

# 学位論文の要旨

論文題目 刺胞動物ミズクラゲのストロビレーションに関する分子生物学的研究

氏名 辻田 菜摘

刺胞動物ミズクラゲ(*Aurelia aurita*)は、日本を含む世界の海の広い範囲に生息するクラゲである。近年、その大量発生が社会問題となっており、網などの漁具の破壊や、漁獲された際の刺胞による水産資源生物への被害は、水産市場における損失となっている。また、火力発電所の冷却用海水の取水口に押し寄せて大規模な停電を引き起こすなど、他産業においても被害をもたらしている。

ミズクラゲの生活環は、無性世代(ポリプ)と有性世代(クラゲ)を交互に繰り返す。成体のクラゲは雌雄異体で、有性生殖をおこなう。受精卵は雌成体クラゲの保育嚢で発生し、プラヌラとなって海水中に泳ぎ出る。プラヌラは岩などの適当な基質の上に着生し、イソギンチャクのような形態のポリプとなる。ポリプは出芽や分裂によって無性的に増殖する。冬になり海水温が低下すると、ポリプの胴体部が伸び、触手のすぐ下にくびれが現れる。くびれは足盤に向かって1つずつ形成され、胴体に数個から十数個のくびれを有するストロビラとなる(分節形成期ストロビラ)。その後、触手が退縮し、分節の外縁にくぼみが生じて弁が形成され、分節は盤となる(形態形成期ストロビラ)。それぞれの盤は拍動し始め、エフィラとなって海水中に遊離する。その後、エフィラは成長して成体クラゲとなる。ポリプから分節の形成を経てエフィラを遊離するまでの一連の過程はストロビレーションと呼ばれる。一匹のポリプから最終的に数匹から十数匹のエフィラが発生するため、ストロビレーションは成体クラゲの個体数決定の上で非常に重要なステップである。しかしながら、ストロビレーションの分子機構はいまだ未解明な部分が多く、いくつかの知見が散在するのみで、ストロビレーションを制御するシグナル伝達経路などの発見には至っておらず、新たな研究成果が待たれている状況である。

本研究の目的は、ストロビレーションの分子機構を解明することである。一般に、ある現象の前後で発現量の変動する遺伝子は、その現象と深く関連していることが期待される。そこで、ポリプとストロビラの間で発現量に差がある遺伝子群(Differentially-expressed Genes; DEG)を探索し、その一部について詳細な解析をおこなった。

## 第1章 瀬戸内海産ミズクラゲのポリプクローン系統の確立と特徴

本研究を開始するにあたり、実験の基盤整備に着手した。実験に用いるポリプの遺伝的背景を単一にするため、広島県倉橋島沿岸で採集した雌成体クラゲの保育嚢からプラヌラを回収し、実験室内で着生変態させた後、ポリプクローン系統を確立した。本研究では、6個体の雌成体クラゲより、15株のポリプクローン系統を作出した。

自然界においては海水温の低下がストロビレーションの引き金となるが、研究室では、飼育海水の温度を下げることでストロビレーションを誘導できる。本研究で確立したクローン系統15株について、ストロビレーションの条件検討をおこなった。その結果、いずれも25℃から10℃への海水温の低下により、32-63日でストロビレーションを開始したが、25℃から15℃への低下ではストロビレーシ

ジョンを開始した系統と開始しない系統に分かれた。また、期間を限定した低温処理実験により、最初のくびれが出現した時点でエフィラへの発生運命が決定されていて、ストロビレーションは一旦開始すると、温度に対して非依存的に進行することを明らかにした。

ところで、近年の分子系統学的な分析によって、ミズクラゲ *Aurelia aurita* には隠蔽種が含まれていることが指摘されている。そこで、実験に用いるポリブクローン系統の分類学的な位置付けを目的として、*Internal Spacer 1/5.8S rDNA* 遺伝子をクローニングし、分子系統解析をおこなった。その結果、瀬戸内海産ミズクラゲは、宮津湾やカリフォルニアなど、世界の広い範囲に分布する *Aurelia* sp. 1 と同種である可能性が示唆された。

## 第2章 differential display 法による変態関連遺伝子の探索

ポリブとストロビラの間で発現量に差がある遺伝子群(以下、DEG と呼ぶ)を探索するため、differential display をおこなった。その結果、ポリブ特異的遺伝子が1個(*P3*)、ストロビラ特異的遺伝子が4個(*S1, S2, S3, S4*)見出された。これらの遺伝子はいずれも、ポリブまたはストロビラにおいて有意に発現量が高かった。このうち、特徴的なアミノ酸配列を有していた *P3* と *S2* について、さらに解析を進めた。

ポリブ特異的遺伝子 *P3* は、シグナルペプチドを持つ未知の分泌タンパク質をコードし、酸性アミノ酸領域と塩基性アミノ酸領域が配列中に交互に存在するという特徴的な構造を有していた。この遺伝子については、第3章の次世代シーケンサーを用いた transcriptome 解析で、アミノ酸配列が類似した別の遺伝子が存在することが分かったため、3章で詳しく触れる。

ストロビラ特異的遺伝子 *S2* は、リソソーム加水分解酵素遺伝子の一種である *aspartylglucosaminidase (AGA)* のオーソログと考えられた。AGA は、リソソーム内での *N* 結合型糖タンパク質の分解の最終段階を担う酵素であり、アミノ酸と単糖への加水分解を触媒する。*S2* について、ポリブ・分節形成期ストロビラ・形態形成期ストロビラ・エフィラの4つのステージの間で発現量を定量した結果、分節形成期および形態形成期ストロビラでは、ポリブやエフィラに比べて発現量が高かった。

ストロビラにおいてリソソーム加水分解酵素遺伝子 *AGA* の発現量が上昇していることから、ストロビレーションとリソソームの活動に何らかの関連があると考え、リソソーム酸性化阻害剤である chloroquine および bafilomycin A1 の投与実験をおこなった。その結果、いずれの化合物の投与においても、触手側の末端に白色で不定形の組織が生じた。さらに、切除した分節組織に対する投与実験から、白色不定形組織は最も触手側の分節に由来することが明らかとなった。すなわち、リソソームの活動は、最も触手側の分節がエフィラへと形態形成する過程に深く関与することが示唆された。なお、リソソーム活動と関連の深いオートファジーの阻害剤である 3-methyladenine の投与では異常は観察されなかったことから、上記の形態異常はオートファジーの阻害に起因するものではないと考えられた。

## 第3章 transcriptome 解析による変態関連遺伝子の探索

ポリブ・ストロビラ間の DEG をさらに網羅的に探索するため、次世代シーケンサーを用いた transcriptome 解析をおこなった。ポリブとストロビラより mRNA を精製し、次世代シーケンサーによる RNA-sequencing をおこなった。assembly の結果、合計 48,925 種の mRNA の塩基配列を得て、さらに expression difference analysis をおこなって 23,091 種の DEG を同定した。

第2章でストロビレーションとリソソーム活動との関連性が示唆されたことから、全 DEG を対象としてリソソーム加水分解酵素遺伝子の網羅的探索をおこなった。その結果、AGA に加えて、*arylsulfatase B (ARSB)* をストロビラ特異的遺伝子として同定した。ARSB はコンドロイチン 4-硫酸などの脱硫酸化を触媒する酵素である。定量的 RT-PCR の結果、ARSB は分節形成期および形態形成期ストロビラで高い発現を示した。AGA と ARSB はともに、プロテオグリカンの加水分解の一部を触媒する

酵素である。これらの遺伝子の発現量が増加していることから、ストロビレーション中には細胞外マトリクスを分解して、変態に必要な生体成分をリサイクルする経路が活発になっているという可能性が示唆された。

ストロビレーションは、分節形成が触手側から足盤側に向けて水平に順序正しく進んでいくことから、非常に高度で複雑な細胞同士の連携によって成立していると考えられる。このような細胞間の情報伝達を担う分子として、分泌タンパク質に着目して解析を進めた。今回得られた全ての DEG を annotation の有無により既知遺伝子 7,949 種と未知遺伝子 15,142 種に分類し、未知遺伝子については SOSUI プログラムで解析し、シグナルペプチドを有する ORF1,872 種を分泌タンパク質として同定した。その中から、第 2 章で見出したポリプ特異的遺伝子 *P3* と相同性の高い分泌タンパクをコードするストロビラ特異的遺伝子 *P3-like* を見出した。*P3-like* と *P3* はお互いよく似たアミノ酸配列を持ちながらも、発現パターンが相補的であったことから、全く反対の生理活性を分担しあう分泌タンパクファミリーと考えられた。

## 総括

本研究では、ストロビレーションの分子機構を担う遺伝子を得る目的で、ストロビレーション過程で発現変動する遺伝子群を網羅的に探索した。その過程でストロビレーションとリソソーム活動の関連性を見出した。これまで、細胞生理学的な側面からストロビレーションを掘り下げた研究はなく、新しい視点を開拓する端緒となるものと期待される。一方、本研究では、一般的には扱いにくいとされる未知タンパク質についても積極的に取り組み、ストロビレーション中に相補的に発現する新規の分泌タンパク質ファミリーの発見に至った。同時に、他にも機能不明な分泌タンパク質が多数存在することも明らかになり、複雑な細胞間ネットワークの全容解明のための基盤を構築できたものと考えられる。