

ヒラムシの発生実験系の構築—らせん卵割型発生の進化史の解明に向けて—

佐藤 啓輔 (筑波大学 生物学類)

指導教員：守野 孔明 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的・材料

らせん卵割動物 (Spiralia) は軟体動物・環形動物・扁形動物などを含み、形態的な多様性に富んだ分類群である。一方で、初期発生における卵割様式や割球運命はよく保存されており、らせん卵割型発生と呼ばれている。冠輪動物 (Fig. 1) を用いた近年の研究により、SPILE 遺伝子群の発現による動物極—植物極軸に沿った運命決定¹⁾やMAP キナーゼの活性化による背腹軸の規定²⁾など、らせん卵割型発生の分子メカニズムが明らかになってきている。しかし、これらのメカニズムがいつ・どのように進化してきたかはまだ明らかではない。解明への手がかりとなるのは冠輪動物以外のらせん卵割動物を用いた発生研究だが、この研究はほとんど行なわれていない。

扁形動物 (Fig. 1) の多岐腸類 (ヒラムシ) はらせん卵割型発生をよく保存しているものの、その分子発生学的な実験系は確立されていない。オオツノヒラムシ *Planocera multitentaculata* は日本の沿岸に広く生息し、大型かつ採集も容易であるため、発生実験の材料として適切であると考えられる。本研究では、オオツノヒラムシにおける「採集・人工発生→遺伝子カタログの作成→in situ hybridization (ISH) 法による mRNA 局在の観察」という一連の発生実験系の構築を目指した。

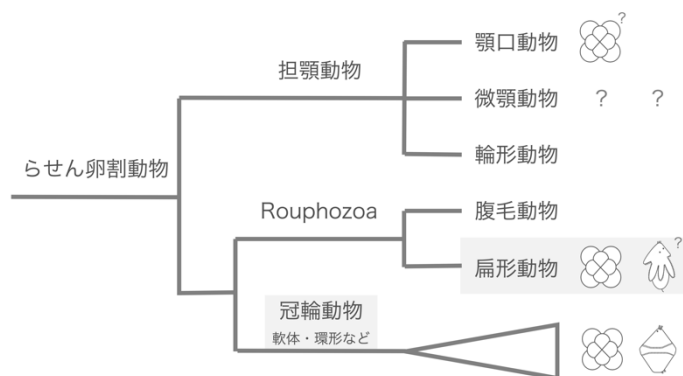


Figure 1. らせん卵割動物内部の系統関係³⁾と発生の特徴。左：らせん卵割型発生の有無。右：幼生期の有無。

方法

1. 繁殖期の調査

オオツノヒラムシの繁殖期は、例として静岡県下田では3~5月と記述されている⁴⁾が、茨城県内での具体的な時期は不明である。これを明らかにするため、2018年5~12月にかけて計6回、茨城県ひたちなか市平磯海岸において採集を行なった。

2. 「裸」の受精卵の発生

産卵後のヒラムシ胚を覆う卵板・卵殻は実験の妨げとなる。これを回避するため、受精嚢を針で突き破り「裸」の受精卵を直接採取した。採取した受精卵は22°Cのペニシリン・ストレプトマイシン入り人工海水の中で発生させた。

3. トランスクリプトーム解析による遺伝子カタログの作成

1, 8, 16, 24 細胞期のオオツノヒラムシ胚から抽出した total RNA を混合し、RNA-Seq を行なった。さらにその結果を用いて、発生過程での遺伝子カタログ作成を含む各種解析を行なった。

4. ISH 法の確立

オオツノヒラムシ胚において適切な ISH 法を検討するため、上記の解析で得た配列について、らせん卵割動物で用いられている ISH 法プロトコル3種類を比較した。

結果・考察

1. 繁殖期の調査

5月下旬から7月上旬にかけて性成熟した個体が採集された。5月より早い時期についてはさらなる調査が必要である。

2. 「裸」の受精卵の発生

「裸」の受精卵の発生は、卵割を含め、通常の受精卵と同様であった。さらに、先行研究⁴⁾では観察されていなかった「裸」の受精卵からミューラー幼生への発生を確認した (Fig. 2)。

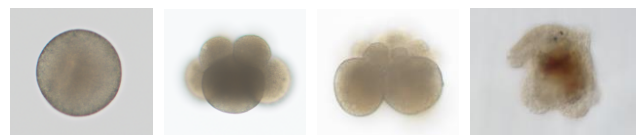


Figure 2. 観察された「裸」のオオツノヒラムシ胚の発生。左から、1、8、16 細胞期、ミューラー幼生期。

3. トランスクリプトーム解析による遺伝子カタログの作成

RNA-Seq により計 24 Gb の配列が得られた。Trinity を用いてそれらの配列をアセンブルしたところ、計 98569 の転写産物が復元された。その中には、らせん卵割型発生に関与するとされる SPILE 遺伝子が2種類含まれていた。

4. ISH 法の確立

詳細は発表会にて報告する。

展望

本研究で確立されたオオツノヒラムシの発生実験系は、らせん卵割型発生とその分子メカニズムの進化史の解明への足がかりとなる。今後の具体的な研究目標としては、本発生実験系を用いた、オオツノヒラムシにおける SPILE 遺伝子の機能解析などが考えられる。

引用文献

- Morino et al. (2017) *Nat. Ecol. Evol.* 1, 1942–1949.
- Lambert & Nagy (2003) *Dev. Biol.* 263, 231–241.
- Laumer et al. (2015) *Curr. Biol.* 25, 2000–2006.
- 石川・沼宮内 (編) (1988) 海産無脊椎動物の発生実験。