The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ワカレオタマボヤにおけるRNAiおよびDNAiを用いた遺伝子解析手法の確立および母性因子のDNAiスクリーニング
Author(s)	表迫, 竜也
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56073
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博士論文

平成２７年度

脊索動物ワカレオタマボヤにおける RNAi および DNAi を用いた遺伝子解析手法の確立

および

母性因子の DNAi スクリーニング

Development of RNAi- and DNAi- mediated gene knockdown methods and analysis of maternal factors using DNAi screening in the appendicularian *Oikopleura dioica*

大阪大学　理学研究科　生物科学専攻

表迫　竜也

目次

和文要旨 5

欧文要旨 7

第一章: 本研究の目的と意義

ワカレオタマボヤ研究の意義 8

卵巣顕微注入法の確立とワカレオタマボヤ研究の新しい可能性 9

母性因子研究の意義と問題点 10

第二章: RNAi を用いた遺伝子機能解析法の検証

序論

RNAi の発見の歴史 13

結果

外来性 RNA による RNAi の効果の検証 14

内在性 mRNA に対する RNAi の効果の検証 17

考察 21

第三章: DNAi を用いた遺伝子機能解析法の確立

序論

生物に見られる多様な遺伝子サイレンシング機構 23

DNA interference の発見 24

結果

二重鎖 DNA による *Brachyury* 遺伝子の機能阻害 24

PCR 断片標的配列による効果の違い 27

PCR 断片の長さ、濃度の検討 27

二重鎖 DNA の構造による効果の違い 29

Zic-like1 に対する機能阻害 30

Acetylcholinesterase に対する機能阻害 30

母性 mRNA β-catenin に対する機能阻害 31

PCR 断片の注入による mRNA の量の変化 34

PCR 断片の注入によるゲノムのメチル化への影響 35
PCR 断片注入の mRNA のスプライシングへの影響 36
PCR 断片注入による mRNA の分解への効果 37
PCR 断片による機能阻害に対する Argonaute の影響 38
考察 41

第四章: DNAi を利用した母性因子のスクリーニング
序論 44
結果
卵巣特異的 cDNA ライブラリーのクオリティーチェック 45
スクリーニング条件の検討 49
プールの顕微注入によるスクリーニング 51
クローンの顕微注入によるスクリーニング 54
考察 60

第五章: 総括と今後の展望 62

第六章: 材料と方法
採集と飼育 64
RNA, DNA の卵巣内顕微注入法 64
cDNA, DNA クローニング、配列決定 65
dsRNA の合成 66
注入 PCR 断片の調整 67
アセチルコリンエステラーゼ組織化学染色 67
ALP 染色 67
定量リアルタイム PCR 67
蛍光強度の定量と比較 68
DNA メチル化解析 68
RT-PCR によるスプライシング異常の検出 69
分子系統樹の作成 69

ライブラリーの作成 69
cDNA ライブラリーにおけるサブトラクション効率の確認 71
スクリーニング用顕微注入 PCR 産物の調整 71
Primer List 74
引用文献 76
発表リスト 77
謝辞 83

和文要旨

様々な生物において母性因子が胚発生の重要な過程に関わっていることが知られている。例えばホヤ類では古くから母性 mRNA の研究が盛んに行われており、細胞質移植実験により未受精卵中に筋肉、表皮、内胚葉運命決定因子の存在が予見されている。しかしながら遺伝学的手法が利用できない多くの生物においては、未受精卵の段階で既にタンパク質として存在している母性因子の機能を阻害することは技術的に困難である為に、現在までに機能が明らかになっている母性因子は一部のものに限られている。母性因子に対する大規模な機能阻害スクリーニングはハエ、線虫、ゼブラフィッシュといった一部の生物で行われてはいるが、それでもこれまでに知られている母性因子の機能は一部に限られていると言わざるを得ない。

本研究で用いるワカレオタマボヤは脊索動物門尾索動物亜門に属する海洋性のプランクトンであり、脊索動物に属しながらも、細胞数が少ない、ライフサイクルが５日と短い、胚、成体ともに透明で顕微鏡観察に優れるといった線虫に匹敵する様な特徴を持つことから新規のモデル生物の候補として実験が行われてきた。近年の研究の成果により、卵巣内への顕微注入により卵母細胞内へ核酸を取り込ませることが可能となっている。この特徴から卵巣内に dsRNA を注入することにより卵巣内で遺伝子機能を抑制することが可能になるのではないかと考えた。もしこれが可能になれば母性因子の機能阻害が可能になり、これまで知見の乏しかった母性因子の研究が可能になると期待される。このことから本研究では①卵巣内への顕微注入による RNAi 法の検証、②卵巣内への顕微注入による DNAi 法の確立、③DNAi を用いた母性因子のスクリーニングという３つの問題に対して研究を行った。

① 卵巣内への顕微注入による RNAi 法の確立

RNAi は線虫でその現象の機構が明らかにされて以来、現在までに菌類から脊椎動物に至たるまで広く保存された遺伝子サイレンシング機構である。この現象は様々な生物で遺伝子機能阻害法として利用されており、内在遺伝子と相同な配列を持つ dsRNA を細胞内に取り込ませると、この dsRNA によって遺伝子サイレンシングシステムが誘導され、dsRNA と相同な配列をもつ内在遺伝子の mRNA の分解が誘導される。そこで本研究では蛍光タンパク質をコードする mRNA および、脊索形成のキー転写因子として知られる *Brachyury* に対する dsRNA の注入を行った。この結果 dsRNA により配列特異的な mRNA の分解が引き起こされ、*Brachyury* に対する dsRNA を注入した場合には mRNA が分解されることにより脊索形成の異常を示す表現型が観察された。この結果か

らワカレオタマボヤにおいて卵巣顕微注入法を用いた RNAi による機能阻害法が確立された。

② 卵巣内への顕微注入による DNAi 法の確立

生物は RNAi のみならず様々な遺伝子サイレンシング機構を進化させてきた。この遺伝子サイレンシング機構の一つとして DNA interference(DNAi)が知られている。DNAi は細胞内に直鎖状の二重鎖 DNA もしくは環状の二重鎖 DNA を取り込ませることにより、この配列に応じて特異的な機能阻害が引き起こされるという現象であり、この DNAi は一部の植物、ゾウリムシ、高度好熱菌においてのみ報告されていた。そこでワカレオタマボヤにおいてこの現象が保存されているかを調べる為に *Brachyury* に対する PCR 断片の注入を行った。この結果、配列特異的な mRNA の減少が引き起こされ脊索形成異常が観察された。またこの機能阻害は exon 領域の部分配列のみならず、intron, UTR, UTR の上流のゲノム領域に対する PCR 断片でも同様に引き起こされた。このことからこの現象は mRNA の分解のみならず転写阻害を介しても機能阻害が引き起こされていると考えられる。またワカレオタマボヤでの DNAi は植物とは異なり直鎖 DNA 特異的な現象であることが明らかになった。これらの結果からワカレオタマボヤにおいて DNAi による遺伝子サイレンシング機構が働きうることを明らかにし、多細胞動物で初めての DNAi の例を報告した。

③ DNAi を用いた母性因子のスクリーニング

①、②の結果からワカレオタマボヤにおいて卵巣顕微注入法を用いることにより卵巣内での機能阻害が可能となり、この手法は母性因子の機能阻害に有効であることが示された。このことからワカレオタマボヤにおいて DNAi 法を用いて卵巣特異的に発現する遺伝子に対する機能阻害スクリーニングを行った。これまでに卵巣特異に発現する遺伝子の 52%に対してスクリーニングを行い 7 個の初期発生期に異常を示す遺伝子を同定した。このスクリーニングの結果、細胞接着に関わる因子、細胞分裂に関わる因子が、産み落とされた卵の初期発生期において重要な働きをしている母性因子として発見された。

欧文要旨

Maternal factors that are loaded into egg cytoplasm are known to play important roles during embryogenesis in wide range of organisms. In *ascidian*, maternal mRNAs, called *postplasmic/PEM* RNAs show characteristic localization pattern related to multiple roles in development including regulation of embryonic axis specification and cell fate determination. On the other hand, there has been only little knowledge about functions of maternal proteins due to lack of the methods to inhibit functions of maternal proteins that are already translated within the mother's ovary in most of organisms.

Oikopleura dioica (*O.dioica*) is a planktonic tunicate belonging to chordate. This animal is expected to be a new model organism in developmental biology because of their biological traits, i) small number of consistent cells, ii) quick development, and iii) transparent embryo and adult body. In this thesis, three topics were investigated using this organism.

First, RNAi mediated gene knockdown method by gonadal microinjection was developed in *O.dioica*. To develop a gene function analysis method in this animal, double-stranded RNAs (dsRNAs) targeting endogenous and exogenous mRNAs were injected into ovary to allow them to be introduced into oocytes during oogenesis. As the results, the injected dsRNAs induces sequence-specific mRNA degradation, which resulted in loss of function phenotypes during embryogenesis.

Second, DNAi mediated gene knockdown method by gonadal microinjection was developed. DNAi is a gene silencing system induced by exogenous double-stranded DNA (dsDNA), which has been only reported in some plants, ciliates and archaea. It was shown that introduced PCR products by gonadal microinjection, which have homologous sequences to endogenous genes, promoted mRNA degradation and transcriptional inhibition in *O. dioica.* This is a first example of DNAi phenomenon in multicellular animals.

Last, DNAi sceening for maternal factors were carried out. Gonadal microinjection with dsDNA enables gene knockdown in ovary. Thanks to this, functions of maternal factors can be analyzed in *O.dioica*. Approximately two thousands (51.9%) of ovary-specific genes were screened by DNAi method and knockdown of seven genes were found to promote abnormality during embryonic developmental processes. Most of them were microtubule-related and cell adhesion-related proteins.

第一章: 本研究の目的と意義

母性因子研究の意義と問題点

母性因子とは、未受精卵細胞質中にすでにロードされている mRNA やタンパク質のことであり、これらは卵形成過程において母親の卵巣内で合成され卵母細胞中に受け継がれる。この母性因子は、受精や細胞分裂といった zygotic な遺伝子発現が見られる前に起こる胚発生期の初期の現象の調節を担っている (Schüpbach and Wieschaus 1989, Hekimi et al., 1995, Dosch et al., 2004)。それだけでなく、母性因子は zygotic な遺伝子の発現を伴う胚発生過程に対しても重要な役割を果たしており、体軸形成や細胞運命決定に関わる母性因子がいくつか見つかっている。例えば母性 mRNA の研究が古くから盛んに行われてきたホヤ類では細胞運命決定因子が未受精卵中に偏って存在していることが知られている。1900 年代初頭に Conklin は未受精卵の植物半球に他の領域の細胞質と異なる色の細胞質が存在し、これが胚発生過程で筋肉細胞に受け継がれていく様子を顕微鏡下で観察しており、未受精卵中に存在している筋肉決定因子を予見していた (Conklin 1905)。また細胞質の移植実験により、未受精卵中に筋肉、表皮、内胚葉の運命決定因子が存在していることが実験的に確かめられた (Nisihida 1992, 1993, 1994)。その後、植物半球特異的に局在する mRNA をサブトラクションにより濃縮し *in situ* hybridization で網羅的に調べることにより筋肉決定因子 macho-1 が同定された (Nishida and Sawada 2001)。*macho-1* mRNA は特徴的な局在パターンを示し、未受精卵では植物半球表層に存在しており、受精後の細胞質再配置によって一度植物極に局在した後、植物半球後方に移動する。また母性 mRNA の *in situ* hybridization を用いた大規模なスクリーニングによって、*macho-1* mRNA と同様の局在パターンを示す mRNA が多数見つかっており、このような特徴的な局在を示す母性 mRNA は *postplasmic/PEM* RNAs と呼ばれている (Makabe et al., 2001)。

一方、胚発生期に重要な働きを担う母性因子として存在が予見されているものの、その実体が明らかとなっていない母性因子も知られている。例えば植物半球決定因子である。多くの無脊椎動物においては β-catenin タンパク質が植物半球特異的に核へ移行し、植物半球特異的な遺伝子の発現の活性化が起こり、植物半球の運命決定がなされる(Logan et al., 1999, Imai et al., 2000, Wikramanayake et al., 2003, Darras et al., 2011) 。この β-catenin タンパク質は卵母細胞では細胞質中に一様に存在しているが、例えばホヤでは 32 細胞期以降に植物半球で核に移行する(Kawai et al., 2007)。この植物半球での核移行は卵母細胞中にタンパク質として存在している植物半球決定因子によって調節されると予想されているが、これまでいかなる生物においてもその実体がはっきり

とは特定されていない。このように動物において広く保存された、胚発生に重要な母性因子が明らかにされずに残されたままとなっている。

これらの因子を同定する為には網羅的な機能阻害スクリーニングが有効であるが多くの生物では技術的に困難である為に、これまでほとんど行われてこなかった。母性 mRNA の機能阻害は未受精卵内にモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO)を取り込ませることにより引き起こすことが可能であるが、MO は研究室内で合成することが困難であり、また MO に用いる配列によっては機能阻害の効果が十分に得られないものがあるため大規模なスクリーニングには適していない。また卵母細胞中にタンパク質として存在する母性因子は、母親の卵巣内で合成されて取り込まれる為に、未受精卵に MO を顕微注入する方法では機能阻害を行うことはできない。そこでタンパク質として存在する母性因子の機能を阻害する方法として、アフリカツメガエルではメスの腹を切開して成熟前の卵母細胞を一度取り出し、そこに顕微注入を行った後、再度腹に卵母細胞を戻して成熟させて産み落とされたものを観察するという方法が取られるが、この方法では作業の煩雑さから母性因子の機能を網羅的に調べることは困難である。このような理由から、逆遺伝学的手法を用いて網羅的に母性因子の機能阻害を行うことはほとんど全ての生物で困難である。

一方で変異原を用いた順遺伝学的手法を用いた母性因子のスクリーニングは線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュといった古くから遺伝学的手法が確立されている動物で行われており、受精、細胞分裂、体軸形成に関わる変異体がいくつか同定されている (Kemphues et al., 1988, Schüpbach and Wieschaus 1989, Hekimi et al., 1995, Dosch et al., 2004, Kishimoto et al., 2004)。しかしながら母性因子に対する順遺伝学的スクリーニングは機能阻害の効果を見るまでに 4 世代の交配を経る必要があることから、多大なる労力を要する為にこれまでに行われたスクリーニングは一部の遺伝子に留まっている。また母性因子としてだけでなく、zygotic な発現も重要な働きをもつ遺伝子に対しては、母性効果を観察する前に致死となってしまう為に、この方法では調べることができない。よって順遺伝学的手法による母性因子のスクリーニングでは、一部の母性因子の機能しか調べることができていない。これらの理由から、胚発生過程における母性因子の機能を明らかにする為には、母性因子の機能阻害スクリーニングをより効率的に行う手法の開発が必要であった。

卵巣顕微注入法の確立とワカレオタマボヤ研究の新しい可能性

ワカレオタマボヤは脊索動物門尾索動物亜門オタマボヤ綱に属する(ホヤ類はホヤ綱に属する)海洋性のプランクトンである。ワカレオタマボヤは①研究室内で人工海水を用いて継代飼育が可

能である、②胚、成体共に透明で、顕微鏡観察に適している、③胚発生過程の細胞系譜に個体差がなく一定である、④胚細胞数が少ない、⑤ライフサイクルが非常に短い、⑥ゲノムサイズがコンパクトであり遺伝子間距離が短い、といった特徴から脊索動物に属しながらも線虫に匹敵する実験上の有用性を備えた希有な生物種であり、遺伝学的手法の適用可能性を秘めた新規のモデル生物の候補として近年注目されている(Nishida 2008)。

これまでの研究によりワカレオタマボヤでは実験上必要な基盤的情報が蓄積されつつある。例えばこれまでに①孵化幼生までの細胞系譜の記載(Stach et al., 2008)、②ゲノム配列の決定、整備(Seo et al., 2001, Denoeud et al., 2010)、③マイクロアレイによる発生ステージ別、組織別の遺伝子発現情報の整備(Danks et al., 2013)が行われている。この情報の蓄積と平行して、実験を行う為に必要な技術開発がなされてきた。

これまでに開発された技術として特筆すべきものに、卵巣内顕微注入法を用いた核酸導入法がある。ワカレオタマボヤの卵は直径 80 μm 程度と非常に小さく、卵への顕微注入が困難である為、卵巣への顕微注入法が確立された (山村 2009, 大内 2010)。ワカレオタマボヤは特有の卵形成過程を持ち、この特徴から卵巣内に注入された核酸は多数の卵母細胞内に取り込まれる。ワカレオタマボヤの卵巣は coenocyst と呼ばれる単一の細胞質を共有した多核の生殖細胞嚢胞から構成される。coenocyst の細胞質には減数分裂核と DNA を増幅した倍数体哺育核が共存しており、一つの減数分裂核を含む卵母細胞前駆細胞は ring canal と呼ばれる孔で哺育核を含む周囲の細胞質と連結し細胞質やオルガネラを共有している。ワカレオタマボヤの卵成長過程ではこの ring canal を介して細胞質やオルガネラが卵母細胞前駆細胞に流入することで卵母細胞が大きくなり、一個体あたり 100-300 個程度の成熟した卵母細胞が形成される (Ganot et al., 2007a, b)。この特徴から、卵成長期の個体の卵巣内に mRNA や DNA を顕微注入するとこれらは卵巣細胞質内の一部に拡散し(図 1a, c)、卵成長過程で ring canal を介して一部の卵母細胞内に取り込まれる。これにより一度の卵巣顕微注入により多数の mRNA や DNA を取り込んだ未受精卵が得られる(図 1d, 大内 2010)。なお顕微注入を行ってから産卵まで、8-12 時間程度である。

以上のようにワカレオタマボヤでは卵巣内部や卵母細胞内に卵形成過程で RNA を取り込ませ、翻訳させることが可能である。この事実はワカレオタマボヤを用いた研究方法に卵巣内部での遺伝子機能阻害という新しい可能性を提供する。様々な生物において遺伝子機能解析の手法として RNAi 法が広く用いられている。RNAi 法では double-stranded RNA(dsRNA)を細胞内に取り込ませることにより、この dsRNA の配列に基づいてターゲット特異的な機能阻害を引き起こすことが可能になる。そこでもし、ワカレオタマボヤにおいても RNAi が適用可能であり、卵巣顕微注入法

を用いて卵巣内に dsRNA を取り込ませ RNAi による機能阻害を誘導することが可能であれば、卵巣内で合成される母性因子の機能阻害が可能になるのではないかと考えた。もしこれが可能になれば、顕微注入から 10 時間程度で母性因子の機能阻害の効果を観察することが可能になり、これまで不十分であった母性因子の網羅的な機能阻害スクリーニングが可能になり、これまで知られていなかった母性因子の発生過程への関わりや、これまで予想されていたがその実体が見つかっていなかった母性因子の特定ができるのではないかと考えた。

そこで本研究ではワカレオタマボヤにおいて卵巣顕微注入法を用いた母性因子の機能阻害スクリーニングを行うことを最終目標とし、まずワカレオタマボヤでの機能阻害法の確立を試みた。第二章では様々な生物で広く用いられている RNAi 法の検証に関して述べる。続く第三章では RNAi 法に比べより簡便でありかつ安価に遺伝子機能解析を行うことが可能な DNAi 法の確立について述べる。最後に第四章ではこの DNAi 法を用いた母性因子の網羅的な機能解析について述べる。

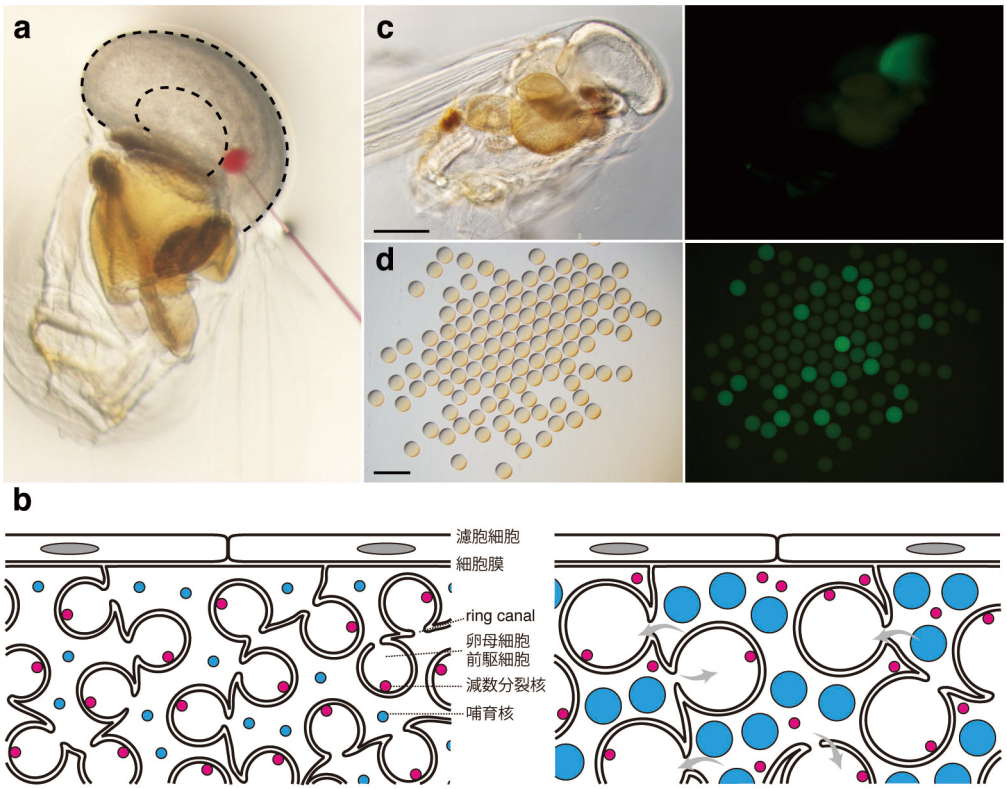


図 1 ワカレオタマボヤにおける卵巣内顕微注入

a:ワカレオタマボヤの体幹部。写真の点線で挟まれた領域が卵巣であり、写真の様にこの卵巣領域内に針を差し込みフェノールレッドと共に溶液を少量注入する。b: ワカレオタマボヤ卵巣内部の模式図(山村氏による Ganot et al., 2007b の図の再描画を転

用)。左図の様にそれぞれの卵母細胞前駆細胞は ring canal を介して細胞質やオルガネラを共有している。卵成長過程で ring canal を通って細胞質やオルガネラが卵母細胞前駆細胞へと流入することで成熟した卵母細胞が形成される(図右)。c: *H2B-EGFP* mRNA 卵巣内顕微注入後の卵巣の図。左が明視野、右は EGFP の蛍光を観察した写真。右の写真に示す様に注入した mRNA は卵巣内部の一部分に拡散し GFP が合成されている。 d: *H2B-EGFP* mRNA 注入後産み落とされた卵。産み落とされた卵の 20-30%程度で注入した mRNA に由来する蛍光が観察される。またこのように取り込まれる mRNA の濃度が卵により異なるため、注入卵ごとに観察される蛍光強度は異なる。スケールバーは 200 μm。

第二章: RNAi を用いた遺伝子機能解析法の検証

序論

RNAi の発見の歴史

ウイルスやトランスポゾンといった外来の核酸が細胞内で働くと細胞の恒常性は乱され細胞は死に至る。この為、多くの生物はこれらの外来の核酸に対抗する手段を発達させてきた。最も良く知られた防御手段として RNAi がある。ウイルスやトランスポゾンが活動する過程で生じる特徴的な構造である二重鎖 RNA(dsRNA)が細胞内に生じると、これに反応してこの防御反応がはたらき細胞の恒常性を維持する。この現象は植物を用いた実験の過程で偶然見つかった。ペチュニアにおいてより色素を強く合成させることを目的に、フラボノイドの合成に必要な酵素である Dihydroflavonol-4-reductase や Chalcone synthase を発現させるプロモーターコンストラクトの形質転換個体を作成すると、予想とは反対に一部の個体でフラボノイドの合成が阻害され斑入りのペチュニアが形成されることが観察された(van der Krol et al., 1990)。この現象から RNA の強制発現を誘導することにより、ある確率で反対に mRNA の阻害が引き起こされることが予想されたが、その詳しいメカニズムに関しては不明のままであった。この機能阻害を引き起こす現象は線虫でも観察された。ある遺伝子を阻害する為に標的 mRNA に対するアンチセンス鎖を導入することによって一部の個体では期待通りの表現型が得られた。しかしながら予想に反してこの機能阻害の効果はセンス鎖を導入した場合にも観察された。このように線虫でも予想外な機能阻害が観察されていたがその原因はしばらくの間謎のままであった。しかしながら 1998 年、Fire や Mello らは後のノーベル生理学・医学賞受賞に繋がる研究によってこの現象の正体を明らかにした。線虫において標的遺伝子に対する dsRNA を注入すると、センス鎖やアンチセンス鎖単体で注入した場合の十倍以上の効率でこの機能阻害が引き起こされ、センス鎖による阻害は合成の過程で生じた少量の dsRNA が原因であったことを示した(Fire et al., 1998)。さらにこの機能阻害は dsRNA による mRNA の分解によって引き起こされていることを示唆し、この現象を RNAi と呼んだ。その後 RNAi の作用機構に関する研究は急速に進み、細胞内に侵入した dsRNA は Dicer によって短い 21 bp 程度の断片(small interfering RNA: siRNA)に切断される。この siRNA と Argonaute が結合して複合体を形成し、この複合体は siRNA の配列をもとに相補的な配列を持つ mRNA を特異的に切断、分解するということが知られている(Hannon 2002)。この RNAi は菌類(Cogoni and Macino 1999)から哺乳類(Wianny and Zernicka-Goetz 1999)に至るまで真核生物で広く保存されている。

さらに多くの生物でこの外来核酸への防御反応が遺伝子機能解析の手法として応用されている。

すなわちその生物の内在の遺伝子と相同な配列をもつ dsRNA を作成し細胞内に取り込ませることで、導入した dsRNA によって内在性の遺伝子から転写されて生じた mRNA が分解され遺伝子機能が阻害される。しかしながらこの RNAi は全ての生物で同様な効率で働く訳ではなく、実際カタユウレイボヤやマボヤの細胞内に内在遺伝子に対する dsRNA を取り込ませても期待される機能阻害の効果が十分に観察されないことが報告されている(Nishiyama and Fujiwara 2008)。

ワカレオタマボヤにおいては、これまでにゲノムや遺伝子の配列情報が整備された一方で、遺伝子機能阻害の手法が確立されていなかった為に、これまでの遺伝子機能解析は *in situ* hybridization による発現解析に留まっていた。そこでワカレオタマボヤを用いて、様々な生物で広く用いられている遺伝子機能阻害法である RNAi 法を検証することを試みた。

なお、材料と方法に関しては以後の各章に共通する部分が多いため巻末(p.60-p.71)にまとめて述べることにした。

結果

外来性 RNA による RNAi の効果の検証

ワカレオタマボヤにおいて RNAi による機能阻害法が適用可能であるかどうかを調べるため、まず外来性 mRNA に対する dsRNA を注入し機能阻害の効果を調べた。この為に、緑色蛍光タンパク質 EGFP もしくは赤色蛍光タンパク質 mCherry にワカレオタマボヤのヒストン H2B を融合させたタンパク質をコードする *H2B-EGFP* mRNA もしくは *H2B-mCherry* mRNA を標的として使い実験を行った。すなわち H2B-EGFP と H2B-mCherry の mRNA 混合液と共に EGFP もしくは mCherry を標的にする dsRNA(dsRNA-EGFP, dsRNA-mCherry)を共注入した際に、蛍光タンパク質をコードする mRNA が抑制されて蛍光強度が減少するかということを指標に実験を行った。卵巣内顕微注入法では、先に述べた様に産み落とされた卵によって取り込まれている mRNA の量は異なる。しかしながら取り込まれる H2B-EGFP mRNA と H2B-mCherry mRNA の比は同じであると考えられるため、mCherry に対する EGFP の蛍光強度の比(EGFP/mCherry)、もしくは EGFP に対する mCherry の蛍光強度の比(mCherry/EGFP)を比較することでこの効果を検証した。まず dsRNA-EGFP を注入した個体では、未受精卵における mCherry に対する EGFP の蛍光強度の比(EGFP/mCherry)が、mRNA 混合液のみを注入したコントロールに比べ 48±19%に減少した。また受精後 2 時間 (2 hours postfertilization: hpf)ではこの値がコントロールに対して 36±14%に減少した(図 2a-c)。つぎに dsRNA-mCherry を共注入した結果、未受精卵において EGFP に対する mCherry

の蛍光強度の比(mCherry/EGFP)が 38±10%に減少し、2 hpf では 37±10%へと減少した(図 2a, b, d)。以上の結果からワカレオタマボヤにおいて dsRNA を注入すると、この dsRNA の配列特異的に mRNA の機能が抑制されることが示唆された。またこの抑制は未受精卵の段階で既に見られたことから、dsRNA による抑制は産み落とされるより前、すなわち卵巣内で既に働いているということが示唆された。

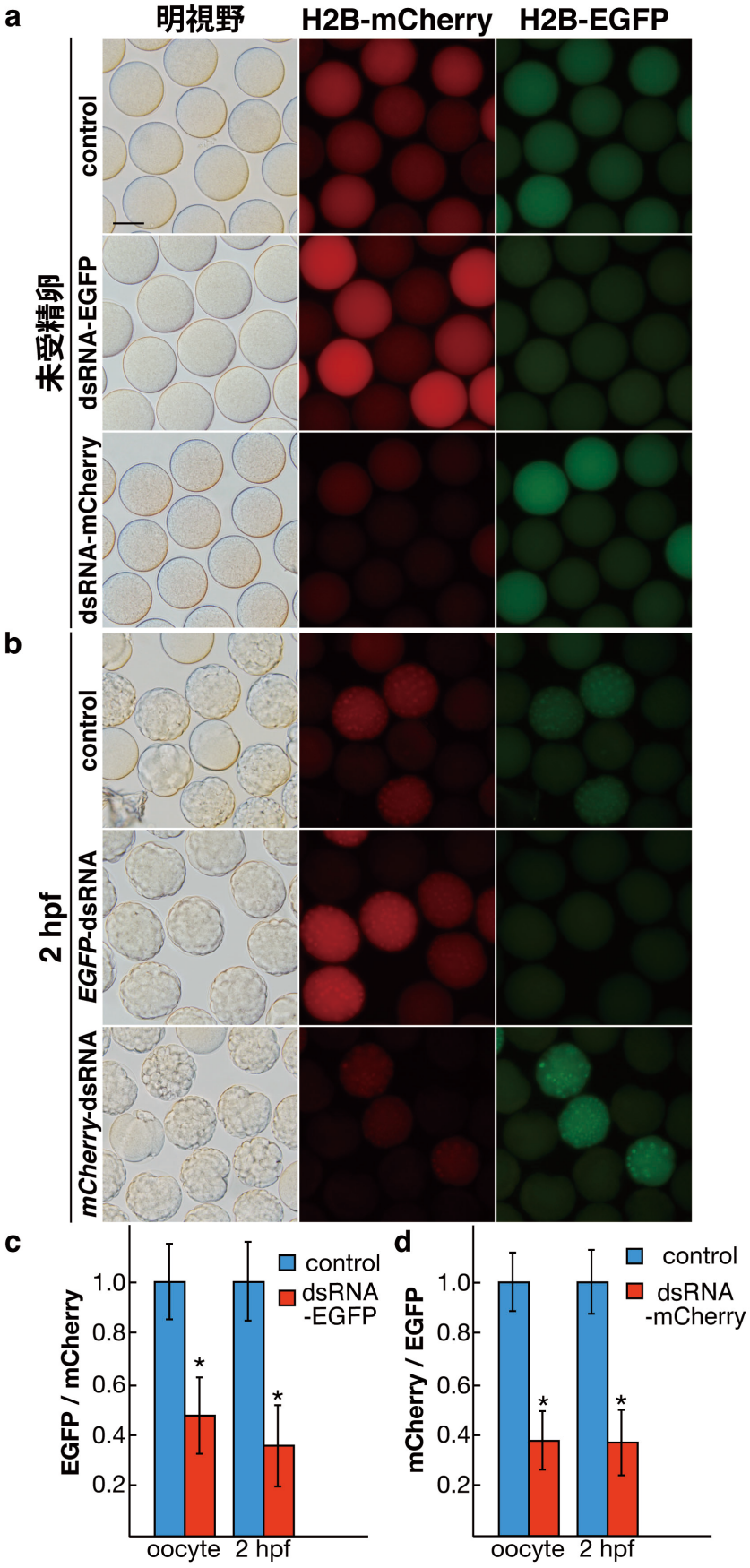


図 2 H2B-EGFP, H2B-mCherry mRNA に対する RNAi の効果 それぞれの dsRNA を共注入した時の未受精卵(a)および 2 hpf(b)における蛍光。c,d: 写真をもとに蛍光強度を Image J を用いて測定し EGFP、mCherry の強度の比を比較した。スケールバーは 50 μm。

内在性 mRNA に対する RNAi の効果の検証

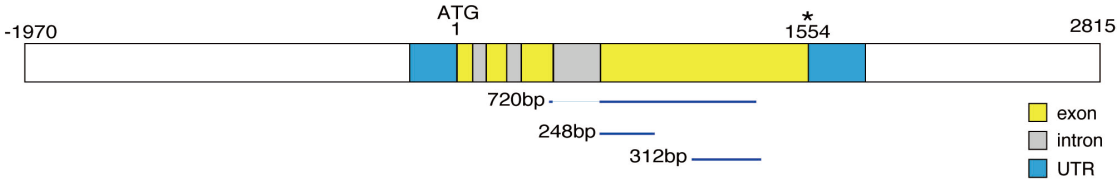
次にワカレオタマボヤゲノム上にコードされた内在性の遺伝子を標的とした dsRNA を注入した時に、機能阻害が引き起こせるかどうかを調べた。これを調べる為に、*Brachyury* 遺伝子を標的に実験を行った。Brachyury はホヤ類で脊索形成のキー転写因子として知られ、カタユウレイボヤではこの *Brachyury* 遺伝子の機能が阻害されると尾部が短縮した表現型が得られることが知られている(Chiba et al., 2009)。またワカレオタマボヤでもこの遺伝子のホモログがクローニングされ、*in situ* hybridization 法を用いた発現解析がなされており、30 細胞期から予定脊索細胞系譜でその発現が見られる(Bassham and Postlethwait 2000)。そこでワカレオタマボヤにおいて *Brachyury* ホモログ遺伝子に対する dsRNA を注入した時に、脊索形成の異常が引き起こされるかを指標に実験を行った。実験には *Brachyury* 遺伝子の主として第四 exon を標的にした三種類の dsRNA; dsRNA-Bra-720bp, dsRNA-248bp, dsRNA-Bra-312bp を用いた(図 3a)。なお dsRNA-Bra-248bp と dsRNA-Bra-312bp はそれぞれオーバーラップしない互いに異なる領域を標的に用いている。また dsRNA-mCherry を注入した個体をコントロールに用いた。通常発生では孵化後の 3.5 hpf(3 hpf で孵化する)から尾部の伸長が見られるのに対して、dsRNA-Bra-720bp を注入した結果、尾部の短縮した異常を示す表現型が得られた(図 3b)。また異常を示す表現型の中には尾部の短縮の程度が異なる 2 種類の表現型が観察されたのでこれらをそれぞれ short tail、shrunken tail とした(図 3b)。この分類では孵化直後の 3.5 hpf において、尾部に脊索様の構造が確認されるものの尾部の長さが体幹部と同程度の長さのままであるものを short tail、脊索様のものが観察されず尾部が体幹部に比べ大きく短縮しているものを shrunken tail とした(図 3b)。そこで次に dsRNA-mCherry, dsRNA-Bra-720bp, dsRNA-248bp, dsRNA-Bra-312bp の注入によって得られる表現型を正常発生, short tail, shrunken tail, 致死(孵化前に細胞分裂が停止したもの)に分類した。その結果、dsRNA-mCherry 注入個体では 96±3%が正常発生であったのに対し、dsRNA-Bra-720bp, dsRNA-Bra-248bp, dsRNA-Bra-312bp の注入ではそれぞれ 85±1%, 88±5%, 77±8%が shrunken tail の表現型を示し、正常発生はほとんど見られなかった(図 3c, d)。この結果から dsRNA の注入によって配列特異的に標的の機能が阻害されることが示唆された。

卵巣内顕微注入法では全体の 20-30%の卵にしか注入した RNA は取り込まれないため、dsRNA が取り込まれた個体を識別する注入マーカーとして蛍光タンパク質 *H2B-EGFP* mRNA を共注入している。上記の結果は EGFP の蛍光を発している個体のみについて集計を行った結果である。またこの *H2B-EGFP* mRNA と dsRNA はほぼ同じ割合でそれぞれの卵内に取り込まれると考えられるので、個体が示す EGFP の蛍光の強さに比例した量の dsRNA がそれぞれの個体に取り込まれて

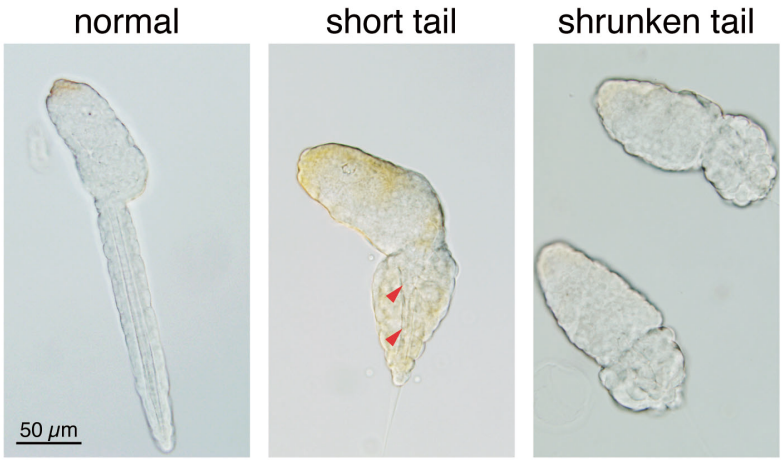
いると予想される。そこで蛍光の強さと表現型の関係を比べると、強い蛍光を示す個体は全てshrunken tailを示した(図4 赤色矢尻)。また蛍光が観察されない、dsRNAが取り込まれていないと考えられる個体は正常発生を示した(図 4 青色矢尻)。一方で、蛍光がごく僅か、もしくは見られないような個体であっても、shrunken tailもしくはshort tailを示した(図4 白色矢尻)。このような取り込みの少ない個体でshort tailが観察されたことから、尾部の短縮の程度が異なる2つの表現型はdsRNAの取り込まれた量依存的な効果の違いによって得られたと考えられる。

次に dsRNA の注入によって mRNA の量が実際に減少しているかを調べた。この為にdsRNA-Bra-720bpを注入した個体における *Brachyury* mRNAの存在量、およびBrachyuryによって脊索特異的にその発現が活性化され、脊索細胞の構造に重要な細胞外マトリックスの構成要素である *Thrombospondin* 遺伝子(Kuglar et al., 2011)の mRNA を *In situ* hybridization および RT-qPCR によって調べた。その結果dsRNA-mCherry注入個体では *Brachyury, Thrombospondin* mRNAが脊索特異的に検出されるのに対して、dsRNA-Bra-720bp注入個体ではこれらのシグナルが消失した(図5a)。またRT-qPCRの結果、dsRNA-Bra-720bp注入個体において *Brachyury* mRNAはコントロールの40%に、*Thrombosopndin* は 16%に減少していた(図 5b)。以上の結果から、dsRNA の注入によって *Brachyury* mRNAの減少が引き起こされ、さらにその下流で調節されている遺伝子の発現量も抑制されることにより脊索形成異常が引き起こされたと結論付ける。

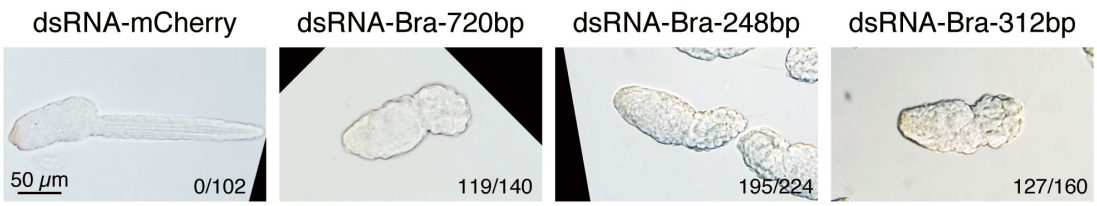
a


-1970
ATG
1
*
1554
2815
720bp
248bp
312bp
exon
intron
UTR

b


normal
short tail
shrunken tail
50 μm

c


dsRNA-mCherry
dsRNA-Bra-720bp
dsRNA-Bra-248bp
dsRNA-Bra-312bp
50 μm
0/102
119/140
195/224
127/160

d

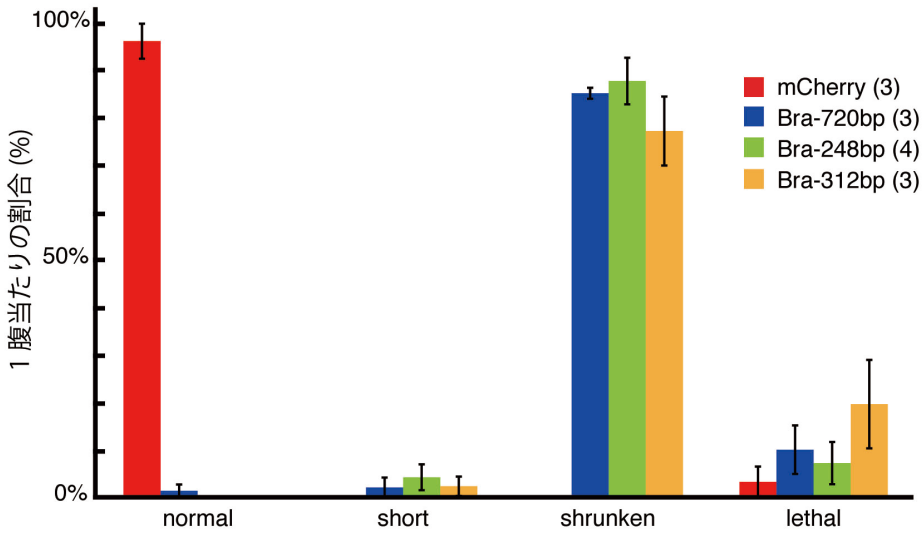

100%
50%
0%
1 腹当たりの割合 (%)
mCherry (3)
Bra-720bp (3)
Bra-248bp (4)
Bra-312bp (3)
normal
short
shrunken
lethal

図 3　*Brachyury* に対する dsRNA による機能阻害の効果

a: dsRNA に用いた *Brachyury* の標的領域。図は *Brachyury* の遺伝子モデルを表し、黄色はエキソン、灰色はイントロン、青色は UTR、白色は *Brachyury* の上流、下流の領域を示す。また青線でターゲットとした配列を示す。b: *Brachyury* に対する dsRNA を注入した際に見られる表現型。矢頭で脊索を示す。c: それぞれの dsRNA を注入した時に見られる代表的な表現型。注入した個体のうち shrunken tail 表現型を示した例数を図中に記した。 d: dsRNA を注入した際に得られるそれぞれの表現型の割合。グラフはそれぞれの一腹から得られた子供の中でのその表現型の割合を何回かの実験について平均したものを示す。 実験に用いたそれぞれの腹の数を()内に示した。垂直のバーは標準偏差。

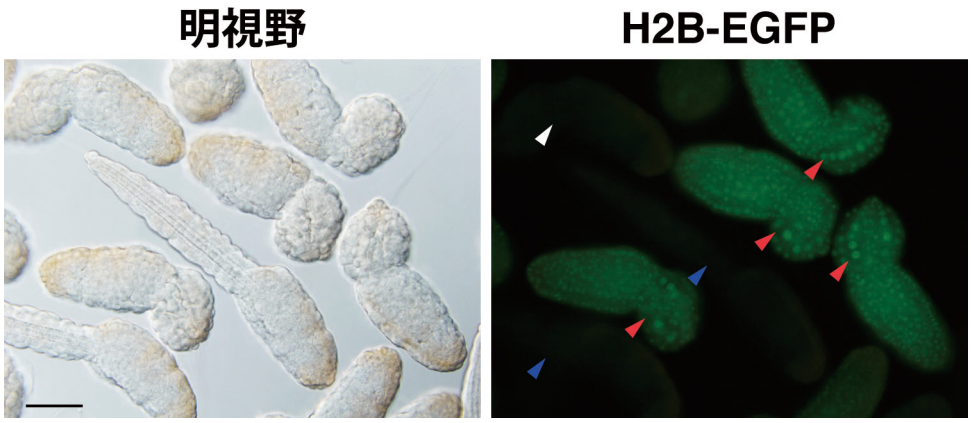


図 4　取り込まれる RNA と表現型の関係

蛍光タンパク質をコードする mRNA の取り込みが多い個体(赤)、取り込みが見られない個体(青)、ほとんど取り込みが見られない個体(白)をそれぞれ矢尻で示す。

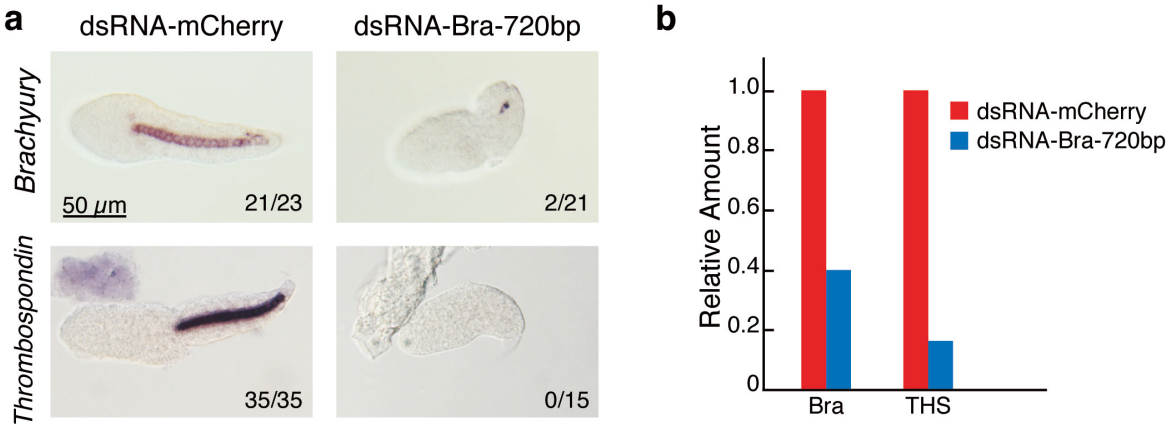


図 5　dsRNA 注入による mRNA 量の変化

dsRNA-Bra-720bp を注入した際の *Brachyury* mRNA, *Thrombospondin* mRNA の存在、及びその量を *In situ* hybridization(a)と RT-qPCR(b)で調べた。*In situ* hybridization によりシグナルが検出された個体の例数を図中に示す。

考察

本研究において①dsRNA-mCherry と dsRNA-EFGP がそれぞれ mCherry, EGFP 特異的に蛍光発現の抑制を行ったこと、②互いにオーバーラップをしない異なる二つの領域を標的にした dsRNA-Bra-248bp と dsRNA-Bra-312bp が共に同様の尾部の異常を引き起こしたこと、③dsRNA-mCherry はこの尾部の異常を引き起こさなかったこと、以上の三点からワカレオタマボヤに dsRNA を注入することにより配列特異的に標的の機能阻害が引き起こせると結論付けた。ワカレオタマボヤにおいて RT-qPCR を行ったところ dsRNA の注入により mRNA が減少したことから、ワカレオタマボヤにおいてもこれまで様々な生物で報告されているように dsRNA の注入によって配列特異な mRNA の分解が引き起こされ、機能阻害を示す表現型が得られると考えられる。dsRNA-Brachyury や dsRNA-mCherry を注入した時に 1-2 割程度の致死の表現型が得られた。しかしながら非注入個体においても同程度の割合で、精子や卵のクオリティーに依存して致死の個体が生じることを経験的に確認している。よって、dsRNA の注入時に観察された致死を示す個体はオフターゲット効果の影響によるものではなく、その時の卵や精子のクオリティーの問題によるものであり、今回の実験ではオフターゲット効果は観察されなかったと推察できる。

また本実験では顕微注入マーカーとして H2B-EGFP もしくは H2B-mCherry をコードする mRNA を共注入し、産み落とされた卵や胚においてこの蛍光の有無をもとに取り込まれている dsRNA の

量の指標とした。これによると dsRNA-Brachyruy による異常は非常に強く蛍光が観察される個体においても、僅かな蛍光しか観察されなかった個体においても同様に異常を示した。このことから、蛍光が検出できないくらい少量の mRNA のとりこみであっても RNAi の機能阻害が引き起こされたと考えられ、ワカレオタマボヤにおける RNAi を用いた機能阻害は dsRNA の取り込みが濃いところから薄いところまで広い範囲で効果を示すことが期待できる。

今回用いた *Brachyury* を標的にした 3 種類の dsRNA の間に目立った効果の差は見られなかった。また比較的長い 720bp の配列を標的にしても今回の実験ではオフターゲット効果は観察されなかったが、一般に標的配列が長くなるに従いオフターゲット効果の影響を受けやすくなることが知られている。従って卵巣内顕微注入法を用いて機能阻害実験を行うには本実験で用いた様に、100 bp から 500 bp 程度の標的配列に対して 0.1-0.2 μg/μL の dsRNA を注入することで行うことが推奨される。また dsRNA-EGFP や dsRNA-mCherry を注入した際、未受精卵の時点で既に機能阻害の効果が観察された。この結果は卵巣内顕微注入法を用いることで、産卵前の卵巣内で RNAi による機能阻害が可能であることを示唆する。卵巣内で起こる卵形成過程や母性因子の機能に関する研究は、卵巣内での機能阻害や顕微鏡観察の困難さからハエや線虫等一部の生物を除き困難であった。しかしながら、本研究によりワカレオタマボヤでは卵巣内で機能阻害を行うことが可能であることが示された。よって、この卵巣内顕微注入による RNAi 法はワカレオタマボヤにおいて、これまで方法が開発されていなかった遺伝子機能解析を可能にする条件を設定するだけでなく、ワカレオタマボヤ研究に卵形成過程や母性因子の解析という戦略を可能にすると期待される。

第三章: DNAi を用いた遺伝子機能解析法の確立

序論

生物に見られる多様な遺伝子サイレンシング機構

二章で議論した様に生物は様々な機構を用いて外来の核酸に対抗することで細胞の恒常性を維持している。RNAi のメカニズムの解析が線虫を用いた研究でなされたように、線虫では古くから単純な RNAi とは異なる「遺伝子サイレンシング機構」に関する研究が盛んに行われた。線虫においては RNAi のみならず、様々な外来核酸に対する遺伝子サイレンシング機構が明らかになっている。線虫における外来核酸への防御機構の研究の歴史は、導入遺伝子を強制発現させる為の技術開発の過程で、期待に反してそれに対抗するサイレンシング現象が観察されたことで発展してきた。線虫において複数コピーの遺伝子をゲノム上に組み込むと、この組み換え遺伝子の発現は線虫の持つ外来遺伝子に対する防御機構により抑制を受けることが知られている。さらにこの抑制機構のせいで、線虫で発現させることを目的として線虫が持つ遺伝子もしくは線虫のもつプロモーターに繋いだ発現カセットをゲノム上に複数コピー組み込むと、この組み換え遺伝子が抑制されるだけでなく、線虫がもともと持つ内在の相同遺伝子も同様に抑制を受けて機能阻害表現型を示すことが知られている(Dernburg et al., 2000)。co-suppression と呼ばれるこの現象の詳細な機構は明らかになっていないが、組み込まれる遺伝子が複数のコピーであることが重要なようであることから、線虫において安定した遺伝子発現を得る為には、1 コピーのみをゲノム上に組み込むことがこつであることが知られてきた。そこで 1 コピーだけを組み込む為の手法として MosSCI 法が確立された(Frøkjær-Jensen et al., 2008)。この MosSCI 法では染色体の特定部分に外来トランスポゾンを組み込んだ線虫を用いて、このトランスポゾンを人工的に活性化させ二重鎖切断を生じさせ、これと共に相同組み換えを起こすことができる様に設計したプラスミドコンストラクトを注入することで、目的の遺伝子を目的の位置に 1 コピーのみ組み込むことが可能となる。この方法によって得られた個体において組み込んだ遺伝子は体細胞においては安定的な発現が見られる。しかしながら生殖細胞においては、それでもある確率で抑制を受け発現が見られなくなる現象が観察されている。この現象は RNA epigenetic silencing(RNAe)と呼ばれている(Shirayama et al., 2012)。このように線虫においては複数の外来核酸に対抗する防御手段を備えることで、細胞内の恒常性が維持されていると考えられている。このような遺伝子サイレンシング機構は線虫特有に見られるものではなく、様々な生物においてそれぞれの遺伝子サイレンシング機構を発達させてきたようである。たとえば co-suppression は線虫のみならずショウジョウバエ(Pal-Bhadra et al., 1997)やペ

チュニア(Jorgensen 1990)においても観察されている。

DNA interference の発見

またこれとは別の遺伝子サイレンシング機構として DNA interference(DNAi)という現象が知られている。これは co-suppression の様にゲノム上に組み込まれた遺伝子によって引き起こされるのではなく、RNAi のように単に細胞内に導入された DNA によって引き起こされる。例えばペチュニアに *Dihydroflavonol-4-reductase* 遺伝子を含むプラスミドを導入すると、導入した Dihydroflavonol-4-reductase のみならず内在の Dihydroflavonol-4-reductase の機能も抑制されて斑入りのペチュニアが観察されるという現象が観察されている(Voinnet et al., 1998)。またゾウリムシにおいても内在遺伝子と相同な配列をもつ遺伝子の断片を細胞内に注入すると内在の遺伝子の機能が抑制されることが観察されている(Ruiz et al., 1998)。この DNAi は一部の植物(Tsuboi et al., 2012)、ゾウリムシ、高度好熱菌(Berenguer et al., 2014)で報告されているが、これまで多細胞動物においての報告例は得られていない。もし同様のことがワカレオタマボヤにおいても観察されるのであれば、遺伝子の断片やプラスミドを導入するだけで機能阻害が可能になり、dsRNA を in vitro で合成しなければならない RNAi に比べ格段に容易に遺伝子機能解析が可能になると考えられる。別の実験を行っている際に、ワカレオタマボヤにおいてもこの DNAi が働いているのではないかという可能性を感じさせる現象がこれまでに観察されていた。そこで本研究では、ワカレオタマボヤにおいてこの DNAi による遺伝子サイレンシング機構が保存されているかどうかを調べた。

結果

二重鎖 DNA による *Brachyury* 遺伝子の機能阻害

ワカレオタマボヤにおいて外来 DNA に対する防御機構が備わっているならば、内在性遺伝子と同じ配列を持つ DNA をワカレオタマボヤの細胞内に取り込ませたとき、取り込ませた配列に応じて内在の遺伝子機能も抑制される可能性があった。そこでワカレオタマボヤにおいて外来 DNA による機能阻害の効果を調べる為に *Brachyury* 遺伝子に対する PCR により増幅した DNA 断片の注入実験を行った。この為に *Brachyury* 遺伝子の約 2 kb 上流配列から下流配列までを含むゲノム領域に対する PCR 断片(PCR-Bra-full; 図 6a)および 248 bp の *Brachyury* 遺伝子 cDNA 部分配列に対する PCR 断片(PCR-Bra-248bp; 図 6a)をそれぞれ作成し、顕微注入を行った。コントロールである EGFP に対する PCR 断片(PCR-EGFP)を注入した場合、注入マーカーの蛍光を取り込んだ PCR-EGFP 注入個体の 92±8%(SD)(n=4)が正常発生を示すのに対して、PCR-Bra-full、PCR-Bra-248bp

注入個体はそれぞれ 92±6%(n=3), 92±1%(n=3)が shrunken tail を示し、正常発生は 0±0%, 1±1%のみであった(図 6b-d, n)。以上の結果から、*Brachyury* に対する PCR 断片を注入することにより *Brachyury* 遺伝子特異的な機能阻害表現型が引き起こされたと考えられる。またこの効果は調節領域を含む全長配列のみならず cDNA の部分配列の PCR 断片によっても引き起こされることが分かった。

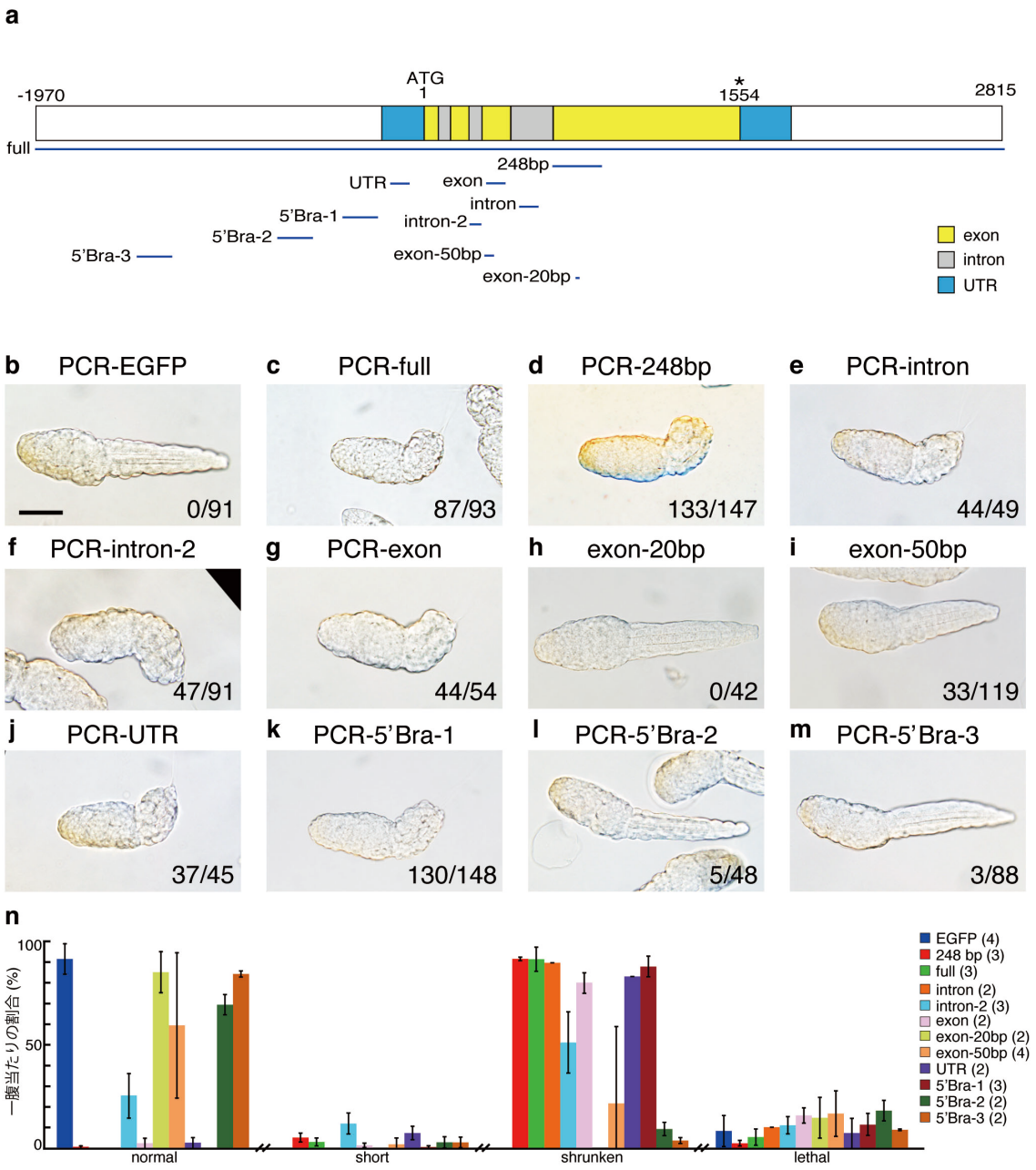


図 6　*Brachyury* に対する二重鎖 DNA による機能阻害の効果

a: PCR 断片に用いた *Brachyury* の標的領域(青線)。図は *Brachyury* の遺伝子モデルを表し、黄色は exon、灰色は intron、青色は UTR、白色は *Brachyury* の上流、下流の領域を示す。b-m: それぞれの二重鎖 DNA を注入した時に見られる代表的な表現型。注入した個体のうち shrunken tail 表現型を示した例数を図中に示す。 d: 二重鎖 DNA を注入した際に得られるそれぞれの表現型の割合。グラフはそれぞれの一腹から得られた子供の中でのその表現型の割合を何回かの実験について平均したものを示す。実験に用いたそれぞれの腹の数を()内に示した。垂直のバーは標準偏差。

PCR 断片標的配列による効果の違い

次に PCR で増幅する標的配列に基づく効果の違いを調べた。先ず、*Brachyury* 遺伝子の exon 領域 100 bp を標的にした PCR 断片(PCR-exon; 図 6a)および、第三 intron 領域 100bp を標的にした PCR 断片(PCR-intron; 図 6a)をそれぞれ注入した。この結果 PCR-exon、PCR-intron 注入個体は共に高い機能阻害を示し、それぞれ 80±5%(n=2)、90±0%(n=2)が shrunken tail を示した(図 6e ,g ,n)。また第二 intron 領域 72bp を標的にした PCR 断片(PCR-intron-2, 図 6a)を用いた場合でも 51±15%(n=3)で shrunken tail を示した(図 6f, n)ことから、ワカレオタマボヤにおける二重鎖 DNA による機能阻害は intron 領域を標的にした場合でも生じることが分かった。次に *Brachyury* 遺伝子の 5'UTR(PCR-UTR; 図 6a)および UTR の外側上流配列を標的にして実験を行った。用いた上流配列に対する PCR 断片はそれぞれ PCR-5'Bra-1(-217 bp から-393 bp の領域; 図 6a)、PCR-5'Bra-2(-617 bp から-793 bp の領域)、PCR-5'Bra-3(-1268 bp から-1444 bp)(それぞれ括弧内は開始メチオニンからの位置を示す)である。その結果、PCR-UTR 、PCR-5'Bra-1 注入個体では shrunken tail の割合が 82±1%, 88±5%(図 6j, k, n)と高い機能阻害の効果を示した。しかしながら PCR-5'Bra-2、PCR-5'Bra-3 ではそれぞれ shrunken tail の割合が 9±4%, 4±2%と低く、69±5%、84±2%で正常発生を示した(図 6l-n)。以上の結果から 5'UTR や 5'UTR すぐ外側の配列を標的に用いても機能阻害の効果は得られるが、UTR から上流に離れると機能阻害の効果は薄れていくことが示唆された。興味深いことに PCR-5'Bra-1 を標的にした dsRNA を注入したところ、このような機能阻害は全く見られなかった(0±0%, n=3)。この結果は、dsRNA が mRNA のみを標的にしていることに一致する。また UTR の上流配列を標的にした PCR 断片であっても機能阻害の効果が得られたことから、PCR 断片の注入による機能阻害は転写阻害を介して引き起こされていることが示唆された。このことから PCR 断片による機能阻害は RNAi とは異なる現象であることが示された。

PCR 断片の長さ、濃度の検討

機能阻害を引き起こす二重鎖 DNA の配列長および濃度条件を調べた。まず配列長に関しては上記の通り 100bp で十分な機能阻害が引き起こされた(図 6g)。そこでさらに短い 20 bp, 50 bp の二重鎖 DNA を得る為に、合成アンチセンスオリゴ DNA およびセンスオリゴ DNA をそれぞれアニーリングした(exon-20bp, exon-50bp; 図 6a)。この結果 exon-50bp における shrunken tail の割合は 22±38%のみであり、exon-20bp では 0±0%であった(図 6h, i, n)。また 74 bp の PCR-intron-2 は 51±15%しか shrunken tail を示さなかった(図 6n)。これらの結果から PCR 断片による機能阻害は 100 bp 以上の配列によって安定的に引き起こされると考えられる。

続いて注入に用いる PCR 断片の濃度による効果の違いを調べた。ここでは PCR-248bp を用いて x1 を 0.3 μg/μL として段階希釈を行い、x1/5(0.06 μg/μL)、x1/25(0.012 μg/μL)、x1/125(0.0024 μg/μL)における機能阻害の効果の割合を調べた。この結果 x1、x1/5 ではそれぞれ 92±1%(n=3)、80±5%(n=3)で shrunken tail を示すのに対し、x1/25、x1/125 は共に 0±0%(n=4)であった(図 7)。以上の結果をまとめると、二重鎖 DNA による機能阻害は 0.1-0.3 μg/μL の濃度で、100 bp 以上の配列を標的にすることが適していると結論付けることができる。

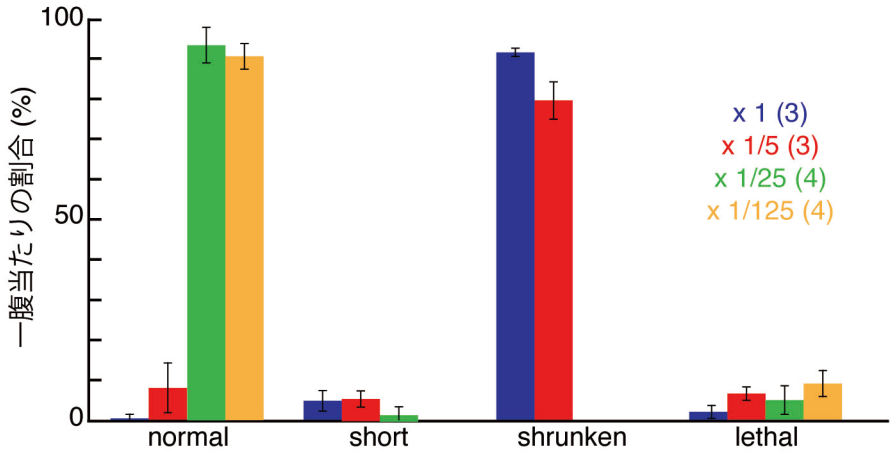


図 7　PCR 断片の濃度による機能阻害効果の違い

実験には PCR-248bp を用い、x1 を 0.3 μg/μL としたときの 1/5 倍(0.06 μg/μL)、1/25 倍(0.012 μg/μL)、1/125 倍(0.0024 μg/μL)の濃度で注入した際の機能阻害の効果を示す。グラフはそれぞれの一腹から得られた子供の中でのその表現型の割合を何回かの実験について平均したものを示す。実験に用いたそれぞれの腹の数を()内に示した。垂直のバーは標準偏差。

二重鎖 DNA の構造による効果の違い

二重鎖 DNA の形状による機能阻害の効果の違いを調べる為に、*Brachyury* 遺伝子の部分配列 720 bp を含む環状プラスミド(pBS-Brachyury: 図 3a の 720bp と同じ配列を標的にする)を用いて実験を行った(図 8a)。pBS-Brachyury の環状のままのもの、プラスミドのバックボーンが 3'側、5'側にそれぞれ連なった構造を取る様に制限酵素で処理したもの(/*Bam*HI または/*Not*I)、インサート部分のみを取り出したもの(/*Not*I, *Bam*HI)をそれぞれ作成し注入を行った。この結果、インサート配列の 3'端に 3 kbp 程度のプラスミドのバックボーンを持ち、*Brachyury* 部分配列の 5'側にはほとんど余分な配列を持たない様に切断した直鎖状 DNA である pBS-Brachyury/*Bam*HI を注入した個体では 91±10%(n=3)で、またインサート領域のみを取り出してきたものを注入した個体では 94±1%(n=2)で shrunken tail が引き起こされた(図 8b)。一方で、pBS-Brachyury を環状のままで注入した個体では 2±3%、*Brachyury* 部分配列の 5'端にプラスミドバックボーンを持つ pBS-Brachyury/*Not*I を注入した場合には 0±0%で shrunken tail が観察された。以上の結果から、二重鎖 DNA による機能阻害は直鎖 DNA 特異的に引き起こされ、更にこの二重鎖 DNA の 5'側に余計な配列がついていると、機能阻害の効果が消失するらしいことが分かった。

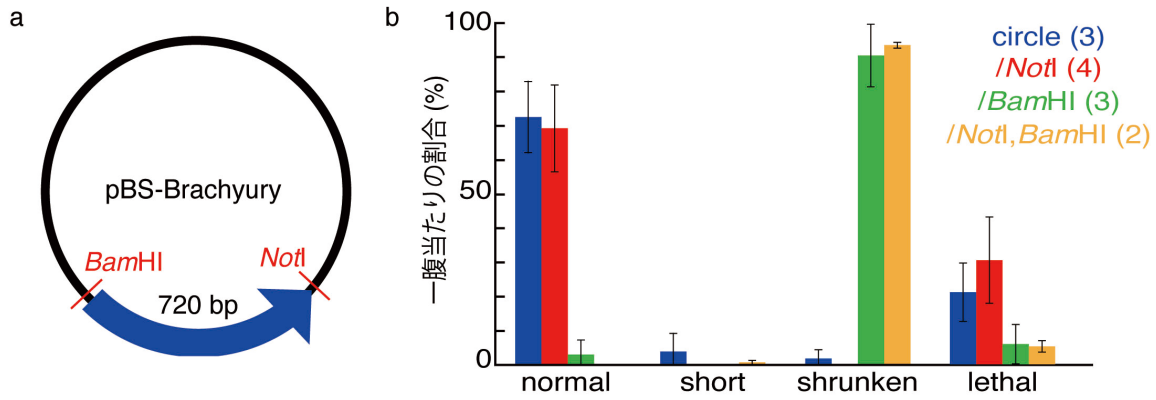


図 8　二重鎖 DNA の構造による効果の違い

a: 実験に用いた pBS-Brachyury の構造。*Brachyury* cDNA の部分配列(720 bp)が挿入されており(青色矢印)、その両端に *Bam* HI および *Not* I の制限酵素認識サイトを含む。 b: それぞれの構造を持った DNA を注入した際の表現型の割合。グラフはそれぞれの一腹から得られた子供の中でのその表現型の割合を何回かの実験について平均したものを示す。実験に用いたそれぞれの腹の数を()内に示した。垂直のバーは標準偏差。

Zic-like1 に対する機能阻害

次にこの二重鎖 DNA による機能阻害が *Brachyury* 以外の遺伝子に対しても働くか調べた。この為に *Zic-like1* に対する PCR 断片を作成し注入を行った。用いた PCR 断片は *Zic-like1* の cDNA を鋳型にして作成した(PCR-Zic-like1: 446 bp)。Zic-like1 は zinc finger モチーフをもったタンパク質であり、mRNA の発現は 2 hpf から一部の細胞のみで観察され、孵化幼生では脳胞および神経索でのみその発現が見られることが報告されている(幸西 2011)。コントロールである PCR 断片の非注入個体では体幹部の構造体が完成し始める 7 hpf には脳胞が完成し、この中に耳石が観察されるのに対して、PCR-Zic-like1 注入個体ではこの耳石が消失した(図 9)。また *Zic-like1* に対する dsRNA を作成し RNAi を行ったところ、RNAi によっても同様の表現型が得られた(図 9)。以上の結果から PCR-Zic-like1 の注入により *Zic-like1* の機能阻害が引き起こされたと考えられる。

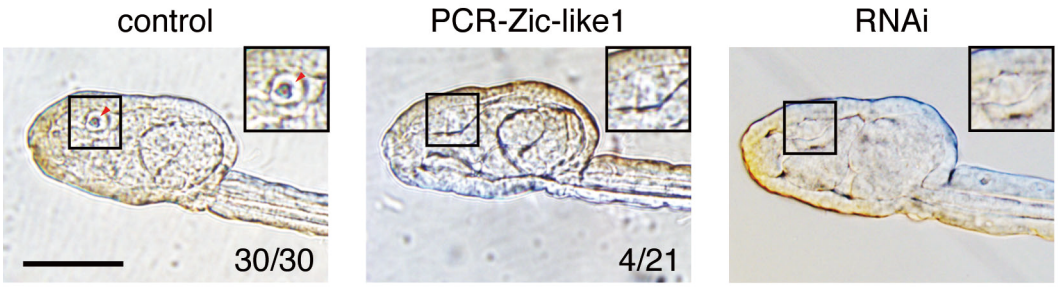


図 9　*Zic-like1* に対する PCR 断片および dsRNA を注入した際の機能阻害の効果
写真内の枠線でかこった領域は脳胞が見られる領域を示し、右上には囲った領域を拡大した写真を挿入した。control の未注入個体ではこの脳胞内に石耳(矢尻)が見られる。この石耳が見られた個体の割合を図中に示す。スケールバーは 50 μm。

Acetylcholinesterase に対する機能阻害

次に *Acetylcholinesterase*(*AChE*)に対する PCR 断片を作成し注入を行った。AChE は筋肉細胞において神経伝達物質であるアセチルコリンの分解により筋肉を弛緩させる為の酵素反応に働き、筋肉の分化マーカーとして用いることができる。この *Acetylcholinesterase* の cDNA を鋳型に PCR を行い、同様に注入を行った(PCR-AChE: 819 bp)。酵素活性が強く検出される 7 hpf において AChE 染色を行い機能阻害の効果を検証したところ、コントロールである PCR 断片非注入個体では筋肉細胞が存在する尾部の両側に二列の染色が見られ、AChE 酵素活性が観察された(図 10)。一方 PCR-AChE 注入個体ではこの二列の染色が消失し、脊索の左側で部分的に薄い染色が見られるのみであった(図 10)。この PCR-AChE 注入個体で見られた染色は、その染色パターンから神経索に

おいて働く他のコリンエステラーゼに起因する染色であり、コントロールではこの染色が筋肉における AChE の強い染色によって隠れていたものと考えられる。これらの結果から PCR-AChE の注入により AChE のタンパク質の減少が引き起こされることが分かった。しかしながらこの機能阻害によって得られた個体は正常に遊泳を行い、10 hpf ではハウスを形成したことから、AChE の減少によって筋肉の収縮はあまり影響を受けていないことが示唆された。

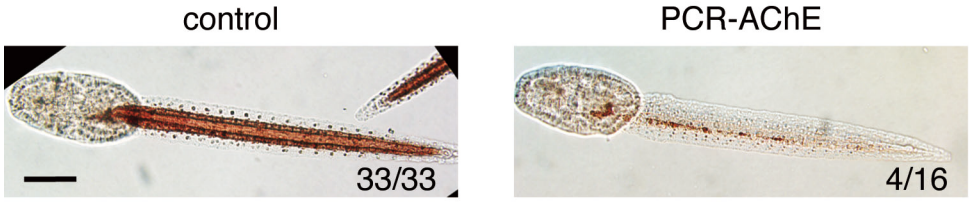


図 10　*Acetylcholinesterase* に対する PCR 断片の効果

PCR-AChE 注入個体および、control の未注入個体に AChE 組織化学染色を行った。筋肉における AChE の酵素活性を示すシグナルが検出された個体の例数を図中に示す。スケールバーは 50 μm。

母性 mRNA *β*-catenin に対する機能阻害

卵巣内顕微注入法を用いると PCR 断片が卵母細胞内に取り込まれることから、母親の卵巣内でも機能阻害が可能であると期待される。そこで母親卵巣内で転写され卵母細胞内に受け継がれる母性因子である *β-catenin* に対する PCR 断片を注入し、この機能阻害が母性因子に対しても有効であるかの検証を行った。β-catenin は一般に 2 つの機能が知られている。まず 1 つは細胞膜貫通型の細胞接着分子である Cadherin の細胞内ドメインに直接結合し細胞接着に関わるという機能である(McCrea et al., 2010)。もう 1 つはシグナルタンパク質としての機能であり、カノニカル wnt シグナル経路において wnt が細胞表面の受容体に結合すると β-catenin は安定化して核内に移行し転写調節に関わることが知られている(McCrea et al., 2010)。例えば無脊椎動物では β-catenin は動植軸形成に関わっていることが知られており、ホヤでは卵細胞質中に一様に存在している β-catenin タンパク質は 32 細胞期から植物半球でのみ核に移行して植物半球特異的な遺伝子の転写を促進する(Imai et al., 2000, Kawai et al., 2007)。そこで機能阻害を行うに先立ってワカレオタマボヤの *β-catenin* のクローニングを行った。カタユウレイボヤでクローニングがなされている β-catenin のアミノ酸配列 (NP_001027779.1) をもとに Oiko base(http://oikoarrays.biology.uiowa.edu/Oiko/index.html, Danks et al., 2012)を用いて tblastn(Database には Odioica_Genemodels_transcripts_reference_v1.0 を用いた)を行った。これにより複数の *β-catenin* のホモログ遺伝子の候補が得られた。また OikoBase の Gene Expression Matrix ではマイクロアレ

イの結果に基づいた様々な発生ステージにおける遺伝子ごとの発現量を調べることが可能である。これを用いてマターナルに発現している β-catenin の候補を検索したところ、2 つの候補(GSOIDP00011813001, GSOIDP00004053001)が得られた。そこでこれらの候補タンパク質の分子系統樹を作成したところ、これらは確かに Catenin の beta サブファミリーに含まれることが分かった(図 11)。そこでこの二つをそれぞれ *β-catenin1*(GSOIDP00011813001), *β-catenin2*(GSOIDP00004053001)とした。次にそれぞれの機能阻害を行う為に *β-catenin1*、*β-catenin2* を標的にした PCR 断片(PCR-catenin1: 498 bp, PCR-catenin2: 530 bp)を作成し注入を行った。この結果 PCR-catenin1 注入個体は受精後 1 hpf 頃から非注入コントロールに比べ細胞境界がくっきりとした。7 hpf では細胞の解離が一部見られる細胞塊となった(図 12a)。一方 PCR-catenin2 注入個体ではこのような細胞の解離は見られず、7 hpf では尾の形成が観察されず、個体の周囲には表皮様の構造が観察され、内部にも構造らしき物が観察された(ワカレオタマボヤ幼生では 7 hpf には体幹部で胃や腸などの器官形成が見られる)(図 12a)。興味深いことに PCR-catenin1, PCR-catenin2 の注入では、注入量の指標である mCherry の蛍光を示さない個体においても高い割合でこの機能阻害表現型が観察された。これの 1 つの考えられる解釈として、母性 mRNA に対する機能阻害の方が注入後すぐに働く為に、より少ない DNA 量であっても機能阻害の効果が強く出るのかもしれない。

さらにこれらの機能阻害による異常の結果を詳細に解析する為に、内胚葉のマーカーとして用いられるアルカリフォスファターゼの酵素活性をもとにした ALP 染色を行った。この結果 PCR-catenin1 注入個体では内胚葉のマーカーであるアルカリフォスファターゼが検出されたのに対して、PCR-catenin2 注入個体では内胚葉の消失が見られた(図 12b)。PCR-catenin2 の結果はホヤにおいて β-catenin の機能を阻害すると、動物半球化して中内胚葉が消失するという知見に一致する。以上のように *β-catenin1* の機能阻害では細胞境界に異常が見られたこと、および *β-catenin2* の機能阻害によって内胚葉が消失したことから、ワカレオタマボヤにおいて β-catenin1 は細胞接着に、β-catenin 2 は植物半球における細胞運命決定のシグナルタンパク質として機能している可能性が考えられる。以上の結果から、ワカレオタマボヤにおいて卵巣内顕微注入法をもちいて PCR 断片を注入することで、母性因子の機能阻害を行うことが可能であり、母性因子の機能解析が可能であることが示された。

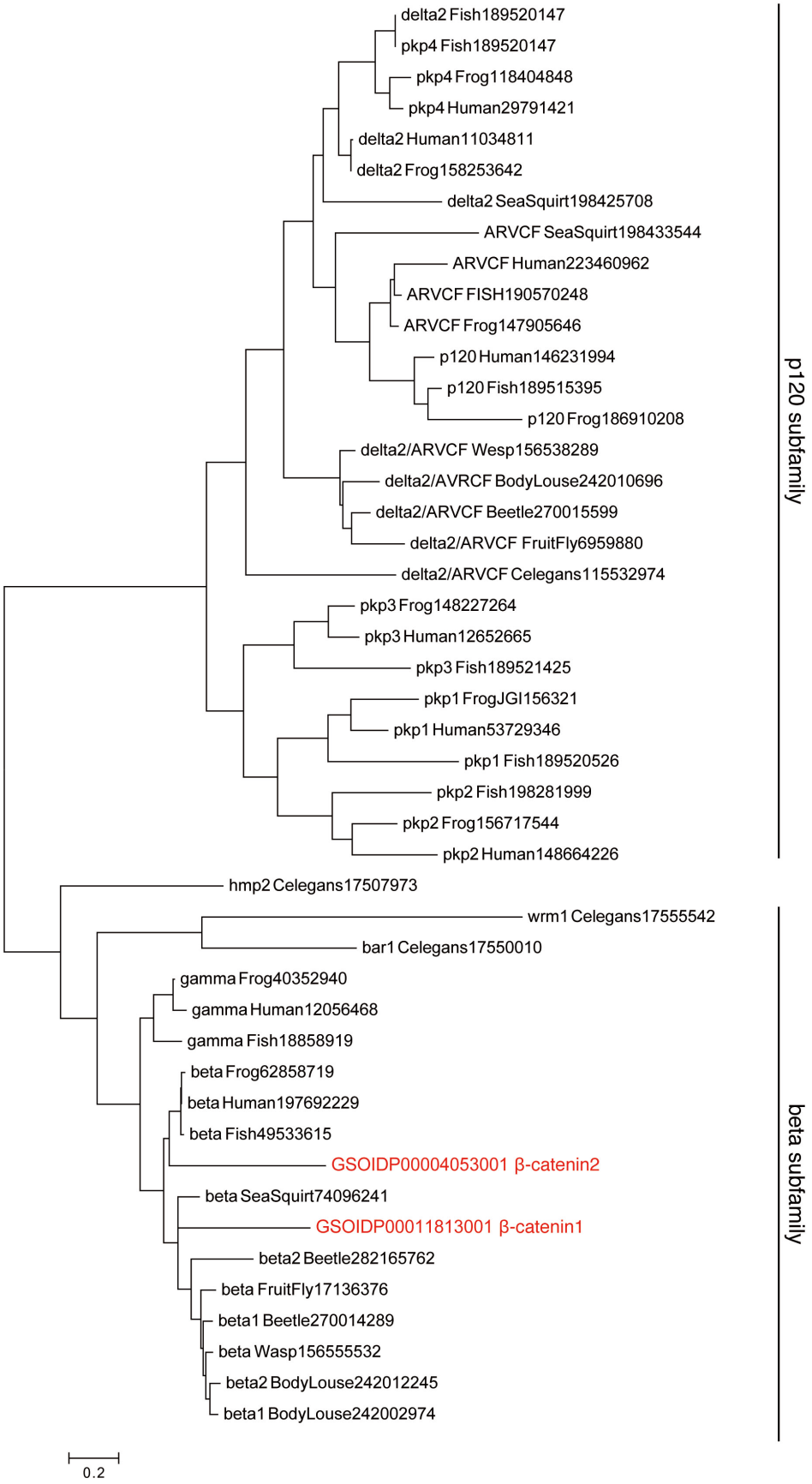


図 11　Catenin 遺伝子ファミリーの分子系統樹

Catenin 遺伝子ファミリーの 1 つである p120 サブファミリーと beta サブファミリーに属するそれぞれの遺伝子を比較した。この結果ワカレオタマボヤでマターナルに発現している 2 つの遺伝子 GSOIDP00011813001 および GSOIDP00004053001 は共に beta サブファミリーに属した。

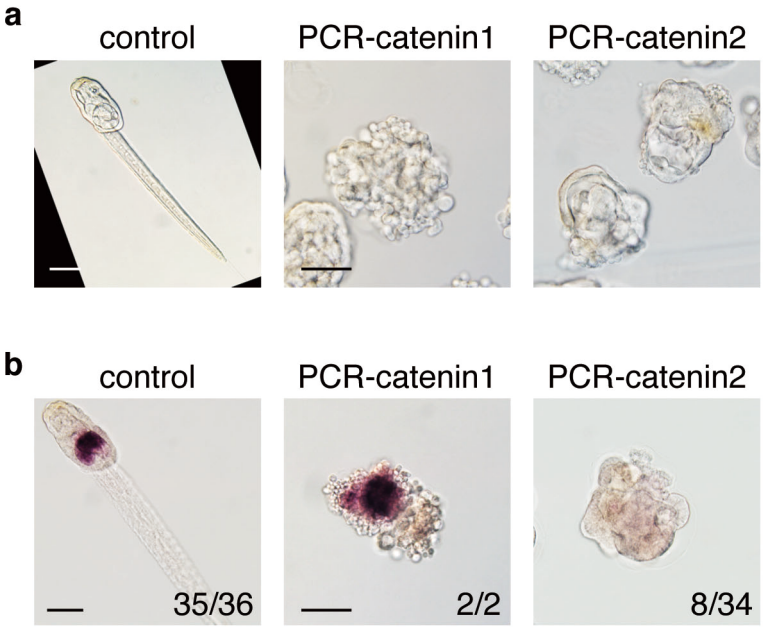


図 12　β-catenin1 および β-catenin2 に対する PCR 断片の効果

PCR-catenin1 および PCR-catenin2 を注入した個体の表現型(a)およびその個体においてアルカリフォスファターゼ組織化学染色をもとに内胚葉の分化を調べた結果(b)。アルカリフォスファターゼの酵素活性によるシグナルが検出された個体の例数を図中に示す。スケールバーは 50 μm。

PCR 断片の注入による mRNA の量の変化

これまでの結果から、PCR 断片を注入することにより配列特異的な機能阻害が引き起こされることが明らかとなった。そこで次にこの機能阻害がどの様にして引き起こされるかを調べる為に、PCR 断片を注入した時の mRNA の量の変化を調べた。そこで *Brachyury* に対する PCR 断片(PCR-Bra-248bp)及び Brachyury の下流でその発現が活性化される *Thrombospondin* に対する PCR 断片(PCR-THS)をそれぞれ注入した際に *Brachyury, Thrombospondin* mRNA の存在量を RT-qPCR を用いて調べた。この結果、*Brachyury* に対する PCR 断片を注入した時、コントロールである PCR-EGFP 注入個体に比べ *Brachyury* mRNA が 21%に、*Thrombospondin* mRNA が 9%に減少した(図 13a)。一方 PCR-THS を注入した結果、*Brachyury* mRNA には変化が見られないのに対して、*Thrombospondin* mRNA が 25%に減少した(図 13b)。以上の結果から PCR 断片の注入によって標的特異的な mRNA の減少が引き起こされることにより機能阻害が生じることが示された。

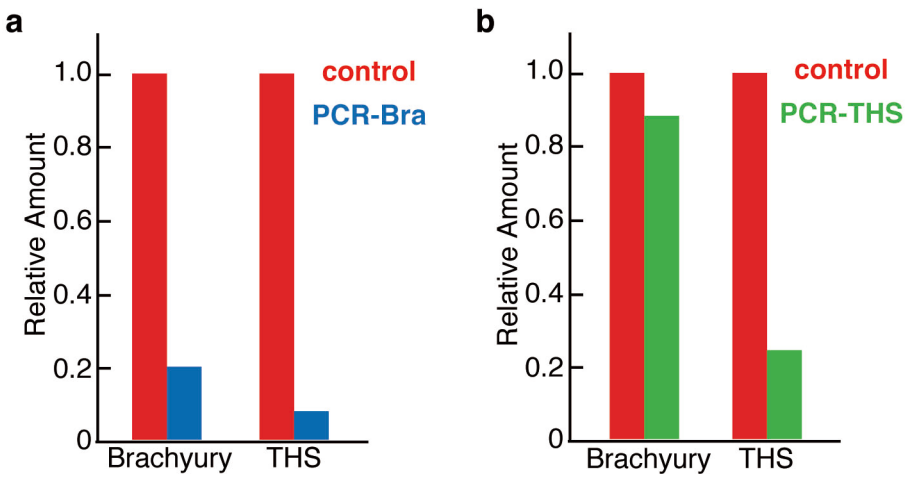


図 13　PCR 断片注入によるターゲット遺伝子の mRNA の減少

PCR-Bra-248bp(a)および PCR-THS(b)を注入した際の *Brachyury, Thrombospondin* mRNA の存在量を RT-qPCR を用いて調べた。コントロールには PCR-EGFP 注入個体を用い、コントロールにおける mRNA の量を 1 とした時の存在量をそれぞれ示す。それぞれの結果は GAPDH mRNA の存在量でノーマライズした。

PCR 断片の注入によるゲノムのメチル化への影響

前述のように PCR 断片による機能阻害は 5'上流配列を標的にしても引き起こされた(図 6k, n)ことから、この機能阻害の過程には転写阻害が関わっていると考えられた。転写阻害を介した機能阻害が示唆されたことから、PCR 断片注入個体によるゲノムのメチル化への影響を調べた。ゲノム上に見られる CpG 配列のシトシンがメチル化を受けると、この領域がヘテロクロマチン化することにより転写が抑制される。このようなメチル化を介した転写状態の制御は X 染色体の不活性化などに関わっていることが知られている(Suzuki and Bird 2008)。また植物における RNAi や DNAi には DNA メチル化を介した抑制が見られることが報告されている(Tsuboi et al., 2012)。そこでワカレオタマボヤにおいて 5'UTR を標的にした PCR 断片(PCR-5'Bra-1)および、コーディング領域を標的にした PCR 断片(PCR-Bra-248bp)を注入した個体において、メチル化依存性 DNA 切断酵素 *Mcr*BC およびメチル化感受性制限酵素 *Hap*II もしくは *Hae*II をそれぞれ用いて、標的領域がメチル化を受けているかどうかを解析した。すなわち標的配列が PCR 断片の注入によってメチル化を受ける場合、*Mcr*BC での処理によってこの領域で切断が生じるため PCR の増幅は見られない。またメチル化感受性制限酵素で処理した場合には、標的配列上に存在する制限酵素サイトがメチル化されることで切断が生じなくなり PCR による増幅が検出されるはずである(図 14a)。実験の

結果、PCR-5'Bra-1, PCR-Bra-248bp を注入した個体において、その標的配列上に見られる CpG 配列にはメチル化の変化が見られなかった(図 14b, c)。よってワカレオタマボヤにおける PCR 断片による転写阻害はゲノムのメチル化によるものではない可能性が高いと考えられる。

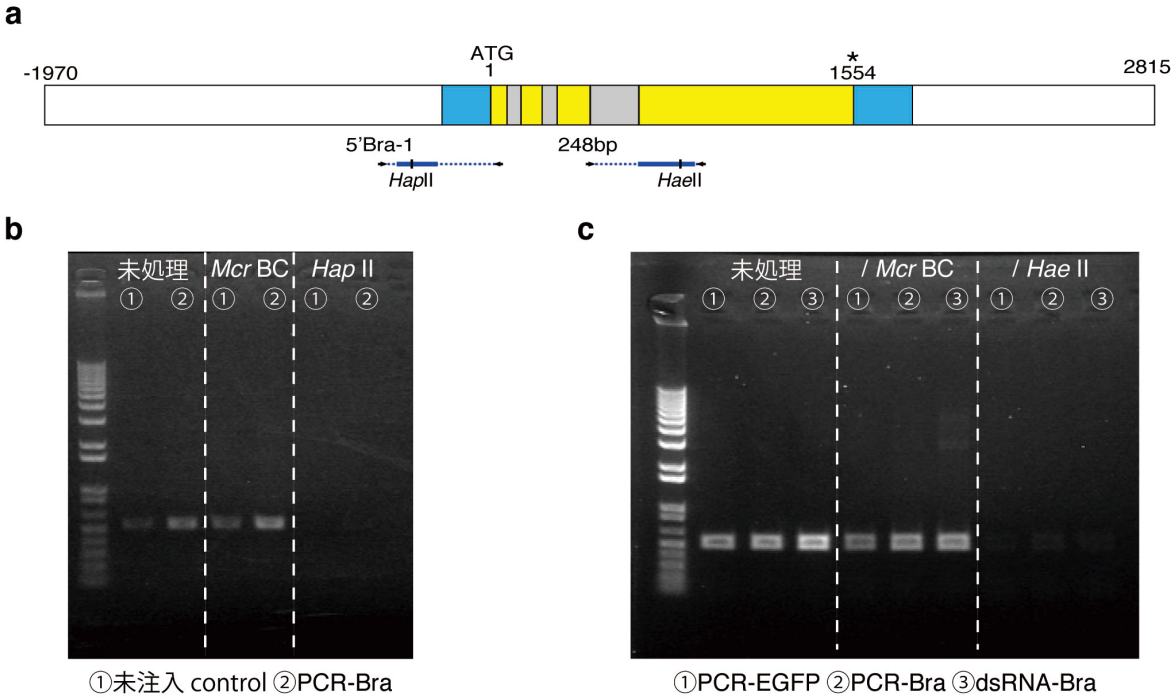


図 14　PCR 断片注入時のワカレオタマボヤゲノムのメチル化の影響

a: PCR 断片標的配列とメチル化検出の為の PCR の領域。PCR-Bra-248bp, PCR-5'Bra-1 の標的配列を青線、メチル化検出の為の PCR に用いたプライマーを矢印、そのプライマーにより増幅される領域を青色破線で示した。またメチル化感受性制限酵素 *Hae*II, *Hap*II の切断領域を黒線で示した。b: ①未注入 control, ②PCR-5'Bra-1 注入個体からそれぞれ図に示す制限酵素で処理した後、標的配列を含むゲノム領域を PCR で増幅した結果。 c: ① PCR-EGFP, ② PCR-Bra-248bp, ③ dsRNA-Bra-248bp をそれぞれ注入した個体から抽出したゲノムを同様に処理した後、標的配列を含むゲノム領域を PCR で増幅した結果。

PCR 断片注入の mRNA のスプライシングへの影響

Bracyury の第三、第二 intron を標的にした PCR 断片(PCR-intron, PCR-intron-2)でも同様に機能阻害が引き起こされた(図 6e, f)ことから、PCR 断片がプロセシング前の mRNA に作用してスプライシングに影響を及ぼすことにより機能阻害が引き起こされている可能性を検証した。この検証の為に PCR-Bra-intron 注入個体から抽出した total RNA をもとに作成した cDNA を鋳型に、標的にし

た intron の両端にある exon 領域に設計したプライマー(図 15)を用いて PCR を行った。もし PCR 断片がスプライシングに影響を及ぼすならばこの RT-PCR によって通常の 294 bp のバンドと共に、スプライシングに異常が生じた mRNA 由来の 506 bp のバンドが検出されると予想した。しかし、PCR-Bra-intron 注入個体においてこのような mRNA のプロセシングの異常を示す様なバンドは検出されなかった(図 15)。この結果から PCR 断片の注入は mRNA のスプライシングに影響を及ぼしているわけではないことが示唆された。

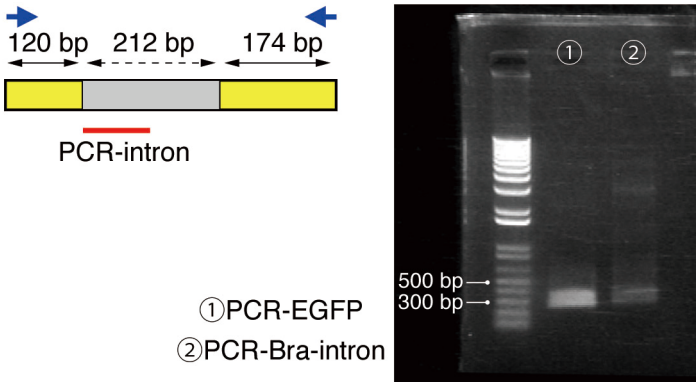


図 15　PCR 断片注入による mRNA のスプライシングに対する影響

左の図は標的配列に用いた *Brachyury* ゲノムの部分配列を示し、黄色で exon、灰色で intron 領域を示した。青色矢印の位置に PCR プライマーを設計した。右の図は①PCR-EGFP, ②PCR-Bra-intron を注入した個体から抽出した total RNA をもとに RT-PCR を行った結果。

PCR 断片注入による mRNA の分解への効果

ここまで PCR 断片による転写阻害への影響およびプロセシング過程への影響を考察してきた。一方で RNAi における機能阻害は主に mRNA の分解を介して引き起こされる現象であることから、PCR 断片による機能阻害においても mRNA の分解が関わっているかどうかを調べた。*H2B-mCherry, H2B-EGFP* mRNA の混合液と共に *mCherry* もしくは *EGFP* に対する PCR 断片を共注入した時に、これらの蛍光タンパク質が抑制されるかを検証した。卵巣内顕微注入法ではそれぞれの卵に取り込まれる mRNA の量は異なるが、その比は同じであると考えられるので、蛍光の抑制効果は、赤色、緑色の蛍光強度の比すなわち mCherry/EGFP もしくは EGFP/mCherry を比較することで検証した。この結果、PCR-mCherry 注入個体ではコントロールに比べ mCherry/EGFP が 76±14%に減少した(図 16a, b)。また PCR-EGFP 注入個体では EGFP/mCherry が 42±17%に減少した(図 16a, b)。この結果から PCR 断片の注入により RNAi と同様に配列特異的な mRNA の分解が引き起こされることが示唆された。

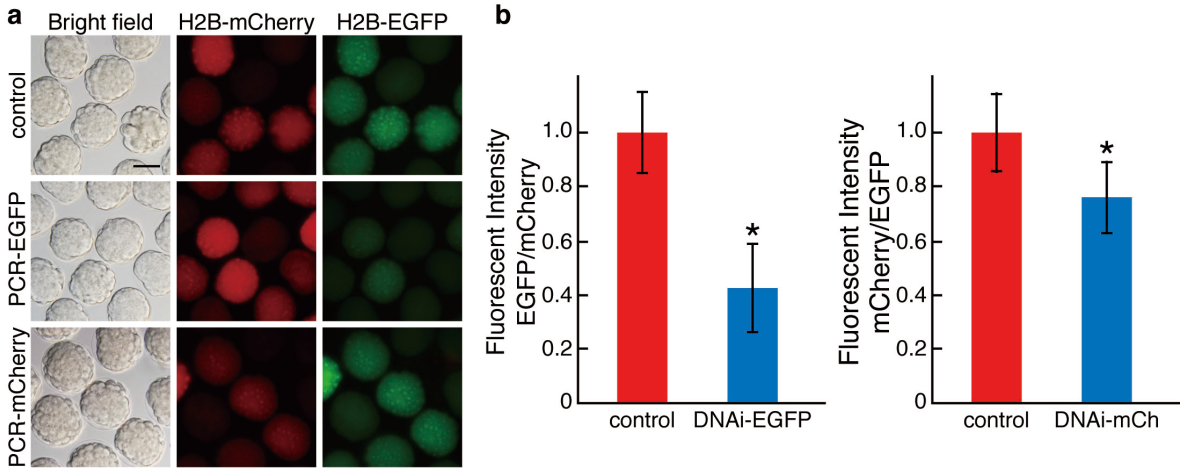


図 16　PCR 断片の注入による mRNA の分解の効果

a:　PCR-EGFP もしくは PCR-mCherry を注入した個体の 2 hpf における EGFP, mCherry の蛍光。b: 写真をもとにそれぞれの蛍光強度を Image J を用いて測定し EGFP、mCherry の強度の比を比較した。

PCR 断片による機能阻害に対する Argonaute の影響

PCR 断片による機能阻害がどのような機構によって引き起こされているのかについて調べる為に、この機能阻害への Argonaute タンパク質の関与について調べた。Argonaute の最も良く知られた機能は RNAi における mRNA のスライサー活性である。RNAi において Argonaute は siRNA と複合体を形成し、この siRNA の配列と相同な配列を持つ mRNA を認識して、Argounaute のスライサー活性により mRNA の分解を行う。しかしながら RNAi のみならず様々な外来核酸に対する防御機構に、この Argonaute タンパク質の関与が知られている。例えば線虫において co-suppression や RNAe においても Argonaute ホモログタンパク質が関わっており、これらの Argounaute はスライサー活性のみならず様々な機能を有すことが知られている(Ketting and Plasterk 2000, Shirayama et al., 2012)。そこで先ず、ワカレオタマボヤにおける Argonaute のホモログタンパク質を探す為に、OikoBase を用いて *Drosophila melanogaster* の Argonaute3(NP_001036627)をクエリにして Blastp を行った(Database には Odioica_GeneModels_peptides_reference_v1.0 を用いた)。得られた多数の候補をそれぞれ SMART(http://smart.embl-heidelberg.de)を用いてドメイン検索を行い、Argonaute ファミリータンパク質の特徴である PAZ ドメインと PIWI ドメインの 2 つを有すものを検索した。この結果、8 つの Argonaute 候補遺伝子(GSOIDP00000331001, GSOIDP00000333001, GSOIDP00009497001, GSOIDP00004070001, GSOIDP00010797001, GSOIDP00005316001,

GSOIDP00012941001, GSOIDP00000293001)がワカレオタマボヤで見つかった。これらの候補タンパク質を他の生物で知られている Argonaute ファミリータンパク質(Argonaute および Piwi)と共に系統樹をもとに解析を行った結果(図 17)、ワカレオタマボヤは 7 つの Argonaute タンパク質と 1 つの Piwi タンパク質を有していることが分かった。そこで GSOIDP00000331001, GSOIDP00000333001, GSOIDP00009497001, GSOIDP00004070001, GSOIDP00010797001, GSOIDP00005316001, GSOIDP00012941001, GSOIDP00000293001 をそれぞれ Ago1, Ago2, Ago3, Ago4, Ago5, Ago6, Ago7, Piwi とし、これらのクローニングを試みた。この結果、Ago1, Ago2, Ago3, Ago6, Piwi の 5 つに対して cDNA の部分配列が得られたが、残りの 3 つに関してはクローニングを行っても目的のバンドを得ることができなかった。Ago1, Ago2, Ago3, Ago6, Piwi の PCR 断片による機能阻害現象への関与を調べる為に、これらを標的にした dsRNA(dsRNA-Ago1, dsRNA-Ago2, dsRNA-Ago3, dsRNA-Ago6, dsRNA-Piwi)と共に *Brachyury* に対する PCR 断片 PCR-intron を注入した時の機能阻害の効果の違いを検証した。すなわち、もしこれらの Argonaute タンパク質が PCR 断片による機能阻害に影響を及ぼすのであれば、dsRNA で Argonaute の機能を抑制している状況下では PCR 断片による機能阻害の効果が弱まると期待した。この共注入の結果、それぞれの dsRNA 注入個体の 70%以上において shrunken tail 表現型が観察され、normal を示す個体はほとんど見られなかった(図 18)。これまで Ago4, Ago5, Ago7 に関しては調べることはできていないが、Ago1, Ago2, Ago3, Ago6, Piwi に関しては、Argonaute の機能阻害によって PCR 断片による機能阻害の効果の減少は引き起こされず、今回の結果からは Argonaute の関与は示されなかった。

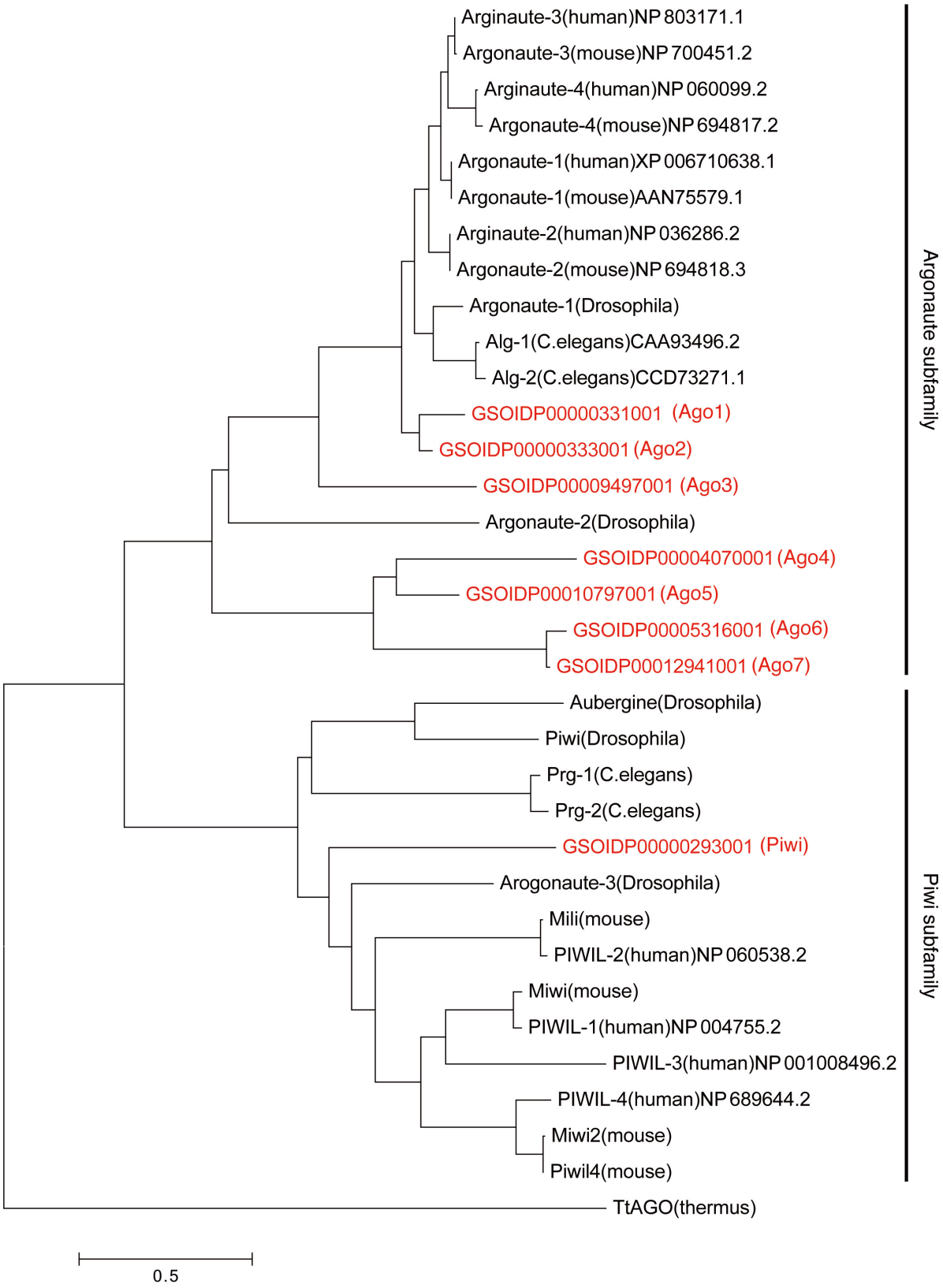


図 17　Argonaute ファミリータンパク質の分子系統樹

高度好熱菌、線虫、ハエ、マウス、ヒトにおける Argonaute ファミリータンパク質とともにワカレオタマボヤにおける 8 個の Argonaute 候補タンパク質の分子系統樹を作成した。この結果、GSOIDP00000331001, GSOIDP00000333001, GSOIDP00009497001, GSOIDP00004070001, GSOIDP00010797001, GSOIDP00005316001, GSOIDP00012941001 は Argonaute サブファミリーに、GSOIDP00000293001 は Piwi サブファミリーに分類された。

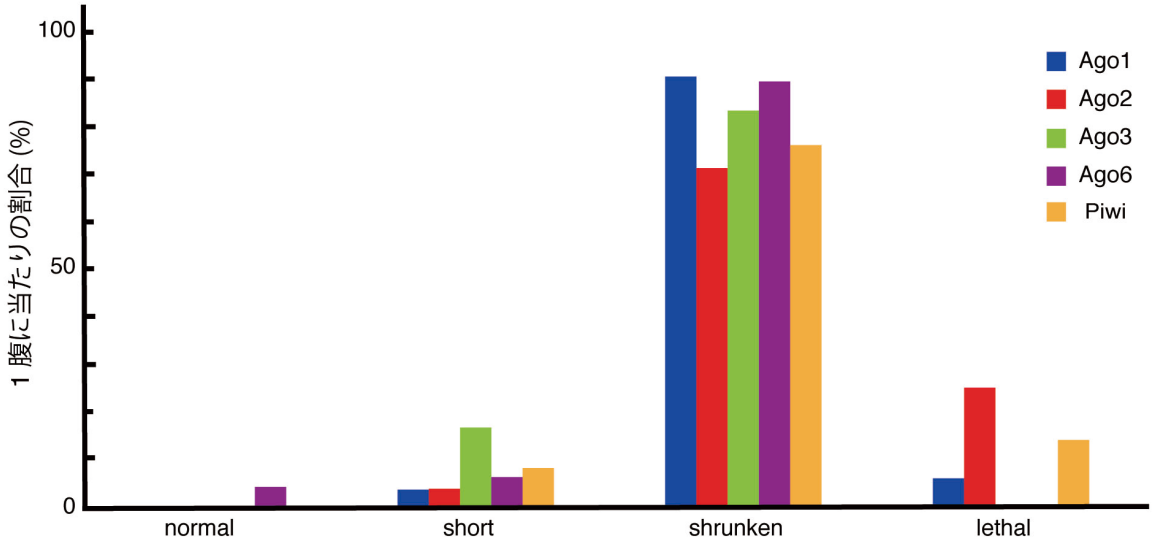


図 18　Argonaute ノックダウン下での PCR-5'Bra-1 の効果

それぞれの Argonaute に対する dsRNA と共に PCR-5'Bra-1 を注入した際に得られた表現型の割合。それぞれ一腹の親においてのみ実験を行った。

考察

本研究によって、ワカレオタマボヤにおいて二重鎖 DNA によって誘導される新規の遺伝子機能抑制現象を発見した。この現象は、ゲノムに組み込むことなく細胞内に DNA を取り込むことで引き起こされる機能阻害であるという点で、これまで一部の生物で報告されている DNAi に一致している。このことから今回発見したこの現象をワカレオタマボヤにおける DNAi と呼ぶことにした。これまでに DNAi は一部の植物、ゾウリムシ、高度好熱菌でのみ報告された現象であった。よって本研究の成果によって多細胞動物において初めての DNAi の例が示された。このワカレオタマボヤにおける DNAi は以下の 2 つの点でこれまでに植物でなされている報告と異なる。まず 1 つに標的配列による効果の違いである。植物における DNAi ではコーディング配列を含む DNA の注入によってのみ機能阻害が引き起こされるが、ワカレオタマボヤにおける DNAi では exon 領域のみならず、UTR 上流配列、UTR、intron によっても同等な機能阻害の効果が得られた。

2 つ目の大きな違いは DNAi を引き起こす為に必要な二重鎖 DNA の構造である。植物における DNAi では環状 DNA であっても、DNA 断片であっても同様に機能阻害の効果を示すのに対し、ワカレオタマボヤでは直鎖 DNA 特異的に引き起こされた。

本研究において、5'UTR のさらに上流を標的にする PCR 断片によっても同様に機能阻害が引き起こされることを示した。よってワカレオタマボヤにおける DNAi は mRNA の分解のみならず転写阻害によっても機能阻害が引き起こされうることを示した。PCR 断片を注入した際、ワカレオタマボヤゲノム上の標的配列における DNA のメチル化は見られなかった。DNAi による転写阻害はヒストンの修飾等を介して引き起こされているのかもしれない。

今回の研究では、この DNAi を引き起こす分子メカニズムを明らかにすることはできなかった。線虫における様々な外来性核酸に対する防御機構(RNAi, co-suppression, RNAe)はそれぞれ異なる Argonaute を介していることが示されている(Baulcombe 2004, Ketting and Plasterk 2000, Shirayama et al., 2012)。また高度好熱菌における DNAi では Argonaute の関与が明らかになっている(Swarts et al., 2014)。ワカレオタマボヤは少なくとも 8 個の Argonaute タンパク質を持っているので、それぞれ異なる Argonaute が RNAi や DNAi に関わっており、多数の Argonaute タンパク質を持つことで外来核酸に対する防御機構を進化させたのかもしれない。しかしながら今回行った実験の範囲内では、ワカレオタマボヤにおける DNAi への Argonaute の関与は見られなかった。今回 dsRNA を共注入することで Argonaute の機能を阻害することを試みたが、Argonaute は卵巣内および体細胞内で恒常的に発現しているため、既に十分なタンパク質が細胞内には含まれていると考えられる。よってこの Argonaute の関与を解析する為にはそれぞれの Argonaute 遺伝子のノックアウト個体をもとにして検証を行う必要があるであろう。

またこの DNAi の現象に small RNA が関与しているかという問題も残されたままである。注入した PCR 断片から small RNA が転写されこれをもとにサイレンシングが引き起こされているという可能性が考えられる。しかし *Brachyury* の上流配列を標的にした PCR-5'Bra-1 は高い効率で機能阻害を引き起こしたが、これと同じ配列を標的にした dsRNA ではこの機能阻害はみられなかった。このことから DNAi と RNAi は少なくとも異なる仕組みを用いていると考えられる。プラスミド DNA の制限酵素処理を行う位置によって DNAi の効率が大きく異なったという結果は、この DNAi に関わるメカニズムを考えるにあたって助けになるであろう。今回の結果から直鎖 DNA であっても 5'側に余分な長い配列が付いていると、この DNAi の効果は消失すると考えられる。この効果の消失は、二重鎖 DNA の標的配列の認識、標的配列への結合、small RNA の合成等の過程においてプラスミドバックボーンの配列が影響を及ぼす為に生じているという可能性が考えられる。

しかしながら現段階で得られている情報だけではこの問題を結論付けることはできない。このような可能性を考える為にも PCR-EGFP を注入した個体において EGFP に対する small DNA や small RNA が合成されているかを調べることは重要であろう。

今回の実験結果は、多細胞動物で初めての DNAi の例であるが、この現象がどれだけ保存された現象であるかということは興味深い問題である。これまでにマボヤにおいてマボヤの *Brachyury* に対する PCR 断片を注入し機能阻害の効果を検証したが、マボヤにおいては DNAi の効果は観察されなかった(data not shown)。今後様々な生き物で検証を行うことで DNAi が RNAi の様に広く保存された機構であるかどうかが明らかになるであろう。

今回の実験結果から、DNAi 法では 100 bp 以上の配列を標的にし 0.1 μg/μL 程度の濃度条件で卵巣内顕微注入を行うことによって効果的に機能阻害を引き起こすことが可能であることが分かった。この DNAi 法は簡便でかつ安価な遺伝子機能解析の手法となる。これまでに一般に用いられている遺伝子機能阻害法である MO は研究室内での合成は困難であり、高価である上に、MO の標的配列によってその機能阻害の効果が大きく異なる。この為、大規模な機能阻害スクリーニングを行うには MO は不向きであった。また RNAi に用いる dsRNA の合成は研究室内で可能であるが、PCR 断片を作成するだけの DNAi に比べると、合成には数倍の時間と費用を要する。このように簡便に機能阻害を行うことが可能な DNAi を用いることでワカレオタマボヤでは大規模なスクリーニングが可能になるであろう。また卵巣内顕微注入法を用いることで RNAi 同様、卵形成過程での遺伝子機能解析も可能である。そこでこの DNAi 法の利点を活かし、第 4 章では DNAi 法を用いた遺伝子スクリーニングについて述べる。

第四章: DNAi を利用した母性因子のスクリーニング

序論

前章までに示した様にワカレオタマボヤでは卵巣内に直接溶液を顕微注入することが可能であるため、RNAi や DNAi 法を用いることで卵形成過程から母性因子の機能を抑制することが可能となった。これまではほとんどの生物で母性因子の機能阻害を行うことが困難であったため、機能解析が行われているのは一部の動物の母性因子に限られていた。またその存在が予見されているが実体が未だ同定されていない母性因子も知られている。例えば多くの動物で、植物半球決定因子はマターナルに受け継がれるタンパク質であると考えられている。ホヤでは β-catenin は未受精卵中で細胞質中に一様に存在しており、32 細胞期以降 β-catenin タンパク質が植物半球でのみ核内に移行し、植物半球特異的な遺伝子発現を活性化する(Kawai et al., 2007)。この β-catenin による植物半球の発生運命決定様式は無脊椎動物で広く保存された機構である。そして、植物半球特異的に β-catenin を核内に移行させる植物半球決定因子として未受精卵中で植物半球に局在するタンパク質の存在が予想されているが、これまでいかなる生物でもはっきりと特定されてはいない。このように母性因子の胚発生過程における働きは、多くの生物で研究が困難である為に未解決な問題が多数残されている。

そこでワカレオタマボヤの「卵巣内で遺伝子機能抑制が可能である」という利点を活かして母性因子に対する DNAi スクリーニングを試みた。母性因子の機能阻害スクリーニングを行うことで、これまでその存在が予想されてはいるがその実体が見つかっていなかった母性因子の発見や、母性因子のこれまで知られていなかった胚発生過程への関わりを明らかにすることができると期待される。第三章で述べた様に、ワカレオタマボヤにおける DNAi は、PCR 断片を注入するだけで機能阻害が可能であるため、cDNA ライブラリーからランダムに取り出した特定の遺伝子の機能を抑制することが容易であり、網羅的な解析に適した手法である。本研究では、まずサブトラクションクローニングを行い卵巣特異的に発現している mRNA の cDNA ライブラリーを作成した。この cDNA ライブラリーからランダムに取り出した cDNA を鋳型に PCR で増幅した断片を混ぜ合わせてプールにし、このプールを顕微注入することで一度に複数の遺伝子の機能阻害を行った。その後、異常が見られたプールに含まれる候補遺伝子を 1 つずつ DNAi により機能阻害することで異常を引き起こす原因遺伝子の特定を行った。

結果

卵巣特異的 cDNA ライブラリーのクオリティーチェック

本研究では卵巣特異的に発現している遺伝子に対して DNAi スクリーニングをおこなう為に、まず卵巣特異的に発現する mRNA の cDNA ライブラリーの作成を行った。その為に卵成熟過程のメスの体幹部及び卵巣で発現している mRNA の cDNA から、成熟過程のオスの体幹部及び精巣で発現している mRNA の cDNA をサブトラクションすることにより卵巣特異的に発現する遺伝子が濃縮された cDNA ライブラリーを作成した。ちなみにワカレオタマボヤにおいてメスとオスの体幹部にはほとんど形態の差がない。得られた cDNA ライブラリーにおいてオスで発現が見られることが分かっている遺伝子がサブトラクションされているかどうかを調べる為に、サブトラクションの効率を解析した。この解析は、サブトラクションを行った cDNA ライブラリーとサブトラクションを行っていない cDNA ライブラリーをそれぞれ鋳型にして、オスとメスの間に発現差が見られる遺伝子と見られない遺伝子をそれぞれ増幅するプライマーを用いて PCR を行い、増幅が確認されるサイクル数をサブトラクションを行ったライブラリーとサブトラクションを行っていないライブラリー間で比較することで行った。PCR を行うに先立って OikoBase 上の Gene Expression Matrix をもとにメスとオスの間で発現差が見られる遺伝子と見られない遺伝子を調べた。OikoBase の Gene Expression Matrix では発生ステージごとの発現量のみならず ovary, testis, trunk の組織ごとの発現量を調べることが可能である(図 19a)。これをもとにして卵巣と精巣の間に発現量の差がある遺伝子と差がない遺伝子をそれぞれランダムに選択した。今回解析に用いたのは、オスでは発現が見られない遺伝子(GSOIDG00003424001)、メスでオスの 11 倍(GSOIDG00001740001)、2.1 倍(GSOIDG00001682001)、1.7 倍(GSOIDG00001134001)発現する遺伝子、オスの方が多く発現する遺伝子(GSOIDG00001205001, GSOIDG00001089001, GSOIDG00001739001)の 7 種である(図 19a)。これらの遺伝子に対して PCR を行った結果、サブトラクションがうまく行われていることが分かった。オスでは発現が見られない遺伝子(GSOIDG00003424001)では 15 サイクル目で、メスでオスの 11 倍発現する遺伝子(GSOIDG00001740001)では 20 サイクル目でサブトラクションライブラリーにおいても、非サブトラクションライブラリーにおいても同様に PCR によるバンドが観察された(図 19b)。すなわちサブトラクションライブラリーと非サブトラクションライブラリーに含まれるこれらの遺伝子の cDNA のコピー数には差がないと考えられる。一方で例えばメスにおいてオスの 2.1 倍発現が見られる遺伝子(GSOIDG00001682001)は、非サブトラクションライブラリーでは 20 サイクル目からそのバンドが観察されるのに対して、サブトラクションライブラリーでは 35 サイクル目でもほとん

どバンドは見られなかった(図 19b)。このことから GSOIDG00001682001 はサブトラクションによってライブラリー中からほとんど除かれていると考えられる。また 1.7 倍の発現差が見られる遺伝子(GSOIDG00001134001)は非サブトラクションライブラリーでは 20 サイクル目でバンドが見え始めるのに対して、サブトラクションライブラリーでは 25 サイクルでバンドが見え始めている(図 19b)。よって GSOIDG00001134001 はサブトラクションを行うことによって cDNA のコピー数が 1/32 に減少していることが分かった。同様に GSOIDG00001205001 は非サブトラクションライブラリーでは 20 サイクル目でバンドが見えるのに対してサブトラクションライブラリーでは 25 サイクル目で観察され、GSOIDG00001089001 は非サブトラクションライブラリーでは 20 サイクル目でバンドが見えるのに対してサブトラクションライブラリーでは 30 サイクル目で観察され、GSOIDG00001739001 は非サブトラクションライブラリーでは 25 サイクル目でバンドが見えるのに対してサブトラクションライブラリーではバンドが観察されなかった。以上の結果から、GSOIDG00001205001, GSOIDG00001089001, GSOIDG00001739001 もサブトラクションによってコピー数が減少していることが分かった。これらの結果から今回作成したライブラリーはオスとメスの間の発現差が大きいもののみが濃縮され、メスでの発現量がオスの発現量の 2 倍以下の遺伝子はサブトラクションによってライブラリー中から効率的に除かれていると予想される。

この結果をもとに、今回得られた cDNA ライブラリー中にはメスの卵巣と体幹部での発現量がオスの精巣および体幹部での発現量の 2 倍以上である遺伝子のみが含まれていると仮定して、cDNA ライブラリー中に含まれる遺伝子の種類数を推定した。OikoBase 上の Gene Expression Matrix を用いてランダムに 1200 個の遺伝子を選択し少なくとも卵巣で発現する遺伝子の割合を調べたところ、卵巣で発現が確認される遺伝子の数は 431 個(36%)であった。またこの 431 個の遺伝子から 100 個をランダムに検索したところ、ovary+trunk の発現量が testis+trunk の 2 倍以上である遺伝子は 67 個(67%)であった。またオタマボヤの総遺伝子数はおよそ 17000 個である。以上の情報をもとに推定すると、今回得られた cDNA ライブラリー中には 4100 個程度の cDNA 種(17000x0.36x0.67=4100)が存在していると考えられる。また cDNA の作成過程でライブラリー中に含まれる存在量のノーマライゼーションを行っている為、それぞれの cDNA 種は卵巣内での発現量によらず同等の量が cDNA ライブラリー中に含まれていると予想される。この cDNA ライブラリーから無作為に遺伝子を取り出しスクリーニングを行うとすると、再び同じ遺伝子を引いてしまう確率が上昇していってしまう為に、スクリーニングを進めるにつれて標的となる遺伝子が重複してしまう。cDNA ライブラリーに卵巣特異的遺伝子 4100 種類が均一に存在していると仮定すると、ある回数顕微注入を行った時に X 回重複して機能阻害される遺伝子の数 N(X)はポアソン分

布に従うため、顕微注入を行った数と実際に解析が行われた遺伝子の数の関係は図 20 のようになると予想される。

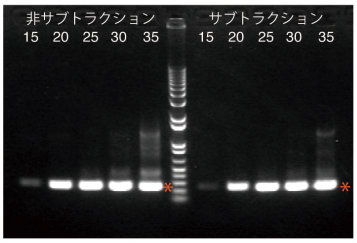
a

	組織ごとの発現量			雌雄の発現量		雌雄の発現比		
	trunk	ovary	testis	メス(trunk+ovary)	オス(trunk+testis)	メス	オス	サブトラクションの結果
GSOIDG00003424001	0	30205	0	30205	0	30205.00	0	されなかった
GSOIDG00001740001	0	11963	1088	11963	1088	11.00	1	されなかった
GSOIDG00001682001	2959	3286	0	6245	2959	2.11	1	された
GSOIDG00001134001	0	5090	2930	5090	2930	1.74	1	された
GSOIDG00001205001	0	1952	2001	1952	2001	0.98	1	された
GSOIDG00001089001	759	3410	3929	4169	4688	0.89	1	された
GSOIDG00001739001	8989	7866	17712	16855	26701	0.63	1	された

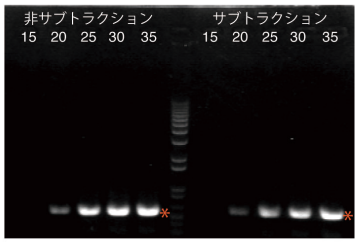
b

サブトラクションされていない遺伝子

GSOIDG00003424001(メスのみ)

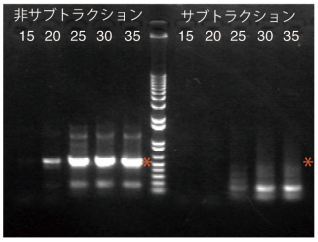


GSOIDG00001740001(メスで 11 倍)

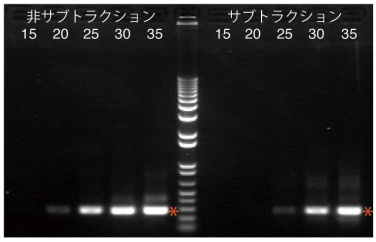


サブトラクションされた遺伝子

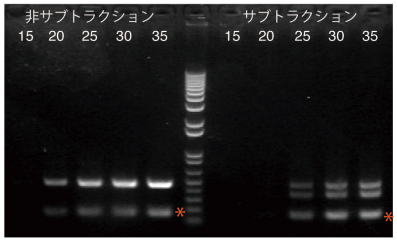
GSOIDG00001682001(メスで 2.1 倍)



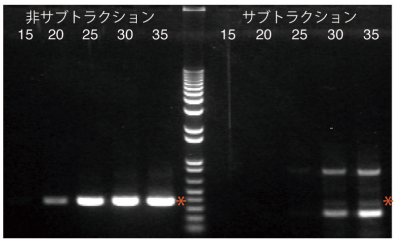
GSOIDG00001134001(メスで 1.7 倍)



GSOIDG0001205001(オスの方が多い)



GSOIDG00001089001(オスの方が多い)



GSOIDG00001739001(オスの方が多い)

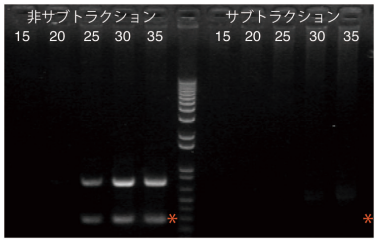


図 19　卵巣特異的 cDNA ライブラリーにおけるサブトラクションの効率の確認

a:GSOIDG00003424001, GSOIDG0000174001, GSOIDG00001682001, GSOIDG00001134001, GSOIDG0001205001, GSOIDG00001089001, GSOIDG00001739001 の遺伝子の発現量。組織ごとの発

現量(trunk, ovary, testis)は OikoBase の Gene Expression Matrix より得た。この値をもとにメス(trunk+ovary)とオス(trunk+testis)の発現量、発現比をもとめた。また PCR によって調べたサブトラクションの結果をまとめた。 b: それぞれの遺伝子に関してサブトラクションを行って作成した cDNA ライブラリーとサブトラクションを行わないで作成した cDNA ライブラリーを用いて PCR をおこない、それぞれの cDNA ライブラリーに含まれる遺伝子のコピー数を比較した。泳動写真中の左側半分がサブトラクションを行っていない cDNA ライブラリーの 15, 20, 25, 30, 35 サイクルにおける PCR の増幅を、右側半分がサブトラクションを行ったライブラリーの 15, 20, 25, 30, 35 サイクルにおける PCR の増幅を示している。*は目的のバンドの位置を示す。

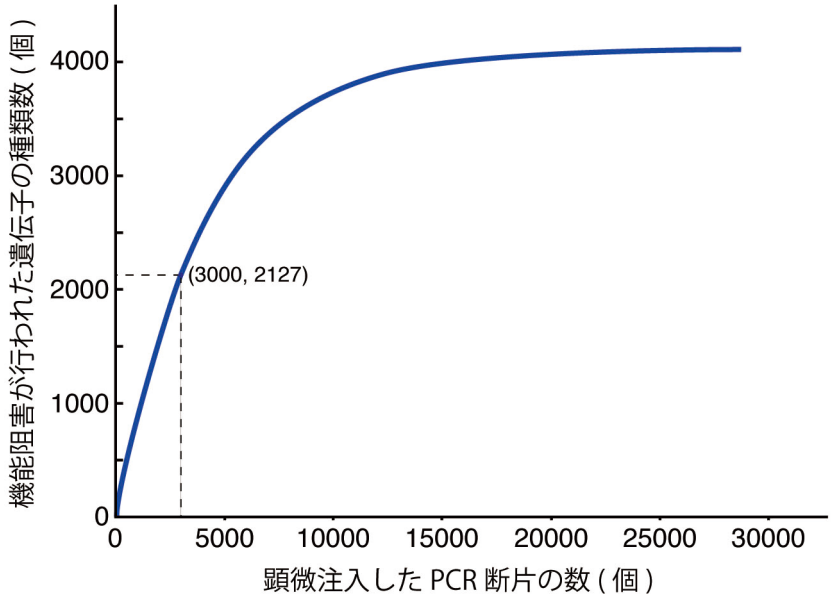


図 20　顕微注入した PCR 断片の数と実際に機能阻害が行われた遺伝子の種類数の関係

cDNA ライブラリー中には同じ遺伝子が複数コピー含まれている為、スクリーニングをするに従って機能阻害を行った遺伝子が重複する。4100 個全ての遺伝子が同じ確率でランダムに取り出されるとすると、y 個の PCR 断片を顕微注入したとき、4100 個の遺伝子は λ=y/4100 回平均で機能阻害が行われたことになる。x 回重複して阻害される遺伝子の数はポアソン分布に従う為、x 回阻害される遺伝子の数を N(x)とすると、N(x)=4100*(e^-λ)*(λ^x)/x!となる。よって一度も阻害されていない遺伝子の数 N(0)=4100*e^-λとなるので y 個の PCR 断片を注入した時に実際にスクリーニングが行われた遺伝子の数は 4100*{1-(e^-λ)} (λ=y/4100)となる。これをもとに横軸に顕微注入した PCR 断片の数、縦軸に実際に機能阻害が行われた遺伝子の種類数をプロットした。

スクリーニング条件の検討

今回のスクリーニングでは複数個の遺伝子クローンをまとめてプールにし、このプールをもとにスクリーングを行った。そこでスクリーニングを行う為の条件検討として、1 つのプール当たりにいくつの遺伝子クローン由来の PCR 断片を混ぜ合わせるかという条件の検討を行った。スクリーングを行うにあたって最適なプールは、①表現型の異常を十分に引き起こすことができる、②顕微注入を容易に行うことができる(顕微注入用の針内で詰まらない)、③1 つのプール内で複数の異常を示す表現型が重ならない、という３つの条件を満たす必要があり、その中でもっとも一度に沢山の遺伝子をスクリーニングできる条件を採用することとした。そこで 5 個のクローンを含むプールと 10 個のクローンを含むプールをそれぞれ作成し効果の違いを検証した。ここで用いたのは単独で注入を行っても孵化幼生において異常を示さないことが既に確認されている clone 61-64 の 4 種類もしくは clone 61-69 の 9 種類のクローンを鋳型にして合成した PCR 断片に PCR-Bra-248bp を混ぜたものである。これらプールはそれぞれのクローンを鋳型に別々に PCR を行った後に、混ぜ合わせて精製を行い、最終的にどちらも 30 μL の水に溶かすことにより得たものである。よって 5 個のプールと 10 個のプールにそれぞれ含まれている PCR-Bra-248bp の濃度は同じ(およそ 0.3 μg/μL)であると考えられる。これらを注入した結果、5 個のプールを注入した場合には 85±6%が shrunken tail を示すのに対して、10 個のクローンを含むプールでは 68±8%に減少し、さらに 5 個のプールでは観察されなかった注入マーカーの蛍光を発するにもかかわらず正常な個体が 9±9%得られた(図 21)。またこの顕微注入を行うにあたって 5 個のプールを注入する際には詰まりは生じなかったのに対して、10 個のプールでは高い確率で針が詰まってしまった。このせいで、注入には針の先端をより太く折らなければならず顕微注入の成功率が低かった。以上の結果から、スクリーニングには 5 個のクローンを含むプールを用いることにした。今回の比較実験ではそれぞれのプールに含まれる PCR-Bra-248bp の濃度は同じであると考えられるが、今回 10 個のプールで PCR-Bra-248bp による機能阻害の効果が小さく現れた。この 1 つの解釈としては、DNAi を行うのに必要な因子(RNAi における Argonaute のようなもの)と結合する際に複数種類の PCR 断片がこの因子を取り合うことになるため、この因子と結合している PCR-Bra-248bp の数が少なくなることになり効果が小さく現れたという可能性が考えられる。

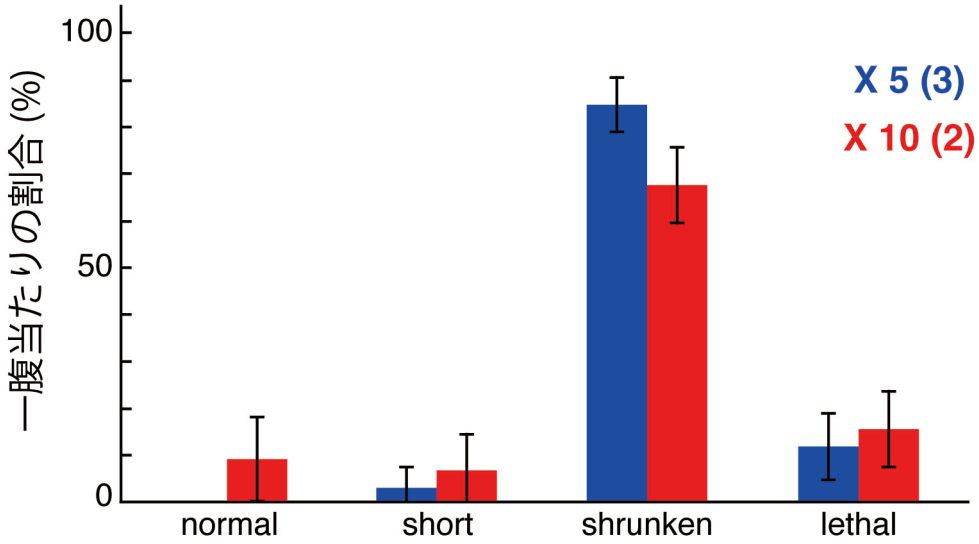


図 21　5 個のクローンを含むプール(x5)と 10 個のクローンを含むプール(x10)の機能阻害の効果

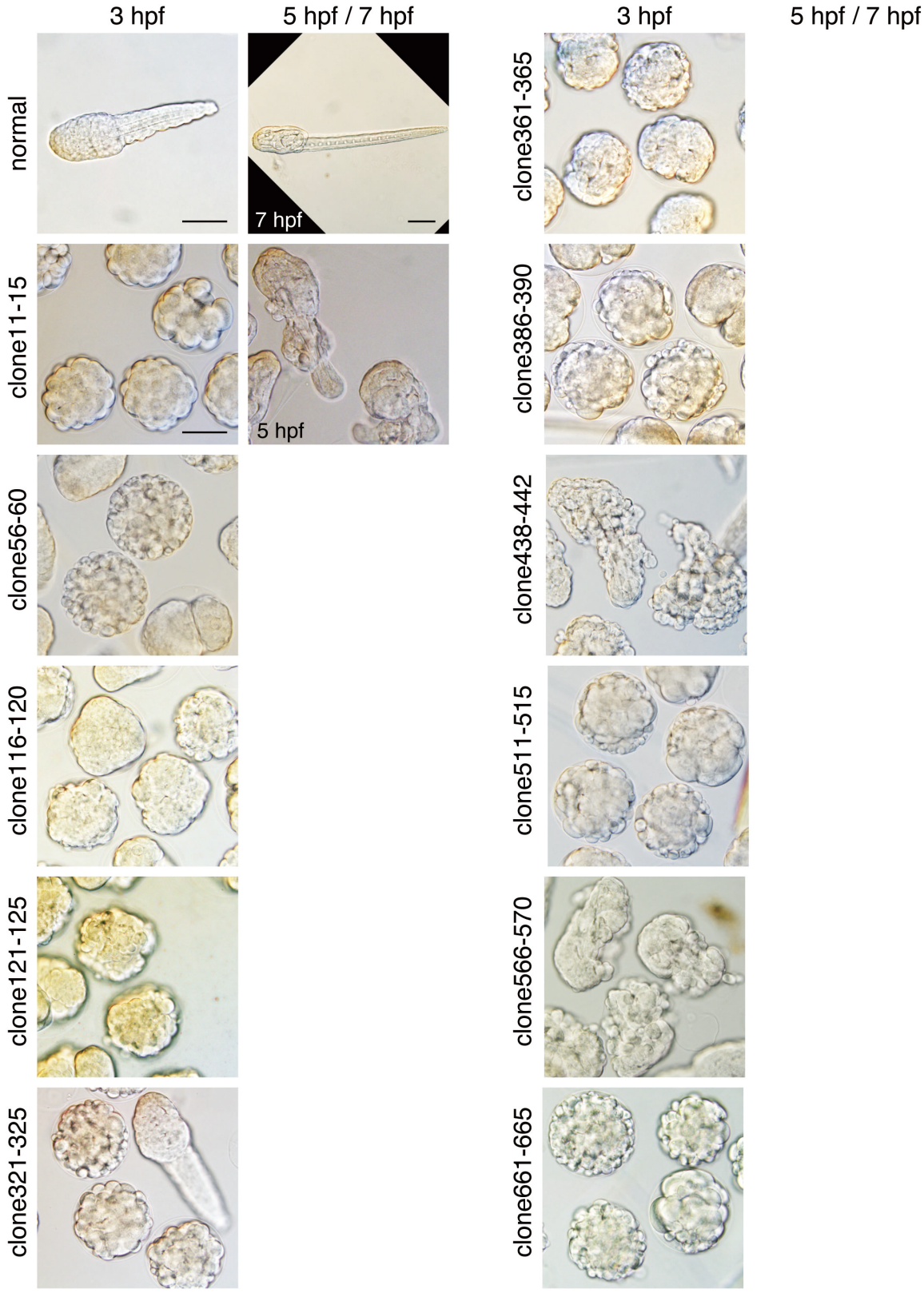
5 個のクローンを含むプールと 10 個のクローンを含むプールを注入した時の PCR-Brachyury-248bp の機能阻害効果をそれぞれ分類した。グラフはそれぞれの一腹から得られた子供の中でのその表現型の割合を何回かの実験について平均したものを示す。実験に用いたそれぞれの腹の数を()内に示した。垂直のバーは標準偏差。

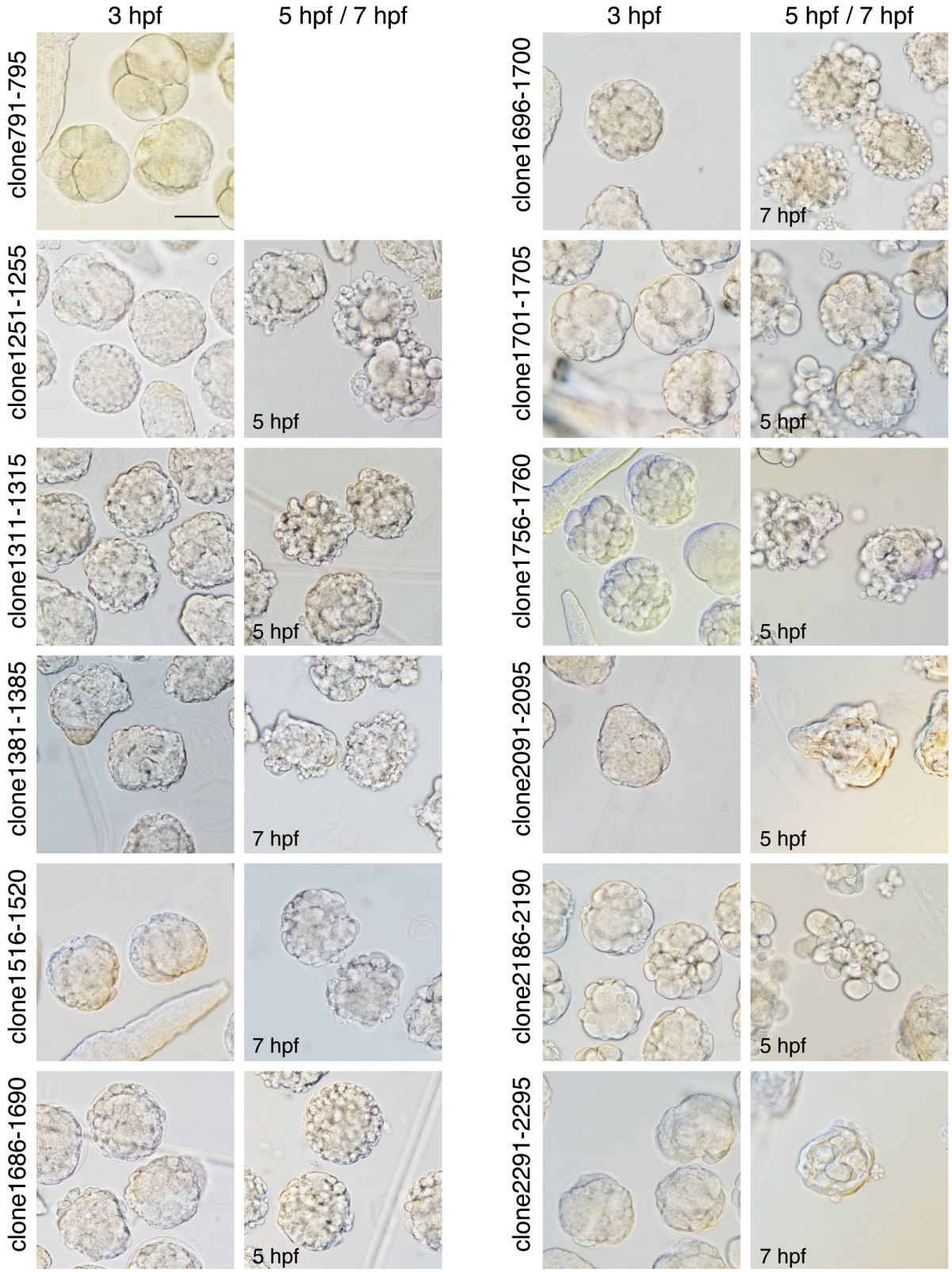
プールの顕微注入によるスクリーニング

cDNA ライブラリーから大腸菌のコロニーをランダムに 1 つずつ選択して、ミニプレップを行うことで clone 1 から clone 3000 までのプラスミドを得た。これらを鋳型にしてそれぞれ別々に PCR を行った後に、5 つずつ混合し精製することで pool 1(clone 1-5)から pool 600(clone 2995-3000)を作成した。これらのプールをそれぞれ顕微注入することで卵巣特異的なクローン 3000 個の DNAi スクリーニングを行った。図 20 のグラフから計算すると、これは 2127 種類の遺伝子に匹敵することが分かる。

このスクリーニングを行う際の指標として、孵化直後に何らかの異常を示したプールを異常を引き起こす原因遺伝子が含まれる候補プールとした。また孵化直後に正常発生と同じ様に尾部の伸長が観察されたプールには異常を引き起こす原因遺伝子が含まれないとしてこのプールを以降の解析から除いた。異常を示したプールの基準として、注入マーカーの蛍光を示す個体のうち 90%以上で何らかの異常を示した場合を候補プールとした。なお、非注入個体から得られる卵においてもバッチによっては高い発生異常を示す為、この基準で異常を示すと判断された候補プールの中には、注入とは無関係に異常を示したものも含まれていると予想されるが、プールの候補を絞

る段階ではこの点は考慮せずに行うこととした。また PCR-catenin1, PCR-catenin2 注入胚では注入マーカーの蛍光を示すもののみならず、蛍光を示さない個体においても高い割合で同様の異常を示したが、今回のスクリーニングにおいては注入マーカーの蛍光を示さない個体の表現型は考慮に入れなかった。以上の基準をもとにしてスクリーニングを行った結果、600 プール中 26 プールで異常が観察された(図 22)。


3 hpf
5 hpf / 7 hpf
3 hpf
5 hpf / 7 hpf
normal
7 hpf
clone11-15
5 hpf
clone56-60
clone116-120
clone121-125
clone321-325
clone361-365
clone386-390
clone438-442
clone511-515
clone566-570
clone661-665


3 hpf
5 hpf / 7 hpf
3 hpf
5 hpf / 7 hpf
clone791-795
clone1251-1255
clone1311-1315
clone1381-1385
clone1516-1520
clone1686-1690
clone1696-1700
clone1701-1705
clone1756-1760
clone2091-2095
clone2186-2190
clone2291-2295
5 hpf
5 hpf
7 hpf
7 hpf
5 hpf
7 hpf
5 hpf
5 hpf
5 hpf
7 hpf

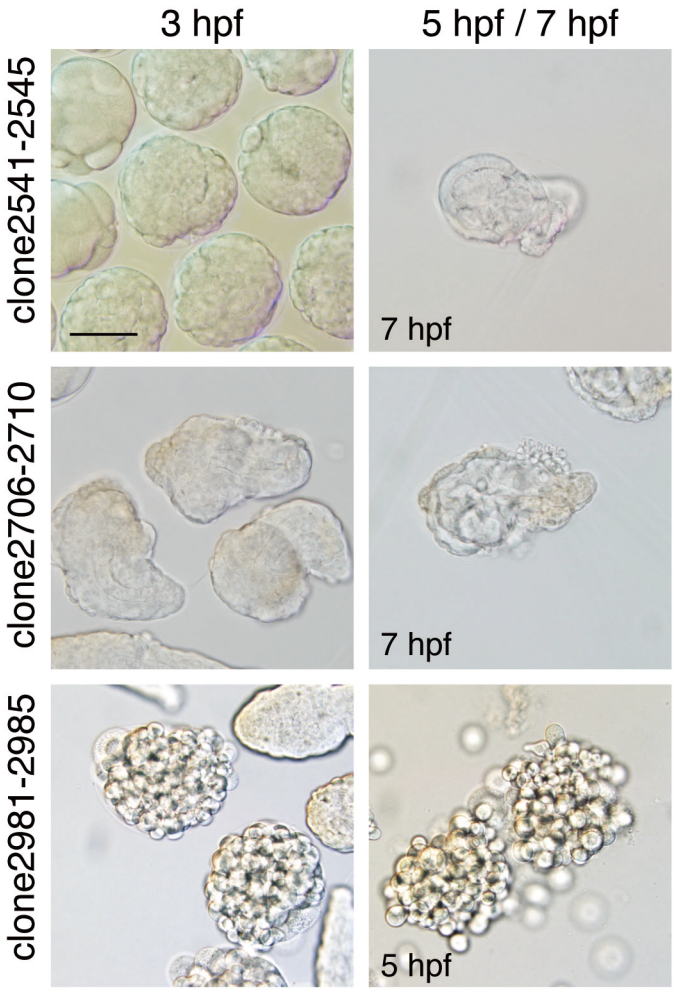


図 22　顕微注入した際に異常を示したプールの表現型

pool 1 から pool 600 までを注入した際に、3 hpf の孵化直後に異常を示したプールの表現型を示す。写真は 3 hpf および 5 hpf もしくは 7 hpf。5 hpf と 7 hpf のどちらかは写真左下に記した。スケールバーは 50 μm。

クローンの顕微注入によるスクリーニング

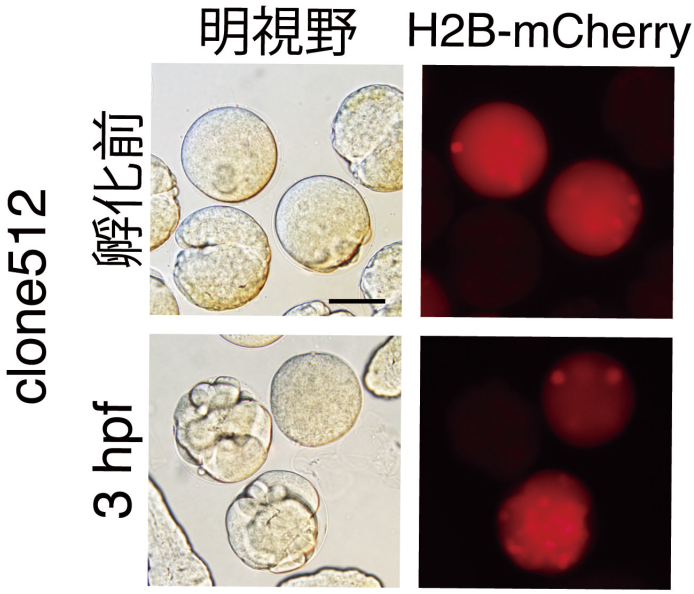
これまでに得られた候補プール 26 個に含まれる原因遺伝子を特定する為に、それぞれのプールに含まれる 5 個の遺伝子に対する PCR 断片を個別に作成し、DNAi によって 1 つずつ機能阻害をした。なお、これ以降の実験は当研究室の修士一年松尾正樹氏との共同研究として行われたものである。その結果 clone 56, clone 322, clone 438, clone 512, clone 663, clone 1760, clone 2186 の 7 個で原因遺伝子が特定された(図 23)。これらプールの残りの 4 つのクローンを注入した場合は正常に孵化幼生となることを確認した。これらの原因遺伝子によって引き起こされる表現型は、それぞれのプールを注入した際に引き起こされた表現型と一致した(図 22, 23)。また個別のクローンの注入によって異常が観察されなかったプールが 19 個存在し、これらに対して再度プール全体を顕微注入して機能阻害を行ったが、これらのプールでは異常が再現されなかった。これらのプールに関して最初に観察された異常は、注入された DNA とは無関係に卵のバッチのクオリティーによる発生異常であったと考えられる。得られた 7 個のクローンによって引き起こされる表現型は、

以下の 3 つに分類することができる。①初期の細胞分裂の異常、②孵化時にオタマジャクシ型になるが細胞が解離した異常、③孵化時にオタマジャクシ型にならず細胞が解離した異常。この 3 つにそれぞれのクローンの注入の結果を分類して図 23 に示した。①の初期の細胞分裂の異常に分類されるクローンは、2.5 hpf において観察すると細胞分裂が見られない、もしくは明確な分裂が見られず表面が隆起しているだけの表現型が見られた(図 23a)。この細胞分裂を行っていない様に見える個体において、H2B-mCherry の局在により核を観察すると、複数の核が観察された。3 hpf 以降に卵膜がなくなると、一見細胞分裂を行っていない様に見えた個体の中には、大きな複数個の細胞で構成された個体も観察された。この様に①に分類される表現型は全く細胞分裂を行わない、もしくは数回の異常な細胞分裂の後に分裂が停止した結果生じたものと考えられる。②の孵化時にオタマジャクシ型になるが細胞が解離した異常では、孵化後くびれは観察されるが尾部の伸長が見られなかった。また表層に位置する細胞が解離していた。③の孵化時にオタマジャクシ型にならず細胞が解離した異常に関しては、孵化時にくびれは観察されず、細胞境界がくっきりとしていた。また発生が進むにつれてこれらの細胞はさらに解離していった。

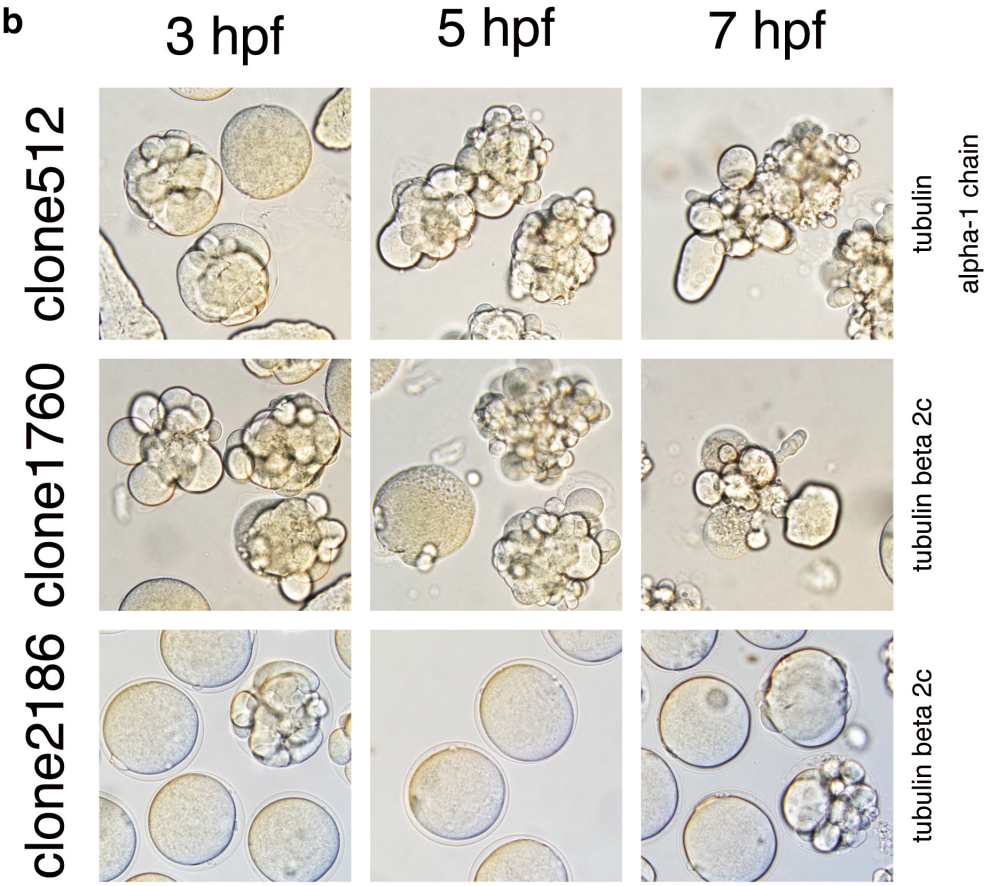
次に特定したクローンのシークエンス解析を行い、得られた配列をもとに OikoBase を用いて blastn(Database には Odioica_Genemodels_transcripts_reference_v1.0 を用いた)を行い原因遺伝子の同定を行った(表 1, 図 23b-d)。この結果 clone 512 以外のクローンに関しては検索に用いた配列に広範囲にわたって一致する配列が得られたが、clone 512 に関しては相同な配列は OikoBase 上ではヒットしなかった。OikoBase はゲノム配列からコンピュータープログラムによって予想される cDNA 配列に対して検索を行うため、検索に用いた配列が UTR である場合にはヒットしない可能性が考えられる。そこで未受精卵および幼生から抽出した total RNA をもとに RNAseq を行い作成した西田研のデータベース(Wang et al., 2015)を用いて blastn(Database には 86,898 trinity transcripts [Japan]を用いた)を行い全長配列を取得し、この全長配列をもとに再度 OikoBase で blastn(Database には Odioica_Genemodels_transcripts_reference_v1.0 を用いた)を行うことにより遺伝子の同定を行った。これにより検索に用いた配列の大部分にわたって相同な配列が得られ、確かに clone 512 の配列は一部 5'UTR に含まれていた。解析の結果 clone 663 は OikoBase の Gene Expression Matrix 上では trunk, testis, ovary 共に発現が見られないが、その他のクローンに関しては確かに精巣に比べ卵巣で発現が多く観察される遺伝子であった。

a

①初期の細胞分裂の異常

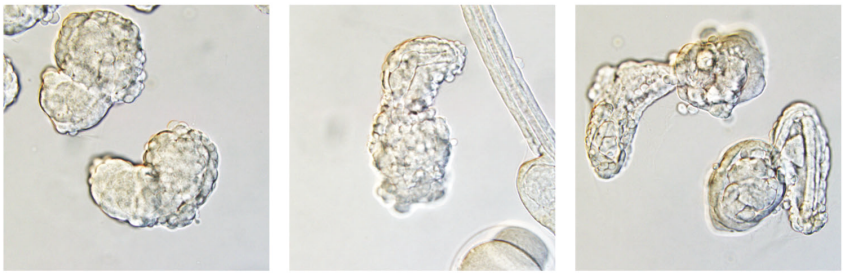


b



c

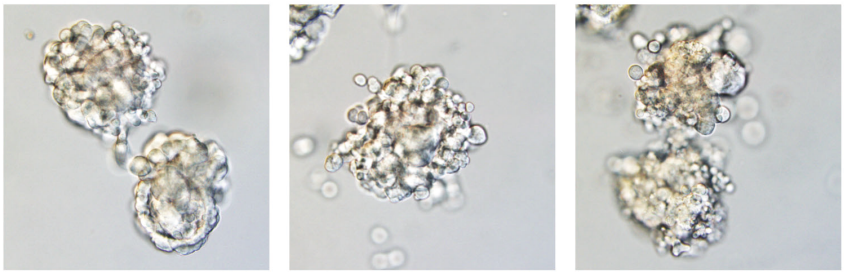
②オタマジャクシ型



chromosome segregation 1-like

d

③細胞が解離した塊



cadherin-6 precursor

catenin alpha-1

rpa-interacting protein a

図 23　顕微注入した際に異常を示したクローンの表現型

異常を示したプールに含まれるクローンをそれぞれ独立に注入することにより、異常を引き起こしていた原因遺伝子 clone 56, clone 322, clone 438, clone512, clone663, clone 1760, clone 2186 の 7 個が特定された。これらのクローンを注入した際の表現型をもとに、①初期の細胞分裂の異常(a, b)、②オタマジャクシ型(c)、③細胞が解離した塊(d)に分類し並べた。OikoBase で予想されるタンパク質名を図の右側に記した。(a)①の初期の細胞分裂の異常の代表として clone 512 の孵化前(2.5 hpf)と孵化直後(3 hpf)の明視野と H2B-mCherry の蛍光を表す。mCherry が濃縮されている点が核に相当する。スケールバーは 50 μm。

clone	GSOIDT	長さ(bp)	遺伝子の特徴	異常のタイプ	trunk	testis	ovary
56	GSOIDT00011474001	720	cadherin-6 precursor	③	2030	0	1983
322	GSOIDT00013374001	323	chromosome segregation 1-like (cerevisiae)	②	0	0	15920
438	GSOIDT00013235001	643	catenin alpha-1	③	3687	0	3683
512	GSOIDT00000916001	192	tubulin alpha-1 chain	①	0	3464	5124
663	GSOIDT00013373001	840	rpa-interacting protein a	③	0	0	0
1760	GSOIDT00006170001	393	tubulin beta 2c	①	6759	3723	5333
2186	GSOIDT00002011001	374	tubulin beta 2c	①	8477	3034	26186

表 1　同定したクローンのシークエンスの結果

clone 56, clone 322, clone 438, clone512, clone663, clone 1760, clone 2186 においてシークエンス解析を行った。表には clone 番号、シークエンス結果をもとに OikoBase において blastn を行い特定された識別番号(GSOIDT)、挿入されている cDNA の長さ、OikoBase 上で予想されるタンパク質名、表現型の異常タイプ、Gene Expression Matrix による trunk, testis, ovary での発現量を示す。表現型の異常タイプはそれぞれ①初期の細胞分裂の異常、②孵化時にオタマジャクシ型になるが細胞が解離した異常、③孵化時にオタマジャクシ型にならず細胞が解離した異常を意味する。

考察

本研究では卵巣特異的に発現している遺伝子3000個のスクリーニングを行ない7個の初期発生期に異常を示す遺伝子を同定した。スクリーニングを進めるにしたがって、重複して機能阻害が行われる遺伝子の数が増加する。このことを加味して今回の結果を考えると、3000クローンのスクリーニングによって2127種類の遺伝子をスクリーニングしたことになる(図20)。卵巣特異的に発現しているcDNAのライブラリー中には4100種類の遺伝子が含まれている為、今回のスクリーニングによって51.9%の卵巣特異的遺伝子が調べられたと考えられる。

今回の実験で得られた7種類の遺伝子の機能阻害による表現型を分類すると、7種類のうち3種類の遺伝子(clone 512, clone 1760, clone 2186)では細胞分裂に異常が生じる個体が得られた(図23a, b)。これらの異常を引き起こす遺伝子の解析の結果、clone 512はtubulin alpha-1 chain、clone 1760はtubulin beta 2c、clone 2186はtubulin beta 2cと予測された(clone 1760とclone 2186はそれぞれ異なる遺伝子によってコードされる)。これらは全て微小管に関わるタンパク質であるという結果は、細胞分裂の異常という表現型に合致する。また1種類(clone 322)は、オタマジャクシ型の形態を形成するが細胞が部分的に解離しており、7 hpfまでに形が崩れていく表現型が得られた。この異常を引き起こすclone 322はchromosome segregation 1-likeと予想された。残りの3種類(clone 56, clone 438, clone 663)に関しては、孵化時にオタマジャクシ型の形態を取らない細胞の解離した塊であり、7 hpfまでにさらに形が崩れていく表現型が得られた。これらの異常を引き起こす遺伝子の解析の結果、clone 56はcadherin-6 precursor、clone 438はcatenin alpha-1, clone 663はrpa-interacting protein aと予測された。cadherin-6 precursorやcatenin alpha-1は細胞接着に関わる分子であることから、今回の細胞が解離するという表現型は細胞接着に異常が生じたことによって得られたと考えられる。

これまでにゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、線虫においては卵巣内で発現する遺伝子の機能阻害スクリーニングがなされている。これにより得られた表現型の多くは卵形成に関わる異常であった(Kemphues et al., 1988, Schüpbach and Wieschaus 1989, Dosch et al., 2004, Kishimoto et al., 2004, Piano et al., 2000)。しかし、今回行ったワカレオタマボヤにおける卵巣特異的遺伝子のスクリーニングでは未受精卵の形や大きさは正常に見え、卵形成の異常を示す様な表現型は得られなかった。今回卵巣内顕微注入を行ったタイミングは、卵核と哺育核が分離し卵核の周りに卵膜が形成され始めるP3ステージと、実際に卵を形成する卵核が選択され細胞質が流入するP4ステージの間のタイミング(Ganot et al., 2008)に相当すると考えられる。このタイミングで機能阻害を行っても既に卵細胞質形成が十分に行われており、既に存在するタンパク質のみで十分卵形成が行

われる為に、今回の結果では卵形成に異常を示す様な表現型は見られなかったと考えられる。また母性因子に関しても注入時に既にタンパク質として十分量が存在している因子に関しては、十分な機能阻害の効果が得られない可能性が考えられる。

卵巣特異的に発現しているβ-catenin は今回のスクリーニングでは引っかかってこなかった。今回は約 50%の遺伝子しかスクリーニングできていないため、β-catenin がその中に含まれていなかったのかもしれない。またプールでは卵巣内で翻訳されている母性因子に対しては十分な効果が得られなかった結果、β-catenin が引っかかってこなかった可能性も考えられる。しかし卵巣内顕微注入による DNAi 法で、単独で機能阻害を行った場合にはβ-catenin の機能阻害の効果が受精後すぐに観察されている(図 12)ことから、この方法による母性因子のスクリーニングはある程度は効果的な手法であると考えられる。

今回の母性因子のスクリーニングでは、卵内で局在しており胚発生の軸形成に関わる様な母性因子の同定が当初の目的(期待)であった。しかし、現状ではその様な表現型を明確に示すようなクローンは得られていない。調べた約 2000 遺伝子の中にそのような遺伝子が含まれていたかどうかは、今のところ不明であるが、今後の進展により、その様な興味深い表現型をもたらす様なクローンが得られることを期待したい。

第五章: 総括と今後の展望

本論文では、①RNAi および DNAi という 2 つの遺伝子機能阻害法を確立した。②卵巣特異的遺伝子の 51.9%をスクリーニングし 7 個の初期発生期に異常を示す表現型を同定した。という 2 つの研究をおこなった。

① RNAi および DNAi という 2 つの遺伝子機能阻害法を確立した。

これまでにワカレオタマボヤではゲノム配列の決定が行われ、またマイクロアレイを用いて様々な発生ステージごとの遺伝子発現プロファイリングがなされていた。その一方でワカレオタマボヤでの遺伝子機能抑制法が確立されていなかった為に蓄積しているこれらの情報を利用して遺伝子機能解析を行うということができなかった。しかしながら本研究により RNAi 法および DNAi 法が確立されたことでワカレオタマボヤにおいて初めて遺伝子機能解析が可能となった。また単に遺伝子機能解析法が確立されただけでなく、卵巣顕微注入法を用いることで卵形成過程での遺伝子機能阻害が可能となった。

また DNAi はこれまで植物、ゾウリムシ、高度好熱菌でのみ報告されていた現象であったが、今回初めて多細胞動物でも保存されていることが明らかになった。このことから DNAi の発見は単に遺伝子機能解析法を確立したのみならず、生物が外来核酸に対する防御手段を進化させてきた歴史を考える上で大きな意味を持つと考えられ、この現象が他の生物で保存されているかを明らかにすることは興味深い。またこの DNAi がどのようなメカニズムで引き起こされているのかということはまだまったくの未解決な問題である。ワカレオタマボヤは少なくとも 8 個の Argonaute タンパク質を有していることを確認しており、ワカレオタマボヤではこのように Argonaute を多数有することで DNAi という遺伝子抑制機構を発達させたのかもしれないということが考察される。しかし、この Argonaute の DNAi への関与を明らかにする為にはワカレオタマボヤでのノックアウト法を確立する必要があり、現段階では解析が困難である。

② 卵巣特異的遺伝子の 51.9%をスクリーニングし 7 個の初期発生期に異常を示す表現型を同定した。

ほとんど全ての生物において母性因子の機能阻害は技術的に困難であった為に、これまでの研究は一部の動物における母性因子の発生過程への関わりしか明らかでなかった。本研究ではワカレオタマボヤにおいて卵巣特異的に発現している遺伝子の 51.9%に対してスクリーニングを行い

7 個の遺伝子による初期発生の異常を示す表現型を明らかにした。今回発見した遺伝子は細胞接着や細胞分裂に関わる因子であった。本研究では得られた遺伝子の詳細な機能の解析には至っていないが、今後の研究で細胞タイプ特異的なマーカーを用いて得られた表現型をより詳細に解析することによって、これらの母性因子の胚発生における詳細な機能を解明することができると期待できる。

第六章: 材料と方法

採集と飼育

実験材料となるワカレオタマボヤは兵庫県赤穂市坂越港、兵庫県相生市突崎湾において採取を行った。ワカレオタマボヤは砂底でない内海で多く採取可能であることが経験的に知られていたため、この点を考慮しながら採取地点を探索した。岸壁からひも付きバケツを用いて海面表層および表層から 1-2 m の所をすくうことで海水を採取した。採取直後の海水からは成熟したオタマボヤがほとんど得られない為、採取を容易にする為に研究室において一晩から二晩静置することでオタマボヤを成熟させた。この方法により突崎湾ではこれまでに 10 L の海水中に 20 匹前後のワカレオタマボヤが一年を通じて安定的に採取できている。

ワカレオタマボヤの飼育は Nishida (2008), Spada et al., (2001) をもとに一部変更を加えて行った。ワカレオタマボヤを 20°C で飼育した場合、受精後 5 日目に肉眼で判別可能な成熟した卵巣もしくは精巣を形成する。そして放卵もしくは放精と共にそれぞれの個体は 5 日のライフサイクルを終える。そこで効率的に受精を行い次世代の個体を得る為に、受精後 5 日目の成熟したオス 20-30 匹とメス 20-30 匹を 5 L の人工海水 (レイシーマリン、レイシー株式会社もしくはマリンアート BR、富田製薬株式会社) の入ったボトルに集め、そのなかで受精させた。10 hpf 以降幼生が正常に成長している (尾部が正常に形成されており遊泳している) ことを確認した後、10 L のボトルに人工海水で 2-6.6 倍に希釈した。その後は 10 L バケツ内の個体密度に応じて人工海水で適宜 2-5 倍に希釈し、正常な個体密度 (10 L 中に受精後 3 日目の個体で 200-250 匹程度) を維持した。受精後 4 日目の生殖巣が肉眼で確認できる個体には 10 L のボトル中に 120 匹ピックアップをおこない成熟個体まで成長させた。餌は *Isochrysis galbana* (終濃度 300 cells/ml), *Chaetoceros calcitrans* (300 cells/ml), *Synecococcus* sp. (0.06 ml/L) を朝昼晩の 3 回与えた。この方法によりこれまでに野外からの個体を追加することなく closed colony を 2 年以上安定的に飼育している。

RNA, DNA の卵巣内顕微注入法

顕微注入は以下の要領で行った。卵巣がある程度発達した適切なステージのメス(卵母細胞の輪郭が顕微鏡下で観察されず、生殖巣が透明のステージ)を 0.015% MS-222 中で麻酔後、0.9%寒天シャーレ上に一滴の人工海水と共に落とし、ほとんど海水のない寒天上に個体をトラップすることでワカレオタマボヤを固定した。注入にはガラス管 (GD-1, NARISIGE)をマイクロピペットプラー (P-97, SUTTER)で作製したガラス針を用いて、卵巣内側の空洞に貫通しないよう針先を卵巣内壁

付近にまで刺し込み、1 mg/ml のフェノールレッドを用いて可視化した mRNA 溶液の注入を行った。この際、ガラス針が卵巣内壁を貫通してしまうと注入した試料はワカレオタマボヤ体内に拡散して卵巣内には広がらず、また卵巣外膜付近で注入すると注入した溶液は体外に逆流してしまうため、卵巣内壁になるべく近い位置で適量を注入する必要がある。卵巣内に注入された場合には、顕微鏡下で卵巣内壁が内側に向かって丘状に赤く膨らむ様に見える。注入済みの個体はゼラチンでコートした 6 穴シャーレ中に 1 匹ずつ移し、産卵まで飼育した。通常、受精後 5 日目の個体に顕微注入を行った場合、注入後 8-10 時間程度で産卵する。

蛍光性色素 1 mM ローダミン・デキストランを卵巣内に顕微注入した場合、産卵されたほとんど全ての卵においてその蛍光が観察されるが、蛍光タンパク質 EGFP にヒストン H2B を融合したタンパク質をコードする *H2B-EGFP* mRNA を注入した場合には、産卵された卵全体の 22% (± 10% SD)の卵でのみ蛍光が観察され、その蛍光強度は卵ごとに異なった。このことから蛍光色素と mRNA の卵巣内での拡散の速度は異なると考えられ、mRNA は卵巣内の一部に濃度勾配を持って拡散し、顕微注入を行った位置からの距離に依存した濃度の mRNA が個々の卵母細胞内に取り込まれ、取り込まれた mRNA の濃度に従った EGFP の蛍光強度が観察されたものと考えられる (大内 2010)。このように RNA を卵巣内に顕微注入した場合、一部の卵母細胞にしか取り込まれない為、実験の際には、実験で用いる RNA 溶液を取り込んだ卵と取り込んでいない卵を区別する為の注入マーカーが必要となる。そこで本研究では *H2B-EGFP* mRNA もしくは *H2B-mCherry* mRNA を注入マーカーとして共に注入することで、産卵された卵における EGFP もしくは mCherry の蛍光の有無を指標に RNA を取り込んだ卵の選別を行った。

卵巣内顕微注入法は、標的のサイズが大きいため注入が容易であり、一度の顕微注入で 20-50 個程度の RNA 注入済み未受精卵が得られ、得られる卵に対して顕微注入による物理的なストレスが小さいことから卵細胞顕微注入法に比べて優れている。卵巣内顕微注入を行うには成熟前のメスとオスを選別する必要がある。成熟前のワカレオタマボヤには肉眼で確認できる明確な雌雄の差がないが、顕微鏡下で生殖巣を観察すると卵巣は精巣に比べ不規則な大きさの粒子が観察されテクスチャーが荒いように見える。一方で精巣は一様な細かい粒子が観察され、卵巣に比べて滑らかかつ均質に見える。またオスのワカレオタマボヤでは輸精管が顕微鏡下で確認できる為、これをもとに選別することも可能である。

cDNA, DNA クローニング、配列決定

本研究で用いた *Brachyury, Acetylcholinesterase, GAPDH, Beta-catenin1, Beta-catenin2* のプラスミ

ドコンストラクトを作成するにあたって *Brachyury*, *Beta-catenin1, Beta-catenin2* cDNA の全長,及び *Acetylcholinesterase, GAPDH* cDNA の部分配列のクローニングと配列決定を行った。*Brachyury, GAPDH* cDNA 合成にあたってまず、孵化幼生由来の total RNA を Nucleospin® RNA XS (MACHEREY-NAGEL)を用いて抽出した後、GeneRacer® kit SuperScript™ III RT Module (Invitrogen)を用いて RACE 用 cDNA ライブラリーを作成した。*Beta-catenin1, Beta-catenin2* cDNA 合成には、未受精卵由来の total RNA を同様に処理して RACE 用 cDNA ライブラリーを作成した。*Acetylcholinesterase* cDNA の合成では、7hpf 幼生由来の total RNA をそれぞれ Nucleospin® RNA XS (MACHEREY-NAGEL)を用いて抽出した後、SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen)を用いて cDNA ライブラリーを作成した。これらのライブラリーをもとに遺伝子特異的プライマー、もしくは GeneRacer® kit SuperScript™ III RT Module キット付属のプライマーを用いてそれぞれの cDNA 配列を増幅し、*Brachyury, GAPDH* cDNA は pCR4-TOPO vector (Invitrogen) に、*Acetylcholinesterase* cDNA は pGEM-T Easy vector (Promega)にサブクローニングした。また *Brachyury*, *Beta-catenin1, Beta-catenin2* は全長配列を得る為に 5'RACE, 3'RACE で得られた部分配列をプラスミド内に挿入したものをもとに再度 PCR を行い 5'側の配列と 3'側の配列を繋ぎ合わせた後に pCR4-TOPO vector にサブクローニングした。pBS-Bra コンストラクトは作成した *Brachyury* cDNA 全長を含むプラスミドから部分配列(720 bp)を増幅し、pBluescript ベクターの *Not*I と *BamH*I の制限酵素サイトの間にサブクローニングした。また *Brachyury* の上流配列から下流配列までを含むゲノム DNA のプラスミドコンストラクトは、*Brachyury* 遺伝子の上流および下流に存在する遺伝子上にそれぞれプライマーを作成し、ゲノム DNA を増幅した後、pCR4-TOPO vector にサブクローニングした。なお用いたプライマー配列は Primer List を参照。また *Zic-like1* は本研究室に所属していた幸西 翔平氏によってクローニングされた(幸西 2011)。

dsRNA の合成

dsRNA を合成する為の鋳型として両端に T7 ポリメラーゼのプロモーター配列をもつ PCR 断片を用いた。標的配列の両端に T7 ポリメラーゼのプロモーター配列を付加したプライマーを作成し PCR でこの鋳型を増幅した。この PCR 産物を Proteinase K 処理、フェノールクロロフォルム抽出、エタノール沈殿により精製した後、T7 RiboMax Express RNAi System (Promega)を用いて dsRNA の作製を行った。3 h の RNA 合成の後、70 °C で 10 min インキュベートし、その後ブロックインキュベーターの設定温度を 37 °C に変更し穏やかに温度を下げていくことでアニーリングを行った。RNaseA, DNase 処理後 dsRNA をフェノールクロロフォルム抽出、イソプロパノール沈殿により精

製した。顕微注入の際、ガラス針のつまりを防ぐため、合成された dsRNA を nuclease free water に溶解の後、15000rpm で 5 min 遠心を行った後、上清を分注し注入用 dsRNA とした。この方法で行った場合 110 μg 程度の dsRNA が合成可能である。

注入 PCR 断片の調整

PCR はプラスミド内に挿入されたワカレオタマボヤゲノム配列もしくは cDNA 配列を鋳型にして、遺伝子特異的プライマーもしくはインサート配列のすぐ外側に設計されているユニバーサルプライマーの配列と共に KOD Plus (TOYOBO)を用いて行った。また exon-20bp、exon-50bp はそれぞれの配列に対するセンス鎖、アンチセンス鎖の合成オリゴ DNA をアニーリングすることで作成した。オリゴ DNA のアニーリングは Sp6 RNA Polymerase (Invitrogen)に付属の 5xSp6 RNA Polymerase buffer 中でサーマルサイクラーを用いて 95°C で 8 min インキュベートの後 25°C まで 90 min かけてゆっくりと温度を下げることによって行った。これらの断片はフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿によって精製した。なお用いたプライマー配列は Primer List を参照。

アセチルコリンエステラーゼ組織化学染色

アセチルコリンエステラーゼ組織化学染色はホヤ類等で筋肉細胞の分化マーカー検出として一般に用いられる手法である。今回の実験では 7 hpf の幼生を 5% formaldehyde 海水中で室温 15 min で固定し、PBSTw で 3 回洗浄を行った後、染色液中で室温、2 h の反応を行った。この後 PBSTw で洗浄し反応を停止した。

ALP 染色

アルカリフォスファターゼ染色はホヤ類等で内胚葉の分化マーカー検出として一般に用いられる手法である。本実験では 7 hpf の幼生を 4%パラホルムアルデヒド中で室温 10 min で固定し、Buffer 3 (100mM Tris-Cl pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM $MgCl_2$)で 3 回洗浄を行った後、染色液中で室温、2 h の反応を行った。この後 PBSTw で洗浄し反応を停止した。

定量リアルタイム PCR

孵化幼生(3.5 hpf)100 匹をもとに Nucleospin® RNA XS (MACHEREY-NAGEL)を用いて total RNA を抽出した。これを鋳型にして Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen)、Oligo$(dT)_{15}$ primer (TaKaRa)を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA から SYBR-Green PCR core reagents kit (PE

Applied Biosystems) を用いて定量リアルタイム PCR を行った。測定には ABI 7300 Real-Time PCR System (PE Applied Biosystems) を用いて、95˚C 15 s, 60˚C 1 min を 40 サイクルで行った。解離曲線の波形および、電気泳動によって PCR で特異的なバンドが増幅されていることを確認した。測定はそれぞれ 3 サンプルずつ行いその平均をとることで qPCR における実験誤差の影響を低減した。結果の解析は正常孵化幼生 200 匹から得た cDNA をもとに、x1/2, x1/4, x1/8, x1/16, x1/32, x1/64 の希釈系列を作り検量線作製の為のスタンダードサンプルとし、相対定量法にておこなった。また *GAPDH* mRNA をリファレンス遺伝子として用いた。用いたプライマー配列は Primer List を参照。

蛍光強度の定量と比較

mRNA、DNA の注入には卵巣内顕微注入法を用いているため、蛍光タンパク質をコードする mRNA を注入した場合、産み落とされた卵全体の 22±10% (n=11)でのみその蛍光は観察され、また取り込まれる mRNA の量がそれぞれ異なる為に示す蛍光強度も卵によって異なる。しかしながら *H2B-EGFP* mRNA と *H2B-mCherry* mRNA の混合液を注入した場合には mCherry に対する EGFP の蛍光強度 (EGFP/mCherry) もしくは EGFP に対する mCherry の蛍光強度 (mCherry/EGFP)は個々の卵間で一定であると考えられる。そこで dsRNA-EGFP , PCR-EGFP を用いた実験では EGFP/mCherry を dsRNA-mCherry, PCR-mCherry を用いた実験では mCherry/EGFP をもとに結果を比較した。取り込んだ卵と取り込んでいない卵を区別する為に、2 hpf の胚において核に蛍光が局在している個体を注入胚とみなし、この胚の蛍光強度を ImageJ (NIH)を用いて定量した。また RNAi の実験で行った未受精卵の解析は、自家蛍光と区別する為に、卵の蛍光強度とバックグラウンドの強度の差が 30 以上であるものを注入卵とみなした。解析は、ImageJ 上で注入胚を一つずつ胚全体を選択しこの範囲の RGB 値の緑、赤の最大値を測定した。この値から卵の背景に見られるバックグラウンドの蛍光強度を差し引いた値をその胚の蛍光強度とした。コントロールと実験群の間で有意差を求める為に Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を行った。

DNA メチル化解析

制限酵素処理により DNA メチル化の解析を行った。実験群、コントロール群共にそれぞれ 50 匹の孵化幼生(3.5 hpf)を液体窒素中で凍結させた後、実験を行うまで-80˚C に保存した。これらの凍結サンプルを 100 μg/ml Proteinase K (Invitroge)を含む DNA 抽出 buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM EDTA, 0.1% SDS)中で 37˚C、一晩反応させ、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿によりゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA 100 ng をメチル化シトシン

を含む配列を特異的に切断するメチル化依存性制限酵素 McrBC (TaKaRa)もしくはメチル化感受性制限酵素 *Hae*II (TaKaRa)もしくは *Hap*II (TaKaRa)中で 37˚C、一晩反応させた。制限酵素処理後、75˚C で 20 min インキュベートすることでこの酵素活性を失活させた。得られたゲノム DNA を鋳型にして、標的配列を含む *Brachyury* ゲノム配列を特異的に増幅させるプライマーを用いて PCR 反応を行い電気泳動で増幅を確認した。PCR 反応は Prime STAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa)を用いて 98˚C 5 sec, 53˚C 30 sec, 68 ˚C 1 min もしくは 98˚C 5 sec, 55˚C 30 sec, 68 ˚C 1 min で 30 サイクル反応させた。メチル化を受けている場合は、*Mcr*BC 処理を行った場合、この PCR を行う領域の間で切断が起こり増幅は見られず、*Hap*II もしくは *Hae*II 処理を行った場合、切断が起こらない為に目的のバンドが検出されるはずである。逆にメチル化を受けていない場合は、*Mcr*BC 処理では増幅が観察され、*Hae*II 処理では増幅が見られないはずである。

RT−PCR によるスプライシング異常の検出

PCR-EGFP もしくは PCR-Bra-intron を注入した孵化幼生(3.5 hpf)100 匹をもとに Nucleospin® RNA XS (MACHEREY-NAGEL)を用いて total RNA を抽出した。この total RNA を鋳型に Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen)、Oligo$(dT)_{15}$ primer (TaKaRa)を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型に Extaq(TaKaRa)を用いて PCR を行った。PCR に用いたプライマーは primer list を参照。PCR の反応条件は 95˚C 30 s, 51˚C 30 sec, 72˚C 1 min を 35 サイクルで行った。

分子系統樹の作成

分子系統樹の作成には、分子進化遺伝学解析ソフト MEGA6 (http://www.megasoftware.net)を用いて行った。解析に用いた配列は、オタマボヤの配列は Oikobase (http://oikoarrays.biology.uiowa.edu/Oiko/index.html)において blastp を行うことにより、またその他の生物の配列は National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/)より取得した。これらの配列を Muscle によりアライメントを取り、ギャップを削り、最尤法によって系統樹を作成した。系統樹には用いた動物種、GeneBank に登録されている遺伝子名とともに Accession No を記した。

ライブラリーの作成

卵巣特異的に発現している cDNA のライブラリーを作成する為に、Nucleospin RNA XS (MACHEREY-NAGEL)を用いて total RNA を抽出し、これをもとに SMARTer™ PCR cDNA

Synthesis Kit (Clontech)を用いて poly A^+ RNA 由来の dsDNA を作成し、PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech)を用いてサブトラクションおよびノーマライゼーションを行った。total RNA 抽出を行うにあたってワカレオタマボヤが成熟する直前(まだ卵母細胞の輪郭が顕微鏡下で観察されず生殖巣が透明の段階)である D5 のメス 7 匹の体幹部(尾部はタングステンナイフで切断し取り除いた)およびオス 8 匹の体幹部(尾部はタングステンナイフで切断し取り除いた)からそれぞれ total RNA の抽出を行った。Nucleospin RNA XS による total RNA 抽出の主な過程は添付のキット説明書に従ったが、より高い回収率を得る為に液体窒素で凍結したサンプルを RA1+TCEP 液にサンプルを溶解する際に pestle ですりつぶすことで完全に溶解させた。また以降の過程に余計な RNA が混入することを避ける為にキット付属の Carrier RNA は加えずに抽出を行った。これにより 3-5 μg の total RNA が得られた。得られた total RNA 1 μg をもとに逆転写反応を行った。基本的な逆転写反応および dsDNA の増幅の過程は SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit 付属の説明書に従ったが、dsDNA の合成、増幅の過程では PCR のサイクル数を検討した結果メス:15 サイクル、オス:13 サイクルでバンドが最も顕著に確認されたことからそれぞれ 14 サイクル、12 サイクルで増幅を行った。また PCR 産物の精製はキット推奨の Nucleo TraP®CR(MACHEREY-NAGEL)による精製ではなくフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製を行った。次に PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit によるサブトラクションおよびノーマライゼーションの原理とその簡単な過程を以下に述べる。PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit では 2 回のハイブリダイゼーションと 2 回の PCR を行うことでサブトラクションとノーマライゼーションを行い卵巣特異的な cDNA を濃縮する(図 24)。メス体幹部由来の cDNA を 2 つに分けそれぞれに別々のアダプターをライゲーションする。この 2 種類アダプターには 5'側に同じプライマー結合配列を持ちその 3'側に異なるプライマー結合配列を持っている。このアダプターを結合したメス体幹部の cDNA と共にオス体幹部の cDNA を過剰量混合し熱変性をかけた後、68 °C でアニーリングする。すると図の a,b,c,d の 4 種類の状態の cDNA が存在することになる。メスとオスの体幹部で発現量の差が小さい cDNA は c の状態をとり、差が大きい cDNA は a または b の状態をとることになる。この時、大量に存在する分子ほど再アニーリング速度が早くなることから、大量に存在する配列の cDNA はより b もしくは c の状態を取る割合が多くる。これによりアニーリング前の cDNA ライブラリーに存在していた分子の数によらず一定の量の cDNA が a の状態を取ることになる(ノーマライゼーション)。このようにして得られた 2 種類のアダプターを持つ 1st ハイブリダイゼーションの産物をそれぞれ温度を変えずに混合し更にアニーリングを行う。すると a,b,c,d の状態の物に加えて新たに e の状態をとる cDNA が得られる。このようにして得られた 2nd ハイブリダイゼーション

産物の陥入末端をDNA polymerase酵素反応により埋めることでeの状態であったcDNAは両端にそれぞれ異なるアダプターを獲得する。このcDNA混合液をもとに先ずアダプターの外側に存在するプライマー結合配列を用いて1st PCRを行うとcの状態にあった物は一次関数的に、eの状態にあった物は指数関数的に増幅される。さらにこの産物をアダプターの内側に存在するプライマー結合配列を用いて2nd PCRを行うとeの状態にあった物を高度に濃縮することができる。このようにしてメスの卵巣内で特異的に発現している遺伝子を特異的に濃縮し、さらにメスの卵巣内での発現量をノーマライズして同等量のcDNAがそれぞれ存在するcDNAライブラリーが得られる。実際の過程はキットに付属のプロトコールに従った。

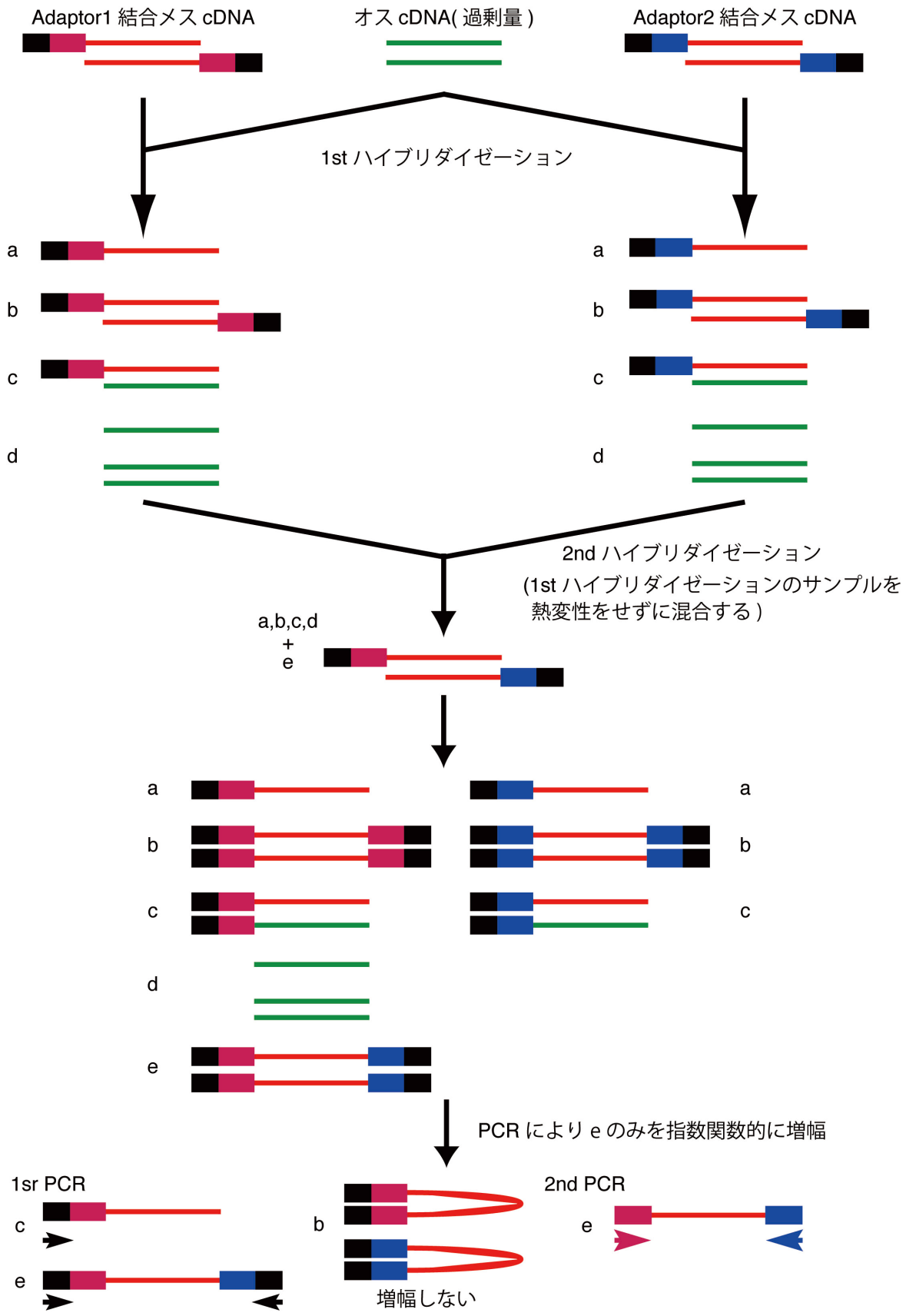

Adaptor1 結合メス cDNA
オス cDNA(過剰量)
Adaptor2 結合メス cDNA
1st ハイブリダイゼーション
a
b
c
d
a
b
c
d
2nd ハイブリダイゼーション
(1st ハイブリダイゼーションのサンプルを
熱変性をせずに混合する)
a,b,c,d
+
e
a
b
c
d
e
a
b
c
PCR により e のみを指数関数的に増幅
1sr PCR
c
e
b
増幅しない
2nd PCR
e

図 24　PCR-Select^{TM} cDNA Subtraction Kit によるサブトラクションクローニングの原理
卵巣特異的な cDNA ライブラリーを得る為に、異なるプライマー認識配列を含むアダプターを結合させたメスの cDNA 2 種類にオスの cDNA をそれぞれ過剰量混合し、2 回のハイブリダイゼーションと 2 回の PCR を行った。

cDNA ライブラリーにおけるサブトラクション効率の確認

cDNA ライブラリーのサブトラクション効率の確認の為の PCR は ExTaq(TaKaRa)を用いて 40 μL の系で行った。PCR の反応条件は 95˚C 30 sec→55˚C 30 sec→72˚C 1min で 15 サイクル行い、ここから 5 μL を分取した後、再度同じ条件で５サイクル PCR を行い 20 サイクルのサンプルを 5 μL 分取した。同様にして 25 サイクル、30 サイクル、35 サイクルで 5 μL ずつ分取した。それぞれのサイクルでのサンプル 5 μL をもとに電気泳動を行いそれぞれのサイクルでのコピー数を比較した。用いたプライマーは図の Primer List を参照。

スクリーニング用顕微注入 PCR 産物の調整

PCR-Select^{TM} cDNA Subtraction Kit を用いて作成した cDNA ライブラリーを 10 倍に希釈したものを TOPO$^{®}$ TA cloning for sequencing(ThermoFisher)を用いてサブクローニングした。10 倍希釈 cDNA 2 μL を 3 μL の系で 30 min 反応させた後、100 μL の DH5α にトランスフォーメーションすると、およそ 300-500 個のコロニーが得られた。同じことを繰り返すことで大量のコロニーを得た。今回はそのうちの 3000 個を用いた。これを一晩液体培養し PureYield^{TM} Plasmid Miniprep System(Promega)を用いてプラスミドを精製した。得られたプラスミドを鋳型に KOD -plus-(TOYOBO), T3 プライマー、T7 プライマーを用いて 50 μL の系で PCR を行った。PCR の反応条件は 98˚C 15 sec→52 ˚C 30 sec→68 ˚C 2.5 min で 35 サイクル行った。これにより得られた PCR 産物をフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製し 30 μL の水に溶解した。この条件で行うとおおよそ 0.3 μg/μL の水溶液が得られる。また pool の顕微注入用サンプルの精製の場合にはそれぞれのクローンは PCR までは個別に行い、フェノールクロロホルム抽出の際にそれぞれのクローンを混合して一度に精製を行い、得られた沈殿は同様に 30 μL の水に溶解した。この方法で調整すると 5 つのクローンを含んだ pool の中にははそれぞれのクローンが 0.3 μg/μL ずつで含まれていると予想される。

products	primer name	location	length(bp)	sequence (5'-3')
for Bra cDNA cloning	3'-brachyury			ccgcagccgacaatcaccgttggaa
for Bra cDNA cloning	nested 3'-brachyury			cctcgccggcaagtccgacggaaaa
for Bra cDNA cloning	5'-brachyury			ggctcggacttggcgacaggaac
for Bra cDNA cloning	nested 5'-brachyury			tctgagcggcactgcggccatttg
for Bra genome cloning	genome_Bra_R2			gacgtgtgagtcgcttccgt
for Bra genome cloning	genome_Bra_F3			gcaaagggtattgaagcactcg
for pBS-Bra cloning	NotI-BraF			gtctggcggccgccggcggaaaacccgaaccacaggtcc
for pBS-Bra cloning	BamHI-BraR			ctacggatccgtcttccaatccggtactgtaatatc
for AChE cloning	AChE-F7			atggagagtttaaaggttccgc
for AChE cloning	AChE-R6			agtcagtattgacgtcgaatcc
for GAPDH cloning	3'-gapdh			gtgctacaagctcaagtacgactc
for GAPDH cloning	nested 3'-gapdh			gctcaagtacgactcgacacatgg
for Zic-like1 cloning	RACE-Zic-like1			ggtagggcttctcggtaaagtgaac
for Zic-like1 cloning	RACE-nested-Zic-like1			atcgtcgatcgcaacctttgaactc
for Beta-catenin1 cloning	RACE-11813001-F			cgctgacgacgctgcacaacatc
for Beta-catenin1 cloning	nested-RACE-11813001-F			gtgcgactcgccggaggcgtccaa
for Beta-catenin1 cloning	RACE-11813001-R			cagagcccgataaccgccttgac
for Beta-catenin1 cloning	nested-RACE-11813001-R			cggaattccgtgccggacagctt
for Beta-catenin2 cloning	RACE-4053001-F			gttagcagctccggccgcctcaa
for Beta-catenin2 cloning	nested-RACE-4053001-F			gcggagttttggcgctcggactt
for Beta-catenin2 cloning	RACE-4053001-R			gaccatcgattgcgctctttcagct
for Beta-catenin2 cloning	nested-RACE-4053001-R			gcgcagatcgctggctctacga
PCR-Bra-full	T7	entire region	4785	taatacgactcactataggg
PCR-Bra-full	T3	entire region	4785	attaaccctcactaaagggac
PCR-Bra-248bp	Bra_938bp-F	exon	248	caggtcccttcatcggtt
PCR-Bra-248bp	Bra_248bp-R	exon	248	acagcaatgaagcgcgtc
PCR-Bra-intron	Bra-intron-100F	intron	100	cgtccatcagtaatttactaga
PCR-Bra-intron	Bra-intron-100R	intron	100	gtttgctcaataagtaaagcg
PCR-Bra-intron-2	Bra-intron-74bp-F	intron	74	ggtaagcttattataaaactc
PCR-Bra-intron-2	Bra-intron-74bp-R	intron	74	tagagtaagatttaaggaataa
PCR-Bra-exon	Bra-exon-100F	exon	100	actaaaggtcttgacgagaac
PCR-Bra-exon	Bra-exon-100R	exon	100	cgggcacccattcgccg
exon-20bp	siDNA-Bra-F	exon	20	gccagcagatcatgcttcac
exon-20bp	siDNA-Bra-R	exon	20	gtgaagcatgatctgctggc
exon-50bp	siDNA-Bra-50bp-F	exon	50	gagaacgcgatgtacaccgtcctccttgacttcaccgcagccgacaatca
exon-50bp	siDNA-Bra-50bp-R	exon	50	tgattgtcggctgcggtgaagtcaaggaggacggtgtacatcgcgttctc
Bra-UTR	Bra-5'UTR-F	5'UTR	100	tcagaaaataacctcgatcct
Bra-UTR	Bra-5'UTR-R	5'UTR	100	aggcacacgtggtgggg
PCR-5'Bra-1	5-up-Bra-F1	5' upstream	177	caatttgtatatcaagcgtata
PCR-5'Bra-1	5-up-Bra-R1	5' upstream	177	ctatttgtttagttagtttgaag
PCR-5'Bra-2	5-up-Bra-F3	5' upstream	177	gacataggacattagacgc
PCR-5'Bra-2	5-up-Bra-R3	5' upstream	177	cactcaatctctcttttaaaaa
PCR-5'Bra-3	5-up-Bra-F4	5' upstream	177	ggaagctcagaagaataataa
PCR-5'Bra-3	5-up-Bra-R4	5' upstream	177	cactttgtattgttttacgaac
PCR-EGFP	partial-EGFP-F		128	gatgccacctacggcaag
PCR-EGFP	partial-EGFP-R		128	atgtggtcggggtagcgg
PCR-mCherry	partial-mCh-F		126	cgcccctacgagggcac
PCR-mCherry	partial-mCh-R		126	ggcggggtgcttcacgta
PCR-thrombospondin	trombospondin-F407	exon+3'UTR	407	cgcgccaaccggtcttc
PCR-thrombospondin	trombospondin-R407	exon+3'UTR	407	cacatttacagtaggaagtac
PCR-Zic-like 1	Od4-448bp-F	cDNA	446	tgttgcttctgtctcctac
PCR-Zic-like 1	Od4-448bp-R	cDNA	446	tatgaacacgaatgtggttg
PCR-AChE	AChE-F7	cDNA	819	atggagagtttaaaggttccgc
PCR-AChE	AChE-R6	cDNA	819	agtcagtattgacgtcgaatcc

products	primer name	location	length(bp)	sequence (5'-3')
PCR-catenin1	catenin1-F	cDNA	498	ttctcagacgctgcatcag
PCR-catenin1	catenin1-R	cDNA	498	gcactttcagaactctggag
PCR-catenin2	catenin2-F	cDNA	530	tctcctcgccggtcgag
PCR-catenin2	catenin2-R	cDNA	530	cggagcgttcgagaagatc
for RT-qPCR of GAPDH	RT-GAPDH-F3			cggagccgattacgtcatc
for RT-qPCR of GAPDH	RT-GAPDH-R3			tcactttctttgcaccgttgt
for RT-qPCR of Bra	RT-Bra-F6			acgagaacgcgatgtacac
for RT-qPCR of Bra	RT-Bra-R6			gattgtcggctgcggtgaa
for RT-qPCR of thrombospondin	RT-thrombospondin-F2			cagtcttcttcgcgcttcta
for RT-qPCR of thrombospondin	RT-thrombospondin-R2			acggagcggaagggcgaa
for maturation check of Bra genome	PCR-CR-Bra1-F3			gatagctgcaagaaatccg
for maturation check of Bra genome	PCR-CR-Bra2-R1			tcagcatcgagaaacgcct
for DNA methylation check	Bra-genome-522bp-F	genome	522	ggcggaaaacccgaacc
for DNA methylation check	Bra-genome-522bp-R	genome	522	tggcggattttcaacgagg
for DNA methylation check	5'-methyl-F	genome	544	ctgccgagtcggaaccct
for DNA methylation check	5'-methyl-R	genome	544	gatcggcttcacttggggc
for dsRNA template	TOPOT7			taatacgactcactatagggcgaattgaatttagcggcc
for dsRNA template	T3T7			taatacgactcactatagggattaaccctcactaaaggga
dsBra-248bp	T7-Bra-248bp-F	exon	248	taatacgactcactatagggcaggtcccttcatcggtt
dsBra-248bp	T7-Bra-248bp-R	exon	248	taatacgactcactatagggacagcaatgaagcgcgtc
dsBra-312bp	T7-Bra-312bp-F	exon	312	ctctaatacgactcactatagggcgaaaacgagccg
dsBra-312bp	T7-Bra-312bp-R	exon	312	ctctaatacgactcactatagggggacactgcgctac
subtraction check	00003424001-F2			ggacacaagtgtcgccctg
subtraction check	00003424001-R			cgatgtgcaggacctctcc
subtraction check	00001682001-F			cgtgacaactggcaggcg
subtraction check	00001682001-R			ctcgcggttcaagctgcgc
subtraction check	00001740001-F			cccgaggaagatgcggag
subtraction check	00001740001-R			tggaactggtgactcttcg
subtraction check	00001739001-F2			cgatcatttacacgccaactg
subtraction check	00001739001-R2			ccaacgtcgatctggattgg
subtraction check	0001205001-F			ccaacgtcgatctggattgg
subtraction check	0001205001-R			tcgactttcgtcgggcgg
subtraction check	00001134001-F			ggaaatgtccagcttcgcc
subtraction check	00001134001-R			gcgtcgacccacgtttgg
subtraction check	00001089001-F			tcccatgtcgccgaggga
subtraction check	00001089001-R			agcgtataagccgccgcg

Primer List

実験に用いたプライマーの情報を記した。表にはそのプライマーを用いて合成される PCR 産物名(products)、プライマー名(primer name)、そのプライマーによって増幅される領域(location)、増幅される産物の長さ(length)、プライマー配列を記した(sequence)。

引用文献

Bassham S, Postlethwait J (2000). *Brachyury* (*T*) Expression in embryos of larvacean urochordate, *Oikoleura dioica*, and the ancestral role of *T*. Dev Biol 220: 322-332.

Baulcombe D (2004). RNA silencing in plants. Nature 431(7006): 356-363.

Chiba S, Jiang D, Satoh N, Smith WC (2009). *brachyury* null mutant-induced defect in juvenile ascidian endodermal organs. Development 136: 35-39.

Cogoni C, Macino G (1999). Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. Curr Opin Microbiol 2(6): 657-662.

Conklin EG (1905). The organization and cell lineage of the ascidian egg. J Acad Nat Sci(Phila)13:1-119.

Czech B, Preall JB, McGinn J and Hannon GJ (2013). A Transcriptome-wide RNAi Screening in the Drosophila ovary reveals factors of the germline piRNA pathway. Mol Cell 50(5): 749-761.

Danks G, Campsteijn C, Parida M, Butcher S, Doddapaneni H, Fu B, Petrin R, Lenhard B, Wincker P, Chourrout D, Thompson EM, Manak JR (2013). OikoBase: a genomics and developmental transcriptomics resource for the urochordate *Oikopleura dioica*. Nucleic Acids Res, 41: D845-D853.

Denoeud F, Henriet S, Mungpakdee S, Aury JM, Da Silva C, Brinkmann H, Mikhaleva J, Olsen LC, Jubin C, Cañestro C, Bouquet JM, Danks G, Poulain J, Campsteijn C, Adamski M, Cross I, Yadetie F, Muffato M, Louis A, Butcher S, Tsagkogeorga G, Konrad A, Singh S, Jensen MF, Huynh Cong E, Eikeseth-Otteraa H, Noel B, Anthouard V, Porcel BM, Kachouri-Lafond R, Nishino A, Ugolini M, Chourrout P, Nishida H, Aasland R, Huzurbazar S, Westhof E, Delsuc F, Lehrach H, Reinhardt R, Weissenbach J, Roy SW, Artiguenave F, Postlethwait JH, Manak JR, Thompson EM, Jaillon O, Du Pasquier L, Boudinot P, Liberles DA, Volff JN, Philippe H, Lenhard B, Roest Crollius H, Wincker P, Chourrout D (2010). Plasticity of animal genome architecture unmasked by rapid evolution of a pelagic tunicate. Science 330: 1381-1385.

Dernburg AF, Zalevsky J, Colaiácovo MP, Villeneuve AM (2014). Transgene-mediated cosuppression in the *C.elegans* germ line. Genes Dev 14(13)1578-1583.

Dosch R, Wagner DS, Mintzer KA, Runke G, Wiemelt AP, Mullins MC (2004). Maternal control of vertebrate development before the midblastula transition: mutants from the zebrafish I. Dev Cell 6(6): 771-780.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic

interference by double-stranded RNA in Caenorohabditis elegans. Nature 391: 806-811.

Frøkjær-Jensen C, Davis MW, Hopkins CE, Newman BJ, Thummel JM, Olesen SP, Grunnet M, Jorgensen EM (2008). Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans.* Nat Genet 40(11): 1375-1383.

Ganot P, Kallesøe T, Thompson EM (2007a). The cytoskeleton organizes germ nuclei with divergent fates and asynchronous cycles in a common cytoplasm during oogenesis in the chordate *Oikopleura*. Dev Biol 302: 577-590.

Ganot P, Bouquet JM, Kallsøe T, Thompson EM (2007b). The Oikopleura coenocyst, a unique chordate germ cell permitting rapid, extensive modulation of oocyte production. Dev Biol 302: 591-600.

Ganot P, Moosmann-Schulmeister A and Thompson EM (2008). oocyte selection is concurrent with meiosis resumption in the coenocystic oogenesis of Oikopleura. Dev Biol 324(2): 266-276.

Hannon GJ (2002). RNA interference. Nature 418: 244-251.

Imai K, Takeda N, Satoh N, Satou Y (2000). β-catenin mediates the specification of endoderm cells in ascidian embryos. Development, 127(14): 3009-3020.

Jorgensen R (1990). Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. Trends Biotechnol 8(12): 340-344.

Kawai N, Iida Y, Kumano G and Nishida H (2007). Nuclear Accumulation of β-catenin and Transcription of Downstream Genes Are Regulated by Zygotic Wntα and Maternal Dsh in Ascidian Embryos. Dev Dyn, 236(6): 1570-1582.

Kemphues KJ, Kusch M, Wolf N (1988). Maternal-effect lethal mutations on linkage group II of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 120(4): 977-986.

Ketting RF, Plasterk RH (2000). A genetic link between co-suppression and RNA interference in C.elegans. Nature 404: 296-298.

Kishimoto Y, Koshida S, Furutani-Seiki M, Kondoh H (2004). Zebrafish maternal-effect mutations causing cytokinesis defect without affecting mitosis or equatorial vasa deposition. Mech Dev 121(1): 79-89.

Kotani T, Kawakami K (2008). *misty somites*, a maternal effect gene identified by transposon-mediated insertional mutagenesis in zebrafish that is essential for the somite boundary maintenance. Dev Biol 316(2): 383-396.

Kugler JE, Kerner P, Bouquet JM, Jiang D, Di Gregorio A (2011). Evolutionary changes in the notochord genetic toolkit: a comparative analysis of notochord genes in the ascidian *Ciona* and larvacean

Oikopleura. BMC Evol Biol, 11: 21.

Makabe KW, Kawashima T, Kawashima S, Minokawa T, Adachi A, Kawamura H, Ishikawa H, Yasuda R, Yamamoto H, Kondoh K, Arioka S, Sasakura Y, Kobayashi A, Yagi K, Shojima K, Kondoh Y, Kido S, Tsujinami M, Nishimura N, Takahashi M, Nakamura T, Kanehisa M, Ogasawara M, Nishikata T and Nishida H (2001). Large-scale cDNA analysis of the maternal genetic information in the egg of Halocynthia rorezi for a gene expression catalog of ascidian development. Development 128: 2555-2567.

McCrea PD, Gu D (2010). The catenin family at a glance. J Cell Sci, 123(Pt5): 637-642.

Minokawa T, Yagi K, Makabe KW, Nishida H (2001). Binary specification of nerve cord and notochord cell fates in ascidian embryos. Development 128: 2007-2017.

Nishida H (1992). Regionality of egg cytoplasm that promotes muscle differentiation in ascidian, Halocynthia rorezi. Development 116: 521-529.

Nishida H (1993). Localized regions of egg cytoplasm that promote expression of endoderm-specific alkaline phosphatase in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Development 118: 1-7.

Nishida H (1994). Localization of egg cytoplasm that promotes differentiation to epidermis in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Development 120: 235-243.

Nishida H, Sawada K (2001). macho-1 encodes a localized mRNA in ascidian eggs that specifies muscle fate during embryogenesis. Nature 409: 724-729.

Nishida H (2008). Development of the appendicularian *Oikopleura dioica*: Culture, genome, and cell lineages. Dev Growth Differ 50: 239-256.

Nishiyama A, Fujiwara S (2008). RNA interference by expressing short hairpin RNA in the Ciona intestinalis embryo. Dev Growth Differ 50(6): 521-529.

Pal-Bhadra M, Bhadra U and Birchier JA (1997). Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of Alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is Polycomb dependent. 90(3): 479-490.

Piano F, Schetter AJ, Mangone M, Stein L, Kemphues KJ (2000). RNAi analysis of genes expressed in the ovary of *Caenorhabditis elegans.* Curr Biol 10(24) 1619-1622.

Prodon F, Yamada L, Shirae-Kurabayashi M, Nakamura Y, Sasakura Y (2007). *Postplasmic/PEM* RNAs with multiple roles in cell polarity and development in Ascidian embryos. Dev Dyn 236(7): 1698-1715.

Schüpbach T, Wieschaus E (1989). Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila*

melanogaster. I. maternal effect mutations. Genetics 121(1): 101-117.

Seo HC, Kube M, Edvardsen RB, Jensen MF, Beck A, Spriet E, Gorsky G, Thompson EM, Lehrach H, Reinhardt R, Chourrout D (2001). Miniature genome in the marine chordate *Oikopleura dioica*. Science 294: 2506.

Shirayama M, Seth M, Lee HC, Gu W, Ishidate T, Conte D Jr, Mello CC (2012). RNAs Initiate an Epigenetic Memory of Nonself RNA in the C.elegans Germline. Cell 150(1): 65-77.

Spada F, Steen H, Troedsson C, Kallesøe T, Spriet E, Mann M, Thompson EM (2001). Molecular Patterning of the Oikoplastic epithelium of the larvacean tunicate *Oikopleura dioica*. Biol Chem 276: 20624-20632.

Stach T, Winter J, Bouquet JM, Chourrout D, Schnabel R (2008). Embryology of a planktonic tunicate reveals trace of sessility. Proc Natl Acd Sci USA 105: 7229-7234.

Suzuki MM, Bird A (2008). DNA methylation landscapes: provocative insight from epigenomics. Nat Rev Genet 9(6): 465-476.

Swarts DC, Jore MM, Westra ER, Zhu Y, Janssen JH, Snijders AP, Wang Y, Patel DJ, Berenguer J, Brouns SJ, van der Oost J(2014). DNA-guide DNA interference by a prokaryotic Argonaute. Nature 507(7491): 258-261.

Treen N, Toshida K, Sakuma T, Sasaki H, Yamamoto T, Sasakura Y (2014). Tissue-specific and ubiquitous gene knockouts by TALEN electroporation provide new approaches to investigate gene function in Ciona. Development 141(2): 481-487.

Tsuboi H, Sutoh K, Wada M (2012). Epigenetic memory of DNAi associated with cytosine methylation and histone modification in fern. Plant Signal Behav 7(11): 1477-1483.

van der Krol A, Mur LA, Beld M, Mol JM, Stuitje AR (1990). Flavonoid genes in Petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. Plant Cell 2(4): 291-299.

Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. Cell 95(2): 177-187.

Wang K, Omotezako T, Kishi K, Nishida H, Onuma TA (2015). 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 225(3): 149-159.

Wianny F, Zernicka-Goetz M (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in

early mouse development. Nat Cell Biol 2(2):70-75.

Ruiz F, Vayssié L, Klotz C, Sperling L, Madeddu L (1998). Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. Mol Biol Cell 9(4):931-943.

大内 一晃 (2010). ワカレオタマボヤを用いた遺伝子導入系統作成に向けた技術開発. 大阪大学大学院平成 21 年度修士論文.

幸西 翔平 (2011). ワカレオタマボヤにおける CAB 様構造体の解析. 大阪大学大学院平成 22 年度修士論文.

山村 真利奈 (2009). 尾索動物ワカレオタマボヤへの高効率な遺伝子導入. 大阪大学大学院平成 20 年度修士論文.

発表リスト

報文目録

Tatsuya Omotezako, Atsuo Nishino, Takeshi A. Onuma, Hiroki Nishida. (2013) RNA interference in the appendicularian *Oikopleura dioica* reveals the function of the *Brachyury* gene. Development Genes and Evolution 223(4): 261-267

Tatsuya Omotezako, Takeshi A. Onuma, Hiroki Nishida. (2015) DNA interference in the appendicularian *Oikopleura dioica*. Proceedings of the Royal Society of London B 282(1807): 20150435

Kai Wang, Tatsuya Omotezako, Kanae Kishi, Hiroki Nishida, Takeshi A. Onuma. (2015) Maternal and zygotic transcriptomes in the appendicularian, *Oikopleura dioica*: novel protein-encoding genes, intra-species sequence variations, and trans-spliced RNA leader. Development Genes and Evolution 225(3): 149-159

講演目録

口頭発表

○Tatsuya Omotezako, Hiroki Nishida. "Development of RNA interference method in appendicularian *Oikopleura dioica*" National Tsing Hua University-Osaka University Life Science Student Activity Fair 2013. Osaka. May. 2013.

○Tatsuya Omotezako, Atsuo Nishino, Takeshi A. Onuma, Hiroki Nishida. "Development of RNA interference method in appendicularian *Oikopleura dioica*" 7th International Tunicate Meeting. Italy. July. 2013.

○ Tatsuya Omotezako, Takeshi A. Onuma, Hiroki Nishida. "Application of TALEN-, CRISPR/Cas9-mediated Gene Knock-in methods in the appendicularian, *Oikopleura dioica* and analysis of DNAi method" Bilateral NTHU-OU Life Science Conference 2014. Taiwan. May. 2014.

○表迫　竜也、○岸　香苗、○小沼　健. “オタマボヤをもちいた発生学研究の近況” ホヤ研究会 2014. 東京. 10 月. 2014 年.

○表迫　竜也、小沼　健、西田　宏記. “RNA interference and DNA interference: two gene silencing systems in the appendicularian *Oikoleura dioica*” 第 37 回分子生物学年会. 横浜. 11 月. 2014 年.

○Tatsuya Omotezako, Takeshi A. Onuma, Hiroki Nishida. “RNA interference and DNA interference: two gene silencing systems in the appendicularian *Oikoleura dioica*” Finnish-Japanese joint symposium on Morphogenesis and Signaling. Finland. March. 2015.

ポスター発表

○表迫　竜也、小沼　健、西田　宏記. “RNA interference and DNA interference: two gene silencing systems in the appendicularian *Oikoleura dioica*” 第 37 回分子生物学年会. 横浜. 11 月. 2014 年.

○Tatsuya Omotezako, Takeshi A. Onuma, Hiroki Nishida. “RNA interference and DNA interference: two gene silencing systems in the appendicularian *Oikoleura dioica*” Finnish-Japanese joint symposium on Morphogenesis and Signaling. Finland. March. 2015.

○Tatsuya Omotezako, Takeshi A. Onuma, Hiroki Nishida. “DNA interference: new gene silencing method in the appendicularian *Oikopleura dioica*” 8th International Tunicate Meeting. Aomori. July. 2015.

謝辞

本論文は筆者が大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻発生生物学研究室に在籍中の研究成果をまとめたものである。同研究室の教授西田宏記先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて頂き、その遂行にあたって終始ご指導いただいた。ここに深謝する。また同研究室の助教西野敦雄先生(現・弘前大学准教授)、助教熊野岳先生(現・東北大学教授)、助教小沼健先生、並びに准教授今井(佐藤)薫先生には本研究に対するご指導、ご助言だけでなく研究に対する基本的な姿勢についてもご指導頂いた。ここに深謝する。また大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻植物生長生理研究室教授柿本辰男先生、並びに、神経回路機能学研究室准教授木村幸太郎先生には、副査として、修士課程からご助言、ご指導頂きました。ここに深謝の意を表する。

ワカレオタマボヤの飼育補助員である鈴木幹恵氏には発生生物学研究室における、ワカレオタマボヤの飼育環境の改善と維持にご尽力頂きました。ここに深謝の意を表する。

発生生物学研究室の諸氏には研究のみならず、日頃の生活面などあらゆる場面でご支援いただきました。特にワカレオタマボヤグループ諸氏にはワカレオタマボヤ研究の実験環境を発展させる為にご尽力頂きました。ここに深謝の意を表する。

Sars International Centre for Marine Molecular Biology の Eric Thompson 博士、Jean-Marie Bouquet 博士には 3 ヶ月間の留学中の実験のみならず、その後の実験を行う上でも様々な情報提供頂いた。ここに深謝の意を表する。

大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻分子遺伝学研究室助教高橋達郎先生並びに、東寅彦博士には現在進行中の β-catenin-EGFP タンパク質の合成、精製に関してご協力頂いた。ここに深謝の意を表する。

広島大学大学院理学研究科分子遺伝学研究室教授山本卓先生、特任講師佐久間哲史先生には現在進行中のワカレオタマボヤにおける TALEN を用いたゲノム編集技術の応用に関して多くのご助言を頂いた。ここに深謝の意を表する。

大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻発生生物学研究室博士前期課程一年の松尾正樹氏にはスクリーニングに関して協力頂きました。ここに深謝の意を表する。

大阪大学理学部生物科学科の山北絵里氏には、研究室でのアルバイト時にミニプレップによるプラスミドの精製に協力頂きました。ここに深謝の意を表する。

本研究の一部は日本学術振興会特別研究員(DC1)の援助により行われました。ここに深謝の意を表する。

最後に、終始温かく見守ってくれた家族に深謝の意を表する。

2016 年 2 月