

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：11302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07482

研究課題名(和文) 明と暗の光受容から始まるクラゲの卵成熟開始経路

研究課題名(英文) Jellyfish oocyte maturation triggered by light or dark stimulus

研究代表者

出口 竜作 (Deguchi, Ryusaku)

宮城教育大学・大学院教育学研究科高度教職実践専攻・教授

研究者番号：90302257

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)：本研究では、エダアシクラゲの明タイプ(明刺激により配偶子を放出)と暗タイプ(暗刺激により配偶子を放出)を対象に比較解析を行った。その結果、引き金となる光刺激は異なるものの、両タイプは共通したホルモンを用いて卵成熟に至ること、交配可能でありF1のハイブリッド個体は中間的性質を示すことを見い出した。しかしながら、明タイプと暗タイプのDNAの塩基配列の差異やF1ハイブリッド個体の不稔性などから、両者は種分化の途中または別種である可能性が高いと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原始的な動物であるクラゲでは、光環境の変化に応じて卵成熟およびそれに続く放卵が起こることが知られていたが、真逆の刺激(明刺激と暗刺激)に反応するクラゲの比較解析が行われたのは本研究が初めてである。得られた結果は新規性が高く、動物における卵成熟機構の「進化」や「原型」の理解を促すものである。また、全国的に人気のある水族館でのクラゲ展示などにも影響を与える重要な成果であると考えている。

研究成果の概要(英文)：There exist light (L)-type and dark (D)-type medusae, in which oocyte maturation and spawning occur in response to light stimulation (light after dark) and dark stimulation (dark after light), respectively, in the hydrozoan jellyfish *Cladonema pacificum*. The present study provides evidence that RPRPamide or related peptides released from the gonad epithelium functions as maturation-inducing hormone in both types. The F1 hybrids obtained from heterotypic crossings could spawn in response to both light and dark stimulations, although stronger changes in light intensity were necessary for the spawning of F1 hybrids. Interestingly, the F2 generation that inherits either or both of F1 hybrid chromosome sets failed to metamorphose into polyps. These data, together with the results of molecular phylogenetic analysis using DNA sequences, support the idea that reproductive isolation has been established between L- and D-type *C. pacificum*, which might be regarded as separate species now.

研究分野：動物発生学

キーワード：卵母細胞 放卵 神経ペプチド 生殖隔離

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 多くのクラゲでは、卵や精子などの生殖細胞は一層の上皮におおわれただけの生殖巣内に存在しており、光変化が刺激となって放出される。どのような光変化に反応するかはクラゲの種類ごとに決まっており、「暗→明」の明刺激に反応する「明タイプ」、または、「明→暗」の暗刺激に反応する「暗タイプ」のどちらかに分けられる。メスの場合、明刺激または暗刺激によって卵巣内の一次卵母細胞が卵成熟を開始し、減数分裂の完了後に、成熟卵が卵巣上皮を破って放出されてくる。私の研究室では、東北地方の日本海側のエダアシクラゲは明タイプ、太平洋側のエダアシクラゲは暗タイプであることを見だし、両タイプの系統化を進めてきた。

(2) エダアシクラゲの暗タイプの卵巣には、アルギニン-プロリン-アルギニン-プロリンの4個のアミノ酸から成り、C末端がアミド化されているペプチド (RPRPa) の前駆体をコードする遺伝子が発現している。PRPa部分を抗原とした抗PRPa抗体が卵巣上皮の神経様細胞を認識すること、抗PRPa抗体のシグナルが暗刺激後に減衰すること、低濃度のRPRPaが卵巣から単離した一次卵母細胞の卵成熟を誘起すること、暗刺激によって放出させた内在性の卵成熟誘起物質の効果が抗PRPa抗体によって阻害されることなどから、RPRPaは神経ペプチドであり、エダアシクラゲのメス個体において卵成熟誘起ホルモンとして働いていると考えられる。また、RPRPaは暗タイプのオス個体の精巣上皮にも発現しており、精巣に投与すると精子放出を誘起することから、このペプチドは雌雄で共通して配偶子放出に関わっていると推測される。エダアシクラゲの明タイプにおいても、RPRPaは卵成熟や配偶子放出を誘起すること、抗PRPa抗体が卵巣上皮の神経様細胞を認識することから、明タイプは暗タイプとは真逆の光刺激に反応するにも関わらず、同じホルモンを利用している可能性が高い。

(3) 明タイプと暗タイプの双方において、フィールドのようなゆっくりとした光変化のどの段階に反応して卵成熟や配偶子放出に至っているのかは良く分かっていない。また、明タイプと暗タイプが遺伝的にどの程度離れているかについても不明である。

## 2. 研究の目的

(1) 明タイプと暗タイプで、光刺激後のRPRPaの動態を詳しく調べ、卵成熟や放卵のタイミングとの関係を明らかにする。

(2) 明タイプや暗タイプを実際のフィールドで採集し、配偶子放出が起こっている時刻と照度変化との関係を明らかにする。

(3) 明タイプや暗タイプに対してさまざまな照度変化を与え、配偶子放出に至るのに必要な光条件を明らかにする。

(4) 明タイプと暗タイプのDNA塩基配列を比較し、両者の系統的關係を明らかにする。

(5) 明タイプと暗タイプを交配して子孫を作出し、それらの形質を調べる。

## 3. 研究の方法

(1) 研究室で維持している明タイプのメス系統と暗タイプのメス系統のポリプからクラゲを遊離させ、性成熟するまで育てた。明タイプの成熟個体 (図1左) に対し、明刺激 (暗所から明所への移行) を与えた後、一定時間ごとにホルマリンで固定していった。固定サンプルに抗PRPa抗体を用いた間接蛍光抗体染色を施し、卵巣上皮の蛍光シグナルが明刺激後にどのように変化するか、共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べた。暗タイプの成熟個体 (図1右) に対しては、暗刺激 (明所から暗所への移行) を与え、同様に抗PRPa抗体の蛍光シグナルの推移を調べた。

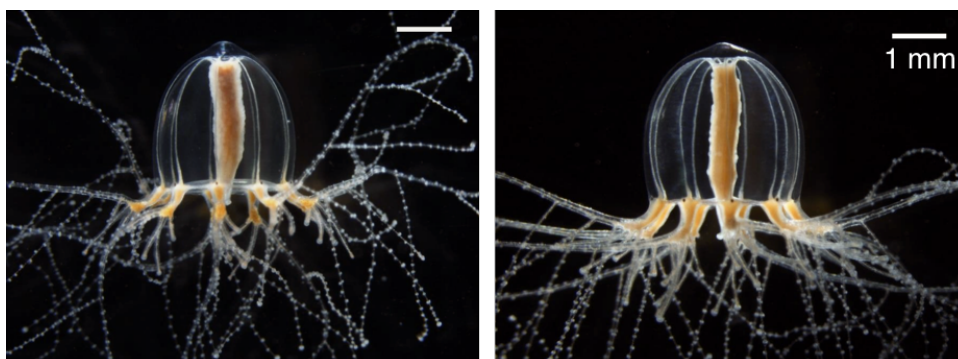


図1 エダアシクラゲの明タイプと暗タイプ (ともにメス個体)

(2) 東北地方のいくつかの地点の藻場において、夜明け頃や夕暮れ時を中心に網をひき、エダアシクラゲのフィールド個体を採集した。採集直後に生殖巣の状態を顕微鏡で観察し、配偶子放出の前なのか、途中なのか、後なのかを調べた。また、藻場に沈めておいたデータロガー照度計により、採集地点の照度変化を記録した。なお、今回用いた照度計の計測値と光量子計の計測値を比較した結果、夕暮れ時の自然光では、照度 100 ルクスはおおよそ光量子束密度  $1.7 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  に相当した。

(3) LED ライトと照度計を入れた暗ボックスを作製し、減光用のシートを挟んで任意の照度変化が与えられるようにした。この中に明タイプと暗タイプのメス個体を入れ、どのような照度変化を与えた場合に放卵に至るか調べた。また、放卵が起こった条件や起こらなかった条件において、卵巣上皮における抗 PRPa 抗体の蛍光シグナルがどのような変化を起こしているか調べた。なお、LED ライトの照度 100 ルクスはおおよそ光量子束密度  $1.9 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  に相当した。

(4) 各地で採集したエダアシクラゲをエタノールで固定して保存しておき、各サンプルから DNA を取り出した。ミトコンドリア DNA や核 DNA のいくつかの領域を PCR で増幅し、それらの塩基配列を調べて比較した。また、データベースにすでに登録されている塩基配列との比較も行った。

(5) 明タイプのメス個体・オス個体および暗タイプのメス個体・オス個体に明刺激または暗刺激を与え、配偶子放出を誘起した。得られた卵と精子を 4 通りの組み合わせ（「明メス×明オス」、「明メス×暗オス」、「暗メス×明オス」、「暗メス×暗オス」）で受精させ、得られたプラヌラ幼生を変態させてポリプを作出した。これらのポリプからクラゲを遊離させ、性成熟するまで育てた後、F1 世代の成熟クラゲがどのような光変化に反応して配偶子放出に至るか調べた。また、F1 世代が放出した配偶子を用い、F2 世代の作出を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) 明タイプのメス個体においては、卵巣上皮の抗 PRPa 抗体の蛍光シグナルは明刺激から 1 分以内にほぼ消失することが分かった（図 2）。卵成熟開始の指標となる卵核胞崩壊はその数分後に開始され、明刺激から約 25 分後に放卵が起こった。一方、暗タイプのメス個体では、暗刺激から 10 分が経過した後に蛍光シグナルの減少が認められ、引き続いて卵核胞崩壊が起こり、暗刺激から約 35 分後に放卵が起こった。これらの結果から、両タイプにおける放卵のタイミングの差異は、光変化後の卵巣上皮の RPRPa 放出のタイミングの差異に起因するものと考えられる。

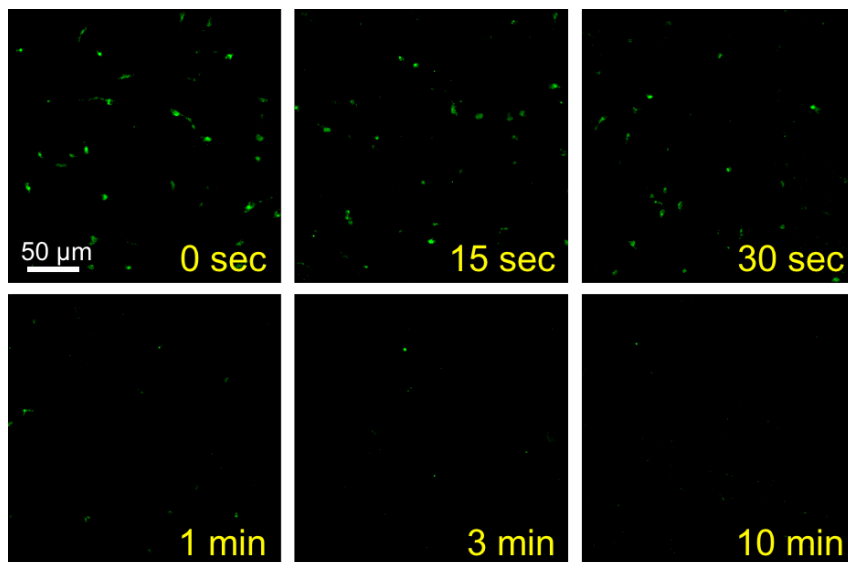


図 2 明タイプの卵巣上皮における抗 PRPa 蛍光シグナルの推移

(2) 明タイプが生息する藻場では、夜明け頃、海中の照度が 0 ルクスからわずかに上回った段階で、配偶子放出途中の個体が採集された。また、それ以前には配偶子放出前の、それ以降には配偶子放出後の個体が採集された。一方、暗タイプが生息する藻場では、夕暮れ時、海中の照度がまだ数百～数十ルクスの段階で配偶子放出途中の個体が採集され、その前後には配偶子放出前の個体が採集された。すなわち、フィールドにおける明タイプ・暗タイプは、照度の絶対値が大きく異なる段階で明刺激・暗刺激を受けていると考えられる。なお、青森県青森市浅虫での調査では、夜明け頃に配偶子を放出している個体と夕暮れ時に配偶子を放出している個体が、同一の場所で採集された。

(3) 暗ボックスを用いた室内実験において、明タイプのメス個体は、0 ルクスから 0.1 ルクスや

0.01 ルクスへの移行といった、ごくわずかな照度上昇によって放卵に至ることが明らかとなった。また、暗タイプのメス個体を用い、スタート時の照度から三分の一の照度に移すという「1/3 暗刺激」を与えた実験では、スタート時の照度が 2000 ルクスや 0.6 ルクスの場合には放卵はほとんど起こらなかったのに対し、スタート時の照度が 100 ルクス～1000 ルクスの範囲であれば放卵が起こった。また、スタート時の照度の三分の二の照度に移すという「2/3 暗刺激」を与えた場合には、スタート時の照度に関係なく放卵は起こらなかったが、「2/3 暗刺激」を与えた後に 15～30 分が経過してからさらにその三分の二の照度に移すという「2 段階の 2/3 暗刺激」を行うと、放卵に至る個体が現れた。「2/3 暗刺激」を与えても卵巣上皮の抗 PRPa 抗体の蛍光シグナルの変化は見られなかったが、「2 段階の 2/3 暗刺激」を与えた場合には蛍光シグナルの減少が確認された。以上の結果は、明タイプは全暗後のごくわずかな明刺激に反応して、暗タイプは一定照度からの弱い暗刺激の積み重ねに反応して RPRPa を放出し、卵成熟や配偶子放出に至ることを示唆している。

(4) 各地で採集したエダアシクラゲにおいて、ミトコンドリア DNA の COI 遺伝子領域や核 DNA の ITS1 領域の塩基配列を調べたところ、明タイプと暗タイプ間では塩基配列に大きな差異があり、系統樹を作成すると両タイプは大きく 2 つのグループに分かれるという結果になった。なお、青森市浅虫で夜明け頃に配偶子を放出していた個体は明タイプ、夕暮れ時に放出していた個体は暗タイプのグループに含まれた。一方、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA 遺伝子領域の塩基配列に着目すると、宮城県塩竈市浦戸野々島などの仙台市近郊の一部の地域で採集した暗タイプ (local 暗タイプ) は明タイプと同じグループに入り、その他の地域の暗タイプ (Global 暗タイプ) とは別のグループを形成することが分かった。明タイプ、local 暗タイプ、Global 暗タイプの三者でミトコンドリア DNA のほぼ全長の塩基配列を比較した結果、local 暗タイプのミトコンドリア DNA は 16S rRNA 遺伝子を含む一定の長さの領域で組換えを起こしている可能性が浮上した。

(5) 青森市浅虫産の明タイプのメス個体・オス個体および塩竈市浦戸野々島産の暗タイプのメス個体・オス個体から放出された卵・精子を受精させたところ、「明メス×暗オス」や「暗メス×明オス」というヘテロな組み合わせでも高い率で卵割が起こり、胚の多くはプラヌラ幼生にまで発生した。また、これらのプラヌラ幼生はポリプへと正常に変態し、ポリプの群体はクラゲを遊離し、クラゲは性成熟に至った。このようにして、複数系統の「F1 ハイブリッド個体」を作出することに成功した。F1 ハイブリッド個体は、0 ルクスから数百ルクスへの移行のような「強い明刺激」や数百ルクスから 0 ルクスへの移行のような「強い暗刺激」に対しては両方に反応し、配偶子放出に至った。しかしながら、0 ルクスから 0.01 ルクスへの移行といった「弱い明刺激」や 100 ルクスから 10 ルクスへの移行といった「弱い暗刺激」では配偶子を放出しなかった。以上の結果より、光による配偶子放出という点では、F1 ハイブリッド個体は明タイプと暗タイプの中間的な形質を示すものと考えられる。次に、F1 ハイブリッド個体から卵や精子を得て、F1 ハイブリッド個体を片親もしくは両親とした F2 世代の作出を試みたところ、プラヌラ幼生までは正常に発生するもののポリプへはほとんど変態できないことが判明した。これに対し、local 暗タイプと Global 暗タイプの交配で生じた F1 個体から得られた卵や精子を使った場合は、F2 世代のプラヌラ幼生はポリプへと正常に変態した。以上の結果より、明タイプと暗タイプの交配により生じた F1 世代は不稔であると考えられる。

(6) 本研究では、実際のフィールドにおいて、明タイプは夜明け頃に、暗タイプは夕暮れ時に配偶子を放出していることが確認された。このような配偶子放出のタイミングの違いから、明タイプと暗タイプの間には「交配前の生殖隔離」が生じていると考えられる。また、F1 ハイブリッドが不稔であることから、明タイプと暗タイプの間には「交配後の生殖隔離」も存在することが判明した。明タイプと暗タイプの DNA の塩基配列には大きな違いがあり、両者が同所的に生息していることなどからも、両タイプは種分化の過程にある、もしくはすでに別種となっている可能性が高い。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tachibana Kazunori, Matsumoto Masaaki, Minowa Aiko, Deguchi Ryusaku	4. 巻 37
2. 論文標題 Isolation and Characterization of Feeding-Deficient Strains in Inbred Lines of the Hydrozoan Jellyfish <i>Cladonema pacificum</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 263 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs190122	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 -
1. 著者名 出口竜作、菅原朱莉	4. 巻 74
2. 論文標題 クラゲの繁殖戦略 無性生殖から有性生殖, 単為生殖まで	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物の科学 遺伝	6. 最初と最後の頁 394-401
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 -
1. 著者名 竹田典代, Evelyn Houliston, 出口竜作	4. 巻 45
2. 論文標題 クラゲの卵成熟誘起ホルモンと光受容によるホルモン放出	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 比較内分泌学	6. 最初と最後の頁 111-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5983/nl2008jsce.45.111	査読の有無 無
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 該当する
1. 著者名 Takeda, N., Deguchi, R., Itabashi, T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Reproductive Strategies in Marine Hydrozoan Jellyfish: Sexual Medusae and Asexual Polyps	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reproductive and Developmental Strategies: The Continuity of Life	6. 最初と最後の頁 157 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-4-431-56609-0_8	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 -

1. 著者名 Deguchi, R., Hirohashi, N.	4. 巻 6
2. 論文標題 Fertilization, Comparative	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Reproduction, 2nd edition	6. 最初と最後の頁 344 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-809633-8.20576-1	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 -

1. 著者名 Quiroga Artigas, G., Lapebie, P., Leclere, L., Takeda, N., Deguchi, R., Jekely, G., Momose, T., Houliston, E.	4. 巻 7
2. 論文標題 A gonad-expressed opsin mediates light-induced spawning in the jellyfish Clytia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.29555	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 該当する

1. 著者名 Takeda, N., Kon, Y., Quiroga Artigas, G., Lapebie, P., Barreau, C., Koizumi, O., Kishimoto, T., Tachibana, K., Houliston, E., Deguchi, R.	4. 巻 145
2. 論文標題 Identification of jellyfish neuropeptides that act directly as oocyte maturation-inducing hormones	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.156786	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 該当する

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 菊地充、出口竜作
2. 発表標題 宮城県沿岸のミサキコモチエダクダクラゲとエダクダクラゲの比較解析
3. 学会等名 日本動物学会2020年度東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅原悠香, 山川奈帆美, 出口竜作
2. 発表標題 エダアシクラゲの暗タイプにおける自然光下での放卵のタイミング
3. 学会等名 日本動物学会令和元年度東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅原悠香, 出口竜作
2. 発表標題 エダアシクラゲの暗タイプの放卵を誘起する光条件と卵成熟誘起神経ペプチドの動態
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立花和則, 松本眞明, 箕輪愛子, 出口竜作
2. 発表標題 エダアシクラゲの摂食障害変異体の単離と解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅原悠香, 石森彩希, 山川奈帆美, 星尚仁, 出口竜作
2. 発表標題 エダアシクラゲの放卵を誘起する光条件
3. 学会等名 日本動物学会平成30年度東北支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 星尚仁, 西住恵太, 出口竜作, 立花和則
2. 発表標題 エダアシクラゲにおける分子系統解析の妥当性 表現型とミトコンドリアDNA相同性の不一致
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 Deguchi, R., Hoshi, T., Takeda, N., Tachibana, K.
2. 発表標題 Oocyte maturation and spawning of light- and dark-type medusae of the hydrozoan <i>Cladonema pacificum</i>
3. 学会等名 Fifth International Oocyte Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hoshi, T., Nishizumi, K., Deguchi, R., Tachibana, K.
2. 発表標題 Molecular phylogenetic analysis and hybridization in light-type and dark-type <i>Cladonema pacificum</i>
3. 学会等名 Fifth International Oocyte Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星尚仁, 出口竜作, 立花和則
2. 発表標題 浅虫はエダアシクラゲの明タイプと暗タイプのボーダーか?
3. 学会等名 日本動物学会平成29年度東北支部大会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 出口竜作、竹田典代
2. 発表標題 クラゲの卵成熟誘起ホルモン
3. 学会等名 日本動物学会第88回富山大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 星尚仁、西住恵太、立花和則、出口竜作
2. 発表標題 配偶子放出条件の異なるエダアシクラゲの掛け合わせによる分類の再検討
3. 学会等名 日本動物学会第88回富山大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Manabu Yoshida, Juan F. Asturiano, Ryusaku Deguchi, Makoto Osada ほか	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 379 (113-165)
3. 書名 Reproduction in Aquatic Animals	

〔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

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