

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14711

研究課題名(和文)脊椎動物における進化と発生の反復傾向の検証に向けた発生時系列の遺伝子制御動態解析

研究課題名(英文) Testing the recapitulation tendency in vertebrate embryogenesis by analyzing developmental patterns of gene regulatory activities

研究代表者

上坂 将弘 (Masahiro, Uesaka)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：20756499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動物の個体発生は、単細胞の受精卵から複雑な多細胞の体を作り上げる。この発生過程から、発生と進化の間には何らかの関係性があるのではないかと様々な説が提唱されてきた。その中でも有名なものの一つが反復説である。反復説によると、動物の個体発生は進化的に古い特徴から新しい特徴へ順番に発生させながら進んでいく。しかし、この考えはあくまで仮説であり、これまで反復説を定量的に支持する分子学的研究はなかった。本研究で、我々は遺伝子制御の観点から反復説の検証を行った。発生における活性化遺伝子制御領域を決定し、その進化的な古さを推定することで、遺伝子制御領域の活性化動態は反復パターンを示すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、発生過程における遺伝子制御領域の活性化動態が反復パターンを示したことは、発生過程は完全に自由自在に変化しながら進化してきたわけではないことを示唆している。これは、何らかの進化的制約が発生過程の進化的変更を徐々に後期段階に偏らせてきた可能性をも提起し、発生がもたらす進化的制約の重要性を、現在の進化学の理解において強調するものとなりうる。また、本研究で得られたゲノムワイドなクロマチン状態の発生系列データは、進化研究はもちろん、ゲノム情報からどのように表現型が生まれるかを理解する上でも重要な基盤的情報となる。

研究成果の概要(英文)：Animal development generally proceeds from a single-celled zygote to a complex multicellular organism. This has led biologists to propose parallel relationships between development and evolution. One of the famous hypotheses is recapitulation theory. This assumes embryogenesis of an animal parallels its evolutionary history, sequentially developing from more ancestral features to more derived ones. However, no molecular studies have not quantitatively supported such recapitulation in vertebrate embryogenesis so far. In this study, we tested the recapitulation from the perspective of gene regulation. By examining developmental changes in active gene regulatory regions and estimating their evolutionary ages, we found that regulatory regions tend to become sequentially activated in an order that parallels their evolutionary ages in three vertebrates. This suggests a recapitulative pattern in gene regulatory activity during embryogenesis.

研究分野：進化発生学

キーワード：進化発生学 進化 発生 反復説 比較エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物に見られる驚異的な形態的多様性の背後には、5億年にも渡り変更されてきた発生過程がある。この発生過程は進化の過程で自由自在に変化してきたわけではない。近年の分子学的研究から、発生過程の中でも、特に発生中期(器官形成期)は、進化を通して殆ど変化しておらず、脊椎動物間で類似した遺伝子発現を示すことが示唆されてきた (Irie et al. 2011, Hu et al. 2017 など)。この保存された器官形成期以降の発生過程において、脊椎動物間で類似した胚形態から生物種特異的な形態が作り上げられていくが、この発生過程はまるで進化の歴史を繰り返しているようにも見える。この考えは反復説と呼ばれる19世紀の比較形態学に由来するアイデアであるが (Haeckel, 1866)、この認識は本当に科学的に妥当なのだろうか？

例えばニワトリの発生では、脊椎動物の共通祖先が獲得した咽頭弓や脊索が咽頭胚期に発生した後、四足動物の共通祖先が獲得した手足の原基が形成され、次に鳥の翼やクチバンが発生する。このように脊椎動物の発生には、「進化的に古い変更が先に、進化的に新しい変更が後に反映されながら進行する傾向(反復傾向)」があるように見える。この傾向が生じるメカニズムに言及したヘッケルの反復説は現在否定されているが、実は反復傾向自体の真偽は未だ決着していない (Abzhanov 2013, 倉谷 2017)。

## 2. 研究の目的

本研究は、脊椎動物の個体発生における反復傾向を、発生過程で使用されるゲノム情報に着目し検証する。脊椎動物の形態は、遺伝子の獲得・喪失よりも既存の遺伝子制御の変更によって進化してきたことが明らかになっているため (Carroll 2008, Seki et al. 2017)、本研究は特に遺伝子制御領域に着目する。個体発生において機能する遺伝子制御領域をゲノムワイドに定量し、それぞれの領域の進化的古さを推定することで、「脊椎動物の器官形成期以降の発生過程は、進化的に古いゲノム領域から新しい領域へ順番に活性化しながら、進行する傾向があるか？」を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本課題では、脊椎動物全体の進化傾向としての反復傾向を検証するために、脊椎動物の代表的系統である哺乳類・鳥類・魚類からマウス・ニワトリ・メダカを採用した。それぞれの生物種について、器官形成期を含む様々な発生段階で活性化している遺伝子制御領域を、ゲノムワイドに決定することを目指した。遺伝子制御領域はクロマチン構造がオープンになることで活性化されるため、活性化遺伝子制御領域の指標として、オープンクロマチン領域に着目した。

各発生段階の全胚をサンプルとし、ATAC-seq法 (Buenrostro et al. 2013)によりクロマチンのオープン度を定量し、オープンクロマチン領域をゲノムワイドに同定した。

次に同定したオープンクロマチン領域が、進化的にいつ獲得されたかをゲノム配列の比較から推定した。脊索動物10種以上のゲノムを用いた比較解析により、各領域と相同な塩基配列が、どのくらい離れた生物種のゲノムに存在するかを網羅的に調べ、それぞれのゲノム領域の進化的年代を推定した。

各発生段階において決定したオープンクロマチン領域を、進化的な獲得時期に応じて分類した。進化的年代ごとにクロマチンのオープン度の総和を計算し、胚全体に対する割合を調べた。これらのデータから、発生過程を通じた各進化的分類群の割合の動態が、進化的に古い制御領域から新しい制御領域へ順次活性化される傾向を示すかを調べた。

## 4. 研究成果

本研究では、まずマウス・ニワトリ・メダカの発生胚のATAC-seqデータの取得を行った。発生後期の胚は細胞種の異質性が高いため、オープンクロマチン領域の検出力が低くなり、全胚を用いたATAC-seqの再現性が保証できない可能性が考えられた。しかし、ATAC-seqライブラリ調整プロトコルの条件検討の結果、マウス・ニワトリ・メダカの後期胚を含む全ての発生段階において、再現性・検出力・ノイズの少なさの観点から、クオリティの高いATAC-seqデータを取得することができた。この発生段階を通して取得した脊椎動物のATAC-seqデータは、本課題だけでなく、ゲノム情報からどのように表現型が生まれるかを理解する上でも貴重な基盤情報となる。そのため、これらのデータは公共データベースに登録し、他の研究グループが利用できるようにしている。

取得したATAC-seqデータをもとに、各発生段階でオープンクロマチン領域を同定した。マウス・ニワトリ・メダカの各発生段階において15万以上の領域を同定できた。続いて、同定したオープンクロマチン領域の進化的年代をゲノム配列の類似度から推定した。推定した年代ごとにオープンクロマチン領域を分類し、脊椎動物個体発生における反復傾向の検証を行った。

解析の結果、クロマチン状態がオープンになる発生段階と進化的古さが相関する傾向が、全ての脊椎動物で観察された (図)。進化的に新しいオープンクロマチン領域、つまり進化的に近い

生物種のゲノムでのみ類似した配列が存在する領域は、個体発生のより後期の段階でクロマチンのオープン度が高くなる傾向が見られた。より進化的に古いオープンクロマチン領域に着目すると、少し前の発生段階においてクロマチンのオープン度が高くなり、更に古いオープンクロマチン領域ではより初期の発生段階でクロマチンのオープン度が高くなる、という傾向が見られた。この結果は、進化的に新しいゲノム領域ほど、後の発生段階で機能する傾向があることを示唆し、オープンクロマチンの発生動態の観点から反復傾向を支持するものである。

更に詳細な解析を行い、この反復傾向は、比較ゲノム解析に使用した生物種の種類や解析条件によらず、ロバストに検出されることを確認した。また、興味深いことに、この反復傾向は、今回調べた全ての生物種において、器官形成期よりも後の発生段階でのみ観察された。このことから、オープンクロマチン領域に見られた反復傾向は、発生砂時計モデルと両立しうる可能性が考えられた。

また、転写開始点から離れたオープンクロマチン領域のみに着目しても、同様の傾向が再現できたことから、エンハンサーの活性化パターンも進化的年代と相関する可能性が示唆された。以上の結果は、Uesaka et al. 2019 に報告した。

本研究は、比較形態学に根ざす古典的仮説である反復説を、分子学的観点から初めて定量的に支持するものである。今回の結果を考察すると、これまで報告されてきた反復説を支持する形態学的事例の背後には、遺伝子制御の反復傾向が関わる発生プロセスの存在が考えられる。また、今回報告した結果は、発生過程を駆動する遺伝子制御の進化は、完全に自由自在ではない可能性を示唆している。遺伝子制御の反復傾向がどのように進化してきたのかについては殆ど明らかになっていないが、何らかの進化的メカニズムの存在が考えられる。今後このメカニズムに迫る研究が進むことが期待される。

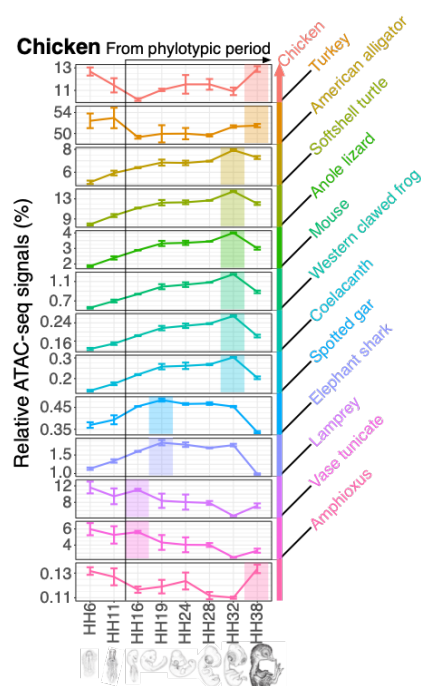


図. 発生に従ったクロマチンオープン度の動態 (例. ニワトリ)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uesaka Masahiro, Kuratani Shigeru, Irie Naoki	4. 巻 2021
2. 論文標題 The developmental hourglass model and recapitulation: An attempt to integrate the two models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jez.b.23027	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 Kuratani Shigeru, Uesaka Masahiro, Irie Naoki	4. 巻 2020
2. 論文標題 How can recapitulation be reconciled with modern concepts of evolution?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jez.b.23020	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 -

1. 著者名 Uesaka Masahiro, Kuratani Shigeru, Takeda Hiroyuki, Irie Naoki	4. 巻 5
2. 論文標題 Recapitulation-like developmental transitions of chromatin accessibility in vertebrates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-019-0148-9	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5件（うち招待講演 4件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masahiro Uesaka
2. 発表標題 Testing the recapitulative pattern in vertebrate embryogenesis from the perspective of gene regulation
3. 学会等名 The 53rd JSDB/APDBN Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiro Uesaka
2. 発表標題 Testing the recapitulative pattern in vertebrate embryogenesis from the perspective of gene regulation
3. 学会等名 JSDB Online Trial Meeting 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上坂 将弘、倉谷 滋、武田 洋幸、入江 直樹
2. 発表標題 脊椎動物の発生過程は進化を反復するのか？
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上坂 将弘、倉谷 滋、武田 洋幸、入江 直樹
2. 発表標題 脊椎動物の胚発生における反復説の検証
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上坂 将弘、倉谷 滋、武田 洋幸、入江 直樹
2. 発表標題 脊椎動物発生のオープンクロマチン動態に見られた系統進化の反復的パターン
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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