

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22370078

研究課題名(和文) ホヤ胚発生における三種の胚軸(動植・前後・左右軸)の決定機構

研究課題名(英文) Specification mechanisms of three embryonic axes (animal-vegetal, anterior-posterior, and left-right axes) during ascidian embryogenesis

研究代表者

西田 宏記(Nishida, Hiroki)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60192689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々のからだには、3つの直交する体軸が存在している。これらの体軸は、一般的に胚発生中に形成される。発生学の重要な課題の一つとして、これらの胚軸の方向と極性、そして軸に沿った組織の配置がどのようにして確立されるのかという問題がある。本研究では脊索動物の尾索動物亜門に属するマボヤとワカレオタマボヤを用いて、3種の胚軸、すなわち動植・前後・左右軸に関して、それぞれの軸に沿って様々な組織前駆細胞が産み出されていくしくみについて解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The adult bodies of most animals have three perpendicular axes. These body axes are established during early embryogenesis. It is important to know how the direction and polarity of these axes are specified and how various tissues are patterned along these axes. In this project, we analyzed the mechanisms of patterning of some cell types along three embryonic axes, which are the animal-vegetal, anterior-posterior, and left-right axes, using urochordates (tunicates); the ascidian, *Halocynthia roretzi*, and the appendicularian, *Oikopleura dioica*.

研究分野：生物科学・発生生物学

キーワード：胚葉形成 生殖細胞 左右非対称性 ホヤ オタマボヤ 胚軸 胚発生

1. 研究開始当初の背景

発生が完了した後のからだには、3つの直交する体軸が存在している。これらの体軸は、一般的に胚発生中に形成される。発生学の重要な課題の一つとして、これらの胚軸の方向と極性、そして軸に沿った組織の配置がどのようにして確立されるのかという問題がある。

ホヤは近年、発生過程の詳細な記述、初期発生のしくみの理解度の深さ、ゲノムプロジェクトの完了などにより、発生生物学における新たなモデル動物として注目を集めていた。また、オタマボヤはその5日間という生活環の短さにより、脊索動物において発生遺伝学的アプローチが可能となる実験動物として注目を集めてきていた。

2. 研究の目的

本研究では脊索動物の尾索動物亜門に属するマボヤとワカレオタマボヤを用いて、3種の胚軸、すなわち動植・前後・左右軸に関して、それぞれの軸に沿って様々な組織前駆細胞が産み出されていくしくみを明らかにすることを目的とした。本研究では、以下に述べる4つのテーマについて研究を進めた。

1. 動植軸: 植物半球決定因子の同定と、内胚葉と中胚葉への分岐。2. 前後軸: 生殖細胞におけるザイゴティック転写開始の抑制。3. 左右軸: 左右軸決定機構と胚の回転。4. オタマボヤを用いた発生遺伝学的アプローチ。

3. 研究の方法

本研究では、研究目的に述べた4つのプロジェクトを推し進めるため、マボヤ (*Halocynthia roretzi*) とワカレオタマボヤ (*Oikopleura dioica*) を用いて、胚操作、遺伝子操作(遺伝子ノックダウン、強制発現)、イメージング、電顕、タンパク質解析(抗体染色、酵母ツーハイブリッド解析)などを組み合わせ進めた。4つのプロジェクトにはそれぞれ3~4人程度の研究者と学生が関わった。

4. 研究成果

(1) 動植軸: 植物半球決定因子の同定と、内胚葉と中胚葉への分岐。

脊索動物では、動植軸に沿って、外・中・内胚葉が配置される。この中で、内胚葉と中胚葉の分離のしくみは、多くの動物で不明なところが多い。マボヤでは、16から32細胞期にかけて中内胚葉細胞が分裂する際に、中胚葉になる娘細胞にのみ転写因子をコードする *Not* 遺伝子の mRNA を分配することで中胚葉と内胚葉運命を分離していることが明らかになっていた。この際に中内胚葉細胞

内で *Not* を転写しつつある核が、将来の中胚葉側に移動し、そこで *Not* mRNA が細胞質に放出されることがその局在に必要である。阻害剤を用いた実験により、核が将来の中胚葉側へ移動するプロセスはPI3KとPTENによるPIP3のリン酸化平衡によりコントロールされている可能性が高いと考えられた。そこで、様々な実験を行いその可能性を確定した。PI3Kタンパク質は動物極から植物極にかけて濃度勾配をなして存在しており、中内胚葉割球では将来の中胚葉側に多い。PI3Kタンパク質は酵素反応でPIP3を産生するので、中内胚葉割球の核はPIP3の濃度の高い方向に向かって移動し、将来の中胚葉側細胞質での *Not* mRNA の放出に至ることが判明した。

もう一つのテーマであった植物半球決定因子の同定に関しては、研究があまり進行しなかった。当初、関与を疑っていた *Wnt5* については、実験の結果が否定的であった。ホヤでは、卵内で局在している母性RNAは後極に局在するものばかりで、植物半球に局在するものがないことがわかりつつある。とすれば、植物半球決定因子は、既に蛋白質として局在している可能性が高く、その場合、植物半球決定因子の同定にはかなり困難が予想される。

(2) 前後軸: 生殖細胞におけるザイゴティック転写開始の抑制。

ホヤ胚の植物半球の最後部には始原生殖細胞が形成される。この始原生殖細胞においては全てのザイゴティックな転写開始が抑制されていることが知られていた。この転写抑制は、体細胞の運命決定に関わる様々な遺伝子の発現から生殖細胞を隔離しておき、生殖細胞の全能性をキープするためのしくみではないかと推測されている。我々は、胚の後極に局在する *PEM* mRNA がこの現象に関わっていることを見つけた。*PEM* mRNA をノックダウンすると生殖細胞でもザイゴティックな転写が開始してしまい、逆に *PEM* mRNA を異所的に発現させると全ての割球でザイゴティックな転写開始が抑制された。ついで、*PEM* のドメイン解析、タンパク質の局在、相互作用する他のタンパク質に関して解析を行った。その結果、*PEM* タンパク質は核に存在し、特定のドメインが機能に必要なこと、pTEFb複合体と結合することによりRNA polymerase IIのC末のリン酸化を阻害することにより転写を抑制するタンパクであることが判明した。また、始原生殖細胞におけるザイゴティックな転写開始の抑制に関して、ハエ、線虫、ホヤの間で分子的な平行進化が起こっていることが明らかになった。

(3) 左右軸: 左右軸決定機構と胚の回転。

多くの動物の体は左右非対称性を示す。*Nodal* の左側での発現は非常によく保存されており、ホヤでも *Nodal* が左側で発現し、*Pitx* がその下流にある。我々は、*Nodal* 発現の直

前にホヤの神経胚が、卵膜の中で前後軸に沿って一時的に反時計回りに回転すること、この回転は胚の左側を下にして停止すること、この回転により *Nodal* が左側で発現し始めることを発見していた。そこで、神経胚を走査型顕微鏡で観察することにより、回転が起こる時期特異的に、胚表面の表皮細胞から繊毛が1本ずつ生えていることを確認した。さらに、胚の左側を下にして回転が停止し左側の表皮が卵膜と接触することにより、卵膜からの化学的シグナルに反応して左側表皮に *Nodal* の発現が誘導されることを確定した。

(4) オタマボヤを用いた発生遺伝学的アプローチ。

まず、オタマボヤを用いてトランスジェニック系統を作成する方法に関して検討した。卵巣にプラスミド DNA を注入し生まれた胚にトランジェントな発現を引き起こすことに成功した。しかし、その DNA は次世代には受け継がれず、トランスジェニック系統を作成するには至っていない。これとは別に、遺伝子の機能を抑制するための方法として RNAi や DNAi が可能であることが判明した。よって、これらの方法を用いれば発生に関わる遺伝子をスクリーニングすることが可能となった。これによりオタマボヤの実験動物としての有用性は向上することになる。

また、卵と幼生の RNA-seq を行い、各ステージにおける発現遺伝子を網羅的に把握した。またその過程で、トランススプライシングのリーダー配列を持つ mRNA が母性の mRNA に多く、胚性発現をした mRNA には少ないことなどが判明した。

総括として、上記の研究成果の位置づけとインパクトに関しては、それぞれインパクトの高い科学雑誌 (*Developmental Cell*, *Current Biology*, *Development* 等) に掲載され、学術的評価は高いと考えられる。現在、ホヤ類の胚発生を研究している研究室は増加しており、世界に 20 程ある。そのうち 5 研究室は、competitive な関係にある。ただし、胚軸の形成に関わるテーマに関して、本研究室は他の追従を許さない成果を上げることができたと考えている。

今後の展望については、マボヤの植物半球決定因子の同定と、オタマボヤを用いた発生遺伝学的アプローチに関して、本研究期間中に達成することができなかった。これらに関しては今後も研究を継続し、是非とも成功に導きたいと考えている。

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 23 件)

Omotezako, T., Onuma, T. A., and Nishida, H. DNA interference: DNA-induced gene silencing in the appendicularian *Oikopleura dioica*. **Proc. R. Soc. B** (2015) in press. 査読あり。

Wang, K., and Nishida, H. REGULATOR: a database of metazoan transcription factors and maternal factors for developmental studies. **BMC Bioinformatics** (2015) 16, 114. 査読あり。

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25880930>.

Stolfi, A., Sasakura, Y., Chalopin, D., Satou, Y., Christiaen, L., Dantec, C., Endo, T., Naville, M., Nishida, H., Swalla, B., Volff J-N, Voskoboynik, A., Dauga, D., and Lemaire, P. Guidelines for the nomenclature of genetic elements in tunicate genomes. **Genesis** (2015) 53, 1–14. 査読あり。doi: 10.1002/dvg.22822

Kishi, K., Onuma, T. A., and Nishida, H. Long-distance cell migration during larval development in the appendicularian, *Oikopleura dioica*. **Dev. Biol.** (2014) 395, 299–306. 査読あり。doi: 10.1016/j.ydbio.2014.09.006

Nishida, H., and Stach, T. Cell lineages and fate maps in tunicates: Conservation and modification. **Zool. Sci.** (2014) 31, 645–652. 査読あり。doi: 10.2108/zs140117

Yamada, A., and Nishida, H. Control of the number of cell division rounds in distinct tissues during ascidian embryogenesis. **Dev. Growth Differ.** (2014) 56, 376–386. 査読あり。doi: 10.1111/dgd.12141

Kumano, G., Negoro, N., and Nishida, H. Transcription factor Tbx6 plays a central role in fate determination between mesenchyme and muscle in embryos of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. **Dev. Growth Differ.** (2014) 56, 310–322. 査読あり。doi: 10.1111/dgd.12133

Kuwajima, M., Kumano, G., and Nishida, H. Regulation of the number of cell division rounds by tissue-specific transcription factors and Cdk inhibitor during ascidian embryogenesis. **PLOS ONE** (2014) 9, e90188. 査読あり。doi:10.1371/journal.pone.0090188.

Omotezako, T., Nishino, A., Onuma T. A., and Nishida, H. RNA interference in the appendicularian *Oikopleura dioica* reveals the function of the *Brachyury* gene. **Dev. Genes Evol.** (2013) 223, 261–267. 査読あり。DOI: 10.1007/s00427-013-0438-8

Nishide, K., Mugitani, M., Kumano, G., and Nishida, H. Neurula rotation determines

left-right asymmetry in ascidian tadpole larvae. **Development** (2012) 139, 1467-1475. 査読あり。DOI: 10.1242/dev.076083

Makabe, K., and Nishida, H. Cytoplasmic localization and reorganization in ascidian eggs: Role of postplasmic/PEM RNAs in axis formation and fate determination. **WIREs Dev. Biol.** (2012) 1, 501-518. 査読あり。doi: 10.1002/wdev.54.

Nishida, H. The maternal muscle determinant in the ascidian egg. **WIREs Dev. Biol.** (2012) 1, 425-433. 査読あり。doi: 10.1002/wdev.22.

Kumano, G., Takatori, N., Negishi, T., Takada T., and Nishida, H. A maternal factor unique to ascidians silences the germline via binding to P-TEFb and RNAP II regulation. **Curr. Biol.** (2011) 21, 1308-1313. 査読あり。DOI: 10.1016/j.cub.2011.06.050

Fujikawa, T., Takatori, N., Kuwajima, M., Kim G. J., and Nishida, H. Tissue-specific regulation of the number of cell division rounds by inductive cell interaction and transcription factors during ascidian embryogenesis. **Dev. Biol.** (2011) 355, 313-323. 査読あり。DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.04.033

Hashimoto, H., Enomoto, T., Kumano, G., and Nishida, H. The transcription factor FoxB mediates temporal loss of cellular competence for notochord induction in ascidian embryos. **Development** (2011) 138, 2591-2600. 査読あり。DOI: 10.1242/dev.053082

Negishi, T., Kumano, G., and Nishida, H. Polo-like kinase 1 is required for localization of PEM protein to the centrosome-attracting body and unequal cleavages in ascidian embryos. **Dev. Growth Differ.** (2011) 53, 76-87. 査読あり。DOI: 10.1111/j.1440-169X.2010.01231.x

Ouchi, K., Nishino, A., and Nishida, H. Simple procedure for sperm cryopreservation in the larvacean tunicate *Oikopleura dioica*. **Zool. Sci.** (2011) 28, 8-11. 査読あり。DOI: 10.2108/zsj.28.8

Denoeud, F., Henriot, S.,, Nishida, H., (34 番目)..... Wincker, P., and Chourrout, D. (計 51 人). Plasticity of animal genome architecture unmasked by rapid evolution of a pelagic tunicate. **Science** (2010) 330, 1381-1385. 査読あり。DOI: 10.1126/science.1194167

Takatori, N., Kumano, G., Saiga, H., and Nishida, H. Segregation of germ layer fates by nuclear migration-dependent localization of *Not* mRNA. **Dev. Cell** (2010) 19, 589-598. 査読あり。DOI: 10.1016/j.devcel.2010.09.003.

Kumano, G., Kawai, N., and Nishida, H. Macho-I regulates unequal cell divisions independently of its function as a muscle determinant. **Dev. Biol.** (2010) 344, 284-292.

- 査読あり。DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.05.013
- ②Prodon, F., Chenevert, J., Hébras, C., Dumollard, R., Faure, E., Gonzalez-Garcia, J., Nishida, H., Sardet, C., and McDougall, A. Dual mechanism controls asymmetric spindle position in ascidian germ cell precursors. **Development** (2010) 137, 2011-2021. 査読あり。DOI: 10.1242/dev.047845
- ②Kobayashi, M., Takatori, N., Nakajima, Y., Kumano, G., Nishida, H., and Saiga, H. Spatial and temporal expression of two transcriptional isoforms of *Lhx3*, a LIM class homeobox gene, during embryogenesis of two phylogenetically remote ascidians, *Halocynthia roretzi* and *Ciona intestinalis*. **Gene Expression Patterns** (2010) 10, 98-104. 査読あり。DOI: 10.1016/j.gep.2010.01.004
- ③Nishida, H., Satoh, N., and Hirose, E. More diversity and more convergence in tunicate biology. **Zool. Sci.** (2010) 27, 67-68. 査読あり。DOI: 10.2108/zsj.27.67

[学会発表] (計 26 件)

- Takatori, N., Saiga, H., and 西田宏記. PI3K-Mediated Migration of the Nucleus Transcribing the *Not* mRNA in Asymmetric Cell Divisions Separates Mesoderm and Endoderm Fates. **7th International Tunicate Meeting**, 2013 年 7 月 22-26 日、Università degli Studi Parthenope, Italy (Napoli)
- Kishi, K., Onuma, T., and 西田宏記. Long-distance cell migrations during larval development in the appendicularian, *Oikopleura dioica*. **17th International Congress of Developmental Biology**, 2013 年 6 月 16-20 日、Cancún Center, Mexico (Cancun)
- 西田宏記. A new chordate model animal with short life cycle of five days; The appendicularian, *Oikopleura dioica*. **Annual Meeting of the Korean Society of Biochemistry and Molecular Biology**. 2013 年 5 月 14-16 日、COEX Convention Center, Korea (Seoul)
- 西田宏記, Fujikawa, T., Takatori, N., Kuwajima, M., and Kim, G.J.。 Tissue-specific Regulation of the Number of Cell Division Rounds by Inductive Cell Interaction and Transcription Factors during Ascidian Embryogenesis. **3rd World DNA and Genome Day**, Qujiang International Convention Center, 2012 年 4 月 25-28 日、China (Xi'an)
- 西田宏記. How do ascidian embryos count the cell division rounds in each tissue lineage? **6th International Tunicate Meeting**, 2011 年 7 月 3-7 日、McGill University, Canada (Montreal)
- 西田宏記. and Mc Dougall, A.。 Expectation from the community II. Cell Biology. **1st**

Tunicate Information System Meeting,
2010年11月11-13日、Hôtel Le Royal,
France (Nice)
西田宏記。How do embryos count the cell
division rounds in each tissue lineage?: An
ascidian case. **2nd Joint Meeting of the**
SFBD and JSDB, 2010年5月26-28日、
Institut Pasteur, France (Paris)

〔図書〕(計 1 件)

西田宏記 細胞周期フロンティア、共立出版
(共著, 174-180 ページ) 2010 年

〔その他〕

ホームページ等

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/nishida/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田宏記 (NISHIDA, Hiroki)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号:

(2) 研究分担者

熊野 学 (KUMANO, Gaku)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号: 80372605
(平成 25 年度 8 月まで連携研究者として
参画)

西野 敦雄 (NISHINO, Atsuo)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号: 50343116
(平成 23 年度 12 月まで連携研究者として
参画)