

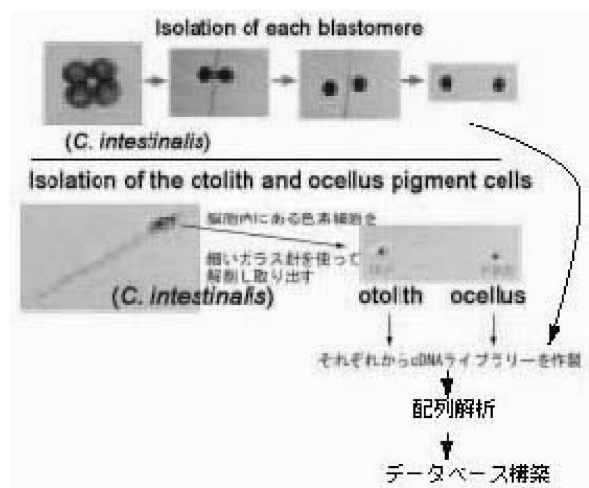
ホヤの原始的な中枢神経系発生過程における細胞単位の遺伝子発現プロファイル解析— 脳発生機構の進化を解析する端緒として —

●山本 博章

東北大学大学院生命科学研究所

＜研究の目的と進め方＞

原索動物ホヤのオタマジャクシ幼生中枢神経系および脳胞内感覚器を形成する細胞について、細胞ごとのcDNAライブラリーを作製し、その網羅的な発現プロファイルを作製する。さらにそこにいたる発生段階の異なる胚においても当該プロファイルを作製し、空間的また時間軸に沿った発生プログラム解析を可能にする。本研究は比較的簡単な原索動物の脳形成機構の解明を高次のデータベース構築を志向して行い、より複雑な我々の脳発生メカニズムとの比較を行うための端緒とする。



＜研究開始時の研究計画＞

具体的には、

- ①ホヤオタマジャクシ幼生中枢神経系および脳胞内感覚器を形成する細胞または数個の隣接する細胞に由来するcDNAライブラリーを作製し、その網羅的な発現プロファイルを作製すること、
- ②さらにそこにいたる発生段階の異なる胚においても当該プロファイルを作製し、空間的また時間軸に沿った発生プログラム解析を可能にすること、
- ③脳胞内感覚器のマーカー細胞として用いることができる色素細胞を特徴付ける遺伝子の発現解析(発現局在とそれを保障する制御領域)を同時に行うことを目標とした。

＜研究期間の成果＞

- ①カタウレイボヤ(C.intestinalis)脳内の眼点および平衡器から、極細のガラス棒を用いて色素細胞を単離し、それぞれ一細胞種からcDNAライブラリーを調製した。

Summary of the EST sequences from pigment cell, ocellus and otolith of ascidian				
	Ocellus		Otolith	
	5'	3'	5'	3'
Number of the total sequenced clones	2100	2100	2116	2116
Number of the clones after filtering	1898	1912	1862	1873
Number of the non-redundant clones*	-	1018	-	1266

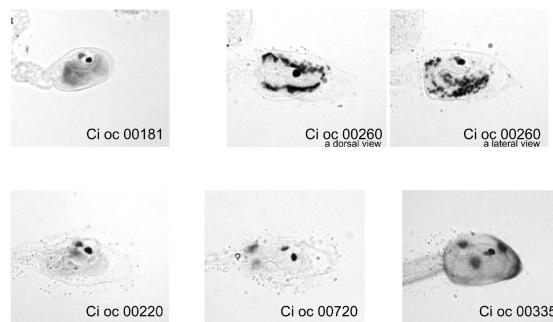
*The number of the non-redundant clones were based on the clustering of the 3'-end sequences.

このcDNAライブラリーのそれぞれから、各2,000あまりのクローンの塩基配列を解析し、冗長な配列を除き1,000あまりの配列を得た。この中で144の配列が平衡器と眼点の色素細胞で共通に発現していることがわかった。このうち半数余りがハウスキーピング遺伝子ではなかった。この中には色素細胞システムに必須の遺伝子に由来する配列を含んでいるはずである。

これらクローンの中で、マウスの毛色発現に関わる遺伝子と相同性を持つ配列もあった。また京都大学のカタウレイボヤデータベースに登録された膨大な配列データと発現解析データと重複しないクローンについては、ホールマウントin situ ハイブリダイゼーション法によりその発現部位を解析した。特徴ある発現パターンを示すクローンも多数見つかった。以下のクローンはunknownな配列であるが、それぞれ脳胞またその周囲に強い発現局在を示す。

In situ hybridization

Probes: Clones having no sequence homology with those in databases



- ②受精卵から8細胞期にいたるすべての割球から同様にcDNAライブラリーを調製した。各ライブラリーから数千個のクローンをピックアップし、これらのEST配列を得た。

Summary of the EST sequences from cleaved cells at the eight-cell stage of ascidian

	A4.1	a4.2	B4.1	b4.2
Number of the total sequenced clones*	2481	2400	2208	2304
Number of the clones after filtering**	749 (1609)	460 (1448)	1890 (1888)	2089 (2064)
Number of the non-redundant clones***	536	291	672	1133

* These clones were sequenced from both ends of the insertion. **The number of the clones with the parenthesis represents 5'-end sequences. ***The number of the non-redundant clones were based on the clustering of the 3'-end sequences.

この表は8細胞期の片側4割球それぞれから作製されたcDNAライブラリーより得たクローンの内訳である。前側の動物極側割球(a4.2、後にこの系譜から色素細胞が発生する)の有効クローン数(edit後の)の割合が小さく、細胞系譜特異的なmRNA分解が起こっている可能性がある。③メラニン産生の鍵酵素チロシナーゼとその関連配列をコードする遺伝子、および脊椎動物では色素細胞発生に必須の転写因子Mitf(Microphthalmia-associated

transcription factor)をコードする遺伝子をクローニングし、それらの発現解析を行った1-3。特にチロシナーゼ遺伝子とその関連配列遺伝子は転写調節領域の保存性を明らかにすべく、詳細な解析を行った。これら配列はマボヤ(H. roretzi)のものであるが、カタユウレイボヤでも機能し、当該遺伝子の調節機構の保存性を議論することができるようになった。

Gene 332:61-69.

〈国内外での成果の位置づけ〉

生体からの、単一細胞種由来のライブラリー作製は当時ほとんど例がなく、国際学会発表時にはたいへん注目を浴びた。また脳内色素細胞の機能解析に繋がる基礎データとなり、脊椎動物が発生させる脳胞由来の網膜色素上皮の発生機構との比較から、この色素システムの進化を論ずる基礎データともなった。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

脳胞からは2種類の色素細胞、また中枢神経全体を含んだ細胞群、さらにはオタマジャクシ幼生前部全体からのライブラリーも作製した。しかし色素細胞以外の領域からの遺伝子発現プロファイルは、時間が足りず取得できなかった。当初はより限られた領域からの遺伝子発現プロファイルの取得も予定していたが、これらについては、領域を特定する手法の工夫に時間を取られ、実際のデータ取得に至らなかった。色素細胞にいたる系譜の全ての細胞からの当該プロファイルの解析も、8細胞期までの割球別のプロファイル解析に時間を費やしてしまった。16細胞期の各割球から情報を得ようとし、割球分離も行ったが、ライブラリー作製に進む時間がなかった。それ以降の発生ステージでは、各細胞の同定に困難があり、着手するには至らなかった。より後期の発生段階からの一細胞種に由来する遺伝子発現プロファイル取得には、各割球を分離し、同定する手法の開発無しには困難を伴うことがわかった。

〈今後の課題〉

これまでに得られた配列はデータベースとして整備しつつある。8細胞期から遊泳幼生まであと6回近くの分裂を経て脳胞の色素細胞が分化する。これらの系譜にある色素細胞前駆細胞を、上記のマーカー遺伝子等を用いてトレースしながら(a4.2割球は脳を構成する全ての細胞を発生させるが、当該色素細胞も同じ割球に由来する)、発生を追った色素細胞系譜での遺伝子発現プロファイルを得、高次のデータベースを完成させることが重要である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0202231814 Toyoda, R., Sato, S., Ikeo, K., Gojobori, T., Numakunai, T., Goding, C., Yamamoto, H. (2000) Pigment cell-specific expression of the tyrosinase gene in ascidian has a different regulatory mechanism from vertebrates. *Gene* 259, 159-170
2. 0602132141 Yajima I., Endo K., Sato S., Toyoda R., Wada H., Shibahara S., Numakunai T., Ikeo K., Gojobori T., Goding C. R. and Yamamoto H. (2003) Cloning and functional analysis of ascidian Mitf in vivo: insights into the origin of vertebrate pigment cells. *Mech. Dev.* 120, 1489-1504.
3. 0602132156 Toyoda, R., Kasai, A., Sato, S., Wada, S., Saiga, H., Ikeo, K., Gojobori, T., Numakunai, T. and Yamamoto, H. (2004) Pigment cell lineage-specific expression activity of the ascidian tyrosinase-related gene.