

## 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：94404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24870035

研究課題名(和文)パターン形成と細胞運動を協調制御する分子機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of molecular networks that regulate pattern formation and cell behavior

研究代表者

小田 康子(秋山康子)(Akiyama-Oda, Yasuko)

株式会社生命誌研究館・その他部局等・研究員

研究者番号：80426650

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)：本研究ではオオヒメグモ初期胚を題材として用い、発生過程においてパターン形成と細胞運動がどのように相互に関係しているかを明らかにすることを目指して、解析系の立ち上げを行った。蛍光多重in situ法と細胞の2段階標識法を立ち上げ、これらとeRNAiとの組み合わせで、複数の遺伝子の発現や細胞運動への影響を解析することを可能とした。さらに、パターン形成と細胞運動の両者の制御に関わる可能性のあるHhシグナルをpRNAiにより抑制し、これとRNA-seqとを組み合わせることで、ゲノムワイドに分子を同定する基盤を作ることができた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to create the analysis system to understand how pattern formation and cell behavior are mutually related during early embryogenesis of the spider *Parasteatoda tepidariorum*. Multiple FISH and 2-step cell labeling methods are now available in this spider system. These methods in combination with embryonic RNA interference make it possible to examine RNAi effects on expression of multiple genes simultaneously and to analyze movement of knockdown-cells compared to surrounding intact cells. Furthermore, when combined with parental RNA interference, RNA sequencing is shown to be a powerful method for searching for target genes of Hedgehog signaling that is possible to regulate both pattern formation and cell behavior in the early spider embryo.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：RNA-seq 蛍光多重in situ RNAi

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 生物の発生過程において、個体を構成する個々の細胞は自らの位置を理解して、その場に応じた遺伝子を発現する。さらに、細胞は多くの場合、位置と体軸の向きを認識して形態形成運動をし、からだを形作る。つまり、細胞は動的な場を構成しながらも、全体としてのパターンを形成し、変化させ、また維持していると考えられる。しかし胚全体のマクロなパターンの形成と個々の細胞の振る舞いを協調させる分子機構はまだ明らかではない。
- (2) ショウジョウバエ胚ではパターン形成の主要な場である上皮細胞は発生過程で相対的な位置を大きく変えることはない。また、線虫やホヤでは、細胞系譜が細胞運命の決定や遺伝子発現、細胞の位置に大きく寄与する。より動的な細胞運動が起こる生物で、個々の細胞がどのように自らの位置を認識し、パターンを形成するかは、あまり研究されていなかった。
- (3) 私たちが新しいモデル生物として開発したオオヒメグモは、発生に調節的な側面が多く、放射相称の円盤形の胚盤から体節構造をもつ帯状の胚帯への転換期と胚帯伸長期に、非常に動的な細胞運動が見られる。この時期の胚のライブ観察と遺伝子発現解析を組み合わせた解析から、細胞系譜に縛られずに遺伝子発現と細胞の運動を協調させる動的な仕組みの存在を示唆するデータを得ていた。
- (4) 胚で局所的に遺伝子発現を抑制する胚性 RNA 干渉(eRNAi)法で Hedgehog (Hh) シグナルを細胞内に伝える *smoothened (smo)* の発現抑制を行ったところ、2本鎖 RNA が導入された細胞クローンだけでなく広範囲に複合的な異常が見られた。細胞運動に対する細胞自律的な制御、場全体の細胞の向きの認識、胚を形作るための形態形成運動とマクロなパターンの形成、全てに影響が見られ、Smo は(おそらく Hh シグナルは)これらの事象を統合的に制御している可能性が考えられた。
- (5) これまでオオヒメグモを実験材料として扱うために、様々な実験を可能としてきた。胚における *in situ* ハイブリダイゼーション法による遺伝子発現パターンの解析。上記の eRNAi に加えて、母親に 2本鎖 RNA を注射して産まれてくる卵全体で遺伝子発現を抑制する parental RNA 干渉 (pRNAi) 法。これらにより遺伝子の機能解析が可能となっていた。さらに蛍光タンパクをコードする遺伝子の mRNA の注射により、細胞のライブ観察が可能であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、オオヒメグモ初期胚を題材として用い、発生過程において細胞がどのように

位置と向きを認識して前後軸・背腹軸に沿ったパターンを形成するのか、そしてパターン形成と細胞運動がどのように相互に関係しているかを明らかにすることを目指している。まず、解析系の立ち上げを行い、パターン形成と細胞運動の協調制御に関わる分子を同定し、分子機構を理解する基盤を作る。

## 3. 研究の方法

- (1) 蛍光多重 *in situ* 法の構築  
標識した(ノックダウン)細胞の染色に加えて、複数の遺伝子の発現を同時に染色することを目指した。
- (2) 細胞運動の解析法の立ち上げ  
蛍光物質により標識した細胞と周囲の細胞の運動の違いをライブ観察する方法の開発を行った。
- (3) 異所的発現系の構築  
TALE や Meganuclease, Tol2 を用いた方法を試し、外因性遺伝子をクモ胚で発現させることを目指した。
- (4) RNA-seq 法の立ち上げ  
オオヒメグモのゲノムプロジェクトが進みつつあったので、ゲノムワイドな遺伝子解析を行うことは将来的に非常に有効であると考へた。同時に、所属する研究施設にイルミナ社の MiSeq が導入されることとなり、オオヒメグモ胚をサンプルとして RNA-seq を行う方法を立ち上げた。サンプルの調整からデータ解析まで自分で行えるように、文献を調査し、実際に実験を行い、方法を確立した。
- (6) パターン形成や細胞運動に関わる遺伝子の候補の探索  
前述のように、Hh シグナルはパターン形成と細胞運動の両方の制御に関わっている可能性があったので、Hh シグナルにより発現制御を受ける遺伝子の探索を開始した。pRNAi と RNA-seq を組み合わせを行った。

## 4. 研究成果

- (1) 蛍光多重 *in situ* 法の構築  
チラミドを用いた方法をオオヒメグモ胚に適用するために、実験条件の検討を行った。これまで用いていた DIG と FLU 以外のプローブ標識と対応する抗体等を選定し、 蛍

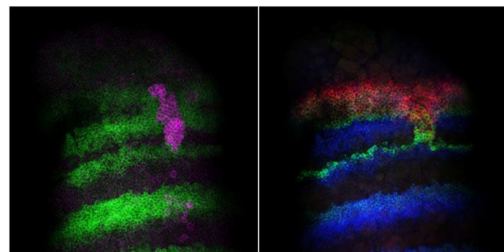


図 1 : 蛍光多重染色した eRNAi 胚

光チラミドを市販のものではなく、自分で合成することと、反応液をホウ酸を入れた緩衝液とし、さらにペルオキシダーゼ促進作用のある物質を添加することで良好なシグナルが得られるようになり、最大4遺伝子の発現を同時に観察することに成功した。eRNAiの解析では、1つの胚で同時に複数の遺伝子に対する影響が解析できるようになり(図1)、効率的に解析が進められるようになった。さらに、染色像は定量的な解析に用いることが可能であることも明らかにした(図2)。このことは、今後の遺伝子発現パターンの数値化や、さらにはパターン形成メカニズムのモデル化へと展開できると考えている。現在、方法についての論文を執筆中である。

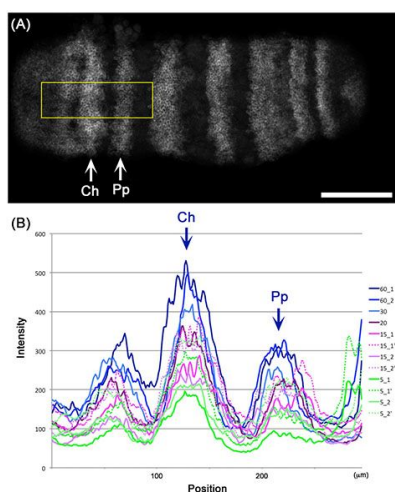


図2 染色時間とシグナルの強さ

### (2) 細胞運動の解析法の立ち上げ

卵への2段階の注射法を開発した。16細胞期のひとつの割球に蛍光色素標識デキストランを注入し、1-2回の細胞分裂の後に異なる蛍光色素で標識したデキストランを注入することで、2回目の注射で標識される細胞と、その姉妹細胞である周囲の細胞とを比較観察することができるようになった。この方法では、2回目の標識の際に2本鎖RNAを同時に注入すれば、遺伝子ノックダウン細胞と周囲の細胞の運動性の違いを可視化できることになる。

### (3) 異所的発現系の構築

さまざまな方法を試したが、オオヒメグモ胚においてmRNAの注射以外に、外来遺伝子の発現を引き起こす方法の構築はできていない。

### (4) RNA-seq法の立ち上げ

所属研究機関に新たに導入されたイルミナMiSeqを用いて、クモの卵をサンプルとしてRNA-seqを行い、さらにデータの解析を独自

に行うまでの解析系を立ち上げた。ライブラリーは、マッピングの効率及び質を上げるという報告があったので、dUTP-USER法でダイレクショナルなものを作製した。ライブラリーの定量は、リアルタイムPCRを用いて行い、これにより一度のランで安定的にデータを得られるようになった。解読が進められているオオヒメグモのゲノムに対するマッピングはDDBJ pipelineで利用できる種々のアルゴリズムを試し、その中で良好な結果を出すことが分かったBLATを採用した。さらに、マッピングの結果をもとにゲノム上の転写単位の予測、カウントデータの取得、差異のある発現を示す遺伝子の同定までの解析を一通り行えるようになった。

国際協力で行っているオオヒメグモのゲノム解析プロジェクトへのデータの提供を行うとともに、UTGBのゲノムブラウザー等を利用して、独自にゲノム情報を公開する準備を進めている。

### (5) パターン形成や細胞運動に関わる遺伝子の候補の探索

オオヒメグモは一度に200個程の卵を、約5日ごとに繰り返し産む。pRNAiを行うと、2本鎖RNA注入後20日以降に産まれた卵はRNAiの効果が最大となっている。この特性を生かし、hh遺伝子の2本鎖RNA注入前のサンプルと、効果が上がってから産まれたサンプルでの遺伝子発現量比較を上記の方法で行い、Hhシグナルにより発現制御を受ける遺伝子の探索を開始した。RNA-seqのカウントデータの結果から、pRNAiとRNA-seqの組み合わせで発現制御を受ける遺伝子を同定し得ることが確認できた(図3)。

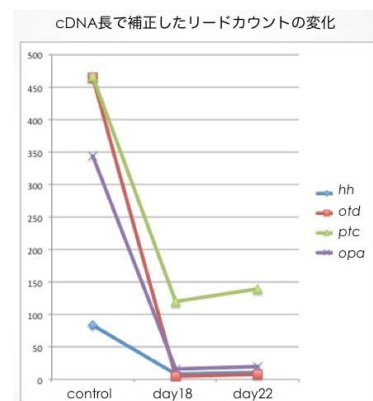


図3

本研究では、具体的な遺伝子の同定までは進まなかったが、研究開始当初の想定より早くゲノムをベースとした解析へと移ることができ、今後の研究基盤を築くことができた。今後は、複数の発生ステージ、RNAiの効果がマイルドなもの・シビアなもの、Hhシグナルの活性化因子・抑制因子に対するpRNAiを組み合わせる解析を行い、初期胚のパターン形成のネットワークを明らかにしたい。明ら

かになってきたネットワークを比較することで、ショウジョウバエなど他の動物との初期発生のメカニズムの違いや、脊椎動物のHhシグナルとの役割の違いなどを理解したいと考えている。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) Akiyama-Oda Y., & Oda H. Genome-wide analysis of Hedgehog target genes using RNAi and RNA-seq in the spider *Parasteatoda tepidariorum*. 第47回日本発牛生生物学会. 2014年5月. 名古屋.

(2) 秋山-小田康子. 初期胚のパターンはどのように作られるか? 細胞間シグナルが司るオオヒメグモのパターン形成と他の動物の仕組みとの違い. 生命誌研究館20周年シンポジウム. 2014年4月. 高槻.

(3) Akiyama-Oda Y., & Oda H. The spider *Parasteatoda tepidariorum* is a good model to study cell-cell signaling and cell movement during development. 第46回日本発牛生生物学会. 2013年5月. 松江.

(4) Akiyama-Oda Y. Formation of the major embryonic axes in the spider *Parasteatoda tepidariorum*. First International SpiderWeb Meeting. 2013年2月. Oxford, UK.

(5) Akiyama-Oda Y., & Oda H. Hedgehog and Dpp play central roles in anterior-posterior and dorsal-ventral patterning of the early spider embryo. Swiss-Japan Developmental Meeting. 2012年11月. 京都.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.brh.co.jp/research/lab04/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

小田康子(秋山康子)(Yasuko Akiyama-Oda)

研究者番号: 80426650

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし