

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07377

研究課題名（和文）淡水棲マミズクラゲの性決定の謎を追う

研究課題名（英文）Mystery of the sex determination in the freshwater jellyfish, *Craspedacusta sowerbii*

研究代表者

小林 千余子 (Kobayashi, Chiyoko)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20342785

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）：刺胞動物門ヒドロ虫綱に属するマミズクラゲは、淡水棲かつメデューサを放出する生物である。しかし、一つの池で一性別だけしか確認されないことが多く、その性決定に関して謎多き生物である。そこで本研究では、マミズクラゲの全生活環を実験室で再現することで、マミズクラゲの性が、遺伝的に決まるのか、環境要因によって決まるのかを明らかにすることを目的とした。実験室におけるメデューサ成熟過程の観察の結果、雌雄が異なる池由来のポリプから形成された幼若メデューサは、それぞれが異なる性に成熟した。よって、ポリプの段階ですでに性がある、つまりマミズクラゲの性は遺伝的に決定されている可能性が大きいと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マミズクラゲの全生活環を実験室で再現した研究室は当研究室が世界でも初めてであると自負している。つまりマミズクラゲ発見当初から不思議とされていた3つの謎（芽体形成、性決定、生物伝播）の解明に迫れる条件が整った。またマミズクラゲは発生学、生態学を含めて様々な角度から研究できる材料であることから、マミズクラゲをモデルとした刺胞動物の発生進化生態学を含む複合的理解が可能となる。

研究成果の概要（英文）：The freshwater jellyfish, *Craspedacusta sowerbii*, belong to the class Hydrozoa, the order Limnomedusae, and one of the few members of the phylum Cnidaria to colonize freshwater successfully. The medusae of *C. sowerbii* often appear to be monosexual. Therefore, in this study, we aimed to clarify whether the sex of the *C. sowerbii* is determined genetically or by environmental factors, by reproducing the entire life cycle of the *C. sowerbii* in the laboratory. As a result of observing the medusa maturation process in the laboratory, young medusa formed from polyps from different ponds of different sexes matured to different sexes. Therefore, it is considered that there is a high possibility that the sex is already present at the polyp stage, that is, the sex of the *C. sowerbii* is genetically determined.

研究分野：発生生物学

キーワード：性決定 生活環 発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マミズクラゲ(図1)は1880年ロンドンで発見報告され(文献1)、約100年後の1982年にイギリスのLytleが生活環を報告している(文献2)。その生活環は、ポリプからクラゲを経て新たな受精卵を作る有性生殖世代、フラストレと呼ばれるプラヌラ様芽体を経て、それが再びポリプになることで個体数を増やす無性生殖世代とに分けられる(図2)。ポリプを得ることが難しいことと、クラゲの発生が「神出鬼没」なため、諸外国においても解析が遅れている。日本では、1990年代に大阪教育大学の故加藤憲一博士が、マミズクラゲに関する研究成果を動物学会で発表している。しかしながら、研究が途絶え、論文発表されないままとなっていた。我々は2011年に偶然にもメスクラゲが発生する兵庫県須磨大池で、マミズクラゲポリプの採集に成功した。1個体だったが、その後順調に個体数を増やすことに成功し、様々な対比実験が出来るまでとなっていた。

図1 マミズクラゲ群体ポリプと成熟クラゲ

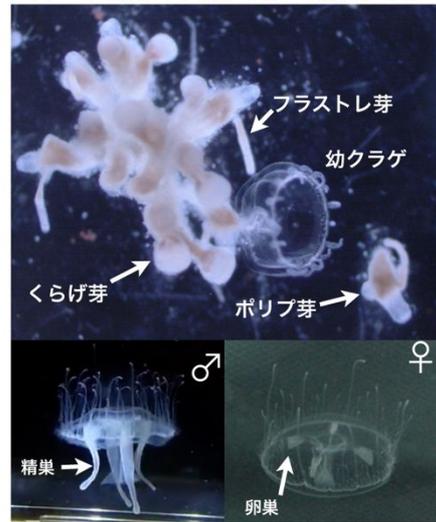
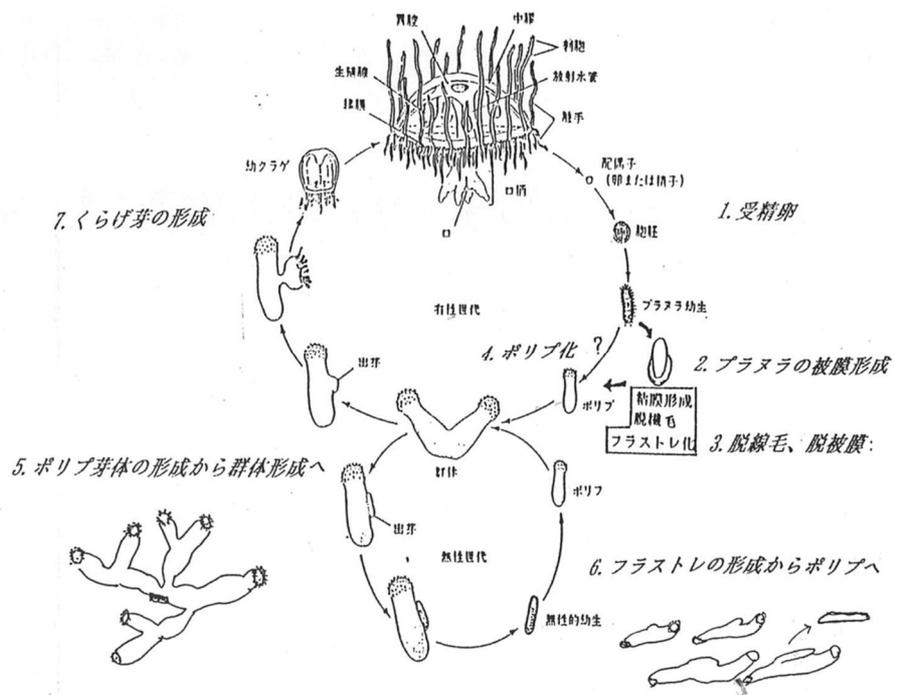


図2 マミズクラゲの生活環

2. 研究の目的

マミズクラゲには、芽体形成決定機構と性決定機構の謎があると考えている。特に性決定機構について、成熟したまみずクラゲは、一つの池に1性別しか現れないことが知られていた。実際、採集した兵庫県須磨大池ではメスクラゲ、大阪大学待兼池ではオスクラゲしか観察されて...



されていない。性が決まっているのは、たまたま1個体のポリプまたはフラストレが水鳥などによって運ばれ増殖した、つまり、1つの池は全てクローンである可能性と、環境要因による可能性が考えられる。そこで、クラゲ芽形成条件を確立し、実験室内での飼育条件を同一にし、性成熟誘導を引き起こすことで、マミズクラゲの生活環を実験室で再現し、マミズクラゲの性決定が、環境要因か、遺伝的要因かの決着をつけることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 幼クラゲから性成熟クラゲへの飼育条件の確立

マミズクラゲポリプの個体数を増やしていく過程で、最低気温が26度を超えるとクラゲ芽形成を始めることが分かっていた。しかし、幼若メデューサはブラインシュリンプという餌だけでは、2ヶ月以上維持していても、生殖腺の発達が見られなかった。2014年の動物学会発表後、

滋賀県の琵琶湖博物館では天然のプランクトンを餌にすることで卵巣の発達した個体が得られたこと、また愛知県の碧南水族園ではワムシを用いた飼育で卵巣が発達したとの情報を頂いた。そこでワムシを餌に用いた飼育で、幼クラゲの性成熟に挑戦する。

(2) 自然状態での生殖腺発達(成熟)過程の観察

野外採集により、オスとメスのメデューサの生殖腺の発達段階を観察する。実験室内でのワムシを用いた生殖腺の発達段階と比較することで、実験室と自然界での成長速度を比較し、実験室内での成長速度を自然界のものと近づけたい

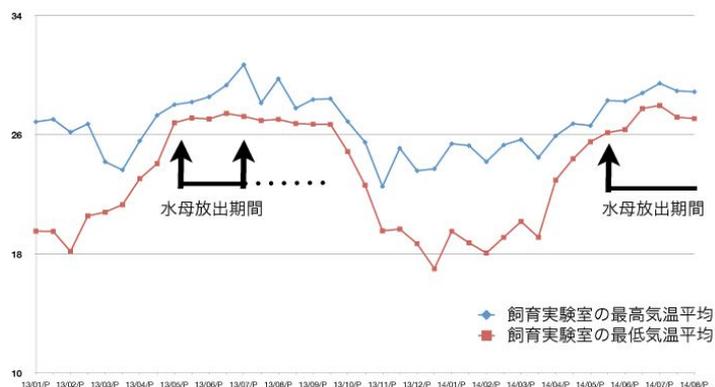
(3) 生殖腺発生初期のトランスクリプトーム解析

実験室での生殖腺の発達が成功していたら、発達段階初期の精巣と卵巣を用いてライブラリーを作製し、生殖腺発達初期の遺伝子の単離を行ない、雌雄を決める遺伝子および、配偶子形成に必要な遺伝子の単離を行なう。実験室での性成熟に成功していない場合は、野外採集によって雌雄のクラゲを採集し、遺伝子の単離を行なう。

4. 研究成果

(1) 自然界では夏にメデューサが観察されることから、低温から高温への温度変化が必須であることがわかる。メデューサ芽形成の条件で調べるために、飼育実験室の気温の計測を行い、飼育実験室内の最高気温と最低気温を記録した。その結果、最低気温が26度を超えるとメデューサ芽形成が引き起こされることが分かった(図3)。次に

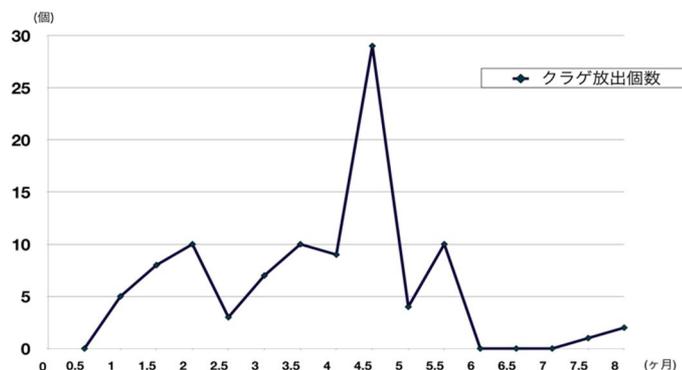
図3 温度変化と水母芽形成の相関



最低気温が約26度を超えると、水母放出が観察された

温度コントロールをすることで、どのくらいの期間でメデューサ芽形成が開始されるのか、温度を維持した場合、どのくらいの期間メデューサ芽を形成し続けるのかを観察するために、15度から28度に飼育温度を上げた。すると、この条件では約2週間で徐々にクラゲ芽を形成するようになった。さらに28度で水温を維持し続けることで、5ヶ月間は安定してクラゲを放出し続けた(図4)。つまり、温度コントロールすることで1年を通して幼若メデューサを得ることが可能となった。

図4 恒温(28°C)飼育中のクラゲ放出期間と個数



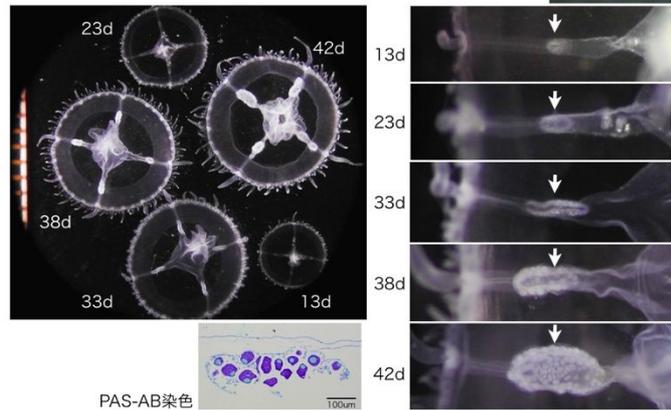
温度コントロールすることで、クラゲ放出を維持することが出来る

性別を明らかにするために、この幼若メデューサを性成熟するまで飼育しなくてはならない。約0.5mmで放出された幼若メデューサは、ブラインシュリンプを与え続けることで、約1ヶ月で、傘の直径が4mmとな

った。しかし、ブラインシュリンプだけでは放射管上に生殖腺の発達は観察できなかった。そこで培養でき（文献）、いつでも大量に手に入れることができる淡水プランクトンであるコガタツボワムシを餌として用いた。ある程度の密度でワムシが存在する状態で幼若メデューサを飼育すると、約2週間、傘直径4mmぐらいから放射管上に細胞の集積が見られ始め、だんだん、傘直径が大きくなるにつれて、細胞の集積も大きくなり、横に伸びていき、約8mmまで成長する頃には、成熟した卵巢、または精巣を持つ成熟メデューサとなった（図5）。

図5 飼育実験室内での卵巢成熟過程

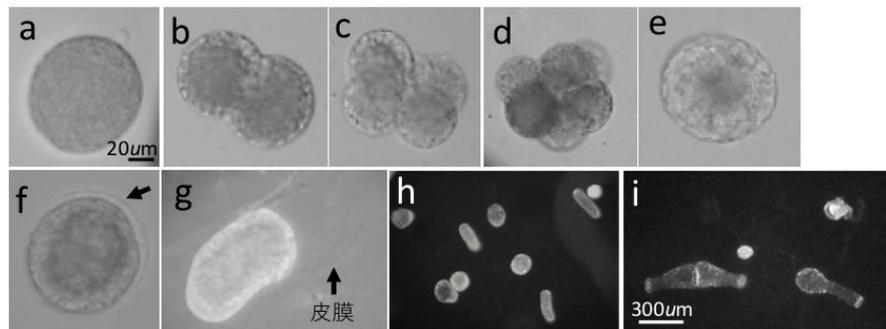
ワムシ10-20匹/mlに飼育水を調整し、ブラインシュリンプを2回/週とすることで性成熟誘導に成功した



次に実験室で育てた成熟クラゲを用いて、受精実験を試みた。単に卵巢から卵を取り出しただけでは受精せず、受精可能な成熟卵になるためには、何らかの光条件が必要であることが分かった。試行錯誤することで、マミズクラゲの放卵・放精は暗条件が引き金で起こり、放卵後、減数分裂が進み、第2極体放出後、受精可能となることが分かった（図6a）。受精後、受精膜は形成されず、受精後第一卵割までは約1時間、その後30-40分間隔で卵割が進み（図6b-d）、約10時間で繊毛を持つプラヌラ幼生となり、遊泳を始めた。プラヌラ幼生は球状であった（図6e）。多くのヒドロ虫ではプラヌラ幼生は固着後ポリプとなるが、マミズクラゲの場合は、プラヌラ幼生は24時間程度遊泳したのち、沈下し、動きを止め、細胞からの粘液の分泌により、被膜を形成した（図6f）。その後6時間ほどで被膜から抜け出し（図6g）無性生殖時に見られるフラストレ様の短い棒状（フラ

図6 マミズクラゲの卵割～ポリプ形成

ストレ様幼生または後期プラヌラ幼生)となり移動し（図6h）受精後約6日で小さいポリプへと変態した（図6i）。



（2）メデューサは実験室では傘直径10mm、生殖腺3mmぐらいまでしか成長しないが、野外では傘直径、20mm、生殖腺が10mmの長さまで成長することも多い。まず野外採集した個体を用いて、精巣の成熟段階のステージングを行ない、6段階に分けた（図7）。

St1では放射管上に細胞の集積がわずかに観察された。切片にすると、精巣が出来る側の放射管の内胚葉が肥厚し、外胚葉との間に1層の縦長の細胞が配置されていた。

St2では放射管上の精巣が明確になり、肥厚した内胚葉と外胚葉の間の細胞層が、2-4層となっていた。

St3では精巣が縁膜方向に伸長し始め、内胚葉と外胚葉との間の細胞層が6層前後となっていた。

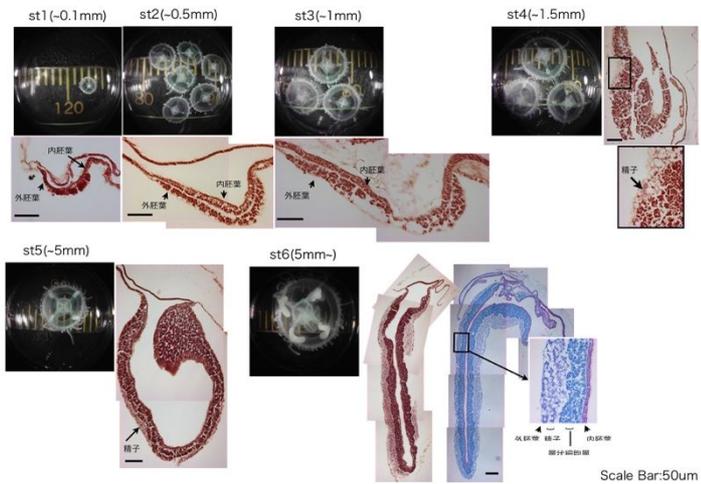
St4で、初めて精巣の1部分で精子が観察された。St4のメデューザの大きさは平均6.5mm、精巣

の大きさは平均1.2mmだった。外胚葉と層状の細胞の間、さらに泡状に見られる構造の周りに矢印で示される様な精子が観察された。

St5 では、ほぼ精巢の全領域の外胚葉直下で精子が観察された。

St 6 は縁膜を超えて精巢が大きくなり、精巢がほぼ成熟した状態だと考えられた。細胞の分化状態が分かりやすい様に、PAS アルシアンブルー染色もしてみたところ、放射管から続く1層の内胚葉細胞、10層前後の細胞層、精子の層、1層の外胚葉という分化状態となっていた。

図7 野外採集個体における精巢成熟過程



(3) マミズクラゲを分子解剖学的に解析するためには、マーカー遺伝子の単離が不可欠である。そこで、精巢、卵巢の発達段階を含めた RNA、ポリプとメデューサの RNA を単離し、RNA シーケンス解析を進めている。特に精巢や卵巢に特異的な遺伝子を単離し、始原生殖細胞がどこからくるのか、どういう分化状態を経て、精子や卵を形成するのか等、発現解析やノックダウンの方法を開発し、調べていきたいと考えている。

(参考文献)

- [1] Lankester, E. R (1880) Journal of Microscope Science 20: 351-371
- [2] Lytle, C. F. (1982) Developmental Biology of Freshwater Invertebrate, Alan R. Liss, Inc., New york. Pp.129-150
- [3] A Novel Method for Rearing Zebrafish by Using Freshwater Rotifers (Brachionus calyciflorus). Yuta Aoyama, Natsumi Moriya, Shingo Tanaka, Tomoko Taniguchi, Hisoshi Hosokawa, Shingo Maegawa. Zebrafish. 2015, Vol. 12: 288-295

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 小林千余子	4. 巻 74
2. 論文標題 淡水にすむクラゲ マミズクラゲの生活史	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生命の科学 遺伝	6. 最初と最後の頁 412-419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林千余子, 中野夏海, 角谷正朝, 川嶋牧, 裏山悟司, 永淵昭良
2. 発表標題 淡水棲マミズクラゲの全生活史-その生態と形態-
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野夏海, 角谷正朝, 川嶋牧, 裏山悟司, 永淵昭良 小林千余子
2. 発表標題 日本産淡水棲マミズクラゲの分子系統解析
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野夏海, 角谷正朝, 川嶋牧, 裏山悟司, 永淵昭良 小林千余子
2. 発表標題 The Lineage of Japanese freshwater jellyfish
3. 学会等名 9th Hydrozoa society workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林千余子
2. 発表標題 淡水棲マミズクラゲの生活史～3種の芽体形成を介した生存戦略～
3. 学会等名 2018日本付着生物学会シンポジウム 刺胞動物の付着：その不思議でユニークな生態や機能」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林千余子、角谷正朝、川島牧、裏山悟司、永淵昭良
2. 発表標題 淡水棲マミズクラゲの生態と形態～全生活環の解明を目指して～
3. 学会等名 日本動物学会 第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林千余子
2. 発表標題 淡水棲マミズクラゲの性決定の謎を追う
3. 学会等名 第3回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林千余子、角谷正朝、川島牧、裏山悟司、永淵昭良
2. 発表標題 淡水棲マミズクラゲの性成熟誘導と正常発生の観察
3. 学会等名 日本動物学会 第88回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林千余子
2. 発表標題 淡水棲マミズクラゲの形態及び生態について-全生活環の解明を目指して-
3. 学会等名 東京大学大気海洋研究所共同利用集会 我が国の刺胞動物研究の発展（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林千余子
2. 発表標題 淡水棲マミズクラゲの性成熟誘導と正常発生の観察
3. 学会等名 第3回 上皮・ジャンクション研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木隆仁, 松田征也, 楠岡泰
2. 発表標題 琵琶湖博物館における小さな生き物たちの常設展示
3. 学会等名 平成29年度東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会 水族館の展示と研究。その相互作用を探る
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木隆仁
2. 発表標題 マミズクラゲの継続飼育、展示に向けて
3. 学会等名 2017年度日本プランクトン学会春季シンポジウム 「ゼラチン質動物プランクトンの世界」
4. 発表年 2017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	蛭田 千鶴江  (Hiruta Chizue)  (20723018)	北海道大学・理学研究院・研究院研究員   (10101)	
研究 分担者	鈴木 隆仁  (Suzuki Takahito)  (60771285)	滋賀県立琵琶湖博物館・研究部・学芸員   (84202)	