

タツノオトシゴの育児嚢の形態形成メカニズム

Mechanism of brood-pouch formation in seahorse

(日本動物学会推薦)

代表研究者	上智大学	川口 眞理	Sophia University	Mari KAWAGUCHI
協同研究者	上智大学	大窪 遼平	Sophia University	Ryohei OKUBO
	上智大学	原田 明里	Sophia University	Akari HARADA

The reproductive strategies of vertebrates are diverse. Seahorses possess the unique characteristic of male pregnancy, wherein males and not females incubate embryos in a specialized brood pouch formed on the ventral or outward-facing surface of the tail. The lumen of the brood pouch is surrounded by loose connective tissue, called pseudoplacenta, and dermis. We employed several staining methods to characterize the pseudoplacenta and dermis of the brood pouch of mature male seahorses. Further observations showed that pouch formation was initiated from linear projections of epithelia on both ventro-lateral sides of the body. The projections elongated toward the ventral midline, eventually fused together, and then formed a baggy structure composed of a single dermis layer with neither smooth muscle nor pseudoplacenta, and finally pseudoplacenta with two layers of dermis and smooth muscle was formed, thus establishing a fully developed brood pouch. Finally, we propose categorization of brood-pouch formation during male seahorse development into three stages: (1) the early stage, characterized by formation of a baggy structure from the primordium; (2) the middle stage, characterized by the differentiation and establishment of brood-pouch-specific tissues; and (3) the late stage, characterized by a fully formed pouch.

研究目的

タツノオトシゴはヨウジウオ科に属しており、同科の魚は全て、オスの体表皮に形成される育児嚢をもつ。育児嚢の形態は魚種ごとに異なり、たとえば原始的な育児嚢をもつトゲヨウジでは、腹部に卵を付着させるだけである。一方、タツノオトシゴの育児嚢は発達した構造で、袋状である。この中でメスから受け取った卵を孵化させ、外界で独立できるようになるまでの数週間、保護している。育児嚢は体表皮側から順に真皮層と胎盤様構造に分かれている (Laksanawimol et al. 2006)。卵と接する組織である胎盤様構造は、妊娠中に卵を覆うひだが形成され、血管の新生が起こることが報告されている。

本研究の目的は、タツノオトシゴの「子育て」器官を詳細に観察し、さらに分子マーカーを用いて育児嚢の形成過程を理解することである。

研究経過

タツノオトシゴ (ポットベリード・シーホース *Hippocampus abdominalis*) の育児嚢の特徴づけを行うために、まず成熟したオスの育児嚢の組織観察を行った。ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を行うと、細胞が密につまった真皮層と網目状の胎盤様構造を観察することができた (図 1)。真皮層はマッソントリクローム (MT) 染色によって青色に染色され、染色の強い緻密層と染色の弱い海綿層の 2 層に分かれていた。緻密層と海綿層の間に MT 染色で赤く染色される平滑筋が観察された。一方、胎盤様構造は鍍銀染色によって黒色に染色された。このことから、真皮層は主に膠原線維、胎盤様構造は主に細網線維で構成され、染色方法によって区別できることが分かった。

次に育児嚢の形成過程を観察した。出生後1ヶ月のタツノオトシゴの腹側尾部を観察すると、様々な形成途中の育児嚢が見られた(図2)。これらの個体観察から、育児嚢は以下のように形成されることが予想された。まず、尻びれの尾側の腹外側部に真皮が2本の隆起線を形成することで育児嚢の原基が生じる。真皮層は正中線に向かってさらに隆起し、やがて正中線で尾側から頭側に向かって融合していき、開口部を残して袋状の育児嚢が形成される。その後、成長と共に育児嚢が膨らんでいった。出生後7~8ヶ月の個体には卵を保有している個体もいたことから、この時期には成熟し繁殖可能であることが分かる。

育児嚢を構成する組織の形成過程を調べるために、HE染色、MT染色、鍍銀染色により、出生後1~8ヶ月の様々な発達段階の育児嚢の組織観察を行った。HE染色を行うと、出生後2ヶ月目までの育児嚢は1層の真皮層のみからなる構造をしていた。出生後3ヶ月になると、真皮層が緻密層と海綿層の2層として観察され始め、それ以降の時期の育児嚢は2層の真皮層が顕著に観察できるようになっていた。このことから、2層の真皮層は出生後3ヶ月ごろに形成され始めると考えられる。

MT染色を行うと、出生後1~2ヶ月の育児嚢では赤い染色が観察されなかったが、出生後3ヶ月になると、真皮層の海綿層側にうっすらと赤い染色が観察された。それ以降の育児嚢ではよりはっきりと赤い染色が観察された。このことから、平滑筋は出生後3ヶ月ごろに形成され始めると考えられる。

鍍銀染色を行うと、出生後1~2ヶ月の育児嚢では

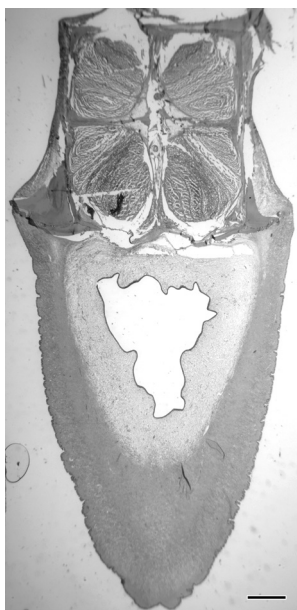


図1 Histology of the brood pouch in mature seahorse, *Hippocampus abdominalis*.

Hematoxylin and eosin stain of cross sections of the brood pouch. The ventral side is up and the dorsal side is at the bottom.

黒い染色は観察されなかった。出生後3ヶ月になると、開口部の背側で繊維状の黒い染色が観察されたが、尾側では観察されなかった。出生後7ヶ月になると開口部では腹側にまで黒い染色が広がり、尾側でも背側に染色が観察された。このことから、胎盤様構造は出生後3ヶ月ごろに開口部の背側で形成が始まり、その後育児嚢内腔を包み込むように腹側と尾側の2方向に広がっていくと考えられる。

育児嚢で発現している遺伝子をクローン化してその局在を調べることにより、育児嚢特異的に発現している遺伝子を探索した。その結果、3種類のC型レクチン(haCTL1-3)がクローン化でき、免疫組織染色により、haCTL2が成熟期の育児嚢の内腔上皮に特異的に局在していることが分かった。一方、haCTL1は育児嚢の内腔上皮と体表に局在してい

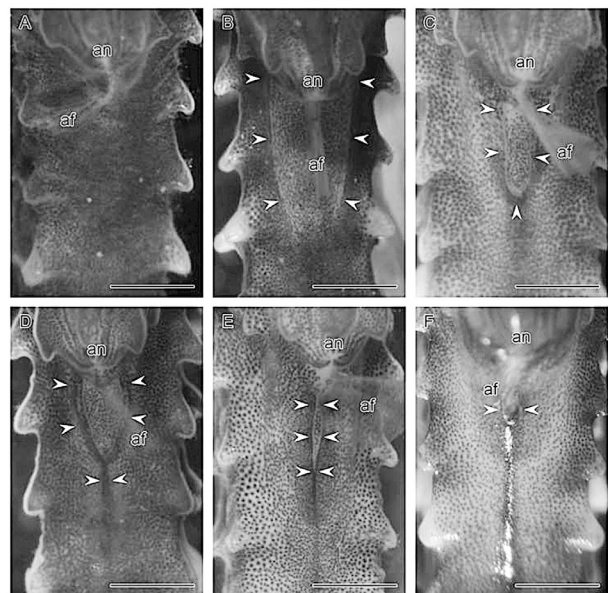


図2 Microscopic observations of brood-pouch formation.

Ventral view of the tail of a male juvenile seahorse. (A) Before formation of brood pouch primordia; development of the brood pouch is considered in the order of B-F. (B) Primordium of the brood pouch as parallel linear projections. (C) Elongation of the projections. (D) A seam line forming a Y-shape. (E) A seam line forming an I-shape. (F) Formation of the pore-like pouch entrance. (G) Arrowheads indicate the edge of the brood pouch. an, anus; af, anal fin. Scale bars: 1 mm.

た。育児嚢の形成過程での haCTL の局在を調べてみると、haCTL1 は形成初期から体表皮と内腔上皮に局在していた。一方、haCTL2 は形成初期では検出されず、胎盤様構造形成時期に育児嚢の内腔上皮でシグナルが検出されるようになった。

考察

種々の発達段階のタツノオトシゴの育児嚢の観察により、育児嚢の形成過程は大きく3つのステージに分けられる(図3)。(1)形成初期:育児嚢の原基形成から袋状の育児嚢が形成されるまでで、この時期の育児嚢は1層の真皮層のみからなる。(2)形成中期:育児嚢を構成する組織が分化する時期で、胎盤様構造の形成が背側頭部から始まり、真皮層が2層に分かれる。2層の真皮層の間には平滑筋が形成され始める。その後、胎盤様構造は育児嚢の腹側尾部まで覆うようになり、育児嚢の内腔全体が胎盤様構造で覆われた形態となる。(3)形成後期:卵を保育可能な成熟した育児嚢となる時期で、胎盤様構造がひだ状になり、より発達して血管が多数観察される。メスから卵を受け取ると、卵は育児嚢内では胎盤様構造で包み込まれる。卵の周辺には血管が発達し、老廃物の除去などを行っていると考えられている(Laksanawimol et al., 2006)。発達した育児嚢の形態はこのように卵を保育できる状態になっていると考えられる。

育児嚢の内腔上皮に特異的なC型レクチンは、胎盤様構造の形成期に検出され始めた。レクチンが局在している上皮に着目すると、成熟期の体表皮には粘液腺が多数観察されるが、内腔上皮にはほとんど見られない。一方、形成初期の育児嚢の内腔には体表皮と同様に粘液腺が多数観察される。これらの結果は育児嚢の形成過程の形態学的な観察と一致していた。すなわち、育児嚢の形成は腹側の真皮が盛り上がるようにして始まることから、形成初期の育児嚢の内腔は体表皮由来である。その後、袋状の構造が完成すると、胎盤様構造などの育児嚢特異的な組織が分化してくるが、それに伴って上皮も内腔上皮特異的な構造へと変化していると考えられる。

参考文献

1. Laksanawimol P, Damrongphol P, and Kruatrachue M. Alternation of the brood pouch morphology during gestation of male seahorses, *Hippocampus*

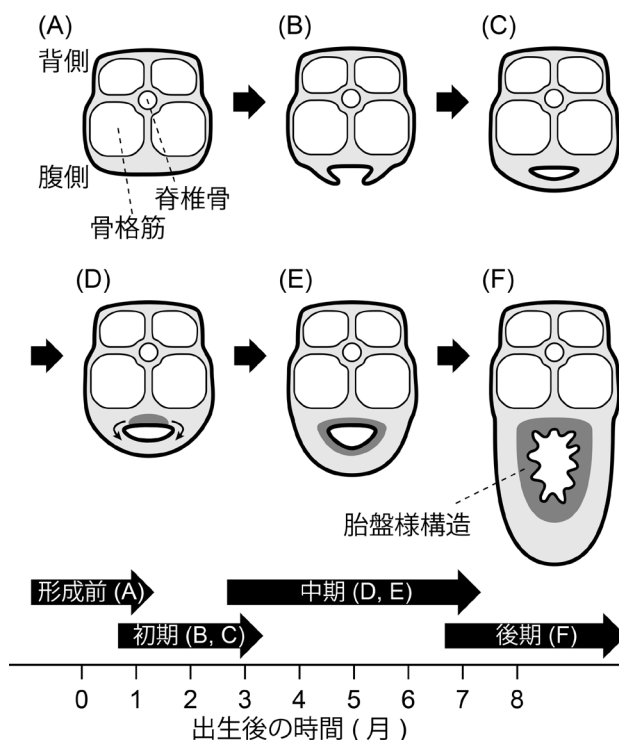


図3 Plausible pathway of brood-pouch formation in the seahorse.

(A) Before formation of the brood pouch. (B) The primordium of the brood pouch first appears as linear projections at both ventro-lateral sides of the body. (C) The projections become fused at the body midline. (D) Differentiation of brood-pouch tissue begins, and the pseudoplacenta first appears on the dorsal side of the pouch. (E) The pseudoplacenta eventually surrounds the pouch entirely. (F) Finally, the pouch-folds are formed, ready to incubate embryos.

kuda. Mar Freshw Res. 2006, 57497-502.

研究の発表

口頭発表

1. Mari Kawaguchi, Ryohei Okubo, Akari Harada, Kazuki Miyasaka, Kensuke Takada, Junya Hiroi, and Shigeki Yasumasu "Morphological observations on the formation of brood pouch of pot-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis*" SyngBIO 2017, Florida, USA, 2017 May.
2. Ryohei Okubo, and Mari Kawaguchi.

"Morphological observation of formation of seahorse brood pouch." Non-conventional animal models surfing the new waves of cutting-edge technologies. Joint Meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan, Okinawa, Japan, 2016 November.

3. 川口眞理 「タツノオトシゴの育児嚢の形成」 第2回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会、岡崎、2016年8月

ポスター発表

1. 原田明里・川口眞理 「タツノオトシゴの育児嚢

を構成する組織の形成過程」 第69回日本動物学会関東支部、東京、2017年3月

2. 高梨亜登・川口眞理 「タツノオトシゴの育児嚢の形成はアンドロゲンによって誘導される」 第69回日本動物学会関東支部、東京、2017年3月
3. 大窪遼平・川口眞理 「タツノオトシゴの育児嚢の形態学的観察」 第49回日本魚類学会、岐阜、2016年9月
4. 川口眞理・大窪遼平・川原玲香・井ノ口繭・金子豊二 「タツノオトシゴ類の孵化様式」 生物資源ゲノム解析拠点シンポジウム・研究発表会、東京、2016年9月