

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18370089

研究課題名（和文） ホヤ神経系の細胞型を規定する転写制御ネットワークの解明

研究課題名（英文） Transcription regulatory networks underlying specification of neuronal types in the nervous system of the ascidian

研究代表者

日下部 岳広 (KUSAKABE TAKEHIRO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授

研究者番号：40280862

研究成果の概要（和文）：体のつくりや遺伝子構成が単純な海産動物ホヤをモデルとして、神経細胞の個性がつくられる仕組みを探った。グルタミン酸、GABA など主要な神経伝達物質を使う神経細胞について、各細胞に固有の性質を与える遺伝子が特異的にはたらく仕組みの一端を解明した。ゲノム情報を生物間で比較することによって、遺伝情報の読み取りを調節する DNA 配列（シス調節配列）とそこに結合するタンパク質（転写調節因子）を同定した。また、様々な神経細胞ではたらくシス調節配列を解析し、結果をデータベースとして公開した。

研究成果の概要（英文）：Molecular mechanisms generating distinct cell types in the nervous system were investigated using a simple chordate model, the ascidian *Ciona intestinalis*. By comparing genome sequences between different ascidian species, we predicted and experimentally verified *cis*-regulatory sequences and transcription factors that regulate specific gene expression in particular neuronal types, such as glutamatergic and GABA/glycinergic neurons. We also identified and analyzed structure and function of *cis*-regulatory sequences for more than 60 genes that are specifically expressed in the nervous system and deposited the information in the Web databases, DBTGR and Aniseed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2007年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

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：ゲノム、遺伝子、発生・分化、発現制御、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

2002年にホヤ（カタユウレイボヤ）のゲノム配列が決定され、ホヤが脊椎動物と基本的な遺伝子セットを共有していることが明らかになった。ホヤの胚発生は短時間で完了し、細胞の分裂パターンや発生運命に個体間の差がほとんどない。さらに幼生の体は透明で個々の細胞が同定でき、生きた個体に細胞レベルおよび遺伝子レベルの実験操作を施すことが容易である。ホヤ幼生の神経系の細胞数はわずか300ほどであり、ニューロンの数はその1/3である。ヒトの脳の細胞数が1000億といわれ、細胞数が少ないとされるゼブラフィッシュの脳でも50万個の細胞からなることを考えると、ホヤの神経系がいかに単純であるかがわかる。したがって、ホヤ幼生の神経系では、システムを構成する全細胞のアイデンティティを把握した上で、全体の構築の過程を、個々の細胞レベルで理解することが可能である。

単純さの一方で、ホヤ幼生の神経系は脊椎動物の神経系と相同であり、発生システムと成熟した神経系の構成の両面で脊椎動物との根源的な共通性がみられる。たとえば、発生過程での前後軸に沿った *Otx*, *Pax2/5/8*, *En*, *FGF8/17/18*, *Hox* などの発現パターンは基本的に脊椎動物胚と同じであり、中枢神経系の領域化が同じしくみによって制御されていることが予想される。研究代表者らが明らかにした、感覚器からの入力を神経信号に変換し、中枢を経て効果器へ伝えるシステムも、脊椎動物と同じタイプ（神経伝達物質の種類等）の細胞が、相同な位置に存在してニューロン・ネットワークを形成している。

このように、ホヤ幼生の神経系は、脊索動物の神経系の基本構築プランを解明するためのすぐれたモデルとなりうる性質を備えているが、実際には細胞の同定が困難であったため、研究は進んでいなかった。研究代表者らは、神経系を構成するほぼ一通りの細胞型に特異的な遺伝子を同定し、それらを利用して、各細胞型を区別して認識する抗体を作ることに成功した。同時に、細胞型特異的プロモーターの解析も進めており、各細胞型特異的に発現するプロモーター:*GFP* 融合遺伝子を構築した。これらの成果により、ホヤ幼生神経系の細胞の同定が可能になった。さらに研究代表者らは、ホヤ遺伝子の上流領域の配列を情報科学的に解析し、新規シスエレメントの発見に成功し、ホヤ転写制御データベースを構築・公開した。本研究では、これら独自の研究成果に基づいて、モデル脊索動物

の神経系構築メカニズムの解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

脊椎動物と同じ脊索動物門に属するホヤの幼生の神経系は、少数の細胞からなる単純なものであるが、発生・生理のさまざまな点で脊椎動物の神経系との共通性がみられる。本研究では、ホヤ（カタユウレイボヤ *Ciona intestinalis*）幼生神経系を構成する各細胞型の発生運命の決定と細胞分化の分子機構を、各細胞型で特異的に発現する遺伝子群の発現制御領域と転写因子の相互作用に基づく遺伝子ネットワークととらえ、ゲノム・インフォマティクスと分子発生生物学実験の連携によって解明する。

3. 研究の方法

(1) 細胞型特異的遺伝子の同定及び神経系で発現する新規遺伝子の体系的な探索

細胞型特異的プロモーターにより蛍光標識し単離した細胞からRNAを抽出し、これを用いて細胞型特異的遺伝子を発見する。前年度に樹立した、細胞特異的に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック系統の胚・幼生を活用する。

(2) 計算機による共通モチーフの発見・比較ゲノム解析・転写因子の推定

① 共発現調節遺伝子群の調節領域に共有されるモチーフの探索と、既知転写因子の結合コンセンサス配列の検索を行う。② 近縁種 *Ciona savignyi* との比較ゲノム解析によるシス調節領域を推定する。③ 結合配列情報に基づいて転写調節因子を推測する。

(3) ホヤ胚への遺伝子導入実験による転写調節領域の機能解析・シス配列候補の実験による検証

① 各遺伝子の近傍領域にレポーター遺伝子をつないだ融合遺伝子をホヤ胚に導入してレポーター遺伝子の発現を調べる。② 上記2で見出されたシス配列の候補に変異や欠失を導入した調節領域の機能を同様にして解析する。下記4の転写因子をコードする遺伝子の調節領域も同様に解析する

(4) 候補転写因子の発現パターンの解析、ノックダウン実験

シス調節領域に結合する転写因子や神経

系の発生過程で発現する転写因子を同定し、発現パターンの解析を行うとともに、アンチセンス・モルフォリノオリゴの顕微注入によりノックダウンを行い、細胞特異的抗体を用いた免疫染色などにより、パターン形成・細胞分化に対する影響を調べる。

(5) 実験発生学的手法による決定および分化機構の解析

細胞系譜の追跡とレーザー照射による細胞破壊実験を行い、細胞レベルの発生機構を解析する。

(6) 実験結果のデータベース化と、ゲノムワイドな転写制御ネットワークの解析

①上記の解析で得られた結果をデータベース化し、i) 遺伝子調節ネットワークのモデル化、ii) 計算機を用いた新規遺伝子の発現パターンの予測、iii) ゲノム中のシス配列分布に基づく新規神経系特異的遺伝子の発見を行う。②得られた結果を脊椎動物や他の新口動物、後口動物と比較する。

4. 研究成果

(1) 神経系特異的遺伝子群のシス制御領域の網羅的な同定

ホヤ幼生の神経系で特異的に発現する約70の遺伝子のそれぞれについて、上流領域を中心としたシス調節領域を含むゲノムDNAを単離し、蛍光レポーター遺伝子 (*GFP* や *Kaede*) に連結した融合遺伝子を作製した。これらをホヤ胚に導入し、*in vivo* における蛍光レポーターの発現を解析した。解析結果および詳細な遺伝子情報をデータベース化した (下記(7)を参照)。

(2) ホヤ幼生の神経系で発現する遺伝子を発現パターンで分類し、同じ細胞で発現する遺伝子群について、上流領域に共有されるモチーフを、計算機を用いて検索した。眼点視細胞、平衡器細胞、口陥 (入水管原基) のそれぞれで発現する遺伝子群の解析を行った。見いだされた共通モチーフの分布に基づいた全ゲノムからの発現遺伝子予測 (東京大学医科学研究所・中井謙太教授らとの共同研究) と、*in vivo* 実験による共通モチーフの機能解析を行った。

(3) 特定のニューロンで蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック系統の樹立

各神経細胞サブタイプ特異的に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック (Tg) 系統カタウレイボヤを作製した (筑波大学下田臨海実験センター、笹倉靖徳博士・堀江健生博士らとの共同研究)。この Tg 系統を用

いて、神経細胞サブタイプごとに発生過程を追跡し、幼生における神経細胞の位置および数、分化過程の経時プロファイルを詳細に明らかにした。

(4) 神経系で複数のニューロンタイプにまたがって発現する遺伝子 *Ci-Gail* 遺伝子が発現するニューロンの種類を GFP レポーターと神経サブタイプ特異的抗体を用いた2重染色、または GFP と WGA (小麦胚芽レクチン) をレポーターとした2重染色法によって決定した。近縁種 *Ciona savignyi* との比較ゲノム解析によってみいだされた *Ci-Gail* 遺伝子上流のシス調節モジュールの機能解析 (図1) により、このシス領域が複数のタイプのニューロンにおける遺伝子発現制御に関わることが示された。この結果から、神経伝達物質作動性が異なるいくつかのニューロン集団間で共通の転写調節機構の存在が示唆された。

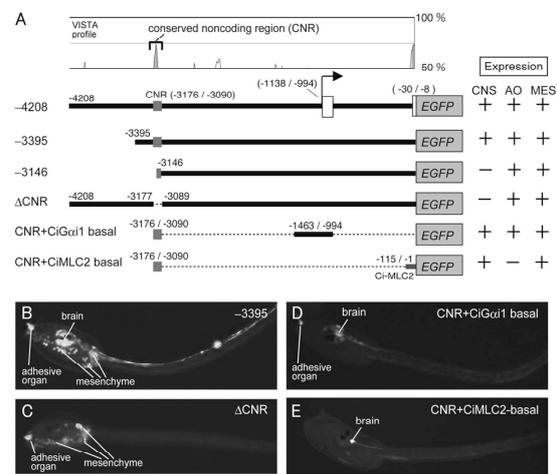


図1. 比較ゲノム解析によるシス調節配列の発見 GFP レポーターを用いた *Ci-Gail* 遺伝子の転写調節領域の機能解析の結果、遺伝子上流の種間で保存された非コード領域 (CNR) は中枢神経特異的なエンハンサーであることが示された。

(5) グルタミン酸作動性ニューロン特異的遺伝子の発現制御機構

ゲノム配列の種間比較により、グルタミン酸作動性ニューロン特異的な小胞型グルタミン酸トランスポーター遺伝子 (*Ci-VGLUT*) の上流に種間で高度に保存された非コード配列を見出した。蛍光レポーター遺伝子を用いた *in vivo* 機能解析により、この領域がグルタミン酸作動性ニューロン特異的な遺伝子発現に重要であることを明らかにした。この領域の配列解析およびホヤゲノムにコードされる転写因子の発現プロファイルから、POU ファミリー転写因子の一つ *Ci-POU-IV* が *Ci-VGLUT* 遺伝子の発現調節に関わる可能性が示唆された。*Ci-POU-IV* のノックダウン

を行ったところ、グルタミン酸作動性表皮ニューロンにおける *Ci-VGLUT* の発現が消失した (図 2)。この結果から、*Ci-POU-IV* の機能が表皮ニューロンにおける *Ci-VGLUT* 遺伝子の発現に必要なことが示された。上記の各神経サブタイプ特異的に *Kaede* レポーターを発現するトランスジェニック系統を用いて、*Ci-POU-IV* は GABA/グリシン作動性細胞やコリン作動性細胞の発生には関与しないことを示す結果を得た。また、グルタミン酸作動性細胞のうち、脳内に細胞体をもつ神経細胞 (例えば眼点視細胞) における *Ci-VGLUT* 遺伝子の発現には、*Ci-POU-IV* は必要でないことも示唆された。

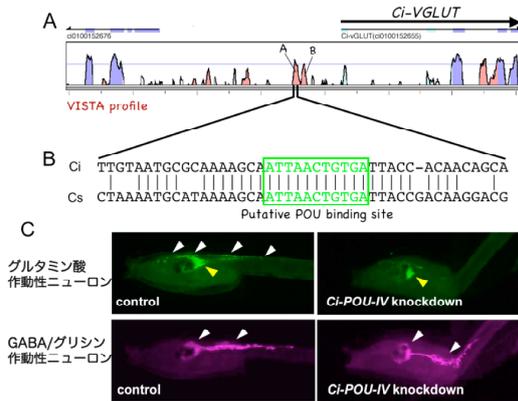


図 2. 細胞特異的転写因子の推定と検証実験

(A) グルタミン酸作動性ニューロン特異的遺伝子 *Ci-VGLUT* の上流領域にいくつかの保存領域がみいだされた。(B) 領域 A にはエンハンサー活性があり、種間で保存された POU 転写因子の結合配列が存在する。(C) POU 転写因子の一つ *Ci-POU-IV* をノックダウンすると大半のグルタミン酸作動性ニューロンが消失する。

(6) GABA/グリシン作動性神経細胞特異的遺伝子 *Ci-VGAT* の発現制御機構

小胞型 GABA トランスポーター遺伝子 (*Ci-VGAT*) は抑制性ニューロンである GABA/グリシン作動性ニューロンで発現する。比較ゲノム解析により *Ci-VGAT* 上流に種間で保存された非コード領域をみいだした。蛍光レポーターを用いた機能解析の結果、この保存領域が、神経索前端部の 2 対の介在ニューロン (ACIN) での *Ci-VGAT* 発現に必要な十分であることが示唆された。*in silico* 解析と遺伝子発現プロファイルに基づいて、この保存領域に結合する転写因子の候補として、*Engrailed* ホモログ (*Ci-En*)、*SoxB1* ホモログ (*Ci-SoxB1*) を同定した。アンチセンスモルフォリノオリゴを用いたノックダウン実験により、*Ci-SoxB1* が ACIN における *Ci-VGAT* の発現に必要なことが示唆された。

(7) 実験結果のデータベース化

ホヤ転写制御データベース DBTGR の機能拡充を行い、これまでの研究で得られた 60 以上の神経特異的遺伝子の転写制御領域の構造と機能に関する実験結果のデータベース化を行った (東京大学医科学研究所・中井謙太教授、Nicolas Sierro 博士、岡村浩司博士、東京大学新領域創成科学研究科・鈴木穰准教授らとの共同研究)。オリゴキャッピング法と次世代シーケンサを用いて得られた転写産物の 5' 端情報や転写制御因子の結合予測情報も統合し、ゲノムワイドな転写制御ネットワークの解析のための機能を強化した。

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 10 件)

- ① Takeo Horie, Masashi Nakagawa, Yasunori Sasakura, Takehiro G. Kusakabe, and Motoyuki Tsuda (2010) Simple motor system of the ascidian larva: neuronal complex comprising putative cholinergic and GABAergic/glycinergic neurons. *Zool. Sci.* **27** (2), 181-190.
- ② Tariq A. F. M. Tariqul Islam, Pricila Khan Moly, Yuki Miyamoto, and Takehiro G. Kusakabe (2010) Distinctive expression patterns of Hedgehog pathway genes in the *Ciona intestinalis* larva: implications for a role of Hedgehog signaling in postembryonic development and chordate evolution. *Zool. Sci.* **27** (2), 84-90.
- ③ Takehiro G. Kusakabe, Noriko Takimoto, Minghao Jin, and Motoyuki Tsuda (2009) Evolution and the origin of the visual retinoid cycle in vertebrates. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **364** (1531), 2897-2910.
- ④ Bo Dong, Takeo Horie, Elsa Denker, Takehiro G. Kusakabe, Motoyuki Tsuda, William C. Smith, and Di Jiang (2009) Tube formation by complex cellular processes in *Ciona intestinalis* notochord. *Dev. Biol.* **330** (2), 237-249.
- ⑤ Takeo Horie, Yasunori Sasakura, Masashi Nakagawa, and Takehiro G. Kusakabe (2009) Cell type and function of neurons in the ascidian nervous system. *Dev. Growth & Differ.* **51** (3), 207-220.
- ⑥ Takeo Horie, Daisuke Sakurai, Hisashi Ohtsuki, Akihisa Terakita, Yoshinori Shichida, Jiro Usukura, Takehiro G. Kusakabe, and Motoyuki Tsuda (2008) Pigmented and nonpigmented ocelli in the brain vesicle of the ascidian larva. *J. Comp. Neurol.* **509** (1), 88-102.
- ⑦ Alexis Vandenbon, Yuki Miyamoto, Noriko

Takimoto, Takehiro Kusakabe, and Kenta Nakai (2008) Markov chain-based promoter structure modeling for tissue-specific expression pattern prediction. *DNA Res.* **15** (1), 3-11.

- ⑧ Takeo Horie, Takehiro Kusakabe, and Motoyuki Tsuda (2008) Glutamatergic networks in the *Ciona intestinalis* larva. *J. Comp. Neurol.* **508** (2), 249-263.
- ⑨ Reiko Yoshida, Takeo Horie, Motoyuki Tsuda, and Takehiro G. Kusakabe (2007) Comparative genomics identifies a *cis*-regulatory module that activates transcription in specific subsets of neurons in *Ciona intestinalis* larva. *Dev. Growth Differ.* **49** (8), 657-667.
- ⑩ Takehiro Kusakabe and Motoyuki Tsuda (2007) Photoreceptive systems in ascidians. *Photochem. Photobiol.* **83** (2), 248-252.

[学会発表] (計26件)

- ① Koki Nishitsuji: Neuronal differentiation in the central nervous system territories marked by the expression of *Otx*, *Pax-2/5/8*, and *En* genes in the ascidian larva. 日本発生生物学会第42回大会、2009年5月28-30日 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター
- ② Koki Nishitsuji: *cis*-Regulatory modules and transcription factors that control gene expression in glutamatergic and GABAergic/glycinergic neurons in the *Ciona intestinalis* larva. 5th Tunicate Meeting、2009年6月24日 Okinawa Industry Support Center
- ③ Florian Razy-Krajka: Dopaminergic cells in *Ciona intestinalis* larva share some features with vertebrate dopaminergic amacrine cells. 5th Tunicate Meeting、2009年6月24日、Okinawa Industry Support Center
- ④ A. F. M. Tariqul Islam: Distinct expression patterns of hedgehog signaling pathway genes during larval development of *Ciona intestinalis*. 5th Tunicate Meeting、2009年6月21日 Okinawa Industry Support Center
- ⑤ Takeo Horie: Ptf1, a bHLH transcription factor, defines the dopaminergic neuronal cell fate in ascidian larva. 5th Tunicate Meeting、2009年6月24日 Okinawa Industry Support Center
- ⑥ Takehiro G. Kusakabe: Decoding *cis*-regulatory systems of cell type-specific genes in the tunicate genome. International Symposium on Marine Genomics 2009、2009年12月18日、Southern Plaza Kaiho, Okinawa
- ⑦ 西辻光希: カタユウレイボヤ幼生の GABA/グリシン作動性ニューロンにおける遺伝子発現を制御するシス調節配列と転写調節因子の機能解析. 分子生物学会 2009年12月12日、パシフィコ横浜
- ⑧ 大道裕: ホヤ幼生におけるグルタミン酸作動性ニューロン特異的な遺伝子発現調節機構と POU 転写遺伝子 Ci-POU-IV の役割. 分子生物学会 2009年12月12日 パシフィコ横浜
- ⑨ Koki Nishitsuji: Identification and characterization of a *cis*-regulatory module required for specific gene expression in a subset of GABA/glycinergic neurons of the *Ciona intestinalis* larva. 日本発生生物学会第41回大会、2008年5月28-29日 徳島県郷土文化会館
- ⑩ Yuki Morimoto: Ontogeny of glutamatergic, GABA/glycinergic, and cholinergic neurons in the *Ciona intestinalis* larva. 日本発生生物学会第41回大会、2008年5月28-29日 徳島県郷土文化会館
- ⑪ Takako Suzuki: Ci-POU-IV, a POU domain transcription factor, is required for development of epidermal glutamatergic neurons in the *Ciona intestinalis* larva. 日本発生生物学会第41回大会、2008年5月28-29日 徳島県郷土文化会館
- ⑫ A. F. M. Tariqul Islam: Roles of hedgehog signaling in *Ciona intestinalis* development: insights from hedgehog and *Gli* expression and cyclopamine treatment. 日本発生生物学会第41回大会、2008年5月29-30日 徳島県郷土文化会館
- ⑬ Koki Nishitsuji: Identification and characterization of a *cis*-regulatory module required for specific gene expression in a subset of GABA/glycinergic neurons of the *Ciona intestinalis* larva. Joint meeting of the Société Française de Biologie du Développement / Japanese Society of Developmental Biologists、2008年9月13-17日 GIENS (FRANCE)
- ⑭ Takehiro Kusakabe: Gene regulatory mechanisms underlying the determination of neuronal identity in the ascidian larva. The 16th CDB Meeting: *Cis*-sequence Regulation and its Evolution、2008年9月29-10月1日 理研 CDB (神戸)
- ⑮ A. F. M. Tariqul Islam : DiI 標識とレーザー細胞破壊によるカタユウレイボヤ幼生の光受容細胞の細胞系譜解析. 日本動物学会第79回大会、2008年9月7日 福岡大学七隈キャンパス
- ⑯ 西辻光希: カタユウレイボヤ神経系特異的遺伝子の転写調節領域の大規模解析. 日本動物学会第79回大会、2008年9月7日

- 福岡大学七隈キャンパス
- ⑰ 目下部岳広: ホヤ幼生の神経発生における Otx と Pax2/5/8 の役割. 第31回日本神経科学大会、2008年9月7日 東京国際フォーラム
 - ⑱ 森元熊紀: カタユレイボヤ幼生のコリン作動性および GABA 作動性神経回路の可視化. 2007年度日本動物学会近畿支部研究発表会、2007年5月19日 神戸山手大学
 - ⑲ 森元熊紀: GFP/WGA 二重標識によるホヤ幼生のコリン作動性および GABA 作動性神経回路の可視化. 第2回ホヤ研究集会、2007年5月8日 下田
 - ⑳ 中井謙太: 転写制御領域に見られる共通構造のコンピューターモデリングに向けて. 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会 合同大会 ミニシンポジウム「形を作る遺伝子調節ネットワーク」、2007年5月28日 福岡国際会議場
 - 21 西辻光希: 比較ゲノムによるカタユレイボヤ GABA 作動性ニューロンおよびグルタミン酸作動性ニューロンのシス調節領域の同定. 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会 合同大会 2007年5月30日 福岡国際会議場
 - 22 Takehiro G. Kusakabe: Molecular and cellular mechanisms of glutamatergic and GABAergic neuron development in the ascidian larva. The Sixth Okazaki Biology Conference "Marine Biology" December 5, 2007, Okazaki Conference Center
 - 23 西辻光希: 比較ゲノムによるニューロン特異的遺伝子のシス調節モジュールの同定. 2007年度日本動物学会近畿支部研究発表会、2007年5月19日、神戸山手大学
 - 24 A. F. M. Tariqul Islam : Role of hedgehog signaling in neuronal patterning of the *Ciona intestinalis* larva. 2007年度日本動物学会近畿支部研究発表会、2007年5月19日、神戸山手大学
 - 25 Alexis Vandebon: Markov chain-based promoter structure modeling. 4th International Tunicate Meeting, Villefranche-sur-Mer. June 24-25, 2007
 - 26 Alexis Vandebon: Markov chain-based promoter structure modeling. 15th Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB) & 6th European Conference on Computational Biology (ECCB), Vienna, Austria: July 21-25, 2007

[図書] (計2件)

- ① 目下部岳広 (共著)、共立出版、ホヤの神経系と行動『動物の多様な生き方5 さまざまな神経系をもつ動物たち: 神経系の比較生物学』(比較生理生化学会編)、2009年、pp. 168-191.
- ② 目下部岳広 (共著)、三共出版、ホヤ『身近な動物を使った実験1-ホヤ メダカ・ゼブラフィッシュ キンギョ カエル』(鈴木範男編)、2009年、pp. 1-12.

[その他]
ホームページ等

- ① ホヤ遺伝子制御データベース (DBTGR) :
<http://dbtgr.hgc.jp/>
- ② ホヤ統合データベース (Aniseed) :
<http://crfb.univ-mrs.fr/aniseed/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

目下部 岳広 (KUSAKABE TAKEHIRO)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授
研究者番号: 40280862