

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07418

研究課題名(和文) 体節形成における遺伝子発現振動の開始機構の解明

研究課題名(英文) Study of the starting mechanisms of the first oscillatory wave for segmentation

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：オオヒメグモのhhやmsx1を中心とした遺伝子の発現と機能の解析を行い、体節形成につながる繰り返しの縞パターンの形成が、体の領域ごとに異なる3種類の波のような遺伝子発現により達成されていることを示した。msx1はそのすべての波の構成成分であり、かつ、制御に関わっていることが分かった。特に本研究で発見したmsx1の第一の発現波は後端から胸部まで進行する大きな波である。この波はヘッジホッグシグナルにより制御されており、胸部で3分割し、後体部での発現振動の開始に関わることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、オオヒメグモの縞パターンの形成が体の領域により2分割、3分割、振動という異なるダイナミクスの遺伝子発現の波により達成されることを示した。これらの異なるダイナミクスの波はコンポーネントを共有していることも示した。この発見はゲノム上に状況に応じて異なるダイナミクスを示す分子ネットワークが存在することを示している。このネットワークのさらなる解析が、コンテキストによる表現型の違いや、動物による縞パターン形成メカニズムの違いなどの理解へと発展しうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study showed that three types of gene expression waves are responsible for segmental stripe formation in three regions of the spider body, head, thorax, and opisthosoma. msx1 is a new segmentation gene in the spider embryo; its expression is detected in all these waves and regulates dynamics of the waves. The newly identified primary wave of msx1, whose dynamics is regulated by Hedgehog signaling, splits into three stripes in the thorax and leads the oscillatory waves for the opisthosoma segmentation.

研究分野：発生生物学

キーワード：胚発生 ゲノム RNA-seq ヘッジホッグシグナル オオヒメグモ

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの動物の胚発生では、受精卵中に生じた少数種類の分子の非対称な分布がより複雑な遺伝子発現パターンへと発展し、体軸に沿った領域特異的なパターンや体節の繰り返しパターンが形成される。脊椎動物や一部の節足動物では、体の後部領域の細胞で遺伝子発現が繰り返し振動することにより体節の繰り返しパターンが生み出される。このような遺伝子発現の振動の分子ネットワークに関して、脊椎動物では詳細な研究が進められていた。しかし、振動開始のメカニズムに関してはどの動物においても未解明であった。

(2) 節足動物・鋏角類のオオヒメグモは、同じ節足動物のショウジョウバエとは異なり、体の後体部の体節は振動により形成される。オオヒメグモでは、初期胚の極性形成がヘッジホッグシグナルにより制御されることも、それまでの研究で明らかにしていた。ヘッジホッグ遺伝子をノックダウンした胚は後部化し、前後軸に沿ったパターンが形成されないだけでなく、体節形成につながる繰り返しの縞パターンの形成も起こらない。さらに、ヘッジホッグシグナルにより負に制御される遺伝子として同定した *msx1* をノックダウンすると、前後のパターンはある程度正常に形成されるものの、縞パターンは形成されないことが分かってきていた。また、オオヒメグモは、卵の表面にある外胚葉の上皮細胞層で縞パターン形成が起きるため、振動現象にアクセスしやすいという利点があった。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、オオヒメグモをモデル系として利用し、発生初期の卵の分子的な非対称性を体節形成につながる遺伝子発現の振動へと発展させるメカニズムを明らかにすることを目的とした。初期胚の極性形成や体節形成への関与が考えられていたヘッジホッグや *msx1* 遺伝子を起点として、これらの遺伝子と、これらにより制御される遺伝子の発現や機能を解析し、遺伝子発現振動の開始に関わる分子のネットワークを明らかにすることを目指した。

(2) 縞パターン形成時には、オオヒメグモ胚の形態は円盤形から帯状に大きく変化する。本研究では細胞の動きと遺伝子発現を同時に観察する方法を構築することも目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 同時に生まれた兄弟胚を取り分けて一定時間ごとに固定し、FISH (蛍光 in situ hybridization) 法により染色することで、縞パターン形成へと発展していく遺伝子発現変化を明らかにする。

(2) Parental RNAi と RNA-seq を組み合わせた実験で *msx1* により発現制御を受ける遺伝子の候補としてリストしていた遺伝子について、発現を詳細に解析し、縞パターン形成に関与する遺伝子を同定する。

(3) Embryonic RNAi (eRNAi)胚および Parental RNAi (pRNAi)胚の表現型の解析や、レーザー照射による実験を取り入れ、発現振動開始に関わる分子ネットワークの解明を目指す。

(4) 胚後体部の微小領域を用いて RNA-seq を行い、振動開始期と振動期の遺伝子発現を細胞レベルで解析する。

(5) オオヒメグモ胚で遺伝子発現系を構築する。

### 4. 研究成果

#### (1) 新しい発現波の発見

*msx1* 遺伝子の発現は、発生初期には将来の後端部に相当する領域で検出されるが、続くステージでは体節ごとに繰り返した縞パターンとして観察される。この縞パターンへの発現変化を、同時に生まれた兄弟胚を一定時間ごとに固定し染色することにより追跡し、3分割 (tri-splitting) と名付けた新しい縞パターン形成の現象を発見した(図1)。

この解析でまず明らかになったことは、*msx1* 遺伝子の発現が非常に動的な波のような動態を示すことである。この発現の波は *hh* の発現領域から最も離れた胚の後端部から開始し、胸部領域まで到達する。後端部の細胞を蛍光物質で標識することで、この波は細胞の移動ではなく、遺伝子発現が各細胞で On/Off することにより起こることを示した。興味深いことに、波が開始する領域の細胞を開始前にレーザー照射により

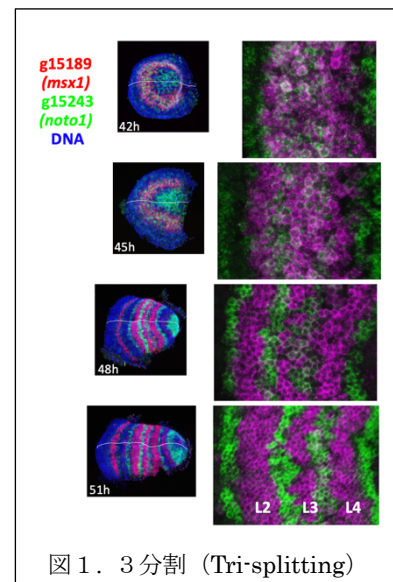


図1. 3分割 (Tri-splitting)

破壊しても、波の広がりには影響しなかった。一方、Hh シグナルの負の制御因子である *ptc* をノックダウンすると *msx1* の発現は開始せず、反対に、*hh* のノックダウンでは *msx1* の発現が胚全体に広がった。Hh シグナルが *msx1* の波の制御に深く関わっていることが明らかとなった。さらに、胸部に到達した *msx1* の発現の波は、胸部3体節に相当する3本の縞に分割することが分かった(これが3分割という現象である)。この発見により、それまでに知られていた後体部の振動と頭部の2分割と合わせて、オオヒメグモの縞パターン形成は、体の3領域で異なる動態を示す3種類の波が関わる現象であることが明らかとなった(図2)。同じゲノムをもつ細胞が状況に応じて異なる動態を示すことから、オオヒメグモの縞パターン形成のメカニズムの解明は、動物による縞パターン形成の違いの理解へつながると考えられる。

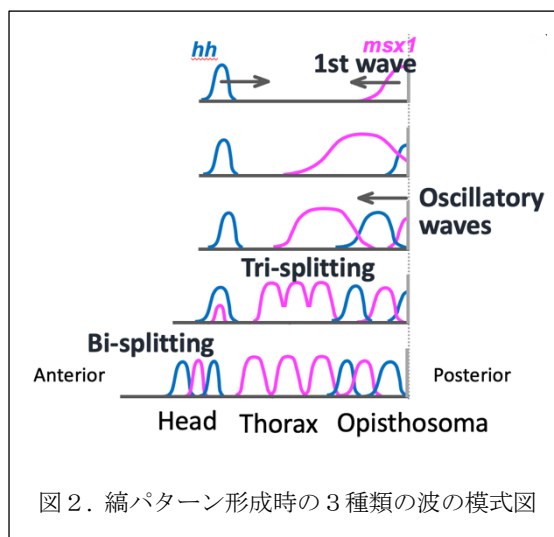


図2. 縞パターン形成時の3種類の波の模式図

### (2) 頭部・胸部・後体部の縞パターン形成に関わる波の動態の解明

*msx1* の発現は3分割を行う第1の波だけではなく、後体部では繰り返しの振動の波として、頭部では2分割する *hh* の発現の縞の間で観察された。また、pRNAiによる胚全体のノックダウンでは、頭部・胸部・後体部のどの領域においても縞パターンが形成されないことが分かっていた。*msx1* を中心とした解析は、それぞれの領域における縞パターン形成の理解に繋がると考え、FISHによる精度の高い発現解析と eRNAiによる *msx1* の局所的なノックダウンを行い、3種類の波の動態の一端を明らかにした。

後体部の振動の波は *msx1* の第1の波に引き続いて開始し、*msx1* や *hh*、これらの遺伝子によって制御される複数の遺伝子の、少しずつ位相を異にした発現で構成されることが分かった。波の開始領域に *msx1* のノックダウンクローンが生じると、クローンの所だけで波を構成する遺伝子の発現が開始しない、または消失しないという異常が引き起こされた(図3)。*msx1* は振動波の開始や進行を制御していることが考えられた。

胸部の3分割では、*msx1* は *noto1* 遺伝子と相補的なパターンを形成する(図1)。*msx1* の胸部のノックダウンクローンではこの相補的なパターンが形成されず、これらの遺伝子が抑制的な相互作用をすることで3分割を引き起こしている可能性が考えられた。

頭部では、*hh* の発現の縞が前端より進行し、続いて2本の縞へ分割する。この時、*msx1* の発現が分割に先立って *hh* を発現する細胞の中に現れ、*hh* の発現を抑制することにより縞が分割することを示すことができた。

本研究により、これらの3種類の縞パターン形成の動態が明らかになりつつある。本研究の結果は3種類を可能とする分子ネットワークがオオヒメグモのゲノム上に存在することを示している。今後、ネットワークの根幹を明らかにしていきたい。

### (3) オオヒメグモ胚における Single-Cell RNA-seq 実験の立ち上げ

振動が開始する後体部の微小領域を取り出して RNA-seq をすることにより、振動状態への移行や振動波の位相の違いに対応した遺伝子発現情報を取得することを計画していた。しかし、ここ数年で Single-cell RNA-seq 技術が格段に向上したため、本研究でもこの技術を取り入れることを考え、これまでの解析で最も情報の取得が進んでいる胚盤期の胚を用いて Single-cell RNA-seq 実験の立ち上げを行った。細胞の解離条件や保存方法などを検討し、予備実験を行い、この技術がオオヒメグモ胚でもうまく動くという結果を得ることができた。縞パターン形成期の胚での実験は行うことができなかったが、今後の発展につながる土台を築くことができた。

当初、計画に入れていたオオヒメグモ胚での発現系の構築には手が回らなかった。今後の課題として取り組んでいきたいと考えている。

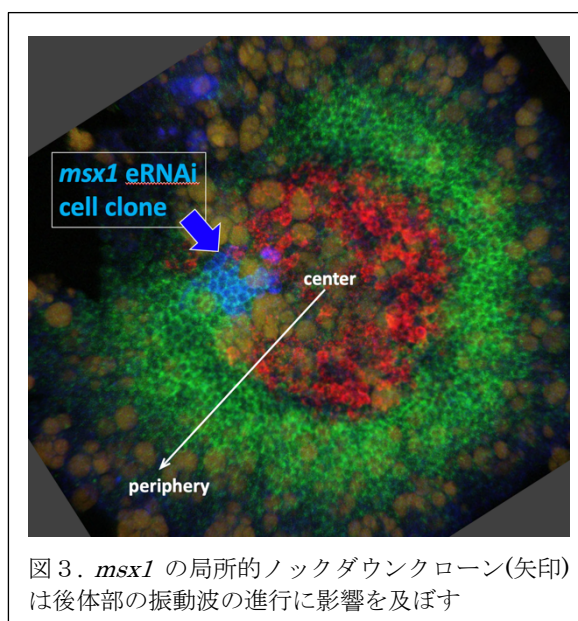


図3. *msx1* の局所的ノックダウンクローン(矢印)は後体部の振動波の進行に影響を及ぼす

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 秋山-小田 康子	4. 巻 74
2. 論文標題 オオヒメグモ胚のパターン形成 縞パターンはどのようにできるか?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物の科学 遺伝 特集 クモのゲノム、遺伝子研究の最前線	6. 最初と最後の頁 670-676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama-Oda Yasuko, Oda Hiroki	4. 巻 6
2. 論文標題 Hedgehog signaling controls segmentation dynamics and diversity via msx1 in a spider embryo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaba7261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aba7261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oda, H., Akiyama-Oda, Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 The common house spider <i>Parasteatoda tepidariorum</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EvoDevo.	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1185/s13227-020-00152-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oda, H., Akiyama-Oda, Y.	4. 巻 28
2. 論文標題 Dataset on gene expressions affected by simultaneous knockdown of Hedgehog and Dpp signaling components in embryos of the spider <i>Parasteatoda tepidariorum</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Data Brief.	6. 最初と最後の頁 105088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2019.105088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oda, H., Akiyama-Oda, Y.	4. 巻 25
2. 論文標題 Microarray data on the comparison of transcript expression between normal and Pt-Delta RNAi embryos in the common house spider <i>Parasteatoda tepidariorum</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Data Brief.	6. 最初と最後の頁 104350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2019.104350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oda, H., Iwasaki-Yokozawa, S., Usui, T., Akiyama-Oda, Y.	4. 巻 230
2. 論文標題 Experimental duplication of bilaterian body axes in spider embryos: Holm's organizer and self-regulation of embryonic fields.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dev. Genes Evol.	6. 最初と最後の頁 49-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00427-019-00631-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Leite, D.J., Baudouin-Gonzalez, L., Iwasaki-Yokozawa, S., Lozano-Fernandez, J., Turetzek, N., Akiyama-Oda, Y., Prpic, N.M., Pisani, D., Oda, H., Sharma, P.P., McGregor, A.P.	4. 巻 35
2. 論文標題 Homeobox gene duplication and divergence in arachnids.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Biol Evol.	6. 最初と最後の頁 2240-2253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/molbev/msy125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Iwasaki-Yokozawa, S., Akiyama-Oda, Y., Oda, H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Genome-scale embryonic developmental profile of gene expression in the common house spider <i>Parasteatoda tepidariorum</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Data Brief.	6. 最初と最後の頁 865-867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2018.05.106.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Henmi, N, Akiyama-Oda Y, Fujimoto K and Oda H	4. 巻 437
2. 論文標題 A quantitative study of the diversity of stripe-forming processes in an arthropod cell-based field undergoing axis formation and growth.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 84-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2018.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Schwager EE, Sharma PP, Clarke T, Leite DJ, Wierschin T, Pechmann M, Akiyama-Oda Y, et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 The house spider genome reveals an ancient whole-genome duplication during arachnid evolution.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Biol.	6. 最初と最後の頁 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-017-0399-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sasaki M, Akiyama-Oda Y and Oda H	4. 巻 17
2. 論文標題 Evolutionary origin of type IV classical cadherins in arthropods.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Evol. Biol.	6. 最初と最後の頁 142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12862-017-0991-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 赤岩孝憲、小田広樹、秋山-小田康子
2. 発表標題 オオヒメグモ胚での全遺伝子発現パターンの推定: シングルセルRNAseq解析に基づく方法の確立
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1 . 発表者名 Akiyama-Oda, Y., Oda, H.
2 . 発表標題 Hedgehog signaling controls segmentation dynamics and diversity via msx1 in a spider embryo.
3 . 学会等名 Society for Developmental Biology 78th Annual Meeting ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Akiyama-Oda, Y., Oda, H.
2 . 発表標題 Segmentation dynamics and diversity controlled by Hedgehog signaling.
3 . 学会等名 52st JSDB
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Akiyama-Oda, Y., Oda, H.
2 . 発表標題 Wave generation mediated by Hedgehog signaling and its target gene: A key link between axis specification and segmentation.
3 . 学会等名 Joint annual meeting of 51st JSDB and 70th JSCB ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Akiyama-Oda, Y., Iwasaki-Yokozawa, S., Oda, H.
2 . 発表標題 Parasteatoda tepidariorum is a model spider the permits genome-based study of developmental biology.
3 . 学会等名 21st International Congress of Arachnology ( 招待講演 ) ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年



1. 発表者名 Akiyama-Oda, Y., Iwasaki-Yokozawa, S., Oda, H.
2. 発表標題 A genome-wide study of Hedgehog signaling identifies a transcription factor gene mediating gene expression dynamics in the early spider embryo.
3. 学会等名 18th International Congress of Developmental Biology (Singapore) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akiyama-Oda, Y., Iwasaki-Yokozawa, S., Oda, H.
2. 発表標題 A Hedgehog signaling network regulates the initiation of segmental oscillations in the early spider embryo.
3. 学会等名 50th Annual Meeting of JSDB (Tokyo)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

BRH Data Resources <a href="http://www.brh2.jp/index.html">http://www.brh2.jp/index.html</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小田 広樹  (Oda Hiroki)  (50396222)	株式会社生命誌研究館・その他部局等・主任研究員    (94404)	



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	佐野 浩一  (Sano Koh-ichi)  (30170806)	大阪医科大学・医学部・教授    (34401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関