

ナメクジウオの体節形質を基に脊椎の発生起源を探る

持齋 峻矢 (筑波大学 生物学類)

指導教員：和田 洋 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

脊椎動物の最も特徴的な形質は脊椎骨(以下、椎骨)である。椎骨の獲得により脊椎動物はより複雑な体制を得ることができ、椎骨を取り囲む筋肉を発達させることで高い運動能力を得ることができた。しかし、この椎骨獲得の背景にある分子的变化は不明な点が多い¹⁾。

ヌタウナギ類を除く脊椎動物では発生過程で脊索を発達させる。成長とともに脊索の周りに軟骨性あるいは硬骨性の椎骨が発達して、脊索はその中に取り込まれる。椎骨が発達した動物では、脊索は椎間板の髄核と呼ばれる痕跡的な構造としてとどまるのみで、成体ではそれも消失する²⁾。

今回実験で使用したナメクジウオ類は外見こそ魚類に似ているが、脊椎動物には存在する頭部の主要感覚器である鼻・眼・耳に対応する構造、そして椎骨を持たないため魚類ではない²⁾。ナメクジウオ類は現在の分類体系では、脊索動物門の中の頭索動物亜門に分類される。脊椎動物門を構成する動物に共通する形態的特徴は、生涯もしくは一時的に保有される脊索と脊索の背側に位置する中空の神経索であり、これらは構造として非常に安定している。ナメクジウオ類の脊索は体の前端まで伸びているのが特徴的で、そのことから頭索動物と呼ばれる。脊索は発生の非常に早い時期に体の前端まで達するが、これは他の動物にはみられない特徴である。

椎骨の発生メカニズムについての研究には、現生の脊椎動物の大半を占める顎口類が用いられている。脊椎動物は大きく2つのグループ、顎口類と無顎類に分けられる。顎口類の胚発生において、体節は表皮側から脊索に向かって、皮節、筋節、硬節に分化する。このうち、体節中胚葉から生じた硬節細胞群が脊索や神経管を覆い、それらが軟骨に分化し最終的に硬骨に置き換わる。この軟骨は軟骨基質(コラーゲン)をコードする *Col2a1* 遺伝子の発現により形成される。無顎類のヤツメウナギにおける椎骨発生は、発生時期こそずれているものの、顎口類と同様のメカニズムであった。つまり、顎口類と無顎類が分岐する以前に椎骨発生のメカニズムを獲得していたと推測されている¹⁾。しかし、脊椎動物に近縁な無脊椎動物のナメクジウオでは、コラーゲンをコードする *Fcol1* の発現が体節表皮側で見られるが、これは高等な脊椎動物である顎口類と比較するとその発生メカニズムが著しく異なっている。そのため、無脊椎動物と脊椎動物の間で比較発生的アプローチから椎骨の初期進化を探るのは困難であると考えられる。

本研究ではナメクジウオの体節分化の様子を組織学的手法により観察する。先行研究により、脊椎動物であるヤツメウナギのアンモシート幼生においてコラーゲン遺伝子が皮節でのみ発現し、硬節は変態期にしかできないことが確認されている¹⁾。一方、無脊椎動物であるナメクジウオでは体節分化がどのように起こっているか不明な点が多い。これを解明することが本研究の目的である。ナメクジウオの体節においてもコラーゲンが発現していることは判明しているため、筋肉との相対的な位置関係を詳細に

調べる。ナメクジウオにおけるコラーゲンと筋肉の位置関係が、よく似た体節構造をもつヤツメウナギのそれと比較することで、椎骨の発生起源を探る。

材料・方法

Branchiostoma belcheli Gray, 1847 ヒガシナメクジウオ
(受精後 18,22,24,26,36 時間胚)

In situ hybridization により、ナメクジウオ胚での *Fcol1* (線維性コラーゲン遺伝子)ならびに *MHC*(ミオシン重鎖遺伝子)の発現を観察した。

In situ hybridization の方法

前処理として、固定済みのヒガシナメクジウオ胚を PBST で洗浄し、ProK 処理により結合組織を分解した。その後、4% パラホルムアルデヒドで固定し、0.1M トリエタノールアミンでアセチル化し内在性の AP の活性を失くした。次にプローブの浸透性を高めるために 55°C で胚をバッファーに慣らした後、ヒートショック処理で RNA 分子をほどこき、hybridization を行った。プローブの入ったバッファーを胚に加え 55°C で 1 晩置いた。プローブを洗浄した後、抗体の非特異的結合を減らすためにブロッキング処理を行った。Anti-Dig 抗体 AP を加えて 4°C で 1 晩置いた。PBST で洗浄後、NBT/BCIP で発色させた。

結果・考察

受精後 18,22,24,26,36 時間胚における *Fcol1* 及び *MHC* の発現を調べた。それを凍結切片にして、発現を比較した。詳細は研究発表会にて紹介する。

参考文献

- 1) 原田敬士(2012)
『ヤツメウナギの脊椎骨形成に関する進化発生的研究』
筑波大学大学院生命環境科学研究科生物科学専攻
修士(理学)学位論文
- 2) 安井金也・窪川かおる(2005)
『ナメクジウオ～頭索動物の生物学』東京大学出版会