

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：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658102

研究課題名(和文)後生動物の初期発生を選択的に阻害する海綿動物成分の分子細胞学的、系統発生学的研究

研究課題名(英文)Molecular, cellular and phylogenetic aspects of selective inhibition of early periods in metazoan ontogenesis by sponge and other substances

研究代表者

池上 晋 (IKEGAMI, Susumu)

慶應義塾大学・自然科学研究教育センター・訪問教授

研究者番号：80011980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)： イトマキヒトデの受精卵は胞胚期、原腸胚期を経てピピンナリア幼生となる。当初、胞胚化や原腸形成を選択的に阻害する海綿成分の活性を模倣する合成化合物を探索したが、そのような化合物を見出すことはできなかった。

次に、胚タンパク質の欠損が発生にどのように影響するかを調べた。イトマキヒトデ胚の細胞核にはヒトデ特有なトランスグルタミナーゼが存在する。このタンパク質の生成をモルフォリノアンチセンスオリゴ注入によって阻止すると、受精卵はピピンナリア期までは正常に発生するが、正常なブラキオラリア幼生が生じなかった。本タンパク質は発生後期のめざましい組織構造の構築に関与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Following fertilization, the starfish, *Asterina pectinifera*, embryo develops to the blastula and then undergoes gastrulation to form a gut and create a feeding bipinnaria larva. The larva then takes on a more elaborate form called a brachioraria larva. Several substances obtained from sponges specifically prevent starfish embryonic development at the blastula or the gastrula stages. Screening search for synthetic compounds which mimic the action of these substances was undertaken but such compounds were not detected.

The study was then focused on the effect of loss of nuclear transglutaminase, a protein that is phylogenetically unique in the starfish embryo, by microinjecting the morpholino antisense oligonucleotide. The injected embryo developed normally through the embryonic and bipinnaria stages but was unable to form normal brachioraria. This result suggests that the unique protein is involved in the morphogenetic event at the latter period in the starfish ontogeny.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：ヒトデ発生 発生阻害

1. 研究開始当初の背景

(1) 胞胚形成と原腸形成を選択的に阻害する化学物質を用いて、その標的となる分子を見出し、胞胚形成と原腸形成の分子機序を明らかにすることは、すべての後生動物の初期発生に普遍的なボディプランの要となる発生過程を理解する上で有意義な試みであると考えられる。これまで、われわれは浅海生態系に棲息する海綿 *Geodia exigua* の生産する新規セスキテルペン化合物 Exiguamide が棘皮動物バフンウニ胚において小割球形成を妨げ、それによって一次間充織細胞を欠失し、原腸と骨片を欠いたプルテウス幼生へと発生させること、骨片を形成しないイトマキヒトデ胚においても原腸形成を阻害し、発生を停止させることを認めていた。また、*Ancorina* 属の一海綿種が生産する新規グリコシド Ancornioside A がイトマキヒトデ胚の胞胚形成を阻害し、発生を停止させることを明らかにしていた。胞胚形成は細胞の上皮化であり、後生動物の多細胞体構築の基本的過程である。本グリコシドはほ乳類細胞の上皮-間充織転換など多くの過程におよぼす効果が期待される。しかし、海綿動物から単離される阻害物質は量が限定されており、比較発生学的、分子細胞学的解析に必要な量が確保出来ていない。必要な量を得るためには活性類縁化合物を合成し、これらを用いて作用の特異性や標的分子を解析することが必要であると考えられた。

(2) 他方、後生動物において、胚発生以降の幼生期の発生はそれぞれの種属に特有の過程を経るが、この過程には種属特有の分子成分

が構造的、機能的統合体としての個体構築に關与すると考えられる。この発生過程に關与する生体内分子を同定する為には、種属特異的な分子を欠失させた個体を作成し、その個体の発生異常の有無を検定することによって明らかにすることが可能となる。

これまで、われわれは、イトマキヒトデの中期胞胚にヒトデ綱固有のクロマチン会合タンパク質 Nuclear transglutaminase (nTG と略称) が出現し、原腸胚期に最大量となるが、胚期以降の幼生期にも継続して存在することを明らかにしてきた。このタンパク質の cDNA は既に全配列が決定されているので、nTG モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を用いて nTG 欠失胚を得ることが可能である。nTG の欠失が受精卵から成体に至るどの過程でどのような形で発生を停止させるのかを追究することによって、新しい発生阻害パターンを表出し得ると考えられた。

2. 研究の目的

(1) Exiguamide の特異的なウニとヒトデの原腸胚形成阻害活性は本セスキテルペンのどのような構造要素によってもたらされるか、容易に合成できる化学類縁体を調製し、その阻害活性を調べる。また、ヒトデ胚の胞胚形成を選択阻害する Ancornioside A についても、これと類似の活性を発現する化合物をケミカルライブラリーの中に探索し、選択された化合物の示す阻害作用と Ancornioside A による阻害作用との類似点と相違点を検討する。

(2) 多くの分子細胞学的特徴を共有する後生動物においても、一部にはそれぞれの種・

綱に固有な分子細胞学的過程を包含して発生が進行している。したがって、ヒトデの系統発生学的特徴を理解するためには、個体発生の進行にともなって生起するヒトデ固有の分子生物学特徴を理解することも必要である。本研究はその一環として、中期胞胚期から出現するヒトデ固有のクロマチン会合タンパク質 nTG の発生学的意義を明らかにすることを目的とする。本研究では、nTG の出現を MO の細胞内注入によって阻止されたイトマキヒトデ胚・幼生の発生過程を追跡し、胚・幼生において果たす nTG の役割りを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 発生阻害検定実験：イトマキヒトデ胚発生実験は 20 で人工海水 (Marine Art SF-1) または濾過自然海水を用いて行った。雌の卵巣片を細断し、20~45 分間 1 μ M の卵成熟誘起物質 1-Methyladenine で処理することにより、卵母細胞の成熟を誘起し、放卵させた。成熟卵を集め、海水で洗浄した後、媒精した。受精卵を海水で洗浄し、試験に供した。一部の試験では、タコノマクラの卵と精子を受精させて得られた受精卵を試験に用いた。タコノマクラ胚は 15 で発生させた。

試料は各種合成化合物標品を使用した。試料をメタノールまたは Dimethylsulfoxide に溶かした後、溶媒濃度が 1.0% 以下になるように海水に加え、順次希釈して試料溶液を調製した。24 穴または 96 穴プレートの各ウエルに試料溶液 0.1~1 ml を加え、これに少量のイトマキヒトデまたはタコノマクラ受精卵を懸濁させ、その発生状態を顕微鏡下で経時

的に観察した。

(2) nTG 欠失イトマキヒトデ胚・幼生発生実験：雌の卵巣片から得た卵母細胞に nTG MO (5' -GATCGACGAACCATTTTGGATGATT-3' の塩基配列を有する) あるいは、その 5 塩基をミスセンス置換したコントロールオリゴ (CMO) (5' -GATTGACAACTATTCTGAATGATT-3' の塩基配列を有する) を 1 個あたり 0.6 ng ずつ注入した。これらを 1 μ M 1-Methyladenine で処理することによって成熟させ、媒精した。受精卵を 24 穴プレートの各ウエルに加え、20 で人工海水または濾過自然海水中で発生させ、径日的に形態を観察した。受精後 3 日目の幼生に、珪藻 *Chaetoceros glacialis* を給餌し、3 日ごとに給餌を繰返し、発生を継続した。

nTG MO 注入の効果を確認するために、nTG MO と nTG CMO を注入した 3 日幼生を短時間 4 % Paraformaldehyde で固定後、0.05 % Triton X-100 含有生理食塩水洗浄、冷アセトン処理を経て、再び 0.05% Triton X-100 含有生理食塩水で洗浄し、nTG に特異的に反応するポリクローナル抗体 (家兔) 二次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗家兔 IgG 抗体 (ヤギ) を用い、さらに Propidium iodide を加えてホルマウント免疫組織化学染色を施した。染色試料は微分干渉装置を備えた共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

幼生の摂餌・嚙下活動量を評価するために、nTG MO 注入 3 日幼生と nTG CMO 注入 3 日幼生それぞれ 10~20 個体を 1 ml の海水中に移し、これらに 1.0×10^6 個の 6 μ m 径の赤色蛍光色素結合ポリスチレン・ラテックスマイクロスフ

エア粒子を加えて一定時間、32 rpm で往復振とうした。その後、幼生を回収し、4 % Paraformaldehyde 含有海水で固定して、微分干渉装置を備えた共焦点レーザー顕微鏡下で観察し、胃内に存在する粒子の数を計測した。

4. 研究成果

(1) Exiguamide の化学類縁体の活性を調べた。その一つは Exiguamide の唯一の官能基であるホルムアミド基を有する Stearylformamide である。本化合物は Dimethylsulfoxide には易溶であるが海水にきわめて溶けにくく、Dimethylsulfoxide 溶液を海水に希釈させたときに系からの分離を起こし、作用点に有効に到達させる事が出来ない可能性が考えられる。実際、イトマキヒトデ受精卵の胚発生に全く影響を与えず、原腸胚形成を阻害しなかった。また、ハスノハカシパン受精卵の胚発生にも全く影響を与えず、小割球形成、一次間充織細胞の形成、原腸陥入は対照無処理胚と同時刻に生じた。これらの成績は Exiguamide の保有する活性の発現にはスピロ [4.5] デセン骨格が不可欠であることを示している。次に、合成イソシアニド類縁体として (R)-(+)-1-(1-Naphthyl)ethylisocyanide を調製した。本化合物は 10 µg/ml で対照胚が後期原腸胚期に達したとき死に至ること、ハスノハカシパン胚においても同様な細胞毒性を示すことが明らかになった。他方、Exiguamide のホルムアミド基がイソシアニド基に置換した (-)-10-*epi*-axionitrile-3 は 100 µg/ml でイトマキヒトデ胚発生にもウニ胚にも全く影響を与えないが、どちらの種

においても受精を低濃度 (0.4 µg/ml) で阻害することが明らかになっている。したがって、(R)-(+)-1-(1-Naphthyl)ethylisocyanide の分子骨格はヒトデ胚とウニ胚に毒性を示す生体不適合構造であることが判明した。

Ancornioside A にはテトラミン酸構造を有するが、単純なテトラミン酸構造を有する Tenuazonic acid はイトマキヒトデ胚に 50 µg/ml の濃度で影響を与えないことが先行実験で明らかにされている。適切な類縁体の調製が困難なことから、12,000 種に及ぶ化合物からなるケミカルライブラリーを活性試験に供した。その結果、Ancornioside A のように胞胚期で選択的に発生を停止させる化合物は 1 種類も見出すことができなかった。他方、別シリーズでの新規発生阻害海綿化合物の探索研究から、奄美大島周辺の浅海から採集された海綿 *Petrosia solida* から新規 C₃₀ ポリアセチレン化合物 Petroacetylene が単離され、構造決定された。本化合物は 3.1 µg/ml の濃度で選択的にイトマキヒトデ胞胚形成を阻害することが明らかになった。本化合物と Ancornioside A によってもたらされる胞胚形成阻害活性の異同は今後の研究課題である。

本研究結果から、ウニ、ヒトデ胚の細胞分裂を阻害せず、胞胚形成、原腸形成という後生動物の最も重要な発生現象を選択的に阻害する海綿由来成分は希有であり、生合成を経由しない合成化合物で代替することは極めて困難であると結論された。

(2) 卵母細胞に nTG MO を注入し、卵成熟、受精を経て胚発生させたところ、ピピンナリア幼生期に至るまでの発生・成長の速度は nTG

CMO を注入した幼生と変わらなかった。3 日幼生の固定試料を抗 nTG 抗血清で免疫染色したところ、nTG CMO を注入した幼生の細胞核に nTG が存在したが、nTG MO を注入した幼生では nTG のシグナルは認められず、予測どおり、nTG mRNA からの翻訳が抑制され nTG 生成が特異的に阻害されていた。nTG MO を注入した 3 日幼生に給餌・生育させると、6 日目から成長は抑制され、12-17 日目に nTG CMO を注入した幼生がブラキオラリア幼生へと移行したのに対し、ビピンナリア幼生にとどまるかブラキオラリア幼生に移行しても、ブラキオラリア腕の発達不全や体サイズの増加量不足などの異常が認められた。これは、摂餌・消化・吸収・同化のいずれかの過程が抑制されていることに起因すると考えられる。そこで、まず摂餌・嚥下活動量を評価するために、餌となる珪藻 *Chaetoceros glacialis* と同サイズの 6 μm 径の赤色蛍光色素結合ポリスチレン・ラテックスミクロスフェア粒子を幼生に与え、2.5 分後に固定し、胃内を観察した。その結果、nTG CMO 注入 3 日幼生では 7 個体すべての胃内に粒子が認められたが、nTG MO 注入 3 日幼生では 30 個体のうち 7 個体に粒子が認められ、23 個体に認められなかった。

本研究によって nTG 欠失イトマキヒトデ幼生はビピンナリア幼生期までは正常に発生するが、ブラキオラリア幼生期に移行する時期で摂餌・嚥下活動に支障が生じ、これによって発育不全、発生異常がもたらされる可能性が示唆された。しかし、どのような機序でこのような障害がもたらされたのか、未だ明らかではない。これまで研究成果を基盤として、

幼生期における nTG の機能を解明することが今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Ohta, S., Ogawa, T., Ohta, E., Ikeuchi, T., Kamemura, K., & Ikegami, S. Petroacetylene, a new polyacetylene from the marine sponge *Petrosia solida* that inhibits blastulation of starfish embryos. *Natural Product Research*. 査読有 Vol. 27, 2013, pp.1842-1847. DOI 10.1080/14786419.2012.763128

Aoki, N., Yamamoto, K., Ogawa, T., Ohta, E., Ikeuchi, T., Kamemura, K., Ikegami, S., & Ohta, S. Bromotheoynic acid, a brominated acetylenic acid from the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Natural Products Research*. 査読有 Vol. 27, 2013, pp. 117-122. DOI 10.1080/14786419.2012.660636

Furukawa, R., Funabashi, H., Matsumoto, M., & Kaneko, H. Starfish *ApDOCK* protein essentially functions in larval defense system operated by mesenchyme cells. *Immunol. Cell Biol.* 査読有 Vol. 90, 2012, pp. 995-965. DOI 10.1038/icb.2012.37

Ogawa, M., Adachi, T., Ikegami, S., Kato, K. H., Yamamoto, A., & Kamemura, K. Characterization of *O*-GlcNAcylation in starfish (*Asterina pectinifera*) development from fertilization to bipinnaria

larva. Biosci. Biotechnol. Biochem. 査読有 Vol. 75, 2011, pp. 358-361. DOI 10.1271/bbb.100601

Hamanaka, G., Hosaka, E., Kuraishi, R., Hosoya, N., Matsumoto, M., & Kaneko, H. Uneven distribution pattern and increasing numbers of mesenchyme cells during development in the starfish, *Asterina pectinifera*. Dev. Growth Differ. 査読有 Vol. 53, 2011, pp. 440-449. DOI 10.1111/j.1440-169X.2011.01259.x.

[学会発表] (計 2 件)

池上 晋, 古川亮平, 金子洋之. イトマキヒトデ胚発生における核型トランスグルタミナーゼの機能について. 日本動物学会大会第 84 回大会. 2013 年 9 月 28 日. 岡山大学津島地区一般教育棟.

池上 晋, 清水孝彦, 金子洋之. イトマキヒトデ胚発生における間充織の分化. 日本動物学会大会第 83 回大会. 2012 年 9 月 13 日. 大阪大学豊中キャンパス全学教育推進管理・講義棟.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池上 晋 (IKEGAMI, Susumu)

慶應義塾大学・自然科学研究教育センター
- 訪問教授

研究者番号: 80011980

(2) 研究分担者

金子 洋之 (KANEKO, Hiroyuki)

慶應義塾大学・文学部・教授

研究者番号: 20169577