

平成 30 年 9 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440163

研究課題名(和文) ナメクジウオからみた脊椎動物の内分泌機構の起源

研究課題名(英文) The origin of endocrine system by the study on comparison between vertebrate and amphioxus

研究代表者

窪川 かおる (KUBOKAWA, KAORU)

東京大学・海洋アライアンス・特任教授

研究者番号：30240740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：動物の生体機能の調節を司る内分泌機構は、微量で働くホルモンの濃度や分布や分泌のタイミングが体内の恒常性を保っている。ホルモンは、私たちの日常生活と健康に関与し、代表的内分泌器官は、膵臓と下垂体と甲状腺であり、これらのホルモン分泌の変調は、糖尿病、代謝異常、不妊症などになる恐れがある。本研究では、脊椎動物の内分泌機構の形成に至る過程、すなわち脊椎動物の祖先動物からの内分泌機構の進化に注目し、脊索動物ナメクジウオの神経索、内柱、生殖腺などの内分泌器官の遺伝子解析を行い、脊椎動物との間で遺伝子発現パターンを比較して違いを明らかにするとともに、脊椎動物の内分泌器官と分泌細胞の起源に関して考察した。

研究成果の概要(英文)： In the endocrine mechanism controlling the physiological function of animals, the concentration of hormones, the distribution of endocrine cells, and secretion pattern of hormones working in trace amount maintain the homeostasis in the body. Hormones are involved in our daily lives and health, especially, pancreas, pituitary and thyroid are important endocrine organs. Modulation of these may result in diabetes, metabolic disorders, infertility and so on. In this study, I focused on the evolution of the endocrine mechanism of vertebrates. The ancestral animal of the vertebrate might use the primitive mechanism of endocrine system including organs, genes, and their correlation. The chordate, amphioxus was used as the materials in the comparison to vertebrates. The gene expression patterns were obviously differed among amphioxus organs and each pattern showed the origin of endocrine organs of vertebrates. As the results, the origin of endocrine organs of vertebrates are discussed.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：ナメクジウオ 甲状腺 ヨウ素 内柱 RNA-seq トランスクリプトーム解析 糖タンパク質ホルモン  
比較内分泌学

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 脊索動物門

脊椎動物は、脊索動物門に属する3亜門のうちの一つであり、この門は、脊索動物亜門、尾索動物亜門、頭索動物亜門からなる。尾索動物亜門にはホヤ類など、頭索動物亜門にはナメクジウオ類が属する。

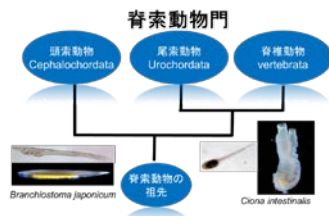


図1. 脊索動物門の系統関係

ホヤ類とナメクジウオ類は、背骨を持たない無脊椎動物で、一生のどこかで脊索をもつという共通点がある。一方、脊椎動物も脊索が発生初期に形成されるが、消失して背骨ができる。脊椎動物のもっとも原始的な動物である無顎類(ヤツメウナギなど)は脊索が残されている。脊索から背骨への進化は、脊椎動物の進化を考える上で最重要である。一方、恒常性を司る内分泌機構は、微量の生体物質で生存を調整する重要な機能であり、その進化も大切な要素である。ナメクジウオは脊索動物の祖先に近い動物であり、脊椎動物の原型を求めることができる。

### (2) 脊椎動物に特有な内分泌器官

脊椎動物の甲状腺ホルモンは、視床下部から甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) が分泌され、下垂体門脈で下垂体に運ばれ、甲状腺ホルモン放出ホルモン (TSH) が分泌される。TSH は循環系で甲状腺に運ばれ、甲状腺ホルモンの合成・分泌が調節される。この系は、視床下部-下垂体系 (Hypothalamus Pituitary Axis, HP 軸) と呼ばれ、下垂体ホルモンの標的器官は、甲状腺、生殖腺を始め体中の器官である。HP 軸は、無脊椎動物にはなく、ホヤ類とナメクジウオにもない。

脊椎動物に特有なホルモンに性ステロイドホルモンがある。その構造は多様で機能も多岐にわたる。無脊椎動物では、サンゴなどにエストロゲンが確認されているが、数多い代謝産物の代謝系は脊椎動物に特有である。

科研費基盤 (C) 「ナメクジウオの内分泌機構の解明と脊椎動物との比較内分泌研究」(平成20年度~平成22年度、代表窪川かおる) では、性ステロイド代謝系を調べた。その結果、ナメクジウオに脊椎動物特有な代謝系があり、主たる働きをもつ性ステロイドは原始的な脊椎動物が利用する  $5\alpha$  還元型ステロイドであることも分かった (1, 2)。

性ステロイドの有無は、性ステロイド代謝酵素の遺伝子の有無で推測する。代謝酵素から進化を推測すると、ナメクジウオが脊椎動物の祖先型であることが示唆された (図2)。

ナメクジウオの内分泌調節系は、脊椎動物の内分泌器官の有無に違いがある一方で、性ステロイド代謝系のように脊椎動物と共通するホルモン分子の利用がある。本研究は、ナメクジウオから内分泌調節系の進化を検証した。

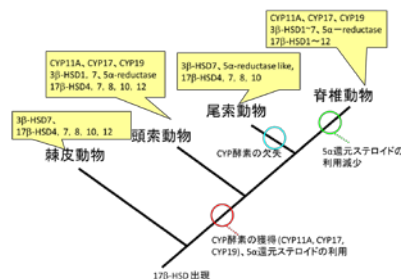


図2. 性ステロイド代謝酵素の進化

## 2. 研究の目的

脊椎動物の内分泌機構には、脊椎動物だけが獲得したものがあつた。それが進化の過程でどのように構築されてきたかは明らかではない。そこでナメクジウオを材料とし、その内分泌物質の分布や遺伝子の発現細胞を明らかにし、脊椎動物の内分泌器官の起源を推定することを目的とした。

脊椎動物の脳・脊髄神経系と相同と考えられる神経索、甲状腺に相同とされる内柱を焦点にした。ナメクジウオと脊椎動物の比較から、ホルモンと受容体の進化、神経内分泌機構から多様な内分泌器官への進化、標的器官の多様化について考察する。

### (1) 神経索の細胞構築

比較解剖学的に、ナメクジウオ神経索の前端部は脊椎動物の脳に対応するとされ、いわゆる「ナメクジウオの脳」を終脳、間脳、中脳、菱形脳に区分している (3) (図3)。脊椎動物の視床下部-下垂体-標的器官系の起源を論じるため、視床下部と下垂体の相当部位の有無を検証する。

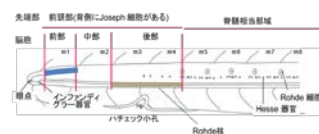


図3. 側面からの神経索の模式図

### (2) 内柱と鰓の形態学的特徴

甲状腺は、ろ胞とその周囲の上皮細胞からなる。ヨウ素を取込み付加した甲状腺ホルモンを分泌する。ろ胞上皮では、脱ヨウ素酵素 (Deiodinase, DIO) の働きでヨウ素が付加された甲状腺ホルモン (Thyroxine, T4) が産生される。さらに T4 は、DIO によりヨウ素が解離して Triiodothyronine (T3) になる。ろ胞には T4 が蓄積され、緩急の分泌に対応する。脊椎動物の中で原始的な無顎類の1種であるヤツメウナギでは、アンモシーテス幼生がろ胞のない内柱をもち、変態で甲状腺に変化する (図4)。

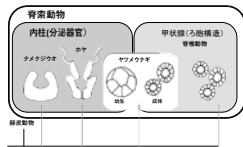


図 4. 脊椎動物の甲状腺とホヤ、ナメコジウオの内柱との関係

ナメコジウオも内柱があり、変態時の甲状腺ホルモンの役割と甲状腺ホルモン投与による変態の誘導、内柱での放射性ヨウ素の取込み、甲状腺特異的な遺伝子の内柱での発現、T4 と T3 の検出が報告されている。これらの検証と内柱の役割の解明を第 2 の目的とした。内柱は、細胞形態と分泌顆粒の多少から 6 つのゾーンに分けられる (図 5) が、その役割は明確ではない。また、甲状腺ホルモンの分泌の調節機構も不明である。これらの解明を目指した。



図 5. 体の断面 (左)、内柱の模式図 (中上)、ヘマトキシリン・エオシン染色 (中)。模式図 (右) 左右対称の 6 ゾーンに分かれ、○は分泌顆粒が見られることを示す。

### (3) RNA-sequencing (RNA-seq) による発現遺伝子の網羅的な探索

神経索、内柱および生殖腺では、それぞれの器官の生理的な役割に対応した特有の遺伝子発現が見られると考えられる。非モデル生物のナメコジウオ類では利用可能なマイクロアレイが開発されていないので RNA-seq を用いた。

なお、日本産ナメコジウオでは、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析に、リファレンスとして一般的に用いられているゲノム配列がない。そのため、当初は自前で解読したホルモン関係の mRNA 配列および EST をリファレンス配列として用いたが、次世代シーケンサーによる配列解析の性能向上にあわせ、トランスクリプトームに由来するリード配列のアセンブリーを作製し、アノテーション付けをしてリファレンスとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料の採集

愛知県渥美半島沖の遠州灘でナメコジウオ *Branchiostoma japonicum* を採集した。愛知県田原市赤羽根漁港の協栄丸に依頼し、34° 36.00N、137° 16.00E 付近の水深 20-40m で採集した。ドレッジ (直径 30 cm、深さ 50 cm) で数分間底曳きした。一部は船上で固定し、残りは東京大学理学系研究科附属三崎臨海実験所 (神奈川県三浦市) で飼育した。

### (2) 神経索の細胞構築

### 2-1 ニッスル染色

ブアン固定を 4°C で 24 時間した頭部 (3 mm x 2 mm x 1 mm) をパラフィン包埋し、厚さ 10 μm の連続切片にして 0.1% トルイジンブルー水溶液で染色した。

### 2-2 ゴルジ染色

PFA 固定した頭部を Milli-Q 水で洗浄後、FD Rapid GolgiStain Kit (FD NeuroTech) を用いてゴルジ染色した。染色した組織ブロックはテクノヴィット 7100 に包埋後、マイクロスライサーにより 50 μm 厚の切片を作成した。

### (3) 内柱と鰓の形態学的特徴

#### 3-1 切片 in situ ハイブリダイゼーション

試料は、4% PFA (0.1 M MOPS, 0.5 M NaCl) (pH 7.5) で固定し、OCT compound で包埋し、凍結後に -80°C で保存した。10 または 20 μm 厚の切片にした。プローブは 20-30 base を用いた。Proteinase K 処理、プレハイブリダイゼーション後に、DIG プローブでハイブリダイゼーションした。発色は BM purple (Roche) を用いた。また、数 mm の厚切りにした試料に対して Whole mount 法で遺伝子発現を調べた。

#### 3-2 免疫組織科学

個体を 5-10 mm に切断し、ブアン-ホルランド液あるいは 4% PFA 液で固定し、パラフィン切片を作成した。1 次抗体にはナメコジウオの cDNA 配列からの合成ペプチドを抗原とした (GenScript)。抗体希釈は 100 倍で、免疫反応、DAB 発色後に顕鏡した。吸収実験は 200 倍 mol の過剰抗原を使用した。

#### 3-3 内柱の 3 次元立体構築

胴体の連続切片を 3D 可視化・解析ソフト AVIZO (マックスネット) で画像処理をした。

### (4) RNA-seq

RNA-seq は予備的な実験と本実験の 2 回にわたり実施した。組織を生体から切り出し、液体窒素で凍結した後、超低温槽 (-80°C) で保存し、必要時に Qiagen RNA 抽出キットあるいは Sepasol®-RNA I Super G (ナカライテスク) を用いて RNA を抽出した。本実験は、神経索 (頭部の筋肉を含む)、内柱、鰓、生殖腺等を解析した。

#### 4-1 次世代シーケンサー (NGS) による解析

NGS による解析手順は、北海道システムサイエンス社、フィルジェン社で次の工程を定法通りに行われた。RNA 試料からの rRNA の除去、cDNA の合成、cDNA のフラグメンテーション、ライブラリー作成、アダプターの付与、PCR による増幅と精製、次世代シーケンサーによる各 PCR 産物の配列解析、FASTAQ によるリード結果の出力である。

#### 4-2 Reference の作成

トランスクリプトームの内容を定量的に反映するとされている RNA-seq のリード結果を網羅的かつ定量的に解析するために、リファレンスを用意した。3 種類のリファレンスは、それぞれについて Blast2GO (Qiagen)

によるアノテーション付けを行った。

なお、次表に示すようにリファレンスのサイズが大きくなると、個々の配列のリード数が少なくなる。そこで、もともと発現量が少ないホルモン関連遺伝子の発現解析には、*B. japonicum* のホルモン関連遺伝子の配列を抽出したリファレンスも用意した。

Effects of the size of reference on unique gene reads					
Endostyle	8100 seq	173 seq	138 seq	67 seq	10 seq
GPA2	265	374	295	414	336
GPB5	75	75	72	75	96
proVT	5	42	39	43	

#### 4-3 統計解析

GLC Genomics Workbench (Qiagen) 解析ソフトを用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 神経索の細胞分布

##### 1-1 神経細胞の分布

神経索の前部分の切片をニッスル染色し、神経細胞の分布を観察した。中心管の周囲に集中すること、頭部先端（眼点と脳胞周囲）から頭部後方（咽頭付近）にかけて、細胞種と分布が変化することを確認した。

図6では、神経索先端の中心管腹側のインファンディブラー器官、背側のジョセフ細胞、中心管周囲腹側の運動神経細胞、感覚神経細胞、中心管をまたぐロード細胞などが確認できる。新たな神経細胞も多く見られ、既知を含めて細胞機能の確定が今後必要である。

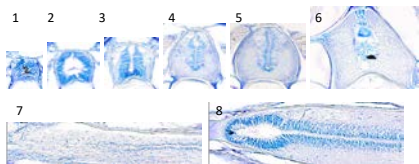


図6. 神経索の細胞分布。上段は横断面、下段は水平面。

銀染色によるゴルジ体の観察では、中心管付近の神経細胞から中心管に向かう突起が確認された。また、脳室の上皮細胞の特徴である繊毛が中心管内に見られた（図7）。

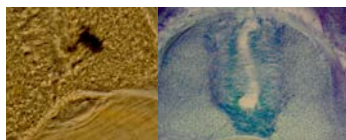


図7. ゴルジ染色による神経細胞とその突起（左）。上皮細胞と繊毛（右）。

##### 1-2 バソトシン遺伝子の発現細胞の分布

神経葉ホルモンは、脊椎動物の下垂体後葉で分泌されるペプチドホルモンで、広く動物界に存在する。9個のアミノ酸からなり、ナメクジウオはバソトシンのみで、その配列は、CYIINCPGa である。バソトシン遺伝子の発現は、神経索先端の眼点付近では中心管全周で見られた。後方では背側の少数細胞のみとな

った。（図8）。バソトシン分泌細胞は散在または集合していることが示された。

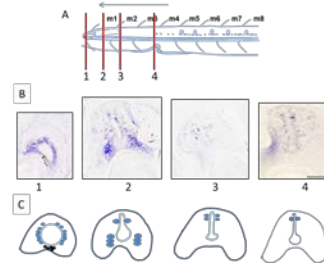


図8. 神経索先端部のバソトシン遺伝子発現細胞の分布。A: 神経索の模式図。B: 発現細胞の分布。C: Bの模式図。Scale bar: 10 μm。

#### (2) 内柱と鰓の形態学的特徴

##### 2-1 甲状腺関連物質の遺伝子の発現

内柱で甲状腺代謝系関連遺伝子が発現している領域を調べた。内柱は、細胞形態に応じて左右対称にそれぞれ6ゾーンに分けられる。ゾーン4はTPO、DIO3を除くすべての遺伝子の発現が確認された。ゾーン5と6はTPOとDIO1の発現が確認された（図9）。

GPA2 (Glycoprotein hormone α subunit) (5) とGPB5 (Glycoprotein hormone β subunit) (6) は、脊椎動物の下垂体ホルモンである甲状腺刺激ホルモン (TSH) と相同な糖たんぱく質 Thyrostimulin (TS) の2つのサブユニットである。TSは脊椎動物のユビキタスに存在するホルモンで、その役割の詳細は不明である。ナメクジウオは下垂体糖たんぱく質ホルモンではないがTSのみあり、内柱、鰓、生殖腺、神経索などでの分泌を確認している。

遺伝子発現と免疫組織化学の結果を総合すると、GPA2は内柱で分泌される主要なホルモンと考えられた。ゾーン5、6は甲状腺に相当し、TPO、DIO1、DIO3、T4が存在した。

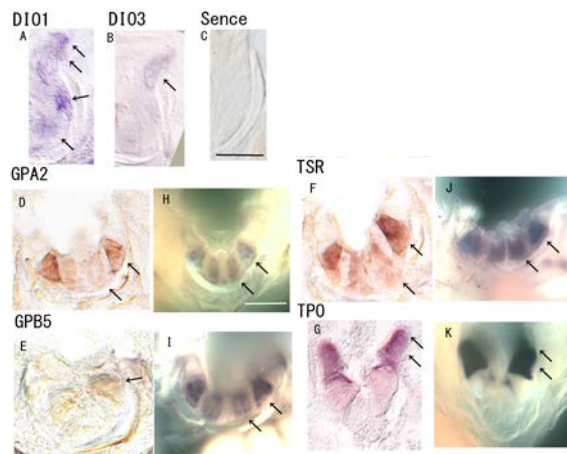


図9. 内柱の in situ ハイブリダイゼーションの結果。A~C: 内柱の右半分のみを示す。A~G: 凍結切片の結果、H~Kは厚切り試料の結果。C: センスプローブの結果。Scale bar: 10 μm

##### 2-2 内柱のヨウ素の元素分析とマッピング

内柱へのヨウ素の取込みは、<sup>131</sup>Iの過剰投与をオートラジオグラフィで検出されたが微量であった。そこで、自然状態でのヨウ素

の有無および分布を SPring8（大型放射光施設、兵庫県）の軟 X 線による元素マッピングで測定した（図 10）。試料はブアン固定したパラフィン切片であった。その結果、ゾーン 5 の咽頭側にヨウ素が集中しており、甲状腺ホルモンの反応と考えられる。また、ヨウ素液での飼育で内柱のヨウ素の蓄積が減少したことから、環境中のヨウ素濃度に蓄積能力が応じていることが示唆された。

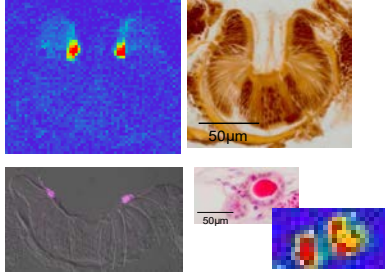


図 10. 内柱のヨウ素の分布（上左）。明視野像（上右）。甲状腺ホルモンの分布（下左）。メダカ甲状腺（下右）。

### 2-3 内柱の 3 次元立体構築

内柱の構造をより詳細に観察した。ゲイコツナメクジウオ (*Epigonichtys inferum*) を用いた。ゲイコツナメクジウオの内柱は、背側に弓なりである。ゾーン番号も凸部から 1 となる。長い繊毛が咽頭側に密集するが、ゾーン 1、5、6 にはなかった（図 11）。鰓との境界は明確であった。甲状腺ホルモンは繊毛のないゾーン 5 から分泌され、繊毛と粘液で運ばれる可能性が考えられた。

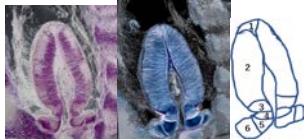


図 11. ゲイコツナメクジウオの内柱の光顕像（左）。ニッスル染色（中）。模式図（右）。

## (3) RNA-seq による発現遺伝子の探索

### 3-1 マッピングの信頼性

今回用いたホルモン関連遺伝子へのマッピングの信頼性を確認するため、生殖機能および甲状腺の機能に関連する遺伝子について、内柱で個々のリードが遺伝子のどの領域を認識しているかをリードカバーレッジによって確認した。（図 12）

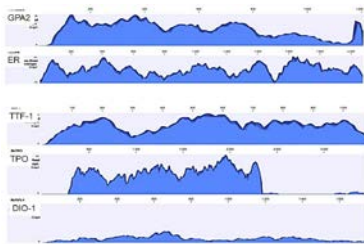


図 12. 内柱に発現しているホルモン関連遺伝子のリードカバーレッジ。

脊椎動物の下垂体－甲状腺系では、下垂体から分泌される甲状腺刺激ホルモン (TSH) が、甲状腺細胞がもつ TSH 受容体 (TSHR)

に結合して機能を現すが、内柱に TSHR 遺伝子が発現しているとは言い難い。TSHR 遺伝子に対応するリードが特定の狭い領域に集中してしまうためである。なお、神経索ではリード数こそ少ないが、カバーレッジは妥当なものであった。

### 3-2 遺伝子発現の組織特異性

ゲノムデータから抽出した mRNA の配列 28,000 余りを並べたリファレンスを用いて網羅的に解析した結果を主成分分析にかけて、頭部、内柱および鰓の遺伝子発現はそれぞれに特異的なことが確認できた。ホルモン関連遺伝子を用いたリファレンスでも同様の結果が得られている（図 13）。それぞれの組織において、リファレンスを用いた解析で発現量が多かったのは以下である。  
頭部：伸長因子、フェリチン、ミオシン  
内柱：カドヘリン、フェリチン、ヒストン  
鰓：アクチン、チュブリンであった。Blas2GO による遺伝子オントロジー解析によって全体的に見た時、内柱と鰓では代謝に関わる遺伝子発現のパターンが似ていた。一方、頭部（神経索）と内柱では情報伝達に関わる遺伝子の発現パターンが似ていた。

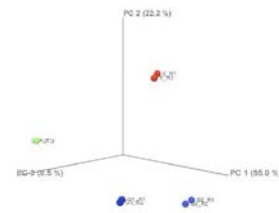


図 13. 頭部（緑丸）、内柱（赤丸）、鰓（青丸）におけるホルモン関連遺伝子の発現の主成分分析。同一サンプルで 2 回の配列解析結果。鰓のみ 2 サンプル。

以下、特徴を挙げる。内柱にはフェリチン遺伝子が大量に発現している（内柱に鉄が集積している部位がある）。鰓では *apextrin1* および 2 の発現が目立っている。*apextrin* は免疫機能に関わるとされているので、体内に取り入れた海水と接する鰓による生体防御と関係する可能性がある。内柱および鰓は粘液を分泌するが、それを反映して両者でムチン遺伝子が大量に発現していた。

ホルモン関連遺伝子をリファレンスとする RNA-seq は、内柱が甲状腺の祖先型であるという仮説を裏付けるだけでなく、いずれの組織でも複数種のホルモン関連遺伝子が発現していることを示した（下表）。

Head		Endostyle		Gill	
NCBI Database Name	TPM	NCBI Database Name	TPM	NCBI Database Name	TPM
luteal-related transcription factor 1	136239	CCAAT enhancer binding alpha	478709	CCAAT enhancer binding alpha	107170
IGF receptor 2 isoform X4	81138	calcium-like	50168	calcitonin receptor-like receptor 1	107230
CCAAT enhancer binding alpha	80649	calcitonin receptor-like receptor 1	57837	interferon 17 alpha hydroxylase 17.20 base	57808
peroxiredoxin, partial	50785	aldose reductase like	40436	ampcPAC1 alpha hormone (beta 2)	26584
Platand receptor interacting 6 like	51685	IGF receptor 2 isoform X4	40251	aldose reductase like	22566
interferon 17 alpha hydroxylase 17.20 base	40129	mitogen receptor	35069	IGF receptor 2 isoform X4	21790
paired box (Pax) 7a like isoform X6	40540	luteal-related transcription factor 1	33337	nuclear receptor subfamily 0 group B member 1	16736
peroxiredoxin isoform X1	44209	peroxiredoxin, partial	34517	calcitonin-like	15435
calcitonin gene-related peptide	41264	nucleosome	32081	peroxiredoxin, partial	15366
luteal-related transcription factor 1	40350	nuclear receptor subfamily 0 group B member 1	32820	calcitonin receptor-like receptor 1, partial	14932
IGF binding protein 7	22076	ampcPAC1 alpha hormone (alpha 2)	20999	mitogen receptor	11775
ROR alpha isoform X1	24816	homocysteine-like isoform X2	20686	ampcPAC1 mRNA, complete	11502
homocysteine-like isoform X2	24753	interferon 17 alpha hydroxylase 17.20 base	20272	nuclear receptor subfamily 0 group B member 1	7947
luteal-related transcription factor 1	20322	nuclear receptor subfamily 0 group B member 1	20142	interferon 17 alpha hydroxylase 17.20 base	6864
wee1	20668	IGF receptor 2 isoform X4	17943	growth factor receptor tyrosine kinase 4	6437
aldose reductase like	20058	iodothyronine deiodinase 1	15709	muscle-like growth factor binding 7	6282
Appt-B oxidophenone dioxygenase	19216	Wnt 1b	11440	iodothyronine deiodinase 2	5784
homocysteine-like isoform X2	15289	IGF binding protein 7	9826	iodothyronine deiodinase 1	5275
Platand hormone receptor beta1	15005	homocysteine-like isoform X2	8909	interferon 17 beta dehydrogenase 8	4414
Platand hormone receptor beta2	15817	peroxiredoxin, partial	8861	homocysteine-like isoform X2	4306
interferon isoform X1	10029	ampcPAC1 alpha hormone (beta 5)	6900	IGF receptor 2 isoform X4	3417
Wnt 1b	8263	Wnt 1b	5470	ampcPAC1 alpha hormone (beta 5)	3204
nuclear receptor subfamily 0 group B member 1	6641	interferon 17 beta dehydrogenase 8	4482	3 beta hydroxysteroid dehydrogenase beta 5	2923
paired box	6458	ampcPAC1 mRNA, complete	4364		
nuclear receptor subfamily 0 group B member 1	6020	iodothyronine deiodinase 8	3829		

### 3-3 遺伝子発現の組織比較

ナメクジウオ、とくに *B. japonicum*、には RNA-seq のリファレンスに使えるゲノムデータベースがないが (2018 年秋に作成された)、上に述べた結果を踏まえ、より多くの試料、すなわち繁殖期の雌の頭部 (神経索と筋肉を含む)、繁殖期および非繁殖期の雌雄の内柱、繁殖期の卵巣と精巣、非繁殖期の筋肉、繁殖期の雌雄の体全体から RNA を採取して RNA-seq に処した。得られたリードのマッピングには、先に述べたリファレンスを用いた。

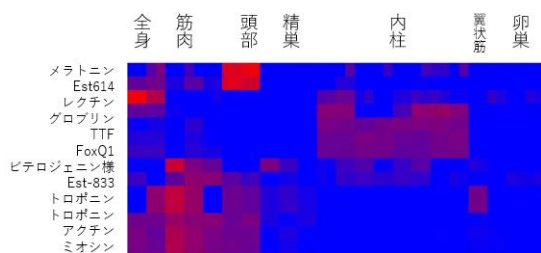


図 14. 組織の RNA-seq のクラスター分析 (結果の一部を表示)

主成分分析およびクラスター分析の結果は、先に行った予備的な実験と同様、それぞれの組織が特異的な遺伝子発現を示している。図 14 は結果の一部を示す。内柱はグロブリン、TTF、レクチンが強い発現を示し、精巣では、数種類の酵素に強い発現が見られ、卵巣は卵膜タンパクの遺伝子が特徴である。一方、内柱は、繁殖期も非繁殖期も雌雄の大きな違いは見られなかった。しかし、繁殖期と非繁殖期の発現量の差が見られた。

#### (4) まとめと考察

ナメクジウオの内分泌機構の研究結果から、脊椎動物への進化について考察した。まず主な結果を要約すると以下ようになる。

1. ナメクジウオには脊椎動物の視床下部と下垂体はないが、神経索に分布する神経細胞がこれらの役割をもつ。
2. 内柱は、甲状腺の機能をもつが、糖タンパク質ホルモン合成、カルシトニンの合成など別の内分泌器官の役割もつ。
3. ナメクジウオでは性ステロイド合成酵素と受容体が多く組織に分布するが、脊椎動物では、性ステロイドの機能が生殖機能に集約されたと考えられた。
4. 器官・組織の機能を推定するには、それぞれの網羅的な発現遺伝子解析が効果的である。

以上から、脊椎動物で特化した機能をもつ内分泌器官の形成は、ナメクジウオでは未分化であると考えられた。さらに、ホルモン分子やその調節分子を運ぶ循環系が未発達であるため、同一器官内で傍分泌により調節している可能性が示唆された。本研究で、無脊椎動物から脊椎動物への進化は、組織・器官の分化による役割の独立が、重要な引き金にな

っていると考えられる。

#### <引用文献>

- (1) Mizuta T, Kubokawa K. Presence of sex steroids and cytochrome P450 genes in amphioxus. *Endocrinology*, 2007, 148:3554-3565
- (2) Mizuta T, Asahina K, Suzuki M, Kubokawa K, In vitro conversion of sex steroids and expression of sex steroidogenic enzyme genes in amphioxus ovary. *J Exp Zool*, 2008, 309A:83-93
- (3) Wicht H, Lacalli TC. The nervous system of amphioxus: structure, development and evolutionary significance. *Can. J. Zool.* 2005. 83: 122 -150.
- (4) Tando, Y., & Kubokawa, K. A homolog of the vertebrate thyrostimulin glycoprotein hormone  $\alpha$  subunit (GPA2) is expressed in Amphioxus neurons. *Zoological Science*, 2009. 26(6), 409-14.
- (5) Tando, Y., & Kubokawa, K. Expression of the gene for ancestral glycoprotein hormone  $\beta$  subunit in the nerve cord of amphioxus. *General and Comparative Endocrinology*, 2009. 162(3), 329-39.

### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 6 件)

- ① 窪川かおる. 生命と進化から考える海洋リテラシー. 日本水圏環境教育研究会大会. 2017
- ② 窪川かおる. 海洋生物で考える地球の未来. 日本船舶海洋工学会. 2016.
- ③ 窪川かおる・小島彩加. ナメクジウオの内柱からの内分泌関連遺伝子の探索. 日本比較内分泌学会大会. 2016.
- ④ 小島彩加・窪川かおる. ナメクジウオの内柱における内分泌物質の局在. 第 67 回日本動物学会関東支部大会. 2015.
- ⑤ 窪川かおる. ナメクジウオの内柱における糖タンパク質ホルモンの存在. 第 86 回日本動物学会. 2015.
- ⑥ 小島彩加・窪川かおる. ナメクジウオ内柱の甲状腺機能と関連遺伝子の局在. 第 85 回日本動物学会大会. 2014.

[図書] (計 1 件)

- ① 窪川かおる. 境界動物の内分泌系と変態に見る脊椎動物への進化の足跡. 44-64. 発生・変態・リズム、ホルモンから見た生命原書と進化シリーズ II. pp.212. 裳華房. 2016.

[その他]

ホームページ等  
<http://amphioxus.net>

### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
 窪川 かおる (KUBOKAWA, Kaoru)  
 東京大学・海洋アライアンス・特任教授  
 研究者番号: 30240740
- (4) 研究協力者  
 丹藤 由紀子 (TANDO, Yukiko)  
 小島 彩加 (KOJIMA, Ayaka)  
 西野 敦雄 (NISHINO, Atsuo)  
 西野 純子 (NISHINO, Junko)  
 浦野 明央 (URANO, Akihisa)