

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570207

研究課題名（和文）ホヤの発生に内在する脊索動物の基本的な発生機構の保存性と可塑性

研究課題名（英文）Basic developmental mechanisms involved in the ascidian development: its conservation and plasticity

研究代表者

西駕秀俊（SAIGA HIDETOSHI）

首都大学東京・理工学研究科・生命科学専攻

研究者番号：60131918

研究成果の概要（和文）：本研究では、動物の発生を司る鍵発生遺伝子のいくつかについて、マボヤとカタユウレイボヤの2種について、発生における構造、機能、転写調節機構の解析を行った。その結果、ホヤのオタマジヤクシ幼生をつくる過程には、鍵発生遺伝子の発現、機能について、保存されているもの、変化しているものが混在していることが分かってきた。これらの結果は、脊索動物の発生機構の特徴とは何か、そこにはどの程度の可塑性があるのかを明らかにする手掛かりとなる。

研究成果の概要（英文）：In the present research, I have analyzed the structure, expression, function and transcriptional regulation in the development of two phylogenetically remote ascidians, *Ciona intestinalis* and *Halocynthia roretzi*. The analyses have shown that some aspects are well conserved and others are not between the two ascidian species. These results should provide important clues to further understand basic developmental features for ascidians and chordates.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：進化発生 発生遺伝子 ホヤ Hox 遺伝子

## 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とカタユウレイボヤは、二つの目を代表する種である。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。しかし両種は、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ヤ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機構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。ホヤの発生遺伝子の内、応募者は、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先駆的に行ってきた。その過程で、応募者は、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）。さらに応募者は、マボヤとカタユウレイボヤの 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., 132, 1663-1674, Development, 2005)。このように、脊椎動物の基本的な発生機構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が分かったが、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が分かってきた (Pitx; Morokuma et al. Dev. Genes Evol. 212, 439-446, 2002, Christiaen et al., Dev. Biol. 277, 557-566, 2005 等)。また、同じような遺伝子発現でも、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ぬ場合が出てきた。従って、ホヤの発生で働いていると想定される脊椎動物の基本的な発生機構には、どのような揺らぎ、あるいは「しなやかさ」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」-を明らかにする必要があるとの考えに至った。

ホヤの Hox 遺伝子については、応募者は染色体蛍光 in situ hybridization (FISH) 法を導入し、初めてホヤ（カタユウレイボヤ）の Hox 遺伝子のクラスター構造の解明、発現の解析を行った (Ikuta et al., PNAS 101, 15118-15123, 2005)。最近では、脊椎動物の起原を考える上で半索動物ギボシムシに関する情報も必要と考え、そのクラスター構造の解明に取り組んだ。これらの Hox 遺伝子の研究結果から、脊椎動物あるいは新口動物の始原生物は、恐らく 10 個以上のメンバー遺伝子が揃った Hox 遺伝子クラスターを持ち、ホヤを含めた尾索動物の成立時に大規模なゲノム再編と発生様式の変化が起こったとするシナリオを提唱した (Ikuta and Saiga, Dev. Dyn. 233, 382-389, 2005)。このシナリオを検証するためには、カタユウレイボヤの発生における Hox 遺伝子の機能を明らかにすること、またマボヤでは Hox 遺伝子のクラスター構造を明らかにすることが必要である。このような Hox 遺伝子に関する情報は、ホヤの進化の系譜での鍵発生遺伝子の「可塑性」、さらにゲノムの進化を理解する上でも必要・有用である。以上のような考えから、本研究の立案に至った。

## 2. 研究の目的

動物の発生を制御する鍵発生遺伝子については、カタユウレイボヤとマボヤ間だけでなく脊椎動物間で発現が保存されている Otx の中枢神経系前方での転写調節機構を2種のホヤについて解明する（予備的実験では、卵割期のものと異なった機構が示唆されている）。2種のホヤ間で発現パターンに保存された部分と保存されていない部分を合わせ持つ遺伝子 Pitx について研究を拡張し、転写調節機構と発現に違いを生む機構を解明する。

Hox 遺伝子については、カタユウレイボヤで見られたクラスター構造の崩壊がマボヤでも同様に起こっているのか否かを、FISH を行って明らかにする。そして、尾索動物の成立と進化を考える手掛かりを得るため、カタユウレイボヤの発生における Hox 遺伝子の機能を解明する。

以上のようなホヤの鍵発生遺伝子の研究を通して、脊椎動物の基本的な発生機構と、その保存性と可塑性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では次の二つの項目について以下に述べる研究を計画する。

(1) ホヤの鍵発生遺伝子の転写調節機構の解明と保存性、可塑性の解析

(2) ホヤの Hox 遺伝子の構造と機能の解析

(1) では、2種のホヤを用いて、主としてレポーターアッセイによる転写調節領域とその中に含まれる転写因子結合部位の同定、レポーターコンストラクトのスイッチ実験を行う。

(2) では、マボヤについて BAC ライブラリースクリーニングを行い、FISH により Hox 遺伝子クラスター構造を明らかにする。カタユウレイボヤでは、発生過程での Hox 遺伝子の機能解析を行う。

## 4. 研究成果

本研究は、系統的に遠く、従ってゲノムに類似性は乏しいが、極めて類似した発生を示す2種のホヤについて、重要な発生遺伝子の構造、発現、機能、転写調節を解析し、その保存性の程度を解明し、ホヤの発生戦略のしなやかさを理解することを目指す、ユニークな研究である。今回の研究では、とくに以下の(2)の Hox 遺伝子の研究に関して、インパクトのある成果が得られたが、その他にも重要な成果、今後の研究の発展に資する興味ある知見が得られている。

(1)

①ホヤ幼生の付着突起は、アフリカツメガエル幼生のセメント腺と相同な器官であるとされている。マボヤでは、Pitx 遺伝子 *Hr-Pitx* が神経胚期から付着突起形成領域で発現する。*Hr-Pitx* の発現制御機構を調べ、Pitx が *Otx* の下流にあることを示した。セメント腺でも *Otx* の下流に Pitx があることが分かっており、Pitx-*Otx* の遺伝子発現カスケードは、ホヤと脊椎動物の付着器官の発生で保存されていることを提唱した。興味深いことに、この遺伝子カスケードはカタユウレイボヤにはなく、ホヤにおける発生プログラムの可塑性の研究に良いパラダイムを提供する重要な成果といえることができる。

②ホヤ幼生の中樞神経系の領域化に関わると想定されている発生遺伝子の前後軸に沿った発現パターンは、脊椎動物との間でも保存されている。中樞神経系前方で発現する *Otx* 遺伝子については、GFP レポーターの蛍光を指標にした先行研究で見出されていたマボヤ、カタユウレイボヤの原腸胚期以降の脳細胞系譜でのエンハンサーとその活性に重要な転写因子結合部位を、GFP mRNA を指標として調べ直した結果、これまで不明であったカタユウレイボヤの尾芽胚期脳細胞での発現を再現するエンハンサーを、翻訳開始点の上流約 2.8-3kb に見出した。さらに、このエンハンサーが後期原腸胚期から初期尾芽胚期まで、脳細胞の系譜で働くことを見出した。

③脊椎動物でオーガナイザー因子の一つとして知られる Not 遺伝子は、ホヤの発生においては中内胚葉の発生運命の分離に関わる鍵遺伝子であること (Takatori et al. Dev. cell, 2010)、そして最も早く発現する接合子遺伝子の一つであることが分かっている。発生初期での発現パターンはマボヤ、カタユウレイボヤで保存されている。Not 遺伝子の活性化機構について解析が行われ、マボヤ、カタユウレイボヤともに翻訳開始点の上流約 0.4 kbp あるいは 0.3kb の中に、接合子遺伝子としての活性化に必要な領域が含まれること、その中にある転写因子 GATA の結合部位が、突然変異導入実験により、活性化に重要であることが示された。

④発生の過程でみられる非対称性に関する研究が、ホヤを用いて行われている。カタユウレイボヤでは、尾芽胚期に左側の表皮で特異的に Nodal 遺伝子が発現する。左側特異的 Nodal シグナリングの新規下流遺伝子であることが明らかにされた目の形成に必須なホメオボックス遺伝子 *Ci-Rx* (Yoshida and Saiga, 2010) の転写調節について、Nodal シ

グナリングによる負の制御に必要な領域を特定する方法を工夫し、*Rx* の転写抑制領域を翻訳開始点の上流 0.7kb にまで狭めた。この中には、*Ci-Rx* の転写を正に制御する転写因子 Onecut、Clox の結合部位の他に、Nodal シグナリングを介在する転写因子 Smad の結合部位があり、突然変異導入実験からこの Smad 結合部位が Nodal シグナリングによる抑制に関わっていることを見出した。今後のさらなる解析が待たれる。

(2)

①カタユウレイボヤの Hox の機能について、幼生期までに発現が検出された 7 個の遺伝子について、アンチセンスモルフォリノオリゴによる翻訳阻害を試みた。その結果、幼生に至る発生について役割が明確に分かったものは Hox12 と Hox10 だけであった。Hox12 は、尾芽胚期に尾の先端で発現し、FGF を介して尾の伸長を制御していること、Wnt を介して尾の先端の細胞の形態を制御していることを明らかにした。Hox10 については、神経細胞の個性決定に関わっていることを明らかにした。この結果が、ホヤの幼生までの発生で、Hox 遺伝子の役割は限られていることを示す (Ikuta et al., Development, 2010)。この論文を発表した時には、Development 誌の論文紹介欄に「Hox を要しない前後軸のパターン化」として取り上げられた。

②上に述べた結果に加えて、我々はこれまでにクラスター構造は壊れていること、にもかかわらずコリアリティを思わせるような発現パターンが幼生の神経管や幼若体の消化管でみられること (Ikuta et al., PNAS 2004) 等を明らかにしてきた。これらの知見は、他の動物に類例をみないが、ホヤの中では、どの程度保存されているのか、一般的であるのか否かについての情報はなかった。そこで、ホヤ綱を構成する二つの目のうち、カタユウレイボヤとは異なる壁性目に属するマボヤ Hox 遺伝子のクラスター構造の解析を開始した。

まず、マボヤの Hox 遺伝子の構成を調べた。マボヤでは、カタユウレイボヤの 9 個の Hox 遺伝子に相応する 9 個の Hox 遺伝子があること、初期胚の押しつぶし標本を作製して、染色体数が 8 ( $2n=16$ ) であることを明らかにした。そして染色体 FISH を行って、カタユウレイボヤの場合とは異なって、一つの染色体にあることを明らかにした。さらに BAC ライブラリーを用いた染色体歩行を行って、Hox1 を除く 8 個の遺伝子の並び順を、ホヤで初めて明らかにした。ホヤが脊椎動物への進化の系譜から分かれた時に Hox 遺伝子クラスターに起きた変化を理解する糸口が得られたといえることができ、今後の遺伝子の配置に

関する解析が大きな成果を産むことが期待される。

③ 9個のHox遺伝子の同定について再検討したところ、系統樹で高いブートストラップ値で支持されるのは anterior Hox 遺伝子グループ (Hox1, 2, 3, 4) だけであった。central および posterior グループの遺伝子は、近い将来適切に命名し直されるべきである。

#### 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5件)

① Yoshida, K., Ueno, M., Niwano, T. and Saiga, H. (2012) Transcription regulatory mechanism of *Pitx* in the papilla-forming region in the ascidian, *Halocynthia roretzi*, implies conserved involvement of *Otx* as the upstream gene in the adhesive organ development of chordates. *Dev. Growth & Differ.* 査読有、54, 649-659.

② Freeman, R.F., Ikuta, T., Wu, M., Koyanagi, R., Kawashima, T., Tagawa, K., Humphreys, Fang, G.-C., Fujiyama, A., Saiga, H., Lowe, C., Worley, K., Kirschner, M., Rokhsar, D., Satoh, N. and Gerhart, J. (2012) Identical genomic organization of two hemichordate Hox clusters. *Curr. Biol.* 査読有、22, 2053-2058.

③ Yoshida, K. and Saiga, H. (2011) Repression of *Rx* gene on the left side of the sensory vesicle by Nodal signaling is crucial for right-sided formation of the ocellus photoreceptor in the development of *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 査読有、354, 144-150.

④ Kobayashi, M., Takatori, N., Nakajima, Y., Kumano, G., Nishida, H. and Saiga, H. (2010) Spatial and temporal expression of two transcriptional isoforms of *Lhx3*, a LIM class homeobox gene, during embryogenesis of two phylogenetically remote ascidians, *Halocynthia roretzi* and *Ciona intestinalis*. *Gene Exp. Patterns* 査読有、10, 98-107.

⑤ Ikuta, T., Satoh, N. and Saiga, H. (2010) Limited functions of Hox genes in the larval development of the ascidian,

*Ciona intestinalis*. *Development* 査読有、137, 1505-1513.

[学会発表] (計11件)

① Sekigami, Y., Kobayashi, T., Omi, A., Ikuta, T., Fujiyama, A., Satoh, N. and Saiga, H. (2012) Cluster structure and developmental expression of Hox genes in the *Halocynthia roretzi*, a phylogenetically remote ascidian from *Ciona intestinalis*. Joint Meeting of the 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Kobe.

② 大沼耕平, 西駕秀俊 (2012) ホヤの脳胞の発生における *Otx* 遺伝子の転写制御機構と保存性の解析 Analysis of the transcriptional regulatory mechanism of *Otx* in the sensory vesicle development and of its conservation between two ascidian species. 日本動物学会第83回大会, 大阪.

③ 関上由佳, 小林拓矢, 尾見歩惟, 生田哲朗, 藤山秋佐夫, 佐藤矩行, 西駕秀俊 (2012) マボヤのHox遺伝子のクラスター構造と発現の解析 Analysis of the cluster structure and expression of Hox genes in the ascidian, *Halocynthia roretzi*. 日本動物学会第83回大会, 大阪.

④ 中澤啓一, 山澤拓実, 吉田慶太, 小椋陽介, 河合成道, 笹倉靖徳, 西駕秀俊 (2012) カタユウレイボヤにおける左右非対称な消化管形成過程の解析 Morphological analysis of the left-right asymmetric digestive tract formation in the ascidian, *Ciona intestinalis*. 日本動物学会第83回大会, 大阪.

⑤ Yoshida, K. and Saiga, H. (2011) Repression of *Rx* gene on the left side of the sensory vesicle by Nodal signaling is crucial for right-sided formation of the ocellus photoreceptor in the development of *Ciona intestinalis*. The 6th International Tunicate Meeting, Montreal, Canada.

⑥ 大沼耕平, 西駕秀俊 (2011) マボヤの *Otx* 遺伝子の脳胞における転写調節機構の解析 Analysis of transcription regulatory mechanisms of *Otx* in the developing central nervous system of the ascidian, *Halocynthia roretzi* 日本動物学会第82回

大会, 旭川.

⑦ 関上由佳, 小林拓矢, 尾見歩惟, 生田哲朗, 藤山秋佐夫, 佐藤矩行, 西駕秀俊 (2011) マボヤのHox遺伝子の解析 Analysis of Hox genes in the ascidian, *Halocynthia roretzi*. 日本動物学会第 82 回大会, 旭川.

⑧ 山澤拓実, 西駕秀俊 (2011) カタユウレイボヤの消化管形成過程の解析 Morphological analysis of the digestive tract formation in the ascidian, *Ciona intestinalis*. 日本動物学会第 82 回大会, 旭川.

⑨ 吉田慶太, 上野元子, 西駕秀俊 (2011) マボヤの*Pitx* の付着突起形成領域での発現は*Otx* により制御される Expression of *Pitx* in the papilla region is regulated by *Otx* in the development of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. 日本動物学会第 82 回大会, 旭川.

⑩ Ikuta, T., Satoh, N. and Saiga, H. (2010) Limited functions of Hox genes in the larval development of the ascidian *Ciona intestinalis*. 43<sup>rd</sup> Annual Meeting for the Japanese Society for Developmental Biologists jointly sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network, Kyoto.

⑪ Yoshida, K. and Saiga, H. (2010) Nodal signaling controls left-right asymmetric ocellus formation in *Ciona intestinalis*. 43<sup>rd</sup> Annual Meeting for the Japanese Society for Developmental Biologists jointly sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network, Kyoto.

## 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・教授  
研究者番号 : 60131918

### (2) 研究分担者

無し