

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07539

研究課題名(和文)「タイマー遺伝子」発現量を指標とした鉢クラゲ発生条件の解明

研究課題名(英文) Estimating effects of temperature on strobilation in Scyphozoa using "timer" gene expression

研究代表者

豊川 雅哉 (Toyokawa, Masaya)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・西海区水産研究所・主任研究員

研究者番号：60371837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：低温で一定期間過ごすことでストロビレーション(ポリプからクラゲになる変態過程)のスイッチが入るというタイマー仮説を、エチゼンクラゲで実験を行い検討した。エチゼンクラゲでは最短2週間でストロビレーションのスイッチが入ったが、スイッチが入るのに要する期間は一定でなかった。スイッチが入った後は水温が高いほど速く変態が進むとの予想も合わなかった。沖縄科学技術大学院大学と共同でストロビレーション中に発現する遺伝子の解析を行い、ミスクラゲにおけるタイマー遺伝子と似た遺伝子が見つかった。

研究成果の概要(英文)：I tried to investigate in detail with a "timer" hypothesis that strobilation (polyp to jellyfish metamorphosis) is induced by a hormone and a temperature-sensitive "timer" protein acts as a precursor to the hormone using polyps of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai*. In *N. nomurai*, strobilation was induced in two weeks at the shortest, but the length of the period required for the induction was not constant. After induction, the prediction that strobilation will progress faster as the water temperature is higher did not match. In collaboration with the Okinawa Institute of Science and Technology, we analyzed genes of *N. nomurai* that are expressed during strobilation, and genes similar to those in *Aurelia aurita* were found.

研究分野：プランクトン学, 水産海洋学

キーワード：クラゲ発生モデル ストロビレーション 温度依存性

## 1. 研究開始当初の背景

鉢クラゲ類は、時に大発生して漁網に混入し、漁獲作業の効率低下、漁獲物の鮮度低下や減少、ひどい場合には破網や転覆などの漁業被害をもたらす。臨海工業施設においては冷却水の取水口を詰まらせ、発電所の出力低下など経済活動への影響をもたらす。また、一部の強毒性クラゲ類は、海水浴客に刺傷被害をもたらす、甚だしい場合には死に至らしめることもある。このため、社会的には有害クラゲ類の防除や発生予測が求められ、発生状況のモニタリング、発生場所の調査、実験室および野外での生活史解明、防護ネットやクラゲ対策漁具などの開発など、様々な研究が行われてきた。

鉢クラゲ類では一般に、付着生活をするポリプが横分体を形成して変態することにより、浮遊生活をするクラゲが発生する(以下、このプロセスを「変態」または「クラゲ発生」と記す)。ミズクラゲのポリプの場合、飼育水温を低下させることで変態を誘導することが可能である(Kakinuma, 1975)。一方、変態の進行は、水温が高いほど速く進むはずである。したがって、変態と水温の関係を解明するためには、この2つの過程を区別する必要がある。しかしこれまで、変態が進行して形態の明確な変化が現れるまで変態の開始を知ることはできなかった。

近年、ミズクラゲのポリプに非ステロイド性抗炎症薬として知られる「インドメタシン」を添加することで、変態を誘導可能であることが発見された。その後、様々なインドール系化合物の微量添加により、速やかに変態が開始すること(ホルモン様機能)が確認された。これにより、変態の開始を化学的に制御可能であることが示された。さらに、低温条件下で発現量が特異的に増加する遺伝子が発見され、この遺伝子がコードするタンパク質がインドール環を持つこと、また変態を開始させるホルモンとして働くことが報じられた(Fuchs et al. 2014)。低温下において、この遺伝子の発現量が増加してタンパク質が蓄積し、一定の閾値を越えると変態が開始する。この遺伝子を「タイマー遺伝子」と呼ぶこととする。

## 2. 研究の目的

本研究では、エチゼンクラゲのクラゲ発生過程を、変態促進ホルモン様タンパク質をコードする「タイマー遺伝子」の発現という仮説に基づいて理解し、新たな知見を得ることを目的とした。あらかじめ想定したクラゲ発生過程は次のようなものである。

1. ある閾値水温をある期間下回ると「タイマー遺伝子」が発現する。2. 発現量が閾値を越えると変態が不可逆的に進行する。3. 変態の過程は水温に依存した成長式による。一度開始した変態は水温が上がっても止まることなく、水温が高いほど速く進む。こ

れらの過程のパラメーターを明らかにし、実環境中におけるエチゼンクラゲの発生予測を行う上で根拠となる科学的データを提供することを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) 鉢クラゲ類9種(*Linuche*属の1種、アカクラゲ、ユウレイクラゲ、アマクサクラゲ、キタミズクラゲ、ミズクラゲ、タコクラゲ、ピゼンクラゲ、ユウレイクラゲ)のポリプをホルモン様物質(5-メトキシ-2-メチルインドール) 50 µg/Lに24時間暴露した後、濾過海水で飼育し、変態が開始されるかどうか調べた。

2) エチゼンクラゲのポリプをホルモン様物質(5-メトキシ-2-メチルインドール)に暴露し、22°Cで変態を進行させた。投与から36時間後、72時間後、および変態を誘導していないポリプと変態を完了したエフィラ、各々5から6個体からRNAを抽出した。別の実験により22°Cでは、ホルモン様物質への暴露が24時間以内で変態が開始し、72時間以内に形態上の変化が起きることが確認されている。暴露36時間のポリプは変態開始後すぐのポリプ、暴露72時間は変態がかなり進行した段階のポリプを代表する。

抽出したRNAは研究協力者が次世代シーケンサーにより配列組成を網羅的に読み取り、読み取り結果を解析ソフトによりマッピングして、配列ごとに計数した。この結果、変態が進行している間に発現量が多い配列で、既にミズクラゲ*A. aurita*において特定されている遺伝子配列に相当するもの、および発現量を標準化するためにポリペプチドの伸長因子(EF1)の配列を特定した。

3) 22°Cで馴致したエチゼンクラゲのポリプを10°Cの低温条件に置き、4, 11, 16, 30, 44日後にRNAを抽出した。各9から12個体をチオシアン酸グアニジン溶液を含む抽出バッファー600µL中で破碎し、RNAを抽出した。抽出したRNAを含むバッファーから、オリゴdTセルロースビーズを用いてmRNAを精製した。精製されたmRNAを鋳型にしてInvitrogen社のSuperScript III (SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR)を用いて逆転写反応を行い、cDNAを作成した。

得られたcDNAについて、方法1で特定された配列を標的として作成したプライマーを用いたPCR実験を行った。

4) 22°Cで馴致したエチゼンクラゲのポリプをホルモン様物質(5-メトキシ-2-メチルインドール) 50 µg/Lに1日暴露した後、22°C, 18°C, 14°C, 10°C, 6°Cで濾過海水

中で飼育し毎日観察した。変態を視認した日と、エフィラが遊離した日を記録した。

5) 22°Cで馴致したエチゼンクラゲのポリプを10°C, 14°Cで2日, 16日, 30日, 44日, 58日飼育した後22°Cに戻して最長28日間飼育した。変態を視認した日と、エフィラが遊離した日を記録した。

#### 4. 研究成果

1) 試験した鉢クラゲ類9種のうち7種で変態が誘導されたが、冠クラゲ目の *Linuche* 属の1種を含む2種で効果がなかった。鉢クラゲ類のうち、旗口クラゲ目と根口クラゲ目では、クラゲ発生において同様のホルモンが関与すると推定されたが、冠クラゲ目のクラゲ発生でも同様のホルモンが関わるかどうかは確かめられなかった。

2) エチゼンクラゲの変態途上のポリプのトランスクリプトーム解析により、ミズクラゲにおける CL390 に似たタンパク質をコードすると考えられる cDNA 配列 (RX2) が存在することが確認された。この配列のリード数は変態を誘導しないポリプと変態完了後のクラゲでは低く、変態途上のポリプにおいて高かった。

3) エチゼンクラゲから抽出精製した mRNA の逆転写生成物 cDNA に対して、EF1 と RX2 が伸長するプライマー対を作成したが、PCR 実験条件の調整がうまくいかず、飼育条件間での遺伝子発現量の比較にはいたらなかった。

4) 変態誘導後、22°Cで飼育したポリプは2日で変態を視認し、5から6日目には全てのポリプからエフィラが遊離した。6°Cでは変態を視認するまでに21から31日かかり、エフィラが遊離するまでに44から64日かかった。その間の水温では、その中間的な日数となった(図1)。

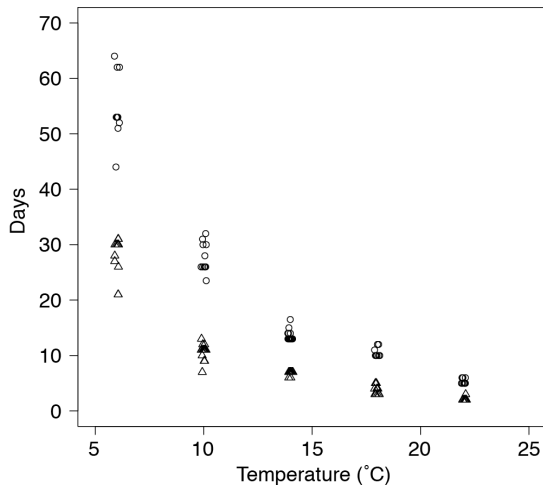


図1 変態誘導後、最初に変態を視認するまでに要した日数(○)および最初にエフィラを遊離するまでに要した日数(□)

5) 10°Cで2日間および16日間低温処理したポリプでは変態は観察されず、30日間以上低温処理したポリプでは変態が確認された。14°Cで2日間低温処理したポリプでは変態は観察されず、16日間以上低温処理したポリプでは変態が確認された。これまで低温で変態が誘導されるのに1ヶ月以上必要と考えられていた。10°Cで30日以上処理で変態が誘導されたのは従来の知見通りだが、14°Cという比較的高めの水温では、変態の誘導に必要な処理期間が約2週間と大幅に短縮された。低温下で「タイマー遺伝子」が発現しても、ホルモン様タンパク質の合成は低温下で遅くなり、変態を誘導する閾値を超えるのに要する期間が長くなると考えられた。すなわち、冬季に「タイマー遺伝子」が発現可能な水温を下まわり、なおかつなるべく高い水温である、すなわち冬季に高水温であると、クラゲの発生時期が早くなる、という可能性が示唆された。これまでエチゼンクラゲが大発生した年では、いずれも冬季の水温が高かったことから、クラゲの発生時期が早かったと推測される。発生時期が早いことが生残に有利に働き、より多くの成体が成長して大発生につながったと考えられるが、なぜ発生時期が早いと生残に有利になるのかは未解明のままである。

#### <引用文献>

- 1 Kakinuma Y., An experimental study of the life cycle and organ differentiation of *Aurelia aurita* Lamarck, Bull. Mar. Biol. Stat. Asamushi, 15 巻、1975、101-113、pls.1-6
- 2 Fuchs, B., Wang, W., Graspentner, S., Regulation of polyp-to-jellyfish transition in *Aurelia aurita*, Curr. Biol., 24 巻、2014、1-11

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

戸篠 祥 他著、豊川雅哉・西川淳・三宅裕志編、生物研究社、クラゲ類の生態学的研究、2017、191

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

豊川 雅哉 (TOYOKAWA, Masaya)  
国立研究開発法人 水産研究・教育機構・  
西海区水産研究所・主任研究員  
研究者番号：10550428

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

Konstantin Khalturin (Khalturin, K.)  
沖縄科学技術大学院大学