

令和 元年 12 月 25 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 H29

受付番号 400

氏 名

清水 啓介

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： エクセター大学 （国名：英国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
海洋汚染物質による貝殻形成阻害の分子メカニズムの解明
3. 派遣期間： 平成29年12月3日 ～ 令和元年12月2日
4. 受入機関名及び部局名

College of Life and Environmental Sciences, University of Exeter

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入
も可）**

（研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等）

（注）「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

本研究の目的は、軟体動物の貝殻形成におけるレチノイン酸経路に着目し、有機スズ化合物汚染によって生じる貝殻形成異常の分子メカニズムを明らかにすることである。2年目の研究では、以下4点の研究課題を遂行した。(1) レチノイン酸受容体(RAR)の時空間的な発現解析、(2) レチノイン酸受容体(RAR)の機能解析(ノックダウン)、(3) レチノイン酸受容体(RAR)とレチノイン酸の結合活性解析、(4) レチノイン酸受容体によって制御される遺伝子群の探索。これらの結果から、軟体動物におけるレチノイン酸受容体のリガンドが脊椎動物で知られる atRA ではない可能性が示唆され、これまで RAR と相互作用することが知られている環境汚染物質以外の物質とも軟体動物の RAR は相互作用する可能性が考えられ、さらなる研究の必要性が出てきた。今回の各研究課題の具体的な成果内容は以下の通りである。

(1) レチノイン酸受容体(RAR)の時空間的な発現解析

マガキ(*Crassostrea gigas*)のゲノム解析を行った先行研究のデータ(Zhang et al., 2012)から、*rar*を含む4種類(*rar*, *en2b*, *gata2/3*, *lsmpl*)のトランスクリプトームによる遺伝子発現量データを探索した。*En2b*と*gata2/3*は転写因子であり、二枚貝のトロコフォア幼生の貝殻形成領域において発現することが知られている遺伝子である。また、*lsmpl*は幼生の貝殻から同定された貝殻基質タンパク質(SMP, shell matrix protein)の1つである。発生ステージごとの遺伝子発現量を解析したところ、*rar*、*en2b*、*gata2/3*は原腸胚初期(EG)からトロコフォア幼生後期(T4)にかけて発現することがわかった(図1)。一方、*lsmpl*は原腸胚期には発現が見られず、トロコフォア幼生期(T1-T4)にのみ発現していることがわかった(図1)。次に、これらの遺伝子がどの細胞でどのように発現しているのかを調べるために、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、*rar*は原腸胚後期(8 hour post fertilization, 8 hpf)の貝殻領域の細胞で発現が見られ、その発現はトロコフォア幼生期まで続いていることが明らかとなった(図2a)。*en2b*と*gata2/3*の発現も原腸胚後期(8 hpf)からすでに見られ、特に*gata2/3*は貝殻領域の外側の細胞で発現していた(図2b-c)。一方、*lsmpl*は発生のステージごとの遺伝子発現量解析の結果と同様、原腸胚後期(8 hpf)にはシグナルが確認されず、トロコフォア幼生初期(10 hpf)に貝殻領域での発現が見られた(図1d)。これらの結果から、*rar*は*lsmpl*よりも早く発現が始まり、トロコフォア幼生期の発現ドメインは重複していることが明らかになった。さらに、二枚貝類と腹足類(巻貝類)で共通パターンを比較するために、クサイロアオガイ(*Nipponacmaea fuscoviridis*)の初期胚を用いて*rar*を含む4種類の遺伝子(*rar*, *en*, *chitin synthase 1*, *6D12*)の発現解析を行った。*cs1*(chitin synthase 1)は貝殻形成の足場となるキチンを合成する酵素であり、*6D12*はアワビの貝殻から同定されたSMPの1つのホモログである(Jackson et al., 2006)。In situ hybridizationの結果、*cs1*と*en*は貝殻領域の辺縁部で発現しており、その内側に*rar*と*6D12*の発現が見られた(図2e-i)。この結果はマガキの*rar*と*lsmpl*で見られた発現パターンと整合的な結果であり、二枚貝と巻貝では*rar*が貝殻形成領域(SMPが分泌される領域)で発現することが明らかとなった。

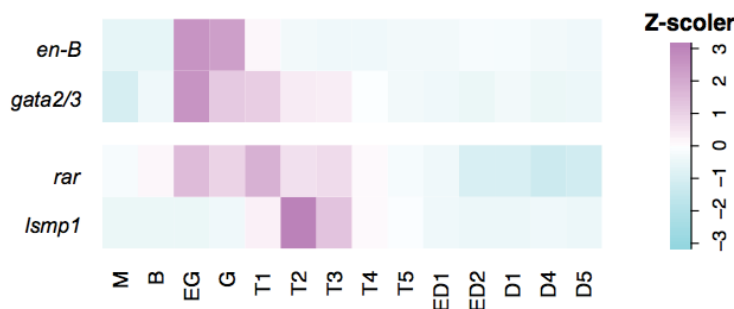


図1 マガキ(*C. gigas*)の初期発生における遺伝子の発現パターン。M, Morula, B, Blastula; EG, Early gastrula; G, Gastrula; T1, Trochophore 1; T2, Trochophore 2; T3, Trochophore 3; T4, Trochophore 4; T5, Trochophore 5; ED1, Early D-larva 1; ED2, Early D-larva 2; D1, D-larva 1; D4, D-larva 4; D5, D-larva 5.

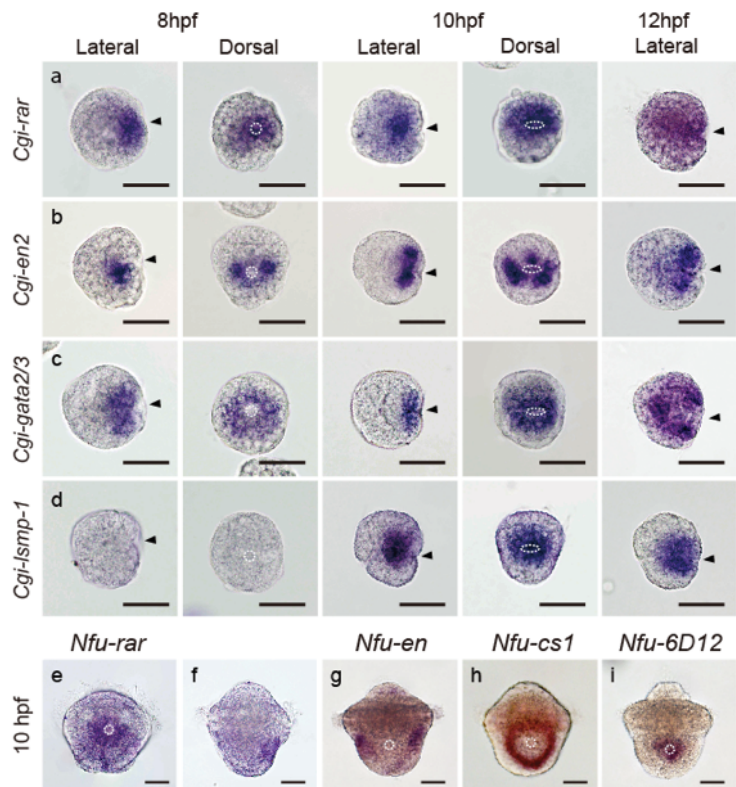


図 2 マガキ (*C. gigas*) およびクサイロアオガイ (*N. fuscoviridis*) の初期胚における遺伝子の発現パターン。a-d マガキ (*C. gigas*) の原腸胚後期 (8 hpf)、トロコフォア幼生 (10, 12 hpf)。e-i クサイロアオガイ (*N. fuscoviridis*) のトロコフォア幼生 (10 hpf)。e, g-i Dorsal view, f Lateral view. 矢尻・破線は Shell field invagination。スケールバーは 20 μ m。

(2) レチノイン酸受容体 (RAR) の機能解析 (ノックダウン)

中間報告ですでに報告したように、RAR の阻害剤 (Ro41-5253 or AGN193109) を飼育水に添加するとマガキ (*C. gigas*) の D 型幼生 (24 hpf) とクサイロアオガイ (*N. fuscoviridis*) のベリジャー幼生 (24 hpf) の貝殻が消失することを明らかにした。しかし、阻害剤による機能阻害実験は効果の特異性が必ずしも高くない。そこで、より遺伝子特異的な機能解析を行うために、クサイロアオガイ (*N. fuscoviridis*) の RAR の配列を元にモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を設計した。NfuRAR MO と Standard control oligo (Negative control) を蛍光色素 (Rhodamine B) と一緒にクサイロアオガイ (*N. fuscoviridis*) の受精卵にマイクロインジェクションによって導入した後、ベリジャー幼生 (24 hpf) の貝殻にどのような影響が見られるか観察した。その結果、control MO をインジェクションした胚ではほぼ完全な貝殻が形成されていたのに対し、NfuRAR MO をインジェクションした胚は貝殻が小さくなる、または完全に消失する表現型が観察された (図 3)。MO による遺伝子ノックダウンの結果は RAR の阻害剤による影響と整合性があり、RAR が巻貝と二枚貝の貝殻形成に非常に重要な核内受容体であることが明らかとなった。

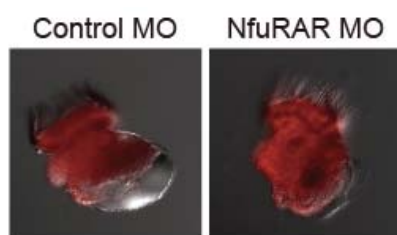


図 3 モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) による RAR のノックダウン。赤色は MO と一緒にマイクロインジェクションした Rhodamine B の蛍光を示しており、マイクロインジェクションによる MO の導入の確認をした。

しかし、脊椎動物の RAR のリガンドとして同定されている all-trans retinoic acid (atRA) が軟体動物や環形動物の RAR のリガンド結合ドメインに強く結合できないことが in vivo の結合実験によってすでに報告されている (Handberg-Thorsager et al., 2018; Vogeler et al., 2017)。そこで、atRA を合成するアルデヒドデヒドロゲナーゼ

(Aldh1a)の阻害剤である Diethylaminobenzaldehyde (DEAB)を使って阻害実験を行なった。その結果、マガキとクサイロアオガイの両種において表現型に顕著な影響が観察されなかった(図4)。この結果は軟体動物の RAR を活性化させるリガンドが脊椎動物で知られている atRA ではない可能性を示唆している。

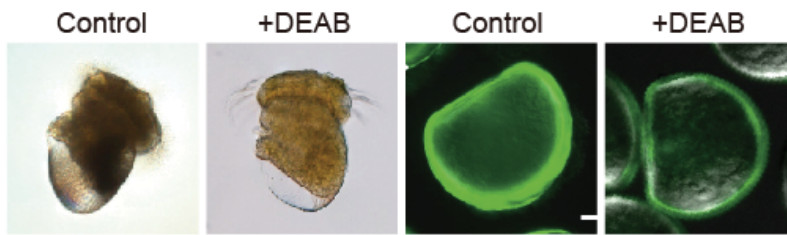


図4 DEAB 処理(10 μ M)による Aldh1a の機能阻害。クサイロアオガイとマガキの両種で顕著な影響は見られなかった。緑色はカルセイン処理による貝殻のラベリング結果を示す。

(3) レチノイン酸受容体(RAR)と atRA の結合活性解析

DEAB の処理実験によって軟体動物の RAR のリガンドが atRA ではない可能性が示唆された。そこで、すでに atRA と RAR の結合が報告されているゼブラフィッシュを用いて atRA によってシグナルが伝達されるかどうかを確認した。まず、マガキの RAR (CgiRAR) の配列からリガンド結合ドメイン(LBD)の領域を PCR によって増幅し、ゼブラフィッシュの RARab の LBD と取り替えることでキメラ DNA (DreRAR Δ CgiLBD)を作成した(図5a)。次に SP6 RNA polymerase を使って DreRARab、DreRAR Δ CgiLBD、CgiRAR の mRNA を合成し、ゼブラフィッシュの受精卵にインジェクションした。その後、atRA (0.1 μ M)で処理し、受精後 20 時間の表現型を観察した。その結果、何もインジェクションしていない胚(control)では atRA 処理によって頭部形成が阻害された(図5b, f)。また、DreRARab をインジェクションした後に atRA 処理を行なった胚では control の表現型よりも強く頭部形成と尾部形成が阻害された(図5c, g)。それに対し、キメラ RAR (DreRAR Δ CgiLBD) またはカキの RAR (CgiRAR) をインジェクションした後に atRA 処理を行なった胚では頭部形成が阻害されることはなく、むしろ control よりも正常に近い表現型が観察された(図5d, e, h, i)。

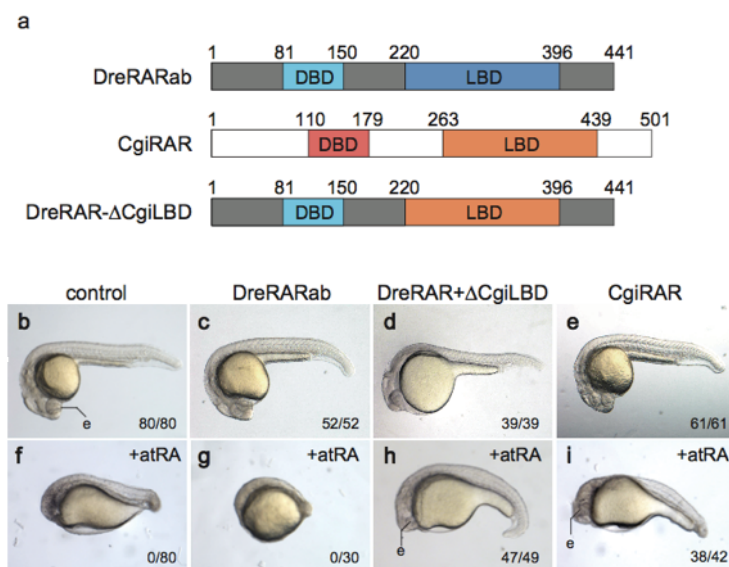


図5. ゼブラフィッシュを使った RAR と atRA の結合解析。
a 野生型の RAR およびキメラ RAR の模式図。DBD, DNA binding domain; LBD, Ligand binding domain. b-i RAR の過剰発現による胚への影響。e, eye.

次に、ゼブラフィッシュの RAR が直接制御することが知られている hox 遺伝子(*hoxb1*, *hoxb3*, *hoxb5*)と頭部のマーカー遺伝子である *pax2* の発現解析を行い、遺伝子発現の調節にどのような影響があるか調べた。その結果、キメラ RAR (DreRARab Δ CgiLBD)をインジェクションすると、hox 遺伝子が発現しない領域(頭部領域)がレスキューされることが確認された(図6)。また、*pax2* の頭部での発現についても確認することができた(図6)。これらの結果は、キメラ RAR (DreRARab Δ CgiLBD)は標的遺伝子の調節領域に結合することはできるが、atRA をシグナルとして受け取ることができないことを示唆して

いる。つまり、先行研究で報告されたように、軟体動物の RAR は atRA をリガンドとして結合させてシグナルを伝達することができないことを別の方法を用いて支持する結果となった。

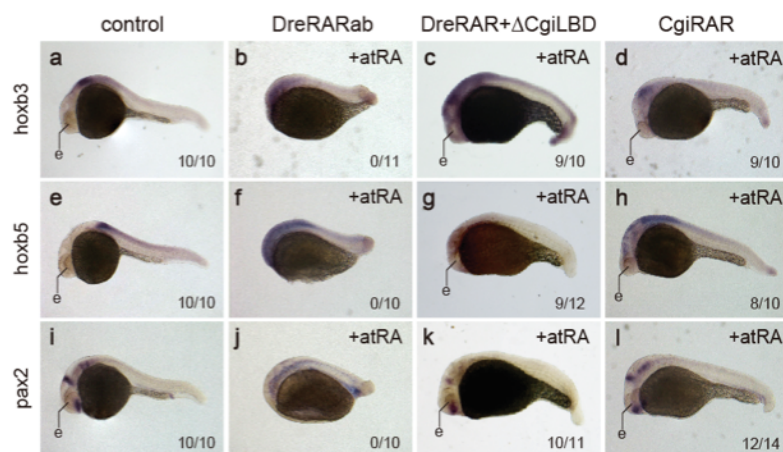


図 6 RAR の過剰発現による遺伝子発現への影響。DreRAR Δ CgiLBD または CgiRAR を過剰発現すると頭部の発現が回復する。e, eye.

(4) レチノイン酸受容体 (RAR) によって制御される遺伝子の探索

本研究で RAR が軟体動物の貝殻形成に非常に重要なことが明らかとなった。そこで、atRA または RAR 阻害剤 (Ro41-5253) で処理した胚でどのような遺伝子の発現が変化するかを明らかにするため、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行なった。その結果、RAR 阻害剤によって 846 個の遺伝子は発現量が減少しており、442 個の遺伝子は増加していた ($|\log FC| > 1$, $q < 0.05$)。それらの遺伝子の特徴を明らかにするためにドメイン構造のエンリッチメント解析 (DAVID) を行なった。すると、8 種類のドメイン構造 (dynein heavy chain domain, caveolin, EF-hand domain, homeodomain, G protein-coupled receptor, FAD/NAD (P) binding domain, and immunoglobulin) をもつ遺伝子が特異的に減少していることが明らかとなった ($p < 0.05$)。特に生物の形態形成に重要な役割を果たす Homeodomain を持つ転写因子や神経伝達物質の受け取りやシグナル伝達に重要な形成に重要な G protein-coupled receptor (G タンパク質共役受容体)、カルシウムイオンと相互作用することが知られる EF-hand などが含まれており、RAR は貝殻だけでなく軟体動物の初期発生に非常に重要な遺伝子である可能性が示唆された。次に、貝殻の炭酸カルシウム結晶内に取り込まれる有機物である貝殻基質タンパク質 (SMPs) をコードする遺伝子の発現に着目した。マガキ (*C. gigas*) の D 型幼生の貝殻に含まれる SMPs (111 個) は既に報告されている (Zhao et al., 2018)。しかし、これらの SMPs の中にはハウスキーピング遺伝子が多数含まれており、本当に貝殻形成に重要な役割を果たしているかは不明である。今回はマガキ (*C. gigas*) のゲノムデータ (Zhao et al., 2012) を元に 111 個の SMPsの中から様々な組織でユビキタスに発現する遺伝子 (RPKM > 1) を取り除き、29 個の SMPs に着目した。その中の 18 個 (62%) はトロコフォア幼生 (9.5 hpf) において比較的発現量が高いことが明らかとなった (FPKM > 10)。さらにその中の 12 個の遺伝子は RAR の阻害剤によって発現量が減少していた ($|\log FC| > 1$, $q < 0.05$)。興味深いことにこれらの SMPs の多くは NCBI のタンパク質データベース内に相同な配列が見られない種特異的なタンパク質であった (BlastP, e-value < $1E-5$)。その中の lsm1 と Tyrosinase の発現を確認したところトロコフォア幼生の貝殻領域 (SF) に限定されており、RAR 阻害剤によって発現ドメインが消失していた (図 7)。この結果から、RAR は貝殻基質タンパク質の発現を制御することで、貝殻形成に直接関与している可能性が示唆された。

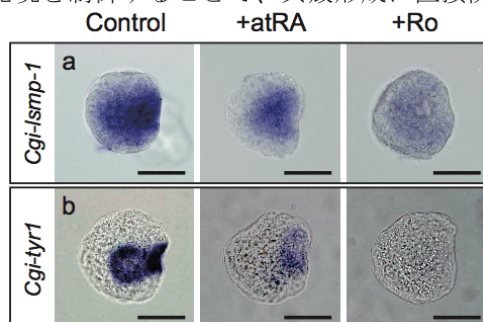


図 7 RAR 阻害剤による貝殻基質タンパク質の発現ドメインの消失。