

機関番号：88001

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20247031

研究課題名（和文） ホヤ胚中枢神経系形成の全遺伝子ネットワーク

研究課題名（英文） Gene regulatory network involved in the formation of central nervous system in ascidian embryos

## 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・マリンゲノミクスユニット・代表研究者

研究者番号：30025481

研究成果の概要（和文）：ホヤのオタマジャクシ幼生の背側には光・重力・水圧などの変化に対応する中枢神経系が存在するが、その構成細胞数はわずか 350 程（ニューロンの数は約 100 個）という特徴を持つ。本研究では、我々が開発したカタユウレイボヤのトランスジェニック系を駆使して中枢神経系で発現する遺伝子の網羅的解析を行った結果、565 の遺伝子を同定することに成功した。またこれらの遺伝子の発現追跡や機能解析などから、ホヤ胚中枢神経系形成遺伝子ネットワークに関する幾つかの新事実を発見した。

研究成果の概要（英文）：Despite containing only approximately 350 cells, the central nervous system (CNS) of *Ciona intestinalis* larvae has an architecture that is similar to the vertebrate CNS. To identify genes expressed in the CNS, we isolated CNS cells using transgenic embryos that showed robust Kaede expression in the larval CNS. With the aid of microarray, we identified 565 genes that are preferentially expressed in the CNS. In addition, tracing cells with specific gene expression and functional analyses of the genes resulted in several discoveries of the gene regulatory network involved in the formation of the *Ciona* larval CNS.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	13,600,000	4,080,000	17,680,000
2009年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2010年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
総計	32,800,000	9,840,000	42,640,000

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、中枢神経系、発生と分化、遺伝子発現、遺伝子ネットワーク、トランスジェニック系、マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物中枢神経系の形成と機能は現代生物科学の中でも最も重要な研究課題であるが、そのメカニズムは非常に複雑なために全体像を把握するまでにはまだ多くの研究が必要とされている。ホヤは脊椎動物に最も近

縁な動物である。ホヤの発生にともなって約 2600 個の細胞からなるオタマジャクシ幼生が形成されるが、この幼生は脊索や背側中枢神経系をもち、脊椎動物を含む脊索動物の基本的体制を表している。その中で中枢神経系を構成する細胞数は全体で 350 程度、感覚胞

は約 285、尾部神経索は約 65（これはすべていわゆる上衣細胞である）の細胞から成る。またいわゆるニューロンの数は約 100 個とされ、感覚胞に約 60 個、運動神経節に 5 対 10 個の運動ニューロンを含む約 20 個、それ以外の領域に約 20 個存在するとされている。このわずかに約 350 個の細胞から成る中枢神経系は光・重力・水圧などの変化に対応する幼生の充分複雑な行動を支配している。このような背景から、最近になって、ホヤの中枢神経系は脊索動物の中枢神経系の発生と機能の基礎を理解するためのモデル系として注目され多くの研究がなされている。しかし、いまだ個々の遺伝子の同定とその発現・機能解析に関する研究が多く、全体的な理解に至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はホヤ胚中枢神経系の発生に関わる全遺伝子ネットワークを解明することである。本研究においては、まずホヤはい中枢神経系の細胞系譜のできるだけ完全な記載をめざし、次に中枢神経系形成時に発現する遺伝子の網羅的記載を進める。そして、これらの研究によって得られた遺伝子発現情報をもとにホヤ中枢神経系の遺伝子発現アトラスを構築する。最後に神経系発生遺伝子の機能阻害実験を行い、発現調節ネットワークの構築をめざす。

## 3. 研究の方法

まず、ホヤ胚中枢神経系の細胞系譜のできるだけ完全な記載については、後期囊胚期から幼生期に至る約 12 時間の神経系形成期の胚を 30 分毎に、コンフォーカル・レーザースキャニングマイクロスコープ (CLSM) 像による構造解析を行い、中枢神経系の細胞系譜の全体像を明らかにする。

また、ホヤ胚中枢神経系形成時に発現する遺伝子の網羅的解析については、カタユレイボヤトランスジェニック系を確立し、その一環としてホヤ胚各組織のマーカーラインを幾つか得ている。その中で、Ci-Nut:GFP および Ci-tub:GFP (または Kaede) を Minos に組み込んだトランスジェニック系統は神経胚期から中枢神経系の細胞のみが GFP (または Kaede) を発現した。そこで、尾芽胚期から細胞を解離し、GFP (または Kaede) ポジティブな細胞のみを集める。こうして集めた神経系細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行う。さらにホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (WISH) によって遺伝子の詳細な発現解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) ホヤの中枢神経系の構築機構を解析するためには、中枢神経系を蛍光タンパク質によ

り可視化する技術が必須になる。まず、ホヤ幼生の全神経系の細胞、コリン作動性神経、GABA/Glycine 作動性神経、グルタミン酸作動性神経、ドーパミン作動性神経、上衣細胞、視細胞のそれぞれについて可視化する人工 DNA を作製・整備した。続いて幼生の全神経系の細胞、コリン作動性神経、GABA/Glycine 作動性神経、グルタミン酸作動性神経、ドーパミン作動性神経については、それらの神経系を特異的に蛍光タンパク質 Kaede でラベルしたマーカートランスジェニック系統 Minos トランスポゾンを利用して作製した。

(2) こうして作成したトランスジェニック系統のうち Ci-tub:Kaede は尾芽胚および幼生の中枢神経系とくに脳 (感覚胞) で Kaede を特異的に発現する。このラインを用いて、Kaede を発現している細胞と発現していない細胞を集め、それぞれから RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行い、前者で優位に発現する遺伝子の単離を行ったところ、565 個の中枢神経系遺伝子を同定することに成功した。この中にはこれまでに報告されているカタユレイボヤの神経系遺伝子のほぼ全てを含んでいた。また、今回の解析から神経系で発現する 6 個の新規遺伝子を含む 11 個の神経ペプチドおよびホルモンをコードする遺伝子を同定することができた。

さらにこれらの遺伝子の空間的発現を WISH により調べた結果、遺伝子の発現をもとに脳に少なくとも 5 つの領域が存在することが分かった。

(3) ホヤ幼生のドーパミン作動性神経の遺伝子ネットワークの解明を、上記のドーパミン作動性神経で特異的に Kaede を発現する系統を利用して進め、その過程においてドーパミン作動性神経の分化に必須の役割を果たす遺伝子として Ci-Ptf1a を同定した。Ci-Ptf1a は脊椎動物の Ptf1a の相同遺伝子であり、basic helix-loop-helix タイプの転写因子をコードする。Ci-Ptf1a はカタユレイボヤ幼生のドーパミン作動性神経で特異的に発現している。Ci-Ptf1a の機能をモルフォリノオリゴを用いて阻害するとドーパミン作動性神経の分化が抑制され、本来ドーパミン作動性神経になる細胞は視細胞へと分化する。逆に Ci-Ptf1a を幼生の神経系全体で過剰発現させると、視細胞及びグリア細胞がドーパミン作動性神経へと分化する。ドーパミン作動性神経の最終分化に必須の役割を果たす遺伝子群 (具体的には tyrosine hydroxylase, aromatic amino acid decarboxylase, vesicular monoamine transporter, GTP cyclohydrolase I) の発現解析並びに上流領域の解析から、Ci-Ptf1a が

これらの遺伝子上流領域にある E-box に結合して転写を活性化させ、神経細胞をドーパミン作動性神経へと分化させる **terminal selector gene** として機能することが明らかとなった。またホヤのドーパミン作動性神経は視細胞と非常に似た細胞群であることが明らかとなった。

(4) ホヤは幼生から成体へと変態して形態を大きく変化させるが、その際に幼生の中枢神経系が完全に失われるのか、または幼生の中枢神経系をもとにして成体の中枢神経系を構築するのかがホヤの神経系を理解する上で重要な問題であった。従来は幼生の中枢神経系の細胞が失われるというのが通説となっていたが、明確な証明はこれまで行われてこなかった。幼生の全神経系の細胞、コリン作動性神経、GABA/Glycine 作動性神経、グルタミン酸作動性神経のそれぞれの細胞群において **Kaede** 蛍光タンパク質を発現させるシステムを利用して、ホヤの変態過程におけるこれらの細胞の追跡により本問題に取り組んだ結果、幼生の中枢神経系の細胞は基本的に残って成体の中枢神経系を構築すること、一方幼生のニューロンの大多数は確かに変態過程でアポトーシスを起こして失われること、成体のニューロンは幼生のグリア細胞（上皮細胞）が分化転換して生じることが明らかとなった。つまり、幼生のニューロンと成体のニューロンは、同じニューロンとしての性質を備えながら系譜の異なる細胞群である。このことはエンハンサートラップ法による神経系の解析でも示唆されており、具体的には幼生のニューロンでは機能しないが成体のニューロンでのみ機能するエンハンサーの存在が判明しており、ホヤは幼生と成体とで異なるメカニズムや遺伝子ネットワークによりニューロンを形成することが支持される。

(5) ホヤ幼生の中枢神経系の構築機構を明らかにする目的で、神経管形成時の形態形成運動の解析を行った。神経管の形成には神経細胞の運動だけでなく、周囲にある表皮細胞の運動が重要であることが判明した。具体的には、神経管閉鎖時に神経管と隣接する表皮細胞においてアクチン繊維が正中線側に強く局在し、表皮細胞が正中線へ向かって伸張する。この表皮細胞の運動を阻害すると神経管の閉鎖が生じない。アクチン繊維の正中線への集積には **Rho/Rock** のシグナリングが必要である。また、表皮細胞は運動時に G2 期で細胞周期を一時的に停止させ、神経管閉鎖の終了と同時に M 期へと進行する。この G2 期での一過的な細胞周期停止には **cdc25** の転写レベルでの調節が関与していることを示した。

(6) 脊椎動物において神経系形成に重要な役割を果たす **Hox** 遺伝子群の機能解析を行った。カタユウレイボヤの **Hox1** 遺伝子の機能を突然変異体並びにモルフォリノオリゴを用いて解析した結果、ホヤの **Hox1** は表皮細胞のパターニング、特に **otic placode** 相同構造の形成に必須の役割を果たすこと、その作用は脊椎動物の中枢神経系と同様にレチノイン酸のシグナルを必要とすること、逆にホヤの **Hox1** は脊椎動物のものとは異なり神経系には機能が見いだせないことが明らかとなった。また、**Hox10** 遺伝子についてモルフォリノオリゴを用いた解析から、内胚葉索細胞の移動並びに変態後の消化管形成に必須の役割を果たすことが明らかとなったが、一方で中枢神経系については機能を見いだせなかった。

(7) ホヤの神経系の可視化技術の発展のため、トランスポゾンによる系統作製の改良を行った。ホヤの卵で転移酵素を発現させるシステムを樹立し、このシステムを利用してゲノム中に単一コピーで挿入されているトランスポゾン **Minos** を再転移させ、新規挿入を作製することに成功した。得られた次世代個体のうち、およそ 4% に新規挿入が遺伝した。本技術により得られた新規挿入システムは基本的に単一の挿入を有するため、挿入位置の特定が容易になった。

(8) さらに、ホヤの神経系で働く遺伝子のネットワークを明らかにする一助として、ホヤの神経細胞とそれらをつなぐ神経回路の同定を試みた。まず、神経マーカー遺伝子の探索とクローニングとして、アセチルコリン合成酵素遺伝子としてはコリンアセチルトランスフェラーゼ (**Ci-ChAT**) 遺伝子を、またその貯蔵に必要な小胞型アセチルコリントランスポーター (**Ci-vAChTP**) 遺伝子を、さらにカテコールアミン合成酵素遺伝子としてチロシンからドーパを合成するチロシン-3-ヒドロキシラーゼ (**Ci-TY3H**) 遺伝子、ドーパからドーパミンを合成するドーパデカルボキシラーゼ (**Ci-DDC**) 遺伝子、ドーパミンからノルアドレナリンを合成するドーパミン-β-ヒドロキシラーゼ (**Ci-DBH**) 遺伝子を単離した。また、**Ci-DBH** においては、5' 端の異なる 2 種の転写産物を同定した。さらに、セロトニンの合成酵素遺伝子であるトリプトファン-5-ヒドロキシラーゼ (**Ci-TP5H**) 遺伝子、GABA 合成強誘遺伝子であるグルタミン酸デカルボキシラーゼ (**Ci-GAD**) 遺伝子も単離した。

次にこれらのマーカー遺伝子が実際にホヤの神経系で働いているかを特異的 RNA プローブを用いて **WISH** 法で調べた。その結果

ホヤ幼生中枢神経系の内、感覚胞では、*Ci-ChAT*、*Ci-vAChTP*、*Ci-TY3H*、*Ci-DDC*、*Ci-GAD* 遺伝子の発現が、運動神経節（内臓神経節）では、*Ci-ChAT*、*Ci-vAChTP*、*Ci-GAD* 遺伝子の発現が観察された。*Ci-DBH* と *Ci-TP5H* の発現は、この方法では確認できなかったが、少なくともホヤの中枢神経系には、コリン作動性、カテコールアミン（ドーパミン？）作動性、GABA 作動性神経が存在することが示された。

さらに、神経マーカー遺伝子の上流域の解析によって神経マップを作成して調べた結果、以下のようなことが明らかになった。感覚胞の *Ci-TY3H* と *Ci-DDC* 発現細胞は同一であり、少なくともこれらの細胞でドーパミンが合成されていること。また、これらの細胞からは明確な軸索の伸長を検出できなかった。感覚胞の *Ci-vAChTP*、*Ci-GAD* 発現細胞は、それぞれクラスターを形成し、その軸索を感覚胞内および後方の運動神経節に伸ばしていた。運動神経節の背側には少数の *Ci-GAD* 発現細胞が存在し、その軸索は多極性のあるものも存在した。運動神経節の腹側には運動神経と思われる *Ci-vAChTP* 発現細胞が左右対称に多数存在し、後方の筋肉にその軸索を伸ばしていた。またそのうちの一对は軸索を左右に交叉させて伸ばしており、魚類の回避行動に関与するマウスナー細胞との類似性が示唆された。これらの結果を基に、ホヤ幼生の神経マップを作成した。

#### 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 7 件）

Horie, T., Shinki, R., Ogura, Y., Kusakabe, T. G., Satoh, N., and Sasakura, Y. 2011. Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells that form the adult nervous system. *Nature* 469: 525-528.

Hamada, M., Shimozono, N., Ohta, N., Satou, Y., Horie, T., Kawada, T., Satake, H., Sasakura, Y., and Satoh, N. 2011. Expression of neuropeptide- and hormone-encoding genes in the *Ciona intestinalis* larval brain. *Dev Biol* 352: 202-214.

Ogura, Y., Sakaue-Sawano, A., Nakagawa, M., Satoh, N., Miyawaki, A., and Sasakura, Y. 2011. Coordination of mitosis and morphogenesis: role of a prolonged G2 phase during chordate neurulation. *Development* 138: 577-587.

Hozumi, A., Kawai, N., Yoshida, R., Ogura, Y., Ohta, N., Satake, H., Satoh, N., and Sasakura, Y. 2010. Efficient transposition of a single Minos transposon copy in the genome of the ascidian *Ciona intestinalis* with a transgenic line expressing transposase in eggs. *Dev Dyn* 239: 1076-1088.

Terakubo, H. Q., Nakajima, Y., Sasakura, Y., Horie, T., Konno, A., Takahashi, H., Inaba, K., Hotta, K., and Oka, K. 2010. Network structure of projections extending from peripheral neurons in the tunic of ascidian larva. *Dev Dyn* 239: 2278-2287.

Shimozono, N., Ohta, N., Satoh, N., and Hamada, M. 2010. Differential regional expression of genes in the developing brain of *Ciona intestinalis* embryos. *Zoolog Sci* 27: 103-109.

Takamura, K., Minamida, N., and Okabe, S. 2010. Neural map of the larval central nervous system in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Zoolog Sci* 27: 191-203.

〔学会発表〕（計 3 件）

Horie, T., Shinki, R., Ogura, Y., Kusakabe, T. G., Satoh, N., and Sasakura, Y. Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells that form the adult nervous system. The 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of Molecular Biology of Japan, Dec. 7-10, 2010, Kobe, Japan.

Satoh, N. Beyond the Conklin's Idea. Society of Developmental Biologists Annual Meeting, August 5-9, 2010, New Mexico, USA

Takamura, K. Identification of the regulatory regions and transcription factors involved in the specific expression of the cholinergic genes in *Ciona intestinalis*, 5<sup>th</sup> International Tunicate Meeting, June 21-25, 2009, Okinawa

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.irp.oist.jp/satoh/>

<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~sasakura/index.html>

新聞報道

平成 23 年 1 月 3 日 日本経済新聞・朝刊  
「ホヤ幼生の中樞神経 成長後も残存」

平成 23 年 1 月 3 日 共同通信各社・朝刊  
「中樞神経失わず細胞再構築」

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・マリング  
ノミックスユニット・代表研究者  
研究者番号：30025481

(2)研究分担者

高村 克美 (TAKAMURA KATSUMI)  
福山大学・生命工学部・准教授  
研究者番号：30106883

笹倉 靖徳 (SASAKURA YASUNORI)  
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・講  
師  
研究者番号：10400649