

東京大学大学院新領域創成科学研究科  
自然環境学専攻  
海洋生命環境学分野

平成 18 年度

修士論文

ナメクジウオの環境刺激の受容と内分泌機構に関する研究

Studies on chemoreceptive and endocrine organs in amphioxus

2007 年 3 月提出

指導教員 窪川 かおる 教授

56715 丹藤 由希子

## 目次

第1章 序論	1
1-1 . はじめに 生命の進化と、環境受容と生体調節機構の変遷	
1-2 . ナメクジウオの分類と形態	
1-3 . ハチェック窩の形態	
1-4 . ハチェック窩の特徴に関する既往研究	
1-5 . 本研究の目的	
第2章 研究方法	4
2-1 . 個体の採集	4
2-2 . ハチェック窩の組織観察	4
2-2-1 . 頭部生体サンプルによる観察	
2-2-2 . 頭部パラフィン切片による観察	
2-3 . cDNA ライブラリー作製	4
2-3-1 . 組織の採集	
2-3-2 . Total RNA の抽出	
2-3-3 . サブトラクションライブラリー作製	
2-3-4 . 塩基配列解析	
2-3-5 . コロニーハイブリダイゼーション	
2-4 . ナメクジウオゲノムデータベースの解析	7
2-4-1 . <i>Branchiostoma floridae</i> のゲノムデータベースの探索	
2-4-2 . アミノ酸の相同性解析	
第3章 結果	9
3-1 . ハチェック窩の形態	9
3-1-1 . 頭部生体サンプルによる観察	
3-1-2 . 頭部パラフィン切片による観察	
3-2 . サブトラクション法による解析	9
3-2-1 . レーザーマイクロダイセクションを用いた cDNA ライブラリーの作製	
3-2-2 . サブトラクション産物の塩基配列解析	
3-2-3 . コロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニング	
3-3 . ナメクジウオゲノムデータベース解析	10
3-3-1 . ナメクジウオゲノムデータから得られた下垂体ホルモン遺伝子	
3-3-2 . データベースから得られた下垂体機能に関連した遺伝子	

第4章 考察	12
4-1 . ハチェック窩の形態と環境受容	12
4-1-1 . ハチェック窩の形態	
4-1-2 . ハチェック窩の環境受容器官としての可能性	
4-2 . サブトラクション法による解析	13
4-2-1 . 微量サンプルを用いたサブトラクションライブラリー作製法の検証	
4-2-2 . サブトラクション産物の塩基配列解析	
4-3 . ナメクジウオの内分泌関連遺伝子の存在	13
4-3-1 . Thyrostimulin $\beta$ 鎖遺伝子	
4-3-2 . ペプチドホルモン遺伝子と受容体遺伝子	
4-4 . まとめ	15
4-4-1 . 形態観察と遺伝子解析から見たハチェック窩の機能	
4-4-2 . 今後の展望	
謝辞	17
引用文献	18
図表	

## 第1章 序論

### 1-1 . はじめに 生命の進化と、環境受容と生体調節機構の変遷

約 38 億年前に誕生した生命体に始まり、膨大な年月をかけた進化の結果として現在の地球上の生物が存在する。動物は現生で 100 万種以上と見積もられるほどの多様さを持つが、その全ては約 38 億年前の太古の地球に存在した、単細胞の原核生物を起源としている。単細胞生物から多細胞動物への進化は、細胞の数及びその形態以外に、生体機構にも大きな変化を生じさせた。この変化は環境受容と生体調節との関係でも見ることができる。すなわち、動物が生きる上で欠かすことのできない光刺激、化学刺激、物理的刺激等の外部環境から生じる刺激を生体が受容する機構と、受容した後にそれらを利用し、生体の調節を行うための機構の両方が変化してきた。この変遷は次に示す現生物の例で説明することができる。ゾウリムシ等の単細胞生物は、一つの細胞で環境刺激の受容と刺激に対する生体調節を行っている。走化性、走光性がそうである。刺胞動物門に属して比較的等な無脊椎動物であるヒドラに代表される多細胞動物では、刺激を受容する細胞とそれに対して生体調節を行う細胞が別のものであるという、細胞の機能分化が起きている。さらに細胞が集まってある機能を司る器官ができると、刺激を受容する器官とその情報を受容して生体調節を司る器官が、いずれも情報の受容と伝播のために複数存在し、さらにそれらを相互に連絡する機構が必要になる。

生体調節機構の中でも生体内の代謝、生殖などに深く影響を及ぼす内分泌機構を取り上げる。前述の器官の間に相互連絡がある場合の一つとして、外部刺激を直接受け取る感覚器官 - 脳 - 下垂体 - 生殖腺のような標的器官という、からの一連の流れがある。この例は脊椎動物に特有のものである。脊椎動物がこのように複雑な内分泌機構を持つに至るにはどのような変遷が考えられるだろうか。まず、外部刺激を直接受け取る感覚器官 標的器官という系が存在したと考えられる。脳 - 下垂体系の存在は脊椎動物になってきたものであり、無脊椎動物には下垂体はない。では、無脊椎動物から脊椎動物に進化する過程で下垂体はどのように形成されたのであろうか。そこで、脊椎動物に近い系統にある動物に下垂体に類似する器官があるかどうかを考えてみると、ナメクジウオという系統的に脊椎動物に近い位置にある動物のハチェック窩という器官が下垂体の原基であるとみなすことができる。この器官は体外環境と直接接し、さらに中枢神経系に相当する神経管との連絡が推定されている。すなわち、感覚器官がハチェック窩であり、さらにハチェック窩と神経管との関係は脳 - 下垂体に相当するという可能性を考えることができる (図 1)。

本論文では、脊椎動物の下垂体が環境受容をする内分泌器官から進化したものであるとの仮説を立て、その起源をナメクジウオのハチェック窩に求められるかどうかを検証する。

## 1-2 . ナメクジウオの分類と形態

ナメクジウオは脊索動物門頭索動物亜門に属する。脊索動物門はホヤ類等を含む尾索動物亜門、頭索動物亜門、脊椎動物亜門から構成されており、その祖先的生物は5億3千万年前に現れたピカイアに代表される動物に求めることができる。脊索動物門に属する動物は、その名の通り脊索を持つという特徴を共有する。我々ヒトを含む脊椎動物では一般に、個体発生のある時期になると脊索が椎骨に置き換わる。尾索動物では変態により消失するが、頭索動物では体の全長にわたる中軸器官として生涯存在する。進化系統学的研究 (Wada & Satoh, 1994) から、頭索動物は脊椎動物に近縁な無脊椎動物であると考えられている。

頭索動物は、現在ナメクジウオ属 (*Branchiostoma*)、カタナメクジウオ属 (*Epigonichthys*)、オナガナメクジウオ属 (*Asymmetron*) の3属に分類され、約30種が同定されている。熱帯から温帯の砂質の浅海に分布し、成体は底に潜って生息している。成体の体長は2~5cmであり、流線型をしている。表皮はほぼ透明なため、体の内部が透けて見える。脊索と平行して神経管が存在し、その周囲によく発達した筋節構造を持つ。雌雄異体であり、繁殖期には腹側に配列する生殖腺が発達する。消化管は口から肛門までほぼ直線的に伸び、植物プランクトン等の懸濁物質を濾過摂食する。

## 1-3 . ハチェック窩の形態

ハチェック窩は頭部先端の背面正中右寄りに存在する、口腔が脊索に沿って背側方向へ陥入した部分である。長さ約80 $\mu$ m、高さ約50 $\mu$ mほどの大きさで、ナメクジウオの外部側面からはピンク色の小さな点に見える。口腔の陥入であるため、口内に流入する海水すなわち外部環境と直接接した構造をしている。電子顕微鏡による観察では2種類のペプチド顆粒が存在することが認められており (Sahlin & Olsson, 1986) 両側には明瞭な境界が見られない線毛輪器官と呼ばれる粘液分泌器官がある。

## 1-4 . ハチェック窩の特徴に関する既往研究

これまでの研究から、ハチェック窩が下垂体の起源である可能性が示唆されているが、その根拠は形態学的研究によるものに限られている。その理由は、ナメクジウオに関する生理学的研究が非常に乏しいこと、ハチェック窩が大変小さな器官であるためにサンプルの扱いが困難なことである。ハチェック窩が下垂体の相同器官である可能性は、電子顕微鏡による観察と免疫組織化学で示唆されている。電子顕微鏡の観察では、ペプチドホルモンを合成・分泌する内分泌器官である証拠として、ペプチド顆粒が観察されている。免疫組織化学では、脊椎動物の下垂体ホルモンである黄体形成ホルモンに対する抗体を使用した時に、ハチェック窩に存在する抗原に結合したと考えられる陽性反応が得られている

(Nozaki & Gorbman, 1992)。さらに、神経管がハチェック窩に向かって伸張し、両者が接近している構造が観察されており、両者間に何らかの相互関係が存在する可能性が考えられている。これは脳から分泌された視床下部ホルモンが下垂体に作用して、下垂体でのホルモンの合成・分泌を調節している機構と類似すると推測される(Nozaki *et al.*, 1999)。

一方、ハチェック窩の口腔へ露出した形態からは、ハチェック窩が海水中の環境要因を受容している可能性が考えられる。この点では、脊椎動物の成体の下垂体のように脳の下方に位置して頭部の奥深くに存在することはなく、空間的位置は下垂体と異なる。しかしながら下垂体の発生途中であるラトケ嚢は口腔に接しており、ハチェック窩との類似性が指摘されている。

### 1-5 . 本研究の目的

環境受容と生体調節機構は、我々ヒトを含む全ての動物が生きるために非常に重要な仕組みである。この機構の進化的変遷の過程を現生の動物から考えようとした時に、脊椎動物に近縁な無脊椎動物であるナメクジウオのハチェック窩は、まさに有用な研究対象である。

本研究では、ハチェック窩と外界との位置関係に焦点を当てて形態学的観察を行い、環境受容器官である可能性を検証する。そして、分子生物学的手法を用いてナメクジウオに存在する遺伝子の解析を行い、下垂体に関する遺伝子の有無を検証する。これらから、ナメクジウオのハチェック窩が環境受容と内分泌の両者の機能を持つものであるかどうかを明らかにすることを本研究の目的とする。

## 第2章 研究方法

### 2-1 . 個体の採集

ナメクジウオ *Branchiostoma belcheri* の採集は 2005 年 12 月上旬、2006 年 6 月下旬、7 月下旬に、愛知県渥美半島沖の生息地 (Kubokawa *et al.*, 1998) 水深約 20m 付近の砂泥帯で、円筒形ドレッジ (直径 30cm、深さ 50cm、ステンレス製) を用いて行った。採集した個体は、東京大学海洋研究所飼育室にて飼育を行った。飼育には円筒型黒水槽を用いた。水槽には生息地で採集した砂を約 5cm 敷き、40cm の水深となるまで海水を張り、約 200 個体を飼育した。水槽には青色のプラスチック板を載せて光量を落とし、エアレーションを行った。飼育室の空調は 25℃ にして終日稼働させた。餌は冷凍した海産クロレラ (一種 (*Nannochloropsis sp.*) (日本クロレラ工業) を購入し、1 リットルにつき 5g を溶かして与えた。

### 2-2 . ハチェック窩の組織観察

#### 2-2-1 . 頭部生体サンプルによる観察

飼育個体の頭部先端から約 5 mm を剃刀で切断し、ピンセットで口披蓋を開いて口腔内を露出させた。背側を下にして口腔内が見えるようにし、実体顕微鏡にて観察を行った。

#### 2-2-2 . 頭部パラフィン切片による観察

飼育個体の頭部先端から約 5 mm を剃刀で切断し、4% (w/v) パラフォルムアルデヒド (PFA)/10 mM リン酸緩衝液 (PB) (pH7.5) にて室温で 5 分間固定した。新しい 4% PFA に固定液を置換した後に、4℃ で 18 時間固定した。固定後の組織は 70、80、90、95、99 および 100% エタノール中で室温下、1 時間ずつ段階的に脱水処理した。その後キシレン中で室温下、15 分間透徹処理を行い、次にキシレン-パラフィン (50 : 50, v/v) にオープン中で 2 時間浸し、さらにパラフィンに 2 時間浸して、最後に新しいパラフィンで包埋した。包埋された組織片から、厚さ 10 $\mu$ m で体の前後軸に対して垂直断面、および左右軸に対して垂直断面となるように切片を作成し、poly-L-lysine (Sigma) でコートしたスライドガラス上に整列した。その後、キシレンで 2 回、10 分間ずつ処理し、100、95、90、80、70% エタノール中で 1 分間ずつ処理した。ヘマトキシリンで 5 分間、エオシンで 1 分間染色した後、70、80、90、95、100% エタノール中で 1 分間ずつ処理し、キシレンで 10 分間の処理を 2 回行った。バルサムで封入した後、組織の観察を行った。

### 2-3 . cDNA ライブラリー作製

#### 2-3-1 . 組織の採集

飼育個体 15 匹の頭部先端から約 3mm を剃刀で切断し、OCT compound (Sakura Finetechnical, Japan) に包埋して -20℃ で凍結させた。凍結サンプルはクリオスタット (ラ

イカ、CM3050S)で厚さ 14 $\mu$ m の切片にした。光学顕微鏡にてハチェック窩を含む切片を確認し、RNase-Free フォイル付きスライドガラス(ライカ、11505189)に載せて風乾した。以下の作業で用いている DEPC 水とは、0.1%ジエチルピロカーボネート(DEPC)処理した滅菌蒸留水である。スライドガラスに載せた約 50 枚の切片を 75%エタノールで 3 分間固定し、DEPC 水で 10 秒間洗浄した後、1% cresyl violet で 1 分間染色し、DEPC 水で 10 秒間洗浄した。95%エタノール、100%エタノールでそれぞれ 30 秒洗浄した後、キシレンで 1 分間の洗浄を 2 回行い、脱水した。風乾させたスライドガラスから、AS レーザーマイクロダイセクション(ライカマイクロシステムズ)(図 2)を用いてスライドガラスからハチェック窩部分を切り出し、30 $\mu$ l の ISOGEN (NIPPON GENE)を入れた 0.5ml PCR チューブ(エペンドルフ)の蓋に回収した(図 3)。新しい 0.5ml チューブの容器部分を蓋にはめて軽く遠心し、組織溶液を容器の底に落として-80 にて保存した。このサンプルをハチェック窩 140 枚分(0.5ml チューブ 3 本分)作製した。

サブトラクション用の筋肉組織は、頭部切片作製時に切断した胴体部分を光学顕微鏡下で解剖し、液体窒素で急速凍結した後-80 で保存した。

### 2-3-2 . Total RNA の抽出

採集したハチェック窩組織は、0.5ml チューブ 3 本分の溶液を 1 本の 1.5ml チューブに集め、ISOGEN を加えて 1ml の試料とした。ISOGEN の説明書に従って Total RNA を抽出し、20 $\mu$ l の DEPC 水に溶出した。この RNA 溶液を NucleoSpin RNA (日本ジェネティクス社)を用いて再抽出した。手順は NucleoSpin RNA の説明書に従い、使用した試薬は全て半量にして 60 $\mu$ l の DEPC 水に溶出した。150 $\mu$ l のエタノール、6 $\mu$ l の 3M 酢酸ナトリウム、1.3 $\mu$ l の 20mg/ml グリコーゲンを加えてエタノール沈殿し、10 $\mu$ l の DEPC 水に溶出した。RNA の収量が非常に少ないことが見込まれたので、RNA 量を保持するために濃度測定は行わず、全量をライブラリー作製のサンプルとして-80 で保存した。

筋肉組織は使い捨てのホモジナイズチューブ Lysing Matrix D (Qbiogene)を用い、Fastprep FP100A 装置(Qbiogene)で破碎した。約 100mg の凍結組織を 500 $\mu$ l の ISOGEN を入れた Lysing Matrix D に入れ、Fastprep FP100A 装置のスピードを 4.5 に設定し、30 秒間破碎した。破碎液を新しい 1.5ml チューブに移し、残りの Lysing チューブとビーズは 500 $\mu$ l の ISOGEN を加えて 1ml の試料とした。ISOGEN の説明書に従って Total RNA を抽出し、20 $\mu$ l の DEPC 水に溶かした。この RNA 溶液を NucleoSpin RNA を用いて再抽出し、60 $\mu$ l の DEPC 水に溶出した。150 $\mu$ l のエタノール、6 $\mu$ l の 3M 酢酸ナトリウム、1.3 $\mu$ l の 20mg/ml グリコーゲンを加えてエタノール沈殿し、10 $\mu$ l の DEPC 水に溶出した。分光光度計を用いて核酸濃度を測定し、約 1ng/ $\mu$ l となるように調整してライブラリー作製のサンプルとして-80 で保存した。



### 2-3-3 . サブトラクションライブラリー作製

cDNA 作製には Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit ( CLONTECH ) を用いた。凍結保存したハチェック窩の Total RNA、筋肉組織の Total RNA それぞれ 10 $\mu$ l を鋳型とし、Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit の説明書に従って 1 本鎖 cDNA の合成と PCR 増幅による 2 本鎖 cDNA の合成を行った。サブトラクションには CLONTECH PCR-Select cDNA Subtraction Kit ( CLONTECH ) を用いた。作製したハチェック窩の 2 本鎖 cDNA を Tester、筋肉の 2 本鎖 cDNA を driver とし、手順は CLONTECH PCR-Select cDNA Subtraction Kit の説明書に従った。サブトラクション操作後に PCR 増幅した産物は、TA クローニングにより pGEM-T Easy Vector ( Promega ) ベクターに挿入し、Competent high JM109 ( TOYOBO ) に形質転換した。得られたコロニーからランダムに選んだ 1000 クローンについて pGEM-T Easy Vector にプライミングサイトがある M13 Forward、M13 Reverse プライマーでコロニーダイレクト PCR を行い、インサートの有無と断片長を確認した。

### 2-3-4 . 塩基配列解析

コロニーダイレクト PCR でインサートが入っていることを確認したクローンについて、断片長が異なると見られる 200 クローンの PCR 産物を Exonuclease I、Shrimp Alkaline phosphatase 処理により精製した。精製した PCR 産物は SP6 プライマーで BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ( Applied Biosystems ) を用いてサイクルシーケンス反応し、ABI3130 Genetic Analyzer ( Applied Biosystems 3130 ) で塩基配列解析を行った。シーケンスデータの解析には ATGC Ver.4 ソフトウェア ( Genetyx Co. Ltd ) を用いた。配列の相同検索には DDBJ ( DNA Data Bank of Japan ) ( <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html> ) の Blastx、Blastn を用いた。

### 2-3-5 . コロニーハイブリダイゼーション

塩基配列の結果、同じクローン配列のコロニーが多数あった 6 個の配列 ( クローン No. 163、504、596、618、671、41B ) に対して、表 1 に示す配列でプライマー ( HP-01、HP-03、HP-04、HP-05、HP-06、HP-07 ) を作製した。コロニーダイレクト PCR で得た産物を 100 倍に希釈した溶液 1 $\mu$ l を PCR 反応の鋳型として使用した。それぞれのプライマーは 20 $\mu$ l の PCR 反応溶液中で最終濃度 0.2 $\mu$ M となるように調整し、以下の条件により各遺伝子の増幅を行った。

No.163	40 サイクル ( 95 10 秒、58 10 秒、72 40 秒 )
No.504	40 サイクル ( 95 10 秒、60 10 秒、72 40 秒 )
No.596	40 サイクル ( 95 10 秒、60 10 秒、72 40 秒 )

No.618	40 サイクル (95 10 秒、58 10 秒、72 40 秒)
No.671	40 サイクル (95 10 秒、58 10 秒、72 40 秒)
No.41B	40 サイクル (95 10 秒、58 10 秒、72 40 秒)

得られた増幅産物を 5000 倍希釈し、PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) を用いたプローブ作製の鋳型とした。それぞれのプライマーは 25 $\mu$ l の反応溶液中で最終濃度 0.2 $\mu$ M となるように調整し、以下の条件により PCR によるプローブ作製を行った。作製したプローブは、コロニーハイブリダイゼーションに用いた。

95 2分、30 サイクル (95 30 秒、58 30 秒、72 40 秒)、72 7分

コロニーハイブリダイゼーションは、コロニーの形成されたプレート 16 枚分に対して行った。正に荷電したナイロンメンブレン Colony/Plaque Screen (NENR Life Science Products) をコロニーの生えたプレートの表面に乗せて 1 分間放置し、コロニーをメンブレンにトランスファーした後、変性溶液 (0.5M NaOH、1.5M NaCl) を 15 分間反応させてコロニーを変性させた。濾紙の上にメンブレンを置いて軽く風乾させた後、中和溶液 (1.5M NaCl、1.0M Tris-HCl, pH7.4) を 15 分間反応させて封乾し、2 $\times$ SSC で 10 分間洗浄した。UV クロスリンカーを用い、説明書に従ってトランスファーされた DNA をメンブレンに固定し、20mg/ml の Proteinase K を 2 $\times$ SSC で 10 倍に希釈した溶液で 37、1 時間処理し、大腸菌のデブリスを取り除いた。DIG Easy Hyb (Roche) 中で 42、1 時間のプレハイブリダイゼーションの後、プローブを 1ml の DIG Easy Hyb につき 0.5 $\mu$ l になるように調整し、42 で 2 時間ハイブリダイゼーションさせた。低ストリンジェント洗浄バッファー (2 $\times$ SSC、0.1% SDS) を用いて室温でメンブレンを 2 回洗浄した後、高ストリンジェントバッファー (0.5 $\times$ SSC、0.1% SDS) を用いて 68 で 2 回洗浄し、Blocking Reagent (Roche) をマレイン酸バッファー (0.1M マレイン酸、0.15M NaCl、pH7.5) で最終濃度 1% となるように溶かしたブロッキング溶液で 30 分間ブロッキングした。ブロッキング溶液で 10000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche) を 30 分間室温で反応させ、洗浄バッファー (0.1M マレイン酸、0.15M NaCl、0.3% Tween20) で 15 分間、2 回洗浄した後、検出バッファー (0.1M Tris-HCl、0.1M NaCl、pH9.5) で 5 分間、メンブレンを平衡化させた。10ml の検出バッファーに 400 $\mu$ l の割合で NBT/BCIP (Roche) を混ぜた基質溶液で発色させ、反応は滅菌蒸留水中にメンブレンを入れることで停止させた。

## 2-4 . ナメクジウオゲノムデータベースの解析

### 2-4-1 . *Branchiostoma floridae* のゲノムデータベースの探索

JOINT GENOME INSTITUTE に登録されている、同属別種のフロリダ産のナメクジウオ *Branchiostoma floridae* のゲノムデータベース ( <http://genome.jgi-psf.org/Brafl1/Brafl1.home.html> ) の BLAST 検索エンジンを使用し、脊椎動物の下垂体ホルモンのアミノ酸配列と相同性のある配列の探索を行った。脊椎動物の下垂体ホルモンのアミノ酸配列は、DDBJ ( DNA Data Bank of Japan ) に登録されている遺伝子情報から入手した。

#### 2-4-2 . アミノ酸の相同性解析

ゲノムデータベース検索で得られたナメクジウオのペプチドホルモンを含む糖タンパク質β鎖、パソプレシンファミリー、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン ( GnRH )、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体 ( GnRHR ) のアミノ酸配列をもとに、MEGA ver.3.1 ソフトウェア ( Kumar et al., 2004 ) 上で近隣結合法 ( Saitou & Nei, 1987 ) により系統樹を構築した。系統樹は Poisson correction による多重置換を補正した進化距離にもとづいて構築したものであり、各枝の信頼性は系統樹作製 1000 回試行でのブートストラップ確率を計算することで確かめた。

## 第3章 結果

### 3-1 . ハチェック窩の形態

#### 3-1-1 . 頭部生体サンプルによる観察

口披蓋を開いた頭部を腹側から観察した写真を図4に示した。ハチェック窩は頭部において先端から後方へ3分の2の位置で、正中を走る脊索の右側に存在する。ナメクジウオを側方の右側から観察した時に見えるピンク色の小さな丸は、図4の赤い部分と同一であると考えられるが、ハチェック窩の形態的特徴である脊索との隣接は見られない。Kajiら(2001)は、観察からハチェック窩は脊索と線毛輪器官との間にあると報告しているため、ハチェック窩は脊索と赤く見える部分の間の領域に存在すると考えられる。観察された赤い部分はハチェック窩ではなく、ハチェック窩の前方からハチェック窩を囲むように存在し、頭部後方の縁膜という口腔と咽頭の境界まで続く線毛輪器官の一部であると考えられる。また、ハチェック窩の左側に存在するハチェックの腎管と呼ばれる排泄器官である可能性もある。赤く見える部分は線毛輪器官、もしくはハチェック窩の左側に存在するハチェックの腎管と考えられる。

#### 3-1-2 . 頭部パラフィン切片による観察

頭部を体の前後軸に対して垂直に切った断面図を図5に示す。ハチェック窩は口腔上皮が一続きになって神経管の方向へ陥入した構造をしており、口腔に接していることが確認できる。また、神経管がハチェック窩に向かって下方に伸長し、両者が接近している様子が観察される。頭部左右軸に対して垂直に切った断面図でも、ハチェック窩が口腔に露出している構造であることが観察される(図6)。また、ハチェック窩が口腔側から神経管側にかけて、複数の細胞群で構成されていることが確認できた。

### 3-2 . サブトラクション法による解析

#### 3-2-1 . レーザーマイクロダイセクションを用いた cDNA ライブラリーの作製

スライドガラス上に載せた切片から、ハチェック窩をレーザーマイクロダイセクションで切り出した顕微鏡像を図7に示した。切り出した140枚分のサンプルからRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作製した(図8)。コントロール実験として作製したヒト胎盤由来のcDNAと比較して同等な電気泳動パターンが得られ、長さの異なる様々な種類のcDNAが含まれていることが予想された。このcDNAを筋肉組織のcDNAとサブトラクションした後、cDNAの両端に付加したアダプターに対するプライマーでPCR増幅した結果を図8に示す。全体的にスミア状に増幅されたDNAが存在する中に、目立った4本のバンドが現れていることから、DNAの増幅程度が均一でなかったと推測された。

#### 3-2-2 . サブトラクション産物の塩基配列解析

サブトラクション後に PCR 増幅した cDNA の塩基配列解析の結果、3 種類の塩基配列が得られた(表 2)。これらの塩基配列とデータベースの塩基配列情報との相同性を比較する検索方法で、*Branchiostoma belcheri* と同属別種である *Branchiostoma floridae* の遺伝子と相同性が高い結果となった。これら 3 種類とも、機能不明のタンパク質をコードする遺伝子であった。

### 3-2-3 . コロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニング

3-2-2 で解析した遺伝子を含めた 200 クロンの塩基配列解析の結果、得られた遺伝子が数種類に集約していた。そこで、重複する遺伝子を除くために、200 クロンをもとに 6 個の配列でプローブを作製し、コロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。その結果、シグナルが検出されない 40 クロンの配列が得られた。これらのクロンは 6 個の配列以外の遺伝子であると考えられるため、塩基配列解析を行った。その結果、得られた配列は塩基長が若干異なるものの、既出の配列の一部であり、新規遺伝子ではなかった。

## 3-3 . ナメクジウオゲノムデータベース解析

### 3-3-1 . ゲノムデータから得られた下垂体ホルモン遺伝子

*Branchiostoma floridae* のゲノムデータベース上で脊椎動物の下垂体のホルモン遺伝子を使ってナメクジウオの遺伝子と相同な配列の検索を行った結果、下垂体ホルモンである甲状腺刺激ホルモンと同じ受容体に結合することが報告されている(Nakabayashi et al., 2002) 糖タンパク質、Thyrostimulin  $\beta$ 鎖をコードする遺伝子と相同性が高い遺伝子が得られた(図 9)。また、神経下垂体ホルモンであるバソプレシンファミリーの一員と考えられる遺伝子も見つかった。アミノ酸の相同性解析によると、アルギニンバソトシンと最も類似していた(図 10)。

### 3-3-2 . データベースから得られた下垂体機能に関連した遺伝子

さらに、脊椎動物の視床下部から分泌され、下垂体のホルモン分泌を促進する機能を持った 2 種類の遺伝子が得られた。一つ目の甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) は、脊椎動物においては 3 つのアミノ酸から成る視床下部ホルモンであり、下垂体からの甲状腺刺激ホルモンの分泌を促進する。アミノ酸配列は、脊椎動物ではグルタミン-ヒスチジン-プロリンであるが、ナメクジウオではグルタミン-セリン-プロリンであり、2 番目のアミノ酸に違いが見られた。二つ目の GnRH (図 11) は、脊椎動物において 10 個のアミノ酸から成る視床下部ホルモンであり、下垂体からの生殖腺刺激ホルモンの放出を促進する機能を持つ。生物によって保持している GnRH の数は異なるが、ナメクジウオでは少なくとも 2 種類が存在していた。また、その受容体である GnRHR の遺伝子と相同性の高い遺伝子も 9 種

類見つかри、アミノ酸配列の相同性において、3つのグループに分けることができた。(図12)

## 第4章 考察

### 4-1 . ハチェック窩の形態と環境受容

#### 4-1-1 . ハチェック窩の形態

ハチェック窩はナメクジウオの頭部中ほどの下部に位置し、口腔から内側に陥入した形態をしている小器官である。これは脊椎動物の下垂体のラトケ嚢と呼ばれる発生途中の形態と類似していることが以前から指摘されている (Goodrich, 1918)。脊椎動物では、発生が進行するに従ってラトケ嚢はさらに体内に入り込んだ形態になり、下垂体となる。この器官は脊椎動物に特有の内分泌器官である。一方、ハチェック窩はラトケ嚢が外界との接触を保持したままナメクジウオに備わった器官と考えられてきた (Goodrich, 1918)。ハチェック窩と下垂体との相同性については、下垂体に特異的に発現し、DNA に結合してその転写を調節する転写因子である Pit-1 が幼生や成体のハチェック窩に存在するという報告 (Candiani & Pestarino, 1998) や、脊椎動物の鼻と下垂体の形成に関与する転写因子であり、ラトケ嚢の発生の一時期に発現する転写因子である Pax-6 が発生途中のハチェック窩にも見られること (Gardon, 1998) からも議論されている。ハチェック窩が下垂体としての機能を持っているのであれば、無脊椎動物から脊椎動物への進化の過程で下垂体が形成される途中の過程を残している構造である可能性が考えられる。しかしながら、下垂体機能を示す物質的、機能的証拠の両方ともに明らかになっていない。

#### 4-1-2 . ハチェック窩の環境受容器官としての可能性

口腔内に露出している形態的特徴から、ハチェック窩が環境受容器官として海水中の何らかの刺激を受容している可能性は大いに考えられる。ハチェック窩が露出している口腔内には海水が直接流入してくることから、この場合の環境要因として考えられるものは、海水中に存在する元素である塩素イオン、ナトリウムイオン、硫酸イオンなどの無機化合物、そして有機物の分解によって生成される窒素化合物、リン酸化合物、アミノ酸、脂肪酸誘導体などの有機化合物である。比較的分子量の小さい無機物質は生物の細胞膜に存在するイオンチャネルやポンプと呼ばれる構造から出入りし、生物体内の環境を調節している。分子量の大きい有機物は、化学物質受容体である G タンパク質共役型の 7 回膜貫通受容体 (GPCR) などの膜受容体に結合することにより、細胞内の刺激の伝達経路を活性化し、生体調節に関わる。

イオンチャネルは生体内の場所によらず、ほとんどの細胞に偏りなく存在するものが多いが、GPCR は組織または器官特異的に存在することが多く、器官の機能特異性を表していることが多い。例えば、ヒトの嗅細胞には匂い物質受容体があり、視細胞には光刺激に対する受容体がある。ナメクジウオでは頭部先端の背側上皮に存在する感覚神経細胞に発現している 1 種類の GPCR が同定されている (Sato, 2005)。しかしながら、ハチェック窩での発現は確認されていない。今後他の GPCR 遺伝子を同定してその発現細胞を調べ、

ハチェック窩が環境受容器官である可能性をさらに検証していきたい。

## 4-2 . サブトラクション法による解析

### 4-2-1 . 微量サンプルを用いたサブトラクションライブラリー作製の検証

ハチェック窩は長さ約 80 $\mu$ m、幅約 50 $\mu$ m の大変小さな器官であり、解剖学的に摘出する場合は筋肉組織の混入が避けられないことから、ハチェック窩のみを取り出して解析を行うことは非常に困難なことであった。そこで、本研究ではレーザーマイクロダイセクション法を用いてハチェック窩をレーザーで切り取ったサンプルを用い、そこに発現している遺伝子の解析を行った。レーザーマイクロダイセクション法を用いた遺伝子発現解析は、最近ではマウス、ヒトの神経細胞など、解剖が困難な組織に広く用いられている技術である (Torres-Munoz, et al., 2004、Segal, et al., 2005)。それらの研究報告をもとに必要と考えられるサンプル量を推定した。14 $\mu$ m の厚さに切った 140 枚分のハチェック窩の切片を使用してサブトラクション法を用いた cDNA ライブラリーを作製し、ハチェック窩に特異的な遺伝子を探索した。その結果、サブトラクション産物から得られた遺伝子は数種類にとどまった。その原因として、次の 3 つの可能性が挙げられる。1) 使用したハチェック窩の切片が少なかつたために、そもそもサンプル内に遺伝子の偏りが存在したこと。2) 今回のサブトラクションに用いたサンプル量からは遺伝子の PCR 増幅を何度も行わなければならないかつたため、その過程で DNA の増幅程度にバイアスがかかり、増幅程度が低い遺伝子はサブトラクションの対象にならなかつたか、またはサブトラクションできてもクローンとして拾いきれなかつたこと。3) サブトラクション操作時に DNA の両端にアダプターを付加する行程での反応が十分でなかつたため、アダプターが付加されなかつた DNA が取りこぼされたことである。以上の可能性を踏まえ、今後は PCR 増幅を極力行わずに済むようにハチェック窩の切片量を増やす、サブトラクションという複雑な操作を行わず、他のスクリーニング法を検討するなどの改善が必要である。

### 4-2-2 . サブトラクション産物の塩基配列解析

サブトラクション法では 3 種類の cDNA が得られた。DDBJ (DNA Data Bank of Japan) のデータベースを用いた塩基配列の相同検索の結果、これらの遺伝子は同属の *Branchiostoma floridae* の遺伝子と最も相同性が高かつた。その各遺伝子との塩基の一致割合はクローン番号 163 が 8.4% (Accession No.BW753886)、クローン番号 618 が 17.4% (Accession No.BW719635)、クローン番号 41B が 37.8% (Accession No.BW738127) と低い。得られた配列はナメクジウオのものであるが、データベースの遺伝子と同種のものではない。また、データベースの遺伝子についても未だタンパク質としての機能が解明されていないものであるため、現段階ではサブトラクションで得られた配列の詳細は分からない。今後 *In situ hybridization* を行い、これらの遺伝子がハチェック窩に発現するか



どうかを確認する必要がある。

### 4-3 . ナメクジウオの内分泌関連遺伝子の存在

#### 4-3-1 . Thyrostimulin $\beta$ 鎖遺伝子

*Branchiostoma floridae* のゲノムデータベース検索によって、ヒトの Thyrostimulin  $\beta$ 鎖と相同性の高い遺伝子が得られた。下垂体で合成される糖タンパク質ホルモンは、全てのホルモンに共通の $\alpha$ 鎖と各ホルモンに特異的な $\beta$ 鎖で構成される。Thyrostimulin  $\beta$ 鎖は、 $\alpha$ 鎖と共にヒトゲノムのスクリーニングによって発見された新規の糖タンパク質ホルモン遺伝子であり、ヒトの脳、下垂体に発現が見られる (Hsu et al., 2002)。また、この $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖の二量体は甲状腺刺激ホルモンの受容体と結合して細胞内シグナル伝達を活性化することが明らかにされている (Nakabayashi et al., 2002)。

この Thyrostimulin  $\beta$ 鎖遺伝子に配列が類似している糖タンパク質ホルモン $\beta$ 鎖は、無脊椎動物である線虫 *Ceanorhadbitis elegans*、鉤虫 *Ancylostoma caninum*、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* でも同定されている。Hsu ら (2002) は、これらの遺伝子とヒトの Thyrostimulin  $\beta$ 鎖、そしてヒトの糖タンパク質ホルモン $\beta$ 鎖遺伝子との系統関係を調べた結果、Thyrostimulin  $\beta$ 鎖が無脊椎動物とヒトの糖タンパク質 $\beta$ 鎖との間に位置することを明らかにした。そして、脊椎動物の糖タンパク質ホルモン $\beta$ 鎖は祖先的遺伝子である Thyrostimulin  $\beta$ 鎖から派生してできたと考えられると報告している。脊椎動物に近縁な無脊椎動物であるナメクジウオに Thyrostimulin  $\beta$ 鎖様の遺伝子が存在することは、無脊椎動物から脊椎動物への進化過程において、視床下部-下垂体系の起源となる機構が形成されていた可能性を示唆する。今後、ナメクジウオにおける下垂体の存在および下垂体遺伝子の同定、発現解析、機能解析を進めていきたい。

#### 4-3-2 . 神経ペプチドホルモン遺伝子とその受容体遺伝子

さらに *Branchiostoma floridae* のゲノムデータベース検索から、バソプレシンファミリーに属する遺伝子が得られた。しかしながら、バソプレシンファミリーとの間でアミノ酸の相同関係を示した系統樹は統計的有意差が低かった。これはバソプレシンファミリーのペプチドが9アミノ酸残基のホルモンであり、その間でアミノ酸の違いは一箇所ないし二箇所だけであるためと考えられる。例えば、哺乳類のアルギニンバソトシンとアルギニンバソプレシンは、3番目のアミノ酸がフェニルアラニンかイソロイシンかの違いである。すなわち、分子系統解析に使うデータ量としてアミノ酸の相違量が少ないので、統計的有意差を見ることが難しい。バソプレシンファミリーは約170残基の前駆体アミノ酸から9アミノ酸が切り出されて成熟体となるホルモンであり、前駆体のアミノ酸配列をもとに系統関係の解析がなされている (Acher, 1996)。それによると、バソプレシンファミリーはアルギニンバソトシンを祖先形質として派生したと考えられている。図10でナメクジウ

オのバソトシンファミリー様遺伝子のアミノ酸配列がアルギニンバソトシンに最も近いことは、その結果を肯定していると考えられる。

GnRH 様遺伝子は、*Branchiostoma floridae* で少なくとも 2 種類存在することが分かった。GnRH は 10 アミノ酸残基からなるホルモンで、脊椎動物の場合は 1 種類あり、視床下部で合成、分泌されたものは血管を通して下垂体に運ばれる。ナメクジウオと他の動物の GnRH を比較すると、GnRH の立体構造を決定する 5、6、7、8 番目のアミノ酸残基が異なり、ナメクジウオに特異的なアミノ酸であった。ナメクジウオの GnRH に関する研究は少なく、ヒトの GnRH に対して作製した抗体を用いた免疫染色でハチェック窩にシグナルが得られたという報告 (Chang, et al., 1982)、ヤツメウナギの GnRH に対して作製した抗体を用いて免疫染色をした結果、ナメクジウオの神経官に存在する細胞にシグナルが得られたが、ハチェック窩にはシグナルが検出されなかったという報告 (Castro, et al., 2006) のみである。ナメクジウオ自身の GnRH を用いた今後の解析が必要である。

GnRH 受容体 (GnRHR) と相同性の高い遺伝子は、9 種類がゲノムデータの検索により見つかった (Sherwood, et al., in press)。アミノ酸配列の相同性から、それらの遺伝子は 3 つのグループに分けることができた。その中でも、脊椎動物の GnRHR と相同性の高いグループと、無脊椎動物のタコに相同性の高いグループに分けられ、ナメクジウオには脊椎動物型の GnRHR と無脊椎動物型の GnRHR が存在する可能性が考えられる。2002 年にドラフトゲノムが解読された脊索動物門尾索動物亜門に属するカタユウレイボヤ (*Ciona intesitinalis*) で、GnRH と GnRHR の存在、そしてその相互関係について詳細に調べられている。カタユウレイボヤには 4 種類の GnRHR が存在することが明らかにされており (Tello et al., 2005) 6 種類存在する GnRH との結合実験の結果、GnRHR の 1 つは活性化されないことが報告されている (Tello et al., 2005)。

アミノ酸の相同性解析では、カタユウレイボヤの GnRHR は 1 つのグループを構成している。これに比べてアミノ酸配列の違いが大きいナメクジウオの GnRHR 様遺伝子は、その機能の多様性を示唆するものであると考えられる。しかしながら GnRHR を含む 7 回膜貫通受容体遺伝子は細胞膜の貫通部分のアミノ酸配列が似ているために、配列が類似している他のタンパク質がゲノムデータベースの検索結果として出力されている可能性も考えられる。検索条件を厳しくするなどの改善が必要である。また、GnRH と GnRHR との結合実験が必要であり、これによりナメクジウオには何種類の GnRH と GnRHR が実際に存在するかを決めることができる。今後、ナメクジウオの GnRH の機能解析に着手していきたいと考えている。

#### 4-4 . まとめ

##### 4-4-1 . 形態観察と遺伝子解析から見たハチェック窩の機能

ナメクジウオにバソプレシン、GnRH、GnRHR、Thyrostimulin  $\beta$ 鎖様の遺伝子が存在

することから、視床下部-下垂体系に類似するカスケードが存在する可能性は考えられるが、それがハチェック窩ではなく、他の器官がその機能を担っている可能性もある。ナメクジウオに近縁なホヤにも GnRH と GnRHR が存在するが、視床下部-下垂体に相当するような器官は見つかっておらず、GnRH は生殖腺に直接働きかけてその機能を調節している。一方で、ホヤにも Thyrostimulin 様遺伝子が存在することが明らかになっている (Campbell et al., 2004)。Thyrostimulin 様遺伝子の機能解析がナメクジウオの視床下部-下垂体系を解明するカギとなりうるだろう。

ハチェック窩が下垂体原基でありながら環境受容器官である可能性の実証までにはまだ多くの解析を勧めなければならない。特に環境受容については形態学的な解釈にとどまっているので、分子生物学的手法を利用したさらなる解析が必要である。今後はハチェック窩の機能は何か、あらゆる可能性を含めてナメクジウオの環境受容機構と生体調節機構の解明をしていきたい。

#### 4-4-2 . 今後の展望

解剖による摘出が困難であったハチェック窩を、レーザーマイクロダイセクション法を用いて初めて摘出し、その遺伝子解析を行った。これは他の微小器官にも適用できる技術として有用であり、小型動物の研究の発展に貢献するものである。その結果、これまで解析が困難であった動物にも技術を適用することで研究対象が増え、生物多様性とそれらの進化研究の重要な一端を担うと期待される。レーザーマイクロダイセクション法を用いた解析では、回収するサンプルの質がその後の実験を大きく左右する。今後はさらに技術の検討を行い、解析に用いるサンプルの質の向上に努めたい。

ナメクジウオが脊椎動物に近縁といわれる理由は、脊椎動物との相同性にあると考えられる。例えば脊索、神経官、エラ構造の存在、雌雄異体であることなどである。遺伝子を見ても、脊椎動物の発生過程で組織の分化誘導に必要な遺伝子セットをナメクジウオは持っている。このことから、脊椎動物の起源をナメクジウオに求めることは可能であると考えられる。生命の進化、中でも無脊椎動物から脊椎動物への進化を考えた時に、ナメクジウオの存在は避けて通れない。発生に関する遺伝子の発現様式を他の動物と比較する比較発生学的視点から、無脊椎動物から脊椎動物への進化を考えようとする気運が高まり、ナメクジウオの研究は大きく進んだ。現在は進化発生学的研究だけではなく、生理学的研究も含めて統合的に進化を考えようとする試みが増えつつある。そのような中、*Branchiostoma floridae* のドラフトゲノムが公開されて遺伝子の入手が容易になった。ナメクジウオにはハチェック窩以外にも、環境受容と生体調節に関係している可能性を持ちながら機能が分かっていない器官が存在する。今はまさにそれらの機能を解明するための役者がそろったところである。ナメクジウオは進化における環境受容と生体調節機構の変遷過程を明らかにする動物として重要であり、今後の研究の発展が期待される。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始のご指導と、本論文の御高閲を賜った東京大学海洋研究所窪川かおる教授に深謝する。東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学研究系自然環境学専攻陸域環境学コースならびに海洋環境学コースの諸先生方からは、環境学、海洋科学の視点から数多くの御助言を賜り、厚く御礼申し上げます。

本研究における個体採集に際し、愛知県田原市赤羽根漁業協同組合の皆様には多大なるご協力を頂き御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、数多くのご指導と御助言、御協力を賜った東京大学海洋研究所水田貴信博士に深謝する。東京大学海洋研究所重谷安代博士ならびに稲葉真由美氏には、研究を進める中で助言と議論の場を頂いた事に感謝する。

最後に、東京大学海洋研究所先端海洋システム研究センター解析分野の皆様、東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学研究系自然環境学専攻海洋環境コース在籍の同期入学の皆様、東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学研究系自然環境学専攻の皆様に変にお世話になったことに感謝する。

## 引用文献

- Acher, R. (1996): Molecular evolution of fish neurohypophysial hormones: neutral and selective evolutionary mechanisms. *Gen Comp Endocrinol* 102:157-172
- 会田勝美, 小林牧人, 金子豊二 (1991) 内分泌. 魚類生理学. 恒星社厚生閣. pp167-234
- Boorman, C.J., Shimeld, S.M. (2002) Pitx homeobox genes in *Ciona* and amphioxus show left-right asymmetry is a conserved chordate character and define the ascidian adenohypophysis. *Evol Dev* 4(5):354-365
- Campbell, R.K., Satoh, N., Degnan, B.M. (2004) Piecing together evolution of the vertebrate endocrine system. *20(8):359-366*
- Candiani, S., Pestarino, M. (1998) Expression of the tissue-specific transcription factor Pit-1 in the lancelet, *Branchiostoma lanceolatum*. *J Comp Neurol* 392:343-351
- Candiani, S., Pestarino, M. (1998) Evidence for the presence of the tissue-specific transcription factor Pit-1 I lancelet larvae. *J Comp Neurol* 400:310-316
- Castro, A., Becerra, M., Manso, M.J., Sheawood, N.M., Anadon, R. (2006) Anatomy of Hesse photoreceptor cell axonal system in the central nervous system of amphioxus. *J Comp Neurol* 494:54-62
- Chang, C.Y., Chu, Y.T., Chen, D. (1982) Immunocytochemical demonstration of luteinizing hormone(LH) in Hatschek's pit amphioxus(*Branchiostoma belcheri*). *Kexue Tongbao* 27:1233-1234
- Gardon, S., Holland, L.Z., Gehring, W.J., Holland, N.D. (1998) Isolation and developmental expression of the amphioxus *Pax-6* gene (*AmphiPax-6*): insights into eye and photoreceptor evolution. *Development* 125:2701-2710
- Gorbman, A. (1995) Olfactory origins and evolution of brain-pituitary endocrine system: facts and speculation. *Gen Comp Endocrinol* 97:171-178
- Gorbman, A., Dickhoff, W.W., Vigna, S.R., Clark, N.B., Ralph, C.L. (1982) "Comparative Endocrinology". Willy New York
- Gorbman, A., Nozaki, M., Kubokawa, K. (1999) A brain-Hatschek's pit connection in amphioxus. *Gen Comp Endocrinol* 113:251-254
- Goodrich, E.S.Q. (1917) "Proboscis pores" in craniate vertebrates, a suggestion concerning the premandibular somites and hypophysis *J Microsc Sci* 62:539-553
- Hsu, S.Y., Nakabayashi, K., Bhalla, A. (2002) Evolution of glycoprotein hormone subunit genes in bilateral metazoa: identification on two novel human glycoprotein hormone subunit family genes, GPA2 and GPB5. *Molecular Endocrinology* 16(7):1538-1551
- Jiang, Y.M., Yamamoto, M., Kobayashi, Y., Yoshihara, T., Liang, Y., Terao, S., Takeuchi,

- H., Ishigaki, S., Katsuno, M., Adachi, H., Niwa, J., Tanaka, F., Doyu, M., Yoshida, M., Hashizume, Y., Sobue, G. (2005) Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57:236-251
- Kaji, T., Aizawa, S., Uemura, M., Yasui, K. (2001) Establishment of left-right asymmetric innervation in the lancelet oral region. *J Comp Neurol* 435:394-405
- Kawamura, K., Kouki, T., Kawahara, G., Kikuyama, S. (2002) Hypophyseal development in vertebrates from amphioxus to mammals. *Gen Comp Endocrinol* 126:130-135
- 川島誠一郎 (1995) 内分泌学. 朝倉書店 .
- Liang, G., Zhang, X.D., Wang, L.J., Sha, Y.S., Zhang, J.C., Miao, S.Y., Zong, S.D., Wang, L.F., Koide, S.S. (2004) Identification of differentially expressed genes of primary spermatocyte against round spermatid isolated from human testis using the laser capture microdissection technique. *Cell Research* 14(6):507-512
- 宮田隆 (1999) 分子進化-解析の技法とその応用-. 共立出版.
- Mojsilovic-Petrovic, J., Nestic, M., Pen, A., Zhang, W., Stanimirovic, D. (2004) Development of rapid staining protocols for laser-capture microdissection of brain vessels from human and rat coupled to gene expression analysis. *J Neuroscience Methods* 133:39-48
- Nakabayashi, K., Matsumi, H., Bhalla, A., Bae, J., Mosselman, S., Hsu, S.Y., Hsueh, A.J.W. (2002) Thyrostimulin, a heterodimer of two new human glycoprotein hormone subunits, activates the thyroid-stimulating hormone receptor. *J Clin Invest* 109:1445-1452
- 西川輝昭, 向井秀夫 (1986) 頭索類. 動物系統分類学 8(下). 中山書店. pp339-392
- Nozaki, M. (1999) Unique asymmetric protrusion of nerve cord in the amphioxus, *Branchiostoma belcheri*. *Naturwissenschaften* 86:328-330
- Nozaki, M., Gorbman, A. (1992) The question of functional homology of Hatschek's pit of amphioxus (*Branchiostoma belcheri*) and the vertebrate adenohypophysis. *Zool Sci* 9:387-395
- Okada, S.L., Ellsworth, J.L., Durnam, D.M., Haugen, H.S., Holloway, J.L., Kelley, M.L., Lewis, K.E., Ren, H., Sheppard, P.O., Storey, H.M., Waggie, K.S., Wolf, A.C., Yao, L.Y., Webster, P. (2006) A glycoprotein hormone expressed in corticotropes exhibits unique binding properties on thyroid-stimulating hormone receptor. *20(2):414-425*
- Ruppert, E.E. (1997) cephalochordate(Acrania). In: Harrison FW, Ruppert EE (eds.) *Microscopic Anatomy of Invertebrates* vol. 15. Hemichordata Chaetognatha, and the Invertebrate Chordates. Wiley-Liss, New York, pp409-419

- Sahlin, K., Olsson, R. (1986) The wheel organ and Hatschek's groove in the lancetlet, *Branchiostoma lanceolatum* (Cephalochordata). *Acta Zoologica*(Stockh) 67(4):201-209
- 才野敏郎 (1995) 栄養塩と生物活動. 月刊海洋科学 8:20-28
- Sanna, P.P., King, A.R., Stap, L.D., Repunte-Canonigo, V. (2005) Gene profiling of laser-microdissected brain regions and sub-regions. *Brain Reseach Protocols* 15:66-74
- Satoh, G. (2005) Characterization of novel GPCR gene coding locus in amphioxus genome: gene structure, expression, and phylogenetic anarysis with implications for its involvement in chemoreception. *Genesis* 41:47-57
- Satoh, G. (2005) A trajectory of increasing activity and the elaboration of chemosensory modality: A new perspective on vertebrate origins. *Zool Sci* 22:613-626
- Savage, J.J., Yaden, B.C., Kiratipranon, P., Rhodes, S.J. (2003) Transcriptional control during mammalian anterior pituitary development. *Gene* 319:1-19
- Scully, K.M., Rosenfeld, M.G. (2002) Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* 295:2231-2235
- Segal, J.P., Stallings, N.R., Lee, C.E., Zhao, L., Socci, N., Viale, A., Harris, T.M., Soares, M.B., Childs, G., Elmquist, J.K., Parker, K.L., Friedman, J.M. (2005) Use of laser-capture microdissection for the ventromedial hypothalamic nucleus. *J Neuroscience* 25(16):4181-4188
- Sherwood, N.M., Adams, B.A., Tello, J.A. (2005) Endocrinology of protochordates. *Can J Zool* 83:225-255
- Sherwood, N.M., Tello, J.A., Roch, G.J. (2006) Neuroendocrinology of protochordates: Insights from *ciona* genomics. *Comp Biochem Physiol* 144:254-271
- Shimamura, M., Garcia, JM., Prough, D.S., Hellmich, H.L. (2004) Laser capture microdissection and analysis of amplified antisense RNA from distinct cell populations of the young and aged rat brain: effect of traumatic brain injury on hippocampal gene expression. *Mol Brain Res* 122:47-61
- 白山義久 (2000)総合的観点からみた無脊椎動物の多様性と系統. 無脊椎動物の多様性と系統. 裳華房. pp2-46
- Sudo, S., Kuwabara, Y., Park, J., Hsu, S.Y., Hsueh, A.J.W. (2005) Heterodimeric fly glycoprotein hormone- $\alpha$ 2(GPA2) and glycoprotein hormone- $\beta$ 5(GPB5) activate fly leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-1(DLGR1) and stimulation of human thyrotropin receptors by chimeric fly GPA2 and human DPB5. *Endocrinology* 146(8):3596-3604

- Tello, J.A., River, J.E., Sherwood, N.M. (2005) Tunicate gonadotropin-releasing hormone(GnRH) peptides selectively activate *Ciona intestinalis* GnRH receptors and the green monkey type GnRH receptor. *Endocrinology* 146(9):4061-4073
- Torres-Munoz, J.E., Waveren, C.V., Keegan, M.G., Bookman, R.J., Petito, C.K. (2004) Gene expression profiles in microdissected neurons from human hippocampal subregions. *Molecular Brain Research* 127:105-114
- 内田勝久 (2005) ヤツメウナギの下垂体発生とその進化. *月刊海洋科学* 41:200-207
- Wada, H., Satoh, N. (1994) Details of the evolutionary history of invertebrates to vertebrate as deduced from sequence 18S rRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1801-1804



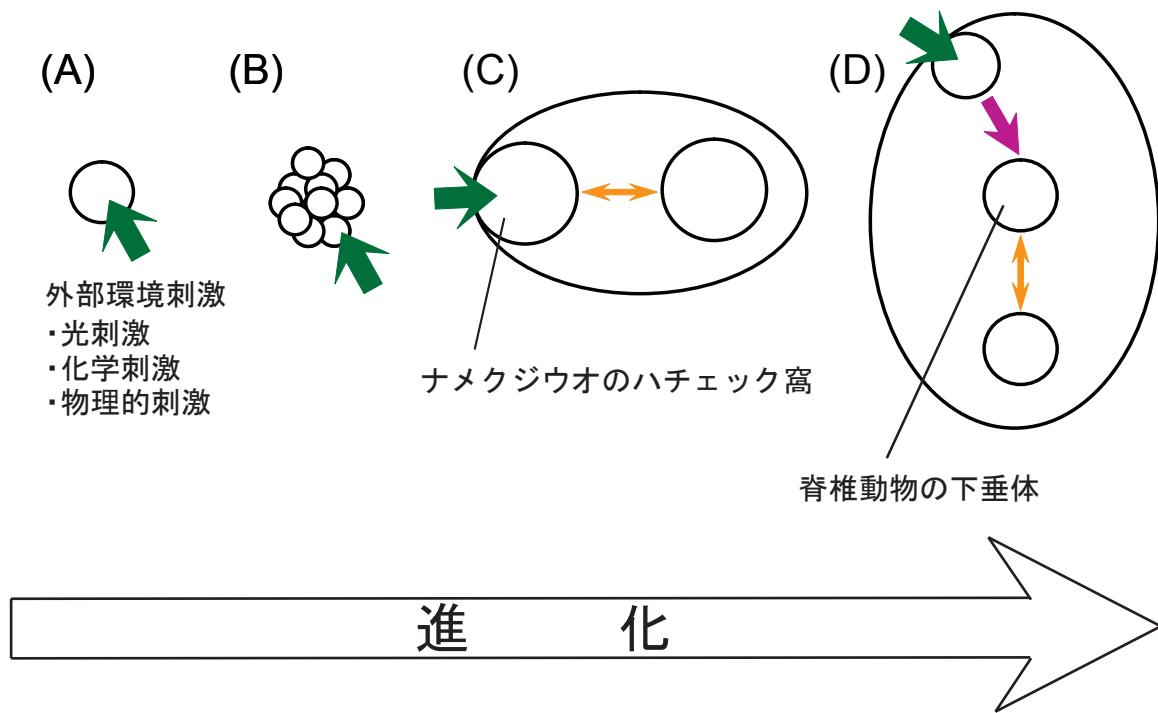


図1. 進化に伴う環境受容機構と内分泌機構の変遷 概図.

(A) : 一つの細胞内で外部環境刺激(矢印)と刺激に対する生体調節機構を行う単細胞生物.

(B) : 刺激を受容する細胞と, それを受けて生体調節を行う多細胞生物. (C) : 外部環境刺激を受容して生体内の器官と相互作用する器官が分化した機構. (D) : 環境受容に特化した器官と

内分泌に特化した器官から成る機構, ↑: 外部環境刺激, ↑: 環境受容器官から脳-下垂体への刺激の伝達, ↓: ハチェック窩または下垂体と他の器官との相互作用.

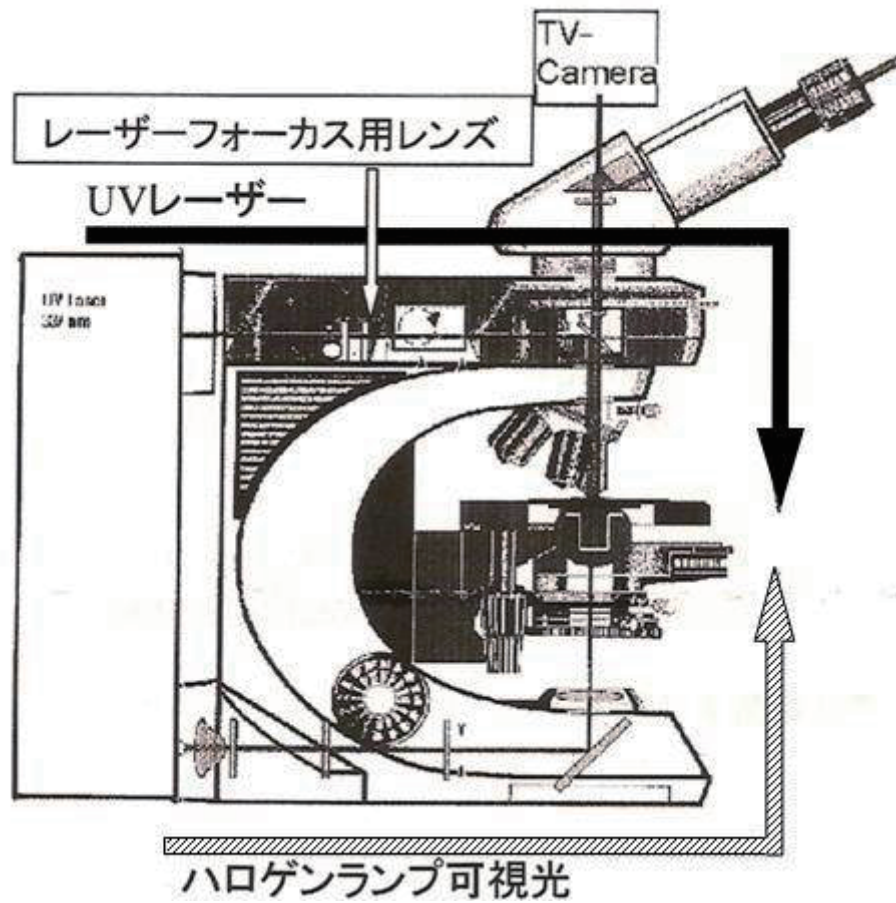
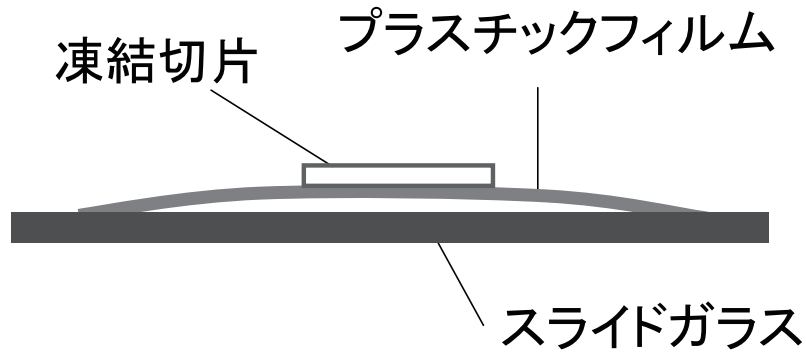


図2. レーザーマイクロダイセクションの原理。  
 ハロゲンランプによる可視光は下側から照射される。UVレーザーは接眼レンズを通過して上側から照射され、スライドガラス上のサンプルを切り出す。

(A)



(B)

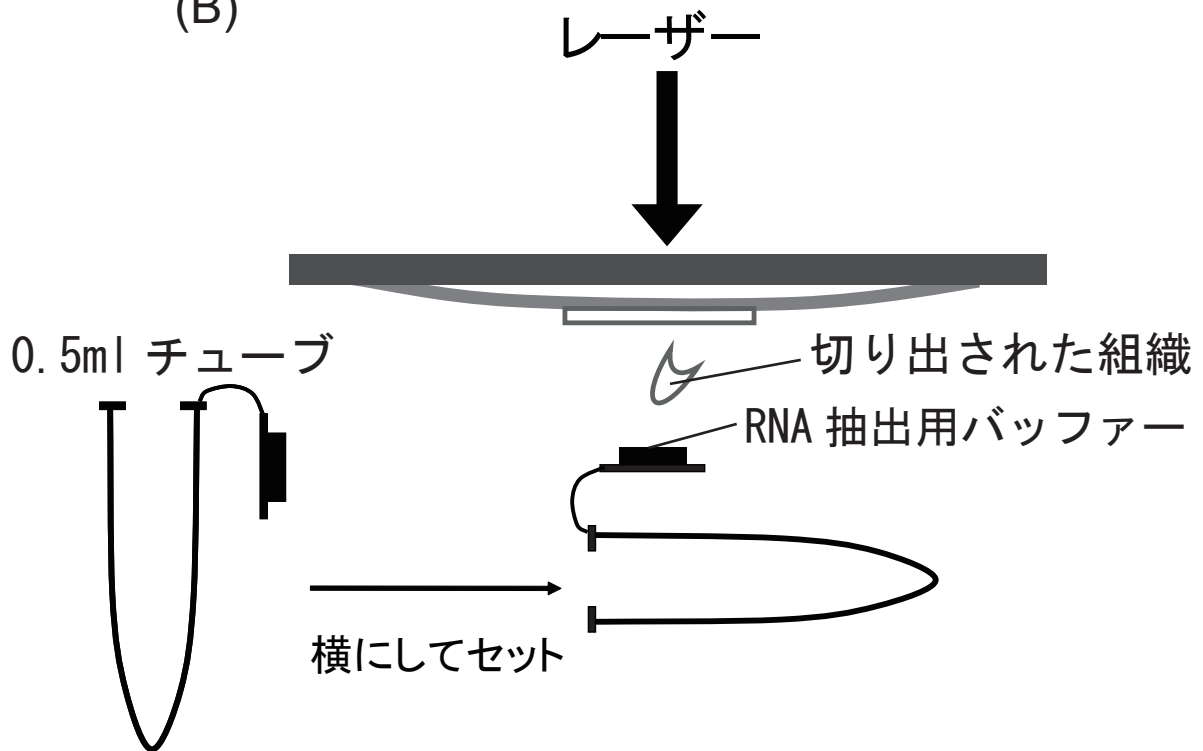


図3. レーザーマイクロダイセクションを用いたサンプルの作製法.

(A): 頭部の凍結切片をのせたプラスチックフィルム付きスライドガラスの模式図.

(B): レーザーマイクロダイセクションで切り出したサンプルの回収の模式図.

表1 . コロニーハイブリダイゼーションで使用したプライマー .

Primer name	Sequence(5' to 3')
HP-01 F	GTATCTGTGTTTTTCAGGTGTTG
HP-01 R	TGTCTCTGCTTAGCACTCA
HP-03 F	CTGGCCACAGACCCTAT
HP-03 R	GCTGCGCATTCTGAAC
HP-05 F	GAACACCACCCTGTTGCATT
HP-05 R	ACATGCTTAAGAATAGGCTAGTG
HP-06 F	GCCGAGGTACATGTATCTGT
HP-06 R	ATGTCTCTGCTTAGCACTCA
HP-07 F	CTGCTTTTGCTAGGTGCACATC
HP-07 R	GGAGTCACGATTAAACTGTACA

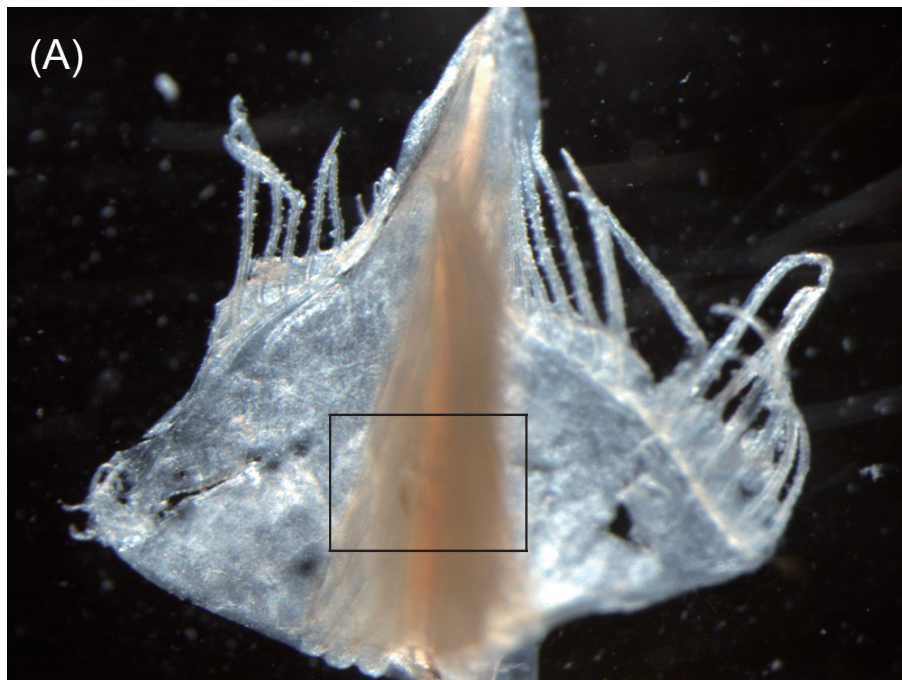


図 4. 頭部腹側から見たハチェック窩.  
(A): ナメクジウオ頭部の口被蓋を開いた全体像. (B): (A) で四角で  
囲んだ領域の拡大写真. 矢印はハチェック窩を示す.

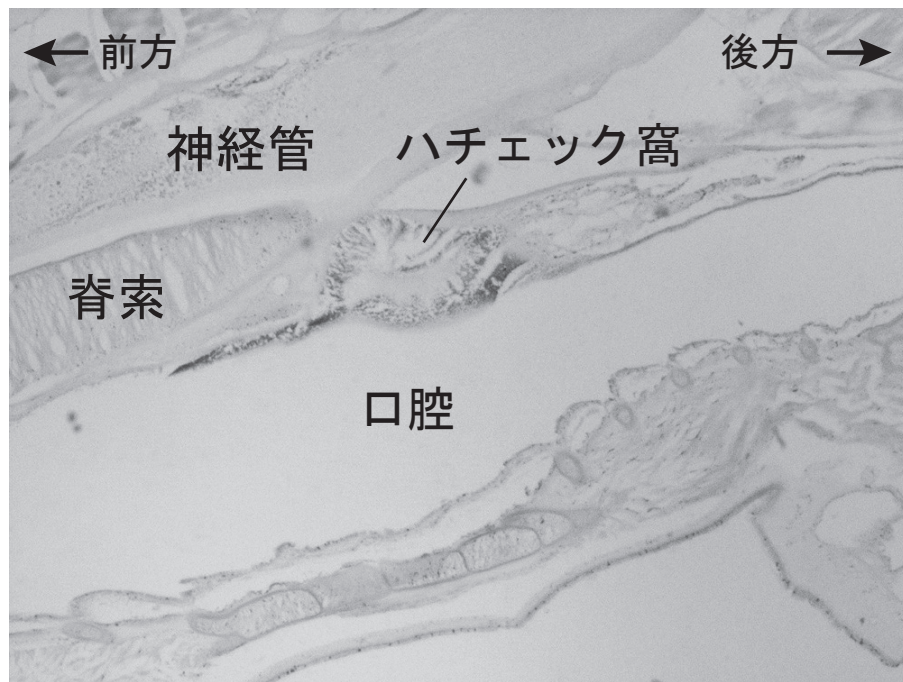


図5. ナメクジウオ頭部の左右軸に対する垂直断面から見たハチェック窩の形態. ヘマトキシリン - エオシン染色後の200倍での観察像.

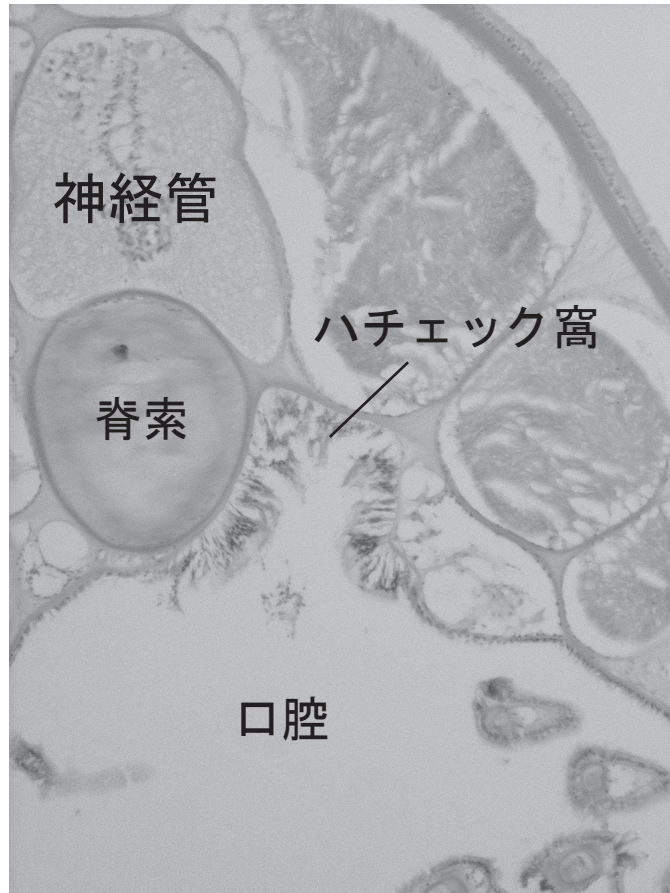


図 6. ナメクジウオ頭部の前後に対する垂直断面から見たハチエック窩の形態. ヘマトキシリン - エオシン染色後の 200 倍での観察像.

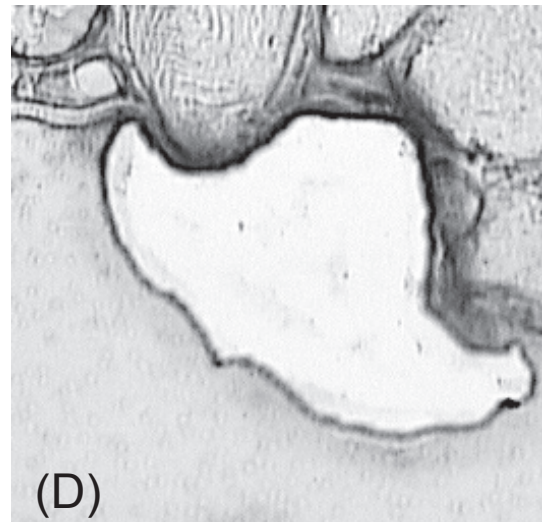
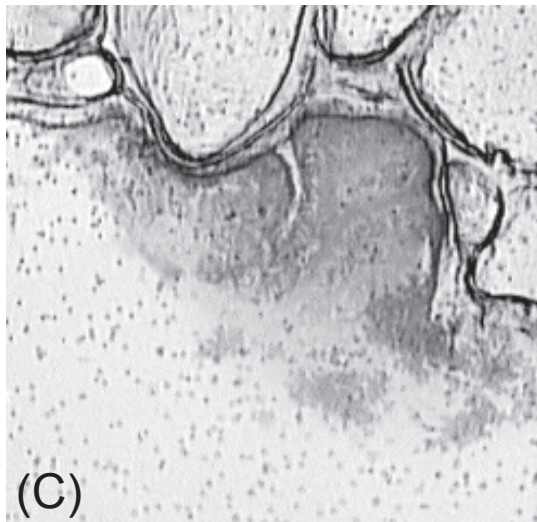
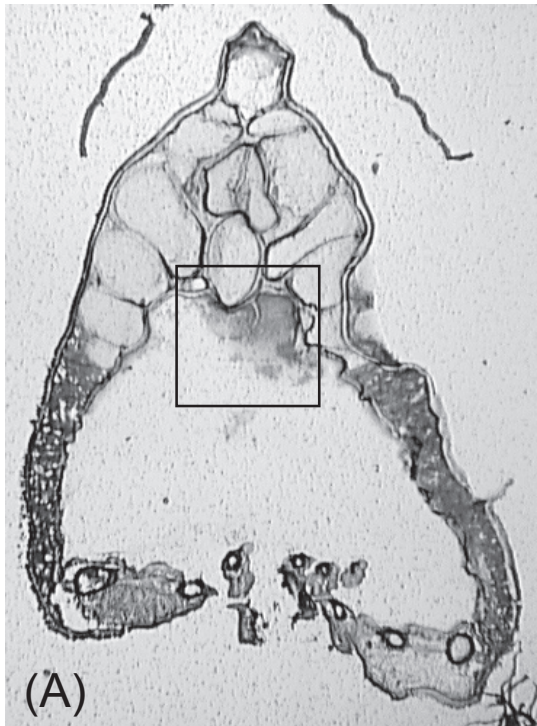


図7. レーザーマイクロダイセクションで切り出した切片。  
(A)：切り出し前のハチェック窩を含む頭部切片。(B)：ハチェック窩を切り出した後の頭部切片。(C)：(A)の四角で囲んだ領域の拡大図。(D)：(B)の四角で囲んだ領域の拡大図。



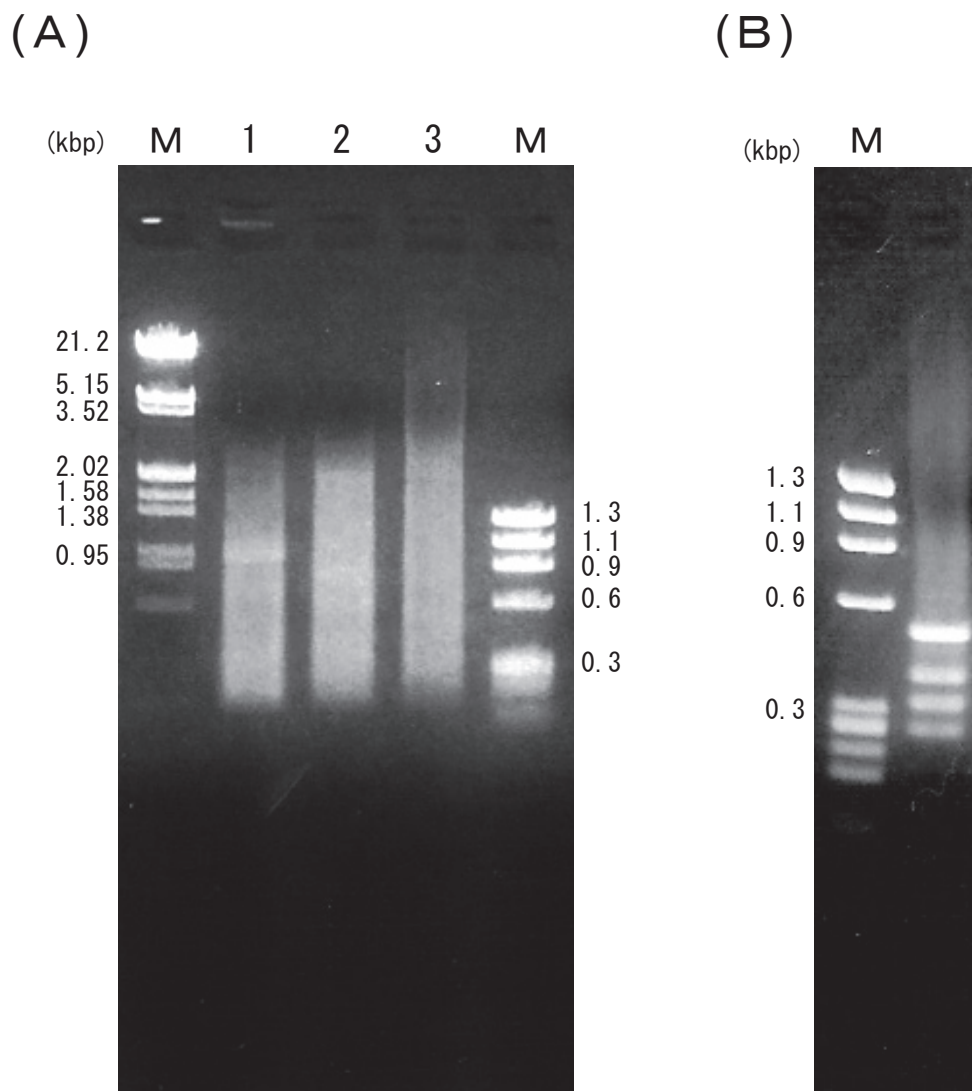


図 8. cDNA ライブラリーの電気泳動像.

(A) : cDNA 両末端に付加した塩基配列に対するプライマーを用いた PCR 増幅産物の電気泳動像. 1: コントロールに用いたヒト胎盤由来の cDNA を鋳型とした増幅産物, 2: ナメクジウオ筋肉由来の cDNA を鋳型とした増幅産物, 3: ナメクジウオハチェック窩由来の cDNA を鋳型とした増幅産物. (B) : サブトラクション後の cDNA を鋳型とするアダプター配列に対するプライマーを用いた PCR 増幅産物の電気泳動像. M: DNA 分子マーカー.

表 2 . サブトラクションで得られた遺伝子 .

クローン 番号	塩基の長さ (bp)	塩基配列の相同性が高い 遺伝子を持つ動物種
163	695	<i>Branchiostoma floridae</i>
618	344	<i>Branchiostoma floridae</i>
41B	354	<i>Branchiostoma floridae</i>

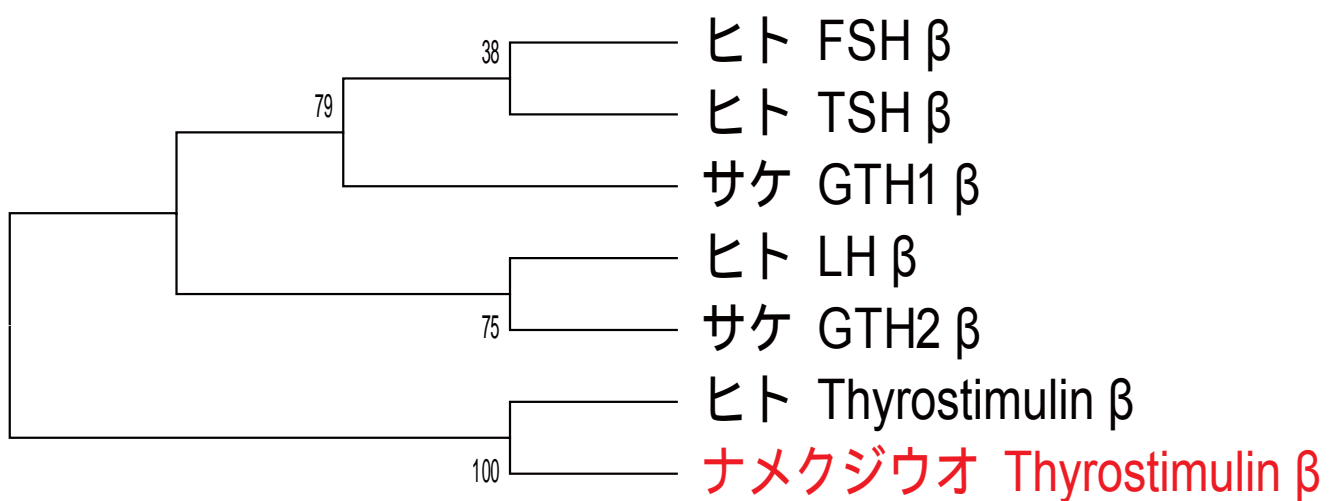


図9．糖タンパク質ホルモン $\beta$ 鎖のアミノ酸配列の相同性．  
 系統樹の数字は，近隣結合法による系統推定1000回試行におけるブートストラップ確率を示す．ナメクジウオ Thyrostimulin を赤で示す．FSH: 濾胞刺激ホルモン，TSH: 甲状腺刺激ホルモン，GTH: 生殖腺刺激ホルモン，LH: 黄体形成ホルモン．

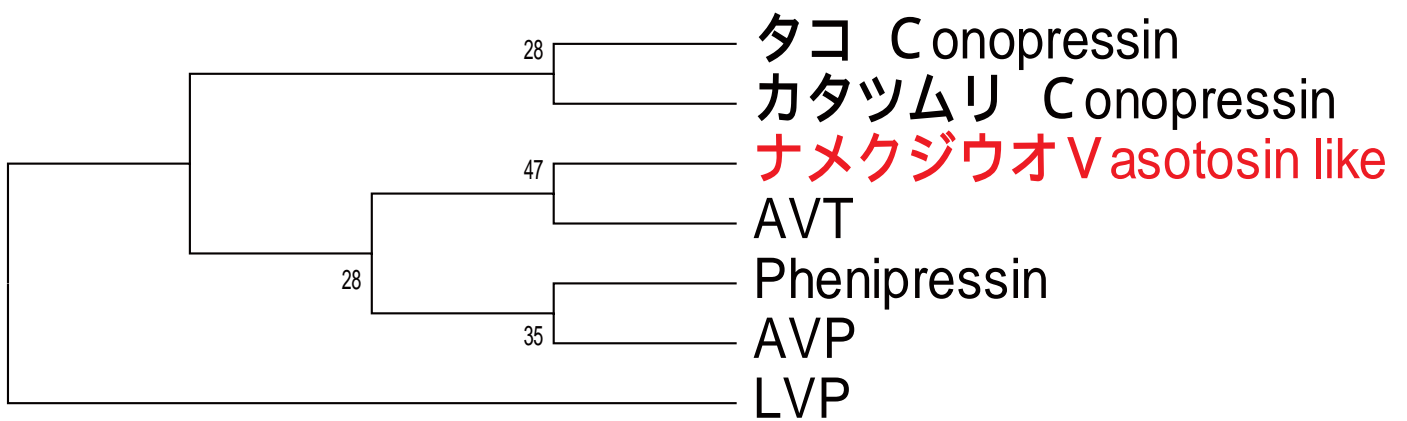


図 10 . バソプレシンファミリーのアミノ酸配列の相同性 .  
 系統樹の数字は近隣結合法による 1000 回試行におけるブートストラップ確率を示す . ナメクジウオ Vasotosin like 様遺伝子を赤で示す . AVT: アルギニンバソトシン , AVP: アルギニンバソプレシン , LVP: リジンバソプレシン .

哺乳類	1	QHWSYGLRPG	10
ニワトリ-2	1	QHWSYGLQPG	10
ニワトリ-1	1	QHWSHGWYPG	10
サケ	1	QHWSYGWLPG	10
ナマズ	1	QHWSHGLNPG	10
サメ	1	QHWSHGWLPG	10
ヤツメウナギ-1	1	QHYSLEWKPG	10
ヤツメウナギ-2	1	QHWSHDWKPG	10
カタユウレイボヤ-1	1	QHWSYEFMPG	10
カタユウレイボヤ-2	1	QHWSNQLTPG	10
カタユウレイボヤ-3	1	QHWSYEYMPG	10
カタユウレイボヤ-4	1	QHWSKGYSPG	10
カタユウレイボヤ-5	1	QHWSYALSPG	10
カタユウレイボヤ-6	1	QHWSLALSPG	10
ナメクジウオ-1	1	QHWNIKEKPG	10
ナメクジウオ-2	1	QHWNIKENPG	10

図 11. 生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) のアミノ酸配列の多重整列解析. ナメクジウオの GnRH を赤で示す. 緑: 全ての種で同じアミノ酸, 黄: 性質が似ているアミノ酸.

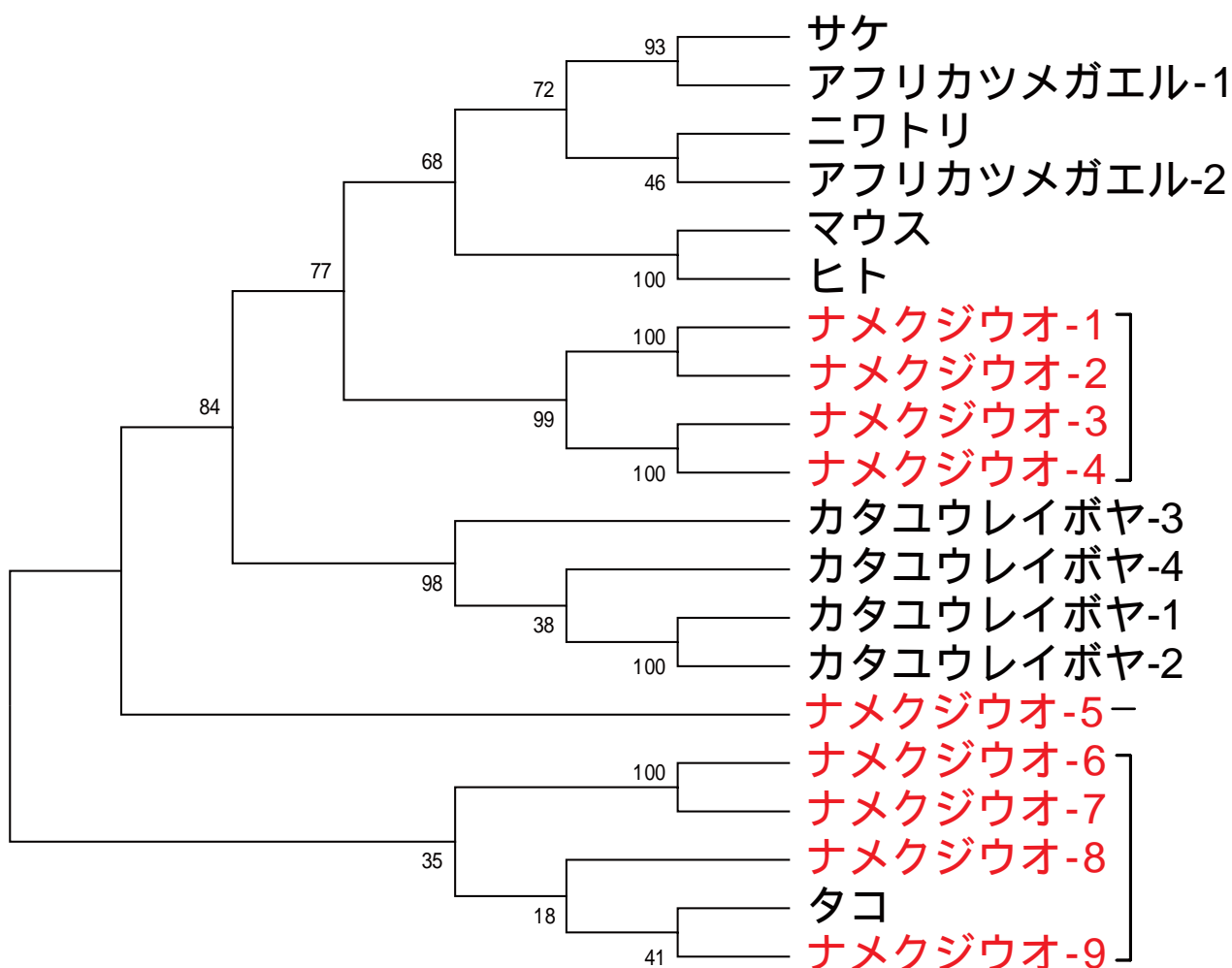


図 12 . 生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体 (GnRHR) のアミノ酸配列の相同性 .  
 系統樹の数字は近隣結合法による 1000 回試行におけるブートストラップ確率を示す .  
 ナメクジウオの GnRHR を赤で示す .

# ナメクジウオの環境刺激の受容と内分泌機構に関する研究

2007年3月 自然環境学専攻 海洋生命環境学分野 56715 丹藤 由希子  
指導教員 教授 窪川かおる

キーワード；ナメクジウオ、ハチェック窩、下垂体、化学受容機構、進化

## 背景と目的

動物が生きる上で、環境中の刺激を受容して生体内の調節を行う機構は不可欠であり、その機構の一つが内分泌機構である。脊椎動物は、下垂体という独自の内分泌器官を持っている。その発生初期には外部環境と接する形態をしていることから、下垂体は化学受容器官から内分泌器官に進化の過程で変化してきたと考えられてきた。そして、下垂体の上位に位置して下垂体のホルモン合成・分泌を制御している脳の視床下部の働きは、下垂体とともに脊椎動物への進化で獲得されたとされる。この下垂体の発生初期の形態に類似する器官を脊索動物門頭索動物亜門に属するナメクジウオのハチェック窩に見ることができる。ナメクジウオは無脊椎動物であるが、脊椎動物に近縁な動物である。ハチェック窩には電子顕微鏡観察によるペプチド分泌顆粒の存在、口腔に接しているという特徴がある。顆粒の存在は内分泌器官であることを、外部との接触は環境刺激の受容器官であることを示すものである。そこで、本研究はハチェック窩が環境受容する内分泌器官として下垂体の起源である可能性を解明することを目的とする。そのためにハチェック窩の詳細な形態観察を行い、環境受容器官である可能性を確認するとともに、分子生物学的手法を用いてナメクジウオの下垂体ホルモン遺伝子の存在を検証した。

## 研究方法

### ハチェック窩の形態観察

ナメクジウオ生体の頭部にある口腔を開いて実態顕微鏡下でハチェック窩を観察した。また、ナメクジウオ頭部のパラフィン切片を作製し、前後軸に対して垂直方向、左右軸に対して垂直方向から見たハチェック窩の形態を観察した。

### ハチェック窩における遺伝子発現解析

ナメクジウオ頭部の凍結切片からレーザーマイクロダイセクションでハチェック窩を摘出し(図1) サブトラクション法を用いて cDNA ライブラリーを作製した。得られた遺伝子の塩基配列解析を行い、データベースとの相同検索により遺伝子の推定を行った。

### ゲノムデータベースを用いた下垂体ホルモン遺伝子の探索

同属別種のフロリダナメクジウオ *Branchiostoma floridae* のゲノムデータベース上で、脊椎動物の下垂体ホルモン遺伝子の配列を使ってナメクジウオで相同な遺伝子の探索を行った。

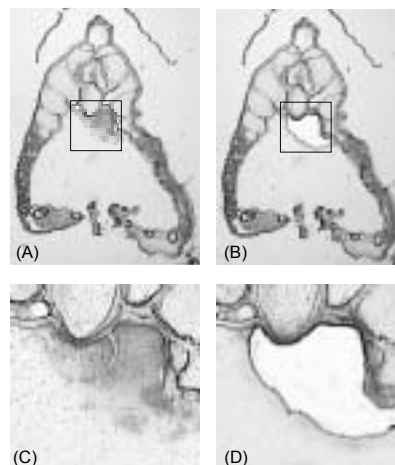


図1 レーザーマイクロダイセクションで切り出した切片。(A): 切り出し前のハチェック窩を含む頭部切片。(B): ハチェック窩を切り出した後の頭部切片。(C): (A)の四角で囲んだ領域の拡大図。(D): (B)の四角で囲んだ領域の拡大図。

## 結果および考察

### ・ハチェック窩の形態

ハチェック窩は頭部中ほどの下部に位置し、口腔に露出した形態をしていた。また、ハチェック窩が口腔側から神経管側にかけて、複数の細胞群で構成されていることが確認できた。ここから、ハチェック窩は領域によつての機能の分化があることが推測できる。

### ・ハチェック窩の遺伝子発現解析

レーザーマイクロディセクションを用いてサブトラクション法により作製した cDNA ライブラリーから、3 種類の遺伝子が得られた。これらは既知の生体タンパク質との類似性はなく、サブトラクションで期待していた下垂体に関する遺伝子の獲得はできなかった。その原因として、1) ライブラリー作製に用いたサンプル量が少なかった、2) 作製の操作中に行う PCR 増幅回数が多かったため、DNA の増幅にバイアスがかかった、3) サブトラクション反応が十分でなかったことが考えられる。

3 遺伝子をデータベースで相同性検索した結果は *Branchiostoma floridae* の遺伝子と最も相同性が高かったが、塩基配列が一致する割合は低いため、データベースの遺伝子と同一のものではない。データベースの遺伝子もタンパク質としての機能が解明されていないものであったため、得られた遺伝子の詳細は分からなかった。

### ・ナメクジウオゲノム検索による内分泌ホルモン遺伝子の解析

*B. floridae* のゲノムデータベース上で下垂体ホルモン遺伝子を検索した結果、Thyrostimulin β鎖と相同性の高い遺伝子が見つかった(図2)。Thyrostimulin β鎖は、ヒトの脳や下垂体に発現し、α鎖と二両体を形成して甲状腺刺激ホルモン受容体に結合する。

さらに、下垂体機能に関連した3種類のホルモン遺伝子が見つかった。甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、バソプレシンファミリー、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンに類似するペプチドの前駆体遺伝子である。脊椎動物では下垂体に存在する生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体様遺伝子は複数種見つかかり、アミノ酸配列の相同性から4つのグループに分けられた。機能については今後の解析が必要であるが、これらの遺伝子の存在はナメクジウオに視床下部-下垂体系の起源となる機構が存在することを示唆するものである。

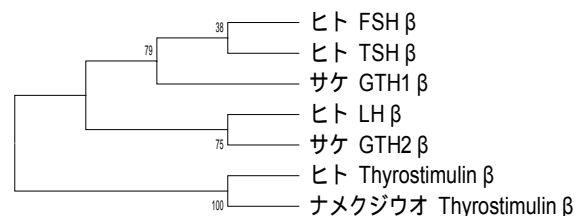


図2. 糖タンパク質ホルモンβ鎖のアミノ酸配列の相同性。系統樹の数字は、近隣結合法による系統推定1000回試行におけるブートストラップ確率を示す。ナメクジウオThyrostimulinを赤で示す。FSH: 濾胞刺激ホルモン、TSH: 甲状腺刺激ホルモン、GTH: 生殖腺刺激ホルモン、LH: 黄体形成ホルモン。

## まとめ

外部環境を受容し、その刺激を液性情報として生体内に伝える仕組みが内分泌機構の始まりであるという大きな仮説に対して、ナメクジウオのハチェック窩がそれを検証する一つになりうるということがさらに強く示唆された。ナメクジウオに視床下部、下垂体機能に関する遺伝子を見つけたことは、視床下部-下垂体系の起源となる機構が存在する可能性を十分考えうるものである。形態、遺伝子の構造から見ても脊椎動物との共通性が多いナメクジウオの存在は、進化における環境受容機構と生体調節機構の変遷過程を明らかにする動物として重要である。ナメクジウオのゲノムが解読され、ハチェック窩を含む様々な器官の機能を解明する役者がそろった今、更なる研究の発展が期待される。



# Studies on chemoreceptive and endocrine organs in amphioxus

Mar. 2007, Department of Natural Environment Studies,  
Marine Life Science and Environment,  
56715 TANDO Yukiko  
Supervisor; Professor, KUBOKAWA Kaoru

Keywords: Amphioxus, Hatschek's pit, Pituitary, Chemoreceptive mechanism, Evolution

## I Background and Objection

In process of evolution, the endocrine system of a pituitary is considered to be developed from a chemosensory system which receives chemical stimuli in environment through chemoreceptors. The endocrine system is necessary for physiological regulations in the entire animal kingdom. One of endocrine systems, hypothalamus-pituitary system exists in only vertebrates and is considered to be established during the evolution from invertebrates to vertebrates. The morphological and developmental similarities between a pituitary in vertebrates and a Hatschek's pit in amphioxus, which belongs to subphylum Cephalochordata and a sister group of Vertebrata, are well known in textbooks of endocrinology. In morphological observation, Hatschek's pit is characterized in presence of peptide secretory granules which indicate the presence of endocrine function, and the direct contact to the oral cavity which is supposed to have a chemoreceptive mechanism. It is suggested that the Hatschek's pit might be work on endocrine function and environmental sensory organ. This study is focused on the function of Hatschek's pit. To accomplish this purpose, I demonstrate morphological characteristics of the pit, and attempt to obtain the genes related to the pituitary function by using molecular biological techniques.

## Materials and methods

### . Morphological observation of Hatschek's pit

From the view of ventral part of the amphioxus head, Hatschek's pit was observed by a stereoscopic microscope. Series of cross and sagittal sections of amphioxus heads are prepared and then confirmed a special position of the pit.

### . Subtractive cloning of genes in Hatschek's pit

Parts of Hatschek's pit in amphioxus head were dissected from the frozen sections using a laser microdissection method (Fig. 1). The cDNA library subtracted between the dissected samples of pits and muscle tissues were constructed from each of PCR amplified cDNA. Obtained clones were sequenced, and the distinguished sequences were subjected to a search for sequence homology in DNA databases.

### . Survey of brain and pituitary hormone genes in genome database of amphioxus

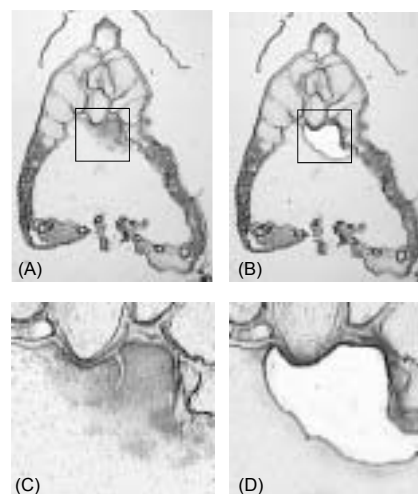


Fig. 1. Dissected tissue sections by laser microdissection.  
(A): Head section containing Hatschek's pit, before dissect.  
(B): Head section containing Hatschek's pit, after dissect.  
(C): Enlarged figure of (A), surrounded by square. (D): Enlarged figure of (B), surrounded by square.

The brain and pituitary hormone genes were surveyed in the database of *Branchiostoma floridae* established in Joint Genome Institute (JGI) USA, using known DNA sequences of vertebrates as query sequences.

## Results and discussions

### . Morphology of Hatschek's pit

Hatschek's pit is located on posterior from middle of the amphioxus head and exposed to oral cavity. The pit is positioned in the right side of a notochord and below a neural tube and divided to several portions with structurally discriminated cells. It is suggested that the pit has multiple functions depending on the regions.

### . Gene expression analysis of Hatschek's pit

Three different genes were obtained from the subtracted cDNA library of Hatschek's pit. These genes were confirmed as homologous genes of amphioxus by a database search. However, they are different genes reported in draft genome sequences of *Branchiostoma floridae*, and also not the pituitary related genes expected in this approach. Considerable reasons of insufficient results are as follows. 1) Amount of tissue samples used as a starting material was too small to construct the highly qualitative cDNA library. 2) Repeated PCR caused the biased amplification and I lost the required unique genes. 3) The condition for subtractive hybridization might be not enough to select the unique genes from the pit.

### . Survey of pituitary hormone genes on the genome database of amphioxus

Highly homologous gene to a thyrostimulin  $\beta$  subunit was found in the *B. floridae* genome database (Fig. 2). In a human thyrostimulin  $\beta$  subunit, the precursor gene expresses in brain and pituitary, and bind to thyroid stimulating hormone receptors as a heterodimer with  $\alpha$  subunit.

Moreover, three genes related to the function of pituitary were found in the genome database. Each of genes showed similarity with precursor genes for thyroid stimulating hormone releasing hormone, vasotocin and gonadotropin releasing hormone. Genes for gonadotropin releasing hormone receptor were also found. These results suggest that the origin of hypothalamus - pituitary system might be presented in amphioxus.

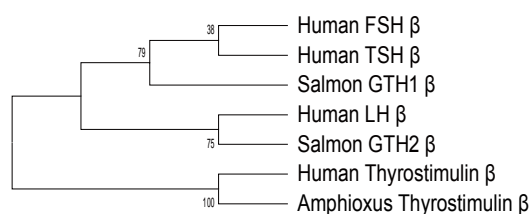


Fig. 2. Amino acid homology of glycoprotein  $\beta$  subunit. Numbers on phylogenetic tree are bootstrap values obtained for 1000 replications using Neighbor-Joining method. FSH: Follicle stimulating hormone, TSH: Thyroid stimulating hormone, GTH: Gonadotrop stimulating hormone, LH: Luteinizing hormone.

## Conclusion

Hatschek's pit of amphioxus is the good model to verify the hypothesis that the endocrine system is originated from the function of receiving environmental stimuli. The finding of genes related to the hypothalamus and pituitary supposes the presence of a hypothalamus - pituitary system in amphioxus. In anatomically and physiologically, amphioxus has homologous profiles to vertebrates, so this animal is essential to reveal the evolution of endocrine mechanism which is considered to evolve from chemoreceptive mechanism in the aspect of molecular and cellular regulation system. Studies on amphioxus are important to progress the understanding of the evolution from invertebrates to vertebrates.