

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570251

研究課題名(和文) 脊索動物門誕生の基盤研究：脊索形質獲得の進化発生学的解析

研究課題名(英文) The origin and evolution of chordates

研究代表者

高橋 弘樹 (Takahashi, Hiroki)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・助教

研究者番号：40283585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊索は脊椎動物体制における中軸器官であるとともに脊索動物を特徴付ける最も重要な形質である。したがって、脊索形成の分子メカニズムの解明は脊椎動物体制構築の解明につながると同時に、脊索動物進化のメカニズムの理解にも直結する。特に頭索動物ナメクジウオは脊索動物で最も祖先的な形質を保持していると考えられており、脊索動物門の誕生を理解する上で欠かせない動物群である。そこで、ナメクジウオ脊索の分子的基盤となる解析を進め、さらに、ナメクジウオのゲノムを用いて脊索形成に機能する遺伝子の発現調節機構の解析を展開した。

研究成果の概要(英文)：Recently, much more attention has paid to cephalochordate amphioxus to answer an important question of metazoan evolution, namely the origin and evolution of chordates. In order to characterize the notochord of adult amphioxus, we examined gene expression profiles by RNA-seq analysis. These genes play roles in the formation, maintenance and function of the notochord. The present repertoire of genes provide molecular basis for future evo-devo studies of early chordate evolution.

研究分野：進化発生

キーワード：脊索形成 脊索動物 形態形成 進化発生

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報が急速に整備される現在、進化発生と比較ゲノムの統合による生物の進化と多様性を解き明かす、新たな研究分野の創造が可能になりつつある。「脊索」は脊椎動物体制における中軸器官であると同時に、脊索動物を特徴づける最も重要な形質である。したがって、脊索形成の分子メカニズムの解明は脊椎動物体制構築の解明につながると同時に、脊索動物進化のメカニズムの理解にも直結する。

これまでに、T-box 転写因子である *Brachyury* (*T*) 遺伝子は脊索動物の共有派生形質である脊索の形成において鍵となる遺伝子であることが明らかにされてきた。さらに、研究が進展すると *Brachyury* 遺伝子は脊索を持たない動物群にも存在することが示され、また T-box 転写因子はファミリーをなして様々な形態形成の過程で重要な働きをしていることなどが明らかにされてきた。その中で世界に先駆けて、佐藤矩行グループが中心となり脊椎動物に近縁な尾索動物、頭索動物、半索動物、棘皮動物、各々から *Brachyury* 遺伝子を同定した (Sato, 2003)。

申請者はこれまでに尾索動物ホヤを用いて、*Brachyury* ターゲット遺伝子群 450 遺伝子を明らかにし、脊索遺伝子の機能解析と転写調節領域解析からホヤ脊索形成の分子機構について研究を進めてきた (Takahashi et al. 2010, Hotta et al. 2008)。

## 2. 研究の目的

海洋生物をはじめ生物多様性に基づいたゲノム情報が急速に整備される現在、進化発生と比較ゲノムの統合は、生物の進化と多様性を解き明かす新たな研究分野の創成につながる。これまでの発生生物学研究から、T-box 転写因子である *Brachyury* 遺伝子は脊索形成の鍵となる遺伝子であることが明らかにされてきた。

そこで、脊索動物(ホヤ、ナメクジウオ)、と脊索を持たない近縁の動物(ギボシムシ)の *Brachyury* ターゲット遺伝子群を明らかにすることから脊索動物門の誕生に関わる遺伝子ネットワーク進化の解明、さらに我々ヒトがどこから来たのか? という地球上で人間が由来した変遷について新しい進化生物学的世界観を得ることに繋がる研究を展開することを目的とした。

## 3. 研究の方法

生物の多様性と進化を解き明かすために、生物多様性の発生学的メカニズムにいかにか挑むか、進化発生学的研究における生物種間のゲノムワイド解析がどのような研究手法で可能か? 本申請研究では、脊索動物門の誕

生を担う脊索形質獲得の分子的基盤を解き明かすために3つのアプローチを取った。

第一のアプローチは脊索細胞の RNA-Seq 解析により脊索形成の発生過程の分子的基盤を明らかにすることである。新しい動物門に共通な共有派生形質である「脊索形質」の分子の実態を明らかにすることを試みた。しかし、この手法のみでは進化の過程で脊索を持たない共通祖先の動物から脊索を獲得した変遷を解き明かすことはできない。

そこで、第二のアプローチは脊索動物において脊索形成の鍵となる遺伝子 *Brachyury* 遺伝子のターゲット遺伝子群を ChIP-Seq 解析により、ゲノムワイドに同定する方法である。このアプローチによって、脊索動物のターゲット遺伝子群と脊索を持たない近縁の動物群のターゲット遺伝子群を比較解析することが可能になる。

第三のアプローチである脊索に発現を制御する *Brachyury* 遺伝子ネットワークの解析により、脊索形質の獲得に至る遺伝子ネットワークの進化プロセスを解明することを目指した。

(1) 脊索動物門における脊索形質の分子的基盤: (RNA-Seq 解析)

(2) 新口動物群の *Brachyury* ターゲット遺伝子群のゲノムワイド解析: (ChIP-Seq 解析)

(3) 脊索に発現を制御する *Brachyury* 遺伝子ネットワークの進化: (遺伝子発現制御解析)

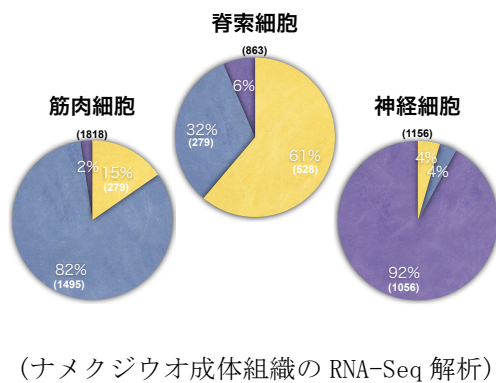
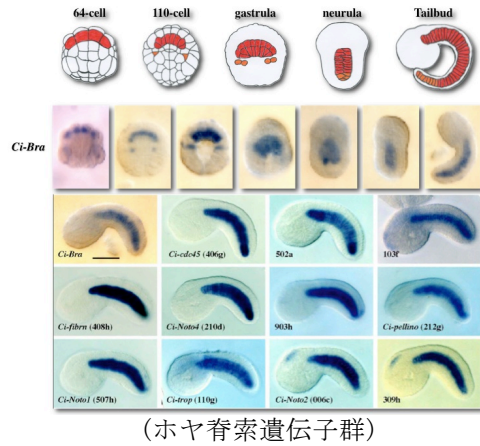
## 4. 研究成果

### (1) 脊索動物門における脊索形質の分子的基盤

脊索動物の共有派生形質である脊索細胞の分子的基盤を明らかにするために RNA-Seq 解析を行った。脊索動物門誕生の進化プロセスを解明する際に鍵となる祖先的な動物群であるホヤ(尾索動物)とナメクジウオ(頭索動物)の脊索細胞の脊索形成遺伝子セットの分子基盤を明らかにすることを試みた。特にナメクジウオの脊索は発生の過程で消失することなく成体においても存在し続けている。脊索動物の祖先的な脊索形質の分子的基盤を明らかにするためにはナメクジウオの成体における脊索形質を解析することは非常に重要となる。成体のナメクジウオの脊索細胞を顕微鏡下で単離して次世代シーケンサーを用いて RNA-Seq 解析を進めた。また、RNA-Seq 解析を進める際にはナメクジウオの筋肉細胞と神経細胞(神経索)の単離も行い同時に解析を進めた。

その結果、ナメクジウオの脊索発現遺伝子解析をすると非常に興味深いことに成体の脊索細胞に *Brachyury* 遺伝子が発現していることが明らかになった。このことは、成体においても脊索形質を維持するナメクジウオ

において *Brachyury* 遺伝子が発生初期の脊索形成時のみならず脊索において発現機能していること示唆している。また、祖先的形質を保持すると考えられるナメクジウオ脊索細胞には筋肉関連分子が数多く発現していることを示す結果が得られた。これらの結果は脊索形質獲得過程を紐解く上で新たな進展を担う基盤的な研究成果である。



## (2) 新口動物群の *Brachyury* ターゲット遺伝子群のゲノムワイド解析

*Brachyury* 抗体の作製：脊索動物(ホヤ、ナメクジウオ)と脊索を持たない近縁の動物群である半脊索動物(ギボシムシ)の *Brachyury* 遺伝子に対する ChIP 可能な特異的抗体を作製することに取り組んだ。ナメクジウオ、ギボシムシ、ウニの ChIP 解析可能な *Brachyury* に対する特異抗体を作製するその際に、すでにホヤ *Brachyury* に対して ChIP 解析可能な抗体の作成に成功している、T-box から C 末端側の領域を抗原として同様な手法を用いて抗体を作製した。各生物種 *Brachyury* 抗体を作製して ChIP 解析を行う利点・意義は2つある。1つは元来の *Brachyury* タンパク質を特異的抗体により検出するために、人工的なタグ付きタンパク質の強制発現実験系によるアーティファクトを排除できる点。2つ目は、これまで遺伝子導入等による実験的アプローチが困難であったナメクジウオやギボシムシなどの *Brachyury* ターゲット遺伝子

群を同定できる可能性が生まれる点にある。

胚サンプルの採集：ナメクジウオは7-8月にギボシムシは11-12月にそれぞれの胚のサンプリング期間が限られる。ゲノム情報が利用可能なフロリダナメクジウオ成体の採集は比較的容易であるが、大量の胚サンプルを確保することは極めて難しく ChIP 解析に十分量の胚サンプルを確保することが重要である。ナメクジウオ胚とギボシムシ胚は産卵シーズンに精力的に胚サンプルを採集し、ほぼ ChIP 解析十分量の胚サンプルを確保するに至った。また、同時にターゲット遺伝子群が明らかになってきた際に *in situ* ハイブリダイゼーションにより発現パターンを解析するために、同時に胚サンプルを確保することに集中した。

*Brachyury* ダイレクトターゲット遺伝子群の同定 (ChIP-Seq 解析)：

*Brachyury* 特異的抗体を用いた ChIP-Seq 解析を進めると同時に、GFP あるいはビオチンアクセプター(Werven & Timmers 2006)をタグとしたカタユウレイボヤ *Brachyury* (Ci-Bra) を脊索細胞に特異的に発現させた胚をもとに、ChIP 解析を検討した。これまでに明らかにした Ci-Bra ターゲット遺伝子群の遺伝子についてリアルタイム PCR を用いて確認し、ホヤ胚の核抽出液を作製して実験を行ってきた技術(Takahashi, et.al. 1999)をもとに ChIP の実験系を確立することを試みた。同時に発生のステージは原腸胚期、神経胚期、尾芽胚期に分けて解析を進めた。

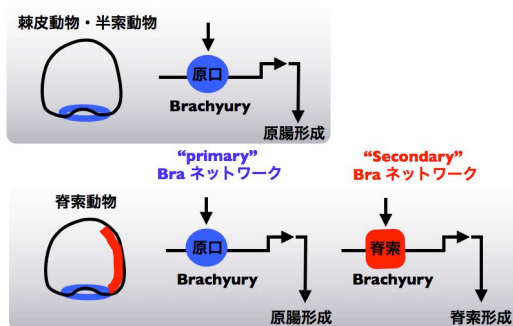
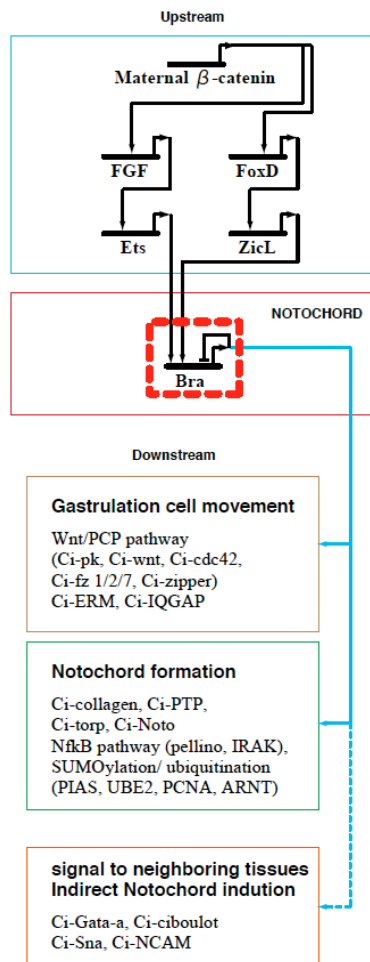
各生物種の *Brachyury* が発現するステージの胚を集めて、それぞれの *Brachyury* 抗体によるクロマチン免疫沈降(ChIP)を行い、次世代シーケンサーを用いた ChIP-Seq 解析により各生物種の *Brachyury* ターゲット遺伝子群をゲノムワイドに同定することを試みた。しかし、本申請研究期間中には ChIP-Seq 解析により十分な結果が得られていない。今後さらに条件を検討して比較可能なターゲット遺伝子群を明らかにしていくことが課題である。

## (3) 脊索に発現を制御する *Brachyury* 遺伝子ネットワークの進化

これまでに、申請者はホヤ *Brachyury* 遺伝子の発現制御メカニズム解析を行ってきた(Takahashi et al. 1999 ; 2005)。本申請研究課題では脊索動物門の *Brachyury* 遺伝子が原口・脊索に発現を制御する遺伝子ネットワーク進化の解析に着手した。*Brachyury* のこれまでの研究から、脊索動物では原口と脊索で *Brachyury* の発現を制御する遺伝子ネットワークが異なると考えられる。

そこで、祖先的な脊索動物であるナメクジウオの *Brachyury* レポーターコンストラクトを作製して、原口と脊索で発現を制御するシスエレメントの同定を試みた。遺伝子導入解析にはすでに実験系が確立している近縁の

尾索動物であるカタユレイボヤを用いて行った。その結果、ナメクジウオ Brachyury の上流領域には筋肉での発現を制御する領域が存在すること、また、Brachyury のイントロン領域には原口での発現と複数の脊索での発現を制御する領域が存在することが示唆された。今後、さらにナメクジウオでの解析、脊索持たない近縁の動物群であるギボシムシでの解析が待たれる。



(Brachyury 遺伝子ネットワークモデル)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Satoh, N., Tagawa, K., Lowe, J.C., Yu, Jr-Kai, Kawashima, T., Takahashi, H., Ogasawara, M., Kirshner, M., Su, Yi-Hsien, & Gerhart, G. On a possible evolutionary link of the stomochord of hemichordates to pharyngeal organs of chordates. *Genesis*. 52, 925-934 (2014). DOI 10.1002/dvg.22831 (査読有)
- ② Satoh, N., Tagawa, K., & Takahashi, H. How was the notochord born? *Evol Dev.* 14, 56-75 (2012). DOI 10.1111/j.1525-142X.2011.00522.x (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 富永斉、高橋弘樹、上野直人、カタユレイボヤを用いたナメクジウオ brachyury 転写調節機構の解析. 日本動物学会、2014年9月11-13日、宮城県仙台市東北大学川内北キャンパス
- ② 関口俊男、高橋弘樹、小笠原道生、桑迫健二、笹山雄一、佐竹炎、鈴木信雄、脊索動物における Calcitonin/Calcitonin gene-related peptide family の分子進化、日本比較内分泌学会、2012年11月30日-12月1日、福井県福井市福井大学文京キャンパス
- ③ 関口俊男、高橋弘樹、小笠原道生、桑迫健二、鈴木信雄、笹山雄一、佐竹炎、ナメクジウオにおけるカルシトニン受容体と受容体共役蛋白質(RAMP)の分子機能、日本動物学会、2012年9月13-15日、大阪府豊中市大阪大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/morphgen/summary/hoya.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 弘樹 (Takahashi, Hiroki)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・助教  
研究者番号：40283585