

脊椎動物起源の研究

●佐藤 矩行¹⁾ ◆窪川 かおる²⁾ ◆西駕 秀俊³⁾ ◆和田 洋⁴⁾ ◆稲葉 一男⁴⁾ ◆藤原 滋樹⁵⁾
◆日下部 岳広⁶⁾ ◆高村 克美⁷⁾ ◆田川 訓史⁸⁾ ◆美濃川 拓哉⁹⁾

1) 京都大学大学院理学研究科 2) 東京大学海洋研究所 3) 首都大学東京大学院理工学研究科 4) 筑波大学大学院生命環境科学研究所
5) 高知大学理学部 6) 兵庫県立大学大学院生命理学研究科 7) 福山大学生命工学部 8) 広島大学大学院理学研究科 9) 東北大学大学院生命科学研究所

<研究の目的と進め方>

本研究の目的は脊椎動物の進化に至る道筋をゲノム科学的に解明することである。脊椎動物はホヤなどの尾索類やナメクジウオの頭索類とともに脊索動物門を形成する。これら3群は脊索・背側神経管・鰓裂など多くの形質を共有し、約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。我々はすでに国立遺伝研・アメリカDOE・JGIとの共同研究で尾索類カタユレイボヤ (*Ciona intestinalis*) のドラフトゲノムを解読した。そして脊椎動物ゲノムや無脊椎動物ゲノムと比較を行い、脊椎骨および神経冠の発達、染色体レベルでの遺伝子の増幅、獲得免疫系、ステロイドホルモン系、長距離の神経伝達系、情緒発現系などの諸生命現象に関わる遺伝子機能の獲得が、脊椎動物の起源と進化に深く関与していることを示した。

本研究においてはまず脊索動物門のもう1つのグループである頭索類ナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*) のゲノムの解読を進める。同時にすでに解読されたカタユレイボヤのドラフトゲノムを染色体にマップしてできるだけ完全なものに近づける。そして脊椎動物を加えた3群のゲノム比較から、脊椎動物の基本体制の確立に関係したと思われる遺伝子群を徹底的に解析する。また、脊椎動物起源に関与したと思われるゲノムの構造的変化を網羅的に解析する。また、脊索動物は半索動物(ギボシムシ)や棘皮動物(ウニなど)と共に新口動物群を形成する。従ってより広く脊索動物ひいては脊椎動物の進化をゲノム科学的に理解するために、半索動物ギボシムシのゲノム解析も視野に入れ研究を進める。

<2007年度の研究の当初計画>

- (a) ナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*) ・ドラフトゲノムの解読：*Branchiostoma floridae*のゲノムサイズは約500 Mbpと見積もられている。支援班、アメリカDOE・JGIおよびカリフォルニア大学の協力を得て、ホールゲノムショットガン法およびBACエンドシーケンシングそれにEST解析を基本としつつドラフトゲノムの解読をめざす。
- (b) カタユレイボヤゲノムの完全解読にむけて：カタユレイボヤのドラフトゲノム(真生クロマチン領域120 Mb)を、BACエンドシーケンシングやBACクローンのFISH法などを駆使して、n=14の染色体へのマッピングを進める。
- (c) 脊椎動物の基本体制の確立に関係する遺伝子群の網羅的機能解析：ナメクジウオやホヤのゲノムの中から、神経管・脊索・脊椎・顎など脊椎動物の基本体制の確立に関係する遺伝子群の発現特異性と遺伝子機能をゲノム科学的に解析する。また、性ステロイドなどを中心に内分泌器官の進化にともなう遺伝子の変化を追跡する。
- (d) ギボシムシ・ドラフトゲノムの解読に向けた研究の展開：ギボシムシのゲノム解読に向け、EST解析などを進める。

<2007年度の成果>

- (a) 脊椎動物の発生においては、いわゆるオーガナイザーが体の

前後軸・背腹軸の確立に大きな役割を担う。最近の両生類胚を中心にしたオーガナイザーの分子的基盤の分子発生物学的研究から、体の腹背軸形成にはBMPとそのアンタゴニストが、また体の前後軸形成にはWntとそのアンタゴニストが重要な役割を担うことが明らかになっている。我々は日米の共同研究でナメクジウオEST解析を行い、その過程でこの動物のBMPとそのアンタゴニスト、Wntとそのアンタゴニストの関連遺伝子18個の相同遺伝子のcDNAを同定した。これらの遺伝子の原腸胚における発現パターンを調べた結果、これらの遺伝子は脊椎動物に見られるとほぼ同様のパターンで発現していること、また、BMPの機能を阻害すると軸形成に異常が生じることが明らかになった。すなわち、頭索類ナメクジウオの背腹軸・前後軸形成には脊椎動物のオーガナイザーと同様の遺伝子群が働いており、これまで脊椎動物特有とされていたオーガナイザーの起源を頭索動物にまで遡ることができた。なお、これらの遺伝子の発現パターンは尾索類ホヤでは大幅に変更されている。

(b) ナメクジウオ・ドラフトゲノムの解読：2005年にナメクジウオゲノムの解読にむけて日米の共同研究を開始し、ホールゲノムショットガン法によるゲノム塩基配列決定(11×)、EST解析(約30万)、BACエンドシーケンス決定(10×)を行った。その結果、この動物のゲノムサイズは約500Mbで、そこに約21,600のタンパク質をコードする遺伝子が存在することが明らかになった。ナメクジウオゲノムを脊椎動物ゲノムと比較すると、驚くべきことに、ナメクジウオとヒトとの間に非常に高いレベルでシンテニーが保存されていることが分かった。また、両者のシンテニー・ブロックの比較から、脊椎動物ゲノムが2回の大規模な重複を起こしたことを支持する結果が得られた。

さらに、これまでにゲノムが解読された動物を対象に、1,035の遺伝子がコードするタンパク質の比較をもとに分子系統学的解析を行った結果、最近になって指摘されている脊索動物門内の系統関係、すなわち脊索動物の中では頭索類が最初に分岐し、次に尾索類と脊椎動物が進化したという構図を強く支持するものとなった。

(c) カタユレイボヤゲノムの染色体マッピング：カタユレイボヤのドラフトゲノム解読後、この動物ゲノム内には669個の転写因子遺伝子が存在することを明らかにし、その中で390個をホヤの体制の構築に関わるコアな転写因子としてまた転写因子および119個の主要シグナル分子をコードする遺伝子の発現を網羅的に解析した。その結果76の遺伝子が初期胚体制の構築に関わっていること、それらは約3,000の要素からなるネットワークを構築しつつ働いていることを明らかにした。同時に、BACエンドシーケンシングやFISH法などを駆使してn=14の染色体へ273に及ぶBACクローンのマッピングを進めた。その結果、339個のコアな転写因子および119個の主要シグナル分子の90%以上を染色体にマップすることができた。これらの情報をもとに、発生におけるゲノムワイドな遺伝子発現調節機構の解析を目指している。

(d) 脊椎動物の基本体制の確立に関係する遺伝子群の網羅的機能解析：研究分担者の和田はJGIの川島武士と共同で、モジュール

シャッフリングによって創出された新しい遺伝子が脊椎動物の形態の進化に果たしてきた役割について調べた。ゲノムのドラフト解析の報告されている脊椎動物7種と無脊椎動物6種、襟鞭毛虫、酵母2種について単一の遺伝子モデルに複数のモジュールが見られるものをカタログ化して、脊椎動物に特異的なモジュールの組み合わせについて調べたところ、約100個の組み合わせが見つかった。そのなかには、脊椎動物を特徴づける軟骨の基質であるaggrecan、聴覚に関わるcochlinやtectorin、脊椎動物とホヤにのみ見られると考えられてきたタイトジャンクションの構成因子であるOccludinが含まれていた。以上の結果から脊椎動物の形態進化にモジュールシャッフリングによる新奇の遺伝子の創出が大きな役割を果たしてきたことがわかってきた。

(e) 脊索動物の内分泌系の進化：研究分担者の窪川は、解読されつつあったナメクジウオのドラフトゲノムから、内分泌関連分子をコードする遺伝子を網羅的に探索した。その結果、この動物には性ステロイドホルモンの受容体および合成に関わる遺伝子が存在し、発現し、機能していることが確かめられた。なお、副腎皮質ステロイドホルモン系は存在しない。ホヤでは性ステロイドホルモンの受容体および合成に関わる遺伝子が存在しない。すでに述べた新しい系統関係からすると、尾索動物では性ステロイドホルモンの受容体および合成に関わる遺伝子が失われた可能性が強い。

(f) ギボシムシ・ドラフトゲノムの解読：ギボシムシのゲノム解読に向け、EST解析などを進めている。ハワイ産ヒメギボシムシ *Ptychodera flava* 胚の4ステージおよび変態期の幼生のEST解析を行い、総数58,133のESTを決定した。ユニークとされた遺伝子数は21,053であった。これらクローンの個々の遺伝子に関する詳細な解析は今後に残されている。また、成体組織より吻・襟部、鰓、肝領域のcDNAライブラリー作成を行い、現在さらなるEST解析を進めている。

<国内外での成果の位置づけ>

本計画研究の多くは、この分野の国内外の第一線級の研究者との共同研究ベースで進められている。したがってその研究成果はすべて世界をリードするものである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ゲノム科学研究における一つの問題点は、その成果を論文としてまとめあげる難しさにある。ナメクジウオゲノムの解読も多くの研究者の共同研究として行われており、論文の取り纏めで予想以上の時間がかかっている。今後はここを改善していく必要があるかもしれない。また、これは以前から指摘されていることであるが、研究の自主性を重んじてきた研究分担者の研究成果が思ったほどあがっていない。全体として、「脊椎動物の起源」に向けた研究としては不足な点も感じられる。今後はより研究分担者の役割および相互連絡を密にし、研究目的達成のために努力する必要がある。

<今後の課題>

この1年はナメクジウオゲノムの解読、ホヤゲノムの染色体マッピングなど、ほぼ予定どおりの研究の進展を得ることができた。今後、「脊椎動物の起源」に向けた研究として、ギボシムシのゲノムを解読し、脊索動物の起源の問題をゲノム科学的に明らかにするとともに、尾索類への進化過程、さらには、頭索類からの脊椎動物の問題を直視して行きたい。

<成果公表リスト>

1) 論文／プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 702141053

Yu, J.-K., Satou, Y., Holland, N. D., Shin-I, T., Kohara, Y., Satoh, N., Bronner-Fraser, M., and Holland, L. Z.: Axial patterning in cephalochordates and the evolution of the organizer. *Nature*, 445, 613-617 (2007).

2. 702141056

Kawashima, T., Shoguchi, E., Satou, Y., and Satoh, N.: Comparative genomics of invertebrates. In *Comparative Genomics: Fundamental and Applied Perspective*, (ed. J. R. Brown), 87-104 (2008).

3. 707091324

Gyoja, F., Satou, Y., Shin-i, T., Kohara, Y., Swalla, B. J., and Satoh, N.: Analysis of large scale expression sequenced tags (ESTs) from the anural ascidian, *Molgula tectiformis*. *Dev. Biol.* 307, 460-482 (2007).

4. 707091322

Hotta, K., Yamada, S., Ueno, N., Satoh, N., and Takahashi, H.: Brachyury-downstream notochord genes and convergent extension in *Ciona intestinalis* embryos. *Dev. Growth Differ.*, 49, 373-382 (2007).

5. 801161212

Mizuta, T., Asahina, K., Suzuki, M., Kubokawa, K.: In vitro conversion of sex steroids and expression of sex steroidogenic enzyme genes in amphioxus ovary. *J. Exp. Zool.*, 309, in press (2007).

6. 704131048

Mizuta, T., and Kubokawa, K.: Presence of sex steroids and cytochrome P-450 (CYP) genes in amphioxus. *Endocrinology*, 148, 3554-3565 (2007).

7. 707130957

Mita, K., and Fujiwara, S.: Nodal regulates neural tube formation in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Genes Evol.*, 217, 593-601 (2007).

8. 710051839

Ikuta, T. and Saiga, H.: Dynamic change in the expression of developmental genes in the ascidian central nervous system: revisit to the tripartite model and the origin of the midbrain-hindbrain boundary region. *Dev. Biol.*, 312, 631-643 (2007).

9. 701150540

Kusakabe, T. and Tsuda, M.: Photoreceptive systems in ascidians. *Photochem. Photobiol.*, 83, 248-252 (2007).

10. 707121628

Inaba K, Nomura, M., Nakajima, A. and Hozumi, A.: Functional proteomics in *Ciona intestinalis* - A breakthrough in the exploration of the molecular and cellular mechanism of ascidian development. *Dev. Dyn.*, 236, 1782-1789 (2007).

2) データベース／ソフトウェア

1. 612221503

カタユウレイボヤのゲノム情報・遺伝子発現情報データベース
<http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/indexr1.html>

2. 707091721

ホヤ遺伝子発現制御データベース DBTGR
<http://dbtgr.hgc.jp/>

3. 612221511

カタユウレイボヤのプロテインデータベース (CIPRO)
<http://cipro.ibio.jp/>