

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24年5月9日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570222

研究課題名（和文） 直接発生ウニ小割球特異化遺伝子ネットワークの進化

研究課題名（英文） Evolution of the micromere gene network in sand dollars

研究代表者

山口 正晃（YAMAGUCHI MASAOKI）

金沢大学・自然システム学系・教授

研究者番号：60182458

研究成果の概要（和文）：ウニ類において間接発生が祖先的であり、直接発生は複数の系譜で独立に進化したと考えられている。直接発生への進化をもたらした発生メカニズムの変更を明らかにするため、発生様式のことなるタコノマクラ目の2種における小割球特異化遺伝子の発現パターンを比較した。初期胚での発現パターンはほぼ保存されていたが、中期胞胚以降、直接発生種においてのみ *delta/hesC* 非発現領域が出現した。この領域から成体の体腔を形成する間充織が移入するので、この直接発生特異的発現が成体構造の形成を促進する発生メカニズム変更点かもしれない。

研究成果の概要（英文）：It is considered that, in echinoids, indirect development is the ancestral mode, and direct development has evolved independently in several lineages. To examine modifications of molecular mechanisms that drive the evolution of direct development, I analyzed expression patterns of the micromere specification genes in two sand dollars with distinct developmental modes. Between the two species, early expression patterns of the regulatory genes were largely conserved. After the mid blastula stage, however, a unique domain emerged in the direct developer, where either *delta* or *hesC* is not expressed. Since this region gives rise to mesenchyme cells which will form coelomic compartments, this modification may promote formation of adult structures in the direct developer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：棘皮動物、ヨツアナカシパン、ハスノハカシパン、体腔形成、*Hox* 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ヨツアナカシパンはバフンウニの約30倍の卵サイズをもつ日本特産の直接

発生種である。この種は直接発生ウニの中で唯一小割球をつくり、骨片形成細胞へと分化する。しかし、その小割球には誘導能がない。同じタコノマウラ目の間接発生種ハスノハ

カシパンの小割球には誘導能があるので、「誘導能なし」は直接発生にもなった変化と考えられるが、その分子機構は同定されていない。発生の進化を遺伝子ネットワーク比較から理解するという研究動向の中で、本研究はヨツアナカシパンと間接発生種の小割球ネットワークの比較から「誘導能なし」の進化的変更点を明らかにするものと位置づけられる。

山口と美濃川は *Thr* 発現をバフンウニ、ハスノハカシパン、ヨツアナカシパンの間で比較し、タコノマクラ目の2種での発現が小割球子孫 (PMC) だけでなく大割球子孫にまで拡大していることを見いだした。つまり、同じ間接発生であっても目がことなるウニの間で *Thr* の調節がちがっていた。この観察から、ヨツアナカシパンの対照としてハスノハカシパンをつかうことによって「発生様式変更による変異」をより正確に指摘できるだけでなく、「同じ間接発生ウニの中での変化」も明らかにできると着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、発生様式のことなるタコノマクラ目の2種における小割球特異化遺伝子の発現パターンを比較することによって、直接発生への進化をもたらした発生メカニズムの変更を明らかにすることである。具体的には、核 β -catenin に調節される7つの小割球遺伝子をヨツアナカシパンとハスノハカシパンから単離し、発現パターンを明らかにする。次に各遺伝子の機能を、翻訳阻害と過剰発現実験によって明らかにするとともに、その実験胚での7遺伝子の発現を解析することによって機能的相互関係を明らかにする。最後に各遺伝子の発現パターンと機能的相互関係から小割球ネットワークを組み立て、アメリカムラサキウニのネットワークと比べて保存と変異を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

ヨツアナカシパンとハスノハカシパンの小割球調節遺伝子およびヨツアナカシパンの *Hox* 遺伝子は GeneRacer kit をもちいて RACE 法によって単離した。

ハスノハカシパン胚におけるそれぞれの遺伝子発現は Hibino et al. (2004) の方法にしたがって WMISH 法によって解

析した。一方、ヨツアナカシパン胚あるいは幼生における遺伝子発現は Hibino et al. (2004) の方法を元に改変した WMISH 法によって解析した (詳しくは Tsuchimoto, Yamada, and Yamaguchi (2011) を参照)。

ヨツアナカシパンにおける体腔形成は、幼生の連続切片を DeltaViewer によって三次元像として再構築することによって解析した。

4. 研究成果

不正形類に属する間接発生種ハスノハカシパンからホンウニ小割球特異化遺伝子 *microI*, *hesC*, *delta*, *alx*, *ets* を単離し、構造を決定した。当初 *microI* の単離は困難であると予想されていたが、いずれのウニからも PCR クローニングに成功し、その配列の多様性からホンウニ *microI* と同様に多型をふくむマルチコピー遺伝子であることが示唆された。ハスノハカシパンの上記5種の発現を WMISH 法によって解析し、バフンウニ胚での発現と比較することによって以下の結果をえた。(1) 2億年前に分岐した間接発生種の間で小割球特異化遺伝子の発現パターンはほぼ保存されていた。(2) *microI* 発現はいずれの種も小割球子孫で活性化されるが、60-120 細胞期にバフンウニでは小小割球子孫で発現が続くのに対してハスノハカシパンでは大小割球子孫に限定された。(3) 逆に *hesC* の発現は 60-120 細胞期から小割球子孫で抑制されるが、ハスノハカシパンでは小小割球子孫の一部に *hesC* 発現細胞が観察された。(4) 一方 *delta* は 60-120 細胞期から小割球子孫で活性化されるが、ハスノハカシパンでは大小割球子孫の限定されるようにみえた。これらの観察は、いずれの種においても *delta* が *microI* と *HesC* の二重抑制によ

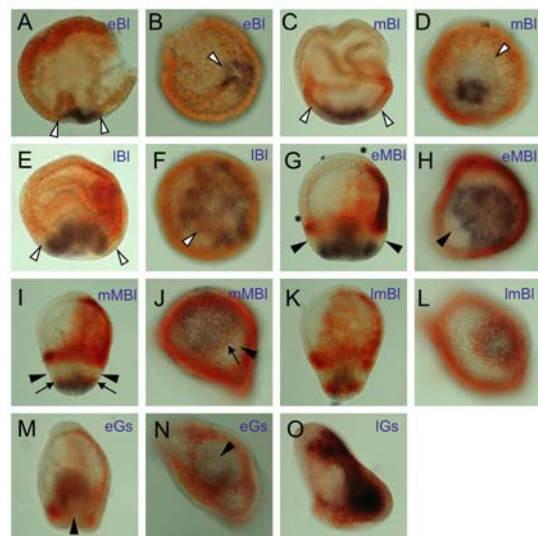


図 1

て小割球子孫で活性化されることを示すとともに、バフンウニ小小割球に誘導能があるのに対してハスノハカシパン小小割球にはないことを分子的に支持した。

次に直接発生種ヨツアナカシパンから *micro1*, *hesC*, *delta* を単離し、それらの発現を WMISH 法によって解析した。その発現パターンを同じタコノマクラ目に属する間接発生種ハスノハカシパンの発現パターンと比較することによって、以下の違いをみいだした。(1) *micro1* 発現はいずれの種も小割球子孫に限定されるが、ヨツアナカシパン胚での発現開始は 64 細胞期で、ハスノハカシパン胚 (16 細胞期) よりも遅かった。この遅れはヨツアナカシパン胚での *wnt8* 発現の遅れ (Nakata and Minokawa, 2009) と対応していた。(2) いずれの種においても、発生とともに *hesC* 発現の消失が小割球から大割球子孫細胞へと拡大するが、ヨツアナカシパンの方がより動物極に広がった。(3) いずれの種においても初期胞胚まで *delta* 発現 (紫) と *hesC* 発現 (橙) 領域は相補的であるが (図 1 A-F; △)、中期胞胚以降、ヨツアナカシパン胚でのみ両遺伝子発現領域の間にいずれも発現しない領域が現れた (図 1 G-J; ▲)。これはヨツアナカシパン胚でのより大きな *hesC* 非発現領域と矛盾しない。(4) この *delta/hesC* 非発現領域は間充織として移入した。ヨツアナカシパン胚では成体構造 (体腔) 形成のため間接発生種よりも多量の間充織が移入する (Amemiya and Arakawa, 1996)。このヨツアナカシパン特異的な *delta/hesC* 非発現領域の出現は成体構造形成の促進を説明する発生メカニズム変更点かもしれない。

ヨツアナカシパン特異的な *delta/hesC* 非発現領域 (図 1 G-J; ▲) は間充織として移入し、体腔形成に関わると推測されているが、ヨツアナカシパンにおける体腔形成過程は未だに解明されていない。そこで、幼生の連続切片から三次元像を再構築することによってヨツアナカシパンの体腔形成過程を解析した。おどろくことに、ヨツアナカシパンはこれまで報告されているどのウニ (間接発生種と直接発生種をふくむ) ともちがい、腸体腔と裂体腔の両方の形成様式をもちいて、かつ左右相称の段階をスキップして、成体構造を構成する複数の体腔を口-反口軸にそって直接、水腔-左後体腔-右後体腔の順に積み上げることを明らかにした (図 2)。

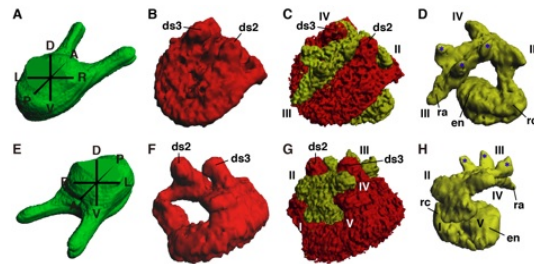


図 2

Hox 遺伝子は左右相称動物の前後軸にそったパターン化を調節している。ウニゲノム解読はウニの *Hox* 遺伝子クラスターに転座と逆位があることを明らかにした。間接発生種では初期胚において *Hox7* と *Hox11/13b* がそれぞれ反口側外胚葉と内胚葉で発現し、変態期の幼生の U 字型体腔で転座していない 5 つの *Hox* 遺伝子 (*Hox7*~*Hox11/13b*) が口-肛門軸にそって collinear に発現する。ヨツアナカシパンにおける *Hox* 発現パターンを WMISH 法によって解析した結果、間接発生種の発現パターンを保存しているだけでなく、*Hox1* と *Hox11/13b* が予定歩帶領域で、*Hox3* と *Hox5* が予定間歩帶領域でそれぞれ放射状に発現していることが判明した (図 3)。この 4 つの *Hox* 遺伝子はいずれもクラスター内で逆位している。これらの *Hox* 遺伝子の発現パターンは棘皮動物の進化に洞察をあたえる：左右相称の祖先種の後方がとぐるを巻きその左中央に口が移動あるいは新生され、その周囲に水管系が放射状に展開したのではないだろうか。その五放射状の新規構造の進化に逆位した *Hox* 遺伝子が転用されたようにみえる。*Hox* 遺伝子クラスターの分裂が棘皮動物のユニークな成体ボディープランの進化と同伴した、あるいは定着させたという仮説を提案する。

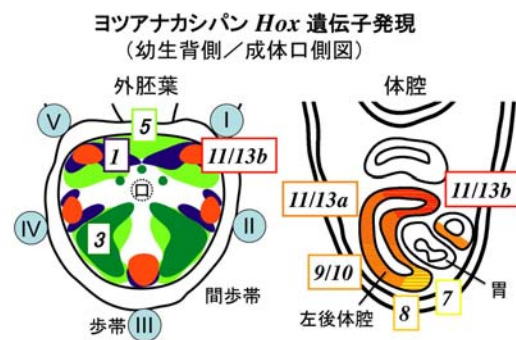


図 3

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 6 件)

- ① Jun Tsuchimoto, Toshihiro Yamada, and Masaaki Yamaguchi (2011)
Unusual coelom formation in the direct-type developing sand dollar *Peronella japonica*. (査読有)
Developmental Dynamics
240:2432-2439.
DOI: 10.1002/dvdy.22751
- ② Toshio Sakamoto, Keisuke Kumihashi, Shinpei Kunita, Takuya Masaura, Kaori Inoue-Sakamoto, and Masaaki Yamaguchi (2011)
The extracellular-matrix retaining cyanobacterium *Nostoc verrucosum* accumulates trehalose but is sensitive to desiccation. (査読有)
FEMS Microbiology Ecology
77:385-394.
DOI:
10.1111/j.1574-6941.2011.01114.x
- ③ Atsuko Yamazaki, Yousuke Furuzawa, and Masaaki Yamaguchi (2010)
Conserved early expression patterns of micromere specification genes in two echinoid species belonging to the order Clypeasteroidea and Echinoidea. (査読有)
Developmental Dynamics
239:3391-3403.
DOI: 10.1002/dvdy.22476Keiko
- ④ Minemura, Masaaki Yamaguchi, and Takuya Minokawa (2009)
Evolutionary modification of *T-brain (tbr)* expression patterns in sand dollar. (査読有)
Gene Expression Patterns
9:468-474.
DOI: 10.1016/j.gep.2009.07.008
- ⑤ Atsuko Yamazaki, Sewon Ki, Tetsuro Kokubo, and Masaaki Yamaguchi (2009)
Structure-function correlation of microl for micromere specification in sea urchin embryos. (査読有)
Mechanisms of Development
126:611-623
DOI: 10.1016/j.mod.2009.06.1083
- ⑥ Makoto Urata, Jun Tsuchimoto, Kinya Yasui, and Masaaki Yamaguchi

(2009)

The *Hox8* of the hemichordate *Balanoglossus misakiensis*. (査読有)
Development Genes and Evolution
219:377-382.
DOI: 10.1007/s00427-009-0297-5

[学会発表] (計 13 件)

- ① 土本純、山口正晃、棘皮動物における五放射相称体制の形成を主導するのは外胚葉と中胚葉のどちらか、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 22 日、大雪クリスタルホール (北海道)
- ② 土本純、山口正晃、直接発生ヨツアナカシパンの発生、日本動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 23 日、東京大学教養部 (東京都)
- ③ 土本 純、山口正晃、直接発生ヨツアナカシパン幼生における *Hox* 遺伝子の発現解析、日本動物学会第 80 回大会、2009 年 9 月 20 日、グランシップ (静岡県)
- ④ Masaaki Yamaguchi, Expression patterns of *Hox* genes in the direct-type developing sea urchin *Peronella japonica*, The 2nd Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology, 2010 年 5 月 28 日, Institut Pasteur (フランス)
- ⑤ 山崎敦子, 古澤陽介, 山口正晃、バフンウニとハスノハカシパンにおける初期小割球特異化遺伝子の発現比較、日本動物学会第 80 回大会、2009 年 9 月 17 日、グランシップ (静岡県)
- ⑥ 石合広樹、古澤陽介、山口正晃、ヨツアナカシパン小割球調節遺伝子の発現解析、日本動物学会第 80 回大会、2009 年 9 月 17 日、グランシップ (静岡県)
- ⑦ Jun Tsuchimoto and Masaaki Yamaguchi, Expression patterns of *Hox* genes in the direct-type developing sea urchin *Peronella japonica*, The 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2009 年 5 月 28 日、トキメッセ (新潟県)

[その他]

ホームページ等

<http://bio.s.kanazawa-u.ac.jp/~uni/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 正晃 (YAMAGUCHI MASA AKI)

金沢大学・自然システム学系・教授

研究者番号：60182458

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

美濃川 拓哉 (MINOKAWA TAKUYA)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：60400305

和田 洋 (WADA HIROSHI)

筑波大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：60303806