

平成 22 年 6 月 11 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19570198

研究課題名 (和文) 光刺激によるクラゲの卵成熟開始機構の解明

研究課題名 (英文) Initiation of oocyte maturation by light cues in jellyfish

研究代表者

出口 竜作 (DEGUCHI RYUSAKU)

宮城教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：90302257

研究成果の概要 (和文)：エダアシクラゲには、放卵・放精の引き金となる光刺激の種類が異なる「明タイプ」と「暗タイプ」が存在する。本研究では、「明タイプ」と「暗タイプ」において、分布域、放卵・放精に対する光依存性、放出される卵のサイズが大きく異なること、また、両タイプが遺伝的に決まっている可能性が高いことを見いだした。さらに、両タイプともに放卵・放精に至る過程で神経ペプチドが重要な役割を果たしていることも明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：In the hydrozoan jellyfish *Cladonema pacificum*, there are two different groups in which spawning is triggered by different photic stimuli: light stimulation after dark (light type) and dark stimulation after light (dark type). This study revealed that the regional distribution, the photic conditions required for spawning, and the size of spawned eggs differ between the two types. The characteristics of the next generation produced in crossbreeding experiments suggest that the two types are caused by genetic factors. The present study also provides evidence that a neuropeptide(s) acts downstream of photoreception and appears essential for spawning in either type of *C. pacificum*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生殖細胞、卵母細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) クラゲは進化過程の早期に他の3胚葉性の高等動物と分岐した原始的な動物であ

る。一般に、クラゲの放卵・放精は、明暗周期に伴う光刺激によって引き起こされる。メスでは、光刺激により卵巣内の卵母細胞が減

数分裂（卵成熟）を開始し、卵成熟を終えてから放出されてくる。一方、オスでは、光刺激により精巣内の精子が運動性を高め、その後放出されてくる。

(2) クラゲの放卵・放精を誘起する光刺激には、明刺激（暗→明）と、それとは逆の、暗刺激（明→暗）があることが古くから知られている。近縁な種でも、明刺激に反応する「明タイプ」と暗刺激に反応する「暗タイプ」がともに存在することから、明と暗の光刺激の違いは「紙一重」であり、容易に変わり得る形質であると考えられる。しかし、現在、クラゲの放卵・放精の制御に焦点をあてた研究はほとんど行われておらず、どのような違いが明と暗の両タイプを規定しているのかは不明なままであった。

(3) 私の研究室では、エダアシクラゲのライフサイクルを研究室で完全に制御することにより、性成熟した個体を一年を通して毎日用いることができる条件を構築してきた。近年、石巻（宮城県）の個体は暗タイプであるのに対し、浅虫（青森県）には明タイプの集団が存在するという興味深い事実を見いだしたことが、本研究の着想に至る直接のきっかけとなった。

## 2. 研究の目的

(1) エダアシクラゲの明タイプと暗タイプの地理的分布について明らかにする。

(2) 明タイプと暗タイプの共通点と相違点を調べた上で、これらが遺伝形質によるものかどうかを明らかにする。

(3) 光刺激の受容から卵成熟の開始に至るまでの経路で働いている細胞種を同定し、それら相互間における情報伝達機構を明らかにする。

(4) 卵成熟の過程で働いている物質を単離し、その化学的性質と局在を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 波が穏やかでアマモやホンダワラなどの海草・海藻が繁茂している港において採集調査を行った。手製のクラゲ採集用の網（クラゲキャッチャー）を海草・海藻の間に投げ

入れ、ゆっくりと引き上げることにより、エダアシクラゲを採集した。採集した個体を実験室に持ち帰り、光条件を変化させることにより、明タイプと暗タイプのどちらかであるかを判別した。また、放出された卵の直径を比較した。

(2) 明タイプと暗タイプの個体から卵と精子を放出させ、これらを受精させることによって次世代を得た。これらを性成熟するまで育てた後、明タイプと暗タイプのどちらかであるかを判別した。

(3) 明タイプと暗タイプのクローン個体を作成し、同一クローンを用いて放卵を誘起し得る光条件について詳しく検討した。

(4) エダアシクラゲと近縁なヒドラから単離されている各種の神経ペプチドにより、放卵や放精が誘起されるか調べた。また、間接蛍光抗体法を用い、神経ペプチドが実際にエダアシクラゲの生体内に存在するか調べた。さらに、卵母細胞と上皮を含む「卵巣片」を作製し、種々の生理実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 地理的分布

青森県と宮城県の沿岸において採集調査を行ったところ、計7カ所からエダアシクラゲを採集することができた。このうち、青森県の陸奥湾側の浅虫、大湊、川内の個体は、主に暗から明への光変化により放卵・放精に至る「明タイプ」であった。一方、宮城県の石巻、女川、松島の個体、ならびに青森県下北半島の太平洋側に位置する下風呂の個体は、明から暗への光変化に反応して卵や精子を放出する「暗タイプ」であった。また、岩手県の大槌のエダアシクラゲも「暗タイプ」であるという私信を得ている。

以上の結果を総合すると、両タイプの分布は緯度よりも、むしろ海流の影響を受けている可能性がある。すなわち、対馬海流（暖流）の影響を受ける陸奥湾には「明タイプ」が、千島海流（寒流）の影響を受ける東北地方太平洋岸には「暗タイプ」が生息している可能性があると考えている。

### (2) 卵サイズ

宮城県の石巻、青森県の浅虫、大湊、下風

呂で採集されたメス個体に明刺激または暗刺激をかけ、放出されてきた成熟卵の直径を測定した。暗タイプである石巻および下風呂では、卵の直径（平均±標準偏差）はそれぞれ  $80.4 \pm 4.0 \mu\text{m}$  および  $79.7 \pm 4.3 \mu\text{m}$  であったのに対し、明タイプである浅虫および大湊では、それぞれ  $90.4 \pm 4.9 \mu\text{m}$  および  $92.7 \pm 4.3 \mu\text{m}$  であった。さらに多くの地点での調査が必要であるが、明タイプのほうが暗タイプよりもやや大型の卵を放出する傾向があるのかもしれない。

### (3) 子孫の形質

宮城県の石巻および松島、青森県の浅虫の個体どうしを交配し、過去に報告されている方法にしたがって次世代（1代目）のクラゲを作出して、これらがどちらの光刺激で放卵・放精を行うか調べた（図1）。

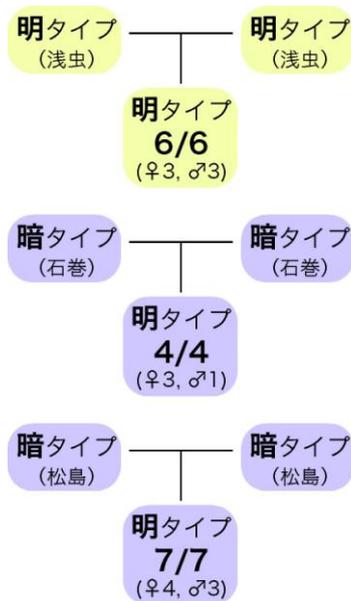


図1 明タイプと暗タイプの子孫の形質

浅虫の個体（明タイプ）どうしの交配によって得られた系統のうち、成熟したクラゲにまで成長したのは6系統であった。これらのクラゲを12時間明・12時間暗の光周期で飼育したところ、いずれも明刺激により放卵・放精を行う明タイプであった。一方、石巻の個体どうし、および松島の個体どうしの交配によっては、それぞれ4系統および7系統の成熟クラゲが得られたが、これらはいずれも暗刺激で放卵・放精を行う暗タイプであった。いずれの場合も、同じ系統から得られたクラゲは雌か雄のどちらかであり、雌雄が混在するこ

とはなかった。以上の結果は、明タイプや暗タイプという形質は遺伝的に決まることを強く示唆している。

また、明タイプと暗タイプの交配も可能であり、90%以上の確率で受精が起こること、受精卵は正常にポリプまで発生することなどは明らかとなったが、次世代のクラゲがどちらのタイプになるかという点は、現在のところはっきりしていない。このような交配実験を進め、明タイプと暗タイプのどちらが優性形質であるか等を明らかにしていく必要がある。

### (4) 放卵の光条件

浅虫の明タイプどうしの交配によって得られた系統のうち、成熟した雌クラゲを安定して得ることのできた浅虫C系統を用い、明タイプの放卵に必要な光条件について詳しく調べた。

この系統のクラゲは、通常の光周期（12時間明・12時間暗）で飼育すると、明に切り替わってからおよそ25分後に放卵を開始した。12時間暗の後の明時間を10秒間にまで短くしても、全てのクラゲは通常の放卵を行った。また、明刺激前の暗時間を9時間にしても通常の放卵が起こったが、3時間以下に縮めた場合には、放卵が抑制された。また、明刺激前に、1時間暗・1時間明を交互に与え、積算した暗時間が9時間になるようにしても、放卵した個体は全くなかった。一方、明刺激の前の暗時間を23時間と極端に長くした場合には、全ての個体が通常の放卵を行った。以上の結果は、明刺激自体はごく短時間で十分なのに対し、明刺激の前には3~9時間の連続した暗が必要であることを示唆している。

次に、石巻の暗タイプどうしの交配によって得られた系統のうち、成熟した雌クラゲを安定して得ることのできた石巻6W系統を用い、暗タイプの放卵に必要な光条件について詳しく調べた。

この系統のクラゲは、通常の光周期（12時間暗・12時間明）で飼育すると、暗に切り替わってからおよそ35分後に放卵を開始した。12時間明の後の暗時間を5分間に減らしても、全ての個体が通常の放卵を行ったが、暗時間をより短くして3分間にした場合には、半分の個体は放卵しなかった。また、暗時間をさらに短くして1分間にすると、放卵は全く起こらなかった。暗刺激前の明時間については、23

時間と極端に長くした場合でも、正常な放卵が起こった。これとは逆に、暗刺激の前の明時間を短くした時の影響を調べるために、前回の放卵以前から暗を23時間継続し、その後1時間の明を与えたところ、暗タイプにもかかわらず、この明が刺激となって全ての個体が放卵した。同様に、前回暗刺激によって放卵させた後、一旦1時間の明を与えてから22時間の暗を与えた場合や、11時間の明を与えてから12時間の暗を与えた場合にも、全ての個体が次の明刺激に反応して放卵した。これらの明刺激によって放卵した個体を明で維持し、翌日に暗を与えてみたところ、今度はこの暗に反応して放卵が起こった。

以上の結果は、暗タイプでは、暗刺激の持続時間は3~5分間必要であること、明暗時間を逆転させると明刺激によっても放卵が可能になることを示唆している。

#### (5) 神経ペプチドによる放卵・放精の誘起

クラゲと同じ刺胞動物であるヒドラから単離された生理ペプチドのうち、神経ペプチドの1種であるHym-355 (FPQSFLPRG-NH<sub>2</sub>) を10<sup>-4</sup>Mまたは10<sup>-5</sup>Mとなるように投与したところ、明タイプと暗タイプの両方のクラゲにおいて、光環境の変化なしに放卵を誘起することができた。また、クラゲの卵巣を細かく切断し、上皮と卵母細胞だけを含ま断片(卵巣片)にHym-355を投与した場合にも、やはり放卵が誘起されたが、卵巣内から単離した一次卵母細胞に直接投与しても卵成熟は誘起されなかった。以上の結果は、Hym-355は卵母細胞の周囲の細胞に作用することにより間接的に一次卵母細胞の卵成熟を誘起し、最終的に放卵に至らせると考えられる。

Hym-355と同様の放卵誘起効果は、N末端側が短いHym-355 Δ (SFLPRG-NH<sub>2</sub>)、脊椎動物のホルモンであるバソプレシン (CYFQNCPRG-NH<sub>2</sub>)、バソトシン (CYIQNCPRG-NH<sub>2</sub>) にも見られたが、C末端がアミド化されていないHym-355-OH (FPQSFLPRG) には見られなかった。次に、ペプチドのC末端のアミド化を触媒する酵素は、銅イオン依存的事であることから、銅イオンのキレーターを投与したところ、暗刺激による放卵は抑制されたが、Hym-355投与による放卵は抑制されなかった。さらに、Hym-355投与が放卵のみならず、オスにおける放精も引き起こすことも明らかとなった。以上の結果は、C末端側にPRG-NH<sub>2</sub>の配列を持つペプチドが、明

タイプ・暗タイプの雌雄に共通して配偶子放出に関わっている可能性を示唆している。

#### (6) 神経ペプチドの生体内分布

Hym-355抗体(福岡女子大学の小泉修教授から譲り受けたもの)を用いた間接蛍光抗体法により、抗原となる分子がエダアシクラゲのどの部位に存在するか調べた。Hym-355抗体が最も強く認識する部位は、眼点の周囲に存在し、その形状から、神経細胞の1種であると考えられる(図2A)。一方、卵巣や精巣の上皮には、陽性の部位が顆粒状に散在していることが分かった(図2B)。卵巣や精巣は、単独で光刺激やHym-355投与に応答して放卵・放精を起こすことから、後者の顆粒状に存在するHym-355またはその類似物質が重要な役割を担っていることが予想される。

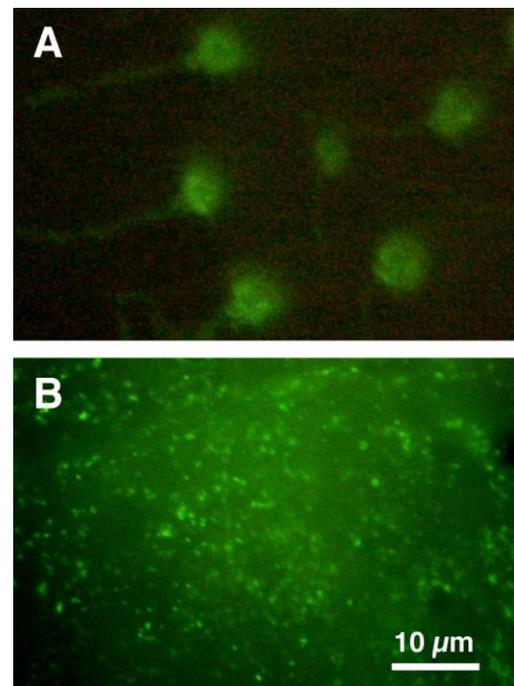


図2 Hym-355抗体による蛍光染色。(A) 眼点周辺、(B) 卵巣上皮。

#### (7) 本研究の位置付けと今後の展望

本研究により、エダアシクラゲの明タイプと暗タイプの地理的分布、形質、遺伝などに関する基礎的知見を得ることができた。明タイプと暗タイプが生息域を異にし、配偶子放出の時間帯を変えていることは、種分化という観点からも興味深い。また、神経ペプチドが光刺激の下流で作用し、卵成熟・放卵のみならず放精にも有効であるという状況は、ヒトデなどより高等な動物と類似しており、卵

成熟および放卵・放精の制御機構の「進化」を考える上で重要であると考えられる。現在、これらの成果を論文としてまとめている段階であるが、ユニークかつ生物学的意義の高いものとして、世界的に認められると自負している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

(1) Kurita, Y., Deguchi, R., Wada, H. (2009). Early development and cleavage pattern of the Japanese purple mussel *Septifer virgatus*. *Zool. Sci.*, accepted. 査読あり

(2) Nakano, T., Kyojuka, K., Deguchi, R. (2008). Novel two-step  $Ca^{2+}$  increase and its mechanisms and functions at fertilization in oocytes of the annelidan worm *Pseudopotamilla ocellata*. *Dev. Growth. Differ.* 50, 365-379. 査読あり

(3) 出口竜作, 青木瞳, 松田聖, 佐藤英樹 (2008). エダアシクラゲの放卵・放精の光条件. *宮城教育大学紀要* 43, 89-95. 査読なし

(4) Deguchi, R. (2007). Fertilization causes a single  $Ca^{2+}$  increase that fully depends on  $Ca^{2+}$  influx in oocytes of limpets (Phylum Mollusca, Class Gastropoda). *Dev. Biol.* 304, 652-663. 査読あり

[学会発表] (計12件)

(1) 出口竜作. タマクラゲの放卵と卵内 MPF および MAPK 活性. 日本動物学会第 80 回大会. 2009 年 9 月 17 日. 静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ.

(2) Deguchi, R. Roles of intracellular  $Ca^{2+}$  increase and MAP kinase dephosphorylation at fertilization in jellyfish eggs. 国際ワークショップ「Oocyte Maturation and the Cell Cycle」における招待講演. 2008 年 3 月 7 日. 京都ガーデンパレス.

(3) 出口竜作. 動物の卵成熟および発生の開始機構の比較解析. 日本動物学会第 78 回大会 (奨励賞受賞). 2007 年 9 月 20 日. 弘前大学文京町キャンパス.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

出口 竜作 (DEGUCHI RYUSAKU)  
宮城教育大学・教育学部・准教授  
研究者番号：90302257