

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 24年 5月 21日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870018

研究課題名（和文） ホヤ中枢神経系における遺伝子調節ネットワークのモデル化と検証

研究課題名（英文） Modeling and experimental analysis of Gene Regulatory Networks of the ascidian CNS

研究代表者

佐藤 薫 (SATOU KAORU)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：00447921

研究成果の概要（和文）：ホヤの原腸胚期の中枢神経系で発現する転写制御因子を網羅的に調べた。その発現プロファイルを元に1つ1つの転写制御因子のモルフォリノオリゴヌクレオチドを用いて機能阻害し、その下流遺伝子の影響を調べることにより遺伝子調節ネットワーク構築した。この遺伝子調節ネットワークに基づき転写制御のモデルを構築した。

研究成果の概要（英文）：

Systematic gene disruption assays by morpholino oligonucleotide injection provided gene circuit diagrams for each cells in the Ascidian CNS. Based on this gene regulatory network, I constructed a model for the mechanism of transcription in Ascidian CNS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：転写・ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

動物の発生における遺伝子調節ネットワークの研究は多くの動物で研究されている。近年の研究の進展によって、格段の進歩があったものの、遺伝子調節ネットワークの動作原理のモデル化にはほとんど成功していない。たとえば、遺伝子のシス制御調節機構については定性的なレベルでほとんどの現象が説

明可能なのか、定量的データが必要なのか、という点についても議論がある。こうした問題に答えるための一つの重要な点は、ゲノムにコードされるすべての調節遺伝子について、細胞の単位で正確な発現パターンが必要なことである。限られた部分的な情報では十分なモデル化は難しいためである。この点において、ホヤは格好の研究材料である。私は

すでにホヤのゲノムにコードされている調節遺伝子について、その胚発生における発現パターンが網羅的・体系的に解析し、細胞単位で明らかにしており、この点において、ホヤは格好の研究材料である。また、モデルは実験的に検証することが大切であるが、ホヤ胚では後述のように容易に検証可能である。

私のこれまでの研究では初期胚を主に扱ってきたが、初期胚では胚性の発現パターンからだけでは十分なモデル構築ができなかった。これはおそらく母性因子の影響が大きいためであると考えられる。そこで、モルフォリノオリゴを用いたノックアウト実験により網羅的にその制御関係を調べを試み、初期胚における遺伝子調節ネットワークを解析した。

原腸胚～尾芽胚の中樞神経系の遺伝子調節ネットワークの解析では、前方の中樞神経系細胞における遺伝子発現パターンを記載することが難しく、必ずしも包括的な解析が出来なかったこと、複雑な発現パターンを持つ遺伝子が多く、受精卵へのモルフォリノオリゴなどの顕微注入ではこうした遺伝子について特定の細胞での機能を調べることが難しいという問題点があった。

その後の実験技術の向上によって前方の中樞神経系細胞における発現パターンの解析が可能になったので、本研究では母性因子の影響が少ないと考えられる原腸胚を対象をしぼり、研究を行う。

すなわち、原腸胚での中樞神経系における遺伝子調節ネットワークの解析を行い、遺伝子の発現パターンの変化を合理的に定性的なレベルで説明できるモデルを構築し、実験的に検証する。それを通じて発生における転写調節の論理を定性的に理解したい。

2. 研究の目的

ホヤ幼生の中樞神経系は初期原腸胚（110細胞期）24個（片側12個）の細胞に由来する。これらの細胞は後期原腸胚期までに二度分裂し、生じる96個の細胞のうち88個が中樞神経系へと分化していく。この間におおよその運命が決まり、たとえば中期原腸胚のA9.29と呼ばれる細胞が分裂して生じる後期原腸胚のA10.57は運動神経に分化し、A10.58は尾部神経索側面の上位細胞に分化する。

本研究ではこの初期原腸胚から後期原腸胚における調節遺伝子の発現パターンの変化に注目して解析を行う。すなわち初期原腸胚の発現プロファイルをもとに次の分裂後の中期原腸胚期の発現パターンを説明出来るモデル、中期原腸胚の発現パターンをもとにさらに1回分裂を経た後の後期原腸胚の発

現パターンを説明できるモデルを作り、実験的に検証する。

これまでの遺伝子ノックダウン等の解析によれば、例えば神経節前方になる割球（A9.30）では *notch* シグナリングの存在と転写制御因子 *ZicL* の発現によって *FGF8* の発現が活性化する。隣り合う後方神経索になる割球（A9.32）では *notch* シグナリングの存在と *ZicL* が発現しているにもかかわらず、*FGF8* が発現しない。これはこの細胞では *snail* の発現が抑制的に働いているためである。つまり、*notch* シグナリング+*ZicL* なら *FGF8* の発現がおこり、*notch* シグナリング+*ZicL*+*snail* なら *FGF8* の発現は起こらない。こうした関係をすべての調節遺伝子の発現について、各ステージの遺伝子発現パターン、すでに解析済みの遺伝子の制御関係の情報を用いてその変化を説明する定性的なモデルを構築する。

上述の例ではさらにその隣の割球（A9.16）では *notch* シグナリングが存在し、*ZicL* が発現し、*snail* が発現していないにもかかわらず *FGF8* は発現しない。これはこの割球で発現する別の調節遺伝子の影響であると予測される。それがどの調節遺伝子であるのかをモデルは予測するはずである。

他の多くのモデル生物においても遺伝子調節ネットワーク研究が行われている。しかし背景の項でも述べたように、それらの遺伝子調節ネットワーク研究では細胞の単位ではなく組織、あるいは領域単位でのネットワークであるが、ホヤでは細胞単位で解析がおこなわれており、細胞の単位で正確にモデル化できるところが優れた点である。

このホヤの特長を生かし、各割球での転写制御因子の発現に必要な転写制御因子の組み合わせ（コード）を探るのが本研究の目的である。

また、本研究では、原腸胚期に中樞神経系に発現するすべての調節遺伝子の発現パターンが基礎となっている。遺伝子の発現制御の全体像を理解するには、一つの遺伝子の制御に関わる調節因子を網羅的に同定することが必要である。

従って、本研究のように、網羅的な発現解析を起点とする方法を用いることは、調節遺伝子の転写制御因子の発現パターンの変化を論理的に説明するためには非常に有効であると考えられる。そのような研究が可能でかつ実際に進めているのは、ホヤ以外にない。

本研究により、遺伝子調節ネットワークの進行が論理的に説明出来れば、動物の発生を転写レベルで包括的にとらえる先駆的研究成果になるはずである。また、ホヤのもつ背側中樞神経系は、脊索動物を特徴づけるものであり、脊索動物の起源において獲得された遺伝子調節ネットワークの変化についても

大きな洞察を与えられるものと考えている。

3. 研究の方法

初期原腸胚から後期原腸胚にかけて中枢神経系に発現する調節遺伝子の発現プロファイルにもとづいて体系的に各遺伝子の発現パターンを説明できる調節遺伝子の組み合わせのモデルを作り、そのモデルを実験的に検証する。その方法は、遺伝子のノックダウンによる下流遺伝子の発現の増減を *in situ* ハイブリダイゼーションや RT-qPCR によって検証する。

さらに、モデルから予測された組み合わせすべてについて転写制御因子を中枢神経系で異所的に発現させ、下流遺伝子の発現を異所的に実現できるかどうか調べる。

4. 研究成果

初期原腸胚から後期原腸胚にかけて中枢神経系に発現する調節遺伝子の数は発現プロファイル (図 1) の研究結果によると 57 個である。これまでの発現パターンの解析は、中期・後期原腸胚においては細胞単位で行われていなかったもので、A 系列、b 系列と呼ばれる系譜の中枢神経系の細胞についてはその後改めて細胞単位での発現解析を行った。

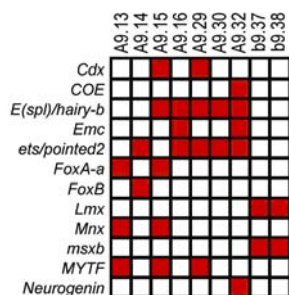


図 1 調節遺伝子の発現プロファイル

技術的な進展によりさらに細かい細胞の同定が可能になったので、本研究では a 系列と呼ばれる細胞系譜の中枢神経系の細胞群にも解析の対象を拡げた。それによって、ホヤゲノムにコードされる調節遺伝子すべてのうち、この時期の中枢神経系の細胞に発現する遺伝子の発現パターンが網羅的に明らかになった。この時期には細胞間で盛んに相互作用をしていると考えられているので、それを考慮に入れつつ、この発現プロファイルにもとづいて体系的に各遺伝子の発現パターンを説明できる調節遺伝子 8 個の組み合わせのモデルを作った (図 2)。

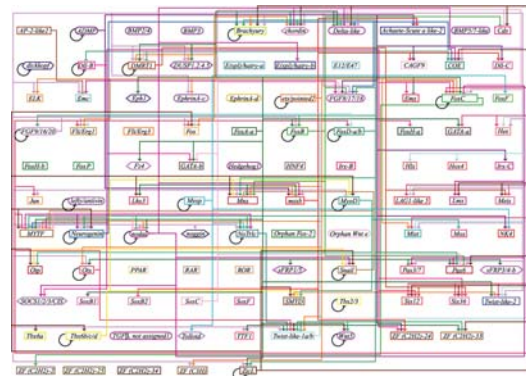


図 2 中枢神経系に発現する調節遺伝子の遺伝子調節ネットワーク

まず、機能解析がほとんど行われていない a 系列の中枢神経系の細胞において、遺伝子のノックダウンによる下流遺伝子の発現の増減を *in situ* ハイブリダイゼーションや RT-qPCR によって検証することにより、これまであきらかにした中枢神経系での転写制御ネットワークをさらに拡張した。さらに、初期原腸胚より中枢神経系全体で特異的に発現する ETR 遺伝子のエンハンサーなどを利用し、調節遺伝子の異所的発現用のコンストラクトを作成しつつある。そしてモデルから予測された組み合わせで転写制御因子を中枢神経系で異所的に発現させ、下流遺伝子の発現を異所的に実現できるかどうか調べる。現在はこの異所的発現データの解析中である。DNA コンストラクトによる異所的発現は受精卵へのエレクトロポレーションによって簡単に行うことができ、大量解析に適している。この方法により、モデルによって予想された組み合わせすべてについて網羅的に行う。その結果によって説明がつかない部分があれば、モデルを見直すとともに、定量的な解析も視野に入れる。

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 1 件)

① Kubo, A., Suzuki, N. Xuayang, Yuan. Nakai, K. Satoh, N. Imai, K. S. and Satou, Y., Development, 査読有, the company of biologists, 137, 2010, pp1613-1623, DOI: 10.1242/dev.046789

〔学会発表〕(計 3件)

① Imai, K. S. and Satou, Y. Pinhead functions as a negative regulator of ADMP in *Ciona intestinalis*, 第82回日本動物学会、旭川、2011年9月21日

② Imai, K. S. and Satou, Y. Pinhead functions as a negative regulator of ADMP in *Ciona intestinalis*, 2nd joint meeting of the French and British Societies for Developmental Biology、ニース(仏)、2011年9月4日

③ Imai, K. S. Pin functions as a negative regulator of BMP signaling, The 4th International Symposium of the Biodiversity and Evolution Global COE project, 京都、2011年7月9日

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 薫 (SATOU KAORU)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：00447921

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし