

平成21年 6月 5日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770193
 研究課題名（和文） カタユウレイボヤ突然変異体のトランスクリプトーム解析による変態機構の解明
 研究課題名（英文） Study of mechanism of metamorphosis by transcriptome analysis of the mutants of *Ciona intestinalis*
 研究代表者
 濱田 麻友子（HAMADA MAYUKO）
 独立行政法人 沖縄科学技術研究基盤整備機構 マリンゲノミックスユニット・研究員
 研究者番号：40378584

研究成果の概要：

本研究ではカタユウレイボヤの変態過程の一部に異常が見られる変異体 *sj1*, *sj2*, *sj4* (*trf*: *tail regression failure*) において、どのような遺伝子発現の変化が見られるかをマイクロアレイを用いて解析した。その結果、体軸回転が進行する *sj1* では間充織で発現する遺伝子の増加が見られた。また、尾部吸収が起こらず、成体組織が成長する *trf* では神経系で発現する遺伝子の減少が示唆された。また、これらの変異体間において発現差が見られた遺伝子は、変異体ごとに異なっており、変態過程が独立の過程から起こることが遺伝子レベルでも示唆される結果となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

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：ホヤ、マイクロアレイ、突然変異体、変態

1. 研究開始当初の背景

ホヤ類は脊椎動物に最も近縁であると言われていた尾索動物に属しており、脊椎動物の進化を考える上で重要な位置付けにある。ホヤの幼生は脊索と中枢神経系を持ち、その発生様式や形態は脊椎動物と類似し、脊椎動物の基本的な体制を持つ。また、初期発生において発現している発生遺伝子は脊椎動物と共通のものが多く、その一方、ホヤの変態は脊椎動物のものとは異なる独自の過程であり、尾索動物の中でもホヤだけが固着生活

を送る。脊索動物の普遍性を保つホヤのオタマジャクシ幼生の形態から脊索を失い、ホヤ類独自の固着型の形態へと変化する変態のメカニズムは、種の形態の多様性を生み出すメカニズムであると言える。

ホヤの変態過程では様々なイベントが連続的に起こる。まず、幼生の頭部にある付着突起がなんらかの基質に固着するとことが一連の変態過程を開始させる引き金となる。最初に尾部が吸収され、続いて、付着突起の消失とアンブラと呼ばれる付着器官の形成、

体軸回転、成体組織の成長などが順番に起こる(図1)。これらの変態イベントは時間的に厳密に制御された過程である。

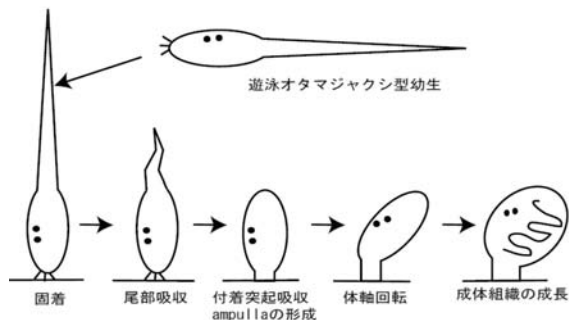


図1 ホヤの変態過程

筑波大学下田研究所・笹倉靖徳講師らの研究グループによって、変態イベントの一部が進行してしまういくつかの突然変異体を作成された。突然変異体 *sj1*, *sj2* はある時期になると尾部が吸収されないうちに付着突起が消失し、アンブラが形成され、体軸回転が進行してしまう(文献1)。一方、*sj4* (*trf: tail regression failure*) は付着後の尾部吸収が見られず、付着突起の吸収とアンブラの形成、成体組織の成長が進行してしまう(文献2)。以上の変異体ではいずれも異時的に変態イベントの一部が進行してしまうが、どのイベントが進行するかは変異体によって異なる。これら変異体の表現型は一連の変態イベントは制御機構の異なる複数の独立のプロセスから成り立っていることを示している。また、通常の変態過程においては固着、尾部吸収が起こるまでは他の変態イベントを抑制する機構が存在していることを示している。

2. 研究の目的

脊索動物と共通の遺伝子セットをどのように利用してホヤ独自の變態能力を獲得したのか、その進化過程に迫るためには變態メカニズムを遺伝子レベルで解明することが重要である。本研究では、變態における遺伝子カスケードの全体像を把握することによって、進化の道筋でホヤが生活環境に適応して独自の形態を得るようになった過程について、分子レベルで理解することを目的とした。

變態過程は複数のイベントが連続的に起こるためにこれまで解析が困難であったが、笹倉らの作成した突然変異体により、それぞれの変態イベントを独立のプロセスとして分け、単純化した形で考えることが可能となった。本研究ではこれらの突然変異体を用いて、變態のメカニズムを遺伝子レベルで解析することを目的とする。それぞれの変異体で

の遺伝子発現の変化を網羅的にとらえる手として、またこれまで知りえなかった新規の遺伝子を探し出す手としてマイクロアレイを用い、變態過程において遺伝子レベルでは何が起きているのかを表現型と合わせて理解する。また、變態制御に関わる遺伝子を同定することを目指した。

3. 研究の方法

筑波大学・笹倉講師の研究グループから變態過程に異常に見られる突然変異 *sj1*, *sj2*, *trf* の提供を受けた。これらの変異体の卵と精子を自家受精させることで1/4の割合で表現型の見られる(変異遺伝子のアリルをホモで持つ)胚を得られることができる。また、コントロールとして同じバッチの表現型の見られない胚を使用した。これらの胚から total RNA を抽出し、コントロールと変異体について異なる蛍光色素でラベル化された cRNA を合成した。カタユレイボヤ全遺伝子に対応する *Ciona intestinalis* 44k オリゴカスタムアレイを使用し、cRNA を競合的にハイブリダイゼーションし、スキャナーによってその蛍光強度を読み取った。変異体とコントロールを比較し、発現量に2倍以上の差があった遺伝子を候補遺伝子とし、変異体において発現が減少、もしくは増加した遺伝子のリストを作成した。

候補遺伝子に関しては、ヒトの相同遺伝子を BLAST によって検索し、どのような遺伝子であるか同定した。また、その中でも興味深いものに関しては定量的 Realtime RT-PCR によりマイクロアレイによって得られたデータの検証を行った。さらに whole mount *in situ* hybridization を行い、発現パターンを調べた。

4. 研究成果

(1) *sj1*

sj1 はトランスポゾンによる挿入変異体で、原因遺伝子はセルロース合成酵素 *Ci-CesA* である。表現型の出始める受精から18時間後、体軸回転の始まる22時間後、さらに体幹部の變態が進んだ2日目の胚を用いて、マイクロアレイによる発現解析を行った。変異体とコントロールを比較して発現差2倍以上の閾値でカットした時、変異体において18時間で減少45、増加67、26時間で減少34、増加36、2日目で減少85、増加64の候補遺伝子を得た。これらの候補遺伝子のうち、複数ステージで變動が見られ、かつ発現差が上位約50遺伝子についてRT-PCRでマイクロアレイの結果を検証した。

その結果、いずれのステージでも10倍以上の減少を示した遺伝子が5つあった。そのうち1つは原因遺伝子の *Ci-CesA* であり、ポジティブコントロールとして遺伝子の不活

性化を検出できている。他4つに関しては、すべて *Ci-CesA* と同じ染色体7番に乗っていた。このことはトランスポゾンの挿入による人為的な不活性化で、表現型には無関係である可能性があると考え、その後の解析からは外した。

また、変異体で増加の見られた5遺伝子に関して、RT-PCRでも増加が確認された。これらの遺伝子は、ヒト遺伝子に対して、titin isoform novex-2, centrosomal protein 290kDa(図2a), tubulin tyrosine ligase-like family, member 7(図2b), hypothetical protein LOC25962(図2c), と two pore segment channel 1(図2d)と相同性のあるタンパクをコードしている。*In situ* hybridizationで、これらの遺伝子の発現パターンを調べたところ、このうち4つで間充織での発現が観察された(図2 矢印)。titin isoform novex-2をコードする遺伝子に関しては発現量が低いためか、今のところ *in situ* hybridizationでは検出に成功していない。

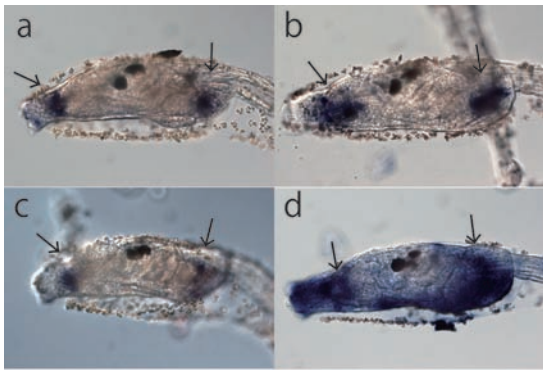


図2 *sj1*の間充織で増加する遺伝子

*sj1*変異体は、通常では変態過程の最初のステップである尾部の吸収が起こらないまま、体軸回転が始まってしまう突然変異体である。このような変異体において、間充織で発現量の増加する遺伝子が見られたことは、体軸回転において間充織がダイナミックに変化していることを示唆しており、今回同定された遺伝子は体軸回転のプロセスに関わっている可能性が高い。

(2) *sj2*

*sj2*は natural mutant であり、原因遺伝子はわかっていない。また、その表現型は *sj1*と同じである。受精から18時間と22時間で突然変異体と正常胚での遺伝子発現の差を比較した。*sj2*では *Ci-CesA*の発現は正常胚同様に見られ、*sj1*と *sj2*両方で大きく減少の見られる遺伝子は見つからなかった。また、*sj2*の2つのステージで2倍以上の減少を示す遺伝子を探したところ、4つの遺伝子が候

補として見つかった。この中には *sj1*では増加を示した titin isoform novex-2をコードする遺伝子と相同性のある遺伝子が含まれている。

(3) *sj4(trf)*

*trf*は natural mutant であり原因遺伝子はわかっていない。*trf*の表現型がはっきりする2日目の胚において、マイクロアレイを用いて変異体の遺伝子発現を正常胚と比べ、発現レベルに違いのある遺伝子を探索した結果、変異体において減少152、増加315の候補遺伝子を得た。特に突然変異体で減少した遺伝子に注目し、ヒトとの相同遺伝子を探索したところ、神経伝達物質トランスポーター、イオンチャンネル、GPCRシグナル関連遺伝子など神経に発現していることが知られている遺伝子が多く含まれていた。このことから、この変異体では神経系に何らかの変化が起きていると考えられる。*trf*変異体の表現型は、付着突起を切除した個体で見られる表現型と同じであることが報告されている(文献2)。このことは尾部吸収が付着突起によって制御されていることを示している。付着突起からはニューロンが走行しており、尾部吸収が付着突起の神経系によって制御されていることを示している可能性がある。もう1つの可能性として、変異体で進行する成体組織の成長に伴う神経系の変化を検出しているとも考えられる。

(4) 3つの変異体の比較

今回、*sj1*、*sj2*、*trf*のマイクロアレイ解析によって得られた候補遺伝子同士を比較して、変異体間で同じように変化が見られる遺伝子がないかを探索したが、そのような遺伝子は見つからなかった。*sj1*、*sj2*は付着のシグナルを受けないまま体軸回転が進行する。また、*trf*は付着のシグナルを受けても尾部吸収が起こらず、成体組織の成長が始まる。このように変異体ごとに表現型(異時的に進行する発生イベント)は異なる。本研究において得られた結果は、それぞれで見られる変態イベントが独立の経路をたどっていることを表現型同様、遺伝子発現においても示している。また、意外にも *sj1*と *sj2*で表現型は同じであるにも関わらず、同様に減少もしくは増加する遺伝子を見出すことはできなかった。

(5) まとめと今後の展望

本研究では変態イベントの一部に異常の起こる突然変異体を用いて、遺伝子発現にどのような変化を起こることを捉え、それぞれの変態イベントにおいて遺伝子レベルで何が起きているのかを示した。*sj1*は、体軸回転が進行する変異体であるが、間充織で発現する遺伝子が増加していることから、この

変態イベントにおいて間充織に大きな変化が起こっていることが示唆される。また、*trf* は尾部吸収が起こらずに成体組織の成長が起こる変異体であるが、神経系で発現していると思われる遺伝子の発現が変動している。このことから、尾部吸収および成体組織の成長は神経系の制御を受けている、もしくはこれらの変態イベントにより神経系に大幅な変化が起こっていることを示唆している。

本研究ではマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析により、各変態イベントに関わっていると思われる候補遺伝子を挙げることができた。また、いくつかの遺伝子に関してはBLASTによる相同性検索や *in situ* hybridization によって、機能や発現パターンを理解することができた。今後は網羅的な解析によって得られた遺伝子1つ1つにターゲットを絞る必要がある。今回、同定された遺伝子について、発現パターンの検証や機能解析を行うことにより変態イベントに関わる重要な遺伝子を同定し、変態のメカニズムを解明することができると考えられる。また、今回の解析は胚全体における発現解析となり、発現量の低い遺伝子は検出できない可能性があった。今後、変態においてダイナミックな変化が起こっていると考えられる神経系や間充織のみを単離し、発現解析を行うことで、変態イベントを制御する重要な遺伝子を同定できると考えられる。

(1) Transposon-mediated insertional mutagenesis revealed the functions of animal cellulose synthase in the ascidian, *Ciona intestinalis*.
Sasakura, Y. et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 15134-15139.

(2) Delineating metamorphic pathways in the ascidian *Ciona intestinalis*.
Nakayama-Ishimura, A. et al. (2009) Dev Biol. 326: 357-367.

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)

[学会発表] (計 1件)

Mayuko Hamada, Yasunori Sasakura, Nori Satoh
Identification of *Ciona intestinalis* genes involved in metamorphosis by microarray analysis of swimming juvenile mutant.
4th International Tunicate Meeting
2007年6月22日~27日
フランス・Villefranche-sur-Mer Marine Station

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 麻友子 (HAMADA MAYUKO)

独立行政法人 沖縄科学技術研究基盤整備機構 マリンゲノミクスユニット・研究員

研究者番号：40378584

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者