

## 学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 ミズクラゲのストロビレーションにおける分節形成機構の解析

広島大学大学院統合生命科学研究科

食品生命科学プログラム

学生番号 D204097

氏 名 藤井 夏鈴

刺胞動物ミズクラゲ *Aurelia coerulea* の生活環は、雌雄異体の成体クラゲが有性生殖を行う有性世代と出芽や分裂によって無性的に増殖するポリプの無性世代から成る。ポリプは、冬季に海水温が低下すると、触手のすぐ下の位置にくびれが形成され、ストロビラとなる。そのくびれの下に次のくびれが形成され、これを繰り返して口側から反口側に向かって複数の分節が形成される。分節の形成が終わると触手が退縮し、それぞれの分節は 8 個の弁を持った盤に変化し、拍動をはじめ。その後、各盤は 1 枚ずつ遊離してエフィラとなる。この過程はストロビレーションと呼ばれる。ミズクラゲのストロビレーションでは、形成された分節の数が成体クラゲの個体数に直結するため、ストロビレーションにおける分節形成は、クラゲの個体数決定において重要なステップであると言える。

ストロビレーションの開始については、低温刺激や *indomethacin* などのインドール化合物により誘導されることが広く知られており、内在性の因子としてレチノイン酸が関与することが示唆されている。しかし、分節形成についての分子レベルでの知見は極めて乏しく、*tryptamine (TAM)* などのいくつかの物質が分節形成阻害活性を持つことが見出されているのみである。本研究の目的は、ミズクラゲのストロビレーションにおける分節形成を制御する因子を同定することである。そこで *TAM* の分節形成阻害活性を利用し、正常なストロビラと分節形成を阻害したストロビラで発現に差がある遺伝子群を探索し、分節形成に関与するシグナル因子を同定した。

### 第 1 章

ストロビレーション中の経時的な外部形態の変化を詳細に観察し、ストロビレーションにおけるステージを定義した。本研究では、1 つ目のくびれの形成をストロビレーションの開始と定義した。ポリプにストロビレーション誘導刺激を加えた後、ストロビレーションが開始するまでの段階をプレストロビラと呼ぶこととした。ストロビレーションの前半は、複数の分節が口側から反口側に向かって順に形成される段階であり、分節形成期とした。ストロビレーションの後半は、各分節がエフィラ形態を形成する段階であり、エフィラ形態形成期とした。口側から順にエフィラが遊離する段階をエフィラ遊離期と呼び、全てのエフィラが遊離した時をストロビレーションの完了と定義した。

組織学的手法を用いて上記のストロビレーション各ステージの内部形態の特徴を記載した。プレストロビラでは外部形態同様、ポリプとの差異は見られなかった。ストロビレーションが開始すると、上皮細胞層は外胚葉性上皮細胞層と内胚葉性上皮細胞層の二層構造を保ったまま、等間隔に胃腔側へ陥入し、複数の分節が形成されることを明らかにした。エフィラ形態形成期には、各分節がエフィラ形態を形成するが、胃腔は口側から反口側まで連続した形態を維持していた。エフィラ遊離期に陥入した上皮細胞層が融合し、胃腔が分割されることが明らかとなった。

## 第2章

一般に、動物の変態において細胞増殖は重要な役割を果たしている。本章では、ストロビレーションの各ステージにおける細胞増殖の役割について解析した。ストロビレーション各ステージで細胞増殖が起きている領域を特定するため、BrdU labeling および抗 PCNA 抗体を用いてポリプ/ストロビラのパラフィン切片上で細胞増殖を検出した。また、ストロビレーション各ステージにおける細胞増殖の役割を調べるため、細胞増殖阻害剤の投与実験を行った。

ポリプではほとんど細胞増殖が検出されなかったが、プレストロビラでは触手のすぐ下の領域でくびれが生じる前に細胞増殖が起きていることを明らかにした。プレストロビラは、外部形態および内部形態はポリプと差異が認められなかったが、プレストロビラの1つ目の分節が形成される予定領域で細胞増殖が始まっていた。このことから、プレストロビラは細胞レベルではポリプとは異なるステージであると考えられた。

分節形成期では、次の分節が形成される予定領域で細胞増殖が起きていた。新たな分節を形成するために、上皮細胞層の陥入に先立って、細胞が増殖する必要があると示唆された。

エフィラ形態形成期では、全ての分節で細胞増殖が起きており、分節形成期ストロビラのすでに形成された分節でも細胞増殖が観察された。このことから、分節の形成直後からエフィラ形態形成期にかけて細胞増殖は継続して起きており、エフィラ形態形成においても細胞増殖が必要であると考えられた。

細胞増殖阻害剤を投与した場合もエフィラが遊離したことから、エフィラの遊離には細胞増殖は必要ないと考えられた。

また、分節形成の性質を調べるため、ストロビラの切断実験を行った。その結果、分節と隣接する領域で次の分節の形成が進行することを明らかにした。このことから、すでに形成された分節が新しい分節の形成を誘導する「分節形成誘導因子」を発信していることが示唆された。

## 第3章

3つのインドール化合物のストロビレーション阻害活性を、バイオアッセイ法を用いて定量的に評価した。その結果、tryptamine (TAM)、*N*-acetyltryptamine (AcTAM)、5-methoxyindole (5MeOIn) は、有意な分節形成阻害活性を示すことを明らかにした。さらに、分節形成が阻害された個体では、すでに形成された分節でもエフィラへの形態形成は進行しなかった。このことから、これらの化合物は、エフィラ形態形成阻害活性を持つことが明らかとなり、エフィラの形態形成は分節形成が完了する前に開始していることが示唆された。

TAM、AcTAM、5MeOIn を分節形成期ストロビラに投与した場合、分節間のくびれから触手様の突起が生じた。行動観察と組織観察の結果、これらはポリプの触手と同等の器官と考えられ、分節形成期ストロビラはポリプの性質を維持している可能性が示唆された。

さらに、TAM の分節形成阻害活性と細胞増殖の関係を免疫組織染色によって解析した。その結果、TAM により分節形成が阻害されたストロビラでも、細胞増殖は観察されたことから、TAM は細胞増殖の後のステップに作用することで分節形成を阻害していることが示唆された。

## 第4章

TAM の分節形成阻害活性を利用して、分節形成期ストロビラの transcriptome 解析を行った。正常なストロビラ (口側/ 足側) と分節形成を阻害したストロビラ (口側/ 足側) の4サンプルから mRNA を精製し、次世代シーケンサーを用いた RNA sequencing を行った。ポリプ (whole body) およびストロビラ (whole body) のデータも合わせて assembly を行った結果、合計 181,271 種の転写産物の塩基配列情報が得られ、これらのうち 31,683 種がアミノ酸 100 個以上をコードしていた。ストロビラ の分節形成に関与する遺伝子を抽出するため、発現パターンにより候補遺伝子群を絞り込んだ。

ステージ別の発現量の比較により、ポリプ特異的遺伝子は 5,601 個、ストロビラ特異的遺伝子は 13,206 個、ステージ特異的な発現パターンを示す遺伝子が合計 18,807 個得られた。さらに、ストロビラの部位別で発現量を比較し、ストロビラ特異的配列のうち、8,720 個が正常なストロビラ の分節を含む口側で高発現していることを見出した。これらのうち、TAM の影響を受けず、ストロビラ の

口側で高発現している TAM 非応答性口側特異的配列 5,677 個と、口側で発現が多い配列のうち TAM により発現量が減少する TAM 抑制性口側特異的配列 1,602 個を分節形成に関与する候補遺伝子群とした。

本研究では、第 2 章のストロビラ切断実験の結果から、すでに形成された分節から次の分節が形成される反口側の領域に向かって発信される「分節形成誘導因子」を同定することを目的としている。「分節形成誘導因子」の候補として、分泌タンパク質と低分子性二次代謝産物の検討を行った。分泌タンパク質について解析した結果、TAM 非応答性口側特異的配列 232 個、TAM 抑制性口側特異的配列 58 個が分泌タンパク質と同定された。同定された分泌タンパク質の中に、幅広い動物種において発生や形態形成において重要な役割を果たすことが知られている Wnt、FGF、BMP と相同性を持つ配列が含まれていた。低分子性二次代謝産物の生合成酵素遺伝子のホモログの有無と発現パターンを調べた結果、レチノイドがストロビレーションに関与していることが考えられた。これらの既知のシグナル因子と分節形成の関連を調べるため、各シグナル伝達経路の阻害剤・活性化剤の投与実験を行った。その結果、Wnt シグナル阻害剤を投与した場合、分節の形成が阻害され、分節と次の分節が形成される予定領域で検出された細胞増殖シグナルは少ない傾向が見られた。一方、Wnt シグナル活性化剤の投与により、ポリプおよび分節形成期ストロビラの反口側の領域で細胞増殖が検出された。薬剤非投与個体のこれらの領域では、ほとんど細胞増殖が観察されない。以上の結果から、Wnt シグナルが分節形成における細胞増殖の誘導に関与している可能性が示唆された。FGF シグナル阻害剤を投与した結果、分節形成が阻害され、FGF シグナルが分節形成に関与している可能性が示唆された。BMP シグナル阻害剤を投与した場合、分節形成は阻害されず、エフィラ形態形成の初期段階である触手の退縮が通常よりも早く起きた。そのため、BMP はエフィラ形態形成に関与する可能性が考えられる。レチノイドシグナル阻害剤を投与した結果、レチノイドが分節形成に関与している可能性が示唆された。一方で、遺伝集団によりストロビレーションに対する作用機序に差異がある可能性が考えられる。

## 総括

本研究では、ミズクラゲのストロビレーションについて解析するにあたり、外部形態と内部形態に基づきステージの定義づけを行った。これにより、ストロビレーションの過程が明確になり、各ステージにおける細胞増殖の関連を明らかにすることができたと考えられる。

ストロビレーションにおける分節形成を制御するシグナル因子をコードする遺伝子を得るため、TAM の分節形成阻害活性を利用して、分節形成に関連して発現量が変動する遺伝子群を網羅的に探索した。その結果、分節形成における細胞増殖の誘導に Wnt が関与していることを見出した。これまでに、ストロビレーションにおける分節形成に的を絞った分子レベルの研究はなく、ストロビレーションの分子機構解明のための一端を担うものと考えられる。