

学位論文

ウニ初期発生をモデルとした原腸形成機構

および染色体構造制御機構の解析

Analysis of the mechanism of gastrulation and
regulation of chromosome structure using sea urchin
early development as a model.

渡邊 開智

指導教員：栗津 暁紀

広島大学大学院統合生命科学研究科 統合生命科学専攻
数理生命科学プログラム 現象数理学研究室

発表論文

参考論文

1. Kaichi Watanabe, Yuhei Yasui, Yuta Kurose, Masashi Fujii, Takashi Yamamoto, Naoaki Sakamoto and Akinori Awazu, (2022). Partial exogastrulation due to apical–basal polarity of F - actin distribution disruption in sea urchin embryo by omeprazole. *Genes to Cells*, 27(6), 392-408.

2. Kaichi Watanabe, Megumi Fujita, Kazuko Okamoto, Hajime Yoshioka, Miki Moriwaki, Hideki Tagashira, Akinori Awazu, Takashi Yamamoto and Naoaki Sakamoto (2023). The Crucial Role of CTCF in Mitotic Progression during Early Development of Sea Urchin. *Development, Growth & Differentiation*, 65(7), 395-407.

その他の発表論文

1. Naoaki Sakamoto, Kaichi Watanabe, Akinori Awazu and Takashi Yamamoto, (2023). CRISPR-Cas9-Mediated Gene Knockout in a Non-Model Sea Urchin, *Heliocidaris crassispina*. *Zoological Science*, 41(2).

2. Akinori Awazu, Daigo Takemoto, Kaichi Watanabe and Naoaki Sakamoto, (2023). Possibilities of skin coat color - dependent risks and risk factors of squamous cell carcinoma and deafness of domestic cats inferred via RNA - seq data. *Genes to Cells*, 28(12), 893-905.

目次

第 I 部 導入	2
第 1 章 全体の導入	2
第 II 部 ウニ胚は H ⁺ /K ⁺ イオンポンプ活性が阻害されると F-actin の頂端-基底極性が乱れ外腸胚を形成する	4
第 2 章 概要	4
第 3 章 導入	5
第 4 章 結果	7
第 5 章 まとめと議論	21
第 6 章 実験方法	25
第 7 章 補足データ	32
第 III 部 ウニの発生初期における有糸分裂進行時の CTCF の重要な役割	40
第 8 章 概要	40
第 9 章 導入	41
第 10 章 結果	44
第 11 章 その他の知見	53
第 12 章 まとめと議論	62
第 13 章 実験方法	66
第 14 章 補足データ	71
第 IV 部 まとめ	74
第 15 章 全体のまとめ	74
謝辞	77
参考文献	80

第 I 部 導入

第 1 章 全体の導入

受精卵から細胞の増殖・分化を経て生物の体が出来上がる発生過程は、信じられないほど精巧な再現性とともな繰り返される。発生のごく初期は、2, 4, 8, 16, 32 個と細胞分裂が同調し、精密機械のように規則的な細胞配置を経て多細胞の塊となり、袋状構造を形成する。その後原腸形成が起こることによって単層の袋状構造であった胚のトポロジーが変化し、体の内側、内臓にあたる領域が形成される。

原腸形成は視覚的に観測できるダイナミックな形態変化であるが、実はこの時期に多くの生物種で細胞内部のリソースにも劇的な変化が起こっている。これまで卵に含まれている母性因子に頼って発生していた胚は、より複雑な発生を進めるために自らの遺伝子を元に必要な胚性リソースをつくり始める。このリソースの切り替えは Maternal to zygotic transition (MZT) と呼ばれており、MZT の前後では胚性遺伝子からの転写が OFF→ON になるという点で細胞状態に決定的な違いがある。この転写の切り替えにはクロマチン制御タンパク質の切り替えやエピジェネティックな制御による染色体状態の変化が伴い、生物個体は母性因子に依存することなく自身が産生した分子で発生を進め、恒常性を保つようになる。

本論文では発生のモデル生物であるウニを用いて、まず上記の初期発生の過程から原腸が形成される機構について(第 II 部)、次いで MZT 前後の染色体構造制御に関与する CCCTC 結合因子 (CTCF) の役割について(第 III 部)、解析を行った結果をまとめた。なお、第 II 部と第 III 部の内容は独立している。

第 II 部で考察される原腸形成という形態形成イベントは、古くから様々な動物種で観察がなされており、発生や分化という観点から分子的な研究がなされてきた。一方で、実験事実に基づいた原腸形成に必要な力学的条件の探索や、形成過程が正常に進行する場合と異常をきたす場合それぞれでの細胞状態の定量的な比較は、ほとんど行われてこなかった。そこで本研究では、原腸形成時に腸の一部が外に突出した異常な形態の胚(外腸胚)が生じる条件を見出し、正常な原腸形成と異常な形態形成が進行する場合の細胞状態(細胞内 pH と細胞

骨格の分布)の違いを定量的に評価した。また、その違いを細胞の性質として取り入れたウニ初期胚の数理モデルを構築し、シミュレーションにより原腸形成過程における力学的特性の考察を行った。

第 III 部で考察される CTCF は、多くの動物種における染色体構造制御のキーファクターの一つである。CTCF は間期染色体におけるクロマチンループ形成タンパク質として知られており、各種モデル生物において初期発生段階から生存に必要であることが知られている。よって CTCF のリソースは初期発生時では母性因子、ある程度発生が進んだ後では胚性遺伝子、と切り替わると考えられる。また発生が進むにつれ細胞周期、特に間期の長さも伸びてくる傾向があるため、CTCF の役割もこの MZT 前後で異なっている可能性が考えられる。加えて、*CTCF* は旧口動物から新口動物まで広く保存されている。よって新口動物で最も早期に分岐したウニを用いた解析によって、クロマチン構造制御因子の原始的な機能に迫れる可能性が考えられる。そこで本研究では母性 *CTCF* と胚性 *CTCF* それぞれの機能阻害と、その結果を受けて行ったシングルセル RNA-seq データの解析から *CTCF* の生物種間普遍的な機能についても考察した。

第II部

ウニ胚は H^+/K^+ イオンポンプ活性が阻害されると F-actin の頂端-基底極性が乱れ外腸胚を形成する

第2章 概要

原腸形成は、多くの動物胚の形態形成における普遍的なプロセスである。しかし原腸形成における形態学および分子生物学的な事象はよく研究されている一方で、力学的な駆動力とその根底にある制御機構は完全には未だ解明されていない。

本研究では、バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) の胚で進行する、原腸形成過程に着目した。まず我々は、ウニ胚の左右非相称性を乱す H^+/K^+ プロトンポンプ阻害剤であるオメプラゾールが、二次陥入 (Secondary invagination) が外側に進む「部分的な外腸胚形成」を誘導することを発見した。このとき、通常の前腸形成初期においては、植物極側の細胞内 F-actin の頂端-基底極性が動物極側よりも高くなっているが、オメプラゾール処理では植物極側の細胞で、F-actin の頂端-基底極性が乱れていた。さらに、*RhoA* または *YAP1* ノックアウトによって全胚における F-actin の重合または脱重合を阻害すると、原腸形成が停止し、部分的な外腸胚の形成さえも起こらなくなることを見出した。

また、実験で得られた F-actin 分布に基づき、細胞依存的な細胞骨格の特徴を考慮した初期原腸形成の数値モデルを構築し、シミュレーションにより正常胚と外腸胚の両方の形状を再現した。

これらの結果から、まず細胞位置依存的な細胞内 F-actin 分布が細胞内 pH 分布によって制御されていることが示唆された。そして正常な原腸形成の進行には、プロトンポンプによって保たれる適切な pH と、それによって制御される細胞位置依存的な F-actin 分布が必須であることが示された。

第3章 導入

原腸形成は様々な動物において不可欠な形態形成過程であり、この過程を通じ初期胚は、細胞の単層袋状構造の胞胚から原腸などを内包する多層の形態に変化する (Najera & Weijer, 2020; Shindo, 2018; Stower & Bertocchini, 2017)。この内臓の形成につながる過程は、種特異的に様々なバリエーションがあり、それが動物の多様な形態の基礎となる。しかし組織再編成と細胞運動によって誘導される胚全体の形態形成の基本メカニズムは、それらの動物種間で非特異的に進化的に保存されている。

ウニは新口動物の初期に分岐した棘皮動物の一種であり、動物で普遍的に観察される様々な形態形成過程が進行する。そしてその進化的位置づけや、胚の観察しやすさや発生同期のさせやすさといった性質から、例えば左右相称性の破れ (Aihara & Amemiya, 2001; McCain & McClay, 1994; Takemoto et al., 2016; Warner & McClay, 2014)、神経ネットワーク形成 (Burke et al., 2014; McClay et al., 2018; Yaguchi et al., 2010)、そして原腸形成 (Dan & Okazaki, 1956; Gustafson & Kinnander, 1960; Hardin & Cheng, 1986; Kominami & Takata, 2004; Martik & McClay, 2017) などの様々な初期形態形成過程の研究に用いられている。特にウニ胚における内中胚葉の特異化を制御する遺伝子制御ネットワークは詳細に研究されている (Davidson et al., 2002; Oliveri & Davidson, 2004)。

ウニの原腸形成は以下の5つのstepを経て進行する (Kominami & Takata, 2004)。step 1 (孵化後)、胚は厚くなった植物極板を持つ上皮単層となる。step 2 (一次陥入)、植物極が曲がって胞胚腔に侵入し、短い管状の原腸が形成される。step 3 (原腸伸長の遅滞)、原腸先端に二次間充織細胞 (Secondary mesenchymal cells : SMC) が出現する。step 4 (二次陥入)、SMCの糸状仮足が原腸先端を引っ張り、細胞の再配列によって原腸が伸長する。step 5 (三次陥入)、推定内胚葉細胞が原腸にリクルートされる。step 1と2は従来、一次陥入、step 3と4は二次陥入と呼ばれてきた (Dan & Okazaki, 1956; Gustafson & Kinnander, 1956)。

ウニ胚は、様々な処理下で異常な形態形成 (外腸胚形成) を示すことが知られている。例えば、LiClや糖の存在下で培養した胚の原腸は、原腸と外胚葉をつなぐ胞胚腔のSMC微小管が脱重合するため、完全に外側に突出する (Dan

& Okazaki, 1956; Hardin & Cheng, 1986; Khurram et al., 2004)。これらの研究は、SMC 糸状仮足が原腸を引っ張り上げることが、原腸形成の step 4 で重要な役割を果たしていることを示唆している。また外腸形成は *Rab35* のノックダウンによっても観察され、このノックダウンは胚全体の細胞骨格を乱すことも示唆された (Remsburg et al., 2021)。さらに、ある種類のウニ (*Lytechinus pictus*) では、通常培養胚の step 2 における植物極板の屈曲が、外科的に分離した植物極板においても起こることが報告された (Ettensohn, 1984)。さらに、一次陥入を開始させるためには、原腸先端の細胞は瓶型 (Nakajima & Burke, 1996)、植物極板周辺の細胞は楔型 (Burke et al., 1991) であることが示唆されている (Kominami & Takata, 2004)。さらに、植物極板の数理モデルは、一次陥入が「頂端収縮」、「細胞牽引」、「頂端収縮リング」、「頂端基底収縮」、「ゲル膨潤」の適切な力条件下で起こることを示唆している (Davidson et al., 1995; Odell et al., 1981)、これらの作用のどれが一次陥入 (step 2) 後の発生に必須なのかは不明である。

本研究では、実験とデータ解析、数理モデリングにより、ウニ胚原腸形成の step 2 以降における支配因子の役割を明らかにした。第一に、バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) 胚を培養している濾過滅菌海水に、プロトンポンプ活性を阻害する胃酸分泌抑制剤として知られているオメプラゾール (Hibino et al., 2006) を添加し発生過程を観察すると、胞胚腔において微小管を失うことなく「部分的」な外腸胚形成が引き起こされた。更に、通常の初期原腸胚期 (step 1 および 2) では、植物極側細胞における F-actin の細胞内頂端-基底の極性が動物極側細胞における極性よりも強くなるが、オメプラゾール処理胚では植物極側細胞の F-actin 極性が乱れていることが、蛍光イメージングより見出された。このことより、部分的な外腸胚の形成は、細胞骨格の異常な挙動によるものと考えられた。また同様の傾向は細胞内 pH においても見られた。次いで、胚における F-actin 重合・脱重合関連遺伝子の CRISPR (clustered regularly interspaced short palin dromic repeat) -Cas9 (CRISPR associated protein 9) を用いたノックアウト実験を行い、原腸形成の進行に F-actin 重合の適切な制御が必須であることが見出された。そして最後に、上記の実験より推定された細胞骨格動力の力学的パラメータを利用した数理モデルを構築し、正常およびオメプラゾール処理 (外腸を示す) 胚の、初期原腸形成過程における形態形成過程をシミュレーションにより再現した。

第4章 結果

4.1 バフンウニ胚はオメプラゾール処理によって外腸胚を形成する

受精直後から発生までオメプラゾールに曝露されたバフンウニ胚（処理胚）は、部分的な外腸形成を伴う異常な形態形成を示した（図 1）。そこで各原腸形成 step における、正常胚（control）と処理胚の植物極周囲の構造的特徴の詳細な比較を行った。以下の step は、小南らの報告（Kominami & Takata, 2004）で定義された step に基づいて指定した。ここで、step 3 は受精後 21-23 時間（hpf）に対応し、step 2（20-22 hpf）および step 4（原腸胚中期：22-24 hpf）と重なるため、本来の step 3 は示していない。まず step 1 では、正常胚と処理胚では植物極板の厚さは同等であった（18-20 hpf）。ついで step 2 では、一次陥入が正常と処理胚の両方で同時に起こった。しかし、腸管の伸長は、処理胚の方が正常胚よりもわずかに浅かった（20-22 hpf）。原腸胚中期（step 4；二次陥入）では、処理胚は胞胚腔への原腸のさらなる伸長を示さず、処理胚の形状は動物-植物軸に沿って伸長した（22-24 hpf）。一方、正常胚では、原腸がさらに伸長し、SMC の存在が明瞭になった。原腸胚後期（step 4；二次陥入）において、処理胚では植物極側の外側への突出が顕著であった（24-26 hpf）。また処理胚では、正常胚に比べて胞胚腔への原腸の伸長が比較的少なかった。step 5（36 hpf）では、処理胚では胚を貫通することなく原腸形成が停止した。このような「部分的」な外腸胚を形成した処理胚は全体の半数以上を占めた。

これらの「部分的」な外腸胚では、原腸の先端は正常な一次陥入によって内側に折りたたまれたが、残りの部分は二次陥入の間に胚の外側に伸びていた。このことは以下の実験から確認できる。まず正常胚では、原腸の下半分（中腸・後腸）が内在性アルカリホスファターゼ活性を示した（図 2a）。一方、部分的な外腸胚形成を示した処理胚では、外側に伸びる部分が染色され（図 2a）、これらの胚の外側で内胚葉組織に相当する部分が形成されたことが示された。しかし内胚葉組織の一部は内側に陥入していたことから、一度は外側に形成された内胚葉組織が二次陥入後に内側に引き上げられた可能性が示唆された。

二次陥入期には、SMC は原腸の先端から切り離され、伸縮する糸状仮足を形成する。原腸の先端と動物極組織との間は、SMC と糸状仮足を介してつながっており、原腸の牽引を容易にしている (Dan & Okazaki, 1956; Hardin, 1988)。実際、正常胚および処理胚のいずれにおいても、SMC の原腸先端から胞胚腔への移動が観察され (図 2b)、step 2 から step 4 の間に SMC が処理胚の胞胚腔に移動し、胞胚腔で糸状仮足が形成されたことが示された。以前に報告された外腸原腸形成では、糸状仮足が消失することによって誘導された (Dan & Okazaki, 1956; Hoshi, 1979; Khurram et al., 2004)。一方、本研究で行った Whole mount in situ hybridization では、処理胚でも SMC が原腸先端から遊離していることが示された (図 2b)。この結果から、処理胚では SMC によって胞胚腔への原腸のさらなる牽引が誘導されたことが示唆された。

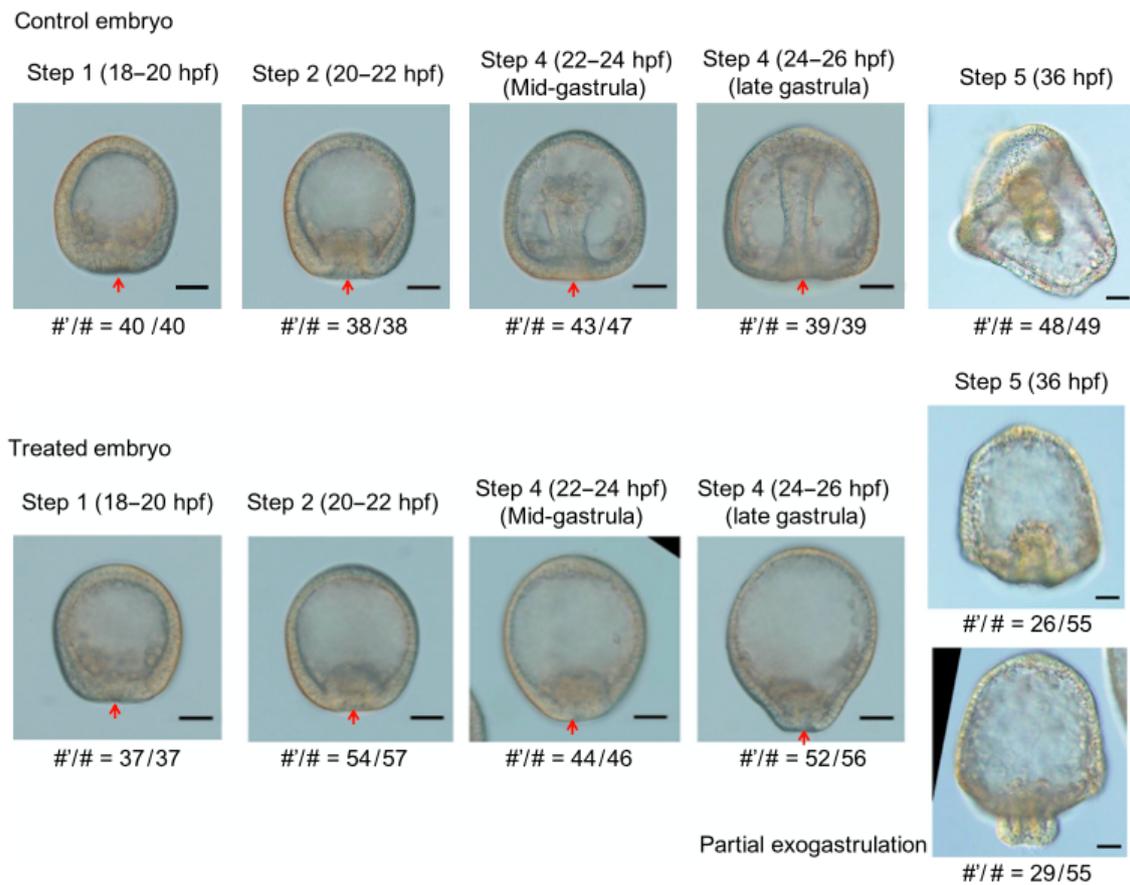


図 1 コントロールとオメガラゾール処理したバフンウニ胚の原腸形成過程 (step 1, 2, 4, 5) の典型的な明視野像 (スケールバー: $30 \mu\text{m}$)。赤矢印は植物極の位置を示す。処理胚では step 2 以降、原腸形成は進行せず、step 4 では植物極側の外側への突出が顕著になった。step 5 では、原腸が胚を貫通することなく不完全に停止し、処理胚の半数以上で「部分的な」外腸胚が観察された (下図)。# と#はそれぞれ、サンプリングした胚の総数と、画像と類似した形状を持つ胚の数を示す。

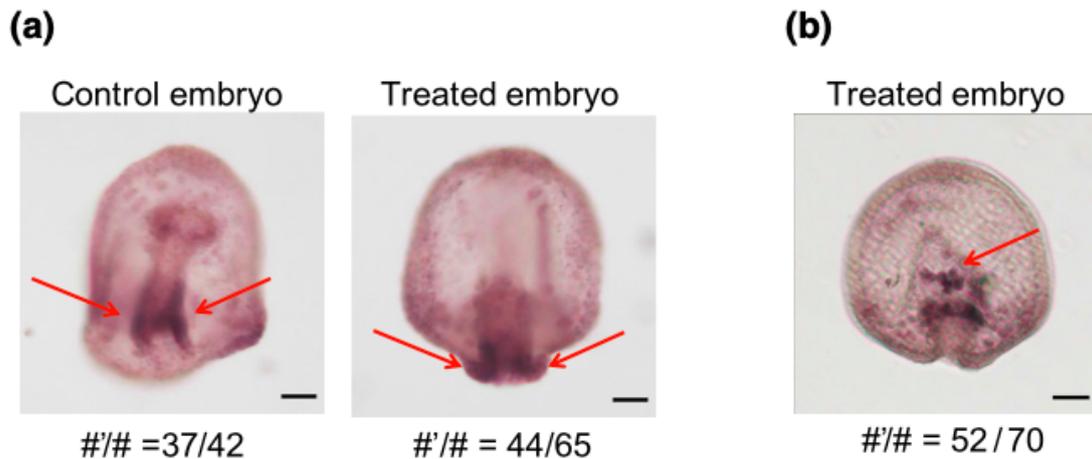


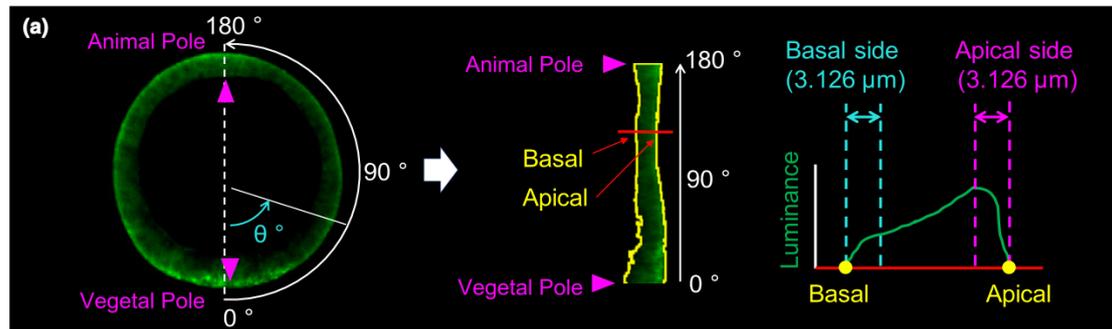
図 2 内胚葉組織と二次間充織細胞 (SMC) の可視化。(a)step 5 の正常胚 (左) と処理胚 (右) で内胚葉組織を内在性アルカリホスファターゼ (赤矢印) 活性により染色した。step 5 における正常胚 (左) と処理胚 (右) の内因性アルカリホスファターゼ (赤矢印)。正常胚では染色された部分が内側領域に位置しているのに対し、処理胚では染色された部分が外側領域に位置している (スケールバー: $30\ \mu\text{m}$)。 (b) step 4 の処理胚における SMC の典型的な位置。SMC のマーカーである *gcm* を Whole mount in situ hybridization によって染色した (赤矢印) (スケールバー: $30\ \mu\text{m}$)。# と#'はそれぞれ、サンプリングした胚の総数と、画像と同様にはっきりと染色された胚の数を示す。

4.2 オメプラゾールは植物極側細胞の細胞骨格分布を乱す

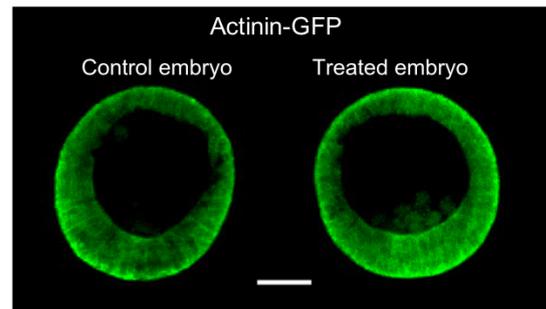
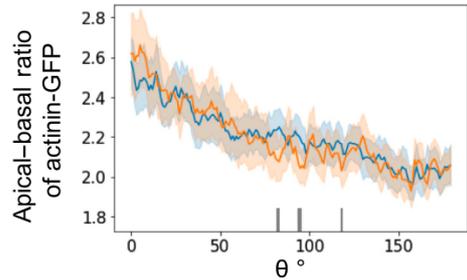
二次陥入期 (step 4) における処理胚の形態変化の基礎となるメカニズムを明らかにするために、その前段階である一次陥入期 (step 1 および 2) における F-actin の細胞内分布を解析した。F-actin は、actinin-GFP 融合タンパクを用いた蛍光イメージングによって可視化した。ここで actinin は F-actin 結合タンパク質の一つとして知られている (Edlund et al, 2001) ため、本研究でも F-actin マーカーとして用いた。細胞内 F-actin 分布の頂端-基底極性は、細胞の頂端側の蛍光強度を基底側の蛍光強度で割った比を算出することで評価した (図 3a)。

step 1 での actinin-GFP シグナルの頂端-基底比分布は、正常胚と処理胚のどちらもほぼ同じ傾向を示し、どちらも植物極に近づくほど徐々に増加する傾向を示した (図 3b、S1a、S2a-d)。一方 step 2 における actinin-GFP シグナル強度の頂端-基底比の分布は、動物極側では正常胚と処理胚の間で類似していた (図 3c、S1b、S2e-h) が、植物極側では次のような違いが現れた：まず赤道から植物極にかけては、正常胚の比が処理胚の比よりも大きかったが、一方植物極とその周辺領域では、正常胚の比が処理胚よりも小さかった。この結果は、処理胚の異常な胚形状の形成が、頂端-基底比の変化と相関することを示唆している。一方、原腸形成への関与が示唆されていた各細胞の頂端極のアピカルラミナにある F-actin の足場である fibropellin-1 (Burke et al, 1998 ; Nakajima & Burke, 1996) の胚全体の分布は、オメプラゾールの影響を受けなかった (図 3d および S1c)。

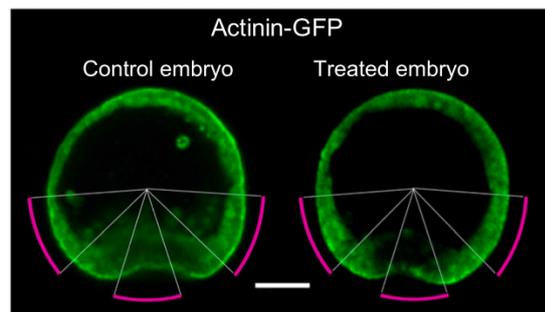
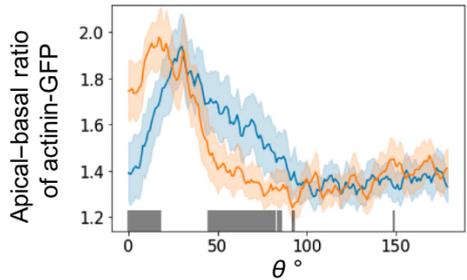
オメプラゾールは H⁺/K⁺プロトンポンプ阻害剤である。そこで pH インジケータを用いて細胞内 pH を推定した。step 2 では正常胚と処理胚の両方で、pH インジケータの頂端側と基底側の比は 1 より大きく (図 3e、S1d、S3)、各細胞の頂端側の pH が基底側の pH より常に低いことが示された。加えてこの比率は、正常胚では植物極側で動物極側よりも高かったが、処理胚ではこのパターンは消失した。このように、pH インジケータの蛍光強度の頂端-基底極性は、全胚における actinin-GFP シグナル強度のそれと正の相関があった (図 3c,e)。



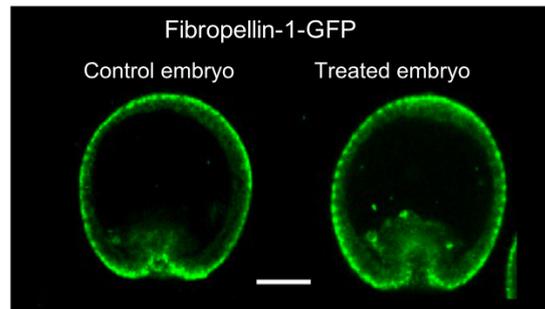
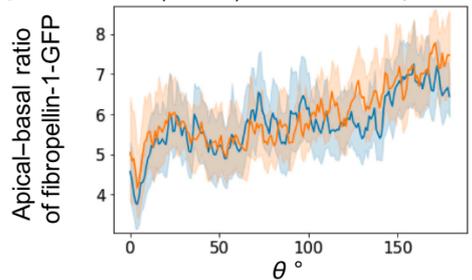
(b) Control ($n = 50$) Treated ($n = 34$)



(c) Control ($n = 34$) Treated ($n = 34$)



(d) Control ($n = 46$) Treated ($n = 42$)



(e) Control ($n = 34$) Treated ($n = 34$)

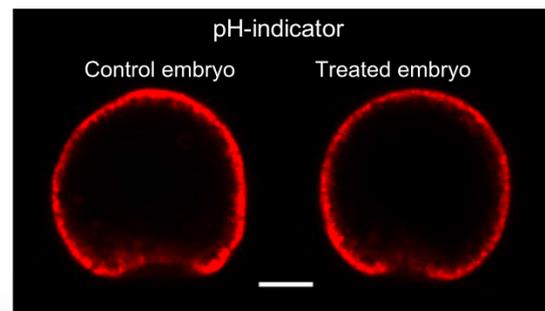
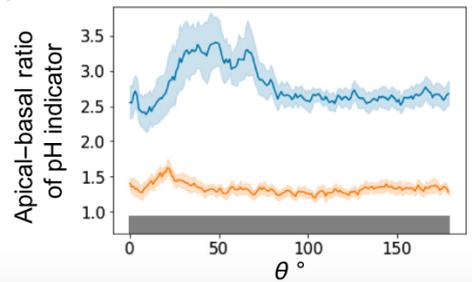


図 3 actinin-GFP, fibropellin1-GFP, pH の全胚分布。(a) 胚の actinin (actinin-GFP : 緑) 強度を介して決定された共焦点蛍光顕微鏡像 (図 S7 も参照) の、胚断面の円周に沿った植物極 (0) から動物極 (180) までの角度 θ (0 -180) の定義。(b-e) n サンプルで得られた角度 θ における頂端-基底比の平均値と 95%信頼区間 (エラーバー) (左)、および step 1 (b) と step 2 (c) における actinin-GFP 強度、step 2 における fibropellin1-GFP 強度 (d)、および step 2 における pH インジケーター強度 (e) の典型的な共焦点蛍光顕微鏡像 (スケールバー : $30 \mu\text{m}$) (右)。左側の画像では、青とオレンジの曲線とバーはそれぞれコントロール胚と処理胚の値を表し、グレーのバーは Welch の t 検定 ($p < .05$) に従ってコントロール胚と処理胚の間で有意に異なる平均値を示す (図 S1 も参照)。(c)の右パネルのマゼンタ色の曲線は、正常胚と処理胚の値の間に有意差がある領域に沿ったものである。正常胚と処理胚の actinin-GFP 強度 (c) と pH インジケーター強度 (e) の頂端-基底比の相関係数は、それぞれ 0.56 と 0.64 であった。

4.3 細胞骨格制御因子ノックアウト胚では、原腸形成は始まるが正常に進行しない

F-actin の形成における代表的な重合因子と脱重合因子である *RhoA* と *YAP1* (Beane et al., 2006; Dupont et al., 2011) の CRISPR-Cas9 を介したノックアウトを、*Cas9* mRNA と sgRNA のマイクロインジェクションによって行い (図 S4)、F-actin 形成制御阻害の原腸形成への寄与を明らかにした。*RhoA* および *YAP1* ノックアウト胚の変異頻度はそれぞれ 55.6% および 77.8% であり、フレームシフト率はいずれも 22.3% であったが (図 S4)、*RhoA* または *YAP1* ノックアウト胚では、一次陥入期の step 2 で原腸形成が停止した (図 4a)。これらのノックアウト胚間の表現型は、遺伝子の機能は異なるものの、類似していた (図 S4)。色素細胞は 45 hpf で観察され、発生が停止していないことが示された。このことは、F-actin の機能に軽度の障害がある胚でも、一次陥入は起こったが、その後の原腸形成過程では適切な F-actin 由来の力が必要であったことを示している。*RhoA* ノックアウト胚では、pH インジケータの平均濃度および頂端-基底比の全胚分布は正常のものと変わらなかったことから、F-actin 重合の乱れは細胞の pH 勾配に影響を与えなかった (図 4b, c および S1e, f)。

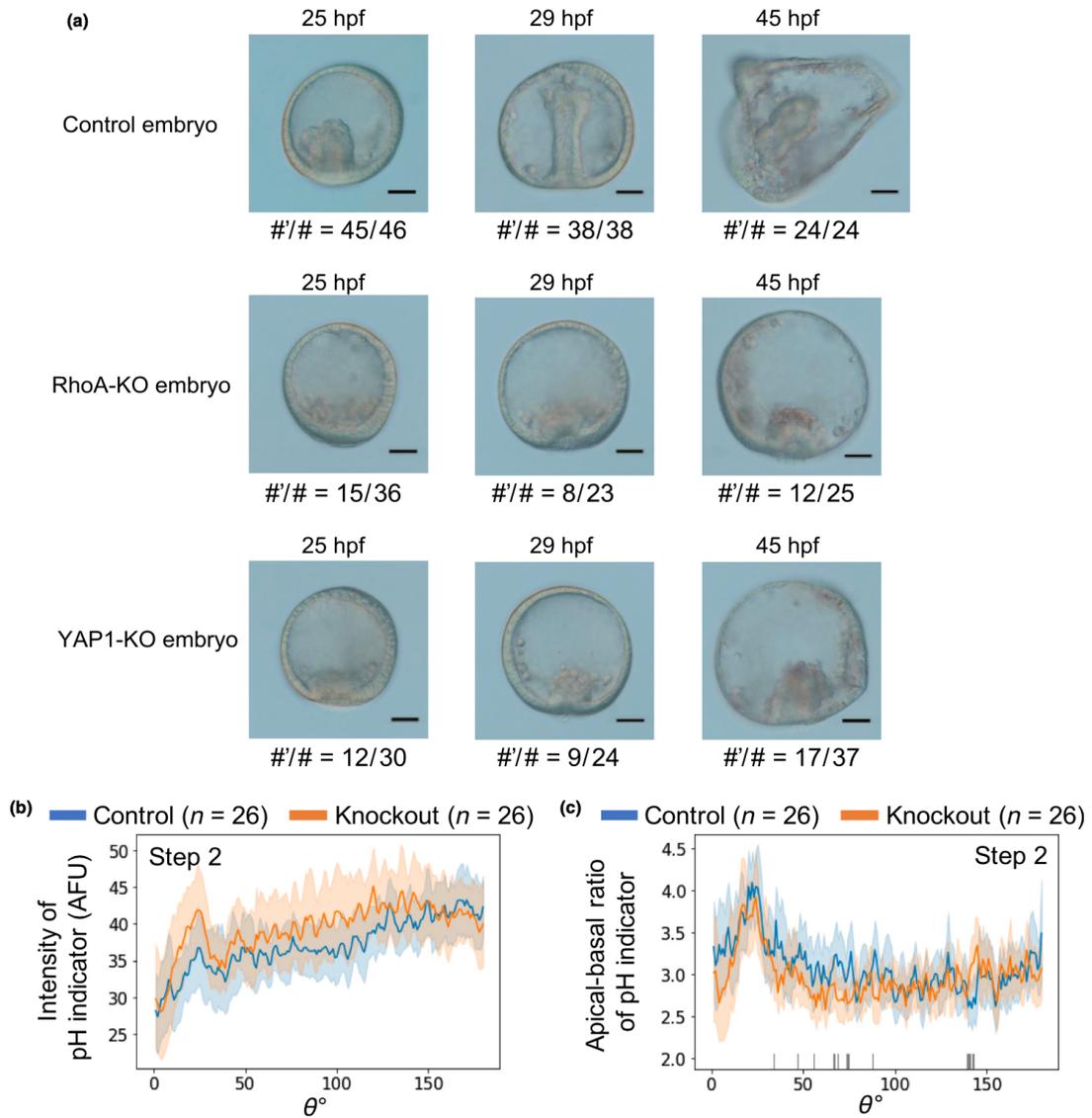


図 4 F-actin 制御因子ノックアウトが胚形成に及ぼす影響。(a) コントロール、*RhoA* ノックアウト、*YAP1* ノックアウト胚の特定の時点における原腸形成の明視野像。すべての胚で一次間充織細胞と色素細胞が観察され、発生が停止していないことが示唆された。ノックアウト胚は、コントロール胚で 45 hpf に観察されたプリズム幼生のような構造を形成しなかった (スケールバー: 30 μm)。# および #' はそれぞれ、サンプリングした胚の総数および画像と同様の形状を持つ胚の数を示す。(b) および (c) 角度 θ の関数としての *RhoA* ノックアウト胚およびコントロール胚の細胞内 pH インジケータ (b) および pH インジケータの頂端-底端比 (c) の平均蛍光強度 (任意蛍光単位) および 95% 信頼区間。

4.4 細胞依存的な F-actin 分布の頂端-基底細胞内極性を考慮した初期原腸形成における胚形状形成の数理モデルの構築

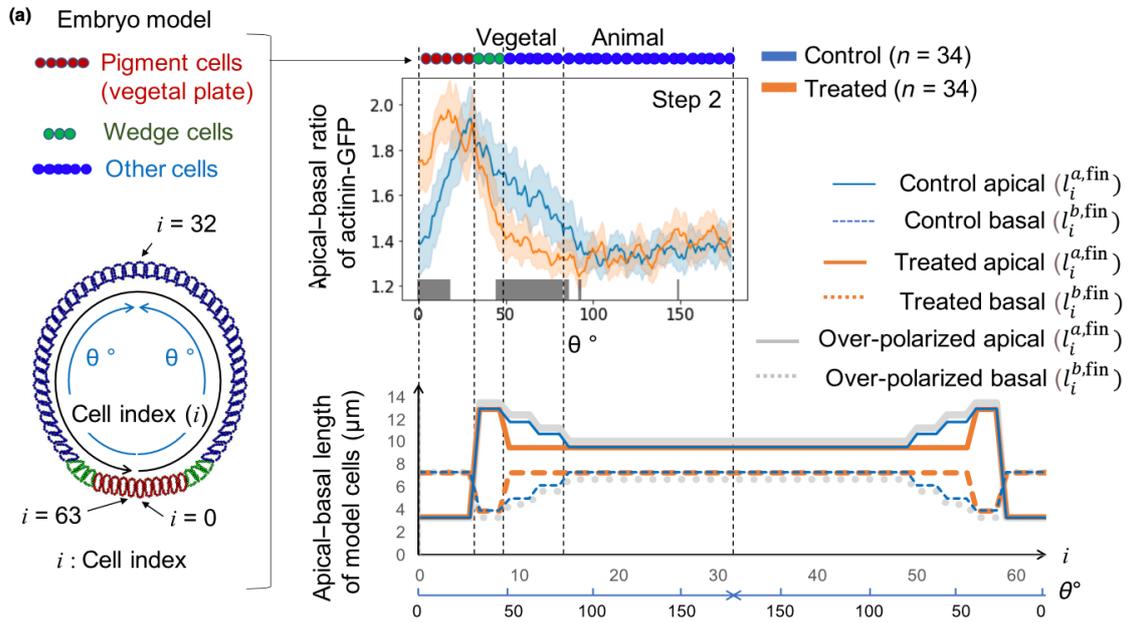
細胞内 F-actin 分布が胚形状の形成に与える影響を調べるために、動物極と植物極を含む断面における胚発生の数理モデルを構築した。モデルはイソギンチャク (*Nematostella vectensis*) の原腸形成モデル (Tamulonis et al., 2011) と実験的に知られている事実に基づいて、以下の仮定を行った：

I. 各胚は、色素細胞 (Kimberly & Hardin, 1998; Kominami & Takata, 2004)、楔型細胞 (Burke et al., 1991)、およびその他の細胞の 3 種類の細胞が含むことが知られている (図 5)。陥入口付近の色素細胞は、部位特異的な力が働いているため、瓶型であると考えられた (Kimberly & Hardin, 1998; Kominami & Takata, 2004)。このことは、外科的に分離した植物極板で起こる一次陥入を説明できるかもしれない (Ettensohn, 1984)。図 4 に示したノックアウト実験で見られた瓶型色素細胞の形成と一次陥入は、F-actin の部分的な機能だけで表現できるかもしれない。そこで本モデルでは、色素細胞の頂端側は他の細胞よりも幅が狭く、各楔状細胞の頂端側は基底側よりも幅が広いと仮定した (図 5a)。初期状態 (図 5b) の細胞の頂端側と基底側の大きさは、相互作用エネルギー緩和後のモデルの形状が step 1 (図 1) の胚の形状を模倣できるパラメータに決定した。

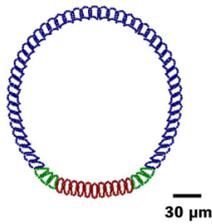
II. F-actin が発生させる細胞骨格の力により、正常胚と処理胚を構成する各細胞の頂端側と基底側の幅が、細胞の位置依存的に変化すると予想された。そこで本モデルでは、各細胞の各側面の F-actin 濃度は、F-actin の重合によって組織を伸展させるために各細胞側面領域を押し出す力の生成と正の相関があると仮定した (Footer et al., 2007; Mullins & Hansen, 2013; Pollard et al., 2000; Pollard & Cooper, 2009)。そこで、色素細胞と楔状細胞を除く細胞の頂端側と基底側の推定される最適な広さ (長さ) を、step 2 の actinin-GFP の頂端側-基底側比のプロファイルを参照して決定し (図 5a) 正常胚のモデル (正常胚モデル) と処理胚のモデル (処理胚モデル) を構成した。ここで、これらの細胞の頂端側の伸長は actinin-GFP の頂端-基底比に基づいて決定され、基底側の長さは細胞面積を維持するために頂端側と反対に変化すると仮定された。

Ⅲ. 主に後期原腸形成に寄与する細胞分裂や三次元的な相互細胞侵入は、初期原腸形成ではほとんど観察されないため、本モデルには含まれていない (Mizoguchi, 1999)。そこで、正常胚と処理胚の胚形状ダイナミクスを、二次元的な運動と変形を導入して記述した(図 5a)。

シミュレーション結果、正常胚 (0.85-0.9) と処理胚 (0.75-0.8) の丸み指数 (図 5c) の時間的变化は、シミュレーションデータ (図 5d, S5a) と実験データ (図 5e, S5b) で同様に観察された。さらに、正常胚モデルおよび処理胚モデルともに、シミュレーションの最終タイムステップで得られた植物極周囲の胚に沿った頂端-基底長の比は、それぞれ step 4 (後期原腸) における正常胚および処理胚と同様の特徴を示した (図 5f)。ここで、正常胚および正常胚モデルは、それぞれ処理胚および処理モデルよりも有意に大きな比率を示したが、観察された胚とシミュレーション結果との間には、正常および処理条件ともに有意差は認められなかった。また、各細胞の頂端側の伸長率をコントロールよりも少し大きくしたシミュレーションも行い、「過分極胚」と名付けた (図 5a, b)。このモデルの胚全体の形状は、コントロール胚よりも広く大きな丸み指数を示した (図 S5a)。このことから、各細胞における F-actin の分布の部位特異的な頂端-底端比極性が、胚全体の形状に敏感に影響していることが示唆された。

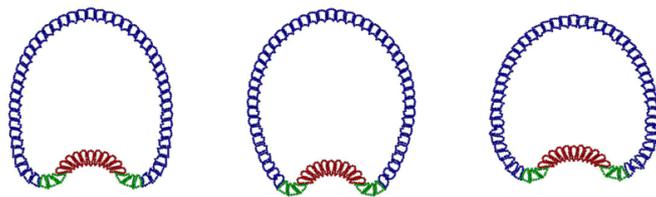


(b) Simulated initial embryo shape at 18 hpf

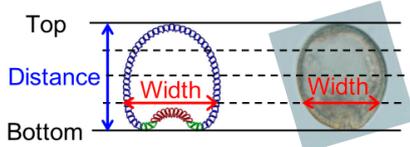


Simulated embryo shapes at 26 hpf

Control embryo Treated embryo Over-polarized embryo



(c)



$$\text{Roundness} = \frac{[\text{Width of embryo at } 1/4 \text{ from vegetal pole}]}{[\text{Length of embryo}]}$$

$$= \frac{[\text{Width}]}{[\text{Distance}]}$$

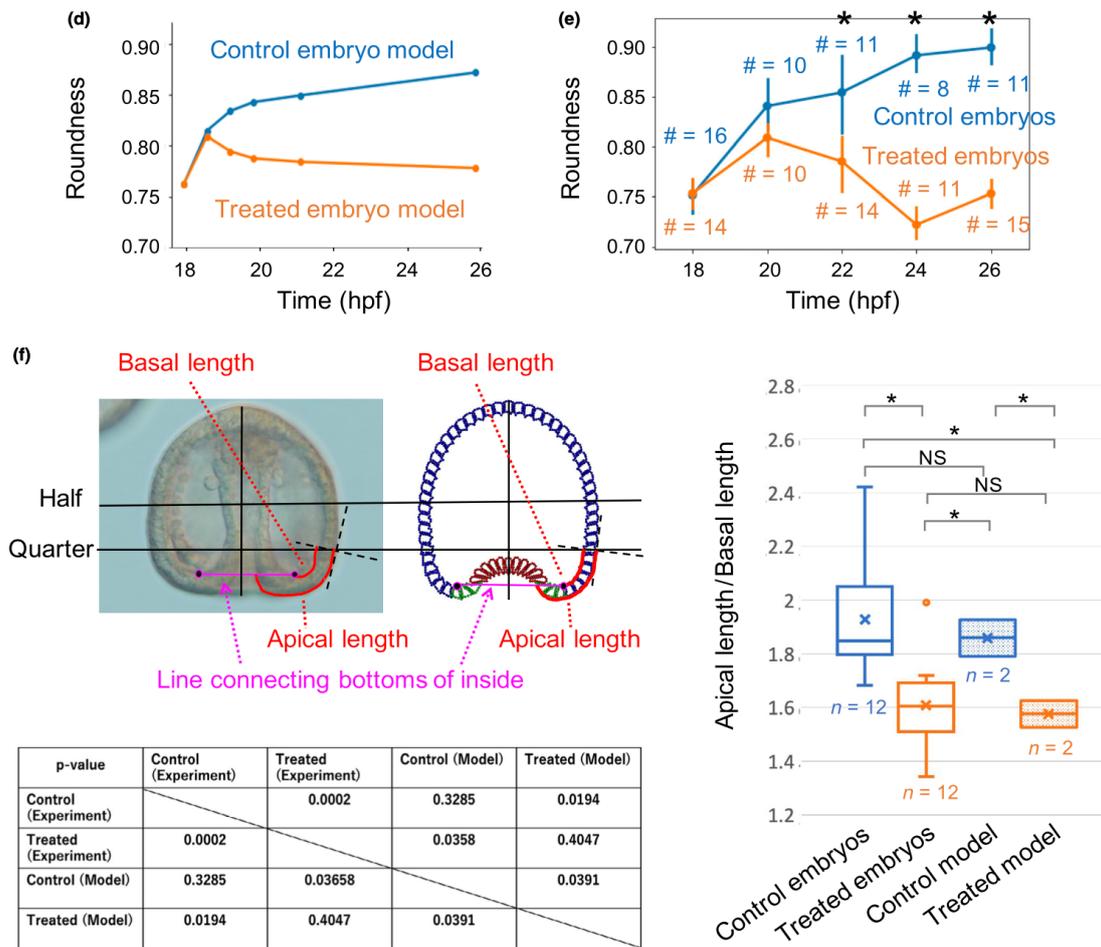


図 5 (a)正常胚、処理胚、過分極胚の頂端側と基底側のモデル細胞長。 $l_i^{a,fin}$ と $l_i^{b,fin}$ は、 i 番目の細胞の頂端側と基底側の最終的な長さを示す（実験方法参照）。前者 2 つのモデルの最終的な長さの分布は、step 2 における正常胚と処理胚の actinin-GFP 強度の頂端側-基底側比の分布に基づいて決定した。中央上部のパネルは図 3d を修正したものである。上部パネルとパネル(b)の赤、緑、青の円はそれぞれ色素細胞、楔状細胞、その他の細胞を表す。(b) 3 つのモデルの 18 hpf と 26 hpf における初期胚形状のスナップショット。(c) シミュレーション結果とイメージングから得られた、胚の植物側の丸みの定義。(d と e) モデル化した正常胚と処理胚の植物側面の丸み指数(d)と実験的に決定した値(e)。青とオレンジの # は各時点における正常胚と処理胚のサンプリング数を示し、エラーバーは 95%信頼区間を示し、* は Welch の t 検定により、正常胚の丸みが処理胚の丸みよりも有意に大きかったことを示す ($p < 0.05$, 図 S5b 参照)。(f) 実験データとシミュレーションデータから得られた頂端-基底

の長さの比と、2種類の間データの Welch の t 検定の p 値を示す。step 4 (後期原腸胚) とシミュレーション最終ステップの胚を比較した。

第5章 まとめと議論

オメガプラズール処理により、不完全な原腸形成を伴う異常な胚の形状が生じた。特に、処理した胚の半数以上が、内胚葉組織が外に伸長した部分的な外原腸形成を示した(図 1, 2)。このような異常な形態形成は、胚の植物極側における細胞内 F-actin 分布の異常によるものであった(図 3, 5)。細胞皮質の力を発生させる F-actin の濃度は、陥入口の細胞を除き、正常胚の植物極側半分、各細胞の頂端側で基底側のそれよりも有意に大きかった。したがって、植物極側の楔型細胞やその他の細胞の頂端面は、基底面よりも有意に広いことが予想された。逆に、処理胚の植物極側の細胞の頂端面は、頂端の F-actin レベルが低いため、基底面側と比べて有意に広くなることはなかった。シミュレーションの結果、植物極側において予想される特徴は、正常胚では正常な初期原腸形成に、処理胚では部分的な外原腸形成につながる可能性があることが示された(図 5)。したがって、植物極側細胞における適切な胚細胞内頂端 F-actin 分布は、原腸形成に必要なものである。

今回の数理モデルでは、F-actin の濃度は、各細胞周辺部を伸長させて組織を伸展させる力と正の相関があると仮定したが、F-actin による力は、環境や他の分子との相互作用によって質的にも量的にも変化する。少なくとも本研究で検討した形態形成過程では、F-actin の濃度と細胞の各側面の伸長との関係について採用した仮定は、形態変化後の正常胚と処理胚における頂端長さと基底長さの関係から支持された(図 5f)。

アピカルラミナが阻害されると、原腸形成は進行しない(Burke et al., 1991)という知見から、本研究例においても全胚のアピカルラミナの分布を可視化・定量したが、正常胚と処理胚の間で有意な差はなかった。しかし正常胚と処理胚の間で植物極半分と全胚の細胞形状には大きな違いが観察されることから、発生する力は各細胞のアピカルラミナの相対量に依存しないことが示された。F-actin 制御因子(*RhoA* または *YAPI*) を部分的にノックアウトした胚では、一次陥入以降の step で原腸形成が阻害された(図 4a, b)。このことは、たとえアピカルラミナが存在しても、F-actin が適切に制御されていなければ、二次陥入が阻害されることを示している。したがって、アピカルラミナは頂端側 F-actin の単なる足場としての役割を果たし、F-actin は原腸形成の二次陥入と胚の全形成を駆動する変形過程に必要な力を発生させるのであろう。ま

た細胞内 F-actin が原腸形成に果たす役割の重要性は、*Rab35* のノックダウンを行った最近の研究 (Remsburg et al, 2021) によっても支持されている。原腸の伸長には、細胞分裂と再編成が必要である (Ettensohn, 1985)。逆に、細胞分裂に依存しない形態形成過程や、細胞分裂がほとんど起こらない初期原腸胚期の形態形成過程に注目するため、本数理モデルでは細胞分裂の影響を考慮しなかった。そのため、このモデルでは、正常胚の原腸の伸長や、処理胚の伸長した原腸の一部がより外側に突出するといった、細胞分裂によって誘発される形態学的過程は再現できなかつた (図 1)。しかし、丸み指数の時間的変化や、植物極側細胞の頂端と基底の長さによって評価される形態学的特徴は、正常胚も処理胚も、細胞分裂の影響を空間的・時間的にほとんど受けず、我々のモデルではよく再現された (図 5d-f)。これらの事実から、細胞分裂だけでなく、細胞骨格の力も原腸形成に大きく寄与していることが示唆された。その一方で、細胞分裂の影響を実装するモデルの検討は重要であり、胚発生の全過程のシミュレーションだけでなく、前述の胚の左右性獲得のような原腸形成後の過程の制御メカニズムの解明のためにも、今後考察すべき課題である。

細胞皮質の力を生み出す F-actin ネットワーク形成は、*in vitro* で pH が低下すると劇的に促進された (Köhler et al., 2012)。step 2 における pH インジケータの頂端-基底比の全胚分布は、細胞内 actinin-GFP シグナル強度の分布と正の相関があることが見出され (図 3c, e)、細胞の頂端側で pH が低いときに F-actin 濃度が高くなることが示唆された。さらに、オメガプラズール処理胚の植物極側半分の細胞における F-actin の分布の頂端-基底極性は、正常胚の分布よりも有意に小さくなった (図 3c) が、胚全体のアピカルラミナの分布は有意な変化を示さなかつた (図 3d)。逆に、F-actin 制御因子のノックアウトによって F-actin の重合が直接障害されても、胚全体の細胞内 pH と極性の分布は変化しなかつた (図 4d)。これらの事実は、バフンウニ胚においても細胞内 pH が F-actin 重合の一方的な制御因子であり、F-actin の分布が適切な頂端-基底細胞内極性を形成するようにすることで、二次陥入の進行に寄与していることが示唆された。

ここで、オメガプラズール添加は、バフンウニ胚のほとんどの細胞において、細胞内 pH の頂端-基底の極性を下げ、逆に細胞内 pH を上昇させていた (図 S6)。一方同じウニである *Lytechinus variegatus* (LV) 胚の最近の研究では、バフンウニ胚の場合とは逆に、オメガプラズールが細胞内 pH を有意に低下させ

ることが報告されている (Schatzberg et al., 2015)。このことは、LV 胚の細胞内 pH の頂端-基底の極性がオメガラゾールによって上昇している可能性を示している。最近の *in vitro* 実験 (Köhler et al, 2012) と今回の *in vivo* 研究の両方を通して確認されたように、F-actin ネットワークの形成と力の発生に対する pH の影響は普遍的な生化学的特徴と期待される。したがって、オメガラゾール添加された LV 胚は、細胞内 pH と F-actin 濃度の頂端-基底の極性が増加した「過分極胚」となっている可能性がある。本研究の数値モデルで考察した「過分極胚モデル」は、正常胚よりも大きな丸み指数を持つ広い胚形状を示した (図 5b, S5b)。そしてこの傾向はオメガラゾール処理された原腸胚期の LV で、蛍光イメージングなどで観察されている (Schatzberg et al., 2015)。このこともまた、細胞位置依存的な細胞内 F-actin の頂端-基部分極が、初期原腸形成に大きく寄与していることを裏付ける。

ウニ胚にオメガラゾールを投与すると、原腸形成は完了するものの、成体原基の左右非相称な形成が乱される (Bessodes et al., 2012; Duboc et al., 2005; Hibino et al., 2006) (図 S7)。この左右非相称性の確立には、原腸形成直後に観察される *Nodal* 遺伝子の左右非相称な発現が重要である (Duboc et al., 2005)。バフンウニにおける左右非相称性の乱れは、本研究で観察されたものとは異なり、オメガラゾール濃度が低い (60%~80%) 場合に観察される (Hibino et al. 2006)。

本報告は、ウニの正常およびオメガラゾール誘発異常原腸形成に焦点を当て、細胞内 pH による細胞内 F-actin 重合および極性化の細胞位置依存的制御を明らかにした。カエル、ニワトリ、ゼブラフィッシュ、ホヤでは、 H^+/K^+ イオンポンプ活性を阻害すると、左右非相称性が乱される (Kawakami et al., 2005; Levin et al., 2002; Shimeld & Levin, 2006)。したがって、オメガラゾールは、 H^+/K^+ イオンポンプ活性の阻害を介して、細胞内 pH による細胞内 F-actin 分布を乱すことでウニ胚の左右非相称性を崩壊させる可能性がある

(Bessodes et al., 2012; Duboc et al., 2005; Hibino et al., 2006)。しかし、ウニの H^+/K^+ イオンポンプと Na^+/K^+ イオンポンプの配列は類似性が高いため、発生過程に沿った胚全体の遺伝子発現プロファイルや細胞内分布など、 H^+/K^+ イオンポンプの詳細な特徴はまだ明らかにされていない。したがって、原腸形成を促進する胚の位置依存的な細胞内状態の基盤となる形成メカニズムを探るためには、さらなる研究が必要である。また、 H^+/K^+ イオンポンプ活性の阻害が

初期原腸形成に及ぼす動物間での普遍的な影響についても、今後明らかにする必要がある。

第6章 実験方法

実験動物

バフンウニの成体を瀬戸内海または館山湾から採集した。卵と精子は 0.55 M KCl を体腔内に注入して得た。受精卵は 16°C の濾過海水で培養した。

オメプラゾール処理

ジメチルスルホキシドに溶解したオメプラゾール（富士フィルム和光純薬）の 100 mM ストック溶液を最終濃度 100 μ M となるように受精卵に添加し、16°C で培養した。

Whole mount in situ hybridization

Grial cells missing (*gcm*) の Whole mount in situ hybridization を、美濃川ら (2004) の方法に従って行った。*gcm* のアンチセンス RNA プローブは、表 S1 に記載のプライマーを用いて cDNA クローンから増幅した PCR 断片から転写した。アンチセンス RNA プローブは、MEGAscript T7 Transcription Kit (Ambion) と DIG RNA Labeling Mix (Roche) を用いて合成した。ウニ胚は Fixative III [4% パラホルムアルデヒド、32.5% ろ過海水、32.5 mM 3-(N-morpholino)propane sulfonic acid (MOPS) (pH 7.0)、162.5 mM NaCl] を用いて 4°C で 16 時間固定した。MOPS バッファー (100 mM MOPS、500 mM NaCl、0.1% Tween20) で洗浄した後、固定した胚は使用するまで -20°C で 70% エタノール中に保存した。胚を MOPS バッファーで 3 回洗浄した後、70% ホルムアミド、100-mM MOPS (pH7.0)、500-mM NaCl、0.1% Tween20、および 1 mg/ml のウシ血清アルブミン (BSA) を含むハイブリダイゼーションバッファー中で、50°C で 3 時間プレハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションのために、0.1 ng/ μ l のプローブをプレハイブリダイズしたサンプルに加え、50°C で 6 日間振盪しながらハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、胚を MOPS バッファーで 5 回洗浄した。その後、胚を再びプローブを含まないハイブリダイゼーションバッファーに移し、50°C で 3 時間インキュベートした後、MOPS バッファーで 3 回洗浄した。ブロッキングのために、胚を 10 mg/ml の BSA を含む MOPS バッファ

一中で室温で 20 分間インキュベートし、続いて 10%のヒツジ血清と 1 mg/ml の BSA を含む MOPS バッファー中で 37°Cで 30 分間インキュベートした。1% ヒツジ血清および 1 mg/ml の BSA を含む MOPS バッファー中で、アルカリホスファターゼ結合 Fab フラグメント (Roche Molecular Biochemicals) の 1:1500 希釈液で 4°Cで一晩インキュベートした。胚を 2 時間ごとに MOPS バッファーで 5 回洗浄し、抗体を除去した (最後の洗浄は一晩振盪して行った)。胚をアルカリホスファターゼバッファー [100 mM Tris HCl (pH 9.5)、5 mM MgCl₂、100 mM NaCl、1 mM Levamisole] で 2 回洗浄した。染色反応は、10%ジメチルホルムアミド、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) (SIGMA) および 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸 (BCIP) (SIGMA) を含むアルカリホスファターゼ緩衝液中で行った。

内胚葉組織のアルカリホスファターゼ染色

内胚葉組織のアルカリホスファターゼ染色を、Whittaker and Meedel (1989) に従って行った。ウニ胚を Fixative III (4%パラホルムアルデヒド、32.5%ろ過海水、32.5 mM MOPS、pH 7.0、162.5 mM NaCl) で 4°Cで 1 時間固定した。胚は 0.5 ml の 1×PBS で 3 回洗浄した。NBT (SIGMA) と BCIP (SIGMA) を含む反応バッファー [100 mM Tris-HCl (pH9.5)、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂] 中で胚をインキュベートし、内在性アルカリホスファターゼ活性による発色反応を行なった。胚は、4°Cで 48 時間反応させた後、室温で 6 時間反応させると中腸・後腸に特異的な染色を示した。

pH, actinin, アピカルラミナのライブイメージング

ウニ胚の細胞内 pH は、pHrodo Red AM 細胞内 pH インジケーターまたは 5-(and-6)-carboxy SNARF-1 (C-1270) (Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ 10 μM および 5 μM の終濃度で、16°Cで 30 分間染色した。胚をろ過した海水で洗浄し、共焦点顕微鏡を用いて、pHrodo は 555/585 nm の励起/発光、SNARF-1 は 555/573 m の励起/発光で観察した。actinin と fibropellin-1 は GFP との融合により可視化した。間充細胞胚期の全 RNA を、ISOGEN (Nippongene) を用いて製造メーカーのマニュアルに従って抽出した。*actinin* および *fibropellin1* をコードする配列は、SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用いて、表 S2 に記載のプライマ

ーで逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) により増幅し、pGreenLantern2 由来プラスミドの EcoRI-XhoI 制限部位間にクローニングした。mRNA (*actinin-GFP*、*fibropellin1-GFP* の順) を、mMESSAGE mMACHINE T7 ultra transcription kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて in vitro で合成し、RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて精製した。 mRNA を、Liu ら (2019) の記載に従って受精卵にマイクロインジェクションした。蛍光画像は、励起波長 488 nm、発光波長 515 nm の共焦点顕微鏡で取得した。胚の動物極と植物極の画像は、厚さ $6\mu\text{m}$ で 7 枚の z 軸画像を平均し、最も面積の広い z スタック画像に基づいて解析した。

蛍光シグナルの定量化

胚の蛍光画像を、円周に沿った植物極と動物極の間の角度 θ ($0\sim 180$) に従って取得し (図 3a, S7)、ImageJ 2.1.0 の "Polar Transformer" 機能 (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/polar-transformer.html>) を用いて帯状画像に変換した。各バンド状画像は、メディアンフィルター (半径=1.0) を用いてフィルター処理した。フィルタリングした画像を、それぞれ "Mean" (pHrodo indicator)、"IsoData" (*actinin*)、"Triangle" (*fibropellin-1* および SNARF-1) 関数を用いて 2 値化し、胚の細胞領域を得た。 θ の pH インジケータ、*actinGFP*、および *fibropellin1-GFP* の頂端-基底比は、頂端側および基底側から幅 $3.126\mu\text{m}$ の領域の平均蛍光強度を用いて決定した (図 3a, S7)。

pHrodo インジケータの蛍光強度は、頂端側から $6.232\mu\text{m}$ の幅の細胞内領域の平均蛍光強度と定義した (図 S7)。蛍光シグナル強度の値は、観察された蛍光強度と胚全体の平均バックグラウンド蛍光強度との比を計算することで推定した。F-actin とアピカルラミナは、受精卵に *actinin-GFP* と *fibropellin1-GFP* の mRNA をマイクロインジェクションして染色した。受精卵サンプル間で、注入された mRNA の量は厳密には一定ではなく、これは発生過程で増幅される可能性がある。したがって、F-actin とアピカルラミナの細胞内分布の特徴を評価するために、主に頂端-基底比のみを用いた。細胞の頂端側と基底側における *actinin-GFP* の蛍光強度については図 S2 参照。胚の左右は動物-植物軸に対して軸対称とみなしたため、胚の各蛍光画像から各 θ について 2 点のデータを得た。両データは、各値の標本平均値および 95% 信頼区間を推定するた

めに用い、標本数 (n) は 2× (観察された胚の数) とした。

CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子ロックアウト

バフンウニにおける内在性 *RhoA* および *YAP1* のロックアウトは、Liu ら (2019) に記載された方法を用いて行った。sgRNA 調製に用いたオリゴヌクレオチド配列を表 S3 に示す。

ヘテロ二重鎖移動度アッセイと DNA 配列決定

ヘテロ二重鎖移動度アッセイ (HMA) と DNA 塩基配列決定を用いたロックアウト胚の解析は、Liu ら (2019) によって既に発表された通りに行った。各標的領域の増幅に用いたプライマー配列を表 S4 に示す。

ウニ胚の数理モデル

ウニ胚の動物極と植物極の断面における、原腸形成の step 1~3 の間の細胞運動を記述する 2 次元粒子モデルを構築した。細胞数は次の通り、胞胚期の胚の赤道面における細胞数に基づき設定した (Mizoguchi, 1999) : (1) 各細胞は半径 (r) が $1.125\ \mu\text{m}$ であり、各胚はリング状に連結された 64 個の細胞で表された (図 S8) ; (2) 各細胞の周囲は $36\ \mu\text{m}$ であり、step 1 における胚の高さと幅はそれぞれ $110\ \mu\text{m}$ と $100\ \mu\text{m}$ であり、これはウニ胚の観察結果と一致した (結果は示していない) ; (3) 細胞の分裂や他の断面からの細胞侵入は、一次侵入の段階ではほとんど観察されないため、細胞数は一定とした

(Mizoguchi, 1999) ; (4) 各粒子の運動は、過減衰型の運動方程式(1)に従った。

$$\frac{\partial \mathbf{X}_{ij}}{\partial t} = -\frac{1}{\gamma} \frac{\partial V}{\partial \mathbf{X}_{ij}} \quad (1)$$

ここで $\mathbf{X}_{ij} = (x_{ij}(t), y_{ij}(t))$ は i 番目のセルを構成する j 番目の粒子 ($i = 0, 1, 2, \dots, 63, j = 0, 1, 2, \dots, 15$) の時刻 x-y 平面上の位置 (図 5 および S8)、 γ は各粒子に作用する抗力の係数、 V は系全体のポテンシャル、(5) y 軸は胚モデルの動物-植物軸に平行である。

$\frac{V}{\gamma} = U$ と置き直し、 U は以下のように計算した

$$U = U_{bond} + U_{collision} + U_{actin} + U_{adhesion} + U_{ca} + U_{ea} \quad (2)$$

ここで U_{bond} は、各セルの周囲を維持するために、各セル内の隣り合う粒子対の間に働く弾性力ポテンシャルであり、次式で示される：

$$U_{bond} = \sum_{i=0}^{63} \sum_{j=0}^{15} \frac{k_b}{2} (d_{(i,j),(i,j+1)} - 2r)^2 \quad (3)$$

ここで、 k_b , $d_{(i,j),(i,j+1)}$, r はそれぞれ弾性係数、時間 t における i 番目のセル内の j 番目と $j+1$ 番目の粒子($j=15$ の場合は $j+1=0$)の距離、粒子半径である。 $U_{collision}$ は全粒子間の排除体積効果のポテンシャルで、次のように表される：

$$U_{collision} = \sum_{i<k} \sum_{j<l} \theta(2r - d_{(i,j),(k,l)}) \frac{k_c}{2} (2r - d_{(i,j),(k,l)})^2 \quad (4)$$

ここで、 k_c は2つの粒子間の反発係数、 $\theta(x)$ はヘヴィサイドの階段関数である。

U_{actin} は、細胞骨格による頂端側と基底側の伸縮によって細胞の形状を形成し、維持するための弾性力ポテンシャルであり、以下のように表される：

$$U_{actin} = \sum_i \frac{k_a}{2} ((d_{(i,10),(i,14)} - l_i^a)^2 + (d_{(i,2),(i,6)} - l_i^b)^2) \quad (5)$$

ここで i 番目の細胞の頂端側と基底側は、それぞれ $j=10-14$ と $j=2-6$ の粒子で構成されていた。時刻 t における頂端側と基底側の幅は、それぞれ $d_{(i,10),(i,14)}$ と $d_{(i,2),(i,6)}$ で与えられた。 k_a は細胞の頂端側と基底側の幅を維持する弾性係数と仮定した。

$U_{adhesion}$ はカドヘリンなどのタンパク質による細胞接着の潜在的な力であり、以下のように表される：

$$U_{adhesion} = \sum_i \sum_j \frac{k_h}{2} (d_{(i,j),(i+1,k(j))} - 2r)^2 \quad (6)$$

ここで、 k_h は i 番目と $i+1$ 番目のセル ($i=63$ の場合は $i+1=0$) の粒子間の接着力の係数であり、 $k(j) \equiv 6, 7, 8, 9, 10$ はそれぞれ $j \equiv 2, 1, 0, 15, 14$ の場合である (図 S7)。

U_{ca} は、各セル面積を保存する力のポテンシャルで、以下のように示される：

$$U_{ca} = \sum_i \frac{k_{ca}}{2} (s_i - s_i^{ini})^2 \quad (7)$$

ここで、 k_{ca} は各セルの面積を維持するために必要な弾性係数である。i 番目のセルの面積は、 $s_i = \sum_{j=0}^{15} |\mathbf{X}_{ij} - \mathbf{X}_i^{cc}|$ と表され、 $\mathbf{X}_i^{cc} = \frac{1}{16} \sum_{j=0}^{15} \mathbf{X}_{ij}$ 、 s_i^{ini} は初期配置において $\mathbf{X}_{i,j}$ で与えられた s_i を指す。

U_{ea} はウニ胚の面積（体積）を維持する力のポテンシャルで、以下のように表される：

$$U_{ea} = \frac{k_{ea}}{2} (S - S^{ini})^2 \quad (8)$$

ここで、 k_{ea} は胚の面積を維持するのに必要な弾性係数である。面積は $S =$

$\sum_{i=0}^{63} |\mathbf{X}_i^{cc} - \mathbf{X}^{ec}|$ で推定し、 $\mathbf{X}^{ec} = \frac{1}{64} \sum_{i=0}^{63} \mathbf{X}_i^{cc}$ とし、 S^{ini} は初期状態の $\mathbf{X}_{i,j}$ で与えられる S を参照した。

U_{ca} と U_{ea} は、実際の 3 次元細胞や胚における体積保存力の代替と考えられ、各細胞や胚の内部圧力は等方的と考えられる。

数理モデルのシミュレーション方法

本数理モデルのシミュレーションは、保存 $\mathbf{X}^{ec} = (0, 0)$ で、0.000064 時間の時間間隔でオイラー法を用いて運動方程式(1)の積分により行った。すべてのモデルにおいて、パラメータ k_{bond} , $k_{collision}$, k_{actin} , $k_{adhesion}$, k_{ca} , k_{ea} は、それぞれ 9375, 6250, 8125, 625, 0.00625 hour⁻¹ と経験的に与えられた。結果の定性的な特徴は、順序が保たれていれば、これらの値の詳細とは無関係であった。色素細胞、楔型細胞、およびその他の細胞のモデルに対して、適切な細胞タイプに依存する l_i^a と l_i^b の値 = $l_i^{a,ini}$ と $l_i^{b,ini}$ を与えれば、モデルは原腸形成の step1 で胚の形状を形成した（図 5）。この構成は、すべてのシミュレーションにおいて、時間 $t = 0$ （初期構成）における粒子位置 $\mathbf{X}_{i,j}$ を与えた。

初期原腸形成過程は、 l_i^a と l_i^b のそれぞれの変化によってシミュレートされ、時刻 $t = 0$ において = $l_i^{a,ini}$ と $l_i^{b,ini}$ から = $l_i^{a,fin}$ と $l_i^{b,fin}$ に変化した。ここで、 $l_i^{a,fin}$ と $l_i^{b,fin}$ は、F-actin が一定であるという予想に基づき、色素細胞以外の細胞では $l_i^{a,fin} + l_i^{b,fin} = l_i^{a,ini} + l_i^{b,ini} =$ 一定に従うと仮定した。このモデルは、 $l_i^{a,fin} + l_i^{b,fin} = l_i^{a,ini} + l_i^{b,ini} =$ と $d_{(i,2),(i,6)} \rightarrow l_i^{b,fin}$ の緩和過程として、初期原腸形成と同様の構造挙動を示した。

統計解析

すべての実験は、1 回あたり 4 レプリケート以上で、2 回以上独立に行った。統計検定は SciPy ライブラリ (<https://www.scipy.org/>) を用いて行った。各胚の植物体側の丸み指数は、以下の式で評価した。各胚の植物体側の丸み指数は、 $[\text{胚の底辺と中央部の中間の幅}]/[\text{胚の長さ}]$ で評価した (図 5C)。植物極付近の胚の頂端長は、胚全体の高さの 1/4 から、胚の内側の底辺を結ぶ直線と交差する点までの頂端側に沿った曲線の長さとして定義した (図 5f)。基底長は、胚の内側の底辺から、この曲線が胚の 1/4 で頂端包絡線の接線と垂直に交わる点までの曲線として定義した (図 5f)。シミュレーション結果についても、植物極周囲の頂端と基底の長さを決定するために、同じ定義を採用した (図 5f)。曲線の各長さは ImageJ 2.1.0 を用いて測定した。サンプル数(n)は 2 (観察された胚の数) とし、シミュレーション結果からのものは、各モデルの左側と右側から得られたデータであるため、2 個とした。

第7章 補足データ

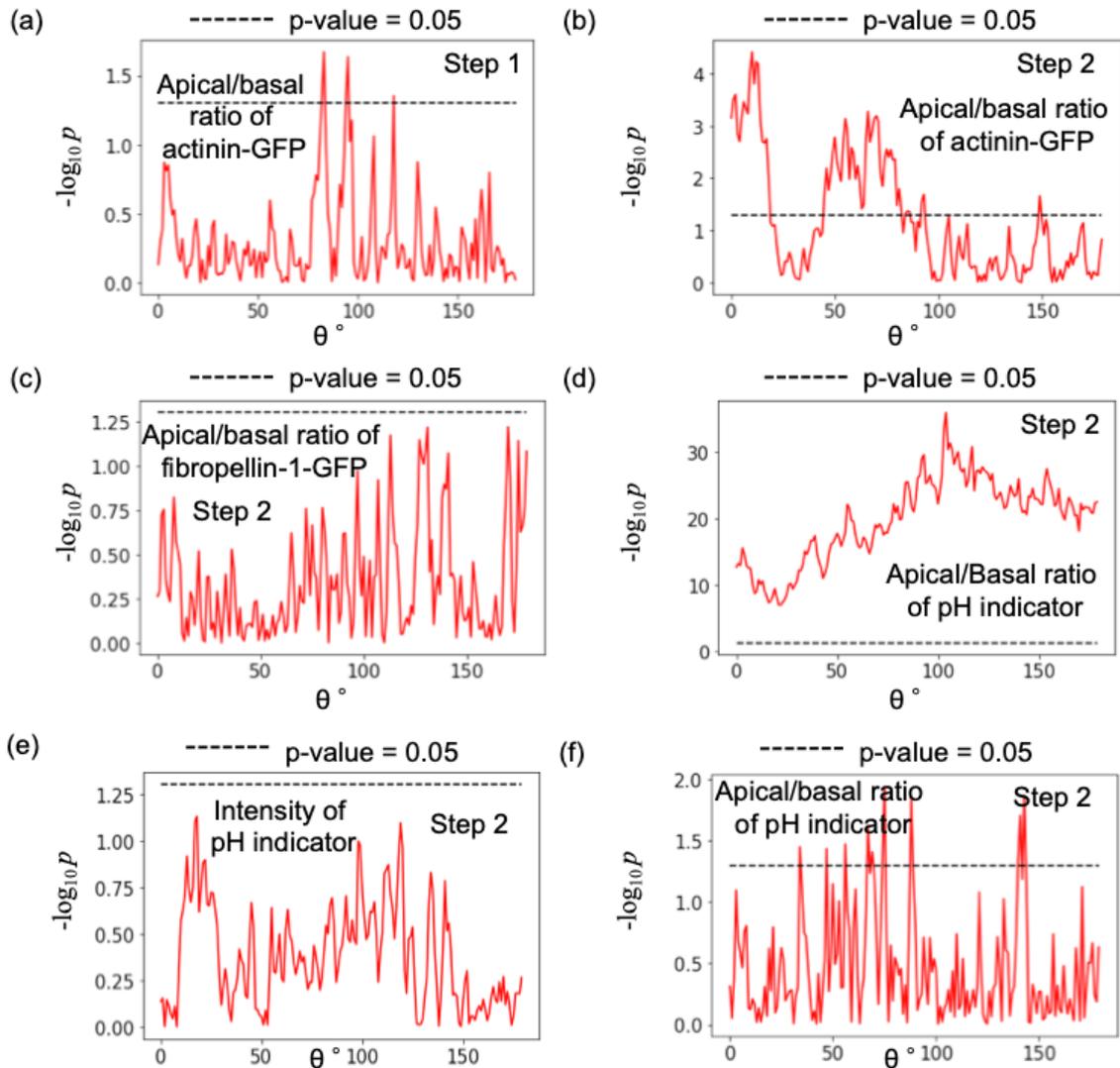


図 S1 p 値の分布 ($-\log_{10} p$)。(a-d)各 θ (0° - 180°) におけるコントロール胚と処理胚の Welch の t 検定を用いて、step 1 の actinin-GFP (a) と step 2 の actinin-GFP (b)、fibropellin1-GFP (c)、pH 指示薬 (d) の蛍光強度を比較して得られた頂端/基底比の p 値分布 ($-\log_{10} p$)。(e-f) 各 θ における *RhoA* ノックアウト胚とコントロール胚の Welch の t 検定の p 値 ($-\log_{10} p$) の分布で、pH インジケータの蛍光強度 (e) および pH インジケータの頂端/基底比 (f) を比較した。

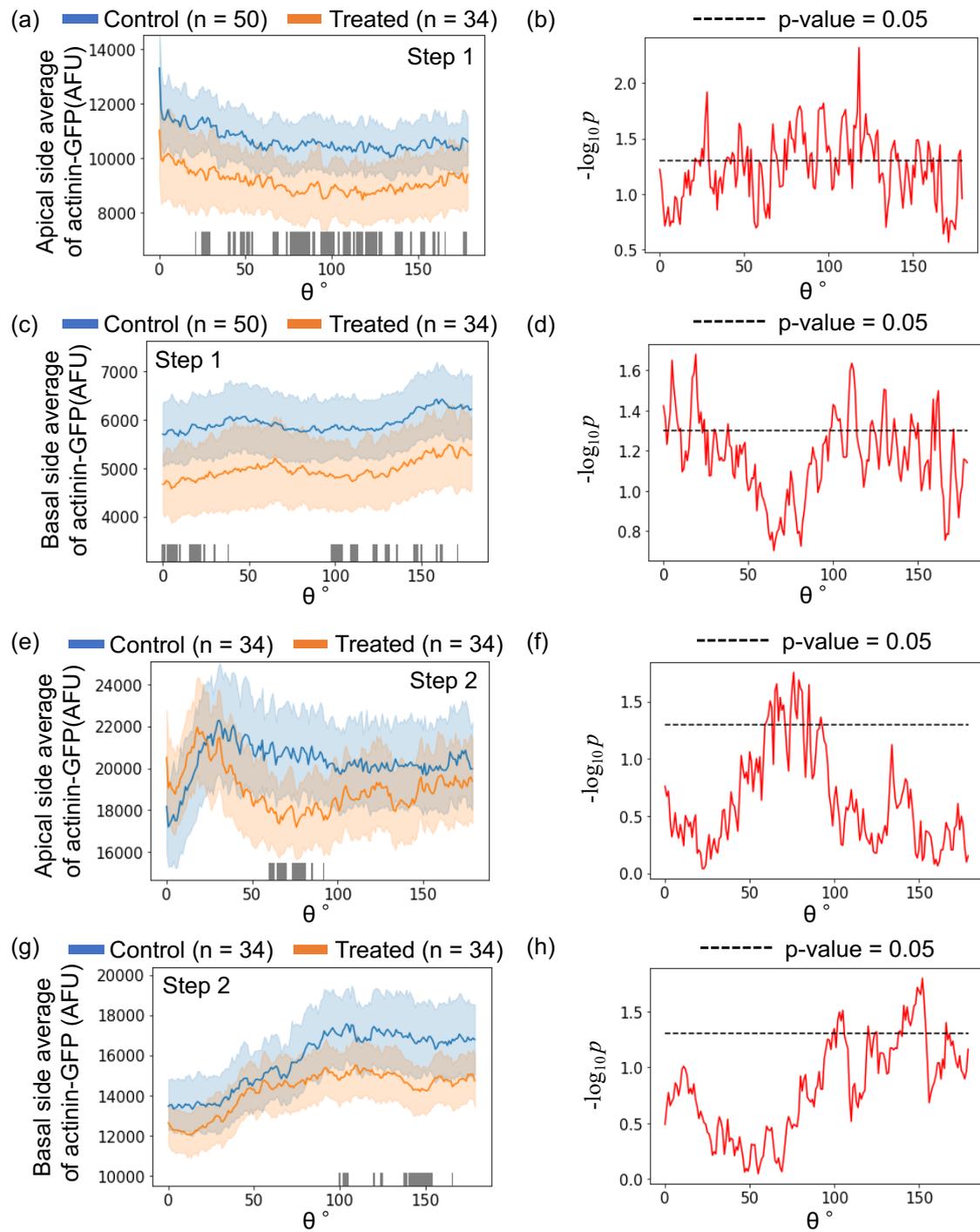


図 S2 細胞内 actinin-GFP 強度の評価。各 θ における step 1 の頂端側 (a)、step 1 の基底側 (c)、step 2 の頂端側 (e)、step 2 の基底側 (g) のコントロールおよび処理胚における actinin-GFP の細胞内蛍光強度の分布。Welch の t 検定を用いて得られた、各 θ における step 1 の頂端側 (b)、step

1 の基底側 (d)、step 2 の頂端側 (f)、step 2 の基底側 (h) の細胞内 actinin-GFP 強度の P 値分布 ($-\log_{10} p$)。色と θ の表示を図 3 に示す。

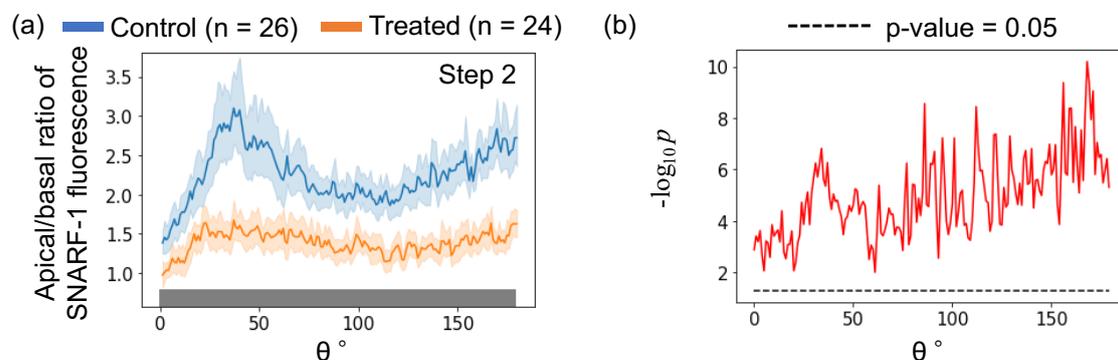
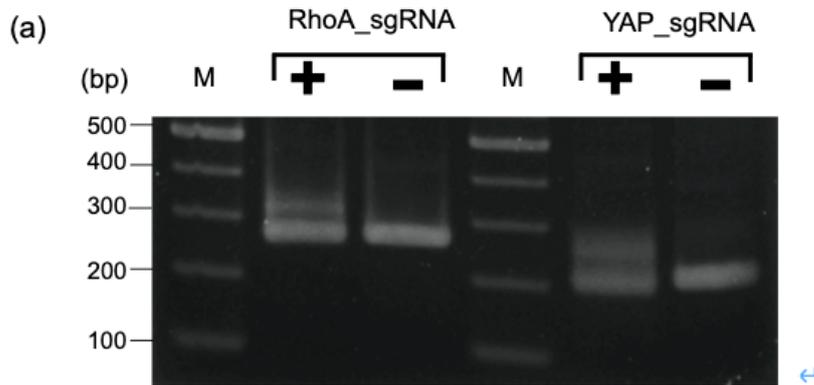


図 S3 SNARF-1 を介した細胞内 pH 極性の評価。(a) SNARF-1 蛍光強度が低いほど pH が高くなる step 2 におけるコントロールと処理胚の角度 θ の関数としての SNARF-1 蛍光強度の細胞内極性分布。(b) 各 θ における SNARF-1 強度の細胞内極性について、コントロール胚と処理胚の間で Welch の t 検定を用いて得られた P 値分布 ($-\log_{10} p$)。コントロール胚と処理胚における SNARF-1 と actinin-GFP シグナル強度の頂端／基底比 (図 3E) の相関係数は、それぞれ 0.48 と 0.64 であった。



(b) RhoA knockout

WT CCACAAGCACCATCTCCAAC-**CCACA**CGA-TAACCAACTTTTCCTAATCGCAGCCATATT

CCACAAGCACCATCTCCAAC-----TTTTTCCTAATCGCAGCCATATT $\Delta 10$
 CCACAAGCACCATCTCCAAC-----CAACTTTTCCTAATCGCAGCCATATT $\Delta 6$
 CCACAAGCACCATCTCCAACGA**A**TAACCAACTTTTCCTAATCGCAGCCATATT +1
 CCACAAGCACCATCTCT**TA**ACGA-TAACCAACTTTTCCTAATCGCAGCCATATT 0
 CCACAAGCACCATCTCCAAC**AA**-TAACCAACTTTTCCTAATCGCAGCCATATT 0
 CCACAAGCACCATCTCCAACGA-TAACCAACTTTTCCTAATCGCAGCCATATT 0
 CCACAAGCACCATCTCCAACGA-TAACCAACTTTTCCTAATCGCAGCCATATT 0
 CCACAAGCACCATCTCCAACGA-TAACCAACTTTTCCTAATCGCAGCCATATT 0
 CCACAAGCACCATCTCCAACGA-TAACCAACTTTTCCTAATCGCAGCCATATT 0

YAP1 knockout

WT CTAGCCATGAAATTG**CCAGTCGTAGCTT**-----GGGTCCG**AG**GGGATGACGATCGCC

CTAGCCATGAAATTGCCAGTCGTAGCTT-----GGGGATGACGATCGCC $\Delta 9$
 CTAGCCATGAAATTGCCAGTCGTAGCTT-----GGGGATGACGATCGCC $\Delta 9$
 CTAGCCATGAAATTGCCAGTCGTAGCTT-----GGGGATGACGATCGCC $\Delta 9$
 CTAGCCATGAAATTGCCAGTCGTAGCTT**GTCC**CCCTAGTCGTAGGGGATGACGATCGCC +14
 CTAGCCATGAAATTGCCAGTCGTAGCTT-----GGGTCC--GGGGATGACGATCGCC $\Delta 3$
 CTAGCCATGAAATTGCCAGTCGTAGCTT-----GGGTCC**C**-AGGGGATGACGATCGCC $\Delta 1$
 CTAGCCATGAAATTGCCAGTCGTAGCTT-----GGG**CC**GCAGGGGATGACGATCGCC 0
 CTAGCCATGAAATTGCCAGTCGTAGCTT-----GGGTCCG**AG**GGGATGACGATCGCC 0
 CTAGCCATGAAATTGCCAGTCGTAGCTT-----GGGTCCG**AG**GGGATGACGATCGCC 0

図 S4 ノックアウト胚における変異の解析。(a) 40 hpf で *Cas9* のみを注入したコントロール胚 (-) または *Cas9*/sgRNA を注入した *RhoA* または *YAP1* ノックアウト胚 (+) から抽出したゲノム DNA および表 S3 に示すプライマーを用いたヘテロ二重鎖移動度アッセイ (HMA) により遺伝子型を決定した。PCR 産物は 3% アガロースゲルで分離した。M は 100-bp DNA ラダーを示す。(b) 9 個体の *RhoA* ノックアウト胚と 9 個体の *YAP1* ノックアウト胚における標的部位の塩基配列。野生型 (WT) の配列が上に示されており、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM 配列) はマゼンタ色で、プロトスペーサー (標的配列) は緑色で強調表示されている。欠失、置換、挿入はそれぞれ赤ダッシュ、赤文字、青文字で示す。

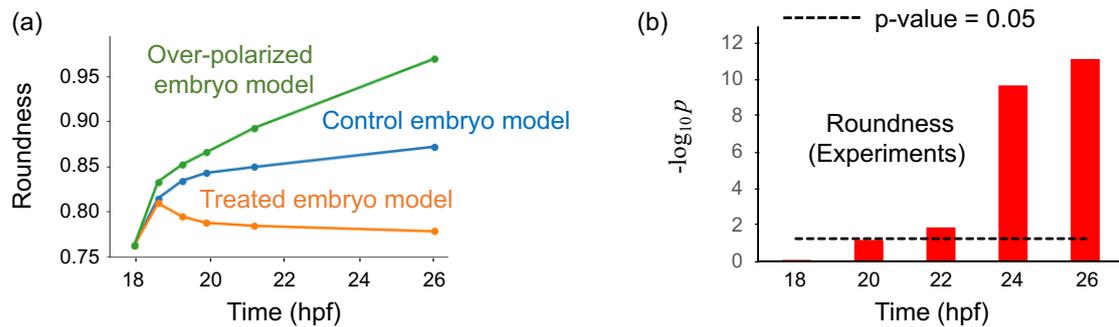


図 S5 胚の植物極側の丸み指数と p 値のシミュレーション. (a)正常胚, 処理胚, 過分極胚のモデル化された植物体側の丸みの時間経過. (b) Welch の t 検定を用いて求めた, 正常胚と処理胚の植物極側面の丸み指数の P 値 ($-\log_{10} p$) .

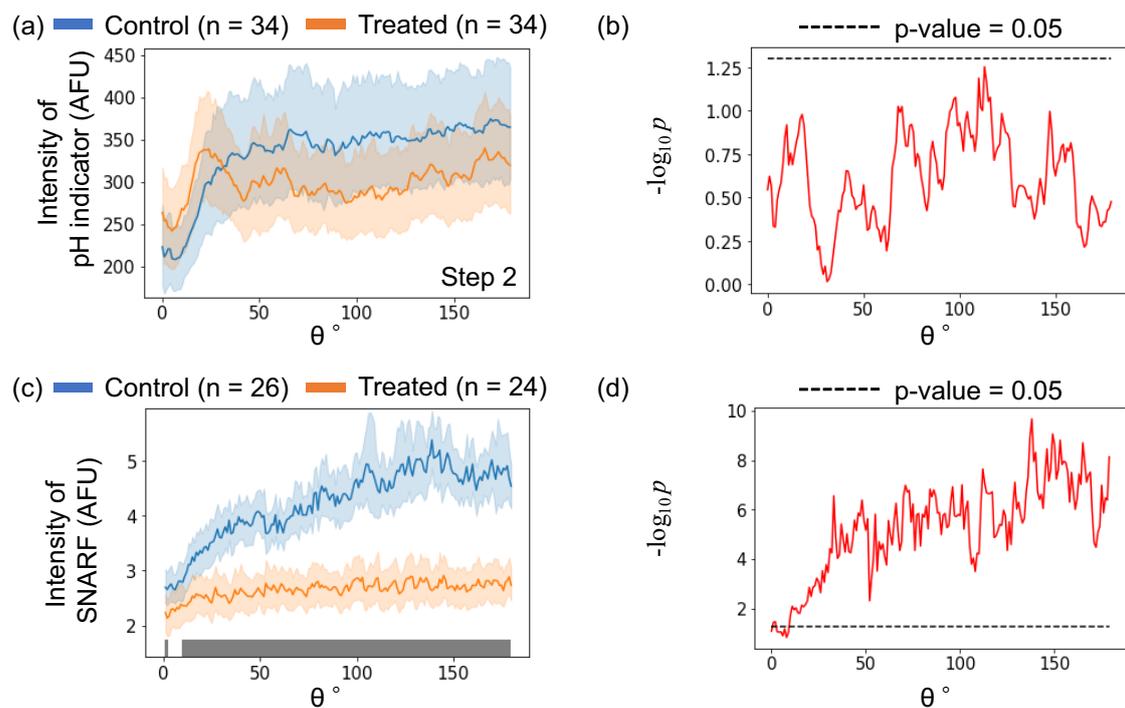


図 S6 細胞内 pH の評価。各 θ における step 2 のコントロールと処理胚の pH インジケーター (a) と SNARF-1 (c) の細胞内蛍光強度の分布。各 θ における pH インジケーター (b) と SNARF-1 (d) の細胞内強度の Welch の t 検定によるコントロールと処理胚間の P 値分布 ($-\log_{10} p$) 。色と θ の表示は図 3 と同様。

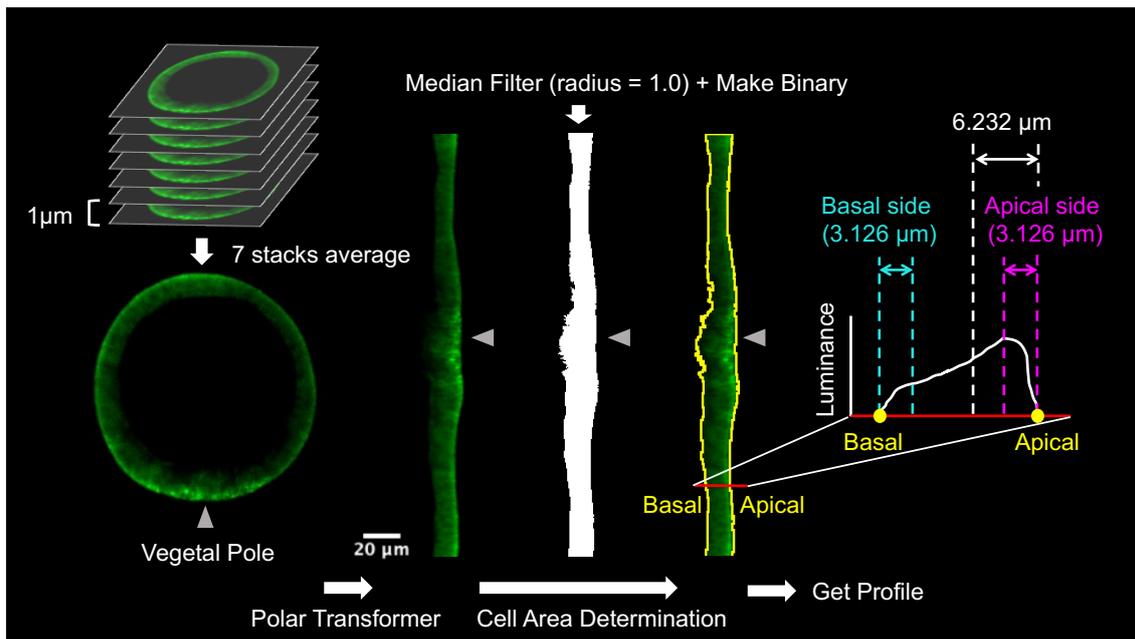


図 S7 蛍光画像の定量化。細胞内蛍光強度と極性を評価するために用いた画像解析法のワークフロー（実験方法を参照）。

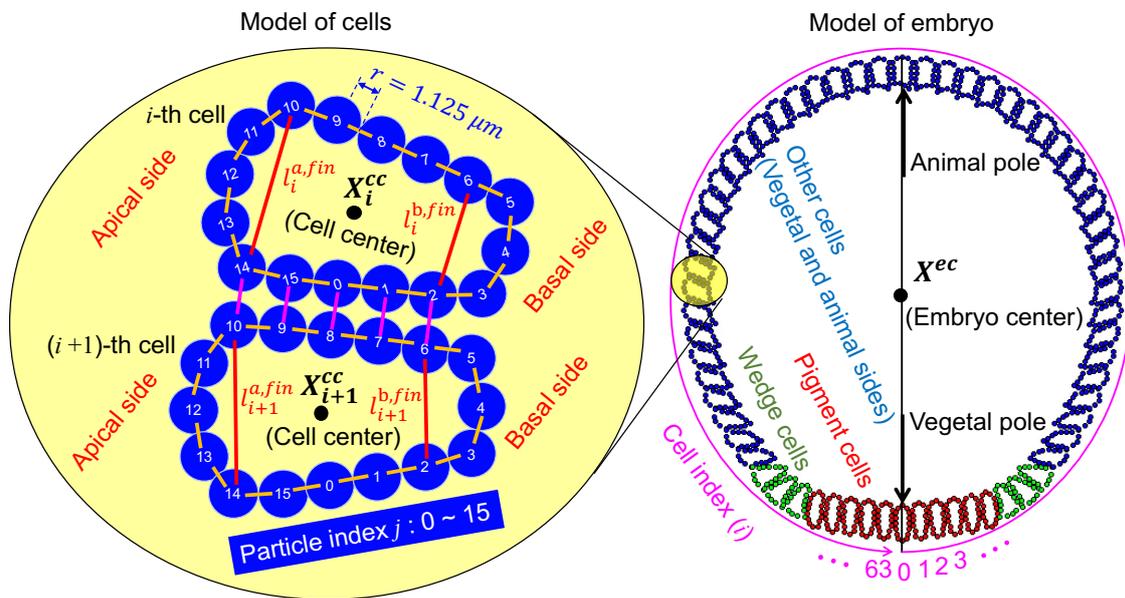


図 S8 各細胞と 64 個の細胞からなる胚の数学的モデル形状の図。オレンジまたはマゼンタの線で結ばれた一対の粒子は、それぞれの直径に等しい自然長を持つバネで結ばれている。オレンジ色の線に沿った 16 個の粒子によって形成される各グループは各細胞の膜を表し、マゼンタ色の線で結ばれた一対の粒子間のバネの弾性力は細胞間の接着力を表す。各細胞の頂端側と基底側における細胞皮質力は、それぞれ自然長 $= l_i^{a,fin}$ と $l_i^{b,fin}$ の赤線で結ばれた一対の粒子間のバネの弾性力によってモデル化した。" X_i^{cc} " と書かれた黒い点は i 番目のセルの中心の位置を表している。植物極から始まる胚のモデルの周りのマゼンタ色の曲線は、細胞インデックス $i = 0, 1, \dots, 63$ の軸である。" X^{ec} " と記された黒い点は胚の中心を表す。赤、緑、青の細胞は、それぞれ色素細胞、楔状細胞、その他の細胞を表し、発生過程におけるさまざまな力学的特徴を示している。

表 S1 アンチセンス RNA プローブの PCR アセンブリーで使用したプライマー

Name	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
GCM	CGACTGATAACCCAGCTCAAC	TCACCATCTATCCACTCGTT

表 S2 cDNA 単離に用いたプライマー

Name	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
Actinin-GFP	CTAGGTACCAAGATCGCCACCATGGCGTACTATGGCAATC	GCCGCCACTAGAATTGCAAGCTCACTCTGGCCG
Fibropellin-1-GFP	CTAGGTACCAAGATCGCCACCATGAGGACGTGGTTACTAGC	GCCGCCACTAGAATTGCTGCATCAGGCTGAGGTG

表 S3 sgRNA テンプレートの PCR アセンブリーで使用したオリゴヌクレオチド

Name	Nucleotide sequence (5' to 3')
RhoA knockout	GTAATACGACTCACTATAGGGAAAAAGTTGGTTATCGTGTTTTAGAGCTAGAAATAG
YAP knockout	GTAATACGACTCACTATAGGCGTAGCTTGGGTCCGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAG

表 S4 HMA アッセイに用いたプライマー

Name	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
RhoA_HMA	GGGCATGTGTATTTCTACAAACGGC	CCTGTTTACCGTCTACTTCTATATCAGC
YAP_HMA	AATAAGCCATTCGAGGGAGTCGAGCGCAG	TCGTAGCTCTGTTGACGAAGATGCTGATT

第 III 部

ウニの発生初期における有糸分裂進行時の CTCF の重要な役割

第 8 章 概要

CCCTC 結合因子 (CTCF) は、11 個のジンクフィンガーを持つインスレーター結合タンパク質で、真核生物ゲノムの Topologically associated domains (TAD) の境界に濃縮されている。本研究では、バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) の CTCF ホモログである *HpCTCF* のウニの初期発生過程における機能を解析した。

HpCTCF をモルフォリノでノックダウンすると、桑実胚から胞胚の段階で細胞分裂が停止した。細胞分裂を停止した細胞では染色体が凝縮した状態を示しており、そのほとんどは、ヒストン H3 のセリン 10 でリン酸化されておらず、*HpCTCF* のノックダウンによって有糸分裂が終期で停止したことを示していた。このことから *HpCTCF* はウニの発生初期、特に細胞周期の終期から間期への移行期における有糸分裂の進行に必須であると考えられる。しかしながら、CRISPR-Cas9 を介した *HpCTCF* ノックアウト胚がプルテウス幼生まで正常に発生したことから、胚性 *HpCTCF* 発現の有無が胚および幼生の発生にほとんど影響しないことが示唆された。

また、バフンウニの近縁種であるアメリカムラサキウニ (*Strongylocentrotus purpuratus*) のシングルセル RNA-seq のデータ解析から、CTCF の発現パターンと正の相関を示す遺伝子群として、細胞周期および分裂期染色体の形成に関わる遺伝子が有意に多く見出された。同様の結果がヒト・マウス・ゼブラフィッシュ・ショウジョウバエにおいても得られたことから、CTCF と細胞周期の関係が生物種を超えて普遍的であることが示唆された。

第9章 導入

真核生物のゲノムは、染色体領域、A/B コンパートメント、Topologically associated domains (TADs) などの高度に階層化されたクロマチン構造として組織化されている (Cremer & Cremer, 2001; Dixon et al., 2012; Racko et al., 2019; Szabo et al., 2019)。ヒトゲノムは、平均サイズが 500 kb から 1 Mb と推定されている TAD を、1つの核あたり約 2000 個を含むとされている

(Dixon et al., 2012)。そして同一 TAD 内のゲノム DNA 配列は、物理的な接触の頻度が高く、適切な発現のために遺伝子と近接するシス調節配列 (例えばエンハンサー) との間の相互作用を容易にし (Dowen et al., 2014; Sexton et al., 2007)、この組織化が正確な遺伝子発現を司っている。

CCCTC 結合因子 (CTCF) は当初、*c-Myc* 遺伝子のプロモーター近傍調節領域に特異的に結合する転写因子として単離された (Lobanenkov et al., 1990)。CTCF は、長く多様な DNA 配列を認識する 11 個のジンクフィンガードメインを持つ DNA 結合タンパク質であり (Kim et al., 2007; Ohlsson et al., 2001)、新口動物と旧口動物の両方の生物種で保存されている (Heger et al., 2012)。CTCF は TAD 境界で濃縮されていることが報告されており、TAD の構成は CTCF とコヒーシオン複合体によって調節されていることが知られている (Merkenschlager & Nora, 2016; Parelho et al., 2008; Wendt et al., 2008)。また近年では上記のようなインスレーター機能に加え、転写調節、スプライシング制御などの複数のプロセスに関与していることもわかってきている (Alharbi et al., 2021; Braccioli & De Wit, 2019)。

これまでいくつかの動物種で *CTCF* の発生過程に対する必要性が検証されている (Fudenberg & Nora, 2021)。例えば *CTCF* を標的とする shRNA を発現するトランスジェニックマウスは、胚盤胞期まで発生することができない (Fedoriw et al., 2004)。一方、胚性 *CTCF* ノックアウトマウスは胚盤胞期まで発生することができるが、着床前段階で致死性を示す (Moore et al., 2012)。さらに、最近の研究では、母性因子と母性-胚性 *CTCF* ノックアウトマウスの両方が胚盤胞期まで発生することが明らかになり、これらの結果は、母性 *CTCF* は初期発生には必須ではないことを示している (Andreu et al., 2022)。ゼブラフィッシュでは、胚性 *CTCF* ノックアウト胚は、咽頭胚期まで正常に発生することができる。これは、母性 *CTCF* の存在によると考

えられる。しかしこれらの胚は、発生の後期段階で致死性を示す (Franke et al., 2021)。さらにモルフォリノアンチセンスオリゴ (Morpholino antisense oligo: MO) によるノックダウンが、致死的な形態学的欠陥をもたらすことも明らかにされている (Carmona-Aldana et al., 2018)。またショウジョウバエでは、*dCTCF* の母性-胚性ノックアウトによって、遺伝的背景にもよるが生存率の低下が起こることが知られている (Kyrchanova et al., 2021)。

ウニは、新口動物の進化の初期に分岐した無脊椎の新口動物であり、細胞生物学や発生生物学のモデル生物として使用されてきた。ウニの初期発生の卵割期の細胞は、主に S 期と M 期のみからなる細胞周期を経て急速に分裂する。その後胚は遺伝子調節ネットワークの制御の下で、外胚葉、中胚葉、内胚葉という 3 つの胚葉を形成する (Davidson et al., 2002; Oliveri et al., 2008; Oliveri & Davidson, 2004)。

ウニの胚は透明度が高く細胞内分子を観察しやすいことに加え、受精卵への顕微注入技術が利用可能である。そこでこれまでに、mRNA の顕微注入による蛍光タンパク質の発現と MO によるノックダウンによる、遺伝子機能の解析が行われてきた。さらに近年、数種のウニのゲノム配列が解読され、公開データベースで利用可能である (Davidson et al., 2020; Kinjo et al., 2018, 2022; Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006)。またウニの初期発生中には、核サイズとヌクレオソーム配置 (Fronk et al., 1990; Savic et al., 1981) を含む核組織の大幅な変化が生じることや、バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) 初期発生の桑実胚段階では異なる染色体上の初期型ヒストン遺伝子座同士が相互作用すること、その相互作用が初期型ヒストン遺伝子の活性転写状態と強く関連していることが知られている (Matsushita et al., 2017)。

一方で、CTCF はクロマチンの組織化と機能に重要な調節因子であるにもかかわらず、これまでにウニの発生におけるその役割は報告されていない。そこで本研究では、バフンウニの初期発生におけるウニ *CTCF* ホモログ *HpCTCF* の機能を解析した。まず、MO による *HpCTCF* のノックダウンが、姉妹染色分体の分離障害と、細胞周期の終期における有糸分裂の停止を引き起こすことを見出した。一方で、CRISPR-Cas9 による *HpCTCF* のノックアウトは、発生異常を引き起こさなかった。これらの結果から、*HpCTCF*

がバフンウニの発生初期における有糸分裂の進行に必須であることが示唆された。

第 10 章 結果

10.1 初期発生における *HpCTCF* ノックダウンの効果

ウニの発生における *HpCTCF* の機能的役割を解析するために、*HpCTCF* mRNA に相補的なモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (*HpCTCF*-MO) を用いて *HpCTCF* への翻訳を阻害した。*HpCTCF*-MO は受精卵へのマイクロインジェクションで導入した。本研究では 2 種類の *HpCTCF*-MO (MO1 および MO2) を、胚性発現した *HpCTCF* mRNA と母性 *HpCTCF* mRNA の両方の翻訳開始を標的とするように設計した。

表現型を解析するために、*HpCTCF*-MO を注入した胚の形態を、コントロールのモルフォリノを注入した胚の形態と比較した。胞胚期において、コントロール胚の約 95% (n=96) は、明瞭な胞胚腔と一次間充織細胞をもつ正常な形態を示した (図 6a, c)。対照的に、MO1 注入胚の約 90% (n=107) および MO2 注入胚の半数 (n=173) は、無秩序な細胞で満たされた不透明な胞胚腔をもつ異常な外観を示した (図 6b, c)。異常胚はその後発生を停止した。同様の結果が 7 つの独立した実験から得られ、*HpCTCF*-MO の表現型は用量依存的に観察された (図 6d)。

表現型を詳細に解析するために、*HpCTCF*-MO1 注入胚の染色体 DNA を DAPI で染色した。5 回の独立した実験において、コントロール胚では 93.5% の細胞 (n = 293) が正常な間期核を示した (図 7a、左パネル)。対照的に、*HpCTCF*-MO1 を注入した胚では、細胞の 57.4% (n = 331) が染色体 DNA の凝縮を示し、これは細胞周期が分裂期で停止したことに起因すると考えられ、26.0% が異常な形態を持つ間期核を示した (図 7a、右パネル)。

HpCTCF-MO による分裂期の停止について、*HpCTCF*-MO1 を注入した胚の染色体 DNA を、有糸分裂マーカーとしてよく知られている抗リン酸化ヒストン H3 (Ser10) 抗体で染色することによってさらに解析した。コントロール胚では、H3S10 リン酸化の高レベルの沈着が、前期から中期にかけての分裂期染色体全体と、後期の染色分体の末端で検出されたが、終期の間は検出されなかった (図 7b、左パネル)。一方、*HpCTCF*-MO1 を注入した胚では、凝縮した染色体 DNA の大部分はこの抗体によって認識されなかった (図 7b、右

パネル)。このことは、*HpCTCF*ノックダウンによって生じた凝縮染色体 DNA は、分裂期終期で停止していたことを示唆している。

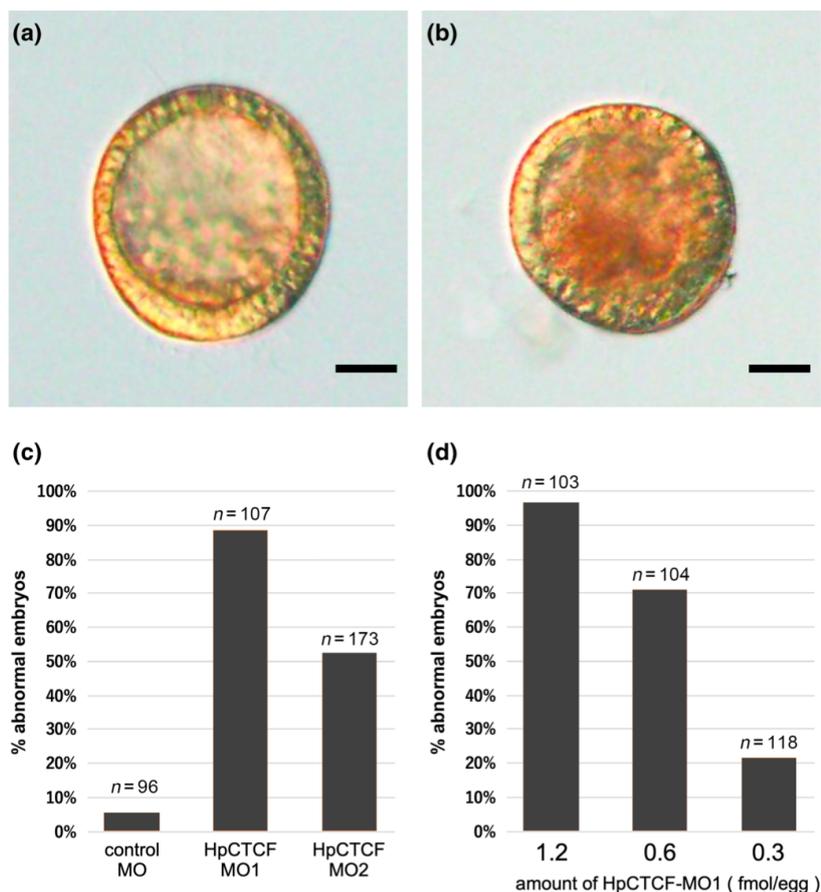


図 6 ウニの初期発生に対する *HpCTCF*ノックダウンの効果。(a) 2.0 fmol/卵のコントロール MO を注入した胚。(b) 2.0 fmol/卵の *HpCTCF*-MO1 を注入した胚。スケールバー：30 μm。(c) コントロール MO および *HpCTCF*-MO を注入した胚における異常胚の割合。各卵に 2 fmol の MO を注入した。数えた胚の総数を各バーの上部に示す。(d) *HpCTCF*-MO1 の用量依存性効果。*HpCTCF*-MO1 をグラフの下に示した濃度で注入し、異常胚の割合を計測した。数えた胚の総数は各バーの上部に示した。

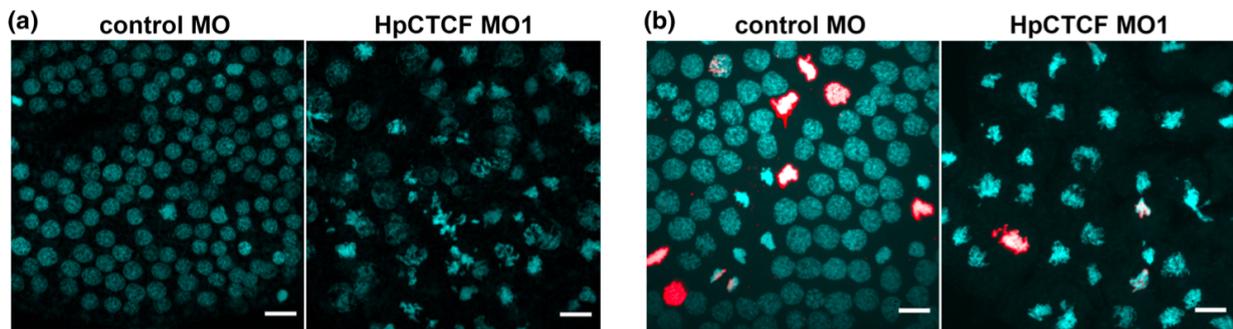


図 7 *HpCTCF* ノックダウン胚で観察された染色体。(a) コントロール MO および *HpCTCF*-MO1 注入胚における染色体の DAPI 染色。スケールバー：10 μm 。(b) コントロール MO および *HpCTCF*-MO1 注入胚における染色体の H3S10 リン酸化の免疫組織染色。スケールバー：10 μm 。

10.2 CRISPR-Cas9 を介した *HpCTCF* のノックアウトの効果

胚性発現 *HpCTCF* の機能を解明するために、CRISPR-Cas9 を介した *HpCTCF* のノックアウトを行った。CTCF が持つ AT-hook モチーフの N 末端側をコードする領域を標的とする 2 つの sgRNA、#1 と #2 を設計した。これらの sgRNA を *SpCas9* mRNA とともに受精卵にマイクロインジェクションし、受精後 24 時間 (hpf) に 20 個の胚からゲノム DNA を抽出し、CRISPR-Cas9 によって導入された変異を HMA により調べた。HMA は、野生型対立遺伝子と変異型対立遺伝子、あるいは異なる変異型対立遺伝子間で形成されるヘテロ二重鎖が電気泳動において遅い移動度を示すことに基づいている。*SpCas9* mRNA といずれかの sgRNA を共注入した胚ではバンドシフトが検出されたが、*SpCas9* mRNA のみを注入した胚ではバンドシフトは見られなかった (図 8a)。

HpCTCF ノックアウト胚からの PCR 産物をサブクローニングし、変異導入の種類と効率を解析するために塩基配列を決定した。sgRNA#1 を注入したノックアウト胚から得られた 11 クローンの塩基配列を決定したところ、欠失 (10 クローン) と挿入 (1 クローン) を確認し、変異率は 100% であった。しかし、5 クローンは 6 bp の欠失を示し、フレームシフト率は 54.5% であった (図 8b)。sgRNA#2 を注入したノックアウト胚のシーケンス解析では、変異率は 57.1% であった。しかし、すべての変異クローンは 3 ヌクレオチドの倍数の欠失を有していた (図 8b)。

CRISPR-Cas9 を介した突然変異誘発を最大化するために、*HpCTCF* コード配列のより N 末端側を標的とする 2 つの追加 sgRNA、#3 および #4 を設計した。これら 2 つの sgRNA を注入した胚も、HMA において効果的な変異誘発を示した (図 8a)。シーケンス解析の結果、sgRNA#3 を注入した胚は 100% の突然変異率を示したが、すべての置換変異はサイレント変異であり、フレームシフト率は 30% であった。さらに、sgRNA#4 を注入した胚は 100% の突然変異率を示したが、フレームシフト率は 37.5% であった。

HpCTCF ノックアウト胚の大部分は、受精後少なくとも 10 日まではコントロール幼生と同様に正常に発育し、コントロール幼生とノックアウト幼生の間に大きさ、形態、致死率に大きな差は見られなかった (図 8c, d)。CRISPR-

Cas9 を介したノックアウト実験における正常幼生の割合は、対照実験と同等であった（図 8d）。*HpCTCF* ノックアウト表現型を確実にするために sgRNA#1 と #4 を混合して用いたが、ノックアウト胚は単一の sgRNA を用いた場合と同様に、正常に発育した。このことは、胚性 *HpCTCF* 発現の阻害は胚や幼生の発育にほとんど影響しないことを示唆している。

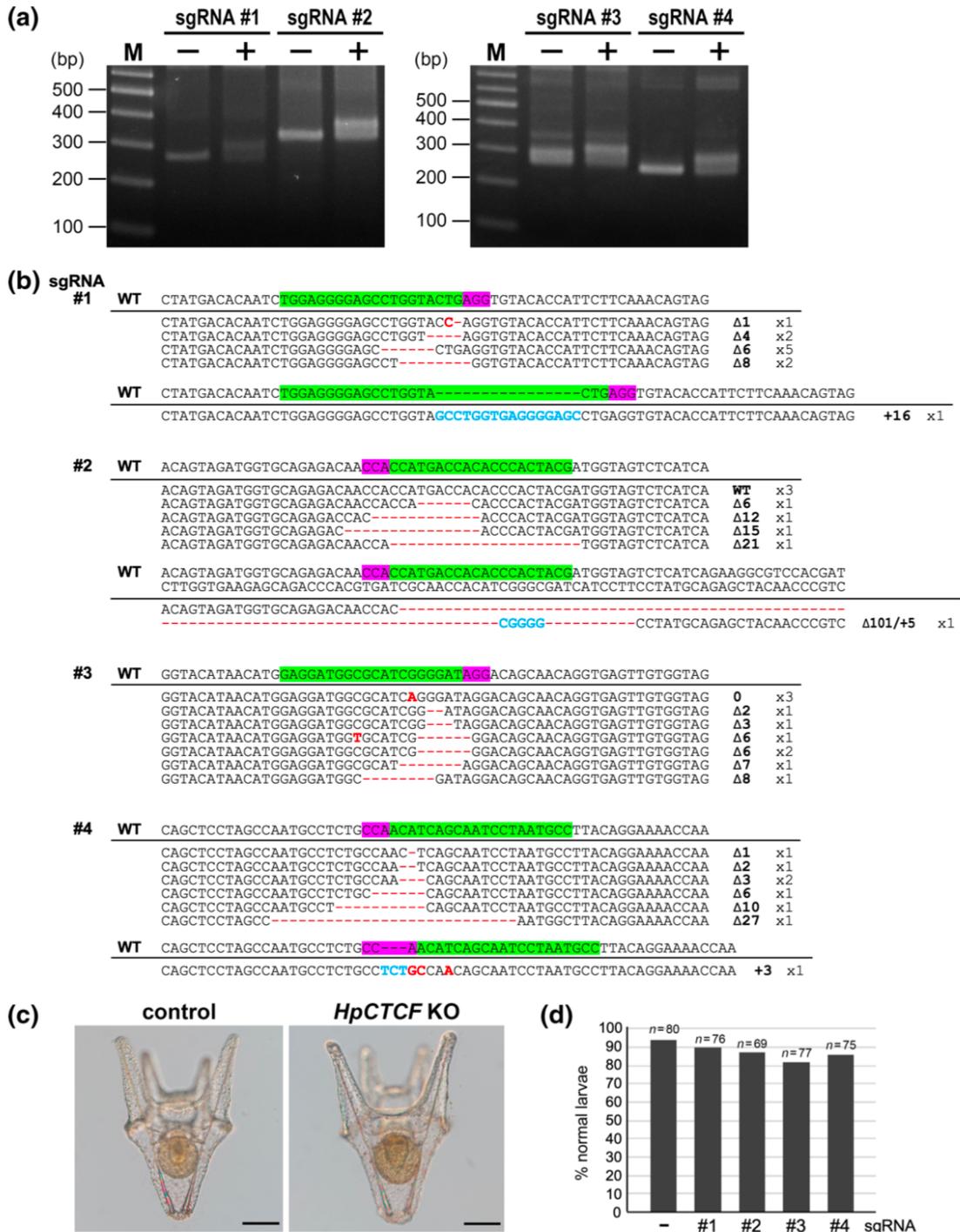


図 8 CRISPR-Cas9 を介した *HpCTCF* ノックアウトがウニの初期発生に及ぼす影響。

(a) sgRNA を注入した胚の HMA による遺伝子型決定。24 hpf で SpCas9 単独

(-) または SpCas9/sgRNA (+) を注入した 20 個の胚からゲノム DNA を抽出し、HMA で標的部位を解析した。M:100 bp ラダーマーカー。(b) *HpCTCF*sgRNA#1、#2、#3、#4 によって誘導された変異のシーケンス解析。野生型配列が上に示され、PAM 配列はマゼンタ色で、標的配列は緑色でハイライトしている。欠失、置換、挿入はそれぞれ赤ダッシュ、赤文字、青文字で示す。(c) コントロールと *HpCTCF*sgRNA#1 を注入したノックアウト胚の形態。スケールバー: 100 μ m。(d) コントロールおよび *HpCTCF*sgRNA を注入した幼生における正常なプルテウス幼生の割合。数えた胚の総数を各バーの上部に示す。

10.3 公共データを用いた *CTCF* と細胞周期の関係の検証

モルフォリノ実験を通して、ウニでは発生初期の *CTCF* が分裂期から間期の正常な移行に必要であることを示唆した。この結果をバフンウニの近縁種であるアメリカムラサキウニ (*Strongylocentrotus purpuratus*) の Single cell RNA-seq (scRNA-seq) データからも検証した。ここでは Gene expression omnibus (GEO) にて scRNA-seq データが公開されている、アメリカムラサキウニの胞胚期から後期原腸胚期のデータ (GEO ID: GSE149221) を使用し、細胞ごとの *CTCF* (*SpCTCF*) の発現量に着目した。まず細胞ごとの遺伝子発現量を次元削減し、2次元にプロットすると、*CTCF* の発現は特定の組織ではなく胚全体に分布する様子が見られた。しかしこのプロットの精度では *CTCF* が特に必要とされている細胞の種類・状態が不明であったため、細胞ごとの *CTCF* mRNA の発現量と相関のある遺伝子を抽出し、その機能を調べた。その機能探索には抽出してきた遺伝子群に対しエンリッチメント解析を行い、その結果を踏まえて、細胞分裂に関する機能を持つ遺伝子が実際にエンリッチされているのか、検証した。

解析の結果、まずいずれの時期も約 2 万遺伝子中 300 弱の遺伝子で、その発現と *CTCF* の発現との相関が認められた (図 9a)。そこでこれらの遺伝子のエンリッチメント解析を行った結果、細胞周期関連の機能は抽出された遺伝子がエンリッチした機能の内の 20% 前後を占めており、また全ての発生ステージで、分裂期関連機能は抽出された遺伝子がエンリッチした細胞周期関連機能の半数を超えていた (図 9a)。また、ランダムな遺伝子群や *CTCF* と発現量の相関が無い遺伝子群には、細胞周期関連のものがエンリッチしていなかった。よってこれらの結果からも、*CTCF* が分裂中の細胞に必要とされていると強く示唆された。

ウニと同様の解析を、ヒト (CS12)、マウス (E17.5)、ゼブラフィッシュ (72 hpf)、ショウジョウバエ (S14) でも行った (図 9b)。その結果、*CTCF* と発現が相関する遺伝子がエンリッチしている機能の中で、細胞周期関連機能は 20-40% を占め、また新口動物ではいずれもその半数以上が分裂期に関連する機能であった。この結果から、ウニで示唆された *CTCF* の分裂期での必要性は広い生物種に普遍的であることが予想された。

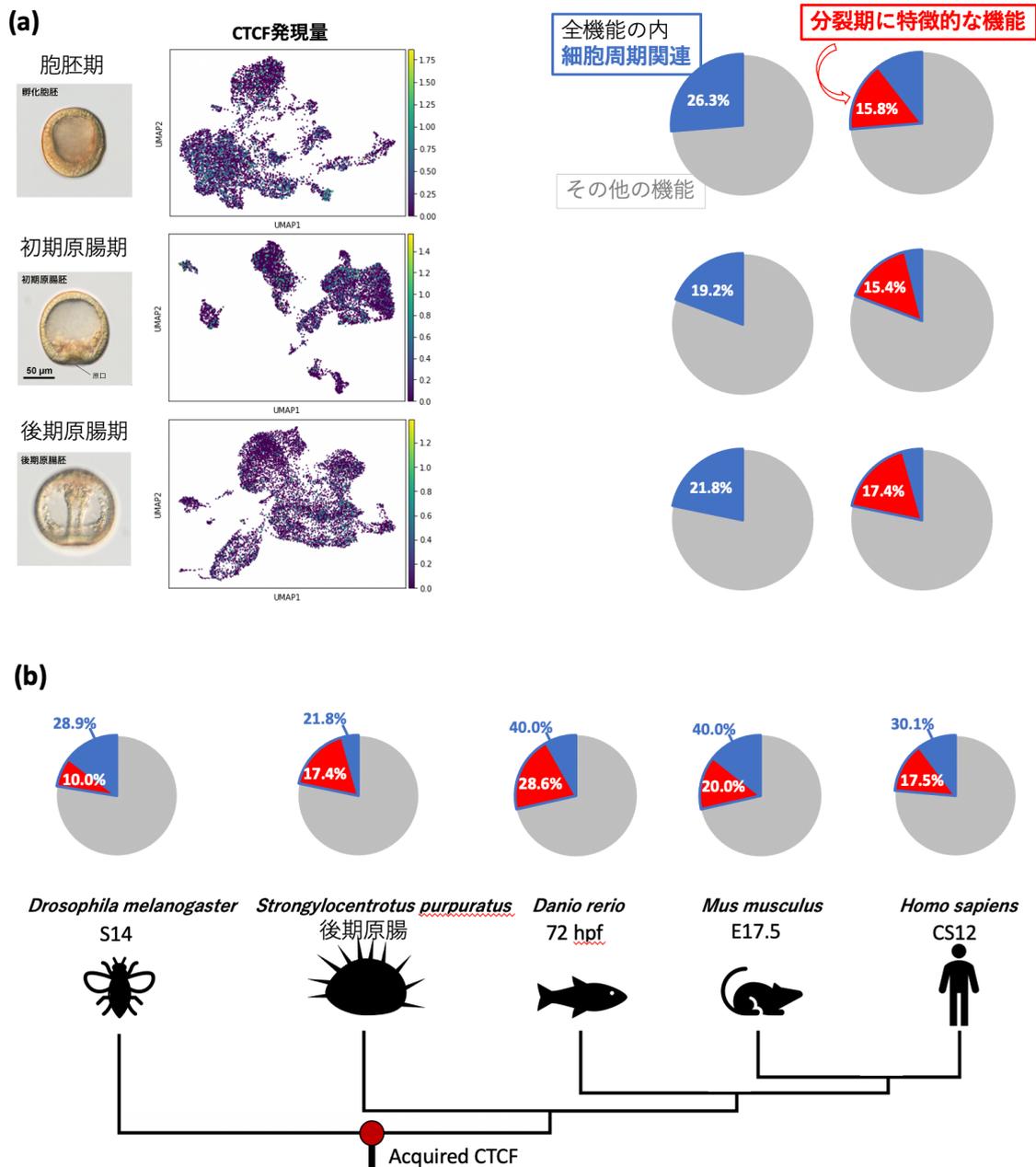


図 9 *CTCF*と相関が認められた遺伝子の機能。(a) 左図は各ステージの遺伝子発現データを次元削減(UMAP)して2次元プロットした結果。右図は *CTCF*と発現の相関が認められた遺伝子群に対しエンリッチメント解析を行い、それらの遺伝子がエンリッチしていた機能のうち、細胞周期および細胞分裂に関連した機能の割合を求めた結果。(b) ウニと同様の解析をヒト・マウス・ゼブラフィッシュ・ショウジョウバエでも行った結果。

第 11 章 その他の知見

HpCTCF については、上記で述べた結果とは別に、下記のような知見も得られている（注：これらの知見は共同研究者によって得られたものであり、前章の結果と共に参考論文 2 に掲載されたものである。）。そこで本章でそれらの知見を示し、次章において、本研究で得られた知見と合わせて *HpCTCF* の性質及び機能を考察する。

11.1 *HpCTCF* の塩基配列

まずバフンウニ cDNA ライブラリーのスクリーニングにより、*HpCTCF* cDNA が単離された。単離された cDNA の塩基配列に基づいて、5'-非翻訳領域 (5'-UTR) と 3'-UTR の両方に 2 つのプライマーを設計し、間充織胞胚から抽出した全 RNA を用いた RT-PCR が行われた。約 5 kb の PCR 産物をクローニングして 4 種類の *HpCTCF* cDNA が得られた (図 10a)。これらの *HpCTCF* cDNA の塩基配列は、アクセッション番号 LC767350, LC7673501, LC767352, LC767353 で日本 DNA データバンク (DDBJ) のデータベースに登録されている。これらの *HpCTCF* cDNA の塩基配列は、5'-UTR およびコード領域において同一であることが確かめられた。しかし、3'-UTR の塩基配列は異なる組成を示し、選択的スプライシングによる異なるエクソンが存在することが示唆された。また *H. pulcherrimus* Genome and Transcriptome データベース (HpBase、<http://cell-innovation.nig.ac.jp/Hpul/>) の検索がなされ、*HpCTCF* cDNA 配列を含む単一のスキュフォールドが見つかり、3'-UTR の各部分に対応するエクソンが含まれていることが見出された (図 10b)。各タイプの 3'-UTR と融合させた *GFP* mRNA をウニ胚に導入した場合でも、胚全体の *GFP* 蛍光分布に観察可能な違いは生じない事が確認された。このことから、3'-UTR が *HpCTCF* mRNA の局在化に寄与している可能性が低いことが示唆された。

これらの cDNA は、単一の AT-hook モチーフと複数の C2H2 型ジンクフィンガーモチーフを持つ、同一の 941 アミノ酸のポリペプチドをコードしていることが見出された (図 2a)。一方 *HpCTCF* のアミノ酸配列がヒトおよびショウジョウバエの CTCF と 30% 以下の同一性であることが見出された。しかし

ながら、HpCTCF のジンクフィンガー領域はよく保存されており、ヒトとショウジョウバエの CTCF の対応する領域とそれぞれ 51.3%と 47.8%の同一性、84.4%と 80.5%の類似性を示すことが見出された。

さらに、哺乳類とショウジョウバエの CTCF には 11 個のジンクフィンガーモチーフがあるが、HpCTCF には 9 個しか存在しないことも見出された (図 11a)。ジンクフィンガーモチーフの種間比較により、HpCTCF のジンクフィンガーモチーフ (ZF1 から ZF9) は、脊椎動物およびショウジョウバエ CTCF の ZF2 から ZF10 と相同であることが明らかにされた (図 11b)。さらに、Lipman-Pearson 法を用いた相同性検索により、HpCTCF の 9 つのジンクフィンガーモチーフのうち、ZF5 から ZF7 はヒト CTCF よりも旧口動物 (ショウジョウバエと線虫) の CTCF と高い相同性 (opti-mized [OPT]スコア) を持つことが示された。具体的には、HpCTCF ZF5 がヒト ZF6 (OPT スコア : 56) と 31%、ショウジョウバエ ZF6 (OPT スコア : 65) と 37%、線虫 TF6 (OPT スコア : 87) と 46%の同一性を、HpCTCF ZF6 がヒト ZF7 (OPT スコア : 72) と 47%、ショウジョウバエ ZF7 (OPT スコア : 83) と 50%、線虫 TF7 (OPT スコア : 77) と 39%の同一性を持つことが示された。さらに HpCTCF ZF7 が、ヒト ZF8 (OPT スコア : 85) と 36%、ショウジョウバエ ZF8 (OPT スコア : 91) と 44%、線虫 TF7 (OPT スコア : 77) と 48%の同一性を持つことも示された。

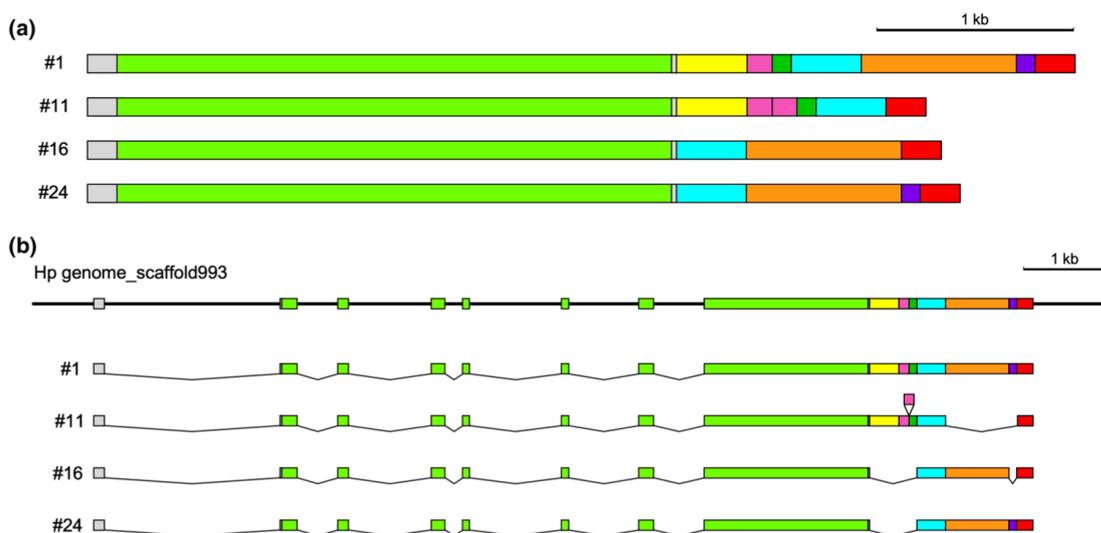


図 10 *HpCTCF*cDNA の模式的構造。(a) 本研究で単離された *HpCTCF* cDNA の4つのクローンを示す。コード領域は緑の枠で示し、異なるヌクレオチド配列は異なる色で示す。(b) *HpCTCF*cDNA の各領域と *HpCTCF* 遺伝子との対応。

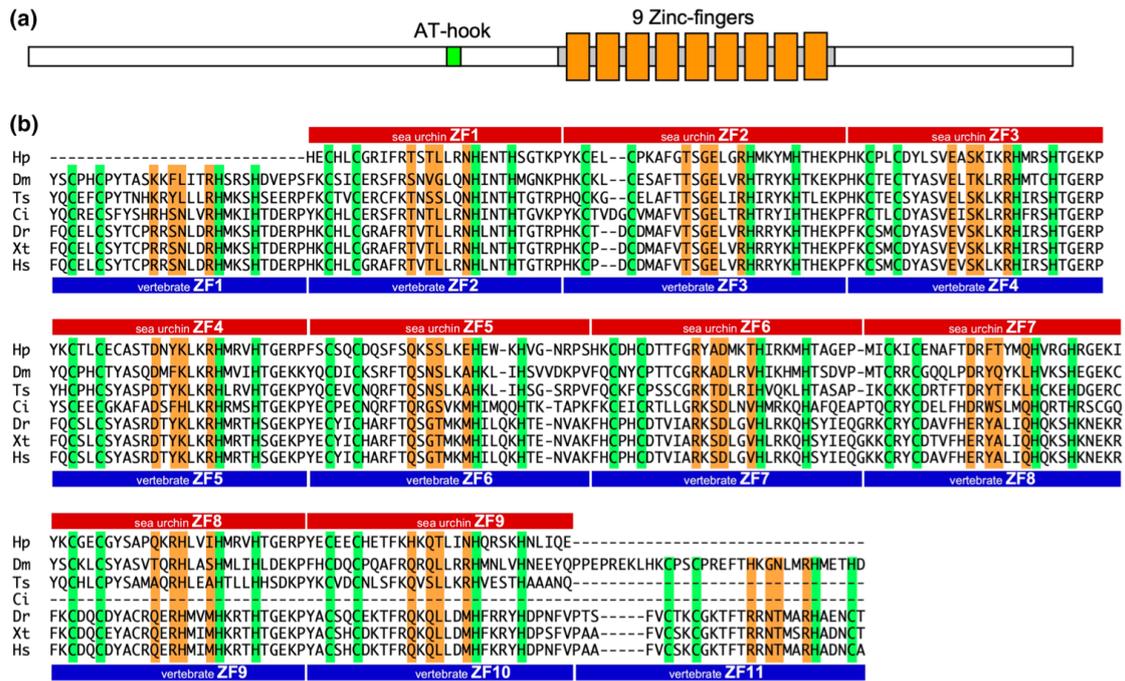


図 11 *HpCTCF* の構造とアミノ酸配列。(a) *HpCTCF* タンパク質の模式図。ジンクフィンガーモチーフはオレンジの枠で、AT-hook モチーフは緑の枠で示す。(b) 様々な生物由来のジンクフィンガードメインのアミノ酸配列のアラインメント。赤と青のボックスはそれぞれウニ CTCF (*HpCTCF*) と脊椎動物 CTCF のジンクフィンガーモチーフの位置を示す。Hp : *HpCTCF* のジンクフィンガードメイン、Dm : ショウジョウバエ CTCF のジンクフィンガードメイン (NP_648109)、Ts : *Trichinella spiralis* (線虫) CTCF のジンクフィンガードメイン (KRY34076)、Ci : *Ciona intestinalis* (尾索動物) CTCF のジンクフィンガードメイン (NP_001104593)、Dr : *Danio rerio* (ゼブラフィッシュ) CTCF のジンクフィンガードメイン (NP_001001844)、Xt : *Xenopus tropicalis* CTCF のジンクフィンガードメイン (NP_001116268)、Hs : *Homo sapiens* (ヒト) CTCF のジンクフィンガードメイン (NP_006556)。ジンク

フィンガー形成に関与するシステイン (C) とヒスチジン (H) は緑色で、DNA 認識に関与する残基はオレンジ色で強調表示されている。

11.2 *HpCTCF* mRNA の発現パターン

HpCTCF mRNA の時間的発現パターンを解析するために、様々な発生段階のバフンウニ胚から単離した全 RNA を用いてノーザンブロット解析が行なわれた (図 12a,b)。母性 *HpCTCF* mRNA が未受精卵で検出された。*HpCTCF* mRNA の量は割卵期には維持され、その後増加し、孵化胞胚期には最大レベルに達することが見出された。一方 *HpCTCF* の mRNA 発現量は、胞胚期には高レベルが維持されたが、原腸胚期からプルテウス幼生期にかけて減少することが見出された。

また *HpCTCF* mRNA の空間的発現パターンが、Whole mount in situ hybridization により解析された (図 13)。ノーザンブロット解析の結果と同様に、*HpCTCF* mRNA はすべての発生段階を通して検出された。さらに、*HpCTCF* mRNA はすべての発生段階で胚全体に検出されたことから、ウニの発生における *HpCTCF* のユビキタスな役割が示唆された。しかし、胞胚期から原腸胚期にかけては、植物極板周辺に強いシグナルが検出された。

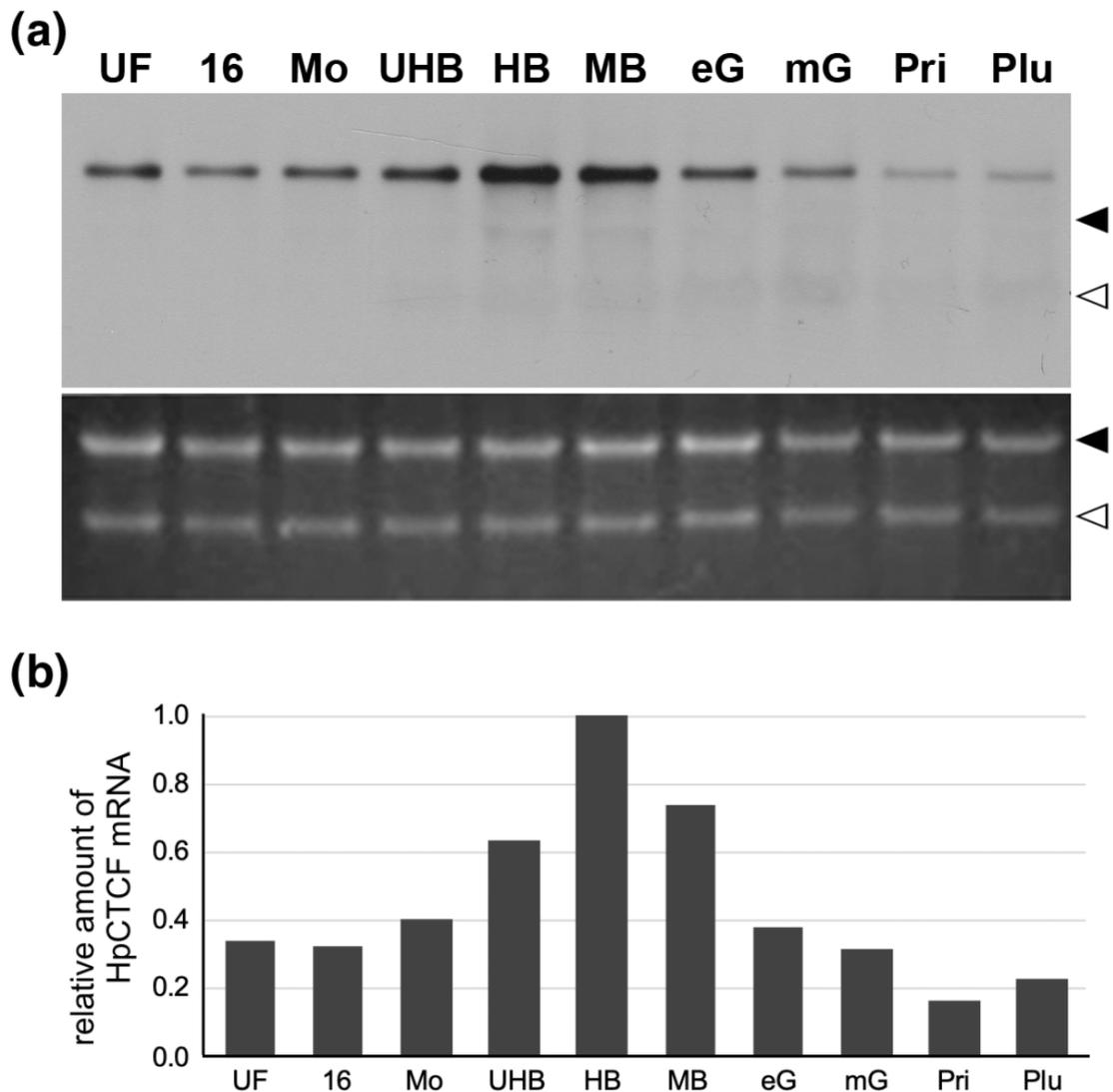


図 12 *HpCTCF* mRNA のノーザンブロット解析。様々な発生段階の胚から抽出した 5 マイクログラムの全 RNA を電気泳動した。(a) 上段は *HpCTCF* mRNA に相補的なアンチセンスプローブを用いたノーザンブロット解析の結果、下段は臭化エチジウムで染色した全 RNA。閉じた三角形は 26S rRNA (4.2kb)、開いた三角形は 18S rRNA (2kb) の位置を示す。UF は未受精卵、16 は 16 細胞期、Mo は桑実胚期、UHB は未孵化胞胚期、HB は孵化胞胚期、MB は間充織胞胚期、eG は初期原腸胚期、mG は中期原腸胚期、Pri はプリズム幼生、Plu はプルテウス幼生。(b) *HpCTCF* mRNA 発現の定量化。*HpCTCF* mRNA のシグナル強度は 26S rRNA 量に対して正規化した。孵化胞胚期 (HB) の mRNA 量に対する相対的な *HpCTCF* mRNA 量を示す。

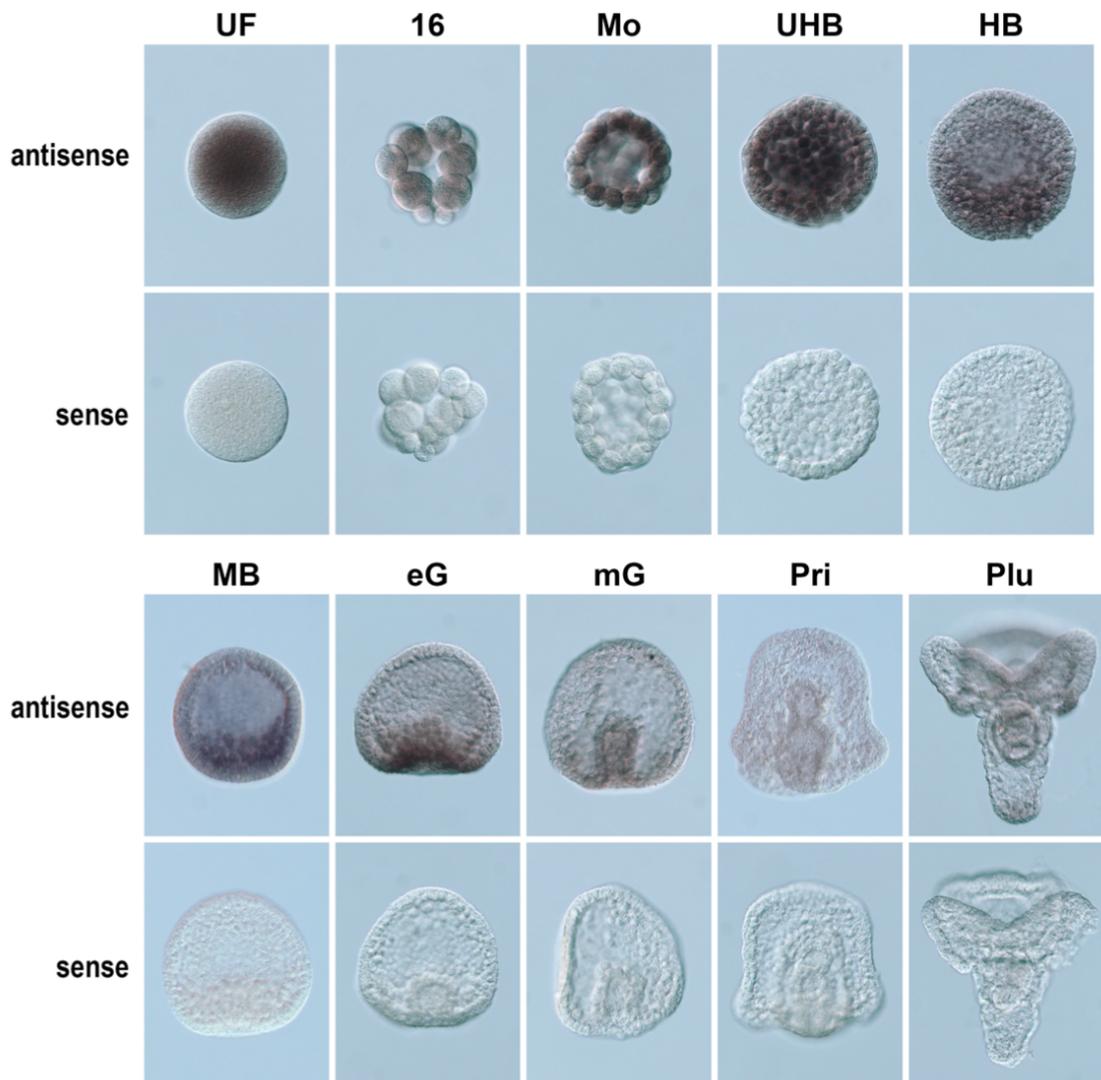


図 13 *HpCTCF* mRNA の Whole mount in situ hybridization 解析。*HpCTCF* mRNA に相補的なアンチセンスプローブ、または *HpCTCF* mRNA と同一の配列を持つセンスプローブを用いて Whole mount in situ hybridization を行った。UF は未受精卵、16 は 16 細胞期、Mo は桑実胚期、UHB は未孵化胞胚期、HB は孵化胞胚期、MB は間充織胞胚期、eG は初期原腸胚期、mG は中期原腸胚期、Pri はプリズム幼生、Plu はプルテウス幼生。

11.3 HpCTCF の細胞内局在

発生過程における HpCTCF の役割を調べるため、HpCTCF タンパク質の細胞内局在が解析された。HpCTCF-GFP 融合タンパク質をコードする mRNA が *H. pulcherrimus* の受精卵にマイクロインジェクションされ、卵割期の GFP 蛍光がタイムラプスイメージングで解析された (図 14)。その結果 HpCTCF-GFP は核全体に分布し、この核蛍光は細胞分裂の約 15 分前に消失したが、細胞分裂後には回復する様子が観察された (図 14a)。

さらに HpCTCF の細胞内挙動の詳細な解析のため、*H2B-mCherry* mRNA が *HpCTCF-GFP* mRNA と共注入され、タイムラプスイメージング解析が行われた。そして図 14b に示すように、HpCTCF-GFP が間期の核で検出されたが、HpCTCF-GFP の蛍光は染色体凝縮の開始 (前期) で減少し始め、分裂中期から分裂後期にかけて染色体上に蛍光が検出されなくなる様子が観察された。しかしこの間期の核が再構成される分裂終期で、HpCTCF-GFP 蛍光が再び観察される様子が見られた。これらの結果から、HpCTCF が細胞の間期核形成に関与している可能性を示唆された。また HpCTCF-GFP 蛍光は、間期の核が再構成される終期で再開したことから、HpCTCF がウニの細胞周期発生における間期核の再編成に関与している可能性が示唆された。

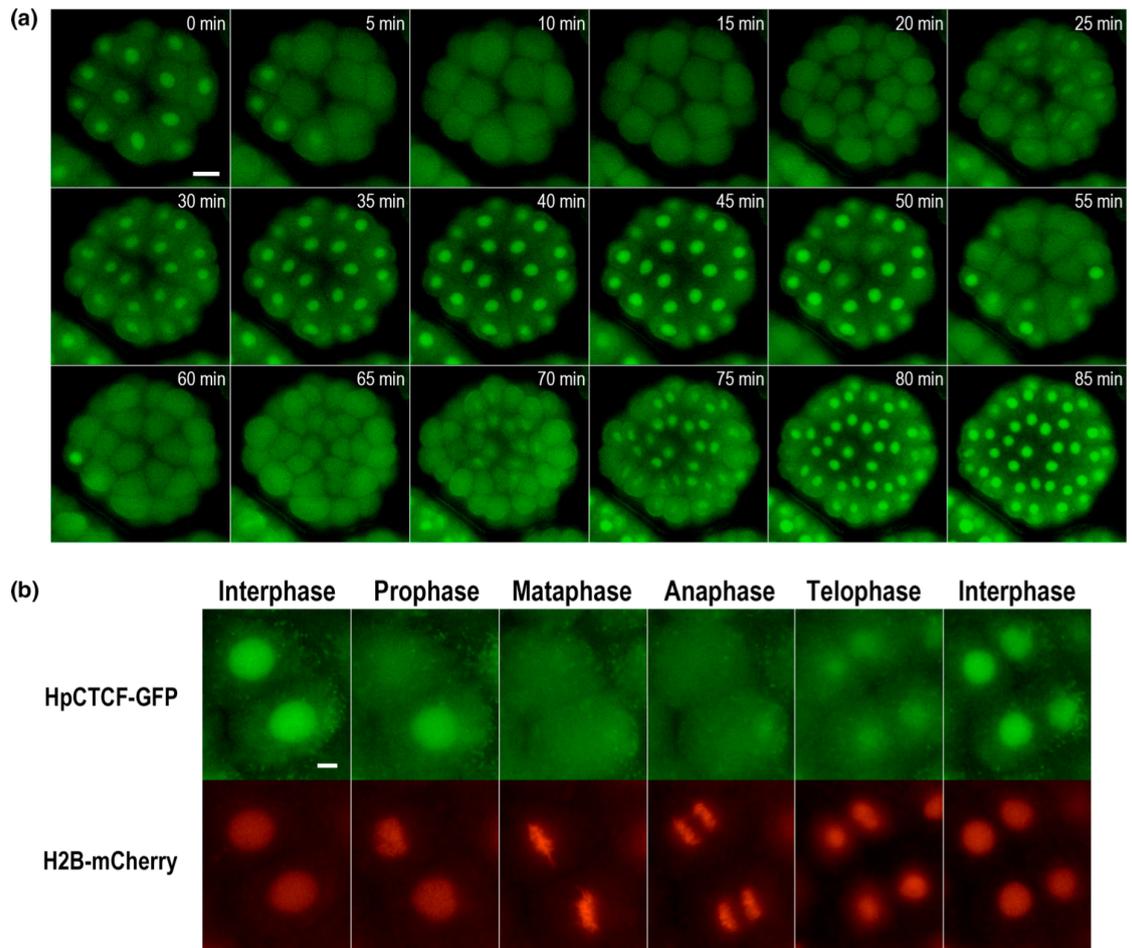


図 14 HpCTCF の細胞周期依存的挙動。(a) 胚全体における HpCTCF-GFP 融合タンパク質の挙動のタイムラプス解析。胚全体における HpCTCF-GFP 融合タンパク質の挙動。スケールバー：20 μ m。(b) 桑実胚の細胞周期における HpCTCF-GFP と H2B-mCherry のタイムラプス解析。スケールバー：5 μ m。

11.4 *HpCTCF* ノックダウン時の染色体タイムラプスイメージング

HpCTCF-MO1 を注入した胚の染色体挙動の可視化のために、*HpCTCF*-MO1 と *H2B-GFP* mRNA を共注入した上で、タイムラプスイメージング解析が行われた。そして3回の独立したイメージング実験における11個の *HpCTCF*-MO1 注入胚のすべてで、桑実胚から胞胚の段階で姉妹染色分体の分離障害を示し、姉妹染色分体が分離されずに部分的につながったままの異常な核形態となる様子が見出された（図15）。

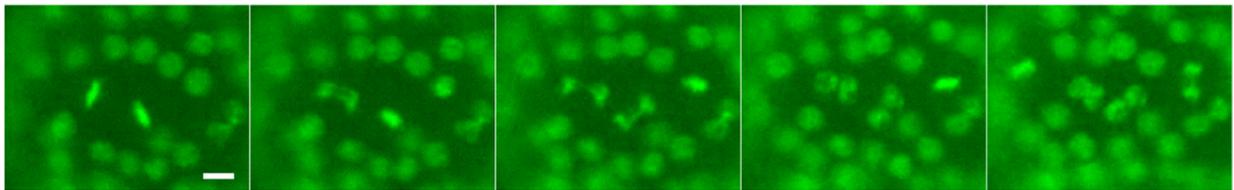


図15 *HpCTCF*-MO1 注入胚における H2B-GFP のタイムラプス解析。スケールバー：10 μ m。

第12章 まとめと議論

本研究で得られた知見と前章の知見を合わせて *HpCTCF* の機能を考察する。すると、ウニは生物学研究にとって進化の観点からも興味深い動物モデルであるが、下記の通り CTCF という分子の進化に対しても興味深い知見が得られる。

まずバフンウニの CTCF ホモログ *HpCTCF* をコードする cDNA を単離し、その配列を解析すると、脊椎動物を含め多くの多細胞生物の CTCF は 11 本のジンクフィンガーモチーフを持つが、*HpCTCF* は脊椎動物の CTCF のジンクフィンガー 2-10 に対応する 9 本のジンクフィンガーのみを持っていた。このようなジンクフィンガーモチーフの数が少ない CTCF を持つ生物は他にも知られており、例えば線虫 *Trichinella spiralis* の CTCF は脊椎動物の CTCF の ZF1 から ZF10 に相当する 10 本のジンクフィンガーのみを持ち (Heger et al., 2009)、尾索動物の CTCF は脊椎動物の CTCF の ZF1 から ZF8 に相当する 8 本のジンクフィンガーのみを持つ。またこれらの生物で注目すべきは、染色体構造内に TAD が同定されていないことである (Satou et al., 2019)。線虫 *Caenorhabditis elegans* は進化の過程で *CTCF* を失っており (Heger et al., 2009)、遺伝子量補償 X 染色体にはコンデンシンを介する TAD が存在する (Crane et al., 2015; Kim et al., 2022) が、常染色体に強固な TAD は存在しない。実はこれまで、ウニにいても TAD の存在は報告されておらず、TAD 形成における CTCF の役割の有無に応じてジンクフィンガーの数が進化的に変わってきた可能性が考えられる。

また *HpCTCF* のアミノ酸配列を他の生物種と比較した結果、*HpCTCF* の ZF5-ZF7 は、ヒトの CTCF よりも旧口動物の CTCF のジンクフィンガーと高い相同性を示した。さらに、*HpCTCF* ZF2 はショウジョウバエ ZF3 (OPT スコア: 112) との間でヒト ZF3 (OPT スコア: 107) よりも高い OPT スコアを示す。特定のアミノ酸配列が進化的に離れた旧口動物と新口動物の間でよく一致する場合、これらの配列が長い進化期間にわたって維持されてきたことを意味し、古来の基本的な生理過程において機能的に重要であることを示している。よって *HpCTCF* のジンクフィンガーのいくつかは、祖先的な機能と関連している可能性があり、特に *HpCTCF* ZF2 と *HpCTCF* ZF5-ZF7 が *HpCTCF* の祖先種から続く元来の役割を担っている可能性が考えられる。またヒトで

は、腫瘍関連ジンクフィンガータンパク質の変異が ZF3 (HpCTCF ZF2 に相当) と ZF7 (HpCTCF ZF6 に相当) で報告されており (Filippova et al., 2002) そのこれらのジンクフィンガーの元来的な性質が、腫瘍発生の機序に関連する可能性もある。しかしながら、それぞれのジンクフィンガーの機能を理解するためには、さらなる解析と機能研究が必要である。

HpCTCF はウニの発生初期にユビキタスに発現しており (図 12, 13)、発生過程において HpCTCF が胚全体で必要であることが示唆された。一方で胞胚期から原腸胚期にかけて、植物極板の周囲に局所的に強いシグナルが検出されていた (図 13)。植物極板周辺での局所的な細胞増殖は以前にも報告はされており (Nislow & Morrill, 1988)、また細胞分裂は原腸の伸長にもわずかながら寄与することが知られている (Martik & McClay, 2017)。これらのことも、ウニの発生初期における HpCTCF の主な役割が、細胞増殖と関連していることを示唆している。

急速な細胞分裂が続くウニ初期胚の細胞では、HpCTCF は間期の核内に一様に存在するが、有糸分裂期、特に前期から後期にかけての染色体では検出されない (図 14)。前中期染色体からの CTCF の消失は HeLa 細胞で報告されており (Oomen et al., 2019)、有糸分裂期のクロマチンからの CTCF の排除は WI-38 細胞で報告されている (Agarwa et al., 2017)。さらに、A/B コンパートメントや TAD といった間期核内の構造は、HeLa S3 細胞では分裂前中期に消失し (Naumova et al., 2013)、HUH7 ヒト肝癌細胞では有糸分裂中に転写レベルが低下する (Palozola et al., 2017)。本研究では、HpCTCF はウニの発生初期に染色体動態で重要な役割を果たすところを見出したが、ウニの間期核における TAD の存在は依然として不明であり、その確認は今後の課題の一つである。

HpCTCF ノックダウン実験では、ヒストン H3 の 10 番目のセリン (H3S10) のリン酸化を免疫組織化学的に解析した。H3S10 のリン酸化は、前期から中期のすべての有糸分裂染色体、および後期の染色分体で検出されたが、終期の間は検出されなかった (図 7b)。ウニにおける H3S10 リン酸化は MCF-7 細胞と同じパターンに従うことが示されており (Yan et al., 2016)、*HpCTCF* のノックダウンにより細胞周期の分裂停止が生じたが、ノックダウン胚では停止した凝縮染色体のほとんどにリン酸化 H3S10 が含まれず、停止した分裂染色体は終期にあることが示唆された。これは、終期の間、分裂後の

HpCTCF の蓄積がうまくいかず、間期の核が再編成されたためと考えられた。

さらに、*HpCTCF* をノックダウンすると、有糸分裂後期中の姉妹染色分体分離が阻害された。*HpCTCF* はアナフェーズ中には検出できなかったが、分裂期の染色体、中心体、中央体上に *CTCF* が存在することは、哺乳類細胞で以前に報告されている (Burke et al., 2005)。従って、少量の *HpCTCF* が有糸分裂染色体や紡錘体上に存在し、姉妹染色分体分離に寄与している可能性がある。最近 CRISPR-Cas9 を介して *CTCF* をノックダウンしたマウス B16-F1 細胞において、紡錘体形成の乱れと、分裂後期の染色体分離の障害を引き起こすことが示された (Chiu et al., 2023)。これは本研究においてウニで見出されたことと非常に類似しており、*CTCF* の細胞分裂周期における重要性が、棘皮動物から哺乳類にかけて保存されていることを示唆する。

CRISPR-Cas9 を介した *HpCTCF* のノックアウト後、胚は正常な形態を持つプルテウス幼生に発育した (図 8c)。プルテウス幼生では、BrdU 陽性の増殖細胞は幼生腕を含む口腔外胚葉に集中していることが報告されている (Katow et al., 2021)。しかし、プルテウス幼虫では *HpCTCF* の量が著しく減少していたことから (図 12, 13)、プルテウス幼虫の細胞増殖は *HpCTCF* を必要としない可能性がある。あるいは、sgRNA を注入した *HpCTCF* ノックアウトのフレームシフト率は 54.5% 以下であったので、この効率では *HpCTCF* の細胞増殖への寄与を破壊するには不十分かもしれない。さらに、すべての CRISPR-Cas9 を介したノックアウト実験において、ほとんどすべての sgRNA 注入胚が生存可能であったことから、この表現型を持たない胚だけが生存しているようには見えなかった。

TAD はプロモーターとエンハンサーの相互作用において重要な役割を果たしている。動物の発生過程において、TAD は接合体ゲノムの活性化中に形成される (Du et al., 2017; Hug et al., 2017; Ke et al., 2017; Wike et al., 2021)。アメリカムラサキウニ (*Strongylocentrotus purpuratus*) では、胚性遺伝子の発現開始時間は 5-6 hpf である (Gildor & Ben-Tabou de-Leon, 2015; Materna et al., 2010)。これに対応して、*HpCTCF* mRNA の量が増加し始め (図 12)、*HpCTCF* が胚性遺伝子発現に関与していることが示唆された。しかしながら、CRISPR-Cas9 を介した *HpCTCF* ノックアウト胚は、プルテウス幼生では正常に発育したことから (図 8c)、間期核の *HpCTCF* は遺伝子発現に必須で

はない可能性が示唆された。ショウジョウバエを含む節足動物は、他にもいくつかのインスレータータンパク質を獲得しており (Heger et al., 2013)、節足動物には CTCF 以外の因子によって媒介される TAD 制御機構があり、CTCF が限られた遺伝子領域のループ形成にしか寄与しないことが知られている

(Cavalheiro et al., 2023; Kaushal et al., 2021; Van Bortle et al., 2014)。ウニでも、CTCF 以外のインスレータータンパク質が報告されており (Cavalieri et al., 2013)、CTCF 以外のタンパク質が胚性遺伝子発現において主要な役割を果たしている可能性がある。CRISPR-Cas9 を介した *HpCTCF* のノックアウトに効果がないのもそのためかもしれない。

まとめると、ウニの CTCF は祖先的な機能を持ち、発生初期の細胞周期の進行に関与している。この仮説は、バフンウニの近縁種であるアメリカムラサキウニ (*S. purpuratus*) の胚から、分裂している細胞と分裂していない細胞の両方が存在する発生段階における scRNA-seq データを解析した結果 (Foster et al., 2020) でも支持され、*CTCF* の発現と細胞周期および分裂期の染色体形成機能を持つ遺伝子の発現との間に有意な正の相関が観察された (表 S1)。ウニ CTCF の間期核の組織化や転写制御における役割は、まだ不明である。染色体コンフォメーションキャプチャー技術を用いた今後の研究により、間期核におけるウニ CTCF の詳細な機能が明らかになる可能性がある。

第 13 章 実験方法

胚培養

バフンウニの卵、精子は、0.55 M KCl を体腔内に注入して得た。

受精卵は 16°C の濾過海水中で培養した。

アンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドによるノックダウン

HpCTCF の翻訳開始部位に相補的なモルフォリノオリゴヌクレオチド

(*HpCTCF*-MO1 : 5'-AGGTTGGTCTGTGTTTTTCATCCATG-3' および *HpCTCF*-MO2 : 5'-CATCCATGGTTCCCTCGTCTTAT GA-3') は Gene Tools (米国、Corvallis) により合成され、標準コントロールモルフォリノオリゴヌクレオチド (5'-CCTCTTACCTCAGTT ACAATTTATA-3') も Gene Tools (米国、Corvallis) から購入した。これらのモルフォリノを 40% グリセロールに溶解し、2 pL のモルフォリノ溶液をバフンウニの受精卵にマイクロインジェクションした。

免疫組織染色

ウニ胚を Fixative III (4% パラホルムアルデヒド、32.5% ろ過海水、32.5 mM MOPS [pH 7.0]、162.5 mM NaCl) で 4°C、16 時間固定した。固定した胚は、1×PBS で 3 回洗浄した後、0.5% Triton X-100 で室温で 20 分間透過処理した。その後、胚を 1% BSA を含む 1×PBS で室温で 1 時間ブロッキングし、1% BSA を含む 1×PBS で 1:2000 に希釈した抗ヒストン H3 (S10 リン酸化) 抗体 (mAbcam 14955) で 4°C で一晩インキュベートした。1×PBS で 3 回洗浄後、胚を Alexa Fluor 555 標識ヤギ抗ウサギポリクローナル抗体 (Abcam 150078) を 1% BSA 含有 1×PBS で 1:2000 に希釈したものと室温で 2 時間インキュベートした。1×PBS で 3 回洗浄した後、SlowFade™ Gold Antifade Mountant with DAPI (Molecular Probes 社製) を用いてサンプルをマウントし、LSM700 共焦点顕微鏡 (Zeiss 社製、ドイツ) を用いて観察した。

CRISPR-Cas9 によるノックアウト

CRISPR-Cas9 を介した *HpCTCF* のノックアウトは、Liu ら (2019) によって記述された。オリゴヌクレオチドの塩基配列は以下の通りである。それぞれのオリゴヌクレオチドの配列は、sgRNA#1 で、
5'GTAATACGACTCACTATAGGGGAGGGAGCCTGGTACTGGTTTTAGAGCTAGAAATAG-3'、sgRNA#2 では、
5'GTAATACGACTCACTATAGGTAGTGGTGGTCATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAG-3'、sgRNA#3 で、
5'GTAATACGACTCACTATAGGGGATGGCGCATCGGGGGGATGTTTTAGAGCTAGAAATAG-3'、sgRNA#4 で、
5'GTAATACGACTCACTATAGGCATTAGGATTGCTGATGTGTTAGAGCTAGAAATAG-3'であった。750 ng/ μ L の Cas9mRNA と 150 ng/ μ L の sgRNA を受精卵にマイクロインジェクションしてから 24 時間後、20 個の胚を回収し、ゲノム DNA を単離し、4 つのプライマーセット (sgRNA#1 標的部位に対して 5'-TTTGGCAACATGTAACAGACTTGCCC-3' および 5'-GTCTGCTCTTCACCAAGATCGTGGAC-3'、sgRNA#2 標的部位に対して 5'-TTTGGCAACATGTAACAGACTTGCCC-3' および 5'-TGAGACGGGTTGTAGCTCTGCATAGG-3' ; sgRNA#3 標的部位に対して 5'-CATCATGGACATGTCTGATAATTCTCTG-3' および 5'-GAAGGCTCTGGTGTGGACTTGCC-3' ; sgRNA#4 標的部位に対して 5'-GTGGTAAAGCAGGAGATAGGTGAGG-3' および 5'-CATATCTCACAAGATGCCTTAATCTC-3') を用いてヘテロ二重鎖移動度アッセイ (HMA) を実施した。PCR 産物は、1 \times TAE 緩衝液中、分解能増強剤 Loupe 4 K/20 (GelBio LLC, Japan) を添加した 0.5% アガロースゲルで分離した。塩基配列解析のため、PCR 産物を In-Fusion[®] HD Cloning Kit (TaKaRa Bio, Japan) を用いて pBluescript SK-ベクターの EcoRV 部位にサブクローニングし、BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて M13 フォワードプライマー (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') で塩基配列を決定した。

scRNAseq データ解析

GEO よりウニの scRNA データ (GEO ID: GSE149221) を取得し、孵化胞胚期から後期原腸胚期のデータを用いて解析した。データのフィルタリングは、データを取得した原著論文 (Foster et al., 2020) を参考に行った。ウニ以外のデータとして、ヒト CS12 (GSE157329)、マウス E17.5 (GSE214942)、ゼブラフィッシュ 72 hpf (GSE178151)、ショウジョウバエ S14 (GSE202987) のデータをそれぞれ GEO より取得し、データのフィルタリング以外はウニのデータと同様のデータ処理を行い、解析した。フィルタリング時の発現遺伝子の上限下限 (max, min) と細胞カウント数の下限 (cell_counts) は、ヒト (min = 1000, max = 5000), マウス (min = 200, max = 500), ゼブラフィッシュ (min = 500, cell_counts = 200), ショウジョウバエ (min = 700, cell_counts = 500)で行った。各生物種の *CTCF* と発現変動が相関する転写産物を抽出するため、各生物で各転写産物と *CTCF* の発現量の相関を計算し、母相関係数の検定を行い ($p = 0.00001$)、*CTCF* と発現の相関がある遺伝子群を抽出した。抽出された遺伝子群の GO エンリッチメント解析には、Gene ontology resource(<http://geneontology.org>)を用い、各機能に占める割合は、各最上流オントロジーに含まれる遺伝子数のより算出した。

実験方法 (共同研究者による実験。11 章参照)

HpCTCF cDNA のクローニング

HpCTCF cDNA は、 λ gt11 ベクターを用いて原腸胚期 cDNA ライブラリーを基に構築した。全 RNA は、Chomczynski and Sacchi (1987) に記載されているように、酸性グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 抽出法を用いて胞胚から単離し、5 μ g の全 RNA を Super Script III 逆転写酵素 (Invitrogen, USA) による cDNA 合成に用いた。*HpCTCF* cDNA を、TaKaRa LA-taq (TaKaRa Bio Inc., Japan) と以下のプライマーを用いて RT-PCR を行った：5' -GTTTCGCCATTCATTTGAGTGGATTTTC-3' および 5' -CTGATCAGGTAAACTCTAAATCAGATTCC-3' を用いた。PCR 産物を 1% アガロースゲルで電気泳動した。約 5.0 kb の PCR 産物をゲルから切り出し、

TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, USA) を用いて pCR®4-TOPO®ベクターにサブクローニングした。cDNA 末端のヌクレオチド配列は、Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kit (USB Corporation, USA) と LI-COR 4000L DNA sequencer (Aloka, Japan) を用いて、ジデオキシ鎖終結化学により決定した。内部領域の塩基配列は、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) と ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) を用いて決定した。

ノーザンブロット分析

アンチセンス・プローブを調製するために、*HpCTCF* cDNA からコード配列の一部（ヌクレオチド 1069-2480）を PstI 消化によって切り出し、pBluescript SK ベクターの PstI 部位にサブクローニングした。アンチセンスプローブは MEGAscript® T7 Kit (Ambion, USA) を用いて digoxigenin-11-UTP (Roche, Germany) で標識した。標識プロセスは、BamHI で消化したプラスミドを鋳型として用い、その後、製造メーカーのマニュアルに従って塩化リチウム沈殿による精製を行った。様々な発生段階のウニ胚から、AGPC 抽出により全 RNA を抽出した。各 RNA サンプルについて、3 µg をホルムアミドを含む変性 1% アガロースゲルで電気泳動し、Nytran® N メンブレン (Whatman, USA) に転写した。ハイブリダイゼーションは、10 ng/mL のアンチセンス RNA プローブを含む CHURCH バッファー (1% BSA, 1 mM EDTA, 0.5 M NaHPO₄ [pH 7.2], 7% SDS) (Church & Gilbert, 1984) 中、65°C で一晩行った。65°C で 1% SDS を含む 1×SSC バッファーでメンブレンを洗浄した後、ハイブリダイズしたプローブをアルカリホスファターゼに結合した抗ジゴキシゲニン抗体 (Roche, Germany) を用いて認識し、X 線フィルム (FUJIFILM, Japan) を用いて CSPD (TROPIX, USA) の脱リン酸化によって生じる化学発光によって検出した。シグナル強度は Fiji ソフトウェア (<https://fiji.sc/>) を用いて定量した。

Whole mount in situ hybridization

Whole mount in situ hybridization は、美濃川ら(2004)の記述に従って行った。プローブを調製するために、コード配列の一部 (ヌクレオチド 1069-2480) を *HpCTCF* cDNA から PstI 消化により切り出し、pBluescript SK-vector の PstI 部位にサブクローニングした。アンチセンスプローブは、BamHI 消化プラスミドを鋳型として、MEGAscript® T7 Kit (Ambion, USA)を用いて digoxigenin-11-UTP (Roche, Germany)で標識した。センスプローブの標識には、MEGAscript® T3 Kit (Ambion, USA)と XhoI 消化プラスミドを用いた。

HpCTCF-GFP 融合タンパク質の発現

HpCTCF-GFP 融合タンパク質をバフンウニ胚で発現させるため、*HpCTCF* コード配列を pGreenLantern2 由来のプラスミドにサブクローニングした。プラスミドを直鎖化した後、HpCTCF-GFP 融合タンパク質をコードする 5'キャップ mRNA を、mMESSAGE mMACHINETM T7 Transcription Kit (Ambion, USA) を用いて合成し、フェノール/クロロホルム抽出とイソプロパノール沈殿によって精製した。*HpCTCF-GFP* mRNA を 40%グリセロールに 250 ng/ μ L で溶解し、Rast (2000)の記載に若干の修正を加えながら、バフンウニの受精卵にマイクロインジェクションした。GFP 蛍光のタイムラプス解析は、Olympus IX81 マイクロスコープと Metamorph ソフトウェア (オリンパス、日本) を用いて行った。

第 14 章 補足データ

(a)

Stage	GO Term(Positive Correlation with <i>SpCTCF</i>)
Early brastula	Establishment or maintenance of cell polarity Regulation of phosphate metabolic process Regulation of protein modification process mRNA processing
Hatched brastula	Establishment of mitotic spindle localization Establishment or maintenance of cell polarity mRNA transport Translation Negative regulation of nucleobase-containing compound Metabolic process Chromatin remodeling DNA conformation change Regulation of cell cycle mRNA splicing, via spliceosome Ribonucleoprotein complex biogenesis Protein-containing complex organization Regulation of dna-templated transcription G protein-coupled receptor signaling pathway
Mesenchyme brastula	Establishment of mitotic spindle localization Regulation of protein kinase activity Nucleosome assembly Regulation of cell cycle process Translation Electron transport chain mRNA processing DNA conformation change RNA splicing Protein folding Regulation of transcription by RNA polymerase II
Early gastrulation	DNA replication-dependent chromatin assembly Positive regulation of cell cycle phase transition Negative regulation of DNA metabolic process Chromosome condensation Translational elongation One-carbon metabolic process Histone lysine methylation Nucleosome assembly Regulation of protein kinase activity Regulation of mitotic cell cycle phase transition Protein acetvlation Nucleoside monophosphate biosynthetic process Cell division Cell cycle Regulation of cellular component organization mRNA processing Ribonucleoprotein complex biogenesis RNA splicing Organelle assembly Cellular response to DNA damage stimulus Regulation of dna-templated transcription
Late gastrulation	Regulation of alternative mrna splicing, via spliceosome Chromosome condensation CTP biosynthetic process Translational elongation Histone lysine methylation Regulation of protein kinase activity Nucleosome assembly Cytoplasmic translation Regulation of mitotic cell cycle Histone acetvlation Regulation of cell cycle process Translational initiation Cell division Cell cycle mRNA processing Ribosome biogenesis Negative regulation of macromolecule metabolic process Regulation of transcription by RNA polymerase II

(b)

Stage	GO Term(Negative Correlation with <i>SpCTCF</i>)
Early brastula	-
Hatched brastula	-
Mesenchyme brastula	-
Early gastrulation	<u>ion transmembrane transport</u>
Late gastrulation	-

(c)

Stage	GO Term(Non Correlation with <i>SpCTCF</i>)
Early brastula	-
Hatched brastula	-
Mesenchyme brastula	-
Early gastrulation	-
Late gastrulation	-

表 S5 (a) *SpCTCF* の発現と正の相関を持つ転写産物の生物学的過程。*SpCTCF* の発現と正の相関を持つ転写産物の機能として、それらの転写産物がエンリッチしている GO の上流に位置する機能群を記載。赤文字は細胞周期関連機能を示す。各段階の転写産物数：(EB = 284, HB = 510, MB = 474, EG = 504, LG = 505) (b) *SpCTCF* の発現と負の相関を持つ転写産物の生物学的過程。*SpCTCF* の発現と負の相関を持つ転写産物の機能として、それらの転写産物がエンリッチしている GO の上流に位置する機能群を記載。転写産物数：(EB, HB, MB, EG, LG = 99, 105, 146, 173, 223) (c) *SpCTCF* と相関のない転写産物の生物学的過程。*SpCTCF* と相関のない転写産物には、それらの転写産物がエンリッチしている GO の上流に位置する機能はなかった。転写産物数：(EB, HB, MB, EG, LG = 284, 510, 474, 504, 505) シングルセルデータは GEO データベース (GSE149221) から取得し、EB から LG ステージのデータを用いて解析した。データのフィルタリングは、データを取得した原著論文 (Foster et al.) *SpCTCF* の発現と相関のある転写産物を抽出するため、各転写産物と *SpCTCF* 発現レベルの相関を計算し、母相関係数の検定を行った ($p = 0.00001$)。正の相関を持つグループに加え、負の相関を持つグループ、相関係数の絶対値が小さいグループも比較のために抽出した。相関係数の絶対値が小さいグループの数は、各発達段階において正の相関を持つグループの数と等しくなるようにした。エンリッチメント解析は Gene ontology resource

第IV部 まとめ

第 15 章 全体のまとめ

本論文ではウニの初期発生をモデルに、原腸形成の機序と CTCF の機能に関する解析を行った。

第 II 部の原腸形成過程の考察では、オメガプラズール処理胚における外腸胚形成過程を比較対象とした細胞骨格の定量化とシミュレーションによる検証により、植物極頂端側の細胞骨格分布が原腸形成の進行に重要であることを示した。海水中を泳ぐ数十マイクロメートルの生体組織に対して、非破壊で力学的な性質を測定することは難しいが、本研究では画像処理による細胞内特徴量の定量化とそれを反映する数理モデルを用いることで、間接的にこれを可能にしている。細胞骨格や細胞内環境の可視化さえできれば、他の生物種の胚組織においても同じプロセスが応用できる。

原腸形成機構を考察するモデルや組織の屈曲に関する研究はこれまでも複数存在するが、正常な原腸形成と外腸胚形成の違いを植物極頂端側の細胞幅が司っているという本研究の知見は新しい。また、細胞内 pH と個体スケールでの形態変化の関係に関する研究はこれまでほとんどなされていない。しかし、本研究における胚全体での pH 極性の変化が、なぜ植物極側のみで細胞骨格分布を乱すのかは未だ不明である。これに答えるためには H^+/K^+ ポンプの発現部位を原腸胚で特定する必要があるが、 H^+/K^+ ポンプと Na^+/K^+ ポンプの構造が非常に類似しているため、可視化に至っていない。

数理モデルによるさらに時間経過が進んだ胚形状の再現に関しては、細胞分裂や細胞の再配置、SMC による原腸の引き上げなど複雑な要素が必要になるため本研究では行わなかったが、今後モデルを発展させることで表現できる現象も多様になると考えている。例えば原腸先端において 8 個の小小割球が左右に 5:3 の配置をとることが知られており、この小小割球を取り除くと左右性が乱れる。pH 変化と細胞配置の関係から小小割球の配置機構を解明することで、左右軸形成の未知なトリガーを特定できる可能性がある。

原腸形成機構の解析に対する研究を始めた当初の動機は、元々あった形態と性格との関連に対する興味からであった。体型と気質に関しての理論はエルン

スト・クレッチマーやウィリアム・シェルドンが有名である。彼らは人の体型と気質を結びつけた3つの型(分裂気質な細長型、躁鬱気質な肥満型、粘着気質な闘士型)があると考えた。この3つの型は胚葉発生と対応づけると細長型：外胚葉優位、肥満型：内胚葉優位、闘士型：中胚葉優位となり、胚発生時の胚葉の分化が、その人の気質まで決定づける傾向にあるとした。原腸形成はまさに胚葉が分化する最初の過程であり、ウニの原腸形成時の異常形態(外腸胚)形成の例を知った時、まだ細胞数が限られた初期胚における形態形成の誤差は成体の形と気質にどんな大きな影響を与えるであろうかと考え、またこの変化が人間だったら、というアナロジーを楽しむことが研究の始まりでありモチベーションであった。実際のところウニには中枢神経はなく、外腸胚は腸が分離してしまい成体になることができない。そのため成体の気質の変化があるのかという問いを検証することはできなかったが、pH調節のためのプロトンポンプの活性次第では形態が変化し、それに伴って胚葉のバランスが変化して性格まで決まってしまうかもしれないという可能性を考えることができた。

第Ⅲ部のCTCFの機能解析では、母性CTCFのノックダウンと胚性CTCFのノックアウト実験から、受精後20時間前後の発生のごく初期ではCTCFが細胞分裂(分裂期から間期への移行)に必要であり、一方で発生後期では生育に必須でないことを示した。CTCFは間期核の構造制御で広く知られているが、本研究ではむしろ分裂終期から間期の切り替わりにおける重要性を初めて示した。CTCFの局在は、間期は核に、分裂期には細胞質に散る様子が哺乳類細胞でも観察されているが、CTCFが枯渇した核が分裂終期で凝縮したままだったことから、分裂期の染色体上でもCTCFが必要であると考えられる。

異なる生物種におけるscRNAseqデータの解析による検証においても、細胞周期関連機能が普遍的であることを示唆し、本研究のモルフォリノアンチセンスオリゴを用いた実験結果と類似した結果が、CTCFをノックダウンしたマウス培養細胞でも観察されたことから、示唆された普遍性がサポートされていると考えられる。

ノックアウト実験ではウニの発生後期にCTCFが必須ではないという結果となった。この結果はゲノム編集の際の変異の入り方なども原因の一つとして考えられるが、ウニの発生の特徴である発生段階依存的な細胞周期の質の変化が大きく影響していると考えられる。ウニの受精卵は数百細胞まで間期のない早い細胞分裂を繰り返す。その後胚性遺伝子からの転写を行うために間期のある

細胞分裂へと切り替わるが、*CTCF*が発生初期の細胞周期に重要であるという事実からも今回の2種類の機能阻害において表現型が全く異なるのはウニの細胞周期様式の違いが影響している可能性があり、今後検証する必要がある。また、発生後期では*CTCF*の発現量が低下していることから、MZT(Maternal to zygotic transition)を経て母性因子には十分に含まれていなかったリソースが胚から供給されることによって*CTCF*の機能が補償されていることも考えられるため、今後の実験により検証する必要がある。

*CTCF*研究を始めたきっかけは、生き物が世代を繰り返す中での個という単位の切れ目に興味を湧いたことであった。卵には母性因子が含まれており、孵化した生物は自身のセントラルドグマを介さずに発生を進めることができる。この母性因子で進む発生は個なのかそれとも母体の延長なのか、何を達成すれば子は個として成立するのかを考えるのが面白く、母性因子で既に存在し、且つMZTに必須なクロマチン構造に関与する因子として*CTCF*に魅力を感じて解析を始めた。通常の発生過程では卵が個体の始まりであると考えられがちであるが、生殖細胞はそれぞれの生物が成熟した際に分化する種特異的な状態にあるとも言える。そう考えるとアワーグラス型にMZT付近での遺伝子発現パターンが種間で収束して見えるのも当然であるように思える。では、個はどこから始まるのか。MZTが起こって母性因子と胚性因子の切り替えが起こった時だろうか。カエルなどでは比較的是っきりとリソースの切り替えが起こるが、ウニでは緩やかに切り替わることが知られている。とすると個とは、ゼロイチではなく連続的な概念なのかもしれない。ウニの機能阻害実験では母性因子と胚性遺伝子で結果が異なった。この結果の違いのあいだに母由来の影響が色濃く残る個が確立されていない状態と、クロマチン構造と細胞周期の変化を経て胚自身のリソースが供給できる個が確立された状態があると考えられる。本研究ではそのあいだを長い時間スケールでしか検証できなかったために、胞胚期を過ぎていつの間にか一人前になっているような結果となったが、命の連続性とその中にある質の変化を感じることができた。

参考文献

第II部

- Aihara, M., & Amemiya, S. (2001). Left-right positioning of the adult rudiment in sea urchin larvae is directed by the right side. *Development*, 128(24), 4935-4948.
<https://doi.org/10.1242/dev.128.24.4935>
- Beane, W.S., Gross, J.M., & McClay, D.R. (2006). RhoA regulates initiation of invagination, but not convergent extension, during sea urchin gastrulation. *Developmental Biology*, 292(1), 213-225.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.12.031>
- Bessodes, N., Haillot, E., Duboc, V., Röttinger, E., Lahaye, F., & Lepage, T. (2012). Reciprocal signaling between the ectoderm and a mesendodermal left-right organizer directs left-right determination in the sea urchin embryo. *PLoS Genetics*, 8(12), e1003121.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003121>
- Burke, R.D., Lail, M., & Nakajima, Y. (1998). The apical lamina and its role in cell adhesion in sea urchin embryos. *Cell Adhesion and Communication*, 5(2), 97-108.
<https://doi.org/10.3109/15419069809040284>
- Burke, R.D., Moller, D.J., Krupke, O.A., & Taylor, V.J. (2014). Sea urchin neural development and the metazoan paradigm of neurogenesis. *Genesis*, 52(3), 208-221. <https://doi.org/10.1002/dvg.22750>
- Burke, R.D., Myers, R.L., Sexton, T.L., & Jackson, C. (1991). Cell movements during the initial phase of gastrulation in the sea urchin embryo. *Developmental Biology*, 146(2), 542-557.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90255-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90255-2)
- Campanale, J. P., Gökirmak, T., Espinoza, J. A., Oulhen, N., Wessel, G. M., & Hamdoun, A. (2014). Migration of sea urchin primordial germ cells. *Developmental Dynamics*, 243(7), 917-927. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24133>

- Dan, K., & Okazaki, K. (1956). Cyto-embryological studies of sea urchins. III. Role of the secondary mesenchyme cells in the formation of the primitive gut in sea urchin larvae. *The Biological Bulletin*, 110(1), 29-42.
<https://doi.org/10.2307/1538890>
- Davidson, E.H., Rast, J.P., Oliveri, P., Ransick, A., Calestani, C., Yuh, C.H.,... Davidson, E.H. (2002). A provisional regulatory gene network for specification of endomesoderm in the sea urchin embryo. *Developmental Biology*, 246(1), 162-190. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0635>
- Davidson, L.A., Koehl, M.A., Keller, R., & Oster, G.F. (1995). How do sea urchins invaginate? Using biomechanics to distinguish between mechanisms of primary invagination. *Development*, 121(7), 2005-2018.
<https://doi.org/10.1242/dev.121.7.2005>
- Duboc, V., Röttinger, E., Lapraz, F., Besnardeau, L., & Lepage, T. (2005). Left-right asymmetry in the sea urchin embryo is regulated by nodal signaling on the right side. *Developmental Cell*, 9(1), 147-158.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.05.008>
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M.,... Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350), 179-183.
<https://doi.org/10.1038/nature10137>
- Edlund, M., Lotano, M.A., & Otey, C.A. (2001). Dynamics of alpha-actinin in focal adhesions and stress fibers visualized with alpha-actinin-green fluorescent protein. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 48(3), 190-200.
[https://doi.org/10.1002/1097-0169\(200103\)48:3%3C190::AID-CM1008%3E3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-0169(200103)48:3%3C190::AID-CM1008%3E3.0.CO;2-C)
- Etensohn, C. A. (1984). Primary invagination of the vegetal plate during sea urchin gastrulation. *American Zoologist*, 24(3), 571-588.
<https://doi.org/10.1093/icb/24.3.571>
- Etensohn, C. A. (1985). Gastrulation in the sea urchin embryo is accompanied by the rearrangement of invaginating epithelial cells. *Developmental biology*, 112(2), 383-390.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(85\)90410-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(85)90410-5)

- Footer, M. J., Kerssemakers, J. W., Theriot, J. A., & Dogterom, M. (2007). Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an optical trap. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(7), 2181-2186. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607052104>
- Gustafson, T., & Kinnander, H. (1956). Microaquaria for time-lapse cinematographic studies of morphogenesis in swimming larvae and observations on sea urchin gastrulation. *Experimental Cell Research*, *11*(1), 36-51. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(56\)90188-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(56)90188-4)
- Gustafson, T., & Kinnander, H. (1960). Cellular mechanisms in morphogenesis of the sea urchin gastrula: The oral contact. *Experimental Cell Research*, *21*(2), 361-373. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(60\)90268-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(60)90268-8)
- Hardin, J. D., & Cheng, L. Y. (1986). The mechanisms and mechanics of archenteron elongation during sea urchin gastrulation. *Developmental Biology*, *115*(2), 490-501. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90269-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90269-1)
- Hibino, T., Ishii, Y., Levin, M., & Nishino, A. (2006). Ion flow regulates left-right asymmetry in sea urchin development. *Development Genes and Evolution*, *216*(5), 265. <https://doi.org/10.1007/s00427-005-0051-6>
- Hoshi, M. (1979). Exogastrulation induced by heavy water in sea urchin larvae. *Cell Differentiation*, *8*(6), 431-436. [https://doi.org/10.1016/0045-6039\(79\)90039-3](https://doi.org/10.1016/0045-6039(79)90039-3)
- Kawakami, Y., Raya, A., Raya, R. M., Rodríguez-Esteban, C., & Belmonte, J. C. I. (2005). Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo. *Nature*, *435*(7039), 165-171. <https://doi.org/10.1038/nature03512>
- Khurram, M., Hernandez, A., Eskalaei, M., Badali, O., Coyle-Thompson, C., & Oppenheimer, S. B. (2004). Carbohydrate involvement in cellular interactions in sea urchin gastrulation. *Acta Histochemica*, *106*(2), 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2004.01.001>
- Kimberly, E.L., & Hardin, J. (1998). Bottle cells are required for the initiation of primary invagination in the sea urchin embryo. *Developmental Biology*, *204*(1), 235-250. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9075>

- Köhler, S., Schmoller, K. M., Crevenna, A. H., & Bausch, A. R. (2012). Regulating contractility of the actomyosin cytoskeleton by pH. *Cell Reports*, *2*(3), 433-439. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.014>
- Kominami, T., & Takata, H. (2004). Gastrulation in the sea urchin embryo: a model system for analyzing the morphogenesis of a monolayered epithelium. *Development, Growth & Differentiation*, *46*(4), 309-326. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169x.2004.00755.x>
- Levin, M., Thorlin, T., Robinson, K. R., Nogi, T., & Mercola, M. (2002). Asymmetries in H⁺/K⁺-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. *Cell*, *111*(1), 77-89. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00939-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00939-X)
- Liu, D., Awazu, A., Sakuma, T., Yamamoto, T., & Sakamoto, N. (2019). Establishment of knockout adult sea urchins by using a CRISPR - Cas9 system. *Development, Growth & Differentiation*, *61*(6), 378-388. <https://doi.org/10.1111/dgd.12624>
- Martik, M. L., & McClay, D. R. (2017). New insights from a high-resolution look at gastrulation in the sea urchin, *Lytechinus variegatus*. *Mechanisms of Development*, *148*, 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2017.06.005>
- McCain, E. R., & McClay, D. R. (1994). The establishment of bilateral asymmetry in sea urchin embryos. *Development*, *120*(2), 395-404. <https://doi.org/10.1242/dev.120.2.395>
- McClay, D. R., Miranda, E., & Feinberg, S. L. (2018). Neurogenesis in the sea urchin embryo is initiated uniquely in three domains. *Development*, *145*(21), dev167742. <https://doi.org/10.1242/dev.167742>
- Minokawa, T., Rast, J. P., Arenas-Mena, C., Franco, C. B., & Davidson, E. H. (2004). Expression patterns of four different regulatory genes that function during sea urchin development. *Gene Expression Patterns*, *4*(4), 449-456. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2004.01.009>
- Miller, J., Fraser, S. E., & McClay, D. (1995). Dynamics of thin filopodia during sea urchin gastrulation. *Development*, *121*(8), 2501-2511. <https://doi.org/10.1242/dev.121.8.2501>

- Mizoguchi, H. (1999). Cell Numbers in the Gut of the Embryo of the Sea Urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Zoological Science*, *16*(2), 341-344. <https://doi.org/10.2108/zsj.16.341>
- Nakajima, Y., & Burke, R. D. (1996). The initial phase of gastrulation in sea urchins is accompanied by the formation of bottle cells. *Developmental Biology*, *179*(2), 436-446. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0273>
- Nájera, G. S., & Weijer, C. J. (2020). Cellular processes driving gastrulation in the avian embryo. *Mechanisms of Development*, *163*, 103624. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2020.103624>
- Odell, G. M., Oster, G., Alberch, P., & Burnside, B. (1981). The mechanical basis of morphogenesis: I. Epithelial folding and invagination. *Developmental Biology*, *85*(2), 446-462. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90276-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90276-1)
- Oliveri, P., & Davidson, E. H. (2004). Gene regulatory network controlling embryonic specification in the sea urchin. *Current Opinion in Genetics & Development*, *14*(4), 351-360. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.06.004>
- Pollard, T. D., Blanchoin, L., & Mullins, R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, *29*(1), 545-576.
- Pollard, T. D., & Cooper, J. A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *science*, *326*(5957), 1208-1212. DOI: 10.1126/science.1175862
- Remsburg, C., Testa, M., & Song, J. L. (2021). Rab35 regulates skeletogenesis and gastrulation by facilitating actin remodeling and vesicular trafficking. *Cells and Development*, *165*, 203660. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203660>
- Schatzberg, D., Lawton, M., Hadyniak, S. E., Ross, E. J., Carney, T., Beane, W. S.,... Bradham, C. A. (2015). H⁺/K⁺ ATPase activity is required for biomineralization in sea urchin embryos. *Developmental Biology*, *406*(2), 259-270. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.08.014>
- Shimeld, S. M., & Levin, M. (2006). Evidence for the regulation of left - right asymmetry in *Ciona intestinalis* by ion flux. *Developmental dynamics: an*

- official publication of the American Association of Anatomists*, 235(6), 1543-1553. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20792>
- Shindo, A. (2018). Models of convergent extension during morphogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 7(1), e293. <https://doi.org/10.1002/wdev.293>
 - Stower, M. J., & Bertocchini, F. (2017). The evolution of amniote gastrulation: the blastopore - primitive streak transition. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 6(2), e262. <https://doi.org/10.1002/wdev.262>
 - Takata, H., & Kominami, T. (2004). Pigment cells trigger the onset of gastrulation in tropical sea urchin *Echinometra mathaei*. *Development, Growth & Differentiation*, 46(1), 23-35. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2004.00726.x>
 - Takemoto, A., Miyamoto, T., Simono, F., Kurogi, N., Shirae - Kurabayashi, M., Awazu, A.,... Sakamoto, N. (2016). Cilia play a role in breaking left-right symmetry of the sea urchin embryo. *Genes to Cells*, 21(6), 568-578. <https://doi.org/10.1111/gtc.12362>
 - Tamulonis, C., Postma, M., Marlow, H. Q., Magie, C. R., de Jong, J., & Kaandorp, J. (2011). A cell-based model of *Nematostella vectensis* gastrulation including bottle cell formation, invagination and zippering. *Developmental Biology*, 351(1), 217-228. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.10.017>
 - Warner, J. F., & McClay, D. R. (2014). Left-right asymmetry in the sea urchin. *Genesis*, 52(6), 481-487. <https://doi.org/10.1002/dvg.22752>
 - Whittaker, J. R., & Meedel, T. H. (1989). Two histospecific enzyme expressions in the same cleavage - arrested one - celled ascidian embryos. *Journal of Experimental Zoology*, 250(2), 168-175. <https://doi.org/10.1002/jez.1402500208>
 - Yaguchi, S., Yaguchi, J., Angerer, R.C., Angerer, L.M., & Burke, R.D. (2010). TGF β signaling positions the ciliary band and patterns neurons in the sea urchin embryo. *Developmental Biology*, 347(1), 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.08.009>

第三部

- Agarwal, H., Reisser, M., Wortmann, C., Gebhardt, J. C. M. (2017). Direct observation of cell-cycle-dependent interactions between CTCF and chromatin. *Biophysical Journal*, 112, 2051–2055. doi: 10.1016/j.bpj.2017.04.018
- Alharbi, A. B., Schmitz, U., Bailey, C. G., & Rasko, J. E. J. (2021). CTCF as a regulator of alternative splicing: New tricks for an old player. *Nucleic Acids Research*, 49, 7825–7838. doi: 10.1093/nar/gkab520
- Andreu, M. J., Alvarez-Franco, A., Portela, M., Gimenez-Llorente, D., Cuadrado, A., Badia-Careaga, C., ... Manzanares, M. (2022). Establishment of 3D chromatin structure after fertilization and the metabolic switch at the morula-to-blastocyst transition require CTCF. *Cell Reports*, 41, 111501. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111501.
- Braccioli, L., & De Wit, E. (2019). CTCF: A Swiss-army knife for genome organization and transcription regulation. *Essays in Biochemistry*, 63, 157–165. doi: 10.1042/EBC20180069
- Burke, L. J., Zhang, R., Bartkuhn, M., Tiwari, V. K., Tavoosidana, G., Kurukuti, S., ... Renkawitz, R. (2005). CTCF binding and higher order chromatin structure of the H19 locus are maintained in mitotic chromatin. *EMBO Journal*, 24, 3291–3300. doi: 10.1038/sj.emboj.7600793
- Carmona-Aldana, F., Zampedri, C., Suaste-Olmos, F., Murillo-de-Ozores, A., Guerrero, G., Arzate-Mejía, R., ... Recillas-Targa, F. (2018). CTCF knockout reveals an essential role for this protein during the zebrafish development. *Mechanism of Development*, 154, 51–59. doi: 10.1016/j.mod.2018.04.006
- Cavalheiro, G. R., Girardot, C., Viales, R. R., Pollex, T., Cao, T. B. N., Lacour, P., ... Furlong, E. E. M. (2023). CTCF, BEAF-32, and CP190 are not required for the establishment of TADs in early *Drosophila* embryos but have locus-specific roles. *Science Advances*, 9, eade1085. doi: 10.1126/sciadv.ade1085.
- Cavalieri, V., Melfi, R., & Spinelli, G. (2013). The Compass-like locus, exclusive to the Ambulacrarians, encodes a chromatin insulator binding

- protein in the sea urchin embryo. *PLoS Genetics*, 9, e1003847. doi: 10.1371/journal.pgen.1003847
- Chiu, K., Berrada, Y., Eskndir, N., Song, D., Fong, C., Naughton, S., ... Stephens, A. D. (2023). CTCF is essential for proper mitotic spindle structure and anaphase segregation. *bioRxiv*, doi: 10.1101/2023.01.09.523293, 10 Jan 2023, preprint: not peer reviewed.
 - Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156–159. doi: 10.1006/abio.1987.9999
 - Church, G. M., & Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 1991–1995. doi: 10.1073/pnas.81.7.1991
 - Crane, E., Bian, Q., McCord, R. P., Lajoie, B. R., Wheeler, B. S., Ralston, E. J., ... Meyer, B. J. (2015). Condensin-driven remodelling of X chromosome topology during dosage compensation. *Nature*, 523, 240–244. doi: 10.1038/nature14450
 - Cremer, T., & Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature reviews in genetics*, 2, 292–301. doi: 10.1038/35066075
 - Davidson, E. H., Rast, J. P., Oliveri, P., Ransick, A., Calestani, C., Yuh, C. H., ... Bolouri, H. (2002). A provisional regulatory gene network for specification of endomesoderm in the sea urchin embryo. *Developmental Biology*, 246, 162–190. doi: 10.1006/dbio.2002.0635.
 - Davidson, P. L., Guo, H., Wang, L., Berrio, A., Zhang, H., Chang, Y., ... Wray, G. A. (2020). Chromosomal-Level Genome Assembly of the Sea Urchin *Lytechinus variegatus* Substantially Improves Functional Genomic Analyses. *Genome Biology and Evolution*, 12, 1080–1086. doi: 10.1093/gbe/evaa101
 - Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., ... Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485, 376–380. doi: 10.1038/nature11082
 - Downen, J. M., Fan, Z. P., Hnisz, D., Ren, G., Abraham, B. J., Zhang, L. N., ... & Young, R. A. (2014). Control of cell identity genes occurs in insulated

- neighborhoods in mammalian chromosomes. *Cell*, 159, 374–387. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.030
- Du, Z., Zheng, H., Huang, B., Ma, R., Wu, J., Zhang, X., … Xie, W. (2017). Allelic reprogramming of 3D chromatin architecture during early mammalian development. *Nature*, 547, 232–235. doi: 10.1038/nature23263.
 - Fedoriw, A. M., Stein, P., Svoboda, P., Schultz, R. M., & Bartolomei, M. S. (2004). Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. *Science*, 303, 238–240. doi: 10.1126/science.1090934.
 - Filippova, G. N., Qi, C-F., Ulmer, J. E., Moore, J. M., Ward, M. D., Hu, Y. J., … Lobanenko, V. V. (2002). Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter its DNA-binding specificity. *Cancer Research*, 62, 48–52.
 - Foster, S., Oulhen, N., & Wessel, G. (2020). A single cell RNA sequencing resource for early sea urchin development. *Development*, 147, dev191528. doi: 10.1242/dev.191528.
 - Franke, M., De la Calle-Mustienes, E., Neto, A., Almuedo-Castillo, M., Irastorza-Azcarate, I., Acemel, R. D., … Gómez-Skarmeta, J. L. (2021). CTCF knockout in zebrafish induces alterations in regulatory landscapes and developmental gene expression. *Nature Communications*, 12, 5415. doi: 10.1038/s41467-021-25604-5
 - Fudenberg, G., & Nora, E. P. (2021). Embryogenesis without CTCF in flies and vertebrates. *Nature Structural & Molecular Biology*, 28, 774–776. doi: 10.1038/s41594-021-00662-x
 - Gildor, T., & Ben-Tabou de-Leon, S. (2015). Comparative Study of Regulatory Circuits in Two Sea Urchin Species Reveals Tight Control of Timing and High Conservation of Expression Dynamics. *PLoS Genetics*, 11, e1005435. doi: 10.1371/journal.pgen.1005435.
 - Heger, P., Marin, B., & Schierenberg, E. (2009). Loss of the insulator protein CTCF during nematode evolution. *BMC Molecular Biology*, 10, 84. doi: 10.1186/1471-2199-10-84

- Heger, P., George, R., & Wiehe, T. (2013). Successive gain of insulator proteins in arthropod evolution. *Evolution*, 67, 2945–2956. doi: 10.1111/evo.12155
- Heger, P., Marin, B., Bartkuhn, M., Schierenberg, E., & Wiehe, T. (2012). The chromatin insulator CTCF and the emergence of metazoan diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 17507-17512. doi: 10.1073/pnas.1111941109.
- Hosoi, S., Sakuma, T., Sakamoto, N., & Yamamoto, T. (2014). Targeted mutagenesis in sea urchin embryos using TALENs. *Development, Growth & Differentiation*, 56, 92–97. doi: 10.1111/dgd.12099
- Hug, C. B., Grimaldi, A. G., Kruse, K., & Vaquerizas, J. M. (2017). Chromatin Architecture Emerges during Zygotic Genome Activation Independent of Transcription. *Cell*, 169, 216–228. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.024.
- Katow, H., Katow, T., Yoshida, H., & Kiyomoto, M. (2021). Involvement of Huntingtin in Development and Ciliary Beating Regulation of Larvae of the Sea Urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 5116. doi: 10.3390/ijms22105116
- Kaushal, A., Mohana, G., Dorier, J., Özdemir, I., Omer, A., Cousin, P., ... Gambetta, M. C. (2021). CTCF loss has limited effects on global genome architecture in *Drosophila* despite critical regulatory functions. *Nature Communications*, 12, 1011. doi: 10.1038/s41467-021-21366-2
- Ke, Y., Xu, Y., Chen, X., Feng, S., Liu, Z., Sun, Y., ... Liu, J. (2017). 3D Chromatin Structures of Mature Gametes and Structural Reprogramming during Mammalian Embryogenesis. *Cell*, 170, 367–381. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.029.
- Kim, T. H., Abdullaev, Z. K., Smith, A. D., Ching, K. A., Loukinov, D. I., Green, R. D., ... Ren, B. (2007). Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell*, 128, 1231–1245. doi: 10.1016/j.cell.2006.12.048
- Kim, J., Jimenez, D. S., Ragipani, B., Zhang, B., Street, L. A., Kramer, M., ... Ercan, S. (2022). Condensin DC loads and spreads from recruitment sites to

- create loop-anchored TADs in *C. elegans*. *eLife*, 11, e68745. doi: 10.7554/eLife.68745
- Kinjo, S., Kiyomoto, M., Yamamoto, T., Ikeo, K., & Yaguchi, S. (2018). HpBase: A genome database of a sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Development, Growth & Differentiation*, 60, 174–182. doi: 10.1111/dgd.12429
 - Kyrchanova, O., Klimenko, N., Postika, N., Bonchuk, A., Zolotarev, N., Maksimenko, O., & Georgiev, P. (2021). Drosophila architectural protein CTCF is not essential for fly survival and is able to function independently of CP190. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1864, 194733. doi: 10.1016/j.bbagr.2021.194733
 - Lin, C. Y., & Su, Y. H. (2016). Genome editing in sea urchin embryos by using a CRISPR/Cas9 system. *Developmental Biology*, 409, 420–428. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.11.018
 - Liu, D., Awazu, A., Sakuma, T., Yamamoto, T., & Sakamoto, N. (2019). Establishment of knockout adult sea urchins by using a CRISPR-Cas9 system. *Development Growth and Differentiation*, 61, 378–388. doi: 10.1111/dgd.12624
 - Lobanenkov, V. V., Nicolas, R. H., Adler, V. V., Paterson, H., Klenova, E. M., Polotskaja, A. V., & Goodwin, G. H. (1990). A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene*, 5, 1743-1753.
 - Materna, S. C., Nam, J., & Davidson, E. H. (2010). High accuracy, high-resolution prevalence measurement for the majority of locally expressed regulatory genes in early sea urchin development. *Gene Expression Patterns*, 10, 177–184. doi: 10.1016/j.gep.2010.04.002.
 - Merkschlager, M., & Nora, E. P. (2016). CTCF and Cohesin in Genome Folding and Transcriptional Gene Regulation. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17, 17–43. doi: 10.1146/annurev-genom-083115-022339

- Minokawa, T., Rast, J. P., Arenas-Mena, C., Franco, C. B., & Davidson, E. H. (2004). Expression patterns of four different regulatory genes that function during sea urchin development. *Gene Expression Patterns*, 4, 449–456. doi: 10.1016/j.modgep.2004.01.009
- Moore, J. M., Rabaia, N. A., Smith, L. E., Fagerlie, S., Gurley, K., Loukinov, D., ... Filippova, G. N. (2012). Loss of maternal CTCF is associated with peri-implantation lethality of *Ctcf* null embryos. *PLoS ONE*, 7(4). doi: 10.1371/journal.pone.0034915
- Naumova, N., Imakaev, M., Fudenberg, G., Zhan, Y., Lajoie, B. R., Mirny, L. A., & Dekker, J. (2013). Organization of the mitotic chromosome. *Science*, 342, 948–53. doi: 10.1126/science.1236083
- Ochiai, H., Fujita, K., Suzuki, K. I., Nishikawa, M., Shibata, T., Sakamoto, N., & Yamamoto, T. (2010). Targeted mutagenesis in the sea urchin embryo using zinc-finger nucleases. *Genes to Cells*, 15, 875–885. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01425.x
- Ohlsson, R., Renkawitz, R., & Lobanenkov, V. (2001). CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends in Genetics*, 17, 520-527. doi: 10.1016/s0168-9525(01)02366-6
- Oliveri, P., & Davidson, E. H. (2004). Gene regulatory network controlling embryonic specification in the sea urchin. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14, 351–360. doi: 10.1016/j.gde.2004.06.004.
- Oliveri, P., Tu, Q., & Davidson, E. H. (2008). Global regulatory logic for specification of an embryonic cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 5955–5962. doi: 10.1073/pnas.0711220105.
- Oomen, M. E., Hansen, A. S., Liu, Y., Darzacq, X., & Dekker, J. (2019). CTCF sites display cell cycle-dependent dynamics in factor binding and nucleosome positioning. *Genome Research*, 29, 236–249. doi: 10.1101/gr.241547.118
- Palozola, K. C., Donahue, G., Liu, H., Grant, G. R., Becker, J. S., Cote, A., ... Zaret, K. S. (2017). Mitotic transcription and waves of gene reactivation during mitotic exit. *Science*, 358, 119–122. doi: 10.1126/science.aal4671

- Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H. C., ... Merckenschlager, M. (2008). Cohesins Functionally Associate with CTCF on Mammalian Chromosome Arms. *Cell*, 132(3), 422–433. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.011
- Racko, D., Benedetti, F., Dorier, J., & Stasiak, A. (2019). Are TADs supercoiled?. *Nucleic Acids Research*, 47, 521–532. doi: 10.1093/nar/gky1091
- Rast, J. P. (2000) Transgenic manipulation of the sea urchin embryo. *Methods in Molecular Biology*, 136, 365–373. doi: 10.1385/1-59259-065-9:365
- Satou, Y., Nakamura, R., Yu, D., Yoshida, R., Hamada, M., Fujie, M., ... Satoh, N. (2019). A Nearly Complete Genome of *Ciona intestinalis* Type A (*C. robusta*) Reveals the Contribution of Inversion to Chromosomal Evolution in the Genus *Ciona*. *Genome Biology and Evolution*, 11, 3144–3157. doi: 10.1093/gbe/evz228
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, 314, 941–952. doi: 10.1126/science.1133609.
- Sexton, T., Schober, H., Fraser, P., & Gasser, S. M. (2007). Gene regulation through nuclear organization. *Nature structural & molecular biology*, 14, 1049-1055. doi: 10.1038/nsmb1324
- Szabo, Q., Bantignies, F., & Cavalli, G. (2019). Principles of genome folding into topologically associating domains. *Science advances*, 5, eaaw1668. doi: 10.1126/sciadv.aaw1668
- Van Bortle, K., Nichols, M. H., Li, L., Ong, C. T., Takenaka, N., Qin, Z. S., & Corces, V. G. (2014). Insulator function and topological domain border strength scale with architectural protein occupancy. *Genome Biology*, 15, R82. doi: 10.1186/gb-2014-15-5-r82
- Wendt, K. S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., ... Peters, J. M. (2008). Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*, 451(7180), 796–801. doi: 10.1038/nature06634
- Wike, C. L., Guo, Y., Tan, M., Nakamura, R., Shaw, D. K., Díaz, N., ... Cairns, B. R. (2021). Chromatin architecture transitions from zebrafish sperm

- through early embryogenesis. *Genome Research*, 31, 981–994. doi: 10.1101/gr.269860.120.
- Yajima, M., Fairbrother, W. G., & Wessel, G. M. (2012). ISWI contributes to ArsI insulator function in development of the sea urchin. *Development*, 139, 3613–3622. doi: 10.1242/dev.081828
 - Yan, Y., Cummings, C. A., Sutton, D., Yu, L., Castro, L., Moore, A. B., ... Dixon, D. (2016). Immunogold electron microscopy and confocal analyses reveal distinctive patterns of histone H3 phosphorylation during mitosis in MCF-7 cells. *Genes Chromosomes & Cancer*, 55, 397–406. doi: 10.1002/gcc.22343.