

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19422

研究課題名(和文)哺乳類における体毛の針化を題材とした新規形質獲得の分子メカニズム解明

研究課題名(英文)The molecular mechanism underlying the acquisition of novel traits by focusing on the evolution of hairs to spines in mammals

研究代表者

二階堂 雅人(Nikaido, Masato)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：70432010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の主な目的はハリネズミの針が複数の体毛が融合したものなのか、1本の体毛が肥大化したものなのかを検証すること、そして針と毛の形態的な違いを生み出す遺伝子をRNAseqにより網羅探索することである。まず針および体毛のパラフィン切片の顕微鏡観察の結果、針基部の毛乳頭細胞領域が単一の構造をとっていることから、針は1本の体毛が肥大化したものであり、発生に伴って内部に規則的なヒダ構造が形成されたものであることが分かった。続いて針、体毛のRNAseqの結果、針領域には特定のケラチン遺伝子およびケラチン関連タンパク質遺伝子が発現しており、これが針に特徴的な内部構造や硬質化に関わっている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハリネズミは研究者だけでなく一般の人々にとってよく知られた生き物であるにもかかわらず、その針の発生の学的起源に関しては意外にも知られていなかった。また、ハリネズミだけでなく多くの哺乳類において観察される体毛の針化は平行進化を理解するための好例である。この体毛の針化メカニズムの一端を明らかにした本成果は学術的・社会的な意義は大きいと感じている。

研究成果の概要(英文)：The main objectives of this study are 1. to examine whether the spines of hedgehogs are a fusion of multiple hairs or an enlargement of one hair, and 2. to exhaustively explore the genes that contribute to the morphological differences between spines and hairs by using RNAseq technique. Microscopic observation of paraffin sections of spines and hairs showed that the base of the needles had a single structure of papillary cell region, implying that the spines developmentally originate from a single hair. Subsequent RNAseq results on spines and hairs indicated that specific keratin and keratin-related protein genes were expressed in the spine region, that may be involved in the hard and characteristic internal structure and of spines.

研究分野：進化生物学

キーワード：ハリネズミ 針 体毛 パラフィン切片 RNAseq 平行進化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類は、その進化過程において多様な生息環境に適応しながら様々な形質を獲得してきた。その中でも針の獲得は、系統によらず何度も独立に起きた進化現象であることが最近の分子系統学的な研究によって明らかになってきた。そこで我々は、哺乳類における針獲得のメカニズムを DNA レベルで明らかにすることで、いまだにその多くが明らかにされていない、適応進化の際に起こる新規形質の獲得の分子基盤を明らかにすることを目指す。本研究において特に我々が注目するハリネズミおよびテンレックは、どちらも背側が針で覆われており形態的には非常に似通っているが、これらのグループは遺伝的には遠縁であり (Nikaido et al. 2003 GGS; Nikaido et al. 2003 MPE) この針構造は極めて巧妙な平行進化の産物であることが分かる。ハリネズミやテンレックの針は、その内部において縦横に隔壁 (Septa) が配置する極めて緻密な構造を持つだけでなく、その基部においては針の直立や支持に必要な立毛筋や輪筋 (皮筋) が発達するなど、その獲得には複合的な進化を必要としており、この針が如何にして獲得されたのかも興味深い。私は、発生初期段階におけるハリネズミの針基部に複数の毛根様構造を見出しており、これは針が体毛の融合によって進化した可能性を示唆している。これから、針発生に関わる毛の融合を実験的に検証すると共に、針をもつ他の哺乳類においてもこの融合メカニズムに共通性があるか否かを中心に添え、どのような遺伝子 (セット) に自然選択が働くことで複合的な進化を必要とする新規形質獲得が可能となったのかをゲノムレベルで明らかにする。

### 2. 研究の目的

現在までに研究代表者は、発生途中のハリネズミの針基部に複数の毛根様構造を見出しておりこれが針獲得過程における体毛の融合の可能性を示唆している。また、ハリネズミの体毛の配置パターンを組織学的に観察したところ、特徴的な配置 (中央の太い毛を複数の細い毛が取り囲む) をしていることを見出しており、針獲得に関わる進化過程を解明する上で、この体毛の特徴的な配置パターンが重要な進化発生的な知見を与えるものと予想し、これからその実験的な検証に進んでいく段階にある。上記の問題を明らかにするために、我々の持つ分子進化学的手法、東工大伊藤研究室のゲノム情報学的手法、および慈恵医大の解剖組織学的手法を統合した、次世代型の進化発生的アプローチを駆使したいと考えている。1. まず、ハリネズミおよびテンレックの皮膚組織の微細構造の観察し理解することで、体毛および針の形態学的な知見をあつめ、体毛から針への進化プロセスを推定する。2. 次に、胎仔期もしくは生後間もない個体の皮膚組織における遺伝子発現パターンの網羅的解析 (RNAseq) をおこない、体毛と針ではどのような差があるかに関するトランスクリプトーム解析をおこなう。3. さらに、体毛に関連する遺伝子群として毛髪ケラチン (HK) 、毛髪ケラチン関連タンパク質 (HKAP) 遺伝子に着目することで、その構造タンパク質の違いを検証する。4. そして、RNAseq において発現差が検出された遺伝子群および、鱗、羽毛や体毛の発生に関わると期待される遺伝子群について、胎仔・新生仔を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを用いて、詳細な発現パターンの解析をおこなう。最終的に、上記知見を統合しながら、「針」という進化的には新規な形質がどのように獲得されたのか、その適応進化の分子メカニズムの解明につなげる。

### 3. 研究の方法

#### ハリネズミの皮膚組織の微細構造の観察

まず、*Atelerix albiventris* (ヨツユビハリネズミ) の成体 (生後3ヶ月) における針部分および毛部分それぞれに関する微細構造の比較観察をおこなうことで、解剖組織学的な側面から針の発生過程を明らかにすることを試みた。この観察は、ホルマリン固定した皮膚サンプルをパラフィンもしくは樹脂包埋し、水平・垂直方向それぞれの切片を作製して実施した。ハリネズミに関しては、東工大・二階堂研究室にて多数の成体が飼育され交配も可能な状態であるため、成体については東工大で準備した。切片作製、染色については、慈恵医大にて進め、東工大の二階堂、大学院生と共にその顕鏡をおこないその結果を議論した。さらに、新生仔 (生後1日) のサンプルについては、飼育中のハリネズミを交配させることで得た。それらの皮膚切片に関しても上記と同様に研究観察を進めた。

#### 皮膚組織における遺伝子発現パターンの解析 (RNAseq)

針化に関連する遺伝子の単離を目的として、生体および新生仔ハリネズミ (胎仔期においてすでに針原基は完成している) について、腹側の体毛の毛根を含む基部領域の組織と、背側の針における基部領域の組織から別々に RNA を抽出し、組織間で発現量の異なる遺伝子を探索した。この RNA 調整は二階堂研究室にておこない、RNAseq の実施は外部業者に委託した。RNAseq データのアセンブルについては *bridger* を用いた。アノテーションについては *Atelerix albiventris* に近縁であり全ゲノム配列データが登録されている *Erinaceus europaeus* (ヨーロッパハリネズミ) に対して BLAST をおこなうことで実施した。哺乳類にはケラチン (KRT) とケラチン関連タンパク質 (KAP) が存在し、どちらも多重遺伝子族を形成し、種間でそのレパートリーが異なることが知られている。本研究でもこれらの遺伝子群に関して特に注目して上記遺伝子の網羅的な単離をおこない、毛と針の各組織において、これら遺伝子群の発現パターンや量にどのような違いがあるのかを検証した。

#### 4. 研究成果

##### 針の発生学的な起源に関して

ヨツコビハリネズミ（新生仔および成体）の皮膚組織 HE 染色切片の光学顕微鏡観察において、針の基部は体毛と同様の放射相称の層構造であり、複数の毛包が融合している様子は観察されず、針も体毛と同様に1つの毛包から形成されている様子が観察された。そして針の基部から先端に向かうに伴い、内部に縦横に隔壁（Septa）が配置する構造が観察されるようになった。つまり、針の発生学的な起源は体毛の融合ではなく拡大であり、その成長過程で内部にいくつかの反復パターンが生じていることが分かった。この結果は、我々の予想していた複数の体毛の融合により針が獲得されたとする結果とは大きく異なっていた。先行研究によると、体の後方に硬質化した針構造をもつトゲマウスの針は1つの体毛の拡大によるものと予想されており（Montandon et al. 2014 *Evo. Devo.*）、ハリネズミにおいてもトゲマウスと似たメカニズムによって針が獲得された可能性が大きいことを示している。しかし、当研究室では、ヨツコビハリネズミの腹側に位置する体毛が、1本ずつバラバラで生えているのではなく、数本ずつが束になって生えている様子が観察されており（中心には太い体毛、そして周辺には細い体毛が配置されている）、発生初期段階に近隣の複数の毛包が融合して針となる可能性も否定はできない。この可能性を検証するためには、毛包が形成する段階での組織観察が必要であると考えられる。ヨツコビハリネズミは出生時には既に皮膚組織内部で針が形成されているため、毛包の発生過程を観察するためには、新生仔ではなく発生のより初期段階である胎児を用いた組織切片の観察が必要であると考えている。

##### ● 遺伝子発現解析

新生仔、生体ハリネズミの針と体毛に関して、TCC 法を用いた遺伝子発現変動解析をおこなった。その結果、新生仔の針と体毛で 1850 個、成熟個体の針と体毛で 323 個、新生児と成熟個体の針で 251 個、新生児と成熟個体の体毛で 2 個、成熟個体の体毛と新生児の針で 2 個、成熟個体の針と新生児の体毛で 24 個、について有意な発現差が認められる遺伝子が検出された。サンプル間で発現差の認められた配列をクエリとして、ヨーロッパハリネズミの全ゲノム配列に対し BLASTN による相同性検索を行った。BLAST 検索の結果の中で最も e-value が高い結果 (best hit) を残し、アノテーション情報を調べ、それぞれの配列に対応する遺伝子を推定した。BLAST 検索で hit のなかった配列、BLAST 検索の結果に関して遺伝子名などのアノテーション情報のない配列は除いた。複数の配列で hit した遺伝子など遺伝子名での重複を除いた結果、サンプル間で有意な発現差が認められ体毛の針化に関わると推定される遺伝子が、新生児の針と体毛で 431 個、成熟個体の針と体毛で 51 個、新生児と成熟個体の針で 70 個、新生児と成熟個体の体毛で 1 個、成熟個体の体毛と新生児の針で 1 個、成熟個体の針と新生児の体毛で 4 個検出された。ケラチン(KRT)とケラチン関連タンパク質(KRTAP)に注目すると、発生段階おける比較よりも、同一個体における針と体毛の比較の方が有意な発現差が多く認められた。同一個体の針と体毛の比較において、17 種のケラチンと 4 種のケラチン関連タンパク質が針で有意に高い発現が認められ、体毛で有意に高い発現が認められたケラチンとケラチン関連タンパク質はなかった。KRT25, 27, 28, 32, 34, 35, 71, 72, 73, 75, 85 の 11 種と KRTAP3-1, 8-1, 15-1, 24-1 の 4 種の遺伝子は、新生仔と成熟個体で共通して針側で有意に高い発現が確認された。KRT16 は成熟個体においてのみ針側で有意に高い発現が認められ、KRT23, 26, 36, 82, 84 は新生児においてのみ針側で有意に高い発現が確認された。また、KRT34 は、針の発生段階における比較において成熟個体の針で有意に高い発現が認められ、成熟個体の体毛と新生児の針の比較と成熟個体の針と新生児の体毛の比較においては、共通して針で有意に高い発現が認められた。特に、ヘアケラチンの KRT34 は、新生仔、生体で共通して針で有意に高い発現が認められ、さらに新生仔よりも成熟個体で有意に高い発現が認められた。したがって、KRT34 は体毛と針の違い、さらにたく硬い成熟した針の形成に関わると考えられる。また、針においては、体毛より多種類のケラチンやケラチン関連タンパク質が関わることが、たく複雑なひだ構造をもつ針を形成に関わると示唆される。KRTAP 3-1, 8-1, 15-1, 24-1 の 4 種は全て針の生える背側に有意に多く発現しており、針に特異的であり、体毛の針化に関係すると予想される。他の哺乳類ではヒツジの羊毛においても KRTAP3-1, 8-1, 24-1 の発現が確認されている。このヒツジにおいては KRTAP3-1 は毛皮質、KRTAP8-1 は羊毛に特徴的なカールを形成するバイラテラル構造を構成するオルソ毛皮質での発現が確認されている(Gong et al., 2016)。KRTAP15-1 は、カシミアゴートの毛包で発現し、その多型が平均繊維径の増減に関わることがわかっている。多型の 1 つを持つグループでは有意にカシミア繊維の平均繊維径が小さく、細いことが知られている(Zhao et al., 2019)。したがって、本研究において針で有意に高い発現が認められた KRTAP15-1 は、針の太さに寄与する可能性が考えられる。今後 qPCR や *in situ* hybridization により発現を定量的な比較や、発現パターンを詳細に調べていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林沙織、重谷安代、岡部正隆、二階堂雅人
2. 発表標題 ハリネズミにおける体毛の針化に関わる分子メカニズム
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林沙織、田中亮輔、重谷安代、岡部正隆、二階堂雅人
2. 発表標題 ハリネズミの針形成に関わる進化発生学的研究
3. 学会等名 第7回 TOKYO VERTEBRATE MORPHOLOGY MEETING
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林沙織、田中亮輔、重谷安代、立花利公、岡部正隆、二階堂雅人
2. 発表標題 ハリネズミの針形成に関わる進化発生学的研究
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村優希、二階堂雅人
2. 発表標題 古代魚におけるケラチン遺伝子クラスターの保存と陸上適応との関連性
3. 学会等名 第2回日本遺伝学会春季分科会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	岡部 正隆  (Okabe Masataka)  (10300716)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授   (32651)	
研究 分担者	重谷 安代  (Shigetani yasuyo)  (70431773)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師   (32651)	