

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 脊椎骨形成の制御遺伝子ネットワークの系統発生的解析

2 研究者氏名: 和田 洋

3 研究の狙い:

発生生物学の大きな目標の一つは、三次元的な空間を占める生物の形態の設計図が、一次元的なゲノムの情報の中にどのように書き込まれているかを解読することにある。形態形成に必要な情報がゲノムの一次情報に書き込まれているということは、すなわち、時を経て形態が進化を遂げてきた背景では、ゲノムの一次情報が書き換えられてきたことを意味する。20世紀の発生生物学は、多様な動物の体制が驚くほどの共通の遺伝子セットで築き上げられていることを明らかにした。そこで、本研究では、その共通性を基盤として、どのようにして多様性が創出されるかについてアプローチした。多様性創出の原動力の一つが遺伝子の発現を制御するシスエレメントの多様性に由来していると考えられていたが、具体的にシスエレメントがどのような進化的な振る舞いをするかについては不明な点が多かった。そこで、脊椎動物を特徴づける脊椎骨の進化に焦点を絞り、そこにどのようなシスエレメントの進化が関わってきたかについて明らかにすることを目指してきた。具体的には、脊椎骨の由来する硬節の分化に深く関わる Pax1/9 の硬節での新たな発現の獲得をシスエレメントの進化として理解することを目指した。また、脊椎骨を形成するための転写制御因子と構造遺伝子の関係性がどのようにして進化してきたのかを明らかにするために、特に Sox9 による type II collagen の発現制御の成立過程をホヤやナメクジウオ、ヤツメウナギを対象に調べた。

4 研究成果:

Pax1/9 の硬節での発現の獲得とシスエレメントの進化に関しては、硬節での発現を獲得する前の段階をとどめていると考えられるホヤの鰓での発現に必要なシスエレメントを 30bp にまで絞り込んだが、trans の因子の同定までには至らなかった。また、硬節での発現を獲得した後のモデルとしてフグの Pax1, Pax9 の鰓と硬節での発現に関わるシスエレメントをメダカで調べるという戦略をとって解析し、Pax1, Pax9 の鰓における発現に必要な領域をそれぞれ絞り込むことができたが、これらのシスエレメントがホヤの鰓の発現に関わるシスエレメントと同じトランスの因子によって制御されているかどうかを判定するまでには至っていない。また、Pax9 の硬節での発現に関わるシスエレメントが上流-7.1kb から-5.4kb の間に存在し、この中には Shh のシグナル伝達経路の転写因子である Gli の結合できる配列が含まれていることまでつきとめ、この Gli の結合配列を欠失させたものの活性を検討している段階であるが、このシスエレメントによって硬節での新しい発現の獲得という脊椎骨進化の第一歩が踏み出されたと考えられる。

この研究を進めていく過程で、メダカの Pax1 と Pax9 が鰓で少し異なっていることが明らかになってきた。Pax1 は第2咽頭嚢から後方でほぼ一様な発現を示すのに対し、Pax9 は第2咽頭嚢で強い発現が見られ、第3咽頭嚢以後では弱い発現しか見られないことがわかった。これに対応するように、Pax1 の鰓での発現に関わるシスエレメントはほぼ均一な発現を活性化するが、Pax9 のシスエレメントのうち 4.6kb 上流まで含む領域では上記の発現パターンに対応した第2咽頭嚢で強く、その後方では弱い発現が見られ、さらに 3.0kb 上流までにすると第2咽頭嚢でのみ活性が見られることが明らかになった。したがって、Pax9 の第2咽頭嚢での強い発現は 3.0kb 上流までのなかに新しいシスエレメントが生じることで進化したと考えることができる。この発現様式の違いが Pax1, Pax9 の機能的な分化に結びついているかを調べるために、それぞれの遺伝子のモルフォリノオリゴで機能阻害をしたところ、Pax9 では第2咽頭嚢に由来する角舌骨の形成不全が見られたのに対し、Pax1 では第3咽頭嚢より後方から生じる角鰓骨の形成不全が見られた。ただし、機能阻害実験で咽頭嚢がホメオティックな変異を示すわけではなく、Hoxa2 の第2咽頭嚢での発現も影響を受けなかったので、最近提唱されている咽頭嚢の個性化における内胚葉の役割の一端が Pax1, Pax9 の発現によって担われていると

は考えにくい。マウスやニワトリではこのような第2咽頭嚢での Pax9 の強い発現は報告されていないため、むしろ真骨魚類で派生した発現様式と考えている。真骨魚類は第2咽頭嚢から特有の構造として鰓蓋が形成される。現在 Pax9 の機能阻害をした場合の鰓蓋の形成への影響をみて、Pax9 の第2咽頭嚢での新たな発現の進化が鰓蓋の進化に結びついた可能性を検討している。

もう一つの研究テーマとして、軟骨の分化を制御する転写因子 Sox9 と構造遺伝子のコラーゲンやアグレカンの関係がどのようにしてくみ上げられてきたかについて調べた。まず、構造遺伝子のコラーゲンが軟骨の基質として進化するまでの分子進化過程を調べていく中で、繊維性コラーゲンは脊索動物の祖先で3つの遺伝子が存在しており、それらは脊索の構造タンパク質としての機能を持っていた。そしてそれらが脊椎動物の祖先で起こったゲノムの重複に伴ってレパートリーを11にまで増やし、その後その中から4つの遺伝子が独立に軟骨の基質としての機能を獲得したことがわかった。この過程には4つの遺伝子が独立に軟骨での発現に関わるシスエレメントを獲得し、そのうちの少なくとも二つは Sox9 によって直接制御を受けるシスエレメントを獲得したことを示している。したがって、軟骨の基質の進化は急速なシスエレメントの進化に裏付けられていることを示すと同時に、シスエレメントの進化という一般的な問題にも重要な知見をもたらした。

もう一つの基質であるアグレカンが軟骨の基質として進化する過程にも、複雑な分子進化過程が見られた。アグレカンは、コンドロイチン硫酸によって修飾されるプロテオグリカンであり、グリコサミノグリカンの一つヒアルロン酸とリンクドメインというモジュールを介して結合することで、軟骨特有の物性をもたらしていることが知られている。軟骨を持たないホヤでは決定されたゲノム配列からヒアルロン酸合成酵素が見つからず、ヒアルロン酸はないことがわかった。興味深いことにヒアルロン酸合成酵素は多細胞動物では脊椎動物からのみ見つかり、脊椎動物のヒアルロン酸合成酵素はゾウリムシなどのものと高い相同性をしめすことがわかった。遺伝子の水平感染によってヒアルロン酸が進化した可能性が示唆された。ところが一方で、ヒアルロン酸を持たないはずのホヤからもリンクドメインと配列の相同性が見られる遺伝子を見つけることができた。この遺伝子は同じくリンクモジュールを持つ脊椎動物の CD44 と構造的に似ており、血球で発現することがわかった。CD44 もリンパ球で発現して、炎症部位への動員やリンパ節へのホーミングに関わっているため、ホヤのリンク遺伝子も同様に血球の移動に関わっていると考えられる。この遺伝子がヒアルロン酸合成酵素の進化に伴って、ヒアルロン酸に対する結合特異性を獲得し、さらに、エクソンシャッフリングによってコンドロイチン硫酸によって修飾される領域やレクチンドメインと一つの遺伝子を形成するようになり、軟骨の基質として機能するようになったと考えられる。すなわち、軟骨の進化に、シスエレメントの進化のほかに遺伝子の水平感染やエクソンシャッフリングによる新たな遺伝子の創生という複雑な分子進化が関わっていたことを明らかにできた。

さらに、このようにして生じた軟骨の基質となる遺伝子が Sox9 の制御を受けるようになる過程にどのような分子進化過程が必要であったかを調べた。Sox9 は軟骨の分化に関わっていると同時に、鰓における軟骨の起源となる神経堤細胞の分化にも深く関わっていることが知られている。したがって、Sox9 が軟骨の基質であるコラーゲンやアグレカンの発現を制御するには、細胞の環境に応じてターゲットの遺伝子を制御する必要が生じる。すなわち神経堤の分化に関わるターゲットと軟骨の分化に関わるターゲットを区別する必要がある。この制御機構の進化には細胞の環境に応じて結合するコファクターの存在が示唆され、実際に Sox9 が環境に応じていくつかのコファクターと結合していることがわかっている。そこで、このようなコファクターと結合するために Sox9 自身が新たな機能ドメインを獲得した可能性について検討した。まずホヤの Sox9 を脊椎動物に導入したときに、神経堤細胞を誘導することができるかどうかを調べたところ、ニワトリ胚の神経板にホヤ Sox9 を過剰発現させると過剰な神経堤細胞が誘導された。同様な活性をニワトリの Sox9 も有していることから、神経堤細胞の分化に関しては機能ドメインの進化は必要なかったことがわかった。現在軟骨細胞の分化に関わる機能をホヤの Sox9 が代替できるかについて、Col2a1 の転写活性化をできるかどうか調べている。

## 5 自己評価:

当初の計画では、脊椎動物とホヤの間でシスエレメントを相互に入れ替えたりする実験(ホヤのシス

エレメントをメダカに導入するなど)を通してシスエレメントの進化の概略をつかみ、その後より詳細に解析していくことでシスエレメントの進化と脊椎骨の進化を結びつけていく研究を思い描いていた。実際に、それ以前にナメクジウオとマウスでこのような方法から Hox 遺伝子のシスエレメントの進化について成果を上げることができていた。ところが、Pax1/9 の解析ではそのような手法が通用せず、さらにコラーゲンの進化に関する研究や他の研究グループからの報告などから、シスエレメントがこれまで考えられてきた以上に急速に進化しようということがわかってきたことで、計画の大幅な見直しを迫られた。その段階で、計画を立て直すことができたのは、さきがけ研究のサポートのおかげであったが、成果の公開が遅れてしまったことは否めない。その後はむしろシスエレメントの進化に関しては、真骨魚類でむしろ最近起こった Pax9 の第2咽頭嚢での新しい発現と鰓蓋の進化に関して、成果が得られてきており、Sox9 に関しては遺伝子のコーディング領域の進化に関して成果が得られつつある。Sox9 の系からは、遺伝子の多面的な発現の進化と形態の進化の関係、すなわち転写因子が進化の過程で新しい発現を獲得するときに、どのようにして新しいターゲット遺伝子の制御の特異性を進化させるのか、またそれまでに制御していたターゲットをどの程度新しい発現部位で活性化させるのかという問題も浮かび上がってきており、進化発生学の新しい研究の展開についてもアイデアが熟成しつつある。

#### 6 研究総括の見解:

脊椎動物の進化生物学的起源を遺伝子レベルで解明しようとした意欲的な研究である。プロジェクトそのものは独創的であり評価できるが、当初の計画を遂行したところ、シスエレメントの進化速度が予想以上に大きいことが明らかとなり、計画の変更を強いられたことが研究の進捗を抑えた。しかし、Pax9 および Sox9 について有望な成果が得られているので、転写因子が進化の過程で如何にして新しいターゲット遺伝子を獲得するかという重要課題に関しては、今後の発展として大いに期待する。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1 . Molecular evolution of fibrillar collagen in chordates, with implications for the evolution of vertebrate skeletons and chordate phylogeny. Hiroshi Wada, Makiko Okuyama, Nori Satoh, Shicui Zhang. Submitted.

##### 総説など

- 1 .ゲノムの多様性と形態の多様性 和田 洋「ポストゲノムの分子生物学」村上康文編 化学同人 pp. 65-78. (2003)
- 2 .エンハンサーの進化 和田 洋「ゲノムからみた生物の多様性と進化」五條堀孝編 シュプリンガーフェアラーク東京 pp. 50-57. (2003)
- 3 .神経堤細胞の進化と遺伝子の進化 和田 洋「発生システムのダイナミクス」上野直人編 共立出版 印刷中
- 4 .脊椎動物の骨の進化と遺伝子進化 和田 洋・三瀬武史・小林麻理・米田雅彦「海洋生命系のダイナミクス」塚本勝巳編 東海大学出版会 印刷中

##### 招待講演

- 1 .脊椎動物の進化と遺伝子重複・シスエレメントの進化 分子進化と形態進化を結ぶ東京医科歯科大学 第24回生命情報学セミナー (2003)
- 2 . Molecular evolution for the vertebrate specific characters. Mini-symposium on Evolution and Development, University of Oxford, Dept. of Zoology. (2003)
- 3 . Evolutionary analysis of Hox1 regulation in the neural tube and neural crest. International

Urochordate Meeting 2003. Marseille (2003)

4 . 分子系統学と比較発生学から脊椎動物の起源を探る 筑波大学生物学系セミナー (2004)

5 . Molecular evolutionary background for the innovation of the neural crest. Banbury Center Meeting on “Origin and evolution of the nervous system” Cold Spring Harbor Laboratory. (2004).

6 . ホヤ、ナメクジウオとヤツメウナギから軟骨の起源を探る Bone and Joint Research Club. (2004)

7 . 脊椎動物の軟骨の進化と遺伝子進化 「境界動物の生物学」東京大学海洋学研究所 (2004)