

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 ウニ初期発生をモデルとした原腸形成機構および染色体構造制御機構の解析
(Analysis of the mechanism of gastrulation and regulation of chromosome
structure using sea urchin early development as a model)

広島大学大学院統合生命科学研究科
数理生命科学プログラム
学生番号 D212083
氏 名 渡邊 開智

本論文では、発生のモデル生物であるバフンウニ(*Hemicentrotus plucherrimus*)を用いて遂行した、原腸形成のイメージング解析に基づいた力学的考察(第II部)、および初期発生期の CTCF による染色体構造制御機構の解析(第III部)について、その結果と考察をまとめた。

・ 原腸形成の力学的考察について

原腸形成は高等動物の形態形成に必須な胚の大域的な組織運動である。胚組織の陥入が身体の内側をつくることで、生物は単純な細胞の集合体から種固有の多様な形態に繋がる基盤構造を獲得する。原腸の形成様式は生物によって様々であるが、ウニでは植物極から組織が陥入する典型的な原腸形成が観察できる。

ウニ初期胚は発生の初期段階では左右相称であるが、プルテウス幼生期には左右非相称な形態を獲得する。そしてウニの左右非相称な形態形成には、桑実胚期に形成される初期繊毛と、原腸胚期での H^+/K^+ ポンプ活性の両方が重要な役割を果たしていることが知られており[1][2]、Omeprazol 処理により H^+/K^+ ポンプ活性が阻害されるとプルテウス幼生の左右性が乱される。我々はそれに加え、初期発生期にこの H^+/K^+ ポンプの活性が阻害されたウニ胚(ポンプ阻害胚)では原腸が正常に形成されず、腸が胚の外側に伸長した「外腸」を形成する傾向があることを見出した。そこで本研究では、バフンウニを用いて原腸形成に必要な力学的機構および、 H^+/K^+ ポンプの活性と原腸形成の関係の解明を目的とし、実験と数理モデルによる考察を行った。

正常胚とポンプ阻害胚に対し、まだ形態の差がない胞胚期と初期原腸期を蛍光 pH インジケータと actinin(F-actin マーカー)-GFP で共染色し、蛍光輝度の頂端-基底比([輝度比] = [頂端輝度] / [基底輝度])の分布を比較した。その結果、pH の輝度比はいずれの発生時期においてもポンプ阻害胚で有意に低く(阻害胚頂端側の pH が相対的に高い)、特に初期原腸胚期の植物局側では正常胚と比べてポンプ阻害胚の輝度比が低かった。胞胚期における actinin 分布には正常胚とポンプ阻害胚の間で差は認められなかったが、初期原腸胚期ではポンプ阻害胚が、正常胚と比べ植物極側の細胞で

有意に低い輝度比を示した。これらの結果及びアクチン系による細胞骨格形成が pH に敏感に依存する [3] ことから、細胞全体の pH 勾配変化が細胞骨格の局所的な分布を変化させ、その結果として形態変化が引き起こされることが示唆された。

細胞骨格因子が原腸形成の主要な原動力であるのかを検証するため、*YAPI* (F-actin 脱重合促進因子) と *RhoA* (F-actin 重合促進因子) の CRISPR-Cas9 system を用いたノックアウトを行なうと、両ノックアウト胚は初期原腸胚以降の形態形成に移行できなかったことから、細胞骨格因子が原腸形成中期以降の主要な原動力であることが明らかになった。

上記の実験・定量評価の結果を基に、ウニ胚における原腸陥入の数理モデル (2次元バネビーズモデル) を構築した。ポンプ阻害によって顕著に変化した植物極側の細胞の細胞骨格分布が原腸形成に及ぼす寄与を検証するため、モデルの細胞幅を制御するバネの自然長を actinin 分布に従って仮定することで、正常胚とポンプ阻害胚のモデルを構築し、シミュレーションを行った。その結果、ポンプ阻害胚を模した胚では正常胚と比較して陥入が阻害され、正常胚・ポンプ阻害胚共に胚全体の形状や植物極の頂端-基底組織の長さの比は実際の胚の計測結果と一致した。このシミュレーションにより、植物極細胞の頂端側が十分に伸長しないことが、初期原腸胚期におけるポンプ阻害胚の形態変化を生み出す条件になり得ると示された。

本研究では細胞内 pH の勾配が細胞骨格の性質を変化させ、それに伴った形態の変化が引き起こされる例を、ウニの原腸形成をモデルに示した。個体発生や形態形成・変化に重要な細胞骨格分布は、細胞内の各種因子群・環境や胚自身の置かれた環境により制御される。本研究から、細胞内 pH 及びその制御因子である H^+/K^+ ポンプの活性が、細胞骨格分布制御を通じた多細胞生物の形態制御に対し大きく寄与する要因の一つであることが示唆された。

・ CTCF による染色体構造維持機構の解析について

真核生物の細胞では膨大な量の DNA が直径数 μm の核内に収納されているが、この収納は異なるスケールの核内構造が階層的に存在することで実現している。Topologically associated domain (TAD) と呼ばれる 100 kb-1 Mb 程の構造単位もその中の 1 つである。同一 TAD 内の DNA 配列は近接頻度が大きくなり、遺伝子の発現調節配列間の物理的接触を容易にしている。CTCF タンパク質 (CCCTC 結合因子) は複数のジンクフィンガードメインをもち、特定の DNA 配列に結合して二量体を形成することで TAD のような DNA のループの境界を形成する。CTCF の機能阻害はとくに初期発生において顕著な影響を示し、マウス・ゼブラフィッシュを用いた研究では *CTCF* のノックアウトが致死的な影響を及ぼす [4]。一方で節足動物では CTCF がごく一部のループ形成にのみ寄与していることも報告されており [5]、TAD の制御機構や CTCF の機能については一部の生物でしか明らかになっていない。

一方で近年、CTCF の TAD 形成以外の機能も明らかになってきており [6]、新たな機能の解明が期待されている。そこで本研究では、新口動物で最も早期に分岐した棘皮動物における CTCF の機能がより広い生物群に普遍的な機能に関する知見につながると考え、その解析を行った。

我々は、モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) と CRISPR-Cas9 system による 2 つの方法でバフン

ウニの *HpCTCF* 遺伝子の機能阻害を行った。MO を用いた母性因子を含む *HpCTCF* mRNA の翻訳阻害では、受精後約 20 時間で発生が停止した。この時の多くの核は分裂期のような状態で染色体が凝縮していた。しかし、この染色体の多くは抗リン酸化ヒストン H3 (Ser10) 抗体で染色されなかったことから、分裂終期で停止していることがわかった。この結果から母性因子を含むごく初期の発生に必要な CTCF は分裂終期から間期への正常な移行に必要であると推測した。CRISPR-Cas9 による内在ゲノムのノックアウトでは、受精後数日で目立った表現型は現れなかった。

MO を用いた実験の結果を受けて、ウニの *CTCF* と初期発生の細胞分裂との間に関連があるのかを近縁種の Single cell RNA-seq (scRNA-seq) データを基に検証した。単一細胞ごとの *CTCF* の発現量と有意に相関の認められる遺伝子を抽出し、GO 解析によって濃縮した機能を調べると、初期胚において全機能の 2 割程度が細胞周期関連の機能であり、その半数以上が分裂期に関連する機能であった。また、ウニ以外の複数の生物種 (ヒト, マウス, ゼブラフィッシュ, ハエ) においても同様の解析を行うと、旧口動物を含む全ての生物種で細胞周期関連の機能はウニよりも高い 3~4 割を占め、新口動物ではその半数以上が分裂期関連の機能であった。これらの結果から初期発生における *CTCF* と細胞周期の進行の関連は広い生物種で普遍的なものであると考えられた。

ノックアウト実験において表現型が現れなかったことに関しては、発生段階依存的な細胞周期の質の変化が原因の一つとして考えられる。ウニの受精卵は数百細胞まで G1 期と G2 期のない速い細胞分裂を繰り返し、その後各分化細胞ごとの機能に必要な遺伝子の転写を行うため、G1 期と G2 期の長い細胞周期へと切り替わる。今回の 2 種類の *CTCF* 機能阻害において表現型が全く異なる原因として、ゲノムのノックアウトではその効果が胞胚期以降に限定され、その時期には CTCF の機能を相補する因子が存在する可能性などが考えられた。

本研究では、バフンウニの初期発生における分裂終期から間期への移行における *CTCF* の必要性が見出され、細胞分裂における *CTCF* の重要性が世界で最初に示された。また異なる生物種の scRNA-seq データの解析により、*CTCF* のこのような機能は広い生物種間で普遍的であることが示唆された。最近、本研究の MO を用いた実験結果と類似した結果が、*CTCF* を阻害したマウスでも観察されたが [7]、この知見は示唆された普遍性をサポートするものと考えられる。

参考文献

- [1] Hibino, T., et al., *Dev. Genes Evol.* 216.5 (2006): 265.
- [2] Takemoto, A., et al., *Genes to Cells* 21.6 (2016): 568-578.
- [3] Köhler, S., et al., *Cell reports* 2.3 (2012): 433-439.
- [4] Fudenberg, G., et al., *Nature Struct. Mol. Biol.* 28.10 (2021): 774-776.
- [5] Kaushal, A., et al., *Nature Commun.* 12.1 (2021): 1-16.
- [6] Braccioli, L., and Elzo, W., *Essays Biochem.* 63.1 (2019): 157-165.
- [7] Chiu, K., et al., *Chromosoma* (2023): 1-12.