

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440108

研究課題名(和文) 始原生殖細胞の発生起源と移動に関する進化発生学的解析

研究課題名(英文) Evolutionary developmental analysis for the origin and migration of primordial germ cells

研究代表者

日下部 りえ (Kusakabe, Rie)

国立研究開発法人理化学研究所・倉谷形態進化研究室・研究員

研究者番号：70373298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヤツメウナギは円口類に属し、脊椎動物のなかでも最も初期に分岐し、祖先的な形質を保持しながら現在に残る動物である。本研究ではヤツメウナギを主たる材料に、始原生殖細胞をはじめとする未分化な前駆細胞の起源と挙動が脊椎動物の進化過程でたどった道のりを明らかにすることを目指し、発生過程における遺伝子の発現パターンの解析と、組織形態学的観察、および遺伝子導入による細胞運命の追跡手法の確立をおこなった。他の脊椎動物系統で得られた知見と比較検討を行い、長距離移動性の未分化前駆細胞の獲得が、複雑かつ多様な形態の進化に結びつくと推察した。

研究成果の概要(英文)：The cyclostome lampreys, a group of vertebrates that diverged early in evolution, retain various ancestral morphological features. In order to clarify the evolutionary pathway of origin and developmental behavior of undifferentiated precursor cells, including primordial germ cells, we conducted examination of expression patterns of developmental genes and histological observation. We also attempted the new experimental techniques for lineage tracing after introduction of artificial gene constructs. Comparison with insights from other vertebrate species implied the evolutionary relationships of the migratory undifferentiated precursor cells and the establishment of complex and diverse morphology of vertebrates.

研究分野：生物学

キーワード：生殖細胞 脊椎動物 神経堤細胞 細胞分化 筋肉 ヤツメウナギ

1. 研究開始当初の背景

動物の初期発生では、未分化な状態を維持しながら長距離を移動する細胞種が複数見出される。始原生殖細胞 (PGC) はその一つであり、この細胞は生殖細胞へと分化し、接合子 (受精卵) となって世代を継続する。すなわち、PGC は次世代の全ての細胞種 (体細胞と生殖細胞) を生み出すという、生命に不可欠の機能を担っている。初期胚において PGC がどのように運命決定されるかということについては長い研究の歴史があり、近年、そのメカニズムには種によって大きな違いがあることが指摘されている。

ゼブラフィッシュやアフリカツメガエルなど複数のモデル脊椎動物において、母性 mRNA やタンパク質の複合体である生殖質 (germ plasm) が存在し、卵割期にそれを受け継いだ細胞が PGC となり、生殖巣原基に向かって長距離を移動することが知られている。一方、哺乳類を含む多くの系統で、特定の割球には PGC の起源が見出せず、生殖巣原基をもたらず中胚葉などとの相互作用の重要性が示唆されている。

ヤツメウナギは円口類に属し、脊椎動物門の中で最も初期に分岐し、祖先的な形質 (顎がない、対鰭をもたないなど) を保持しながら生き残った動物である。生息域の狭い希少種であり、胚発生の解析例は少なく、PGC の形成過程については、Okelberg (1921) や Hardisty (1971) によるものが存在するのみである。いずれも後期発生に関するものであり、PGC が受精卵のどの部分に由来し、どのような相互作用に制御されて生殖巣内に収まるのかは全く不明である。

また、脊椎動物の初期発生においては PGC 以外にも、長距離移動をする体細胞の前駆細胞が存在する。神経堤細胞や、皮筋節に由来する軸下筋前駆細胞がその例であり、移動に必須なシグナル情報伝達の分子機構が解明されつつある。例えば Sdf1-CXCR4 などのリガンド-受容体相互作用は、これらの体細胞と PGC の両方で必須であることが示唆されている。このような情報伝達機構が脊椎動物の初期進化においてどのように獲得されたのかは謎に包まれている。

2. 研究の目的

本研究ではヤツメウナギ PGC の初期胚内での移動経路を観察し、細胞移動を制御する遺伝子の相互作用を、実験発生学的手法により調べる。また、ヤツメウナギにおいて発生初期に現れる様々な組織の前駆細胞を蛍光標識することにより、筋肉前駆細胞や神経堤細胞の挙動を追跡する。得られた結果を、真骨魚類のモデルであるゼブラフィッシュやメダカ、およびアフリカツメガエルでの知見と比較することにより、PGC 形成および未分化な体細胞前駆細胞の長距離移動に関わ

る遺伝子機能の進化プロセスを解明する。

3. 研究の方法

以下の解析により、日本産カワヤツメ *Lethenteron japonicum* の PGC および体細胞系列前駆細胞の生成と挙動を分子マーカーを用いて解明し、形態学的な観察と合わせて記述する。

(1) ヤツメウナギの後期胚およびアンモシテス幼生の組織切片標本を作成し、一般的な組織染色法により、生殖巣と生殖細胞を同定し、位置関係の変化を解明する。

(2) ヤツメウナギの PGC 形成の初期に働くと思われる遺伝子、および生殖巣発生に関わる遺伝子の発現パターンを調べる。方法としてはホールマウント in situ ハイブリダイゼーションを用いる。

(3) 繁殖期 (5 月～7 月) に得られるヤツメウナギ胚を用いて、外来遺伝子 DNA 導入手法を開発する。組織特異的なレポーター遺伝子の発現が可能になれば、特定の組織に分化する細胞の挙動を発生過程を通じて観察することができる。

(4) 発生初期に現れるさまざまな組織の前駆細胞を蛍光トレーサー DiI で標識する実験を行う。

(5) 上記の実験結果について、脊椎動物系統間での比較を行い、遺伝子配列の多様性や初期発生様式の違いと合わせて考察する。

4. 研究成果

(1) 外来遺伝子 (DNA) 導入手法の開発

神経堤細胞、神経細胞、および体節細胞に特異的に発現する遺伝子について、上流転写調節領域を蛍光タンパク質 (GFP, kaede, venus 等) に連結した DNA コンストラクトを作成した。これを転移酵素の mRNA と混合し、ヤツメウナギ受精卵に顕微注入したところ、後脳、神経管、および筋肉に特異的な蛍光が観察された。また前脳や心臓に特異的な遺伝子の発現が胚発生過程を通じて観察できた。この手法は遺伝学的解析の困難なヤツメウナギにおいて、初期発生におけるさまざまな遺伝子の発現制御の解析を行う際に有効であると期待される。

(2) アンモシテス幼生および後期胚を用いた形態的な観察

ヤツメウナギの後期胚およびアンモシテス幼生を用いて体幹部の形態的な観察を

行った。ブアン固定あるいはセラ固定した標本から横断組織切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行って観察したところ、生殖腺とそこに含まれる生殖細胞が見出された。また筋肉に発現する抗体を用い、ヤツメウナギの腹直筋および鰓下筋（移動性軸下筋の一つ、舌筋に相同）の前駆細胞の移動と伸展を、胚発生過程を追って観察した。

(3) 蛍光タンパク質の光変換を用いた細胞追跡

カワヤツメの初期胚を用いて、蛍光タンパク質 *kaede* を微小な領域で光変換することにより、細胞運命を追跡する技術を開発した。筋肉特異的な遺伝子上流制御配列に *kaede* をコードする遺伝子をつないだ融合 DNA を、カワヤツメ受精卵に顕微注入し、発生させたところ、咽頭胚において骨格筋および心筋に特異的な *kaede*（緑色）の発現が見られた。そこでこの胚を、長焦点距離の対物レンズを装着した蛍光顕微鏡にマウントし、体節一個分という小さな領域に焦点を合わせ、紫外線で励起したところ、*kaede* タンパク質が赤色に変換された。この細胞はのち数週間に渡って観察可能であり、特定の体節由来の細胞の移動をトレースすることができた。これらの実験により、ヤツメウナギの腹直筋および鰓下筋の発生過程を観察した。この技術を発生により初期（原腸陥入期など）における光変換に応用すれば、神経堤細胞などの長距離移動性の前駆細胞の追跡が可能である。

(4) 初期発生における新規遺伝子の発現パターンの解析

カワヤツメについて、生殖巣前駆細胞、神経堤細胞、筋肉細胞などの発生に関わる遺伝子（Sox 遺伝子群、Islet 遺伝子群など）を新規に単離した。方法としては個々の遺伝子のゲノム配列についてプライマーを設計し、カワヤツメ初期胚から抽出した mRNA に対して RT-PCR を行った。プライマー配列の探索については、2013 年に公開された日本産ヤツメウナギのゲノムシーケンスデータベースを活用した。続いて各遺伝子に対する RNA プロブ（ジゴキシンゲニンで標識）を合成し、*in situ* ハイブリダイゼーションにより胚における発現を調べた。その結果、第 23 期ごろのヤツメウナギ胚において、側板中胚葉・頭部中胚葉・体節の各領域の前後軸に沿った配置を明らかにした。また DiI による細胞標識の結果とあわせ、これらの中胚葉領域が生殖細胞、筋肉細胞、神経堤細胞の移動の場となることが推察された。

(5) 考察

脊椎動物の各系統で、母性 mRNA およびタンパク質の局在パターン、また PGC や移

動性の体細胞の移動様式が多様化し、それは脊椎動物の複雑かつ多様な形態を反映していると考えられる。また、分化前の多能性 (multipotent) 細胞が胚内を移動するという発生パターンが、脊椎動物の複雑な体制の基盤にあったと考えられる。

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 3 件)

- 1) 日下部りえ「ヤツメウナギで解き明かす進化の謎」実験医学 Vol.34, No.18. pp. 3086-3090 2016 年 11 月号 (羊土社) (査読なし)
- 2) Rie Kusakabe and Kunio Inoue. (2015) Developmental regulation and evolution of muscle-specific microRNAs. *Sem. Cell Dev. Biol.* 47-48: 9-16. (査読有)
- 3) Yuri L. Kawai, Kei Yura, Miyuki Shindo, Rie Kusakabe, Keiko Hayashi, Kenichiro Hata, Kazuhiko Nakabayashi, Kohji Okamura (2015) Complete genome sequence of the mitochondrial DNA of the river lamprey, *Lethenteron japonicum*. *Mitochondrial DNA* 26(6), 863-864 (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Rie Kusakabe and Shigeru Kuratani. Evolution and development of skeletal musculature in early vertebrates: with special reference to the head/trunk. “International Symposium: Morphological Evolution of Vertebrates: The Joint meeting of The 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan” 2016.11.16. 沖縄科学技術大学院大学(沖縄県国頭郡恩納村) 招待講演)
2. Rie Kusakabe. Molecular basis for divergence and elaboration of skeletal muscles. “The 4th Society of Skeletal Muscle Cell”

2016.11.14.ウイנקあいち(愛知県名古屋市)(招待講演)

3. Rie Kusakabe and Shigeru Kuratani.
Development and evolution of mesodermal components of early vertebrates. "Society for Developmental Biology 75th Annual Meeting-International Society of Differentiation 19th International Conference" 2016.8.4. ボストン(アメリカ)
4. Rie Kusakabe and Shigeru Kuratani.
Divergence and elaboration of skeletal musculature in early vertebrates. "The 11th International Congress of Vertebrate Morphology" 2016.7.2. ワシントンDC(アメリカ)
5. Rie Kusakabe and Shigeru Kuratani.
Evolution and development of muscles in the head/trunk interface of vertebrates. "Frontier of Myogenesis meeting: Molecular Mechanisms Modulating Skeletal Muscle Development and Homeostasis in Health and Disease" 2016.6.8. アシロマー(アメリカ)
6. 日下部りえ「円口類ヤツメウナギを用いた進化発生学」ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会 2015.8.18. 基礎生物学研究所(愛知県岡崎市)(招待講演)
7. Rie Kusakabe. Development and evolution of mesodermal components of the lamprey.
"Inaugural Meeting of the Pan-American Society for Evolutionary Developmental Biology" 2015.8.6. バークレー(アメリカ)
8. 日下部りえ「軸下骨格筋の多様性と発生メカニズム」第85回日本動物学会大会

2014.9.10-9.13. 東北大学(宮城県仙台市)

9. Rie Kusakabe, Saori Tani, Richard M. Harland, Kunio Inoue, Shigeru Kuratani.
Evolution of regulatory mechanisms in hypaxial muscle development. "10th International Congress of Vertebrate Morphology" 2013.7.8.-7.12. バルセロナ(スペイン)
10. Rie Kusakabe, Saori Tani, Richard M. Harland, Shigeru Kuratani and Kunio Inoue.
Developmental evolution of the hypaxial muscles of vertebrates. "46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists" 2013.5.28-5.31, くにびきメッセ(島根県松江市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

日下部 りえ (KUSAKABE, Rie)
国立研究開発法人理化学研究所・倉谷形態進化研究室・研究員
研究者番号：70373298

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

井上 邦夫 (INOUE, Kunio)
神戸大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：40252415