

Title	海産動物を材料とした非モデル生物の発生現象 (卵成熟、受精、成長、形態形成) の解明
Sub Title	Study on developmental phenomena in non-model marine invertebrates : oocyte maturation, fertilization, growth and morphogenesis
Author	倉石, 立(Kuraishi, Ritsu)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2022
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2021. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>Dinophilus 属多毛類に関する研究</p> <p>1) 受精可能な卵を採取する技術の模索</p> <p>Dinophilus sp のメス胚を卵嚢から取り出し、オス胚から隔離することで未交尾のメスを得る技術を確認した。未交尾メスは産卵せず、卵を体内に蓄積した。卵蓄積後にオスと交尾させることで、これらのメスが発生可能な卵を産むことを確かめ、未交尾メスが体内に蓄積する卵が受精可能な未受精卵であることが明らかにした。今後は、このような卵を体外に採取し、体外受精を可能にする系の確立を試みる。</p> <p>2) EdU による精子の標識と交尾後の精子の追跡</p> <p>交尾によりメスにもたらされた精子がどのように貯えられ受精に使われるか知るため、精子系列細胞をEdUで標識することにより追跡を試みた。3日目におけるEdUパルス処理で精原細胞が標識されることは確認できたが、EdUの細胞毒性によりその後の発生は停止した。十分な標識を得られ、かつ細胞毒性を示さない標識条件の検討が課題として残された。</p> <p>ヒトデ幼生の成長メカニズムに関する研究</p> <p>1) アスタチン族メタロプロアーゼMC5分子によりアポトーシス細胞死は回避されているか？</p> <p>TGFbを活性化させて上皮増殖を誘起するMC5分子が、細胞の生存にも関与している可能性を見出していた。TGFbとMC5分子のモルフォリノオリゴ(MO)で発現を抑制させた各サンプルでは、アポトーシス細胞死の特徴である細胞の断片化がMC5-MOサンプルのみで電子顕微鏡下で検出され、TGFb-MOでは検出されなかった。なお、ペプチド性アポトーシス阻害剤とMC5-MOの同時注射では、MC5-MOに特徴的な著しい細胞数の減少が緩和された。</p> <p>2) 受精後の初期胚から得た分離割球の胚期と幼生期における成長特性</p> <p>時間依存的に進行する胚期の発生と異なり、摂餌を行うビピンナリア幼生期以降はサイズ依存的な成長段階のシフトが生じることが判明した。摂餌必要性的検討実験では、ビピンナリア幼生期の前半は母性栄養で成長が可能であるのに対し、後半以降は餌が必須条件になることが示唆された。温度感受性の感覚神経細胞が発現しているTRPAチャネル機能をモルフォリノで抑制したところ、胚期の発生には何ら影響はなかったが、ビピンナリア幼生の摂餌量は減少し、成長速度が遅延した。これにより、成長に感覚神経細胞が関与している可能性が浮かび上がった。</p> <p>1-1 Preparation of fertilizable oocytes of Dinophilus sp</p> <p>We established the protocol to obtain virgin female of Dinophilus sp by isolating female embryos from cocoons and allowed develop solitarily. The females stored fully grown oocytes in their body cavity but could not spawn. Since the females spawned fertilized eggs after mating with males, we confirmed the stored oocytes are fertilizable. We are now examining the appropriate condition to fertilize these oocytes in vitro.</p> <p>1-2 Labeling spermatozoa in developing male embryo of Dinophilus sp</p> <p>In order to trace the behavior of spermatozoa within female body after mating, we tried to label sperm nuclei in developing male embryo. In the preliminary study, we confirmed that pulse treatment of EdU on the third day of development resulted in clear labeling of spermatogonia in male embryos. However, the treated embryos ceased development because of the cytotoxicity of EdU. Examination of appropriate condition of EdU labeling of spermatozoa is in progress</p> <p>2-1 MC5 molecule ( Astacine metalloprotease ) prevents to trigger apoptotic cell death of the epithelial cells ?</p> <p>We examined the possibility of the MC5 molecule, which induces epithelial cell proliferation through activating the TGFb, being responsible for the survival of the epithelial cell itself. Electron microscopy of samples whose expression was suppressed by morpholino-oligo (MO) injection displays cell fragmentation characteristic of apoptotic cell death only in the MC5-MO samples and not in the TGFb-MO samples. Furthermore, simultaneous injection of peptidic apoptosis inhibitor and MC5-MO relieved significant decrease cell numbers characteristic of effect of only MC5-MO.</p>

	<p>2-2 (2) The developmental characteristics of the isolated blastomeres after insemination during the embryonic and larval stages</p> <p>It was discovered that in contrast to the synchronous embryonic development, during the bipinnaria larval stage when feeding takes place, there exist size-dependent shifts in the developmental stages of starfish larvae. Experiments examining the need for feeding in larvae suggested that maternal nutrition was capable of providing for the first half of the bipinnaria stage, whereas feeding was a necessity to continue developing thereafter. When the TRPA-MO was used to suppress the TRPA channel, in which temperature-sensitive sensory neurons are expressed, it had no effect at the embryonic stage but caused a reduction in the feeding amount of bipinnaria larvae and consequently significantly delayed growth. This raised the possibility that sensory nerve cells are involved in the growth of starfish larvae.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2021000004-20210027">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2021000004-20210027</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	文学部	職名	准教授	補助額	1,337 千円
	氏名	倉石 立	氏名（英語）	Ritsu Kuraishi		
研究課題（日本語）						
海産動物を材料とした非モデル生物の発生現象(卵成熟、受精、成長、形態形成)の解明						
研究課題（英訳）						
Study on developmental phenomena in non-model marine invertebrates: Oocyte maturation, fertilization, growth and morphogenesis						
研究組織						
氏 名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
倉石 立 (Ritsu Kuraishi)		文学部・准教授				
松本 緑 (Midori Matsumoto)		理工学部・生命情報・准教授				
清水 史郎 (Siro Simizu)		理工学部・応用化学・教授				
坪川 達也 (Tatsuya Tsubokawa)		法学部・専任講師				
金子 洋之 (Hiroyuki Kaneko)		文学部・名誉教授				
1. 研究成果実績の概要						
<p>Dinophilus 属多毛類に関する研究</p> <p>1) 受精可能な卵を採取する技術の模索</p> <p>Dinophilus sp のメス胚を卵嚢から取り出し、オス胚から隔離することで未交尾のメスを得る技術確立した。未交尾メスは産卵せず、卵を体内に蓄積した。卵蓄積後にオスと交尾させることで、これらのメスが発生可能な卵を産むことを確かめ、未交尾メスが体内に蓄積する卵が受精可能な未受精卵であることが明らかになった。今後は、このような卵を体外に採取し、体外受精を可能にする系の確立を試みる。</p> <p>2) EdU による精子の標識と交尾後の精子の追跡</p> <p>交尾によりメスにもたらされた精子がどのように貯えられ受精に使われるか知るため、精子系列細胞を EdU で標識することにより追跡を試みた。3 日目における EdU パルス処理で精原細胞が標識されることは確認できたが、EdU の細胞毒性によりその後の発生は停止した。十分な標識を得られ、かつ細胞毒性を示さない標識条件の検討が課題として残された。</p> <p>ヒトデ幼生の成長メカニズムに関する研究</p> <p>1) アスタチン族メタロプロアーゼ MC5 分子によりアポトーシス細胞死は回避されているか？</p> <p>TGFb を活性化させて上皮増殖を誘起する MC5 分子が、細胞の生存にも関与している可能性を見出していた。TGFb と MC5 分子のモルフォリノオリゴ(MO)で発現を抑制させた各サンプルでは、アポトーシス細胞死の特徴である細胞の断片化が MC5-MO サンプルのみで電子顕微鏡下で検出され、TGFb-MO では検出されなかった。なお、ペプチド性アポトーシス阻害剤と MC5-MO の同時注射では、MC5-MO に特徴的な著しい細胞数の減少が緩和された。</p> <p>2) 受精後の初期胚から得た分離割球の胚期と幼生期における成長特性</p> <p>時間依存的に進行する胚期の発生と異なり、摂餌を行うビピンナリア幼生期以降はサイズ依存的な成長段階のシフトが生じることが判明した。摂餌必要性の検討実験では、ビピンナリア幼生期の前半は母性栄養で成長が可能であるのに対し、後半以降は餌が必須条件になることが示唆された。温度感受性の感覚神経細胞が発現している TRPA チャネル機能をモルフォリノで抑制したところ、胚期の発生には何ら影響はなかったが、ビピンナリア幼生の摂餌量は減少し、成長速度が遅延した。これにより、成長に感覚神経細胞が関与している可能性が浮かび上がった。</p>						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
<p>1-1 Preparation of fertilizable oocytes of Dinophilus sp</p> <p>We established the protocol to obtain virgin female of Dinophilus sp by isolating female embryos from cocoons and allowed develop solitarily. The females stored fully grown oocytes in their body cavity but could not spawn. Since the females spawned fertilized eggs after mating with males, we confirmed the stored oocytes are fertilizable. We are now examining the appropriate condition to fertilize these oocytes in vitro.</p> <p>1-2 Labeling spermatozoa in developing male embryo of Dinophilus sp</p> <p>In order to trace the behavior of spermatozoa within female body after mating, we tried to label sperm nuclei in developing male embryo. In the preliminary study, we confirmed that pulse treatment of EdU on the third day of development resulted in clear labeling of spermatogonia in male embryos. However, the treated embryos ceased development because of the cytotoxicity of EdU. Examination of appropriate condition of EdU labeling of spermatozoa is in progress</p> <p>2-1 MC5 molecule (Astacine metalloprotease) prevents to trigger apoptotic cell death of the epithelial cells?</p> <p>We examined the possibility of the MC5 molecule, which induces epithelial cell proliferation through activating the TGFb, being responsible for the survival of the epithelial cell itself. Electron microscopy of samples whose expression was suppressed by morpholino-oligo (MO) injection displays cell fragmentation characteristic of apoptotic cell death only in the MC5-MO samples and not in the TGFb-MO samples. Furthermore, simultaneous injection of peptidic apoptosis inhibitor and MC5-MO relieved significant decrease cell numbers characteristic of effect of only MC5-MO.</p> <p>2-2 (2) The developmental characteristics of the isolated blastomeres after insemination during the embryonic and larval stages</p> <p>It was discovered that in contrast to the synchronous embryonic development, during the bipinnaria larval stage when feeding takes place, there exist size-dependent shifts in the developmental stages of starfish larvae. Experiments examining the need for feeding in</p>						

larvae suggested that maternal nutrition was capable of providing for the first half of the bipinnaria stage, whereas feeding was a necessity to continue developing thereafter. When the TRPA-MO was used to suppress the TRPA channel, in which temperature-sensitive sensory neurons are expressed, it had no effect at the embryonic stage but caused a reduction in the feeding amount of bipinnaria larvae and consequently significantly delayed growth. This raised the possibility that sensory nerve cells are involved in the growth of starfish larvae.

### 3. 本研究課題に関する発表

発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)
大蔵ヤマト (American High School)、倉石立 (慶大自然科学)、金子洋之 (慶大自然科学)	ヒトデ幼生の成長特性: サイズ依存性、摂餌必要性、感覚神経細胞の関与	日本動物学会関東支部第 74 回大会	2022 年 3 月 5 日