

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0013

研究課題名(和文)線虫近縁種間のゲノム比較およびゲノム改変による遺伝子回路リワイヤリング過程の解明

研究課題名(英文) Analysis of rewiring of genetic pathways by comparison and modification of nematode genomes

研究代表者

杉本 亜砂子 (Sugimoto, Asako)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80281715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、3種の線虫(*C. elegans*, *C. inopinata*, *P. pacificus*)を用い、比較ゲノムと遺伝子機能解析を統合的に用いることによって、細胞極性確立と生殖顆粒形成過程における遺伝子回路リワイヤリングの解析を行った。その結果、重要遺伝子の喪失や獲得により、近縁種であっても予想以上に遺伝子回路のリワイヤリングが起きていることが明らかになった。とくに細胞極性確立については、*P. pacificus*受精卵においてはアクチン凝集体に紡錘体微小管が引き寄せられることにより非対称分裂が引き起こされるという*C. elegans*には見られない新たな現象を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物が進化する過程では、生命現象を制御する遺伝子回路の変化が重要だと考えられているが、そのプロセスについては十分な理解が進んでいない。本研究では、3種の近縁の線虫種のゲノム比較と遺伝子操作により、遺伝子の喪失や獲得により個体発生の素過程が予想以上に急激に変化し得ることを明らかにした。これは生物進化プロセスの遺伝子レベルでの理解に貢献する成果である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we characterized the rewiring of gene circuits using three nematode species (*C. elegans*, *C. inopinata*, and *P. pacificus*), by comparative genomics and gene function analysis. We focused on the gene circuit rewiring of the establishment of cell polarity and germ granule formation in zygotes. We found that the loss or acquisition of key genes led to the rewiring of gene circuits at a high frequency, even in closely related species. In particular, we found a new phenomenon in the process of cell polarity establishment in *P. pacificus* zygotes; an actin aggregate is involved in the reorientation of the mitotic spindle, which is not observed in *C. elegans*.

研究分野：発生生物学

キーワード：遺伝子回路 ゲノム進化 線虫 細胞極性 生殖顆粒

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命現象を制御する遺伝子回路は、遺伝子の重複や喪失・新規遺伝子の獲得により、『リワイヤリング (rewiring, 繋ぎ変え)』され、変化していく (図1)。近年の比較ゲノム解析から、遺伝子回路リワイヤリングは進化の過程で頻繁に起こることが推測されており、個体形質変化の駆動力となっていると考えられるが、そのプロセスについてはほとんどわかっていない。

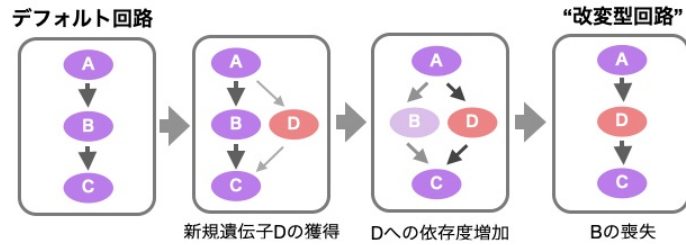


図1 遺伝子回路のリワイヤリング (rewiring, 繋ぎ変え)

遺伝子回路リワイヤリング過程の解明のためには、近縁種間の比較により、ゲノム上の遺伝子の重複・喪失・獲得が遺伝子回路を構成する遺伝子間の相互作用にどのような影響を及ぼすかを理解することが必要である。そこで、本研究では、全ゲノム配列が解読済みであり、かつ、遺伝子操作が可能な3種の線虫 *Caenorhabditis elegans*、*Caenorhabditis inopinata*、および *Pristionchus pacificus* をモデル生物として選択した (図2)。*C. elegans* は最も多角的に解析されているモデル生物であり、遺伝子回路に関する情報が蓄積されていることから、比較解析のための基盤となる。*C. inopinata* は最近、沖縄で発見され、*C. elegans* の姉妹種として注目を集めている (Kanzaki et al., *Nature Comm.*, 2018)。興味深いことに、*C. inopinata* は *C. elegans* の姉妹種であるにもかかわらず、サイズ・生殖様式・生態などで異なる点が多く、遺伝子回路にも多数の違いがあると推測される。研究分担者の菊地らは *C. inopinata* の全ゲノム配列を解読し、研究代表者である杉本は遺伝子操作技術の開発を行ってきた。*P. pacificus* は *Caenorhabditis* 属線虫とは異なる科に属しており、*Caenorhabditis* 属線虫の outgroup として位置づけられる。

2. 研究の目的

本研究では、3種の線虫 (*C. elegans*、*C. inopinata*、および *P. pacificus*) を用い、2つの遺伝子回路 (1) 細胞極性確立、(2) 生殖顆粒形成 に着目し、比較ゲノムと遺伝子機能解析を統合的に用いることによって、遺伝子回路リワイヤリング状態の解析を行うとともに、人為的な遺伝子回路リワイヤリングの誘導を試みることにした。これらの解析を通して遺伝子回路リワイヤリング過程の解明をめざした。

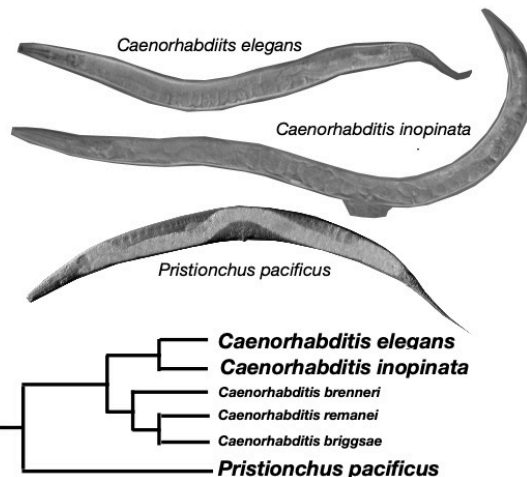


図2 本研究で用いた3種の線虫

3. 研究の方法

(1) 細胞極性確立回路

細胞極性確立を制御する遺伝子回路は進化的に保存されており、PAR 複合体と LGL の拮抗的作用が重要である。ゲノム比較により、*C. elegans* およびその近縁種では PAR-2 が獲得されたことにより LGL の回路への貢献度が低下するような遺伝子回路リワイヤリングが起きたと推測されていた。本研究では、PAR-2 を持つ *C. elegans*・*C. inopinata* および PAR-2 を持たない *P. pacificus* の受精卵における細胞極性確立過程をライブイメージングと遺伝子機能解析により比較し、この過程を制御する遺伝子回路の違いを解析した。

(2) 生殖顆粒形成回路

生殖顆粒は多くの動物において生殖細胞特異的にはたらく RNP 顆粒であり、*C. elegans* では PGL タンパク質 (PGL-1 および PGL-3) が生殖顆粒形成に中心的な役割を果たしている。ところが、PGL は *Caenorhabditis* 属線虫にしか存在しないことから、*Caenorhabditis* 属線虫では PGL の獲得により生殖顆粒形成回路のリワイヤリングが行われた可能性がある。そこで、まず、*C. inopinata* (PGL を1つ持つ) と *P. pacificus* (PGL を持たない) の生殖顆粒形成過程をライブイメージング解析し、*C. elegans* との違いを比較した。つぎに、PGL を持たない *P. pacificus* における生殖顆粒形成回路をゲノム解析および遺伝子操作により解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞極性確立回路

① *C. inopinata* および *P. pacificus* における遺伝子操作法の確立

C. inopinata と *P. pacificus* では *C. elegans* に比べて有効な遺伝子操作法が確立されていなかったため、まず手法の確立を行った。*C. inopinata* における RNAi による遺伝子機能破壊法、*C. inopinata* と *P. pacificus* における Bombardment 法による遺伝子挿入法、*P. pacificus* における CRISPR/Cas9 によるゲノム編集法を確立した(Kanzaki et al., *Nature Comm.*, 2018; Namai and Sugimoto, *Dev. Genes Evol.*, 2018)。

② *C. elegans* と *C. inopinata* 初期胚のライブイメージング比較解析

C. elegans と *C. inopinata* の初期胚ライブイメージングにより細胞ダイナミクスを比較した結果、以下の違いが観察された：a) *C. elegans* では未受精卵で前後軸がすでに決定されているのに対して、*C. inopinata* では未決定であること、b) *C. inopinata* では前核融合の位置が *C. elegans* よりも後極側であること、c) *C. elegans* で分裂後期にみられる紡錘体の振動が、*C. inopinata* ではほとんどみられないこと。すなわち、*C. elegans* と *C. inopinata* は最近縁種であるにもかかわらず、細胞極性確立機構の遺伝子回路に顕著な変化があることが示唆された。

③ *C. elegans* と *P. pacificus* 初期胚のライブイメージング比較解析

P. pacificus 初期胚における細胞極性確立および非対称分裂のライブイメージング解析を行い、詳細に解析されている *C. elegans* と比較した。紡錘体微小管は、*P. pacificus* では *C. elegans* よりも分裂中期までは短い、分裂後期以降に安定化された。一方、アクトミオシンの収縮に依存すると考えられている細胞膜のラッピングは *P. pacificus* の方が顕著に激しいことが示された。さらに、第一分裂における紡錘体の後極側への移動の際に、*P. pacificus* ではアクチン集積点が後極に一過的に形成され、その点に紡錘体極が引き寄せられることを発見した。

ゲノム比較により、*C. elegans* の細胞極性確立に必須である PAR-2 や微小管と細胞表層の相互作用に必要な LIN-5 が *P. pacificus* では欠損しており、*P. pacificus* では *C. elegans* とは異なる遺伝子回路が構築されていることが示唆された。

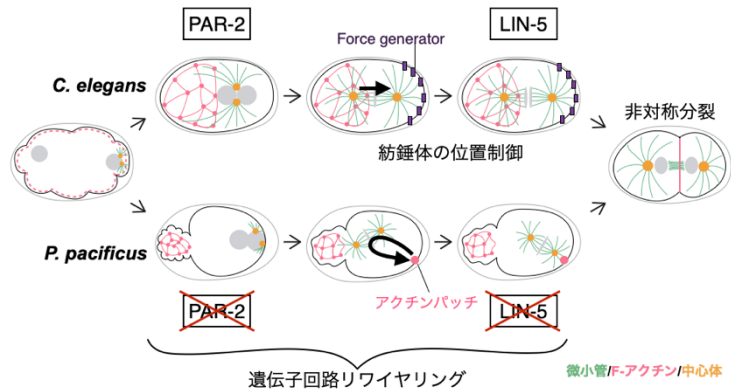


図3 *C. elegans*と *P. pacificus*の細胞極性確立・非対称分裂経路の相違点

(2) 生殖顆粒形成回路

① *C. elegans* と *C. inopinata* の生殖顆粒の比較解析

C. elegans の生殖顆粒形成には PGL タンパク質 (PGL-1 および PGL-3) が必須であり、常に生殖顆粒に局在する。PGL タンパク質は進化速度が早く *Caenorhabditis* 属線虫にしか存在しない。*C. elegans* の PGL-3 に対する抗体を用いて、*C. inopinata* の唯一の PGL タンパク質 Ci-PGL-1 の初期胚での細胞内局在を調べた結果、*C. elegans* よりもサイズは若干小さいが生殖細胞内で顆粒状の構造をとっていることが確認された。以上より、*Caenorhabditis* 属においては形状や細胞内分布の若干の相違はあるものの PGL タンパク質が生殖顆粒の構成因子として保存されていることが明らかになった。

② *C. elegans* と *P. pacificus* の生殖顆粒の比較解析

P. pacificus には PGL タンパク質は存在しないが、多くの生物種に保存されている生殖顆粒構成因子 VASA ホモログ (GLH) タンパク質が 3 種 (*Pp-glh-1*~*3*) 存在する。これらの GLH タンパク質群が生殖顆粒の構成因子であることを確認するために、*Pp-GLH-2* の GFP 標識株を Bombardment 法によって作製し、ライブイメージング解析を行った。その結果、*Pp-GLH-2* は *C. elegans* の生殖顆粒と類似した細胞内局在を示すことが明らかになった。すなわち、*P. pacificus* においては PGL タンパク質非依存的に生殖顆粒が形成されていることが示された。

さらに、*P. pacificus* の *Pp-glh-1* および *Pp-glh-2* 遺伝子の機能喪失株を CRISPR/Cas9 法により作出し

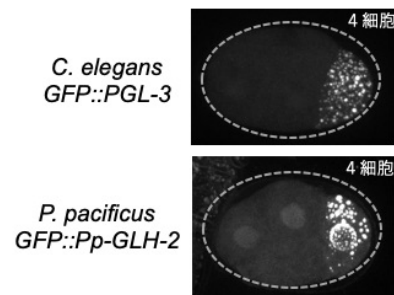


図4 *C. elegans*と *P. pacificus*の生殖顆粒

表現型解析を行った。その結果、*Pp-glh-1* 変異株は顕著な表現型が見いだされなかったが、*Pp-glh-2* 変異株は生殖細胞増殖および卵形成に顕著な異常を示し不稔となった。以上より、*P. pacificus* の GLH 遺伝子群は生殖顆粒に局在し、生殖細胞増殖・配偶子形成に重要な役割を果たしていることが示された。

(3) まとめと展望

本研究で実施した 3 種の近縁線虫の比較解析から、細胞極性確立や生殖顆粒形成という初期発生で重要な過程においても細胞動態の顕著な変化と遺伝子の重複・喪失・獲得が並行して起きており、遺伝子回路のリワイヤリングが予想以上に高頻度で生じていることが示唆された。今後、異種間遺伝子交換や異種遺伝子導入等により、人為的な遺伝子回路リワイヤリング誘導実験を実施することを計画している。

<引用文献>

Kanzaki, N., Tsai, I. J., Tanaka, R., Hunt, V. L., Liu, D., Tsuyama, K., Maeda, Y., Namai, S., ... Sugimoto, A., Kikuchi, T. Biology and genome of a newly discovered sibling species of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* 9, 3216 (2018).

Namai, S. & Sugimoto, A. Transgenesis by microparticle bombardment for live imaging of fluorescent proteins in *Pristionchus pacificus* germline and early embryos. *Dev. Genes Evol.* 228, 75–82 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Kanzaki N, Tsai IJ, Tanaka R, Hunt VL, Liu D, Tsuyama K, Maeda Y, Namai S, Kumagai R, Tracey A, Holroyd N, Doyle SR, Woodruff GC, Murase K, Kitazume H, Chai C, Akagi A, Panda O, Ke HM, Schroeder FC, Wang J, Berriman M, Sternberg PW, Sugimoto A, Kikuchi T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Biology and genome of a newly discovered sibling species of <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-05712-5	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 Satoshi Namai, Asako Sugimoto	4. 巻 228
2. 論文標題 Transgenesis by Microparticle Bombardment for Live Imaging of Fluorescent Proteins in <i>Pristionchus Pacificus</i> Germline and Early Embryos	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev Genes Evol.	6. 最初と最後の頁 75-82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00427-018-0605-z	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 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 2件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 杉本 亜砂子
2. 発表標題 線虫におけるゲノムスケール変化と表現型進化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野呂 美波、杉本 亜砂子
2. 発表標題 Evolutionary Cell Biological Analysis of Germ Granules using <i>C. elegans</i> and closely Related Species <i>P. pacificus</i>
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大村 駿、杉本 亜砂子
2. 発表標題 Early embryogenesis of <i>C. inopinata</i> , a sibling species of <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Oomura, Y. Hoshi, Y. Matsumura, N. Haruta, A. Sugimoto
2. 発表標題 Early embryogenesis of <i>C. inopinata</i> , a sibling species of <i>C.elegans</i>
3. 学会等名 22nd International <i>C.elegans</i> Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asako Sugimoto
2. 発表標題 An actin-dependent spindle positioning mechanism in the zygote of <i>Pristionchus pacificus</i>
3. 学会等名 <i>C.elegans</i> development, cell biology and gene expression Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daichi Sasaki, Asako Sugimoto
2. 発表標題 An actin patch on the posterior cortex contributes to spindle displacement in <i>Pristionchus pacificus</i> zygotes
3. 学会等名 The 8th Asia-Pacific <i>C.elegans</i> meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Bang Uikyu, Satoshi Namai, and Asako Sugimoto
2. 発表標題 Assembly mechanism of germ granules in <i>Pristionchus pacificus</i> is distinct from that in <i>Caenorhabditis elegans</i>
3. 学会等名 The 8th Asia-Pacific <i>C.elegans</i> meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 春田 奈美、生井 聡史、津山 研二、杉本 亜砂子
2. 発表標題 <i>Caenorhabditis elegans</i> の近縁種における遺伝子操作法の開発
3. 学会等名 2018年度日本線虫学会定期大会 (第26回大会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Bang Uikyu、生井 聡史、杉本 亜砂子
2. 発表標題 <i>C. elegans</i> とその近縁種 <i>P.pacificus</i> を用いた生殖顆粒の進化 細胞生物学的解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中條 桃江、狩野 ひかる、春田 奈美、杉本 亜砂子
2. 発表標題 中心体形成に必須な <i>C.elegans</i> SPD-5のin vivoドメイン解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田 桂、土屋 賢汰、小日向 寛之、小野寺 静、春田 奈美、杉本 亜砂子
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> におけるチューブリンアイソタイプの発現パターンおよび機能の網羅的解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉本 亜砂子
2. 発表標題 Distinct regulatory mechanisms control the first asymmetric cell division of <i>Pristionchus pacificus</i> and <i>Caenorhabditis elegans</i>
3. 学会等名 The 2nd Indian <i>C. elegans</i> Meeting (India) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daichi Sasaki, Satoshi Namai, Asako Sugimoto
2. 発表標題 Comparative analysis of polarity establishment mechanisms in <i>C. elegans</i> and <i>P. pacificus</i> zygotes
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (CnBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木 大地、生井 聡史、杉本 亜砂子
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> と <i>P. pacificus</i> 初期胚の細胞極性化機構の比較解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (CnBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木大地、生井聡史、杉本亜砂子
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> と <i>P. pacificus</i> 初期胚の細胞極性化機構の比較解析
3. 学会等名 日本動物学会・平成29年度東北支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Kikuchi; I. Tsai; R. Tanaka; G. Woodruff; J. Wang; M. Berriman; P. Sternberg ; A. Sugimoto; N. Kanzak
2. 発表標題 Evolutionary insights into the <i>C. elegans</i> biology from the morphology, ecology and genome of the sister species <i>Caenorhabditis</i> sp. 34
3. 学会等名 21st International <i>C. elegans</i> Conference (USA) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Asako Sugimoto; Kenji Tsuyama; Yuki Hoshi; Satoshi Namai; Ryohei Kumagai; Natsumi Kanzaki; Taisei Kikuchi
2. 発表標題 Establishing genetic techniques to study <i>Caenorhabditis</i> sp. 34, a sister species of <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 21st International <i>C. elegans</i> Conference (USA) (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
研究 分担 者	菊地 泰生	宮崎大学・医学部・准教授	
	(Kikuchi Taisei)		
	(20353659)	(17601)	