

孵化腺細胞欠損変異体の遺伝子発現解析：

胚葉を越えた機能転移はどのようにして起こったか

東京工業大学生命理工学院 助教（助成時）

同上（現在）

長澤 竜樹

研究の背景

繁殖の効率は、生物が種を繁栄させる上で最も重要な要因の一つである。とりわけ胚発生期は堅牢な組織構造や免疫系による防護策を持たないため、これらの外環境から如何にして卵を保護するかが重要となる。水中に卵を産み付ける魚類と両生類では、水流などの物理的ストレスや細菌による侵襲などから胚を保護するために、卵膜と呼ばれる構造物で周囲を覆うことによって効率的な胚の保護を可能としている。

強固な卵膜は胚の効率的保護を可能にする一方で、孵化時には胚が外界へと進出するための障壁となる。そこで胚は孵化酵素と呼ばれる卵膜分解酵素を分泌することで孵化を可能にしている。孵化腺細胞は胚体表面に局在する細胞で、孵化酵素の合成・分泌のみを担う特殊化した細胞である。

本研究では (1)魚類型孵化腺細胞の分化機構解明、(2)脊椎動物における孵化酵素遺伝子ファミリーの分子進化パターンの解明、(3)卵膜硬化機構の進化、の3つを解明することを目的として研究を行った。

結果

(1) 魚類型孵化腺細胞の分化機構解明

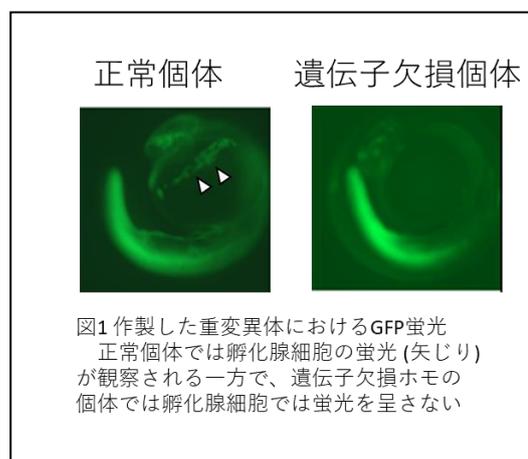
脊椎動物における相同な組織・器官は同一の胚葉を起源とする一方で、孵化腺細胞は両生類(外胚葉由来)と魚類(内中胚葉由来)とで発生学的起源が異なる特異な細胞である。この発生学的起源が脊椎動物の進化過程でどのように進化したかを解明することを最終目的として、まずは魚類型孵化腺細胞の分化機構解明を目指した。

2種類の転写因子を CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトしたゼブラフィッシュをそれぞれ作製し、いずれの系統においても孵化腺細胞が分化しなくなることを確認

した。その後、両系統の RNA-seq 解析を計画していたが、どちらのホモ系統も成熟に至らないことが判明した。そこでこの問題を解決するためにヘテロ個体同士を掛け合わせ、胚の段階でホモ個体を判別可能な新しい系統の作製に取り掛かった。新たな系統では、尾と孵化腺細胞の両方が GFP 蛍光を呈し、遺伝子欠損ホモでは孵化腺細胞のみの蛍光が消失することが確認された(図 1)。今後はこの系統を用いた RNA-seq 解析を行うことで、魚類型孵化腺細胞の分化機構の解明を目指す。

(2) 脊椎動物における孵化酵素遺伝子ファミリーの分子進化パターンの解明

これまでに孵化酵素遺伝子は魚類の進化過程において、ゲノム中を飛び回りながら遺伝子重複を起こし



てきたことを明らかにしてきた(Nagasawa et al. *Sci Rep* 2019)。さらに魚類では孵化酵素と配列のよく似たパラログ遺伝子(pactacin, nephrosin, patristacin など) がコピー数を増大させているために、これら遺伝子ファミリーの分子進化を詳細に追跡するのは困難であった。

近年では染色体レベルでアセンブルされた良質なゲノムデータが多くの脊椎動物種において公開されている。そこで本研究では 30 種の脊椎動物ゲノムから 382 個の遺伝子を対象に、これらの分子進化の挙動を分子系統解析やゲノムシテニー解析、遺伝子発現解析を用いて追跡した。これらの解析の結果、pactacin, nephrosin, patristacin, 孵化酵素遺伝子のすべてが顎口類との共通祖先における単一遺伝子に由来することを明らかにした。この結果は、論文としてまとめ現在投稿中である。さらに、このようにして魚類で誕生した新規遺伝子の一つである pactacin が魚類の消化酵素として機能していることも明らかにし、学術論文として公表した(Kawaguchi et al. *Sci Rep* 2021)。

(3) 卵膜硬化機構の進化

前述のように卵膜は外環境から胚を保護する上で重要な細胞外構造物である。その一方で魚類には、グッピーやタツノオトシゴのように、親の体内で卵を保護する種がいることが古くから知られている。この卵保護種は魚類の系統で独立に複数回生じており、平行進化の好例であるものの、これらに共通した分子機構は未だに知られていない。これに対し本研究では親による卵保護を受ける種において卵膜による保護の重要性が低下しているのではないかと予想した。

そこで 140 種の魚類のゲノムデータを再解析し、卵保護の有無を考慮し比較したところ、非卵保護種では卵膜形成に重要な遺伝子セットがほぼ全て維持されているものの、多くの卵保護種では、卵膜形成因子の複数が偽遺伝子かしていることが明らかになった。このことは卵保護の平行進化における共通の分子機構を示す初めての例であり、さらに魚類の卵膜形成機構を解明する上での重要な分子基盤となることが期待される。

また、魚類の卵膜は真骨魚類の共通祖先で、より強靱な硬化系へと変化したことをこれまでに明らかにしていたが(Nagasawa et al. *JEZB* 2015)、この強靱な硬化系へのシフトが、卵膜硬化とは異なる役割を持った既存の遺伝子の使い回しを含む、複数の遺伝子セットの変化により引き起こされたものである可能性が新たに示された。

まとめ

本研究では孵化酵素・孵化腺細胞・卵膜の研究における基盤構築を行った。研究開始当初は孵化腺細胞の分化機構解明を主眼としていたものの、COVID-19 の拡大や作製系統が致死であることの発覚等の問題点が生じ、計画の変更を余儀なくされた。そこでインフォマティクス解析等を用いながら、対象を孵化酵素・孵化腺細胞・卵膜に拡大させ、それぞれの研究における基盤構築を行った。今後は、作製系統を使った遺伝子発現解析による孵化腺細胞分化機構の解明や、卵保護種と非保護種の比較による卵膜形成機構の平行進化の様相の解明を目指す。

未発表データを多く含むため、実際の遺伝子名は非公開とさせていただきます。

参考

Nagasawa et al. Translocation of promoter-conserved hatching enzyme genes with intron-loss provides a new insight in the role of retrocopy during teleostean evolution. *Scientific Reports* 9, Article number: 2448 (2019)

Kawaguchi et al. Pactacin is a novel digestive enzyme in teleosts. *Scientific Reports* volume 11, Article number: 7230 (2021).