

## ホヤ幼生において固着の刺激が変態を開始させる分子メカニズムの解明

坂本 彩 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 笹倉 靖徳 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景】

変態は、多くの動物が成体へと発生するために欠かせない、劇的に体を作り変える過程である。昆虫類や両生類が変態するのは一般的によく知られているが、変態はこれらのグループに限らず、ほぼ全ての動物門に認められる普遍的な現象である。尾索動物であるホヤは、典型的な変態を行う生物である。ホヤの幼生は脊椎動物と共通する特徴を備えた体制をもち、海水中を自由遊泳する。摂食はせず適当な基盤に固着した後に、その固着が刺激となって変態を開始させる。変態後、成体となったホヤは固着生活を送り、濾過摂食を行う。尾索動物は脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物であるため、ホヤの特殊な生活様式は、脊椎動物との共通祖先に由来したゲノムセットを基軸として獲得されていると考えられる。

ホヤはその系統学的特徴などの理由から、古くから発生学・進化学的研究に用いられてきた。ホヤの初期発生メカニズムはかなり研究が進んでいる一方で、後期発生である変態がどのように制御されているかは、未だに解明されていないことが多い。特に、変態を開始するきっかけは「固着」だと知られているにもかかわらず、固着が変態を引き起こすメカニズムは解明されていない。ホヤ幼生は前端部にある付着突起によって固着するが、この組織には感覚ニューロンが集中している。つまり、ホヤ幼生は固着している状態を物理刺激として受容し、変態を開始させているのではないかと考えられる。私は、ホヤ幼生には付着突起ニューロンで刺激を受容し、変態開始に繋げる分子メカニズムが存在していると予想し、これを明らかにすることを研究の目的とした。

本研究では、カタユウレイボヤ(*Ciona intestinalis*)の幼生を用いて、固着の物理刺激が変態を開始させているのか、また、どのような分子メカニズムが存在しているのかを調べる。物理刺激を受容する分子としては、他の生物では TRP チャネルや、PIEZO チャネルというイオンチャネルタンパク質が知られている。これらと相同なタンパク質をコードする遺伝子は、カタユウレイボヤのゲノムにも存在することが分かっている<sup>1</sup>。研究の足がかりとして、カタユウレイボヤ幼生が変態を開始させるためには、本当に固着の刺激が必要なのかどうかを確かめていくとともに、幼生におけるこれらのイオンチャネルタンパク質の発現を調べていく。

## 【方法・結果】

## 実験材料

カタユウレイボヤ(*Ciona intestinalis*)

## 方法・結果

## 1. 尾部切断・麻酔処理による変態への影響の評価

ホヤ幼生が変態するために本当に物理刺激が必要かどうかは、現状において物理刺激を感じできないホヤを作製することが不可能なため、直接的には証明し難い。そのため、刺激を弱くすると予想される操作によって、間接的に証拠を得ていく必要がある。

ホヤ幼生は固着後もしばらくの間尾部を振り続けて、推進力を生み出している。固着後の運動で生じる力が付着突起ニューロンに刺激を与えていると考え、尾部の切断や麻酔処理によって尾部の運動を奪うことでこの刺激が弱くなり、変態の開始に影響

が出ると予想できる。従って、まずは尾部の切断によって変態の開始に差が生じるかを調べる実験を行った。具体的には、孵化後4時間が経過し、幼生が固着を始めた時間に、尾部を切断した。その後、通常ならば変態が完了している時間に観察を行い、観察した総個体数と、そのうちの変態している個体数を記録した。結果、尾部切断によって変態の進捗が遅れることが示唆された。尾部自体に変態を促進する成分が含まれている可能性も考えられるため、尾部を切断せずに運動を奪った場合と差が生じるかどうかを調べた。具体的には麻酔処理による運動能力除去を行った。尾部を切断した上で麻酔処理を行った群と尾部を残したまま麻酔処理を行った群との間では有意差が出なかったため、尾部そのものには変態促進作用はなく、遊泳運動が変態を促進していることが示唆された。以上の結果から、ホヤ幼生の変態は、固着後の遊泳運動により発生する力によって開始が促進されることが示された。

## 2. ホヤゲノムデータベースを利用した候補遺伝子の探索

カタユウレイボヤ 幼生において物理刺激を受容できる分子を調べるために、カタユウレイボヤのゲノムデータベース (<http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/cgi-bin/gb2/gbrowse/kh/>) を用い、候補となる遺伝子を調べた。検索の結果、先行研究で調べられていたカタユウレイボヤ における TRP チャネル関連遺伝子について、25 個の遺伝子を候補として得た。PIEZO チャネル関連遺伝子については3 個の遺伝子を候補として得た。

## 3. 逆転写(RT-PCR)によるスクリーニング

上記遺伝子の幼生における発現を、RT-PCR によって確認した。この際、幼生全身を用いたスクリーニングで発現が確認された遺伝子を、幼生の付着突起周辺の組織と、これ以外の組織とで二分したスクリーニングにかけた。これによって、付着突起に発現が確認できる遺伝子をピックアップできると予想される。逆転写には、孵化後4時間の幼生を用いた。結果、幼生全身において TRP チャネル関連遺伝子は18 個、PIEZO チャネル関連遺伝子は2 個の遺伝子の発現が認められた。更なるスクリーニングの結果、付着突起では、TRP チャネル関連遺伝子は13 個、PIEZO チャネル関連遺伝子は1 個の遺伝子の発現が認められた。

## 【考察・今後の展望】

以上の結果より、ホヤ幼生は付着突起に物理的な刺激を受けることで変態が開始される可能性が高いことが示された。そして、他の生物で物理刺激を受容できることが分かっている TRP、PIEZO チャネルタンパク質関連遺伝子の付着突起における発現が確認されたため、これらの遺伝子が付着突起において刺激の受容に関与している可能性が示唆された。今後は、上記の TRP、PIEZO チャネル関連遺伝子が発現している組織を Whole-mount *in situ* hybridization 法によって確認する予定である。さらに、付着突起ニューロンの変態に関わる機能について調べるために、ホヤ幼生の付着突起ニューロンで特異的に遺伝子のノックアウトを行うなど、機能を阻害する実験を行う予定である。

## 【参考文献】

- Okamura *et al.* *Physiol Genomics* 22, 269-282 (2005)