



令和3年6月9日

## 動物の発生を司る Hox クラスターは 脊椎動物の進化過程で機能が多様化した

### 【概要】

埼玉大学大学院理工学研究科 生体制御学コースの山田一哉 大学院生と川村哲規 准教授を中心とする研究グループは、情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 前野哲輝 技術専門職員と共同で、動物のボディプランを規定する Hox 遺伝子クラスターが、マウスとゼブラフィッシュの間で多くの異なった機能をもつことを明らかにしました。Hox 遺伝子クラスターは、動物の体づくりの基盤となる役割を担う遺伝子群で、これまで進化的にも機能が高く保存されていると考えられていましたが、本研究結果は、脊椎動物の進化の過程の新しい側面を示すものとなります。この研究成果は、国際科学誌「Development」に6月7日付のオンライン版で掲載されました。

### 【研究内容】

Hox 遺伝子群は、動物のからだの体軸に沿った様々な形づくりの基盤となる重要な役割を担います。Hox 遺伝子群は、特定の染色体に複数の Hox 遺伝子が一列に並んだ Hox クラスターを形成しているのが一つの大きな特徴です(図1)。Hox 遺伝子群の重要性を端的に表すのは、ショウジョウバエの Hox 遺伝子であるホメオティック遺伝子群の変異体で、ホメオティック遺伝子のひとつに突然変異が生じると、ショウジョウバエの触覚が別の脚に置き換わってしまう異常が生じてしま

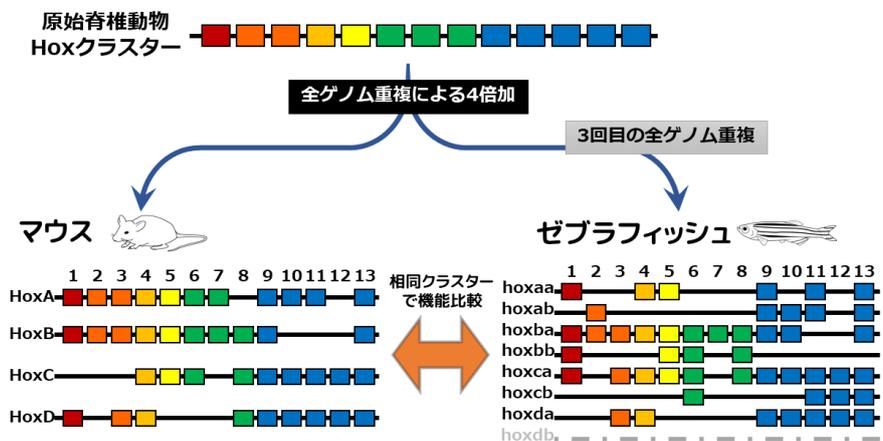


図1. 脊椎動物の進化におけるHoxクラスターの重複

脊椎動物の進化初期にHoxクラスターは4つに分岐した。その後、マウスでは4つのHoxクラスターを維持している。一方、真骨魚類では再度分岐し、ゼブラフィッシュは7つのhoxクラスターをもつ。

ます。このように Hox 遺伝子群は動物において広く保存され、動物の形態形成を司る基盤的な役割を担っていることが分かっています。ヒトを始めとする脊椎動物では、進化の初期段階(約5億年前)に生じた2回の全ゲノム重複により、単一であった Hox クラスターは4つの Hox クラスターへ分岐しました(図1)。その後、一部の Hox 遺伝子は失われたものの、マウスやヒトでは4つの Hox クラスター(HoxA, HoxB, HoxC, HoxD)がそれぞれ別の染色体に存在し、合計39個の Hox 遺伝子が保持されています。一方、真骨魚類では3度目の全ゲノム重複が生じ、さらに



大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構  
国立遺伝学研究所

Hox クラスターが倍加しました。本研究で用いた小型熱帯魚のゼブラフィッシュでは、一つの Hox クラスターは消失しましたが、合計 7 つの Hox クラスターが存在し、48 個の Hox 遺伝子が存在しています。脊椎動物 Hox 遺伝子の機能について、これまでマウスでの研究が主流であり、39 個あるマウスの Hox 遺伝子のほぼ全てについて、機能を欠失したノックアウトマウスが作製され、解析が行われてきました。しかしながら、マウスで得られた研究成果が、脊椎動物の間で同様に当てはまるのかについては、カエルや魚などを用いて一部の Hox 遺伝子について研究が実施されていましたが、Hox 遺伝子全般については不明のままです。Hox 遺伝子の機能が脊椎動物の進化の過程で保存されているかを検証する上で、マウスと進化的に離れている魚類が最適です。しかしながら、ゼブラフィッシュには 48 個の Hox 遺伝子が存在します。数が多いため、各々の Hox 遺伝子の機能を明らかにし、全体像を比較することはとても難しいと考えられます。そこで、本研究では、脊椎動物の Hox 遺伝子は、Hox 遺伝子のみから構成される遺伝子クラスターを形成するという特徴に着目し、ゼブラフィッシュに存在する 7 つの Hox クラスターの両端をゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 法により同時に切断し、Hox クラスター全域を欠失させた変異体を作製することで、Hox クラスター単位の機能比較を試みました(図2)。その結果、ゼブラフィッシュの Hox 遺伝子 48 個全てを網羅する 7 つの Hox クラスター欠失変異体の作製に成功し、さまざまな発生過程における役割を網羅的に解析し、すべてカタログ化しました。また、7 つの Hox クラスター欠失変異体のうち、成魚まで生存した 5 つについては、X 線マイクロ CT スキャンを用いて、成魚における全身骨格や臓器などの軟部組織について詳細な解析を行いました。

今回、得られた成果から、マウスとゼブラフィッシュの相同な Hox クラスター間で機能が異なる点が多く見出されました。具体的には、ゼブラフィッシュの 7 つの Hox クラスター欠失変異体のうち、*hoxba* クラスター欠失変異体が後脳、胸びれ、

下顎骨格や側線の形成に異常を示し、最も重篤であることが分かりました。重要なことに、マウスの *HoxB* クラスターを欠失した変異体では、後脳に異常を示すという共通点は認められますが、ゼブラフィッシュの *hoxba* クラスター欠失

変異体で観察された後脳以外の異常に関しては報告されていません。また、*HoxD* クラスター全域を欠失したマウスでは、四肢の形成異常や頸椎の癒合などが観察されます。しかしながら、ゼブラフィッシュで相同な *hoxda* クラスターを欠失した場合には、胸ひれや腹ひれ(四肢の相同器官)に異常は認められず、脊椎骨も正常に形成されていることが分かりました。さらに、ゼブラフ

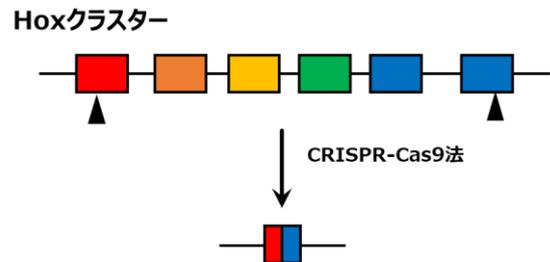


図2. CRISPR-Cas9によるHoxクラスター全域の欠失  
CRISPR-Cas9法を用いて、Hoxクラスターの両端をターゲットとするgRNA(矢じり)を受精卵に導入し、Hoxクラスター全域を欠失させた変異体を作製した。

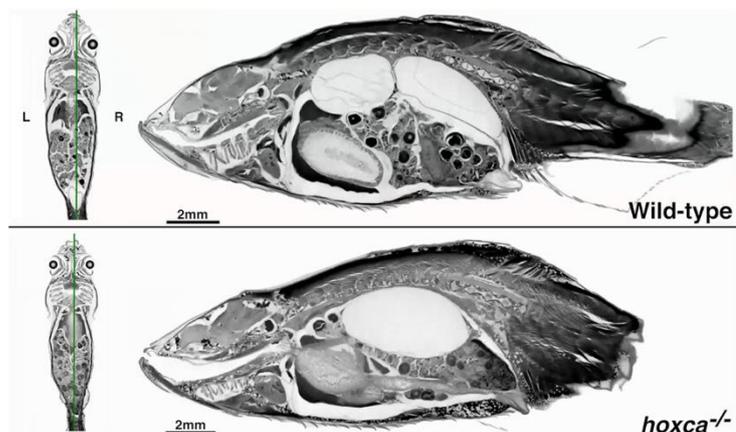


図3. *hoxca*クラスター欠失変異体における浮き袋の形成異常  
成魚の軟組織をX線CTスキャンにより解析した結果、野生型では浮き袋が2つ観察されるが、*hoxca*クラスター欠失変異体では1つのみであった。

イッシュ *hoxca* クラスター欠失変異体では、魚類に特有の構造である浮き袋の形成に異常が生じることが判明しました(図3)。また、ゼブラフィッシュなどのコイ科やナマズ科の魚などから構成される骨鰾類は、優れた聴力をもつ魚として有名で、ウェーバー器官と呼ばれる聴力増幅を担う骨格を独自に発達させています。X線マイクロCTスキャンを用いた解析から、*hoxca* クラスター欠失変異体でウェーバー器官の骨

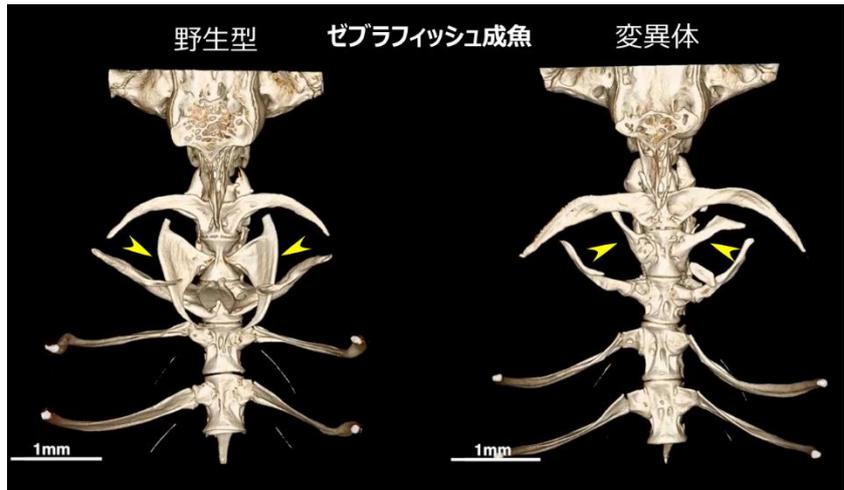


図4. *hoxca*クラスター欠失変異体におけるウェーバー器官形成異常  
 X線CTスキャンにより、成魚の頭部側の骨格を腹側から解析した結果、扇型の骨tripus(矢じり)の形成異常が観察された。

が著しく乱れることが分かりました(図4)。これらの結果から、*hoxca* クラスターは、魚類の進化過程で魚類特有の機能を新たに獲得したことが示唆されました。

Hox クラスターは、動物の発生において極めて重要な基盤的な役割を担うことから、実験を開始した当初は、「同じ脊椎動物であるゼブラフィッシュとマウスの Hox クラスターの機能は類似しているであろう」と想定していました。しかしながら、この予想に反して、ゼブラフィッシュとマウスにおいて機能的な相違が多く見出されました。本研究から導き出されることとして、脊椎動物の Hox クラスターは約 5 億年前に 4 つに分岐した後、独自の進化の過程で異なる機能分担化、そして新機能を獲得し、機能が多様化したことが示唆されます。しかしながら、作製したゼブラフィッシュの変異体は Hox クラスター全体を機能欠失させたため、具体的にクラスター内のどの Hox 遺伝子が違いを生じさせているかについては不明です。そのため、今後、ゼブラフィッシュにおいて各 Hox 遺伝子の機能を明らかにし、その違いを生じさせた原因を明らかにすることが課題です。また、ゼブラフィッシュは 3 回目の全ゲノム重複を経ているため、マウスやヒトが有している Hox クラスターがさらにもう一回、分岐した状態にあります。分岐した Hox クラスターを同時に欠失させたゼブラフィッシュの変異体を作製し、マウスの知見と比較することで、脊椎動物の進化に伴って、Hox クラスターの機能がどのように変遷したのか明らかになることが期待されます。

#### 【論文情報】

掲載誌 Development  
 論文 **An atlas of seven zebrafish *hox* cluster mutants provides insights into sub/neofunctionalization of vertebrate *Hox* clusters**

著者名 Kazuya Yamada\*, Akiteru Maeno\*, Soh Araki, Morimichi Kikuchi, Masato Suzuki, Mizuki Ishizaka, Koumi Satoh, Kagari Akama, Yuki Kawabe, Kenya Suzuki, Daiki Kobayashi, Nanami Hamano, and Akinori Kawamura  
 山田一哉\*, 前野哲輝\*, 荒木 颯, 菊地守道, 鈴木聖人, 石坂瑞樹, 佐藤こうみ, 赤間 耀, 河部友貴, 鈴木賢弥, 小林大貴, 浜野七海, 川村哲規  
 (\* these authors contributed equally to this work)



大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構  
国立遺伝学研究所

<https://journals.biologists.com/dev/article-abstract/148/11/dev198325/269044/An-atlas-of-seven-zebrafish-hox-cluster-mutants>

**【作製したゼブラフィッシュ hox クラスター欠失変異体について】**

作製した hox クラスター欠失変異体は、全ての系統を National BioResource Project (ゼブラフィッシュ) に寄託しています。ゼブラフィッシュの発生などにおける Hox 遺伝子群の機能解析として、利用することが可能です。

**【研究に関する問合せ先】**

・埼玉大学大学院理工学研究科 生命科学系専攻 生体制御学コース

川村哲規 准教授

・国立遺伝学研究所

前野哲輝 技術専門職員