

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2005～2010  
 課題番号：17018018  
 研究課題名（和文） 脊椎動物起源の研究

研究課題名（英文） Studies of the vertebrate origin

## 研究代表者

佐藤 矩行 (SATO NORIYUKI)

独立行政法人沖縄科学技術研究基盤整備機構・マリンゲノミックユニット・代表研究者

研究者番号：30025481

研究成果の概要（和文）：脊椎動物はホヤなどの尾索類やナメクジウオの頭索類と共に脊索動物門を形成し、5.5億年以上前にこれらの共通祖先から進化してきたものと考えられている。我々はすでに尾索類カタユレイボヤのドラフトゲノムを解読していたが、本研究で頭索類ナメクジウオのゲノムを解読した。そしてこれら3群の比較ゲノム科学的解析から、これまで長い議論の対象であった脊索動物の進化および脊椎動物の起源について、頭索類がその祖先型に最も近く、そこからかなり直接的に脊椎動物が起源したことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Vertebrates are one of the three sub-phyletic groups of the phylum Chordata, together with cephalochordates and urochordates. Previously we decoded the genome of a urochordate, *Ciona intestinalis*. In the present study we succeeded to decode the genome of a cephalochordate, *Brachyostoma floridae*. Comparative analyses of the three genomes gave us an insight into the evolutionary scenario of chordates and the origin of vertebrates; namely, cephalochordates are most basal, from which vertebrates evolved rather directly.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	54,300,000	0	54,300,000
2006年度	53,600,000	0	53,600,000
2007年度	53,700,000	0	53,700,000
2008年度	54,000,000	0	54,000,000
2009年度	55,000,000	0	55,000,000
年度			
総計	270,600,000	0	270,600,000

研究分野：動物進化ゲノム科学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：動物進化、脊椎動物の起源、脊索動物の進化、ゲノム解読、比較ゲノム、ナメクジウオ、カタユレイボヤ、ドメインシャフリング

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物はホヤなどの尾索類やナメクジウオの頭索類とともに脊索動物門を形成する。これら3群は脊索・背側神経管・鰓裂など多くの形質を共有し、約5.5億年以上前に共通の祖先から進化してきたものと考えられている。我々は2002年に国立遺伝学研究所やアメリカDOE(JGI)との共同研究で尾索類カタユレイボヤ(*Ciona intestinalis*)のドラフトゲノムを解読した。そして脊椎動

物ゲノムや無脊椎動物ゲノムと比較を行い、脊椎骨および神経冠の発達、染色体レベルでの遺伝子の増幅、獲得免疫系、ステロイドホルモン系、長距離の神経伝達系、情緒発現系などの諸生命現象に関わる遺伝子機能の獲得が、脊椎動物の起源と進化に深く関与していることを示した。

こうした研究状況にあって、脊索動物門のもう1つのグループである頭索類ナメクジウオのゲノムの解読を進めることが急務であった。また同時に、すでに解読されたカタ

ユウレイボヤのドラフトゲノムを染色体にマップしてできるだけ完全なものに近づけることも重要であった。そして脊椎動物を加えた3群のゲノム比較から、脊椎動物の基本体制の確立に関係したと思われる遺伝子群を徹底的に解析することが望まれていた。さらに、脊椎動物起源に関与したと思われるゲノムの構造的変化を網羅的に解析することも重要な課題であった。さらに、脊索動物は半索動物（ギボシムシ）や棘皮動物（ウニなど）と共に新口動物群を形成するので、より広く脊索動物については脊椎動物の進化をゲノム科学的に理解するためには、半索動物ギボシムシのゲノム解読も視野に入れつつ研究を進めることも大切であった。

## 2. 研究の目的

(1) ナメクジウオ・ドラフトゲノムの解読：フロリダナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*) のゲノムサイズは約 500 Mbp と見積もられている。支援班、JGI およびカリフォルニア大学の協力を得て、この動物のドラフトゲノムを解読する。そして比較ゲノム科学的に脊索動物の進化および脊椎動物の起源を解析する。

(2) カタユウレイボヤゲノムの完全解読にむけて：カタユウレイボヤのドラフトゲノム（真生クロマチン領域 120 Mb）を n=14 の染色体へのマッピングをする。そして得られた情報をもとに染色体レベルでの遺伝子発現カスケードを解析する。

(3) 脊椎動物の基本体制の確立に関する遺伝子群の網羅的解析：ナメクジウオやホヤのゲノムの中から、神経管・脊索・脊椎・顎など脊椎動物の基本体制の確立に関する遺伝子群の発現特異性と遺伝子機能をゲノム科学的に解析する。また、性ステロイドなどを中心に内分泌器官の進化にともなう遺伝子の変化を追跡する。

(4) ギボシムシ・ドラフトゲノムの解読に向けた研究の展開をはかる。

## 3. 研究の方法

(1) ナメクジウオ・ドラフトゲノムの解読は、ホールゲノムショットガン法、BAC エンドシーケンシング、EST 解析などをもとに解読する。そして比較ゲノム科学的に脊索動物の進化および脊椎動物の起源を解析する。

(2) カタユウレイボヤゲノムの完全解読にむけて：カタユウレイボヤのドラフトゲノム（真生クロマチン領域 120 Mb）を BAC エンドシーケンシングや BAC クローンの FISH 法などを駆使して n=14 の染色体へのマッピングをする。

(3) 脊椎動物の基本体制の確立に関する遺伝子群の網羅的解析：比較ゲノム科学的に解析する。

(4) ギボシムシ・ドラフトゲノムの解読に向けた研究の展開：ギボシムシの EST 解析を進める。

## 4. 研究成果

(1) フロリダナメクジウオ・ドラフトゲノムの解読：

2005 年にフロリダナメクジウオゲノムの

解読にむけて日米の共同研究を開始し、ホールゲノムショットガン法によるゲノム塩基配列決定 (11×)、EST 解析 (約 30 万)、BAC エンドシーケンシング決定 (10×) を行った。そして、それらをもとにこの動物のドラフトゲノムを解読し、2008 年に論文の公表に結びつけた。その結果、この動物のゲノムサイズは約 520Mb で、そこに約 21,900 のタンパク質をコードする遺伝子が存在することが明らかになった。そしてナメクジウオ、ホヤ、ウニ、脊椎動物とのゲノム比較から、次のようなことが明らかになった。

(a) これまでにゲノムが解読された動物を対象に、1,035 の遺伝子がコードするタンパク質の比較をもとに分子系統学的解析を行った。その結果、最近になって指摘されている脊索動物門内の系統関係、すなわち脊索動物の中では頭索類が最初に分岐し、次に尾索類と脊椎動物が進化したという構図を強く支持するものとなった。その結果をふまえると、脊索動物の進化については、図 1 に示すように、(i) 自由遊泳性の祖先からまず頭索類が起源し、(ii) 脊椎動物は頭索類様祖先から頭部、顎部、四肢などを発達させることによって直接的に進化したと推論でき、(iii) 尾索類は頭索類的祖先から濾過摂食に適應すべく独特の進化を遂げた、と考えられる。これは、これまで長い間議論されてきた脊索動物の起源と進化についてのほぼ最終的な結論が得られたことになる。これらをもとに脊索動物の起源と進化を説明する aboral-dorsalization 仮説を提唱した。

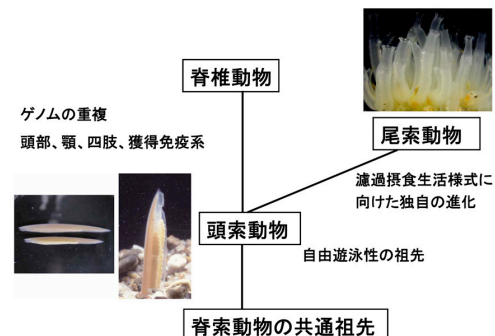


図 1. 脊索動物の起源と進化についての新しい考え方

(b) 次に、ナメクジウオゲノムを脊椎動物ゲノムと比較解析した結果、驚くべきことに、ナメクジウオとヒトとの間に非常に高いレベルでマクロシンテニーが保存されていることが分かった。そしてそれをもとに、17 のリンケージ・グループからなる脊索動物の基本的染色体構成を描くことができ、さらにそこからヒト染色体に至った変化を推論することができた (図 2)。しかしこの動物の実際の染色体数は n=19 であり、現在 FISH 法による BAC クローンの染色体マップを進めている。そして、17 の連鎖群を 19 の連鎖群に改変した後で、この 19 本の基本的組成をヒトの染色体などと比較することによって脊椎動物の進化における染色体の変化を追跡する予定である。

(c) さらに、両者のシンテニー・ブロックの比較から、脊椎動物ゲノムが2回の大規模な重複を起したことを支持する結果が得られた(図2)。すなわち、これまで、個々の遺伝子レベルで指摘されてきた脊椎動物進化の際の2回の遺伝子重複仮説(2R仮説)をゲノムワイドで証明できる。

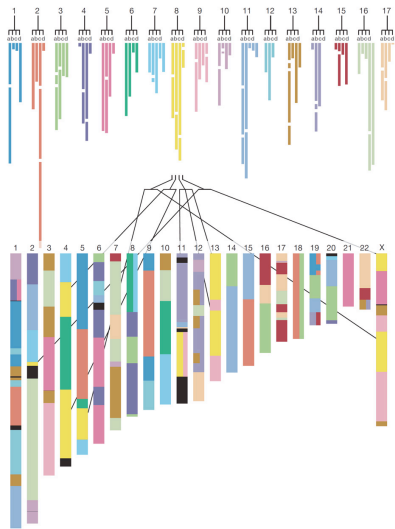


図2. ナメクジウオゲノムとヒトゲノムの間で保存されているシンテニー関係をゲノム全体に適用すると、脊椎動物の祖先型としての17のリンケージグループを得ることができる(上図)。また、それに対応する形で23本の色分けしたヒトの染色体を得ることができる(下図)。

## (2) カタユレイボヤゲノムの染色体マッピング:

カタユレイボヤのドラフトゲノム解読後、この動物ゲノム内には669個の転写因子遺伝子が存在することを明らかにし、その中で390個をホヤの体制の構築に関わるコアな転写因子としてまた転写因子および119個の主要シグナル分子をコードする遺伝子のほぼすべてをBACエンドシーケンシングやFISH法などを駆使してn=14の染色体にマップすることができた。

次に、初期胚体制の構築に76の転写因子/シグナル分子遺伝子が関わっていることを明らかにし、それらの遺伝子1つ1つについてその機能を阻害することにより、他の遺伝子にどのような影響を及ぼすかを調べた。その結果、これら76の遺伝子は、約3,000の要素からなるネットワークを構築しつつ働いていることを明らかにした。そしてさらに、これらのネットワークの染色体レベルでの相関性を明らかにした(図3)。これらの成果は、今後脊椎動物の基本体制の構築メカニズムをゲノムレベルで研究する上での基礎を築くものである。



図3. ホヤ体制構築のための遺伝子ネットワーク。ホヤのオタマジャクシ幼生は脊索動物の基本的体制を示す。その初期の体制構築に関わる転写因子およびシグナル分子遺伝子76を全て同定し、それらが染色体でどのような位置をしめ、どのような関係にあるのかを示した。

## (3) 脊椎動物の基本体制の確立に関する遺伝子群の網羅的機能解析:

(a) ドメインシャッフリングによる新規遺伝子の創成と脊椎動物の起源: 後口動物の進化の過程で、ドメインシャッフリングによる遺伝子の創成がどのような頻度で起こっているか、そして新しく生まれた遺伝子がどのように表現型の進化に寄与しているかについて調べた。そして、1つの遺伝子モデルにコードされているドメインの組み合わせが、どのような動物種で共有されているかリストアップして、系統樹に沿って、ドメインシャッフリングのイベントをマップした(図4)。その結果、脊椎動物で獲得されたものの中には、軟骨の基質となったアグレカンや、タイトジャンクションの制御を行っているoccludin、聴覚に関わるtectorinやcochlinが含まれており、ドメインシャッフリングによる遺伝子の創成が表現型の進化に寄与している可能性が明らかになった。また、脊椎動物の祖先で獲得された遺伝子には、脊索の進化に関わっていた可能性を示唆するものも含まれていた。

次に、脊椎動物の軟骨の進化に関連して、ナメクジウオの外鬚の再生過程についても解析を行った。ナメクジウオの外鬚は、人為的に切除すると1-2日で傷はふさがり、1週間以内に軟骨様組織の形成を伴いながら再生することを明らかにした。この軟骨様組織の分化の系を用いて、脊椎動物の軟骨形成の遺伝子ネットワークの起源をナメクジウオに求めて、遺伝子発現の解析を行い、軟骨と硬骨の形成ネットワークのひな形が外鬚の軟骨様組織の形成に機能していることを明らかにした。

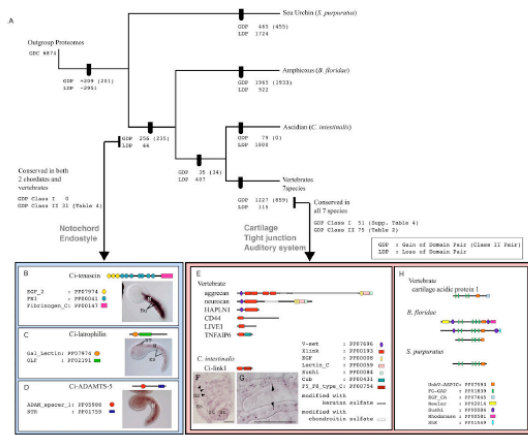


図 4. 後口動物の系統樹にドメインの組み合わせの獲得と欠失をマップした。脊椎動物で獲得された組み合わせのうち、ヒト、マウス、ラット、ニワトリ、ツメガエル、フグ、ゼブラフィッシュの 7 種で保存されている組み合わせは 126 あり、そのうちドメインシャッフルリングで獲得されたことのあるあきらかな Class II は 75 あった。その中には軟骨の基質アグレカタンなどが含まれていた。また、脊索動物の祖先で獲得された組み合わせをもつ遺伝子には脊索で発現する 3 つの遺伝子が見られた。

(b) Hox およびホメオボックス遺伝子の解析:

まず、ナメクジウオ *Branchiostoma floridae* の全ホメオボックス遺伝子のアノテーションを行って 133 個のホメオボックス遺伝子を同定した。因みに脊椎動物では、235 個である。これは主として脊椎動物に至る過程で起きたとされる遺伝子重複による。脊椎動物のホメオボックス遺伝子の多くはナメクジウオでもみられるが、起原の古いホメオボックス遺伝子のいくつかは脊椎動物で失われたこと、逆にいくつかのホメオボックス遺伝子が脊椎動物で新規に生じたことが分かった。脊椎動物の進化過程で起こった事象の一端が明らかになった。

次に、カタユウレイボヤの Hox 遺伝子 9 個の内、オタマジャクシ幼生までの発生で発現が WISH により確認された 7 個の遺伝子すべてについて、MO による機能阻害実験を行って機能を推定した。その結果、2 個の遺伝子は、尾の先端部の形態、一部神経細胞の分化に関わることを見出した。しかし、残りのものについては、調べた限りでは特段の機能は見出せなかった。幼生期までの発生に限っては、Hox 遺伝子の機能は限定的だと思われる。ホヤのボディプランは変態後に最終的に確立されることから、変態後の機能が想定される。事実、変態後の幼若体消化管においては、脊椎動物と極めて類似した後方 Hox 遺伝子群の発現パターンがみられた。また最近では Hox1 の機能が、幼生期後期以降に出水口原基の形成に機能を持つことが明らかになりつつある。消化管の発生における機能については、形態形成とともに、現在研究中である。

また、ギボシムシの Hox 遺伝子、ParaHox 遺伝子: *Ptychodera flava* のゲノム中に存在すると考えられる 12 個の Hox 遺伝子および 3 個の ParaHox 遺伝子を 1 ~ 3 個含むクローン

を複数単離した。この結果から予想されるギボシムシの Hox 遺伝子クラスターは、ナメクジウオのもの (約 250 kb) と同程度の大きさで予想される。また 3 個の ParaHox 遺伝子は 1 個の BAC クローンに含まれることから、ゲノム上でクラスターを作って存在していることが考えられる。また、国産のシモダギボシムシ *Balanoglossus simodensis* についてもゲノム PCR によって 12 個の Hox 遺伝子、3 個の ParaHox 遺伝子の断片を全て単離した。両種についての解析から、これまで存在が不明だった Hox8 は、ギボシムシに存在することが確認された。脊索動物の起原生物は、10 個を超えるメンバーからなる Hox 遺伝子クラスターを持っていたと考えられる。

(c) レチノイン酸関連遺伝子の機能解析:

脊索動物に特有な背側神経管の前後軸に沿った部域化や、咽頭嚙裂のパターン形成、神経堤細胞の分化などには、レチノイン酸が必要である。脊索動物以外の動物においては、レチノイン酸は胚発生にほとんど関与していない。そこで、レチノイン酸を胚発生に使う仕組みを獲得したことが、脊索動物の進化において重要なイベントであったと予想される。しかしながら、ホヤに近縁なオタマジャクシのゲノムには、レチノイン酸の合成酵素 (Raldh2)、分解酵素 (Cyp26) および受容体 (RAR) の遺伝子が存在しない。そのため、ホヤ類においては、レチノイン酸は発生に必須ではないという主張も見受けられる。そこで、本研究では、オリゴヌクレオチドマイクロアレイを利用して、レチノイン酸の標的遺伝子を多数同定した。中でも Hox1 遺伝子は、レチノイン酸に強く応答する。私たちは、この遺伝子の表皮エンハンサー中にレチノイン酸受容体 (RAR) の結合配列が存在し、この配列を破壊すると表皮における転写活性化もレチノイン酸への応答性もなくなることを突き止めた。実際、Raldh2 や RAR に対するモルフォリノオリゴを注入したり、レチノイン酸合成阻害剤で胚を処理したりすれば、Hox1 の発現がなくなることもわかった。これらのことから、ホヤ胚においては、レチノイン酸が Hox1 の正常な発現に必要であることがわかった。

一方、Raldh2 や RAR をコードする遺伝子の転写調節についても研究を行った。RAR の背側正中線表皮特異的エンハンサーは、Sox と Msx の協働によって活性化することがわかった。脊椎動物の神経堤細胞においては、SoxE と Msx1/2 が上位の転写調節因子として機能しており、レチノイン酸が神経堤細胞の分化に必要なこともわかっている。ホヤにおいては、背側表皮の細胞とは別に移動性の細胞が発見され、そちらが神経堤細胞の起源ではないかという説も出されているが、私たちの得た結果からは、ホヤの背側正中線表皮が神経堤細胞の起源であることが示唆された。

また、カタユウレイボヤにおいては、遺伝子の機能阻害実験にはモルフォリノオリゴの頭微注入という方法が頻繁に用いられている。しかし頭微注入には熟練の技術が必要であり、また処理できる胚の数も少なくなる。そこで、ゲノム規模の簡便な機能阻害実験法を確立するために RNAi 法の応用を試みた。

私たちは、カタユウレイボヤのゲノム中に U6 snRNA 遺伝子を同定し、このプロモーター領域を用いて短鎖ヘアピン型 RNA (shRNA) を発現する実験系を作出した。私たちは、この方法でチロシナーゼ遺伝子のノックダウンを行い、眼点と平衡器のメラニン沈着を阻害することに成功した。

(d) ナメクジウオの内分関連遺伝子の探索:

ナメクジウオのゲノム解読に伴い、内分泌機構のホルモンとその受容体の探索を行った。脊椎動物の内分関連物質と比較すると、脊椎動物に固有な内分泌器官である視床下部、下垂体、甲状腺、副腎などで合成・分泌されているホルモンおよびその受容体はほとんど存在せず、脊椎動物に進化する直前に内分泌機構は大きく変化したと考えられる。

また、性ステロイド代謝経路の進化についても解析した。脊椎動物の性ステロイド代謝経路はコレステロールから始まり、テストステロンとエストラジオールに代謝される。脊椎動物以外では、ナメクジウオがこの性ステロイド代謝経路をもつ唯一の動物であることを明らかにした。さらに、エストラジオールを含むグループであるエストロゲンがナメクジウオの主要なステロイドの一つであること、原始的な脊椎動物である両生類や魚類で利用されている性ステロイドがナメクジウオでは主要なステロイドであることなど、系統進化に伴う性ステロイド代謝の変化を明らかにした。一方、性ステロイド受容体も、その特異性と機能がナメクジウオから脊椎動物に至る過程で変化し、ホルモンと受容体の共進化がみられることが示唆された。

さらに、脳一下垂体系内分分泌機構の進化について解析し、脊椎動物の脳一下垂体系の内分分泌機能と関係する遺伝子をナメクジウオから単離し、それらの構造とナメクジウオでの局在を明らかにした。調べた遺伝子のすべてが神経索の前部あるいは先端部に発現していた。この結果は、脊椎動物の脳一下垂体系の機能はナメクジウオの神経索前部の神経内分泌細胞に集中していることを示唆する。今後は、脊椎動物の内分分泌系の進化を明らかにするために、神経内分泌細胞の機能の同定と、細胞間の相互作用の解析が課題となる。

(4) ギボシムシ・ドラフトゲノムの解読: ギボシムシのゲノム解読に向け、EST 解析などを進めている。ハワイ産ヒメギボシムシ *Ptychodera flava* 胚の 4 ステージおよび変態期の幼生の EST 解析を行い、総数 58,133 の EST を決定した。ユニークとされた遺伝子数は 21,053 であった。これらクローンの個々の遺伝子に関する詳細な解析は今後に残されている。また、成体組織より吻・襟部、鰓、肝領域の cDNA ライブラリー作成を行い、現在さらなる EST 解析を進めている。また、ホールゲノムショットガン法により、2×のゲノム配列を決定した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 81 件)

- Kubo, Y., Suzuki, N., Yuan, X., Nakai, K., Satoh, N., Imai, K.S. and Satou, Y. Genomic cis-regulatory networks in the early *Ciona intestinalis* embryo. *Development* 137, 1613-1623 (2010).
- Ikuta, T., Satoh, N. and Saiga, H. Limited functions of Hox genes in the larval development of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Development* 137, 1505-13 (2010).
- Takahashi, H., Hotta, K., Takagi, C., Ueno, N., Satoh, N. and Shoguchi, E. Regulation of Notochord-Specific Expression of Ci-Bra Downstream Genes in *Ciona intestinalis* Embryos. *Zool. Sci.* 27, 110-118 (2010)
- Satoh, N.: An advanced filter-feeder hypothesis for urochordate evolution. *Zoolog. Sci.* 26, 97-111 (2009).
- Kawashima, T., Kawashima, S., Tanaka, C., Murai, M., Yoneda, M., Putnam, N. H., Rokhsar, D. S., Kanehisa, M., Satoh, N., and Wada, H.: Domain shuffling and the evolution of vertebrates. *Genome Res.*, 19, 1393-1403 (2009).
- Kusakabe, T. G., Takimoto, N., Jin, M., and Tsuda, M.: Evolution and the origin of the visual retinoid cycle in vertebrates. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B 364, 2897-2910 (2009).
- Dong, B., Horie, T., Denker, E., Kusakabe, T., Tsuda, M., Smith, W. C., and Jiang, D.: Tube formation by complex cellular processes in *Ciona intestinalis* notochord. *Dev. Biol.*, 330, 237-249 (2009).
- Hanashima, A., Kubokawa, K., and Kimura, S.: Structure of the Amphioxus Nebulin Gene and Evolution of the Nebulin Family Genes. *Gene*, 443, 76-82 (2009).
- Tando, Y., and Kubokawa, K.: A Homolog of the Vertebrate Thyrostimulin Glycoprotein Hormone  $\alpha$  Subunit (GPA2) is Expressed in Amphioxus Neurons. *Zool. Sci.*, 26, 409-414 (2009).
- Koyano, R., Ishida, S., and Fujiwara, S.: Transcriptional regulation of the retinoic acid receptor in the dorsal midline epidermis in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Growth Differ.*, 51, 777-786 (2009).
- Kanda, M., Wada, H., and Fujiwara, S.: Epidermal expression of Hox1 is directly activated by retinoic acid in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Biol.*, 335, 454-463 (2009).
- Ikuta, T., Miyamoto, N., Saito, Y., Wada, H., Satoh, N., and Saiga, H.: Ambulacrarian prototypical Hox and ParaHox gene complements of the indirect-developing hemichordate *Balanoglossus simodensis*. *Dev. Genes and Evol.*, 219, 383-389 (2009).
- Yasuoka, Y., Kobayashi, M., Kurokawa, D., Akasaka, K., Saiga, H., and Taira, M.: Evolutionary roots of blastoporal expression and 'organizer' activity of the vertebrate gastrula organizer gene *lhx1* and its ancient metazoan paralog *lhx3*. *Development*, 136, 2005-2014 (2009).
- Tando, Y., and Kubokawa, K.: Expression of the Gene for Ancestral Glycoprotein Hormone  $\beta$ Subunit in the Nerve Cord of Amphioxus. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 162, 329-339 (2009).
- Nakayama-Ishimura, A., Chambon, J., Horie, T., Satoh, N., and Sasakura, Y.: Delineating metamorphic pathways in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.*, 326, 357-367 (2009)
- Satoh, N.: An aboral-dorsalization hypothesis for chordate origin. *Genesis*, 46, 614-622 (2008).
- Horie, T., Sakurai, D., Ohtsuki, H., Terakita, A., Shichida, Y., Usukura, J., Kusakabe, T., and Tsuda, M.: Pigmented and nonpigmented ocelli in the brain vesicle of the ascidian larva. *J. Comp. Neurol.*, 509, 88-102 (2008).
- Nishiyama, A., and Fujiwara, S.: RNA

- interference by expressing short hairpin RNA in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Growth Differ.*, 50, 521–529 (2008).
- Yao, T., Ohtani, K., and Wada, H.: Whole-mount observation of pharyngeal and trabecular cartilage development in lampreys. *Zool. Sci.*, 25, 976–981 (2008).
- Ohtani, K., Yao, T., Kobayashi, M., Kusakabe, R., Kuratani, S., and Wada, H.: Expression of Sox and fibrillar collagen genes in lamprey larval chondrogenesis with implications for the evolution of vertebrate cartilage. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.*, 310B, 596–607 (2008).
- Kinjo, S., Shirayama, Y., and Wada, H.: Evolutionary History of Larval Skeletal Morphology in Sea Urchin Echinometridae (Echinoidea: Echinodermata) as Deduced from Mitochondrial DNA Molecular Phylogeny. *Evol. Dev.*, 10, 632–641 (2008).
- Takatori, N., Butts, T., Candiani, S., Pestarino, M., Ferrier, D. E. K., Saiga, H., and Holland, P. W. H.: Comprehensive survey and classification of homeobox genes in the genome of amphioxus, *Branchiostoma floridae*. *Dev. Genes Evol.*, 218, 570–590 (2008).
- Takatori, N., and Saiga, H.: Evolution of CUT class homeobox genes: insights from the genome of the amphioxus, *Branchiostoma floridae*. *Int. J. Dev. Biol.*, 52, 969–977 (2008).
- Putnam, N. H., Butts, T., Ferrier, D. E. K., Furlong, R. F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-Rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A., Yu, J.-K., Saiga, H., and Rokhsar: The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature*, 453, 1064–1071 (2008).
- Shoguchi, E., Hamaguchi, M., and Satoh, N.: Genome-wide network of regulatory genes for construction of a chordate embryo. *Dev. Biol.*, 316, 498–509 (2008).
- Holland, L. Z., Albalat, R., Azumi, K., Benito-Gutiérrez, E., Blow, M. J., Bronner-Fraser, M., Brunet, F., Butts, T., Candiani, S., Dishaw, L. J., Satoh, N.: The Amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res.*, 18, 1100–1111 (2008).
- Mise, T., Iijima, M., Inohaya, K., Kudo, A., and Wada, H.: Function of Pax1 and Pax9 in the sclerotome of medaka fish. *Genesis*, 46, 185–192 (2008).
- Kawashima, S., Kawashima, T., Putnam, N. H., Rokhsar, D. S., Wada, H., and Kanehisa, M.: Comparative pair-wise domain-combinations for screening the clade specific domain-architectures. *Genome Informatics*, 19, 50–60 (2007).
- Horie, T., Kusakabe, T., and Tsuda, M.: Glutamatergic networks in the *Ciona intestinalis* larva. *J. Comp. Neurol.*, 508, 249–263 (2008).
- Ikuta, T., and Saiga, H.: Dynamic change in the expression of developmental genes in the ascidian central nervous system: revisit to the tripartite model and the origin of the midbrain-hindbrain boundary region. *Dev. Biol.*, 312, 631–643 (2007).
- Mita, K., and Fujiwara, S.: Nodal regulates neural tube formation in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Genes Evol.*, 217, 593–601 (2007).
- Inaba, K., Nomura, M., Nakajima, A., and Hozumi, A.: Functional proteomics in *Ciona intestinalis* - A breakthrough in the exploration of the molecular and cellular mechanism of ascidian development. *Dev. Dyn.*, 236, 1782–1789 (2007).
- Koyanagi, M., Kubokawa, K., Tsukamoto, H., Shichida, Y., and Terakita, A.: Cephalochordate melanopsin, Evolutionary linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells. *Cur. Biol.*, 15, 1065–1069 (2005).
- Gyoja, F., Satou, Y., Shin-i, T., Kohara, Y., Swalla, B. J., and Satoh, N.: Analysis of large scale expression sequenced tags (ESTs) from the natural ascidian, *Molgula tectiformis*. *Dev. Biol.* 307, 460–482 (2007).
- Hotta, K., Yamada, S., Ueno, N., Satoh, N., and Takahashi, H.: Brachyury-downstream notochord genes and convergent extension in *Ciona intestinalis* embryos. *Dev. Growth Differ.*, 49, 373–382 (2007).
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
佐藤 矩行 (SATO NORIYUKI)  
沖縄科学技術研究基盤整備機構・マリンゲノミックユニット・代表研究者  
研究者番号：30025481
- (2) 研究分担者  
窪川 かおる (KUBOKAWA KAORU)  
東京大学・海洋研究所・教授  
研究者番号：30240740
- 西駕 秀俊 (SAIGA HIDETOSHI)  
首都大学東京・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：60131918
- 和田 洋 (WADA HIROSHI)  
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号：60303806
- 藤原 滋樹 (FUJIWARA SHIGEKI)  
高知大学・教育研究部自然科学系理学部  
門・教授  
研究者番号：40229068
- 日下部 岳広 (KUSAKABE TAKEHIRO)  
甲南大学・理工学部・教授  
研究者番号：40280862
- 田川 訓史 (TAGAWA KUNIFUMI)  
広島大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：00403577
- 真壁 和祐 (MAKABE KAZUHIRO)  
徳島大学・総合科学部・教授  
研究者番号：60222288
- 久保田 洋 (KUBOTA HIROSHI)  
京都大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：40115837