

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07074

研究課題名(和文) 一年魚の発生休止の分子機構とその進化の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of annual killifish diapause.

研究代表者

黒川 大輔 (KUROKAWA, DAISUKE)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：40342779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：東アフリカに生息する一年魚(*Nothobranchius korthausae*)を用いて、脊椎動物の発生休止メカニズムの分子実態と、それらが進化的にいかに関与したのかを推定することを目的に研究を行った。

発生休止前後で発現が変動する遺伝子の発生休止に関わる機能を調べるためにCRISPR/Cas9により突然変異体を作成し、表現系を観察した。

また発生休止に伴う細胞分裂周期を可視化するために、Fucciトランスジェニック系統を樹立し、発生休止に伴う細胞周期の変動を観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで研究に用いられてこなかったアフリカ産の小型魚類*Nothobranchius korthausae*を用いて、ほとんど解析が進んでいない脊椎動物の発生休止現象の解明に先鞭をつけた。また、本研究を通じて、これまで研究に用いられてこなかった*N. korthausae*を、メダカやゼブラフィッシュのように簡単に実験室で飼育維持する方法や、蛍光タンパク質遺伝子を導入するトランスジェニック技術や、CRISPR/Cas9等のゲノム編集技術も確立し、新しい実験モデル生物を提案できた。

研究成果の概要(英文)：The diapause of vertebrate was analyzed using african annual killifish, *Nothobranchius korthausae*.

In order to investigate the function of genes involved in the diapause that expression fluctuates before and after the developmental arrest, mutants were created with CRISPR / Cas9 and the phenotype was observed.

In addition, in order to visualize the cell division cycle associated with developmental arrest, a Fluorescent Ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci) transgenic line was established, and changes in cell cycle associated with the developmental arrest were observed.

研究分野：発生生物学

キーワード：一年魚 発生休止

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

発生に不利な環境において、動物の初期発生の特定の段階で胚の細胞が一斉に細胞周期を停止して代謝が非常に低い状態になる現象を発生休止(Diapause)と呼ぶ。一定期間の発生休止後、環境が整うと発生は再開する。発生休止は動物界に広く見られる現象で“生きたまま”の状態を保ちつつも細胞の活動を低下させると言う点で非常に興味深い現象である。脊椎動物においても一部のほ乳類において、哺育に適した時期に出産するように胚の着床遅延(Delayed implantation)や、本研究に用いた一部の真骨魚類等で発生休止現象が報告されているが、その分子的メカニズムはほとんど解明されていない。



カダヤシ目 *Nothobranchius* 属の魚(図 1)は、東アフリカの雨期乾期の明瞭な乾燥地帯に生息し、雨期に生じる水たまりで成長して産卵し、乾期になり水が干上がると成体は死んでしまうが卵は発生休止状態で乾期を過ごし、次の雨期に生じる水たまりで発生を再開して孵化・成長して産卵すると言うライフサイクルを持ち「一年魚(Annual killifish)」と呼ばれている。およそ 40 種類が知られており、国内でも熱帯魚として販売飼育されている。

発生休止中の一年魚胚がどのような形態をしているのかは 1970 年代に幾つかの報告がされていた。一般の真骨魚の胞胚は、将来の胚体となる深層細胞が互いに接着してシート状の構造(Deep layer)を成し、エピボリーにより卵黄を覆っていくが、*Nothobranchius* 胚の深層細胞は、胞胚期に分裂を停止して、周りの細胞との接着を失い、間充織様の形態で、上皮層と卵黄多核層の隙間を仮足によって拡散して行く。エピボリーが終了し、上皮層が完全に卵黄を覆うと深層細胞は卵黄表面に拡散した状態で存在する。この時期に乾燥や酸素不足が生じると、深層細胞は移動を停止し、休眠状態となる。この時期を発生休止第一期と呼ぶ。

発生休止中の一年魚胚がどのような形態をしているのかは 1970 年代に幾つかの報告がされていた。一般の真骨魚の胞胚は、将来の胚体となる深層細胞が互いに接着してシート状の構造(Deep layer)を成し、エピボリーにより卵黄を覆っていくが、*Nothobranchius* 胚の深層細胞は、胞胚期に分裂を停止して、周りの細胞との接着を失い、間充織様の形態で、上皮層と卵黄多核層の隙間を仮足によって拡散して行く。エピボリーが終了し、上皮層が完全に卵黄を覆うと深層細胞は卵黄表面に拡散した状態で存在する。この時期に乾燥や酸素不足が生じると、深層細胞は移動を停止し、休眠状態となる。この時期を発生休止第一期と呼ぶ。

一般の真骨魚類ではエピボリーの進行と共に中内胚葉の巻き込みと背側への細胞の移動によりオーガナイザーとして働く胚盾が形成され、それが前方に伸びて行くことによって胚の軸を形成する。一方、一年魚ではこの時期に発生休止が生じ、エピボリーの終了時点では将来の胚体を成す深層細胞は卵黄表層中に間充織様の細胞としておよそ 200 個程度で散在しており、中内胚葉や前後軸の形成は全く認められない。発生休止が終了し、発生が再開すると深層細胞は一カ所に集合し、さかんに分裂しながら隣接する細胞と接着して卵黄の一部に円盤状の胚盤胞を形成する。この胚盤胞中に神経板が形成され、胚体の軸が形成される。

以上に述べたように深層細胞の集合後に形態形成が生じる事は分かっているが、深層細胞がどのようにして集合するのか？原腸陥入時の細胞の動きはどうなっているのか？また、どのような環境ストレスによって発生休止が起こるのかといった報告はあったが、環境ストレスがどのようなシグナル経路を用いて細胞の代謝低下を引き起こすのか？代謝が低下した状況で長時間の生存がどのように保証されるのか？といった発生休止を可能にする分子メカニズムについては全く報告がなかった。また、2015 年に *Nothobranchius furuzeri* の全ゲノム配列が決定されたが、*Nothobranchius* 属中で *furuzeri* 種は飼育が最も難しい種の一つで実験室での維持が難しく実験発生学への適応が難しいなどの課題があった。

### 2. 研究の目的

以上述べた背景のもと、未だ不明な点が多い脊椎動物の発生休止の分子メカニズムを解析する為に、

- (1)熱帯魚として飼育されているが、飼育難種の多い一年魚を実験室で系統維持する技術を確立すること。また遺伝子導入やゲノム編集等、分子生物学的手法の応用し実験モデル系を確立する。
  - (2)発生休止の獲得に伴う形態形成パターンの変化による発生ツール遺伝子の発現パターンや機能の変化を記載する。
  - (3)発生休止に関わる遺伝子の同定し、その機能を解析すること
  - (4)発生休止胚における細胞の振る舞いを観察すること
- の 4 点を目標に研究を行った。

### 3. 研究の方法

- (1)細胞の振る舞いが他の真骨魚類と大きく異なる中内胚葉や体軸の形成期にそれらの形成に重要な働きをする遺伝子をクローニングする。また発生休止を起こさずに発生させた胚と、発生休止した胚から全胚 RNA を得て、それぞれの RNA より次世代シーケンサーにより RNAseq を行い、発生休止胚で高発現している遺伝子の候補を選抜する。
- (2) (1)項で得られた遺伝子群の発生休止の進行に伴う時空間的な発現パターンを、ホールマウンツ in situ ハイブリダイゼーション法や RT-PCR 法により解析する。
- (3) (2)項で同定した胚発生や休眠に重要であると考えられる遺伝子を CRISPR/CAS9 を用いた

ゲノム編集法により突然変異体を作成し、その機能を解析する。

(3) 全身の細胞核にEGFPやFucciなど各種蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック系統を樹立し、胚発生中の細胞の振る舞いを観察する。

#### 4. 研究成果

(1) 上述した通り、2015年に*N. furuzeri*種のゲノム解読が発表されているが*furuzeri*種は飼育が難しく、実験発生学的適応が難しいために、飼育維持が容易な*N. korthausae*(図1)が孵化後5週間程で成熟し、体長4cmと小型、成熟は毎日20個程度の卵を産むなど、メダカやゼブラフィッシュに準じた実験モデル動物として優れた特性を有する事を確認し、本研究では全てこの種を用いて実験を行った。また、申請者の実験室の水槽で20代以上に渡り、近親交配で維持できており、今後のゲノム解析等の展開にも、有用なりソースを確立した。

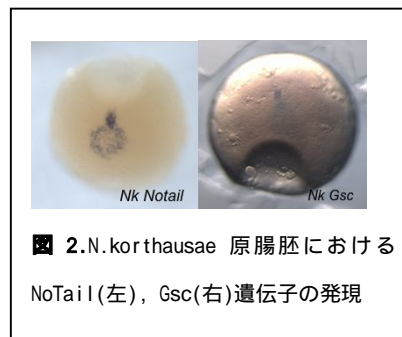


図 2. *N. korthausae* 原腸胚における NoTail(左), Gsc(右)遺伝子の発現

(2) 中内胚葉や体軸形成等の形態形成に関わる遺伝子をRT-PCR法によりクローニングして、その発現パターンを観察した所、他の真骨魚類とは異なり、ニワトリの胚盤におけるそれと良く似たパターンを示した(図2)。

(3) 発生休止によって発現量が変化する遺伝子を網羅的に検索した(発表準備中)ところ、1)転写を抑制する遺伝子、2)細胞分裂を抑制する遺伝子、3)細胞の物理的強度に関わる細胞表層や細胞骨格に関わる遺伝子、4)糖代謝に関わるホルモン遺伝子等が、発生休止胚において高発現していることが分かった。現在、これらの遺伝子について定量的RT-PCR法を用いて実際に発生休止胚で発現が上昇しているかを確認し、再現性が確認できた遺伝子についてはCRISPR/CAS9法を用いたゲノム編集技術により突然変異体の作製を行った。今後はこれらの突然変異体の解析を行い、休眠に関わる遺伝子の機能解析を行った。

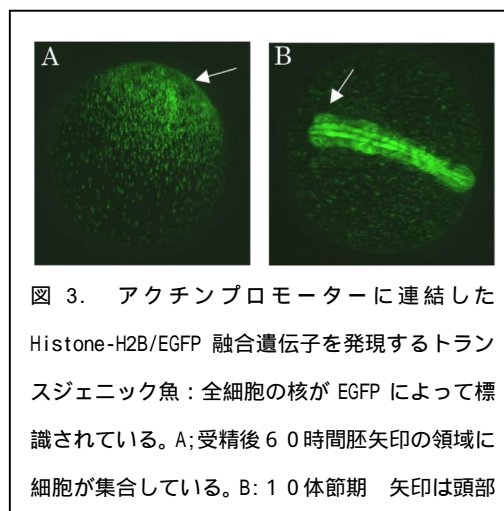


図 3. アクチンプロモーターに連結した Histone-H2B/EGFP 融合遺伝子を発現するトランスジェニック魚: 全細胞の核がEGFPによって標識されている。A; 受精後60時間胚矢印の領域に細胞が集合している。B: 10体節期 矢印は頭部

(4) Tol2トランスポサナーゼを用いて高効率に外来遺伝子をゲノムに挿入する技術を確立し、核や細胞膜に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック魚の系統を確立した。核にEGFPやFUCCIを発現する魚を用いて、休眠前後の細胞の振る舞いを共焦点レーザー顕微鏡でタイムラプス観察することに成功した(図3)。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5件)

1. Spatially restricted dental regeneration drives pufferfish beak development. Alex Thiery, Takanori Shono, Daisuke Kurokawa, Ralf Britz, Zerina Johanson, Gareth J. Fraser. *Proceeding of national academy of Science of USA*, 114 E442-E4434 (2017) (査読有)
2. Nervous system disruption and swimming abnormality in early-hatched pufferfish (*Takifugu niphobles*) larvae caused by pyrene is independent of aryl hydrocarbon receptors. Tatsuya Itoyama, Moe Kawahara, Makiko Fukui, Yuki Sugahara, Daisuke Kurokawa, Masahumi Kawaguchi, Shin-ichi Kitamura, Kei Nakayama, Yasunori Murakami. *Marine Pollution Bulletin* inpress (2017) (査読有)
3. Embryonic development of the grass pufferfish (*Takifugu niphobles*): From egg to larvae. Victor Gallego, Manabu Yoshida, Daisuke Kurokawa, Juan F. Asturiano, Gareth J. Fraser. *Theriogenology* 90, 191-196. (2017) (査読有)

4. Conserved and divergent expression patterns of markers of axial development in the laboratory opossum, *Monodelphis domestica*. Michio Yoshida, Eriko Kajikawa, Daisuke Yamamoto, Daisuke Kurokawa, Shigenobu Yonemura, Kensaku Kobayashi, Hiroshi, Kiyonari, Shinichi Aizawa. *Developmental Dynamics* 245, 1176-1188,(2016) (査読有)
  
5. Conserved and divergent expression patterns of markers of axial development in reptilian embryos: Chinese softshell turtle and Madagascar ground gecko. Michio Yoshida, Eriko Kajikawa, Daisuke Kurokawa, Miyuki Noro, Tetsuhiro Iwai, Shigenobu Yonemura, Kensaku Kobayashi, Hiroshi Kiyonari and Shinichi Aizawa. *Developmental Biology* 415, 122-142. (2016) (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

- (1) 黒川大輔、吉田真明 小倉淳、相沢慎一、赤坂甲治 一年魚の初期発生 日本動物学会第 89 回大会 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) 2018 年 9 月
- (2) 黒川大輔、吉田真明 小倉淳、相沢慎一、赤坂甲治 一年魚の初期発生:Molecular Mechanisms of Deep Cell Reaggregation during Early Development of Annual Killifish *Nothobranchius korthausae*. 日本動物学会第 88 回大会 富山県民会館(富山県富山市) 2017 年 9 月 21-23 日

〔その他〕

ホームページ等

#### 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。