

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440130

研究課題名(和文) モルフォゲンヘッジホッグによる初期胚の細胞動態制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of Hedgehog signaling-mediated regulation of cell dynamics in the early embryo

研究代表者

小田 康子(秋山康子)(Akiyama-Oda, Yasuko)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80426650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヘッジホッグ・シグナルはさまざまな発生現象で重要なはたらきをもつが、オオヒメグモの初期胚では前後軸に沿ったパターン形成や背腹軸の向きの決定、形態形成などを制御する。本研究ではヘッジホッグ・シグナルが制御する遺伝子をRNAiとRNA-seqを用いた方法を開発してゲノム・ワイドに探索し、初期胚で領域特異的に発現する遺伝子を多数同定した。そのうちのひとつmsh遺伝子は体節形成や胚帯形成に関わることが分かってきた。

研究成果の概要(英文)：Hedgehog signaling has an important role in various developmental events. In the embryo of the spider *Parasteatoda tepidariorum*, Hedgehog signaling regulates early developmental events, such as anterior-posterior patterning, orientation of the dorsal-ventral axis, and morphogenesis. In this study, we performed genome-wide searches to identify target genes of Hedgehog signaling. We combined RNAi and RNA-seq techniques and identified many target genes that show region-specific expression in the early embryo. One of the identified genes, msh is found to be involved in segmentation and formation of the germ band.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゲノム 遺伝子発現 初期発生 ヘッジホッグシグナル

1. 研究開始当初の背景

動物の体はある一定の形を成し、そこには前後・背腹の軸に沿ったパターンや繰り返しのストライプなどのパターンが存在する。調節的な発生をする動物においては、細胞分裂はかなり自由な向きやタイミングで起こり、細胞運命も細胞系譜に縛られない。細胞は固定した位置座標をもつのではなく、形態形成運動とともに大きく位置を変える。このような状況において胚が一定の形やパターンを形成するためには、細胞の動態が細胞間相互作用を通じて協調的に制御される必要があるが、協調制御の実現にどのような分子が働いているかはまだ研究が進んでいない。

私たちが新たなモデル生物として開発したオオヒメグモは、同じ節足動物のショウジョウバエとは異なり、調節性の高い発生を行う(1)。これまでの研究で、オオヒメグモの胚発生では Hedgehog(Hh)シグナルが発生初期に起こる現象、例えば、前後パターンの形成、背側を誘導する細胞の移動(左右相称性の確立)、中胚葉細胞の形成、頭部体節の形成に中心的な役割を果たすことが明らかとなり(2, 3)、方向性を持った細胞再配列運動にも関与することを示唆するデータが得られていた。Hh シグナルにより制御を受ける遺伝子も断片的には分かっていた。

オオヒメグモでは遺伝子機能を解析する実験方法、胚全体で遺伝子発現を抑制する Parental RNA 干渉(pRNAi)法と胚で局所的に抑制する Embryonic RNA 干渉(eRNAi)法が確立されている(3, 4)。pRNAi では二本鎖 RNA(dsRNA)注入後の日数により効果の強さの異なるサンプルが得られ(図 1)、様々な角度から遺伝子機能を解析できる実験系になっている。さらに欧米の研究者とともにゲノム・プロジェクトが進められていた。

2. 研究の目的

本研究では、調節的な発生をするオオヒメグモの初期胚において、パターン形成や細胞分化、細胞移動、再配列運動の制御に関わるモルフォゲン Hh に着目し、Hh シグナルが細胞にどのように認識され、細胞の次の行動に変換されるかを明らかにすることを目指した。Hh シグナルにより制御される遺伝子の網羅的な探索を行い、同定した標的遺伝子の細胞レベルの機能や標的遺伝子同士の関係を解析し、初期胚を構成する細胞の動態を協調的に制御する分子機構の理解につなげたいと考えた。

3. 研究の方法

(1) *hh* pRNAi と *ptc* pRNAi を行い、RNAseq により正常胚との発現量比較をし、オオヒメグモ初期胚で Hh シグナルにより制御される遺伝子をゲノム・ワイドに探索する(図 1)。pRNAi の効果の強さの違いを利用してシグナルの強弱に対する反応性も解析する。染色体レベルの制御の解析も目指す。

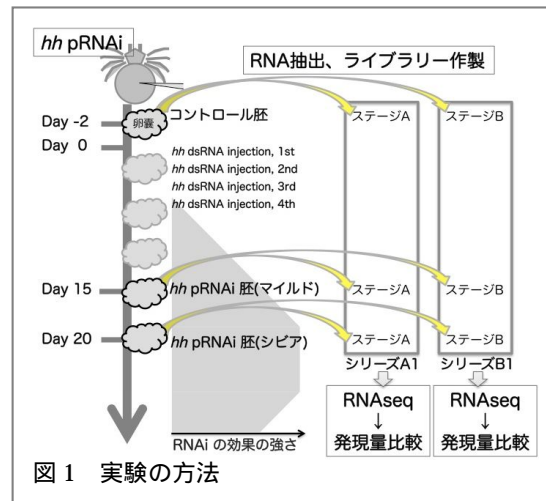


図 1 実験の方法

(2) 同定した遺伝子の発現を、体軸に沿ったパターン形成が起こる胚盤において解析する。さらに、正常胚と *hh* pRNAi、*ptc* pRNAi 胚でのパターンの比較も行う。

(3) eRNAi と pRNAi により同定した遺伝子の機能解析を行い、Hh が制御するどの現象に関わるのかを明らかにする。*hh* や他の遺伝子との関係を解析し、遺伝子ネットワークと現象同士の関係を明らかにする。

4. 研究成果

(1) pRNAi と RNA-seq による網羅的遺伝子探索方法の開発。本研究開始時には次世代シーケンサーを利用した遺伝子発現解析はオオヒメグモではまだほとんど行われていなかったため、方法の開発から開始した。また本研究の1年目にオオヒメグモのゲノム情報が利用可能となり(論文は2017年に発表)、解析系を構築する非常に良い状況が整った。pRNAi の前後のオオヒメグモ胚からの RNA 抽出、次世代シーケンサー用のライブラリー作製、MiSeq による塩基配列の決定などの実験方法と、取得した配列データのバイオインフォマティクスの解析方法(オオヒメグモ・ゲノムへのマッピング、アノテートされた遺伝子の発現量の数値化、ライブラリー間で発現量に差のある遺伝子の同定のためのアルゴリズム)の最適化を行った。これまでの pRNAi, real-time PCR, in situ ハイブリダイゼーションなどの実験結果と矛盾ない結果

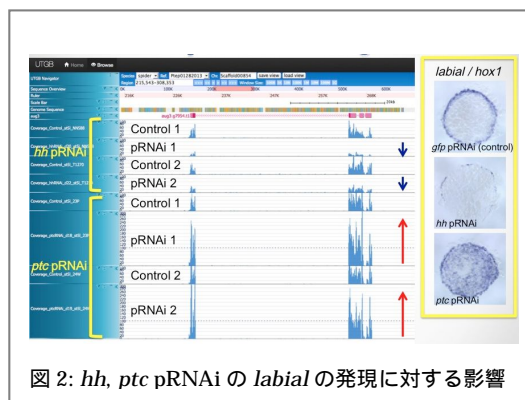


図 2: *hh*, *ptc* pRNAi の *labial* の発現に対する影響

が得られ(図 2)、ゲノム・ワイドに実験・解析する方法は開発できたと考えた。

(2) Hh シグナルにより制御される遺伝子の同定。上記の方法を用いて、*hh* 遺伝子、およびその受容体をコードする *ptc* 遺伝子に対する pRNAi を行い、発現量が変化する遺伝子の同定を行った。胚発生の 2 つのステージ (第 1 の形態的非対称性が生み出されるステージ 3 と、将来の背腹軸につながる第 2 の非対称性が形成されるステージ 5) pRNAi の効果の違いが想定される 2 つの時期 (2 本鎖 RNA 注射後 2 週目と 3 週目) と注射前のコントロール、これらのサンプルからライブラリーを作製し、解析した(図 1)。さらに *gfp* に対しても同様に行い、pRNAi のコントロールとした。

hh, *ptc* のどちらの実験でも、発現量に差があるものとして同定された遺伝子数は、ステージ 3 より 5、2 週目より 3 週目の方が多かった。全ての比較による結果を総合すると、同定された遺伝子の多くは Hh シグナルとの制御関係が未知の遺伝子であった。また、同定された遺伝子には、その脊椎動物やショウジョウバエの相同遺伝子が脊椎動物の肢芽や神経系、ショウジョウバエの体節や成虫原基のパターン形成に関わるものが含まれていた。これらの現象は Hh による制御が知られているものである。本研究のオオヒメグモのデータがゲノム・ワイドに取得したものであることと合わせて、Hh シグナルによる制御のメカニズムを統合的に理解することにこのオオヒメグモのデータが貢献していることを示している。

(3) 胚盤のパターン形成の Hh シグナルによる制御を解析。上記の解析により *hh* と *ptc* で共通に同定されたのは約 100 遺伝子であった。これらの遺伝子の胚盤における発現を in situ ハイブリダイゼーションにより解析した。その結果、約半数の遺伝子が胚盤で領域特異的な発現を示すことが分かった。*hh* pRNAi で発現量が低下し *ptc* pRNAi で発現量が増加する遺伝子の多くは Hh シグナル・ソースの近傍の胚盤周縁領域で発現し、反対に *ptc* pRNAi で発現量が低下し *hh* pRNAi で発現量が増加する遺伝子の多くは胚盤中心領域で発現した。また、どちらの pRNAi でも発現量が低下するものは中間領域で発現するものが多かった(図 3)。

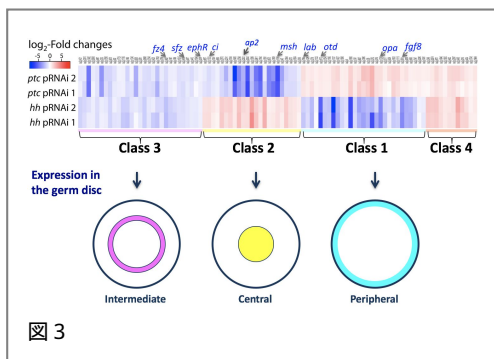
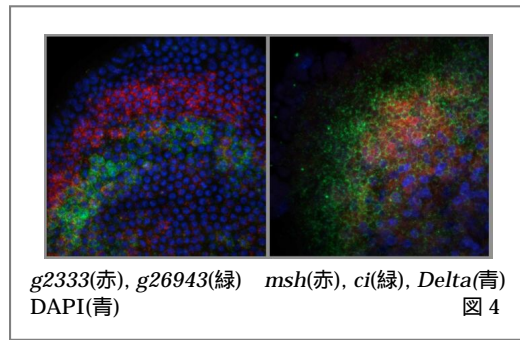


図 3



蛍光 in situ ハイブリダイゼーションにより複数の遺伝子の発現を同時に解析したところ、隣り合う細胞でも発現している遺伝子が異なることが分かってきた(図 4)。さらに、発生の進行とともに胚盤での遺伝子発現パターンが複雑化していく様子も観察でき、単なるフレンチ・フラッグ・モデルではない制御機構の存在が示唆された。

(4) 染色体レベルでの制御の解析。Hh シグナルによる染色体レベルでの制御の可能性を考え、同定された遺伝子のゲノム上の位置を解析した。しかし Scaffold が十分に長いとは言えず、はっきりした結論には至らなかった。ただし Hox クラスターが存在する Scaffold では、*hox* 遺伝子と、その間に存在する遺伝子のいくつかは、*hh* や *ptc* pRNAi で発現量に変化が見られており、今後さらなる解析を行いたいと考えている。

(5) 新しい体節形成遺伝子として *msh* 遺伝子を同定。本研究で同定された遺伝子 *msh* は *hh* pRNAi で発現が上昇し *ptc* pRNAi で低下する。*msh* に対する pRNAi を行うと胚盤から胚帯への形態変化が起こらず、頭部・胸部・後体部の全ての領域で体節の繰り返しパターンが形成されなかった(図 5)。*msh* は Hh シグナルが制御する卵の極性から、体節形成や形態形成に展開させる役割を持つと考えられ、その機能を今後深く追求したいと考えている。

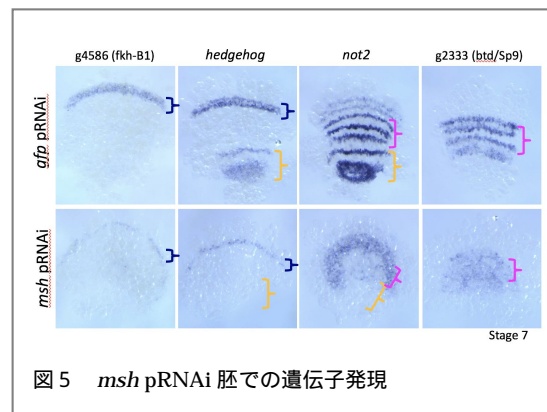


図 5 *msh* pRNAi 胚での遺伝子発現

< 引用文献 >

- (1) Oda & Akiyama-Oda. *Dev. Growth Diff.* 50, 203-214 (2008).
- (2) Akiyama-oda & Oda. *Development* 137, 1263-1273 (2010).

(3) Kanayama et al. *Nature Comms.* 2, 500. doi:101038/ncomms 1510 (2011).

(4) Akiyama-Oda & Oda. *Development* 133, 2347-2357 (2006).

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 4 件)

1. Hemmi, N, Akiyama-Oda Y, Fujimoto K and Oda H. A quantitative study of the diversity of stripe-forming processes in an arthropod cell-based field undergoing axis formation and growth. *Dev. Biol.*, 査読有, 2018, 437, 84-104. DOI: 10.1016/j.ydbio.2018.03.001

2. Schwager EE, Sharma PP, Clarke T, Leite DJ, Wierschin T, Pechmann M, Akiyama-Oda Y, et al. The house spider genome reveals an ancient whole-genome duplication during arachnid evolution. *BMC Biol.*, 査読有, 2017, 15, 62. DOI: 10.1186/s12915-017-0399-x

3. Akiyama-Oda Y. Oda H. Multi-color FISH facilitates analysis of cell-type diversification and developmental gene regulation in the *Parasteatoda* spider embryo. *Dev. Growth Diff.*, 査読有, 2016, 58, 215-224. DOI: 10.1111/dgd.12263

[学会発表](計 8 件)

1. Akiyama-Oda Y. Iwasaki-Yokozawa S, Oda H. A genome-wide study of Hedgehog signaling identifies a transcription factor gene mediating gene expression dynamics in the early spider embryo. 18th International Congress of Developmental Biology. 2017.

2. Akiyama-Oda Y. Iwasaki-Yokozawa S, Oda H. A Hedgehog signaling network regulates the initiation of segmental oscillations in the early spider embryo. 第50回日本発生物学会. 2017.

3. Akiyama-Oda Y. Iwasaki-Yokozawa S, Oda H. Genome-wide identification of Hedgehog signaling targets in axial patterning of the early embryo of the spider *Parasteatoda tepidariorum*. *EuroEvoDevo*. 2016.

4. Akiyama-Oda Y. Iwasaki-Yokozawa S, Oda H. Analysis of Hedgehog signaling in the early spider embryo using RNAi and RNA-seq techniques. 第48回日本発生物学会 2015.

5. Akiyama-Oda Y. Genome-wide identification of Hedgehog targets in the spider *Parasteatoda tepidariorum*. 2nd. International SpiderWeb meeting. 2014.

6. 秋山-小田康子, 小田広樹. オオヒメグモ RNAi胚のRNAseqから考える体軸形成機構の進化. 日本進化学会第16回大会. 2014.

7. Akiyama-Oda Y. Iwasaki-Yokozawa S, Oda H. Genome-wide analysis of Hedgehog signaling target genes using RNAi and RNA-seq in the spider *Parasteatoda tepidariorum*. 第47回日本発生物学会 2014.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.brh2.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋山-小田 康子(AKIYAMA-ODA, Yasuko)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：80426650

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し

(4)研究協力者

小田 広樹 (ODA, Hiroki)
株式会社生命誌研究館・主任研究員
研究者番号：50396222