

2. 脊索動物と節足動物の共通祖先を理解する

小田広樹（主任研究員）、秋山-小田康子（派遣研究員）
岩崎佐和（奨励研究員）、野田彰子（研究補助員）

2-1 オオヒメグモの胚発生を支配する分子メカニズムの解明

はじめに

多細胞動物は形態や発生様式に基づいて「門」と呼ばれる高次分類群（例えば、ヒトを含む脊索動物門や昆虫を含む節足動物門）に区分されているが、それぞれの分類群を特徴付ける形態が進化してきた過程やその進化の仕組みを理解することは簡単ではない。その大きな要因のひとつは、分類群を特徴づける、機能性の高い進化的に安定な形態であっても、その形態を形作るための発生過程やゲノム情報（遺伝子発現制御機構や遺伝子ネットワークなどを含む）は進化の過程で多様に変化するにある。このような現象は「システムドリフト」と呼ばれ、様々な事例が報告されている¹⁾。

本研究においては、ヒトなどの脊椎動物を含む脊索動物門と昆虫やクモを含む節足動物門に共通して見られる体軸そのもの（前後軸と背腹軸）とその前後軸に沿った反復構造に注目している。例えば、その反復パターンを形作る遺伝的仕組みに両者が同一起源であることを示す確かな証拠は見出されていない。しかし、だからと言ってその類似の形態的特徴が異なる起源から別々に進化したと断言することはできない。なぜならば、共通祖先において存在した反復パターンを形成する仕組みが、発生プログラムのアウトプットとなる反復パターンを保持したまま、現存種のゲノムの比較では簡単に追跡できないほど大きな変化を経て多様化したかもしれないからである。このような可能性を考えた場合、形態で分類されるそれぞれの動物門での遺伝的仕組みの多様性の程度を大局的に把握することが動物門間の進化的関係を理解する上で重要である。さらに、形態進化とゲノム進化の基本原則を理解するという観点から言えば、特定の形態やパターンを発生プログラムのアウトプットとして出し続けながらそのプログラムがどのように進化し、多様化するかを、システム生物学や数理生物学を取り入れて解析することも重要となる。

私たちはこれまで独自のモデル生物種として、節足動物門 鋏角類 オオヒメグモ (*Parasteatoda tepidariorum*) を用いて、節足動物の基本的体制（ボディープラン）に関わる発生メカニズムの多様性を明らかにしてきた。オオヒメグモ胚では、ヘッジホッグシグナルとディーピーピーシグナルを介した細胞間のコミュニケーションが直交した2つのからだの軸（前後軸と背腹軸）の形成に主要な役割を果たす^{2),3)}。ヘッジホッグシグナルの初期胚での役割の重要性は、節足動物の進化において発生プログラムが大きな変化を受けたことを象徴的に示す。オオヒメグモ初期胚で分泌タンパク質のヘッジホッグが果たす役割と同様の役割をショウジョウバエでは転写因子のビコイドが果たす⁴⁾。さらに、ヘッジホッグやビコイドの支配下で起こる縞パターン形成（体節形成）にもオオヒメグモとショウジョウバエで違いがある。つまり、発生プログラムのアウトプットとして縞パターンは両方で保存されているが、その縞パターンの形成過程は大きく異なる⁵⁾。クモを起点とした比較研究は、ボディープランの保守的進化の中で発生過程や発生メカニズムがどのように多様化したのか、また、どうして多様化してきたのかを理解することに貢献しうる。これは、遺伝的発生システムの進化能の問題であり、

理論研究とも連携すべき研究課題である⁶⁾。

私たちは昨年度までに、ゲノム情報を活用した二種類の方法論によってオオヒメグモ初期胚で働くパターン形成遺伝子の探索を行い、本年度、同定した遺伝子について発現解析及び機能解析を進めた。いずれの方法論も他のモデル生物からの知見に頼らず、オオヒメグモが引き継ぐ仕組みの中の、祖先的な側面と派生的な側面の両方をバイアスなく発見しうる方法論である。本年度の解析で、オオヒメグモ胚の非常に初期のパターン形成に働く新たな遺伝子が同定された。また遺伝子解析とは別に、これまでに蓄積したタイムラプス画像データに対する定量解析によって、縞パターン形成における細胞運動と遺伝子発現の関係を特徴付け、理論研究へと結びつけるための基礎的データを取得した。以下に、本年度の研究活動の詳細を報告する。

結果と考察

(1) 節足動物の配列データの公開と独自検索サイトの作成

2012年度から2014年度にかけてBRHの次世代シーケンサーで取得した節足動物3種、オオヒメグモ (*Parasteatoda tepidariorum*)、フナムシ (*Ligia exotica*)、ヤマトヌマエビ (*Caridina multidentata*) のゲノム及びトランスクリプトのリードデータを、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録し、公開した。これらのデータについて記載した論文は現在投稿中である。

次世代シーケンスで取得した大量の配列データを国内外の研究者が有効に活用できるようにするために、それらに対してBLAST検索ができるようにしたサイトを立ち上げ、公開した(図1)。また、公共データベースの私たちのデータに手軽にアクセスできるようにリンクを貼った。論文が受理され、公開されれば、多くの利用が期待される。

(2) クモ初期胚のパターン形成に 関与するヘッジホッグシグナル支配 下遺伝子のゲノムワイドな探索

動物の発生において、受精卵中に生じた少数種類の分子の非対称性は前後・背腹の体軸に沿った領域特異的なパターンや体軸ごとの繰り返しパターンへと発展する。私たちはこれまでの研究から、オオヒメグモ初期胚ではヘッジホッグシグナルが胚全体の極性形成を支配し、直交する2つの体軸の形成と前後軸に沿ったパターンの形成を制御することを明らかにした。ヘッジホッグシグナルが制御する遺伝子を網羅的に探索することで、胚のパターンが複雑化する機構を明らかにできると考え、parental RNA interference (pRNAi)とMiSeqを利用したRNA sequencing (RNAseq)、ゲノムへのマッピングを組み合わせた解析を進めている。昨年度までに、ヘッジホッグ遺伝子、ヘッジ

図1. 節足動物の配列情報の検索ページ

BRH Data Resources サイトのトップページ (<http://www.brh2.jp/>) より「BLAST against arthropod genome/RNA databases」を選択。

ホッグシグナルの負の制御因子をコードするパッチト遺伝子、実験のコントロールとしてクラゲの蛍光タンパク質をコードする *gfp* 遺伝子に対する解析を行い、ヘッジホッグとパッチトのどちらの pRNAi でも発現が変動する約 100 の候補遺伝子を同定し、そのうちの約半数の遺伝子が将来の前後パターンの形成が起こる胚盤において領域特異的に発現することを見出した。

本年度はまず、これらの遺伝子の発現の詳細な解析を行った。多くの遺伝子が胚盤上で円形の発現パターンを示したが、蛍光 in situ ハイブリダイゼーションにより複数の遺伝子発現を同時に可視化すると、発現領域が重なり合いながらも少しずつ異なることが明らかとなった。発現の円の半径の大きさと RNAseq で明らかとなった pRNAi 胚における発現量変化に相関が見られることも分かった。pRNAi 胚における発現解析から、胚盤上の発現がヘッジホッグシグナルに依存したものであることが確認できた。多数の遺伝子の発現の重なり合いを考えると、様々な状態の細胞が胚盤の半径に沿って存在し、そのような細胞パターンの形成をヘッジホッグシグナルが制御していると言える。

本年度はさらに、同定された遺伝子の 1 つである *msh* 遺伝子に注目し解析を行った。*msh* は胚盤の中心領域で発現し、パッチト pRNAi で最も強く発現抑制がかかる遺伝子である。*msh* pRNAi 胚の胚盤では同心円状のパターンはかなり正常に形成されるが、*ci* やデルタなどの遺伝子の胚盤中心領域での発現が抑制されず、この領域で続いて起

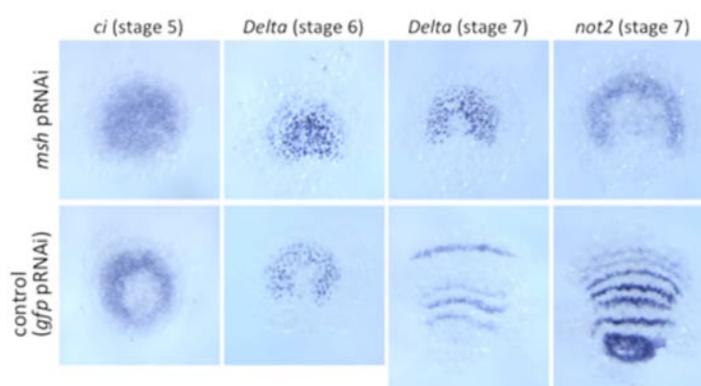


図 2. *msh* pRNAi 胚の表現型.

こる後部体節形成につながる遺伝子の発現振動が開始しないことが分かった(図 2)。pRNAi 胚では胚盤から胚帯への変換が起こらず、形態的にも大きな異常が生じた。*msh* pRNAi と RNAseq による解析を行ったところ、発現が振動する遺伝子や後部体節で発現する遺伝子が同定された。*msh* は胚盤の同心円状のパターンを体節ごとの繰り返しパターンへと発展させることに関わっていると考えられる。今後はオオヒメグモの初期胚のパターン形成を、分子ネットワークと細胞の動きの両方向から解析したいと考えている。

(3) 胚盤形成期胚におけるパターン形成遺伝子のゲノムワイドなスクリーニング

オオヒメグモ初期胚は、発生のごく初期には明確な体軸パターンは確認されておらず、16 核期の細胞化以降に生じる細胞間の相互作用によりパターン形成が行なわれると考えられる。しかし、胚に明確な第一軸が現れる胚盤形成期以前にどのような遺伝子発現がパターンを形成しているのかは未だ知られていない。私たちは前年度、初期胚から微量の細胞を採取し RNAseq を行うことで、初期胚で領域特異的に発現する遺伝子をゲノムワイドに検出できる手法を確立した。本年度はその手法を用いて、初期胚ステージ 3 の胚盤形成期において、将来の胚盤中心部、周縁部とその中間部分の 3 種類の細胞を採取し mRNA を抽出した。ライブラリを作製し、MiSeq シーケンシングにより 1000~2000 万リード程度の塩基配列を取得した。配列は QC チェックを行い、BLAT アルゴリズムを用いてゲノムにマッピングし、HTseq count プログラムにより発現

カウントデータを得た。edgeR/iDEGES プログラムを用いて中心部、中間部、周縁部で発現に差のある遺伝子を検出し、リスト化した。続いて、それらリスト上位の遺伝子について、pRNAi 技術を用いて、表現型のスクリーニングを行なった。

(4) オオヒメグモの胚盤の細胞モデルと細胞運命地図の構築

オオヒメグモの胚発生のステージ5の始まりは胚形態の放射相称性が破られ、左右相称形への転換が始まるタイミングである。この時期、球形の胚は上半球側が上皮細胞で構成された胚盤で覆われており、その中心に相当する極領域から内側へ陥入した細胞塊（クムルス間充織細胞、CM細胞）が表層上皮の基底面に沿って一方向に動き始める。この細胞の動きが放射相称性を破るイベントとなる。そのため、ステージ5の始まりは体軸形成過程のひとつの基準となるべき発生ポイントと言える。そこで私たちは、この発生ポイントの胚盤の細胞数とサイズを計測し、それを元に胚盤の細胞モデルを構築して、そこに細胞運命をマップすることを考えた。計測の結果、胚盤を構成する細胞の数は 1412 ± 96 個で、胚盤の半径は $273.9 \pm 11.4 \mu\text{m}$ であった (N=4)。さらに、ステージ5の始まり時点での胚全体の外形の半径が平均 $538.0 \pm 15.7 \mu\text{m}$ (N=6) であったことから、この半径の球面に、同じサイズの細胞が均等分布で密集した状態を仮定すると、胚盤表面での各細胞の占有面積が約 $153 \mu\text{m}^2$ で、細胞の列と列の間の距離が約 $11.5 \mu\text{m}$ になると概算された。この概算に基づくと、胚盤の半径は約24列の細胞から構成されていることになる。

2014年度の報告書に記した細胞標識実験のデータを再調査し、細胞運命を今回の胚盤の細胞モデルに当てはめたところ、胚盤の縁から1-2列分の細胞が胚内部に入り込み中胚葉または内胚葉の運命をとること、それら以外の胚盤の縁から5-6列目までの細胞が表層外胚葉の頭部領域になること、胚盤の中心から（閉じた原口の位置から）約10-11列の細胞が表層外胚葉の後体部領域か、中胚葉になること、中間の7-8列の細胞が表層外胚葉の胸部領域になることが推定された。

これらのデータは、縞パターン形成が起こる細胞場の位置と広さを具体的に示すもので、昨年度の報告書に示した「反復性を示す縞パターン形成ダイナミクスの定量解析」と合わせて、予定頭部領域と予定後体部領域にダイナミックな遺伝子発現波が発生していることを示唆した。

(5) 尾葉を形作る細胞の動きの解析

2009年度に取得したNLS-tdTomato標識胚のタイムラプス観察画像データを解析し、胚盤中心部領域から尾葉が形成される際の細胞の振る舞いを調べた。追跡可能な細胞系統を6系統選んで、細胞分裂のタイミングと各細胞の運動ベクトルの経時変化を調べた。その結果、それ

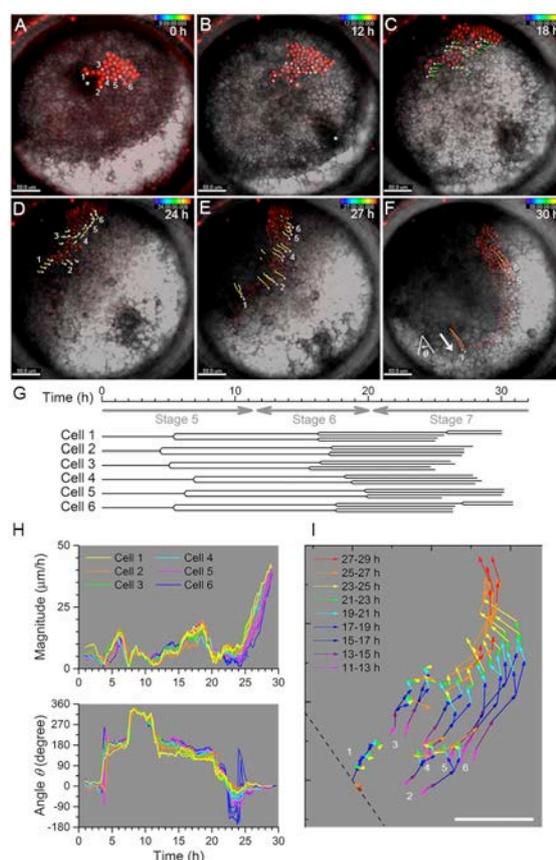


図4. 尾葉を形作る細胞の動きの解析

ぞれの細胞はステージ5で1回分裂後、10時間程度のサイクルで分裂しており、尾葉形成に対する細胞分裂の貢献は限定的であることが示唆された。一方、細胞の動きは、ステージ6の胚外領域の拡大に伴った動きに引き続いて、胚盤の中心からの距離に応じて異なる向きの動きが表れ、尾葉特有のカーブした組織形状が形作られることが分かった。この際、組織全体の後方へ向けた回転運動が卵内で発生することと、胚外領域の拡大が、形成されつつある胚帯の両サイドを回り込むように前方に進行することのために、胚帯が後方へ急速に伸長しているように見えるが、元の胚盤の中心近傍に由来する細胞の多くは伸長する胚帯の後端部に継続して留まっていることに注意する必要がある。このことは、対応する時期の胚帯の後端部で観察されるヘッジホッグの発現パターンのダイナミックな変化が個々の細胞の発現振動によるものであることを支持する根拠となる。

(6) 胸部領域の縞パターン形成と組織の伸長を駆動する細胞の動きの解析

縞パターンの形成は、細胞分裂と細胞運動が関わる前後軸方向への組織の伸長を伴う。予定胸部領域では、ステージ6の始まりから約8時間後には4つの体節に対応した *Pt-Not2* 遺伝子の反復性の発現が確立している。この発現パターンの形成に直接貢献する細胞が胚盤上においてどのような位置関係を取っているのか、また、その形成過程において、それらの細胞がどのような挙動を示しているのかを調べるために、ヒストン-tdEosFPで標識した細胞クローン内の細胞をステージ5のはじめから23時間にわたってタイムラプス観察した後に、*Pt-Not2* 転写産物に対する蛍光染色を行うことによって、追跡した個々の細胞と形成された *Pt-Not2* ストライプとを関連づけた。その結果、将来隣の離れた *Pt-Not2* ストライプになる細胞が、ステージ5の胚盤の互いに接する細胞から由来しているケースがあることが分かった。このことは、少なくともステージ5の初期の胚盤には独立したストライプが形成されていないことを意味する。特に、L2とL3の *Pt-not2* ストライプになる細胞は、ステージ6に入った後もしばらく接触し続けていたが、その後の細胞分裂と細胞の割り込み運動を経て分離した。これまでにステージ6の胚のいくつかのサンプルで、発現レベルが低く、L2とL3のピークがはっきりとしていない状態の *Pt-not2* の発現が観察されていたことを考えると、前後に組織を伸長させる細胞の動きとともに、L2とL3に対応して *Pt-not2* の鋭い発現ピークが形成されることが推測された。今回観察した、予定胸部と予定後体部を含む領域においては、細胞分裂の間隔が10時間程度でほとんどばらつきがなかったこと以外に、細胞分裂のタイミングや細胞分裂の向きにはっきりとした規則性は見つからなかった。そのため、前後軸に沿った組織の伸長には主に内外方向の細胞の割り込み運動が積極的な貢献をしていると考えられた。

これらの解析データは、細胞間の位置関係の動的制御とパターン形成の展開が密接に関係している可能性を示唆しており、胚の形状指標と縞パターンの発展を関連づけた解析結果とも矛盾しない。細胞の動的振る舞いと遺伝子発現制御がどのような仕組みで協調するのか、今後の研究において取り組むべき課題である。

謝辞

バーラー医科大学のヒトゲノムシーケンシングセンター (BCM-HGSC) とオオヒメグモゲノムコンソーシアムの成果で、現段階で未発表のオオヒメグモのゲノムアセンブリ及びトランスクリプトモデルを解析に利用した。

おわりに

本年度、第一軸の極性が形態的に表れる時期の初期胚で領域特異的に発現する遺伝子としてゲノムワイドに同定した遺伝子群の一部に対して機能スクリーニングを行って、異常の表れる遺伝子を複数特定できたことは、オオヒメグモの実験系の可能性を高める画期的な成果であった。他のモデル生物の知見に頼らずに、現実的な労力で現象ベースの解析を展開できるようになったことにはかけがえのない価値がある。左右相称動物の共通祖先にどれだけ迫れるかは未知数であるが、ゲノム形質や発生メカニズムの随所に祖先性を示す動物種で、遺伝子探索の新たな方法論を得たことは進化研究の発展に貢献するであろう。

2-2 カドヘリンの構造と機能の解析

はじめに

多細胞動物は、細胞と細胞を連結する微細構造（ジャンクションと呼ぶ）を持ち、ジャンクションを巧みに操ることによって体の形を作り上げる。ジャンクションには微細形態と機能によって何種類かのタイプが知られており、その中でもアドヘレンスジャンクションは、多細胞動物で最も広い系統分布を示すジャンクションで、形態形成に最も密接に関わっていることが知られている^{7,8)}。アドヘレンスジャンクションの主要な接着分子はクラシカルカドヘリンである。このカドヘリンは隣接した細胞に発現する同種のカドヘリンを認識し、結合する。上皮組織では、各細胞内で作用する張力がカドヘリンの細胞外領域での分子間結合を介して隣接細胞に伝達されるが、この力学的相互作用が上皮組織の形態形成運動を引き起こす主要因の一つとなっている^{9, 10)}。

細胞間で起こるこの同種カドヘリン間の結合は、細胞外カドヘリンドメイン（EC）と呼ばれる繰り返し構造を介して行われる。ところが、形態形成運動に必要な力が作用するクラシカルカドヘリンの細胞外領域において、ECドメインの数やドメインの構成には、多細胞動物の系統間で大きな多様性が存在する¹¹⁾。例えば、昆虫類および鰓脚類は、7個のECを持ち上皮組織に局在するタイプIVカドヘリンと、17個のECを持ち神経組織に局在するタイプIIIカドヘリンを持つ。しかし、同じ節足動物でも、オオヒメグモのゲノムではタイプIIIカドヘリンしか見つかっていない。タイプIIIカドヘリンは、節足動物以外にも、ウニやヒトデ、一部の脊椎動物を含め多くの左右相称動物で見つかっているために、左右相称動物の祖先的なクラシカルカドヘリンである可能性が考えられる。一方、脊椎動物とホヤの系統では、細胞外領域が5個のECだけからなるタイプIとタイプIIカドヘリンが主要なクラシカルカドヘリン分子として存在している。私たちは、これらのクラシカルカドヘリンの構造の動物系統による違いに対して、以下の疑問を持っている。カドヘリンの構造はどのように多様化してきたのか？ その多様化の際、カドヘリンの機能や接着のメカニズムは変化したのか？ もしメカニズムの変化があったのなら、それは形態の進化に影響を与えなかったのか？ 本研究では、これらの疑問に対する答えを探究している。

これまでのアミノ酸配列の比較解析では、タイプIIIカドヘリンが左右相称動物の祖先的なクラシカルカドヘリンであること、そして、タイプI/IIカドヘリンとタイプIVカドヘリンはそれぞれ独立に欠失変化を経て、脊椎動物/ホヤの系統と節足動物の系統で別々にタイプIIIカドヘリンから派生したことが示唆された。しかしながら、それぞれの動物門の共通祖先においてどの

ような状態が存在していたのか、また、祖先型から派生型への変化が一度で起こったのか、それとも段階的に起こったのかははっきりしていない。

一方、ショウジョウバエを使った実験研究では、ショウジョウバエ上皮カドヘリン (DEカドヘリン) のN末側6個のECが細胞間の接着を仲介できる機能単位を構成していることが明らかになり¹²⁾、昨年度、原子間力顕微鏡による観察と細胞実験で、N末側4個のECが球状構造を取っており、その領域のうちEC2-EC4の部分にホモフィリック結合の特異性を決定する主要因子が含まれることを突き止めた (本年度論文発表¹³⁾)。さらに、タイプIVカドヘリンのEC2-EC4に相同なタイプIIIカドヘリンの領域にも同じ種類のカドヘリンを結合相手として見分ける活性が存在することを見出した。これらの発見は、タイプIIIカドヘリンからタイプIVカドヘリンへの進化において、接着メカニズムが少なくとも部分的に引き継がれている可能性を示唆しており、興味深い。

本年度、クラシカルカドヘリンの進化メカニズムを追究するために、タイプIVカドヘリンの細胞外領域全体の構造の観察とタイプIIIカドヘリンのEC領域の観察に向けて準備を進めるとともに、新たに利用可能となった様々な動物種のゲノムアセンブリを活用して、クラシカルカドヘリン遺伝子のゲノム解析を行ったので報告する。

結果と考察

(1) ショウジョウバエEカドヘリン、Nカドヘリンの構造観察に向けて

ショウジョウバエDEカドヘリンの細胞外領域の基部側の構造を調べるために、DEカドヘリンの細胞外領域全体をGFPにつなげたコンストラクトDEEXfull-GFPを作製し、そのコンストラクトを恒常的に発現するショウジョウバエ細胞株を樹立した。現在、オリンパスとの共同で、DEEXfull-GFPの原子間力顕微鏡での観察に向けた準備を進めている。また、祖先型のドメイン構成をもつDNカドヘリンとDEカドヘリンの構造を比較するために、DNカドヘリンの細胞外領域のN末側から16個のECをもつコンストラクトと13個のECをもつコンストラクトを作製した。

(2) 節足動物門におけるクラシカルカドヘリン遺伝子のゲノム解析

2013年度の報告書に示したオオヒメグモ (鋏角上綱クモ類)、フナムシ (甲殻上綱等脚類) のクラシカルカドヘリン遺伝子に関するゲノムのデータをさらに詳細に他の節足動物種と比較するために、昆虫及び節足動物の5000ゲノムプロジェクト (i5k)¹⁴⁾などで、比較的良質なゲノムアセンブリが最近利用可能となった *Stegodyphus mimosarum* (鋏角上綱クモ類)、*Tetranychus urticae* (鋏角上綱ダニ類)、*Metaseiulus*

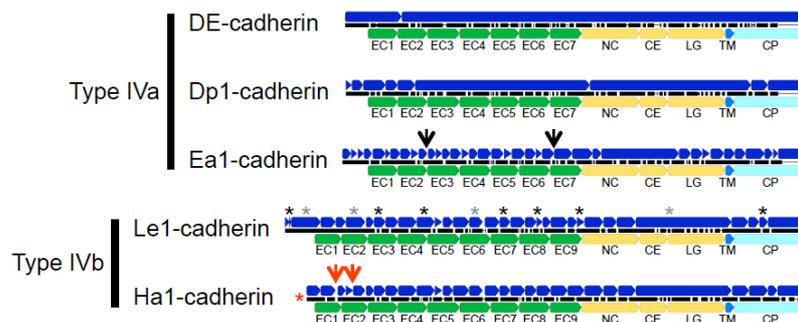


図5. 節足動物で見つかったタイプIVaカドヘリンとタイプIVbカドヘリンのドメイン構成と遺伝子構造. 上から、ショウジョウバエ、ミジンコ、ケンミジンコ、フナムシ、ヨコエビのタイプIVカドヘリン遺伝子を示している。

ト (i5k)¹⁴⁾などで、比較的良質なゲノムアセンブリが最近利用可能となった *Stegodyphus mimosarum* (鋏角上綱クモ類)、*Tetranychus urticae* (鋏角上綱ダニ類)、*Metaseiulus*

occidentalis (缺角上綱ダニ類)、*Strigamia maritima* (多足上綱ムカデ類)、*Eurytemora affinis* (甲殻上綱ケンミジンコ類)、*Hyalella azteca* (甲殻上綱ヨコエビ類)、*Daphnia pulex* (甲殻上綱ミジンコ類)を加えて、ゲノム及びトランスクリプトのデータの再解析を行った。その結果、ショウジョウバエのDNカドヘリン、オオヒメグモの2つのクラシカルカドヘリンに対応する祖先型のクラシカルカドヘリン(タイプⅢカドヘリン)は、解析したすべての節足動物種に存在しており、私たちがこれまでに提案してきたクラシカルカドヘリンの進化モデルと矛盾がなかった。遺伝子構造の比較では、オオヒメグモのクラシカルカドヘリン遺伝子のエキソントロンの構造が節足動物の中で最もよく祖先性を示すことが明らかになった。今回のゲノム解析の最大の注目点は、以前に私たちがフナムシで同定した新しいタイプのドメイン構成のクラシカルカドヘリンが他の節足動物に見つかるかどうかであったが、解析したゲノムアセンブリの中ではヨコエビでのみ見つかった(図5)。解析した他の甲殻類のゲノムには代わりに、DEカドヘリンと同じドメイン構成のクラシカルカドヘリンが存在していた。DEカドヘリンを代表とする昆虫型のクラシカルカドヘリンはこれまでタイプⅣカドヘリンとして分類してきたが、このタイプⅣカドヘリンと、フナムシとヨコエビで見つかった新型のクラシカルカドヘリンは非常によく似た構造的特徴を持っており、両者間の違いは、新型のクラシカルカドヘリンが細胞外カドヘリンドメイン(EC)を2つ多く持っていた点にあった(図5)。今回の発見に基づいて、タイプⅣカドヘリンをタイプⅣaとタイプⅣbの2つのサブタイプに区分し、タイプⅣaをこれまで通りの7個のECをもつ昆虫型のクラシカルカドヘリンに対応させ、タイプⅣbをフナムシとヨコエビで見つかった新型クラシカルカドヘリンに対応させることとした。

次に、タイプⅣaカドヘリンより2つ多く存在するタイプⅣbカドヘリンのECがどこから由来したかを調べるために、他の節足動物のクラシカルカドヘリンと様々な組み合わせでアミノ酸配列の比較解析を行った。その結果、タイプⅣbカドヘリンのEC3-EC9はタイプⅣaカドヘリンのEC1-EC7に相当すること、そして、タイプⅣbカドヘリンのEC1-EC2はEC3以降とのつながりでタイプⅢカドヘリンの連続するECに関連付けられることが示された。これらの結果は、タイプⅣbカドヘリンがタイプⅢカドヘリンからタイプⅣaカドヘリンへの進化の中間状態を反映している可能性を示唆した。つまり、今回のゲノムの再解析は、タイプⅣカドヘリンの前駆体が節足動物系統の初期の多様化以降にタイプⅢカドヘリンから生成し、段階的な欠失変化を経て昆虫のタイプⅣaカドヘリンが進化したことを支持した。

クラシカルカドヘリンの構造に関連して同定したゲノム形質の変化は、動物の系統関係について情報を持つ可能性がある。タイプⅣaカドヘリンをもつ動物とタイプⅣbカドヘリンをもつ動物の区分は、六脚類を含めた汎甲殻類(Pancrustacea)が少なくとも2つのグループに大きく分けられることを示唆し、そのひとつは六脚類全体とミジンコ類、ケンミジンコ類を含む単系統グループとして、もうひとつは軟甲類を含む側系統グループとして規定された。これらの知見は昆虫類または六脚類の起源を理解する上で客観性の高い情報資源となるであろう。

おわりに

昨年度までの研究でタイプⅣaカドヘリンではEC1-EC4が球状構造をとり、この部分がホモフィリック結合の特異性決定因子として働くことを示したが、タイプⅣbカドヘリンにはN末側にさらに2つのECが存在しており、接着機能を果たす上でこれらのECが球状構造とどのような関係にあるのか、興味深い点である。クラシカルカドヘリンの構造の、欠失を伴う段階的な進化がなぜ可能だったのか、進化の中間段階となる状態が他にも存在していたのか、今後節

足動物種からのゲノム情報がさらに増え、整備されることにより、これらの問題への取り組みは容易になるであろう。

謝辞

原子間力顕微鏡によるカドヘリンの分子形態の観察は、オリンパス株式会社の西口茂孝氏、八木明氏、酒井信明氏にご協力いただいた。節足動物のクラシカルカドヘリン遺伝子のゲノム解析は旭川医科大学の佐々木瑞希氏との共同研究で行った。ペーラー医科大学のヒトゲノムシーケンシングセンター (BCM-HGSC)、オオヒメグモゲノムコンソーシアム、*E. affinis* ゲノムコンソーシアム、*H. azteca* ゲノムコンソーシアムの成果で、現段階で未発表のゲノムアセンブリとトランスクリプトデータを、承諾を得て解析に利用した。また、マリーランド大学の Ryan Gott 氏の未発表の *H. azteca* のトランスクリプトデータも承諾を得て利用した。

参考文献

- 1) True, J. R. and Haag, E. S. (2001). Developmental system drift and flexibility in evolutionary trajectories. *Evol Dev* **3**, 109-119.
- 2) Akiyama-Oda Y., Oda H. (2006) Axis specification in the spider embryo: *dpp* is required for radial-to-axial symmetry transformation and *sog* for ventral patterning. *Development*. **133**, 2347-2357.
- 3) Akiyama-Oda Y., Oda H. (2010) Cell migration that orients the dorsoventral axis is coordinated with anteroposterior patterning mediated by Hedgehog signaling in the early spider embryo. *Development*. **137**, 1263-1273.
- 4) Driever W., Nüsslein-Volhard C. (1988) The *bicoid* protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell*. **54**, 95-104.
- 5) Kanayama M., Akiyama-Oda Y., Nishimura O., Tarui H., *et al.* (2011) Travelling and splitting of a wave of *hedgehog* expression involved in spider-head segmentation. *Nat. Commun.* **2**, 500.
- 6) Fujimoto K., Ishihara S., Kaneko K. (2008) Network evolution of body plans. *PLoS. One*. **3**, e2772.
- 7) Harris T.J.C., Tepass U. (2010) Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**, 502-514.
- 8) Oda H., Takeichi M. (2011) Evolution: Structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *J. Cell. Biol.* **193**, 1137-1146.
- 9) Rauzi M., Verant P., Lecuit T., Lenne P.-F.F. (2008) Nature and anisotropy of cortical forces orienting *Drosophila* tissue morphogenesis. *Nat. Cell. Biol.* **10**, 1401-1410.
- 10) Landsberg K.P., Farhadifar R., Ranft J., Umetsu D., *et al.* (2009) Increased cell bond tension governs cell sorting at the *Drosophila* anteroposterior compartment boundary. *Curr. Biol.* **19**, 1950-1955.
- 11) Oda H., Tagawa K., Akiyama-Oda Y. (2005) Diversification of epithelial adherens junctions with independent reductive changes in cadherin form: identification of potential molecular synapomorphies among bilaterians. *Evol. Dev.* **7**, 376-389.
- 12) Haruta T., Warrior R., Yonemura S., Oda H. (2010) The proximal half of the *Drosophila*

E-cadherin extracellular region is dispensable for many cadherin-dependent events but required for ventral furrow formation. *Genes. Cells.* **15**, 193-208.

- 13) Nishiguchi, S., Yagi, A., Sakai, N. and Oda, H. (2016). Divergence of structural strategies for homophilic E-cadherin binding among bilaterians. *J Cell Sci.* **129**, 3309-3319.
- 14) Richards S. (2016) Human Genome Sequence Center Baylor College of Medicine, <https://www.hgsc.bcm.edu/arthropods/>