

18. 表皮細胞におけるハウスの設計プログラム

鹿児島大学学術研究院 理工学域 理学系 生物学プログラム 准教授 小沼 健

概要

1. 研究目的： オタマボヤは、「ハウス」というセルロースを含む構造体を体外に作り、その内に棲む。ハウスは海水中の餌を濾しとって食べるフィルターなどを備えた構造体である。この形態形成を理解するため (1) 表皮細胞の scRNA-seq データの取得と、(2) ハウスの 3D 展開の数値シミュレーションを行う基盤構築を目指した。

2. 実施内容： (1) 表皮細胞の scRNA-seq を取得するため、オタマボヤを一日絶食させたのちに尻尾を切断し、細胞を分離して 10X Genomics によりデータを取得した。

(2) ハウスの形状を保ったままゲルに固め、セルロース染色を施したのち、Z スタック画像を取得する手法を開発した。

3. 得られた成果： (1) 鹿児島系統と沖縄系統のオタマボヤから scRNA-seq を実施した。データのカバー率は高く、表皮特異的な遺伝子発現を検出できた。

(2) ハウスの 3D 画像をもとに、3D プリンターによる模型を作成した。これらをもとに、内部の水流の再構築や、これまで着目されていなかった立体形状を保持する繊維構造などを新たに見出した (Onuma et al., in preparation)。

本助成によって、分子レベルでも形態レベルでも情報がほとんどなかったハウス形成の理解を進めるための基盤を構築できた。

背景および目的

ワカレオタマボヤ (*Oikopleura dioica*、以下、オタマボヤ) は、「ハウス」というセルロースを含む構造体を体外に作り、その内に棲む

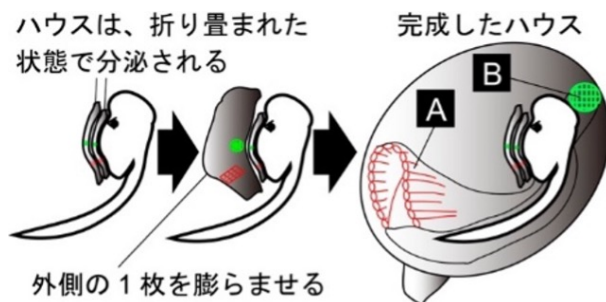


図 1. ハウスの展開

オタマボヤは体表に数枚ハウスを折り畳んで作り、これを膨らませることでハウスが出来上がる

。ハウスは海水中の餌を濾しとって食べるフィルターなどが備わった立体構造である。オタマボヤは常に数枚の折り畳まれたハウスをストックとして体表に保持して

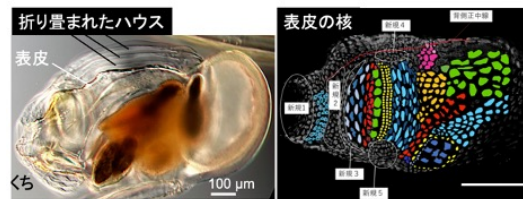


図 2. オタマボヤの表皮細胞

左図。オタマボヤを側面から見たもの。体表に数枚、折り畳まれたハウスが見られる。

右図。表皮細胞の核染色。領域ごとに特定の配列パターンをもち、細胞数・形状は生涯にわたり一定である。

外側の一枚を膨らませて使用する（図 1）。すなわち、オタマボヤは 2-3 時間に一枚、古いハウスを脱ぎ捨てて、新しいハウスを再現性よく作り出すのである。

ハウスを作る表皮細胞（図 2 右）は 2400 個あまりあるが、特有の配列パターンを持った 15 種類以上の集団からできており、その細胞数や並び方には個体差がない。すなわち、表皮細胞は分裂も移動も行わうことなく、わずかな数時間の周期で、ハウスを表皮上に作り出すのである。表皮上にはハウスを作る何らかの「流れ作業」があるはずだが、その実体については全く分かっていない。これまで類似の生物現象が研究されたことはなく、その理解は、生物の形づくりに新しい理解をもたらすだろう。

代表者は、オタマボヤの実験系を独自に構築してきた。本研究では、ハウス形成の理解を目的として、(1) 表皮細胞の一細胞トランスクリプトームの作成と、(2)ハウスの 3D 画像の取得法を開発し、展開の数値シミュレーションの土台の構築の 2 つを試みた。

方法

オタマボヤは、鹿児島県志布志湾で取得したものを研究室で数年にわたり継代飼育している。世代時間が 5 日と短く、その間に個体のサイズもハウスのサイズも 5 倍以上変化する。これを活用して、以下の 2 つの方法に適したオタマボヤを使用して研究を行った。

(1) 表皮細胞の scRNA-seq の実施。

代表者は、オタマボヤのゲノム配列やトランスクリプトーム情報を構築してきた実績がある (Wang et al., 2020; Wang et al., 2025 など)。これを元に、ハウス合成細胞、すなわち表皮細胞 (図 2) の特徴づけを実施するため、シングルセル RNA-seq を試みた (沖縄科学技術大学院大学との共同研究)。当初は、核を抽出してシーケンスすることを試みたが、データ量が少なく、分解されてしまう RNA が多いことが判明した。そこで scRNA-seq に手法を切り替えた。ライブラリー作成やシーケンスは 10X Genomics のキットに従って実施した。

オタマボヤは藻類を餌として育てるが、これらの細胞が混じってしまうことを避けるため、一晩絶食させたオタマボヤを材料とした。この処置を行っても、ハウスを膨らますことができることが分かっている。尻尾を手作業で除去した個体を 15-30 個体集め、細胞を解離させて、scRNA-seq に供した。このため、比較的大型の個体 (3-4 日目) を使用するようになった。

(2) ハウスの 3D 画像の取得と 3D プリンターによる再構築。

オタマボヤハウスの立体形状については、150 年以上にわたり画像情報がなかったと言える。ハウスは非常に脆弱であり、細胞よりはるかに剛性が低い、粘液もしくは水飴のような構造であるため、細胞の固定液中では容易に変形してしまう。この問題を解決するため、iPGell (GenoStaff 社) をもちいて短時間で海水中のハウスをゲ

ルに固めて固定し、そのゲルごとセルロースのホールマウント染色を行う手法を開発した。100 個あまりのハウスを調べ、変形が少ないもの 15 個あまりについてライトシート顕微鏡による蛍光 Z スタック画像を取得した。こちらについては、変形を可能な限り減らすため、直径 1 ミリ以下の最小のハウス (1 日目の個体) を狙って撮影を実施した。

続いて、この蛍光画像をもとに、3D プリンターによる模型を作成することを試みた。そのために、Z スタック画像を 2 値化し、バックグラウンドまたはシグナルが消失した部位については手作業で全て書き直しを行った。この画像を元に STL 画像を構築して、3D プリンターにより内部構造を出力した。

結果および考察

2つの目的について、以下の成果が得られた。

(1) scRNA-seq データを取得した。

前項目に記したように、当初は単一核をもちいた RNA-seq を試みたが、解析に十分な深度のデータが得られないことが判明したので、核の抽出はやめ、単一細胞をもちいた scRNA-seq を試みた

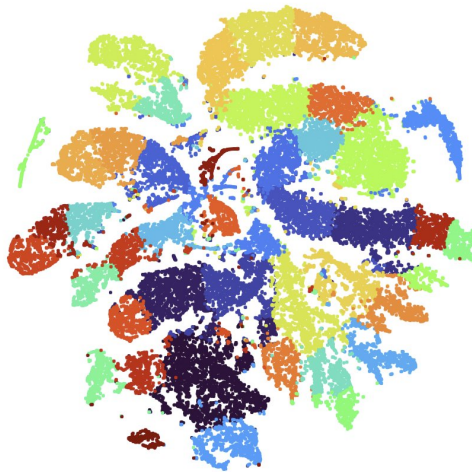


図 3. scRNA-seq データ

scRNA-seq データを次元圧縮して表示したもの。鹿児島と沖縄の集団より取得した (未発表データ)

。その結果、データの深度、回収した細胞数ともに十分な数が得られた (図 3)。表皮細胞の領域特異的なマーカー遺伝子として Oikosin というタンパク質が 70 種類あまり知られるが、これらも特定の集団に検出することができたことから、特異性も十分であると考えられる。

今後は、脳や消化管などの他の組織に該当する細胞をマーカー遺伝子の発現を元に取り除いたのち、表皮細胞が何種類に分けることができるかを調べていく。表皮細胞にはセルロース合成酵素や分解酵素を発現する集団としない集団があることも明らかになってきたため (Suwa et al., in preparation)、このような集団分けもした上でハウス形成の土台となる表皮細胞が幾つの部位に細分化できるのかを見直し、各部位のマーカー遺伝子の探索へと展開していきたい。

(2) ハウスの立体形状の解明に成功した。

ハウスのインタクトな立体形状を保持して、セルロースの Z スタック画像を撮影する手法を開発した (図 4、左図)。この画像を元にして、内部を 3D プリントした模型を作成することで、ハウスの各部位の形状を手にとって眺めることができるようになった (図 4、右図)

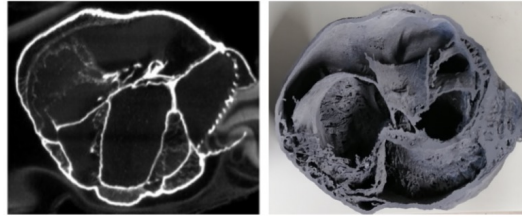


図4. ハウスの立体形状の解明

左図. ハウスの蛍光画像。セルロースの蛍光染色を行った。

右図. 3D プリンターにより作成したハウスの立体模型。

。これらの立体形状を詳細に調べたことで、ハウスの内部と壁を繋ぎ止める繊維構造を3つ、餌フィルターと壁を繋ぎ止める繊維構造を2つ見出した。このようにハウスの形状についての理解が大きく進んだ (Onuma et al., in preparation)。

従来、ハウスの可視化については、餌粒子を食べさせることで流路に色をつける方法がほとんどであった。この方法は有用であるが、標識される部位にバイアスがかかることは否めない。この点で、ハウスの全ての領域をバイアスなく標識することができたのは、今回のセルロース染色が最初の例と言えるだろう。柔らかく崩れやすいという実験素材としての制約を克服したことで、ハウス形成の理解が飛躍的に進むことが期待できる。現在はこれを元にして、完成したハウスと、表皮上の折り畳みそれぞれについて、餌フィルターの表面形状を3D画像として記録して、その膨らむプロセスの数値シミュレーションとアニメーション化を試みている。これがうまくいけば、他の部位についても解析を進めていく。

以上のように、研究計画に挙げた目標をほぼ達成することができた。ハウス形成の研究は例のない1からの試みであったが、このようにさまざまな問題を検証できる状況に進むことができた。三菱財団の方々には、新しいチャレンジに対するご理解とご支援を賜ったことを心より感謝申し上げる。

(完)

発表論文

- 1) Transcriptomes of a fast-developing chordate uncover drastic differences in transcription factors and localized maternal RNA composition compared with those of ascidians.
Wang K, Suyama R, Mizutani N, Matsuo M, Peng Y, Seki M, Suzuki Y, Luscombe NM, Dantec C, Lemaire P, Toyoda A, Nishida H, Onuma TA * (2025). *Development*. 152(6):DEV202666. doi: 10.1242/dev.202666.
- 2) Extreme genome scrambling in marine planktonic Oikopleura dioica cryptic species.
Plessy C*, Mansfield MJ, Bliznina A, Masunaga A, West C, Tan Y, Liu AW, Grašič J, del Río Pisula MS, Sanchez-Serna G, Fabrega-Torres M, Ferrandez-Roldán A, Roncalli V, Navratilova P, Eric M. Thompson EM, Onuma T, Nishida H, Canestro C *, and Luscombe NM (2024).
Genome Research. 34(3):426-440. doi: 10.1101/gr.278295.123.
- 3) Sasakura Y*, Sunanaga T, Onuma TA, Satake H (2025, Nov.).
Germ cell formation and reproduction in tunicates.
Developmental Biology. 527:226-249. doi: 10.1016/j.ydbio.2025.08.013.
- 4) 小沼健* (2025).
“fast-developing chordate” ワカレオタマボヤの発生段階および動植半球のトランスクリプトーム情報.
比較内分泌学. 180: e0126.