The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	神経胚回転によるマボヤ幼生の左右非対称性の決定
Author(s)	西出, 和彦
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/24731
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博 士 論 文

平成 23 年度

神経胚回転による
マボヤ幼生の左右非対称性の決定

大阪大学 大学院理学研究科 生物科学専攻

西 出　和 彦

目　　次

和文要旨 1

欧文要旨 4

第一章　序論

1-1 動物の胚発生における軸形成 5

1-2 nodal と左右非対称性形成 6

1-3 nodal flow 8

1-4 nodal flow の作用機序 10

1-5 nodal flow より早い段階での左右非対称性の確立 11

1-6 無脊椎動物（センチュウ、巻貝、ショウジョウバエ）における左右非対称性の確立 13

1-7 ホヤの左右非対称性とホヤ胚発生の特徴、および研究上の利点 16

1-8 本研究の概要と意義 19

第二章　材料と方法

2-1 実験動物 21

2-2 nodal 阻害剤 21

2-3 遠心力による胚の固定 22

2-4 サンドイッチによる胚の固定 22

2-5 走査型電子顕微鏡観察 22

2-6 Whole mount in situ hybridization 23

第三章　結果

3-1 マボヤのオタマジャクシ幼生における左右非対称性 24

3-2 nodal シグナリングの阻害は、オタマジャクシ幼生の左右非対称性を崩す 26

3-3 Neurula rotation（神経胚の回転） 29

3-4 表皮細胞上の Monocilia の存在 32

3-5 左右非対称の極性は胚の向きで決まる 34

3-6 神経胚回転後の胚と卵膜との接触が *nodal* 発現に重要である 36

3-7 卵膜が *nodal* 発現に不可欠である 38

3-8 他のホヤにおける Neurula rotation 39

第四章　考察

4-1 nodal シグナルと幼生の非対称な形態 41

4-2 表皮細胞の繊毛と神経胚回転 42

4-3 胚の左が下側にくると神経胚回転が止まるしくみ 43

4-4 左側の表皮と卵膜との接触が nodal 発現を促進する 45

4-5 ホヤの神経胚回転 45

4-6 総括および今後の課題 46

引用文献 48

発表リスト 53

謝辞 55

和文要旨

受精卵というたった一つの細胞が分裂を繰り返す初期発生過程において、動物の初期胚は前後軸・背腹軸が決定され、これら２つの軸が決まると同時に３つめの体軸である左右軸も決まる。この左右軸については多くの動物で一定の左右非対称性を示すことが知られている。本研究では、この左右軸上における非対称性の確立メカニズムを明らかにすることを目的としている。

私たちヒトを含む脊椎動物では、心臓・胃・肝臓などの内臓器官が体内で左右非対称な位置に配置され、また、それらの器官自体も左右非対称な形態を示している。これらの左右非対称な特徴の決定機構の解明は、発生学の重要な課題となっている。この左右非対称性に関する分子生物学的な研究は、1995 年にニワトリで左右非対称に発現する遺伝子 *Sonic hedgehog* が見つかったことによって急速に進展した。その後、マウスやアフリカツメガエルでも左右非対称に発現する遺伝子が見つかり、さらに、ゼブラフィッシュ・メダカ・ウニ・ショウジョウバエ・センチュウ・モノアラガイなどが研究対象になり、新口動物のみならず旧口動物にまで研究が広がっている。

脊椎動物では、ニワトリ胚やマウス胚において左右非対称に発現する *nodal*・*lefty*・*Pitx2* などの遺伝子が明らかにされ、これらの遺伝子は他の脊椎動物でも見つかっている。さらに、左右の対称性を破る最初の現象としてマウス胚で観察された nodal flow が、ニワトリでは未確認であるが、ウサギ・アフリカツメガエル・ゼブラフィッシュなどでも確認さている。さらにアフリカツメガエルやニワトリでは、H^+/K^+-ATPase の阻害により左右非対称形成に影響が出るという結果が報告され、これらの動物では、より早い発生段階で左右非対称性が確立している可能性も示されている。

本研究の研究対象であるマボヤは、脊椎動物に最も近縁な分類群である脊索動物尾索動物亜門に属しており、その分類学上の位置は脊椎動物における左右非対称性の確立機構との比較においても興味深い。私はまず、マボヤの初期胚に対してホヤでも体の左側で発現することが知られている nodal に対する受容体の阻害剤処理を行い、*nodal* 発現よりも前の段階から阻害剤処理を行った場合に、幼生の尾の巻き方や脳胞の位置における左右非対称な形態に影響がでることを観察した。これらの結果はマボヤにおいても nodal は左右非

対称な形態形成に関与していることを示唆している。

また、神経胚の回転とそれによって胚の左側が下向きになって卵膜と接触することが、*nodal* の左側特異的発現を引き起こすという、左右非対称な遺伝子発現の新しいメカニズムを発見した。受精後 15 時間（*nodal* 遺伝子発現が開始する 2 時間前）になると、神経胚が胚の後方から見て反時計回りに前後軸に沿って回転する。この回転は常に胚の左側が下向きになると止まる。神経胚回転の時期に表皮細胞のほぼ中央からそれぞれ 1 本の繊毛が走査型電子顕微鏡によって観察され、繊毛の運動が神経胚回転の原動力（driving force）となる可能性が示された。神経胚回転の停止メカニズムについては、胚の左側が下向きになると、神経胚の neural fold の盛り上がりが物理的障害となり、さらなる回転が妨げられると考えられる。また、neural fold から尾部にかけての背側には繊毛が存在しないことも、神経胚回転の停止に関与している可能性もある。遠心力を用いて胚の右側を卵膜に接触させ続けると *nodal* は正常とは逆に胚の右側で発現し、尾の巻き方や脳胞の位置についての左右非対称性は逆転する。スライドガラスとカバーガラスで胚をはさみ、胚の左右両側を卵膜に接触させると *nodal* は左右両側に発現し、左右非対称性は乱れる。これらの結果は、表皮細胞と卵膜との接触が *nodal* 発現を引き起こすことそして神経胚の回転・停止が *nodal* 発現を左側表皮細胞に限定していることを示唆している。卵膜を除去して発生させると *nodal* は発現しない。卵膜を除去して胚の左右両側をガラスで押さえつけても *nodal* は発現しない。また、*nodal* 発現にとって卵膜を外から覆っている濾胞細胞は必要ない。これらのことは卵膜からの化学的なシグナル（機械的なシグナルではなく）が、*nodal* 発現を引き起こす可能性を示唆している。さらに、神経胚回転は他のホヤでも起こることを確認した。

本研究では、神経胚回転がマボヤ幼生の左右非対称な形態形成につながることを *nodal* 遺伝子発現の観察を通して明らかにした。その過程は次のように考えられる。まず、神経胚回転・停止により、胚の左側側面が下向きになり卵膜と接触する。次に、卵膜からの化学的なシグナルによって胚の左側側面（卵膜と接触した部分）に *nodal* が発現する。その後 nodal シグナリングを経て幼生の尾が左側に巻き、脳胞が右側に位置するという左右非対称な形態形成につながる。*nodal* を胚の右側に発現させると左右非対称性が逆転する。これらのことから神経胚回転によって左右非対称性が決定されると結論づけた。そして、

その神経胚回転の driving force として繊毛運動の可能性を指摘した。今後、この繊毛が動き、確かに胚を回転させる力を発生しているのかどうか見極めていきたい。

欧文要旨

Tadpole larvae of the ascidian, *Halocynthia roretzi*, show morphological left-right asymmetry. The tail invariably bends towards the left side within the vitelline membrane. The structure of the larval brain is remarkably asymmetric. *nodal*, a conserved gene that shows left-sided expression, is also expressed on the left side, but unlike vertebrates, in the epidermis layer. I show that nodal signaling at the late neurula stage is required for stereotypic morphological L-R asymmetry at later stages. I found a novel mechanism to break embryonic symmetry, in which rotation of whole embryos provides the initial cue for left-sided expression of the *nodal*. Two hours prior to onset of *nodal* expression, the neurula embryo rotates along the anterior-posterior axis in a counterclockwise direction when seen in posterior view, and then this rotation always stops when the left side of the embryo becomes oriented downwards. It is likely that epidermis monocilia appearing at the neurula rotation stage generate the driving force for the rotation. When the embryo became to lie on the left side, protrusion of the neural fold physically prevents it from rotating further. Results of experiments in which neurula rotation is perturbed by various means, including centrifugation and sandwiching between cover slips, indicate that contact of the left epidermis with the vitelline membrane as a consequence of neurula rotation promotes *nodal* expression in the left epidermis. It is suggested that chemical, and not mechanical, signals from the vitelline membrane promote *nodal* expression. Neurula rotation is also conserved in other ascidian species.

第一章　序論

1-1 動物の胚発生における左右軸の非対称形成

動物界のうち海綿・刺胞・櫛板動物を除く左右相称動物の成体には、それぞれに決まった左右非対称性が存在する。脊椎動物の胚発生の初期段階における形態は、左右対称であるが、後に、その対称性は左右軸に沿って破られる（Raya and Belmonte, 2006）（図１）。発生初期においては、前後軸・背腹軸は決まっていても左右は対称である（図１a）。左右対称を破る最初の情報は不明なものが多いが（図１b）、脊椎動物におけるその情報は胚のノード（青丸で示す）で表出する（図１c）。ノード周辺では、*nodal* などの遺伝子が非対称に発現し（図１d）、そのノードで生じた非対称なシグナルは、左側側板中胚葉に伝わり *nodal* 発現を引き起こす（図１e）。左右両側で特異的な遺伝子が発現し（図１f）、その後、器官原基にその左右の情報が伝わり（図１g）、順に、左右非対称な形態形成のプログラムが実行される（図１h）と考えられている。

すなわち、脊椎動物ではノードにおいて左右極性が生成され、その極性シグナルがノードから側板中胚葉へ伝わり、そこで左右非対称な遺伝子発現を確立する。その後、左右の側板中胚葉に生じた遺伝子発現の差に基づいて左右非対称な形態形成が起こると考えられる。

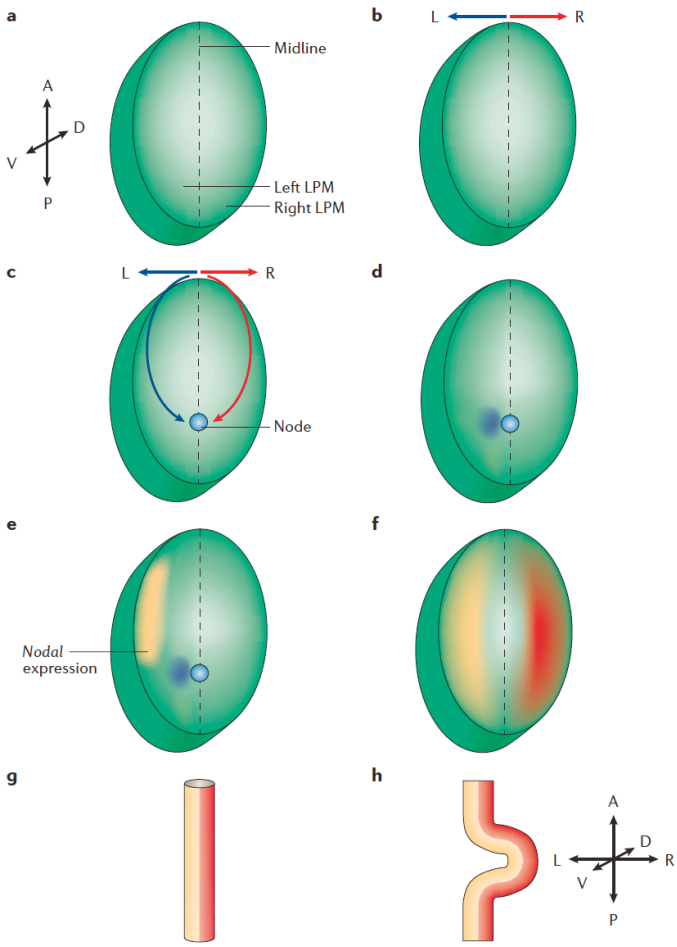

図１　脊椎動物の胚における左右軸決定の概要
(Raya and Belmonte, 2006, 許諾を得て転載)

1-2 nodal と左右非対称性形成

nodal 遺伝子の左側発現は、ニワトリ胚やマウス胚における形態的な左右非対称性の出現より先に起こることが知られている（Levin et al., 1995; Collignon et al., 1996; Lowe et at., 1996）。nodal は脊椎動物の初期発生において多様な役割をもつペプチド性の誘導物質で、トランスフォーミング増殖因子 β(TGFβ)スーパーファミリーの一員である。細胞から分泌された nodal タンパク質は、細胞膜に存在する nodal 受容体との結合を介して、細胞質の Smad タンパク質によって核内に伝えられる。核の中で Smad タンパク質は FAST（FoxH1）などの転写因子と結合して標的遺伝子の発現を調節する（Schier and Shen, 2000）（図２）。

左右軸の非対称性における nodal タンパク質の関与は、アフリカツメガエルやゼブラフィッシュを含む多くの脊椎動物間で保存されている（Burdine et al., 2000; Whitman et al., 2001）（図３）。

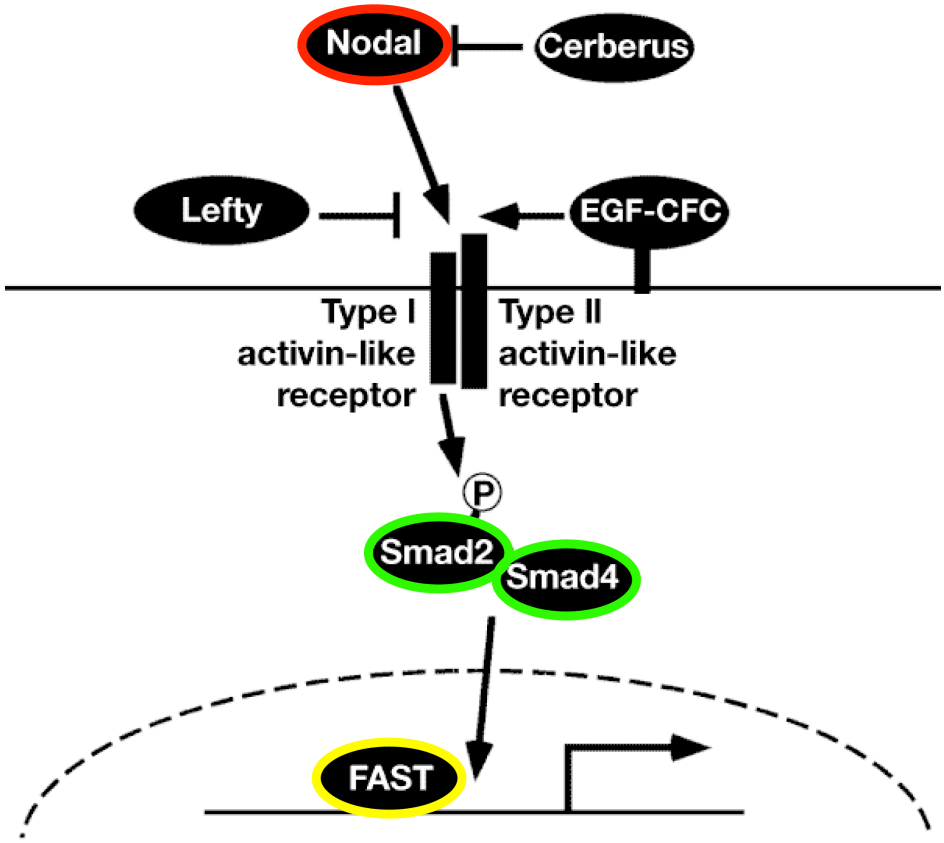

図２　nodal シグナル伝達経路（Schier and Shen, 2000 を改変，許諾を得て転載）

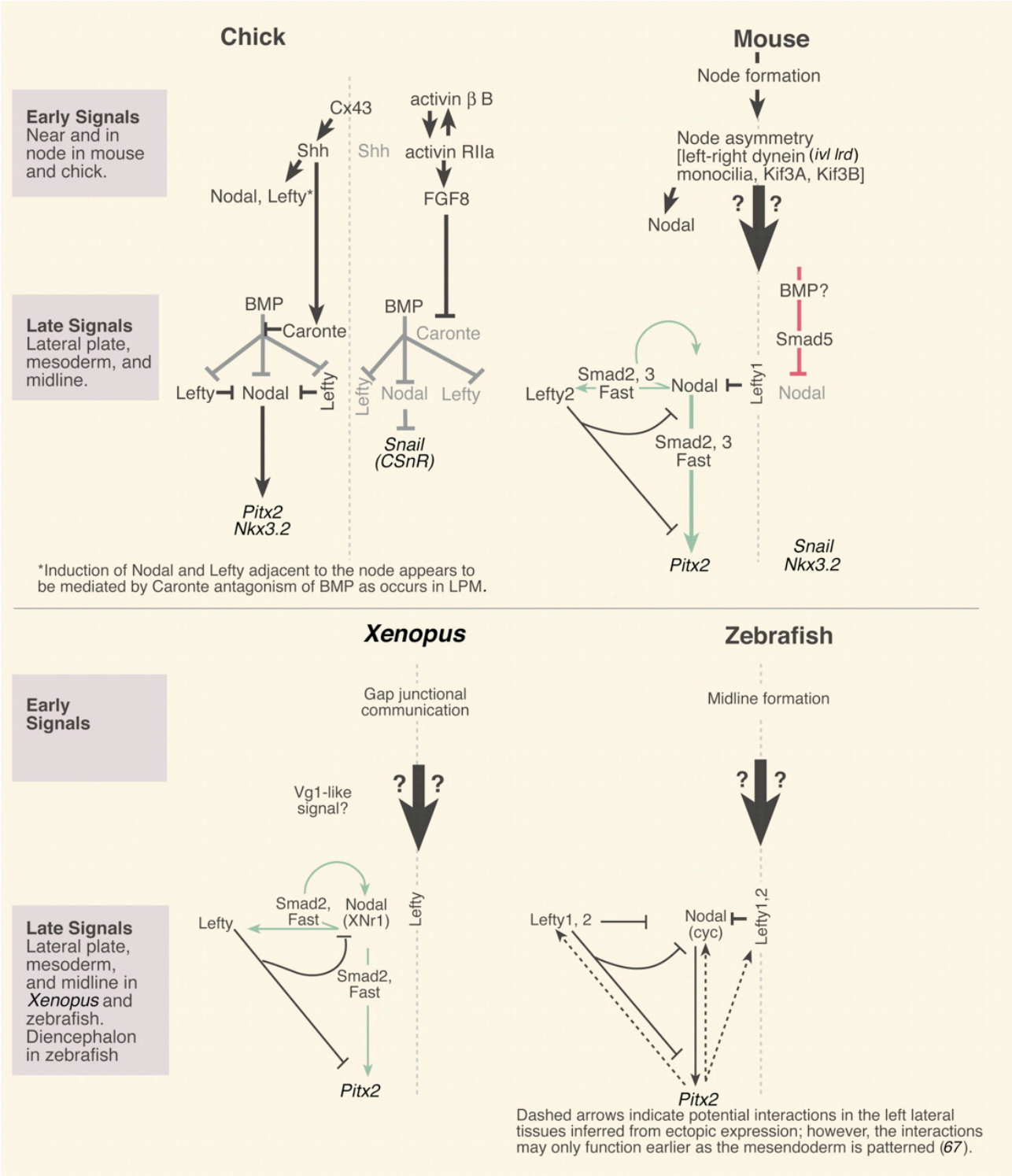

図 3　左右軸に関するシグナル伝達経路（Whitman et al., 2001）

1-3 nodal flow

nodal 遺伝子の左側特異的発現が、脊椎動物の左右非対称性の確立に必要なのであれば、どのような仕組みで左右非対称な *nodal* の遺伝子発現が生じるのであろうか。

マウスのノードの細胞には monocilia が存在しており、その回転運動によって nodal flow と呼ばれる左向きの水流を生じさせ、左右対称性を破るためのメカニズムとして働いている (Nonaka et al., 1998)（図 4）。これは、人工的に右向きの水流を生じさせると左右が逆転したことで確認されている（Nonaka at al., 2002）。このノード内における左向きの水流（nodal flow）は、マウス胚における左右決定の最も早い時期に起こる現象と見られている。nodal flow が生じるメカニズムは、ノードの細胞にある monocilia が後方に倒れて回転することによって左向きの流れを発生させている（Nonaka et al., 2005; Okada et al., 2005；Hirokawa et al., 2006）（図 5）。この monocilia が傾く現象には、平面内細胞極性 (PCP) 経路と流体の力が関わっていることが示された（Borovina et al., 2010；Guirao et al., 2010；Hashimoto et al., 2010）。このシステムでは、前後軸の極性と繊毛のキラルな構造による時計回り（繊毛の先端から見て）の回転運動によって胚の左右対称性は破られる。ノードにおける左向きの流れは、ニワトリを除く他の脊椎動物においても発生することが知られている(Okada et al., 2005)。

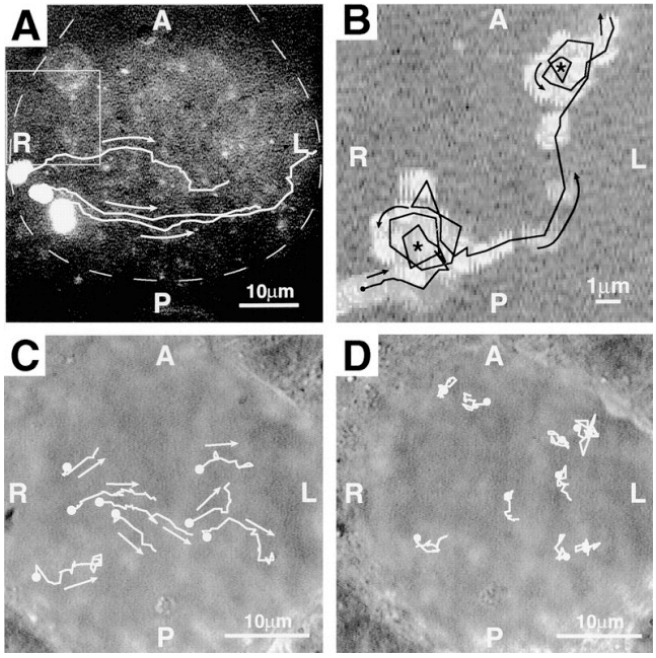

図 4　nodal flow (Nonaka et al., 1998, 許諾を得て転載)

(A) 野生型ノードでは 3 つの蛍光ビーズは左向きに移動。破線内がノード。

(B)（A）の枠内の軌跡。ノード繊毛の周りに反時計回りの渦が観察された。

(C) kif3B + / -では、ビーズの動きは左向きであった。

(D) kif3B - / -（繊毛のキネシンの突然変異体）では、ランダムな動きが観察された。

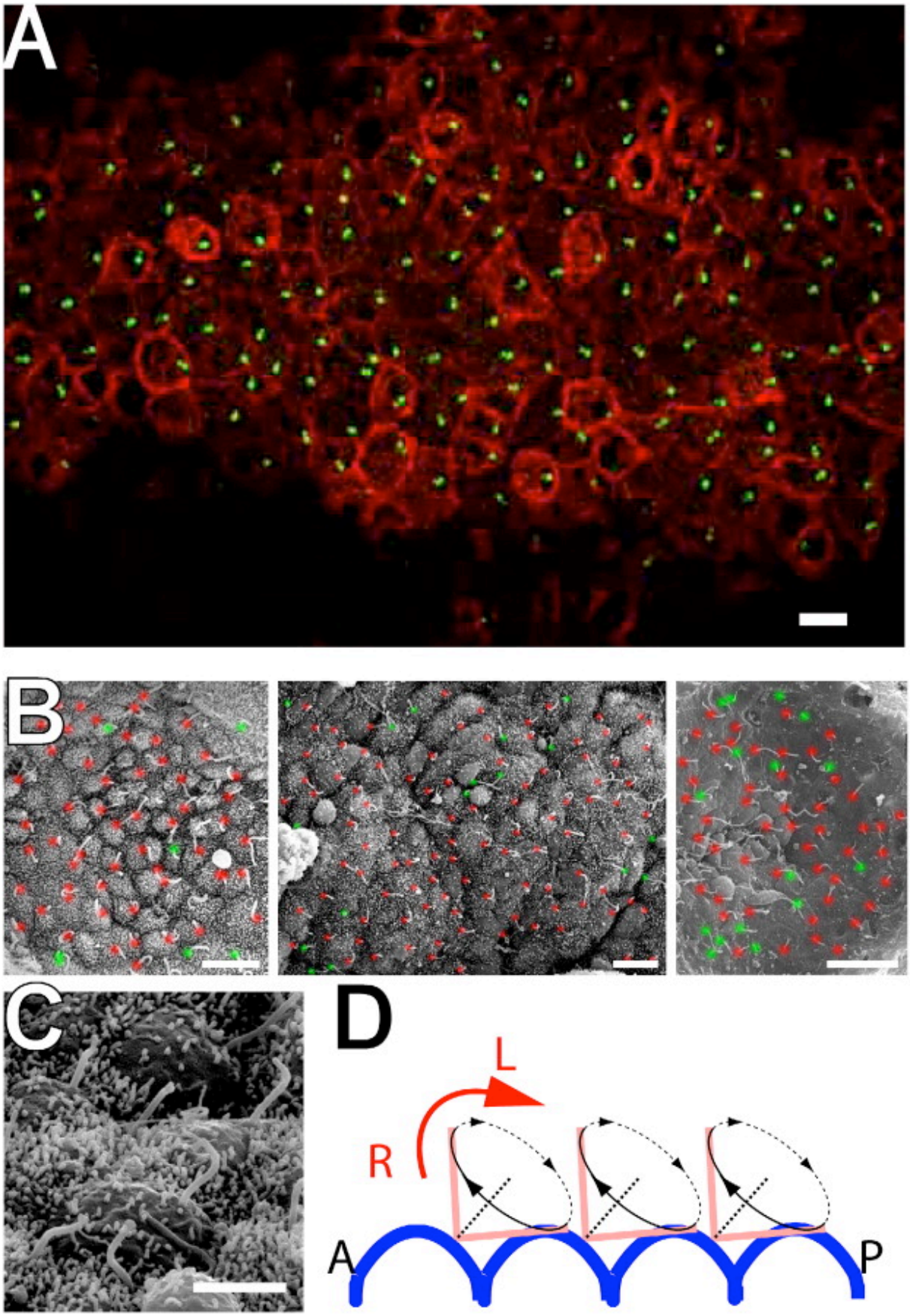

図 5　Basal body が後方に位置することによって繊毛は腹側後方へ倒れる(Okada et al., 2005, 許諾を得て転載)

（A） ウサギ胚の腹側ノード

Basal body は、抗γ-チューブリン抗体（緑）で染色。細胞境界は抗ウサギ抗体（赤）で染色。スケールバー：10μm。写真の左側が胚の前側。

（B） マウス（左）、ウサギ（中央）、メダカ（右）のノードに相当する部分における繊毛。繊毛の基部が細胞の後側に位置する場合は赤で、それ以外の場合は緑で表示。繊毛の約 85%は細胞の後方側から生えている。スケールバー：10μm。

（C） ウサギのノード繊毛細胞の走査型電子顕微鏡写真。個々の細胞の表面はドーム状を呈しているので、後方に存在する繊毛は後方に向けて傾斜している。スケールバー：5μm。

（D）monocilia の腹側後方への傾きと回転方向を示す模式図。

1-4　nodal flow の作用機序

このようにいくつかの脊椎動物で nodal flow が確認され、その左向きの水流がどのように左右非対称な形態形成に寄与するのかが明らかになりつつある。マウスのノードでは、膜で包まれた直径数ミクロンの NVP（nodal vesicular parcel）と呼ばれる粒子がノード細胞から出てきて、nodal flow によってノードの左側へ運ばれている。NVPs はソニックヘッジホッグ（SHH）とレチノイン酸（RA）を含んでおり、これらのシグナルに依存して、ノード左側の細胞で Ca^{2+}の流入が生じる（Tanaka et al., 2005）（図 6）ことが提唱されている。

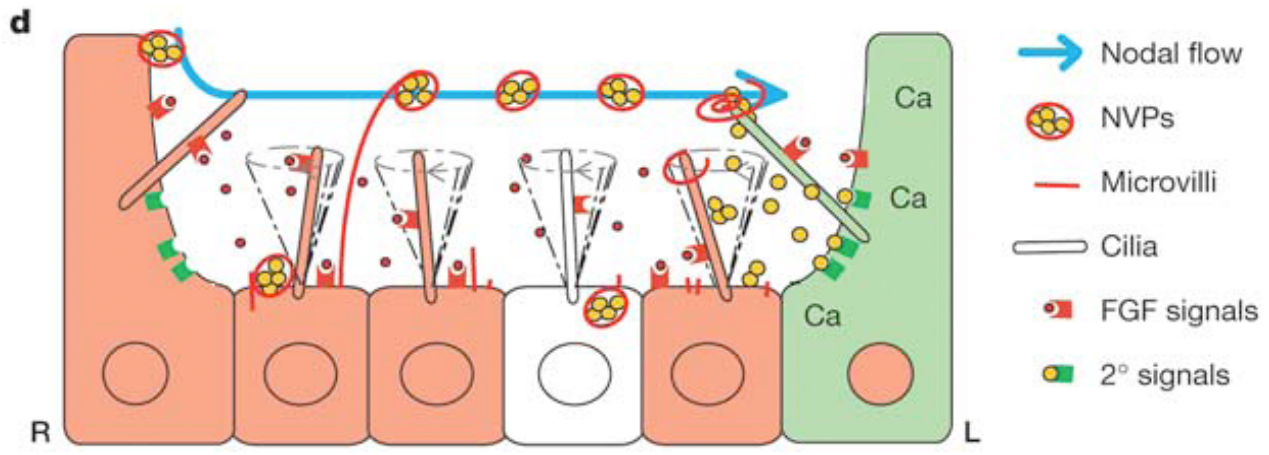

図 6　ノード繊毛の回転による nodal flow（青矢印）が、SHH と RA を含んだ NVPs（nodal vesicular parcels、黄色い粒を赤線で囲んだもの）をノードの左側へ運ぶ模式図。（Tanaka et al., 2005, 許諾を得て転載）

1-5　nodal flow より早い段階での左右非対称性の確立

マウスでは、ノードにおける nodal flow が左右決定の最も早い時期に起こる現象だと考えられているが、アフリカツメガエル・ニワトリ・ゼブラフィッシュでは、nodal flow に加えて発生の非常に初期の段階で、H^+/K^+ATP アーゼ活性によって作られるイオン flux のような左右非対称シグナルによって、左右非対称性が確立する可能性も報告されている (Levin et al., 2002; Qiu et al., 2005; Kawakami et al., 2005)。

アフリカツメガエルやニワトリ（ニワトリにはノードに繊毛はない）では、次のような 3 つのモデルが示されている（Levin et al., 2002）。まず 1 つ目のモデルは、H^+/K^+ATP アーゼ活性が初期胚の右側に局在していることから、H^+/K^+ATP アーゼの mRNA の局在（アフリカツメガエル）や翻訳後のタンパクの局在（ニワトリ）によって左右非対称形成への関与が想定される（図 7A）。２つ目は、H^+/K^+ATP アーゼの機能が非対称な遺伝子発現に対する決定因子の分泌を直接制御する可能性を示している（図 7B）。３つ目は、H^+/K^+ATP アーゼが未知の低分子量の左右決定因子（緑粒）の細胞間の伝達に影響を与える可能性を示している。これはギャップジャンクションを通しての左右決定因子の一方向の伝達が、多細胞での非対称な遺伝子発現のきっかけとなるというモデルである（図 7C）。

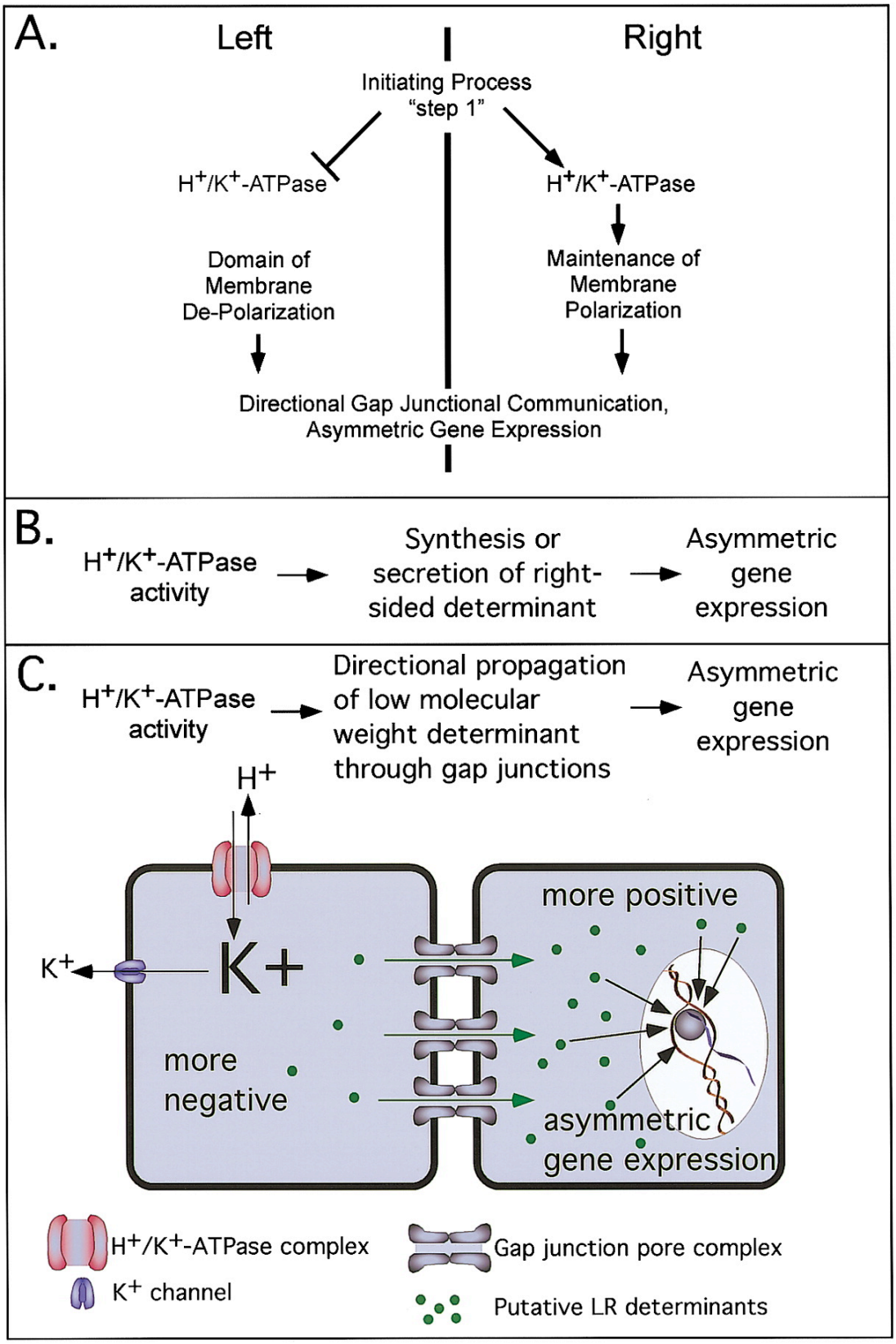

図 7　左右非対称性における H^+/K^+ATP アーゼ関与の 3 つのモデル(Levin et al., 2002, 許諾を得て転載)

1-6 無脊椎動物（センチュウ、巻貝、ショウジョウバエ）における左右非対称性の確立

センチュウの成体においては、腸・生殖腺・神経系に左右非対称性が見られるが、初期発生過程の 4 細胞期までは左右対称である。4 細胞期から 6 細胞期になるときに分裂する 2 つの細胞で紡錘体が傾く結果、6 細胞期において一定の（個体差のない）形態的左右非対称性を示すようになる（Wood, 1991）（図 8）。このことは、紡錘体の極性が対称性を破るきっかけになることを意味している。さらに、その後 8 細胞期に細胞のキラルな動きによって正中線が前後軸からずれ、左右非対称な形態形成が行われていくことが報告されている（Pohl et al., 2010）。

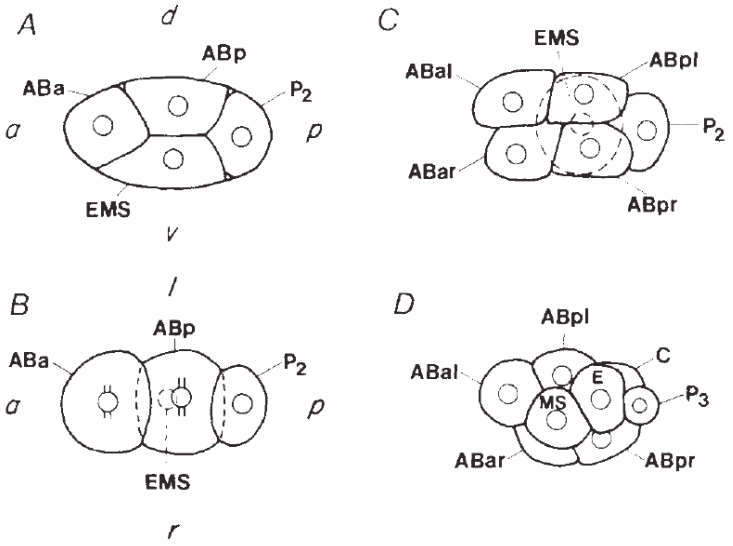

図 8　センチュウの 4 細胞期胚から 8 細胞期胚（Wood, 1991, 許諾を得て転載）

A：4 細胞期の左側面

B：4 細胞期の背側

C：6 細胞期の背側

D：8 細胞期の腹側

巻貝の貝の巻く方向は種によって固有であるが、右巻き種の方が多数派である。巻貝の卵割はらせん卵割で、右巻きの巻貝は右回旋のらせん卵割を行うことが知られている。また、巻貝の左右性は母性遺伝子で決定されることも知られているが、先に述べた脊椎動物において左右非対称に発現する *nodal* 遺伝子が、巻貝においても左右非対称に発現していることが報告された（Grande et al., 2009）。この結果は、nodal シグナル伝達経路が新口動物に特有の特徴ではないことを示している。また、*nodal* が発現する前のらせん卵割が始まる第 3 卵割において割球配置を人為的に変更すると、巻き方の左右性を変更できることも明らかにされている（Kuroda et al., 2009）（図 9）。

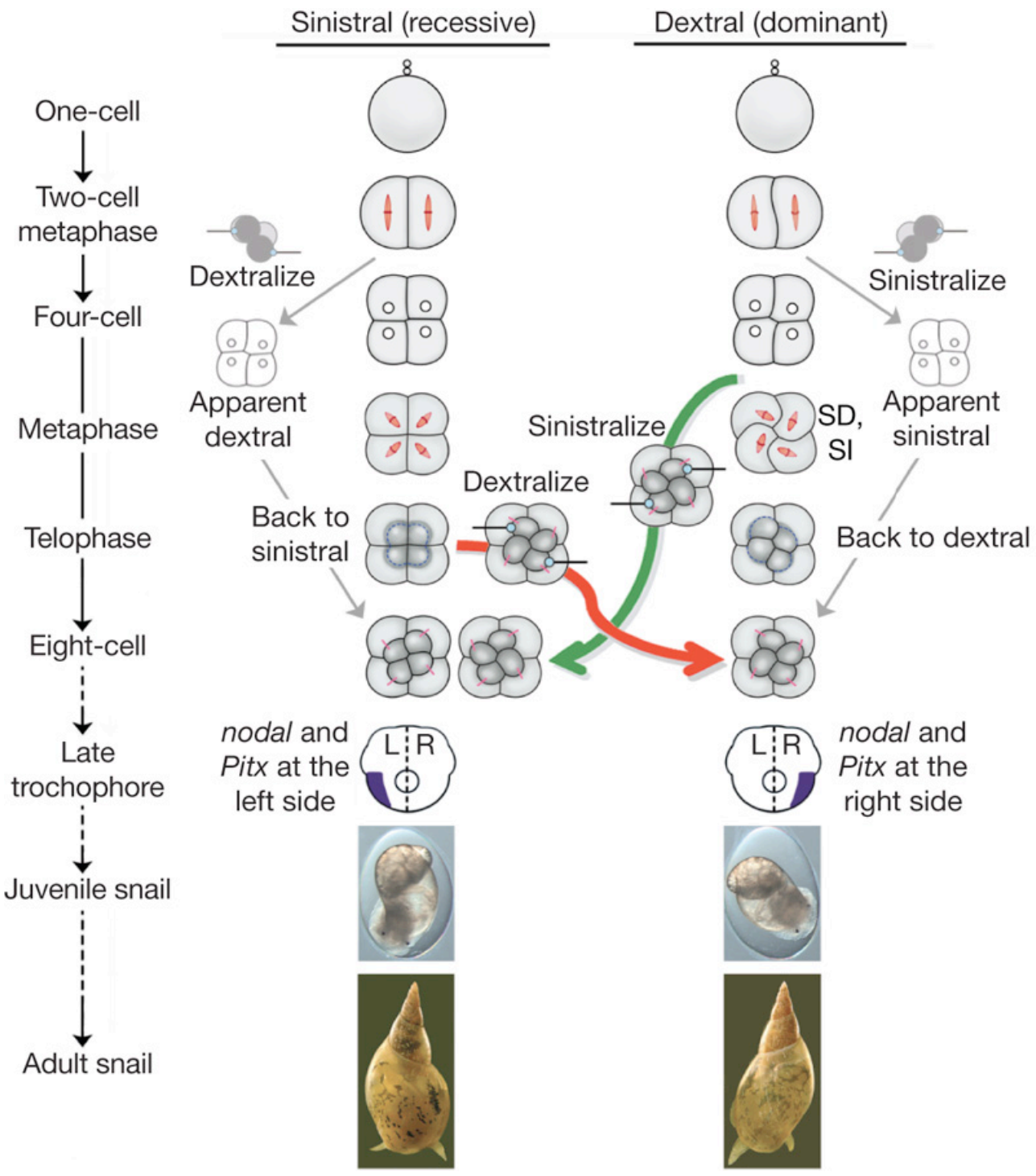

図 9　第 3 卵割期に細胞配置を人為的に操作すると（図の中央）、逆巻の貝になる（Kuroda et al., 2009, 許諾を得て転載）

ショウジョウバエでは、消化管・精巣・雄性外生殖器・成虫脳において左右非対称性が知られており、Myo31DF 変異のホモ接合体では、胚の消化管・成虫の消化管・精巣の左右性が逆転することが報告されている（Hozumi et al., 2006）。Myo31DF はアクチン上を動くモータータンパク質として、左右非対称形成に関与することが示された。また、後腸上皮のアクチンフィラメントを破壊すると胚の消化管の左右非対称性がランダムになる。このことから Myo31DF が機能するためには、アクチンが必要なことも示唆された。さらに、別の I 型ミオシンである Myo61F を過剰に発現させると、胚の消化管の左右非対称性が逆転し、ノックダウンしても左右のパターン形成に異常が生じる。これら 2 つの非定型 I 型ミオシンは、左右のパターン形成において拮抗的に働いている可能性が示されている。このようにアクチン細胞骨格と I 型ミオシンタンパク質は、ショウジョウバエの左右非対称性の形成に重要な役割を果たしていると考えられている（Hozumi et al., 2006）（図 10）。

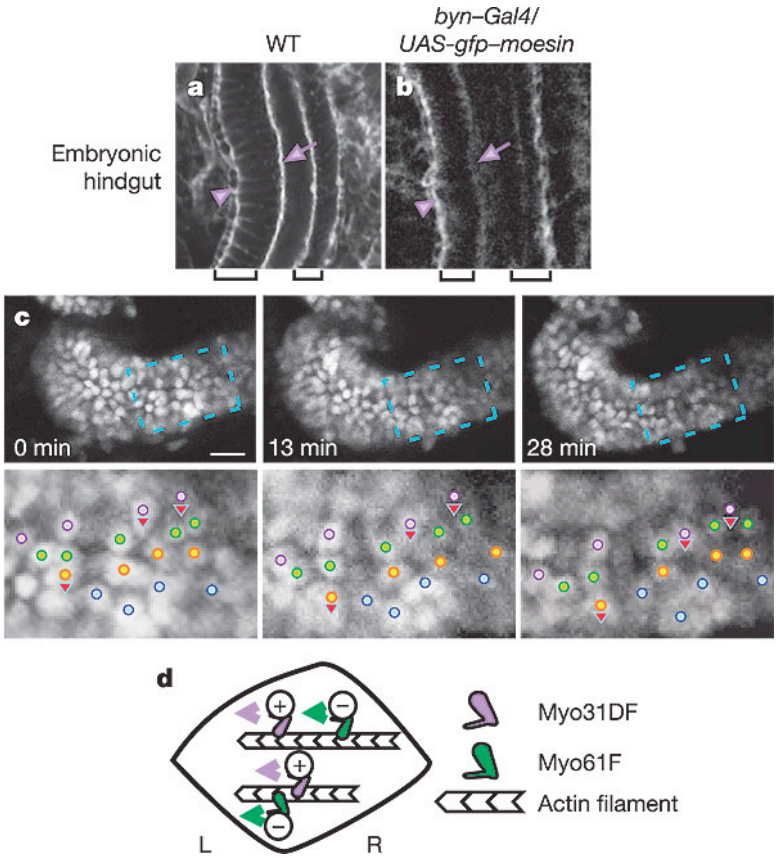

図 10　ショウジョウバエの腸における左右非対称性（Hozumi et al., 2006, 許諾を得て転載）
(a) 野生型の腸上皮におけるアクチンの局在　(b) GFP-moesin 過剰発現。基底面を矢頭で、頂端表面を矢印で、後腸上皮細胞層を括弧で示す。(c) 腸上皮細胞のタイムラプス画像。各色の点は細胞の位置を示す。下段の画像はそれぞれの上段の破線領域の高倍率画像。細胞の移動と再編は、後腸の左ネジ方向への回転と一致している。インターカレーションを示す細胞について、動く方向を矢頭で示す。スケールバー：10 μm　(d) ショウジョウバエの左右非対称性におけるミオシン I タンパク質の機能モデル。Myo31DF と Myo61F は、それぞれ拮抗する活性（+と−）をもつ左右決定因子を運ぶと考えられる。

1-7 ホヤの左右非対称性とホヤ胚発生の特徴、および研究上の利点

脊椎動物に最も近縁であるホヤの形態は、幼生、成体ともに左右非対称性を示す（Hirano et al., 2000; Boorman et al., 2002）（図 11）。マボヤのオタマジャクシ幼生では、２つの形態的な左右非対称性が見られる（結果 3-1 章も参照）。第一に、幼生の尾は限られたスペースである囲卵腔内で常に左側へ巻く。第二に、脳の構造が著しく非対称で、脳胞と感覚色素細胞が正中線の右側に位置する；（Taniguchi and Nishida, 2004）（図 12）。また、ホヤの遺伝子 *nodal* や、nodal シグナルによって発現が誘導される *Pitx*（転写因子をコードする）が神経胚や初期尾芽胚の左側で発現することが知られている。しかし、その発現は表皮細胞で起こり、脊椎動物の場合のように中胚葉では発現しない(Morokuma et al., 2002; Shimeld and Levin, 2006; Yoshida and Saiga, 2008)（図 13）。さらに、ホヤにはノードに相当する領域は存在せず、ノード繊毛の回転運動による nodal flow のような流れは生じない。

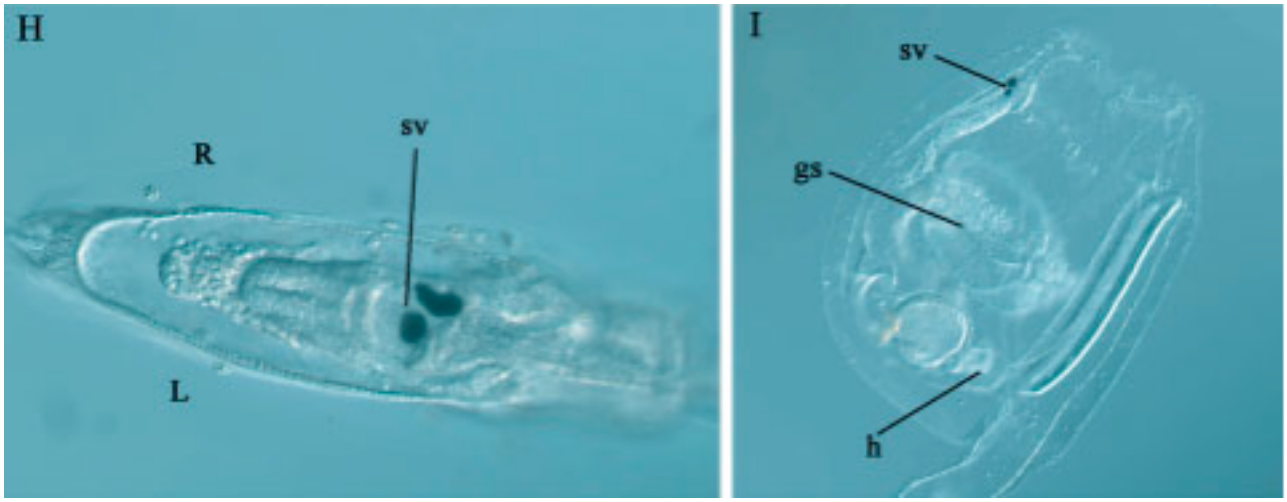

図 11　カタユウレイボヤにおける形態的左右非対称性（Boorman et al., 2002 を改変，許諾を得て転載）

H：カタユウレイボヤの幼生。感覚胞（sv）中に２つの感覚細胞が存在する。

I：　カタユウレイボヤの幼若体。非対称に折りたたまれた腸と心臓(h)　。gs:鰓裂。

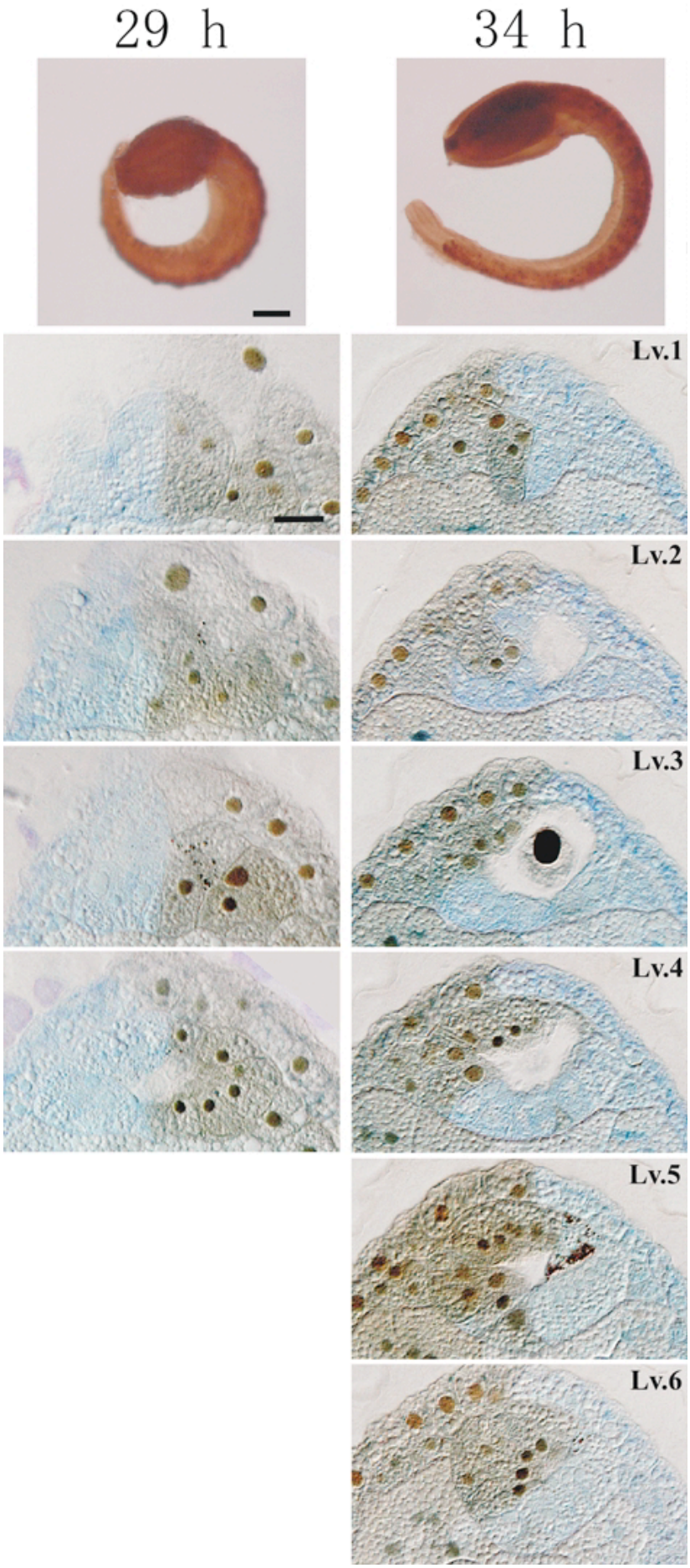

図 12　マボヤ尾芽胚内部における左右の境界(Taniguchi and Nishida, 2004, 許諾を得て転載)

（上）受精後 29 時間と 34 時間の尾芽胚。

（左）2 細胞期の右割球に HRP を注入。受精後 29 時間後に固定。脳における標識および非標識領域の境界は、胚全体の正中線と一致する。

（右）2 細胞期の左割球に HRP を注入。受精後 34 時間後に固定。脳における左右の境界は、Lv.2 – 6 の間で、後方から見て時計回りに回転してずれている。Lv.2-6 は切片の位置を示し、Lv.6 が最も後方。29 時間尾芽胚のスケールバーは、100 μm。切片のスケールバーは、20 μm。

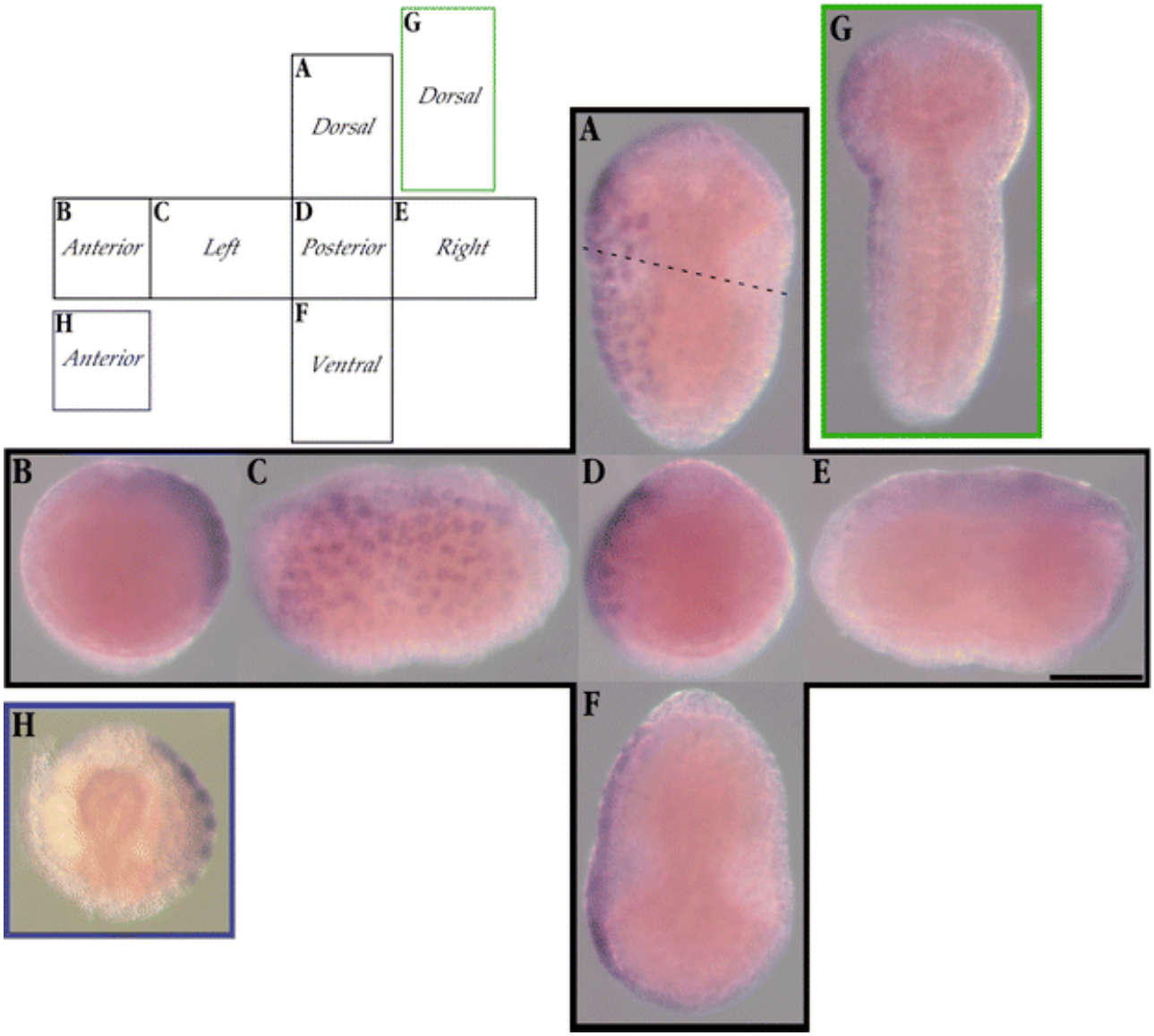

図 13　左側表皮の *nodal* 遺伝子発現（Morokuma et al., 2002, 許諾を得て転載）

A-F：初期尾芽胚。G：中期尾芽胚。*nodal* の発現が確認できるが弱まっている。H：初期尾芽胚。A の点線部分における横断面。背側が上。切片の左側が胚の右。*nodal* 発現が左側表皮細胞内に限られている。スケールバー：100μm。

マウスをはじめとする脊椎動物で左右非対称性の確立に関して、分子メカニズムが明らかになる一方、その後の左右非対称な形態形成について未だ多くは未知である。この点について、マボヤ尾芽胚の表皮細胞における *nodal* の非対称な発現とその数時間後に生じる尾の非対称な巻き方との関係は、非対称な遺伝子発現と非対称な形態形成を関連付ける研究対象として適している。

1-8 研究の概要と意義

多くの左右相称動物の体内の器官は左右非対称性を示す。1 つの受精卵が卵割により多細胞化していく初期の段階では左右対称であったものが、どのようなメカニズムで左右非対称になるのか。前述のように、脊椎動物で左右非対称に発現する遺伝子が発見されて以来、多くの知見が得られている。ニワトリやマウスをはじめとする脊椎動物において、左右非対称に発現する *nodal* がよく保存されていることが知られており、ニワトリを除くそれらの脊椎動物では nodal flow という現象が観察されており、マウスではそれが左右対称を破る現象として確認されている（Nonaka at al., 2002）。また、ウニ・センチュウ・ショウジョウバエ・巻貝などではノードに相当する領域が存在せず、nodal flow も存在しないが、独自のメカニズムで左右非対称性が確立している。脊椎動物と無脊椎動物との間で左右非対称性の確立メカニズムが大きく異なることから、進化の過程が影響を及ぼしている可能性も考えられる。このような背景から、脊椎動物に最も近縁な分類群に属するホヤにおける知見は、左右非対称性の問題においても重要である。さらに、左右非対称に発現する遺伝子が、左右非対称な形態形成にどのように関与しているかについては依然として多くが未知である。

マボヤでは、*nodal* 遺伝子が後期神経胚から尾芽胚にかけて胚の左側表皮のみに非対称に発現し、また、孵化前の幼生の尾が左側に巻き、脳胞は右側に配置するという非対称な形態が報告されている(Morokuma et al., 2002)。しかし、*nodal* の非対称な発現と幼生の非対称な形態との関係は未知である。

そこで本研究では、まず、マボヤの形態的な左右非対称性の形成にける nodal シグナルの関与について、nodal 受容体に対する阻害剤処理によって調べた。nodal 発現よりも前の段階から阻害剤処理を行った胚では、幼生の形態の左右非対称性が乱れた。このことから、マボヤにおいても nodal の非対称な発現がその後の左右非対称な形態形成に関与していることが示唆された。

次に、左右対称が破られる最初のきっかけを調べるため、*nodal* 遺伝子の発現に先立ち、神経胚が卵膜内で回転する現象に注目した。この回転は、基本的に前後軸に沿って後方から見て反時計回りに回転し、常に神経胚の左側が下向きになると止まる。この現象は

「neurula rotation（神経胚回転）」と呼ばれている。回転を終了した胚の表皮細胞を走査型電子顕微鏡で観察したところ、背側を除く表皮細胞にそれぞれ 1 本ずつ繊毛を観察した。繊毛が生え始める時期と神経胚回転の開始時期が一致することも観察された。さらに、卵膜を除去して寒天上で発生させると神経胚回転の時期に寒天上で動く胚が観察されることがある。これらのことから、繊毛の運動が神経胚回転の driving force となっている可能性が考えられる。

また、正常発生では神経胚回転・停止により胚の左側が一定期間卵膜と接触し続けることにより、胚の左側表皮のみに *nodal* が発現するが、遠心力を利用して神経胚の右側を一定期間卵膜と接触させ続けると、*nodal* は胚の右側表皮のみに発現する。また、カバーガラスとスライドガラスで神経胚の左右両側をはさみ、胚の両側を一定期間卵膜と接触させ続けると、*nodal* は胚の左右両側に発現した。これらの結果から、卵膜と胚との接触が *nodal* 発現のきっかけとなっていることが示唆された。さらに卵膜を除去した場合や卵膜を除去して胚の左右をガラスではさんだ場合では *nodal* は発現せず、通常の卵膜や、濾胞細胞を除去した卵膜と胚を一定期間接触させ続けると接触させた領域に *nodal* が発現した。よって、*nodal* 発現には卵膜からの化学的なシグナルが必要であることが示唆された。

以上の結果から、次のような過程を経てマボヤ幼生の左右非対称性が形成されると考えられる。

① 神経胚回転の Driving Force である繊毛の存在　→　② 神経胚回転　→　③ 神経胚の左側が下向きになり卵膜と接触　→　④ 卵膜からの化学的シグナルにより初期尾芽胚の左側表皮に特異的な *nodal* 発現　→　⑤ nodal シグナリング　→　⑥ 非対称な形態形成

第二章　材料と方法

2-1 実験動物

本研究で用いた *Halocynthia roretzi* （和名：マボヤ)は、分類学上、脊索動物門尾索動物亜門ホヤ綱壁性目マボヤ亜目に分類される。実験に用いたマボヤは、青森県陸奥湾にて自然生息している個体、もしくは陸奥湾および岩手県大槌湾にて養殖された個体である。集められたマボヤは、配偶子の放出を抑えるため低温（8～11℃）、明条件下で維持した。産卵誘起に際しては、海水温（10～13℃)と約８時間の暗期後の明条件とのコントロールによって配偶子を放出させた。マボヤは雌雄同体であるが自家不和合性を持つため、異個体由来の卵と精子を混ぜ合わせることにより人工授精を行った。

受精卵は濾過海水中で、13℃で発生させた。濾過海水は自然海水に 50 mg/L のストレプトマイシン硫酸塩（Sigma）と 50 mg/L のカナマイシン硫酸塩（Nakarai）を加え、孔径 0.45 μm のニトロセルロース膜（Millipore）を用いて濾過滅菌したものである。

2-2 nodal 阻害剤

nodal シグナル伝達経路を阻害するために、胚を 5 μM SB431542 (Sigma)で処理した。SB431542 は、アクチビンや nodal などのリガンドの受容に関わる TGF-β タイプ I 受容体 ALK4、ALK5、ALK7 をブロックする。この際、BMP リガンドに結合する他の ALK ファミリーメンバーは阻害されない（Inman et al., 2002)。また、この阻害剤は既にこれまでのホヤの実験でも使用され有効性が示されている（Hudson and Yasuo, 2005; 2006; Hudson et al., 2007; Yoshida and Saiga, 2011)。本実験での阻害剤処理は受精後 10 時間から 2 時間おきにスタートし、観察する時点まで続けた。

2-3 遠心力による胚の固定

卵膜内で胚の向きを固定するための方法として遠心力を用いた。受精後 15 時間の神経胚回転の直前にタングステン針を用いて、胚の左側を下向きにした後で（あるいは右側を下向きにした後で）、胚を遠心チューブに入れた。直ちに 2000 rpm (300G)で 90 分間、アングルローターで遠心することで、遠心の間、胚の位置や向きは変わらない状態を維持する。遠心後、胚の位置を確認し、遠心前の方向を維持していた胚（左側を下向きにした胚、あるいは右側を下向きにした胚）のみを選択し実験に使用した。

2-4 サンドイッチによる胚の固定

卵膜内で胚の向きを固定する 2 つめの方法では、神経胚をスライドガラスとカバーガラス間で緩やかにはさんだ。その胚は両側を卵膜によってはさまれた状態を維持することになる。胚を押さえる力は、スライドガラスとカバーガラス間のワセリンよって調節した。卵膜を除いた胚をサンドイッチする場合には、胚がガラスに張り付くことを防ぐために、ガラスをゼラチンで被覆した。ゼラチンでガラスを被覆するためには、蒸留水に 0.1%ゼラチン、0.1%ホルムアルデヒドを溶かし、その溶液でガラス上をコートして乾燥させた後、水で洗った（Zalokar and Sardet, 1984; http://biodev.obs-vlfr.fr/recherche/biomarcell/ascidies/methodabcdefgh.html）。

2-5 走査型電子顕微鏡観察

走査電子顕微鏡観察用の胚は、2.5%グルタールアルデヒド・1%パラホルムアルデヒド・0.5 M 塩化ナトリウム・0.1 M MOPS (pH7.5)を含む固定液で、4°C、16 時間固定し、その後、卵膜を除去した。PBS で胚を 3 回洗った後、それらの胚は 30%、50%、70%エタノールで脱水処理し、70%エタノール中で、-30°C のフリーザー内において使用するまで保存された。観察に際して保存しておいた胚は、100%エタノールで完全に脱水した後、エタノールを酢酸イソアミルに置換した。臨界点乾燥は、日立 HCP-2 装置で液化二酸化炭素を用

いて行なった。試料を臨界点乾燥した後、薄い金でコートし、走査型電子顕微鏡を用いて観察した（JEOL JSM-5800 と HITACHI SU6600）。

2-6 Whole mount in situ hybridization

Hr-nodal（Morokuma et al., 2002）と *Hr-ETR-1*（Yagi and Makabe, 2001）の mRNA の検出は、Wada et al. (1995)の Whole mount in situ hybridization の方法に従って行なった。ただし、0.1% Tween20 を含む 0.2x SSC で洗う工程は省略した 。

第三章　結果

3-1 マボヤのオタマジャクシ幼生における左右非対称性

マボヤのオタマジャクシ幼生では、2 つの形態的な左右非対称性が見られ（Morokuma et al., 2002）、本研究でもこれらを再確認した。第 1 に、幼生の尾が伸長するにつれて、ほとんどの場合、尾は囲卵腔内の限られたスペース内で左側に巻く（90-100%、卵のバッチや産卵時期により差が出る；図 14A）。背側正中線は、in situ hybiridization により *ETR-1* 遺伝子の神経管特異的発現を検出することによって可視化すると、この過程は容易に認められる（図 14C-E）。第 2 に、幼生の脳は非対称な形態を示し、otolith や ocellus の感覚色素細胞がほとんどの幼生において脳内で右側に位置し、otolith を包んでいる脳胞も正中線より右側に配置する（図 14A）。これらの非対称な位置は、胚の切片を観察すると良く分かる（図 14F）。これらの形態的な非対称性の出現に先立ち、*nodal* 遺伝子やその下流の *Pitx* 遺伝子の発現が、後期神経胚から初期尾芽胚の左側に観察される（Morokuma et al., 2002）。この *nodal* の発現は 13°C 下において受精後約 17 時間で始まり、18 時間で最高になり、23 時間までに減少する（図 14G-I）。

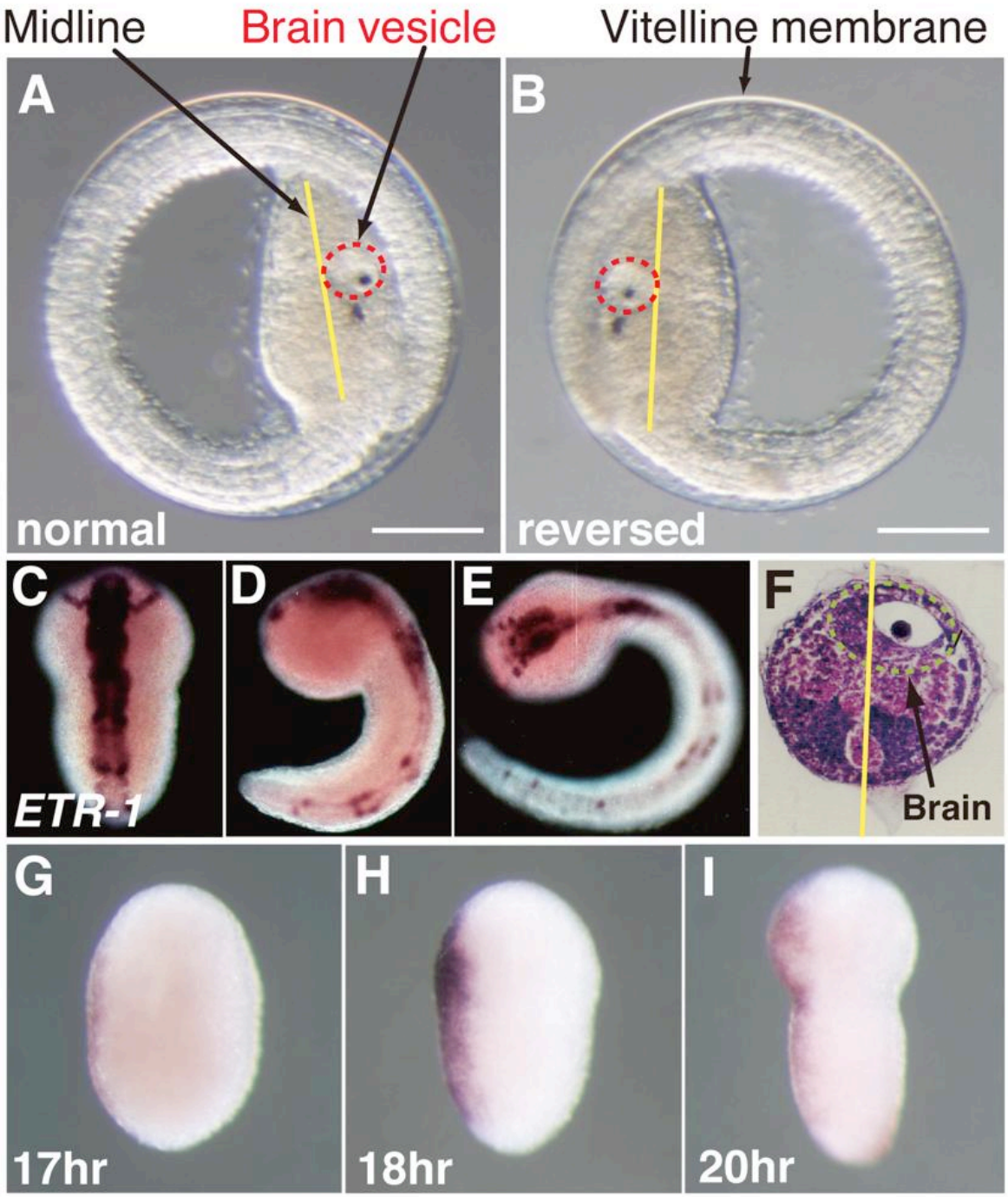

図 14　マボヤ幼生における左右非対称性

(A)、孵化直前の卵膜内の幼生。背側から見て。ほとんどの幼生の尾は限られた囲卵腔内で左側に巻く。脳胞（赤破線）や otolith・ocellus の感覚色素細胞は、正中線（黄線）の右側に位置する。スケールバー、100 μm。(B) まれに尾が逆（右側）に巻く幼生。脳胞や感覚色素細胞が正中線の左側に位置している。（C E）尾が伸長中の胚における *ETR-1* 発現。*ETR-1* は背側正中線の中枢神経系で発現し、尾が徐々に左に巻くことがわかる。(F) 脳

胞の非対称な位置を示す体幹の横断切片。黄線は、背側と腹側のフィンをつないだ線。緑の破線は、脳の領域を示す。Otolith 色素細胞は、脳胞内に存在している。（G-I）*nodal* の遺伝子発現の時間プロファイル。背側から見て。*nodal* の発現は 13°C で受精後 17 時間後に始まり、18 時間で最大に達し、次第に減少していく。

3−2 nodal シグナリングの阻害は、オタマジャクシ幼生の左右非対称性を崩す

オタマジャクシ幼生の左右非対称性な形態形成における nodal シグナルの機能を調べるために、胚を nodal 受容体の阻害剤で処理した。その処理は、受精後 10 時間（原腸胚）以降 22 時間（中期尾芽胚）まで、2 時間おきにスタートし、観察時点まで継続した（図 15A、E　グラフ下　青棒線）。孵化直前（受精後 35 時間）に、卵膜内で尾が巻く方向を観察し、記録をとり、ふ化後、体幹と背側・腹側のフィンを使って正中線を割り出し、脳胞の位置を観察した。コントロールとして DMSO で処理した幼生の尾は、95%以上の割合で左側に巻いた（図 15B ）。阻害剤 SB431542 処理を原腸胚直前の 64 細胞期（８時間）に始めると、ほとんどの尾の形成は異常になった(data not shown)。これは、nodal シグナルが、原腸胚期において尾を形成する 3 つの組織である二次筋肉細胞・二次脊索前駆細胞・背側神経管細胞のそれぞれの細胞運命決定に関わっているという観察と一致する（Hudson and Yasuo, 2005; 2006; Hudson et al., 2007）。異常な尾の形態形成は、阻害剤処理が遅くなるほど減少した（図 15A、E 黄）。受精後 17 時間で始まる *nodal* 遺伝子の発現に先立つ阻害剤処理では、約半数の幼生の尾が逆に巻き（図 15A,赤）、尾の巻き方が卵膜内でランダムになることが示された(Fig. 15C,D)。尾が逆に巻く割合は、阻害剤処理を、より遅いステージから始めると、より低くなった。これらの結果は、nodal シグナルが個体間で一定な尾の左右非対称性形成に不可欠であることを示唆する。

コントロールでは、90%以上の幼生において脳胞は、正常に右側に位置した（図 15F）。脳胞もまた尾の巻き方同様、*nodal* 発現の前に阻害剤処理を始めると影響を受けた。しかし、尾の巻き方と脳胞の位置に関する結果における重要な違いは、*nodal* 発現に先立つ阻害剤処理したほとんどの幼生において、脳胞は正中線上に位置し、左右にランダム化することはなかった（図 15E、緑）。したがって、nodal シグナルの欠如によって左右非対称性

が失われて、脳胞と感覚色素細胞は対称な位置（すなわち、正中線上）になったと考えられる（図 15G—H）。 これらの結果は、後期神経胚から初期尾芽胚期の左側表皮の *nodal* 遺伝子の発現が、尾の巻き方と脳胞の位置における左右非対称性の形成にとって極めて重要であることを示唆している。また、*nodal* 遺伝子の発現の前に阻害剤処置を行っても *nodal* 遺伝子の発現自体に対する影響は、45 個体中 43 個体で出なかった。このことは、マボヤの *nodal* 遺伝子発現に脊椎動物でしばしば見られるような autoregulation がないことを示唆している（Burdine and Schier, 2000; Meno et al., 1999; Schier and Shen, 2000）。

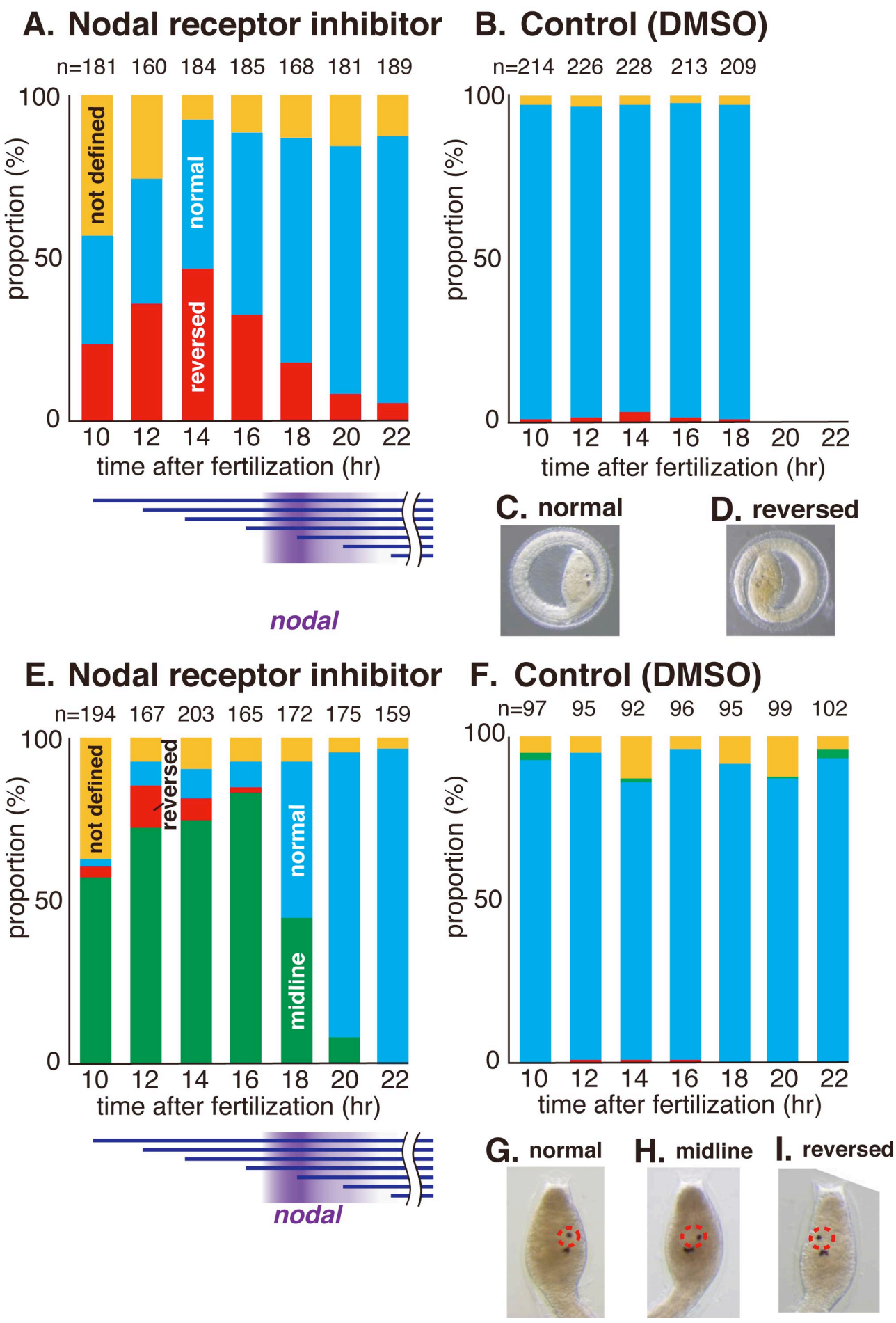
A. Nodal receptor inhibitor
n=181 160 184 185 168 181 189
100
50
0
proportion (%)
not defined
normal
reversed
10 12 14 16 18 20 22
time after fertilization (hr)
B. Control (DMSO)
n=214 226 228 213 209
100
50
0
proportion (%)
10 12 14 16 18 20 22
time after fertilization (hr)
nodal
C. normal
D. reversed
E. Nodal receptor inhibitor
n=194 167 203 165 172 175 159
100
50
0
proportion (%)
not defined
reversed
normal
midline
10 12 14 16 18 20 22
time after fertilization (hr)
F. Control (DMSO)
n=97 95 92 96 95 99 102
100
50
0
proportion (%)
10 12 14 16 18 20 22
time after fertilization (hr)
nodal
G. normal
H. midline
I. reversed

図 15　nodal の受容体阻害剤による処理　（A、B）尾の巻く方向。　(A)nodal 受容体阻害剤で処理された幼生の尾の巻く方向。処理開始は、受精後 10 時間（原腸胚）以降 22 時間（中期尾芽胚）まで、2 時間ごとにスタートし、観察時点まで継続した。ヒストグラムの下の水平の紫色のバーは処理期間を示している。*nodal* の遺伝子発現は、紫色のグラデーションによって示されている。赤は逆に尾が巻いているもの。青は通常どおり左に尾を巻くもの。黄色は異常な形態のため判断できないもの。　(B) DMSO 入り海水中で発生させた control 幼生。　(C、D) C:正常、D : 正常とは逆に右に巻く例。(E、F) 脳胞の位置。(E) nodal 受容体阻害剤処理。赤は逆の左側配置。青は通常の右側配置。緑は中央配置。黄色は発生異常により判断不能。　(F) DMSO 入り海水中で発生させた control 胚。　（G、H、I）G : 正中線の右側に位置する正常な脳胞（赤破線)、H : 中央に位置する脳胞、I : 正常とは逆の左側に位置する脳胞。

3-3 Neurula rotation（神経胚の回転）

マボヤの卵には卵膜内に大きな囲卵腔スペースが存在し、卵の直径は 280 μm、卵膜の直径は 560 μm である。タイムラプスビデオを撮影すると、後期神経胚が前後軸に沿って卵膜内で回転し、回転後すべての胚の左側が下向きになっていることが分かる（図 16A,B と補足 movies S1)。この神経胚の回転は 13°C で受精後約 15 時間（*nodal* 発現の 2 時間前）に起こり、2～7 分間で完了する。その回転は常に胚の後方から見て反時計回りに回転し、その回転は胚の左側が下向きになったときに止まる。その回転速度は毎分約 30°～45°で、タイムラプスムービーなしでは観察が難しい。タイムラプスムービーで 192 個体の胚の回転運動を記録し、観察を行った（Fig.16C)。録画開始時に、神経胚の半分以上（58%）は、腹側を下向きに背側を上向きにしていた（図 3C、左上、青)。 それらの神経胚は胚の後方から見て反時計回りに 90°を回転し、胚の左側が下向きになると回転が止まった。12%のケースでは胚の右側が下向きの状態で録画が開始され、反時計回りに 180°を回転し（緑）左側を下向きにして止まった。 8%の胚は、録画当初から胚の左側が下向きになっており、それらの胚は回転しなかった（黄)。 22%の胚は背側が下向きで録画が開始され、その内 10%の胚は時計回り方向に 90°を回転させて、左側を下向きにして止まった（赤)。 残り

12%の胚は反時計回りの方向に 90°を回転し、右側を下向きにし、しばらく止まり、その後さらに反時計回りの方向に180°回転を再開して、左側を下向きにして止まった（ピンク）。これら背側が下向きで録画を開始した胚は、最初の 90°の回転は受動的に起こり、その回転の方向はランダムである可能性がある。なぜなら、このステージになると neural fold が盛り上がってくるため（図 17A 参照）、背側を下向きにした胚は不安定な状態となり、左右ランダムに倒れると考えられる。胚が右側を下向きに倒れた場合は、受動的に倒れた後、小休止の後、反時計回りの方向の回転が始まるようである。

神経胚回転が完了した後、再び胚の右側が下向きになるように、人為的にタングステン針を用いて卵膜と胚を回転させると、驚いたことに、胚は再び回転を起こした。胚は常に反時計回りの方向に 180°回転し、再び左側を下向きにしたところで回転は止まった。この回転能力は受精後 15 時間の神経胚回転の後、約 3 時間続いた（表皮細胞が次に細胞分裂をする時期に近くなる受精後 18 時間頃まで）。このことは、回転の推進力が長い期間（3 時間）持続していることを示唆する。

次に、自然の海の中で波によって海水が動く海中でも神経胚回転が起こり、胚の左側を下向きにしたままの状態を維持できるのかどうかに疑問が生じた。これを調べるために、多くの胚が入った容器（25cm x 35cm）を、神経胚回転が起こる前にシェーカー上に置き、1.7Hz（ 1 分あたり 100 回の攪拌）で攪拌した。神経胚回転が起こる時期に攪拌状態から胚を取り出し、1 分以内でその胚の向きを観察した。観察された胚は、すべてにおいて左側を下向きにしていた（n = 50）。このように、胚はたとえ揺れる海水中であっても回転でき、左側を下向きに維持できることが示唆された。卵膜内の液には粘性があり、人為的に卵膜を 180°回転させてその位置を保つと、胚は一旦、囲卵腔内の上部に持ち上がるが、その後、底へゆっくりと沈んでいく。したがって、囲卵溝内の中心が胚の重心と一致しないので、卵膜をもつ胚は起き上がり人形または起き上がり小法師のようにふるまうようである。たとえ胚が水の動きによって一時的に卵膜内の上部に位置しても、卵膜と胚は重心のバランスをとるためにそのままの相互位置関係を保ったまま素早く元に戻ることができる。その上、先ほど示したように、たとえ胚の向きが乱されたとしても、すぐに回転し左下に戻ることができる。さらに、マボヤが生息する水深 10m 以下ではそれほど大きな波の動きはないと考えられる。

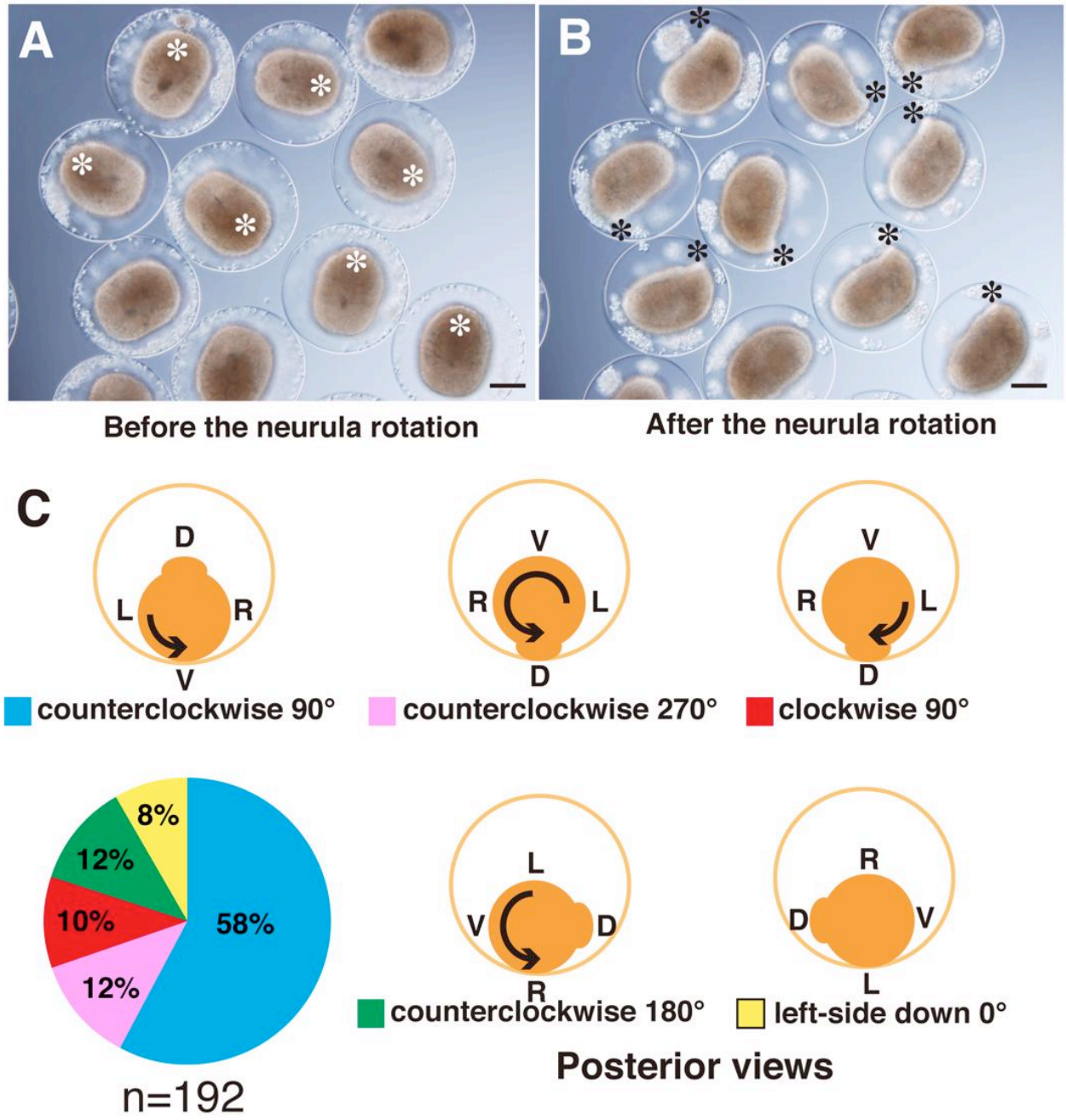

図 16　神経胚回転

（A）受精後約 15 時間の神経胚回転の直前。タイムラプスムービーのスナップショット。アスタリスクは、神経胚の背側前方の位置を示す（神経板の前方端)。アスタリスクの付いていない胚は、背側が下向きになっている。スケールバー : 100 μm.　（B）神経胚回転後。胚の小さな突起は、前方神経管が閉じている領域で、背側前方(アスタリスク）を示している。神経胚回転の後、すべての胚は左側を下向きにしている。　（C）神経胚回転の方向と角度。後ろ側から見た模式図。突出している部分は neural fold。青: 回転開始時に、胚の

背側が上。このような胚は胚の後方から見て反時計回りに 90°回転する。ピンク：胚の背側が下。このような胚は反時計回りに 270°回転する。赤： 胚の背側が下。このような胚は時計回りに 90°回転する。緑：胚の右側を下。このような胚は反時計回りに 180°回転する。黄色: 胚の左側が下。このような胚は回転しなかった。

3-4 表皮細胞上の Monocilia の存在

次に、神経胚回転のドライビングフォースについて調べるため、神経胚回転期の胚を走査型電子顕微鏡で観察した。すると、長さ約 5 μm の繊毛が、各々の表皮細胞に 1 本ずつ観察された（図 17A-C)。そのほとんどの繊毛は、各々の細胞表面のほぼ中央に位置するようで、明らかに偏りのある傾向は認められなかった。繊毛は、閉じつつある neural fold と前方正中線の領域（図 17A、緑）を除く、胚の全ての表皮細胞に存在した。

また、これらの繊毛は、神経胚回転が始まる以前には観察されなかった（図 17D)。回転直後に、約 3 μm の短い繊毛が観察され（図 17E、黄 bar)、3 時間後さらに長くなった繊毛が観察され、最長 5μm の長さに達した（図 17F)。これらの観察から、繊毛の運動が神経胚回転を引き起こす driving force である可能性が示唆される。

ここで卵が受精して、幼生が孵化するまでの過程を図 18 にまとめた。マボヤは受精後 15 時間頃になると神経胚が回転し、胚の左側を下向きにしたところでその回転は停止する。また、この回転開始に一致して胚の表皮細胞に繊毛が観察された。その繊毛の存在は胚の回転可能な時期と一致する。受精後 17 時間ごろから胚の左側表皮に *nodal* が発現し始め、受精後 18 時間ごろをピークにしてその後発現は弱まる。*nodal* は受精後 22 時間ごろの尾芽胚まで発現していた。尾芽胚はその後卵膜内で尾を巻き始め、孵化直前の幼生は体側の左側を内側にして尾を巻き、脳胞は右側に位置する。

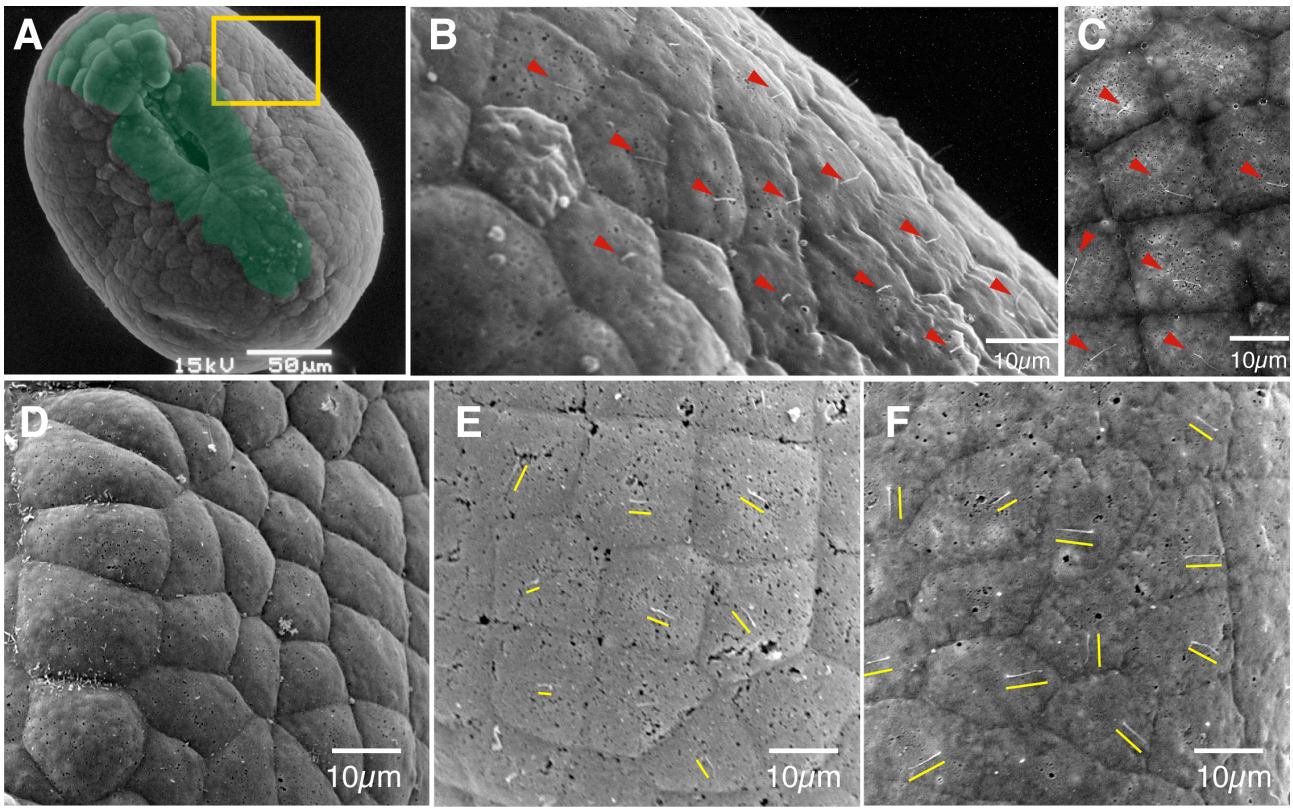

図 17　神経胚表面の表皮細胞を走査型電子顕微鏡で観察した繊毛

(A) 背側から見た胚全体。緑の領域は閉じつつある neural fold と前方正中線の表皮細胞の領域で、繊毛は観察されない。　(B) (A)の黄色の四角形に対応する拡大図。赤の矢頭は繊毛を示す。　(C)腹側表皮細胞の繊毛。　(D) 繊毛は神経胚回転の前には存在していない。(E)回転直後では、約 3 μm の長さの短い繊毛が観察された。黄色のバーは、繊毛の長さを示す。　(F)繊毛は 3 時間で、5μm の長さに達した。

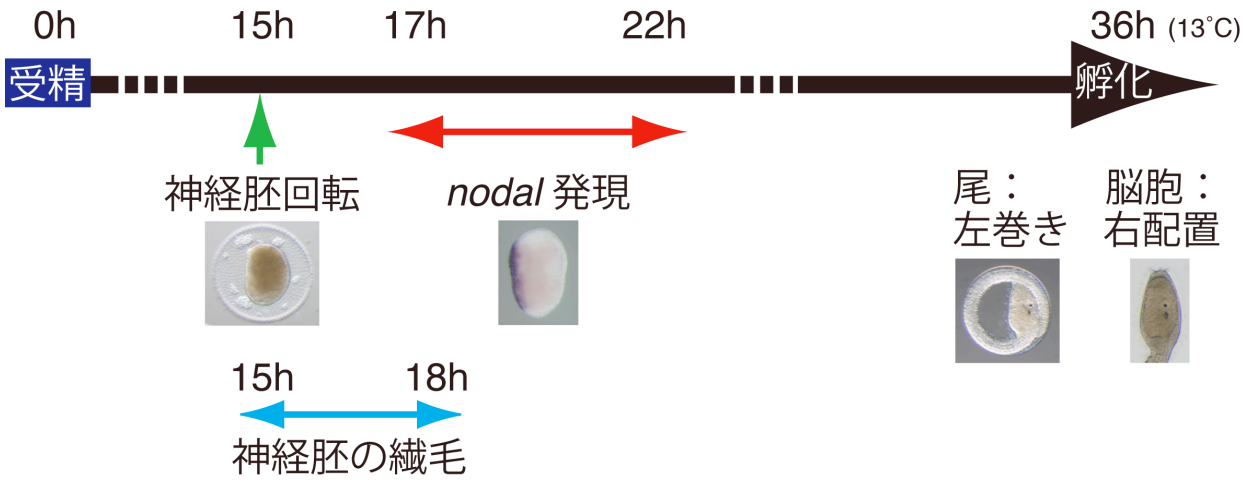

図 18　受精後、孵化までのタイムテーブル

3-5 左右非対称の極性は、胚の向きで決まる

左右非対称性の確立に神経胚回転が重要であることを確認するために、次のような実験を行った。胚を一定の向きに固定するために、穏やかな遠心力を利用した。神経胚回転の前に、胚の左側または右側が下向きになるようにタングステン針を用いて卵膜と胚を回転させ、それらの胚をすぐに遠心チューブに入れた。それらのチューブを直ちにアングルローターにセットし、2000 rpm で 1.5 時間穏やかに遠心した。遠心後、胚の左側を下向きにした胚（図 19A 左）、右側を下向きにした胚（図 19A 右）をそれぞれ選別し、観察に使用した。左側を下向きにした（正確には左側遠心端）胚では、89%の胚で通常通り、尾は左側の方向へ巻き、一方、右側を下向きにした胚では、84%の胚で尾は逆の方向（右側）へ巻いた（図 19A)。 同様に、脳胞は、右側を下向きにした胚では、65%の胚で、ふ化後、通常とは逆の左側に位置した（図 19B)。さらに *nodal* の発現を、初期尾芽胚期で観察した結果、左側を下向きにした胚では、胚の左側で発現し、逆に、右側を下向きにした胚では、ほとんどの場合、右側で *nodal* は発現した（図 19C,C')。

これらの結果は、左右非対称の極性が神経胚期における胚の向きで決定されることを示唆する。この極性がどのように決定されるかについては、次の 2 つの可能性がある。 1 つは、極性が、重力（または遠心力）の方向によって決定される場合。この場合、胚の下向きの側が、左側として決定される。 もう一つの可能性では、表皮と卵膜との接触が、重要である場合。 この場合、卵膜と接触した側が、左側として決定される。

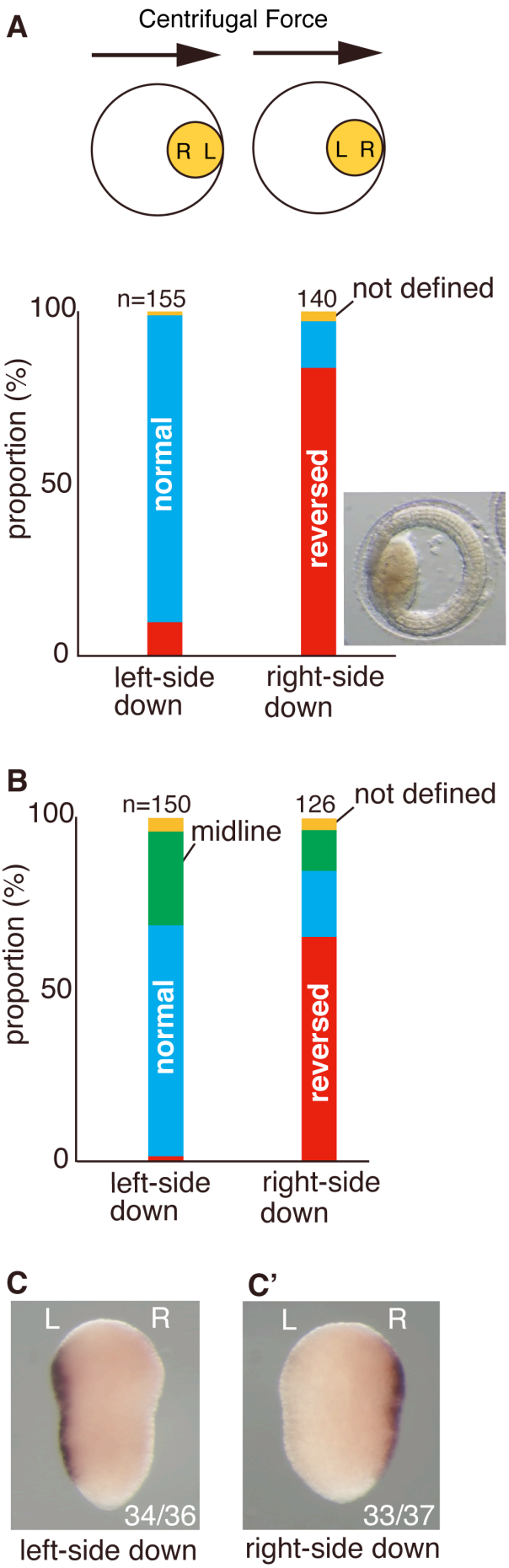

図 19 遠心実験

遠心力を用いて、神経胚回転期に胚の方向を固定し維持した。 (A)尾の巻き方の方向。胚は、左側または右側を下向き（より正確には、左/右サイドを遠心力方向）に固定された。写真は、正常とは逆の尾の巻き方を示す。(B)脳胞の位置。(C)左側を下向きにした胚の nodal 発現が、胚の左側に観察された。左下の角の数字は、観察した全体の数の内、写真に対応する個体の観察個体数の合計を示している。 (C') *nodal* は右側を下向きにした場合、胚の右側で発現した。

3-6 神経胚回転後の胚と卵膜との接触が *nodal* 発現に重要である

上記の 2 つの可能性を識別するために、神経胚の左右両側が卵膜と接触するように左右からスライドガラスとカバースガラスで胚をはさみ、その状態を 90 分間維持した。胚の左右どちら側を下向きにしてはさんだとしても、尾の巻き方は卵膜内で左右にランダム化された（図 20A）。さらに面白いことに、このとき *nodal* の発現は、全ての初期尾芽胚の左右両側で観察された（図 20B）。*nodal* が胚の左右両側で発現したことは、胚をはさんだ位置関係からすると、胚をはさんだ上下両側で発現したことになる。したがって、重力の方向は、左右の極性の確立にとって重要ではないことが分かった。卵膜と接触する表皮の側が、*nodal* が発現する側として決定されると考えられる。

次に胚を背腹方向からはさんでみた。この場合、胚は神経管を閉じることができず、幼生の尾と脳胞の発生が異常になった。このとき、*nodal* の発現を調べると、33 個体中 21 個の胚で *nodal* が発現しなかった（図 20C）。このことは、背側や腹側の正中線上の表皮細胞は、*nodal* 遺伝子を発現する能力をもっていないことを示唆している。これは、正常胚において、*nodal* は胚の左側面にのみ発現するが、正中線上の領域では発現しないことと一致する（たとえば、図 14H 参照）。33 個体中 5 個体の胚では、*nodal* が背側や腹側ではなく、左右両側で発現した（図 20C'）。これらの場合は、胚がより強く押しつぶされ、左右両側面の表皮細胞が卵膜と接触するようになったためと考えられる。

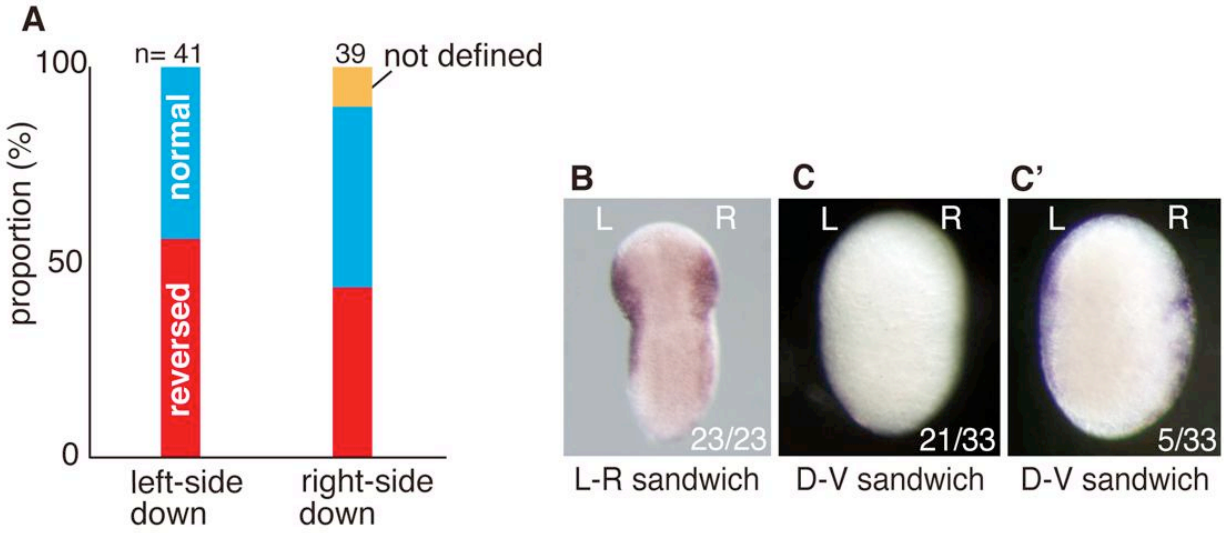

図 20 サンドイッチ実験

(A)卵膜内の胚をスライドガラスとカバースガラスで 90 分間はさんだ。左側を下向きにしても右側を下向きにしても、どちらの場合も、尾の巻き方は卵膜内で左右ランダム化した。(B)これらのケースでは、*nodal* の発現は胚の左右両側に観察された。　（C—C'）卵膜を持った胚を背腹軸ではさむと、nodal 発現はほとんど観察されなかった。いくつかの場合(C')、左右両側で発現したが、決して背側や腹側の正中線上では発現しなかった。

次に、胚と卵膜との接触が尾の巻き方に影響を及ぼす期間を調べた。神経胚回転開始前 30 分から・回転終了直後から・回転終了後 30 分から、それぞれの胚の左右両側を 30 分間はさみ、その後の尾の巻く方向を観察した（図 21)。神経胚回転直後の 10 分間で（0-10 分）胚をはさみ、30 分間その状態を維持することで、尾の巻き方が最も効率よくランダムになる傾向を示した（図 21 中、横軸の 0 と示した)。また、回転終了後 30 分を過ぎるとコントロールと差がほとんどない。これらの観察は、神経胚回転直後の 30 分間における、胚と卵膜との接触が尾の巻く方向の決定に重要であることを示唆している。ただし、30 分間という接触の長さは、尾の巻き方の非対称性を決定づけるには少し短すぎるかもしれない。なぜなら、接触時間が 90 分のときよりも 30 分のときの方が、尾の巻き方の逆転する割合が低いからである。

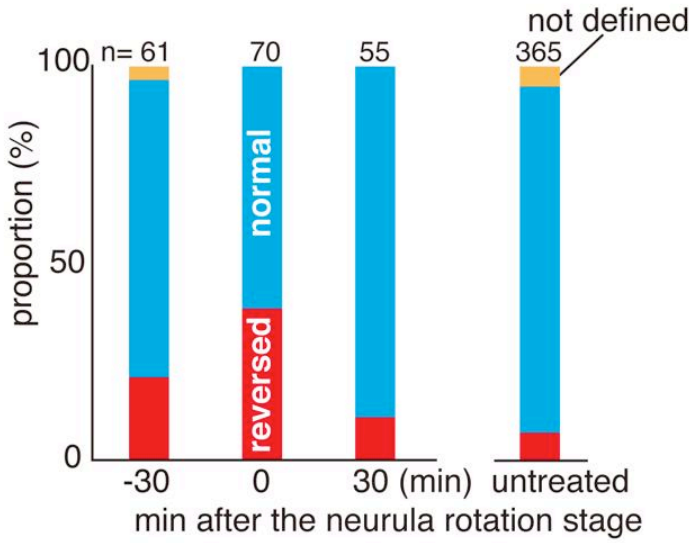

図 21 サンドイッチ実験での胚における卵膜との接触応答期間。神経胚回転の 30 分前(-30)、神経胚回転直後（0）、神経胚回転後、30 分後（30）にそれぞれ胚左右軸に沿ってはさみ始め、30 分間はさみ続けた。

3-7 卵膜が *nodal* 発現に不可欠である

胚の表皮細胞と卵膜との接触が *nodal* 遺伝子発現のために重要であるという可能性をさらに追求した。神経胚回転の前に、細いタングステン針を用いて卵膜を取り除き、寒天を敷いたシャーレで胚を発生させると、*nodal* の発現は 38 個体すべての胚で観察されなかった。回転直後に卵膜を除去しても、同様の結果となった（27 個体中すべての胚で *nodal* 発現は観察されなかった）。回転後 1 時間で卵膜を除去した場合は、27 個体中 23 個体（85%）で、胚の左側に *nodal* が発現した。同様に、回転後 2 時間で卵膜を除去した場合は、42 個体中 41 個体（98%）で胚の左側に *nodal* が発現した。回転直後に卵膜を取り除いたときの結果は、回転運動そのものが *nodal* 発現に重要ではなく、その後の胚と卵膜との一定期間の接触が欠かせないことを示している。

次の疑問は、何が *nodal* 発現を誘発するか（接触による機械的刺激が誘発するのか、それとも卵膜からの化学的刺激が誘発するのか）ということである。卵膜を取り除いた寒天上の裸の胚では、決して *nodal* は発現しない（図 22A）。物理的接触を模倣するために、胚がガラスに張り付くのを防ぐためにゼラチンで被覆されたガラスを用いて、裸の胚を左右軸で穏やかにはさんだ（図 22B）。しかし、*nodal* は発現しなかった。 また、卵膜の外には多数の濾胞（follicle）細胞が付着しているが、その卵膜の外側から胚を左右軸ではさむと、左右両側で nodal が発現した（図 22C）。化学的シグナルが濾胞細胞から分泌されているかどうか調べるために、プロテアーゼの短時間処理により、濾胞細胞を受精直後と神経胚回転の直前に除去した胚を左右両側からはさんだ。すると、すべての個体で、卵膜にはさまれた左右両側で *nodal* が発現した（図 22D）。これらの結果は、化学的シグナルが濾胞細胞ではなく、卵膜上に存在し、表皮細胞での *nodal* の発現を促した可能性を示唆しているが、卵膜との物理的接触が必要である可能性は排除できない。

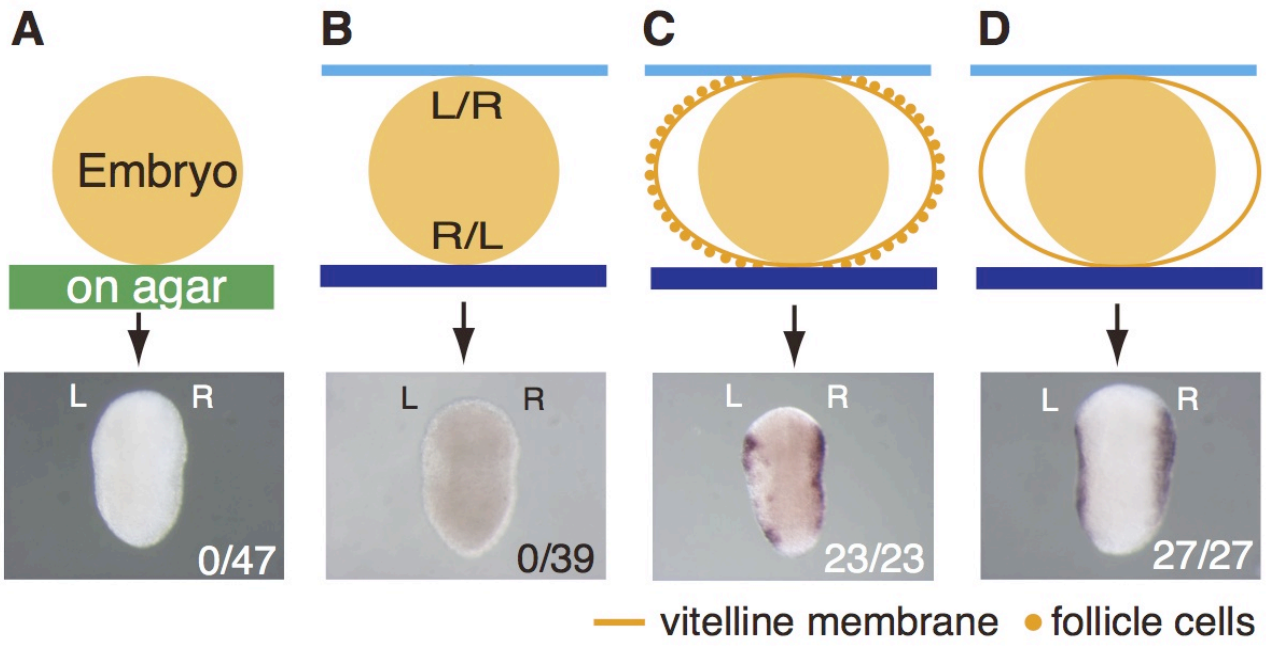

図 22　*nodal* 発現に卵膜は必要であるが、濾胞細胞は不必要である。

(A)卵膜のない裸の胚では *nodal* は発現しない。左下の角の数字は、観察した全体の数の内、写真に対応する個体の観察数を示している。(B)神経胚回転の直前に卵膜を除去し、ゼラチンで被覆されたスライドガラスとカバーガラスで胚をはさんだところ、胚は *nodal* を発現しなかった。(C) 濾胞細胞がついた卵膜で胚をサンドイッチにすると、左右両側で *nodal* が発現した。(D)前者と同様に、濾胞細胞を取り除いた卵膜も左右両側で *nodal* が発現した。

3-8 他のホヤにおける Neurula rotation

最後に、他のホヤでも神経胚回転を示すかどうかについて調べた。次に示すように、調べた限りの全ての 4 種のホヤすべてにおいて神経胚回転が認められた。*Ciona intestinalis* (Dr. R. Schnabel and Dr. A. Hejnol によって撮影されたタイムラプスムービーによって確認した。)、*Phallusia mammillata*（Dr. T. Negishi によって撮影されたタイムラプスムービーによって確認した。)、*Corella inflata*　(Drs. K. Sherrard and G. von Dassow によって撮影されたタイムラプスムービーによって確認した。)、*Styela clava* (Pozhanski, A. and Venuti, J. によって撮影されたタイムラプスムービーによって確認した。)。面白いことに

すべてが、マボヤ胚と同様に反時計回りの方向に回転する。このように、神経胚回転は、ホヤの種間で保存されている。しかし、マボヤ胚とは異なり、他のホヤ胚では、360°以上（およそ 1 回転と半分）回転する。

第四章　考察

この研究では、nodal シグナルがマボヤ幼生の形態的な左右非対称形成に不可欠であることを示した。また、*nodal* の左側表皮細胞での発現は、神経胚回転の結果、卵膜と左側表皮との接触によって促進されることも示した。神経胚回転のドライビングフォースを生み出す候補としては、表皮細胞に存在する繊毛が観察されている。神経胚回転は調べた 5 種のホヤの間で保存されていた。

4-1 nodal シグナルと幼生の非対称な形態

幼生の尾は、卵膜内の限られたスペースの中で左側へ巻く。尾の巻く方向は、nodal 受容体に対する阻害剤処理を *nodal* 発現の前に開始したときに左右にランダムになった。実際に起こっていることは、尾が伸び始めるときに尾の向きを左側へ少し偏らせることによって、nodal シグナルが左右軸に沿って決まった極性を決定している可能性がある。その後、尾は卵膜の内側表面に沿って伸張し、極端に曲がっていくのかもしれない。阻害剤処理胚において（*nodal* が働かない）、またサンドイッチにされた胚においても（*nodal* が左右両方で出る）、胚は非対称な構造を作ることはやめず左右軸の極性がランダムになるのか、それとも左右非対称性自体を失って尾がまっすぐに伸びようとした結果、結局、卵膜内で尾がランダムに巻くことになるのか、は上記の実験からは分からない。なぜなら、卵膜による空間的制約があるため、いずれにしても尾は左右いずれかに巻かなければならないからである。

脳胞と感覚色素細胞は、nodal シグナルがない（阻害剤処理）と正中線上に位置する。2 細胞期の一つの割球をラベルすることで、脳の形態的な非対称がいつ観察され始めるのかがわかっている（Taniguchi and Nishida、2004：序論の図 12 も参照）。それによると、後期尾芽胚期に脳を作る神経管が後ろから見て約 45°時計回りに同軸回転することによって、左右非対称な形態になることが示された。したがって、nodal シグナルが神経管の回転の方向をコントロールすることが示唆される。nodal シグナルがないと、この回転は起こらないのかもしれない。最近、カタユウレイボヤにおいて、脳胞の左側で nodal シグナ

ルが *Rx* 遺伝子発現を抑えることによって、ocellus 感覚色素細胞が右側に配置され、また光受容細胞群が左側で形成されるのを抑制していることが報告された（Yoshida and Saiga、2011）。今回のマボヤでの結果は、彼らの結果とかなり一致している。彼らは、*nodal* がカタユウレイボヤの後期尾芽胚において脳胞の左側にも発現することを示しているが、マボヤにおいても同様のことが観察されている（Morokuma and Nishida, unpublished）。Yoshida and Saiga (2011) は、後期尾芽胚の脳胞において発現した *nodal* が、脳の非対称形成に役割を果たすことを示唆している。しかし、今回のマボヤでの結果はこの仮説を支持しない。nodal 受容体の阻害剤に対する感受性期間は、初期尾芽胚期における左側表皮における *nodal* 発現直後に終わり、それ以降（すなわち後期尾芽胚）における nodal シグナリングは必要ではないことを示している。よって、少なくとも、マボヤ胚での結果は、後期尾芽胚期の脳胞での nodal シグナルは、感覚色素細胞の右側配置や脳胞の右側配置に重要ではないことを示唆する。しかし、本研究では光受容体細胞群の形成や位置を観察してはいないので、脳胞で発現する *nodal* が光受容体細胞群の形成や位置を制御している可能性は排除できない。

4-2 表皮細胞の繊毛と神経胚回転

神経胚回転の時期に表皮細胞の表面に細胞あたり 1 本の繊毛が生じることが走査型電子顕微鏡で観察された。しかし、ハイスピードカメラや画像処理を使っても、現在までのところ光学顕微鏡を用いて、これらの短くて細い繊毛の存在とその動きの観察に成功していない。卵膜を除去して寒天上で発生させると、胚は回転することができないが、いくつかの胚が神経胚回転の時期に、寒天上で突然動き出すことがある。その時期は表皮の繊毛が存在する時期とよく一致している。このことは、表皮細胞の繊毛に運動性があることを示唆する。表皮の繊毛が神経胚回転の推進力を発生させる可能性があり、卵膜の内側の湾曲は、胚が動き回ることなく定位置で回転するために必要であると考えられる。

マウスのノードに存在する monocilia は後方に傾いていて、繊毛は先端から見て時計回りに回転する（Shiratori et al., 2006）。ホヤの繊毛が後方に傾いていて同様の方向に回転するなら、神経胚回転の方向は反時計回りになるだろう（図 23）。しかし、それぞれの表

皮細胞の繊毛の位置は、ほ乳類で見られるように細胞の後ろ側には偏っていないようである。ホヤの表皮の繊毛が回転しているか、それともビートしているかどうかは、現在のところまだ分からない。ホヤにおける左右非対称に関する論文としては、神経胚期のイオン flux が左右非対称な *Pitx* 発現に必要であることが報告されている(Shimeld and Levine, 2006)。イオン flux が、繊毛のビートする方向をコントロールすることがあるかもしれない。

4-3 胚の左が下側にくると神経胚回転が止まるしくみ

胚の左が**下側にくると**、神経胚回転は常に止まる。 胚の左が下向きになると、neural fold の小さな突起が、それ以上の胚の回転を妨げると推測される（図 23)。 この仮説は、次の 3 つの証拠によって支持される。 第 1 に、neural fold の細胞には繊毛がなく、ドライビングフォースを生み出せず、更なる回転の物理的障害になっている (図 17A、緑)。 第 2 に、背側が下向きになる状態は不安定で、乗り越えられないようであり、胚が回転を開始するときに背側を下向きにしていると、回転の初めは左右どちらかに倒れるように見える（図 16C、ピンクと赤)。第 3 に、次の細胞分裂が近づき繊毛なくなるまでは、繊毛が神経胚回転のドライビングフォースを維持しているが、物理的な障害によって更なる回転が妨げられていると考えられる。この考えは、神経胚回転が完了した後、人為的に胚の向きを右下になるように胚を回転させると、胚は常に反時計回りの方向に 180°再回転して、再び左側を下向きにすることから支持される。これは、神経胚回転後、繊毛が長期間存在するという観察と一致する。

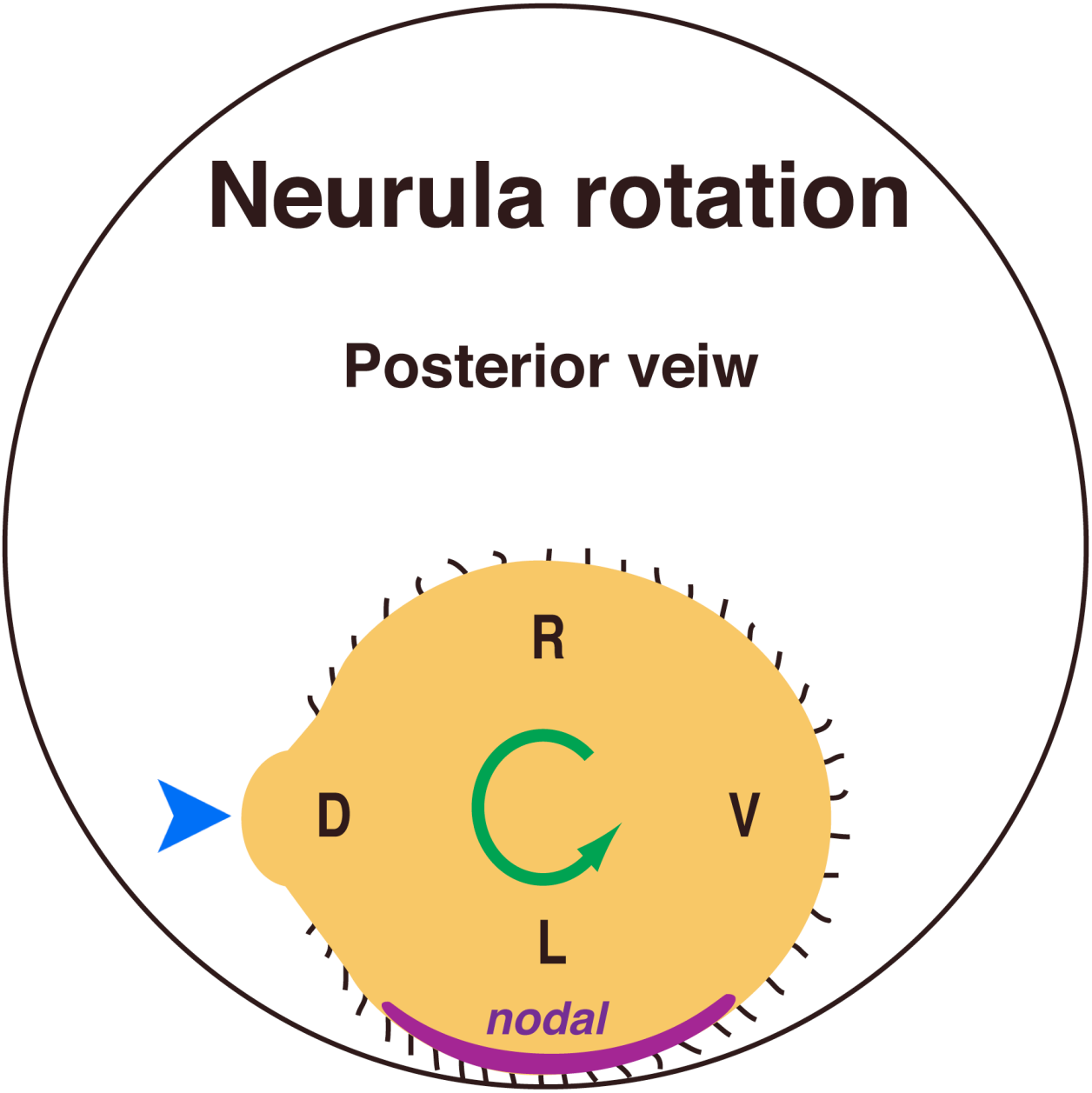

図 23　神経胚回転のモデル　繊毛は、神経胚回転の時期に neural fold を除く、胚の表面の表皮細胞全体に、細胞あたり 1 本ずつ存在する。これらの繊毛は、胚の後方から見て反時計回りに胚全体を回転させるドライビングフォースを生み出していると考えられる。胚の左側が下向きになると、繊毛のない neural fold の小さな突起が、胚の更なる回転の物理的障害となって胚の回転が止まると推測される。

4-4 左側の表皮と卵膜との接触が nodal 発現を促進する

神経胚回転後 2 時間で、*nodal* の遺伝子発現は左側表皮で始まる。卵膜除去、遠心実験、サンドイッチ実験のすべての結果は、左側の表皮と卵膜との接触が左側の *nodal* 発現を促進することを示している。次のような証拠がこの結論をさらに支持している。脊椎動物では *nodal* や *Pitx* の発現は左側中胚葉で観察されるが、ホヤでは左側表皮の細胞で起こる。卵膜と直接接触している、ホヤの表皮細胞における *nodal* や *Pitx* の発現は、表皮と卵膜との接触が左側の表皮における *nodal* 発現を促進することを支持する。同様に、神経胚回転が完了した後でも卵膜をすぐに除去すると、*nodal* 発現が妨げられるので、回転運動そのものは重要ではない。サンドイッチ実験で nodal は胚の上側でも発現するため、重力の方向も重要ではない。サンドイッチ実験の結果やいろいろな時期での卵膜の除去実験の結果は、表皮細胞と卵膜との接触が *nodal* 発現を促進するために、ある一定期間維持されなければならないことを示している。

次の疑問は、*nodal* 発現のきっかけが、機械的シグナルであるのか、それとも化学的シグナルであるのかである。ゼラチンで被覆したガラスで、卵膜を除去した胚を押しつぶしただけでは、*nodal* は発現しなかった。濾胞細胞（卵膜の外側に存在）は、*nodal* の発現誘導には関わっていなかった。したがって、卵膜によって提示される化学的シグナルが、*nodal* の発現を誘発するかもしれないという仮説を提案する。

4-5 ホヤの神経胚回転

調べた 5 種のホヤ全てで、神経胚回転が示された。しかし、マボヤ以外のホヤ胚は、360°以上、回転し続ける。 *Ciona intestinalis* では、尾が腹側の方へ巻き始めると、胚の回転が止まる傾向があるが、これは更なる確認を必要とする。したがって、カタユウレイボヤでは、左側の *nodal* 遺伝子発現を促進するために、マボヤとは異なったメカニズムを利用している可能性が高い。確かに、卵膜が除去されたカタユウレイボヤ胚で、*nodal* や *Pitx* が（卵膜からのシグナルなしに）左右両側で発現することが報告されている（Schimeld and Levin, 2006; Yoshida and Saiga, 2008）。カタユウレイボヤでは、右側表皮と卵膜との接

触が、右側での *nodal* 発現を抑制している可能性がある。この推測は、マボヤとカタユウレイボヤでは卵膜からのシグナルが、*nodal* 発現にとって逆の効果を及ぼすことを示しており今後の検討をまつ必要がある。

少なくとも、神経胚期特異的に起こる回転運動はホヤの種間で保存されており、その回転は、おそらく表皮の monocilia によって引き起こされると考えられる。脊索動物以外の大部分の新口動物では、胚が発生し繊毛で泳ぐ幼生となる（例えばウニの胞胚やプルテウス幼生、半索動物のトルナリア幼生、ナメクジウオ胚（Satoh,2009）。一方、ホヤ幼生は、尾で泳ぐ。ホヤは、先祖の表皮繊毛を泳ぐためではなく、神経胚回転のために再利用することにしたのかもしれない。脊椎動物とホヤで、左右非対称の決定メカニズムを比較すると、脊椎動物では、胚内部で繊毛が液体の流れを起こすのにたいし、ホヤ胚では繊毛が胚全体の回転の推進力を生じさせているかもしれないことは、大変興味深い。

4-6 総括および今後の課題

本研究の結果から、マボヤにおいても *nodal* 遺伝子が幼生の左右非対称な形態形成に関与していることが示され、神経胚と卵膜が接触することによって *nodal* の発現が促されることが示唆された。さらに、神経胚が回転し、胚の左側面が下向きになって卵膜と接触する位置に来るとその回転が止まる現象が観察され、胚の左側面が卵膜と接触することによって、*nodal* の発現が胚の左側に限定されることも示唆された。すなわち、マボヤにおける *nodal* の左右非対称な発現は、神経胚の回転と停止に起因し、その後の左右非対称な形態形成を引き起こすと考えられる。その神経胚の回転のドライビングフォースについては、神経胚回転の時期に胚の表皮細胞に生じる繊毛がその候補と考えられるが、未だ、繊毛の運動を直接観察するには至っていない。よって、今後、この繊毛の運動の有無を明らかにし、また、この繊毛の断面を透過型電子顕微鏡で観察することによって、その構造も明らかにしたい。さらに、繊毛形成に対する阻害実験を行うことによって、神経胚回転のドライビングフォースとしての繊毛の機能を明らかにしたい。一方、表皮細胞における *nodal* 発現は、卵膜からの何らかの化学的なシグナルによって促されるという結果を得たが、この化学的なシグナルとは何かについても大変興味がある。

以上のような左右非対称性が確立するメカニズムの解明と同時に、*nodal* の左右非対称な発現が、その後の左右非対称な形態形成にどのように関与しているのかという問題についても取り組んでいきたい。神経胚から尾芽胚にかけて、表皮細胞において *nodal* が左右非対称に発現することが、その後の尾芽胚において、尾の左右の伸長成長にどのように関与するか、あるいは、尾が非対称に巻くという現象にどのように関与しているのか、という問題は、脊椎動物における *nodal* の非対称な発現がその後の左右非対称な器官形成にどのように関与しているのか、という問題よりもかなり単純であると思われる。なぜならば、*nodal* の非対称発現と尾の巻く現象が時間的に近いことや、ホヤの尾芽胚の尾の構造が単純であることなどから、これら 2 つの関係を解明することに適していると考えられる。左右の表皮細胞に *nodal*・*Pitx2*・*lefty* 遺伝子の非対称な発現が見られることから、それぞれの細胞の伸長成長に違いが観察されるかもしれない。

様々な動物における左右非対称性の形成機構が明らかになることによって、なぜ左右非対称なのか、という問いに少しずつ答えられるようになることを期待している。

引用文献

Boorman, C. J. and Shimeld, S. M. (2002). The evolution of left-right asymmetry in chordates. *Bioessays* 24, 1004-1011.

Borovina, A., Superina, S., Voskas, D. and Ciruna, B. (2010). Vangl2 directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia. *Nat. Cell Biol.* 12, 407-412.

Burdine, R. D. and Schier, A. F. (2000). Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation. *Genes Dev.* 14, 763-776.

Collignon, J., Varlet, I. and Robertson, E. J. (1996). Relationship between asymmetric *nodal* expression and the direction of embryonic turning. *Nature* 381, 155-158.

Grande, C. and Patel, N. H. (2009). Nodal signalling is involved in left-right asymmetry in snails. *Nature* 457, 1007-1011.

Guirao, B., Meunier, A., Mortaud, S., Aguilar, A., Corsi, J. M., Strehl, L., Hirota, Y., Desoeuvre, A., Boutin, C., Han, Y. G., Mirzadeh, Z., Cremer, H., Montcouquiol, M., Sawamoto, K. and Spassky, N. (2010). Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nat. Cell Biol.* 12, 341-350.

Hashimoto, M., Shinohara, K., Wang, J., Ikeuchi, S., Yoshiba, S., Meno, C., Nonaka, S., Takada S., Hatta, K., Wynshaw-Boris, A. and Hamada, H. (2010). Planar polarization of node cells determines the rotational axis of node cilia. *Nat Cell Biol* 12, 170-176.

Hirano, T. and Nishida, H. (2000). Developmental fates of larval tissues after metamorphosis in the ascidian, *Halocynthia roretzi*. II. Origin of endodermal tissues of the juvenile. *Dev. Genes Evol.* 210, 55-63.

Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y. and Takeda, S. (2006). Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* 125, 33-45.

Hozumi, S., Maeda, R., Taniguchi, K., Kanai, M., Shirakabe, S., Sasamura, T., Spéder,

P., Noselli, S., Aigaki, T., Murakami, R. and Matsuno, K. (2006). An unconventional myosin in Drosophila reverses the default handedness in visceral organs. *Nature* 440, 798-802.

Hudson, C. and Yasuo, H. (2005). Patterning across the ascidian neural plate by lateral Nodal signalling sources. *Development* 132, 1199-1210.

Hudson, C. and Yasuo, H. (2006). A signalling relay involving Nodal and Delta ligands acts during secondary notochord induction in Ciona embryos. *Development* 133, 2855-2864.

Hudson, C., Lotito, S., Yasuo, H. (2007). Sequential and combinatorial inputs from Nodal, Delta2/Notch and FGF/MEK/ERK signalling pathways establish a grid-like organisation of distinct cell identities in the ascidian neural plate. *Development* 134, 3527-3537.

Inman, G. J., Nicolas, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping, N. J. and Hill, C. S. (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.* 62, 65-74.

Kawakami, Y., Raya, A., Raya, R. M., Rodriguez-Esteban, C. and Belmonte, J. C. (2005). Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo. *Nature* 435, 165-171.

Kuroda, R., Endo, B., Abe, M. and Shimizu, M. (2009). Chiral blastomere arrangement dictates zygotic left-right asymmetry pathway in snails. *Nature* 462, 790-794.

Levin, M., Johnson, R. L., Stern, C. D., Kuehn, M. and Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* 82, 803-814.

Levin, M., Thorlin, T., Robinson, K. R., Nogi, T. and Mercola, M. (2002). Asymmetries in H+/K+-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. *Cell* 111, 77-89.

Lowe, L. A., Supp, D. M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C. V., Potter, S. S., Overbeek, P. and Kuehn, M. R. (1996). Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine *situs inversus*. *Nature* 381, 158-161.

Meno, C., Gritsman k., Ohishi, S., Ohfuji, Y., Heckscher, E., Mochida, K., Shimono, A., Kondoh, H., Talbot, W. S., Robertson, E. J., Schier, A. F., Hamada, H. (1999). Mouse Lefty2 and zebrafish antivin are feedback inhibitors of nodal signaling during vertebrate gastrulation. *Mol Cell* 4, 287-298.

Morokuma, J., Ueno, M., Kawanishi, H., Saiga, H. and Nishida, H. (2002). *HrNodal*, the ascidian *nodal*-related gene, is expressed in the left side of the epidermis, and lies upstream of *HrPitx*. *Dev. Genes Evol.* 212, 439-446.

Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M. and Hirokawa, N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95, 829-837.

Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y. and Hamada, H. (2002). Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* 418, 96-99.

Nonaka, S., Yoshiba, S., Watanabe, D., Ikeuchi, S,. Goto T,. Mrshall, W.F. and Hamada, H. (2005). De novo formation of left-right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia. *PLoS Biol* 3, 1467-1472.

Okada, Y., Takeda, S., Tanaka, Y., Belmonte, J. C. and Hirokawa, N. (2005). Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* 121, 633-644.

Pohl, C. and Bao, Z. (2010). Chiral forces organize left-right patterning in C. elegans by uncoupling midline and anteroposterior axis. *Dev Cell* 19, 402-412.

Pozhanski, A. and Venuti, J. (1991). Ascidian Embryogenesis. in “A Dozen Eggs: Time-lapse Microscopy of Normal Development” edited by Fink, R., Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.

Qiu, D., Cheng, S. M., Wozniak, L., McSweeney, M., Perrone, E. and Levin, M. (2005). Localization and loss-of-function implicates ciliary proteins in early, cytoplasmic roles in left-right asymmetry. *Dev. Dyn.* 234, 176-189.

Raya, A. and Belmonte, J. C. I. (2006). Left-right asymmetry in the vertebrate embryo: From early information to higher-level integration. *Nature Reviews Genetics* 7, 283-293.

Satoh, N. (2009). An advanced filter-feeder hypothesis for urohordate evolution. *Zool. Sci.* 26, 97-111.

Schier, A. F. and Shen, M. M. (2000). Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* 403, 385-389.

Shimeld S. M. and Levine, M. (2006). Evidence for the regulation of left-right asymmetry in *Ciona intestinalis* by ion flux. *Dev. Dyn.* 135, 1534-1553.

Shiratori, H. and Hamada, H. (2006). The left-right axis in the mouse: from origin to morphology. *Development* 133, 2095-2104.

Tanaka, Y., Okada, Y. and Hirokawa, N. (2005). FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* 435, 172-177.

Taniguchi, K. and Nishida, H. (2004). Tracing cell fate in brain formation during embryogenesis of the ascidian *Halocynthia roretzi. Dev. Growth Differ.* 46, 163-180.

Wada, S., Katsuyama, Y., Yasugi, S., Saiga, H. (1995). Spatially and temporally regulated expression of the LIM class homeobox gene Hrlim suggests multiple distinct functions in development of the ascidian, Halocynthia roretzi. *Mech Dev.* 51, 115-126.

Whitman, M. and Mercola,M. (2001). TGF-beta superfamily signaling and left-right asymmetry. *Sci. STKE,* DOI: 10.1126/stke.2001.64.re1.

Wood, W. B. (1991). Evidence from reversal of handedness in C. elegans embryos for early cell interactions determining cell fates. *Nature* 349, 536-538.

Yagi, K. and Makabe, K. W. (2001). Isolation of an early neural maker gene abundantly expressed in the nervous system of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Dev. Genes Evol.* 211, 49-53.

Yoshida, K. and Saiga, H. (2008). Left-right asymmetric expression of *Pitx* is regulated by the asymmetric Nodal signaling through an intronic enhancer in *Ciona intestinalis*. *Dev. Genes Evol.* 218, 353-360.

Yoshida, K. and Saiga, H. (2011). Repression of *Rx* gene on the left side of the sensory vesicle by Nodal signaling is crucial for right-sided formation of the ocellus photoreceptor in the development of *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 354, 144-50.

Zalokar, M. and Sardet, C. (1984). Tracing of cell lineage in embryonic development of *Phallusia mammillata* (Ascidia) by vital staining of mitochondria. *Dev. Biol.* 102, 195-205.

発表リスト

報文目録

Kazuhiko Nishide, Michio Mugitani, Gaku Kumano, Hiroki Nishida. (2012) Neurula rotation determines left-right asymmetry in ascidian tadpole larvae. *Development* in press.

講演目録

招待講演

○西出　和彦, 麥谷　道生, 熊野　岳, 西田　宏記. “マボヤ胚発生における左右非対称性”　第 80 回日本動物学会. 第 29 回ホヤの生物学談話会. 静岡. 9 月. 2009 年.

口頭発表

○Kazuhiko Nishide, Michio Mugitani, Gaku Kumano, Hiroki Nishida. “Neurula rotation determines left-right asymmetry in ascidian tadpole larvae ” National TSING HUA UNIVERSITY-OSAKA UNIVERSITY Life Science Student Activity Fair 2010. Taiwan. May. 2010.

○西出　和彦, 麥谷　道生, 熊野　岳, 西田　宏記. “マボヤにおける神経胚の回転と左右非対称性の形成” 第 43 回日本発生生物学会. 京都. 6 月. 2010 年.

○西出　和彦, 麥谷　道生, 熊野　岳, 西田　宏記. “マボヤにおける神経胚の回転と左右非対称性の形成” 日本発生生物学会　夏期シンポジウム. 八王子. 8 月. 2010 年.

○西出　和彦, 麥谷　道生, 熊野　岳, 西田　宏記. “マボヤにおける神経胚の回転と左右非対称性の形成” 第 17 回　臨海若手の会　神奈川県三崎. 9 月. 2010 年.

ポスター発表

○Kazuhiko Nishide, Michio Mugitani, Gaku Kumano, Hiroki Nishida. “Neurula rotation determines left-right asymmetry in ascidian tadpole larvae ” National TSING HUA UNIVERSITY-OSAKA UNIVERSITY Life Science Student Activity Fair 2010. Taiwan. May. 2010.

○西出　和彦, 麥谷　道生, 熊野　岳, 西田　宏記. “マボヤにおける神経胚の回転と左右非対称性の形成” 第 43 回日本発生生物学会. 京都. 6 月. 2010 年.

○Kazuhiko Nishide, Michio Mugitani, Gaku Kumano, Hiroki Nishida. “Neurula rotation determines left-right asymmetry in ascidian tadpole larvae ” Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting. A Joint Meeting with the Japanese Society of Developmental Biologists. L8-B108. Albuquerque, USA. August. 2010.

謝辞

本論文は筆者が大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻発生生物学研究室に在籍中の研究成果をまとめたものである。同研究室の教授西田宏記先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって始終、ご指導いただいた。ここに深謝の意を表する。同研究室の助教熊野岳先生、並びに、助教西野敦雄先生（現・弘前大学准教授）には、本研究に対するご指導、ご助言だけでなく研究に対する基本的な姿勢についてもご指導いただいた。ここに深謝する。大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻生命誌学研究室の教授橋本主税先生、並びに、同准教授小田広樹先生には、副査としてご助言をいただくとともに本論文の細部にわたりご指導をいただいた。ここに深謝の意を表する。

マボヤの採集・飼育および研究にあたり東北大学大学院生命科学研究科附属浅虫海洋生物学教育研究センター・東京大学大気海洋研究所国際沿岸海洋研究センター・京都大学フィールド科学教育研究センター瀬戸臨海実験所・神戸市立須磨海浜水族園の諸氏に多くのご支援をいただいた。ここに深謝の意を表する。

発生生物学研究室の諸氏には研究のみならず、あらゆる場面でご支援いただいた。特に、博士研究員の高鳥直人博士・博士研究員の根岸剛文博士（現・Villefranche CNRS/UPMC, Station Zoologique, Observatoire, Yasuo 研究室）・先輩の橋本秀彦博士（現・The University of Chicago, Department of Molecular Genetics and Cell Biology, Munro 研究室）には実験方法や研究に関する多くのご助言をいただいた。ここに深謝の意を表する。

大阪大学大学院生命機能研究科の篠原恭介博士には、ハイスピードカメラを用いた繊毛の観察に関してご協力をいただいた。ここに深謝の意を表する。

大阪大学超高圧電子顕微鏡センターの長谷川紀昭氏、並びに、特任研究員の西田倫希博士には、電子顕微鏡観察に関してご協力をいただいた。ここに深謝の意を表する。

最後に、終始温かく見守っていてくれた家族に深謝の意を表する。

2012 年 2 月