

ウニ幼生の発生における Wnt7 の機能解析

具志堅 芽生 (筑波大学生物学類)

指導教員：谷口 俊介 (筑波大学生命環境系)

【背景・目的】

ウニ胚・幼生の発生過程にはさまざまなシグナル分子や転写因子のネットワークが関与している。その中で、他の動物種の発生過程において重要な細胞外シグナル分子として知られている Wnt グループに私は着目し、今回は Wnt7 の機能解析を試みた。ウニの受精卵に Wnt7 特異的なモルフォリノオリゴを用いたノックダウンを行うと、プルテウス幼生期にて明確な形態の変化が見られることが所属研究室のこれまでの成果で明らかになっている。具体的には、腕が短くなり体が後方側に伸びた状態となる (図 1)。この形態的差異だけでなく、本卒業研究では正常発生下のプルテウス幼生期に脳および繊毛帯の神経系が発達する点に着目し、それらがどのように変化しているのかを明らかにするため、神経および繊毛帯、繊毛そのものをマーカーとした染色と観察を行った。

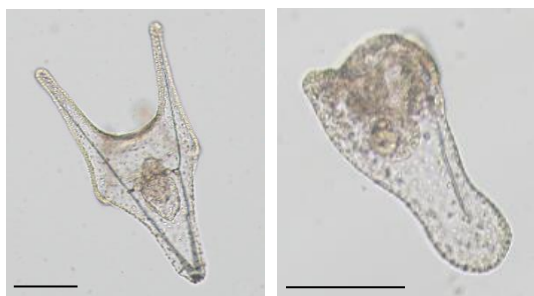


図 1. バフンウニのプルテウス幼生
コントロール胚 (左) と Wnt7 ノックダウン胚 (右)
スケールバー：50 μ m

【方法】

・Wnt7 ノックダウン

バフンウニおよびエゾバフンウニの受精卵に対し、Wnt7 特異的なモルフォリノオリゴを用いたマイクロインジェクションを行った。コントロール胚にはインジェクションの際に溶媒として用いるグリセリンを注入した。それぞれ 15°C のインキュベーターで飼育し、受精後 24 時間にて水替えを行った。

実験 1：受精後 40、48、72、96、120 時間が経過した胚・幼生をそれぞれホルマリンで固定し、神経系を特異的に認識するセロトニン抗体・SynB 抗体 (全神経マーカー) にて免疫染色し、観察した。

実験 2：受精後 48、72 時間が経過した幼生をそれぞれホルマリンで固定し、繊毛帯のマーカーとして転写因子 Hnf6 の mRNA を、骨片細胞のマーカーとして SM50 の mRNA を *in situ* hybridization 法にて染色し、観察した。

実験 3：受精後 72 時間が経過した胚をメタノールで固定し、繊毛そのもののマーカーとして acetylated tubulin 抗体にて免疫染色し、観察した。

【結果】

・実験 1 (神経系)

受精後 40 時間では、Wnt7 ノックダウン胚に発生の遅れが見られた。コントロール胚では一部がプルテウス幼生になっていたのに対し、Wnt7 ノックダウン胚は全てプリズム幼生のままであった。

受精後 48 時間では、コントロール胚のすべての個体がプルテウス幼生になり、9 割以上の胚で脳領域のセロトニン神経細胞が明確に見えた (14/15 匹)。一方 Wnt7 ノックダウン胚では、まだプリズム幼生のままの個体が存在し、セロトニン神経細胞が明確に観察できる個体はいなかった (0/11 匹)。

受精後 72 時間では、コントロール胚のすべての個体でセロトニン神経細胞を明確に観察することができた (17/17 匹)。一方で Wnt7 ノックダウン胚では、セロトニン神経細胞を明確に観察できる個体は全体の約 2 割だった (4/21 匹)。

受精後 96 時間では、コントロール胚のセロトニン神経細胞の個数は平均して 8.6 個であり、Wnt7 ノックダウン胚では 6.6 個であった (ともに n=10)。また、Wnt7 ノックダウン胚では、コントロール胚と比較してセロトニン神経細胞の分布域、つまり脳領域が明らかに狭まっており、SynB についても同様に、より狭い範囲でのみ観察された。

受精後 120 時間でも、コントロール胚と比較して Wnt7 ノックダウン胚で神経細胞の減少が見られた。

・実験 2 (繊毛帯、骨片細胞)

受精後 48 時間胚において、Wnt7 ノックダウン胚ではコントロール胚と比較して脳領域の Hnf6 の発現量が少ないように見えた。

骨片細胞は、Wnt7 ノックダウン胚でもコントロール胚と差異はそれほど見られなかった。

・実験 3 (繊毛)

コントロール胚と比較して、Wnt7 ノックダウン胚では脳領域の繊毛が明瞭でなかった。

【考察・今後の展望】

実験 1 の結果より、コントロール胚と比較して、Wnt7 ノックダウン胚では発生が遅れるように見え、Wnt7 ノックダウンの影響により正常な発生が阻害されている可能性が示唆された。さらに、発生が十分に進んだと思われる 120 時間の段階でも神経系が分布する領域に差が生じたことから、Wnt7 は特に神経の分化および脳領域のパターニングを制御していることが示唆された。今回の解析結果は、形態的に見られる劇的な差異の一部をより明確に説明することにつながったが、まだ十分ではないため、他の遺伝子マーカーや遺伝子の機能と組み合わせで解析することによって、Wnt7 の機能をより明確にしていこう。