

ウニ生殖巣の分化と成熟の過程を探る

山野恵祐^{*1}・東藤 孝^{*2}・浦 和寛^{*2}

Differentiation and maturation of sea urchin gonad

Keisuke YAMANO, Takashi TODO, and Kazuhiro Ura

Abstract The process of differentiation and maturation of sea urchin gonads were studied at the molecular levels with the aim of controlling gonadal maturation. To find germ cell-specific makers, genes for vasa, PL10 and nanos were cloned. RT-PCR and *in situ* hybridization demonstrated that vasa and nanos genes were specifically expressed in germ cells in both sexes. Then, expression levels of those genes during embryonic development were measured by real-time PCR. Transcripts for vasa were accumulated in unfertilized eggs as a maternal factor whereas the expression of nanos gene enhanced during embryonic development. An ovary cDNA library was screened to find genes expressed with a stage-specific manner during ovarian maturation by the combination of EST and microarray analyses. Further analysis by real-time PCR on selected 18 genes demonstrated that 15 genes increased in their expression levels in the ovary during oogenesis. These genes encoded a component of cortical granules, cell division controlling factor, growth factor, enzyme, sperm-activation factor, unknown products, etc. We discuss about perspectives on the control of sea urchin maturation in relation to our study.

Key words : sea urchin, gonad, differentiation, maturation, vasa, nanos.

近年のウニ類の漁獲量は一万数千トンを推移しており、北海道を中心とした北日本ではエゾバフンウニ (*Stroglyocentrotus intermedius*)、キタムラサキウニ (*Stroglyocentrotus nudus*)、九州を中心とした西日本ではアカウニ (*Pseudocentrotus depressus*) が主要な漁獲対象となっている。これらのウニの資源増大を図るため、種苗生産・放流も長年に渡って実施されている。ウニ類の漁業生産はもっぱら漁獲に依っており、一部、養殖が行われているケースもあるが、養殖による生産量は極めて少なく漁業統計には現れない程度に過ぎない。

食品としてのウニを見た場合、ウニは水産物の中でも特異な性質を有している。すなわちウニ類では生殖巣 (卵巣及び精巣) だけが食される。また食用に適した生殖巣は、栄養物を生殖巣内に十分に蓄積しているが成熟期に入る前の未成熟な状態のもので

ある。このため食品としての品質や歩留まりは成熟状態と密接に関連しており、良質の生殖巣を得られる時期、いわゆる旬は、種毎に限られた季節となる。

一方、ウニの生殖巣の発達や成熟の調節機構に関する知見は少なく、生殖巣がいつ頃どのようにして分化してくるのか、卵形成がどのような過程や制御のもと進行するのかなど、不明な点が多く残されている。生殖巣の分化・発達・成熟の過程や仕組みが解明されることで、性や成熟の人為管理を通じて食品としての質を高める技術開発が可能になると期待される。そこで本課題では、ウニの生殖巣の分化及び生殖巣の発達・成熟に関する研究を実施した。

ウニ生殖巣分化マーカー遺伝子の単離と発現解析

ウニ類の生殖巣分化機構については、稚ウニへの変

2008年4月23日受理 (Received on April 23, 2008)

^{*1} 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦 422-1 (National Research Institute of Aquaculture, 422-1, Nakatsuhamura, Minami-ise, Mie 516-0193, Japan)

^{*2} 北海道大学大学院水産科学研究科 〒041-8611 北海道函館市港町 3-1-1 (Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1 Minato, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan)

態後に起こる始原生殖細胞 (PGC) や生殖巣原基の形成についての形態学的研究がなされているのみであり、受精前後から発生過程における生殖細胞系列の存在や動態に関する知見はほとんど無い。PGC や生殖巣原基が変態直後の後部体腔壁に形成されることから (Houk and Hinegardner, 1980)、将来、体腔形成を担う予定運命を持つ、16 細胞期に植物極側に生ずる小割球が、生殖細胞形成にも重要な役割を担っていると考えられているが (Ogawa, et al., 1999; Ransick, et al., 1996)、その証明は未だなされていない。このように、これまでウニ類における生殖細胞形成や生殖巣分化の機構に関する研究の進展が立ち後れてきたのは、生殖細胞系列を識別するマーカーが得られていなかったことが、大きな要因の一つとして考えられる。

そこで、多くの動物種で生殖細胞特異的に発現しており、生殖細胞系列の特異的マーカーとして使用されている *vasa* 遺伝子と *nanos* 遺伝子に着目し、エゾバフンウニから *vasa* および *nanos* 相同遺伝子をクローニングした。エゾバフンウニ精巣より、*vasa* 遺伝子については *vasa* および *vasa* と同じファミリーに属する PL10 の 2 種類の cDNA が、*nanos* 遺伝子については 1 種類の cDNA がそれぞれ得られた。これら遺伝子の発現が生殖細胞特異的であるか否かを調べるため、先ずエゾバフンウニの各体組織における各遺伝子の発現を

RT-PCR 法により調べた。その結果、PL10 遺伝子は調べた全ての組織 (卵巣、精巣、咽頭、食道、胃、腸など) で発現していたが、*vasa* と *nanos* 遺伝子の発現は卵巣と精巣に局限していた。

そこで次に、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、生殖巣における各遺伝子の発現細胞について組織学的に解析した (Fig. 1)。その結果、卵巣において、*vasa* と *nanos* 遺伝子は卵原細胞や未熟な卵母細胞で強い発現が認められたが、卵形成の進行とともに発現は弱まり、成熟した卵母細胞では発現は見られなかった。一方、PL10 遺伝子も卵原細胞や未熟な卵母細胞でのみ発現が強かったが、成熟した卵母細胞でも弱い発現が認められた。精巣での各遺伝子の発現は精原細胞や精母細胞などの生殖細胞にのみ認められたが、*nanos* 遺伝子の発現は極めて弱かった。

次いで、リアルタイム定量 PCR 法により胚発生過程に伴う各遺伝子発現量の変化を調べた。その結果、*vasa* と PL10 の遺伝子発現量は、未受精卵から受精卵にかけて最も高く、胚発生の進行とともに減少した。このように、未受精卵と初期の卵割期の胚で高い発現が見られたことから、これらが卵形成過程で合成され、卵内に母性 mRNA として蓄積されることが示唆される。一方、*nanos* 遺伝子の発現量は、未受精卵から胚発生の進行とともに増加し、胞胚で最も高値を示した

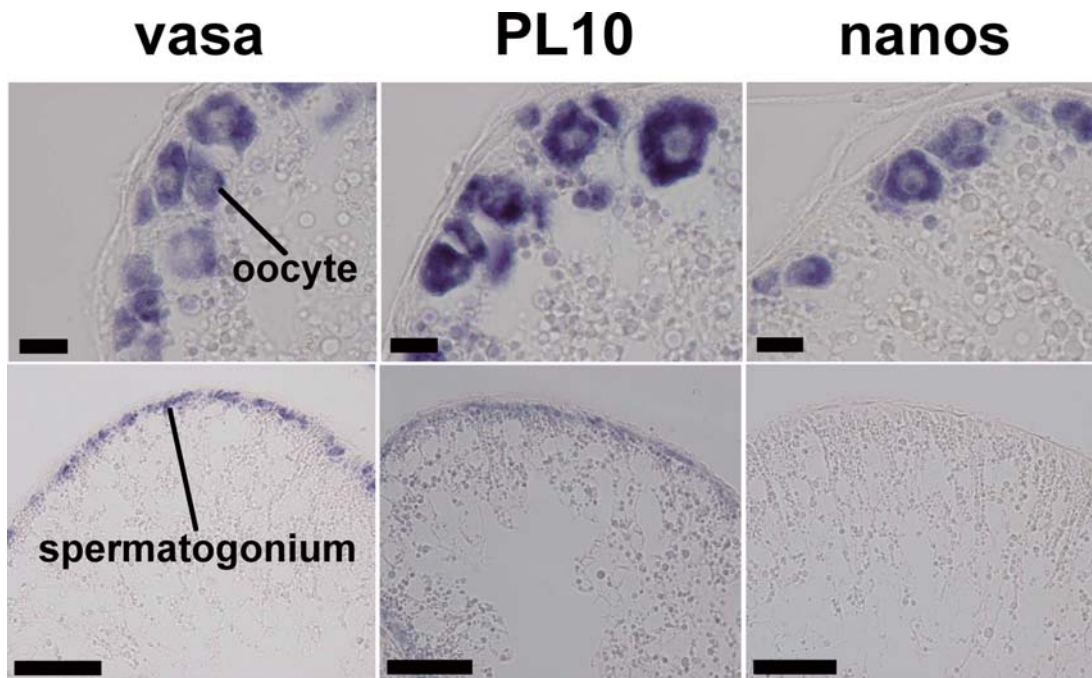


Fig. 1. *In situ* hybridization of sea urchin ovary (upper figures) and testis (lower figures) at stage 2 (early gametogenesis) with antisense probes of *vasa*, PL10 and *nanos* cRNAs. Scale bars indicate 10 μ m (ovary) and 50 μ m (testis).

が、その後減少した。このように、受精卵で発現が見られたことから、nanos 遺伝子も量的に少ないとしても母性 mRNA として卵内に蓄積されているが、その発現パターンから、胚発生後に zygotic な発現が起こっていると考えられる。

以上の様に、vasa と nanos 遺伝子は生殖巣かつ生殖細胞特異的に発現していたことから、両遺伝子はエゾバフンウニの生殖細胞特異的のマーカースとして利用できることが示された。そこで、ウニの生殖細胞を検出するうえでより汎用性の高いツールを得るため、ウニ Vasa タンパク質に対する特異抗体の作製を試みた。エゾバフンウニ vasa cDNA のアミノ酸配列より特異性の高い領域を選択し、大腸菌発現系を用いて組み換えタンパク質を作製した。これを家兎に免疫し、抗ウニ Vasa ポリクローナル抗体を得た。得られた抗体は、エゾバフンウニ生殖巣抽出液のウェスタンブロット解析において、卵巣と精巣ともに予想される分子量 80 kDa の一本のバンドのみを認識した。また、免疫組織化学では、卵原細胞や卵母細胞、精原細胞、精母細胞などの生殖細胞のみを認識することが確認された (Fig. 2)。さらに、キタムラサキウニでも同様の結果が得られたことから、作製された抗ウニ Vasa 抗体がウニ類一般の生殖細胞マーカーとして有用であることが示唆された。

ウニの生殖巣の成熟過程

Fig. 3 には Unuma, et al. (1996) に基づくアカウニの生殖巣の発達段階を示している。

Stage1 (未熟期)：配偶子形成の始まる前の生殖巣である。雌雄とも生殖巣内は栄養細胞が卓越している。栄養細胞内には、将来、配偶子形成のエネルギー源として利用される、また卵黄タンパク質となる物質が蓄積されている。非常に強いエオシン好性を示す。配偶子は小嚢壁に沿って存在するが極めて小さく、少数である。この状態の生殖巣が食用として適している。

Stage2 (成熟前期)：配偶子が発達し始める。雌では小嚢壁に沿って存在する卵母細胞が肥大し始める。この時期には卵細胞質内に多量の核酸を蓄積するためヘマトキシリン好性を示している。雄では小嚢壁に沿って精母細胞のクラスターが現れ、急激に細胞数を増加する。小嚢内は依然として栄養細胞が充満している。

Stage3 (成熟中期)：発達した卵細胞や精子が小嚢壁から移動し、小嚢内の中央部に位置するようになる。移動中の卵細胞は大きな卵核を有するが、中央部の卵は卵核を持たない。卵内には卵黄タンパク質を蓄積し、卵径が増大するとともにエオシン好性となる。中間部には栄養細胞が存在する。

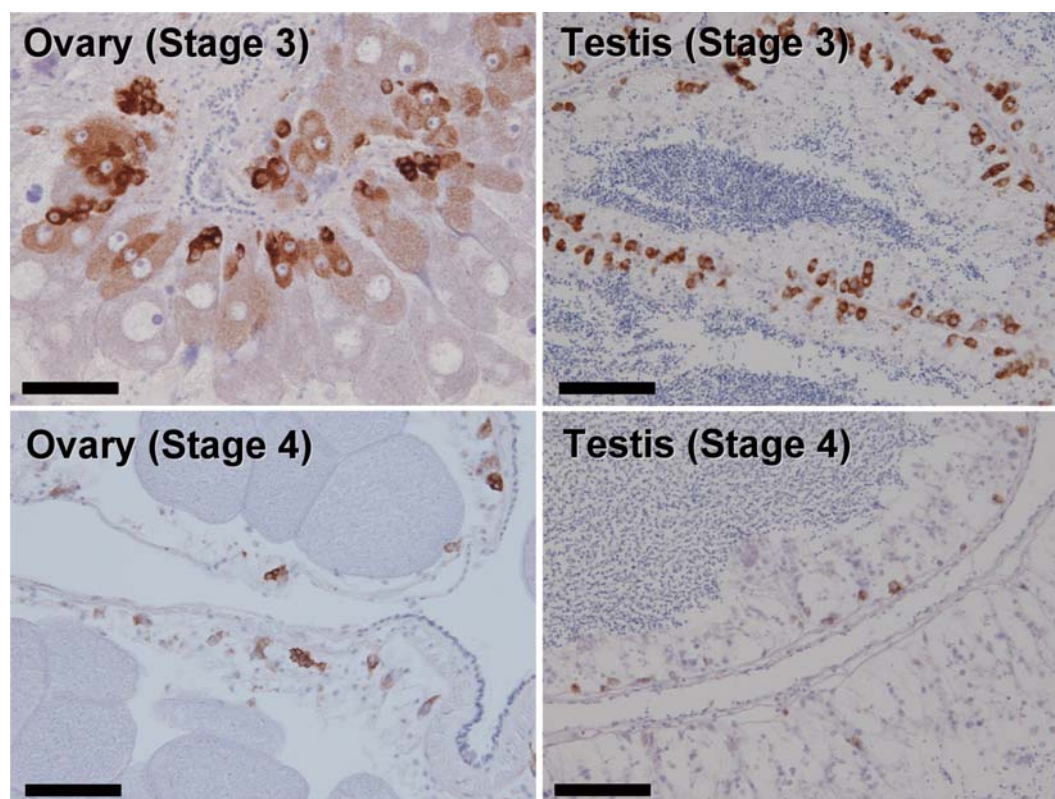


Fig. 2. Anti-Vasa immunohistochemistry of sea urchin gonads. Scale bars indicate 50 μ m.

Stage4 (成熟後期)：小嚢内は成熟卵、精子で充満されている。栄養細胞はほとんど消失して周辺部に少し残るのみである。

ウニ類の生殖巣発達、特に卵巣発達には、他の卵生生物には見られない特徴がある。第一には、生殖巣の肥大が配偶子形成に先駆けて起こり、成熟期間中に生殖巣の増大は起こらない。これは、配偶子形成以前に体細胞である栄養細胞内に必要な栄養源を蓄積するためである。

第二には、ウニ類では、順次、発達の進んだ卵から、卵核胞が崩壊した状態にまで進み、卵核胞を持たない完熟卵が産卵を待ち受けていることである。同じ棘皮動物のナマコ類、ヒトデ類なども含めて、他の卵生生物では、卵核胞を有する状態で卵発達は一旦停止し、産卵誘導の刺激を受けると一斉に卵核胞が崩壊して、引き続いて排卵、放卵に至る。ウニ類には、何らかの特殊な卵成熟調節の仕組みがあると推測される。

第三には、ウニ類の卵巣には濾胞細胞がない。多くの卵生生物では、卵を濾胞細胞が取り囲み、濾胞細胞が卵発達の調節に介在する。ウニ類では濾胞細胞がないことが特殊な卵発達過程と関係しているのかもしれない。卵を取り囲む栄養細胞が濾胞細胞の役割を持つのかもかもしれないが、その詳細は分かっていない。

ウニ卵巣発達に関連する遺伝子の探索

これまでのウニ卵巣あるいは卵の発達に関する分子レベルの研究では、主に卵黄や表層顆粒に関連した研究が実施されてきた。ウニ類の卵に最も多量に含まれる卵黄タンパク質は、主要卵黄タンパク質 (MYP) と名付けられているタンパク質である。MYPは主に消化管、生殖巣で作られて、雌雄ともに未熟な生殖巣内の栄養細胞に蓄積される (Shyu, et al., 1986)。雌では一部が卵へと移行して、卵黄タンパク質になる。また、表層顆粒の形成過程や受精後に卵外に放出されたあとに表層顆粒の構成成分が受精膜として再構築される機構も明らかにされている (Wong and Wessel, 2006)。

しかしながら、未熟期から成熟期に変わる時期、すなわち配偶子形成を始める時期に卵巣内で起こっていることについては、未だ十分に分かっていない。特に、配偶子形成を開始させる仕組みは全く不明のまま残されている。このようなことから、配偶子形成に重要な役割を持つ候補遺伝子として、また将来的には成熟調節因子を同定するための分子マーカーとして利用することを旨として、成熟初期に発現量が明瞭に上昇する遺伝子の探索に取り組んだ。

成熟初期のアカウニ卵巣 cDNA ライブラリから得た

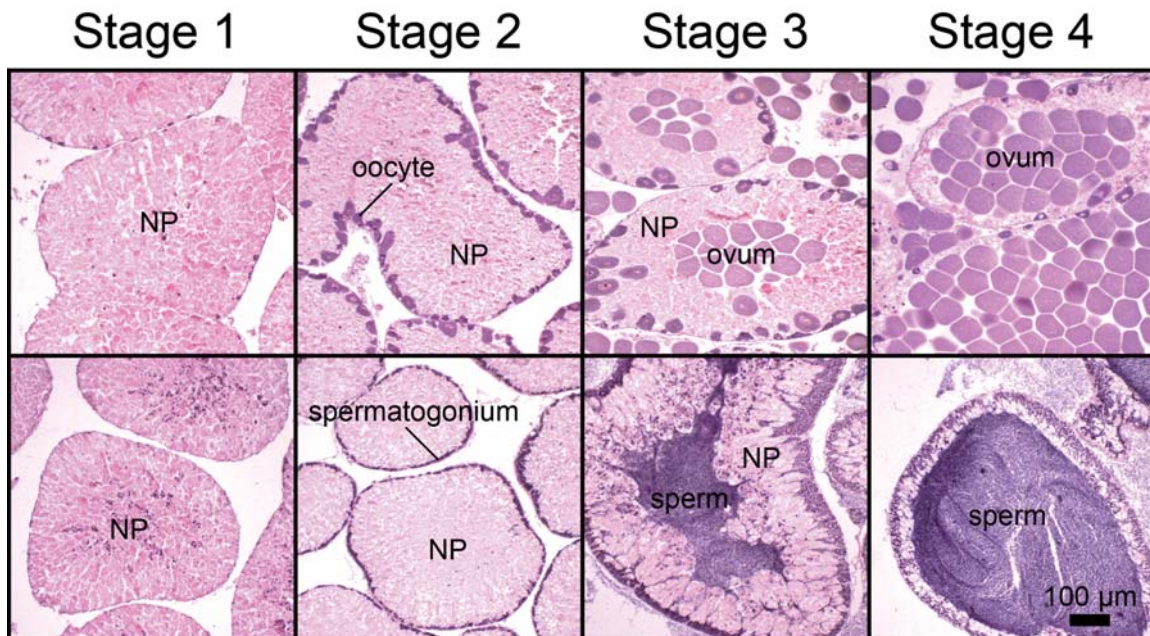


Fig. 3. Histological sections of the ovary (upper figures) and testis (lower figures) at different maturational stages. Stage 1, immature; Stage 2, early gametogenesis; Stage 3, mid gametogenesis; Stage 4, late gametogenesis; NP, nutritive phagocyte.

960 個の EST (Expressed Sequence Tag、発現遺伝子の部分的な塩基配列情報) データを解析した結果、100 塩基以上の長さの独立した 869 種類の塩基配列情報を得た。この EST データを DNA データベースに照合したところ、約 70% が既報の塩基配列に対して有効な相同性 (E 値 $< 1E-20$) を示したが、残りは未知の塩基配列であった。また最も高い相同性を示すことが多かったのはアメリカムラサキウニ (*Strongylocentrotus purpuratus*) の登録配列であったが、これはアメリカムラサキウニの全ゲノムの塩基配列解析が行われたためである (Sea urchin genome sequencing consortium, 2006)。また、EST ライブラリーからのランダムな遺伝子解析と平行して、これまでの他種のウニ卵巣において発現していることが確かめられている透明層タンパク質、卵黄タンパク質などについても直接遺伝子クローニングを行った。

このようにして得られた成熟初期の卵巣で発現している遺伝子群から、配偶子形成の開始マーカーの候補遺伝子を次のように選択した。第一には、直接クローニングした遺伝子あるいは EST ライブラリーからクローニングした遺伝子から卵発達と関連が深いと判断された YP30 (30kDa 卵黄蛋白質) 及び dynamin (MYP リセプター) 遺伝子を解析対象とした。第二には、EST ライブラリーから塩基配列解析した 960 個の卵巣発現遺

伝子をスライドグラス上に整列して吸着させた cDNA マイクロアレイを作製し、それを用いて成熟に伴う遺伝子群の発現の変化の概要を解析した。その結果から、成熟初期に発現量の上昇した 16 遺伝子を候補遺伝子として選んだ。

次いでこれら合計 18 遺伝子について、より正確に遺伝子発現量を測定できるリアルタイム PCR 法を用いて、未熟期から成熟後期までの遺伝子発現量の変化を定量した。その結果、15 遺伝子は成熟期間中に遺伝子発現量が高まることが確認された。これらの遺伝子配列から推測される産物には、表層顆粒タンパク質、細胞分裂調節因子、成長因子、酵素、精子活性化因子、未知のものなどが含まれていた (table 1)。

ウニ類の成熟の人為コントロールに向けた展望

ウニ類は技術的には養殖できるが、実際の養殖生産量は極めて少ない。その主な原因は、天然物の漁獲と比較して、養殖が経済的に見合わないためである。食用に適したウニの生殖巣は、十分に栄養分を蓄積している未熟期のものである。このため天然ウニの旬の時期は限られる。旬の時期を長く保ち、端境期にも出荷できるような付加価値を持った産物を作ることができれば、養殖生産を促進するための一つの解決手段に成

Table 1 List of genes highly expressed in the ovary during oogenesis

Homologous gene	Function in sea urchin oocytes	Fold induction*	Expression ratio** Female / Male
beta 1.3-glucanase	digestion of fertilization envelope	22.10	14.87
sperm-activating protein	activation of sperm mobility	10.44	61.44
fibropellin-1 precursor	component of hyaline layer	9.46	66.81
cyclin B	maturation promoting factor	8.40	9.55
dynamin	MYP receptor	6.08	no data
HeEL-1	component of hyaline layer	3.68	9.77
18kDa cortical vesicle protein	-	6.71	42.84
epidermal growth factor II precursor	-	17.63	42.14
fucosyltransferase 1 precursor	-	3.98	12.13
hypothetical protein XP_846215	-	4.81	31.41
hypothetical LOC752503	-	4.41	51.84
hypothetical LOC577181	-	38.47	57.88
unknown 1	-	6.07	46.08
unknown 2	-	4.95	9.36
unknown 3	-	4.01	24.61

*, Expression levels of each gene from stage 1 to 4 were measured by real time PCR, and normalized to the level of GAPDH. Fold induction was calculated as a ratio of the highest level during oogenesis (stage 1 - 3) to the level at immature stage (stage 1).

**, Expression levels were compared between both sexes by the microarray analysis, in which target genes were prepared from males and females at the stage 2.

りうるだろう。

旬の状態を長く保つためには、成熟の進行を遅らせる、あるいは成熟しないような管理手法が必要になる。これまでのところ、ウニ類の成熟をコントロールするホルモンなどの内的な因子は分かっていない。本研究では、成熟開始期に明瞭に遺伝子発現量が上昇する遺伝子を見出した。このような遺伝子をマーカーとして解析することで、成熟を調節する因子の特定を進めることが可能となる。成熟調節因子が特定されれば、どのような環境が成熟進行に影響を及ぼすかなどの解析を詳細に行うことができるようになる。さらには、成熟調節因子自体の機能を抑制することで未熟な状態を保つことができるかもしれない。

一方、近年の魚類等を用いた発生工学的な研究では、生殖巣の分化時に生殖細胞の分化に重要な働きを持つ遺伝子の発現を抑えることで、生殖細胞が欠除した生殖巣を作り出すことに成功している。本研究では、*vasa* や *nanos* 遺伝子が生殖細胞特異的に発現することを明らかにし、これらの遺伝子をマーカーとして生殖細胞の分化時期を明らかにした。これらの遺伝子の機能をノックダウンすることで、体細胞のみからなる成熟しない生殖巣を作り出すことができるかもしれない。

ウニ類の生殖巣の分化、成熟機構に関する研究はまだ緒に就いたばかりである。成熟の人為管理に向けてさらなる研究の進展が望まれる。

文 献

- Houk M S, Hinegardner R T, 1980: The formation and early differentiation of sea urchin gonads. *Biol. Bull.*, **159**, 280-294.
- Ogawa M, Amikura R, Akasaka K, Kinoshita T, Kobayashi S, Shimada H, 1999: Asymmetrical distribution of mitochondrial rRNA into small micromeres of sea urchin embryos. *Zool. Sci.*, **16**, 445-451.
- Ransick A, Cameron R A, Davidson E H, 1996: Postembryonic segregation of the germ line in sea urchins in relation to indirect development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6759-6763.
- Sea urchin genome sequencing consortium, 2006: The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*, *Science*, **314**, 941-952.
- Shyu A B, Raff R A, Blumenthal T, 1986: Expression of the vitellogenin gene in female and male sea urchin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3865-3869.
- Unuma T, Konishi K, Furuita H, Yamamoto T, Akiyama T, 1996: Seasonal changes in gonads of cultured and wild red sea urchin, *Pseudocentrotus depressus*, *Suisanzoushoku*, **44**, 169-175.
- Wong J L, Wessel G M, 2006: Rendezvin: an essential gene encoding independent, differentially secreted egg proteins that organize the fertilization envelope proteome after self-association, *Mol. Biol. Cell*, **17**, 5241-5252.