



2022年1月13日

報道関係者各位

慶應義塾大学

侵略的外来種ホヤの「ステルス性」の活用

ーバイオイメージングのための新規モデル生物へー

慶應義塾大学大学院理工学研究科の修士2年 船越悠、紫藤拓巳、同大学理工学部の岡浩太郎教授、堀田耕司准教授らは、ヨーロッパザラボヤ (*Ascidella aspersa*) をバイオイメージング研究の新規モデル生物とするための第一歩として、発生段階の定義づけと三次元胚画像リソースの構築を行いました。

ヨーロッパザラボヤは、脊椎動物に最も近い尾索動物に属するホヤの一種です。このホヤは日本だけでなく世界中で侵略的に繁殖し、養殖ホタテガイに付着することで漁業被害をもたらす有害外来種として有名です。一方、我々は本種の胚は可視光の90%を透過するほど透明であることを見出し、バイオイメージング研究に役立つモデル生物としての潜在的な可能性を模索しています。しかし、これまで本種の発生研究に必要な不可欠な標準発生段階表はありませんでした。

本研究はヨーロッパザラボヤをモデル生物として確立するための最初のステップとして、カタユレイボヤ (※1) の世界標準発生段階表を参照し、受精卵から孵化幼生までの28の異なる発生段階をヨーロッパザラボヤ用に定義しました。さらにこの発生段階表を Web ベースの三次元胚画像リソースとして整備し、世界中の誰もが閲覧できるようにしました。このリソースには、共焦点レーザー走査顕微鏡で撮影された実に3,000を超えるヨーロッパザラボヤ胚の断層画像と3D画像が含まれています。

本研究で構築したヨーロッパザラボヤ3D画像リソースは、さまざまなオミクスデータを発生段階の各時空間階層と結びつけるために不可欠であり、ヒトを含む脊椎動物の胚発生や系統進化をシステムレベルで理解するのに役立つと期待されます。さらにヨーロッパザラボヤの研究基盤の整備により本種の研究が進めば、ホタテガイの貝殻への付着防止策につながると考えられます。

研究成果は、2021年12月17日にスイスの科学誌『*Frontiers in Cell and Developmental Biology*』にオンライン掲載されました。

1. 研究の背景

顕微鏡や各種蛍光プローブをはじめとした科学技術の著しい発展に支えられ、生体内の様々な分子の動態を可視化できるバイオイメージングという手法は生命科学研究に大いに貢献しています。特に生きた個体を用いたイメージング研究において、実験動物の胚透明性は非常に重要です。胚が不透明な場合深部の撮像は困難で、イメージング技術をフルに活かすことができないためです。

ヨーロッパではすでに胚が透明な *Phallusia* 属のホヤが実験動物として用いられていますが、日本やアメリカなど他の地域には生息していません。当研究室ではイメージングに適した透明な胚をもつ種を日本沿岸にて網羅的に探索しました。その結果、国内で胚が最も透明なホヤは、北海道や東北地方の養殖ホタテガイに大量に付着し (図1)、養殖漁業に多大な被害を与えていると報告されている (金森ら, 2016) 外来種ヨーロッパザラボヤであることを見出しました (Shito *et al.*, 2020)。

本種は可視光域の高い胚透明性 (光透過率約90%、これはガラス窓と同等の透過率) に加え、未受精卵の時点から mRNA の翻訳が可能であるため蛍光タンパク質型プローブを発生の早い時期から使えること、侵略的外来種であるゆえに *Phallusia* 属のホヤがない地域にも生息し世界中で入手しや

すいことなどから世界標準のモデル生物となりうることがわかりました。

そこで本研究グループはヨーロッパザラボヤの持つ胚透明性、すなわち「ステルス性」を活かし、本種をイメージングに最適な新規モデル生物として確立することを目指しています。本研究ではまず、世界標準となるヨーロッパザラボヤの発生段階を定義しました。

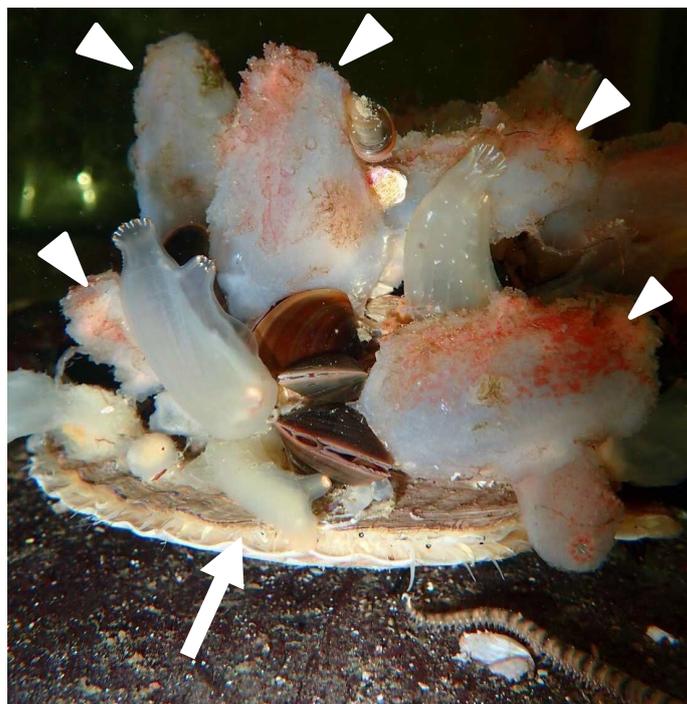


図1 ホタテガイ（矢印）に付着するヨーロッパザラボヤ（矢頭）

写真のように養殖ホタテガイにホヤ類やイガイなどさまざまな生物が付着することで成長が妨げられる。ヨーロッパザラボヤは赤みがかった被囊が特徴的。

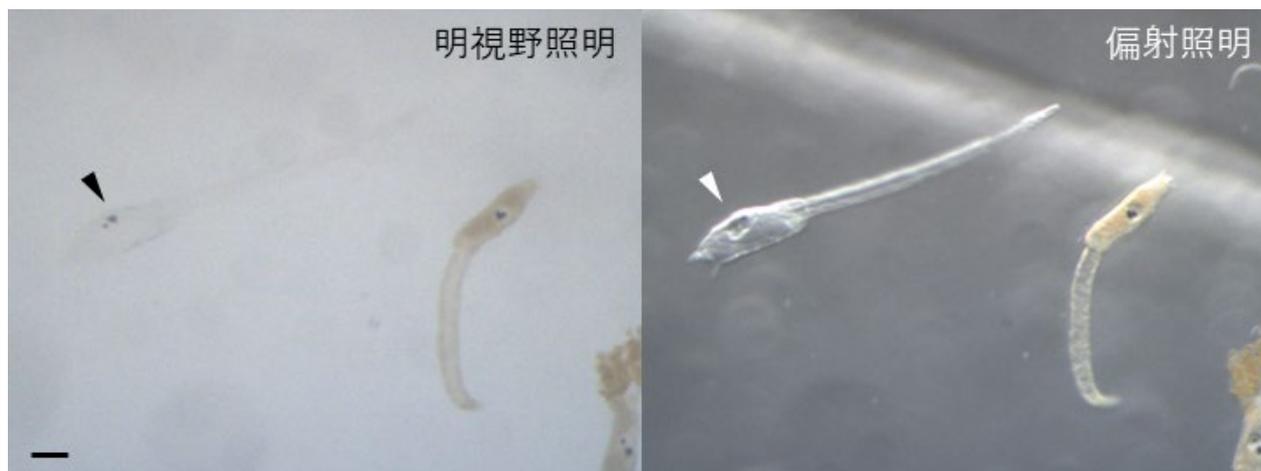


図2 明視野照明および偏射照明で撮影したヨーロッパザラボヤとカタユウレイボヤの幼生 (Shito et al., 2020 より)

カタユウレイボヤ幼生はいずれの照明でも視認できるのに対し、明視野照明ではヨーロッパザラボヤ幼生（左）は眼点（矢頭）以外視認できない「ステルス性」を持つ。

2. 研究の概要

ホヤは脊椎動物に最も近縁であり、構成する細胞数が少なく細胞系譜も明らかであるため、脊椎動物の発生や進化を理解する上で非常に有用なモデル生物です。中でもカタユレイボヤやマボヤが主に研究に使用されています。一方、外来種のヨーロッパザラボヤは胚が非常に透明であることが見いだされ (Shito *et al.*, 2020)、また世界中の海に広く生息することから、バイオイメーjing研究のモデル生物として期待されています。しかし、この生物の標準的な発生段階表の定義はなされておらず、解剖学的知見も不足していました。そこでヨーロッパザラボヤをモデル生物として確立するための第一歩として、カタユレイボヤ (*Ciona intestinalis* type A) の標準発生段階表を参考に (Hotta *et al.*, 2007)、標準的な発生段階を定義しました (図3)。受精卵から孵化した幼生までの発生過程は 28 種類の発生段階 (ステージ 1~26) に分類されました。(※2)



図3 可視光の90%を透過するヨーロッパザラボヤ胚の発生段階を定義

次に、定義された 28 の発生段階ごとのヨーロッパザラボヤ胚を共焦点レーザー走査顕微鏡で撮影しました。3,000 枚以上の断面画像をもとにあらゆる角度から胚の詳細な構造を観察することができる 3D 画像がつくられました (図 4)。これら断層画像や 3D 画像には、細胞系譜や尾の長さや体幹部の長さ等、発生段階の定義の基準となる情報も付加されています。

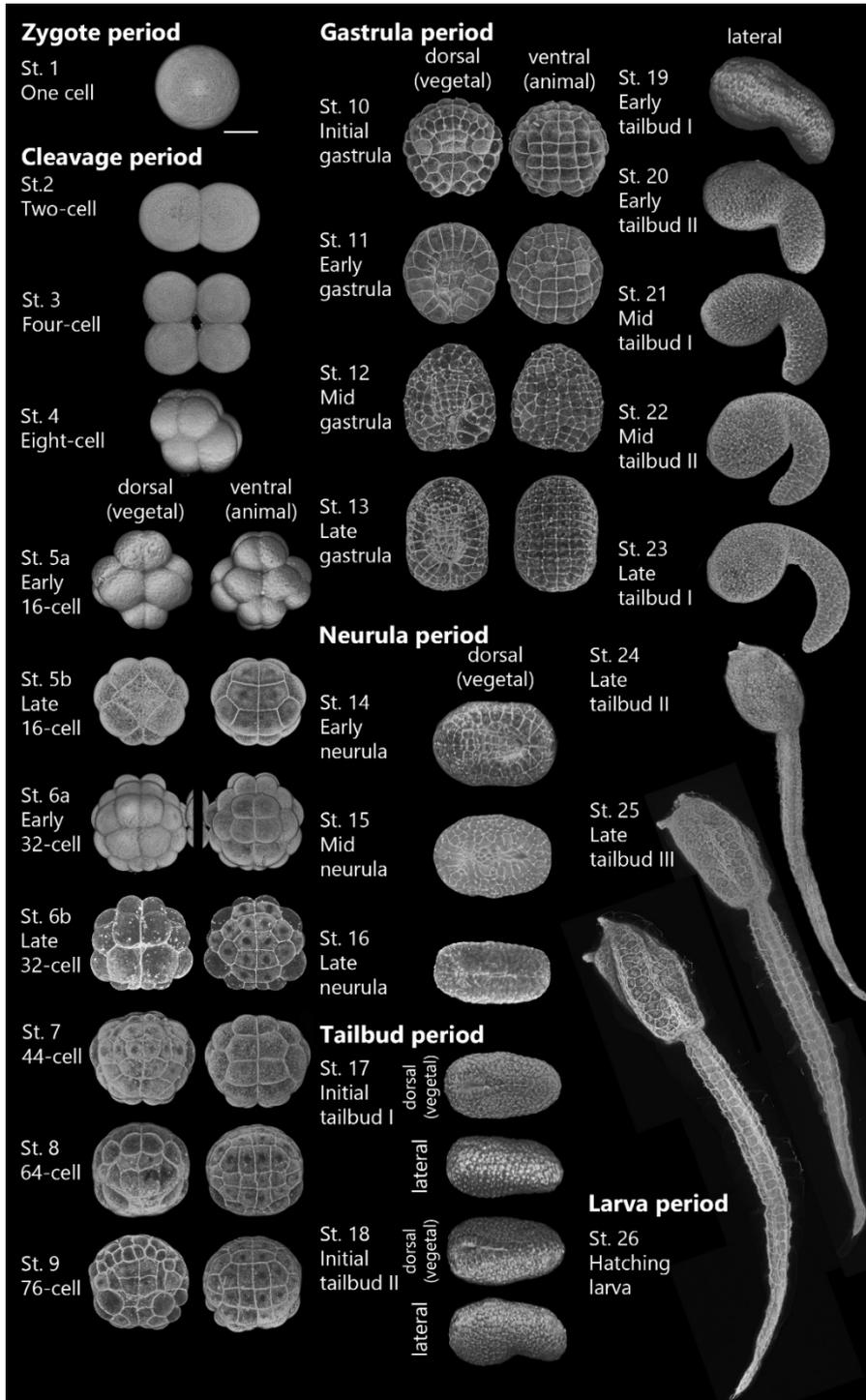


図 4 3,000 枚以上の共焦点レーザー顕微鏡画像から 3D 構築された各発生段階の胚画像

本研究で得られたすべての画像や発生段階の定義、注釈情報は Web 上のデジタル画像リソース RAMNe: Resources of Ascidiella aspersa Morphology Network-based にまとめられ、世界中どこからでも誰もが閲覧可能です (図 5)。

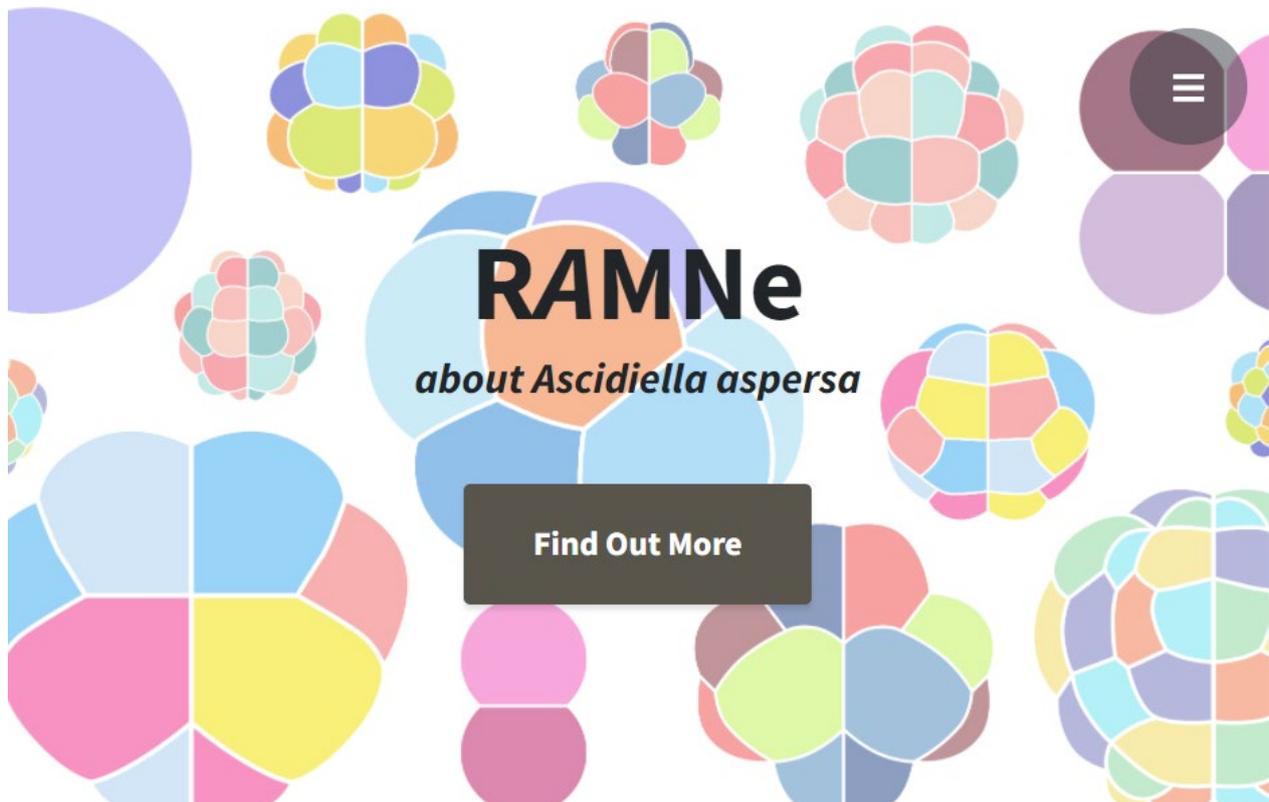


図 5 本研究で整備されたヨーロッパザラボヤ 3D データベース RAMNe のトップページ

URL : <https://www.bpni.bio.keio.ac.jp/RAMNe/latest/index.html>

本研究グループはさらに、ヨーロッパザラボヤとカタユウレイボヤの二種間で細胞分裂パターン、胚の形態、発生速度について種間比較をおこないました。その結果、二種間で細胞分裂パターンと神経胚までの発生速度は驚くほどよく保存されていることがわかりました。一方、尾芽胚期における尾部と体幹部の長さ比はカタユウレイボヤよりも小さく、尾が相対的に短いことが示されました。これはヨーロッパザラボヤの尾部表皮を構成する細胞数がカタユウレイボヤより少ないことと関連している可能性があります。また、尾が屈曲する時期はカタユウレイボヤより早いこともわかりました。これらの違いはヨーロッパザラボヤの侵略的生態の基盤となっている可能性があります。

最後に、ヨーロッパザラボヤのもつ優れた特性 (胚透明性や早期 mRNA 翻訳能) を活かした二つのイメージング実験を行いました。一つ目の実験ではヨーロッパザラボヤ胚の細胞膜を染色し生きたまま胚全体を 3D 撮影可能であることが示されました。(※3) 二つ目はヨーロッパザラボヤの特筆すべき性質である発生早い時期における外来 mRNA の翻訳能を示した実験です (図 6)。ヨーロッパザラボヤを用いると受精の瞬間に Ca^{2+} 濃度上昇が波のように伝わっていく様子を蛍光タンパク質センサーで観察できることを示しました。(※4)

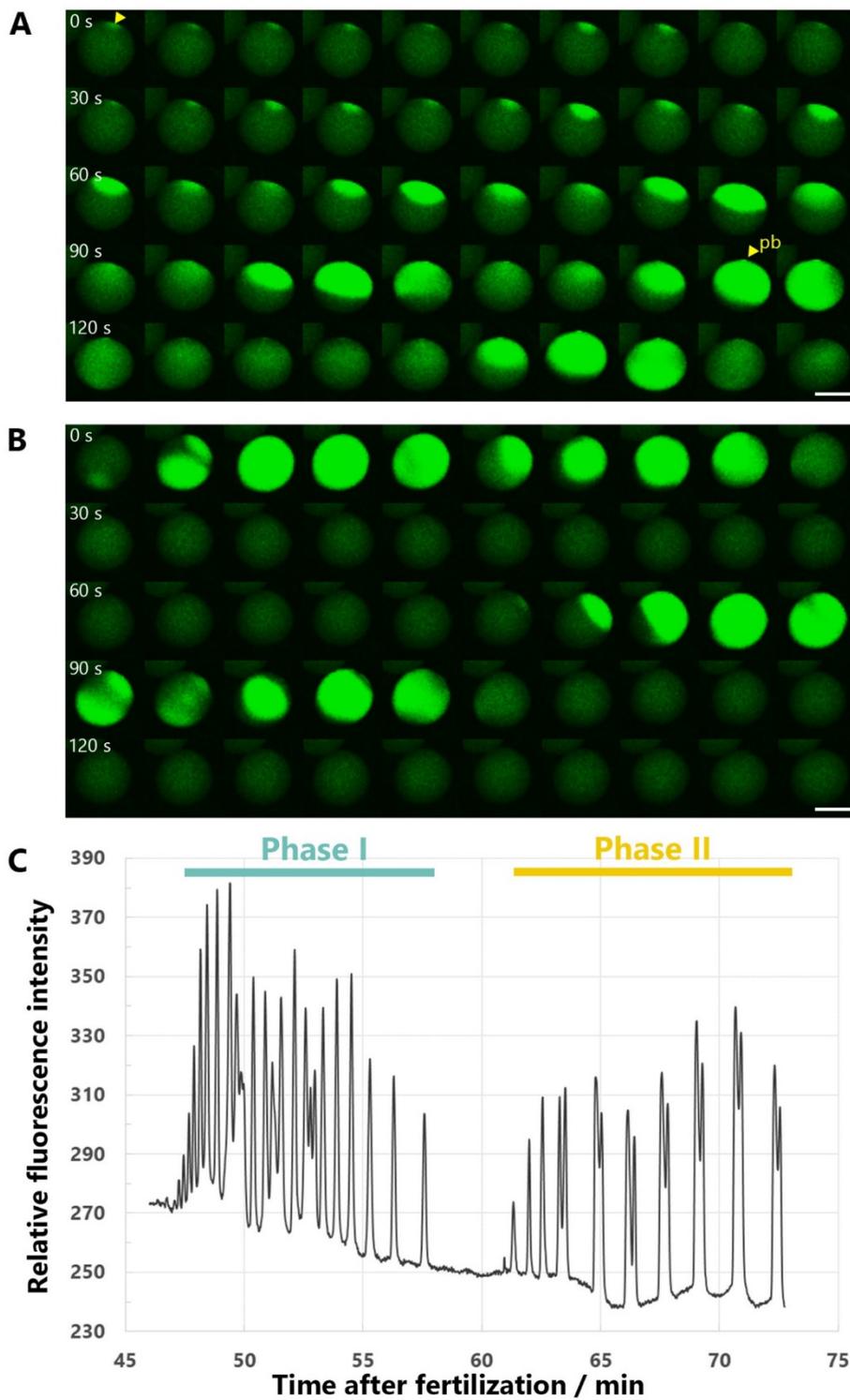


図6 GCaMP6s mRNA 導入により2度の受精時Ca²⁺振動を捉えた図

A: 受精直後にみられる1度目のCa²⁺振動、B: 2度目のCa²⁺振動、C: Ca²⁺振動時の輝度変化グラフ

3. 今後の展望

今後はヨーロッパザラボヤをより使いやすい実験動物にするため、生命科学研究に必須な情報であるゲノムやトランスクリプトームデータの整備を進めていきたいと考えています。また、カタユレイボヤとの種間比較により、ヨーロッパザラボヤは尾が相対的に短いこと、付着器（※5）の配置が異なることがわかりました。これらの特徴はホタテガイ等への漁業被害をもたらす当種の侵略的生態に関与している可能性があります。本研究では孵化幼生までの発生段階について扱っていませんが、今後遊泳幼生から変態期、幼若体についても発生段階の定義を検討しており、より発生後期の研究が進むことで漁業被害軽減につながる知見が得られると期待されます。

以上の展望に加え、引き続き三次元胚画像リソース RAMNe を介しヨーロッパザラボヤの発生学・解剖学的情報を世界中の研究者へ提供することにより、この魅力的な生物が細胞レベル・システムレベルで発生や進化を理解するための新たなモデル生物の選択肢として発展していくことを願っています。

4. 謝辞

ヨーロッパザラボヤの採取は以下の方々のご支援を受けました。

- 東北大学大学院農学研究科 附属女川フィールドセンター 池田実教授・平塚豊一船長
- 北海道立総合研究機構 水産研究本部 函館水産試験場 金森誠様
- 北海道立総合研究機構 水産研究本部 中央水産試験場 瀧谷明朗様・萱場隆昭様・山口幹人様
- 東北大学大学院生命科学研究科 熊野岳教授

本研究は、以下の研究助成の支援を受けて実施されました。

- JSPS 科研費：21H00440
- 慶應義塾大学自然科学研究教育センター研究プロジェクト
- 慶應義塾大学 KLL 研究プロジェクト
- 慶應義塾大学教育・研究調整予算
- 水産無脊椎動物研究所育成研究助成：IKU2021-02

<原論文情報>

【題名】 Developmental Table and Three-Dimensional Embryological Image Resource of the Ascidian *Ascidella aspersa* (ヨーロッパザラボヤの発生段階表と三次元胚発生画像リソース)

【著者名】 Haruka M. Funakoshi[†], Takumi T. Shito[†], Kotaro Oka and Kohji Hotta* (†equally contributed)

【掲載誌】 *Frontiers in Cell and Developmental Biology*

【論文 URL】 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.789046/full>

【DOI】 10.3389/fcell.2021.789046

<データベース情報>

Resources of *Ascidella aspersa* Morphology Network-based; RAMNe

<https://www.bpni.bio.keio.ac.jp/RAMNe/latest/index.html>

<参考文献>

金森 誠, 馬場 勝寿, 近田 靖子, 五嶋 聖治, 北海道における外来種ヨーロッパザラボヤ *Ascidella aspersa* (Müller, 1776) の分布状況, 日本ベントス学会誌, 2014, 69 巻, 1 号, p. 23-31

<https://doi.org/10.5179/benthos.69.23>

Shito, T. T., Hasegawa, N., Oka, K., and Hotta, K. (2020). Phylogenetic Comparison of Egg Transparency in Ascidians by Hyperspectral Imaging. *Sci. Rep.* 10, 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-77585-y>

Hotta, K., Mitsuhashi, K., Takahashi, H., Inaba, K., Oka, K., Gojobori, T. and Ikeo, K. (2007), A web-based interactive developmental table for the ascidian *Ciona intestinalis*, including 3D real-image embryo reconstructions: I. From fertilized egg to hatching larva. *Dev. Dyn.*, 236: 1790-1805.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21188>

<用語説明、参考資料>

※1 カタユレイボヤ

世界的に研究に用いられているホヤのモデル生物の一つ
学名 *Ciona intestinalis* type A (*Ciona robusta*)

※2 受精卵から孵化した幼生までの発生過程（動画）

https://figshare.com/articles/media/Video1_Developmental_Table_and_Three-Dimensional_Embryological_Image_Resource_of_the_Ascidian_Ascidiella_aspersa_MP4/17255246

※3 ヨーロッパザラボヤ胚の3D撮影（動画）

https://figshare.com/articles/media/Video2_Developmental_Table_and_Three-Dimensional_Embryological_Image_Resource_of_the_Ascidian_Ascidiella_aspersa_MP4/17255249

※4 受精時 Ca²⁺振動（動画）

https://figshare.com/articles/media/Video3_Developmental_Table_and_Three-Dimensional_Embryological_Image_Resource_of_the_Ascidian_Ascidiella_aspersa_MP4/17255252

※5 付着器

ホヤ幼生が岩などの基質に付着し変態するための器官

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

・研究内容についてのお問い合わせ先

慶應義塾大学 理工学部 生命情報学科 准教授 堀田耕司（ほったこうじ）
TEL : 045-566-1700 FAX : 045-566-1789 E-mail : khotta@bio.keio.ac.jp

・本リリースの配信元

慶應義塾広報室（澤野）
TEL : 03-5427-1541 FAX : 03-5441-7640
Email : m-pr@adst.keio.ac.jp <https://www.keio.ac.jp/>