

## 発生分化システムの多様化と進化の研究

●五條堀 孝

国立遺伝学研究所 生命情報・DDBJ研究センター

### 〈研究の目的と進め方〉

多細胞生物の遺伝子システムの多様化の進化機構を解明することを目的に研究を進める。対象を神経系の多様化と種分化に関わる形態の多様化に絞り、遺伝子発現プロファイルの進化的な比較解析手法を用いる。

研究を進める上で各種生物・器官毎における遺伝子発現プロファイルの違いを調べることで、遺伝子発現制御ネットワークの変化が生物進化におよぼした影響を調べていく。多様な生物種におけるゲノム情報と遺伝子発現情報を組み合わせて比較解析をすることを目的とするため、具体的には、「脳神経系の発生進化機構」「種分化の分子機構」という2つの具体的な問題に集中して研究を行う。これらの研究目的を達成するために、ゲノムや関係する遺伝子群の比較解析が可能であり、それぞれの具体的な問題に適した生物種を選定した。

1つめの課題である「脳神経系の発生分化システムの多様化と進化機構」に関しては、脊椎動物と無脊椎動物の分岐以前に派生したと考えられ、かつ最も原始的な脳を持つとされる扁形動物・プラナリアを用いて研究を行う。神経系とそれに関連した遺伝子システムに注目し、cDNA配列決定とマイクロアレイによって遺伝子発現プロファイルを決定し、プラナリアの脳に特異的な遺伝子システムを解明する。

もう一方の課題である「種分化の分子機構」に関しては、アフリカのタンザニア湖に生息しわずか数百万年で激しい種分化を経験したといわれるカワズメ科魚類のシクリッドを用いて研究を行う。互いに近縁なシクリッドのゲノムの中で、種特異的な形態的あるいは生態的特徴に結びつく遺伝的変異を検出し、表現型へと結びつく分子機構を解明する。

### 〈研究開始時の研究計画〉

異種間のゲノム情報を比較検討することにより、多細胞の遺伝子システムの多様性と進化機構を解明することを目的とした。この目的を具体的に達成するため、比較ゲノム解析のための中心的な対象物を系統進化の過程を考慮して次のように選定した。それらは、プラナリア（扁形動物：脊椎動物と無脊椎動物の分岐以前に派生したと考えられるもの）、シクリッド（魚類：脊椎動物出現後、間もなく誕生したと考えられるもの）である。個々の研究グループにおいて以下のように研究をすすめる。(1) 脳神経系の進化の研究（五條堀）では神経系とそれに関連した遺伝子システムに注目し、プラナリアの脳の各組織におけるcDNA配列決定とマイクロアレイによって遺伝子発現プロファイルを決定する。(2) 比較ゲノム解析による発生分化システムの多様化と進化の研究（岡田）ではシクリッド魚類の発生の過程で、それぞれの発生段階で鍵になる細胞中でどのような遺伝子が発現しているかを調べるため、まずESTのカタログ作りをおこなう。鍵となる細胞をいくつか選択し、そこからRNAを抽出し逆転写酵素を用いて相補的なDNAを合成した後、塩基配列を決定し遺伝子発現プロファイルを作成する。cDNA

チップを作成し、発生の過程でどのような遺伝子が発現しているのかを検討する。

### 〈研究期間の成果〉

#### (1) 脳神経系の発生進化機構

(i) 遺伝子発現プロファイル作成プロジェクト：中枢神経系の原始的な形態を持つ動物としてプラナリアを選び、再生の時期に神経系に特異的に発現する遺伝子のcDNA配列収集を行い、それをもとにマイクロアレイを構築し、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの作成を行った（京都大学研究室との共同研究 38,43,45,47）。この結果、プラナリア中枢神経において脳形成に特異的に機能する遺伝子が多数見つかった。また、このプラナリア遺伝子と植物を含むほかの種との比較ゲノム的な解析を行うことにより、神経系に重要な遺伝子であっても、かなりの遺伝子が植物と動物に共通に存在する非常に起源の古い遺伝子であることが明らかになってきた。本研究を通じて116遺伝子のプラナリア脳で発現する遺伝子が既に植物と動物の分岐以前に存在し、進化の過程で新たな機能や発現調節を得ることにより神経系の分化に大きな役割を持つようになったことが推定された(37)。さらに、これらの遺伝子のプラナリア脳における発現部位を調べたところ、既にプラナリア脳において遺伝子の発現パターンレベルでの領域化が進んでいることが明らかになった(38)。このことは、脳の進化において、かなりの遺伝子メカニズムがこれまで考えられていた以上に古くから出現していたことを示唆している。次に、神経系の進化を考える上で重要な種であるヒドラ（散在神経系を持ち集中神経系を持たない）や脊椎動物の祖先型を持つホヤを用いて比較ゲノム学的手法を中心にして神経系に関する遺伝子の進化を総合的に調べた。この結果、神経系に関する遺伝子は、進化の早い段階に出現した遺伝子が新たな機能を獲得しただけでなく、進化過程における遺伝子の獲得と消失が大きな役割を果たしたことが伺えた。特に、タコの眼（脊椎動物と異なるカメラ眼を持つ）に関わる遺伝子の出現時期を調べたところ、眼の進化において遺伝子の消失の果たした役割が大きかったと推定された(18,12)。

(ii) 各種生物種における器官毎の遺伝子発現データの収集とデータベース化：上記発現プロファイル研究を通して得られた情報や発表済みの発現研究に関するデータを収集しデータベース化を行った(13,14,22,23,25)。これらの一部はDDBJを通じてCIBEX（遺伝子発現データデータベース）として公開されている。また、マイクロアレイ実験に関する文献情報の整備も行った。

(iii) 遺伝子発現の比較方法の開発と表現方法の検討：遺伝子発現パターンを統合的に扱うためのシステムのプロトタイプの開発を進めた。さらに、遺伝子発現プロファイルの比較のための統計的手法を検討し、TFIDFという文献比較に用いられる手法の遺伝子発現データへの応用を検討した。

#### (2) 発生分化システムの多様化と進化の研究

(i) シクリッドの種特異的な顎形態の形成機構解明のため、EST配列決定により遺伝子発現の比較および遺伝子配列の比較を行った。決定したEST配列を用いてマイクロアレイの作成を構築し、シクリッド種間における遺伝子発現の違いおよびシクリッドの個体内で顎部特異的に発現する遺伝子のスクリーニングを行った。得られた遺伝子について現在のところ目的とする遺伝変異は検出されていないが、現在も解析を継続中である。

(ii) 形態形成に関わる他生物での既知遺伝子をシクリッドより単離し、シクリッド種間で塩基配列の比較を行った。その結果、骨形成に関わるBMP4、視物質の構造遺伝子であるLWSに種特異的な遺伝変異の蓄積が見られた。LWS遺伝子のイントロンの解析から、LWS遺伝子が強い正の選択を受け、シクリッドの進化に大きく関与していることが考えられた。更にRH1遺伝子にも大きな多様化が見られ、シクリッドの環境適応や性選択にこれらの遺伝子が重要であることが示唆された。さらに体表模様形成に関わるhagoromo遺伝子にも遺伝子発現パターンに多様性が見られた。シクリッドは様々な模様・色を持つことでも知られるが、その原因の一つとしてhagoromo遺伝子のスプライスパターンが多様化し、シクリッド特異的なアイソフォームが存在することが明らかになった。

(iii) シクリッドの多様化をゲノムレベルで大規模に解析する目的でBACライブラリーの作成を行った。平均インサート長120kbでゲノムを約10回カバーするクローンを調整した。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

近年モデル生物以外のESTプロジェクトが世界的に再び盛んになってきている。しかし、進化的な視点で動物を選んで進められているプロジェクトは多くない。また、生物情報科学の手法を導入して網羅的な比較研究を進めているグループは少ない。しかし、今後、各種のゲノム配列データが利用可能になり、網羅的な遺伝子の解析と形態の関係を議論していくことは種の進化の研究に必須の手法となっていくと予測される。このような姿勢が進化研究者の賛同を得て現在国内外の研究室から共同研究の申し込みが寄せられている。

生物の多様化機構を比較ゲノムによって行うに当たり、シクリッドはもっとも理想とされる生物種である。一方、シクリッドの各遺伝子に関する研究を大規模に行った例は無く、また生物学的に貴重であるにもかかわらず絶滅に瀕しているため、シクリッドの遺伝情報の収集という観点から本研究は重要である。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

(1) 現在本格的な公開に向けて遺伝子発現データベースの整備を進めている。さらに遺伝子発現プロファイル比較法も本格的な利用には至っておらず、さらなる検証が必要と考えられる。

(2) ヴィクトリア湖産シクリッドに関しては野生種由来のcDNAが存在しないことからコーディング領域の比較が容易ではない。

#### 〈今後の課題〉

今後はデータベースの公開に向けてインターフェースの開発に力を注ぐとともに、多種多様な利用可能データの取り込みをより進めていくことが比較解析の視点からも重要である。本研究で整備されたデータベースはマイクロアレイのデータを中心にSAGEなどのデータを調

査・収集した各生物種における器官ごとの遺伝子発現パターンデータベースである。データベースの比較解析を目的とした部分では、独自に収集したデータはまだしも、比較のための多様な種に関係した遺伝子発現データの収集はまだ不十分である。同時にマイクロアレイに代表される遺伝子発現データの再現性や定量性の問題により、独立した実験結果をどのように定量的に扱うかの方法論の確立が今後の課題の一つである。さらには、遺伝発現ネットワークを想定した種間比較の方法に関しても、改良と新規開発の余地が残っている。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1: Osada N, et al. Substitution Rate and Structural Divergence of 5'UTR Evolution: Comparative Analysis Between Human and Cynomolgus Monkey cDNAs. *Mol Biol Evol.* 2005 22(10):1976-1982.

2: Choy, KW, et al. Genomic annotation of 15,809 ESTs identified from pooled early gestation human eyes. *Physiological Genomics* 2005 Dec 20; [Epub ahead of print]

3: Noda, AO, et al. Comparative genome analyses of nervous system-specific genes. *Gene* 2005 [Epub Dec 20.]

4: Tanaka T et al. Evolution of metabolic networks by gain and loss of enzymatic in eukaryotes. *Gene* 2005 [Epub 2005 Dec 15]

5: Koyanagi KO, et al. Comparative genomics of bidirectional gene pairs and its implications for the evolution of a transcriptional regulation system. *Gene.* 2005 Jul 4;353(2):169-76.

6: Nishio Y, et al. Comparative whole genome sequence analysis of corynebacteria. *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure II.* 2005 121-129

7: Kijimoto T, et al. cimp1, A Novel Astacin Family Metalloproteinase Gene from East African Cichlids, Is Differentially Expressed Between Species During Growth. *Mol Biol Evol.* 2005 Aug;22(8):1649-1660.

8: Fujii, Y. et al. A web tool for comparative genomics: G-compass. *Gene* 2005. 364C, 45-524

9: Shirai T, et al. Comparative study of flux redistribution of metabolic pathway in glutamate production by two coryneform bacteria. *Metab Eng.* 2005 Mar;7(2):59-69.

10: Ogasawara M, et al. Length variation of CAG/CAA triplet repeats in 50 genes among 16 inbred mouse strains. *Gene.* 2005 Apr 11;349:107-19.

11: Ogura A, Ikeo K, Gojobori T. Estimation of ancestral gene set of bilaterian animals and its implication to dynamic change of gene content in bilaterian evolution. *Gene.* 2005 Jan 17;345(1):65-71. Epub 2005 Jan 5.

12: Tanino M, et al. The Human Anatomic Gene

- Expression Library (H-ANGEL), the H-Inv integrative display of human gene expression across disparate technologies and platforms. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 1;33(Database issue):D567-72.
- 13: Tateno Y, Saitou N, Okubo K, Sugawara H, Gojobori T. DDBJ in collaboration with mass-sequencing teams on annotation. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 1;33(Database issue):D25-8.
- 14: Iwama H, Gojobori T. Highly conserved upstream sequences for transcription factor genes and implications for the regulatory network. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Dec 7;101(49):17156-61.
- 15: Kadota M, et al. Proteomic signatures and aberrations of mouse embryonic stem cells containing a single human chromosome 21 in neuronal differentiation: an in vitro model of Down syndrome. *Neuroscience.* 2004;129(2):325-35.
- 16: Alexopoulos H, et al. Evolution of gap junctions: the missing link? *Curr Biol.* 2004 Oct 26;14(20):R879-80.
- 17: Tanaka T, Tateno Y, Gojobori T. Evolution of vitamin B6 (pyridoxine) metabolism by gain and loss of genes. *Mol Biol Evol.* 2005 Feb;22(2):243-50.
- 18: Ogura A, Ikeo K, Gojobori T. Comparative analysis of gene expression for convergent evolution of camera eye between octopus and human. *Genome Res.* 2004 Aug;14(8):1555-61.
- 19: Nakamura Y, Itoh T, Matsuda H, Gojobori T. Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nat Genet.* 2004 Jul;36(7):760-6. Erratum in: *Nat Genet.* 2004 Oct;36(10):1126.
- 20: Hwang JS, et al. Detection of apoptosis during planarian regeneration by the expression of apoptosis-related genes and TUNEL assay. *Gene.* 2004 May 26;333:15-25.
- 21: Toyoda R, et al. Pigment cell lineage-specific expression activity of the ascidian tyrosinase-related gene. *Gene.* 2004 May 12;332:61-9.
- 22: Imanishi T, et al. Integrative annotation of 21,037 human genes validated by full-length cDNA clones. *PLoS Biol.* 2004 Jun;2(6):e162. E
- 23: Ikeo K, et al. CIBEX: center for information biology gene expression database. *CR Biol.* 2003 Oct-Nov;326(10-11):1079-82.
- 24: Wang CC, et al. Molecular hierarchy in neurons differentiated from mouse ES cells containing a single human chromosome 21. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Feb 6;314(2):335-50.
- 25: Miyazaki S, Sugawara H, Ikeo K, Gojobori T, Tateno Y. DDBJ in the stream of various biological data. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 1;32(Database issue):D31-4.
- 26: Yajima I, et al. Cloning and functional analysis of ascidian *Mitf* in vivo: insights into the origin of vertebrate pigment cells. *Mech Dev.* 2003 Dec;120(12):1489-504.
- 27: Ohshima K, et al. Whole-genome screening indicates a possible burst of formation of processed pseudogenes and Alu repeats by particular L1 subfamilies in ancestral primates. *Genome Biol.* 2003;4(11):R74.
- 28: Hotta K, et al. A genome-wide survey of the genes for planar polarity signaling or convergent extension-related genes in *Ciona intestinalis* and phylogenetic comparisons of evolutionary conserved signaling components. *Gene.* 2003 317(1-2):165-85.
- 29: Niimura Y, et al. Comparative analysis of the base biases at the gene terminal portions in seven eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* 2003 Sep;31(17):5195-201.
- 30: Nishio Y, et al. Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*. *Genome Res.* 2003 13(7):1572-9.
- 31: Nakamura Y, et al. The genome stability in *Corynebacterium* species due to lack of the recombinational repair system. *Gene* 2003 317, 149-55
- 32: Ando A, et al. Genetic polymorphism of the swine major histocompatibility complex (SLA) class I genes, SLA-1, -2 and -3. *Immunogenetics* 2003 55, 583-03.
- 33: Anzai T, et al. Comparative sequencing of human and chimpanzee MHC class I regions unveils insertions /deletions as the major path to genomic divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003 :100, 7708-13
- 34: Komiyama T, et al. Where is the origin of the Japanese gamecock? *Gene* 2003: 317, 195-202
- 35: Ota K, et al. Highly differentiated and conserved sex chromosome in fish species (*Aulopus japonicus*:Teleostei, Aulopidae). *Gene* 2003: 317, 187-93
- 36: Ishibashi T, et al. Microarray analysis of embryonic retinoic acid target genes in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev Growth Differ.* 2003 Jun;45(3):249-59.
- 37: Mineta K, et al. Origin and evolutionary process of the CNS elucidated by comparative genomics analysis of planarian ESTs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 ;100(13):7666-71.
- 38: Nakazawa M, et al. Search for the evolutionary origin of a brain: planarian brain characterized by microarray. *Mol Biol Evol.* 2003 20(5):784-91.
- 39: Piskurek O, et al. Unique mammalian tRNA-derived

repetitive elements in dermopterans: The t-SINE family and its retrotransposition through multiple sources. *Mol Biol Evol.* 2003 20(10):1659-68.

40: Kawai K, et al. The status of the Japanese and East asian bats of the genus *Myotis* (Vespertiliidae) based on mitochondrial sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2003 28 (2) :297-307.

41: Terai Y, et al. Using SINEs to probe ancient explosive speciation: "hidden" radiation of African cichlids? *Mol Biol Evol.* 2003 20(6):924-930.

42: Iwama H, Gojobori T. Identification of neurotransmitter receptor genes under significantly relaxed selective constraint by orthologous gene comparisons between humans and rodents. *Mol Biol Evol.* 2002 Nov;19(11):1891-901.

43: Cebria F, et al. FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians. *Nature.* 2002 Oct 10;419(6907):620-4.

44: Ogawa K, et al. Induction of a *noggin*-like gene by ectopic DV interaction during planarian regeneration. *Dev Biol.* 2002 Oct 1;250(1):59-70.

45: Cebria F, et al. The expression of neural-specific genes reveals the structural and molecular complexity of the planarian central nervous system. *Mech Dev.* 2002 Aug;116(1-2):199-204.

46: Blair JE, et al. The evolutionary position of nematodes. *BMC Evol Biol.* 2002 Apr 8;2(1):7.

47: Cebria F, et al. Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. *Dev Growth Differ.* 2002 Apr;44(2):135-46.

48: Sato S, et al. Functional conservation of the promoter regions of vertebrate tyrosinase genes. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2001 Nov;6 (1):10-8.

49: Toyoda R, et al. Pigment cell-specific expression of the tyrosinase gene in ascidians has a different regulatory mechanism from vertebrates. *Gene.* 2000 Dec 23;259 (1-2):159-70.

## 2) データベース

CIBEX <http://cibex.nig.ac.jp/index.jsp>

国際標準に準拠した国際発現データベース

遺伝子機能発現研究会

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/gxpress/index.html>

マイクロアレイ文献

## 3) 発明、特許など

## 4) その他顕著なもの