

珍味なホヤのマッコな発生生物学

ホヤは東北地方で珍味として食される。一方、ホヤは発生学の材料として130年以上前から使われてきた。それは、分類学上ホヤが脊椎動物に近いこと、その発生が単純であり研究しやすいことによる。本稿では、胚細胞の発生運命決定に関して、100年以上前からその存在が予想されていた、ホヤの卵の中で局在して存在している筋肉決定因子の分子実体の同定とその働き方の解析に至るストーリーをまとめた。



西田宏記

はじめに

私たちヒトを含む全ての多細胞動物と植物は元を辿れば受精卵から発生してくる。自分が何十年か前に、母親の子宮の中の1 mmの10分の1の透明で丸い卵から発生してできてきたことに思いを馳せてみたことがあるだろうか？我々は、生まれてきた時に既に人間の形をしているので、その前の出来事、すなわち卵から体ができてくる過程を目の当たりにすることはまずないのだが、卵からの発生は、まさに生物が示すめざましい、そして神秘的ですらある能力を反映しているプロセスでもある。顕微鏡で発生中の胚を眺めたり、発生の高速再生ビデオを見たりしていると発生過程の整合性とダイナミックな細胞の挙動という一見矛盾するように思える特性に生物の本質を見たような気になる。私は、長らくこの胚発生という現象に魅了されて研究を続けてきたが、本稿では、この胚発生に関して解析した1つのストーリーを紹介する。それは卵細胞の中で片寄って局在していて、発生が進

むとそれを受け継いだ細胞が筋肉を作ることになる物質（遺伝子産物）を特定したという話である。

1 マボヤってなに？

卵から体ができてくるしくみは、非常に複雑であることが予想される。それを解析したければ、まずはできるだけ単純な実験系を選ぶことが重要であって、生物学は多様な生物の中からその解析に適した種とシステムを実験材料として選ぶことで発展してきた。

マボヤ (*Halocynthia roretzi*) (図1左) は、ホヤ類に属していて主に東北地方の太平洋沿岸で養殖されている。三陸海岸の民宿に泊まれば必ずといっていいほど出てくるし、飲み屋のメニューの定番である。普通は、酢の物にして生のまま食べる。その味はというと実はかなり特殊である。濃い海の味がするという表現が当てはまると思うが、塩っ辛いわけではない。とにかく、初めて食べた人の半分は好きになれないと言うだろう。しかし、そのうちやみつきになっていく味である。ホヤ

キーワード：胚発生 (embryogenesis)、ホヤ (ascidian)、尾索動物 (urochordates)、卵細胞質内組織決定因子 (maternal tissue determinants)、筋肉 (muscle)

著者連絡先：hnishida@bio.sci.osaka-u.ac.jp

カラー図版：<http://www.jsa.gr.jp/04pub/2020/202009nishidashiryo.pdf>



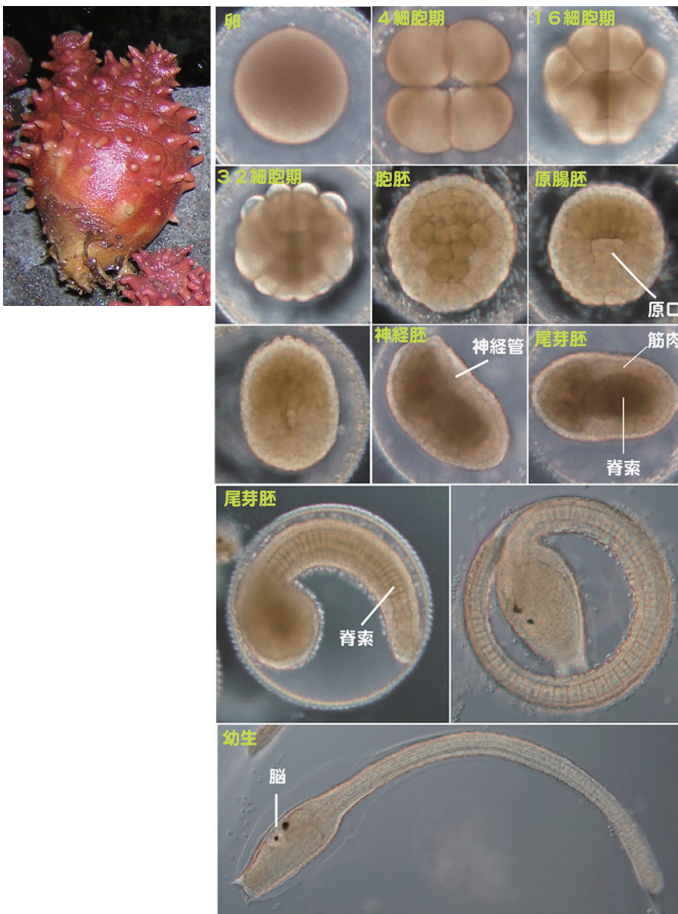


図1 マボヤの成体と胚発生

左：15 cm 位のマボヤの成体

右：マボヤの卵からオタマジャクシ幼生まで、卵の直径は 280 μm 、受精から 35 時間で孵化する。

は日本と韓国とフランスでいくつかの種が食されている。私は普通に食材として使われている以外のホヤもいくつか食べてみたことがあるのだが、どのホヤを食べても味はホヤの味であった。すなわち、目をつむって食べてもこれはホヤだと言い当てることのできるの、ホヤの味はホヤ類の中で共通に保存されており、ホヤ以外の食べ物にこの味は存在しないらしい。

このマボヤ、発生の研究に適した利点をいくつか持っている。養殖されているので、実験材料として大量に手に入れることができる。研究室では、毎日マボヤに産卵をさせている。

朝、研究室に来たらフレッシュな卵と精子が手に入り、受精させて発生をスタートできるようになっている。

次に、マボヤは意外に我々ヒトに近い（実は高校生物でもこれを習っている）。分類学では動物を 30 くらいの門に分けている。例えば、軟体動物門、節足動物門というふうに、我々ヒトは脊索動物門（脊椎動物ではないことに注意）に分類されるが、何とサボテンのように見えるホヤ類も脊索動物門に入っている。この最もわかりやすい証拠は、発生過程に見ることができる。つまり、ホヤの卵はカエルのようにオタマジャクシ幼生に発生する（図 1 右）。これは、1866 年にロシアの科学者 A. コワレフスキーが発見したもので、彼はホヤの胚発生過程が脊椎動物によく似ていることも報告している¹⁾。脊索動物門は 3 つの亜門に分かれていて、脊椎動物亜門（ヒトが含まれる）、尾策（被囊）動物亜門（ホヤが含まれる）、頭策動物亜門である。つまり、

ホヤは進化の過程で最後に脊椎動物と分岐した無脊椎動物で、脊椎動物の直近の親戚にあたる。このことは、全ゲノム配列の比較でも確認されている。脊椎動物とは異なり、ホヤ類はオタマジャクシになった後、岩に付着し変態しサボテンのようになっていく過程をホヤ類の独自の進化の間に付け足したことになる。実は、成体のホヤでも解剖すると中身に脊椎動物と共通する特徴を見いだすことができる。

最後に、ホヤの胚発生は比較的単純で発生の解析にむいている。幼生はわずかに約 3000

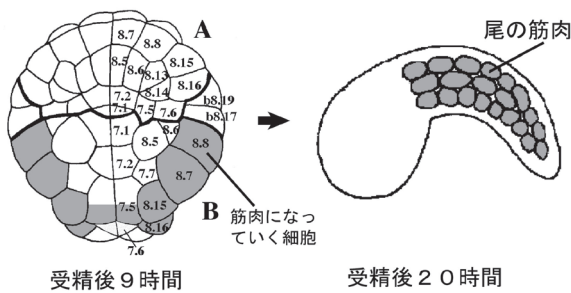


図2 尾の筋肉を作る胚細胞

左：マボヤの胞胚期を下から見たところ、100個くらいの細胞からできている。各細胞には固有の番号がついている。
 右：尾が伸び始めている。片側21個の筋肉細胞ができている。

個の細胞で作られており（ヒトの大人は37兆個といわれている）、例えばシッポを振って泳ぐために（実はこれが脊索動物の特徴でもある）尾の両側に存在する筋肉細胞も42細胞しかない。原腸胚（図1右の6つめの写真）も、300位の細胞数で、ウニの原腸胚の4000細胞、カエルの原腸胚の数万細胞と比べても格段に少ない。また、卵の細胞分裂パターン（いつどちら向けに細胞分裂するか）は、個体差なく、定まっている。これらの特徴により、原腸胚までの全ての細胞に番号がつけられており、顕微鏡下で個々の細胞を特定することが可能になっている。また、それぞれの番号の細胞が、幼生のどの場所のどの組織の何個の細胞になっていくかについても、顕微鏡観察や、個々の胚細胞に標識をつけて発生を追跡することによって調べられており、これも個体差無く一定であることがわかっている^{2,3)}。例えば、発生の中に尾の筋肉細胞（一次筋肉細胞）を作る胚の細胞は、図1右の5つめの写真（胞胚）では、写真の下側に並ぶ10個の細胞からできる（図2、灰色）。ホヤの発生研究の歴史は古く、これらの概要は100年以上も前からわかっていた。

受精卵からは体の全部ができるが、細胞分裂が進むと、個々の胚細胞は特定の部分を作るように発生運命が狭められてくる。ある

時期以降、細胞は分裂してもその子孫細胞は全て単一の細胞タイプになるように発生運命が1つの組織（表皮や筋肉や神経など）を作るように限定されることが想像できるだろう。この時期を組織限定段階とよぶ。ホヤでは、この発生運命の限定が非常に早く進み、図1右の5つめの写真（胞胚、約100細胞、受精後9時間）の時に、組織限定段階に達する。前述のようにこの100細胞の内、10個の細胞が筋肉を作る細胞である。朝に受精させると夕方には胞胚になるので、胚細胞の発生運命決定のしくみを知るにはこの9時間の間に何が起きているかを解析すればいいのである。

2 モザイク卵としてのホヤ

高校の生物で発生を習ったときに、調節卵とモザイク卵というのを習ったのを覚えておられるだろうか。ホヤの卵が1回細胞分裂した2細胞期の胚から2つの細胞をそれぞれ分離して育てると、1つは幼生の右半分に発生し、もう1つは左半分に発生する。同じことをウニで行うと結果は全く異なり、2つとも正常な形をした幼生全体を作ることができる。前者がモザイク卵であり、後者が調節卵だ。前述のホヤの胞胚から、例えば筋肉になる予定の細胞を顕微操作ではずしてそのまま置いておくと、細胞分裂が進み勝手に筋肉だけができてくる。培養液に浸ける必要すら無く、海水中で筋肉ができる。モザイク卵では、ややこしい調節作用が全く起こらず、細胞を胚から外しても本来正常発生でなるべきものになっていくのみである。余計なことが起こらないので解析がしやすい。胚に操作を加えると本来起こらないことが起こってしまうとなるとややこしい。

モザイク的な発生様式は、どんなしくみを反映しているのだろうか。細胞を胚から単離してなるべきものになっていくということ

は、細胞の外からの影響（他の細胞からのシグナルや胚内での環境）なしで、細胞の発生運命が決定されていることを示している。言い換えれば細胞の発生運命は細胞の中身（内容物）で決まっている可能性が高い。

3 卵のなかの組織決定因子が胚細胞の発生運命を決める

細胞の中身で発生運命が決まるとすると、初期胚の細胞の内容物は卵細胞から受け継いできたものである可能性が高い。そこで、最も単純な可能性として、卵の中ですでに組織決定因子が偏って存在しており、それが受精後の細胞分裂で特定の細胞にのみ分配され、例えば筋肉決定因子を受け継いだ細胞がその

後、筋肉になっていくという仮説が考えられる。この可能性を最初に指摘したのは、E.G. コンクリンである（1905 年）²⁾。ある種のホヤでは、幼生の筋肉が黄色みを帯びている。発生を遡っていくと、初期胚の予定筋肉細胞が黄色く見え、さらに遡ると卵の一部が黄色く見える（図3 上段）。またこの黄色い卵細胞質は受精後に移動し、最初の細胞分裂までに将来の筋肉を作る部位（植物半球後方）に移動する。コンクリンはこの黄色く見える細胞質の中に筋肉決定因子が含まれているのではないかと提唱した。ホヤの発生を詳しく観察したコンクリンの論文は 100 ページ以上に及び、さらに、黄色い細胞質を見せるために、100 年以上も前に論文をカラー刷りで出版し

ている。その後、様々な動物をもちいて顕微操作により卵の特定の部位の細胞質を除去する実験が行われ、卵の中身は均一ではないことがわかってきた。

コンクリンの説は正しいのだろうか？ほぼ、100 年間の間、特に進展はなかったのだが、卵の断片を切り取り、それを、細胞融合法を使い単離した予定表皮細胞に移植するという方法を開発することで、筋肉決定因子の存在をはっきりと証明することができた⁴⁾。コンクリンが黄色く見えるといていた部分の卵細胞質を、あらかじめ単離しておいた筋肉以外の胚細胞に移植したときだけ、本来出ないはずの筋肉ができてくるのである（図3 中段）。この移植実験法の開発には 1 年がかかり、最初に成功した次の

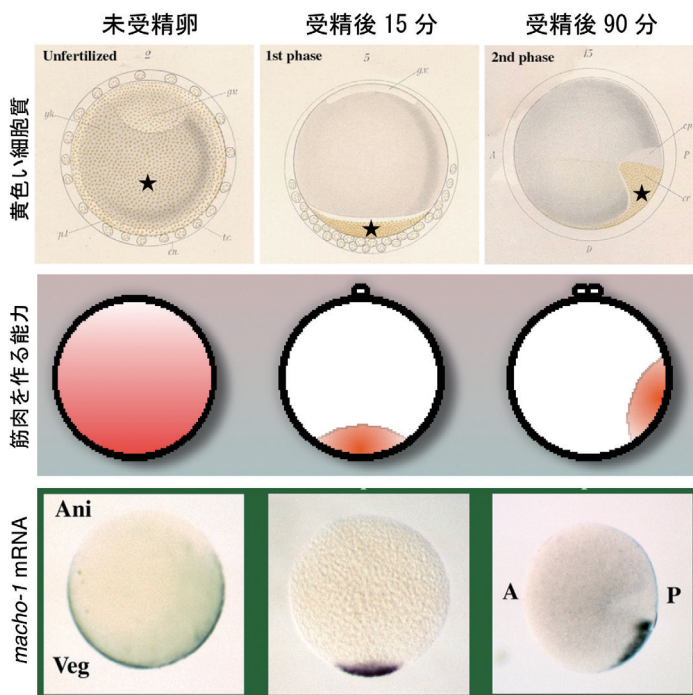


図3 筋肉運命決定因子の局在

上段：コンクリンが 1905 年に観察した黄色く見える卵細胞質（星印）の分布の原画。未受精卵では卵の広い部分に分布しているが、受精直後に下側（植物極，Veg）に下がり、最初の細胞分裂が起こるまでに将来の後側（P，図では右）に移動する。

中段：卵の細胞質移植によって明らかになった筋肉決定因子の予想分布。

下段：macho-1 mRNA の分布³⁾。In situ hybridization という方法で mRNA があ部分

日には、筋肉を作るはずのない胚細胞から筋肉を作り出せることがわかった。当時、私は神戸大学で働いていたが、夜に結果が出た後、徒歩で山を下りて六甲道駅前までいき、ひとりで祝杯をあげたことを覚えている。

4 筋肉決定因子は何でできている？

では、筋肉決定因子はどんな物質でできているのか？卵細胞質の中には何万種類の物質が入っているのか想像もつかない。また、遺伝子の産物だけでも1万遺伝子の産物が卵に蓄えられていると推測された。これまた難問であるが、時は分子生物学の時代に突入していた。筋肉決定因子は卵の下半分に入っている。下半分にだけ入っている分子を濃縮するには、下半分から上半分を引いたとき残っているものを集めればよい。どうやってそんなことを実行するのか？相手は卵の分子であって、数字ではない。遺伝子はDNAでできっており、4種類のヌクレオチド（アデニン、チミン、グアニン、シトシン：それぞれA, T, G, C）がつながっている2本の鎖だ。互いの鎖は相補的になっており、引きはがしても、もう一度張りつくことができる。この相補鎖の結合を利用して引き算を行った（サブトラクションハイブリダイゼーション）。

DNAからは1本鎖のmRNAが転写され、mRNAがタンパク質に翻訳される。卵が3回分裂し8細胞期になった胚を、細いガラスの針で上下4細胞ずつに分離する。それらを3000個ずつ集め、上半分と下半分に含まれるmRNAを別々に回収する。それぞれについて相補的な1本鎖DNA（cDNA）鎖を合成した後、上半分のcDNAに小さい磁気ビースを結合した。これを下半分のcDNA溶液と混ぜ合わせ、同じ遺伝子の配列があれば相補的に結合するようにした。この水溶液を試験管の下から磁石で引っ張れば胚の上下両方にあったものは

沈んできて、胚の下のみにあったものが水溶液中に浮かんでいる状態になる。このようにして集めてきた遺伝子産物の分布を卵で観察し、筋肉決定因子と同じ分布を示すものを探した（図3下段）。上記の実験は当時博士研究員であり、分子生物学に長けた澤田佳一郎さんがやってくれた。

いくつか候補がとれたが、その中の一つが後述のように筋肉決定因子としての判定基準を満たすことがわかり、macho-1 遺伝子産物と名付けた⁵⁾。100年以上も前からその存在が予想されていた物質がついに見つかったのである。筋肉決定因子を探している段階でまだ見つけていないにもかかわらず、捕らぬ狸の皮算用で、その名前を何にするかいろいろ考えていた。結局macho-1にすることにしたが、macho-1は「マボヤのチョーおもしろい遺伝子-1」の略である。machoの2番があるわけではないが、わざわざ-1（one）と付けてあるのはその響きがマッチョマンに似るようにするためである。マッチョは元はスペイン語であるが、たいがいどの国の言葉でもマッチョは筋肉モリモリのことを意味する。一度聞いたら忘れられない遺伝子名にしたことは、その後いろいろな国を訪れて研究の話をする際に、こてこてではあるがわりと粋な命名法であったと覚えることが多々あった。

5 macho-1 の働き方

特定の遺伝子産物（mRNA）をホヤ卵から取り除く方法を開発するのに1年かかった。その結果、卵からmacho-1 mRNAをなくすと発生してきた幼生の尾の筋肉がほとんどできず、macho-1 mRNAを卵に大量に注入するとほぼ全ての胚細胞を筋肉に転換することができることがわかった。よって、macho-1は卵の筋肉を作り出す部分に元から局在し、筋肉形成に必要な充分な物質である（図4）。

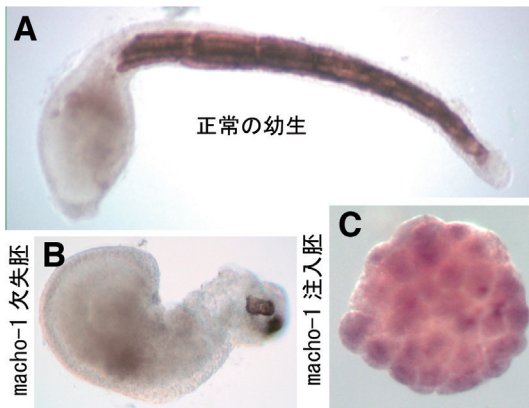


図4 macho-1 は尾の筋肉形成に必要充分

- A: 正常幼生. 筋肉に存在する酵素 (アセチルコリンエステラーゼ) を検出している.
 B: macho-1 をなくすとほとんどの筋肉が消失する.
 C: macho-1 mRNA を大量に注入すると, ほぼ全ての細胞が筋肉に転換し, 胞胚の全ての細胞がアクチンを作り, 筋肉になり始めている⁵⁾.

macho-1 遺伝子産物は, どのようなしくみで筋肉を作りだすのだろうか? また, macho-1 遺伝子から作られる macho-1 タンパク質はどのような働きを持っているのか? 例えば, 筋肉細胞では細胞を収縮させるためにアクチンやミオシンというタンパク質が筋肉特異的遺伝子から作られる必要がある (図 4C). 遺伝暗号表を用いて macho-1 の DNA 配列をアミノ酸配列に翻訳して, データベースを用いて解析してみると, タンパク質の中央部分にジंकフィンガーと呼ばれるアミノ酸の並びがあることがわかった. この特徴的な配列は DNA に結合するタンパク質によく見られる配列である. その後の解析により, macho-1 タンパク質は TGGGGGGT というグアニンに富んだヌクレオチド配列を認識してゲノム DNA に結合し (3, 4, 6 番目の G は必須), 近傍にある遺伝子を ON にする (すなわち転写を

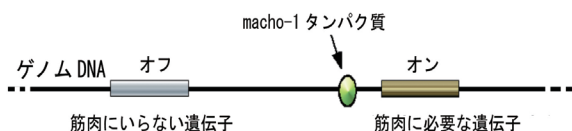


図5 macho-1 は転写因子である

開始させる) いわゆる転写因子として働いていることがわかった. すなわち, 卵形成中に作られ受精前から存在している macho-1 mRNA から, 発生開始後に macho-1 タンパク質が作られ, ゲノム DNA 中に存在する筋肉細胞のみで ON になる筋肉遺伝子の近傍に貼り付き, その筋肉遺伝子のスイッチを入れるという一連の流れで筋肉細胞ができあがっていくことがわかった (図 5)⁶⁾.

macho-1 遺伝子は, 調べた限りホヤにのみ存在することがわかっている. 脊椎動物と分かれてホヤが進化する過程で Zic という遺伝子の重複が起き, 1 つは Zic のまま残り, もう 1 つが変化して macho-1 に使い回された可能性が高い. 1 日半でオタマジャクシになり泳ぎ出すために, ホヤの胚発生は簡略化されており, 筋肉細胞の運命決定等を素早く行うためにこのような進化が起こったと考えることもできる.

おわりに

ホヤのみに関わらず, ショウジョウバエの前方を決定する転写因子 bicoid mRNA やカエルの卵の下半分を決定する転写因子 VegT mRNA も卵の中でそれぞれの部分に片寄って局在していることがわかっている⁷⁾. このようにとても小さく顕微鏡レベルの大きさの卵でもその中身は均一ではない. 多くの動物の発生でも同様のことが起こっている可能性が高いと考えられる.

ただし, 成体の全ての組織の形成が, 卵の中の決定因子によって制御されているわけではなく, 卵の中の偏りは単純なものでない. 非常に複雑な成体の構造を作り出すためには, 発生過程での様々な細胞のやりとりが必要となってくることを忘れてはならない. ホヤでも脳の形成は細胞間相互作用である誘導現象に依存している. 卵の中の偏りは発生の初期

における細胞間の違いをコントロールし、発生を順調にスタートさせる役割を担っている。例外的であり不思議なことに、我々ほ乳類の卵には全く方向性がなく、何らかの因子の局在を示す証拠が全くないので、ほ乳類の卵は等方性である可能性が高い。

本稿では、ホヤにおける筋肉の発生に焦点を当てたが、ホヤの発生における様々な細胞タイプの発生運命決定機構は現在ではほぼ全て解明されているといっても過言でない状況にある。また、そのおかげで分子生物学的方法を使って、細胞の発生運命を自由に変更することが可能となっている。これらのことは発生の基礎研究に属しているが、細胞の種類を思いのままに変更できる手法は、例えば将来の再生医療に役立つ可能性もある。

なお、この総説は西田が高校生向けに講演を行ったものを文章にまとめたものである。簡略化しすぎた記述もあるが、要点をわかりやすくするためであることをご容赦願いたい。ホヤの発生に関して詳しく知りたい方は、文献 8～10 をご覧いただきたい。

注および引用文献 (Web page 最終閲覧日: 2020 年 2 月 27 日)

- 1) Kowalevsky, A.: Entwicklungsgeschichte der einfachen Ascidien. *Mémoires de l'Académie Impériale des Sciences de St-Petersbourg VIIe Série*. 1-19 (1866).
- 2) Conklin, E.G.: The organization and cell lineage of the ascidian egg. *J Acad Nat Sci (Phila)* **13**:1-119 (1905).
- 3) Nishida, H.: Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage. *Dev. Biol.* **121**, 526-541 (1987).
- 4) Nishida, H.: Regionality of egg cytoplasm that promotes muscle differentiation in ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Development* **116**, 521-529 (1992).
- 5) Nishida, H., & Sawada, K.: macho-1 encodes localized mRNA in ascidian eggs that specifies muscle fate during embryogenesis. *Nature* **409**, 724-729 (2001).
- 6) Sawada, K., Fukushima, Y., and Nishida, H.: Macho-1 functions as transcriptional activator for muscle formation in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Gene Express. Patt.* **5**, 429-437 (2005).
- 7) スコット F. ギルバート: 『ギルバート発生生物学 第 10 版』 (阿形清和, 高橋淑子監訳, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2015).
- 8) 西田宏記, 沢田佳一郎: 「ホヤ胚発生過程における中胚葉パターンニング」『細胞工学』**21** (1), 98-105 (2002).
- 9) Nishida, H.: Specification of embryonic axis and mosaic development in ascidians. *Dev. Dyn.* **233**, 1177-1193 (2005).
- 10) Satou, N: *Developmental Genomics of Ascidian*. (Wiley-Blackwell, 2014).

(にしだ・ひろき: 大阪大学大学院理学研究
科生物科学専攻, 発生生物学)

2020 年 1 月 20 日受付, 2 月 20 日受理