

有尾目両生類幼生の外鰓における機能形態に関する研究

豊泉龍児研究室

市川麗子

(201970165)

【総序論】

両生類は、その生活史の初期には淡水環境に生息するが故に、幼生期までは呼吸器官として外鰓や内鰓をもつ。水棲生活ではガス交換のための外呼吸で必要な酸素を取り込む際に、環境水中の溶存酸素からこれを得る必要がある。従って、両生類幼生にとって、外鰓や内鰓といった呼吸器官は生存に必須の器官の一つであるといえる。両生類は、初期幼生の段階では十分に機能する肺がまだ形成されていないため、はじめに皮膚呼吸と鰓呼吸を併用する形で外呼吸をおこなう。外鰓は鰓弓領域の体側面から突出した呼吸器官であり、頭尾軸に沿って反復的かつ分節的に形成される branchiomere (鰓分節/咽頭弓分節)とよばれる構造の一部から形成される。水中生活をする両生類幼生がこれを形成し、長期間にわたって維持する。有尾目両生類のイモリ幼生の外鰓は頭部後方に左右 3 本ずつ対になっており、太い鰓である rachises と細い鰓である fimbriae からなる分岐構造をとる(図 1)。イモリ幼生の外鰓の器官形成過程としては、尾芽胚期に達すると、鰓原基が頭部左右に形成される。鰓原基からまず rachis が伸長し、それに伴い血管網が rachis の表皮直下に形成される。rachis がある程度伸長すると、rachis 後方腹側に fimbriae が分岐していく。伸長した fimbriae の内部でも同様に、血管網が表皮直下に形成される。そして、fimbriae の分岐数は発生が進行とともに次第に増えていく。fimbriae が rachis の後方腹側に分岐するという基本構造は有尾目のどの科、どの種でも基本的には保存されていて、有尾目の外鰓の形態形成の基本的なルールである。両生類の出現は中生代と考えられており、最古の有尾目の一種とされる約 1 億 5,000 万年前の中期ジュラ紀に生息していたチェネルペトン(Chunerpeton)の化石や、その他のサンショウウオの化石でも外鰓の痕跡が発見されている。

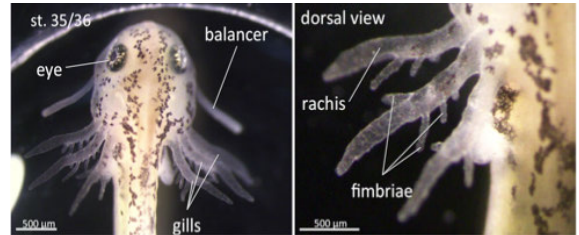


図 1 イベリアトゲイモリ幼生の外鰓の構造。
rachis と rachis の後方腹側から分岐した fimbriae からなる単純な分岐構造をもつ。

本研究は近年有尾目の実験動物として注目されているイベリアトゲイモリを主な研究対象として用いて、両生類幼生の外鰓の形態形成を二つの視点から調べ、二章構成の博士論文としてまとめた。第一章として、外鰓のミクロな細胞レベルの構造の視点から、外鰓の表皮に無数に存在する繊毛細胞に着目した。第二章では、外鰓形態について比較的マクロな視点をもって、その分岐形態形成機構に着目し、その分子機構の解明を試みた。

本博士論文の総考察においては、本研究が明らかにした第一章ならびに第二章で得られた研究結果をもとに、外鰓の機能形態の調節機構について両生類の生活史や系統進化の観点から考察した。両生類幼生が永らく呼吸器官としての外鰓を維持してきた戦略的な意味を両生類の進化や生活史とからめて総合的に考察した。

【第一章】有尾目両生類幼生の外鰓における繊毛細胞の役割に関する研究

[序論] 第一章では幼生期の外鰓について深く理解するために、ミクロな機能形態学的視点から、有尾目幼生の外鰓に無数に分布する繊毛細胞に着目した。繊毛は細胞表面から突出した繊維状の細胞小器官である。表皮を含めた上皮シートにおいては、繊毛はその頂端側に形成される。これまでに、外鰓の表面表皮には多数の繊毛細胞が存在し、走査型電子顕微鏡と古典的な組織学的観察を組み合わせることで、これらの細胞が multi-cilia 細胞であることが明らかになっている(Brunelli et al.2005; Brunelli et al.2009)。しかし、外鰓の表面にある multi-cilia 細胞の生理的な役割については、不明なままである。そこで本研究では、イベリアトゲイモリ幼生を用いて、外鰓表皮に分布する繊毛細胞の運動パターンや、外鰓全体における繊毛細胞の配置の可視化、そして繊毛細胞の運動によって生成される繊毛流とよばれる水流の方向性を調査した。さらに、比較生物学的な観点から、イベリアトゲイモリ以外の両生類 6 種の幼生を用いて外鰓における繊毛流のパターンと繊毛配置について、種を超えた共通性はあるかを調べた。

[材料と方法] 主な実験動物はイベリアトゲイモリ(*Pleurodeles waltl*)である。有尾目イモリ科に属するイベリア半島と北アフリカの一部地域に生息する種である。野生型とリュウシ型の 2 タイプが存在しており、本研究ではそのどちらも実験動物として使用した。イベリアトゲイモリの胚は自然交配もしくは人工授精で胚を得た。メルカプト酢酸ナトリウム(チオグリコール酸ナトリウム)(pH 9.0)で胚のゼリー層を除去し、10% Steinberg 氏液(人工淡水)で洗浄した。イモリ胚は 16–24℃ 下で管理して、目的の発生段階になるまで発生させた。発生段階の同定については Shi and Boucaut(1995)の発生段階表に従った。これに加えて、有尾目では、トラフサンショウウオ科に属するメキシコサンショウウオ(*Ambystoma mexicanum*)、サンショウウオ科に属するクロサンショウウオ(*Hynobius*

nigrescens)、カスミサンショウウオ(*Hynobius nebulosus*)、およびヒダサンショウウオ(*Hynobius kimurae*)の合計 4 種を用いた。また、無尾目では、ヒキガエル科に属するアズマヒキガエル(*Bufo japonicus*)、およびアオガエル科に属するカジカガエル(*Buergeria buergeri*)を用いた。

第一章では、外鰓における繊毛細胞の役割を調べるために、ハイスピードカメラ FASTCAM Mini AX50 (Photron)による観察、赤色ポリスチレンビーズ(直径 2.9 μm , Warrington)による水流パターンの可視化、切断した外鰓周辺的水流パターンの可視化、エタノール処理による繊毛の除去、走査型電子顕微鏡 NeoScope JCM-5000 (日本電子株式会社)を用いた観察、anti-acetylated α -tubulin antibody を 1 次抗体として用いた間接法による蛍光免疫染色による外鰓の繊毛配置の可視化をおこなった。

[結果] 1-① イベリアトゲイモリ幼生の外鰓表面の精密に制御された繊毛打が方向性のある水流を発生させる

イベリアトゲイモリ幼生の外鰓を培養倒立顕微鏡で観察した際、外鰓表面において活発な繊毛の動きが観察された。そこで、ハイスピードカメラを用いて、外鰓に分布する各繊毛の動きを詳細に調べたところ、外鰓表皮における繊毛運動の方向性は各鰓の長軸方向と平行に行われていた。さらに、繊毛の有効打の方向は、rachis と fimbriae のどちらにおいても基部側から先端側に向かって運動していた。続いて、繊毛運動による繊毛流のパターンを外鰓全体についてビーズを用いて調べた。その結果、繊毛流は大局的には幼生の前後軸に沿って前側から後側に一貫して流れていて、さらに、rachis の前方表面では、前方の表皮に沿って基部側から先端側に向かって流れていることもわかった(図 2-a)。また、fimbriae 近傍でもその基部側から先端側に向かって繊毛流が流れていた。この繊毛流は外鰓 rachis 前方においては、血流と対向流を成していた。

次に、外鰓周辺的水流パターンが外鰓固有に生成されるものなのかを明らかにするため、rachis のみをウェッセルで単離し、単離した rachis の周りの水流をビーズで可視化させたところ、外鰓の近傍の水流は全体としては幼生の方から後方(fimbriae の無い側 \Rightarrow fimbriae の基部側 \Rightarrow 先端部側)に向けて流れ、rachis 前方表面では rachis の基部側から先端側に向かっても流れていた(図 2-b)。また、外鰓の前方表面では、ビーズが rachis の長軸方向と平行に流れていた。これらの結果は、無傷個体における外鰓近傍の水流のパターンと完全に一致した。外鰓近傍で見られた方向性のある水流は外鰓に局在する繊毛細胞によって生成される繊毛流であることが分かった。ここで、確かに外鰓の繊毛によって方向性のある水流が生成されていることを別角度から検証するために、エタノールを用いて脱繊毛処理を行った。イベリアトゲイモリ幼生をエタノールで短時間パルス処理した結果、処理後には非常に短い基底部を除いた軸索のほぼ全体が multi-cilia 細胞から失われた。そして、エタノール処理後には、処理前の正常な環境水の流れとは対照的に、外鰓の周囲の方向性のある定常的な水流が失われた。

1-② イベリアトゲイモリ幼生の外鰓における繊毛細胞の分布の可視化

筆者が走査型電子顕微鏡を用いてイベリアトゲイモリ幼生の外鰓における繊毛細胞を調べた結果、st. 42-44 のイベリアトゲイモリ幼生の外鰓では、rachis および fimbriae のどちらにおいても、繊毛細胞は一つの細胞に複数の繊毛が生えた multi-cilia 細胞であることがわかった(図 3-a)。これらの multi-cilia 細胞は頂端部側が楕円形になっていることが多く、その表面に多数の微繊毛を有していた。次に、外鰓全体に多数の multi-cilia 細胞が観察されたことから、その配置は生物学的な意味があるのかについて調査した。外鰓全体における multi-cilia 細胞の配置を蛍光免疫染色法により可視化して、外鰓が伸長し始める段階から発生段階ごとに観察した。st. 28/29 幼生の外鰓では、rachis 表面に円周状の繊毛分布がその長軸に沿って繰り返されているのが観察され、繊毛分布は rachis の長軸方向に対して直交した配置をとる傾向があることがわかった。rachis における繊毛の配置は、rachis が伸長し始めた若い段階である st.28/29 幼生の場合、rachis の軸に対して環状にクラスターを形成して配置していた。しかし、発生が進み rachis が伸長することに伴い、徐々に整列された配置は外鰓の遠位側に向けて歪んだ長楕円形となり、そして上記のパターンは崩れていった。一方で、fimbriae が伸長し始めた st. 33 の段階から fimbriae が複数対形成された st. 35 以降の幼生では、fimbriae における繊毛の配置は、各 fimbriae の長軸方向に対して直交して環状に整列したクラスターを形成していた。また、外鰓

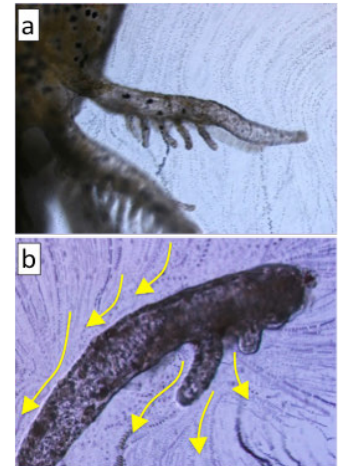


図 2 イベリアトゲイモリ幼生の外鰓の繊毛流のパターン。(a) 外鰓周辺の繊毛流をビーズによって可視化させた。(b) 単離した外鰓の繊毛流。

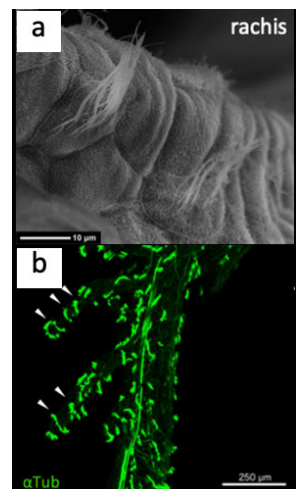


図 3 イベリアトゲイモリ幼生の外鰓の繊毛細胞の可視化。(a) 走査型電子顕微鏡で観察した外鰓の multi-cilia 細胞。(b) 外鰓における繊毛細胞の配置を免疫組織化学染色にて可視化した。緑色蛍光: アセチル化 α チューブリン。

rachis 内にはその長軸に沿って神経の軸索の束と思われる構造が染色されていた。繊毛配置を 3 次元的に観察するために、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて 3D 再構築を行った。その結果、fimbriae が rachis から徐々に数を増やしながら分枝し始める st. 33/34 以降の幼生では、fimbriae での繊毛は fimbriae の長軸方向に直交する形で環状にクラスターを形成して配置する傾向があった(図 3-b)。

1-③ 有尾目 4 種、無尾目 2 種における外鰓の繊毛配列の可視化と繊毛流の観察

イベリアトゲイモリはスペイン原産のトゲイモリ属に属している種であり、日本とは異なる環境に生息している。外鰓の表面に高度に整列した繊毛が存在し、その結果として血流と対向流をなすことがイベリアトゲイモリに固有の現象にすぎないのか否かを調べるために、他の有尾目属 4 種と、さらに拡張として、無尾目属 2 種について比較発生学的な調査を行った。有尾目の実験動物としてトラフサンショウウオ科のメキシコサンショウウオ、サンショウウオ科で日本に生息しているカスミサンショウウオ、クロサンショウウオ、ヒダサンショウウオを使用し、無尾目 2 種はアズマヒキガエルとカジカガエルを使用した。メキシコサンショウウオ、カスミサンショウウオ、クロサンショウウオでは、外鰓の基本的な形態はイベリアトゲイモリの外鰓とほぼ同様で、左右に 3 本ずつ対で生えている rachis から fimbriae が rachis 後方に複数対分岐していた。ヒダサンショウウオ初期幼生の外鰓は、樹枝状の枝分かれパターンを示し、隆起部とひだ部の直径がわずかに異なるだけであるが成長するにつれて通常の形態の外鰓をもつに至る。無尾目では、有尾目と同様に発生過程で外鰓を形成するが、その外鰓は一時的なもので、鰓蓋の形成に伴い呼吸の主体は内鰓にシフトしてしまい、外鰓は急速に退化する。アズマヒキガエルとカジカガエルでは外鰓は有尾目のものと比べると小さい。これら 6 種の両生類幼生の外鰓における繊毛配置および繊毛流を可視化させる実験をおこなった。その結果、新たに調査した両生類種 6 種の全てにおいて、外鰓における類似した繊毛配置および繊毛流のパターンが見出された。また、血流との相関をみたところ、どの種においても繊毛流と血流は rachis 前方表面において対向流を成していた。従って、本研究は、イベリアトゲイモリを含む有尾目 5 種および無尾目 2 種の幼生外鰓について、繊毛細胞の配置は外鰓の長軸に対して直交しており、その繊毛流は方向性をもっていて、かつ血流とは対向流を成していることを明らかにしたといえる。

【考察】外鰓における繊毛細胞は呼吸効率を向上させている可能性がある

イベリアトゲイモリを中心とした有尾目 5 種と無尾目 2 種の外鰓における繊毛運動の方向性、その繊毛配置や繊毛流の可視化の実験結果から、両生類の外鰓は発生の進行に従って形態を変えつつも、繊毛細胞が呼吸効率の向上に役立つような、精密な繊毛配置や繊毛打の方向性の制御を有していることがわかった。呼吸器官での血液中の酸素濃度は、対向流が生じるように個体発生することで溶存酸素を 100%に至るまで増加させることができる。真骨魚類においては、この対向流システムは生理学実験によっても理論的にも研究されており、鳥類や哺乳類など気相下でのガス交換に比べてガス交換効率が高まることが示されている。幼生の外鰓における繊毛流と血流の対向流は、比較的幼若な有尾目幼生が外敵から見つからないように環境水中に佇みつつも、最小限のエネルギー消費で効率の良いガス交換を実現するために最適なシステムである可能性を考えている。

【第二章】有尾目両生類幼生の外鰓における形態形成に関する研究

【序論】外鰓が呼吸効率を上げる戦略は第一章で明らかにした内容ばかりではなく、外鰓形態にも投影している可能性が高い。外鰓の形態形成の分子機構を明らかにすることは、呼吸器官の進化を考える上で重要な示唆をもたらすと考えた。そこで、第二章では外鰓が盛んに分枝構造をつくる器官であることに着目し、外鰓全体の形態形成を扱うマクロな視点をもって研究に取り組み、外鰓の分枝形態の形成機構の解明に注力した。有尾目両生類幼生の外鰓は、rachises と fimbriae から構成された単純な分枝構造をもつ。外鰓は一時的な器官であるにも関わらず、1 億 5000 年以上前から確立されている呼吸器官である。これまでは、発生生物学的なアプローチを用いた外鰓の形態形成に関する研究はほとんど存在しない。僅かに、イベリアトゲイモリの正常発生の過程が記載されている報告が Shi and Boucaut(1995)によってなされているだけである。筆者は外鰓そのものの global な形に注目し、どのようなメカニズムの制御下で外鰓の形態形成がなされていくのかを明らかにしたいと考えた。第二章では、外鰓の発生における分泌因子を介した細胞間シグナル伝達機構による形態形成に着目し、以下の背景から Wnt シグナル伝達経路に焦点を絞った。Wnt シグナル伝達経路は、発生において重要な役割を担う細胞間シグナル伝達経路であり、四肢、肺、腎臓など様々な器官での組織形成に関与する。本研究では、はじめにイベリアトゲイモリの外鰓にて Wnt リガンドが発現しているのかを RT-PCR を用いて調べ、外鰓を含む咽頭領域にて、今回調査した 3 つの wnt 遺伝子(paralogs)の発現パターンを *in situ* hybridization 法にて可視化した。さらに、イベリアトゲイモリ幼生をはじめとする両生類幼生を用いて Wnt シグナル伝達機構に関わる因子に対する阻害剤を用いた薬理処理実験をシステムティックに行った。

【材料と方法】主な実験動物は第 1 章と同じく有尾目イモリ科に属するイベリアトゲイモリ(*Pleurodeles walt*)である。これに加えて、有尾目ではトラフサンショウウオ科に属するメキシコサンショウウオ(*Ambystoma mexicanum*)、サンショウウオ科に属するクロサンショウウオ(*Hynobius nigrescens*)、およびカスミサンショウウオ(*Hynobius*

nebulosus)の合計3種を用いた。また、無尾目では、アカガエル科に属するタゴガエル(*Rana tagoi*)、アオガエル科に属するカジカガエル(*Buergeria buergeri*)、およびヒキガエル科に属するアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)を用いた。第二章では、外鰓の形態形成機構を調べるために、RT-PCR による *wnt* 遺伝子群(*wnt5a* (GenBank: U80582.1), *wnt7a* (GenBank: U80581.1), *wnt10a* (GenBank: U65428.1))の発現調査、イペリアトゲイモリ *wnt* 遺伝子の wholemount *in situ* hybridization による発現パターンの可視化、いくつかの Wnt 阻害剤を用いた薬理処理実験、anti-JNK1 + JNK2 + JNK3 antibody を一次抗体として用いた間接法による蛍光免疫組織化学染色をおこなった。薬理処理に使用した試薬は Wnt-C59 (Wnt リガンドの分泌阻害を介して Wnt シグナル伝達経路の下流にある3つの経路全てを特異的に阻害する)、LGK-974 (Wnt-C59 とは異なる構造をもつ porcupine 阻害剤であり、Wnt シグナル下流3経路の全てを特異的に阻害する)、SP600125 (リン酸化酵素の JNK (c-Jun N-terminal kinase)の作用機序の阻害剤)、Y-27632 (ROCK I および ROCK II の阻害剤)、Cardionogen1 (Wnt 古典経路である β -カテニン経路の阻害剤)、W-7 Hydrochloride (カルモジュリン阻害剤)の計6種類である。

[結果] 2-① RT-PCR 法を用いた外鰓における *wnt* 遺伝子の発現の調査

イペリアトゲイモリの外鰓における *wnt* 遺伝子の発現の有無を調べるために、RT-PCR 法によって各遺伝子の発現の有無を調べた。*wnt5a* の発現に関して、st. 33/34, st. 35/36, st. 39/40 幼生の外鰓において増幅産物が検出され、外鰓にて *wnt5a* 発現していることが分かった(図 4-a)。次に、*wnt7a* の発現に関して、st. 31/32, st. 33/34, st. 35/36 幼生の外鰓において増幅産物が検出され、*wnt7a* もまた形成期の外鰓にて発現していることが分かった。最後に、*wnt10a* の発現に関して、同様に調査した結果、st. 31/32, st. 33/34, st. 35/36 幼生の外鰓において増幅産物が検出され、*wnt10a* も形成期の外鰓にて発現していることが分かった。

2-② イペリアトゲイモリ胚・幼生における *wnt* 遺伝子の発現パターンの wholemount *in situ* hybridization 法による可視化

RT-PCR の結果、幼生の外鰓組織には *wnt* リガンド遺伝子が発現していることが明らかになったので、wholemount *in situ* hybridization を試みた。試料は外鰓原基が突出する前の st. 21/22 幼生、外鰓原基が突出し始めた st. 25/26 幼生、そして rachis が伸長し始めた st. 31/32 幼生を用いた。まず、*wnt5a* の結果については、特に外鰓の突出部で *wnt5a* のシグナルが顕著であった。st. 21/22 胚では将来外鰓が形成される鰓原基の領域特異的に *wnt5a* が発現した(図 4-b)。st. 25/26 幼生では外鰓原基を中心とした鰓弓領域、背側頭部、尾端に *wnt5a* が発現した(図 4-c)。st. 31/32 幼生では外鰓の突出部を含む外鰓ならびにその周辺の領域、背側頭部の一部に *wnt5a* が発現した(図 4-d)。よって、*wnt5a* は今回調査した発生段階の形成期の外鰓に持続的に発現していることが分かった。次に、*wnt7a* の結果については st. 25/26 幼生の外鰓の形成領域である咽頭領域に発現していた。三番目に、*wnt10a* の結果については、外鰓を含む腹側咽頭弓領域に発現していた。st. 25/26 幼生では、外鰓の突出部を含む鰓弓領域にて *wnt10a* が発現していた。st. 31/32 幼生では外鰓の突出部を含む外鰓周辺の領域に *wnt10a* が発現していた。これらの結果から、外鰓形成期のイペリアトゲイモリ幼生の外鰓では、今回調査した *wnt* 遺伝子群がいずれも外鰓とその形成領域に局在する形で発現していることがわかった。

2-③ Wnt シグナル伝達経路特異的な阻害剤を用いた薬理実験

イペリアトゲイモリの外鰓では継続的に *wnt* リガンド遺伝子群が発現しており、外鰓の発生に関して何かしらの機能を担っていることが予想されたので、外鰓の形態形成において Wnt シグナル伝達経路がどのような機能を担っているのかを明らかにするために、いくつかの Wnt シグナル伝達経路特異的な阻害剤を用いた薬理実験を試みた。まず、Wnt シグナル伝達経路の下流に位置する3つの経路(β カテニン経路、PCP 経路(planar cell polarity, 平面内細胞極性経路)、カルシウム依存性経路)のすべてを強力に阻害する特異的な阻害剤 Wnt-C59 による薬理処理をおこなった。その結果、10 μ M Wnt-C59 処理によって幼生の外鰓は欠損や低形成が生じた(図 5-a, b)。加えて、幼生のからだの支持器官であるバランスの矮小化や正中鰭の欠損もしくは低形成、尾端には団子状の未分化な細胞塊も生じた。他の有尾目への実験の拡張として、メキシコサンショウウオ幼生とカスミサンショウウオ幼生を用いて同様に Wnt-C59 処理を実施した結果、イペリアトゲイモリ幼生の場合の結果と同様に、この2種の幼生の外鰓でも欠損もしくは低形成が生じ、同じく正中鰭でも欠損もしくは低形成も生じ、尾端には未分化な細胞塊も生じた。さらに、無尾目への実験の拡張として、アフリカツメガエル、タゴガエル、カ

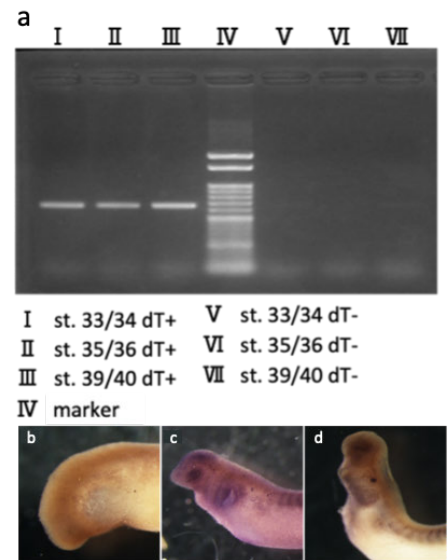


図4 外鰓における *wnt5a* mRNA の発現。
(a) 外鰓における *wnt5a* に対する RT-PCR の結果。(b, c, d) st. 21/22 幼生(b), st. 25/26 幼生(c), st. 31/32 幼生(d)における *wnt5a* の発現パターン。

ジカガエルでも同様に Wnt-C59 浸漬処理をおこなった。調査した無尾目 3 種すべてにおいて、咽頭領域まわりに形成される鰓蓋、ならびにその近傍領域がえぐれたように欠損した。次に、WntC-59 同様に Wnt シグナル伝達経路の下流3経路すべてを強力に阻害する特異的な阻害剤である LGK-974 による薬理処理をおこなった。その結果、10 μ M LGK-974 処理によってもイベリアトゲイモリ幼生の外鰓は欠損もしくは低形成が生じた(図 5-c, d)。加えて、尾端には未分化な細胞塊も生じ、処理幼生は 10 μ M Wnt-C59 と同様の形態になった。ここまでの結果から、外鰓の形態形成には Wnt シグナル伝達経路が必要不可欠であることが予想された。

そこで、Wnt シグナル伝達経路の下流3経路のうち、いずれの下流経路が特に外鰓の形態形成に関与するのかを調べた。 β カテニン経路、カルシウム依存性経路、PCP 経路それぞれの player に対する特異的な阻害剤を用いて、薬理処理実験を行った。最初に β カテニン経路の阻害剤である Cardionogen 1 を用いて薬理処理を行ったところ、外鰓の基本的な構造に大きな影響は生じなかった。続いて、Wnt-カルシウム依存性経路の阻害剤としてカルモジュリン阻害剤である W-7 を用いて薬理処理を行ったところ、10 μ M W-7 処理によって外鰓に特に影響は生じなかった。続いて、Wnt-PCP 経路の Rho を介する経路に位置する ROCK の阻害剤である Y-27632 を用いて薬理処理を行ったところ、10 μ M Y-27632 処理でも外鰓をはじめ他の外部形態に特に影響は生じなかった。最後に、Wnt-PCP 経路の Rac を介する経路に位置する JNK の阻害剤である SP600125 を用いて薬理処理を行った。その結果、10 μ M SP600125 処理群によって外鰓の細い鰓である fimbriae の分枝数が大幅に減少し、突出した fimbriae の長さがコントロール群の fimbriae よりも短くなった(図 6)。一方で、外鰓の太い鰓である rachis は同腹無処理対照群と同等の長さまで伸長しており、太さも変わらず、正常に発生していた。

2-④ 抗-JNK 抗体を用いた免疫組織化学染色

薬理処理の実験結果から、Wnt シグナル伝達経路の下流 3 経路のうち PCP 経路(平面内細胞極性経路)の JNK を介するシグナル伝達が外鰓の fimbriae の形成に関与している可能性が示唆された。そこで PCP 経路の特に JNK に焦点を当て、抗-JNK 抗体を用いた間接法による蛍光免疫組織化学染色で外鰓の JNK の局在を調べた。その結果、st. 33/34 から st. 35/36 の間のイベリアトゲイモリ幼生では外鰓において各 rachis の長軸に沿ってその内部を後方寄りに走行する索状のシグナルが検出された。外鰓以外の領域について、体節の筋組織にも JNK の発現が観察された。st. 34/35 幼生では st. 33/34 幼生のものより JNK の発現領域の分布は先端側に向けて伸長していた。また st. 35/36 幼生も st. 34/35 幼生と同様に rachis の長軸に対して並行にかつ索状に JNK は分布していた。ここで、fimbriae と JNK の位置関係に着目すると、外鰓の rachis 内の JNK シグナルの範囲は最も先端側に位置する fimbriae の基部領域までのみであり、fimbriae が分枝していない領域、つまり rachis の最遠位側では JNK のシグナルは検出されなかった。これらの結果を踏まえて、SP600125 処理をして fimbriae が低形成となった幼生の外鰓における JNK の局在を可視化した。その結果、無処理幼生のコントロール群では上記と同様の局在を示したが、一方で 10 μ M SP600125 処理幼生の外鰓では JNK シグナルがコントロール群よりも減弱していることがわかった。

【考察】外鰓の形態形成には Wnt シグナル伝達経路が必要である

外鰓における *wnt5a*, *wnt7a*, *wnt10a* の発現解析、*in situ* hybridization による発現パターンの可視化、そして Wnt シグナル伝達経路特異的な阻害剤を用いた薬理処理などの結果から、形成期のイベリアトゲイモリの外鰓では *wnt* 遺伝子群が発現していて、外鰓の形態形成には Wnt シグナル伝達経路が必要であることが明らかになった。特に PCP 経路の仲介因子の一つである JNK によるリン酸化を特異的に阻害する阻害剤 SP600125 を用いて浸漬処理をおこなったところ、外鰓の細い鰓である fimbriae のみを欠損する、あるいはその分枝数の著しい減少が生じた。この結果から、Wnt 非古典経路の PCP 経路のうち、JNK を介するシグナル伝達経路は、有尾目において外鰓の形態形成のなかでも fimbriae の分枝形態形成に関与していることが強く示唆された。

【総考察】

イベリアトゲイモリをはじめとする両生類幼生の外鰓に関して、本研究では二つの視点から、その機能形

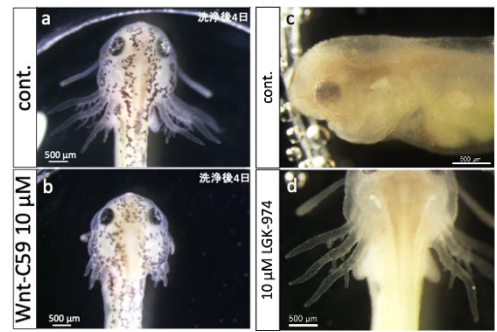


図 5 Wnt シグナル伝達経路特異的な阻害剤による外鰓の低形成。

(a, b) 10 μ M Wnt-C59 の投与により外鰓の伸長が抑制された。(c, d) 10 μ M LGK-974 の投与により外鰓を含む咽頭領域に欠損が生じた。



図 6 JNK の阻害による fimbriae の喪失。

10 μ M SP600125 に浸漬した実験群の外鰓はコントロール群と比べて、fimbriae の分枝が徹底的に喪失した。

態の生物学的意味を明らかにするべく研究を進めた。第一章ではミクロな視点から外鰓を捉え、発生生理学的アプローチによって、外鰓に無数に分布する繊毛細胞の運動および配置を詳細に調べた。第二章ではマクロな視点から外鰓を捉え、外鰓そのものの形態を分子発生的なアプローチを用いて調査した。板鰓類(サメ、エイの仲間)は呼吸のためには絶えず移動せねばならないことが知られる。一方、外鰓形成期の発生段階の有尾目両生類幼生にとっては、外鰓の機能形態が最高度の tuning を受けているために、外鰓が退縮する変態期を迎えるまでは言わばステルス状態で生活できるため、捕食者に見つからずに生存できる確率が上がっていると思われる。つまり外鰓は幼若な有尾目幼生が捕食者に見つからずに生きていくために必要となる、その方向に進化し続けた呼吸器官なのかもしれない。

本研究の成果のひとつは、呼吸器の形態形成学と進化学への理解の深化がある。本研究の研究成果をもとに、いずれも咽頭派生体(pharyngeal derivatives)として形態形成がなされる有尾目両生類の外鰓、哺乳類の呼吸器官である肺、真骨魚類の呼吸器官である内鰓、ポリプテルスやハイギョなど一部の硬骨魚類の外鰓の個体発生上の由来や特徴を比較すると、その形態形成機構にはミクロスケールでもマクロスケールでも数多くの共通点が多くある。1 つ目が呼吸界面としての表面積の拡大化と換気/換水効率の極大化である。両生類の外鰓も含めて、どの呼吸器官でも外界と接する面積を広くするべく、他の器官に比べて格段に分岐形態形成をおこなう。そして外界からの酸素をより効率的に受け取るメカニズムを形態形成のアウトプットの上に確立している。哺乳類の場合は横隔膜や肋間筋などを活用して簡単にガス交換ができるようになっている。真骨魚類では、口腔と鰓蓋の運動による水流の生成によって、常に高い溶存酸素量の新鮮な水が鰓部に取り込まれるようになっている。そして、有尾目幼生の場合には、繊毛流と血流が対向流をなすように仕向けられる絶妙な形態形成が進化していて、「捕食者に目立つ運動」を避けている。2 つ目がその形態形成メカニズムの分子レベルでの類似性、進化発生学でいうところの co-option である。本研究によって、有尾目両生類の外鰓の形成では Wnt シグナル伝達経路の必要性が示唆された。また、外鰓の fimbriae の分岐には Wnt シグナルの下流経路である JNK が関与していることも強く示唆された。Wnt シグナル伝達経路は肺や唾液腺、腎臓などの分岐形態形成に深く関わっていることが明らかにされている。つまり、分岐形態形成する組織は器官の違いを超えて横断的に、Wnt 依存的にそれを行うことが知られている。また真骨魚類でも同様に、枝分かれした構造である鰓耙の形成に Wnt が関与していることが知られている(Shimizu et al., 2012)。これらは呼吸器官がその機能面から分岐形態を必須としており、それを実現させるために Wnt シグナル伝達経路が必要になっており、進化的に保存された遺伝子ネットワークの使い廻しによりそれが実現されている可能性がある。本研究の結果、有尾目の外鰓の形態形成が他の脊椎動物の分岐器官と共通の Wnt 依存的な形態形成機構でなされることが見えてきた。本研究の取り組みの成果として、繊毛細胞の運動性・配置および外鰓形態形成のメカニズムに関して、両生類の外鰓は他の動物種の呼吸器官と共通性があり、たとえ生活史の一部を占めるにすぎない一過性の幼生器官であっても外鰓は呼吸器官として非常に簡潔に完成された器官のひとつであることを明らかにした。分岐形態形成に関しても、前述の通り、哺乳類の肺や魚類の鰓と外鰓は似通った点があり、形態形成の原理に関してミクロスケールの共通性もあることが本研究によって明らかになった。哺乳類の呼吸器官である肺は実用可能なオルガノイドの作出に向けて研究が進められている。iPS 細胞や ES 細胞を出発点として複雑な分岐構造をもつ高機能オルガノイドを形成し、そのオルガノイドをもとに肺炎、COPD(慢性閉塞性肺疾患)、肺がんなどの深刻な病態の治療のための試験管内アッセイ系を作出することに、筆者の外鰓研究で得た知見を接続させて、両生類研究の立場から基礎医学や再生工学にも貢献していきたいと考えている。

【出版リスト】

Ichikawa, R., Toyozumi, R. Finely tuned ciliary alignment and coordinated beating generate continuous water flow across the external gills in *Pleurodeles waltl* larvae. *Zoomorphology* **139**, pp. 247-262 (2020). (Springer-Nature) <https://doi.org/10.1007/s00435-020-00479-0>

【文献リスト】

Brunelli E, Tripepi S, (2005), Effects of Low pH Acute Exposure on Survival and Gill Morphology in *Triturus italicus* Larvae, *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 2005 Nov 1; **303**(11): 946-57.
Brunelli E, Maisano M, Sperone E, Tripepi S, (2009), Morphology and ultrastructure of the gills in two Urodela species: *Salamandrina terdigitata* and *Triturus carnifex*. *Italian Journal of Zoology* **76**(2): 158-164
DOI: 10.1080/11250000802484869
Shi D L, Boucaut J C (1995) The chronological development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* (Michah) *Int. J. Dev. Biol.* **39**(3): 427-441.
Shimizu N, Kawakami K, Ishitani T, (2012), Visualization and exploration of Tcf/Lef function using a highly responsive Wnt/ β -catenin signaling-reporter transgenic zebrafish, *Dev. Biol.* **370**(1): 71-85. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.07.016.