

## 脊椎動物起源の研究

●佐藤矩行<sup>1)9)</sup> ◆窪川かおる<sup>2)</sup> ◆西駕秀俊<sup>3)</sup> ◆和田洋<sup>4)</sup> ◆藤原滋樹<sup>5)</sup> ◆日下部岳広<sup>6)</sup>  
◆田川訓史<sup>7)</sup> ◆久保田 洋<sup>1)</sup> ◆真壁和裕<sup>8)</sup>

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科  
5) 高知大学教育研究部自然科学系 6) 甲南大学理工学部生物学科 7) 広島大学大学院理学研究科 8) 徳島大学総合科学部  
9) 沖縄科学技術研究基盤整備機構

### <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5.5億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2002年に国立遺伝学研究所やアメリカ 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。さらに、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読も視野に入れつつ研究を進める。

### <研究開始時の研究計画>

(1) ナメクジウオ・ドラフトゲノムの解読：フロリダナメクジウオ (*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、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、BACエンドシーケンシング、EST解析などをもとに、この動物のドラフトゲノムを解読する。そして比較ゲノム科学的に脊索動物の進化および脊椎動物の起源を解析する。

(2) 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する。そして得られた情報をもとに染色体レベルでの遺伝子発現カスケードを解析する。

(3) 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。

(4) 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。

### <研究期間の成果>

(1) フロリダナメクジウオ・ドラフトゲノムの解読：

2005年にフロリダ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。そして、それらをもとにこの動物のドラフトゲノムを解読し、2008年に論文の公表に結びつけた(成果公表リスト28)。その結果、この動物のゲノムサイズは約520Mbで、そこに約21,900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。そしてナメクジウオ、ホヤ、ウニ、脊椎動物とのゲノム比較から、次のようなことが明らかになった。

(a) 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。その結果、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。その結果をふまえると、脊索動物の進化については、図1に示すように、(i)自由遊泳性の祖先からまず頭索類が起源し、(ii)脊椎動物は頭索類様祖先から頭部、顎部、四肢などを発達させることによって直接的に進化したと推論でき、(iii)尾索類は頭索類的祖先から濾過摂食生活様式に向けた独自の進化を遂げた、と考えられる。これは、これまで長い間議論されてきた脊索動物の起源と進化についてのほぼ最終的な結論が得られたことになる。これらをもとに脊索動物の起源と進化を説明するaboral-dorsalization仮説を提唱した(成果公表リスト19、28)。

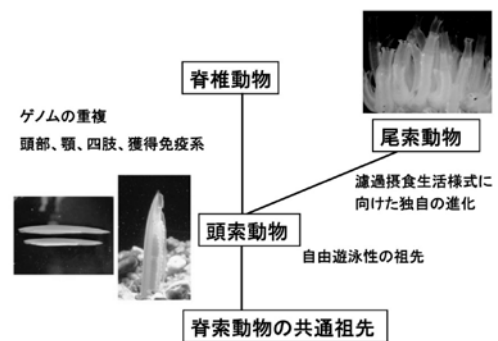


図1. 脊索動物の起源と進化についての新しい考え方

(b) 次に、ナメクジウオゲノムを脊椎動物ゲノムと比較解析した結果、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マクロシンテニーが保存されていることが分かった。そしてそれをもとに、17のリンケージ・グループからなる脊索動物の基本的染色体構成を描くことができ、さらにそこからヒト染色体に至った変化を推論することができた(図2)。しかしこの動物の実際の染色体数はn=19であり、現在FISH法によるBACクローンの染色体マップを進めている。そして、17の連鎖群を19の

連鎖群に改変した後で、この19本の基本的組成をヒトの染色体などと比較することによって脊椎動物の進化における染色体の変化を追跡する予定である。

(c) さらに、両者のシnten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(図2)。すなわち、これまで、個々の遺伝子レベルで指摘されてきた脊椎動物進化の際の2回の遺伝子重複仮説(2R仮説)をゲノムワイドで証明できる。

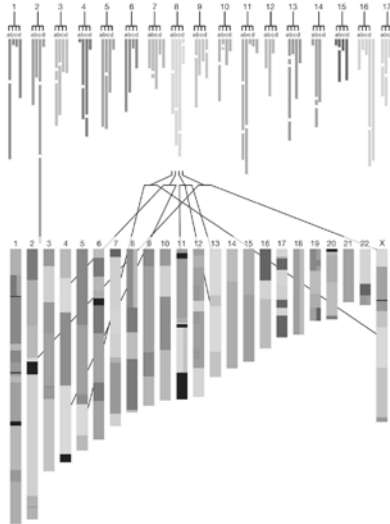


図2. ナメクジウオゲノムとヒトゲノムの間で保存されているシntenニー関係をゲノム全体に適用すると、脊索動物の祖先型としての17のリンカー・グループを得ることができる(上図)。また、それに対応する形で23本の色分けしたヒトの染色体を得ることができる(下図)。

(2) 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ほぼすべてをBACエンドシーケンシングやFISH法などを駆使してn=14の染色体にマップすることができた(成果公表リスト64)。

次に、初期胚体制の構築に76の転写因子/シグナル分子遺伝子が関わっていることを明らかにし、それらの遺伝子1つ1つについてその機能を阻害することにより、他の遺伝子にどのような影響を及ぼすかを調べた。その結果、これら76の遺伝子は、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。そしてさらに、これらのネットワークの染色体レベルでの相関性を明らかにした(図3; 成果公表リスト29)。これらの成果は、今後脊索動物の基本体制の構築メカニズムをゲノムレベルで研究する上での基礎を築くものである。

(3) 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:

この項目については主として以下のことが明らかになった。

(a) ドメインシャッフリングによる新規遺伝子の創成と脊椎動物の起源: 後口動物の進化の過程で、ドメインシャッフリングによる遺伝子の創成がどのような頻度で起こっているか、そして新しく生まれた遺伝子がどのように表現型の進化に寄与しているかについて調べた。そして、1つの遺伝子モデルにコードされている



図3. ホヤ体制構築のための遺伝子ネットワーク。ホヤのオタマジャクシ幼生は脊索動物の基本的体制を示す。その初期の体制構築に関わる転写因子およびシグナル分子遺伝子76を全て同定し、それらが染色体でどのような位置をしめ、どのような関係にあるのかを示した。

ドメインの組み合わせが、どのような動物種で共有されているかリストアップして、系統樹に沿って、ドメインシャッフリングのイベントをマップした(図4; 成果公表リスト1)。その結果、脊椎動物で獲得されたものの中には、軟骨の基質となったアグレカンや、タイトジャンクションの制御を行っているoccludin、聴覚に関わるtectorinやcochlinが含まれており、ドメインシャッフリングによる遺伝子の創成が表現型の進化に寄与している可能性が明らかになった。また、脊索動物の祖先で獲得された遺伝子には、脊索の進化に関わっていた可能性を示唆するものも含まれていた。

次に、脊椎動物の軟骨の進化に関連して、ナメクジウオの外鬚の再生過程についても解析を行った。ナメクジウオの外鬚は、人

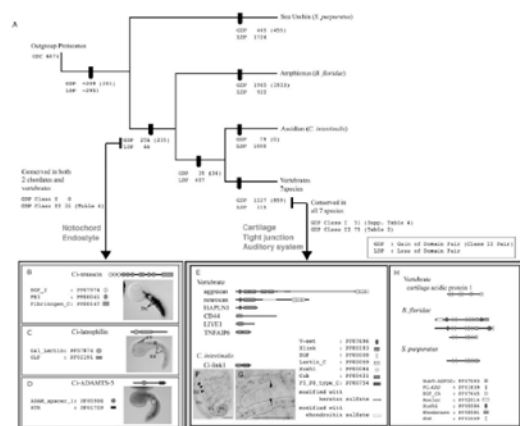


図4. 後口動物の系統樹にドメインの組み合わせの獲得と欠失をマップした。脊椎動物で獲得された組み合わせのうち、ヒト、マウス、ラット、ニワトリ、ツメガエル、フグ、ゼブラフィッシュの7種で保存されている組み合わせは126あり、そのうちドメインシャッフリングで獲得されたことのあるClassIIは75あった。その中には軟骨の基質アグレカンなどが含まれていた。また、脊索動物の祖先で獲得された組み合わせをもつ遺伝子には脊索で発現する3つの遺伝子が見られた。

為的に切除すると1-2日で傷はふさがり、1週間以内に軟骨様組織の形成を伴いながら再生することを明らかにした。この軟骨様組織の分化の系を用いて、脊椎動物の軟骨形成の遺伝子ネットワークの起源をナメクジウオに求めて、遺伝子発現の解析を行い、軟骨と硬骨の形成ネットワークのひな形が外鬚の軟骨様組織の形成に機能していることを明らかにした。

#### (b) Hox およびホメオボックス遺伝子の解析

まず、ナメクジウオ *Branchiostoma floridae* の全ホメオボックス遺伝子のアノテーションを行って133個のホメオボックス遺伝子を同定した(成果公表リスト30)。因みに脊椎動物では、235個である。これは主として脊椎動物に至る過程で起きたとされる遺伝子重複による。脊椎動物のホメオボックス遺伝子の多くはナメクジウオでもみられるが、起原の古いホメオボックス遺伝子のいくつかが脊椎動物で失われたこと、逆にいくつかのホメオボックス遺伝子が脊椎動物で新規に生じたことが分かった。脊椎動物の進化過程で起こった事象の一端が明らかになった。

次に、カタユレイボヤのHox遺伝子9個の内、オタマジャクシ幼生までの発生で発現がWISHにより確認された7個の遺伝子すべてについて、MOによる機能阻害実験を行って機能を推定した。その結果、2個の遺伝子は、尾の先端部の形態、一部神経細胞の分化に関わることを見出した。しかし、残りのものについては、調べた限りでは特段の機能は見出せなかった。幼生期までの発生に限っては、Hox遺伝子の機能は限定的だと思われる。ホヤのボディプランは変態後に最終的に確立されることから、変態後の機能が想定される。事実、変態後の幼若体消化管においては、脊椎動物と極めて類似した後方Hox遺伝子群の発現パターンがみられた。また最近ではHox1の機能が、幼生期後期以降に出水口原基の形成に機能を持つことが明らかになりつつある。消化管の発生における機能については、形態形成とともに、現在研究中である。

また、ギボシムシのHox遺伝子、ParaHox遺伝子:*Ptychodera flava* のゲノム中に存在すると考えられる12個のHox遺伝子および3個のParaHox遺伝子を1~3個含むクローンを複数単離した。この結果から予想されるギボシムシのHox遺伝子クラスターは、ナメクジウオのもの(約250 kb)と同程度の大きさと予想される。また3個のParaHox遺伝子は1個のBACクローンに含まれることから、ゲノム上でクラスターを作って存在していることが考えられる。また、国産のシモダギボシムシ *Balanoglossus simodensis* についてもゲノムPCRによって12個のHox遺伝子、3個のParaHox遺伝子の断片を全て単離した。両種についての解析から、これまで存在が不明だったHox8は、ギボシムシに存在することが確認された。脊索動物の起原生物は、10個を超えるメンバーからなるHox遺伝子クラスターを持っていたと考えられる。

#### (c) レチノイン酸関連遺伝子の機能解析

脊索動物に特有な背側神経管の前後軸に沿った部域化や、咽頭鰓裂のパターン形成、神経堤細胞の分化などには、レチノイン酸が必要である。脊索動物以外の動物においては、レチノイン酸は胚発生にほとんど関与していない。そこで、レチノイン酸を胚発生に使う仕組みを獲得したことが、脊索動物の進化において重要なイベントであったと予想される。しかしながら、ホヤに近縁なオタマボヤのゲノムには、レチノイン酸の合成酵素(Raldh2)、分解酵素(Cyp26)および受容体(RAR)の遺伝子が存在しない。そのため、ホヤ類においては、レチノイン酸は発生に必須ではないという主張も見受けられる。そこで、本研究では、オリゴヌク

レオチドマイクロアレイを利用して、レチノイン酸の標的遺伝子を多数同定した。中でもHox1遺伝子は、レチノイン酸に強く応答する。私たちは、この遺伝子の表皮エンハンサー中にレチノイン酸受容体(RAR)の結合配列が存在し、この配列を破壊すると表皮における転写活性化もレチノイン酸への応答性もなくなることを突き止めた。実際、Raldh2やRARに対するモルフォリノオリゴを注入したり、レチノイン酸合成阻害剤で胚を処理したりすれば、Hox1の発現がなくなることもわかった。これらのことから、ホヤ胚においては、レチノイン酸がHox1の正常な発現に必要であることがわかった(成果公表リスト13)。

一方、Raldh2やRARをコードする遺伝子の転写調節についても研究を行った。RARの背側正中線表皮特異的エンハンサーは、SoxとMsxの協働によって活性化することがわかった。脊椎動物の神経堤細胞においては、SoxEとMsx1/2が上位の転写調節因子として機能しており、レチノイン酸が神経堤細胞の分化に必要なこともわかっている。ホヤにおいては、背側表皮の細胞とは別に移動性の細胞が発見され、そちらが神経堤細胞の起源ではないかという説も出されているが、私たちの得た結果からは、ホヤの背側正中線表皮が神経堤細胞の起源であることが示唆された。

また、カタユレイボヤにおいては、遺伝子の機能阻害実験にはモルフォリノオリゴの顕微注入という方法が頻繁に用いられている。しかし顕微注入には熟練の技術が必要であり、また処理できる胚の数も少なくなる。そこで、ゲノム規模の簡便な機能阻害実験法を確立するためにRNAi法の応用を試みた。私たちは、カタユレイボヤのゲノム中にU6 snRNA遺伝子を同定し、このプロモーター領域を用いて短鎖ヘアピン型RNA(shRNA)を発現する実験系を作出した。私たちは、この方法でチロシナーゼ遺伝子のノックダウンを行い、眼点と平衡器のメラニン沈着を阻害することに成功した(成果公表リスト21)。

#### (d) 感覚器・神経系の解析

視覚の重要な生理過程である視覚サイクルに関わる遺伝子群を脊椎動物、ホヤ、ナメクジウオの間で比較し、ホヤはアミノ酸配列レベルでも組織・細胞レベルでも脊椎動物により近いシステムをもつことを明らかにした。また脊椎動物に特有の細胞機能特異化における新規遺伝子獲得の重要性を示した。

次にホヤ感覚器・神経系の発生と生理の解析から脊椎動物の感覚器神経系の起源を探った。特に、視覚系とグルタミン酸作動性神経系についてその全体像を明らかにした。聴覚・機械受容系についてはゲノムワイドな遺伝子探索と培養細胞を用いた遺伝子機能解析を行った。聴覚に関わる分子prestinのホモログの解析からは、脊索の形態形成に関する新しい知見も得た。視覚と嗅覚の中心的な役割を担うCNGチャネルの分子進化と機能を解析した。脊索動物の祖先がもっていたCNGチャネルは嗅覚型であり、脊椎動物の進化の過程で視細胞に特化した構造と機能をもつCNGチャネル遺伝子が獲得されたことを明らかにした。また脊椎動物の神経系のパターン形成に重要な役割をもつヘッジホッグシグナル伝達系に関わる主要分子のホモログの発現をホヤ幼生で明らかにし、ヘッジホッグシグナルのホヤ発生における役割およびヘッジホッグの役割に関する知見を得た。ホヤ幼生における視覚の重要な生理過程である視覚サイクルに関わる遺伝子群を脊椎動物、ホヤ、ナメクジウオの間で比較し、ホヤはアミノ酸配列レベルでも組織・細胞レベルでも脊椎動物により近いシステムをもつことを明らかにした。また脊椎動物に特有の細胞機能特異化における新規遺伝子獲得の重要性を示した(図5;成果公表リスト3)。さらに、視覚系の遺伝子研究からはヒト遺伝病に関連する知見も得られた。

ゲノム配列の種間比較により、ニューロン特異的調節配列を同定し、一部は論文で報告した。ニューロン特異的遺伝子の調節領域に結合する転写因子を推定し、ノックダウン実験によりその役割を証明した。ホヤ転写調節データベースを構築・公開した(東大・中井研との共同)。

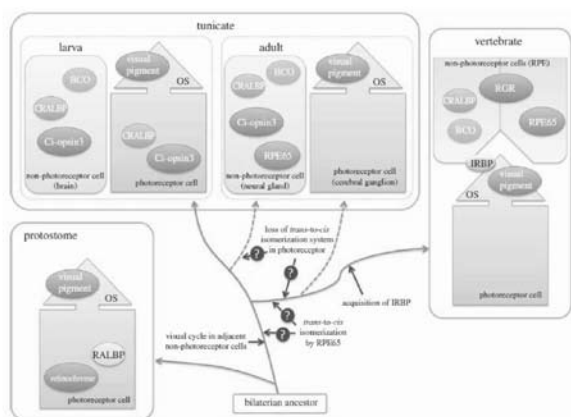


図5. 脊索動物における視覚サイクルの進化経路のモデル

(e) ナメクジウオの内分分泌関連遺伝子の探索

ナメクジウオのゲノム解読に伴い、内分分泌機構のホルモンとその受容体の探索を行った。脊椎動物の内分分泌関連物質と比較すると、脊椎動物に固有な内分分泌器官である視床下部、下垂体、甲状腺、副腎などで合成・分泌されているホルモンおよびその受容体はほとんど存在せず、脊椎動物に進化する直前に内分分泌機構は大きく変化したと考えられる。

また、性ステロイド代謝経路の進化についても解析した。脊椎動物の性ステロイド代謝経路はコレステロールから始まり、テストステロンとエストラジオールに代謝される。脊椎動物以外では、ナメクジウオがこの性ステロイド代謝経路をもつ唯一の動物であることを明らかにした(成果公表リスト31)。さらに、エストラジオールを含むグループであるエストロゲンがナメクジウオの主要なステロイドの一つであること、原始的な脊椎動物である両生類や魚類で利用されている性ステロイドがナメクジウオでは主要なステロイドであることなど、系統進化に伴う性ステロイド代謝の変化を明らかにした。一方、性ステロイド受容体も、その特異性と機能がナメクジウオから脊椎動物に至る過程で変化し、ホルモンと受容体の共進化がみられることが示唆された。

さらに、脳一下垂体系内分分泌機構の進化について解析し、脊椎動物の脳一下垂体系の内分分泌機能と関係する遺伝子をナメクジウオから単離し、それらの構造とナメクジウオでの局在を明らかにした。調べた遺伝子のすべてが神経索の前部あるいは先端部に発現していた。この結果は、脊椎動物の脳一下垂体系の機能はナメクジウオの神経索前部の神経内分分泌細胞に集中していることを示唆する。今後は、脊椎動物の内分分泌系の進化を明らかにするために、神経内分分泌細胞の機能の同定と、細胞間の相互作用の解析が課題となる。

(4) 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。また、ホールゲノムショットガン法により、2×のゲノム配列を決定した。

<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。特に、ナメクジウオのゲノム解読によってもたらされた脊索動物の進化と脊椎動物の起源に関する進化シナリオは、これまで長く続いた議論に決着をつける成果として、国内外から大きな評価を得た。またこの成果には、脊椎動物の進化いたるゲノムレベルでの2回の遺伝子重複をほぼ証明する内容も含まれ、この点でも大きな反響をよんだ。さらに、ホヤに初期発生における遺伝子ネットワークの解析は、ゲノムワイドな解析としては初めてのものであり、内外で大きな話題となったのみならず、今後の研究方向を示すものとして評価されている。

<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。しかし、2008年にナメクジウオ・ゲノムの解読論文を取り纏めることができた。さらにギボシムシのゲノム解読に取り組んでいるが、2009年までには完了できなかったので、引き続き取り組んでいきたい。

<今後の課題、展望>

この5年間にナメクジウオのゲノム解読を行い、2002年に公表したホヤゲノムと共に、脊索動物2群のゲノムを解読し公表することができた。これらのデータは、脊索動物進化および脊椎動物起源のこれからの研究の基礎データとして広く利用されるものと思われる。現在進行中のギボシムシゲノムが解読されれば、これらの問題解析のためのさらなる貢献になるものと思われる。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

- 0912020613  
Kawashima, T., Kawashima, S., Tanaka, C., Murai, M., Yoneda, M., Putnam, N. H., Rokhsar, D. S., Kanehisa, M., Satoh, N., and Wada, H.: Domain shuffling and the evolution of vertebrates. *Genome Res.*, 19, 1393-1403 (2009).
- 0912030155  
Islam, A. F. M. T., Moly, P. K., Miyamoto, Y., and Kusakabe, T. G.: Distinctive expression patterns of Hedgehog pathway genes in the *Ciona intestinalis* larva: implications for a role of Hedgehog signaling in postembryonic development and chordate evolution. *Zool. Sci.*, 27, (in press).
- 0912030149  
Kusakabe, T. G., Takimoto, N., Jin, M., and Tsuda, M.: Evolution and the origin of the visual retinoid cycle in vertebrates. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B* 364, 2897-2910 (2009).
- 0912030135  
Dong, B., Horie, T., Denker, E., Kusakabe, T., Tsuda, M., Smith, W. C., and Jiang, D.: Tube formation by complex cellular processes in *Ciona intestinalis* notochord. *Dev. Biol.*, 330, 237-249 (2009).
- 0912030113

- Horie, T., Sasakura, Y., Nakagawa, M., and Kusakabe, T. G.: Cell type and function of neurons in the ascidian nervous system. *Dev. Growth Differ.*, 51, 207–220 (2009).
6. 0912020624  
Wada, H.: Origin and Genetic Evolution of the Vertebrate Skeleton. *Zool. Sci.*, (in press).
7. 0912020622  
Teng, L., Wada, H., and Zhang, S.: Identification and functional characterization of legumain in amphioxus *Branchiostoma belcheri*. *Biosci. Rep.*, (in press).
8. 0911301359  
Hanashima, A., Kubokawa, K., and Kimura, S.: Structure of the Amphioxus Nebulin Gene and Evolution of the Nebulin Family Genes. *Gene*, 443, 76–82 (2009).
9. 0911301353  
Hanashima, A., Kubokawa, K., and Kimura, S.: Characterization of Amphioxus Nebulin and Similarity to the Human Nebulin. *J. Exp. Biol.*, 212, 668–672 (2009).
10. 0911301347  
Tando, Y., and Kubokawa, K.: A Homolog of the Vertebrate Thyrostimulin Glycoprotein Hormone  $\alpha$  Subunit (GPA2) is Expressed in Amphioxus Neurons. *Zool. Sci.*, 26, 409–414 (2009).
11. 0910171506  
Kataoka, Y., Mishina, R., and Fujiwara, S.: Mechanism of DNA replication-dependent transcriptional activation of the acetylcholinesterase gene in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Growth Differ.*, 51, 841–850 (2009).
12. 0910171500  
Koyano, R., Ishida, S., and Fujiwara, S.: Transcriptional regulation of the retinoic acid receptor in the dorsal midline epidermis in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Growth Differ.*, 51, 777–786 (2009).
13. 0910171456  
Kanda, M., Wada, H., and Fujiwara, S.: Epidermal expression of Hox1 is directly activated by retinoic acid in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Biol.*, 335, 454–463 (2009).
14. 0910171452  
Mita, K., Koyanagi, R., Azumi, K., Sabau, S.V., and Fujiwara, S.: Identification of genes downstream of Nodal in the *Ciona intestinalis* embryo. *Zool. Sci.*, (in press).
15. 0910051045  
Ikuta, T., Miyamoto, N., Saito Y., Wada, H., Satoh, N., and Saiga, H.: Ambulacrarian prototypical Hox and ParaHox gene complements of the indirect-developing hemichordate *Balanoglossus simodensis*. *Dev. Genes and Evol.*, 219, 383–389 (2009).
16. 0910051037  
Yasuoka, Y., Kobayashi, M., Kurokawa, D., Akasaka, K., Saiga, H., and Taira, M.: Evolutionary roots of blastoporal expression and ‘organizer’ activity of the vertebrate gastrula organizer gene *lhx1* and its ancient metazoan paralog *lhx3*. *Development*, 136, 2005–2014 (2009).
17. 0901061510  
Tando, Y., and Kubokawa, K.: Expression of the Gene for Ancestral Glycoprotein Hormone  $\beta$  Subunit in the Nerve Cord of Amphioxus. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 162, 329–339 (2009).
18. 0901051159  
Nakayama-Ishimura, A., Chambon, J., Horie, T., Satoh, N., and Sasakura, Y.: Delineating metamorphic pathways in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.*, 326, 357–367 (2009).
19. 0901071111  
Satoh, N.: An aboral-dorsalization hypothesis for chordate origin. *Genesis*, 46, 614–622 (2008).
20. 0901050501  
Horie, T., Sakurai, D., Ohtsuki, H., Terakita, A., Shichida, Y., Usukura, J., Kusakabe, T., and Tsuda, M.: Pigmented and nonpigmented ocelli in the brain vesicle of the ascidian larva. *J. Comp. Neurol.*, 509, 88–102 (2008).
21. 0812311644  
Nishiyama, A., and Fujiwara, S.: RNA interference by expressing short hairpin RNA in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Growth Differ.*, 50, 521–529 (2008).
22. 0812261231  
Yao, T., Ohtani, K., and Wada, H.: Whole-mount observation of pharyngeal and trabecular cartilage development in lampreys. *Zool. Sci.*, 25, 976–981 (2008).
23. 0812261228  
Ohtani, K., Yao, T., Kobayashi, M., Kusakabe, R., Kuratani, S., and Wada, H.: Expression of Sox and fibrillar collagen genes in lamprey larval chondrogenesis with implications for the evolution of vertebrate cartilage. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.*, 310B, 596–607 (2008).
24. 0812261224  
Kinjo, S., Shirayama, Y., and Wada, H.: Evolutionary History of Larval Skeletal Morphology in Sea Urchin Echinometridae (Echinoidea: Echinodermata) as Deduced from Mitochondrial DNA Molecular Phylogeny. *Evol. Dev.*, 10, 632–641 (2008).
25. 0812241337  
Takatori, N., Butts, T., Candiani, S., Pestarino, M., Ferrier, D. E. K., Saiga, H., and Holland, P. W. H.: Comprehensive survey and classification of homeobox genes in the genome of amphioxus, *Branchiostoma floridae*. *Dev. Genes Evol.*, 218, 570–590 (2008).
26. 0812241335  
Yoshida, K., and Saiga, H.: Left-right asymmetric expression of *Pitx* is regulated by the asymmetric Nodal signaling through an intronic enhancer in *Ciona intestinalis*. *Dev. Genes Evol.*, 218, 353–360 (2008).
27. 0812241327  
Takatori, N., and Saiga, H.: Evolution of CUT class homeobox genes: insights from the genome of the amphioxus, *Branchiostoma floridae*. *Int. J. Dev. Biol.*, 52, 969–977 (2008).
28. 0806261537  
Putnam, N. H., Butts, T., Ferrier, D. E. K., Furlong, R. F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-Rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A., Yu, J.-K., et al.: The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature*, 453, 1064–1071 (2008).
29. 0806261520  
Shoguchi, E., Hamaguchi, M., and Satoh, N.: Genome-wide network of regulatory genes for construction of a chordate embryo. *Dev. Biol.*, 316, 498–509 (2008).
30. 0806161618

- Holland, L. Z., Albalat, R., Azumi, K., Benito-Gutiérrez, E., Blow, M. J., Bronner-Fraser, M., Brunet, F., Butts, T., Candiani, S., Dishaw, L. J., et al.: The Amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res.*, 18, 1100–1111 (2008).
31. 0801161212  
Mizuta, T., Asahina, K., Suzuki, M., and Kubokawa, K.: In vitro conversion of sex steroids and expression of sex steroidogenic enzyme genes in amphioxus ovary. *J. Exp. Zool. A*, 309, 1–11 (2008).
32. 0801161048  
Mise, T., Iijima, M., Inohaya, K., Kudo, A., and Wada, H.: Function of Pax1 and Pax9 in the sclerotome of medaka fish: *Genesis*, 46, 185–192 (2008).
33. 0801161044  
Kawashima, S., Kawashima, T., Putnum, N. H., Rokhsar, D. S., Wada, H., and Kanehisa, M.: Comparative pair-wise domain-combinations for screening the clade specific domain-architectures. *Genome Informatics*, 19, 50–60 (2007).
34. 0801120709  
Horie, T., Kusakabe, T., and Tsuda, M.: Glutamatergic networks in the *Ciona intestinalis* larva. *J. Comp. Neurol.*, 508, 249–263 (2008).
35. 0710051839  
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).
36. 0707130957  
Mita, K., and Fujiwara, S.: Nodal regulates neural tube formation in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Genes Evol.*, 217, 593–601 (2007).
37. 0707130953  
Azumi, K., Sabau, S.V., Fujie, M., Usami, T., Koyanagi, R., Kawashima, T., Fujiwara, S., Ogasawara, M., Satake, M., Nonaka, M., Wang, H-G., Satou, Y., and Satoh, N.: Gene expression profile during the life cycle of the urochordate *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.*, 308, 572–582 (2007).
38. 0707121628  
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).
39. 0707111939  
Koyanagi, M., Kubokawa, K., Tsukamoto, H., Shichida, Y., and Terakita, A.: Cephalochordate melanopsin, Evolutionary linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells. *Cur. Biol.*, 15, 1065–1069 (2005).
40. 0707111904  
Deheyn, D. D., Kubokawa, K., McCarthy, J. K., Murakami, A., Porrachia, M., Rouse, G. W., and Holland, N. D.: Endogenous green fluorescent protein (GFP) in amphioxus. *Biol. Bull.*, 213, 95–100 (2007).
41. 0707091324  
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).
42. 0707091322  
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).
43. 0707110542  
Yoshida, R., Horie, T., Tsuda, M., and Kusakabe, T. G.: Comparative genomics identifies a cis-regulatory module that activates transcription in specific subsets of neurons in *Ciona intestinalis* larvae. *Dev. Growth Differ.*, 49, 657–667 (2007).
44. 0704211740  
Takatori, N., Wada, S., and Saiga, H.: Regionalization of the tail-tip epidermis requires inductive influence from vegetal cells and FGF signaling in the development of an ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Zool. Sci.*, 24, 441–448 (2007).
45. 0704131048  
Mizuta, T., and Kubokawa, K.: Presence of sex steroids and cytochrome P-450 (CYP) genes in amphioxus. *Endocrinology*, 148, 3554–3565 (2007).
46. 0702141056  
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).
47. 0702141053  
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).
48. 0701151113  
Barran, P. E., Roeske, R. W., Pawson, A.J., Sellar, R., Bowers, M. T., Morgan, K., Lu, Z. L., Tsuda, M., Kusakabe, T., and Millar, R. P.: Evolution of constrained GnRH ligand conformation and receptor sensitivity. *J. Biol. Chem.*, 280, 38569–38575 (2005).
49. 0701150928  
Takimoto, N., Kusakabe, T., and Tsuda, M.: Origin of the vertebrate visual cycle. *Photochem. Photobiol.*, 83, 242–247 (2007).
50. 0701150554  
Takimoto, N., Kusakabe, T., Horie, T., Miyamoto, Y., and Tsuda, M.: Origin of the vertebrate visual cycle: III. Distinct distribution of RPE65 and  $\beta$ -carotene 15,15'-monooxygenase homologues in *Ciona intestinalis*. *Photochem. Photobiol.*, 82, 1468–1474 (2006).
51. 0701150540  
Kusakabe, T., and Tsuda, M.: Photoreceptive systems in ascidians. *Photochem. Photobiol.*, 83, 248–252 (2007).
52. 0612211437  
Anno, C., Satou, A. & Fujiwara, S.: Transcriptional regulation of ZicL in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Genes Evol.*, 216, 597–605 (2006).
53. 0612211434  
Sakabe, E., Tanaka, N., Shimozono, N., Gojobori, T., and Fujiwara, S.: Effects of U0126 and fibroblast growth factor

- on gene expression profile in *Ciona intestinalis* embryos as revealed by microarray analysis. *Dev. Growth Differ.*, 48, 391–400 (2006).
54. 0607061541  
Wada, H., Okuyama, M., Satoh N., and Zhang, S.: Molecular evolution of fibrillar collagen in chordates, with implications for the evolution of vertebrate skeletons and chordate phylogeny. *Evol. Dev.*, 8, 370–377 (2006).
55. 0607061537  
Kinjo, S., Uehara, T., Yazaki, I., Shirayama Y., and Wada, H.: Morphological diversity of larval skeletons in the sea urchin family Echinometridae (Echinoidea: Echinodermata). *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 86, 799–816 (2006).
56. 0607061533  
Wada, H., Escriva, H., Zhang, S., and Laudet, V.: Conserved RARE localization in amphioxus Hox clusters and implications for Hox code evolution in the vertebrate neural crest. *Dev. Dyn.*, 235, 1522–1531 (2006).
57. 0606270907  
Sayer, J. A., Otto, E. A., O'toole, J. F., Nurnberg, G., Kennedy, M. A., Becker, C., Hennies, H. C., Helou, J., Attanasio, M., Fausett, B. V., Utsch, B., Khanna, H., Liu, Y., Drummond, I., Kawakami, I., Kusakabe, T., Tsuda, M., Ma, L., Lee, H., Larson, R. G., Allen, S. J., Wilkinson, C. J., Nigg, E. A., Shou, C., Lillo, C., Williams, D. S., Hoppe, B., Kemper, M. J., Neuhaus, T., Parisi, M. A., Glass, I. A., Petry, M., Kispert, A., Gloy, J., Ganner, A., Walz, G., Zhu, X., Goldman, D., Nurnberg, P., Swaroop, A., Leroux, M. R., and Hildebrandt, F.: The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat. Genet.*, 38, 674–681 (2006).
58. 0606221422  
Fujiwara, S.: Retinoids and non-vertebrate chordate development. *J. Neurobiol.*, 66, 645–652 (2006).
59. 0606221416  
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. Dyn.*, 233, 1571–1578 (2005).
60. 0606221412  
Kobayashi, Y., Ohashi, M., Kawamura, K., Yubisui, T., and Fujiwara, S.: An ascidian homologue of the gonadotropin-releasing hormone receptor is a retinoic acid target gene. *Comp. Biochem. Physiol.*, 141, 274–280 (2005).
61. 0606221407  
Fujiwara, S.: Promoter activity of the retinoic acid receptor gene in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Dyn.*, 232, 1124–1130 (2005).
62. 0602010838  
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).
63. 0602010835  
Satoh, N., and Levine, M.: Surfing with the tunicates into the post-genome era. *Genes Dev.*, 19, 2407–2411 (2005).
64. 0601311708  
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).
65. 0601311702  
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).
66. 0601311659  
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).
67. 0601311657  
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).
68. 0601311651  
Ushimaru, Y., Konno, A., Kaizu, M., Ogawa, K., Satoh, N., and Inaba, K.: Association of a 66 kDa homolog of Chlamydomonas DC2, a subunit of outer arm docking complex, with outer arm dynein of sperm flagella in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Zool. Sci.*, 23, 679–687 (2006).
69. 0601311648  
Koyanagi, M., Kubokawa, K., Hisao, T., Shichida, Y., and Terakita, A.: Cephalochordata melanopsin: Evolutionary linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells. *Cur. Biol.*, 15, 1065–1069 (2005).
70. 0601311645  
Tanaka, H., Kubokawa, K., and Morisawa, M.: Sperm-derived sperm motility-initiating substance from amphioxus *Branchiostoma belcheri*. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.*, 305, 68–73 (2006).
71. 0601311643  
Keys, D. N., Lee, B., Di Gregorio, 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).
72. 0601311640  
Ikuta, T., and Saiga, H.: Organization of Hox genes in ascidians: present, past and future. *Dev. Dyn.*, 233, 382–389 (2005).
73. 0601311634  
Wada, H., Kobayashi, M., and Zhang, S.: Ets identified as a trans-regulatory factor of amphioxus Hox2 by transgenic analysis using ascidian embryos. *Dev. Biol.*, 285, 524–532 (2005).
74. 0601311631

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

75. 0601311628

Sierro, N., Kusakabe, T., Park, K.-J., Yamashita, R., Kinoshita, K., and Nakai, K.: DBTGR: a database of tunicate promoters and their regulatory elements. Nucl. Acids Res., 34, D552-D555 (2006).

2) データベース／ソフトウェア

1. 707091721

ホヤ遺伝子発現制御データベース DBTGR

<http://dbtgr.hgc.jp/>

2. 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/>

3. 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>

3) 新聞発表など

ナメクジウオのゲノム解読によって、脊椎動物の起源が明らかになったが、この成果は、我々ヒトの遠い起源と関係してNHKテレビ、民放テレビ、主要全国紙などに取り上げられ、お茶の間でも話題になった。“ナメクジウオ”が2008年の話題の動物になったといっても過言ではない。