

令和元年6月17日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04815

研究課題名(和文)動物の変態において、形態と行動の変化を調和させるメカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms that coordinate events of animal metamorphosis

研究代表者

笹倉 靖徳 (Sasakura, Yasunori)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：10400649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：動物は変態を通じて様々な側面から体を作り替える。これらの変化の正確な制御は変態の成功に必須である。変態イベントの開始・進行は神経や内分泌経路によって制御されているが、これらの因子が変態の多岐に渡る現象のタイミングを調節する仕組みはまだ分かっていない。本研究では、遊泳生のオタマジャクシ型幼生から固着性の成体へと劇的に変化を遂げるホヤを用いて、変態イベントの開始・進行を調節する仕組みの解明を行った。GABAが全変態イベントのスイッチであること、尾部吸収はGABAの下流のGnRHホルモンにより開始されること、成体構造の構築はGnRHと甲状腺ホルモンの協調的作用で進行することなどの発見をもたらした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でホヤの変態制御因子を特定したことは、発生・生理学的に極めて重要である。変態のような変化はあらゆる動物群で見られる普遍的な特徴である。哺乳類においても思春期の時に体が大きく変化することは知られている。私たちの研究は、ホヤの重要な変態制御因子としてGnRHを特定した。GnRHは脊椎動物の第二性徴に必須のペプチドホルモンである。つまり、ホヤの変態は脊椎動物の第二性徴と似た機構で進行されるのである。本研究を通じ、動物が大人に至る仕組みには、GnRHというホルモンを通じた共通した機構があることが推定され、本分野の新しい理解を促す重要な学術的・社会的な意義がある。

研究成果の概要(英文)：Metamorphosis allows animals to convert their various aspects such as body shape, physiology, gene expression, behavior, life style and environment. How the timing of these metamorphic changes are regulated by the neuronal and endocrine systems is the important question for understanding animal metamorphosis? To address this issue, we characterized regulatory network of the metamorphosis in the ascidian. We identified the neurotransmitter GABA is essential for the whole metamorphic events of ascidian. GABA uses its metabotropic receptor for initiating metamorphosis. GnRH is the downstream molecule of GABA for initiating tail regression. The other metamorphic event of ascidian, growth of adult organs is regulated by a portion of GnRH and thyroid hormone. Our findings are necessary for understanding the nature of animal metamorphosis.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：変態 ホヤ GABA GnRH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物は、変態を通じて幼生・幼体から成体へとその体を劇的に変化させる。このとき、単に体制が変化するだけでなく実に様々な生物的機能が変化する。遺伝子発現、生理反応のような内的要因から、行動や生活場所といった生態的な外的要因も含めた大きな変化が、変態というたった一つのイベントによってもたらされる。逆に言えば、動物の変態は上記のイベントが一度に、同一の体で同時的に生じる、劇的な生物現象である。

動物の変態で生じる上記の変化は、互いに深い関係があり、タイミングが厳密に制御されている。例えば、無尾両生類のカエルは水中生活を送るオタマジャクシから水を離れて生活可能な成体へと変態するが、その過程で生じる変化は、全て陸上生活に適応するためのものとなっている。一部の変化が、まだ水中にいる段階で生じると個体の死につながるため、陸上への進出と呼応する形で様々な変化を遂げなくてはならない。動物の変態は神経系とホルモン・内分泌系によりそのタイミングが制御されていることはよく知られており、その下流に個々の変態イベントが存在する。つまり、上流の制御因子がどのように、下流のイベントのタイミングを制御しているのか、その協調を達成する仕組みを明らかにすることが、動物変態の理解に必須である。

2. 研究の目的

ホヤは脊椎動物に最も近い無脊椎動物であり、オタマジャクシ型で活発に遊泳する幼生から、固着性の成体へと変態する。ホヤ幼生はその最前方に付着突起と呼ばれる神経性の固着器官を有しており、付着突起で岩などに固着する。固着するとその固着刺激によって一連の変態現象がスタートする。ホヤの変態イベントは尾部吸収などの幼生構造の破壊・喪失と、成体組織の構築・成長に大別される。ホヤの変態開始には神経系により制御されていると予想されており、神経系がどのように方向性の異なる変態イベントの開始を司っているのか、その仕組みを解明することを通じ、動物変態における変化が協調的に制御される仕組みを理解することを目指すことが本研究の目的である。

我々は本研究の開始前に、ホヤの変態開始に重要な機能を有する物質が GABA であることを支持するデータを得た。GABA は神経伝達物質であるため、この GABA による伝達をトリガーにしてホヤが変態を開始していると予想される。本研究では、GABA がホヤの変態制御因子であることを証明し、さらに GABA の下流にある因子・神経細胞を同定することで、ホヤの変態の各イベントが開始されるメカニズムへとアプローチし、最終的にそれらのイベントが統合的にホヤの変態を開始・進行させる機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) ホヤの1種であるカタコウレイボヤを材料に用いる。幼生への神経伝達物質や各種阻害剤の投与によって変態への影響を調べる。また遺伝子機能をゲノム編集ならびにモルフォリノオリゴを用いて抑制し、変態に必要な遺伝子を特定する。ゲノム編集にはTALENを主に用い、Crispr/Cas9も必要に応じて併用する。変態中のホヤからRNAを抽出しての遺伝子発現解析、固定胚を用いたin situ hybridization、組織化学染色を通じて変態イベントへの影響を観察する。カタコウレイボヤは遺伝学的アプローチが可能なホヤであり、遺伝子ノックアウトや遺伝子組換え実験から系統を樹立し、遺伝子機能や細胞・組織分化を観察する。

4. 研究成果

(1) GABA はカタコウレイボヤの変態に必須である

幼生の尾部を一部切除して変態を生じなくし、GABA を添加すると変態が誘導されることを確認した。そのほかアセチルコリン、グルタミン酸、グリシンといったホヤ幼生が発現している神経伝達物質の添加も行ったが、変態誘導活性があるのはこれらのなかではGABAのみであった。また我々は、single cell transcriptome 解析を使って神経伝達物質の1つドーパミンを産生する神経の分化に必須な転写因子 Ptf1 と Meis を同定した。このことにより、ドーパミンがないホヤの作出に成功したが、このホヤは正常に変態したため、ドーパミンもホヤの変態には必要ではない。

GABA の変態への必要性を確認するために、GABA の合成・分泌に必要なタンパク質をコードする遺伝子を抑制し、変態への影響を観察した。その結果、これらの遺伝子抑制個体は変態できず幼生のままであった。これらの個体に GABA を作用させると変態能力が回復する。従って、ホヤの全変態イベントの開始には GABA が必須であることが明らかとなった。

(2) GABA の受容体の特定

GABA は細胞表面にある受容体に受け取られることでシグナルを伝達する。この受容体を特定する実験を行った。GABA 受容体はイオンチャネル型の A 受容体と、代謝型の B 受容体に大別される。それぞれのタンパク質をコードする遺伝子を破壊したところ、B 受容体の破壊個体は変態しなかった。従って、変態において GABA は B 受容体を利用していることが明らかとなった。

(3) GABA・GABA 受容体の下流因子の同定

GABA 及び受容体が変態を開始・進行させる機構を解明するためには、GABA が受容される細胞を同定する必要がある。GABA B 受容体の発現パターンは既知であり、そのパターンはアセチルコリンを放出するコリン作動性神経と似ている。しかしながらアセチルコリンには変態イベントを促進する活性はなく、他の因子が存在することが予想された。

その下流因子候補として、神経ペプチドの一種であるゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) に着目した。GnRH をホヤ幼生に添加すると、変態開始が促進されること、一部の GnRH は変態中の細胞増殖を抑制する効果があることが分かっていた。GnRH をコードする 3 種類の遺伝子 (gnrh1, gnrh2, gnrhx) の機能を阻害した個体の表現型の解析から、これらの遺伝子は共に変態、特に尾部吸収に必要であることが明らかとなった。

ホヤの変態、特に尾部吸収が進行する機構を解明するため、吸収中の細胞で生じる細胞内イベントを解析した。その結果、アクチン繊維及びミオシンを介した細胞収縮運動が尾部を吸収させていることを明らかにした。

(4) 変態進行に異常を示す突然変異体 trf の解析

我々は以前、変態に異常を示す突然変異体 tail regression failed (trf) を報告していた。この変異体は、固着後尾部が吸収されないが、成体構造の成長は生じる変異体であり、変態イベントの協調性が崩れているという、本研究に必須の特徴を有している。この変異体の原因遺伝子の同定を進め、Prohormone convertase 2 (PC2) タンパク質をコードする遺伝子であることを突き止めた。実際に PC2 をノックアウトすると、trf と同様の表現型が出現する。PC2 は神経ペプチドの成熟に必要なプロテアーゼであり、ホヤの変態、特に尾部吸収に GnRH 等の神経ペプチドが必要であるということ裏付ける結果となった。

神経ペプチドがどのように変態を制御するかを包括的に解明する目的で、trf 変異体と野生型間で遺伝子発現を比較した。その結果、発現の変動を示す遺伝子のリストを得たが、その中には GABA の代謝に関わる遺伝子が含まれており、神経ペプチドのパスウェイが GABA パスウェイと関連を持つことが示唆された。これらの下流遺伝子についてはノックアウトを試みている。

(5) GABA と GnRH の関連

GABA が B 受容体を介して、GnRH の分泌を制御して変態を生じさせている可能性を追求するため、上下関係を調べる実験を組んだ。GABA 関連遺伝子の機能を阻害した幼生において、GnRH を添加すると変態が開始されること、すなわち表現型が回復することが明らかになった。一方で PC2 や GnRH のノックアウト個体において、GABA を添加しても変態能力は回復しない。従って、GABA の下流因子として GnRH があると強く推定された。そのことを裏付けるため、遺伝子の発現解析を行った。GnRH と GABA B 受容体遺伝子の発現を調べたところ、GnRH 陽性神経の一部において、GABA B 受容体が実際に発現していた。すなわち、GnRH 神経は GABA を受容できることが明らかになった。

上記の結果は、GABA が GnRH の放出を促進していることを意味しているが、GABA は通常抑制性の神経であり、神経活動を抑える機能を有している。GABA がどのように GnRH の分泌を制御しているかを調べるため、GnRH 神経を単離し、GABA の添加時におけるカルシウムイオンの変動をイメージング技術によって解析した。しかしながらカルシウムイオンの上昇は認められなかった。このことから、GABA は GnRH の放出を特殊な経路で制御していることが示唆された。

(6) 成体組織成長を開始させる因子の同定

ホヤの変態では、尾部吸収だけでなく成体組織構築・成長も重要なイベントである。このイベントの進行を制御する因子の同定を目指した。まず、GABA はホヤ変態のトータルのスイッチであり、GABA の抑制は成体組織成長も停止させる。GABA B 受容体にも同様の効果があることから、B 受容体を介したパスウェイが組織成長にも関わると考えられる。一方で GnRH 遺伝子をノックアウトした際には、gnrh2 を破壊した時に組織成長の停止が観察されたため、GnRH の一部も組織成長に関わる可能性が高い。一方で PC2 破壊個体では組織成長が認められており、gnrh2 の破壊と PC2 の機能欠損とでの表現型の不一致の解決は今後の課題である。

脊椎動物においては甲状腺ホルモンが体の成長に必須である。このホルモンはホヤにも存在している。甲状腺ホルモン合成酵素である thyroid peroxidase (TPO) を破壊すると、尾部吸収までは正常に進行するが、体の成長が停止するという表現型が得られた。この組織成長の停止は、細胞周期の G1 arrest であることも分かった。ホヤの変態時には G1 から S 期への進行を制御することで組織成長を促すことが我々の過去の研究から明らかになっており、TPO の変異が確かに変態中の組織成長に関わることが裏付けられている。甲状腺ホルモンの産生に関わる他の因子をコードする遺伝子のノックアウトも作製しており、これから解析を進める予定である。

(7) 成体組織を作る仕組み

上記の解析より、成体組織を成長させる仕組みは解明されているが、組織がどのように幼生のものから成体のものへと分化するのかが分かっていなかった。本研究ではこの問題にもアプローチした。

まず、Hox1 と Otx という2つの転写因子は内柱(甲状腺相同器官)のそれぞれ後方と前方で発現する。これらの遺伝子を破壊し解析した結果、発現パターンから予想されるとおり Hox1 が内柱後方、Otx が内柱前方の構築に必要であること、Hox1 と Otx は互いの発現を抑制しあってそれぞれの領域の identity を獲得すること、Hox1 の後方での発現は、周囲の組織からのレチノイン酸シグナルによって誘導されることを明らかにした。

Hox12 は幼生期の表皮の一部と変態後の消化管の一部で発現することが分かっていた。この遺伝子のノックアウト個体の解析から、Hox12 は消化管の正常な形態の構築に必要であることが明らかになった。

Hox13 もまた、変態後の消化管の後方で強い発現を示すことが明らかになっている。Hox13 のノックアウト個体の解析から、Hox13 は輸精管の先端でも発現し、そこに位置する放精制御器官の構築に必須であることが明らかになった。一方で Hox13 を破壊しても消化管に異常はこれまでのところ見つかっておらず、発現と機能は必ずしも一致しないこともまた明らかになった。

(8) セルロース合成能力獲得の進化的考察

ホヤは動物でありながらセルロースを合成する極めて珍しい特性を持っている。我々は以前、ホヤが変態能力を獲得する過程でセルロース合成能力が必須であったと推定していた。ホヤのセルロースは、ゲノムにコードされているセルロース合成酵素遺伝子により作られ、これは細菌の1種であるアクチノバクテリアより水平伝搬を通じてホヤゲノムへと取り込まれたと推定されている。しかしながら、遺伝子を単に取り込んだだけでは遺伝子機能の獲得には至らない。特に重要なのは、獲得した遺伝子の発現を得ることである。動物とバクテリアでは遺伝子発現調節機構が異なることから、どのようにホヤの祖先がセルロース合成酵素遺伝子の発現を得たのか、その仕組みの理解がホヤ変態の理解に必要である。

ホヤのセルロース合成酵素遺伝子は表皮で発現する。まず我々は、セルロース合成酵素遺伝子の表皮での発現に必須な転写因子 AP2 を特定した。また、セルロース合成酵素遺伝子の転写調節領域にただ1つある、AP2 結合領域も同定した。この結合領域は、GC rich な配列中に存在していたが、ホヤのゲノムは全体的に AT rich であることから考えると不釣り合いであった。セルロース合成酵素遺伝子の由来であるアクチノバクテリアは GC rich なゲノムを持つという特徴を持っているため、ホヤのセルロース合成酵素遺伝子の転写調節領域に見られる GC rich な特徴は、このバクテリアに由来する可能性がある。実際に、アクチノバクテリアのセルロース合成酵素遺伝子付近のゲノム配列には、ホヤ内で表皮のエンハンサー活性を有していた。これらのことを総合し、ホヤの祖先はアクチノバクテリアからセルロース合成酵素遺伝子を獲得した際に、単に遺伝子のみならず表皮のエンハンサーも同時に獲得していて、このことは遺伝子発現をオンにする原動力となった、と考察した。

(9) 遺伝子破壊のための新手法の構築

変態などの解析には、変異体を系統化して表現型を観察することが求められるが、変態制御因子をノックアウトするとそもそも変態しなくなるために、成体まで育てることができず、変異体を樹立できないという矛盾があった。このことを解決する新しい遺伝子破壊方法を構築した。ホヤの始原生殖細胞は尾部にあるが、尾部の切除を通じてこれらの細胞を無くした個体は体細胞から生殖細胞を再生することが分かっていた。この現象を利用して、変態へと異常を示さない条件付きの遺伝子を破壊した個体において生殖細胞再生を引き起こさせ、高い効率で生殖細胞に変異を蓄積した個体を作成することに成功した。これによって、通常の方法では系統樹立できなかった遺伝子の変異体の樹立を可能にし、PC2 変異体など様々な変異体を実際に樹立し、解析に役立てた。

(10) トランスジェニック系統作製の新手法の構築

ホヤにおける遺伝子や細胞などの機能解明には、遺伝子組換え系統を迅速にまたローコストで作製できるシステムが必須である。この基盤達成のために、PhiC31 によるトランスジェニック系統作製方法のカタユウレイボヤへの導入を試みた。PhiC31 の組換え認識配列を有するカタユウレイボヤ系統の樹立、PhiC31 がカタユウレイボヤゲノムにおいて組換えを引き起こすこと、組換え効率はカタユウレイボヤの従来の形質転換法であるトランスポゾンを用いた手法と比べて高効率であろうと予想されること、を期間内に突き止めた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7件)

Horie T, Horie R, Chen K, Cao C, Nakagawa M, Kusakabe TG, Satoh N, Sasakura Y, Levine M. Regulatory cocktail for dopaminergic neurons in a protovertebrate identified by whole-embryo single-cell transcriptomics. *Genes Dev.* 2018;32:1297-1302. 査読有

Sasakura Y, Hozumi A. Formation of adult organs through metamorphosis in ascidians.

Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2018;7(2). 査読有

Ogura Y, Sasakura Y. Emerging mechanisms regulating mitotic synchrony during animal embryogenesis. Dev Growth Differ. 2017;59:565-579. 査読有

Osugi T, Sasakura Y, Satake H. The nervous system of the adult ascidian *Ciona intestinalis* Type A (*Ciona robusta*): Insights from transgenic animal models. PLoS One. 2017;12(6):e0180227. 査読有

Yoshida K, Nakahata A, Treen N, Sakuma T, Yamamoto T, Sasakura Y. Hox-mediated endodermal identity patterns pharyngeal muscle formation in the chordate pharynx. Development. 2017;144:1629-1634. 査読有

Yoshida K, Hozumi A, Treen N, Sakuma T, Yamamoto T, Shirae-Kurabayashi M, Sasakura Y. Germ cell regeneration-mediated, enhanced mutagenesis in the ascidian *Ciona intestinalis* reveals flexible germ cell formation from different somatic cells. Dev Biol 2017;423:111-125. 査読有

Sasakura Y, Ogura Y, Treen N, Yokomori R, Park SJ, Nakai K, Saiga H, Sakuma T, Yamamoto T, Fujiwara S, Yoshida K. Transcriptional regulation of a horizontally transferred gene from bacterium to chordate. Proc Biol Sci. 2016;283(1845). pii: 20161712. 査読有

〔学会発表〕(計 9件)

笹倉靖徳 脊索動物ホヤの変態は、GABAを介したゴナドトロピン放出ホルモン GnRH の放出制御によって開始される 第41回日本分子生物学会年会、2018年

笹倉靖徳 ホヤの変態機構の研究の展開 第4回ホヤ研究会、2018年

山路 草太 異なる組織の形態形成運動の協調がホヤ幼生の尾部を効率的に退縮させる 生命科学系学会合同年次大会、2017年

田島由佳子 カタウレイホヤにおける Hox13 は、放精を制御する輸精管先端の感覚器官形成に必須である 生命科学系学会合同年次大会、2017年

笹倉靖徳 固着により開始されるホヤの変態を司る分子メカニズム 日本付着学会シンポジウム 2017年

笹倉靖徳 The neuronal mechanisms that coordinate metamorphic events of ascidian 日本発生物学会年会 2017年

Keita Yoshida Hox1 mediated endodermal identity patterns the pharyngeal muscle formation in the ascidian, *Ciona intestinalis* Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology & the 87th meeting of the Zoological Society of Japan, 2016年

Sota Yamaji Cellular behaviors driving tail regression during ascidian metamorphosis Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology & the 87th meeting of the Zoological Society of Japan, 2016年

笹倉靖徳 ホヤの変態メカニズムの解明に向けて 第3回ホヤ研究会、2016年

〔図書〕(計 4件)

Sasakura Y. Transgenic Ascidiarians. Adv Exp Med Biol. 2018, 1029

Sasakura Y. Germline Transgenesis in *Ciona*. Adv Exp Med Biol. 2018; 1029:109-119. 査読有

Sasakura Y. The Enhancer Trap in *Ciona*. Adv Exp Med Biol. 2018;1029:121-129. 査読有

Sasakura Y, Yoshida K, Treen N. Genome Editing of the Ascidian *Ciona intestinalis* with TALE Nuclease. Methods Mol Biol. 2017;1630:235-245. 査読有

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~sasakura>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。