

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770253

研究課題名(和文) 群体ホヤの生殖系列細胞が新生する仕組み

研究課題名(英文) Screening and identification of differentially expressed genes in gonadal tissues in colonial ascidian

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：ミダレキクイタボヤの生殖細胞形成に関与する遺伝子群をスクリーニングした。生殖腺をもつ群体(有性生殖期)と生殖腺が未発達な群体(無性生殖期)を材料としてサブトラクションライブラリーを作り、104クローンのcDNAを得た。RT-PCRにより、有性生殖期での発現量が無性生殖期の発現量よりも有意に高い91クローンを選抜した。21クローンについてin situ解析で発現を調べたところ、生殖系列細胞で特異的な発現が観察された。生殖系列幹細胞で発現する遺伝子に注目し、機能阻害実験を行うと、生殖腺形成に著しい遅延が引き起こされた。本研究により、群体ホヤの生殖細胞形成を調節する重要な遺伝子が多数明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Animals that propagate asexually are exciting models to investigate the cellular system, which produces germline cells constitutively throughout life. In botryllid ascidians, each of the sexual individuals produces hermaphrodite gonads during breeding season. To understand the molecular mechanisms underlying gamete and gonadal development, screening and identification of differentially expressed genes in gonadal tissues were performed. Subtractive cDNA library was constructed from cDNAs synthesized from the Botryllus primigenus colonies with and without mature gonads. 104 transcripts were isolated from the library. We then determined the ratio of the expression in colonies with mature gonads to the expression in asexually growing colonies by qRT-PCR. Among the transcripts, 91 showed higher ratios above 1. In order to elucidate the roles of the genes chosen from the list, functional analyses with genetic knockdown using siRNAs have been successfully performed.

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：生殖細胞 配偶子形成 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞形成のしくみは、種独自の生殖戦略を反映し、修飾されてきた。つまり、生殖細胞を生み出すしくみには、生物の本質である普遍性と多様性が具現化されているのである。一般に、生殖系列の決定は、胚発生のごく早い時期におこることが知られている。これは胚期を終えた成体では、生殖系列の新生(もしくは、再生)が不可能であることを意味する。しかし、群体ホヤでは、くり返される無性生殖サイクルのなかで、ヘモブラストと呼ばれる多能性幹細胞から生殖細胞が分化する。よって、群体ホヤは、生殖系列の決定に関する一般法則に従わない新たな動物種の一つとなり得る。本研究では、これまでにマウスやショウジョウバエをモデルとして発展してきた生殖細胞形成の研究で得られた知見や技術を戦略的に活用しながら、群体ホヤのユニークな生殖系列の決定・分化・再生現象にスポットライトを当てる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、無性生殖で増殖する「群体ホヤ」のユニークな生殖細胞形成能力に注目し、その能力を支える「細胞システムの実体」と「システムを制御する分子メカニズム」を明らかにすることである。具体的には、ミダレキクイタボヤを材料として以下の2つの項目に取り組む。

- (1) 群体ホヤの生殖細胞形成に関する遺伝子群を探索し、その機能を解析する。
- (2) 遺伝子発現をマーカーとして、胚発生期から無性増殖期における生殖系列細胞の挙動を追跡し、群体ホヤ全生活史にわたって、生殖系列の細胞系譜を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) Suppression Subtractive Hybridization 法により、群体ホヤの生殖細胞形成に関する遺伝子群をスクリーニングし、cDNA 配列を得る。

RT-PCR および in situ ハイブリダイゼーション法によって、得られた遺伝子の発現解析を行い、成体での生殖細胞形成過程のいつ、どの細胞で、どんな遺伝子が発現しているのかを明らかにする。

siRNA を用いたノックダウン法により、個々の遺伝子の機能を解析する。

- (2) 生殖系列マーカー遺伝子を絞り込み、RT-PCR および in situ ハイブリダイゼーション法によって、胚発生過程での生殖系列形成を解析する。

4. 研究成果

- (1) ミダレキクイタボヤ群体における生殖細胞形成に関する遺伝子群をスクリーニングした。発達した生殖腺をもつ群体(有性生殖期)と生殖腺が未発達の群体(無性生殖期)を材料としてサブトラクション cDNA ライブラリーを作製した。ライブラリーから 572 サンプルの配列解析を行い、327 クローンの cDNA を得た。次に、Web 上に公開されたデータベースを用いた類似性検索により、各クローンにアノテーションを付加した。ハウスキーピング遺伝子の断片と推測されるクローンを除き、さらに、重複するクローンをまとめた結果、104 クローンに集束した。この 104 クローン全てについて、定量 RT-PCR によって、有性生殖期の群体と無性生殖期の群体の間で発現量を比較した。その結果、無性生殖期での発現量を 1 としたときの有性生殖期での発現量 (S/A 比) が 1 を超えるクローンが 91 個見つかった(図 1)。なお、ここでは、「クローン」を「遺伝子」とみなして差支えない。

Clone ID	EST	Candidate genes	Domain description	S/A ratio	SD
P07-F09	—	—	—	127.54	25.47
P07-E01	c21984	Otoancorin	—	124.90	13.90
P07-H08	c563	—	—	115.50	15.45
P06-H11	c1138	Creatine kinase	ATP-gua_Ptrans	112.66	48.30
P06-H10	c27834	transmembrane serine protease-1	CUB domain (CUB) ,Trypsin	108.70	57.48
P07-G11	c4257	—	—	101.55	27.59
P04-D07	c19498	Outer dense fiber protein sperm tails3-like2	—	97.32	34.70
P04-D04	c2229	Protease inhibitor Hs1	Kunitz/Bovine pancreatic trypsin inhibitor	88.98	18.27
P07-G12	—	Fatty acyl-CoA reductase	Male sterility protein (NAD_binding_4, Ster	87.92	33.97
P06-H11	—	—	—	86.16	19.97
P05-H04	c1897	Spermosin	Trypsin	84.72	15.70
P07-G09	—	—	—	83.38	12.82
P06-D01	—	—	—	75.65	7.77
P02-C10	c1663	F-box protein 39	—	72.17	16.97
P05-B12	c64	—	—	71.14	37.06
P02-D05	—	—	—	65.74	6.40
P06-H02	c20013	Dynein beta chain	Dynein heavy chain and region D6 of dyne	62.49	22.75
P05-E11	—	elastase	Trypsin	61.84	23.92
P06-G03	c5804	Sjogren syndrome nuclear autoantigen 1	—	58.66	11.77
P07-C11	—	—	—	57.08	9.38
P03-B04	c25681	—	—	55.29	12.85
P05-H09	c27841	—	—	51.95	14.61
P03-A09	c24215	vitellogenin S1 [Hyalocynthia roretzi]	—	51.28	10.25
P02-F08	c23626	resocoverin-like	EF-hand domain pair (EF_hand5)	50.95	20.98
P02-H05	c11747	—	—	50.34	16.07
P06-G11	—	—	Organic Anion Transporter Polypeptide (O	19.40	7.32
P04-F05	c1095	Nanos	—	19.07	10.26
P07-B05	c6219	—	—	14.89	1.04
P06-A09	—	catalase	—	13.69	21.04
P03-A07	—	—	—	13.55	4.22
P03-G02	c21804	Outer dense fiber protein sperm tails3	Sperm-tail PG-rich repeat (SHEPPO-rpt)	10.08	4.36
P07-F02	—	VC70-like protein-1	—	9.37	11.39

図 1: S/A 比の高い順で上位 30 クローン

- (1) S/A 比の大きなクローンから順に、アノテーションが付かなかったクローンについては RACE 法によって未知領域の単離および配列決定をおこなった。次に、800 bp 以上の cDNA を単離できた 21 クローンについ

て in situ ハイブリダイゼーション法で時間的・空間的発現を調べた。その結果、全てのクローンについて、生殖系列細胞で特異的な発現が観察された。また、生殖細胞の分化段階によって遺伝子の発現パターンが異なっていた(図2, 3, 4)。本研究において、これまで生殖細胞形成との関連が報告されていなかった遺伝子が群体ホヤの有性生殖期特異的遺伝子としてリストアップされ、群体ホヤ独自の生殖細胞形成系メカニズムの存在を示唆する結果が得られた。S/A 比の大きいクローンは、精巢内で発現していた。これは、生殖系列幹細胞、前駆細胞、雌性生殖細胞に比して精原細胞および精母細胞の細胞数が多いことが原因と推測される。

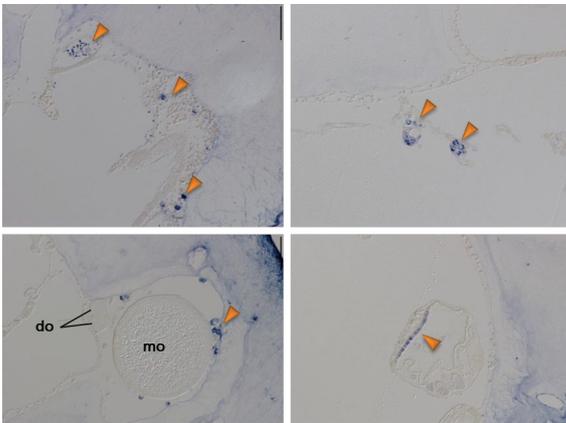


図2: P7A7 クローンの発現パターン
矢尻が mRNA を発現する細胞を示す。
成熟卵 (mo)、卵母細胞 (do) では発現が見られない。

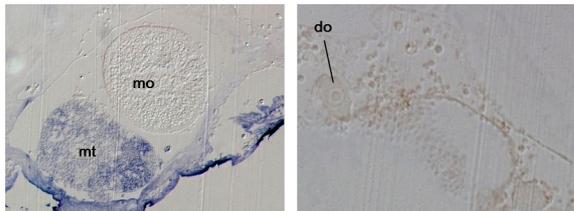


図3: P6H11 クローンの発現パターン
成熟した精巢 (mt) でのみ発現する。

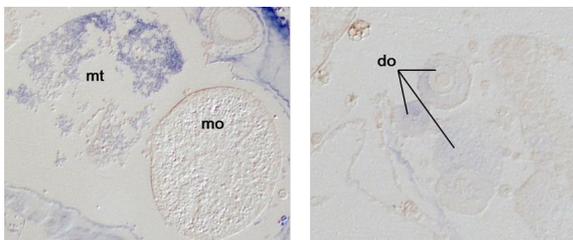


図4: P6H10 クローンの発現パターン
成熟した精巢と卵母細胞で発現する

(1) 間充織細胞の一部として存在する生殖系列幹細胞で発現することが分かった6クローン(P02C12, P04A07, P04B08, P06C08, P06G03, P07A07)に対して、siRNA 導入による遺伝子機能の阻害実験を行った。ノックダウン処理後、コントロール群体に生殖腺形成が観察されるまで飼育し、ノックダウン処理群体の生殖腺形成を観察した。その結果、6クローンの実験群では、すべて、生殖腺の発達が確認されなかった。この結果は、解析した6つの遺伝子が、生殖系列幹細胞から生殖細胞が分化する過程に必須の機能を持つことを示唆している。今後、各遺伝子の阻害が生殖細胞の分化過程のどの段階に影響をおよぼしているかを詳細に解析する。

(2) ミダレキクイタボヤの胚発生過程における生殖系列細胞の形成を、マーカー遺伝子の発現を目印にして解析した。既知マーカーである *Vasa* 遺伝子は、中期尾芽胚期以降で、発現細胞が観察できなくなってしまうため、成体まで生殖系列細胞を追跡するマーカーとしては不十分である。まず、RT-PCR を用いて mRNA の発現を定量解析すると、尾芽胚期において、*Vasa* mRNA は体幹部に比べ尾部に有意に多く存在していた(約2倍)。これは、尾芽胚期には、尾部に生殖系列細胞が存在する可能性を示している。続いて、*Vasa* に加えて、*Nanos*, *Piwi*, *Pum*, *Pem* 遺伝子をマーカーの候補とし、各遺伝子の発現をホルマウント in situ ハイブリダイゼーション法で調べた。その結果、*Vasa* 以外の遺伝子について、初期胚の生殖系列で発現が見られなかった(図5)によって、引き続き、本研究で得られたクローンプールから生殖系列マーカーのスクリーニングをおこなう。

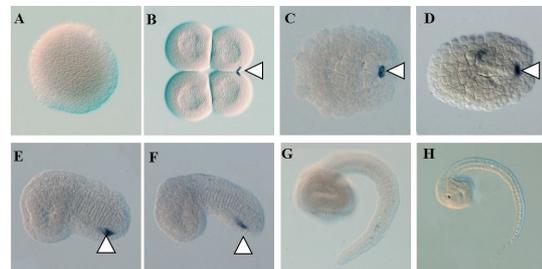


図5: 初期胚での *Vasa* mRNA の発現パターン
矢尻が mRNA を発現する細胞を示す。
中期尾芽胚期以降では、発現細胞が観察されない (G, H)。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Kawamura, K. and Sunanaga, T. (2013). Senescence-associated superoxide dismutase influences mitochondrial gene expression in budding tunicates. *Development Growth & Differentiation* 55, 606-614. 査読あり
DOI: 10.1111/dgd.12065

Kawamura, K., Kitamura, S., Sekida, S., Tsuda, M. and Sunanaga, T. (2012). Molecular anatomy of tunicate senescence: reversible function of mitochondrial and nuclear genes associated with budding cycles. *Development* 139, 4083-4093. 査読あり
DOI:10.1242/dev.083170.

Tatzuke, Y, Sunanaga, T., Fujiwara, S. and Kawamura, K. (2012). RACK1 regulates mesenchymal cell recruitment during sexual and asexual reproduction of budding tunicates. *Developmental Biology* 368, 393-403. 査読あり
DOI:10.1016/j.ydbio.2012.06.006.

Kawamura, K. & Sunanaga, T. (2011). Role of Vasa, Piwi, and Myc-expressing coelomic cells in gonad regeneration of the colonial tunicate, *Botryllus primigenus*. *Mechanisms of Development* 128, 457-470. 査読あり
DOI:10.1016/j.mod.2011.09.001.

[学会発表](計5件)

Sunanaga, T., Kuroda, S., Otsuki, M. and Kawamura, K. Screening and identification of differentially expressed genes in gonadal tissues in colonial ascidian, *Botryllus primigenus*. 7th TUNICATE MEETING, ナポリ 平成 25 年 7 月 25 日

砂長毅, 大月恵, 黒田紗希, 川村和夫, 群体ホヤの生殖腺形成に関わる遺伝子群の単離 日本動物学会 84 回大会, 岡山市, 平成 25 年 9 月 28 日

Sunanaga, T. and Kawamura, K. Cellular and Molecular Basis for Germline Specification in Colonial Ascidian, *Botryllus primigenus*.

Asia-Pacific Developmental Biology Conference, 台北市, 平成 24 年 10 月 6 日

Sunanaga, T. and Kawamura, K. Cellular and Molecular Basis for Germline Specification in Colonial Ascidian, *Botryllus primigenus*.
58th/60th NIBB conference, 岡崎市, 平成 24 年 7 月 17~21 日

Ryuzaki, M., Kawamura, K. and Sunanaga, T. Isolation and spatiotemporal expression analysis of *BMP* in the *Botryllus primigenus* 日本発生生物学会第 45 回大会, 神戸市, 平成 24 年 5 月 31 日

[その他]

講演活動

砂長毅「幹細胞を上手に使うって増やす, 治す」高知県鍼灸師会学術研修会
高知市 高知共済会館
平成 25 年 2 月 17 日

砂長毅「幹細胞を上手に使うって増やす, 治す」高知県鍼灸師会学術研修会
高知市 高知共済会館
平成 23 年 10 月 23 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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