

棘皮動物のウニ

坂本 尚昭*・山本 卓

ウニといえば、海に棲息する棘（トゲ）のあるボール状の生き物として一般的には認識されているだろう。もちろん食材としてのウニも、寿司ネタ・瓶詰めなどでお馴染みである。したがって、ウニを使って研究していると家族に話すと、「美味しいウニをつくる研究？」と必ず言われる。あまり知られていないが、ウニは我々ヒトに近い生き物である。左右対称で目や脚をもつ昆虫よりも、ウニの方がはるかにヒトに近い生き物なのである。そんなウニだから、研究材料としての意義は大きい。また、ウニの研究にはあまり知られていない魅力的な部分もたくさんある。本稿では、そんなウニ研究の魅力について紹介したい。

研究材料としてのウニ

ウニは、世界で約950種いると言われている。四方を海に囲まれた日本には、約160種のウニが棲息している。広島県内の筆者らが活動している範囲内でも、バフンウニ・ムラサキウニ・アカウニ・サンショウウニ・トゲサンショウウニ・ハスノハカシパン・スカシカシパン・ヨツアナカシパン・オカメブンプク・ヒラタブンプク・オオブンプクなど、非常に多くの種を実際に見つけることができる。ウニを研究材料とするためには、海に潜ってウニを採集しているという印象をもつ方も多いだろうが、そんなことをしなくてもウニは容易に採集できる。

ウニの発生について研究するためには、産卵期のウニを採集してくる必要がある。我々がおもな研究材料としているバフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) は、産卵期が1月から3月の寒い時期であり、この時期に自分たちの足で海へ出て採集している。しかし、極寒の海に潜る必要はなく、この時期の大潮の日の深夜に磯ブーツを履いて海へ行き、岩の隙間などを探れば容易にウニを採集できる(図1)。もちろん、たくさんのウニを採集するためには、それなりの経験も必要ではある。

採集してきたウニは、水槽でしばらく飼育することも可能であり、必要に応じて採卵・採精し、受精させればよい。ウニの採卵・採精は非常に簡単であり、ウニの口器(アリストテレスの提灯)をピンセットで除去して体

腔内に塩化カリウム溶液を注入するだけである。この方法だとウニはいずれ死んでしまうが、口器を除去せずに塩化アセチルコリン溶液を体腔内に注射して採卵すれば、コリンエステラーゼの作用によりアセチルコリンが加水分解されるため産卵は一過的なものであり、その後もウニを水槽で飼い続けることができる。

ウニの発生を研究するにあたっての大きな問題点は、産卵期が限定されていることである。しかし近年、ウニの産卵期を人工的に調整することも可能になっている。広島大学のある東広島(西条)でも、水槽の温度を調節して産卵期をずらすことは可能であるが、やはり海から離れた土地であるため限界がある。しかし、お茶の水女子大学湾岸生物教育研究センターの清本正人博士は、臨海実験所という利点を生かして産卵期をずらしたウニを

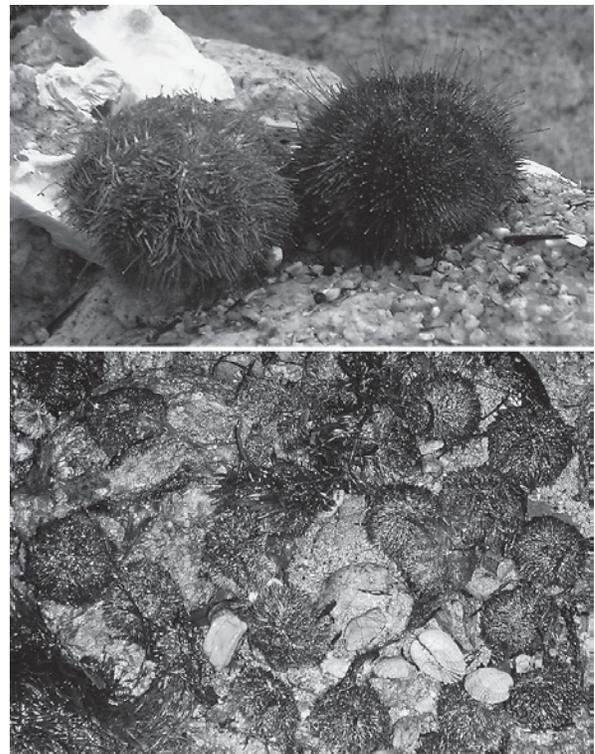


図1. 水槽で飼育中のバフンウニ(上)と海岸の岩の下で見つけたバフンウニの群れ(下)

* 著者紹介 広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻(准教授) E-mail: naosaka@hiroshima-u.ac.jp

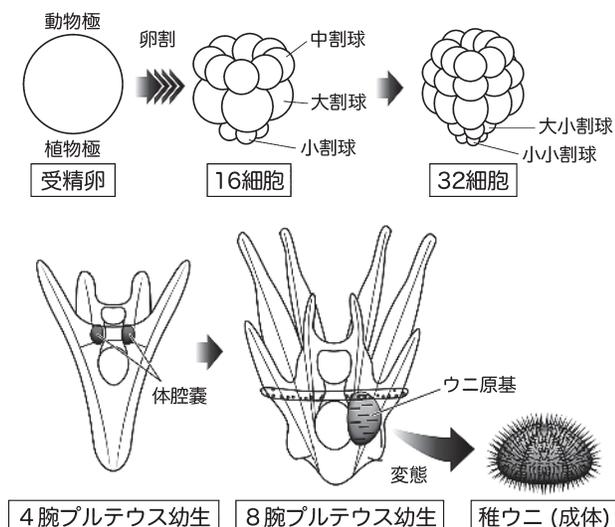


図2. ウニの32細胞期までの発生（上）とプルテウス幼生期以降の発生（下）の模式図

飼育しており、研究のために提供してもらえるので、ウニの発生研究における産卵期の問題は近年大きく改善されている。

食材としてのウニ

ウニといえば食材としてのウニだが、いったいウニのどの部分を食べているのかご存知だろうか。寿司ネタとして出てくるあの黄色いウニの身は、卵巣や精巣といった生殖巣である。生殖巣は、卵や精子という生殖細胞をつくり出し、遺伝情報を次世代へ伝達するための重要な器官である。我々の研究室では、ウニを使った研究のひとつとして、ウニの生殖細胞形成機構の解析を行っている。

ウニの発生は『生物学』の教科書にも出てくるところだが、少し復習しよう。ウニの卵は受精後、卵割とよばれる細胞分裂を繰り返す。ウニの卵は少量の卵黄が均一に分布した等黄卵であり、3回の卵割で8個の均等な大きさの割球を生じる。しかし第4卵割において、動物極側では等割により8個の中割球を生じるが、植物極側では不等割により4個の大割球と4個の小割球を生じる。ここまでは教科書でも馴染みのプロセスである。この後、もっとも植物極側にある4個の小割球はさらに不等分裂を行い、4個の大小割球と4個の小小割球に分かれる(図2)。このときに生じる大小割球は幼生の骨格を形成する細胞となるが、小小割球はウニの生殖細胞の起源であると考えられている¹⁾。我々は、小小割球に由来する細胞が未分化性を維持し、生殖細胞へと分化する過程について、遺伝子レベルで解析を行っている。*Nanos* 遺伝子

は多くの動物で生殖細胞の形成や維持に必要な遺伝子であることが知られているが、我々はウニの*Nanos* ホモログ (*HpNanos*) について解析し、*HpNanos* mRNA が小小割球由来細胞で特異的に発現することを示した²⁾。また、*HpNanos* をノックダウンすると小小割球由来細胞が将来の成体になる体腔囊へと移動できなくなることを示した³⁾。さらに、*HpNanos* ノックダウン胚では別の細胞系譜で*HpNanos* mRNA の発現が新たに誘導される³⁾。このような調節性の高さも、ウニの魅力の一つであると言える。

我々が寿司ネタとして食しているあの黄色い部分は前述の通り生殖巣だが、では本当に卵や精子を食べているのだろうか？ 実は我々が美味しく食べているのは、生殖巣の中でも卵や精子などの生殖細胞ではなく、配偶子形成に必要な栄養を蓄えている栄養細胞という体細胞である。バフンウニの場合、食用に採集するのは夏場であり、決して産卵期のウニを使うわけではない。というのも、バフンウニの生殖巣では夏場にエサの海藻から栄養を蓄えた栄養細胞が大きくなり、その後産卵期に向けて生殖細胞が成熟するにつれて栄養細胞が小さくなっていく。実は生殖細胞が成熟してくると、ウニの種によっては苦味が出てきたり、溶けやすくなったりして食用に向かなくなってくるらしいのである⁴⁾。生殖細胞の形成や成熟をコントロールできれば、旬の時期が長く美味しいウニが作れるかもしれない⁵⁾。このように、生殖細胞形成に関する研究は、「美味しいウニをつくる研究」という側面からも、興味深い研究である。

発生学研究におけるウニ

ウニといえば、昔から発生学の材料として知られている。ウニが発生学の研究材料として優れている点は、採卵・採精が容易であり、研究室内で簡単に人工受精させることにより大量の同調胚を得られることである。また胚の透明度が高いため、胚の内部構造まで顕微鏡で詳細に観察でき、目的のタンパク質と緑色蛍光タンパク質(GFP)の融合タンパク質を発現させればその細胞内局在も明瞭に観察できる(図3)。さらに胚操作が可能であり、割球の分離実験やさまざまな割球の組合せ実験から、ウニの発生の基本的な仕組みが明らかにされてきたことは有名である。

ウニのプルテウス幼生は、我々人間と同じ左右相称な構造をしているが、成体のウニはまったく異なる形をしている。一見すると丸いボール状の体をしているが、実は五放射相称とよばれる構造であり、生殖巣などの構造が5つ放射状に配置されている。ウニと同じ棘皮動物に

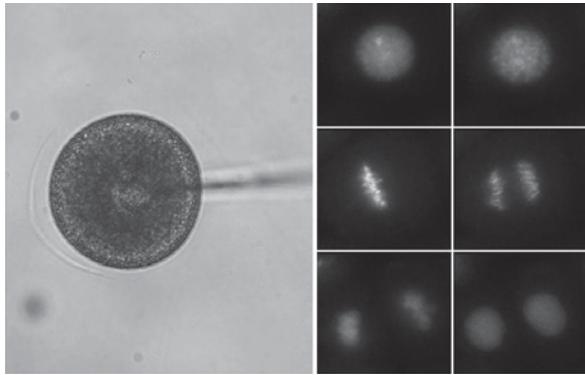


図3. 顕微注入法による遺伝子導入（左）とH2B-GFP融合タンパク質の発現による染色体の観察（右）

属しているヒトデの体を想像すると分かりやすいだろう。このような五放射相称の体は、ウニ・ヒトデ・ナマコ・クモヒトデ・ウミユリなどを含む棘皮動物の特徴である。

では、左右相称なウニの幼生が、どのような過程を経て五放射相称の成体になるのかご存知だろうか。プリズム期になると、原腸先端部の両側に一对の体腔囊が生じる。ここには、上記の小小割球に由来する細胞や、大割球に由来する細胞の一部が含まれる。プルテウス幼生になって口ができると、ウニの幼生はエサとなる珪藻を食べながら成長を続ける。その過程で、あるとき幼生の左側から羊膜陥と呼ばれる陥入が生じ、左体腔囊に由来する水腔を包み込む。これがウニ原基とよばれる成体原基を形成するのだが、このウニ原基が五放射相称の体をもっており、変態を経て成体のウニ（稚ウニ）となる（図1）。つまり、幼生の体の左側にある体腔囊から、まったく異なる体制の体が新たにつくられ、これが成体となるのである。稚ウニまでの発生過程の詳細については、我々の研究室のホームページにおいて写真付で解説しているので、そちらを参考にしていきたい⁶⁾。

遺伝子研究におけるウニ

ウニを用いた研究の利点の一つは、大量の同調胚を得られることにある。各発生ステージの胚を大量に得られるため、それぞれの発生ステージの核抽出液を得ることも可能であり、我々もこれらの核抽出液を用いて転写調節因子の精製・同定を行ってきた。ただ最近では、質量分析などの解析技術の革新により、微量のタンパク質試料からの転写調節因子の同定が可能となっている。

ウニを用いた研究では、遺伝子導入法が確立されていることも大きな利点である（図3）。遺伝子の転写調節機構の解析では、ルシフェラーゼや緑色蛍光タンパク質

（GFP）などのレポーター遺伝子を用いた解析がよく行われてきた。さらに、モルフォリノアンチセンスオリゴを用いた標的遺伝子の特異的な発現阻害も可能であり、ウニにおける遺伝子の機能解析では欠かせないツールとなっている。これらの技術を駆使して近年、ウニの形態形成における遺伝子調節ネットワークが解析され、ウニの発生を遺伝子の連鎖的な発現調節とそれらの複雑な相互作用として捉えられるようになってきた^{7,8)}。

近年の研究において欠かせないのがゲノム情報であり、ウニにおいては2006年にアメリカムラサキウニ（*Strongylocentrotus purpuratus*）のゲノムが解読されている⁹⁾。それによると、ウニのゲノムサイズは、8億1400万塩基対であり、23,300個の遺伝子をもっていることが示された。面白いことに、ヒトの遺伝子と大差ない数の遺伝子を、体の構造がまったく異なるウニもっているのである。しかも、もっている遺伝子のセットも、ヒトと大きく共通しているのだ（もちろんウニらしさを生み出すためのウニに特異的な遺伝子も存在する）。これは、ウニとヒトが共通の祖先から進化してきたことを意味する。では、ウニとヒトはなぜこんなにも見た目の形が違うのだろうか？

Otx（*Orthodenticle-related protein*）遺伝子は、ショウジョウバエや脊椎動物で頭部形成に必要な転写調節因子をコードする遺伝子として知られている。この遺伝子を欠損すると、動物に頭部構造が形成されなくなるのである。ウニは明確な頭部構造をもたないにも関わらず、この頭部形成に必要な *Otx* 遺伝子をもっている。非常に不思議な話である。我々は、ウニの *Otx* が反口側外胚葉特異的に発現するアシルスルファターゼ（*HpArs*）遺伝子を標的とすることを示した¹⁰⁾。すなわち、ウニは *Otx* 遺伝子の使い方を変え、別の目的に利用していると考えられる。しかし、後期型の *Otx*（*HpOtxL*）はプリズム幼生期に口側外胚葉でも発現しており、*Otx* は頭部に限らず胚の前方部分の形成に関与するとも考えられる¹¹⁾。

また、ウニには明確な器官としての眼（視覚器）をもたないが、光を感知できることは古くから知られている。では、ウニはどこで光を感知しているのか。その答えは、ウニのゲノム情報にあった。アメリカムラサキウニの解析によると、ウニゲノム中には *pax6*・*atonal*・*neuroD*・*barhl* といった脊椎動物の網膜形成に必要な遺伝子群や、6つの光受容タンパク質（オプシン）遺伝子が存在していた^{12,13)}。しかも、これらは成体のウニの管足に発現していたのである。つまり、ウニの光受容細胞が管足に存在していたのである。また、ウニゲノムには嗅覚など他の感覚に関連する遺伝子も見つかっており⁹⁾、ウニがど

のようにして世界を感じているのか想像すると面白い。

上述した体腔囊において五放射相称の体がつくられる分子メカニズムについては、非常に興味深いところである。このメカニズムが遺伝子レベルで解明されるとよいが、いまだ解明には至っていない。その原因の一つが、ウニ原基の形成までに長い時間を要することである。遺伝子ノックアウトが利用できないウニではモルフォリノアンチセンスオリゴを用いてノックダウンを行うのが一般的であるが、モルフォリノアンチセンスオリゴは受精卵に顕微注入して使用しており、ウニ原基形成の時期までは効果が持続しないのである。HOX遺伝子群などを阻害できるとよいが、それが難しいのである。しかし近年、Zinc-Finger Nuclease (ZFN) や Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) などの人工ヌクレアーゼによるゲノム編集技術が開発され、遺伝子改変が困難であった動植物でも遺伝子破壊などの操作が可能となってきた^{14,15)}。我々は、ZFNを用いたウニでの遺伝子破壊に成功しており¹⁶⁾、TALENについても技術開発などを進めている¹⁷⁾。これらの技術を駆使してウニのF0ノックアウトが可能となれば、ウニ原基形成の時期まで特定の遺伝子を破壊できるようになり、五放射相称な形態形成を含めた後期発生のメカニズムが明らかになると期待される。

ウニの“クローニング”

『クローニング』というと、遺伝子やcDNAの単離を連想する人が多いだろう。ところがウニを含めた棘皮動物には、これとは異なる意味の『クローニング』という現象が知られている。ここでいう『クローニング』は無性生殖の一種で、幼生の体から出芽のように新個体が形成される現象であり、ウミユリ綱を除く棘皮動物では広く行われる¹⁸⁾。しかも、人工的に誘導される現象ではなく、自発的に起こる現象なのである。

たとえば、バフンウニと比較的近縁なアメリカムラサキウニの場合、受精後4週間のプルテウス幼生の約5%において、幼生の後端部に出芽が見られるという¹⁸⁾。それらは幼生から離れ、2週間後には通常の幼生の形態となり、3週間後には成体原基を形成するのである。カシパンにおいても、3.5%の幼生でクローニングが見られる。

このようなクローニングを促進する条件についてはヒトデ (*Pisaster ochraceus*) の幼生で調べられており、幼生にとって適切な温度と餌が存在する環境において、より多くのクローンが生じることが示されている¹⁹⁾。こ

のようなクローニングは、自然界での死亡率が高い幼生が、成長に適した環境下で少しでも個体数を増やすための戦略であると考えられている。

さらにウニでは、捕食者である魚の影響により、クローニングが促進されるという報告がある²⁰⁾。カシパン (*Dendraster excentricus*) の受精後4日のプルテウス幼生では通常クローニングは起こらないが、0.1 mg/mlの魚の粘液を含む海水で飼育すると、24時間以内に40%の幼生でクローニングが起こるといふ。これは、粘液により魚の存在を感じたときに、より小さく捕食者に見つかりにくいクローンを生み出し、捕食者から逃れるための生存戦略と考えられている。

ウニ胚における遺伝子導入や人工ヌクレアーゼによる遺伝子破壊では、胚を構成するすべての細胞でその効果が表れるわけではなく、効果のモザイク性が問題になる。クローニングのメカニズムについてはまだ不明な点は多いものの、もしこのクローニングがうまく利用できれば、モザイク性を解消するための有効な手段として利用可能になるかもしれない。

文 献

- 1) Yajima, M. and Wessel, G. M.: *Development*, **138**, 237 (2011).
- 2) Fujii, T. *et al.*: *Gene Expr. Patterns*, **6**, 572 (2006).
- 3) Fujii, T. *et al.*: *Dev. Dyn.*, **238**, 2511 (2009).
- 4) Unuma, T.: *The sea urchin: from basic biology to aquaculture* (Yokota Y. *et al.* eds.), 115 (2002).
- 5) 山野恵祐ら: 水研センター研報, **26**, 129 (2008).
- 6) <http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/msg/index.html>
- 7) Davidson, E. H. *et al.*: *Science*, **295**, 1669 (2002).
- 8) Davidson, E. H. *et al.*: *Dev. Biol.*, **246**, 162 (2002).
- 9) Sea Urchin Genome Sequencing Consortium: *Science*, **314**, 941 (2006).
- 10) Sakamoto, N. *et al.*: *Dev. Biol.*, **181**, 284 (1997).
- 11) Mitsunaga-Nakatsubo, K. *et al.*: *Int. J. Dev. Biol.*, **42**, 645 (1998).
- 12) Burke, R. D. *et al.*: *Dev. Biol.*, **300**, 434 (2006).
- 13) Raible, F. *et al.*: *Dev. Biol.*, **300**, 461 (2006).
- 14) Urnov, F. D. *et al.*: *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 636 (2010).
- 15) Joung, J. K. and Sander, J. J.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 49 (2013).
- 16) Ochiai, H. *et al.*: *Genes Cells*, **15**, 875 (2010).
- 17) Sakuma, T. *et al.*: *Genes Cells*, **18**, 315 (2013).
- 18) Evans, A. A. and Palmer, A. R.: *Nature*, **425**, 146 (2003).
- 19) Vickery, M. S. and McClintock: *Biol. Bull.*, **199**, 298 (2000).
- 20) Vaughn, D. and Strathmann, R. R.: *Science*, **319**, 1503 (2008).