

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23770063

研究課題名（和文） ワカレオタマボヤ形態の網羅的解析～最も単純なモデル脊索動物の確立に向けて

研究課題名（英文） Comprehensive analyses on the morphology of *Oikopleura* and its establishment as the simple chordate model.

研究代表者

西野 敦雄 (NISHINO ATSUO)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：50343116

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、脊索動物ワカレオタマボヤを真に有用なモデル動物として確立することであった。我々は、核局在性蛍光タンパク質を胚に発現させ、これまで不明だった孵化後の組織構築過程を詳細に調べた。また RNA 干渉により遺伝子発現抑制を起こす手法を確立した。電子顕微鏡観察により、オタマボヤ類の表皮に驚くべき多様性を見出した。本研究により得られた技術・知識はこの動物の有用性を高め、今後多くの発見をもたらす基盤となる。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aimed to establish an appendicularian chordate *Oikopleura dioica* as a simple and useful research model system, as comparable to the nematode *C. elegans*. We analyzed cellular behaviors during the developmental processes of this organism using real-time imaging techniques. Also we raised an efficient dsRNA-induced RNA interference method in *O. dioica*. We accumulated morphological data of *O. dioica* and other species by transmission electron microscopy, uncovering surprising diversity of epidermis among appendicularian species. These methods and data accumulated through this project would strengthen the usefulness of this organism and provide a basis for the plentiful discoveries in future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：形態形成、ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

生物学の歴史の中で、単純な細胞構成・ゲノム構成を備える線虫 *C. elegans* の果たしてきた役割は大きい。しかし線虫と我々ヒトを含む脊索動物は系統学的に大きく隔たっており、実際、さまざまな細胞機能や分子機能上の違いが指摘されてきた。ワカレオタマボヤは脊椎動物と同じ脊索動物門に属し、オタマジャクシ形の基本形態を脊椎動物と共有するが、線虫に比するほど単純な細胞・ゲノム構成を持つ動物として注目されていた。ワ

カレオタマボヤは海洋プランクトンで、世代時間が約5日、ゲノムサイズは約72 Mb、神経細胞は100個程度、体全体でも3000細胞程度に過ぎない。このような有用な特徴を備えているにもかかわらず、動物理解の基本となる形態・生理・発生学的な知識の蓄積は未熟な段階にとどまっていた。我々は、研究開始までに実験室内で人工海水を用いてこの動物を長期かつ安定に経代飼育する方法を確立し、また受精卵や卵巣への合成mRNAやDNAコンストラクトの注入による外来遺

伝子の強制発現法、遺伝子資源を半永久的に保存するための精子凍結保存法を完成させていた。

2. 研究の目的

本研究で我々は、線虫のように真に有用で単純な研究モデル動物を、脊索動物において確立することを目的とした。既に完成させた飼育技術と外来の核酸からタンパク質を生体内で発現させる手法を元に、これを有効に活用し、ワカレオタマボヤの全生活史を通じた形態学的特徴とその形態形成過程を網羅するとともに、さらなる発展に資する遺伝学技術の導入を図った。

3. 研究の方法

平成 23, 24 年度の 2 年間にわたり、我々は個体によらず一定の発生パターン、速い発生プロセス、少ない構成細胞数、生活史を通じた高い透明性、コンパクトなゲノム構造を示す脊索動物であるワカレオタマボヤ *Oikopleura dioica* を対象として、以下の 3 点に関する研究を進めた。

(1) 蛍光タンパク質プロンプを用いた核と細胞膜のライブイメージングにより、発生過程を通じた細胞分裂のパターン、細胞系譜、細胞移動、細胞形態変化を調べた。特に後期発生に注目して解析を進めた。

(2) この動物に対して、遺伝学的な研究技術の導入を試みる。特に遺伝子発現の抑制する RNAi 技術の導入に取り組んだほか、蛍光タンパク質発現コンストラクトのトランスジェニック系統作出にかかる技術の確立に取り組んだ。

(3) 走査型および透過型電子顕微鏡により、細胞表面、体内表面、細胞内外の微細形態を明らかにした。ワカレオタマボヤの近縁種についても解析を進めていった。

4. 研究成果

上記の各手法による成果は以下のようにまとめられる。

(1) 2011 年度には、我々はまず、核局在性蛍光タンパク質の合成 mRNA を卵巣に注入すると、胚の細胞核に安定した蛍光局在を観察できることを示した。2012 年度には研究代表者の前任地である大阪大学理学研究科生物科学専攻西田宏記教授の研究室のメンバーとともに研究を進めた。微分干渉像のタイムラプス観察や、核に局在する蛍光タンパク質の観察、FM-43 で細胞膜染色を行うことを組み合わせて、これまでほとんど分かっていなかった孵化後の組織構築過程について、ワカレオタマボヤの後期発生過程を詳細にタイムラプス観察することに成功した。このことは、ワカレオタマボヤでライブイメージングの手法がきわめて良好に適用できること

を示す。

(2) 2011 年度に卵巣内に核局在性蛍光タンパク質をコードした mRNA とともに蛍光タンパク質の dsRNA を導入することによって、非常に高効率に RNAi を引き起こせることを見出した。2012 年度には研究代表者の前任地である大阪大学理学研究科生物科学専攻西田宏記教授の研究室のメンバーとともに研究を進め、RNAi の手法を内在性の遺伝子発現に対しても適用を行った。脊索に特異的な転写因子をコードする *Brachyury* 遺伝子に対してその dsRNA を卵巣内に注入することで、生まれた胚における有意な *Brachyury* 遺伝子発現の減退と顕著な尾部の退縮を引き起こした。この結果は、ワカレオタマボヤにおいて、RNAi の手法がきわめて良好に適用できることを示唆する。

(3) 走査型および透過型電子顕微鏡による観察を、ワカレオタマボヤとともに、それと同時に採取される様々なオタマボヤ類とあわせ詳細に行った。これにより、オタマボヤ類の表皮の組織構築には驚くべき多様性が存在することを見出した。この形態学的研究については琉球大学理学部海洋自然科学科広瀬裕一教授とともに研究を進めた。

本研究を通して発展した技術、蓄積した観察事実は、この動物の新しいモデル生物としての有用性を高め、今後多くの発見をもたらす基盤となるものである。

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 8 件)

Keisuke Nakashima, Atsuo Nishino, Euichi Hirose “Forming a tough shell via an intracellular matrix and cellular junctions in the tail epidermis of *Oikopleura dioica* (Chordata: Tunicata: Appendicularia).” *Naturwissenschaften* 98: 661-669, 2011. 査読有. DOI: 10.1007/s0014-011-0815-y

Euichi Hirose, Keisuke Nakashima, Atsuo Nishino “Is there intracellular cellulose in the appendicularian tail epidermis? A tale of the adult tail of an invertebrate chordate.” *Communicative & Integrative Biology* 4: 768-771, 2011. 査読有. DOI: 10.4161/cib.4.6.17757

Koichi Nakajo, Atsuo Nishino, Yasushi Okamura, Yoshihiro Kubo “KCNE1 subdomains involved in KCNE1 and KCNE3 modulation revealed by an invertebrate KCNE1 ortholog.” *Journal of General Physiology* 138: 521-535, 2011. 査読有. DOI: 10.8085/jgp.201110677

Atsuo Nishino, Shoji A. Baba, Yasushi Okamura “A mechanism for graded motor control encoded in the channel properties of the muscle ACh receptor.” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108: 2599-2604, 2011. 査読有. DOI: 10.1073/pnas.1013547108

Keisuke Nakashima, Atsuo Nishino, Yoshiki Horikawa, Euichi Hirose, Junji Sugiyama, Nori Satoh “The crystalline phase of cellulose changes under developmental control in a marine chordate.” Cellular and Molecular Life Sciences 68: 1623-1631, 2011. 査読有. DOI: 10.1007/s00018-010-0556-7

Michio Ogasawara, Mari Sasaki, Noriko Nakazawa, Atsuo Nishino, Yasushi Okamura “Gene expression profile of Ci-VSP in juveniles and adult blood cells of ascidian.” Gene Expression Patterns 11: 233-238, 2011. 査読有. DOI: 10.1016/j.gep.2010.12.004

西野敦雄 “脊索動物の遊泳運動：リズムックで可変的な進行波生成のための似て非なる二つの方法” 数理解析研究所講義究録 1796: 85-92, 2012. 査読無.

Tatsuya Omotezako, Atsuo Nishino, Takeshi A. Onuma, Hiroki Nishida “RNA interference in the appendicularian, *Oikopleura dioica*, reveals the function of the *Brachyury* gene.” Development, Genes and Evolution, in press, 2013. 査読有. DOI: 10.1007/s00427-013-0438-8

〔学会発表〕(計6件)

表迫竜也、西野敦雄、西田宏記 オタマボヤにおける RNAi の試み 日本動物学会第 82 回大会 2011 年 9 月 21 日 旭川市大雪クリスタルホール

西野敦雄、馬場昭次、岡村康司 ホヤの尾の運動制御機構 日本動物学会第 82 回大会、シンポジウム「動物細胞の移動のメカニズム—単細胞・多細胞・二次元・三次元—」 2011 年 9 月 23 日 旭川市大雪クリスタルホール

西野敦雄、中島啓介、広瀬裕一 ホソサイヅチボヤ *Fritillaria haplostoma* における表皮の微細構造 日本動物学会第 83 回大会 2012 年 9 月 13 日 大阪大学豊中キャンパス

西野敦雄 海の青にも染まらず漂うオタマボヤ 日本動物学会第 83 回大会シンポジウム「数ミリ以下の動物学」 2012 年 9 月 14 日 大阪大学豊中キャンパス

Tatsuya Omotezako, Atsuo Nishino, Takeshi Onuma, Hiroki Nishida “Development of RNA interference method in appendicularian

Oikopleura dioica. The 7th International Tunicate Meeting 2013 年 7 月 22 日予定 The Universita degli Studi di Napoli Parthenope, in Napoli, Italy.

〔図書〕(計2件)

斎藤成也 他編 共立出版 進化学事典 2012 pp. 292-296、303-305、306-307.

中村桂子 編 新曜社 生命誌年刊号「遊ぶ」 2012 pp. 161-167.

〔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://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/animalphysiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西野敦雄 (NISHINO ATSUO)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：50343116