

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570235

研究課題名(和文) Hox 遺伝子の機能解析から探る棘皮動物の進化

研究課題名(英文) Hox complex modification underlying the evolution of echinoderms

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000 円

研究成果の概要(和文)：棘皮動物は左右相称動物に属しながら五放射相称という奇妙なボディープランをもつ。しかし、その体制がどのように進化したかは動物学の謎として残っている。Hox遺伝子複合体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。ウニ成体原基におけるその発現としらべることによって棘皮動物の前後軸を探り、3つの新知見を得た：(1) 棘皮動物の祖先的な前後軸情報は成体の消化管(口-肛門)にあるらしい、(2) 5本の腕は軸ではなく口の周りの突起とみなすべきである、(3) 五放射体制の形成には一部のHox遺伝子が軸情報としての機能を失い、放射状パターン化に転用されたらしい。

研究成果の概要(英文)：Echinoderms are a curious group of deuterostomes that forms a clade with hemichordates but has a pentamerous body plan. In contrast to hemichordates with an organized Hox cluster, a sea urchin has a Hox cluster with an atypical organization. We report a comprehensive examination of hox expression in a sand dollar. Nine hox genes are expressed in the adult rudiment, which are classified into two groups: one with linear expression in coeloms and another with radial expression around the adult mouth. The linear genes may endow the mesentery with axial information to direct postmetamorphic transformation of the digestive tract, whereas the radial genes developmentally correlate with the morphological novelties of echinoderms and/or sea urchins. Recruitment of the radial genes appears to be accompanied by the loss of axial roles. This in toto co-option of the hox genes provides insight into the molecular mechanisms underlying the evolution of echinoderms from a bilateral ancestor.

研究分野：進化発生学

キーワード：棘皮動物 ボディープラン 進化 ヨツアナカシパン Hox遺伝子 前後軸

1. 研究開始当初の背景

ギボシムシに代表される半索動物とウニやヒトデに代表される棘皮動物は姉妹群であり、いずれも左右相称の幼生期をもつ。半索動物は幼生のボディープランをそのまま成体へと引き継ぐのに対して、棘皮動物は幼生の左側の体腔と外胚葉に由来する羊膜を中心とする成体原基の中で五放射相称をつくり、成体へと変態する。棘皮動物のこの特異なボディープランへの進化にたいして複数の説が提案されているが、大別すると2つのシナリオに収束する：ヒトデの「腕」を体軸ととらえるか、付属突起とみなすかである。前者が環状神経から腕へのびる放射神経を左右相称動物の前後軸（中枢神経系）の複製ととらえるのに対して、後者は成体の口-反口（肛門）軸が祖先種の前後軸に相当し、腕は食道をとり囲む水管環からでる放射水管の外成長とみなす。

Hox 複合体は重複した遺伝子セットで、左右相称動物の収斂的な発生段階で活性化され、前後軸にそったパターン化を調節している。多くの動物において hox 遺伝子は染色体上でクラスターを形成していて、それぞれの遺伝子のクラスター内での並びと前後軸にそった発現領域がおおよそ一致する。

2006年に間接発生種 *Strongylocentrotus purpuratus* のゲノムが解読され、ウニの Hox クラスターに3つの異常が見つかった。(1) 3つの前方 hox 遺伝子の5'側への逆位の転座、(2) *hox4* の欠失、(3) *hox5* と *hox11/13b* の *in situ* 逆位である。このウニの原基形成期の幼生の左右の後体腔において、転座していない5つの hox 遺伝子 (*hox7* から *hox11/13b*) が U 字型消化管の口-肛門軸にそって co-linear に発現する。その後、この発現は左の後体腔だけで維持され、*hox3* が歯嚢で発現するが、*hox1*, *hox2*, *hox5*, *hox6* の発現領域はいまだに不明である。研究の進展をさまたげている原因は、このウニが間接発生であることにある：摂餌幼生期が1~2ヶ月にもおよぶため、「腕」ができるステージの幼生をそろえるのはむずかしい。その点、派生的ではあるが、摂餌することなく数日で変態する直接発生種のほうが材料として適している。実際、Morris と Byrne はオーストラリアの直接発生種をつかって、将来の成体外胚葉の口側で *hox5*、反口側で *hox11/13* が発現することを示した。この発現パターンは「腕は体軸」を支持するようにみえるが、2つの遺伝子発現領域の比較では本格的に議論できない。つまり、間接発生種と直接発生種のいずれにおいても Hox 遺伝子の発現解析が断片的であるため、棘皮動物のボディープランの起源にせまっていない。

ヨツアナカシパンは日本特産の直接発生型のウニで、受精からわずか3日で変態する。申請者はこの特性をいかして、棘皮動物の五放射相称体制の進化を Hox 遺伝子複合体か

ら理解することを進めてきた。まず、ヨツアナカシパン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成体原基形成過程を明らかにした。ヨツアナカシパンは成体原基を例外的に幼生の背側正中線上につくる。次に RACE 法によってヨツアナカシパンのすべての hox 遺伝子の全長 cDNA を単離した。さらに whole mount *in situ* hybridization (WMISH) 法によって、*hox2* を除くすべての hox 遺伝子の全発生過程における発現パターンを明らかにした（草稿執筆中）。(1) *hox1* はプリズム幼生期に羊膜陥で活性化され、ブルテウス幼生期にその発現は予定成体外胚葉の5つの歩帯領域 I~V に限定された。(2) *hox11/13b* は歩帯領域で、*hox3*, *hHox5* は間歩帯領域で五放射状に発現していた。(3) 一方、幼生の左後体腔において5つの hox 遺伝子 (*hox7* から *hox11/13b*) が番号順に入れ子時計回りで発現していた。

この観察は、これまでに報告されているウニ hox 遺伝子発現とおおむね一致し、とくに後体腔での5つの hox 遺伝子発現パターンは発生様式を問わず共有されるので、祖先的な前後軸を示唆する。そうだとすると、左右相称の祖先種の後半部がとぐるを巻いてその左側中央に口を移動あるいは新成し、その口の周囲に水管系がそれを被う羊膜外胚葉とともに放射状に展開したようにみえる。その放射状パターン化と棘・歯の形成に、逆位した hox 遺伝子が転用されたのではないだろうか、と着想した。さらに、赤道面で切断した動物半球と植物半球の発生形態と遺伝子発現は、それぞれの自律性と相補性の両面を示した。申請者は、成体原基の特異化は外胚葉と中胚葉の両方で独立に始まり、その相互作用をとおして五放射性を確立するのではないかと予想した。

2. 研究の目的

本研究の目的はこの着想と予想を実証することである。そのため、(1) ヨツアナカシパン幼生のトランスクリプトーム解析の情報と産物をつかって、WMISH 法によって水管系と後体腔区画のマーカー遺伝子を網羅的に検索するとともに、羊膜-体腔間相互作用を仲介する可能性のあるシグナル分子遺伝子を選抜する。(2) 8つの hox 遺伝子を単独あるいはセットでノックダウンした幼生の表現型を形態と分子マーカーから明らかにする、(3) 候補シグナル分子で処理した動物半球と植物半球の表現型解析から、五放射のプレパターンが外胚葉と中胚葉のどちらに、あるいは両方にあるのか明らかにする。

3. 研究の方法

連携研究者の和田はヨツアナカシパン幼生のトランスクリプトーム解析をすでに始

めている。この情報と産物をつかって、WMISH法によって中胚葉の区画マーカー遺伝子を網羅的にさがすとともに、幼生で発現するシグナル分子遺伝子を選びだす。8つの *Hox* 遺伝子にたいするモルフォリノを受精卵に注入し、*hox* 遺伝子を単独あるいはセットでノックダウンした幼生の表現型を形態と分子マーカーによって解析する。赤道面で切断した動物半球と植物半球の発生形態と遺伝子発現は、それぞれの自律性と相補性の両面を示す。候補シグナル分子で処理した動物半球と植物半球の表現型と遺伝子発現解析から五放射プレパターンの局在を特定する。

4. 研究成果

受精卵へのモルフォリノオリゴ注入によって *hox* 遺伝子ノックダウンを試みたが、顕著な表現型が得られなかった。少なくとも2つの理由が考えられる。(1) ヨツアナカシパンをふくむウニ類のゲノムには遺伝的多型が頻繁にみられるため、機能阻害実験において設計したモルフォリノオリゴと標的配列が完全に一致していないことは当然考慮しなくてはならない。1塩基でも不一致があるとモルフォリノオリゴの翻訳阻害作用は大幅に減退し、それを補うため高濃度で注入すると、非特異的な発生の遅れや異常が現れ、明確な表現型が得られない。この問題を解決するには、スプライシング阻害型のモルフォリノオリゴを設計して阻害作用を RT-PCR 法によって確認する必要がある。(2) 体腔中胚葉で線状に発現する *hox* 遺伝子は成体の消化管分化の軸情報を与えている可能性が高い。成体の消化管は変態後数週間かけて形成されるので、表現型を確認するには変態後の稚ウニ飼育方法の確立と消化管の部域マーカーが必要である。

赤道面で切断した動物半球と植物半球の発生形態と遺伝子発現は、それぞれの自律性と相補性の両面を示す。動物半球の表現型と遺伝子発現は、成体原基において中胚葉から外胚葉に向けて複数のシグナルが放出されることを示唆する：(1)自律的な *hox1* と *hox5* の発現を放射化するシグナル、(2) *otx* 発現を誘導するシグナル、(3)羊膜外胚葉の発生を維持するシグナル、である。一方、植物半球はプルテウス型の幼生へと発生したが、対照のように棘をつくらず、変態しなかった。つまり、外胚葉-中胚葉間の双方向のシグナル伝達が成体原基形成に必須であると考えられる。実際、初期幼生を U0126 で処理すると(図1)、対照と同様にプルテウスへと発生し、羊膜陥は中胚葉を被った(図1の橙色: *dlx* 発現)。しかし、*hox3* 発現(図1, 紫)は、棘原基()すべてで抑制され、歯嚢原基()での抑制は21時間を境に部分的に解除された。この時間差は、原基での *hox3* の発現時期・順序と矛盾しない。したがって、外胚葉シグナルは中胚葉で MAPK 経路をへて *hox3* を

活性化すると予想される。

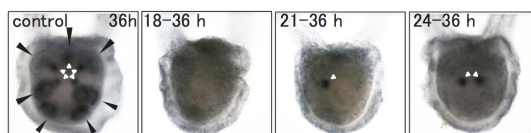


図1 U0126 処理胚における *dlx* と *hox3* 発現

ヨツアナカシパン幼生の成体原基をふくむ内部構造は、光学顕微鏡で観察できない。そこで、報告者は固定・包埋した幼生の連続切片から *DeltaViewer* によって三次元像を再構築した(図2A)。しかし、この作業は手間と時間がかかるので、複数の実験胚の形態を解析するのはむずかしい。そのため、共焦点レーザー顕微鏡による光学的連続切片から三次元像を再構築する方法を検討した。図2Bは phalloidin 染色・透明化した 24-h 幼生を背側から観察した1枚の光学切片である。図2Cは、*Reconstruct* (Fiala, 2005)をつかって172枚の切片から二日で再構築した三次元像である；従来の像(図2A)より高解像であった。図2Dは、幼生の右後方(やや背側)からみた成体原基で、水腔(hy)と右体腔(rc)は、原腸(es)から腸体腔的に連続してつくられる。この体腔形成はヨツアナカシパン特有である。しかし、その成体原基は棘皮動物の共有形質を保持する：成体の口-反口軸にそって、羊膜外胚葉-水腔-左後体腔-右体腔の順につみ重なる。

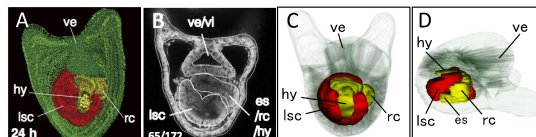


図2 成体原基の三次元像

本研究の特色は、エサなし3日で変態するヨツアナカシパンを材料とすることにある。間接発生種の成体原基形成期幼生は非常にもろいため、発現解析に WMISH 法を使えない。直接発生種も卵黄と色素が多いので、WMISH 法に成功していない。つまり、ヨツアナカシパンは WMISH 法による発現解析ができる唯一のウニ種である(図1が例)。今後、ヨツアナカシパン成体原基において放射状に発現する *hox1*, *hox3*, *hox5* を調節しているシグナル伝達分子を同定し、その機能解析によって、成体原基形成における双方向の胚葉間シグナル伝達とその下流 *hox* 遺伝子の機能を明らかにすることを計画している。

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)

研究代表者

1. Amemiya, S., Omori, A., Tsurugaya, T., Hibino, T., Yamaguchi, M., Kuraishi, R., Kiyomoto, M., and Minokawa, T. (2015) Early stalked stages in ontogeny of the living isocrinid sea lily *Metacrinus rotundus*. *Acta Zoologica* (in press), DOI: 10.1111/azo.12109 (査読あり)

2. Amemiya, S., Hibino, T., Nakano, H., Yamaguchi, M., Kuraishi, R., and Kiyomoto, M. (2015) Development of ciliary bands in larvae of the living isocrinoid sea lily *Metacrinus rotundus*. *Acta Zoologica* 96(1), 36-43. (査読あり)

3. Yamazaki, A., Kidachi, Y., Yamaguchi, M., and Minokawa, T. (2014) Larval mesenchyme cell specification in the primitive echinoid occurs independently of the double-negative gate. *Development* 141(13), 2669-2679. (査読あり)

4. Tsuchimoto, J. and Yamaguchi, M. (2014) *Hox* expression in the direct-type developing sand dollar *Peronella japonica*. *Developmental Dynamics* 243(8), 1020-1029. (査読あり)

5. Urata, M., Iwasaki, S., Ohtsuka, S., and Yamaguchi, M. (2014) Development of the swimming acorn worm *Glandiceps hacksii*: similarity to holothroids. *Evolution & Development* 16 (3), 149-154. (査読あり)

6. Shiomi, K., Yamazaki, A., Kagawa, M., Kiyomoto, M., and Yamaguchi, M. (2012) Par6 regulates skeletogenesis and gut differentiation in sea urchin larvae. *Development Genes & Evolution* 222(5), 269-278. (査読あり)

〔学会発表〕(計2件)

研究代表者

1. 新美伊代、山口正晃、ヨツアナカシパン成体原基形成における胚葉間相互作用の解析、平成26年度日本動物学会中部支部大会、2014年11月23日、ホテルのときんぷら(能登町)

2. 丹後麻衣、香川弘恵、山口正晃、ウニ胚におけるデルマタン硫酸エピメラーゼの発現と機能解析、日本動物学会第84回大会、岡山大学、2013年9月26日(岡山市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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