様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月 １７ 日現在

機関番号：１２１０２
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2009～2013
課題番号：２１３７０１０５

研究課題名（和文）後口動物における新規形態進化の背景にある分子進化に関する研究

研究課題名（英文）Molacular evolutionary background of the innovations of deuterostome morphologo

研究代表者
和田　洋（WADA, Hiroshi）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：６０３０３８０６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　14,400,000円、（間接経費）　4,320,000円

研究成果の概要（和文）：後口動物の形態進化に関与してきた重要な特徴の進化が、どのような遺伝子レベルの進化によって引き起こされたか、いくつかの例を取り上げて解析した。神経堤細胞の進化には、FoxD3のN末領域に新しいドメインを獲得したことを明らかにした。また、棘皮動物の幼生の進化においては、VEGFやAlx1の発現様式の進化が、大きな形態の変化をもたらしたことを明らかにした。また、脊椎動物の顎の進化に、二つの細胞集団の融合のような大きな発生プロセスの改変を伴ったこともわかった。以上の結果から、分子進化が、様々な形で形態進化に結びついてきたことがわかった。

研究成果の概要（英文）：We investigated how the morphological features of deuterostomes were acquired, especially from the aspect of molecular evolution. We found that neural crest evolution required acquisition of a novel domain of FoxD3. In addition, we found that co-option of Alx1 and vegf signaling also contributed the evolution of pluteus larval morphology. We also succeeded to get evidence showing that lamprey mandibular arch contain two distinct cell populations, that may correspond to the upper and lower jaw. Based on this finding, we propose a new evolutionary scheme of vertebrate jaw evolution. These results indicate that novel morphology of deuterostomes were acquired through a variety of molecular evoltuion, such as acquisitions of new domain, co-option of transcription factors and heterotopic shift of signaling system.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：後口動物　神経堤細胞　脊索　顎　ギボシムシ　プルテウス幼生　ヤツメウナギ　咽頭弓

１．研究開始当初の背景

最近２０年の進化発生生物学という学問分野の発展で、「動物の多様な形態を生み出す形成プロセスで、共通の形態形成遺伝子（転写因子やシグナル伝達分子）が用いられていること」が明らかになってきた。このような研究をもとに、動物の体制進化の歴史が、説得力のあるシナリオとして理解できるようになってきた。また、共通の遺伝子基盤を用いて、どのように多様な形態の進化がもたらされたのかという問題についても、「遺伝子の発現制御を司るシス制御領域の変化が、形態進化の原動力である」と考えられるようになった。このような成果から、形態進化の分子的な基盤についての、論理的な枠組みも整理されてきたかのように思える。

しかし、形態進化の歴史をみると、脊索動物の脊索、脊椎動物の神経堤細胞や軟骨や骨のように、祖先の段階では見られなかったような新規の形態が何度も出現している。シス制御領域が進化の原動力であるとする理論的な枠組みは、ハエの翅模様やトゲウオの鰭など近縁種の違いに関する研究をもとに築かれてきた。脊索や軟骨などの進化に見られる、動物進化過程での創造性は、このような近縁種の比較に基づく理論的枠組みでは、説明できないものである。

２．研究の目的

本課題では、後口動物の進化の過程で、新規に獲得された構造の進化を、遺伝子の分子進化として理解することを目指す。特にここでは以下の３つの分子進化過程に着目して研究を進める。

３．研究の方法

無脊椎動物ギボシムシから神経管と脊索の誘導関係を探索することで、脊索の起源に関する解析を行う。また、脊椎動物メダカでの *Pax1* の鰓の発生に関する機能を解析すること、棘皮動物ウニのプルテウス幼生と成体での骨片形成プログラムを明らかにすることで、転写因子の多面的発現と細胞性質の融合について解析する。さらに、ニワトリを用いて FoxD3 が神経堤細胞形成での新規機能に結びついた相互作用ドメインを同定することで、転写因子の相互作用ドメインの獲得と新規機能について解析する。

４．研究成果

脊索動物の共有派生形質である脊索と神経管の進化的起源を明らかとするために，ギボシムシの口盲管と襟神経索の発生を分子レベルで解析した．口盲管と襟神経索は，かつてそれぞれ脊索と神経管と相同であると考えられていた時期もあったが，現在では発生のタイミングやトポロジーの面から否定的な意見が多い．しかし，これまでは形態学的な比較しか行われていなかった．そこで、脊索や神経管形成に関わる遺伝子の，ギボシムシ相同遺伝子の発現を，口盲管と襟神経索が形成される変態期において観察した．その結果，脊索と口盲管，神経管と襟神経索は非常に似た分子メカニズムによって形成，パターン化されていることが示唆された（図１）。

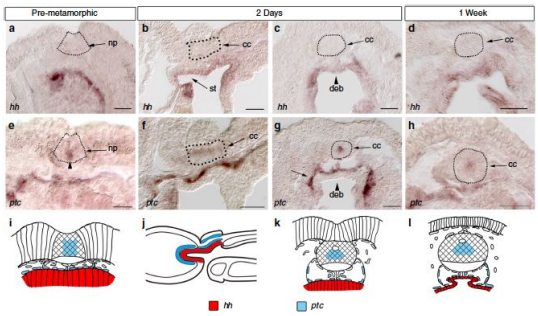

図１　ギボシムシの変態期における hedgehog遺伝子の発現

以上の結果から脊索動物において脊索と神経管を形成するための分子メカニズムの、少なくとも一部が，ギボシムシと脊索動物

の共通祖先で、すでに存在していたことが示唆された.

プルテウス形態の進化に関わる重要なイベントである、幼生骨片の獲得メカニズムを明らかにすべく研究を行なった。Alx1 はウニでは幼生骨片に不可欠な因子であり、同じく骨片を持つクモヒトデやナマコの幼生、そしてヒトデの成体でも骨片特異的に発現していた。しかし Alx1 は、ヒトデの初期幼生では発現していなかった。したがって、幼生骨片の獲得には、*alx1* 遺伝子の幼生期発現が必要であったことが示唆された。また、　近年当研究室の研究により、外胚葉からの VEGF シグナルも同様の発現パターンを示すことも明らかになった（図２）。以上の結果から、棘皮動物の幼生が骨片を獲得するためには､少なくとも２つの要素、Alx1 と VEGF シグナルの幼生期への発現移行が必要であったことが示唆された。

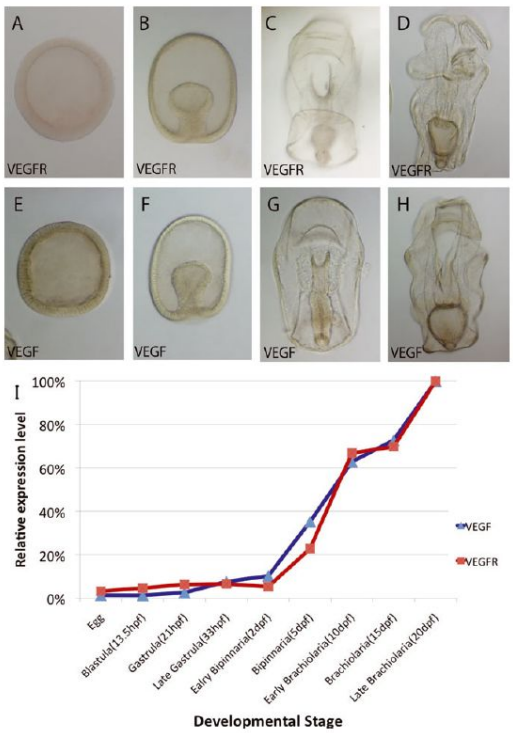

図２　ヒトデでは、幼生期には vegf, vegf 受容体の発現は検出されない

神経堤細胞の誘導に関わる転写因子は脊椎動物において新たに獲得された転写因子ではなく、相同な転写因子はほとんどの動物に存在している。そこで、FoxD グループの転写因子やナメクジウオの FoxD をニワトリの神経管において強制発現し、神経堤細胞の誘導能力を比較した。その結果、脊椎動物の FoxD1、FoxD2、FoxD4、FoxD5、さらにナメクジウオの FoxD は過剰な神経堤細胞を誘導することができず、脊椎動物の FoxD3 のみが過剰な神経堤細胞を誘導する能力があることが明らかとなった。

さらに、FoxD3 タンパク質の神経堤細胞誘に重要なタンパク質の領域を特定するために、ゼブラフィッシュの FoxD3 とナメクジウオの FoxD のドメインスワッピングにより、キメラ DNA を作成し、神経堤細胞の誘導能力を調べた。その結果、ナメクジウオ FoxD の N 末領域の 40 アミノ酸をゼブラフィッシュ FoxD3 の 39 アミノ酸と入れ替えたキメラタンパク質が神経堤細胞を誘導する能力をもつことがわかった（図３）。

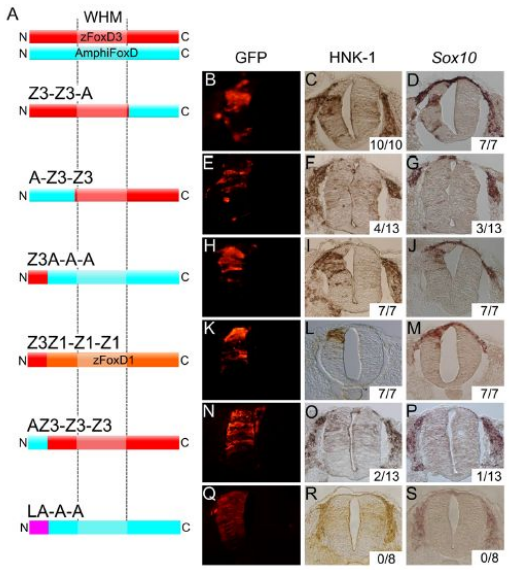

図３　脊椎動物の種間で比較的保存性が高い FoxD3 の N 末の約 40 アミノ酸の領域が神経堤細胞の誘導するために必要である

本研究で明らかとなった FoxD3 の新規の機能獲得は、脊椎動物における神経堤細胞進化の研究において、タンパク質の変化が重要であったことを示す最初の報告である。さらに、FoxD3 の神経堤細胞を誘導する能力が転写因子の主な機能ドメインである DNA 結合ドメイン以外の領域によってもたらされていることも興味深い。DNA 結合ドメイン以外の転写因子の領域は他の協調的にはたらく因子との相互作用の変化や自身の転写活性を変化させるドメインであると考えられているため FoxD3 による神経堤細胞の誘導には他の転写因子やコーファクターが関与している可能性がある。

ヤツメウナギの第 1 咽頭弓領域には前後に分かれた 2 種類の神経堤細胞群が存在していることが明らかにされた。そしてそれぞれの神経堤細胞群に顎骨の発生に関わる遺伝子制御機構が分かれて存在していることが示唆された。そのため、本研究の成果を加えて「ヘテロトピー説」を発展させた新たな仮説を立てることができた（図４）。新しい進化プロセスとして、前方の神経堤細胞群で発現する顎骨のパターニング遺伝子が、後方の第１咽頭弓軟骨に分化する神経堤細胞群にシフトしたことによって顎骨の進化が導かれたと推測される

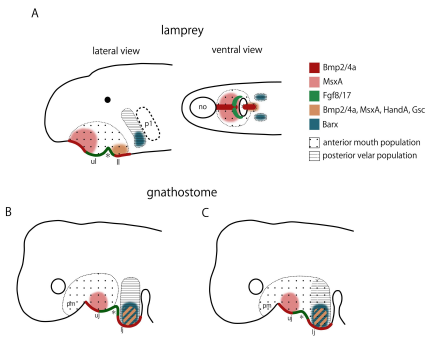

図４　ヤツメウナギの第一咽頭弓と顎の進化に関する仮説

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　11　件）

1. Hiroki Ono, Zbynek Kozmik, Jr-Kai Yu and Hiroshi Wada. A novel N-terminal motif is responsible for the evolution of neural crest-specific gene-regulatory activity in vertebrate FoxD3. Developmental Biology, 385, 396-404 (2014)
DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.11.010
査読有

2. Hiroyuki Koga, Yoshiaki Morino and Hiroshi Wada. The Echinoderm Larval Skeleton as a Possible Model System for Experimental Evolutionary Biology.Genesis, in press (2014)
査読有

3. Norio Miyamoto and Hiroshi Wada. Hemichordate neurulation and the origin of the neural tube. Nature Communications, 4, 2713 (2013)
DOI: 10.1038/ncomms3713
査読有

4. Yoshiaki Morino, Hiroyuki Koga, Kazunori Tachibana, Eiichi Shoguchi, Masato Kiyomoto and Hiroshi Wada. Heterochronic Activation of VEGF Signaling and the Evolution of the Skeleton in Echinoderm Pluteus Larvae. Evolutuion and Development 14: 428-436 (2012)
DOI: 10.1111/j.1525-142X.2012.00563.x
査読有

5. Tuoya Yao, Kaoru Ohtani, Shigeru Kuratani, and Hiroshi Wada. Development of lamprey mucocartilage and its dorsal–ventral patterning by endothelin signaling,

with insight into vertebrate jaw evolution. Journal of Experimental Zoology, Part B Molecular and Developmental Evolution, 316:339-346 (2011)
DOI: 10.1002/jez.b.21406
査読有

6. Satoshi Kaneto and Hiroshi Wada. Regeneration of amphioxus oral cirri and its skeletal rods: implications for the origin of the vertebrate skeleton. Journal of Experimental Zoology, Part B Molecular and Developmental Evolution, 316: 409-417 (2011)
DOI: 10.1002/jez.b.21411
査読有

7. Norio Miyamoto, Yoko Nakajima, Hiroshi Wada and Yasunori Saito Development of the nervous system in the acorn worm *Balanoglossus simodensis*: insights into nervous system evolution.Evolution and Development, 12: 416-424 (2010)
DOI: 10.1111/j.1525-142X.2010.00428.x
査読有

8. Masahiko Yoneda, Toshiya Nakamura, Miho Murai, Hiroshi Wada. Evidence for the heparin-binding ability of the ascidian Xlink domain and insight into the evolution of the Xlink domain in chordates.Journal of Molecular Evolution, 71: 51-59 (2010)
DOI: 10.1007/s00239-010-9363-x
査読有

9. Kazunori Okada, Yuji Yamazaki, Shinichi Yokobori and Hiroshi Wada Repetitive sequences in the lamprey mitochondrial DNA control region and speciation of *Lethenteron*. Gene, 465: 45-52 (2010)
DOI: 10.1016/j.gene.2010.06.009
査読有

10. Hiroyuki Koga, Mioko Matsubara, Haruka Fujitani, Norio Miyamoto, Miéko Komatsu, Masato Kiyomoto, Koji Akasaka, Hiroshi Wada. Functional evolution of *Ets* in echinoderms with focus on the evolution of echinoderm larval skeletons. Development, Genes and Evolution, 220: 107-115 (2010)
DOI: 10.1007/s00427-010-0333-5
査読有

11. Hiroshi Wada, Origin and Genetic Evolution of the Vertebrate Skeleton. Zoological Science, 27:119-123 (2010)
DOI: 10.2108/zsj.27.119
査読有

〔学会発表〕（計　6　件）

1．和田　洋
エボデボのこれまでとこれから 脊椎動物の起源を例に
2013.8.24
第１４回日本進化学会　進化生物学夏の学校
首都大学東京　八王子

2. Kazunori Okada, Daichi Suzuki, Miho Yoshimura and Hiroshi Wada
Establishment and Elaboration of the Vertebrate Pharyngeal Arches
March 6-8 2013
CDB simposium 2013
Kobe Japan

3. Hiroshi Wada. Homology and Deep homology between hemichordate and chordate
Dec. 6. 2012
OIST Winter Course “Evolution of

Complex Systems”
Okinawa Japan

4. Hiroshi Wada. Hemichordate neurulation and the origin of the chordate body plan. Oct 25-27, 2012
Sea urchin meeting XXI
Woods Hole, MA, USA

5. Hiroshi Wada. Experimental evolutionary biology on the convergent evolution of the pluteus larvae. Apr. 27-May 1, 2011
Sea urchin meeting XX
Woods Hole, MA, USA

6. Hiroshi Wada, Yoshihisa Kurita and Norio Miyamoto. Origin and evolution of novel bodyplan -lessons from marine invertebrates: molluscs and hemichordates. 2011.6.1
OIST Marine Genomics Seminar
Okinawa, Japan

〔図書〕（計　1　件）

1. Hiroshi Wada. Domain Shuffling and the Evolution of Vertebrate Extracellular Matrix “Evolution of Extracellular Matrix” F. W. Keeley and R. P. Mecham, Eds. Springer pp. 27-37. (2013)
DOI: 10.1007/978-3-642-36002-2_2

〔その他〕

ホームページ等

http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~hwada/index.html

６．研究組織

(1)研究代表者

和田　洋　（WADA, Hiroshi）
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：60303806