

課題番号 3

## ウニ幼生後期から変態までの発生と運動能における ハンチントン病遺伝子の作用機構-2

[1] 組織

代表者：清本 正人

(お茶の水女子大学 基幹研究院自然科学系  
湾岸生物教育研究センター)

対応者：小椋 利彦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

加藤秀生(東北大学名誉教授)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

本研究計画は昨年度に行われた胚発生初期から幼生中期までのウニハンチントンタンパク(Hp-Htt)が幼生腕の繊毛帯附置線状構造(CBAS)に発現し、それがHp-Htt モルフォリノ(Hp-Htt-MO)投与によって消失し、同時に幼生腕の繊毛運動による渦流も消失し、幼生の遊泳行動が阻害されることを明らかにした。これによって、ヒトにおけるハンチントン病の原因の一つとされる脳室内の繊毛運動が関与する脳脊髄液の流動減少が、棘皮動物幼生における繊毛運動減少による遊泳運動の低下と機構的には良く似ていることが示された。Htt の機能が動物進化の中で、維持されている考えることができる。そこで、ウニ幼生のように発生後期には腕を消失する変態直前の8腕幼生と直後の稚ウニでは Htt がどのような働きをしているかが進化的機能を解明する重要な知見をもたらすと考えられることから、今回の研究テーマとした。本研究は、したがって、稚ウニに変態する直前の後期幼生内に形成される成体原基(Echinorudiment; ER)に注目して、ここへ Hp-Htt Morpholino antisense Oligo の3'末に Fluorescein (FL)を結合した FL-Hp-Htt-MO を作成し、細胞内取り込みを促進する Polyethylene glycol (PEG)と一緒に直接幼生の成体原基周辺に注入した。この時、Htt-MO の活性持続期間とされる1週間程度の際に、変態を誘導し、その効果を(1)幼生・稚ウニ繊毛の形成状況、(2)繊毛による水流発生(渦流; Swirling) 状況の解析、そして(3)渦流による遊泳運動パターンの解析によって検証した。これらには FL-Hp-Htt-MO の顕微注入、免疫組織化学結果の蛍

光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡(CFM)による観察を行なった。そのために、本研究計画の対応者の小椋利彦教授と随時連絡を E メール等で取りながら遂行した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、本研究の基礎となる FL-Hp-Htt-MO の顕微注入位置の確認を図1に示したように蛍光顕微鏡で行なった。注入は受精後38日の8腕ブルテウス幼生(38-dpf 8aPL)の ER 左右の体腔にそれぞれ100-200pL、合計1個体当たり、最大400pL 注入した(図1A)。その後直ちに変態誘導のために石灰紅藻(*Calcareous red algae*)を附着させたプラスチック板と一緒に3日間培養した。この期間に8aPLは8本の腕を退縮させ、多数の棘と叉棘を体表に形成した稚ウニに変態する。注入した FL-Hp-Htt-MO は稚ウニ体表面部位に観察された(図1B)。

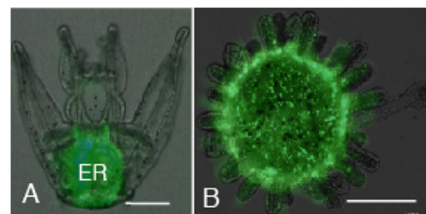


図1. 受精後38日の8aPLに注入したFL-Hp-Htt-MO(緑色)は成体原基(ER)領域に止まる(A)が、変態後3日の稚ウニでは体表面に広く認められる(B)。A、Bとも固定前の生体での蛍光写真。下線100 $\mu$ m(A)、200 $\mu$ m(B)。

第2に、8aPLまで発生したときのHtt-MOの繊毛帯形成への影響を免疫組織化学で解析した(図2)。

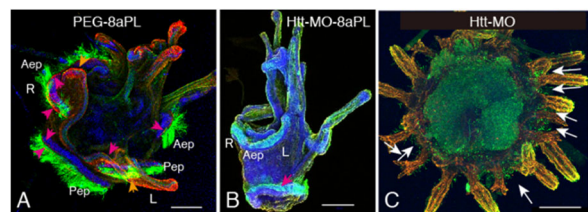


図2. 8aPL(A、B)と変態後3日の稚ウニ(C)におけるHtt(赤)、繊毛(Acetylated $\alpha$ -tubulin;緑)のCFM像。PEG単独注入幼生(A)と比較するとHtt-MO注入幼生(B)では幼生本体前方(Aep)での繊毛形成が後方(Pep)よりも著しく阻害されている。(C)稚ウニではHttを持つ短い繊毛は叉棘間の体表面(矢印)に多く認められる。下線100 $\mu$ m。

8aPLの繊毛帯は前方と後方の左右4箇所(図2A、B; L、R)に作られるがHtt-MO注入幼生では前方の繊毛帯形成阻害が後方繊毛帯より顕著に認められた(図2B)。これが渦流形成に及ぼす影響を解析すると、左右の後方繊毛帯(図3A、B: MO-RP、MO-LP)での渦流形成の上昇が見られた(図3C、矢印)。これは、前方繊毛帯繊毛の退縮に伴う渦流の縮小(図3B)が後方繊毛帯の保証的運動上昇として現れているのかもしれない。

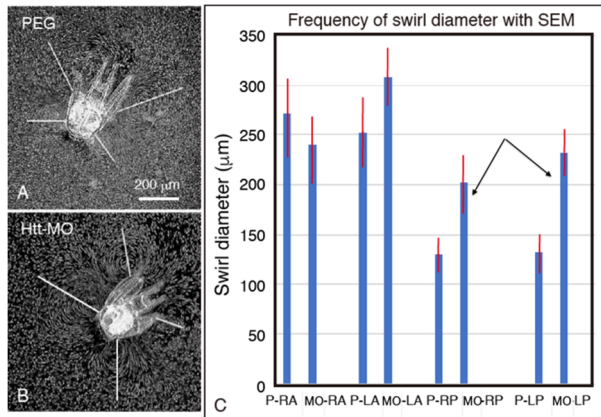


図3. 8aPLの前後の繊毛運動によって出現する渦(A、B)の大きさ(白線)は後方繊毛帯で拡張(C: MO-RP、MO-LP; 図中矢印)して見られる。各カラムの上の赤線はSEM。

最後に変態直後の稚ウニでの体表繊毛の動きを渦流解析で調べた(図4)。ここでは、Htt-MO処理は渦流サイズが縮小するが(図4A—C)、その数は増加することから(図4D)、補償的に小さな渦流を多数生じるのかもしれない。

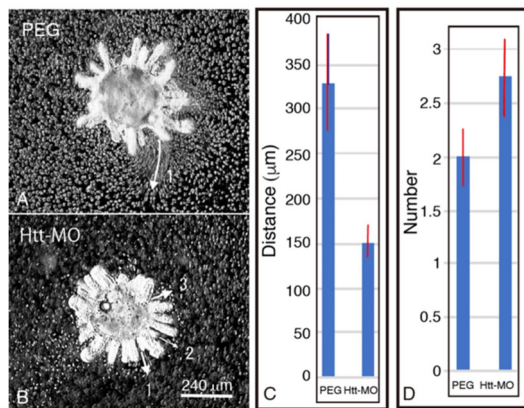


図4. 稚ウニ体表での水流は体表の叉棘間(図4矢印)を起点として発生し、その到達距離はPEG注入ウニ(A)では体表から平均300μm離れた位置まで到達する(C: PEG)がHtt-MO注入ウニではその半分の150μmに減少する(C: Htt-MO)。一方、渦の数はHtt-MO注入個体では増加する(D: Htt-MO)。(C)、(D)の各カラムの上の赤線はSEM。

以上から、本研究では、Htt-MOは体表の繊毛形成とその運動に、従って、8aPLおよび幼生の遊泳運動に大きな影響を与えることが示された。

### (3-2) 波及効果と発展性など

昨年度のウニハンチントン研究結果は世界的にもウニでの研究例としてNCBIでの文献検索のトップ付近に紹介されている。機会があれば、国際会議からの招待の一つにでも応じて、この分野の研究交流に貢献したい。国内においても少なからずの学外研究者たちとの交流グループができて来たので、今後はナマコ等の進化系列的関係にある海産無脊椎動物を用いて、より詳細な学問領域の創成に貢献したい。

### [4] 成果資料

(1) Katow, H., Katow, T., Kiyomoto, M. (2019) The ontogeny of synaptophysin expression patterns on the GABAergic ciliary band-associated strand during larval development of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* A. Agassiz, 1864. *Zoomorphology* 138:117–126.

(2) Katow, H., Yoshida H., Kiyomoto, M. (2020) Initial report of  $\gamma$ -aminobutyric acidergic locomotion regulatory system and its 3- mercaptopropionic acid-sensitivity in metamorphic juvenile of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Scientific Reports* 10:778 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57567-w>

(3) Katow, H., Abe, K., Katow, T., Yoshida, H., Kiyomoto, M. (2020) Involvement of Netrin/Unc-5 Interaction in Ciliary Beating and in Pattern Formation of the Ciliary Band-Associated Strand (CBAS) in the Sea Urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 6587; doi:10.3390/ijms21186587

(4) Katow, H., Yoshida, H., Kiyomoto, M. (2021) Spatiotemporal immunohistochemical expression pattern of Huntington disease protein and its involvement in ciliary beating at the larval ciliary band of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *International Journal of Molecular Sciences* 22,5116. <https://doi.org/10.3390/ijms22105116>