

「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。これまでにその機能が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、脊椎動物ボディ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レイボヤ (*Ciona intestinalis*) のゲノムを解読した。そして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、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認する。

[これまでの研究の概要と成果]

(1) カタユ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た今後の研究のために、ホヤゲノム情報の染色体マッピング、ホヤ発生遺伝子の発現情報に関する Web の公開など、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 β -カテニンの上流で働く5つの新規発生遺伝子を同定し、その幾つかについては更に詳細な解析を行った。

(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。

(4) 突然変異体の作製による遺伝子機能の解析:

トランスポゾン *Minos* の挿入突然変異体の作製とその原因遺伝子の同定を通じた新規遺伝子の機能の解析を進めている。

[今後の見通し] 5年間の研究のうち最初の4年間の研究としてはほぼ予定通りの研究成果が得られている。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かつ網羅的に行うためには、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17年度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。そしてさらに、このホヤの発生に重要な役割を担う転写因子遺伝子および細胞間シグナル分子遺伝子の90%について、その染色体上での配置を決定した。現在これらの遺伝子の染色体での分布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:

昨年度から新規発生遺伝子のみではなく、既知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) 既知遺伝子の解析: 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* 遺伝子は一箇であり、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。現在これらの遺伝子を中心にその下流ネットワークを解析している。

(b) 新規遺伝子の解析: 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 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。そのうちの幾つかについてはさらに詳細な解析を行っている。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、現在これらの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。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 (*Ci-Scale*) 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と、その産物(タンパク質)が脊索の背側に位置する神経系を取り囲むように分布することがわかった。*Ci-Scale* タンパク質の分布は神経系から分泌される Notch シグナルに制御されている。そして、この両者の協同作業によって、神経系の背側パタニングを制御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が関わることを示す初めての証拠である。

(5) 突然変異体の作製による遺伝子の機能解析:

本年度から挿入突然変異体の作製を通じた新規発生遺伝子の機能の解析を本格化した。現在得られている変異体の中で *balloon* と名づけた変異体は水腫様変異を引き起こす。今後この変異体の解析を進めたい。

3. 研究実施体制

「佐藤矩行」グループ

①研究分担グループ長：佐藤 矩行（京都大学、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

「高橋弘樹」グループ

①研究分担グループ長：高橋 弘樹（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

「安住薫」グループ

- ①研究分担グループ長：安住 薫（北海道大学、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

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

- 著者：Takeshi Kawashima, Yutaka Satou, Seiko D.Murakami, Nori Satoh
表題：「Dynamic changes in developmental gene expression in the basal chordate *Ciona intestinalis*」
掲載誌：「Develop. Growth Differ.」 vol.47,p187-199, 2005
- 著者：Eiichi Shoguchi, Takeshi Kawashima, Chizuko Nishida-Umehara, Yoichi Matsuda, Nori Satoh
表題：「Molecular cytogenetic characterization of *Ciona intestinalis* chromosomes」
掲載誌：「Zoologocal Science」 vol.22, p511-516, 2005
- 著者：Kasumi Yagi, Naohito Takatori, Yutaka Satou, Nori Satoh
表題：「Ci-Tbx6b and Ci-Tbx6c are key mediators of the maternal effect gene Ci-macho1 in muscle cell differentiation in *Ciona intestinalis* embryos」
掲載誌：「Developmental Biology」 vol.282, p535-549, 2005
- 著者：Tomoko Ishibashi, Takeshi Usami, Manabu Fujie, Kaoru Azumi, Nori Satoh, Shigeki Fujiwara
表題：「Oligonucleotide-based microarray analysis of retinoic acid target genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*」
掲載誌：「Developmental Dynamics」 vol.233, p1571-1578, 2005
- 著者：Lixy Yamada, Kenji Kobayashi, Yutaka Satou, Nori Satoh
表題：「Microarray analysis of localization of maternal transcripts in eggs and early embryos of the ascidian, *Ciona intestinalis*」
掲載誌：「Developmental Biology」 vol.284, p536-550, 2005
- 著者：Yutaka Satou, Takeshi Kawashima, Eiichi Shoguchi, Akie Nakayama, Nori Satoh
表題：「An integrated database of the ascidian, *Ciona intestinalis*: towards functional genomics」
掲載誌：「Zoologocal Science」 vol.22, p837-843, 2005
- 著者：Yasunori Sasakura, Keisuke Nakashima, Satoko Awazu, Terumi Matsuoka,

Akie Nakayama, Jun-ichi Azuma, Nori Satoh

表題：「Transposon-mediated insertional mutagenesis revealed the functions of animal cellulose synthase in the ascidian *Ciona intestinalis*」

掲載誌：「Proceedings of the National Academy of Sciences」 vol.102, no.42, p15134-15139, 2005

- 著者： Miki Tokuoka, Nori Satoh, Yutaka Satou

表題：「A bHLH transcription factor gene, Twist-like1, is essential for the formation of mesodermal tissues of *Ciona* juveniles」

掲載誌：「Developmental Biology」 Vol.288, p387-396, 2005

- 著者： Mayuko Hamada, Shuichi Wada, Kenji Kobayashi, Nori Satoh

表題：「Ci-Rga, a gene encoding an MtN3/saliva family transmembrane protein, is essential for tissue differentiation during embryogenesis of the ascidian *Ciona intestinalis*.」

掲載誌：「Differentiation」 Vol.73, No.7, p364-376, 2005

- 著者： Eiichi Shoguchi, Takeshi Kawashima, Yutaka Satou, Makoto Hamaguchi,

Tadasu Sin-I, Yuji Kohara, Nik Putnam, Daniel S. Rokhsar, Nori Satoh

表題：「Chromosomal mapping of 170 BAC clones in the ascidian *Ciona intestinalis*」

掲載誌：「Genome Research」 vol.16 No.2, p297-303, 2006

- 著者： Shuichi Wada, Mayuko Hamada, Nori Satoh

表題：「A genomewide analysis of genes for the heat shock protein 70 chaperone system in the ascidian *Ciona intestinalis*」

掲載誌：「Cell Stress & Chaperones」 vol.11 No.1, p23-33, 2006

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：8 件）