![](_page_0_Picture_0.jpeg)

Title	Identification and characterization of maternal factors that are involved in embryogenesis of the larvacean, Oikopleura dioica			
Author(s)	松尾,正樹			
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文			
Version Type	VoR			
URL	https://doi.org/10.18910/76395			
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

# 令和元年度

# 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

# Identification and characterization of maternal factors that are involved in embryogenesis of the larvacean, *Oikopleura dioica*

# 大阪大学 理学研究科 生物科学専攻

# 松尾正樹

# 目次

和文要旨 英文要旨	4 6
<ul> <li>第一章:序論         <ol> <li>4. 母性因子研究の意義</li> <li>2. ワカレオタマボヤの生物学的特徴を利用した母性因子へのアプローチ</li> </ol> </li> </ul>	8
<b>第二章:母性因子の機能的スクリーニング</b> 序論 1 初期発生と母性因子の関係	13 13
<ol> <li>2. 母性因子を大規模に調べるための課題</li> <li>3. ワカレオタマボヤの母性因子の機能解析における利点</li> <li>結果         <ol> <li>二本鎖DNAを用いた母性因子のノックダウン(DNAi)</li> </ol> </li> </ol>	14
2. 機能的スクリーニングの手順 3. 同定した8つのcDNAクローンの機能阻害による表現型 考察	23
1. 母性因子の大規模な機能的スクリーニングについて 2. 本研究で実施した機能的スクリーニングにおける問題点と今後の課題	
<ul> <li>第三章:未受精卵の減数分裂停止に関わる脱リン酸化酵素(PP2A)の研究</li> <li>序論         <ol> <li>卵における減数分裂停止の意義</li> </ol> </li> </ul>	25 25
2. 減数分裂停止機構の分子メカニズムおよびPP2Aの役割 結果 1. 母性PP2Acがノックダウンされた未受精卵では減数分裂再開と単為発生が起こる	26
<ol> <li>PP2Ac-KD卵におけるDNAと微小管の構造</li> <li>PP2Ac-KD卵における減数分裂の再開は産卵後のpHの上昇に依存して起こる</li> <li>PP2Ac-KD卵は産卵直後にカルシウムバーストを示す</li> <li>PP2Ac-KD卵ではCa<sup>2+</sup>/CaMK II経路を介して単為発生的な卵活性化が起こる</li> </ol>	
考察 <ol> <li>未受精卵の減数分裂停止におけるPP2Aの役割について</li> <li>受精時のカルシウムイオン放出の分子経路におけるPP2Aの役割</li> <li>脊椎動物の減数分裂停止機構との比較</li> <li>本と網の減数分裂停止機構との比較</li> </ol>	36
動画1~4の説明	39
第四章:卵と初期胚で局在する母性mRNAの時間空間的解析 序論	<b>40</b> 40
1. ホヤ綱におけるpostplasmic/PEM RNAs、その局任と組織連命決定における役割 2. ワカレオタマボヤの卵形成は母性mRNAの時間空間的分布を調べるのに適している 結果	42
<ol> <li>植物半球側に多く存在している母性mRNAの候補の選別</li> <li>8細胞期で植物半球後方に局在する母性mRNAの同定</li> <li>未受精卵で植物極に局在する母性mRNAの同定</li> </ol>	45
考察 1. ホヤ綱のpostplasmic/PEM RNAsとの局在パターンの比較 2. 卵形成中の母性mRNAの時間空間的局在解析に向けて	43
第五章:総括と今後の展望	48
<ul> <li>第六章:材料と方法</li> <li>・ワカレオタマボヤの採集と飼育</li> <li>・卵巣特異的遺伝子のcDNAライブラリ作製</li> <li>・PP2Acのデータ</li> </ul>	50

- ・TAクローニング ・DNAi用PCR産物の合成

- ・RNAi用二本鎖RNAの合成
- ・mRNA合成
- ·卵巢内顕微注入法
- ・in fusionクローニング
- ・*in situ* hybridizationのプローブ合成
- Whole mount in situ hybridization (WISH)
- アルカリホスファターゼ組織化学染色
   アセチルコリンエステラーゼ組織化学染色
- ・微小管の免疫染色
- ・人工海水
- ・細胞内pHの測定
- ・薬剤処理
- ・細胞内カルシウムイオン濃度のタイムラプスイメージング
- Quantitative real-time PCR

文献リスト	58
発表リスト	65
謝辞	67

## 和文要旨

「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。これらは卵形 成過程において卵巣内で合成され、卵母細胞質中に蓄積される。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、胚が正しく発生を開始するためのプロセスで重要な役 割を果たす。本研究では脊索動物ワカレオタマボヤ(*Oikopleura dioica*)をもちいて、母性因子の同 定や機能の解明を行った。

ワカレオタマボヤ(以下オタマボヤ)は、脊索動物尾索動物亜門オタマボヤ綱に属する海洋性プラ ンクトンである。体を構成する細胞数が少ないこと、発生が早いこと、胚や幼生が透明であること、 孵化までの細胞系譜が記述されていること、ゲノムとトランスクリプトームの情報が公開されている ことなどから、新しいモデル生物として期待されている。

この動物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、細胞質を共有した多核体となっている。減数分裂核を持った多数の卵母細胞が、 ring canalという孔を通じて哺育核を持つ周囲の細胞質と連結している。そして卵成長が進むにつれて、 卵母細胞の中に周囲から卵巣細胞質が流入していき、やがて産卵が起こる。この卵成長過程は約半日 という早さで完了する。また卵巣は薄く透明な卵巣上皮で覆われているだけなので、顕微注入などの 物理的干渉が容易であるほか、卵形成の段階を生きた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「卵形成から初期発生まで」幅広い現象において、母性因子に関する三つの テーマ「母性因子の機能的スクリーニング」「減数分裂停止機構の研究」「局在する母性mRNAの同 定および時間空間的解析」に取り組んだ。

一つ目が、母性因子の大規模な機能的スクリーニング法の確立である。母性因子の研究はオタマボ ヤ綱と近縁なホヤ綱をはじめとした幅広い生物で行われてきた。一方、細胞質の除去や移植実験など によって、胚発生で重要な働きをすると思われる母性因子の存在が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いまだに存在する。しかし母性因子の大規模な機能解析をするにあ たって、一般的な手法である未受精卵にアンチセンスオリゴや二本鎖RNAなどを注入してノックダウ ンする方法では、卵形成過程で既にタンパク質に翻訳されていた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は細胞質を共有しており顕微注入が可能である。 つまり「卵巣内顕微注入法」によって、卵形成過程から母性遺伝子をノックダウンすることが可能で ある。また、標的配列のPCR産物を注入するとノックダウンできる「DNAi」という簡便かつ安価な ノックダウンの手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」の手法を確立した。Ovary-enriched cDNAライブラリからランダ ムに3000クローン(卵巣で発現する母性遺伝子の57%)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。この研究は当研究室に所属してい た表迫竜也と共同で行った。

二つ目が、未受精卵における減数分裂停止維持のしくみの解明である。母性因子の機能的スクリー ニングで同定した遺伝子の一つである、脱リン酸化酵素PP2Aをノックダウンすると「産卵後の卵が

4

受精していないにもかか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、新たな減数分裂停止のしくみや生物間での多様性にアプローチすることを目指して、 この表現型を詳細に調べた。面白いことに、PP2Aノックダウン卵は卵巣内にある間は減数分裂が停 止したままだが、海水中に産卵されてから減数分裂再開・単為発生を開始した。一般的に海水は生物 の体内よりもpHが高いことが知られている。そこで低いpHの人工海水によって卵巣内環境を再現し た結果、pHの上昇がきっかけとなってこの表現型が開始することが判明した。細胞内カルシウムイオ ン濃度の変化をタイムラプスで追跡した結果、産卵でpHが上昇した直後に、受精に似たカルシウムバ ーストが発生していることがわかった。このカルシウムバーストが、受精の時のカルシウムバースト をミミックし、ノックダウン卵では受精なしに減数分裂再開・単為発生を開始すると考えられた。こ の可能性を検証するために、薬剤処理によってカルシウムジナルを阻害した場合、この表現型を抑 えられることがわかった。以上から、産卵のタイミングで受精に似たカルシウムバーストが発生し、 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明らかに なった。

三つ目が、オタマボヤ初期胚で局在する母性 mRNA の探索と局在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、様々な動物において胚細胞の発生運命決定や体軸形成など に関して重要な役割を果たす。例えばホヤ綱では *postplasmic/PEM* RNAs と呼ばれる一群の母性 mRNAs が植物半球の後方に局在することが知られている。オタマボヤの初期胚でも、植物半球の前 方と後方で細胞の発生運命が異なる。しかし、ホヤ綱の *postplasmic/PEM* RNAs のオタマボヤ綱にお けるホモログは初期胚で局在しないことが示されており、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。私はこの問題に注目して、初期胚を動物と植物半球に切断し、 RNA-seq によって植物半球側に偏った母性 mRNA をリスト化し、これらの遺伝子について時間空間 的解析を行った。9 つの候補母性 mRNA を whole-mount *in situ* hybridization (WISH) で検出し、8 細 胞期に植物半球後方に局在する mRNA を 5 つ同定した。さらに未受精卵ですでに植物極側に局在す る mRNA も 1 つ同定した。この発見によって、これらの母性 mRNA が局在に至る過程を切片 *in situ* hybridization によって卵形成過程を通して調べることができるようになった。卵形成中の mRNA の局 在過程を時系列に沿って調べることのできる動物は限られている。「卵成長にかかる時間が約半日と 早く」「卵形成の発達段階を生きたまま目視できる」オタマボヤ卵巣は、そのための実験に適してい ると考えられる。

以上より、本研究ではオタマボヤの母性因子について総合的研究を行い、卵形成から初期発生まで 幅広い現象について一層理解を深めることに貢献した。

 $\mathbf{5}$ 

## 英文要旨

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. Maternal factors have been studied in various animals. However, some open questions are still elusive. Therefore, I tried to approach those questions on maternal factors using larvacean, *Oikopleura dioica*.

*Oikopleura dioica* (*O. dioica*) is a planktonic tunicate belonging to chordate. The animal is expected to be a promising model organism in developmental biology because of their biological traits, I) small number of consistent cells, II) quick development, III) transparent body, and IV) publicly available genome browser and transcriptomic data. *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. Each oocyte precursor that contains a meiotic nucleus is connected with coenocyte cytoplasm, which contains nurse nuclei, via cytoplasmic bridges, called "ring canal". Then, coenocyte cytoplasm is transferred into oocytes through the ring canal, and mature oocytes are spawned. An ovary is surrounded by thin and transparent ovary epithelium, so one can microinject solutions into the ovary 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 RNAi or injection of antisense oligos into spawned eggs is not feasible. On the other hand, we can inject those into immature ovary of *O. dioica*. So ovary microinjection was a powerful tool for depletion of maternal factors expressed during oogenesis. Convenient and inexpensive 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 (57% of ovary-enriched genes) 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. This research was collaborative project with Tatsuya Omotezako, a former member of our laboratory.

Second, mechanisms of the meiotic arrest were investigated in *O. dioica* oocytes. In above-mentioned functional screening of maternal factors, I found a specimen that show interesting phenotype. Unfertilized eggs of most animals are arrested at a certain point in the meiotic cell cycles. Reinitiation of meiosis and the start of embryogenesis are triggered by fertilization. This arrest is essential for preventing parthenogenetic activation and for promoting proper initiation of development by fertilization. In *O. dioica*, the unfertilized egg is arrested at metaphase of meiosis I. I showed that protein phosphatase 2A (PP2A) is essential

6

for maintenance of meiotic arrest after spawning of oocytes. Knockdown (KD) of the maternal PP2A catalytic subunit caused unfertilized eggs to spontaneously release polar bodies after spawning, and then start pseudo-cleavages without fertilization, namely, parthenogenesis. Parthenogenetic embryos failed to undergo proper mitosis and cytokinesis because of lack of a centrosome, which is to be brought into the egg by a sperm. 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. Live recording of intracellular calcium level of the KD oocytes indicated that the pH rise caused an aberrant Ca<sup>2+</sup> burst, which mimicked the Ca<sup>2+</sup> burst that occurs at fertilization. Then, the aberrant Ca<sup>2+</sup> burst triggered meiosis resumption through Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK II). Therefore, PP2A is essential for maintenance of meiotic arrest and prevention of parthenogenesis by suppressing the aberrant Ca<sup>2+</sup> 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 as determinants of embryonic axis establishment and cell fate specification. For example, in ascidians, maternal mRNAs called "*postplasmic/PEM* RNAs" are localize 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 supposed. However, homologs of the ascidian *postplasmic/PEM* RNAs in *O. dioica* were not localized in 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 mRNA during oogenesis by ovary section *in situ* hybridization.

#### 1. 母性因子研究の意義

本研究で言う「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。 これらは「卵形成」の過程において卵巣内で合成され、卵母細胞質中に受け継がれる。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、胚が正しく発生を開始するた めのプロセスで重要な役割を果たす。ほとんどの動物において、受精してから一定の期間はゲノムか らの転写が活性化されていないため、初期発生で働くタンパク質は元々卵にロードされていた母性タ ンパク質か、母性mRNAから翻訳されたものである。そしてゲノムからの転写が活性化すると、タン パク質はその胚自身のmRNA由来のものに切り替わっていき、母性因子は分解されていく(maternal to zygotic transition) (Tadros and D.Lipshitz 2009)。つまり卵というたった一つの細胞から個体が発生する ための最初の過程を担っているのが母性因子であり、母性因子を解析することは、胚発生に関わる重 要な命題であるといえる。

母性因子の研究は幅広い動物で行われており、母性因子による初期発生制御のメカニズムも動物に よって様々である。ショウジョウバエでは卵母細胞の前方と後方に異なるmRNAが局在して胚軸形成 物質として働く(Johnstone and Lasko 2001)。アフリカツメガエルでは卵母細胞の植物半球側にVegT という転写因子をコードする遺伝子のmRNAが局在して、内中胚葉形成や軸決定に関わる(White and Heasman 2008)。無脊椎動物の中でも我々脊椎動物に進化的に最も近い「脊索動物」においては、ホ ヤ綱のいくつかの種を用いて、古くから母性因子の研究が行われてきた。例えば20世紀初頭には、未 受精卵の植物半球に他の領域とは色が異なる細胞質が存在し、これが胚発生中に筋肉細胞に受け継が れていくことが顕微鏡下で観察されており、未受精卵中に存在する筋肉決定因子の存在が予見されて いた(Conklin, 1905)。その後、細胞質の移植実験によって、未受精卵中に筋肉、表皮、内胚葉の発 生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(Nishida, 1992; 1993; 1994)。さらに植 物半球に多く存在するmRNAをサブトラクションによって濃縮してから、in situ hybridizationで時間空 間的に、およびアンチセンスオリゴで機能的に解析することによって、筋肉決定因子macho-1が同定 された(Nishida et al., 2001)。母性因子であるmacho-1 mRNAの卵内分布は特徴的な局在パターンを示す。 未受精卵で植物半球側表層に存在しており、受精後の表層流によって一度植物極に濃縮された後、第 二極体放出後に植物半球後方に移動する。またmacho-1mRNAと同様の局在パターンを示すmRNAが 多数見つかっており、このような母性mRNAは総じて*postplasmic/PEM* RNAsと呼ばれている(Makabe et al., 2001)。このように脊索動物における母性因子の研究は盛んに行われてきたが、一方で未解明 の問題もまだ多く存在する。

本研究ではワカレオタマボヤという脊索動物のモデル生物を利用して、1. 母性因子の機能的スクリ ーニング法の確立 2. 減数分裂停止機構の解明 3. 初期胚で局在する母性mRNAの同定、という3つ のテーマに取り組んだ。

#### 2. ワカレオタマボヤの生物学的特徴を利用した母性因子へのアプローチ

ワカレオタマボヤ(Oikopleura dioica)は脊索動物尾索動物亜門オタマボヤ綱に属する海洋性プラン クトンである(以下オタマボヤ)。無脊椎動物でありながら、脊椎動物と同じオタマジャクシ型の体 制を持つ。オタマジャクシ型から壺型に変態するホヤ綱の動物とは違い、一生をオタマジャクシ型で 過ごす。細胞数が少ないこと、世代時間が約5日と短いこと、透明な胚・幼生を持つこと、孵化まで の完全な細胞系譜図が記述されていること、ゲノムおよびトランスクリプトームの情報が公開されて いること(Oikobase: http://oikoarrays.biology.uiowa.edu/Oiko/, Aniseed: https://www.aniseed.cnrs.fr)などか ら、特に発生学の研究に適している(図1A) (Nishida, 2008; Danks et al., 2013; Wang et al., 2015)。当研 究室ではオタマボヤを人工海水で継代飼育する系を確立しており、一年を通して安定的にサンプルを 得ることが可能である。そして母性因子の研究をする上で特筆すべき最大の特徴が、卵巣の構造であ る(図1B)。オタマボヤの未成熟な卵巣内部は、coenocystと呼ばれる細胞質を共有した多核体となっ ている。減数分裂核を持った多数の卵母細胞が、ring canalという孔を通じて、DNAをおよそ1000倍に 増幅した哺育核を含む周囲の卵巣細胞質とつながっている。そして卵成長が進むにつれて、卵母細胞 に周囲から卵巣細胞質が流入していき、卵母細胞は大きくなり、哺育核はやがて消失する。卵母細胞 が十分に成熟すると、卵巣と体壁が破裂することによって、1匹あたり100-300個程度の卵が海水中に 産卵される(Ganot et al., 2007)。さらにオタマボヤの卵巣は薄い卵巣上皮細胞層に覆われているため、 顕微注入などの物理的干渉が容易である他、卵成長の発達段階を生きたまま顕微鏡下で視認すること も可能である。この特徴的な利点を持ったオタマボヤを活用し、私は「卵形成から初期発生まで」幅 広い現象において、母性因子に関する以下3つの研究テーマに取り組んだ。

1. 第二章では、母性因子の大規模な機能的スクリーニング法の確立と結果について述べる。動物卵 においては、細胞質移植・除去による実験などから胚発生で重要な働きをすると考えられるものの、 分子実体の判明していない母性因子がいまだに存在する。しかし、母性因子の大規模な機能解析をす るにあたって一般的な手法である未受精卵にアンチセンスオリゴや二本鎖RNAなどを注入してノッ クダウンする方法では、卵形成過程ですでにタンパク質に翻訳されてしまっている母性因子の阻害に 間に合わないという問題があった。一方で上記の通り、オタマボヤの未成熟な卵巣は細胞質を共有し ており、顕微注入が可能である。つまり「卵巣内顕微注入法」によって、卵形成過程から母性遺伝子 をノックダウンすることが可能である(Omotezako *et al.*, 2013)。また標的配列のPCR産物を注入する とノックダウンできる「DNAi」という、オタマボヤ特有の簡便かつ安価なノックダウン手法も確立 されている(Omotezako *et al.*, 2015)。この二つの手法を組み合わせることで、母性因子の大規模な 機能的スクリーニング法を確立した。これは、当研究室に所属していた表迫竜也氏と共同で遂行した。 (巻末の論文業績2)

2. 第三章では、産卵後の未受精卵における減数分裂停止機構について述べる。機能的スクリーニン グで同定した遺伝子の一つであるタンパク質脱リン酸化酵素PP2Acをノックダウンすると、産卵後の 卵が受精していないにもかか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現れるこ とを見出した。「産卵時における新たな減数分裂停止維持のしくみを調べる」「ホヤ綱や脊椎動物な どでのしくみと比較し、生物間の多様性についてアプローチする」という二点から、私はこの表現型

9

に興味を抱き、詳細に解析した。その結果、PP2Aが、産卵の時に受精に似たカルシウムバーストが 発生してしまうことを防止する役割を持つことを明らかにした。(巻末の論文業績1)

3. 第四章では、オタマボヤ初期胚で局在する母性mRNAの同定および時間空間的解析について述べる。オタマボヤの初期胚では、植物半球側の前方と後方で発生運命が異なるため、ホヤ綱の postplasmic/PEM RNAsと似た局在mRNAが存在すると考えられた。しかし、ホヤ綱のpostplasmic/PEM RNAsのオタマボヤ綱におけるホモログは初期胚で局在しないことが示されており、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(幸西翔平、平成22年度修士論文2010)。そ こで、オタマボヤ初期胚に局在mRNAがあるかどうかを検証し、その同定を行った。8細胞期胚を動 物と植物半球ごとに切断し、RNA-seqによって植物半球側に偏って存在する母性mRNAをリスト化し、 これらの遺伝子についてwhole mount *in situ* hybridizationにより時間空間的局在解析を行った。その結 果、8細胞期で植物半球後方に局在する5つの母性mRNAを同定した。このうち、未受精卵ですでに植 物極側に局在する母性mRNAも1つ同定した。卵成長の発達段階を生きたまま目視で判断できること がオタマボヤ特徴の一つである。今回の結果により、卵形成中に局在する母性mRNAの動態を、時系 列に沿った切片*in situ* hybridizationにより アプローチしていくことが可能になったと考えられる。 (未発表)

![](_page_11_Figure_0.jpeg)

#### 図1 ワカレオタマボヤの発生と卵形成

A. オタマボヤを 20℃で飼育したときのライフサイクル。受精後 35 分で 8 細胞期に、受精後 3 時間 (3 hours post fertilization: 3 hpf) で孵化し、10 hpf で形態形成が完了し、5 日で性成熟する。卵
 巣・精巣が破裂することによって海水中に産卵・放精し、その後、個体は死ぬ。卵の直径は 80 μm。
 成体のスケールバーは 500 μm。(Nishida 2008)より引用、改変。

#### B. ワカレオタマボヤの卵巣の構造、および卵巣内顕微注入の模式図

オタマボヤの未成熟な卵巣は、減数分裂核(赤)を持った卵母細胞と、哺育核(青)を含んだ卵巣 の細胞質が ring canal でつながった多核体である。卵形成が進むにつれ、卵母細胞へ周囲の卵巣細 胞質が流入していく。卵巣内顕微注入によって核酸等を注入すると濃度勾配を持って拡散し、複数の 卵母細胞に取り込まれる。オタマボヤの卵巣は写真のように上皮が薄く、ステージを顕微鏡下で視認 できる。スケールバーは 100 μm。

#### 序論

#### 1.初期発生と母性因子の関係

生物の卵にロードされている mRNA やタンパクなどの母性因子は、幅広い動物種で初期発生にお いて重要な役割を果たすことが知られている(Schupbach and Wieschaus 1989)。一方、胚顕微操作 による実験結果から存在することが予測されるものの、分子実体の判明していない母性因子も多々あ る。たとえばホヤ類を含む多くの無脊椎動物では、β-catenin タンパク質が初期発生の過程で植物半 球側の割球でのみ核に移行することが植物半球の運命決定に重要である(Imai *et al.* 2000; Kawai *et al.* 2007; Darras *et al.* 2011; Logan *et al.* 1999)。しかしβ-catenin タンパク質は卵細胞質中に偏在 しているため、植物半球に局在しβ-catenin の核移行をもたらしている未知の母性因子(植物半球決 定因子)が別に存在すると考えられている(Nishida 1993)。ホヤの未受精卵へアンチセンスオリゴを注 入する手法で局在 mRNA の機能を網羅的に解析しても、植物半球決定因子が見つからなかったため、 その分子実体は卵形成中に翻訳されたタンパク質の形で局在していると考えられている。このように、 母性因子群には未知の発生に必要な因子が存在している。

#### 2.母性因子を大規模に解析するための課題

しかし、母性因子を大規模に解析するための手段は少ない。その原因は主に二つある。一つめは、 母性因子を完全に取り除く実験系が乏しいことにある。母性 mRNA をノックダウンする手法として は morpholino antisense oligo や二本鎖 RNA を産卵後の未受精卵に注入するのが一般的であるが、 この手法では卵形成中にすでに翻訳されたタンパク質のノックダウンには間に合わない。そのために は卵巣での卵形成過程で遺伝子発現を抑制する必要があるが、卵巣内の卵子に外部から核酸を注入で きる実験生物は少ない。実際に、母性因子の逆遺伝学的な機能的スクリーニングは、線虫 (Caenorhabditis elegans)でしか行われていない (Piano et al. 2000)。二つめは、母性遺伝子の突然 変異系統を大量に集めることができる生物が少ないことである。順遺伝学的な母性因子の機能的スク リーニングは、線虫(C. elegans)やキイロショウジョウバエ(Drosophila melanogaster)、ゼブラフィ ッシュ(Danio rerio)などで行われている(Schupbach and Wieschaus 1989; Hekimi, Boutis, and Lakowski 1995; Dosch et al. 2004; Kemphues et al. 1988; Kishimoto et al. 2004)。しかし、特定の 母性効果遺伝子を変異原物質などによってノックアウトするためには、その表現型を確認するのに4 世代の交配が必要になる。すなわち、胚性に発現する遺伝子のノックアウト生物を作るよりも世代数 が一つ余計に必要であり時間がかかる上、ノックアウトをした親が致死のときは解析できない。この ため、大規模な解析という目的には限界がある。もしも母性因子をタンパク質も含めて網羅的に探索 するための実験手法を確立できれば、発生生物学に大きく貢献すると考えられる。本研究では、ワカ レオタマボヤを用いてこの課題へのアプローチを試みた。

#### 3. ワカレオタマボヤの母性因子の機能解析における利点

ワカレオタマボヤは、卵巣特異的に発現する遺伝子の大規模な機能的スクリーニングを可能にする、 二つの有利な特長を持つ。一つめは、卵巣に顕微注入ができることである。未成熟な卵巣内部は細胞 質を共有する多核体となっている。ここに DNA や RNA などを顕微注入すると複数の発達途上の卵 母細胞に取り込まれる(図 1)。例えば、蛍光タンパク質 H2B-EGFP の mRNA を未成熟な卵巣に注入 した場合、産まれた卵の約 20~30%で蛍光を確認できる(Omotezako et al. 2013)。すなわち、卵形成 時に発現する遺伝子を抑制できる見込みが高いため、タンパク質性の母性因子も含めてスクリーニン グが行える可能性がある。二つめは、DNAi というオタマボヤ独自の遺伝子抑制手法が確立されてい ることである(Omotezako et al. 2015)。DNAi は外来性の二本鎖 DNA 断片を注入すると、その配列 をもつ遺伝子の機能が阻害される現象である(Omotezako et al. 2015)。DNAi は動物では現在のとこ ろワカレオタマボヤでしか確認されていないが、二本鎖 DNA、特に PCR 産物を注入するだけで遺 伝子のノックダウンが可能なため、従来の遺伝子抑制手法としての antisense oligo や RNAi と比べ ると注入産物の作製が簡単かつ安価である。「卵巣内顕微注入」と「DNAi」という二つの技術が開発 されているワカレオタマボヤを用いることで、効率よくタンパクも含めた母性因子の機能的スクリー ニングを行うことができると考えられた。

そこで、実際に母性因子の機能的スクリーニングを行った。卵巣に多く発現する遺伝子の cDNA から 3000 クローン(母性遺伝子の約 57%に相当する)をスクリーニングした結果、7 つの初期発生に関わる遺伝子と、1 つの減数分裂停止に関わる遺伝子を同定した。この結果から、卵巣内顕微注入と DNAi が確かに母性因子を探索するための有用な実験手法であると示すことができた。

#### 結果

#### 1. 二本鎖 DNA を用いた母性因子のノックダウン(DNAi)

最初に、DNAi が母性遺伝子をノックダウンできることを確認するための実験を行った。先行研究 において、DNAi は卵巣に注入した蛍光タンパク質の mRNA の発現を未受精卵の時点で阻害できる ことが証明されていた(Omotezako *et al.* 2015)。一方、内在性の母性遺伝子への阻害効果があるかど うかは示されていなかった。そこではじめに、母性遺伝子の一つであるβ-catenin を用いて検証した。 β-catenin は多くの動物の未受精卵に存在する母性因子であり、胚の細胞接着や、多くの無脊椎動物 で植物半球および内胚葉の運命決定に必要なことが知られている(Imai *et al.* 2000; Darras *et al.* 2011; Logan *et al.* 1999)。

まずワカレオタマボヤの $\beta$ -catenin のホモログを同定するために、カタユウレイボヤ(*Ciona intestinalis*)の $\beta$ -catenin のアミノ酸配列をクエリーとして Oikobase にて blast 検索を行った。する と相同性の高い候補遺伝子のうち、卵巣で発現する2つのホモログを見出した(GSOIDP00011813001, GSOIDG00004053001 in Oikobase)。この研究では、これらの遺伝子を、 $\beta$ -catenin-1 と2 と名付 けた。

 $\beta$ -catenin1,2 のそれぞれの部分的な配列(545–1042 and 537–1066 nucleotides counted from the starting methionine, respectively)の PCR 産物(PCR- $\beta$ -catenin1, PCR- $\beta$ -catenin2)をワカレオタマ ボヤの卵巣に顕微注入した。その結果、PCR- $\beta$ -catenin1 を注入した胚は 32 細胞期には割球同士の

接着が弱くなり、本来なら孵化するステージまでに細胞同士が解離してしまった(図 2A)。このことから、 $\beta$ -catenin1 は細胞接着に寄与する機能を持つと考えられる。一方 PCR- $\beta$ -catenin2 を注入した 胚は受精後 7 時間(7 hpf, hour post fertilization)において、表皮のような組織を含む細胞塊に発生した(図 2A)。

尾索動物であるホヤ綱では、β-catenin が内胚葉分化に必要である(Imai *et al.* 2000)。そこでオ タマボヤでも同様かどうかを調べた。まず、内胚葉特異的マーカーであるアルカリホスファターゼ (ALP)の組織化学染色(Imai *et al.* 2000; Kawai *et al.* 2007)を7 hpf 胚で行った。すると、PCR-β -catenin1 の注入胚では ALP が染色されたが、PCR-β-catenin2 の注入胚では、ALP の活性が落ち ていた。このことから、β-catenin2 は内胚葉決定に寄与していることが示された(図 2B)。次に、中 胚葉の組織マーカーも用いて染色を行った。行ったのは筋肉分化マーカーであるアセチルコリンエス テラーゼ(AChE)の染色である(Nishino *et al.* 2000)。すると PCR-β-catenin1 の注入胚では染まった が、PCR-β-catenin2 の注入胚でのみ、AChE の活性が落ちていた(図 2C)。これはβ-catenin2 によ る植物半球決定が阻害されたことで筋肉の分化も失敗したためであると考えられる。一方、上皮様組 織が 7 hpf 胚で見られるため(図 2A)、また対照実験として PCR-EGFP を注入した胚は正常に発生し たため(negative control) (図 2A)、この表現型は DNAi によるβ-catenin2 の特異的な抑制によって引 き起こされたものであり、DNAi の何らかの毒性によって胚が死亡したことによるものではないと考 えられる。

さらに、DNAiによって $\beta$ -catenin1,2の母性 mRNA が減少したかどうかを確認するために、注入 卵の whole-mount *in situ* hybridization (WISH)を行った。すると PCR- $\beta$ -catenin1,2 をそれぞれ注 入した未受精卵において、標的 mRNA が減少していることが確認できた(図 2-D)。以上の結果から、 オタマボヤの $\beta$ -catenin1,2 はそれぞれ細胞接着と植物半球の組織分化に寄与する働きがあると示唆 された。以上より、DNAi は母性遺伝子を特異的にノックダウンできると考えられたため、母性因子 の機能的スクリーニングを行うことにした。

![](_page_16_Figure_0.jpeg)

図 2 DNAi による母性因子  $\beta$ -catenin への阻害効果の検討

- A. β-catenin1,2の DNAi を行い、7 hpfの胚を観察した。control として EGFP の PCR 産物を注入した。β-catenin1 を阻害した胚は細胞同士が解離した。β-catenin2 阻害胚の上皮様組織になっている箇所を、赤い印で示した。スケールバーは以後すべて 50 μm を示す。
- B.  $\beta$ -catenin1,2 の阻害胚を用いてアルカリホスファターゼ (ALP) 染色を行った。control と $\beta$ -catenin1 の阻害胚は内胚葉が赤紫に染まり、 $\beta$ -catenin2 の阻害胚は染まらなかった。右下の例数は、観察胚のうち染まった胚の数を示している。
- C.  $\beta$ -catenin1,2の阻害胚を用いてアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 染色を行った。control と $\beta$ -catenin1の阻害胚は筋組織が赤に染まり、 $\beta$ -catenin2の阻害胚は染まらなかった。
- D. β-catenin1,2 を阻害した未受精卵の whole-mount *in situ* hybridization。1,2 どちらも mRNA の量が control と比較して減少した。

#### 2. 機能的スクリーニングの手順

標的を母性因子に絞って大規模なスクリーニングを効率的に行うため、オタマボヤの卵巣で多く発 現する遺伝子の cDNA ライブラリを作製した。その後、cDNA を導入した大腸菌のコロニーをランダ ムにピックアップすることで、クローンごとに単離した。卵巣特異的 cDNA には、Oikobase の発現 マイクロアレイデータから 3564 個程の遺伝子が含まれていると計算された。本研究のスクリーニン グでは、卵巣特異的遺伝子 2000 種類(約 57%に匹敵)をカバーできる 3000 クローンを目標とした(図 3)。

![](_page_17_Figure_2.jpeg)

#### 図3 卵巣に多く発現する遺伝子の数とクローンの数の相関図

作製した cDNA に含まれる卵巣特異的遺伝子の総数は 0ikobase の発現マイクロアレイデータから 3564 個と期待される(赤線)。クローンをランダムに多くスクリーニングするほど同じ遺伝子を重複し てピックアップする可能性が高まるので、解析できる遺伝子の数は 3564 に漸近する。3000 クローン をピックアップしてスクリーニングすれば、2028 遺伝子(約 57%)をカバーできる計算になる。

表現型異常を効率よく探索するため、スクリーニングは二段階に分けて行った。第一段階では、5 つのクローンを1つにまとめたプールを600プール、ワカレオタマボヤの卵巣に注入し、産卵させた。 そして発生させた3hpf 胚に何らかの異常な表現型が観察されたプールのみ、第二段階の実験で使用 した。なお5つのクローンをまとめて注入してもDNAiの機能阻害効果が適切に現れることは、スク リーニングの条件検討で確認できている。脊索の運命決定に必要な zygotic に発現する遺伝子 Brachyury と、初期胚で表現型異常を引き起こさないクローン4つの合計5つのPCR 産物をまとめ て注入したところ、脊索がなくなるというBrachyury 特異的な機能阻害表現型が、注入胚の90%ほ どの割合で現れた (Omotezako and Matsuo *et al.*, 2017)。次の第二段階では、1つのプールに入っ ていた5つのクローンを個別に卵巣に注入して、3hpf 胚における表現型を観察した(図4)。第二段階 では共注入した蛍光タンパク(H2B·mCherry)の蛍光を注入マーカーとして用い、注入を確認できた胚 (すなわち注入マーカの蛍光を発していた胚)のうち表現型の現れる割合(penetrance)が 90%以上の クローンについてのみ、候補遺伝子として採用した。

以上のスクリーニングの結果、第一段階では 600 プール中 26 プールで何らかの表現型が観察され た。そして第二段階では 26 プール中 8 つのプールから penetrance が 90%以上の表現型を示すクロ ーンが同定された。プールの中では表現型が見られた 1 クローン以外の残り 4 つのクローンについて は、すべて正常な発生が見られた。また 18 個のプールについては、5 つのクローンすべてで表現型 が見られなかったか、見られたとしても penetrance が低かった。第一段階では表現型が現れたにも 関わらず第二段階で見られなくなった原因ついては、ワカレオタマボヤのメスは顕微注入をされなく とも稀に発生異常になる卵を産んでしまうからであると考えられる。1 匹のメスは通常 100~300 個の 卵を産む (Omotezako et al., 2013)。その約 5%以下は発生過程で異常な胚になることが経験上分か っており、今回のスクリーニングにおいて 14/600(約 2.3%)という割合で DNAi によらない非特異的 な発生異常が見られたのは、この非特異的な発生異常によるものであると言える。

![](_page_18_Figure_2.jpeg)

#### 図4機能的スクリーニングの手順

(A)オタマボヤの卵巣で多く発現する遺伝子の cDNA を作製した。(B)コロニーをランダムにピック アップし、クローンごとに PCR によって増幅した。(C)スクリーニングの第一段階。5 つのクローンを 1 つにまとめたプールを、ワカレオタマボヤの卵巣に注入した。3 hpf 胚に何らかの異常な表現型が 観察されたプールのみ、次以降の実験で使用した。(D) 第二段階。5 つのクローンを個別に卵巣に注入 して、3 hpf 胚における表現型を観察した。表迫は A, B, C のステップを行い、松尾は B, D のステッ プを行った。

#### 3. 同定した 8 つの cDNA クローンの機能阻害による表現型

機能的スクリーニングによって同定された8つのクローンのうち、No.56,322,438,512,663,1760, 2186の7つについては、受精以降に表現型が現れた。一方、No.791のみは受精以前から表現型が現 れていた。そこでまず前者7つのクローンについて3hpf(孵化直後幼生),5hpf(中期幼生),7hpf

(後期幼生)のステージで、No.791 については産卵後から時間を追って、それぞれ詳細に観察した。 表現型の確認はすべてのクローンについて3回以上行った。その結果、表現型を4つのパターンに分 類することができた。以下では表現型のパターンごとに説明していく。 ーつめの表現型を示したのは、クローン No.512, 1760, 2186 である。これらのクローンを注入した胚では全く卵割しない、あるいは異常な卵割を数回した後に分裂停止するという表現型が現れた(図 5A)。コントロールは PCR-EGFP を注入した胚である。一方、ヒストン 2B (H2B)-mCherry(注入マーカー、核が光る)で染色された核が一つの割球の中に複数見られたことから(図 5B)、DNA 複製は行われていたようである。これらのクローンの塩基配列を特定し、Oikobase で同定したところ、No.56 は *tubulin alpha-1* 遺伝子を、 No.1760 と 2186 は似通っているものの異なる二つの *tubulin beta 2c* 遺伝子をそれぞれコードしていた。tubulin は微小管の構成タンパクであり、微小管は細胞分裂の際、紡錘体の形成に必須である(Walczak and Heald 2008)。上記の表現型は微小管を形成できなくなったために正常な細胞分裂が行えなくなったために起こったと考えられる。

![](_page_19_Figure_1.jpeg)

![](_page_19_Figure_2.jpeg)

![](_page_19_Figure_3.jpeg)

В

![](_page_19_Figure_5.jpeg)

clone 512

図 5 DNAi による母性因子の機能的スクリーニングの結果

A. クローン No. 512, 1760, 2186 の注入胚の写真。それぞれ 3 hpf, 5 hpf, 7 hpf で観察した。卵割

が行われないか、少しの卵割を行った後に停止する表現型が得られた。各クローンに対応するタンパク質名を図の上に記した。写真の右下に書かれている数字は、総実験回数分のなかで、その 表現型が 90%以上観察された実験回数である。

 B. クローン No. 512 (tubulin α-1 chain)を阻害した 32 細胞期の胚。二つの胚に注入マーカーが見 える。明視野(DIC40)で観察した際は卵割を行っていないが、一つの割球の中に複数の核(ヒストン: H2B-mCherry)が観察された。

二つめの表現型を示したのは、クローン No.322 である。このクローンを注入すると、胚形成の途 中で発生が止まってしまう表現型が得られた(図 5C)。細胞分裂自体は正常に進んでいるように見える のだが、形態形成に失敗し、組織分化していないような細胞塊に発生した。配列を解析したところ、 この No.322 は chromosome segregation 1-like (CSE1L)タンパク質の遺伝子をコードしていた。 CSE1L は物質の核輸送に必要なタンパク importin-a を核内から細胞質に排出して戻す役割を持つタ ンパクである(Hood and Silver 1998)。阻害胚ではこのタンパクの機能が損なわれたために、正常な 形態形成に必要な核輸送が行われなかったのだと考えられる。

三つめの表現型を示したのは、クローン No. 56, 438, 663 である。これらのクローンを注入した胚では、発生すると細胞同士が解離し、極小の細胞がたくさん出てきてしまうという表現型が得られた(図 5D)。これらのクローンのうち No.56 と 438 は、16~32 細胞期という発生の早い時期から細胞接着が弱くなってることを確認できた(図 5E)。一方、No.663 は 32 細胞期には細胞接着が正常であるように見えるが(図 5E)、孵化するステージの頃からは徐々に胚が崩れていった。クローンの配列を解析したところ、No.56 と 438 はそれぞれ cadherin-6 precursor と catenin alpha-1 というタンパクの遺伝子をコードしていた。この二つはどちらも細胞接着因子の構成タンパクである(Dalva *et al.* 2007)。上記の表現型は細胞接着因子が減少したために現れたものだと考えられる。一方、No.663 は replication protein A (rpa)-interacting protein a というタンパクの遺伝子をコードしていた。このタンパク複合体の構成物である(Jullien *et al.* 1999)。このタンパクが抑制された胚では、DNA の修復や組み替えが正常に行われなかったことによる細胞死や異常な細胞増殖などが起こっていたと考えられる。

C

D

![](_page_21_Picture_2.jpeg)

Ε

![](_page_21_Picture_4.jpeg)

- 図 5 DNAi による母性因子の機能的スクリーニングの結果
- C. クローン No. 322 の注入胚の 3 hpf, 5 hpf, 7 hpf における写真。胚発生が途中で止まり、形態形 成が正常に行われない表現型が得られた。
- D. クローン No. 56, 438, 663 の注入胚の 3 hpf, 5 hpf, 7 hpf の写真。割球同士が解離し、極小の 細胞となって崩れていった。
- E. クローン No. 56, 438, 663 の注入胚の 32 細胞期の写真。56 (cadher in-6 precursor) と 438 (catenin alpha-1) は発生初期から割球同士の接着が弱くなっていたが(赤矢印)、663 (rpa-interacting protein a) は発生初期には表現型が現れなかった。

四つめの表現型を示したのは、クローン No.791 である。このクローンの配列を解析したところ、 protein phosphatase 2A catalytic subunit (PP2Ac) のタンパクの遺伝子をコードしていた。タンパ ク質脱リン酸化酵素である PP2A は、structural subunit A、regulatory subunit B、catalytic subunit C の 3 つの構成因子の複合体であり、結合する regulatory subunit B の種類によって異なる機能を持 つことが知られている(Cho and Xu, 2007; Xu *et al.* 2006)。今回見出したのは活性部位を持つ catalytic subunit C であった。PP2Ac をノックダウンした卵の表現型の解析および PP2Ac の役割については、次の章で詳細に記述する。

以上が母性因子の機能的スクリーニングにより同定された8つの遺伝子である(表 1)。スクリーニ ングにおいてこれらの遺伝子を特異的にノックダウンできていたのかどうかを調べるために、それぞ れの遺伝子中のオーバーラップしない2箇所の配列のPCR断片を作製し、これを注入した(表 2)。す ると clone56 を除いて、オーバーラップしない2箇所のテーゲット配列で元のスクリーニングで観察 したときと同じ表現型が現れた。いくつかの遺伝子では penetrance が下がったが、少なくとも同じ 表現型だったため、DNAi によって遺伝子を特異的にノックダウンできていることが確認された。ま た、今回観察した表現型異常が母性効果だったかどうかについては、それを検証する実験を行えなか ったため、zygotic である可能性を完全には排除できていない。ただし、オタマボヤの zygotic な遺伝 子発現は8細胞期から始まるといわれている(Danks *et al.* 2013)。clone2186の tubulin6 2c は卵割 の始まる前から、後述する clone791 の PP2Ac は未受精卵の段階から表現型が現れたことから、これ らは母性効果の表現型である可能性が高い。以上の結果から、確かに卵巣内注入と DNAi を用いて初 期発生に関わる母性因子の機能的スクリーニングを行えたといえるだろう。

clone No.	Protein name	gene ID	Target position	Target length
56	cadherin-6 precursor	GSOIDT00011474001	-193~489	682
438	$\alpha$ -catenin1	GSOIDT00013235001	2368~2776	408
663	rpa-interacting protein a	GSOIDT00013373001	-79~625	704
322	CSE1like	GSOIDT00013374001	1744~2033	289
512	alpha 1b(tubulin)	GSOIDT00000916001	72~68	140
1760	tubulin $\beta$ 2c	GSOIDT00006170001	842~1194	352
2186	beta 2c (tubulin)	GSOIDT00002011001	601~844	243
791	pp2a subunit alpha isoform	GSOIDT00009452001	970~1427	457

#### 表1 母性因子の機能的スクリーニングにより同定した遺伝子一覧

同定した遺伝子の clone No.、遺伝子名、gene ID、target position 、塩基配列の長さをまとめた。 target position の数値は、翻訳開始位置の塩基を1として表した。

		targeting position	targeting position	
clone No.	Protein name	rate of malformation	rate of malformation	
		-156~161	217~473	
56	cadherin-6 precursor	104/106	0/77	
		2368~2487	2510~2776	
438	$\alpha$ -catenin1	96/97	98/118	
		25~213	358~625	
663	rpa-interacting protein a	56/71	87/90	
		1744~1845	1890~2007	
322	CSE1like	13/50	57/73	
		10~196	208~362	
512	alpha 1b(tubulin)	17/75	12/65	
		912~1032	1034~1194	
1760	tubulin $\beta$ 2c	84/93	50/65	
		601~645	659 <sup>~</sup> 844	
2186	beta 2c (tubulin)	66/70	105/106	
		970~1117	1202~1427	
791	PP2Ac	69/69	33/33	

#### 表2 DNAiの遺伝子特異性の検討

同定した遺伝子から同一遺伝子中のオーバーラップしない二つの配列領域を用いて DNAi を行い、 DNAi の特異性を確認した。スクリーニングの際と同じ表現型を示した胚の数を数えた。target positionの数値は、翻訳開始位置の塩基を1として表した。

#### 考察

#### 1. 母性因子の大規模な機能的スクリーニングの確立と結果

本研究では、ワカレオタマボヤを用いて卵巣特異的に発現する遺伝子の機能的スクリーニングを実行した。cDNAの3000個のクローン(卵巣特異的遺伝子の約57%)について調べた結果、7つの初期発生に関わる遺伝子と、1つの減数分裂停止に関わる遺伝子を同定することができた。このDNAiを用

いた実験系が母性因子の大規模な解析のためのツールになるとわかり、実際に重要な母性因子を同定 することができた。しかし、以下に述べるように、スクリーニングの結果からいくつかの課題も見え てきた。。

#### 2. ワカレオタマボヤを用いた機能的スクリーニングにおける課題

第一に、同定できた遺伝子の数の少なさについてである。卵巣特異的遺伝子の半分以上、すなわち 2000 個以上を理論上ではスクリーニングしたにもかかわらず合計 8 つの遺伝子しか表現型が出なか ったという結果は、特定した遺伝子数が少ないように見える。事実、線虫(C. elegans)では母性因子の RNAi による機能的スクリーニングが行われており、ここでは 350 クローン中 81 個が卵形成に影響す る表現型を示した(Piano et al. 2000)。一方、オタマボヤのスクリーニングでは卵形成に影響したクロ ーンは一つも見つからなかった。この原因としては、卵巣に DNA を注入したタイミングが遅すぎた せい(産卵 8-12 時間前)で、卵形成(と胚発生)に必要十分なタンパクがすでに産生されていた可 能性が考えられる。実際に今回のスクリーニングでは、注入する時間帯によって表現型の現れる割合 に違いがあるクローンも存在した(penetrance が低かったため詳細な解析は行わなかった)。これとは別 に、cDNA ライブラリ作製のサブトラクションの際に、発生や卵形成に関わる遺伝子が減少していた 可能性も考えられる。また、今回は penetrance の基準を 90%と高い値に設定した。しかし DNAi の特 異性を確認した実験で示したように、一部の遺伝子は塩基配列の領域を変えたことで penetrance が低 くなり、さらにクローン No.56 に関しては片方の領域では表現型が全く現れなくなった (Table2)。こ のことから、ターゲット配列によっては DNAi の効率が悪く、初期発生に必要な母性因子を取りこぼ している可能性もある。また、当初の予想と異なり、局在して働くような母性 mRNA の候補が見つ からなかったということも取りこぼしの可能性を示唆しているのかもしれない。

24

#### 序論

#### 1. 卵における減数分裂停止の意義

一般的に、ほとんどの動物の未受精卵は精子と出会うまで、第一減数分裂か第二減数分裂のどこか で細胞周期を停止している。この現象は単為発生を防止し、受精による正常な発生を開始するために 必要である。受精時、卵に入った精子は、卵の小胞体からカルシウムイオンを放出させることによっ て、あるいは海水からカルシウムイオンを取り入れることによって、細胞内カルシウムイオン濃度を 上昇させる。このしくみを卵活性化(もしくは卵賦活化、egg activation)と呼び、ほとんどの後口動 物の卵において広く保存されている現象である (Stricker, 1999)。一方で、その詳細な分子機序は種に よって様々なしくみが報告されている(Masui and Markert, 1971; Levasseur et al., 2013; Moriwaki et al., 2013)。卵活性化および減数分裂再開の分子メカニズムは、ヒトデやカエルをもちいて幅広く研究さ れてきた(Kishimoto, 2011; Hörmanseder et al., 2013)。第二章で、私はオタマボヤの二つの特徴、卵巣内 顕微注入と DNAi を活用した母性因子の大規模な機能的スクリーニングを行ったことを紹介した。 卵 巣で多く発現する遺伝子の cDNA から 3000 個のクローンをスクリーニングし、受精以後の初期発生 に必要な7つの遺伝子を同定した(Omotezako et al., 2007)。第三章では、ノックダウンすると受精し ていないにもかかわらず減数分裂の再開と単為発生をしてしまう母性遺伝子、タンパク質脱リン酸化 酵素 2A の活性サブユニット(PP2Ac)の表現型について詳しく解析する。3000 個のクローン中で受 精前に表現型異常が観察された母性遺伝子はこれが唯一であり、インパクトの強いものであったので 興味が引かれた。なお、ワカレオタマボヤの卵は第一減数分裂中期で受精するまで停止していること が知られているが(Ganot et al., 2007)、その分子メカニズムに関しては未知であった。

#### 2. 減数分裂停止機構の分子メカニズムおよび PP2A の役割

PP2A は構造サブユニット A、制御サブユニット B、活性サブユニット C の三量体構造を持った脱 リン酸化酵素で、一般的には細胞周期制御やがん抑制遺伝子としての役割が知られている (Jansens *et al.*, 2001; Xu *et al.* 2006; Cho and Xu, 2007)。減数分裂停止の分子経路における PP2A の役割は生物種 によって異なる。例えば、脊椎動物のアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の受精においては、カルシ ウムシグナルによって Erp1 (哺乳類での Emi2、別名 f-box protein 43) という減数分裂停止の中心と なる制御因子が分解される。受精する前、Erp1/Emi2 は Mos/MEK/MAPK 経路の下流で活性化・安定 化されている。Erp1/Emi2 は Cdc2 活性型後期促進複合体 (APC/C)の働きを阻害し、結果として APC/C によって分解される M 期促進因子(MPF、Cdk1/CyclinB 複合体)を安定的に維持している (Inoue *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Isoda *et al.*, 2011; Tischer *et al.*, 2012; Hörmanseder *et al.*, 2013)。この経路において、 PP2Ac-B56 は Erp1/Emi2 を特定のアミノ酸を脱リン酸化することによって安定化・活性化することで、 減数分裂停止の維持に働いている(Isoda *et al.*, 2011)。

その一方で、脊索動物ホヤ綱のカタユウレイボヤ(*Ciona robusta*; former *C. intestinalis*, type A)では、 PP2A は減数分裂停止を維持するはたらきを持っていないと考えられる。カタユウレイボヤをはじめ としたホヤ綱は Mos/MEK/MAPK 経路が働いているにもかかわらず(Dumollard et al., 2011; Russo et al., 2009; Sensui et al., 2001)、ゲノム中に Emi2 が存在しないいないからである(Yamamoto et al., 2008)。ホ ヤ綱では、MAPK が直接 APC/C を阻害して減数分裂停止を維持している。ツメガエルとは対照的に、 ホヤ卵の受精時における PP2A の機能は APC/C の活性化であり、そのため減数分裂停止の維持ではな く卵活性化の方に必要とされている(Levasseur et al., 2013)。

これらを踏まえつつ、私はオタマボヤの卵における PP2A の減数分裂停止における役割を調べた。 PP2Ac をノックダウンすると、極体の放出と単為発生が引き起こされた。この表現型は産卵後に始ま り、産卵前の卵巣内にある卵では始まらなかった。卵周囲・および卵細胞内 pH が産卵に伴って上昇 すると、PP2A が欠落している卵では長時間の細胞内カルシウム濃度の上昇(Ca<sup>2+</sup>バースト)が発生 し、この現象が本来なら受精の時に起こるはずの Ca<sup>2+</sup>バーストをミミックすることにより、卵の減数 分裂の再開及び単為発生が引き起こされたと考えられる。

#### 結果

#### 1. 母性 PP2Ac のノックダウンは減数分裂再開と単為発生を引き起こす。

卵巣や卵内の母性 PP2Ac を、卵巣内顕微注入法を用いた DNAi (標的配列の位置:976-1433) によって機能阻害した。その結果、注入マーカー (H2B-EGFP または lifeact-mCherry)の蛍光を示す卵は、 受精することなく産卵後約 10 分で極体様の小さな細胞を放出し、その後卵割に似た不均等な細胞分 裂(偽卵割)を開始した(93%, n=154, N=3、n は卵の数、N は実験回数) (図 6A, B, 動画 1) (全て の動画は以下のサイトにアクセスすると、閲覧可能になっている。

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio web/lab page/nishida/matsuo/index.html。またこの章で扱う動画 1~4 の各動画の説明は、この章末の 38 ページに書かれている)。この表現型は未注入卵あるいは異なる 遺伝子を標的配列とした二本鎖 DNA の注入卵ではまったく見られなかった。極体様細胞の DNA を DAPI で染色したところ、第一極体、第二極体ともに、通常の受精卵と似て強く染まったので、これ らは極体であるということができる(図 6B)。これらの結果は、PP2A の機能が低下すると、未受精 卵は減数分裂を停止した状態を維持できなくなり、減数分裂と単為発生を開始してしまうことを示し ている。

通常の受精後の卵の発生過程、および産卵後の PP2Ac ノックダウン(KD)卵における変化を時間 軸上にまとめた(図6C,D)。すると第一極体および第二極体を放出するタイミングに時間的な相関 が存在した。一方、第一極体放出までの時間は、正常卵の受精後から計測するよりも、KD 卵の産卵 後から計測した方が5分ほど長かった。そして第二極体放出から偽卵割(第一卵割と考えられる)開 始までの時間は6分ほど遅れていた。この偽卵割においては、受精後の第一卵割とは異なり、多くの 場合で卵を二等分することに失敗していた(図6A)。卵割の異常は、本来ならば受精時に精子から 提供される中心体が失われていることが原因だと推測出来る。以上から、母性 PP2Ac をノックダウン した卵で産卵後から起きるこれらの表現型は、減数分裂の再開および発生の開始であるように見える。

DNAiによる母性 PP2Ac のノックダウンの効果を確かめるため、この DNAi 卵について whole-mount *in situ* hybridization (WISH) およびリアルタイム PCR (qPCR) を行った。いずれの実験においても、

PP2Ac mRNA が有意に減少していた(図 6E, G)。さらに、PP2Ac cDNA クローンについて、範囲の 重なっていない異なる配列を標的にした DNAi(標的配列の位置:7-946)、および RNAi を行った場 合でも同様の単為発生の表現型が観察されたことから(49%, n=80; 92%, n=63, 図 6F)、 この PP2A DNAi の効果は、標的遺伝子に特異的であることが確認された。これらの結果は、母性 PP2Ac が減数 分裂停止の維持と単為発生の防止に必要であることを示している。以降のノックダウン実験では、 DNAi(標的配列:976-1433)を用いている。

![](_page_27_Figure_1.jpeg)

#### 図 6 PP2Ac-KD 卵における単為発生の表現型

A. PP2Acの PCR 産物を注入した卵では、産卵後に極体のような細胞片が放出され(矢印)、不均等な 偽卵割が見られた。産卵後10分おきに撮影したものである。このような卵の動画1は、 <u>http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio\_web/lab\_page/nishida/matsuo/index.html</u>で閲覧可能にしてある。また 各動画の説明は、この章末の\*\*ページに書かれている。

B. 対照卵および KD 卵の第一極体、第二極体様細胞片の DNA を DAPI で染色した(矢印)。DAPI で染まったサンプルの数を右下に記した。

C. 正常な発生における受精後のイベント(極体放出や卵割)のタイミングを時間軸上に記した。青 が第一極体放出、オレンジが第二極体放出、灰色が第一卵割開始である。

D. PP2A-DNAi 卵の単為発生における産卵後のイベントのタイミングをCと同様に時間軸上に記した。
 E. *PP2Ac* mRNA に対するプローブで *in situ* hybridization を行った。

F. 二本鎖 RNA を注入した卵の産卵二時間後の写真(RNAi)。

G. リアルタイム定量 PCR で *PP2Ac と \beta -catenin* の母性 mRNA の発現量を対照卵(kaede, 赤)と PP2A-DNAi 卵(青)で調べた。 発現量のノーマライゼーションは *cytoplasmic actin* mRNA で行った。 星印は有意差があることを示している (p < 0.001, t-test)。スケールバーはすべて 50  $\mu$  m。

#### 2. 単為発生した PP2Ac-KD 胚における DNA と微小管の構造

この単為発生的な表現型は、通常の初期発生と同様に、DNA 複製や微小管の構造変化を伴うので あろうか。そこでまず DNA を DAPI で染色した(図 7A)。通常の未受精卵では、DNA は 1 つの減 数分裂装置に集中していた(100%, n=32)。この時期の卵では、細胞周期は第一減数分裂中期で停止 している(Ganot *et al.*, 2008)。産卵直後の PP2Ac-KD 卵においても、DNA の状態は通常の未受精卵 と似ているように見える(100%, n=31)。一方、PP2Ac-KD 卵の産卵後から 3 時間が経過すると、卵 核と比べて明らかに大きくかつサイズも不揃いな核が複数観察された(100%, n=35)(図 7A)。卵 活性化から 3 時間という時期は、通常の発生ならば孵化直前に相当する時期であり、細胞数は約 300 個程あるはずである(Stach et al., 2008)。この KD 卵の大きな核は DNA 複製の開始が起こったことを示 しているが、一方で精子から提供されるはずの中心体を欠いたことにより、有糸分裂と細胞質分裂に 失敗し、結果として KD 卵は巨大な核を複数持った少数の細胞の胚に発生してしまったことによるも のと考えられる。

次に、微小管を観察するため、tubulin 抗体染色を行った(図7B)。通常の2細胞期胚において、 微小管は中心体から放射状に伸びている(100%, n=43)。対照的に、産卵後3時間のPP2Ac-KD卵で は精子により持ち込まれるはずの中心体がないせいで、無秩序な微小管構造が観察された(100%, n=35)。そこで産卵直後のKD卵を受精させる実験を行ったところ、それぞれの卵に精子から中心体 が提供されることで、中心体および星状体を持った通常の2細胞期胚に発生した(100%, n=31)。受 精したKD卵はその後も正常に見える細胞分裂を続け、その中の大部分は頭部と尾部を持ったオタマ ジャクシ幼生に発生したものの、中には変形しているものもあった(図7C)。以上の実験から、 PP2Ac-KD胚で観察された不均等な偽卵割は中心体の欠如によるものであると説明できる。また単為 発生が始まる前の産卵直後に受精させた場合、ほぼ正常に発生が進行することから、母性 PP2Ac は初 期発生にはほとんど必須ではないことがわかった。

![](_page_29_Figure_0.jpeg)

#### 図 7. 単為発生した PP2Ac-KD 胚における DNA と微小管

A. DNA を DAPI で染色した。矢頭は減数分裂装置または核を示している。

B. 微小管をα-tubulin 抗体で染色した。矢頭は星状体の形をした中心体を示している。

C. PP2A c – DNAi 卵と kaede DNAi 卵 (control) を産卵直後に受精させた。3.5 時間後、3 つのタイプ の表現型が観察できた。正常に見える幼生と、異常な形の幼生と、孵化に失敗した細胞塊に結果を分 類して示す。p < 0.001 ( $X^2$  test)。 スケールバーは 50  $\mu$  m。

3. PP2Ac-KD卵における減数分裂の再開は産卵後のpHの上昇に依存して起こる。

産卵直前の卵巣内では、ほぼ完成した未受精卵が多数存在する(図1B,下)。PP2Ac-KD卵巣でも それは変わらない。それにもかかわらず単為発生的な卵活性化は、なぜ産卵後から見られ、卵巣内 にある間は起こらないのだろうか。この疑問解決の手がかりとして、私はpHが関わるのではないか と考えた。ホヤ綱においては、卵巣中の卵周囲のpHが海水のpHよりも低く、その低いpHが産卵ホ ルモンにより引き起こされる卵核胞崩壊(GVBD)を伴う卵成熟を、ホルモンがないときには卵巣 内で防止するために必要であることが知られている(Lambert, 2005)。ヒトデにおいてもまた、体 腔液のCO2濃度が高いために卵巣中のpHが低く、このことが減数分裂停止の維持に必要であること がわかっている(Moriwaki et al., 2013)。そこで私は、オタマボヤの卵巣内も同様にpHが低いので はないかと考え、卵周囲のpHの上昇がPP2Ac-KD卵の減数分裂再開のトリガーになっているかどう かを検証した。産卵直前の性成熟したメスを低pHの人工海水(pH 6.6)に移し、そしてPP2Ac-KD 卵を低pH人工海水中に放出させた。するとKD卵は30分間、単為発生をしなかった。その後KD卵を 通常のpHの人工海水(pH 8.1)に移すと、典型的な単為発生が始まった(54%, n=91, N=3, 図8A)。つ まり、30分間低pHで処理されてもKD卵の半数以上が、減数分裂再開能を保持していたことを意味 している。一方、コントロールとしてkaede PCR産物を注入した卵は、低pHから通常pHに移動させ ても活性化しなかった(0%, n=41)。よって、PP2Ac-KD卵においてpHの上昇は減数分裂の再開と単為 発生のきっかけになることが示された。オタマボヤの卵巣内が実際に酸性であるかどうかはわから ないが、産卵の際に卵が卵巣内から海水中へ放出されるタイミングにおいて、PP2Acは減数分裂停 止の維持に必要であることが明らかになった。

次に卵周囲のpHが細胞内pHに影響しているかどうかを調べるため、pH試薬pHrodoを用いて、細 胞内pHの変化を計測した。人工海水のpHが6.8から8.2に上がる前後の蛍光強度の変化率を計測した。 すると、pHrodoの赤の蛍光強度はpH上昇5分後に約70%にまで減少しpHの上昇を示した。細胞内pH の絶対値は計測できなかったものの、この結果から、卵の細胞内pHが上昇していたことがわかった (図8B)。以上から、産卵による卵周囲のpH上昇が細胞内pHを上昇させ、そのことがPP2Ac-KD卵 での減数分裂再開を引き起こした可能性がある。

卵を低pH人工海水中に置いて卵巣内環境を再現する方法は、薬剤処理実験でプレインキュベーションするときに使える有用な手段である。そこで、未受精卵を、PP2A活性阻害剤であるオカダ酸で 処理する実験を行った。しかし、通常の未受精卵を、通常のpHの人工海水に溶かしたオカダ酸で処 理しただけでは、2時間経っても卵は活性化しなかった(data not shown)。そこで低pH人工海水(pH 6.6)中にて1 μMのオカダ酸で卵を産卵後から20分間処理したのち、通常のpHの人工海水に移した ところ、卵は極体様構造の放出と偽卵割の表現型を示した(100%, n = 70) (図8C, 動画2)。この 結果は、PP2A活性が産卵後ではなく、産卵のタイミングで働いており減数分裂再開と単為発生を防 止する為に必要であることをさらに補強した。

30

![](_page_31_Figure_0.jpeg)

#### 図8 PP2Ac-KD 卵における減数分裂の再開は pH に依存する。

A. PP2Ac-KD 卵を低い pH の人工海水 (pH 6.6) 中に産卵させた。その後、通常の pH の人工海水 (pH 8.1) に移した。矢印は極体を示しており、これを減数分裂が再開した証拠とみなしている。 control 実験 では (左パネル)、PP2Ac-KD 卵を pH 8.1 の人工海水中に産卵させた。lifeact-mCherry (赤)を注入 マーカーとして用いた。

 B. 未受精卵における細胞内 pH の変化を pHrodo を用いて計測した。右のグラフでは、周囲の pH を上 昇させる前後での蛍光強度(赤)の変化の割合を示している。control としては、低い pH の海水から 低い pH の海水に移した。(p < 0.001, t-test)</li> C. pH 6.6の人工海水中に産ませた未受精卵を、DMSO (control) またはオカダ酸で 20 分間処理した。 その後、卵を pH 8.1の人工海水へ移した。オカダ酸で処理したすべての卵が、極体の放出および (ま たは) 不均等な卵割の表現型を、移動後 20 分以内に見せた。 (p < 0.001, Fisher's extract test). スケールバーは 50 μm。

#### 4. PP2Ac-KD 卵は、産卵直後にカルシウムバーストを示す。

ほとんどの動物における受精時の卵の活性化の要因として、卵内カルシウムイオン濃度が数分間上 昇するカルシウムバースト(Ca<sup>2+</sup>バースト)がある。これと同じことが PP2Ac ノックダウンによる単 為発生的な卵活性化でも起きているのかどうかを調べるため、細胞内カルシウムイオン濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) を、カルシウムセンサータンパク質の G-CaMP8 を用いて、タイムラプスイメージングで計測した。 最初に、通常の受精で何が起きているのかを観察した。全く予想外なことに、オタマボヤの卵はホヤ 綱や脊椎動物と異なり(McDougall and Sardet, 1995; Cuomo et al., 2006; reviewd by Whitaker, 2006)、受精 前でもカルシウムパルスのオシレーションを発していた(図 9A, 動画 3)。そして他の多くの生物と同 様に、受精によって約2分間のカルシウムバーストが引き起こされた。次に、コントロールとしてkaede PCR 産物を注入した卵を低 pH 人工海水から通常の pH 人工海水に移すことで産卵を再現し、このと きの細胞内カルシウムイオン濃度を観察した(図 9B, 動画 4)。低 pH 人工海水から移す前はカルシウ ムイオン濃度が高く、移した後に低くなり始めた。これと同じ現象は kaede PCR 産物を注入していな い普通の卵でも確認された(data not shown)。この結果は、オタマボヤ卵で見られる受精前のカルシウ ムオシレーションは、産卵で pH が上昇したときから始まることを示唆している。ただし、高いカル シウム濃度によってオシレーションがマスクされている可能性も残っている。pH が低いときに(普 通なら卵巣中で)カルシウムイオン濃度が高くなっている理由は現在のところ不明である。一方で GFP には、pH が低くなるにつれ、蛍光強度も弱くなっていくという性質がある (Kneen et al., 1998)。 今回の結果においては、pH が低いときに G-CaMP8 の蛍光強度が高くなっているため、GFP の性質で はこの結果の理由を説明することはできないと考えられる。またこの実験の際には、受精を行ってい ないので、受精時のカルシウムバーストは観察されなかった。

対照的に、PP2Ac-KD 卵を低 pH から通常の pH の人工海水に移したときには、5 例すべてにおいて、 異常なカルシウムバーストが、カルシウムオシレーションの第一波で観察された(図 9C, 動画 4)。カ ルシウムの濃度が高い期間は、ちょうど受精時のカルシウムバーストと同じように、約2 分間続いた。 また、より小さなカルシウムバーストがすべてのオシレーションごとに見られる傾向があった。これ らの結果から、異常なカルシウムバーストは、受精をしていないにもかかわらず受精時のカルシウム バーストをミミック(模倣)することによって、単為発生的な卵活性化を引き起こしている可能性が 示された。PP2Ac は産卵のタイミングのときに、異常なカルシウムバーストが発生してしまうことを 防止する役割を持つと考えられる。

![](_page_33_Figure_0.jpeg)

**図 9 PP2Ac-KD において、pH 上昇が異常なカルシウムバーストを引き起こした。** 細胞内カルシウムイオン濃度は G-CaMP8 タンパク質の蛍光を用いて測定した。縦軸は G-CaMP8 の蛍光 強度をΔF/F0 として示している。また、*G-CamP8* mRNA の注入量はサンプルによって異なるため、そ の違いがΔF/F0 の振幅(縦軸のスケール)に影響していることを注記しておく。

A. 通常の受精における、典型的な細胞内カルシウムイオン濃度の変化。精子を10分のタイミングで 加えた。受精は11.2分のタイミングで観察された(赤矢印)。第一卵割は32分に始まった(黒矢印)。 赤いバーはカルシウムバーストを示している。

B. kaede PCR 産物を注入した対照卵における、海水の pH を上昇させたときの細胞内カルシウム濃度の変化(control)。人工海水の pH は 10 分のタイミングで上昇させた(赤矢印)。

C. PP2Ac-KD 卵における、海水の pH を上昇させたときの細胞内カルシウム濃度の変化。pH は 10 分の タイミングで上昇させた(赤矢印)。第一偽卵割は 32.5 分に始まった(黒矢印)。赤いバーは異常 なカルシウムバーストを示している。

G-CaMP8 のイメージングは当研究室の小沼健助教に御願いした。

#### 5. PP2Ac-KD 卵では Ca<sup>2+</sup>/CaMK II 経路を介して単為発生的な卵活性化が起こる

この異常なカルシウムバーストが、単為発生的な卵活性化を引き起こしているのかどうかを検討した。その際、3 つの独立したアプローチを行った。最初に、オタマボヤ卵では他の動物の卵と同じように(Mitalipov et al., 2001; Heytens et al., 2008)、カルシウムイオノフォアで処理すると人工的なカルシウムバーストを発生させられるかどうかを確認した。通常の未受精卵を1 µM のイオノマイシンで処理することで、PP2Ac ノックダウン時と似たような減数分裂再開と単為発生の表現型が引き起こされた(図 10A)。このときの細胞内カルシウム濃度はイオノマイシン処理をした直後に上昇していた(図 10D)。イオノマイシンの効果を抑制するために、カルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ (CaMK II、図 11 参照)の阻害剤である KN93 を用いて、イオノマイシン処理の前の卵を 20 分間処理した。この実験は、脊椎動物においてカルシウムバーストが CaMK II を介して卵活性化を誘導するという先行研究(Hansen et al., 2006)を元にデザインした。すると期待通り、KN93 処理によって、イオノマイシンで単為発生が活性化される卵の割合が減少した(図 10A)。

次に、PP2Ac-KD 卵における単為発生も、CaMK II 活性が必要なのかどうかを実験した。PP2Ac-KD 卵を低 pH 人工海水中(pH 6.6) にて KN93 で 20 分間処理し、通常の pH(pH 8.1) に上昇させた。す ると KN93 処理によって PP2Ac-KD 卵の活性化が強く阻害された(図 10B)。つまり、PP2Ac ノックダ ウンとイオノマイシン処理の両方において、CaMK II がエフェクターとして必要であることが示され た。一方で、CaMK II 阻害剤は通常の卵の受精を阻害することはできなかった(data not shown)。考 えられる理由として、カルモジュリン依存性セリン/スレオニン脱リン酸化酵素(カルシニューリン) という、ホヤ綱の受精においてカルシウムシグナルを媒介すると知られているエフェクターが

(Levasseur *et al.*, 2013)、オタマボヤの受精においても重複して働いている可能性がある。このことから、PP2Ac ノックダウンとイオノマイシン処理による卵活性化で起きていることは、受精時のそれと 完全に同じというわけではないと言える。

最後に、異常なカルシウムバーストの重要性を検証するために、PP2Ac-KD 卵をカルシウムキレー ターである BAPTA-AM によって処理した。PP2Ac-KD 卵を低 pH 人工海水中(pH 6.6)で 5 分間処理 し、通常の pH (pH 8.1)に上昇させた。すると BAPTA-AM 処理によって PP2Ac-KD 卵の活性化が強 く阻害された(図 10C)。以上の実験結果を総括すると、PP2Ac-KD 卵で産卵時に見られる異常なカル

![](_page_35_Figure_0.jpeg)

シウムバーストが、カルシウムシグナル経路を活性化し、単為発生を引き起こしていることが示され

図 10 イオノマイシンによる単為発生の活性化、および CaMK II 阻害剤や BAPTA による単為発生の阻 害

A. 未受精卵を通常のpHの海水中に産卵させ、DMSOまたはKN93で20分間処理した。その後、それらを イオノマイシンで処理した。1時間後、卵を3種類の表現型に分類した。極体放出と偽卵割を行った卵 と、何も変化のなかった卵と、この二つに該当しない異常な卵である。矢頭は極体を示している。(p < 0.001, X2 test)

B. 未受精のPP2Ac-KD卵をpH 6.6の人工海水中に産卵させ、DMSOまたはKN93で20分間処理した。その 後、pHを8.1に上昇させた。(p < 0.001, Fisher's extract test)

C. 未受精のPP2Ac-KD卵をpH 6.6の人工海水中に産卵させ、DMSOまたはBAPTA-AMで5分間処理した。その後、pHを8.1に上昇させた。(p < 0.001, X2 test)</li>

D. G-CaMP8を用いて、イオノマイシンで未受精卵を処理した際の細胞内カルシウムイオン濃度を測定した。イオノマイシン処理は10分のタイミングで行った(赤矢印)。

A. Dの実験は当研究室の小沼健助教に御願いした。

#### 考察

#### 1. 受精卵の減数分裂停止におけるPP2Aの役割について

PP2Acは、第二章で述べた母性因子の機能的スクリーニングによって見出した。PP2Acの卵巣内に おけるノックダウンは、産卵された卵が受精することなく減数分裂再開および単為発生を開始すると いう表現型を引き起こした。また、PP2A阻害剤のオカダ酸処理によっても似た表現型が得られた。 これらのプロセスは卵が卵巣内にある間は見られず、産卵で海水中に放出されることで卵周囲と細胞 内pHが上昇することがきっかけとなって開始する。PP2Ac-KD卵の産卵の際には異常なカルシウムバ ーストが観察された。この異常な卵活性化は、CaMK IIによるCaシグナリングの阻害、およびCaキレ ート剤のBAPTA-AM処理によって抑制された。以上の結果から、産卵のタイミングで起こるpH上昇 の際に、減数分裂停止を維持し続けるためにPP2Aが働いていると考えられる(図11)。

![](_page_36_Figure_5.jpeg)

#### 図11 PP2Ac-KD卵で単為発生が引き起こされるモデル

卵母細胞の細胞内pHは、卵巣内にある間は低く、産卵すると高くなる。産卵のタイミングでPP2Ac が欠失している場合、何らかの分子経路によって異常なカルシウムバーストが発生する。異常なカ ルシウムバーストは通常の受精におけるカルシウムバーストを模倣しており、CaMK IIを通して卵活 性化を引き起こす。その結果、第一減数分裂中期で停止していた減数分裂が再開し、単為発生が始 まる。

#### 2. 受精時のカルシウムイオン放出の分子経路におけるPP2Aの役割

本研究では、母性PP2Aが産卵時にカルシウムバーストが発生することを抑制する役割を持っていると示した。ホヤ綱と脊椎動物では、受精時のカルシウムバーストは小胞体上にあるイノシトール 1,4,5トリリン酸(IP3)レセプターのカルシウムチャネルが開くことによって発生する (Miyazaki *et*  al., 1993)。この経路の上流では、ホスホリパーゼCが(ホヤ綱では受精で活性化されたPLCγ、脊椎 動物では精子から提供されたPLCζ)ホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェート (PIP2)をIP3 に加水分解する (Hachem et al., 2017; Runft et al., 2002)。この分子経路を阻害するようなPP2Aの働き はまったく報告されていない。つまり、PP2Ac-KD卵で観察された異常なカルシウムバーストは、通 常の受精とは独立した他の経路の活性化によって引き起こされたものだと考えられる。PP2Acが存 在しないとき、細胞内pHに活性を依存した分子経路において、何かしらの母性タンパク質が過剰に リン酸化されるのかもしれない。その基質が細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に関わるようなも のであった場合、今回のような異常なカルシウムバーストが発生するのだろう。

#### 3. 脊椎動物の減数分裂停止機構との比較

カルシウムバーストから後の減数分裂再開までの分子経路は生物によって多岐にわたっている (表3)。以下、本研究の結果と脊椎動物の知見とを比較して、次にホヤ綱の知見と比較する。脊椎 動物では、受精時のカルシウムバーストはCaMK IIを活性化する。活性化されたCaMK IIはEmi2とい うタンパク質をリン酸化する(Hansen et al., 2006; Lorca et al., 1993; Madgwick et al., 2005)。すると Emi2上にあるPlk1によるリン酸化サイトが解放され、SCFβ-TrCPによる分解を引き起こす(Rauh et al., 2005)。このようにEmi2タンパク質は脊椎動物の減数分裂停止において中心となるファクターである。 受精前のEmi2は細胞周期促進因子(APC/C)に結合してその働きを阻害し、結果としてCdk1/CycB を安定化させることによって、受精まで減数分裂停止を維持している(Inoue et al., 2007; Tischer et al., 2012; Hörmanseder et al., 2013)。その後、受精するとCaMK IIによるEmi2の分解が起こる。この分子 経路において、PP2Ac(活性サブユニット)-B56(制御サブユニット)複合体は、Emi2の特定のア ミノ酸を脱リン酸化によって安定化・活性化している。Emi2上のPP2A-B56がリクルートする部位 (S335A/T336T)に変異を入れると、Emi2の分解・不活性化を引き起こす(Isoda et al., 2007: Wu et al., 2007)。以上から、PP2Aは脊椎動物において減数分裂停止を維持するために必要であるといえる。 つまり表面的にはPP2Acのノックダウンによる結果がオタマボヤと脊椎動物で似ているといえるも のの、そのメカニズムについては同じとは考え難い。なぜなら、オタマボヤのPP2Aは産卵時にカル シウムバーストを抑制しているが、他方で脊椎動物のPP2Aは産卵後に受精するまでEmi2を安定化・ 活性化するからだ。

ワカレオタマボヤはEmi2 (F-box protein 43) (GSOIDT00005520001 and GSOIDT00013161001 in the Oikobase database, <u>http://oikoarrays.biology.uiowa.edu/Oiko/</u>) と B56 制 御 サ ブ ユ ニ ッ ト (GSOIDT00007712001 and GSOIDT00015933001) をゲノム上に持っている。これらの遺伝子は卵巣お よび卵で発現している。つまり、オタマボヤにおいても脊椎動物のようにEmi2が減数分裂停止の維 持に働き、またPP2A-B56がEmi2を安定化・活性化させている可能性は残っている。しかし、脊椎動 物ではこの現象は産卵後の卵が受精するまでの維持を司っている。本研究で発見したPP2Aの役割は、 産卵というより早いタイミングで機能するというものである。そのため、DNAiによるPP2Aの機能 阻害を行った場合、先に産卵のタイミングで表現型が現れてしまうため、産卵後の現象である上記 の可能性を検証することは難しい。

#### 4. ホヤ綱の減数分裂停止機構との比較

次にホヤ綱と比較する。ホヤ綱は尾索動物亜門に属しており、オタマボヤ綱と進化的に最も近い生物である。ホヤにおいて、PP2Aが受精前に減数分裂停止を維持する役割を持つという報告はされていない。ホヤが受精すると、カルシウムバーストはCaMK IIではなく、カルモジュリン依存性セリン/スレオニン脱リン酸化酵素(カルシニューリン)を活性化する。CaMKII活性は卵活性化に伴って上昇することはなく、減数分裂の再開にも必要とされないことが阻害剤処理によって報告されている(Levasseur et al., 2013)。また、脊椎動物とは異なり、ホヤはゲノム上にEmi2を持っておらず(Yamamoto et al., 2008)、またEmi2の安定化・活性化に必要なB56制御サブユニットも持っていない(Aniseedにての検索結果)。よって、脊椎動物亜門と尾索動物亜門が進化上分岐し、さらにオタマボヤ綱とホヤ綱が分岐した後に、Emi2とB56がホヤ綱で失われた可能性が高い。以上から、オタマボヤ綱は以下の2点においてホヤ綱よりも脊椎動物に似ていると言える。1. ワカレオタマボヤにおいて、異常なカルシウムバーストに活性化されたCaMK IIは減数分裂を再開させた(ただし、通常の受精においてカルシニューリンが重複して働いているかもしれない)。2. ワカレオタマボヤは、Emi2とB56制御サブユニットの両方をゲノム上に持っている。

本研究結果をまとめると、ワカレオタマボヤにおいてPP2Aは産卵時に減数分裂停止を維持し、 単為発生を防止するために必要である。PP2Acが失われると、産卵時のpH上昇が何らかの未知の分子 メカニズムによって異常なカルシウムバーストを引き起こし、減数分裂を再開させ、結果的に正常で はない胚発生を開始させてしまうということが示された。

	Asterina pectinifera	Ciona intestinalis	Oikopleura dioica	Xenopus laevis
class	starfish (echinoderm)	ascidian (tunicate)	larvacean (tunicate)	amphibian (vertebrate)
meiotic arrest	Meta-I (Harada <i>et al.</i> , 2003)	Meta-I (Russo <i>et al.</i> , 1998)	Meta-I (Ganot <i>et al.</i> , 2007)	Meta-II (Masui and Markert, 1971)
Effectors in Ca signaling	-	calcineurin (Levasseur <i>et al.</i> , 2013)	CaMK II calcineurin (?)	CaMK II (Hansen <i>et al.</i> , 2006)
role of PP2A for maintenance of meiotic arrest	-	-	maintenance of meiotic arrest just after spawning	maintenance of meiotic arrest until fertilization (Q. Wu <i>et al.</i> , 2007)
Emi2 in the genome	× (Yamamoto et al., 2008, Moriwaki <i>et</i> <i>al.</i> , 2013)	× (Russo <i>et al.</i> , 2008)	0	。 (Inoue <i>et al.</i> , 2007)

表 3 Summary of features of the meiotic arrest mechanism in various animals

### 動画1~4の説明

全ての動画は以下のサイトにアクセスすると、閲覧可能になっている。 http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio web/lab page/nishida/matsuo/index.html

#### 動画1 PP2Ac-KD卵の単為発生

(A) PP2AcをDNAiで阻害した卵を、産卵2分後から30秒おきにタイムプスで撮影した。動画は10フレーム/秒で、実際の300倍の速度である。撮影時間は約2時間。

(B) PP2AcをDNAiで阻害した卵6つの動画を並べた。いずれも産卵数分後の同時期から30秒おきに撮影 している。動画は10フレーム/秒で、実際の300倍の速度である。撮影時間は約1時間。図6Aと同様の動 画である。

スケールバーは50 μm。

#### 動画2 オカダ酸処理した未受精卵

卵をpH 6.6の人工海水中でオカダ酸処理し、pH 8.1の人工海水に移したタイミングの2分後から撮影 を開始した。15秒おきのタイムラプス撮影。動画は20フレーム/秒で、実際の300倍の速度である。動画 中のすべての卵が活性化している。

#### 動画3 正常受精卵のG-CaMP8のライブイメージング

G-CaMP8によって細胞内カルシウムイオン濃度のライブイメージングを行った。2.5秒おきのタイムラ プス撮影。動画は8フレーム/秒で、実際の20倍の速度である。スケールバーは50 μm。左上の数字が撮 影開始からの時間(秒)を表しており、図9Aの5分~20分に対応している。右上に星印(\*)が表示さ れている期間が受精卵におけるカルシウムバーストを示している。

#### 動画4 pHを上昇させたときのG-CaMP8のライブイメージング

(左) kaede PCR産物を注入したcontrol 胚。

(右) PP2Ac PCR産物を注入した胚。

2.5秒おきのタイムラプス撮影。動画は8フレーム/秒で、実際の20倍の速度である。スケールバーは 50 μm。左上の数字が撮影開始からの時間(秒)を表しており、図9B, Cの5分~20分に対応している。 (右)の右上に星印(\*)が表示されている期間がPP2Ac-KD卵における異常なカルシウムバーストを示 している。

## 第四章:卵と初期胚で局在する母性mRNAの時間空間的解析

#### 序論

#### 1. ホヤ綱におけるpostplasmic/PEM RNAs、その局在と組織運命決定における役割

「*postplasmic/PEM* RNAs」はホヤ綱の初期胚において、植物半球後方に局在する母性mRNAの総称であり、50個程の母性mRNAが知られており、胚の軸決定や細胞の発生運命決定に重要な役割を持つ (Nakamura et al., 2003; 個々のmRNAの機能については総説Makabe et al., 2012を参照)。

postplasmic/PEM RNAsが植物半球後方へと局在する過程のパターンは2通り(Type I, Type II)に分類 される(Prodon et al., 2007)(図12)。また、様々な手法を用いた網羅的探査の結果、ホヤ綱におけ る卵内の母性mRNAの局在パターンとしては、postplasmic/PEM RNAs が示すパターン(最終的には植 物半球の後方に局在する)以外にはないだろうと考えられている。Type Iのpostplasmic/PEM RNAsは、 まず卵母細胞内で卵核胞(GV)の周囲に存在する。その後卵母細胞が大きくなるにつれ、卵表層に 集積する。卵核胞崩壊(GVBD)において減数分裂核が動物極側へ移動する際に、表層細胞質流動に 乗って植物半球側にやや偏る。この時点でpostplasmic/PEM RNAsは動植軸に沿った分布極性を持つよ うになる(Nishida et al., 2001; Prodon et al., 2006; Prodon et al., 2008)。産卵後の卵が受精すると、

postplasmic/PEM RNAsは植物極に強く濃縮される。この過程はフェーズ1と呼び、アクチン依存的で ある。第二極体放出後に、postplasmic/PEM RNAsは植物半球後方に移動する。この過程はフェーズ2 と呼び、微小管依存的である(Sardet et al., 2007)(図12)。postplasmic/PEM RNAsは、卵細胞膜を裏 打ちしている小胞体の編み目にアンカーされており、小胞体もろとも卵細胞質の動きによって移動す ることがわかっている(Sardet et al., 2003)。また、postplasmic/PEM RNAsの3'UTRに局在に必要十分な ヌクレオチド配列が存在することもわかっている(Sasakura et al., 2002)。こうして局在したmRNAは、 卵割後に植物半球後方の割球にのみ受け継がれ、運命決定や体軸形成などに働くようになる。一方、 Type IIのpostplasmic/PEM RNAsは、GVBD以前までGV周囲に存在する。GVBD後の未受精卵では細胞 質中に遍在しており、受精するとType Iほど明確ではないものの植物極側に局在する。その後、植物 半球後方側に緩やかに集積し、8細胞期までにはType Iと同じ領域に強く凝集する(Prodon et al., 2009)。 postplasmic/PEM RNAsに関しては、in situ hybridizationによる大規模な時間空間的解析および未受精卵 へのアンチセンスオリゴ注入による機能的解析などの研究が行われてきた(Makabe et al., 2001; Nishida et al., 2001; Nakamura et al., 2005, 2006)。

一方で、局在する母性因子に関してアプローチの難しい問題も未だに残っている。その一つが第二 章ですでに述べた「卵形成中に翻訳される母性因子の大規模な機能解析」である。そしてもう一つが、 「産卵以前の卵形成過程での*postplasmic/PEM* RNAsの時間空間的局在解析」である。卵形成中の母性 mRNAの動きを時系列に沿って可視化する実験に適した生物は限られている。例えばホヤ綱のモデル 生物であるマボヤのライフサイクルは3年であり、卵巣は分厚く不透明な被嚢に包まれている。その ため卵形成の各発達ステージにある卵巣の安定的な収集が困難で、このことが卵形成過程における *postplasmic/PEM* RNAsの時間空間的局在解析を難しくしていた。これまでに、卵形成中の局在パター ンが明らかになっていない母性mRNAも多く存在している(Makabe and Nishida; 2012)。しかし、mRNA は何処で作られるのか、どのような過程を経て母性mRNAが受精卵中で局在するに至るのか、さらに その局在の分子メカニズムを知るためには、卵形成の過程でのmRNAの分布を知る必要がある。

![](_page_41_Figure_1.jpeg)

#### 図12 postplasmic/PEM RNAsの局在パターンの模式図

postplasmic/PEM RNAsの局在パターンは2通りに分けられる。上段がType Iで、下段がType IIである。またType Iが受精後に植物極へ強く局在する動きをフェーズ1、第二極体放出後に植物半球後方 へ移動する動きをフェーズ2と呼ぶ。(Prodon *et al.*, 2007)より改変。

#### 2. ワカレオタマボヤの卵形成は母性mRNAの時間空間的分布を調べるのに適している

一方、ライフサイクルが約5日と短いワカレオタマボヤは、卵形成にかかる時間もまた短く、減数分裂核が決定している未成熟な多核体構造の卵巣から性成熟が完了するまで、約3日しかかからない(Ganot et al., 2008)。また最終段階として、卵母細胞に周囲の卵巣細胞質が流れ込むことで起こる卵成長は約半日で起こる(Omotezako et al., 2013)オタマボヤの生殖巣は薄い卵巣上皮と表皮で覆われているだけのため、この間、卵形成のステージを顕微鏡下で判別することが可能である(Ganot et al., 2007)。これらの特徴から、オタマボヤの卵巣は卵形成のステージごとのサンプル収集が容易であり、局在母性 mRNA の卵形成過程における時間空間的分布解析に適していると期待できる。

ただし、オタマボヤでこのテーマを扱うにあたって大きな未解決問題が一つ存在する。それは、オ タマボヤ初期胚で植物半球後方に局在する母性 mRNA が見つかっていなかったということである。 オタマボヤ初期胚の予定運命地図においては、ホヤ綱と同様に植物半球の前方と後方で割球の発生運 命が異なっているため、*postplasmic/PEM* RNAs と似たしくみが存在すると予想されていた(Stach *et al.*, 2008)。しかし当研究室では過去にオタマボヤにおけるホヤの postplasmic/PEM RNAs のホモログを クローニングし、初期胚の in situ hybridization によって局在を調べたことがあったが、それらはオタ マボヤの胚では局在を示さなかった(幸西翔平、平成 22 年度修士論文 2010)。そのため、局在 mRNA が存在するのかどうか自体が不明であった。そこで私は、まずワカレオタマボヤの初期胚で局在する 母性 mRNA の候補を選び、それらを in situ hybridization によって検定することを目標に据え、以下の 実験を行った。オタマボヤの8 細胞期胚を動物半球側と植物半球の二つに切断し、それぞれを RNA-seq にかけ、植物半球で多く発現している母性 mRNA をリストアップした。動植軸で発現量の差が大き い mRNA を中心に初期胚で9 つの遺伝子について Whole-mount in situ hybridization (WISH) を行った 結果、5 つの遺伝子の mRNA が植物半球後方に局在することを示した。さらにその中の1 つは、未受 精卵においても既に植物極側に局在していることが明らかになった。

#### 結果

#### 1. 植物半球側で多く存在している母性 mRNA の候補の選別

ワカレオタマボヤで動植軸に沿って局在する母性 mRNA をリストアップするために、二つの RNA-seq の結果を組み合わせて候補を選別した。まず一つが、8 細胞期胚を動物半球と植物半球に切 断して、それぞれで RNA-seq を行い、動物半球と植物半球の発現量を比較するというものである(図 13) (AV-seq)。これによって、植物半球側で多く発現している mRNA をリストアップした。ただ し、この中には zygotic に発現する遺伝子も含まれていると考えられた。そこでもう一つの、ステー ジごとの RNA-seq のデータを利用した(Staged RNA-seq)。Staged RNA-seq ではオタマボヤの卵巣、 未受精卵、受精卵、2 細胞期、4 細胞期、8 細胞期……とそれぞれのステージで発現量が解析された。 AV-seq は当研究室の小沼健助教と表迫竜也博士、および沖縄科学技術大学ゲノム・遺伝子制御シス テム科学ユニットとの共同で行われ、Staged RNA-seq は当研究室の小沼健助教と Kai Wang によって 行われた(未発表)。まず動植半球の RNA-seq の結果を用い、全ての遺伝子を植物半球側の存在量: 動物半球側の存在量の比率が大きい順に並べた。それらの遺伝子について、ステージごとの RNA-seq の結果を用いて未受精卵で存在しているかどうかを確認した。3 つの biological replicates のうち RPKM (fragments per kilobase of exon per million reads mapped。1RPKM とは 100 万リードあたり、またその 遺伝子の 1kb あたり、リードが1 つマッピングされることを意味する) がすべて 1 未満の場合、母性

因子ではなく zygotic に発現した遺伝子であるとみなして扱わないこととした。このような方法によって、比率が 3 倍以上の母性の mRNA を 24 個リストアップした。現在までに、そのうち 9 つの遺伝子について Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) を行った(表 4)。

![](_page_43_Figure_0.jpeg)

#### 図 13 動植半球ごとの RNA-seq

ワカレオタマボヤの8細胞期胚を動物半球と植物半球に 切断し、それぞれで RNA-seq が行われた。私はその結果を 比較し、植物半球側で発現量の多い mRNA をリストアッ プした。

predicted gene	gene ID	Vegetal/Animal Fold Change	RPKM-egg (Average)	WISH-8cell localization	WISH-egg localization
no hits	OD_K21COV4_DN15239_c1_g1_i1	21.55	2.98	0	×
snail	OD_K25COV6_DN20191_c0_g1_i7	17.83	0.78	0	×
no hits	OD_K29COV6_DN11267_c1_g1_i3	15.71	60.95	0	×
no hits	OD_K29COV15_DN10088_c0_g3_i1	12.48	8.98	0	0
wnt11-b	OD_K25COV10_DN18944_c0_g4_i1	9.29	1.19	0	×
no hits	OD_K21COV15_DN11865_c0_g1_i1	6.98	1.08	×	×
no hits	OD_K29COV15_DN6713_c0_g3_i1	6.37	13.94	×	×
no hits	OD_K29COV10_DN9833_c0_g4_i1	6.02	9.1	×	×
no hits	OD_K21COV6_DN13245_c2_g4_i7	3.11	27.22	×	×

表 4 Whole-mount in situ hybridization が完了している植物半球側に多く発現する母性 mRNA

#### 2. 8細胞期で植物半球後方に局在する母性mRNAの同定

植物半球側で多く存在していると考えられた候補mRNAが実際に局在しているのかどうか確かめ るため、表4のmRNAについて8細胞期胚でWISHを行った。当初は母性mRNAの局在を可視化するの が困難だったため、WISHの条件検討を繰り返した。最終的なプロトコルは「材料と方法」に記した とおりであるが、母性mRNAの局在を可視化する目的でWISHを行う場合、その中でも特に重要なプ ロセスは「卵膜剥き液は調製後1カ月以内のものを使うこと」と「ブロッキングには0.5% Blocking Reagent (Roche)を使うこと」の2点であった。表4の9つの遺伝子について8細胞期胚でWISHした結果、 OD K21COV4 DN15239 c1 g1 i1、OD K25COV6 DN20191 c0 g1 i7、

OD\_K29COV6\_DN11267\_c1\_g1\_i3、OD\_K29COV15\_DN10088\_c0\_g3\_i1、

OD\_K25COV10\_DN18944\_c0\_g4\_i1の5つの遺伝子のmRNAについて局在を確認できた(表4の〇、図 14)。これらのmRNAはすべて植物半球後方割球(B, Bと呼ばれる左右対称な割球)(Fujii *et al.*, 2008; Nishida, 2008)に局在しており、割球の中でも後方極の付近に集積していた。この結果から、ワカレ オタマボヤにおいても、植物半球後方に局在する母性mRNAが存在することが明らかになった。

![](_page_44_Figure_0.jpeg)

図148細胞期で植物半球後方に局在する母性mRNAのWISH

8細胞期胚を用いて、表4のリストにある母性mRNAのWISHを行った。上段3つのmRNAは左側から撮影し、下段2つのmRNAは植物極側から撮影した。黒矢印がmRNAの局在を示している。胚の向きは割球の大きさと、割球配置からわかる。スケールバーは50 µm。2回の実験により確認できている。

#### 3. 未受精卵で植物極に局在する母性mRNAの同定

これらの母性mRNAは、発生のどの時期から局在しているのだろうか。表4の遺伝子について、未 受精卵でもWISHを行った。その結果、OD\_K29COV15\_DN10088\_c0\_g3\_i1のmRNAが未受精卵におい て明解に植物極に局在することが判明した(図15A)。オタマボヤの未受精卵では減数分裂装置が動 物極に存在しているため、DNAを染色すれば動植軸を判断することが可能である。その結果、この mRNAは未受精卵全体にも存在しているものの、減数分裂装置と反対側の植物極付近に特に濃く局在 していた。植物半球側から観察したとき、濃い領域の形は直径約50 µmの円盤状のように見えた(図 15B)。さらに、このmRNAが未受精卵の植物極側から8細胞期の植物半球後方へ移動する経過を調べ るため、受精卵(第一極体放出)、受精卵(第二極体放出)、2細胞期胚でそれぞれWISHを行った(図 15C)。その結果、第一極体、第二極体放出までは未受精卵と同じ位置の円盤状であったが、2細胞期 胚では8細胞期胚と似た表層付近の強い集積になっていた。ただし、オタマボヤの2細胞期胚は、それ まで動植軸の判断材料になっていた減数分裂核が雄性前核と融合するため消失し、さらに極体も卵割 溝に埋まってしまうため、胚の向きを正確に把握することができなかった。

![](_page_45_Figure_0.jpeg)

#### 図 15 未受精卵で局在する母性 mRNA の WISH

A. 未受精卵で OD\_K29COV15\_DN10088\_c0\_g3\_i1 を WISH した。黒矢印が mRNA の局在を、白矢印 が減数分裂核の DNA を示している。この二つをマージすると、mRNA の局在部位は植物極であるこ とがわかる。スケールバーはすべて 50 μm。3 回の実験に基づく。

B. OD\_K29COV15\_DN10088\_c0\_g3\_i1 を WISH した未受精卵を植物半球側から撮影した。 mRNA の濃い領域を白丸で囲った。

C. 受精卵(第一極体放出)、受精卵(第二極体放出)、2細胞期胚の WISH を行った。すべて明視野 と DAPI の合成写真である。黒矢印が mRNA の局在を、白矢印が核を示している。2回の実験により 確認できている。

#### 考察

#### 1. ホヤ綱の postplasmic/PEM RNAsとの局在パターンの比較

植物半球で多く存在している母性mRNAを、動植半球ごとのRNA-seqの結果からリストアップし、9 つの遺伝子についてWISHを行った。その結果、8細胞期で植物半球後方に局在するmRNAを5つ同定 し、またその中で、未受精卵から植物極側に局在することが明らかなmRNAを1つ同定した。この結 果から、ワカレオタマボヤにおいてもホヤ綱と同様に初期胚で植物半球後方に局在するmRNA群が存 在することが明らかになった。

ホヤ綱のpostplasmic/PEM RNAsとオタマボヤ綱の初期胚に局在する母性mRNAの共通点と相違点に ついて述べる。最初に、未受精卵の時点で植物半球側に局在することが共通している、Type I postplasmic/PEM RNAsのmacho-1 mRNAと、本研究で同定したOD\_K29COV15\_DN10088\_c0\_g3\_i1の 比較を行う。まずmacho-1は、卵成熟時に起こるGVBDを伴う細胞質流動に伴って、未受精卵の動物 半球側の途中から植物半球側に向かって、濃度勾配をなして卵表層に存在している(Nishida et al., 2001)。一方、オタマボヤの卵母細胞にはGVが存在せず、そのためGVBDによる細胞質流動も確認さ

れていない(Ganot et al., 2008)。未受精卵における局在パターンについては、オタマボヤの場合、植 物極付近に円盤状の形で強く局在しているほかにも、卵全体の内部細胞質中にも遍在している。これ らの違いから、OD\_K29COV15\_DN10088\_c0\_g3\_i1 mRNAが未受精卵で局在するメカニズムは、 macho-Iが未受精卵で局在するメカニズムとは異なると考えられる。特にオタマボヤは、卵成長が進 むにつれて、予定植物極に存在するring canal を通して、卵母細胞に周囲から卵巣細胞質が流入して いき、卵母細胞が成長するという、特殊な卵形成過程を持つことと関係しているかもしれない。また、 受精後の局在パターンに関しても、ホヤとオタマボヤで違いがあるようである。ホヤのType I postplasmic/PEM RNAsは受精後の細胞質流動に伴って、植物極に強く集積する(フェーズ1)。一方、 受精卵におけるOD\_K29COV15\_DN10088\_c0\_g3\_i1 mRNAの局在パターンは、受精後も未受精卵と変 わらない円盤状であった。加えて、オタマボヤの卵細胞質移動を撮影した動画でも、ホヤのフェーズ 1に相当する細胞質流動は起こらないように見える(動画5、幸西翔平、平成22年度修士論文2010;動 画5についてはこの章末ページで説明)。このことから、オタマボヤの母性mRNAにフェーズ1は存在 しない可能性が高い。一方、ホヤのType I postplasmic/PEM RNAsが植物半球後方に移動するフェーズ2 に類似する現象は、オタマボヤにも存在する可能性がある。その理由は、ホヤ綱と同じように、オタ マボヤの雌性前核と雄性前核の融合に伴う、植物極から後方極への細胞質流動が観察されるからであ る(動画5、幸西翔平、平成22年度修士論文2010)。また母性mRNAの局在パターンも、局在位置の 正確な把握はできなかったものの、卵の円盤状から2細胞期の卵割溝付近への強い集積へと変化して いた。8細胞期に植物半球後方割球にmRNAが局在することは明らかなので、これらの観察結果から、 ホヤのフェーズ2と同じタイミングで植物半球後方へmRNAが移動している可能性が高い。

OD\_K29COV15\_DN10088\_c0\_g3\_i1以外の4つの母性mRNAは未受精卵での局在を確認できず、8細 胞期で植物半球後方に局在した。この局在経過はホヤのType IIの*postplasmic/PEM* RNAsに似ているよ うに見える。つまりオタマボヤにおいても、ホヤ綱の「Type I」「Type II」と同様に、2通りの局在パ ターンが存在すると考えられる。ただし、これら4つの母性mRNAをすべて「未受精卵に局在しない パターン」と結論するためには今後の再検討が必要である。実際、WISHの条件検討が不十分だった 時期は、OD\_K29COV15\_DN10088\_c0\_g3\_i1 mRNAも未受精卵では局在していないと考えてしまって いた。WISHの条件検討をさらに進めれば、4つの母性mRNAも未受精卵で局在することが判明する可 能性があると同時に、オタマボヤにおける局在タイプの区別も明確になると期待できる。

#### 2. 卵形成中の母性mRNAの時間空間的局在解析に向けて

未受精卵で植物極側に局在する母性mRNAがオタマボヤにも存在することが明らかになったので、 今後、卵形成のステージに沿った母性mRNAの時間空間的分布解析に着手することができるようにな った。興味がわくのは、オタマボヤの卵母細胞にロードされる母性因子の多くは、減数分裂核ではな くDNAを増幅した哺育核で発現していると予想されている(Ganot et al., 2007)。なぜなら卵形成中 の減数分裂核のヒストンはリン酸化によって修飾されており(H3S28P)、転写機能を行っていない と推測されるためである(Ganot et al., 2008)。そこで一つ目の目標として、哺育核で転写された母性 mRNAが実際に卵母細胞にロードされていく過程を、卵巣の切片 *in situ*によって実証したい。また二 つ目の目標として、卵形成中に植物極側に母性mRNAが局在するプロセスも可視化したい。卵巣細胞 質と繋がっている卵母細胞の予定植物極側にはring canalが存在する(図1)。局在過程の予想として は、一旦卵母細胞全体にロードされたmRNAが植物極側に移動するのか、あるいはmRNAが卵母細胞 の入り口であるring canal付近にトラップされるのか、といった仮説が考えられ、それを検証すること ができるだろう。

#### 動画 5 正常受精卵の発生

受精直後からオタマボヤの卵をタイムラプスで撮影した動画。動物極(左上)から極体が放出され ている。第二極体放出後(動画内時間約6~7秒)に、雌性前核と雄性前核が近づいていくにともな い、植物極側(右下)から表層に沿って後方(右)へ細胞質が流動していく様子を確認できる。(幸 西翔平、平成22年度修士論文2010)より引用。

### 第五章:総括と今後の展望

本論文では「母性因子」にこだわり研究を進めた。脊索動物であるワカレオタマボヤのユニークな 特徴を活かして、1. 母性因子の機能的スクリーニング。 2. オタマボヤの減数分裂停止機構の研究。 3. 初期胚で局在する母性mRNAの同定。という3つの研究を行った。

#### 1. 卵巣顕微注入法とDNAiを組み合わせた母性因子の機能的スクリーニング。

多くの生物において、卵形成時に翻訳されるタンパク質も含めた母性因子の大規模な機能解析は技術的に困難であった。そのため卵細胞質移植実験などから存在が予測されているものの、その分子実体が明らかになっていない母性因子も未だに存在している。本研究では、卵巣内顕微注入法とDNAiを組み合わせた機能的スクリーニングを行うことによって、効率的な母性因子の機能的スクリーニングが可能であることを示した。ワカレオタマボヤの卵巣で多く発現している遺伝子の57%(3000クローン)に対してスクリーニングを行った結果、ノックダウンすると初期発生が異常になる7つの母性遺伝子を同定した。ここで発見した遺伝子は、細胞接着や細胞分裂に関わる因子、すなわちハウスキーピング遺伝子が含まれていた。一方、残念ではあるが、胚軸や胚細胞の発生運命決定に関与するような母性遺伝は特定できなかった。また、ノックダウンすると産卵した卵が受精する前に表現型異常を示す母性遺伝子も1つ同定した。これについて第三章で詳細に解析した。

#### 2. オタマボヤにおいてPP2Aは産卵のタイミングで減数分裂停止を維持するために必要である。

母性遺伝子PP2Acをノックダウンすると、産まれた卵が受精することなく減数分裂を再開し、単為 発生を行うという表現型が得られた。ワカレオタマボヤの減数分裂停止の分子メカニズムはまったく 知られていなかったため、この表現型を解析した。この表現型は卵が卵巣内にある間は見られず、産 卵時にpHが上昇することがきっかけとなって開始することがわかった。PP2Ac-KD卵の産卵の際には 受精を模倣した異常なカルシウムバーストが観察され、これが異常な卵活性化を引き起こしていると 考えられた。以上から、産卵というイベントが起こる際にPP2Aが減数分裂停止を維持するために働 いていることが示された。

産卵時におけるこのPP2Aの役割は他の動物では報告されていなかったものである。動物の卵にお いて、産卵時に何が起きているのかは分子レベルではまだわかっていないことが多い。というより、 多くの研究者は、産卵という出来事の時に、卵に何らかの変化が起こるとは余り考えていないかもし れない。本研究が、その問題を解明する先駆けになることを期待する。また、ホヤ綱および脊索動物 の減数分裂停止機構と比較した際に、いくつかの点においてオタマボヤ綱がホヤ綱よりも脊索動物に 似ていることが示唆された。一方、PP2Aが異常なカルシウムバーストを防止する分子経路に関して は未解明のまま終わった。PP2Aのノックダウン胚でタンパク質のリン酸化の解析を行うことによっ て、過剰にリン酸化された因子をPP2Aの基質の候補として解析することが可能であると期待できる。

#### 3. 初期胚で局在する母性mRNAの同定。

未受精卵や初期胚で局在する母性 mRNA は、初期発生で重要な役割を果たす。未受精卵で既に母 性 mRNA が局在するメカニズムについて、局在に至るまでの過程を追って解析するためは、卵巣の 発達段階の判断や多くのサンプルの安定的な収集が必要であるため、実験に適した動物が少なかった。 オタマボヤの卵巣は、卵形成の発達段階を顕微鏡下で視認できるほか、安定して多くのサンプルを収 集できるため、卵形成時の母性 mRNA の局在パターンの解析に適していると期待できる。しかしオ タマボヤでは初期胚で局在する母性 mRNA の存在が予測されていたものの、その実体は見つかって いなかった。私は 8 細胞期胚の動物半球と植物半球それぞれの RNA-seq から、植物半球で多く発現す る母性 mRNA をリストアップし、これらが実際に初期胚で局在するのかどうか WISH による検証を 行った。その結果、8 細胞期で植物半球後方に局在する母性 mRNA を 5 つ同定することに成功した。 さらにそのうちの 1 つは未受精卵でも植物極側に局在することが判明した。この結果を受けて、卵形 成過程に母性 mRNA がどのようなプロセスで卵にロードされて局在に至るのかを、卵巣切片の *in situ* を用いて解析していくことが可能になった。

本研究では、母性因子の同定やその役割について、卵形成、受精の制御、初期発生といった幅広い 現象に対して取り組んだ。オタマボヤを用いることで、発生生物学における母性因子へのアプローチ の手段が一層発展することに寄与できたと考えている。

#### ・ワカレオタマボヤの採集と飼育

実験材料となるワカレオタマボヤ(Oikopleura dioica)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。ひも付きバケツを用いて海水を採取し研究室に持ち帰った後、顕微鏡下 でワカレオタマボヤの特徴(雌雄異体なので性成熟すると卵巣または精巣のどちらかのみを目視でき る、subchordal cellを2つ持つなど)を基準に選別した。その後、2019年まで研究室内では約7年間継 代飼育を続けたものを使用している。

ワカレオタマボヤはNishida(2008)、Spada et al.(2001)、Omotezako et al. (2013)をもとに、一部変更を 加えて飼育した。飼育用海水には、レイシーマリン(REI-SEA社)およびMARINE ART BR(富田製薬) の2種類を主に組み合わせて使用し、さらに2018年以降はレイシーマリンの後継品であるレイシーマ リンII(REI-SEA社)のも併用した。効率的に次世代の個体を得るために、受精後5日目の性成熟し た個体をオスメス合わせて80匹以上、朝夕2回、5Lの人工海水の入ったボトルに集め、その中で自然 交配によって受精させた。その後、7 hpf 以上の幼生が遊泳していることを確認した後、ボトルから5 ml海水を採取し、その中に何匹が遊泳しているかを数え、その数に応じて10Lボトルに人工海水で2-4 倍に希釈した。その後は10Lボトル内の個体密度に応じて人工海水で適宜1.5倍-4倍に希釈して適切な 密度を維持し(10L中に受精後3日目の個体200-250匹となるよう)、受精後4日経って体が大きくなっ たところで、10Lのボトルにワカレオタマボヤを120匹ほどピックアップして移し、成熟個体まで成長 させた。餌にはIsochrysis galbana (終濃度300 cells/ml), Chaetoceros calcitrans (300 cells/ml), Synecococcus sp. (0.06 ml/L)の3種類を朝、昼、夜の3回与えた。この方法により、海で採集した個体群を約7年間 安定的に飼育してきた。

#### ・卵巣特異的遺伝子のcDNAライブラリ作製

遺伝子配列のデータはOikobase(<u>http://oikoarrays.biology.uiowa.edu/Oiko/)</u> (Danks *et al.* 2013) および当 研究室の転写物データ(<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/GCJN01</u>) (Wang *et al.* 2015)から取得し た。最近では、統合データベースAniseed (https://www.aniseed.cnrs.fr/)も利用可能になっている。

母性因子の効率的なスクリーニングを行うため、卵巣で多く発現する遺伝子のcDNAライブラリを作 製した。個々の卵母細胞の輪郭をまだ視認できない未成熟な卵巣を持つメスを7匹と、色づき始めた未 成熟な精巣を持つオスを8匹それぞれ採集した。これらは20℃下で飼育するとおよそ8-12時間後に産卵 および放精すると期待されるステージである。尾部を顕微鏡下においてナイフで切除し、残りの生殖巣 および体幹部を試料として用いた。トータルRNAをNucleospin RNA XS (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany)により抽出した。その後、SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, California, USA)を用 いてcDNA合成を行った。PCRによってメスのcDNAを14 cycle、オスのcDNAを12 cycleでそれぞれ増幅 した。メスで発現量の多い遺伝子のみを残すため、サブトラクションとノーマライゼーションを PCR-Select<sup>™</sup> cDNA Subtraction Kit (Clontech)を用いて行った。 サブトラクションが正しく行われたかどうかを確かめるために、卵巣特異的遺伝子(gene ID of Oikobase: GSOIDG00003424001, GSOIDG00001740001)と卵巣特異的でない遺伝子(GSOIDG00001682001, GSOIDG00001134001, GSOIDG00001205001, GSOIDG00001089001, GSOIDG00001739001)のcDNA含有量 を、サブトラクションしたcDNAとサブトラクションしていないcDNAとの間で比較した。これらの遺伝 子はOikobaseのmicroarrayのデータを参考にして選択した。PCRの条件は95℃ 30 s→55℃ 30 s→72℃ 1 minで行った。増幅に使用したプライマーは遺伝子特異的に作製したもので(プライマーの配列は Omotezako et al., 2017を参照)、15, 20, 25, 30, 35 cycleにおけるPCR産物をそれぞれゲル電気泳動で流して バンドの濃度を比較し、サブトラクションの有効性を検証したライブラリを以降の実験に用いた。

ライブラリ中の二本鎖DNAをキットTOPO® TA cloning for sequencing (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA)を使用してサブクローニングし、大腸菌DH5αに導入した。機能的スクリーニングを 行った際は、プレートに生えたコロニーからランダムに大腸菌をピックアップしてプラスミドを抽出し た。cDNAライブラリの作製は同研究室の表迫竜也が行った。

#### ・PP2Acのデータ

第三章で扱ったPP2Acのデータについて詳細に記述する。Oidioi-PP2Ac[Gene ID:

GSOIDT00009452001 in the Oikobase database; comp26645\_c0 in the transcriptome data (Wang *et al.* 2015)] は、母性因子の機能的スクリーニングよって同定された。分子系統樹解析を行った結果、この Oidioi-PP2Acにはよく保存されたPP2Acがコードされていることがわかった(図16)。卵巣特異的cDNA でクローニングされていた配列の領域は、Oidioi-PP2Ac cDNA (GenBank accession No: BR001514)の3' untranslated region (3'UTR)の一部 (976-1433塩基)であった。第二章の機能的スクリーニングおよ び、第三章のほとんどの実験において、この3'UTRの領域を用いた。一方、第三章でDNAiの特異性 を確かめるために、3'UTRとは被っていない領域の配列を用いたDNAiも行った。その際は、下記の TAクローニングによって、未受精卵のcDNAからPP2Acのopen reading frame領域 (7-946塩基)をクロ ーニングし、そのPCR産物をDNAiに用いた。

![](_page_52_Figure_0.jpeg)

#### 図16 脱リン酸化酵素の分子系統樹

Ser/Thr タンパク質脱リン酸化酵素ファミリーの分子系統樹を、近隣結合法によって作製した。ワカ レオタマボヤの脱リン酸化酵素のアミノ酸配列はOikobaseから取得した(GSOIDP-)。他の種のアミ ノ酸配列はNCBIの protein databaseから取得した。MUSCLE softwareによってアラインメイトし、それ ぞれの枝にbootstrap値を記した。アスタリスクは、本研究で用いたOidioi-PP2Acを示している。

・TAクローニング

目的の遺伝子をcDNAからクローニングする際は、以下の方法で行った。まず標的遺伝子のプライマーを作製し、cDNAからKOD plus (TOYOBO, Osaka, Japan)で遺伝子の断片を増幅した。反応条件は

98°C 15 sec→Tm-2 °C 30 sec→68 °C 1 minで40サイクル行った。PCR solution 4.5 µlと10x A-attachment mix (TOYOBO) 0.5 µlを60°C 30minでインキュベートした後、pGEM-T easy ベクター (Promega) に ライゲーションした。大腸菌DH5αに導入し、プレーティングの際は20 mg/ml X-Galを大腸菌と等量撒 いて、ブルー/ホワイトセレクションを行った。

#### ・DNAi用PCR産物の合成

DNAiを行うため、クローンごとにPCR産物を作製した。まず、増幅したいインサートの入ったプラ スミドを用意した。プラスミド抽出と精製にはPureYield<sup>™</sup> Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, Wisconsin, USA)あるいはWizard<sup>®</sup> Plus SV Minipresps DNA purification System (Promega)を使用した。プ ラスミド上のT7とT3配列に相補的なプライマーを用いて、KOD plus (TOYOBO)によって増幅した。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。増幅産物はフェノールクロ ロホルムとエタノール沈殿によって精製し、dH<sub>2</sub>Oで溶解した。母性因子の機能的スクリーニングにお いて、5つのクローンを1つにまとめる(pool of 5 clones)際には、増幅はクローンごとに行い、精製前に一 つのチューブに混合し、最終的に30 µlのdH<sub>2</sub>Oに溶解した。個々のDNA終濃度は約0.2 µg/µL以上になる ようにした。

#### ・RNAi用二本鎖RNAの合成

PP2AcノックダウンにおけるDNAiの有効性を検証するために、RNAiも行った。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 (pGEMTeasy-PP2Ac-3'UTR)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、フェノールクロロホルム抽出、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処理後、dsRNA

#### ・mRNA合成

注入用mRNAの合成を行う際は、発現用ベクターpSD64TFに入っている遺伝子のプラスミドを鋳型と して用いた。本研究では、pSD-H2B-EGFP、pSD-H2B-mCherry、pSD-lifeact-mCherry、pSD-lifeact-EGFP、 pSD-PP2Acを用いた。制限酵素Xba Iで切断処理をしたのち、mMESSAGE mMACHINE SP6 kit (Thermo fisher)を用いてRNA合成を行った。その後、poly-A Tailing kit (Thermo fisher)を用いてPoly-Aシグナル の付加を行った。合成したmRNAは、フェノールクロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿を行った後、 DWに溶かし、-80℃で保管した。

#### ・卵巣内顕微注入法

53

未成熟な卵巣は細胞質を共有して繋がっているため、注入された核酸は濃度勾配を持って卵巣内で拡 散し、複数の卵母細胞に取り込まれる。一匹のメスから約200個の卵が生まれ、全体のおよそ10~30%の 卵が核酸を取り込むことがわかっている(Omotezako *et al* 2015)。蛍光タンパク質のH2B-EGFP (H2B: ヒ ストン2B)、H2B-mCherry、またはlifeact-mCherry [lifeact:アクチンの蛍光マーカー(Riedl *et al*. 2008)]の mRNAを顕微注入モニターとして、DNAi用のPCR産物などと共注入した。顕微注入モニターとしての EGFPやmCherryタンパク質の蛍光をもとに注入胚を選別し、解析に用いた。注入したPCR産物の終濃度 はフェノールレッド(10 mg/ml)を加えた後に約0.2 μg/μLになるように調節した。

注入する際は、まず卵巣が十分な厚みのあるものの、卵母細胞の輪郭が見えるまでには至っていない ステージの雌の個体を選別した。これを0.015% MS222 海水に1分ほど浸して麻酔した後、1% 寒天シャ ーレの上にマウントした。実体顕微鏡(Olympus, SZX-16)下で、マイクロマニピュレーターを用いて 背側から注入した。その後6穴シャーレに1匹ずつ入れ、水面にオタマボヤがトラップされるのを防ぐた めにヘキサデカノール(Sigma)の粒を浮かべた。20℃で約12時間後に産卵された卵を実験に使用した。 一方、産卵時からスタートするPP2Acノックダウンの表現型を観察する際は、産卵直前のステージ(ハ ウスをすべて脱ぎ、卵巣が大きく膨れている状態)のものを選別して扱った。産卵の時間帯を夜間以外 に調節したい場合には、飼育温度を下げて卵成熟を遅らせる手法を用いた。15℃のインキュベーターで オーバーナイトすると、産卵までの時間が約5時間遅れの約17時間になった。

#### ・in fusionクローニング

サブクローニングする際は、in fusionクローニングを用いた。まず挿入先のpSD64TFベクター (from Dr. T. Snutch, University of British Columbia, Canada)の直鎖状ベクターおよび目的遺伝子のインサート 配列を、それぞれ KOD plus (TOYOBO)によってPCRで増幅した。その際、インサート配列のPCR に用いるプライマーの末端には、直鎖状ベクターの末端と相補的な配列を15塩基付加した。また、イ ンサート配列をPCRする際のテンプレートの終濃度が、1 ng/µl未満になるよう希釈した。この濃度が 高いと、プレーティングした際にテンプレートのみを取り込んだ大腸菌の割合が極めて高くなってし まうためである。その後は、In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara Bio, Shiga, Japan)のプロトコルに従 い、ライゲーションを行った。大腸菌DH5αに導入し、プラスミドを抽出した。

#### ・in situ hybridizationのプローブ合成

アンチセンスRNAプローブは、digoxigenin (DIG) RNA labeling mix (Roche, Basel, Switerland)および、 プラスミド内の遺伝子配列の向きによってT7もしくはSP6のRNA polymerase (Roche)を用いて合成した。 精製はほとんどの場合において、合成したsolution 20  $\mu$ lにDW 30  $\mu$ lとlithium Chloride Precipitation Solution (Thermo Fisher) 30  $\mu$ lを加えたのち、遠心によって精製した。一方、*wnt11* mRNAおよび OD\_K29COV15\_DN10088\_c0\_g3\_i1の初期胚における局在を見るための条件検討をした際は、精製の前 にプローブのアルカリ分解を行った。アルカリ分解でプローブが短くなると、サンプルに染み込みやす くなるためである。合成したsolution 10  $\mu$ lにアルカリ処理液(60 mM Na2CO3, 40 mM NaHCO3)を90  $\mu$ l 加え、60℃でインキュベートした。インキュベーションの反応時間は「反応時間T={処理前のRNAの長 さLo(kb)-分解後の長さLf(kb)}/0.1 x Lo x Lf」で算出した。その後、3M NaOAC 10 µl、10 mg/ml tRNA 5 µl、エタノール 350 µlを加え、エタノール沈殿によって精製した。

#### • Whole mount in situ hybridization (WISH)

卵膜を除去するために0.05% Actinase E (Funakoshi, Tokyo, Japan), 1% sodium thioglycolate (Sigma, Tokyo, Japan)の卵膜剥き液(調製後1ヶ月以内)によって4分間常温で処理した。次に4%パラホルムアルデヒ ド in 人工海水 (MARINE ART BR) で固定した。70% エタノールで脱水処理をし、サンプルを冷凍保 存した。サンプルを使う際は0.1% PBS-TweenでWashした。DNAi処理胚を扱う際は、注入されているPCR 産物を取り除くために固定胚を2 U/ml Turbo DNase (Thermo Fisher Scientific)によって15分間常温で処理 するプロセスをここに挟んだ。0.1% DMSOを用いて20分間常温で処理したのち、digoxigenin (DIG)でラ ベルしたアンチセンスRNA を用いて、hybridization buffer (50% de-ionized formamide, 5X SSC, 0.1% Tween-20, 50 µg/ml Heparin, 100 µg/ml E. coli tRNA)中で4時間62℃の条件下でハイブリダイゼーションさ せた。プローブを洗浄したのち、blocking buffer (0.5% Blocking Reagent (Roche) in PBST)を用いて1時間 常温でブロッキングを行った。その後anti DIG-AP抗体 (Roche)の存在下で4℃, over night (O/N) の条件下 でインキュベートした。Coloring solution (100m M Tris-HCl (pH7.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl, 0.1% Tween) で洗った後、BCIP (nitro-blue tetrazolium chloride) 87.5 μg/ml. NBT (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt) 175 µg/mlを加え、常温または4℃で発色反応を行った。 このプロトコルは、Onuma et al., (2017)をもとにしてアレンジを加えて作成した。

#### ・アルカリホスファターゼ組織化学染色

内胚葉を染色するため、アルカリホスファターゼ (ALP)染色を行った。幼生を4% パラホルムアルデ ヒド in 0.1 M MOPS and 0.5 M NaClを用いて常温10分間で固定した。Coloring solution (100m M Tris-HCl (pH7.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>)で洗った後、 NBT/BCIPを用いて30分間常温でインキュベートし、 発色させた。

#### ・アセチルコリンエステラーゼ組織化学染色

筋組織を染色するため、アセチルコリンエステラーゼ (AChE)染色を行った。幼生を5%ホルマリン海 水を用いて常温20分間で固定した。洗った後、 Coloring solution (Phosphate buffer 65 mM, Sodium Citrate 5.0 mM, Copper Sulfate 3.0 mM, Pottesium Ferricyamide 0.50 mM, Acetylthiocholine Iodide 0.50 mg/ml)を用い て常温30分でインキュベートし、発色させた。

#### ・微小管の免疫染色

オタマボヤ胚の微小管を免疫染色した。胚を100%メタノールで10分間固定し、PBS-T (0.1% Tween20) で洗った後、Tubulin Antibody YL1/2 (Novus Biologicals)を用いて12時間インキュベートした。一次抗体 を洗った後に、Alexa Fluor® 488 goat anti-rat IgG (Molecular Probes)を用いて3時間インキュベートした。 以上の操作は、微小管構造が低温で崩壊するのを防止するため、すべて常温下で行った。

#### ・人工海水

pHを調整する実験に用いた人工海水の組成は、以下の通りである。450 mM NaCl、9 mM KCl、48 mM MgSO<sub>4</sub>、10 mM CaCl<sub>2</sub>、6 mM NaHCO<sub>3</sub>、10 mM MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, a Good's buffer)。 その後、実験に用いる直前にNaOHとHClを加えてpHを適宜調整した。特に卵巣内の環境を再現する 目的で低いpHの人工海水を作製する場合は、pH 6.5からpH 6.6の間で厳密に調整しなければならない。 pH 6.5以下になると卵が死亡する割合が高くなるためである。一方pH 6.6以上になると、PP2Ac-KD卵 の表現型である減数分裂の再開が起こらなくなる。この理由は、何らかの反応が卵内で中途半端に進 んでしまうためであると考えられる。

#### ・細胞内pHの測定

pHrodo<sup>™</sup> Red AM Intracellular pH Indicator (Thermo Fisher)を、H2B-EGFP mRNAとともに卵巣内顕 微注入した。pHRodoは赤色蛍光を発する。産卵された卵を撮影した写真から、卵の領域を指定し、 赤の蛍光強度をImageJ (NIH)で測定した。バックグラウンドとして卵以外の領域の蛍光強度を取得 し、その差分を卵自体の蛍光強度とした。

#### ・薬剤処理

卵の薬剤処理に用いた試薬と終濃度は以下の通りである。1 μM Okadaic acid (PP2A inhibitor, Wako, Osaka)、1 μM ionomycin (Ca ionophore, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)、100 μM KN-93 (CaMK II inhibitor, Tokyo Chemical Industry, Tokyo)、50 μM BAPTA-AM (calcium chelator, Nacalai Tesque, Kyoto). DMSO (solvent, 0.2-0.5%)。

#### ・細胞内カルシウムイオン濃度のタイムラプスイメージング

カルシウムの測定とライブイメージングには、G-CaMP8蛍光タンパクを使用した。pSD64TFベクタ ーにサブクローニングしたG-CaMP8からmRNAを合成し、*H2B-mCherry* mRNAとともに卵巣内顕微注 入した。G-CaMPの蛍光ライブイメージングの撮影に用いた機材は、顕微鏡がOlympus BX61、対物レ ンズがLUM Plan Apo 40x /0.80 水浸レンズ、カメラがOlympus DP72であった。画像は2.5秒おきに撮影 し、露光時間はおよそ400 msec/frameであった。蛍光強度の変動( $\Delta$ F/F0)は先行研究(Macleod, 2012; Tanimoto *et al.*, 2017)を参考にして計算した。卵のシグナル強度をImageJ(NIH)で測定し、この値をF valueとした。卵の外側のシグナル強度でベースライン上にある100 frame以上の中央値をF0とした。  $\Delta$ F/F0は([F - F<sub>0</sub>]/F<sub>0</sub>)の式で算出した。この実験は、当研究室の小沼健助教に依頼した。

#### • Quantitative real-time PCR

DNAiによるPP2Acのノックダウンができているかどうか確かめるため、定量RT-PCRを行った。 PP2AcのDNAi卵およびcontrolとしてkaedeのDNAi卵の20個ずつをもとに、Nucleospin<sup>®</sup> 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)<sub>15</sub> primer (TaKaRa) を用いて逆転写反応を行った。得られたcDNAからTB Green<sup>™</sup> Advantage<sup>®</sup> qPCR Premix (Takara Bio)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 30 sec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kaede DNAiを4サンプル、PP2Ac DNAiを5サンプル行った。PP2Acおよびβ-catenin2 (Omotezako et al., 2017)の発現量は、cytoplasmic actinの結果を用いてノーマライズした。この実験は、当研究室の小沼健助教に依頼した。

用いたプライマーを以下に記す。

PP2Ac-forward primer 5' -GCAACATCGTGTGGGAGTTC-3',

PP2Ac-reverse primer 5' -GTGACTCGGGTAAATCAGGTTG-3',

βcatenin2-forward primer 5' -GTTGAAGCGGCCCAAGAAATGCAAC-3',

βcatenin2-reverse primer 5' -TCTCGTTTCGAAAACTGATGCAGCG-3',

CA-forward primer 5' -CTGGGACGATATGGAGAAGATCTG-3',

CA-reverse primer 5' -CATGGCGGGAGTGTTAAAAGTTTCG-3'.

## 文献リスト

- Cho, U.S., Xu, W., 2007. Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. Nature 445, 53–57. https://doi.org/10.1038/nature05351
- Conklin E.G., 1905. The organization and cell lineage of the ascidian egg. J. Acad. Nat. Sci. (Phila.) 13:1-119. https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Paper\_-\_The\_Organization\_and\_Cell-Lin eage of the Ascidian Egg
- Cuomo, A., Silvestre, F., De Santis, R., Tosti, E., 2006. Ca2+ and Na+ current patterns during oocyte maturation, fertilization, and early developmental stages of Ciona intestinalis. Mol. Reprod. Dev. 73, 501–511. https://doi.org/10.1002/mrd.20404
- Dalva, M.B., McClelland, A.C., Kayser, M.S., 2007. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. Nat Rev Neurosci 8, 206–220. https://doi.org/10.1038/nrn2075
- Danks, G., Campsteijn, C., Parida, M., Butcher, S., Doddapaneni, H., Fu, B., Petrin, R., Metpally, R., Lenhard, B., Wincker, P., Chourrout, D., Thompson, E.M., Manak, J.R., 2013. OikoBase: a genomics and developmental transcriptomics resource for the urochordate Oikopleura dioica. Nucleic Acids. Res. 41, D845–D853. https://doi.org/10.1093/nar/gks1159
- Darras, S., Gerhart, J., Terasaki, M., Kirschner, M., Lowe, C.J., 2011. β-catenin specifies the endomesoderm and defines the posterior organizer of the hemichordate Saccoglossus kowalevskii. Development 138, 959–970. https://doi.org/10.1242/dev.059493
- Dosch, R., Wagner, D.S., Mintzer, K.A., Runke, G., Wiemelt, A.P., Mullins, M.C., 2004. Maternal control of vertebrate development before the midblastula transition: mutants from the zebrafish I. Dev. Cell 6, 771–780. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.05.002
- Fujii, S., Nishio, T., Nishida, H., 2008. Cleavage pattern, gastrulation, and neurulation in the appendicularian, Oikopleura dioica. Dev. Genes Evol. 218, 69–79. https://doi.org/10.1007/s00427-008-0205-4
- Ganot, P., Bouquet, J.-M., Kallesøe, T., Thompson, E.M., 2007. The Oikopleura coenocyst, a unique chordate germ cell permitting rapid, extensive modulation of oocyte production. Dev. Biol. 302, 591–600. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.10.021
- Ganot, P., Moosmann-Schulmeister, A., Thompson, E.M., 2008. Oocyte selection is concurrent with meiosis resumption in the coenocystic oogenesis of Oikopleura. Dev. Biol. 324, 266–276. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.09.016
- Hachem, A., Godwin, J., Ruas, M., Lee, H.C., Ferrer Buitrago, M., Ardestani, G., Bassett, A., Fox, S.,
  Navarrete, F., de Sutter, P., Heindryckx, B., Fissore, R., Parrington, J., 2017. PLCζ is the physiological trigger of the Ca2+ oscillations that induce embryogenesis in mammals but conception can occur in its absence. Development 144, 2914–2924. https://doi.org/10.1242/dev.150227

- Hansen, D.V., Tung, J.J., Jackson, P.K., 2006. CaMKII and polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 608–613. https://doi.org/10.1073/pnas.0509549102
- Harada, K., Oita, E., Chiba, K., 2003. Metaphase I arrest of starfish oocytes induced via the MAP kinase pathway is released by an increase of intracellular pH. Development 130, 4581–4586. https://doi.org/10.1242/dev.00649
- Hekimi, S., Boutis, P., Lakowski, B., 1995. Viable maternal-effect mutations that affect the development of the nematode Caenorhabditis elegans. Genetics 141, 1351–1364.
- Heytens, E., Soleimani, R., Lierman, S., De Meester, S., Gerris, J., Dhont, M., Van der Elst, J., De Sutter, P.,
  2008. Effect of ionomycin on oocyte activation and embryo development in mouse. Reprod. Biomed.
  Online 17, 764–771.
- Hood, J.K., Silver, P.A., 1998. Cse1p is required for export of Srp1p/importin-alpha from the nucleus in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 273, 35142–35146.
- Hörmanseder, E., Tischer, T., Mayer, T.U., 2013. Modulation of cell cycle control during oocyte-to-embryo transitions. EMBO J. 32, 2191–2203. https://doi.org/10.1038/emboj.2013.164
- Imai, K., Takada, N., Satoh, N., Satou, Y., 2000. (beta)-catenin mediates the specification of endoderm cells in ascidian embryos. Development 127, 3009–3020.
- Inoue, D., Ohe, M., Kanemori, Y., Nobui, T., Sagata, N., 2007. A direct link of the Mos-MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of Xenopus laevis eggs. Nature 446, 1100–1104. https://doi.org/10.1038/nature05688
- Isoda, M., Sako, K., Suzuki, K., Nishino, K., Nakajo, N., Ohe, M., Ezaki, T., Kanemori, Y., Inoue, D., Ueno, H., Sagata, N., 2011. Dynamic regulation of Emi2 by Emi2-bound Cdk1/Plk1/CK1 and PP2A-B56 in meiotic arrest of Xenopus eggs. Dev. Cell 21, 506–519. <u>https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.029</u>
- Janssens, V., Goris, J., 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. Biochem J 353, 417–439.
- Johnstone, O., Lasko, P., 2001. Translational regulation and RNA localization in Drosophila oocytes and embryos. Annu. Rev. Genet. 35, 365–406. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090756
- Jullien, D., Görlich, D., Laemmli, U.K., Adachi, Y., 1999. Nuclear import of RPA in Xenopus egg extracts requires a novel protein XRIPalpha but not importin alpha. EMBO J 18, 4348–4358. https://doi.org/10.1093/emboj/18.15.4348
- Kawai, N., Iida, Y., Kumano, G., Nishida, H., 2007. Nuclear accumulation of beta-catenin and transcription of downstream genes are regulated by zygotic Wnt5alpha and maternal Dsh in ascidian embryos. Dev. Dyn. 236, 1570–1582. https://doi.org/10.1002/dvdy.21169
- Kemphues, K.J., Kusch, M., Wolf, N., 1988. Maternal-effect lethal mutations on linkage group II of Caenorhabditis elegans. Genetics 120, 977–986.

- Kishimoto, T., 2011. A primer on meiotic resumption in starfish oocytes: the proposed signaling pathway triggered by maturation-inducing hormone. Mol. Reprod. Dev. 78, 704–707. https://doi.org/10.1002/mrd.21343
- 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, 79–89.
- Kneen, M., Farinas, J., Li, Y., Verkman, A.S., 1998. Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. Biophys. J. 74, 1591–1599. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77870-1
- Lambert, C.C., 2005. Signaling pathways in ascidian oocyte maturation: effects of various inhibitors and activators on germinal vesicle breakdown. Dev. Growth Differ. 47, 265–272. https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2005.00796.x
- Levasseur, M., Dumollard, R., Chambon, J.-P., Hebras, C., Sinclair, M., Whitaker, M., McDougall, A., 2013. Release from meiotic arrest in ascidian eggs requires the activity of two phosphatases but not CaMKII. Development 140, 4583–4593. https://doi.org/10.1242/dev.096578
- Logan, C.Y., Miller, J.R., Ferkowicz, M.J., McClay, D.R., 1999. Nuclear beta-catenin is required to specify vegetal cell fates in the sea urchin embryo. Development 126, 345–357.
- Lorca, T., Cruzalegui, F.H., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Méry, J., Means, A., Dorée, M., 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of Xenopus eggs. Nature 366, 270–273. https://doi.org/10.1038/366270a0
- Madgwick, S., Levasseur, M., Jones, K.T., 2005. Calmodulin-dependent protein kinase II, and not protein kinase C, is sufficient for triggering cell-cycle resumption in mammalian eggs. J. Cell. Sci. 118, 3849– 3859. https://doi.org/10.1242/jcs.02506
- Makabe, K.W., 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., Nishida, H., 2001. Large-scale cDNA analysis of the maternal genetic
  information in the egg of Halocynthia roretzi for a gene expression catalog of ascidian development.
  Development 128, 2555–2567.
- Makabe, K.W., Nishida, H., 2012. Cytoplasmic localization and reorganization in ascidian eggs: role of postplasmic/PEM RNAs in axis formation and fate determination. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 1, 501–518. https://doi.org/10.1002/wdev.54
- Masui, Y., Markert, C.L., 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. J. Exp. Zool. 177, 129–145. https://doi.org/10.1002/jez.1401770202
- McDougall, A., Levasseur, M., 1998. Sperm-triggered calcium oscillations during meiosis in ascidian oocytes first pause, restart, then stop: correlations with cell cycle kinase activity. Development 125, 4451– 4459.

- Mitalipov, S.M., Nusser, K.D., Wolf, D.P., 2001. Parthenogenetic activation of rhesus monkey oocytes and reconstructed embryos. Biol. Reprod. 65, 253–259.
- Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K., Honda, Y., 1993. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca2+ release channel in Ca2+ waves and Ca2+ oscillations at fertilization of mammalian eggs. Dev. Biol. 158, 62–78. https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1168
- Moriwaki, K., Nakagawa, T., Nakaya, F., Hirohashi, N., Chiba, K., 2013. Arrest at metaphase of meiosis I in starfish oocytes in the ovary is maintained by high CO2 and low O2 concentrations in extracellular fluid. Zool. Sci. 30, 975–984. https://doi.org/10.2108/zsj.30.975
- Nakamura, Y., Makabe, K. W., and Nishida, H. 2003. Localization and expression pattern of type I postplasmic mRNAs in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Gene Expression Patterns 3, 71-75.
- Nakamura, Y., Makabe, K. W., and Nishida, H. 2005. POPK-1/Sad-1 kinase is required for the proper translocation of maternal mRNAs and putative germ plasm at the posterior pole of the ascidian embryo. Development 132, 4731-4742.
- Nakamura, Y., Makabe, K. W., and Nishida, H. 2006. The functional analysis of *Type I postplasmic/PEM* mRNAs in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. **Dev. Genes Evol.** 216, 69-80.
- Nishida, H., 2008. Development of the appendicularian Oikopleura dioica: culture, genome, and cell lineages. Dev. Growth Differ. 50 Suppl 1, S239-256. https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01035.x
- Nishida H (1992). Regionality of egg cytoplasm that promotes muscle differentiation in ascidian, Halocynthia rorezi. Development 116: 521-529. https://dev.biologists.org/content/116/3/521
- 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. https://dev.biologists.org/content/120/2/235
- Nishida, H., Sawada, K., 2001. macho-1 encodes a localized mRNA in ascidian eggs that specifies muscle fate during embryogenesis. Nature 409, 724–729. https://doi.org/10.1038/35055568
- Nishino, A., Satou, Y., Morisawa, M., Satoh, N., 2000. Muscle actin genes and muscle cells in the appendicularian, Oikopleura longicauda: phylogenetic relationships among muscle tissues in the urochordates. J. Exp. Zool. 288, 135–150.
- Omotezako, T., Matsuo, M., Onuma, T.A., Nishida, H., 2017. DNA interference-mediated screening of maternal factors in the chordate Oikopleura dioica. Sci Rep 7, 44226. https://doi.org/10.1038/srep44226
- Omotezako, T., Nishino, A., Onuma, T.A., Nishida, H., 2013. RNA interference in the appendicularian Oikopleura dioica reveals the function of the Brachyury gene. Dev. Genes Evol. 223, 261–267. https://doi.org/10.1007/s00427-013-0438-8

- Omotezako, T., Onuma, T.A., Nishida, H., 2015. DNA interference: DNA-induced gene silencing in the appendicularian Oikopleura dioica. Proc. R. Soc. B 282, 20150435. https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0435
- Onuma, T.A., Matsuo, M., Nishida, H., 2017. Modified whole-mount in situ hybridization and immunohistochemistry protocols without removal of the vitelline membrane in the appendicularian Oikopleura dioica. Dev. Genes Evol. 227, 367–374. https://doi.org/10.1007/s00427-017-0588-1
- Piano, F., Schetter, A.J., Mangone, M., Stein, L., Kemphues, K.J., 2000. RNAi analysis of genes expressed in the ovary of Caenorhabditis elegans. Curr. Biol. 10, 1619–1622.
- Prodon, F., Chenevert, J., Sardet, C., 2006. Establishment of animal-vegetal polarity during maturation in ascidian oocytes. Dev. Biol. 290, 297–311. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.11.025
- Prodon, F., Hanawa, K., Nishida, H., 2009. Actin microfilaments guide the polarized transport of nuclear pore complexes and the cytoplasmic dispersal of Vasa mRNA during GVBD in the ascidian Halocynthia roretzi. Dev. Biol. 330, 377–388. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.006
- Prodon, F., Sardet, C., Nishida, H., 2008. Cortical and cytoplasmic flows driven by actin microfilaments polarize the cortical ER-mRNA domain along the a-v axis in ascidian oocytes. Dev. Biol. 313, 682– 699. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.001
- Prodon, F., Yamada, L., Shirae-Kurabayashi, M., Nakamura, Y., Sasakura, Y., 2007. Postplasmic/PEM RNAs: a class of localized maternal mRNAs with multiple roles in cell polarity and development in ascidian embryos. Dev. Dyn. 236, 1698–1715. https://doi.org/10.1002/dvdy.21109
- Rauh, N.R., Schmidt, A., Bormann, J., Nigg, E.A., Mayer, T.U., 2005. Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. Nature 437, 1048–1052. https://doi.org/10.1038/nature04093
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M., Wedlich-Soldner, R., 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. Nat Methods 5, 605. https://doi.org/10.1038/nmeth.1220
- Runft, L.L., Jaffe, L.A., Mehlmann, L.M., 2002. Egg activation at fertilization: where it all begins. Dev. Biol. 245, 237–254. https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0600
- Russo, G.L., Bilotto, S., Ciarcia, G., Tosti, E., 2008. Phylogenetic conservation of cytostatic factor related genes in the ascidian Ciona intestinalis. Gene 429, 104–111. https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.09.035
- Russo, G.L., Wilding, M., Marino, M., Dale, B., 1998. Ins and outs of meiosis in ascidians. Seminars in Cell & Developmental Biology 9, 559–567. https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0250
- Sardet, C., Nishida, H., Prodon, F., and Sawada, K. 2003. Maternal mRNAs of *PEM* and *macho-1*, the ascidian muscle determinant, associate and move with a rough endoplasmic reticulum network in the egg cortex. Development 130, 5839-5849.

- Sardet, C., Paix, A., Prodon, F., Dru, P., Chenevert, J., 2007. From oocyte to 16-cell stage: cytoplasmic and cortical reorganizations that pattern the ascidian embryo. Dev. Dyn. 236, 1716–1731. https://doi.org/10.1002/dvdy.21136
- Sasakura Y, Makabe KW. 2002. Identification of cis-elements which direct the localization of maternal mRNAs to the posterior pole of ascidian embryos. Dev. Biol. 250, 128–144.
- Schupbach, T., Wieschaus, E., 1989. Female Sterile Mutations on the Second Chromosome of Drosophila Melanogaster. I. Maternal Effect Mutations. Genetics 121, 101–117.
- Sensui, N., Yoshida, M., Tachibana, K., 2012. Role of Mos/MEK/ERK cascade and Cdk1 in Ca2+ oscillations in fertilized ascidian eggs. Dev. Biol. 367, 208–215. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.05.011
- Spada, F., Steen, H., Troedsson, C., Kallesoe, T., Spriet, E., Mann, M., Thompson, E.M., 2001. Molecular patterning of the oikoplastic epithelium of the larvacean tunicate Oikopleura dioica. J. Biol. Chem. 276, 20624–20632. https://doi.org/10.1074/jbc.M100438200
- Stach, T., Winter, J., Bouquet, J.-M., Chourrout, D., Schnabel, R., 2008. Embryology of a planktonic tunicate reveals traces of sessility. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 7229–7234. https://doi.org/10.1073/pnas.0710196105
- Stricker, S.A., 1999. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. Dev. Biol. 211, 157–176. <u>https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9340</u>
- Tadros, W., Lipshitz, H.D., 2009. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. Development 136, 3033–3042. <u>https://doi.org/10.1242/dev.033183</u>
- Tischer, T., Hörmanseder, E., Mayer, T.U., 2012. The APC/C inhibitor XErp1/Emi2 is essential for Xenopus early embryonic divisions. Science 338, 520–524. https://doi.org/10.1126/science.1228394
- Walczak, C.E., Heald, R., 2008. Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. Int. Rev. Cytol. 265, 111–158. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)65003-7
- Wang, K., Omotezako, T., Kishi, K., Nishida, H., Onuma, T.A., 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, 149–159. https://doi.org/10.1007/s00427-015-0502-7
- Whitaker, M., 2006. Calcium at fertilization and in early development. Physiol. Rev. 86, 25–88. https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2005
- White, J.A., Heasman, J., 2008. Maternal control of pattern formation in Xenopus laevis. J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol. 310, 73–84. https://doi.org/10.1002/jez.b.21153
- Wu, J.Q., Hansen, D.V., Guo, Y., Wang, M.Z., Tang, W., Freel, C.D., Tung, J.J., Jackson, P.K., Kornbluth, S., 2007. Control of Emi2 activity and stability through Mos-mediated recruitment of PP2A. PNAS 104, 16564–16569. https://doi.org/10.1073/pnas.0707537104
- Wu, Q., Guo, Y., Yamada, A., Perry, J.A., Wang, M.Z., Araki, M., Freel, C.D., Tung, J.J., Tang, W., Margolis,S.S., Jackson, P.K., Yamano, H., Asano, M., Kornbluth, S., 2007. A Role for Cdc2- and

PP2A-Mediated Regulation of Emi2 in the Maintenance of CSF Arrest. Current Biology 17, 213–224. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.12.045

- Xu, Y., Xing, Y., Chen, Y., Chao, Y., Lin, Z., Fan, E., Yu, J.W., Strack, S., Jeffrey, P.D., Shi, Y., 2006.
  Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. Cell 127, 1239–1251.
  https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.033
- Yamamoto, D.S., Tachibana, K., Sumitani, M., Jae Min Lee, Hatakeyama, M., 2008. Involvement of Mos-MEK-MAPK pathway in cytostatic factor (CSF) arrest in eggs of the parthenogenetic insect, Athalia rosae. Mech. Dev. 125, 996–1008. https://doi.org/10.1016/j.mod.2008.08.004

### 発表リスト

#### 原著論文

- <u>Masaki Matsuo</u>, Takeshi A. Onuma, Tatsuya Omotezako, Hiroki Nishida (2020)
   "Protein phosphatase 2A is essential to maintain meiotic arrest, and to prevent Ca<sup>2+</sup> burst at spawning and eventual parthenogenesis in the larvacean *Oikopleura dioica*." Developmental Biology, in press.
- 2. Tatsuya Omotezako, <u>Masaki Matsuo</u>, Takeshi A. Onuma, Hiroki Nishida (2017)
  "DNA interference-mediated screening of maternal factors in the chordate *Oikopleura dioica*" Scientific Reports, 7: 44226.
- 3. Takeshi A. Onuma, <u>Masaki Matsuo</u>, Hiroki Nishida (2017)
  "Modified whole-mount in situ hybridization and immunohistochemistry protocols without removal of the vitelline membrane in the appendicularian *Oikopleura dioica*." Development Genes Evolution, 227: 367-374.

#### 日本語記事

<u>松尾正樹</u>、表迫 竜也、小沼 健、西田 宏記 「脊索動物ワカレオタマボヤを用いたDNAiによる母性因子の機能的スクリーニング」 比較内分泌学 Vol. 43 (2017) No. 162 p. 136-137

#### 小沼健, 松尾正樹, 西田宏記

「オタマボヤの発生学を開拓する:「単純な体の脊索動物」という個性を活かす試み」 実験医学. 36 (6) (2018): 1021-1025.

#### 小沼健, 松尾正樹

「母性因子の大規模な母性因子の大規模な機能的スクリーニングを可能にする新しい脊索動物」 Medical Science Digest. 6 (2019): 42-43.

#### 口頭発表

OMasaki Matsuo, Takeshi A. Onuma, Tatsuya Omotezako, Hiroki Nishida

"Protein phosphatase 2A is essential to maintain meiotic arrest, and to prevent  $Ca^{2+}$  burst at spawning and eventual parthenogenesis in the larvacean, *Oikopleura dioica*."

10th International Tunicate Meeting, France, Villefranche-sur-Mer, July, 2019, T18

○松尾 正樹、小沼 健、西田 宏記

"Protein phosphatase 2A (PP2A) is essential for maintenance of meiotic arrest in the larvacean, *Oikopleura dioica*"

『第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会』、東京、2018年6月、WS11-01

○松尾 正樹、小沼 健、西田 宏記

「脊索動物ワカレオタマボヤの動植半球に局在する母性mRNAの解析」 『第3回ユニークな動物の勉強会』、静岡、2017年8月、O13

○松尾 正樹

「ワカレオタマボヤ未受精卵における減数分裂停止のしくみ」

『第4回ホヤ研究会』、宮城、2018年10月

#### ポスター発表

○松尾 正樹、表迫 竜也、小沼 健、西田 宏記

"DNAi screening for maternal factors that are involved in embryogenesis of the appendicularian, *Oikopleura dioica*."

『日本動物学会 第87回 沖縄大会2016』、沖縄、#264、2016年11月

○松尾 正樹、表迫 竜也、小沼 健、西田 宏記

"Functional screening of maternal factors and analysis of metaphase arrest of meiosis in the appendicularian, *Oikopleura dioica*" 『日本発生生物学会 第50回大会』、東京、P047、2017年5月

○松尾 正樹、表迫 竜也、小沼 健、西田 宏記

「脊索動物ワカレオタマボヤにおける母性mRNAと転写因子の包括的解析」 『第2回ユニークな動物の勉強会』、静岡、2016年8月、P23 謝辞

本研究を遂行するにあたって、多くの方々のお世話になりました。

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の、西田宏記教授、今井薫准教授、小沼 健助教をはじめとする皆様には多大なるご指導をいただきました。心より感謝を申し上げます。西田 教授には指導教官として、本研究を行う機会を与えていただき、また日々の議論から実験の助言まで 幅広くご指導をいただきました。今井准教授には度々実験のご相談をさせていただきました。小沼助 教には実験の助言やご協力をしていただいただけでなく、オタマボヤ班の教員としても何かとお世話 になりました。

また大阪大学理学研究科生物科学専攻細胞生物学研究室の松野健治教授ならびに生命誌学研究室 の小田広樹招聘准教授には、副査として、博士前期課程の頃からご助言、ご指導をいただきました。 心より感謝を申し上げます。

ワカレオタマボヤの飼育補助員である鈴木幹恵様と萱原恵子様には、ワカレオタマボヤの飼育環境 の維持・改善にご尽力いただき、安定したオタマボヤの供給を支えてくださいました。心より感謝を 申し上げます。

当研究室の先輩である表迫竜也氏(現 PhD・P&G 株式会社)には、母性因子の機能的スクリーニ ングを行うにあたってご指導いただけただけでなく、研究・研究を行う姿勢の基礎についても一から お手本を見せていただきました。心より感謝を申し上げます。

当研究室の留学研究生である彭宇氏には、卵巣切片の in situ の条件検討を行うにあたって現在も協力いただいています。心より感謝を申し上げます。

オタマボヤ班をはじめとしたその他の発生生物学研究室のメンバーにも、研究面のみならず日常生 活においても様々な局面で支えていただきました。皆様に心より感謝を申し上げます。

甲南大学フロンティアサイエンス学部分子細胞発生学研究室の西方敬人教授には、微小管の抗体染 色についてご助言をいただきました。心より感謝を申し上げます。

琉球大学医学研究科人体解剖学講座の泉水奏助教には、低い pH の人工海水の作製方法についてご 助言をいただきました。心より感謝を申し上げます。

Universitat de Barcelona の Josep Martí-Solans 博士には、ワカレオタマボヤ初期胚で母性 mRNA の局 在を観察するための *in situ* hybridization についてのご助言をいただきました。心より感謝を申し上げ ます。

本研究の一部は日本学術振興会特別研究員(DC2)の援助により行われました。心より感謝を申し 上げます。

第10回国際ホヤ学会へ参加する際、渡航費の一部を日本動物学会の2019年度川口賞基金より援助 していただきました。心より感謝を申し上げます。 最後に、大学院での生活を様々な面で支えてくださった、家族、友人に、心より感謝を申し上げま す。