

Title	Identification and characterization of maternal factors that are involved in embryogenesis of the larvacean, <i>Oikopleura dioica</i>
Author(s)	松尾, 正樹
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.18910/76395
DOI	10.18910/76395
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (松尾 正樹)	
論文題名	Identification and characterization of maternal factors that are involved in embryogenesis of the larvacean, <i>Oikopleura dioica</i> (脊索動物ワカレオタマボヤの胚発生にかかわる母性因子についての総合的研究)
論文内容の要旨	
<p>「母性因子」とは未受精卵にロードされているmRNAやタンパク質の総称である。母性因子は受精の制御や初期発生における胚軸決定や胚細胞の発生運命決定など、胚が正しく発生を始めるためのプロセスで重要な役割を果たす。本研究ではワカレオタマボヤ (<i>Oikopleura dioica</i>) (以下オタマボヤ) を用いて、母性因子の同定や機能の解明を行った。オタマボヤを用いて母性因子の研究をする上で特筆すべき特徴は、卵巣の構造である。オタマボヤの未成熟な卵巣内部は、卵母細胞が周囲の細胞質と孔を通して繋がった多核体となっている。そして卵成長が進むにつれ、卵母細胞に周囲から細胞質が流入していく。この卵成長過程は約半日という早さで完了する。また、卵形成の段階を生きのまま顕微鏡下で観察することもできる。これらの特徴を活用して、私は母性因子に関する三つのテーマに取り組んだ。</p> <p>一つ目が、母性因子の機能的スクリーニングである。胚発生で重要な働きをすることが細胞質移植実験などによって示唆されているものの、その分子実体の判明していない母性因子が未だに存在する。しかし、既存の主な機能阻害法では、卵形成過程でタンパク質に翻訳される母性因子の阻害に間に合わないという問題があった。一方、オタマボヤの未成熟な卵巣ならば「卵巣内顕微注入法」によって卵形成過程から母性因子を機能阻害できる。また、標的配列のPCR産物を注入すると機能阻害できる「DNAi」という簡便かつ安価な機能阻害法も確立されていた。この二つの手法を組み合わせることで、母性因子の大規模かつ効率的な機能的スクリーニングを実行した。Ovary-enriched cDNAライブラリからランダムに3000クローンをスクリーニングし、7つの初期発生に必要な母性遺伝子と、1つの受精制御に必要な母性遺伝子を同定した。</p> <p>二つ目が、減数分裂停止機構の解析である。スクリーニングで同定した遺伝子の一つ、脱リン酸化酵素PP2Aを機能阻害すると「産卵後の卵が受精していないにも関わらず減数分裂を再開し、単為発生を開始する」という表現型が観察された。これに注目し、減数分裂停止機構を明らかにするため、この表現型を詳細に調べた。まず、低いpHの人工海水によって卵巣内環境を再現した結果、産卵時のpH上昇がきっかけとなって表現型が開始することが判明した。さらに細胞内カルシウム(Ca)イオン濃度の観察やCaシグナル阻害剤による処理を行った結果、「産卵時に受精に似たCaバーストが発生し、減数分裂の再開や単為発生が起きてしまうのを抑制する役割」を、PP2Aが持っていることが判明した。</p> <p>三つ目が、初期胚で局在する母性mRNAの時間空間的解析である。多くの動物で、初期胚や未受精卵で局在する母性mRNAは、発生運命決定や体軸形成などで重要な役割を果たす。一方、卵巣を卵形成の時系列に沿って調べられる動物は少ないため、卵形成中のmRNAの局在過程はあまり知られていない。オタマボヤ卵巣の特徴は、そのための実験に適していると期待できる。しかし、オタマボヤには局在する母性mRNAが存在するのか不明な状況にあった。そこで、初期胚で局在する母性mRNAを同定するため、RNA-seqによって植物半球側に偏った母性mRNAをリスト化し、whole-mount <i>in situ</i> hybridizationによる時間空間的解析を行った。9つの候補のうち、8細胞期で植物半球後方に局在するmRNAを5つ同定した。さらに未受精卵で植物極側に局在するmRNAも1つ同定した。</p>	

論文内容の要旨

氏名 (松尾 正樹)

論文題名

Identification and characterization of maternal factors that are involved in embryogenesis of the larvacean, *Oikopleura dioica*
(脊索動物ワカレオタマボヤの胚発生にかかわる母性因子についての総合的研究)

論文内容の要旨

Proteins and mRNAs that are loaded into an unfertilized egg are called “maternal factors”. Maternal factors are expressed during oogenesis and loaded into the oocyte cytoplasm. Maternal factors play important roles during embryogenesis because it controls fertilization, and regulate embryonic cell fate specification and embryonic axis establishment. In this study, I identified and characterized maternal factors by using *Oikopleura dioica* (*O. dioica*), which is a model organism belonging to chordate. *O. dioica* has a unique ovary organization, and it provide us with advantages for analysis of maternal factors. In an immature ovary, oocytes share their cytoplasm as a syncytial coenocyte. An ovary is surrounded by thin and transparent ovary epithelium, so one can microinject the ovary with solutions and observe oogenesis stage under microscope. Taking advantages of the unique organization, I carried out three research projects.

First, I carried out functional screening of maternal factors. Although some essential maternal factors have been predicted by conventional micromanipulation approaches, most of them have not yet been identified because knockdown of maternal protein that has been already translated during oogenesis by RNA interference in spawned eggs is not feasible. In contrast, one can inject any solutions into immature syncytial ovary in *O. dioica*. So ovary microinjection was a powerful tool for depletion of maternal factors expressed during oogenesis. Convenient and less-expensive gene knockdown method called “DNAi” has been developed in *O. dioica*. This method was suitable for large-scale functional screening. Using DNAi and ovary microinjection, we carried out large-scale functional screening for maternal factors. 3000 clones from ovary-enriched cDNA library were randomly screened. Seven maternal mRNAs that are essential for early embryogenesis and one maternal mRNA that is required for meiotic arrest before fertilization were identified.

Second, mechanisms of the meiotic arrest were investigated in *O. dioica* oocytes. Unfertilized eggs of most animals including *O. dioica* are arrested at a certain point in the meiotic cell cycles. Reinitiation of meiosis and the start of embryogenesis are triggered by fertilization. However, in the above-mentioned functional screening of maternal factors, I found a specimen that show interesting phenotype. Knockdown (KD) of the maternal protein phosphatase 2A (PP2A) caused unfertilized eggs to spontaneously release polar bodies after spawning, and then start pseudo-cleavages without fertilization, namely, parthenogenesis. Activation of the KD oocytes was triggered by possible rise of ambient and intracellular pH upon their release from the gonad into seawater at spawning. Furthermore, live recording of intracellular calcium level and pharmacological treatment by calcium signal inhibitors showed that PP2A is essential for maintenance of meiotic arrest and prevention of parthenogenesis by suppressing the aberrant calcium burst at spawning.

In the third project, spatiotemporal analysis of localized maternal mRNAs was carried out. Maternal mRNAs localized during early embryogenesis play important roles in determination of embryonic axis establishment and cell fate specification. For example, in ascidians, maternal mRNAs called “*postplasmic/PEM* RNAs” are localized to vegetal-posterior region. Fate map of *O. dioica* in the vegetal hemisphere also differs between the anterior and posterior region, so similar involvement of maternally localized mRNA has been expected. However, homologs of the ascidian *postplasmic/PEM* RNAs in *O. dioica* were not localized within the eggs. Identification of maternal mRNAs localized in larvacean unfertilized egg was elusive. Therefore, I listed vegetal-enriched maternal mRNAs from RNA-seq data, in which the animal and vegetal hemispheres were isolated and separated at the 8-cell stage. Spatiotemporal localization was examined in 9 candidate mRNAs by whole-mount *in situ* hybridization. 5 mRNAs were found to be localized to the vegetal/posterior region of the 8-cell stage. One mRNA was already localized to the vegetal pole of unfertilized egg. These result would enable observation of the processes of localization of the maternal mRNAs during oogenesis using ovary section *in situ* hybridization.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (松尾 正樹)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	西田 宏記
	副 査	教 授	松野 健治
	副 査	准教授	小田 広樹

論文審査の結果の要旨

母性因子は、受精制御や胚細胞の発生運命決定など、胚が正しく発生を始めるためのプロセスで重要な役割を果たす。申請者はワカレオタマボヤを用いて、母性因子の同定や機能の解明を行った。オタマボヤの未成熟な卵巣内部は多核体であり、卵成長が進むにつれ、卵母細胞に周囲から細胞質が流入していく。この卵成長過程は約半日という早さで完了し、また卵形成の段階を生きたまま判別することもできる。この特徴的な卵巣を利用し、申請者は母性因子に関する三つの課題に取り組んだ。

一つ目が、母性因子の機能的スクリーニングである。胚発生で重要な働きをすると考えられているものの、分子実体の判明していない母性因子が存在する。しかし既存の主な機能阻害法では、卵形成過程で翻訳される母性因子の阻害に間に合わないという技術的制限があった。一方、オタマボヤの卵巣ならば卵巣内顕微注入法によって卵形成過程から母性因子を機能阻害できる。この注入法と、DNAi という簡便かつ安価な機能阻害法を組み合わせ、申請者は母性因子の機能的スクリーニングを行った。Ovary-enriched cDNA ライブラリから 3000 クローンを機能阻害し、7 つの初期発生に必要な遺伝子と、1 つの受精制御に必要な遺伝子を同定した。これにより、母性因子を効率的に解析するための新しい実験系が確立された。

二つ目が、減数分裂停止機構の解析である。スクリーニングで同定された遺伝子 PP2A (Protein Phosphatase 2A) を機能阻害すると「産卵後の卵が受精していないにも関わらず減数分裂を再開し、単為発生を開始する」という表現型が観察された。申請者はこれに注目し、不明だったオタマボヤの卵活性化機構を明らかにするため、この表現型を調べた。その結果、「産卵時に受精に似た Ca バーストが発生し、減数分裂再開や単為発生が起きてしまうのを抑制する役割」を、PP2A が持っていることが判明した。この産卵時の PP2A の機能は、オタマボヤに限らずまだ報告されていないものだった。この成果は、*Developmental Biology* 誌に論文として出版された。

三つ目が、初期胚で局在する母性 mRNA の時間空間的解析である。初期胚や未受精卵で局在する母性 mRNA は初期発生で重要な役割を果たす。一方、卵巣を卵形成の時系列に沿って調べられる動物は少ないため、卵形成中の mRNA の局在過程はあまり知られていない。オタマボヤ卵巣の特徴はそのための実験に適していると期待できるが、オタマボヤには局在する母性 mRNA が存在するのかわからない状況にあった。そこで、申請者はそういった母性 mRNA を同定するため、RNA-seq によって植物半球側に偏った母性 mRNA をリスト化し、whole-mount *in situ* hybridization による時間空間的解析を行った。9 つの候補遺伝子のうち、8 細胞期で植物半球後方に局在する mRNA を 5 つ同定した。さらに未受精卵で植物極側に局在する mRNA も 1 つ同定した。この成果により、卵巣切片を用いた母性 mRNA の局在過程を観察できるようになった。

上記の研究は、他の多くの動物では技術的に困難だった母性因子の機能解析および時間空間的解析の新しい技術基盤を提供するとともに、その技術によって実際に産卵時の新しい減数分裂停止機構を発見したことから、新奇性と学術的価値が高いと考えられる。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分に価値のあるものであると認める。