

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650079

研究課題名(和文)新規モデル脊索動物としてのオタマボヤを用いた順遺伝学的スクリーニング法の開発

研究課題名(英文) Development of forward genetics methods in appendicularians as a novel chordate model organism

研究代表者

西田 宏記(Nishida, Hiroki)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60192689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ワカレオタマボヤ(*Oikopleura dioica*)はヒトを含む脊索動物門に属する海洋性プランクトンで、脊椎動物と共通な基本体制を持ちながらも世代時間が5日と短い。本研究では、ワカレオタマボヤを利用して、線虫やハエのように有用な研究モデル生物を作り上げることを目指した。研究の過程で遺伝子の機能を抑制するための方法としてDNAiが可能であることが判明した。この方法を用いれば、ワカレオタマボヤをもちいて発生に関わる遺伝子を容易にかつ安価にスクリーニングすることが可能となった。

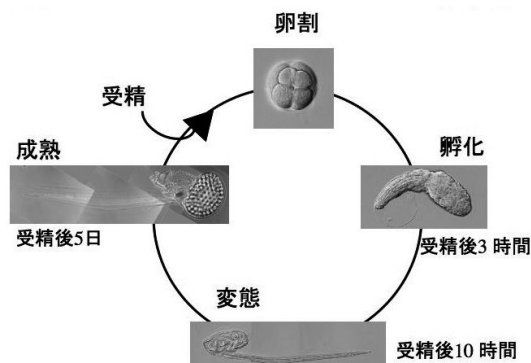
研究成果の概要(英文)：The appendicularian, *Oikopleura dioica* is a planktonic chordate, which share basic bodyplan with vertebrates. The life cycle is just 5 days. In this project, we aimed to make *O. dioica* an emerging model animal with which genetic approaches are feasible, such as in nematode and fly. In the processes of this project, we found that novel DNAi method works in this animal. Gene knockdown using DNAi will facilitate to screen and find developmentally important genes with ease and less expensive way.

研究分野：生物科学・発生生物学

キーワード：オヤマボヤ 尾虫類 遺伝子導入 DNAi トランスジェネシス RNAseq 遺伝子機能阻害

1. 研究開始当初の背景

ワカレオタマボヤ *Oikopleura dioica* はヒトを含む脊索動物門に属する海洋性プランクトンで、脊椎動物と共通な体制を持ちながらも世代時間が 5 日と短い(図)。オタマボヤはホヤ類とは異なり、終生オタマジャクシの形を維持する。また、受精からオタマジャクシ幼生が孵化するまで 3 時間、成体と同じ構造が完成するまで 10 時間という発生の早さで、成体の細胞数が約 3000 個と少ない。また、胚と成体は透明であり、加えてゲノム配列や遺伝子発現のデータベースが利用できる。このようにオタマボヤは、脊索動物に属しながら、線虫にも匹敵する特性を備えており、脊索動物に共通な形作りや生理機能の解明に有用な、新規モデル動物になると期待されていた。



2. 研究の目的

本研究では、ワカレオタマボヤを利用して、線虫やハエのように有用な研究モデル生物を作り上げることを目指した。ワカレオタマボヤは成体でもオタマジャクシ型をしており、我々ヒトを含む脊索動物に共通な体制を持ちながら、体を構成する細胞数が少なく、5 日という短い世代時間をもつなど、他の脊索動物にない多くの特性を備えている。本研究では、このオタマボヤにトランスポゾンをもちいた技術を適用し、発生遺伝学的な研究を可能にすることを目的とした。当初の目標はトランスポゾンを用いた (1)トランスジェニック個体の作成、(2) エンハンサートラップ、そして (3)変異体形成の 3 点を可能にすることであった。最終的には、「受精卵から機能的個体が完成し、生殖活動にいたる全生活環を遺伝子・単一細胞レベルで追求できる新しいモデル脊索動物」を確立し、発生学や進化学を含む生物学全般にかかわる新たな研究領域を開拓していくことを視野に入れて研究を行った。

3. 研究の方法

トランスポゾンは転移 DNA 因子であり、その転移には両端の繰り返し核酸配列の存在とトランスポゼースの発現で充分であることが知られている。これまでに様々なモデル動物を用いてトランスポゾンを利用したエンハンサートラップや変異体形成が行われ

てきており、この技術は今やモデル動物では必須の技術と断言していいほどになっている。本研究ではオタマボヤを用いて、トランスポゾンのゲノムへの導入と転移技術を主として検討した。したがって、オタマボヤで転移活性をもつトランスポゾンを見つけることがブレークスルーの鍵となると考えられた。他の生物で活性をもつトランスポゾンを 7 種 (*Sleeping beauty*, *Minos*, *Tol2*, *piggyBac*, *Ac/DS*, *Space invador*, *TcBuster*) を入手し、以下を調べた。

様々な蛍光タンパクの mRNA を卵巣に注入することにより生まれてきた多数の卵や胚に蛍光タンパクが発現してくることを確認している。そこで、転移酵素の発現を調べるため、EGFP 標識した転移酵素の mRNA を卵巣に注入した。注入胚を蛍光顕微鏡で観察し、蛍光の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) 遺伝子導入方法の開発。

トランスポゼース 7 種の mRNA を卵巣に顕微注射し翻訳されたタンパクを可視化して調べたが、翻訳はほとんど起こっていなかった。他の種類の mRNA を注入した場合には、効率よく翻訳される場合とされない場合があることがわかった。なぜ、トランスポゼースの全てが翻訳されないメンバーに含まれてしまうのかの原因は不明である。オタマボヤでは母性 mRNA の多くにトランスプライスリーダー配列がついていることから、トランスポゼースの mRNA にトランスプライスリーダー配列を付けて発現効率を見ると、翻訳効率は上昇していた。これを用いてトランスジェニック体の作成を試みたが、レポーター遺伝子のトランジェニックな発現が見られるもの次世代に導入 DNA が受け継がれることはなかった。かなりの種類の条件検討を行ったが、最終的に、トランスジェニック系統を作成するには至っていない。オタマボヤのゲノムは非常に小さく(70 Mb)、外来の DNA がゲノムに入らないようにするための拒絶機構が強く働いているものと思われた。

(2) DNAi 現象の発見。

卵巣に DNA を顕微注射しているときに、不思議なことが起こることに気づいた。これは当初予想していなかった発見に繋がった。トランスジェニック系統作成研究の副産物として、遺伝子の機能を抑制するための方法として DNAi が可能であることが判明した。この方法を用いれば発生に関わる遺伝子を容易にかつ安価にスクリーニングすることが可能となった。これによりオタマボヤの実験動物としての有用性は向上することになる。この発見は、日本とアメリカで二つの記事に取り上げられた(5. 主な発表論文等の報道関連情報を参照)。

(3) 発生段階ごとの RNA-seq。

また、卵と幼生の RNA-seq を皮切りに、発生段階ごと RNA-seq を行い、各発生ステージにおける発現遺伝子を網羅的に把握した。またその過程で、トランススプライシングのリーダー配列を持つ mRNA が母性の mRNA に多く、胚性発現をした mRNA には少ないことなどが判明した。

現在、オタマボヤを用いて研究を行っている研究室は世界でも 5 つしかなく、それぞれ異なった興味の元に研究を行っているが、互いによく知っておりコミュニティを形成しつつある。生命現象の理解は、近年、マウス、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、線虫などのモデル生物の解析を礎として発展してきた。オタマボヤが利点に富んだ新しいモデル実験動物となることは、発生学や進化学に留まらず生物学全般に対しても貢献するところが有り、その波及効果は大きいと考えている。さらに、オタマボヤ類は世界中の海洋に高密度に生息し（海洋バイオマスとして 2 位）それゆえ、魚の餌としての水産学、海洋の炭素循環などの生態学に関しても重要度の高い動物である。オタマボヤのゲノム機能の解明につながる本研究による結果（特に DNAi による遺伝子機能の抑制）は、日本とアメリカの記事に取り上げられた（5. 主な発表論文等の報道関連情報を参照）ことからわかるように、学術的意義、社会的意義の両方から興味を集め、その効果は広範囲に波及すると予想される。

オタマボヤを用いた発生遺伝学的アプローチに関しては、本研究期間中に達成することができなかった。これらに関しては今後も研究を継続し、是非とも成功に導きたいと考えている。遺伝子導入の別な方法として、近年利用可能となっている TALEN や Crisper 法についても検討始めているので、そちらも積極的に進めていきたいと考えている。

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 11 件)

Brozovic, M., Martin, C., Dantec, C., Dauga, D., Mendez, M., Simion, P., Percher, M., Laporte, B., Scornavacca, C., Di Gregorio, A., Fujiwara, S., Gineste, M., Lowe, E.K., Piette, J., Racciopi, C., Ristoratore, F., Sasakura, Y., Takatori, T., Brown, T.C., Delsuc, F., Douzery, E., Gissi, C., McDougall, A., Nishida, H., Swalla, B.J., Yasuo, H., and Lemaire, P. ANISEED 2015: a digital framework for the comparative developmental biology of ascidians. **Nucleic Acids Res.** (2016) 44, D808-D818. 査読あり。DOI: 10.1093/nar/gkv966
Takatori, N., Oonuma, K., Nishida, H., and

Saiga, H. Polarization of PI3K activity initiated by ooplasmic segregation guides nuclear migration in the mesendoderm.

Developmental Cell (2015) 35, 333–343. 査読あり。DOI:

10.1016/j.devcel.2015.10.012

Wang, K., Omotezako, T., Kishi, K., Nishida, H., and Onuma, T. A. Maternal and zygotic transcriptomes in the appendicularian,

Oikopleura dioica: Novel protein-encoding genes, intra-species sequence variations, and trans-spliced RNA leader. **Dev. Genes Evol.** (2015) 225, 149–159. 査読あり。DOI: 10.1098/rspb.2015.0435

Omotezako, T., Onuma, T. A., and Nishida, H. DNA interference: DNA-induced gene silencing in the appendicularian *Oikopleura dioica*. **Proc. R. Soc. B** (2015) 282, 20150435. 査読あり。DOI: 10.1098/rspb.2015.0435

Wang, K., and Nishida, H. REGULATOR: a database of metazoan transcription factors and maternal factors for developmental studies. **BMC Bioinformatics** (2015) 16, 114. 査読あり。DOI: 10.1186/s12859-015-0552-x

Stolfi, A., Sasakura, Y., Chalopin, D., Satou, Y., Christiaen, L., Dantec, C., Endo, T., Naville, M., Nishida, H., Swalla, B., Volff, J.-N., Voskoboynik, A., Dauga, D., and Lemaire, P. Guidelines for the nomenclature of genetic elements in tunicate genomes. **Genesis** (2015) 53, 1–14. 査読あり。DOI: 10.1002/dvg.22822

Kishi, K., Onuma, T. A., and Nishida, H. Long-distance cell migration during larval development in the appendicularian, *Oikopleura dioica*. **Dev. Biol.** (2014) 395, 299-306. 査読あり。DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.09.006

Nishida, H., and Stach, T. Cell lineages and fate maps in tunicates: Conservation and modification. **Zool. Sci.** (2014) 31, 645-652. 査読あり。DOI: 10.2108/zs140117

Yamada, A., and Nishida, H. Control of the number of cell division rounds in distinct tissues during ascidian embryogenesis. **Dev. Growth Differ.** (2014) 56, 376–386. 査読あり。DOI: 10.1111/dgd.12141

Kumano, G., Negoro, N., and Nishida, H. Transcription factor Tbx6 plays a central role in fate determination between mesenchyme and muscle in embryos of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. **Dev. Growth Differ.** (2014) 56, 310-322. 査読あり。DOI: 10.1111/dgd.12133

Kuwajima, M., Kumano, G., and Nishida, H. Regulation of the number of cell division rounds by tissue-specific transcription factors and Cdk inhibitor during ascidian

embryogenesis. **PLOS ONE** (2014) 9, e90188. 査読あり。
DOI:10.1371/journal.pone.0090188.

〔学会発表〕(計 18 件)

岸香苗, 林桃子, 小沼健, 西田宏記. 脊索動物ワカレオタマボヤの表皮パターンニングと系譜解析. 日本動物学会、**2015 年 9 月 17-19 日**、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)
小沼健, 林桃子, 西田宏記. オタマボヤの左右対称な器官の形成は細胞系譜レベルの左右非対称性をもつ. 日本動物学会、**2015 年 9 月 17-19 日**、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

王凱, 表迫竜也, 岸香苗, 西田宏記, 小沼健. オタマボヤを用いた母性と胚性の RNA-Seq. 日本動物学会、**2015 年 9 月 17-19 日**、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)
平尾早智澄, Kai Wang, 小沼健, 西田宏記, 小笠原道生. ワカレオタマボヤの甲状腺・内柱関連遺伝子群の発現. 日本動物学会、**2015 年 9 月 17-19 日**、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

Masumi Tokuhisa, and Hiroki Nishida. Oocyte maturation and establishment of the animal-vegetal axis in ascidians. The 8th International Tunicate Meeting, **2015 年 7 月 13-17 日**、Aomori City Cultural Hall (青森県青森市)
Kai Wang, Tatsuya Omotezako, Kanae Kishi, Hiroki Nishida, and Takeshi A. Onuma. Maternal and zygotic transcriptomes in the appendicularian, *Oikopleura dioica*: Novel protein-encoding genes, intra-species sequence variations, and trans-spliced RNA leader. The 8th International Tunicate Meeting, **2015 年 7 月 13-17 日**、Aomori City Cultural Hall (青森県青森市)

Kanae Kishi, Momoko Hayashi, Takeshi A. Onuma, Hiroki Nishida. Morphogenesis and patterning of the trunk epidermis of the appendicularian, *Oikopleura dioica*. The 8th International Tunicate Meeting, **2015 年 7 月 13-17 日**、Aomori City Cultural Hall (青森県青森市)
Takeshi A. Onuma, Miho Isobe, Hiroki Nishida. Internal and external morphology of adults of the appendicularian, *Oikopleura dioica*: A

SEM study. The 8th International Tunicate Meeting, **2015 年 7 月 13-17 日**、Aomori City Cultural Hall (青森県青森市)

Tatsuya Omotezako, Takeshi A. Onuma, and Hiroki Nishida. DNA interference: new gene silencing method in the appendicularian, *Oikopleura dioica*. The 8th International Tunicate Meeting, **2015 年 7 月 13-17 日**、Aomori City Cultural Hall (青森県青森市)

Hiroki Nishida

Oocyte maturation and establishment of the animal-vegetal axis in ascidians. Oocyte maturation and Fertilization Meeting IV, **2015 年 6 月 15-18 日**、浅虫海洋生物学教育研究センター(青森県青森市)

王凱, 表迫竜也, 岸香苗, 西田宏記, 小沼健. **オタマボヤを用いた母性と胚性の RNA-Seq: 新規遺伝子、種内変異、トランスプライミング**. 日本発生生物学会、**2015 年 6 月 2-5 日**、International Congress Center (茨城県つくば市)

小沼健, 磯部美穂, 西田宏記. 走査型電子顕微鏡による脊索動物ワカレオタマボヤの外部構造・内部構造の観察. **日本発生生物学会、2015 年 6 月 2-5 日**、International Congress Center (茨城県つくば市)

岸香苗, 林桃子, 小沼健, 西田宏記. 脊索動物ワカレオタマボヤの表皮パターンニングと系譜解析. **日本発生生物学会、2015 年 6 月 2-5 日**、International Congress Center (茨城県つくば市)

〔その他〕

ホームページ

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/nishida/index.html

報道関連情報

DNAi の発見が日本とアメリカの以下の二つの記事に取り上げられた。

読売新聞

2015 年 6 月 1 日

「タンパク質合成 DNA が阻害」

The Scientist Magazine (USA)

2015 年 7 月 1 日

「Metazoans in the DNAi Club」

<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/43335/title/Metazoans-in-the-DNAi-Club/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西田宏記 (NISHIDA, Hiroki)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号 : 60192689

(2)研究分担者

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