

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570227

研究課題名（和文） 群体ボヤの生殖系列幹細胞が再生する仕組み

研究課題名（英文） Molecular and Cellular mechanisms of germline mother cell regeneration in colonial 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（和文）：ホヤは、脊椎動物に最も近縁な海産動物である。群体ボヤは、生殖細胞やその前駆細胞を除去しても生殖巣を再生出来ることから、生殖系列の可塑性を知る優れた材料である。本研究は、（1）Myc 遺伝子や Piwi 遺伝子を共発現することで特徴づけられる細胞がホヤ体液中に潜んでいること、（2）BMP に応答して、Myc⁺/Piwi⁺細胞は Vasa 遺伝子を発現し、生殖系列前駆細胞に分化すること、（3）従って、Myc⁺/Piwi⁺細胞は生殖系列母細胞（幹細胞）であり、その細胞が生殖系列の再生を可能にしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Ascidians are the marine invertebrate that is most closely related to vertebrates. Colonial tunicates propagate by means of both sexual and asexual reproduction, and they can regenerate gonads and germ cells even though gonad components are completely extirpated from the colony. This study has disclosed that *Myc/Piwi*-expressing cells are reserved in the hemocoel, and that they respond to BMP to express germline-specific gene *Vasa*, enabling the regeneration of germline cells and tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：幹細胞、生殖細胞、再生、無性生殖、ホヤ

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は、世代から世代へ生命を繋ぐ役割を担っている。その重要な役割ゆえに、生殖細胞は胚発生の初期に体細胞から隔離され、分化全能性や不老化といった機能を保持するとされてきた。

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。

他方、原始的後生動物は、これと全く異なる方法で生殖細胞を形成する。海産ヒドロ虫の胚は、プラヌラ幼生を経てポリプとなる。ポリプは機能的に分業しており、摂餌に専念する栄養個体とクラゲを出芽する生殖個体がある。生殖巣と生殖細胞、更に生殖細胞特異的遺伝子はクラゲの世代になってやっと登場する。

ホヤは脊椎動物に最も近縁な現生生物である。群体ホヤは、有性生殖の他に無性生殖（出芽）により増殖する。出芽は、組織器官の劇的再編であり、この時、生殖巣を含むほぼすべての組織が renewal される。群体ホヤが生殖系列をどのように維持・新生しているか、興味深いところである。

ホヤ生殖細胞の研究は、Mukai and Watanabe (1976)の形態学的研究、Sabbadin et al. (1979)の遺伝学を用いた研究、Manni et al. (1992)やOkada and Yamamoto (1993)の微細構造的研究のあと、10年近く途絶えていた。2000年以降、Vasaを分子マーカーとして、ユウレイボヤ胚生殖系列の発生と分化 (Fujimura and Takamura, 2000; Shirae-Kurabayashi et al., 2006)、群体ホヤにおける生殖系列の可塑性 (Sunanaga et al., 2006, 2007)等の研究が再開された。外国においては、2007年以降、群体ホヤ *Botryllus* を用いた研究が複数の国と研究室で実施された。しかし、専門用語の不統一、用いたプローブの精度、結果の解釈等に重大な齟齬があり、研究成果は一時期混乱をきたした。

2. 研究の目的

本研究は、ホヤ生殖系列の発生・分化・再生を統一的に理解することを主たる目的とした。

(1) 群体ホヤの生殖系列細胞が発現する遺伝子を網羅し、それらの遺伝子を用いて、幹細胞・前駆細胞・生殖細胞を再定義したいと考えた。

(2) 生殖系列の再生過程を詳細に追跡し、再生細胞のルーツを洞察したいと考えた。

(3) その洞察を検証するために、生殖細胞の分化誘導実験を計画した。

(4) 胚における群体ホヤ生殖系列の起源を探索し、始生殖細胞 (PGC) から成体の生殖系列母細胞に至る経路を考察したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) 材料の調製

ミダレキクイタボヤ (*Botryllus primigenus*)

を用いた。生殖細胞は、群体の成長に同調して形成・発達することが分かっているため、母群体を6等分し、それらを各々6枚のガラスプレートに貼り付け、24時間毎に固定した。

(2) 遺伝子調製

生殖系列の形成と分化への関与が予想される遺伝子は、degenerate primers もしくは網羅的 cDNA 解析によりサブクローニングした。Vasa, Myc, Nanos に加えて、Sox, Piwi, BMP, BMP receptor, Smad 等の cDNA を得た。

(3) 免疫組織化学

材料を4%パラホルムアルデヒド (氷温) で0.5-1時間固定し、脱水したのち、水溶性樹脂 (Technovit 8100) に包埋した (Kawamura and Sunanaga, 2011)。ウルトラミクロトームで準薄切したのち、通常の免疫染色を行った。

(4) in situ hybridization

材料を4%パラホルムアルデヒド (氷温) で12-18時間固定し、-30°C70%メタノールにて保存した。染色前にメタノールを除き、55°CでDig標識RNAプローブと12時間ハイブリダイズさせた。明視野染色は、この後アルカリフォスファターゼ標識抗Dig抗体で染色した。蛍光二重染色 (Double FISH) の場合は、DigもしくはBiotin標識RNAプローブとハイブリダイズさせた後、樹脂に包埋し、準薄切片をローダミン標識抗Dig抗体とFITC標識ストレプトアビディンで染色した (Kawamura and Sunanaga, 2011)。

4. 研究成果

(1) ホヤ生殖系列が発現する遺伝子群

Vasa: 生殖巣原基と生殖細胞で発現し、体細胞系列での発現は全く見られなかった。Vasaは、最も信頼できる生殖系列の分子マーカーの一つである。

Myc: 体細胞系列と生殖系列の未分化細胞で発現する。後述するように、生殖系列幹細胞の維持に必要ならしい。

Nanos: 雄性生殖細胞で強く発現する。体細胞系列と生殖系列の未分化細胞でも弱く発現する。

Sox: *Botryllus* SoxB は、体腔細胞にのみシグナルが見られる。生殖系列では発現が見られなかった。

Piwi: 全ての生殖細胞と体腔細胞の一部で強く発現する。

BMP: 上皮系体細胞がBMPを発現する。

BMP receptor: 間充織細胞で発現。生殖系列が含まれているか否かは不明。

Smad: 間充織細胞で発現。生殖系列が含まれているか否かは不明。

(2) 生殖系列の再生プロセス
ミダレクイタボヤは血管出芽を行うことが知られている。この芽体及びその子孫個体は完全に de novo に生殖細胞を再生している。Vasa を指標に生殖細胞を追跡し、次のことが明らかとなった。

①ホヤの血体腔は、約 0.5%の割合で Vasa 発現細胞を含む。Vasa⁺細胞が芽体に入ると、直接卵母細胞に分化した。すなわち、血中の Vasa⁺細胞は、すでに雌性生殖細胞にコミットされている。

②Vasa⁻細胞が予定生殖巣領域で細胞塊を形成する。細胞塊は、徐々に Vasa を発現するようになり、生殖系列前駆細胞 (germline precursor cells, GPC) となる。

③GPC は、Vasa を強く発現し、精巢原基、卵巣原基に分化する。

以上の結果を図 1 に要約した。

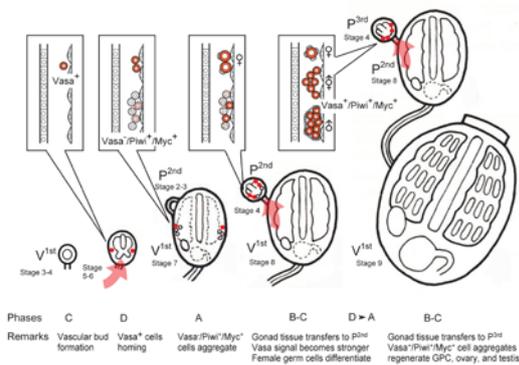


図 1 ホヤの無性生殖において生殖系列が再生する仕組み

血体腔に存在する Vasa⁺細胞は、形成直後の芽体に homing し、雌性生殖細胞に分化する。その他の生殖巣組織 (生殖系列前駆細胞・精巢原基・卵巣原基等) は、Vasa⁻細胞塊として芽体に住みつき、無性世代を受け渡される間に Vasa を強く発現するようになる。

(3) RNAi の結果

再生する生殖系列のリソースを探索するため、Double FISH を行った。その結果は、Vasa⁻/Piwi⁺細胞が生殖系列の供給源であることを示唆した (図 2)。Piwi を RNAi すると、GPC 形成が著しく損なわれることが、上記の推論を支持した。Piwi⁺細胞は Myc を共発現していた。Myc を RNAi すると Piwi⁺細胞数が激減し、GPC 形成が損なわれた。これより、Myc は Piwi の発現維持を通して、生殖系列の再生に寄与しているものと予想される。

(4) BMP による Vasa 誘導

Myc⁺/Piwi⁺/Vasa⁻細胞が生殖系列のリザーブ細胞であることを、より直接的に証明するために、BMP による Vasa 誘導実験を行った。0.15 - 0.2 マイクロ g ヒトリコンビナント

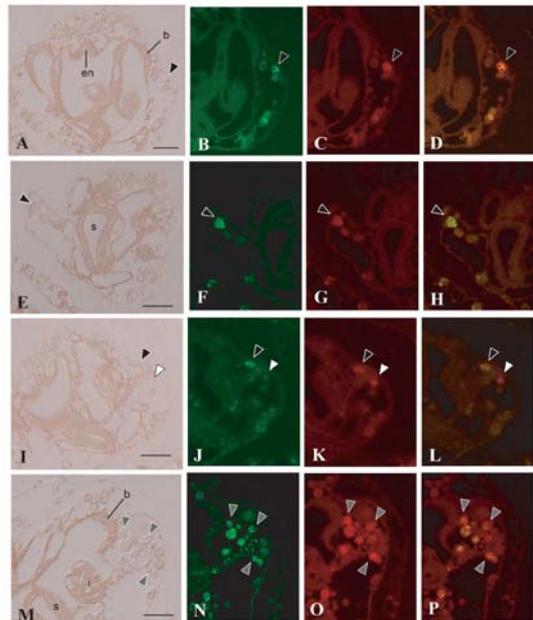


図 2 生殖系列における Vasa と Piwi の共発現、FISH

(A, E, I, M) 発達中の芽体の明視野像. (B, F, J, N) Vasa の発現. (C, G, K, O) Piwi の発現. (D, H, L, P) マージ像. 黒矢尻 Vasa⁺/Piwi⁺, 白矢尻 Vasa⁻/Piwi⁺, グレー矢尻 Vasa⁺/Piwi⁺.

BMP4 を群体小片に顕微注入し、2 日後に血体腔中の Vasa の発現を調べた。すでに述べたように、血体腔の Vasa 陽性細胞は全細胞の 0.5%を占めるにすぎないが、BMP の注入により、Vasa 陽性細胞が集合塊として出現するようになった (図 3)。Vasa を誘導された細胞を Double FISH 法で調べたところ、それらは Piwi を発現している細胞であった。以上の結

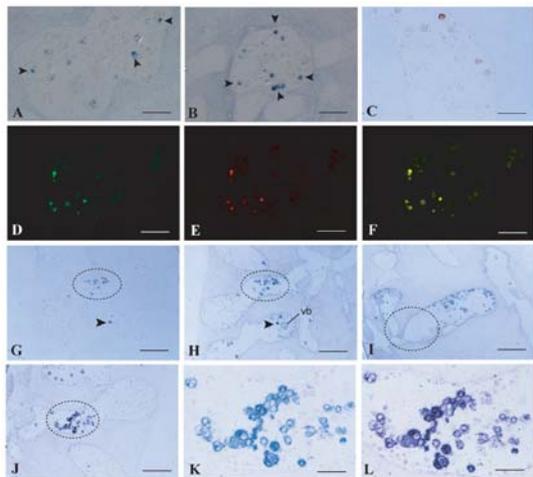


図 3 BMP による Vasa 誘導

(A-F) 発達中の芽体における Vasa⁺細胞の分布 (矢尻). (D) Vasa 発現 (E) Piwi 発現 (F) マージ像. (G-L) 被囊血管における Vasa 発現. Vasa⁺細胞は、細胞凝集塊として出現する。

果より、ホヤの血中にはGPCのfounder cellとして働く生殖系列母細胞(幹細胞)(GSC)が存在し、GSCはMyc+/Piwi+/Vasa-の特徴をもつと結論した。

(5) 生殖系列母細胞の胚発生上の起源

群体ボヤ(*Botryllus*)における生殖細胞の形成と再生を、単体ボヤ(*Ciona*)のそれと比較した。Vasa陽性細胞は*Botryllus*胚の後端に出現し、尾芽胚期の尾に位置を占めた。ここまでは、*Ciona*のVasa陽性細胞が示す挙動と一致していた(図4)。*Ciona*のVasa陽性細胞は、その後も、幼生尾部の内胚葉索近傍に保持され、幼生の尾の吸収に伴い変態中の個体に移動し、消化管に隣接する血体腔で生殖巣を形成する。故に、Vasa陽性細胞は、始原生殖細胞(PGC)と見なされている。他方、群体ボヤでは、尾芽期まで存在していたVasa陽性細胞が幼生期・変態期を通して失われ、無性生殖を数世代更新したのち、始めて生殖系列前駆細胞(GPC)が出現した(図4)。Vasaのシグナルが消える理由については、細胞死・発現停止・シグナルの特異的分解等が考えられるが、メカニズムは依然不明である。

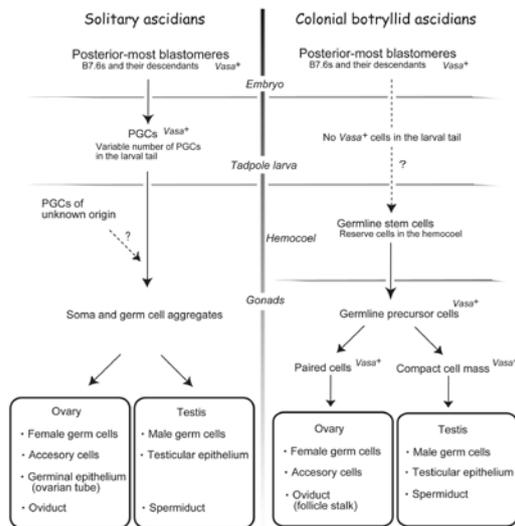


図4 単体ボヤと群体ボヤにおける生殖系列細胞の比較

胚における生殖系列細胞の挙動は、単体ボヤと群体ボヤで共通している。幼生・成体(群体)におけるVasa+細胞の挙動は、一見すると全く異なっているように見える。しかし、単体ボヤでは変態直後、群体ボヤでは生涯にわたって生殖系列が再生可能であることを斟酌すると、両者に根本的な違いは認められない。

*Ciona*では、PGCを含む幼生の尾を切除しても生殖細胞が出現する。これは、幼生のPGC

以外にも、生殖系列に分化する資格をもった細胞が変態中の個体に出現することを強く示唆している(図4)。すでに述べたように、*Botryllus*では、変態期よりも遙かにあとまでVasa陽性細胞がde novoに出現する。これらの結果を総合すると、Vasa陽性細胞の再生は、単体ボヤと群体ボヤに共通した特徴であると言えよう。

(6) BMPの作用機序に関する仮説

本実験で用いたヒトリコンビナントBMP4は、Vasa+細胞を誘導するだけでなく、体細胞系列未分化細胞(ヘモブラスト)の凝集、すなわちvascular bud形成も誘導した。我々は、BMP4が生殖系列と体細胞系列において、RACK1(receptor for activated C-kinase 1)を誘導することを発見した。RACK1は、細胞増殖や細胞接着を仲介するScaffoldタンパクである。ホヤRACK1を機能阻害すると、細胞接着と生殖巣再生が著しく阻害された。この結果は、BMPの下流で働くRACK1がGSCによる細胞接着を仲介し、その細胞接着がトリガーとなってVasa遺伝子がONとなり、GSCからGPCへの分化が進むことを示唆している。

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 10件)

- ① Tatzuke, Y., Sunanaga, T., Fujiwara, S. and Kawamura, K. RACK1 regulates mesenchymal cell recruitment during sexual and asexual reproduction in budding tunicates. *Dev. Biol.* 査読有, accepted.
- ② Ballarin, L., Franchi, N., Schiavon, F., Tosatto, S. C. E., Mičetić, I. and Kawamura, K. Looking for putative phenoloxidases of compound ascidians: haemocyanin-like proteins in *Polyandrocarpa misakiensis* and *Botryllus schlosseri*. *Dev. Comp. Immunol.* 査読有, accepted.
- ③ Kawamura, K., Takakura, K., Mori, D., Ikeda, K., Nakamura, A. and Suzuki, T. Tunicate cytostatic factor TC14 induces the polycomb group gene *Eed* and histone modification through Ca²⁺ binding and protein dimerization. *BMC Cell Biol.* 査読有, 13, 2012, 1-13.
- ④ Fujiwara, S., Iozaki, T., Mori, K. and Kawamura, K. Expression and function of myc during asexual reproduction of the budding ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis*. *Develop. Growth Differ.* 査読有, 53, 2011, 1004-1014.

- ⑤ Kawamura, K. and Sunanaga, T. Role of Vasa, Piwi and Myc-expressing coelomic cells in gonad regeneration of the colonial tunicate, *Botryllus primigenus*. Mech. Dev. 査読有, 128, 2011, 457-470.
- ⑥ Kawamura, K., Tiozzo, S., Manni, L., Sunanaga, T., Burighel, P. and De Tomaso A.W. Germline cell formation and gonad regeneration in solitary and colonial ascidians. Dev. Dyn. 査読有, 240, 2011, 299-308.
- ⑦ Kawamura, K. and Sunanaga, T. Hemoblasts in colonial tunicates: Are they stem cells or tissue-restricted progenitor cells? Develop. Growth Differ. 査読有, 52, 2010, 69-76.
- ⑧ Kaneko, N., Katsuyama, Y., Kawamura, K. and Fujiwara, S. Regeneration of the gut requires retinoic acid in the budding ascidian *Polyandrocarpa misakiensis*. Develop. Growth Differ. 査読有, 52, 2010, 457-468.
- ⑨ Sunanaga, T., Inubushi, H. and Kawamura, K. Piwi-expressing hemoblasts serve as germline stem cells during postembryonic germ cell specification in colonial ascidian, *Botryllus primigenus*. Develop. Growth Differ. 査読有, 52, 2010, 603-614.
- ⑩ Ballarin, L. and Kawamura, K. The hemocytes of *Polyandrocarpa misakiensis*: morphology and immune-related activities. Invert. Surv. J. 査読有, 6, 2009, 154-161.

[学会発表] (計 6件)

- ① Kitamura, M. Isolation and spatiotemporal expression analysis of SoxB1 and SoxB2 in colonial ascidian, *Botryllus primigenus*. 第33回日本分子生物学会年会, 2010年12月8日, 神戸ポートピア.
- ② Kashiwase, Y. Cellular and molecular basis of germ cell specification in colonial ascidian, *Botryllus primigenus*. 第33回日本分子生物学会年会, 2010年12月8日, 神戸ポートピア.
- ③ Sunanaga, T. Exploration of origin of germ cells in colonial ascidian, *Botryllus primigenus*. 2009年6月24日, 那覇市沖縄産業支援センター.
- ④ Fujiwara, S. Regeneration of the gut requires retinoic acid in the budding ascidian *Polyandrocarpa misakiensis*. 2009年6月24日, 那覇市沖縄産業支援センター.
- ⑤ Kawamura, K. Cellular and molecular basis of germ cell regeneration in colonial tunicates. The 5th International Tunicate Meeting. 2009年6月22日, 那覇市沖縄産業支援センター.
- ⑥ Kawamura, K. Role of RACK1 homologue in zooidal growth and reproduction of budding tunicates. The 5th International Tunicate Meeting. 2009年6月22日, 那覇市沖縄産業支援センター.

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・講師
研究者番号 : 20448393