

形成メカニズムの比較からヤツメウナギと顎口類の脊椎骨の相同性を探る

網本 壮一郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 和田 洋 (筑波大学 生命環境系)

1. 背景・目的

脊椎骨は脊椎動物を特徴づける重要な形質であり、背側正中で各脊椎骨が連なった脊柱が体の支持を行っている。脊椎骨の獲得によって脊椎動物は複雑で大型の体と高い運動能力を持つことができるようになり、捕食者として進化的に成功することが出来た。このように脊椎動物にとって重要な特徴である脊椎骨であるが、その初期進化に関しては知見が少ない。

脊椎動物は顎を持った顎口類と、より原始的で顎を持たない無顎類に大きく分けられる。ヤツメウナギは無顎類に属し、初期の脊椎動物の特徴を多く保持していると考えられている。ヤツメウナギの脊椎骨は顎口類の脊椎骨と異なり硬骨ではなく軟骨であり、神経管の左右に弓状構造が不連続に並んでいるだけである (Fig.1)。さらに、幼生の時期は脊椎骨を持たず変態期に脊椎骨が形成される。このようにヤツメウナギの脊椎骨は成分も形状も形成時期も顎口類のものとは大きく異なっており、脊椎骨の初期進化を探るためにはこれらの相同性を検証することが不可欠である。

本研究ではヤツメウナギの発生過程において体節形成期と変態期での脊椎骨形成関連遺伝子の発現パターンを調べ、形成メカニズムの比較からヤツメウナギと顎口類の脊椎骨の相同性を検証することを目的とした。

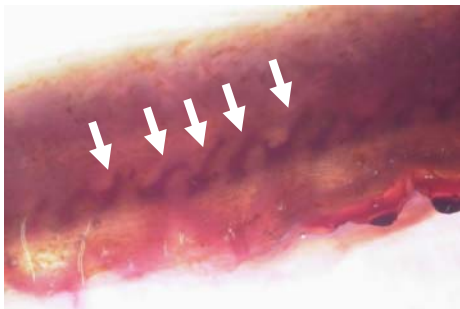


Fig.1 ヤツメウナギのワイゲルト染色。白矢印が脊椎骨²⁾。

2. 材料・方法

胚発生期の観察においてはカワヤツメ *Lethenteron japonicum* を人工授精させ、15 °Cのインキュベーターで必要なステージになるまで生育した。

変態期のカワヤツメは採集が困難であるため変態期の観察は近縁種のスナヤツメ *Lethenteron reissneri* の変態期を用いた。2015年10月に富山県山崎川で採集した変態期前のスナヤツメのアンモシート幼生を15 °Cの水温で変態するまで飼育した。

○*in situ* hybridization

先行研究を参考に *in situ* hybridization を行い、発現している遺伝子を検出した¹⁾。

○凍結切片

PBS中で保存していた胚をOCT Compoundに置換し、クリオスタットで凍結切片を作成した。目的に応じてカワヤツメの体節形成期の胚は *in situ* hybridization 後に切片化し、変態期のスナヤツメは切片化した後に *in situ* hybridization を行った。

○ワイゲルト染色

固定後メタノール中で保存しておいた成体のスナヤツメをエタノールに置換後ワイゲルト液で3日間染色した。染色したサンプルをPBSへと置換し、10% KOHで処理したのち30%飽和四ホウ酸ナトリウム1%トリプシン溶液で透明化した。

3. 結果・考察

○体節形成期での脊椎骨関連遺伝子の発現パターン

顎口類では体節中胚葉の脊索側領域である硬節の細胞が脊索・神経管の周囲に遊離し脊椎骨が形成される。ヤツメウナギでは硬節の存在が確認されておらず、少なくとも硬節のマーカ―遺伝子の一つである *Pax9* はこの時期には体節で発現していないことが報告されている¹⁾。そこで、本研究ではその他の硬節マーカ―遺伝子である *Pax1*、硬節から派生する *syndetome* のマーカ―遺伝子である *Scx*、それらの発現を上流で制御している *Shh*、*Shh* のレセプター遺伝子の *Gli* の発現パターンをカワヤツメの体節形成期の *st.25* の胚で検証した。

また、顎口類の体節では表皮側から順に真皮や結合組織に分化する皮節、筋肉に分化する筋節、腱や靭帯に分化する *syndetome*、脊椎骨に分化する硬節の4層構造を形成する。先行研究からヤツメウナギでは *st.23* において顎口類の硬節で発現する *FColl1* が体節表皮側で、顎口類の筋節で発現する *MA2* が体節脊索側でそれぞれ発現し、*st.25* で *FColl1* の発現領域が体節脊索側にも拡大し *MA2* の発現領域を取り囲むという現象が報告されている²⁾。これは顎口類の体節形成では見られない現象であり、これが *Shh* シグナルに依存しているかどうかを検証するために *Shh* 阻害剤を投与した阻害胚での遺伝子発現パターンを調べた。

○変態期での脊椎骨関連遺伝子の発現パターン

前述の通り、ヤツメウナギの脊椎骨は顎口類と異なり幼生では存在せず、変態期に形成される。そこで、変態期での脊椎骨形成が顎口類の脊椎骨形成と同じメカニズムで行われているのかを検証するため顎口類の脊椎骨形成関連遺伝子の発現パターンを検証した。先行研究から眼が出現する変態期 *st.1* で神経管と脊索の周囲に間葉細胞が凝集し、眼が拡大し口が伸長する変態期 *st.2* で脊椎骨が形成されることが報告されている²⁾。そこで、変態期 *st.2* での脊椎骨形成関連遺伝子の *Pax1*、*Pax9*、*Bapx*、腱のマーカ―遺伝子の *Scx*、それらを上流で制御している *Shh* の発現パターンを切片 *in situ* hybridization で検証した。

各結果・考察に関しては発表会にて報告する。

参考文献

- 1) Ogasawara *et al.* (2000) *Dev Biol* 223, 399-410
- 2) 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学的研究』
筑波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