

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290067

研究課題名(和文)モデル脊索動物を用いた神経系細胞の個性化を司るゲノム情報発現ネットワークの解明

研究課題名(英文) Studies on genomic regulatory networks for development of diverse cell-types in chordate nervous systems

研究代表者

日下部 岳広 (KUSAKABE, Takehiro)

甲南大学・理工学部・教授

研究者番号：40280862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経系は多様なニューロンとグリア細胞から構成されており、共通の前駆細胞から生じるこれらの細胞が、各々固有の性質を獲得し、正しく配置されることが、神経系の機能発現のために必要であるが、その理解はきわめて断片的である。ゲノムも神経系もともにシンプルなホヤとメダカを用い、神経系の各細胞が固有の性質を獲得するためのゲノム情報発現ネットワークを探った。ゲノムワイドにプロモーターを同定し、転写因子との相互作用を解析した。受精卵から神経細胞分化に至る過程の細胞系譜を明らかにし、細胞分化の制御に関わる因子として、マイクロRNAやRNA結合タンパク質の重要性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The chordate nervous systems consist of diverse cell types of neurons and glia, which develop from common progenitor cells. Temporally and spatially precise control of development of neural cell types is the base for proper function of the nervous system, yet the molecular and cellular mechanisms that control cell-type specification have been only partially elucidated. We have used two simple model chordates, the tunicate *Ciona intestinalis* and the medaka fish *Oryzias latipes*, to study genomic regulatory networks for the development of diverse cell-types in the chordate nervous system. We systematically identified promoters in the *Ciona* genome and analyzed interactions between transcription factors and cis-regulatory DNAs. We also determined the precise cell lineage, from the fertilized egg to the terminal differentiation, of particular cell types in the brain of the *C. intestinalis*. In medaka, we have identified microRNAs as a regulator for the development of neuronal cell types.

研究分野：発生生物学 ゲノム生物学

キーワード：ホヤ メダカ 転写調節 神経系 発生・分化 小分子RNA 転写調節

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は多様かつ膨大な数のニューロンとグリア細胞で構成される。神経系が正常に機能するためには、固有の機能と形態をもつ各細胞が、適切な場所に適切な数、生じることが重要である。そのしくみの解明は、神経系の発生研究における中心的なテーマのひとつであるが、脊椎動物、とりわけ胎内で胚発生が進行する哺乳類では、中枢神経系の成熟過程を細胞レベルで克明に追跡することは困難であり、特有の性質をもった個々の細胞が形成される分子メカニズムはごく断片的に理解されているにすぎない。

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、脊椎動物との多くの共通点がみられる。研究代表者らは、ホヤ神経系を構成する細胞を同定し、神経回路とその形成過程を詳細に明らかにしてきた。

ホヤ胚は尾芽胚期までの全細胞系譜が解明され、転写因子と細胞間シグナル分子の発現パターンが詳細に明らかにされているが、神経系の細胞分化は尾芽胚期以降に起こるため、個々のニューロンの細胞系譜や分化経路は未解明であった。研究代表者らは、蛍光色素 DiI を用いた細胞追跡とシス調節モジュールおよび転写因子の機能解析を組合せ、遊泳運動を制御する神経回路を構成する抑制性ニューロンの細胞系譜と分化経路を明らかにした。

また、研究代表者と分担者は、ホヤゲノムのコンパクトさと細胞レベルの胚操作や遺伝子機能操作が容易な点に着目して、情報科学とイン・ピボ実験を融合させた遺伝子発現制御機構の解析を行い、シス調節配列の予測やゲノム中の遺伝子発現パターンの予測、小分子 RNA の同定、ゲノムワイドな転写開始点マッピングによるプロモーターのプロファイリングなどの成果をあげてきた。

さらに研究代表者は、ホヤと同様な研究上の利点をもつメダカを脊椎動物のモデルとして用い、ホヤでみだした新奇な現象やメカニズムが脊椎動物にもみられる普遍的なものであることを示してきた。

## 2. 研究の目的

神経系は多様なニューロンとグリア細胞から構成されており、共通の前駆細胞から生じるこれらの細胞が、各々固有の性質を獲得し、正しく配置されることが、神経系の機能発現のために必要である。そのしくみの解明は、神経発生学の中心課題であるが、胚発生が胎内で進行し、膨大な数と種類の細胞から構成される哺乳類の神経系では、その理解はきわめて断片的である。本研究では、研究代表者と分担者の共同研究の成果に立脚し、ゲノムも神経系もともにシンプルなホヤとメダカを用い、神経系の各細胞が固有の性質を獲得するためのゲノム情報発現ネットワークを探る。(1)転写因子とシス調節配列の相互

作用、(2)細胞間シグナル、(3)ノンコーディング RNA による制御、(4)染色体上の遺伝子配置に関連した制御、をネットワークの基本要素ととらえ、脊索動物に普遍的な神経系構築のメカニズムの解明をめざす。

## 3. 研究の方法

中枢神経系の各細胞が固有の性質(生理機能、形態)を獲得する過程には、複数の転写因子の組合せによる、多数の遺伝子の発現の質的・量的変化が関わっていると考えられる。これらを明らかにするために、ホヤとメダカのいくつかの細胞種に注目し、以下の解析を行う。

(1) ゲノム中の転写開始点と転写因子の結合部位を網羅的に解析し、標的遺伝子を予測し、イン・ピボ実験(遺伝子機能の阻害実験、過剰発現実験、蛍光レポーターを用いたシス調節機能のレポーターアッセイ、等)により検証する。

(2) 細胞間シグナルによる転写因子群のディファレンシャルな発現制御機構を、発生遺伝学的実験により明らかにする。

(3) 神経細胞の個性獲得に関わると推測されるマイクロ RNA をいくつか発見している。これらの発現制御機構と標的遺伝子を調べる。

(4) 染色体上の遺伝子配置やシス調節 DNA 間の相互作用と遺伝子発現制御の関係をクロマチン構造の解析とイン・ピボのレポーターアッセイ実験の連携により解析する。

## 4. 研究成果

カタコウレイボヤ諸器官および各発生段階から得た RNA を用いて、大量の 5' 端 EST 配列を次世代型超並列シーケンサーで決定し、ゲノムへのマッピングを行った。マッピング結果からは、転写開始点の情報に加え、新規な組織特異的および発生段階特異的遺伝子発現に関する情報が得られた。ホヤ特有のトランススプライシングにより転写開始点がわからなかった多くの遺伝子について、転写開始点を同定し、トランススプライシングにより除去されるアウトロン配列を同定することに成功した。この解析で同定した転写開始点の情報を、神経系の発生過程で発現制御を受ける遺伝子群の解析に活用し、各遺伝子の詳細な制御機構の解析を進めた。

個々の細胞の発生機構を明らかにするためには細胞系譜の情報が非常に重要であるが、胚の細胞系譜が詳しく解明されているホヤにおいても、神経系に関しては例外であり、細胞系譜の詳細がまだ不完全であった。そこでゲノムワイドな解析と並行して、光変換により蛍光波長が変化する蛍光タンパク質 Kaede を用いて神経板の細胞系譜を解析し、従来考えられていた細胞系譜を大きく書き換える結果を得た。さらに、神経細胞特異的な幾つかの遺伝子のシス制御領域を用いた細胞標識解析と、これらの細胞の発生を制御

するシグナルの解析により、脊椎動物の頭部形成に必須の要素である頭部プラコード様の細胞をみだし、脊椎動物の頭部プラコードの起源に関する新しい知見を得た。

中枢神経系の発生に関わる転写因子およびシグナル分子について、発現細胞の同定と追跡を、光変換により蛍光波長が変化する蛍光タンパク質 Kaede を用いて行い、中枢神経系を構成する細胞がこれまで知られていた以上に多様な集団であること、脊椎動物の脳とさまざまな点で共通性がみられることを明らかにした。細胞の個性獲得に関わるものが実験的に示された転写因子にタグをつけた融合タンパク質を、ホヤ胚において過剰発現させ、タグ配列に対する抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行った。

視細胞で特異的に発現する遺伝子群について、転写制御領域を比較ゲノム解析と保存モチーフ検索を行い、シス調節配列および転写制御因子を推定した。その過程で視細胞サブタイプ特異的な遺伝子発現制御に関わる因子として2種類のマイクロRNAを同定し、これらが標的とするmRNAを推測した。これらのマイクロRNAは染色体上で隣接し同じ視細胞で発現するオプシン遺伝子とシス制御モジュールを共有する双方向プロモーターから転写されることを示し、共有シス制御モジュールに結合する転写調節因子の候補をみだした。さらに、メダカ胚を用いて、細胞種特異的に発現するマイクロRNAについてCRISPR-Cas9法によるノックアウトを行い、マイクロRNAの一部を欠損した個体の表現型を解析した結果、細胞特異的な遺伝子発現の大きな変化がみられ、当該マイクロRNAが細胞の固有の性質の獲得において重要な役割をもつことが示唆された。また比較ゲノム解析と蛍光レポーターを用いたイン・ビボ実験によって見出されたシス調節モジュールをCRISPR-Cas9法を用いて欠損させた個体を作製した。

神経系における新たな細胞分化制御因子として、生殖幹細胞に必要な因子として知られる Piwi タンパク質をみだした。Piwi に対する特異的抗体を作製し、転写産物レベルに加え、タンパク質レベルでもホヤ幼生の中枢神経系、とくに脳の特定の細胞群に局在することを明らかにした。中枢神経系の本来 Piwi が発現しない細胞で Piwi を異所的に強制発現させたところ、神経細胞分化が抑制され、Piwi が中枢神経系において分化制御に関与することが示された。

##### 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4件)

Rui Yokomori, Kotaro Shimai, Koki Nishitsuji, Yutaka Suzuki, Takehiro G. Kusakabe, and Kenta Nakai (2016)

Genome-wide identification and characterization of transcription start sites and promoters in the tunicate *Ciona intestinalis*. *Genome Research* 査読有, Vol. 26, No. 1, pp. 140-150, DOI: 10.1101/gr.184648.114

島井光太郎, 日下部岳広 (2016) 太古に遡る嗅覚と生殖のつながり -ホヤを使った研究から-. *AROMA RESEARCH* 査読無, 第17巻 第1号(通巻65号), pp. 42-44.

Philip Barron Abitua, T. Blair Gainous, Angela N. Kaczmarczyk, Christopher J. Winchell, Clare Hudson, Kaori Kamata, Masashi Nakagawa, Motoyuki Tsuda, Takehiro G. Kusakabe, and Michael Levine (2015) The pre-vertebrate origins of neurogenic placodes. *Nature* 査読有, Vol. 524, No. 7566, pp. 462-465, DOI:10.1038/nature14657

Yutaka Daido, Sakurako Hamanishi, and Takehiro G. Kusakabe (2014) Transcriptional co-regulation of evolutionarily conserved microRNA/cone opsin gene pairs: implications for photoreceptor subtype specification. *Developmental Biology* 査読有, Vol. 392, No. 1, pp. 117-129, DOI:10.1016/j.ydbio.2014.04.021

[学会発表](計50件)

島井光太郎: ホヤ中枢神経系における Piwi の役割. RNA フロンティアミーティング 2015、2015年12月9日、タカミヤヴィレッジホテル樹林(山形県山形市)

長谷川裕一: カタユウレイボヤにおける Pax2/5/8 発現細胞の発生運命. BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会) 2015年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

入江直樹: 発生システムが動物ボディプラン進化を制約している可能性. BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会) 2015年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

細川恵梨華: メダカ視細胞の形態多様性の解析および視細胞形態とオプシンアイソフォームの関係性. BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会) 2015年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

Yutaka Daido: Targeted disruption of cone photoreceptor subtype-specific miRNA genes by the CRISPR/Cas9 system in medaka. 第21回小型魚類研究会、2015年9月20日、大阪大学銀杏会館(大阪府吹田市)

Erika Hosokawa: A possible role of opsin isoforms in the morphological diversity of retinal photoreceptor cells in medaka. 第21

回小型魚類研究会、2015年9月19日、大阪大学銀杏会館（大阪府吹田市）

Shota Sasaki: Targeted disruption of a skeletal muscle actin gene by the CRISPR/Cas9 system in medaka. 第21回小型魚類研究会、2015年9月19日、大阪大学銀杏会館（大阪府吹田市）

細川恵梨華: メダカ視細胞の形態多様性を生み出す要因の検討 III. 日本動物学会第86回大会、2015年9月19日、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター(新潟市)

長谷川裕一: ホヤ中枢神経系における *Pax2/5/8* 遺伝子の役割. 日本動物学会第86回大会、新潟、2015年9月17日、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター(新潟市)

Kotaro Shimai: A role of Piwi in development of the ascidian central nervous system. 第38回日本神経科学大会、2015年7月30日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

Erika Hosokawa: Studies on retinal photoreceptor cells in medaka as a model for studying mechanisms generating morphological diversity of neuronal cells. 第38回日本神経科学大会、2015年7月29日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

Yuichi Hasegawa: Expression of the *Pax2/5/8* genes delineates antero-posterior and dorso-ventral domains of the central nervous systems of the ascidian larva. 第38回日本神経科学大会、2015年7月28日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

Megumi Mukai: Regulation of a hedgehog gene in the central nervous system of *Ciona intestinalis*. 8th International Tunicate Meeting, 2015年7月14-17日、青森市文化会館(青森県青森市)

Yuichi Hasegawa: Regional homology of the central nervous system between ascidians and vertebrates: insights from *Pax2/5/8* paralogs. 8th International Tunicate Meeting, 2015年7月14-17日、青森市文化会館(青森県青森市)

Erika Hosokawa: Electron microscopic visualization of neural circuits in the ascidian nervous system using molecular markers and genetically encoded tags. 8th International Tunicate Meeting, 2015年7月14-17日、青森市文化会館(青森県青森市)

Takeo Horie: Structural and physiological analyses of a neural circuit for swimming locomotion of the *Ciona intestinalis* larva. 8th International Tunicate Meeting, 2015年7月14日、青森市文化会館(青森県青森市)

Kotaro Shimai: Piwi and neuronal differentiation in the ascidian central nervous system. 8th International Tunicate Meeting,

2015年7月14日、青森市文化会館(青森県青森市)

Kotaro Shimai: Piwi plays a role in regulating cell differentiation in the ascidian central nervous system. 第36回日本発生生物学会年会、2015年6月4日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

Yuichi Hasegawa: Piwi plays a role in regulating cell differentiation in the ascidian central nervous system. 第36回日本発生生物学会年会、2015年6月3-4日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

Erika Hosokawa: On the mechanisms that generate morphological diversity of retinal photoreceptor cells: possible contribution of opsin subtypes. 第36回日本発生生物学会年会、2015年6月3-4日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

21 細川恵梨華: オブシンがメダカ視細胞の形態多様性に及ぼす影響の解析. 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

22 入江直樹: 動物進化と個体発生の統合的理解に向けて. 第37回日本分子生物学会年会ワークショップ「生態進化発生学(Eco-Evo-Devo)とは言うけども」、2014年11月26日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

23 柏木洋貴: レポーター遺伝子を用いた透過型電子顕微鏡によるホヤ神経系細胞の特異的な可視化. 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

24 向恵実: カタユレイボヤヘッジホッグ遺伝子 *Ci-hh2* の中枢神経系における発現に必要なシス調節領域の解析. 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

25 横森類: 計算機を用いた脊索動物カタユレイボヤにおける組織特異的シス調節配列の同定. 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

26 日下部岳広: ホヤ中枢神経系の前後および背腹パターンの進化的考察. ホヤ研究会2014、2014年10月13日、筑波大学東京キャンパス(東京都文京区)

27 横森類: カタユレイボヤにおける転写開始点の網羅的同定とプロモーター解析. ホヤ研究会2014、2014年10月13日、筑波大学東京キャンパス(東京都文京区)

28 細川恵梨華: メダカ視細胞の形態多様性を生み出す要因の検討. 日本動物学会第85回大会、2014年9月13日、東北大学川内キャンパス(宮城県仙台市)

29 堀江健生: ホヤ幼生の遊泳運動神経回路

- の構造と生理機能の解析. 日本動物学会第 85 回大会 シンポジウム「海産無脊椎動物 - 生命情報の宝の山 II -」, 2014 年 9 月 12 日、東北大学川内キャンパス (宮城県仙台市)
- 30 向恵実: カタユウレイボヤ Hedgehog 遺伝子の神経索特異的発現に必要なシス調節領域の解析. 日本動物学会第 85 回大会、2014 年 9 月 11 日、東北大学川内キャンパス (宮城県仙台市)
- 31 柏木洋貴: カタユウレイボヤの運動を制御する神経回路の微細構造解析 (II). 日本動物学会第 85 回大会、2014 年 9 月 11 日、東北大学川内キャンパス (宮城県仙台市)
- 32 長谷川裕一: カタユウレイボヤ幼生における Pax2/5/8 発現細胞の同定. 日本動物学会第 85 回大会、2014 年 9 月 11 日、東北大学川内キャンパス (宮城県仙台市)
- 33 Také Kusakabe: *Ciona* and medaka as model organisms for studying neural development and function. Seminar at Department of Molecular & Cell Biology, University of California, Berkeley, 2014 年 8 月 7 日、パークレー (米国カリフォルニア州)
- 34 日下部岳広: 脊索動物ホヤの神経系の発生と機能 -動物 1 個体の神経回路の完全解明をめざして-. 神戸大学大学院理学研究科学術講演会、2014 年 6 月 13 日、神戸大学六甲台第 2 キャンパス (兵庫県神戸市)
- 35 Takeo Horie: Structural and physiological analysis for a central pattern generator controlling swimming locomotion of the ascidian larva. 第 91 回日本生理学会大会 シンポジウム「無脊椎動物から哺乳類へつながる運動制御の神経回路 -Central Pattern Generator 研究の最前線-」、2014 年 3 月 17 日、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県鹿児島市)
- 36 横山貴央: ホヤのメチローム解析から探る組織特異的メチル化の起源. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- 37 横森類: カタユウレイボヤにおける転写開始点およびプロモーターの網羅的解析. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- 38 Také Kusakabe: Development and function of the sensory and motor systems in the simple chordate *Ciona intestinalis*. OIST Winter Course “Evolution of Complex Systems”、2013 年 12 月 3 日、沖縄科学技術大学院大学シーサイドハウス (沖縄県恩納村)
- 39 大道裕: 錐体オプシン遺伝子と共発現するマイクロ RNA の役割. 日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月 27 日、岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)
- 40 柏木洋貴: カタユウレイボヤの運動を制御する神経回路の微細構造解析. 日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月 27 日、岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)
- 41 島井光太郎: カタユウレイボヤ幼生の遊泳運動制御回路の機能解析. 日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月 27 日、岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)
- 42 Yutaka Daido: Cone subtype-specific microRNAs as putative regulators for photoreceptor subtypes: evidence from primary transcripts localization and target prediction in medaka. 第 19 回小型魚類研究会、2013 年 9 月 20-21 日、仙台 AER ビル 5 階 仙台市情報・産業プラザ (宮城県仙台市)
- 43 Takehiro G. Kusakabe: Functional and structural evidence for a central pattern generator controlling swimming locomotion of the *Ciona intestinalis* larva. 7th International Tunicate Meeting、2013 年 7 月 25 日、Naples, Italy.
- 44 Moeko Tanaka: Cell-lineage analysis of the larval photoreceptor cells in *Ciona intestinalis*. 7th International Tunicate Meeting、2013 年 7 月 22-26 日、Naples, Italy
- 45 Megumi Mukai: Tracking cells expressing Hedgehog signaling molecules during postembryonic development of *Ciona intestinalis*. 7th International Tunicate Meeting、2013 年 7 月 22-26 日、Naples, Italy
- 46 Kotaro Shimai: Molecular characterization of Piwi in the central nervous system of the *Ciona* larva. 7th International Tunicate Meeting、2013 年 7 月 22-26 日、Naples, Italy
- 47 Hiroki Kashiwagi: Ultrastructural analysis of the neural circuit for swimming locomotion of the *Ciona intestinalis* larva. 7th International Tunicate Meeting、2013 年 7 月 22-26 日、Naples, Italy
- 48 Rui Yokomori: Genome-wide analysis of transcription start sites and promoters in *Ciona intestinalis*. 7th International Tunicate Meeting、2013 年 7 月 22-26 日、Naples, Italy
- 49 Kotaro Shimai: A novel somatic role of Piwi in the central nervous system of the ascidian *Ciona intestinalis*. 17th International Congress of Developmental Biology、2013 年 6 月 19-20 日、Cancún, Mexico
- 50 Yutaka Daido: Shared *cis*-regulatory modules regulate transcription of evolutionarily conserved and bidirectionally transcribed miRNA-opsin gene pairs in the medaka retina. 17th International Congress of Developmental Biology、2013 年 6 月 16-17 日、Cancún, Mexico

〔その他〕

ホームページ等

ホヤ遺伝子制御データベース (DBTGR):

<http://dbtgr.hgc.jp/>

ホヤ統合データベース (Aniseed):

<http://crfb.univ-mrs.fr/aniseed/>

新聞報道等 (雑誌論文 に関する報道)

2015年8月20日(木), 東京 FM / JFN 38

局ネットワーク「中西哲生のクロノス」

"SUZUKI BREAKFAST NEWS" 8:00~

2015年8月15日(土), 日本経済新聞

2015年8月13日(木), 朝日新聞(東京

本社版) 夕刊

2015年8月11日(火), 朝日新聞(大阪

本社版) 朝刊

2015年8月11日(火), 神戸新聞 朝刊

2015年8月11日(火), 産経新聞 朝刊

2015年8月11日(火), 北日本新聞

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日下部 岳広 (KUSAKABE, Takehiro)

甲南大学・理工学部・教授

研究者番号: 40280862

### (2) 研究分担者

中井 謙太 (NAKAI, Kenta)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号: 60217643

鈴木 穰 (SUZUKI, Yutaka)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・

教授

研究者番号: 40323646