

ウニ胚の原腸陥入を制御する新規メカニズムの解析

谷口 友梨 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 谷口 俊介 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

動物胚の初期発生時に、体の一部が内部に入り込んで将来の消化管を形成する原腸陥入は、非常に重要な形態形成運動のひとつである。原腸陥入は、細胞接着や細胞骨格を通じた細胞形態の変化など、様々な要因により制御されていることがこれまでも示されているが、そのメカニズムは複雑に入り組んでいる。そのため、その全貌の解明には多種多様な動物種での原腸陥入の知見を蓄積する必要がある。

本研究で用いるウニ胚は体が極めて透明であり、原腸が実際に体の内部に陥入する様子を外部から観察することが容易である。そのため、ウニ胚は原腸陥入研究の有用な材料とされ、実際に細胞形態の変化やアクチン細胞骨格が原腸陥入に関与することが報告されてきた (Burke *et al.* 1991; Nakajima & Burke, 1996)。一方、原腸陥入を引き起こすシグナル経路など、原腸陥入開始を明確に説明するメカニズムに関しては、決定的な証拠が示されておらず、その詳細は不明である。そのような状況下で、所属研究室は、筋組織においてのみ発現が報告されている筋収縮調節タンパク質のトロポニンが、ウニ胚の陥入中の原腸細胞に発現している可能性を示した (谷口ら、未発表)。

I、T、C の三量体からなるトロポニンは左右相称動物内で広く保存された筋収縮調節因子であり、昨年、ウニ幼生の食道筋肉においてもトロポニン I の発現とその機能が報告された (Yaguchi *et al.* 2017)。しかし、今回新たに見られた、原腸の細胞におけるトロポニン I に関しては、その詳細な時空間的発現パターンや機能は未解明である。

そこで、本研究では、トロポニン I が原腸陥入制御に貢献している可能性を探ることを目的として、原腸胚期におけるトロポニン I の発現パターンと機能を検証した。

【方法】

材料としてバフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus* を使用した。

(1) トロポニン I 抗体の作製

トロポニン I の検出手段の確立を目的として、トロポニン I 抗体を作製した。まず、トロポニン I 遺伝子の一部の配列を組み込んだベクタープラスミドを作成し大腸菌に形質転換して培養した。その後、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加してタンパク質を強制発現させ、抗原となるタンパク質を精製し、これをマウスに注射した。その後、採血により血清を得て、免疫グロブリン (IgG) を精製した。得られた IgG を用いて、原腸胚及びプルテウス幼生の免疫染色を行った。

(2) トロポニン I 翻訳阻害胚での免疫染色

受精直後の卵にトロポニン I 特異的モルフォリノをマイクロインジェクションにより注入してトロポニン I 翻訳阻害胚を得た。この翻訳阻害胚において、トロポニン I タンパク質の発現が抑制されていることを確認するため、翻訳阻害胚を発生させて得

られたプルテウス幼生に対し、(1)で作製した抗体を用いて免疫染色を行った。

(3) トロポニン I 翻訳阻害胚の原腸陥入観察

トロポニン I が原腸陥入に関与しているかを確認するため、トロポニン I の翻訳阻害胚と正常胚を用いて、受精してから 24、30、40 時間後において原腸の形態を顕微鏡下で観察し比較した。

【結果】

(1) トロポニン I 抗体の作製

IgG を用いた免疫染色の結果、陥入中の原腸において、トロポニン I の発現が確認された。また、幼生期においても、先行研究での報告同様に、消化管でトロポニン I の発現が観察された。

(2) トロポニン I 翻訳阻害胚での免疫染色

作製した抗体を用いた免疫染色の結果、正常胚においては食道・噴門・肛門などでトロポニン I の発現が確認されたが、翻訳阻害胚においては、それらの領域での発現は確認されなかった。このことから、作製した抗体はトロポニン I を特異的に認識していることが確かめられた。

(3) トロポニン I 翻訳阻害胚の原腸陥入観察

トロポニン I の翻訳阻害胚における原腸陥入は、正常胚に比べ進行が遅延していた。正常胚では受精後 24 時間で原腸陥入が開始しており、30 時間後に原腸胚後期まで発生し、40 時間後には初期プルテウス幼生まで発生が進んだ。一方で翻訳阻害胚では、受精後 24 時間では原腸の陥入は確認されず、30 時間後ようやく原腸陥入が開始した。さらに、40 時間後でも原腸胚後期の形態であった。

【考察と今後の展開】

本研究結果から、トロポニン I がウニ原腸胚期においても発現が見られることの確証が得られた。また、トロポニン I 翻訳阻害胚で原腸陥入の遅れが観察されたため、原腸胚期におけるトロポニン I は原腸陥入の進行、特に陥入開始の調節に関与していることが示唆された。

今後は原腸胚期におけるトロポニンの機能をより詳細に解明するため、トロポニンと協働するタンパク質や他の因子について解析していく予定である。