

## 研究課題別事後評価結果

### 1. 研究課題名： 特異的・新規発生遺伝子の機能の網羅的解析

### 2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

佐藤 矩行 (京都大学大学院理学研究科 教授)

主たる共同研究者

安住 薫 (北海道大学大学院薬学研究科 助手)

高橋 弘樹 (基礎生物学研究所 助手)

### 3. 研究内容及び成果：

#### 研究課題全体の成果

転写因子をコードする遺伝子や細胞間シグナル分子をコードする遺伝子は動物の体づくりに重要な役割を担う。これまでにその機能が明らかにされている遺伝子に加え、未だ機能未知の新規の遺伝子が発生に重要な働きを果たしている可能性は極めて高い。また発生関連遺伝子は単独で機能するよりも複雑なネットワークを構成しつつ働いていると考えられる。ホヤの受精卵は発生してオタマジャクシ型幼生になるが、このオタマジャクシ型幼生は脊索や背側中枢神経系をもち、脊索動物ボディープランの最も単純な形を表している。

我々は日米の共同研究でカタユレイボヤ (*Ciona intestinalis*) のドラフトゲノムを解読し、約 160 Mb のゲノムの中に約 15,800 のタンパク質をコードする遺伝子が存在することを明らかにした。このうち転写因子およびシグナル分子をコードする遺伝子は脊索動物に基本的なものであり、しかも脊椎動物でみられる遺伝子の重複がほとんどない。こうしたホヤの特徴を生かして、特異的・新規発生遺伝子の機能を、既知遺伝子の新規機能の探索とともに、できるだけ網羅的に解析することをめざした。また、複雑な発生過程をネットワークとして理解する発生ゲノム科学的研究を展開した。その結果、初期発生を司る遺伝子ネットワークの解明、マイクロアレイを利用した発生遺伝子の発現と機能の解析、新規発生遺伝子の機能の解析、既知遺伝子の新規の機能の解析、挿入突然変異体の作製による遺伝子の機能解析などで多くの成果が得られた。本プロジェクトは、カタユレイボヤを発生ゲノム科学の一つの研究系として確立することに大きく貢献した。

#### 各グループの成果

##### [佐藤グループ]

(A) 初期発生を司る遺伝子ネットワークの解明： ゲノム解読をうけて、カタユレイボヤのゲノムに含まれる転写因子をコードする遺伝子とシグナル分子をコードする遺伝子を正確に同定した。その結果、このホヤのゲノムに存在する 669 個の転写因子遺伝子のうち 359 個をコア転写因子遺伝子として、また 118 個のシグナル分子遺伝子をコアなものとして研究を進めた。これらの中で 53 個の転写因子遺伝子および 23 個のシグナル分子遺伝子が発生運命の限定がおこる 16~110 細胞期に発現することがわかり、これら 76 個の遺伝子一つ一つの機能をモルフォリノ・オリゴヌクレオチド(MO)で阻害した時に他の 75 の遺伝子にどのような影響が及ぶかを調べた結果、これらの遺伝子は 3000 以上の要素からなるネットワークを構成しつつ協調的に働いていることが明らかになった。

(B) ホヤ発生遺伝子の染色体マッピング： 発生遺伝子の発現と機能をよりゲノム科学的に解析するために、二色 FISH 法によるゲノム情報の染色体マッピングを行った。その結果、上に述べコア転写因子遺伝子およびコア細胞間シグナル分子遺伝子の約 96%を染色体上にマップし、発生運命の限定に関わる遺伝子ネットワ

ークを染色体レベルでとらえることが可能になった。

(C) 新規発生遺伝子の機能の解析: カタユレイボヤゲノムには少なくとも 2,500 の機能未知の新規遺伝子が存在する。そこで、脊椎動物に相同遺伝子のある機能未知遺伝子を中心に MO を用いた翻訳阻害による大規模スクリーニングを行い、これまでに 504 遺伝子のスクリーニングを完了した。その結果、111 遺伝子は機能阻害によって幼生期に何らかの形態異常を引き起こし、さらにこのうち 34 遺伝子は主要 6 組織の分化に関わっていることが示された。特に 5 遺伝子の機能阻害胚は  $\beta$  カテニン機能阻害胚と同じ表現型を持ち、Wnt シグナル経路への関与が考えられる。このように、MO を駆使した遺伝子機能の大規模スクリーニングによって多くの新規遺伝子が同定された。

(D) 挿入突然変異体の作製による遺伝子の機能解析: ここでは、ホヤでのトランスジェニックラインの確立と挿入突然変異体の作製を通じた新規発生遺伝子の機能の解析を試みた。多くのトランスポゾン調べた結果、Tc1/*mariner* スーパーファミリーに属する *Minos* がホヤで活性を示すことがわかり、*Minos* を駆使した挿入変異体の作製が続いている。これまでに変態の時間的進行に異常の起こる変異体や水腫様変異を引き起こす変異体などが得られており、順遺伝学研究手法を海産無脊椎動物として初めてホヤで確立することができた。

#### [安住グループ]

本プロジェクトを通じてホヤのマイクロアレイ研究系を確立した。cDNA をもとにした 2 種類とオリゴヌクレオチドをもとにした 2 種類の合計 4 種類のマイクロアレイを作製し、ホヤの発生全体における遺伝子の変動、また初期発生における胚細胞の発生運命の限定における発生遺伝子変異の解析を進めた。その結果、発生関連遺伝子とその発現パターンから幾つかのグループに集約できること、またこれまでに考えられているよりもはるかに複雑な発生現象に潜む遺伝子発現の変動が明らかになった。

#### [高橋グループ]

脊索形成の分子メカニズムはホヤで最も研究が進んでいる。ここでは、脊索形成のキー遺伝子である *Ci-Bra* の標的遺伝子として単離された既知遺伝子につき MO を使って機能を阻害する実験を進めた。その結果、*Ci-Bra* 標的遺伝子の多くは、収斂・伸長という脊索動物胚に特徴的な形態形成運動に関わっていることが明らかになった。また特に、フィブリノーゲン様タンパク質をコードする *Ci-fibrin* が、中枢神経系で作られる *Notch* と相互作用しつつ、神経系の背側パタニングに関わるという新知見を得た。これは古くから考えられていた、神経系全体のパタニングに脊索に関わることを示す初めての分子的証拠である。

### 4. 事後評価結果

#### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

ホヤは進化的に脊椎動物の原型である脊索を持つ生物として、古くから発生生物学の実験モデル系として有名である。発生研究が遺伝子を軸として展開するようになってからは、遺伝学をフルに活用できるショウジョウバエや線虫などの急速な研究発展の蔭に隠れていた時期が長かったが、近年のゲノム解読の時代となって遺伝学的な実験を飛び越して比較ゲノム学の手法で、進化遺伝学の立場から理解を深める道が開かれてきた。本研究はその機を捉えて、わが国が中心となって米国の研究者とも協力してホヤのゲノム解析を行おうとするものである。国立遺伝学研究所のシーケンスセンターの支援も得て、解読は順調に進み、既にドラフト配列の発表を *Science* 誌に発表した。ホヤのゲノム解読により、無脊椎動物と脊椎動物の進化の分岐点に近い塩基配列が得られたこととなり、ヒトやショウジョウバエとの比較ゲノム解析が進行した。また古典発生学におけるホヤの特異な地位と知見を利用した発生生物学の解析を、チップアッセイやモルフオリノオリゴの利用によって急速に展開することが出来た。既に比較ゲノム解析については数多くの興味深い知見を高度な専門誌に報告しているが、発

生機構に関する研究は現在進行中で、未発表のデータも多い。これらについては本研究期間終了後も多数の重要な論文報告が続くと期待される。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

ホヤゲノムの解読が発生分化再生の研究に与える大きなインパクトは2つある。第一には原索動物という脊椎動物の先祖を反映するゲノムデータが得られることによって、脊椎動物の進化に関する理解、さらにはヒトの理解が格段に進んだことであり、第二には豊富な古典発生学の知識と技術が蓄積されたホヤという実験系を新しい方法論で再度とりあげて興味深いモデル実験系を確立したことである。とくにホヤではショウジョウバエやマウスと異なり、初期発生の卵割期からの細胞系譜が詳細に理解されており、細胞分化とその決定の遺伝子機構の解析に、他の系では困難なアプローチが可能となる。このような重要な生物種のゲノム解読がわが国の、本研究領域の研究として発展したことは大いに誇りとすべきことである。最近の医療は単純な遺伝子疾患の遺伝子解析はむろんのことであるが、遺伝子やゲノムの理解が重要である。これまでの遺伝子疾患の研究の多くはショウジョウバエにも相同遺伝子があるような生物に基本的な遺伝子の変化が多く報告されてきたが、今後はショウジョウバエや線虫とは異なる脊椎動物固有、さらにはヒト固有の遺伝子の疾患研究が重要となろう。その際に、その中間をつなぐホヤゲノムの知識が得られることは、遺伝病の理解にも特段の貢献をすると期待される

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

佐藤矩行: 東レ科学技術賞 (2005 年 3 月 17 日)

「ゲノムワイドな発生遺伝子解析システムの確立」

佐藤矩行: アレキサンダー・コワレフスキーメダル (2005 年 11 月 8 日)

発生と進化に関する顕著な研究

佐藤矩行: 紫綬褒章 (平成 18 年 4 月 29 日)

発生生物学・ゲノム科学研究功績