

令和元年5月28日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07368

研究課題名(和文) 棘皮動物進化の鍵となる成体原基Hox遺伝子発現を制御するシグナル伝達の解明

研究課題名(英文) Signal transduction that controls gene expressions in the adult rudiment of echinoderms

研究代表者

山口 正晃 (Yamaguchi, Masaaki)

金沢大学・生命理工学系・教授

研究者番号：60182458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：半索動物と棘皮動物は歩帯動物クレードの姉妹群で、三体腔性の幼生を共有する。半索動物は幼生プランを引きつく。一方、棘皮動物は成体原基の中で五放射体制をつくり、稚虫へと変態する。半索動物外胚葉の前後軸にそったパターン化を制御する遺伝子のウニ相同遺伝子を単離し、比較発現解析した。ウニ成体原基の外胚葉で発現するのは、ギボシムシの襟外胚葉相同遺伝子のみで、その発現は放射水管を覆う歩帯外胚葉領域に制限されていた。棘皮動物は、共通祖先から吻と胴を失い、襟からの放射状突起伸長によって進化したことを提唱する。一方、Hox複合体の共線的発現は、棘皮動物の前後軸は成体の口-肛門軸であることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

棘皮動物の特異な体制の進化は未だ動物学の謎である。その進化を幼生の体腔プランからの変形として捉え、それを分子的に提示したことに学術的な意義がある。ギボシムシの襟外胚葉で発現する前後軸マップ遺伝子は、ウニ成体原基において水腔から伸長する放射水管を覆う歩帯外胚葉で発現する。襟外胚葉と歩帯外胚葉は幼生の相同な体腔を内包しているので、ウニの五放射の歩帯外胚葉とギボシムシの襟外胚葉は相同であり、棘皮動物の放射線は、歩帯動物共通祖先の前後軸の重複ではなく、半索動物翼鰓類の触手器官のような付属突起であることを示唆する。Hox複合体の共線的発現は、棘皮動物の前後軸は成体の口-肛門軸と考えられる。

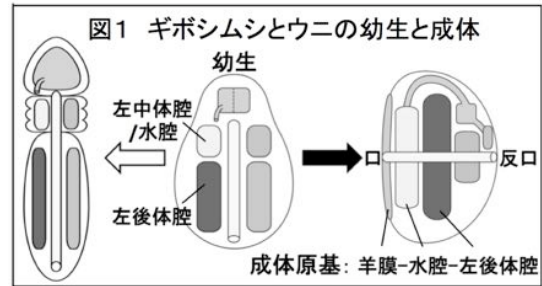
研究成果の概要(英文)：Hemichordates and echinoderms are sister taxa of the Ambulacraria clade, and share tripartite larvae. Hemichordates inherit the body plan (proboscis-collar-trunk) from larvae. In contrast, echinoderms form a pentaradial body plan in the adult rudiment and metamorphose into juveniles. The evolution of this unique body plan of echinoderms still remains a mystery in zoology. We isolated sand dollar orthologs of anteroposterior (AP) map genes that control ectodermal patterning along the AP axis in hemichordates, and examined their expression in the sand dollar. Solely orthologs of collar AP map genes were expressed in ectoderm of the adult rudiment, and their expression was restricted to the future ambulacral ectoderm. I propose that the evolution of echinoderms was accompanied by loss of the proboscis and trunk from a common ancestor, concomitant with radial outgrowth from the collar. Co-linear expression of Hox complex suggests adult mouth-anus axis may represent AP axis of echinoderms.

研究分野：進化発生学

キーワード：棘皮動物 五放射体制 成体原基 半索動物 AP map gene FGFシグナリング Hox複合体

1. 研究開始当初の背景

半索動物(ギボシムシ)と棘皮動物(ウニやヒトデ)は歩帯動物クレードの姉妹群であり、三体腔性の幼生期を共有する。半索動物は幼生の体腔プランをそのまま成体へと引きつぐ。一方、棘皮動物は幼生の左側でできる中胚葉性の水腔および左後体腔とそれを被う羊膜外胚葉からなる成体原基の中で五放射体制をつくり、成体へと変態する(図1)。棘皮動物のこの特異なボディープランの進化は、未だに動物学の謎として残っている。その進化に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(歩帯)を「体軸」ととらえるか「付属突起」とみなすかである。「体軸モデル」は、食道を囲む環状神経から腕へのびる放射神経を左右相称動物の中樞神経系(前後軸)の複製ととらえる。一方「付属突起モデル」は、成体の口-反口/肛門軸が祖先種の前後軸に相当し、腕は、水腔(左中体腔)に由来する水管系の放射水管の外成長とみなす。



Hox 複合体は、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。Hox クラスターにおける *hox* 遺伝子の並びは、前後軸にそった発現領域としばしば一致する。したがって、棘皮動物の成体原基における *hox* 遺伝子の発現から祖先的な前後軸を探ろうとするのは当然の流れであった。実際、1990年代後半から5つのグループが独立にこのアプローチで研究を開始した。その中で、申請者はヨツアナカシパンを材料として、ウニにおける受精から変態にいたる Hox 複合体発現の全貌を世界で初めて明らかにした。その発現から、ウニの *hox* 遺伝子は2つのグループに分けられる: 成体の口の周りで放射状に発現するもの(*hox1, hox3, hox5, hox11/13b*)とC字型の左後体腔(成体の口側体腔)において線状に発現するもの(*hox7, hox8, hox9/10, hox11/13a, hox11/13b*)である; *hox11/13b* は両グループに属す。一方、ギボシムシの Hox 複合体発現は脊索動物と同様に共直線性を示す。この対比は、棘皮動物の進化に2つ洞察をあたえる。(1) 棘皮動物の祖先的な前後軸情報は、腕ではなく成体の口-反口軸(後体腔にそって時計回りに伸びる消化管)にある。(2) *hox1, hox3, hox5* は軸の役割を失い、棘皮動物あるいはウニの新規構造(歩帯と間歩帯、棘および歯)のパターン化に転用されたい。すなわち、放射状発現する *hox1, hox3, hox5* 遺伝子の調節機構の解明が、棘皮動物の進化を解く鍵になると着想した。

2. 研究の目的

成体原基を構成する羊膜外胚葉と隣接する中胚葉(水腔と左後体腔)との間の相互作用は、これまでほとんど研究されていない。そこで申請者は、ヨツアナカシパン胞胚を赤道面で切り、動物半球(外胚葉)と植物半球(内中胚葉)の発生を追った。動物半球は羊膜陥をつくり、そこで *hox1* と *hox5* を発現したが、対照とちがい一カ所であった。正常胚では、五葉の水腔に接する外胚葉で *otx* が発現する。しかし、動物半球に *otx* 発現はなかった。その後、羊膜陥は細胞死を起こした。この観察は、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* 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 でパルス処理すると、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。しかし、*hox3* 発現は棘原基すべてで抑制され、歯原基での抑制は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 MAP kinase 経路をへて *hox3* を活性化すると予想される。

以上の学術的背景と予備的結果からの予想をふまえて、本研究は、ヨツアナカシパン成体原基において放射状発現する *hox1, hox3, hox5, otx* を調節している胚葉内および胚葉間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シグナル伝達とその下流 *hox/otx* 遺伝子の機能を明らかにする。

当初、Hox 遺伝子複合体の発現を調節する胚葉間シグナル伝達の解明を目標としたが、ヨツアナカシパン成体原基の外胚葉・中胚葉マーカーの単離・発現解析および FGF 受容体阻害剤処理幼生の表現型解析から、成体原基外胚葉(成体の口側外胚葉)の進化的起源と成体原基における歩帯領域(水腔中胚葉からの放射水管伸長とそれを覆う歩帯外胚葉)の形成機構が見えてきた。五放射の歩帯が棘皮動物のボディープランを特徴付ける中心的な形質であるため、Hox 遺伝子複合体に限定せず、より急進・求心的アプローチを採用した。

3. 研究の方法

棘皮動物の水腔は、ギボシムシの左襟体腔と相同である(図1)。水腔を覆う歩帯外胚葉の起

源を特定するため、ギボシムシ外胚葉の前後 (AP) 軸にそったパターン化を制御する AP マップ遺伝子のヨツアナカシパン相同遺伝子を単離し、その発現を比較解析した。

CRISPR/Cas9 システムによって *fgf8/17/18* をノックアウト (KO) したヨツアナカシパン幼生の表現型を、whole-mount in situ hybridization (WMISH) 法によるマーカー遺伝子発現と共焦点レーザー顕微鏡光学切片から再構築した幼生の三次元 (3D) 像の両面から解析した。

4. 研究成果

棘皮動物の成体原基形成において、羊膜外胚葉の陥入と体腔の再配列によって、成体の口-反口軸にそって、羊膜-水腔 (左中体腔) -左後体腔-右後体腔の順に積み重なり (図 1 右)、それぞれ成体の口側外胚葉、水管系区画 (水管環と放射水管)、口側および反口側体腔へと発生する。棘皮動物の放射線 (歩帯) は、水腔から伸長する放射水管とそれを覆う歩帯外胚葉からなる。

日本特産種のヨツアナカシパンは、プルテウス幼生へと発生するが、摂餌することなく 3 日で変態する。ウニでは例外的に、幼生の口陥 (図 2A; 21 h, 右側面図, ◀) を羊膜 (vestibule) としてつかい、幼生背側に水腔をつくる (図 2B; 24 h, 背面図, hy)。水腔から 5 つの放射水管が伸長し (図 2C, 32 h, 背面図, I-V)、

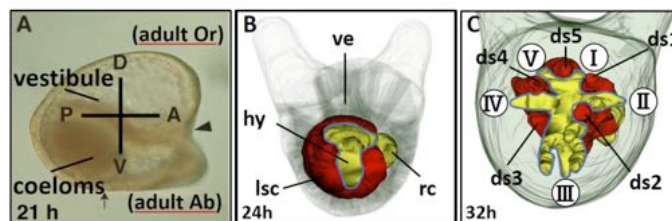


図 2 ヨツアナカシパンの成体原基形成

その中心に成体の口が開く。一方、左後体腔が歩帯の間に配置され (図 2B, lsc)、その間歩帯領域に歯囊原基 (図 2C, ds1-5) や棘原基がつけられる。このヨツアナカシパン成体口側図は、図 1 右のウニ成体図を左側から見た口側図に相当する。

棘皮動物の水腔は、ギボシムシの左襟体腔と相同である (図 1)。水腔を覆う歩帯外胚葉の起源を特定するため、ギボシムシ外胚葉の前後 (AP) 軸にそったパターン化を制御する AP マップ遺伝子のヨツアナカシパン相同遺伝子を単離し、その発現を比較解析した。ギボシムシの襟外胚葉で発現する遺伝子 (*six3/6*, *foxa*, *emx*, *otx*, *hh*, *sfrp1/5*) は、ヨツアナカシパンの水腔を覆う外胚葉で発現を開始し (図 3; 24 h, A, A', *hh*; C, C', *foxa*; E, E', *otx*; △III)、その発現は放射水管を覆う歩帯外胚葉へと五放射状に展開した (図 6; 36 h, B, *hh*; D, *foxa*; F, *otx*; △I-V)。 *otx* はさらに管足外胚葉でも発現していた (F, F'; 白矢印)。

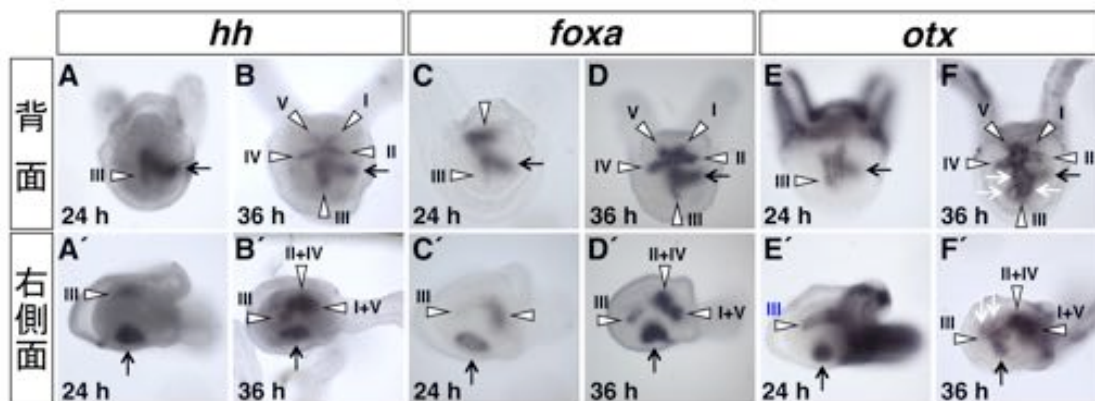


図 3 歩帯外胚葉で発現する AP マップ遺伝子

これらの外胚葉領域は相同な体腔を内包しているので、(1) ウニの五放射の歩帯外胚葉とギボシムシの襟外胚葉は相同であり、(2) 棘皮動物の放射線は、歩帯動物共通祖先の前後軸の重複ではなく、半索動物翼鰓類の触手器官のような付属突起であると結論した。棘皮動物の前後軸は、*hox* 遺伝子の共線的発現から、成体の消化管にそった口-肛門軸に対応すると示唆された。以上の結果を雑誌論文 2 として発表した。

棘皮動物の成体原基形成は、幼生外胚葉から陥入する羊膜が水腔と接することによって始まる。しかし、その相互作用の分子機構はわかっていない。ギボシムシでは、外胚葉で発現する *fgf8/17/18* が原腸から体腔中胚葉を誘導する。ヨツアナカシパンの成体原基において、*fgf8/17/18* と *fgfa* がそれぞれ羊膜外胚葉と水腔中胚

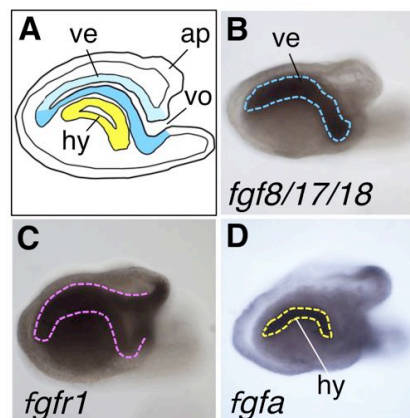


図 4 羊膜と水腔での *fgf* 発現

葉で発現していた (図 4A, ve, hy)。一方、FGF 受容体 *fgfr1* は成体原基全体で発現していた (図 4C)。FGF 受容体阻害剤 SU5402 処理した幼生において、原腸からの水腔形成とそこでの *fgfa* 発現が抑制され、歩帯外胚葉遺伝子の発現も低下した。この表現型は、(1) *fgf8/17/18* (図 4B) が原腸から水腔中胚葉を誘導する (図 4A, hy) とともに *fgfa* を活性化する (図 4D)。(2) その水腔からの *fgfa* シグナリングが水腔/放射水管と接する外胚葉を歩帯外胚葉へと分化させる遺伝子 (図 5; *hh*, *otx*) を活性化することによって歩帯が確立することを示唆している。実際、*fgf8/17/18* に対する guide RNA と Cas9 タンパク質を受精卵に共注入すると、水腔マーカーの *zic* と *fgfa* 発現が低下する (図 5B, B', Δ; D, D', Δ) だけでなく、歩帯外胚葉遺伝子の発現も抑制された (図 5F, F'; H, H')。しかし、原腸での *hh* と *otx* 発現には影響がなかった (図 5E-H, 矢印)。

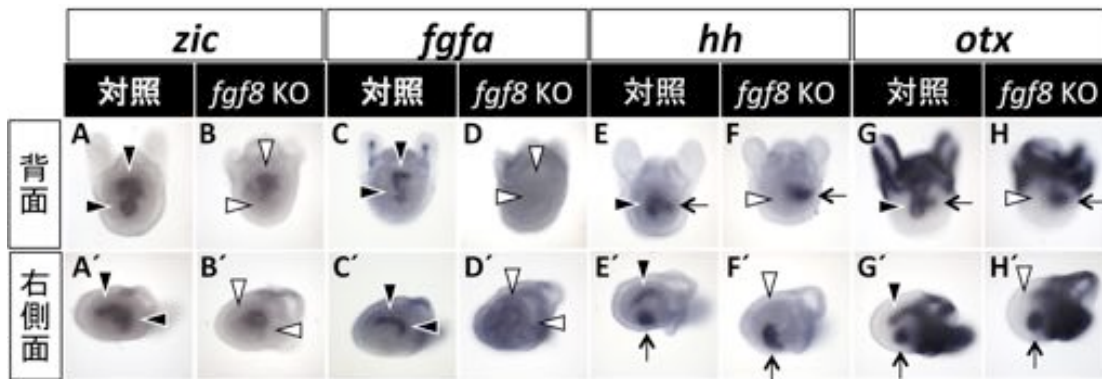


図 5 *fgf8/17/18* KO 幼生における水腔 *zic*, *fgfa* 発現低下と歩帯外胚葉 *hh*, *otx* 発現抑制

図 6 は、*fgfa* ノックアウト (KO) 幼生の 3D 像を示す。対照幼生では、水腔が原腸から腸体腔的に幼生背側前方から後方に伸長し (A, B; 24 h)、その水腔から放射水管が五放射に展開する (A', B'; 32 h, I-V)。さらに、放射水管 III から三つ組の管足が形成される (A', B'; 白矢印)。一方、*fgf8/17/18* KO 幼生では、原腸からの腸体腔形成が不全で (C, D; 24 h)、それに続く放射水管の伸長と管足の形成が阻害された (C', D')。この幼生から変態した稚ウニは、対照と同様の棘をもつが、管足はないか少なかった。同様の研究方法によって、*fgfa* KO 幼生の表現型を解析することを計画している。

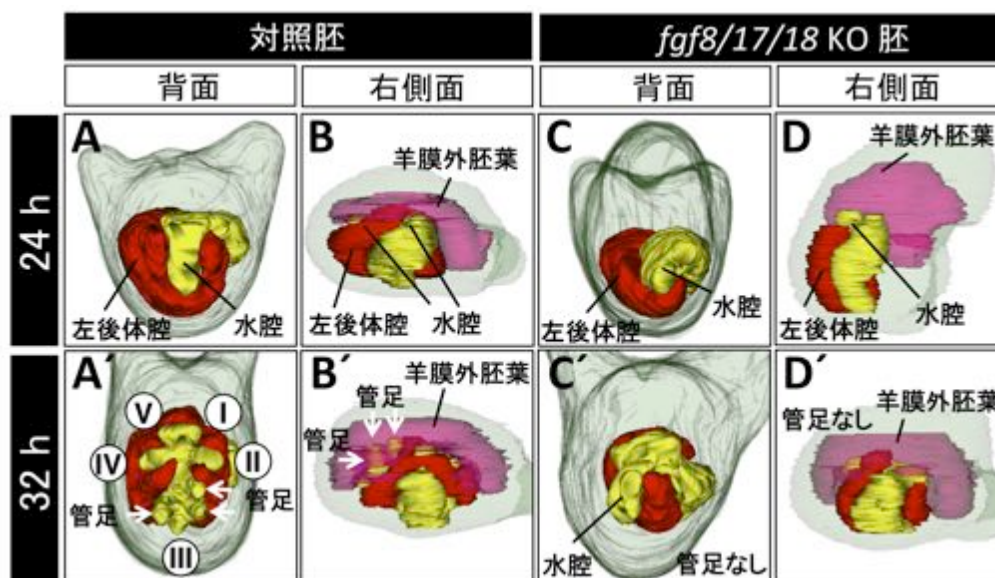


図 6 *fgf8/17/18* KO 幼生における成体原基形成

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Amemiya, S., Omori, A., Tsurugaya, T., Hibino, T., Yamaguchi, M., Kuraishi, R., Kiyomoto, M., and Minokawa, T. (2016) Early stalked stages in ontogeny of the living isocrinid sea lily *Metacrinus rotundus*. *Acta Zoologica* 97(1), 102-116.

doi: 10.1111/azo.12109 (査読あり)

2. Adachi, S., Niimi, I., Sakai, Y., Sato, F., Minokawa, T., Urata, M., Sehara-Fujisawa, A., Kobayashi, I., and Yamaguchi, M. (2018) Anteroposterior molecular registries in ectoderm of the echinus rudiment. *Developmental Dynamics* 247(12), 1297-1307. doi: 10.1002/dvdy.24686 (査読あり)

〔学会発表〕 (計 6 件)

Sae Sugino¹, Takahiro Ohyama, Atsuko Yamazaki, Makoto Urata, Isao Kobayashi, Masaaki Yamaguchi. Expression of *phb1* and *blimp1* in the primitive sea urchin *Prinocidaris baculosa*. The 22nd International Congress of Zoology (Okinawa, Japan) 2016/11/17

Iyo Niimi, Chinami Koike, Mami Asai, Rika Kawabata, Yoshiaki Morino, Fuminori Sato, Atsuko Sehara-Fujisawa, Hiroshi Wada, Isao Kobayashi, Masaaki Yamaguchi. Reciprocal signaling between ectoderm and mesoderm during the adult rudiment formation in the sand dollar *Peronella japonica*. The 22nd International Congress of Zoology (Okinawa, Japan) 2016/11/17

Shinya Adachi¹, Iyo Niimi, Takuya Minokawa, Isao Kobayashi, Masaaki Yamaguchi. Comparative expression analysis of larval ectoderm genes between hemichordates and echinoderms. The 22nd International Congress of Zoology (Okinawa, Japan) 2016/11/17

大山高弘, 山寄敦子, 小平俊光, 杉野咲恵, 浦田慎,
谷口俊介, 山口正晃
バフンウニ **phb1/micro1 paralog** の発現・調節・機能解析
日本動物学会第 89 回札幌大会、2018/9/13

山口美瑛, 杉野咲恵, 山寄敦子, 浦田慎, 小林功, 山口正晃
ノコギリウニにおける **phb1** の発現・調節・機能解析
日本動物学会第 89 回札幌大会、2018/9/13

酒井唯妃, 安達慎也, 浦田慎, 守野孔明, 和田洋, 小林功, 山口正晃
胚葉間 **FGF** シグナリングが棘皮動物の歩帯を確立する
日本動物学会第 89 回札幌大会、2018/9/14

〔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：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。