

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22420

研究課題名(和文)棘皮動物の五放射体制はどのように進化したのか-放射線を確立する分子機構の解明-

研究課題名(英文)Evolution of echinoderms -molecular mechanisms that establish the rays-

研究代表者

山口 正晃(Yamaguchi, Masaaki)

金沢大学・生命理工学系・教授

研究者番号：60182458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：棘皮動物は左右相称動物に属すが、幼生内に成体原基を形成し、五放射の成体へと変態する。しかし、成体原基形成の分子メカニズムはほとんど分かっていない。

CRISPR/Cas9システムを用いてfgf8/17/18とfgfaをノックアウトしたウニ幼生の成体原基の表現型を解析し、以下のことを明らかにした。(1)羊膜外胚葉で自律的に発現するfgf8/17/18が原腸から水腔中胚葉を誘導し、水腔からの放射水管伸長とそれを覆う歩帯外胚葉特異化を調節している。(2)fgf8/17/18は水腔fgfaを誘導するが、放射線(歩帯)の確立は、fgf8/17/18下流にある未同定のシグナルによって調節されるらしい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

棘皮動物の特異な体制の進化は未だに動物学の謎として残っている。その五放射体制は幼生の成体原基のなかで作られる。しかし、成体原基形成の分子機構はほとんど不明であった。

成体原基形成は、羊膜外胚葉が水腔中胚葉と接触することから始まる。本研究は、羊膜外胚葉で自律的に発現するfgf8/17/18が原腸から水腔中胚葉を誘導することを初めて明らかにしたことに学術的な意義がある。さらに、fgf8/17/18は水腔からの放射水管伸長とそれを覆う歩帯外胚葉の特異化をも調節しているので、ウニの成体原基形成遺伝子調節ネットワークのトップであると考えられる。他の棘皮動物における成体原基形成機構との比較が待たれる。

研究成果の概要(英文)：Echinoderms belong to bilaterian animals, but they form the adult rudiment in larvae and metamorphose into pentaradial juveniles. However, little is known about the molecular mechanisms underlying the adult rudiment formation.

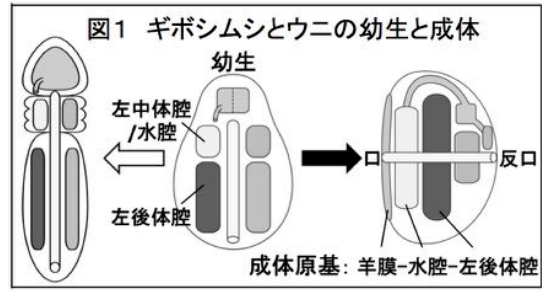
Using CRISPR/Cas9 system, I knocked out fgf8/17/18 and fgfa in sea urchin larvae and analyzed phenotypes of the adult rudiment from both the three-dimensional images and the expression of marker genes, and clarified the followings. (1) fgf8/ 7/18 autonomously expressed in the vestibule ectoderm induces the hydrocoel mesoderm from the archenteron and regulates the extension of radial canals from the hydrocoel. Therefore, fgf8/ 7/18 KO larvae fails to form adult rudiment and cannot metamorphose, (2) fgf8/17/18 activates fgfa in the hydrocoel, but fgfa KO larvae can metamorphose into pentaradial juveniles, and (3) establishment of echinoderm's rays is likely regulated by unidentified signals downstream of fgf8 /17/18.

研究分野：進化発生学

キーワード：棘皮動物 成体原基 ボディープラン FGFシグナリング 放射線/歩帯 ヨツアナカシパン

1. 研究開始当初の背景

半索動物（ギボシムシ）と棘皮動物（ウニやヒトデ）は、歩帯動物クレードを構成する姉妹群で、三体腔性（前-中-後体腔）の幼生を共有する（図1中）。半索動物は幼生の体腔プランと外胚葉をそのまま成体へと引き継ぎ、それぞれ吻、襟、胴体腔とそれを被う外胚葉となる（図1左）。一方、棘皮動物は、幼生の左側にて成体原基の中で五放射体制をつくり、成体へと変態する。成体原基形成において、羊膜外胚葉の陥入と体腔の再配列によって、成体の口-反口軸にそって、羊膜-水腔（左中体腔）-左後体腔-右後体腔の順に積み重なり（図1右）、それぞれ成体の口側外胚葉、水管系区画（水管環と放射水管）、口側および反口側体腔へと発生する。棘皮動物の放射線（歩帯）は、水腔から伸長する放射水管とそれを覆う歩帯外胚葉からなる。棘皮動物のこの特異なボディープランの進化は、未だに動物学の謎として残っている。



日本特産種のヨツアナカシパン

は、プルテウ幼生へと発生するが、摂餌することなく3日で変態する。ウニでは例外的に、幼生の口陥（図2A; 21 h, 右側面図, ◀）を羊膜（vestibule）としてつかい、幼生背側に水腔をつくる（図2B; 24 h, 背面図, hy）。水腔から5つの放射水管が伸長し（図2C, 32 h, 背面図,

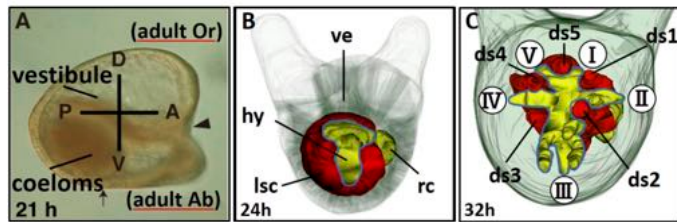


図2 ヨツアナカシパンの成体原基形成

I-V)、その中心に成体の口が開く。

一方、左後体腔が歩帯の間に配置され（図2B, lsc）、その間歩帯領域に歯囊原基（図2C, ds1-5）や棘原基がつくられる。このヨツアナカシパン成体口側図は、図1右のウニ成体図を左側から見た口側図に相当する。

棘皮動物の成体原基形成は、幼生外胚葉から陥入する羊膜が水腔と接することによって始まる。しかし、その相互作用の分子機構はわかっていない。申請者による予備的実験は、羊膜外胚葉（図3A, ve）で自律的に発現する *fgf8/17/18*（図3B）が原腸から水腔中胚葉を誘導する（図3A, hy）とともに *fgfa* を活性化する（図3D）。その水腔からの *fgfa* シグナリングが水腔からの放射水管伸長を促進し、それに接する外胚葉を歩帯外胚葉へと分化させる遺伝子（図4; *hh*, *otx*）を活性化することによって歩帯が確立することを示唆している。FGF 受容体 *fgfr1* は成体原基全体で発現している（図3C）。実際、*fgf8/17/18* に対する crRNA と Cas9 タンパク質を受精卵に共注入すると、水腔マーカーの *zic* と *fgfa* 発現が低下する（図4B, B', △; D, D', △）だけでなく、歩帯外胚葉遺伝子の発現も抑制される（図4F, F'; H, H'; △）。一方、原腸での *hh* と *otx* 発現には影響がない（図4E-G, 矢印）。

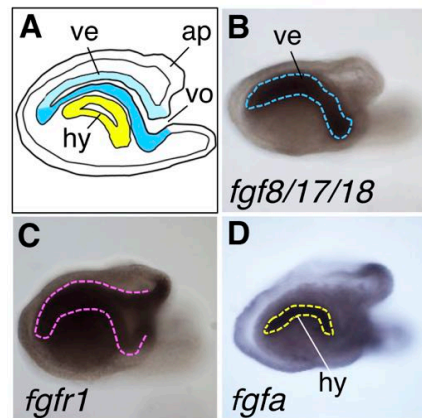


図3 *fgf* と *fgfr* の発現

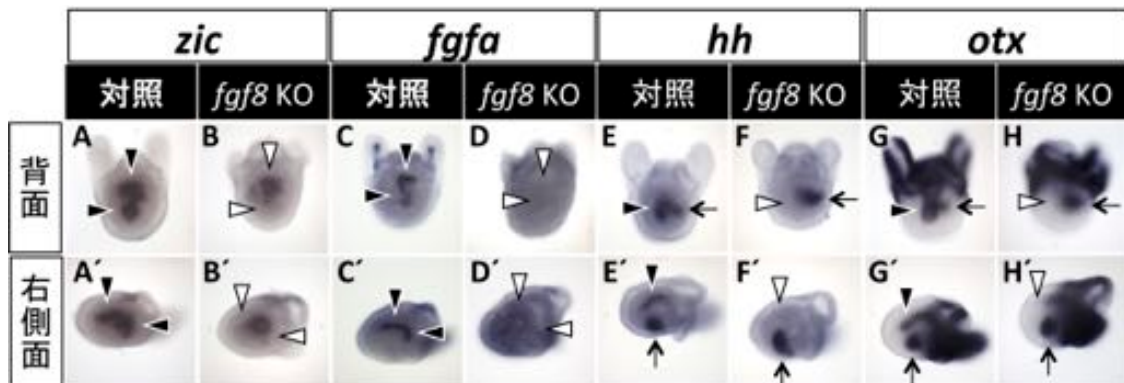


図4 *fgf8/17/18* KO 初期プルテウス幼生における遺伝子発現

図5は、光学切片から再構築した初期(24 h)および後期(32 h)プルテウス幼生の3D像を示す。対照幼生では、水腔が原腸から腸体腔的に幼生背側前方から後方に伸長し(A,B; 24 h)、その水腔から放射水管が五放射に展開する(A',B'; 32 h, I-V)。さらに、放射水管 III から三つ組の管足が形成される(A',B'; 白矢印)。一方、*fgf8/17/18* KO 幼生では、原腸からの水腔形成が不全で(C,D; 24 h)、それに続く放射水管の伸長と管足の形成が阻害される(C',D')。

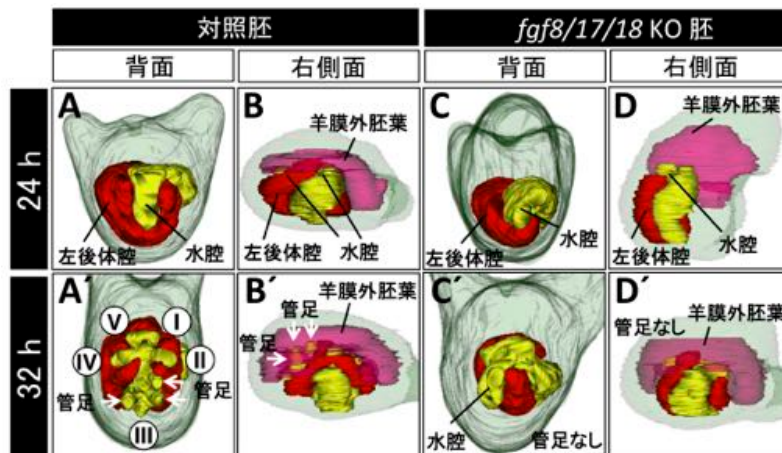


図5 *fgf8/17/18* KO 幼生における水管系形成阻害

## 2. 研究の目的

本研究は、動物学の永年の課題「棘皮動物の進化」を解くことに挑戦的研究としての意義がある。具体的には、羊膜外胚葉と水腔中胚葉の間の双方向の FGF シグナリングが歩帯を確立することを実証する。さらに、棘皮動物のボディプランの進化を歩帯動物共通祖先からの変形(頭部と胴部の喪失および襟部からの歩帯伸長)として捉える着眼点からの分子的理解は、ウニをブレイクスルーとして他の棘皮動物(ウミユリ、ヒトデ、クモヒトデ、ナマコ)へと展開すると期待される。

## 3. 研究の方法

本研究では、CRISPR/Cas9 システムによって *fgf8/17/18* あるいは *fgfa* をノックアウト(KO)したヨツアナカシパン幼生の表現型を、whole-mount in situ hybridization (WMISH) 法によるマーカー遺伝子発現と共焦点レーザー顕微鏡光学切片から再構築した幼生の三次元(3D)像の両面から解析した。

ヨツアナカシパンはWMISH法によって成体原基での発現解析ができる唯一のウニである。間接発生種の後期幼生は非常にもろいため、直接発生種は卵黄と色素が多いためWMISH法に成功していない。さらに、申請者は成体原基の3D像の作成法を確立してきた(図5)。有利な材料とこの手法と合わせ、豊富なマーカー遺伝子を使って研究を遂行した。

## 4. 研究成果

### (1) *fgf8/17/18* は成体原基形成に必須である。

受精卵に *fgf8/17/18* に対する2種のcrRNAsとCas9を共注入し、24-h幼生からDNAを抽出し、変異を調べた。INDEL導入: 26/26 (100%)、frameshift変異: 16/26 (61%)、site spanning deletion導入: 1/26 (4%)であった。この幼生の3D像解析によって、1種のcrRNAを注入した予備実験(INDEL導入: 73%)と同様に、原腸からの水腔形成不全、それに続く放射水管の伸長および管足の形成の阻害、左後体腔の環状化および歯囊原基形成阻害が観察された。さらに、対照幼生が変態

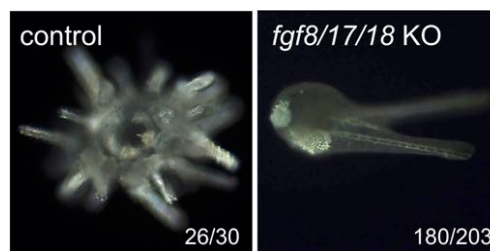


図6 *fgf8/17/18* KO 幼生は変態しない

(26/30 = 86%) するのに対して、*fgf8/17/18* KO 幼生の89% (180/202)は変態せず、棘形成もほとんど観察されなかった(図6)。また、変態した22個体のうち正常稚虫は6個体で、残り16個体は四放射あるいは奇形であった。

### (2) *fgf8/17/18* KO は水腔 *fgfa* と歩帯外胚葉遺伝子発現を抑制する

*fgf8/17/18* KO 幼生における水腔 *fgfa* と歩帯外胚葉遺伝子発現をWMISH法によって解析した。水腔マーカーである *zic* 発現は、対照初期プルテウス幼生でT字型の水腔、後期プルテウス幼生で放射水管 I~V および放射水管 III から突出する三つ組の管足で検出された(図8左)。一方、*fgfa* は初期プルテウス幼生の水腔で一過的に発現した。後期幼生ではその発現は消失し、棘原基と管足に発現がシフトした(図7右)。

*fgf8/17/18* KO 幼生での *zic* 発現は、3D像解析における水腔形成阻害と一致した。すなわち、初期幼生ではT字前方の発現が消失し、後期幼生では放射水管と管足での発現が消失した(図7左、KO)。

*fgf8/17/18* KO 幼生において、歩帯外胚葉遺伝子 (*foxa*, *hh*, *otx*, *six3/6*) の発現はルテウス幼生をとおして全面的に阻害されていた (図 8)。動物半球での発現解析 (図 6) から、*fgf8/17/18* は歩帯外胚葉遺伝子を直接ではなく、未同定の植物シグナルを介して調節していると考えられる。FGFR 阻害剤である SU4502 処理幼生の表現型 (3D 像およびマーカー遺伝子発現) は、この *fgf8/17/18* KO 幼生のそれとよく似ているので、*fgf8/17/18* によって調節される水腔 *fgfa* を植物シグナル候補として解析をすすめた。

### (3) *fgfa* KO は成体原基形成を阻害しない

受精卵に *fgfa* に対する 2 種の crRNAs と Cas9 を共注入し、24-h 幼生から DNA を抽出し、変異を調べた。INDEL 導入: 28/28 (100%)、rameshift 変異: 28/28 (100%)、site spanning deletion 導入: 23/28 (82%) であった。

*fgfa* KO 幼生の成体原基形成を 3D 像から解析した。驚いたことに、*fgfa* KO 幼生は対照幼生と同様に原腸から水腔-放射水管-管足を形成するだけでなく、左後体腔は前方へ伸長し、環状化し、歯嚢原基を形成した。さらに、対照幼生と同様に稚虫へと変態した。

### (4) *fgfa* KO は一過的に歩帯外胚葉遺伝子発現を抑制するが、後期プルテウス幼生期にはその発現は回復する

図 9 左は、対照幼生と *fgfa* KO 幼生における水腔マーカー *zic* の発現を示す。いずれの幼生も、初期プルテウス幼生期に T 字型水腔で発現し (黄色▽)、後期プルテウス幼生期になると放射水管 (I-V) と放射水管 III から突出する三つ組管足 (黄色↓) で発現した。この発現は、3D 像解析による「*fgfa* KO 幼生は対照幼生と同様に原腸から水腔-放射水管-管足を形成する」観察と矛盾しない。

図 9 右と図 10 は、対照幼生と *fgfa* KO 幼生における歩帯外胚葉遺伝子 *foxa*, *otx*, *six3/6* の発現を示す。いずれの遺伝子も対照幼生では、初期プルテウス幼生期に水腔を覆う外胚葉で発現し (▼)、後期プルテウス幼生期になると放射水管を覆う歩帯外胚葉 (I-V) で五放射状に発現する。一方、*fgfa* KO 幼生では、初期プルテウス幼生期に対照幼生と同様に *zic* 発現水腔を形成するにも関わらず、水腔を覆う外胚葉での *foxa*, *otx*, *six3/6* の発現が消失した (▽)。ところが、後期プルテウス幼生期になると、放射水管を覆う歩帯外胚葉での発現が、少なくとも一部、回復した (I-V)。

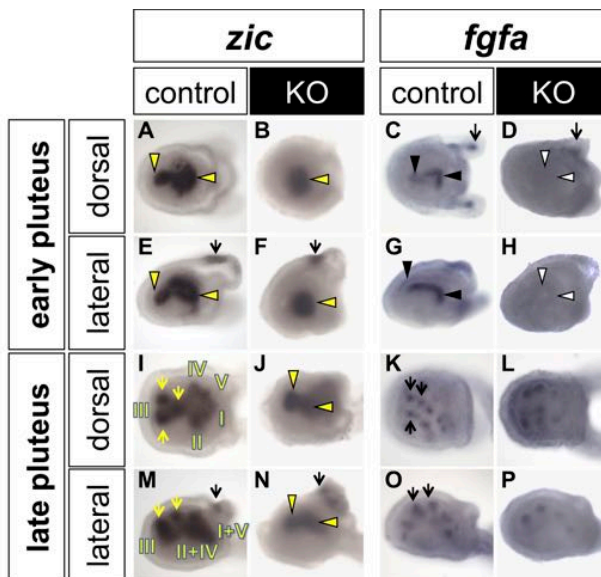


図 7 *fgf8/17/18* KO 幼生での *zic* と *fgfa* 発現

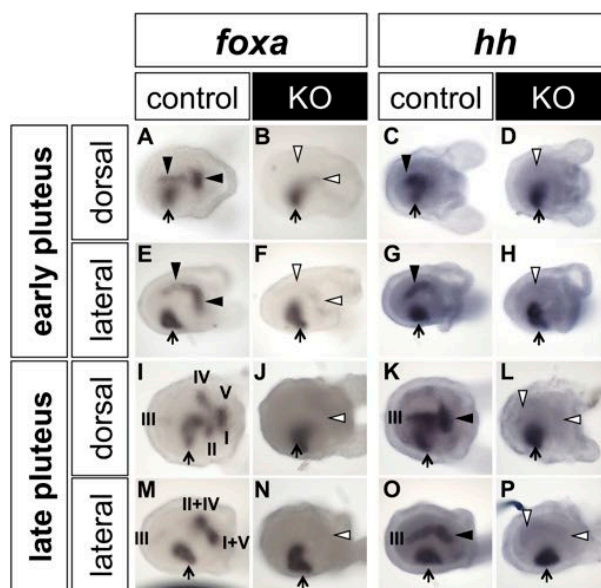


図 8 *fgf8/17/18* KO 幼生での *foxa* と *hh* 発現

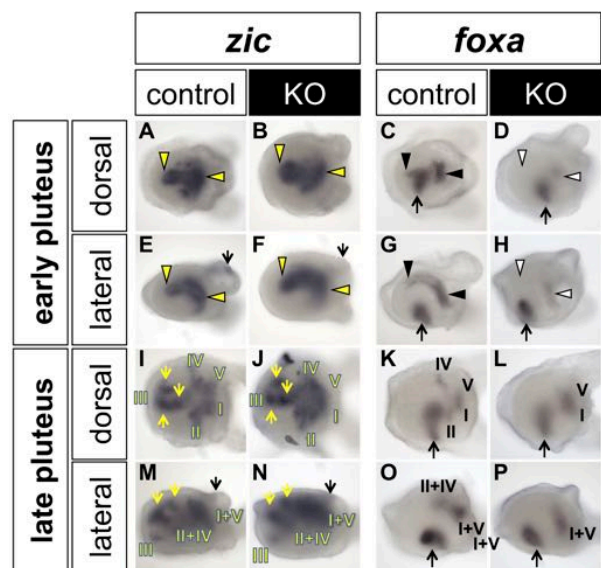


図 9 *fgfa* KO 幼生での *zic* と *foxa* 発現

ただし、*hh* 発現は例外であった。*fgfa* KO によって、その発現は後期プルテウス幼生期まで抑制された (図 11)。

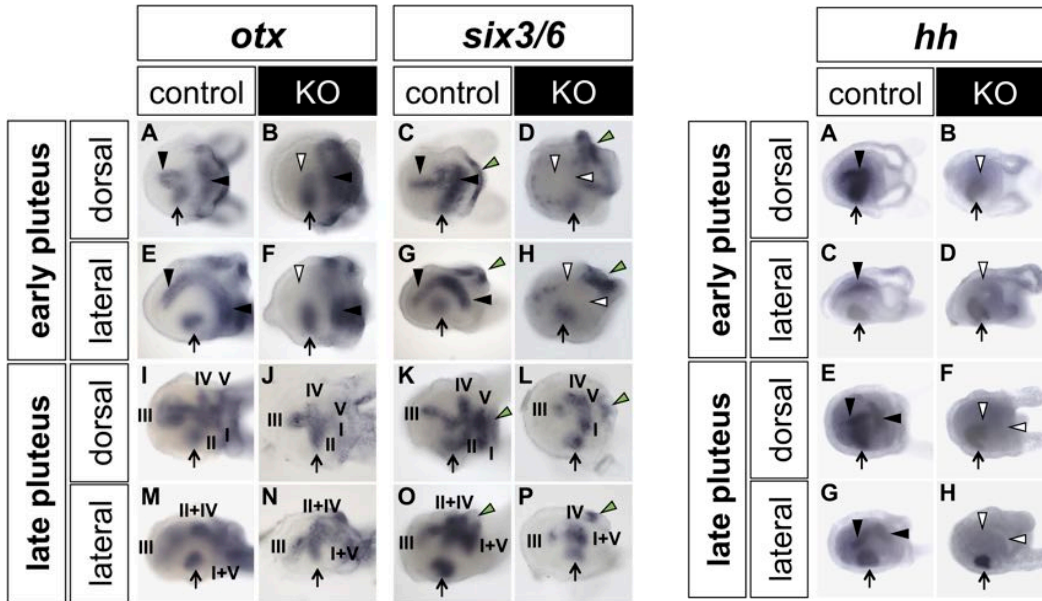
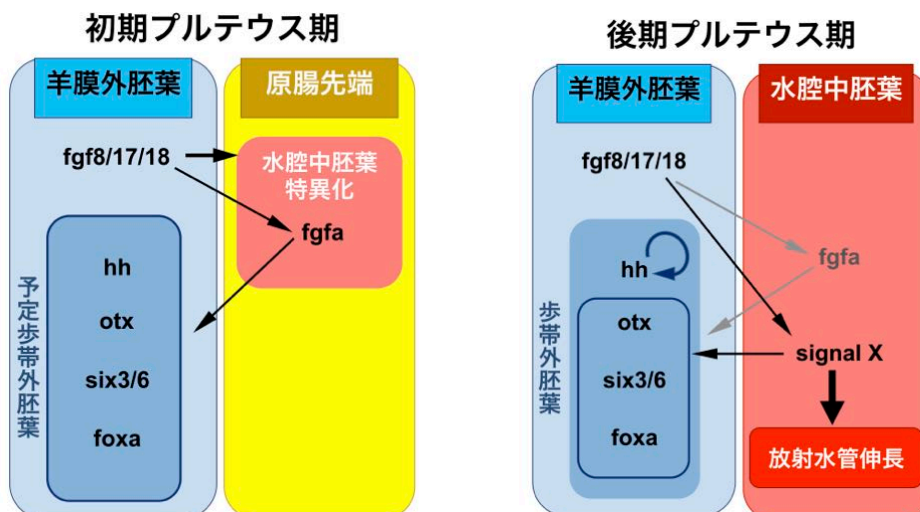


図 10 *fgfa* KO 幼生での *otx* と *six3/6* の発現

図 11 *fgfa* KO 幼生での *hh* 発現

(6) まとめ

- (i) 羊膜外胚葉で自律的に発現する *fgf8/17/18* シグナリングが、初期プルテウス幼生期に原腸先端から水腔中胚葉を誘導するとともに、そこで *fgfa* を一過的に活性化する。
- (ii) この *fgf8/17/18* シグナリングは左体腔の伸長と環状化とそれに続く歯囊原基形成も制御している。
- (iii) したがって、羊膜外胚葉 *fgf8/17/18* がウニ成体原基形成遺伝子ネットワークのトップと考えがえられる。
- (iv) 水腔 *fgfa* シグナリングが水腔に接する外胚葉で *hh*, *otx*, *six3/6*, *foxa* を一過的に活性化し、予定歩帯外胚葉領域を形成する。
- (v) しかし、この水腔 *fgfa* シグナリングは水腔からの放射水管伸長を調節していない。
- (vi) 後期プルテウス幼生期になると、*fgf8/17/18* の下流にある未同定の signal X が、おそらく放射水管で活性化され、放射水管を覆う歩帯外胚葉遺伝子 (*hh* を除く) の発現を維持し、歩帯外胚葉領域を特異化する。
- (vii) 水腔からの放射水管伸長を調節するシグナルも *fgf8/17/18* の下流にあるが、上記 signal X と同一かは不明である。
- (viii) 初期プルテウス幼生期に活性化された *hh* は、ポジティブな自己調節ループによって発現が維持されるらしい。



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 0件）

1. 著者名 Atsuko Yamazaki, Yoshiaki Morino, Makoto Urata, Masaaki Yamaguchi, Takuya Minokawa, Ryohei Furukawa, Mariko Kondo, and Hiroshi Wada	4. 巻 147
2. 論文標題 pmar1/phb homeobox genes and the evolution of the double-negative gate for endomesoderm specification in echinoderms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev182139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.182139	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 Isao Kobayashi, Jingjing Kobayashi-Sun, Yuto Hirakawa, Madoka Ouchi, Koyuki Yasuda, Hiroyasu Kamei, Shigetomo Fukuhara, and Masaaki Yamaguchi	4. 巻 147
2. 論文標題 Dual role of jam3b in early hematopoietic and vascular development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev181040
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.181040	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 Kobayashi-Sun Jingjing, Yamamori Shiori, Kondo Mao, Kuroda Junpei, Ikegame Mika, Suzuki Nobuo, Kitamura Kei-ichiro, Hattori Atsuhiko, Yamaguchi Masaaki, Kobayashi Isao	4. 巻 3
2. 論文標題 Uptake of osteoblast-derived extracellular vesicles promotes the differentiation of osteoclasts in the zebrafish scale	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-0925-1	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒井唯妃, 安達慎也, 新美伊代, 浦田 慎, 小林 功, 山口正晃
2. 発表標題 胚葉間双方向のFGFシグナリングが棘皮動物の歩帯を確立する
3. 学会等名 令和元年度 日本動物学会中部支部大会（金沢）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口美瑛, 杉野咲恵, 山崎敦子, 浦田 慎, 小林 功, 山口正晃
2. 発表標題 ノコギリウニにおけるpaired homeobox 1の機能解析
3. 学会等名 令和元年度 日本動物学会中部支部大会 (金沢)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井唯妃, 安達慎也, 新美伊代, 浦田慎, 小林功, 山口正晃
2. 発表標題 FGFシグナリングが棘皮動物の放射線を確立する
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会 (オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 4. 山口美瑛, 杉野咲恵, 山崎敦子, 浦田慎, 小林功, 山口正晃
2. 発表標題 原始的なノコギリウニにおけるpaired homeobox 1の機能解析
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会 (オンライン)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

なし
----

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