

「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、このホヤの発生過程で発現する遺伝子を網羅的に調べてみると、15,852と推定された遺伝子のうち少なくとも2,500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脊椎動物でその機能を確かめる。

[これまでの研究の概要と成果]

#### (1) カタユウレイボヤ発生遺伝子のゲノム科学的基盤整備：

ホヤ発生遺伝子の機能を中心として今後の研究のために、ホヤゲノムの染色体マッピングなど、その基盤整備を進めた。

#### (2) ホヤの特異的・新規発生遺伝子の機能の解析：

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。その結果、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。特にほぼすべての動物でその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 $\beta$ -カテニンの上流で働く5つの新規発生遺伝子を同定することに成功した。

#### (3) 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：

本プロジェクトを通じてホヤのマイクロアレイ研究系を確立した。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の解析を進めている。また、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。

[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年半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。今後より成果の公表に結びつく研究を進めたい。

## 2. 研究実施内容

### (1) カタユウレイボヤ発生遺伝子のゲノム科学的基盤整備：

我々は2002年にこのホヤのドラフトゲノムを解読したが、今後、新規発生遺伝子の発現と機能の解析をよりゲノム科学的に研究するためには、その基盤整備としてまだ多くの課題が残されている。平成16年度では特にゲノム情報の染色体マッピングを試み、 $2n=28$ 本の染色体の核型を決定し、この動物のゲノム情報の約65%を染色体にマッピングすることに成功した。現在、発生遺伝子の染色体上での分布などを新規発生遺伝子の機能と関連付けながら調べている。

### (2) ホヤの特異的・新規発生遺伝子の同定と機能の解析：

本年度から新規発生遺伝子のみではなく、既存の発生遺伝子も含めてより広い角度から発生遺伝子の機能を解析することとした。

(a) 既存遺伝子の解析：マウスで単離された*Mesp*遺伝子はbHLH転写因子をコードし、心臓などの筋肉の分化に重要な働きを持つと考えられている。しかし遺伝子の重複による機能のリダンダンシーおよびその複雑性により、その完全なる機能の解明に至っていない。ホヤでは*Mesp*遺伝子は一個であり、この遺伝子機能を阻害すると心臓が全く形成されず、この遺伝子が脊索動物の心臓形成に必須の遺伝子であることを突き止めた。また、血球形成の基本的遺伝子として、*Twist-like1*の機能も解明しつつある。

(b) これまでに、カタユウレイボヤの発生過程で発現し、全長塩基配列の決定されたcDNAの中から脊椎動物で機能未知の相同遺伝子をもつものを400個以上選び、その機能を特異的モルフォリノで阻害したところ、約18%にあたる70の遺伝子で形態異常が現れた。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 $\beta$ -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、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おり、現在これまでの解析で得られた神経関連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。

### (3) マイクロアレイを利用した特異的・新規発生遺伝子の機能カスケードの解析：

カタユウレイボヤのcDNAプロジェクトで得られた情報をもとに、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進めている。特に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、すでに多くのデータを得ている。また、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。

(4) 形態形成関連新規発生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。特に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（論文投稿中）。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。

また、*Ci-Bra*の下流遺伝子として脊索で発現するものの一つが、ショウジョウバエの*Scabrous*の相同遺伝子であることがわかった。この遺伝子の脊椎動物ホモログについての研究はまだない。この遺伝子の機能を調べてみる。その産物（タンパク質）が神経系のパタニングに重要な働きをすることがわかった。これは古くから考えられていた、神経系全体のパタニングに脊索に関わることを示す初めての証拠である。

### 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（自然科学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

イシユ) 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

高村克美グループ

- ① 高村克美 (福山大学生命工学部海洋生物工学科)
- ② 研究項目  
モルフォリノオリゴを使った研究によって明らかになった神経関連新規発生遺伝子についてその機能を解析する。

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文 (原著論文) 発表

- Nori Satoh:  
Genomic Resources for Ascidians: Sequence/Expression Databases and Genome Projects.  
Method in Cell Biology, vol.74 p759-772 (2004)
- Yutaka Satou, Kaoru S. Imai and Nori Satoh:  
The ascidian *Mesp* gene specifies heart precursor cells.  
Development, Vol.131, No.11 p2533-2541 (2004)
- Naohito Takatori, Kohji Hotta, Yasuaki Mochizuki, Gouki Satoh, Yasuo Mitani, Nori Satoh, Yutaka Satou and Hiroki Takahashi:  
T-box Genes in the Ascidian *Ciona intestinalis*: Characterization of cDNAs and Spatial Expression.  
Developmental Dynamics, vol.230 p743-753 (2004)
- Kaoru Azumi, Manabu Fujie, Takeshi Usami, Yasufumi Miki, Nori Satoh:  
A cDNA microarray technique applied for analysis of global gene expression profiles in tributyltin-exposed ascidians.  
Marine Environmental Research, vol.58, No2-5, p543-546 (2004)
- Kaoru S. Imai, Kyosuke Hino, Kasumi Yagi, Nori Satoh and Yutaka Satou:  
Gene expression profiles of transcription factors and signaling molecules in the ascidian embryo: towards a comprehensive understanding of gene networks.  
Development, Vol.131, No.13 p4047-4058 (2004)
- Kasumi Yagi, Nori Satoh, Yutaka Satou:

Identification of downstream genes of the ascidian muscle determinant gene *Ci-machol*.

Developmental Biology, vol.274 p478-489 (2004)

- Terumi Matsuoka, Satoko Awazu, Eiichi Shoguchi, Nori Satoh, Yasunori Sasakura:

Germline Transgenesis of the Ascidian *Ciona intestinalis* by Electroporation.

genesis, vol.41 p67-72 (2005)

- Yuhkoh Satouh, Potturi Padma, Toshifusa Toda, Nori Satoh, Hiroyuki Ide, Kazuo Inaba:

Molecular Characterization of Radial Spoke Subcomplex Containing Radial Spoke Protein 3 and Heat Shock Protein 40 in Sperm Flagella of the Ascidian *Ciona intestinalis*.

Molecular Biology of the Cell, vol.16 p626-636 (2005)

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：3件（CREST研究期間累積件数：7件）