

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570198

研究課題名（和文） 発生調節遺伝子ネットワーク改編の機構

研究課題名（英文） Mechanism of the reorganization of developmental gene regulatory network

研究代表者

美濃川 拓哉（MINOKAWA TAKUYA）

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：60400305

研究成果の概要（和文）：

本研究は動物進化過程における GRN 改編の分子機構の解明を目指している。研究対象としてウニ類を中心とした歩帯動物をモデルに選択した。中でも、ヨツアナカシパンの頂器官における *tbr* 発現に特に注目している。ヨツアナカシパンは頂器官での *tbr* 発現をもつ、きわめて例外的なウニであることを確かめた。また、ヨツアナカシパン *tbr* 遺伝子 (*Pjtbr*) のシス解析によって、コード領域上流 1kb のゲノム配列には、胚の広い領域でリポーター遺伝子の転写を活性化させる能力があることも明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of the present research is to elucidate the molecular mechanism responsible for the gene regulatory network (GRN) reorganization during animal evolution. Various species belonging to the ambulacraria have been used as model species. Especially, we are interested in *tbr* expression in the apical organ of the sand dollar *Peronella japonica*. We confirmed that *P. japonica* is an exceptional echinoid species that possesses *tbr* expression in the apical organ. The *cis*-regulatory analysis for *P. japonica tbr* revealed that approximately 1 kb upstream sequence of the coding region suffices to activate transcription of a reporter gene in the broad regions containing mesoderm and ectoderm.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：進化発生

1. 研究開始当初の背景

個体発生過程は多数の発生調節遺伝子の相互作用を基礎とした遺伝子ネットワーク (GRN) によって調節されている。相同な器官・構造は、相同な GRN によって形成されるが、相同 GRN を構成する発生調節遺伝子の種

類や役割は完全に同一というわけではない。相同 GRN の種間比較研究から、進化の過程で GRN における特定の発生調節遺伝子の役割が変化したことがあきらかになった。このような GRN 改編をもたらす分子基盤の理解は、発生メカニズムの進化を理解するうえで重要

である。われわれは棘皮動物の幼生神経系 (Apical organ、以下、頂器官) と、神経系形成に関与する遺伝子 *tbrain* (以下 *tbr*) に注目し、器官形成 GRN における発生調節遺伝子の役割の進化と、GRN 改編の分子機構解明を目指し、本研究を開始した。

tbr はさまざまな発生プロセスに関与する転写因子遺伝子であり、多くの左右相称動物で神経系形成に関与する。新口動物は脊索動物、半索動物、棘皮動物の 3 門からなるが、このうち脊索動物では *tbr* は中枢神経系で、半索動物ギボシムシでは幼生神経系の主要部分 (頂器官) で発現する。一方、棘皮動物の *tbr* 発現パターンは脊索・半索動物のそれとは大きく異なっている。棘皮動物は有柄類 (ウミユリ類) と遊在類 (ウニ類、ヒトデ類、ナマコ類、クモヒトデ類) の 2 グループに分けられる。本研究開始直前までに報告された遊在類 6 種 (ウニ 3 種、ヒトデ 2 種、ナマコ 1 種) の *tbr* 発現パターン解析の結果、頂器官およびそれに相当する器官における特異的な *tbr* 発現はどの種でも確認されなかった。神経系での *tbr* 発現は左右相称動物における祖先型形質であると考えられているので、棘皮動物の祖先も *tbr* を頂器官で発現していたと思われる。つまり遊在類の頂器官で *tbr* 発現がみられないのは、約 5 億年前におきた遊在類の多様化以前に *tbr* 発現が失われたことを示唆している。

本研究開始の直前、申請者らは特殊化したウニ類: カシパン類 2 種から *tbr* を単離し、その発現パターンをあきらかにした (Minemura et al. 2009)。間接発生型カシパン・ハスノハカシパンの頂器官では、他の遊在類同様、*tbr* 発現はみられなかった。一方、直接発生型カシパン・ヨツアナカシパンの頂器官では *tbr* が発現していた。棘皮動物では間接発生型発生様式が祖先形であり、直接発生型発生様式は比較的最近 (数千万年前) に進化した派生型発生様式である。このことをふまえると、ヨツアナカシパンの *tbr* が頂器官で発現することは発生 GRN の進化を考える上できわめて興味深い。数千万年前に生まれた、もっとも特殊化した発生様式をとる種だけが、約 5 億年前より以前にこの系統から失われた祖先形質をもっているのだ。この奇妙な現象は、ヨツアナカシパンの頂器官で *tbr* 発現が再獲得されたことを強く示唆している。*tbr* 発現の再獲得を説明する最節約な仮説は以下のとおりである。(A) 半索動物と棘皮動物の共通祖先は頂器官で *tbr* を発現していたが、(B) 棘皮動物の多様化の過程で頂器官での発現がいったん失われ、(C)

最近になって何らかの変化でヨツアナカシパンでのみ *tbr* の発現が再獲得された。

発生 GRN から特定の発生調節遺伝子が失われる・あるいは追加されることによる GRN の改編は発生メカニズムの進化をもたらす要因のひとつとして重要だと考えられており、さまざまな動物の GRN からこのような例が報告されている。しかし本研究が対象とする *tbr* に見られるように、ひとたび GRN から失われた遺伝子が再度、もとの GRN に組み込まれるという例は特異であり、その分子基盤はわかっていない。

2. 研究の目的

本研究は前述の *tbr* 再獲得仮説の検証を通して GRN 改編分子機構の解明を目指している。特に、頂器官での *tbr* 発現が棘皮動物の進化の過程でいつ失われたのか、という問題と、ヨツアナカシパンの頂器官における *tbr* 発現の「再獲得」を可能にした転写調節メカニズムに重点をおいて研究を進めている。

3. 研究の方法

頂器官での *tbr* 発現が棘皮動物の進化過程のどの段階で失われたかを解明するために、さまざまなウニ類と、有柄類棘皮動物トリノアシの *tbr* 発現パターンの比較解析を計画した。この比較解析によって、現生棘皮動物につながる系統のどこで頂器官での *tbr* 発現が失われたかを絞り込む。

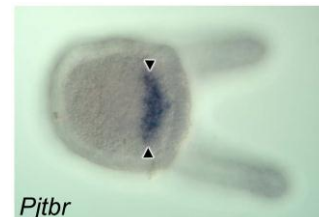
ヨツアナカシパン頂器官における *tbr* 発現の再獲得機構を解明するために、*tbr* 発現を調節するシスエレメントの同定と、その機能解析、種間比較実験を計画した。

研究の進行にともない、半索動物ギボシムシの重要性がクローズアップされてきたことから、ギボシムシの転写制御研究を視野にいたした実験動物化にも注力した。

4. 研究成果

(1) ヨツアナカシパン *tbr* 遺伝子の頂器官における発現パターンの特異性

本研究開始時に *tbr* の発現パターンが詳しく記載されていたウニ類はホンウニ目 3 種とタコノマクラ目 2 種 (うち 1 種はヨツアナカシパン) の合計 5 種に限られていた。その



ためヨツアナカシパン *tbr* 遺伝子 (以下 *Pjtbr*) の頂器官での発現 (左図の矢じ

り)が本当にウニ類で例外的であるかどうかは議論の余地があった。ホンウニ目もタコノマクラ目もともにかなり特殊化したウニであるので、その他の目では頂器官での *tbr* 発現がみられても不思議ではなかった。そこで原始的なウニ・キダリス目とアルバキア目、上記の4目とは幼生形態が異なるウニ・ブンブク目からそれぞれ1種、合計3種を選び、*tbr* 遺伝子のクローニングをおこない、それらの遺伝子の時間的・空間的発現パターンを調べた。その結果、これらの3種のウニでも、ヨツアナカシパン以外の4種のウニ類と同様、*tbr* 遺伝子の発現は予定中・内胚葉領域に限定されており、頂器官予定領域に限定された発現は観察されなかった(下図はキダリスの *tbr* 遺伝子

Pbtbr の例)。キダリス目、アルバキア目、ブンブク目、ホンウニ目、タコノマクラ目の5目は約2億年前に存在した共通祖先に由来し、その後の分散

によって多様化したと考えられている。すなわち、これら5目の共通祖先はすでに *tbr* の頂器官での発現を失っていて、タコノマクラ目のヨツアナカシパンへつながる系統で、この性質が再獲得されたとするシナリオが強く示唆される。

(2) 棘皮動物進化過程における頂器官 *tbr* 発現の喪失のタイミング

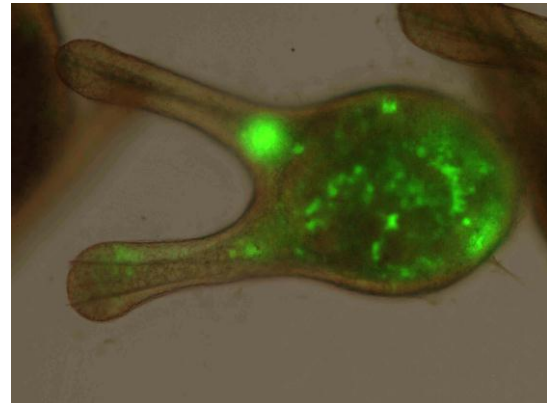
前述のウニ類における比較研究から、約2億年前のウニ類共通祖先がすでに頂器官における *tbr* 発現をもたなかったことが示唆された。先行研究によると、ナマコ1種とヒトデ2種でも *tbr* 遺伝子の頂器官特異的発現は見つかっていないので、遊在類棘皮動物(ウニ類、ヒトデ類、クモヒトデ類、ナマコ類)は共通して頂器官相当領域での *tbr* 遺伝子発現をもたなかった可能性がある。では棘皮動物全体の共通祖先は頂器官相当領域に限定された *tbr* 発現を有していたのだろうか? 遊在類の姉妹群である有柄類棘皮動物(ウミユリ類)を調べることで、棘皮動物の共通祖先が、頂器官相当領域での *tbr* 遺伝子発現を有していたかどうかを推定することが可能となる。そこで、有柄類棘皮動物ウミユリ類トリノアシからの *tbr* 相同遺伝子の単離を進めた。実験材料入手等にはウニ類とは異なる困難があり、研究の進展は必ずしも順調ではないが、現在までにトリノアシ *tbr* 遺伝子の部分断片を得ることに成功した。現在、全長



cDNA の単離を進めている。

(3) ヨツアナカシパン *tbr* 遺伝子のシスエレメント解析と機能解析

ヨツアナカシパンの *tbr* 遺伝子 (*Pjtbr*) は他のウニ類の *tbr* 遺伝子とは異なり、幼生の神経系である頂器官で発現する。頂器官での転写活性化を調節するメカニズムの理解を目指し、*Pjtbr* の翻訳開始点より上流約1 kbまでのゲノムDNA領域の転写調節能の解析を開始した。まず、リポーター遺伝子GFPと当該ゲノムDNAの融合遺伝子(以下 *Pjtbr*-GFP)を作成した。これをヨツアナカシパン胚に導入して、GFPの転写活性化の空間的・時間的パターンの解析を行った。*Pjtbr*-GFPを顕微注入したヨツアナカシパン受精卵を幼生まで飼育し、蛍光顕微鏡でGFP蛍光陽性細胞の分布を調べた結果、GFPの蛍光は幼生の広い領域に分布する多数の間充細胞と一部の外胚葉細胞にみられた(下図)。このことは翻訳開始点より上流



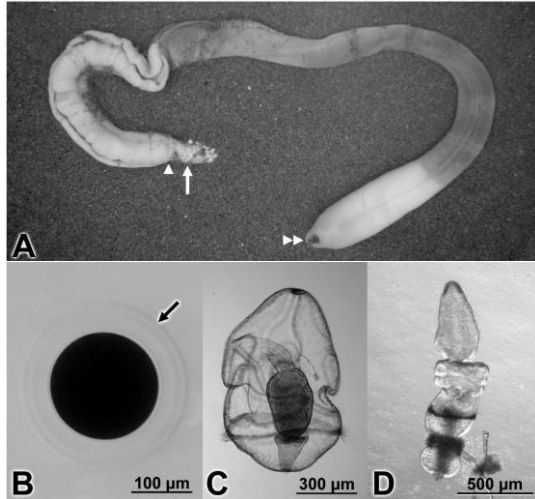
約1 kbまでの領域には転写を活性化する能力はあるが、頂器官に発現を限定する能力はないことを示している。現在、さらに広い範囲のゲノムDNA領域をターゲットとして、頂器官に発現を限定するシスエレメントの発見をめざしている。

Pjtbr の機能解析とGRNにおける役割については、現在、頂器官領域の神経細胞分布様式の検討、頂器官関連遺伝子群のクローニング、モルフォリノオリゴを用いた *tbr* 遺伝子翻訳阻害実験を進めている。

(4) 半索動物ギボシムシの実験動物化

ギボシムシは棘皮動物ともっとも近縁な門である半索動物に属する。先行研究の結果から、ギボシムシの幼生の頂器官で *tbr* 遺伝子が発現することが明らかにされている。ヨツアナカシパン *tbr* 遺伝子の頂器官での限定的転写活性化メカニズムがギボシムシのそれと同様な機構であるか、あるいは独立に進化した機構であるかを理解することは極め

て重要な問題であり、(3)の研究プロジェクトと同様に、ギボシムシの *tbr* 転写調節機能解析の重要性もクローズアップされてきた。しかしギボシムシで同様の実験系は確立されていないため、本研究の遂行上必要なギボシムシの個体発生実験系の開発を開始した。まず、我々はミサキギボシムシの生息地を陸奥湾内に発見した(阿部ら 2012、下図 A)。



さらに、人工受精や顕微注射法についても基礎的なテクニックの開発をおこない、人工受精で得た受精卵(下図 B)を極めて高率で幼生まで飼育し(下図 C)、さらに一部は変態させることに成功した(下図 D)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Yamazaki, A., Y. Kidachi and T. Minokawa (2012) “Micromere” formation and expression of endomesoderm regulatory genes during embryogenesis of the primitive echinoid *Prionocidaris baculosa*. *Development, Growth and Differentiation* 54: 566-578、査読あり

② 阿部広和、鷲尾正彦、山寄敦子、美濃川拓哉、西川輝昭 (2012) 「青森県陸奥湾における半索動物ミサキギボシムシ *Balanoglossus misakiensis* Kuwano, 1902 の初記録」 *青森自然誌研究* 17: 25-27. 査読無し

[学会発表] (計 9 件)

① 山寄敦子、美濃川拓哉 (2012) 「ウニ類における「小割球」の進化」第 9 回棘皮動物研究集会(東北大学)平成 24 年 12 月 8 日

② 山寄敦子、木立由美、美濃川拓哉 (2012) 「原始的ウニ・キダリスの間充織特異化メカニズム」日本動物学会第 83 回大阪大会(大阪大学)平成 24 年 9 月 22 日

③ Takuya Minokawa “Evolution of the micromeres in echinoids” Commemorative of 27th International Prize for Biology, 2011 (京都ガーデンパレス)平成 23 年 11 月 30 日

④ 山寄敦子、木立由美、美濃川拓哉 (2011) 「ウニ類の“祖先型”幼生骨片形成機構」日本動物学会第 82 回旭川大会(旭川市大雪クリスタルホール)平成 23 年 9 月 22 日

⑤ 美濃川拓哉、雨宮昭南 (2011) 「ウニにおける第一卵割面と幼生前後軸の関係の多様性」日本動物学会第 82 回旭川大会(旭川市大雪クリスタルホール)平成 23 年 9 月 22 日

⑥ 浦田慎、美濃川拓哉、西川輝昭、阿部広和、鷲尾正彦 (2011) 「青森湾に生息するギボシムシ類(半索動物腸鰓綱)」日本動物学会第 82 回旭川大会(旭川市大雪クリスタルホール)平成 23 年 9 月 21 日

⑦ 阿部広和、鷲尾正彦、山寄敦子、西川輝昭、美濃川拓哉 (2011) 「青森県陸奥湾で発見されたミサキギボシムシについて」日本動物学会平成 23 年度東北支部大会(弘前大学農学生命科学部)平成 23 年 7 月 30 日

⑧ 山寄敦子、美濃川拓哉 (2011) 「オカメブクとツガルウニから探る“ウニ幼生骨片形成機構”の進化」日本動物学会平成 23 年度東北支部大会(弘前大学農学生命科学部)平成 23 年 7 月 30 日

⑨ 美濃川拓哉、雨宮昭南 (2011) 「ウニ類における第一卵割面と幼生前後軸の関係: その多様性と進化」日本動物学会平成 23 年度東北支部大会(弘前大学農学生命科学部)平成 23 年 7 月 30 日

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/minokawala/b/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美濃川 拓哉 (MINOKAWA TAKUYA)

東北大学・大学院生命科学研究所・准教授
研究者番号: 60400305

(2) 研究協力者

山崎 敦子 (YAMAZAKI ATSUKO)

東北大学・大学院生命科学研究科・日本学
術振興会特別研究員 (PD)