

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770061

研究課題名（和文） 軟体動物有肺類の肺形成に関する研究：動物の陸上化の進化と多様性について

研究課題名（英文） Study of the pulmonary development in the pulmonate gastropod of the mollusc: implications for the evolution and diversity of the terrestrial adaptation of animals

研究代表者

飯島 実 (IIJIMA MINORU)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・研究員

研究者番号：80375443

研究成果の概要：

多細胞動物の陸上化進化の一要因を発生過程の肺形成イベント獲得と捉え、その様な視点での研究対象となっていなかった冠輪動物について肺形成の発生メカニズム解明を目的に、軟体動物有肺類を用い研究を行った。有肺類のカラムツガイにおいて発生過程を観察するとともに、マウス等で気管形成に関与する遺伝子の単離を試みた。軟体動物を含む冠輪動物群における、肺形成の形態形成、遺伝子発現等の発生メカニズムの詳細な解析は、動物の陸上化適応についての統一的見解を示唆し得る重要な手掛かりを与えるだろう。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,700,000 | 0 | 2,700,000 |
| 2008年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 210,000 | 3,610,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分科＝基礎生物学、細目＝生物多様性・分類

キーワード：多様性

1. 研究開始当初の背景

現在、地球上に存在する全ての生物は、たったひとつの祖先種を起源としているが、長い時間を経た進化の結果、多様な生物種が出現してきている。その中で、多細胞性という特徴は、多細胞動物、植物、真菌類に見られる特徴であるが、それぞれの多細胞性は独立に獲得されたものであると考えられている。現生の多細胞動物は30以上の門に分類されており、その形態や生態は非常に多様化し

ているが、海産無脊椎動物型の種を共通祖先種としているとされる。しかし、その中には、我々ヒトを含む有羊膜類（脊椎動物の中の、いわゆるハ虫類、鳥類、哺乳類）の様に、乾燥した陸上への進出に成功したグループも複数存在する。他には、例えば、環形動物門貧毛類（ミミズ等を含む）、節足動物門甲殻綱等脚類（ダンゴムシ等を含む）、節足動物門昆虫綱（昆虫類）、そして軟体動物門腹足綱有肺亜綱（いわゆるカタツムリ類）等であ

る。現在、広く受け入れられている系統関係から考えると、これらの陸上化は、それぞれ独立に獲得された形質であると考えることが妥当である。つまり、多細胞動物の陸上化は、進化上、いくつかの動物門内のグループで、それぞれ独立に生じた可能性が考えられる。脊索動物門の中での有羊膜類の陸上化は、その出現や生理機構に関して、比較的研究がなされている (Colbert et al., 2004)。その他のグループにおける陸上化に注目した研究は多くないが、有羊膜類のマウスの肺形成と昆虫類のキロシヨウジョウバエの気管形成において、相同な遺伝子が発現していることが明らかとなっている (Metzger and Krasnow, 1999)。しかし、マウス、キロシヨウジョウバエは、現在、大きく3つに分類される多細胞動物 (Aguinald et al., 1997)のうち、2つのグループ (後口動物: マウス、脱皮動物: キロシヨウジョウバエ) を代表する動物である。もうひとつの大きなグループである冠輪動物 (軟体動物、環形動物、触手冠動物等) については、陸上化に適応し、肺呼吸を行う軟体動物有肺類が存在するにも関わらず、その肺形成の分子メカニズムは不明のままである。よって、多細胞動物の陸上化というイベントにおける形態や分子メカニズムの進化的変化が、陸上化グループ間でまったく異なった、独立したものなのか、または、機能上、形態上、類似した形質を獲得した収斂によるものなのか、ということについての統一的な解釈は、冠輪動物におけるデータが欠失している限り、達成されない。本研究は動物の陸上化に関わるイベントの多様性もしくは進化的保存性を、軟体動物有肺類を材料に、特に発生メカニズムの観点から解明することを目的とする。

2. 研究の目的

軟体動物門において陸上化に成功したのは、腹足綱 (いわゆる巻貝) の中の有肺亜綱のグループ (カタツムリ類) であり、外套腔と呼ばれる器官 (= 肺) で空気呼吸をしている。同じく腹足類である前鰓類 (サザエ類など) と後鰓類 (いわゆるウミウシ類) は、軟体動物門の中でも原始的と言われるグループ (有針類) と同様に水生であることから、軟体動物の祖先種は水生で、鰓呼吸をしていたと考えられている (Salvini-Plawen, 1985)。有肺類は、進化上、外套腔内に形成されていた鰓を失い、肺へと変化させ、陸上化に適応したのである。しかし、潮間帯に生息する、有肺類のカラマツガイ類は、外套腔内に鰓をもち、

鰓呼吸、空気呼吸の両方を行っており、有肺類の中でも祖先的である可能性が示されている (Wade and Morden, 2000)。このことから、有肺類の陸上化に関して、カラマツガイ類は水生から陸生に移行する進化の中間段階であるとみなすことが可能である。水生腹足類の外套腔と陸生腹足類 (有肺類) の肺とは、組織学的に相同である (Ruthensteiner, 1997) ことから、鰓をつくる発生メカニズムの一部に進化的変化が生じ、有肺類では鰓ではなく、空気呼吸に適応した肺を形成するよう進化したことが強く示唆される。よって、本研究は、カラマツガイ類における肺形成の発生メカニズムを分子的、解剖学的に詳細に解明することで、有肺類における陸上化の進化過程の一部を明らかにすることを目的とする。このことにより、動物界を3つに大別した際に、これまで肺形成についての分子的知見がなかったひとつのグループ、冠輪動物について、初めての知見を得ることが可能となる。

本研究期間中に、カラマツガイ *Siphonaria japonica* を用い、肺形成に関わる細胞系譜と分子メカニズムとを解明することを目標とする。将来、肺形成に関与する割球を特定することで、肺の形態形成の基本となる発生過程を理解する。成体においては、光学顕微鏡、電子顕微鏡などを用い、肺の形態、微細構造を明らかにする。また、肺形成に関与する遺伝子 (カスケイド、またはネットワークの一部) を明らかにする。それと同時に、後口動物 (マウス)、脱皮動物 (キロシヨウジョウバエ) の肺または気管形成に関与している遺伝子 (*FGF10*, *sonic hedgehog* など) について、有肺類の肺形成における関与を明らかにする。さらに、軟体動物有肺類内での比較のため、カラマツガイよりも陸上化に適応した有肺類モノアラガイ *Lymnaea stagnalis* を同様の研究に用いる。この比較により、肺形成に着目した、有肺類の陸上化進化過程における形態形成、分子メカニズム上の保存性 (発生拘束) や多様性 (新奇性) を明らかにすることが可能であり、動物界における陸上化への呼吸器官形成メカニズムについての統一的な理解が可能となる。

3. 研究の方法

野外 (神奈川県三浦市) においてカラマツガイ、キクノハナガイ、およびマツバガイの成体を採集し、それぞれからゲノムDNAを抽出した (Iijima et al., 2006 など)。

カラマツガイの繁殖シーズンの春から夏に、成体の採集を行い、研究室内で飼育を行った（図1）。水温調節を行い、人工的に研究室内で産卵を継続させるよう、飼育条件の検討を行ったが、自然状態における繁殖シーズンより長い産卵時期を維持することはできなかった。

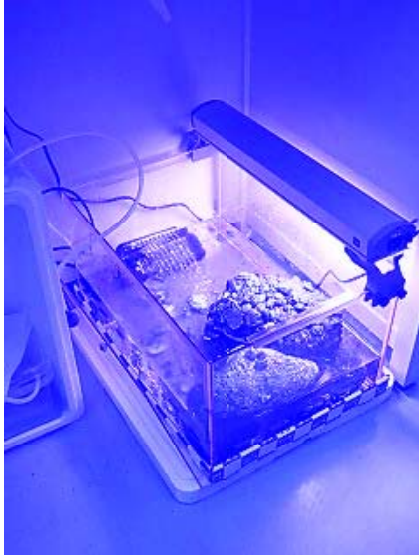


図1 カラマツガイ *Siphonaria japonica* 成体の実験室における飼育の様子

研究室内飼育下で得られた受精卵（卵塊の状態）および自然状態で産卵された受精卵（潮間帯の岩礁に産みつけられた卵塊の状態）を採集し、実体顕微鏡および生物顕微鏡を用い、発生過程の観察を行った。

マウスやショウジョウバエの気管形成に関与することが知られている遺伝子、*branchless (bnl)*、FGF family、*Sprouty (Spry)* の、各種における相同遺伝子単離のため、カラマツガイ、キクノハナガイ、マツバガイ、またモノアラガイ成体から抽出したゲノムDNAを鋳型に、degenerate primersを用い、PCRを行った。degenerate primersの作成は、*Spry*については、DNAのデータベースから得たショウジョウバエ、アフリカツメガエル、ニワトリ、マウスのアミノ酸配列に対し、ClustalW (DDBJ)またはpfam (NCBI)を用いて多重配列を得た後、保存性の高い領域を選んで行った。また、*bnl*については、ショウジョウバエ、カイコガ、線虫、イソギンチャクそれぞれの相同遺伝子をもとに得られた多重配列より、*Spry*と同様に保存性の高い領域を選んだ。PCRはアニーリング温度を36～50℃の範囲で変えながら行った。得られたDNA配列のアミノ酸配列について、ClustalW (DDBJ)を用い多重配列を得た。

4. 研究成果

カラマツガイの繁殖シーズンの春から夏に、成体の採集を行い、研究室内で飼育を行った（図1）ところ、岩に卵塊が産み付けられた（図2矢印）。



図2 カラマツガイ *Siphonaria japonica* 成体の実験室飼育下における産卵（矢印=黄色い卵塊）

産み付けられた卵塊を採集し、ペトリ皿に移し、飼育した。実体顕微鏡および生物顕微鏡を用い観察したところ、発生が進行しており、受精直後の胚を観察することができた（図3、AからFへ発生が進行）。

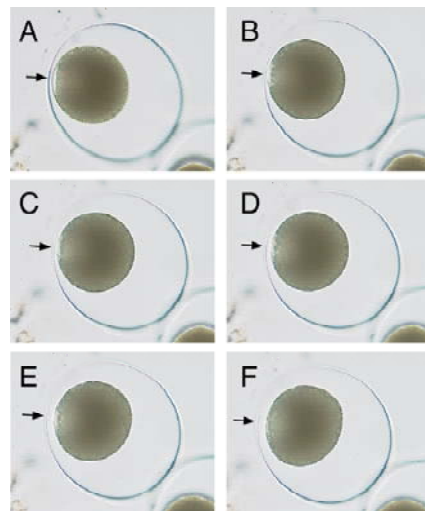


図3 カラマツガイ *Siphonaria japonica* の発生：受精直後の極体（矢印）形成

また、卵塊の飼育を続けると、卵割、原腸陥入、胚形成、ベリジャー幼生成成、貝殻形成の様子が観察された（図4）。

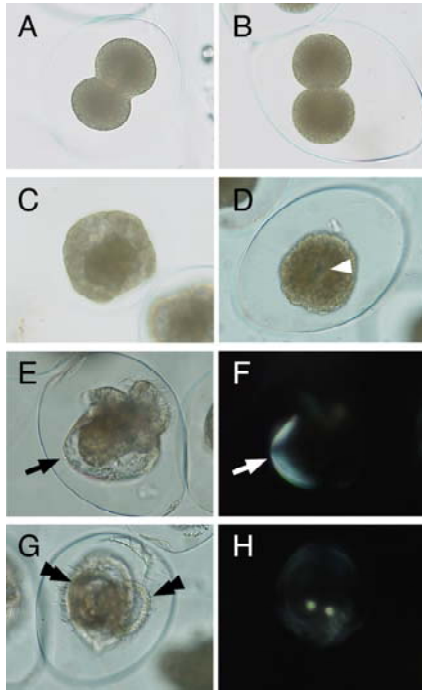


図4 カラマツガイ *Siphonaria japonica* の発生：A) 第一卵割、B) 2細胞期胚、C、D) トロコフォア幼生、E、F、G、H) ベリジャー幼生。原腸胚では陥入する原口（D 矢尻）がみられる。ベリジャー幼生では貝殻（矢印）が形成され始める。F、HはそれぞれE、Gの偏光顕微鏡像。また、面盤（ベリジャー）（G二重矢尻）も発達している。

マウスやショウジョウバエの気管形成に関与することが知られている遺伝子、*branchless (bnl, FGF family)*、*Sprouty (Spry)* の、各種における相同遺伝子単離のため、それぞれの *degenerate primers* を作成し、カラマツガイ、キクノハナガイ、マツバガイ、またモノアラガイ成体から抽出したゲノムDNAを鋳型に *polymerase chain reaction (PCR)* を行った。各条件を変えながらPCRを行ったが、いずれの断片の単離にも至らなかった。しかし、各種のゲノムDNAを鋳型に、*elongation factor 1a (EF1a)*、転写調節因子である *engrailed* に対する *degenerate primers* を用いてPCRを行ったところ、すべての種において各相同遺伝子と思われる断片が得られた（図5、図6）ことから、ゲノムDNAの抽出に問題はないと思われた。また、今回、増幅を試みた *EF1a* 断片には、マツバガイではイントロンがひとつであったが、有肺類のカラマツガイ、キクノハナガイ、モノアラガイではそれ以外にふたつイントロンが含まれていた。

図5 各動物のゲノムDNAを鋳型にPCRにより単離された *engrailed* 断片の翻訳エクソン領域の多重配列。Sja, カラマツガイ

```
Sja-en      TNDQLQRLKREFEDCRYL TEARRKSLADELGLTESQI
Ssi-en      -----P-----
Lst-en      -----DE-----T---N-----
Cni-en      --E--K-V-DE-----T---D--LR-N-----
```

Siphonaria japonica; Ssi, キクノハナガイ
Siphonaria sirius; Lst, モノアラガイ
Lymnaea stagnalis; Cni, マツバガイ
Cellana nigrolineata

```
Sja-EF1a    TRYVVTIIDAPGHRDFIKNMITGTSQADCAVLVAAGTGEFEAGISKEGQTRHALLAYT
Lst-EF1a    DKF-----
Cni-EF1a    EKYY-----
```

```
Sja-EF1a    LGVKQLIIGVNMDSITPPYSEARFREIEKEVATYIKKIGFNKAVFPVPSGHWGDMNL
Lst-EF1a    ---G-5-----L-KN--SN-----Y-PV-----
Cni-EF1a    -----E-R-GKD--E-V---TG-----P-T-A-----FH-----
```

```
Sja-EF1a    DSDCPNMPWYKGSIERKEGKAEKSLINALDAILPPSRPYDKPLRLPL
Lst-EF1a    E--S---T-----D-N-S--T-----T-----
Cni-EF1a    E-PSD--S-----V-----N-S--T-LE-----T--TA-A-----
```

図6 各動物のゲノムDNAを鋳型にPCRにより単離された *EF1a* 断片の翻訳エクソン領域の多重配列。Sja, カラマツガイ *Siphonaria japonica*; Lst, モノアラガイ *Lymnaea stagnalis*; Cni, マツバガイ *Cellana nigrolineata*

bnl、*Spry* に対する *degenerate primers* 設計に改善の余地があることが考えられるが、有肺類においては、前鰓類よりも2つ多いイントロンが *EF1a* 断片領域に挿入されていた進化的変化から、単に *primers* の再設計ではなく、*cDNA library*、*ゲノム library* 作成による直接的な配列の解読が必要である可能性がある。軟体動物を含む冠輪動物群では、これまで *bnl*、*Spry* の相同遺伝子は単離されておらず、将来的に単離され、発現パターンも解析されるならば、分子進化のみならず、遺伝子や形態の機能の進化の視点からも、動物の陸上化適応について、統一的な見解をサポートする重要な手掛かりを与えるだろう。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[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

飯島 実 (IIJIMA MINORU)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・
研究員
研究者番号：80375443

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし