

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15849

研究課題名(和文)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の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the developmental system contributing to the conservation of blastomere fate in spiralian development

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)：らせん卵割型発生における割球運命の保存をもたらす分子機構の解明を目指し、軟体、環形、扁形動物のトランスクリプトーム解析と、初期発生で発現する転写因子の機能解析を行なった。軟体・環形動物間では、卵割期にzygoticに発現する転写因子のレパートリーと発現パターンの保存性は高くなかった。また、扁形動物の卵割期に特定の割球に偏って発現する転写因子の中に、他動物門と共通するものは見出せなかった。更に、軟体動物で割球運命特異化に寄与する転写因子を新規に同定したが、それらの存在/発現も3動物門間で必ずしも共通していなかった。以上のことは割球運命特異化機構がらせん卵割動物内でも多様化していることを暗示する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の高次分類は中学校/高校の生物の教科者でも取り扱われる社会的関心の高いトピックであるが、動物の高次分類群を規定する形質がどのように成立し、なぜ進化の過程で変化しにくいのかということは、当該分野の領域内においても議論が続いている。本研究課題では、らせん卵割動物を規定する保存性の高い初期発生を制御する分子メカニズムの解析を行い、それらの発生システムのらせん卵割動物内での意外な多様性を明らかにした。これらの知見は、動物の高次分類群を規定する形質の進化機構についての理解を前進させるものである。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular developmental system responsible for the conservation of blastomere fate in spiralian development, we performed comparative transcriptome analysis of mollusks, annelids, and platyhelminthes, and functional analysis of transcription factors which are expressed in early cleavage stage. Among mollusks and annelids, the repertoire and expression pattern of transcription factors expressed zygotically during cleavage were not highly conserved. Also, in flatworms, we could not find transcription factors that are expressed in specific blastomeres at cleavage stage in common with other animal phyla. Furthermore, we identified novel transcription factors involved in blastomere fate specification in mollusks, but their presence/expression was not always common among the three phyla. These findings imply the diversification of blastomere fate specification mechanisms within spiralian animals.

研究分野：進化発生学

キーワード：らせん卵割型発生 初期発生 進化発生学 転写因子 軟体動物

1. 研究開始当初の背景

大分類群を特徴付ける形質を作り出す発生様式はどのように獲得され、なぜそのような形質は強く保存され続けるのか。この二つの問いに答えることは現在も難しい。例えば、左右相称動物の上門のひとつであるらせん卵割動物 (図 1; 軟体動物や環形動物) が示す“らせん卵割型発生”は、動物-植物極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 (図 2) ことが最大の特徴であるが、その進化機構は不明である。また、らせん卵割型発生の割球運命図がなぜ進化的に保存されているのかについても未解明である。

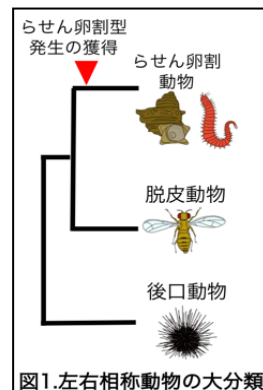


図1.左右相称動物の大分類

1 つの仮説として、共通祖先で割球運命を特異化する GRN (遺伝子制御ネットワーク) が成立したが、変更を加えることが難しい (変更を加えると重大な害) ために現在まで高度に保存されつづけている、ということが考えられるが、実際に割球運命を特異化する分子基盤が不明であるために検証が困難であった。

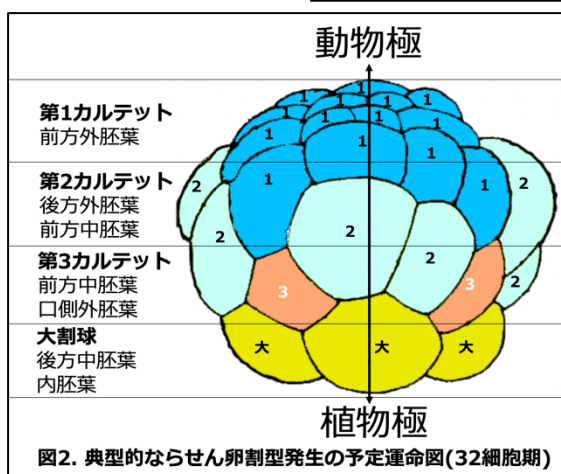


図2. 典型的ならせん卵割型発生の予定運命図(32細胞期)

申請者は先行研究において、トランスクリプトーム解析と機能解析を通じて、

軟体動物の割球運命特異化機構を検証した。その結果、らせん卵割動物にのみ存在する転写因子である SPILE 遺伝子群をはじめ、多くの系統特異的転写因子を含んだ遺伝子群が、初期卵割期の動物-植物極軸上で Hox 遺伝子群のように入れ子状に発現し、軟体動物の割球運命特異化に機能するであろうことを明らかにしてきた。一方で、らせん卵割動物の共通祖先で成立した GRN の進化過程や、割球運命の保存をもたらす発生機構に迫るためには、軟体動物だけでなく多くのらせん卵割動物の割球運命特異機構を比較し、どの GRN が進化的に保存されているのかについての検証が必須である。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえた本研究の目的は本研究の目的は、らせん卵割動物における割球運命特異化に寄与する GRN の解明と、その保存性の検証である。この問いに答えるために、本研究課題ではらせん卵割動物の中で系統的に離れた3動物門である軟体動物・環形動物・扁形動物を用い、(1) 初期卵割期に発現する転写因子群を網羅的に明らかにし、(2) それらの中から保存された発現を示す転写因子群を同定して機能解析することにより、実際に割球運命の特異化を担う GRN を同定することを試みた。材料として、典型的ならせん卵割型発生を示す扁形動物オオツノヒラムシ (*Planocera multitentaculata*)、環形動物ヤッコカンザシ (*Spirobranchus akitsushima*) および軟体動物クサイロアオガイ (*Nipponacmea fuscoviridis*)、ヒザラガイ類の一種 (*Acanthochitona* sp. A; 以下、ヒザラガイと表記する) を用いた。

3. 研究の方法

(1)トランスクリプトーム解析による転写因子発現パターンの比較

ヤッコカンザシ、ヒザラガイにおいて卵及び卵割期の胚から RNA を抽出し、それらを用いて時系列トランスクリプトームデータを取得した。Trinity により *de novo*

assembly を行い、RSEM を用いて発現量解析を行った。また、オオツノヒラムシを用いて 8 細胞期の割球ごとのトランスクリプトームを行い、同様に RSEM を用いて発現量解析を行った。これらの発現データを事前研究で同定済みのクサイロアオガイと合わせて 3 門間で比較し、転写因子群の発現パターンの保存性について検討した。

(2) 機能解析による割球運命特異化を担う GRN の検証

項目 1 で保存性があると見出された転写因子群に関して、クサイロアオガイにおいて翻訳阻害に機能するモルフォリノオリゴを未受精卵に注入することにより機能を阻害した。卵割期及び幼生期においてマーカー遺伝子の発現を調べることにより、その影響を検証した。

4. 研究成果

(1) 各種の初期発生トランスクリプトーム解析と転写因子発現パターンの比較

ヤッコカンザシ、ヒザラガイの 2 種において、卵及び卵割期の複数ステージの時系列トランスクリプトーム。発現量解析を行い、特に zygotic に卵割期に発現が上昇する転写因子に着目して同定した。それらのレパートリーと発現パターンを軟体動物クサイロアオガイと合わせて比較した。

環形動物と軟体動物 (クサイロアオガイとヒザラガイ) では、FoxQ2 や SPILE 遺伝子、PRD-V 遺伝子といった遺伝子の zygotic な発現が卵割期に開始される点で共通性が見られた。その一方で、相同な SPILE 遺伝子 (クサイロアオガイの SPILE-B とヤッコカンザシの SPILE-X, -Y) に関しては、それぞれの遺伝子が発現するカルテットが異なることが知られる (Morino et al., 2017; Barton-Owen et al., 2018)。また、PRD-V 遺伝子に関してもクサイロアオガイとヤッコカンザシで発現パターンは異なっていた。さらに、FoxQ2 遺伝子に関しても、少なくとも一部の遺伝子に関しては両者で異なった発現が観察された。

並行して、両者で独自に拡張し、卵割期での zygotic な発現を示す Homeobox 型転写因子も多数見出された。軟体動物では PRD-VI (分類は Barton-Owen et al., 2018 に準じた) 遺伝子が大幅に拡張し、卵割期に発現していた。これらのうち複数の遺伝子が実際に特定のカルテットに限定した発現を示すことが先行研究で明らかになっている。一方で、環形動物では、環形動物で獲得されたと考えられる PRD-VII 遺伝子の拡張が見られ、かつ卵割期で zygotic に発現を開始していた。

以上のことは、軟体動物と環形動物では、卵割期に多数の系統特異的転写因子を含む遺伝子群が zygotic に発現開始すること、それらの多くが特定のカルテット (群) のみでの発現を示すことは共通するが、どのような転写因子が発現しているか、及び相同な転写因子の発現パターンについては必ずしも保存されていないことを示唆する。

また、オオツノヒラムシの時系列トランスクリプトーム解析から、卵割期のステージで zygotic に発現が開始される転写因子はほぼ見出されないことが先行研究より明らかになっている。本研究課題では、8 細胞期の 1q 割球 (小割球) と 1Q 割球 (大割球) を単離し、それぞれの割球ごとのトランスクリプトーム解析を行った。しかし、統計的にどちらかの割球に発現が偏っていると判定された転写因子の中に、軟体動物や環形動物の初期発生において特定の割球に偏って発現することが知られる転写因子は含まれていなかった。以上のことは、扁形動物オオツノヒラムシでは、軟体動物や環形動物とは大きく異なる分子機構によって割球運命の特異化が起きていることを暗示する。

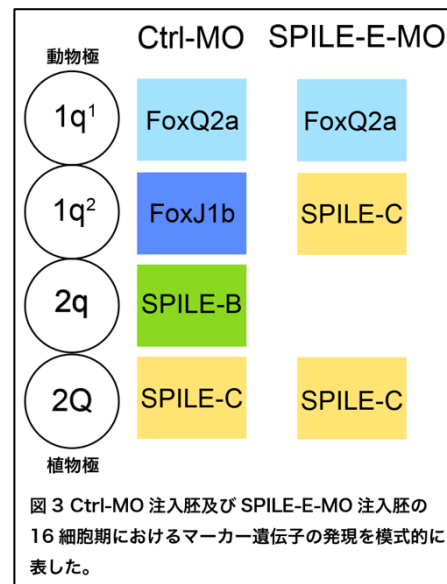
(2) クサイロアオガイにおける転写因子群の機能解析

当初の予想に反し、4種で顕著な発現パターンの保存を示す転写因子は項目(1)の解析では同定することができなかった。そこで、3種以上で卵割期に発現しており、かつ系統特異的な転写因子に着目し、クサイロアオガイにおいてそれらの遺伝子の機能解析を試みた。具体的には、TALE型 Homeobox 遺伝子である SPILE-E 遺伝子と TALE2 に関して、翻訳阻害に機能するモルフォリノオリゴを未受精卵にインジェクションすることにより、機能解析を行った。

① SPILE-E

SPILE-E 遺伝子はらせん卵割動物で獲得されたと考えられる SPILE 遺伝子の1つである。これまでに、SPILE-E に相当する遺伝子は、扁形動物、軟体動物、および腕足動物での存在が確認されている。また、少なくとも軟体動物では母性的に発現が見られ、扁形動物でも受精卵での発現が確認されている。本研究課題では、SPILE-E の KD をクサイロアオガイで行い、(1) 16細胞期の各カルテットでのマーカー転写因子、(2) 受精後8時間の幼生での各カルテット由来の胚葉のマーカー転写因子の発現をそれぞれ行った。

その結果、MO 注入胚では、16細胞期に 1q² 割球 (FoxJ1b) 及び 2q 割球 (SPILE-B) のマーカー遺伝子の発現が消失する一方で、2Q 割球 (SPILE-C) のマーカー遺伝子の発現が 1q² で異所的に発現することが観察された (図3)。また、2q 割球及び 2Q 割球のマーカー遺伝子の発現を制御することが知られる SPILE-A 遺伝子 (Morino et al., 2017) の発現が、MO 注入胚では消失していた。この発現の変化と一貫し、SPILE-E-KD 幼生では、1q² と 2q 由来組織のマーカー遺伝子の発現が乱れる、もしくは消失した。以上のことは、SPILE-E は軟体動物において各カルテットの発生運命の適切な特異化に必須であること、それらの特異化は少なくとも部分的には SPILE-A の発現の制御を通じて行われていることを示唆する。この成果は査読有り英文誌に投稿し、受理されている (Morino and Yoshikawa, accepted)。その一方で、環形動物ヤッコカンザシにおいては、この遺伝子の初期発生における発現は確認されていない。このことは、軟体動物と環形動物の間での割球運命特異化機構の多様化を暗示する。



② TALE2

TALE2 は現在までに軟体動物、環形動物及びその他の冠輪動物での存在が確認されており、冠輪動物で獲得されたと考えられている (Paps et al., 2015)。また、軟体動物では母性的に発現が見られ、環形動物でも卵割期に発現が確認されている。SPILE-E と同様に、MO による KD を行い、KD 胚の 16細胞期及び幼生期におけるマーカー遺伝子の発現を検証した。16細胞期では、1q¹ と 1q² 割球のマーカー遺伝子の発現が消失す

る一方で、 $1q^1$ で2q割球の、 $1q^2$ では2Q割球のマーカ-遺伝子の異所的な発現が観察された。この変化と一貫し、受精後6時間のTALE-2KD胚では、2Q割球に由来する領域のマーカ-遺伝子の発現領域の拡張が見られた。以上のことは、TALE2もまた各カルテットの発生運命の適切な特異化に必須であることを示唆する。一方で、TALE2は扁形動物において存在が確認されていないことから、扁形動物においてはTALE2に依存しない割球運命特異化が行われていると考えられる。これらの成果は現在投稿準備中である。

以上の結果は、当初の予想に反して、らせん卵割動物における割球運命の特異化は、強固に保存された分子機構ではなく少なくとも一部はそれぞれの系統に特有の機構によって制御されていることを暗示する。今後、特に扁形動物と環形動物での割球運命特異化機構の解析を進めていくことで、らせん卵割動物内での割球運命特異化機構の多様性について理解すると共に、割球運命の保存性とそれを実現する発生システムの多様化がどのように両立しているのかについて解明していくことを目指す。

引用文献

- Barton-Owen, T. B., Szabó, R., Somorjai, I. M. L., & Ferrier, D. E. K. (2018). A Revised Spiralian Homeobox Gene Classification Incorporating New Polychaete Transcriptomes Reveals a Diverse TALE Class and a Divergent Hox Gene. *Genome Biology and Evolution*, *10*(9), 2151–2167. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy144>
- Morino, Y., Hashimoto, N., & Wada, H. (2017). Expansion of TALE homeobox genes and the evolution of spiralian development. *Nature Ecology & Evolution*, *1*(12), 1942–1949. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0351-z>
- Paps, J., Xu, F., Zhang, G., & Holland, P. W. H. (2015). Reinforcing the Egg-Timer: Recruitment of Novel Lophotrochozoa Homeobox Genes to Early and Late Development in the Pacific Oyster. *Genome Biology and Evolution*, *7*(3), 677–688. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv018>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yoshiaki Morino, Hiroki Yoshikawa	4. 巻 in press
2. 論文標題 Role of maternal spiralian-specific homeobox gene SP1LE-E in the specification of blastomeres along the animal-vegetal axis during the early cleavage stages of mollusks	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 沓澤 紗奈、佐藤啓輔、和田洋、守野孔明
2. 発表標題 巻貝類を用いたらせん卵割型発生を制御する遺伝子群の探索
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 館岡 美紅、和田洋、守野孔明
2. 発表標題 軟体動物の割球運命特異化における系統特異的転写因子TALE2の役割
3. 学会等名 日本動物学会 第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 守野孔明、Supanat Phuangphong、和田洋
2. 発表標題 らせん卵割動物特異的homeobox遺伝子SP1LEのダイナミックな進化史と初期発生様式の進化
3. 学会等名 日本動物学会 第93回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1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
---------	---------