

論文の内容の要旨

Developmental Mechanisms and Evolution of Shell Formation in Mollusca

(軟体動物における貝殻形成の発生メカニズムと進化)

清水 啓介

生物の多様な形態は長い時間をかけて進化してきた。そして、化石は生物が進化してきたことを示す唯一の直接的証拠であり、化石を用いることで現生の生物からは推定することができない形態進化の変遷を復元することができる。軟体動物の貝殻は化石記録が豊富であるため、その形態進化に着目した進化古生物学的な研究は古くから行われてきた。しかし、実際の進化は発生プロセスの進化であり、化石として残る形態情報からだけでは形態進化の至近要因に迫ることは難しい。そこで、現生の貝類の貝殻形成および成長の発生プロセスに着目することで、貝殻の形態進化をもたらす分子メカニズムを明らかにし、化石を含む貝殻の多様な形態進化を理解することを目的とし、以下5つの研究を行った。

まず初めに、巻貝の貝殻形成の分子メカニズムと進化を明らかにするため、淡水棲巻貝の

右巻種であるタケノコモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) の *decapentaplegic* (*dpp*) の 遺伝子発現解析と **Dpp** のシグナル阻害剤を用いた機能解析を行った (第二章)。遺伝子 *dpp* は、モノアラガイのトロコフォア期に貝殻の初期形成を担う貝殻腺の右側でのみ発現することが知られている (Iijima et al. 2008)。今回は新たにベリジャー期における発現解析を行った結果、貝殻の後期成長を担う外套膜の右側の局所部分で発現していることを明らかにした。また、貝殻形成が開始されるトロコフォア期やベリジャー期において、**Dpp** のシグナル阻害剤ドルソモルフィンによる機能阻害実験を行なった結果、貝殻が巻かずに円錐形の貝殻を持つ奇形が得られた。これらの結果は、**Dpp** の濃度勾配が貝殻の成長勾配を生み出し、外套膜上での *dpp* の発現パターンの変化が貝殻形態の進化を引き起こしている可能性を示唆している。

次に第三章では、貝殻の螺旋成長の進化を引き起こす発生メカニズムを探るため、貝殻が螺旋状に巻くタケノコモノアラガイ (*L. stagnalis*) の右巻 (野生系統) と左巻 (変異系統)、また、笠型の貝殻を持つセイヨウカサガイ (*Patella vulgata*) とクサイロアオガイ (*Nipponacmea fuscoviridis*) の様々な発生段階における *dpp* の発現解析を行い、それらの発現パターンを比較した。その結果、貝殻腺だけでなく外套膜においても、*dpp* がモノアラガイの右巻では右側、左巻では左側で発現するのに対し、笠型のセイヨウカサガイおよびクサイロアオガイでは左右対称に発現していることを明らかにした。さらに、**Dpp** シグナルの下流で働くリン酸化 **SMAD** (p**SMAD**) の発現解析を行なった結果、タケノコモノアラガイの右巻では外套膜の右側で、左巻では左側で強く発現す

るのに対し、セイヨウカサガイでは左右で発現量に差が見られなかった。これらの結果から、外套膜上での *dpp* の発現パターンを左右非対称から左右対称へと変化させるような発生システムの変更によって外套膜の成長パターンが変化し、巻貝の貝殻形態を螺旋型から笠型への進化を引き起こしている可能性が示唆される。

螺旋型の貝殻形態は巻貝だけではなく、アンモナイトやオウムガイを含む頭足類においても進化した形質のひとつである。そこで第四章では、現生で唯一の外殻性頭足類のオウムガイ (*Nautilus pompilius*) を用いて、巻貝の螺旋成長に重要な Dpp の下流で働くリン酸化 SMAD (pSMAD) の発現解析を行なった。その結果、前後方向に螺旋成長をするオウムガイの成体外套膜において pSMAD が前方で強く発現しており、Dpp シグナルの分布パターンが貝殻の成長勾配のパターンと一致していることが明らかとなった。Dpp の発現パターンが腹足類だけでなく、頭足類においても貝殻の成長パターンと一致していることから、腹足類と頭足類の共通祖先ですでに貝殻成長における Dpp の機能が獲得されていたことが示唆される。また、外套膜における Dpp シグナルの濃度勾配で生み出された貝殻の成長勾配のパターンの変更により、絶滅種であるアンモナイト類などの多様な貝殻形態の進化が引き起こされていた可能性が示唆される。

次に第五章では、貝殻の初期形成の分子メカニズムに着目する。ホメオティック遺伝子のひとつである *engrailed* は貝殻腺で発現することが軟体動物の多くの分類群において既に報告されており、貝殻形成領域の決定に重要であることが示唆されてきたが、実際の機能は不明である。

そこで、ホメオティック遺伝子を制御していることが期待されるレチノイン酸経路に関わる3つの遺伝子、レチノイン酸合成酵素(*aldh1a*)、レチノイン酸分解酵素(*cyp26*)、レチノイン酸受容体(*rxr*)を同定した。また、セイヨウカサガイ(*P. vulgata*)のトロコフォア期・ベリジャー期において *cyp26* の発現解析を行った結果、貝殻腺と外套膜の縁辺部での発現が確認された。さらに、クサイロアオガイ(*N. fuscoviridis*)の初期胚にレチノイン酸またはレチノイン酸阻害剤で処理を行なった結果、貝殻腺で発現するホメオティック遺伝子である *engrailed* の発現が抑制され、貝殻が小さく、石灰化が起こらない表現型が観察された。これらの結果は、レチノイン酸経路が発生初期の形態形成を上流で制御するホメオティック遺伝子 *engrailed* を制御することで、軟体動物における貝殻という新規形質の獲得に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

最後に、軟体動物における貝殻形成に重要な遺伝子である *dpp* を含むシグナル分子 TGF- β スーパーファミリーの進化プロセスを明らかにするため、近年明らかになった二枚貝類のアコヤガイ (*Pinctada fukata*) のゲノム情報から TGF- β スーパーファミリーに含まれる遺伝子の同定を行った。その結果、これまでショウジョウバエや線虫といった前口動物のモデル生物では見つからなかった TGF- β スーパーファミリーの遺伝子 (BMP3、BMP9/10、Nodal) を発見した。さらに、この結果と後口動物のゲノム情報をもとに、前口動物と後口動物の共通祖先における TGF- β スーパーファミリーの遺伝子セットの復元を行った結果、軟体動物には前口動物の祖先に近い遺伝子セットを保持していることが明らかとなった。今回得られた結果は、軟体動物の貝殻形成と進化

の理解だけでなく、冠輪動物のボディープランの進化を理解する上で非常に重要である。

Abstract

The variety of morphology in animals or plants has evolved with very long-term, and fossil records are the only direct evidence of their evolutionary processes. Although the morphological diversity is produced by developmental process, it is difficult to find out only from fossil form. In Mollusca, their various shell shapes have evolved ever since the Cambrian, but their developmental processes remain unclear. In order to understand how various shell shapes are formed and have evolved in Mollusca, I sought to reveal the molecular basis of initial shell formation and late embryonic shell growth using living species as following five topics.

Firstly, I examined *decapentaplegic (dpp)* expression patterns in pond snail *Lymnaea stagnalis*, and analyzed the functions of *dpp* using the Dpp signal inhibitor dorsomorphin in order to understand developmental mechanisms and evolution of shell formation in gastropods in chapter 2. The *dpp* gene is expressed in the right half of the circular area around the shell gland at the trochophore stage and at the right-hand side of the mantle at the veliger stage in the dextral snails. Two types of shell malformations were observed when the Dpp signals were inhibited by dorsomorphin. When the embryos were treated with dorsomorphin at the 2-cell and blastula stages before the shell gland is formed, the juvenile shells grew imperfectly and were not mineralized. On the other hand, when treated at the trochophore and veliger stage

after the shell gland formation, juvenile shells grew to show a cone-like form rather than a normal coiled form. These results indicated that *dpp* plays important roles in the formation and coiling of the shell in this gastropod species.

Second in chapter 3, I compared expression patterns of the *dpp* gene in the shell gland and mantle tissues at various developmental stages between coiled-shell and non-coiled-shell gastropods. I analyzed the expression patterns of *dpp* for the two limpets *Patella vulgata* and *Nipponacmea fuscoviridis*, and for the dextral wild-type and sinistral mutant lineage of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. The limpets had symmetric expression patterns of *dpp* throughout ontogeny, whereas in the pond snail, the results indicated asymmetric and mirror image patterns between the dextral and sinistral lineages. I hypothesize that Dpp induces mantle expansion, and the presence of a left-right asymmetric gradient of the Dpp protein causes the formation of a coiled shell. These results provide a molecular explanation for shell coiling including new insights into expression patterns in post-embryonic development, which should aid in understanding how various shell shapes are formed and have evolved in the gastropods.

In chapter 2 and 3, I focused on the molecular basis of shell coiling in gastropods. However, coiled shell morphologies have evolved not only in gastropods but also in cephalopods like Ammonoides and Nautililods. In chapter 4, thus, as a first step to understand the molecular mechanism of shell coiling in cephalopod, I therefore focused on Dpp expression pattern in the mantle of Nautilus and sought to compare

their patterns between gastropod and cephalopod. I revealed that a Dpp signal gradient indeed exists in the mantle edge of the coiled-shell and its gradient is anterior-posterior asymmetrically by western blotting. This distribution pattern of Dpp signals corresponds with their shell growth gradient pattern like gastropod's results. Although coiled shell morphologies have evolved independently in gastropod and cephalopod lineages, spiral shell growth is regulated by same molecular system, left-right or anterior-posterior asymmetric expression of Dpp signals.

Next in chapter 5, I sought to understand the role of homeotic gene *engrailed* in early shell development by focusing on retinoic acid signal pathway. I examined the expression pattern of RA degradease *cyp26* in the limpet *Patella vulgate*, and found that *cyp26* expressed around the edge of shell filed. As results of gain or loss of functional analysis of RA, shell deformations were observed and their shells were failed to calcification too. While I revealed that *engrailed* is regulated by RA and this result suggested that the modesty-concentration of RA regulates the expression of *engrailed*, and *engrailed* determines the boundary delimitation of the area forming the shell and regulate a part of the genes' expression are related with shell formation. This new insight provided evolutionary hypothesis that the common ancestor of Mollusca likely used RA signaling system to make novel phenotypic traits that is called "shell" by regulating the expression of homeotic gene *engrailed*.

Finally, I sought to annotate the TGF superfamily genes are belonging to signal molecules using

full genome sequence information of pearl oyster *Pinctada fucata* in chapter 6. Recently, its draft genome was determined, and many experimental tools are being developed. In this chapter, I reported the result of genomic survey on developmental signaling molecule coding gene families, TGF- β superfamily. I found most of the representative genes of major signaling pathway involved in axial patterning, as well as copies of the signaling molecule paralogs. By doing phylogenetic character mapping, I also deduced a possible evolutionary scenario of the signaling molecules in the protostomes, and reconstructed the possible copy number of signaling molecule-coding genes in the ancestral protostome. This ancestral reconstruction suggested a possibility that *P. fucata* retains the ancestral protostome conditions, giving further justifications to utilize this animal as a model organism for understanding molluscan shell developmental mechanisms.