

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06800

研究課題名(和文) 甲殻類生物の背甲の進化起源に関する古典的仮説の分子発生生物学的検証

研究課題名(英文) Molecular and developmental analyses of the classical hypothesis on the evolutionary origin of the crustacean carapace

研究代表者

志賀 靖弘 (Shiga, Yasuhiro)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：00277253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は「背甲は甲殻類の系統における原始的な構造物である」という、1909年に W.T. Calman によって提唱されてから100年以上経った現在でも結論が出ていない仮説を、オオミジンコをはじめとした複数種の甲殻類生物における「背甲形成関連遺伝子」の分子発生生物学的解析により、総合的に検証することを目的とした。

本研究により、アメリカカブトエビの背甲形成の分子機構が、オオミジンコのそれと共通している可能性が高いこと、ブラインシュリンプが「背甲を持たない」ことと、いくつかの背甲形成関連遺伝子の発現様式が関連していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生物の形態形成機構の進化を分子発生生物学的な見地から研究する「進化発生生物学(EvoDevo)」が重要な研究分野となってきた。提唱されてから100年以上経った現在でも結論が出ていない「甲殻類の背甲の進化起源」を探る本研究課題からは、主題である「背甲の進化の謎」に対する解答に留まらず、節足動物全体の形態多様性の成立と形態形成遺伝子群の分子進化との関係などに関して、学術的に意義の大きい、新たな知見が得られつつある。またこれらの知見は、エビやカニ等の食用甲殻類資源の保全や改良、食物連鎖を通じた生態系の回復や保全など、他の分野の研究にも寄与することが大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to comprehensively investigate a hypothesis that has remained unresolved for over 100 years since its proposal by W.T. Calman in 1909, which states that the carapace is a primitive structure in the evolutionary lineage of crustaceans. The analyses focused on the molecular developmental biology of "carapace formation-related genes" in various species of crustaceans, including the water flea *Daphnia*, *Triops*, *Artemia*, and *Procambarus*.

My data suggested that the molecular mechanisms of carapace formation in the American horseshoe crab *Triops* are highly likely to be shared with those of the water flea, *Daphnia*. In addition, the absence of a carapace in the brine shrimp, *Artemia* appeared to be associated with the expression patterns of several carapace formation-related genes.

研究分野：進化発生生物学

キーワード：甲殻類 背甲 進化 形態形成遺伝子 CRISPR/Cas9 RNAi 発現解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

甲殻亜門に属する生物(以下「甲殻類」)は現在までに 60,000 種類以上が知られているが、多くの系統の背側において、2つの上皮細胞層からなる平板状の構造物である『背甲』が形成される。背甲は、種によって体躯部分の保護、卵室の形成、呼吸、濾過など様々な機能を持つことが知られており、これらを反映して背甲自体の形態にも大きな多様性が見られる。

(1)-1 甲殻類の背甲の進化に関する『謎』

上記したような形態的・機能的多様性は多くの研究者の興味を引きつけ、「甲殻類の背甲の進化」という問題は長年に渡り数多くの研究や論争の源となってきた。特にスコットランドの動物学者 William Thomas Calman が、1909 年出版の自著「A Treatise on Zoology vol. 7 Appendiculata: Crustacea」の中で述べた「背甲は甲殻類の系統における原始的な構造物である」という「背甲の進化起源」に関する有名な仮説は、その提唱から 1 世紀以上経った現在においてもその真偽に関する結論が出ていない、生物学研究の大きな問題の一つであった。

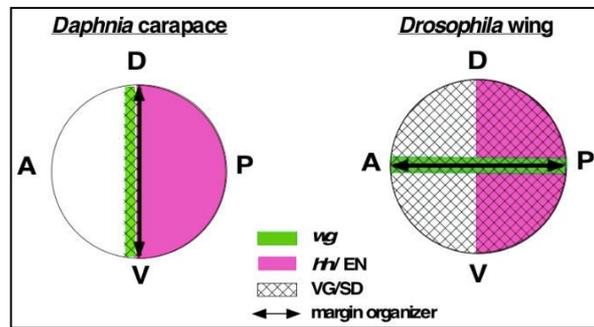
甲殻類の背甲は、頭部背側後縁の外皮が折りたたまれ、その周縁部から細胞 2 層が平面状に伸張することで形成されるのが基本となるが、この系統の頭背部領域の体節構造は、進化の過程で融合や修飾により極めて多様化している。このため (I) 背甲はこの系統における原始的な構造物なのか? という Calman の仮説の根本的な「問い」は元より、(II) 現生の甲殻類で見られる背甲は単一起源なのか? (III) 背甲は複数の「背板」が融合したものなのか? (IV) そもそも背甲はどの体節に由来する構造物なのか? など、背甲の進化に関する『謎』を、外形態を比較するという旧来の手法で明らかにすることは非常に困難であり、これらの『謎』のほとんどはほぼ「未解決」であった。

(1)-2 オオミジンコの「背甲形成関連遺伝子」の解析 (研究代表者による)

研究代表者が主な研究材料としているミジンコ類(鰓脚綱異脚目)は、背側正中線が蝶番状に折れ曲がって体を覆う「二枚貝様」の背甲を有する。このタイプの背甲はカンブリア紀初期(約 5 億 2 千万年前)に生息していた甲殻類および甲殻類様生物に既に存在していたことが化石記録上明らかであり、甲殻類系統の進化の最初期段階で現れた「新奇構造物」である可能性が示唆されている。

研究代表者は本研究課題開始前に、「背中側に形成される細胞 2 層からなる平板状構造」であるミジンコ類の背甲と昆虫類の翅の形成が、同じような分子機構でコントロールされているのではないかと仮定し、昆虫類の翅のマスター遺伝子と考えられている転写補助因子の *vestigial* (*vg*) と転写因子 *scalloped* (*sd*)、更には分泌型シグナル因子をコードする *wingless* (*wg*) のオオミジンコにおける相同遺伝子をクローン化し、背甲形成過程におけるそれらの発現様式を mRNA およびタンパク質レベルで解析した。その結果、オオミジンコの背甲形成時には、ショウジョウバエの翅形成時と同様(ただし周縁形成の体軸に対する方向は異なる / 図)に、*VG/SD/wg* の発現が線状に重なった部位で外皮細胞が折りたたまれ、その周縁部から細胞 2 層が伸張して体躯部分を覆うこと、RNA 干渉法によりこれらの遺伝子が直接的に背甲形成に関わっていることを明らかにし

た。また既に調製済のオオミジンコの全てのホメオティック(Hox)タンパク質に対する特異抗体を用いた免疫染色により、オオミジンコの背甲は、Sex Combs Reduced (SCR)が特異化する第1・第2小顎体節由来(オオミジンコにおける謎(IV)への解答)であること、背甲には融合した背板は含まれない(同じく謎(III)への解答)ことを明らかにした。



2. 研究の目的

本研究の最終目的は、(1)-1 で詳解した1世紀以上も真偽不明のままの「背甲の進化」に関する仮説に対する分子レベルでの「結論」を得ることである。研究代表者が本研究課題開始前までに得た結果は「オオミジンコの背甲は、Hox タンパク質 SCR が特異化する第1・第2小顎体節由来で、融合した背板は含まず、VG/SD/wg が共発現する周縁部で折りたたまれ伸張する」とまとめられる。もしCalmanの仮説が正しく、甲殻類(絶滅/現生種)が有する全ての背甲が単一起源を持つ原始的な構造物であるならば、背甲形成の基本的分子機構はオオミジンコ以外の現生甲殻類においても保存されている可能性が高く、これら4つの主要な遺伝子の「発現様式」はオオミジンコと同様であることが期待される。しかしながら、研究代表者より前に甲殻類の背甲形成機構を遺伝子レベルで明らかにしようという試みはほとんどされておらず、オオミジンコ以外の甲殻類における発現パターンはほぼ不明という状況であった。

W. T. Calman (1909) 「甲殻類の頭部背側後縁の外皮の折りたたみから生じる『背甲』は、恐らくこの系統における原始的な構造物である」

甲殻類の背甲の進化に関する謎【未解決】

1. 本当に原始的な構造物なのか?
2. 単一起源?
3. 融合した背板からなる?
4. どの体節由来?

→ これまでにオオミジンコ背甲形成において *Scr, vg, sd, wg* 遺伝子の関与を確認済

『オオミジンコの背甲は、SCRが特異化する第1・第2小顎体節由来で、融合した背板は含まず、VG/SD/wgが共発現する周縁部で折りたたまれ伸張する』

→ オオミジンコ以外の甲殻類生物ではどうなのか?

そこで本研究課題では、オオミジンコ(鰓脚綱異脚目:背甲あり)と同じ鰓脚綱に属するアメリカカブトエビ(鰓脚綱背甲目:背甲あり)と、甲殻亜門の中で鰓脚綱よりも大きなグループである軟甲綱に属するアメリカザリガニ(軟甲綱十脚目:背甲あり)において、オオミジンコで同定された

4つの主要な背甲形成関連遺伝子の発現を mRNA/タンパク質レベルで解析し、これらの発現パターンが上記の「枠組み」に合致するかどうかを総合的に考察することで、Calmanの仮説の真偽を検証することを目的とした。ミジンコ類という「モデル甲殻類」の研究から得られた甲殻類に特徴的な構造物である背甲形成の分子機構を、他の甲殻類生物においても解析し、甲殻類の「背甲の進化」という長年の謎を明らかにしようとするという本研究は、昆虫のモデル生物であるショウジョウバエの発生生物学研究で得られた知見を別の節足動物で解析するという従来の節足動物の進化発生生物学研究とは一線を画すものであった。またブラインシュリンプ(鰓脚綱無甲目:背甲なし)など甲殻類の一部系統では、化石記録からかつては背甲を有していたものの進化の途中で背甲を退化させた可能性が示唆されている。本研究ではブラインシュリンプにおける主要な「背甲関連遺伝子」の解析も計画しており、「背甲の進化」のみならず「背甲の退化」に関

しても重要な知見が得られる可能性が高いと考えられた。

3. 研究の方法

(3)-1 各種甲殻類における主要背甲形成遺伝子の発現パターンと機能の解析

アメリカカブトエビ、アメリカザリガニ、ブラインシュリンプにおいて、オオミジンコの主要な背甲形成関連遺伝子である *Scr*、*vg*、*sd*、*wg* 相同遺伝子の発現を、*in situ* hybridization により mRNA レベルで、また組み換え遺伝子産物に対する特異抗体を使った免疫染色によりタンパク質レベルで解析し、これらの生物の背甲でも「SCR によって特異化される体節で形成され、周縁部では VG/SD/*wg* が共発現しているか」を検証することを試みた。

(3)-2 オオミジンコにおける下流背甲形成関連遺伝子の同定と機能解析

上述した4つの背甲形成関連遺伝子はオオミジンコの背甲形成に決定的な役割を果たしていることが強く示唆されていたが、これら4つの遺伝子だけで背甲形成が成し遂げられる訳では決してなく、これらの下流標的遺伝子も背甲の形成に重要な働きをしているのは自明であった。そこで、背甲形成における下流遺伝子(群)を同定することで、オオミジンコにおける背甲形成の分子機構をより詳細に理解しようとした。またオオミジンコにおいては、CRISPR/Cas9 などによるゲノム編集法が確立しており、実際に研究代表者の研究室でも Hox 遺伝子群を始めとした多くの遺伝子機能を明らかにしつつあったので、上記したいくつかの背甲形成関連遺伝子のゲノム編集によるノックアウトを試みた。

4. 研究成果

(3)-1 各種甲殻類における主要背甲形成遺伝子の発現パターンと機能の解析

(I) アメリカカブトエビに関して

アメリカカブトエビの *wg* mRNA が、発生中の背甲の周縁部で発現していることは既に他研究室から報告されている (Nulsen and Nagy, Dev. Genes Evol. 209:340-8 (1999))。SCR は *in situ* hybridization および抗アメリカカブトエビ SCR 抗体による免疫染色により、第1・第2小顎体節から背甲まで連続して発現していることを明らかにした。SD は *in situ* hybridization および抗アメリカカブトエビ SD 抗体による免疫染色により、腹側に形成される胸脚と背甲の周縁部で発現していた。アメリカカブトエビ *vg* 遺伝子に関しては、全長 cDNA を取得し、大腸菌におけるほぼ全長の組み換え VG タンパク質の発現を確認したので、今後 VG タンパク質の精製と特異抗体の作製、免疫染色を試みる。VG の発現パターン解析の結果を待たねばならないが、これまでに得られた結果は、アメリカカブトエビの背甲形成の分子機構が、オオミジンコのそれと共通していることを示唆するものであった。

(II) ブラインシュリンプに関して

背甲を持たないブラインシュリンプにおける背甲形成関連遺伝子の発現様式からは、この生物が「進化の途中で背甲を失った」あるいは「そもそも背甲を作ることができなかった」理由を理解できる可能性がある。SCR は *in situ* hybridization および抗ブラインシュリンプ SCR 抗体による免疫染色により、第2小顎体節で強い発現が確認で

きた。この発現は背側方向にも連続して伸長するが、背側の SCR 発現は 1 あるいは 2 細胞幅のみであった。wg mRNA の発現様式を in situ hybridization により解析したところ、ブラインシュリンプ wg mRNA の発現は腹側に限局し、背側まで伸張しないことを明らかにした。SD の発現は、抗ブラインシュリンプ SD 抗体による免疫染色により、胸腹部において背腹部ほぼ全体で確認された。大腸菌で発現したブラインシュリンプ VG の組み替え C 末端側タンパク質を精製し、ラットとモルモットに免疫し、このタンパク質に対する特異抗体を得た。これら 2 種類の抗体と、過去に作製していた様々な生物の VG タンパク質の C 末端に保存されている配列を元に合成したペプチドに対する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、これら 3 種類 (計 5 ロット) の染色パターンがそれぞれ異なる結果となってしまう、どのパターンがブラインシュリンプ VG 発現のものか、あるいはどれも違うのかを判断できなかった。そこでブラインシュリンプ vg の全長 cDNA を取得し、大腸菌における全長の組み替え VG タンパク質の発現も確認した。今後は in situ hybridization と、この全長 VG タンパク質の精製と特異抗体の作製、免疫染色を試みる。こちらも VG の発現パターン解析の結果を待たねばならないが、ブラインシュリンプにおいて SCR の背側の発現が非常に狭く、細胞層を折りたたむことができそうにないこと、wg の発現が背側まで伸張しないことは、この生物が「背甲を持たない」という事実と関連しているように思われた。

(III) アメリカザリガニに関して

アメリカザリガニの背甲形成関連遺伝子の解析は現在進行中であるが、抗アメリカザリガニ SD 抗体および抗アメリカザリガニ SCR 抗体によるアメリカザリガニ胚の作製・精製は完了している。またアメリカザリガニ vg 遺伝子に関しては、全長 cDNA を取得し、大腸菌におけるほぼ全長の組み替え VG タンパク質の発現を確認した。今後は in situ hybridization と、VG タンパク質の精製と特異抗体の作製、免疫染色を試みる。またアメリカザリガニ wg の全長 cDNA をクローン化したので、wg mRNA の発現様式を in situ hybridization により解析する予定である。

(3)-2 オオミジンコにおける下流背甲形成関連遺伝子の同定と機能解析

オオミジンコ背甲形成に関わる分子機構の詳細を理解するために、上記した 4 つの主要な背甲形成関連遺伝子の下流背甲形成関連遺伝子の同定を試み、発生中のオオミジンコ背甲において特異的なパターンで発現している、Notch Signaling Pathway の構成遺伝子群、複数の WNT 遺伝子群、*aristalless* を含む約 10 種の形態形成遺伝子群を新たに見出した。現在これら遺伝子の機能解析を進めつつある。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsumoto, H., Miyagi, H., Nakamura, N., Shiga, Y., Ohta, T., Fujiwara, S., Tsuzuki, M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Carbonic anhydrase inhibitor induces otic hair cell apoptosis via an intrinsic pathway and ER stress in zebrafish larvae.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicol Rep.	6. 最初と最後の頁 1937-1947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxrep.2021.11.018	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 -

1. 著者名 Shiga, Y	4. 巻 54
2. 論文標題 Molecular Evolutionary Biology of Carapace Formation in Crustaceans.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn.	6. 最初と最後の頁 17-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 志賀靖弘
2. 発表標題 甲殻類生物の背甲形成関連遺伝子群の分子進化的解析
3. 学会等名 第57回日本節足動物発生学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大澤郁摩、時下進一、志賀靖弘
2. 発表標題 CRISPR/Cas9によるオオミジンコDaphnia magnaのHox遺伝子Deformedの機能解析
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下高廣、藤井研吾、藤藪千尋、酒井佳寿美、志賀靖弘
2. 発表標題 赤色光感受性非視覚オプシンの解析
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志賀靖弘
2. 発表標題 CRISPR/Cas9-mediated functional analyses of Hox/paraHox genes in the water flea, Daphnia magna.
3. 学会等名 日本発生物学会第53回大会 (Web要旨公開により成立)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下高廣、藤井研吾、藤藪千尋、酒井佳寿美、志賀靖弘
2. 発表標題 長波長光感受性非視覚オプシンの解析
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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0件

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
---------	---------