

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006-2008

課題番号：18370088

研究課題名 (和文) ホヤの発生遺伝子から探る脊索動物の基本的な発生戦略

研究課題名 (英文) Basic developmental strategy of chordates as revealed by the analysis of key developmental genes of ascidians.

研究代表者

西駕 秀俊 (SAIGA HIDETOSHI)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：60131918

研究成果の概要：本研究では、動物の系統を通じて構造がよく保存された鍵発生遺伝子のいくつかについて、ホヤの発生における機能、転写調節機構の解析を行った。その結果、ホヤのオタマジャクシ幼生をつくる過程には、脊椎動物と同様な発生遺伝子カスケードとともに、脊椎動物とは大きく異なる機能、発現の制御機構があることが分かった。これらの結果は、脊索動物の発生機構の特徴とは何か、どの程度の可塑性があるのかを明らかにする手掛かりとなる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
19 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
20 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：脊索動物、ホヤ、発生、遺伝子、転写調節、Hox

1. 研究開始当初の背景

ホヤの発生については、系統的に離れたマボヤとカタユウレイボヤでも、よく保存された細胞系譜を持ち、類似の発生をすることはよく知られていたが、そのような発生を可能としている分子基盤についての説明はなかった。我々は Otx 遺伝子をモデル遺

伝子として、その転写制御機構を 2 種のホヤで解明し、ゲノムが大きく異なっているにもかかわらず、何故 Otx 遺伝子がほとんど同じ発現パターンを示すのか、初めて明らかにした (Oda-Ishii et al., Development 132, 1663-1674, 2005)。すな

わち *Otx* 遺伝子の転写調節機構は、2 種のホヤ間で保存されていること、その保存性は少数の転写因子結合部位の保存性に依拠することを明らかにした。ホヤで明らかにされた *Otx* 遺伝子の転写調節機構の一部は高等脊椎動物でも保存されていることが示唆され、2 種のホヤを研究対象とすることにより、脊索動物の基本的な発生戦略をも明らかにできる可能性が出てきた。一方、*Otx* 遺伝子は動物界でも保存性の最も高い発生遺伝子の一つであるが、発生遺伝子の保存性の程度はホヤ間でも様々である。ホヤの発生の様相は、系統の遠いホヤ間でよく保存されているように見えるが、オタマジャクシ幼生を作る遺伝子基盤はどの程度保存されているのかを明らかにし、さらに、その基盤は、他の脊索動物の発生の遺伝子基盤とどの程度共通性があるのかを考察し、脊索動物の基本的な発生プログラムを理解したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、脊索動物の特徴的な発生様式を支える発生遺伝子の機能、発現制御機構を解析することによって、脊索動物の基本的な遺伝子プログラムとその変化を理解することを目的とする。このために、本研究では系統上興味ある位置を占めるホヤの発生遺伝子に着目し、ホヤの発生における発生遺伝子の機能を解析する。さらに系統的に遠い 2 種のホヤに着目し、脊索動物の初期発生機構を理解する上で鍵となる発生遺伝子の機能と発現制御機構を明らかにし、比較することによってホヤの系譜で保存された発生プログラムを見出し、発生遺伝子の基本的な発現制御機構の解明・推定を行う。これらの研究から得られる情報をもとに、脊索動物の基本的な発生戦略とその変化を

考察する。

3. 研究の方法

(1) ホヤにおける発生遺伝子の転写調節機構とその保存性の解析：目的とする発生遺伝子の上流域を組み込んだレポーターコンストラクトを胚に導入し、内在性の遺伝子発現を再現できることを指標として、エンハンサーを同定する。エンハンサー内の必須転写因子結合部位を変異の導入により同定し、その転写因子をコードする遺伝子を MO により抑制し、目的とする遺伝子の発現に対する影響を調べ、遺伝子ネットワークを個別に解析する。

4. 研究成果

(1) *Pitx* 遺伝子の左側表皮特異的な発現を制御する遺伝子カスケードの同定：脊椎動物の左右非対称性に関わる *Pitx2* のカタユレイボヤ相同遺伝子 *Ci-Pitx* は、ホヤの尾芽胚期に表皮で発現するが、その発現は左側に限られる。カタユレイボヤ *Ci-Pitx* の尾芽胚表皮における左側特異的な発現に関わるエンハンサー領域を同定した。さらにそのエンハンサー活性は *FoxH* を介して *Nodal* によって制御されていることを明らかにした（以下の 5. 主な発表論文等に挙げてある論文 2）。この遺伝子カスケードは脊椎動物で知られているものと基本的に同じであり、脊索動物の基本的な発生戦略の一つとなっていることが考えられる。

(2) *Hox* 遺伝子の機能解析：我々はカタユレイボヤの *Hox* 遺伝子クラスターが崩壊していること、それにもかかわらず一部の *Hox* 遺伝子は前後軸に沿って発現域が並ぶ *Hox* 遺伝子に特徴的な発現パターンを示すことを明らかにしてきた (Ikuta et al, PNAS 101, 15118-15123, 2004)。オタマジャクシ幼生を作る過程で発現するすべての *Hox* 遺伝子に対してアンチセンス MO オリゴを作成し、機能阻害を行った結果、*Ci-Hox12* と *Ci-Hox10* について、軽微ながら明らかな形態形成異常を見いだすことが出来た。*Ci-Hox12* については、*Wnt5* を介して尾の先端の表皮細胞を柱状にすること、*Fgf8/17/18* を介して尾の先端部の伸張を制御していることを明らかにした。また *Ci-Hox10* については神経細胞の分化に

関わっていることを明らかにした（論文準備中）。

（3）ホヤの中樞神経系におけるマーカー遺伝子発現パターンのダイナミックな変動：上記（2）の研究中にカタユレイボヤの幼生中樞神経系における領域マーカーの発現を調べていたところ、領域マーカーの発現が予想以上に大きく変動すること、このため実験結果の解釈に影響が及ぶことに気づいた。そこで、尾芽胚の3発生段階について、8領域マーカー遺伝子の細胞レベルでの発現を詳細に記載した中樞神経系の発生・遺伝子発現マップを作成し、公表した（以下の5. 主な発表論文等に挙げてある論文6）。この論文は、カタユレイボヤの中樞神経系の発生と領域マーカー遺伝子の発現に関する今後の研究の指標となるだけでなく、その他のホヤの中樞神経系、運動神経の発生のよい reference となることが見込まれる。

（4）ホヤの尾芽における遺伝子発現
従来ホヤの発生では脊椎動物の尾芽に相当する領域はないと考えられていた。しかし、ホヤのオタマジャクシ幼生の尾の先端部では、脊椎動物の尾芽と同様に Fgf, Wnt などの遺伝子発現があることが分かってきた（以下の5. 主な発表論文等に挙げてある論文7）。

（5）ナメクジウオのホメオボックス遺伝子に関する研究成果：本研究の応募時には予定していなかった項目であるが、ナメクジウオ *Branchiostoma floridae* のゲノムプロジェクトに参加し、Peter Holland 博士（Oxford Univ.）とともに、その全ホメオボックス遺伝子の注釈付けを主導的に行った。ナメクジウオのホメオボックス遺伝子は133個、そのほとんどは脊椎動物と共有されていたが、脊椎動物の進化の過程で失われた遺伝子、また変化した遺伝子も見いだすことができた（以下の5. 主な発表論文等に挙げてある論文3, 4, 5）。ナメクジウオの全ホメオボックス遺伝子を明らかにすることに貢献しただけでなく、ナメクジウオが脊椎動物の始原生物に最も近い現生生物であることをホメオボックス遺伝子からも明らかにした。

（6）以上の研究を通じて、ホヤのオタマジャクシ幼生を作る過程で働く遺伝子カスケードは、脊椎動物の発生過程で見られる発生遺伝子カスケードとは相当に変化しているのではないかと考えられた。その一方で、左右性に関わる遺伝子カスケードのように極めてよく保存されている例もあった。また尾の先端では発現する遺伝子は似ているが、その遺伝子制御ネットワークは脊椎動物と

は相当に変化している例も見いだされた。ホヤのオタマジャクシ幼生の発生には、様々な程度で他の脊椎動物との保存性が見いだされることが見込まれるが、それを実証することが必要である。それにより脊椎動物の発生プログラムの基本型と可塑性に関する情報が得られ、多様な動物の形態形成機構の中での脊椎動物の特徴を初めて定義・理解できると考えられる。

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7件）

- ① Yasuoka, Y., Kobayashi, M., Kurokawa, D., Akasaka, K., Saiga, H. and Taira, M. (2009) Evolutionary roots of blastoporal expression and ‘organizer’ activity of the vertebrate gastrula organizer gene *lhx1* and its ancient metazoan paralog *lhx3*. *Development* (in press) 査読有り
- ② Yoshida, K. and Saiga, H. (2008) Left-right asymmetric expression of *Pitx* is regulated by the asymmetric Nodal signaling through an intronic enhancer in *Ciona intestinalis*. *Dev. Genes Evol.* 218, 353-360. 査読有り
- ③ Takatori, N., Butts, T., Candiani, S., Pestarino, M., Ferrier, D.E.K., Saiga, H. and Holland, P.W.H. (2008) Comprehensive survey and classification of homeobox genes in the genome of amphioxus, *Branchiostoma floridae*. *Dev. Genes Evol.* 218, 579-590. 査読有り
- ④ 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., Ferrier, D.E.K., Garcia-Fernández, J., Gibson-Brown, J.J., Gissi, C., Godzik,

- A., Hallböök, F., Hirose, D., Hosomichi, K., Ikuta, T., Inoko, H., Kasahara, M., Kasamatsu, J., Kawashima, T., Kimura, A., Kobayashi, M., Kozmik, Z., Kubokawa, K., Laudet, V., Litman, G. W., McHardy, A. C., Meulemans, D., Nonaka, M., Olinski, R. P., Pancer, Z., Pennacchio, L. A., Pestarino, M., Rast, J. P., Rigoutsos, I., Robinson-Rechavi, M., Roch, G., Saiga, H., Sasakura, Y., Satake, M., Satou, Y., Schubert, M., Sherwood, N., Shiina, T., Takatori, N., Tello, J., Vopalensky, P., Wada, S., Xu, A., Ye, Y., Yoshida, K., Yoshizaki, F., Jr-Kai, Y., Zhang, Q., Zmasek, C. M., Putnam, N. H., Rokhsar, D. S., Satoh, N. and Holland, P. W. H. (2008) The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res.* 18, 1100-1111. 査読有り
- ⑤ Takatori, N. and Saiga, H. (2008) Evolution of CUT class homeobox genes in the lineage to the vertebrates: insights from the analysis of the genomic sequence of amphioxus, *Branchiostoma floridae*. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 969-977. 査読有り
- ⑥ Ikuta, T. and Saiga, H. (2007) 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. 査読有り
- ⑦ Takatori, N., Wada, S. and Saiga, H. (2007) Regionalization of the tail-tip epidermis requires inductive influence from vegetal cells and FGF signaling in the development of an ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Zool. Sci.* 24, 441-448. 査読有り
- [学会発表] (計 13 件)
- ① Saiga, H. : Making very similar embryos with divergent genomes: conservation of transcriptional regulatory mechanisms of *Otx* between the ascidians *Halocynthia roretzi* and *Ciona intestinalis*. 2008 年 10 月, 神戸.
- ② Yoshida, K. and Saiga, H. : Left-right asymmetric expression of *Pitx* is regulated by the asymmetric Nodal signaling through an intronic enhancer in *Ciona intestinalis*. *Frontiers in Developmental Biology: Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology.* 2008 年 9 月, Gien, France.
- ③ 生田哲朗, 濱田麻友子, 佐藤ゆたか, 佐藤矩行, 西駕秀俊 : カタユウレイボヤ Hox 遺伝子の機能解析. 日本動物学会第 79 回大会. 2008 年 9 月, 福岡.
- ④ 生田哲朗, 宮本教生, 田川訓史, トムハンフリー, 斎藤康典, 佐藤矩行, 西駕秀俊 : 二種のギボシムシにおける Hox 遺伝子および ParaHox 遺伝子の単離と後生動物の進化. 日本動物学会第 79 回大会. 2008 年 9 月, 福岡.
- ⑤ Yasuoka, Y., Kobayashi, M., Kurokawa, D., Akasaka, K., Saiga, H. and Taira, M. : Protein evolution of the LIM-homeodomain transcription factors Lhx1 and Lhx3 in acquisition of the vertebrate gastrula organizer. *Japanese Society of Developmental*

- Biologists. 2008年6月, 徳島.
- ⑥ Ikuta, T. and Saiga, H. : Dynamic change in the expression of developmental genes in the central nervous system of *Ciona intestinalis*; reconsideration of the tripartite model and the origin of the midbrain. First Pan American Congress in Developmental Biology. 2007年6月, Cancun, Mexico.
 - ⑦ 生田哲朗, 西駕秀俊 : カタユウレイボヤ中枢神経系における主要発生遺伝子のダイナミックな発現. 2007年5月, 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会大会合同大会, 福岡.
 - ⑧ 安岡有理, 小林正明, 黒川大輔, 赤坂甲治, 西駕秀俊, 平良眞規 : LIM ホメオドメインタンパク質 Lim1 と Lim3 のオーガナイザー活性における機能比較を通じた進化生物学的解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 2007年12月, 横浜.
 - ⑨ 高鳥直士, 小林正明, 生田哲朗, 吉田慶太, 広瀬 弾, 西駕秀俊 : 下等脊索動物ゲノム配列の解析から見た脊索動物 Cut クラスホメオボックス遺伝子の進化. 日本動物学会第78回大会, 2007年9月, 弘前.
 - ⑩ 広瀬 弾, 西駕秀俊 : ホヤの中枢神経系における *Otx* 遺伝子の転写調節機構の解析. 日本動物学会第78回大会, 2007年9月, 弘前.
 - ⑪ 吉田慶太, 西駕秀俊 : カタユウレイボヤの発生における左右非対称な遺伝子発現とその調節機構の解析. 日本動物学会第78回大会, 2007年9月, 弘前.
 - ⑫ 守山裕大, 生田哲朗, 小笠原道生, 西駕秀俊 : カタユウレイボヤの消化管形成と遺伝子発現. 2007年3月, 日本動物学会関東支部 第59回大会, 東京.

- ⑬ 生田哲朗, 佐藤矩行, 西駕秀俊 : カタユウレイボヤの Hox 遺伝子の機能解析. 日本発生生物学会第39回大会, 2006年5月, 広島.

[図書] (計1件)

- ① 西田宏記, 西駕秀俊 (2007) 背側神経管の出現. 第5章, 神経系の多様性 その進化. シリーズ2 1世紀動物科学 第7巻 (阿形清和, 小泉 修 共編). 培風館, pp. 133-175.

その他 (計1件)

- 1. 生田哲朗, 西駕秀俊 (2006) Hox 遺伝子の進化. 生体の科学 57, 504-505.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西駕 秀俊 (SAIGA HIDETOSHI)
首都大学東京・理工学研究科・教授

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し