

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考えられる。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同様な遺伝子の探索を行った。

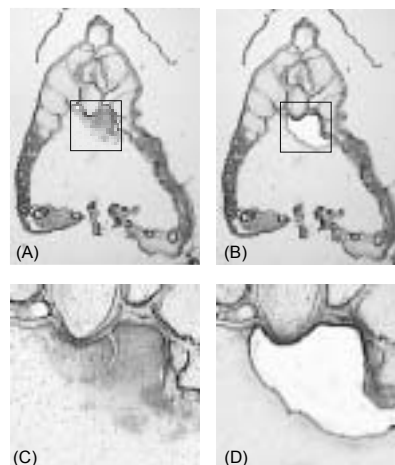


図1 レーザーマイクロダイセクションで切り出した切片。(A): 切り出し前のハチェック窩を含む頭部切片。(B): ハチェック窩を切り出した後の頭部切片。(C): (A)の四角で囲んだ領域の拡大図。(D): (B)の四角で囲んだ領域の拡大図。

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

レーザーマイクロダイ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。

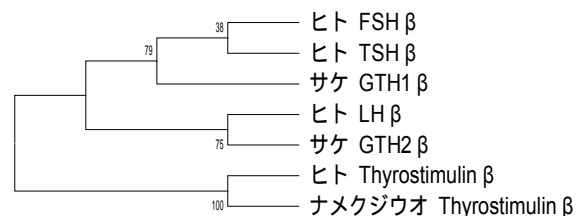


図2. 糖タンパク質ホルモンβ鎖のアミノ酸配列の相同性。系統樹の数字は、近隣結合法による系統推定1000回試行におけるブートストラップ確率を示す。ナメクジウオThyrostimulinを赤で示す。FSH: 濾胞刺激ホルモン、TSH: 甲状腺刺激ホルモン、GTH: 生殖腺刺激ホルモン、LH: 黄体形成ホルモン。

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

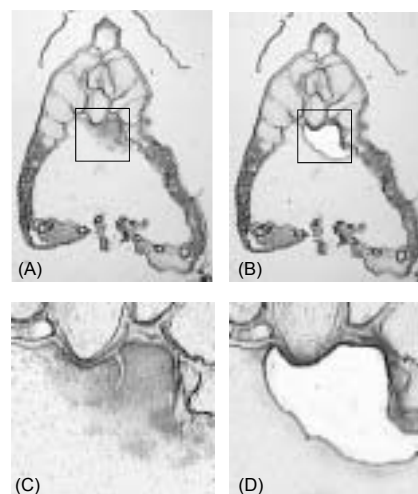


Fig. 1. Dissected tissue sections by laser microdissection.
(A): Head section containing Hatschek's pit, before dissect.
(B): Head section containing Hatschek's pit, after dissect.
(C): Enlarged figure of (A), surrounded by square. (D): Enlarged figure of (B), surrounded by square.

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

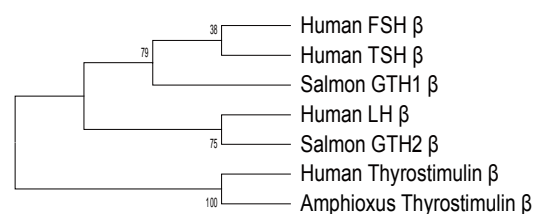


Fig. 2. Amino acid homology of glycoprotein β subunit. Numbers on phylogenetic tree are bootstrap values obtained for 1000 replications using Neighbor-Joining method. FSH: Follicle stimulating hormone, TSH: Thyroid stimulating hormone, GTH: Gonadotrop stimulating hormone, LH: Luteinizing hormone.

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.