

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570232

研究課題名(和文)一年魚を用いた脊椎動物の発生休止の分子メカニズムの解析

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of the diapause

研究代表者

黒川 大輔(Daisuke, Kurokawa)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40342779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000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の分子メカニズムとその進化の解明を目標に三年間の研究を行った。

発生中の胚と発生休止胚のそれぞれのトランスクリプトーム解析を行い、得られた遺伝子発現プロファイルやRT-PCR等の解析から発生休止胚に高発現している遺伝子を選抜に成功した。これらの遺伝子についての機能を調べる為にCRISPR/Cas9ゲノム編集技術によりこれらの遺伝子の突然変異体系統の樹立を行った。

研究成果の概要(英文)：Diapause is an alternative developmental pathway that arrests growth at specific developmental stages, and is an important strategy to adapt to the environment, but its molecular function is poorly understood. To elucidate the molecular mechanisms of vertebrate embryos, I have studied it using the annual killifish *Nothobranchius korthausae*. Highly expressed genes in diapause embryos were selected by the comparison of the transcriptome analysis between diapause and developing embryos. To analyze the function of these genes, mutations were introduced into these loci using genome editing technology.

研究分野：発生生物学

キーワード：発生進化 発生休止

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い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。

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？代謝が低下した状態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。

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、ホルマウント 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) 核にEGFP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) *Nothobranchius* 属の魚は飼育が難しい種が多いため、本研究を開始するに当たって、国内で入手可能な数種を飼育し、比較検討を行った所、*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 15 代以上に渡り、近親交配で維持されており、近交系の樹立に成功し、今後のゲノム解析等にも有用なリソースを確立出来た。今後もこの系統を維持する予定である。

(2) 中内胚葉や体軸形成等の形態形成に関わる BMP4, Chordin といったシグナル分子や Gsc や Otx2 といった転写因子をコードする遺伝子を縮重プライマーを用いた 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。

(3) 飼育法の確立により *N. korthausae* から大量の受精卵を得る事が可能になったため、実験的に得た休眠胚と、休眠していない胚のそれぞれから全胚 RNA を得て、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行った。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 TALEN 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う予定である。

(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 を発現する魚を用いて、休眼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 2)。これらの系統も研究ツールとして維持して行く予定である。

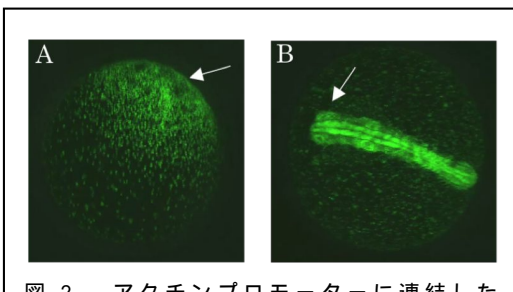


図 2. アクチンプロモーターに連結した Histone-H2B/EGFP 融合遺伝子を発現するトランスジェニック魚: 全細胞の核が EGFP によって標識されている。A; 受精後 60 時間胚矢印の領域に細胞が集合している。B: 10 体節期 矢印は頭部

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

黒川大輔 (代表) 非モデル真骨魚類へのゲノム編集技術の応用 第 4 回ゲノム編集研究会 2014 年 10 月 6 日 広島国際会議場(広島県広島市)

黒川大輔 (代表) Molecular mechanisms of deep cell reaggregation during early development of an annual killifish, *Nothobranchius korthausae*. 第 46 回日本発生物学会 2013 年 5 月 26 日くにびきメッセ(島根県松江市)

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.mmbs.s.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
黒川 大輔 (KUROKAWA, Daisuke)
東京大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 40342779

(2) 研究分担者
無し ()

研究者番号:

(3)連携研究者
無し ()

研究者番号：