

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15850

研究課題名（和文）孵化腺細胞の進化発生学的研究による新しい進化モデルの提唱-胚葉を越えた機能転移-

研究課題名（英文）New evolutionary model based on evolutionary developmental studies of hatching gland cells

研究代表者

長澤 竜樹 (Nagasawa, Tatsuki)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：60782828

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では卵生脊椎動物の孵化に必須である孵化酵素とおよびその産生細胞である孵化腺細胞の進化に焦点を当てて研究を行った。その結果、孵化酵素を含むアスタシンファミリーの脊椎動物全体における進化的共同を詳細かつ網羅的に明らかにし、さらには魚類の卵保護と関連する分子の同定とその進化パターンも明らかにする事で、魚類の繁殖戦略の進化と生体とを関連付けて議論した。さらには孵化腺細胞の分化カスケードの解明の為に、変異体ゼブラフィッシュを複数作製し系統の樹立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では孵化酵素を始めとした、孵化に関連する遺伝子の網羅的な分子進化パターンを明らかにしている。特に222魚種の全ゲノム配列を用いた網羅的な解析からあきらかになった卵保護との関連が強く示唆される遺伝子の偽遺伝子化は、水産業への応用も見込めるだけでなく、深海魚などの繁殖方法が未同定の種における非侵襲的な遺伝子マーカーとしても応用展開が見込めるものである。このように、本研究成果は脊椎動物の繁殖生態について重要な知見をもたらすだけでなく、その社会的意義も大きいものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the evolution of hatching enzymes, which are essential for the hatching of oviparous vertebrates, and their producing cells, hatching gland cells. Our results comprehensively elucidate the molecular evolution of the astacin family, including hatching enzymes, across vertebrates. Additionally, we identified the genes associated with egg protection in fish and elucidated their evolutionary patterns, thereby linking the evolution of fish reproductive strategies and ecological adaptation. Furthermore, to investigate the differentiation cascade of hatching gland cells, we successfully generated and established multiple mutant zebrafish lines.

研究分野：進化生物学

キーワード：魚類 両生類 卵保護 繁殖戦略 孵化 卵膜

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の胚発生過程は、やがて孵化という現象を以て終了する。この現象は、両生類や魚類では周囲を覆う、卵膜と呼ばれる構造物から外界への進出を指す。硬い卵膜は、水流などの物理的ストレスやバクテリアの侵襲などから効率的に胚を保護する一方で、孵化時には胚にとっての障壁となる。そこで胚は孵化酵素と呼ばれる卵膜を軟化させるプロテアーゼを放出することで孵化を可能にしている。このように孵化酵素は脊椎動物の繁殖に不可欠であり、実際にこれをコードする遺伝子も(偽遺伝子化した胎生・卵胎生種を除き)脊椎動物間で相同である(Nagasawa et al. 2019 & 2022)。しかし、この重要な遺伝子が機能する場である孵化腺細胞は、真骨魚類と両生類の間では胚葉さえも異なる細胞を起源として分化する、特異な細胞であることが知られている。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、脊椎動物の強い進化的制約を受けたボディプランの中で、この胚葉を越えた機能転移が如何にして生じたのかを明らかにすることにある。本研究目的達成の為に、次の2つの転写因子(klf17 と foxa3)に着目して解析を進める。klf17 は両生類と真骨魚類の孵化腺細胞分化に共通して必須である(共通因子: Gardiner et al. Dev Dyn 2005, Kurauchi et al. Differentiation 2010)。一方で、foxa3 は真骨魚類の孵化腺細胞分化に必須だが、両生類の孵化腺細胞分化には関与しない(真骨魚類特異的因子: Dal-Pra et al. Dev Biol 2011, Nagasawa et al. Zool Sci 2016)。本研究では特に共通因子 klf17 を中心とした孵化腺細胞分化カスケードを両種で解明・比較し、これが特に真骨魚類特異的因子 foxa3 とどのように関与するかを明らかにすることで、真骨魚類型孵化腺細胞が如何にして獲得されたのかを解明する。

### 3. 研究の方法

まずは脊椎動物全体における孵化酵素遺伝子ファミリー(アスタシンファミリー)の分子進化の包括的な理解を目指した。孵化酵素遺伝子を含むアスタシンファミリーは、遺伝子重複を繰り返す多くのパラログ遺伝子が生じている。これに加え、各パラログ遺伝子の縦列重複や孵化酵素遺伝子のレトロポゾン様の振る舞いも相まって、相同遺伝子の比較を行う事が困難であった。近年は多くの全ゲノム配列が公開されている為、これを用いて脊椎動物全体におけるアスタシンファミリー遺伝子の分子進化パターンを明らかにした。具体的には全 243 種の脊椎動物の全ゲノム配列を対象に、相同遺伝子の探索と分子系統解析、ゲノムシニエーター解析を駆使する事によって、網羅的な比較を行った。

さらに孵化腺細胞の進化的比較を目指し、まずは魚類型孵化腺細胞の分化カスケードの理解を目指した。具体的には CRISPR/Cas9 法を用いて、klf17-KO と foxa3-KO のゼブラフィッシュ系統を樹立し、さらに孵化腺細胞および体軸とを蛍光ラベルしたゼブラフィッシュ系統との掛け合わせにより、重変異体を作製した。この系統を用いて遺伝子のノックアウトにより孵化腺細胞が未分化なゼブラフィッシュと野生型個体をそれぞれトランスクリプトーム解析し、発現変動遺伝子解析から魚類型孵化腺細胞の分化カスケードの推定を目指した。

### 4. 研究成果

代表者のこれまでの解析から、魚類では孵化酵素遺伝子がゲノム上を頻りに転移するという特徴を持つ事が明らかとなり、これにより陸上脊椎動物と魚類の間で遺伝子の進化起源を推定するのが困難であるという特徴があった。加えて魚類では孵化酵素のパラログ遺伝子が多様化している事もあり、脊椎動物全体を通して遺伝子の進化パターンの追跡が困難な状況にあった。そこで近年拡充されつつある脊椎動物の全ゲノム配列を用いて孵化酵素を含むアスタシンファミリー遺伝子の網羅的かつ詳細な進化比較解析を行った。特に古代魚と俗に呼ばれるグループとの比較から、これまで相同関係の対応が困難であった魚類と四足動物の対応関係を整理することが出来た。

さらに魚類における孵化腺細胞の分化における分子メカニズム解明の為に、遺伝子改変ゼブラフィッシュの作製を行った。これには孵化腺細胞の分化に必須である 2 種類の転写因子をそれぞれノックアウトした系統を樹立した。これらの樹立した二系統は、ホモ接合体で致死であったため、さらに孵化腺細胞を蛍光標識した系統との掛け合わせにより、生きたまま孵化腺細胞の分化を可視化・選別可能な系統をさらに樹立させた。今後はこれらの系統を用いて、孵化腺細胞の欠失個体における遺伝子の網羅的な発現変動比較を行い、これを両生類であるツメガエルと比較する事により、孵化腺細胞の発生システムの進化的な比較を行っていく計画である。

さらに脊椎動物におけるアスタシンファミリー遺伝子の進化パターンを整理する過程で、副次的なことも明らかになってきた。具体的には alveolin 遺伝子が遺伝子重複により Acanthopterygii で新たに獲得されたこと、さらには alveolin 遺伝子が多くの卵保護種で偽遺伝子化している事が明らかになった。alveolin は卵膜硬化の引き金として機能する分子であり(Shibata et al. 2012)、ノックアウトメダカは極めて脆弱な卵膜を形成する事が明らかにされて

いる(Fu et al. 2023)。すなわち、卵保護種では親の体内で卵を保護する事により、強靱な卵膜形成の必要性が低下している事を示している。同様に卵膜タンパク質や孵化酵素などの硬化卵膜の形成に関連する遺伝子を 222 魚種の全ゲノム配列から探索した結果、卵保護種では共通して複数の硬化卵膜関連遺伝子が偽遺伝子化している事が明らかになった。これらの卵膜硬化システムの崩壊は、卵胎生、育児嚢保護、口内哺育、泡巣保護など、その卵保護の様式に依らず、共通していた。すなわち卵保護種では、強靱な卵膜の形成システムが崩壊しており、強靱な卵膜に頼った非保護戦略へと再び適応する事が困難である事を示している。魚類は多様な繁殖戦略を取る一方で、系統的には非保護から卵保護へと向かう強い進化的バイアスが存在する事が知られていたが(Mank et al. 2005)、これらの結果は、その進化的バイアスを分子レベルで裏付ける結果である。さらに、これまでは卵保護へと向かう進化的バイアスは、卵保護における適応度の高さに由来すると考えられていたが、今回の結果はむしろ進化的な不可逆性に起因する事を強く示すものである。

このように、脊椎動物全体における孵化や孵化腺細胞の進化の様相を理解する上で極めて重要な知見をもたらすと考えられる。

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagasawa Tatsuki, Kawaguchi Mari, Nishi Kohki, Yasumasu Shigeki	4. 巻 22
2. 論文標題 Molecular evolution of hatching enzymes and their paralogous genes in vertebrates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Ecology and Evolution	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） 10.1186/s12862-022-01966-2	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 Sakuma Atsuhiko, Zhang Zicong, Suzuki Eri, Nagasawa Tatsuki, Nikaido Masato	4. 巻 8
2. 論文標題 A transcriptomic reevaluation of the accessory olfactory organ in Bichir ( <i>Polypterus senegalus</i> )	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-022-00189-z	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 Kawaguchi Mari, Okazawa Yohei, Imafuku Aiko, Nakano Yuko, Shimizu Risa, Ishizuka Reiji, Jiang Tianlong, Nagasawa Tatsuki, Hiroi Junya, Yasumasu Shigeki	4. 巻 11
2. 論文標題 Pactacin is a novel digestive enzyme in teleosts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86565-9	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 該当する

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤隆晃, 西浦賀乃子, 木村優希, 中牟田信明, 長澤竜樹, 二階堂雅人
2. 発表標題 魚類に見られる鼻管の適応的意義と平行進化に関する研究
3. 学会等名 日本進化学会第24回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桐ヶ窪寛, 佐久間敦丈, 長澤竜樹, 二階堂雅人
2. 発表標題 魚類の体表における化学感覚の探索
3. 学会等名 日本進化学会第24回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西浦賀乃子, 長澤竜樹, 二階堂雅人
2. 発表標題 魚類の鱗における化学感覚受容体遺伝子の発現探索
3. 学会等名 日本進化学会第24回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 待井長敏, 畑島諒, 中村遥奈, 丹羽達也, 長澤竜樹, 二階堂雅人
2. 発表標題 東アフリカ産シクリッドにおける肥大化した唇の分子実態解明
3. 学会等名 日本進化学会第24回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒瀬成美, 田中亮輔, 小林汐織, 重谷安代, 岡部正隆, 長澤竜樹, 二階堂雅人
2. 発表標題 ハリネズミの針形成に関する進化発生学的起源の解明
3. 学会等名 日本進化学会第24回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本田健人, 長澤竜樹, 安増茂樹, 川口真理
2. 発表標題 魚類孵化酵素遺伝子の遺伝子重複と新規機能遺伝子の誕生
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長澤竜樹, 藤崎花美, 二階堂雅人
2. 発表標題 魚類におけるOMP遺伝子の分子進化
3. 学会等名 第8回 ケモビ研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 賈云帆, 相原光人, 長澤竜樹, 伊藤武彦, 二階堂雅人
2. 発表標題 透明ナマズとその近縁種を用いた発現変動遺伝子解析による筋肉透明化遺伝子の探索
3. 学会等名 日本動物学会関東支部会第24回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤隆晃, 西浦賀乃子, 木村優希, 中牟田信明, 長澤竜樹, 二階堂雅人
2. 発表標題 魚類の鼻管に関する研究
3. 学会等名 日本動物学会関東支部会第24回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤隆晃, 長澤竜樹, 二階堂雅人
2. 発表標題 脊椎動物における母性発現の進化に関する研究
3. 学会等名 第3回日本遺伝学会春の分科会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒瀬成美, 田中亮輔, 小林沙織, 重谷安代, 岡部正隆, 長澤竜樹, 二階堂雅人
2. 発表標題 ハリネズミの針形成に関わる進化発生的研究
3. 学会等名 第2回日本遺伝学会春の分科会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畑島諒, 待井長敏, 豊田敦, 梶谷嶺, 長澤竜樹, 伊藤武彦, 二階堂雅人
2. 発表標題 免疫システムがもたらしたシクリッドの唇肥大化平行進化
3. 学会等名 第2回日本遺伝学会春の分科会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 賈云帆, 相原光人, 長澤竜樹, 二階堂雅人
2. 発表標題 透明魚とその近縁種を用いたDEG解析による筋肉透明化遺伝子の探索
3. 学会等名 第2回日本遺伝学会春の分科会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 賈云帆, 相原光人, 長澤竜樹, 二階堂雅人
2. 発表標題 透明ナマズとその近縁種を用いた系統解析と発現変動遺伝子解析による筋肉透明化遺伝子の探索
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第74回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 待井長敏, 畑島諒, 中村遥奈, 丹羽達也, 田口 英樹, 長澤竜樹, 二階堂雅人
2. 発表標題 マルチオミクス解析で探る「シクリッドの唇肥大化」の平行進化メカニズム
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第74回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長澤竜樹, 相原光人, 二階堂雅人
2. 発表標題 卵保護魚類における卵膜硬化システムの収斂退化
3. 学会等名 第6回ユニーク会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 待井長敏, 畑島諒, 中村遥奈, 長澤竜樹, 二階堂雅人
2. 発表標題 東アフリカシクリッドにおける唇肥大化の遺伝的基盤の解明
3. 学会等名 日本進化学会第23回東京大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Machii, N., Hatashima, R., Nakamura, H., Nagasawa, T. and Nikaido, M
2. 発表標題 Elucidating genetic mechanism of cichlid hypertrophic lips, using differentially expressed gene analysis
3. 学会等名 The 2nd AsiaEvo Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大嶋理香, 辰巳徳史, 姫岩翔子, 長澤竜樹, 矢野十織, 岡部正隆
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの内胚葉発現遺伝子地図に基づく肺と鰓の相同性の探索
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回 日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芦宣頤, 畑島諒, 長澤竜樹, 二階堂雅人
2. 発表標題 条鰭類の苦味受容体遺伝子 T2R の機能的多様性
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤崎花美, 二階堂雅人, 長澤竜樹
2. 発表標題 Molecular evolution of teleostean omp genes provides an inferring of the molecular evolution of Ohnologous genes
3. 学会等名 日本進化学会第22回オンライン大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長澤竜樹、安増茂樹、矢野十織、岡部正隆
2. 発表標題 Evo-Devo study of hatching gland cells in vertebrates
3. 学会等名 日本進化学会第22回オンライン大会
4. 発表年 2020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
---------	---------