

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06363

研究課題名(和文) タコブネの殻にみる進化的形質の喪失と再獲得の遺伝的基盤

研究課題名(英文) Genetic background of re-evolution of shells in Argonaut octopuses

研究代表者

吉田 真明 (Yoshida, Masa-aki)

島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授

研究者番号：50555498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タコブネ類(Argonauta)は、軟体動物がもつ外殻(貝殻)を失ったタコ類の1種であるが、腕からカルシウム結合タンパク質を分泌し、立派な貝殻を形成する。他の軟体動物が殻を分泌するのは背側にある貝殻腺であり、タコブネ類とは異所的であることから、タコブネ類が他の軟体動物とは異なる場所で貝殻形成能を再進化したことが明らかである。タコブネ類の殻に含まれているタンパク質の分析から、他の軟体動物で知られている殻形成タンパク質が3種見つかリ、殻をもたない祖先タコ類においても、貝殻マトリックスタンパク群がゲノム中に保存されており、場合によって遺伝子を使い分けることで殻の再進化が起こることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タコブネ類は、軟体動物がもつ貝殻を失ったタコ類の1種であるが、腕からカルシウム結合タンパク質を分泌し卵殻を形成する。一般に貝殻タンパク質は安価で軽く強靱な構造物のリソースとして、バイオミメティクス(生物模倣)に利用されている。タコブネ類の殻は薄く透けているが強靱で、生成速度が早い。体外にあって海水に接している腕から分泌されることもあり、生物材料として優れた性質をもつ。タコブネ類の殻形成機構とその貝殻マトリックスタンパクは、将来の生物性高耐久プラスチック材料の研究資源としての可能性を兼ね備えている。

研究成果の概要(英文)：Argonautids are a type of octopus that has lost the outer shell of mollusks, but they secrete calcium-binding proteins from their arms to form a magnificent shell. Other molluscs secrete their shells from dorsal shell glands, which is ectopic to the Argonautids, indicating that the Argonautids re-evolved their shell-forming ability in a different place than other molluscs. Analysis of the proteins in the shells of Argonautids revealed three shell-forming proteins known from other molluscs, indicating that shell matrix proteins are conserved in the genome of the ancestral octopuses, which did not have shells, and that shell re-evolution occurs by using different genes in different cases.

研究分野：進化生物学

キーワード：バイオミネラリゼーション プロテオーム 分子進化 軟体動物 比較ゲノム

1. 研究開始当初の背景

「進化の過程で一度失われた形質は二度と現れることはない」という一般則は、イギリスの古生物学者ルイス・ドロウ (1857-1931) が提案したもので「ドロウの法則」と呼ばれている。形質を司る遺伝子の分子進化過程を考えると、機能を喪失した遺伝子は容易に偽遺伝子化されゲノムから失われるため、複数の遺伝子のネットワークによって形成される複雑な形質が再進化する可能性は低いと考えられる。しかし一方で、再進化したと考えられる形質の再獲得が様々な動物において報告されている。

タコブネ類 (Argonauta) は、軟体動物がもつ外殻 (貝殻) を失ったタコの 1 種であるが、メスのみが殻をもち、浮遊生活のための浮力デバイスとして、また卵保護のために用いている。タコブネ類の殻は 1 対の腕から分泌されるカルシウム結合タンパク質群が海水中のカルシウムイオンを結晶化し、他の構造タンパク質を巻き込んで形成される。これら貝殻内に封じられる構成タンパク質を貝殻マトリックスタンパク (SMPs) と総称する。これは軟体動物が行う貝殻形成と同じメカニズムであるが、同じ頭足類のオウムガイなどが殻を分泌するのは背側にある貝殻腺であり、タコブネ類とは異所的であることから、タコブネ類が他の軟体動物とは異なる場所で貝殻形成能を再進化したことが明らかである。

タコブネ類において貝殻が進化するためには、以下のいずれかの仮説に従うと期待される。

- ・殻をもたない祖先タコ類においても、SMPs がゲノム中に保存されている
- ・タコブネ類の貝殻は他の軟体動物とは異なる SMP 群を独立に獲得した

いずれの場合にしろ、タコブネ類において、一連の SMPs を異所的に分泌する能力を獲得したことは明らかである。

動物の貝殻タンパク質の研究は、国内外で精力的に進められており、国内ではアコヤガイのゲノムが解読され、真珠形成に関わる SMPs が同定されている。また、リン酸カルシウムの貝殻をもつ腕足動物のゲノムと SMPs が同定されている。国外では軟体動物のゲノム解析としてタコゲノムを含む 6 種が解読済みであり、比較ゲノム解析を行ううえで必要な情報は揃っている。さらに、軟体動物の SMPs の研究は、その物性に注目したバイオミメティクスや物性研究が進行している。

2. 研究の目的

本研究では、タコブネ類という日本海周辺域で特徴的に漁獲される動物を使い、動物の進化において重要な働きを果たしてきた貝殻という形質がいかにして進化をしたのかを比較ゲノム生物学を用いて解き明かす。貝殻形成の責任遺伝子ある SMPs は貝殻内のタンパク質画分として検出される構造タンパク質であり、貝殻という形質を司る機能遺伝子として明確に定義可能である。SMPs の研究は様々な軟体動物において進行しており、系統ごとの比較からその進化パターンを考察できる局面にきている。しかし、本研究で取り扱うタコブネのように、一旦殻をもつ祖先種ともたない近縁種が明確で、その祖先の形質状態まで明らかな例は稀である。本研究によって、或る形質に関わる構造遺伝子とその制御遺伝子のペアを得ることができ、これにより形質の消長が同じ遺伝的なバックグラウンドをもつのか、あるいは一見同じ形質に見えて実際は別の経路で進化したのか、その形質を司る遺伝子の進化過程を明らかにすることが可能である。SMP 遺伝子研究のさらなる発展として、タコブネ類が異所的に殻を誘導するために必要であったであろうゲノム上の変化や、雌だけが殻を分泌する性特異的なエピゲノム制御についても、ゲノム配列解読とエピゲノム解析を組み合わせた進化的新奇性の研究に展開する。

3. 研究の方法

(1) 比較トランスクリプトーム・プロテオームによるタコブネ貝殻マトリックスタンパクの新規同定

タコブネ類を用いた次世代シーケンス解析により、SMPs の新規同定を行う。島根県の近海に産するタコブネ類 2 種 (アオイガイ *Argonauta argo*, タコブネ *Argonauta hians*) を採集し、生体から殻形成部位に発現する遺伝子の mRNA、および貝殻内の構造タンパク質を抽出する。貝殻を EDTA 等の脱カルシウム剤で処理することによって、水溶性画分と非溶解画分それぞれの SMPs を得る。それぞれの画分から LC MS 質量分析計によりプロテオーム解析を行う。これと並行して、de novo トランスクリプトーム解析を行い、プロテオーム解析を組み合わせ、タコブネの貝殻マトリックスタンパクを同定する。

(2) 比較ゲノム解析によるタコブネ貝殻マトリックスタンパクの由来の同定

次に、同定されたタコブネの SMPs が、これまでに知られている他の動物の殻形成遺伝子と共通するかを推定する。すでにゲノムの決定されている他種の軟体動物ゲノムと生命情報解析によって比較し、タコブネ貝殻マトリックスタンパクが、他の軟体動物と共通性をもつのかを明らかにする。貝殻形成の研究が進んでいるマガキ・シンジュガイ・カサガイなどでは共通する

SMPs が 13 種類ほど存在することが分かっている。これらと比較することで、タコブネ SMPs が他種の軟体動物の貝殻形成と一致するのか検証する。

(3)比較ゲノム解析による“cryptic homologous genes”の同定と再進化の背景の解析

殻をもたない祖先タコ類が貝殻マトリックスタンパクをゲノム中に保持しているかについて検討する。ここで、殻形成に関わるが、殻をたない動物に保持されている一連の遺伝子を“cryptic homologous genes (隠れた相同遺伝子)”と呼称する。ゲノムの公開されているカリフォルニアツースポットオクトパスや他の頭足類の公開データを用いて比較ゲノム解析を行うことで、SMPs の相同遺伝子の有無を明らかにする。

(4)アオイガイゲノムアセンブリの構築と比較ゲノム解析

本課題を基盤課題として、新学術研究領域・先進ゲノム支援によるサポートを得ることができ、アオイガイの新規ゲノム解読を行う。同一の1個体に由来する DNA を準備し、ショートリード DNA シーケンサー Illumina HiSeq による高カバレッジのショットガンシーケンス(x20 程度)を行う。ゲノムアセンブリ等の情報解析を行い、全ゲノムとコードされる遺伝子モデルを構築する。

4. 研究成果

(1)カイダコ類のサンプリング

カイダコ類からタコブネおよびアオイガイの2種について、隠岐海域から季節的に漁獲される個体を継続的にサンプリングを行い、以下の解析に供した。

(2)プロテオーム解析によるカイダコ類の卵殻タンパク質の同定

得られたカイダコの貝殻を破碎・試薬処理によって溶解し、外注により貝殻タンパク画分を LC-MS/MS 解析を行った。EDTA 水溶液による可能性・不溶性画分の両方についてタンパク質溶液を作成し、10ug 相当を短距離展開ののちゲル中でトリプシン分解し、LC-MS 解析に供した。情報解析 (Assembler として Trinity を使用) によって構築したタコブネ遺伝子の塩基配列をもとに、末端ペプチド配列から貝殻内の構成タンパク質を同定した。

プロテオーム解析の結果、アオイガイの可溶性画分から 30 件、不溶性画分から 44 件のタンパク質配列を得た。同様に、タコブネにおいて可溶性画分から 9 件、不溶性画分から 45 件のタンパク質配列を得た。アオイガイでは 13 種類、タコブネでは 3 種類のタンパク質が、可溶性と不溶性を共通していた。これを集計すると、アオイガイでは 29 個、タコブネでは 31 個のユニークなタンパク質が見つかった (図 1)。

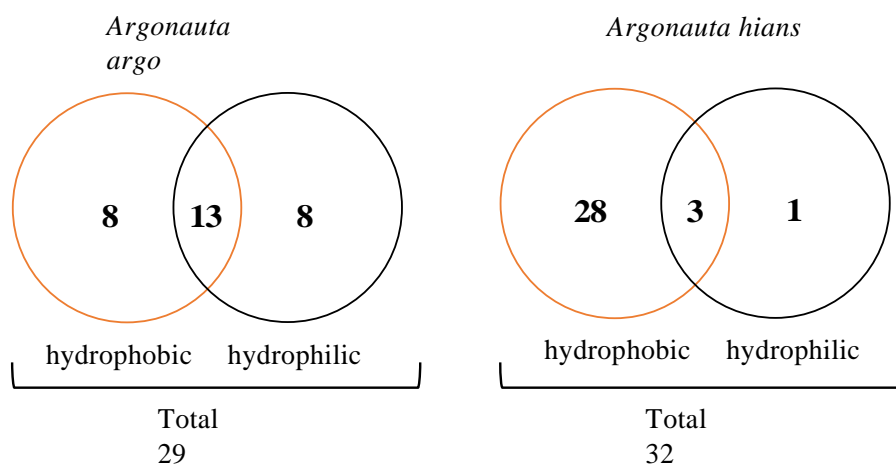


図 1 アオイガイ・タコブネにおける可溶性画分・不溶性画分から検出した SMP 遺伝子数

プロテオームにおける存在量指数 exponentially modified protein abundance index (emPAI) の頻度が高い順に並べると、最も頻度の高いタンパク質は klerin/chordin-like protein であった。これは、von Willebrand factor type C (VWC)を含むタンパク質で、構造的には VWC ドメインのみを持つ。次に頻度が高かったのはグリピカンで、これはグリピカン関連積分膜プロテオグリカンファミリー (GRIPS) のメンバーである。これらのタンパク質は SMP としては非典型的なものであり、カイダコの卵殻は殻とは異なるメカニズムで作られていることを示唆している

一方、注目すべき発見として、タコブネにおいて Pif 様タンパク質が見いだされた。Pif はアコヤガイから同定された SMP で、真珠層からあられ石結晶に特異的に結合する酸性タンパク質である。さらに、アオイガイとタコブネで、共通に見られる SMP として、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ=チオレドキシン (TRX) がある。つまり、代表的な SMPs のうち 3 種類がカイダコの殻から検出された。

(3)カイダコ類の比較ゲノム解析による卵殻タンパク質の進化過程

プロテオーム解析で得られた SMP 3 遺伝子について、webBLAST 検索から他の軟体動物・冠輪動物における相同遺伝子を検索し、分子系統解析を行った。その結果、Pif, SOD, TRX のすべてにおいて、他の頭足類と同じドメイン構造をもち、単系統となる相同遺伝子が見られた。このことから、殻をもたない祖先タコ類においても SMPs がゲノム中に保存されており、「隠れた相同遺伝子」仮説が支持された。現在、この結果について原著論文を作成している。

(4)アオイガイのゲノム解析

本課題を基盤課題として、新学術研究領域・先進ゲノム支援によるサポートを得ることができ、アオイガイの新規ゲノム解読を行った。ショートオーバーラップリード(PE600)、3kb、8kb、および 40kb のメイトペアライブラリのシーケンスを行った。予測される 1.2Gb のゲノムサイズを用いた場合、イルミナリードのシーケンスカバレッジの合計は 76x であった。ゲノムアセンブリの前に、全長のミトゲノムを構築し、ミトゲノムにヒットするリードを除いた。オーバーラップした配列リード (250bp) は、Platanusv2.2.2 を用いた De Bruijn graph assembly でアセンブルした。トランスクリプトームマッピングと相同性検索を組み合わせて遺伝子モデルセットを構築し、29,089 個のタンパク質配列が得られた。アオイガイのドラフトゲノムについて、遺伝子アノテーションが完了したため、ゲノムビューワーによる公開準備を始めた。

得られたアオイガイゲノムは全長で 1G bp 程度と推定され、これまで知られている頭足類ゲノムの中で最小のゲノムをもつことが明らかとなった。このドラフトゲノムは公開されている頭足類ゲノムより高い N50 をもつ。他の頭足類ゲノムとのサイズの差は反復配列が少ないことに起因すると推定される。これをもとに頭足類で見出すことの難しかった染色体上で縦列重複した遺伝子クラスターを見出すことができた。タコ類で初報告となる Hox クラスターや ParaHox クラスターが発見された。カイダコ類がもつ特徴的な形態に関連すると考えられる光反射遺伝子であるリフレクチンについても重複遺伝子のクラスターが見出され、その分子進化過程について精査を行っている。さらにプロテオームから得られた SMP 遺伝子を遺伝子モデルにマップし、全ゲノム中の貝殻タンパク質のロケーションを推定し、比較ゲノム解析を行っている。構築したアオイガイのドラフトゲノムについて、ゲノムビューワーによる公開準備を行い、別途原著論文を作成している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirota Kazuki, Yoshida Masa-aki, Itoh Takehiko, Toyoda Atsushi, Setiamarga Davin H. E.	4. 巻 6
2. 論文標題 The full mitochondrial genome sequence of the greater argonaut <i>Argonauta argo</i> (Cephalopoda, Argonautoidea) and its phylogenetic position in Octopodiformes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mitochondrial DNA Part B	6. 最初と最後の頁 1451 ~ 1453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23802359.2021.1911710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Setiamarga Davin H. E., Hirota Kazuki, Yoshida Masa-aki, Takeda Yusuke, Kito Keiji, Shimizu Keisuke, Isowa Yukinobu, Ikeo Kazuho, Sasaki Takenori, Endo Kazuyoshi	4. 巻 2020.11.14.382804
2. 論文標題 Hydrophilic Shell Matrix Proteins of <i>Nautilus pompilius</i> and The Identification of a Core Set of Conchiferan Domains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.11.14.382804	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 9件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Masa-aki Yoshida
2. 発表標題 Acquisition of Argonate pelagic life style on the octopus genetic background
3. 学会等名 第2回イカ・タコ研究会 (東京大学大気海洋研究所共同研究集会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Setiamarga DHE
2. 発表標題 Natural History Research on Biodiversity Using Molecular Biology And Genomic Approaches
3. 学会等名 The 2019 International Conference on Biotechnology and Life Sciences (IC-BIOLIS 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Setiamarga DHE
2. 発表標題 Unraveling the evolution of Octopodiformes using recent methods in genomics: Mitochondrial phylogenomics and the evolution of shell matrix proteins.
3. 学会等名 第2回イカ・タコ研究会(東京大学大気海洋研究所共同研究集会)(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Setiamarga DHE
2. 発表標題 The phylogeny and shell evolution of Octobranchia explored using molecular and genomics methods
3. 学会等名 LIPI Seminar Series招待講演; インドネシア科学院海洋科学研究センター(LIPI P20)(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masa-aki Yoshida, Risa Ikai, Davin H. E. Setiamarga
2. 発表標題 Reacquisition of Argonaute outer shells on the octopus genetic background
3. 学会等名 Cephalopod International Advisory Council Conference 2018(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田真明
2. 発表標題 タコブネの殻にみる進化的形質の喪失と再獲得の遺伝的基盤
3. 学会等名 第一回イカ・タコ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirota K, Yoshida M, Isowa Y, Kito K, Imoto S, Yonemitsu H, Setiamarga DHE*.
2. 発表標題 Proteomics analysis of the shell matrix protein in the paper nautilus genus Argonauta: A preliminary report
3. 学会等名 The 4th International Biology Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Setiamarga DHE
2. 発表標題 Molecular Biology and Genomics Approaches to Study Marine Biodiversity
3. 学会等名 Fisheries and Marine Products Biotechnology Research Center, Ministry of Maritime Affairs and Fisheries of the Republic of Indonesia (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Setiamarga DHE
2. 発表標題 Mitochondrial phylogenomics and the evolution of shell matrix proteins in Octopods
3. 学会等名 Special Lecture in Dental and Biomedical Science, Department of Dental Medicine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Setiamarga DHE
2. 発表標題 ゲノム科学的アプローチから見る頭足類の系統進化と貝殻進化
3. 学会等名 特別招待セミナー, 中央水産研究所 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Setiamarga DHE
2. 発表標題 DNA-based Studies in Natural History Research of Marine Biodiversity
3. 学会等名 International Conference on the Ocean and Earth Sciences (ICOES) 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Setiamarga DHE
2. 発表標題 DNA-based Studies in Natural History Research of Marine Biodiversity
3. 学会等名 5th International Biology Conference (IBOC) 2020: Ecofarming, Ecotourism & Green Management for Sustainability of Natural Resources (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masa-aki Yoshida
2. 発表標題 Argonaute genome: Adaptation of pelagic lifestyle on the octopus
3. 学会等名 The Symposium of Recent Activity in Marine Genome Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤成祥, 吉田真明・広橋教貴, 岩田容子 他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 生物研究社	5. 総ページ数 400
3. 書名 『海洋と生物』 AQUABIOLGY 253号 (Vol.43-No.2)	

〔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	スティアマルガ デフィン (Setiamarga Davin) (50625259)	和歌山工業高等専門学校・生物応用化学科・准教授 (54701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 第2回イカ・タコ研究会(東京大学大気海洋研究所共同研究集会)	開催年 2019年～2019年
------------------------------------------	--------------------

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------