

令和 4 年 5 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22669

研究課題名（和文）異なる性表現を創出する発生メカニズムの進化的起源を探る

研究課題名（英文）Evo-Devo study on the origin of sex differentiation system in bilaterian

研究代表者

福田 和也（Fukuda, Kazuya）

広島大学・統合生命科学研究科（理）・助教

研究者番号：20882616

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、無腸動物ナイカイムチョウウズムシ *Praesagittifera naikaiensis* に注目し、左右相称動物の祖先的な性分化メカニズムを明らかにすることを目指した。得られた成果は主に以下である。(1) 無腸動物の生殖細胞に発現する5遺伝子を特定した。一方で、進化的に新しい左右相称動物の生殖細胞に共通して発現が見られるものの、無腸動物では発現が見られない遺伝子が存在した。(2) 無腸動物の簡易・迅速な細胞分散方法を確立した。また、細胞集団から共生藻類を除去し、無腸動物由来の細胞のみを単離する方法を確立した。これらを基に、今後シングルセル解析を実施することを目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で注目した無腸動物は、その系統的位置から様々なアプローチに基づく進化生物学研究の対象となり得る潜在性を有するが、本動物を対象にした研究は未だ少ないため、基本的な実験手法の確立や適用可能性の検討が十分になされていない。本研究では、非モデル生物ゆえの実験確立の難しさに阻まれ当初の目的を達成できなかったものの、今後本種を含む無腸動物を研究に用いる際に有益な基礎情報を重ねることができた。また、本種において生殖細胞の多能性を維持するメカニズムが他の左右相称動物と異なる可能性を得たことで、左右相称動物における性の進化研究に新たな疑問を提唱することができた。

研究成果の概要（英文）：We explored the most ancestral sex differentiation mechanisms in bilaterians using an acoela animal, *Praesagittifera naikaiensis*. We obtained the following results. (1) We detected five genes expressed in *P. naikaiensis*' germ cell, whereas some genes commonly expressed in the bilaterian's germ cell were not detected in this species. (2) We established the easy and quick method of cell dispersion for this species. Also, methods to selectively remove symbiotic algae from a mixture of algae and *P. naikaiensis* cells were established. Based on these methods, we aim to conduct a single-cell analysis in the future.

研究分野：進化生物学

キーワード：性表現 系統進化 生殖細胞 無腸動物 シングルセル解析

1. 研究開始当初の背景

左右相称動物では、雌雄異体・雌雄同体といった異なる性表現が様々な系統で進化している。性表現の違いは、個体の生活史戦略に異なる最適解をもたらすため、それらの動物がいかんして進化したのかを理解するには性表現の違いを創り出す発生メカニズムを理解することが不可欠である。一般的に、動物の性は初期発生段階に始原生殖細胞が精原細胞もしくは卵原細胞に分化することによって決定される。したがって、異なる性表現は生殖細胞の性分化に関わる分子機構が種分化の過程で変遷したことで進化したと考えられるが、具体的にどのような分子機構の変化が原因となったのかは全く分かっていない。これまで、生殖細胞の性分化に関する発生学的な研究は数種のモデル動物において進められてきた。しかし、それらの研究は左右相称動物のうち性表現に多様化が進んだ後の比較的新しい分類群の動物を主に対象としていたため、性分化機構がそもそもどのような変遷経路を辿って異なる性表現に至ったのかといった左右相称動物全体を通じた連続性については考察できていなかった。そこで、申請者は左右相称動物のうち古くに分岐した動物の性分化機構を解明し、共通祖先が有した性分化機構の原型を推定することでその後が生じた変遷や保存性を検討できると考えた。そこで、本研究では左右相称動物の最も基部で分岐したと考えられている無腸動物の一種ナカイムチョウウズムシ *Praesagittifera naikaiensis* の生殖細胞に注目し、1細胞ごとの遺伝子発現を網羅的に解析(シングルセル解析)することで、生殖細胞が精原細胞・卵原細胞へ分化する過程における遺伝子発現動態の全容を明らかにし、左右相称動物において祖先的な性分化メカニズムの解明とその後の系統における性表現の多様化過程を理解することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では無腸動物ナカイムチョウウズムシを対象に、性分化前の生殖細胞、および生殖細胞への分化能を有する幹細胞が精原細胞・卵原細胞へ分化する過程で生じる遺伝子発現の変化を単一細胞レベルで明らかにし、左右相称動物において祖先的な性分化機構を理解することを目的とした。その後、雌雄異体・雌雄同体の左右相称動物種との比較を行い、祖先型からどのような性分化機構の変遷が生じたのかを検討することを目指した。

3. 研究の方法

本研究の完遂に向けて、以下3つの方法を計画した。

- (1) 幹細胞および生殖細胞を特定するために必要となるマーカー遺伝子を探索する。多くの動物では、幹細胞と生殖細胞のみに共通して発現する遺伝子が複数見つかるため、それらの遺伝子のうち本種でも同様に発現するものを *in situ hybridization* 法によって選抜する。
- (2) 無腸動物の個体を構成する細胞を分散し、幹細胞・生殖細胞マーカーを発現する細胞のみを選択的に回収する。手法の概要は以下である。
 - ① 個体を迅速に単一細胞レベルに分散する方法を確立する。
 - ② 幹細胞・生殖細胞マーカーとなる細胞内 mRNA にハイブリダイズする DNA プローブを作成し、上記の細胞を選択的に蛍光標識する。
 - ③ セルソーター (FACS) を用いて、無腸動物の体内に共生する藻類を除去し、さらに蛍光標識に基づいて幹細胞・生殖細胞のみを回収する。

その後、回収した細胞が有する mRNA に、細胞ごとに異なる組み合わせのタグ配列を付加し、シングルセルトランスクリプトーム解析を行う。これにより、幹細胞・精原細胞・卵原細胞がそれぞれどのような遺伝子発現プロファイルを有するのかを明らかにするとともに、生殖細胞が性分化する過程でどのように遺伝子発現プロファイルが推移するのかを描写し、性分化に関与する一連の分子機構を推定する。

4. 研究成果

本研究では、期間内に研究計画の中心となるシングルセル解析に細胞を供するに至らなかった。その理由は、これまでに無腸動物を対象にした細胞生物学的実験、および分子生物学実験の前例が少ないため、まず他の動物種で確立されているプロトコルを適用して実験を行ったが、多くの手段が適用できず、実用的な実験条件を設定するまでに時間を費やしたことによる。また、申請者が任期付雇用であり、年度末に研究機関を移籍したため、研究の大詰めとなる時期に十分な時間を研究に充当することができなかったことも、計画の未完に繋がったと考える。

一方で、本研究により、今後本計画の完遂を目指す上で有益な結果を得ることができた。また、

いくつかの実験手法を無腸動物に適用し、実験方法を確立した。主な成果は以下である。番号は「3. 研究の方法」と対応する。

- (1) 左右相称動物の生殖細胞・幹細胞において一般的に発現することが知られている 8 つの遺伝子をクローニングした。無腸動物に対する whole mount in situ hybridization 法の実験条件を最適化して、8 遺伝子について個体内での発現パターンを調べたところ、5 遺伝子については生殖細胞・幹細胞特異的な発現が見られたものの、3 遺伝子については他の左右相称動物と異なり発現が見られなかった。これは、無腸動物の生殖細胞・幹細胞の維持・分化メカニズムが他の左右相称動物と異なる可能性を示すものであり、引き続き調査を続けている。また、上記遺伝子について定量 PCR (qPCR) によって発現量の定量を試みたが、一般的なプロトコルでは再現性のある結果を得られなかった。これは、個体内に共生する藻類による影響と考えられるため、現在条件の改良を行っている。
- (2) 組織（もしくは個体）を単一細胞に分散する際、多くの場合酵素処理を行うが、シングルセル解析に供することを考えた場合、細胞を損壊する危険性があるだけでなく、時間がかかるため RNA の品質が低下する可能性がある。そこで、条件検討を重ねたのち、酵素処理を行わずに簡便・迅速に個体を単一細胞に分散する方法を確立した。この方法を用いて分散させた細胞に対し、上記 (whole mount in situ hybridization 法) で発現が確認できた生殖細胞マーカーとなる細胞内 mRNA へ蛍光プローブをハイブリダイズさせ、その結果を確認したところ、顕微鏡下では細胞の蛍光を確認できなかったものの、セルソーターではネガティブな細胞との微弱な蛍光強度の差を検出した。ソーティングに実用するには、より蛍光シグナルの S/N 比を向上させる必要があったが、様々な条件検討を重ねたものの改善することができなかった。一方で、無腸動物の体内に共生する藻類由来の細胞は、葉緑体の自家蛍光に基づいて無腸動物の細胞と分離することができた。以上のことから、無腸動物に対してシングルセル解析を含む単一細胞レベルの実験を行おうとする場合、現状としては細胞分散後にセルソーターに供し、共生藻類を除去して下流の分析に利用する(目的細胞の濃縮は行わない)ことが現実的な方法と結論した。

本研究で注目した無腸動物は、その系統的位置から様々なアプローチに基づく進化生物学研究の対象となり得る潜在性を有するが、本動物を対象にした研究は未だ少ないため、基本的な実験手法の確立や適用可能性の検討が十分になされていない。本研究では、非モデル生物ゆえの実験確立の難しさに阻まれ当初の目的を達成できなかったものの、今後無腸動物を対象とする細胞・分子生物学実験を行う上で非常に有益となる基礎情報を得ることができた。今後は、本研究で得られた成果をもとにシングルセル解析を行い、当初の計画の完遂を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 福田和也, 有本飛鳥, 田川訓史	4. 巻 4
2. 論文標題 シングルセル解析の進歩と進化発生生物学研究における活用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 759-762
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 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------