

脊索動物モデルのホヤ発生の遺伝子システムとその進化の解明

●佐藤 矩行

京都大学大学院理学研究科

＜研究の目的と進め方＞

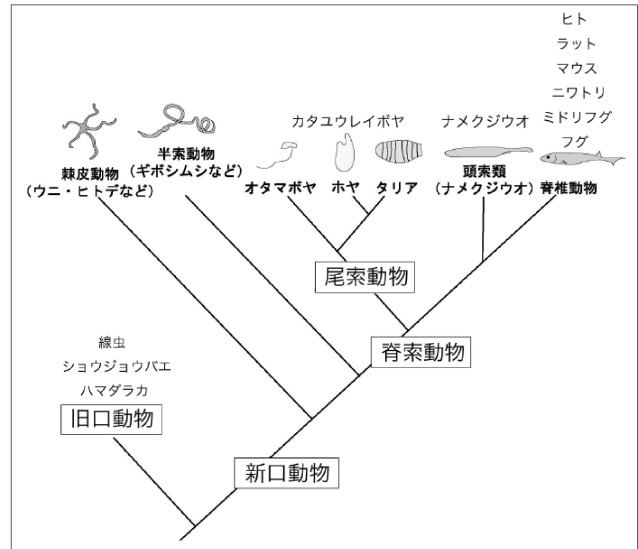
ホヤは尾索類（尾部に脊索をもつ動物）に属し、ナメクジウオの頭索類（脊索が頭部の先端まで存在する動物）、サカナやヒトを含む脊椎動物（発生にともなって脊索が脊椎骨におきかわる動物）とともに脊索動物門を構成する。これらの動物は脊索・背側神経管・鰓裂など多くの共有形質を有し、今から約5.5億年以上昔に共通の祖先から進化してきたものと考えられている。本研究は、カタユレイボヤのcDNAプロジェクトおよびゲノムプロジェクトの展開を計り、脊索動物モデルとしての発生遺伝子システムとその進化に関連したゲノム科学の進展を計ることを目的とした。

ホヤゲノムの解読には少なくとも2つの理由がある。まず第一は、この動物のゲノムの解読によって動物の進化・多様性の一端が理解できるのではないかと考えられるからである。図1に動物の簡単な系統学的関係と2005年までにそのゲノムが解読された動物を示した。この図から明らかなように、本研究を開始したときにゲノムが解読された動物は脊椎動物3種と、無脊椎動物の中で旧口動物（しかも最近脱皮動物と呼ばれるようになった）3種だけという片寄りがある。したがって、ホヤのゲノムが解読され、例えば、ホヤとヒトにあってC.エレガンスやショウジョウバエにはない遺伝子を探ることによって脊索動物を特徴づける遺伝子を理解することができるかもしれない。あるいはまた、C.エレガンス・ショウジョウバエ・ホヤにはなくヒトやフグにある遺伝子を明らかにすることによって脊椎動物の進化に関わった遺伝子がわかるかもしれない。

ホヤのゲノムプロジェクトを展開するもう1つの理由は、脊索動物モデルとしてのホヤ発生システムの分子生物学的基盤を確立することである。カタユレイボヤの受精卵は約30分に1回のペースで卵割を繰返し、5時間後の約120細胞で原腸が陥入し、7時間後には神経管が形成される。その後尾芽胚が形成され、受精後約18時間でオタマジャクシ幼生が泳ぎ出す。幼生はその後しばらく遊泳した後適当な基質に付着して変態し、入水口と出水口をもった成体ができあがる。ホヤのオタマジャクシ幼生を構成する細胞の数はわずか2600程である。全体を1層の表皮細胞（細胞数800）がおおい、体幹部の背側には脳とそれに続く尾部神経索からなる中枢神経系（約350細胞）、またその腹側には内胚葉細胞（約500細胞）、後部両側に間充織細胞（約900細胞）が分化する。尾部中央には正確に40個の細胞からなる脊索が走り、その両側に約40個の単核で横紋をもった筋肉細胞が位置する。このホヤのオタマジャクシ幼生の体制は私達ヒトを含む脊椎動物の体制の最も単純でかつ基本的な型を現している（カエルのオタマジャクシ幼生と比較して欲しい）。ゲノムが解読されれば、この体制の形成に関与する遺伝子の研究が飛躍的に進展するものと期待できる。

＜研究開始時の研究計画＞

このような研究のバックグラウンドのもと、カタユレイ



【図1】

イボヤ (*Ciona intestinalis*) を対象に、以下の3つの研究を行うことを計画した（カタユレイボヤを選んだ理由は、先行研究によりそのゲノムサイズが約160Mb、遺伝子数は15,500と推定されていたからである）。

(1) cDNAプロジェクトの展開：できるだけ多くのEST情報およびcDNA情報を得る。これらの情報を2)のゲノムの解読に役立てるとともに、3)の脊索動物モデルとしての発生遺伝子システムの解析の基本情報として利用する。

(2) ゲノムプロジェクトの展開：遺伝研およびアメリカとの共同研究によって、ゲノムプロジェクトを展開し、できれば期間内にドラフトゲノムを解読する。

(3) 脊索動物モデルとしての発生遺伝子システムの解析：上の2つの研究プロジェクトで得られた情報をもとに、脊索動物モデルとしてのホヤ発生遺伝子システムの解析を行う。

＜研究期間の成果＞

研究の成果については、上の計画研究の3つのうち、2) ゲノムプロジェクトの展開、1) cDNAプロジェクトの展開、3) 脊索動物モデルとしての発生遺伝子システムの解析の順に述べる。

(2) カタユレイボヤのドラフトゲノムの解読：

(a)我々がゲノムプロジェクトを開始する以前に、カタユレイボヤのゲノムサイズは約160Mb、遺伝子数は約15,000と見積もられており（染色体数はn=14本）、脊椎動物への進化の過程で起こったと考えられ2回の遺伝子重複が起こる以前の脊索動物の基本的なゲノム構成をホヤはもつと予測されていた。今回のゲノムプロジェクトで作製したデータセットは、カリフォルニア産のホヤ（雌雄同体）1個体の精子および女川産3個体の精子に由来するゲノムDNAを、それぞれゲノムの8倍(米国)および5

倍相当分(日本)ホールゲノムショットガン法により解読した塩基配列、BAC、cosmidの末端塩基配列に加えて、発生中の胚や幼生、成体で発現するmRNAから作製した12種類のcDNAライブラリーに由来する約48万のEST(後述)、および約1万近いcDNAの近全長塩基配列である。これらの情報をすべて統合し、コンピュータによるドラフトゲノムのアセンブリー (JAZZ) およびそこにコードされる遺伝子予測を行った。その結果、190 kbp 長以上のscaffolds 177個により全ゲノムの約半分が、また20 kbp 以上のscaffolds 905個によって全ゲノムの約85% (104 Mbp) をカバーすることができている。また遺伝子予測は、豊富なEST/cDNA情報をもとにかなり精度の高い予測となっている (公表論文番号0303241121)。

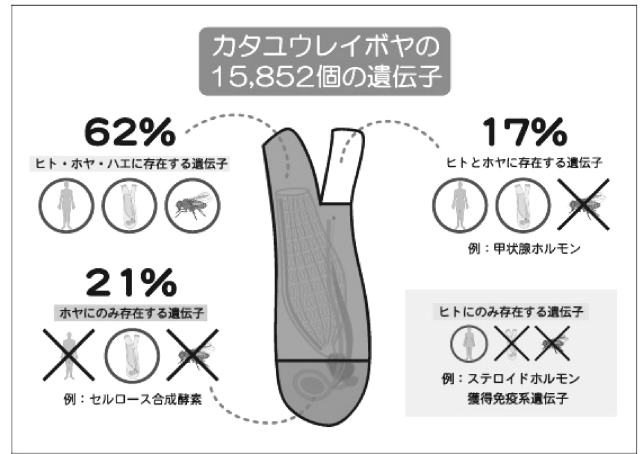
その結果を要約すると、カタユウレイボヤのゲノムサイズは153~159 Mbpで、そこにタンパク質をコードする15,852の遺伝子の存在が予測される。これはほぼショウジョウバエのゲノムサイズと遺伝子数に匹敵する。約155 Mbpのうち約118 Mbpがいわゆる真性クロマチン領域で、ここにESTおよび近全長cDNAの塩基配列情報の95%以上が含まれている。同様に、このホヤですでに報告されている遺伝子の97%もここに含まれる (すなわち、ホールゲノム・ショットガン法によるドラフトゲノム決定法の妥当性を示している)。真性クロマチン領域以外ではrRNAやtRNAなどの長い繰り返し構造がゲノムの約11% (17 Mbp) を占め、残りの約20 Mbpは短い繰り返し構造などのためアセンブルできないままである。

カタユウレイボヤ・ゲノムは一般的にATリッチである(65%)。また高頻度のallelic polymorphismが存在し、カリフォルニア産1個体の母方と父方から由来したゲノム塩基配列の中に1.2%の差が認められる (これはヒトの約15倍の頻度である)。同じ塩基配列が少なくとも数回読まれており、polymorphismは塩基配列決定の際の誤りからは明確に区別される。polymorphismの多くは1~数塩基の置換や欠失などから成り立っている。

(b)ホヤ・ゲノムの全体像

カタユウレイボヤのゲノムを他の動物と比較した。ホヤのゲノムは他の動物と比べると明らかにコンパクトであり、タンパク質をコードする遺伝子は7.5 kbpに1つの割合で存在する。これはショウジョウバエの9 kbpあたり1個に比べてもコンパクトである。15,852遺伝子のうち9,883 (約62%) はC. エレガンス・ショウジョウバエ・ヒトなどと共通であり、すべての動物が共有する遺伝子と考えられる (図2)。後述するように、脊索動物の一員であるホヤの遺伝子は、明らかに、C. エレガンスやショウジョウバエの遺伝子よりもヒトなどの脊椎動物の遺伝子に似ている。また2,570 (約17%) はホヤと脊椎動物に共通な遺伝子で、ショウジョウバエなどの無脊椎動物 (旧口動物) にはない遺伝子である。この遺伝子は脊索動物を特徴づける遺伝子と考えられる。また、残りの3,399 (約21%) は今のところホヤに特徴的な遺伝子である。このうちの80%以上はESTによってその発現が認められており、アラインメントのミスによるものではないと考えられる (情報解析がさらに進めば、他の動物で相同遺伝子がみつかる可能性があり、この範疇の遺伝子は今後少なくなるものと予測される)。以下、それぞれについて少し詳しく報告する。

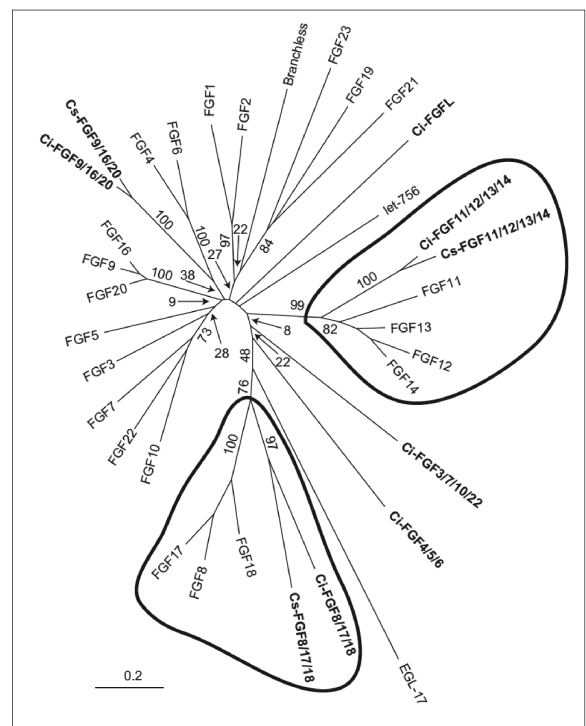
(b-1) ホヤは脊索動物の基本的な遺伝子セットを持つ
ホヤのドラフトゲノムを決定し、この動物の持つ遺伝子を同定し、他の動物の遺伝子と比較することによって



【図2】 カタユウレイボヤのゲノム中にコードされる15,852遺伝子の、他の動物の遺伝子との比較。

さまざまなことがわかってきた。その一つは、ホヤの遺伝子のほとんどは無脊椎動物の遺伝子よりも脊椎動物の遺伝子によく似ており、しかも、ホヤは脊索動物の基本的な遺伝子セットをもつということである。このことは、これまで発生に関与するホヤの遺伝子の研究から予測されていたことではあったが、今回のゲノム解読によってこの特徴が明確なものとなった。ここではFgf遺伝子の例を紹介する。

Fgf遺伝子：哺乳類ではこれまでに少なくとも22個のFgf遺伝子の報告があるのに対し、ショウジョウバエでは1個 (branchless)、C. エレガンスでは2個 (egl-17とlet-756) のFgf関連遺伝子の報告しかない。哺乳類のFGFの分子量が17~34 kD であるのに対して、これら無脊椎動物のFGFはその分子量が35~84 kDと大きく、哺乳類のFGFとの対応関係を見つけることが難しい。また、FGF分子は一般に保存された領域に関する情報が少ないために、哺乳類のFGF間でさえその類似性・相関性を明確に示すことは容易でない。



【図3】 カタユウレイボヤのFgf遺伝子と脊椎動物のFGF遺伝子の関連。

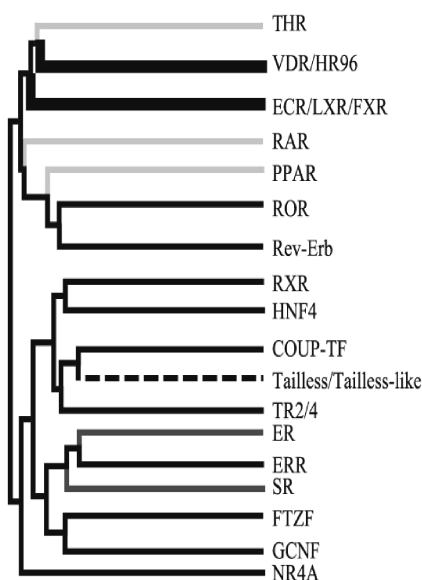
カタユウレイボヤの網羅的cDNA解析（公表論文番号0303241115）およびゲノム解析（公表論文番号0303241121）は、このホヤには6個のFgf遺伝子が存在することを示している。これらのホヤの遺伝子を中心にFgf遺伝子の相関性を分子系統学的に解析した結果を図3に示す。まず哺乳類のFgf8, 17, 18の祖先型遺伝子と考えられるFgf8/17/18遺伝子が一つ、およびFgf11, 12, 13, 14の祖先型と思われるFgf11/12/13/14が1個ホヤのゲノムに存在する。さらに哺乳類のFgf3, 7, 10, 22の祖先型と思われるFgf3/7/10/22、Fgf4, 5, 6の祖先型と思われるFgf4/5/6、Fgf9, 16, 20の祖先型と思われるFgf9/16/20遺伝子がこれも一つずつ存在する。カタユウレイボヤにはさらにもう一個FgfLが存在するが、この遺伝子は他との相関性がつかめていない。Fgf9/16/20は、ホヤの初期発生において内胚葉が中胚葉を誘導する過程で重要な働きをする。また、FgfL, Fgf9/16/20, Fgf8/17/18, Fgf3/7/10/22は幼生の中樞神経系で前後軸に沿った発現パターンを示す(12)。このようになホヤからもたらされる遺伝子情報は、脊椎動物のFGF分子の機能予測にも役立つものと思われる。

脊椎動物の基本的遺伝子セットをホヤがもつという傾向は、特に転写因子やシグナル分子をコードする遺伝子に多く見てとれる。したがって、ホヤはこれらの遺伝子の機能をリダンダンシーに煩わされることなく解析できる格好の実験系を提供する。

(b-2) 脊索動物および脊椎動物を特徴づける遺伝子群

今回解読したホヤゲノムを他の動物のゲノムと比較することによって最も鮮明になったことは、無脊椎動物とホヤのゲノムには存在しないが、ヒトやフグのゲノムに存在する遺伝子、すなわち脊索動物の共通祖先から脊椎動物が進化する際に獲得したと考えられる遺伝子群である。2つの例をあげて紹介する。

核内レセプター遺伝子： 図4に内分泌系のシグナル受容体としても働く核内レセプター分子の分子系統樹を示した。この図は、カタユウレイボヤゲノム中に存在するすべての核内レセプター遺伝子を同定し、これまでに知られているショウジョウバエとヒトの相同分子との比較により得られたものである（公表論文番号0303241121）（公表論文番号0309041633）。



〔図4〕核内受容体遺伝子群の進化。核内受容体タンパク質全体のアミノ酸配列の比較をもとにNJ法で描いた分子系統樹。主なもの:TR, 甲状腺ホルモン受容体; VDR, ビタミンD受容体; ECR, エクジソン受容体; RAR, レチノイン酸受容体; RXR, レチノイドX受容体; ER, エストロゲン受容体; SR, ステロイドホルモン受容体; NR4A, 核受容体4A。

図中黒線で示した核内レセプターはショウジョウバエ・ホヤ・ヒトが共有するもので、多細胞動物が基本的にもっている遺伝子と思われる。ここには、HNF4やエクジソンレセプター (ECR) などが含まれる。次に緑色の線で示したものは、ショウジョウバエのゲノム中にはなくホヤとヒトに認められるもので、甲状腺ホルモンレセプター (THR) やレチノイン酸レセプター (RAR) などが含まれる。一方、赤線で示した核内レセプターは、ショウジョウバエとホヤにはなくヒトやフグにだけ認められるもので、エストロゲンレセプター (RE) やアンドロジェン・コルチコイドなどのステロイドホルモンレセプター (SR) が含まれる。すなわち脊索動物の進化にともなってレチノイン酸系などが働くようになり（これに関しては、ウニなどの棘皮動物やギボシムシなどの半索動物(図1)のゲノム情報が得られていないために、今のところ「脊索動物の進化にともなって」と書いたが、近々ウニのゲノムが明らかにされこれらの遺伝子の存在が確認されれば、「新口動物の進化にともなって」と訂正される可能性がある）、また脊椎動物の進化にともなってステロイドホルモン系が発達したことになる。

このステロイドホルモンのレセプターの欠如と呼応して、ホヤのゲノム中にはステロイドホルモン合成にたずさわる酵素をコードする遺伝子が存在しないこともわかってきている（公表論文番号0408131121）。

免疫関連遺伝子：動物の免疫系は、すべての動物が持つ自然免疫系（先天性免疫系）と脊椎動物にみられる獲得免疫系（後天性免疫系）からなる。前者には補体系やレクチンが、また後者には免疫抗体の作製を含む非常に複雑な生命活動系が働いている。脊椎動物以外に獲得免疫に関わる遺伝子が存在しないことは予測されていたが、今回のゲノムワイド・サーベイはカタユウレイボヤのゲノム中にはイミュングロブリンを初めとしてMHC（主要組織適合複合体）関連遺伝子が全く存在しないことを示している（公表論文番号0404141704）。分子的にみて、獲得免疫系を構成しようとする芽のようなものは感じられるが、すでに機能的になっている分子はホヤには一つ

も存在しない。最近のナメクジウオでの研究結果も踏まえて、獲得免疫系は脊椎動物の進化とともに現れたと結論づけられる。

ホヤに存在する約15,800の遺伝子をヒトやマウスなどの脊椎動物の遺伝子とゲノムワイドに比較してみると、脊椎動物を特徴づける遺伝子が浮かび上がってきた。それらの多くは内分泌や免疫など広い意味での生理を司る遺伝子といえる（表1）。

表1. ホヤ・ゲノムの解読から推測される脊椎動物の主たる特徴

発生系：	基本的な発生遺伝子セットをもとに遺伝子重複による形態・機能の多様化
内分泌系：	ステロイドホルモン系（合成酵素および核内受容体）の進化
神経系：	ミエリン・軸索伸長関連遺伝子の進化
免疫系：	獲得免疫系の進化
筋肉系：	速筋・遅筋・心筋・平滑筋に対応した筋構造タンパク質のアイソフォームの発達

(b-3) ホヤ・ゲノム内での独特な変化

中国の約5.2億年昔の地層から最近出土したホヤの化石は現在我々が目にしているホヤとほとんど変わらない姿をしている。カンブリア紀の動物進化の大爆発の時に出現して以来、ホヤも5億年以上の進化の歴史を刻んでいる。この事実を反映して、この動物の系列に特徴的と思われる遺伝子の変化がホヤのゲノム中でいくつかおこっていることが今回のゲノム解読で見えてきた。

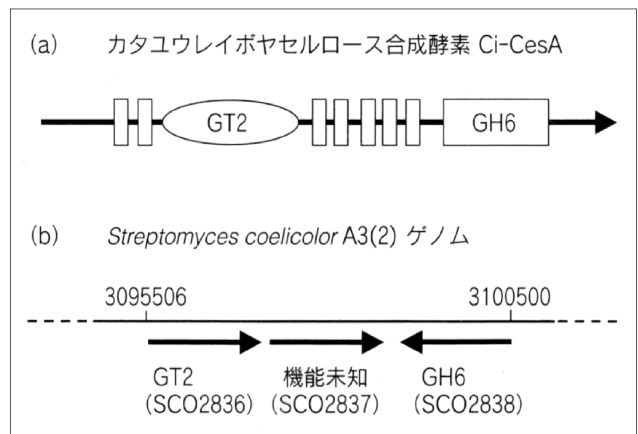
Hoxクラスター遺伝子群：ホヤゲノム内での独自の変化の1つは、無脊椎動物と脊椎動物との間でよく保存されているにもかかわらず、ホヤの系列で独自に失われたと思われる遺伝子が存在することである。HOM-C/Hoxクラスターの遺伝子はその例で、カタユウレイボヤゲノムを詳細に解析すると、Hox1、Hox2/Hox3/Hox4、Hox5/Hox6、Hox10、Hox12/Hox13のそれぞれが5つのScaffold内に見出される。Hox7、Hox8、Hox9およびHox11の存在が確認できない（公表論文番号0303241121）。Hox遺伝子の存在する5つのScaffoldをつなぎ合わせると約980 kbpにも達する。Hoxクラスターは通常300 kbp以内（ヒトでは125 kbp 以内）におさまっていることから、この1 Mbp 程に広がっていること自体異常なことといえる。その後の研究で、カタユウレイボヤのHOM-C/Hoxクラスターの遺伝子は、2つの染色体に分離されていることがわかっている。

Hox7, 9, 11と同様に、ホヤのゲノム中から抜け落ちた（あるいは偽遺伝子化したために認知できない）と考えられる遺伝子が幾つか見つかってきている。例えば6つある主要なLIMクラス・ホメオボックス遺伝子（Lim1, Lim3, Islet, apterous, LIMX, Lhx6/7）のうちホヤゲノムはLhx6/7を欠く。またClock, b-mal, periodなどサーガディアンリズムに関わる遺伝子や核内レセプターであるtailess遺伝子も見つからない（図4参照）。

ヘモシアニン遺伝子：各動物門を代表するほとんどの動物が酸素運搬タンパク質としてヘモグロビンをもつものに対して、軟体動物と環形動物の一部はヘモシアニンをもつ。ヘモグロビンとヘモシアニンは分子的に全く別の起源をもち、両者の間に分子的な相関性はない。驚いたことに、ホヤのゲノム中にはヘモグロビンをコードす

る遺伝子は存在せず、代わりにヘモシアニンをコードする遺伝子が存在する。ホヤのヘモシアニンは分子的に多様化しており、軟体動物や環形動物のヘモシアニンとの類似性を見つけていることが難しい（公表論文番号0303241121）。

セルロース合成系酵素遺伝子：ホヤは被囊類とも呼ばれ、成体の最外層を被囊が取り囲みそこにセルロースの存在が推定されていたが、今回のゲノム解読によりセルロース合成・分解に関わる酵素であるendoglucanase、glycosyltransferase、glycosylhydrolaseなどが見つかった。セルロース分解酵素はシロアリなども持っているが、セルロース合成酵素はホヤ以外の動物では全く知られていないので、遺伝子の水平伝搬（horizontal gene transfer）を示す好例かもしれない（公表論文番号0303241121）。



(c) カタユウレイボヤ発生関連遺伝子のアノテーションドラフトゲノムの解読後、我々は、このホヤのゲノム内に認められる発生関連遺伝子を中心に、できるだけ正確なアノテーションを行った。以下はそれらのリストである。

- ・内分泌関連遺伝子（公表論文番号0408131121）。
- ・アポトーシス関連遺伝子（公表論文番号0309041758）。
- ・免疫関連遺伝子（公表論文番号0404141704）。
- ・イオンチャンネル関連遺伝子（公表論文番号0602101152）。
- ・色素合成経路関連遺伝子（公表論文番号0602101146）。
- ・特に発生関連遺伝子については、当研究室のスタッフ、PD、院生の協力を得て、Cionaゲノム中の発生関連遺伝子を、転写因子のbHLH（公表論文番号0308251515）、ホメオボックス関連（公表論文番号0308251623）、核内レセプター（公表論文番号0309041633）、HMG転写因子関連（公表論文番号0309041643）、細胞間シグナル分子Notch（公表論文番号0309041649）、TGFなど（公表論文番号0309041656）、細胞極性関連遺伝子（公表論文番号0309041707）、PIK3関連遺伝子（公表論文番号0309041715）、筋肉構造遺伝子（公表論文番号0309041721）、細胞間結合関連遺伝子（公表論文番号0309041729）などにつき、できるだけ正確にアノテーションした。そしてその成果を10編の論文として、一括して、Dev. Genes Evol. の特集号で公表した。

このような努力により、また後述するcDNA情報の整備により、カタユウレイボヤは、発生関連遺伝子をもっとも正確にアノテーションされている動物として、今後の発生遺伝子のゲノムワイドな解析に有効な実験系を提供するものとなった。また、このことを研究者に周知してもらうべく、いくつかの総説を公表した（公表論文番

号0112051812) (公表論文番号03082551441) (公表論文番号0308251145) (公表論文番号0308251211) (公表論文番号0602101128)。

(1) cDNAプロジェクトの展開と(3)脊索動物モデルとしての発生遺伝子システムの解析

すでに述べたように、カタユレイボヤの受精卵は約30分に1回の卵割、原腸陥入、神経管形成、尾芽胚形成を経て、受精後約18時間でオタマジャクシ幼生になる。ホヤのオタマジャクシ幼生を構成する細胞の数はわずか2600程で、表皮細胞、体幹部の背側の脳とそれに続く尾部神経索からなる中枢神経系、内胚葉細胞、間充織細胞、脊索、単核で横紋をもった筋肉細胞などが分化する。このホヤのオタマジャクシ幼生の体制は私達ヒトを含む脊索動物の体制の最も単純でかつ基本的な型を現している。またこれまでの研究で、細胞分化の分子メカニズムを細胞一つ一つのレベルで解析できることがわかってきている。我々は上に述べたカタユレイボヤのドラフトゲノムの解読と並行しつつ、cDNAプロジェクトを展開し、脊索動物モデルとしての発生遺伝子システムの解析を行ってきた。以下にその主たる結果を述べる。

(a) EST解析

我々は遺伝研のアカデミア・シーケンスセンターの多大なる協力を得て、カタユレイボヤの大規模EST解析を展開した。これまでに、未受精卵、卵割期胚、囊胚・神経胚、尾芽胚、遊泳幼生、幼若体、成体の卵巣、精巣、体壁筋、内柱、神経複合体、消化管などを含め、12のcDNAライブラリーを作製し、それぞれの5'および3'を約1万から3万のEST解析を行った。最終的には、5'側約33万6千、3'側33万6千の合計67万のEST情報を得ることができた。これは、この動物での転写産物の数を考えると、ほ乳類の3・4百万のEST情報に匹敵するものと考えられる(公表論文番号0303241054)。

これらのcDNAクローンを、3'側の塩基配列情報をもとにリダンダンシーを除くと、約1万8千個の独立したcDNAクローンになる。これを再アレイしたものを”Ciona intestinalis Gene Collection”として作製し、世界中の研究者に配布した(公表論文番号0303241110)。このGene Collectionを駆使して、ホヤの遺伝子研究は飛躍的に高まったといつて過言ではない(公表論文番号0308251211)。

さらに、これらのcDNAの中から、転写因子やシグナル分子をコードする発生関連遺伝子を中心に、約6000の準完全長cDNA塩基配列を決定した。これらの情報は、我々の研究室のデータベース<http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/Indx.html>で見ることができる(公表論文番号0602101540)。

(b) 発生における遺伝子発現の解析

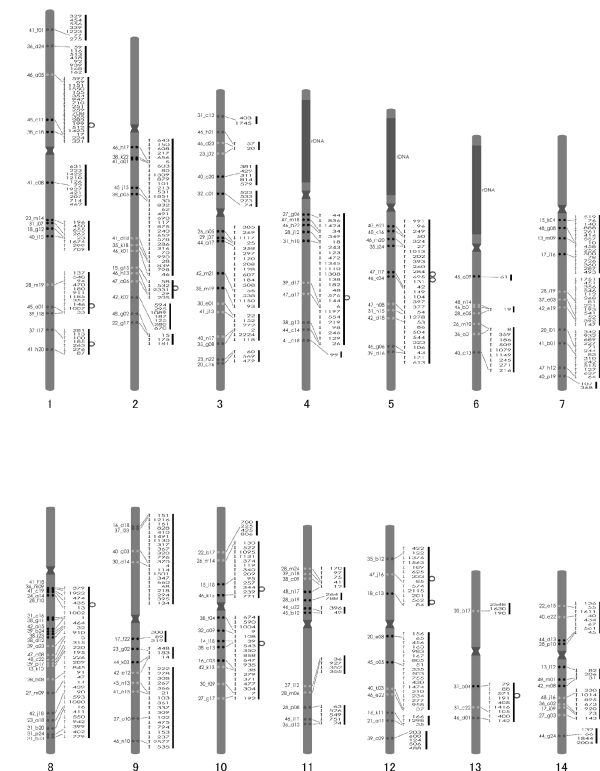
未受精卵・卵割期胚・尾芽胚・幼生・幼若体の5つの発生段階のEST・cDNAプロジェクトによって得られた約3万のクローンを、まずその機能に基づいて分類し、さらにその中から、ランダムに約1千クローンを選び、ホールマウント in situ ハイブリダイゼーションによって、その空間的発現パターンを解析した[未受精卵(公表論文番号0112051805)・卵割期胚(公表論文番号0303241042)・尾芽胚(公表論文番号0112051759)・幼生(公表論文番号0303241034)・幼若体(公表論文番号

0303241047)]。その結果、さまざまな遺伝子の発現情報が選られた。これらは胚細胞の分化マーカー、あるいは成体組織の分化マーカーとしての遺伝子を特定したという意味でも重要である。

我々が作製したcDNAライブラリーはノーマライズなどの作業を行っていない。したがって、各ライブラリーにおけるESTの数(ESTカウント)は、そのライブラリーにおける各遺伝子の転写産物の量を反映していると考えられる。したがって、ESTカウントを各ライブラリーで比較することによって、ある遺伝子の発生における時間的発現パターンを、また、成体組織における空間的発現パターンを予測することができる(公表論文番号0309041739)。これは、大量のEST解析を行って初めて得られる貴重なデータであり、今後、ホヤの発生遺伝子の発現パターンの解析に役立つものである。

(c) ゲノム情報の染色体マッピング

カタユレイボヤゲノム情報の染色体マッピングは、これから脊索動物モデルとしての発生遺伝子解析システムを確立する上で必須である。ショウジョウバエやマウスなどこれまでにゲノムが解読された多くの動物では、その遺伝地図などを駆使してゲノム塩基配列情報を染色体上にマップすることができる。遺伝的バックブランドを持たないホヤでも遺伝地図作製の努力は続けられているが、それを利用するまでには至っていない。そこで我々は、ゲノム解読のため作製したBACライブラリー(公表論文番号0303241059)のBACクローンを利用し、その2色蛍光 in situ hybridization (FISH) による染色体マッピングを試みた。またBACエンドシーケンスによるスカフォールドの結合によって、より完全に近いゲノムの解読を進めた。



14対(2n=28)のカタユレイボヤの染色体は平均約2umと極めて小さくまた似かよっており、形態だけによる通常の核型分析は不可能である。そこで我々はまずこの動物における2色FISH法を確立した上で、14対の染色体を同時に見分けることのできるBACクローンの組合せを

作り、それを利用して核型を決定した。そして現在までに、それぞれができるだけ長いスカフォールドに対応した170個のBACクローンを染色体にマップすることに成功した(公表論文番号0602101617)。また、BACクローンの両端配列を利用して、FISHで位置の確かめられた2つのスカフォールド間のギャップを繋げるなどして、これまでに約120 Mbの真生クロマチンのうち約75 Mbのゲノム配列(約63%)を染色体上にマッピングすることができている(上図)。

現在これらホヤゲノム染色体情報と脊椎動物ゲノム染色体情報の比較を進めており、幾つかのシンテニーが見えだしている。また現在、転写因子およびシグナル分子をコードする遺伝子の染色体マッピングを精力的に進めている。下で述べるように、ゲノム解読後精力的に転写因子およびシグナル分子をコードする遺伝子のアノテーションを行っており、そのうちの約90%を現在までにマップすることができている。

(d) 発生遺伝子の発現と制御：そのゲノムワイドな解析

ホヤ幼生の体制は脊椎動物の体制の原型ともいえるべきもので、その発生メカニズムのゲノムワイドな解析が望まれている。動物の体づくりには転写因子とシグナル分子が重要な働きをする。ドラフトゲノムの解読によってカタユウレイボヤは脊椎動物としての基本的な発生遺伝子セットを持つことが分かり、その後、このホヤのゲノムに存在する390の転写因子遺伝子と118のシグナル分子遺伝子が正確に同定されている(これらの遺伝子の約9割はそのcDNAが得られている)(公表論文番号0602101543)。

また、cDNAプロジェクトで得られた約18000の転写産物情報およびゲノム情報をもとに、44kのオリゴヌクレオチドを載せたCionaチップをすでに完成させている。現在これらを利用して、初期発生における遺伝子ネットワークを明らかにする努力を続けている。

カタユウレイボヤのゲノム解読が開始されて間もなく、近縁種のユウレイボヤ(*Ciona savignyi*)のゲノム解読も始められ、現在までに約174Mbと考えられているゲノムサイズの約16倍の塩基配列情報が得られている。最近になって、近縁な動物種間のゲノム配列の比較が、非コード領域内の未知の機能部位の予測に役立つことがわかってきた。カタユウレイボヤとユウレイボヤのゲノム配列を比較してみると、この2種のゲノム塩基配列は遺伝子コード領域以外にはほとんど類似性がない。しかし互いにオーソログな遺伝子の5'上流域などには相同性の高い短い配列モチーフが検出され、そのなかのいくつかは、この2種のホヤの両方で遺伝子の発現調節モチーフとして機能することが実験的に確認されている(公表論文番号0602101156)(公表論文番号0602101545)。

さらにホヤではlacZなどのリポーター遺伝子との融合遺伝子をエレクトロポレーションによって数百の卵に一度に導入できる。またホヤの胚発生は速く、仮にリポーター遺伝子の発現を尾芽胚で調べようとすると、受精後わずか10時間でその結果が得られる。最近Keysらは、こうした特徴を生かして、Hoxクラスターのコードされている2つのゲノム領域(Hox2, 3, 4を含む約120kbと、Hox11/12, HOX12/13を含む110kb)をそれぞれ約3 kbに切断し、それらをリポーター遺伝子に繋ぎ、エレクトロポレーションによってこの領域のエンハンサーの分布を調べた。その結果、29のゲノムDNA断片が組織特異的な遺伝子発現に関わるエンハンサーを含むことが明らかになった(11)。ホヤでは、このような方法で遺伝子の発現

制御領域をゲノムワイドに解析することが可能であり、脊椎動物との発現制御領域の比較解析が期待されている(公表論文番号0602101118)。

<国内外での成果の位置づけ>

ドラフトゲノムの解読、cDNAプロジェクトの展開、発生関連遺伝子のアノテーションとそれを利用した脊椎動物モデルとしての発生遺伝子システム確立に関する本研究の成果は、この分野で世界を完全にリードしている。またそれだけではなく、この分野の研究の裾野を広げ、さらに個々の研究の深さを掘り下げたものとして、十分評価されている。

ゲノムの解読はその生物種の遺伝情報に関する辞書を作り上げる作業に似ている。また通常その論文を読むことは、完成した辞書を1ページずつめくるようなもので決して楽しいものではない。本研究成果として公表したホヤゲノムの論文は塩基配列情報の記載をできるだけ簡潔化し、その分この動物のゲノム情報から脊椎動物および脊椎動物の起源と進化について何が言えるかについてできるだけ多くを議論した。動物の比較ゲノムを前面に出した初めての論文として、生物科学の研究論文の中で長く評価される論文になったのではないかと自負している。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

2000年の当初計画は、本当のところどれだけできるものか不安もあった。しかし、上に述べたように、当初の予想をはるかに上回る成果が得られた。特にカタユウレイボヤの発生遺伝子をほぼすべて同定し染色体にマッピングしたことは、今後の研究にとって非常に有効であると思われる。

<今後の課題>

これまで述べてきたように、ホヤ・ゲノムの解読は動物比較ゲノム科学という新しい局面を開きつつある。現在公開されているドラフトゲノムはカリフォルニア産の1個体のゲノム・シーケンスをもとにしたものである。現在日本産カタユウレイボヤのゲノム塩基配列をアセンブルし、カリフォルニア産との比較を進めており、近日中に一種の動物の異なる2つの集団のゲノムの違いの情報を見ることになる。またカタユウレイボヤの近縁種ユウレイボヤ(*Ciona savignyi*)のゲノム解読も進みだしている。近い将来に、カタユウレイボヤとユウレイボヤという近縁2種および前者の2つの集団のドラフトゲノムが解読される可能性が高い。これからの駆使した種間比較ゲノム科学の展開がこれからの一つの課題である。また、本研究の成果として得られた膨大な遺伝子情報を駆使して、どれだけ発生の遺伝子システムに迫れるかが、今後の大きな課題である。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

1.0112051759

Satou, Y., Takatori, N., Yamada, L., Mochizuki, Y., Hamaguchi, M., Ishikawa, H., Chiba, S., Imai, K., Kano, S., Murakami, S. D., Nakayama, A., Nishino, A., Sasakura, Y., Satoh, G., Shimotori, T., Shin-i, T., Shoguchi, E., Suzuki, M. M., Takada, N., Utsumi, N., Yoshida, N., Saiga, H., Kohara, Y. and Satoh, N., Gene expression profiles in *Ciona intestinalis* tailbud embryos. *Development* 128, 2893-2904 (2001).

- 2.0112051805
Nishikata, T., Yamada, L., Mochizuki, Y., Satou, Y., Shin-i, T., Kohara, Y. and Satoh, N., Profiles of maternally expressed genes in fertilized eggs of *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 238, 315-331 (2001).
- 3.0112051812
Satou, Y., Imai, K. S. and Satoh, N., Action of morpholinos in *Ciona* embryos. *genesis* 30, 103-106 (2001).
- 4.0112051816
Satoh, N., Ascidian embryos as a model system to analyze expression and function of developmental genes. *Differentiation* 68, 1-12 (2001).
- 5.0112051830
Takamura, K., Oka, N., Akagi, A., Okamoto, K., Okada, T., Fukuoka, T., Hogaki, A., Naito, D., Oobayashi, Y. and Satoh, N., EST analysis of genes that are expressed in the neural complex of *Ciona intestinalis* adults. *Zool. Sci.* 18, 1231-1236 (2001).
- 6.0303241034
Kusakabe, T., Yoshida, R., Kawakami, I., Kusakabe, R., Mochizuki, Y., Yamada, L., Shin-i, T., Kohara, Y., Satoh, N., Tsuda, M. and Satou, Y., Gene expression profiles in tadpole larvae of *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 242, 188-203 (2002).
- 7.0303241042
Fujiwara, S., Maeda, Y., Shin-i, T., Kohara, Y., Takatori, N., Satou, Y. and Satoh, N., Gene expression profiles in *Ciona intestinalis* cleavage-stage embryos. *Mech. Dev.* 112, 115-127 (2002).
- 8.0303241047
Ogasawara, M., Sasaki, A., Metoki, H., Shin-i, T., Kohara, Y., Satoh, N. and Satou, Y., Gene expression profiles in young adult *Ciona intestinalis*. *Dev. Genes Evol.* 212, 173-185 (2002).
- 9.0303241054
Satou, Y., Takatori, N., Fujiwara, S., Nishikata, T., Saiga, H., Kusakabe, T., Shin-i, T., Kohara, Y. and Satoh, N., *Ciona intestinalis* cDNA projects: expressed sequence tag analyses and gene expression profiles during embryogenesis. *Gene* 287, 83-96 (2002).
- 10.0303241059
Kobayashi, M., Matsuda, M., Asakawa, S., Shimizu, N., Nagahama, Y., Satou, Y. and Satoh, N., Construction of BAC libraries derived from the ascidian *Ciona intestinalis*. *Genes Genet. Syst.* 77, 283-285 (2002).
- 11.0303241110
Satou, Y., Yamada, L., Mochizuki, Y., Takatori, N., Kawashima, T., Sasaki, A., Hamaguchi, M., Awazu, S., Yagi, K., Sasakura, Y., Nakayama, A., Ishikawa, H., Inaba, K. and Satoh, N., A cDNA resource from the basal chordate *Ciona intestinalis*. *genesis* 33, 153-154 (2002).
- 12.0303241115
Satou, Y., Imai, K. S. and Satoh, N., Fgf genes in the basal chordate *Ciona intestinalis*. *Dev. Genes Evol.* 212, 432-438 (2002).
- 13.0303241121
Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R. K., Chapman, J., Degnan, B., DeTomaso, A., Davidson, B., DiGregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D. M., Harafuji, N., Hastings, K. E. M., Ho, I., Hotta, K., Huang, W., Kawashima, T., Lemaire, P., Martinez, D., Meinertzhagen, I. A., Necula, S., Nonaka, M., Putnam, N., Rash, S., Saiga, H., Satake, M., Terry, A., Yamada, L., Wang, H.-G., Awazu, S., Azumi, K., Boore, J., Branno, M., Chin-bow, S., DeSantis, R., Doyle, S., Francino, P., Keys, D. N., Haga, S., Hayashi, H., Hino, K., Imai, K. S., Inaba, K., Kano, S., Kobayashi, K., Kobayashi, M., Lee, B.-I., Makabe, K. W., Manohar, C., Matassi, G., Medina, M., Mochizuki, Y., Mount, S., Morishita, T., Miura, S., Nakayama, A., Nishizaka, S., Nomoto, H., Ohta, F., Oishi, K., Rigoutsos, I., Sano, M., Sasaki, A., Sasakura, Y., Shoguchi, E., Sin-i, T., Spagnuolo, A., Stainier, D., Suzuki, M. M., Tassy, O., Takatori, N., Tokuoka, M., Yagi, K., Yoshizaki, F., Wada, S., Zhang, C., Hyatt, P. D., Larimer, F., Detter, C., Doggett, N., Glavina, T., Hawkins, T., Richardson, P., Lucas, S., Kohara, Y., Levine, M., Satoh, N. and Rokhsar, D. S., The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 298, 2157-2167 (2002).
- 14.0307181713
Ishibashi, T., Nakazawa, M., Ono, H., Satoh, N., Gojobori, T. and Fujiwara, S., Microarray analysis of embryonic retinoic acid target genes in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Growth Differ.* 45, 249-259 (2003).
- 15.0308251145
Satoh, N., The ascidian tadpole larva: Comparative molecular development and genomics. *Nature Rev. Genet.* 4, 285-295 (2003).
- 16.0308251211
Satoh, N., Satou, Y., Davidson, B. and Levine, M., *Ciona intestinalis*: an emerging model for whole-genome analyses. *Trends Genet.* 19, 376-381 (2003).
- 17.0308251441
Satou, Y. and Satoh, N., Genomewide surveys of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. *Dev. Genes Evol.* 213, 211-212 (2003).
- 18.0308251515
Satou, Y., Imai, K. S., Levine, M., Kohara, Y., Rokhsar, D. and Satoh, N., A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*: I. Genes for bHLH transcription factors. *Dev. Genes Evol.* 213, 213-221 (2003).
- 19.0308251623
Wada, S., Tokuoka, M., Shoguchi, E., Kobayashi, K., DiGregorio, A., Spagnuolo, A., Branno, M., Kohara, Y., Rokhsar, D., Levine, M., Saiga, H., Satoh, N. and Satou, Y., A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*: II. Genes for homeobox transcription factors. *Dev. Genes Evol.* 213, 222-234 (2003).
- 20.0309041633
Yagi, K., Satou, Y., Mazet, F., Shimeld, S. M., Degnan, B., Rokhsar, D., Levine, M., Kohara, Y. and Satoh, N., A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*: III. Genes for Fox, ETS, nuclear receptors and NF κ B. *Dev. Genes Evol.* 213, 235-244 (2003).
- 21.0309041643
Yamada, L., Kobayashi, K., Degnan, B., Satoh, N. and Satou, Y., A genomewide survey of developmentally

- relevant genes in *Ciona intestinalis*: IV. Genes for HMG transcriptional regulators, bZip and GATA/Gli/Zic/Snail. *Dev. Genes Evol.* 213, 245-253 (2003).
- 22.0309041649
Satou, Y., Sasakura, Y., Yamada, L., Imai, K. S., Satoh, N. and Degnan, B., A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*: V. Genes for receptor tyrosine kinase pathway and Notch signaling pathway. *Dev. Genes Evol.* 213, 254-263 (2003).
- 23.0309041656
Hino, K., Satou, Y., Yagi, K. and Satoh, N., A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*: VI. Genes for Wnt, TGF β , hedgehog and JAK/STAT signaling pathways. *Dev. Genes Evol.* 213, 264-272 (2003).
- 24.0309041707
Sasakura, Y., Yamada, L., Takatori, N., Satou, Y. and Satoh, N., A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*: VII. Molecules involved in the regulation of cell polarity and actin dynamics. *Dev. Genes Evol.* 213, 273-283 (2003).
- 25.0309041715
Kawashima, T., Tokuoka, M., Awazu, S., Satoh, N. and Satou, Y., A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*: VIII. Genes for PI3K signaling and cell cycle. *Dev. Genes Evol.* 213, 284-290 (2003).
- 26.0309041721
Chiba, S., Awazu, S., Itoh, M., Chin-Bow, S. T., Satoh, N., Satou, Y. and Hastings, K. E. M., A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*: IX. Genes for muscle structural proteins. *Dev. Genes Evol.* 213, 291-302 (2003).
- 27.0309041729
Sasakura, Y., Shoguchi, E., Takatori, N., Wada, S., Meinertzhagen, I. A., Satou, Y. and Satoh, N., A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*: X. Genes for cell junctions and extracellular matrix. *Dev. Genes Evol.* 213, 303-313 (2003).
- 28.0309041739
Satou, Y., Kawashima, T., Kohara, Y. and Satoh, N., Large scale EST analyses in *Ciona intestinalis*: Its application as Northern blot analyses. *Dev. Genes Evol.* 213, 314-318 (2003).
- 29.0309041750
Elphick, M. R., Satou, Y. and Satoh, N., The invertebrate ancestry of endocannabinoid signalling: an orthologue of vertebrate cannabinoid receptors in the urochordate *Ciona intestinalis*. *Gene* 302, 95-101 (2003).
- 30.0309041758
Terajima, D., Shida, K., Takada, N., Kasuya, A., Rokhsar, D., Satoh, N., Satake, M. and Wang, H.-G., Identification of candidate genes encoding the core components of the cell death machinery in the *Ciona intestinalis* genome. *Cell Death Differ.* 10, 749-753 (2003).
- 31.0309041805
Mochizuki, Y., Satou, Y. and Satoh, N., Large-scale characterization of genes specific to the larval nervous system in the ascidian *Ciona intestinalis*. *genesis* 36, 62-71 (2003).
- 32.0404141704
Azumi, K., De Santis, R., De Tomaso, A., Rigoutsos, I., Yoshizaki, F., Pinto, M. R., Marino, R., Shida, K., Ikeda, M., Ikeda, M., Arai, M., Inoue, Y., Shimizu, T., Satoh, N., Rokhsar, D. S., Du Pasquier, L., Kasahara, M., Satake, M. and Nonaka, M., Genomic analysis of immunity in a urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot". *Immunogenetics* 55, 570-581 (2003).
- 33.0408131056
Shoguchi, E., Ikuta, T., Yoshizaki, F., Satou, Y., Satoh, N., Asano, K., Saiga, H. and Nishikata, T., Fluorescent in situ hybridization to ascidian chromosomes. *Zool. Sci.* 21, 153-157 (2004).
- 34.0408131104
Yagi, K., Satou, Y. and Satoh, N., A zinc finger transcription factor, ZicL, is a direct activator of Brachyury in the notochord specification of *Ciona intestinalis*. *Development* 131, 1279-1288 (2004).
- 35.0408131111
Takatori, N., Hotta, K., Mochizuki, Y., Satoh, G., Mitani, Y., Satoh, N., Satou, Y. and Takahashi, H., T-box genes in the ascidian *Ciona intestinalis*: Characterization of cDNAs and spatial expression. *Dev. Dynamics* 230, 743-753 (2004).
- 36.0408131121
Campbell, R. K., Satoh, N. and Degnan, B. M., Piecing together evolution of the vertebrate endocrine system. *Trends Genet.* 20, 359-366 (2004).
- 37.0408131130
Imai, K. S., Hino, K., Yagi, K., Satoh, N. and Satou, Y., Gene expression profiles of transcription factors and signaling molecules in the ascidian embryo: towards a comprehensive understanding of gene networks. *Development* 131, 4047-4058 (2004).
- 38.0602101118
Keys, D. N., Lee, B.-i., DiGregorio, A., Harafuji, N., Detter, J. C., Wang, M., Kahsai, O., Ahn, S., Zhang, C., Doyle, S. A., Satoh, N., Satou, Y., Saiga, H., Christian, A. T., Rokhsar, D. S., Hawkins, T. L., Levine, M. and Richardson, P. M., A saturation screen for cis-acting regulatory DNA in the Hox genes of *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 679-683 (2005).
- 39.0602101125
Kawashima, T., Satou, Y., Murakami, S. D. and Satoh, N., Dynamic changes in developmental gene expression in the basal chordate *Ciona intestinalis*. *Dev. Growth Differ.* 47, 187-199 (2005).
- 40.0602101128
Satoh, N. and Levine, M., Surfing with the tunicates into the post-genome era. *Genes Dev.* 19, 2407-2411 (2005).
- 41.0602101132
Yagi, K., Takatori, N., Satou, Y. and Satoh, N., Ci-Tbx6b and Ci-Tbx6c are key mediators of the maternal effect gene Ci-machol in muscle cell differentiation in *Ciona intestinalis* embryos. *Dev. Biol.* 282, 535-549 (2005).
- 42.0602101143
Shoguchi, E., Kawashima, T., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y. and Satoh, N., Molecular cytogenetic characterization of *Ciona intestinalis* chromosomes.

- Zool. Sci. 22, 511-516 (2005).
- 43.0602101146
Takeuchi, K., Satou, Y., Yamamoto, H. and Satoh, N., A genome-wide survey of genes for enzymes involved in pigment synthesis in an ascidian, *Ciona intestinalis*. Zool. Sci. 22, 723-734 (2005).
- 44.0602101152
Okamura, Y., Nishino, A., Murata, Y., Nakajo, K., Iwasaki, H., Ohtsuka, Y., Tanaka-Kunishima, M., Takahashi, N., Hara, Y., Yoshida, T., Nishida, M., Okado, H., Watari, H., Meinertzhagen, I. A., Satoh, N., Takahashi, K., Satou, Y., Okada, Y. and Mori, Y., Comprehensive analysis of the ascidian genome reveals novel insights into the molecular evolution of ion channel genes. *Physiol. Genomics* 22, 269-282 (2005).
- 45.0602101156
Vinson, J. P., Jaffe, D. B., O'Neill, K., Karlsson, E. K., Stange-Thomann, N., Anderson, S., Mesirov, J. P., Satoh, N., Satou, Y., Nusbaum, C., Birren, B., Galagan, J. E. and Lander, E. S., Assembly of polymorphic genomes: Algorithms and application to *Ciona savignyi*. *Genome Res.* 15, 1127-1135 (2005).
- 46.0602101538
Ishibashi, T., Usami, T., Fujie, M., Azumi, K., Satoh, N. and Fujiwara, S., Oligonucleotide-based microarray analysis of retinoic acid target genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Dev. Dynamics* 233, 1571-1578 (2005).
- 47.0602101540
Satou, Y., Kawashima, T., Shoguchi, E., Nakayama, A. and Satoh, N., An integrated database of the ascidian, *Ciona intestinalis*: Towards functional genomics. Zool. Sci. 22, 837-843 (2005).
- 48.0602101543
Satou, Y. and Satoh, N., Cataloging transcription factor and major signaling molecule genes for functional genomic studies in *Ciona intestinalis*. *Dev. Genes Evol.* 215, 580-596 (2005).
- 49.0602101545
Johnson, D. S., Zhou, Q., Yagi, K., Satoh, N., Wong, W. and Sidow, A., De novo discovery of a tissue-specific gene regulatory module in a chordate. *Genome Res.* 15, 1315-1324 (2005).
- 50.0602101548
Sasakura, Y., Nakashima, K., Awazu, S., Matsuoka, T., Nakayama, A., Azuma, J.-i. and Satoh, N., Transposon-mediated insertional mutagenesis revealed the functions of animal cellulose synthase in the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 15134-15139 (2005).
- 51.0602101617
Shoguchi, E., Kawashima, T., Satou, Y., Hamaguchi, M., Sin-i, T., Kohara, Y., Putnam, N., Rokhsar, D. S. and Satoh, N., Chromosomal mapping of 170 BAC clones in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Genome Res.* 16, 297-303 (2006).
- 52.0602101624
Miwata, K., Chiba, T., Horii, R., Yamada, L., Kubo, A., Miyamura, D., Satoh, N. and Satou, Y., Systematic analysis of embryonic expression profiles of zinc finger genes in *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* in press (2006).

2) データベース

<http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/Indx.html>

3) 特許など

なし