

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：12611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15167

研究課題名(和文)発生緩衝における母性遺伝のしくみの解明

研究課題名(英文)Mechanisms of maternal inheritance of developmental buffering

研究代表者

佐藤 敦子 (Sato, Atsuko)

お茶の水女子大学・基幹研究院・助教

研究者番号：90589433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：カタユレイボヤの姉妹種を用いた異なる発生緩衝度合いを示すハイブリッドでの遺伝子発現比較からは、100を超える遺伝子において、発生緩衝との関連が示唆された。これらの遺伝子はシャペロンばかりでなく、様々な機能を持つ遺伝子にまたがっており、特に代謝や細胞内プロセスに関係する遺伝子が多くみられた。これらの遺伝子の発現におけるインバランス解析を行うことにより、約40%の遺伝子で母親由来のゲノムによる発現であることが示唆された。また、小胞体関連シャペロンについては、線虫での機能スクリーニングを行い、ほとんどの小胞体関連シャペロンが発生緩衝にかかわることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の発生は、遺伝子型や環境の影響を緩衝し、一定に保たれている。このため、遺伝型から発生を予測することが現在でも困難である。例えば、ゲノム中に病気の原因となる遺伝子を持っていたとしても、その病気を発症するとは限らない。どのような場合に発症するのか、そのしくみが理解されれば、大病を未然に防いだり、地球環境の変動下でどのような病気が起こるかを予測したり、もしくは環境の変動による生物の進化を予測することも可能になるだろう。本研究は、ゲノムレベルで発生緩衝に関する分子を明らかにした。

研究成果の概要(英文)： This project aims to investigate the molecular basis of developmental buffering by comparing two types of cross hybridization of sibling species in *Ciona intestinalis* adapted to different seawater temperatures. By comparing transcriptomes of heat treated early tailbud embryos, dozens of genes were inferred to be involved in developmental buffering (here we entitled 'developmental buffering genes' (DBG)). We undertook imbalance analysis in which we identified SNP origin in each transcript. We found that nearly 40% of DBGs showing imbalance in expression. We also conducted comparisons of egg transcriptomes and epigenome sequencing (ATAC-Seq) from heat treated early tailbud embryos. Nearly half of the DBGs showing imbalance are expressed differently between type A and type B eggs. We also conducted functional screening of 12 DnaJ genes in *C. elegans* using RNAi. We found that most of the ER-associated DnaJ chaperones are involved in developmental buffering.

研究分野：環境発生進化学

キーワード：発生のロバストネス 発生緩衝 カタユレイボヤ 母性効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物の発生は、環境の影響やゲノムの変異の影響を緩衝し、一定に保たれている。このような作用を発生緩衝とよぶ。半世紀以上も前、Conrad Hal Waddington が提唱[1]して以来、理論研究は盛んに行われてきたが、実際の分子レベルの現象としての知見が乏しい。20 年前、Suzan Lindquist らが、熱によって発現が上昇するシャペロン分子の一種、Hsp90 との関連を発表[2]して以来、Hsp90 があたかも発生緩衝の Master regulatory gene であるかのように、発生生物学者や生態学者から扱われてきた。しかし代表研究者は、異なる温度環境に適応したカタコウレイボヤ姉妹種の比較研究から、Hsp40 に含まれる複数のシャペロン分子も発生緩衝の役割を果たしていることを明らかにした[3]。本研究では、シャペロン以外にも発生緩衝に関係している分子を探索するため、カタコウレイボヤのハイブリッドの比較研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、まず、タイプ A およびタイプ B の両方のゲノムを持つにもかかわらず、卵の違いによって異なる発生緩衝を示すハイブリッド集団を比較することにより、発生緩衝分子を網羅的に探索する。また、発生緩衝が母性効果を示す仕組みを明らかにするため、ハイブリッドのトランスクリプトームについて SNPs 解析を行うことにより、発生緩衝の母性効果におけるエピジェネティックな制御の可能性を模索する。

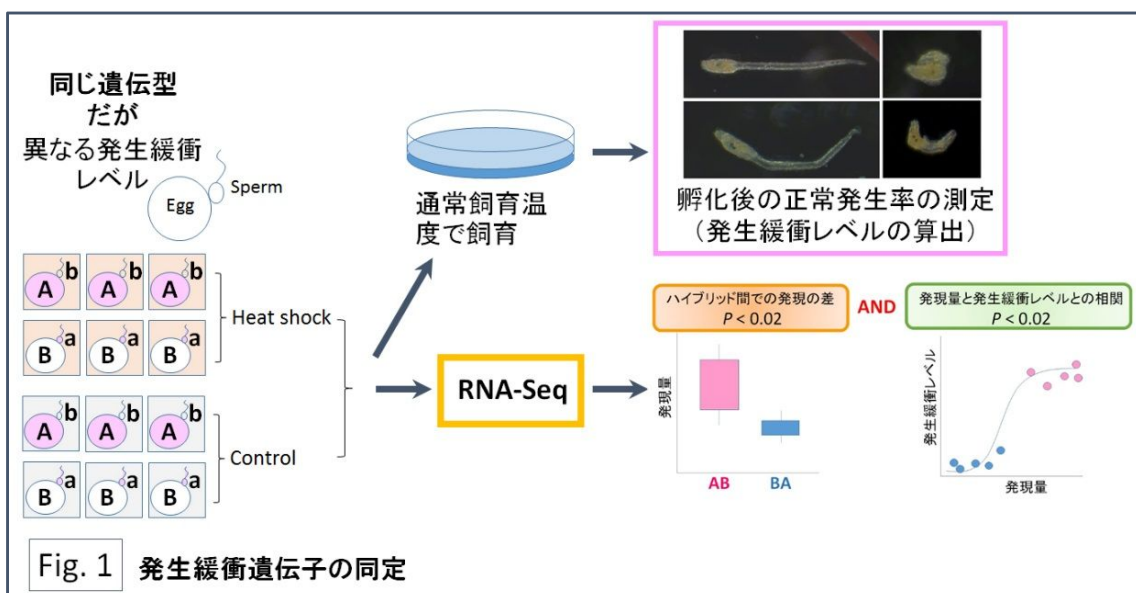
3. 研究の方法

(1) カタコウレイボヤの姉妹種におけるハイブリッド胚の RNA-Seq 解析

発生緩衝を制御する母性因子は、発生中の胚でも発現量が異なるために、発生中の胚の発生緩衝が母性遺伝すると考えられる。発生中の胚で母性由来の発現量を示す分子を特定するため、タイプ A の卵を使ったハイブリッドと、タイプ B の卵を用いたハイブリッドとの間でトランスクリプトームを比較した。胚のサンプルは、タイプ A およびタイプ B の両種が同所的に棲息している英国南西部のプリマス(英国海洋生物学研究所)にて両種を採集し、ハイブリッドを作成した。脊椎動物も含む脊索動物の特徴が現れはじめる尾芽胚の時期に、自然界での海水温度(約 17)と熱ストレスを加えた条件下(27 1 時間)の区画に分け、それぞれのハイブリッドを保存した。日本に持ち帰り、遺伝型を確認したのち、コントロールでの正常発生率が 70%以上のサンプルについて RNA-Seq 解析を行い、Bioconductor[4]を用いた統計解析により、発生緩衝度合いと有意な相関性が見られる発現量を示す遺伝子のリスト 1 を作成した。

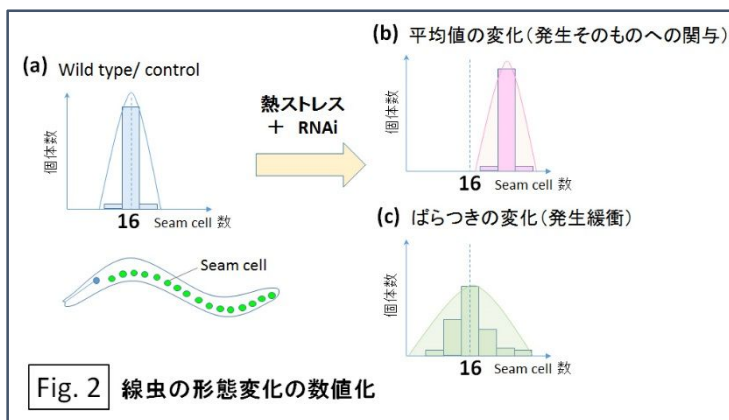
(2) 母性発現を示す遺伝子の探索

リスト 1 にあがった分子について、それぞれのハイブリッドで母性由来の発現を示す遺伝子を特定するため、RNA-Seq データにおける多型解析を行った。本研究では、すでに発表されているパイプライン Allele Workbench[5]を使って SNP の認識やゲノムのマスクを行ったが、SNPs の数をまとめた bed ファイルを作成後は、カタコウレイボヤのゲノムでの解析に適合させるために python スクリプトを作成し、タイプ A 由来のゲノムからの発現とタイプ B ゲノム由来の発現の比をヒートマップにまとめた。母性由来の発現量と父性由来の発現量をまとめ、統計的に母性由来の発現量に有意な差が見られる遺伝子を特定し、リスト 2 を作成した。



(3) 動物界における保存性の確認

発生緩衝との関係が示唆された小胞体関連シャペロンについて、線虫で seam cell を GFP で標識したトランスジェニックシステムを用いて機能解析を行った。Seam cell は、L4 ステージで 16 個現れることが知られている。発生緩衝は、発生における形態のばらつきを抑える効果として定義されるため、遺伝子の機能阻害 (RNAi) を行った際、形態のばらつきが大きくなった場合発生緩衝に関係していることが示される (Fig. 2)。



4. 研究成果

発生緩衝分子の網羅的同定

タイプ A 由来の卵とタイプ B 由来の精子を受精して作成したハイブリッド (AB) と、その逆の組み合わせで作成したハイブリッド (BA) を各 3 バッチずつ作成し、illumina によるトランスクリプトーム解析を行った。得られたシーケンスデータは bwa mem [6] によってカタウレイボヤタイプ A ゲノム (HT ゲノム) にマップし、featureCount [7] で各リード数を算出した。正規化したリード数をもとに、edgeR [4] で解析した結果、852 遺伝子モデルで、母親が異なるハイブリッド間で発現量における有意な差が示された ($FDR < 0.05$)。さらに、各バッチの一部をヒートショック後通常の温度で飼育した場合の孵化後の正常発生率 (発生緩衝度合い) と、各遺伝子の発現量との相関を調べたところ、852 遺伝子モデルのうち、約 130 遺伝子モデルが有意な相関 ($P < 0.05$) を示した。カタウレイボヤの遺伝子モデルは、GO が割り当てられていないものが多いが、Ensemble の遺伝子モデルに置き換えて GO を調べたところ、代謝や細胞プロセスに関わる遺伝子が大半を占めていた。本研究の成果について、2019 年 4 月にスペインで開催された MBO Workshop 「Protein Quality Control: From Mechanism to Disease」および 2019 年 7 月に英国マンチェスターで開催された国際学会 SMBE で研究成果の発表を行った。

母親由来ゲノムからの発現の同定

発生緩衝における母性効果のしくみを探るため、カタウレイボヤハイブリッドのトランスクリプトームデータについて、SNP 解析を行った。全 SNPs におけるレファレンス (タイプ A) と同じ場合のカウントの割合について、「個々の遺伝子の発現が、母方由来のゲノムもしくは父方由来のゲノムからランダムに起こっている」ことを帰無仮説として線形モデルを作成した結果、スクリプトームのうち、約 2000 遺伝子モデルが母方もしくは父方に偏った発現を示すことが明らかになった。これらのうち、発生緩衝遺伝子としてリストされた 129 の遺伝子のうち、約 40% の遺伝子が母方もしくは父方に偏った発現を示していることが明らかになった。

以上の結果から、発生緩衝遺伝子の発現に観察された偏りが、未受精卵にすでに含まれている母性 RNA の供給量における制御であるのか、それとも胚性発現のエピジェネティックな制御によるものであるかを検証する必要がある。そこでまず、タイプ A の未受精卵およびタイプ B の未受精卵のトランスクリプトームを比較した。得られたデータはトランスクリプトームデータと同様に解析し、edgeR による発現量の差を検定した。未受精卵で異なる遺伝型間で差が見られる遺伝子のうち、発生緩衝分子でインバランスが確認された遺伝子は約 20 遺伝子にとどまった。つまり、残りの約 25 遺伝子は、胚性発現における何らかの母性制御によってインバランスを生じていることになる。

そこで、胚性発現におけるエピジェネティックな制御について検証するため、トランスクリプトームデータを取ったサンプルと同様に、ヒートショックをかけた後の胚で、クロマチン構造を調べる ATAC-Seq を行った。得られたシーケンスデータについてトランスクリプトームデータと同様の解析を行った。この結果、ATAC-Seq で父性もしくは母性ゲノムのどちらかのみからの発現を示す遺伝子に、本研究で同定された発生緩衝分子は含まれていなかった。これらの結果から、インバランスを示す発生緩衝分子のうち、母性効果を示すものの半分以上は、タイプ A ゲノムとタイプ B ゲノムにおける胚性発現制御における違いによるものであると考えられる。また、同定された発生緩衝分子の全体を考えると、半分以上はインバランスを示していないことから、エピジェネティクスでも母性 RNA でもない、胚性発現における制御の重要性が示された。

線虫での機能解析

線虫では、小胞体関連シャペロンを含む 12 個の DnaJ シャペロンの発生緩衝における役割について、RNAi による機能解析を行った。この結果、温度ストレス下でのみ発生緩衝に関係している分子のほか、通常の発生温度下で発生緩衝に関わっている分子、また、温度と無関係に発生緩衝に関わっている分子や、通常発生のばらつきを増している遺伝子(ノックダウンすることにより、発生におけるばらつきが小さくなる)遺伝子など、様々な機能に分かれ、スクリーニングを行ったほとんどの DnaJ が何らかの発生緩衝に関わっていることが明らかになった (Fig.3)。本研究成果は国際学術雑誌[8]に発表され、2018 年夏にアイルランドで開催された国際学会 Euro-Evo-Devo では、この研究成果の発表が口頭発表に選ばれた。

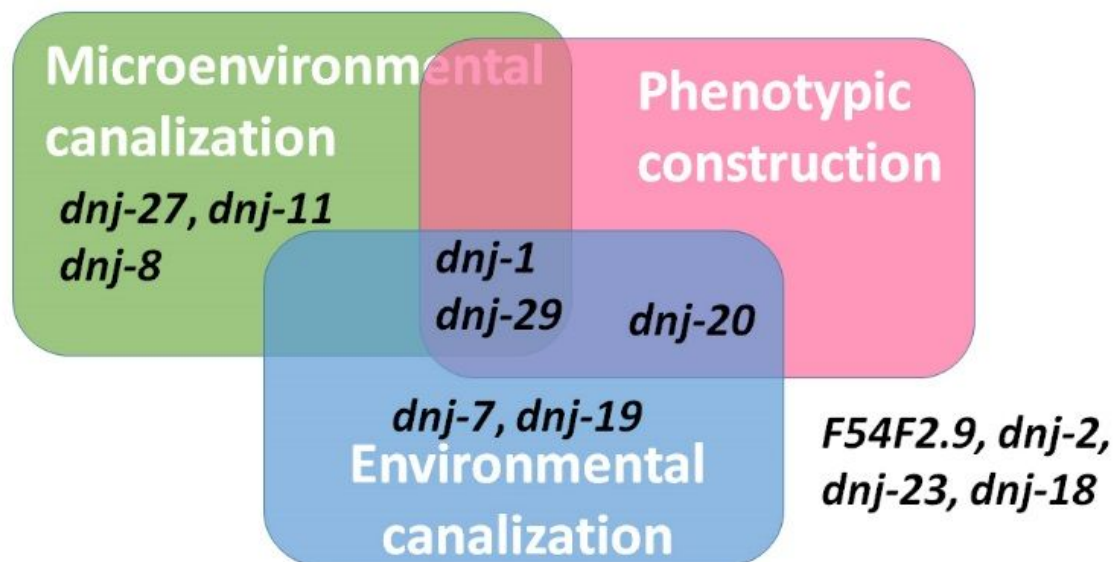


Fig. 3 発生緩衝に関わるDnaJ分子

引用文献

- [1] Waddington, C.H.. The Strategy of the Genes. George Allen & Unwin (1957).
- [2] Rutherford, S.L. & Lindquist S. Nature 396: 336-42 (1998)
- [3] Sato, A. et al. Sci. Rep. 5: 16717 (2015).
- [4] Robinson, M.D. et al. Bioinformatics. 26: 139-140 (2010)
- [5] Soderlund, C.A. et al. PLoS One 9 (2014)
- [6] Li, H. & Durbin, R. Bioinformatics 25, 1754-1760 (2009)
- [7] Liao, Y. et al. Bioinformatics. doi:10.1093/bioinformatics/btt656 (2014)
- [8] Hughes, S. et al. J. Exp. Zool. A Ecol Integr Physiol 331: 201-212 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato A	4. 巻 19
2. 論文標題 Chaperones, canalization, and evolution of animal forms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 3029
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3390/ijms19103029.	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 Hughes S, Vrinds I, de Roo J, Franck C, ShimeId SM, Woollard A, Sato A	4. 巻 2019
2. 論文標題 DnaJ chaperones contribute to canalization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology part A	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/jez.2254. Epub 2019 Jan 17.	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Sato A	4. 巻 14
2. 論文標題 How does environmental change influence the development and evolution of organisms?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Biologists	6. 最初と最後の頁 08-09
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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 10件）

1. 発表者名 Oba GM, Sato A
2. 発表標題 Protein homeostasis and developmental robustness
3. 学会等名 EMBO workshop 'Protein quality control: From mechanisms to disease'（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato A
2. 発表標題 Protein homeostasis and developmental robustness
3. 学会等名 Society for Molecular Biology and Evolution (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oba GM, Sato A
2. 発表標題 Maternal factors involved in developmental buffering
3. 学会等名 International Conference on Systems Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大庭ジーナ未来, 佐藤敦子
2. 発表標題 Ciona intestinalis とCiona robustaハイブリッドの発生緩衝における母性効果の分子基盤の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oba GM, Sato A
2. 発表標題 Transcriptome analysis investigating maternal factors involved in developmental buffering
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oba GM, Sato A
2. 発表標題 カタユレイボヤのハイブリットで発生緩衝に関わる遺伝子の探索
3. 学会等名 日本動物学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hughes S, Vrinds I, Oba GM, de Roo J, Shimeld S, Sato A.
2. 発表標題 Role of DnaJ in developmental robustness and canalization
3. 学会等名 Euro Evo Devo meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hughes S, Vrinds I, Oba GM, de Roo J, Shimeld S, Sato A.
2. 発表標題 DnaJ chaperones are important in environmental and genetic canalization
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Symposia 'Homeostasis in Health and Disease' (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato A
2. 発表標題 DNAJs in canalization and evolution of animal forms
3. 学会等名 International Symposium on 'Proteins; from the Cradle to the Grave' (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Oba GM & Sato A.
2. 発表標題 Evolution of DNAJ family genes associated to canalization
3. 学会等名 International Symposium on 'Proteins; from the Cradle to the Grave' (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Oba GM & Sato A
2. 発表標題 Maternally supplied 'hub molecules' controls environmental buffer in a wild population of the chordate Ciona.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Symposia 'Gene Expression and Systems Biology' (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤敦子
2. 発表標題 カタコウレイボヤの種分化と環境適応について
3. 学会等名 日本動物学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sato A, Duong HTT, Nakayama M, Yamaguchi H, Kametani H, Yura K, Shimada A, Takeda H.
2. 発表標題 Folding or degradation: an endoplasmic reticulum chaperone as a key of buffering and thermal adaptation in teleost fish
3. 学会等名 Gordon Research Conference "Molecular mechanisms of evolution" (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----