

「生物の発生・分化・再生」

平成 13 年度採択研究代表者

佐藤 矩行

(京都大学大学院理学研究科 教授)

「特異的・新規発生遺伝子の機能の網羅的解析」

1. 研究実施の概要

[研究のねらい]

動物の体づくりは多くの発生遺伝子の働きによって成し遂げられるが、これまでに明らかにされている遺伝子に加えて、いまだ機能未知の新規の遺伝子が発生に重要な働きを果たしている可能性が極めて高い。脊索動物ホヤの受精卵はオタマジャクシ幼生へと発生する。この幼生は尾部に脊索その背側に中枢神経系をもち、脊椎動物ボデープランの最も単純な形を表している。最近になって我々がホヤ胚で発現する遺伝子を網羅的に調べてみると、約 15,500 と見積もられているホヤ発生遺伝子の半数以上はいわゆる新規の遺伝子であり、しかも、その多くが組織特異的に発現する。加えて、モルフォリノ・オリゴヌクレオチドによってホヤ発生遺伝子の機能を特異的かつ効率的に解析できる。そこで本研究では、ホヤの特異的・新規発生遺伝子の機能を網羅的に解析し、特に重要と思われるものについては両生類およびマウスでその機能を確かめる。

[これまでの研究の概要と成果]

本年度はまず、カタユレイボヤの特異的・新規発生遺伝子の同定を進めた。ホヤの5つの発生段階で発現する遺伝子の cDNA クローンの中からランダムに選んだ約 5,000 の遺伝子の発現パターンを確かめた。その中から特異的に発現する新規遺伝子について cDNA の全長の塩基配列の決定を進めた。また、cDNA チップについては試作品を作製し、その有効性を確かめた。

[今後の見通し]

5年間の研究を進めるにあたっての初年度の研究としては十分な結果が得られており、特異的・新規発生遺伝子の機能の網羅的解析は十分可能と思われる。

2. 研究実施内容(研究目的、方法、結論などを記述)

(1) ホヤの特異的・新規発生遺伝子の同定とデータベースの構築

これまでに行ったカタユレイボヤ発生遺伝子の cDNA プロジェクトから 8,000 以上に及ぶ新規発生遺伝子の候補としての cDNA クローンが得られている。まず初めにこれらの cDNA の全長塩基配列を決定し、新規遺伝子であることを確かめる作業を行った(現在も続行している)。これまでに約 4,000 についてはその全長塩基配列を決定した。特に Zinc finger モチーフをもつタンパク質をコードする約 120 の遺伝子、および神経系で特異的に発現する約 70 の遺伝子については、論文発

表可能な精度での配列決定を行った。同時に Whole-mount in situ hybridization によってその空間的発現パターンを調べており、このようにして特異的・新規発生遺伝子の同定を進めている。

我々はすでにカタユレイボヤ発生遺伝子の発現プロファイルについてデータベースを構築し、インターネット上で公開している (<http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp>)。本研究で明らかにされるであろう特異的・新規発生遺伝子についても、特許の申請等が済み次第、順次、cDNA 塩基配列情報および発現パターン情報をデータベース化して公開する予定である。

(2) DNA チップの作製とそれを利用した特異的・新規発生遺伝子の機能カスケードの解析

カタユレイボヤ cDNA プロジェクトで得られたホヤ全遺伝子に対応する cDNA をスライドガラス上にアレイした *Ciona* 標準 cDNA チップを作製することが最終目的であるが、本年度は *Ci-Bra* (脊索でのみ発現し、脊索形成のカギとなる遺伝子)の下流・標的遺伝子と考えられる遺伝子の cDNA のチップを作製した。このチップを利用して *Ci-Bra* 下流・標的遺伝子候補を解析したところ、これらが *Ci-Bra* 標的遺伝子であることが確認された。現在、*Ciona* 標準 cDNA チップの作製を進めている。

(3) 脊椎動物(ゼノパス・ゼブラフィシュ)での相同遺伝子の機能の解析

ホヤの発生で重要な働きをもつ特異的・新規発生遺伝子が得られた場合、その相同遺伝子 cDNA をゼノパスまたはゼブラフィシュから単離し、その機能を解析することが本研究の目的の一つでもある。本年度は *Ci-Bra* の標的遺伝子として単離された *prickle* 遺伝子についてそのゼノパスの相同遺伝子の cDNA クローンを単離し、その発現を解析したところ、脊索で特異的に発現することが確かめられた。現在、モルフォリノを使ってこの遺伝子の機能を阻害する実験を進めている。

3. 研究実施体制

佐藤矩行グループ

- ① 佐藤矩行(京都大学大学院理学研究科・教授)
- ② 研究項目
 - (1) ホヤの特異的・新規発生遺伝子の同定とデータベースの構築
 - (2) モルフォリノを駆使した特異的・新規発生遺伝子の機能の解析

安住薫グループ

- ① 安住薫(北海道大学大学院薬学研究科・助手)
- ② 研究項目
DNA チップの作製とそれを利用した特異的・新規発生遺伝子の機能カスケードの解析を行う

高橋弘樹グループ

- ① 高橋弘樹(岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所・助手)
- ② 研究項目
 - (1) DNA チップの作製とそれを利用した特異的・新規発生遺伝子の機能カスケードの解析を行う

(2) ホヤでみつかった特異的・新規発生遺伝子の脊椎動物(ゼノパス・ゼブラフィッシュ)の相同遺伝子の機能の解析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

なし

(2) 特許出願

なし