

脊椎動物胚からの網羅的遺伝子検索と形態的進化発生学

●倉谷 滋 ◆村上安則

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター

＜研究の目的と進め方＞

脊椎動物の進化において際だつのは、翼や鰭など、大規模な多細胞体制を基盤とした大がかりな構造の変形である。カバのような偶蹄類がクジラになるのに、高々数千万年しか必要ではなかった。ならば、進化は偶然の徐徐の積み重ねではなく、ゲノムや発生機構の中にすでに、外的要因と相互作用しうる積極的な可塑性があり、その内容を我々はまだ全く知り得ていないと認めざるを得ない。モデル動物を通じて得られた発生機構の理解と知見は膨大であるが、それは一定不変のものではない。そのレベルを脱却できる可能性は、モデル動物を離れることをおいてほかにはない。上に述べた過激な形態進化や変形のタイプには、いくつかのものが区別される。ひとつは基本的構築プランを変えずに、比率やサイズだけを変化させているもの。コウモリの翼は我々の腕と基本的には同じ構成要素からなり、そこに相同性を確認することができる。相同性の一部が失われ、要素の増減が認められる。しかし、そこにはなお高次レベルでの基本的形態プランの一致が認められる。このようなレベルの、相同性が破壊された可能性がある例として、カメの甲羅や、顎口類の顎などがあり、ここでは遺伝子発現や発生機構レベルの大規模な変化が関わっているに違いない。ただし、それは必ずしも遺伝子発現機構が大きく変わったのではなく、ほんのわずかな変化が、それに続く発生カスケードの方向を大きく逸脱させただけなのかもしれない。いずれにせよ、激しい進化の内容を探るための鍵は、発生に関わる遺伝子の発現変化に見つけるのが近道のようなのである。通常の羊膜類の体幹とカメの甲、あるいはヤツメウナギと顎口類の口器形態には相同の一致が認められない。こういったタイプの構造には、発生プラン、発生メカニズムの抜本的変革として進化を理解できる可能性が存在するわけである。

本研究ではもっぱら、ヤツメウナギの口器、カメの甲を材料として取り上げ、それらの形態発生のどこがどのように変化してきたのか、網羅的遺伝子検索の手法を応用することによって究明し、最終的にはゲノムの中に「選択された刻印」を発見することを目指す。従来、実験動物以外の野生動物において、とりわけ形態進化に言及する分子発生学的研究は、マウス、その他でよく分かっているマスターコントロール遺伝子の相同物を問題とされる動物胚から単離し、その発現パターンを観察し、相同的に保存されている機構をさがしだし、脊椎動物共通の発生パターンや、共通した胚形態を強調するのが常であった。しかしながら、このような方針から発見されるのは、常に実験動物において樹立したアイデアの変奏でしかなく、しかも実験動物の特異性に完璧にバイアスをかけられたものでしかあり得ない。必然的に、非実験動物たる、特定の野生動物だけで独自に進化した分子機構のようなものは、最後まで分からない。こういった意味で、相同遺伝子の単離に重きをおく進化発生学的手法を打開する方法が、是非とも要求されることになる。むしろ、それはゲノム全体を直接、間接に射程においた、

分子レベルでの理解を目指す性格のものでなければならない。上のような視点から、とりわけ脊椎動物の進化研究において、ヤツメウナギやスッポンは、ゲノム研究の方法論を適用して解明すべき、最も興味深い動物候補の一つである。目標は、実験動物の系からは決してもたらされることのない、分子発生機構の視点に基づく進化的アイデアを提示することである。本研究は、ヤツメウナギやカメの体制の独自性を問題として捉え、相同遺伝子の単離では見つけることのできなかった糸口をつかむことを目的とする。

＜研究開始時の研究計画＞

14年度

カワヤツメのステージ24～26胚より得られたcDNAライブラリーをランダムにシークエンスし（10000内外のクローン数を目標）、cDNAチップの礎とする（倉谷・村上共同）。この段階で、いくつかの、すでに知られているターニング遺伝子断片が採集できるはずである。こういったものの多くは、後の実験、観察におけるマーカー遺伝子として用いることができる。しかし基本的、本来的には、このESTが発現プロファイル検出のためのプローブとなるべきものである。カワヤツメ咽頭胚の口周辺部からいくつかの異なった領域を選び出し、微量の組織を切りだし、微小組織PCR（polymerase chain reaction）を遂行し（倉谷担当）、それぞれのライブラリーを作成する（村上担当）。まず、これら両者に発現する遺伝子の発現プロファイルをリストアップすることによって、ヤツメウナギの口周辺各部に特異的に発現している遺伝子、あるいはすべての領域に共通して発現する遺伝子を同定、比較することができる。あるいは、このプロファイルの比較を上で作成したチップ上で行うこともできる。

さらに、直接的にヤツメウナギ口周辺部に発現、機能する遺伝子の特異的な検索のために、レチノイン酸で処理した胚（倉谷が準備）を用いることも計画中。すでに報告したように、神経胚期にレチノイン酸にて処理したヤツメウナギの胚は、特異的に頭部顔面領域や鰓弓部を欠く。従って、無処理の胚とレチノイン酸処理胚における発現プロファイルを比較する（村上担当）ことによって、頭部鰓弓領域に特異的に発現する遺伝子を効率よくリストアップすることができるはずである。この年度は、品質の高いcDNAを確実に採取することが目標である。

15年度

14年度において得られた標品を元に、各実験における遺伝子発現プロファイルの比較を、上で作成したチップ上で行う（倉谷・村上共同）。こうして得られたクローンをを用い、in situ ハイブリディゼーションによるスクリーニングを行う（倉谷・村上共同）。

同様の実験を、顎を持つ動物（ニワトリ）においても行い、プロファイルを比較することもできる。こうして得られたデータは、脊椎動物の第1の鰓をどのような形に変化させるか、すなわち、顎骨弓間葉をどのように分

割し、そして顎を作るか作らないかという、脊椎動物の最初の進化的形態発生における、最も重要な遺伝子リクルート（遺伝子の使い回し）の背景を教えてくれるはずである。

スッポンについては、甲羅の発生に関わると思われる甲稜での遺伝子発現プロファイル、甲羅部と体側体壁部での遺伝子発現プロファイルの比較という手段で行う（組織の切り出し、処理については倉谷；続くライブラリー作成については村上が担当）。

〈研究期間の成果〉

ヤツメウナギの頭部顔面領域、ならびに脳の進化的発生についての研究では、以前より継続中であった、遺伝子発現レベルでの比較研究、ならびに実験発生学的研究が成果を結んだ他は、特記すべきことなし。

スッポンの研究についても、期間内での成果はなし。後にこのときの結果が礎となり、C Rに発現する遺伝子とその発現を得、2005年に論文を発表することになる。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ヤツメウナギを用いた研究では、このテーマは抜本的なデータを与えるものでは必ずしもなかったが、後にカメの甲の発生においてこのときの研究作業は、カメ特異的な遺伝子発現に関わる有用な所見をもたらしてくれた。これは、非モデル動物を用いて新しい遺伝子発現レベルでの現象を解明する、画期的な仕事になり、カメの進化研究に先鞭を付けることができたと思う。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

網羅的遺伝子探索に基づく研究は、たとえそれが原理的には優れたものであっても、とりわけ形態変化について具体的機構の変化を予想できる場合には適切ではなく、また、領域特異的なマーカー遺伝子を得るのにも必ずしもよい方法ではなかった。とりわけ、それは適切な量のサンプルを得ることに伴う困難さによるものである。ヤツメウナギのように、限られた期間のみ入手でき、しかも1個体のサイズが極端に小さな胚を扱う際は、必ずつきまとう問題である。

〈今後の課題〉

研究戦略の変更に伴い、現在、本研究課題の範疇内で該当する内容なし。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Murakami, Y., Ogasawara, M., Satoh, N., Sugahara, F., Myojin, M., Hirano, S., and Kuratani, S. (2002). Compartments in the lamprey embryonic brain as revealed by regulatory gene expression and the distribution of reticulospinal neurons. *Brain Res. Bull.* 57, 271-275.
2. Shigetani, Y., Sugahara, F., Kawakami, Y., Murakami, Y., Hirano, S., and Kuratani, S. (2002). Heterotopic shift of epithelial-mesenchymal interactions for vertebrate jaw evolution. *Science* 296, 1316-1319.
3. Kuratani, S., Kuraku, S., and Murakami, Y. (2002). Lamprey as an Evo-Devo model: lessons from comparative embryology and molecular phylogenetics. *Genesis* 34, 175-195.