

## 脊椎動物起源の研究

●佐藤 矩行<sup>1)</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> ◆笹倉 靖徳<sup>4)</sup> ◆堀田 耕司<sup>8)</sup> ◆真壁 和裕<sup>9)</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) 兵庫県立大学大学院生命科学研究科 7) 広島大学大学院理学研究科 8) 慶應義塾大学理工学部 9) 徳島大学総合科学部

### <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うち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。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。

### <2008年度の研究の当初計画>

- (a) 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、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、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し、論文を公表する。
- (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。
- (c) 脊椎動物の基本体制の確立に関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。

### <2008年度の成果>

- (a) 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、論文の公表に結びつけた(成果公表リスト1)。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。これらのナメクジウオ遺伝子と脊椎動物遺伝子とを詳細に比較し、脊椎動物進化に関わったと思われる遺伝子群を明らかにした(公表リスト2)。

さらに、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マクロシ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本の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。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の連鎖群にまとめた後で、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。

また、両者のシテニー・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。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。

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。これらの成果をふまえると、脊索動物の進化については、(1)自由遊泳性の祖先からまず頭索類が起源し、(2)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、(3)尾索類は頭索類の祖先から濾過摂食に適応すべく独特の進化を遂げた、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4)。

- (b) 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。すでに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てきたが、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(公表リスト3)。
- (c) 脊椎動物の基本体制の確立に関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。

- ・ヤツメウナギの軟骨形成過程を初めて3次的に解析することに成功し、ヤツメウナギの鰓軟骨にも背腹に沿った分化が見られることがわかった。さらに細胞性の脊椎動物の軟骨と類似している軟骨をもつナメクジウオの外鬚が、外科的に切断すると1週間程度で再生が開始し、軟骨が新規に形成されることを見いだした。
  - ・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。
  - ・ナメクジウオの性ステロイド代謝系は、無類類にみられる5 $\alpha$ 還元ステロイドが最重要ステロイドであること、またアンドロゲン系は脊椎動物から機能したことが示唆された。また、性ステロイド代謝調節に関わる糖タンパク質ホルモン(GPH)の候補はサイロステイムリンのみであることをゲノム情報から確認し、祖先型GPHから脊椎動物のGTHとサイロステイムリンに分化したと考えられる。
- (d) 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。

#### <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が、本年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。残り1年でギボシムシのゲノム解読に結びつけ、「脊椎動物の起源」の理解に結びつけたい。

#### <今後の課題>

今後の1年は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. 806261537  
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)
2. 806261532  
Holland, L. Z. et al.: The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res.*, 18, 1100-1111 (2008)
3. 806261520  
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)

4. 901071111  
Satoh, N.: An aboral-dorsalization hypothesis for chordate origin. *genesis*, 46, 614-622 (2008)
5. 812261228  
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)
6. 812241337  
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)
7. 812241327  
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)
8. 812311644  
Nishiyama, A., and Fujiwara, S.: RNA interference by expressing short hairpin RNA in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Growth Differ.*, 50, 521-529 (2008)
9. 801120709  
Horie, T., Kusakabe, T., and Tsuda, M.: Glutamatergic networks in the *Ciona intestinalis* larva. *J. Comp. Neurol.*, 508 (2), 249-263 (2008)
10. 901050501  
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)
11. 901061510  
Tando, Y., and Kubokawa, K.: Expression of ancestral thyrostimulin beta subunit in the nerve cord of amphioxus. *Gen. Comp. Endocrinol.*, in press
12. 901051159  
Nakayama-Ishimura, A., Chambon, J., Horie, T., Satoh, N., and Sasakura, Y.: Delineating metamorphic pathways in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.*, in press (2009)
- 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/>