

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440113

研究課題名(和文) ホヤに内在する脊索動物の基本的な発生プログラムの保存性と可塑性

研究課題名(英文) Plasticity of the basic developmental mechanism of chordate as observed in ascidians

研究代表者

西駕 秀俊 (Saiga, Hidetoshi)

首都大学東京・理工学研究科・客員教授

研究者番号：60131918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊索動物尾索動物亜門に属するホヤは2つの綱からなる。我が国で多用されているマボヤとカタユウレイボヤは異なる綱に属するが、互いによく似た発生過程を示してオタマジャクシ幼生をつくる。本研究では、動物の発生で前後軸に沿ったボディプランを司る発生遺伝子Hox遺伝子のクラスターについて、また前方部の形成を司るOtx遺伝子の発生過程における転写調節機構の変化について解析を行った。その結果、マボヤとカタユウレイボヤの間での同様な発生過程に含まれる発生プログラムの相違が明らかになってきた。

研究成果の概要(英文)：Ascidians, a closest animal group to vertebrates, are classified into 2 groups. *Ciona intestinalis* (Ci) and *Halocynthia roretzi* (Hr) are popular ascidian species belonging to the distinct groups. However, they exhibit very similar development to form tadpole larvae. The present study focused on the Hox and Otx, which play pivotal roles in anterior-posterior and anterior patterning, respectively. We have shown the Hox gene complement and cluster structure of Hr. The Hr Hox gene complement consisted of 9 members like in Ci, and the Hr Hox gene cluster is disintegrated in Hr but in a different manner from that in Ci. As regards developmental changes in the gene regulatory mechanisms of Otx, we have found that regulatory mechanisms change as development proceeds, but the way of the change is distinct between Hr and Ci. Thus, the different genetic mechanisms produce a similar outputs, development and expression pattern, in phylogenetically remote ascidians.

研究分野：発生生物学

キーワード：ホヤ Hox Otx マボヤ カタユウレイボヤ

## 1. 研究開始当初の背景

脊索動物門・尾索動物亜門に属すホヤは、分類上、壁性目と腸性目の2群に大別される。発生研究によく用いられるマボヤ(*Hr*)とカタユレイボヤ(*Ci*)は、二つの目の代表的な種である。両者のゲノムの非コード領域の塩基配列には類似性がほとんどない。しかし二つのホヤは、よく保存された細胞系譜を含め、極めて類似した発生の様式を持ち、脊索動物の始原的な体制を持ったオタマジャクシ型幼生をつくる。ホヤの発生には脊索動物の基本的な発生プログラムが働いていることが想定される。

発生機構やその進化を理解する上で、発生を直接的に制御する転写因子、シグナル伝達関連遺伝子(発生遺伝子)の機能や転写調節の解明は必須である。私は、ホヤのホメオドメイン転写因子をコードする遺伝子の構造解析、発生における発現、機能、転写調節機構の解析を行ってきたが、その過程で、動物の発生を考える上で鍵となる発生遺伝子(鍵発生遺伝子)の発現パターンが、ホヤと脊椎動物との間でよく保存されている例があることを見出した(例えば *Hox1*, *Otx*; Katsuyama et al., *Development* 121, 3197-3205, 1994, Wada et al., *Development* 125, 1113-1122, 1998)。さらに、*Hr* と *Ci* の *Otx* 遺伝子の転写調節機構(卵割期内胚葉でのもの)が2種間で保存されていること、その保存性の基盤は少数の転写因子結合部位の保存にあること、そして、ホヤで見いだされた機構の一部は高等脊椎動物でも保存されていることを明らかにした(Oda-Ishii et al., *Development* 132, 1663-1674, 2006)。

このように、脊索動物の基本的な発生プログラムを解明する方策として、2種のホヤに着目するアプローチが有効であることを示したが、その一方で、鍵発生遺伝子の発現が2種のホヤ間で異なる場合があるこ

と(例えば *Pitx*; Morokuma et al., *Dev. Genes Evol.* 212, 439-446, 2002) また、類似した遺伝子発現でも、異なる転写調節機構によって作り出される可能性を考えなければならない場合があることがわかった(例えば Ikuta and Saiga, *Dev. Biol.* 312, 631-643, 2007)。

従って、ホヤの発生で働いていると想定される脊索動物の基本的な発生プログラムには、どのような揺らぎが含まれるのか、すなわち鍵発生遺伝子の機能、転写調節機構の保存性だけではなく、変化し得た部分「可塑性」-を解明する必要があるとの考えに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1)動物の発生で前後軸に沿ったボディプランを司る発生遺伝子 *Hox* 遺伝子のクラスターについて、(2)前方部の形成を司る *Otx* 遺伝子の発生過程における転写調節機構の変化について、*Hr* と *Ci* について、それぞれ解析する。両者の結果を比較し、保存性と可塑性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1)ホヤの *Hox* 遺伝子のクラスター：  
*Hr* ゲノムから単離した *Hox* 遺伝子断片をもとに RT-PCR を行うことにより、*Hox* 遺伝子の homeodomain 配列を推定し、系統樹を作成することにより、*Hr* ゲノム中の *Hox* 遺伝子を同定する。*Hr* の BAC library を活用して、2色の蛍光染色体 in situ hybridization、染色体歩行を行う事により、クラスター構造を明らかにする。既に明らかにしている *Ci* のものと比較する。

(2)ホヤの *Otx* 遺伝子の転写調節機構：  
レポーターアッセイにより、2種のホヤで *Otx* 遺伝子の転写調節領域を同定する。さらに、同定した領域内の転写因子結合部位に突

然変異を導入してレポーターアッセイを繰り返すことにより、転写調節活性に重要な転写因子を推定する。これを2種のホヤで行い、その結果を比較検討する。

#### 4. 研究成果

(1)ホヤのHox遺伝子のクラスター:*Hr*の9個のHox遺伝子候補の系統樹解析を行った結果、*Hr*の9個の遺伝子の内8個は*Ci*のものと相同な遺伝子であること、残りの1個は*Ci*のどのHox遺伝子とも系統樹上で挙動を共にすることのない遺伝子であるが、この遺伝子はHox遺伝子のパラロググループ(PG)6-8に属する遺伝子(*Hox6/8*)であることが示唆された。9個のHox遺伝子は*Ci*とは異なって1本の染色体上に並ぶこと、そしてその並び順を明らかにした。*Hr*と*Ci*の比較から、ホヤではHox遺伝子のメンバーは9個、クラスターは崩壊しているが、その様式はホヤにより異なることが示唆された。さらに、興味深いことに崩壊の仕方は2種のホヤで異なっているものの、保存された遺伝子の配置も見出された。これらの知見と既知の新口動物におけるHox遺伝子クラスターに関する情報を勘案し、ホヤの進化におけるクラスター構造の崩壊過程を推察・提唱した(論文投稿中)。

(2)ホヤの*Otx*遺伝子の転写調節機構:中枢神経系の前方の領域化に関わる*Otx*遺伝子は、発生を通して脳胞の系譜で連続的に発現する。*Hr*と*Ci*の*Otx*遺伝子の脳胞細胞系譜での各発生段階でのエンハンサー、その活性に重要な転写因子結合部位の推定をレポーター遺伝子GFPのmRNAの検出を指標として調べた。その結果、2種のホヤでエンハンサーはそれぞれ複数あること、それらの活性に重要な転写因子結合部位は時期特異的に変化すること、変化の仕方は2種のホヤで異なること、従って、よく類似した発現パターン

が発生の進行とともに異なる機構で作り返されていることが明らかになった。

#### 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6件)

Sasakura, Y., Ogura, Y., Treen, N., Yokomori, R., Park, S. J., Nakai, K., Saiga, H., Sakuma T, Yamamoto T, Fujiwara S, Yoshida K. (2016) Transcriptional regulation of a horizontally transferred gene from bacterium to chordate. Proc Biol Sci. 2016 Dec 28;283(1845). doi: 10.1098/rspb.2016.1712.

Kawai, N., Ogura, Y., Ikuta, T., Saiga, H., Hamada, M., Sakuma, T., Yamamoto, T., Satoh, N. and Sasakura, Y. (2015) Hox10-regulated endodermal cell migration is essential for development of the ascidian intestine. Dev. Biol. 403, 43-56.

Oonuma, K., Hirose, D., Takatori, N. and Saiga, H. (2014) Analysis of the transcription regulatory mechanism of *Otx* during the development of the sensory vesicle in *Ciona intestinalis*. Zool. Sci. 31, 565-572.

Oonuma, K., Hirose, D., Takatori, N. and Saiga, H. (2014) Continuous expression of *Otx* in the anterior neural lineage is supported by different transcriptional regulatory mechanisms during the development of *Halocynthia roretzi*. Dev. Growth & Differ. 56, 189-198.

Ikuta, T., Chen, Y.-C., Annunziata, R., Ting, H.-C., Tung, C.-H., Koyanagi, R., Tagawa, K., Humphreys, T., Fujiyama, A., Saiga, H., Satoh, N., Yu, Jr-K., Arnone, M. I. and Su, Y.-H. (2013) Identification of an intact ParaHox cluster with temporal colinearity but residual spatial colinearity in the hemichordate *Ptychodera flava*. BMC Evol. Biol. 13, 129.

Nakazawa, K., Yamazawa, T., Moriyama, Y., Ogura Y., Kawai N., Sasakura Y. and Saiga, H. (2013) Formation of the digestive tract in *Ciona intestinalis* includes two distinct morphogenic processes between its anterior and posterior parts. Dev. Dyn. 242, 1172-1183.

〔学会発表〕(計 8 件)

Sekigami, Y., Kobayashi, T., Omi, A., Nishitsuji, K., Satoh, N., Fujiyama, A. and Saiga, H. (2017) Analysis of the Hox gene cluster of the ascidian *Halocynthia roretzi* suggests multiple steps of the cluster disintegration during the course of ascidian evolution. The 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Tokyo. 5月10日

Sekigami, Y., Kobayashi, T., Omi, A., Ikuta, T., Fujiyama, A., Satoh, N. and Saiga, H. (2015) Hox gene cluster structure in *Halocynthia roretzi* genome. The 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Tsukuba. 6月2日

Nakazawa, K., Yamazawa, T., Moriyama, Y., Ogura, Y., Kawai, N., Sasakura, Y. and Saiga, H. (2015) Formation of the digestive tract in *Ciona intestinalis* includes distinct morphogenetic processes between its anterior and

posterior parts. The 8<sup>th</sup> International Tunicate Meeting, Aomori. 7月13日

Sekigami, Y., Fujiyama, A., Satoh, N. and Saiga, H. (2015) Hox gene cluster structure in *Halocynthia roretzi* genome. The 8<sup>th</sup> International Tunicate Meeting, Aomori. 7月13日

Oonuma, K., Takatori, N. and Saiga, H. (2014) Analysis of the transcription regulatory mechanism of *Otx* gene in the cells to form the neural tube in two ascidian species, *Halocynthia roretzi* and *Ciona intestinalis*. The 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Nagoya. 5月27日

大沼耕平, 高鳥直士, 西齋秀俊 (2014) 2種のホヤの神経管の発生における *Otx* 遺伝子の比較解析 Analysis of the transcription regulatory mechanisms of *Otx* gene in the developing neural tube of two ascidians. 日本動物学会第85回大会, 仙台. 9月11日

Morita, C., Takatori, N. and Saiga, H. (2013) Relationship between the onset of *Hr-Nodal* expression and the neurula rotation in the development of *Halocynthia roretzi*. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸. 12月3日

Oonuma, K., Takatori, N. and Saiga, H. (2013) Analysis of transcriptional regulatory mechanisms of *Otx* in the developing central nervous system of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸. 12月3日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

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・客員教授  
研究者番号：60131918

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )