慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	海洋プランクトン幼生の成長 : 摂餌の消化・吸収と栄養素の伝播・受容
Sub Title	Marine plankton growth : digestion and adsorption of food and nutrient propagation and reception
Author	金子, 洋之(Kaneko, Hiroyuki) 倉石, 立(Kuraishi, Ritsu) 古川, 亮平(Furukawa, Ryohei)
Publisher	
Publication year	2024
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	浮遊性プランクトンの個体成長を理解するために、棘皮動物イトマキヒトデのビピンナリア幼生をモデルに発生研究を進め、以下の事実を見出した。（１）ビピンナリア幼生は餌依存下で特定のサイズ到達を関門としながら変態期へと発生を進行する、（２）一部の神経系構成細胞に過ぎない熱感受性のTRPA1細胞は、全体の神経回路形成と外胚葉の成長に必要である、（３）結合組織性の間充織細胞は、上皮細胞の増殖誘起のみならず外胚葉の相当量の細胞死を回避させる、（４）消化・吸収に関与する胃腸では、細胞質内で消化酵素の安全な運搬制御がなされている。なお、採餌下で、ヒトの糖尿病・肥満・脂肪細胞分化への関与因子が発現している。 From the viewpoint of developmental biology and animal histology, we studied the growth of plankton larvae, which are the subject of research in marine biology. Using the starfish, Patria pectinifera as a model, we found the following facts:(1) The bipinnaria larvae develop into the phase competent for metamorphosis, while reaching a specific size under food dependence, (2) TRPA1 cells, which are heat sensitive and are only some nerve constituent cells, involve in circuit formation and ectoderm growth, (3) Connective tissue mesenchyme cells not only induce the proliferation of a substantial amount of epithelial cells but also avoid cell death, (4) In the gastrointestinal tract, which plays a role for digestion and absorption, the safe transport of digestive enzymes in the cytoplasm id controlled. In addition, it has been found that human diabetes, obesity, and adipocyte differentiation factors may be expressed in foraging larvae.
Notes	研究種目 : 基盤研究 (C) (一般) 研究期間 : 2018 ~ 2023 課題番号 : 18K05829 研究分野 : 発生生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K05829seika

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.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ６ 月 １０ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2023
課題番号：１８Ｋ０５８２９

研究課題名（和文）海洋プランクトン幼生の成長：摂餌の消化・吸収と栄養素の伝播・受容

研究課題名（英文）Marine Plankton Growth: Digestion and Adsorption of Food and Nutrient Propagation and Reception

研究代表者

金子　洋之（Kaneko, Hiroyuki）

慶應義塾大学・文学部（日吉）・名誉教授

研究者番号：２０１６９５７７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：浮遊性プランクトンの個体成長を理解するために、棘皮動物イトマキヒトデのビピンナリア幼生をモデルに発生研究を進め、以下の事実を見出した。（１）ビピンナリア幼生は餌依存下で特定のサイズ到達を関門としながら変態期へと発生を進行する、（２）一部の神経系構成細胞に過ぎない熱感受性のTRPA1細胞は、全体の神経回路形成と外胚葉の成長に必要である、（３）結合組織性の間充織細胞は、上皮細胞の増殖誘起のみならず外胚葉の相当量の細胞死を回避させる、（４）消化・吸収に関与する胃腸では、細胞質内で消化酵素の安全な運搬制御がなされている。なお、採餌下で、ヒトの糖尿病・肥満・脂肪細胞分化への関与因子が発現している。

研究成果の学術的意義や社会的意義
海洋中に浮遊するプランクトンを深く理解していくために、イトマキヒトデを材料に幼生成長の研究を行っている。幼生期の成長特性として、変態後に捕食者から逃れて生存率を上げるため、胚期における時間を優先する発生様式と異なりサイズ獲得を優先すること、神経系の一部にすぎない熱感受性細胞や身体の内部を構成する結合組織系の間充織細胞が幼生成長における増殖誘起や細胞生存を保証していることを明らかにした。一方、消化器系においては、消化酵素の分泌に向け細胞質内の安全な運搬システムが稼働していることに加え、ヒト疾患（胃潰瘍や糖尿病など）の進化的な源泉を考察できる可能性を見出している。

研究成果の概要（英文）：From the viewpoint of developmental biology and animal histology, we studied the growth of plankton larvae, which are the subject of research in marine biology. Using the starfish, Patria pectinifera as a model, we found the following facts:(1) The bipinnaria larvae develop into the phase competent for metamorphosis, while reaching a specific size under food dependence, (2) TRPA1 cells, which are heat sensitive and are only some nerve constituent cells, involve in circuit formation and ectoderm growth, (3) Connective tissue mesenchyme cells not only induce the proliferation of a substantial amount of epithelial cells but also avoid cell death, (4) In the gastrointestinal tract, which plays a role for digestion and absorption, the safe transport of digestive enzymes in the cytoplasm id controlled. In addition, it has been found that human diabetes, obesity, and adipocyte differentiation factors may be expressed in foraging larvae.

研究分野：発生生物学

キーワード：マリンバイオロジー　海洋プランクトン幼生　棘皮動物ヒトデ　幼生成長　神経系　結合組織系　消化器系　ヒト疾患因子

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

海産性無脊椎動物群の 8 割にあたる 34 門では、幼生の過程でプランクトンとしての生活環を経る。これにより、種の生息域の拡大、餌が豊富な海域への移動などの生態学的な有利性を手に入れる（Pechenik, 1999)。従来、マリンバイオロジー領域において、プランクトン幼生が研究対象にされた場合、季節や海流などによる多海域での分布変動観測や生態地理学モデル（Follows *et al.*, 2007)などの生態地理学視点からの研究、また光（Jekely *et al.*, 2008)や温度（Winder *et al.*, 2012）や塩分濃度（Balzano *et al.*, 2010）などの自然環境を構成する要素に対する反応行動などの生理学的視点からの研究が主流となってきた。一方、プランクトン幼生の成長について、発生生物学や器官組織学などの視点から、展開されてきた研究は少ない。

多くの海産無脊椎動物の卵は海洋中での受精後、前後・口反口・左右の基本体軸を確立させながら、卵割・胞胚・原腸形成といった胚葉形成運動も行い胚期を経過する。原腸胚後期に外胚葉と内胚葉が融合して開口すると、珪藻などの植物性プランクトンを摂餌し始め幼生期に入る。これ以後、種々の器官が稼働し始め、外部環境の感知システムや成体原基などを新たに形成しながら変態可能な状態に到達する。幼生期には身体サイズは著しく増加するが、その利点は身体が大きいほど捕食者から逃れて生存率が高まることにあると考えられている（Marshall *et al.*, 2003: Moksnes *et al.*, 1998: Palmer, 1990: Sousa 1993）。

棘皮動物イトマキヒトデは日本近海に広く生息しており、生態的に成功している海洋動物である（Matsuoka & Asano, 2003）。幼生の身体は、五放射相称の成体の身体とは異なり、典型的な左右対称性であり、外部環境との境界をなす内外胚葉の上皮性単層シート、ならびに身体内部に発達した細胞外マトリックス（ECM）中に散在する間充織細胞からなる（上皮細胞と間充織細胞の細胞数比は 100：1）。開口後のイトマキヒトデの幼生期はビピンナリア期、変態可能になるとブラキオラリア期と呼ばれる。これ迄、私たちはイトマキヒトデ幼生期の細胞機能研究において、間充織細胞は異物排除を担う免疫系のみならず、上皮細胞の増殖誘起や ECM 再配置に関与する結合組織系として機能していること、また神経細胞は身体中を覆う神経回路を形成し、その一部は熱感受性細胞として特化していることなどを明らかにしていた（Furukawa *et al.*, 2009 : Hamanaka *et al.*, 2010：Murabe *et al.*, 2008 : Saito *et al.*, 2017）。しかしながら、これらの機能がどの様に幼生成長に関与するのか、また内胚葉由来の消化器系の細胞の稼働実体については未解明であった。

２．研究の目的

棘皮動物イトマキヒトデを研究モデルとして、広大な海洋中で微弱な遊泳力しか持たない微小なプランクトン幼生が、変態後に生息域を得ていく前段階で、どの様に成長しているのか解明する。最初に、成長過程における時間、サイズと取得栄養に関する特性の解析を皮切りに、神経系と結合組織系の機能的関与の実体を探る。次に、成長に伴った消化・吸収ならびに取得栄養の伝搬・受容に関して、消化器系の機能解析への取り組みを開始する。

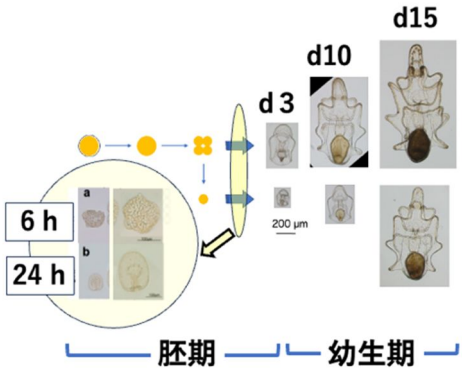
３．研究の方法

幼生成長におけるサイズ依存性の検討は、１-メチルアデニン処理により得た成熟卵を受精後、２細胞期、４細胞期の時点で、直径が細いガラス管内を上下動させることにより受精膜を剥き、続いて 1/1、 1/2、1/4 割球に分離した後にマルチウエルプレート内で飼育した。幼生成長に関わる器官機能の解析においては、これ迄に単離同定していた各器官の構成細胞に発現する特異的遺伝子の配列からモルフォリノオリゴを設計し、未成熟卵に顕微注射後、１-メチルアデニン

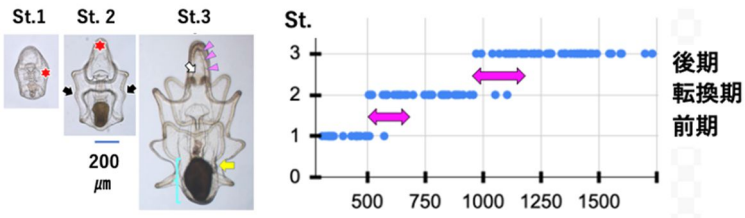
により成熟させた後に媒精し、幼生過程で生じる表現型を解析した。イメージングには以下の抗体を用いた：神経細胞：TRPA 抗体と１F９抗体、間充織細胞：MC5 抗体。

４．研究成果

（１）成長特性：幼生成長におけるサイズ特性を調べるために、分離割球から小型ビピンナリア幼生を準備した。先行研究で報告されていたように、１/1、１/2、1/4 の各割球は、同じタイミングで胞胚期、中期原腸胚期を経て開口し、割球サイズに対応したビピンナリア幼生になった（Dan-Sohkawa & Sato, 1978）。続いて、各割球由来のビピンナリア幼生に投餌しながら飼育したところ、発生時間の同調性はなくなり、割球サイズが小さいほどブラキオラリア幼生期に到達する時間は長くなり、どれも 1000-1200μmの体長サイズに到達したときにブラキオラリア幼生になった（図参照）。この様に、ビピンナリア幼生は、サイズに依存してブラキオラリア幼生になる。

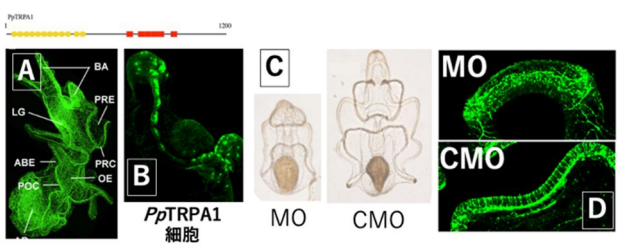


次に、ビピンナリア幼生にいつサイズ依存性が現れるかを観察した。その結果、各割球由来のビピンナリア幼生では、その身体サイズが 500-700μmに達したときに腕形成を開始し、その後は同じ発生速度でブラキオラリアへ成長することが分かった。言い換えれば、ビピンナリア幼生期には、ブラキオラリア幼生への形態形成を開始するターニングポイントが身体のサイズが 500-700μmになる時点で存在し、そこに到達する迄を前期、それ以降を後期として分離できる（左図）。また、投餌の有無における 1/4 割球由来と 1/１割球由来（実験コントロール）のビピンナリア幼生の発生パターンを解析したところ、餌なしの状態で両者とも同じ飼育日時（受精後 5 日目）に発生を停止した。このとき、1/１割球由来のビピンナリア幼生では身体のサイズが 500-700μmであり、前期の終了時点となる。この観察事実は、母性栄養はビピンナリア幼生前期に枯渇し、これ以後は摂餌からの餌由来の栄養で発生が賄われることを示している。



（２）幼生成長と神経系

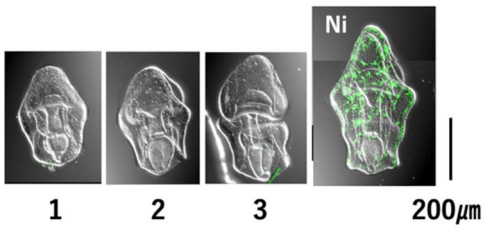
ブラキオラリア幼生の身体には著しい量の神経細胞が存在しているが（図 A）、その繊毛帯領域に熱感受性神経細胞は小数存在する（図 B）。TRPA1 感覚神経の温度感受性チャネルをモルフォリノオリゴ(MO)で欠失させると、幼生成長はブラキオラリア幼生への転換期で停止する（図 C）。このとき、神経回路の形成は不全になっていた（実験コントロール CMO では梯子状の回路が完成しているが、モルファントでは神経繊維が寸断されてドット状の蛍光シグナルが見えるのみである: 図 D の CMO）。この事実は、外部環境からの入力の伝達経路が神経ネットワーク形成に重要であることだけでなく、神経系が幼生成

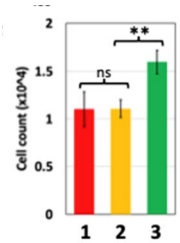


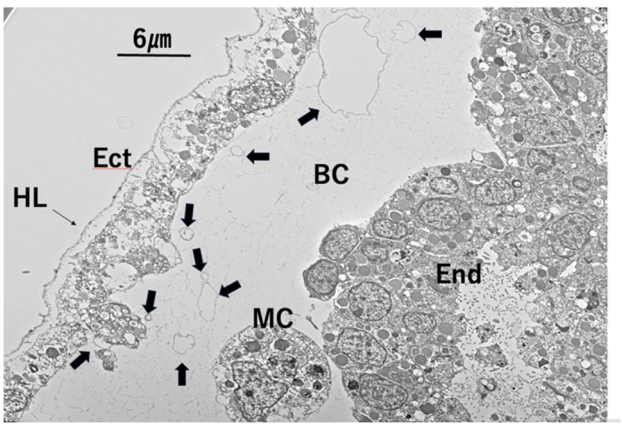
長に必須であることも示している。

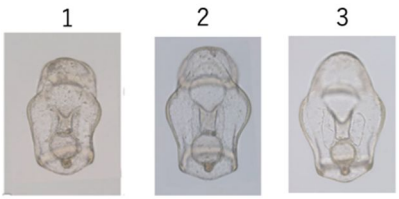
（3）幼生成長と結合組織系

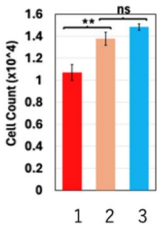
イトマキヒトデ幼生の間充織細胞には、上皮細胞の増殖誘起に関与するアスタチン属メタロプロテアーゼ（MC5 分子）が細胞表面に発現している(Hamanaka *et al.*, 2010)。その作用メカニズムを明らかにするために、MC5 分子が成長因子 TGFb を活性化している可能性を検討した。先にイトマキヒトデ固有の潜在型 TGFb 遺伝子を単離し、続いて試験管内でタンパク合成後、MC5 分子の酵素分解作用による活性化を試みた（結果非表示）。次に、MC5 モルファントの中期原腸胚の胞胚腔中に活性型 TGFb を注入し 4 日幼生になるまで飼育し、実験コントロールとなる潜在型 TGFb サンプルと比較した（左図 1：MC5 モルファント、2：潜在型 TGFb 注入、 3：活性型 TGFb 注入、 4：何も注射していない 4 日サンプル）。活性型 TGFb 注入サンプルは潜在型 TGFb 注入サンプルより有意にサイズを増しており、細胞数も約 4000 個増加していた。この結果から、身体の 1/100 しかない結合組織系の間充織細胞が、自身に発現する 1 種類のアスタチン属メタロプロテアーゼで成長因子 TGFb を活性化し、上皮細胞の増殖誘起を介して成長に寄与していることが示された。









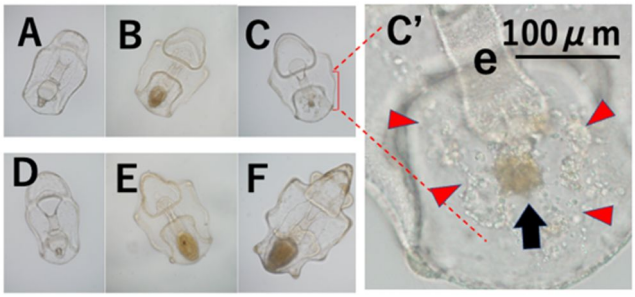


一方、透過型電子顕微鏡下の MC5 モルファントでは、内胚葉性の消化管（End）や間充織細胞（MC）と異なり、外胚葉部（Ect）に細胞死を示す形態が認められた（左図）。細胞死の特徴として、イトマキヒトデ未受精卵において観察されたアポトーシス細胞死の形態と類似点があった（Sasaki & Chiba, 2001）。そこで、MC5 モルフォリノと同時にアポトーシス阻害剤を未成熟卵に顕微注射することにより、MC5 モルファントの矮性化表現型が改善されるか調べた。阻害剤を用いない 4 日モルファント（左図 1 のサンプル）と比べ、身体サイズの増加ならびに約 3000 個の細胞数の増加が認められた（左図 2 のサンプル。左図 3 のサンプルは MC5 MO を注射していない同じ発生ステージの幼生）。これらの結果は、幼生過程で生じるデフォルト細胞死が、結合組織系の間充織細胞の MC5 分子により抑制されていることを示している。

（4）幼生成長と消化・吸収系

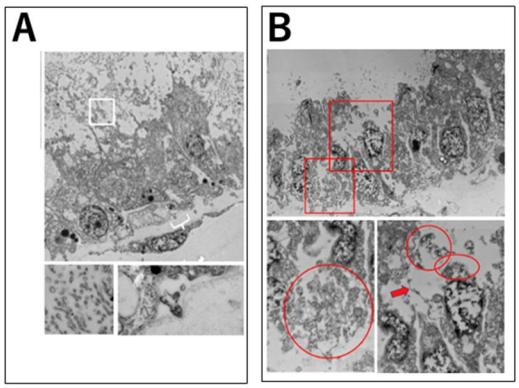
他種のヒトデ原腸胚において、胃腸領域で飲食作用が透過型電子顕微鏡により観察されており（Huvard & Holland, 1986）、消化後の分解産物の吸収に飲食作用を制御するクラスリンの関与が予測される。クラスリンのモルファントには、吸収の抑制効果が期待されたが、予想を超えた

衝撃的な結果が得られた。クラスリンのモルファントは実験コントロールと同様に胚期を経たが、投餌条件下でビピンナリア幼生の前期から後期への転換期に発生が停止した（左図 B, C)。



6 日目には、胃腸は若干萎縮しており（左図 B)、コントロールがブラキオラリア期に入る 10 日目迄に(左図 F)、胃・腸領域は断片化してしまう（左図 C'の黒シグナル、赤シグナルは体腔嚢も崩壊しはじめていることを示す)。興味深いことに、非投餌下では、この様な胃腸崩壊は生じない。

8 日幼生の胃腸を透過型電子顕微鏡で観察すると、実験対照が基底膜側への核配列や頂端側の発達した微絨毛構造が認められた（右図 A)。これに対し、モルファントでは胃腸の上皮配列は乱れ、微絨毛の密度は圧倒的に低く、腸領域には剥離したと思われる細胞残骸や多量の小胞が存在していた（右図 B)。より詳細な高倍率での観察によると、多くの細胞の細胞膜は断裂しており（右図 B の四角や丸囲い部分)、細胞質が露出している像が頻繁に見出された。以上、吸収に関与する胃領域では消化酵素の安全な運搬が制御されていることが示唆され、クラスリン欠如による過激な胃潰瘍状態が認められた。



（５）消化・吸収系（ヒト疾患との関連性）

幼生成長を担保する摂餌に対処する消化器官で合成される酵素などの因子群を網羅的にリストアップすることを目指して、摂餌を活発に行わせながら ANS 標識された胃細胞の分画を試行した。通常のセルソータでは分画に生理食塩水を用いるため細胞構造が破壊され、RNA 取得が不可能であった。そこで、シース液として海水を使用可能な On-chip Sort システムのセルソータを用いることにより、5 日目ビピンナリア幼生の解離細胞中から胃細胞を分画できた（Dan-Sohkawa & Kaneko, 1990)。この細胞画分に加え、投餌の有無条件で飼育した２種類の５日ビピンナリア幼生、合わせて３種類のサンプルを元にトランスクリプトームの比較解析を行った。その結果、胃細胞及び摂餌を行ったビピンナリア幼生で特異的に発現する遺伝子として、ヒトの糖尿病、肥満、脂肪細胞の分化に関わるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ:PPARG)と推測される転写遺伝子が高発現していることを見出した（現時点では事前に予測していた多様な消化酵素の存在は不明である)。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Yamato Okura, Ritsu Kuraishi, Hiroyuki Kaneko	４．巻 64
２．論文標題 Size adjustment occurs during the larval growth of the separated blastomeres of the starfish, Patria Pectinifera	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Development, Growth and Differentiation	６．最初と最後の頁 517-526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111.org/dgd.12817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 大蔵ヤマト　倉石立　金子洋之
２．発表標題 ヒトデ幼生の成長特性：サイズ依存性、摂餌必要性、感覚神経の関与
３．学会等名 日本動物学会関東支部会第74回大会
４．発表年 2022年

１．発表者名 古川亮平、田口瑞姫、田内珠子、倉石立、金子洋之
２．発表標題 ビピンナリア期からブラキオラリア期へ；ヒトデ幼生の身体サイズの増加と神経ネットワーク形成
３．学会等名 日本動物学会大阪大会
４．発表年 2019年

１．発表者名 金子洋之、田中泉吏、佐藤由紀子
２．発表標題 細胞の意思とは何か　ヒトデ胚と幼生の構成細胞を例として細胞の意思を考える
３．学会等名 日本動物学会大阪大会
４．発表年 2019年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	倉石　立 (Kuraishi Ritsu) (60195526)	慶應義塾大学・文学部（日吉）・准教授 (32612)	
研究分担者	古川　亮平 (Furukawa Ryohei) (90458951)	慶應義塾大学・文学部（日吉）・助教 (32612)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関