

## 3 オオヒメグモ胚のパターン形成 ——縞パターンはどのようにできるか？

秋山-小田 康子 *Yasuko Akiyama-Oda*

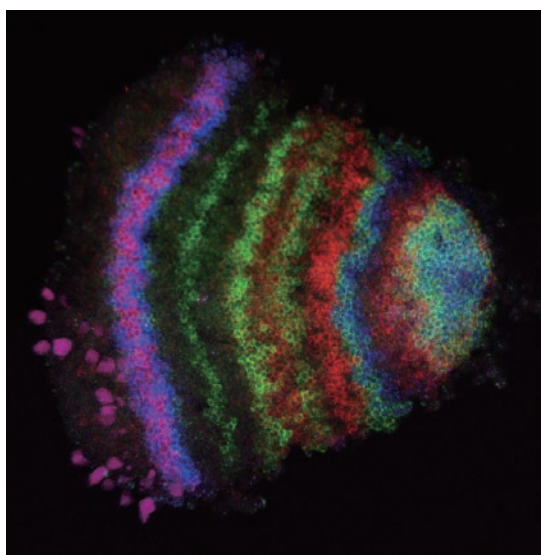
大阪医科大学 医学部 微生物学教室 非常勤講師 / JT生命誌研究館 細胞・発生・進化研究室 特別研究員

オオヒメグモ胚の体節の基となる空間的に繰り返した遺伝子発現の縞パターンは、体の領域により異なる様式で形成される。ゲノムワイドな遺伝子探索と、遺伝子の発現と機能の解析から、異なる振る舞いをする3種類の遺伝子発現の波を、共通する遺伝子が制御し、繰り返しの縞パターンを作り出すことがわかってきた。

### 1 はじめに

節足動物の体は体節とよばれる繰り返しの構造からできている。筆者らが研究に用いているオオヒメグモのように、体節が成体では判別しにくい種もあるが、胚が帯状の形態を示す時期、**胚帯期\***に、ショウジョウバエでセグメントポラリティー遺伝子として知られるエングレイルド (*engrailed*, *en*) 遺伝子が、前後軸(頭から尾の軸)上で、縞状に発現することが多くの節足動物で示されている(図1)。このような縞パターンに基づいて、その後、形態的なくびれを持つ体節が形成される。

*en*などの遺伝子が共通して発現するため、縞状の遺伝子発現は(そして体節は)、節足動物で進化的に保存された形質だと考えられている。では、



オオヒメグモ胚の繰り返し縞パターン

文献13)より改変(CCBY4.0)。

#### 用語解説 Glossary

##### 【胚帯期】

体が前後に帯状に長くなった胚帯となる胚発生ステージ。多くの節足動物に共通するステージで、セグメントポラリティー遺伝子の発現が体節ごとの縞パターンとして検出されるようになる。

縞パターンを形成する分子的なしくみは、すべての節足動物で共通なのだろうか？ これは次節に示すように否である。しかし、節足動物の祖先でどのようなしくみで縞パターンを形成していたのか、それがどのように進化して異なるしくみが生じたのかは、まだわかっていない。筆者らはオオヒメグモの研究で、この問題のヒントとなるような現象を見つけたので、ここで紹介したい。

## 2 節足動物で知られる 縞パターン形成の二つの様式

まず、節足動物の縞パターン形成の研究の現状から話を始めよう。ショウジョウバエは最も研究の進んだ生物の一つであり、縞パターン形成のカスケードも詳細に解析されている<sup>1)</sup>。このカスケードは主に転写調節因子\*で構成されている。ビコイド (*bicoid*, *bcd*) などの母性効果因子の分布に基づいてギャップ遺伝子が領域特異的に発現し、続いてペアルール遺伝子が7本の縞で(2体節に1本の縞)、そしてセグメントポラリティ遺伝子が14本の縞で発現する。この14本の縞は一つの体節ごとに1本の縞に相当する。このようにショウジョウバエでは、徐々に細かい単位で遺伝子発現が引き起こされることにより、体節に相当する縞パターンが同時に形成される(図1)。

縞パターンの形成過程やここに関わる遺伝子の機能の研究は、現在でも限られた動物でしかおこなわれていないが、胚帯における遺伝子発現の解析から、縞パターンの形成にショウジョウバエとは異なる様式があることがわかってきている。その代表的なものは、個々の細胞が特定の遺伝子の発現を繰り返しOn/Offする振動(Oscillation)である<sup>2)</sup>。前後軸に沿って並ぶ細胞で振動に少しずつずれがあり、遺伝子発現が波のように観察される。この振動の波は、体の後端部の細胞から始まり前方の細胞へ進み、新しい1つの縞を作る。これが繰り返し起こり、周期的な縞パターンが形成

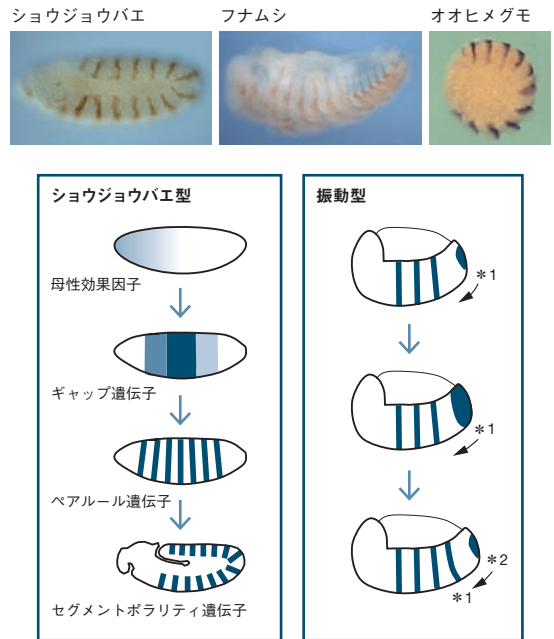


図1 節足動物胚の縞パターン形成

上: ショウジョウバエ, フナムシ, オオヒメグモ胚における *engrailed* の発現。

下: 空間的に繰り返した縞パターンの形成の2種類の様式。ショウジョウバエ型(左)と振動型(右)。

される(図1)。遺伝子発現の振動は幅広い節足動物で知られており、脊椎動物でも観察されるので、節足動物の祖先的な様式との考えも示されている<sup>2)</sup>。しかし、振動を引き起こす分子的なしくみが共通なのかはわかっていない。また、1回の振動で、ペアルールのように2本の縞が形成される動物と<sup>3)4)</sup>、1本の縞が形成される動物があるなど、違いも知られている。最近では、振動により縞が順々に増える様式と、ショウジョウバエのように縞が同時に現れる様式の、遺伝子レベルでの繋がりを説明しようとする研究が進められている<sup>5)6)</sup>。

### 用語解説 Glossary

#### 【転写調節因子】

多くの場合、DNA結合領域と転写調節領域を持つタンパク質で、DNAの特定の塩基配列を認識して遺伝子の発現制御に関わるゲノム領域に結合し、転写を活性化、または抑制する機能を持つ。

### 3 オオヒメグモの前後パターンと縞パターンを繋ぐ遺伝子の同定

私たちが研究対象としているオオヒメグモは、初期胚にアクセス可能であり、縞パターン形成期の胚の形態や細胞を直接観察することもできる、有望な実験動物である<sup>7)</sup>。RNA干渉法を用いた遺伝子のノックダウンによる遺伝子の機能解析も進められており<sup>8)</sup>、解読されたゲノムを利用した研究もおこなわれている<sup>9)10)</sup>。

オオヒメグモの初期の胚発生は球形、円盤、扇型、胚帯と球面上で形態変化が起き、幾何学的にわかりやすい(図2)。円盤形の胚は胚盤とよばれ、縁を前側、中心を後側とする前後のパターンが同心円状に形成される。この前後パターンの形成メカニズムがショウジョウバエの*bcd*に依存した方法と大きく異なることがわかってきている。オオヒメグモでは分泌性の細胞間シグナル分子\*をコードするヘッジホッグ(*hedgehog*, *hh*)遺伝子が、前後のパターン形成を制御する<sup>11)</sup>。*hh*は、ショウジョウバエ胚ではセグメント極性遺伝子として各体節の前後の極性形成に関わる<sup>12)</sup>。オ

オヒメグモでも、発現は胚帯期には体節ごとの縞パターンとして観察されるため(図2)、セグメント極性遺伝子としての役割は同じように有していると考えられる。これに加えて、オオヒメグモでは胚発生の非常に早い時期から発現が検出され、ノックダウンによる異常も胚帯が形成される前に現れる。胚盤では、*hh*の発現は縁(前側)で環状に検出され、*hh*のノックダウンをすると前側の運命が形成されずに全体が後側の運命となる(図2)。オオヒメグモでは、*hh*がからだ全体の前後のパターン形成を制御しており、ショウジョウバエにおける*Bcd*の役割と匹敵する役割を担っていると考えられている。

私たちは、*hh*遺伝子や関連する遺伝子のノックダウン胚では前後のパターン形成が異常になり、その後の縞パターンの形成も妨げられるため、これを手がかりに縞パターン形成に関わる遺伝子を同定できるのではないかと考え、RNA sequencing (RNA-seq) 法を利用したゲノムワイドな探索をおこなった<sup>13)</sup>。RNA-seqでは胚や組織に存在するmRNAを、次世代シーケンサー\*を用いて数千万~数億という規模で解析する。解析した配列をゲノム配列と対応させる(マップさせる)ことにより、ゲノム上のすべての遺伝子の発現を定量的に明らかにできる。この方法をRNA干渉と組み合わせることで、ノックダウンの影響で発現量が変化する遺伝子の探索をゲノムワイドにおこなうことができ(図3)、他の生物の情報を利用せずに新しい遺伝子や新しい相互作用を発見すること

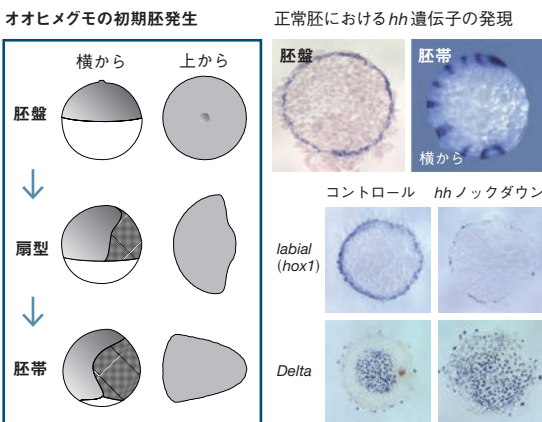


図2 オオヒメグモの初期胚発生と *hh* 遺伝子の発現と機能

左: 形態変化の模式図。

右上: 胚盤と胚帯における *hh* の発現。

右下: *hh* ノックダウンの胚盤の前後パターンへの影響。

文献11)より改変。

#### 用語解説 Glossary

##### 【細胞間シグナル分子】

細胞内で翻訳された後、細胞外に分泌されシグナルとしてはたらくタンパク質。他の細胞の細胞膜に存在する受容体に結合し、その細胞の転写などの状態を変化させる。

##### 【次世代シーケンサー】

数千万から数億のDNA断片の塩基配列を同時に読み取る機械。従来型の機械と比較すると読み取り速度が格段に高く、数年かかっていたヒトゲノム程の情報量の塩基配列の読み取りが数日できる。



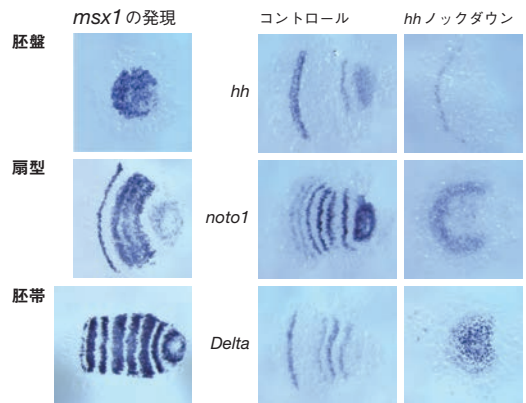
が可能である。この実験の結果、*hh*の制御により胚盤でさまざまな大きさの同心円で発現する遺伝子が多数同定され、*hh*が前後のパターン形成を制御することが再確認された。さらに、*hh*に発現抑制を受ける遺伝子として同定された*msx1*は、転写調節因子をコードするが、胚盤では中心領域で、胚帯では体節ごとの縞パターンで発現した(図3)。*msx1*の縞パターンは、*hh*の縞パターンとは相補的\*であった。*msx1*をノックダウンすると、正常に近い前後パターンを示す胚盤が形成されるものの、胚帯への転換が起こらず、*hh*を含むさまざまな遺伝子の発現の空間的に繰り返した縞パターンが形成されなかった(図3)。これらの結果から*msx1*は前後パターンから縞パターンへの転換に関わっていると考えられた。*msx1*は、ショウジョウバエでは背腹軸に沿ったパターンの形成に、脊椎動物では神経管や肢芽でパターンの形成に関わるが<sup>14)15)</sup>、体節形成に関しては報告がない(最近、クモと同じ鋏角類のザトウムシで、縞パターンで発現することが示された<sup>16)</sup>)。オオヒメグモの研究でこの遺伝子が同定されたのは、ゲノムワイドな探索がおこなわれたからである。

#### 4 オオヒメグモ縞パターン形成の領域による多様性

このように前後のパターン形成を制御する*hh*と、*hh*により抑制される*msx1*が縞パターン形成に重要な役割を果たすことがわかってきた。私たちは、胚盤から扇型を経て胚帯へと発生する過程において、この二つの遺伝子を中心に、発現の時間変化を観察した<sup>13)17)18)</sup>。その発現は非常にダイナミックであり、おもしろいことに、体の領域により異なる性質の遺伝子発現の波が観察された。ここからは各領域を見ていく。

頭部における縞パターンの形成は、*hh*の胚盤の縁(体の前端)における環状の発現に由来する。この*hh*の発現は、胚が扇型へと変化を始める

#### オオヒメグモゲノム*msx1*領域



*hh* (緑) と *msx1* (赤) の発現

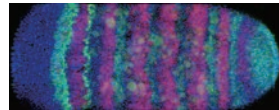


図3 *msx1* 遺伝子の発現と機能

上: オオヒメグモゲノム*msx1*領域におけるRNA-seqの結果。Hhノックダウンではエクソン領域にマップされる配列が多くなる。

中左: 胚盤、扇型胚、胚帯における*msx1*の発現。

下: 胚帯における*hh* (緑) と *msx1* (赤) の相補的な発現。青色はDNA (核) の染色。

中右: *msx1*ノックダウンの縞パターン形成に与える影響。

文献13)より改変 (CCBY4.0)。

前端から離れ、徐々に後側の細胞で検出されるようになる。細胞を標識する実験から、この発現は進行波であることが示された<sup>17)</sup>。*hh*の波の発現は、細胞が再配列し胚帯が伸長する時に、前後方向に太くなり、2本の縞に分かれる(図4)。2分裂(Bi-splitting)と名づけた現象である。2本となった縞のうち、前方に位置する縞がもう一度2

#### 用語解説 Glossary

##### 【相補的】

お互いに補い合うような状態。2遺伝子の発現がある領域において重なり合わず、その領域のすべての細胞がどちらかの遺伝子を発現している場合、発現が相補的であるという。

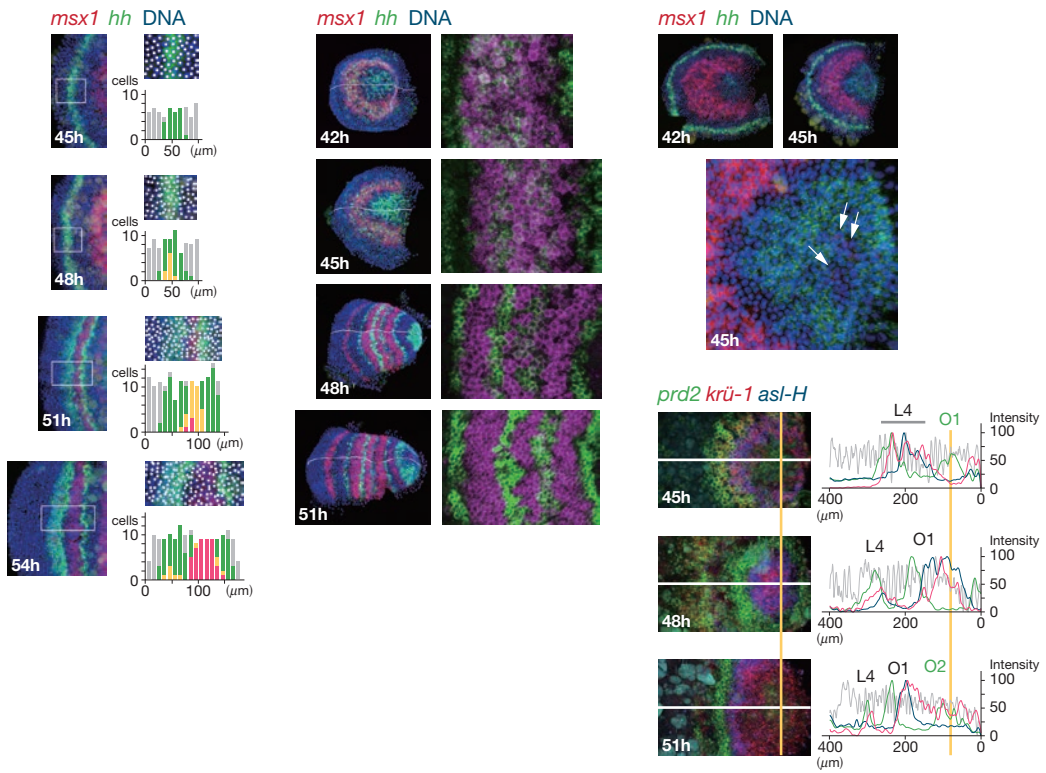


図4 体の3領域における縞パターン形成

左：頭部の2分裂。左の写真の長方形の中で *hh* と *msx1* を発現している細胞数を色分けしてグラフにした。黄色は両方の遺伝子を発現していることを示す。

中：胸部の3分裂。

右上：後体部の振動。矢印は *msx1* を発現している細胞を示している。

右下：ヘアール遺伝子 (*prd2*)、ギャップ遺伝子 (*krü-1*)、脊椎動物の振動遺伝子 (*asl-H*) のホモログの後体部における発現。

各写真左下は産卵後の時間。

文献13)より改変 (CCBY4.0)。

分裂して合計で3本の縞となり、頭部の3体節を形成する。このとき *msx1* の発現を観察すると、*hh* の発現波のピークに位置する細胞で発現が開始することがわかった<sup>13)</sup>。波がまだ一つのピークを呈している時に *msx1* の発現が現れ、*hh* の発現が抑制されて2本の縞に分裂するのである(図4)。*msx1* を局所的にノックダウンすると、ノックダウンした細胞では *hh* の発現が継続することも観察された<sup>13)</sup>。さらに、頭部形成に関わる遺伝子などのノックダウンで、*hh* 遺伝子の波の進行や維持、分裂に異常が生じることも示されている<sup>17)</sup>。

一方、胚盤の中心領域で検出された *msx1* の発

現も非常に動的であり、この発現が胸部の縞パターン形成に繋がる。*msx1* の発現は中心付近のわずかな数の細胞から始まり、徐々に胚盤の直径の半分ほどの範囲に存在する細胞に広がるが、胚盤の中心付近の発現は徐々に無くなっていく<sup>13)</sup>。この発現も波の振る舞いといえる。この *msx1* の第1の波の制御に *hh* が関わることもわかってきている。*msx1* の第1の波は胸部まで達し、扇型から胚帯へと発生が進むと3本の縞に分裂する。これらの縞が胸部の3体節を作る。この現象を3分裂(Tri-splitting)と名づけた。3分裂は一度だけ起こる現象である。扇型の時期に胸部で縞状に

発現する *noto1* 遺伝子<sup>18)</sup> と *msx1* の発現を同時に観察すると、はじめ重なり合った発現が相補的な縞へと分かれる様子が見えてきた (図4)<sup>13)</sup>。胸部における *msx1* の局所的ノックダウンでは、相補的なパターンが作れないこともわかり、新しいしくみがここで動いていると考えられる。*noto1* を発現する細胞は遅れて *hh* の発現を開始し、これにより *msx1* と *hh* の発現は相補的なパターンを形成する。

後体部の縞パターンは振動により形成される。*hh* も *msx1* も発現が振動し、後体部の縞パターンを形成する。*msx1* の第1の波に続いて、中心領域の細胞で *hh* の発現が開始する (図4)。これが *hh* の後体部での一つ目の波となり、以降、*hh* と *msx1* の発現波が逆位相を保ちながら、より後方の後体部の体節を1回の振動で一つずつ構成することになる。*msx1* のノックダウンとRNA-seqを組み合わせた実験でいくつかの振動遺伝子が同定された<sup>13)</sup>。これらの遺伝子はショウジョウバエのギャップ遺伝子やパールール遺伝子、脊椎動物の振動遺伝子のホモログを含んでおり、少しずつ異なる位相で発現が振動する様子が観察された (図4)。*msx1* のノックダウンではこれらの遺伝子すべての振動の発現が止まり、*msx1* が振動を駆動する役割を持つことがわかってきた。

このようにオオヒメグモの縞パターン形成は、頭部、胸部、後体部の体の3領域によって、異なる振る舞いをする遺伝子発現の波が関わる現象である (図5)。領域による違いが生み出されるしくみはまだわかっていないが、すべてに *hh* と *msx1* が関与している。この二つの遺伝子を中心とした、違いを生じさせる、一つの大きなネットワークが存在すると考えられる。ショウジョウバエでは発現が振動しない縞パターン形成遺伝子が、オオヒメグモでは振動することや、一つの個体で多様な縞パターン形成がおこなわれることから、オオヒメグモのしくみを明らかにすることは、節足動物の縞パターン形成のしくみの進化を理解する手がかりになるかも知れない。

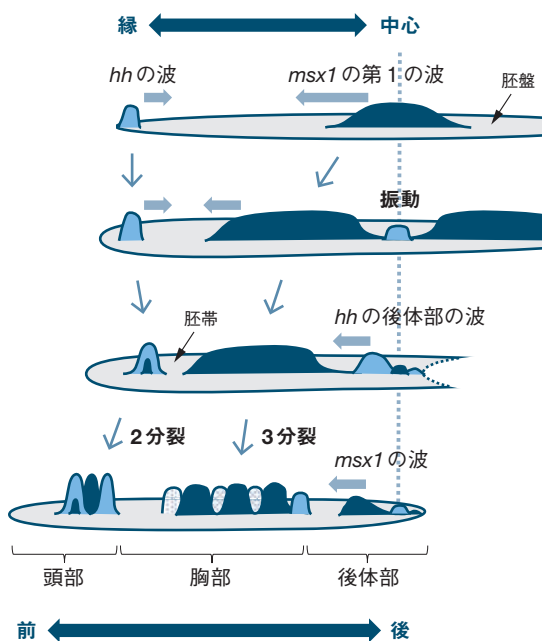


図5 オオヒメグモの縞パターン形成における *hh* と *msx1* の発現の波

文献13)より改変 (CCBY4.0)。

## 5 今後の展開

*hh* は節足動物の体節形成だけでなく、脊椎動物の神経管や枝芽などにおいても、区画パターンや繰り返しパターンの形成を制御することが知られている<sup>19)20)</sup>。数理解析では *hh* と転写調節因子が作るネットワークが、条件によってさまざまなパターンを作る可能性があることが示されている<sup>21)</sup>。オオヒメグモでは、各領域で発現する転写調節因子の組み合わせやHhタンパク質の濃度が、異なる波や前後のパターンを生み出す原因となっている可能性もある。節足動物で見られるさまざまな縞パターン形成の様式も、このようなさまざまなパターンを作り得る遺伝子ネットワークがはたらくしくみから進化したのかも知れない。

次の展開として、縞パターンをまさに作っている一つひとつの細胞の状態の時間変化を解析することが考えられる。さらに、数理解析へと発展させ、コンピューター上で縞パターンを作り出すネッ



トワークを導き、進化させる研究もあるだろう。オオヒメグモは、公共のデータベースや筆者らのグループで構築しているデータベース (<https://www.brh2.jp>) があり、ゲノムや遺伝子の情報が誰でも利用できるように整えられている。オオヒメグモを縞パターン形成だけでなく、さまざまな生命現象の研究に利用して欲しいと思う。

[文献]

- 1) Peel, A. D., Chipman, A. D. & Akam, M. Arthropod Segmentation: beyond the *Drosophila* paradigm. *Nature Reviews Genetics* **6**, 905–916 (2005).
- 2) Clark, E., Peel, A. D. & Akam, M. Arthropod segmentation. *Development* **146**, dev170480 (2019).
- 3) Chipman, A. D., Arthur, W. & Akam, M. A Double Segment Periodicity Underlies Segment Generation in Centipede Development. *Current Biology* **14**, 1250–1255 (2004).
- 4) Sarrazin, A. F., Peel, A. D. & Averof, M. A Segmentation Clock with Two-Segment Periodicity in Insects. *Science* **336**, 338–341 (2012).
- 5) Zhu, X. *et al.* Speed regulation of genetic cascades allows for evolvability in the body plan specification of insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, E8646–E8655 (2017).
- 6) Clark, E. & Peel, A. D. Evidence for the temporal regulation of insect segmentation by a conserved sequence of transcription factors. *Development* dev.155580 (2018) doi:10.1242/dev.155580.
- 7) Oda, H. & Akiyama-Oda, Y. The common house spider *Parasteatoda tepidariorum*. *EvoDevo* **11**, 6 (2020).
- 8) Akiyama-Oda, Y. & Oda, H. Axis specification in the spider embryo: *dpp* is required for radial-to-axial symmetry transformation and *sog* for ventral patterning. *Development* **133**, 2347–2357 (2006).
- 9) Iwasaki-Yokozawa, S., Akiyama-Oda, Y. & Oda, H. Genome-scale embryonic developmental profile of gene expression in the common house spider *Parasteatoda tepidariorum*. *Data Brief* **19**, 865–867 (2018).
- 10) Pechmann, M., Benton, M. A., Kenny, N. J., Posnien, N. & Roth, S. A novel role for *Ets4* in axis specification and cell migration in the spider *Parasteatoda tepidariorum*. *eLife* **6**, e27590 (2017).
- 11) Akiyama-Oda, Y. & Oda, H. 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 (2010).
- 12) Lee, J. J., von Kessler, D. P., Parks, S. & Beachy, P. A. Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene *hedgehog*. *Cell* **71**, 33–50 (1992).
- 13) Akiyama-Oda, Y. & Oda, H. Hedgehog signaling controls segmentation dynamics and diversity via *msx1* in a spider embryo. *Sci. Adv.* **6**, eaba7261 (2020).
- 14) Bensoussan-Trigano, V., Lallemand, Y., Saint Clément, C. & Robert, B. *Msx1* and *Msx2* in limb mesenchyme modulate digit number and identity. *Developmental Dynamics* **240**, 1190–1202 (2011).
- 15) Ramos, C. & Robert, B. *msh/Msx* gene family in neural development. *Trends in Genetics* **21**, 624–632 (2005).
- 16) Leite, D. J. *et al.* Homeobox gene duplication and divergence in arachnids. *Mol. Biol. Evol.* (2018) doi:10.1093/molbev/msy125.
- 17) Kanayama, M. *et al.* Travelling and splitting of a wave of hedgehog expression involved in spider-head segmentation. *Nature Communications* **2**, (2011).
- 18) Hemmi, N., Akiyama-Oda, Y., Fujimoto, K. & Oda, H. A quantitative study of the diversity of stripe-forming processes in an arthropod cell-based field undergoing axis formation and growth. *Developmental Biology* **437**, 84–104 (2018).
- 19) Briscoe, J. & Small, S. Morphogen rules: design principles of gradient-mediated embryo patterning. *Development* **142**, 3996–4009 (2015).
- 20) Tickle, C. & Towers, M. Sonic Hedgehog Signaling in Limb Development. *Front. Cell Dev. Biol.* **5**, (2017).
- 21) Panovska-Griffiths Jasmina, Page Karen M. & Briscoe James. A gene regulatory motif that generates oscillatory or multiway switch outputs. *Journal of The Royal Society Interface* **10**, 20120826 (2013).



秋山-小田 康子 *Yasuko Akiyama-Oda*

大阪医科大学 医学部 微生物学教室 非常勤講師 / JT生命誌研究館 細胞・発生・進化研究室 特別研究員 博士 (理学, 東京大学)。日本学術振興会特別研究員, JST さきがけ研究21 専任研究員, JT生命誌研究館 奨励研究員, などを経て現職。専門分野は、発生生物学。成茂動物科学振興賞 (2012年) を受賞。