature in the morphological change of the digestive tract during the metamorphosis period from larva to adult. Regarding [2], it was verified whether or not the larval constituent cells are involved in post-embryonic development using a larval regeneration experimental system. It was confirmed that the larvae can regenerate the missing part and reconstruct the functionally and structurally normal digestive tract even if most of the digestive tract is removed experimentally.

研究分野：進化発生学

キーワード：ウニ 後胚発生 成体 幼生 変態 消化管

## 1. 研究開始当初の背景

個体発生の様式は、間接発生と直接発生に分けられる。間接発生とは、卵から幼生までの【胚発生 embryogenesis】と、幼生から成体に至る【後胚発生 post-embryonic development】の二つの段階を明瞭に区分できる発生様式を指す。一方、幼生段階を経ずに、直接、成体ボディプランを作るしくみを直接発生と呼ぶ。間接発生は多細胞動物に広く見られる発生様式であり、その機構の理解は多細胞動物の起源と進化を考えるうえで重要な鍵を提供するとして、古くから注目を集めている。

胚発生についてはさまざまな動物で研究が進んでいるが、後期幼生特有の形質と成体ボディプラン形成の段階である後胚発生の知見は蓄積が比較的少ない。個体発生の完全な理解には後胚発生の理解が不可欠であることは自明であり、以前より多くの研究者がこの問題に挑んできた。しかし必ずしも理解が進んでいるとはいえない状況にある。

後胚発生の重要性を認識していた進化発生学者の一人である Eric H. Davidson は、20 世紀末に「set aside cell 仮説」を提唱した (Peterson et al. 1997 他)。この仮説の要点は、間接発生型発生機構を、「胚発生と後胚発生を担当する細胞が、発生の極めて初期の段階で区別される機構」とみなす点にある。この仮説によると、幼生を構成する細胞は 2 タイプに分けられる。第一のタイプは、もっぱら幼生形成にのみ関わる「幼生構成細胞 (非 set aside cell)」で、もう一つのタイプは「set aside cell」である。前者は幼生を形作ることにだけ関与して、後胚発生には関与しない。一方、set aside cell は幼生基本構造の完成後にスタートする成体形成過程にのみ関与する細胞であり、幼生形成機構から「set aside」されているため、このように呼ばれる。これら二タイプの運命は発生の極めて早い段階に決定される、と set aside cell 仮説は主張する。たしかに、この仮説は間接発生現象のいくつかの性質を合理的に説明する。しかし、同時に問題点も指摘されている。その一つは set aside cell の実在性である。Davidson はウニの小小割球を set aside cell とみなし、この細胞の挙動をもとに当該仮説を構築したが、小小割球以外の細胞がウニの成体形成に関与する可能性は古くから指摘されている。成体原基の主要部をつくる左側体腔嚢には確かに小小割球が含まれるものの、同時に大割球の子孫細胞も貢献する。正常発生において、小小割球のみが成体原基形成に関わるとは考えがたく、大割球子孫細胞も成体形成に関与することはおそらく確からしいのだが、これに関連する現象の理解は不十分である。つまり set aside cell とは具体的にどのような細胞かということについての実験事実を基礎とした説明には不十分な点がある。

幼生構成細胞 (非 set aside cell) が set aside cell (成体構成細胞) とは性質が異なる点にも疑問が呈されている。体の一部を失った幼生や、幼生の一部分由来の出芽体が、欠損部分を修復するだけでなく成体原基をも形成したとする報告がある (Vickery et al. 2002, Eaves & Palmer 2003)。これらの報告は、幼生構成細胞の発生能には大きな可塑性があることと、幼生構成細胞も成体形成に関与する可能性を示唆している。なかでも、左側体腔嚢を含まないと思われる再生体や出芽体による成体原基形成の報告は極めて示唆に富むが、これらの研究報告には細胞・組織の起源に関する情報が乏しく、set aside cell 仮説検証の実験的証拠としては不十分である。しかし、この方向の研究は set aside cell 仮説再検討の重要性と、後胚発生の実験的研究における重要かつ新しい方向性を示唆している。

このような状況のもと、本研究では幼生とはなにか、成体とはなにか、成体を形作るしくみとはどのようなものか、という後胚発生に関連する発生学上の問題を、後胚発生過程におきる形態形成と幼生構成細胞の機能の観点から理解することをめざしてきた。

## 2. 研究の目的

本研究は、後胚発生機構の諸課題のうち、(1)胚発生と後胚発生が別の細胞によって進行すると考える「set aside cell 仮説」の検証、(2)胚発生と後胚発生の機構的関連の二点に注目した。具体的には【課題 1】「正常発生における成体原基の形成過程と構造の解析」、【課題 2】「再生・出芽実験系を利用した胚発生と後胚発生の機構的関連の理解」の 2 課題を扱った。

胚発生と後胚発生の機構的関連については、set aside cell 仮説のように極めて独立性が高いと考える立場と、ある程度の関連性があると考えられる立場がある。胚発生と後胚発生の機構的独立性を支持する例としては、胚発生が典型的な様式で進行しない場合でも後胚発生は一見正常に進行する事例や、胚発生過程が進化の過程で大きく変更された直接発生ウニの存在などが挙げられる。一方、再生・出芽における予定成体領域以外の幼生細胞による成体原基形成現象 (Vickery et al. 2002, Eaves & Palmer 2003) は、胚発生と後胚発生の関係が従来考えられてきたより複雑であることを示唆している。幼生構成細胞 (非 set aside cell) には成体形成に関与しうるほどの高い発生可塑性があるのかもしれない。このような視点から、胚発生と後胚発生の機構的関連を実験的に理解することを本研究のゴールの一つとして設定した。

### 3. 研究の方法

【課題1】については、共焦点レーザー顕微鏡をはじめとした各種顕微鏡による観察と、三次元再構築をはじめとした画像解析技術を利用した。本研究の対象となるウニ後期幼生と幼若個体は透明性が低く、光学顕微鏡観察に困難な点が多い。この問題を解決するための透明化技術についての技術開発もおこなった。

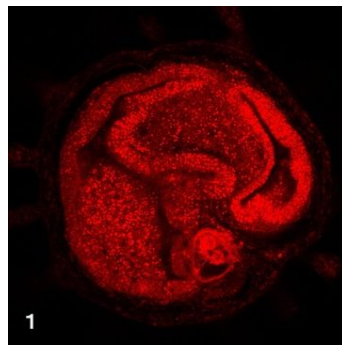
【課題2】については、顕微操作技術による構造欠損幼生の作成と、その再生過程解析を主たる手段として用いた。構造欠損幼生の再生は形態および遺伝子発現の点から評価した。形態の解析には各種顕微鏡を用い、遺伝子発現についてはリアルタイム定量PCRとWhole mount in situ hybridization法を用いた。平行して、出芽誘導技術の開発を実施した。

後胚発生研究がすすんでいない原因として、後胚発生特有の様々な技術的困難があげられるが、本研究ではそれらの困難の一部を再生実験系の導入で解決し、別の問題については回避する。後胚発生研究の阻害要因の一つは、後胚発生の個体間多様性にある。胚発生は発生段階の同調性も極めて高く、形態形成にも個体差の見られないプロセスだが、後胚発生の時間的同調性は極めて低く、形態形成にも大きな個体差がある。この非同調性・個体差の原因は複雑で、正常発生過程でこの差異を解消する方法は現時点では存在しない。しかし、再生系であれば、これらの問題を実験的解析が可能なレベルにまで縮小できる可能性があった。再生現象は幼生組織の切除でスタートする。つまり、現象のトリガーを実験者が「引く」ことができる。これによって対象とする現象の時間的同調性をある程度揃えることが可能になると考えられる。さらに実験対象とする個体も、その形態的特徴を指標として目的に合致したものを実験者が選択できるので、形態的個体差の問題も最小化できる可能性があった。

後胚発生研究を妨げているもう一つの理由は、後胚発生のみで効果的な発生調節遺伝子の機能阻害実験が現時点では存在しないことにある。胚発生と後胚発生の過程では、多くの発生調節遺伝子が共通して機能する。現在、ウニで実用化されている遺伝子機能阻害法では、胚発生に影響を与えずに後胚発生のみを攪乱することは困難である。本研究では遺伝子機能攪乱を行わない。イメージングによる形態解析と、再生実験等の発生攪乱系での細胞分化・形態変化から後胚発生の機構解明を目指すことで、遺伝子機能阻害実験の限界を回避することをめざした。

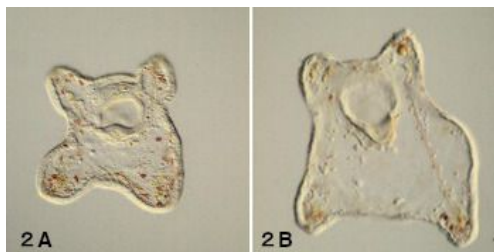
### 4. 研究成果

【課題1】では成体原基形成過程の記載にとりくんだ。本研究を進める過程で、変態期初期の消化管領域に注目すべき変化がある可能性が示唆された。そこで、消化管の構造解析に重点をおき、稚ウニの内部構造の変態期における形態変化の詳細な理解をめざした。幼生型の消化管が成体型消化管に変化する過程は数日以上かかる長いプロセスである。染色・透明化技術の確立をおこなうことで、透明度が低いうえに大きな稚ウニの内部構造が共焦点レーザー顕微鏡で明瞭に可視化できるようになった。図1は変態開始後1日目の個体の共焦点レーザー顕微鏡画像である。我々はこの発生段階に新規現象を発見した。この現象は、幼生から成体への変態期の極めて短い時期に、消化管とその近傍で生じる。この現象には、複数の細胞タイプ・組織の性質の変化が関与していることが示唆されている。現在、この現象の詳しい解析を進めている。



本課題では研究方針の変更を行ったものの、その後は前述のように着実に研究はすすんでいる。当初の計画時には、成体原基形成過程を体腔囊に注目して理解することを目指していたが、体腔囊の構造上の特性から、解析に必要な技術開発が難航した。この技術開発の過程で前述の新現象の発見があり、その現象の理解にむけて方針の変更をおこなった。なお、中胚葉構造の理解については、新現象の解析を進める過程で解明の糸口を掴みつつある。今後、さらなる技術開発を行いながら、当初の計画で焦点をあてていた体腔囊の形態の解析にも進む計画である。

【課題2】については幼生の再生実験系を用いて、幼生構成細胞（非 set aside cell）が後胚発生に関与するかどうかを検証した。幼生は、その消化管の大部分を失っても、欠損部を再生し、機能的・構造的に正常とみなしうる消化管を再構築できるとする、従来の研究を本邦産の3種のウニで確かめた。幼生の前側断片には小割球子孫細胞（set aside cell）が含まれないことを形態学的に確認して一連の研究を進めた。前側断片幼生における消化管再生は、口に由来する盲管の形成から始まる。図2Aは盲管形成前、図2Bは盲管形成開始後の前側断片個体の写真である。盲管の形成にひきつづいて、左右体腔囊の形成と、消化管の分節化が起きる。前側断片個体の消化管分節化には、正常発生における消化管分節化とは大きく異なる点が見つかっている。正常発生での盲管形成は原腸陥入であり、原腸陥入で最初に作られる陥入部は将来、肛門になる。一方、前側断片個体で最初に作られる陥入部は口になる。正常発生では伸長する原腸は腸、胃、食道の順番で形成され



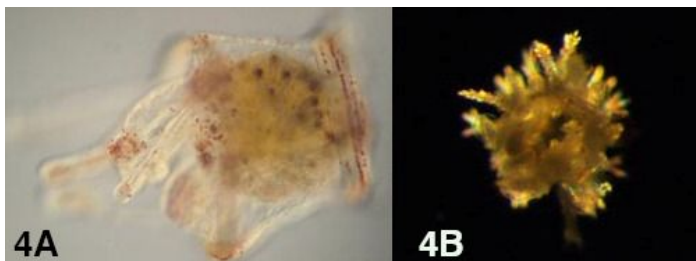
て、最後に口が形成される。一方、前側断片個体では口に続いて食道、胃、腸、肛門の形成が起きるため、正常発生と器官形成の順番が逆である。器官形成の過程には差異が認められるものの、結果として形成される三分節の消化管は形態的には類似している。図3は三分節消化管の完成した前側断片個体である。分節構造各部分の相対的なサイズは正常胚とは異なっているものの、正常なものと同様の三分節構造が再生している。

器官形成のタイミングの違いに関連した違いが発生調節遺伝子の転写レベルでもみられるかどうかを確かめるため、前側断片個体における発生調節遺伝子の発現状況をリアルタイム PCR 法と whole mount in situ hybridization 法で検証した。その結果、原腸陥入直前期の内中胚葉特異化に関与する一群の発生調節遺伝子の発現は、前側断片個体でも確認できたものの、前側断片の再生と正常発生を区別する遺伝子発現に関連した特徴の発見には至っていない。再生系の発生には当初の想定を超えた時間的非同調性が存在したことも、遺伝子発現レベルでの研究を困難なものにした。そのため、再生消化管形成過程の分子レベルでの特徴を理解することは将来の課題として残されている。



前側断片個体はもっぱら幼生構成細胞（非 set aside cell）からなる。set aside cell なしに成体原基形成が起きるかどうかを確かめるため、前側断片個体の後期発生を解析した。その結果、前側断片個体の一部は形態的に正常なウニ原基を形成し（図4A）、その後、変態して外部形態の点からは正常にみえる稚ウニに発生した（図4B）。今後、前側断片個体での消化管三分節化プロセスと再生消化管の機能、再生した幼生消化管の成体消化管への変態機構などに注目した詳しい解析が必要である。

なお、この課題では出芽誘導技術の開発も重要な目的の一つであった。しかし、これまでに報告されている技術では我々の研究対象のウニ類に出芽を誘導することはできなかった。再現性の高い出芽誘導技術の確立は本研究の発展に重要ではあるが、本研究期間にはこの目的を達するには至らなかった。



#### 引用文献:

Peterson KJ, Cameron RA, Davidson EH (1997) Set-aside cells in maximal indirect development: evolutionary and developmental significance. *BioEssays* 19, 623-631.

Eaves AA, Palmer AR (2003) Reproduction: Widespread cloning in echinoderm larvae. *Nature* 425, 146.

Vickery MS, Vickery MCL, McClintock JB (2002) Morphogenesis and organogenesis in the regenerating planktotrophic larvae of asteroids and echinoids. *Biol. Bull.* 203, 121-133.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Adachi S., Niimi I., Sakai Y., Sato F., Minokawa T., Urata M., Sebara-Fujisawa A., Kobayashi I. and Yamaguchi M.	4. 巻 247
2. 論文標題 Anteroposterior molecular registries in ectoderm of the echinus rudiment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1297-1307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.24686.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hibino T., Minokawa T., and Yamazaki A.	4. 巻 150
2. 論文標題 Cidaroids, clypeasteroids, and spatangoids: Procurement, culture, and basic methods	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 81-103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 美濃川拓哉
2. 発表標題 ブルテウス幼生の再生
3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	日比野 拓  (Hibino Taku)  (60513835)	埼玉大学・教育学部・准教授    (12401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	根岸 剛文  (Negishi Takefumi)  (30726576)	国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教    (63801)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関