

平成30年 5月31日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07174

研究課題名(和文) 脊索動物誕生の進化発生学的基盤：脊索形質獲得進化とオタマジャクシ型幼生の出現

研究課題名(英文) Evo-Devo view on the origin of the chordate

研究代表者

高橋 弘樹 (Takahashi, Hiroki)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・助教

研究者番号：40283585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊索動物の進化は、繊毛を使って遊泳する幼生から、筋肉を備えた尾を使って遊泳するオタマジャクシ型の幼生の出現に起因する。脊索は脊索動物体制における中軸器官であると同時に、脊索動物を特徴づける最も重要な形質である。その脊索形成にはBrachyury遺伝子が重要な役割を果たす。しかし、Brachyury遺伝子の役割は脊索形成に特化したものではなく、もともと原腸形成に関連した役割を持っていたものが、脊索動物の進化の際に脊索形成に関わったものと考えられる。そこで、Brachyury遺伝子が担う脊索形成の機能を獲得する進化プロセスを明らかにすることから、脊索動物誕生の進化発生学的基盤の解明を目指した。

研究成果の概要(英文)：Chordate is well distinguished animal taxa. They have notochord as a common feature, but their sister group, echinoderms and hemichordates do not. This suggests that notochord is a novel feature gained by the chordate common ancestor. Brachyury gene is known as the master gene of notochord development, but it is also shared by non-chordate animals. In non-chordate invertebrate species, Brachyury is expressed in blastopore or stomodeum. On the other hand, typical chordates express this gene in blastopore as well as dorsal archenteron. Axial part of dorsal archenteron continues to express Brachyury gene, and differentiates into notochord. This indicates that the chordate common ancestor alternated Brachyury expression pattern, and thus acquired notochord. To understand how chordate ancestor acquired this novel expression pattern, we focus on Brachyury enhancer activity of amphioxus, the most basal chordate.

研究分野：進化発生生物学

キーワード：脊索動物 尾索動物 頭索動物 ホヤ ナメクジウオ 脊索

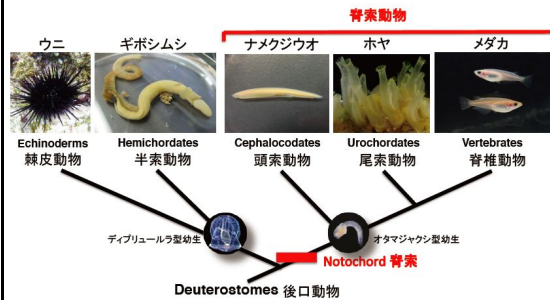
1. 研究開始当初の背景

生物ゲノム情報が急速に整備される現在、進化発生(Evo-Devo)と比較ゲノムの統合による生物の進化と多様性を解き明かすことが可能になりつつある。脊索動物の進化は、繊毛を使って遊泳する幼生から、筋肉を備えた尾を使って遊泳するオタマジャクシ型の幼生の出現に起因する。「脊索」は脊椎動物体制における中軸器官であると同時に、脊索動物を特徴づける最も重要な形質である。したがって、脊索形成の分子メカニズムの解明は脊椎動物体制構築の解明につながると同時に、脊索動物進化のメカニズムの理解にも直結する(Harvey et al. 2010, Satoh et al. 2014)。

これまでに、T-box 転写因子である *Brachyury* (*T*) 遺伝子は脊索動物の共有派生形質である脊索の形成において鍵となる遺伝子であることが明らかにされてきた。また T-box 転写因子はファミリーをなして様々な形態形成の過程で重要な働きをしていることなどが明らかにされてきた。その中で世界に先駆けて、佐藤矩行グループが中心となり脊椎動物に近縁な尾索動物、頭索動物、半索動物、棘皮動物、各々から *Brachyury* 遺伝子を同定した(Satoh, 2003)。研究代表者はこれまでに尾索動物ホヤを用いて、*Brachyury* ターゲット遺伝子群450遺伝子を明らかにし、脊索遺伝子の機能解析と転写調節領域解析からホヤ脊索形成の分子機構について研究を進めてきている(Takahashi et al. 2010, Hotta et al. 2008)。

Brachyury の役割は脊索形成に特化したものではなく、もともと原腸形成に関連した役割を持っていたものが、脊索動物の進化の際に脊索形成に関わったものと考えられる(Satoh et al. 2012)。すなわち、刺胞動物から脊索動物にいたるまで原口領域に一過的に発現する Primary *Brachyury* ネットワーク(原腸形成・原口)に加えて、脊索動物誕生

にともない脊索形成期に持続的に発現機能する Secondary *Brachyury* ネットワーク(脊索形成・脊索)が新たに加わったと考えることができる。しかし、この進化プロセスに焦点を当てた進化発生的解析はいまだ十分に行なわれていない。



2. 研究の目的

脊索動物門であるナメクジウオ(頭索動物)、ホヤ(尾索動物)を用いて脊索細胞を単離してトランスクリプトームをRNA-Seq解析により明らかにして脊索形質の分子的基盤を解明する。同時に頭索・尾索・脊椎動物の脊索形質進化の分子基盤を明らかにする。また一方では、脊索動物に近縁の動物群を含む後口動物を対象として、ナメクジウオ(頭索動物)、ホヤ(尾索動物)、メダカ(脊椎動物)、ギボシムシ(半索動物)、ヒトデ(棘皮動物)のゲノム配列と胚を用いて Primary(原口)と Secondary(脊索)に発現を制御する *Brachyury* 遺伝子ネットワークの解析を進める。さらに、クロマチン免疫沈降法を用いた ChIP-Seq 解析による *Brachyury* ターゲット遺伝子群をゲノムワイドに明らかにして遺伝子ネットワークの解明を目指す。

すなわち *Brachyury* 遺伝子が脊索形成の機能を獲得する進化プロセスを明らかにすることから、脊索動物門誕生の進化発生的基盤の解明に迫ることを目的とした。

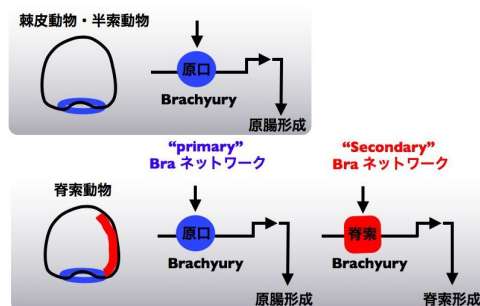
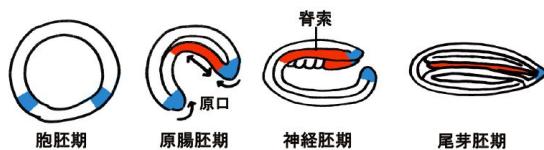
3. 研究の方法

脊索動物門の誕生の進化発生的基盤に直結する脊索形質獲得進化とオタマジャクシ型幼生の出現を解き明かすことを目指し、3つの研究手法をとった。

第一のアプローチは脊索細胞のRNA-Seq解析により脊索形成の発生過程の分子基盤を明らかにすることである。新しい動物門に共通な共有派生形質である「脊索形質」の分子実体を明らかにする。

第二のアプローチは*Brachyury*遺伝子の脊索を持たない動物に共通する原口で発現を制御するPrimaryと、脊索動物の脊索に発現を制御するSecondary *Brachyury* 遺伝子ネットワークの解析から、脊索形質の獲得に至る遺伝子ネットワークの進化プロセスを解明することを目指す。

第三のアプローチはPrimary(原口)とSecondary(脊索)の*Brachyury*ターゲット遺伝子群をChIP-Seq解析により、ゲノムワイドに同定する方法である。このアプローチによって、脊索を持たない動物群に保存された原腸形成に働くのターゲット遺伝子群と脊索形成に働くターゲット遺伝子群を比較解析することが可能になると考えられる。



4. 研究成果

(1) 脊索形質の分子基盤

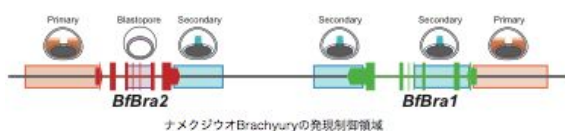
脊索動物門を特徴付ける共有派生形質である脊索細胞の分子基盤を明らかにするためにRNA-Seq解析を行った。脊索動物門誕生の進化プロセスを解明する際に鍵となる最も祖先的な脊索動物であるナメクジウオ(頭索動物)の脊索細胞の脊索形成遺伝子セットの分子基盤を明らかにすることを試みた。

特にナメクジウオの脊索は発生の過程で消失することなく成体においても存在し続けている。成体のナメクジウオの脊索細胞を顕微鏡下で単離して次世代シーケンサーを用いてRNA-Seq解析を進めた。また、RNA-Seq解析を進める際にはナメクジウオの筋肉細胞と神経細胞(神経索)の単離も行った。同時に解析を進めた。その結果、興味深いことにナメクジウオ成体の脊索細胞には*Brachyury*遺伝子が発現していることが初めて明らかになった。このことは、成体においても脊索形質を維持するナメクジウオにおいて*Brachyury*遺伝子が発生初期の脊索形成時のみならず脊索において発現機能していること示唆している。また、祖先的形質を保持すると考えられるナメクジウオ脊索細胞には筋肉関連分子が数多く発現していることを示す結果が得られた。これらの結果は脊索形質獲得過程を解明する上で新たな進展を担う基盤的な研究成果である。

(2) 原腸形成と脊索形成を制御する*Brachyury* 遺伝子ネットワークの解析

これまでに研究代表者はホヤ*Brachyury*遺伝子の発現制御メカニズム解析を行ってきた(Takahashi et al.1999;2005)。本申請研究課題では脊索動物門の*Brachyury*遺伝子がPrimary(原口)とSecondary(脊索)の発現を制御する遺伝子ネットワーク進化の解析

を進めた。Brachyury のこれまでの研究から、脊索動物では原口と脊索で Brachyury の発現を制御する遺伝子ネットワークが異なると考えられる。そこで、祖先的な脊索動物であるナメクジウオの Brachyury レポーターコンストラクトを作製して、原口と脊索で発現を制御するシスエレメントの同定を試みた。遺伝子導入解析にはすでに実験系が確立している近縁の尾索動物であるカタユレイボヤを用いて行った。その結果、ナメクジウオ Brachyury の上流領域には筋肉での発現を制御する領域が存在すること、また、Brachyury のイントロン領域には原口での発現と複数の脊索での発現を制御する領域が存在することが示唆された。今後、さらにナメクジウオ胚を用いた解析、また、脊索を持たない近縁の動物群であるヒトデ・ギボシムシの Brachyury 遺伝子ネットワークの解析が待たれる。



(3) Brachyury ターゲット遺伝子群の ChIP-Seq 解析

独自に作製した各生物種 Brachyury 特異的抗体を用いた ChIP-Seq 解析を進めると同時に、GFP あるいはビオチンアクセプターをタグとしたカタユレイボヤ Brachyury (Ci-Bra) を脊索細胞に特異的に発現させた胚をもとに、ChIP 解析を検討した。その際には、これまでに明らかにした Ci-Bra ターゲット遺伝子群の遺伝子についてリアルタイム PCR を用いて確認し、ChIP 実験系を確立することを試みた。同時に発生ステージは原腸胚期、神経胚期、尾芽胚期に分けて解析を進めた。ナメクジウオ(頭索動物)、ホヤ(尾索動物)、メダカ(脊椎動物)、ギボシムシ(半索動物)の Brachyury が発現するステー

ジの胚を集めて、各生物種 Brachyury 抗体によるクロマチン免疫沈降(ChIP)を行い、次世代シーケンサーを用いた ChIP-Seq 解析により各生物種の Brachyury ターゲット遺伝子群をゲノムワイドに同定することを試みた。しかし、これまでに試みた ChIP-Seq 解析では十分有意な結果が得られていない。今後さらに条件を検討して比較可能なターゲット遺伝子群を明らかにすることが課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Jun Inoue, Yuuri Yasuoka, Hiroki Takahashi, Noriyuki Satoh, The chordate ancestor possessed a single copy of the Brachyury gene for notochord acquisition. *Zoological Letters*, 査読有, 3, 4. (2017). DOI 10.1186/s40851-017-0064-9.

[学会発表](計5件)

Hitoshi Tominaga, Noriyuki Satoh, Naoto Ueno, Hiroki Takahashi, Enhancer activities of Amphioxus two Brachyury genes. 50th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists. (2017).

Hitoshi Tominaga, Naoto Ueno, Hiroki Takahashi, Analysis of Amphioxus Brachyury enhancer activity. 日本動物学会、(2016).

Hitoshi Tominaga, Naoto Ueno, Hiroki Takahashi, Analysis of Amphioxus Brachyury enhancer activity. The 22nd International Congress of Zoology, (2016).

Hitoshi Tominaga, Naoto Ueno, Hiroki Takahashi, Analysis of Amphioxus Brachyury Cis-elements functions by using *Ciona intestinalis* for understanding chordate body plan evolution. International Tunicate Meeting, (2015).

富永育、上野直人、高橋弘樹、ナメクジウオの Brachyury シスエレメントから探る脊索動物の進化、日本動物学会、(2015).

〔図書〕(計 1 件)

佐藤矩行、高橋弘樹、田川訓史、秀潤社、
進化の謎をゲノムで解く(無脊椎動物と
脊椎動物の間)、(2015)、188-195.

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.nibb.ac.jp/morphgen/summary/
lightbox/hoya.html](http://www.nibb.ac.jp/morphgen/summary/lightbox/hoya.html)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 弘樹 (Takahashi Hiroki)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・助教

研究者番号：40283585

(4) 研究協力者

富永 斉 (Tominaga Hitoshi)

総合研究大学院大学・生命科学研究科・基礎

生物学専攻・大学院生