

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05851

研究課題名(和文)ケミカルジェネティクスによるミズクラゲの変態制御シグナル分子群の解明

研究課題名(英文) Identification of signaling molecules that control the metamorphosis in the moon jellyfish by chemical genetics

研究代表者

国吉 久人 (Kuniyoshi, Hisato)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・准教授

研究者番号：60335643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミズクラゲのライフサイクルでは、固着性のポリプからストロビラを経て浮遊性のクラゲへと変態する。本研究は、ミズクラゲの変態を制御する内因性分子を同定することを目的とした。まず、変態調節物質を得るために、放線菌ライブラリーをスクリーニングした。その結果、変態阻害物質として、bipyrrole化合物を同定した。一方、ポリプ・ストロビラに発現する遺伝子群の網羅的同定を行い、バイオインフォマティクス解析により変態制御遺伝子を探索した。その結果、3種類の細胞増殖因子の相同遺伝子を見出した。これら3種の細胞増殖因子のシグナル伝達経路阻害剤の投与により、変態が阻害または攪乱された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はミズクラゲの変態を制御する分子を同定することを目的とし、以下の2つの研究成果を得た。(1)変態阻害物質として、放線菌由来のbipyrrole化合物を同定した。(2)内因性変態制御分子として、3種の細胞増殖因子を見出した。

近年、ミズクラゲの大量発生が社会問題になっている。ミズクラゲのライフサイクルから、クラゲの大量発生はポリプからクラゲへの変態に依存することが理解できる。本研究で明らかにした変態制御分子のさらなる解析により、クラゲの大量発生を分子レベルで理解すること、そして新たなクラゲ抑制法開発の足掛かりを得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The life cycle of moon jellyfish shows a metamorphosis from benthic polyps to planktonic jellyfish via strobilae. The aim of this study was to identify endogenous molecules that control the metamorphosis in the moon jellyfish. First, a library of actinomycetes was screened to obtain regulators of metamorphosis. As a result, a bipyrrole compound was identified as a metamorphosis-inhibiting substance. On the other hand, a comprehensive identification of genes expressed in polyps and strobilae was conducted, and bioinformatics analysis was used to search for genes that control metamorphosis. As a result, we found homologous genes for three cell growth factors. The metamorphosis was inhibited or disturbed by the administration of inhibitors of the signaling pathways of these three cell growth factors.

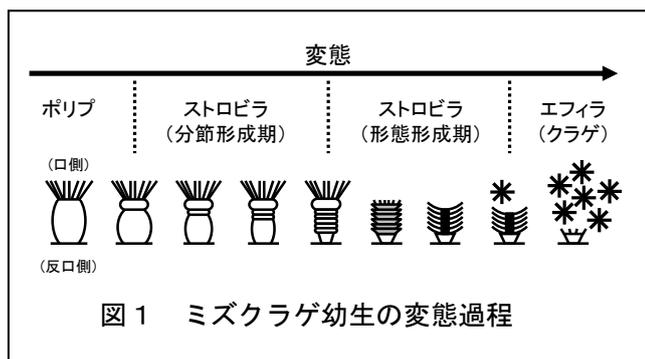
研究分野：生物有機化学

キーワード：生理活性物質 RNAseq解析 ミズクラゲ

1. 研究開始当初の背景

ミズクラゲのライフサイクルは、固着性の無性世代(ポリプ)と浮遊性の有性世代(クラゲ)を繰り返す。ポリプは出芽や分裂によって無性的に増殖し、冬期に海水温が低下すると、有性世代の前段階であるストロビラに変態する(図1)。ストロビラは胴体部に複数の分節を持ち、それぞれの分節がクラゲの形態へと変化した後、一枚ずつ遊離する。遊離したばかりの若いクラゲはエフィラと呼ばれ、成長して成体のクラゲとなる。近年、ミズクラゲの大量発生が社会問題になっている。上記のライフサイクルから、クラゲの大量発生はポリプからクラゲへの変態に依存することが理解できる。しかし、クラゲの変態に関する分子レベルの知見は、現時点で極めて乏しい。そこで申請者は、クラゲの大量発生を基礎研究の立場から理解し、新たなクラゲ抑制法開発の足掛かりを得るため、クラゲの変態現象の分子メカニズムを解明する研究を開始した。

ポリプからクラゲへの変態(図1)は、前半の分節形成期と後半の形態形成期に分けられる。分節形成期では、ポリプの口側から反口側に向けて分節が一つずつ順番に増えていく。形態形成期では、それぞれの分節がクラゲ形態に変化する。最終的に1匹のポリプから分節数と同じ数のクラゲが生じる(図1では分節数は6)。本研究では、分節数があるままクラゲの数に反映されることを鑑み、分節形成に焦点を絞ることとする。



申請者はこれまでに、薬剤投与、切断・移植実験、組織化学的観察により、分節形成に先立ち口側末端領域から分節形成の開始シグナルが発信されること、既にできた分節から次の新規分節の誘導シグナルが発信されること、などを明らかにした。これらの結果から、分節形成に際して、細胞の分裂・形態変化・分化を制御する各種の細胞間シグナル分子群の連携が予想される。

以上の背景に立脚して、本研究は、ミズクラゲ変態の分節形成を制御する細胞間シグナル分子群の化学的実体を解明することを目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ケミカルジェネティクスの手法を用いて、ミズクラゲにおけるポリプからクラゲへの変態過程を制御する内在性の細胞間シグナル分子群を明らかにすることである。具体的には、以下の3つの方針で実験を進める。

- (1) 放線菌の菌株ライブラリーを探索源として、変態調節活性を示す物質をスクリーニングし、精製・単離・構造決定する。
- (2) 変態調節物質の投与群とコントロール群について次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行い、投与によって発現変動する遺伝子群を同定する。
- (3) (2)で得られた変態関連遺伝子群について、発現解析と機能解析を行い、変態制御に関わる細胞間シグナル分子群を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 変態調節物質のスクリーニングと同定
 活性物質の探索源として、広島大学・微生物遺伝資源保存室(HUT)の放線菌ライブラリーを用いる。各菌株の培養液を下記のバイオアッセイに供する。

【バイオアッセイ】低温処理で誘導した分節形成期ストロビラ(分節数1個)を24穴ウェルに移し、サンプルを投与して22℃で培養し、実体顕微鏡下で変態の進行を毎日観察する。ここでは、分節形成のみが停止しクラゲへの形態形成は正常に進む分節形成阻害物質と、分節形成は進むがクラゲへの形態形成が停止する形態形成阻害物質の取得を目指す。

上記の活性が検出された菌株について大量培養し、培養液を出発材料として、溶媒抽出とクロマトグラフィーを組み合わせて精製を進める。活性物質の単離が確認できれば、NMRや質量分析などの機器分析により化学構造を決定する。

(2) RNA-seq 解析による変態関連遺伝子群の探索

変態調節物質で処理したストロビラから mRNA を抽出する。逆転写により cDNA に変換後、次世

代シーケンサーに供し(受託解析サービスを利用)、得られた塩基配列データについてバイオインフォマティクス解析を行う。投与群とコントロール群との間で Expression Difference Analysis を行い、発現量が変動する遺伝子群を抽出して、それらを変態関連遺伝子と考える。

本研究では、細胞間シグナル分子の候補として、分泌タンパク質を想定している。変態関連遺伝子の中から分泌タンパク質をコードする遺伝子を選抜するため、SOSUI プログラムによるシグナルペプチド/膜貫通ドメイン解析を行う。その中から、既知の細胞増殖因子の相同遺伝子を抽出する。

(3) 変態関連遺伝子群の発現解析と機能解析

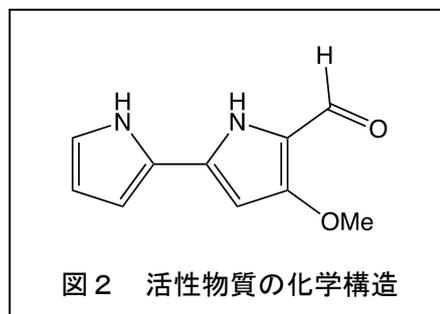
①発現解析：(2)で得た候補遺伝子がコードするタンパク質について抗体を作成し、免疫組織化学的染色により、発現細胞・局在性を明らかにする。

②機能解析：(2)で抽出した候補遺伝子(既知の細胞増殖因子の相同遺伝子)から予想されるシグナル伝達経路の阻害剤または活性化剤を変態中のストロビラに投与し、その効果を調べる。

4. 研究成果

(1) 変態調節物質のスクリーニングと同定

広島大学・微生物遺伝資源保存室(HUT)の放線菌ライブラリー約 100 株中、培養液中に変態阻害活性を示す菌株を複数見出した。そのうち、最も強い活性を示した 6047 株について大量培養を行い、活性物質の精製を試みた。培養液 4L を出発材料とし、酢酸エチル抽出、Sephadex LH-20 ゲルろ過クロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを経て、活性物質を単離した。NMR、質量分析による構造解析を行った結果、活性物質は 4-methoxy-2,2'-bipyrrrole-5-carbaldehyde(MBC)(図 2)と推定された。推定構造に基づいて合成品を大量調製して生物活性を調べた結果、精製した天然物と全く同じ活性が認められた。以上のことから、6047 株が生産する変態阻害物質は MBC であると確定した。



(2) RNA-seq 解析による変態関連遺伝子群の探索

過去の研究で分節形成阻害活性が見出された tryptamine(TAM)を用いて、RNA-seq 解析を実施した。TAM 投与群ストロビラの口側半分と反口側半分および非投与群ストロビラの口側半分と反口側半分のそれぞれから RNA を調製し、外部受託サービスを利用して次世代シーケンサーによる塩基配列分析を行った。上記 4 サンプルの解析結果に、過去に実施したポリプとストロビラの whole body の解析結果もあわせてバイオインフォマティクス解析を行い、ストロビラの口側(分節を含む)で特異的に発現する遺伝子群を抽出した。さらに SOSUI と SignalP によるシグナルペプチド解析を行い、分泌タンパク質をコードするものを選抜した。その中から、3 種類の細胞増殖因子の相同遺伝子を見出し、変態制御に関わる細胞間シグナル分子の候補と考えた。

(3) 変態関連遺伝子群の発現解析と機能解析

①発現解析：(2)で抽出された 3 種類の細胞増殖因子のうち 1 つについては抗体を作成し、免疫組織化学的染色を試みた。しかし、現在までのところ、特異的な染色シグナルは得られていない。これについては、さらに条件検討を進める予定である。また、残りの 2 つについても抗体作製を計画している。

②機能解析：(2)で抽出された 3 種類の細胞増殖因子のそれぞれについて、予想されるシグナル伝達経路の阻害剤を変態中のストロビラに投与した。その結果、3 種の候補分子のうち、2 つについては分節形成が阻害された。また、残りの 1 つは、分節形成に影響はないものの、形態形成が部分的に攪乱された。

本研究はミズクラゲの変態を制御する内在性の細胞間シグナル分子を同定することを目的とし、以下の 2 つの研究成果を得た。

- ・外因性の変態阻害物質として、放線菌由来の bipyrrrole 化合物 MBC(図 2)を同定した。
- ・内因性の変態制御分子の候補遺伝子として、3 種の細胞増殖因子を見出した。

本研究で見出した変態制御分子候補の発現解析・機能解析は、現在も進行中である。また、本研究でのバイオインフォマティクス解析により抽出された変態関連遺伝子群の中には、既知タンパク質とは相同性を持たない分泌タンパク質も多数含まれている。これら新規分泌タンパク質の解析も計画しており、そのうちの 2 種については抗体を作成し、免疫組織化学的染色による予備的な結果も得ている。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Misaki Yuya, Hirashima Tomomi, Fujii Karin, Hirata Asahi, Hoshino Yutaro, Sumiyoshi Miho, Masaki Sachiko, Suzuki Toshihiro, Inada Kuninobu, Koyama Hiroki, Kuniyoshi Hisato, Arakawa Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 4-Methoxy-2,2 -bipyrrole-5-carbaldehyde, a biosynthetic intermediate of bipyrrole-containing natural products from the Streptomyces culture, arrests the strobilation of moon jellyfish Aurelia coerulea	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Marine Science	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmars.2023.1198136	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 -

1. 著者名 Fujii Karin, Koyama Hiroki, Kuniyoshi Hisato	4. 巻 90
2. 論文標題 Role of cell proliferation in strobilation of moon jellyfish Aurelia coerulea	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 179~190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-023-01744-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 見崎 裕也、平嶋 友美、藤井 夏鈴、住吉 美保、稲田 晋宣、鈴木 敏弘、星野 有太郎、小山 寛喜、国吉 久人、荒川 賢治
2. 発表標題 ミズクラゲの変態制御物質のスクリーニングと単離・構造決定
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井 夏鈴、辻田 菜摘、国吉 久人
2. 発表標題 ミズクラゲAurelia coeruleaに対するストロビレーション阻害物質の活性の特徴付け
3. 学会等名 日本動物学会 第94回大会
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	荒川 賢治 (Arakawa Kenji) (80346527)	広島大学・統合生命科学研究科(先)・准教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------