

博士論文

メダカをモデルとした  
細胞型特異的遺伝子制御機構に関する研究

2015年3月

甲南大学大学院  
自然科学研究科 生命・機能科学専攻

大道 裕

## 目次

要旨	…P. 1
第1章 総合緒言	…P. 2
第2章 ホヤで発見された新奇現象の脊椎動物への展開 (I) - 非生殖性 GnRH システムの進化的保存性 -	…P. 5
第3章 ホヤで発見された新奇現象の脊椎動物への展開 (II) - 初期胚における背腹境界形成の分子機構 -	…P. 21
第4章 視細胞サブタイプ特異的 microRNA の発現制御と機能の解析	…P. 33
第5章 総合考察	…P. 67
謝辞	…P. 70
引用文献	…P. 71
公表論文リスト	…P. 94
副論文	…P. 95

## 要 旨

一つの個体を構成する同じゲノム情報をもつ細胞が、異なる個性を獲得する過程で中心的な役割を果たすのは、細胞によって特異的な遺伝子群を発現するメカニズムである。多くの生物のゲノム DNA 配列が解明された現在においても、細胞によって異なる遺伝情報が読み出されるメカニズムは、依然として大きな謎である。近年、遺伝子制御研究のモデル生物として注目され、研究が盛んになってきた生物として、脊椎動物と同じ脊索動物門に属する海産動物のホヤがある。ホヤのオタマジャクシ幼生は、約 3000 と少数の細胞からなるにも関わらず、脊椎動物と共通のボディープランをもっている。胚発生が体外で進行し、胚が透明ですべての細胞を顕微鏡下で観察することが可能で、個体レベルの遺伝子機能操作も容易である。さらにゲノムサイズが小さく、シス調節配列の発見や解析が容易であるという利点もある。ホヤはモデル脊索動物としてさまざまな利点があるが、その一方で、特殊化する方向へ進化してきた生物であり、脊椎動物とのさまざまな相違点も存在する。ホヤと同様な研究モデルとしての利点をもちながら、脊椎動物に特有の性質も備えたシンプルなモデルとして注目されているのが、ゼブラフィッシュやメダカなどの小型魚類である。とくにメダカは、ゲノムサイズがゼブラフィッシュの半分であり、シス調節領域のゲノムレベルおよび個体レベルの解析に優れた特徴を備えている。

本研究では、メダカを個体レベルで細胞特異的な遺伝子発現制御機構を解析するためのモデル脊椎動物にとらえ、メダカを用いて新奇現象あるいはあらたに発見された分子の普遍性を明らかにすることを目指した。まず、ホヤを用いて発見された、細胞特異的な転写制御に関わる2つの現象について、その普遍性をメダカを用いて調べた。一つは、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)の非生殖現象における新奇役割の可能性である。もう一つの現象は、ホヤ胚を用いて見いだされた背腹軸に沿った遺伝子発現制御と遺伝子配置およびクロマチンレベルの遺伝子発現制御機構である。メダカを用いて、細胞特異的なシス調節領域を同定し、個体レベルでその活性を解析することにより、ホヤでみいだされたこれらの新奇現象が、脊椎動物にもあてはまる普遍的なものであることを示した。さらに、脊椎動物に特異的な細胞の個性化を伴う現象として、網膜における視細胞の多様性形成機構に注目し、メダカを用いた解析を行った。網膜視細胞の個性化に関わる分子機構として、錐体オプシン遺伝子とシス制御領域を共有する2つの microRNA を発見し、転写後調節と転写制御が共役することによる、視細胞の個性化に関わる新しい調節メカニズムを提唱した。

## 第1章

### 総合緒言

1個の細胞である受精卵が分裂を繰り返し、多細胞体を構築する過程で、細胞が時間とともに性質を変化させ、適材適所に異なる性質を獲得する細胞の個性化は、多細胞生物の発生が成立するための中心的な現象の一つである。一つの個体を構成する同じゲノム情報をもつ細胞が、異なる個性を獲得する過程で中心的な役割を果たすのは、細胞によって特異的な遺伝子群を発現するメカニズムである(Howard and Davidson, 2004)。多くの生物のゲノム DNA 配列が解明された現在においても、細胞によって異なる遺伝情報が読み出されるメカニズムは、依然として大きな謎である。この大きな理由として、遺伝情報の発現を制御する DNA 配列(シス調節配列)は、配列情報のみからは発見することが難しいことがあげられる。ヒトゲノムの約98%はタンパク質をコードしない配列であり、そこには機能性 RNA をコードする遺伝子やシス調節配列など、本質的に重要な機能性配列が多数存在している(Birney et al., 2007)。このような配列を発見し理解することは、ゲノム配列決定後の最重要課題の一つであり、米国を中心とした ENCODE 計画の目標でもある(Birney et al., 2007)。ENCODE 計画によって、多くの情報が蓄積されている一方で、依然としてヒトゲノムの個々の遺伝子の発現制御機構の理解はきわめて断片的な段階に留まっている。最近のエピジェネティクス研究の進展により、細胞による遺伝子活性の差異の形成には、クロマチンレベルの制御が重要な役割を担っていることが明らかになってきた(Nozaki et al., 2011)。遺伝子発現のエピジェネティックな制御機構は研究が盛んな分野であるが、現時点では、やはり細胞の個性化の統合的な理解にはほど遠い段階であり、多くの課題が山積している。

シス調節 DNA を明らかにするための強力な手段の一つは、比較ゲノム解析、すなわち種間でのゲノム配列の比較解析である。多くの生物種のゲノム解読が進んできた結果、近縁なあるいは進化的に離れた系統関係にある種間でタンパク質非コード配列を比較することにより、シス調節配列や機能性非コード RNA 配列を推測することが可能になってきた(Frazer et al., 2004; Janssen and Giegerich, 2014)。比較ゲノム解析によって、ひとたび機能性非コード配列の候補をみいだすことができた場合、次に必要なのは、これらの配列の機能を明らかにするための実験系である。特に発生過程で重要な機能をもつ配列の機能解析には、個体レベルでの実験系が必

須である。マウスをはじめとする哺乳類モデルは、トランスジェニック技術や遺伝子ノックアウトなどの技術開発が進み個体レベルの解析が可能であるが、細胞分化や器官形成の過程が母親の子宮内で進行すること、ゲノムサイズが大きく、潜在的に機能性配列が埋もれていると考えられる非コード配列の割合が大きいこと、発生の完了に比較的長い時間を要すること、多数個体の飼育には大きなスペースと費用が必要であることなど、さまざまな制約がある。

近年、遺伝子制御研究のモデル生物として注目され、研究が盛んになってきた生物として、脊椎動物と同じ脊索動物門に属する海産動物のホヤがある(Satoh, 1994, 2013)。ホヤの受精卵は、受精後1日以内にオタマジャクシ幼生へと発生する。ホヤのオタマジャクシ幼生は、約 3000 と少数の細胞からなるにも関わらず、脊椎動物と共通のボディープランをもっている。また、ホヤは人工受精が容易で、胚発生は親の体外で進行し、胚が透明であるため、すべての細胞を顕微鏡下で観察することが可能で、個体レベルの遺伝子機能操作も容易である。さらにホヤのゲノムサイズはヒトやマウスの約 1/20 であり、非コード配列が少ないため、シス調節配列や非コード機能性 RNA の発見が容易であるという利点もある(Dehal et al., 2002; Kusakabe, 2005; Satoh, 2013)。

ホヤはモデル脊索動物として上記のような利点があるが、その一方で、特殊化する方向へ進化してきた生物であり、脊椎動物とのさまざまな相違点も存在する。たとえば、胚発生の非常に早い時期で各割球の発生運命が決定されること、ごく単純な脳や感覚器官しかもたないため、脊椎動物に特有の高度な視覚や脳機能のモデルにはなりえないこと、などである。ホヤと同様な研究モデルとしての利点をもちながら、脊椎動物に特有の性質も備えたシンプルなモデルとして注目されているのが、ゼブラフィッシュやメダカなどの小型魚類である。とくにメダカは、ゲノムサイズがゼブラフィッシュの半分であり、シス調節領域のゲノムレベルおよび個体レベルの解析に優れた特徴を備えている(Kasahara et al., 2007)。

本研究では、メダカを個体レベルで細胞特異的な遺伝子発現制御機構を解析するためのモデル脊椎動物ととらえ、メダカを用いて新奇現象あるいはあらたに発見された分子の普遍性を明らかにすることを目指した。まず、ホヤを用いて発見された、細胞特異的な転写制御に関わる2つの新奇現象について、その普遍性をメダカを用いて調べた。一つは、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンの非生殖現象における新奇役割の可能性である(第2章; 副論文3 Kusakabe et al., 2012)。もう一つの現象は、ホヤ胚を用いて見いだされた背腹軸に沿った遺伝子発現制御と遺伝子配置お

よびクロマチンレベルの遺伝子発現制御機構である(第3章; 副論文2 Imai et al., 2012)。メダカを用いて、細胞特異的な遺伝子発現に必要なシス制御領域を同定し、個体レベルでその活性を解析することにより、ホヤでみいだされた新奇現象が、脊椎動物にもあてはまる普遍的なものであることを示した。

さらに、脊椎動物に特異的で、かつ普遍的な細胞の個性化を伴う現象として、網膜における視細胞の多様性形成機構に注目した。網膜視細胞に特異的な遺伝子発現に関わる遺伝子制御機構を明らかにするためのモデルとしてメダカを用いた(第4章; 副論文1 Daido et al., 2014)。網膜視細胞の個性化に関わる分子機構として、錐体オプシン遺伝子とシス制御領域を共有する2つの microRNA を発見し、転写後調節と転写制御が共役することによる、視細胞個性化に関わる新しい調節メカニズムを提唱した。

## 第2章

### ホヤで発見された新奇現象の脊椎動物への展開 (I) —非生殖性 GnRH システムの進化的保存性—

#### 2-1. 序論

生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)は脊椎動物で生殖機能のコントロールにおいて中心的役割を果たす。脊椎動物において、3つの主要な GnRH システムがみいだされている。従来からよく知られている下垂体刺激 GnRH(GnRH1)システムと2つの視床下部外の GnRH(GnRH2 と GnRH3)システムである(Yamamoto, 2003; Okubo and Nagahama, 2008; Oka, 2009; Kanda et al., 2010)。視床下部で産生される GnRH1 は下垂体から生殖腺刺激ホルモンの放出を促進することによって生殖の内分泌システムを制御する。また、GnRH2 と GnRH3 を産生する細胞の細胞体はそれぞれ中脳と終神経に局在する。下垂体刺激性と視床下部外のどちらにしても、GnRH システムのほとんどの機能は生殖腺の発生、生殖腺の機能、そして生殖行動といった生殖活動の制御に関連付けられてきた(Okubo and Nagahama, 2008; Oka, 2009)。中枢神経系での GnRH 受容体の広範囲にわたる分布(Dolan et al., 2003; Chen and Fernald, 2006; Flanagan et al., 2007; Albertson et al., 2008)と脳での広い領域への GnRH 神経の投射(Oka 2009; Yamamoto et al., 1995)から、GnRH が生殖活動の制御以外の役割をもつことが示唆される。さらに、初期胚における GnRH の存在と GnRH 活性の実験的操作で得られた表現型から、脊椎動物胚での GnRH の発生における役割が示唆されている(Sherwood and Wu, 2005; Wu et al., 2006; Abraham et al., 2008; Kanaho et al., 2009; Ramakrishnan et al., 2010)。しかしながら GnRH の生殖における役割と比べると、GnRH の非生殖性の役割はよくわかっていない。

尾索類は脊椎動物の姉妹群である(Delsuc et al., 2006; Putnam et al., 2008)。固着性の尾索類であるホヤにおいても、GnRH は生殖の制御に関与することが示唆されている(Ohkuma et al., 2000; Terakado, 2001)。解剖学的な構造と生殖様式の単純さにもかかわらず、ホヤ類の GnRH とその受容体はきわめて多様であり、6つの GnRH ペプチドと4つの受容体がカタユウレイボヤのゲノム上にコードされて

いる(Adams et al., 2003; Kusakabe et al., 2003; Tello et al., 2005)。このような GnRH システムの分子的複雑性から、ホヤにおいても GnRH が非生殖性の役割をもつ可能性が考えられる。GnRH の非生殖的役割はユウレイボヤの胚と幼生での GnRH がコードされた転写産物の存在によって示唆されている(Adams et al., 2003)。また、ホヤ成体の感覚神経細胞における GnRH 様の免疫反応も、ホヤにおける非生殖的役割を示唆する(Mackie and Wyeth, 2000; Mackie and Singla, 2004)。

ホヤ類の GnRH の役割と局在は、脊索動物の標準ボディープランを大きく改変した形態を示す成体の尾索類で主に研究されており、脊索動物とよく保存されたボディープランを示すホヤ幼生での GnRH システムはほとんど知られていなかった。著者の所属研究室では、最近、カタユウレイボヤ(*Ciona intestinalis*) 幼生において *GnRH* 遺伝子(*Ci-gnrh2*) が体の前後軸に沿って中枢神経系で顕著な発現を示すことが明らかにされた(図 2-1A, B; Kusakabe et al., 2012)。同様に、*GnRH* 受容体遺伝子(*gnrhr* 遺伝子)が中枢神経系に沿ったファイロティピック(脊索動物門に特徴的な軸構造(脊索、筋肉、および正中感覚神経系)に特異的に発現することが示された(図 2-1C, D)。生殖に関係のない発生段階である幼生期における GnRH と GnRH 受容体の顕著な遺伝子発現は、ホヤ幼生において、GnRH が生殖とは関わりのない新奇な役割をもつことを示唆する。

ホヤ幼生において *Ci-gnrh2* 遺伝子が発現する中枢神経系の部位は、脊椎動物の後脳および脊髄に相同と考えられている(Kusakabe et al., 2012)。著者が知る限り、これまで脊椎動物の後脳と脊髄では GnRH 産生細胞は報告されていない。本研究では GnRH とその受容体が同定され、解析が進んでいること(Okubo et al., 2000; Okubo et al., 2001)、プロモータートランスジェニック実験による生きた個体への遺伝子導入と導入遺伝子の発現の観察が容易であること(Kusakabe et al., 1999; Kusakabe and Suzuki, 2000)から、脊椎動物モデルとしてメダカを採用した。メダカ *GnRH* 遺伝子の転写制御領域の同定と機能解析を通して、脊椎動物においてもホヤ幼生と類似の非生殖性の GnRH の発現が存在するのか検証した。その結果、これまで知られていなかった脊椎動物の後脳と脊髄における GnRH 産生細胞の局在を示す証拠をみいだした。本研究の知見は GnRH システムが脊索動物特異的な特徴に深く関連し、尾索動物と脊椎動物間で非生殖性 GnRH システムが進化的に保存されていることを示唆している。



## 2-2 材料と方法

### 2-2-1 実験動物の飼育と胚試料の調製

メダカ *Oryzias latipes* (ヒメダカ) の成魚は、室内水槽において、人工的な生殖条件下 (暗期 9 h 45 min, 明期 14 h 15 min の 24 時間サイクル; 水温 28°C) で飼育を行った。餌として人工飼料おとひめ B2 (日清丸紅飼料 (株)) を与えた。朝 (暗期から明期への移行時) に自然産卵された受精卵を集め、0.6 ppm メチレンブルーを含んだ脱イオン水中、28°C で発生させた。適当な発生段階において、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP Medaka; <http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/>) より提供されたメダカ孵化酵素 (Yamagami, 1979) を用いて卵殻 (コリオン) を消化し、裸胚を得た。

### 2-2-2 比較ゲノムとバイオインフォマティクス

メダカ、トラフグ *Takifugu rubripes*、イトヨ *Gasterosteus aculeatus* およびゼブラフィッシュ *Danio rerio* のゲノム配列は Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) から入手した。DNA 配列のアライメントと比較には VISTA ツール (Frazer et al., 2004; <http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) を使用した (パラメーターは、50 bp window、50% identity threshold)。比較した領域は、メダカ *gnrh2* 遺伝子座 Chr.5:16,156,463-16,161,955、ゼブラフィッシュ *gnrh2* 遺伝子座 Chr.21:14,022,338-14,024,403、イトヨ *gnrh2* 遺伝子座 groupXVII: 8,626,987-8,632,735、トラフグ *gnrh2* 遺伝子座 Scaffold\_116: 254,015-258,718 である。

### 2-2-3 GnRH 遺伝子のシス調節領域を用いた GFP による細胞標識

Ensembl ゲノムデータベースから入手したメダカ *gnrh2* 遺伝子の 5' 近傍配列を用いて、一組の遺伝子特異的プライマーを設計した。設計した遺伝子特異的プライマーの塩基配列は、5'-GACTGTCGACATCAGGCTTGCTTTGTTG-3' および 5'-GACTGGATCCCGAGACATTACCTAAAACC-3' であった。メダカのゲノム DNA は 1 匹の Hd-rR 近交系から抽出されたもの (Kusakabe and Suzuki, 2000) を用いた。上記の遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーと耐熱性 DNA ポリメラーゼ (PrimeStar HS DNA polymerase, TAKARA Bio, Japan) を用いて、*gnrh2* 遺伝子の 5' 上流領域を含む DNA 断片を増幅した。増幅された 5 kb の上流領域を

pBluescript-EGFP ベクター (Yoshida et al., 2004) の *Sall/BamHI* サイトに挿入した。完成したプラスミド DNA (*gnrh2::gfp*) の顕微注入法によるメダカ胚への導入は、Kusakabe et al. (1999) の方法に従った。

#### 2-2-4 *gnrh2::gfp* トランスジェニック系統の作出

メダカ *gnrh2* 遺伝子上流 5 kb の制御領域を単離し GFP レポーター遺伝子に連結した DNA コンストラクト *gnrh2::gfp* (上述) を 20 ng/ $\mu$ l の濃度の溶液に調製し、メダカの 2 細胞期の両割球に顕微注入を行った。DNA を注入した胚は滅菌水で洗浄後、28°C でインキュベートした。胚の段階で GFP の発現が強い個体を選別し、およそ 30 個体を成魚まで飼育し、得られた F1 個体の中から GFP 陽性のものを選別した。蛍光実体顕微鏡 (MF165FC; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて蛍光を観察した。

#### 2-2-5 メダカ胚における蛍光免疫染色

DNA コンストラクト *gnrh2::gfp* を注入した胚を 28°C でインキュベートした。上述の方法で卵殻を除いた胚を 4% パラホルムアルデヒド/PBS 中、4°C で一晩かけて固定した。数回の 1% Triton X-100 を含む PBS (T-PBS) での洗浄と 1 回の滅菌水での洗浄後、胚は -20°C の冷アセトン中で 20 分間の透徹を行い、滅菌水と T-PBS で再度洗浄した。その後、胚は段階的に濃度をあげたメタノール (50%、70%、100%) による脱水を 4°C で行い、-20°C メタノール中で一晩保存した。メタノールを除去し水に戻した後、1% DMSO を含む T-PBS で洗浄し、10% ヤギ血清と 1% DMSO を含む T-PBS 中、4°C で一晩かけてブロッキングを行った。つぎに、抗 GFP ウサギポリクローナル抗体 (A11122, Invitrogen) がブロッキング溶液に 1/1000 溶けている溶液で 4°C、9 時間インキュベートし、1% DMSO を含む T-PBS で一晩洗浄した後、Alexa-488 標識された抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR) 溶液で 4°C、9 時間インキュベートした。1% DMSO を含む T-PBS で何回かすすいだ後、80% グリセロールにマウントし、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus) を用いて観察した。

#### 2-2-6 RT-PCR 解析

メダカ成魚の前脳、中脳、後脳、および脊髄から ISOGEN (ニッポンジーン社) を使って全 RNA を単離した。つぎに、SuperScript III First Strand Synthesis System

for RT-PCR (Invitrogen) の oligo(dT) を使用した標準的プロトコルに従って、1 µg の全 RNA を鋳型に用いて、一本鎖 cDNA を合成した。これを鋳型として遺伝子特異的プライマー対を用いた PCR を行い、*gnrh1*、*gnrh2*、*gnrh3* もしくはコントロールとしての細胞内アクチン遺伝子 *OICA1* の cDNA 断片を増幅した。使用したプライマーの配列は以下の通りであった。

*gnrh1*: 5'-ACTTATGAACTGAAGCTCTGTGT-3'

5'-TTACACTCCCAAGAAGCCC-3'

*gnrh2*: 5'-ACCACTCAGACTAAGGTAATGTC-3'

5'-CAAGGCATCCAGAACAATATTTCT- 3'

*gnrh3*: 5'-GAAAACACAGAGTTCTAATGGACG-3'

5'-GAGCCATCATTAAATTAGATTGTATTGTC-3'

*OICA1*: 5'-GACCCAGATCATGTTTGAGACT-3'

5'-GACTCCATACCAAGGAAGGAA-3'

1.0 µl の cDNA を鋳型とし、25 pmol の各プライマー、そして 1.25 U の Taq DNA ポリメラーゼ (Ex Taq、タカラバイオ) を使用して、98°C、2 分の変性の後、98°C 10 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分の反応を 35 サイクル行い、そして 72°C 7 分の最終伸長を行った。混入したゲノム DNA から PCR 増幅の可能性を排除するためのコントロール実験として、逆転写しないまま 35 サイクルの PCR 増幅を行った。PCR 産物は 1.5 % のアガロースゲルで分離し、臭化エチジウム染色を行った。

## 2-3 結果

### 2-3-1 メダカ *gnrh2* 遺伝子上流領域の比較ゲノム解析および機能解析

メダカでは3つの遺伝子(*gnrh1*、*gnrh2*、*gnrh3*)に GnRH がコードされている (Okubo et al., 2000)。また、本研究では以下の2つの理由から *gnrh2* 遺伝子に注目した。一つの理由は、胚での発現が *gnrh1* 遺伝子と *gnrh3* 遺伝子については報告されている (Okubo et al., 2006) が、*gnrh2* 遺伝子では報告されていないことである。もう一つの理由は、メダカ *gnrh2* 遺伝子がコードしているニワトリ型 GnRH-II は効率的にカタユウレイボヤの GnRH 受容体を活性化できること (Tello et al., 2005) である。

比較ゲノムツール VISTA を用いて、メダカの *gnrh2* 遺伝子の5'近傍配列をトラフグ、イトヨ、ゼブラフィッシュの *gnrh2* 遺伝子のものと比較した。その結果、上流5 kb 付近に高度に保存された領域が見つかったので、この領域を含む上流5 kb をクローニングし、GFP レポーター遺伝子に連結した DNA コンストラクト (*gnrh2::gfp*) を作製した (図 2-2A)。顕微注入法により、この DNA コンストラクトをメダカ胚に導入し、3日胚まで育てたところ、後脳と脊髄といった中枢神経系での GFP の発現が確認された (図 2-2B)。後脳では毛様体脊髄路ニューロンと考えられる細胞の細胞体と軸索が GFP によって標識された (図 2-2C)。脊髄では、最低でも2タイプのニューロンが標識された。1つのタイプは一次軸索が最初腹側に伸長し、脊髄の腹側で頭側に曲がり、最終的に同じ側の脊髄の腹側表層部を前方に伸びる (図 2-2D)。このタイプのニューロンの形態は V1 抑制型介在ニューロンにきわめて似ている (Higashijima et al., 2004; Li et al., 2004; Gosgnach et al., 2006)。もう一つのタイプの標識されたニューロンは腹側正中線を横切って反対側へと軸索を伸長する交連ニューロンである (図 2-2E)。GFP 陽性ニューロンのうちほとんどが前者であり、前後軸に沿った脊髄全体を通して分布していた。

### 2-3-2 メダカ *gnrh2::gfp* トランスジェニック系統

作製した *gnrh2::gfp* DNA コンストラクトをメダカ胚に顕微注入し、GFP の発現が強い個体を選抜して飼育したところ、F1 世代の中から *gnrh2::gfp* のトランスジェニック系統を得ることができた。このトランスジェニック系統は前脳、中脳、後脳、脊髄、および網膜での GFP の発現が確認された (図 2-3A)。また脊髄では GFP 陽性神経細

胞の細胞体が中枢神経系の前後軸に沿って左右対称に並んでいることがわかった(図 2-3B)。

### 2-3-3 RT-PCR を用いたメダカ GnRH 遺伝子の発現解析

メダカの成魚から脳と脊髄を取り出し、全 RNA を抽出した(図 2-4A, B)。*gnrh1*、*gnrh2*、*gnrh3*、および内部コントロールとして細胞質アクチン遺伝子 *OICA1* に特異的なプライマーを用いて、抽出された全 RNA 中の各遺伝子の転写産物を RT-PCR 解析によって検出した(図 2-4C)。*gnrh2* の転写産物は中脳、後脳、脊髄で検出されたのに対し、*gnrh1* と *gnrh3* の転写産物は前脳と中脳でのみ検出され、後脳および脊髄では検出されなかった。これらの結果は特定の GnRH 遺伝子(*gnrh2*)を発現する細胞が脊椎動物の後脳と脊髄に存在することを示唆する。

### 2-3-4 RT-PCR を用いたメダカ GnRH 受容体遺伝子の発現解析

メダカ GnRH 遺伝子の RT-PCR による発現解析と同様に *gnrh-r1*、*-r2*、*-r3*、内部コントロールとしての *OICA1*、そしてサンプリング時に混入した骨格筋の影響を考慮するために骨格筋特異的アクチン遺伝子 *OIMA1* に対する特異的なプライマーを用いて、RT-PCR を行った(図 2-5)。その結果、*gnrh-r1* は中脳、後脳および脊髄で、*gnrh-r2* は中脳、後脳、脊髄、眼で、*gnrh-r3* は前脳、中脳、後脳、脊髄、および眼で cDNA 断片の増幅が検出された。これらの結果は GnRH 発現細胞があると考えられる領域とその周辺部に GnRH 受容体を発現する細胞が存在することを示唆する。

## 2-4 考察

### 2-4-1 ホヤ類における非生殖性 GnRH システム

これまでに調べられたほとんどの動物種において、2つかそれ以上の GnRH ペプチドと GnRH 受容体が報告されている (Okubo et al., 2003; Millar et al., 2004; Fernald, 2009)。これらのなかで、尾索類であるカタユウレイボヤは GnRH リガンドと受容体の多様性において特に特徴的である。著者の所属研究室における研究では、これらのペプチドおよび受容体をコードしている遺伝子がカタユウレイボヤ幼生で顕著な発現することを示した。これらの遺伝子の発現パターンは互いに明確に異なっており、この特異な発現は尾索類の GnRH システムのいっそうの複雑さを示唆するものである。

カタユウレイボヤの幼生は非生殖性の分散段階であり、生殖腺は変態後のもっと遅い時期に生じる (Okada and Yamamoto, 1999; Chiba et al., 2004)。変態過程において、神経系の大規模な編成が行われ (Horie et al., 2011)、神経索、筋肉、脊索、そして尾部上皮神経を含む尾部も退化する (Cloney, 1982; Nakayama-Ishimura et al., 2009)。神経系と幼生尾部組織での GnRH と GnRHR の顕著な発現は GnRH が生殖には直接関係のない生物学的プロセスを制御することを強く示唆する。どのような生物学的プロセスを制御するのだろうか。自発運動と遊泳行動の調節はその候補の一つである。光と重力という2つのタイプの環境シグナルが幼生の遊泳運動を制御する (Inada et al., 2003; Tsuda et al., 2003; Kusakabe and Tsuda, 2007; Horie et al., 2008)。光と重力はそれぞれ脳胞内にある眼点と平衡器で感知され、感覚入力は脳胞後部と運動神経節に作用して尾部での筋収縮を制御する (Nishino et al., 2010; Horie et al., 2010)。受容体遺伝子が脳胞、運動神経節、および筋細胞で発現し、リガンド遺伝子が脳胞、運動神経節、および神経索で発現することから、GnRH シグナル伝達は感覚、神経伝達、そして筋肉の機能を制御している可能性がある。

ホヤ幼生における GnRH の役割のもう一つの可能性は変態の制御である。変態の開始は付着突起の基質への固着によって引き金がひかれる (Cloney et al., 1982; Nakayama-Ishimura et al., 2009; Eri et al., 1999)。付着突起によって感じられた固着刺激は体幹部と尾部組織での変態イベントを引き起こすために中枢神経系へと伝達されると考えられる。カタユウレイボヤ幼生の付着突起を除去したとき、尾部の縮小といった主な変態イベントが抑制され、遊泳可能な尾部が維持される

(Nakayama-Ishimura et al., 2009)。 *Ci-gnrh1* は変態シグナルを感じる事が可能な付着突起神経に発現し、一方で *Ci-gnrh2* は尾部に変態シグナルを伝達すると考えられる脳胞、運動神経節、神経索を含む中枢神経系で発現する。一方、*GnRH* 受容体遺伝子は付着突起、脳胞、筋肉、脊索、尾部上皮といった変態シグナルの標的候補部位で発現する。

#### 2-4-2 脊索動物における非生殖性 GnRH システムの進化的保存性

本研究では、メダカ *gnrh2* 遺伝子のシス調節 DNA がメダカ胚の後脳と脊椎のニューロンで特異的に転写するようにはたらくことを見いだした。*gnrh2::egfp* のメダカ胚での発現パターンは、ホヤ幼生での *Ci-gnrh2* 遺伝子の発現パターンとよく似ている。後脳と脊髄における内在性の *gnrh2* 遺伝子の発現は RT-PCR によって確認することができた。後脳では、*gnrh2::egfp* は脊髄の自発的運動をコントロールする神経回路の毛様体脊髄路ニューロンで発現する (van Mier and ten Donkelaar, 1989; Grillner et al., 1998; Soffe et al., 2009)。脊髄では、少なくとも 2 つの異なるタイプのニューロン (交連神経の介在ニューロンと同側性の介在ニューロン) で *gnrh2::egfp* が発現する。交連神経の介在ニューロンは、遊泳や歩行といった規則正しい繰り返し運動を生じさせる神経回路である中枢パターン発生器 (central pattern generator; CPG) の一部として脊髄の左右間での相互協調を行っている (Soffe et al., 1984; Dale, 1985; Buchanan, 1999; Quinlan et al., 2007)。*gnrh2::egfp* が発現し、同じ側に投射する介在ニューロンは V1 脊髄ニューロンに形態的に似ている。V1 介在ニューロンはモーターニューロンを神経支配し、かつ自発的 CPG において重要な役割を果たす抑制性ニューロンである (Higashijima et al., 2004; Li et al., 2004; Gosgnach et al., 2006)。このように、GnRH シグナルは脊椎動物において規則正しい繰り返し運動を生じさせる神経回路の機能もしくは発生を制御しているかもしれない。

ホヤ幼生では、*GnRH* 遺伝子が発現する運動神経節と尾部神経索に存在する CPG が提唱されている (Nishino et al., 2010; Horie et al., 2010)。尾索類の運動神経節/神経索と脊椎動物の後脳/脊髄の間での相同性が、保存された転写因子とシグナル分子の発現と機能から示唆されている (Imai et al., 2002; Dufour et al., 2006; Ikuta and Saiga, 2007; Stolfi and Levine, 2011)。これらの知見と本研究で得られた結果から、脊索動物における非生殖性の胚/幼生 GnRH システムが進化的にかなり古い起源を有すると考えられる。





## 2-5 図と表

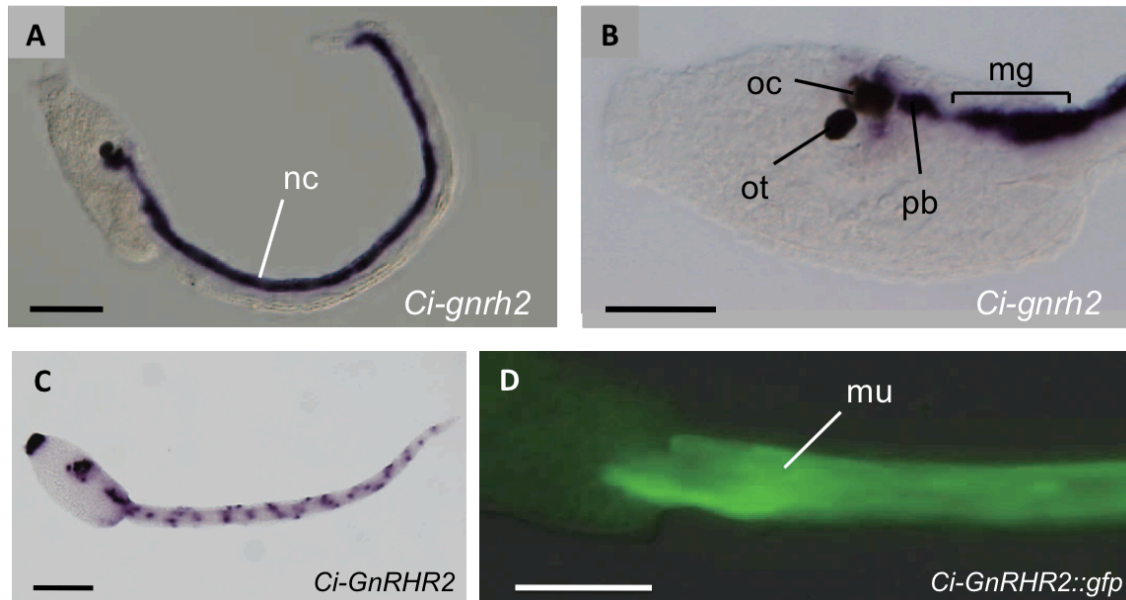


図 2-1 カタユウレイボヤ幼生における *Ci-gnrh2* 遺伝子と *Ci-GnRHR2* 遺伝子の発現

(A, B) *Ci-gnrh2* 遺伝子は脳胞、運動神経節、そして体幹側から尾部末端までの神経索全体で顕著な発現を見せる。(C, D) *Ci-GnRHR2* 遺伝子は付着突起、脳胞、運動神経節、尾部の表皮神経、そして筋肉で発現する。(A, C) のスケールバーは 100 μm を、(B, D) のスケールバーは 50 μm を示す。nc: 神経索、oc: 眼点、ot: 平衡器、pb: 脳胞後部、mg: 運動神経節、mu: 筋肉細胞

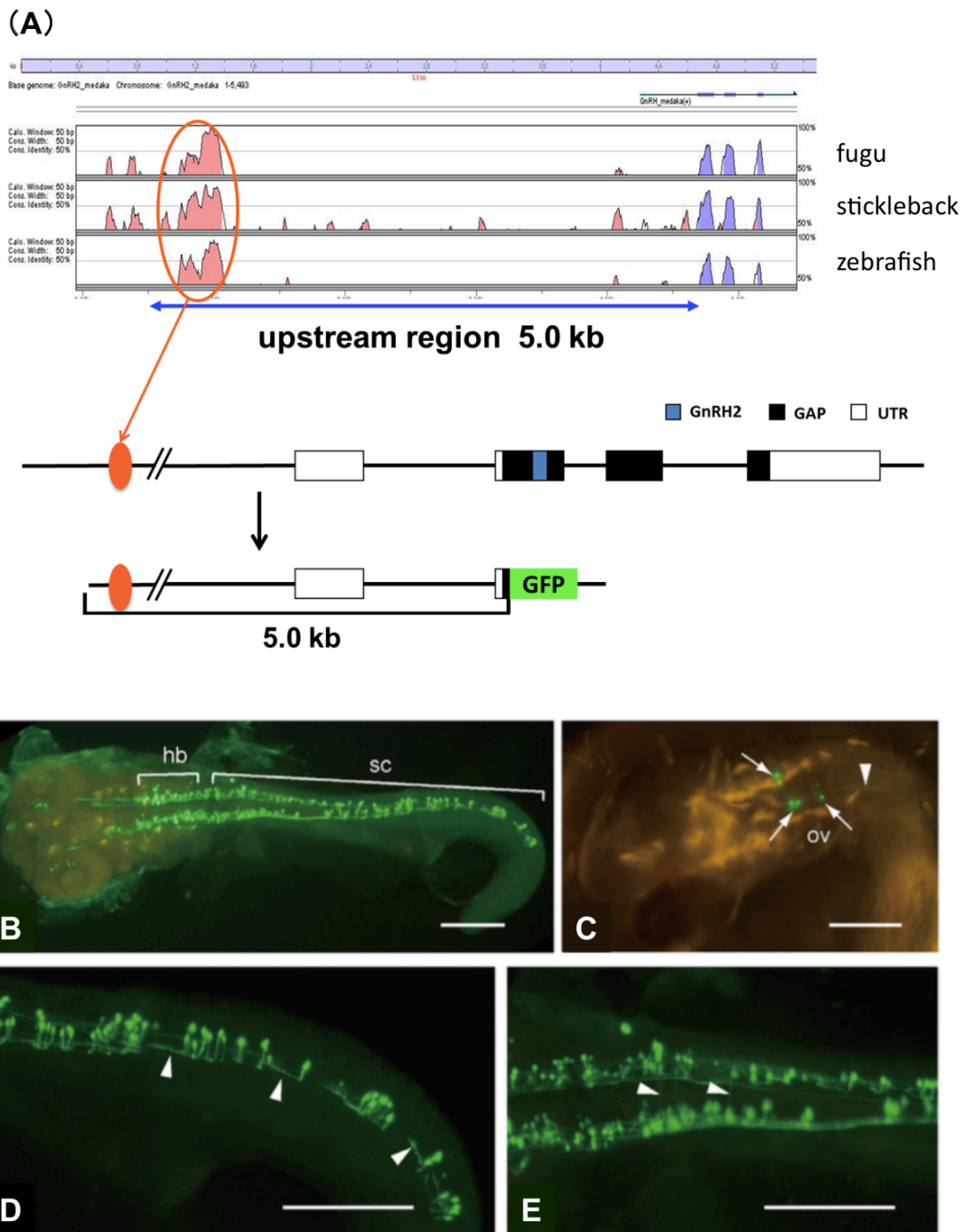
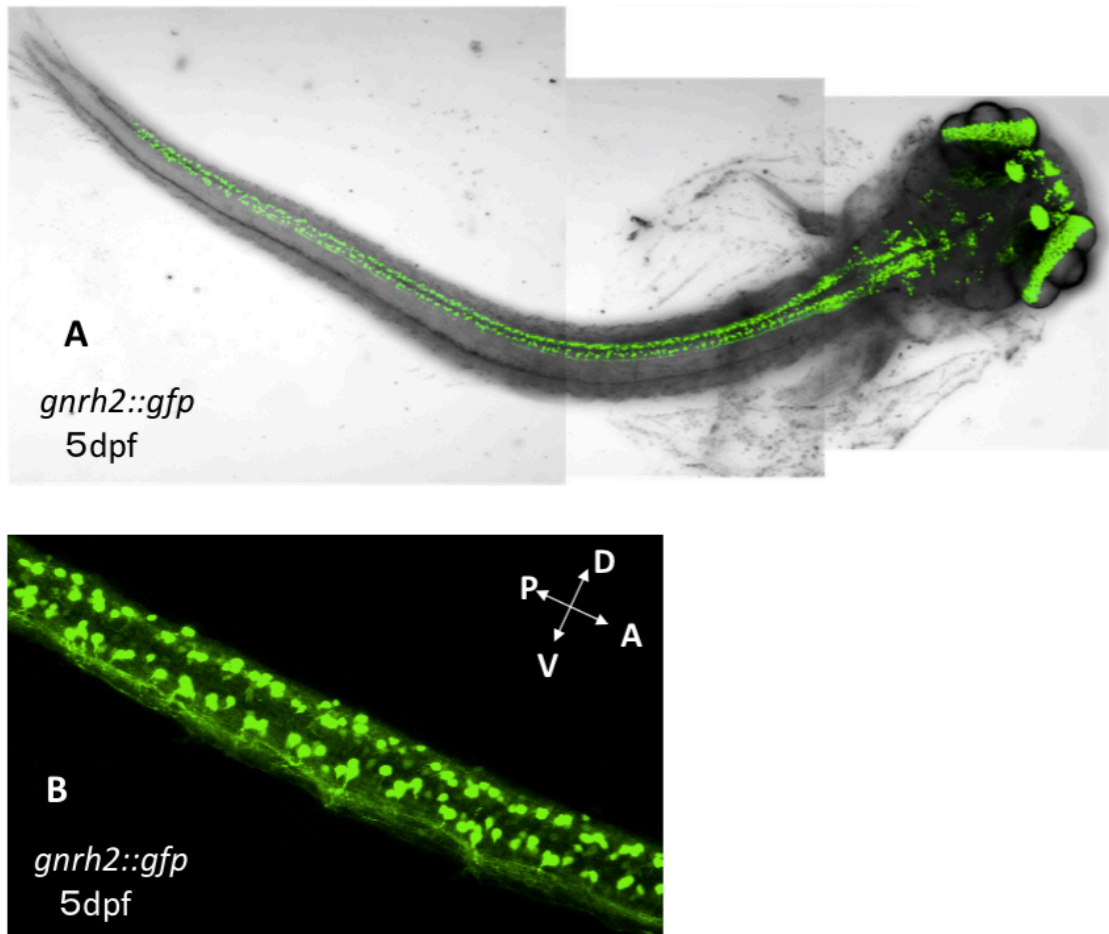


図 2-2 メダカ *gnrh2* 遺伝子の上流領域を用いたレポーター遺伝子コンストラクトの作製と GFP の発現

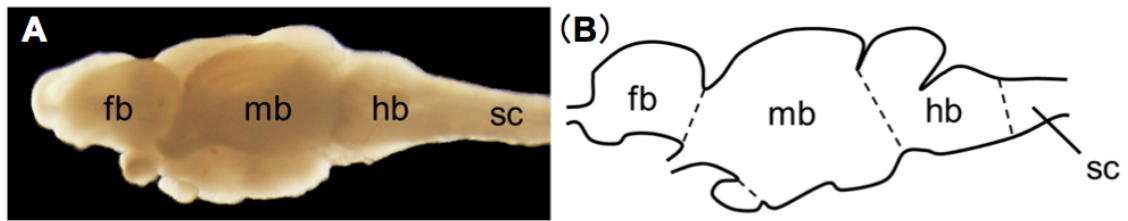
(A) VISTA によって、メダカ *gnrh2* 遺伝子とその 5' 近傍配列をフグ、イトヨ、ゼブラフィッシュの *gnrh2* 遺伝子とその 5' 近傍配列を比較した。比較の結果、遺伝子の上流 5kb の付近に種間で高度に保存された領域が見つかった。この領域を含むように

上流 5kb をクローニングし、GFP レポーター遺伝子に連結した DNA コンストラクトを作製した。(B-E)メダカの *gnrh2* 遺伝子のシス調節領域の制御下に置いた GFP を用いた後脳と脊髄の細胞の可視化。すべて受精後3日の胚を示している。(B)GFP シグナルは中枢神経系特異的にみられ、後脳と脊髄で特に明らかであった。(C)毛様体脊髄路神経(矢印)と脊髄に伸びているそれらの軸索(矢じり)で GFP シグナルがみられる胚の一例。(D)GFP で標識された脊髄の介在神経細胞は最初に腹側に伸び、脊髄の腹側部を前方へと曲がる軸索をもつ。(E)GFP で標識された繊維が正中線をまたいで走る様子から、いくつかの交連神経でも GFP が発現することが示唆される。(A-D)のスケールバーは 200  $\mu\text{m}$  を示す。

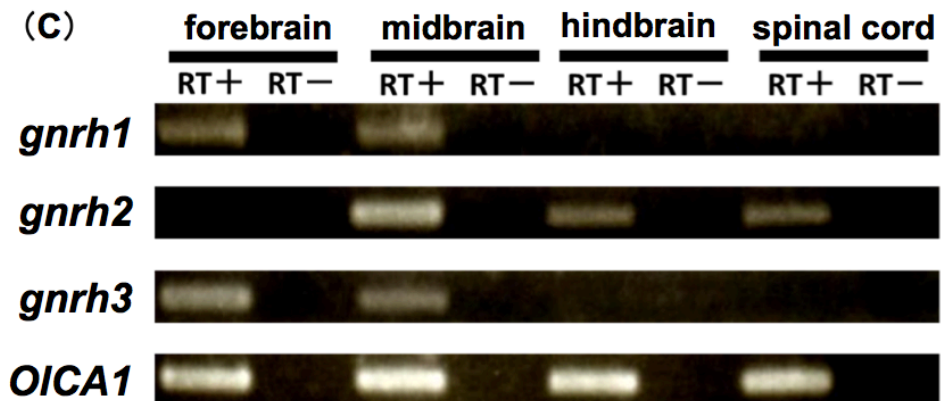


**図 2-3 *gnrh2::gfp*トランスジェニック系統における GFP の空間的発現**

(A) 5日胚の *gnrh2::gfp*トランスジェニック胚を抗 GFP 抗体を用いた蛍光免疫染色によって染色したもの。前脳、中脳、後脳、脊髄、網膜で GFP の発現がみられた。  
 (B) (A)の個体の脊髄の一部を拡大したもの。左右対象な GFP 陽性細胞の細胞体と腹側に伸ばした軸索がみられる。



fb : forebrain, mb : midbrain, hb : hindbrain, sc : spinal cord



#### 図 2-4 メダカ成魚中枢神経系における GnRH 遺伝子の発現

メダカ成魚の脳、脊髄といった中枢神経系から全 RNA を回収し(A, B)、GnRH 遺伝子の発現を RT-PCR によって確認した(C)。*gnrh1* の転写産物は前脳と中脳で、*gnrh2* の転写産物は中脳、後脳、脊髄で、*gnrh3* の転写産物は前脳と中脳で発現する。RT+と RT-はそれぞれ逆転写酵素存在下および非存在下の PCR 増幅を表す。RT-PCR の内部コントロールとして細胞質アクチン遺伝子 *OICA1* を用いた。fb: 前脳、mb: 中脳、hb: 後脳、sc: 脊髄

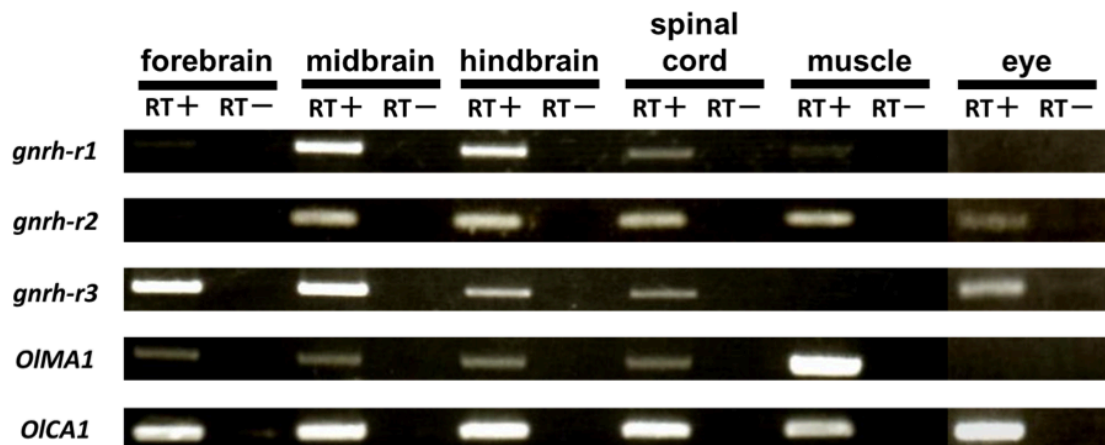


図 2-5 メダカ成魚における *GnRH* 受容体遺伝子の発現

中枢神経系を中心に、その周辺組織から total RNA を回収し、*GnRHR* 遺伝子の発現を RT-PCR によって確認した。*GnRHR1* の転写産物は中脳、後脳、脊髄で、*GnRHR2* の転写産物は中脳、後脳、脊髄、筋肉、眼で、*GnRHR3* の転写産物は前脳、中脳、後脳、脊髄、眼で検出された。また、RT+と RT-はそれぞれ逆転写酵素存在下および非存在下の PCR 増幅を表す。RT-PCR の内部コントロールとして細胞内アクチン遺伝子 *OICA1* を用いた。

## 第3章

### ホヤで発見された新奇現象の脊椎動物への展開 (II) —初期胚における背腹境界形成機構の分子機構—

#### 3-1 序論

動物の初期発生において背腹軸の決定は非常に重要な過程である。ここで決定された背腹軸を元に、後の胚発生が進む。動物胚の背腹軸決定には骨形成タンパク質 (Bone morphogenetic protein; BMP) シグナルが大きな役割をはたしている。BMP シグナルは腹側を誘導し、背側では BMP シグナルは阻害される。ほかの BMP リガンドとは異なり、抗背側形成タンパク質 (antidorsalizing morphogenetic protein; Admp) は背側で発現するが、腹側に輸送されて、腹側の運命決定を行う (Reversade and De Robertis, 2005)。ツメガエル、ゼブラフィッシュ、プラナリアを含む多くの動物で、背腹軸の特異化は *Bmp4/Bmp7* と *Admp* の空間的に対立した発現に依存する (Dosch et al., 2000; Reversade and De Robertis, 2005; Joubin and Stern 1999; Lele et al., 2001; Willot et al., 2002; Dickmeis et al., 2001; Gaviño and Reddien, 2011)。脊椎動物とともに脊索動物に分類されるホヤ (カタユウレイボヤ) の胚には中内胚葉の形成と神経組織の誘導を行う脊椎動物のオーガナイザーに相当する構造を欠いているのだが (Lemaire et al., 2008)、*Admp* が幼生の尾部外胚葉において背腹軸の特異化に対する重要な役割を果たす (Imai et al., 2006; Pasini et al., 2006)。さらに、尾芽胚での体幹表皮の背腹軸に沿った *Admp*、*Bmp2/4*、そして BMP のアンタゴニストをコードする *Chordin* の発現パターンには脊椎動物の原腸胚におけるこれらの分子の発現パターンと類似性がみられる (Imai et al., 2004)。

カタユウレイボヤでも、他の動物と同様に *Admp* は背側で発現する。最近、京都大学の今井薫博士と佐藤ゆたか博士は、*Admp* の新規アンタゴニストとして *Pinhead* を同定した (Imai et al., 2012)。カタユウレイボヤ *Pinhead* 遺伝子は尾芽胚の腹側で、*Admp* 遺伝子と相補的な発現パターンを示す (図 3-1A, B)。アンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド (MO) を用いて遺伝子の機能を阻害したところ、*Admp* 遺伝子および *Bmp2/4* 遺伝子の機能を阻害した胚では腹側の領域の形成が阻害された

のに対し、*Pinhead* 遺伝子の機能を阻害した胚では腹側の領域が拡大した。このことから、*Admp* 遺伝子と *Bmp2/4* 遺伝子は腹側の形成に対し正の制御を行い、*Pinhead* 遺伝子は負の制御を行なっていると考えられた。興味深いことに、ホヤゲノムにおいて、*Pinhead* 遺伝子は *Admp* 遺伝子と同一染色体上で並んで存在し、この遺伝子配置は、カエルやゼブラフィッシュなどの脊椎動物、ウニ、そして昆虫でも保存されている(図 3-2)。また、*Pinhead* 遺伝子と *Admp* 遺伝子が発現する際には共通のエンハンサーである”G エンハンサー”を中心にクロマチン構造が大きく変化し、一方の遺伝子が転写活性化されているときはもう一方が転写抑制されるという転写制御機構が明らかとなった(Imai et al., 2012)。

*Pinhead* 遺伝子と *Admp* 遺伝子が染色体 DNA 上で隣接する遺伝子配置は、種を超えて保存されていることから、ホヤで明らかにされたクロマチンレベルの制御機構が、脊椎動物をはじめとする幅広い動物でも保存されていると思われた。本研究では、このことを実験的に確かめるために、メダカを用いた実験を行った。



## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 実験動物の飼育と胚試料の調製

メダカ *Oryzias latipes* (ヒメダカ) の成魚は、室内水槽において、人工的な生殖条件下 (暗期 9 h 45 min, 明期 14 h 15 min の 24 時間サイクル; 水温 28°C) で飼育を行った。餌として人工飼料おとひめ B2 (日清丸紅飼料 (株)) を与えた。朝 (暗期から明期への移行時) に自然産卵された受精卵を集め、0.6 ppm メチレンブルーを含んだ脱イオン水中、28°C で発生させた。発生段階は Iwamatsu (1994) に従った。

### 3-2-2 メダカ *Pinhead* 遺伝子および *Admp* 遺伝子上流領域の単離と機能解析

Ensembl ゲノムデータベースから入手したメダカ *Pinhead* 遺伝子および *Admp* 遺伝子の 5' 近傍配列を用いて、それぞれの領域に特異的なプライマーを設計した。設計した遺伝子特異的プライマーの塩基配列は以下の通りであった。

*Pinhead*: 5'-CAGCGACATGCAGCAAGGA-3'

5'-CCATGACTTTTGGCTGAAGGCTTC-3'

*Admp*: 5'-TAGGACAGCGCCCTCTGCT-3'

5'-CATCTGTGCGCTTGGAGGAGCA-3'

これらのプライマーを用いて、メダカゲノム DNA から上流領域を含むゲノム DNA 断片を増幅し、それぞれ mCherry と EGFP レポーター遺伝子に連結した。メダカのゲノム DNA は 1 匹の Hd-rR 近交系から抽出されたもの (Kusakabe and Suzuki, 2000) を用いた。得られた DNA コンストラクトは 20 ng/μl の濃度に調製し、メダカの 2 細胞期胚の両割球の細胞質に注入した。注入された胚は滅菌水で洗ったのち、28°C でインキュベートした。DNA コンストラクトを顕微注入したメダカ胚は、ステージ 15 と 2 日胚の両方で蛍光の観察を行った。蛍光観察には蛍光実体顕微鏡 (MF165FC; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いた。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 ステージ 15(St. 15)メダカ胚でのレポーター遺伝子の発現

カタユウレイボヤで行われたのと同様に、*Pinhead* 遺伝子と *Admp* 遺伝子転写制御領域を用いたレポーター遺伝子の発現解析を行った。DNA コンストラクトを導入したメダカ胚を St. 15 まで育て、レポーター遺伝子の蛍光観察を行った。

*pinhead*>*mCherry*-*ADMP*>*EGFP* 導入胚では、*mCherry* が胚盾付近とその周辺部位で、*EGFP* が胚盾で発現した(図 3-3A-D)。*pinhead*>*mCherry* 導入胚では、*mCherry* が胚盾の周辺部位で発現した(図 3-3E-G)。さらに *Admp*>*EGFP* 導入胚では、*EGFP* が胚盾領域を中心に発現した(図 3-3H-J)。しかしながら、メダカ胚において *Pinhead* が背側、*Admp* が腹側という背腹軸に沿った遺伝子発現が行われているか、確認することができなかった。

#### 3-3-2 メダカ2日胚でのレポーター遺伝子の発現

DNA コンストラクトを導入した St. 15 のメダカ胚では、レポーター遺伝子の発現と背腹軸との関連が不明瞭であったので、さらに胚発生を進めて観察を行った。DNA コンストラクトを導入したメダカ胚を 2 日胚まで育てて、レポーター遺伝子の発現を蛍光によって観察した。その結果、*pinhead*>*mCherry*-*ADMP*>*EGFP* 導入胚では、頭部から尾部にかけての中軸組織で *EGFP* の発現がみられ、中軸組織の外側(中軸組織周縁部と卵黄上皮)で *mCherry* の発現がみられた。(図 3-4A-D)。レポーター遺伝子がこの発現パターンを示したのは、29 個体中 17 個体(58%)であった。周辺組織での *GFP* の発現は、ごく少数の胚でのみ観察された(7%)。一方、*pinhead*>*mCherry* 導入胚では中軸組織の外側で *mCherry* の発現がみられた(図 3-4E-G)。さらに *ADMP*>*EGFP* 導入胚では中軸組織だけでなく、卵黄上皮でも *EGFP* の発現がみられた(図 3-4H-J)。*EGFP* がこの発現パターンを示したのは 47 個体中 20 個体(42%)であった。これらの結果より、脊椎動物のモデル動物であるメダカでもホヤと同様、*Admp* が背側で、*Pinhead* が腹側で発現し、両遺伝子の 5' 近傍配列間の相互作用によって、2 つの遺伝子の相補的な発現パターンが制御されていることが予測された(図 3-5)。

## 3-4 考察

### 3-4-1 *Pinhead* 遺伝子の進化的保存性

BMP リガンドとアンタゴニストはシステインノットとよばれるドメインを共通にもつことがわかっている。この構造をもつ様々な因子が調べられた結果、アフリカツメガエルの *Pinhead* 遺伝子ホモログはシステインノット構造を3つもっており、しかもゲノム上では *Admp* 遺伝子と隣接していることが明らかとなった (Imai et al., 2004)。この特徴的な遺伝子配置は、魚類、両生類、ホヤ、棘皮動物といった後口動物の間で保存されているだけでなく、前口動物である節足動物(昆虫)でも保存されている。このことは、後口動物と前口動物の共通祖先において、すでにこの遺伝子配置が成立していたことを強く示唆している。また同時に、遺伝子配置の高い保存性は、両遺伝子が染色体上近傍で連鎖するということの背後には、機能的な重要性があることを示唆している。

このようなきわめて高い進化的保存性を示す一方、羊膜類すなわち哺乳類、鳥類、爬虫類からは *Pinhead* 遺伝子は見つかっていない。羊膜類に共通する特有の発生様式の進化と *Pinhead* 遺伝子の喪失の間には、何らかの関わりがあると考えられる。

### 3-4-2 *Pinhead* 遺伝子の機能

ホヤ胚において、*Pinhead* の表皮の発現は神経胚期までに前方部に広がることで腹側全体に広がる。尾芽胚では、腹側表皮の発現は体幹領域に限定され、さらに腹側内胚葉にも発現する。*Pinhead* の発現は *Bmp2/4* の発現と重なるが、側方部の表皮と腹側内胚葉にみられる *Admp* の発現とは重ならない (Imai et al., 2004)。

*Pinhead*、*Admp*、もしくは *Bmp2/4* に対するアンチセンスモルフォリノオリゴ(MO)を受精卵に顕微注入し、尾芽胚でのそれらの影響が調べられた。体幹部の腹側内胚葉の指標となる *NK4* の発現は *Admp* モルファントにおいて抑制された。また側方部の表皮領域の指標となる *FoxB* の発現は腹側領域に広がった。*Bmp2/4* モルファントでは、*NK4* の発現は減少する、一方で *FoxB* の発現の特徴的な変化はみられなかった。*Pinhead* モルファントでは、*NK4* の発現は側方部領域に広がり、そして *FoxB* の発現は減少した。このように、BMP シグナルは腹側運命決定のために必要で、体幹部表皮での *Pinhead* 遺伝子によってネガティブ制御される。

*Admp* の発現は *Bmp2/4* モルファントでは普通に見えるが、*Pinhead* モルファント

では発現領域が狭まる。*Bmp2/4* の発現は *Admp* モルファントで抑制され、*Pinhead* モルファントでは広がる。そして *Pinhead* の発現は *Admp* と *Bmp2/4* モルファントの両方で抑制される。このようにこれら 3 つの遺伝子間には複雑な相互関係がある。

そして、それぞれ FLAG 標識と Myc 標識された *Pinhead* と *Admp* を表皮全体で過剰発現させたのち、標識に対する抗体を用いて免疫沈降を行った結果、*Pinhead* と *Admp* が直接的に相互作用していることが明らかとなり、*Admp* に拮抗的に働いて BMP シグナルを阻害すると考えられた。

### 3-4-3 *Pinhead* 遺伝子と *Admp* 遺伝子の発現制御機構

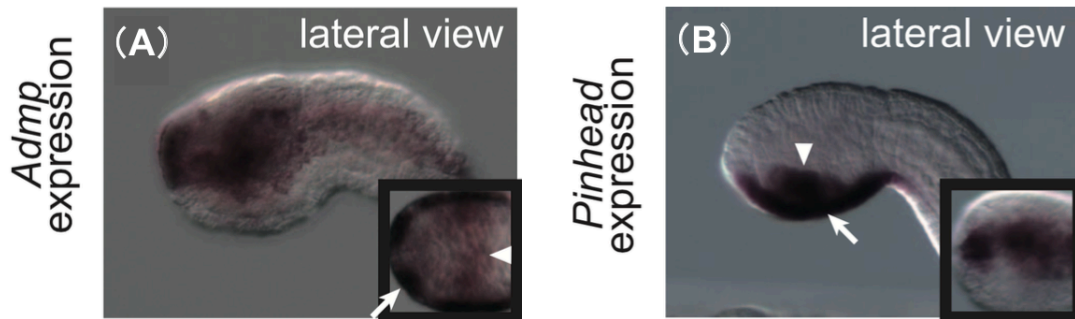
今井と佐藤は、*Pinhead* 遺伝子上流領域から *Admp* 遺伝子の 3' 末端までをクローニングし、それぞれの遺伝子を RFP/GFP に乗せ替えた DNA コンストラクトを作製し、ホヤ胚に導入することで *Pinhead* 遺伝子と *Admp* 遺伝子の発現部位におけるレポーター遺伝子の発現を確認した (Imai et al., 2012)。このコンストラクトとは対照的に、*Admp* 遺伝子上流配列のみでは、側方部と異所的な腹側領域でのレポーター発現がみられた (Imai et al., 2012)。また、*Pinhead* 遺伝子と *Admp* 遺伝子の遺伝子間領域には両者の転写を活性化する領域 (G エンハンサー) と *Admp* 遺伝子の転写を活性化する 3 つの E-box を含む領域 (A エンハンサー) が存在することが示された (Imai et al., 2012)。そして *Pinhead* 遺伝子上流配列には、*Pinhead* 遺伝子の転写を活性化する Smad 結合配列 (SBE) を含む領域 (P エンハンサー) が存在する。この P エンハンサーは腹側での *Admp* の発現を直接的に阻止しない代わりに、*Pinhead* 遺伝子の転写が *Admp* の転写を妨害することが明らかとなった (Imai et al., 2012)。

より詳細な転写活性制御を調べるために、*Pinhead* 遺伝子と *Admp* 遺伝子それぞれが転写される際のクロマチン構造を 3C (chromosome conformation capture) 法を用いて解析された (Imai et al., 2012)。その結果 *Pinhead* 遺伝子が転写活性化されるとき、P エンハンサーと G エンハンサーが相互作用することで G エンハンサーに A エンハンサーが相互作用できなくなることで *Admp* 遺伝子の転写が阻害されることが示唆された。反対に、*Admp* 遺伝子が転写活性化されるときは G エンハンサーと A エンハンサーが相互作用することで P エンハンサー-G エンハンサーと相互作用できなくなり、*Pinhead* 遺伝子の転写が阻害されることが示唆された。

本研究により、この転写制御の様式はメダカでも保存されていることが明らかになった。mCherry と GFP をそれぞれメダカの *Pinhead* と *Admp* の上流配列の制御下

においた DNA コンストラクトは、メダカ 2 日胚の大半において、軸性組織と周辺組織で GFP と RFP の重ならない発現を引き起こし、GFP の発現は軸性組織に限定されていた。一方、*Admp* の上流領域を単独で GFP レポーターに連結したコンストラクトでは、軸性組織と周辺組織の両方で GFP の発現が引き起こされた。つまり、*Pinhead* の上流配列を欠くコンストラクトでは、*Admp* の制御領域によるレポーターの発現が異所的にみられるようになった。このことから、ホヤでみいだされたクロマチンレベルの相互作用による、*Pinhead* と *Admp* の相補的な発現パターンの制御が、脊椎動物においても同様に存在すると考えられる。

### 3-5 図と表



**図 3-1 ホヤ尾芽胚での *Admp* 遺伝子と *Pinhead* 遺伝子の空間的な発現**

(A, B)ホヤの *Admp* 遺伝子と *Pinhead* 遺伝子発現をホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法によって尾芽胚期で検出した(共同研究者の今井博士らによるデータ; Imai et al., 2012)。(A) *Admp* 遺伝子発現は背側と側方部表皮で見られる(矢印)。(B) *Pinhead* 遺伝子の発現は尾芽胚において腹側表皮(矢印)と腹側内胚葉(矢じり)にみられる。これらの遺伝子発現は重なることはない。

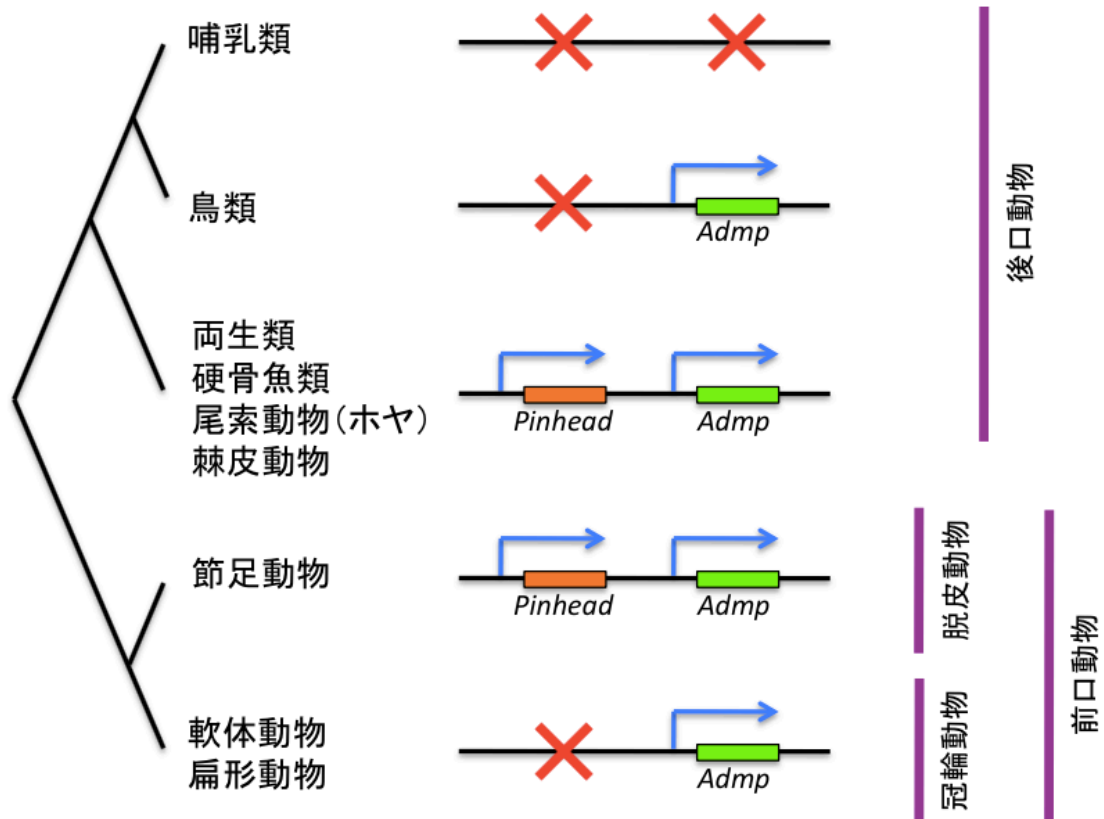


図 3-2 *Pinhead* 遺伝子と *Admp* 遺伝子の進化的保存性

*Pinhead* 遺伝子と *Admp* 遺伝子の進化的保存性の模式図(今井薫博士らによる解説 <http://first.lifesciencedb.jp/archives/5697#i-2> の図 1a をもとに作成)。冠輪動物および哺乳類を除くさまざまな系統の後口動物のゲノム上で *Admp* 遺伝子が同定された。*Admp* 遺伝子はミジンコ、キョウソヤドリバチ、ミツバチなどの脱皮動物(旧口動物の一群)のゲノム上にも存在する。*Pinhead* 遺伝子はミジンコ、ミツバチ、ウニ、ナメクジウオ、フグ、ゼブラフィッシュ、ツメガエルのゲノム上で見つかった。*Pinhead* 遺伝子が見つかったすべての種のゲノムで、*Pinhead* は *Admp* 遺伝子が転写される向きと同じ向きをむいて、*Admp* の上流部に存在する。

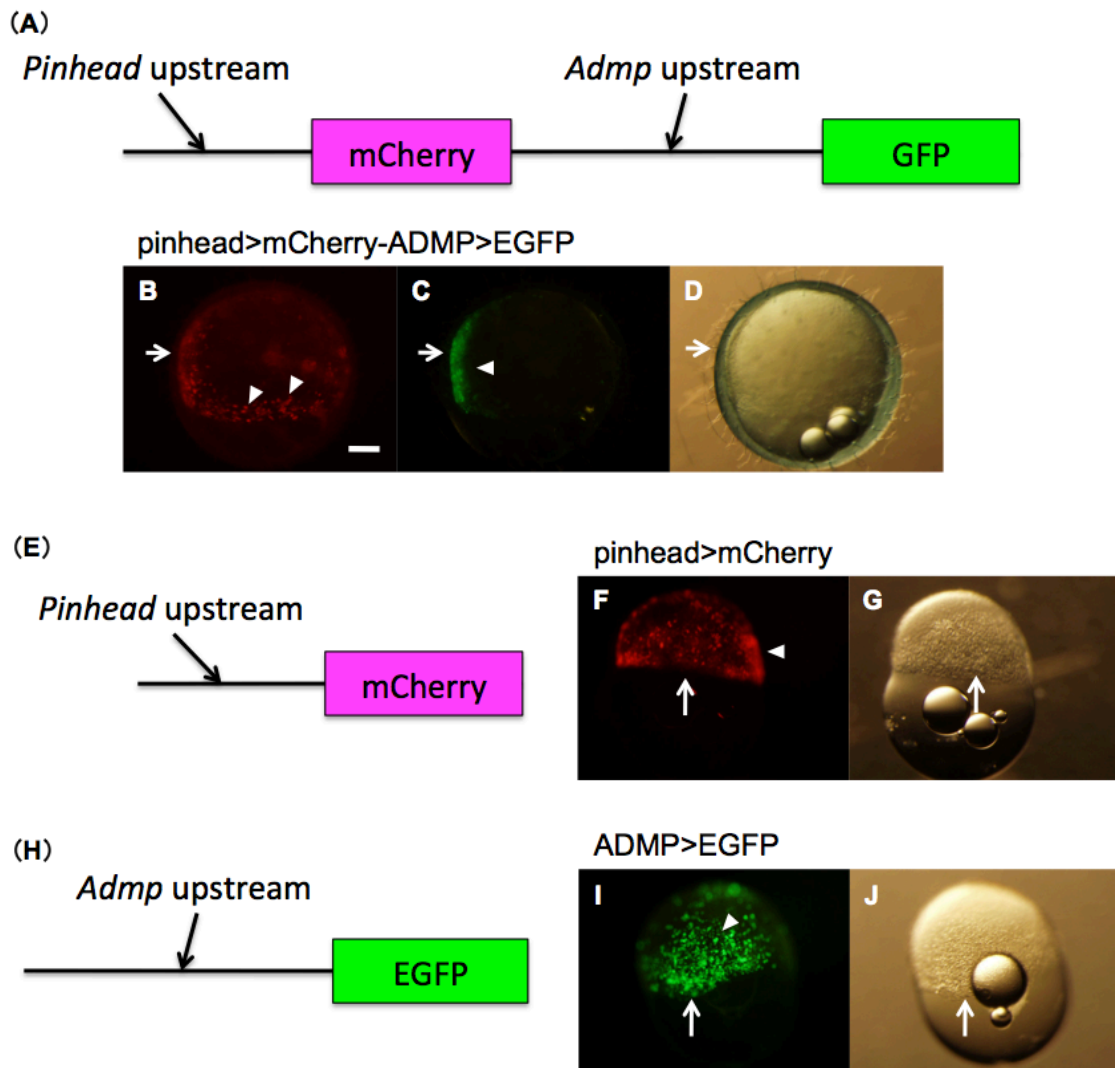


図 3-3 各 DNA コンストラクトを導入したメダカ胚 (St. 15) でのレポーター遺伝子発現

(A-D) *Pinhead* 遺伝子上流制御領域と *Admp* 遺伝子上流制御領域をクローニングし、それぞれ mCherry と GFP に連結した DNA コンストラクトを作製し、メダカ胚に顕微注入した。pinhead>mCherry-ADMP>EGFP の顕微注入した St. 15 の胚での mCherry の発現 (B, 矢じり) と GFP の発現 (C, 矢じり)。 (E) pihead>mCherry を顕微注入した St. 15 胚での mCherry の発現 (矢じり)。 (H) ADMP>EGFP を顕微注入した St. 15 胚での GFP の発現 (I, 矢じり)。 (B-D, F-G, I-J) の矢印は胚盾を指している。 (D, G, J) は各 DNA コンストラクト導入胚の透過像。 (B) のスケールバーは 200  $\mu$ m を示す。



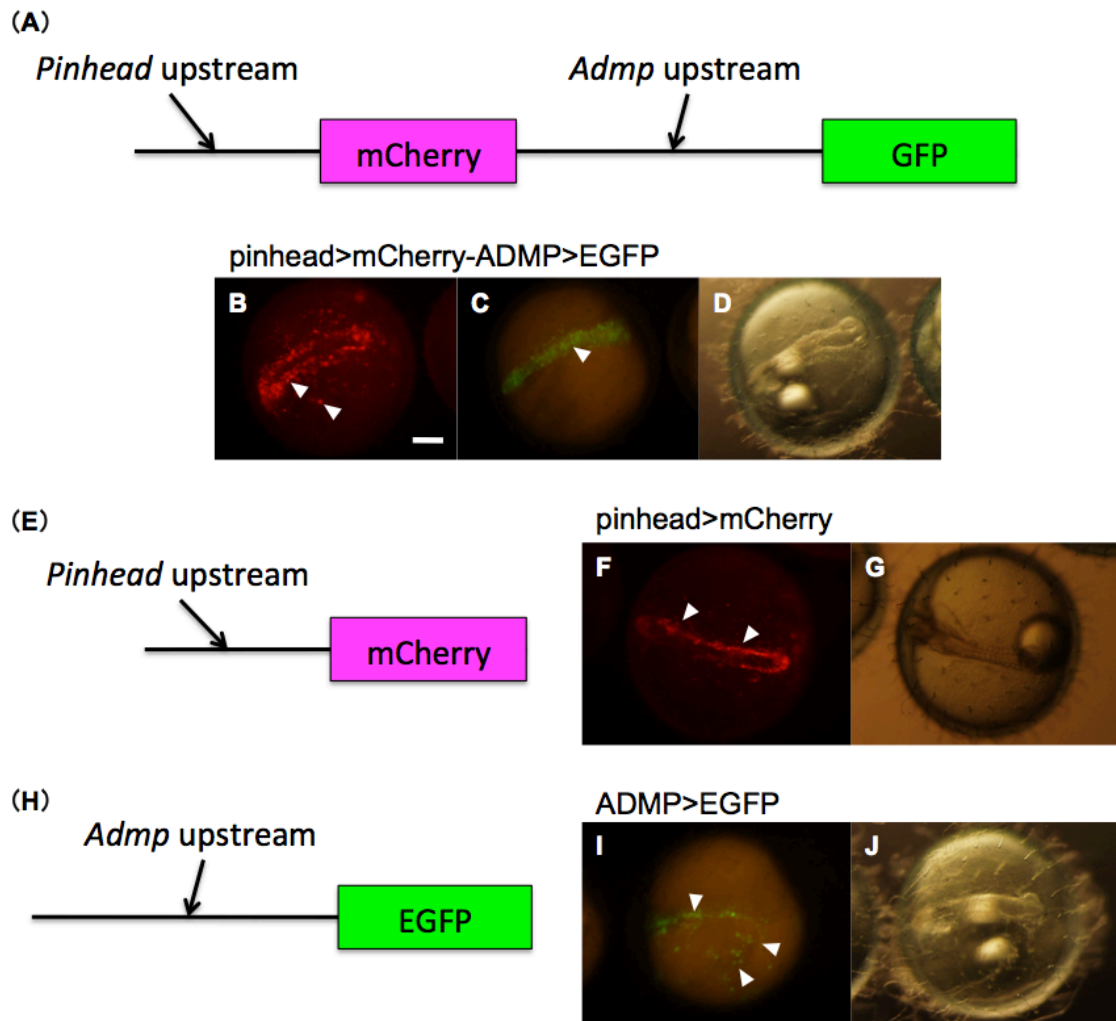


図 3-4 各 DNA コンストラクトを導入したメダカ胚(2dpf)でのレポーター遺伝子発現

(A-D) pinhead>mCherry-ADMP>EGFP の顕微注入したメダカの 2 日目胚での mCherry の発現 (B, 矢じり) と GFP の発現 (C, 矢じり)。 (E-G) pihead>mCherry を顕微注入したメダカの 2 日目胚での mCherry の発現 (矢じり)。 (H-J) ADMP>EGFP を顕微注入したメダカの 2 日目胚での本来よりも広がった GFP の発現 (矢じり)。 (D, G, J) は各 DNA コンストラクト導入胚の透過像。(A) のスケールバーは 200  $\mu$ m を示す。

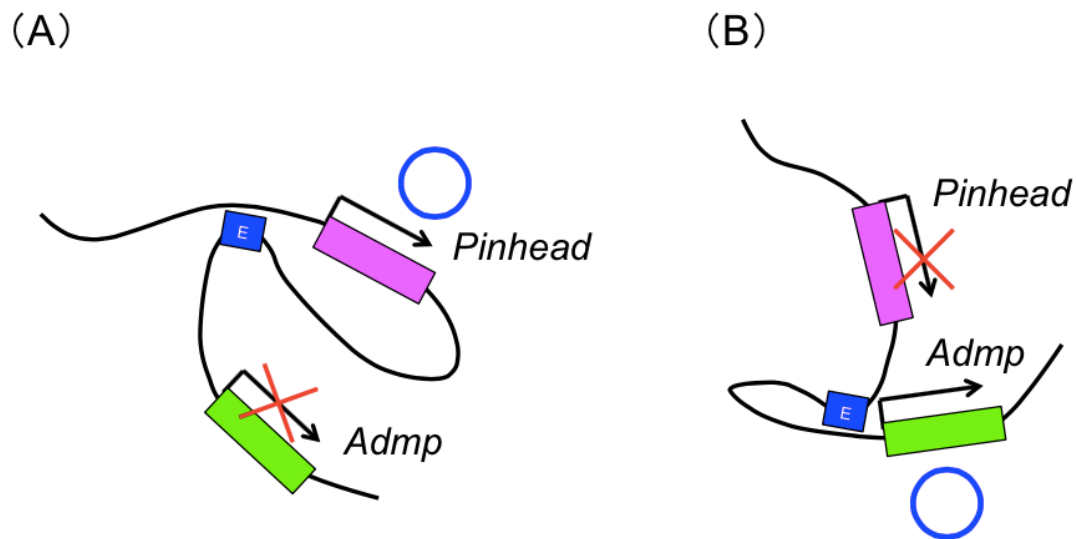


図 3-5 予測される *Pinhead/Admp* 遺伝子の発現調節機構

(A, B)ゲノム上にタンデムに並んでいる *Pinhead* 遺伝子と *Admp* 遺伝子の転写の活性化における、それぞれの遺伝子の近傍配列の相互作用の模式図 (Imai et al., 2012 の Fig. 4B を改変)。 *Pinhead* 遺伝子と *Admp* 遺伝子の間には両遺伝子に共通のエンハンサー (E) が存在する。(A) *Pinhead* 遺伝子が転写されているときには、共通のエンハンサーが *Pinhead* 遺伝子の上流領域と相互作用しているために、 *Admp* 遺伝子の発現に必要なエンハンサーが作用できない。(B) *Admp* 遺伝子が転写されているときには、共通のエンハンサーが *Admp* 遺伝子の上流領域と相互作用し、 *Pinhead* 遺伝子の上流とは相互作用できなくなる。

## 第4章

### 視細胞特異的 microRNA の発現制御と機能の解析

#### 4-1 序論

脊椎動物の網膜視細胞は、桿体細胞と錐体細胞とよばれる2種類に大別でき、それぞれ異なるタイプのオプシンを使っている(Nathans, 1987; Palczewski, 2012; Kefalov, 2012)。錐体細胞は光波長感受性と形態をもとにしていくつかのサブタイプにさらに分けることができる。光波長感受性の違いは主にオプシンサブタイプの発現に起因する(Bowmaker, 2008; Allison et al., 2010)。

転写因子とシス制御 DNA の特異的な相互作用を介した転写調節は視細胞の発生を調節するための中心的なメカニズムである(Swaroop et al., 2010; Forrest and Swaroop, 2012)。Otx クラスのホメオドメイン転写因子である Otx2 と Crx は視細胞前駆体細胞で発現し、それらの発現は桿体細胞と錐体細胞の分化に必要である(Chen et al., 1997; Freund et al., 1997; Furukawa et al., 1997; Nishida et al., 2003)。Maf ファミリーの転写因子である Nrl とオーファン核受容体 Nr2e3 は桿体細胞の特異性と分化に必要である(Mears et al., 2001; Cheng et al., 2004; Chen et al., 2005; Akimoto et al., 2006; McIlvin et al., 2007; Oh et al., 2007)。

錐体細胞サブタイプの発生も特異的転写因子によって制御されていることが知られている。たとえば、哺乳類において甲状腺ホルモン受容体  $TR\beta 2$  とその他の核受容体  $RXR\gamma$ 、 $ROR\alpha$ 、 $ROR\beta$  が錐体細胞の特異性を制御しており(Ng et al., 2001; Roberts et al., 2005; Roberts et al., 2006; Srinivas et al., 2006; Applebury et al., 2007; Lu et al., 2009; Glaschke et al., 2011)、T-box 転写因子  $Tbx2b$  はゼブラフィッシュにおいて桿体細胞への発生運命を抑制することによって UV 感受性錐体細胞への発生運命を促進する(Alvarez-Delfin et al., 2009)。最近の研究は *sine oculis* 相同遺伝子である *Six7* もゼブラフィッシュの視細胞サブタイプ発生の制御において重要な役割を果たすことを示唆している(Alvarez-Delfin, 2011; Saade et al., 2013)。しかしながら、桿体と錐体の差異を生じるメカニズムと比べ、錐体サブタイプ特異性を制御する機構の理解は進んでおらず、とくに、哺乳類よりも多様な錐体視細胞をもつ哺乳類以外の脊椎動物では、まったく解明されていないといっても過言ではない。

最近の研究により、microRNA(miRNA)の転写後調節が網膜を含む様々な組織の細胞の発生と機能を制御することが示されてきた(Ambros, 2004; Bartel, 2004; Bartel, 2009; Sundermeier and Palczewski, 2012)。網膜の発生と機能におけるmiRNAの重要性が、成熟miRNAが必要なRNase IIIエンドヌクレアーゼであるdicerの条件的不活化により示されている(Damiani et al., 2008; Georgi and Reh, 2010; Pinter and Hindges, 2010; Davis et al., 2011)。哺乳類の網膜では、miRNAクラスターであるmiR-183/96/182が視細胞で発現し、視細胞の通常の分化や機能に必要である(Xu et al., 2007; Zhu et al., 2011; Lumayag et al., 2013)。しかしながら、これまでmiRNAが視細胞サブタイプの制御に関わるかどうかについては知られていなかった。

本研究では、オプシン遺伝子座近くに存在し、視細胞サブタイプ特異性に関与する可能性のある2つのmiRNA(miR-726とmiR-729)について報告する。miR-726とmiR-729をコードしている遺伝子は、様々な硬骨魚類のゲノム上で、赤感受性オプシン遺伝子*LWS-A*とUV感受性オプシン遺伝子*SWS1*の上流領域にそれぞれ位置している。これらのmiRNA-錐体オプシン遺伝子対の発現パターンとシス制御領域の機能に基づき、転写と転写後調節間での連携を通して視細胞サブタイプ特異性を制御する新奇メカニズムを提唱する。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 実験動物の飼育と胚試料の調製

メダカ *Oryzias latipes* (ヒメダカ) の成魚は、室内水槽において、人工的な生殖条件下 (暗期 10 時間, 明期 14 時間の 24 時間サイクル; 水温 28°C) で飼育を行った。餌としてアルテミアのノープリウス幼生 (ミヤコ化学 (株)) と人工飼料おとひめ B2 (日清丸紅飼料 (株)) を与えた。朝 (暗期から明期への移行時) に自然産卵された受精卵を集め、0.6 ppm メチレンブルーを含んだ脱イオン水中、28°C で発生させた。適当な発生段階において、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP Medaka; <http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/>) より提供されたメダカ孵化酵素 (Yamagami, 1979) を用いて卵殻 (コリオン) を消化し、裸胚を得た。

### 5-2-2 比較ゲノムとバイオインフォマティクス

メダカ、イトヨ、トラフグ、ミドリフグ *Tetraodon nigroviridis*、ゼブラフィッシュ、ネツタイツメガエル *Xenopus tropicalis*、アノールトカゲ *Anolis carolinensis* のゲノム配列は Ensembl から入手した。DNA 配列のアライメントと比較には VISTA ツール (Frazer et al., 2004; <http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) を使用した (パラメーターは、50 bp window、50% identity threshold)。比較した領域は、メダカ miR-726/LWS 遺伝子座 Chr. 5: 27,010,969-27,017,65、ゼブラフィッシュ miR-726/LWS 遺伝子座 Chr. 11: 26,409,202-26,414,002、イトヨ miR-726/LWS 遺伝子座 groupXVII: 10,624,091-10,629,945、トラフグ miR-726/LWS 遺伝子座 Scaffold\_79: 746,356-750,681、ミドリフグ miR-726/LWS 遺伝子座 Chr. 11: 10,120,886-10,124,588、ネツタイツメガエル miR-726/LWS 遺伝子座 Scaffold GL172911.1: 207,521-219,737、アノールトカゲ miR-726/LWS 遺伝子座 Chr. 2: 88,641,952-88,669,311、メダカ miR-729/SWS1 遺伝子座 scaffold1021: 44,173-47,630、ゼブラフィッシュ miR-729/SWS1 遺伝子座 Chr. 4: 12,641,956-12,649,372、イトヨ miR-729/SWS1 遺伝子座 Scaffold\_90: 456,569-463,114 である。

保存された非コード領域内の予測される転写因子結合部位は JASPER CORE データベース (<http://jaspar.genereg.net/>; Mathelier et al., 2014) 内のマトリックスモデルを用いてゲノム配列をスキャンすることによって予測した。検索に用いた相対プロファイルスコア閾値は 80 パーセントであった。ClustalW プログラム (Thompson et

al., 1994)を用いて、保存された非コード配列を含むゲノム配列のアライメントを作成し、予測された転写因子結合配列の進化的保存性解析に用いた。

TargetScanFish (Release 6.2; [http://www.targetscan.org/fish\\_62](http://www.targetscan.org/fish_62)) でアノテートされたゼブラフィッシュ UTR (Lewis et al., 2005; Ulitsky et al., 2012) を検索することによりゼブラフィッシュにおける miRNA の標的候補を予測した。

### 5-2-3 *in situ* ハイブリダイゼーションのためのプローブの作製

ISOGEN (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使って 3 個体のメダカ成魚の眼から全 RNA を単離した。全 RNA 1 µg を鋳型とし、Superscript™ III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) およびオリゴ (dT) プライマーを用いて一本鎖 cDNA を合成した。*pri-ola-miR-726*、*pri-ola-miR-729*、*LWS-A*、*SWS1*、*RH2-A*、*RH2-B*、*RH2-C*、およびロドプシンの部分的な cDNA は Taq DNA ポリメラーゼ (Ex Taq; TAKARA Bio, Otsu, Japan) と遺伝子特異的プライマーを用いた PCR によって一本鎖 cDNA から増幅し、TA クローニング法 (Marchuk et al., 1991) によって pBluescript II SK(+) ベクターの EcoRV 部位にクローニングした。メダカの *LWS-A*、*SWS1*、*RH2-A*、*RH2-B*、*RH2-C*、ロドプシン遺伝子に対するプライマーは過去に報告されたヌクレオチド配列をベースに設計した (Hisatomi et al., 1997; Matsumoto et al., 2006; NCBI accession numbers AB223051, AB223053, AB223054, AB223055, AB223058, AB001606)。プライマーのヌクレオチド配列は *LWS-A* が 5'-AGTGGGAAGCGATGACCCT-3'

5'-CGTGCATTATGATACATTCCCTCT-3'、

*SWS1* が 5'-CCGTCCTCTCCTTTGAGAGATAC-3'

5'-TCCATCTTCTTTCCGAAAACCATC-3'、

*RH2-A* が 5'-GCTCAACAGTAACTCTGCTTGG-3'

5'-CCAAGACCGTCAACAAGGAAAC-3'、

*RH2-B* が 5'-GGATCCTCCGCTTCAAGAGA-3'

5'-GAAGTATGCCGATGGAATTCCTTAG-3'、

*RH2-C* が 5'-GCATCAGCTGAAGCTCCA-3'

5'-GTTCCCACATGCATTTCTGTG-3'、

ロドプシンが 5'-TTATGTCCCTATGGTGAACAC-3'

5'-AGCAGCCTCCTTGACA-3'、

*pri-ola-miR-726* が 5'-GTACCTTTGCTGTTTTGCTT-3'

5'-CTGACTCATGCAAACAAAATG-3',  
*pri-ola-miR-729* は 5'-AGTCTGGGCTGCAGT-3'  
5'-ATGTAACCCGTTTCATGGTT-3' であった。

増幅した *pri-ola-miR-726*、*pri-ola-miR-729*、*LWS-A*、*SWS1*、*RH2-A*、*RH2-B*、*RH2-C*、およびロドプシン遺伝子の cDNA 断片のサイズはそれぞれ 693bp、514bp、604bp、595bp、1267bp、1274bp、1337bp、676bp である。cDNA フラグメントを含むプラスミドクローンを制限酵素によって切断し、これを鋳型に用いて DIG もしくは Fluorescein labeling Mix (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を用いて、DIG 標識 RNA プローブ (*pri-ola-miR-726*、*pri-ola-miR-729* そしてロドプシン) もしくは FITC 標識 RNA プローブ (*LWS-A*、*SWS1*、*RH2-A*、*RH2-B*、*RH2-C* そしてロドプシン) を合成した。

#### 4-2-4 二重蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション

メダカ成魚を解剖し、頭部を 4% パラホルムアルデヒドを含む PBT (0.1% Tween-20 を含む PBS) 中で 4°C、20 時間 (一晚) かけて固定した。固定された組織は 3 回 PBT で洗浄した後、段階的にエタノール濃度を上げたエタノール/PBT およびエタノールによる洗浄で脱水を行った (25%、50%、75%、100%)。キシレンによって試料を透徹した後、65°C のパラフィン (Paraffin Wax II60; Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) に包埋した。ミクロトーム (RM2125; Leica Biosystems, Nussloch, Germany) を用いて、試料を含んだパラフィンブロックから 10  $\mu$ m の厚さの切片を作製した。切片は伸展器 (HI1220; Leica Biosystems) 上で接着性のスライドガラス (MAS coated glass slide; Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) にマウントした。キシレンによる脱パラフィンと段階的に薄めたアルコールによる再水和後、切片を PBS により洗浄し、2  $\mu$ g/ml Proteinase K を含む PBS 中、室温で 5 分間、部分的な消化を行った。PBS で洗浄後、切片は 4% パラホルムアルデヒドを含む PBS 中、室温で 10 分間、後固定し、その後 PBS で洗浄した。つぎに、0.25% 無水酢酸を含む 0.1M トリエタノールアミン (pH 8.0) 中で 20 分間、アセチル化し、再度洗浄した。その後、切片を 63°C でハイブリダイゼーションバッファーと共にインキュベートした。ハイブリダイゼーションバッファーに終濃度 5 ng/ $\mu$ l の DIG 標識プローブと FITC 標識 RNA プローブを加え、68°C で 10 分間、変性した後、切片に加えた。ハイブリダイゼーションは 63°C で 16 時間行った。ハイブリダイゼーションバッファーの組成は、50% ホルムアミド、5 $\times$  SSC (0.15M NaCl, 0.0015M Na<sub>3</sub>クエ

ン酸, pH 7.0)、50 µg/ml yeast tRNA、50 µg/ml ヘパリン、0.1% Tween-20 である。

ハイブリダイゼーションを行った切片は、4×SSC 中で短時間洗浄した後、50% ホルムアミド/2×SSC で63°C 1時間、0.2×SSC で63°C 2時間の洗浄を行った後、PBS 中で室温 5 分間洗浄した。次に切片を 0.5% ブロッキング溶液 (Roche Diagnostics) in PBS 中で室温、30分でブロッキングした後、同じブロッキング溶液にペルオキシダーゼ標識された抗 DIG 抗体 (1:1000, 11207733910; Roche Diagnostics) を加え、室温で2時間インキュベートした。5分間×4回のPBSでの洗浄後、切片は 0.0015% 過酸化水素が含まれる増幅バッファー (Invitrogen) に TSA-Alexa488 (T20912; Invitrogen) を加えた溶液中で4°C、16時間反応させた。次に1.5%過酸化水素中で30分間処理することによってペルオキシダーゼを不活化した。FITC 標識プローブはペルオキシダーゼ標識された抗 FITC 抗体 (1:200, NF7100001EA; Perkin Elmer) 溶液で室温で 2 時間インキュベートした後、そして室温 30 分間 (ロドプシンの場合) もしくは 3 時間 (その他のプローブの場合) の TSA-Alexa594 溶液で反応させることで検出した。切片は 2% DABCO in 80% グリセロール-PBS を用いて、スライドガラス上にマウントし、レーザー走査型共焦点顕微鏡 (FV1200; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて蛍光像を得た。

#### 4-2-5 蛍光レポーターコンストラクト

二重レポータープラスミドである pBluescript-mCherry-EGFP は以下のように構成されている: mCherry (Dr. R. Tsien, University of California San Diego, CA 提供) のコーディング配列は pBluescript-EGFP の EGFP コーディング配列と置換され、その後 pEGFP-1 (clontech, Mountain View, CA) 由来の EGFP をコードする配列と SV40 poly(A) を含む DNA 断片を *EcoRI/SaII* サイトをつかって mCherry とは逆向きに挿入した。メダカのゲノム DNA は以前記述された Hd-rR 近交系の 1 個体から抽出されたもの (Kusakabe and Suzuki, 2000) を用いた。ola-miR-726 と LWS-A (Chr. 5: 27,011,474-27,015,548) と ola-miR-729 と SWS1 (scaffold1021: 46,113-47,306) の遺伝子間領域は耐熱性の DNA ポリメラーゼ (PrimeStar HS DNA polymerase, Takara Bio, Japan) と遺伝子特異的オリゴプライマー対による PCR でゲノム DNA から増幅した: *ola-miR-726* と *LWS-A* の遺伝子間領域が 5' -GTCAGGATCCTCACTCAGAAGAAGGGGT-3' と 5' -ACTGGTCGACGTGATCGCACAAGG-3'、*ola-miR-729* と *SWS1* の遺伝子間



領域が 5'-CGATGGATCCTCTGGTTCTGGTCCTG-3' と 5'-ACGTGTCGACGTGAAGCTGAGCTCTG-3' (プライマーの下線部は制限酵素認識サイトを示す)。増幅された遺伝子間領域は pBluescript-mCherry-EGFP の *Sall/Bam*HI サイトに挿入した。

遺伝子間領域に部分的な欠失を施したレポーターコンストラクトは以下のように作製した: 全長のオリジナルプラスミドから削りたい領域以外を除いた部分を正確性の高い DNA ポリメラーゼ (PrimeStar HS DNA polymerase; Takara Bio) とプライマー対 ( $\Delta$ LWS-CNR-A: 5'-CGTATCTAGATCAAACTGTGCAAGGAATC-3' 5'-GCTATCTAGAGTCAGGTCGGTGTCTTG-3、 $\Delta$ LWS-CNR-B: 5'-CGATTCTAGAACAGGCATGTTTTGG-3' 5'-CGTATCTAGATGCTAATGCTACATGTCCTT-3'、 $\Delta$ LWS-CNR-C: 5'-CGATTCTAGACGGATTTTTAGCCTGGAG-3' 5'-CGTATCTAGAGATTTCCACAGAGACGGG-3'、 $\Delta$ LWS-CNR-B+C: 5'-CGATTCTAGACGGATTTTTAGCCTGGAG-3' 5'-CGTATCTAGATGCTAATGCTACATGTCCTT-3'、LWS-CNR-A: 5'-CGATTCTAGACGGATTTTTAGCCTGGAG-3' 5'-CGTATCTAGATTCTTGCACAGTTTTG-3'、 $\Delta$ SWS1-CNR- $\alpha$ : 5'-GCTATCTAGACAGTTTGGGTTCTGGTCT-3' 5'-GCATTCTAGAGCTCTGCTCCCAACAG-3'、 $\Delta$ SWS1-CNR- $\beta$ : 5'-GCTATCTAGATTAGACAAAGCCGTAAGCT-3' 5'-CGTATCTAGAACCAGGACCTTCTCATAA-3'、SWS1-CNR- $\alpha$ : 5'-GCTATCTAGATTAGACAAAGCCGTAAGCT-3' 5'-GCATTCTAGACCAGAACCCAACTG-3') を用いて増幅し、*Xba*I (認識サイトはプライマー配列上に下線部で示した) によって切断した後自己結合させた。

#### 4-2-6 レポーターDNA コンストラクトの顕微注入とレポータータンパク質の蛍光免疫検出

環状プラスミド DNA コンストラクトは顕微注入法によってメダカ胚に以前記述された方法 (Kusakabe et al., 1999) で導入した。注入された胚は 28°C でインキュベートし、蛍光実体顕微鏡 (MF165FC; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて蛍光の観察を行った。胚は第2章で述べた方法で卵殻を除いた後、4% パラホルムアルデヒド/PBS で 4°C、一晩かけて固定した。固定した胚は、数回の 1% Triton

X-100 を含む PBS (T-PBS) と 1 回の滅菌水での洗浄後、 $-20^{\circ}\text{C}$  の冷アセトン中で 20 分間透徹処理し、次に滅菌水と T-PBS で再度洗浄した。その後胚は段階的に濃度を上げたメタノール (50%、70%、100%) によって  $4^{\circ}\text{C}$  で脱水した後、 $-20^{\circ}\text{C}$  メタノール中で一晩保存した。再び水に戻した後、胚は 1% DMSO を含む 1% T-PBS で洗浄し、10% ヤギ血清および 1% DMSO を含む T-PBS で  $4^{\circ}\text{C}$ 、一晩かけてブロッキングを行った。次に胚を抗 GFP ウサギポリクローナル抗体 (A11122; Invitrogen) と抗 RFP ラットモノクローナル抗体 (5F8; ChromoTek gmbH, Martinsried, Germany) がブロッキング溶液に各 1/1000 溶けている溶液で  $4^{\circ}\text{C}$ 、9 時間インキュベートし、1% DMSO を含む T-PBS で一晩洗浄した後、Alexa-488 標識された抗ウサギ IgG と Alexa-594 標識された抗ラット IgG 抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR) 溶液で  $4^{\circ}\text{C}$ 、9 時間インキュベートした。1% DMSO を含む T-PBS で数回すすいだ後、80% グリセロールでスライドガラス上にマウントし、共焦点顕微鏡 (FV1000, Olympus) を用いて観察した。

## 4-3 結果

### 4-3-1 硬骨魚類、両生類、爬虫類の錐体オプシン遺伝子の 5'近傍領域に miRNA をコードする配列が保存されている。

メダカの錐体オプシン遺伝子座に保存された非コード配列を研究する過程で、miRNA と推測される配列をコードする 2 つの保存性の高い配列を発見した。これらのうち 1 つは赤色光感受性オプシン遺伝子 *LWS-A* (Matsumoto et al., 2006; Ensembl ID ENSORLG00000014088) の 4 kb 上流の逆鎖にコードされている(図 4-1A)。予測された成熟 miRNA 配列はゼブラフィッシュの miRNA、*dre-miR-726* と同配列であることから、メダカの miRNA を *ola-miR-726* (Kloosterman et al., 2006) と名付けた(図 4-1C)。*miR-726* がコードされた配列は、硬骨魚類だけでなく、両生類と爬虫類でも *LWS-A* 相同遺伝子の 5'近傍領域に高度に保存されている(図 4-1A, B)。この領域の *miR-726* との同一性および進化的保存性は、O'Quin ら(2011)も指摘している。

もう一つの予測された miRNA (Ensembl ID ENSORLG00000021049) は UV 感受性オプシン遺伝子である *SWS1* (Matsumoto et al., 2006) の 1.2 kb 上流にコードされる。この miRNA もオプシン遺伝子とは逆鎖にコードされる(図 4-2)。予測された成熟 miRNA の配列は、ゼブラフィッシュの *miR-729* の SEED 配列(成熟 miRNA の 2 番目から 8 番目にかけての塩基配列)に似ていることから、Li ら(2010)によって *ola-miR-729* と名付けられた。*miR-729* は硬骨魚類ゲノムに保存されている(図 4-2A, B)。

### 4-3-2 錐体視細胞サブタイプ特異的に対をなす miRNA とオプシン遺伝子が共発現する

*ola-miR-726* と *ola-miR-729* の一次転写産物(*pri-ola-miR-726* と *pri-ola-miR-729*) の空間的な発現パターンを、それぞれが対をなすオプシン遺伝子の発現パターンと二重蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによって比較した。*pri-ola-miR-726* と *pri-ola-miR-729* のシグナルは視細胞の核が存在する外顆粒層(Outer Nuclear Layer; ONL)に特異的にみられた(図 4-3)。 *pri-ola-miR-726* の局在は *LWS-A* 陽性細胞の内節直下の核に検出され(図 4-3A)、一方で *pri-ola-miR-729* の局在は *SWS1* 陽性細胞の核で検出された(図 4-3B)。対照的に、*pri-ola-miR-726* の局在は *SWS1* 陽性細胞(図 4-3C) や緑感受性オプシン遺伝子(*RH2*)陽性細胞(図 4-3E)

とは一致しなかった。同様に、pri-ola-miR-729 の局在は LWS-A 陽性細胞 (図 4-3D) や RH2 陽性細胞 (図 4-3F) とは一致しなかった。桿体細胞核は ONL 内側領域に局在し、pri-ola-miR-726 や pri-ola-miR-729 の局在とは重ならなかった (図 4-3G, H)。pri-ola-miR-726 と pri-ola-miR-729 のシグナルはほとんどの場合、異なる核にみられた (図 4-3I)。今回の解析では、錐体視細胞の外節で一様な蛍光がみられたが、同様の蛍光はセンスプローブを用いた切片でもみることができ、miRNA 一次転写産物の検出のために感度を増強したためのバックグラウンドである (図 4-3J)。これらの結果は ola-miR-726 と ola-miR-729 がそれぞれ赤色光感受性オプシン遺伝子 LWS-A と UV 感受性オプシン遺伝子 SWS1 と共発現することを一貫して示唆している。

#### 4-3-3 対をなす miRNA 遺伝子とオプシン遺伝子が共有する遺伝子間領域が同一視細胞での双方向的な転写を引き起こす

miRNA/オプシン遺伝子対の進化的な保存性および共発現は、遺伝子間領域に存在する共通のシス調節配列によって共発現が調節されていることを示唆する。この仮説を検証し、miRNA/オプシン遺伝子対の共発現に関わる分子メカニズムを明らかにすることを目的として、ola-miR-726 と LWS-A、ola-miR-729 と SWS1 間の遺伝子間配列をクローニングし、遺伝子間配列の miRNA 遺伝子側には赤色蛍光タンパク質 (mCherry) をオプシン遺伝子側には緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を連結した (図 4-4A, 図 4-5A)。これらの二重レポーターコンストラクトを顕微注入法によってメダカ受精卵に導入し、導入胚網膜でのレポーターの発現を調べた。どちらのコンストラクトを導入した胚においても、受精後 8 日の視細胞で mCherry と EGFP の発現が特異的に観察された。これらの胚では、mCherry のシグナルが EGFP のシグナルに重なることがしばしば観察された (図 4-4B-G, 図 4-5B-G)。これらの結果は ola-miR-726 と ola-miR-729 が網膜の桿体細胞ではなく錐体細胞で発現することを示唆する。また、遺伝子間領域は miRNA/オプシン遺伝子対の同一視細胞で双方向的な転写を再現するのに十分であることが示された。これらの結果からも、対をなす miRNA とオプシン遺伝子が特異的な錐体サブタイプで共発現することが支持される。

#### 4-3-4 miRNA/オプシン遺伝子対の共発現は共通のシス調節領域によって制御されている

miRNA とオプシン遺伝子の発現に必要なシス調節配列の候補をさらにしぼるために、シス調節配列の候補として、保存された非コード配列に注目した。*miR-726* と *LWS-A* の遺伝子間領域では、基本プロモーターに加えて 3 箇所保存された非コード領域 (conserved non-coding regions; CNRs) があり、それぞれ *LWS-CNR-A*、*-B*、*-C* と名付けた (図 4-6A)。同様に *miRNA-729* と *SWS1* 間の 2 つの CNRs をそれぞれ *SWS1-CNR- $\alpha$* 、*- $\beta$*  と名付けた (図 4-7A)。

図 4-6B に示すように CNRs を含む *miR-726/LWS-A* 遺伝子間領域を組み込んだ野生型の二重レポーターコンストラクトから CNR を除去したプラスミドコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトを注入された卵から発生した胚の視細胞における各レポーターの発現を調べた。*LWS-CNR-A* を除去すると、mCherry の発現が完全に消滅し、EGFP の発現もかなり減少する (図 4-8A-C)。一方、*LWS-CNR-B* または *LWS-CNR-C* を除去した場合には、レポーターの発現に変化はみられなかった。つぎに、*LWS-CNR-A* が *miR-726* と *LWS-A* 両方の転写活性化に十分であるかを調べた。*LWS-CNR-A* のみを *miR-726* と *LWS-A* の基本プロモーターに連結したコンストラクトをメダカ胚に注入したところ、EGFP と mCherry の発現が視細胞でみられた (図 4-6B の "CNR-A" コンストラクト、図 4-8D-F)。これらの結果から、*LWS-CNR-A* は視細胞において *miR-726* と *LWS-A* 両方のエンハンサーとしてはたらくと考えられる。

*miR-729* と *SWS1* の遺伝子間領域にある CNRs の役割も二重レポーターコンストラクトシリーズをメダカ胚に導入することで調べた (図 4-7B)。*SWS1-CNR- $\alpha$*  の除去は大幅に mCherry と EGFP の発現を減少させ (図 4-9A-C)、一方で *SWS1-CNR- $\beta$*  の除去はレポーターの発現に影響しなかった (図 4-7B、図 4-9D-F)。このように、*SWS1-CNR- $\alpha$*  と基本プロモーターの組み合わせは *miR-729* と *SWS1* の両方の転写活性化に十分のようである。これらの結果は、対をなす miRNA とオプシン遺伝子の転写が共通シス調節配列によって調節されていることを示唆している (図 4-10A, B)。

*LWS-CNR-A* あるいは *SWS1-CNR- $\alpha$*  と相互作用する転写因子を、コンピューターを用いて転写因子の結合可能配列を検索することによって予測した (図 4-6C、図 4-7C)。メダカの *LWS-CNR-A* には 3 カ所の視細胞特異的転写因子 Crx (Chen et al., 1997; Freund et al., 1997; Furukawa et al., 1997) の結合可能配列が存在する。これらの Crx 部位はホメオドメイン認識配列 (Levine and Hoey, 1988; Hayashi and Scott, 1990) のコア・モチーフである ATTA 配列を含んでいる。さらに 2 つの

ATTA 配列も硬骨魚類の LWS-CNR-A 領域に高く保存されている(図 4-6C)。LWS-CNR-A にみられるその他の結合可能部位として、視細胞発生に関わることが知られている核受容体ファミリータンパク質である Nr2e3 と RXR の結合配列が含まれていた(Chen et al., 2005; Swaroop et al., 2010)。これらの配列は硬骨魚類間であまり保存されていない。

メダカの SWS1-CNR- $\alpha$  は 2 つの Crx 結合可能部位を含んでいる(図 4-7C)。これらの Crx 部位はメダカとイトヨの間で高度に保存されている。また、Hox、Fox、POU、bZip、核受容体ファミリータンパク質といった様々な転写因子の結合候補配列が存在し、これらのうちいくつかはとてもよく保存されている(図 4-7C)。もう一つの興味深い配列は桿体細胞の分化を制御する STAT3(Rhee et al., 2004; Ozawa et al., 2004; Zhang et al., 2004)の結合可能部位である。STAT 部位はメダカの LWS-A にもみられる(図 4-6C)。

#### 4-3-5 miRNA 標的候補には視細胞発生制御に関わる転写因子が含まれる

現時点では、メダカにおける 3'非翻訳領域(UTR)の情報はゼブラフィッシュのもの比べて大幅に限られている。たとえば、UTR データベース UTRdb (<http://utrdb.ba.itb.cnr.it/>; Grillo et al., 2010)にエントリーされている 3'UTR の数は、ゼブラフィッシュの 18,233 に対し、メダカは 358 である。そこで、アノテートされたゼブラフィッシュ UTR(Ulitsky et al., 2012)の中から、TargetScan システム(Lewis et al., 2005)を用いて、miR-726 と miR-729 の標的と予測される遺伝子を探した。合計 2,986 個と 2,157 個の遺伝子がそれぞれ miR-726 と miR-729 の標的と予測された。少なくとも視細胞サブタイプの発生に関わる 4 つの転写因子(Nrl、甲状腺ホルモン受容体  $\beta$ 、Six7、ROR  $\beta$ )は dre-miR-726 の標的の可能性はある(図 4-11A, B)。dre-miR-729 の標的候補には視細胞発生に重要な役割をする 3 つのホメオドメインタンパク質(Six7、Crx、Otx2)が含まれている(図 4-12A, B)。これらの標的候補をメダカとゼブラフィッシュで比較し、メダカ Six7 の 3'UTR が ola-miR-729 の標的配列を含んでいることを見つけた(図 4-12C, D)。

## 4-4 考察

### 4-4-1 miR-726 と miR-729 の錐体サブタイプ特異的発現と推定される役割

本研究で示された結果は、miR-726 と miR-729 がそれぞれ赤色感受性錐体と UV 光感受性錐体細胞に特異的に発現することを示唆する。ゼブラフィッシュによる以前の研究で、miR-726 と miR-729 はノーザンブロット解析によって眼で検出されている (Kloosterman et al., 2006)。しかし LNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションでは miR-726 と miR-729 のシグナルは検出されていなかった (Kloosterman et al., 2006)。本研究においても、LNA プローブを用いて成熟 *ola*-miR-726 と *ola*-miR-729 を検出することができなかつたので、RNA プローブを用いて miRNA の一次転写産物の発現を検出した。我々が知る限りでは、これらの miRNA について他の種で発現パターンは報告されていない。miRNA の視細胞サブタイプ特異的な発現についても以前に報告されていない。このように、本研究は視細胞サブタイプ特異的に発現する miRNA の証拠を初めて示すものである。

miR-726 と miR-729 の視細胞サブタイプ特異的な発現は、網膜での視細胞サブタイプの制御といった役割をはたすことを示唆する。これらの miRNA は特定の錐体サブタイプで本来発現すべきでない遺伝子の発現を転写後抑制しているかもしれない。たとえば、長波長感受性錐体細胞で発現する miR-726 が短波長感受性錐体細胞や中波長感受性錐体細胞、もしくは桿体視細胞への分化をうながす転写因子を抑制するかもしれない。視細胞の異なるサブタイプは光感受性細胞としての共通の特徴を共有し、共通の前駆細胞から発生するので、異なる視細胞サブタイプが発現する遺伝子群は一部重複している。たとえば、錐体の異なるサブタイプは光伝達タンパク質の同じアイソフォームを使用している (Hisatomi et al., 2002; Larhammar et al., 2009)。miRNA による転写後抑制メカニズムは視細胞サブタイプ間での明瞭な区別を確実にするのに役立つだろう。

本研究のイン・シリコ解析によって、視細胞発生の制御に関わるいくつかの転写因子が miR-726 と miR-729 の標的候補であることを明らかにした。miR-726 の標的候補の 1 つは桿体細胞特異性と発生を促進する Maf ファミリー bZip 転写因子の *Nrl* である (Mears et al., 2001; McIlvain and Knox, 2007; Oh et al., 2007)。*Nrl* ノックアウトマウスの網膜では、桿体細胞は機能的な錐体細胞へと変化する。(Mears et al., 2001; Daniele et al., 2005; Akimoto et al., 2006)。逆に、*Nrl* の異所的発現は錐体前駆細胞を機能的な桿体細胞へと変化させることができる (Oh et al., 2007)。

もう1つ別の miR-726 の標的候補は前駆体に桿体細胞の特徴を与える Nrl と同様の転写経路ではたらく ROR $\beta$  である (Jia et al., 2009)。このように miR-726 の機能の一つは Nrl と ROR $\beta$  の下方制御によって桿体細胞形質を抑制することであるかもしれない。miR-729 の標的候補は 2 つの Otx ファミリーメンバー (Otx2 と Crx) を含んでいる。これらの転写因子の機能は桿体と錐体細胞両方の発生に必要なものである (Chen et al., 1997; Freund et al., 1997; Furukawa et al., 1997; Nishida et al., 2003)。哺乳類網膜において、6 つのキー転写因子 (Otx2, Crx, ROR $\beta$ , Nrl, Nr2e3) そして甲状腺ホルモン受容体  $\beta$  2) の協調的かつ正確にバランスのとれた作用は、網膜前駆体細胞の桿体もしくは錐体視細胞運命への拘束に重要であることが提唱されている (Swaroop et al., 2010)。これらの因子のうち5つで miR-726 と miR-729 の標的候補が見つかることから、これらの miRNA はキー転写因子の特異的サブセットの差次的な下方制御を通して視細胞サブタイプの発生を制御しているかもしれない。

*sine oculis* ホモログ (Six7) は miR-726 と miR-729 両方の標的候補と予測されている。ゼブラフィッシュとメダカ間での miR-729 の標的配列の保存性は予測の有効性を支持する。しかしながら視細胞発生における Six7 の役割はほとんど分かっていないことから、これらの miRNA による Six7 抑制の役割を推測することは現在のところ難しい。

上記で議論した miR-726 と miR-729 の予測標的は視細胞の発生を制御する因子であり、miRNA/錐体オプシン遺伝子対の保存されたシス調節領域 (LWS-CNR-A と SWS1-CNR- $\alpha$ ) にそれらの転写因子の結合候補配列が見つかった。たとえば、Crx と Otx2 は miR-729 の標的候補であると同時に、SWS1-CNR- $\alpha$  は Crx/Otx の高度に保存された結合配列を含んでいる。したがって、miR-726 と miR-729 は視細胞運命決定を調節するための負のフィードバックループを構成している可能性がある。

#### 5-4-2 miRNA/オプシン遺伝子対の進化的保存性

*miR-726/LWS* 遺伝子対は硬骨魚類、両生類、爬虫類で保存されている。この保存性は、祖先型の *miR-726/LWS* 遺伝子対が硬骨魚類と四足動物の共通祖先で存在したことを示す。この遺伝子対の進化的保存性は miR-726 の機能的な重要性とゲノム構造の重要性も示唆する。興味深いことに、miR-726 は鳥と哺乳類のゲノムでは見つかっておらず、miR-726 が鳥と哺乳類の系統で独立に失われたこと示唆している。LWS オプシンは最もよく保存された錐体オプシンサブクラスであり、有顎脊椎動



物のすべての綱および無顎類に存在する (Davies et al., 2012)。したがって、*miR-726/LWS* 遺伝子対は脊椎動物の進化過程において特定の細胞タイプに密接に関連する miRNA の獲得メカニズムとその役割、そして消失の研究に対してユニークなモデルを提供する。

メダカゲノムでは、*LWS-A* の上流に青色光感受性オプシン遺伝子 *SWS2-A* と紫光感受性オプシン遺伝子 *SWS2-B* が存在し、*LWS-A* の下流にもうひとつの赤色光感受性オプシン遺伝子 *LWS-B* が存在して、4 つのオプシン遺伝子がタンデムなクラスターを形成している (Matsumoto et al., 2006)。*ola-miR-726* 遺伝子は *SWS2-B* と *LWS-A* の間に位置し、最近、他の研究グループによって領域 I (Watson et al., 2010) もしくは CNE 7a (O'Qui et al., 2011) と名付けられた高度に保存された遺伝子間領域と一致する。*SWS2* と *LWS* オプシン遺伝子が同一染色体上で近接して存在するという関係性は進化的に保存されている (Wakefield et al., 2008; Watson et al., 2010)。本研究では、*SWS2* 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションによって検出することができなかつたので、*SWS2* 遺伝子と *ola-miR-726* 遺伝子の発現を直接的に比較できなかつた。メダカ網膜での錐体サブタイプの規則的に配置されたモザイクパターンから判断して、*ola-miR-726* 遺伝子はおそらく *SWS2-A* 遺伝子や *SWS2-B* 遺伝子とは共発現しない。一方で、*LWS-A* と *LWS-B* の配列がほとんど同じであり、かつそれらは同じ錐体サブタイプで発現するとみられるため、*ola-miR-726* 遺伝子が *LWS-B* 遺伝子と共発現する可能性は除外することができない (Matsumoto et al., 2006)。

*SWS1* サブクラスの視物質オプシンは無顎類からヒトまでの幅広い脊椎動物にまたがってよく保存されている (Davies et al., 2012)。それにもかかわらず、*miR-729/SWS1* 遺伝子対は硬骨魚類でしか見つかっていない。一方で、*miR-729/SWS1* 遺伝子対は硬骨魚類間で高度に保存されている。この状況は *miR-729* が短波長感受性錐体細胞の発生もしくは機能に関わる重要な硬骨魚類特異的役割を果たすことを示唆する。初期の硬骨魚類の祖先は進化的新規性として *miR-729* を獲得したのかもしれない。しかしながら、多種多様な脊椎動物種にまたがったゲノム配列の現時点での不十分さを考慮すると、*miR-729/SWS1* 遺伝子対が硬骨魚類以外の種に存在する可能性も否定できない。

#### 4-4-3 *LWS-CNR-A* および *SWS1-CNR- $\alpha$* と相互作用する転写因子

ゼブラフィッシュでは、*LWS-CNR-A* に相当する遺伝子間領域は 2 つのタンデムに

並んだ LWS 遺伝子(LWS-1 と LWS-2)の共通制御領域(LWS-activating region; LAR)として同定されている(Tsujimura et al., 2010)。2つの Otx 認識配列(A/GGATTA)と Otx 結合類似配列(TGATTA)がゼブラフィッシュの LAR には存在する。2つの Otx 認識部位は本研究で同定した、保存された Crx 部位と一致する。LWS-CNR-A と一致する領域は領域 II、もしくは CNE 7b として、硬骨魚類の LWS 遺伝子座についての最近の比較ゲノム研究によって同定されたものである(Watson et al., 2010; O'Quin et al., 2011)。これらの研究では、保存された Crx 結合部位に加え、別の高度に保存された配列が核受容体ファミリー因子の結合候補サイトとして同定されている(HRE 図 4-6C; Watson et al., 2010; O'Quin et al., 2011)。Nr2e3、TR $\beta$  2、RXR $\gamma$ 、ROR $\alpha$  そして ROR $\beta$  を含む多様な核受容体ファミリータンパク質が視細胞発生制御に関わることが知られており、これらのうち、いくつかのタンパク質はこの高度に保存された配列と相互作用する可能性がある。

#### 4-4-4 転写調節と転写後調節を共役させる装置としての mRNA-miRNA 対の双方向的なシス調節領域

本研究により、錐体オプシンをコードする遺伝子と miRNA 前駆体をコードする遺伝子が頭と頭を向かいあわせるように逆向きに配置されていることが示された。このタイプの双方向的な遺伝子配置は、ハエ(Logna et al., 1989; Horfmann et al., 1991; Herr and Harris, 2004)、ホヤ(Kusakabe et al., 1995)、哺乳類(Burdbelo et al., 1988; Adachi and Lieber, 2002; Trinklein et al., 2004)を含むさまざまな後生動物で、対をなした遺伝子の協調的な制御と関連づけられている。ヒトでは、遺伝子間領域が 1000 bp に満たない長さで、相互に逆方向に転写される遺伝子対がゲノム中の遺伝子の 10%以上を占めている(Trinklein et al., 2004)。これらのヒト遺伝子対の大半はハウスキーピングタンパク質をコードしており、それらの短い遺伝子間領域が双方向的なプロモーターであると考えられている(Adachi and Lieber, 2002; Trinklein et al., 2004)。それに比べて、*miR-726/LWS-A* 遺伝子対と *miR-729/SWS1* 遺伝子対の遺伝子間領域はそれぞれ 3.9kb と 1.1kb と相対的に長く、対をなす錐体オプシン遺伝子は高度な組織特異性がある。本研究のシス調節解析から、対をなす miRNA 遺伝子とオプシン遺伝子は各々のコア・プロモーターをもつが、遺伝子間領域に共通のエンハンサーをもつことが示唆された。このように *miRNA/オプシン* 遺伝子対のような双方向的な遺伝子構造は機能上、重要な意味をもつと考えられる。また、これらの遺伝子対は、上記のヒトで多く見いだされているよう

な遺伝子対とは別の双方向的に転写される遺伝子対のクラスをなすものと考えられる。

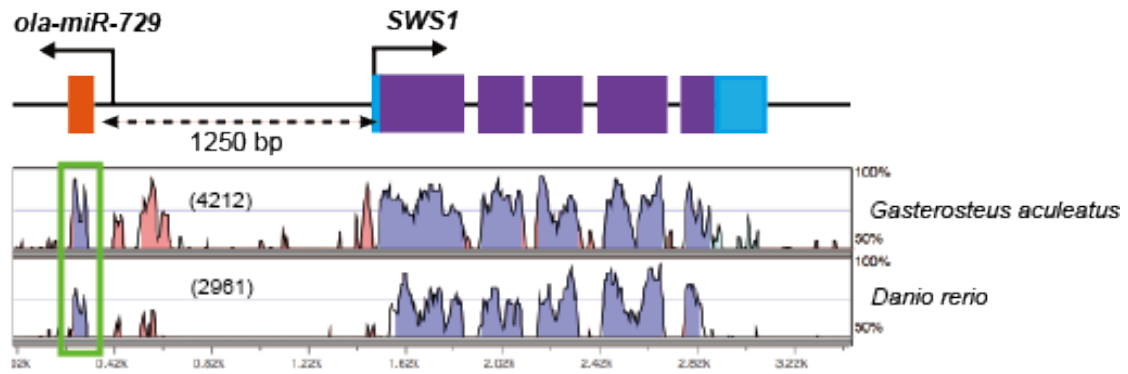
miRNA 遺伝子とタンパク質をコードした遺伝子対の双方向的な転写の例はヒトでもひとつ報告されている。*miR-34b/c* と B 細胞転位遺伝子 4 (*BTG4*) が双方向的プロモーターから転写される例である (Toyota et al., 2008)。*miR-34b/c* と *BTG4* の両者はがん抑制因子であると考えられ、したがって、それらの協調的な制御は適応的であるといえる。*miRNA/タンパク質コード* 遺伝子対の双方向的な転写は、細胞タイプの特異化やがん抑制といった特定の生物学的経路で以前から存在している転写機構を利用することによって、転写後制御メカニズムを効率的に追加するために、進化してきたのかもしれない。しかしながら、現在、このタイプの遺伝子対がどれくらい独特もしくは広凡なのか明らかではない。他の多くの生物種ゲノムからの体系的でゲノムワイドなデータ収集により、双方向的な *miRNA/タンパク質コーディング* 遺伝子対の例がさらに明らかになるものと考えられる。



**図 4-1 LWS-A の上流領域にある高度に保存された非コード配列は microRNA(miRNA)をコードする**

(A)硬骨魚類、両生類、そして爬虫類間で、VISTA(Frazer et al., 2004)を用いた LWS-A の遺伝子座のゲノム配列比較によって、高度に保存された非コード領域(緑色のボックス)が明らかになった。括弧内の数字は予測される miRNA の 3'末端からそれぞれの生物種のオプシンのコーディング配列の開始コドンまでの距離(bp)を示す。(B)この領域の塩基配列のアライメント。高度に保存された塩基をアスタリスクで、推定上の成熟 miRNA 配列は赤色で示す。(C)予測されたメダカの miRNA 配列はゼブラフィッシュの miRNA、dre-miR-726 と同一のものである(Kloosterman et al., 2006)。成熟 miRNA の 5'端から 2~8 番目の seed とよばれる配列は青色で示した。(D)RNAshapes(Steffen et al., 2006)を用いて予測した pre-ola-miR-726 のステムループ構造。

(A)



(B)

```

Oryzias      G-GATCCGTACCCTCCAGAG--CAGGGGCTGTATCATAACCAGGCTGTGAGC-T
Gasterosteus TTGATCCAT---CATCAAAG--CTGGGGCTGTATCATAACCAGTCTGGTTAT-T
Danio        AAGGGCCAT-----CCAGTGACCCGGGGTTGTATTGTAACCAAGCTGTAAGTGT
              *  *  *          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

GAACGA-GCATGGGTATGATACGACCTCAGTT-----TGGAGGAGCTCCTCCT
TTAGAA-GCATGGGTATGATACGACCTCAGTT-----TGTTGATGATTTTCTT
CCATGATGCATGGGTATGATACGACCTGGGTTACAGAATGGTGATGGACATCCT
              *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

(C)

```

ola-miR-729  1 cauggguaugauacgaccucaguu 24
              |||
dre-miR-729  1 cauggguaugauacgaccuggguu 24

```

(D)

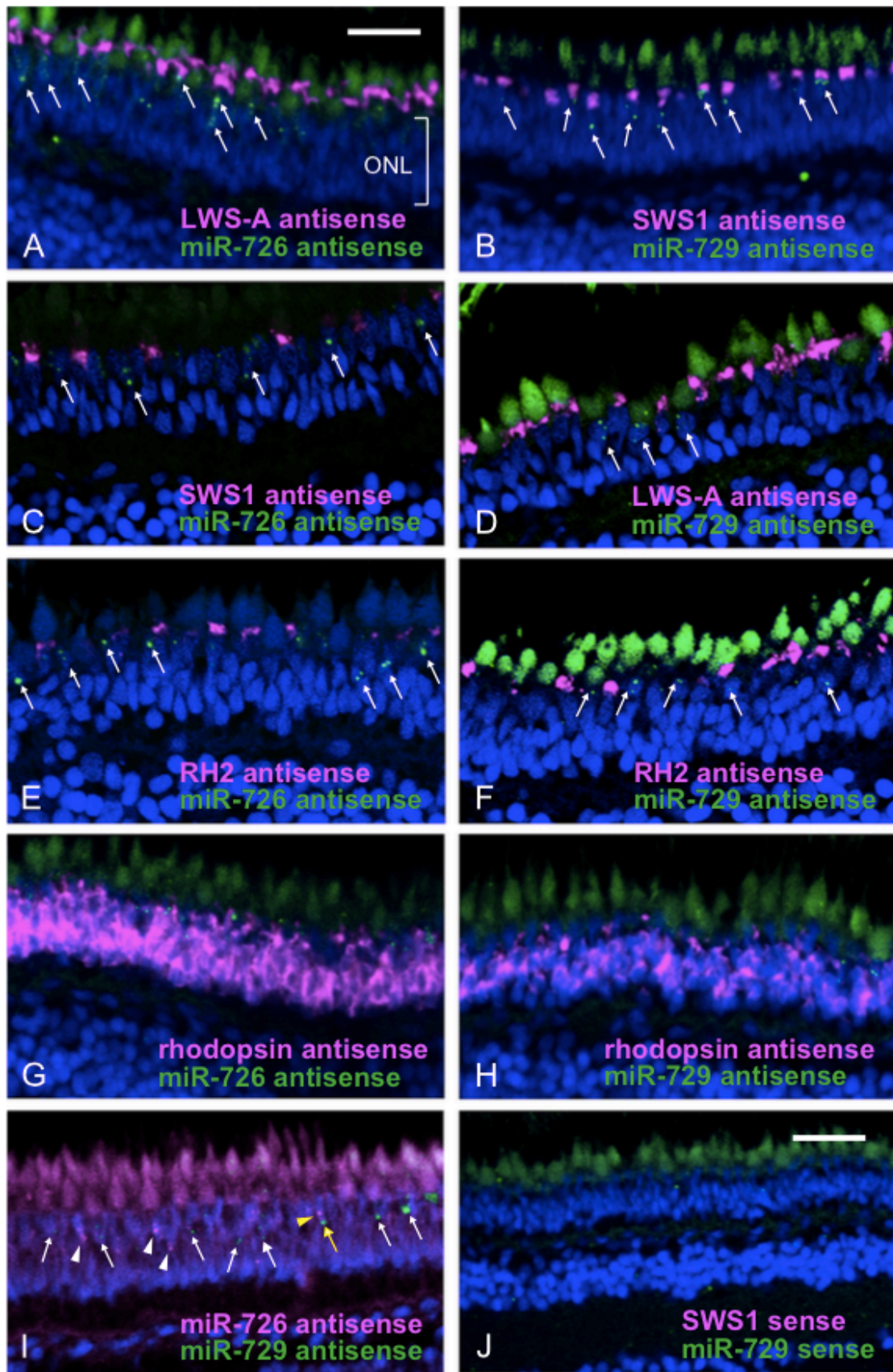
```

5'- UAC      G  A  C      A  G  GA
      CCUCCA AGC GGGG UGUAUCAUA CCA GCU-GU  G
      ||||| ||| |||| ||||| ||| ||| || C
      GGAGGU-UUG CUCC GCAUAGUAU GGU CGA CA U
3'- CGA      A  A      G  A  G  AG

```

#### 図 4-2 SWS1 の上流領域にある高度に保存された非コード領域は miRNA をコードする

(A) 硬骨魚類間での VISTA を用いた SWS1 の遺伝子座のゲノム配列比較によって、高度に保存された非コード領域(緑色のボックス)を明らかにした。括弧内の数字は予測される miRNA の 3'末端からそれぞれの種のオプシンのコーディング配列のスタートコドンまでの距離(bp)を示す。(B) 高度に保存された領域の塩基配列のアライメント。3 種間で同じ塩基をもつ部位はアスタリスクで、予測された成熟 miRNA 配列は赤色で示した。(C) 予測されたメダカの miRNA 配列はゼブラフィッシュの miRNA、dre-miR-729 に似ており(Kloosterman et al., 2006)、seed 配列は完全一致している。成熟 miRNA の 5'端から 2~8 番目の seed 配列は青色で示した。(D) RNASHapes を用いて予測した pre-ola-miR-729 のステムループ構造。





**図 5-3 *ola-miR-726* と *ola-miR-729* の一次転写産物 (pri-*ola-miR-726* と pri-*ola-miR-729*) の錐体サブタイプ特異的な発現**

pri-*ola-miR-726* の局在 (A, C, E, G) と pri-*ola-miR-729* の局在 (B, D, F, H) を、生後 3 ヶ月の成魚で赤色感受性オプシン (LWS-A) の mRNA (A, D)、UV 感受性オプシン (SWS1) の mRNA (B, C)、緑色感受性オプシン (RH2) の mRNA (E, F)、桿体細胞特異的ロドプシンの mRNA (G, H) との二重蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法によって比較した。(A, B) miRNA 一次転写産物のシグナル (緑) は錐体オプシンのシグナル (マゼンタ) の真下にそれぞれ局在する。いくつかの典型的な部分は矢印で示した。(C, E) pri-*ola-miR-726* のシグナル (緑、矢印) は UV 感受性と緑色感受性錐体細胞シグナルの真下には局在しない。(D, F) pri-*ola-miR-729* のシグナル (緑色、矢印) は赤色感受性と緑色感受性の錐体オプシンシグナルの真下には局在しない。(G, H) ロドプシン mRNA の局在 (マゼンタ) に囲まれた桿体細胞核は ONL (外顆粒層) の内側に存在し、miRNA 一次転写産物との局在 (緑) とは重ならない。(I) pri-*ola-miR-726* (マゼンタ、矢じり) と pri-*ola-miR-729* (緑、矢印) の局在を二重蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法によって比較した。(J) SWS1 (マゼンタ) と pri-*ola-miR-729* (緑) のセンスプローブを用いたコントロールである。核はすべての切片において DAPI で染色されている。錐体視細胞の外節は、miRNA 一次転写産物の検出のために感度を増強したために、バックグラウンドとしての蛍光を示す。このバックグラウンドはセンスプローブを用いた切片でも見ることができる (J)。スケールバー = 20  $\mu\text{m}$  (A-I) もしくは 30  $\mu\text{m}$  (J)。

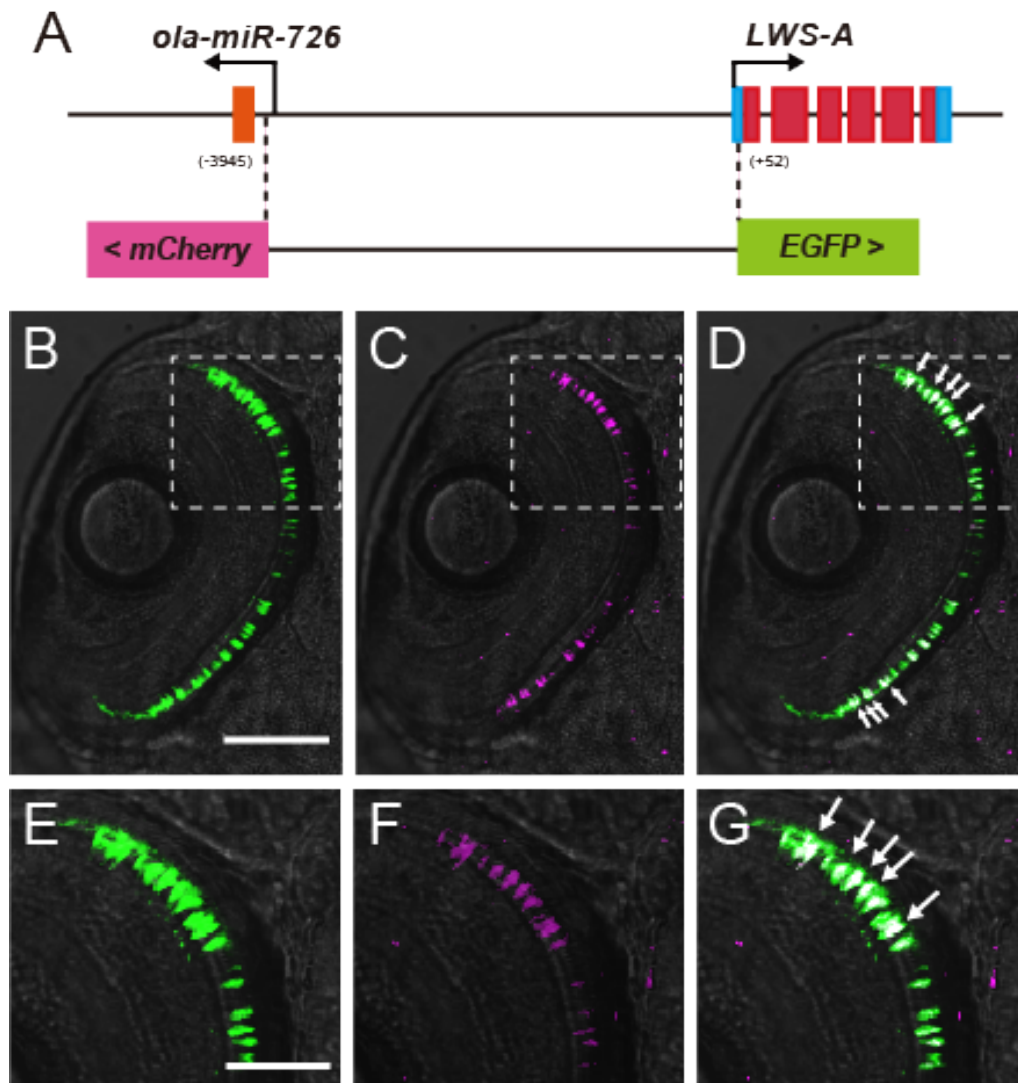


図 4-4 同一視細胞での、*ola-miR-726*と *LWS-A* の遺伝子間領域からの双方向的な転写

(A) 二重レポーターコンストラクト(*ola-miR-726*と *LWS-A* をそれぞれ mCherry と EGFP に置き換えた mCherry<*ola-miR-726\_LWS-A*>EGFP)を示した模式図。括弧内の数字は、レポーター遺伝子に連結した上流領域の末端の、*LWS-A* の転写開始点に対する位置を示している。(B-D) mCherry<*ola-miR-726\_LWS-A*>EGFP を顕微注入した8日胚の網膜視細胞での mCherry(マゼンタ、BとD)とEGFP(緑色、CとD)の共局在(矢印)。スケールバー = 100  $\mu$ m。(E-G) B-D の点線をつけた領域の高倍率像。スケールバー = 50  $\mu$ m。

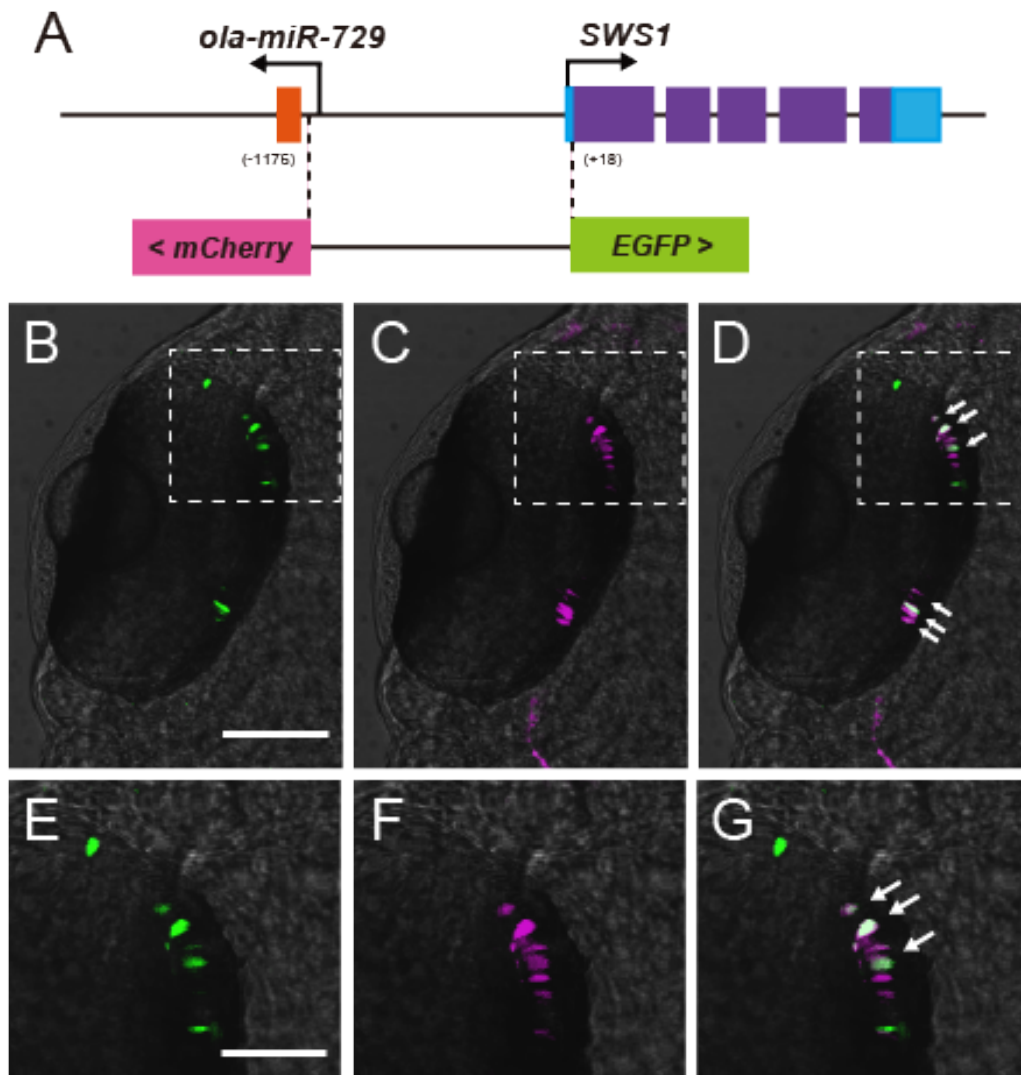


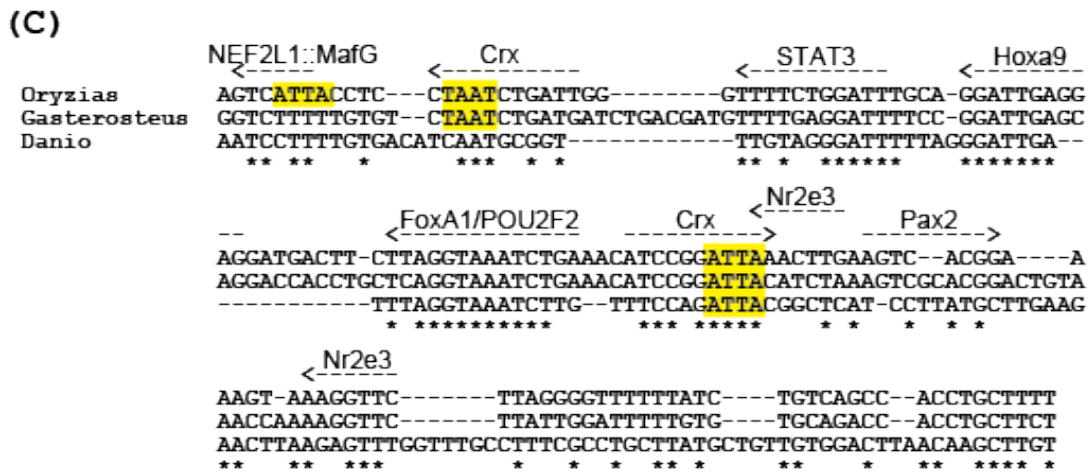
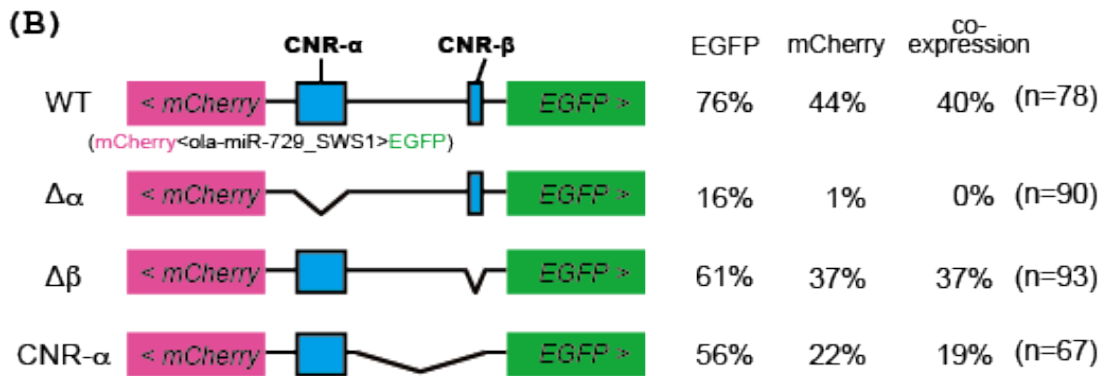
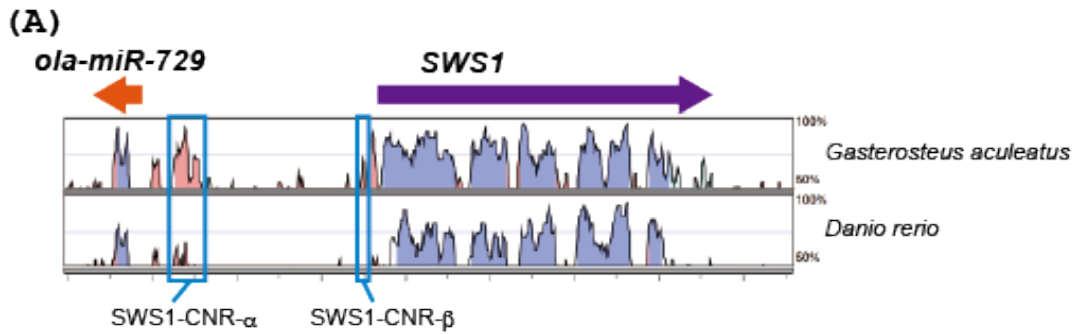
図 4-5 同一視細胞での、*ola-miR-729* と *SWS1* の遺伝子間領域からの双方向的な転写

(A) 二重レポーターコンストラクト(*ola-miR-729* と *SWS1* をそれぞれ *mCherry* と *EGFP* に置き換えた *mCherry*<*ola-miR-729\_SWS1*>*EGFP*)を示した模式図。括弧内の数字は、レポーター遺伝子に連結した上流領域の末端の *SWS1* の転写開始点に対する位置を示している。(B-D) *mCherry*<*ola-miR-729\_SWS1*>*EGFP* を顕微注射した 8 日胚の網膜視細胞での *mCherry* (マゼンタ、B と D) と *EGFP* (緑色、C と D) の共局在 (矢印)。スケールバー = 100  $\mu\text{m}$ 。(E-G) B-D の点線をつけた領域の高倍率像。スケールバー = 50  $\mu\text{m}$ 。



**図 4-6 *ola-miR-726/LWS-A* 遺伝子対の双方向的な視細胞特異的転写における保存された非コード領域 (CNR) の機能**

(A)メダカ、イトヨ、そしてフグ間での遺伝子間領域の配列保存性を示す VISTA プロファイル。3つの CNR をそれぞれ LWS-CNR-A、-B、-C と名付けた。これらの CNRに加えて、*ola-miR-726*と *LWS-A* の基本プロモーター領域も保存されている。矢印は *ola-miR-726/LWS-A* 遺伝子の転写方向を示す。(B)二重レポーターコンストラクトの構造と8日胚の視細胞でのそれらの発現頻度。野生型もしくは変異を導入した遺伝子間領域を *mCherry*と *EGFP*レポーター遺伝子に連結した(左)。マゼンタと緑色のボックスはそれぞれ *mCherry*と *EGFP* のコーディング配列を示し、青色のボックスは CNR を示している。それぞれのコンストラクトのレポーター発現をともなった胚の頻度を百分率で右に示した。「co-expression」の列は *EGFP*と *mCherry*が同一視細胞でみられた胚の割合を示す。括弧内の数字はそれぞれのコンストラクトを導入した胚の個体数を示す。(C)5種の硬骨魚類の CNR-A 領域の塩基配列のアライメント。JASPAR core database(Mathelier et al., 2014)を用いて予測されたメダカ CNR-A 内の推定上の転写因子結合部位の位置と方向を点線矢印で示した。黄色のボックスは推定上のホメオドメインタンパク質のコア配列(ATTA)(Levine and Honey, 1988; Hayashi and Scott, 1990)を示す。線で囲んだ配列は先行研究(Watson et al., 2010; O'Quin et al., 2011)でホルモン応答配列(HRE)として同定された高度保存配列である。5種間で一致した塩基をアスタリスクで示した。



#### 図 4-7 *ola-miR-729/SWS1* 遺伝子対の双方向的な視細胞特異転写における CNR の機能

(A)メダカ、イトヨ、フグ間での遺伝子間領域の配列保存性を示す VISTA プロファイル。2つの CNR をそれぞれ *SWS1*-CNR- $\alpha$  と *SWS1*-CNR- $\beta$  と名付けた。これらの CNR に加えて、*ola-miR-729* と *SWS1* の基本プロモーター領域も保存されている。矢印は *ola-miR-729/SWS1* 遺伝子の転写方向を示す。(B)二重レポーターコンストラクトの構造(左)と8日胚の視細胞でのそれらの発現頻度(右)。野生型および変異を導入した遺伝子間領域を *mCherry* と *EGFP* レポーター遺伝子に連結した(左)。マゼンタと緑色のボックスはそれぞれ *mCherry* と *EGFP* のコーディング配列を示し、青色のボックスは CNR を示している。それぞれのコンストラクトのレポーター発現をともなった胚の頻度を百分率で右に示した。「co-expression」の列は *EGFP* と *mCherry* が同一視細胞でみられた胚の割合を示す。括弧内の数字はそれぞれのコンストラクトを導入した胚の個体数を示す。(C)3種の硬骨魚類の CNR- $\alpha$  領域の塩基配列のアライメント。JASPAR core database (Mathelier et al., 2014) を用いて予測されたメダカ CNR- $\alpha$  内の推定上の転写因子結合部位の位置と方向が点線矢印で示されている。黄色のボックスは推定上のホメオドメインタンパク質のコア配列 (ATTA) (Levine and Honey, 1988; Hayashi and Scott, 1990) を示す。3 種間で一致した塩基の部位をアスタリスクで示した。

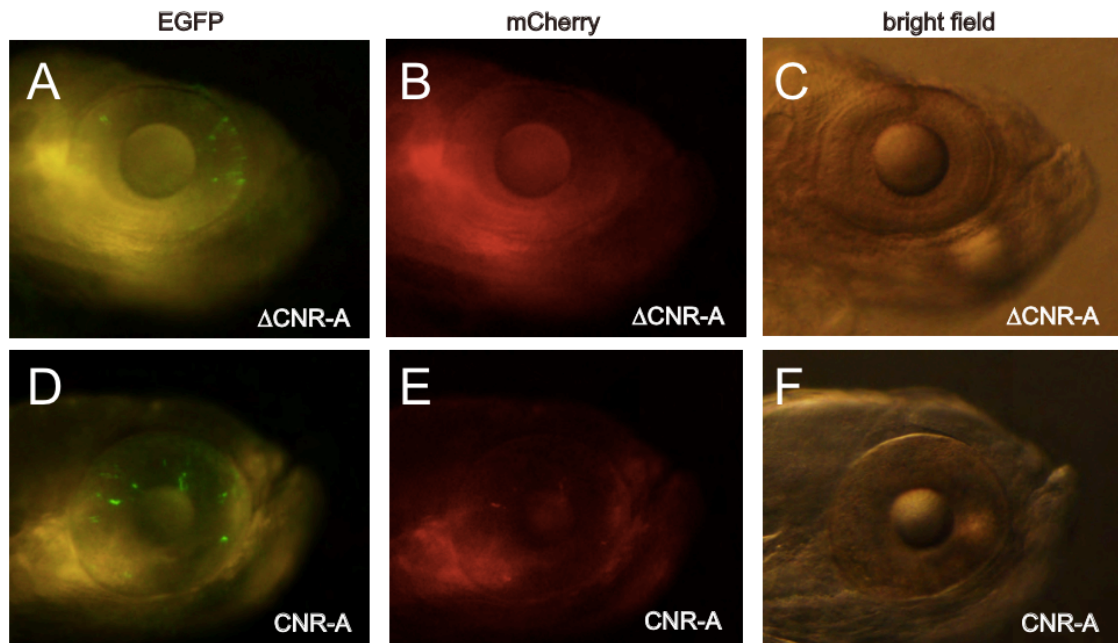


図 4-8 図 5-6B に示した二重レポーターコンストラクトの 8 日胚における蛍光レポーター発現の例

(A-C)レポーターコンストラクト“ $\Delta$ CNR-A”を顕微注入した 8 日胚。LWS-CNR-A の欠損は mCherry の発現を完全に消滅させる (B) 一方で、EGFP の発現は同じ胚の視細胞で観察される (A)。(D-F) LWS-CNR-A のみを *ola-miR-726* と LWS-A の基本プロモーターに結合したレポーターコンストラクト“CNR-A”を顕微注入した 8 日胚。EGFP (D) と mCherry (E) の発現は同一視細胞で観察された。



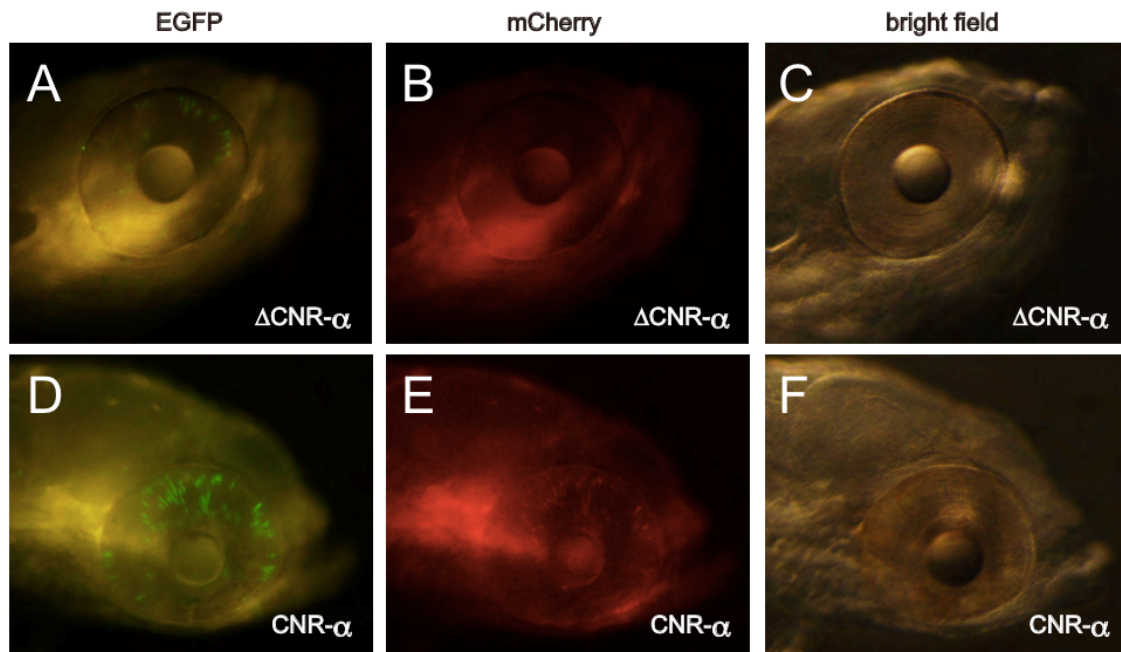


図 4-9 図 5-7B に示した二重レポーターコンストラクトの 8 日胚の蛍光レポーター発現の例

(A-C)レポーターコンストラクト“ $\Delta$ CNR- $\alpha$ ”を顕微注入した 8 日胚。SWS1-CNR- $\alpha$  の欠損は mCherry の発現を完全に消滅させる(B)一方で、EGFP 発現は同じ胚の視細胞で観察される(A)。(D-F)SWS1-CNR- $\alpha$  のみを *ola-miR-729* と SWS1 の基本プロモーターに結合したレポーターコンストラクト“CNR- $\alpha$ ”を顕微注入した 8 日胚。EGFP(D)と mCherry(E)の発現は同一視細胞で観察された。

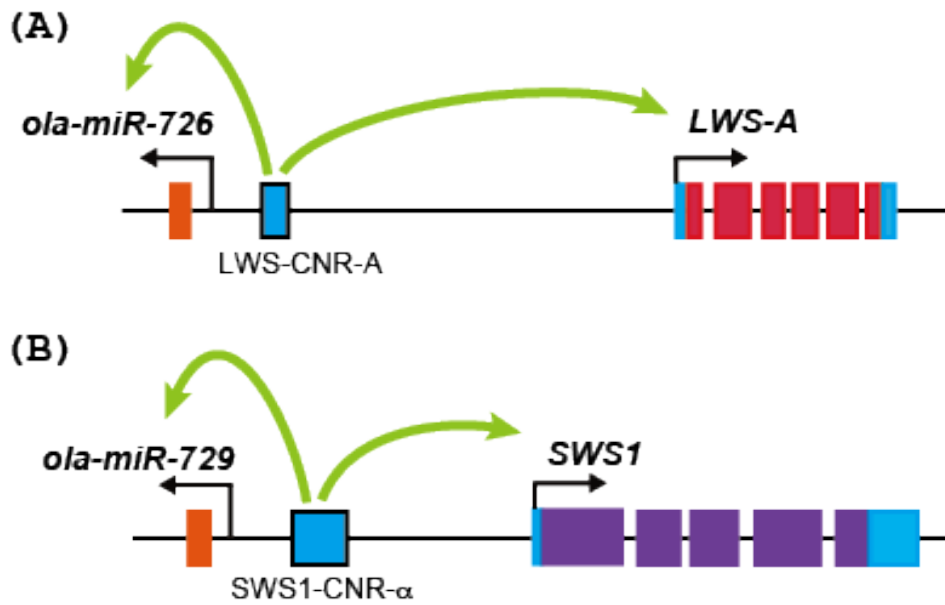


図 4-10 miRNA/オプシン遺伝子対の転写制御。

miRNA/オプシン遺伝子対の共発現は、両遺伝子が共有する上流遺伝子間領域に存在する共通のシス調節配列によって制御される。(A) *ola-miR-726* と *LWS-A* の転写は *LWS-CNR-A* によって赤色感受性錐体細胞で活性化される、(B) *ola-miR-729* と *SWS1* の転写は *SWS1-CNR-α* によって UV 感受性錐体細胞で活性化される。

(A)

Gene Symbol	Ensembl Gene ID	Description
nrl	ENSDARG00000044013	neural retina leucine zipper
thrb	ENSDARG00000021163	thyroid hormone receptor beta
six7	ENSDARG00000070107	sine oculis homeobox homolog 7
rorb	ENSDARG00000033498	RAR-related orphan receptor beta

(B)

**Nrl**

Position 1146-1153 of nrl 3' UTR 5' ...GCGGUUCAUUCGCU-**GUAGUGAA**...  
dre-miR-726 3' GGCUCAAGACGAU**CAUCACUU**

Position 3642-3648 of nrl 3' UTR 5' ...GAUUAUGCUCGCU**GUAGUGAU**...  
dre-miR-726 3' GGCUCAAGACGAU**CAUCACUU**

**ThRβ**

Position 2312-2318 of thrb 3' UTR 5' ...UAUCAGUUUUGU**GUAGUGAU**...  
dre-miR-726 3' GGCUCAAGACGAU**CAUCACUU**

Position 3461-3467 of thrb 3' UTR 5' ...AAUAAUUCAAU**CAUGAGUGAU**...  
dre-miR-726 3' GGCUCAAGACGAU-**CAUCACUU**

**Six7**

Position 1060-1066 of six7 3' UTR 5' ...ACCUCUGAAAGGAUC**UAGUGAAC**...  
dre-miR-726 3' GGCUCAAGACGAU**CAUCACUU**

Position 1437-1444 of six7 3' UTR 5' ...CUAUACUGUUGUAC**GUAGUGAA**...  
dre-miR-726 3' GGCUCAAGACGAU**CAUCACUU**

**RORβ**

Position 1012-1018 of rorb 3' UTR 5' ...AUUCCAGAU**CAGACUAGUGAAU**...  
dre-miR-726 3' GGCUCAAGACGAU**CAUCACUU**

図 4-11 TargetScanFish release 6.2 による、ゼブラフィッシュにおける miR-726 の標的候補の予測

(A) 視細胞発生の制御に関わる転写因子をコードする dre-miR-726 標的候補のリスト。(B) 予測された 3' UTR 内の標的領域(上)と miRNA(下)の組み合わせ。成熟 miRNA の 2-8 もしくは 2-7 番目の塩基と完全な一致を示している "A(アデニン)" に続く標的部位を赤で示す。標的と対をなす塩基をもつ成熟 miRNA の seed 配列を緑で示す。



## 第5章

### 総合考察

本研究では、個体レベルで細胞特異的な遺伝子発現制御機構を解析するためのモデル脊椎動物としてメダカを用いることによって、いくつかの新奇現象や分子機構の普遍性を明らかにすることに成功した。第2章と第3章では、ホヤで発見された新奇な現象がメダカを用いて、脊椎動物にもみられる現象であるかどうかを検証した。得られた結果は、これらの新奇現象に類似の現象が脊椎動物においても存在することを示している。さらに第4章では、メダカを用いて発見した新しい細胞特異性制御機構が、ひろくさまざまな脊椎動物にあてはまる普遍的な機構である可能性を示した。以下に本研究の3つの主要テーマについて、再度、総合的に考察し、モデル脊椎動物としてのメダカを用いた研究の意義について議論する。

第2章では、メダカの後脳および脊髄に GnRH 遺伝子を発現すると考えられる細胞群をみいだした(Kusakabe et al., 2012)。これらの組織では本研究以前には、どの脊椎動物においても GnRH 産生細胞は報告されていなかった。従来、GnRH のはたらきはもっぱら生殖と関連づけられてきた。視床下部ニューロンが産生し、下垂体のゴナドトロピン放出を調節する視索前野 GnRH 系以外に、2つの視床下部外 GnRH 系(終神経 GnRH 系、中脳 GnRH 系)が知られている。これらの視床下部外 GnRH は神経活動の修飾因子として感覚や行動の制御に関わると考えられているが、やはり何らかの形で生殖活動と関連づけて解釈されている(Yamamoto, 2003; Okubo and Nagahama, 2008; Oka, 2009; Kanda et al., 2010)。本研究では、当初から生殖制御にとらわれない解析を行い、これまで知られていない新奇な GnRH 系の可能性を提示することができたといえる。本研究で得られたメダカの新奇 GnRH 系と、ホヤ幼生の GnRH 系の間には高い類似性がみられる。(1)後脳(≡運動神経節)から脊髄(≡神経索)の全長にわたる GnRH 遺伝子の発現、(2)後脳から脊髄に軸索を伸ばす GnRH 遺伝子を発現する介在神経細胞、(3)沿軸筋での受容体の発現などである。相同な組織での酷似したパターンは、本研究でみいだした新奇 GnRH 系が、進化の過程で高度に保存されており、普遍的で重要なものであることを示唆している。メダカは生殖生物学の研究材料として以前から盛んに研究に用いられており、GnRH およびその受容体についても豊富な知見が蓄積されていた(Okubo et al., 2000; Okubo et al., 2001)。このようなメダカの利点と、遺伝子制御

研究に適したメダカの特徴を組み合わせたことによって得られた成果といえる。

第3章では、胚の背腹軸に沿った *Pinhead* 遺伝子と *Admp* 遺伝子の相補的な発現パターンの形成機構が脊椎動物とホヤで共通であることを、メダカを用いて明らかにした (Imai et al., 2012)。背側に限定した *Admp* 遺伝子の発現が背腹パターン形成に重要であることは、アフリカツメガエルを用いた研究などにより知られていた (Reversade and De Robertis, 2005; Gaviño and Reddien, 2011) が、その発現パターンを生み出す機構はまったく不明であった。本研究は、ゲノムがコンパクトでシス制御領域の機能解析が迅速に行えるという、ホヤとメダカに共通の利点を生かして、パターン形成の普遍的な分子機構の一端を明らかにした研究といえる。脊椎動物においてもクロマチンレベルの相互作用や転写因子群を明らかにすることによって、分子機構がどこまで生物間で共通であるか、その普遍性がどの程度なのかを明らかにすることが今後の課題である。

第4章では、脊椎動物で高度に発達した視覚、とくに色覚を担う細胞の多様性に焦点をあて、miRNA が錐体サブタイプの特異性を制御しているという新しい分子機構を提唱した (Daido et al., 2014)。網膜錐体細胞の多様性は色覚の基盤であり、その正確な制御は、ヒトを含む多くの動物の生理・生態・行動にとって非常に重要である。錐体サブタイプの制御は、マウスを用いて、転写制御と転写因子の修飾および甲状腺ホルモン作用による制御機構が示されている (Onishi et al., 2010)。しかし、錐体を2種類しかもたず色覚に乏しいマウスを用いた研究が主であり、個々の錐体サブタイプに特異的な形態と生理機能がどのように制御されているか、という重要問題は未解明である。メダカやゼブラフィッシュの網膜では波長感受性と形態が異なる4種類の錐体が規則正しく整列しており、遺伝学的解析や遺伝子機能の個体操作、および発生過程の観察が容易であることから、錐体サブタイプの決定および分化のメカニズム研究に格好のモデルといえる (Allison et al., 2010)。今後、次に述べるような、メダカの利点をさらに生かした解析を進めることにより、脊椎動物に普遍的な視細胞の多様性が生み出されるメカニズムを明らかにできることが期待される。

脊椎動物のモデル動物であるメダカは胚が透明で、発生段階における観察が容易である。本研究で行ったように、初期胚に顕微注入法によって容易に外来遺伝子を導入し、発現させることが可能である (Kusakabe et al., 1999)。また、メダカは脊椎動物のモデル動物としてよく利用されるマウスやゼブラフィッシュと比べて、遺伝子数はあまり変わらないが、ゲノムサイズが小さい (Kasahara et al., 2007)。したがっ

て、他の多くのモデル脊椎動物よりも遺伝子間距離が短く、遺伝子転写調節配列の解析に適していると考えられる。その一方で、ボディプランはマウスやヒトと基本的に同じで、組織形成過程で関わってくる遺伝子も共通のものが多い(Oliver et al., 1995; Carl et al, 2002)。さらに哺乳類とは違い、毎日のように採卵が可能であり、同タイミングで受精した卵の胚発生が同調的に進むことから、安定的な胚発生過程の研究が行える。これらの特徴から、メダカは遺伝子の転写調節機構から組織形成過程の機構を解析する上で有用なモデル動物であるといえる。

これまでマウスにおいて相同遺伝子組換えによってゲノム編集が施された ES 細胞を用いることで、標的遺伝子ノックアウト個体の作出とその遺伝子の機能を調べることが行われてきたが(Bernstein and Breitman, 1989)、その他のモデル動物でゲノム編集操作を行うことは容易ではなかった。近年 ZFN(zinc-finger nuclease)、TALEN(transcription activator-like effector nuclease)、CRISPR/Cas9といった人工ヌクレアーゼを用いることで様々な生物種でのゲノム編集が可能になってきた(Carroll, 2011; Joung and Sander, 2013; Le Cong et al., 2013; Terns and Terns, 2014)。これらの人工ヌクレアーゼの中でも第2世代、第3世代に位置付けられるTALEN と CRISPR/Cas9 がメダカに適用され、容易かつ効率的なゲノム編集が可能となった(Ansai et al., 2013; Ansai and Kinoshita, 2014)。これらの新たな技術を用いることで、本研究で見いだした新奇現象の背後にある詳細な分子機構を明らかにできることが期待される。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、研究における環境整備、熱心な御指導御鞭撻をいただいた生物学科発生学研究室 日下部岳広 教授に心より深く御礼申し上げます。また、共焦点レーザー顕微鏡の使用にあたり便宜をはかって下さいました生物学科生体調節学研究室 久原篤 准教授に心より御礼申し上げます。

卒業研究を開始した時から徹底した基礎実験の指導をしていただいた OIST の西辻光希氏、顕微注入技術の習得において適切な指導をしていただいたカリフォルニア工科大学の谷沙織氏、実験手法に対する有意義なディスカッションをして頂いた島井光太郎氏、バイオインフォマティクス解析に協力して下さった濱西桜子氏、当研究室における卒業研究としてメダカ GnRH および GnRH 受容体の発現解析に協力して下さった瀧川徹氏にも御礼申し上げます。

生物の飼育等でお世話になった宮本由紀さん、寺島泰子さん、そして発生学研究室の後輩の皆様にも御礼を申し上げます。

また今回、共同研究のお誘いを頂き、貴重な体験をさせていただいた京都大学の佐藤ゆたか 准教授と大阪大学大学院の今井(佐藤)薫 准教授にも御礼申し上げます。

最後になりましたが、私の研究生活に反対することなく、あらゆる面において応援してくれた両親と家族に対して、改めて感謝いたします。



## 引用文献

Abraham, E., Palevitch, O., Ijiri, S., Du, S. J., Gothilf, Y., Zohar, Y., 2008. Early development of forebrain gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurons and the role of GnRH as an autocrine migration factor. *J Neuroendocrinol.* 20, 394–405.

Adachi, N., Lieber, M. R., 2002. Bidirectional gene organization: a common architectural feature of the human genome. *Cell* 109, 807–809.

Adams, B. A., Tello, J. A., Erchegeyi, J., Warby, C., Hong, D. J., Akinsanya, K. O., Mackie, G. O., Vale, W., Rivier, J. E., Sherwood, N. M., 2003. Six novel gonadotropin-releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology* 144, 1907–1919.

Akimoto, M., Cheng, H., Zhu, D., Brzezinski, J. A., Khanna, R., Filippova, E., Oh, E. C. T., Jing, Y., Linares, J.L., Brooks, M., Zarepari, S., Mears, A. J., Hero, A., Glaser, T., Swaroop, A., 2006. Targeting of GFP to newborn rods by *Nrl* promoter and temporal expression profiling of flow-sorted photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3890–3895.

Albertson, A. J., Talbott, H., Wang, Q., Jensen, D., Skinner, D. C., 2008. The gonadotropin-releasing hormone type I receptor is expressed in the mouse cerebellum. *Cerebellum* 7, 379–384.

Allison, W. T., Barthel, L. K., Skebo, K.M., Takechi, M., Kawamura, S., Raymond, P. A., 2010. Ontogeny of cone photoreceptor mosaics in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 518, 4182–4195.

Alvarez-Delfin, K., Morris, A. C., Snelson, C. D., Gamse, J. T., Gupta, T., Marlow, F. L., Mullins, M. C., Burgess, H. A., Granato, M., Fadool, J. M., 2009. *Tbx2b* is required for ultraviolet photoreceptor cell specification during zebrafish retinal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 2023–2028.

Alvarez-Delfin, K., 2011. Transcriptional Regulation of Photoreceptor Development in the Zebrafish Retina. Electronic Theses, Treatises and Dissertations. Paper 4597. Florida State University. <http://diginole.lib.fsu.edu/etd/4597>

Ambros, V., 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350–355.

Ansai, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., Ariga, H., Uemura, N., Takahashi, R., Kinoshita, M., 2013. Efficient targeted mutagenesis in medaka using custom-designed transcription activator-like effector nucleases. *Genetics* 193, 739–749

Ansai, S., Kinoshita, M., 2014. Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka. *Biol. Open* 3, 362–371

Applebury, M. L., Farhangfar, F., Glösmann, M., Hashimoto, K., Kage, K., Robbins, J. T., Shibusawa, N., Wondisford, F. E., Zhang, H., 2007. Transient expression of thyroid hormone nuclear receptor TR $\beta$  2 sets S opsin patterning during cone photoreceptor genesis. *Dev. Dyn.* 236, 1203–1212.

Bartel, D. P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.

Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.

Bernstein, A., Breitman, M., 1989. Genetic ablation in transgenic mice. *Mol. Biol. Med.* 6, 523–530

Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E. T., Thurman, R. E., Kuehn, M. S., Taylor, C. M., Neph, S., Koch, C. M., Asthana, S., Malhotra, A.,

Adzhubei, I., Greenbaum, J. A., Andrews, R. M., Flicek, P., Boyle, P. J., Cao, H., Carter, N. P., Clelland, G. K., Davis, S., Day, N., Dhami, P., Dillon, S. C., Dorschner, M. O., Fiegler, H., Giresi, P. G., Goldy, J., Hawrylycz, M., Haydock, A., Humbert, R., James, K. D., Johnson, B. E., Johnson, E. M., Frum, T. T., Rosenzweig, E. R., Karnani, N., Lee, K., Lefebvre, G. C., Navas, P. A., Neri, F., Parker, S. C., Sabo, P. J., Sandstrom, R., Shafer, A., Vetric, D., Weaver, M., Wilcox, S., Yu M., Collins, F. S., Dekker, J., Lieb, J. D., Tullius, T. D., Crawford, G. E., Sunyaev, S., Noble, W. S., Dunham, I., Denoeud, F., Reymond, A., Kapranov, P., Rozowsky, J., Zheng, D., Castelo, R., Frankish, A., Harrow, J., Ghosh, S., Sandelin, A., Hofacker, I. L., Baertsch, R., Keefe, D., Dike, S., Cheng, J., Hirsch, H. A., Sekinger, E. A., Lagarde, J., Abril, J. F., Shahab, A., Flamm, C., Fried, C., Hackermüller, J., Hertel, J., Lindemeyer, M., Missal, K., Tanzer, A., Washietl, S., Korb, J., Emanuelsson, O., Pedersen, J. S., Holroyd, N., Taylor, R., Swarbreck, D., Matthews, N., Dickson, M. C., Thomas, D. J., Weirauch, M. T., Gilbert, J., Drenkow, J., Bell, I., Zhao, X., Srinivasan, K. G., Sung, W. K., Ooi, H. S., Chiu, K. P., Foissac, S., Alioto, T., Brent, M., Pachter, L., Tress, M. L., Valencia, A., Choo, S. W., Choo, C. Y., Ucla, C., Manzano, C., Wyss, C., Cheung, E., Clark, T. G., Brown, J. B., Ganesh, M., Patel, S., Tammana, H., Chrast, J., Henrichsen, C. N., Kai, C., Kawai, J., Nagalakshmi, U., Wu, J., Lian, Z., Lian, J., Newburger, P., Zhang, X., Bickel, P., Mattick, J. S., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Weissman, S., Hubbard, T., Myers, R. M., Rogers, J., Stadler, P. F., Lowe, T. M., Wei, C. L., Ruan, Y., Struhl, K., Gerstein, M., Antonarakis, S. E., Fu, Y., Green, E. D., Karaöz, U., Siepel, A., Taylor, J., Liefer, L. A., Wetterstrand, K. A., Good, P. J., Feingold, E. A., Guyer, M. S., Cooper, G. M., Asimenos, G., Dewey, C. N., Hou, M., Nikolaev, S., Montoya-Burgos, J. I., Löytynoja, A., Whelan, S., Pardi, F., Massingham, T., Huang, H., Zhang, N. R., Holmes, I., Mullikin, J. C., Ureta-Vidal, A., Paten, B., Srinivasan, M., Church, D., Rosenbloom, K., Kent, W. J., Stone, E. A., Batzoglou, S., Goldman, N., Hardison, R. C., Haussler, D., Miller, W., Sidow, A., Trinklein, N. D., Zhang, Z. D., Barrera, L., Stuart, R., King, D. C., Ameer, A., Enroth, S., Bieda, M. C., Kim, J., Bhinge, A. A., Jiang, N., Liu, J., Yao, F., Vega, V. B., Lee, C. W., Ng, P., Shahab, A., Yang, A., Moqtaderi, Z., Zhu, Z., Xu, X., Squazzo, S., Oberley, M. J., Inman, D., Singer, M. A., Richmond, T. A., Munn, K. J., Rada-Iglesias, A.,

Wallerman, O., Komorowski, J., Fowler, J. C., Couttet, P., Bruce, A. W., Dovey, O. M., Ellis, P. D., Langford, C. F., Nix, D. A., Euskirchen, G., Hartman, S., Urban, A. E., Kraus, P., Van, Calcar, S., Heintzman, N., Kim, T. H., Wang, K., Qu, C., Hon, G., Luna, R., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., Aldred, S. F., Cooper, S. J., Halees, A., Lin, J. M., Shulha, H. P., Zhang, X., Xu, M., Haidar, J. N., Yu, Y., Ruan, Y., Iyer, V. R., Green, R. D., Wadelius, C., Farnham, P. J., Ren, B., Harte, R. A., Hinrichs, A. S., Trumbower, H., Clawson, H., Hillman-Jackson, J., Zweig, A. S., Smith, K., Thakkapallayil, A., Barber, G., Kuhn, R. M., Karolchik, D., Armengol, L., Bird, C. P., de, Bakker, P. I., Kern, A. D., Lopez-Bigas, N., Martin, J. D., Stranger, B. E., Woodroffe, A., Davydov, E., Dimas, A., Eyraes, E., Hallgrímsson, I. B., Huppert, J., Zody, M. C., Abecasis, G. R., Estivill, X., Bouffard, G. G., Guan, X., Hansen, N. F., Idol, J. R., Maduro, V. V., Maskeri, B., McDowell, J. C., Park, M., Thomas, P. J., Young, A. C., Blakesley, R. W., Muzny, D. M., Sodergren, E., Wheeler, D. A., Worley, K. C., Jiang, H., Weinstock, G. M., Gibbs, R. A., Graves, T., Fulton, R., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Clamp, M., Cuff, J., Gnerre, S., Jaffe, D. B., Chang, J. L., Lindblad-Toh, K., Lander, E. S., Koriabine, M., Nefedov, M., Osoegawa, K., Yoshinaga, Y., Zhu, B., de, Jong, P. J., 2007. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799-816.

Bowmaker, J. K., 2008. Evolution of vertebrate visual pigments. *Vision Res.* 48, 2022–2041.

Buchanan, J. T., 1999. Commissural interneurons in rhythm generation and intersegmental coupling in the lamprey spinal cord. *J. Neurophysiol.* 81, 2037–2045.

Burbelo, P. D., Martin, G. R., Yamada, Y., 1988.  $\alpha 1(IV)$  and  $\beta 2(IV)$  collagen genes are regulated by a bidirectional promoter and a shared enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9679–9682.

Carl, M., Loosli, F., Wittbrodt, J., 2002. Six3 inactivation reveals its essential role for the formation and patterning of the vertebrate eye. *Development* 129,

4057–4063.

Carroll, D., 2011. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* 188, 773–782.

Chen, C. C., Fernald, R. D., 2006. Distribution of two gonadotropin-releasing hormone receptor types in a cichlid fish suggest functional specialization. *J. Comp. Neurol.* 495, 314–323.

Chen, J., Rattner, A., Nathans, J., 2005. The rod photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 represses transcription of multiple cone-specific genes. *J. Neurosci.* 25, 118–129.

Chen, S., Wang, Q. L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Zack, D. J., 1997. Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* 19, 1017–1030.

Cheng, H., Khanna, H., Oh, E.C., Hicks, D., Mitton, K.P., Swaroop, A., 2004. Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1563–1575.

Chiba, S., Sasaki, A., Nakayama, A., Takamura, K., Satoh, N., 2004. Development of *Ciona intestinalis* juveniles (through 2nd ascidian stage). *Zool. Sci.* 21, 285–298.

Cloney, R. A., 1982. Ascidian larvae and the events of metamorphosis. *Am. Zool.* 22, 817–826.

Dale, N., 1985. Reciprocal inhibitory interneurons in the *Xenopus* embryo spinal cord. *J. Physiol.* 363, 61–70.

Damiani, D., Alexander, J. J., O'Rourke, J. R., McManus, M., Jadhav, A. P.,

Cepko, C. L., Hauswirth, W. W., Harfe, B. D., Strettoi, E., 2008. *Dicer* inactivation leads to progressive functional and structural degeneration of the mouse retina. *J. Neurosci.* 28, 4878–4887.

Daniele, L. L., Lillo, C., Lyubarsky, A. L., Nikonov, S. S., Philp, N., Mears, A. J., Swaroop, A., Williams, D. S., Pugh, E. N., Jr., 2005. Cone-like morphological, molecular, and electrophysiological features of the photoreceptors of the *Nrl* knockout mouse. *Invest. Ophthalmol, Vis. Sci.* 46, 2156–2167.

Davies, W. I., Collin, S. P., Hunt, D. M., 2012. Molecular ecology and adaptation of visual photopigments in craniates. *Mol. Ecol.* 21, 3121–3158.

Davis, N., Mor, E., Ashery-Padan, R., 2011. Roles for *Dicer1* in the patterning and differentiation of the optic cup neuroepithelium. *Development* 138, 127–138.

Dehal, P., Satou Y., Campbell, R. K., Chapman, J., Degnan, B., De, Tomaso, A., Davidson, B., Di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D. M., Harafuji, N., Hastings, K. E., Ho, I., Hotta, K., Huang, W., Kawashima, T., Lemaire, P., Martinez, D., Meinertzhagen, I. A., Necula, S., Nonaka, M., Putnam, N., Rash, S., Saiga, H., Satake, M., Terry, A., Yamada, L., Wang, H. G., Awazu, S., Azumi, K., Boore, J., Branno, M., Chin-Bow, S., DeSantis, R., Doyle, S., Francino, P., Keys, D. N., Haga, S., Hayashi, H., Hino, K., Imai, K. S., Inaba, K., Kano, S., Kobayashi, K., Kobayashi, M., Lee, B. I., Makabe, K. W., Manohar, C., Matassi, G., Medina, M., Mochizuki, Y., Mount, S., Morishita, T., Miura, S., Nakayama, A., Nishizaka, S., Nomoto, H., Ohta, F., Oishi, K., Rigoutsos, I., Sano, M., Sasaki, A., Sasakura, Y., Shoguchi, E., Shin-i, T., Spagnuolo, A., Stainier, D., Suzuki, M. M., Tassy, O., Takatori, N., Tokuoka, M., Yagi, K., Yoshizaki, F., Wada, S., Zhang, C., Hyatt, P. D., Larimer, F., Detter, C., Doggett, N., Glavina, T., Hawkins, T., Richardson, P., Lucas, S., Kohara, Y., Levine, M., Satoh, N., Rokhsar, D. S., 2002. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 298, 2157–2167.

Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D., Philippe, H., 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relative of vertebrates. *Nature* 439, 965–968.

Dickmeis, T., Rastegar, S., Aanstad, P., Clark, M., Fischer, N., Korzh, V., Strähle, U., 2001. Expression of the anti-dorsalizing morphogenetic protein gene in the zebrafish embryo. *Dev. Genes Evol.* 211, 568–572.

Dolan, S., Evans, N. P., Richter, T. A., Nolan, A. M., 2003. Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor in sheep spinal cord. *Neurosci. Lett.* 346, 120–122.

Dosch, R., Niehrs, C., 2000. Requirement for anti-dorsalizing morphogenetic protein in organizer patterning. *Mech. Dev.* 90, 195–203.

Dufour, H. D., Chettouh, Z., Deyts, C., de Rosa, R., Goridis, C., Joly, J. S., Brunet, J. F., 2006. Precranial origin of cranial motoneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8727–8732.

Eri, R., Arnold, J. M., Hinman, V. F., Green, K. M., Jones, M. K., Degnan, B. M., Lavin, M. F., 1999. Hemps, a novel EGF-like protein, plays a central role in ascidian metamorphosis. *Development* 126, 5809–5818.

Fernald, R. D., 2009. Gonadotropin-releasing hormone receptors: Where did they come from? *Endocrinology* 150, 2507–2508.

Flanagan, C. A., Chen, C. C., Coetsee, M., Mamputha, S., Whitlock, K. E., Bredenkamp, N., Grosenick, L., Fernald, R. D., Illing, N., 2007. Expression, structure, function, and evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors GnRH-R1SHS and GnRH-R2PEY in the teleost, *Astatotilapia burtoni*. *Endocrinology* 148, 5060–5071.

Forrest, D., Swaroop, A., 2012. The role of nuclear receptors in photoreceptor

differentiation and disease. *Mol. Endocrinol.* 26, 905–915.

Frazer, K. A., Pachter, L., Poliakov, A., Rubin, E. M., Dubchak, I., 2004. VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* 32, W273–W279.

Freund, C. L., Gregory-Evans, C. Y., Furukawa, T., Papaioannou, M., Looser, J., Ploder, L., Bellingham, J., Ng, D., Herbrick, J. A., Duncan, A., Scherer, S. W., Tsui, L. C., Loutradis-Anagnostou, A., Jacobson, S. G., Cepko, C. L., Bhattacharya, S. S., McInnes, R. R., 1997. Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell* 91, 543–553.

Furukawa, T., Morrow, E. M., Cepko, C. L., 1997. Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91, 531–541.

Gaviño, M. A., Reddien, P. W., 2011. A Bmp/Admp regulatory circuit controls maintenance and regeneration of dorsal-ventral polarity in planarians. *Curr. Biol.* 21, 294–299. doi: 10.1016/j.cub.2011.01.017.

Georgi, S. A., Reh, T. A., 2010. Dicer is required for the transition from early to late progenitor state in the developing mouse retina. *J. Neurosci.* 30, 4048–4061.

Glaschke, A., Weiland, J., Del Turco, D., Steiner, M., Peichl, L., Glösmann, M., 2011. Thyroid hormone controls cone opsin expression in the retina of adult rodents. *J. Neurosci.* 31, 4844–4851.

Gosgnach, S., Lanuza, G. M., Butt, S. J., Saueressig, H., Zhang, Y., Velasquez, T., Riethmacher, D., Callaway, E. M., Kiehn, O., Goulding, M., 2006. V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. *Nature* 440, 215–219.



Grillner, S., Parker, D., el Manira, A., 1998. Vertebrate locomotion—a lamprey perspective. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 860, 1–18.

Grillo, G., Turi, A., Licciulli, F., Mignone, F., Liuni, S., Banfi, S., Gennarino, V. A., Horner, D. S., Pavesi, G., Picardi, E., Pesole, G., 2010. UTRdb and UTRsite (RELEASE 2010): a collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 38, D75–D80.

Hayashi, S., Scott, M. P., 1990. What determines the specificity of action of *Drosophila* homeodomain proteins? *Cell* 63, 883–894.

Herr, D. R., Harris, G. L., 2004. Close head-to-head juxtaposition of genes favors their coordinate regulation in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.* 572, 147–153.

Higashijima, S., Masino, M.A., Mandel, G., Fetcho, J.R., 2004. *Engrailed-1* expression marks a primitive class of inhibitory spinal interneuron. *J. Neurosci.* 24, 5827–5839.

Hisatomi, O., Satoh, T., Tokunaga, F., 1997. The primary structure and distribution of killifish visual pigments. *Vision Res.* 37, 3089–3096.

Hisatomi, O., Tokunaga, F., 2002. Molecular evolution of proteins involved in vertebrate phototransduction. *Comp. Biochem. Physiol. B* 133, 509–522.

Hofmann, A., Garfinkel, M. D., Meyerowitz, E. M., 1991. *cis*-Acting sequences required for expression of the divergently transcribed *Drosophila melanogaster* *Sgs-7* and *Sgs-8* glue protein genes. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2971–2979.

Horie, T., Sakurai, D., Ohtsuki, H., Terakita, A., Shichida, Y., Usukura, J., Kusakabe, T., Tsuda, M., 2008. Pigmented and nonpigmented ocelli in the brain vesicle of the ascidian larva. *J. Comp. Neurol.* 509, 88–102.

Horie, T., Nakagawa, M., Sasakura, Y., Kusakabe, T. G., Tsuda, M., 2010. Simple motor system of the ascidian larva: neuronal complex comprising putative cholinergic neurons and GABAergic/glycinergic neurons. *Zool. Sci.* 27, 181–190.

Horie, T., Shinki, R., Ogura, Y., Kusakabe, T. G., Satoh, N., Sasakura, Y., 2011. Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells that form the adult nervous system. *Nature* 469, 525–528.

Howard, M. L., Davidson, E. H., 2004. *cis*-Regulatory control circuits in development. *Dev. Biol.* 271, 109–118.

Ikuta, T., Saiga, H., 2007. 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.

Imai, K. S., Satoh, N., Satou, Y., 2002. Region specific gene expressions in the central nervous system of the ascidian embryo. *Gene Expr. Patterns* 2, 319–321.

Imai, K. S., Hino, K., Yagi, K., Satoh, N., Satou, Y., 2004. Gene expression profiles of transcription factors and signaling molecules in the ascidian embryo: towards a comprehensive understanding of gene networks. *Development* 131, 4047–4058.

Imai, K. S., Levine, M., Satoh, N., Satou, Y., 2006. Regulatory blueprint for a chordate embryo. *Science* 312, 1183–1187.

Imai, K.S., Daido, Y., Kusakabe, T. G., Satou, Y., 2012. *Cis*-acting transcriptional repression establishes a sharp boundary in chordate embryos. *Science* 337, 964–967.

Inada, K., Horie, T., Kusakabe, T., Tsuda, M., 2003. Targeted knockdown of an opsin gene inhibits the swimming behaviour photoresponse of ascidian larvae. *Neurosci. Lett.* 347, 167–170.

Iwamatsu, T., 1994. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.* 11, 825–839.

Janssen, S., Giegerich, R., 2014. The RNA shapes studio. *Bioinformatics* pii, btu649

Jia, L., Oh, E. C., Ng, L., Srinivas, M., Brooks, M., Swaroop, A., Forrest, D., 2009. Retinoid-related orphan nuclear receptor ROR is an early-acting factor in rod photoreceptor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 17534–17539.

Joubin, K., Stern C. D., 1999. Molecular interactions continuously define the organizer during the cell movements of gastrulation. *Cell* 98, 559–571.

Joung, J. K., Sander, J. D., 2013. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 49–55.

Kanaho, Y., Enomoto, M., Endo, D., Maehiro, S., Park, M. K., Murakami, S., 2009. Neurotrophic effect of gonadotropin-releasing hormone on neurite extension and neuronal migration of embryonic gonadotropin-releasing hormone neurons in chick olfactory nerve bundle culture. *J. Neurosci. Res.* 87, 2237–2244.

Kanda, S., Nishikawa, K., Karigo, T., Okubo, K., Isomae, S., Abe, H., Kobayashi, D., Oka, Y., 2010. Regular pacemaker activity characterizes gonadotropin-releasing hormone 2 neurons recorded from green fluorescent protein-transgenic medaka. *Endocrinology* 151, 695–701.

Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., Jindo, T., Kobayashi, D., Shimada, A.,

Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., Shimizu, N., Hashimoto, S., Yang, J., Lee, Y., Matsushima, K., Sugano, S., Sakaizumi, M., Narita, T., Ohishi, K., Haga, S., Ohta, F., Nomoto, H., Nogata, K., Morishita, T., Endo, T., Shin-I, T., Takeda, H., Morishita, S., Kohara, Y., 2007. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* 447, 714-719.

Kefalov, V. J., 2012. Rod and cone visual pigments and phototransduction through pharmacological, genetic, and physiological approaches. *J. Biol. Chem.* 287, 1635–1641.

Kloosterman, W. P., Steiner, F. A., Berezikov, E., de Bruijn, E., van de Belt, J., Verheul, M., Cuppen, E., Plasterk, R. H., 2006. Cloning and expression of new microRNAs from zebrafish. *Nucleic Acids Res.* 34, 2558–2569.

Kusakabe, T., 2005. Decoding *cis*-regulatory systems in ascidians. *Zool. Sci.* 22, 129–146.

Kusakabe, R., Kusakabe, T., Suzuki, N., 1999. In vivo analysis of two striated muscle actin promoters reveals combinations of multiple regulatory modules required for skeletal and cardiac muscle-specific gene expression. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 541–554.

Kusakabe, T., Hikosaka, A., Satoh, N., 1995. Coexpression and promoter function in two muscle actin gene complexes of different structural organization in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Dev. Biol.* 169, 461–472.

Kusakabe, T., Suzuki, N., 2000. Photoreceptors and olfactory cells express the same retinal guanylyl cyclase isoform in medaka: visualization by promoter transgenics. *FEBS Lett.* 483, 143–148.

Kusakabe, T., Mishima, S., Shimada, I., Kitajima, Y., Tsuda, M., 2003. Structure, expression, and cluster organization of genes encoding gonadotropin-releasing

hormone receptors found in the neural complex of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Gene* 322, 77–84.

Kusakabe, T., Tsuda, M., 2007. Photoreceptive systems in ascidians. *Photochem. Photobiol.* 83, 248–252.

Larhammar, D., Nordström, K., Larsson, T. A., 2009. Evolution of vertebrate rod and cone phototransduction genes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 364, 2867–2880.

Le Cong et al., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.

Lele, Z., Nowak, M., Hammerschmidt, M., 2001. Zebrafish *admp* is required to restrict the size of the organizer and to promote posterior and ventral development. *Dev. Dyn.* 222, 681–687.

Lemaire, P., Smith, W. C., Nishida, H., 2008. Ascidians and the plasticity of the chordate developmental program. *Curr. Biol.* 18, R620–631.

Levine, M., Hoey, T., 1988. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* 55, 537–540.

Lewis, B. P., Burge, C. B., Bartel, D. P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.

Li, S. C., Chan, W. C., Ho, M. R., Tsai, K. W., Hu, L. Y., Lai, C. H., Hsu, C. N., Hwang, P. P., Lin, W. C., 2010. Discovery and characterization of medaka miRNA genes by next generation sequencing platform. *BMC Genomics* 11, Suppl. 4, S8.

Li, W. C., Higashijima, S., Parry, D. M., Roberts, A., Soffe, S. R., 2004. Primitive

roles for inhibitory interneurons in developing frog spinal cord. *J. Neurosci.* 24, 5840–5848.

Logan, S. K., Garabedian, M. J., Wensink, P. C., 1989. DNA regions that regulate the ovarian transcriptional specificity of *Drosophila* yolk protein genes. *Genes Dev.* 3, 1453–1461.

Lu, A., Ng, L., Ma, M., Kefas, B., Davies, T. F., Hernandez, A., Chan, C. C., Forrest, D., 2009. Retarded developmental expression and patterning of retinal cone opsins in hypothyroid mice. *Endocrinology* 150, 1536–1544.

Lumayag, S., Haldin, C. E., Corbett, N. J., Wahlin, K. J., Cowan, C., Turturro, S., Larsen, P. E., Kovacs, B., Witmer, P. D., Valle, D., Zack, D. J., Nicholson, D. A., Xu, S., 2013. Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, E507–E516.

Mackie, G. O., Wyeth, R. C., 2000. Conduction and coordination in deganglionated ascidians. *Can. J. Zool.* 78, 1626–1639.

Mackie, G. O., Singla, C. L., 2004. Cupular organs in two species of *Corella* (Tunicata: Ascidiacea). *Invertebr. Biol.* 123, 269–281.

Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., Collins, F. S., 1991. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 19, 1154.

Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A. W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., Arenillas, D. J., Buchman, S., Chen, C. -y., Chou, A., Ienasescu, H., Lim, J., Shyr, C., Tan, G., Zhou, M., Lenhard, B., Sandelin, A., Wasserman, W. W., 2014. JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 42, D142–D147.

Matsumoto, Y., Fukamachi, S., Mitani, H., Kawamura, S., 2006. Functional

characterization of visual opsin repertoire in Medaka (*Oryzias latipes*). *Gene* 371, 268–278.

McIlvain, V. A., Knox, B. E., 2007. Nr2e3 and Nrl can reprogram retinal precursors to the rod fate in *Xenopus* retina. *Dev. Dyn.* 236, 1970–1979.

Mears, A. J., Kondo, M., Swain, P. K., Takada, Y., Bush, R. A., Saunders, T. L., Sieving, P. A., Swaroop, A., 2001. Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat. Genet.* 29, 447–452.

Millar, R. P., Lu, Z. L., Pawson, A. J., Flanagan, C. A., Morgan, K., Maudsley, S. R., 2004. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr. Rev.* 25, 235–275.

Nakayama-Ishimura, A., Chambon, J. P., Horie, T., Satoh, N., Sasakura, Y., 2009. Delineating metamorphic pathways in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 326, 357–367.

Nathans, J., 1987. Molecular biology of visual pigments. *Annu. Rev. Neurosci.* 10, 163–194.

Ng, L., Hurley, J. B., Dierks, B., Srinivas, M., Salto, C., Vennstrom, B., Reh, T.A., Forrest, D., 2001. A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat. Genet.* 27, 94-98

Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I., Furukawa, T., 2003. *Otx2* homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat. Neurosci.* 6, 1255–1263.

Nishino, A., Okamura, Y., Piscopo, S., Brown, E. R., 2010. A glycine receptor is involved in the organization of swimming movements in an invertebrate chordate. *BMC Neurosci.* 11, 6.

Nozaki, T., Yachie, N., Ogawa, R., Kratz, A., Saito, R., Tomita, M., 2011. Tight associations between transcription promoter type and epigenetic variation in histone positioning and modification. *BMC Genomics* 12, 416

Oh, E. C. T., Khan, N., Novelli, E., Khanna, H., Strettoi, E., Swaroop, A., 2007. Transformation of cone precursors to functional rod photoreceptors by bZIP transcription factor NRL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 1679–1684.

Ohkuma, M., Katagiri, Y., Nakagawa, M., Tsuda, M., 2000. Possible involvement of light regulated gonadotropin-releasing hormone neurons in biological clock for reproduction in the cerebral ganglion of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Neurosci. Lett.* 293, 5–8.

Oka, Y., 2009. Three types of gonadotrophin-releasing hormone neurones and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurones in teleosts. *J. Neuroendocrinol.* 21, 334–338.

Okada, T., Yamamoto, M., 1999. Differentiation of the gonad rudiment into ovary and testis in the solitary ascidian, *Ciona intestinalis*. *Dev. Growth Differ.* 41, 759–768.

Okubo, K., Amano, M., Yoshimura, Y., Suetake, H., Aida, K., 2000. A novel form of gonadotropin-releasing hormone in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 298–303.

Okubo, K., Nagata, S., Ko, R., Kataoka, H., Yoshiura, Y., Mitani, H., Kondo, M., Naruse, K., Shima, A., Aida, K., 2001. Identification and characterization of two distinct GnRH receptor subtypes in a teleost, the medaka *Oryzias latipes*. *Endocrinology* 142, 4729–4739.

Okubo, K., Ishii, S., Ishida, J., Mitani, H., Naruse, K., Kondo, M., Shima, A., Tanaka, M., Asakawa, S., Shimizu, N., Aida, K., 2003. A novel third gonadotropin-releasing hormone receptor in the medaka *Oryzias latipes*:



evolutionary and functional implications. *Gene* 314, 121–131.

Okubo, K., Sakai, F., Lau, E. L., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Naruse, K., Aida, K., Nagahama, Y., 2006. Forebrain gonadotropin-releasing hormone neuronal development: insights from transgenic medaka and the relevance to X-linked Kallmann syndrome. *Endocrinology* 147, 1076–1084.

Okubo, K., Nagahama, Y., 2008. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta. Physiol.* 193, 3–15.

Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. Gruss, P., 1995. Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* 121, 4045–4055.

O'Quin, K. E., Smith, D., Naseer, Z., Schulte, J., Engel, S. D., Loh, Y. H., Streelman, J. T., Boore, J. L., Carleton, K. L., 2011. Divergence in *cis*-regulatory sequences surrounding the opsin gene arrays of African cichlid fishes. *BMC Evol. Biol.* 11, 120.

Ozawa, Y., Nakao, K., Shimazaki, T., Takeda, J., Akira, S., Ishihara, K., Hirano, T., Oguchi, Y., Okano, H., 2004. Downregulation of STAT3 activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina. *Mol. Cell. Neurosci.* 26, 258–270.

Palczewski, K., 2012. Chemistry and biology of vision. *J. Biol. Chem.* 287, 1612–1619.

Pasini, A., Amiel, A., Rothbacher, U., Roure, A., Lemaire, P., Darras, S., 2006. Formation of the ascidian epidermal sensory neurons: insights into the origin of the chordate peripheral nervous system. *PLoS. Biol.* 4, e225.

Pinter, R., Hindges, R., 2010. Perturbations of microRNA function in mouse

dicer mutants produce retinal defects and lead to aberrant axon pathfinding at the optic chiasm. PLoS ONE 5, e10021.

Putnam, N. H., Butts, T., Ferrier, D. E., Furlong, R. F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-Rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A., Yu, J. K., Benito-Gutiérrez, E. L., Dubchak, I., Garcia-Fernández, J., Gibson-Brown, J. J., Grigoriev, I. V., Horton, A. C., de Jong, P. J., Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kohara, Y., Kuroki, Y., Lindquist, E., Lucas, S., Osoegawa, K., Pennacchio, L. A., Salamov, A. A., Satou, Y., Sauka-Spengler, T., Schmutz, J., Shin-I, T., Toyoda, A., Bronner-Fraser, M., Fujiyama, A., Holland, L. Z., Holland, P. W., Satoh, N., Rokhsar, D. S., 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. Nature 453, 1064–1071.

Quinlan, K. A., Kiehn, O., 2007. Segmental, synaptic actions of commissural interneurons in the mouse spinal cord. J. Neurosci. 27, 6521–6530.

Ramakrishnan, S., Lee, W., Navarre, S., Kozlowski, D. J., Wayne, N. L., 2010. Acquisition of spontaneous electrical activity during embryonic development of gonadotropin-releasing hormone-3 neurons located in the terminal nerve of transgenic zebrafish (*Danio rerio*). Gen. Comp. Endocrinol. 168, 401–407.

Reversade, B., De Robertis, E. M., 2005. Regulation of ADMP and BMP2/4/7 at opposite embryonic poles generates a self-regulating morphogenetic field. Cell 123, 1147–1160.

Roberts, M. R., Hendrickson, A., McGuire, C. R., Reh, T. A., 2005. Retinoid X receptor is necessary to establish the S-opsin gradient in cone photoreceptors of the developing mouse retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 46, 2897–2904.

Roberts, M. R., Srinivas, M., Forrest, D., Morreale de Escobar, G., Reh, T. A., 2006. Making the gradient: thyroid hormone regulates cone opsin expression in the developing mouse retina. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 6218–6223.

Rhee, K. D., Goureau, O., Chen, S., Yang, X. J., 2004. Cytokine-induced activation of signal transducer and activator of transcription in photoreceptor precursors regulates rod differentiation in the developing mouse retina. *J. Neurosci.* 24, 9779–9788.

Saade, C. J., Alvarez-Delfin K., Fadool, J. M., 2013. Rod photoreceptors protect from cone degeneration-induced retinal remodeling and restore visual responses in zebrafish. *J. Neurosci.* 33, 1804–1814.

Satoh, N., 1994. “Developmental Biology of Ascidians.” Cambridge Univ. Press, New York.

Satoh, N., 2013. “Developmental Genomics of Ascidians.” Wiley-Blackwell, New Jersey.

Sherwood, N. M., Wu, S., 2005. Developmental role of GnRH and PACAP in a zebrafish model. *Gen. Comp. Endocr.* 42, 74–80.

Soffe, S. R., Clarke, J. D. W., Roberts, A., 1984. Activity of commissural interneurons in the spinal cord of *Xenopus* embryos. *J. Neurophysiol.* 51, 1257–1267.

Soffe, S. R., Roberts, A., Li, W. C., 2009. Defining the excitatory neurons that drive the locomotor rhythm in a simple vertebrate: insights into the origin of reticulospinal control. *J. Physiol.* 587, 4829–4844.

Srinivas, M., Ng, L., Liu, H., Jia, L., Forrest, D., 2006. Activation of the blue opsin gene in cone photoreceptor development by retinoid-related orphan receptor beta. *Mol. Endocrinol.* 20, 1728–1741.

Steffen, P., Voss, B., Rehmsmeier, M., Reeder, J., Giegerich, R., 2006. RNAshapes: an integrated RNA analysis package based on abstract shapes. *Bioinformatics* 22, 500–503.

Stolfi, A., Levine, M., 2011. Neuronal subtype specification in the spinal cord of a protovertebrate. *Development* 138, 995–1004.

Sundermeier, T. R., Palczewski, K., 2012. The physiological impact of microRNA gene regulation in the retina. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2739–2750.

Swaroop, A., Kim, D., Forrest, D., 2010. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 563–576.

Tello, J. A., Rivier, J. E., Sherwood, N. M., 2005. Tunicate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) peptides selectively activate *Ciona intestinalis* GnRH receptors and the green monkey type II GnRH receptor. *Endocrinology* 146, 4061–4067.

Terakado, K., 2001. Induction of gamete release by gonadotropin-releasing hormone in a protochordate, *Ciona intestinalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 124, 277–284.

Terns, R. M., Terns, M. P., 2014. CRISPR-based technologies: prokaryotic defense weapons repurposed. *Trends Genet.* 30, 111–118.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.

Toyota, M., Suzuki, H., Sasaki, Y., Maruyama, R., Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T., 2008. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res.* 68, 4123–4132.

Trinklein, N. D., Aldred, S. F., Hartman, S. J., Schroeder, D. I., Otilar, R. P., Myers, R. M., 2004. An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res.* 14, 62–66.

Tsuda, M., Sakurai, D., Goda, M., 2003. Direct evidence for the role of pigment cells in the brain of ascidian larvae by laser ablation. *J. Exp. Biol.* 206, 1409–1417.

Tsujimura, T., Hosoya, T., Kawamura, S., 2010. A single enhancer regulating the differential expression of duplicated red-sensitive opsin genes in zebrafish. *PLoS Genet.* 6, e1001245.

Ulitsky, I., Shkumatava, A., Jan, C. H., Subtelny, A. O., Koppstein, D., Bell, G. W., Sive, H., Bartel, D. P., 2012. Extensive alternative polyadenylation during zebrafish development. *Genome Res.* 22, 2054–2066.

van, Mier, P., ten, Donkelaar, H. J., 1989. Structural and functional properties of reticulospinal neurons in the early-swimming stage *Xenopus* embryo. *J. Neurosci.* 9, 25–37.

Wakefield, M. J., Anderson, M., Chang, E., Wei, K. J., Kaul, R., Graves, J. A., Grutzner, F., Deeb, S. S., 2008. Cone visual pigments of monotremes: filling the phylogenetic gap. *Vis. Neurosci.* 25, 257–264.

Watson, C. T., Lubieniecki, K. P., Loew, E., Davidson, W. S., Breden, F., 2010. Genomic organization of duplicated short wave-sensitive and long wave-sensitive opsin genes in the green swordtail, *Xiphophorus helleri*. *BMC Evol. Biol.* 10, 87.

Willot, V., Mathieu, J., Lu, Y., Schmid, B., Sidi, S., Yan, Y. L., Postlethwait, J. H., Mullins, M., Rosa, F., Peyri eras, N., 2002. Cooperative action of ADMP- and BMP-mediated pathways in regulating cell fates in the zebrafish gastrula. *Dev. Biol.* 241, 59–78.

Wu, S., Page, L., Sherwood, N. M., 2006. A role for GnRH in early brain regionalization and eye development in zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 257–258, 47–64.

Yamamoto, N., Oka, Y., Amano, M., Aida, K., Hasegawa, Y., Kawashima, S., 1995. Multiple gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-immunoreactive systems in the brain of the dwarf gourami, *Colisa lalia*: immunohistochemistry and radioimmunoassay. *J. Comp. Neurol.* 355, 354–368.

Yamamoto, N., 2003. Three gonadotropin-releasing hormone neuronal groups with special reference to teleosts. *Anat. Sci. Int.* 78, 139–155.

Yamagami, K., 1972. Isolation of a choriolytic enzyme (hatching enzyme) of the teleost, *Oryzias latipes*. *Dev. Biol.* 29, 343–348.

Yoshida, R., Sakurai, D., Horie, T., Kawakami, I., Tsuda, M., Kusakabe, T., 2004. Identification of neuron-specific promoters in *Ciona intestinalis*. *Genesis* 39, 130–140.

Xu, S., Witmer, P. D., Lumayag, S., Kovacs, B., Valle, D., 2007. MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J. Biol. Chem.* 282, 25053–25066.

Zhang, S. S., Wei, J., Qin, H., Zhang, L., Xie, B., Hui, P., Deisseroth, A., Barnstable, C. J., Fu, X. Y., 2004. STAT3-mediated signaling in the determination of rod photoreceptor cell fate in mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 2407–2412.

Zhu, Q., Sun, W., Okano, K., Chen, Y., Zhang, N., Maeda, T., Palczewski, K., 2011. Sponge transgenic mouse model reveals important roles for the microRNA-183 (miR-183)/96/182 cluster in postmitotic photoreceptors of the retina. *J. Biol. Chem.* 286, 31749–31760.



## 公表論文リスト

### 副論文

Daido, Y., Hamanishi, S., Kusakabe, T. G., 2014. Transcriptional co-regulation of evolutionarily conserved microRNA/cone opsin gene pairs: implications for photoreceptor subtype specification. *Dev. Biol.* 392, 117–129.

Imai, K. S., Daido, Y., Kusakabe, T. G., Satou, Y., 2012. *Cis*-acting transcriptional repression establishes a sharp boundary in chordate embryos. *Science* 337, 964–967.

Kusakabe, T. G., Sakai, T., Aoyama, M., Kitajima, Y., Miyamoto, Y., Takigawa, T., Daido, Y., Fujiwara, K., Terashima, Y., Sugiuchi, Y., Matassi, G., Yagisawa, H., Park, M. K., Satake, H., Tsuda, M., 2012. A conserved non-reproductive GnRH system in chordates. *PLoS One* 7, e41955.

### 参考論文

なし



## 副論文(3編)

- 1: Daido, Y., Hamanishi, S., Kusakabe, T. G., 2014. Transcriptional co-regulation of evolutionarily conserved microRNA/cone opsin gene pairs: implications for photoreceptor subtype specification. *Dev. Biol.* 392, 117–129.
- 2: Imai, K. S., Daido, Y., Kusakabe, T. G., Satou, Y., 2012. *Cis*-acting transcriptional repression establishes a sharp boundary in chordate embryos. *Science* 337, 964–967.
- 3: Kusakabe, T. G., Sakai, T., Aoyama, M., Kitajima, Y., Miyamoto, Y., Takigawa, T., Daido, Y., Fujiwara, K., Terashima, Y., Sugiuchi, Y., Matassi, G., Yagisawa, H., Park, M. K., Satake, H., Tsuda, M., 2012. A conserved non-reproductive GnRH system in chordates. *PLoS One* 7, e41955.