

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：32702

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14794

研究課題名(和文) 脱皮ホルモンから迫るミジンコの性分化機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying molting hormone signaling for sex differentiation in the water flea *Daphnia*

研究代表者

豊田 賢治 (Toyota, Kenji)

神奈川大学・理学部・研究員

研究者番号：00757370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脱皮ホルモンはその名の通り、昆虫類や甲殻類の属する節足動物のグループで脱皮を制御している内分泌分子である。本研究では、最近研究代表者が発見した日照時間によって生まれてくる子供の雌雄が変わるオオミジンコ *Daphnia magna* の2系統が長日条件(14時間明：10時間暗)と短日条件(10時間明：14時間暗)で生涯飼育した場合、どれくらいの性比が得られるか明らかにした。これらは今後、脱皮ホルモンがミジンコの性決定や性分化にどう影響しているのか調べる良いモデル生物になると期待される。また、ミジンコと同じ甲殻類に属するクルマエビの幼生の成長における脱皮ホルモンの作用を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脱皮ホルモンは昆虫類の脱皮・成長に必須のホルモンであることから、古くから農薬成分として農業分野で使用されてきた。その結果、ミジンコや農業益虫などの農薬の非対象生物である節足動物にまで影響がでてしまっていることが社会問題となっている。本研究からミジンコでは脱皮ホルモンが性分化(メスに成長するかオスに成長するか)に重要な役割を果たしていることが示唆されているが、農薬などの脱皮ホルモン成分によって生物が子孫を残すうえで非常に重要な形質である“性”を攪乱してしまう可能性があることは深刻な問題である。このように本研究を通して脱皮ホルモンの未だ知られていない生理機能を研究することには大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Molting hormone is widely known to regulate the molting in the Arthropod species such as crustaceans and insects. In this study, I newly found two *Daphnia magna* strains that can also control the production of female or male offspring by photoperiod differences and demonstrated the lifetime production profiles of female and male offspring under the long-day or short-day conditions. In near future, daphnids with photoperiod-dependent sex determination manner will hugely contribute to understanding the molecular mechanisms underlying molting hormone-driving sex differentiation in daphnids. In addition to daphnids, I demonstrated that physiological function of molting hormone on larval development of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* to comprehensively understand the function of molting hormone in crustaceans.

研究分野：環境生理学

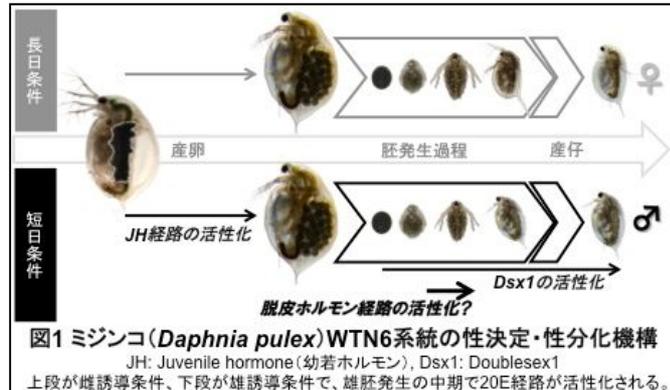
キーワード：ミジンコ 脱皮ホルモン 甲殻類

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動物の性決定機構には、性染色体(性決定遺伝子)の有無に起因する遺伝型性決定と、外部環境要因によって決まる環境依存型性決定がある。遺伝型性決定は、マウスやショウジョウバエなどのモデル生物の研究からその分子基盤が明らかにされつつあるが、環境依存型性決定は有用なモデル生物やその実験系の確立が障壁となり未だその多くが現象の記載に留まっている。

ミジンコ類は、単為生殖によって外部環境に応じて雌雄を産み分けるため、雌雄ともに母親と同一のゲノム情報を有するクローンである。これまでに、幼若ホルモン(JH)作用を有する物質がミジンコ類の雄産生を引き起こす現象が発見され、JHが雄性決定を制御する生体内分子であると考えられてきた。しかしながら、環境情報がどのようにJHシグナルへと変換されているのか、そのメカニズムは謎に包まれていた。研究代表者は、ミジンコ(*Daphnia pulex*) WTN6系統を用いてJH投与を必要としない日長依存的な雌雄の誘導系を確立した(図1)。本系を用いて、トランスクリプトーム解析により雄性決定に関与する複数のJH生成の上流制御因子を見出し、同様にメタボローム解析から新規の雄性決定因子としてビタミンB5を同定した。さらに、雌雄の性決定期前から性分化過程にかけた時系列トランスクリプトーム解析を実施し、雄性分化過程において脱皮ホルモンシグナル関連遺伝子の発現が顕著に増加していることを見出した。脱皮ホルモンは節足動物が有する唯一のステロイドホルモンであり、脱皮のみでなく胚発生や卵成熟など多様な生命現象への関与が報告されている。



### 2. 研究の目的

脱皮ホルモンは、昆虫綱と甲殻亜門軟甲綱以外ではその生理作用を含め未解明な点が数多く残されている。脱皮ホルモンの生合成器官は分類群毎に大きく異なり、中でも甲殻類はその分類学的多様性の高さから、軟甲綱の知見を甲殻亜門全般に適用することは極めて危なかしく、綱ごとの知見の収集と比較解析が要求されている。

脊椎動物では、卵巣と精巣から分泌される性ステロイドによって全身の性分化が細胞非自律的に進行する。一方で、無脊椎動物は性ステロイドを有せず、雌雄の発生運命は細胞自律的に決定される。しかし、甲殻亜門軟甲綱では雄特異的の器官である造雄腺から造雄腺ホルモンというペプチドが分泌され、それによって細胞非自律的な雄性分化が促進される。研究代表者は、ミジンコゲノム中から造雄腺ホルモンの相同遺伝子が見出せないことを明らかにした。これらにより、ミジンコ類も昆虫類同様に性決定遺伝子カスケードによる細胞自律的な性分化機構を有していると考えられてきた。しかし、研究代表者が実施した時系列トランスクリプトーム解析の結果により、脱皮ホルモンが雄性分化に関与している可能性があることから、脱皮ホルモンによる全身の雄性分化の細胞非自律的な同調機構の存在が示唆された。実際、昆虫類において一部の性形質が脱皮ホルモンシグナルの制御下にあることが報告されており、ミジンコの性分化プロセスにおいても脱皮ホルモンが関与している可能性は十分考えられる。

以上の知見を踏まえて、本研究では、日長依存的な雌雄の誘導が可能なミジンコ WTN6 系統をモデルに、甲殻類鰓脚綱の脱皮ホルモン経路のブラックボックスである脱皮ホルモン生合成器官の同定を第一の目的とする。加えて、LC-MS 解析による性分化(胚発生)過程における脱皮ホルモン動態の定量解析や脱皮ホルモン生合成器官の時系列トランスクリプトーム解析から、ミジンコの性分化過程における脱皮ホルモンシグナルの機能解明を第二の目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 日長時間で雌雄を産み分けるオオミジンコの生涯産仔プロファイルの作製

研究代表者が見出したオオミジンコの LRV13.2 系統と LRV13.5-1 はそれぞれ日長時間に応じて雌雄仔虫を産仔する (Toyota et al., 2019)。この 2 系統の長日条件(14 時間明:10 時間暗)と短日条件(10 時間明:14 時間暗)における生涯産仔パターンとその仔虫の性比を詳細に調べた。50 ml の遠沈管に生後 24 時間以内のメス仔虫を 1 匹投入し、その個体が死ぬまでに産んだ全ての仔虫数を調べた (n = 10)。

#### (2) 脱皮ホルモンのクルマエビ幼生への影響解析

愛知県産のクルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) から孵化幼生を入手し、三重県栽培漁業センターにおいて幼生成長過程における脱皮ホルモン (20-hydroxyecdysone: 20E) 投与による生存や変態への影響を調べた。クルマエビはノープリウス幼生として孵化するが、その後ゾエア幼生、ミス幼生、そしてポストラバと成長・変態を繰り返す。500 ml ガラスピーカーに幼生を各 10 匹ずつ投入し、20E を 16.0, 8.0, 4.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625  $\mu\text{M}$  で投与した。

#### 4. 研究成果

(1) 日長時間に応じて雌雄仔虫を産み分けるミジンコ WTN6 系統の発見はこれまでブラックボックスだったミジンコの性決定システムの理解に大きく貢献してきた。しかし、ミジンコの性決定を引き起こす環境要因はミジンコの地理系統によって異なり、日長時間以外にも水温や栄養条件、個体密度などが知られている。このため WTN6 系統から得た知見がミジンコ全般に適用できるのかを検証する必要があった。そこで本研究ではまず、研究代表者がバーミンガム大学(英国)のミジンコストックから見出した日長時間で雌雄を産み分けるオオミジンコの LRV13.2 系統と LRV13.5-1 系統について (Toyota et al., 2019)、長日条件と短日条件におけるその雌雄産仔パターンを詳細に調べた。その結果、LRV13.2 系統は短日条件で平均 80% 前後でオスを産生すること、そして加齢に伴いオス誘導率は低下することを見出した (図 2 上段)。一方で LRV13.5-1 系統は長日条件で 60% ほどのオス誘導率を示し、LRV13.2 系統と同様に加齢に従いオス誘導率は低下した (図 2 下段)。加齢に伴うオス誘導率の低下は WTN6 系統でも確認しており、オス性決定を抑制するようなメカニズムが加齢と密接にかかわっていることを示唆している。

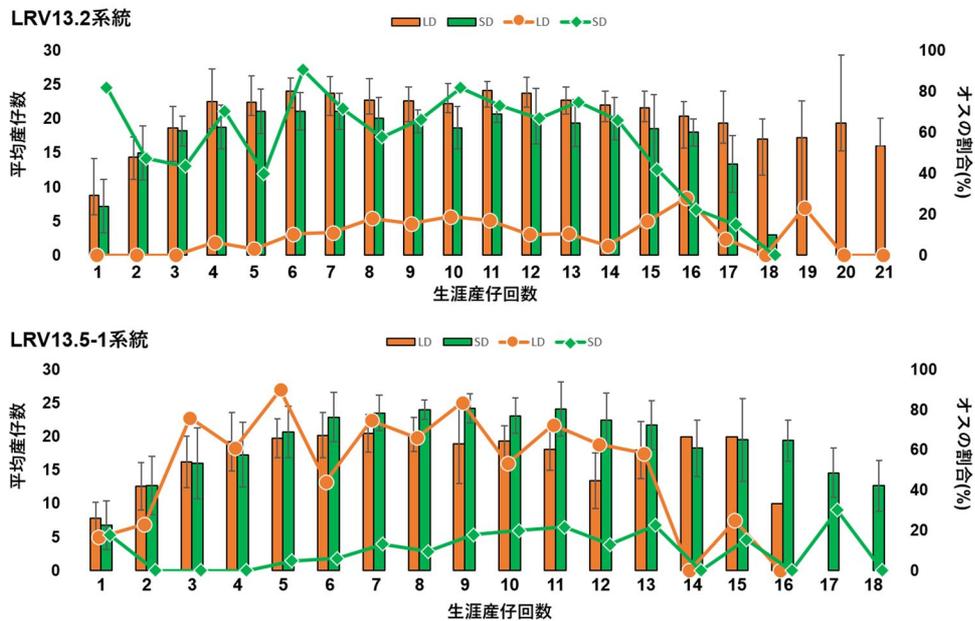


図2 オオミジンコ (*Daphnia magna*) の長日条件と短日条件における生涯産仔パターン

LRV13.2系統: 長日条件でメスを、短日条件でオスを産生。  
LRV13.5-1系統: 長日条件でオスを、短日条件でメスを産生。

(2) クルマエビの孵化後のノープリウス幼生のステージ 4 に 20E 曝露を 72 時間おこなった。曝露水は 24 時間ごとに 100% 交換し、生存数とステージ 6 への成長とゾエア幼生への変態率を調べた。その結果、生存数が半減する 50% effective concentration (EC50) の値は 48 時間後は 3.84  $\mu\text{M}$ 、72 時間後は 0.29  $\mu\text{M}$  であった (図 3A, 3B)。また、ゾエア幼生への変態率は 20E 濃度が上昇するに従い減少した。興味深いことに、20E のすべての曝露群でノープリウス幼生のステージ 4 からステージ 6 への成長脱皮は正常に観察された。死亡している個体は全てノープリウス 6 であり、ゾエア幼生への変態時に外部から脱皮ホルモン作用に曝されると変態を伴う脱皮が正常に進行しないことが明らかとなった (図 3C)。

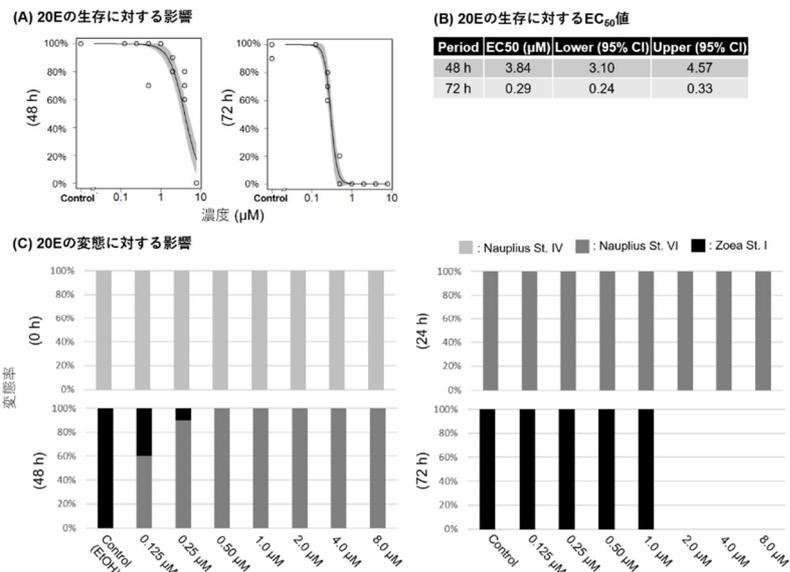


図3 クルマエビのノープリウス幼生に対する20E曝露の結果

同様に、ゾエア幼生

からミス幼生、ミス幼生からポストラバへの変態前から 20E を複数濃度で曝露したときの生存や変態における影響調べた (図 4)。その結果、ゾエア幼生からミス幼生への移行期は 20E の生存における EC50 値が 0.22  $\mu\text{M}$  (48 時間後) とノープリウス幼生からゾエア幼生の移行期と同レベルであること、さらにミス幼生への変態率は 20E 濃度依存的に減少することを見出した (図 4 左)。一方で、生存率は濃度依存的に減少するが、ミス幼生からポストラバへの移行期はどの曝露群においてもポストラバが観察された。以上の結果はクルマエビの幼生変態には昆虫類と同様に脱皮ホルモンによる制御を受けていること、さらに外部からの脱皮ホルモン作用物質の感受性は幼生ステージによって異なることを見出した。

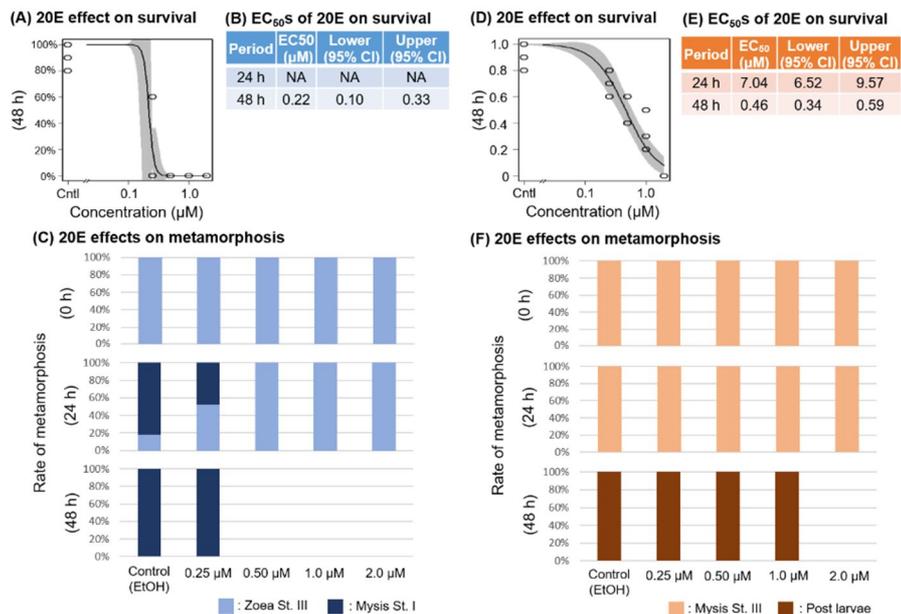


図4 クルマエビのゾエア幼生(A-C)およびミス幼生(D-F)に対する20E曝露の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kenji Toyota, Maria Cambroner Cuenca, Vignesh Dhandapani, Antonio Suppa, Valeria Rossi, John K. Colbourne, Luisa Orsini.	4. 巻 9
2. 論文標題 Transgenerational response to early spring warming in <i>Daphnia</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-019-40946-3">https://doi.org/10.1038/s41598-019-40946-3</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kenji Toyota, Kentaro Izumi, Takashi Ichikawa, Tsuyoshi Ohira, Ken Takeuchi.	4. 巻 AA2020-1
2. 論文標題 Morphometric approaches reveal sexual differences in the carapace shape of the horsehair crab, <i>Erimacrus isenbeckii</i> (Brandt, 1848).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aquatic Animals	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.34394/aquaticanimals.AA2020.0_AA2020-1">https://doi.org/10.34394/aquaticanimals.AA2020.0_AA2020-1</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 豊田賢治
2. 発表標題 ミジンコの生物学
3. 学会等名 教養セミナー，東京理科大学長万部キャンパス（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田賢治
2. 発表標題 Crustacean endocrinology: larval metamorphosis and sexual differentiation
3. 学会等名 国際農業教育研究推進センター公開セミナー，九州大学（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田賢治
2. 発表標題 甲殻類の生物学：性決定や変態のメカニズムに迫る
3. 学会等名 学びのジャンクション -異分野交流セミナー -, 津山工業高等専門学校 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田賢治, 山根史裕, 大平剛.
2. 発表標題 クルマエビの幼生変態の内分泌機構の解析
3. 学会等名 第90回日本動物学会大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田賢治, 泉賢太郎, 大平剛, 市川卓, 竹内謙.
2. 発表標題 ケガニ甲羅の雌雄形態解析
3. 学会等名 第57回日本甲殻類学会, 東京海洋大学
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田賢治
2. 発表標題 ミジンコの環境依存型性決定の分子基盤
3. 学会等名 第291回 三崎談話会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田寛治
2. 発表標題 ミジンコの光周期依存的な性決定機構の分子基盤
3. 学会等名 第58回 C-Bioセミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊田寛治, 赤司寛志, 谷津遼平, 重信秀治, 河野郷通, 井口泰泉, 宮川信一.
2. 発表標題 クサガメとアメリカアリゲーターの温度依存型性決定期における比較トランスクリプトーム
3. 学会等名 新学術領域研究 性スペクトラム -連続する表現型としての雌雄 第二回領域会議
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考