

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19770195

研究課題名(和文) ウニ幼生の左右非対称性確立機構に関する研究

研究課題名(英文) Study of mechanisms of establishment of the left-right asymmetry of sea urchin larvae

研究代表者

北沢 千里 (KITAZAWA CHISATO)

山口大学・教育学部・准教授

研究者番号：30403637

研究成果の概要(和文)：ウニ幼生の左右非対称性確立には、卵割期のイオン流入及び小割球からのシグナルが、それぞれ独立して影響することが明らかとなった。しかしながら、それらの作用の程度については、同じ科に属する種間においても異なる。また、その下流において、右化因子として知られる Nodal が、体腔嚢が形成されるまでに、成体原基をはじめとする左右の違いを構成していくことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： My results revealed that the ion-fluid during the cleavage stage and a signal from the micromeres effect independently to establish to the left-right asymmetry of the sea urchin larvae. However, the effects of these factors differed from each species. It was also shown that Nodal, a factor to form the larval right side, causes to the difference between the left and right features until formation of the coeloms at the down stream.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度	0	0	0
総計	3,300,000	630,000	3,930,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生・分化，進化，棘皮動物，左右性

1. 研究開始当初の背景

本研究の研究対象であるウニ綱は、後口動物の一門である棘皮動物門に属する。この門の特徴は、5放射相称の成体形態を示すこと、海洋での環境に適した水管系という体液調節を行う機構を持っていること、放射状に発達する神経系を持つことなどがあげられる。この門は、ウミウリ、ヒトデ、クモヒトデ、ウニ、ナマコの5綱に分類される。これらの動物では、発生初期の胚や幼生は、上記の成体の特徴にもかかわらず左右対称性を示し、やがて、幼生が成体へと体制を大

きく変化させる“変態”が近づくと、幼生は体の左側に成体の元となる成体原基を形成し、幼生の左右対称性は崩れる。変態が完了した個体は、5放射相称性を示し始め、成体へと成長していく。

特に、ウニ綱については、古くから発生生物学分野の研究が盛んに行われてきた。特に、胚の消化管の元となる原腸の形成を中心とした、発生初期の形態形成は、異なる細胞運命を持つ細胞間の相互作用によりおこることが、細胞移植などの微細操作により証明されてきた。近年

においては、ゲノム解析により莫大な遺伝子情報をういた解析が可能となり、これらの遺伝子情報と実験発生生物学的手法により得られた細胞間相互作用の知見から、初期発生過程において形態形成をもたらすシグナル伝達機構の詳細は、現在も積極的に研究されている。

しかし、初期発生過程におけるこれらの飛躍的な研究成果に対して、発生後期の形態形成機構については、幼生を変態まで長期飼育することに大変な労力や手間がかかることから、形態の特徴の記載を除いて、研究はほとんど行われてこなかった。従来に記載によると (Mortensen, 1921; MacBride, 1914, 1918)、一般に発生の一時期に餌を食べて過ごす幼生時代を経る間接発生型のウニにおいては、4腕ブルテウス幼生期から餌を食べて浮遊生活を始め、その後、6-8腕ブルテウス幼生にまで成長すると、体の左側において体腔囊の一部(水腔)と外胚葉とが相互作用を行うようになる。外胚葉の一部が体内に陥入し水腔と密着することで、これらは将来の管足となる。この幼生体内における成体形質を成体原基とよぶ。本研究開始当初、ウニ幼生の左右非対称性に関して、わずかながらではあるが、報告されつつあった。従来から知られる薬剤処理によるウニの幼生の成体原基の形成方向における左右非対称性の攪乱や (Marcus, 1981)、顕微手術による半胚作成によりもたらされる攪乱 (McCain and McClay, 1994) に加えて、TGF β ファミリーに属する転写因子の一つで、後口動物の多くの系統で左右非対称性確立機構において重要な役割を果たすことで知られているNodalは、ウニにおいても、原腸陥入後の初期胚で左右非対称に発現し、Pitx2, Sox9等の、他の生物で知られるNodalの下流因子を制御していることが示された (Duboc *et al.*, 2005)。このことから、Dubocらは、後口動物の系統で左右非対称性決定に関する共通の機構が存在するという説を提案した。また、これまでウニの初期胚や幼生で左右非対称に発現することが知られていたNot, Foxという転写因子が、日本国内の沿岸領域に広く生息しているバフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*)の幼生においても同様に左右非対称に発現することが報告された (Hibino *et al.*, 2006)。更に、これらの発現パターンを指標として、イオンの輸送を阻害した場合、これらの発現は攪乱され、ウニの左右非対称性の確立は、左右非対称に発現する因子は、イオン輸送により、制御されている可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

申請者は、動物の発生過程における形態形成のメカニズムについて関心を抱き、動物の系統におけるその形成機構の多様性について焦点を当てて研究を行ってきた。特に、棘皮動物のウニを研究材料として、その幼生が、発生過程の中で、どのように成体形質を構築していくのか

かという、幼生から成体への体制変化の機構を解明し、その意義について考察し、明らかにすることを研究主題としている。その研究目標を達成する一段階として、本研究では、ウニの幼生が、変態が近づくにつれ、成体形質を構築していく現象に注目し、特に左右対称性を示していた幼生体内において、成体形質が現れることにより生じる左右非対称性が、どのように確立していくのかについて、実験発生学的手法を用いて、明らかにしていくことを本申請の目的とした。

また、申請者は、これまでウニの成体原基形成方向の左右非対称性は、卵割期における塩化リチウム処理により攪乱できることを数回の国内及び国外の学会で報告してきた。塩化リチウムは、多くの動物において左右非対称性を攪乱する物質として知られており、バフンウニの幼生においても同様の感受性が見られた。また、発生初期に形成される一部の細胞(小割球というウニの発生過程で消化管形成を他の細胞に誘導する細胞)が、成体原基形成方向の左右非対称性の確立に関与することについて、バフンウニを用いて明らかにした(北沢、学位論文 2001)。しかし、更なる研究の結果、この成体原基形成方向に見られる左右非対称性の塩化リチウム処理や小割球系列細胞群の除去実験の影響が、ウニの種類により、攪乱の程度が異なる結果が得られている(小割球の持つ成体原基の左右非対称性の確立に関与する能力は、バフンウニ 50%攪乱 > アメリカミドリウニ (*Lytechinus variegatus*) > ハスノハカシパン (*Scaphechinus mirabilis*) > *Eucidaris tribuloides* [最も原始的とされるウニの系統] 0%) (Kitazawa and Amemiya, 2007; Kitazawa and Wray, 未発表)。申請者は、これらの研究成果を、国内外の学会で数回報告してきた。また、これらの攪乱の影響は、他のグループが報告しているような攪乱のタイプ(左右両側に遺伝子発現が見られる)とは異なり、左右が完全に逆転して右側に成体原基が形成されることから、左右非対称性確立機構における別のイベントに注目していることが示唆された。

上記の研究成果をふまえて、本申請では、①小割球の左右非対称性確立への影響が、ウニの系統間でどのように異なっているのか、種間で比較する、②小割球による左右非対称性確立への影響が低いあるいは見られない種において、どのように左右非対称性が決定しているのか、③既知の左右非対称性確立に関与する因子がウニの系統間でどのように変化しているのか、について、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 幼生の左右非対称性確立に対する割球の影響

正形類ウニのサンショウウニ (*Temnopleurus toreumaticus*)、キタサンショウウニ (*T. hardwickii*)、ハリサンシ

ヨウウニ (*T. reevesii*) 及びコシダカウニ (*Mespilia globulus*) の成体原基形成方向における左右非対称性の確立が、16 細胞期の小割球に依存しているかどうか、16 細胞期に小割球をガラス針により実体顕微鏡下で除去後、成体原基を形成する6-8 腕プルテウス幼生期まで餌を与えて隔離飼育し、成体原基の形成方向を顕微鏡観察により検証した。また、様々な卵割期の胚に対して、同様の方法で、部分胚を作成し、その後の発生過程を追跡した。

(2) ウニ幼生の左右非対称性確立機構へのイオンとの関係の解析

ウニの卵割期に割球内へのイオン流入が阻害されると、成体原基形成方向が攪乱される [H^+/K^+ -ATPアーゼの阻害剤処理 (Hibino *et al.*, 2006)]。前述の種の胚に対して、 H^+/K^+ -ATPアーゼの阻害剤であるオメプラゾール及びランソプラゾールを含む海水で処理することにより、成体原基の左右非対称性が攪乱されるかどうか、どの時期に攪乱されるのか、スクリーニングを行った。

(3) 左右非対称性確立機構に関与する *nodal* ホモログの単離

正形類のバフンウニ、サンショウウニ、キタサンショウウニ及びコシダカウニの胚や幼生から、cDNAの作成を行った。同時に、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、mRNAの空間的な発現パターンを知るために、各発生段階の胚や幼生を固定した。Dubocら(2004)で報告された *Paracentrotus lividus* の *nodal* の塩基配列を元にプライマーを設計し、PCRにより遺伝子の増幅を行った。

(4) 左右非対称性確立機構に関与する *nodal* ホモログの翻訳阻害

P. lividus の *nodal* の塩基配列から、外注によりモルフォリノアンチセンスオリゴの合成を行い、サンショウウニに対して、未受精卵及びプリズム期の胚腔内に、マイクロインジェクションを行い、その後の発生過程を観察した。

4. 研究成果

(1) 幼生の左右非対称性確立に対する割球の影響

これまでの研究代表者の研究により、ウニ幼生の左右非対称性の確立には、16 細胞期に形成される小割球の子孫細胞が細胞間相互作用を介して影響するが、種により作用する程度が異なることが、数種のウニを用いて明らかにされてきた(Kitazawa and Amemiya, 2007; Kitazawa and Wray, 未発表)。本研究では、新たにサンショウウニを含む複数種における、小割球の成体原基形成方向決定への影響について調べた。まず、サンショウウニに対する小割球除去は、成

体原基の形成方向を攪乱する程度が、他種のウニに比べて、中程度であることが明らかとなった。そのため、他の割球が左右非対称性決定に貢献している可能性が考えられ、同時期の様々な割球を除去したところ、ほとんどの幼生が正常に成体原基を形成した。これらのことより、本種では 16 細胞期以前に成体原基の形成方向が決定している可能性が考えられた。そのため、16 細胞期以前の 2 あるいは 4 細胞期胚に対して割球分離を行ったところ、どちらの実験においても、16 細胞期の小割球除去より多くの個体で成体原基の形成方向は攪乱され、本来左側に形成される成体原基が右側に形成された個体が増加した。また、2 細胞期の半胚を対として飼育した場合、左あるいは右側に成体原基を形成した対も確認された。以上の結果より、サンショウウニでは、成体原基の形成方向が、他種よりも早期に方向付けられている可能性が考えられた。

次に、サンショウウニと同様にサンショウウニ科に属するコシダカウニ、ハリサンショウウニ及びキタサンショウウニを採集することができ、これらのウニの成体原基形成過程を観察したところ、基本的にサンショウウニと同様の成体原基形成を行うことが確認された。また、これらのウニの 16 細胞期における小割球の成体原基形成方向への影響を調べるために、16 細胞期の小割球除去実験を行い、その後の発生過程を追跡した。キタサンショウウニでは、サンショウウニ及びコシダカウニよりも成体原基形成方向が攪乱される割合が高く、小割球の左右非対称性確立に影響する程度は、同科内においても異なることが示唆された。

(2) ウニ幼生の左右非対称性確立機構へのイオンとの関係の解析

バフンウニなどで左右非対称性の確立に関与することで知られている H^+/K^+ -ATP アーゼの阻害を、オメプラゾール及びランソプラゾールを含む海水中で、サンショウウニ及びコシダカウニ胚を飼育することにより行った。既知の報告と同様に両側に成体原基を形成する個体を増加させたことから、サンショウウニ及びコシダカウニでは、左右非対称性確立に対する割球の初期卵割期の影響とは独立して、細胞内へのイオン流入も左右非対称性確立に影響をもたらしていると考えられた。

(3) 左右非対称性確立機構に関与する *nodal* ホモログの単離

次に、*nodal* 遺伝子の単離を試みるため、第一段階としてサンショウウニをはじめ複数種のウニ胚から cDNA を作成した。次に、既知の *nodal* 遺伝子プライマーを設計し、作成された各種ウニの cDNA から、PCRにより *nodal* 遺伝子の単離を行った。現在も、解析を継続中である。また、*in situ* ハイブリダイゼーション用に各発生段階

の胚や幼生の固定を、各種のウニで行った。

(4) 左右非対称性確立機構に関与する *nodal* ホモログの翻訳阻害

既知の *nodal* 遺伝子のモルフォリノアンチセンスオリゴを作成し、これをサンショウウニの未受精卵とプリズム幼生の体腔内に注入した。前者のほとんどは、原腸胚期で発生を停止したが、後者の約半分では、成体原基を構成する細胞塊が両側に形成された後、右側に成体原基が形成された。

一方、*Nodal* の阻害剤である SB431542 を用いて、サンショウウニの様々な時期の胚に対して処理を行った。これまで報告のあった *P. lividus* に対する結果と同様に、幼生の口は分化せず、サンショウウニにおいても *Nodal* の形態形成への関与は認められた。次に、間充織胞胚期からの処理では、幼生腕の伸長に影響が見られ、片側の腕のみが伸長し、新たな左右非対称の形態的特徴が得られた。更に、原腸胚期からプリズム幼生期から継続処理を行ったところ、両側に成体原基が形成する個体が増加した。このことから、サンショウウニにおいても、*Nodal* が左右非対称に成体原基を形成する際に機能することが考えられた。

更に、同じ科に属するキタサンショウウニ及びコンダカウニに対して、SB431542 処理を行った。サンショウウニと同様の結果が見られ、また、サンショウウニを加えたいずれの種においても、原腸胚期から体腔囊形成時までの間の 5 分程度で、幼生の左右性が攪乱された。

(5) ウニの系統間における左右非対称性確立機構について

以上の結果より、ウニ幼生の左右非対称性確立機構には、小割球子孫細胞のシグナル伝達を含む発生初期の細胞間相互作用や、イオン流入がそれぞれ独立して影響することが明らかとなった。しかしながら、それらの作用の程度については、同じ科に属する種間においても異なる。更に、これらの下流で右化因子として機能する *Nodal* 依存的な形態形成は、ウニ類でほぼ共通に保存されていると考えられる。更に、体腔囊が形成されるまでに、*Nodal* が幼生の左右の違いを構成していくことが結論付けられた。

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)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Kitazawa et al. Morphogenesis during early development in four Temnopleuridae sea urchins. *Information*, 13, 1075-1089, 2010, 査読有り.
- ② 北沢・小林. 秋穂沿岸を眺めてみる～ウニ類の分布調査から～. 山口大学環境保全,

12-14, 2009, 査読無し.

- ③ Kitazawa et al. Comparison of the early development with Temnopleuridae sea urchins. Proceedings of the fifth international conference on information., 435-438, 2009, 査読有り.
- ④ Kitazawa et al. Novel morphological traits in the early developmental stages of *Temnopleurus toreumaticus*., *Biol. Bull.*, 217, 2215-221, 2009, 査読有り.
- ⑤ 北沢. サンショウウニとヨツアナカシパン. *山口生物*, 30, 1-1, 2008, 査読無し.
- ⑥ Kitazawa et al. Distribution and habitat preferences of sea urchin species in Shirikawa Bay, Yamaguchi, during the period from 2005 to 2007. *山口大学教育学部研究論叢*, 57, 95-105, 2007, 査読無し.
- ⑦ Ettensohn, Kitazawa et al. Gene regulatory networks and developmental plasticity in the early sea urchin embryo: alternative development of the skeletogenic gene regulatory network. *Development*, 134, 3077-3087, 2007, 査読有り.
- ⑧ Kitazawa et al. Micromere-derived signal regulates larval left-right polarity during sea urchin development. *J. E. Z.*, 307A, 249-262, 2007, 査読有り.

[学会発表] (計 31 件)

- ① 北沢ら. サンショウウニの成体原基形成における *Nodal* 阻害の影響, 日本動物学会第 81 回大会, 2010 年 9 月 23 日, 東京, 東京大学.
- ② 北沢ら. サンショウウニ科ウニ 4 種の発生初期における形態形成の比較, 生物系三学会中国四国支部大会 (第 62 回日本動物学会中国四国支部大会), 2010 年 5 月 15 日, 山口, 山口大学.
- ③ Kitazawa et al. Comparison of the early development with Temnopleuridae sea urchins. The fifth international conference on information. 2009 年 11 月 9 日, 京都, 京都大学.
- ④ 北沢ら. サンショウウニの発生初期における 2 つの皺について, 日本動物学会第 80 回大会, 2009 年 9 月 17 日, 静岡, 静岡県コンベンションアーツセンターグランシップ.
- ⑤ 北沢ら. サンショウウニにおける皺卵形成, 生物系三学会中国四国支部大会 (第 61 回日本動物学会中国四国支部大会), 2009 年 5 月 16 日, 高知, 高知大学.
- ⑥ 北沢ら. 正形類ウニ 2 種における幼生の成体原基形成方向の左右極性決定機構に関する研究, 日本動物学会第 79 回大会, 2008 年 9 月 5 日, 福岡, 福岡大学.
- ⑦ 北沢ら. サンショウウニにおける割球の左右極性決定能に関する研究, 2008 年 5 月 17

日, 生物系三学会中国四国支部大会(第60回日本動物学会中国四国支部大会), 広島, 広島大学.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北沢 千里 (KITAZAWA CHISATO)

山口大学・教育学部・准教授

研究者番号: 30403637

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし