

# 還元環境における脊索動物の環境適応に関する研究

2008年3月 自然環境学専攻 海洋生命環境学分野 076704 稲葉真由美

指導教員 窪川かおる 教授

キーワード ; ナメクジウオ, 鯨骨環境, 甲状腺, 内柱, ヨウ素, SPring-8

## 1. 背景と目的

頭索動物亜門ナメクジウオは、我々ヒトと同じ脊索動物門に属する海産無脊椎動物で、脊椎動物への進化やその起源を考える上で重要な位置にある生物である。研究に用いられているナメクジウオ、*Branchiostoma* がよく知られているが、2003年7月に鯨遺骸から新種のゲイコツナメクジウオ *Asymmetron inferum* が発見されている。海底に沈む鯨遺骸は、熱水噴出域や冷水湧出域と同様な極限環境にあり、化学合成細菌に始まる化学合成共生システムが形成されている。ゲイコツナメクジウオは「内柱」が他のナメクジウオよりも肥大している特徴をもつ。内柱はヨウ素を取り込むことから、脊椎動物に固有な甲状腺の相同器官であると考えられている。甲状腺は生体の代謝調節や遺伝子発現の調節など、生命維持と恒常性に不可欠な機能を担う器官である。2008年にフロリダナメクジウオのゲノムが解読され、ナメクジウオが脊椎動物の甲状腺ホルモン合成経路と同様な経路をもつ可能性が示唆されたが、経路に必須の要素が欠けているなど、内柱の機能は未知のままである。

本研究では、環境変化に応じた生体調節機能が、脊椎動物の祖先型動物であるナメクジウオではどのようにあるかを調べ、脊椎動物が獲得してきた環境適応機構の進化について考えることを目的とする。特に、甲状腺の祖先型と考えられているナメクジウオの内柱に焦点を絞り、1) 内柱は甲状腺の祖先型であるか、2) ゲイコツナメクジウオの内柱に極限環境の影響あるいは適応機構が見られるかどうか、に着目した。

## 2. 材料と方法

ナメクジウオ *B. belcheri* は、愛知県渥美半島沖で採集した。ゲイコツナメクジウオは、鹿児島県野間岬沖の水深230-290mに沈むマッコウクジラ遺骸から研究船なつしま-ハイパードルフィン航海で採集した。

組織をブアン固定し、通常の方法で5 $\mu$ mと10 $\mu$ mのパラフィン切片とした。光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡、走査型電子顕微鏡で観察した。

ナメクジウオ成体からRNAを抽出し、DIOの1型と3型のcDNAをクローニングした。DIOの構造の特徴を3'非翻訳領域の立体構築で明らかにし、様々な組織での発現をRT-PCR法で確認した。系統樹を作成して脊椎動物のDIOとの系統関係を調べた。

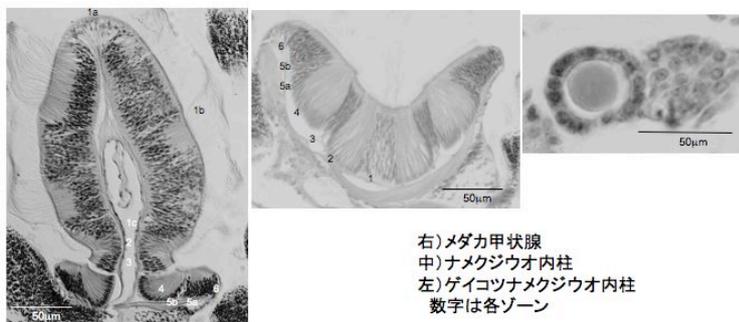
厚さ10-50 $\mu$ mのパラフィン切片を作製し、水でカプトン膜上に伸展した。測定は播磨科学公園都市にある大型放射光施設(SPring-8)でおこなった。初めにビームサイズ4 $\mu$ m<sup>2</sup>で5 $\mu$ m間隔の粗いスキャンをした。その結果から照射範囲を設定し、同じビームサイズで間隔を

ゼロとし、詳細にスキャンした。

### 3. 結果と考察

#### 3-1. 内柱の組織観察

ナメクジウオの内柱は7ゾーンに分けられている。本研究ではゲイコツナメクジウオの内柱が9ゾーンであることを明らかにした。ゲイコツナメクジウオの



内柱は咽頭腔の下からΩ型に突出した形態をしている。突出部分の先端のゾーン1bは複数の細胞群が非対称かつ不規則に存在していた。ゾーン1bは長い繊毛、粘液や顆粒の分泌、餌の付着から、食物に関わる器官であると考えられた。ゾーン2から6の形態は、ナメクジウオとの類似性が高いため、ゾーン1のみが変化していることがわかった。

3-2. ヨードチロニン脱ヨウ素酵素(DIO)のクローニングと遺伝子発現 甲状腺ホルモンの活性化に関わる酵素DI03とDI01の遺伝子をクローニングし、このうちDI03遺伝子が内柱で発現することを明らかにした。しかし、DIOの活性の指標となるアミノ酸であるセレノシステインは、DI01遺伝子にあったが、DI03遺伝子にはなかった。また系統解析では、DI03は脊椎動物のDI02型と3型の祖先分子である可能性が示唆された。そこで、DIOは、ヨウ素を利用する機能をもつ酵素が脊椎動物への進化の過程で1アミノ酸がセレノシステインに変わる突然変異を起こし、さらに甲状腺での機能を獲得したと考えられた。

3-3. 放射光蛍光 X線分析 ナメクジウオとゲイコツナメクジウオの内柱で微量に存在するヨウ素を検出できた。さらに過剰投与はヨウ素の取り込みを減少させる負のフィードバック機構が存在する可能性が示唆された。また、両種ともゾーン5bから6でヨウ素を検出できたが、ナメクジウオは高濃度で、しかも集積していた。ゲイコツナメクジウオはナメクジウオよりも分岐が古いことも考え合わせると、甲状腺でのヨウ素の蓄積と濾胞の存在は、脊椎動物の進化の過程で獲得されたと考えられた。微量元素の分析では、ヨウ素の他に鉄の集積、亜鉛と銅の分布も内柱で検出されているので、これらの役割の検討も必要である。

#### 4. まとめ

ヨウ素の取り込み、DIOの存在、形態観察の結果から、内柱の一部は甲状腺の祖先型であることが示唆され、他の一部は消化の役割をもつことが考えられた。このように、内柱は従来の甲状腺との比較にとらわれず、複数の重要な機能を司る器官の集合体と考えられることがわかった。次に、ゲイコツナメクジウオの内柱と極限環境との関係は明らかにならなかったが、肥大化した内柱や低レベルでのヨウ素の取り込みは環境適応に関する可能性があり、今後検討していきたいと考えている。

# Study on the environmental adaptation of lancelet found in the anaerobic environment

Mar. 2009, Department of Natural Environmental Studies, 076704, Mayumi INABA

Supervisor; Professor Kaoru KUBOKAWA

keywords : lancelets, whale-fall, thyroid gland, endostyle, iodine, SPring-8

## 1. Introduction

Lancelets, subphylum Cephalochordata, are chordates important for the study of the evolution of the Vertebrata. In July 2003, a new species of lancelets, *Asymmetron inferum*, was found in the carcasses of sperm whales at Kagoshima, Japan. The whale-fall environment is known as an extreme environment that is characterized by hydrothermal vents and cold seeps, and has a symbiotic ecosystem based on chemosynthetic bacteria. The whale-fall lancelet has a larger endostyle than that of the major lancelet genus *Branchiostoma*. The endostyle is considered to be a homologue of thyroid gland of vertebrates because of its intake of iodine. In 2008, the draft genome sequences of the Florida lancelet *Branchiostoma floridae* were added to the genome database. The analysis of gene models from the genome sequences indicated that the lancelet has a similar pathway for the thyroid hormone synthesis to that of vertebrates. However, some essential elements for the synthesis of thyroid hormones were not found in the genome. The function of the endostyle is still not fully understood.

In this study, I explored the mechanisms of biological regulation for environmental adaptation in the whale-fall lancelet *A. inferum* and the evolution of the endocrine actions from the endostyle to the thyroid gland. In particular, I focused on two questions. 1) Is the endostyle an ancestor of the thyroid gland? 2) Are there any morphological and physiological changes in the endostyle of the whale-fall lancelet relating to its adaptation to the extreme and anaerobic environment?

## 2. Materials and Methods

### 2-1. Animals

Lancelets, *B. belcheri* were collected off Atsumi Peninsula, using a cylinder dredge. The whale-fall lancelets, *A. inferum* were collected during research cruises on Natsushima/HyperDolphin (JAMSTEC), off Noma-Misaki, Kagoshima Prefecture.

### 2-2. Histological observation of endostyle

Lancelet tissues were fixed in Bouin's solution, and paraffin-embedded sections (5 - 10µm thick) were observed using scanning electron, and light microscopies.

### 2-3. Cloning and expression of iodothyronine deiodinase (DIO) genes

The cDNAs of DIO1 and DIO3 were cloned from RNA extracted from the whole body of the lancelets *B. belcheri*, and the 3D structure was analyzed to confirm the characteristics of DIO. The expression of the genes was investigated in tissues by PCR. The phylogenetic tree was constructed from DIO genes of lancelets and vertebrates.

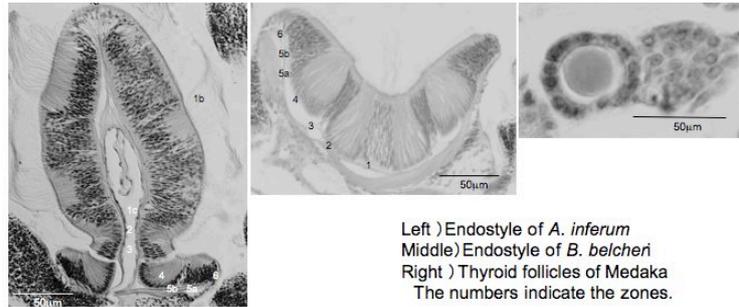
#### 2-4. Mapping of trace elements using synchrotron radiation

The paraffin-embedded sections of thicknesses of 10 - 50  $\mu\text{m}$  were extended on Kapton film with water. The experiments were performed in the large synchrotron radiation facility (SPring-8) at Harima Science Garden City. Fine image-mapping was performed with a beam size of 4  $\mu\text{m}^2$  and exposure time of 3 s without an interval.

### **3. Results and Discussion**

#### 3-1. Morphology of endostyle

The endostyle of *A. inferum* is a large organ that protrudes from the ventral part of the pharynx. In *B. belcheri*, it is divided into seven zones. In this study, I identified nine zones in the



endostyle of *A. inferum*. The largest area of the protruding part named 1b has many long cilia and secretes mucus and granules, which trap food particles in the cilia. The role of zone 1b may be concerned with food intake. The morphology of zones 2-6 is similar in both lancelet species. I concluded that zone 1 is specialized in the whale-fall lancelet.

#### 3-2. Expression of iodothyronine deiodinase (DIO) genes

DIO is an enzyme that catalyzes thyroid hormone synthesis in the thyroid gland of vertebrates. cDNAs encoding DIO1 and DIO3 were cloned from *B. belcheri*. The DIO3 gene was expressed in the endostyle. However, selenocystein, which is needed to activate the DIO function, is lacking in the DIO3 gene but is present in DIO1 gene. The phylogenetic tree indicates that DIO3 is the ancestral molecule of types 2 and 3 of DIO in vertebrates. It is hypothesized that the ancestral DIO gene mutated from a cysteine to a selenocystein and developed a deiodinase role with an iodine intake function during the evolution of chordates.

#### 3-3. Synchrotron radiation excited X-ray fluorescence analysis

The trace iodine was detected in the endostyle of both species of lancelets. Iodine markedly accumulated in zones 5b to 6 in *B. belcheri*, while there was little in the same zones in *A. inferum*. It is suggested that the accumulation of iodine in the thyroid follicles may be a step in the evolution of vertebrates. Furthermore, Fe, Zn, and Cu were detected in the endostyle.

### **4. Conclusion**

The results of this study, indicating iodine intake and the presence of DIO in the endostyle, suggest that part of the endostyle is an ancestral organ of the thyroid gland and another part has a role in digestion. It is considered that the large endostyle and the low iodine intake activity in whale-fall lancelets are important phenomena related to the environmental conditions.