

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on the metamorphosis induced by adrenaline and noradrenaline in
 the larvae of the ascidian, *Ciona savignyi*

(アドレナリン、ノルアドレナリンが誘起するユウレイボヤ幼生変態機構に関する研究)

氏名 木村 有希子

幼生が成体に至る過程で、大きな形態的变化を起こすことは多くの動物種で知られている。この現象は一般に変態と呼ばれ、両生類や昆虫でその機構の詳細が明らかにされている。一方、海産無脊椎動物でも多くの種で変態が起こることが知られているが、それに関する研究は、長年形態学的な変化の記載に留まり、機構に迫る研究は行われてこなかった。しかし、最近になっていくつかの種のホヤで、分子生物学的手法の導入により、変態時に変動するシグナル分子の特定が進んでいるが、それらの分子の機能や、それらがどのように協調して変態現象に関与しているかの調節の仕組みはいまだ明らかではない。

そこで私は、ユウレイボヤ (*Ciona savignyi*) 幼生の変態誘起を調節する機構を解明することを目的とし、複数の海産無脊椎動物で変態を誘起し、かつ内在性の変態誘起物質として働く可能性が高いと考えられている神経伝達物質に着目して研究を行い、以下の成果を得た。

(1) ホヤ幼生は孵化後オタマジャクシ型幼生として遊泳生活を送り、その後底質への付着などの外部からの刺激を受けるなどして尾部吸収を始まりとする変態を開始する。本研究では、まず、ユウレイボヤにおいてノルアドレナリン又はアドレナリンが幼生の尾部吸収を促進することを初めて明らかにした(図1)。さらに、ノルアドレナリン、アドレナリンによる尾部吸収は幼生の付着行動を伴わないが、付着突起を必要とすることも示された。一方、他の海産無脊椎動物の変態に影響を与えることが知られている神経伝達物質、ドー

パミンやセロトニン、GABA など、ホヤ幼生の変態を促進させることが報告されているチロキシンやアセチルコリンにはユウレイボヤの変態を促進する効果は見られなかった。

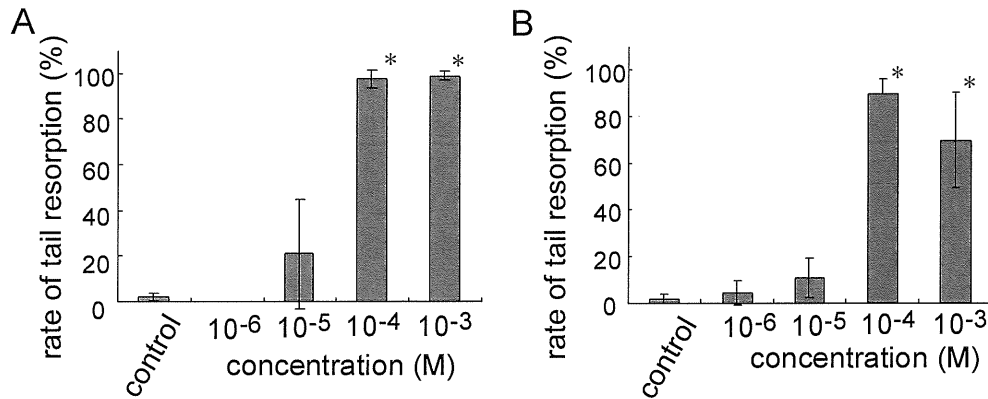


図1 尾部吸収に対するノルアドレナリン (A)、アドレナリン (B) の効果
 孵化後2時間の幼生を薬剤処理し、孵化後10時間に尾部吸収を起こした幼生の割合を調べた。* t -test $p < 0.05$

(2) ノルアドレナリン、アドレナリンがユウレイボヤ幼生の尾部吸収を促進することから、幼生における内在性のカテコールアミンの存在をカテコールアミンの蛍光組織化学法 (図2 A) およびノルアドレナリンとアドレナリンの合成酵素であるドーパミンβ-ヒドロキシラーゼに対する抗体を用いた免疫染色法 (図2 B) により調べた。その結果ノルアドレナリン、アドレナリンは変態期幼生の脳胞付近に局在することが示唆された。

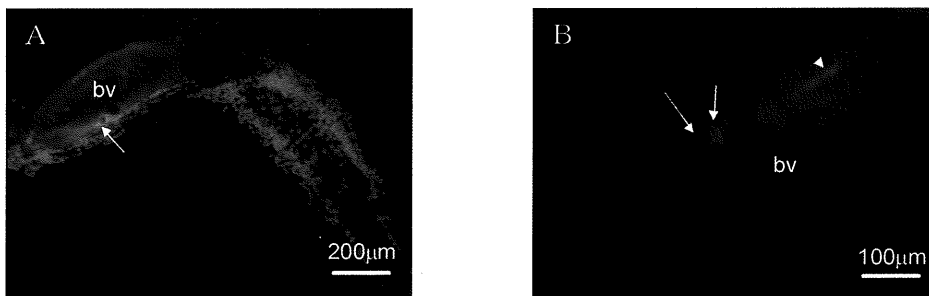


図2 ノルアドレナリン、アドレナリンの幼生後期における脳胞への局在
 A: 蛍光組織化学法によるカテコールアミンの検出像 B: ノルアドレナリン合成酵素 (ドーパミン β-ヒドロキシラーゼ) の局在を示した免疫染色像 bv:脳胞

(3) ノルアドレナリンの受容体の尾部吸収の関与について調べるために薬理学的実験を行った。βアドレナリン受容体の選択的アゴニストであるイソプロテレノールはノルアドレナリンや、アドレナリンに比べ低濃度で尾部吸収を促進した (図3)。β選択的アンタゴニストであるプロプラノロールやβ₁選択的アンタゴニストであるメトプラロールはノルアドレナリンによる尾部吸収を阻害した (図4)。以上の結果はノルアドレナリンによる尾部吸収の促進にはβ₁-アドレナリン受容体が介在することを示唆している。

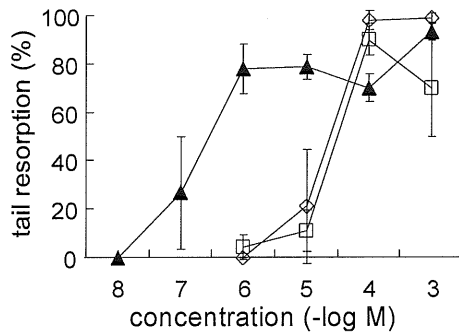


図3 尾部吸収に対する各種アドレナリン受容体アゴニストの効果

▲ : イソプロテレノル (β 選択的アゴニスト)、
□ : アドレナリン、◇ : ノルアドレナリン

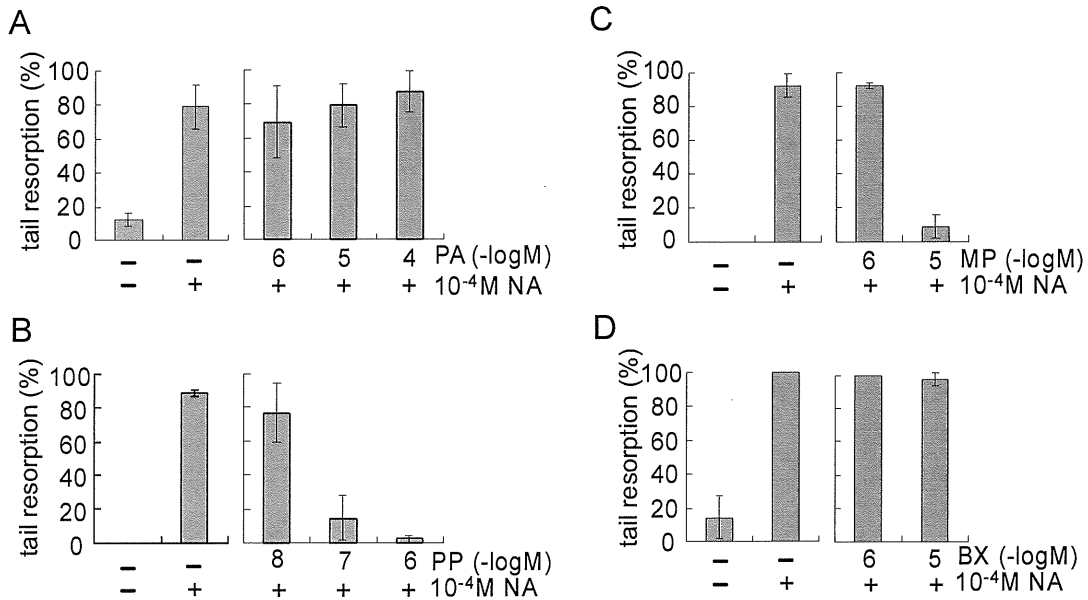


図4 尾部吸収に対する各種アドレナリン受容体アンタゴニストの効果

PA : フェントラミン (α 選択的アンタゴニスト)、PP : プロプラノロール (β 選択的アンタゴニスト)、MP : メトプラロール (β_1 選択的アンタゴニスト)、BX : ブトキサミン (β_2 選択的アンタゴニスト)、NA : ノルアドレナリン

(4) 以上の結果によりユウレイボヤ幼生変態における β_1 -アドレナリン受容体の関与が示唆されることから、抗マウス β_1 -アドレナリン受容体抗体を用いて免疫染色法によりその局在について調べた。その結果、孵化頃の幼生から神経系に受容体の発現が始まり、遊泳期、変態期にかけて強く発現することが示された。

(5) ユウレイボヤ幼生の β -アドレナリン受容体の cDNA クローニングを行った。その結果、哺乳類における β_1 、 β_2 と β_3 アドレナリン受容体に類似するホヤのアドレナリン受容体様の遺伝子配列 (*CsBAR*) を得た (図5)。近隣結合法による系統樹解析で *CsBAR* は哺乳類における β_1 と β_2 および β_3 アドレナリン受容体が分岐する以前の祖先型遺伝子の特徴を有することが示唆された (図6)。従って、*CsBAR* は図4、5で示された β_1 アドレナリン

受容体の薬理的性質を持つ可能性がある。また、RT-PCR 法(図7)及びノザンブロットィング法により遊泳期、変態期の幼生に *CsβAR* 遺伝子が発現していることが明らかとなった。

```

CsβAR  MFTFKKNNLRQQLNGLAHSTGYRKLNGRRNRKLFYFGLVLIHLFAIPVHASDITQS 60
Hb1AR  -----MGAGVTVLIGASEPGNLSAAPLPD 24
Hb2AR  -----MA 2
Hb3AR  -----MA 2

CsβAR  ILEPFLIISNKFDLRHIGITTEVEYNGNSPSKSGVPLSLCVCIHTYIGHWVLIITA 120
Hb1AR  GAFAARLLVVASPPASLLPFASSPPELSQOQTAGMG-LLMALIVLLVAGNIVIVAI 83
Hb2AR  -MCGNGCSAFLAPNFGHAPDHDTGCRDEVVVMG-IVAGLIVLAIHGGNIVIVAI 58
Hb3AR  PWHEHSSSLAPWFDIPTLAFNTANTSGLPVFWELLAGALLAVLAVLATVGGNIVIVAI 62

CsβAR  IIFRKLRIIPRMFELHSLASADITIGTVLIPMWSHYVIGRRALGCAFWGIIHPSVDVTSVT 180
Hb1AR  AKTPRUCIDRIFPMLASADLVHGLVWFGATIIWVGRVYSESPCELTPSVDVIVCVT 143
Hb2AR  AKEDRUCVWVHPSLACDIDVGLAWVFGAARLHMKVTEFEMSGSEPTSDIWDVCT 118
Hb3AR  AWTFPLGDMVWVPLSLADLVHGLVWFGAATLALGHHGHPGCEIHTPSVDVIVCVT 122

CsβAR  ASIEGLCAISLDKSNVATMPFNKSNKNTIRASSTIGFNIIVSAAIHSFNIHLKRTQSG 240
Hb1AR  ASIEGLGVHLDVRYAIATSPFRVOSLITPRARAGLVCTVGAISGVISDPIIMHWRAES 203
Hb2AR  ASIEGLGVHLDVRYAIATSPFRVOSLITPRARAGLVCTVGAISGVISDPIIMHWRAES 178
Hb3AR  ASIEGLGVHLDVRYAIATSPFRVOSLITPRARAGLVCTVGAISGVISDPIIMHWRAES 182

CsβAR  P-DRFRLDQVNSKPKRNVVAVGSGCLGPIIFLIMVCAHSVAVTIIKQSGKTIHNS 299
Hb1AR  D-EARCRNPKKQDQVNSKPKRNVVAVGSGCLGPIIFLIMVCAHSVAVTIIKQSGKTIHNS 262
Hb2AR  Q-EAINGANPKKQDQVNSKPKRNVVAVGSGCLGPIIFLIMVCAHSVAVTIIKQSGKTIHNS 237
Hb3AR  DAERCRNPKKQDQVNSKPKRNVVAVGSGCLGPIIFLIMVCAHSVAVTIIKQSGKTIHNS 242

CsβAR  QVYR-----RSMFCSRTLIDWGRKRVRA 322
Hb1AR  RRELGGPARPPSPSPVPAPAPPPPPRPAATAAATPLANGRAGRPPSRVAVLRQGR 322
Hb2AR  GRHFVQN-----EQDQGRTHGHRSSKFLKRRK 271
Hb3AR  GRFP-PEE-----SPAPSRSLAPAVGTCAFPFEGVPACGRPARLDFRHR 290

CsβAR  VFIIGIIMGVFTLWLPFFIANLVQVCE-CGISAENMIDGLGYNSENPFLIYGRSP 381
Hb1AR  LKIDGIIIMGVFTLWLPFFIANLVQVCE-CGISAENMIDGLGYNSENPFLIYGRSP 381
Hb2AR  LKIDGIIIMGVFTLWLPFFIANLVQVCE-CGISAENMIDGLGYNSENPFLIYGRSP 330
Hb3AR  LKIDGIIIMGVFTLWLPFFIANLVQVCE-CGISAENMIDGLGYNSENPFLIYGRSP 350

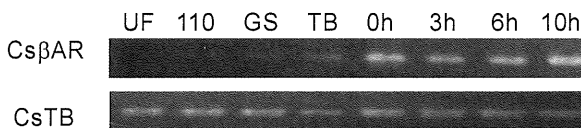
CsβAR  DFFRFRFRLIIGGSGIIGFPCISFRASLIVYTHSSSRSSVRSSTESSLPQSHPLSESLR 441
Hb1AR  DFRFRFRLIIGGSGIIGFPCISFRASLIVYTHSSSRSSVRSSTESSLPQSHPLSESLR 432
Hb2AR  DFRFRFRLIIGGSGIIGFPCISFRASLIVYTHSSSRSSVRSSTESSLPQSHPLSESLR 365
Hb3AR  DFRFRFRLIIGGSGIIGFPCISFRASLIVYTHSSSRSSVRSSTESSLPQSHPLSESLR 385

CsβAR  KRTRFRFSSKRSNKFFPTGRASPAASMQAFLPKTMVYGFSSINRFDSDTTSGSTN 501
Hb1AR  DDVGAFTPPARLLEPWAGCGCAALDS5LDEPCRFPGFASESKV----- 477
Hb2AR  ---YHVEQKRWKLLCELELCEDEVSHGCFVPSDNIDSQGRNCFENDSLL----- 413
Hb3AR  ---AARSFPAQPLCQRLLEASWGVG----- 408

CsβAR  SVGTASNGSRPLTALDETSVSVANGVVRGTDDETMSHIFNNAPTQRFPSAYKEVTPDLS 561
Hb1AR  ----- 561
Hb2AR  ----- 561
Hb3AR  ----- 561

CsβAR  KTAHRKSSSLRALDGIASGGNINTLNTYKDTDLLLHESAESNADVKETDSVSDSVVR 619
Hb1AR  ----- 619
Hb2AR  ----- 619
Hb3AR  ----- 619
    
```

図5 *CsβAR* とヒトβアドレナリン受容体のアミノ酸配列比較



まとめ

以上の結果から、ユウレイボヤでホヤ類幼生の変態開始機構が明らかになった。ホヤ類の変態は付着など外部からの刺激により開始されることが知られているが、この刺激は変態期の幼生の脳胞付近に存在する神経伝達物質ノルアドレナリン、アドレナリンの放出に働くと考えられる。さらに、この神経伝達物質のシグナルは幼生に発現するβ-アドレナリン受容体を介してユウレイボヤ幼生の変態を制御している可能性が示された。一方、ユウレイボヤにおけるβ-アドレナリン受容体の cDNA クローニングは、海産無脊椎動物の変態におけるその役割の分子生物学的解析を可能にするだけでなく、アドレナリン受容体の起源を明らかにする視点からも重要である。今後、アポトーシスなどホヤ幼生の変態時に生じることが知られている様々な現象と本研究によりはじめて明らかにされた変態開始機構を関連付けることにより、ホヤ幼生の変態機構の全体像が解明されていくと考えられる。

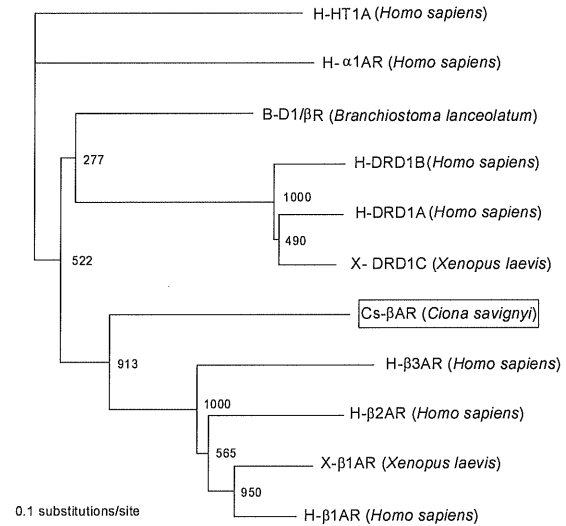


図6 *CsβAR* の近隣結合法による系統樹
HT1A: 5-ヒドロキシトリプタミン 1A 受容体、AR: アドレナリン受容体、D1/βR: ドーパミン D1/β 受容体、DRD1: ドーパミン受容体 D1

図7 *CsβAR* の RT-PCR 法による発現解析
UF:未受精卵、110:110 細胞期、GS:囊胚、TB:尾芽胚、0h:孵化幼生、3h:遊泳幼生、6h:変態初期、10h:変態中期、CsTB:チューブリンβ 2