

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：12611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18584

研究課題名(和文)小胞体シャペロンの脊索動物における発生緩衝における役割の解明

研究課題名(英文)Role of ER chaperones in developmental buffering in chordates

研究代表者

佐藤 敦子 (Sato, Atsuko)

お茶の水女子大学・基幹研究院・助教

研究者番号：90589433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：環境のストレスを緩衝し、生物の発生を一定に保つしくみ(発生緩衝)は、半世紀以上前から想定されてきたが、その分子メカニズムの全貌は明らかになっていない。本研究では、まず、カタコウレイボヤの姉妹種を用いて温度ストレス影響を及ぼす発生経路の同定を行った。この結果、2000以上の遺伝子モデルが熱ストレスによる影響を受けることが示唆された。さらに、魚類の発生における小胞体シャペロンdnajc3遺伝子の探索及び機能解析を行った結果、dnajc3遺伝子は魚類で倍加しているが、このうちdnajc3aのみが発生緩衝に関与し、脊索動物で共通して、温度環境への適応に関係していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Organismal development is robust, being buffered impact of environmental stress. Molecular basis of such buffering mechanism has not entirely uncovered. I investigated which developmental processes are affected by temperature stress using the tunicate *Ciona intestinalis* species complex, and whether role of dnajc3, an endoplasmic reticulum associated chaperone, in developmental buffering is conserved amongst chordates. As a result, I discovered that over 2000 gene models are affected by heat shock. Moreover, dnajc3 is duplicated in teleost fish lineages, but only dnajc3a is involved in developmental buffering. My study also indicated that dnajc3a controls thermal adaptation in chordates.

研究分野：環境発生進化学

キーワード：発生のロバストネス 小胞体 シャペロン 姉妹種 ハイブリッド ヒートショック 環境適応

1. 研究開始当初の背景

生物の発生は固定されたプロセスであり、環境の影響(ストレス)やゲノムの変異から緩衝されている。この緩衝作用(発生緩衝)は、生物の種の維持と進化という両面の重要な鍵であるが、その分子メカニズムはまた明らかにされていない。

申請者はこれまで、脊椎動物に最も近い無脊椎動物の一種であるホヤのうち、ごく最近異なった温度環境に適応・分岐したカタユウレイボヤの2種をストレス応答について比較することで、小胞体シャペロン分子が発生中の温度ストレスを緩衝していることを明らかにした。

2. 研究の目的

(1) 温度ストレスが影響する発生プロセスを明らかにする。

(2) 魚類で小胞体シャペロンの機能解析を行い、小胞体シャペロンの発生緩衝における役割が脊索動物全般に保存されているかどうかを検証する。

3. 研究の方法

(1) カタユウレイボヤにおける発生関連遺伝子の温度ストレス応答

英国プリマスで、カタユウレイボヤ タイプA及びタイプBを採集し、ハイブリッドを形成し、17 8h 飼育した。27 で1時間のヒートショックを行った後、胚を回収し、RNALater (Ambion)に固定した。固定サンプルからRNAを抽出し、cDNAを合成してqPCRを行った。また、抽出したRNAを用いて次世代シーケンサーillumina HiSeqによるRNASeq解析を行った。得られたデータは、Trinityによる*de novo assembly*および発現量解析を行い、得られた発現量についてBioConductorによる統計解析を行った。

(2) ニジマスゲノムにおける小胞体シャペロンの同定

ゲノム情報は、<http://www.genoscope.cns.fr/trout/>を利用した。ゼブラフィッシュ及びヒトの*dnajc3*の配列を用い、BLASTN検索によりニジマスゲノムから該当する配列を取り出した。

(3) ニジマスでのモルフォリノ・ノックダウン実験を用いた小胞体シャペロンの機能解析

ニジマスは、英国・Dorsetにある Houghton Spring Fish farm から購入し、未受精卵、筋肉、脳、肝臓、心臓の4つの組織から、RNAおよびゲノムのサンプルを固定した。サンプルからRNAおよびゲノムを抽出し、RNAからcDNAを作成した。ゲノム情報から検索され取り出された配列(*dnj1-dnj4*)をもとに、

プライマーを作成し、cDNAを鋳型とするPCR反応により、該当する*dnajc3*ホモログの検索を行った。得られた配列について、MEGA6により系統解析を行った。

4. 研究成果

(1) カタユウレイボヤにおける発生関連遺伝子の温度ストレス応答

まず、カタユウレイボヤの神経胚期から初期尾芽胚に至る過程でヒートショックしたサンプルで、神経形成及び神経冠形成に関係する20個の遺伝子について、qPCRを行った。この結果、神経冠形成に関係する*twist-c*、*ZicL*、*id*の3遺伝子で、温度に対する反応が観察された。そこでwhole mount *in situ* hybridization法でこれらの遺伝子の発現パターンを解析したところ、*ZicL*でのみ、発現の空間的パターンにバリエーションが観察された。これらの結果をまとめ、投稿したところ、発生遺伝子の一部に環境による影響が観察されたとしても、ネットワーク内で緩衝影響が緩衝されるのではないかと指摘があった。この点を解決するためには、ゲノムワイドで発現解析を行い、環境ストレスによる影響をネットワークレベルで解析する必要がある。さらに、タイプA及びタイプBのカタユウレイボヤを比較してきたが、これらの姉妹種で様々な生物学的要素に微妙な差が生じているのではないかと指摘もあった。

これらの問題を解決するため、発生緩衝度合いが異なるが遺伝型を等しくするハイブリッド間で遺伝子発現をゲノムワイドで比較することにした。これまでの研究から、タイプAの卵を用いたハイブリッドはタイプAの野生型と同程度の発生緩衝を示し、タイプBの卵を用いたハイブリッドはタイプBの野生型と同程度の発生緩衝となることがわかってきている。その結果、およそ2000遺伝子モデルで、これらの2集団での遺伝子発現レベルにおける差が観察された。現在これらの遺伝子モデルから発生関連遺伝子を抽出し、qPCR法を用いた確認作業を行っているところである。

(2) ニジマスゲノムにおける*dnajc3*遺伝子の同定

ニジマスのゲノムはフランスのチームによって解読されているが、小胞体シャペロン*dnajc3*のホモログに関しては遺伝子の登録がこれまでされていなかった。このためまず、ゲノム情報からBLASTN検索によって*dnajc3*遺伝子を同定する作業を行った。

この結果、これまで他の魚類(ゼブラフィッシュやメダカ)では*dnajc3*のホモログとして*dnajc3a*および*dnajc3b*の2遺伝子のみが知られていたが、ニジマスでは4つの異なるホモログ(*dnj1-dnj4*)が予測された。

しかし、予測されたホモログの配列をもと

にプライマーを作成し、ニジマス cDNA から PCR 法により増幅し、クローニングを行ったところ、想定外の 2 つの相同配列しか得られなかった。系統解析を行ったところ、そのうちひとつは *dnajc3a* に、もう片方は *dnajc3b* に相同な遺伝子であることが明らかになった。これらの結果は、発表されているゲノムアセンブリが不完全であることを示唆する。

(3) 魚類における小胞体シャペロンの発現

魚類における *dnajc3a* および *dnajc3b* の機能解析を調べるため、ゼブラフィッシュでモルフオリノ(MO)を用いたノックダウン解析を行った。この結果、*dnajc3a* は 28 度と 32 度の両方で発生に大きく影響を与えた ($P < 0.0015$) もの、*dnajc3b* ではほとんど影響が見られなかった ($P = 0.16$)。また、*dnajc3a* および *dnajc3b* の発現量を、ゼブラフィッシュから卵、受精卵、及び胚を採集し、qPCR 法により解析した。その結果、*dnajc3a* ではゼブラフィッシュのひとつの卵もしくは胚につき 0.0005 ~ 0.001ng の発現量が見られたのに対し、*dnajc3b* では 0.0001ng 以下と、非常に低いレベルでの発現しか確認されなかった。これらのことから、本研究では、*dnajc3a* ホモログのみに着目することにした。

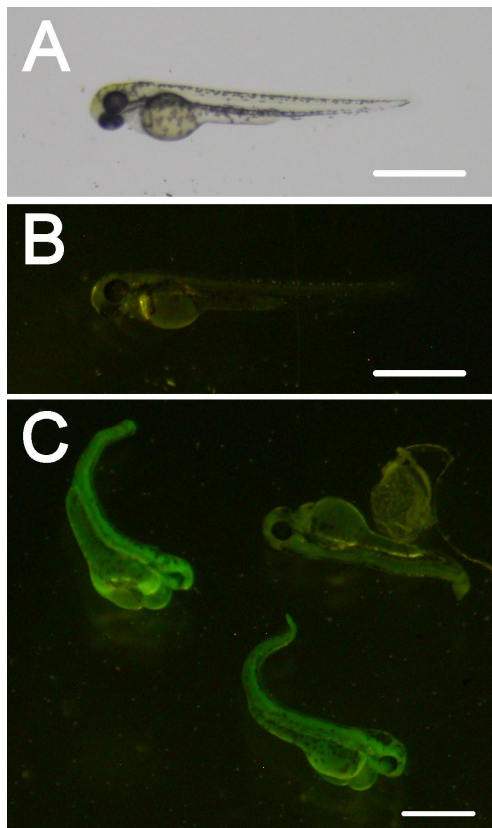


図1 ゼブラフィッシュにおける *dnajc3a* MO を用いたノックダウン実験. A コントロール MO による表現型. B コントロール MO をインジェクションした個体. GFP を付加していない MO のため、蛍光顕微鏡でも光らない. C *dnajc3a* MO (GFP) をインジェクションした胚.

MO ノックダウンされた個体 (GFP の蛍光が光っている) で形態にバリエーションが現れていることがわかる. Scale bar: 100um.

(4) 異なった環境に適応した魚類での小胞体シャペロンの発現比較及び機能解析

(1) で推定されたニジマスの *dnajc3a* 配列を利用し、MO を作成して MO ノックダウンによる機能解析を行った。MO による影響を適切に検証するための温度条件を設定するため、まず、ニジマスの受精卵を 18 及び 20 で飼育した。その結果、20 では、インジェクションを行わない正常胚でも死滅することがわかった。そこで、コントロールの胚で正常発生が起こるぎりぎりの温度として 18 を選び、MO をインジェクションした胚を 12 及び 18 で飼育した。その結果、12 で飼育した胚では正常な発生が見られた ($n=1$) もの、18 で飼育した胚は尾が折れ曲がる異常が観察された ($n=1$)。今後インジェクションする数を増やし、得られた結果を統計的に検証する必要がある。

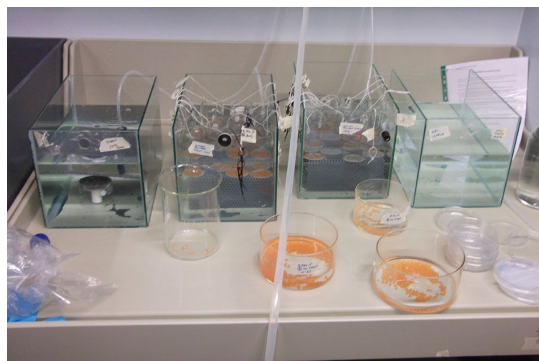


図2 英国におけるニジマスのインジェクション実験の様子. 中央の 2 つの水槽 (12 と 18) に各実験区画の胚を飼育し、経過観察を続けた。

さらに、ゼブラフィッシュのほかに、メダカおよび英国で採集したニジマスの卵から mRNA を抽出し、*dnajc3a* の発現量を比較したところ、ニジマスではメダカやゼブラフィッシュに比べ、発現が 10 分の 1 以下と、大変低いことがわかった ($P < 0.0001$)。ゼブラフィッシュやメダカは、温暖な環境に適応し、30 前後で正常発生するのに対し、ニジマスは 18 以上になると正常発生しない。これらのことから、*dnajc3a* の発現量が、温度環境に対する適応をコントロールしていることが示唆される。

以上の研究成果から、魚類で倍加した小胞体シャペロン *dnajc3* のうち、*dnajc3a* は発生を緩衝する作用があること、また魚類でも、*dnajc3a* の発現量が温度環境への適応と関連していることが示唆された。今後、カタユウ

レイボヤと魚類の両方で、発生におけるどのようなネットワークが熱ストレスによる影響を受けるかについて明らかにし、dnajc3aによってどのような発生経路が熱ストレスから緩衝されているかについて明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. * Sato A, Kawashima T, Fujie M, Hughes S, Satoh N, Shimeld S (2015)

Molecular basis of canalization in an ascidian species complex adapted to different thermal conditions *Scientific Reports* 5: 16717

2. Pennati R, Ficetola F, Brunetti R, Caicci F, Gasparini F, Griggio F, Sato A, Stach T, Kaul-Strehlow S, Gissi C, Manni L. (2015)

Remarkable morphological differences between larvae of the *Ciona intestinalis* species complex: hints for a valid taxonomic definition of distinct species.

PLoS One DOI:10.1371/journal.pone.0122879

[学会発表](計 5 件)

佐藤敦子. “カタユレイボヤの種分化と環境適応について”. 日本動物学会 ホヤの生物学談話会, 富山、2017年9月21日(招待講演)

Sato A. “Folding or degradation: An endoplasmic reticulum chaperone is key in developmental buffering and thermal adaptation in teleost fish”. Gordon Research Conference Boston, USA “Molecular Mechanisms of Evolution”, 2017年6月11日 ~16日

Sato A & Sebastian Shimeld. “Endoplasmic reticulum chaperones control developmental buffering under thermal stress”. Euro Evo Devo meeting, Uppsala, Sweden, 2016年7月28日 (selected contribution talk)

Sato A. “The endoplasmic reticulum chaperones control canalization in animal development under environmental stress”. SICB meeting, Portland, Oregon, USA, 2016年1月5日 (selected contribution talk)

Atsuko Sato, Takeshi Kawashima, Manabu Fujie, Samantha Hughes, Nori Satoh, Sebastian Shimeld. “The endoplasmic reticulum chaperones *dnajc3* and *dnajc10* control

canalization of animal development under environmental stress”. 第48回 日本発生生物学会 年会, 2015年6月4日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www-p.sci.ocha.ac.jp/bio-atsuko/member/researcher.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤敦子 (SATO Atsuko)

お茶の水女子大学 基幹研究院 助教

研究者番号: 90589433

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: