

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24770227

研究課題名(和文)ウニ類の成体原基形成機構の進化に関する研究

研究課題名(英文)Study on mechanisms of adult rudiment formation in sea urchin evolution

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、棘皮動物の発生過程における体軸形成や成体原基形成機構に注目し、実験発生生物学的・分子生物学的アプローチにより研究を行った。その結果、サンショウウニ科のウニ類は非常に再生能の高い細胞塊を介した成体原基形成機構を導入したことで、発生の初期から成体原基形成を開始することを可能にし、環境圧にも耐えうる再生能を獲得したと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, evolution of animal morphogenesis was analyzed by developmental and molecular biological approaches focusing on body axis formation and adult rudiment formation during development of echinoderms. In results, it was identified that temnopleurid sea urchins were involved adult rudiment formation by a cell mass that is formed at the early larval stage and obtains higher regenerative potential. These results suggest that involvement of the cell mass formation in the adult rudiment formation causes to start to form the adult rudiment from the earlier stage and to give larvae regenerative potential to survive in environment.

研究分野：生物学

キーワード：形態進化 棘皮動物 成体原基 割球分離 マイクロマニピュレーション 細胞塊

1. 研究開始当初の背景

ウニ類は、後口動物の棘皮動物門に属し、この動物門の発生学的・形態学的特徴の一つは、大規模な体制変化である。左右相称の初期胚が、次第に成体形質を体の左側に発現させていくことで左右非対称の幼生となる。幼生は体制を大きく変更させる“変態”を通して、5放射相称の形態を持つ成体へと変化していく。棘皮動物には、ウニ類、ウミユリ類、ヒトデ類、クモヒトデ類およびナマコ類が属し、進化の過程で各系統が独特の特徴を獲得してきたと考えられている。

特に、ウニ類については、ゲノム解読以降、更に飛躍的な解析が行われ、発生初期に起こる胚葉分化や様々な形態形成（特に、幼生の消化管に分化していく原腸の形成や、中胚葉の分化など）は、異なる細胞運命を持つ細胞間の相互作用や、様々な遺伝子の調節機構により制御されていることが明らかとなった。また、従来の細胞移植等による実験発生学的手法と遺伝情報解析の融合により、発生初期の形態形成が遺伝子発現ネットワークを基に理解できつつある。

しかしながら、このような初期発生の形態形成過程に関する躍進的な研究成果に対して、成体を構築していく機構については、現在も解明が進展していない。例えば、成体原基形成の追跡には、幼生の長期間飼育が必須であり、発生初期のイベントが成体原基形成に関与しているかを結論づけることは極めて困難を要する。それゆえ、成体の形態的特徴の記載を除き、その形態形成機構に関する研究は非常に限られている。一般的なウニ類において、幼生は発生初期から餌を食べて浮遊生活を行い、その後、後期幼生に成長すると、体の左側では、体腔嚢の一部（水腔）と外胚葉が陥入した羊膜陥とが相互作用を行うようになり、幼生体内に成体形質（成体原基）を構築していく（MacBride, 1914, 1918; Mortensen, 1921）。近年、成体形質が左右非対称に形成される機構については、卵割期におけるイオン流（Hibino *et al.*, 2006）や細胞間相互作用（Kitazawa & Amemiya, 2007）が左右軸決定に関与し、その後、右側でのNodal因子の発現が左側形態形成を抑制することで、左右で異なった形態的特徴をもたらすこと（Duboc *et al.*, 2005）が明らかとなってきた。この機構には、ウニの種により多様性が存在することも示唆されている（Kitazawa & Amemiya, 2007）。

上記のような一般的な成体原基形成に対して、最も原始的な種では羊膜陥を形成せず、外胚葉に直接成体原基が形成されることから（Emlet, 1995）、羊膜陥は原始的な種が分岐した以降に導入された形質であると考えられてきた。一方、本研究で用いるサンショウウニ科のキタサンショウウニでは、羊膜陥は形成されず、代わりに外胚葉

から体内に落ち込んだ細胞塊を形成する（Fukushi, 1959, 1960）。しかしながら、この細胞塊が本種に特有であるのかあるいはサンショウウニ科全体の特徴であるのかは不明であった。

また、サンショウウニ科のウニ類は、深海性であったり、種の同定が困難であったことなどから、発生学的研究は少ないが、ザイモグラム解析（Matsuoka & Inamori, 1996）や、分子系統解析（Jeffery *et al.*, 2003）により、この科の系統関係は提案されている。近年、申請者は、山口県沿岸にキタサンショウウニをはじめとするサンショウウニ科のウニ類が複数種生息していることを確認し（Kitazawa *et al.*, 2007）更に、同科に属するサンショウウニでは、受精直後に皺状の構造を形成することや、直接発生型（幼生期に餌をとらない型）の多くの種でみられる皺胞胚を形成することを初めて明らかにした（Kitazawa *et al.*, 2009, 2010）。このように、サンショウウニ科のウニ類の発生は、モデル生物とされるウニの種の発生過程とは多くの点で異なっており、これらの形態的特徴がどのような分子機構を基に発現していくのかを明らかにすることは、ウニ類の進化を考える上で、極めて重要である。

更に、近年、棘皮動物の進化過程を考察するために、他の棘皮動物についても注目されつつある。多くのヒトデやクモヒトデ類の発生過程は明らかにされているものの、その詳細な発生機構についてはあまり研究が行われていない。これらのグループの成体原基形成機構が同様に明らかになれば、広い範囲で比較することが可能となり、棘皮動物の成体原基形成の進化過程についても発展させて考察することが可能となる。

2. 研究の目的

動物の系統間における形態形成機構の進化多様性、特に、棘皮動物の幼生から成体への体制変化機構ならびに系統進化を解明することを目的とした。第一に、実験発生学および分子生物学的手法を用いて、ウニ類を主とした棘皮動物の幼生期における成体形質の形成機構や体軸形成機構の解析を行った。第二に、棘皮動物の成体原基形成機構の進化について、前述のキタサンショウウニや幼生期に餌を採らない直接発生型ウニ類等のウニ類間の成体原基形成の比較およびウニ類とそれ以外の棘皮動物との比較解析を行い、系統進化の解明を試みた。

3. 研究の方法

申請者が所在する山口県沿岸で採集可能なウニ類を用いて、光学および走査型電子顕微鏡観察による形態学的手法・顕微手術や遺伝子発現阻害などの実験発生学的手法・遺伝子発現の解析などの分子生物学的手法を用いて、成体原基形成過程について

比較解析を行った。特に、3つの成体原基形成様式のうち、羊膜陥および細胞塊形成を介する様式に注目して、それぞれの様式における成体原基形成メカニズムについて明らかにするために、(1)各種ウニ類における成体原基形成の追跡、(2)細胞塊形成機構の解析、(3)羊膜陥形成機構の解析、(4)他の棘皮動物における成体原基形成の追跡を行った。(2)(3)については、形成過程、形成方向、他器官との相互作用の面から、明らかにしていった。これらの成果を基に、ウニ類の成体原基形成がどのように変化してきたかについて考察した。

(1) 各種ウニ類における成体原基形成の追跡

各種の成体原基形成過程を詳細に観察し、羊膜陥あるいは細胞塊、もしくは新たな成体原基形成様式をとるかについて確認した。細胞塊形成種については、細胞塊を介した成体原基形成のタイミングや形態的特徴などについて、種間における違いを見出した。

(2) 細胞塊形成機構の解析

形成過程: キタサンショウウニと(1)で細胞塊形成を行うことが明らかとなった種を用いて、細胞塊形成後の細胞塊の大きさや、構成する細胞数を含めた形態的特徴について、DAPI染色による細胞数の確認を行いながら解析を行った。更に、成体原基を構築する際にみられる細胞塊の形態的变化を、各発生段階の幼生の観察により追跡した。

細胞塊の形成が自律的に起こるか否かを明らかにするために、16細胞期の予定外胚葉領域(中割球群)を顕微手術により単離し、その後の細胞塊形成能を確認した。また、植物極側からのシグナルを必要とする場合を考え、小割球除去胚および予定外胚葉領域と小割球のキメラ胚の作成を行い、細胞塊形成を促す領域の特定を試みた。更に、細胞塊形成に貢献する領域について、中割球の数を変えて除去し、これらの細胞塊形成能について調べた。中割球は、次の卵割で、an1とan2に分かれる。これらの割球群間で、細胞塊形成能に違いがあるか、割球除去を行った。

また、様々な発生段階において、細胞塊をマイクロマニピュレーションにより吸引除去し、再生の有無を確認した。将来、成体原基は、外胚葉領域と中胚葉領域である体腔嚢(軸腔、水腔および体腔)から主に構成されていることから、この体腔嚢に注目して、細胞塊形成との関係について調べた。次に、細胞塊が形成される口側外胚葉を顕微手術により、一部を除去した場合、細胞塊が形成されるか否か、また、細胞塊を再生する能力を持つ外胚葉領域の特定を行うため、細胞塊が形成された後の口側外

胚葉領域を顕微手術により除去し、その後の細胞塊の再生過程を調べた。更に、細胞塊を別の場所に移植し、その後の成体原基形成について追跡した。

形成方向: 細胞塊は、幼生の左側で形成される左右非対称な形質の一つである。他種の成体原基形成方向を攪乱すると知られているNodal阻害(SB431542)、近年、Nodalの上流因子として知られるDeltaの阻害(DAPT)、イオン流阻害(オメプラゾール、ランソプラゾール、イオノフォアなど)および塩化リチウム処理や小割球除去により、細胞塊の形成方向に攪乱がみられるか調べた。更に、各種の胚や幼生からトータルRNAを抽出しcDNAを合成した。

(3) 羊膜陥形成機構の解析

形成過程: 直接発生型ウニであるヨツアナカシパンでは、卵割期の予定外胚葉領域からなる部分胚や小割球除去胚からも、羊膜陥は自律的に形成されるが、その形成時期については不明である。そのため、これらの胚の羊膜陥が形成される時期について追跡を行った。

形成方向: バフンウニ胚に対するNodalやDelta阻害の影響については明らかになっておらず、Nodal阻害(SB431542)およびDelta阻害(DAPT)処理を行い、羊膜陥の形成方向に攪乱がみられるか調べた。また、ヨツアナカシパンに対するNodal阻害(SB431542)を行い、羊膜陥の形成方向に攪乱がみられるか調べた。

他器官との相互作用: 羊膜陥あるいは予定羊膜陥領域をマイクロマニピュレーションで除去し、その後の再生過程を追跡した。その作用が自律的であるか、他器官との関係があるか、内中胚葉器官の除去により行った。

(4) 他の棘皮動物における成体原基形成の追跡

山口県沿岸に生息するヒトデおよびクモヒトデ類の種の同定と繁殖時期の確認を行った。同定可能な種を用いて、変態に至るまでの発生過程を詳細に観察した。

(5) ウニ類の成体原基形成の進化についての考察

上記の結果を基に、細胞塊を介した成体原基形成機構について考察を行った。更に、ヒトデ・クモヒトデ類と比較することにより、ウニ類の成体原基形成の進化について考察を行った。

4. 研究成果

(1) 各種ウニ類における成体原基形成の追跡

山口県沿岸で採集が可能なサンショウウニ科を含むウニ類の成体原基形成過程を詳細に観察し、羊膜陥あるいは細胞塊を介し

た、もしくは新たな成体原基形成様式をとるかについて確認した。その結果、サンショウウニ科の4種(コシダカウニ、ハリサンショウウニ、サンショウウニおよびコデマリウニ)が、細胞塊を形成して成体原基を形成することが明らかとなった。また、コデマリウニの発生に関する報告はほとんどなく、今回、変態まで至る発生過程も明らかにすることに成功した。

(2) 細胞塊形成機構の解析

形成過程: サンショウウニの細胞塊形成に必要な領域の特定を試みた。ウニ類の胚葉分化が起こる16細胞期に注目して、様々な割球分離実験を行った。予定外胚葉領域である中割球のみでは、細胞塊は形成されなかった。染色した中割球と非染色の大割球・小割球とのキメラ個体は、細胞塊を形成し、細胞塊が染色されていたことから、外胚葉領域が植物極側からの何らかのシグナルを受けて、細胞塊を形成していることが考えられた。また、胚に存在する中割球が1個であっても、細胞塊は形成されることが明らかとなった。

卵割期から原腸胚期までの(予定)外胚葉領域の様々な除去実験および染色した予定外胚葉領域の移植実験により、an2領域が植物極側からのシグナルを受けた後、細胞塊を形成すると考えられた。an2領域の細胞塊を形成する運命は、間充細胞胚期までに決定されることも明らかとなった。また、細胞塊をマイクロマニピュレーションにより吸引除去したところ、新たに細胞塊が再生されることが明らかとなった。このとき、Nodal 阻害剤により左右極性を攪乱された場合でも、攪乱された極性を保ちながら、細胞塊が再生されることが明らかとなった。

原腸胚期の予定体腔囊部分や、発生後期に細胞塊と体腔あるいは水腔を除去した場合も、細胞塊は自律的に再生した。また、細胞塊を連続除去した場合においても、再生が確認された。しかしながら、再移植した場合は、新たに細胞塊が形成され、細胞塊と水腔との位置関係が重要であることが示唆された。

形成方向: Nodal 阻害および塩化リチウム処理や小割球除去により、細胞塊の形成方向に攪乱がみられるか調べた。その結果、この細胞塊の形成方向も、種特異的ではあるが、これらの処理により攪乱されることが明らかとなった。また、細胞塊を介して成体原基形成を行うサンショウウニに対して Delta 阻害を行った場合、本来左側で形成される細胞塊が右側に形成される個体が増加した。本種についても、Delta 阻害により細胞塊の左右極性を攪乱可能な時期を特定した。

(3) 羊膜陥形成機構の解析

形成過程: 直接発生型ウニであるヨツアナカシパンでは、卵割期の予定外胚葉領域からなる部分胚や小割球除去胚からも、羊膜陥は正常個体と同様の時期に自律的に形成された。

形成方向: バフンウニ胚に対する Nodal 阻害を行ったところ、羊膜陥の形成方向に攪乱がみられた。羊膜陥の左右極性が攪乱され、その攪乱可能な時期を特定した。更に、Delta 阻害も行い、羊膜陥の形成方向に Nodal とは異なった攪乱が認められた。

(4) 他の棘皮動物における成体原基形成の追跡

まず、山口県沿岸での生態学的調査を行い、2種のクモヒトデ類の繁殖時期を特定した。そのうち、採集が比較的容易なナガトゲクモヒトデについて、変態に至るまでの発生過程を追跡することに成功した。本種は、これまで放卵・放精機構について知られておらず、今回その誘起法を見出した。

クモヒトデ類およびヒトデ類における成体原基形成機構とその左右非対称性について追跡した。ナガトゲクモヒトデに対して卵割期に Nodal 阻害を行ったところ、ウニ類でみられた左右極性への影響は認められなかった。また、イトマキヒトデに対する影響も同様であった。

(5) ウニ類の成体原基形成の進化についての考察

ウニ類の成体原基形成の進化において、特にサンショウウニ科は非常に再生能の高い細胞塊を介した形成機構を導入した。その結果、発生初期から成体原基形成を行うことを可能にただけでなく、環境圧にも耐えうる再生能を獲得したと考えられる。

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 19件)

Hiratoko, Doi, Yamanaka and Kitazawa. Left-right polarity in regenerating larvae of sea urchins. Proceedings of the seventh international conference on information (Information'2015), 査読有, 2015, 125-28.
Fujii, Doi, Hiratoko, Yamanaka and Kitazawa. Development of *Temnotrema sculptum*. Proceedings of the seventh international conference on information (Information'2015), 査読有, 2015, 21-24.
Sakaguchi, Fujii, Miyahara, Doi, Yamanaka and Kitazawa. Learning of sea urchin development using a computer painting tool. Proceedings of the seventh international conference on information (Information' 2015), 査読有, 2015, 17-20.

Kitazawa et al. (7人中1番目) Development of the brittle star *Ophiothrix exigua* Lyman, 1874 a species that bypasses early unique and typical planktotrophic ophiopluteus stages. *Zoomorphology*, 査読有, 134, 2015, 93-105.

DOI: 10.1007/s00435-014-0233-8.

北沢ら. (3人中1番目) アサリのペーパークラフトモデル: 無脊椎動物の体制の学習, *研究論叢*, 査読無, 64, 2015, 43-53.

Kitazawa et al. (4人中1番目) Effects of ion flow on establishment of left-right polarity of the adult rudiment in larvae of *Temnopleurus toreumaticus*. *Information*, 査読有, 17, 2014, 327-333.

Kitazawa et al. (6人中1番目) Development of the sea urchins *Temnopleurus toreumaticus* Leske, 1778 and *Temnopleurus reevesii* Gray, 1855 (Camarodonta: Temnopleuridae). *Zoological Studies*, 査読有, 53, 2014, 3.

DOI: 10.1186/1810-522X-53-3

Kitazawa et al. (4人中1番目) Inhibition of ion fluids causes to disturb left-right polarity in larvae of *Temnopleurus toreumaticus*. *Proceedings of the sixth international conference on information (Information'2013)*, 査読有, 2013, 240-243.

Kitazawa et al. (5人中1番目) Morphogenesis of adult traits during the early development of *Mespilia globulus* Linnaeus, 1758 (Echinodermata: Echinoidea). *Zoological Studies*, 査読有, 51, 1481-1489, 2012.

McCauley, Wright, Exner, Kitazawa and Hinman. Development of an embryonic skeletogenic mesenchyme lineage in a sea cucumber reveals the trajectory of change for the evolution of novel structures in echinoderms. *EvoDevo*, 査読有, 3, 2012, 17.

DOI: 10.1186/2041-9139-3-17

[学会発表](計 45件)

平床・土井・山中・北沢. 8腕幼生期に分離されたサンショウウニ科2種の左右個体の成体原基形成能について, 中国四国地区生物系三学会合同大会鳥取大会, 2016年5月14-15日. 米子コンベンションセンター: ビッグシップ(鳥取県米子市).

北沢ら. サンショウウニ科ウニ類における Delta の役割, 中国四国地区生物系三学会合同大会鳥取大会, 2016年5月14-15日. 米子コンベンションセンター: ビッグシップ(鳥取県米子市).

Hiratoko, Doi, Yamanaka and Kitazawa. Left-right polarity in regenerating larvae of

sea urchins, The seventh international conference on information (Information'2015), 2015年11月25-28日. National Taiwan University (台北市・台湾).

Fujii, Doi, Hiratoko, Yamanaka and Kitazawa. Development of *Temnotrema sculptum*, The seventh international conference on information (Information'2015), 2015年11月25-28日. National Taiwan University (台北市・台湾).

Sakaguchi, Fujii, Miyahara, Doi, Yamanaka and Kitazawa. Learning of sea urchin development using a computer painting tool, The seventh international conference on information (Information'2015) (招待講演), 2015年11月25-28日. National Taiwan University (台北市・台湾).

北沢ら. ウニ類部分幼生の左右極性について, 日本動物学会第86回新潟大会, 2015年9月17-19日. 朱鷺メッセ: 新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市).

Kitazawa et al. Left-right polarity of partial embryos in the temnopleurid *Temnopleurus toreumaticus*, 15th International Echinoderm Conference, 2015年5月25-29日. Playa del Carmen, Mexico.

Fujii, Egusa, Yamanaka, Komatsu and Kitazawa. Morphological diversity of blastula formation and gastrulation in temnopleurid sea urchins, 15th International Echinoderm Conference, 2015年5月25-29日. Playa del Carmen, Mexico.

北沢ら. 特徴的な発生初期と典型的な浮遊幼生期を経るナガトゲクモヒトデの発生, 中国四国地区生物系三学会合同大会(愛媛大会), 2015年5月16-17日, 愛媛大学(愛媛県松山市).

藤井・江草・山中・北沢. サンショウウニの皺胞胚形成, 中国四国地区生物系三学会合同大会(愛媛大会), 2015年5月16-17日, 愛媛大学(愛媛県松山市).

藤井・山中・北沢. サンショウウニの皺胞胚形成における細胞接着の役割, 日本動物学会第85回大会, 2014年9月11-13日, 東北大学(宮城県仙台市).

藤井・宮原・山中・北沢. サンショウウニの皺胞胚形成, 中国四国地区生物系三学会合同大会(岡山大会), 2014年5月10-11日, 岡山理科大学(岡山県岡山市).

北沢ら. ハリサンショウウニの発生; サンショウウニ科ウニ類の成体原基形成の進化について, 第10回棘皮動物研究集会, 2013年12月7日, 富山大学(富山県富山市).

北沢ら. サンショウウニ科ウニ類の細胞塊形成能について, 日本動物学会第84回大会, 2013年9月26-28日, 岡山大学(岡山県岡山市).

北沢ら. ウニ類の皺胞胚形成に関する研究, 中国四国地区生物系三学会合同大会 (徳島大会), 2013年5月11-12日, 徳島大学 (徳島県徳島市).

Kitazawa *et al.* Inhibition of ion fluids causes to disturb left-right polarity in larvae of *Temnopleurus toreumaticus*, The sixth international conference on Information (Information'2013), 2013年5月8-11日, ホテルアルカディア市谷 (東京都千代田区).

北沢. 棘皮動物の発生過程における進化多様性～ウニ類の実験発生学的アプローチから～, 山口大学理学部公開セミナー (招待講演), 2012年9月26日, 山口大学理学部 (山口県山口市).

笠原・山中・北沢. コシダカウニ幼生の細胞塊再生能について, 日本動物学会第83回大会, 2012年9月13-15日, 大阪大学 (大阪府吹田市).

北沢ら. サンショウウニ科ウニ類の左右非対称性確立機構に対する小割球除去および塩化リチウム処理の影響, 中国四国地区生物系三学会合同大会 (島根大会), 2012年5月12-13日, 島根大学 (島根県松江市).

山口大学・教育学部・准教授
研究者番号: 30403637

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号:

〔図書〕(計 1件)

自然史学会連合, 理科好きな子に育つふしぎのお話 365 見てみよう、やってみよう、さわってみよう体験型読み聞かせブック, 誠文堂新光社, 2015, 391.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

北沢 千里 (KITAZAWA, Chisato)