

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440199

研究課題名(和文) 形質転換体ミジンコを用いた形態形成遺伝子機能のリアルタイム解析

研究課題名(英文) Real-time RNAi analysis of morphological genes in the GFP-expressing water flea, *Daphnia magna*.

研究代表者

志賀 靖弘 (Shiga, Yasuhiro)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：00277253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：「節足動物の外形態多様性の成立と形態形成遺伝子の分子進化との関係」を明らかにすることを最終目標に、「甲殻類のモデル生物」となりつつあるミジンコのGFP発現形質転換系統を研究材料として、各種形態形成遺伝子のRNA干渉法によるリアルタイム解析を行った。ミジンコ発生の全体像を理解することが出来る動画などを複数作製し、正常胚とRNA干渉胚の形態形成過程を比較し、目的の形態形成遺伝子の生体内における機能を考察した。

研究成果の概要(英文)：How morphological diversity of arthropods has been established is one of key questions in evolutionary developmental biology. To understand the molecular function of morphological genes during embryogenesis in the water flea, *Daphnia magna*, real-time RNAi analyses in a GFP-expressing strain were performed. Several time-lapse movies of developing *D. magna* embryos were also created.

研究分野：進化発生生物学

キーワード：形態進化 ミジンコ GFP RNA干渉 リアルタイム

## 1. 研究開始当初の背景

「節足動物の形態多様性の成立と形態形成遺伝子の分子進化との関係」は、博物誌的観点からも興味を持たれてきた生物学上の大問題である。近年「甲殻類のモデル生物」となりつつあるミジンコには、分子発生生物学的解析に適した特長が数多く備わっており、この「大問題」を明らかにするための非常に良い研究材料であると考えられた。

研究代表者が過去の研究で明らかにしたミジンコにおける各種形態形成遺伝子の発現様式は、一部のモデル生物で明らかにされ、半ば「定説」化している分子機構でさえも、ミジンコ付属肢の形態形成において必ずしも同じように働いてはいないことを強く示唆しており、先入観を持たずに各形態形成遺伝子の機能を地道に解析することが必須であるのは明白であった。しかしながら、野生株のミジンコ胚における RNA 干渉法による機能解析では、多数の形態形成遺伝子の機能を解析するためには非常に効率が悪かった。

## 2. 研究の目的

「節足動物の形態多様性の成立と形態形成遺伝子群の分子進化の関係の解明」を最終目標に、Hox 遺伝子群をはじめとした各種形態形成遺伝子の機能を、胚全体および形態形成中の各付属肢で GFP を発現する形質転換体ミジンコと RNA 干渉法を組み合わせることによって、「リアルタイム」で効率的に解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

上記した目的を達成するために、研究開始当初から予定していた(1)「形質転換法による GFP 発現ミジンコの作製と GFP 発現を指標とした胸部付属肢形成過程の詳述」、(2)「形質転換体ミジンコ胚における RNA 干渉法による各種形態形成遺伝子群の「リアルタイム」機能解析」を実施した。また当初予定していた(3)「形態形成過程の胸部付属肢細胞で発現する形態形成遺伝子群のマイクロアレイを用いた網羅的プロファイリングと ChIP 解析による確認」に関しては、残念ながらその実施には至らなかった。

## 4. 研究成果

### (1) 形質転換法による GFP 発現ミジンコの作製と GFP 発現を指標とした胸部付属肢形成過程の詳述

野生株のミジンコ胚における RNA 干渉実験では、発生の各ステージで固定した RNAi 胚の表現型や遺伝子発現の変化を観察するしかないために、多数の形態形成遺伝子の機能を効率よく解析するのは困難である。RNAi 胚の表現型や遺伝子発現の変化などを、GFP を発現する形質転換系統を用いて胚発生過程の初期から終期まで追跡すれば、この問題を乗り越えてより効率的に研究を進めることが

できると着想した。

既に確立されている胚全体で核局在型 GFP を発現する系統の胚発生過程を共焦点レーザー顕微鏡でタイムラプス解析し、ミジンコ発生の全体像、頭部付属肢の形成、胸部付属肢の形成、腹部中枢神経系の発生、背甲の形成など理解するために大いに役に立つ詳細な動画を多数作製した。この過程で、胚内部を放射状に移動する細胞群の波が複数回生じることや、胚発生初期に腹部正中線に沿って後部から前部に移動する細胞群が存在することなどを見出した。このようなミジンコ胚発生時に移動する細胞群の存在は、これまで全く報告されておらず、ミジンコを研究材料とした発生生物学研究にとって非常に重要な発見となった。

更に三種類(胚全体:細胞膜局在型、付属肢:細胞膜局在型、付属肢:核局在型)の GFP 発現形質転換系統の樹立を試みたが、元々ミジンコにおける形質転換の効率が非常に低いこと、一部のコンストラクトに関しては、ミジンコのゲノム断片の挿入によりプラスミドが非常に不安定になることなどから、それらの新系統の樹立には至らなかった。

当初作製予定であった「付属肢:核局在型」の GFP 発現形質転換系統の樹立に至らなかったことを踏まえ、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集系を用いて、既に確立されている「付属肢:核局在型」の GFP 発現形質転換系統のプロモーター領域にミジンコ *dll* 遺伝子の発現制御領域をノックインすることで「付属肢型」に入れ替えることを試みたが、本研究課題の期間内には目的の系統の樹立には至らなかった(継続中)。

### (2) 形質転換体ミジンコ胚における RNA 干渉法による各種形態形成遺伝子群の「リアルタイム」機能解析

GFP を発現する形質転換系統ミジンコの初期胚内に、各種の形態形成遺伝子の 2 本鎖 RNA を微小注入し、RNA 干渉によりそれらの遺伝子機能を抑制した場合に形態形成過程のどの時期にどのような影響があるのかを、GFP の発現を指標にして「リアルタイム」で追跡した。

研究代表者は、本研究課題の開始当初までに、ミジンコ染色体上に存在する全 Hox 遺伝子 (*lab*, *pb*, *Hox3*, *Dfd*, *Scr*, *ftz*, *Antp*, *Ubx*, *abd-A*, *Abd-B*) と、唯一の paraHox 遺伝子である *cad* の発現時期および領域を、mRNA およびタンパク質レベルで解析しており、これらの発現様式の違いと各体節に形成される計 10 対の付属肢外形の違いが完全に相関関係にある(例えば形態が異なる第 1、第 2、第 3 / 4、第 5 胸部付属肢間の比較ではそれぞれ異なった組み合わせの Hox 遺伝子

が発現しているが、形態が相同な第3および第4胸部付属肢における発現様式はほぼ同じ)ことを明らかにしていた。このような発現様式は、本研究課題における最終目的と直接関係する『胸部付属肢形態の「違い」を決定するために重要な遺伝子群』の条件と完全に一致するものであるため、ミジンコ Hox 遺伝子群の機能解析は何よりも優先して行わなければならないと考えられた。各 Hox/paraHox 遺伝子のノックダウンにより、これらのタンパク質産物の発現領域に応じた付属肢の形態異常や欠失を動的に観察した。その一方で、実際の発現領域より後方の体節に生じる付属肢の形態にも高頻度で異常が生じることが明らかになった。微小注入した2本鎖RNAが非特異的に影響を及ぼしたという可能性の検討も含め、今後はより特異的な効果が期待できるCRISPR/Cas9によるゲノム編集系の導入が必要であると考えられた。

腹部正中線細胞の発生に必須であることが示唆されていた *single-minded (sim)* の dsRNA を微小注入して胚発生の経時的変化を追跡したところ、腹部正中線細胞の形成および移動が異常になり、数も減少することを動的に明らかにした。

#### 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 2件)

Analysis of spatiotemporal expression and function of the single-minded homolog in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*, Morita, S., Shiga, Y., Tokishita, S., Ohta, T. Gene. 査読あり, 2015 Jan 25;555(2):335-45.

doi: 10.1016/j.gene.2014.11.028. Epub 2014 Nov 14.

Common transcriptional mechanisms for visual photoreceptor cell differentiation among Pancrustaceans, Mahato, S., Morita, S., Tucker, A.E., Liang, X., Jackowska, M., Friedrich, M., Shiga, Y., Zelhof, A.C., PLoS Genet. 査読あり, 2014, Jul 3;10(7):e1004484.

doi: 10.1371/journal.pgen.1004484.

[学会発表](計 7件)

Yasuhiro Shiga, Comprehensive study on Hox genes in the water flea, *Daphnia magna*. The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, 2016/11, Okinawa

森田慎一、時下進一、志賀靖弘、太田敏博、オオミジンコ *single-minded* ホモログを介した正中線細胞の機能、第52回日本節足動物発生学会、2016/6、横須賀

川端晃平、志賀靖弘、オオミジンコ *labial* 遺伝子の RNA 干渉法による機能解析、第38回日本分子生物学会年会、2015/12、神戸

後藤翔平、大見川沙織、森田慎一、時下進一、志賀靖弘、オオミジンコにおける Hox 遺伝子 *Antennapedia* の RNAi 法による機能解析、第37回日本分子生物学会年会、2014/11、横浜

加藤大昂、志賀靖弘、オオミジンコで見出された12種類の *wnt* 遺伝子の解析、日本動物学会第85回大会、2014/9、仙台

森田慎一、志賀靖弘、時下進一、太田敏博、オオミジンコ *single-minded* を介した正中線細胞の機能解析、日本動物学会第85回大会、2014/9、仙台

Shinichi Morita, Chisato Hiraga, Yasuhiro Shiga, Shinichi Tokishita, Taisen Iguchi, Toshihiro Ohta, *single-minded* gene is required for specification of ventral cell by determining on ventral midline cell fate in *Daphnia magna*, 第47回日本発生生物学会年会、2014/5、名古屋

[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

「オオミジンコにおける *single-minded* の時間的、空間的発現とその機能の解析」  
<http://pathos.ls.toyaku.ac.jp/applife/E7%A0%94%E7%A9%B6%E7%99%BA%E8%A1%A8/?nc>

\_session=2mfp1h9nohnp48nu1tq9rcir4

「節足動物の感桿型光受容細胞の分化には、  
共通した転写機構が存在する」

[http://pathos.ls.toyaku.ac.jp/index.php  
?action=pages\\_view\\_main&&block\\_id=2868#  
\\_2868](http://pathos.ls.toyaku.ac.jp/index.php?action=pages_view_main&&block_id=2868#_2868)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

志賀靖弘 (SHIGA, Yasuhiro)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：00277253