

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660263

研究課題名(和文)極体の活性化及び不活性化を制御する普遍的分子基盤の解明

研究課題名(英文)Studies on the fundamental molecular mechanisms regulating activation and inactivation of polar body

研究代表者

鈴木 雅京 (SUZUKI, MASATAKA)

東京大学・新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：30360572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：極体核由来細胞の数と分布について調べた所、大半の極体核由来細胞は、極体が退化消失する部位である卵の前極付近の背側に分布することがわかった。極体特異的マーカーを用いたPCR解析の結果、胚発生初期(stage 8)の卵では極体の存在が確認されたが、漿液膜の消失するstage 25の卵では極体の存在は確認されなかった。極体由来細胞をDsRedにより可視化し、その発生運命を追跡した所、卵黄細胞中にDsRed陽性細胞が見られたが胚子には認められなかった。以上の結果、極体核由来細胞は胚体外組織である漿液膜や卵黄細胞への分化能を有するが、胚子を構成する細胞には分化し得ず胚発生には寄与しないことがわかった。

研究成果の概要(英文)：We have found that fertilized eggs contain polar body-derived cells in serosa. This finding suggests that polar body remains active and has ability to participate in embryonic development. To examine whether the polar body-derived cells can develop into embryo, we investigated the positions of serosa cells originated from polar body nuclei. As a result, 80% of polar body-derived cells were located around the area at which is not relevant to embryogenesis. PCR based analysis using a polar body specific-marker revealed that polar body-derived cells disappeared at later embryonic stage at which the serosa disappears. To further define the fate of polar body, the polar body-derived cells were visualized by DsRed gene. Analyses using confocal laser microscopy demonstrated that DsRed-positive cells were observed only in yolk cells. Taken together with these findings, the polar-body-derived cells can develop into extraembryonic cells but has no ability to develop into embryonic cells.

研究分野：農学

キーワード：昆虫発生・生殖 卵 受精 極体形成 カイコ

## 1. 研究開始当初の背景

卵形成の際、減数分裂の過程で卵母細胞は不等分裂を起こし、結果的に1個の卵細胞と3個の極体を生じる。極体は、核と少量の細胞質しかもたず、やがて退化消滅してしまう。極体が形成されることの意義として、あえて不等分裂を引き起こすことによって成熟卵の細胞質が減ることを防ぐ役割をもつと考えられている。しかし、全ての動物にこの考え方が当てはまるわけではない。例えば昆虫の場合、卵細胞の減数分裂は細胞質の分裂を伴わないため、極体は卵細胞内部に留まり、胚盤が形成される頃まで存続する。その後極体は消失すると言われているが、極体が精子と受精することによって活性化し、正常に発生する場合もある。昆虫だけに限らず、多胚性のアルマジロでは極体は形成されず、1個の卵母細胞から4個の卵細胞が生じる。このように、極体は単に退化消失するばかりではなく、生物種によっては発生に参加するケースもみられ、不活性型から活性型に変化するという可塑性も持ち合わせている。退化消失する運命にある極体と、受精などの刺激により活性化した極体との間にはいかなる質的差異が存在し、それはどのような機構によってもたらされるのだろうか? カイコには極体が不活性化しない系統が複数存在し、卵を温湯に晒すことで極体を人工的に活性化させることも出来る。そこで我々はカイコのこのような特性に着目し、本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

カイコには極体が不活性化しない系統があり、卵を温湯に晒すことで極体を人工的に活性化させることも出来る。この点に着目し、本研究では退化消失する運命にある極体と、温湯処理などの刺激や突然変異が原因で活性化した極体との質的差異を捉え、その制御機構を明らかにすると共に、極体の活性化・不活性化を制御する普遍的分子基盤の解明を目指す。活性型極体と不活性型極体との間に見られる質的差異や、極体の活性化・不活性化の制御機構に着目した研究は少なく、これまでに得られた知見も極めて限られている。本研究は、カイコならではの特性を活かしてこの難題に答えようとしている点で独創的であり、学術的価値も高いと言える。本研究により、極体の活性化・不活性化を規定する特徴が明らかとなり、極体の活性化・不活性化の制御に関わる因子が同定されるだろう。それによって人工的に極体を活性化させ、単為生殖を誘発させることによって有用生物のクローン生産や繁殖が困難な希少種の人工繁殖が可能となるかも知れない。さらに細胞の全能性や多能性獲得機構の理解に寄与する新たな発見やヒントをもたらす可能性があり、ガン細胞の増殖を効果的に抑制する新

たな薬剤作用点の発見にも繋がる発展性を有する、意義深い価値をもつと言える。

## 3. 研究の方法

(1) 極体核由来細胞の視覚化し、その動態を追跡する

ショウジョウバエの場合、減数分裂の結果生じた3個の極体は卵の表層部に留まり、胚盤形成期まで分裂停止状態を維持するが、その後は卵の中央部に移動し、退化消失する (Foe et al., *The Development of Drosophila*, 1993)。しかし一方で、ある種の多胚性の寄生バチでは、極体が卵黄細胞に分化することが知られている。このことは、昆虫の極体が必ずしも退化消失する運命にあるわけではなく、実は増殖する方が一般的である可能性を示唆している。この点に着目し、カイコの極体由来細胞を可視化し、その発生運命を追跡する。このために、卵色や体色、DsRedなどの優性マーカー遺伝子をヘテロにもつ雌と、これらの遺伝子について劣性ホモにもつ雄、もしくはDsRed 遺伝子をもたない雄とを交配することによって得られた受精卵のうち、受精核の遺伝子型が劣性ホモ、もしくはDsRed マイナスである卵を解析の対象に用いる。もし極体由来の細胞が退化消失することなく増殖する場合、マーカー遺伝子由来の表現形質を発現する極体由来の細胞と、それらを発現しない受精核由来の細胞がモザイク状に観察されることが予想される。実際にそのような卵がどれくらいの頻度で見られるのか、また極体由来の細胞はどの程度まで増殖し、発生のどのステージまで増殖を続けるのか、さらに何らかの特定の細胞や組織、器官に分化するのか、という点について明らかにする。

(2) 極体活性化機構とヒストン修飾やDNAのメチル化修飾との関連性を調べる

カイコの極体も通常は退化消失する。退化消失する運命にある極体では遺伝子の発現が見られない。従って、極体の遺伝子発現はゲノムワイドに抑制されていると考えられる。ゲノムワイドな遺伝子発現の抑制メカニズムとして、DNAのメチル化や染色体のヘテロクロマチン化、ヒストン H3 やヒストン H4 の特定のリジンのメチル化や脱アセチル化、ヒストン H2 もしくはヒストン H3 バリエーションとの置換などが知られている。そこで、これらの点について不活性型極体と活性型極体の間に何らかの差異がみられるか否かを調べるため、抗メチル化 DNA 抗体、抗修飾ヒストン抗体、抗ヒストンバリエーション抗体、抗ヘテロクロマチンタンパク質抗体を用いた免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による詳細な解析を行う。活性型極体の誘発には、カイコで古くから用いられている温湯処理法を用いると共に、活性型極体を生じる変異体で

ある *mo* 系統の受精卵を解析の対象として用いる。以上の解析によってある特定のヒストン修飾や DNA 修飾の蓄積が見られたら、それらの修飾を触媒する酵素を標的とする阻害剤や siRNA を卵に顕微注入することによって極体の活性化・不活性化に影響を及ぼすことが出来るかどうかを確認する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 卵色遺伝子を用いた極体核由来細胞の可視化とその追跡

これまでの卵色マーカーを用いた解析により、漿液膜を構成する細胞(漿液膜細胞)の一部に極体核由来の細胞を含む卵が、一雌の産下する卵あたり約 20%から 40%の割合で出現することが確認された。また、調査に供した全ての雌(10 雌)の産下卵において、極体核由来の漿液膜細胞をもつ卵がみられることがわかった。このことは、カイコにおいて極体核は退化消失することなく分化能を有しており、少なくとも漿液膜細胞に分化する能力については一般的であることを示唆している。

そこで次に、極体核由来の細胞が胚子に分化する可能性について検討するため、漿液膜細胞へと分化した極体核由来細胞の数と、その分布について詳細に調べることにした。

その結果、胚盤葉が形成される領域である、卵の腹側に分布する極体核由来の漿液膜細胞の数は、全ての極体核由来漿液膜細胞の 2%から 25%程度であったが、卵の後極側の腹側に分布する極体核由来漿液細胞の割合はほぼ 0%であった。大半の極体核由来漿液膜細胞は前極付近の背側に分布していることが判明した。この部位は極体核が受精核から離れ、退化消失する部位として知られている。従って、以上の結果は、極体核由来の漿液膜細胞は、退化消失する運命にある極体核が退化せず、その場で分裂をくり返した結果形成されたものと推測された。将来胚盤葉が形成される領域に分布する極体核由来漿液細胞の割合が少なかったことから、極体核由来の細胞が胚子に取り込まれる可能性は低いことが予想された。

##### (2) 極体核特異的 DNA マーカーを用いた極体核由来細胞の経時的推移

漿液膜細胞は胚発生の後期(stage 25)には胚子に食下され、消失してしまう。このため、胚発生の後期において極体核由来の細胞の存否を視覚的に判断することはできない。そこで、極体核特異的な DNA マーカーを PCR により検出することによって、極体核由来の細胞が胚発生のどのステージまで存在するかを確認することにした。

その結果、胚発生の初期である stage 8 の卵では極体核特異的な DNA マーカーの増幅がみられたが、stage 25 の卵では DNA マ

ーカーの増幅が全く見られないことが判明した。以上の結果は、極体核由来の細胞は漿液膜細胞の消失と共に卵から完全に消失してしまうことを示している。従って、極体核由来の細胞は、胚体外組織である漿液膜細胞には分化できるものの、胚子に取り込まれることはなく、胚子の発生には寄与しない可能性が高いといえる。

##### (3) DsRed 遺伝子による極体核由来細胞の可視化とその追跡

これまでの卵色マーカーを用いた解析では、卵表面における極体核由来の細胞の挙動についてしか追跡することができない。そこで次に、カイコの極体由来細胞を DsRed により可視化し、その発生運命を追跡することにした。全身で DsRed の発現を示す transgene をもつ組換えカイコ系統を実験に供試することにした。このために、全身で DsRed を発現する組換え遺伝子をヘテロにもつ雌と、この組換え DsRed 遺伝子を持たない雄とを交配することによって得られた受精卵のうち、受精核の遺伝子型が DsRed マイナスであるもの、すなわち、一見すると DsRed を発現していない卵を解析の対象に用いる。もし極体由来の細胞が退化消失することなく増殖する場合、DsRed を発現する極体由来の細胞と DsRed を発現しない受精核由来の細胞がモザイク状に観察されることが予想される。

カイコの産下卵から胚子及び卵黄細胞を解剖により取り出し、DsRed 陽性細胞の所在を確認した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察の結果、卵黄細胞の中に DsRed 陽性細胞が見られ、だるま胚期の胚子においても DsRed 陽性細胞が見られる場合があった。胚子において検出された DsRed 陽性細胞が極体核由来の細胞であることを確認するため、極体核特異的 DNA マーカーを用いた PCR を行ったが、マーカーの増幅は確認されなかったことから、これらの DsRed 陽性細胞は極体核由来であると断言することができなかった。

##### (4) 生細胞染色法を用いた胚子特異的染色法の開発

stage 8 頃の胚子は多量の卵黄細胞に埋没しているため、胚子と卵黄細胞の識別が困難であり、胚子だけを解剖により単離することが困難であることが問題として浮上した。卵黄細胞は胚子の発生に必要な栄養素として使用され、漿液膜細胞同様、胚発生の後期には消失してしまう。従って、胚子に確実に取り込まれた極体核由来細胞を特定するためには、胚子に付着した卵黄細胞を剥離し、胚子を的確に分離する必要があると考えられた。

そこで我々は、卵黄細胞は染色せず、胚子だけを明瞭に染色する方法を模索することにした。様々な染色法を試した結果、カ

ルセイン-AM を用いた生細胞染色法を施すと、卵黄細胞は一切染色されず、胚子のみが明瞭に染色され、容易に視認することができることを突き止めた。そこでこの方法を利用し、様々なステージの胚子を解剖により摘出し、DsRed 陽性細胞の所在をあらためて確認することにした。しかし、前回の結果と同様、胚子に含まれる DsRed 陽性細胞を確認することはできなかった。上述した極体核特異的 DNA マーカーを用いた PCR による診断結果と総合すると、やはり極体核由来細胞は、胚子を構成する細胞には分化し得ず、胚発生には寄与しない可能性が高いといえる。

#### (5) ヒストン H3 メチル化酵素が胚発生に及ぼす影響

上述の実験結果を総合すると、極体核由来の細胞は退化消失せず、胚体外組織である漿液膜細胞へと分化する能力をもつといえる。従って、極体核は何らかのメカニズムにより不活性化を免れると予想される。極体核の活性化・不活性化にヒストン修飾の変化が関与するか否かを確かめるため、ヒストン H3 のメチル化酵素である SETD2, ADH2, EZH2, DOT1L の発現をノックダウンし、漿液膜細胞に含まれる極体核由来の細胞数をカウントすることにした。その結果、これらのメチル化酵素をノックダウンした卵において極体核由来と推定される漿液膜細胞は確認することができなかった。しかしながら、ヒストンメチル化酵素のノックダウンの影響により漿液膜細胞の着色ステージまで発生が進んだ卵の数が少なかったため、ヒストン H3 メチル化酵素のノックダウンが、極体核の活性化に及ぼす影響について正しく評価することはできなかった。今後は、極体核を細胞学的に特定する手法を開発し、極体核を構成する染色体におけるヒストンメチル化のパターンの変化を免疫組織学的に評価することで、極体核活性化とヒストン修飾の関連性について調査する必要があると考えられた。

#### 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)

酒井弘貴, 横山岳, 青木不学, 鈴木雅京. 限性黒卵系統を用いたカイコ性決定研究に適したアッセイ系の構築. 昆虫 DNA 研究会ニュースレター, 査読無, 22 巻, 2015, 28-31.

Hiroki Sakai, Takeshi Yokoyama, Hiroaki Abe, Tsuguru Fujii, Masataka G. Suzuki. Appearance of differentiated cells derived from polar body nuclei in the silkworm, *Bombyx mori*. *frontiers in PHYSIOLOGY*, 査読有, Vol. 4, 2013,

##### [学会発表](計1件)

酒井弘貴, 横山岳, 青木不学, 鈴木雅京. 限性黒卵系統 S-2 を用いたカイコ性決定研究に適したアッセイ系の構築. 昆虫 DNA 研究会第 11 回研究集会, 査読無, 22 巻, 2015, 28-31. 2014 年 5 月 18 日. つくばサイエンスインフォメーションセンター (茨城県つくば市)

##### [その他]

ホームページ等

資源生物制御学分野業績発表論文

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/seigo/Publication/paper/Publication2014.html>

資源生物制御学分野業績学会発表

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/seigo/Publication/conference/conference2014.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 雅京 (SUZUKI MASATAKA)

東京大学大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号 : 30360572