

ウニ幼生の変態におけるドーパミン受容体の役割

ROLE OF THE DOPAMINE RECEPTOR ON THE METAMORPHOSIS OF SEA URCHIN LARVAE

プロジェクト代表者：末光隆志（理工学研究科・教授）

TAKASHI SUYEMITSU (GRADUATE SCHOOL OF SCIENCE AND ENGINEERING,
PROFESSOR)

1 序論

海産無脊椎動物の数多くの動物において、幼生形から成体系に変態することが知られている。ウニ幼生においても、体の左側に形成されたウニ原基（生体原基）が発達し、一方、腕などの幼生型組織が退縮する過程を経て、稚ウニへと変態する。*Dendraster excentricus* においてドーパミンが低い割合ではあるが変態を促進する (Burke, 1983)。*Strongylocentrotus droebachiensis* においては、GABA が変態を誘導する (Pearce et al., 1990)。*Hemicentrotus pulcherrimus*, *Anthocidaris crassispina*, *Pseudocentrotus depressus* においては、餌となる珪藻に含まれている甲状腺ホルモンがウニ原基の発達を誘起することが報告された (Chino et al., 1994)。また、直接発生型のウニである *Peronella japonica* においても、甲状腺ホルモンが変態を誘起し、この場合には、ウニ幼生が甲状腺ホルモンを生成していることが明らかにされた (Saito et al., 1998)。また、*Hemicentrotus pulcherrimus* や *Pseudocentrotus depressus* において、L-グルタミンが変態を誘導することが報告された (Yazaki et al., 1994, 1995)。

一方、*Dendraster excentricus* 変態直前期幼生を電気刺激すると変態することが報告されている (Burke, 1983)。このことから、ウニ幼生の変態には神経系が関与していると考え、変態直前期のバフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus* 幼生に様々な神経伝達物質を投与した。その結果、DA, NE, E が変態を促進した。また、ウニ幼生がこれらのカテコールアミンを保持しているかどうかを定量したところ、ドーパミン (DA) が一番多く含まれていた。以上のことから、ドーパミンがバフンウニ幼生の変態に重要な機能を担っていることが示唆されたので、バフンウニのドーパミン受容体遺伝子の解析が試みられた。

2 結果

バフンウニドーパミン受容体遺伝子のクローニング

プライマー設計であるが、様々な動物のドーパミン受容体のアミノ酸配列を参考にし、よく保存されているアミノ酸配列をもとにして、degenerate primer を作成した。degenerate primer を用いて、変態期バフンウニ幼生から抽出した total RNA にて RT-PCR および nested PCR をおこない、254 bp の増幅断片を得ることができた。この遺伝子の全長を得るために、inverse PCR を試みた。それは、脊椎動物のドーパミン受容体遺伝子には、ORF 内にイントロンが存在しないことから、バフンウニのドーパミン受容体遺伝子でも同じではないかと考えたから

である。inverse PCR の結果から、開始コドンから DNA 断片までの塩基配列および、DNA 断片から終止コドンまでの増幅断片がえられた。これらの塩基配列をもとに specific primer を作成し、バフンウニのゲノム DNA を鋳型に PCR をおこなった結果、1,360 bp の増幅断片を与えることができた。この増幅断片の塩基配列を決定し、コンピューター解析により、脊椎動物のドーパミン受容体との相同性を比較した。その結果、アミノ酸配列について、ヒトと 40%、マウスと 39%、ニワトリと 42%、コイと 40% の相同性があり、バフンウニのドーパミン受容体 D1(HPDRDI)である考えられた。

ノーザンハイブリダイゼーション

各発生段階での遺伝子発現を調べるために、各発生段階のウニ幼生から mRNA を調製し、ノーザンハイブリダイゼーションを試みた。その結果、未受精卵では、シグナルは確認できなかったが、4 腕プルテウス幼生、6 腕プルテウス幼生、変態期幼生で 15 kb の位置にシグナルが確認された。しかし、変態期幼生でのシグナルは、幾分、弱いものであった。

Real time PCR

各発生段階での *HpDRDI* の mRNA の量を定量するために、各発生段階の幼生から調製した RNA 量を同一にして、real time PCR を行った。その結果、未受精卵にはほとんど存在せず、2 腕プルテウス幼生において最大であった。2 腕プルテウス幼生における発現量を 100% とすると、4 腕プルテウス幼生で 58%、6 腕プルテウス幼生で 29%、変態期幼生で 6.2% であった。また変態期幼生をチロキシンで処理すると発現量がさらに低下することが確認された。

whole mount *in situ* hybridization

HpDRDI が各発生段階でどこに発現しているかを調べるために、2 腕プルテウス幼生、6 腕プルテウス幼生、変態期幼生において、whole mount *in situ* hybridization を行った。その結果、2 腕プルテウス幼生では、口の周り と 繊毛体でシグナルが確認された。6 腕プルテウス幼生では、apical neuropile, oral ganglion, circumoral ciliary band, lower lip ganglion, upper lip ganglion や前繊毛体、後繊毛体にシグナルが観察された。変態期幼生においても、6 腕プルテウス幼生の場合よりも幾分弱いものの同様にシグナルが観察された。ただし、後繊毛体のシグナルは消失していた。また、ウニ原基にもシグナルが観察された。

3 考察

ここで得られた遺伝子クローンは、脊椎動物の *DRDI* とアミノ酸配列に相同性がみられたことから、バフンウニの *DRDI* であると考えられた。しかし、ノーザンハイブリダイゼーションの結果から、脊椎動物の *DRDI* 産物の大きさが約 3 kb であるにもかかわらず、*HpDRDI* では 15 kb になってしまった。今後の検討が必要である。whole mount *in situ* hybridization の結果から、*HpDRDI* の転写産物は繊毛体や神経系に分布していることが明らかになった。このことは、ウニ幼生の変態機構を考える上で、非常に重要な知見である。