

Title	ウニ変態時の幼生組織の退縮に伴うアポトーシス
Sub Title	Apoptosis of retracting larval tissues during metamorphosis of sea urchin
Author	佐藤, 由紀子(Sato, Yukiko)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2004
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 No.35 (2004.) ,p.19- 27
JaLC DOI	
Abstract	Metamorphosis of sea urchin, <i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> , can be induced by L-glutamine. In metamorphosis, arms retracted initially and anterior and posterior-ciliary bands retracted finally. I report that retracting or presumptive retracting tissues of larvae show apoptosis during metamorphosis of <i>H. pulcherrimus</i> . When larvae were treated with glutamine, the apoptotic features, pycnonosis of chromatin and DNA fragmentation, were observed in arms earliest, and in anterior- and posterior- ciliary bands latest. These results suggest that apoptosis is important in retraction of larval tissue during metamorphosis of sea urchin.
Notes	
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20040000-0019

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.

ウニ変態時の幼生組織の退縮に伴うアポトーシス

佐藤 由紀子

Apoptosis of retracting larval tissues during metamorphosis of sea urchin

Yukiko SATO

Summary — Metamorphosis of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, can be induced by L-glutamine. In metamorphosis, arms retracted initially and anterior- and posterior- ciliary bands retracted finally. I report that retracting or presumptive retracting tissues of larvae show apoptosis during metamorphosis of *H. pulcherrimus*. When larvae were treated with glutamine, the apoptotic features, pycnosis of chromatin and DNA fragmentation, were observed in arms earliest, and in anterior- and posterior- ciliary bands latest. These results suggest that apoptosis is important in retraction of larval tissue during metamorphosis of sea urchin.

Key words: sea urchin, glutamine, apoptosis, metamorphosis, retraction

序 論

変態は、幼生の体制が成体の体制に作り替えられる複雑な発生過程であり、多くの動物において観察される。棘皮動物ウニは、遊泳性のプルテウス幼生が、底性の稚ウニに変態する。ウニの変態は、内因性のホルモンではなく、外因性因子が変態を開始するための引き金（トリガー）となっていることが特徴的で（Hingadner, 1969）、その機構を調べることは、変態を理解する上で非常に重要である。ウニの変態のトリガーとなる因子はバイオフィーム、緑藻類、紅藻類、ペプチド（Hingardner, 1969; Burke, 1984, Kitamura et al., 1993; Takahashi et al., 2002）など複数知られているが、特に、アミノ酸のL-グルタミンによる変態はよく研究されている（Naidenko, 1983; Yazaki and Harashima, 1994; Yazaki, 1995; Sato and Yazaki, 1999）。グルタミンによる変態では、変態誘導処理の開始から2, 3時間でプルテウス幼生の遊泳が停

止し、15~24時間で幼生表皮組織の退縮が始まり、処理から48時間で体内のウニ原基が外反して稚ウニになる。その後約1週間かけて稚ウニ背側に残っていた幼生表皮組織が完全に退縮する。しかし、この選択的な組織退縮の機構については全くわかっていない。

一般に、脊椎動物および無脊椎動物の正常発生では、形態形成や組織の再構築時に、遺伝的に制御された細胞死であるアポトーシスが働いている。アフリカツメガエルやウシガエルでは、変態時の尾の退縮にアポトーシスが関与していることが報告されている。ウニでは、発生初期胚の上皮にアポトーシスが生じ、変態が近づくとアポトーシス細胞が減少することが報告されている (Roccheri et al., 1997, 1999)。変態期のアポトーシスの報告は無いが、幼生をグルタミンで処理すると、幼生組織の細胞分裂活性が低下し (Yazaki, 1995)、腕、および口部周辺の上皮の核のクロマチンが凝集する (Sato and Yazaki, 1999) ことから、退縮する組織にはアポトーシスが生じている可能性が示唆されている。

本研究では、ウニにおいても、変態時の組織退縮に伴ってアポトーシス細胞死が生じることを検証するために、グルタミンによって変態を誘導した幼生の腕について、アポトーシスの特徴のクロマチンの凝集およびDNAの断片化を電子顕微鏡観察およびTUNEL法によって調べた。また、腕に遅れて退縮する胴部上皮についても、核クロマチンの観察とTUNEL法によるアポトーシスの解析を行った。

実験材料および方法

実験材料

1つがいのバフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus* から得た幼生を、野口 (1978) の方法を参考に、濾過滅菌した20°Cの海水中で飼育した。海水は、毎分30回転のモーターにつないだパドルで攪拌し、3日に一度取り替えた。餌は、珪藻の *Chaetoceros gracilis* と *Dunaliella tertiolecta* を毎日与えた。変態可能な幼生は、受精から45-60日で得られた。

変態誘導

変態誘導は、矢崎 (1995) の方法を参考に以下の要領でおこなった。5匹から10匹の幼生を5 mlの人工海水または 10^{-4} M L-グルタミンを含む人工海水 (グルタミン海水) で満たしたプラスチックプレートに入れ、20°Cで6時間または24時間処理した。変態過程を更に進行させる場合は、24時間グルタミンで処理をした後、グルタミンを含まない人工海水に移した。

核の観察

グルタミン処理した幼生を、1% OsO_4 、2% グルタルアルデヒドを含む0.45M酢酸緩衝バッファー (pH 6.4) で室温で1時間固定し、エタノールシリーズで脱水後、樹脂に胞埋した。ガラスナイフをウルトラミクロトーム (LKB 4800) に装填し、厚さ2 μm の薄切り切片を作成し、2% トリジンブルーで染色して、光学顕微鏡によって観察した。超薄切切片は、ダイヤモンド (microstar) で作成し、EM-fine glid no. 100 (Nisshin EM co.) に載せ、4% 酢酸ウランで3分、0.4% クエン酸鉛で3分染色したあと、透過型電子顕微鏡で観察した。

TUNEL法

TUNEL法は、断片化DNAを検出する方法として一般的である。TUNEL法の前に、グルタミン処理した幼生を、4%パラフォルムアルデヒドを含むカルシウムマグネシウム除去海水中で4℃で6時間固定し、70%エタノールに移して-20℃で保存した。固定サンプルを、O. C. T. compound (MILES) に包埋し、-18℃でCRYOCUT 1800 (Reichert-Jung co.) によって凍結切片を作成した。切片を、“in situ Cell Death Detection Kit, POD” (Rohm & Haas, Philadelphia, USA) を用いてTUNEL法を行った。発色はDABで行い、対比染色はメチルグリーン (Trevigen社) を用いた。

結果および考察

バフンウニ8腕幼生をグルタミン海水で処理すると、矢崎 (1995) の報告どおり、グルタミン処理開始から6-24時間で腕が短くなりはじめた (Figs. 1B-1D)。24時間のグルタミン海水処理後に人工海水に移すと、2日後に幼生の体内のウニ原基が外反して稚ウニになり、原管足を延ばして歩行し始めた。この時、右後背腕、口後腕、幼生胴部が稚ウニの背側に残り、2本の腕を背負った状態になった (Fig. 1E)。その後、残っていた組織は退縮を続け、腕、胴部扁平上皮、胴部繊毛帯の順になくなった。

退縮時の腕上皮の変化と細胞死

腕は、変態時に最も早く退縮が開始する器官である (Yazaki 1995; Fig. 1)。バフンウニ腕横断切片の電子顕微鏡像とその模式図をFig. 2に示す。バフンウニの腕上皮は大きく二つの領域に分けられる。一つは繊毛帯領域で、頂端側 (外界側) に長い繊毛をもつ円柱上皮細胞 (Fig. 2A 橙) によって形成される。上皮の大部分を占める残りの領域は、短い繊毛をもつ扁平上皮細胞 (Fig. 2A 青) と、細胞内に大きな小腔をもつ泡状細胞によって形成される (Fig. 2A fc)。泡状細胞はバフンウニにのみ見られる細胞で、他のウニでは報告がなく、機能および由来は一切わかっていない。扁平上皮細胞は泡状細胞に覆い被さって、仮足を泡状細胞間のスペースに進入させ基底膜に達する。この構造によって上皮は厚みを増していると考えられる。各上皮細胞は体表面でseptate junctionによって互いに結合する事によって外と界面を形成している。

24時間のグルタミン海水処理によって、繊毛帯も残りの領域も、上皮組織を構成する細胞間の隙間が広がった (Fig. 2B)。この隙間は、上皮の細胞が減少したために生じたものと考えられる。いずれの上皮細胞も体表面でのseptate junction構造は保たれており、外との界面効果は保たれたままであることが示された。また、全ての上皮細胞の核が丸くなりクロマチンが著しく凝集して、核の周囲に集まっていた (Fig. 2B, 矢尻)。この核の形態は、典型的なアポトーシス細胞の核と同じであった。

次に、アポトーシスの特徴の一つであるDNAの断片化をTUNEL法によって調べた。6時間のグルタミン処理で、腕の先端から中央部の細胞がTUNEL陽性になった (Fig. 3B)。グル

タミン処理6時間では腕の退縮はまだ始まっていないので、組織の退縮の開始に先だってアポトーシスが生じる事が示された。24時間のグルタミン処理で退縮を進ませた腕では、腕の先端から根本のほとんど全ての細胞がTUNEL陽性であり (Fig. 3C), 同じ腕の上皮組織でも位置によってアポトーシスの生じる時間に差があることが示された。

以上の結果から、腕の退縮は、上皮細胞がアポトーシスを起こして減少していくことによって進行していくと推察された。一般に、アポトーシスを起こした細胞は、食細胞に取り込まれたり、断片化して外に排出される。ウニ変態において、どのような機構で死んだ細胞が減少していくのかは今後の研究で明らかになるであろう。

胴部の細胞死

変態時の胴部の退縮は腕の退縮に遅れて始まる。グルタミン処理により、後から退縮する胴部組織にもアポトーシスが生じるかどうかを明らかにするために、胴部横断切片の観察と、TUNEL法による解析を行った (Fig. 4, Fig. 5)。胴部の大部分を占める上皮は、腕と同様に扁平上皮細胞と泡状細胞によって形成されるが (Fig. 4C), 左右体側の口後腕と後背腕に挟まれる領域の上皮は、扁平上皮細胞のみで形成されていた (Fig. 4B)。胴部前繊毛帯および後繊毛帯の円柱上皮細胞は、腕のものよりも細長かった (Fig. 4D, 4E)。

グルタミン24時間処理で、前繊毛帯および後繊毛帯の中央部の円柱上皮細胞を除き、全ての上皮細胞のクロマチンが凝集した (Figs. 4F, 4G, 4H)。TUNEL陽性の細胞は、グルタミン処理6時間では繊毛帯以外のすべての上皮で確認され (Figs. 5D, 5E), 24時間後には、繊毛帯の周辺領域の上皮にも確認された (Fig. 5F)。これらの結果から、胴部においても退縮はアポトーシスによって進行することが示唆された。左右体側の泡状細胞の無い領域における、扁平上皮細胞のクロマチンの凝集は著しく (Fig. 4F), この領域は他の領域よりも先に細胞死が開始することが示唆された。興味深いことに、左右体側の扁平上皮は、グルタミン処理6時間ではほぼ全ての細胞がTUNEL陽性であったのに (Fig. 5E), 24時間後にはTUNEL陰性であった (Fig. 5G)。DNAの断片化が進行しすぎると、TUNEL法による検出ができなくなることがあり、今回の結果はその現れであると考えられる。繊毛帯中央部の円柱上皮細胞はクロマチンの凝集もDNA断片化も起こしていなかった (Fig. 4I, Fig. 5F)。前繊毛帯および後繊毛帯は、外反後に退縮し、退縮スピードが腕などよりも遅い組織であることを考えると、この組織では、今回の実験で使用した変態ステージよりもっと遅い時期に散発的にアポトーシスが生じていくのではないかと考えられる。

一般にアポトーシスは組織内で散発的に生じる。一方、本研究の結果では変態時に退縮する各組織において、組織内のほとんどの細胞が短時間のうちに一斉にアポトーシスを起こした。このことから、ウニ変態時に見られるアポトーシスは、典型的なアポトーシスとは異なる性質を持っている可能性が予測される。昆虫の変態では退縮に伴ってアポトーシスに加え、オートファジー (自食作用を伴う細胞死) が生じていることが報告されている (Dai and Gilbert, 1997; 1999)。筆者は、予備的な実験で退縮中の組織に自食胞が存在することを確認している。

ウニの変態でも、アポトーシスと同時にオートファジーがおこっているかもしれない。また、本研究で、グルタミン処理をしてから細胞がアポトーシスを起こすまでの時間が組織の種類や、組織内での細胞の位置によって差があることが示された。なぜ、このような差違が生じるのかは不明であるが、死のシグナルに対する受容体の数や種類が細胞によって異なっている可能性が考えられる。これらの問題は、今後の研究により明らかにされるであろう。

引用文献

- Burke, R. D. (1984). Pheromonal control of metamorphosis in the pacific sand dollar, *Dentaster excentricus*. *Science*, 225, 442-443.
- Dai, J.-D. and Gilbert, L. I. (1997). Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis. *Insect Biochem. Mol Biol*, 27(1), 69-78.
- Dai, J.-d. and Gillbert, L. I. (1999). An in vitro analysis of ecdysteroid-elicited cell death in the prothoracic gland of *Manduca sexta*. *Cell Tiss Res*, 297, 319-327.
- Hinegardner, R. T. (1969). Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. *Biol Bull*, 137, 465-475.
- Kitamura, H., Kitahara, S., and Koh, H. B. (1993). The induction of larval settlement and metamorphosis of two sea urchins, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocardis crassispira*, by free fatty acids extracted from the coralline red algae *Corallina pilulifera*. *Marine Biol*, 115, 387-392.
- Naidenko, T. K. (1983). Laboratory cultivation of the sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*. *Soviet J Mar Biol*, 9, 46-51.
- Noguchi, M. (1978). Metamorphosis of the sea urchin. *Biology of Metamorphosis*. 89-115, eds. The Jap Soc of Develop Biologists, Iwanami-shoten, Tokyo (in Japanese).
- Roccheri (#100) Roccheri, M. C., Barbata, G., Cardinale, F., Tipa, C., Bosco, L., Oliva, O. A., Cascino, D., and Giudice, G. (1997). Apoptosis in sea urchin embryos. *Biochem Biophys Res Commun.*, 240, 359-366.
- Roccheri, M. C., Tipa, C., Bonaventura, R., and Matranga, V. (2002). Physiological and induced apoptosis in sea urchin larvae undergoing metamorphosis. *Int. J. Dev Biol*, 46, 801-806.
- Sato, Y. and Yazaki, I. (1999). A cellular analysis of sea urchin metamorphosis induced by L-glutamine. *Echinoderm Research 1998.*, eds. M. D. C. Carnevali and F. Bonasoro., 221-226, Rotterdam, Balkema.,
- Takahashi, Y., Itoh, K., Ishii, M., Suzuki, M., and Itabashi, Y. et al. (2002). Induction of larval settlement and metamorphosis of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* by glycolipids from the green alga *Ulva lens*. *Marine Biol*, 140, 763-771.

- Yazaki, I. and Harashima, H. (1994). Induction of metamorphosis in the sea urchin, *Pseudocentrorus depressus*, using L-Glutamine. *Zool Sci*, 11, 253-260.
- Yazaki, I. (1995). Quantitative analysis of metamorphosis induced by L-Glutamine in embryos of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Zool Sci*, 12, 105-112.

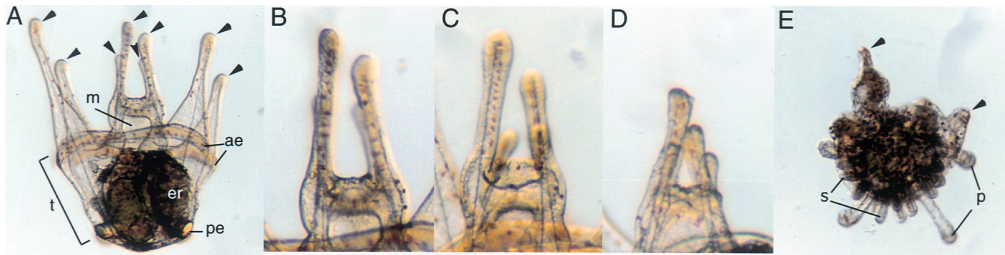


Fig. 1. グルタミンで誘導したバフンウニの変態

(A) 8腕プルテウス幼生 (背面図)。幼生は8本の腕 (矢尻) をもつ。胴部の前後に、前繊毛帯と後繊毛帯が発達している。(B-D) グルタミンによる腕の長さの変化。(B) コントロール, (C) 6時間グルタミン処理, (D) 24時間グルタミン処理。腕の長さはグルタミン処理開始から6時間までは変化がないが, 24時間後には短くなる。(E) グルタミン海水で24時間処理し, 人工海水に移してから2日目の稚ウニ (背面図)。背側に退縮中の腕 (矢尻) と胴部が背負われた状態になる。ae, 前繊毛帯; pe, 後繊毛帯; er, ウニ原基 (成体原基); p, 原管足; s, 棘; t, 胴部。

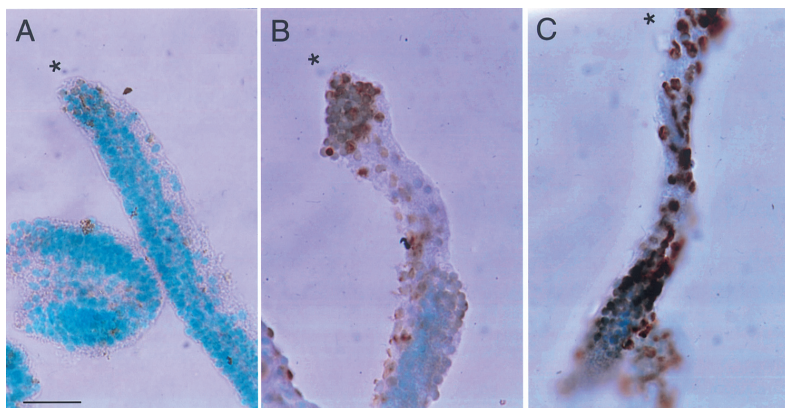


Fig. 3. 変態時の腕のTUNEL法による染色

(A) コントロール。(B, C) グルタミン6時間処理(B)と24時間処理(C)。DNAの断片化した核は茶色に染まり, 断片化していない核はメチルグリーンの緑色で示される。星印は腕の先端側を示す。Scale bar = 20 μ m.

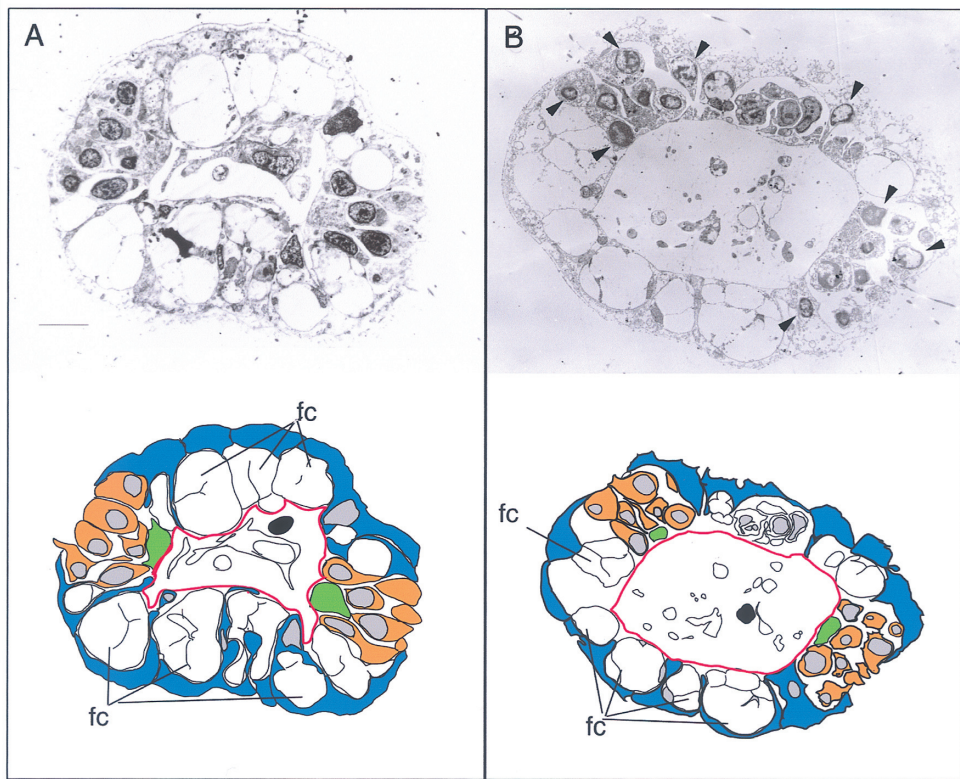


Fig. 2. 変態時の腕横断切片の電子顕微鏡像(上)とその模式図(下)

(A)control。(B)グルタミン24時間処理。赤, 基底膜; 橙, 円柱上皮, 青, 扁平上皮; 緑, 軸索; 灰, 核; 黒, 骨, fc, 泡状細胞。

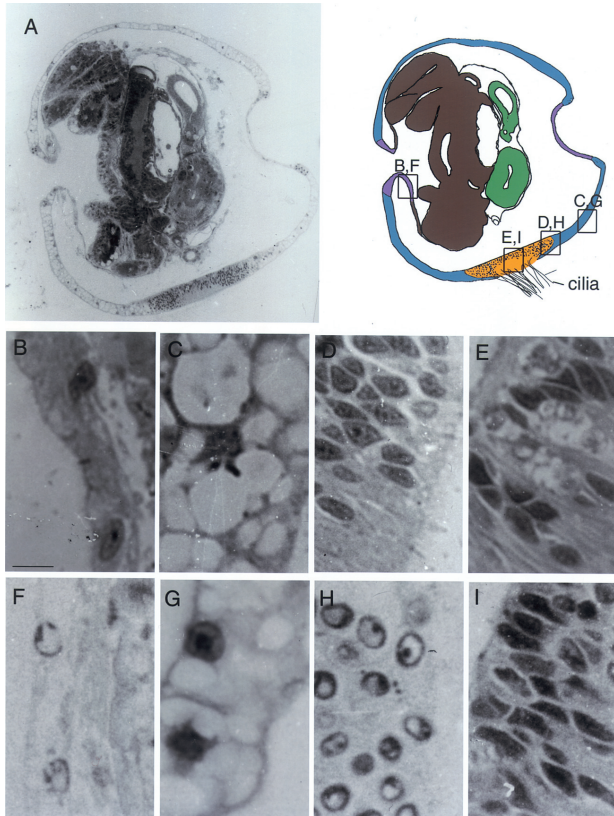


Fig. 4. 変態時の胸部における核の変化 (A) 胸部横断切片像とその模式図。(B-E) (A)の拡大写真。(F-I) グルタミン処理24時間後の幼生における(B-E)に対応する組織。赤, 扁平上皮のみの領域; 青, 扁平上皮と泡状細胞の領域; 橙, 円柱上皮; 緑, 胃; 茶, ウニ原基 (B, F) 胸部左扁平上皮, (C, G) 扁平上皮と泡状細胞, (D, E, H, I) 繊毛帯。扁平上皮に近い領域(C, G)と中央部(D, H). Scale Bar = 5 μ m

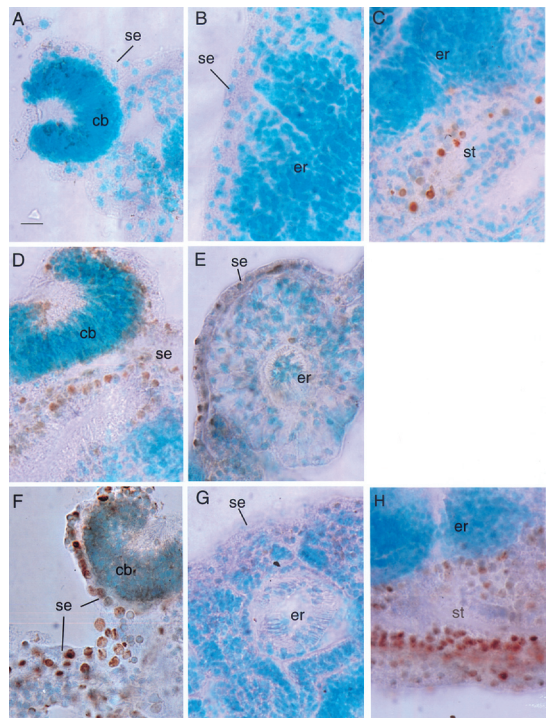


Fig. 5. 変態時の胸部のTUNEL法による染色 (A)-(C) Control. (D, E) グルタミン6時間処理。(F-H) グルタミン24時間処理。DNAの断片化した核は茶色に染まり, 断片化していない核はメチルグリーンの緑色で示される。cb, 繊毛帯; er, ウニ原基; se, 扁平上皮; st, 胃。Scale bar = 20 μ m.