

論文の内容の要旨

論文題目：Nutrient absorption in the developing embryo of oviparous
cloudy catshark, *Scyliorhinus torazame*

(卵生軟骨魚類トラザメの胚発生期における消化吸収機構に関する研究)

氏名 本田 祐基

全ての動物は餌を食べ消化吸収することで生存に必要なエネルギーを得ている。消化吸収の主要な器官は腸であるが、胚発生期の個体では消化器官が未発達であるため、異なる方法で栄養を得る必要がある。卵生の動物は卵黄から、胎盤を持つ哺乳類では母親から血液を介して栄養を吸収する。適切な栄養吸収は正常な胚発生にとって必須であり、そのメカニズムの理解は重要な課題である。

軟骨魚類は真骨魚類と異なり体内受精を行い、産仔数が少なく発生期間が長い。また、繁殖様式も卵生から胎生まで多様である。長期間の胚発生期における成長と、これを達成するための栄養吸収機構が重要であるものの、胚自身がどのようにして栄養を消化吸収しているのかはほとんどわかっていない。その原因として、特に胎生種では適切な時期に継続的にサンプルを得ることが困難なことが挙げられる。そこで本研究では、卵生種のトラザメ (*Scyliorhinus torazame*) をモデル動物として、軟骨魚類の胚発生期における栄養吸収機構の研究を行った。近年、トラザメのゲノム・トランスクリプトーム情報が公開された。水族館との共同研究により多数の受精卵を得ることができ、さらには近縁種において発生段階

表が作成されている、などの利点がトラザメにはある。トラザメの卵は固い卵殻に包まれ、産み落とされてから約半年をかけて発生し、孵化する。この途中、およそ二ヶ月が経過したところで、卵殻の一部が開き、卵殻内に海水が流入するようになる「プレハッチ」と呼ばれる現象が起きる。プレハッチ後も胚は卵殻内に留まり成長し、孵化に至る。

本研究の第一章では、主要な栄養吸収器官であり、軟骨魚類に特徴的な「らせん腸」の発達を、形態と機能の観点から調べた。第二章では、卵を包む卵黄嚢上皮 (Yolk sac membrane, YSM) に着目し、YSM と腸で消化吸収に関わる遺伝子の網羅的探索を行い、胚発生期を通じた消化吸収機構の発達を調べた。

【1. トラザメらせん腸の機能的・形態的発達】

腸は栄養吸収器官であり、哺乳類や真骨魚では腸管を細長くすることで表面積を増やしている。一方、軟骨魚類のらせん腸は太くて短いものの、内部にらせん状の腸壁が発達することで表面積を増やしている。このらせん腸が胚発生過程でどのように作られ、機能し始めるのかはよくわかっていなかった。

まず、様々な発生段階の胚の組織連続切片を元に腸管の三次元立体構築を行った。発生段階表ステージ 31 の途中でプレハッチが起きるため、プレハッチより前をステージ 31E、後をステージ 31L と定義した。ステージ 23 では直線状だった腸管腔がステージ 24 かららせんを巻き始め、プレハッチ前のステージ 31E では親魚と同じ巻き数になることがわかった。プレハッチ後のステージ 32 では、腸管内に卵黄が検出されたため、胚体外卵黄嚢に蓄えられている卵黄が腸内に流入するタイミングを調べた。プレハッチ前には、胚体と卵黄嚢を繋ぐ卵黄柄内に卵黄流入を防ぐ膜状構造が観察されたのに対し、プレハッチ後、遅くとも 48 時間以内には膜状構造が崩壊し、卵黄柄を通して卵黄が腸管内に直接流入することがわかった。表面積を増やす構造である微絨毛はプレハッチ前から形成され、絨毛ヒダはプレハッチ後に形成されることがわかった。微絨毛、絨毛ヒダともに、発生の進行とともに発達して表面積が増大していくことも明らかとなった。一方で、食道や直腸は、胚が卵殻から出て餌を食べ始めるまで開口せず、口から総排泄腔までの消化管の中で、プレハッチ後には腸のみが機能することもわかった。

次に、栄養吸収機能の指標としてペプチド輸送体 PepT1 と中性アミノ酸輸送体 Slc6a19 を同定し、その mRNA 発現を調べたところ、腸管に卵黄が流入したステージ 32 以降、特に PepT1 の発現が上昇した。らせん腸全体における局在を調べたところ、ステージ 32 では腸全体に発現が見られたのに対し、ステージ 34 と稚魚では前方に偏った発現を示すことがわかった。一方 Slc6a19 は腸全体で発現する傾向を示したが、発生の最終段階であるステージ 34 ではらせん腸の最後部できわめて強い発現を示した。PepT1 と Slc6a19 の結果から、腸の前方でジペプチド・トリペプチドを吸収するのに対し、より消化の進んだアミノ酸を腸の後方で吸収していることが示唆された。特にステージ 34 における Slc6a19 の最後部での強い発現は、限られた栄養を最大限に吸収するためのしくみであると考えられた。

【2. トラザメ胚発生期の卵黄嚢上皮および腸における消化吸収遺伝子の発現解析】

第一章では、トラザメ胚がプレハッチと同時に卵黄を腸に入れ、機能的になった腸で卵黄を吸収することを見出した。プレハッチより前の栄養吸収は、他の卵生動物同様に YSM で行われると考えられる。また、胚体外卵黄嚢はプレハッチ後徐々に退縮し、ステージ 34 では痕跡的になる。そのため、プレハッチより前は YSM が栄養吸収の場であり、プレハッチ後は YSM の栄養吸収機能が徐々に低下し、YSM から腸への機能のシフトが起こるのではないかと考えた。このことを明らかにするため、胚発生期全体を通した消化吸収の全貌を調べることを目的とした。

プレハッチ前の YSM ならびにプレハッチ後の YSM と腸の RNA-seq を行い、卵黄の主成分であるタンパク質と脂質の消化吸収に関わる遺伝子の網羅的探索を行った。その結果、多数のアミノ酸輸送体、脂質代謝関連遺伝子、リソソーム消化酵素を同定することができた。得られたターゲット遺伝子について、発生段階を追って YSM と腸での mRNA 発現変化を調べた。その結果、腸での消化吸収遺伝子の発現はプレハッチ以降に上昇し、吸収機能が備わっていく様子が見られた。一方、予想に反して、多くの消化吸収遺伝子が、YSM においても発生後期に発現を上昇させることが明らかになった。胚体重量と卵黄重量はプレハッチまでは大きな変動を示さず、プレハッチ後のステージ 32 から胚体重量が有意に増加した。第二章で明らかにした消化吸収遺伝子の発現パターンと合わせると、プレハッチまでは器官形成は行われるものの成長量は少なく、プレハッチを境に腸と YSM を併用して栄養吸収を活発にし、成長が促進されることを見出した。

哺乳類の腸上皮細胞では、頂端膜と側基底膜にそれぞれ異なるアミノ酸輸送体が存在し、頂端膜タイプのアミノ酸輸送体が腸管腔からアミノ酸を吸収し、側基底膜タイプのアミノ酸輸送体が上皮細胞から毛細血管へとアミノ酸を運ぶことがわかっている。トラザメ胚・稚魚の腸においても、プレハッチ後には両方のタイプのアミノ酸輸送体発現が上昇し、哺乳類と同様のアミノ酸吸収メカニズムが用いられていることが示唆された。一方 YSM では側基底膜タイプに比べて頂端膜タイプの輸送体発現が少ないことがわかった。腸における主要な頂端膜タイプの輸送体である PepT1、Slc6a19 がともに発現しておらず、YSM では腸とは異なるアミノ酸吸収メカニズムが使われていることが示唆された。アトランティックシャープノーズシャーク胚での先行研究と同様、トラザメ胚の YSM では内胚葉細胞にエンドサイトーシスによって卵黄顆粒が取り込まれることが透過型電子顕微鏡観察により観察され、細胞内で消化されて生じたアミノ酸が側基底膜タイプのアミノ酸輸送体を介して血中に放出されているのではないかと考えた。側基底膜タイプの中性アミノ酸輸送体 Slc43a2、脂質の輸送に関わる Apolipoprotein B およびリソソーム消化酵素 Cathepsin L1 は、いずれも YSM の内胚葉細胞に発現が局在しており、内胚葉細胞の消化吸収への寄与が示唆された。

本論文では、プレハッチまでにらせん腸が形成され、プレハッチを境にして卵黄が流入して腸が機能的になること、YSM での消化吸収機能も発生後期に活発となり、腸と YSM を

併用して栄養吸収を行うようになるなど、卵生軟骨魚類の胚発生期を通した消化吸收機構を明らかにした。これまでプレハッチとは、卵殻が開いて海水が流入し、胚の呼吸に寄与することや、大きくなる胚体のスペースを確保することが利点だと考えられてきた。しかし本研究の結果から、プレハッチとは胚の消化吸收機能にとって大きな転換点であることがわかった。プレハッチが起きるステージ31では、胚が海水を吸い込むようになり、鰓を使った呼吸が始まることや、肝臓に尿素合成機能が備わり始めることが報告されている。すなわち、プレハッチとは胚体が生理学的に機能し始める発生イベントであると考えられる。胚体が外環境に晒されるようになることから、プレハッチとは生理学的には真骨魚における孵化に相当し、卵生軟骨魚では孵化後の仔魚が安全な卵殻内で引き続き成長する、といえるのかもしれない。卵殻内で大きく成長した仔魚は孵化時点ですでに親と似た姿かたちになっており、捕食者として摂餌をすることができる。多産多死である真骨魚に対して、少産少死の戦略を取る軟骨魚類が、胚を無事に大きく成長させるための適応なのではないだろうか。本研究の成果は軟骨魚類胚の消化吸收機構、さらには生活史の適応戦略を理解する上で重要な知見である。