

論文内容の要旨

論文題目 Studies on *Hox* genes in the stalked crinoid *Metacrinus rotundus*
(棘皮動物有柄ウミユリ類トリノアシの *Hox* 遺伝子に関する研究)

氏名 原 祐子

序論

棘皮動物は動物系統分類学上、脊索動物、半索動物と同様、新口動物の一門をなす。棘皮動物は少なくとも生涯の一時期に茎を持つ有柄亜門と茎を持たない遊在亜門に大別され、さらに有柄類は便宜上有柄ウミユリ類とウミシダ類に分類される。有柄ウミユリ類は古生代に繁栄した動物であり、現生種として報告されているものは非常に少なく、一般的に深海性であるために採集が困難である。従って豊富に存在する化石記録からの研究とは対照的に、現生種を用いた研究は非常に遅れていた。しかし、化石記録と分子系統解析から遊在類よりも有柄類が祖先的であり、さらには有柄ウミユリ類が現生棘皮動物の中で祖先的形質を最もよく保存したグループであることが支持されている。従って、新口動物の共通祖先から分岐した祖先的棘皮動物の形質を最もよく保存している現生棘皮動物は有柄ウミユリ類であり、有柄ウミユリ類を研究することは棘皮動物、ひいては新口動物の体制進化過程を解明する上で極めて重要であると考えられる。

Hox 遺伝子群は真正後生動物に共通して前後軸形成に関与していることが知られている。一般的に遺伝子配列の保存性が高いことや複数の *Hox* 遺伝子が染色体上でクラスターを形成すること、発現する時期や領域がクラスター上の遺伝子の順序に従っていることなど興味深い特徴が種を超えて保存されていることが知られているため、動物の体制の発生過程と確立過程を理解する上で鍵となる遺伝子である。

本研究では現生棘皮動物で最も祖先的形質を保持していると考えられる有柄ウミユリ類の一種トリノアシ *Metacrinus rotundus* の *Hox* 遺伝子に着目し、遺伝子のクローニングと初

期発生過程での発現解析を行った。これらの結果に基づいて、有柄ウミユリ類の体制確立への *Hox* 遺伝子の関与、棘皮動物の系統において有柄類から遊在類が分岐する過程で起きた進化的な変化について考察した。

方法

Hox 遺伝子が共通に持つ homeobox の一部を degenerate PCR によってクローニングした後、RACE、inverse PCR、cDNA library を template とした PCR により、トリノアシの *Hox* 遺伝子をクローニングした。各 ortholog group の推定のため、これらの遺伝子について分子系統解析を行った後、RT-PCR と Whole mount *in situ* hybridization(WMISH)により、初期発生過程での発現を調べた。

結果

トリノアシから 8 種類の *Hox* 遺伝子をクローニングした。クローニングされた 8 種類の *Hox* 遺伝子には homeobox が存在し、*lab*、*Antp* group の遺伝子については homeobox の 5'側に hexapeptide 配列が存在することなど、他の動物の既知 *Hox* 遺伝子と同様の特徴が保存されていた。これら 8 種類の *Hox* 遺伝子それぞれの orthologous group は *Hox1*、*Hox2*、*Hox4*、*Hox5*、*Hox7*、*Hox8*、*Hox9/10*、*Hox11/13c* であると推定した (Fig. 1A, B)。

次に RT-PCR により、初期発生過程の 8 発生時期 (胞胚期、原腸胚期、孵化幼生期、pre-auricularia 幼生期、初期 auricularia 幼生期、中期 auricularia 幼生期、後期 auricularia 幼生期、doliolaria 幼生期)における 8 種類のトリノアシ *Hox* 遺伝子 (*MrHox*) の発現を調べた。その結果、4 遺伝子 (*MrHox5*、*MrHox7*、*MrHox8*、*MrHox9/10*) について発現が認められ、他の 4 遺伝子については発現が認められなかった (Fig. 2)。*MrHox5* は pre-auricularia 幼生から発現が確認され、doliolaria 幼生に至るまで発生の進行に伴って発現量が増加した。*MrHox7* は 4 遺伝子の中では最も早い原腸胚期から強い発現が確認されたが、発生の進行に伴って発現量は減少した。*MrHox8* は孵化幼生以降で発現が確認され、特に pre-auricularia 幼生期と doliolaria 幼生期で強い発現が観察された。*MrHox9/10* は pre-auricularia 幼生期に強い発現が見られ、中期 auricularia 幼生期まで発現が確認された。

次に孵化幼生期、pre-auricularia 幼生期、中期 auricularia 幼生期の 3 発生時期における *MrHox* 遺伝子の発現を WMISH により調べた。これらの幼生期における胞胚腔内の構造は、孵化幼生期には原腸由来の原腸囊 (ar) が胞胚腔の大部分を占め、pre-auricularia 幼生期には原腸囊が前後軸に沿って 3 つの部分に分かれ、幼生の前方から後方に向かって軸水腔囊 (ah)、腸囊 (es)、予定後部体腔囊 (psc) となる。中期 auricularia 幼生期には、予定後部体腔囊が左右に分離して、一対の後部体腔囊 (左後部体腔囊=lsc、右後部体腔囊=rsc) となる (Fig.3)。WMISH の結果、*MrHox5*、*MrHox7*、*MrHox8*、*MrHox9/10* の 4 遺伝子についてのみ発現が認められた。この結果は RT-PCR による発現解析の結果を支持している。これらの 4 遺伝子は主に中胚葉性の後部体腔囊で発現していた。*MrHox5* は pre-auricularia 幼生期に予定後部体腔囊、中期 auricularia 幼生期に左右後部体腔囊、それぞれの最前部に限定した発現が確認された (Fig. 3A, B, C)。*MrHox7* は孵化幼生期に原腸囊の後部半球で、pre-auricularia 幼生期に予定後部体腔囊の前方 2/3 程度の領域で、また、中期 auricularia 幼生期に左右後部体腔囊の前方 2/3 程度の領域で発現していた (Fig. 3D, E, F)。*MrHox7* は他の 3 遺伝子と異なり、中

胚葉性の体腔以外に前部口側外胚葉での発現も認められた。*MrHox8* は孵化幼生期には *MrHox7* と同様に原腸囊の後部半球で発現し、pre-auricularia 幼生期には予定後部体腔囊の後方 2/3 程度の領域、中期 auricularia 幼生期には左右後部体腔囊の後方 2/3 程度の領域で発現していた (Fig. 3G, H, I)。*MrHox9/10* は pre-auricularia 幼生期の予定後部体腔囊、中期 auricularia 幼生期に左右後部体腔囊、それぞれの最後部での発現が確認された (Fig. 3J, K, L)。これら 4 種類の *Hox* 遺伝子の予定後部体腔囊、左右後部体腔囊での発現は *MrHox5*, *MrHox7*, *MrHox8*, *MrHox9/10* の順に幼生の前方から後方へ発現領域が並ぶパターンを示した。

考察

トリノアシで今回全長またはほぼ全長がクローニングされた *Hox* 遺伝子は 8 種類であった。他の棘皮動物や姉妹群である半索動物の *Hox* 遺伝子との比較から、祖先的棘皮動物には *Hox1*, *Hox2*, *Hox3*, *Hox4*, *Hox5*, *Hox6*, *Hox7*, *Hox8*, *Hox9/10*, *Hox11/13a*, *Hox11/13b*, *Hox11/13c* の 12 種類の *Hox* 遺伝子が存在していた可能性が示唆される (Fig. 1B)。

WMISH で観察されたトリノアシ幼生後部体腔囊での *MrHox5*, *MrHox7*, *MrHox8*, *MrHox9/10* の発現には、幼生前後軸に沿った spatial colinearity が観察された。このことは、有柄ウミユリ類の初期発生過程においても他の動物と同様、*Hox* 遺伝子が前後軸に沿った幼生の体制確立に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。また、トリノアシ *Hox* 遺伝子 *MrHox* とウニ *Hox* 遺伝子 *SpHox* の初期発生過程の後部体腔囊での発現パターンの相違点は主に 2 点にまとめられる。第一に、トリノアシでは *MrHox5* の発現は確認されるが、ウニでは *SpHox5* の発現は確認されていない。棘皮動物の系統においてトリノアシが属する有柄類はより祖先的であり、遊在類のウニは由来型であること、*MrHox5* が発現している領域は後に茎が形成される箇所に重なっていることを考え合わせると、*Hox5* の発現の削除が遊在類分岐過程で茎が削除されたことに関連している可能性が考えられる。第二に、トリノアシ幼生の *MrHox7*, *Hox8*, *Hox9/10* の一連の発現領域はウニ幼生の *SpHox7*, *Hox8*, *Hox9/10* の各発現領域と比較して、全て後方へ shift していた。このことは棘皮動物の遊在類の進化過程で体制の後方化が起こっていることを示している (Fig. 4)。

結論

1. 棘皮動物の中で祖先的な形質をより多く保存していると考えられる有柄ウミユリ類の一種トリノアシは少なくとも 8 種類の *Hox* 遺伝子 *MrHox* を持つ。
2. 8 種類の *MrHox* 遺伝子のうち、*MrHox5*, *MrHox7*, *MrHox8*, *MrHox9/10* の 4 遺伝子は幼生期において主に後部体腔囊での発現が確認された。また、その発現は *MrHox5*, *MrHox7*, *MrHox8*, *MrHox9/10* が順番に幼生前後軸に沿って並ぶパターンを示した。このことから、*Hox* 遺伝子がトリノアシ幼生前後軸確立に機能していることが支持される。
3. トリノアシ *MrHox* 遺伝子の発現パターンとウニ *SpHox* 遺伝子の発現パターンの比較により、遊在類進化過程で体制の後方化 (posteriorization) が起こったことと *Hox5* が茎形成に関与する遺伝子であることが示唆される。

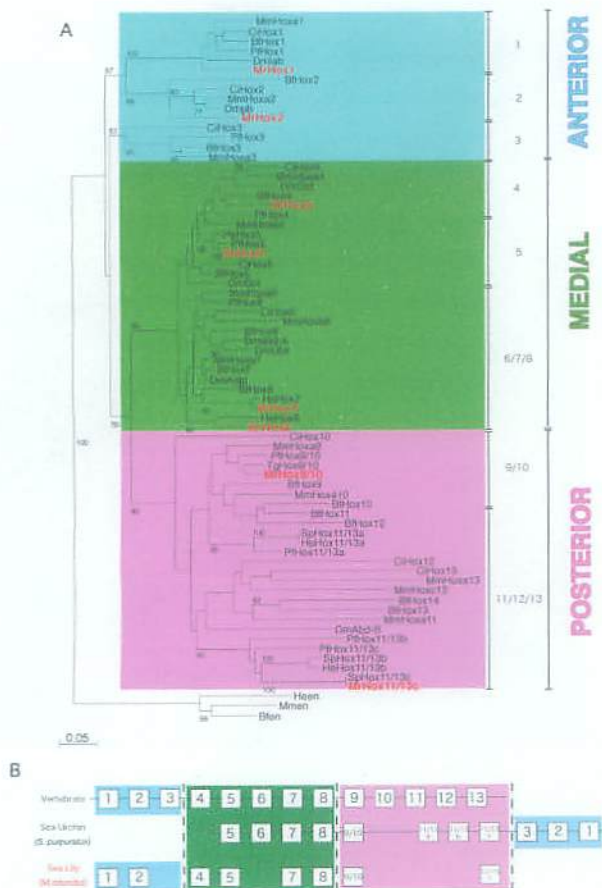


Fig. 1 Hox遺伝子のorthologous groupの推定
 A) ホメオドメイン60アミノ酸を用いた分子系統解析
 B) 新口動物のHox遺伝子の構成

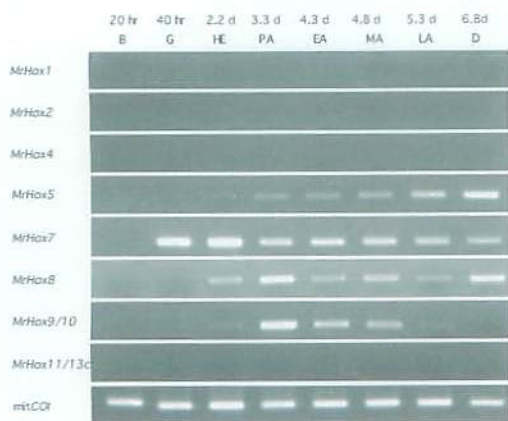


Fig. 2 初期発生過程におけるMrHox遺伝子の発現解析 (RT-PCR)
 MrHox5, MrHox7, MrHox8, MrHox9/10の4つのHox遺伝子の発現が確認された。
 lane1: 胎胚 (B), lane2: 原腸胚 (G), lane3: 孵化幼生 (HE),
 lane4: pre-auricularia幼生 (PA), lane5: 初期auricularia幼生 (EA),
 lane6: 中期auricularia幼生 (MA), lane7: 後期auricularia幼生 (LA),
 lane8: dolio-larvia幼生 (D)

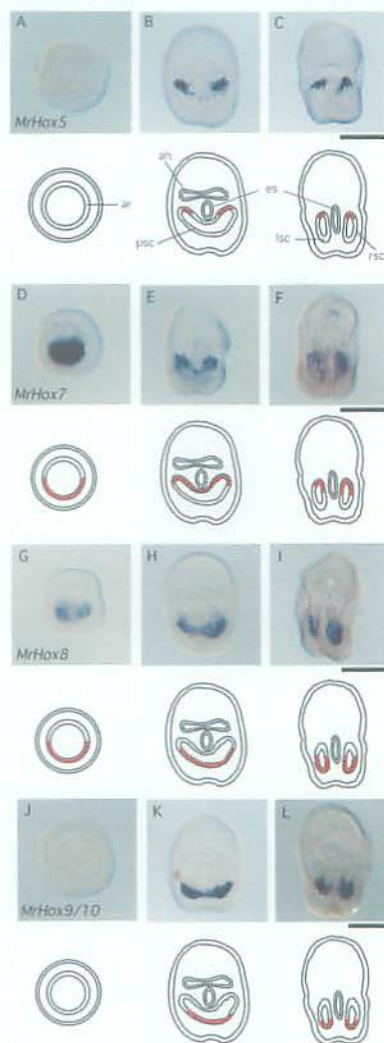


Fig. 3 初期発生過程におけるMrHox遺伝子の発現解析 (ISH)
 初期発生過程で発現が確認された4遺伝子の発現パターンをイラストとともに示す。
 A, B, C) MrHox5, D, E, F) MrHox7, G, H, I) MrHox8, J, K, L) MrHox9/10
 (A, D, G, J)は孵化幼生, B, E, H, K)はpre-auricularia幼生, C, F, I, L)は中期auricularia幼生
 MrHox5は左右後部体腔発前部, MrHox7は左右後部体腔発後部, MrHox8は左右後部体腔
 後部, MrHox9/10は左右後部体腔発後部, という後部体腔前後軸に一致する一連の発現
 を示した。ar: 原腸蓋, ah: 軸水腔蓋, psc: 予定後部体腔蓋, op: 腸蓋, lsc: 左後部体
 腔蓋, rsc: 右後部体腔蓋

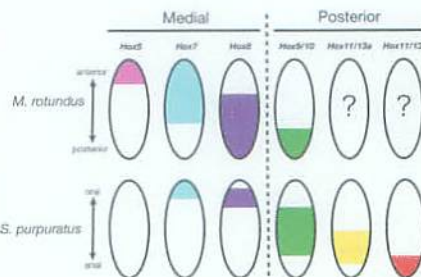


Fig. 4 トリノアシ幼生とウニ幼生の後部体腔におけるHox遺伝子の発現
 トリノアシ幼生の4つのHox遺伝子 (MrHox5, MrHox7, MrHox8, MrHox9/10) と
 ウニ幼生の6つのHox遺伝子 (SpHox5, SpHox7, SpHox8, SpHox9/10, SpHox11/13a,
 SpHox11/13b) について示す。
 ウニ幼生の後部体腔蓋はU字形だが、口側を前方として示した。