

## 学位論文要旨

### Study on mechanism for the determination of left-right asymmetry mediated by cilia in sea urchin embryo

(ウニ胚における繊毛を介した左右非相称性決定機構の研究)

氏名 竹本 あゆみ

動物の体は前後軸、背腹軸そして左右軸の3つの軸に基づいてつくり、各軸に対して体は非相称に形成されている。一見左右相称に見える体であっても体内の臓器は非相称に配置されている。近年、脊椎動物において、マウスやカエルを用いて左右非相称性の決定機構が解明されつつある。マウスでは、7.5日目の胚の腹部に node と呼ばれるくぼみが形成され、その中心部に存在する繊毛が回転運動を行うことにより水流を生じる。その流れを側方に形成されている繊毛が感知することで左右非相称性が決定する (Nonaka et al., 1998)。一方カエルでは、繊毛を介した決定システムよりも上流に  $H^+/K^+$ -ATPase イオンポンプの局所的な開閉による膜電位の変化が左右非相称の決定に必要であると報告されている (Levin et al., 2002)。脊椎動物に近い脊索動物のホヤにおいては、神経胚期になると胚表面に繊毛が形成され、その繊毛を利用して胚自体が回転する。そして、その胚の回転が止まったときに卵膜と接している部位に左右決定遺伝子の一つである *Nodal* が発現し、この *Nodal* の非相称な発現により左右相称性が破れるということが明らかにされている (Nishide et al., 2012)。そこで私は、左右非相称性決定メカニズムの起源を明らかにするため、新口動物の中で最も早期に分岐した棘皮動物であるバフンウニを用いて、左右非相称性の決定メカニズムの解明を試みた。

バフンウニ胚における左右非相称性は、将来幼生の体の中に成体構造をつくる上で重要な体腔のうの左右非相称な発生にみられる。初期プルテウス幼生 (受精後約2日) になると左右に一对の体腔のうが形成されるが、後期8腕プルテウス幼生 (受精後約1ヶ月) になるとほぼすべての個体で右側の体腔のうが退縮し、左側のみが成体原基を形成して成体へと発生していく。このようなバフンウニの左右非相称性の決定は、胚表面に存在する  $H^+/K^+$ -ATPase イオンポンプによる膜電位の変化と (Hibino et al., 2006)、その下流に存在する *Nodal* 遺伝子や *Lefty* 遺伝子の局所的な発現により制御される (Duboc et al., 2005)。一方で、バフンウニ胚は胞胚期 (受精後約24時間) に至ると、ほぼすべての個体が動植物軸を中心に植物極側からみて左回りに回転しながら遊泳することから、バフンウニ胚においてもホヤと同様に、繊毛運動による胚の回転運動が左右非相称の決定と確立に関与しているのではないかと考えられる。そこで私は、ウニの初期胚における繊毛を介した左右非相称性決定メカニズムの解明を試みた。

本研究ではウニ胚の繊毛を除去する効果が報告されている (Semenova et al., 2008)

Dillapiol isoxazoline derivative 1 (DID1)という薬剤を用いて繊毛の阻害を行った。バフンウニ胚を受精後 24 時間、DID1 処理して繊毛の形成を阻害すると、約 30%の個体で右側または両側に成体原基が形成された。そこで、胚の右側に発現して左右非相称性の制御に関わる遺伝子である *Nodal* と *Lefty* の発現を解析したところ、約 90%の DID1 処理胚で両遺伝子の発現は大きく減少し、発現の非相称性が消失していることが明らかになった。また、DID1 処理時間を変えることにより、繊毛を介した左右非相称性の決定に重要なタイミング（発生段階）を調べたところ、受精後 6 から 8 時間における繊毛が左右非相称性の決定に重要であることが明らかになった。しかし、この時期の胚では繊毛運動による胚回転が観察されないため、受精後 8 時間の胚に繊毛が形成されているのかを  $\alpha$ -tubulin 抗体を用いた免疫染色により確認した。その結果、胞胚期以降の遊泳のための繊毛よりも短い繊毛が局所的に形成されていることが示唆された。また、この局所的な繊毛が形成される位置を特定するために、小小割球特異的に発現する Hp-Seawi タンパク質に対する抗体との共染色を行ったところ、受精後 8 時間に局所的に観察される繊毛は 4 つある小小割球のうちの数個に形成されていることが明らかになった。以上の結果から、バフンウニ胚における、左右非相称性の決定は、発生初期のステージにおいて、将来生殖細胞になる小小割球に局所的に形成されるごくわずかな繊毛によって制御されていることが示唆された。

つぎに私は、繊毛を介した左右非相称性決定の分子メカニズムを解明するために、関連する遺伝子の解析を行うことにした。しかし、バフンウニではまだ胚における繊毛の形成・機能を制御する遺伝子は明らかにされていない。そこで、ゼブラフィッシュやマウスなどで繊毛の形成と機能を制御している Intraflagellar transport (IFT) 遺伝子に着目した。IFT タンパク質は、繊毛内において、キネシンやダイニンなどのモータータンパク質と複合体を形成し、微小管にそって繊毛形成に必要なタンパク質を繊毛の先端部まで運ぶという“繊毛内輸送”の役割を担っていることが報告されている (Kozminski et al., 1993)。本研究では、多様に存在する IFT 遺伝子の中でもマウスの左右非相称性の決定に関与する繊毛の形成を制御している IFT88 遺伝子 (Huangfu et al., 2003) に着目し、そのバフンウニホモログの同定を試みた。その結果、バフンウニ胚にも IFT88 遺伝子は存在し、その配列はマウス、ゼブラフィッシュなどとよく保存されていることが明らかになった。さらに発生段階における IFT88 遺伝子の発現パターンを解析したところ、繊毛が形成される胞胚期や原腸胚期で高く発現していることが明らかになった。以上より、バフンウニ胚においても IFT88 遺伝子が繊毛の形成を制御していることが示唆された。今回同定された IFT88 のバフンウニホモログが左右非相称性を決定する繊毛の形成に関与しているかは明らかではないが、今後の詳細な解析により繊毛を介した左右非相称性決定の分子機構が明らかになれば、左右非相称性決定機構の進化の過程も明らかになると考えられる。