

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24870019

研究課題名(和文)ワカレオタマボヤをもちいた発生遺伝学的アプローチの開発

研究課題名(英文)Developing methodologies for developmental genetics of an appendicularian, *Oikopleura dioica*.

研究代表者

小沼 健 (Onuma, Takeshi)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30632103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：短い生活環や少ない細胞数など多くの利点をもつ脊索動物ワカレオタマボヤを、発生遺伝学的アプローチが可能なモデル生物として開発するため、(1)トランスジェニック動物の作成法の検討、(2)遺伝子発現の情報収集、(3)変異体作成の3つの課題に取り組んだ。(1)では、卵巣へのmRNA注入により、オタマボヤの胚で発現するトランスポゾンの転移酵素を3種類特定した。(2)では、精巣特異的ヒストンや、初期胚の極性形成に關与する遺伝子のホモログをクローニングした。また未受精卵および幼生に存在するmRNAの配列を、RNA seq解析により網羅的に明らかにした。(3)では、掛けあわせによる近交系の作出を試みた。

研究成果の概要(英文)：A planktonic tunicate, *Oikopleura dioica*, is a candidate model organism to understand and mechanisms of chordate development. It has the short life cycle of only five days and consists of small number of cells. In this study, I aimed to establish molecular and genetic approaches using this simple chordate. First, I tried transposon-mediated transgenesis of *O. dioica*. My analyses identified three transposons of which exogenous transposase mRNAs are translated to proteins and localize to the nucleus of early embryos. Second, I cloned several cDNAs from Japanese *O. dioica*. They include testis-specific histones and homologues of proteins that regulate cell polarizing and axis formation in other model organisms. Furthermore, to characterize all mRNA transcripts in unfertilized eggs and larvae, RNA seq analysis was performed. Third, inbreeding over 10 generations was carried out to establish inbred line.

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：オタマボヤ トランスポゾン 遺伝子導入 RNA seq 近交系 発生遺伝学 トランスジェニック

1. 研究開始当初の背景

ワカレオタマボヤ *Oikopleura dioica* は、脊索動物門尾索動物亜門オタマボヤ綱に属する海洋性プランクトンである。我々ヒトを含む脊索動物に共通な体制を持ちながら、体外で発生し、約5日という短い世代時間、約3000個という少ない細胞数などを特徴とする。ゲノム情報や遺伝子発現のデータベースが利用でき、さらに受精から孵化までの全細胞系譜が解明されている。これらの特徴から、線虫やハエのような「単純な体制の実験モデル動物としての利点」を備えた、新しい脊索動物のモデル生物となることが期待できる。

現在、オタマボヤを実験動物として用いている研究室は世界でもたいへん少ない。しかしオタマボヤは上記の生物学的特性から、発生遺伝学、すなわち個体発生や形態形成を遺伝子レベルで理解するのに有利な動物と考えられる。この特性を活用するため、分子遺伝学の技術を導入したいと考えた。線虫やゼブラフィッシュなどのモデル生物では、「外来遺伝子をゲノムへ導入する技術」や「突然変異体を作成する技術」により、初期発生や形態形成の遺伝子レベルでの理解が進んでいる。このような方法論をワカレオタマボヤに導入すれば、脊索動物の遺伝子機能を、単純な生体システムの中で、組織や単一細胞レベルに還元して理解しようと考えた。

本研究計画は、ポストドク時代(2008年-)からゼブラフィッシュの発生学、遺伝子工学を行ってきた研究代表者(小沼)が、ワカレオタマボヤの研究室内での継代飼育システムを維持する現所属(西田宏記教授)へ着任したことを機に、相互の経験と技術をもとにして「単純な体制の脊索動物モデルを利用し、発生遺伝学の新たな研究領域を開拓する」ことを目標にすえて開始した。

2. 研究の目的

短い生活環や少ない細胞数など、実験動物として多くの発展性を秘めたワカレオタマボヤをもちいた発生遺伝学の確立に向けて、(1)トランスジェニック個体の作成にむけた遺伝子導入方法の検討、(2)遺伝子発現の情報収集、(3)変異体の作成にむけた準備を行う、の3点を目的とした。

3. 研究の方法

ワカレオタマボヤは西日本沿岸で採取し、実験室内で継代飼育した。人工海水による飼育方法はすでに確立されたものに沿ったが、当該研究期間内に、レイシーマリンとマリンアートという2種類を交互に使用するとより長期に安定して飼育できることがわかり、現在はこの方式を採用して、1年半にわたる継代飼育ができています。安定してオタマボヤを

供給できる環境を活用して、以下の実験を進めた。

(1)まず、外来DNAをオタマボヤに注入し発現させることを試みた。筋肉特異的な遺伝子であるワカレオタマボヤ筋肉アクチン3の上流配列2.5kbを用いて、蛍光タンパク質VenusかKaedeを発現させるDNAコンストラクトをもちいた。所属研究室の先行研究により、成熟途上の卵巣にRNAを顕微注入すると、生まれてくる数十の卵に取り込まれることが分かっていたので(Omotezako et al., 2013)、DNAの注入にもこの方法が使えるか検討した。取り込みが起こった胚の選別のため、核に局在する融合蛍光タンパク質であるH2B-mCherryのmRNAを同時に注入した。また、近縁種のカタコウレイボヤでは、電気穿孔法によるDNAコンストラクトの導入が可能であるため、電気穿孔法による導入も試した。

(2)トランスポゾンをもちいた遺伝子導入法を検討した。他の生物で実績のあるトランスポゾンを7種類(Sleeping beauty, Minos, Tol2, piggyBac, Ac/DS, Space invador, TcBuster)入手して検討した。ワカレオタマボヤ胚において転移酵素が発現するか検討するため、そのC末端側を緑色蛍光タンパク質(EGFP)で標識したコンストラクトを作成した。ここからmRNAを合成し卵巣内に注入することで、転移酵素が翻訳され核移行するかを検討した。続いて、(1)のDNAコンストラクトと転移酵素mRNAを注入し、筋肉が光る胚を選別して、トランスジェニック個体ができるかを検討した。同時に、ワカレオタマボヤの体内でトランスポゾンの切り出し反応、転移反応が起こるかを調べるため、抗生物質耐性遺伝子を転移させるベクターを作成して検討した。

(3)細胞・組織特異的な発現マーカーが少ない状況を勘案し、1)オタマボヤの精巣特異的に発現するヒストン群のcDNAを単離し、その発現を *in situ* hybridization で調べた。また、2)他の生物で、卵や胚の極性形成に重要とされるいくつかの遺伝子のホモログの単離を試みた。

(4)遺伝子発現の情報を得るため、日本産オタマボヤのmRNA配列を網羅的に決定した。未受精卵と受精後8時間の幼生それぞれからtotal RNAを調整し、次世代シーケンサーによるRNA seq解析を行った。得られた配列(リード平均サイズ89bp)をアセンブルして、存在するmRNAの種類を特定するとともに、既存のノルウェー産オタマボヤのゲノムデータベースにおいて存在が予測されている転写産物の何割をカバーするのかを調べた。

(5)遺伝学的な解析、とくに変異体作成を行う基盤として、日本産オタマボヤの近交系の作成を試みた。雌雄1匹ずつのペアからスタートし、その子孫を隔離したバケツ内で飼育し、そこから再び雌雄一尾ずつを選んで掛け合わせる、というサイクルを繰り返した。ここでは、15世代分の近親交配を目標とした。

4. 研究成果

(1) ワカレオタマボヤ筋肉アクチン 3 遺伝子の上流領域と蛍光タンパク質 Venus または Kaede をつないだレポーター-DNA を卵巣に注入し、その卵を受精させて育てたところ、一部の胚では筋肉での蛍光を確認できた(図 1)。その胚は 6 穴のシャーレに移し、次世代へと育てることができた。他の生物と同様に、オタマボヤでも組織特異的なプロモーターをもちいて細胞や組織の可視化ができることが分かる。しかし発現の効率は低く、同時注入した H2B-mCherry mRNA 由来の赤色の蛍光が見られる胚のうち、5%程度でしかレポーターの発現が見られなかった。また注入胚の半数は奇形になった。ワカレオタマボヤ胚では、外来 mRNA の発現効率は高いのだが(卵巣に顕微注入すると、生まれた卵の 3-4 割で mRNA の発現が起こる)、これと比べて外来 DNA の発現効率はかなり低いようである。加えて、カタユレイボヤで高効率な遺伝子導入法である電気穿孔法も試みたが、顕微注入の場合よりも発現効率は低かった。カタユレイボヤ胚への効率的な電気穿孔法には卵膜の除去が必要だが、オタマボヤでは卵膜の除去が困難であることも原因と思われる。

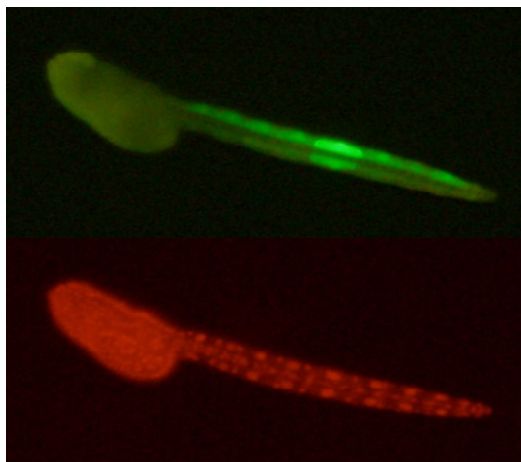


図 1. 筋肉アクチン 3 プロモーターにより、Venus の筋肉特異的な発現誘導が生じた幼生(上図)。コントロールとして H2B-mCherry mRNA を同時に注入し、すべての細胞の核が赤色の蛍光を示すことを確認している(下図)。

(2) トランスポゾンをもちいた遺伝子導入法を検討した。まず転移酵素の mRNA を *in vitro* 合成し、卵巣に注入したところ、胚発生には影響しないことが確認できた。7 種類の転移酵素の C 末端を EGFP で標識した融合タンパク質の mRNA を作成して卵巣へ注入したところ、Tol2, Piggybac, TcBuster の 3 つはワカレオタマボヤの胚で翻訳され、核に移行することを確認できた(図 2)。

これらの転移酵素の標的配列(逆向き反復配列)の内側に(1)のレポーター-DNA 配列を組み込んだベクターを作り、トランスポゾンによる遺伝子導入が可能か調べた。ベクターと

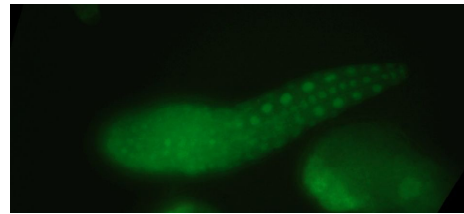


図 2. C 末端側に EGFP を融

合した転移酵素の mRNA を注入した胚(受精後 3 時間)。ここでは piggyBac の例を示すが、蛍光の核局在は Tol2 と TcBuster でも同様に見られる。

転移酵素 mRNA を卵巣に共注入すると、一部の胚では筋肉が光ることを確認できた。しかし、その効率は(1)の場合と同様に低いものであった。筋肉での蛍光が確認できた胚を 9 個育てて次世代を得ることに成功したが、レポーター遺伝子の発現は確認できなかった。しかし発現はしなくとも、ゲノムヘレポーター遺伝子が組み込まれた可能性はまだ残っている。サンプルの例数をさらに増やした上で、ゲノム PCR 法により確認する予定である。

転移酵素がトランスポゾンの認識配列と共存したときに、転移反応が生じるかを定量する実験系を作成した。異なる抗生物質の耐性遺伝子をもつ、ドナー側とホスト側のベクターを用意し、転移酵素 mRNA とともに卵巣に注入した。その胚を受精後 3 時間まで育て、DNA を抽出したのち、電気穿孔法により大腸菌に導入して形質転換した。その結果、10,000-100,000 個の薬剤耐性コロニーが回収でき、実験に十分な感度をもつことが確認できた。ただ、現在のところ転移反応を検出することはできていない。切り出し反応については、孵化後の幼生からプラスミドを回収し PCR により調べたところ、一部の幼生では標的配列が失われた痕跡が見られた。しかし出現頻度は低く、また由来不明な挿入配列が同時に生じていたため、転移反応に依存して起きたものかは不明である。

このように、現在のところワカレオタマボヤでは、当初の研究計画に沿った二本鎖 DNA をもちいて遺伝子導入をするアプローチは困難が多いことが明らかになってきた。また最近、所属研究室の大学院生が、ワカレオタマボヤでは外来の DNA が相同配列をもつ内在性遺伝子の発現に干渉する可能性があることを見出した(表迫ら、投稿準備中)。今後はこれまでの方法をさらに検討するだけでなく、ワカレオタマボヤで効率よく発現する RNA をベースにした遺伝子導入(シュードウイルスをもちいた方法など)を試していこうと考えて準備を進めている。

(3) 精巣特異的に発現することが知られているヒストン遺伝子の cDNA を、日本産のオタマボヤから 4 種類単離した。ノルウェー産の cDNA の塩基配列と比較したところ、86.1-92.7%の配列が一致した。また、そのう

ち1つは産卵期のオスの精巢で特異的に発現することを *in situ* hybridization 法により確認した(図3)。さらに5'上流配列約1 kb 分の上流配列を単離することができた。

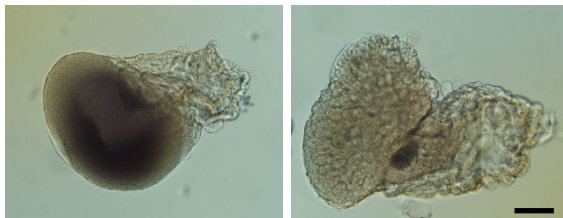


図3. 精巢特異的なヒストン遺伝子の1つ、H4t の mRNA に対する *in situ* hybridization. 雄(左図)の精巢で発現が検出されるが、雌(右図)ではほとんど発現が見られない。スケールバーは0.2mm。

胚や卵の極性形成のマーカの単離を試みた。既存のデータベースをもとに探索したところ、植物極のマーカであるβカテニンを2種類、細胞極性マーカである par-6 と PKCιota、さらにカエル卵で局在することが転写因子 Noa36 のホモログの存在が予測できた。そこで、産卵前のメス個体の cDNA ライブラリを作成して、これを鋳型に PCR を行い、これらのタンパク質のコード領域全長をカバーした塩基配列を単離した。今後は、これらと EGFP または mCherry との融合タンパク質をコードしたコンストラクトを作成し、卵巣への mRNA 注入によって、卵や胚の極性形成の過程を可視化できるか調べていく。

(4) 日本産のワカレオタマボヤで発現している mRNA の配列を、RNA seq により網羅的に決定した(解析は、バイオインフォマティクスを専門とする大学院生の Kai Wang 氏が担当)。RNA サンプルは、未受精卵と幼生(受精後8時間)の2つのステージから調整した。Clean reads をアセンブルしたところ、平均長(N50)が1,806ヌクレオチドで、86,898種類の転写産物が得られた。そのうち、コードしているアミノ酸が、既知のペプチド配列のデータベースにヒットしたものは55%程度(47,963個)であった。興味深いことにこれらは、ノルウェー産のオタマボヤのゲノムデータベースで存在が予想されていた転写産物(ペプチド産物)全体のうち、実に95.4%をカバーしていた。残りの45%程度の転写産物の大部分は500ヌクレオチド以下の短い配列であったが、転写産物と思われる2,000ヌクレオチド以上の配列も200種類程度含まれていたことから、未知の遺伝子産物をコードしている新規の mRNA である可能性が高い。これらの結果をもとに、RNA 配列やコードされるアミノ酸配列の情報を検索する Blast を構築した。このようにして、日本産オタマボヤの発生に関わる遺伝子のクローニングや機能解明に資する解析基盤を確立した(Wang

ら、投稿準備中)。

(5) 変異体形成を行う基盤として、近交系の樹立に取り組んだ。雌雄を一匹ずつ用意して掛けあわせ(雌は数十から数百個の卵を産む)、その子孫を育てることを繰り返し、13世代の近親交配に成功している。飼育環境の悪化により何度か潰えてしまっているが、近交系の作出は十分に可能だと判断した。ただし、オタマボヤの研究室内での飼育状況は、水質や餌など様々な条件により変動しやすいので、飼育環境が悪化した場合に対処するための保存技術が望まれる。現在、精子の凍結保存法が利用可能だが(Ouchi et al., 2011)、精子を保存するだけでは近交系の保存はできない。線虫で行われているように、卵ないしは胚を凍結保存する技術が将来的には必要になるかもしれない。

近親交配については、掛け合わせ時期や海水量の条件を検討した。その結果、「1リットル海水中に、産卵・放精の6時間前ほど前のペアを入れる」のが、受精の効率が良い条件であることが分かった。すべての遺伝子がホモ接合になるには理論上15世代の近親交配が必要なので、今後も掛けあわせを継続していく。

以上のように、当初計画していた遺伝子導入方法の開発に難航している一方で、予想外の興味深い成果に結びつく展開も得られ、ワカレオタマボヤの発生遺伝学を進めるための基礎的知見を得ることができたと思われる。本研究計画は分子遺伝学の技術開発が中心なのでここでは紹介しないが、他にも新たな細胞のイメージング技術や観察技術を取り入れて、興味深い発生現象や形態に関する知見を得ているところである。今後もさらに技術的な改良を加え、当初の計画に掲げた研究目的の実現に向けて取り組んでいきたい。

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3件)

1. Onuma TA and Duan C (2012). Duplicated Kiss1 receptor genes in zebrafish: Distinct gene expression patterns, different ligand selectivity, and a novel nuclear isoform with transactivating activity. *The FASEB Journal*. 26: 2941-2950. (査読有り)
2. Omotezako T, Nishino A, Onuma TA and Nishida H (2013). RNA interference in the appendicularian, *Oikopleura dioica*, reveals the function of the *Brachyury* gene. *Development Genes and Evolution*. 223(4): 261-267. (査読有り)

3. 小沼健 (2013) ゼブラフィッシュにおける Kiss1 受容体の重複遺伝子が示す「発現とリガンド選択性の多様性」および「転写促進活性をもつ核局在バリエーション」.
比較内分泌学. 148: 48-51 (査読無し).

[学会発表](計 8 件)

1. 岸香苗, 表迫竜也, 西野敦雄, 小沼健 (西田宏記研究室オタマボヤグループ). ワカレオタマボヤの発生遺伝学研究の現状. ホヤ研究会, 口頭発表 (要旨集 pp30) (京都, 京都大学, 2012/6/1-6/2)
2. Nishida H, Nishio T, Onuma T, Omotezako T, Kishi K. A new chordate model animal with short life cycle of five days: The Appendicularian, *Oikopleura dioica*. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology, oral presentation (Seoul, COEX, 2013/5/14-16).
3. 岸香苗, 小沼健, 西田宏記. Long-distance cell migrations during larval development in an appendicularian, *Oikopleura dioica*. 第 46 回日本発生生物学会, 口頭・ポスター発表 (P-169) (松江, くにびきメッセ, 2013/5/28-31)
4. 小沼健, 岸香苗, 表迫竜也, 西田宏記. ワカレオタマボヤにおける遺伝子導入の取り組み. 第 3 回 Just do it!!の会, 2013, 口頭発表 (島根, さんぴーの出雲, 2013/5/27).
5. Kishi K, Onuma TA, Nishida H. Long-distance cell migrations during larval development in the appendicularian, *Oikopleura dioica*. 17th International Congress of Developmental Biology, poster presentation (Abstract No. OR12-2). (Cancun, Cancun Center, 2013/06/16-20).
6. Omotezako T, Nishino A, Onuma TA, Nishida H RNA interference method in appendicularian. The 7th International Tunicate Meeting (Naples, the Università degli Studi di Napoli "Parthenope", 2013/07/22-26).
7. Onuma TA, Kishi K, Omotezako T, Nishida H. A new model organism in developmental genetics: The appendicularian, *Oikopleura dioica*. (発生遺伝学の新しいモデル生物、ワカレオタマボヤの紹介と研究の現状) The 3rd Annual Meeting of Whole-Organism Science Society Joint meeting with The 12th Annual Meeting of Structural-Biological Whole Cell Project. (大阪、大阪大学工学部シグマホール、2013/9/21-22).

8. 岸香苗, 小沼健, 西田宏記. ワカレオタマボヤ幼生期の蛍光ライブイメージング. 第 84 回日本動物学会、ホヤ談話会 (岡山、岡山大学津島キャンパス, 2013/9/26-28).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
大阪大学研究者総欄内
<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=10000266&f1=12&sm=field&sl=ja&sp=1>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小沼 健 (ONUMA, Takeshi)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：30632103

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：