

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23681039

研究課題名(和文)トランスポゾンによるゲノム改変技術を元にした脊索動物の発生と進化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Understanding mechanisms of evolution of chordates through genome editing technologies

研究代表者

笹倉 靖徳(SASAKURA, Yasunori)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：10400649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,400,000円

研究成果の概要(和文)：脊索動物の進化のメカニズムを解明するために、脊椎動物の姉妹群であるホヤの1種カタユレイボヤにおいて遺伝学的アプローチを利用した遺伝子機能解析を実施した。カタユレイボヤの任意の遺伝子の機能欠損体を作製するノックアウトをはじめとする実験手法を導入し、その手法を基にして脊索動物に保存された遺伝子のホヤにおける新機能を明らかにした。例えばHox転写因子群の消化管や表皮におけるパターンニングへの関与、変態の研究基盤形成と性腺刺激ホルモン放出ホルモンの機能、細胞分裂制御機構の解明など、脊索動物の進化を知る上で欠かせない数多くの知見を得た。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish molecular and genetic technologies for investigating gene functions in the chordate *Ciona intestinalis* for elucidating mechanisms of the evolution of chordates. Through transposon-mediated transgenesis and gene knockouts, this study revealed functions of various genes that are conserved among chordates in this ascidian. Hox10 is essential for forming the intestine by regulating the migration of endodermal cells. Gonadotropin-releasing hormones expressed at the larval stage are involved in the regulation of metamorphosis of *Ciona*. New mechanisms of cell cycle regulation has been revealed that are mediated by conserved, developmentally relevant transcription factors. These new findings provide us new insights for deepen the knowledge about the evolution of chordates and ascidians.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：脊索動物 進化 遺伝子改変 ノックアウト カタユレイボヤ 脊椎動物

1. 研究開始当初の背景

脊索動物は他の動物群にない特有の形質を有しており、それらの形質が進化過程で獲得されたメカニズムの解明は動物学の最重要命題の1つである。その謎を解くためには、脊索動物に属する各動物における遺伝子機能の解明と比較が必要である。尾索動物亜門に属するホヤは、脊索動物の中でも脊椎動物の直接の姉妹群であり、脊索動物の進化を解明するための重要なポジションに位置している。ホヤの1種、カタユウレイボヤはゲノムが解読されていること、遺伝子機能を解析する基本的実験手法が確立していること、室内飼育が可能であり、遺伝学的手法を利用できることから、最適な実験材料となっている。特に我々の研究室では、カタユウレイボヤにおいてMinosトランスポゾンを用いた形質転換法を確立し、トランスジェニック系統や突然変異体系統を駆使した、独創的な研究を展開していた。これらの遺伝学的手法を基に、ホヤの有するセルロース合成酵素の意外な機能や、免疫系遺伝子の発生への貢献、転写因子Hox1の表皮での機能など、脊索動物や尾索類の進化メカニズムを解明する手がかりとなる遺伝子機能を明らかにしてきた。一方、ホヤでは狙った遺伝子の遺伝学的ノックアウト法を中心に、遺伝子機能に効率的にアプローチする手法の開発は遅れており、課題となっていた。これまでの研究で、カタユウレイボヤにおいてGal4エンハンサートラップ系統は、遺伝子の近傍にトランスポゾン挿入を有することが多いことが分かっていた。そのため、このトラップ系統では遺伝子の機能欠損を引き起こしている可能性が高く、突然変異体のよいリソースになると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ホヤの1種カタユウレイボヤの遺伝子機能を解明することを通じて、脊索動物の発生・進化のメカニズムを解明することを目的とする。そのために、トランスポゾンによるゲノム改変・突然変異体作製が可能になった原始脊索動物カタユウレイボヤにおいて、Gal4エンハンサートラップ法やゲノム欠失方法といったトランスポゾン技術を開発し、それらの技術を元に突然変異体を効率よく単離する方法を確立する。またGal4-UASによる遺伝子強制発現系をこのホヤに導入する。これらの遺伝学的技術の確立によりカタユウレイボヤにおける遺伝学を進展させると共に、その技術をベースに新奇の遺伝子機能を明らかにする。

3. 研究の方法

カタユウレイボヤのGal4エンハンサートラップ系統が高頻度で遺伝子近傍にトランスポゾン挿入を持つことに着目し、この手法により突然変異体を作製する。またトランスポゾンが挿入箇所のごく近傍に転移するロー

カルホップ転移を応用したゲノム欠失法をカタユウレイボヤに導入し、遺伝子の欠失系統を単離する。また、研究開始後に開発された人工ヌクレアーゼを用いたノックアウト法は本研究の目的達成に最適な手法であるため、この方法も取り入れつつ、遺伝子機能解析技術を確立する。これらの技術により変異体を作製し、遺伝子の新奇機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) Gal4エンハンサートラップ系統の単離を進めた。転移酵素発現系統と、Gal4トランスポゾンベクターを有するドナー系統を掛け合わせて二重系統を作製した。二重系統の生殖細胞を野生型と掛け合わせ、次世代を得た。その中から新規のレポーター遺伝子発現パターンを示す系統を単離した。結果、新規のエンハンサートラップ系統を3系統得た。その一方で、エンハンサートラップ系統の出現率が、パイロット実験からの見積もりと比較して大幅に減少した。新しくGal4トランスポゾンベクターのドナー系統を樹立してチャレンジしたものの、状況の改善には至らず、本研究手法で遺伝子の機能に迫ることは難しいと判断された。

(2) Sleeping Beautyトランスポゾンを用いてカタユウレイボヤのトランスジェニック系統を作製できることを示した論文を発表した。続いてこのトランスポゾンベクターをローカルホップ転移型に改変し、系統を樹立した。転移酵素発現系統と掛け合わせてローカルホップを誘導したが、トランスポゾンのジャンピングを確認することができなかった。以下に述べる人工ヌクレアーゼが開発されたこともあり、本手法による変異体作製から、人工ヌクレアーゼによる変異体作製へと方針をシフトすることとした。

(3) 人工酵素Zinc finger nuclease (ZFN)がカタユウレイボヤ内で変異活性を有することを、eGFPに対するZFNとトランスジェニック系統を利用して証明した。eGFP ZFNの変異導入率は非常に高いものであり、導入した個体の有するeGFP遺伝子のほぼ100%が変異型になる。また、double strand breakを誘発することに伴う非特異的な異常の出現率を調べた。一方、ZFNを用いた内在遺伝子のノックアウトを試みたが、活性の高いZFNの構築が非常に難しいことが判明した。そのため、次に挙げるTALENを用いることにした。

(4) 人工酵素TALENを用いて、ホヤゲノムの狙った遺伝子に突然変異を誘発できることを示した。ZFNと同様に、TALENによる変異導入活性は非常に高いこと、及びZFNと比べて構築が容易であり内在遺伝子に変異を導入できるTALENを高効率で作製できることが判明した。また、TALENを遺伝子の転写

調節領域を用いて体細胞で発現させることにより、遺伝子機能を組織また時期特異的に破壊することができることを示した。また、TALEN は体細胞のみならず生殖細胞ゲノムにおいても変異を誘発し、その変異は次世代個体に受け継がれることも証明した。

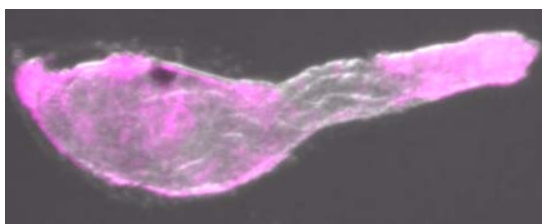


図1：FGF3 のノックアウトにより変態に異常を示したカタユレイボヤ幼生。

(5) ゲノム編集技術の1つである Crispr/Cas9 を用いて、ホヤ遺伝子のノックアウトを行うことができることを示した。TALEN と比較すると、高い変異導入活性を有する guide RNA を得るのにスクリーニングが必要であること、変異導入率がやや低いことが欠点となっている。Crispr/Cas9 の導入によるホヤへの非特異的な異常はほぼ出現しないこと、この手法を用いてゲノムのおよそ 4kbp の領域の欠失を引き起こすことができることを突き止めた。以上の結果より、カタユレイボヤの遺伝子ノックアウトにおいては、TALEN を主として用い、TALEN が変異を導入できない遺伝子について Crispr/Cas9 を試すのがよいと結論づけた。

(6) 母性 mRNA 特異的ノックダウン法を開発した。母性発現遺伝子の転写調節領域に eGFP をつなげた人工 DNA を有するトランスジェニック系統では、使用した転写調節領域の基となる遺伝子の母性 mRNA が特異的に消失する。この現象を利用した母性 mRNA のノックダウン法を MASK 法と名付けた。

(7) 以上述べた研究手法を用いて、カタユレイボヤの遺伝子機能を解明し、脊索動物の進化のメカニズムを明らかにした。特に動物間で広く保存されている重要な転写調節因子である Hox 転写因子群を中心に解析を行った。カタユレイボヤの Hox1 は、耳相同器官の形成に必須の役割を果たしていることを明らかにした。また、Hox1 は甲状腺相同器官で発現し、その後方領域の形成に働いていること、一方、前方領域は別のホメオボックス型転写因子の Otx が形成していることを解明した。

(8) Hox10 は幼生の時期に内胚葉後方で発現している。Hox10 の機能阻害により、この内胚葉細胞の細胞運動が阻害され、結果として消化管が形成されないことを明らかにした。Hox10 は Collagen type IX の転写を負に制御すること、内胚葉細胞の運動にコラーゲン分解酵素が必要であることを突き止めた。

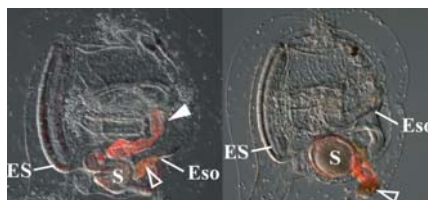


図2：左がコントロール、右が Hox10 の機能欠損個体。右の個体では消化管（白の矢尻）が消失している。

(9) カタユレイボヤの Hox2, Hox12, Hox13 の機能は不明であったが、ノックアウト法により Hox2 は耳相同器官の融合に必須であること、Hox12 は消化管の正常な形態形成に必要であること、Hox13 は輸精管の前方にある色素器官の形成に必要であることをそれぞれ明らかにした。一方、Hox3, Hox4, Hox5 については特に大きな機能を有さないことも判明した。

(10) セルロース合成は、尾索動物が脊椎動物と進化過程で分かれてのちに獲得した重要な形質である。このセルロース合成の中心的な遺伝子 CesA の転写調節機構を解明し、ホヤがセルロース合成能力を獲得した進化プロセスに迫った。その結果、CesA の転写は脊椎動物と保存された転写因子 AP-2 により制御されていることを明らかにした。

(11) 初期発生の過程で、ホヤは厳密に細胞分裂の回数とタイミングを制御している。そのメカニズムを解析し、表皮においては AP-2 と GATA という2つの転写因子が、細胞周期制御遺伝子の1つである cdc-25 の転写を調節していることを明らかにした。また筋肉と脊索細胞においては、ZicL 転写因子がそれらの細胞分裂の回数を限定するキープ因子であることを突き止めた。

(12) ホヤと脊椎動物の変態機構の共通性を探るため、ホヤの変態メカニズムを解析した。ホヤの変態イベントが開始される詳細なタイムテーブルを作成し、変態研究の基礎を構築した。またホヤが変態過程で、固着刺激を記憶することができることが明らかになった。変態の分子機構を TALEN を用いて解析し、変態の進行には、グルタミン酸作動性神経と GABA 作動性神経が必要であることが明らかになった。

(13) ホヤは幼生期に生殖ホルモンであるゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) を発現させているが、幼生期は性的に未成熟であるため、その機能は謎であった。ホヤ幼生の GnRH の機能を解析した結果、GnRH が変態の開始を制御すること、特に GnRH3 と GnRH5 は細胞分裂を負に制御することが明らかになった。

(14) 変態後のホヤ幼若体は、消化管や鰓裂、

心臓など、脊椎動物と共通の構造を有する一方で、それらを制御する中枢神経系は前後軸方向に特に目立った形態パターンを有さない。幼若体の中枢神経のニューロンの位置をトランスジェニックシステムを利用して解析した結果、幼若体の中枢神経には明確な前後軸に沿った領域があり、また機能も分業されていることを解明した。

(15) エンハンサートラップ系統 E15 は、幼若体の中枢神経系で特異的に GFP を発現させる系統である。この系統のトランスポゾン挿入位置は、2 つの遺伝子に挟まれているが、それらの 1 つ Galnt6-related が中枢神経を含む領域で発現していた。つまりトラップされたエンハンサーはこの遺伝子を制御していると考えられる。一方、Galnt6-related は中枢神経系の他に、消化管や内柱でも発現する。またトランスポゾン挿入位置近傍には、中枢神経系のエンハンサーの他に消化管と内柱の発現を正に制御するエンハンサーが存在している。つまりトランスポゾンは、消化管と内柱のエンハンサーをトラップしていないことになる。解析の結果、消化管と内柱のエンハンサーは遺伝子の転写方向に依存した活性を示し、一方中枢神経系のエンハンサーは転写方向に非依存であることが判明した。つまりトランスポゾンの挿入方向が、消化管と内柱のエンハンサーの制御を受けない向きであったために、E15 系統は中枢神経系特異的なトラップラインとなったと考えられる。

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 16 件)

① Narudo Kawai, Yosuke Ogura, Tetsuro Ikuta, Hidetoshi Saiga, Mayuko Hamada, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Nori Satoh, Yasunori Sasakura, Hox10-regulated endodermal cell migration is essential for development of the ascidian intestine. *Developmental Biology*, 査読有, 印刷中, 2014, doi: 10.1016/j.ydbio.2015.03.018

② Nicholas Treen, Keita Yoshida, Tetsushi Sakuma, Haruka Sasaki, Narudo Kawai, Takashi Yamamoto, Yasunori Sasakura, Tissue-specific and ubiquitous gene knockouts by TALEN electroporation provide new approaches to investigating gene function in *Ciona*. *Development*, 査読有, 141 巻, 2014, 481-487, doi: 10.1242/dev.099572

③ Akiko Hozumi, Kaoru Mita, Csaba Miskey, Lajos Mates, Zsuzsanna Izsvak, Zoltan Ivics, Honoo Satake, Yasunori Sasakura, Germline transgenesis of the chordate *Ciona intestinalis*

with hyperactive variants of Sleeping Beauty transposable element. *Developmental Dynamics*, 査読有, 242 巻, 2013, 30-43, doi: 10.1002/dvdy.23891

④ Yasunori Sasakura, Miyuki Kanda, Taku Ikeda, Takeo Horie, Narudo Kawai, Yosuke Ogura, Reiko Yoshida, Akiko Hozumi, Nori Satoh, Shigeki Fujiwara, Retinoic acid-driven *Hox1* is required in the epidermis for forming the otic/atrial placodes during ascidian metamorphosis. *Development*, 査読有, 139 巻, 2012, 2156-2160, doi: 10.1002/dvdy.23891

[学会発表] (計 29 件)

① Nicholas Treen, Ascidian genome editing using TALENs. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日, 神戸国際会議場, 神戸

② 佐々木陽香, カタユレイボヤにおける CRISPR/Cas システムを用いたゲノム編集, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 5 日, 神戸国際会議場, 神戸

③ 笹倉 靖徳, 脊索動物ホヤにおける遺伝学的技術を用いた発生メカニズムの解明, 日本動物学会第 84 回大会, 2013 年 9 月 26 日, 岡山大学, 岡山

④ 笹倉 靖徳, 脊索動物ホヤにおけるセルロース合成酵素遺伝子の獲得とその機能, 日本進化学会第 14 回大会, 2012 年 8 月 21~24 日, 首都大学東京, 東京

⑤ 笹倉 暁子, Sleeping Beauty トランスポゾンを用いた脊索動物カタユレイボヤの形質転換, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13~16 日, パシフィコ横浜, 横浜

[図書] (計 5 件)

① Yasunori Sasakura, Springer, Germline transformation in the ascidian *Ciona intestinalis*, In Sexual reproduction in animals and plants (eds H.Sawada, N. Inoue, M. Iwano), 2014, p465-473

② Nicholas Treen, 吉田慶太, 佐々木 陽香, 笹倉 靖徳, ホヤにおける TALEN を用いたゲノム編集, 実験医学別冊 今すぐ始めるゲノム編集 (山本卓編), 2014, p161-168

[その他]

ホームページ等

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

卵における遺伝子の働きを調べる新しい手法「マスク法」を開発, 筑波大学プレスリリース, 2014 年 5 月 23 日

耳を形成するには表皮での Hox1 遺伝子の発

現が重要-筑波大などが発見, マイナビニュース 2012年5月16日

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹倉 靖徳 (SASAKURA, YASUNORI)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：10400649