

## マガキにおける体軸決定機構の解明

栗田喜久（九州大学大学院農学研究院附属水産実験所）

### 【背景と目的】

軟体動物の初期発生、特に体の背腹/前後の軸を決定する機構は19世紀より盛んに研究されている課題である（例えば Lillie, 1895 など）。近年の分子発生学の発展により、軟体動物の体軸形成に関わる因子もカサガイや巻貝をもちいた実験からリン酸化 MAP キナーゼと呼ばれるタンパク質が、体軸を決定する誘導因子（オーガナイザー）として機能することが明らかになった(Lambert and Nagy, 2001)。しかしこのリン酸化 MAP キナーゼの発現や機能は腹足類で確認されているのみで、他の軟体動物でも同じ誘導機能をもつかは不明である。

本研究では、マガキの初期発生をモデルとして、リン酸化 MAP キナーゼの発現と機能を検証する事で、二枚貝、そして軟体動物の体軸決定機構の共通性を明らかにすることを目的とする。

### 【材料と方法】

#### 1. マガキの人工授精

産卵期（6-7月）に水産総合研究センター増養殖研究所および広島県立水産海洋技術センターより入手したマガキの成熟個体を用いた。人工授精は、卵巣から取り出した卵を1  $\mu$ M セロトニン含海水にて処理し、成熟させたのち精子を添加しておこなった。受精卵は22°C海水にて飼育し、適宜固定し実験に用いた。

#### 2. 抗体染色と薬剤処理

リン酸化 MAP キナーゼの抗体染色には市販の抗体を用いた。MAP キナーゼシグナル経路の阻害には20  $\mu$ M U0126 含海水を飼育海水として用いた。受精後2時間の胚をこの薬剤含海水に浸し、受精後6時間まで飼育したのち、胚を通常の海水に戻し受精後24時間で固定した。阻害胚の形態を正常胚と比較し、マガキにおける MAP キナーゼシグナル経路の機能を評価した。

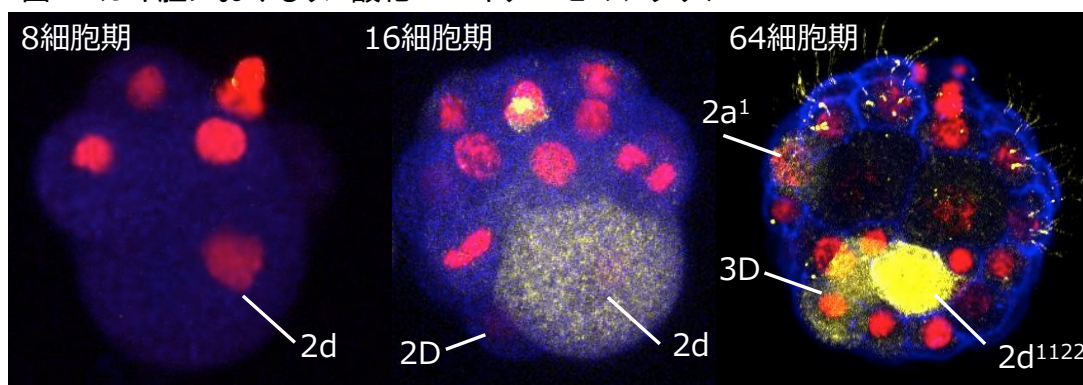
### 【結果と考察】

抗体染色の結果、マガキ胚においてリン酸化 MAP キナーゼは8細胞期まで検出されなかった。しかし16細胞期に至ると2d 割球においてシグナルが検出され、このシグナルはその後64細胞期において2d 系列の割球である2d<sup>1122</sup>にのみ残り、他の2d

系列の細胞では検出されなかった(図)。また64細胞期において、3D割球および2a<sup>1</sup>割球でもリン酸化MAPキナーゼのシグナルが検出されるようになり、このシグナルはすくなくとも原腸貫入が生じる(受精後7時間)までは維持されたが、それ以降の発生段階では検出されなかった。

MAPキナーゼシグナルの阻害実験の結果、貝殻、繊毛環、および筋肉の分化は確認された。遊泳方向についても多くの個体が体の前方へと遊泳しており、前後/背腹軸は形成されていると思われる。しかし明確な消化管構造は確認されなかった。また筋肉も繊維状に分化しているものの正常な配置ではなく2枚の殻をつなぎ合わせる閉殻筋が正常に形成されなかったため、貝殻が背側に開いた状態で形成されており、二枚貝特有の扁平な形態ではなくトロコフォア幼生期のような球状の形態のままであった。

図. マガキ胚におけるリン酸化MAPキナーゼのシグナル



赤:核, 青:細胞膜, 黄色:リン酸化MAPキナーゼ

二枚貝と姉妹群と考えられている腹足類ではリン酸化MAPキナーゼは、およそ32細胞期において3D割球で初めて発現するようになり、その後おそらく3D割球との物理的接触を経て、他のいくつかの割球においてリン酸化MAPキナーゼの活性化が誘起されると考えられている(Lambert and Nagy, 2001)。軟体動物と近縁な環形動物においても同様に、3D割球もしくはその娘細胞である4d割球においてリン酸化MAPキナーゼが検出されるようになることが示されている(Lambert and Nagy, 2003)。このことから軟体動物や環形動物を含む分類群であるらせん卵割動物において、リン酸化MAPキナーゼの発現様式は保存されていると考えられてきた(Lambert and Nagy, 2003)。しかしマガキにおいては3D割球より先に2d割球でリン酸化MAPキナーゼが発現しており、このことは軟体動物内においてリン酸化MAPキナーゼの発現様式が多様化している可能性を示している。さらにマガキにおいてリン酸化MAPキナーゼの発現が検出された2d割球と3D割球、および2a<sup>1</sup>割球は胚内部で接しており、もしかすると他種で3D割球が担っているリン酸化MAPキナーゼの活性化誘起の役割を二枚貝では2d割球が担うようになっているのかもしれない。

阻害剤による機能解析からは、他の軟体動物でみられるような軸や同部領域への重篤な影響は観察されなかった。しかし筋肉の配置が乱れ、消化管の形成が阻害されるなど、内部形態への異常がみられた。3D 割球は二枚貝において原口貫入部位を構成し (Kurita et al., 2009)、また 2a 割球は筋肉の始原細胞であると考えられている (Lillie, 1985)。これらの割球はマガキではリン酸化 MAP キナーゼを発現する割球であったことから、原口貫入や筋肉の正常な配置といった形態形成にリン酸化 MAP キナーゼが関与しているのかもしれない。以上のように、マガキでは他の軟体動物や環形動物とは異なるリン酸化 MAP キナーゼの発現様式が確認された。また機能についても何らかの相違が生じている可能性が示唆された。今後、より詳細な解析を進めることで軟体動物におけるオーガナイザー機能の多様性を明らかにできるかもしれない。以上の成果を私は貴財団の研究助成によって挙げることができた。本成果は速やかに学術誌において発表する予定であり、その際には貴財団からの支援をうけて研究を実施した旨を論文中に明記する。

#### 引用文献

- Kurita, Y., Deguchi, R, and Wada, H. (2009) Early development and cleavage pattern of the Japanese purple mussel, *Septifer virgatus*. *Zoological Science*, 26, 814-820
- Lambert, J. D., and Nagy, L. M. (2001) MAPK signaling by the D quadrant embryonic organizer of the mollusc *Ilyanassa obsoleta*. *Development*, 128, 45-56
- Lambert, J. D., and Nagy, L. M. (2003) The MAPK cascade in equally cleaving spiralian embryos. *Developmental biology*, 263, 231-241
- Lillie, F. R. (1895) The Embryology of the Unionidae. *J Morphology* 10, 1-100