

「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。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。最近になって我々はカタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) のゲノムを解読し、さらにこのホヤの発生過程および成体の器官形成で発現する遺伝子を網羅的に調べてみた。その結果、15,852と見積もられているこのホヤの遺伝子のうち少なくとも2,500近くはいわゆる新規の遺伝子であり、しかも、そのいくつかは時間的・空間的に特異的に発現することがわかった。加えて、最近モルフォリノ・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ことが確かめられた。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] 平成13年度および14年度では、カタユウレイボヤのゲノムの解読およびcDNAプロジェクトを展開し、このホヤの特異的・新規発生遺伝子の情報を得た。本年度 (H15年度) は(1)ホヤの特異的・新規発生遺伝子の機能の解析と(2) cDNAチップの作製とそれを利用したマイクロアレイによる特異的・新規発生遺伝子の機能カスケードの解析を中心に研究を進めた。(1)についてはこれまでに400以上の新規遺伝子の機能をモルフォリノ・オリゴヌクレオチドによって阻害したところ、約70の遺伝子(約18%にあたる)が特異的形態異常を示し、その機能を推測することができた。特に初期発生において胚の軸形成に重要な働きをすることがわかっているβ-カテニンの作用と関連して、5つの新規発生遺伝子を同定することができた。また、(2)についてはすでにチップを完成させ、特異的・新規発生遺伝子の機能カスケードの解析を進めている。現在、安住はこれらのチップを使って、環境応答に関連した新規発生遺伝子の解析を進めており、環境応答と自然免疫反応とに関連した興味深

い結果を得ている。また佐藤はホヤの初期発生における胚細胞の発生運命の限定、体壁筋および心臓の分化、さらに変態に関連した発生遺伝子カスケードを解析しており、すでに多くの予備的データを得ている。

[今後の見通し] 5年間の研究を進めるにあたっての最初の3年間の研究としてはほぼ予定通りの研究結果が得られている。特に上の(1)で述べた研究成果から、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網羅的解析は十分有効である。また(2)のマイクロアレイによる解析は、予想以上の発展をみせており、平成16年度には大きな成果が得られるものと考えている。

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機能の解析（主として佐藤と稲葉が担当）：

カタユウレイボヤの発生過程で発現し、これまでに全長塩基配列の決定されたcDNAの中からまず200個を選定した。その中には64のzinc fingerモチーフをもつタンパク質をコードする遺伝子、38の神経で特異的に発現する遺伝子および98の脊椎動物で機能未知の相同遺伝子をもつホヤ遺伝子が含まれている。これらの遺伝子の機能の特異的モルフォリノで阻害したところ、20%にあたる40の遺伝子で形態異常が現れた。このことは、提案したプロジェクト研究が充分可能であることを示すもので、その成果をDevelopment誌に公表した。その後さらに解析数を400に増やした。その結果、特に初期発生において胚の軸形成に重要な働きをすることがわかっている β -カテニンの作用と関連して、5つの新規発生遺伝子を同定することができた（論文準備中）。また、これまでの研究では特に神経系の形成に働くと思われる新規遺伝子が数多く得られている。現在、これまでの解析で得られた新規発生遺伝子の機能を、組織特異的分化マーカーを用いてさらに詳細に検討中である。また、稲葉は、 β -カテニン関連新規遺伝子の機能を、それがコードするタンパク質に対する抗体を作り、それを利用した解析を進めている。

(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（主として安住と佐藤が担当）：

カタユウレイボヤのcDNAプロジェクトで得られた情報をもとに、cDNAチップおよびオリゴヌクレオチドチップを作製し、マイクロアレイによる特異的・新規発生遺伝子の機能カスケードの解析をめざしている。これまでに、約13,400の転写産物に対するcDNAチップ（ver. 1）および約17,800の転写産物に対するオリゴヌクレオチドチップ（ver. 1）を完成させた。現在、安住はこれらのチップを使って、環境応答に関連した新規発生遺伝子の解析を進めており、環境応答と自然免疫反応とに関連した興味深い結果を得ている（論文準備中）。また佐藤はホヤの初期発生における胚細胞の発生運命の限定（論文準備中）、体壁筋および心臓の分化、さらに変態に関連した発生遺伝子カスケードを解析しており、すでに多くの予備的データを得ている。

(3) 形態形成関連新規発生遺伝子の機能の解析（主として高橋と佐藤が担当）：
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ッシュから単離し、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。本年度は脊椎動物胚の中軸中胚葉構造の形成に関わる遺伝子の機能を探る目的で、ホヤの脊索形成のキー遺伝子である*Ci-Bra*の標的遺伝子として単離された*prickle*遺伝子など約20の遺伝子につきモルフォリノを使って機能を阻害する実験を進めた。その結果、これらの遺伝子の機能がコンバージェンス、インターカレーション、エクステンションなどの形態形成運動のそれぞれに対応した機能を示すことがわかった（論文準備中）。現在、これらの遺伝子の相互作用を調べるとともに、これらの脊椎動物相同遺伝子の解析も予定している。

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

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) 形態形成運動に関連した特異的・新規発生遺伝子の機能解析
 - (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

稲葉一男グループ

- ① 稲葉一男（東北大学大学院理学研究科附属臨海実験所・助教授）
- ② 研究項目
抗体の作製とそれを利用した特異的・新規発生遺伝子の機能の解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

○（総説）

著者：Nori Satoh

表題：「The Ascidian Tadpole Larva : Comparative Molecular Development and Genomics」

掲載誌：「Nature Review of Genetics」Vol.4 No.4, 285-295 2003.4.7

○（総説）

著者：Nori Satoh, Yutaka Satou, Brad Davidson and Michael Levine

表題：「*Ciona intestinalis* : An emerging model for whole-genome analyses」

掲載誌：「Trends in Genetics」Vol.19 No.7 353-414 2003.7.1

○（原著論文）

著者：Yasuaki Mochizuki, Yutaka Satou, and Nori Satoh

表題：「A Large-Scale Characterization of Genes Specific to the Larval Nervous System in the Ascidian *Ciona intestinalis*」

掲載誌：「Genesis」No36, 62-71 2003.5.15

○（原著論文）

著者：Shuichi Wada, Miki Tokuoka, Eiichi Shouguchi, Kenji Kobayashi, Anna Di Gregorio, Antonietta Spagnuolo, Margherita Branno, Michael Levine, Yuji Kohara, Daniel Rokhsar, Hidetoshi Saiga, Nori Satoh, Yutaka Satou

表題：「A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*:(II) Genes for homeobox transcription factors」

掲載誌：「Development Genes and Evolution」Vol.213 No.5-6 222-234 2003.7.1

○（原著論文）

著者：Yasunori Sasakura, Eiichi Shoguchi, Naohito Takatori, Shuichi Wada, Ian A. Meinertzhagen, Yutaka Satou, Nori Satoh

表題：「A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*: (X) Genes for cell junctions and extracellular matrix」

掲載誌：「Development Genes and Evolution」Vol.213 No.5-6 303-313 2003.7.1

○（原著論文）

著者：Kaoru Azumi, Hiroki Takahashi, Yasufumi Miki, Manabu Fujie, Hisayoshi Ishikawa, Atsushi Kitayama, Yutaka Satou, Naoto Ueno, and Nori Satoh

表題：「Construction of a cDNA microarray derived from the ascidian *Ciona intestinalis*」

掲載誌：「Zoological Science」No.20, 1223-1229 2003.10.25

○ (原著論文)

著者：Lixy Yamada, Eiichi Shoguchi, Shuichi Wada, Kenji Kobayashi, Yasuaki Mochizuki, Yutaka Satou and Nori Satoh

表題：「Morpholino-based gene knockdown screen of novel genes with developmental function in *Ciona intestinalis*」

掲載誌：「Development」 Vol.130 No.26, 6485-6495 2003.12.15

○ (原著論文)

著者：Eiichi Shoguchi, Tetsuro Ikuta, Fumiko Yoshizaki, Yutaka Satou, Nori Satoh, Katsutoshi Asano, Hidetoshi Saiga and Takahito Nishikata

表題：「Fluorescent *in situ* hybridization to ascidian chromosomes」

掲載誌：「Zoological Science」 No.21, 153-157 2004.2.25

○ (日本語雑誌記事)

著者：和田修一、將口栄一、佐藤矩行

表題：「新規発生遺伝子の探索」

掲載誌：「化学工業」 第54巻7号, 489-493 2003.7.1

○ (日本語雑誌記事)

著者：和田修一、山田力志、小林健司、將口栄一、佐藤矩行

表題：「モルフォリノヌクレオチドを利用した機能未知遺伝子の探索」

掲載誌：「生化学」 第75巻7号, 617-620 2003.7.25

○ (日本語雑誌記事)

著者：佐藤ゆたか、佐藤矩行

表題：「ホヤのゲノムワイドな遺伝子科学 脊索動物の普遍的な生命現象の理解を目指して」

掲載誌：「細胞工学」 vol.22 No.9, 1003-1008 2004.8.22

(2) 特許出願

平成15年度特許出願件数 0 件 (CREST研究期間累積件数 4 件)