

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：24405

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19295

研究課題名（和文）ヘビ特有の体軸伸長を誘導する進化的に獲得した分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the evolutionarily acquired molecular mechanisms that induce the unique axial elongation in snakes

研究代表者

鈴木 孝幸（Suzuki, Takayuki）

大阪公立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40451629

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）：オルソログ解析により、シマヘビ、マウス、ニワトリ、スッポンのオルソログを Ortho Finderを用いて19557個特定した。そのうち4種で保存されているものは7714個であった。Gene Ontology解析の結果、転写調節や器官発生に関わる遺伝子が多く含まれていた。RNA-seqデータを解析し、各種のゲノムにリードをマッピングし、その後、発現変動解析を行った。特にシマヘビと他三種で発現変動していた遺伝子を明らかにし、ヘビの尻尾が形成される場所において高発現する遺伝子を特定した。この中から発現量と胴体の長さに正の相関がある遺伝子を複数発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘビは手足の退化や非常に多くの脊椎骨を持つなど、他の脊椎動物とは異なる特異な形態的特徴を持つ。このため進化学の分野において極めて魅力的な研究対象である。ヘビの細くて長い体の特徴は、ヘビの形態の中でも最も特徴的な形態要素の一つとして、科学者だけではなく昔から人類の興味の対象であった。本研究では、ヘビと他の生物種との遺伝子発現の比較解析からヘビで長い胴体を作る候補遺伝子を複数同定することに成功した。これまでヘビの長い胴体を作る原因遺伝子は全く明らかにされていないため、本研究はヘビの進化の謎の解明に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Snakes possess unique morphological features distinct from other vertebrates, such as the degeneration of limbs and an exceptionally high number of vertebrae. These characteristics make them highly intriguing subjects for evolutionary studies. The slender and elongated body of snakes is one of their most distinctive morphological traits, capturing the interest of not only scientists but also humanity throughout history. In this study, we successfully identified several candidate genes responsible for the elongated body of snakes through comparative gene expression analysis between snakes and other species. Since the genetic causes behind the long bodies of snakes have remained completely unknown until now, this research is expected to significantly contribute to unraveling the mysteries of snake evolution.

研究分野：進化発生学

キーワード：進化 発生学 脊椎骨 ヘビ 次世代シーケンズ

## 1. 研究開始当初の背景

ヘビは手足の退化や非常に多くの脊椎骨を持つなど、他の脊椎動物とは異なる特異な形態的特徴を持つ。このため進化発生学の分野において極めて魅力的な研究対象である。特に細くて長い体の特徴は、ヘビの形態の中でも最も特徴的な形態要素の一つとして、科学者だけではなく昔から人類の興味の対象であった。ヘビの細くて長いと言われる体の形は、胸腰椎の脊椎数が多いことに起因する。シマヘビではおよそ 200 個の胸腰椎が存在する。胸腰椎は前肢と後肢の間の脊椎骨であるが、手足が退化する前のテトラポドピスの化石を見る限り、既に胸腰椎の数が多いことから、ヘビは手足を失う前からすでに現存するヘビと同じく胸腰椎の数が増えていたことが分かる。脊椎骨は発生中の中軸中胚葉に形成される体節から形成される。この体節が多く作られるほど、その後形成される脊椎骨の数も多くなる。したがって、ヘビの体が長い謎を解明するためには、発生期にヘビ特異的に体節数が多く作られるメカニズムを解明する必要がある。

## 2. 研究の目的

近年、コブラやパイソンなどの卵生ヘビの産卵後の有精卵を用いて、孵化までの形態的特徴の変化が複数報告されている(Jackson 2002, Boughner *et al.*, 2007)。しかしながら産卵直後の胚はすでに体節が 200 個程度形成されてしまっている。このためヘビ特異的な体節形成メカニズムの全容を解明するためには、産卵前のヘビ初期胚を親個体から取り出して調べる必要がある。我々は日本固有種であるシマヘビの親個体から胚の採取を行い、原腸陥入期から産卵直前までのシマヘビ胚の発生ステージ表を作成した。また産卵前の未熟な有精卵を体外培養し、発生を進める手法も開発した (Matsubara *et al.*, 2017)。そしてこのような準備段階を経て集めたシマヘビの初期胚を観察した結果、ファイロティピック段階のシマヘビ胚において、体軸の後端に位置する中軸幹細胞の数が他の脊椎動物胚と比べて異常なほど多く、組織が肥厚していることを発見した。中軸幹細胞は、初期胚の体軸の後端に存在する原腸から、細胞が腹側に陥入した部分に存在し、細胞が分裂を繰り返しながら前側に細胞を供給することで、体節の元となる中軸中胚葉の細胞を生み出す。これらの知見から、本研究では我々が発見したヘビの初期胚に見られる特異な中軸幹細胞の分子生物学的特性を解明することにより、ヘビ特有の体軸の伸長を誘導する進化的に獲得された原因遺伝子を探索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

他の脊椎動物と形態的に似ているファイロタイプ期のシマヘビ胚で、脊椎骨の原器である体節を生み出す中軸幹細胞の細胞数が増加している原因を探るために、シマヘビ初期胚の中軸幹細胞 (PSM) を微細操作により単離した。比較対象として、中軸幹細胞数が少ないスッポン胚、ニワトリ胚、マウス胚において同様に、中軸幹細胞を単離した。これらの4種についてトランスクリプトーム解析を行った。スッポン、ニワトリ、シマヘビの順番で遺伝子の発現量が多く・少なくなっているもの(発現変動遺伝子)を選定し、中軸幹細胞の増加を誘導する候補遺伝子を得た。

## 4. 研究成果

発現変動解析に用いるオルソログは基礎生物学研究所との連携研究によりシマヘビ、マウス、ニワトリ、スッポンのオルソログを *Oltho finder* というソフトを用いて 19557 個特定した。この中で、4 種で 1 つずつ保存されているオルソログは 7714 個存在した。これらのオルソログにどのような機能の遺伝子が主に含まれているかを調べるため GO を割り当てた (Fig.1)。その結果 66092 個の GO が割り当てられ、この内、最も多く検出された GO から順に 10 つ挙げると、

positive regulation of transcription by RNA polymerase II、negative regulation of transcription by RNA polymerase II、multicellular organism development、regulation of transcription, DNA-templated、signal transduction、cell differentiation、positive regulation of transcription, DNA-templated、protein phosphorylation、protein transport であった(Fig.1)。この結果から、解析に用いる遺伝子のオルソログには転写調節と器官発生に関わる遺伝子が多く含まれていることがわかった。

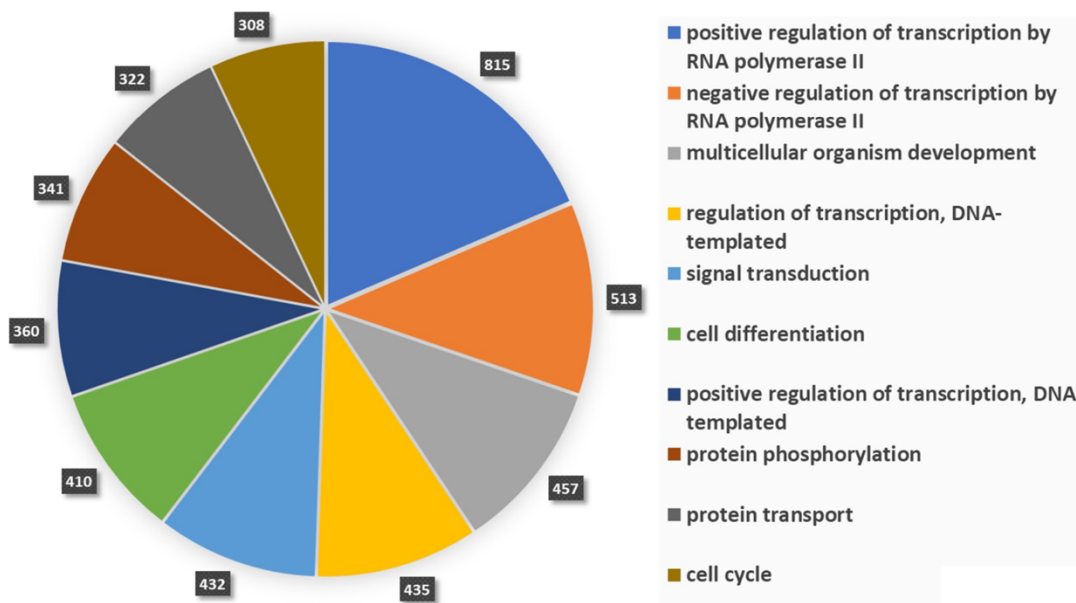


Fig. 1 オルソログの GO 解析の結果

RNA-seq はペアエンドリードで解読した。得られた RNA リードは、cutadapt でアダプター配列を除去し、QV 値が 2 以下は取り除いた。その結果、ss. (体節数) 19 のシマヘビの PSM では、リード 1 が 36275106 個、リード 2 が 36275106 個、体節ではリード 1 が 14547447 個、リード 2 が 14547447 個得られた。ss.45 のシマヘビの PSM では、リード 1 が 36206047 個、リード 2 が 36206047 個、体節では、リード 1 が 14482623 個、リード 2 が 14482623 個得られた。ss.46 ~80 のシマヘビの PSM では、リード 1 が 34895329 個、リード 2 が 34895329 個、体節ではリード 1 が 14072603 個、リード 2 が 14072603 個得られた。ss.6~14 のマウスの PSM ではリード 1 が 35383227 個、リード 2 が 35383227 個、体節ではリード 1 が 11547382 個、リード 2 が 11547382 個得られた。ss.9~10 ニワトリの PSM ではリード 1 が 46249652 個、リード 2 が 46249652 個、体節ではリード 1 が 11309665 個、リード 2 が 11309665 個得られた。ss.6~10 のスッポンの PSM ではリード 1 が 45761401 個、リード 2 が 45761401 個、体節ではリード 1 が 14762994 個、リード 2 が 14762994 個得られた。これら RNA リードは hisat2 を用いて、各種のゲノムにリードをマッピングした。マッピングされたリードの割合を示す Alignment rate は、ss.19 のシマヘビの PSM が 85.96%、体節が 84.6% であった。ss.45 のシマヘビでは、PSM が 86.42%、体節が 86.5% であった。ss. 46 ~ 80 のシマヘビでは、PSM が 87.12%、体節が 87.07%であった。ss.6 ~ 14 のマウスでは、PSM が 96.54%、体節が 96.60%であった。ss.9 ~ 10 のニワトリでは、PSM が 91.66%、体節が 93.10% であった。ss.6~10 のスッポンでは、PSM が 87.48%、体節が 88.84% であった。マッピングされたリードは stingtie を用いてカウントし、後方 PSM と体節の遺伝子発現量を並べてマトリクスを作製した。

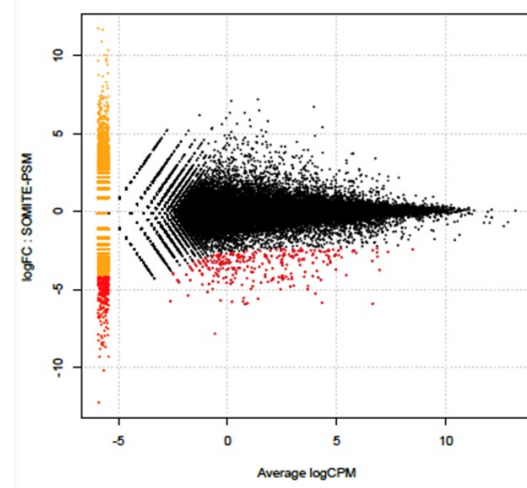
一般的な発現変動解析は同種の組織に発現する遺伝子で行われる。しかし、異種間の RNAseq の発現変動解析は遺伝子重複のない 1:1 オルソログを用いた例がある (David et al.,2011)。そこで、同定した 7722 個のオルソログを用いて、シマヘビ、マウス、ニワトリ、スッポンの後方 PSM

の発現変動解析を行った。その結果、ss.19 のシマヘビと他三種で発現変動していた遺伝子は 839 個(FDR < 0.05)であった。また、ss.46 のシマヘビと他三種で発現変動していた遺伝子は 862 個(FDR < 0.05)であり、ss.46-80 のシマヘビと他三種で発現変動していた遺伝子は 850 個(FDR < 0.05)であった。

これらの結果から、さらに遺伝子を限定し、PSM で高発現する遺伝子を明らかにするために、4 種別々に、体節と後方 PSM で発現変動解析を行った。その結果から MAplot を作製した。シマヘビでは ss. 19(Fig.2) 、 ss. 45 、 ss. 46~80 でそれぞれ 523 個、620 個、474 個が体節と比較して PSM で有意に高発現であった。このうち、7722 オルソログに含まれるのは、74 個、97 個、70 個であった。また同様に、マウス、ニワトリ、スッポンでは、それぞれ、458 個、256 個、603 個が体節と比較して PSM で有意に高発現であった。このうちオルソログに含まれるのは、マウスが 113 個、ニワトリ 40 個、スッポン 194 個であった。PSM 高発現遺伝子として、シマヘビ ss19 で有意に検出された遺伝子と他 3 種で有意に検出された遺伝子を足し合わせると、同じ遺伝子の重複を除いてシマヘビ ss.19 では 421 個、ss. 45 では 444 個、ss. 46 ~ 80 では 417 個であり、これを PSM 高発現遺伝子とした。

前述の異種間での発現変動解析から、ss19 の時に 839 個、ss45 の時に 862 個、ss46~80 の時に 850 個の遺伝子が異種間で、有意に発現量が変化していた。この内、PSM 高発現遺伝子は、ss19 の時に 134 個、ss45 の時に 134 個、ss46~80 の時に 125 個含まれることがわかった。この有意に検出された PSM 高発現の中で、胴体の長さや発現量に相関のある遺伝子を、TMM method で補正した RNA リード数(遺伝子発現量)と共に表に示した。その結果、胴体の長さや発現量に正の相関があった遺伝子を 8 個発見した。

今後はマウス胚・ニワトリ胚を用いて候補遺伝子の発現量を操作し、マウス胚・ニワトリ胚でヘビ様の形態を再現できるかを検証する。これにより本研究で明らかとなったヘビで長い胴体を作る候補遺伝子を機能的に検証していきたい。これまでヘビの長い胴体を作る原因遺伝子は全く明らかにされていないため、本研究はヘビの進化の解明に大きく貢献すると考えられる。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Lancman Joseph J., Hasso Sean M., Suzuki Takayuki, Kherdjemil Yacine, Kmita Marie, Ferris Andrea, Dong P. Duc S., Ros Marian A., Fallon John F.	4. 巻 251
2. 論文標題 Downregulation of <i>Grem1</i> expression in the distal limb mesoderm is a necessary precondition for phalanx development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.431	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 該当する
1. 著者名 Suzuki Takayuki, Fallon John F.	4. 巻 250
2. 論文標題 The dynamic spatial and temporal relationships between the phalanx forming region and the interdigits determine digit identity in the chick limb autopod	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1318 ~ 1329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.323	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 該当する
1. 著者名 Ishishita Satoshi, Kitahara Shumpei, Takahashi Mayuko, Iwasaki Sakura, Tatsumoto Shoji, Hara Izumi, Kaneko Yoshiki, Kinoshita Keiji, Yamaguchi Katsushi, Harada Akihito, Ohmori Yasushige, Ohkawa Yasuyuki, Go Yasuhiro, Shigenobu Shuji, Matsuda Yoichi, Suzuki Takayuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Uterus-specific transcriptional regulation underlies eggshell pigment production in Japanese quail	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0265008 ~ 0265008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0265008	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 -
1. 著者名 Suzuki Takayuki	4. 巻 99
2. 論文標題 Current research on mechanisms of limb bud development, and challenges for the next decade	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.23-00287	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 -

1. 著者名 Chen Yi-Chen, Saito Daisuke, Suzuki Takayuki, Takemoto Tatsuya	4. 巻 150
2. 論文標題 An inducible germ cell ablation chicken model for high-grade germline chimeras	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.202079	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 -

1. 著者名 Morishita Yoshihiro, Lee Sang-Woo, Suzuki Takayuki, Yokoyama Hitoshi, Kamei Yasuhiro, Tamura Koji, Kawasumi-Kita Aiko	4. 巻 14
2. 論文標題 An archetype and scaling of developmental tissue dynamics across species	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-43902-y	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 -

1. 著者名 Saito Seiji, Kanazawa Utsugi, Tatsumi Ayana, Iida Atsuo, Takemoto Tatsuya, Suzuki Takayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Functional analysis of a first hindlimb positioning enhancer via Gdf11 expression	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2024.1302141	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4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鈴木孝幸
2. 発表標題 四肢動物における後肢の位置の多様性を生み出した分子基盤
3. 学会等名 日本解剖学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木孝幸
2. 発表標題 ニワトリ・ウズラの属間F1雑種胚を用いたトランスクリプトーム解析による種間の遺伝子発現量の違いの検出
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木孝幸
2. 発表標題 四肢動物における後肢の位置の多様性を生み出した分子基盤
3. 学会等名 日本動物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 晋、鈴木孝幸
2. 発表標題 ヘビで進化的に獲得された体軸伸長の分子メカニズムの探索
3. 学会等名 NGS EXPO 2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪公立大学理学研究科生物学専攻 発生生物学研究室  
<https://www.omu.ac.jp/sci/biol-dbiol/>

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