

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14735

研究課題名(和文) オタマボヤの表皮が複雑な細胞パターンを個体差なしに形成するしくみの解析

研究課題名(英文) Generation of complex and elaborate patterns with invariant cell lineages during trunk oikoplastic epidermis development of appendicularians

研究代表者

西田 宏記(Nishida, Hiroki)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：60192689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：動物の発生において、複雑で規則性のないパターンを個体差なく作り出すしくみの理解は遅れている。ワカレオタマボヤ体幹部の表皮は、単層上皮であり、細胞レベルで完全に左右鏡像対称で個体差のない、かつ規則性に乏しい複雑なパターンを持つ。まず、完成した表皮に関してドメイン境界を細胞レベルで設定し、ドメイン内の個々の細胞に名前を付け、アトラスを完成させた。次に、発生を遡りパターン形成過程で個々の細胞がどのような挙動を取るのか、ライブイメージングを用いて細胞分裂の観察を行った。その結果、パターン形成には、細胞移動や細胞死ではなく、細胞分裂の方向と回数の制御が重要であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms for morphogenetic processes that generate complex patterns in a reproducible manner remain elusive. The trunk epidermis of appendicularians, called the oikoplastic epithelium (OE), has elaborate cellular arrangements showing a complex pattern. The OE is characterized by invariant number, size, and shape of the monolayer epithelial cells. First, we subdivided the OE and defined several domains by cellular resolution, and systematically gave names to the constituent cells. Time-lapse imaging of the epidermal cells revealed region-specific pattern formation processes. Regulation of orientation, timing, and the number of rounds of cell divisions, but not cell death and migration, was a critical mechanism for determination of final cell arrangement and size. These detailed descriptions of OE patterning processes provide basic and essential information in the generation of elaborate and intricate but stereotyped cellular patterns.

研究分野：発生生物学

キーワード：オタマボヤ 尾虫類 Oikopleura 表皮 パターン形成 細胞系譜 ライブイメージング 幹細胞分裂

### 1. 研究開始当初の背景

動物の発生において、複雑で規則性のないパターンを個体差なく作り出すしくみの理解は遅れている。オタマボヤの持つ非常にユニークな特徴を利用し上記のことを解析できる独自の系として表皮のパターニングの解析を着想した。これまで、細胞レベルでの複雑なパターン形成のしくみに関する研究はほとんどなく、我々の理解を超えていた。

これまでの研究により、オタマボヤはイメージングに向いていることがわかってきた。卵の直径は 80  $\mu\text{m}$  と小さく、透明でイメージング向きであると共に、発生が早い。受精後 10 時間で成体と同じ構造が完成する。その後の 5 日間で、ほとんど体細胞の細胞分裂は起こらず、個々の細胞が大きくなっていくことで成長する。10 時間でハウスを作り始めるまでは、餌をとることもないので幼生の体積増加はなく、簡単に育てることができる。このような特徴により、オタマボヤをモデル実験動物とすべく、研究、開発を続けてきた。

### 2. 研究の目的

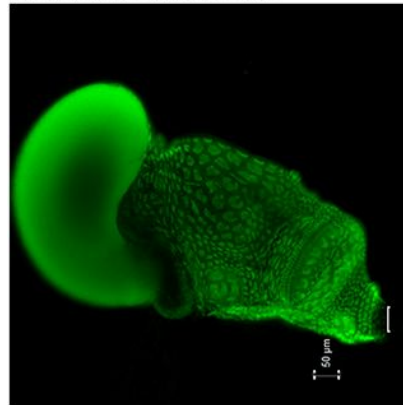
本研究では、脊索動物であるワカレオタマボヤを利用して、複雑かつ規則的ではないパターンを個体差なく築き上げるしくみを解析できる系を作り上げることを目指した。オタマボヤは脊索動物門に属する海洋性プランクトンで、脊椎動物と共通な体制を持ちながらも世代時間が 5 日と短い。受精からオタマボヤ幼生が孵化するまで 3 時間、成体と同じ構造が完成するまで 10 時間という発生の早さで、成体の細胞数が約 3000 個と少ない。また、胚と成体は透明であり、加えてゲノム配列や遺伝子発現のデータベースが利用できる。このようにオタマボヤは、新規モデル動物になりうる特徴を備えている。オタマボヤは普段、ハウスと呼ばれる自身が分泌した複雑な構造をもつ構築物の中に棲んでいる。ハウスは細胞を含んでいないが、海水からプランクトンを濾過して食べるための複雑なフィルター構造を有している。このハウスを分泌するために体幹部の表皮は非常に複雑な細胞配置のパターンを持っている(図)。体幹部の表皮細胞は合計で 1800 細胞からなり、この表皮平面上の 2D のパターン形成のしくみを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

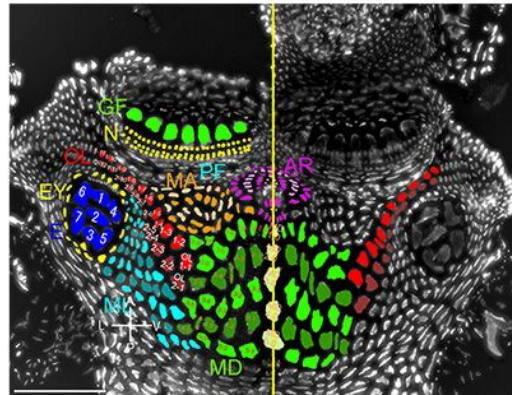
ワカレオタマボヤ (*Oikopleura dioica*) ライフサイクルは 5 日である。我々はこの発生の早さを利用して、孵化後幼生発生のライブイメージングを精力的に行った。ワカレオタマボヤ体幹部の表皮 (oikoplastic epidermis と呼ばれている) は、単層上皮であり、細胞レベルで完全に左右鏡像対称で個体差のない、かつ規則性に乏しい複雑なパターンを持ち、部域ごとに細胞や核の大きさが異なることが知られている。ハウスや摂餌フィルターを分

泌するためにこの複雑なパターンが必須であり、生存のためにも表皮のパターニングは重要であると考えられる。この美しくも複雑な表皮パターニングがいかにして行われるのかに興味を持ち、4D 蛍光ライブイメージングを行った。本研究で対象としている過程は受精後 3 時間から 8 時間までの 5 時間で起こる。卵巣に蛍光タンパク質の mRNA を注入することで、このステージを通して核、膜、細胞骨格などを可視化した。

A: 核を光らせた体幹部



B: 表皮をはがして開いたもの



### 4. 研究成果

(1) この表皮のパターンは、孵化直後(受精後 3 時間)の幼生では観察されないが、その後 5 時間ほどの間に急激にできあがってくる。まず、完成した表皮に関してドメイン境界を細胞レベルで設定し、ドメイン内の個々の細胞に名前を付け、アトラスを完成させた。

(2) 次に、発生を遡りパターン形成過程で個々の細胞がどのような挙動を取るのか、ライブイメージングを用いて分裂方向やそのタイミングの観察を行った。その結果、パターン形成には基本的に、細胞移動や細胞死ではなく、細胞分裂の方向と回数の制御が重要であることがわかった。

(3) 加えて、領域ごとにいくつかのおもしろい現象も観察された。Fol 領域は、体幹部前側方の領域で、決まった数の細胞が列状に並んでいる領域である。この部分では、細胞が背腹方向の分裂を繰り返しながら列を形成

してゆく様子が観察されている。腹側の表皮には、腹側正中線方向へ向かって小さな細胞（おそらく感覚細胞）を数珠つなぎに複数生み出すように不等幹細胞分裂を繰り返し行う、大きく丸い細胞が観察された。また背側には、孵化後 20 分で正中線に沿って並ぶ一列の細胞が現れること、これらの細胞はその後もっぱら前後軸方向に沿って分裂すること、さらに、この正中線を挟んで、両側の細胞分裂方向はほぼ左右対称であることがわかった。

(4) また、可変色蛍光タンパク質 Kaede を使い、2 細胞期(それぞれの割球の子孫細胞は、おおむね体の左右片側を形成する)に細胞をラベルして、細胞の系譜解析を行った。その結果、表皮細胞では、それらの割球の子孫細胞の境界と、実際の体の左右境界が一致しないことが示された。つまり、左右対称な表皮組織において、由来の左右非対称性が観察される。ここから、パターン形成には、細胞の系譜よりも表皮フィールド内での位置情報が重要である可能性が示唆された。

本研究により、「複雑で不規則なパターンを個体差なく築き上げるしくみを単一細胞レベルで追求できる新しいモデル系」を確立し、新たな研究領域を開拓できたと考えている。

#### 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 11 件)

Miyaoku, K., Nakamoto, A., Nishida, H., Kumano, G. Control of Pem protein level by localized maternal factors for transcriptional regulation in the germline of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. **PLOS ONE** (2018) 13, e0196500. doi: 10.1371/journal.pone.0196500 査読あり。

Brozovic, M., Dantec, C.,...Nishida, H., ..... and Lemaire, P. (39 人中 34 番目) ANISEED 2017: Extending the integrated ascidian database to the exploration and evolutionary comparison of genome-scale datasets. **Nucleic Acids Res.** (2018) 46, D718–D725. doi: 10.1093/nar/gkx1108 査読あり。

Onuma, T. A., Matsuo, M., and Nishida, H. Modified whole-mount *in situ* hybridisation and immunohistochemistry protocols without removal of the vitelline membrane in the appendicularian *Oikopleura dioica*. **Dev. Genes Evol.** (2017) 227, 367–374. doi: 10.1007/s00427-017-0588-1 査読あり。

Kishi, K., Hayashi, M., Onuma, T. A., Nishida, H. Patterning and morphogenesis of the intricate but stereotyped oikoplasmic epidermis of the appendicularian, *Oikopleura dioica*. **Dev. Biol.** (2017) 428, 245–257. doi:

10.1016/j.ydbio.2017.06.008 査読あり。  
Wang, K., Dantec, C., Lemaire, P., Onuma, T. A., and Nishida, H. Genome-wide survey of miRNAs and their evolutionary history in the ascidian, *Halocynthia roretzi*. **BMC Genomics** (2017) 18, 314. doi:

10.1186/s12864-017-3707-5 査読あり。  
Negishi, T. and Nishida, H. Asymmetric and unequal cell divisions in ascidian embryos. “**Asymmetric Cell Division in Development, Differentiation and Cancer in Results and Problems in Cell Differentiation**” (2017)

(Springer) 61, 261–284. doi: 10.1007/978-3-319-53150-2\_12 査読あり。  
Omotezako, T., Matsuo, M., Onuma, T. A., and Nishida, H. DNA interference-mediated screening of maternal factors in the chordate *Oikopleura dioica*. **Scientific Reports** (2017) 7, 44226. doi:10.1038/srep44226 査読あり。  
Tokuhisa, M., Muto, M., and Nishida, H. Eccentric position of the germinal vesicle and cortical flow during oocyte maturation specify the animal-vegetal axis of ascidian embryos. **Development** (2017) 144, 897–904.

doi:10.1242/dev.146282 査読あり。  
Onuma, T. A., Isobe, M., and Nishida, H. Internal and external morphology of adults of the appendicularian, *Oikopleura dioica*: an SEM study. **Cell and Tissue Research** (2017) 367, 213–227. doi: 10.1007/s00441-016-2524-5 査読あり。  
Kodama, H., Miyata, Y., Kuwajima, M., Izuchi, R., Kobayashi, A., Gyoja, F., Onuma, T. A., Kumano, G., Nishida, H. Redundant mechanisms are involved in suppression of default cell fates during embryonic mesenchyme and notochord induction in ascidians. **Dev. Biol.** (2016) 416, 162–172. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.05.033 査読あり。  
岸香苗, 西田宏記, 小沼健 実験動物紹介: ワカレオタマボヤ 比較内分泌学 157 巻 頁.1-4 (2016) 査読なし。

#### [学会発表](計 12 件)

Nishida, H. Tokuhisa M, Muto M. Eccentric position of the germinal vesicle and cortical flow during oocyte maturation specify the animal-vegetal axis of ascidian embryos. 国際発生生物学会 2017 年

Kanae Kishi, Momoko Hayashi, Takeshi A. Onuma, and Hiroki Nishida. Patterning and morphogenesis of the intricate but stereotyped Oikoplasmic epidermis of the appendicularian, *Oikopleura dioica*. 9th International Tunicate Meeting 2017 年

Masumi Tokuhisa, Miyuki Muto, Hiroki Nishida. Eccentric position of the germinal vesicle and cortical flow during oocyte maturation specify the animal-vegetal axis of ascidian embryos. 日本発生生物学会 2017

年。

Takeshi Onuma, Masaki Matsuo, Hiroki Nishida. Whole-mount in situ hybridization and immunohistochemistry procedures without removal of the vitelline membrane of embryos in the appendicularian, *Oikopleura dioica*. 日本発生生物学会 2017 年。

Masaki Matsuo, Tatsuya Omotezako, Takeshi Onuma, Hiroki Nishida. Functional screening of maternal factors and analysis of metaphase arrest of meiosis in the appendicularian, *Oikopleura dioica*. 日本発生生物学会 2017 年。

小沼健, 林桃子, 岸香苗, 西田宏記. オタマボヤにおける 2 細胞期から開始する左右非対称な発生過程。日本動物学会 2017 年。

田中 佑佳, 山田 詩織, 西田 宏記. 神経胚回転によるマボヤの左右非対称性の決定には繊毛が関与している。日本動物学会 2017 年。

横堀 伸一, 笠原 享祐, 大塚 玄航, 西野 敦雄, 小沼 健, 西田 宏記, 山岸 明彦. 18S rRNA 遺伝子並びにミトコンドリアゲノムに基づくオタマボヤ綱の分子系統解析。日本動物学会 2017 年。

Takeshi A Onuma, Masaki Matsuo, Tatsuya Omotezako, Hiroki Nishida. オタマボヤは母性遺伝子の機能解明に貢献するか? **日本動物学会 2016 年**

Hiroki Nishida. ホヤの胚軸はどうやって決まるのか: 卵母細胞からオタマジャクシ幼生まで。 **日本動物学会 2016 年**

Kanae Kishi, Momoko Hayashi, Takeshi Onuma, Hiroki Nishida. ワカレオタマボヤ *Oikopleura dioica* における体幹部表皮細胞のパターン形成。 **日本動物学会 2016 年**

Masaki Matsuo, Tatsuya Omotezako, Takeshi A. Onuma, Hiroki Nishida. ワカレオタマボヤの胚発生に関わる母性因子の DNAi によるスクリーニング。 **日本動物学会 2016 年**

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio\\_web/lab\\_page/nishida/index.html](http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/nishida/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西田 宏記 (NISHIDA, Hiroki)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 60192689

### (2) 研究分担者

小沼 健 (Takeshi ONUMA)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 30632103