平成 22 年度水産学進歩賞

内臓の左右非対称性を制御するノダル経路による
ヒラメ・カレイ類の眼位制御機構^a

鈴木 徹

東北大学大学院農学研究科

Control system of eye-sidedness by the Nodal pathway
that functions in the lateralization of internal organs

TOHRU SUZUKI

*Laboratory of Marine Life Science and Genetics, Graduate School of Agricultural Science,
Tohoku University, Sendai, Miyagi 981-8555, Japan*

1. はじめに

ヒラメ・カレイ類を含む異体類は胚発生では他の魚同様外見的に左右対称に発生するが、変態期に片方の眼が体の反対側に移動し、有眼側（両眼が配置する体側）に色素形成が起こることで体全体が左右非対称に変形する。異体類の種苗生産では、眼位異常や体色異常など左右性に関係する形態異常が発生するが、その防除には左右非対称性の制御機構の解明が必要である。また発生学的には異体類の左右非対称性形成は、特に脳の非対称性および体色のパターン形成と言う観点から興味深い。日本ではヒラメやホシガレイなどのさまざまな異体類が種苗生産され、それらの胚や仔魚を研究に利用できる環境にある。私達は、世界に先駆けて異体類の左右非対称性形成の全貌を解明したいと考えている。ここではヒラメ・カレイ類の眼位制御機構について、私達のこれまでの研究成果を中心に紹介する。

2. 異体類の左右非対称性の進化と発生

左ヒラメに右カレイと言われるように、ヒラメでは両眼が体の左側に配置し、カレイ類では一般に両眼が右側に配置する。まず進化的側面から異体類の非対称性についてながめてみよう。最初に眼の配置が非対称になった異体類の祖先種は約 1 億 8 千万年前に誕生し、その化石は、右眼位と左眼位が半々で見つかる。¹⁾ 現存の異体類のなかで最も原始的なボウズガレイでも右眼位と左眼位の個体が半々で漁獲される（図 1）。ボウズガレイ以外では、眼位は左か右に固定されている。従って、異体

類の非対称性の進化過程について考えると、異体類が左右対称な祖先から最初に進化した時点では、同種内でも右眼位と左眼位が混在し、その後に眼位の方向を固定するシステムが発達した可能性が高い。眼位が左右ランダムな種はボウズガレイだけであることを考えると、眼位の固定システムは異体類進化の早い段階で発達したものであると思われる。

個体発生から異体類の非対称性形成を振り返ってみる（図 1）。ヒラメの仔魚は、孵化して 2 週間あまりの間は、眼の配置も色素の分布も左右対称である。なお心臓と消化器官は孵化まもなく非対称性形成を終了する。孵化 2 週間頃から、右眼が徐々に上に向かって移動を始め、約 10 日間で鼻の上を通り越して左顔面にまで移動する。²⁾ この時期に仔魚は無眼側を底に向けて着底し、間もなく有眼側に黒色素胞が現れて体色も左右差を形成

図 1 原始的異体類ボウズガレイの左右性の特徴とヒラメの非対称性形成

図2 眼の移動をもたらす間脳の非対称形成（ヒラメ）

する。³⁾ 眼の移動から有眼側の着色までの変化は劇的で、変態現象の一つと考えられている。種苗生産では、両体側が白くなる白化あるいは両体側が黒くなる黒化は起こることがあるが、有眼側が白で無眼側が黒と言うように眼位と体色の関係が通常と完全に逆になることはない。従って、どちらの眼が移動するかが、異体類の体の向きを決定するうえで最も重要なイベントだと考え、私達はこの点について研究を進めている。では、どうして片方の眼だけが反対顔面に向かって移動するのであろうか？実は、脳が前脳部分で捻れるように傾きを発生し（図2）、脳の非対称性形成に伴って頭部がダイナミックに変形することにより、片方の眼が移動するのである。²⁾ 前脳の捻れと眼位との間には、前脳が左に傾くと右眼が移動し、右に傾くと左眼が移動する関係がある。

以上から、異体類の非対称性形成を理解するうえで、重要なポイントが3つあると考えている。第1は、何故、異体類がこれほど極端な脳の非対称性を形成するようになったかである。第2は、眼位の固定システムの解明である。第3は、ヒラメとカレイが左眼位と右眼位に分かれるシステムである。第1と第3については、現在解析途中であるので、第2のポイントについて、内臓の非対称性を制御するノダル経路と眼位との関係を中心に紹介する。

3. ノダル経路による内臓の非対称性の制御

まず、内臓と脳の非対称性の制御システムについて触れたい。このシステムは、魚類に共通で、異体類とゼブラフィッシュで違いはないが、変態期に異体類はこのシステムを眼位制御に用いることになる。⁴⁾ 魚類でも哺乳類でも、内臓と脳には左右非対称性が見られる。心臓や肝臓の形や配置は左右非対称で、腸はループを形成する。脳の左右非対称性は、間脳上部が特に顕著で、松果体と副松果体が左右対で発生するが、必ず松果体が右に発生する。その下の手綱核（図2）は、左右の核が機能的・形態的に非対称である。⁵⁾ 内臓と脳の左右差は種内で一定で、ゼブラフィッシュやメダカを使った発生研究により、ノダル経路とクッパー胞が左右制御で中心的な役割を果たすことが示されている。ノダル経路は分泌型

図3 クッパー胞（左）による *nodal* の左側板中胚葉への入力（中央）とノダル経路 *lefty* の発現（右）

シグナル因子 *nodal* と *lefty*、転写調節因子 *pitx2* で構成される。⁶⁾ 胚発生において、3つのメンバーは相互作用することにより、脊索を挟んで左右に形成された側板中胚葉のうち左側だけに発現する（図3）。間脳上部では左半分にノダル経路が発現する。左右の側板中胚葉は、心臓原基と腸管周囲の間質組織を形成するが、この時点では心臓、腸管原基および間脳上部とも形態的には左右対称である。ところが遺伝子レベルでは、ノダル経路が左側に発現することにより、左右差が発生している。*pitx2* が最終的な左右決定遺伝子で、器官原基の左側に発現した *pitx2* の影響で、左右で細胞増殖等の差が発生し、器官は一定方向に非対称性を形成する。

クッパー胞は、体節形成初期に尾端に一過的に形成される直径 100 μm ほどの空胞状の器官で、ヒラメ胚だと受精後約 20 時間で出現し 6 時間ほどで消失する（図3）。⁴⁾ ノダル経路を胚左側に入力するのが、クッパー胞で、その仕組みは次のようである。⁷⁾ 初期のデフォルト状態では左右両方にノダル経路が発現できる状態になっている（左右側板中胚葉とも *nodal* 受容体を発現する）。クッパー胞の上皮細胞には繊毛が分布し、繊毛は、運動タンパク質のキラリティーにより、必ず反時計回りに旋回する。そのため、クッパー胞内に左向きに強い水流が発生する（図3）。これが体の中で発生する最初の左右非対称で、水流の刺激により左側板中胚葉の後端に *nodal* が入力される。その後、ノダル経路の発現は、尾端から間脳上部左までリレーされる。私達は、ゼブラフィッシュを使ってクッパー胞の機能についても解析し、クッパー胞だけに発現する新規遺伝子 *charon* を発見した（図4）。⁸⁾ *Charon* は、*Nodal* に結合し、ノダル経路が右側板中胚葉へ伝わらないように働いている。遺伝子ノックダウンにより、*charon* の機能を抑制すると、ノダル経路が右側板中胚葉にも伝わり、発現は大部分の胚で左右両側化し、一部で右あるいは左に起こる。発現が左に起こった胚は正常に内臓の非対称性を作り、右に起こった胚は向きが反転する。両側化した場合、方向制御がなくなるため、内臓は個体間でランダムに逆位、正

図4 ゼブラフィッシュ胚における *charon* の発現と遺伝子ノックダウンによるノダル経路と心臓の左右性異常

常、イソメリズム（左右性がない状態）の3通りに分離する。ノダル経路が発現しない場合にも、内臓の左右差はランダム化されている。一方、間脳上部に発現するノダル経路は、松果体と副松果体の配置と手綱核の機能的な左右差を制御し、発現の両側化と欠損はやはり左右差をランダム化する。⁵⁾ つまり内臓と間脳原基とも左右どちらにも非対称を作るポテンシャルを持ち、ノダル経路が向きを固定するのである。

4. ノダル経路による眼位の制御

私達が最初にノダル経路とヒラメの眼位との関連に気づいたのは、2002年に発表した逆位変異体（雌性発生によって作成されたホモクローン家系）の解析に遡る（図5）。⁹⁾ 眼位逆位の発生率は、通常、ヒラメ種苗では1%未満であるが、この変異体では約2割の高率で発生した。種苗生産で起こる眼位逆位は、内臓逆位を伴わないが、この変異体では、内臓逆位も眼位逆位とはほぼ同じ比率で発生した。ただし図5で分かるように、内臓と眼位逆位は必ずしも同時に発生しない。当時非常に驚いたのだが、変異体胚のノダル経路の発現は左右ランダム化している。この発現異常は、*charon* のノックダウン実験と酷似することから、逆位変異体ではクッパー胞の機能に障害が起こっているものと考えられる。内臓逆位はノダル経路の異常によることが明らかである。一方、カレイ類の種苗生産では（親魚は当然正常）、多くの場合、ヒラメ逆位変異体と同程度の比率で眼位異常が発生する。あるホシガレイ種苗生産ロットでは、100%の胚でノダル経路が正常に発現し、内臓の非対称性も正常に発生したのにも関わらず、眼位異常が34%の高率で発生した。²⁾ 従って、胚のノダル経路が正常でも眼位逆位は発生し、胚のノダル経路では眼位はまだ決められていないことになる。逆位変異体の話にもどると、胚のノダル経路のランダム化自体は、眼位異常の直接的な原因ではない可能性が高い。では、どのようにノダル経路が異体類の眼位と関わっているのだろうか。

		眼位	
		正常	逆位
腸の捻転	正常	76%	9%
	逆位	4%	11%

図5 ヒラメ逆位変異体における左右性異常と胚ノダル経路の発現

図6 ヒラメ発生における *pitx2* 発現と相対的強度の推移

ヒラメ・カレイ類の不可思議な左右逆転現象の謎は、ここ5年の研究によって解明できた。面白いことに、間脳上部左側の *pitx2* 発現は、胚発生後にはほぼオフ状態になるが、変態期に左手綱核で再活性化する（図6）。²⁾ ヒラメとホシガレイを比べると、眼位が強く固定されたヒラメ種苗では、*pitx2* 再発現が100%の仔魚で起こる。一方、先ほどのホシガレイロットでは、再発現率が約40%であった。また実験的にヒラメ胚をノダル経路発現の阻害薬品で処理すると、胚ノダル経路が欠損し、変態期再発現も欠損して眼位逆位が発生する。²⁾ これらの結果から、変態期に起こる *pitx2* 再発現が、脳の非対称性を一方向に調節することにより、眼位を固定すると結論した。逆位発生のメカニズムについては、次のよう

に考えている。眼位が固定された種でも左右どちらにも非対称を作るポテンシャルを維持しており、*pitx2* 再発現に異常が発生すると、ボウズガレイの状態に先祖帰りして、眼位がランダムとなって逆位が発生する。進化的に考えると、異体類の非対称性は左右ランダムな状態で誕生した後、*pitx2* の変態期再発現を利用することにより、眼位制御システムを形成したのであろう。*pitx2* と内臓、眼位との関係は次のように考える。(1)胚発生で *pitx2* が左側に発現し、変態期に正常に再発現した場合、内臓と眼の左右性は両方正常となる。これが正常発生である。(2)胚発生で *pitx2* が左側に発現したが、変態期に再発現しない場合、内臓の非対称性は正常だが、眼位がランダム化して眼位逆位が発生する。ホシガレイ種苗の異常は、これに当てはまる。(3)胚で *pitx2* が発現しない場合、変態期の発現も欠損するため、やはり眼位逆位が発生する。ノダル抑制試薬の実験例である。(4)クッパー胞の異常により、胚で *pitx2* 発現がランダム化し、左右両側に発現した場合、変態期の発現も両側化する。そのため胚期に半数で内臓逆位が発生し、変態期に半数が眼位逆位が発生する。2つの逆位が時期的に独立して発生するため、左右性異常の組合せは4通りになる。もちろん *pitx2* が右側に発現した場合には、内臓と眼位とも逆転する。ヒラメ逆位変異体がこれに当てはまると考えており、逆位変異体がホモクロン家系であるのにも関わらず、左右性異常の表現型が多様な理由を説明できる。

5. 今後の展望

異体類の変態は甲状腺ホルモンにより制御されることが日本の研究グループによって発見されている。私達は、*pitx2* の転写調節領域には、甲状腺ホルモン受容体とコルチゾル受容体に対するコンセンサス配列が存在することを発見し、コルチゾルがヒラメ仔魚の *pitx2* 発現を活性化することを観察しており、変態関連ホルモンが *pitx2* 再発現に関与している可能性を考えている（近藤ら、未発表）。またヒラメでは、T4をT3に転換する *dio1* が、変態期に肝臓で高発現することを発見した。¹⁰⁾ これらの結果は、変態ホルモンと非対称性形成との関わりを示唆している。ホシガレイでは飼育水温により眼位逆位の発生率が変化する。¹¹⁾ この現象については、環境要因に起因した内分泌系の攪乱が要因となって、*pitx2* 再発現が抑制される可能性を推定している。今後は、これらの相互作用を解明することにより、従来の研究を発展させるとともに、異体類の種苗生産の高度化に貢献したい。

体色の左右差形成のメカニズムは依然謎のままである。私達は、変態期に分化する成体型黒色素胞は、初期仔魚の体内では、背鰭と臀鰭基部に無色透明な幹細胞の

状態で分布し、変態前期に色素前駆細胞に分化することを報告した。³⁾ 前駆細胞から色素胞への分化を調節するシグナルを同定し発現解析することにより、異体類の体色の左右差形成にも分子レベルで迫りたい。

謝 辞

これらの研究は、田中克・京都大学名誉教授、橋本寿史氏（名古屋大学）および佃水産総合研究センターの有瀧真人氏、清水大輔氏、藤浪裕一郎氏、宇治督氏および研究室のメンバーとの共同研究である。この場を借りて、心からの謝辞を述べさせていただく。

文 献

- 1) Friedman M. The evolutionary origin of flatfish asymmetry. *Nature* 2008; **454**: 209–212.
- 2) Suzuki T, Washio Y, Aritaki M, Fujinami Y, Shimizu D, Uji S, Hashimoto H. Metamorphic *pitx2* expression in the left habenula correlated with lateralization of eye-sidedness in flounder. *Dev. Growth. Differ.* 2009; **51**: 797–808.
- 3) Watanabe K, Washio Y, Fujinami Y, Aritaki M, Uji S, Suzuki T. Adult-type pigment cells, which color the ocular sides of flounders at metamorphosis, localize as precursor cells at the proximal parts of the dorsal and anal fins in early larvae. *Dev. Growth. Differ.* 2008; **50**: 731–741.
- 4) Hashimoto H, Aritaki M, Uozumi K, Uji S, Kurokawa T, Suzuki T. Embryogenesis and expression profiles of charon and nodal-pathway genes in sinistral (*Paralichthys olivaceus*) and dextral (*Verasper variegatus*) flounders. *Zool. Sci.* 2007; **24**: 137–46.
- 5) Concha ML, Wilson S. W. Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J. Anat.* 2001; **199**: 63–84.
- 6) Hamada H, Meno C, Watanabe D, Saijoh Y. Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat. Rev. Genet.* 2002; **3**: 103–113.
- 7) Essner JJ, Amack JD, Nyholm MK, Harris EB, Yost HJ. Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* 2005; **132**: 1247–1260.
- 8) Hashimoto H, Rebagliati M, Ahmad N, Muraoka O, Kurokawa T, Hibi M, Suzuki T. The Cerberus/Dan-family protein Charon is a negative regulator of Nodal signaling during left-right patterning in zebrafish. *Development* 2004; **131**: 1741–1753.
- 9) Hashimoto H, Mizuta A, Okada N, Suzuki T, Tagawa M, Tabata K, Yokoyama Y, Sakaguchi M, Tanaka M, Toyohara H. Isolation and characterization of a Japanese flounder clonal line, *reversed*, which exhibits reversal of metamorphic left-right asymmetry. *Mech. Dev.* 2002; **111**: 17–24.
- 10) Itoh K, Watanabe K, Wu X, Suzuki T. Three members of the iodothyronine deiodinase family, *dio1*, *dio2* and *dio3*, are expressed in spatially and temporally specific patterns during metamorphosis of the flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zool. Sci.* 2010; **27**: 574–580.
- 11) 有瀧真人, 太田健吾, 堀田又治, 田川正朋, 田中 克. 異なる飼育水温がホシガレイ仔魚の発育と変態に関連した形態異常の出現に及ぼす影響. 日本誌 2004; **70**: 8–15.