

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570208

研究課題名（和文） 出芽ホヤにおける生殖系列と体細胞系列幹細胞の厳密さと柔軟性

研究課題名（英文） Stringency of germ and somatic stem cell lineages
in budding tunicates

研究代表者

川村 和夫（KAWAMURA KAZUO）

高知大学・教育研究部自然科学系・教授

研究者番号：30136361

研究成果の概要：出芽ホヤ生殖系列の再生を実行している間葉系幹細胞へモブラストを、分子レベルでcharacterizeし、RNA干渉法で機能を検討した。生殖系列幹細胞は、Vasa, Piwi, Myc, RACK1 を強く、Nanosを弱く発現した。VasaとRACK1 は、生殖腺形成に必須である。Piwiは、Vasaより広い範囲の生殖系列細胞で発現した。本研究結果は、Vasa⁺、Piwi⁺へモブラストが生殖系列の供給源（前駆細胞）であり、ホヤ生殖系列は、Piwiに代表される分子によって体細胞系列から仕切られていることを支持した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：群体ボヤ、出芽、へモブラスト、生殖系列、体細胞系列、幹細胞、Vasa、Piwi

1. 研究開始当初の背景

動物の生殖系列は、ショウジョウバエのように、卵細胞質の生殖細胞決定因子により前成的に決定される場合と、哺乳類のように、生殖細胞が発生学上等価な細胞群から後成的に形成される場合がある。いずれにしても、生殖系列は胚発生の早い時期に体細胞から隔離され、生殖細胞はその系列の子孫細胞のみから出現すると考えられた。

2000年前後から、Vasa や Nanos ホモログをプローブとして用いて、ヒドラ、コツブクラゲ、プラナリアなどの原始的後生動物の生

殖細胞を追跡する研究が始まった。ヒドラの幹細胞は、生殖系列マーカーを恒常的に弱く発現しており、生殖細胞にコミットされると強く発現し、体細胞に分化すると発現を失った。コツブクラゲの場合は更に興味深い。胚期で発現していたマーカーを、ストロンポリプ世代は完全に失う。しかし、次のクラゲ世代が到来すると、Nanos の発現が復活するとともに、始めて生殖細胞が出現する。このように、原始的後生動物の生殖は、世代交代と深い関係をもっており、胚期の割球と成体の生殖細胞が直線で結びつかないのが一般的

である。しかし、系統的に高等な動物で、そのようなことが起きる例はまだ知られていなかった。

2. 研究の目的

群体ボヤは、間葉系未分化細胞へモブラストをもつ。我々は、群体ボヤの生殖系列へモブラストと体細胞系列へモブラストの関係について4つの作業仮説を立てた。①ホヤのへモブラストは分化全能性であり、生殖系列と体細胞系列のどちらにも分化可能である。②生殖系列へモブラストは厳密に体細胞系列から隔離されており、互換性はない。③ホヤは生殖系列と体細胞系列のへモブラストをもつが、その他にどちらにもコミットされていない small population をもつ。④生殖系列と体細胞系列のへモブラストは、低い確率で分化転換可能である。

これらの可能性を実験的に検証し、群体動物における生殖細胞樹立のメカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。この問題を解決することにより、「群体動物は有性生殖のためになぜ世代交代を必要とするのか」という古典的疑問に解答を得ることが期待される。

3. 研究の方法

ミダレキクイタボヤとミサキマメイタボヤを用いた。各々の群体ライブラリから ERK, RACK1, Myc, Vasa, Piwi, Nanos の cDNA をクローニングし、in situ hybridization 法により発現部位と時期を調べた。

RACK1, Myc, Nanos の機能を RNAi 法により調べた。

BrdU 標識法を用いて、ミダレキクイタボヤ幹細胞の分裂増殖活性を調べた。

ミダレキクイタボヤの血管系にヒトリコンビナント BMP を顕微注射した。抗 Vasa 抗体を用いて、生殖系列幹細胞が誘導されるか否かを調べた。

4. 研究成果

(1) 未分化細胞で特異的に発現する遺伝子とその機能

群体ボヤ RACK1 は、生殖系列未分化細胞で強く発現した。生殖上皮(卵原細胞)と精巢外縁(精原細胞)で特に強い発現が見られた。ホヤ芽体の体細胞系列脱分化細胞も RACK1 を発現した。ホヤ芽体を RACK1 siRNA 処理し、4週齢で観察したところ、22例中全てにおいて生殖腺の発達が認められず、クランプ状態(細胞塊)で止まっていた。また、12例において個虫の成長が遅延した。成長不良の個体は、その後回復し、10週前後(2-2.5ヶ月)で対照群と見分けがつかなくなった。

RACK1 が生殖系列未分化細胞で強く発現

することを更に確かめるため、RACK1 5' flanking region 約 1.9kb をクローニングし、GFP レポーター遺伝子に連結し、生殖腺外植体にエレクトロポレーションした。その結果、

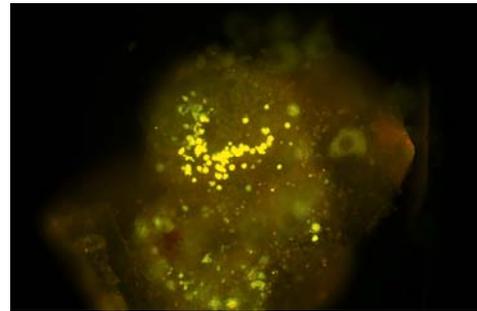


図1 ミサキマメイタボヤの生殖巣における RACK1-GFP の発現 矢印、卵原細胞と卵母細胞

生殖系列幹細胞が特に強いシグナルを発することがわかった(図1)。

ミダレキクイタボヤの Myc は、生殖細胞系列の未分化細胞と体細胞系列の多能性上皮(芽体原基)で強く発現したが、組織幹細胞(食道上皮や咽頭縦走血管)では発現しなかった。また、Myc RNAi は、体細胞系列幹細胞による Vascular budding を阻害した。これらの結果は、Myc が未分化細胞の維持増殖に機能していることを示している。

ホヤ Vasa と Piwi は生殖系列特異的で、Piwi がより広い範囲の細胞を染めた(図2)。Vasa RNAi は、体細胞系列に全く影響することなく、生殖巣の形成と発達を阻害した。

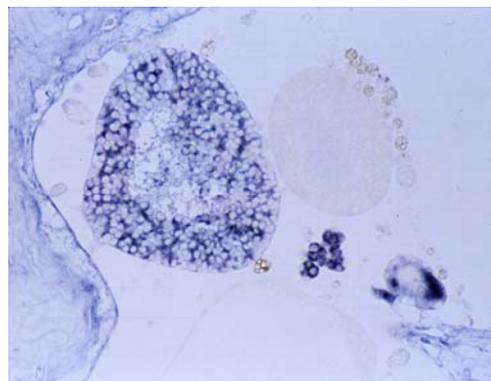


図2 ホヤ生殖巣における Piwi の発現

ホヤ Nanos は、精巣で強く発現し、卵巣でほとんど発現が見られなかった。体細胞系列は、芽体原基などの未分化組織が弱いシグナルを発した。Nanos RNAi は、体細胞系列に影響を与えることなく、精巣の組織のみを破壊した。

ホヤ生殖巣における ERK は、卵巣でのみ発現が見られた。体細胞系列では、芽体の形態形成領域で強い発現が認められた。発現する組織は、順次、表皮、間充織、咽頭腔上皮

に広がった。ERK は細胞の未分化性と直接関係しない、と結論した。

(2) 群体ボヤ幹細胞の分裂増殖活性

ミダレキクイタボヤ群体に BrdU を顕微注射し、一定時間ごとに群体の一部を固定し、抗 BrdU 抗体で核染色した。その結果、生殖系列では、loose cell mass の BrdU 標識指数が低く(図 3)、compact cell mass と精巢は著しく高い値を示した。Loose cell mass は、抗 Vasa 抗体で最初に染まる組織でもある。これらの結果は、loose cell mass が群体ボヤの生殖幹細胞であることを示している。体細胞系列では、芽体原基が高い取り込み指数を示すのみならず、成体の食道、咽頭縦走血管、内柱が標識された。これらの組織が成体幹細胞をもつことが始めて示唆された。血球は、内柱の周りや咽頭内で強く標識された。他方、被のう血管中の血球は、パルスラベルでほとんど染まらず、注射後 4 日目によく染まるようになった。この結果は、血球は体外の被のう血管では分裂せず、個体の血体腔を住处として増殖していることを示している。

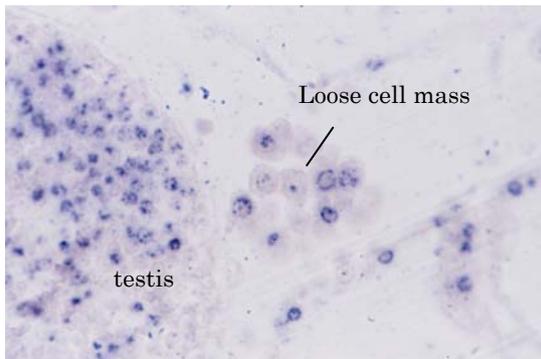


図 3 loose cell mass による BrdU 取り込み

ここまでを整理すると、生殖系列幹細胞は、Vasa, Piwi, Myc, RACK1 を強く発現する細胞であり、このうち Vasa と Piwi は生殖系列特異的であることがわかった(図 4)。

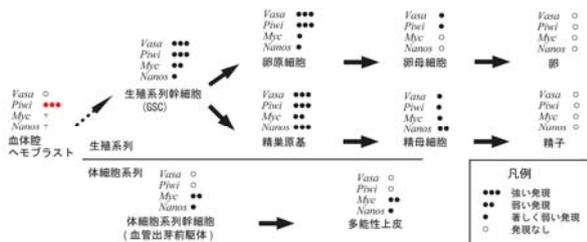


図 4 ヘモブラストとその子孫細胞による遺伝子発現

(3) BMP による Vasa 誘導

ミダレキクイタボヤの zooid-free colony (血管群体) に BMP2 を顕微注射 (0.15-0.2 μ g/ μ l) すると、vascular bud の数が著しく増加した(図 5)。また、同じ群体で抗 Vasa 抗体に反応する未分化様細胞が出現した(図 6)。特定の分子が、生殖系列を誘導できることを示したのは、少なくとも無脊椎動物では本研究が最初である。

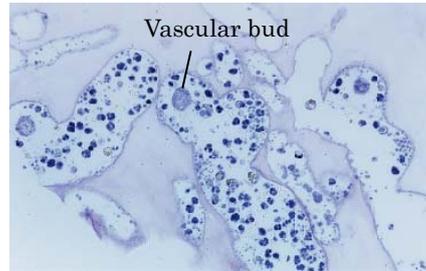


図 5 BMP による vascular bud の誘導

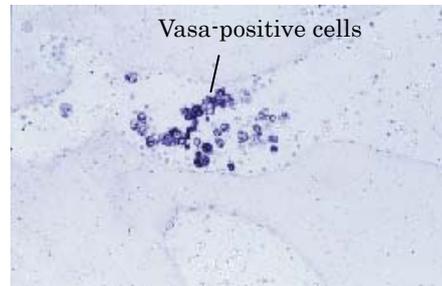


図 6 BMP による Vasa 陽性細胞の誘導

ホヤ BMP 関連分子が、体細胞系列幹細胞の組織分化、あるいは体細胞系列と生殖細胞系列の分化を調節する内在性因子か否かを確かめるため、以下の実験を行った。

まず、ホヤ BMP cDNA を調製した。5' 末端は不完全ながら、3' 末端は poly(A) までを含む約 1.5 kb 長 cDNA を得た。この配列をプローブにして、in situ hybridization を行った。発現部位は、生殖巣が位置する腹側血体腔に限られた。特によく発現したのは、腹側表皮であり、期待されたとおりの発現パターンであった。

(4) 結論

生殖系列のヘモブラストは、Vasa⁺Piwi⁺細胞と Vasa⁺Piwi⁺細胞を含んでいる。BMP によって誘導がかかるのは、Vasa⁺Piwi⁺細胞と予想されることから、この細胞が生殖系列の供給源(前駆細胞)である可能性が高い。また、本研究は、ホヤ生殖系列が Piwi に代表される分子によって体細胞系列から仕切られていることを支持した。

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 5 件)

- ① Sunanaga, T., Satoh, M. and Kawamura, K. (2008) The role of Nanos homologue in gametogenesis and blastogenesis with special reference to male germ cell formation in the colonial ascidian, *Botryllus primigenus*. *Develop. Biol.* 324, 31-40.
- ② Kawamura, K., Tachibana, M. and Sunanaga, T. (2008) Cell proliferation dynamics of somatic and germline tissues during zooidal life span in the colonial tunicate *Botryllus primigenus*. *Dev. Dyn.*, 237, 1812-1825.
- ③ Kawamura, K., Sugino, Y.M., Sunanaga, T. and Fujiwara, S. (2008) Multipotent epithelial cells in the process of regeneration and asexual reproduction in colonial tunicates. *Develop. Growth Differ.*, 50, 1-11.
- ④ Sunanaga, T., Watanabe, A. and Kawamura, K. (2007) Involvement of vasa homologue in switching from somatic stem cells to germline cells in the budding tunicate, *Polyandrocarpa misakiensis*. *Dev. Genes Evol.*, 217, 1-11.
- ⑤ Sugino, Y.M., Matsumura, M. and Kawamura, K. (2007) Body muscle cell differentiation from coelomic stem cells in colonial tunicates. *Zool. Sci.*, 24, 542-546.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kawamura, K. and Sunanaga, T.: Stem cells and transdifferentiation in colonial tunicates. 日本発生生物学会第 41 回大会. 2008 年 5 月 28 日. 徳島県徳島市.
- ② Sunanaga, T., Inubushi, H. and Kawamura, K.: Postembryonic germline specification in colonial ascidian, *Botryllus primigenus*. 日本発生生物学会第 41 回大会. 2008 年 5 月 28 日. 徳島県徳島市.
- ③ 西岡宗一郎・上野愛・川村和夫: 出芽ホヤにおける加齢のリセット機構. 第 31 回日本分子生物学会年会. 2008 年 12 月 11 日. 兵庫県神戸市.
- ④ 砂長毅・川村和夫: ミダレキクイタボヤ生殖細胞形成における nanos の機能解析. 第 30 回日本分子生物学会年会. 2007 年 12 月 12 日. 神奈川県横浜市.

[図書] (計 1 件)

- ① 川村和夫・砂長毅: ホヤ生殖系列幹細胞のフレキシビリティ. 21 世紀の動物科学 第 4 巻「性と生殖」培風館. 2008. 64-94.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川村 和夫 (KAWAMURA KAZUO)

高知大学・教育研究部自然科学系・教授

研究者番号: 30136361

(2) 研究分担者

砂長 毅 (SUNANAGA TAKESHI)

高知大学・教育研究部自然科学系・助教

研究者番号: 20448393

(3) 連携研究者

なし