

科学研究費補助金研究成果報告書

平成23年 5月15日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20681019

研究課題名（和文） トランスポゾンを用いた順遺伝学および逆遺伝学的手法に基づく
ホヤ遺伝子機能の解明研究課題名（英文） Study of genetic function of the ascidian based on the forward and
reverse genetic approaches

研究代表者 笹倉 靖徳（SASAKURA YASUNORI）

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：10400649

研究成果の概要（和文）：脊索動物カタユレイボヤにおいて、遺伝子機能解析の基盤構築と遺伝子機能の解明を目指した。高効率の変異体作製方法を確立し、Hox1 を中心とする遺伝子の新規機能を解明した。また母性効果遺伝子の新しい抑制法を開発した。組織特異的なマーカーとなる系統を整備し、それを利用して遺伝子機能や神経系のリモデリングの機構を解明した。細胞分裂の周期の可視化技術を導入し、細胞分裂と形態形成運動の調和メカニズムを明らかにした。Sleeping Beauty トランスポゾンによるカタユレイボヤの新しい遺伝子組換え法を確立した。

研究成果の概要（英文）：This study was purposed to establish the methods for investigation of gene functions in the chordate *Ciona intestinalis*. It was shown that enhancer detection is an effective way to create insertional mutants. It was shown that Hox1 functions in the patterning of epidermis. As a reverse genetic approach, a novel method of targeted disruption of maternally expressed genes was established. Transgenic maker lines were established that express reporter genes in the tissue-specific manner. The neural tissue-specific lines were utilized to investigate how the larval central nervous system was remodeled to construct the adult nervous system during metamorphosis. A method to live-image the cell cycle progression was introduced, and by using this method mechanisms of the coordination between cell division and morphogenesis were shown. A new method of germline transformation in *Ciona* mediated by Sleeping Beauty transposon was established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
総 計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

研究分野：発生ゲノム科学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：発生・分化、ゲノム、遺伝子、突然変異体、トランスポゾン

1. 研究開始当初の背景

海産無脊椎の脊索動物ホヤの一種カタユウレイボヤはその進化学的に重要な位置に加え、ゲノム配列情報を伴ったコンパクトで遺伝子数の少ないゲノムを有することから、遺伝子機能解析のよい研究材料であり、また飽和突然変異体を実行するポテンシャルを有している。我々の研究グループは、カタユウレイボヤにおいてトランスポゾンを利用した遺伝学的手法、具体的にはトランスジェニック系統作製、エンハンサートラップ、挿入突然変異体作製の手法を導入してきた。しかしながらこれらの手法によるホヤの変異体作製の効率は高くなく、飽和突然変異体作製のためには技術革新が必要である状態であった。

2. 研究の目的

トランスポゾンを用いた突然変異体作製が可能になったカタユウレイボヤにおいて、エンハンサートラップ法や遺伝子ターゲティング法などのトランスポゾン技術を突然変異体の単離と組み合わせることにより、順遺伝学、逆遺伝学の両方向から効率よく突然変異体を作製する方法を開発し、ホヤにおける飽和突然変異体作製の基盤形成を目指す。その手法を基に突然変異体を実際に単離し遺伝子の機能や遺伝子ネットワークを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 順遺伝学的手法としてトランスポゾン技術の改良を、エンハンサートラップ法を主軸にして進める。また実際にエンハンサートラップ系統から突然変異体をスクリーニングし、その変異体の解析から遺伝子機能を明らかにする。

(2) 逆遺伝学的手法として遺伝子ターゲティング法をカタユウレイボヤに導入することを目指す。手法はショウジョウバエのターゲティング法を模倣する。遺伝子ターゲティング法により、母性効果遺伝子の機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) カタユウレイボヤゲノム中に挿入された単一コピーの Minos を再転移させる技術はトランスポゾン技術の進展に重要であり、これを開発した。転移酵素を卵で発現させるトランスジェニック系統を作製し、その系統と Minos の単一コピー挿入を有する系統を掛け合わせると、2重系統の卵（母細胞）内で Minos の転移が生じた。その2重系統の卵を野生型精子と掛け合わせて次世代を得ると、次世代個体のおよそ 4%に新規挿入が遺伝し

た。

(2) Minos がホヤゲノム中をどのように転移するかの性質を調べることが技術開発において重要である。(1)で開発した系を利用して、Minos のカタユウレイボヤゲノム中の転移傾向を調べた。Minos はゲノム中をほぼランダムに移動できること、10%程度は同一染色体内へのローカルホップが生じることが判明した。Minos のランダムに転移する性質は、ゲノムワイドな変異体作製において有利に働いた。

(3) エンハンサートラップ系統の持つトランスポゾン挿入位置の傾向を明らかにした。TPO 遺伝子の promoter と GFP を用いたエンハンサートラップベクターにより作製された 50 種類の系統の挿入位置を決定したところ、約 50%の系統は遺伝子内かごく近傍に挿入を有すること、10%はエキソンへと挿入を持つことが判明した。このことからエンハンサートラップ系統は突然変異体の有用なソースになることが判明した。

(4) Minos を利用して UAS-Gal4 エンハンサートラップ法をホヤに導入した。基礎プロモーターとしてカタユウレイボヤで実績のある Ci-TPO 遺伝子のプロモーターを用いた。また、Gal4 を含んだベクターに UAS-GFP を組込んだ。このベクターの挿入を持つトランスジェニック系統を作製し、(1)で示した方法により転移させ、エンハンサートラップ系統を樹立した。樹立した系統の挿入箇所を同定したところ、従来のエンハンサートラップ系統と比較して遺伝子内に挿入を持ちやすい傾向があることが判明した。具体的には、Gal4 系統のうちおよそ 80%が遺伝子内、もしくはごく近傍に挿入を有していた。このことは Gal4 エンハンサートラップ系統が高効率突然変異体作製に適していることを表している。この手法により、DUSP, NOR1 といった遺伝子について変異体と考えられる系統を得ており、現在解析を進めている。

(5) エンハンサートラップ法により、Hox1 遺伝子の突然変異体を単離した。Hox1 が幼生表皮細胞で機能し、出水口原器の形成に必須の役割を果たしていること、出水口原器が消失することの二次的な効果として変態後の鰓及び出水口筋肉、体壁筋が消失することを突き止めた。また Hox1 の表皮での機能にはレチノイン酸によるシグナルが必要であることを示した。

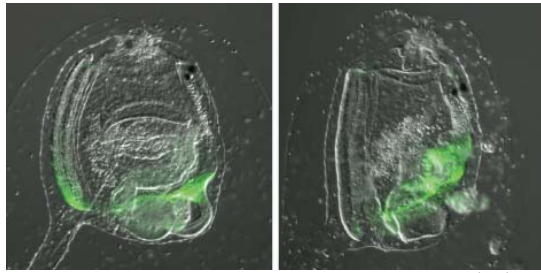


図1 野生型個体(右)とHox1変異体(左)

(6) 母性で発現する遺伝子の新規ノックダウン手法を確立した。まず、ホヤにおいてGFP遺伝子の母性における発現が抑制されることを発見した。続いて、GFP遺伝子と母性遺伝子のプロモーターおよび5'UTRを連結させておくと、その母性遺伝子の発現も共抑制されることが明らかになった。また、ターゲットとなった母性遺伝子が胚性の発現を示す場合には、その胚性の発現はノックダウンの影響を受けないことが判明した。本手法は遺伝子の母性での機能のみを特異的に解析できる逆遺伝学的手法であり、ホヤの母性因子研究の起爆剤となることが期待できる。本手法により **posterior end mark**、**maternal T** 遺伝子のノックダウンシステムを作製した。**posterior end mark** のノックダウンシステムは原腸陥入に異常を示し、**maternal T** のノックダウンシステムは尾部形成に異常を示した。

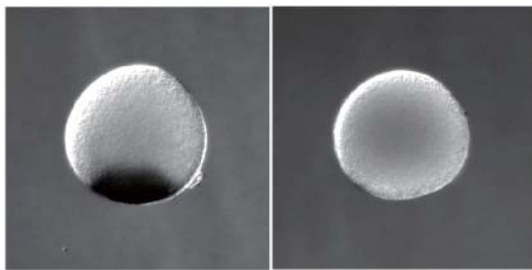


図2 母性 mRNA の特異的ノックダウン。
posterior end mark mRNA を染色している。左は野生型卵での **posterior end mark mRNA** が黒い部分に存在している。右はノックダウンシステムの卵で、染色が認められない。

(7) ホヤにおける **Hox** 遺伝子群の機能解析は、脊索動物の進化及び遺伝子機能解明に必須である。これまでホヤの **Hox** の機能は不明であったが、上記で述べたように **Hox1** が幼生で機能していることを突き止めた。このことを受けて他の **Hox** 遺伝子の機能解析をモルフオリノオリゴと **Minos** エンハンサートラップシステムを利用して進めた。その結果、**Hox10** が消化管の後方を形成するのに必要であることを突き止めた。

(8) 以前の研究で単離されていたカタユウレイボヤの **Minos** 挿入系統 **Tg[MiTFr3dTPOG]45** 系統において **GFP** 遺伝子サイレンシングが生じていることを発見した。このサイレンシングは **Tg[MiTFr3dTPOG]45** 系統の卵で合成される母性因子が **GFP mRNA** を分解することにより生じることを明らかにした。ホヤにおいて **mRNA** の分解による遺伝子サイレンシングが生じることの初の証拠となった。

(9) カタユウレイボヤへの遺伝子ターゲットング技術の導入を進めた。メガヌクレアーゼ **I-SceI** および組換え酵素遺伝子 **Cre** を生殖細胞で発現させるシステムを樹立した。続いてターゲットングベクターを組み込んだシステムを樹立し、それらを掛け合わせて3重システムを作製した。その3重システムの子孫から、ターゲットングが生じた個体を3ファミリーについてスクリーニングしたが、これまでのところターゲットングを生じた個体は発見できていない。本手法の確立のためにはさらなる工夫が必要である。

(10) カタユウレイボヤにおける変異体作製や遺伝子機能解析のためには、様々な組織、細胞、細胞小器官を可視化することが基盤として必要である。本研究で作製されたエンハンサートラップシステムのうち、組織の可視化に有用なシステムをマーカーシステムとして樹立した。また、ホヤ幼生は細胞数が少なく単純な神経系を有することから、神経系の機能解明のよい材料である。このことを受けて神経系の各種細胞でレポーター遺伝子 **Kaede** を発現させるシステムを **Minos** を用いて作製した。さらに、細胞分裂を可視化するマーカーとして **Fucci** 技術を導入した。

(11) 神経系のマーカーシステムを利用し、ホヤの変態時における神経系のリモデリングの機構を解析した。ホヤの幼生の中樞神経系は変態時に失われるとされてきた通説を覆し、幼生の中樞神経系は基本的に残ること、一方幼生ニューロンは変態過程でほぼ失われること、幼生のグリア細胞が成体の中樞神経系に受け継がれ、その一部が成体ニューロンを構築することを明らかにした。また本実験を通じて、**Kaede** を利用した細胞追跡技術がカタユウレイボヤにおいて可能であることを示した。

(12) 神経系のマーカーシステムの有効性を示すため、神経で発現する転写因子 **Ptf1a** の機能解析をそれらのマーカーシステムを利用して進めた。カタユウレイボヤの **Ptf1a** はドーパミン作動性ニューロンで特異的に発現し、そのニューロンの分化に必須であること、**Ptf1a**

がドーパミン作動性ニューロンの最終分化に必要な各種の遺伝子の転写を直接制御し、ニューロンの最終分化を引き起こしていることを明らかにした。

(13) 細胞周期可視化技術を用いて、ホヤの初期発生過程における細胞分裂パターンを解析した。神経管閉鎖時に、表皮細胞が特徴的な細胞周期パターンを生み出すこと、具体的にはそれまでの細胞周期と比べて 30 分程度長い G2 期を有していることを明らかにした。この細胞周期の伸長に *cdc25* 遺伝子の発現調節が関与していることを突き止めた。また、その G2 期を人工的に短くすると神経管閉鎖が阻害されることから、G2 期の伸長化がこの形態形成運動には必要であることが判明した。

(14) カタユウレイボヤのトランスポゾン技術の発展のためには、*Minos* 以外にもう一つのトランスポゾンによる形質転換系の構築が有効である。*Sleeping Beauty* トランスポゾンの活性型フォームである SB100X がカタユウレイボヤ内で形質転換に足る活性を示すことを突き止め、このトランスポゾンを用いたトランスジェニック系統を作製した。また SB100X を生殖細胞で発現させた系統も併せて作製し、ゲノム中の SB トランスポゾンの再転移にも成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- ①Takeo Horie, Ryoko Shinki, Yosuke Ogura, Takehiro G. Kusakabe, Nori Satoh, Yasunori Sasakura, Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells that form the adult nervous system, *Nature*, 査読有, 469 巻, 2011, 525-528
- ②Yosuke Ogura, Asako Sakaue-Sawano, Masashi Nakagawa, Nori Satoh, Atsushi Miyawaki, Yasunori Sasakura, Coordination of mitosis and morphogenesis: role of a prolonged G2 phase during chordate neurulation, *Development*, 査読有, 138 巻, 2011, 577-587
- ③Akiko Hozumi, Narudo Kawai, Reiko Yoshida, Yosuke Ogura, Naoyuki Ohta, Honoo Satake, Nori Satoh, Yasunori Sasakura, Efficient transposition of a single *Minos* transposon copy in the genome of the ascidian *Ciona intestinalis*

with a transgenic line expressing transposase in eggs, *Developmental Dynamics*, 査読有, 239 巻, 2010, 1076-1088

- ④Yasunori Sasakura, Miho M. Suzuki, Akiko Hozumi, Kazuo Inaba, Nori Satoh, Maternal factor-mediated epigenetic gene silencing in the ascidian *Ciona intestinalis*, *Molecular Genetics and Genomics*, 査読有, 283 巻 2010, 99-110

〔学会発表〕(計 10 件)

- ①笹倉靖徳、神田美幸、池田拓、堀江健生、河合成道、小椋陽介、吉田麗子、保住暁子、佐藤矩行、藤原滋樹、脊索動物ホヤの表皮においてレチノイン酸→Hox1 カスケードはotic placode相同器官の形成に必須である。第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド
- ②飯塚貴子、三田薫、濱田麻友子、佐藤矩行、笹倉靖徳、カタユウレイボヤにおける母性 mRNA の特異的ノックダウン技術の開発、日本動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 23 日、東京大学
- ③ Takeo Horie, Nori Satoh, Yasunori Sasakura, Developmental changes of nervous system during metamorphosis in the ascidian *Ciona intestinalis*, 日本発生生物学会第 41 回大会、2008 年 5 月 28 日、徳島県郷土文化会館

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~sasakura/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹倉 靖徳 (SASAKURA YASUNORI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号 : 10400649