

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380104

研究課題名(和文) 左ヒラメに右カレイの謎と健苗育成に向けた稚魚発生システムの解明

研究課題名(英文) Developmental control system of asymmetry of eye-sidedness and body coloration in flatfishes, and the mechanism that induces abnormality in the asymmetry development

研究代表者

鈴木 徹 (Suzuki, Tohru)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70344330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円、(間接経費) 4,680,000円

研究成果の概要(和文)：ヒラメ・カレイ類の左右非対称性の制御機構と脊椎骨発生機構を解析した。内臓と間脳の非対称性を制御するNodal経路がヒラメ・カレイ類の左右非対称制御を制御することが証明された。左ヒラメと右カレイを振り分ける発生機構にNodal経路に加え手綱核および視神経束交叉が関与していることが示された。

体色の左右差は、背鰭基部に分布する色素前駆細胞が筋間膜を通過して左右両側の皮膚に遊走する間に、有眼側でのみ色素芽細胞に分化することで形成される。レチノイン酸への暴露は、無眼側の色素前駆細胞も色素芽細胞に分化誘導し、無眼側黒化を起こすことが分かった。またレチノイン酸による脊椎骨機構の発生機序が解明された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the developmental mechanism that controls external asymmetry of flatfish (eye location and skin pigmentation). It was demonstrated that the Nodal signaling pathway (NSP), which is known to control the sidedness of internal organs and neural circuit of habenulae, fixes the eye-sidedness by controlling the forebrain asymmetry formation. The dextral and sinistral flatfishes are segregated by the opposite asymmetry formation at the habenulae and optic chiasma under the control of the NSP.

It was found that the precursors of adult-type melanophores that locate at the base of dorsal fin migrate in the myoseptum toward both left and right lateral sides. The asymmetry of skin pigmentation is established by the maturation of precursors to chromatoblasts during the migration in the myoseptum of the ocular side. Exposure to retinoic acid (RA) induces maturation of the precursors also in the ocular side, resulting in the coloration of blind side skin.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：ヒラメ・カレイ 異体類 左右非対称性 Nodal経路 色素胞分化 変態 脊椎骨発生 種苗生産

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒラメ・カレイ類(異体類)の最大の特徴は、片側眼球の移動から始まり、有眼側の色素形成によって完成する体全体の左右非対称性形成である。私達のこれまでの研究により、眼の非対称性については、内臓の左右非対称性を調節する Nodal 経路が眼位を一定方向に調節していること、ヒラメとカレイで左右逆の眼が移動するのは、視神経交叉が両者で左右逆で固定されていることが要因であることを示唆していた。ただし実験的に Nodal 経路を完全に遮断する方法がなかったために、Nodal 経路と眼位制御との関係について決定的な証拠は得られていなかった。

(2) 体色の非対称性形成については、私達のこれまでの研究により、変態期に有眼側に出現する成体型黒色素胞は、変態前の仔魚では背ビレ基部の骨格筋の背側に無色透明な前駆細胞の状態で存在することが明らかにされていた。しかし、前駆細胞の骨格筋上での分布密度には左右差がなく、どのようにして体色の左右差が発生するかは、不明のまま残されていた。

(3) ヒラメ・カレイ類の種苗生産全般での解決すべき問題として、無眼側の黒化などの体色異常、またカレイ類で高率に発生する眼位逆位があげられる。左右非対称性の制御機構の分子基盤の解明、および異常の発生機序の究明は、形態異常の防御策の開発に通じることから、産業的にも期待されていた。また硬骨魚類の脊椎骨については、発生機構そのものに不明な点が多く残されており、この点も解析が望まれていた。

(4) 海産魚類種苗生産全般で問題となっている形態異常に、脊椎骨の奇形がある。これまで栄養学的な研究が進められ、飼料中のビタミン A 過剰が脊椎骨融合を起こすことが明らかにされていたが、異常の発生機序は不明で、その解明が望まれていた。

2. 研究の目的

(1) 申請課題では、異体類の非対称性形成メカニズムの全貌を解明するとともに、非対称性形成と変態ホルモンとの関係、レチノイン酸(活性型ビタミン A)が組織分化におよぼす影響を発生学的な視点から解析することにより、異体類の非対称性形成を総合的に理解することを目指した。

(2) 得られた基礎的な研究成果を基に、種苗性を低下させる外的要因とその因果関係を解明することを目的とすること、また異体類をモデルとして種苗性を発生生物学的に解析することを目指した。

(3) 眼位の制御機構については、最近 Nodal 経路の特異的な抑制剤として SB431542 が発見されたので、この試薬を使ってヒラメ胚で Nodal 経路の入力を抑制し、眼位への影響を解析することとした。また左ヒラメに右カレイと言われるように、ヒラメ・カレイ類には眼位が逆の種が存在する。どのようにして右眼位の種と左眼位の種が誕生した

のか、進化的側面から検討することを試みた。

(4) 体色の左右差形成については、色素前駆細胞の背ビレ基部から皮膚への移動パターンと色素細胞への分化する場所を解析することにより、体色左右性の発生機構の解明に迫ることを目的とした。

(5) 脊椎骨異常の発生機序を検討することを目的として、強い催奇形が知られているレチノイン酸を使って、脊椎骨の異常を実験的に誘導し、どのような過程で脊椎骨の形成異常が発生するかを調べた。また、近年、実用的となった次世代シーケンズ解析を使って、脊椎骨の遺伝子発現プロファイルを明らかにすることも試みた。

3. 研究の方法

(1) Nodal 経路と眼位との関連を実証するために、受精後 20 時間のヒラメ胚を SB431542 と 10 時間インキュベートした後、正常海水で変態終了まで発生した。この間、孵化直後と変態期初期に Nodal 経路の *lefty* と *pitx2* の発現、変態期に眼位と腸の捻転方向の異常の出現を観察した。

(2) 色素胞の分化段階をここでは、黒色素と黄色素形成に機能する酵素遺伝子 *gch2* (マーカー遺伝子) を発現していない幹細胞様の段階を「色素前駆細胞」、マーカー遺伝子の発現を始めたものを色素芽細胞、色素形成を始めたものを色素細胞と呼ぶ。色素前駆細胞の背ビレ基部から体表への遊走を生体用蛍光色素 Dil で標識することにより追跡した。体色の左右差形成の実験では、in situ ハイブリダイゼーション法で、*gch2* を可視化することにより、色素芽細胞を可視化した。

(3) 脊椎骨異常の解析では、変態終了期ヒラメ稚魚を  $10^{-7}$  M レチノイン酸と 3 日間浸漬し、その後

3 ヶ月間飼育して、脊椎骨への影響を調べた。

(4) 次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析では、受精後約 100 日のヒラメの脊椎骨から RNA を精製して cDNA ライブラリーを調整し、HiSeq2000 を使用して配列解析を行った。

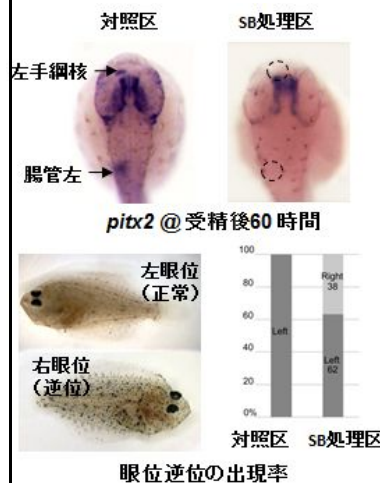


図1 SB431542による左特異的 Nodal経路の抑制、および眼位逆位の出現

4. 研究成果

(1) Nodal 経路が眼位を制御することの証明

化合物 SB431542 は、Nodal と受容体との結合を特異的に抑制することが報告されている。ヒラメ胚では、Nodal シグナルは、受精後 20 時間でクッパー細胞の制御により左側板中胚葉と間脳上部左側に入力される。この時期のヒラメ胚を SB431542 と

10時間インキュベートすることにより、期待通りにノダル経路の胚左側への入力を完全に抑制することができた(図1上)。ノダル経路の入力抑制により、内臓は捻転方向の制御を完全に失い、逆位と左右差のないイソメリズムを合計約50%発症した。処理した仔魚を変態まで飼育すると、眼位逆位が約40%の高率で発生し、ダル経路が眼位の固定に機能することが証明された(図1下)。

Nodal 経路のメンバーは胚期に左手綱核に入力されたのち、左右制御の実行因子である *pix2* のみ変態期に再び高発現する。胚期の一過的な SB431542 処理により、胚期のみならず変態期の *pix2* の発現も完全に抑制された(図2)。変態期に左右どちらの眼が移動するか変態期に決定されることが既に分かっているので、ノダル経路の *pix2* が変態期に左手綱核で再発現し、眼位を制御するものと考えられた。

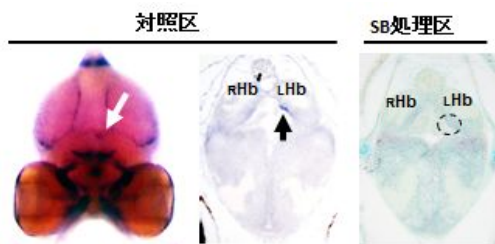


図2 胚期のSB431542により消失した変態期左手綱核(Hb)における*pix2*発現

眼の移動は、手綱核と視神経交叉を通る間脳前方部で左右への捻れが発生し、それにより終脳が左に傾くと右眼が移動し、右に傾くと左眼が移動することが分かった。魚類では左眼から来る視神経束が右脳に、右眼から来る視神経束が左脳に投射する完全交叉であるため、交叉部に非対称性が存在する。左右どちらの眼由来の視神経束が背側を通るかは、魚類一般では50:50で個体間でランダムであるが、ヒラメ・カレイ類ではヒラメなど左眼位の種では右眼由来の視神経束が背側を通り、ホシガレイなど右眼位のカレイ類では左眼由来の視神経束が背側を通る(図3)。魚類では視神経束は間脳前方下部に直接接している。そのために、接する視神経束の捻れの影響により、もともと間脳前方下部にはヒラメとカレイで左右逆の非対称性が形成されていることになる(図4上)。ヒラメ・カレイ類では *pix2* が手綱核で再発現したあと、右の手綱核が大きく成長し、左右の核で形態的左

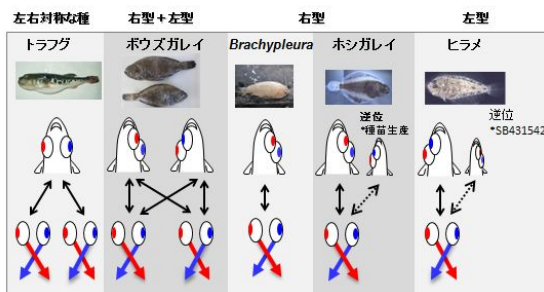


図3 視神経束の交叉と眼位との関係

右差が発生し、眼位逆位の個体ではこの左右差が逆転していた。変態期後これまでの成果を総合すると、*pix2* の制御により手綱核が一定方向の非対

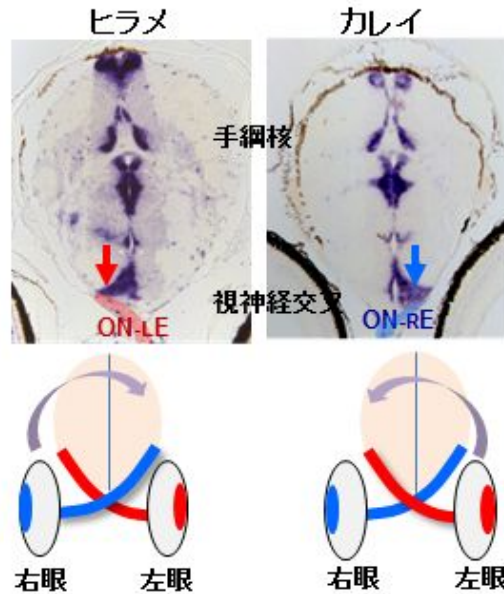


図4 左ヒラメと右カレイを分ける視神経交叉の非対称性と眼球移動の関係

称性を形成する性質があり、一定方向の手綱核の非対称性形成と間脳前方下部の非対称性が協調すると、視神経交叉の捻れを解放する向きに終脳が非対称性を形成し、左ヒラメと右カレイに分かれることが示唆される(図4)。

## (2) ヒラメ・カレイ類の左右非対称性の進化

異体類の最も古い祖先種の化石では、眼の位置は右型と左型が半々で出現し、現存の異体類で最も原始的なボウズガレイ (*Psettodes erumei*) でも単一種内で右型と左型が混在する。従って、ヒラメ・カレイ類が最初に誕生した時点では、左右どちらの眼が移動するのはランダムで、その後右型の種と左型の種に分かれたものと考えられる。どのようにして右型と左型の種に進化したかという問題に迫るために、ボウズガレイとその次に原始的なカレイ (*Brachypleura novae*; 和名はない) の2種をボルネオ島で採取し、これら原始的異体類における視交叉と眼位との関係を解析した。

ボウズガレイの視神経束の交叉の順は個体間で完全にランダムで、しかも右眼由来の視神経束が背側を通るタイプでも右眼位と左眼位の個体が存在し、逆も同じであった(図3)。一方、*B. novae* では、より進化したホシガレイと同じく眼位は右型に完全に固定され、視神経束の交叉も、ホシガレイと同じく、左眼由来の視神経束が背側を通っていた。

従来のゼブラフィッシュを使った研究成果により、*pix2* を含め Nodal 経路の発現は、胚発生で内臓と間脳上部の神経回路の左右差を決定したあと、発現が停止するものと考えられていた。今回、ヒラメ・カレイ類以外で *pix2* の発現を解析したところ、調べたトラフグ、カンパチ、メダカのいずれでも変態期仔魚の左手綱核に *pix2* の発現が検出された。従って、仔魚発生における *pix2* の発現維持は、異体類に固有な発生の調節機構ということではなく、魚類に普遍的なシステムであると考

えられる。手綱核は脊椎動物共通に形態的左右非対称性を示すことから考えると、後期発生（魚類や両生類では変態）でおこる手綱核の形態的非対称性形成の左右差制御のために *pix2* の発現が維持されている可能性が予想される。

以上の結果から、ヒラメ・カレイ類の左右性は、次のような順で進化したと推定した。脳と顔面の対称性を損なうような変異が発生し、片側の眼が移動する異体類が初めて進化した。誕生した時点では、どちらの眼が移動するかはランダムで、視神経束交叉の左右性も一般魚類と同じでランダムで、両者の間には直接的な関係はなかった。眼位がランダムな現存種はボウズガレイだけであることから推定すると、眼位がランダムな祖先種が進化してまもなく、視神経束の交叉の順（左右どちらの眼球由来の視神経束が背側を通るか）を種内で一定に固定する新しい発生システムが進化し、このとき交叉の仕方は2通りに固定された。

このシステムの進化により、既存の *pix2* による手綱核の左右差制御システムが眼位の制御にも利用され、視神経交叉の順に基づいて左ヒラメと右カレイが振り分けられるように進化した。なお、視神経束の交叉は、自然発生した逆位および *Nodal* 抑制剤による逆位でも逆にはなつた個体は見つからないことから、*Nodal* 経路以外の未知の左右制御システムで調節されていることが考えられる。

### (3) 種苗生産で起こる眼位逆位の発生機序

ホンガレイの種苗生産で起こる眼位逆位の場合、胚期の *pix2* 発現が 100%正常に起こるものの、60%あまりの仔魚で変態期の発現が抑制され、それらの仔魚で移動する眼がランダムとなり、半数の仔魚に眼位逆位が発生する。*pix2* の転写調節領域にはコルチゾル受容体のコンセンサス配列が存在することを見だしていたが、今回、実際にコルチゾル浸漬により仔魚内の *pix2* 発現が上昇することが明らかになり、コルチゾルが変態期 *pix2* 再発現を調節していることが示唆された。種苗生産では、何らかの環境要因が原因で変態期にコルチゾル体内含量が増加せずに、*pix2* 発現が抑制されて眼位逆位が発生している可能性が考えられる。コルチゾル体内含量を正常に増加させる飼育条件を検討することにより、眼位異常を低減できる可能性が考えられ、実証実験が望まれる。

### (4) 体色の左右差形成機構

仔魚の背鰭基部に分布する色素前駆細胞集団を Dil で蛍光標識して遊走経路を観察した結果、前駆細胞は背鰭基部から左右両方の皮膚に向かって筋間膜内を遊走し、移動の間にも有眼側でのみ *gch2* を発現して色素芽細胞に分化することが明らかになった（図5上）。色素前駆細胞が遊走する時期の仔魚をレチノイン酸とインキュベートすると、無眼側の色素前駆細胞も *gch2* を発現して色素芽細胞に分化し、そのまま発生すると無眼側の体色が有眼側と同じに着色した（図5下）。また仔魚の無

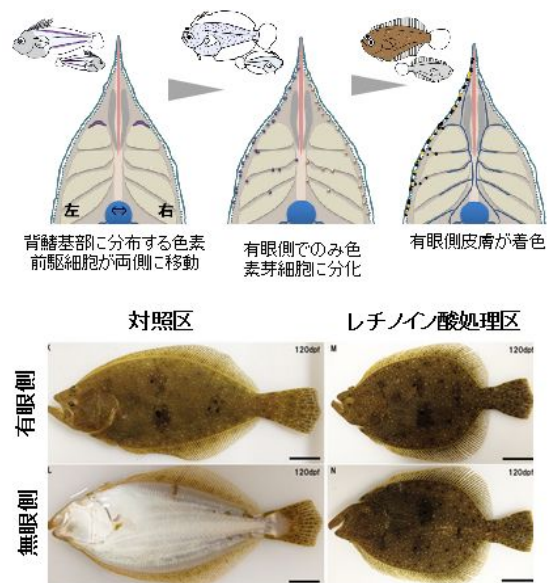


図5 (上)有眼側を着色する成体型色素胞の前駆細胞の遊走と左右差形成。(下)レチノイン酸によって誘起された無眼側の完全黒化

眼側皮膚を剥離して通常の条件で培養しても *gch2* 陽性の色素芽細胞は出現しないが、レチノイン酸存在下で培養すると有眼側と同程度の密度に *gch2* 陽性の色素芽細胞が出現した。

これらの結果から、背鰭基部に分布する色素前駆細胞が筋間膜を通して左右体側に皮膚に移動する間に、有眼側でのみ色素芽細胞への分化が起こることにより、体色の左右差が発生することが示された。色素分化を制御するシグナル因子は不明であるが、分化の促進因子が有眼側半身で、あるいは抑制因子が無眼側半身で分泌されていることが推定される。現在、シグナル因子の同定を試みている。また今回、無眼側の皮膚にも色素前駆細胞が遊走していること、さらにそれら細胞はレチノイン酸に反応して色素芽細胞から色素胞に分化することも明らかになった。これらの結果から、種苗生産で起こる無眼側黒化の発生機序について、飼料中ビタミンAの過剰により無眼側の色素前駆細胞が色素胞に分化することが原因だと推定された。

### (5) 脊椎骨融合の発生機序の解明

本研究により、硬骨魚類では脊索が最初に分節を形成して機能的に椎間板に相当する関節組織を形成すること、椎体は硬節細胞から分化した骨芽細胞により脊索の窪んだ部位に膜性骨化で形成され、最終的には脊索を分断することで完成することが分かった（図6）。このような脊椎骨の発生機構は、四肢動物では体節内に分化した硬節から椎体と椎間板が軟骨として分節的に発生するのと著しく異なっている。そのため四肢動物で得られている脊椎骨異常の発生機序に関する知見は、硬骨魚類には当てはまらないことが多いと考えられる。

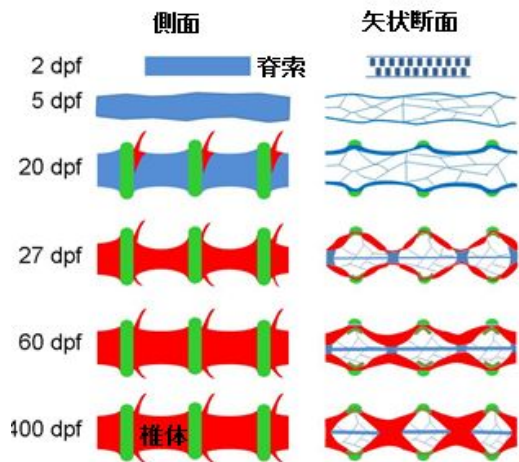


図6 硬骨魚類の脊椎骨発生における脊索(青)と椎体(赤)の関係

ヒラメでは脊索の分節形成と椎体の骨化が変態期に起こり、この時期にレチノイン酸に3日間浸漬すると、分節途中の脊索が萎縮し、萎縮した部分では隣り合う椎体が融合して、さらに骨化が進むと椎体融合となって顕在化することが明らかになった(図7)。過去の研究により、飼料中ビタミンA 過剰が脊椎骨融合を起こすことが知られていたが、今回の研究により初めて脊椎骨融合の発症機序が明らかになり、防御法の開発に貢献できるものと考えている。

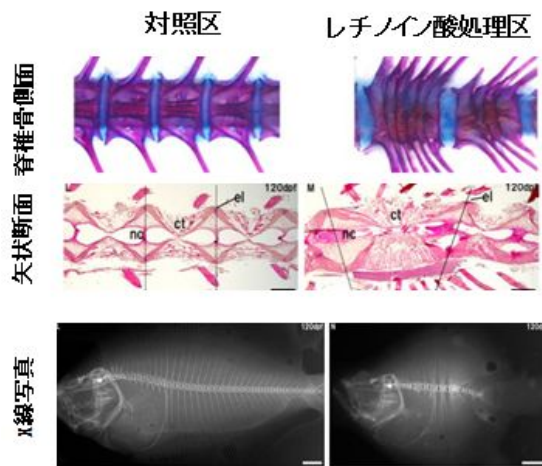


図7 レチノイン酸によって起こった脊椎骨融合

次世代シーケンサーを使ってヒラメ脊椎骨のトランスクリプトーム解析を行った結果、ゼブラフィッシュを使った研究では胚発生後に発現が停止すると考えられていた転写因子 *no tail (ntl)* やシグナル因子 *sonic hedgehog (shh)* 等の遺伝子が、成体の脊椎骨でも発現していることが明らかになった。組織レベルでの発現解析により、*shh* と *no tail* 遺伝子ともに脊索細胞で発現していることが分かった(図8)。哺乳類では、脊索は脊椎骨形成過程で退化して痕跡程度の組織として残るだけであるが、硬骨魚類では終生にわたって脊椎骨の関節として機能し、脊索細胞も基質分泌等で機能し続けていることが考えられる。*shh* は代表的なレチノイン酸応答遺伝子であり、レチノイン酸に

よる脊椎骨異常の発生が *shh* を介している可能性が考えられた。これらの知見は、仔魚用配合飼料の適正化に貢献できるものと考えている。

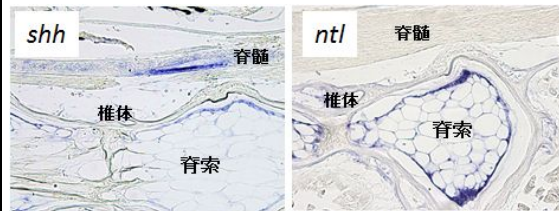


図8 脊椎骨で関節組織を形成した脊索における *shh* と *ntl* の発現

## 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14件)

鷲尾洋平、有瀧真人、藤浪祐一郎、清水大輔、横井勇人、鈴木徹、Ocular-side lateralization of adult-type chromatophore precursors: Development of pigment asymmetry in metamorphosing flounder larvae. Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution. 査読有、320巻、2013年、151-165

DOI:10.1002/jez.b.22491

渡辺奈々子、伊藤香絵、茂木淳、藤浪祐一郎、清水大輔、宇治督、横井勇人、鈴木徹、Circadian pacemaker in the suprachiasmatic nuclei of teleost fish revealed by rhythmic *period2* expression. General and Comparative Endocrinology. 査読有、178:巻、2012年、400-407

DOI:10.1016/j.ygen.2012.06.012

伊藤香絵、鷲尾洋平、宇治督、藤浪祐一郎、清水大輔、横井勇人、鈴木徹、Constant illumination through larval development suppresses dopamine synthesis in the suprachiasmatic nucleus, causing activation of  $\alpha$ -MSH synthesis in the pituitary and abnormal metamorphic pigmentation in flounder. General and Comparative Endocrinology. 査読有、176巻、2012年、215-221

DOI:10.1016/j.ygen.2012.01.017

鈴木徹、平成22年度水産学進歩賞「内臓の左右非対称性を制御するノダル経路によるヒラメ・カレイ類の眼位制御機構」、日本水産学会誌、査読無、77巻、2011年、364-367.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/suisan/77/3/77\\_3\\_364/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/suisan/77/3/77_3_364/_pdf)

伊藤香絵、渡辺耕平、鷲尾洋平、鳥暁明、有

瀧真人、鈴木徹、Three members of iodothyronine deiodinase family, *dio1*, *dio2* and *dio3*, are expressed in spatially and temporally specific manners during flounder, *Paralichthys olivaceus*, metamorphosis. Zoological Science. 査読有、27巻、2010年、574-580  
DOI:10.2018/zsj.27.574

〔学会発表〕(計53件)

烏曉明、鷺尾洋平、宇治督、横井勇人、鈴木徹、レチノイン酸により誘導される無眼側黒化の分子マーカーを用いた解析、平成26年度日本水産学会春季大会、2014年3月29日、函館

鷺尾洋平、横井勇人、鈴木徹、Flounder eye-sidedness can be experimentally randomized by transient treatment with a Nodal antagonist SB431542 at somite stage . 第36回日本分子生物学会、2013年12月4日、神戸

鈴木徹、渡辺奈々子、横井勇人、Circadian pacemaker in the superchiasmatic nuclei of teleost fish revealed by rhythmic period2 expression、International symposium: Frontiers in behavioral brain science - Solving the mystery of sleep、2012年3月20日、東京

鈴木徹、近藤大地、横井勇人、烏曉明、宇治督、橋本寿史、非対称性を制御する*pitx2* の変態期再発現と、再発現に関連する左特異的エンハンサー内の核受容体応答配列、第33回日本分子生物学会、2010年12月9日、神戸

鈴木徹、横井勇人、宇治督、橋本寿史、田中克、左ヒラメと右カレイを振り分ける発生システムについての解析、第16回小型魚類研究会、2010年9月9日、浦和

〔図書〕(計1件)

鈴木徹、尾定誠、朝倉書店、「見てわかる農学シリーズ 4. バイオテクノロジー概論」、2012年、81-95 ページ

〔その他〕

ホームページ

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bioinfor/index-j.html>

新聞報道:2013年10月28日 朝日新聞朝刊「右利き左利きの謎に迫る」

科研費 NEWS: 科研費からの展開事例「ヒラメやカレイの目の偏りが生じるメカニズムを解明」2011年、3巻、21 ページ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 徹 (SUZUKI, TOHRU)  
東北大学・大学院農学研究・教授  
研究者番号: 70344330

### (2) 研究分担者

横井 勇人 (YOKOI, HAYATO)  
東北大学・大学院農学研究・助教  
研究者番号: 40569729

宇治 督 (UJI, SUSUMU)

独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所・研究員  
研究者番号: 40372049

### (3) 連携研究者

藤浪 祐一郎 (FUJINAMI, YUICHIRO)  
独立行政法人水産総合研究センター・東北区水産研究所・技術開発員  
研究者番号: 30443360

清水 大輔 (SHIMIZU, DAISUKE)

独立行政法人水産総合研究センター・東北区水産研究所・技術開発員  
研究者番号: 40443361