

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生物の発生・分化・再生」
研究課題
「特異的・新規発生遺伝子の機能の網羅的解析」

研究終了報告書

研究期間 平成13年12月～平成19年3月

研究代表者：佐藤矩行
(京都大学大学院理学研究科 教授)

1 研究実施の概要

[研究の構想]

尾索類ホヤは我々脊椎動物と同じ脊索動物門に属し、両者は約 5.4 億年以上昔に共通の祖先から進化してきたものと考えられている。図 1 に示すように、ホヤの受精卵は左右相称卵割を繰り返し、約 120 細胞期に原腸が陥入し、神経胚期、尾芽胚期を経てオタマジャクシ型幼生になる。このオタマジャクシ型幼生は、表皮、体幹部背側の約 350 個の細胞からなる中枢神経系、腹側の内胚葉と間充織、また尾の中央部の 40 個の細胞からなる脊索、そしてその両側の 36 個の筋肉細胞によって構成され、脊索動物ボディープランの最も単純な形を表している。また、ホヤでは胚細胞の発生運命の限定(あるいは決定)が発生初期におこり(図 2)、発生の分子メカニズムを一つ一つの細胞レベルで解析することができる研究系として注目されてきた。

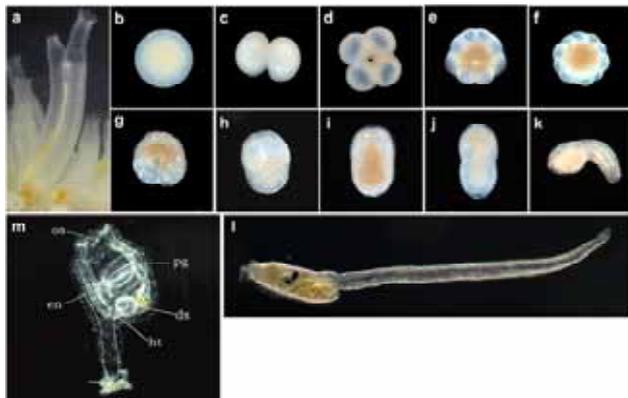


図 1 . カタユレイボヤの発生

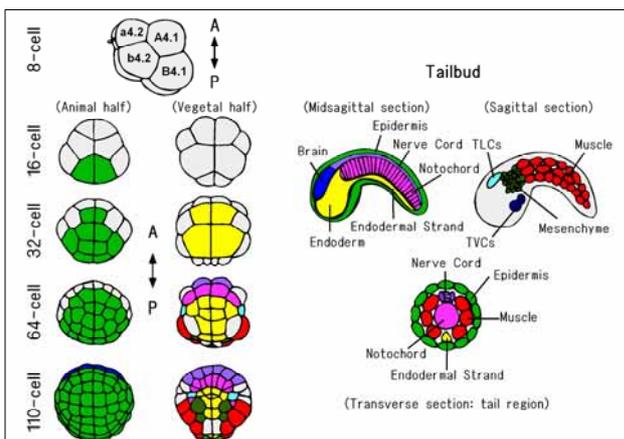


図 2 . ホヤにおける発生運命の限定

転写因子をコードする遺伝子や細胞間シグナル分子をコードする遺伝子は、動物の体づくりに重要な役割を担う。これまでにその機能が明らかにされている発生関連遺伝子に加えて、

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。また発生ゲノム科学的研究は、発生関連遺伝子が単独で機能するよりも、より複雑なネットワークを構成しつつ機能していることを示唆している。

最近になって我々は、日米の共同研究で、世界の研究者に最も広く使われているカタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) のドラフトゲノムを解読し、約 160Mb のゲノムの中に約 15,800 のタンパク質をコードする遺伝子が存在することを明らかにした。このうち転写因子およびシグナル分子をコードする遺伝子は脊索動物に基本的なものであり、しかも脊椎動物で見られる遺伝子の重複がほとんどない。このことは、ホヤでは、遺伝子重複による機能のリダンダシーを考えることなく、遺伝子機能を解析できることを意味する。さらに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、15,800 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。加えて、最近になってモルフォリノ・オリゴヌクレオチド (MO) 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。

こうした研究のバックグラウンドのもとで、本研究では、ホヤの特異的・新規発生遺伝子の機能を、既知遺伝子の新規機能の探索とともに、できるだけ網羅的に解析することをめざした。また、上に述べた発生のシンプルさとゲノムのシンプルさを生かすことによって、複雑な発生過程をできるだけそのまま理解するような発生ゲノム科学的研究を展開したいと考えた。そしてそのようにして、カタユウレイボヤをこれからの発生ゲノム科学研究の一つのモデルシステムとして確立することを願った。

[研究の実施と成果]

上記の研究構想のもとで、以下のような研究を実施し、成果が得られた。

(A) 初期発生を司る遺伝子ネットワークの解明： ドラフトゲノム解読後、我々は、カタユウレイボヤのゲノムに含まれる転写因子をコードする遺伝子とシグナル分子をコードする遺伝子を中心に発生に関わる遺伝子をできるだけ正確にアノテーションした。その結果、このホヤゲノムに存在する 669 個の転写因子遺伝子のうち 359 個をコア転写因子遺伝子として、またシグナル分子遺伝子のうち 118 個をコアなものとして研究を進めた。これらの遺伝子の発生における時間的・空間的発現を網羅的に調べてみると、53 個の転写因子遺伝子および 23 個のシグナル分子遺伝子が発生運命の限定がおこる 16~110 細胞期に発現することがわかった。これら 76 個の遺伝子一つ一つの機能を MO で阻害し他の 75 の遺伝子にどのような影響が及ぶかを調べた結果、これらの遺伝子は 3000 以上の要素からなるネットワークを構成しつ

つ協調的に働いていることが明らかになった。

(B) ホヤ発生遺伝子の染色体マッピング： カタユウレイボヤのドラフトゲノム解読後、新規および既知発生遺伝子の発現と機能をよりゲノム科学的かつ網羅的に解析するためには、その基盤整備としてまだ多くの課題が残されている。その最も重要な課題の一つが、ゲノム情報の染色体マッピングである。まず $2n=28$ 本の染色体の核型を BAC クローンの二色 FISH 法によって決定した。そしてその後、これまでに 263 個の BAC クローンを二色 FISH することにより、この動物のゲノム情報の約 80% 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コア転写因子遺伝子およびコア細胞間シグナル分子遺伝子の約 95% について、その染色体上での位置を決定した。その結果、上に述べた遺伝子ネットワークを染色体レベルでとらえることができるようになった。

(C) マイクロアレイを利用した発生遺伝子の発現と機能の解析： 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。cDNA をもとにした 2 種類とオリゴヌクレオチドをもとにした 2 種類の合計 4 種類のマイクロアレイを作製し、ホヤの発生全体における遺伝子の変動、また初期発生における胚細胞の発生運命の限定における発生遺伝子変異の解析を進めた。その結果、これまでに考えられているよりもはるかに複雑な発生現象に潜む遺伝子発現の変動が明らかになった。

(D) 新規発生遺伝子の機能の解析： カタユウレイボヤゲノムには少なくとも 2,500 の機能未知の新規遺伝子が存在し、その多くは発生に重要な役割を持つと考えられる。そこで、脊椎動物に相同遺伝子のある機能未知遺伝子を中心に、MO を用いた翻訳阻害による大規模スクリーニングを行い、これまでに 504 遺伝子のスクリーニングを完了した。その結果、111 遺伝子は機能阻害によって幼生期に何らかの形態異常を引き起こし、さらにこのうち 34 遺伝子は主要 6 組織の分化に関わっていることが示された。特に 5 遺伝子の機能阻害胚は カテニン機能阻害胚と同じ表現型を持ち、内胚葉が消失し扁平で空洞のある形態を持つ。この カテニン機能阻害胚と同じ表現型を持つ遺伝子は Wnt シグナル経路への関与が考えられる。このように、MO を駆使した遺伝子機能の大規模スクリーニングによって多くの新規遺伝子が同定された。

(E) 既知遺伝子の新規の機能の解析： ここでは特に筋肉細胞分化、血球系分化、脊索分化に関わる遺伝子を中心に研究を行った。幼生の尾の筋肉細胞分化については、*macho-1* の下流で働く *Tbx6b* 遺伝子の機能を明らかにし、また *Mesp* 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。さらに、血球形成の基本的遺伝子としての *Twist-like1* の機能も明らかにした。また、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

して単離された既知遺伝子につき MO を使って機能を阻害する実験を進めた。その結果、特にフィブリノーゲン様タンパク質をコードする *Ci-fibrn* が、中枢神経系で作られる Notch と相互作用しつつ、神経系の背側パタニングに関わるという新知見を得た。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分子的証拠である。

(F) 挿入突然変異体の作製による遺伝子の機能解析： 本プロジェクトにおいては、ホヤでのトランスジェニックラインの確立と、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試みた。多くのトランスポゾン調べた結果、Tc1/*mariner* スーパーファミリーに属する *Minos* がホヤで活性を示すことがわかり、*Minos* を駆使した挿入変異体の作製を続けている。これまでに変態の時間的進行に異常の起こる変異体や水腫様変異を引き起こす変異体などが得られており、順遺伝学研究手法を海産無脊椎動物として初めてホヤで確立することができた。

以上のように、本プロジェクト研究によって、4 つの大きな技術がホヤ発生研究システムに導入された。1 つは大規模な MO による機能阻害実験である。これによって多くの新規発生遺伝子の機能を同定することができ、また既知の遺伝子の新規の機能を明らかにすることができた。また、これまでに蓄積されたゲノム情報を生かし、初期発生の転写ネットワークを築くことができた。2 つ目は FISH 法の導入であり、これによりドラフトゲノム情報を染色体にマップすることに成功した。特にコア転写因子遺伝子の 95% はその染色体上での位置を確かめた。3 つ目はマイクロアレイ法の導入である。これにより発生全体における遺伝子の変動をとらえることができただけでなく、発生運命の決定の際に起こる遺伝子発現のダイナミクスを知ることができた。4 つ目はトランスジェニック技術の確立である。*Minos* トランスポゾンによる挿入突然変異体作製技術を確立し、幾つかの新しい遺伝子機能が明らかになりつつある。このように、本プロジェクトは、カタユレイボヤを今後の発生ゲノム科学の一つの研究系として確立することに大きく貢献した。

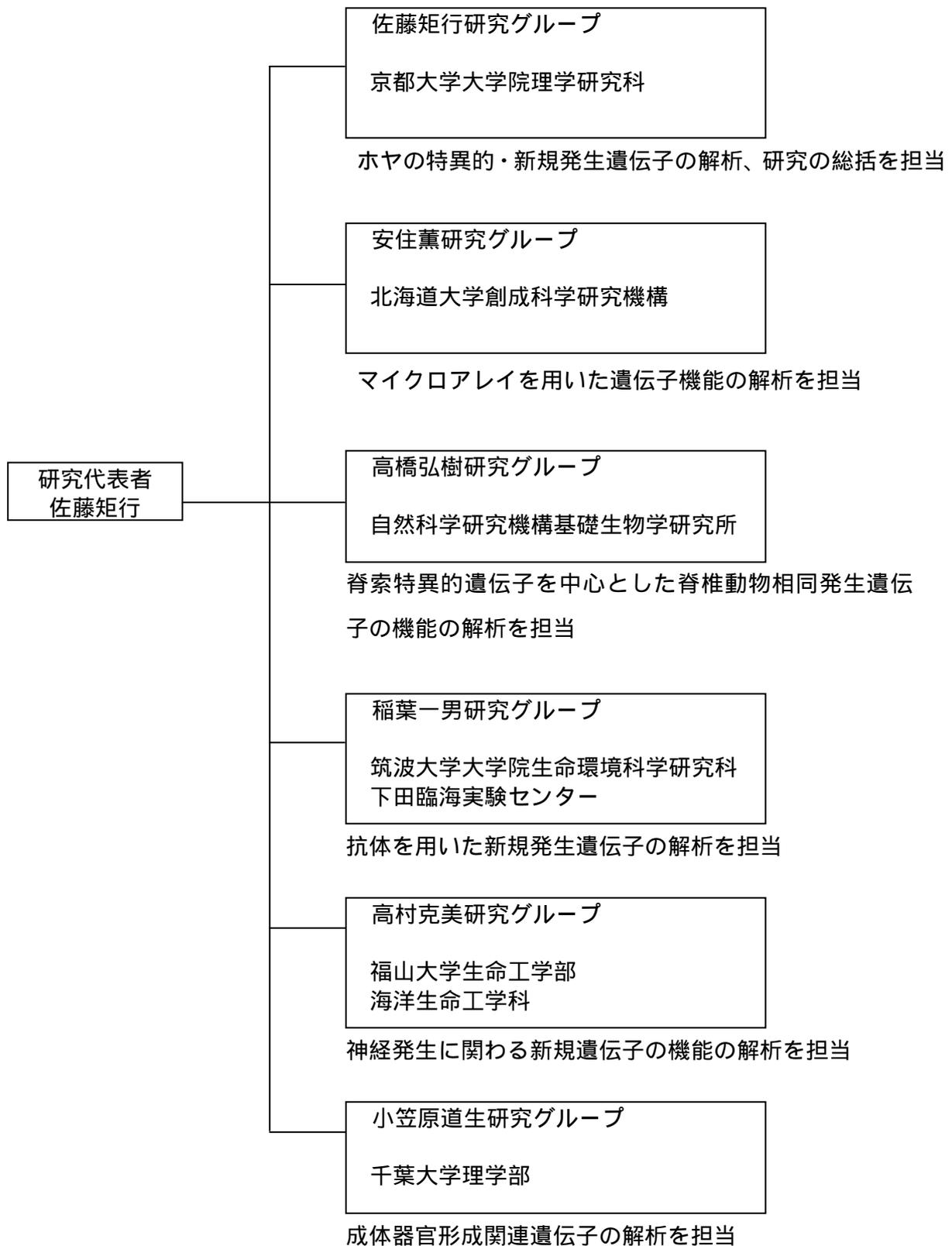
2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

平成 13 年度の研究開始時には、4 つの目標、すなわち ホヤの特異的・新規発生遺伝子の同定と、そのゲノムワイドな解析のためのデータベースの構築、 モルフォリノ・オリゴヌクレオチドによる機能阻害を利用した発生遺伝子の機能の解析、 オリゴチップの作製とそれを利用した発生遺伝子の機能カスケードのマイクロアレイ解析、 ホヤで得られた知見をもとにした脊椎動物の相同遺伝子の機能の解析を立案した。研究分担者として安住薫研究グループと高橋弘樹研究グループを加え、安住研究グループは主として を、高橋研究グループは主として を担当し、 と および研究の総括を佐藤研究グループが担うこととした。また新しい研究分野を考え、平成 15・16 年度の 2 年間抗体を用いた新規発生遺伝子の機能解析のために稲葉一男研究グループに、平成 16 年度の 1 年間神経特異的遺伝子の解析として高村克美研究グループに、さらに、平成 18 年度の 1 年間血球関連遺伝子の解析として小笠原道生研究グループに参加を願った。その後、ホヤのゲノム科学の発展とともにより発生ゲノム科学的な研究を進めることと、また発生遺伝学的研究手法の導入を取り入れていくことを考えた。

したがって、「研究実績の概要」の成果 A は主として新しく加えたゲノム科学的研究目標にそった、また成果 B は当初の目標の にそった、成果 C は当初の目標 にそった、成果 D は当初の目標 にそった、成果 E は当初の目標の にそった、そして成果 F は新しく加えた発生遺伝学的研究手法導入の目標にそった成果である。

(2) 実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 ホヤの発生遺伝子の発現と機能の網羅的解析

(京都大学大学院理学研究科 佐藤矩行研究グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

(A) 発生遺伝子の発生運命決定時における転写ネットワークの解明

ゲノム解読によって得られる遺伝子情報の多くは、おうおうにして遺伝子のコンピュータモデルであったり、cDNA 情報と一致しないものであったりする。そこで、カタユレイボヤを発生遺伝子の発現と機能を解析するための一つのモデル研究系として高めていくためには、より正確な遺伝子の同定とその発現プロファイルの理解が必要と考えた。そのため、ドラフトゲノムの解読後、研究室構成員総出で転写遺伝子をコードする遺伝子、細胞間シグナル分子をコードする遺伝子を中心にして、このホヤのゲノムに存在する遺伝子の正確なアノテーションを行った。その際に、約 68 万に及ぶ EST 情報および約 7000 に及ぶ完全インサート長 cDNA 情報をフルに活用した。その結果、カタユレイボヤのゲノム内には 669 個の転写因子遺伝子が存在することがわかり、そのうちの Zn フィンガー遺伝子 310 個を除く 359 遺伝子をコア転写因子遺伝子として今後の研究対象とすることにした。また細胞間シグナル分子全体を同定することは容易でないので、そのうち 118 遺伝子をコアなものとして研究することにした(Satou and Satoh, *Dev. Genes Evo.* 215: 580-596, 2005)。

これらの発生遺伝子の全てについて、母性および胚発生での発現を調べたところ、359 転写因子遺伝子のうち 200 が、また 118 シグナル分子遺伝子のうち 68 が胚発生において発現することがわかった。また同時に、これらの遺伝子の空間的発現パターンをホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (WMISH) で確かめた (Imai et al., *Development* 131:4047-4058, 2004)。

受精卵は発生学的に全能である。しかし胚の細胞は発生が進むにつれてその発生能力が限定されていき(多能性) やがて 1 つの細胞型にその発生能力が限定され決定される。この過程がどのような遺伝子発現変化によってもたらされるのかを理解することは、発生全能性(または多能性)を保持した幹細胞の遺伝子的背景を理解する上でも重要である。ホヤは、その進化的発生ストラテジーを反映してか、16 細胞期という初期に 1 対 2 個(左右相称卵割のため)の細胞の発生運命が表皮に決定される(図 2)。以後、32 細胞期、64 細胞期と発生運命の決定が次々におこり、110 細胞期ではほぼすべて細胞の発生運命の決定がおこる(図 2)。

先に述べた転写因子遺伝子および細胞間シグナル分子遺伝子のこの時期での発現を調べてみると、53 個の転写因子遺伝子および 23 個のシグナル分子遺伝子の合計 76 個の遺伝子がザイゴティックに発現することがわかった。そこで、この 76 個の遺伝子一つ一つを特異的 MO によって機能を阻害し、その時に残りの 75 個の遺伝子にどのような影響が及ぶかを調べることによって、この発生運命決定期におけるゲノムワイドな転写ネットワークを明らかにすることができる。その結果、図 3 に示すように、3000 以上の要素からなるネットワークを描きあげることができた (Imai et al., Science 312:1183-1187, 2006)。これは、ホヤの囊胚作成に関わる遺伝子群が脊椎動物の囊胚形成に関する遺伝子群と幾分異なるとしても、脊索動物の一つの発生過程における遺伝子制御ネットワークを完全に網羅的に描き上げたものとしては初めてのものである。また、このネットワークは、今後、例えば心臓形成の遺伝子ネットワークのように、それぞれの素過程を支える遺伝子ネットワークを理解する上でも重要である。

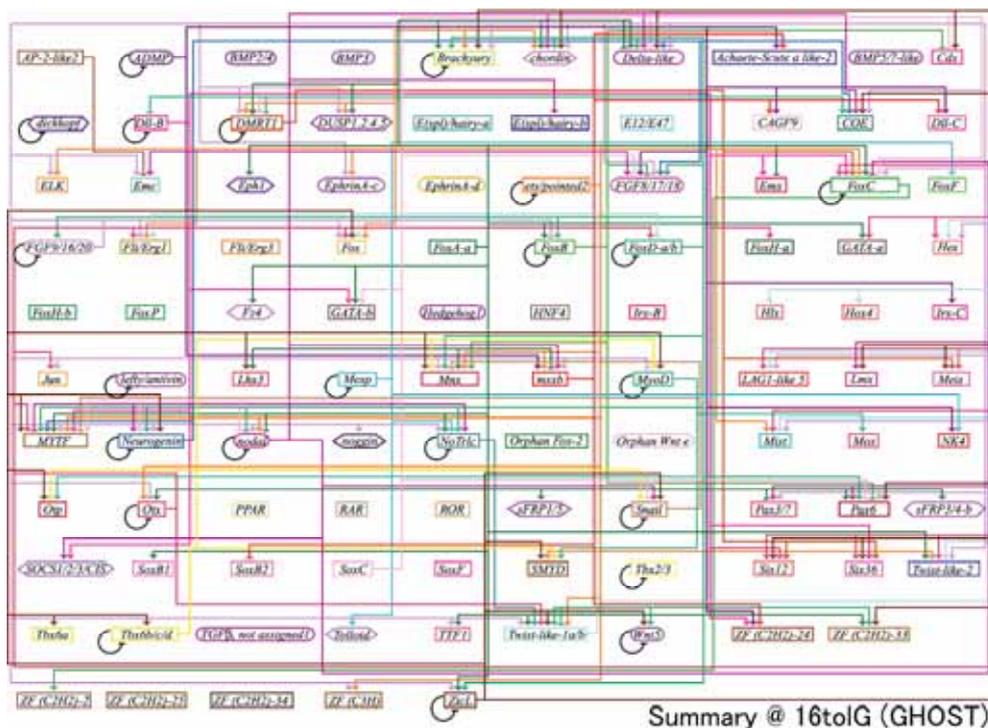


図 3. カタユレイボヤの初期発生における遺伝子ネットワーク

(B) ゲノム情報の染色体マッピング

(B1) カタユレイボヤのゲノム約 160Mb のうち約 120Mb がいわゆる真正クロマチン領域で、ここに EST および cDNA 解析によって得られたタンパク質をコードする遺伝子のほぼすべての情報が存在する。今後カタユレイボヤの発生遺伝子の発現と機能をゲノムワイド

に理解していくためには、ドラフトゲノム情報を染色体にマップすることが必須である。今後、遺伝的バックグラウンドをもたないさまざまな動物のドラフトゲノムが全ゲノムショットガン法で解読されると思われるが、その際に問題となるのが、ドラフトゲノム情報と染色体との関係である。このような研究の背景のもとに、カタユレイボヤのドラフトゲノムの染色体マッピングを試みた。

染色体マッピングは、BAC クローンの二色 Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) 法によって行った。まず核型分析を試みた。しかし、 $2n=28$ 本のカタユレイボヤの染色体は極めて小さく、また大きさが似かよっているために、通常の模型分析では 28 本の染色体の一つ一つを同定することが不可能であった。何回かの試行後、図 4 A に示すように、21 個の BAC クローンを GFP および RFP で染めわけた上で同時に FISH を行うことによって、 $2n=28$ 本の染色体を一度に同定することに成功した(図 4 B, C)。そしてさらに、同様の 2 色 FISH 法で総数 169 個の BAC クローンを染色体にマップした (Shoguchi et al., *Genome Research* 16:297-303, 2006)。その結果、第 4, 5, 6 染色体の 3 本の短腕は rDNA クラターで占められていることや、遺伝子は 28 本の染色体にほぼ均等に分布することなどがわかった。

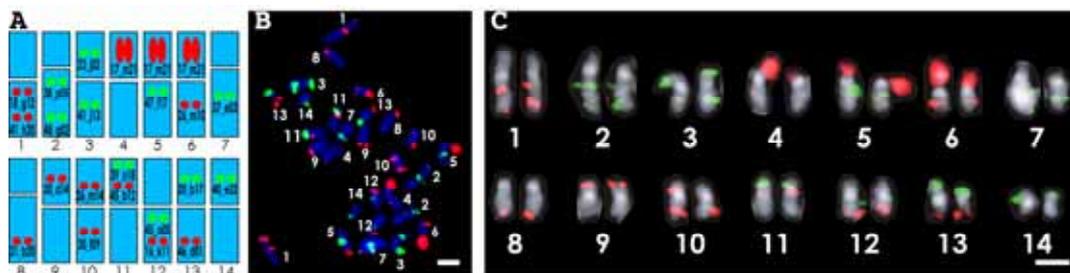


図 4. カタユレイボヤの FISH による核型の決定

しかし、この研究成果では、ゲノム情報がマップされない染色体領域がいくらか残された。そこでさらに BAC クローンの 2 色 FISH 解析を続け、現在 263 個の BAC クローンの染色体マッピングに成功している(図 5)。その結果、ゲノム情報の約 85% を染色体にマップすることができた (Shoguchi et al. 論文投稿準備中)。これらの情報は今後この動物の遺伝子発現制御機構と関連しつつ遺伝子機能を解析する上で重要な基礎情報を提供するものである。また遺伝子バックグラウンドの少ない動物でも、ホールゲノムショットガン法によって得られるドラフトゲノム情報を大規模な FISH 作業によって染色体レベルにまで高めることが可能であることを示した意義は大きい。

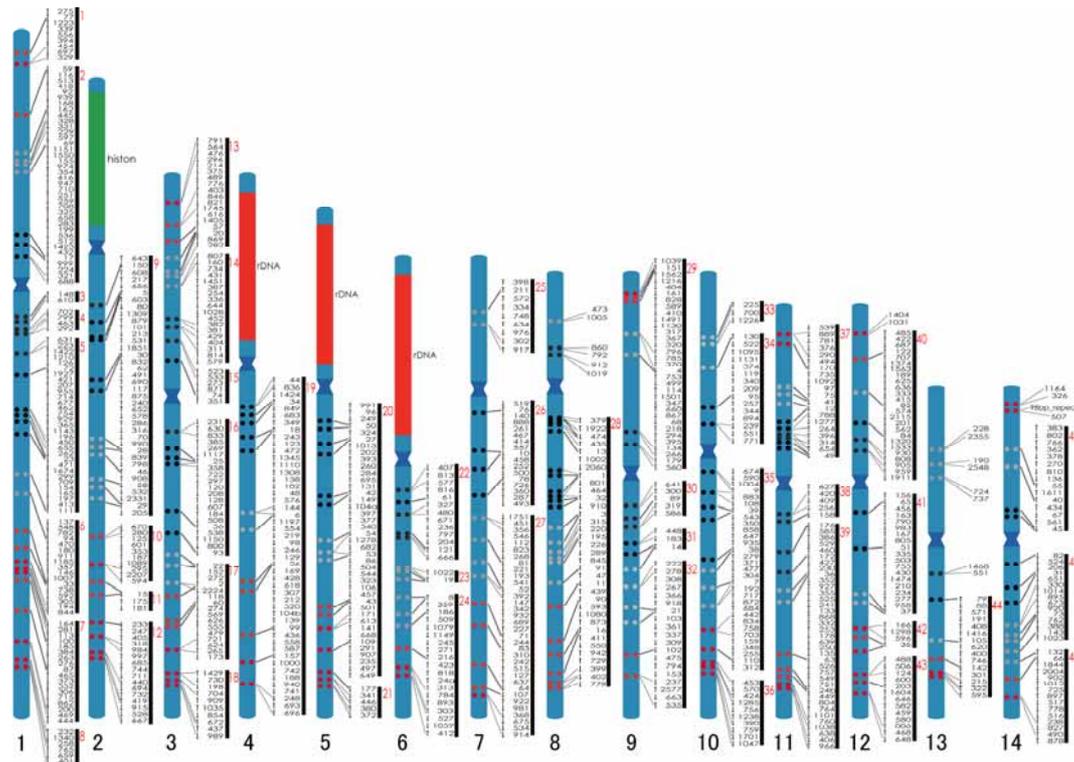


図5 . ホヤゲノム情報の染色体マッピング

(B2) 発生遺伝子の染色体マッピング

成果(A)で述べたように、この動物の初期発生において胚細胞の発生運命の決定がおこる16細胞期から110細胞期(原腸陥入直前期)のザイゴティックな発生遺伝子のネットワークを明らかにした。ここで発現する76個の遺伝子のネットワークを今後染色体レベルで理解することは重要である。そこでまず、(A)で述べたコアな転写因子遺伝子359、コアなシグナル分子遺伝子118について、それぞれを含むBACクローンを選択的に選び2色FISH解析を行った。その結果、図6に示すように、上記のコア発生遺伝子477個の95%におよぶ遺伝子を28本の染色体にマップすることができた(Shoguchi et al. 論文投稿準備中)。この解析によって、例えばホヤHoxクラスター遺伝子のうちHox1~Hox6が1番染色体に、またHox11~Hox13が7番染色体に分かれて存在することや、Eph-Eprin関連遺伝子がタンDEM重複の結果が染色体上で近傍に位置することなどがわかった。

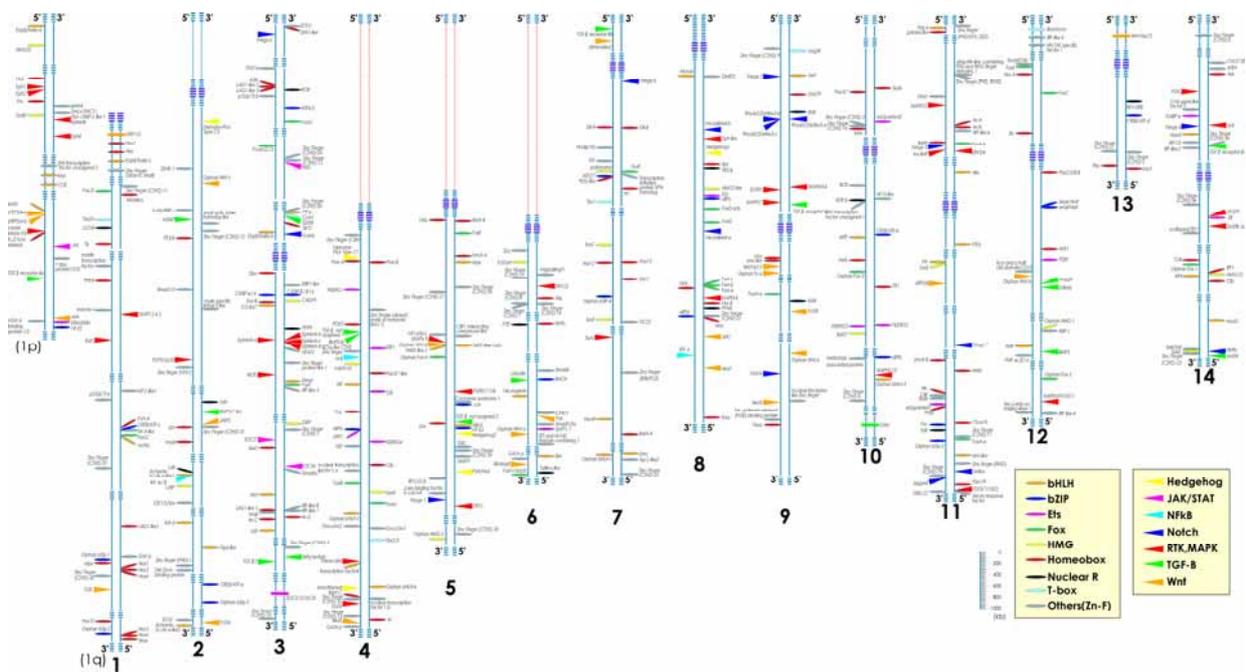


図6. 転写因子遺伝子とシグナル分子遺伝子の染色体上での位置

さらに、初期胚転写ネットワークに関わる遺伝子の染色体マップを完成させ、それをネットワーク上に貼り付けたのが図7である。ここでは *Orphan Fox-2*を除くすべての遺伝子の染色体上の位置が記載されている。このような試みは動物で初めてのものといえよう (Shoguchi et al. 論文投稿準備中)。これによって、例えば心臓形成のための遺伝子ネットワークと、そこに関わる遺伝子の染色体上の位置関係が明らかにされ、今後染色体レベルでの遺伝子発現制御を研究する上で必須の情報を提供するといえる。

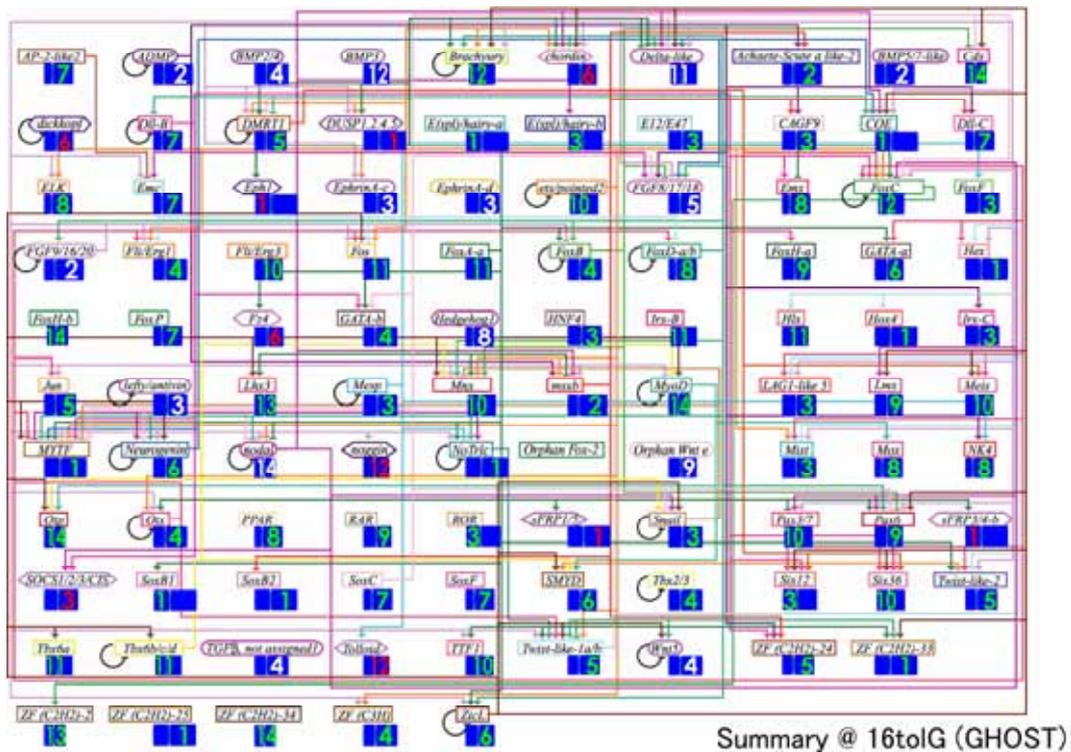


図7. 転写ネットワーク遺伝子の染色体上の位置関係

(C) マイクロアレイによる解析

本プロジェクト研究の成果の柱の一つはマイクロアレイ技術の導入とその確立である。マイクロアレイの作製と発生における遺伝子発現の全体像については安住研究グループによる成果にゆずり、ここでは我々のグループで得た研究成果について述べる。

(C1) 発生運命の決定機構の研究

すでに述べたようにホヤ胚細胞の発生運命の決定は16細胞期から110細胞期にかけておこり、そこで働く76の発生遺伝子(53転写因子遺伝子および23シグナル分子遺伝子)の3000以上の要素からなるネットワークを明らかにした(図3)。しかし、ゲノム科学的に考えれば、これらの遺伝子以外にも発生運命の決定に関与すると思われる遺伝子は多いと思われる。そこでこの問題に、割球単離という古典的研究手法とマイクロアレイという近代的研究手法を組み合わせることによってチャレンジした。

(C1-a) 脊索細胞と神経索細胞の発生運命の分岐と決定

図8Aに示すように32細胞胚のA6.2およびA6.4割球対(以後単に割球と書く)は脊索

細胞と神経索細胞の母細胞であり、次の分裂で 64 細胞胚になったとき、A7.3 と A7.7 は脊索に、A7.4 と A7.8 は神経索にその発生運命が限定される。これまでの研究から、A7.3/A7.7 で *Brachyury* が、A7.4/A7.8 で *FGF9/16/20* が、また両者で *ZicL* が発現することがわかっていた。しかし、それ以外のどれだけの遺伝子がこの発生運命の分岐に関わっているのかは不明であった。そこで 64 細胞期胚から A7.3/A7.7 割球および A7.4/A7.8 割球を単離し(それぞれ約 2200 個)(図 8B, C)そこに含まれる mRNA の差異をマイクロアレイで解析した。その結果 2 倍のカットバリュウで両者に差のある遺伝子候補を得、その後それらの一つ一つすべてについて WMISH 法でその空間的差次的発現を確かめた。その結果、始原脊索細胞で有意に発現レベルの高い遺伝子が 111 個、また始原神経索細胞で有意に発現レベルの高い遺伝子が 84 個存在することが明らかになった。前者には *Brachyury* を初め *Mnx* などの発生遺伝子の他に、*cadherin-related 3* などが含まれ、また後者には *FGF9/16/20* や *FoxB* などの発生遺伝子の他に *NCAM* や *protocadherin* などが含まれていた。また、これらの遺伝子すべての空間的発現パターンから、この両者の発生運命の分岐決定には、遺伝子が新しく特異的に発現する、遺伝子が新しくこの割球(もう一方の娘細胞を除く)で発現するとともに、この遺伝子は他の割球でも発現する、母細胞で発現していた遺伝子が選択的にどちらかの細胞で発現を継続する、の 3 つの要素から成り立っていることが明らかになった (Kobayashi et al., 論文投稿準備中)。

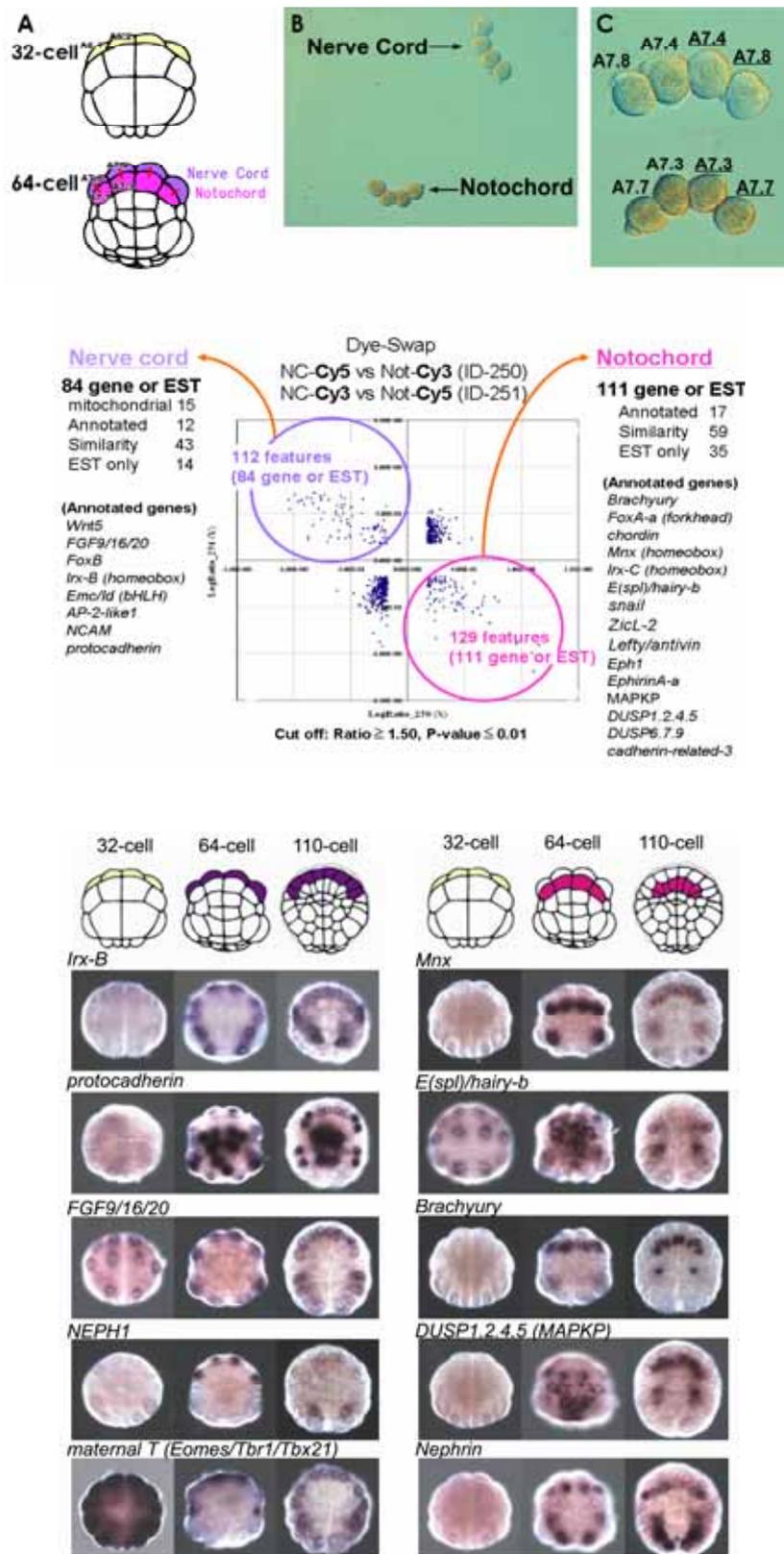


図 8 . 脊索細胞と神経索細胞の発生運命の分岐のマイクロアレイ解析

(C1-b) 表皮細胞と脳細胞

図9に示すように16細胞胚のa5.3割球は表皮および脳細胞の母細胞であり、次の分裂で32細胞胚になった時、娘細胞の一つa6.6は表皮に、a6.5は脳にその発生運命の限定がおこる。先に述べた脊索細胞と神経索細胞と同様に、a6.6割球1172個とa6.5割球1172個を集め、RNAを抽出後マイクロアレイ解析を行った。またさらに候補遺伝子全てにつきWMISHを行いその空間的発現パターンを確かめた。その結果、始原表皮細胞で有意に発現レベルの高い遺伝子が29個、始原脳細胞で有意に発現レベルの高い遺伝子が22個明らかになった(図9)。前者には*Emc/Id-a*や*Emc/Id-b*などが、また後者には*Otx*や*ELK*など含まれる。また脊索細胞対神経索細胞のところでも述べた発生運命の分岐の3つの要因が確認できた(Kobayashi et al., 論文投稿準備中)。

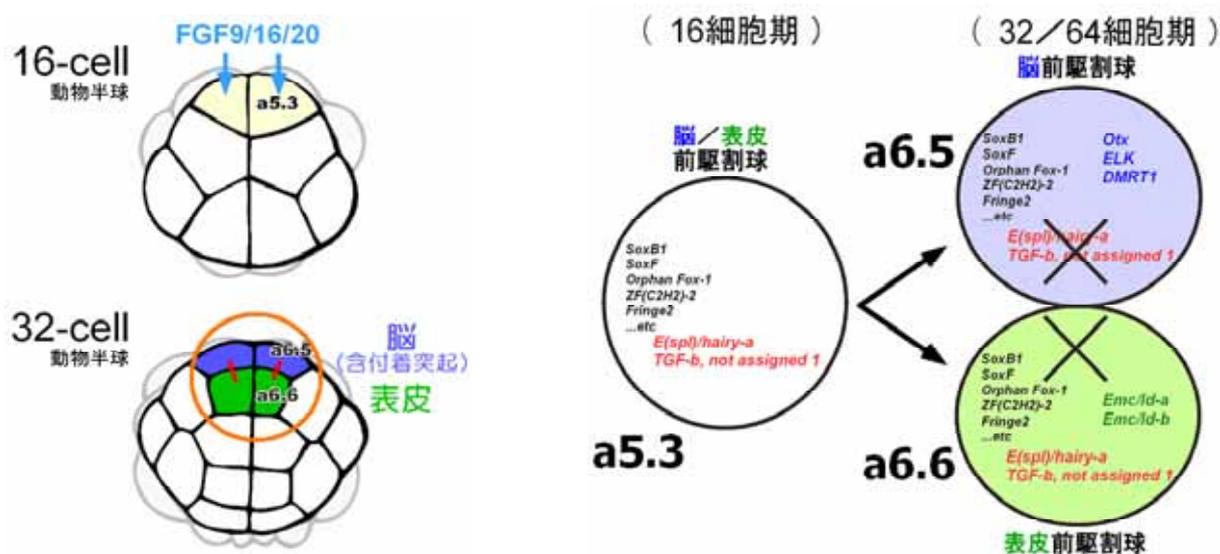


図9. 表皮細胞と脳細胞の発生運命の分岐のマイクロアレイ解析

(C1-c) 筋肉細胞と間充織細胞

上で述べた2つと同様の方法で、筋肉細胞と間充織細胞の発生運命の決定に伴う遺伝子発現変化を追跡した。32細胞胚のB6.2とB6.4は両者の母細胞であるが、次の分裂で64細胞胚になると、そのうちのB7.4とB7.8は筋肉に、B7.3とB7.7は間充織にその発生運命が決定する(図10)。B7.3/B7.7割球1814個とB7.4/B7.8割球1894個を単離し(図10)、RNAを抽出してマイクロアレイ解析を行った。得られた候補遺伝子についてはWMISH法を行いその空間的発現パターンを確認した。その結果、始原筋肉細胞で有意に発現の高い遺伝子が1080個、また間充織で有意に発現が高い遺伝子が72個明らかになった(Kobayashi et

al., 論文投稿準備中)。前者には *Tbx6b* や *MyoD* の他に数多くの筋肉特異的構造遺伝子が含まれており、また後者には *FoxA* や *lefty/antivin* などが含まれていた。この結果は、先に述べた3つの要素が発生運命の決定を司るという基本的考え方をさらに支持するものであるが、始原筋肉細胞ではそれらに加えて特異的構造遺伝子が含まれる。これは筋肉構造遺伝子が発生非常に早期から発現するというホヤの筋肉発生の特徴を反映していると思われる。

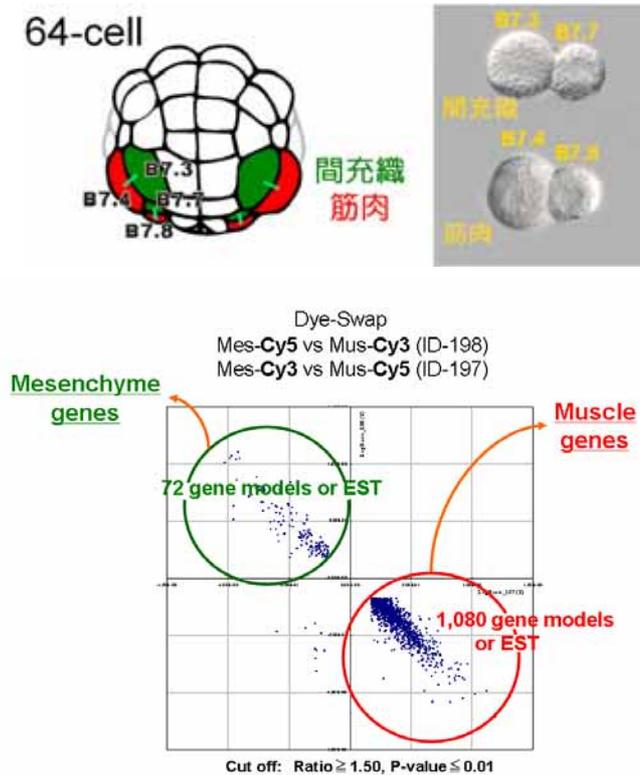


図 10. 筋肉細胞と間充織細胞の発生運命の分岐のマイクロアレイ解析

以上の結果は、これまで一般に考えられていたような、発生運命の限定ないし決定を一つあるいは少数の特異的遺伝子の発現と関係付けてとらえることに加えて、少なくとも数十の遺伝子とその発生運命の限定に関わっていることを示している。今後は転写因子遺伝子とシグナル分子遺伝子を対象とした発生遺伝子の転写ネットワークの理解に加えて、こうした多数の遺伝子のネットワークの解明が、動物の発生の初期過程の、なかでも発生運命の決定・限定を支える分子機構を理解する上で大切であろう。

(C2) 局在する母性 mRNA の解析

ショウジョウバエやアフリカツメガエルの研究から明らかなように、未受精卵に蓄えられ

た母性 mRNA は動物の初期発生に重要な役割を担う。またそうした母性 mRNA は受精卵において局在することが多い。ホヤは古くからモザイク的発生を行う動物として知られており、最近の研究からも、筋肉分化決定因子 *macho-1* の同定を初め、内胚葉分化決定因子、表皮細胞分化決定因子などが想定されている。しかし、実際どれだけの母性 mRNA が植物極側にあるいは動物極側に局在するのは完全に理解されているとはいえない。そこで、8 細胞期胚の植物半球 4 割球と動物半球 4 割球とを単離して、この両者の間での母性 mRNA の違いを調べる実験と、8 細胞期の B4.1 割球対（筋肉分化決定因子など多くの局在母性 mRNA が存在することが知られている）とそれ以外の 6 割球との間での母性 mRNA の差をマイクロアレイによって解析した（Yamada et al., *Dev. Biol.* 284:536-550, 2005）。その結果、総計 17 個の遺伝子の母性 mRNA が植物極後側に局在することがわかった。予想に反して、これ以外の局在化パターンは認めることができず、母性 mRNA の基本的な局在化パターンはほぼこの一つだけであるらしい。

(D) 新規発生遺伝子の機能の解析

ゲノム配列解読後における発生生物学の重要な課題の 1 つは、ゲノム上に同定された多数の機能未知遺伝子の中から発生過程で重要な働きをする遺伝子を発見することである。そのための有効な解析方法として、体系的・網羅的な機能阻害実験が考えられる。本研究では、カタユレイボヤの機能未知遺伝子についてモルフォリノ・オリゴヌクレオチド (MO) を用いた翻訳抑制による大規模機能的スクリーニングを行った。対象とした遺伝子は、ヒトやマウスなどの脊椎動物に相同遺伝子が存在するものである。進化的に保存されている遺伝子には重要な役割がある可能性が高く、ホヤで得られた知見が脊椎動物の発生に重要な機能を持つ遺伝子の発見に繋がるものと考えられる。これまでに、パイロット実験としてすでに報告された 200 個の遺伝子 (Yamada et al., *Development* 130:6485-6496, 2003) に加えて、さらに 304 個の遺伝子について翻訳阻害実験を行い、合計 504 遺伝子のスクリーニングが完了したので、幾分詳しく述べる。

遺伝子選び: スクリーニングの対象となった遺伝子はカタユレイボヤ cDNA プロジェクトによって同定された機能未知遺伝子の中から、EST 情報を元に初期胚で発現している遺伝子を選んだ。選ばれた遺伝子の 70% 以上には母性の転写産物が存在していた。Lee ら (Lee et al., 1999) は、遺伝子をコードするタンパク質の種類によって以下のような機能クラスに分類している。Class A: 構造遺伝子もしくはハウスキーピング遺伝子。Class B: 細胞間相互作用に関する遺伝子。Class C: 転写因子など他の遺伝子を調節する機能のある遺伝子。残り

の遺伝子は生物学的機能のわからない未知の遺伝子で、Class D に分類される。Class D は他の動物における相同遺伝子の有無によってさらに2つのサブクラスに分類される。DI：他の動物に相同性のある遺伝子が存在するが、機能のわからない遺伝子。DII：既知の遺伝子に相同性がない機能未知遺伝子。今回新たにスクリーニングを行った304 遺伝子のうち80%以上(247 遺伝子)はDI から選ばれた。加えて、56 遺伝子が Class A-C、1 遺伝子が Class DII から選ばれた。

1st スクリーニング：機能障害は未受精卵への10 fmolのMOのインジェクションにより行ない、受精後尾芽胚まで発生させ、形態に何らかの異常が見られるかどうかを観察した。その結果、新たにスクリーニングを行った304 個の遺伝子のうち71 個の遺伝子(23.4%)について、機能障害による形態異常が観察された。これまでに行なわれた200 遺伝子のスクリーニングでも約20%の遺伝子の機能障害が何らかの形態異常を引き起こすことが観察されており、今回の結果もそれと同様の割合となった。機能的クラスごとに、形態異常の見られた遺伝子の数を見てみたところ、A-C Class 56 遺伝子のうち12 遺伝子(21.4%)について、DI Class 247 遺伝子のうち58 遺伝子(23.5%)について機能障害による形態異常が観察された。以上のように、どのクラスでも約20%の遺伝子において陽性であると判断され、陽性遺伝子の割合の点で既知遺伝子(Class A-C)と未知遺伝子(Class D)の間にはほとんど差はなかった。この結果は生物学的機能のわかっているA-C Classと同程度に、機能未知のDI Classにも発生において重要な役割を持っている遺伝子が含まれていることを示している。

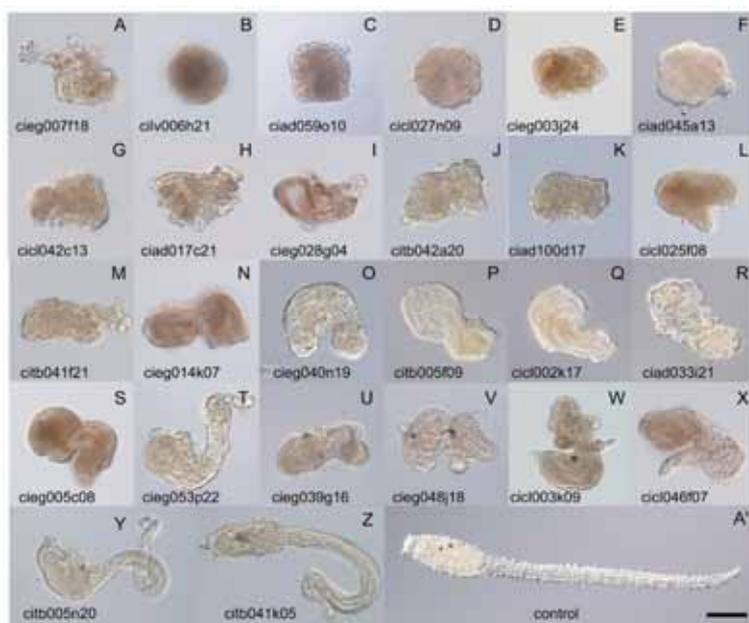


図 11

機能阻害によって形態異常の見られた胚の形態や異常の程度は遺伝子によって大きく異なる。まず、機能阻害胚を形態によって2つのクラス、すなわち「細胞塊」と「尾部異常」に分類した。「細胞塊」には異常が体全体に及んでいるような胚を分類し、71 遺伝子中 43 遺伝子の機能阻害においてこのような表現型が見られた(図 11A-R)。このカテゴリー内では完全に体軸の失われたような塊から、ある程度頭尾軸に沿った伸長の見られるような胚も観察された。また特に特徴的な形態を示した遺伝子がいくつか観察された。例えば、ボール状の球体の塊になったものや(図 11B)、細胞接着が緩んだような解離しかけた胚も観察された(図 11A)。また、200 個のスクリーニングにおいて2 遺伝子で見られた カテニン機能阻害胚と同じ表現型を示した胚が、今回さらに3つ観察された(図 11P-R)。「尾部異常」には主に尾部に異常をきたした胚を分類し、71 遺伝子中 28 遺伝子についてこのような表現型が観察された。尾部異常を示した胚では、尾が屈曲する程度の異常から、尾の長さが縮小するような胚までが見られた(図 11S-Z)。

2nd スクリーニング：次に、今回新たにスクリーニングを行った 304 遺伝子とすでにスクリーニングが完了していた 200 遺伝子合わせて合計 504 遺伝子のうち、何らかの形態異常の観察された 111 遺伝子から、さらに主要組織の分化に関っている遺伝子をスクリーニングした。調べた組織は内胚葉、筋肉、表皮、神経、間充織、脊索の6種で、MOによる機能阻害胚において組織特異的分化マーカーの発現の有無を調べ、これらの組織の分化に関っている遺伝子を探索した。内胚葉と筋肉の分化はそれぞれアルカリ性フォスファターゼとアセチルコリンエステラーゼの組織化学染色によって検出し、表皮、神経、間充織、脊索はそれぞれ *Ci-Ep1*, *Ci-ETR*, *Ci-AKR1a*, *Ci-talin* の発現を WMISH によって検出し、コントロール胚と比べて発現領域が消失もしくは明らかに減少、または増加している場合に陽性と判断した(図 12)。その結果 34 遺伝子(34/504; 6.7%)について、少なくとも1つの組織分化に異常が観察された(表 1)。陽性と判断された遺伝子の割合は A-C Class (6/85; 7.1%)でも DI Class (27/391; 6.9%)でもほとんど変わらなかった。また、ほとんどの遺伝子に関して、機能阻害の結果、複数の組織に異常が見られた(28/34; 82%)。さらに組織ごとに見てみると、影響の見られた遺伝子の数は内胚葉が 17, 筋肉が 8, 表皮が 21, 神経が 24, 脊索が 24, 間充織が 24 となった(図 13)。この結果から、筋肉分化に関っている遺伝子は少なく、逆に神経、脊索、間充織の分化に関する遺伝子が多いという傾向が見られた。

表 1

クラス	調べた遺伝子数	組織分化異常を起こした 遺伝子数 (%)
A-C	85	6 (7.1)
DI	391	27 (6.9)
DII	28	1 (3.6)
計	504	34 (6.7)

組織分化に関っている遺伝子：6種の組織分化マーカーの観察の結果、何らかの異常の見られた機能障害胚の形態はほとんど「細胞塊」に属していた(32/34)。この表現型を形態の特徴によってさら4つのグループ「Dissociated」, 「Ball」, 「a/p axis」, 「Flat」に分け、明確な特徴を持たない不定形の細胞塊となる表現型を「irregular」に分類し、各グループごとに組織分化マーカーの異常を比較した。

「Dissociated」: *cieg015c02* と *cieg007f18* は細胞接着がゆるみ解離しかけた細胞の塊となった(図 11A)。この2つの遺伝子はどちらも C2H2 タイプのジンクフィンガーモチーフを持つタンパクをコードしており (*Ci-ZF025*, *Ci-ZF027*)、母性の転写産物のみが存在していることが示されている (Miwata et al., Dev. Biol. 292:546-554, 2006)。この2つの胚の表現型には類似性があったが、組織マーカーの発現はそれぞれ異なっていた。*cieg015c02* についてはすでに山田らによって報告されており (Yamada et al., Development 130:6485-6496, 2003)、機能障害胚では表皮マーカーのみが消失し、他のマーカーの発現は見られたことより、この遺伝子は表皮の分化に関っているものと思われる。一方、*cieg007f18* の機能障害胚では筋肉マーカーの発現が消失し、脊索、間充織も失われ、表皮と神経のマーカーの発現領域も減少していた(図 12B)。このような重度の組織分化異常を表した一方、内胚葉マーカーALPの発現は観察された。このことから、この遺伝子は複数の組織分化に必要とされ、特に筋肉分化に深く関っている遺伝子であると思われる。また形態から判断すると、この遺伝子は細胞接着に関っている可能性もある。

「Ball」: *cieg040a13*, *cilv008a08*, *ciad059o10*, *cilv015k10* と *cilv006h21* の機能障害胚はボール状の細胞塊となった(図 11B)。これらの胚ではほとんどすべての主要組織マーカーの発現が消失していた(図 12C)。*cieg040a13* はジンクフィンガータンパク質をコードしている遺伝子である (*Ci-ZF402*)、*cilv008a08* は TALE ホメオドメインタンパク質の Pbx をコードしている。また、モチーフサーチの結果、*ciad059o10* は糖輸送タンパクモチーフを持つタンパク質を、*cilv015k10* は膜貫通ドメイン持つタンパク質をコードしていることがわかったが、*cilv006h21* には明確なモチーフが見当たらなかった。EST 情報によると、*cieg040a13*、

cilv008a08 は母性の転写産物が存在する。ciad059o10 は尾芽胚に、cilv015k10 と cilv006h21 は幼生期に転写産物が存在していた。

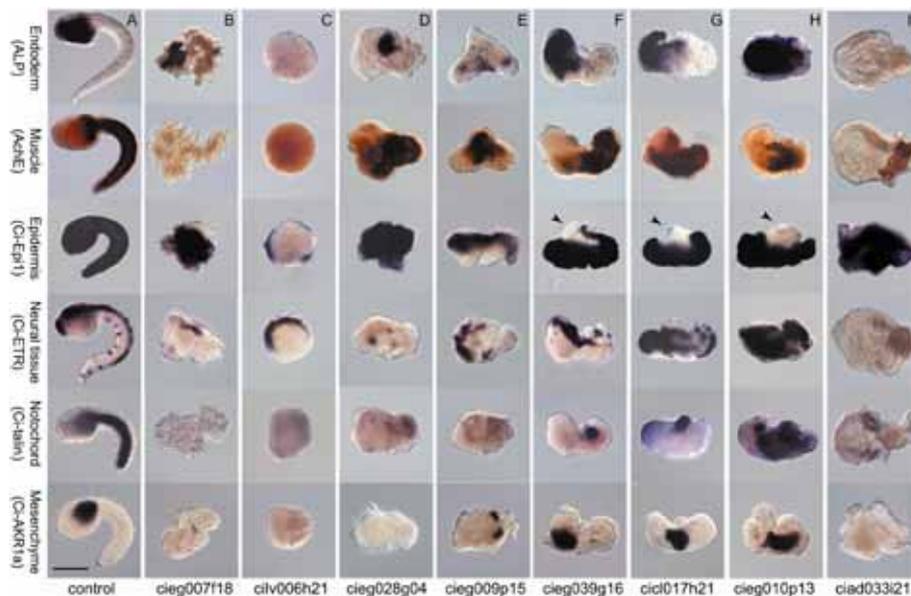


図 12

これらの遺伝子では機能障害の結果、ほとんどの組織が分化せず、体軸も見られない。このことから、これらの遺伝子は細胞の正常な生存、分化に全体的な役割を持っているものと考えられる。

「a/p axis」: ciad017c21, cicl017h21, cieg010p13, cieg014k07, cieg019k04, cilv004g17, cicl003c13, cieg039g16, cieg052o01, cieg008h18 の機能障害胚は頭尾軸にそって少しだけ伸長が見られるが、通常尾芽胚期で見られるような尾の大幅な伸長は見られず、頭尾の区別もつかない(図 11I)。これらの胚ではしばしば神経管が閉じず、中・内胚葉が外にはみだしたような形態になる(図 12F, G, H)。これらの胚では内胚葉や筋肉マーカの発現に影響があることはほとんどなかったが、主に脊索、間充織、神経の減少もしくは増加が見られた。これらの組織分化は誘導を必要とする。また逆に自律的に決定される内胚葉と筋肉にはほとんど影響が見られなかった。このことから、このグループに属する遺伝子は誘導を必要とする組織の分化に何らかの形で関わっている可能性がある。cieg052o01 は C2H2 タイプのジンクフィンガータンパク質である (*Ci-ZF219*)。相同性検索やモチーフサーチの結果、ciad017c21 は Thrombospondin type 1 repeats, Trefoil (P-type) ドメインを持ちヒトの NP_114141 hemicentin と相同性のあるタンパク質をコードしていることがわかった。また、ciad017c21 はヒトの NP_057573 5'-nucleotidase, cytosolic III と相同性のあるタンパク質をコードしてい

る。cilv004g17 はヒトの NP_004130 Lipopolysaccharide-binding protein precursor と同一性のあるタンパク質であった。また、cieg010p13 は armadillo リピートを、cieg014k07 は TBC ドメインを、cieg008h18 は basic region leucin zipper (BRLZ) と Glyco_hydro_18 と Nol1_Nop2_Fmu ドメインを持つタンパク質をコードしているが、cicl017h21 と cieг039g16 には明確なドメインが見つからなかった。ciad017c21、cicl003c13、cieg019k04、cieg014k07 にコードされるタンパク質は膜貫通ドメインを持っていた。

「Flat」: 全 504 遺伝子の中で 5 つの遺伝子が、機能障害胚の形態が カテニン機能障害胚の表現型と同様になった。これらの胚は特徴的な扁平で空洞のある形態を示し、内胚葉、間充織、脊索が失われる一方、筋肉と表皮は形成された (図 11P-R, 図 12I)。cieg003h01 は GPI inositol-deacylase をコードしており、人などに明らかなオルソログが見られる。cicl045c22 は C2H2 ジンクフィンガータンパク質をコードしている (*Ci-ZF278*)。cicl002k17 はシャペロンに見られる J-protein family タンパク質をコードしており、ヒトの NP_060633 hypothetical protein FLJ10634 に同一性がある。citb005f09 はロイシンリッチリピートを持つタンパク質をコードしている。ciad033i21 は明らかなドメインを持たないが、ヒトの NP_689923 chromosome 10 open reading frame 27 と同一性がある。

「irregular」: 残りの機能障害胚の表現型は不定形細胞塊となった。これらの胚では形態からは a/p 軸や頭や尾の区別は形態からは判断できない。また、組織特異的マーカーの発現は遺伝子によって異なる。

以上の結果をまとめると、504 遺伝子のうち 111 遺伝子は機能障害によって幼生期に何らかの形態異常を引き起こし、さらにこのうち 34 遺伝子は主要 6 組織の分化に関わっていることが示された。また、本スクリーニングは脊椎動物などに相同遺伝子があるが機能未知である DI Class の遺伝子を中心にスクリーニングを行なったもので、これらは既知の遺伝子である A-C Class の遺伝子と同様の割合で初期発生に関わっていることが示唆された。カタユレイボヤゲノムには少なくとも 2500 の DI Class 遺伝子が存在し、このことはホヤの機能未知の遺伝子の中に、まだ多くの発生に重要な役割を持つ遺伝子が存在していることを示している。これまでのホヤの初期発生研究は主に転写因子やシグナル分子を中心に進められてきたが、その他の遺伝子の中にも発生において重要な役割を持つ遺伝子が存在することが示唆された。D Class 遺伝子のような未知遺伝子については解析の手がかりが少ないことから、本研究のような網羅的スクリーニングは新規の重要な機能未知遺伝子を効率的に発見することが可能である。また、DI Class 遺伝子は他の動物に相同遺伝子が存在する保存された遺伝子であることから、本研究で発見された遺伝子は他の動物の発生においても何らかの機能を持っている

る可能性が高い。

主要 6 組織分化に関わっていることが示された 34 遺伝子について、機能障害の結果、筋肉と内胚葉に関わっていた遺伝子に比べ、神経、脊索、間充織に影響した遺伝子が比較的多い傾向となった。筋肉と内胚葉は母性のデターミナントによって決定する一方、神経、脊索、間充織は FGF シグナル経路を介した誘導によって決定することが知られている。今回の結果はこの差を反映しているのかもしれない。例えば、誘導源が失われると誘導される側の組織の分化は起こらなくなる。また、デターミナントによって自律的に決定される組織に比べて、誘導の必要とされる組織分化は様々なプロセスを経てから決定されることになり、多くの遺伝子が必要とされるのかもしれない。さらに今回得られた 34 遺伝子のうちの 80% が複数の組織分化に関わっていた。このことも誘導の必要性によるものである可能性がある。または、一種の組織特異的な分化に関する遺伝子よりも分化過程一般に関する遺伝子や、細胞の正常な生存に関する遺伝子が多いのかもしれない。

主要組織分化に異常の見られた機能障害胚の形態は、一見頭尾の区別のつかない「細胞塊」に属しているものがほとんどであった。またその中でも形態は遺伝子によって様々であったが、いくつかの特徴的な形態的パターンが見られ、そのパターンごとに分類し、それぞれ組織特異的マーカーの発現を観察したところ、形態と組織分化マーカーの発現にはグループごとにある程度相関があった。例えば球状のボール状の表現型を持つ「Ball」グループに入った 5 つの遺伝子はほぼすべてのマーカーの発現が消失した。その一方、a/p 軸に沿って多少の伸長の見られる細胞塊という表現型を持つ「a/p axis」グループでは内胚葉や筋肉に影響はほとんど無かった一方、神経、脊索、間充織に異常をきたす傾向があった。また、カテニン機能障害胚と同じ表現型を持ち、内胚葉が消失し扁平で空洞のある形態を持つ「Flat」グループに入る遺伝子が 5 つ見つかった。相同性検索やモチーフサーチの結果、各グループには様々な特徴の遺伝子が含まれているが、同じ表現型を共有する遺伝子どうしは同じ発生プロセスに関わっている可能性が高い。特にカテニン機能障害胚と同じ表現型を持つ遺伝子については Wnt シグナリングへの関与が考えられる。いずれにしても、今後さらに解析を続け、新規発生遺伝子の機能を明らかにする必要がある。

(E) 既知遺伝子の新規の機能の解析

ここでは、既知遺伝子のうち特に筋肉細胞分化に関わる遺伝子と血球形成に関わる遺伝子の機能を解析した。まず、幼生の尾部に 36 個の単核で横紋をもった筋肉細胞の分化について研究した。ホヤでは幼生の筋肉細胞分化決定因子として macho-1 が同定されたものの、その

下流遺伝子カスケードが不明であった。本研究では、これまでに筋分化に関すると思われる転写因子遺伝子の機能を網羅的に解析した結果、*macho-1* の下流で *Tbx6b/6c* が 16 細胞期から働きだすこと (Yagi et al., *Develop. Biol.* 274:478-489, 2004; Yagi et al., *Develop. Biol.* 282:535-549, 2005)、さらに 64 細胞期から *MyoD* が働き、筋肉分化のカスケードが進むことを明らかにした。

次に、心臓形成に関する遺伝子を解析した。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、その機能の完全なる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 (Satou et al., *Development* 131:2511-2541, 2004)。さらに、血球形成の基本的遺伝子としての *Twist-like1* の機能も明らかにした (Tokuoka et al., *Develop. Biol.* 288:387-396, 2005)。

(F) トランスジェニック技術の確立と突然変異体の作製

新規の発生遺伝子の機能を解明する手段として最も有効な方法の一つは突然変異体の作製とその原因遺伝子の解析である。カタユレイボヤは世代時間が約 3 ヶ月と短く、雌雄同体であり、人為的に自家受精させることが可能である。これらの特徴を生かして、ホヤのフォワード・ジェネティクスが期待されていた。しかしながら、海産無脊椎動物のホヤにおいては自然突然変異体および ENU による変異体の作製が 1998 年頃から始まりだしていたが、本プロジェクトを開始する直前までは、トランスジェニック技術の導入も進んでいなかった。遺伝的バックグラウンドが弱い海産無脊椎動物一般にいえることではあるが、例え ENU による突然変異体を得ることができたとしても、その原因遺伝子をつきとめ同定することは容易ではない。我々は、これらの問題を同時に解決するために、挿入突然変異体の作製を試みた。

数多くのトランスポゾン調べた結果、*Tc1/mariner* スーパーファミリーに属するトランスポゾン *Minos* だけがカタユレイボヤで活性を持つことがわかった。そこでこの *Minos* による挿入突然変異体の作製を精力的に続けた結果、変態過程に異常を示すものがいくつか見つかった。その一つは幼生が遊泳している (すなわち幼生としての尾部構造を保持している) にもかかわらず、体幹部で幼若体への変態過程が進行するもので、その形態から swimming juvenile (sj) と名付けた (Sasakura et al., *ProcNAS* 102:15124-15139, 2005)。sj の原因遺伝子を同定したところ、セルロース合成酵素遺伝子 (*Ci-CesA*) の上流 (遺伝子発

現調節領域)に *Minos* が挿入されていることがわかった。実際この動物ではセルロース合成がおこっていない。

ホヤを含む尾索動物は別名被のう動物と呼ばれ、成体の最外層は比較的硬い被のうで覆われている。この被のうにはセルロースが含まれ、被のう類は動物で唯一セルロースを合成できる動物である。sj 突然変異体の解析結果は、セルロースが単に被のうの構造要素として機能するだけでなく、変態プロセスの時間的進行に密接に関わっていることを示すものとなった。

Minos トランスポゾンを利用した突然変異体の作製は、現在、筑波大学下田臨海研究センターの笹倉靖徳博士を中心に精力的に進められており、今後新規の発生遺伝子の機能の解明に大いに役立つものと期待される。

(2) 研究成果の今後期待される効果

以上のように、本プロジェクト研究によって、4 つの大きな技術がホヤ発生システムに導入された。1 つは大規模な MO による機能阻害実験である。これによって多くの新規発生遺伝子の機能を同定することができ、また既知の遺伝子の新規の機能を明らかにすることができた。また、これまでに蓄積されたゲノム情報を生かし、初期発生の転写ネットワークを築くことができた。2 つ目は FISH 法の導入であり、これによりドラフトゲノム情報を染色体にマップすることに成功した。特にコアな転写因子遺伝子についてはその 95% の染色体上での位置を確かめた。3 つ目はマイクロアレイ法の導入である。これにより発生全体における遺伝子の変動をとらえることができただけでなく、発生運命の決定の際に起こる遺伝子発現のダイナミクスを知ることができた。4 つ目はトランスジェニック技術の確立である。*Minos* トランスポゾンによる挿入突然変異体作製技術も確立し、幾つかの新しい遺伝子機能が明らかになりつつある。このように、本プロジェクトによって、カタコウレイボヤを今後の発生ゲノム科学の一つの研究系として確立することができたので、これらの技術をさらにフルに利用して、発生の分子メカニズムのゲノム科学的研究が進むものと期待される。

3.2 マイクロアレイを用いた遺伝子機能の解析

(北海道大学創成科学研究機構 安住薫研究グループ)

(1) 研究実施内容および成果

(A) ホヤ大規模 DNA チップの作製：DNA チップ (あるいは DNA マイクロアレイ) は、

表面を特殊加工したスライドガラスなどの上に多数（数百から数万）の遺伝子断片を高密度に固定化したもので、細胞あるいは組織での遺伝子発現を網羅的に解析できるツールとして、ヒト、マウス、ショウジョウバエなどでこの技術を利用した大規模遺伝子解析が進んでいる。本プロジェクトでは、5年間で、*Ciona* cDNA chip version 1 (cDNA 13,400 種類を4枚のスライドガラスに分割してスポット)、*Ciona* 22K oligo DNA chip(米国アジレント社製。60merの塩基配列をもとに、カタユレイボヤ全遺伝子の約7割が検出可能)、*Ciona* 44K oligo DNA chip (米国アジレント社製。60merの塩基配列をもとにカタユレイボヤ全遺伝子の約9割が検出可能)、*Ciona* cDNA chip HU version (cDNA 17,800 種類を2枚のスライドガラスに分割してスポット)の4種類のホヤDNAチップの作製を行った。cDNAチップとオリゴDNAチップを組み合わせて用いることにより、より精度の高いデータが得られるものと考えている。

(B)ホヤライフサイクルにおける遺伝子発現プロファイルの解析：ホヤDNAチップを用いた網羅的遺伝子発現解析の基盤となるデータを収集する目的で、ホヤの受精卵から老成体までの19ステージ(受精卵、2細胞期、4細胞期、8細胞期、16細胞期、32細胞期、64細胞期、初期原腸胚、後期原腸胚、神経胚、初期尾芽胚、前期尾芽胚、中期尾芽胚、後期尾芽胚、幼生、幼若体、1.5ヶ月成体、2.5ヶ月成体、4.0ヶ月成体)における遺伝子発現の解析を行い、ホヤのライフサイクルにおける遺伝子発現の全体像の解明を試みた(Azumi et al., 論文投稿中)。19の各ステージで得られた各遺伝子の発現量を受精卵での発現量を1とした相対値で表し、すべてのステージの値をつないで、遺伝子発現プロファイルを得た。ホヤ全遺伝子(15,852 遺伝子)の内、ライフサイクルを通じた遺伝子発現の解析では10,415 遺伝子の情報が得られた。さらに、発現パターンの類似性でグループ分けを行う「クラスタリング」を行った結果、10,415 遺伝子は49種類のサブクラスターに分けられ、それらは大きく5つのグループにまとめられた(図13)。5つのグループの内、属する遺伝子数が一番大きいグループは、受精卵ですでに発現していて発生が進むにつれて発現が減少する遺伝子群(グループE；母性遺伝子群、39%)であった。次いで、胚発生の中期に発現が誘導され、成体でもその発現レベルが維持される遺伝子群(グループB；発生中期・成体遺伝子群、20%)、成体期に特異的に発現する遺伝子群(グループC；成体特異的遺伝子群、15.8%)、胚発生期特異的に発現する遺伝子群(グループA；胚特異的遺伝子群、13.0%)、ライフサイクルを通じて一定量の発現を維持している遺伝子群(グループD；発現が変動しない遺伝子群、12.5%)の順であった。DNAチップで検出された約1万個のホヤ遺伝子の内、約4割の遺伝子は受精卵ですでに発現していることが見いだされたが、ハエやカエルでも各々3割の遺伝子が母性

遺伝子であることが報告されている。さらに、成体特異的遺伝子群(グループC)の中には、変態時期に特異的に発現する遺伝子群(3.0%)、組織特異的に発現する遺伝子群(1.6%)、加齢と共に発現が亢進する遺伝子群(2.8%)なども見いだされた。

さらに、胚発生期と成体期に分けてそれぞれの時期における遺伝子発現パターンを比較したところ、胚発生期では、受精卵から幼生までのどこかのステージで1回以上、受精卵に比べて2倍以上に発現が亢進、あるいは低下した遺伝子が約8割を占めており、大きい変動を示さない遺伝子は約2割だった。一方、成体期においては(特に1.5ヶ月から4.0ヶ月)、8割以上の遺伝子は一定量発現しており、加齢に伴う大きな変動を示さないことが見いだされた。このことは、ライフサイクルという生物学的なイベントにおいて、胚発生期は短時間に形態形成を行うので、遺伝子発現のスイッチの頻繁なオン・オフが必要であり、一方、形がすでに作られた成体期は機能が維持されればよいので、遺伝子発現の変動はそれほど必要でないことが推測される。しかし、成体期の8割の一定量発現遺伝子の中には、外部からの刺激(物理的な刺激、化学物質の暴露や微生物の侵入など)に反応して発現が大きく変動する遺伝子が存在することも予備的な実験で見いだしており、そのような刺激に反応する遺伝子群は生物の生存戦略において必須であり、かつ、遺伝子の機能を明らかにする上でも貴重な情報源となる。

(C)ホヤの遺伝子発現情報からヒト機能未知遺伝子の機能推定へ：我々は、ホヤの遺伝子をライフサイクルの発現プロファイルを基盤にして5つのグループに分類したが、それとは別に、各遺伝子がコードする推定アミノ酸配列を用いてホモロジー検索を行い、遺伝子の機能的な分類も試みた。さらに、機能的に分類された遺伝子のライフサイクルの発現パターン(A~E)を調べ、ライフサイクルの発現パターンと機能との関連性を調べた。その結果、図14に示した(i)ヒトの遺伝子にカウンターパートを持つ遺伝子群、(ii)ヒトとホヤで共通の機能未知遺伝子群、(iii)既知のタンパク質と相同性のないホヤ特異的遺伝子群、(iv)成体組織に主に発現する遺伝子群、(v)変態後の幼若体にのみ発現する遺伝子群、(vi)発生・形態形成に関与する遺伝子群、(vii)免疫に関与する遺伝子群、の7種類の分類方法においてライフサイクルの発現パターンと機能に何らかの関連性があることを見いだした。

ホヤの6,443遺伝子はヒトにもオースログが存在し、その内の900遺伝子は推定アミノ酸配列中に既知の機能ドメインを持たず、ヒトとホヤで共通の機能未知遺伝子であった。これら900個の遺伝子のライフサイクルにおける発現パターンは、432遺伝子(48%)がグループEに、108遺伝子(12%)がグループAに、117遺伝子(17%)はグループBに、126遺伝子(14%)はグループCに属することが明らかになった。このことは、900個のヒトとホヤで共通の機

能未知遺伝子の内、グループ E と A の合計 540 遺伝子は胚発生時に機能する遺伝子、グループ B と C に属する 243 遺伝子はホヤ生体の組織形成や成熟あるいは組織の機能維持に関与する遺伝子であることが推定される。ホヤとヒトで共通の機能未知遺伝子に発生関連遺伝子が多いのは、ホヤの胚発生が脊椎動物の胚発生と似ていることと、胚発生で機能する遺伝子が、脊椎動物でもホヤでも未だ機能が明らかになっていないものが多いためと推測される。

一方、他の動物と相同性の低い、ホヤ特有の遺伝子は、グループ B、C の順に多かった。ホヤの組織特異的遺伝子や幼若体特異的遺伝子もグループ C と B で 5 割以上を占めていた。このことは、胚発生期に機能する遺伝子に比べて、変態や成体の組織形成に関与する遺伝子の中には脊椎動物や他の無脊椎動物には存在しないホヤ特有の遺伝子が多いということなのかもしれない。また、発生・形態形成関連遺伝子はグループ B が多く、免疫関連遺伝子はグループ C と B の割合が多かったが、これらの遺伝子の機能と発現時期にも関連性がありそうである。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本プロジェクトによってホヤの大規模 DNA チップの作製と解析方法の確立に成功した。また、ホヤの遺伝子発現の基盤データといえる、ライフサイクルを通じた 1 万遺伝子の発現変動の解析に成功した。ホヤのライフサイクルにおける遺伝子発現プロファイリングは、ハエ、カエルに次ぐ貴重な生命科学情報を提供しようと考えている。我々は、ホヤ DNA チップを用いた応用研究として、有機スズやダイオキシンなどの汚染化学物質に暴露したホヤを作製し、体内で変動する遺伝子の解析も行ってきた。その過程で、ライフサイクルの遺伝子発現プロファイルデータと化学物質暴露ホヤ体内で変動する遺伝子情報を重ね合わせることで、ホヤのライフステージにおける恒常的な遺伝子のネットワーク、および化学物質が作用する遺伝子のネットワークの解明が可能であることに気づいた。今回見いだしたヒトとホヤで共通の機能未知遺伝子 900 個の中には、外来刺激特異的に発現が変動する遺伝子も多数存在する。ホヤはゲノム解読の結果からもヒトと共通の祖先を有することが明らかになっているので、ホヤとヒトで共通の遺伝子（あるいは蛋白質）は機能の上でもホヤとヒトで共通性を有している可能性が高く、ホヤの遺伝子発現プロファイル情報がさらに蓄積されれば、それらの知見はホヤの遺伝子の発現調節機構や機能の解明だけでなく、ヒトを含む脊椎動物の遺伝子の機能解明や進化のプロセスの解明にも非常に有益であることは明白である。今後、ホヤ DNA チップを用いて、発生学にとどまらない独創的な研究の展開が期待される。

また、ホヤの DNA チップを用いた解析データは近い将来データベースを構築して公開す

る予定である。

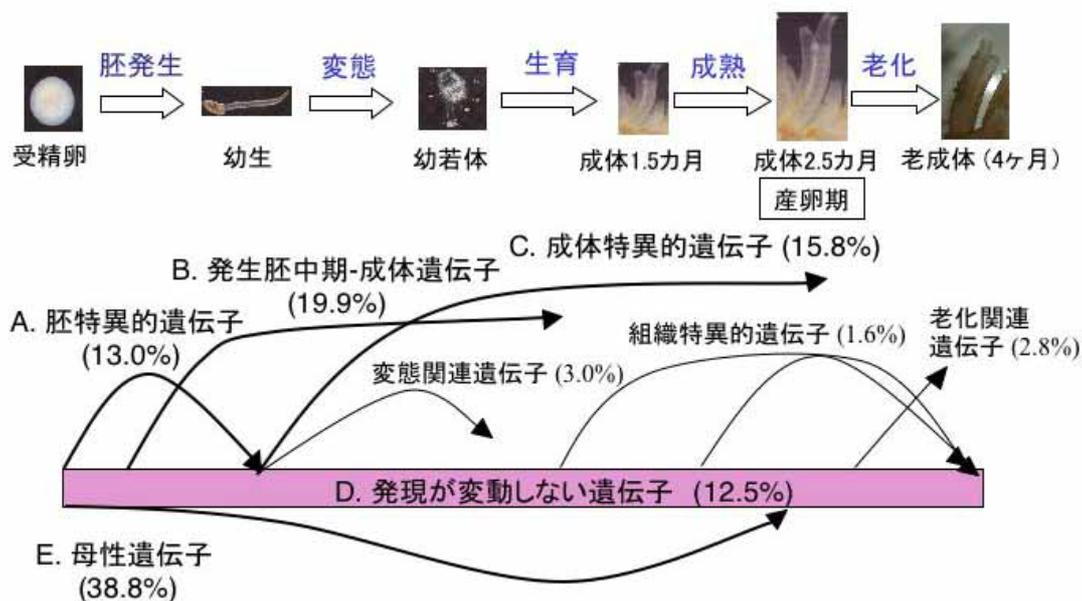


図 13 ホヤ 10,415 遺伝子のライフサイクルにおける発現パターン全体像

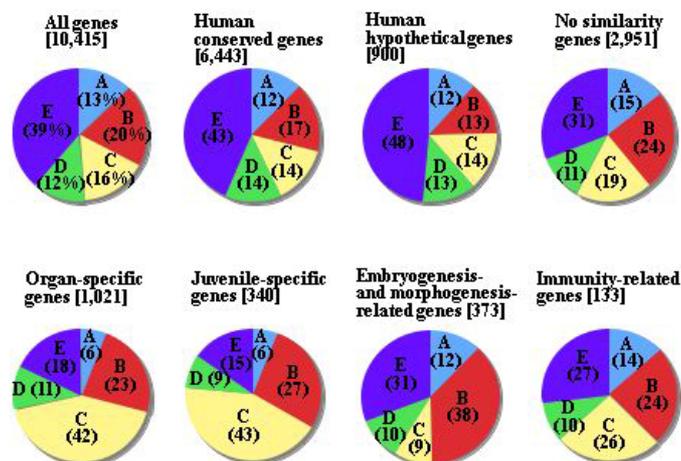


図 14 ホヤ遺伝子の機能的な分類と 5 つのカテゴリに属する遺伝子の比率

A ; 胚特異的遺伝子群、 B ; 発生中期-成体遺伝子群、 C ; 成体特異的遺伝子群、 D ; 発現が変動しない遺伝子群、 E ; 母性遺伝子群。 []内の数字は遺伝子数を、 ()内の数字は%を表している。

3.3 脊索特異的遺伝子を中心とした脊椎動物相同発生遺伝子の機能の解析

(自然科学研究機構基礎生物学研究所 高橋弘樹研究グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

中軸器官としての脊索とその背側の中空の神経管は、脊索動物の体制を特徴づける代表的な形質である。したがって、ホヤ脊索形成の分子メカニズムの解明は脊椎動物体制の進化メカニズムを理解する上で重要である。これまでの研究で、ホヤ胚脊索形成のキー遺伝子が T-box 遺伝子の一つ *Brachyury(Bra)*であることを明らかにし、また、カタユレイボヤ *Ci-Bra* の下流で働く標識遺伝子約 40 個を単離し (Takahashi et al., Genes Dev. 13 : 1519-1523, 1999) それらの完全長 cDNA を得て遺伝子の同定を行ってきた (Hotta et al., Dev. Biol. 224:69-80, 2000)。この中には少なくとも 4 つの新規遺伝子が含まれる。本プロジェクトではその中の 32 個の *Ci-Bra* 下流脊索特異的遺伝子について、それぞれの機能を特異的に阻害する MO を設計し、受精卵に顕微注入することによってその機能を調べた。なおこの際に、*Ci-Bra* プロモーターにアクチン・EGFP をつないだコンストラクトを同時に顕微注入することによって脊索細胞を可視化し、またビデオ撮影観察によって脊索形成を継続的に追跡した。

その結果 32 遺伝子中 24 遺伝子の機能を阻害すると、いわゆるコンバージェント、インターカレーション、エクステンションによる脊索形成運動に異常が認められた (Hotta et al., 論文投稿中)。これらの結果は、*Ci-Bra* の下流で脊索に特異的または優勢に発現する遺伝子の多くが、コンバージェント、インターカレーション、エクステンションという脊索動物の発生で特徴的な中軸器官の形態形成運動に関わっていることを示す。

中でも *Ci-fibrn* について新知見が得られたので以下に幾分詳しく述べる (Yamada et al., 論文投稿中)。*Ci-fibrn* は 644 アミノ酸からなるフィブリノーゲ様タンパク質をコードし、この分子はシヨウジョウバエの Scabrous とも相同性がある。図 15A に示すように、この遺伝子は神経板期から脊索細胞に特異的に発現する。しかし、そのタンパク質は脊索細胞内にとどまらず、繊維状構造をとりながら、脊索の周囲さらには脊索背側の神経索を中心とした神経系をおおうようになる。*Ci-fibrn* にはフィブリノーゲン関連ドメイン (FBG) とよばれるドメインがあり、そこでよく保在されているアミノ酸の変更や、N 末側の欠損によって *Ci-fibrn* タンパク質の分布に異常が起こることから、これらの分子構成要素がこのタンパク質の細胞外分布に関与しているらしい(図 16)。

シヨウジョウバエにおいては、Scabrous と Notch の相互作用が複眼形成に重要な機能を

担っていることが報告されている。そこで、カタユレイボヤの Notch を調べてみると、Ci-Notch は中枢神経系で発現する（図 17A）。また Notch の機能を阻害すると Ci-fibrn の分布が異常になる。すなわち Ci-fibrn タンパク質の分布には Notch との相互作用が必要であるらしい。さらにこのようにして Ci-fibrn の分布を乱すと、神経細胞の配置が腹側化し、また神経細胞からのびる軸索も腹側を走るようになることがわかった。

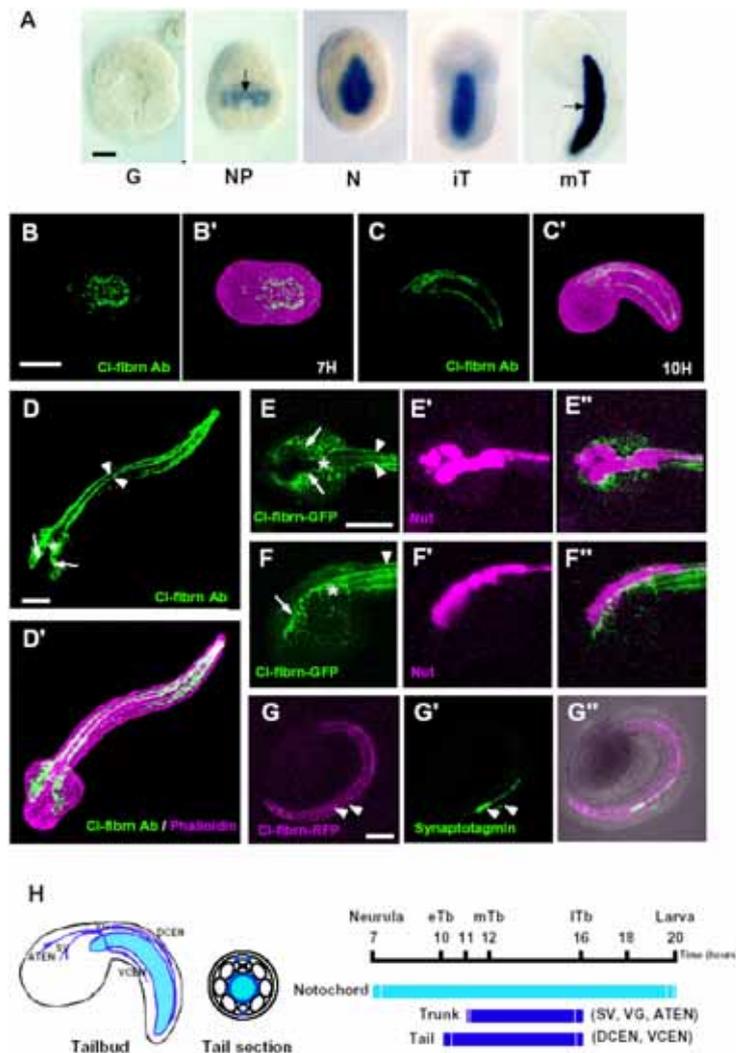


図 15A Ci-fibrn の発現

(A)遺伝子の脊索特異的発現，(B-D)タンパク質の脊索細胞外の分布，
(E,F)神経特異的遺伝子および(G)軸索特異的遺伝子の発現の比較による Ci-fibrn の分布と神経との位置関係

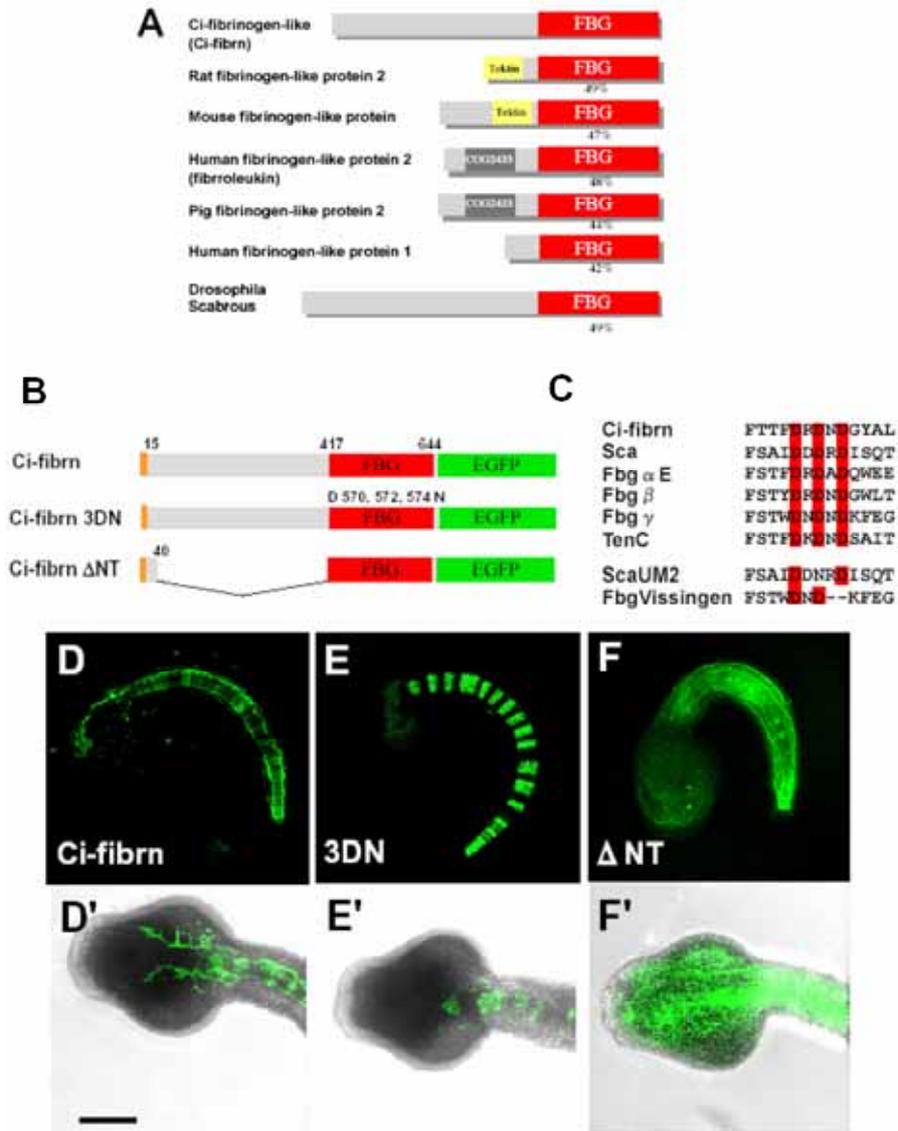


図 16

(A) Ci-fibrn はフィブリノーゲン様タンパク質をコードする。
 (B-C) その構造的特徴, (E) FBG で保存されたアミノ酸 (C) および
 (F) N 末を変更することによって Ci-fibrn の分布が乱れる。

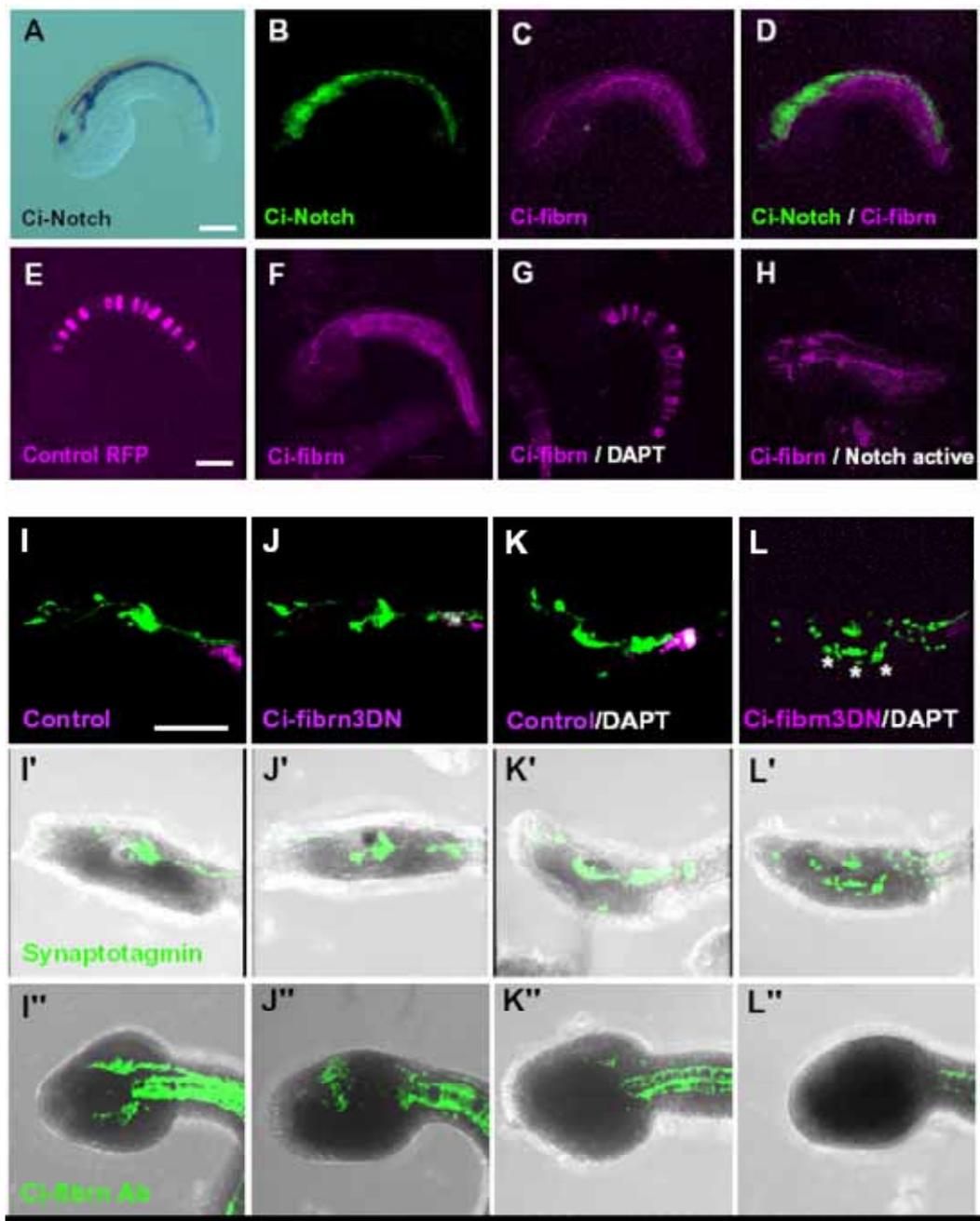


図 17

(A-H)神経で特異的に発現する Notch と Ci-fibrin の関係 ,
 (I-L)Ci-fibrin の分布を乱すと神経細胞の分布の腹側化および
 軸索の走行の異常がおこる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

これまでの研究から、Shh などの分子が脊索及び神経管基部で発現し、神経細胞の分化や軸索の走行に重要な働きを担うことが知られている。しかし、脊索特異的に発現する遺伝子

がコードするタンパク質が細胞外に分布し、その背側に位置する神経系のパタニングに関与するという例はこれまで全く知られていない。脊索とその背側神経系は脊索動物の体制を特徴づける最も重要な形質であり、そこで働く分子を同定した意義は非常に大きい。今後も同様の方法で、カタユレイボヤの脊索形成のシンプルさを生かしてこれからも多くの新知見が得られるものと期待される。

3.4 抗体を用いた新規発生遺伝子の機能の解析

(筑波大学下田臨海実験センター 稲葉一男研究グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

ホヤゲノム解析から明らかになった新規で機能未知の遺伝子の機能を解明すべく、各遺伝子産物に対する抗体を作製し、これらを用いて機能解析を行なった。本研究期間において、特に精巢で発現している未知遺伝子の機能に関して、以下の成果が得られた。

(A)カタユレイボヤ精巢で高発現している機能未知遺伝子の解析: EST 解析にもとづき、精巢において発現している機能が未知の遺伝子をその発現頻度の高い順にリストアップした。このうち、発現頻度の高い順から遺伝子産物に対する抗体を作製した。免疫化学的解析からこれらの全てが精子の構成成分であること、精子頭部、ミトコンドリア、尾部、ミトコンドリアと尾部にまたがった分布など、特徴的な局在を示すことを明らかにした(論文投稿準備中)。また、解析した遺伝子の中には、受精における卵-精子相互作用に重要な役割を果たすことが示唆されているテトラスパニンに属するタンパク質を初めとする3種類の新規膜タンパク質や新規セリンスレオニンキナーゼ、新規微小管結合タンパク質が含まれており、これらは精子機能のキーとなる役割を果たしていると考えられる。

(B)プロテオミクスと抗体を用いた新規タンパク質の同定:カタユレイボヤ精巢の EST 解析およびゲノムドラフト配列にもとづき、ペプチドマスフィンガープリント法に用いる新規の検索プログラム PerMS を作成した(Hozumi et al., BBRC 319:1241-1246, 2004)。これを用いて、精子に存在する複数の新規タンパク質を同定することに成功した。このうち、新規ロイシンリッチリピートタンパク質 LRR37、MRON リピートタンパク質 MORN40、および Ci-p33 に関しては、抗体を用いた間接蛍光抗体と免疫電子顕微鏡法から、いずれも鞭毛軸系のラジアルスポークに存在することが明らかになった(Padma et al., Mol. Biol. Cell 14:474-485,2003; Satouh et al., Mol. Biol. Cell 16:626-636, 2005)。また、配列から超コイル構造に富む機能未知タンパク質に関して、抗体を用いて解析した結果、3 種の新規超コイ

ル構造のタンパク質はいずれも鞭毛軸系の外腕ダイニンに存在していることが明らかになった。詳細な配列解析の結果、これらは全てダイニンドッキング複合体と呼ばれる、微小管上のダイニンの周期的配置に関わるタンパク質群であることがわかった (Ushimaru et al., Zool. Sci. 23:679-689, 2006; Hozumi et al., Cell Motil. Cytoskel. 63:591-603, 2006)。

(2) 研究成果の今後期待される効果

このように、本研究において精子の機能に関する幾つかの新規遺伝子が明らかになった。現在これらの遺伝子の機能をとくに抗体を用いてさらに検討を進めており、精子機能に関連した新しい分子が次々に見つかるものと期待できる。

3.5 神経発生に関わる新規遺伝子の機能の解析

(福山大学生命工学部海洋生命工学科 高村克美研究グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

カタユレイボヤの神経発生に関わる新規および既知の遺伝子の機能を調べるために、その指標となる神経細胞特異的な遺伝子の単離と発現パターンの解析を行い、以上のような成果を得た。

(A) GABA 合成酵素類似遺伝子: カタユレイボヤゲノム中には3種の GABA 合成酵素類似遺伝子があり、そのうち *CiGAD* と名付けたものが幼生の感覚胞および内蔵神経節で神経特異的に発現することを明らかにし、この遺伝子の上流 1.4kbp 領域内に神経特異的な転写調節領域が存在することを明らかにした。(論文投稿準備中)

(B) ドーパデカルボキシラーゼ類似遺伝子: カタユレイボヤゲノム中にドーパデカルボキシラーゼ類似遺伝子は2つ存在し、その内の1つ *CiDDC1* は幼生の感覚胞に特異的に発現し、その上流 1.3kbp の領域内に神経特異的な転写調節領域が存在することを明らかにした。(論文投稿準備中)

(C) 芳香族アミノ酸ヒドロキシラーゼ遺伝子: カタユレイボヤのゲノム中には3種の芳香族アミノ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が存在し、それぞれフェニルアラニンヒドロキシラーゼ(PH4H)、チロシンヒドロキシラーゼ(TY3H)、トリプトファンヒドロキシラーゼ(TR5H) 遺伝子に相同性が高かった。これらの遺伝子の発現部位を WMISH により解析したが特異的なシグナルが得られなかった。*CiPH4H* の上流解析では一部の間充織にシグナルが見られたが、これらの遺伝子については引き続き解析中である。

(D)アセチルコリン合成関連遺伝子：カタユレイボヤからアセチルコリン合成酵素コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)およびアセチルコリントランスポーター(vAChTP)遺伝子を単離し、その発現パターンを解析したところ、幼生の内蔵神経節内の運動神経および感覚胞内の一部の細胞での発現を確認した。これら遺伝子はゲノム上に連続して配置しており、このゲノム構成は線虫からほ乳類に至るまで保存されている。しかしながらその発現様式は種によってかなり異なり、カタユレイボヤでは両遺伝子が共通の5'UTRを介して転写される場合と、*CiChAT*が独立に転写される場合とがあることを、5'RACE および上流解析により明らかにした。

(2) 研究成果の今後期待される効果

現在まではカタユレイボヤ幼生の神経で特異的に発現する既知遺伝子について、その発現制御機構を中心に調べてきた。今後はさらにこれらの遺伝子と相互作用する新規遺伝子の同定をめざしている。

3.6 成体器官形成関連遺伝子の解析

(千葉大学理学部 小笠原道生研究グループ)

(1) 研究実施内容及び成果と研究成果の今後期待される効果

カタユレイボヤの cDNA プロジェクトを通して、成体の循環器系で特異的あるいは優性に発現する新規および既知遺伝子が数多く得られた。また、カタユレイボヤでは、ホヤの鰓形成と関連しつつ、*in vitro* で血管形成を導くことができることがわかった。そこで血管形成や血球形成に関する発生遺伝子の発現と機能の解析を進めつつある。

4 研究参加者

佐藤矩行研究グループ（ホヤの発生遺伝子の研究）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
佐藤 矩行	京都大学大学院理学研究科	教授	研究の総括	平成13年12月～
久保田 洋	京都大学大学院理学研究科	助教授	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成13年12月～
佐藤 ゆたか	京都大学大学院理学研究科	助教授	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成13年12月～
平山 和子	京都大学大学院理学研究科	教務補佐員	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成13年12月～
村上 聖子	京都大学大学院理学研究科	教務補佐員	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成13年12月～ 平成15年3月
和田 修一	京都大学大学院理学研究科	CREST 研究員	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成14年4月～ 平成17年9月
將口 栄一	京都大学大学院理学研究科	CREST 研究員	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成14年4月～ 平成17年10月 平成18年4月～ 平成18年6月
小林 健司	京都大学大学院理学研究科	CREST 研究員	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成17年4月～ 平成18年1月
濱田 麻友子	京都大学大学院理学研究科	CREST 研究員	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成17年5月～
八木 香澄	京都大学大学院理学研究科	CREST 研究員	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成16年4月～ 平成17年5月
藤本 朝子	京都大学大学院理学研究科	CREST 技術員	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成14年1月～ 平成17年4月
笹倉 靖徳	京都大学大学院理学研究科	日本学術振興会特別研究員(PD)	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成13年12月～ 平成15年3月
中山 晶絵	京都大学大学院理学研究科	COE 研究員(PD)	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成13年12月～ 平成15年3月
高鳥 直士	京都大学大学院理学研究科	大学院生	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成13年12月～ 平成17年3月
山田 力志	京都大学大学院理学研究科	大学院生	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成13年12月～ 平成18年3月
佐々木 あかね	京都大学大学院理学研究科	大学院生	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成13年12月～ 平成18年3月
濱口 誠	京都大学大学院理学研究科	大学院生	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成13年12月～ 平成18年3月
望月 恭彰	京都大学大学院理学研究科	大学院生	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成13年12月～ 平成15年3月
藤江 学	京都大学大学院理学研究科	大学院生 CREST 研究補助員	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成15年4月～ 平成15年9月
小笠原 道生	千葉大学理学部	助手	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成17年11月～ 平成18年3月
今泉 智香子	京都大学大学院理学研究科	CREST チーム事務員	ホヤの特異的・新規発生遺伝子の解析	平成14年1月～

安住薫研究グループ（マイクロアレイを用いた遺伝子機能の研究）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
安住 薫	北海道大学大学院 薬学研究科 北海道大学 創成科学研究機構	助手(兼任)	マイクロアレイを用いた遺伝子機能の解析	平成13年12月～ 平成16年2月～
三木 康史	北海道大学大学院 薬学研究科	CREST 技術員	マイクロアレイを用いた遺伝子機能の解析	平成14年3月～ 平成16年3月
藤江 学	北海道大学大学院 薬学研究科 北海道大学 創成科学研究機構	CREST 研究補助員 CREST 技術員	マイクロアレイを用いた遺伝子機能の解析	平成14年9月～ 平成15年3月 平成15年10月～
宇佐美 剛志	北海道大学大学院 薬学研究科	CREST 研究補助員	マイクロアレイを用いた遺伝子機能の解析	平成15年4月～ 平成16年3月

高橋弘樹研究グループ（脊椎動物での新規発生遺伝子の研究）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
高橋 弘樹	基礎生物学研究所	助手	脊椎動物での新規発生遺伝子の解析	平成13年12月～
山田 成宏	基礎生物学研究所	CREST 技術員	脊椎動物での新規発生遺伝子の解析	平成17年4月～
谷山 和美	基礎生物学研究所	CREST 研究補助員	脊椎動物での新規発生遺伝子の解析	平成17年4月～ 平成18年9月
合田 忠弘	基礎生物学研究所	CREST 研究補助員	脊椎動物での新規発生遺伝子の解析	平成18年10月～

小笠原道生研究グループ（成体器官形成関連遺伝子機能の研究）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
小笠原道生	千葉大学理学部	助教授	成体器官形成関連遺伝子機能の解析	平成18年4月～

稲葉一男研究グループ（抗体を用いた新規発生遺伝子の機能の研究）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
稲葉 一男	東北大学大学院理学研究科 附属臨海実験所 筑波大学大学院生命環境科学研究科 下田臨海実験センター	助教授 教授	抗体を用いた新規発生遺伝子の機能の解析	平成15年4月～ 平成16年3月 平成16年4月～ 平成17年3月

高村克美研究グループ（神経発生に関わる新規遺伝子の機能の研究）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
高村 克美	福山大学生命工学部 海洋生命工学科	助教授	神経発生に関わる新規遺伝子の機能の解析	平成16年4月～ 平成17年3月

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
William C. Smith (University of California, Santa Barbara, Associate Professor)	第2回「生物の発生・分化・再生」研究領域シンポジウムでの講演及び指導。	京都大学 大学院理学研究科 動物学教室 佐藤研究室 日本科学未来館 (シンポジウム)	平成15年5月27日 ~ 平成15年5月31日

6 成果発表等

(1) 原著論文発表 (国際誌 42 件)

1. Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R. K., Levine, M., Satoh, N. and Rokhsar, D. S.: The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 298: 2157-2167 (2002).
2. Satou, Y., Yamada, L., Mochizuki, Y., Takatori, N., Kawashima, T., Sasaki, A., Hamaguchi, M., Awazu, S., Yagi, K., Sasakura, Y., Nakayama, A., Ishikawa, H., Inaba, K. and Satoh, N.: A cDNA resource from the basal chordate *Ciona intestinalis*. *genesis* 33: 153-154 (2002).
3. Mochizuki, Y., Satou, Y. and Satoh, N.: Large-scale characterization of genes specific to the larval nervous system in the ascidian *Ciona intestinalis*. *genesis* 36: 62-71 (2003).
4. Wada, S., Tokuoka, M., Shoguchi, E., Kobayashi, K., DiGregorio, A., Spagnuolo, A., Branno, M., Kohara, Y., Rokhsar, D., Levine, M., Saiga, H., Satoh, N. and Satou, Y.: A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. II. Genes for homeobox transcription factors. *Dev. Genes Evol.* 213: 222-234 (2003).
5. Sasakura, Y., Shoguchi, E., Takatori, N., Wada, S., Meinertzhagen, I. A., Satou, Y. and Satoh, N.: A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. X. Genes for cell junctions and extracellular matrix. *Dev. Genes Evol.* 213: 303-313 (2003).
6. Padma, P., Satou, Y., Wakabayashi, K., Hozumi, A., Ushimaru, Y., Kamiya, R. and Inaba, K.: Identification of a novel leucine-rich repeat protein as a component of flagellar radial spoke in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol. Biol. Cell* 14: 474-485 (2003).
7. Inaba, K.: Molecular architecture of sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zool. Sci.* 20: 1043-1056 (2003).
8. Azumi, K., Takahashi, H., Miki, Y., Fujie, M., Usami, T., Ishikawa, H., Kitayama, A., Satou, Y., Ueno, N. and Satoh, N.: Construction of a cDNA microarray derived from the ascidian *Ciona intestinalis*. *Zool. Sci.* 20: 1223-1229 (2003).
9. Yamada, L., Shoguchi, E., Wada, S., Kobayashi, K., Mochizuki, Y., Satou, Y. and Satoh, N.: Morpholino-based gene knockdown screen of novel genes with developmental function in *Ciona intestinalis*. *Development* 130: 6485-6495 (2003).
10. Shoguchi, E., Ikuta, T., Yoshizaki, F., Satou, Y., Satoh, N., Asano, K., Saiga, H. and Nishikata, T.: Fluorescent *in situ* hybridization to ascidian chromosomes. *Zool. Sci.* 21: 153-157 (2004).

11. Satou, Y., Imai, K. S. and Satoh, N.: The ascidian *Mesp* gene specifies heart precursor cells. *Development* 131: 2533-2541 (2004).
12. Takatori, N., Hotta, K., Mochizuki, Y., Satoh, G., Mitani, Y., Satoh, N., Satou, Y. and Takahashi, H.: T-box genes in the ascidian *Ciona intestinalis*: Characterization of cDNAs and spatial expression. *Dev. Dynamics* 230: 743-753 (2004).
13. Azumi, K., Fujie, M., Usami, T., Miki, Y. and Satoh, N.: A cDNA microarray technique applied for analysis of global gene expression profiles in tributyltin-exposed ascidians. *Marine Environ. Res.* 58: 543-546 (2004).
14. Imai, K. S., Hino, K., Yagi, K., Satoh, N. and Satou, Y.: Gene expression profiles of transcription factors and signaling molecules in the ascidian embryo: towards a comprehensive understanding of gene networks. *Development* 131: 4047-4058 (2004).
15. Yagi, K., Satoh, N. and Satou, Y.: Identification of downstream genes of the ascidian muscle determinant gene *Ci-macho1*. *Dev. Biol.* 274: 478-489 (2004).
16. Hozumi, A., Satouh, Y., Ishibe, D., Kaizu, M., Konno, A., Ushimaru, Y., Toda, T. and Inaba, K.: Local database and the search program for proteomic analysis of sperm proteins in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319: 1241-1246 (2004).
17. Satou, Y. and Satoh, N.: Cataloging transcription factor and major signaling molecule genes for functional genomic studies in *Ciona intestinalis*. *Dev. Genes Evol.* 215: 580-596 (2005).
18. Matsuoka, T., Awazu, S., Shoguchi, E., Satoh, N. and Sasakura, Y.: Germline transgenesis of the ascidian *Ciona intestinalis* by electroporation. *genesis* 41: 67-72 (2005).
19. Satouh, Y., Padma, P., Toda, T., Satoh, N., Ide, H. and Inaba, K.: Molecular characterization of radial spoke subcomplex containing radial spoke protein 3 and heat shock protein 40 in sperm flagella of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol. Biol. Cell* 16: 626-636 (2005).
20. Kawashima, T., Satou, Y., Murakami, S. D. and Satoh, N.: Dynamic changes in developmental gene expression in the basal chordate *Ciona intestinalis*. *Dev. Growth Differ.* 47: 187-199 (2005).
21. Shoguchi, E., Kawashima, T., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y. and Satoh, N.: Molecular cytogenetic characterization of *Ciona intestinalis* chromosomes. *Zool. Sci.* 22: 511-516 (2005).
22. Yagi, K., Takatori, N., Satou, Y. and Satoh, N.: *Ci-Tbx6b* and *Ci-Tbx6c* are key mediators of the maternal effect gene *Ci-macho1* in muscle cell differentiation in *Ciona intestinalis* embryos. *Dev.*

- Biol.* 282: 535-549 (2005).
23. Ishibashi, T., Usami, T., Fujie, M., Azumi, K., Satoh, N. and Fujiwara, S.: Oligonucleotide-based microarray analysis of retinoic acid target genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Dev. Dynamics* 233: 1571-1578 (2005).
 24. Yamada, L., Kobayashi, K., Satou, Y. and Satoh, N.: Microarray analysis of localization of maternal transcripts in eggs and early embryos of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 284: 536-550 (2005).
 25. Satou, Y., Kawashima, T., Shoguchi, E., Nakayama, A. and Satoh, N.: An integrated database of the ascidian, *Ciona intestinalis*: Towards functional genomics. *Zool. Sci.* 22: 837-843 (2005).
 26. Sasakura, Y., Nakashima, K., Awazu, S., Matsuoka, T., Nakayama, A., Azuma, J.-i. and Satoh, N.: Transposon-mediated insertional mutagenesis revealed the functions of animal cellulose synthase in the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 15134-15139 (2005).
 27. Tokuoka, M., Satoh, N. and Satou, Y.: A bHLH transcription factor gene, *Twist-like 1*, is essential for the formation of mesodermal tissues of *Ciona juveniles*. *Dev. Biol.* 288: 387-396 (2005).
 28. Hamada, M., Wada, S., Kobayashi, K. and Satoh, N.: *Ci-Rga*, a gene encoding an MtN3/saliva family transmembrane protein, is essential for tissue differentiation during embryogenesis of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Differentiation* 73: 364-376 (2005).
 29. Shoguchi, E., Kawashima, T., Satou, Y., Hamaguchi, M., Sin-i, T., Kohara, Y., Putnam, N., Rokhsar, D. S. and Satoh, N.: Chromosomal mapping of 170 BAC clones in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Genome Res.* 16: 297-303 (2006).
 30. Wada, S., Hamada, M. and Satoh, N.: A genomewide analysis of genes for the heat shock protein 70 chaperone system in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Cell Stress Chaperones* 11: 23-33 (2006).
 31. Imai, K. S., Levine, M., Satoh, N. and Satou, Y.: Regulatory blueprint for a chordate embryo. *Science* 312: 1183-1187 (2006).
 32. Miwata, K., Chiba, T., Horii, R., Yamada, L., Kubo, A., Miyamura, D., Satoh, N. and Satou, Y.: Systematic analysis of embryonic expression profiles of zinc finger genes in *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 292: 546-554 (2006).
 33. Ogasawara, M., Nakazawa, N., Azumi, K., Yamabe, E., Satoh, N. and Satake, M.: Identification of thirty-four transcripts expressed specifically in hemocytes of *Ciona intestinalis* and their expression

- profiles throughout the life cycle. *DNA Res.* 13: 25-35 (2006).
34. Satou, Y., Hamaguchi, M., Takeuchi, K., Hastings, K. E. and Satoh, N.: Genomic overview of mRNA 5'-leader trans-splicing in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Nucleic Acids Res.* 34: 3378-3388 (2006).
 35. Hiruta, J., Mazet, F. and Ogasawara, M.: Restricted expression of NADPH oxidase/peroxidase gene (*Duox*) in zone VII of the ascidian endostyle. *Cell Tissue Res.* 326: 835-841 (2006).
 36. Ushimaru, Y., Konno, A., Kaizu, M., Ogawa, K., Satoh, N. and Inaba, K.: Association of a 66 kDa homolog of *Chlamydomonas* DC2, a subunit of the outer arm docking complex, with outer arm dynein of sperm flagella in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Zool. Sci.* 23: 679-687 (2006).
 37. Hozumi, A., Satou, Y., Makino, Y., Toda, T., Ide, H., Ogawa, K., King, S. M. and Inaba, K.: Molecular characterization of *Ciona* sperm outer arm dynein reveals multiple components related to outer arm docking complex protein 2. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63: 591-603 (2006).
 38. Hamaguchi, M., Fujie, M., Noda, T. and Satoh, N.: Microarray analysis of zygotic expression of transcription factor genes and cell signaling molecule genes in early *Ciona intestinalis* embryos. *Dev. Growth Differ.* 49: 27-37 (2006).
 39. Kawashima, T., Shoguchi, E., Satou, Y. and Satoh, N.: Comparative genomics of invertebrates. *In* "Comparative Genomics" (Brown, J.R., Ed.), in press (2007).
 40. Yamada, S., Hotta, K., Ueno, N., Satoh, N. and Takahashi, H.: Involvement of a fibrinogen-like protein in notochord-dependent dorsal patterning of the nervous system in *Ciona intestinalis* embryos. submitted (2007).
 41. Hotta, K., Yamada, S., Ueno, N., Satoh, N. and Takahashi, H.: *Brachyury*-downstream notochord genes and convergent extension in *Ciona intestinalis* embryos. submitted (2007).
 42. Azumi, K., Sabau, S. V., Fujie, M., Usami, T., Koyanagi, R., Kawashima, T., Fujiwara, S., Ogasawara, M., Satake, M., Nonaka, M., Wang, H.-G., Satou, Y., Satoh, N.: Gene expression profile during the life cycle of the urochordate, *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* in press (2007).
- (2) その他の著作物 (総説・書籍など)
1. Satoh, N.: The ascidian tadpole larva: Comparative molecular development and genomics. *Nature Rev. Genet.* 4: 285-295 (2003).
 2. Satoh, N., Satou, Y., Davidson, B. and Levine, M.: *Ciona intestinalis*: an emerging model for

- whole-genome analyses. *Trends Genet.* 19: 376-381 (2003).
3. Satoh, N.: Genomic resources for ascidians: Sequence/expression databases and genome projects. *In* "Methods in Cell Biology. Experimental analysis of the development of sea urchins and other non-vertebrate deuterostomes" (Ettensohn, C. A., Wray, G. and Wessel, G., Eds.), Vol. 74, pp. 759-774. Elsevier Inc. (2004).
 4. Satoh, N. and Levine, M.: Surfing with the tunicates into the post-genome era. *Genes Dev.* 19: 2407-2411 (2005).
 5. Satoh, N., Kawashima, T., Shoguchi, E. and Satou, Y.: Urochordate genomes. *In* "Vertebrate Genomes. Genome Dynamics" (Volf, J.-N., Ed.), Vol. 2, pp. 198-212. Karger, Basel (2006).
 6. Satou, Y. and Satoh, N.: Gene regulatory networks for the development and evolution of the chordate heart. *Genes Dev.* 20: 2634-2638 (2006).
 7. 和田修一、將口栄一、佐藤矩行. 新規発生遺伝子の探索, 化学工業, 54: 489-493 (2003).
 8. 和田修一、山田力志、小林健司、將口栄一、佐藤矩行. モルフォリヌクレオチドを利用した機能未知遺伝子の探索, 生化学, 75: 617-620 (2003).
 9. 佐藤ゆたか、佐藤矩行. 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, 細胞工学, 22: 1003-1008 (2004).
 10. 小笠原道生、佐藤矩行、野地澄晴. InSitu チップを用いたホールマウント in situ ハイブリダイゼーション法: 免疫染色 & in situ ハイブリダイゼーション最新プロトコール (野地澄晴 / 編), 155-164 (2006).

(3) 学会発表

招待講演 (国内会議 1 件、国際会議 4 件)

1. Nori Satoh, Yutaka Satou

Genome-Wide Survey of Genes Involved in the Formation of Chordate Body Plan: A Case Study of the Ascidian *Ciona intestinalis*, CDB SYMPOSIUM 2005 "Origin and Development of the vertebrate traits", (神戸) 2005.4.10-13

2. Nori Satoh, Yutaka Satou, Takeshi Kamashima

The ascidian *Ciona intestinalis*: An experimental system for whole-genome analyses of development, 15th International Society of Developmental Biologists Congress, (Sydney, Australia) Sep.7-13, 2005

3. Nori Satoh

Developmental Genomics in Marine Organisms: A Case Study of the Tunicate *Ciona intestinalis*,
DOBIS International Symposium / JSPS International Meeting Series: Dynamics of the Ocean
Biosystem, (東京) 2005.11.15-18

4. Nori Satoh

Ciona intestinalis and developmental genomics, EMBO/SNF Symposium
“The Genomics of Development”, (Arolla, Switzerland) Aug.21-27,2006

5. 佐藤矩行

脊索動物の進化:最近の話題から, 日本進化学会 2006 年大会, (東京) 2006.8.29-31

口頭発表 (国内会議 8 件、国際会議 2 件)

1. 和田修一, 山田力志, 望月恭彰, 小林健司, 將口栄一, 佐藤ゆたか, 佐藤矩行

遺伝子機能解析 1: モルフォリノ・オリゴヌクレオチドによる翻訳阻害, 第 25 回日本分子生物学会年会, (横浜) 2002.12.14

2. 安住 薫, 高橋弘樹, 佐藤矩行

カタユウレイボヤ cDNA チップを用いた遺伝子発現解析, 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2002.12.14

3. Kaoru Azumi¹, Manabu Fujie, Shinji Nakamura, Hisato Iwata, Shinsuke Tanabe, Satoru Suzuki and Nori Satoh

Analysis of global gene expression in tributyltin-exposed ascidian using cDNA microarray, 12th International Symposium “Pollutant Responses in Marine Organisms”, (Tampa, USA) 2003.5.12

4. 高橋弘樹, 堀田耕司, 山田成宏, 佐藤矩行, 上野直人

カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) 脊索形成の分子機構, 日本発生生物学会第 36 回大会, (札幌) 2003.6.11

5. 和田修一, 濱田麻友子, 小林健司, 佐藤矩行

β -catenin を介したシグナル伝達経路に必要な 5 つの新規遺伝子の同定, 第 37 回日本発生生物学会年会, (名古屋) 2004.6.4

6. 八木香澄, 佐藤ゆたか, 佐藤矩行

ホヤ脊索分化において ZicL は Brachyury を直接転写活性化する, 第 37 回日本発生生物学会年会, (名古屋) 2004.6.5

7. 紺野在, 佐藤矩行, 井出宏之, 稲葉一男

カタユウレイボヤ精巣特異的に発現する機能未知遺伝子の解析, 日本動物学会第 75 回大会(神

戸) 2004.9.10-12

8. Hiroki Takahashi, Shigehiro Yamada, Khoji Hotta, Nori Satoh, Naoto Ueno
Notochord derived Scabrous-like regulate long-range patterning of nervous system in the *Ciona intestinalis* embryo, 3rd International Tunicate Meeting (UCSB, U.S.A) 2005.7.9-14
 9. 笹倉靖徳, 粟津智子, 松岡輝実, 稲葉一男, 佐藤矩行
Minos トランスポゾンを利用したカタユウレイボヤにおける高効率エンハンサートラップライン作製, 日本発生生物学会第 39 大会 (広島) 2006.5.31-6.3
 10. 松岡輝実, 粟津智子, 稲葉一男, 佐藤矩行, 笹倉靖徳
ransposon-mediated mutagenesis revealed the function of Alpha-2-macroglobulin in *Ciona intestinalis*. 日本発生生物学会第 39 大会 (広島) 2006.5.31-6.3
- ポスター発表 (国内会議 9 件、国際会議 3 件)
1. 將口栄一, 和田修一, 小林健司, 佐藤ゆたか, 佐藤矩行
カタユウレイボヤ胚を用いた新規発生遺伝子の同定と機能解析 (IV): 既知の配列情報に類似性が認められない遺伝子, 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)2002.12.13-14
 2. 山田成宏, 堀田耕司, 佐藤矩行, 上野直人, 高橋弘樹
カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) 脊索特異的遺伝子群の細胞内局在
日本発生生物学会第 36 回大会 (札幌) 2003.6.11
 3. 和田修一, 將口栄一, 山田力志, 佐藤矩行
ホヤを使ってみませんか モルフォリノオリゴヌクレオチドによる新規発生関連遺伝子の探索, 日本発生生物学会第 36 回大会 (札幌) 2003.6.12
 4. Kohji Hotta, Shigehiro Yamada, Naoto Ueno, Nori Satoh, Hiroki Takahashi
Function of Brachyury-Downstream Notochord-Specific Genes in Morphogenetic Movements of the *Ciona intestinalis* Embryo, CDB SYMPOSIUM 2005 "Origin and Development of the vertebrate traits" (神戸) 2005.4.10-13
 5. Shigehiro Yamada, Nori Satoh, Naoto Ueno, Hiroki Takahashi
Analysis of Brachyury-downstream notochord-specific gene products during embryogenesis of the Ascidian *Ciona intestinalis*, 3rd International Tunicate Meeting 2005 (UCSB, U.S.A) 2005.7.9-14
 6. Eiichi Shoguchi, Takeshi Kawashima, Makoto Hamaguchi, Yutaka Satou, Nori Satoh
Chromosomal mapping of the *Ciona intestinalis* genome by fluorescent *in situ* hybridization, 3rd International Tunicate Meeting 2005 (UCSB, U.S.A) 2005.7.9-14

7. 山田成宏, 佐藤 矩行, 上野直人, 高橋弘樹
カタユウレイボヤ Scabrous-like と Notch シグナルの神経形成における機能, 日本発生生物学会第 38 回大会 (仙台) 2005.6.1-4

8. 小林健司, 山田力志, 佐藤ゆたか, 佐藤矩行
発生運命決定に伴う遺伝子発現のダイナミクス : ホヤのマイクロアレイを用いた解析, 日本動物学会第 76 回大会 (つくば) 2005.10.6-8

9. 高村克美, 森田奈巳, 藤原隆司
Analysis of gene regulation in the *Ciona intestinalis* cholinergic locus.
日本発生生物学会第 39 大会 (広島) 2006.5.31-6.3

10. 山田成宏, 上野直人, 佐藤矩行, 高橋弘樹
カタユウレイボヤ脊索遺伝子 (Ci-Noto4) の解析, 日本動物学会第 77 回大会 (松江) 2006.9.21-24

11. 島崎亜紀, 小笠原道生
カタユウレイボヤの鰓孔周縁の領域性をもたらす分子の探索と鰓孔形成メカニズム
日本動物学会第 77 回大会 (松江) 2006.9.21-24

12. 中沢典子, 安住薫, 佐藤矩行, 佐竹正延, 小笠原道生
カタユウレイボヤの血球特異的遺伝子群の比較発現解析, 日本動物学会第 77 回大会 (松江) 2006.9.21-24

13. 石原綾, 安住 薫, 小笠原道生
カタユウレイボヤの消化管で発現する FABP 関連遺伝子群の解析, 本動物学会第 77 回大会 (松江) 2006.9.21-24

(4) 特許出願

国内出願（8件）

1. 発明者：佐藤矩行 佐藤ゆたか 山田力志
名 称：「Zinc finger タンパク質をコードするホヤ由来の新規遺伝子」
出願人：科学技術振興事業団
出願日：平成 14 年 7 月 31 日

2. 発明者：佐藤矩行 佐藤ゆたか
名 称：「発生段階で発現するホヤ由来の新規遺伝子」
出願人：科学技術振興事業団
出願日：平成 14 年 7 月 31 日

3. 発明者：佐藤矩行 佐藤ゆたか 望月恭彰
名 称：「発生段階で組織特異的に発現するホヤ由来の新規遺伝子」
出願人：科学技術振興事業団
出願日：平成 14 年 7 月 31 日

4. 発明者：佐藤矩行 佐藤ゆたか
名 称：「中枢神経系の形成および機能に関わるホヤ由来の新規遺伝子」
出願人：科学技術振興事業団
出願日：平成 14 年 7 月 31 日

5. 発明者：佐藤矩行 藤江学 宇佐見剛志
名 称：「DNA マイクロアレイの再生方法及びその利用」
出願人：京都大学
出願日：平成 17 年 1 月 19 日
出願番号：特願 2005 - 012127

6. 発明者：佐藤矩行
名 称：「内胚葉の形成に不可欠な新規遺伝子およびその利用」
出願人：京都大学

出願日：平成 16 年 11 月 9 日

出願番号：特願 2004 - 325653

7 . 発明者：佐藤矩行 岡村康司 岩崎広英 村田喜理

名 称：「新規イオンチャンネル様ポリペプチドおよびその活用」

出願人：京都大学

出願日：平成 16 年 11 月 16 日

出願番号：特願 2004 - 332070

8 . 発明者：佐藤矩行 岡村康司

名 称：「電位依存性プロトンチャンネルポリペプチドおよびその利用」

出願人：京都大学

出願日：2005 年（平成 17 年）5 月 26 日

出願番号：特願 2005 - 154598

海外出願（1 件）

1 . 発明者：佐藤矩行 岡村康司 岩崎広英 村田喜理

名 称：「新規イオンチャンネル様ポリペプチドおよびその活用」

出願人：京都大学

出願日：2005 年（平成 17 年）5 月 13 日

出願番号：PCT/JP2005/008807

(5) 受賞等

受賞

- 1．佐藤矩行：東レ科学技術賞（2005年3月17日）
「ゲノムワイドな発生遺伝子解析システムの確立」
- 2．佐藤矩行：アレキサンダー・コワレフスキーメダル（2005年11月8日）
発生と進化に関する顕著な研究
- 3．佐藤矩行：紫綬褒章（平成18年4月29日）
発生生物学・ゲノム科学研究功績

新聞報道

読売新聞 2005年10月5日

「細菌から移動遺伝子で進化」

京都新聞 2005年10月5日

「細菌からのもらい物？ ホヤ独特のセルロース合成遺伝子」

産経新聞 2006年5月26日 30面

「脊椎動物、進化への道 遺伝子ネット全容解明」

毎日新聞 2006年5月26日 3面

「ホヤの受精卵分裂体の細胞形成遺伝子の相互作用解明」

京都新聞 2006年5月26日 28面

「脊索動物「ホヤ」研究遺伝子相互作用を解明進化理解へ一歩」

日本経済新聞 2006年5月29日 19面

「ホヤ受精卵の成長で働く遺伝子の協調解明」

読売新聞 2006年5月29日 11面

「脊椎動物の原形ホヤの体作る遺伝子の働き全容解明」

朝日新聞 2006年6月9日夕刊 4面

「ホヤの受精卵～幼生まで遺伝子の「共働」ぶり解明」

その他

日経バイオテク（ONLINE）2005年6月10日

「北大創成科学研究機構、ホヤゲノムを利用した DNA チップで海洋汚染の診断を目指す」

(6) その他

Ogasawara M, Satoh N, Shimada Y, Wang Z, Tanaka T, Noji S. 「 Rapid and Stable Buffer Exchange System Using InSitu Chip Suitable for Multi-Color and Large-Scale Whole-Mount Analyses 」 Development Genes and Evolution, 216(2):100-104, 2006 をもとに、InSitu チップ (S, L) および自動処理システム HYBRIMASTERHS-5100 をアロカ (株) を製品化。

詳細解説記事は小笠原道生著「細胞・組織の形態観察と解析のテクノロジー 第4回 InSitu チップ: ホールマウント遺伝子発現解析手法の新たな潮流」バイオテクノロジージャーナル, vol.5, No.5, p610-617 (2005)

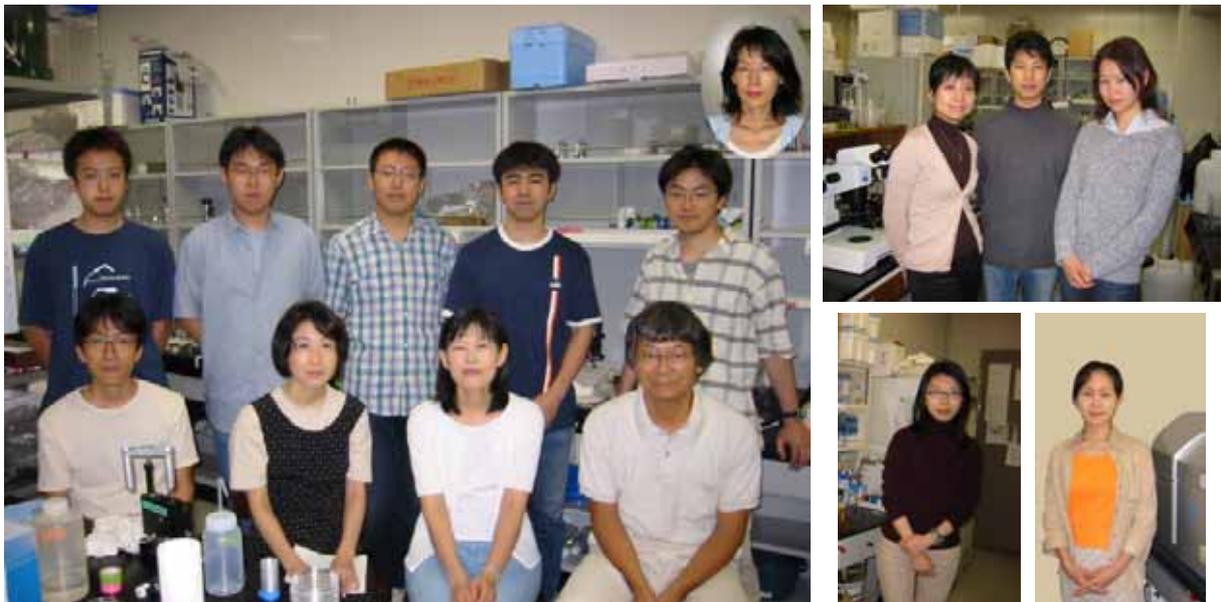
7 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 14 年 11 月 18 日	チーム内 DNA チップ解析セミナー	京都大学大学院理学研究科動物学教室	20 名	cDNA チップの作製とその利用について議論した。(研究報告&ディスカッション)
平成 16 年 11 月 5 日~7 日	ホヤ研究集会	ホテル大観荘 (宮城郡松島町松島)	78 名	CREST プロジェクトと関連したホヤ発生遺伝子の発現と機能について各研究グループの成果を議論し、今後の研究の展開を打ち合わせた。
平成 17 年 6 月 15 日	ホヤ遺伝子発現ネットワーク解析についての研究打ち合わせ	京都大学大学院理学研究科動物学教室	8 人	ホヤの DNA マイクロアレイデータを用いたホヤ胚発生時の遺伝子発現ネットワーク解析について討論を行った。
平成 18 年 2 月 24 日	Brachyury 下流脊索特異的遺伝子の機能に関する研究打ち合わせ	京都大学大学院理学研究科動物学教室	9 人	セミナー形式での発表の後、brachyury 下流脊索特異的遺伝子の機能に関する論文作成、および今後の研究の進め方についての打ち合わせを行った。

8 結び

すでに述べたように、本プロジェクト研究によってカタユレイボヤを発生ゲノム科学研究の一つの研究系としてほぼ確立することができた。本プロジェクトが 100%の成功であったかといえばそうではなく、多々研究の進展をみれない場面もあった。これらを反省材料にしつつ、今回得られた成果をもとにさらなる研究成果を目指して努力したいと考えている。



京都大学大学院理学研究科動物学教室発生ゲノム科学研究室