

二枚貝における2枚目の貝殻獲得をもたらした分子機構の解明

小島 優音（筑波大学 生物学類） 指導教員：守野 孔明（筑波大学 生命環境系）

【導入】

軟体動物門は非常に多くの生物群を網羅する巨大な動物群であり、その外部形態は多様性に富んでいる。中でも二枚貝は2枚の貝殻を持ち、それらで柔らかい軟体部を覆うことで外敵から身を守り、繁栄してきた。二枚貝と比較的近縁で祖先形質である一枚の貝殻を持つ腹足類を比較すると、内部形態や発生初期の卵割パターン、割球運動などは似通っているが、貝殻の枚数は幼生の頃から既に違いが見られる。特に幼生期に背側に出現する貝殻腺領域の形態は大きく異なり、腹足類は楕円状である一方で、二枚貝はダンベル状であり、また、その正中線上にミネラリゼーションが起こらないと考えられる蝶番領域が存在する。このような貝殻腺形態、ひいては貝殻の形態の違いをもたらした分子発生プロセスの改変を解明するためには両者の貝殻腺の分子発生機構の丹念な比較が重要になってくる。二枚貝及び腹足類初期においては、貝殻腺領域は少なくとも3つの細胞領域に分かれることが知られている (Liu et al., 2020, Phuangphong et al., in prep; 図1)。しかし、腹足類・二枚貝類間におけるそれらの領域の対応関係は不明である。また、二枚貝の3つの細胞領域が貝殻形成後期におけるダンベル状の貝殻腺のどの領域を構成するのかも不明である。

本研究では、二枚貝・腹足類の貝殻腺形成初期における領域の比較、及び二枚貝における貝殻形成初期と後期における領域の対応関係の検証を目的とし、二枚貝における貝殻腺で発現する遺伝子群の発現パターンを観察し、その結果を腹足類の既知の細胞領域及び二枚貝の貝殻形成初期と後期間で比較した。

【材料と方法】

軟体動物二枚貝のムラサキインコガイ *Mytilisepta virgata* を茨城県平磯海岸で採集し、人工授精を行なった。受精によって得られた胚は、貝殻形成の初期 (12hpf) 及び後期 (16hpf) で固定した。これらの固定胚を用いて貝殻腺細胞で発現することが知られる遺伝子群の *in situ* hybridization を行ない、それぞれの遺伝子の発現パターンを観察した。具体的には転写因子として *Hox1*, *Hox4*, *MIST*, *Engrailed2 (En2)*, *GATA1/2/3*、シグナル分子として *Dpp*, ミネラリゼーションに関わる遺伝子として *CS*, *Tyrosinase (Tyr)* の発現を観察した。

【結果】

まず、腹足類・二枚貝類間の初期の領域を比較するために上記遺伝子の初期における発現パターンを観察した。先行研究において二枚貝類マガキの貝殻腺領域では *En2* が内側領域 (A/B) のマーカー、*GATA1/2/3* 及び *Dpp* が外側領域 (C) のマーカーとなっており、ムラサキインコガイにおいてもこれらのマーカー遺伝子の発現パターンを観察した結果、先行研究と同様にそれぞれ内側 (A/B) /外側 (C) の領域で発現していることが確認できた。続いて、上記遺伝子の発現を指標とし、腹足類の貝殻腺において内側 (A/B) で発現する *Hox1*, *Hox4*, *MIST*, *Tyr* 及び外側 (C) で発現する *CS* が二枚貝では内側/外側のどちらで発現しているのかを検証した。その結果、腹足類で外側の発現を示す *CS* は二枚貝でも外側(C)で発現し、腹足類で内側の発現を示す遺伝子群は内側

(A/B) で発現していた。

次に二枚貝の初期と後期での領域の対応関係を検証するために上記遺伝子の 16hpf 胚の発現パターンの観察を行った。初期に外側で特異的に発現した遺伝子群 (*CS*, *Dpp*, *GATA1/2/3*) はいずれも貝殻腺を縁取る領域 (iii) での発現が見られ、*CS*, *Dpp* については蝶番領域 (i) での発現も観察された。また内側に特異的に発現した遺伝子群のうち、*Hox1*, *Tyr* も貝殻腺を縁取る領域 (iii) での発現が見られた。一方で *MIST* は貝殻腺内部の一部 (ii) のみで発現が観察された。*En2*, *Hox4* は貝殻腺での発現が見られなかった。

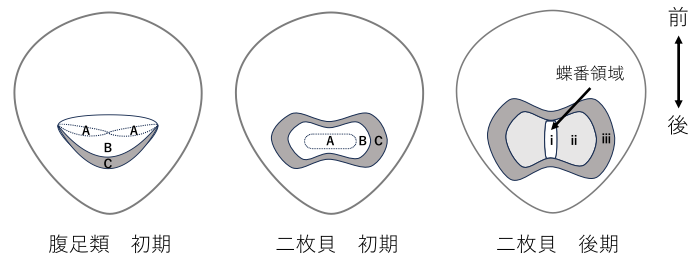


図1 腹足類初期及び二枚貝初期・後期における貝殻腺の形態

	Hox1	Hox4	MIST	En2	GATA1/2/3	Dpp	Tyr	CS
A/B	○	○	○	○	×	×	○	×
C	×	×	×	×	○	○	×	○
i	×	×	×	×	×	○	×	○
ii	×	×	○	×	○	×	×	×
iii	○	×	×	×	○	○	○	○

表1 二枚貝初期・後期における各遺伝子の発現パターン

【考察】

本研究の結果から、腹足類・二枚貝類の初期の貝殻腺領域において、いずれも *CS* は外側の領域、*Hox1*, *Hox4*, *MIST*, *Tyr* は内側の領域で発現していることが明らかとなった。このことは腹足類と二枚貝の発生初期の貝殻腺の内側 (A/B) と 外側 (C) の領域には対応関係があることを示唆する。ただし内側領域に含まれる2つの領域 (A/B) が両者で対応しているかどうかについては不明であり、より多数のマーカー遺伝子の発現を観察する必要がある。今後、この対応関係を基盤として、二枚貝と腹足類の貝殻腺発生プロセスの相違点を解明していく。

また、二枚貝の発生後期においては初期の発現パターンに関わらず多くの遺伝子が貝殻腺を縁取る領域での発現を示した。しかしこれらの発現が同所的なのか、いずれかの遺伝子が貝殻腺周縁のより外側/内側で発現しているかは不明である。今後二重染色等の手法を用いてより詳細な観察を行い、発現領域の区別を行う。また、近年公開されたマガキのシングルセル RNA-seq データの解析も組み合わせることでより正確な領域分けと領域ごとの分子的特徴付けを行っていくことで、貝殻腺のそれぞれの領域、特に蝶番がどのような遺伝子発現によって特徴付けられるかを解明することを目指す。

【引用文献】

1. Liu et al. (2020) Dev Genes Evol. Jan; 230(1), 39-45