

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) ナショナルバイオリソースプロジェクト
(英語) National Bioresource Project

補助事業課題名： (日本語) カタユウレイボヤリソースの拡充整備
(英語) Resource Project of *Ciona intestinalis*

補助事業担当者 (日本語) 下田臨海実験センター・センター長・稲葉 一男
所属 役職 氏名： (英語) Shimoda Marine Research Center, Director, Inaba, Kazuo

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) カタユウレイボヤリソースの拡充整備
(カタユウレイボヤ自然集団種(野生型)及び近交系の収集・保存・提供、トランスジェニック系統の保存)

分担課題名： (英語) Breeding and supplying of *Ciona intestinalis* wild types and inbred lines.

補助事業分担者 (日本語) 京都大学大学院理学研究科 准教授 佐藤ゆたか
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, Kyoto University, Associate professor, Satou, Yutaka

補助事業分担者 (日本語) 東京大学大学院理学研究科 教授 赤坂 甲治
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, the University of Tokyo, professor, Koji Akasaka

II. 成果の概要(総括成果報告)

本事業は、我々脊椎動物にもっとも近い無脊椎動物であり、発生・進化・生殖・神経学その他数多くの分野の好材料として 100 年以上もの間研究に利用されてきたホヤの代表的な種であるカタユウレイボヤ *Ciona intestinalis* について、そのトランスジェニック等の系統および自然集団種(野生型)を収集・保存しユーザーに提供すること、また自家交配を繰り返して得られた近交系を維持しつつ提供体制を整備することを通じ、ホヤ研究コミュニティの発展を支えることを目的として行われた。ホヤの研究は日本以外にアメリカとヨーロッパを中心に盛んに行われており、リソース事業的な試みは散見

されるが、本リソース事業が質・量共に世界最大規模のリソース事業である。

トランスジェニック系統に関する事業では、第2期事業からの収集系統を加えて合計で134系統を収集・保存した。これらの系統は全て我が国独自の系統であり、極めて貴重なものである。ユーザーへの提供は5年間でのべ155件に達した。この数値は目標値である100件を大きく上回っている。また、収集した系統リソースの蛍光タンパク質発現情報や変異体の表現型、組み込まれた外来DNAの配列、論文情報、ゲノム編集の各種情報をデータベース化して公開し、ユーザーにとって必要な情報に素早くアクセスできる体制を整えた。本リソースを利用した論文のなかには、ホヤにおける初のゲノム編集技術の導入、卵形成過程を解析する新手法の開発や、神経系の構築機構、消化管形成機構など、本リソースを利用することでのみ到達できるユニークな研究が含まれている。

自然集団種（野生型）に関する事業では、毎年度30,000匹を越える数の個体を海中養殖してユーザーに提供しており、本リソース事業はホヤ研究コミュニティにとって欠かすことができない地位を確立している。カタユウレイボヤの野生集団は夏場の高温時に数が激減するため、実験を野生集団に頼る方法では実験可能な時期が限られていた。本リソースはその問題点を解決してほぼ周年研究に利用できる研究環境を研究者に提供しており、ホヤコミュニティの発展に大きく貢献している。特に第3期では夏場の飼育システムの改善に取り組み、これまで困難であった8~9月期の養殖個体の提供を可能にした。また国内への提供に限らず、米国へも生きたまま自然集団種（野生型）を送付することに成功した。このことは、本リソース事業の海外進出に大きく寄与すると予想している。本リソースを利用した研究成果が年間10~20報の論文として発表されている。たとえばホヤと脊椎動物の感覚器官の共通性、神経系構築の分子機構、細胞周期と形態形成の関係、発生期の転写調節機構、受精時の自家不和合性の分子機構、ペプチドホルモンの生殖細胞制御などの研究が、Nature, Science, Cell姉妹紙を含む一流の雑誌に発表された。

カタユウレイボヤはその研究の歴史の長さに対し、世界中で共通して研究に使われる標準野生型系統が存在しない。このことはハイレベルな研究を推進するモデル生物として大きな欠点であり、コミュニティ全体として解決すべき問題としての共通認識が持たれている。本リソース事業では2つの方向から、この問題についての解決を目指した。1つめは、自然集団種（野生型）をクローズドコロニー、つまり外からの遺伝子の流入を可能な限り減らし、ファミリー内での掛け合わせで得られた集団として維持して遺伝子の多型を減らすことであり、本リソースを使うことで安定した実験結果が得られる一助となっていると推察している。2つめは自家交配を繰り返した近交系を作製して遺伝子的に完全に均質な集団を得ることであり、第3期間に自家交配を19回繰り返した個体群を得るまでに至った。本近交系については第2期NBRPにおいて自家交配11世代目のゲノムを解読したものであり、ゲノムの均質化が野生集団と比較して25倍程度に進んでいること、受精の自家不和合性に関する遺伝子座には多型が残されていることなどの新知見を得て、第3期間に論文発表にまで至った。しかしながら、自家交配を繰り返すなかで近交弱勢の影響によって健康状態が非常に悪くなり、実験に利用する品質を保つことができないと判断され、最終的に標準系統として樹立することは出来なかった。今後は、前述のクローズドコロニーを標準的な野生型として広める方針を進める。

Because tunicates form the sister group of vertebrates, studies of tunicates are essential for understanding developmental and evolutionary mechanisms of chordates. This project is purposed to support tunicate researchers all over the world through collection, storage and delivery of transgenic lines and wild types of the representative tunicate, *Ciona intestinalis*. We have collected and store 134 transgenic lines that include marker lines expressing fluorescent proteins in the tissue/organ specific manner and mutant lines that are essential for elucidating functions of genes.

All of these transgenic lines were created in Japan, suggesting the uniqueness of this resource project. The information of the transgenic lines has been databased and open for researchers from our website. We delivered the lines 155 times to users in this five year. The transgenic lines have enabled researchers to carry out unique researches, including the first report of genome editing in *Ciona*, construction of nervous system and digestive tubes, knockdown of maternally stored mRNAs and so on.

Another important project is about wild types. Without this resource project, researchers have to collect *Ciona* from the ocean. This is not easy for researchers living far from the ocean, and the collection is dependent on the seasonal conditions; in several seasons *Ciona* becomes uncollectable probably because of inappropriate temperature for *Ciona*. Therefore, experiments are frequently interrupted. We cultivate *Ciona* in order to achieve constant provision of wild types to researchers almost throughout the year including summer season when *Ciona* is barely present in the natural condition. Every year we provide over 30,000 animals to users. This resource has become inevitable for the tunicate community. With our wild types, 10-20 manuscripts have been constantly published in a year. The manuscripts include the descriptions of the evolutionary mechanisms of chordates, molecular mechanisms of the nervous system construction, cell cycle regulation during development, *cis* regulatory mechanisms of gene expressions conserved among chordates, self-recognition mechanisms during fertilization and so on.

A major issue of tunicate researcher community is the absence of the standard wild type strain that assures reproducibility of experiments. Our project has proposed two possible solutions for this issue. First, our wild types are derived from the closed colonies, meaning that they are propagated by crossing inside the populations while minimizing outcrossing with another population. This enables to restrict the genomic variations in the populations in order to achieve more reproducible experiments than those done with animals from wild spontaneous populations. The other solution is the establishment of inbred lines. By repeating self-fertilization, we developed inbred strains. The genome of one strain was sequenced, to reveal their isogenic genome that is about 25% higher homozygosity than those of wild populations. The genome sequence showed that the locus responsible for the self-recognition kept its variations among alleles, suggesting the possible cause to allow repetitive self-fertilization. We wished to establish this inbred line as the standard wild type; however, the strain became very weak due to inbreeding depression, and finally we failed to achieve it.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2件、国際誌 17件）

1. YOSHIDA K, HOZUMI A, TREEN N, SAKUMA T, YAMAMOTO T, SHIRAE-KURABAYASHI M, SASAKURA Y. Germ cell regeneration-mediated, enhanced mutagenesis in the ascidian *Ciona intestinalis* reveals flexible germ cell formation from different somatic cells. Dev. Biol. 2017, 423, 111-125.
2. BROZOVIC M, MARTIN C, DANTEC C, DAUGA D, MENDEZ M, SIMON P, PERCHER M, LAPORTE B, SCORNAVACCA C, DI GREGORIO A, FUJIWARA S, GINESTE M, LOWE EK, PIETTE J, RACIOPPI C, RISTORATORE F, SASAKURA Y, TAKATORI N, BROWN TC, DELSUC F, DOUZERY E, GISSI C, MCDUGALL A, NISHIDA H, SAWADA H, SWALLA

- BJ, YASUO H, LEMAIRE P. ANISEED 2015: a digital framework for the comparative developmental biology of ascidians. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44(D1), D808-818.
3. HOZUMI A, HORIE T, SASAKURA Y. Neuronal map reveals the highly regionalized pattern of the juvenile central nervous system of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Dyn.* 2015, 244, 1345-1393.
 4. KAWAI N, OGURA Y, IKUTA T, SAIGA H, HAMADA M, SAKUMA T, YAMAMOTO T, SATOH N, SASAKURA Y. *Hox10*-regulated endodermal cell migration is essential for development of the ascidian intestine. *Dev. Biol.* 2015, 403, 43-56.
 5. KARAIKOU A, SWALLA BJ, SASAKURA Y, CHAMBON JP. Metamorphosis in Solitary ascidians. *Genesis.* 2015, 53, 34-47.
 6. SATOU Y, HIRAYAMA K, MITA K, FUJIE M, CHIBA S, YOSHIDA R, ENDO T, SASAKURA Y, INABA K, SATOH N. Sustained heterozygosity across a self-incompatibility locus in an inbred ascidian. *Mol. Biol. Evol.* 2015, 32, 81-90.
 7. STOLFI A, SASAKURA Y, CHALOPIN D, SATOU Y, CHRISTIAEN L, DANTEC C, ENDO T, NAVILLE M, NISHIDA H, SWALLA BJ, VOLFF JN, VOSKOBOYNIK A, DAUGA D, LEMAIRE P. Guidelines for the nomenclature of genetic elements in tunicate genomes. *Genesis.* 2015, 53, 1-14.
 8. YOKOYAMA TD, HOTTA K, OKA K. Comprehensive morphological analysis of individual peripheral neuron dendritic arbors in ascidian larvae using the photoconvertible protein Kaede.
 9. KAMIYA C, OHTA N, OGURA Y, YOSHIDA K, HORIE T, KUSAKABE TG, SATAKE H, SASAKURA Y. Nonreproductive role of gonadotropin-releasing hormone in the control of ascidian metamorphosis. *Dev. Dyn.* 2014, 243, 1524-1535.
 10. IITSUKA T, MITA K, HOZUMI A, HAMADA M, SATOH N, SASAKURA Y. Transposon-mediated targeted and specific knockdown of maternally expressed transcripts in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Sci. Rep.* 2014, 4, 5050.
 11. NAKAZAWA K, YAMAZAWA T, MORIYAMA Y, OGURA Y, KAWAI N, SASAKURA Y, SAIGA H. Formation of the digestive tract in *Ciona intestinalis* includes two distinct morphogenic processes between its anterior and posterior parts. *Dev. Dyn.* 2013, 242, 1172-1183.
 12. SUZUKI MM, YOSHINARI A, OBARA M, TAKUNO S, SHIGENOBU S, SASAKURA Y, KERR AR, WEBB S, BIRD A, NAKAYAMA A. Identical sets of methylated and nonmethylated genes in *Ciona intestinalis* sperm and muscle cells. *Epigenetic Chromatin.* 2013, 6, 38.
 13. MITA K, KAWAI N, RUECKERT S, SASAKURA Y. Large-scale infection of the ascidian *Ciona intestinalis* by the gregarine *Lankesteria ascidiae* in an inland culture system. *Dis. Aquat. Organ.* 2012, 101, 185-195.
 14. HOZUMI A, MITA K, MISKEY C, MATES L, IZSVAK Z, IVICS Z, SATAKE H, SASAKURA Y. Germline transgenesis of the chordate *Ciona intestinalis* with hyperactive variants of sleeping beauty transposable element. *Dev. Dyn.* 2013, 242, 30-43.
 15. 河合成道, TREEN N, 佐々木陽香, 笹倉靖徳. 脊索動物ホヤにおけるゲノム改変技術。細胞工学, 2013, 32, 553-557.
 16. 阪上・沢野朝子, 小椋陽介, 笹倉靖徳, 宮脇敦史. ユビキチンオシレーターによる細胞周期可視

化 - 細胞周期を四次元で理解する. 実験医学, 2013, 31, 178-185.

17. KAWAI N, OCHIAI H, SAKUMA T, YAMADA L, SAWADA H, YAMAMOTO T, SASAKURA Y. Efficient targeted mutagenesis of the chordate *Ciona intestinalis* genome with zinc-finger nucleases. Dev. Growth Differ. 2012, 54, 535-545.
18. SASAKURA Y, KANDA M, IKEDA T, HORIE T, KAWAI N, OGURA Y, YOSHIDA R, HOZUMI A, SATOH N, FUJIWARA S. Retinoic acid-driven *Hox1* is required in the epidermis for forming the otic/atrial placodes during ascidian metamorphosis. Development. 2012, 139, 2156-2160.
19. SASAKURA Y, MITA K, OGURA Y, HORIE T. Ascidiens as excellent chordate models for studying the development of the nervous system during embryogenesis and metamorphosis. Dev. Growth Differ. 54, 420-437.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「カタユレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 吉田麗子, 荒武里衣, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 国内.
2. ナショナルバイオリソース事業の今後について, 口頭, 笹倉靖徳, 佐藤ゆたか, 吉田学, 赤坂甲治, 稲葉一男, ホヤ研究集会, 2016/10/14, 国内.
3. National BioResource Project of the tunicate *Ciona intestinalis*, Inaba K, Satou Y, Akasaka K, Yoshida M, Sasakura Y, Yoshida K, ポスター, ANRRC2016, 2016/9/20-22, 国内 (国際学会).
4. Ascidian *Ciona intestinalis* as the simple model for studying cellular and molecular mechanisms for constructing chordate body, Sasakura Y, 口頭, Aquatic Model Organism for Human Disease and Toxicology Research, 2016/3/19, 国内 (国際シンポジウム).
5. 「カタユレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 吉田麗子, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015/12/1-3, 国内.
6. *Hox1* establishes the anterior-posterior character of the pharyngeal endoderm, 口頭, Keita Yoshida K, Treen N, Sakuma T, Yamamoto T, Sasakura Y, 8th International Tunicate Meeting, 2015/7/17, 国内 (国際学会).
7. Efficient and easy knockout of *Ciona* genes with TALE nuclease, ポスター, Treen N, 佐久間哲史, 山本卓, 吉田慶太, 笹倉靖徳, 8th International Tunicate Meeting, 2015/7/14, 国内 (国際学会).
8. 「カタユレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 吉田麗子, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014/11/25-27, 国内.
9. *Hox1* による内柱の前後パターン形成とその意義, 口頭, 吉田慶太, ホヤ研究会 2014, 2014/10/13, 国内.
10. PR ホヤ遺伝子の命名法について, 口頭, 佐藤ゆたか, 笹倉靖徳, 西田宏記, 遠藤俊徳, ホヤ研究会 2014, 2014/10/13, 国内.
11. Genome Editing with TALENs and Cripsr/Cas9 in the ascidian *Ciona intestinalis*. 口頭,

- Treen N, Yoshida K, Sasaki H, Sakuma T, Kawai N, Yamamoto T, Sasakura Y, 2014/3/15, 国内.
12. 「カタユウレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013/12/3-5, 国内.
 13. 人工ヌクレアーゼ TALEN を用いたカタユウレイボヤの突然変異体系統の作製, ポスター, 吉田慶太, Treen N, 保住暁子, 佐久間哲史, 山本卓, 笹倉靖徳, 2013/12/4, 国内.
 14. Resource project of the tunicate *Ciona intestinalis*, Sasakura Y, Akasaka K, Satou Y, Yoshida M, Inaba K, ポスター, The 5th ANRRC International Meeting, 2013/10/30-11/1, 国内 (国際学会).
 15. 脊索動物ホヤにおける遺伝学的技術を用いた発生メカニズムの解明, 口頭, 笹倉靖徳, 日本動物学会第 84 回大会, 2013/9/26, 国内.
 16. Exploring functions of ascidian Hox genes in adult tissue formation. 口頭, Kawai N, Yoshida K, Treen N, Sasaki H, Sakuma T, Ikuta T, Hamada M, Saiga H, Yamamoto T, Satoh N, Sasakura Y, 7th Tunicate meeting, 2013/7/25, 海外.
 17. Disruption of Hox1 causes a homeotic transformation in the endostyle, ポスター, Yoshida K, Ogura Y, Sasakura Y, 7th Tunicate meeting, 2013/7/23, 海外.
 18. Establishment of an inbred strain of *Ciona intestinalis*, ポスター, Mita K, Hirayama K, Sasakura Y, Chiba S, Endo T, Fujie M, Saito T, Shiba K, Sumiyoshi N, Yoshida M, Yoshida R, Akasaka K, Sawada H, Satoh N, Satou Y, Inaba K, 7th Tunicate meeting, 2013/7/25, 海外.
 19. Knockout of genes with TALE nucleases in the chordate *Ciona intestinalis*. 口頭, Sasakura Y, Treen N, Sasaki H, Kawai N, Sakuma T, Yamamoto T, Yoshida K, The 46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2013/5/31, 国内.
 20. 「カタユウレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012/12/11-14, 国内.
 21. 人工ヌクレアーゼを用いた脊索動物ホヤにおけるゲノム編集, 口頭, 笹倉靖徳, Treen N, 佐々木陽香, 河合成道, 山田力志, 澤田均, 落合博, 佐久間哲史, 山本卓, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012/12/12, 国内.
 22. The Resource project of *Ciona intestinalis* in Japan, 口頭, Sasakura Y, Satou Y, Akasaka K, Yoshida M, Inaba K, International Workshop on Tunicate Information System, 2012/11/26, 国内 (国際会議).
 23. PR: カタユウレイボヤ・ナショナルバイオリソースプロジェクト, 口頭, 稲葉一男, 笹倉靖徳, 吉田学, 佐藤ゆたか, 2012/6/1, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. なぜ、ホヤを研究するのか? 笹倉靖徳, 筑波大学下田臨海実験センター, 2016/12/10, 国内.
2. 下田臨海実験センター 一般公開, 笹倉靖徳, 筑波大学下田臨海実験センター, 2016/12/10, 国内.
3. 下田臨海実験センター 一般公開, 笹倉靖徳, 筑波大学下田臨海実験センター, 2015/12/12, 国内.

内.

4. 下田臨海実験センター 一般公開, 笹倉靖徳, 筑波大学下田臨海実験センター, 2014/11/8, 国内.
5. 下田臨海実験センター 一般公開, 笹倉靖徳, 筑波大学下田臨海実験センター, 2012/11/10, 国内.

(4) 特許出願

該当無し

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) ナショナルバイオリソースプロジェクト
(英語) National Bioresource Project

補助事業課題名： (日本語) カタユウレイボヤリソースの拡充整備
(英語) Resource Project of *Ciona intestinalis*

補助事業担当者 (日本語) 下田臨海実験センター・センター長・稲葉 一男
所属 役職 氏名： (英語) Shimoda Marine Research Center, Director, Inaba, Kazuo

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 「カタユウレイボヤリソースの拡充整備」
(カタユウレイボヤ自然集団種(野生型)及び近交系の収集・保存・提供、トランスジェニック系統の保存)
分担課題名： (英語) Breeding and supplying of *Ciona intestinalis* wild types and inbred lines.

補助事業分担者 (日本語) 京都大学大学院理学研究科 准教授 佐藤ゆたか
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, Kyoto University, Associate professor, Satou, Yutaka

II. 成果の概要(総括成果報告)

補助事業代表者： 国立大学法人筑波大学・下田臨海実験所・稲葉一男 総括成果報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧(国内誌 0 件、国際誌 54 件)

1. Yoshida K, Hozumi A, Treen N, Sakuma T, Yamamoto T, Shirae-Kurabayashi M, Sasakura Y. Germ cell regeneration-mediated, enhanced mutagenesis in the ascidian *Ciona intestinalis* reveals flexible germ cell formation from different somatic cells. *Dev. Biol.* 2017, 423(2). 111-125.
2. Ikeda T, Satou Y. Differential temporal control of Foxa.a and Zic-r.b specifies brain versus

- notochord fate in the ascidian embryo. *Development*. 2017, 144(1), 38-43.
3. Imai KS, Hikawa H, Kobayashi K, Satou Y. Tfp2 and Sox1/2/3 cooperatively specify ectodermal fates in ascidian embryos. *Development*. 2017, 144(1), 33-37.
 4. Oonuma K, Tanaka M, Nishitsuji K, Kato Y, Shimai K, Kusakabe TG. Revised lineage of larval photoreceptor cells in *Ciona* reveals archetypal collaboration between neural tube and neural crest in sensory organ formation. *Dev. Biol.* 2016, 420(1). 178-185.
 5. Imai KS, Hudson C, Oda-Ishii I, Yasuo H, Satou Y. Antagonism between β -catenin and Gata.a sequentially segregates the germ layers of ascidian embryos. *Development*. 2016, 143(22). 4167-4172.
 6. Oda-Ishii I, Kubo A, Kari W, Suzuki N, Rothacher U, Satou Y. A Maternal System Initiating the Zygotic Developmental Program through Combinatorial Repression in the Ascidian Embryo. *PLoS Genet*. 2016, 12(5). e1006045.
 7. Ogura Y, Sasakura Y. Developmental Control of Cell-Cycle Compensation Provides a Switch for Patterned Mitosis at the Onset of Chordate Neurulation. *Dev. Cell*. 2016, 37(2). 148-61.
 8. Negishi T, Miyazaki N, Murata K, Yasuo H, Ueno N. Physical association between a novel plasma-membrane structure and centrosome orients cell division. *Elife*. 2016, 5. e16550.
 9. Yokomori R, Shimai K, Nishitsuji K, Suzuki Y, Kusakabe TG, Nakai K. Genome-wide identification and characterization of transcription start sites and promoters in the tunicate *Ciona intestinalis*. *Genome Res*. 2016, 26(1). 140-50.
 10. Ohta N, Waki K, Mochizuki A, Satou Y. A Boolean Function for Neural Induction Reveals a Critical Role of Direct Intercellular Interactions in Patterning the Ectoderm of the Ascidian Embryo. *PLoS Comput. Biol.* 2015, 11(12). e1004687.
 11. Matsunobu S, Sasakura Y. Time course for tail regression during metamorphosis of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 2015, 405(1). 71-81.
 12. Abitua PB, Gainous TB, Kaczmarczyk AN, Winchell CJ, Hudson C, Kamata K, Nakagawa M, Tsuda M, Kusakabe TG, Levine M. The pre-vertebrate origins of neurogenic placodes. *Nature*. 2015, 524(7566). 462-5.
 13. Kawai N, Ogura Y, Ikuta T, Saiga H, Hamada M, Sakuma T, Yamamoto T, Satoh N, Sasakura Y. Hox10-regulated endodermal cell migration is essential for development of the ascidian intestine. *Dev. Biol.* 2015, 403(1). 43-56.
 14. Satou Y, Hirayama K, Mita K, Fujie M, Chiba S, Yoshida R, Endo T, Sasakura Y, Inaba K, Satoh N. Sustained heterozygosity across a self-incompatibility locus in an inbred ascidian. *Mol. Biol. Evol.* 2015, 32(1). 81-90.
 15. Waki K, Imai KS, Satou Y. Genetic pathways for differentiation of the peripheral nervous system in ascidians. *Nat Commun*. 2015, 6. 8719.
 16. Sakamaki K, Shimizu K, Iwata H, Imai K, Satou Y, Funayama N, Nozaki M, Yajima M, Nishimura O, Higuchi M, Chiba K, Yoshimoto M, Kimura H, Gracey AY, Shimizu T, Tomii K, Gotoh O, Akasaka K, Sawasaki T, Miller DJ. The apoptotic initiator caspase-8: its functional ubiquity and genetic diversity during animal evolution. *Mol. Biol. Evol.* 2014, 31(12). 3282-301.
 17. Iitsuka T, Mita K, Hozumi A, Hamada M, Satoh N, Sasakura Y. Transposon-mediated targeted and specific knockdown of maternally expressed transcripts in the ascidian *Ciona*

- intestinalis. *Sci Rep.* 2014, 4. 5050.
18. Shiba K, Inaba K. Distinct roles of soluble and transmembrane adenylyl cyclases in the regulation of flagellar motility in *Ciona* sperm. *Int J Mol Sci.* 2014, 15(8). 13192-208.
 19. Treen N, Yoshida K, Sakuma T, Sasaki H, Kawai N, Yamamoto T, Sasakura Y. Tissue-specific and ubiquitous gene knockouts by TALEN electroporation provide new approaches to investigating gene function in *Ciona*. *Development.* 2014, 141(2). 481-7.
 20. Kawamura K, Shiohara M, Kanda M, Fujiwara S. Retinoid X receptor-mediated transdifferentiation cascade in budding tunicates. *Dev. Biol.* 2013, 384(2). 343-55.
 21. Matsuoka T, Ikeda T, Fujimaki K, Satou Y. Transcriptome dynamics in early embryos of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 2013, 384(2). 375-85.
 22. Ikeda T, Matsuoka T, Satou Y. A time delay gene circuit is required for palp formation in the ascidian embryo. *Development.* 2013, 140(23). 1023988.
 23. Hozumi A, Yoshida R, Horie T, Sakuma T, Yamamoto T, Sasakura Y. Enhancer activity sensitive to the orientation of the gene it regulates in the chordate genome. *Dev. Biol.* 2013, 375(1). 79-91.
 24. Ohta N, Satou Y. Multiple signaling pathways coordinate to induce a threshold response in a chordate embryo. *PLoS Genet.* 2013, 9(10). e1003818.
 25. Suzuki MM, Yoshinari A, Obara M, Takuno S, Shigenobu S, Sasakura Y, Kerr AR, Webb S, Bird A, Nakayama A. Identical sets of methylated and nonmethylated genes in *Ciona intestinalis* sperm and muscle cells. *Epigenetics Chromatin.* 2013, 6(1). 38.
 26. Mizuno K, Shiba K, Okai M, Takahashi Y, Shitaka Y, Oiwa K, Tanokura M, Inaba K. Calaxin drives sperm chemotaxis by Ca²⁺-mediated direct modulation of a dynein motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, 109(50). 20497-502.
 27. Imai KS, Daido Y, Kusakabe TG, Satou Y. Cis-acting transcriptional repression establishes a sharp boundary in chordate embryos. *Science.* 2012, 337(6097). 964-7.
 28. Sasakura Y, Kanda M, Ikeda T, Horie T, Kawai N, Ogura Y, Yoshida R, Hozumi A, Satoh N, Fujiwara S. Retinoic acid-driven Hox1 is required in the epidermis for forming the otic/atrial placodes during ascidian metamorphosis. *Development.* 2012, 139(12). 2156-60.
 29. Sakai T, Aoyama M, Kawada T, Kusakabe T, Tsuda M, Satake H. Evidence for differential regulation of GnRH signaling via heterodimerization among GnRH receptor paralogs in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology.* 2012, 153(4). 1841-9.
 30. Sekiguchi T, Ogasawara M, Satake H. Molecular and functional characterization of cionin receptors in the ascidian, *Ciona intestinalis*: the evolutionary origin of the vertebrate cholecystokinin/gastrin family. *J. Endocrinol.* 2012, 213(1). 99-106.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「カタユウレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 吉田麗子, 荒武里衣, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 国内.
2. ナショナルバイオリソース事業の今後について, 口頭, 笹倉靖徳, 佐藤ゆたか, 吉田学, 赤坂甲治, 稲葉一男, ホヤ研究集会, 2016/10/14, 国内.

3. National BioResource Project of the tunicate *Ciona intestinalis*, Inaba K, Satou Y, Akasaka K, Yoshida M, Sasakura Y, Yoshida K, ポスター, ANRRC2016, 2016/9/20-22, 国内 (国際学会).
4. 「カタユウレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 吉田麗子, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015/12/1-3, 国内.
5. 「カタユウレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 吉田麗子, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014/11/25-27, 国内.
6. PR ホヤ遺伝子の命名法について, 口頭, 佐藤ゆたか, 笹倉靖徳, 西田宏記, 遠藤俊徳, ホヤ研究会 2014, 2014/10/13, 国内.
7. 「カタユウレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013/12/3-5, 国内.
8. Resource project of the tunicate *Ciona intestinalis*, Sasakura Y, Akasaka K, Satou Y, Yoshida M, Inaba K, ポスター, The 5th ANRRC International Meeting, 2013/10/30-11/1, 国内 (国際学会).
9. Establishment of an inbred strain of *Ciona intestinalis*, ポスター, Mita K, Hirayama K, Sasakura Y, Chiba S, Endo T, Fujie M, Saito T, Shiba K, Sumiyoshi N, Yoshida M, Yoshida R, Akasaka K, Sawada H, Satoh N, Satou Y, Inaba K, 7th Tunicate meeting, 2013/7/25, 海外.
10. 「カタユウレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012/12/11-14, 国内.
11. The Resource project of *Ciona intestinalis* in Japan, 口頭, Sasakura Y, Satou Y, Akasaka K, Yoshida M, Inaba K, International Workshop on Tunicate Information System, 2012/11/26, 国内 (国際会議).
12. PR: カタユウレイボヤ・ナショナルバイオリソースプロジェクト, 口頭, 稲葉一男, 笹倉靖徳, 吉田学, 佐藤ゆたか, 2012/6/1, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) ナショナルバイオリソースプロジェクト
(英語) National Bioresource Project

補助事業課題名： (日本語) カタユウレイボヤリソースの拡充整備
(英語) Resource Project of *Ciona intestinalis*

補助事業担当者 (日本語) 下田臨海実験センター・センター長・稲葉 一男
所属 役職 氏名： (英語) Shimoda Marine Research Center, Director, Inaba, Kazuo

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) カタユウレイボヤリソースの拡充整備
(カタユウレイボヤ自然集団種 (野生型) の収集・保存・提供、近交系の収集・保存・提供)
分担課題名： (英語) Breeding and supplying of *Ciona intestinalis* wild types and inbred lines.

補助事業分担者 (日本語) 東京大学大学院理学研究科 教授 赤坂 甲治
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, the University of Tokyo, professor, Koji Akasaka

II. 成果の概要 (総括成果報告)

補助事業代表者： 国立大学法人筑波大学・下田臨海実験所・稲葉一男 総括成果報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 54 件)

1. Yoshida K, Hozumi A, Treen N, Sakuma T, Yamamoto T, Shirae-Kurabayashi M, Sasakura Y. Germ cell regeneration-mediated, enhanced mutagenesis in the ascidian *Ciona intestinalis* reveals flexible germ cell formation from different somatic cells. *Dev. Biol.* 2017, 423(2). 111-125.
2. Ikeda T, Satou Y. Differential temporal control of *Foxa.a* and *Zic-r.b* specifies brain versus notochord fate in the ascidian embryo. *Development.* 2017, 144(1), 38-43.

3. Imai KS, Hikawa H, Kobayashi K, [Satou Y](#). Tfap2 and Sox1/2/3 cooperatively specify ectodermal fates in ascidian embryos. *Development*. 2017, 144(1), 33-37.
4. Oonuma K, Tanaka M, Nishitsuji K, Kato Y, Shimai K, Kusakabe TG. Revised lineage of larval photoreceptor cells in *Ciona* reveals archetypal collaboration between neural tube and neural crest in sensory organ formation. *Dev. Biol.* 2016, 420(1). 178-185.
5. Imai KS, Hudson C, Oda-Ishii I, Yasuo H, [Satou Y](#). Antagonism between β -catenin and Gata.a sequentially segregates the germ layers of ascidian embryos. *Development*. 2016, 143(22). 4167-4172.
6. Oda-Ishii I, Kubo A, Kari W, Suzuki N, Rothacher U, [Satou Y](#). A Maternal System Initiating the Zygotic Developmental Program through Combinatorial Repression in the Ascidian Embryo. *PLoS Genet*. 2016, 12(5). e1006045.
7. Ogura Y, [Sasakura Y](#). Developmental Control of Cell-Cycle Compensation Provides a Switch for Patterned Mitosis at the Onset of Chordate Neurulation. *Dev. Cell*. 2016, 37(2). 148-61.
8. Negishi T, Miyazaki N, Murata K, Yasuo H, Ueno N. Physical association between a novel plasma-membrane structure and centrosome orients cell division. *Elife*. 2016, 5. e16550.
9. Yokomori R, Shimai K, Nishitsuji K, Suzuki Y, Kusakabe TG, Nakai K. Genome-wide identification and characterization of transcription start sites and promoters in the tunicate *Ciona intestinalis*. *Genome Res*. 2016, 26(1). 140-50.
10. Ohta N, Waki K, Mochizuki A, [Satou Y](#). A Boolean Function for Neural Induction Reveals a Critical Role of Direct Intercellular Interactions in Patterning the Ectoderm of the Ascidian Embryo. *PLoS Comput. Biol.* 2015, 11(12). e1004687.
11. Matsunobu S, [Sasakura Y](#). Time course for tail regression during metamorphosis of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 2015, 405(1). 71-81.
12. Abitua PB, Gainous TB, Kaczmarczyk AN, Winchell CJ, Hudson C, Kamata K, Nakagawa M, Tsuda M, Kusakabe TG, Levine M. The pre-vertebrate origins of neurogenic placodes. *Nature*. 2015, 524(7566). 462-5.
13. Kawai N, Ogura Y, Ikuta T, Saiga H, Hamada M, Sakuma T, Yamamoto T, Satoh N, [Sasakura Y](#). Hox10-regulated endodermal cell migration is essential for development of the ascidian intestine. *Dev. Biol.* 2015, 403(1). 43-56.
14. [Satou Y](#), Hirayama K, Mita K, Fujie M, Chiba S, Yoshida R, Endo T, [Sasakura Y](#), Inaba K, Satoh N. Sustained heterozygosity across a self-incompatibility locus in an inbred ascidian. *Mol. Biol. Evol.* 2015, 32(1). 81-90.
15. Waki K, Imai KS, [Satou Y](#). Genetic pathways for differentiation of the peripheral nervous system in ascidians. *Nat Commun*. 2015, 6. 8719.
16. Sakamaki K, Shimizu K, Iwata H, Imai K, [Satou Y](#), Funayama N, Nozaki M, Yajima M, Nishimura O, Higuchi M, Chiba K, Yoshimoto M, Kimura H, Gracey AY, Shimizu T, Tomii K, Gotoh O, Akasaka K, Sawasaki T, Miller DJ. The apoptotic initiator caspase-8: its functional ubiquity and genetic diversity during animal evolution. *Mol. Biol. Evol.* 2014, 31(12). 3282-301.
17. Iitsuka T, Mita K, Hozumi A, Hamada M, Satoh N, [Sasakura Y](#). Transposon-mediated targeted and specific knockdown of maternally expressed transcripts in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Sci Rep*. 2014, 4. 5050.

18. Shiba K, Inaba K. Distinct roles of soluble and transmembrane adenylyl cyclases in the regulation of flagellar motility in *Ciona* sperm. *Int J Mol Sci.* 2014, 15(8). 13192-208.
19. Treen N, Yoshida K, Sakuma T, Sasaki H, Kawai N, Yamamoto T, Sasakura Y. Tissue-specific and ubiquitous gene knockouts by TALEN electroporation provide new approaches to investigating gene function in *Ciona*. *Development.* 2014, 141(2). 481-7.
20. Kawamura K, Shiohara M, Kanda M, Fujiwara S. Retinoid X receptor-mediated transdifferentiation cascade in budding tunicates. *Dev. Biol.* 2013, 384(2). 343-55.
21. Matsuoka T, Ikeda T, Fujimaki K, Satou Y. Transcriptome dynamics in early embryos of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 2013, 384(2). 375-85.
22. Ikeda T, Matsuoka T, Satou Y. A time delay gene circuit is required for palp formation in the ascidian embryo. *Development.* 2013, 140(23). 1023988.
23. Hozumi A, Yoshida R, Horie T, Sakuma T, Yamamoto T, Sasakura Y. Enhancer activity sensitive to the orientation of the gene it regulates in the chordate genome. *Dev. Biol.* 2013, 375(1). 79-91.
24. Ohta N, Satou Y. Multiple signaling pathways coordinate to induce a threshold response in a chordate embryo. *PLoS Genet.* 2013, 9(10). e1003818.
25. Suzuki MM, Yoshinari A, Obara M, Takuno S, Shigenobu S, Sasakura Y, Kerr AR, Webb S, Bird A, Nakayama A. Identical sets of methylated and nonmethylated genes in *Ciona intestinalis* sperm and muscle cells. *Epigenetics Chromatin.* 2013, 6(1). 38.
26. Mizuno K, Shiba K, Okai M, Takahashi Y, Shitaka Y, Oiwa K, Tanokura M, Inaba K. Calaxin drives sperm chemotaxis by Ca²⁺-mediated direct modulation of a dynein motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, 109(50). 20497-502.
27. Imai KS, Daido Y, Kusakabe TG, Satou Y. Cis-acting transcriptional repression establishes a sharp boundary in chordate embryos. *Science.* 2012, 337(6097). 964-7.
28. Sasakura Y, Kanda M, Ikeda T, Horie T, Kawai N, Ogura Y, Yoshida R, Hozumi A, Satoh N, Fujiwara S. Retinoic acid-driven Hox1 is required in the epidermis for forming the otic/atrial placodes during ascidian metamorphosis. *Development.* 2012, 139(12). 2156-60.
29. Sakai T, Aoyama M, Kawada T, Kusakabe T, Tsuda M, Satake H. Evidence for differential regulation of GnRH signaling via heterodimerization among GnRH receptor paralogs in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology.* 2012, 153(4). 1841-9.
30. Sekiguchi T, Ogasawara M, Satake H. Molecular and functional characterization of cionin receptors in the ascidian, *Ciona intestinalis*: the evolutionary origin of the vertebrate cholecystokinin/gastrin family. *J. Endocrinol.* 2012, 213(1). 99-106.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「カタユウレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 吉田麗子, 荒武里衣, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 国内.
2. ナショナルバイオリソース事業の今後について, 口頭, 笹倉靖徳, 佐藤ゆたか, 吉田学, 赤坂甲治, 稲葉一男, ホヤ研究集会, 2016/10/14, 国内.
3. National BioResource Project of the tunicate *Ciona intestinalis*, Inaba K, Satou Y, Akasaka

- K, Yoshida M, Sasakura Y, Yoshida K, ポスター, ANRRC2016, 2016/9/20-22, 国内 (国際学会).
4. 「カタユレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 吉田麗子, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015/12/1-3, 国内.
 5. 「カタユレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 吉田麗子, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014/11/25-27, 国内.
 6. 「カタユレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013/12/3-5, 国内.
 7. Resource project of the tunicate *Ciona intestinalis*, Sasakura Y, Akasaka K, Satou Y, Yoshida M, Inaba K, ポスター, The 5th ANRRC International Meeting, 2013/10/30-11/1, 国内 (国際学会).
 8. Establishment of an inbred strain of *Ciona intestinalis*, ポスター, Mita K, Hirayama K, Sasakura Y, Chiba S, Endo T, Fujie M, Saito T, Shiba K, Sumiyoshi N, Yoshida M, Yoshida R, Akasaka K, Sawada H, Satoh N, Satou Y, Inaba K, 7th Tunicate meeting, 2013/7/25, 海外.
 9. 「カタユレイボヤ」脊索動物の発生・進化の研究を支える代表リソース, ポスター, 稲葉一男, 赤坂甲治, 佐藤ゆたか, 吉田学, 笹倉靖徳, 三田薫, 吉田慶太, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012/12/11-14, 国内.
 10. The Resource project of *Ciona intestinalis* in Japan, 口頭, Sasakura Y, Satou Y, Akasaka K, Yoshida M, Inaba K, International Workshop on Tunicate Information System, 2012/11/26, 国内 (国際会議).
 11. PR: カタユレイボヤ・ナショナルバイオリソースプロジェクト, 口頭, 稲葉一男, 笹倉靖徳, 吉田学, 佐藤ゆたか, 2012/6/1, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし