

論文の内容の要旨

Histological and molecular developmental studies on the regeneration of digestive tract in the sea cucumber *Eupentacta quinquesemita*

(ナマコ綱イシコの消化管再生における組織学および分子発生的研究)

氏名 岡田 朱理

序論

“再生”とは欠失した体の部位を周囲の組織から再形成し、機能的な部位を再獲得する現象であり、多くの動物で研究されている (Goss, 1969). 後口動物である棘皮動物においてもヒトデの腕や盤の再生に見られるように再生能力が高いことが知られる。ナマコ綱の多くの種では、捕食者に襲われると自らの内臓を放出することで防衛を行うため、放出後には消化管の再生が必須である。しかしこれまでに様々な種を用いた研究が行われているにもかかわらず、消化管再生の機構については未解明である (Mashanov and Garcia-Arraras, 2011; Garcia-Arraras and Greenberg, 2001).

内臓放出には、ナマコの系統により前方放出と後方放出に大別される。これらは内臓を放出する方向と放出する部位に違いがある。樹手目が行う前方放出では、腸間膜と消化管の中で最も後方にある総排出腔を残して、体の口側から消化管や環状神経、触手をも放出する。楯手目が行う後方放出では、体の後方から食道と総排出腔の間にある消化管部位のみを放出する。後方放出の場合、前後に残った元の消化管から再生が始まることが知られる (Garcia-Arraras et al., 1998; Leibson, 1992, Mashanov and Garcia-Arraras, 2011) が、前方放出の場合、前方には消化管組織は残っておらず、機能的な消化管が再生する詳細な過程は分かっていない (Mashanov et al., 2005).

そこで本研究では、樹手目に属し前方放出を行うイシコ *Eupentacta quinquesemita* を対象として消化管再生過程の組織学的な観察と、考えられる分子発生的機構に関わる遺伝子の発現解析を行い、消化管再生のメカニズムを明らかにすることを試みた。

Chapter 1 消化管再生過程の内部形態および組織学的観察

イシコの消化管は、内臓放出により口器と体壁の間、総排出腔と第二下行腸の間、さらに腸

間膜と消化管の結合部分で組織が切断される。内部形態の観察から、再生組織は先行研究と同様に 2 方向から形成され、腸間膜に沿って新しい消化管を形成することが確認され、I 内臓放出直後、II 口側再生組織の形成、III 反口側再生組織の形成と管の伸長、IV 再生組織同士との結合、の 4 つのステージを定義した。また、ステージごとに組織学的観察をした結果、ステージ I では内臓放出直後の腸間膜上には再生組織らしいものは見られないが、ステージ II では前方の腸間膜の肥厚が観察された。ステージ III では前方の肥厚した腸間膜の間充織中に複数の小さな管や上皮様の組織が見られ、後方の再生組織中には総排出腔から連続して伸びている閉じた管が観察された。ステージ IV では内部形態の観察において再生組織が結合しているように見えた個体であっても、消化管自体は不連続である場合も確認された。腸間膜または体壁由来の肥厚した組織中に上皮様の組織が見られたことから間充織上皮転換 (MET) が起きていることが示唆された。

Chapter 2 消化管再生過程における MET 関連遺伝子と発生関連遺伝子の発現

詳細な組織観察により、イシコの消化管再生において残存された腸間膜または体壁由来の肥厚組織中で MET が起こり消化管を再生することが示唆されたため、MET への関与が知られている因子 (twist, snail などの転写因子および細胞接着に関わる cadherin) の発現パターンをリアルタイム qPCR 法により解析することを試みた。イシコの発生中の複数ステージの胚から total RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を行い、遺伝子データベースを構築した。オルソログ解析 (reciprocal Blast および分子系統解析) により、他種で知られる目的遺伝子のオルソログを同定することに成功した。組織観察による消化管再生ステージに基づき、前方と後方の再生部位それぞれについて RNA を抽出し qPCR を行ったところ、MET 関連因子のうち、twist は再生過程のごく初期から前方の組織で発現上昇し次第に減少してくることが明らかとなった。in situ ハイブリダイゼーションにより、再生の初期ステージの腸間膜組織で発現の局在が見られており、組織観察から示唆された MET の関与を裏付ける結果が得られている。

また、棘皮動物の消化管は部位によって形態や機能が分化しており、消化管再生過程においても部位の分化が行われると考えられる。失われた管状の構造が MET により再生されることは明らかとなったが、その後どのようにして機能的な消化管へと分化するかは未知である。そこで、特に棘皮動物の他の種において、消化管部位の分化に必要であることが知られる Hox 遺伝子および Parahox 遺伝子を上記と同様の方法により同定し、リアルタイム qPCR による発現解析を行った。遺伝子により発現パターンに違いがあるものの、MET 関連因子よりも遅れて発現が上昇する遺伝子がいくつか確認され、さらに既に知られる前後の局在パターンを示すことが明らかとなった。これにより、内臓放出により失われた消化管はまず、腸間膜組織や間充織から管状構造が構築され、その後でパターンニング遺伝子により部位のアイデンティティーが与えられることが示唆された。これらのパターンニング遺伝子の発現時期は、MET 関連遺伝子の発現時期と重なっているが、おそらくこれは、MET によ

る消化管再生が全て完了した後でパターンニングが起こるのではなく、管構造が再形成された部位において次々に分化も起こっていくことによると考えられる。このことは、組織観察の結果とも合致している。

Chapter 3 消化管再生過程における中枢神経系の再構築

前方放出を行うイシコでは、内臓放出により、前方（口側）に位置する環状神経、触手も全て失ってしまう。特に口器の周囲を取り巻く環状神経は、棘皮動物では中枢神経と考えられており、これが失われ、また再生をすることは驚くべき事実である。そこで、脊椎動物の頭部形成や棘皮動物の神経の発生に関わるとされる遺伝子（*otx*, *pax6*, *six3/6*など）についても同様に発現解析を行った。これらの遺伝子のうち、特に中枢の形成に関わるものについては、前方での発現上昇が顕著であった。現在神経組織の再生過程についても組織学的な観察を行っており、観察結果と合わせて神経系の再生についての考察を行う予定である。

結論と展望

棘皮動物ナマコ綱の多くの種で内臓放出という特異な防御機構を備えるが、本研究の結果から、最も多くの部位を失う前方放出のナマコについて、放出後の再生過程とそれに関わる分子発生機構の一端を明らかにした。イシコにおいては残された腸間膜と体壁から間充織様の細胞集団が形成され、その中で間充織上皮転換（MET）が生じること、さらに新生された未分化な管状組織はパターンニング遺伝子の働きにより消化管部位の分化が生じることが示唆された。このようなプロセスを経て完全に機能的な消化管を再生できることが、ナマコという特異な生態的特徴を有する海産動物の進化に繋がったと推測される。また、本研究により明らかにされた機構は、再生医学など応用的側面からも有意義なものとなる可能性も考えられる。