

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23570266

研究課題名(和文) 始原的新口動物Hox/ParaHox遺伝子群の包括的研究

研究課題名(英文) Comprehensive analysis on Hox and ParaHox genes in the primitive deuterostomes

研究代表者

生田 哲朗 (IKUTA, Tetsuro)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生物多様性研究分野・技術研究員

研究者番号：80584846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：HoxおよびParaHox遺伝子群は、動物に共通する前後軸に沿った体制構築とその進化に深く関わるとされている。本研究では、始原的な新口動物である半索動物ギボシムシ類と棘皮動物ウミシダ類において、HoxおよびParaHox遺伝子群の染色体上のクラスター構造と発生期の発現パターンを解析した。その結果、これらの動物には新口動物および脊索動物へ至る体制構築機構の基本的プログラムが保存されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hox and ParaHox genes have been regarded to play a central role in anterior-posterior patterning of the animal body and its evolution. In this study, cluster organizations and developmental expression patterns of Hox and ParaHox genes in the primitive deuterostomes, the hemichordate acorn worm and the crinoid feather star were analyzed. The results suggested that these animals retain the fundamental developmental programs to gain insights into the origins of deuterostome and chordate body plans.

研究分野：進化発生生物学

キーワード：Hox/ParaHox 新口動物 進化 半索動物 棘皮動物

1. 研究開始当初の背景

ホメオボックス転写因子に属する Hox 遺伝子群と、その進化的姉妹群である ParaHox 遺伝子群は、動物に共通する前後軸に沿った体制構築とその進化に深く関わるとされている。Hox/ParaHox 遺伝子は、一般に染色体上狭い領域に集まって存在し、その染色体上の並びに従って、各遺伝子の発現領域の前方境界が前から後に並ぶ現象は空間的コリニアリティー、発現の時期が並び順に従うことは時間的コリニアリティーと呼ばれる。このような性質から、Hox/ParaHox 遺伝子は動物に共通の、前後軸に沿った体制の源である一方で、そのクラスター構造の変化や発現パターンの変化を通じて、動物界に形態的な多様性をもたらしたと考えられている。

新口動物で無脊椎動物に属するグループは、我々脊椎動物の体制構築機構の基本的プログラムを知る上で重要な分類群である。特に歩帯動物（棘皮動物と半索動物）は脊索動物と姉妹群を形成し、脊椎動物へと至る新口動物の進化を考える上で重要な位置を占める。しかし、それらの特に始原的なグループにおける、Hox/ParaHox 遺伝子群の発現、クラスター構造、機能に関する情報は無く、脊椎動物の基本体制の確立におけるこれらの遺伝子群の役割は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、始原的な新口動物にあたる半索動物のギボシムシ類と、棘皮動物のウミシダ類の Hox および ParaHox 遺伝子群のクラスターの構造、発現、機能を明らかにし、無脊椎動物から脊椎動物へと至る形態進化の理解に有用な知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒメギボシムシ (*Ptychodera flava*) において、既に Hox 遺伝子が含まれることが分かっている 4 つの BAC クローン、および ParaHox 遺伝子が含まれることが分かっている 1 つの BAC クローンについて、全塩基配列のシーケンス解読を行う。得られた配列情報から、Hox と ParaHox 遺伝子クラスターの構造を解析する。RT-PCR 法または定量 PCR 法、および whole-mount *in situ* hybridization (WISH) 法を用いて、Hox および ParaHox 遺伝子の発現パターンの解析を各発生段階で行う。siRNA あるいはアンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) の導入による機能阻害実験を行い、その効果を検証する。

(2) ニッポンウミシダ (*Oxycomanthus japonica*) の ParaHox 遺伝子について、BAC ライブラリースクリーニングを行い、該当クローンの全塩基配列のシーケンス解読を行う。得られた配列情報から、ParaHox 遺伝子クラスターの構造を解析する。RT-PCR 法または定量 PCR 法、および WISH 法を用いて、ParaHox 遺伝子の発現パターンの解析を各発

生段階で行う。

4. 研究成果

(1) ヒメギボシムシ (*P. flava*) における成果：事前に行っていた PCR によるスクリーニングから、Hox 遺伝子および ParaHox 遺伝子が含まれることが分かっていた計 5 つの BAC クローンについて、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型)『生命科学系 3 分野支援活動』“ゲノム支援”の支援を受け、キャピラリーシクエンサーによる全塩基配列のシーケンス解読を行った。得られた配列を検討した結果、ヒメギボシムシ (*P. flava*) の Hox および ParaHox 遺伝子クラスターの全貌が明らかになった。

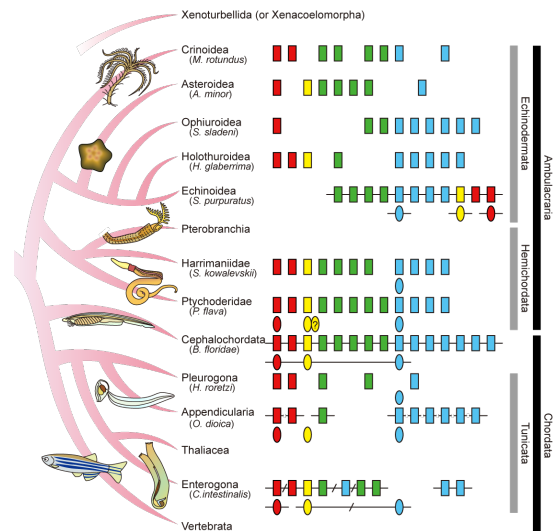


図 1. 新口動物の系統樹と、研究開始当初の Hox (四角) と ParaHox (楕円) 遺伝子群のクラスター構造に関する情報。遺伝子を貫く線は染色体上の並びを示しており、途切れた線やスラッシュはクラスター構造が壊れていることを示す。脊椎動物 (Vertebrata) 以外で当時情報があつたのは、頭索動物 (Cephalochordata) と尾索動物 (Tunicata) の一部、および棘皮動物 (Echinodermata) でも最も新しいグループであるウニ類 (Echinoidea) だけだった。

Hox 遺伝子クラスターに関しては、Hox1 から Hox9/10 に属する 9 つの遺伝子で、その並び順、転写方向に関して、始原的脊索動物である頭索動物のナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*) や脊椎動物との完全な共通性が見出された。一方、最も後方に相当するグループである Hox11/13 では、解析に使用した BAC ライブラリーには Hox11/13b が含まれていなかった。そこで当時進行中であった、ヒメギボシムシの全ゲノム解読のシーケンスデータを合わせ、さらに PCR による Gap-filling 作業を行った所、Hox11/13b を含めた後方グループの構造が明らかとなった。ヒメギボシムシの後方グループの Hox 遺伝子は、棘皮動物と同様に Hox11/13a, 11/13b, 11/13c の 3 つから構成

されていたが、並び順や転写方向は棘皮動物のものとは異なり、脊索動物との共通性も見出されず、半索動物で独自に構造が進化していることが窺われた。また、遺伝子クラスターの規模としては全体で約450kbと、ナメクジウオのものとはほぼ同じであることが分かった。

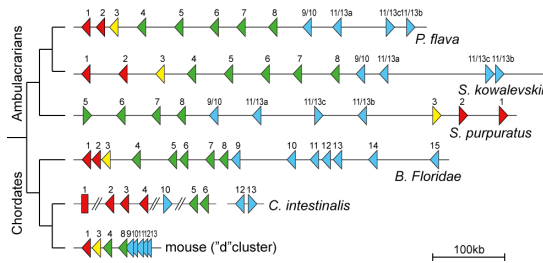


図2. 半索動物ギボシムシ類の2つのグループ(幼生期を介する間接発生タイプ:*P. flava*と幼生期を介さない直接発生タイプ:*S. kowalevskii*)におけるHox遺伝子群のクラスター構造と規模、および近縁種との系統関係。三角は各遺伝子の位置と転写の方向を表す。2種ともに後方グループでギボシムシ類独自の構造変化が認められたが、脊索動物(Chordates)との共通祖先におけるクラスター構造に近い状態が保存されていると推測された。

ParaHox遺伝子クラスターに関しては、Gsx, Xlox, Cdxの3つの遺伝子の並び、転写方向ともに、ナメクジウオや脊椎動物と全く同じであることが明らかとなった。また、遺伝子クラスターの規模としては全体で約110kbと、ナメクジウオのものより約2倍の大きさであることが分かった。

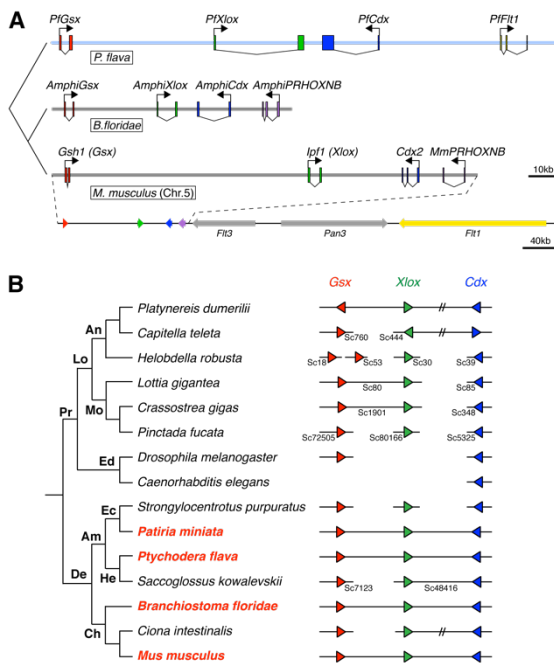


図3. (A) *P. flava* および脊索動物 ParaHox 遺伝子群のクラスター構造と規模。(B) 左右相称動物 (Bilateria) における ParaHox 遺

伝子クラスターの進化。3つの遺伝子が並ぶコンパクトな ParaHox 遺伝子クラスターは、前口動物 (Pr: Protostomia) では例が無く、新口動物 (De: Deuterostomia) でも赤字のグループのみで見ついている。新口動物の共通祖先では保存されたクラスター構造が見られた事が推察される。

また、発現パターンに関しては、Hox 遺伝子では、BAC シークエンスの結果得られたゲノム配列情報をもとに、WISH のプローブを設計・作成し、現在解析中である。ParaHox 遺伝子では、定量 PCR 解析により、Cdx は胞胚期(受精16時間後)、Xlox は初期原腸胚期(受精22時間後)、そしてGsxはその数時間後に発現を開始することが分かった。この順番は、脊椎動物やナメクジウオなど、これまでクラスター構造の保存性が報告されてきたグループで観察されているパターンと同様であった。発現領域に関しては、胚発生期においては、Cdx は原口周縁と原腸後方、Xlox は原口周縁と原腸後方、Gsx は原口周辺のいくつかの細胞で発現が観察され、前後軸に沿って並ぶようなパターンは認められなかった。一方、変態中の個体では、Cdx は内胚葉後方、Xlox は内胚葉中部に発現が観察され、脊索動物および棘皮動物でのパターンと類似性が認められた。

各遺伝子の機能に関しては、下記ニッポンウミシダでの解析に予想外に時間を要し、全容を解明するに至らず、今後の課題となった。

以上から、ヒメギボシムシにおけるHox/ParaHox 遺伝子群は、遺伝子の欠失や並び替え等の少ない(intactな)クラスター構造を持つ事が分かり、脊索動物との共通祖先におけるクラスター構造に近い状態が保存されていると推測された。

Hox 遺伝子群においては、Hox1-9/10までのクラスター構造に高い保存性が見られ、今後、これらの発現や機能の解析から、新口動物の共通祖先における形態形成機構との関わりが明らかになっていくものと期待される。一方で最も後方のHox11/13のグループでは、脊索動物とも棘皮動物とも異なる状況が確認され、脊索動物における尾部など、各分類群の後方の形態進化との関係が注目される。

ParaHox 遺伝子群においては脊索動物以外で、intactなクラスターが見つかったのは初めて(論文報告はヒトデ(*Patiria miniata*)が先となった)である。また、発現解析の結果、発現領域にはギボシムシ独自のパターンが認められ、空間的コリニアリティーの保存性は部分的であったものの、発現開始の順番と染色体上の並びは一致しており、時間的なコリニアリティーは保たれていることが分かった。従って、クラスターと発現パターンのコリニアリティーについて、「Hox/ParaHox 遺伝子クラスターの主な保存要因は、時間的なコリニアリティーの制御機構である」という、

これまで言われていた仮説（引用文献）を支持する興味深い結果となった。今後は、クラスター構造の保存機構やコリニアリティーの背景にある分子機構等について、脊索動物よりさらに遡った詳細な研究が望まれる。そして本研究により、特にギボシムシ類がその有用なモデルである事が示された。

(2)ニッポンウミシダ (*O. japonicus*) における成果：*O. japonicus* のゲノム DNA から、縮重プライマーを用いた PCR により Gsx, Xlox, Cdx の3つの ParaHox 遺伝子を同定し、RACE 法を用いて CDS 配列を決定した。これらの遺伝子について、PCR による BAC ライブラリーのスクリーニングを行い、3つの ParaHox 遺伝子を含むクローンを同定した。クラスター構造の詳細を解析するため、同定された BAC クローンについて、IonPGM 次世代シーケンサーによる全長解読を試みた。しかし、多くの繰り返し配列が含まれることが分かり、Gap-filling 作業を集中的に行ったが、クラスター構造を知る情報は得られなかった。そこで、illumina Miseq にてメイトペアによる再解読を行った。その結果、数カ所の Gap は残ったものの、各遺伝子のエクソン・イントロン構造、転写方向、クラスターの規模などの詳細が明らかとなった。既に知られている同じ棘皮動物に属するヒトデ類や上記の半索動物ギボシムシ類と比較して、興味深い知見が得られた。

発現パターンに関しては、2細胞期から卵割期、胞胚期、原腸胚期、ドリオラリア幼生までの各発生段階の胚の mRNA から調整した cDNA を鋳型に、RT-PCR 法による発現解析を行なった。各遺伝子の発現開始時期について得られた結果と、上記のクラスター構造の解析結果と合わせて検討したところ、「Hox/ParaHox 遺伝子クラスターの主な保存要因は、時間的コリニアリティーの制御機構である」という従来の仮説（引用文献）を検証するために極めて重要な知見が得られた。また、後期原腸胚期から初期ドリオラリア幼生を用いた WISH による解析では、各遺伝子の発現領域について、他の動物群で知られているものとの共通性が見出されたが、詳細は現在検討中である。また、定量 PCR による、各遺伝子のより詳細な発現パターンと、WISH によるふ化前の胚と変態後の発現領域に関しても現在解析中である。

全体を通して、本研究で対象とした半索動物ギボシムシ類と棘皮動物ウミシダ類では、新口動物および脊索動物へ至る体制構築機構の基本的プログラムが保存されていることが示唆された。今後これらの生物をモデルとして、脊椎動物の基本体制の進化とそのメカニズムに関して多くの知見が蓄積されていくことが望まれる。

<引用文献>

Ferrier D.E. and Minguillon C. Evolution of the Hox/ParaHox gene clusters. *Int. J. Dev. Biol.* 47, 605-611 (2003).

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. Ikuta T., Chen Y. C., Annunziata R., Ting H. C., Tung C. H., Koyanagi R., Tagawa K., Humphreys T., Fujiyama A., Saiga H., Satoh N., Yu J. K., Arnone M. I. and Su Y. H. Identification of an intact ParaHox cluster with temporal colinearity but altered spatial colinearity in the hemichordate *Ptychodera flava*. *BMC Evol. Biol.* 査読有 13, 129 (2013). doi:10.1186/1471-2148-13-129
2. Freeman R., Ikuta T. (co-first author), Wu M., Koyanagi R., Kawashima T., Tagawa K., Humphreys T., Fang G. C., Fujiyama A., Saiga H., Lowe C., Worley K., Jenkins J., Schmutz J., Kirschner M., Rokhsar D., Satoh N. and Gerhart J. Identical genomic organization of two hemichordate hox clusters. *Curr. Biol.* 査読有 22, 2053-2058 (2012). doi: 10.1016/j.cub.2012.08.052

[学会発表] (計1件)

1. 生田 哲朗, 大森 紹仁, 津田 美和子, 高木 善弘, 近藤 真理子. 「ニッポンウミシダ ParaHox 遺伝子群のクラスター構造と発現」第68回日本動物学会関東支部大会, 2016年3月12日 神奈川大学横浜キャンパス (神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

生田 哲朗 (IKUTA, Tetsuro)

国立研究開発法人海洋研究開発機構, 海洋生物多様性研究分野, 技術研究員

研究者番号: 80584846