

## 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25年6月18日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510209

研究課題名（和文）カタユウレイボヤにおける被囊細胞の遺伝子発現解析

研究課題名（英文）Transcriptome analysis for tunic cells of the ascidian, *Ciona intestinalis*

## 研究代表者

川島 武士（KAWASHIMA TAKESHI）

沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・グループリーダー

研究者番号：10378531

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は、近年になって進化発生生物学におけるモデル生物としての位置づけが確立しつつあるカタユウレイボヤについて、もっとも研究の進んでいない細胞群の一つである被囊細胞の分子および細胞生物学的研究基盤の確立をめざした。研究は大きく2パートに分かれる。すなわち(1)ホヤの被囊細胞に発現するRNAの網羅的な解析と、(2)被囊細胞自体の分子細胞生物学的な解析である。(1)について当初の予想と異なり、RNAはとれるものの、配列解析に十分な高い精製度のRNAを取得することができず、研究計画を大きく変更せざるを得なくなった。このため(1)については、期間中にできるだけ多くの被囊の冷凍サンプルを取得することと、被囊からの被囊細胞RNAの抽出方法についての条件検討を行った。また配列解読以外の方法を模索するために、DNAマイクロアレイの設計を行った(13. 研究発表Matsumae et al. を参照のこと)。(2)被囊細胞については、まわりを覆うセルロース性の繊維のために、細胞生物学および分子生物学的な解析をおこなうのも困難である。連携研究者の広瀬祐一教授の助言を得て、被囊細胞のみをスライドグラスに移動させる手法を開発し、核の染色を行った。このことで被囊細胞がまちがいなく核をもつことや、この手法ですくなくとも2種類の被囊細胞をスライドグラス上に移動させることができることを確かめた。この手法を利用することで、被囊細胞で発現する遺伝子のin situ hybridizationも可能になったと考えている。残念ながら(1)の計画の遅れのために、当初の目的を期間中に達成することができなかったが、必要なサンプルを十分量確保し、保存してあるので、今後、予定の被囊細胞RNAの解析を2年以内をめどにすすめたいと考えている。

## 研究成果の概要（英文）：

This study intend to build a molecular biological basis of tunic cells in an ascidian, *Ciona intestinalis*, which is now an important model organism of EvoDevo research. Although tunic is the main characteristic-organ of this animal, the group of cells which are inlaying of the organ is not really investigated to date.

The original plan of this study was made up of two parts of strategy that are (1) decoding of RNAs expressed in the tunic cells and, (2) molecular and cellular study for the tunic cells. The RNA extraction from tunic cells for NGS sequencing were difficult than I have been expected.

To avoid this problem, we corrected the original plan in the term as followings; (a) we collected the frozen sample of tunic-organ, (b) we provided the continued requirement-study to isolate the RNAs from tunic cells and (c) we designed a custom microarray for future analysis of gene expression in tunic cells. (See Matsumae et al. 2013 in Section 13.)

In order to forward the second of above strategies, we were concerned about the cellulose filament which is the main component of tunic as an obstruction for analysis of tunic cells. On the advices of Prof. Hirose who is one of cooperative researcher of this study, we overcame this second difficulty. We established a method to isolate the tunic cells from the tunic-organ by means of incubation of tunic with a glass slide. This method allowed us to observe a clear view of the tunic-cells and its nuclei by DAPI-staining. We have verified that two types of tunic-cells are isolated from the crude tunic that contains at least three types of cells by our method. We expect that this method has made possible for variety of analytical approaches including of in situ hybridization and cell culture of *C. intestinalis*.

As for future perspectives, because we have collected the tunic-organ sample for RNA-extraction, I'm planning for decoding the RNA sequences of tunic cells within around next two years.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：海産無脊椎動物・トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

海産無脊椎動物であるホヤは、その進化学的および発生生物学的重要性により、進化発生生物学のモデル生物として広く利用されるようになってきている。しかしこの動物のもっとも顕著な形質の一つである被囊についての研究はあまりすすんでおらず、特に被囊内に分散している被囊細胞については分子生物学的な研究がほとんど行われていない。しかしながら配列解読機やカスタマイクローレイなどの新技術が使いやすくなってきたことから、これまで解析対象とすることが困難であった被囊細胞についても分子レベルでの研究をおこなうことが可能になってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、近年になって進化発生生物学におけるモデル生物としての位置づけが確立しつつあるカタユウレイボヤについて、もっとも研究の進んでいない細胞群の一つである被囊細胞の分子および細胞生物学的研究基盤の確立をめざしたものである。

3. 研究の方法

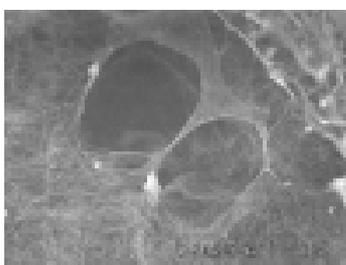
研究はおおきく二つに分けられる。一つ目は被囊細胞の網羅的な遺伝子発現情報の取得である。二つ目は、被囊細胞を被囊内から単利して分子生物学的および細胞生物学的な解析を行い、複数種類の分化状態の細胞の集

合体と考えられている被囊細胞群について、細胞の種類を区別するためのマーカーを探索し、今後の被囊細胞研究のためのツールとして確立することである。

#### 4. 研究成果

研究方法の第一である網羅的な遺伝子発現情報の取得については、当初の細胞の取り扱いについての見込みがあまく、大きく変更しなくてはならなくなった。これは被囊細胞からの RNA の単離が、とくに配列解読用ライブラリ作成に必要なレベルで生成したものを得るという意味で、想像以上に困難であったためである。RNA を抽出することはできるが、配列解読用のライブラリを作成することはまだ達成できていない。このため研究方針を変更し、RNA 抽出条件をあらためて再調査することと、期間中に被囊や被囊細胞の冷凍サンプルを集めること、カスタムマイクロアレイの準備などを行うこととした。マイクロアレイについての準備については発表論文も参照 (Matsumae H. et al 2013)。

研究方法の第二については、いくつかの成果が得られた。被囊細胞はセルロース性の被囊の中に埋まっており、分子生物学的な手法を用いて解析することが困難であると予想された。下記の写真は、被囊の走査型電子顕微鏡像である。被囊細胞はこの像にもみられる網目状の空洞をゆっくり移動していると考えられている。



連携研究者の広瀬のアドバイスにより、カタユウレイボヤの被囊細胞をスライドガラス上に移動させ、生きた状態で傷つけずに単離することができるようになった。下記の図は、スライドガラス上に移動させた被囊細胞である。左は光学顕微鏡像で、右はその DAPI 染色である。このように、カタユウレイボヤの被囊細胞も確かに核をもった細胞であることが示された。



このようにスライドガラス上に被囊細胞を移しとる方法は、今後のカタユウレイボヤ被囊細胞の細胞生物学的実験に利用できることが期待できるほか、RNA の抽出もスライドガラスに移した細胞から得ることができるのではと期待している。

#### 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 1 件)

Matsumae H., Hamada M., Fujie M., Niimura Y., Tanaka H., Kawashima T.  
A Methodical Microarray Design Enables Surveying of Expression of a Broader Range of Genes in *Ciona intestinalis*  
**Gene** 519:82-90 (2013)

[学会発表] (計 1 件)

川島武士 「海産生物の表面に注目する」  
2012. 1.7 定量生物学の会第 4 回年会

[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：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

MarineGenomicsDB: 本研究の関連データのダウンロードサイト

<http://marinegenomics.oist.jp/genomes/d>

ownloads?project\_id=3

[アウトリーチ活動]

沖縄科学の最前線 2010(2010年9月19日から9月26日まで)に、研究内容の展示発表を行った。

川島武士、中島啓介、山田力志、広瀬祐一  
「動物がもつセルロース繊維」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川島 武士 ( KAWASHIMA TAKESHI )  
沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・グループリーダー  
研究者番号：10378531

### (2) 研究分担者

中島 啓介 ( NAKASHIMA KEISUKE )  
沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・研究員  
研究者番号：10422924

### (3) 連携研究者

山田 力志 ( YAMADA RIKIISHI )  
名古屋大学・理学系研究科・助教  
研究者番号：10551020

広瀬 祐一 ( HIROSE YUICHI )  
琉球大学・理学部・教授  
研究者番号：30241772