

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14503

研究課題名(和文) 微小管動態多様性の進化プロセス解明をめざした線虫モデル実験系の確立

研究課題名(英文) Nematodes as a model system for studying evolution of diverse microtubule behaviors

研究代表者

杉本 亜砂子 (Sugimoto, Asako)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80281715

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)：本研究では、まず、線虫 *Caenorhabditis elegans* とその近縁種である *Pristionchus pacificus* を用い、『進化細胞生物学 (Evolutionary Cell Biology)』という新しい視点に立った実験系を構築した。*C. elegans* と *P. pacificus* の初期胚における微小管およびアクチン動態を蛍光タンパク質で可視化しライブイメージング観察することにより、これらの2種の線虫間には、微小管の形成・分解制御のタイミングに相違があり、その結果、初期胚における紡錘体の挙動や細胞極性確立メカニズムに顕著な引き起こされていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a model system for “evolutionary cell biology” using nematode *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus*. By live imaging of microtubules and actin filaments, we found that the timing of microtubule assembly/disassembly is different in these two nematodes, which correlates with distinct mitotic spindle behaviors and cell polarity establishment mechanisms.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微小管 線虫 進化 *C. elegans* *P. pacificus*

1. 研究開始当初の背景

微小管は細胞分裂や細胞形態変化・維持、細胞内輸送など多彩な機能を果たしており、細胞種や細胞周期、細胞内領域によって異なる構造を構築する。多細胞生物の進化過程を遡って考えてみると、細胞内で構築される微小管構造や動態の多様性が増すことこそが、さまざまな形態や機能の細胞を産み出す原動力となったとも考えられる。微小管動態の多様性は、微小管を構成するチューブリンや微小管制御タンパク質の構造および発現パターン変化によって獲得されたと推測される。しかし、微小管関連因子のゲノム配列変化が実際にどのような微小管動態の変化（およびその結果としての細胞動態の変化）を引き起こしてきたかという進化プロセスについては、実験手法が確立されていないため理解が進んでいない。

2. 研究の目的

微小管の動態は細胞周期や細胞種に依存して大きく異なっている。このような微小管動態の多様性は進化の過程でどのように獲得され変化してきたのだろうか。本研究では微小管動態の進化プロセスの解明をめざし、線虫 *Caenorhabditis elegans* とその近縁種である *Pristionchus pacificus* (図1、図2) を用い、『進化細胞生物学 (Evolutionary Cell Biology)』という新しい視点に立った実験系を構築することをめざす。具体的には、これら2種の線虫間のゲノム比較解析、CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子操作、および、高分解能ライブイメージングを統合的に用いて、微小管関連因子のゲノム配列上の変化と微小管動態の多様性（さらには細胞動態の多様性）獲得との関連性を解明するための研究基盤を確立する。

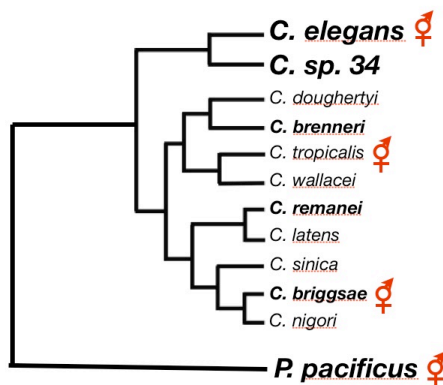


図1 *C. elegans* とその近縁種

3. 研究の方法

本研究では、*C. elegans* の近縁種である *Pristionchus pacificus* をサテライトモデル生物として用い、微小管動態の進化細胞生物学的解析のための実験系構築をめざして、以下の3つの実験を行う。

1) *P. pacificus* における遺伝子操作技術の確立：*P. pacificus* の遺伝子操作技術の整備は *C.*

elegans と比して遅れている。そこでまず、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術を確立することをめざす。

2) *P. pacificus* と *C. elegans* 初期胚における微小管動態の比較解析：1)で確立したゲノム編集技術を用いて、微小管、染色体、中心体、等を蛍光標識することによって可視化した *P. pacificus* 株を作製し、高分解能ライブイメージングによって *C. elegans* の微小管動態との比較解析を行う。

3) 微小管関連因子の遺伝子操作による進化細胞生物学的解析：*C. elegans* と *P. pacificus* の微小管関連遺伝子配列の相違が微小管動態（およびその結果としての細胞動態）にどのような影響を与えているかを、遺伝子操作によって双方の線虫のオルソログを交換することによって検証する。

Caenorhabditis elegans



Caenorhabditis sp. 34



Pristionchus pacificus

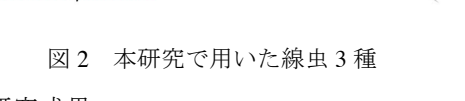


図2 本研究で用いた線虫3種

4. 研究成果

1) *P. pacificus* における遺伝子操作技術の確立：従来、*P. pacificus* にトランスジーンを導入する手法としては、マイクロインジェクションが用いられてきたが、その場合は導入された遺伝子は染色体内には挿入されず不安定な染色体外アレイとなり、遺伝子サイレンシングにより生殖細胞系列および初期胚における遺伝子発現が抑制されるという欠点があった。そこで、*P. pacificus* に遺伝子銃で染色体への遺伝子挿入を行う手法を確立した。

セレクションマーカーとして Hygromycin B 耐性遺伝子を用い、ユニバーサルプロモーターとしてリボソーム RNA 遺伝子プロモーターを用いた。*C. elegans* で用いられている遺伝子銃法を参考に遺伝子導入条件を検討し、生殖細胞系列および初期胚を含む全身で GFP 融合タンパク質を発現させることに成功した。この手法を用いることにより、*P. pacificus* において GFP:: β -チューブリン（微小管マーカー）、GFP:: γ -チューブリン（中心体マーカー）、GFP::ヒストン（染色体マーカー）、GFP::LIFEACT (F-アクチンマーカー) を発現する株を作製した。

CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集法についてはいまだ成功には至っておらず、引き続き条件検討を行う。

2) *P. pacificus* と *C. elegans* 初期胚における微小管動態の比較解析：まず、*C. elegans* と *P. pacificus* の受精卵における前核融合・紡錘体形成・細胞分裂過程を微分干渉顕微鏡観察により比較した (図3、図4)。

その結果、*C. elegans* と *P. pacificus* では以下の違いがあることがわかった。1) *P. pacificus* 受精卵のほうが *C. elegans* 受精卵よりも細胞膜のラップリングが激しい。2) *C. elegans* 受精卵では雌性前核が将来の前極側、雄性前核が将来の後極側に局在化するのに対して、*P. pacificus* では前核の位置はランダムである。3) *C. elegans* では前核融合は受精卵の中央でおきるのに対して、*P. pacificus* では後極端で起きる。4) *C. elegans* の紡錘体は受精卵中央部で形成されて分裂後期に振動しながら後極側に移動するのに対し、*P. pacificus* の紡錘体は分裂中期まで後極側に接しており、一旦中央に移動した後にもう一度後極寄りに移動する。

これらの細胞分裂過程における違いは、微小管動態の違いに依存すると推測されたため、抗体染色によって受精卵における紡錘体微小管の観察を行った (図5、図6)。その結果、*P. pacificus* の紡錘体微小管は分裂後期までは *C. elegans* と比較すると顕著に短いが、後期以降に伸長し終期まで安定に維持された。一方、*C. elegans* では後期以降急激に紡錘体微小管が短縮する。それぞれの受精卵で微小管核となる γ -チューブリンの細胞内局

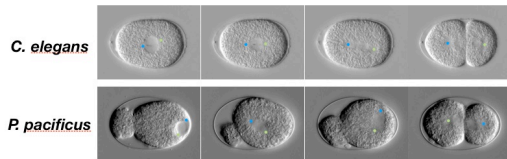


図3 *C. elegans* と *P. pacificus* の初期胚動態

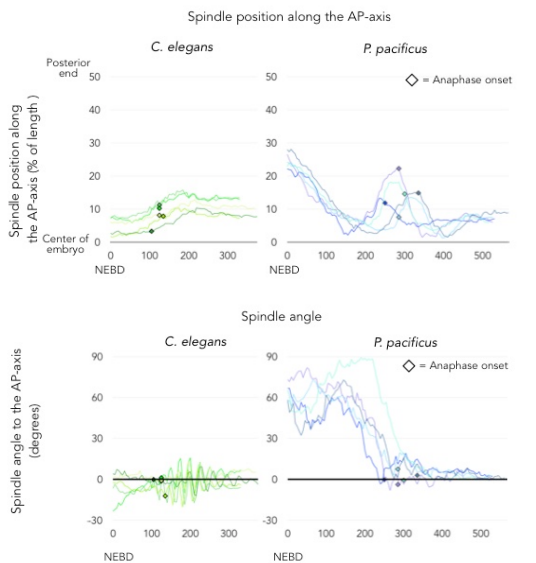


図4 *C. elegans* と *P. pacificus* の紡錘体動態

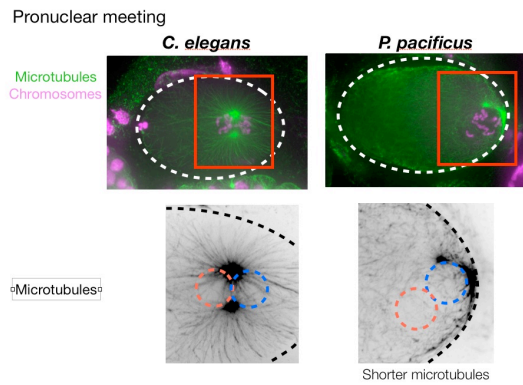


図5 *C. elegans* と *P. pacificus* の分裂前期の微小管

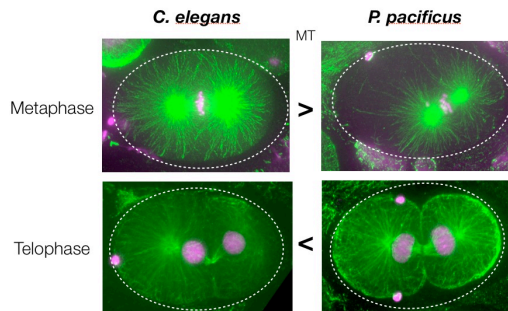


図6 *C. elegans* と *P. pacificus* の分裂中期・終期の微小管

在を GFP:: γ -チューブリンのライブイメージングで調べた結果、*C. elegans* では γ -チューブリンの中心体局在は分裂中期に最大となるのに対して、*P. pacificus* では分裂後期から終期に最大となることが明らかになった。以上の結果から、*C. elegans* と *P. pacificus* の紡錘体挙動の違いは、 γ -チューブリンの中心体への局在化のタイミングの違いに依存していることが推測された (図7)。

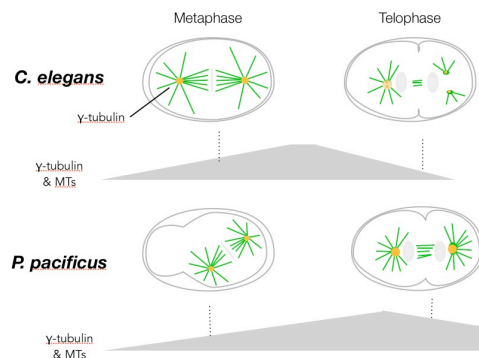


図7 *C. elegans* と *P. pacificus* の微小管動態の違い

3) *P. pacificus* と *C. elegans* 初期胚におけるアクチン動態と紡錘体動態の関係：GFP::LIFEACT (F-アクチンマーカー) を発現する株を用いて、*C. elegans* と *P. pacificus* 受精卵における F-アクチン動態をライブイメージングにより比較した。その結果、全曲側の細胞表層に F-アクチンがメッシュ状に集

積することは共通しているが、*P. pacificus* では紡錘体形成後に後極側に F-アクチンが一過的に集積するという *C. elegans* にはない現象が見られた。さらに、GFP:: γ -チューブリンと GFP::アクチンの二重標識株のライブイメージング解析を行った結果、*P. pacificus* でみられた一過的な F-アクチン集積点は、融合した前核が後極から離れると同時に、前核が接していた細胞膜領域に形成され、分裂後期になるとその F-アクチン集積点に紡錘体極が引き寄せられることが観察された。この F-アクチン集積点は、紡錘体ポジショニングに関与していることが推測される。

4) *C. elegans* の最近縁種 *C. sp. 34* の初期胚の観察： *C. sp. 34* は最近、石垣島のオオバイヌビワ花囊から発見された、*C. elegans* の最近縁種である（神崎、菊地、ほか、私信）。*C. sp. 34* は *C. elegans* ともっとも近縁であるにも関わらず、*C. sp. 34* の方が約 2 倍も体長が長いことをはじめ、至適温度、生態、行動などで相違点が多い。私たちは、*C. sp. 34* も *C. elegans* の比較対象として進化細胞生物学のモデル系として適していると考え、初期発生過程の観察を行った。

微分干渉顕微鏡で観察した結果、20°C で発生させた *C. elegans* と 25°C で発生させた *C. sp. 34* の胚発生過程は基本的に類似していたが、*C. sp. 34* の方が核のサイズがやや大きく、膜のラフリングも激しいことが観察された。今後、微小管動態の比較を行う予定である。

次に、*C. sp. 34* の遺伝子操作を確立することを目指した。RNAi による遺伝子機能破壊は、*C. elegans* と同様、feeding 法および soaking 法のいずれでも効率よく実施できることが明らかとなった。トランスジェニック線虫は、*C. elegans* よりも低頻度ではあるものの、マイクロインジェクションによって作製可能であることを見いだした。

今後、*C. sp. 34* において、GFP:: β -チューブリン（微小管マーカー）、GFP:: γ -チューブリン（中心体マーカー）、GFP::ヒストン（染色体マーカー）、GFP::LIFEACT（F-アクチンマーカー）等を発現する株を作成し、初期胚における微小管動態の比較解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 5 件)

- ① 杉本 亜砂子
進化細胞生物学のモデル系としての線虫。
第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年 11 月、横浜)
- ② Asako Sugimoto
Caenorhabditis sp. 34 is a sister species to *C. elegans* with marked differences in morphology and ecology.
7th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting (2016 年 6 月, Beijing, China)

- ③ Ryohei Kumagai, Kenji Tsuyama, Asako Sugimoto

Comparative analysis of germ granules between *Caenorhabditis elegans* and its sister species *Caenorhabditis sp. 34*

7th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting (2016 年 6 月, Beijing, China)

- ④ Satoshi Namai, Asako Sugimoto
Distinct microtubule behaviors in zygotes of *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus*.

Cold Spring Harbor Symposium
“Evolutionary Biology of *Caenorhabditis* and other nematodes” (2016 年 3 月, Cold Spring Harbor, NY, USA)

- ⑤ 生井 聡史、久保田 幸彦、杉本 亜砂子
線虫 *C. elegans* と *P. pacificus* の細胞分裂様式の比較解析

日本動物学会平成 27 年度東北支部大会
(2015 年 8 月、東北大学農学部)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 亜砂子 (SUGIMOTO, Asako)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：80281715

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

久保田 幸彦 (KUBOTA, Yukihiro)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：70333325

本多 優 (HONDA, Yu)

東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生

生井 聡史 (NAMAI, Satoshi)

東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生

津山 研二 (TSUYAMA, Kenji)

東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生

土屋 賢汰 (TSUCHIYA, Kenta)

東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生

熊谷 亮平 (KUMAGAI, Ryohei)

東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生

生

小日向 寛之 (OBINATA, Hiroyuki)
東北大学・理学部生物学科・学部学生

佐々木 大地 (SASAKI, Daichi)
東北大学・理学部生物学科・学部学生