

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14916

研究課題名(和文) ミズクラゲ幼生の変態を制御するインドール酢酸生合成ネットワークの解明

研究課題名(英文) Involvement of indoleacetic acid biosynthesis in metamorphosis of the moon jellyfish.

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究で、インドール酢酸(IAA)とトリプタミン(TAM)がミズクラゲのポリプからクラゲへの変態を阻害することを見出した。IAAは植物ホルモンとして知られ、TAMを経由して生合成される。ミズクラゲでも、IAA/TAMが変態調節ホルモンとして機能することが考えられた。この可能性を検討するため、ミズクラゲ体内のIAA/TAMの検出を試みたが、両物質とも変態中のポリプ・クラゲからは検出されなかった。一方、ミズクラゲ大量発生抑制剤としての利用を目指し、TAMの変態阻害活性を詳細に調べた。その結果、TAMは変態開始を阻害するだけでなく、変態中に投与するとクラゲへの変態を停止させることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、IAA/TAMが変態調節ホルモンとして機能する可能性を検討することであったが、この仮説を支持する結果は得られなかった。しかし、内在性IAA/TAMの検出を進める過程で、変態に伴って増加または減少する複数の内在性物質を同定できた。これらの中に変態調節ホルモンが含まれている可能性が高く、新しい研究テーマとして展開している。また、TAMの活性を詳細に調べた結果、変態中でも阻害効果があることを見出し、クラゲ大量発生抑制剤としての有用性を示した。一方、TAMが特異な活性を示すことから、これを分子ツールとして用いた新しい研究課題を立案し、基盤研究(C)として発展的に継続している。

研究成果の概要(英文)：Previously, we revealed that indoleacetic acid (IAA) and tryptamine (TAM) inhibit metamorphosis from polyp to jellyfish in the moon jellyfish. IAA is known to be a plant hormone, and synthesized via TAM in several species of plants. To examine the possibility that IAA/TAM function as metamorphosis-controlling hormones, we measured endogenous IAA/TAM. As a result, we did not detect IAA/TAM in animals during metamorphosis. On the other hand, we characterized the activity of TAM in detail. TAM inhibited the initiation of metamorphosis, and interrupted metamorphosis when it was administered during metamorphosis.

研究分野：生物有機化学

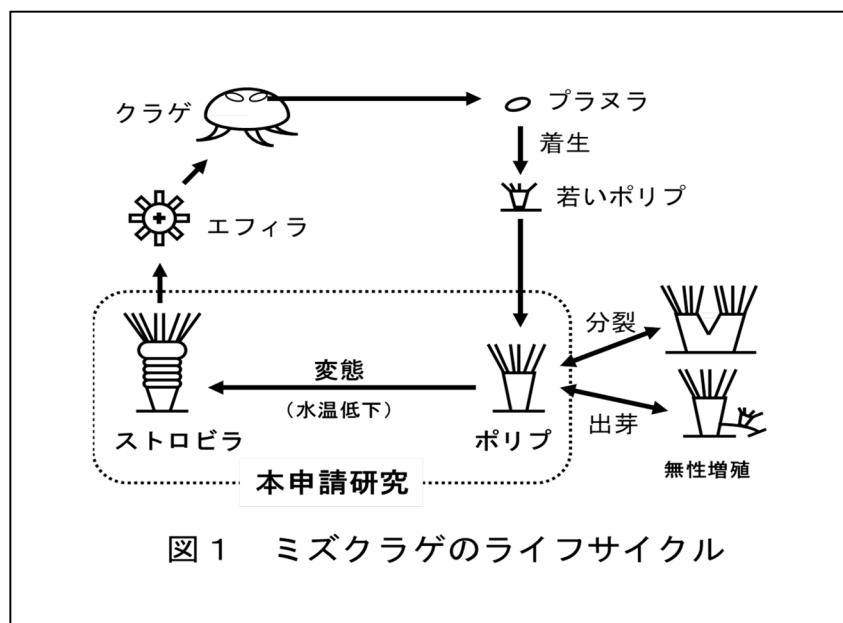
キーワード：ミズクラゲ 変態 インドール酢酸 生合成

## 1. 研究開始当初の背景

近年、日本近海においてミズクラゲの大量発生が社会問題になっている。ミズクラゲの幼生であるポリプは出芽や分裂によって無性的に増殖し、水温の低下に反応してストロビラ幼生へと変態し、クラゲの初期段階であるエフィラ幼生を大量に放出する(図1)。したがって、クラゲ大量発生の抑制は、ポリプからエフィラへの変態期に効果的となる可能性が高い。

申請者のグループでは、クラゲ防除剤としての利用を目指して変態調節物質の探索を進め、変態開始誘導物質としてインドール化合物の一種 indomethacin (IM)を見出した(Kuniyoshi et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2012)。さらに、IMの構造活性相関研究の過程で、植物ホルモンとして知られる indole-3-acetic acid (IAA)とその生合成中間体である tryptamine (TAM)が変態阻害活性を持つことを発見した。一方、申請者らは変態を制御する遺伝子群の解明を目指し、トランスクリプトーム解析を実施した。得られた塩基配列データについて代謝経路解析を行った結果、IAA生合成経路を担当する酵素遺伝子群のいくつかがミズクラゲ幼生体内で発現することを明らかにした。

以上の結果を踏まえ、申請者は「植物の成長ホルモンとして知られる IAA 関連物質は、動物でも生理的機能を担うのではないかと考え、ミズクラゲ幼生における IAA 生合成系の生理的意義を検証する研究を着想した。さらに、IAA 生合成中間体 TAM のクラゲ防除剤としての利用法も考えた。



## 2. 研究の目的

ミズクラゲにおいて、幼生からクラゲへの変態はクラゲ大量発生の key step である。申請者はこれまでに、IAA とその生合成中間体 TAM が変態阻害活性を持つことを見出し、ミズクラゲにおいて、IAA/TAM が変態調節ホルモンとして機能することが考えられた。この可能性を検証するために、(A)ミズクラゲ幼生における IAA/TAM の内在性を確認する実験と、(B)変態過程における IAA 生合成酵素遺伝子の存在を確認する実験を計画した。さらに、深刻化するクラゲの大量発生問題に対する新たな防除策の開発を目指し、(C)TAM の生物活性について詳細な特徴づけを試みた。

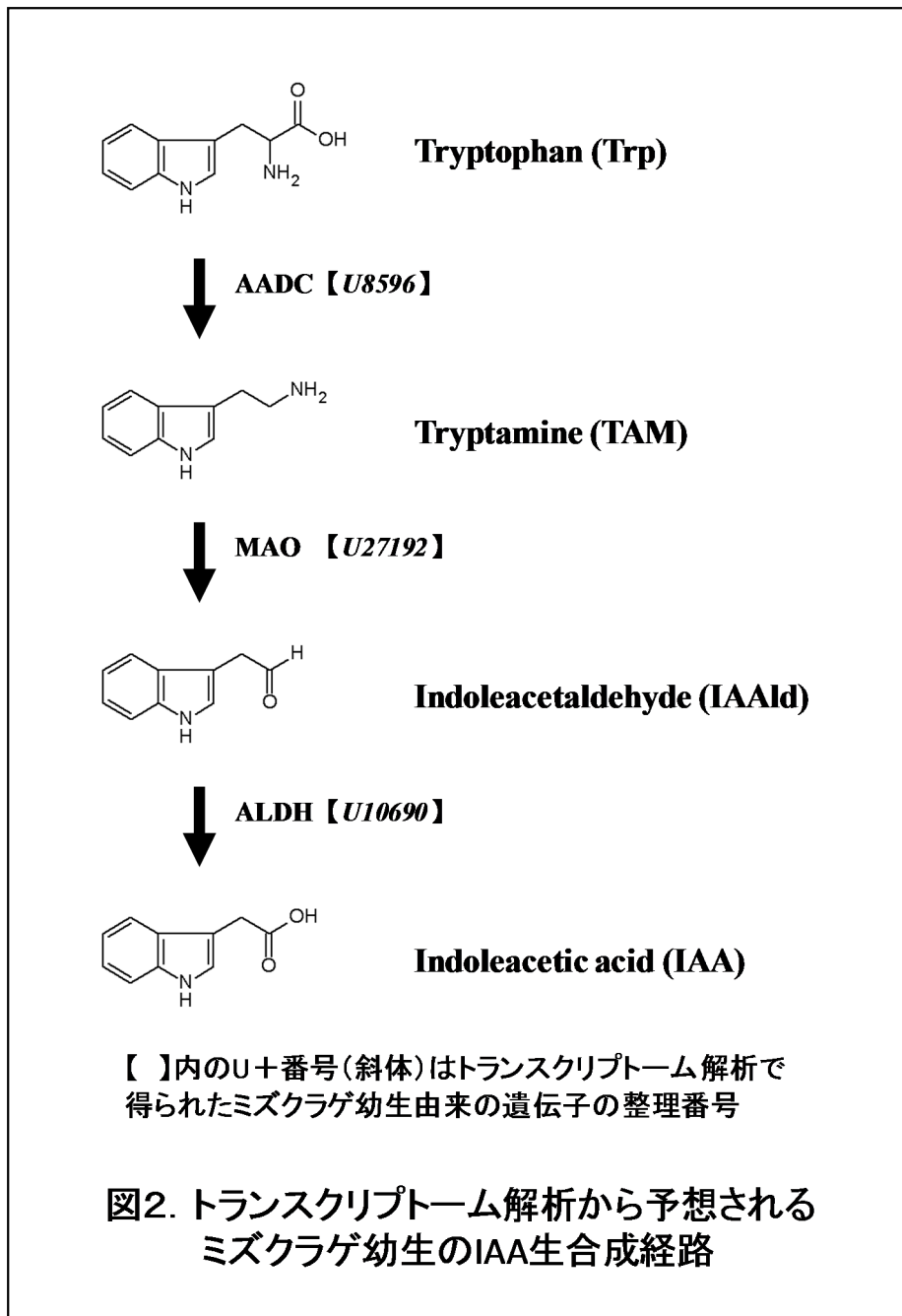
## 3. 研究の方法

### (A) ミズクラゲ幼生における IAA/TAM の内在性の確認

ミズクラゲ幼生体内に存在する IAA/TAM を分析するため、ポリプ、ストロビラ、エフィラのそれぞれについて、段階的にメタノール抽出、2%NaCl 水抽出をおこない、ODS カラムを用いた逆相 HPLC に供した。225 nm の吸収でモニタし、全てのピークを分取した。その中から、IAA と TAM の標品と同程度の保持時間を示したピークを選び、高性能ハイブリッド型質量分析システム (Thermo Fisher Scientific 製・LTQ Orbitrap XL) による精密質量測定をおこなった。

(B) 変態過程における IAA 生合成酵素遺伝子の存在の確認

トランスクリプトーム解析により、ミズクラゲ幼生では aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC)、monoamine oxidase (MAO)、aldehyde dehydrogenase (ALDH) の 3 酵素によって IAA が生合成されることが予想された(図 2)。local BLAST の結果、AADC では 2 個、MAO では 1 個、ALDH では 4 個の相同遺伝子が存在することが判明した。このうち、いくつかの遺伝子について部分配列しか得られていなかったため、inverse PCR 法により全長 cDNA を単離した。また、それぞれの遺伝子について、ポリプ・ストロビラ内での発現量を RT-PCR 法により調べた。



(C) TAM の生物活性の特徴づけ

TAM による変態阻害活性の特徴を詳細に調べるため、投与濃度、投与時期、培養温度などの条件を変えて外部形態の変化を観察した。また、内部構造を観察するため、パラフィン切片標本作製し hematoxylin-eosin (HE) 染色を行った。さらに、TAM 投与個体内での細胞増殖を検出するため、TAM を投与した後に 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 存在下で培養し、パラフィン切片標本作製して抗 BrdU 抗体で染色した。

4 . 研究成果

(A) ミズクラゲ幼生における IAA/TAM の内在性の確認

高性能ハイブリッド型質量分析システム LTQ Orbitrap XL による精密質量測定の結果、いずれのピークも IAA/TAM の分子量・分子式と一致せず、ポリプ、ストロビラ、エフィラの生体内における IAA/TAM の存在を確認できなかった。

(B) 変態過程における IAA 生合成酵素遺伝子の存在の確認

2 種の *AADC* 遺伝子、1 種の *MAO* 遺伝子、4 種の *ALDH* 遺伝子の全てについて、全長 cDNA のクローニングに成功した。このうち、ミズクラゲにおける *AADC* 遺伝子と考えていた 2 種と、他の動物に存在する同族の遺伝子群との間で詳細に分子系統解析を行った結果、いずれも *AADC* 遺伝子でないことが判明した。現在までに、これら以外の *AADC* 相同遺伝子が見つかっていない。RT-PCR による発現解析では、*ALDH* 遺伝子の 1 種のみがストロビラ特異的に発現し、それ以外は全てポリプ、ストロビラ両方で発現していた。

本研究の目的の一つは、「IAA/TAM が変態調節ホルモンとして機能する」可能性を検証することであったが、以上の(A)と(B)の実験からは、この仮説を支持する結果は得られなかった。

(C) TAM の生物活性の特徴づけ

ポリプを低温処理(10 培養)して変態開始前に TAM を投与した場合、変態は開始しなかった。これに対し、低温処理によりストロビラへの変態を誘導した後に TAM を投与し、引き続き 10 で培養した結果、100%のストロビラで変態中の分節形成が停止し、その後のエフィラ(クラゲ)の形態形成も阻害された。さらに培養を続けると分節間に異所性触手が生じ、パラフィン切片での HE 染色の結果では、異所性触手は正常なポリプの触手の特徴を示した。以上の結果から、TAM は変態開始を阻害するだけでなく、変態中に投与するとクラゲへの変態を停止させ、ポリプに戻す活性を持つことが確認できた。

一方、BrdU ラベル法により TAM 投与個体内での細胞増殖を可視化した結果、細胞増殖の阻害は認められず、TAM 非投与個体と比較しても差異はなかった。申請者の研究室での先行研究で、分節形成とエフィラ形態形成には細胞増殖が必要であることが見出されているが、TAM は細胞増殖以外のステップで作用していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tsujiita,N., Kuwahara,H., Koyama,H., Yanaka,N., Arakawa,K., Kuniyoshi,H.	4. 巻 81
2. 論文標題 Molecular characterization of aspartylglucosaminidase, a lysosomal hydrolase upregulated during strobilation in the moon jellyfish, Aurelia aurita.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 938-950
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2017.1285686	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井 夏鈴、小山 寛喜、国吉 久人
2. 発表標題 刺胞動物ミズクラゲの変態における細胞増殖の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井 夏鈴、小山 寛喜、国吉 久人
2. 発表標題 ミズクラゲのストロビレーションにおける細胞増殖の関与
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辻田 菜摘、小山 寛喜、辻 敏之、矢中 規之、荒川 賢治、国吉 久人
2. 発表標題 刺胞動物ミズクラゲの変態とリソソーム加水分解酵素群の関連
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井 夏鈴、黒田 理絵、辻田 菜摘、小山 寛喜、荒川 賢治、国吉 久人
2. 発表標題 ミズクラゲに対するストロビレーション阻害物質の活性の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辻田 菜摘、辻 敏之、渡部 彰大、小山 寛喜、荒川 賢治、国吉 久人
2. 発表標題 ミズクラゲのストロビレーションに伴って発現変動する新規分泌タンパク質遺伝子ファミリーの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辻田 菜摘、小山 寛喜、辻 敏之、矢中 規之、荒川 賢治、国吉 久人
2. 発表標題 ミズクラゲのストロビレーションに伴って発現増加するリソソーム加水分解酵素遺伝子群の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井 夏鈴、荒川 賢治、国吉 久人
2. 発表標題 変態阻害物質を用いたミズクラゲのストロビレーションの組織化学的解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井 夏鈴、国吉 久人
2. 発表標題 刺胞動物ミズクラゲの変態に関する組織化学的研究
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部
4. 発表年 2019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