

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770046

研究課題名 (和文) ライブイメージングによるオタマボヤ全発生過程の解析

研究課題名 (英文) Live-image Analysis on whole developmental process of Oikopleura

研究代表者

西野 敦雄 (NISHINO ATSUO)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：50343116

研究成果の概要 (和文)：

オタマボヤは、脊索動物の中で最も短時間、かつ最小の細胞で、完全に機能的な体を作り上げる。本研究は、このオタマボヤの発生の速さと卵の透明性を活かし、ライブイメージング技術と遺伝学的手法を適用して、受精卵から成体に至るまでの細胞配置と分化状態を解明することを目的とした。結果、発生中の核と細胞表層を生きのまま受精直後から染め出すことが可能になり、また初期卵割中にそれまで観察されていなかった新たな構造体を見出した。

研究成果の概要 (英文)：

Eggs of Oikopleura (Appendicularia, Tunicata) build a functional juvenile body in the shortest time period and with the least number of cells among chordate organisms. We aimed to comprehend all the cell divisions, cell positions, and the differentiation status from cleavage stage to juvenile stage in Oikopleura development using live-imaging and genetic techniques. Our effort in this study established reliable markers that can track nuclei and plasma membrane, and discovered a subcellular apparatus in cleavage staged embryos that is involved in pulling the nucleus before the cytokinesis to make an unequal cleavage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 ・ 形態・構造

キーワード：蛍光イメージング、ワカレオタマボヤ、発生、尾索動物

1. 研究開始当初の背景

オタマボヤは、世代時間が短く、全生活史を通じて透明で構成細胞数がきわめて少ないことを特徴とする新しい脊索動物の研究モデル生物である。オタマボヤは海洋性プランクトンで、脊椎動物の最も近縁な無脊椎動物系統である脊索動物門尾索動物亜門に属する。オタマボヤはその尾索動物中で唯一、一生の間、脊椎動物と体制を共有したオタマボヤは脊椎動物と同様、脊索、筋肉、神経索を備えた尾部を持ち、また鰓裂、内柱、心臓などの脊椎動物との共有派生形質を、きわめて少ない細胞数で一生保持する。

オタマボヤは脊椎動物の起源と進化のカギを握る動物だと古くから指摘されてきたにも関わらず、その形態発生学的な知見は乏しかった。近年になっていくつかの相同遺伝子の発現パターンが報告されてきたが、あくまで脊椎動物における遺伝子発現との局所的な比較がなされる程度にとどまっており、独立の生物システムとしての研究に必要な、細胞系譜の決定やそれに基づく遺伝子発現の記述など、オタマボヤを理解し、モデル生物として確立するための情報基盤の整備が強く望まれていた。

本研究計画は、大学院生時代からオタマボヤ研究を行っていた研究代表者（西野）が、ワカレオタマボヤの実験室内での経代飼育システムを完成させた現所属（西田宏記教授）に異動したことを契機に、相互の蓄積を活用した新たな展開として着想された。

2. 研究の目的

本研究では、ワカレオタマボヤ胚の速い発生、高い透明性、単純な細胞構成を持つ点を活かし、その発生過程の完全な理解に向けて、

(1) 完全な細胞系譜を完成させること、
(2) 生きたまま細胞分化のプロセスを可視化すること、(3) 細胞種特異的に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック系統を作製するための基本技術を確立すること、の3点を追求することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) まず初期胚発生期における形態学的特徴を精査するために、受精後に起こるプロセスを微分干渉顕微鏡による高解像の観察を行った。長時間タイムラプス観察を行うための条件を検討した。

(2) 発生段階を通じて細胞配置を経時的に観察するために、オタマボヤに由来するヒストン H2B と細胞質アクチンを単離し、それと緑色および赤色蛍光タンパク (EGFP および

mCherry) との融合コンストラクトを作製した。これから得られた合成 mRNA を受精卵内や卵巣内に導入することで核の位置、細胞の形状が蛍光観察できるかを検討した。また、細胞表層を効率よく検出する目的で、膜電位感受性蛍光タンパク質である mermaid の合成 mRNA も同様に発現させて検討を行った。

(3) 筋肉特異的、脊索特異的な発現を導くことを期待して、ワカレオタマボヤの筋肉アクチン遺伝子 Muscle Actin 3 および Brachyury 遺伝子の上流配列約 2.5 kb を YFP や Kaede 遺伝子の上位に配したコンストラクトを作製し、それぞれが組織特異的な発現を行うかを調べた。また、それが組織特異的な発現を起こすときに最適となる条件を検討した。

(4) トランスジェニック系統の作出を目指し、すでに比較的近縁な動物であるカタユレイボヤで有効であると判明している Minos に関して、ワカレオタマボヤ胚の中でトランスポゾンの逆向き反復配列の切り出しを行うことができるかを PCR 法により検討した。また、系統作出後に系統の長期間にわたる維持を可能にする精子の凍結保存法の改良を進めた。

4. 研究成果

(1) 初期発生過程を、新たに導入した高倍率ノンカバー水浸レンズを用いた微分干渉顕微鏡により詳細に検討したところ、初期卵割期胚の後極部に、連続した不等分裂が起こるのに伴って核を引き付けるように見える構造が生じることがわかった (図 1 矢尻)。これはホヤ類で観察されている Centrosome Attracting Body に類似する。以降の詳細な観察から、この構造は 2 細胞期から胚の後極部において観察可能で、細胞周期に応じて出現と消失を繰り返すことが分かった。この構造は、分裂期に先立って核をひきつけることで、オタマボヤに見られる特徴的な卵割パターンを生み出す原動力になっている可能性がある。また、ホヤ類において示されているように、筋肉分化や生殖細胞分化に関わる mRNA 因子を濃縮する役割をも果たしている可能性がある。現在これらの点を検討するべく、筋肉分化や生殖細胞分化に関わることが期待される相同遺伝子を単離し、その発現様式や局在パターンを解析している。(幸西翔平ら、学会発表済)

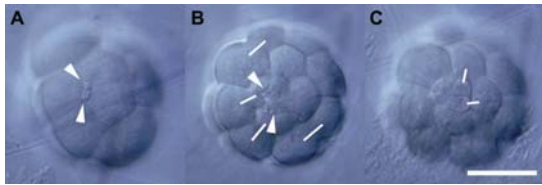


図 1. ワカレオタマボヤ初期胚に観察される Centrosome-Attracting Body 様の構造 (A の矢尻)。A-C は同一胚の連続写真。A:16 細胞期。B:30 細胞期。C:32 細胞期。分裂したての姉妹細胞は白線で結んだ。後極において極端な不等分裂が起こる (C) が、小さいほうの割球が生じる位置に Centrosome-Attracting Body 様の構造が観察され、核を引き付けているように見える (A, B 矢尻)。スケールバーは 50 ミクロン。

(2) 発生期における核の連続的な定位に用いるためにワカレオタマボヤゲノムからヒストン H2B を単離し、これと EGFP および mCherry 遺伝子との融合コンストラクトを作製した。これらから合成 mRNA を作製し受精卵に注入したところ、原腸胚期以降に核への蛍光の局在が観察された (図 2)。

また細胞表層を染め出すために、すでに単離していたオナガオタマボヤ由来の細胞質アクチン CC7 を EGFP と融合したコンストラクト、カタユレイボヤの Rapsyn 由来のミリストイル化配列を結合した EGFP コンストラクトを作製し、同様に胚に導入したが、必ずしも明確な細胞表層への蛍光タンパクの濃縮は見られなかった (not shown)。

次に、高効率に細胞表面に発現する可能性を考え、膜電位感受性の蛍光タンパク質として開発された mermaid (大阪大学医学研究科の筒井秀和助教より提供) の mRNA を、上記のヒストン H2B-mCherry mRNA とともにワカレオタマボヤ胚に導入してみた。すると非常に効率よく細胞表層を染め出すことが分かった (図 2)。Mermaid が細胞表層に正確に T 局在化するということは、さらにオタマボヤの研究の中で膜電位の計測を光学ベースで行えるということを示しており、今後の展開を考える上で望ましい結果といえる。

これらの結果から、mermaid と今回作製したヒストン H2B-mCherry とをオタマボヤ胚に導入することで、細胞の構造を詳しく追跡しながら発生過程を観察できることが分かった。しかし、オタマボヤ胚の小ささや光毒性などの問題から、いまだ十分な解像度で発生が進んだ段階の胚の全体像を生きたまま詳細に観察することはできていない。研究計画をさらに推し進めて目的を達成するには、光学的な問題を解決しながらさらに研究を進めていく必要がある。なおここで作製された H2B-EGFP および H2B-mCherry はホヤ類においても有効に使用できることが分かったため、

すでに他の研究にも使われ始めている。

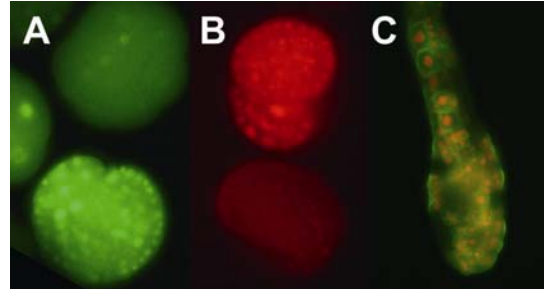


図 2. (A, B) ヒストン H2B-EGFP (A) と mCherry (B) の発現と核局在。それぞれ核に強く濃縮する。(A 上) 原腸胚。(A 下) 尾芽胚。(B) 尾芽胚。(C) Mermaid と H2B-mCherry の mRNA を 2 細胞期の片側の割球に注入した。生じたオタマボヤ幼生では Mermaid は細胞表層に、H2B-mCherry は核に濃縮する。

(3) 組織特異的な蛍光タンパク質の発現を導くため筋肉アクチン遺伝子と Brachyury 遺伝子上流配列を用いた。合成 mRNA に比して DNA の受精卵の導入と発現誘起は容易ではなかった。RNA の注入により、注入液に 0.5 M の KCl を加えておくと注入や注入後の発生が安定に進行することがわかってきた。しかし、DNA の注入に関して詳細な条件検討を行ったところ、まさにこの 0.5 M KCl を加えることにより著しく発現が妨げられることが判明した。現在さらに最適な DNA の導入法を検討する必要があり継続して行っている。

しかし、その中で利用した筋肉アクチンと Brachyury の遺伝子上流配列は筋肉および脊索でレポーター (蛍光タンパク質) の発現を導くことができることが分かった (図 3)。これら以外の遺伝子としてもすでに神経系特異的な遺伝子として HuC を、生殖細胞特異的な遺伝子として vasa を、また組織非特異的に発現を導く遺伝子としてヒストン H2A と RNA polymerase のサブユニットである Rpb2 を選択し、それぞれの遺伝子上流配列をすでに回収している。好適な注入条件を明らかにした後、これらによる蛍光タンパク質の発現誘導能を解析していく。条件が定まり次第、さらに大々的に効果的にレポーターの発現を誘起できるエンハンサー・プロモーター配列の収集を行っていく計画である。これらと、(2) で可能になった細胞の可視化技術とを併せ、個体発生の中での細胞分化と器官構築のプロセスを明らかにしていく。



図 3. 筋肉アクチン遺伝子上流配列 (A) と Brachyury 遺伝子上流配列 (B) による VenusYFP の組織特異的な発現。スケールバーは 100 ミクロン。

(4) トランスジェニック系統を作出する目的で、Minos トランスポゾンによる挿入突然変異個体を得ることを目標において研究を進めた。まず、一つ一つの卵にトランスジーンを導入するのでは非常に非効率であると考えられたので、トランスポゼースを卵巣内で働かせる方法を検討した。ワカレオタマボヤの卵巣は卵母細胞と保育細胞が細胞質を共有する巨大な多核体であることが分かっているので、この細胞質にトランスジーンとトランスポゼース mRNA を導入すれば高効率にトランスジェニック個体が得られるのではないかと考えた。そこで卵巣内に導入された合成 mRNA が発現するかをまず検討するために、上記で得られたヒストン H2B-EGFP を卵巣に注入し、卵巣内で発現するかを調べたところ、実際に卵巣内で多数の卵において同時に発現を誘起できることが分かった (図 4)。この蛍光を持った卵は正常に受精・発生を行った (図 4)。このことにより、外来の因子を卵巣内で働かせることができることが示された。(大内一晃、修士論文)

Minos トランスポゼースがトランスポゾンの逆向き反復配列と共存したときに、オタマボヤの細胞の中でその配列を認識し、切り出すことができるかを調べるために、Minos トランスポゼースの合成 mRNA とトランスポゾンの逆向き反復配列をもったプラスミドを同時に受精卵内に導入した。孵化後の幼生から得たプラスミドを PCR により調べたところ、一部の幼生においては逆向き反復配列が切り出された形跡が確認された。ただ効率は必ずしも高いものではなかったのでより効率のよい注入条件を検討する必要があると考えられた。今後は、To12 や Sleeping Beauty といった脊索動物で働くことが分かっている Minos 以外のトランスポゾンも併せて検討するほうがよいと考えて準備を進めている。

卵巣の中で合成 mRNA からの発現を誘導できたことはトランスジェニック個体の作出に向けて非常に大きな技術となる。第一に一度の注入によって多くの卵に外来の核酸を導入でき、スクリーニングの効率を大きく高める。またトランスポゼースを同様に発現させられれば、卵巣内で一部の卵にトランスジェネシスを引き起こして、その場合、その卵を発生させるだけで (掛け合わせなしで) トランスジェニック個体が得られることになる。今後この技術に基づいて、卵巣内でトランスポゾンの切り出しや転移が起こるかを詳しく検討していく。

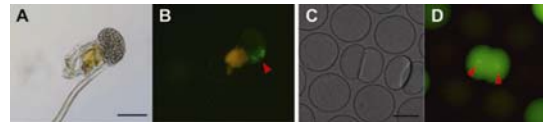


図 4. (A, B) H2B-EGFP を発現した卵巣。一部の卵母細胞が強い蛍光を発しているのが分かる (B の赤矢尻)。スケールバーは 500 ミクロン。(C, D) H2B-EGFP を発現した卵母細胞由来する 2 細胞期胚。受精前から蛍光を発しており、2 細胞期には核への濃縮も観察される (D の赤矢尻)。

また将来的に作出されたトランスジェニック系統の維持に利用する目的で、精子の凍結保存法を確立、改良した (大内一晃修士論文。大内ら論文投稿中。)

以上の研究から、オタマボヤの発生過程をライブイメージングで観察する技術とオタマボヤにおいてトランスジェニック系統を作出する技術の基礎は完成したと考えられる。引き続き、技術的な改良を加えながら、期間中に終了しなかった当初計画に掲げた研究の完成に向けて取り組む。

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)

Nishino A, Okamura Y, Piscopo S, Brown ER "A glycine receptor is involved in the organization of swimming movements in an invertebrate chordate." BMC Neuroscience 査読有り 11 (2010): 6 (p.1-12)

Hill SA, Nishino A, Nakajo K, Zhang G, Fineman JR, Selzer ME, Okamura Y, Cooper EC Ion channel clustering at the axon initial segment and node of Ranvier evolved sequentially in early chordates. PLoS Genetics 査読有り 4 (2008): e1000317 (p.1-15).

[学会発表] (計 3 件)

幸西翔平、西野敦雄、西田宏記 「オタマボヤにおける Centrosome Attracting Body」 日本動物学会第 80 回大会 2009 年 9 月 17 日 静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ

西野敦雄 「ホヤ幼生遊泳運動の形成機構と ACh 受容体・Gly 受容体の役割」 日本動物学会第 79 回大会関連集会 (ホヤの生物学談話会) 「神経ネットワークの全理解にむけて」 2008 年 9 月 5 日 福岡大学

Nishino A, Baba SA, Okamura Y 「Morphological evolution and physiological

evolution: a molecular basis for ascidian's "simple" tadpole to fluently swim.] The 41st annual meeting for the Japanese society of developmental biologists. 2008年5月28日 Tokushima Arts Foundation for Culture, Tokushima, Japan.

[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
大阪大学研究者総覧内
<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/kg-portal/aspI/RX0011D.asp?UNO=17284&page=>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西野 敦雄 (NISHINO ATSUO)
大阪大学・理学研究科・助教
研究者番号：50343116

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：