

## 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 4月 3日現在

機関番号：82648

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22651078

研究課題名（和文）環境指標生物であるミジンコの逆遺伝学的手法の開発：  
エコゲノミクスの新規アプローチ

研究課題名（英文）Development of reverse-genetics methods for Daphnids

研究代表者

井口 泰泉（IGUCHI TAISEN）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：90128588

研究成果の概要（和文）：ミジンコ類（枝角目甲殻類）は世界中の淡水に生息し、扱い易いことから生態学の研究に用いられてきた。我々は化学物質などの環境要因に応答する遺伝子を網羅的に解析するエコ（トキシコ）ゲノミクスを開始しているが、今後詳細に遺伝子機能解析を進めるには、導入遺伝子の発現を自在に制御することが必要不可欠である。本研究では遺伝的な交配実験系の開発について解析を行い、ミジンコは、複数の外部環境シグナルを統合して、単為生殖と有性生殖を切り替えることが分かった。また遺伝子導入法に改良を加えてその効率化を行った。これらの知見は、今後トランスジェニックミジンコ作出するための基礎的な知見として応用可能である。

研究成果の概要（英文）：

The water flea *Daphnia magna* is a small crustacean which is an ubiquitous inhabitant in fresh water. As daphnids inhabit a diverse array of aquatic environments, they are a good model for understanding response and adaptation to environmental changes and evolution. Therefore, they have been used one of standard organisms in ecotoxicology. While daphnids have significant importance in ecotoxicology, tools to understand response to environmental changes in daphnia is very limited. We investigate a condition for natural male production and improve introduction of foreign DNA into daphnids. These basic information will be available for establishment of transgenic daphnids.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	0	2,200,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：ミジンコ、逆遺伝学、エコゲノミクス

## 1. 研究開始当初の背景

ミジンコ類（枝角目甲殻類）は世界中の淡水に生息し、扱い易いことから生態学の研究に用いられてきた。ミジンコ類は、動物プランクトンとして食物連鎖で重要であり、環境指標生物にも指定されている。我々はミジンコ類の中で最大級（体長約 5 mm）であるオオミジンコの EST を約 5 万決定し（Genome (2005) 48:606-609）、マイクロアレイを作製して化学物質などの環境要因に応答する遺伝子を網羅的に解析するエコ（トキシコ）ゲノミクスを開始している（*Environ Toxicol Chem* (2007) 26:669-676）。一方で、アメリカでオオミジンコの近縁種のミジンコのゲノム解読が終了し（*Science* (2011) 331:555）、現在はオオミジンコのゲノム解読が進行中である。

我々は幼若ホルモン類似物質処理により、単為生殖でメスしか生まないオオミジンコにオスを産ませることを見出した。この知見に基づいて、オオミジンコの性決定候補遺伝子として *Dsx1* を同定するなど、オオミジンコの性決定機構（オスの産仔）のメカニズムの一端を解明した。

## 2. 研究の目的

環境要因によってどのように生物が表現型を変え環境に順応するかは、生態、進化の興味的であり、2つのアプローチによってこれまで研究が行われてきた。1つは、モデル生物による解析である。モデル生物には、洗練した分子生物学的、遺伝学的手法を用いることができるという利点がある一方、環境要因による表現型の変化についての研究が少ないという致命的な欠点を持つ。もう1つは、ミジンコ類のように古くから生態学の研究に用いられてきた非モデル生物を用いたエコゲノミクス、すなわち、遺伝子発現変化を指標に環境応答に関与している遺伝子の候補を見いだす研究がこれまで進められてきた。一方で、環境要因によって発現変化を示した遺伝子がどのような作用機序で表現型の変化を誘導しているか、についてはこの手法では明らかにすることはできない。

本研究では、環境指標生物であるオオミジンコをモデルとしてエコゲノミクスで明らかとなった遺伝子の機能解析を行うための逆遺伝学的手法を開発する。これは、環境要因が表現型の変化を誘導する分子メカニズムを解明する為に必要不可欠なものである。これにより、自然環境が及ぼすミジン

コ類の性決定、生殖、外部形態等の表現型の変化を遺伝子レベルで解明するための基盤をつくることを目的とする。本研究では、逆遺伝学的な解析に必須の交配実験系を立ち上げ、さらに遺伝子導入法をオオミジンコで確立する。

## 3. 研究の方法

オオミジンコは、自然環境条件により、単為生殖と有性生殖を使い分ける。有性生殖卵は、乾燥にも耐えられる耐久卵で、半永久的に保存可能である。この生殖戦略を人為的に制御する方法を開発することができれば、純系、異系の作出及び、保存が可能となる。我々はメスのみを産んでいる単為生殖メスに、幼若ホルモン（Juvenile hormone: JH）のアナログであるフェノキシカルブを曝露することで、人工的に 100%オスの仔を産ませることができると見出しているが（*Chemosphere* (2003) 53:827-833）、このようなケミカル誘導オスでなく、ナチュラルオスの作出できることが望ましい。そこで、人工気象機を使用して明暗周期や温度などを調節し、人為的にオスを安定して作出する条件を決定する。オオミジンコは M2 培地で飼育した。遺伝子機能解析実験のためのオオミジンコ初期胚は、排卵直後の 2 週齢成虫から採取し、実験に供した。

## 4. 研究成果

遺伝的なオオミジンコは、自然環境条件により、単為生殖と有性生殖を使い分ける。光、温度などを人工気象器で調節し、雄の出る条件を検討した。この結果、20°C、14 時間明期 10 暗期周期、50mL 容器中 1 匹で飼育したところ、数十パーセントの割合で雄が誘導できることが分かった。一方、一つのパラメーター変化だけでは、雄は生まれなかった。したがってミジンコは、複数の外部環境シグナルを統合して、単為生殖と有性生殖を切り替えることが分かった。しかしながら、興味深いことに、このとき誘導できたオオミジンコ雄は、雌がいても、雌に耐久卵を作らせるには至らなかった。一般に雄産生から耐久卵産生までは同一条件でできるものと考えられてきたが、厳密にはその二つの条件が異なることが示唆された。有性生殖卵は、乾燥にも耐えられる耐久卵で、半永久的に保存可能である。したがって耐久卵産生は人為的に制御する方法を開発し、純系、異系の作出及び、保存方法を確立する技術に不可欠である。今後、より効率の良い雄誘導条件、そして耐久卵産生条件を、厳密に決定していく必要があ

ろう。

我々はこれまで、オオミジンコ *in vivo* における遺伝子機能解析実験として、RNAi 解析法を行ってきた。一方で、過剰発現系については、未だオオミジンコ性決定・性分化過程を解析するための系は立ち上げられていない。したがって、効率の良い遺伝子導入法の開発と、最終的にはトランスジェニックオオミジンコを作出するための条件検討が必要である。

エレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションを用いたオオミジンコへの遺伝子導入を試みた。エレクトロポレーション法では、Cytomegalovirus (CMV) プロモーターの制御下で、GFP を発現するプラスミド pAcGFP1-C1 を用いた。エレクトロポレーション法では卵への遺伝子導入が難しいため、仔虫の血リンパへの DNA 溶液の注入後、様々な条件でエレクトロポレーションを行った。GFP の蛍光は、エレクトロポレーションから 6 時間後から認められ、最大 3 週間持続した。一方マイクロインジェクション法では、オオミジンコの初期胚は物理的に脆く、また、排卵後 2 時間を経過すると卵膜の形成に伴いインジェクションが困難になる。そのため、我々は排卵後間もない卵を氷冷した 80 mM sucrose を含む M4 培地 (M4-sucrose) に移し、卵膜の形成を遅らせ、さらに針を刺したダメージで初期胚が崩れない条件設定に成功した。この条件で、生物界で広く保存されている付属肢の先端領域で特異的に発現するオオミジンコ *distal-less* (*D11*) 遺伝子について、初期胚に *D11*-dsRNA を注入したところ、高効率で付属肢の先端部が欠損することが明らかとなり、オオミジンコで遺伝子の機能解析が可能な効率的遺伝子導入法であることが実験的に示された。このようにどちらの方法も遺伝子導入法として利用可能であることが明らかとなったが、我々は特にオオミジンコの性決定機構に焦点をあてて研究をしており、より発生の早い段階で遺伝子導入ができる卵へのマイクロインジェクション法を今後の実験で採用することにした。

次に *tol2* (主にゼブラフィッシュの研究で使われている) トランスポゾン及び、HSP70 プロモーターを用いたトランスジェニックミジンコの作出を試みたが、このプロモーターを活性化させるためのヒートショックの条件ではミジンコの生存が難しいことがわかった。そのため今後、ヒートショックの条件検討またはその他のプロモーターを使用する必要がある。

本研究の進展の 1 つは、オオミジンコへの遺伝子導入とオオミジンコ体内で外来遺伝子を異所的に発現させる方法を開発したことである。未だ改善する点が多いが、将来的には

本実験で得られた知見を基に、トランスジェニックオオミジンコを作製することもできるようになると思われる。したがってこれまで我々が明らかにしてきた性決定関連遺伝子などの機能解析を *in vivo* で行うことが可能となる。また環境変化に应答するレポーター遺伝子をもつトランスジェニックミジンコを作製することで、*in vivo* での毒性評価を遺伝子レベルで行うことも可能となるであろう。このように、生態系で重要なオオミジンコとその生息環境の相互作用を分子レベルで解明できるようになり、非常に意義深い成果が得られた。

## 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 8 件)

- ① Kato, Y., Kobayashi, K., Watanabe, H. and Iguchi, T. (2011). Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: Deep conservation of a Doublesex gene in the sex-determining pathway. *PLoS Genetics*. 7, e1001345 査読有り
- ② Kato, Y., Shiga, Y., Kobayashi, K., Tokishita, S., Yamagata, H., Iguchi, T. and Watanabe, H. (2011). Development of a RNA interference method in the cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *Devel. Genes Evol.* 220, 337-345. 査読有り
- ③ Oda, S., Kato, Y., Watanabe, H., Tatarazako, N., Iguchi, T. (2011) Morphological changes in *Daphnia galeata* induced by a crustacean terpenoid hormone and its analog. *Environ Toxicol Chem.* 30, 232-238. 査読有り
- ④ Hayes, T.B., Beasley, V.R., de Solla, S., Iguchi, T., et al (21 人中 4 番目) (2011) Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 127, 64-73. 査読有り
- ⑤ Blumberg, B., Iguchi, T. and Odermatt, A. (2011) Endocrine disrupting chemicals. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 127, 1-3. 査読無し

⑥ Celander, M.C., Goldstone, J.V., Denslow, N.D., Iguchi, T., Kille, P., Meyerhoff, R.D., Smith, B.A., Hutchinson T.H. and Wheeler, J.R. (2011) Species extrapolation for the 21st century. *Environ. Toxicol. Chem.*, 30, 52-63. 査読あり

⑦ Kato, Y., Kobayashi, K., Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H. and Iguchi, T. (2010). Sequence divergence and expression of a transformer gene in the branchiopod crustacean, *Daphnia magna*. *Genomics*, 95, 160-165. 査読有り

⑧ Kato, Y., Kobayashi, K., Watanabe, H. and Iguchi, T. (2010). Introduction of foreign DNA into the water flea, *Daphnia magna*, by electroporation. *Ecotoxicology*, 19, 589-592. 査読有り

[学会発表] (計 15 件)

① 井口泰泉. 内分泌かく乱物質の生物影響に関する研究. 日本動物学会第 82 回大会. 2011 年 9 月 21-23 日 (北海道旭川市)

② Iguchi, T. Endocrine disrupters issues in Japan. 2nd International Conference on Endocrine Disruptors, 2011 年 6 月 7-8 日 (ドイツ)

③ Iguchi, T. Endocrine disruption in invertebrates: Sex determination of *Daphnia magna*. 6th Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors, 2011 年 4 月 26-29 日 (デンマーク)

④ Iguchi, T. Endocrine disruption in invertebrates: sex determination of *Daphnia magna* 11<sup>th</sup> e. hormone Symposium, 2010 年 10 月 19 日 (アメリカ)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/%7Ebioenv1/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井口 泰泉 (IGUCHI TAISEN)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授