

ホヤ遺伝子発現調節領域の構造と機能の網羅的解析

●日下部 岳広

兵庫県立大学大学院生命理学研究科

〈研究の目的と進め方〉

多細胞生物の高度に統合された形態と機能は、多くの遺伝子のはたらきが空間的、時間的、および量的に正しく制御されることにより作られる。この制御には転写レベルの遺伝子の発現調節機構が大きな役割を果たしている。遺伝子の転写制御は多くの転写調節タンパク質とゲノムDNA上のシス調節配列との相互作用によってもたらされる。したがって、ゲノムに刻み込まれた多細胞生物の遺伝子プログラムを解明するためには、遺伝子産物の一次構造を直接規定するコード領域の機能だけでなく、主に非コード領域に存在するシス調節配列の機能を明らかにする必要がある。ところがコード領域に比べ、シス調節配列の情報科学的方法のみによる発見と機能予測は现阶段では困難であり、実験的手法による解析が中心となっている。一方、個体発生におけるシス調節配列の解析はレポーター遺伝子を導入したトランスジェニック生物の作製によるが、特に脊椎動物では労力と時間がかかり、シス調節配列の構成と機能が詳細に明らかにされた遺伝子は限られている。

本研究では、ホヤ（カタユレイボヤ *Ciona intestinalis*）幼生の神経系をモデルとして、神経系特異的に発現する多数の遺伝子のシス調節配列の網羅的解析を行なう。ホヤ幼生は本研究を進めるにあたって次のようなユニークな利点をもつ。(1) 脊索動物の基本的組織要素をすべてもちながらも総細胞数が2600個ときわめて少ない、(2) 細胞系譜が詳細に解明されている、(3) 胚発生が短時間（カタユレイボヤで約18時間）に完了する、(4) ゲノムサイズが約160Mbと小さく、遺伝子総数も脊椎動物と比べてかなり少ない、(5) 胚への遺伝子導入法が確立されており、短時間で多くの種類のDNAコンストラクトの発現を解析することが可能である、(6) イントロンのサイズは一般に小さく、また組織特異的転写に必要なシス調節配列が遺伝子上流の短い領域に含まれることが多い。

ホヤ幼生の中樞神経系の細胞数はわずか330個ほどであるが、脊椎動物の中樞神経系の基本的構成を備えている。本研究では中樞神経系で特異的に発現する遺伝子群に的を絞り、遺伝子発現調節領域とレポーター遺伝子との融合遺伝子を胚に導入して発現解析を行なうとともに、上流領域の配列の比較を行なう。こうして得られる実験結果をデータベース化し、(1) シスエレメント検索システムの構築、(2) 転写調節領域の機能予測（発現パターンの予測）、(3) ホヤ神経系発生の遺伝子プログラムのモデル化、を目指す。本研究はゲノムに刻み込まれた発生プログラムの解明につながるとともに、ゲノム研究におけるシス調節配列の情報科学的アプローチの開発にも貢献すると期待される。

〈研究開始時の研究計画〉

1. 神経系特異的遺伝子上流領域のクローニング

脊椎動物の中樞神経系で特異的に発現する遺伝子（発現調節遺伝子および特異的分化マーカー）のホヤホモロ

グのcDNAクローニング、および国立遺伝研および京都大学で解析されているカタユレイボヤESTクローンの幼生期の発現解析により、神経系特異的遺伝子を得る。神経系特異的遺伝子上流領域を、ゲノムDNAライブラリーのスクリーニング、inverse PCR法、またはPCRによるgenome walking法により単離する。100個の神経系特異的遺伝子上流領域の解析を目標とする。

2. 遺伝子上流領域-GFPレポーター融合遺伝子のホヤ胚における発現解析

1で得られた上流領域にレポーターとしてGFP遺伝子をつないだ融合遺伝子を作製する。融合遺伝子上流領域の5'側から削り、単離した上流領域全体の塩基配列を決定する。これらの融合遺伝子コンストラクトを電気穿孔法または顕微注入法によりホヤ胚に導入し、レポーター遺伝子の発現を調べる。

3. 遺伝子上流領域の塩基配列の比較解析

各遺伝子上流領域を比較し、遺伝子間で保存された配列を検索するとともに、既知の転写因子の結合コンセンサス配列を検索する。配列比較には既存の塩基配列解析用計算機プログラムを利用するとともに、必要に応じて解析用プログラムを作成する。

4. 上流領域への変異導入によるシス転写調節配列の機能解析

塩基配列の比較解析によりみいだした転写調節に関わる可能性がある配列に変異を導入したGFP融合遺伝子や、さまざまな欠失変異を導入したGFP融合遺伝子を作製し、ホヤ胚の体内でのレポーター遺伝子の発現を調べる。

5. 計算機によるシス調節配列解析システムの開発

遺伝子情報、遺伝子上流領域の塩基配列、シスエレメントの検索結果、上流領域の機能解析結果などをデータベース化する。構築したデータベースを活用し、次の3点に関するコンピュータ上の解析システムの開発を検討する。

- (1) シスエレメント検索システムの構築
- (2) 転写調節領域の機能予測（発現パターンの予測）
- (3) ホヤ神経系発生の遺伝子プログラムのモデル化

〈研究期間の成果〉

1. 神経特異的遺伝子上流領域のクローニング

脊椎動物の神経系特異的遺伝子のオーソログとして、オープン遺伝子ファミリー（文献1,5,7）、Gタンパク質遺伝子（文献4,9）、GnRH受容体遺伝子（文献8）、アレスタン遺伝子（文献9）、小胞型アセチルコリントランスポーター遺伝子（文献9）、小胞型GABAトランスポーター遺伝子（文献9）、小胞型グルタミン酸トランスポーター遺伝子、Pax遺伝子ファミリー、Six遺伝子ファミリーなどを同定し、発生過程における遺伝子発現パターンを明らかにした。これと平行して、in situ ハイブリダイゼーション

ョンによりホヤ幼生で発現する1000以上の遺伝子の発現プロファイルを明らかにし、多数の組織特異的遺伝子をみいだした(文献2,3; データベース1)。神経系で発現するクラスターが245個みいだされ、うち60個は神経系のみで発現した(文献2)。脊椎動物の眼で重要な役割を担う遺伝子のホヤホモログの解析を通して、ヒト遺伝子病の新規原因遺伝子の解析にも貢献した(文献11)。神経細胞サブタイプ特異的な抗体を作製し、後述する特異的プロモーターによるGFP標識とあわせて、これまで困難だったホヤ幼生神経系の細胞の同定が可能になり、主要なニューロンサブタイプの分布をほぼ明らかにした(文献9; 論文準備中)。

同定した神経系特異的遺伝子のうち、約90遺伝子について遺伝子上流領域のクローニングが完了した。クローニングができていない遺伝子は、遺伝子周辺のゲノム配列情報や遺伝子予測が不完全などの理由によりゲノム情報から上流領域が特定できなかったものである。したがって、本研究により既同定の神経系特異的遺伝子の大半について上流領域のクローニングが行われた。また、当初からの研究対象であった神経系特異的遺伝子に加え、対照群として、また情報科学的解析のモデルとして、カタユウレイボヤおよびユウレイボヤ*C. savignyi*の筋肉特異的遺伝子についても同様の解析を行った(文献10)。

2. 遺伝子上流領域-GFPレポーター融合遺伝子のホヤ胚における発現解析

上記1で得られたすべての遺伝子上流領域について、GFP遺伝子をつないだ融合遺伝子を作製した。これらの融合遺伝子コンストラクトを電気穿孔法によりホヤ胚に導入し、レポーター遺伝子の発現を調べた。視細胞特異的遺伝子、コリン作動性ニューロン特異的遺伝子、GABA作動性ニューロン特異的遺伝子、グルタミン酸作動性ニューロン特異的遺伝子、ニューロン全般で発現する遺伝子、筋肉特異的遺伝子上流領域の機能解析を行い、各細胞タイプで特異的に発現するために必要な領域を同定した(文献9,10)。

3. 遺伝子上流領域の塩基配列の比較解析

*C. intestinalis*と近縁種*C. savignyi*の計50個の遺伝子上流領域の塩基配列を、計算機を用いて比較した(文献10,12)。ニューロン特異的遺伝子、視細胞で発現する遺伝子、筋肉細胞特異的遺伝子の3グループについて、各グループのプロモーターに特異的に共有されるモチーフをみいだした。いくつかは既知転写因子の結合配列に類似したものであったが、他の多くは新規なシス配列である可能性が高い。いくつかのモチーフは転写開始点から一定の距離に存在する傾向がみられた。

*C. intestinalis*と*C. savignyi*のゲノム配列が明らかになった結果、両種の形態的な類似とは対照的にゲノム配列はきわめて相違度が高いことが判明した。神経系特異的遺伝子の両種間での比較ゲノム解析によって、非コード領域に保存された配列をみいだした(文献12; 論文準備中)。

4. シス転写調節配列および神経特異的遺伝子のin vivo機能解析

計算機によりみいだされた筋肉特異的モチーフ部位に変異を導入することにより、これらが細胞特異的な発現に重要なシス調節配列であることを示した(文献10,12)。3つの神経特異的遺伝子(Ci-G α 11、Ci-VGLUT、Ci-CRALBP)について、種間で保存された領域が神経細胞

特異的シス配列であることを実験的に示した(論文準備中)。

ホヤ神経系発生の遺伝子プログラムの解明にむけ、遺伝子機能のin vivo解析を進めた(文献6; 論文投稿中)。アンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドを受精卵に顕微注入することにより、神経系特異的な転写因子や機能タンパク質の遺伝子のノックダウンに成功した。

5. 計算機によるシス調節配列解析システムの開発

横紋筋細胞や視細胞をモデルとして、共発現遺伝子群の転写調節領域に共有されるモチーフを情報科学的に発見し、統計学的に評価する手法を開発した(文献10,12)。神経系特異的遺伝子と筋肉特異的遺伝子について、遺伝子情報と上流領域のデータベースを構築した。複数のモチーフの組合せや位置の情報に基づいた組織特異的プロモーターの構造モデルを構築した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ホヤの遺伝子の転写調節領域に関する研究は研究代表者らによる筋肉アクチン遺伝子の研究が最初であり、以来ホヤ胚における遺伝子導入・発現解析法の改良を重ねてきた。ホヤ幼生の網羅的な遺伝子発現プロファイル解析により、神経系で発現する遺伝子を多数同定した。これを活用して、特定の細胞で共発現する遺伝子のプロモーターに共通に存在する新規モチーフを情報科学的に発見し、その機能を実験で証明することに成功した(文献10,12)。これまで、計算機を用いてゲノム配列からシス調節配列を発見することは細菌や酵母で成功しているが、多細胞生物では限られた成功例しかなく、ゲノム機能研究における先駆的な成果であるといえる。ほぼ同時期に米国の2つのグループも情報科学的解析と検証実験を組み合わせてホヤゲノムの転写制御配列を探索した論文を発表したが、異なる手法を用いており、我々の結果はユニークなものであった。一方で、我々が予測したシス配列の一つが米国のグループが種間比較によって同定した配列と完全に一致した。このことは、情報科学的なシスエレメントの探索が信頼性の高いものであることを示しているといえるであろう。2004-2005年に発表した我々のホヤ転写調節領域に関する論文(文献10,12)が、2005年に主要国際誌に発表された論文(Johnson et al. *Genome Research* 15:1315-1324, 2005; Stathopoulos and Levine. *Developmental Cell* 9:449-462, 2005; Shi et al. *Genome Research* 15:1668-1674, 2005など)に引用されていることから、本研究の成果が国際的に注目されていることがうかがえる。

各種ニューロンに特異的なプロモーターは我々により初めて同定されたものである。これらを活用して平成18年度からフランスCNRSのPhilippe Vernier博士らとの国際共同研究を開始する予定である。

本特定領域研究の成果に基づいて、平成17年度から東京大学医科学研究所・中井謙太教授とホヤ転写調節領域のゲノムインフォマティクスに関する共同研究を開始し、ホヤ転写制御データベースを作成・公開した(DBTGR: <http://dbtgr.hgc.jp>)。

神経系のin vivo遺伝子機能解析の成果発表(文献6)は、米国の遺伝子病研究者F. Hildebrandt博士との共同研究に発展し、ヒト疾患原因遺伝子Nephrocystin-5の解析につながった(文献11)。さらにHildebrandt博士らとの共同研究により、別のヒト疾患原因遺伝子ホモログの解析も進めている(論文投稿中)。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

d情報科学によるシス調節配列の予測は、筋肉特異的遺伝子群で最も成功している。一方、神経系特異的遺伝子ではかならずしもうまくいっていない。その第一の理由として、脊椎動物と比べてはるかに単純であるとはいえ、ホヤ幼生の神経系は多くの異なるタイプの細胞により構成されていることが挙げられる。現状では、特定の神経細胞タイプで共発現する遺伝子群に含まれる同定済みの遺伝子の数は多くてもせいぜい10程度である。その他の理由として、発現調節機構の複雑さの程度が異なることや、用いた遺伝子群が発現調節に関してヘテロな集合であることが考えられる。単純な内在性の遺伝子カスケードによって分化に至る筋肉細胞と、細胞間相互作用をへて、発生の後期に細胞の発生運命が決定される神経細胞の違いが考えられる。

*C. savignyi*のゲノム配列は同属であるにもかかわらず *C. intestinalis*のものとは相当違っている。2種間の比較ゲノム解析は機能配列を推定するのに有効であるが、利用できる *C. savignyi*のcDNA配列データが少ないために、配列保存性の低いエキソン（翻訳開始コドン付近や5'UTR）の予測が難しい場合があり、種間の比較解析の障害となった。

ホヤゲノムの解析が進み、きわめて多くの遺伝子がトランススプライシングを受けることが明らかにされた。その数は全遺伝子の約半数に上るともいわれている。実際我々が解析対象とした遺伝子にもトランススプライシングを受けるものがかかり含まれていた。これらの遺伝子は、従来の方法では転写開始点が不明であり、ゲノムワイドに解析する際、特に、プロモーターの構造モデルを構築する上で大きな障害となっている。

〈今後の課題〉

共発現遺伝子群に含まれる遺伝子数を増やすことが重要である。そのための方策として、レポーター遺伝子の発現を指標として、特定の細胞を単離し、DNAチップを用いて共発現遺伝子を同定することが考えられる。ホヤ幼生で発現する約5000の遺伝子のうち、*in situ*ハイブリダイゼーションで空間的発現パターンが明らかになっているのはまだ1500遺伝子に満たない。ハイスループット *in situ*ハイブリダイゼーションにより、残りの3000以上の遺伝子の発現パターンを明らかにすることも重要である。

トランススプライシングを受ける遺伝子の転写開始点などプロモーター情報を解明する必要がある。シス配列の組み合わせに基づいたゲノムワイドな遺伝子探索には、ゲノム情報科学と実験生物学の連携が重要である。先述のように、現在、東京大学医科学研究所の中井謙太教授との共同研究により、ゲノムワイドなホヤ転写調節領域の解析を進めている。

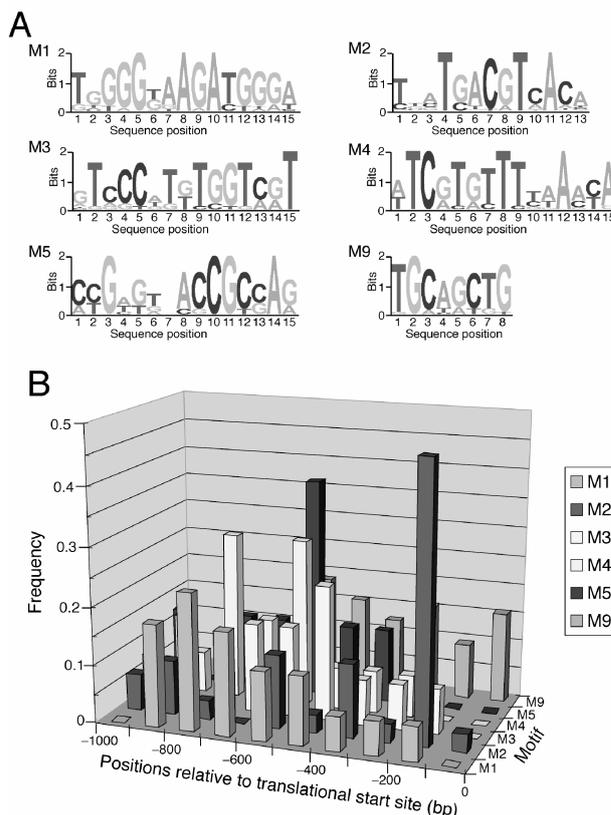


図1. 計算機によって予測された筋肉特異的 DNA モチーフ。

(A) ホヤ筋肉特異的のプロモーターに特異的に共有される DNA モチーフのコンセンサス配列。(B) いくつかの DNA モチーフは転写開始点から一定の距離に高頻度に存在する。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文/プロシーディング (査読付き)
 1. 0111131020
Kusakabe, T., Kusakabe, R., Kawakami, I., Satou, Y., Satoh, N., and Tsuda, M.: Ci-opsin1, a vertebrate-type opsin gene, expressed in the larval ocellus of the ascidian *Ciona intestinalis*. FEBS Lett. 506, 69-72 (2001).
 2. 0202131108
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).
 3. 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: EST analyses and gene expression profiles during embryogenesis. Gene 287, 83-96 (2002).
 4. 0303251409
Yoshida, R., Kusakabe, T., Kamatani, M., Daitoh, M., and Tsuda, M.: Central nervous system-specific expression of G protein α subunits in the ascidian *Ciona intestinalis*. Zool. Sci. 19, 1079-1088 (2002).
 5. 0303251430
Nakashima, Y., Kusakabe, T., Kusakabe, R., Terakita, A., Shichida, Y., and Tsuda, M.: Origin of the vertebrate

visual cycle: genes encoding retinal photoisomerase and two putative visual cycle proteins are expressed in whole brain of a primitive chordate. *J. Comp. Neurol.* 460, 180-190 (2003).

6. 0402220543

Inada, K., Horie, T., Kusakabe, T., and Tsuda, M.: Targeted knockdown of an opsin gene inhibits the swimming behaviour photoresponse of ascidian larvae. *Neurosci. Lett.* 347, 167-170 (2003).

7. 0402220559

Tsuda, M., Kusakabe, T., Iwamoto, H., Horie, T., Nakashima, Y., Nakagawa, M., and Okunou, K.: Origin of the vertebrate visual cycle. II. Visual cycle proteins are localized in whole brain including photoreceptor cells of a primitive chordate. *Vision Res.* 43, 3045-3053 (2003).

8. 0402220646

Kusakabe, T., Mishima, S., Shimada, I., Kitajima, Y., and Tsuda, M.: Structure, expression, and cluster organization of genes encoding gonadotropin-releasing hormone receptors found in the neural complex of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Gene* 322, 77-84 (2003).

9. 0411170349

Yoshida, R., Sakurai, D., Horie, T., Kawakami, I., Tsuda, M., and Kusakabe, T.: Identification of neuron-specific promoters in *Ciona intestinalis*. *Genesis* 39, 130-140 (2004).

10. 0411170402

Kusakabe, T., Yoshida, R., Ikeda, Y., and Tsuda, M.: Computational discovery of DNA motifs associated with cell type-specific gene expression in *Ciona*. *Dev. Biol.* 276, 563-580 (2004).

11. 0503020439

Otto, E.A., Loeys, B., Khanna, H., Hellemans, J., Sudbrak, R., Fan, S., Muerb, U., O'Toole, J.F., Helou, J., Attanasio, M., Utsch, B., Sayer, J.A., Lillo, C., Jimeno, D., Coucke, P., De Paepe, A., Reinhardt, R., Klages, S., Tsuda, M., Kawakami, I., Kusakabe, T., Omran, H., Imm, A., Tippens, M., Raymond, P.A., Hill, J., Beales, P., He, S., Kispert, A., Margolis, B., Williams, D.S., Swaroop, A., and Hildebrandt, F.: Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin. *Nat. Genet.* 37, 282-288 (2005).

12. 0502211353

Kusakabe, T.: Decoding cis-regulatory systems in ascidians. *Zool. Sci.* 22, 129-146 (2005).

2) データベース/ソフトウェア

1. 0110292256

カタユウレイボヤcDNAデータベース

<http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/indexr1.html>