

淡水産巻貝 *Lymnaea stagnalis* の巻型を決める 1 個の遺伝子 *Lsdial* の機能を探る : 正常発生への影響

黒田玲子

Exploring the functions of the handedness-determining single gene *Lsdial* in freshwater snail *Lymnaea stagnalis*: influence on the normal development

Reiko Kuroda

The establishment of left-right body asymmetry is a key biological process which is tightly regulated genetically. We have revealed unequivocally that the shell coiling direction and internal soft-body chirality of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* are determined by the single maternal diaphanous-related formin gene, *Lsdial*. There are tandemly repeated homologous genes, *Lsdial* and *Lsdia2* in this species. By knocking out the *Lsdial* gene of the dextral snail embryos using the CRISPR/Cas9 genome-editing technique, we could create sinistrally-coiled offspring generation-after-generation, in the otherwise totally-dextral genetic background. The target site for genome editing was chosen in the FH1 domain (496-566) of the protein, almost in the middle. By contrast, sinistral strains in the wild (recessive and only 2%) possess a point mutation c 184delC in the GBD domain (1-95) in the N-terminal region of the protein. The phenotypes of embryos at different developmental stages were compared. Interestingly, the two sinistral lines (wild-type and genome-edited) show differences in the ratio of embryos that develop into adult snails. The lower ratio seen for the CRISPR/Cas9-edited line seems to be associated with the mutant LsDia1 protein which as a consequence of editing has ca. 60 altered amino acids in the FH1-FH2 domains and is then truncated. These aspects are discussed in terms of the protein 3D structure.

Keywords : body handedness, diaphanous-related formin, *Lymnaea stagnalis*

1. はじめに

動物の外観は多くの場合左右相称であるが、各種臓器の配置やねじれた形態で代表される体内構造は左右非対称である。形態形成は遺伝子レベルで厳密に制御されている。近年、モデル生物を中心に、左右形態形成メカニズムの研究が進み、徐々にその詳細が分子レベルで明らかにされつつある。脊椎動物においては左側側板中胚葉における *Nodal-Pitx2* シグナル伝達経路の活性化が共通した左右性形成メカ

ニズムと考えられているが^{1), 2)}, それを引き起こすメカニズムは生物により多様である。そもそも、最初に左右対称性が破られるのはいつで、どのようにして行われるのかについては、明らかになっていない。生物種により多様なメカニズムがあるようにも見えるが、種によって異なる対称性の破れのタイミングやメカニズムの根底には種を超えた普遍的なメカニズムが存在するかもしれない。これらの研究に一石を投じたのが、モデル生物ではない淡水産巻貝 *Lymnaea (L.) stagnalis* (ヨーロッパモノアラガイ) を対象とした我々の研究である。

この巻貝は、左右性研究の対象として他の生物にはない優れた特徴を複数持っていることに着目し、長年研究を行ってきた。同一種に右巻貝(優性, 約 98%)と左巻貝(劣性, 約 2%)がいる。体内だけではなく体外構造も左右性を示すので、左右性の観察が容易である。雌雄同体で自家受精と他家受精の両方を行うので遺伝学研究がやりやすい。巻貝の左右巻型が遺伝子によって決まっていることは 1920 年代から報告されていた。Sturtevant³⁾と Diver⁴⁾は *L. peregra* (ソトモノアラガイ) の交配実験を行い、巻型が母親の 1 個の遺伝子型に依って決まっていることを報告した。ただし、この時代はまだ DNA の構造が発見される前で、“メンデルの遺伝子”の範疇にとどまる。我々は、*L. stagnalis* を対象に 10 世代までに及ぶ連続戻し交配実験を行い、巻型が遅滞遺伝すること、現代の遺伝子の定義においても 1 遺伝子座にコードされる巻型決定遺伝子によって決まっていることを実証した⁵⁾。

さらに、長年にわたる BAC ライブラリー作成、ポジショナルクローニング、AFLP マーカー作製によって、巻型と関連したゲノム領域を狭めて 15 個の遺伝子に絞った。その中から母性遺伝子であり、アクチン骨格形成に関与している 5 個の遺伝子の配列を右巻貝と左巻貝で比較した。その結果、遺伝子配列に違いがある遺伝子を 1 個見つけることができた⁶⁾。巻型決定遺伝子の有力候補である。フォルミンという大きなファミリーを形成する Diaphanous-related formin (Dia) タンパク質をコーディングする遺伝子で、*Lsdia1* と名付けた。相同性の高い二つの遺伝子、*Lsdia1* と *Lsdia2* とがタンデムに並んでいる。左巻貝では、このうち、*Lsdia1* 遺伝子に点突然変異があり、タンパク質が作られなくなっていたのである⁶⁾。

しかし、この段階ではまだ巻型決定遺伝子の“候補”に過ぎず、他にも遺伝子があるか、あるいは複数の遺伝子が左右性決定に関与しているかもしれない。そこで、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集で、右巻胚のその一つの遺伝子だけをノックアウトしてみた。その結果、驚くべきことに、完全に右巻貝の遺伝的背景を持つ胚が、代々左巻に変わった。両方の対立遺伝子にフレームシフト変異があると左巻になるという、クリアな結果を得た。⁷⁾ 我々は、未分割受精卵時に既に左右性が決定されていることも明らかにした。⁷⁾ 巻型決定遺伝子 *Lsdia1* とそのホモログ遺伝子 *Lsdia2* の両方のタンパク質が存在すると右巻に、*LsDia2* だけになると左巻になるというのは驚くべき結果である。一個の遺伝子が、受精卵の左右性に始まり、生物の階層を超えて、マクロレベルでの生物個体の左右性まで決めていているということは、大変に興味深い。^{5), 8)} 未分割受精卵のキラリティーとは何で、どのようにして巻型決定遺伝子産物 *LsDia1* によって構築されているのだろうか? 分子間相互作用で生じるキラリティーを明らかにするには、*LsDia1* の構造と機能を明らかにする必要がある。今回、ゲノム編集によってできた左巻貝の正常発生率が天然由来の左巻系統と比べてかなり低いことに着目し、その観点から当該蛋白質の機能を探ることとした。

2. *LsDia1* knock out 貝の異常発生率

CRISPR/Cas9 ゲノム編集の PAM 配列およびターゲット配列は FH1 ドメインに設計した。⁷⁾ ここ以外、*Lsdia1* と *Lsdia2* 遺伝子配列に差がなく、選択的ノックアウトができないからである。Fig. 1A に *LsDia1* および *LsDia2* 蛋白質のドメイン構造を比較してある。天然に棲息している左巻貝は N 端の GBD ドメインに点突然変異がある。

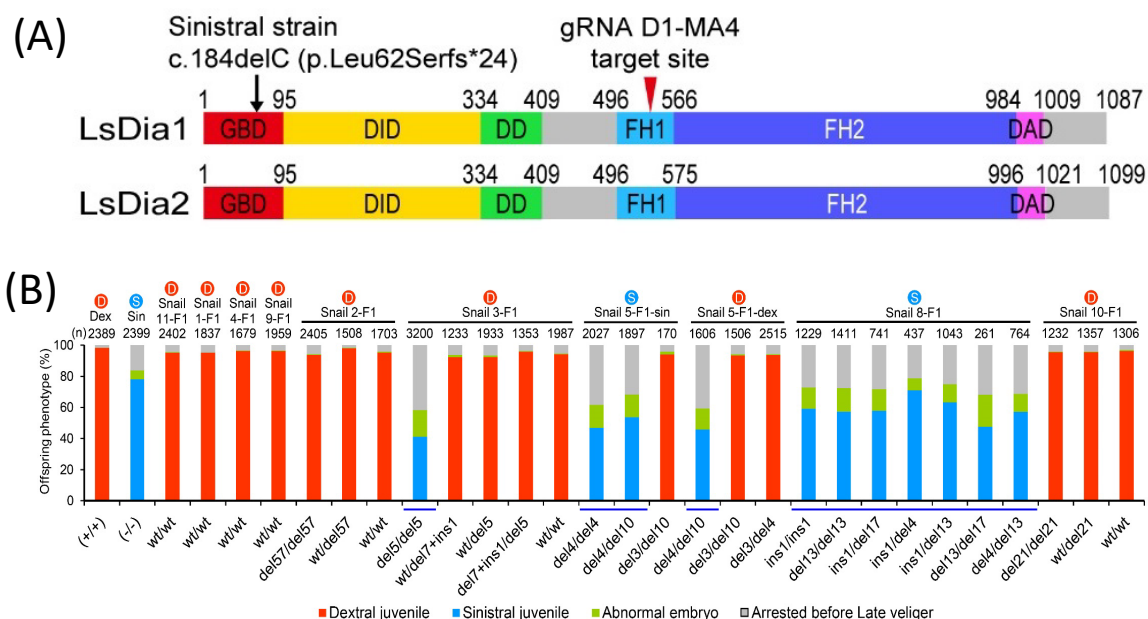


Figure 1A. Domain structures of LsDia1 and LsDia2. The target site of the CRISPR/Cas9 knockout and the mutation site of the sinistral strain in the wild are indicated. 1B. Bar chart of offspring (F2) phenotype checked at the juvenile stage for each F1 genotype (bottom of the bar chart), including wild-type Dex (+/+), Sin (-/-), control (snail 11), and non-edited F1 (snails 1, 4, 9). The total number of embryos studied (n) is shown on the top of each bar graph.⁷⁾

ゲノム編集によって導入された変異には, del 3, del 21, del 57, del 7 + ins 1, del 4, del 5, del 10, del 13, del 17, ins 1があった. F1から自家受精で生まれたF2世代の貝の左右性を, その親F1の genotypeによって分類し Fig. 1Bにまとめている.⁷⁾ Frameshiftを起こさない変異が少なくとも一方の対立遺伝子にあれば右巻の貝であった. たとえ57塩基, つまり19アミノ酸残基が失われても frameshiftを起こさなければ右巻の貝となった. 一方で, 両方の対立遺伝子が frameshiftを起こす変異になっている個体は例外なく左巻の個体になった. CRISPR/Cas9により導入された frameshift mutationの genotypeによらず, 天然由来の左巻貝よりも正常発生率が低かった. late veliger期より前に発生が止まる例が多く観察された (Fig. 1B)⁷⁾. 異常発生の頻度は genotypeによって大きくは変わらなかった. そこで正常発生率の低さの原因を探るために変異 del5/del5に対して発生過程を詳細に観察した. 現在, F11-F13世代になっているが, 右巻貝F0で Lsdia1遺伝子を1個ノックアウトして作成した左巻貝の子孫は左巻系統となっており健在である.

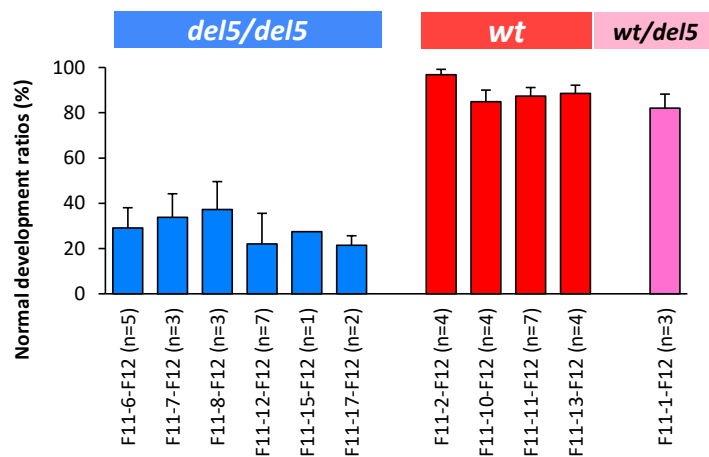
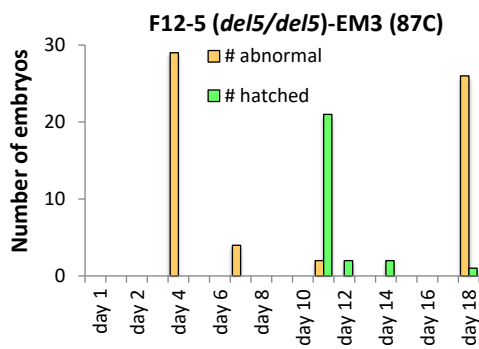


Figure 2. Normal development ratios of F12 (%) averaged for egg masses laid by each F11 snail.

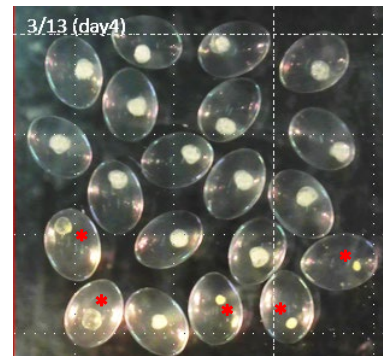
Fig. 2 に、同じ 1 匹の親 (F10, wt/del5) から生まれた F11 が産んだ複数の EM (egg mass, 卵塊, F12 世代) の正常孵化率の平均値を、親貝 F11 毎にまとめている。EM によるばらつきは小さかった。一つの卵塊には、1 個の胚が入ったカプセルが通常 60–90 個入っている。同じ親から生まれた F11 であるが、F11 の遺伝子型に依存して F12 の正常発生率が異なった。wt/del5 は wt 型に近い高い正常発生率を示した。

Fig. 3A には産卵後の経時変化を示した。F12-5 (del5/del5) の EM3(F13)には 87 個の胚がそれぞれのカプセル内に入っていた。このうち、正常に発生し左巻となった胚は、天然由来の左巻貝と同様に 11 日目から孵化し始めた。1 胚だけ 18 日目になって孵化した。これらはその後も順調に成長した。緑色のバーで孵化数を示してある。オレンジ色のバーは新たに発生異常が観察された数を、観察した日ごとに表している。Day4 における胚の写真を、異常胚にはアスタリスクを付けて Fig. 3B に示した。発生が進行せず小さいまま、あるいは水膨れとなったものが、この時期に既に見られた。

(A)



(B)



(C)

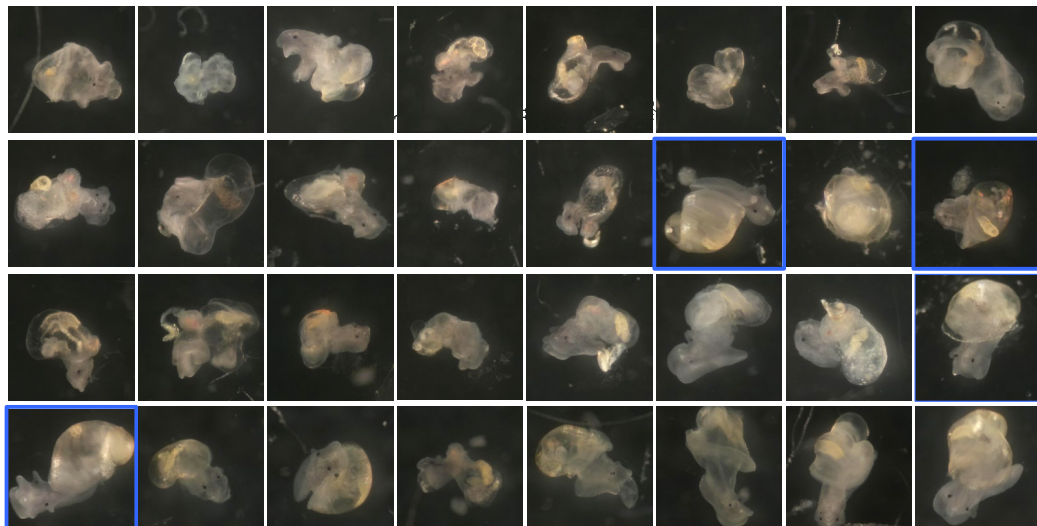


Figure 3. (A). Bar chart showing the number of embryos hatched normally (green) and number of abnormal development observed (orange) on the day after being laid. There was a total of 87 eggs (capsules) in EM3 of F12-5 (del5/del5). (B) Photographs of the embryos at day 4. Embryos marked with an asterisk were noted as abnormal: development stopped and stayed at a small size or blistered. (C) Photographs of abnormally shaped embryos which survived and were taken out of their capsules at day 21. All were alive for some time but eventually died.

バク質には自己活性制御機能がある。通常、自己分子内で N 末端側の DID ドメインと C 末端側の DAD ドメインが相互作用することで自己抑制型構造を形成しており、アクチン重合と微小管構造の制御に関与する FH1 ドメインと FH2 ドメインの機能を立体構造的に抑制している^{16, 17)}(Fig. 5B)。しかし、GBD ドメインに低分子 Rho-GTPase が結合するか、もしくは DAD に NPFs (nucleation promoting factor) が結合すると、DID-DAD 間の相互作用が解消され、活性型構造をとることができる。ゲノム編集により frameshift mutation を起こした変異蛋白質には DD 領域が存在するので、二量化構造をとることができると考えている。一方で、DAD ドメインが存在しないので、DID-DAD 相互作用による不活性型構造をとることはできない。GBD ドメインに低分子 Rho-GTPase は結合できるので、活性型構造をとるはずである。

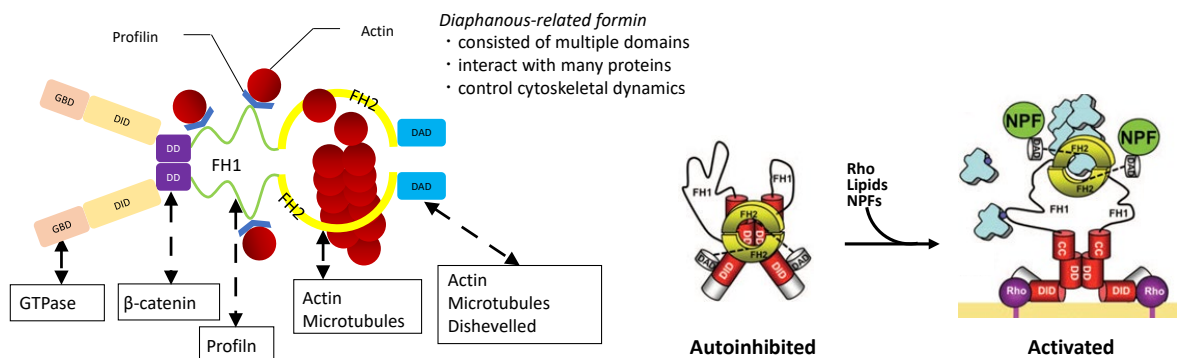


Figure 5. (A) mDia1 dimerizes and interacts with many factors through its respective domains. (B) Autoinhibited and activated structures. Modified from Ref 16.

FH1 ドメインは柔軟な構造をとるので構造解析からは構造が明らかにならないが、最近、コンピュータモデリングが行われた。その結果、FH1 には固いポリプロリンヘリックス構造をとる PP 領域と柔軟な部分が混在しており、PP/PRMs にプロフィリン-アクチン複合体が結合して barbed-end に運ばれるが、FH1-FH2 の Dimer 構造において、一方の FH1 が leading FH1、もう一方が lagging FH1 と名づけられ、profilin の barbed-end へのアクセスが二つで異なることが示唆されている¹⁸⁾。

Frameshift mutation を起こすゲノム編集では、FH1 ドメインの 35% まで、517 残基までは正しい蛋白質が作られるが、その後に約 60 個の誤ったアミノ酸配列が続く、そこで truncate される。この部分がどのような 2 次構造をとるかは不明であるが、異なった変異蛋白質が左右性や発生異常に同様の影響を与えることから、この部分の 1 次、2 次構造はあまり重要ではないのかもしれない。ゲノム編集で frameshift mutation を起こしていない貝は FH1 ドメインで大きな欠失があっても右巻のままである。一方、天然由来の左巻貝では、*LsDia1* の N 端ですぐに終始コドンとなり蛋白質がほとんど作られない。Frameshift mutation を起こしたゲノム編集貝も代々左巻になった。このことは、右巻になるためには、*LsDia1* の FH2 ドメイン以降が重要な働きをしていることを示唆している。

F2 世代では天然由来の左巻貝の正常発生率は 78% 程度で、天然由来の右巻貝の 98% より低かった。一方、ゲノム編集された貝は、F2 世代では frameshift を起こし左巻きとなった貝は 43~70% の正常発生率で、late veliger 期より前に発生の止まる例が多く観察された。Frameshift を起こさない右巻貝は 92-95% 程度であった (Fig. 1B)。今回実験に用いた F12-F13 世代は、左右両方ともに F2 世代よりも正常発生率は減少し、それぞれ、23-37%、84-96% であった。これは長年実験室で樹立し、個別飼育などを行った影響と思われる。いずれにしても、ゲノム編集で左巻になった貝の異常発生率は明らかに天然由来の左巻貝のそれよりも高い。その理由は *LsDia1* 蛋白質が途中まで作られていること、或いは、正しくないアミノ酸配列が FH1 の途中から続くことが毒性となっていると考えられる。二量化ドメイン DD はあるので二量化していると考えられる。Truncate された蛋白質が二量化してホモダイマーを作るか

(Fig. 6A)、正常な LsDia2 とヘテロダイマーを作ることが想定される (Fig. 6B)。アクチン繊維は発生のすべての段階で必要であり、その伸長にかかわる蛋白質の変異が様々な異常を引き起こすことは予想できる。むしろ、30–40%の割合で、子孫を残す左巻貝が誕生することの方が驚くべきことなのかもしれない。

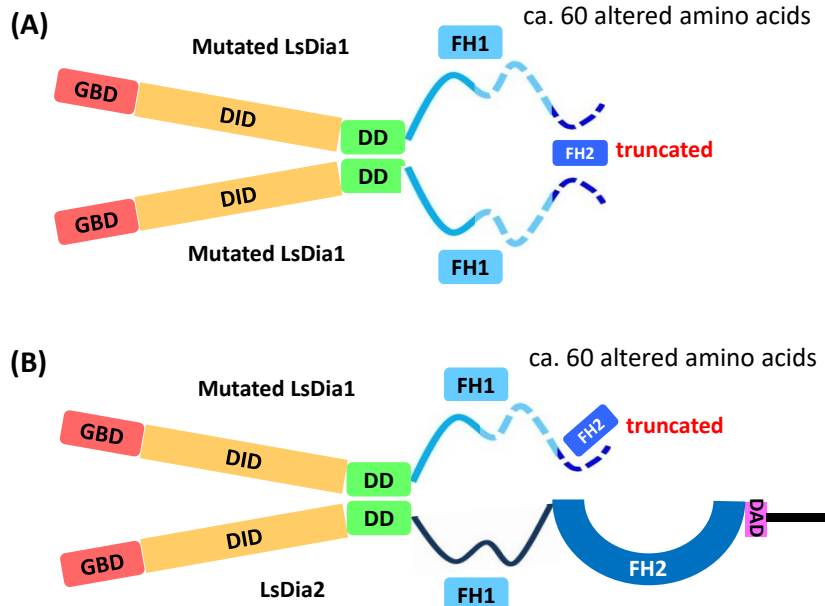


Figure 6. Possible structures of a homodimer of mutated LsDia1(A) and a heterodimer with LsDia2 (B).

4. 今後の展望

L. stagnalis の左右性がフォルミン関連の Dia 遺伝子 1 個で決定されていることを明らかにしてきた。フォルミンファミリータンパク質は、真核生物に広く存在するアクチン重合核形成促進因子である。哺乳類では約 15 個、シロイヌナズナでは約 20 個の遺伝子が存在する^{19), 20)}。フォルミンの多くは細胞質分裂、細胞極性形成に必須な遺伝子の産物である。出芽酵母の Bni1^{12), 13)}、マウスの mDia1^{10), 11), 14), 17)}、ヒトの Daam1¹⁵⁾ の構造等が研究されてきた。ゲノム編集は、LsDia1 のフォルミン相同ドメイン FH1 をターゲットとしたが（他に選択肢はない）、アクチン繊維の重合に重要な影響を与えられられる。ヨーロッパモノアラガイを用いた今回の実験から、右巻になるためには、LsDia1 の FH2 ドメイン以降が重要な働きをしていること、LsDia1, LsDia2 で大きなアミノ酸配列の違いがあり、従って重要な機能の差があると思われる FH1 領域は、重合速度に影響は与えるかもしれないが、左右性決定の機能には直接には関与していないこと、LsDia1 蛋白質が FH1 ドメインの途中まで作られていること、或いは、正しくないアミノ酸配列が FH1 の途中から続くことが毒性となって発生異常が起きていることが明らかとなった。LsDia1 が完全に欠失した胚の方が正常発生率は高かった。

89.4% 同源性のある二つのタンパク質 LsDia1, LsDia2 が共存すると右巻貝、LsDia2 のみだと左巻貝になるという不思議の原因は奥が深い。現在、Lsdia2 のノックアウト実験も行っているが、それと並行して構造の違いが引き起こすアクチン重合速度、らせん構造の違い、ヘテロ二量体の可能性、他のタンパク質との相互作用の違い、微小管との関係、アクチン架橋構造への影響など、様々な仮説を立てている。

L. stagnalis は左右性決定に関与する分子種が少なく、未分割卵ですでに LsDia1 によって左右性が決

定されているというシンプルな系である。分子レベルでの相互作用が提示するキラリティーを明らかにできる可能性が高い。その情報が細胞内、細胞間へ伝わり、生物個体のキラリティーまでに伝達されることが明らかになっているので、生命現象の根幹にかかわるテーマである。分子レベルで始まる生物個体の左右性構築のプロセスを明らかにしていきたい。

謝辞

本研究は中部大学先端研究センター 2022 年度プロジェクト 6 の援助を受け遂行されたものであり、ここに謝意を表します。先端研究センター特任講師の内田孝幸博士には異常胚の写真や統計図を提供いただき、深く感謝いたします。

参考文献

- 1) T.Nakamura and H. Hamada: *Development*, **139** (2012) 3257.
- 2) J.Coutelis *et al.*: *EMBO Rep.*, **9** (2014) 926.
- 3) A.H.Sturtevant: *Science*, **58** (1923) 269.
- 4) A.E.Boycott *et al.*: *Phil. Trans. Roy. Soc., B* **219** (1930) 51.
- 5) R.Kuroda: *Integr. Comp. Biol.*, **54** (2014) 677.
- 6) R.Kuroda *et al.*: *Sci. Rep.*, **6** (2016) 34809.
- 7) M.Abe and R.Kuroda: *Development*, **146** (2019) 175976.
- 8) R.Kuroda: *QRB Discovery*, **48** (2015)445.
- 9) R.Kuroda: *Sogo-Kogaku*, 34, 38-45 (2022).
- 10) R.Rose *et al.*: *Nature*, **435** (2005)513.
- 11) T.Otomo *et al.*: *Mol. Cell*, **18** (2005) 273.
- 12) Y.Xu *et al.*: *Cell*, **116** (2004) 711.
- 13) T.Otomo *et al.*: *Nature*, **433** (2005) 488.
- 14) A.Shimada *et al.*: *Mol. Cell*, **13** (2004) 511.
- 15) J.Lu *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **369** (2007) 1258.
- 16) S.Maiti *et al.*: *Cytoskeleton*, **69** (2012)393.
- 17) G.Azin *et al.*: *Structure*, **14** (2006) 257.
- 18) B.G.Horan *et al.*: *FEBS Lett.*, **592** (2018) 1804.
- 19) H.N.Higgs: *Trends Biochem Sci.*, **30** (2005) 342.
- 20) B.Blanchoin and C.J. Staiger: *Biochem. Biophys. Acta*, **1803** (2008) 201.