

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14762

研究課題名(和文)冠輪動物特異的転写因子に着目したらせん卵割型発生の進化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the Evolutionary Process of Spiralian Development Focusing on Spiralian-Specific Transcription Factors

研究代表者

守野 孔明(MORINO, Yoshiaki)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：20763733

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)：近年、新規発生遺伝子の発生進化への役割が注目を集めつつある。しかし、新規発生遺伝子が発生の秩序を保ちつつ遺伝子制御ネットワーク(GRN)に組み込まれ、新規発生様式を制御する過程についての理解は乏しい。本研究ではらせん卵割動物が示すらせん卵割型発生および系統特異的転写因子群に着目した。軟体動物を用いた解析により、初期発生で発現する系統特異的転写因子群とそれらに制御されるであろう転写因子群を同定し、初期発生GRNの構成要素を明らかにした。また、系統特異的転写因子の一部はカテニン経路により発現が制御されており、カテニン経路への応答要素の獲得が、初期発生への組み入れに必要であ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

進化における自然選択の概念は一般社会にも比較的浸透している一方で、選択の対象となる新しい形質およびそれを作り出す発生過程の進化については、当該分野の領域内においても未解決の問題が多い段階である。本研究の成果は、これまで説明が困難であった複雑で新しい発生様式が生み出される過程についての理解を押し進めるものであり、一般社会の進化への理解を深めうるという点で、学術的のみならず社会的な意義も併せ持つ。

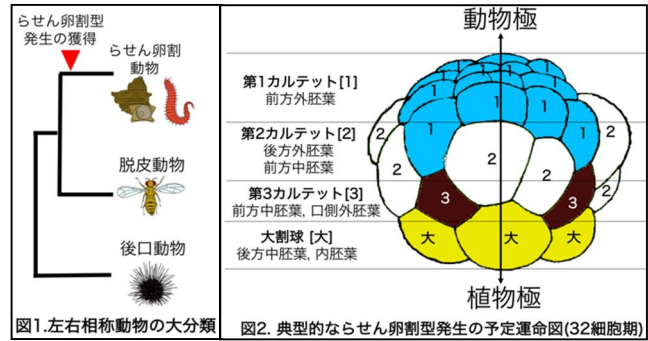
研究成果の概要(英文)：The contribution of novel developmental genes to developmental evolution has attracted attention. However, there is little understanding of how new developmental genes are organized and integrated into gene regulatory networks (GRN) to control the pattern of novel development. In this study, we focused on the spiraling development and the lineage-specific transcription factors in spiralian. Using molluscs, we identified lineage-specific transcription factors that are expressed during early development and transcription factors that may be regulated by them, and identified the components of early development GRNs. In addition, the expression of some lineage-specific transcription factors is controlled by the β -catenin pathway, suggesting that the acquisition of a response element to the β -catenin pathway is necessary for its incorporation into early development.

研究分野：進化発生学

キーワード：進化発生学 系統特異的転写因子 軟体動物 らせん卵割型発生

1. 研究開始当初の背景

発生の進化は多くの場合、共通のツールキット遺伝子群（転写因子やシグナル分子）の使い方の変更で説明されてきた。一方で、門や綱といった高次分類群レベルを特徴付ける発生様式の進化は、こうした枠組みからは説明できないケースも多い。例えば、左右相称動物の一群であるらせん卵割動物（軟体動物や環形動物、扁形動物等；図1）が示す“らせん卵割型発生”は、動植物軸に沿って決まった位置に決まった発生運命を持つ割球群（カルテット）を生み出すことが最大の特徴である（Lambert, 2010；図2）が、その分子発生基盤および進化機構は長らく未解明であった。申請者は先行研究（Morino et al. 2017）で、らせん卵割動物に特異的な TALE-homeobox、SPILE 遺伝子群（SPiralian-taLE）が存在し、この遺伝子が各カルテットに特異的な運命の割り当てに重要であることを示した。このことは、系統特異的に獲得された転写因子群が、系統特異的な発生様式であるらせん卵割型発生の進化に重要であることを示す。その一方で、進化的に新規な転写因子群がどのように発生の秩序を乱さずに初期発生の遺伝子制御ネットワーク（GRN）に組み込まれ、新しい発生様式を制御するようになるのかということは、未解決の問題として残されていた。



2. 研究の目的

上記の問いに答えるには、現在までの知見が少ない、SPILE 遺伝子群を中心としたらせん卵割型発生の初期発生の遺伝子制御ネットワーク（GRN）を解明し、祖先 GRN のどの部分にどのように挿入されたのかを理解する必要がある。本研究では、典型的ならせん卵割型発生を示す軟体動物腹足類のクサイロアオガイ (*Nipponacmea fuscoviridis*) を用いて、胚操作とトランスクリプトーム解析を組み合わせることにより、SPILE 遺伝子群を中心に母性因子から胚葉分化までの初期発生 GRN についての知見を得ることを目的とした。具体的には、SPILE 遺伝子群のカルテット特異的な発現を制御する分子機構および初期卵割期に発現する転写因子群とその機能の解明を目指し研究を行なった。

3. 研究の方法

(1) 系統特異的転写因子群の割球特異的な発現制御機構の解明

SPILE 遺伝子の胚性の発現は 4-16 細胞期と非常に早い段階で始まることから、母性因子によって直接活性化されていると考えられる。多くの無脊椎動物では、母性の核内 β -カテニンの植物極側への局在により、動植物軸が規定される。腹足類カサガイ類における β -カテニンの局在の知見はこれまでにないが、 β -カテニン経路が SPILE 遺伝子群の動植物軸に沿ったカルテット特異的な発現を制御している可能性が高いと推測し、 β -カテニン経路と SPILE 等の系統特異的転写因子群の発現の関連を調べた。具体的には、 β -カテニン経路の亢進 (1-Azakenpaulone 処理) と阻害 (β -Cadherin mRNA 注入) を行い、トロコフォア幼生の形態の変化および卵割期に発現する転写因子群の発現パターンの変化を観察した。また、GFP- β -カテニンの融合タンパク質の mRNA を卵に注入し、内在性 β -カテニンの局在を理解することを試みた。

(2) 初期卵割期に発現する転写因子群の網羅的探索と機能の解明

初期卵割期に発現する転写因子群、特に SPILE の下流として GRN を構成する転写因子の探索を目的に、卵からトロコフォア幼生期まで 8 発生段階 \times 2 バッチのトランスクリプトーム解析を行った。これらから、発現量およびアノテーションを判断材料に複数の転写因子を選び、*in situ* hybridization により卵割期の発現パターンを精査した。また、SPILE と同様に 8-16 細胞期に発

現が上昇する転写因子群についても発現を精査した。一部のカルテット特異的発現を示す転写因子については、過剰発現による機能解析も行った。

4. 研究成果

(1) 系統特異的転写因子群の割球特異的な発現制御機構の解明

まず、 β -カテニン経路を薬剤もしくは mRNA 注入により亢進/阻害し、トロコフォア幼生期の形態を、頭頂部/繊毛/内胚葉等のマーカー遺伝子もしくは抗体の発現により検証した。その結果、カテニン経路の亢進を行うと、内胚葉等の植物極側の要素が拡張する一方で、阻害時には反対に繊毛領域や頭頂部領域といった動物極側の要素が拡張した。このことは、当初の想定通り、カテニン経路がクサイロアオガイの動物-植物極軸の規定を行なっていることを示唆する。これを踏まえて、カテニン経路の亢進/阻害胚において SP1LE、および(2)で検出された系統特異的転写因子群 PRD-V 遺伝子の発現を精査した。その結果、正常胚で植物極側で発現する遺伝子群が、カテニン経路の亢進時に拡張する一方で、阻害時には発現が縮小もしくは消失した。このことは、SP1LE を含む系統特異的転写因子群のカルテット特異的な発現は、カテニン経路により制御されていることを示唆する。よって、SP1LE を始めとした系統特異的転写因子群が初期発生過程へ挿入される煮は、 β -カテニン経路に应答する要素の獲得が必要であったことが推察される。一方で、現時点までに GFP 融合 mRNA の注入等の手法ではカテニタンパク質の局在を確認することができておらず、カテニン経路が具体的にどのような仕組みで系統特異的な転写因子群のカルテット特異的発現を制御しているかについては不明である。この点に関しては、今後手法の再検討が必要である。

(2) 初期卵割期に発現する転写因子群の網羅的探索と機能の解明

卵からトロコフォア幼生期までの 8 発生段階を対象とした時系列トランスクリプトーム解析を行い、該当時期に発現する転写因子群を約 1000 個抽出した。これらのうち、32 細胞期に発現が開始される転写因子を約 30 遺伝子、桑実胚期で発現が開始される転写因子群を約 20 遺伝子同定した。発現量およびアノテーションを判断材料に、これらの中から候補遺伝子を選出し、*in situ* hybridization により発現パターンを精査した。その結果、32 細胞期/桑実胚期において特定のカルテットもしくは割球で発現する転写因子群を多数同定することに成功した。例を挙げると、予定繊毛環領域で発現する *Otx*、予定内胚葉領域で発現する *GATA*、予定オーガナイザー領域 (=3D) 割球で発現する *Lopx* などが同定された。

一方で SP1LE と同様に 8-16 細胞期に発現が上昇する転写因子群が約 20 遺伝子検出され、それらのほぼ全てが系統特異的転写因子であった。これらの遺伝子の発現パターンを *in situ* hybridization により精査すると、多くの転写因子群が SP1LE と同様に 8-32 細胞期で動物植物軸に沿って偏った発現を示した。更に、これらの系統特異的転写因子の一つである PRD-V 遺伝子群に属する 3 つの遺伝子に関して、mRNA 注入による過剰発現を行い、トロコフォア幼生期の形態をマーカー遺伝子群の発現により評価した。その結果、過剰発現胚ではそれぞれの PRD-V 遺伝子の発現領域に概ね対応した領域がトロコフォア幼生期で増大していることが確認できた。このことは、卵割期に行われるカルテットごとの運命特異化は、SP1LE 遺伝子群だけでなく数多くの系統特異的転写因子群が関わっていることを示唆する。

以上より、初期発生 GRN の構成要素を網羅的に同定することに成功した。特に 8-16 細胞期で割球特異的に発現する転写因子群については、当初はほぼ SP1LE のみであると想定していたが、SP1LE 以外にも数多くの系統特異的転写因子群が検出された。今後、個々の遺伝子の機能解析を進め、初期発生 GRN の構造およびその進化プロセスを解明していく。

<引用文献>

J. David Lambert. "Developmental Patterns in Spiralian Embryos" *Current Biology* 2010 20:2, R72-R77

Yoshiaki Morino, Naoki Hashimoto, Hiroshi Wada. "Expansion of TALE homeobox genes and

the evolution of spiralian development ” *Nature Ecology & Evolution* 2017 1, 1942-1949

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 1件）

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Supanat Phuangphong, Jumpei Tsunoda, Hiroshi Wada, Yoshiaki Morino
2. 発表標題 Increased number of spiralian TALE homeobox genes in bivalve lineage and evolution of cell fate segregation program in the early development
3. 学会等名 第70回細胞生物学会・第51回発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiaki Morino, Hiroshi Wada
2. 発表標題 Expansion of lineage-specific homeobox genes and the evolution of spiralian development
3. 学会等名 第70回細胞生物学会・第51回発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiaki Morino, Hiroshi Wada
2. 発表標題 Evolution of the spiralian development: insights from lineage specific homeobox genes
3. 学会等名 7th Meeting of the European Society for European Developmental Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 守野孔明、和田洋
2. 発表標題 冠輪動物の割球特異化機構における発生システム浮動
3. 学会等名 日本進化学会第20回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiaki Morino, Hiroshi Wada
2. 発表標題 Lineage specific expansion of homeobox genes and evolution of spiralian development
3. 学会等名 Developmental Biology of the Sea Urchin XXV (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 守野孔明
2. 発表標題 らせん卵割型発生の割球運命分配機構と進化
3. 学会等名 日本動物学会 第89回代替大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Supanat Phuangphong, Jumpei Tsunoda, Hiroshi Wada, Yoshiaki Morino
2. 発表標題 The increasing of spiralian TALE homeobox gene number and the modification of cell fate segregation pattern in bivalve early development
3. 学会等名 日本動物学会 第89回代替大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤啓輔、和田洋、守野孔明
2. 発表標題 ヒラムシの分子発生実験系の構築-らせん卵割型発生の進化史の解明に向けて-
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 守野孔明、和田洋
2. 発表標題 Developmental system drift of blastomere fate specification mechanism in spiralian development
3. 学会等名 日本発生生物学会第52回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 守野孔明、和田洋
2. 発表標題 らせん卵割型発生における割球運命の保存性をもたらす発生システム
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 守野孔明、和田洋
2. 発表標題 らせん卵割型発生における割球運命特異化機構の進化と発生システム浮動
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤啓輔、和田洋、守野孔明
2. 発表標題 ヒラムシ卵割期の遺伝子発現解析から探るらせん卵割型発生の進化
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shunsuke Yaguchi, Yoshiaki Morino, Yasunori Sasakura	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 25
3. 書名 Development of Marine Invertebrates (chapter 10 in book "Japanese Marine Life")	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----