

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 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：2012～2013

課題番号：24657022

研究課題名(和文)生殖細胞解析のための遺伝子改変ミジンコの作製とモデル化

研究課題名(英文) Investigation of Daphnia as a genetic model organism

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ミジンコ類は、古くから生態学の研究に用いられてきたが、遺伝学的、分子生物学的、発生学的な研究は、他のモデル生物に比べようやく基盤が整備されつつあるという状況にある。本研究では日長条件という単一のバロメーターを調節することにより、ほぼ100%雄が出るミジンコの系統を見いだした。さらにマイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物個体の作出を試みた。現在のところ、一過的な遺伝子発現は認められたものの、次世代にトランスジーンが伝達されることは確認できていない。しかしながら、効率よくミジンコをin vitroでの発生させる方法も見出し、モデル生物としてのミジンコの基盤を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：The ubiquitous, freshwater microcrustacean Daphnia has been analyzed as a model animal for monitoring ecosystem integrity. Daphnia are capable of either clonal or sexual reproduction, making them ideally suited for genetic research, but the establishment of in vitro development of the embryos and gene modification techniques has not been established. We investigate a condition for natural male production and found the Daphnia strain whose sex is solely regulated by day length. In addition, we established an optimal condition for microinjections and the following in vitro development of the embryos. The current research is preliminary but our findings provide useful knowledge for further study for genetic study for Daphnids.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：ミジンコ 逆遺伝学 エコゲノミクス 甲殻類

1. 研究開始当初の背景

湖沼生態系の中核を担う構成員であるミジンコ (*Daphnia pulex*) は、環境に応じて様々な表現型を作りだし、その複雑な生活環は、古くから生態学や進化学の分野で研究の対象とされてきた。近年では、環境の変化に対し敏感に応答する特徴を生かして湖沼環境や水質汚染の環境指標生物としても用いられており、生態系の保全など、様々な分野で利用されている。さらに、甲殻類で初めて全ゲノムが解読され、ゲノム研究の情報基盤が整いつつあるほか、申請者は RNAi 手法も開発し、ミジンコは進化-発生-生態学の分野を縦断する新しいモデル生物となりうることで注目されている。一方で、実験手法・技術の面で、まだ克服しなければならない課題も多い。例えばトランスジェニック動物については、マイクロインジェクション法による作出の報告はあるが、遺伝子の導入頻度は低く、実用化のためには多くの点で改善が必要である。さらに、ミジンコの系統保存には絶え間なく継代飼育を行うよりほかに、モデル生物としての基盤整備には安定的な系統の長期保存技術が必須な状況である。

2. 研究の目的

ミジンコは通常雌が雌を産む単為生殖により繁殖するが、環境条件が悪化すると雄を産出し有性生殖を行う。研究代表者らはこれまでに、幼若ホルモン類似体によって環境非依存的にミジンコの雄産生が誘導されること、幼若ホルモン感受による雄への発生運命決定が産卵前の母親卵巣内で起きていること、及び雄胚特異的に発現する *Dsx* (doublesex) が雄形質の発現に重要であることを明らかにした。さらに我々は、ミジンコの性決定遺伝子カスケードを完全に明らかにしようと生殖細胞に注目して研究を推進しているが、母親卵巣内において性決定プロセスの進行している生殖細胞のみを取り出して解析に用いることは技術的に困難であり、そもそもミジンコの卵巣内で生殖細胞がどのような振る舞いをしているかについてさえよくわかっていない。そこで本研究では、ミジンコの生殖細胞の「環境要因から性が決まるまでの一連の遺伝子カスケード」を明らかにするために、生殖細胞特異的ラベル化トランスジェニックミジンコの作出と、単為生殖卵の凍結保存法を確立し、進化-発生-生態学の分野の新しいモデル生物としての基盤を整備することを目的とした。

3. 研究の方法

ミジンコは通常雌が雌を産む単為生殖により繁殖するが、環境条件が悪化すると雄を産出し有性生殖を行う。この環境に依存した

雄産生の過程では、環境シグナルの下流で内分泌系や性分化に関わる因子が働くことが予想されている。本研究ではそのような環境条件を厳密にコントロールするために、人工気象器を用いてミジンコを飼育し、えさは一日一回クロレラを与えた。遺伝子機能解析実験のためのミジンコ初期胚は、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

幼若ホルモンを曝露されたミジンコは環境非依存的に雄の産生が誘導されることから、環境悪化のシグナルを感受したミジンコでは体内の幼若ホルモン濃度が上昇していることが予想される。ミジンコは環境ストレスを単為生殖メスに与えることで、一定の割合でオスを産むことが知られている。しかしながら研究室内で、環境パラメーター変化によって安定的に性比をコントロールすることは難しい。トランスジェニック解析を今後進めていくためには、産まれてくる仔虫の性比をコントロールし、雄と雌を交配させ、有性生殖によって子孫を得ることが不可欠である。われわれはミジンコのある地理系統が単一パラメーター変化により安定的に雄を産み出す条件を見出すことに成功した。すなわち、長日条件(明 14 時間: 暗 10 時間)で産まれてくる仔虫はほぼ 100%メス、短日条件(明 10 時間: 暗 14 時間)ではオスとなる系統を見だし、以下の実験はこの系統を用いて解析を行った。

次にトランスジェニック個体の作出を試みた。マイクロインジェクションを始めるに先立ち、シャーレ中で効率よく卵を発生させる条件を検討した。その結果、60mM のスクロースを含んだ M4 培地中で、なおかつ 2% アガロース上でハンドリングしたミジンコ胚が最も効率よく発生することが分かった。次にこのミジンコ系統から、EF-1a 遺伝子のゲノム DNA を単離し、その遺伝子本体を蛍光タンパク質に置換したコンストラクトを作製した。マイクロインジェクションによるトランスジェニックミジンコ作出を行い、1 世代目では蛍光シグナルがモザイク状に観察されたが、生殖細胞系列に伝わっておらず、ライン化には至らなかった。

さらに、この条件下で飼育したミジンコから RNA を抽出し、雄を産むミジンコおよび雌を産むミジンコの網羅的遺伝子解析のため、RNA-seq 法による解析を行った。すでにそのシーケンスのランは終わっており、現在解析を進めている。雌雄それぞれの誘導条件下における網羅的な遺伝子発現解析から幼若ホルモンの動態制御に関わる因子が同定されるものと期待される。

また、ミジンコの系統保存には絶え間なく

継代飼育を行うよりほかに、モデル生物としての基盤整備には安定的な系統の長期保存技術が必須であることから、本研究では、ミジンコの単為発生卵の凍結方法についても検討を行った。胚を育房に抱えた親個体または単離胚を用いて、産卵直後、産卵後 24 時間、産卵後 48 時間の各ステージの胚について、グリセロール耐性が低く、すべての処理条件において生存率を検討したところ、48 時間胚において、グリセロール耐性がもっとも大きく、生存率が 80% を超えた。しかしながら、この条件で凍結融解を行ったミジンコは産卵せず、凍結および融解の条件をさらに検討する必要がある。

本研究では以上にまとめたように、遺伝的な交配実験系の開発について解析を行った。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。日長条件を調節することにより、生まれてくる仔虫の性を高精度で制御できる系統を見出した。さらにマイクロインジェクション法によるトランスジェニック個体の作出を試みた。現在のところ、インジェクション直後に一過的な遺伝子 (EGFP) 発現が認められたものの、次世代にトランスジーンが伝達されることは確認できていない。また、我々は TALEN により遺伝子編集法を検討し、ライン化を試みている。これらは、今後遺伝子改変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。

結果的に本研究期間中には、生殖細胞系列に外来遺伝子をもつトランスジェニック個体の作出には至らなかった。しかし本研究を通じて得られた知見、及び開発した遺伝子操作技術全般により、生態系で重要な位置を占めるミジンコと、その生息環境の相互作用を分子レベルで理解するための「環境応答のゲノミクス研究における新規モデル生物」としての基盤を作るという目標は達せられたと思われる。今後、ミジンコの生殖戦略転換という非常にユニークな現象から、性という種の繁栄を左右する重要な性質が、いかにして環境シグナルの下流で制御されているかという発生生物学的な知見はもとより、生物全般に見られる多様な性決定様式がどのように進化してきたかについても新たな示唆が得られると期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件) 全て査読あり

(1) Abe R, Watanabe H, Yamamuro M, Iguchi T, Tatarazako N. Establishment of a short-term, in vivo screening method for detecting chemicals with juvenile hormone activity using adult *Daphnia magna*. J

Appl Toxicol. 2014, in press, doi: 10.1002/jat.2989.

(2) Hiruta C, Toyota K, Miyakawa H, Ogino Y, Miyagawa S, Tatarazako N, Shaw JR, Iguchi T. Development of a microinjection system for RNA interference in the water flea *Daphnia pulex*. BMC Biotechnol. 2014, 13:96, doi: 10.1186/1472-6750-13-96.

(3) Toyota K, Kato Y, Miyakawa H, Yatsu R, Mizutani T, Ogino Y, Miyagawa S, Watanabe H, Nishide H, Uchiyama I, Tatarazako N, Iguchi T. Molecular impact of juvenile hormone agonists on neonatal *Daphnia magna*. J Appl Toxicol. 2014, 34:537-544, doi: 10.1002/jat.2922.

(4) Miyakawa H, Toyota K, Hirakawa I, Ogino Y, Miyagawa S, Oda S, Tatarazako N, Miura T, Colbourne JK, Iguchi T. A mutation in the receptor Methoprene-tolerant alters juvenile hormone response in insects and crustaceans. Nat Commun. 2013, 4:1856, doi: 10.1038/ncomms2868.

(5) Jeong SW, Lee SM, Yum SS, Iguchi T, Seo YR. Genomic expression responses toward bisphenol-A toxicity in *Daphnia magna* in terms of reproductive activity. Mol. Cell. Toxicol. 2013, 9:149-158, Web page; <http://link.springer.com/article/10.1007/s13273-013-0019-y>

(6) Bergman Å, Andersson AM, Becher G, van den Berg M, Blumberg B, Bjerregaard P, Bornehag CG, Bornman R, Brandt I, Brian JV, Casey SC, Fowler PA, Frouin H, Giudice LC, Iguchi T, Hass U, Jobling S, Juu A, Kidd KA, Kortenkamp A, Lind M, Martin OV, Muir D, Ochieng R, Olea N, Norrgren L, Ropstad E, Ross PS, Rudén C, Scheringer M, Skakkebaek NE, Söder O, Sonnenschein C, Soto A, Swan S, Toppari J, Tyler CR, Vandenberg LN, Vinggaard AM, Wiberg K., Zoeller RT. Science and policy on endocrine disrupters must not be mixed: a reply to a “common sense” intervention by toxicology journal editors. Environ. Health, 2013, 12:69, doi: 10.1186/1476-069X-12-69.

(7) Bergman Å, Heindel JJ, Kidd KA, Jobling S, Zoeller RT, Becher G, Bjerregaard P, Bornman R, Brandt I, Brian JV, Kortenkamp A, Muir D, Ochieng R, Skakkebaek NE, Iguchi T, Toppari J, Woodruff TJ. The impact of endocrine

disruption: A consensus statement on the state of the science. Environ. Health Perspect., 2013, 121:A104-106, doi: 10.1289/ehp.1205448.

(8) Toyota K, Kato Y, Sato M, Sugiura N, Miyagawa S, Miyakawa H, Watanabe H, Oda S, Ogino Y, Hiruta C, Mizutani T, Tatarazako N, Paland S, Jackson C, Colbourne JK, Iguchi T. Molecular cloning of doublesex genes of four cladocera (water flea) species. BMC Genomics. 2013, 14:239, doi: 10.1186/1471-2164-14-239.

〔学会発表〕(計 22 件)

(1) Hiruta C, Toyota K, Miyakawa H, Miyagawa S, Ogino Y, Tatarazako N, Shaw JR, Tanaka D, Iguchi T: Approach to establishing tools for gene functional analysis and cryopreservation in *Daphnia pulex*. Daphnia Genomics Consortium 2014, 2014 年 1 月 20-22 日, University of Birmingham, イギリス

(2) Hiruta C, Tochinai S, Iguchi T: Abortive meiosis found in the oogenesis of parthenogenetic *Daphnia pulex*. Daphnia Genomics Consortium 2014 meeting, 2014 年 1 月 20-22 日, University of Birmingham, イギリス

(3) Miyakawa H, Toyota K, Hirakawa I, Ogino Y, Miyagawa S, Oda S, Tatarazako N, Miura T, Colbourne JK, Iguchi T: A single amino acid substitution in Methoprene-tolerant (Met) alters juvenile hormone use by insects and Crustaceans. Insect Hormones International Workshop 2013, 2013 年 7 月 21-26 日 University of Minnesota, アメリカ

(4) Iguchi T, Toyota K., Miyakawa H, Hiruta C, Ogino Y, Miyagawa S, Tatarazako N: Environmental sex determination of water flea, *Daphnia magna*. 17th International Congress of Comparative Endocrinology (ICCE 2013), 2013 年 7 月 15-19 日, Facultat de Biologia at the Universitat de Barcelona, スペイン

(5) Hiruta C, Toyota K, Miyakawa H, Iguchi T: Development of an RNA interference method using microinjection in the water flea *Daphnia pulex*. 46th Ann. Meet. Jap. Soc. Devel. Biol., 2013 年 5 月 28-31 日, 島根県松江市

(6) Iguchi T: Aquatic environments and

endocrine activity: The regulatory approach in Japan. SETAC Europe 23rd Ann. Meet. 2013 年 5 月 12-16 日, Glasgow, イギリス

〔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
研究者番号 : 90128588