

論文内容の要旨

論文題目 Studies on the genes related to the echinoderm body axes
 (棘皮動物の体軸関連遺伝子に関する研究)

氏名 日比野 拓

序論

左右相称動物は方向性のある三つの体軸を持っている。このうち前後軸は *Hox* クラスター遺伝子の colinearity より定義づけられ、広く左右相称動物に保存されている。一方、背腹軸の対応関係は、昆虫と脊椎動物との器官の配置から軸の逆転が生じていることが提唱され、論議的となってきた。近年の分子生物学的研究は背腹軸のパターン形成のシグナル分子メカニズムが昆虫と脊椎動物で逆転していることを示し、背腹軸の逆転を支持した。一方、この背腹軸の逆転が左右相称動物の系統のどの段階で生じているのか、背腹軸の逆転によって左右軸はどのように変化しているのか、という疑問に関する知見はほとんど得られていなかった。

前後軸と背腹軸が定義づけられると左右軸は自動的に決まるが、左右非対称な器官の形成は発生より後期に始まる。脊索動物ではこの非対称な器官配置を一つの分子 pathway が発生制御していることが明らかになってきた。本研究で私は脊索動物門で保存されている左右非対称性確立分子 pathway が脊索動物門と近縁関係にある棘皮動物にも保存されているのかを明らかにすることを試みた。さらに、本研究で明らかになった棘皮動物と脊索動物との間に生じている左右軸の逆転を元に、左右相称動物の体軸の対応関係に対して、議論を加えた。

PART 1: 棘皮動物幼生の右側での転写因子 Pitx の発現

脊索動物の左右非対称性確立分子 pathway の中で、現在調べられているもっとも下流で働く

遺伝子が転写因子 *Pitx 2* である。脊椎動物の *Pitx2* だけでなく、ホヤ・ナメクジウオの *Pitx* も体の左側で発現することが知られている。棘皮動物でもこの *Pitx* の非対称な発現パターンが保存されているのかどうかを明らかにするため、この遺伝子をウニとヒトデからそれぞれ単離し、in situ hybridization により発現パターンを調べた。

結果) ウニのプリズム幼生では左右相称に PMC クラスターが形成されるが、*Pitx* の発現は最初この左右両 PMC クラスター各々の一つの細胞で観察された(Fig. 1A)。この発現はすぐに消失し、その後初期二腕プルテウス幼生の右側体腔嚢と右側外胚葉(右腕の先端で強いシグナル)に、つまり左右非対称な発現を示した(Fig. 1B,C)。ヒトデのビピンナリア幼生でも *Pitx* は右側体腔嚢、右側外胚葉(繊毛帯に強いシグナル)と口の右側というウニと同様に非対称な発現が見られた(Fig. 1D)。

考察) 棘皮動物の *Pitx* も脊索動物同様に左右非対称に発現したことから、*Pitx* が後口動物全体に渡って左右非対称確立の中核的な役割を果たしていると考えられる。一方、脊索動物の左側で発現する *Pitx* が棘皮動物では右側で非対称に発現していることにより、二つの動物門で左右軸が逆転していることが示唆される。

PART 2: イオン流動の左右非対称性への関与

棘皮動物と脊索動物との間に共通の左右非対称性分子 pathway が働いていることをより確かなものとするために、脊索動物で分子 pathway の上流で働くメカニズムがウニにおいて保存されているかどうかを調べた。脊椎動物の初期胚において、 H^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} イオンの非対称な局在が下流の遺伝子の非対称な発現をコントロールしていることが知られている。ウニの初期胚においてもこのメカニズムが機能していることを明らかにするために、 H^+ 、 K^+ イオン輸送装置 HK-ATPase を阻害する omeprazole, SCH28080, lansoprazole、また Ca^{2+} のイオン濃度を上昇させる calcium ionophore A23187 を、時間を区切って処理し、非対称発現をする分子マーカー *HpNot*, *HpFoxFQ-like* で効果を調べた。

結果) 上記三種類の HK-ATPase 阻害剤を原腸胚期から 2 腕プルテウス期(24-42h)まで処理した場合、*HpNot* は正常胚と同じ局在パターンを示した(Fig. 2B-C)。一方、omeprazole を受精卵から孵化胞胚期(0-12h)、孵化胞胚期から原腸胚期(12-24h)まで処理をすると、*HpNot*, *HpFoxFQ-like* の非対称な発現パターンが左右相称へとかく乱される例が 40%以上見られた(Fig. 2A, E-H)。次に A23187 処理を行ったところ、0-12h 処理の場合では *HpNot* は正常胚と同じパターンを(Fig. 2J)、12-24h 処理をすると omeprazole 処理での効果と類似した左右相称なく乱パターンを示した(Fig. 2K)。24-42h 処理した場合は 0-42h 処理と同様に非対称な発現パターンの左右の逆転が観察された(Fig. 2D, I, L)。

考察) omeprazole の効果は受精卵から原腸胚期まで、とくに受精卵から孵化胞胚期までの処理で十分に非対称発現の分子マーカーを左右相称なパターンへとかく乱できることが明らかになった。カエルでは omeprazole などの HK-ATPase 阻害剤を初期卵割期から胞胚期に処理したときに、ニワトリではヘンゼン結節出現の前までに処理したときに、分子マーカーを左右相称パターンへとかく乱する効果が知られている。ゆえにウニと脊椎動物で HK-ATPase を用いたイオン流動に

よる共通の非対称性メカニズムが機能していることが示唆される。石井らの抗体染色実験により HK-ATPase-like なタンパクがウニの 32 細胞期の一つの細胞に局在し、卵割期まで見られていることは、今回の omeprazole によるかく乱効果のタイミングと一致する。一方、ウニ胚を A23187 処理したときでは、omeprazole よりも後の時期に効果があることが明らかになった。カエルでは神経胚期に A23187 で処理したときに器官の左右性が逆転していることが知られている。ウニと脊椎動物で共通の Ca^{2+} の濃度勾配による非対称性メカニズムが存在することが示唆される。

PART 3: ウニ系統内での *Brachyury* の発現パターンの保存性と異所性

背腹軸の逆転は口が背腹の反対の位置に置き換わることで起こったという仮説がある。PART1 より、棘皮動物 *Pitx* は口陥での発現は見られなかった(Fig. 3A)。一方脊椎動物 *Pitx1, 2* は口陥で発現する。PART2 よりウニの *Not* は口陥で発現していた(Fig. 3B)。反対に脊椎動物 *Not* の口陥での発現は見られない。このような 2 つの動物門間での口陥での発現パターンの相違は上記の仮説を支持する。両方の動物門で *Not* と類似した発現パターンを示す遺伝子に *Bra* がある。4 種の近縁なウニで *Bra* の発現パターンが報告されているものの、口陥での発現の保存性は曖昧であった。ゆえに、バフンウニで再度 *Bra* をクローニングし、その発現パターンを調べた。

結果) バフンウニから再度クローニングした *Bra* cDNA の配列や発現パターンは他の近縁なウニでの報告と酷似しており(Fig. 3C)、以前報告されたバフンウニ *Bra* の発現パターンはクローニングの際に人工的に結合した無関係な遺伝子に起因するということが明らかになった。また 4 種のカシパンで *Bra* の発現パターンを調べたところ、発現パターンの変化はあるものの(Fig. 3D)、原口と口陥での発現はすべてのウニで保存されていることが明らかになった。

考察) *Bra* も *Not* と同様、ウニの口陥で発現している。一方、脊椎動物では口陥で発現が見られず、Spemann organizer 領域に発現が見られる。また脊索動物の organizer で機能する遺伝子がウニの口陥で発現している例が他にもいくつか見つかっている。ゆえに、脊索動物の系統で *Bra, Not* などを用いて形成される口を失い、*Pitx* を用いて形成される口を新たに獲得したと考えられる。

結論

PART1,2 の結果を統合すると、棘皮動物と脊索動物との間で共通の左右非対称性分子 pathway が働いていることが示唆される。その一方で、*Pitx* の発現パターンの比較から、2 つの動物門の間で左右軸が逆転していることが考えられる。ウニを含めすべての左右相称動物で前後軸は保存されている。背腹軸のパターニングに関わる *BMP4 (dpp)* 遺伝子活性は昆虫とウニでは背側化、一方脊索動物では腹側化を示す。これらの結果から脊索動物の系統で背腹軸と左右軸の両軸の対応関係が逆転していることが示唆される。PART3 により口陥での発現する遺伝子が棘皮動物と脊索動物で相違していることから脊索動物で新たな口が開いたことが考えられる。新たな口が背腹軸に沿って反対側に出現すれば、内在的な軸形成メカニズムを何も変える事なしに、背腹軸と左右軸は逆転する。個々の動物に対する背腹の伝統的な命名と、軸形成メカニズムによって形成される内在的な軸の方向性とは必ずしも対応していないことが、今回の研究結果から実証を挙げて示すことができた。

Fig. 1

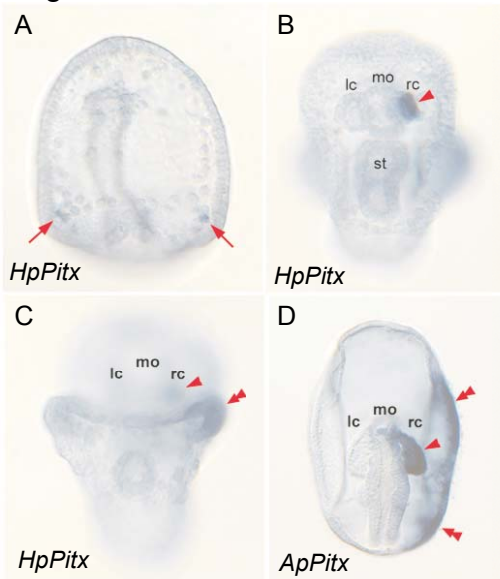


Fig. 1. 棘皮動物*Pitx*の発現パターン。(A)バフンウニ プリム幼生。(B,C)2腕プルテウス幼生。(D)イトマキヒトデ口形成期。(arrow)PMCでの発現。(arrowhead)右体腔囊での発現。(double arrowhead)右外胚葉での発現。(lc)左体腔囊,(rc)右体腔囊,(mo)口,(st)胃。

Fig. 2

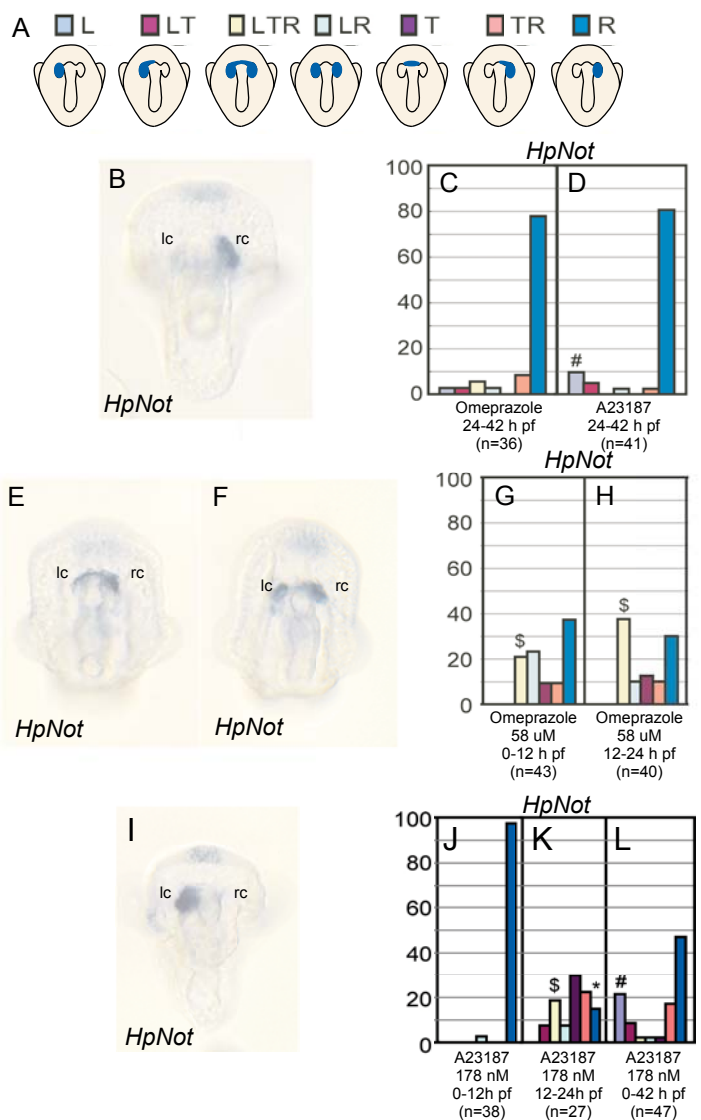


Fig.3

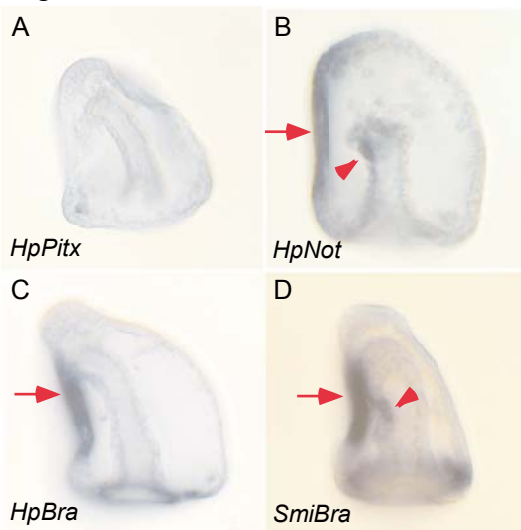


Fig. 3.原腸胚期の予定口陥領域での発現パターンの比較。(A)*HpPitx*は予定口陥領域での発現はない。(B)*HpNot*。(C)バフンウニ *HpBra*。(D)ハスノハカシパン *SmiBra*。(arrowhead)原腸の口側での発現。(arrow)予定口陥領域での発現。

Fig. 2 イオン流動阻害による *HpNot*の発現パターンのかく乱。(A)かく乱パターンの7つの分類。(B)*HpNot*正常パターン。(C, D)24-42h 処理の発現パターンの分布。(E,F)omeprazoleの処理の代表的な *HpNot*のかく乱パターン。(H,I)omeprazole処理の *HpNot*のかく乱分布。(J)A23187処理の代表的な *HpNot*のかく乱パターン。(K-M)A23187処理の *HpNot*のかく乱分布。