

博士論文  
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

2024年3月

広島大学大学院統合生命科学研究科

藤井 夏鈴

# 目次

略語リスト	2
緒言	4
第1章 ミズクラゲのストロビレーションのステージの定義づけ	9
第1節 ストロビレーション中の外部形態変化の観察	10
第2節 ストロビレーション各ステージにおける内部形態の観察	13
第2章 ストロビレーションにおける分節形成の性質	19
第1節 ストロビレーションと細胞増殖の関係	21
第2節 外科的処理による分節形成機構の解析	32
第3章 分節形成阻害物質の探索と特徴付け	35
第4章 transcriptome 解析による分節形成関連遺伝子の探索	44
第1節 次世代シーケンサーを用いた RNA sequencing	45
第2節 分節形成における既知シグナル伝達経路の関与	60
総括	68
総合考察	72
謝辞	79
引用文献	80
図表	90

## 略語リスト

本論文において使用する略号を以下に記載する。

1-AZP	1-azakenpaullone
5MeOIn	5-methoxyindole
aa	amino acid
AcTAM	<i>N</i> -acetyltryptamine
ADH	alcohol dehydrogenase
ALP	alkaline phosphatase
AOX	aldehyde oxidase
ASW	artificial seawater
BCDO1	$\beta$ -carotene 15,15'-dioxygenase
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt
BMP	bone morphogenesis protein
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
COX	cyclooxygenase
CS	cold shock
DEPC	diethylpyrocarbonate
DHRS	dehydrogenase/reductase SDR family member
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
dpp	decapentaplegic
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	ethanol
Exp.	experiment
FGF	fibroblast growth factor
FSW	filtered seawater
HE	hematoxylin-eosin
HRP	horseradish peroxidase

HU	hydroxyurea
MMI	5-methoxy-2-methylindole
mRNA	messenger ribonucleic acid
NBT	nitro blue tetrazolium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NPDepo	Natural Products Depository
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline plus Triton-X
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
RDH	retinol dehydrogenase
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
SDR16C5	all-trans-retinol dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> )
SDS	sodium dodecyl sulfate
TAM	tryptamine
TPM	transcripts per million

## 緒言

### [ミズクラゲの学名]

ミズクラゲは、刺胞動物門鉢虫綱に属し、世界中に広く生息するクラゲである [安田, 2003]。長年、ミズクラゲの学名は *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758) が用いられ、単一種とされてきたが、近年の分子系統学的研究により、多くの隠蔽種が含まれていることが明らかとなった。Dawson ら [2001]によると、*A. aurita* はヨーロッパ周辺に生息する集団であり、日本周辺に生息するミズクラゲは *Aurelia* sp. 1 に分類される。当研究室で用いている広島県呉市倉橋島由来のミズクラゲのポリプクローン系統についても分子系統解析により *Aurelia* sp. 1 であることが確認された [辻田ら, 2015]。近年、*Aurelia* sp. 1 が *Aurelia coerulea* (von Lendenfeld, 1884) であるという論文が発表された [Scorrano *et al.*, 2016]ことから、本研究では日本産ミズクラゲの学名として *Aurelia coerulea* を用いることとする。

### [ミズクラゲのストロビレーション]

ミズクラゲを含む刺胞動物門は約 10,000 種が属する動物門であり、サンゴやイソギンチャクなどの花虫綱 (Anthozoa) と、ヒドラやクラゲ類の 4 綱 (Medusozoa) [十文字クラゲ綱 (Staurozoa)、箱虫綱 (Cubozoa)、鉢虫綱 (Scyphozoa)、ヒドロ虫綱 (Hydrozoa)] からなる [Collins *et al.*, 2006] (Fig.1)。花虫綱や十文字クラゲ綱に属する種が一生を通じて固着生活を送る一方で、箱虫綱、鉢虫綱、ヒドロ虫綱の種の多くは、固着性のポリプ世代と浮遊性のクラゲ世代からなる複雑な生活環を持つ [Ulrich *et al.*, 2015]。

鉢虫綱に属するミズクラゲ *A. coerulea* の生活環は古くから知られており [久米・団, 1957]、受精卵からプラヌラ (planula) →ポリプ (polyp) →ストロビラ (strobila) →エフィラ (ephyra) へと形態を変え、成体クラゲ (メデューサ: medusa) へと成長する (Fig. 2)。ミズクラゲの受精は雌の体内で行われ、発生が進み、繊毛を有したプラヌラになると海水中へと泳ぎ出る。その後、プラヌラは適当な基質に着生し、固着性のポリプに変態する (Fig.4a)。ポリプは足盤 (pedal disc) (Fig.3a) で基質に付着し、出芽や分裂により無性的に増殖する。冬季に海水温が低下すると、ポリプの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 (Fig.4c)。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くびれが形成される (Fig. 4d, e)。その後、触手が退縮し、ストロビラは赤く色づき始める (Fig. 4f)。各分節は8対の縁弁 (marginal lappets) (Fig. 3d) を持ったディスク状になり、クラゲの最初期幼生であるエフィラの形態を形成する (Fig. 4g, h)。エフィラ形態を形成した各分節は、口側から1枚ずつ順に遊離し (Fig. 4i)、浮遊生活を開始する (Fig. 4j)。エフィラ遊離後には、最も反口側のくびれと足盤の間の部分が残体 (residuum) (Fig. 3c) となり、触手と口を再生して再びポリプとなる (Fig. 4k)。このようなポリプからストロビラを経て、クラゲとなる変態様式は鉢虫綱の多くの種で見られ、ストロビレーション (strobilation) と呼ばれる。

### [ポリプ世代からクラゲ世代への変態様式]

ポリプからクラゲへの変態様式はバリエーションに富んでおり、鉢虫綱では、ポリディスクストロビレーション (polydisc strobilation) とモノディスクストロビレーション (monodisc strobilation) の2種類が知られている。ポリディスクストロビレーションでは、ミズクラゲのように、1個体のストロビラから複数のエフィラが遊離する。一方、モノディスクストロビレーションは、タコクラゲ *Mastigias papua* やサカサクラゲの1種 *Cassiopea andromeda*、ナンヨウタコクラゲ *Phyllorhiza punctata*、アマクサクラゲ *Sanderia malayensis* などで見られ、複数の分節を形成せず、1個体のストロビラからは1個体のエフィラが遊離する [Sugiura, 1964; Hofmann *et al.*, 1978; Jufri, 2001; Adler and Jarms, 2009]。モノディスクストロビレーションでも残体ができ、ポリプとして再生する。

箱虫綱に属するミツデリッポウクラゲ *Tripedalia cystophora* の変態では、残体が形成されず、1個体のポリプの組織全てが1個体のクラゲに変態する [Werner *et al.*, 1971]。この変態様式は、完全変態と呼ばれる。一方で、同じ箱虫綱の *Carybdea marsupialis* の変態では、残体が形成され、その残体からポリプが再生された [Straehler-Pohl and Jarms, 2005]。この変態様式は不完全変態と呼ばれる。

ヒドロ虫綱の多くの種では、ポリプは出芽により群体を形成する。成熟したポリプは、クラゲ芽を形成し、これが遊離して浮遊生活へと入り、クラゲとなる [Houliston *et al.*, 2010]。

これらのように、ポリプ世代とクラゲ世代の交代様式は極めて多様である。その中でミズクラゲなどのポリディスクストロビレーションでは、複数の分節

が形成され、各分節が1匹の成体クラゲに成長することで、1匹のストロビラから多数の成体クラゲが生じる点が特徴的である。

長年、ミズクラゲの大量発生により、漁業活動や臨海発電所での取水などに悪影響を与え、社会問題となっている [上・上田, 2004]。ポリディスクストロビレーションでは、変態過程で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、他の変態様式以上に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。ポリディスクストロビレーションのメカニズムを解明することは、大量発生の原因を理解する上でも必要不可欠である。

### [ミズクラゲのストロビレーションに関与する因子]

ミズクラゲのストロビレーションは、(1) ストロビレーションの開始、(2) 分節形成、(3) エフィラ形態形成、(4) エフィラの遊離の4つのステップからなる。

(1) ストロビレーションの開始は、海水温の低下により誘導されることが知られている [Kroiher *et al.*, 2000]。当研究室では、理研・天然化合物バンク Natural Products Depository (NPDepo) [Osada, 2010]の化合物ライブラリーに含まれる化合物をスクリーニングし、indomethacin がストロビレーション開始誘導活性を持つことを見出した [Kuniyoshi *et al.*, 2012]。indomethacin と共通構造を有するインドール化合物について構造活性相関の解析を行い、5-methoxy-2-methylindole (MMI) が indomethacin よりも強いストロビレーション開始誘導活性を持つことが明らかとなった [黒田, 2014; Fuchs *et al.*, 2014; Helm and Dunn 2017]。また、Fuchs らにより 9-*cis*-retinoic acid や CL390 遺伝子由来の heptapeptide (WSRRRWL) が内在性ストロビレーション開始因子として機能することが報告されている。それ以外にも、光条件や給餌、ヨウ素イオン、溶存酸素濃度などもストロビレーションの開始に影響するという報告がある [Sukhoputova and Kraus, 2017]。

(2) 分節形成では、まず触手のすぐ下の位置にくびれが形成され、そのくびれの下に次のくびれができる。くびれとくびれの間領域を分節と呼び、口側から反口側に向かって順にくびれができることで複数の分節が形成される。先行研究 [Tsujita *et al.*, 2017]に従い、本研究ではくびれおよび分節は口側から反口側に向かって数える。最も口側のくびれを「第1くびれ」とし、以下、反口側に向けて「第2くびれ」「第3くびれ」・・・と呼ぶ。第1くびれから口側末端

までの領域を「分節 1」とし、第 1 くびれと第 2 くびれの間を「分節 2」、以下、反口側に向けて「分節 3」「分節 4」・・・と呼ぶ (Fig. 3e)。

くびれは等間隔に形成され、北海 (the North Sea) 由来の *A. aurita* の場合、約 0.18 mm 間隔である [Kroiher *et al.*, 2000]。ストロビレーションにおいて形成される分節の数は決まっておらず、大きなストロビラでは多くの分節が形成され、小さなストロビラでは少ない [Kroiher *et al.*, 2000]。分節の形成は他の動物種にも見られ、古くから研究が行われているのはショウジョウバエの胚発生における分節形成 [Peel *et al.*, 2005]や脊椎動物の体節形成 [Dequeant and Pourquie, 2008]である。これらの動物において、形成される節の数は種によって固有である。しかし、ミズクラゲのストロビラの分節の数は体の大きさなどによって異なり、同じクローン系統の個体でも数個から十数個と幅がある。この点はストロビラの分節形成におけるユニークな特徴である。分節形成に関する分子レベルの知見は極めて乏しく、tryptamine (TAM) や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 [黒田, 2014]。

(3) エフィラ形態形成に関しては、Kraus ら [2015]により、ポリプとエフィラで発生に関する遺伝子マーカーの発現パターンが調べられており、ポリプとエフィラの体制に共通性があることが分かっている。また、最も口側の分節におけるエフィラ形態の形成には、リソソーム加水分解酵素が関与しているという報告もある [Tsujiita *et al.*, 2017]。

ストロビレーションの開始については、indomethacin [Kuniyoshi *et al.*, 2012]などの開始誘導物質が見出され、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[Fuchs *et al.*, 2014]。しかし、ストロビラの「分節形成」に焦点を絞った研究は見当たらず、分節形成を制御する内因性の因子については候補すら不明である。本研究は、ミズクラゲのストロビレーションにおける分節形成を誘導する因子の同定を目指して遂行された。

第 1 章では、形態観察に基づくストロビレーションのステージ分けについて記載する。ストロビレーションにおけるステージを明確にして解析を進めるため、ストロビレーション中の経時的な外部形態の変化を記載し、各ステージを定義した。このステージに従い、内部形態についても組織学的手法を用いて観察を行い、ストロビレーションの各ステージの特徴付けを行った。

第 2 章では、ストロビレーションにおける分節形成の性質を調べるため、ストロビレーションの各ステージにおける細胞増殖の関与について検討した。一

般に、動物の変態において細胞増殖は重要な役割を担っている。ミズクラゲのストロビレーションにおいて、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 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体を用いた免疫組織染色により、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、細胞増殖阻害剤の投与実験を行い、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を調べた。さらに、細胞増殖を検出した結果を踏まえてストロビラの切断実験を行い、分節形成機構の解析を行った。

第3章では、分節形成阻害物質の探索を行い、TAMなどのインドール化合物のストロビレーション阻害活性を定量的に評価した。さらに、TAMの分節形成阻害活性と細胞増殖の関係を抗PCNA抗体を用いた免疫組織染色によって解析した。

第4章では、TAMの分節形成阻害活性を利用したストロビラの transcriptome 解析について述べる。次世代シーケンサーを用いた RNA sequencing により、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) でそれぞれ発現している遺伝子の塩基配列情報を得た。これらの情報を用いて、バイオインフォマティクス解析を行い、遺伝子データセットを構築した。その結果、ストロビラの分節を含む口側で特異的に発現している遺伝子群の中に、他種生物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るシグナル因子が含まれていた。これらの既知シグナル因子について、阻害剤および活性化剤の投与実験により分節形成への影響を検討したので、これについて述べる。

## 第1章 ミズクラゲのストロビレーションのステージの定義づけ

### 序論

ミズクラゲの生活環そのものは古くから知られており [久米ら, 1957]、プラヌラ、ポリプ、ストロビラ、エフィラという各段階を表す名称は広く使われている。しかしながら、ストロビレーションについては、(1) ストロビレーションの開始、(2) 分節形成、(3) エフィラ形態形成、(4) エフィラの遊離のように複数のステップを経てポリプからエフィラへと変化するにもかかわらず、各ステップについて明確な定義はない。

最近の次世代シーケンサーの発展と普及により、ミズクラゲにおいても、ストロビレーション中の各段階において developmental に発現変動する遺伝子の探索が行われている [Fuchs *et al.*, 2014; Brekhman *et al.*, 2015]。しかし、これらについてもステージ分けは各研究者によってなされており、ステージが明確に示されていないことも少なくない。

本章では、形態観察に基づき、ミズクラゲのストロビレーションにおけるステージを定義した。第1節では、ストロビレーション中の外部形態の観察を行った。一般に、ミズクラゲのストロビレーションは、低温刺激 [Kroiher *et al.*, 2000] や indomethacin [Kuniyoshi *et al.*, 2012]、5-methoxy-2-methylindole (MMI) [黒田, 2014; Fuchs *et al.*, 2014; Helm and Dunn 2017] といったインドール化合物によって誘導されることが知られている。本章では、低温刺激により誘導したストロビレーション中の外部形態の変化を記載し、MMI を用いて誘導したストロビレーションと比較した。

第2節では、第1節で記載したストロビレーションのステージに従い、各段階の個体のパラフィン切片を作製して内部形態の変化を観察した。この結果から、ストロビレーションの過程を詳細に記載した。

## 第1節 ストロビレーション中の外部形態変化の観察

### 1-1-1. 目的

ストロビレーション中の経時的な形態変化を記載するため、実体顕微鏡下で外部形態を観察した。

### 1-1-2. 材料と方法

#### 1-1-2A. ポリプの飼育

ミズクラゲのポリプは、広島県倉橋島南部で採集したメスの成体クラゲ由来のクローン系統 *KH1A* 株 [辻田ら, 2015] を用い、9 cm シャーレまたはプラスチックタッパー (6×8×5.5 [cm]: DAISO) 内で 22–25 °C で飼育した。週に 2 度、休眠卵から孵化させた *Artemia* 幼生を給餌し、給餌後 3–5 時間で飼育水を交換した。

ポリプの飼育には、広島大学大学院統合生命科学研究科附属瀬戸内圏ワールド科学教育研究センター 竹原ステーションで調製された濾過海水 (filtered seawater; FSW) を使用した。

生体の観察は、双眼実体顕微鏡 (Stemi 305 CAM: ZEISS) を用いて行い、内蔵カメラで形態を記録した。

#### 1-1-2B. ストロビレーションの誘導

##### ・低温処理 (cold shock; CS)

22–25 °C で飼育したポリプを 10 °C のインキュベーターに移し、6–8 週間培養した。

##### ・MMI 投与

5-methoxy-2-methylindole (MMI: Alfa Aesar) 8.1 mg を dimethyl sulfoxide (DMSO: 関東化学) 1 mL に溶解した stock 溶液 (50 mM) を調製し、-30 °C で保存した。使用時に FSW で 2,500,000 倍希釈して 20 nM に調製した。

22–25 °C で飼育したポリプを、FSW 500  $\mu$ L と一緒に 24 穴マイクロタイタープレート (TPP 製) のウェルに移した。これに 20 nM MMI/ FSW 500  $\mu$ L を加え (MMI 終濃度 10 nM)、23 °C で培養した。ポリプを 24 穴プレートのウェルに移す際は、先端をハサミで切ったチップを装着したピペットマンを用いた。

### 1-1-3. 結果

#### [外部形態の観察]

低温処理 (CS) によりストロビレーションを誘導し、ストロビレーション終了まで 10°C で培養した場合、1 か月以上、形態の変化は見られなかった。CS 後、5–8 週間で触手の下に 1 つ目のくびれができた。1 つ目のくびれの下にさらにくびれができ、約 2 週間かけて口側から反口側に向かって順に複数の分節が形成された。その後、約 2 日で口の周囲の触手が退縮し、さらに約 1 週間で各分節はディスク状になり、エフィラ形態を形成した。各分節は拍動し始め、口側から順にエフィラが遊離した。全てのエフィラが遊離するまでに約 1 週間を要し、足盤側の領域はエフィラにならずに残された。この部分は、残体と呼ばれ、ポリプと似た形態をしていた。

CS によりストロビレーションを誘導し、ストロビレーションが開始し、くびれが 1 個形成されたストロビラ (Fig. 4c) を 23°C で培養した。23°C で培養開始後、72 時間までに分節が形成され (Fig. 4d, e)、触手が退縮し、85–110 時間で各分節はエフィラ形態を形成した (Fig. 4f, g)。23°C で培養開始から 118 時間では、拍動しており (Fig. 4h)、172 時間で全ての分節が遊離し (Fig. 4i, j)、残体が形成された (Fig. 4k)。

MMI 投与によりストロビレーションを誘導した場合、MMI 投与から 24–48 時間で 1 つ目のくびれができ (Fig. 5c)、ストロビレーションが開始した。MMI 投与から 48–72 時間で口側から順に複数の分節が形成された (Fig. 5d, e)。MMI 投与から 72–104 時間で口の周囲の触手が退縮し (Fig. 5f)、各分節がエフィラ形態を形成した (Fig. 5g)。MMI 投与から 125 時間では各分節は拍動しており (Fig. 5h)、144 時間で第 1 分節がエフィラとして遊離した (Fig. 5i)。MMI 投与から 176 時間で全ての分節が遊離し (Fig. 5j)、残体が形成された (Fig. 5k)。

### 1-1-4. 考察

#### [ストロビレーションのステージ分け]

CS によってストロビレーションを誘導し、10°C で培養した場合、ポリプからエフィラに至るまでに外部形態は以下のように変化することが明らかとなっ

た。

- ① 10°Cで培養開始後、1か月以上、外部形態の変化は観察されない。
- ② ポリプの触手のすぐ下に1つ目のくびれができる。
- ③ 1つ目のくびれの下にさらにくびれができる。
- ④ ③を繰り返して、口側から反口側に向かって順に分節が形成される。
- ⑤ 口側の分節から赤く色づき、触手が退縮する。
- ⑥ 各分節が弁を形成し、エフィラの形態となる。
- ⑦ 各分節が拍動を始める。
- ⑧ 口側から順にエフィラが遊離する。
- ⑨ 全てのエフィラが遊離し、残体が形成される。

以上の知見から、本研究では、1つ目のくびれの形成 (Fig. 4c) をストロビレーションの開始と定義し、ストロビレーションを誘導してから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 (prestorobila) (①; Fig. 4b) と呼ぶこととした。ストロビレーションの前半 (②–④) 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 (Fig. 4c-e) であり、分節形成期 (segmentation phase) と定義した。ストロビレーションの後半 (⑤–⑦) の各分節がエフィラ形態を形成する段階をエフィラ形態形成期 (ephyra morphogenesis phase) と定義し、触手退縮中をエフィラ形態形成初期 (⑦; Fig. 4f)、触手退縮後、各分節が弁を形成している段階をエフィラ形態形成中期 (⑧; Fig. 4g)、各分節が拍動している段階をエフィラ形態形成後期 (⑨; Fig. 4h) とした。ストロビレーションの最終段階 (⑧–⑨; Fig. 4i) は、各分節がエフィラとして遊離する段階であり、エフィラ遊離期 (ephyra detachment phase) とし、全てのエフィラが遊離した時点をストロビレーションの終了と定義した。以後、これらのステージを用いることとする。

CSによりストロビレーションを誘導した分節形成期ストロビラ (くびれ1個) を23°Cで培養した場合とMMI投与によりストロビレーションを誘導した場合のいずれも、ストロビレーションの進行に要する時間には培養温度により違いがあるものの、CSでストロビレーションを誘導し、ストロビレーション終了まで10°Cで培養した場合と同じステップを経て、正常にポリプからエフィラまで変態することを確認した。

## 第2節 ストロビレーション各ステージにおける内部形態の観察

### 1-2-1. 目的

ストロビレーションの各ステージの内部形態を記載するため、パラフィン切片を作製し、各種組織化学染色を行った。

### 1-2-2. 材料と方法

#### 1-2-2A. 生物材料

ポリプの飼育は、1-1-2A.と同様に行った。ストロビラおよびエフィラは、低温処理 (CS) によりストロビレーションを誘導した個体を用いた。

#### 1-2-2B. 固定・切片作製

ポリプ/ストロビラを小ガラス瓶に FSW と一緒に移した。FSW を取り除き、0.17 M MgCl<sub>2</sub> 溶液を入れて5分間静置し、麻酔処理をした。0.17 M MgCl<sub>2</sub> 溶液を取り除き、4 % formaldehyde/ 人工海水 (artificial seawater; ASW: 日本海水) を加え、室温で60分間静置した。

4 % formaldehyde/ ASW を取り除き、ASW を加えて氷上に30分間静置した。ASW を取り除き、25 % EtOH/ ASW を加えて氷上に30分間静置した。同様に、50 % EtOH/ ASW、75 % EtOH/ ASW、80 % EtOH/ ASW 中で各30分間氷上で静置し、組織の脱水を行なった。その後、80 % EtOH/ ASW を取り除き、80 % EtOH/ H<sub>2</sub>O を加えて室温で一晩静置した。これ以降の行程は特に断りがない限り全て室温で行なった。80 % EtOH/ H<sub>2</sub>O を取り除き、90 % EtOH/ H<sub>2</sub>O を加えて60分間静置し、90 % EtOH/ H<sub>2</sub>O を取り除いて95 % EtOH/ H<sub>2</sub>O を加えて一晩静置した。95 % EtOH/ H<sub>2</sub>O を取り除いて、99.5 % EtOH を加えて60分間静置し、99.5 % EtOH を新しく入れ換えて再度60分間静置した。99.5 % EtOH を取り除いて、xylene を加えて30分間静置した。xylene を新しく入れ換え、30分間静置した。再度 xylene を新しく入れ換え、さらに30分間静置した。

xylene 中から固定サンプルを取り出し、80 °C で融かしたパラフィンを入れた金属製の小皿に入れ、80 °C で90分間静置した。パラフィンを新しく入れ換え、さらに80 °C で90分間静置した。

その後、固定サンプルをパラフィンと一緒に UV レジン用シリコンソフトモ

ールド (DAISO) に入れ、1 個体ずつ包埋してパラフィンブロックを作成した。ブロックをパラフィンで木片に接着し、microtome blade (A35: FEATHER) を取り付けた回転式マイクロトーム (OSK97LF506: 小川精機株式会社) を用いて 5  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切した。組織切片は MAS コートスライドガラス (MAS-05: MATSUNAMI) に載せた。切片を乗せたスライドガラスを染色バスケットに入れ、脱水 xylene 2 分  $\times$  2、脱水 EtOH 30 秒、90 % EtOH 30 秒、80 % EtOH 30 秒、70 % EtOH 30 秒浸して脱パラフィンを行い、以後の染色に用いた。脱パラフィンに用いた脱水 EtOH 及び脱水 xylene は Molecular Sieves 3A 1/16 を加えて脱水処理をした。

### 1-2-2C. hematoxylin-eosin (HE) 染色

脱パラフィンした切片標本を流水で 5 分間洗浄後、eosin Y 溶液 (武藤化学) で 1 分間染色した。再度、流水で 5 分間洗浄後、Mayer の hematoxylin 溶液で 5 分間染色した。流水で 5 分間洗浄し、スライドガラスを染色バスケットに入れ、脱水 EtOH  $\times$  2、脱水 xylene  $\times$  3 の入った染色バットに順に浸した。

その後、Multi Mount 480 (MATSUNAMI) を用いて封入し、カバーガラス (NEO MICRO COVER GLASS NO1 : MATSUNAMI) をかけ、USB 接続式顕微鏡アダプタ (3R-DMKC01: 3R SOLUTION) を接続した顕微鏡 (ALPHAPHOT YS microscope: Nikon) 下で観察した。

### 1-2-2D. 内在性 alkaline phosphatase (ALP) 活性染色

脱パラフィンした切片標本を phosphate buffered saline plus Triton-X (PBST; 10 mM phosphate buffer [pH 7.5], 0.15 M NaCl, 0.1% [v/v] Triton-X 100) で 3 回、1M Tris-HCl (pH9.5) で 1 回洗浄後、ALP 発色液 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate *p*-toluidine salt (BCIP) 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , nitro blue tetrazolium (NBT) 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1M Tris-HCl (pH9.5)) を滴下し、顕微鏡で適宜観察しながら暗所で約 15 分間反応させた。反応を停止させるため超純水にスライドガラスを浸した。その後、スライドガラスを染色バスケットに入れ、脱水 EtOH  $\times$  2、脱水 xylene  $\times$  3 の入った染色バットに順に浸した。

Multi Mount 480 (MATSUNAMI) を用いて封入し、カバーガラス (NEO MICRO COVER GLASS NO1 : MATSUNAMI) をかけ、USB 接続式顕微鏡アダプタ (3R-DMKC01: 3R SOLUTION) を接続した顕微鏡 (ALPHAPHOT YS microscope: Nikon) 下で観察した。

### 1-2-3. 結果

#### [内部形態の観察]

ミズクラゲのストロビレーション中の内部形態の変化を観察するため、ポリプおよびプレストロビラ、分節形成期ストロビラ、エフィラ形態形成期ストロビラ、エフィラ遊離期ストロビラ、エフィラのパラフィン切片を作製し、HE染色および内在性 ALP 活性染色による内胚葉特異的染色を行った。本実験で用いたストロビラは、低温処理 (CS) で誘導した。

#### 【ポリプ】

23 °C で飼育したポリプの縦断切片および横断切片を作製し、ストロビレーション開始前の内部形態を観察した。縦断切片では、ポリプは二層の上皮細胞層からなる袋状の構造であり、内部には消化器官である胃腔 (gastric cavity) を確認できた (Fig. 6a, j)。内在性 ALP 活性染色により、上皮細胞層は染色された内胚葉性上皮細胞層と染色されない外胚葉性上皮細胞層の二層構造であることを確認した (Fig. 7a)。横断切片でも、二層の上皮細胞層とその間に中膠 (mesoglea: ゼラチン様間充ゲル層) が観察できた (Fig. 6b)。また、胃腔には隔壁 (septum: 胃腔を仕切る膜) が突出していることも確認できた (Fig. 6b, 7b)。

#### 【プレストロビラ】

CS でストロビレーションを誘導し、ストロビレーション開始前のプレストロビラの縦断切片を作製した。同じ期間 10°C で培養した同一シャーレ内の個体の中には、すでにストロビレーションを開始している個体もあり、まだくびれが形成されていない個体はストロビレーション開始直前のプレストロビラであると考えられる。

プレストロビラの縦断切片でも胃腔が確認できた (Fig. 6c)。上皮細胞は外胚葉層と内胚葉層の二層からなっており (Fig. 6k, 7c)、ポリプとの形態的な差は観察されなかった。

#### 【分節形成期ストロビラ】

CS によりストロビレーションが開始した分節形成期ストロビラの縦断切片を作製した。固定した時点で 4 個の分節が形成されており、パラフィン切片上でも 4 個の分節が確認できた (Fig. 6d)。この段階でも口側から反口側まで連続

した胃腔が確認でき、袋状の構造が維持されていた (Fig. 6d)。内在性 ALP 活性染色による内胚葉特異的染色の結果、分節のくびれの部分は、外胚葉・内胚葉上皮細胞層が二層構造を保ったまま胃腔側へ陥入することで形成されていた (Fig. 6l, 7d)。

#### 【エフィラ形態形成期ストロビラ】

エフィラ形態形成期 (初期、中期、後期) ストロビラの縦断切片を作製した。エフィラ形態形成初期ストロビラは、固定した時点で9個の分節が形成されており、パラフィン切片上でも9個の分節が確認できた (Fig. 6e)。分節形成期と比べてくびれの陥入が深くなっているが、目立った内部形態の違いは観察されなかった。また、上皮細胞層は二層構造を保っていた (Fig. 6m, 7e)。エフィラ形態形成中期ストロビラは、固定した時点で9個の分節が形成されており、パラフィン切片上でも9個の分節が確認できた (Fig. 6f)。エフィラ形態を形成するため、各分節は分節形成期と比べて薄くなっていた (Fig. 6n)。くびれの陥入がさらに深くなっていたが、口側から反口側まで連続した胃腔が確認できた (Fig. 7f)。エフィラ形態形成後期ストロビラは、固定した時点で6個の分節が形成されており、パラフィン切片上でも6個の分節が確認できた (Fig. 6g)。各分節はさらに薄くなり、エフィラの感覚器 (rhopalia) が形成される部分 (縁弁先端の二又部分の間) に細胞核が密集していることが観察された (Fig. 6o)。一方で、この段階でも反口側の分節の胃腔は分節ごとに分割されていないことを観察した (Fig. 7g)。

#### 【エフィラ遊離期ストロビラ】

エフィラ遊離期ストロビラの縦断切片を作製した。固定した時点で、形成された分節6個のうち、口側4個が遊離していた。エフィラ遊離期では、陥入した上皮細胞層が融合しており (Fig. 6h)、胃腔は分節ごとに分割されていた (Fig. 6p, 7h)。

#### 【エフィラ】

エフィラの縦断切片を作製した (Fig. 6i)。エフィラも上皮細胞は外胚葉層と内胚葉層の二層からなっているが、縁弁の先端部分は外胚葉層のみであった (Fig. 7i)。ポリプや分節形成期ストロビラと比べると、上皮細胞の厚みは薄く、中膠の部分も薄いことが観察された (Fig. 6q)。

#### 1-2-4. 考察

刺胞動物は、外胚葉性上皮細胞層と内胚葉性上皮細胞層から構成される二胚葉性動物である。その2層の細胞層の間にゼラチン様間充ゲル層である中膠がある。ポリプは足盤で基質に付着し、上端が口である。肛門はなく、袋状の構造をしている。ポリプを倒立させた形がクラゲであり、やはり肛門はなく、ポリプと同様に袋状構造である。

ポリプの内部形態観察では、すでに報告 [安田, 2003] されている通り、胃腔、隔壁、外胚葉性上皮細胞層、内胚葉性上皮細胞層、中膠を確認できた (Fig. 6a, b, j, 7a, b)。

プレストロビラでは、ポリプと比較して外部形態に目立った変化は見られなかった (Fig. 4a vs 4b)。組織化学染色による内部形態観察においてもポリプとの差異は見当たらず、著しい形態的变化は起きていないと考えられる (Fig. 6a vs 6c)。

分節形成期ストロビラの内部構造観察により、分節間のくびれは、上皮細胞層が外胚葉・内胚葉の二層構造を保ったまま (Fig. 7d)、胃腔側へ陥入して形成されていることが明らかとなった (Fig. 6d)。このことから、上皮細胞層の陥入が口側から反口側に向かって順に等間隔で起こることで分節構造が形成されると考えられる。

エフィラ形態形成初期および中期ストロビラでは、次第に分節間のくびれは深くなっているものの (Fig. 6e, f)、この時点でも胃腔は口側から足盤部までつながっていた (Fig. 7e, f)。2層の上皮細胞層は口側から反口側まで連続しており、ポリプの袋状構造を維持していることが分かった (Fig. 6e, f)。エフィラ形態形成期には、ストロビラの各分節の厚みが薄くなって8つの縁弁が形成される (Fig. 4g, h)。パラフィン切片上でも、各分節の厚みが薄くなっていることが観察できた (Fig. 6e-g)。

エフィラ形態形成後期ストロビラでは、反口側の分節では胃腔は分節ごとに分割されていないことを観察した (Fig. 6g, 7g)。エフィラ遊離期では、陥入した上皮細胞層が融合していた (Fig. 6h, 7h)。このことから、エフィラ形態形成後期からエフィラ遊離期の間には上皮細胞層が融合して胃腔が分割され、上皮細胞層の切離が起こることで、エフィラが遊離すると考えられる。

エフィラの切片では、上皮細胞の厚みは薄く、中膠の部分も薄いことが観察

された (Fig. 6i)。しかし、成体クラゲでは、中膠が非常に発達して厚い[柿沼, 1988]。エフィラから成体クラゲになる過程で、8つの縁弁の間が肥厚し、円形に変化していくこと[安田, 2003]から、この間に中膠も発達すると考えられる。

以上の結果から、ストロビレーションの各ステージにおいて内部形態は以下のように変化すると考えられる。

**【プレストロビラ】** 外部形態と同様に、内部形態の変化も観察されない。

**【分節形成期】** ストロビレーションが開始すると、上皮細胞層は外胚葉細胞層と内胚葉性細胞層の二層構造を保ったまま、触手のすぐ下の位置で胃腔側へ陥入し、第1くびれを形成する。その分節の下に一定の間隔を空けて、上皮細胞層が陥入して第2くびれができ、分節2を形成する。これを繰り返して口側から反口側に向かって1つずつ順にくびれができ、最終的に複数の分節が形成される。

**【エフィラ形態形成期】** 各分節の厚みが薄くなり、縁弁や感覚器などのエフィラ形態を形成する。この段階でも、胃腔は口側から反口側まで連続した形態を維持している。

**【エフィラ遊離期】** 陥入した上皮細胞層が融合し、胃腔が分割される。

## 第2章 ストロビレーションにおける分節形成の性質

### 序論

細胞増殖は、一般に動物の変態において重要な役割を果たす。例えば、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の蛹期には、翅の形成において細胞増殖が関与している [Milan *et al.*, 1996]。ツメガエル *Xenopus laevis* などの両生類では、変態の過程で消化管の上皮細胞が幼生型から成体型に置き換わる。変態の前後では、細胞死 (アポトーシス) や細胞増殖はほとんど検出されないが、変態が開始すると幼生型上皮細胞でのアポトーシスが急増し、成体型上皮細胞で細胞増殖が盛んに起きる [Ishizuya and Ueda, 1996]。

刺胞動物においても細胞増殖は変態に関与している。完全変態を行う箱虫綱の *Tripedalia cystophora* のポリプでは、変態が開始すると触手とその周辺や口の周囲で細胞増殖が起こる。その後、ポリプの触手が分解され始めると、触手では細胞増殖が見られなくなる。変態後期には、新たに形成されるクラゲの触手、感覚器が形成される領域 (触手のつけ根部分)、環状神経が形成される口の周囲などで細胞増殖が起こる。同じ箱虫綱の *Alatina moseri* でも同様の細胞増殖パターンが観察されている [Gurska and Garm, 2014]。ヒドロ虫綱のエダアシクラゲ *Cladonema pacifica* では、クラゲ芽から遊離した若いクラゲの触手のつけ根や傘 (umbrella)、口柄 (manubrium) の部分で細胞増殖が起こる [Fujita *et al.*, 2019]。ヒドロ虫綱のウミヒドラ *Hydractinia echinata* のプラヌラからポリプの変態においては、細胞増殖は胃域 (gastric region) と基部で起きており、触手や走根 (stolone) では検出されない [Plickert *et al.*, 1988]。

ミズクラゲにおいては、ポリプからプラヌラへの着生変態について調べられている。プラヌラでは後極 (posterior pole; ポリプの口になる部分) で細胞増殖が起きている。プラヌラが着生し、ポリプの口が形成されると、細胞増殖が検出される領域が反口側に移動していく [Gold *et al.*, 2016]。このことから、ミズクラゲのプラヌラからポリプへの着生変態では、細胞増殖の関与が予想される。Balcer and Black ら [1991]の報告では、<sup>3</sup>H-labeled thymidine を用いて *Aurelia* のストロビレーション中の細胞増殖が検出された。また、細胞増殖阻害剤 hydroxyurea (HU) がストロビレーションを阻害することも報告されている。しかし、先行研究においてはストロビレーションの過程が明確に定義されていないため、ストロビレーション中の各ステージにおける細胞増殖の役割については

不明である。

本章第1節では、第1章で定義したストロビレーションの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、免疫組織化学的手法を用いてポリプ/ストロビラの細胞増殖を検出した。また、細胞増殖阻害剤の投与実験を行い、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を調べた。

第2節では、第1節の結果を踏まえてストロビラの切断実験を行い、すでに形成された分節および次の分節が形成される予定領域の分節形成における役割を調べた。

## 第1節 ストロビレーションと細胞増殖の関係

### 2-1-1. 目的

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) labeling および抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体を用いた免疫組織染色により、ストロビレーションの各ステージでの細胞増殖を検出した。また、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を調べるため、細胞増殖阻害剤をポリプ/ストロビラに投与した。

### 2-1-2. 材料と方法

#### 2-1-2A. 各ステージの個体の BrdU labeling

BrdU labeling に用いるポリプ/ストロビラは、以下のように調製した。

- ・ポリプ

23 °C で飼育し、1 週間以上絶食したものをシャーレから集めた。

- ・プレストロビラおよび分節形成期ストロビラ

10 °C で 38–50 日間培養したシャーレから集めた。

- ・エフィラ形態形成期ストロビラ

10 °C で 64 日間培養したシャーレからを集めた。

ポリプ/ストロビラを FSW 500  $\mu$ L と一緒に 24 穴マイクロタイタープレート  
のウェルに移した。20 mM BrdU (Cayman Chemical) / FSW を 500  $\mu$ L 加え (BrdU  
終濃度 10 mM)、ポリプは 48 時間、プレストロビラとストロビラは 24 時間 23  
°C のインキュベーター内で培養した (Fig. 8)。培養後、ポリプ/ストロビラを小  
ガラス瓶に FSW と一緒に移し、1-2-2B.と同様の方法で固定した後、切片標本  
を作製した。

切片標本を脱パラフィンした後、PBST で 3 回洗浄した。2 M HCl をスライ  
ドガラス上に滴下し、パラフィルムを被せて湿箱中で室温で 10 分間インキュ  
ベートした。パラフィルムを剥がし、PBST で 3 回洗浄後、blocking solution  
(1% [w/v] bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) , and 2% [v/v] normal sheep serum  
(CHEMICON) , PBST) をスライドガラス上に滴下し、新しいパラフィルムを被  
せて湿箱中で室温で 30 分間インキュベートした。スライドガラス上の blocking  
solution を捨て、blocking solution で 500 倍希釈した rabbit anti-BrdU polyclonal

antibody (Gene Tex) をスライドガラス上に滴下し、新しいパラフィルムを被せて湿箱中で室温で3時間インキュベートした。PBSTで3回洗浄後、blocking solution で1000倍希釈した goat ALP-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Sigma-Aldrich) をスライドガラス上に滴下し、新しいパラフィルムを被せて湿箱中で室温で1時間インキュベートした。PBSTで3回、1M Tris-HCl (pH9.5) で1回洗浄後、内在性のALPを失活させるため、levamisole 溶液 (2 mM levamisole hydrochloride, 1 M Tris-HCl (pH 9.5)) を滴下し、パラフィルムを被せて湿箱中で室温で15分間インキュベートした。スライドガラス上の液を捨て、ALP 発色液 (125 µg/mL BCIP, 250 µg/mL NBT, 1 mM levamisole hydrochloride, 1 M Tris-HCl (pH 9.5)) を滴下し、顕微鏡で適宜観察しながら暗所で約15分間反応させた。反応を停止させるため超純水にスライドガラスを浸した。スライドガラスを染色バスケットに入れ、脱水 EtOH 30秒 × 2、脱水 xylene 1分 × 3 の入った染色バットに順に浸した。

その後、Multi Mount 480 (MATSUNAMI) を用いて封入し、カバーガラス (NEO MICRO COVER GLASS NO1 : MATSUNAMI) をかけ、USB 接続式顕微鏡アダプタ (3R-DMKC01, 3R SOLUTION) を接続した顕微鏡 (ALPHAPHOT YS microscope; Nikon) 下で観察した。

#### 2-1-2B. 抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色

ポリプおよび低温処理 (CS) で誘導したストロビラを、1-2-2B.と同様の方法で固定した後、切片標本作製した。

切片標本を脱パラフィンした後、流水で5分間洗浄後、phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した。スライドガラスを10 mM クエン酸バッファー (pH 6.0) に浸し、121°C 1分間のオートクレーブ処理により抗原を賦活化した。PBSで洗浄後、PBSで300倍希釈した rabbit anti-PCNA polyclonal antibody (Gene Tex) をスライドガラス上に滴下し、湿箱中で4°Cで一晩 (約16時間) インキュベートした。PBSで2回洗浄後、ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI) (ニチレイバイオサイエンス) をスライドガラス上に滴下し、湿箱中で室温で1時間インキュベートした。PBSで2回洗浄後、DAB Substrate (TaKaRa) を滴下し、顕微鏡で適宜観察しながら約5分間反応させた。反応を停止させるため超純水にスライドガラスを浸した。スライドガラスを染色バスケットに入れ、脱水 EtOH 30秒 × 2、脱水 xylene 1分 × 3 の入った染色バットに順に浸した。

その後、Multi Mount 480 (MATSUNAMI) を用いて封入し、カバーガラス (NEO MICRO COVER GLASS NO1 : MATSUNAMI) をかけ、USB 接続式顕微鏡アダプタ (3R-DMKC01, 3R SOLUTION) を接続した顕微鏡 (ALPHAPHOT YS microscope; Nikon) 下で観察した。

### 2-1-2C. 時間差投与アッセイ

23 °Cで飼育したポリプ 1 個体を、FSW 500  $\mu$ L と一緒に 24 穴マイクロタイタープレートのウェルに移した。20 nM MMI/ FSW を 500  $\mu$ L ずつポリプの入ったウェルに加えた (MMI 終濃度 10 nM)。Fig. 12 に示した hydroxyurea (HU: Wako) の投与スケジュールに従い、200 mM HU をそれぞれのウェルに 50  $\mu$ L 加えた (HU 終濃度 10 mM)。MMI 投与と同時に HU を加えた実験群を Exp. A とした。MMI 投与から 24 時間後、48 時間後、72 時間後に HU を投与した実験群をそれぞれ Exp. B、Exp. C、Exp. D とした。HU を加えない実験群を control とした。MMI 投与から 10 日間 23 °Cで培養し、双眼実体顕微鏡 (Stemi 305 CAM) を用いて外部形態と分節の数を毎日観察した。

Exp. C における HU 投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) は、以下の式により計算した。

$$\Delta\text{segment} = (\text{number of segments at 10 days after MMI administration}) \\ - (\text{number of segments at 48 h after MMI administration})$$

分節の数および分節数の増加 ( $\Delta$ segment) の検定には Mann-Whitney *U* test を用い、Bonferroni 法による補正を行った。

また、外部形態で異常を示した個体については、固定した後、切片標本作製し (1-2-2B.)、HE 染色 (1-2-2C.) によって内部形態を観察した。

### 2-1-2D. CS 誘導ストロビラのステージ別アッセイ

CS で誘導したプレストロビラ/ 分節形成期ストロビラ/ エフィラ形態形成初期ストロビラ 1 個体を、ASW 500  $\mu$ L と一緒に 24 穴マイクロタイタープレート (TPP 製) のウェルに移した。20 mM HU を含む ASW 500  $\mu$ L をストロビラの入ったウェルに投与した (HU 終濃度 10 mM)。HU を含まない ASW 中で培養した実験群を control とした。23 °Cで培養し、control 群の個体のエフィラが全て遊離するまで外部形態と分節の数を毎日観察した。試料物質投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) は、2-1-2C.と同様に計算した。

分節の数および分節数の増加 ( $\Delta$  segment) の検定には Mann-Whitney  $U$  test (Bonferroni 法による補正) を用いた。

### 2-1-3. 結果

#### [BrdU labeling]

BrdU labeling は細胞増殖を可視化する実験法の 1 つである。BrdU は thymidine のアナログであり、細胞周期 S 期の DNA 複製の際に thymidine の代わりに DNA に取り込まれる。これを抗 BrdU 抗体で染色することで、BrdU 培養中に分裂した細胞の核を可視化できる [Gratzner *et al.*, 1975]。

ストロビレーション中の細胞増殖を検出するため、ポリプおよび各ステージのストロビラについて BrdU labeling を実施した。具体的には、ポリプは 23 °C で 48 時間、プレストロビラ、分節形成期ストロビラ、エフィラ形態形成期ストロビラのそれぞれを 23 °C で 24 時間、BrdU を含む海水中で培養し、固定後パラフィン切片を作製し、抗 BrdU 抗体で染色した (Fig. 8)。

#### 【ポリプ】

BrdU 培養中に、ポリプの出芽は観察されず、形態的な変化は見られなかった。BrdU を取り込ませたポリプの縦断切片では、ポリプの胴体部分にシグナルはほとんど観察されなかった (Fig. 9a)。

#### 【プレストロビラ】

BrdU 培養中に、プレストロビラの形態的な変化は見られなかった。BrdU を取り込ませたプレストロビラの縦断切片では、シグナルは触手の直下で観察されたが (Fig. 9b, e)、反口側では、シグナルが観察されなかった。

#### 【分節形成期ストロビラ】

BrdU 培養中に、2-3 個の分節が新たに形成された (Fig. 9c 実線括弧)。BrdU を取り込ませた分節形成期ストロビラの縦断切片では、BrdU 取り込み前にすでに形成されていた分節 (Fig. 9c 破線括弧) と、BrdU 取り込み中に形成された分節 (Fig. 9c 実線括弧) の両方でシグナルが観察された。さらに、最も反口側のくびれの下側、すなわち次の分節が形成される予定領域 (Fig. 9c 点線括弧) でもシグナルが見られた。一方で、反口側ではほとんどシグナルは検出されな

かった。細胞増殖は外胚葉性上皮細胞層と内胚葉性上皮細胞層の両方で観察された (Fig. 9f)。

#### 【エフィラ形態形成期ストロビラ】

BrdU 取り込み中に、新たな分節は形成されず、エフィラ形態形成初期から中期に移行した。BrdU を取り込ませたエフィラ形態形成期ストロビラの縦断切片では、全ての分節でシグナルが検出された (Fig. 9d)。細胞増殖は外胚葉層と内胚葉層の両方で観察された (Fig. 9g)。

#### [抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色]

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) は、細胞増殖マーカーとして利用されている。第 4 章で行った transcriptome 解析の結果、ミズクラゲにおいても *Homo sapiens* PCNA (accession number: NP\_002583.1) と 62% の相同性を持つ配列 (comp97985\_c0\_seq3.p1) が得られた (Fig. 10, Table 1)。

BrdU labeling と同様に、ポリプおよび各ステージのストロビラのパラフィン切片を用いて、抗 PCNA 抗体による細胞増殖の検出を行った。

#### 【ポリプ】

15 日間絶食をしたポリプを固定し、パラフィン切片を作製した。免疫染色の結果 (Fig. 11a)、ポリプの胴体部分の内胚葉層ではシグナルが検出されたが、外胚葉層ではほとんど観察されなかった (Fig. 11e, i)。

#### 【プレストロビラ】

プレストロビラの縦断切片では、シグナルは胴体の口側の領域で観察されたが、反口側ではほとんどシグナルが観察されなかった (Fig. 11b)。口側の領域では、外胚葉層・内胚葉層ともにシグナルが検出された (Fig. 11f, j)。

#### 【分節形成期ストロビラ】

分節が 4 個形成された分節形成期ストロビラを固定し、パラフィン切片を作製した。免疫染色の結果 (Fig. 11c)、すでに形成された分節および次の分節が形成される予定領域でシグナルが見られた。一方で、反口側ではほとんどシグナルは検出されなかった。細胞増殖は外胚葉層と内胚葉層の両方で観察され、ほとんどの細胞核が染色されていた (Fig. 11g, k)。

### 【エフィラ形態形成期ストロビラ】

分節が9個形成されたエフィラ形態形成中期ストロビラを固定し、パラフィン切片を作製した。免疫染色の結果、全ての分節でシグナルが検出された (Fig. 11d)。シグナルは、外胚葉層と内胚葉層の両方で観察された (Fig. 11h, l)。内胚葉層ではほとんどの細胞核が染色されていたが、外胚葉層の中膠側の一部では染色されていない細胞核が見られた (Fig. 11h, l 点線部分)。

### [細胞増殖阻害剤の投与実験]

ストロビレーションへの細胞増殖の関与を調べるため、細胞増殖阻害剤 HU [Sinclair, 1965] をポリプおよびストロビレーションの各ステージのストロビラに投与した。ストロビレーションは、MMI の投与により誘導した。Fig. 12 に示した HU の投与スケジュールに従い、MMI 投与から 0 時間後 (Exp. A)、24 時間後 (Exp. B)、48 時間後 (Exp. C)、72 時間後 (Exp. D) に HU を投与した。

HU を投与しない control 群では ( $n = 12$ )、MMI 投与から 24–48 時間後に第 1 くびれができてストロビレーションを開始した。分節の形成が進行し (分節形成期)、MMI 投与から 72 時間で口の周囲の触手が退縮し始めた (エフィラ形態形成初期)。MMI 投与から 140 時間程度で各分節がエフィラ形態を形成し (エフィラ形態形成中期)、6–15 個体のエフィラが遊離した (エフィラ遊離期)。

Exp. A ( $n = 6$ ) では、ポリプに MMI と HU を同時に投与した。10 日間の観察中にストロビレーションは開始せず、分節の数は 0 であった ( $p < 0.01$  vs control, Mann-Whitney  $U$  test with Bonferroni correction) (Fig. 13a; Exp. A)。観察 10 日目まで全ての個体で外部形態の異常は見られなかった (Fig. 14a)。

Exp. B ( $n = 6$ ) では、MMI 投与から 24 時間後のプレストロビラに HU を投与した。10 日間の観察中にストロビレーションは開始せず、分節の数は 0 であった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 13a; Exp. B)。胴体部中央にくびれのようなものができたが (Fig. 14b)、正常なストロビラの分節と比べると間隔が広く、さらなるくびれは形成されなかったため、これはストロビラのくびれではないと判断した。

Exp. C ( $n = 5$ ) では、MMI 投与から 48 時間後に分節が 2–4 個形成された分節形成期ストロビラに HU を投与した。10 日間の観察中に形成された分節の数は control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.05$  vs control) (Fig. 13a; Exp. C)。HU

投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) についても、control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 13b)。

この群では全ての個体で奇形が見られ、胴体が部分的に膨張する形態異常が見られた (Fig. 14c)。形態異常を生じた個体のパラフィン切片を作製し、HE 染色した結果、外胚葉性上皮細胞層と内胚葉性上皮細胞層の間の部分である中膠が、正常な分節形成期ストロビラと比べて著しく肥大していた (Fig. 14h)。また、全ての個体がエフィラ形態形成期には移行しなかった。

Exp. D ( $n = 6$ ) では、MMI 投与から 72 時間後にエフィラ形態形成初期のストロビラに HU を投与した。HU 投与後、2-7 個の分節が増加し、10 日間の観察中に形成された分節の数は control 群と比べて有意な差は見られなかった (Fig. 13a; Exp. D)。この群の全ての個体がエフィラ形態形成初期から中期に移行したが、エフィラ形態に変化した分節は形態異常を生じた (Fig. 14d)。これらのストロビラから遊離したエフィラにも形態異常が見られ、膨らみが生じており、正常なエフィラより小さい傾向が見られた (Fig. 14e)。形態異常を生じたエフィラのパラフィン切片を作製し、HE 染色を行った。その結果、Exp. C の分節形成期ストロビラで観察されたのと同様に、正常なエフィラ (Fig. 6i) と比べて中膠が肥大していた (Fig. 14i, j)。

低温処理により誘導したストロビラでも、HU によりストロビレーションが阻害されるか確認するため、CS 誘導ストロビラを用いてアッセイを行った。

分節形成前のプレストロビラを  $10^{\circ}\text{C}$  で 39 日間培養したシャーレから集め、HU を投与しない群を control 群とした。control 群 ( $n = 6$ ) では、1 個体を除きストロビレーションを開始し、3-6 個の分節が形成され、エフィラとして遊離した。低温処理で誘導したプレストロビラに HU を投与した場合、8 日間の観察中にストロビレーションは開始せず、分節の数は 0 であった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 15a)。

分節が 1-3 個形成された分節形成期ストロビラを  $10^{\circ}\text{C}$  で 39 日間培養したシャーレから集め、HU を投与しない群を control 群とした。control 群 ( $n = 6$ ) では、全ての個体で分節形成が進行し、6-11 個の分節が形成され、エフィラとして遊離した。低温処理で誘導した分節形成期ストロビラに HU を投与した場合、8 日間の観察中に形成された分節の数は control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 15b)。HU 投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) についても、control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 15d)。

MMI でストロビレーションを誘導した分節形成期ストロビラ (Fig.14c) と同様に、HU 投与により胴体が部分的に膨張する形態異常が生じた (Fig. 14f)。

触手退縮中のエフィラ形態形成初期ストロビラを 10°C で 60 日間培養したシャーレから集め、HU を投与しない群を control 群とした。control 群 (n = 6) では、0 または 1 個の分節が増加し、形成された分節は全て正常にエフィラとして遊離した。低温処理で誘導したエフィラ形態形成初期ストロビラに HU を投与した場合、0 または 1 個の分節が増加し、8 日間の観察中に形成された分節の数は control 群と比べて有意な差は見られなかった (Fig. 15 c)。この群の全ての個体でエフィラ形態形成が進行したが、遊離したエフィラの縁弁の先端部分に膨らみが生じており、形態異常が見られた (Fig. 14g)。

#### 2-1-4. 考察

ストロビレーションの各ステージと細胞増殖の関係を調べるため、BrdU labeling および抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色を行った。また、細胞増殖阻害剤 HU の投与実験を行った。以下に、(1) ストロビレーションの開始、(2) 分節形成、(3) エフィラ形態形成、(4) エフィラの遊離のそれぞれのステップにおける細胞増殖の役割を考察する。

##### (1) ストロビレーションの開始

BrdU labeling および抗 PCNA 抗体により、プレストロビラでは触手の下の領域で細胞増殖が観察された (Fig. 9b, 11b)。この領域は分節 1 が形成される予定領域であり、第 1 くびれの陥入に先立ち、細胞増殖が起きていることが明らかとなった。一方、HU をストロビレーション開始前に投与すると、MMI による誘導、低温処理による誘導ともにストロビレーションは開始しなかった (Fig. 13a; Exp. A, B, Fig. 14a, b, Fig. 15a)。これらの結果から、ストロビレーションを開始するために、分節 1 が形成される予定領域で細胞増殖が起きることが必要であると考えられる。

分節 1 が形成されることは、ストロビレーションにおいて重要なステップであることが先行研究により明らかにされている。低温処理でストロビレーションを誘導し、分節 1 が形成された後は室温に戻しても、ストロビレーションは正常に進行した [辻田ら, 2015]。また、indomethacin 投与によりストロビレーションを誘導した場合でも、1 つ目の分節が形成された後に indomethacin を除去

しても、ストロビレーションが正常に進行した [Kuniyoshi *et al.*, 2012]。つまり、分節1が形成されれば、その後のストロビレーションは誘導刺激非依存的に進行する。これらの知見と本研究の結果を合わせると、細胞増殖は、ストロビレーションの開始において分節1を形成するために重要な役割を果たしていると考えられる。

BrdU labelingの結果、ポリプの胴体部分では細胞増殖はほとんど検出されなかった (Fig. 9a)。一方で、抗 PCNA 抗体による免疫染色に用いた絶食期間15日のポリプでは、内胚葉層で細胞増殖が検出された (Fig. 11a)。BrdU labelingでは、細胞周期S期にDNAに取り込まれたBrdUを検出する。PCNAは、細胞周期のG1後期からS期にかけて合成されるが、M期以外には存在することが報告されている [田中 1991]。このことから、抗 PCNA 抗体により、BrdU labelingより多くの細胞核が染色される可能性が考えられる。また、ポリプの採餌の有無や栄養状態が細胞増殖に関係している可能性が考えられる。先行研究において、出芽中のポリプ [Balcer and Black 1991]やポリプの触手 [Gold *et al.* 2015]で細胞増殖が観察された例がある。BrdU labelingに用いたストロビラは、低温処理により誘導しており、10°Cでの培養中に給餌は行っていない。ストロビラと条件を合わせるため、ポリプについても実験前に絶食を行った。給餌していないポリプは採餌行動をしないため、触手や刺胞の消耗もないと考えられる。また、ポリプのBrdU培養中に出芽は観察されなかった。これらのことから、BrdU labelingに用いた絶食条件下のポリプでは細胞増殖がほとんど検出されなかったと考えられる。一方で、絶食期間15日のポリプでは、消化と関連して胃腔側の内胚葉層で細胞増殖が起きていた可能性が考えられる。

第1章で行った外部形態および内部形態の観察では、ポリプとプレストロビラの差異は認められなかったが、プレストロビラの触手のすぐ下の領域で第1くびれが生じる前に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るべきである。

## (2) 分節形成

BrdU labelingにより、分節形成期ストロビラでは、BrdU培養前・培養中に形成された分節に加えて、次の分節が形成される予定領域でも細胞増殖が観察された (Fig. 9c)。抗 PCNA 抗体でも、分節および予定領域で細胞増殖が検出された (Fig. 11c)。また、HUを分節形成期ストロビラに投与した場合、1-3個の分節が形成された後、分節形成が停止した (Fig. 13b, 15d)。このことから、HUの

投与と細胞増殖が阻害されるまでに時間差があることが推測される。それでもなお、正常なストロビラと比べて形成された分節の数が少なかったことから、細胞増殖は分節形成に必要であると考えられる。

第1章のHE染色の結果から、ストロビラのくびれは上皮細胞層が繰り返し胃腔側へ陥入することで形成されていることが明らかとなった。細胞増殖は、外胚葉層・内胚葉層の両方で観察されたことから、細胞増殖により上皮細胞層の細胞数を増やすことで、陥入に必要な細胞数を確保していると考えられる。

HUを分節形成期ストロビラに投与すると、胴体が部分的に膨張する形態異常が生じた (Fig. 14c, f)。内部形態観察の結果、膨張部分の中膠が肥大していた (Fig. 14h)。このような形態異常の原因として、以下の可能性が考えられる。HU投与により上皮細胞層の細胞増殖が阻害されると、陥入に必要な細胞数が不足する。そのため、上皮細胞層や中膠が拡張できなくなり、中膠内の細胞外マトリックスタンパク質を収めるスペースが足りなくなる。その結果、細胞外マトリックスタンパク質が局所的に蓄積し、その部分の中膠が肥大した可能性が予想される。

細胞増殖は、次の分節が形成される予定領域でも起きていた。つまり、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る。HUは、次の分節が形成される予定領域での細胞増殖を阻害することで、新たな分節の形成を妨げている可能性が考えられる。

### (3) エフィラ形態形成

BrdU labeling および抗 PCNA 抗体により、エフィラ形態形成期ストロビラでは、全ての分節で細胞増殖が観察された (Fig. 9d, 11d)。分節形成期ストロビラの BrdU 培養前にすでに形成されていた分節でも細胞増殖が起きていた (Fig. 9c)。つまり、細胞増殖は、分節の形成直後からエフィラ形態形成期にかけて継続することが明らかとなった。

HUをエフィラ形態形成期ストロビラに投与した場合、口側の分節から奇形のエフィラが遊離した (Fig. 14d)。このことは、正常なエフィラ形態を作る上で細胞増殖が必要であることを示唆する。また、奇形エフィラの体全体が膨張しており (Fig. 14e)、分節形成期ストロビラへのHU投与で生じた奇形ストロビラと同様の中膠が肥大する形態異常が観察された (Fig. 14i, j)。前項での考察と同じく、細胞増殖阻害によって細胞外マトリックスタンパク質を保持するための中膠の体積が不足した可能性が考えられる。低温処理によりストロビレーシ

ヨンを誘導したエフィラ形態形成期ストロビラに HU を投与して 10°C で培養した場合、MMI で誘導した場合よりも奇形エフィラの形態異常が軽度であった (Fig. 14g)。Mostovshchikova らは、MMI 投与によりストロビレーションを誘導した場合、エフィラの形態異常が生じやすくなることを報告している [2022]。一方で、MMI による誘導と低温処理による誘導では、培養温度 (23 °C/ 10 °C) が異なり、ストロビレーションの完了までに要する時間が大きく変わる。このことから、形態異常の程度については、1. MMI 投与による影響、2. 培養温度のちがいによるストロビレーションの進行速度の影響があると考えられる。

箱虫綱の *Tripedalia cystophora* と *Alatina moseri* では、ポリプからクラゲへの変態過程で、rhopalia (感覚器の一種) が形成される部分で細胞増殖が起きている [Gurska and Garm, 2014]。鉢虫綱では、rhopalia の基本的な形や位置は共通しており [Helm, 2018]、成体クラゲでは傘の縁にある [久米・団, 1957]。ミズクラゲのエフィラでは、rhopalia は各対の縁弁の間にあり (Fig. 3d) [久米・団, 1957]、ストロビレーション中のエフィラ形態形成期初期に、触手の退縮と同時並行的に、rhopalia が触手の根本部分に形成される [Spangenberg, 1991]。第 1 章の HE 染色の結果、rhopalia が形成される部分に細胞核が密集していることを観察した (Fig. 6o)。本研究ではエフィラでの細胞増殖は確認していないが、ミズクラゲの rhopalia の形成においても細胞増殖が関与している可能性が予想される。

また、奇形を生じたエフィラは、正常なエフィラ (Fig. 4j) より小さい傾向が見られた (Fig. 14e)。ヒドロ虫綱のエダアシクラゲ *Cladonema pacifica* において、HU 投与により細胞増殖を阻害すると体サイズの成長が抑制されたことが報告されている [Fujita *et al.*, 2019]。いずれの場合も、細胞増殖阻害により正常な体サイズを構成するための細胞数を確保できなかったことに起因すると考えられる。

以上のことから、正常な形態およびサイズのエフィラを形成するために必要であることが示唆される。

#### (4) エフィラの遊離

HU をエフィラ形態形成期に投与した個体でも奇形エフィラが遊離した (Fig. 14e, g)。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る。

## 第2節 外科的処理による分節形成機構の解析

### 2-2-1. 目的

第1節でストロビレーションの各ステージでの細胞増殖を検出した結果、上皮細胞層の陥入に先立って、次の分節が形成される予定領域で細胞増殖が起きることが、分節形成において必要があると考えられる。この結果を踏まえて、分節形成期ストロビラの切断実験を行い、すでに形成された分節および予定領域の分節形成における役割を検討した。

### 2-2-2. 材料と方法

#### 2-2-2A. ストロビラ切断実験

CSにより誘導した分節形成期ストロビラ（くびれ1-4個）をシャーレから集め、ストロビラを切断して口側と反口側に分けた。

##### ・切断実験 A

分節および次の分節が形成される予定領域が反口側に含まれないように、予定領域より下で切断した (Fig. 16a; Exp. A)。

##### ・切断実験 B

分節1個が反口側に含まれるように最も反口側の分節のすぐ上で切断した (Fig. 16a; Exp. B)。

##### ・切断実験 C

反口側に分節は含まれず、予定領域は含まれるように最も反口側の分節のすぐ下で切断した (Fig. 16a; Exp. C)。

切断した反口側をそれぞれ24穴マイクロタイタープレートのウェルに移し、23°Cで培養した。反口側で形成された分節の数を記録した。また、反口側で形成された分節の数から切断時に反口側に含まれていた分節の数 (Exp. A: 0個、Exp. B: 1個、Exp. C: 0個) を引いた、分節数の増加 ( $\Delta$ segment) を計算した。分節の数および分節数の増加 ( $\Delta$ segment) の検定には Steel-Dwass test を用いた。

### 2-2-3. 結果

ストロビラの分節形成について詳細に調べるため、分節形成期ストロビラを口側と反口側に分ける切断実験を行った。

反口側に分節および次の分節が形成される予定領域を含まないように切断した切断実験 A では、反口側で分節は形成されず触手を再生してポリプになった (Fig. 16b, c; Exp. A)。

一番下の分節が反口側に含まれるように切断した切断実験 B の反口側では、すでに形成されていた分節の下に新たに複数の分節が形成された (Fig. 16b; Exp. B)。反口側で形成された分節の数から切断時に反口側に含まれていた分節の数 (1 個) を引いた、分節数の増加 ( $\Delta$ segment) は、5–10 個であった (Fig. 16c; Exp. B)。

反口側に分節は含まれず、予定領域が含まれるように含まれるように切断した切断実験 C では、予定領域の下にくびれが形成され、その下にさらに分節が形成された (Fig. 16b; Exp. C)。分節数の増加 ( $\Delta$ segment) は、6–10 個であった (Fig. 16c; Exp. C)。

### 2-2-4. 考察

分節形成期ストロビラの切断実験を行った結果、分節と予定領域を含まない反口側 (切断実験 A) がポリプになった。一方で、反口側に分節を含む (切断実験 B) と、新たな分節が形成された。このことから、すでに形成された口側の分節が次の分節の形成に必要であると考えられる。先行研究により、低温処理によりストロビレーションを誘導した場合でも、indomethacin 投与によりストロビレーションを誘導した場合でも、最も口側の分節 1 が形成されれば、誘導刺激を除去しても、その後の分節形成は正常に進行することが明らかになっている [辻田ら 2015, Kuniyoshi *et al.* 2012]。つまり、すでに形成された分節と隣接する反口側の領域で新たな分節の形成が進行することが示唆された。これらのことから、分節が、反口側の領域に向かって新しい分節の形成を誘導するシグナルを分泌していることが予想される。

また、切断実験 C では、分節を含まなくても予定領域が含まれていれば、切断後に予定領域の下側にくびれができて分節となり、その下にさらに新たな分節が形成された。このことから、分節の形成を誘導するシグナルを受け取った

予定領域は、上皮細胞層の陥入が起きるより前に分節となる運命決定がなされていることが考えられる。

分節形成に関して、第1章・第2章の結果から以下の知見を得た。

- ①分節間のくびれは上皮細胞層が陥入してできている。
- ② HU 投与によりストロビラの分節形成が阻害されたことから、細胞増殖が分節形成に必要である。
- ③ BrdU labeling および抗 PCNA 抗体を用いた観察から、細胞増殖はすでに形成された分節と次の分節が形成される予定領域で起きている。
- ④ 分節形成期ストロビラの切断実験より、分節と隣接する領域で分節の形成が進行する。

以上の知見に基づき、分節形成メカニズムについて以下のモデルが考えられる (Fig. 17)。まず、(a) 口側の分節から隣接する反口側の領域に向かって分節の形成を誘導する「分節形成誘導因子」が分泌される。(b) 「分節形成誘導因子」を受け取った、次の分節ができる予定領域で細胞増殖が起こる。そして、(c) 上皮細胞層が陥入してくびれが生じ、新たな分節が完成する。(a)~(c) を繰り返すことで複数の分節が形成される。「分節形成誘導因子」やその下流で働くシグナルが、細胞増殖の誘導や上皮細胞層の陥入を誘導することが予想される。「分節形成誘導因子」として機能する因子を同定することを目指し、第4章では transcriptome 解析を行った。

### 第3章 分節形成阻害物質の探索と特徴付け

#### 序論

ストロビレーションの開始誘導物質として、indomethacin [Kuniyoshi *et al.*, 2012]や 5-methoxy-2-methylindole (MMI) [黒田, 2014; Fuchs *et al.*, 2014; Helm and Dunn 2017]が広く知られている一方で、ストロビレーションの抑制物質および分節形成に関与する分子についての知見は乏しい。先行研究により、tryptamine (TAM)、*N*-acetyltryptamine (AcTAM)、5-methoxyindole (5MeOIn) の3つのインドール化合物は強い「ストロビレーション開始阻害活性」を持つことが見出され、「分節形成阻害活性」、「エフィラ形態形成阻害活性」を示すことが報告された[黒田, 2014]。ストロビレーション開始阻害活性については、統計学的に有意な活性であることが示されたが、その他の活性について詳細な解析は行われていない。

そこで、本章ではバイオアッセイ法を用いてこれらの3つのインドール化合物の分節形成やエフィラ形態形成に与える影響を定量的に調べた。さらに、第2章でストロビラの分節および次の分節が形成される予定領域において細胞増殖が起きていたことを踏まえて、TAMについて、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。

### 3-1-1. 目的

強いストロビレーション開始阻害活性を持つ3つのインドール化合物について、分節形成やエフィラ形態形成に与える影響を定量的に調べるため、各種バイオアッセイを行った。

### 3-1-2. 材料と方法

#### 3-1-2A. 試料物質

ストロビラアッセイに用いた試料物質は、以下のように stock 溶液を作製し、使用時に ASW で希釈した。

- ・ tryptamine (TAM: Wako)

16.0 mg を DMSO 1 mL に溶解した stock 溶液 (50 mM) を調製し、-30 °C で保存した。

- ・ *N*-acetyltryptamine (AcTAM: TOCRIS)

10.1 mg を DMSO 1 mL に溶解した stock 溶液 (50 mM) を調製し、-30 °C で保存した。

- ・ 5-methoxyindole (5MeOIn: Wako)

7.4 mg を DMSO 1 mL に溶解した stock 溶液 (50 mM) を調製し、-30 °C で保存した。

#### 3-1-2B. 生物材料

ポリプの飼育は、1-1-2A.と同様に行った。ストロビラは、低温処理 (CS) によりストロビレーションを誘導した個体を用いた。

#### 3-1-2C. ストロビラアッセイ

CS で誘導したストロビラ 1 個体を、ASW 500  $\mu$ L と一緒に 24 穴マイクロタ イタープレート (TPP 製) のウェルに移した。試料物質を含む ASW 500  $\mu$ L をストロビラの入ったウェルに投与した。試料物質を含まない ASW 中で培養した実験群を control とした。10 °C で培養し、control 群の個体のエフィラが全て遊離するまで外部形態と分節の数を毎日観察した。試料物質投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) は、2-1-2C.と同様に計算した。

分節の数および分節数の増加 ( $\Delta$ segment) の検定には Steel-Dwass test または

Mann-Whitney *U* test (Bonferroni 法による補正) を用いた。TAM 投与個体の各日の分節数の検定には Welch's *t* test を用いた。また、外部形態で異常を示した個体については、固定した後、切片標本作製し (1-2-2B.)、HE 染色 (1-2-2C.) を行った。

### 3-1-2D. リンス実験

ストロビラアッセイを行った後、ウェルに入っている海水を全て取り除き、新鮮な ASW 1 mL を加えた。これを 3 回繰り返して物質の除去を行い、23 °C で培養した。

### 3-1-3E. TAM 投与個体の抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色

CS で誘導した分節形成期ストロビラ (くびれ 1–3 個) に 50  $\mu$ M TAM を投与し、10°C で 3 日間培養した。培養後は、1-2-2B. と同様の方法で固定した。切片標本作製し、2-1-2B. と同様の方法で抗 PCNA 抗体および二次抗体 (HRP 標識抗 Rabbit IgG 抗体) を用いて免疫組織染色を行い、DAB で発色を行った。

## 3-1-3. 結果

### [インドール化合物の分節形成期ストロビラに対する阻害活性]

3 つのインドール化合物 (TAM、AcTAM、5MeOIn) について、分節形成阻害活性、エフィラ形態形成阻害活性を定量的に評価するため、分節形成期ストロビラ (くびれ 1–3 個) に試料物質 (最終濃度 50  $\mu$ M) を投与し、ストロビラアッセイを行い、25 日間 10°C で培養した。

分節形成阻害活性については、各個体の分節の数および試料物質投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) を計測することで、分節形成に対する影響を定量的に評価した。エフィラ形態形成阻害活性は、遊離した正常なエフィラの数計測し評価した。

試料物質を投与しない control 群では、分節の形成が進行し、観察期間中に 2–5 個の分節が形成された (分節形成期)。その後、各分節がエフィラ形態を形成し (エフィラ形態形成期)、4–8 個体のエフィラが遊離した (エフィラ遊離期)。

TAM 投与群 ( $n = 8$ ) では、観察期間中に形成された分節の数は control 群と

比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 18a)。TAM 投与後の分節数の増加 ( $\Delta$  segment) は、0 個または 1 個であり、control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 18b)。TAM 投与群の全ての個体で、エフィラへの形態形成が進行せず、正常なエフィラを遊離した個体はいなかった (Fig. 19)。8 個体中 6 個体で分節間のくびれ部分から触手のような突起 (Fig. 20c, d) (以後、「触手様突起」と呼ぶ) が生じた (Table 2)。触手様突起は、まず 90 度ごとに 4 本形成され、その後、それらの間にさらに 4 本形成された。

AcTAM 投与群 ( $n = 8$ ) では、観察期間中に形成された分節の数は control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 18a)。AcTAM 投与後の分節数の増加 ( $\Delta$  segment) についても、control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 18b)。この群の 8 個体のうち 6 個体でエフィラへの形態体形成が進行せず (Fig. 19)、分節間のくびれ部分から触手様突起 (Fig. 20h) が生じた (Table 2)。

5MeOIn 投与群 ( $n = 8$ ) では、観察期間中に形成された分節の数 (Fig. 18a)、5MeOIn 投与後の分節数の増加 ( $\Delta$  segment) (Fig. 18b) とともに、control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control)。この群の全ての個体でエフィラへの形態体形成が進行せず (Fig. 19)、7 個体で分節間のくびれ部分から触手様突起 (Fig. 20i) が生じた (Table 2)。

TAM の用量依存的な分節形成阻害活性を調べるため、12.5  $\mu$ M – 50  $\mu$ M の 2 倍希釈系列を調製し、分節形成期ストロビラ (くびれ 1–3 個) に投与し、10°C で培養するストロビラアッセイを行った。TAM を投与しない群を control 群 (0  $\mu$ M) とした。その結果、50  $\mu$ M TAM を投与した群のみ観察期間中に形成された分節の数は control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 21a)。TAM 投与後の分節数の増加 ( $\Delta$  segment) についても、50  $\mu$ M TAM を投与した群のみ control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 21b)。50  $\mu$ M TAM を投与した群の全ての個体で、分節間のくびれ部分から触手様突起が生じ、エフィラ形態形成が進行しなかった。control 群および 12.5  $\mu$ M、25  $\mu$ M TAM を投与した群では、形態異常は観察されなかった。

50  $\mu$ M TAM を投与後 0–9 日の各日の分節の数を TAM 投与群と control 群で比較した (Fig. 22)。その結果、TAM 投与後 3 日で control 群より有意に分節の数が少なくなる ( $p < 0.05$  vs control) ことを確認した。

### [触手様突起の観察]

上記の投与実験で触手様突起が生じた個体の内部形態を観察するため、分節形成期ストロビラに TAM を投与し、10°C で培養した。TAM 投与後 3 日では、形成された分節の数は正常なストロビラと比べて少なく、この時点では触手様突起は観察されなかった (Fig. 23a)。TAM 投与後 8 日では、分節間のくびれから触手様突起が生じていた (Fig. 23d)。TAM 投与後 3 日または 8 日培養した個体のパラフィン切片を作製して HE 染色を行った。触手様突起を生じる前の TAM 投与後 3 日の個体では、上皮細胞層は正常なストロビラ (Fig. 6d, l) と同様に、外胚葉性・内胚葉性上皮細胞層の二層構造を保ったまま胃腔側に陥入し、くびれを形成していた。触手様突起が生じた TAM 投与後 8 日の個体では、触手様突起の部分では外胚葉性上皮細胞層が外側に突き出していた (Fig. 23e, f)。HU を投与した個体 (Fig. 14h) のような中膠の肥大は見られなかった。

TAM 投与により触手様突起を生じた奇形ストロビラを新鮮な ASW で洗浄し、TAM を除去して 23°C で培養 (リンス実験) した場合、各分節が分離し、それぞれがポリプに似た形態になった。これらは、触手様の突起を動かして餌を捕食する様子が観察された (Fig. 24)。また、ポリプ様になった個体を再度、10°C で培養した結果、ストロビレーションが開始し、エフィラを遊離した。

### [TAM の分節形成阻害活性と細胞増殖]

TAM による分節形成阻害と細胞増殖の関係を調べるため、TAM を投与して 3 日間 10°C で培養した分節形成期ストロビラを固定し、パラフィン切片を作製して抗 PCNA 抗体を用いて免疫染色をした。

正常な分節形成期ストロビラの縦断切片 (Fig. 11c) では、分節と最も反口側のくびれの下側、すなわち次の分節が形成される予定領域でシグナルが見られた。TAM を投与した分節形成期ストロビラの縦断切片でも同様に、分節と次の分節が形成される予定領域の両方でシグナルが観察された (Fig. 25a)。外胚葉層・内胚葉層の両方で細胞増殖が検出された (Fig. 25b, c)。

### [TAM のエフィラ形態形成期ストロビラに対する阻害活性]

TAM のエフィラ形態形成期ストロビラに対する阻害活性を調べるため、エフィラ形態形成初期ストロビラに TAM (最終濃度 50  $\mu$ M) を投与し、ストロビラ

アッセイを行った。control 群では、形成された分節と同数のエフィラが遊離した。TAM 投与群 (n = 12) についても、全ての個体で正常にエフィラ形態の形成が進行し、形成された分節と同数の 5–11 個体のエフィラが正常に遊離した (Fig. 26)。

#### 3-1-4. 考察

##### [分節形成阻害活性]

TAM、AcTAM、5MeOIn の分節形成への影響を調べるため、各個体の分節の数および試料物質投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) を評価した。3つの化合物を分節形成期ストロビラに投与した場合、全ての群で control 群と比較して分節の形成が阻害された。一方、TAM 投与群、AcTAM 投与群、5MeOIn 投与群の間で分節の数および分節数の増加 ( $\Delta$ segment) に差は見られず、同程度の分節形成阻害活性を持つことが明らかとなった。

細胞増殖阻害剤 HU は、分節形成期ストロビラに対して分節形成阻害活性を示し (Fig. 13, 15b, c)、中膠が肥大する奇形を示した (Fig. 14c, f, h)。TAM 投与により、分節形成が阻害された個体では中膠肥大は見られず、上皮細胞層の二層構造は正常であった (Fig. 23b, e)。この観察結果から、TAM と HU はどちらも分節形成を阻害するものの、作用機構が異なっている可能性が高い。HU は細胞増殖阻害剤である [Sinclair, 1965; Bode *et al.*, 1976] ので、その生物活性は細胞増殖の阻害に起因するものであると考えられる。一方、細胞増殖に対する TAM の効果は不明であったので、抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色により TAM と細胞増殖の関係を調べた。その結果、TAM 投与個体の細胞増殖の分布パターンは、非投与群の正常な分節形成期ストロビラ (Fig. 11c) と差異は見られず (Fig. 25a, b)、TAM が細胞増殖を阻害しないことが明らかとなった。すなわち、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。

また、TAM は 50  $\mu$ M の投与で分節形成阻害活性を示し (Fig. 21)、投与から 3 日で control 群と比べて有意な分節形成阻害活性を示すことが分かった (Fig. 22)。この結果をもとに、第 4 章では transcriptome 解析に供するサンプルの TAM 処理を行うこととした。

### [エフィラ形態形成阻害活性]

TAM、AcTAM、5MeOIn をそれぞれ分節形成期ストロビラに投与した場合、分節の形成が停止した後、投与前に形成されていた分節でもエフィラへの形態形成は進行しなかった (Fig. 19)。このことから、TAM、AcTAM、5MeOIn は、分節形成期のストロビラに対して、エフィラ形態形成阻害活性を示すことが分かった。このことから、各分節でのエフィラ形態形成は分節形成期が終了する前に開始している可能性が考えられる。これは、第2章の BrdU labeling において、細胞増殖が分節の形成直後からエフィラ形態形成期にかけて継続して起きていたこととも一致するものと考えられる。一方で、TAM をエフィラ形態形成初期ストロビラに投与した場合、正常なエフィラが遊離した (Fig. 26)。この結果から、TAM は、触手退縮前に起きるエフィラ形態形成に関わるステップに作用することでエフィラ形態形成阻害活性を示していると考えられる。

### [触手様突起]

TAM 投与群、AcTAM 投与群、5MeOIn 投与群の全ての群で、分節形成が阻害された後、分節間のくびれから触手のような突起を生じる形態異常が観察された (Fig. 20)。TAM 投与によって生じた触手様突起について詳細に観察した結果、以下のことが明らかとなった。

- ・触手様突起は、はじめに 90 度ごとに 4 本形成され、その後、それらの間にさらに 4 本形成された。これはポリプの口の周囲の触手が形成される場合[安田 *et al.*, 2003]と同様の順番であった。

- ・TAM を投与したストロビラのパラフィン切片を作製して組織染色を行い、触手様突起の内部構造を観察した。その結果、この触手状突起は外胚葉性・内胚葉性上皮細胞層からなり、伸長時の先端部には外胚葉性上皮細胞層が突き出た構造が見られた (Fig. 23e, f)。これは、ポリプの口の周囲の正常な触手と同様の構造であった。

- ・触手様突起が生じた個体を新鮮な ASW で洗浄し、TAM を除去するリンス実験を行った。その結果、各分節が分離し、それぞれがポリプに似た形態になり (Fig. 24)、触手様突起を用いて餌を捕食していた。

以上のことから、分節間のくびれから生じた触手様突起はポリプの触手と同等の器官と考えられ、本研究ではこれらの触手様突起を「異所性触手」と呼

ぶ。

先行研究においてもストレス下 [Helm, 2018]の個体や MS222 meta-aminobenzoic acid ethylester を投与した[柿沼, 1988] 場合に、異所性触手が生じたことが報告されている。

これらの知見を踏まえ、TAM 投与による異所性触手の形成は、「エフィラ形態形成期への移行が阻害されたため、各分節の形態形成の方向がエフィラからポリプへと転換した」と解釈することができる。つまり、分節形成期ストロビラはポリプの性質を維持しており、この段階でエフィラ形態形成に移行できなければ、それぞれの分節はエフィラの代わりにポリプとして再生する、と考えられる。オキクラゲのエフィラが持つ筋肉は、ポリプおよびストロビラの筋肉に由来するのではなく、エフィラ形態の形成過程で新たに作られることが報告されている [Helm *et al.*, 2015]。箱虫綱のミツデリッポウクラゲの完全変態において、ポリプの触手は分解され、新たにクラゲの触手が形成される[Gurska and Garm, 2014]。これらの先行研究と合わせて、無性世代のポリプとストロビラでは、共通の性質を持つ組織を維持しており、有性世代への転換に伴って新たにクラゲの組織が形成される可能性が考えられる。

#### [ストロビレーションに関わるインドール化合物]

indomethacin [Kuniyoshi *et al.*, 2012] や MMI [黒田, 2014; Fuchs *et al.*, 2014; Helm and Dunn 2017] がストロビレーションの開始を誘導することは広く知られている。また、5-methoxy-2-methylindole acetic acid や 5-methoxyindole-2-carboxylic acid、 2-methylindole についてもストロビレーション開始誘導活性を持つことが報告されている[Fuchs *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2020]。これらの知見から、インドール環 [Fuchs *et al.*, 2014] やメトキシ基またはメチル基が結合したインドール環 [Wang *et al.*, 2020] が活性発現に必要であることが示唆されている。しかし、メトキシ基を持つ 5MeOIn は、ストロビレーション開始誘導活性を持たず、強いストロビレーション開始阻害活性を示した [黒田, 2014]。本章で行った投与実験の結果、TAM、 AcTAM 、 5MeOIn の3つのインドール化合物は、ストロビレーション開始阻害活性に加えて分節形成阻害活性およびエフィラ形態形成阻害活性を持つことも明らかとなった。これらの結果を踏まえると、ストロビレーション開始誘導活性を示した物質は2位にメチル基が結合したインドール環を共通構造として持つ。ミズクラゲのストロビレーション開始

誘導において、インドール環の2位にメチル基が結合していることが必要である可能性が予想される。

## 第4章 transcriptome 解析による分節形成関連遺伝子の探索

### 序論

2010年代以降の次世代シーケンサーの発展と普及により、非モデル生物を対象としたゲノム解析や transcriptome 解析が広く行われるようになった。ミズクラゲにおいても、ゲノム解析 [Gold *et al.* 2019; Khalturin *et al.* 2019] やストロビレーション中の各段階における transcriptome 解析が行われている [Fuchs *et al.*, 2014; Brekhman *et al.*, 2015]。プラヌラ、ポリプ、ストロビラ、エフィラの各ステージで特異的な発現パターンを示す遺伝子についての報告はあるものの、ストロビレーションにおける分節形成に的を絞った解析例は見当たらない。

本研究では、第2章で行ったストロビラの切断実験により、すでに形成された口側の分節が新しい分節の形成を誘導する「分節形成誘導因子」を分泌している可能性が示唆された。また、第3章では TAM の分節形成阻害活性について特徴付けを行った。これらの結果から、本章では「分節形成誘導因子」として機能する因子を同定することを目指し、正常なストロビラと TAM 投与により分節形成を阻害したストロビラについて、分節が形成されている口側の領域とされていない足側の領域に分けて次世代シーケンサーを用いた transcriptome 解析を行った。

本章第1節では、RNA sequencing およびバイオインフォマティクス解析により、「分節形成誘導因子」の候補の絞り込みを行った。発現パターンにより配列の絞り込みを行い、「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について検討した。

第2節では、第1節で得られた候補因子について分節形成との関連を調べるため、薬剤投与実験および免疫組織学的手法を用いて、ストロビレーションおよび分節形成への関与を調べた。

## 第 1 節 次世代シーケンサーを用いた RNA sequencing

### 4-1-1. 目的

分節形成に関与する遺伝子群を探索するため、正常な分節形成期ストロビラと TAM を投与した分節形成期ストロビラを用いた RNA sequencing を行った。

### 4-1-2. 材料と方法

#### 4-1-2A. 試薬

##### ・ DEPC 処理水

超純水 1 L に diethylpyrocarbonate (DEPC) 500  $\mu$ L を加え、よく混合した。室温で一昼夜静置し、121  $^{\circ}$ C で 20 分間オートクレーブした。

##### ・ 2 M 酢酸ナトリウム (pH 4.0)

酢酸ナトリウム・三水和物 13.6 g を超純水約 15 mL に溶解し、氷酢酸を加えて pH 4.0 に調整した。超純水を加えて 50 mL にメスアップし、DEPC 25  $\mu$ L を加え、よく混合した。室温で一昼夜静置し、121  $^{\circ}$ C で 20 分間オートクレーブした。

##### ・ 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)

酢酸ナトリウム・三水和物 20.4 g を超純水約 40 mL に溶解し、氷酢酸を加えて pH 5.2 に調整した。超純水を加えて 50 mL にメスアップし、DEPC 25  $\mu$ L を加え、よく混合した。室温で一昼夜静置し、121  $^{\circ}$ C で 20 分間オートクレーブした。

##### ・ 0.5 M EDTA (pH 8.0)

2NA (EDTA  $\cdot$  2Na) 18.61 g を超純水に溶解し、水酸化ナトリウムを加えて pH 8.0 に調整した。超純水を加えて 100 mL にメスアップし、DEPC 50  $\mu$ L を加え、よく混合した。室温で一昼夜静置し、121  $^{\circ}$ C で 20 分間オートクレーブした。

##### ・ 3 M 水酸化ナトリウム

NaCl 17.53 g を超純水に溶解し、100 mL にメスアップし、DEPC 50  $\mu$ L を加

え、よく混合した。室温で一昼夜静置し、121 °C で 20 分間オートクレーブした。

・ 1 M Tris-HCl (pH 7.5)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane 12.11 g を DEPC 処理水約 80 mL に溶解し、HCl で pH 7.5 に調整した。DEPC 処理水を加えて 100 mL にメスアップし、121 °C で 20 分間オートクレーブした。

・ 10 % SDS

sodium dodecyl sulfate (SDS) 10 g を DEPC 処理水に溶解し、100 mL にメスアップした。

・ 1 M DTT

dithiothreitol (DTT) 1.55 g を 0.01 M 酢酸ナトリウム溶液に溶解し、10 mL にメスアップした。200  $\mu$ L ずつ分注し、-30 °C で保存した。

・ 水飽和フェノール

フェノール約 30 g に超純水 20 mL を加え、65 °C のインキュベーターに入れ溶解した。よく混合し、室温で冷却後、4 °C で保存した。

・ Lysis buffer

以下の試薬を混合して 1.95 mL を調製した。

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	200 $\mu$ L
0.5 M EDTA (pH 8.0)	40 $\mu$ L
3 M NaCl	66 $\mu$ L
10 % SDS	200 $\mu$ L
1M DTT	20 $\mu$ L
2-メルカプトエタノール	20 $\mu$ L
DEPC 水	1.404 mL

#### 4-1-2B. 生物材料

ポリプの飼育は、1-1-2A.と同様に行った。ストロビラは、低温処理によりストロビレーションを誘導した個体を用いた。

#### 4-1-2C. TAM 処理 (RNA 抽出用)

低温処理で誘導したストロビラ 28 個体 (分節 1~2 個) を、4 個体ずつ FSW 500  $\mu$ L と一緒に 24 穴マイクロタイタープレート (TPP 製) のウェルに移した。100  $\mu$ M TAM / FSW 500  $\mu$ L を加え (TAM 最終濃度 50  $\mu$ M)、10  $^{\circ}$ C のインキュベーター内で 3 日間培養した。

#### 4-1-2D. total RNA 抽出

低温処理で誘導したストロビラ (分節 1~5 個) 30 個体を、15 mL チューブに移した。ピペットマンを用いて FSW を取り除き、0.17 M MgCl<sub>2</sub> 溶液を入れて氷上に 5 分間静置し、麻酔処理をした。ストロビラを最も反口側の分節より分節 1 個分より下で切断し、分節が形成されている口側と、分節と次の分節が形成される予定領域を含まない足側に分けた。TAM 処理をした個体も同様に口側と足側に分けた。

4 種類のサンプルについて、それぞれ Lysis buffer 1.95 mL と 20 mg/mL Proteinase K 水溶液 50  $\mu$ L を加えた。ホモジナイザー (AHG-160A、AS ONE) で 30 秒ホモジナイズ [16,200 rpm (目盛り 60)] し、55  $^{\circ}$ C で 1 時間おだやかに振とうしながらインキュベートした。その後、4  $^{\circ}$ C で 10 分間遠心 (3700、KUBOTA) [12,000 rpm (13,200  $\times$  g)] した。遠心後、上層の水層画分を 2 mL チューブ 2 本に回収し、各チューブに 2 M 酢酸ナトリウム (pH 4.0) 140  $\mu$ L と水飽和フェノール 700  $\mu$ L を加えた。ボルテックスミキサーで 30 秒攪拌し、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心 [12,000 rpm (13,200  $\times$  g)] した。再度、水層画分を回収し、各チューブに水飽和フェノール 700  $\mu$ L を加えた。ボルテックスミキサーで 30 秒攪拌し、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心した [12,000 rpm (13,200  $\times$  g)]。その後、水層画分を回収し、等量の 2-プロパノールを加えて転倒混和し、-30  $^{\circ}$ C で 1 時間静置した。室温で 10 分間遠心 (Eppendorf centrifuge 5418, Eppendorf AG) [14,000 rpm (16,870  $\times$  g)] した後、上清を捨てて、RNA の沈殿を得た。各チューブに DEPC 処理水 100  $\mu$ L を加えて溶解し、1.5 mL チューブ 1 本にまとめた。3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 10  $\mu$ L と 99% エタノール 200  $\mu$ L を加えて、ボルテックスミキサーで攪拌した。その後、室温で 10 分間遠心 [14,000 rpm (16,870  $\times$  g)] し、上清を捨てて沈殿を得た。沈殿に 70% エタノール 200  $\mu$ L を加えてリンスし、室温で 5 分間遠心 [14,000 rpm (16,870  $\times$  g)] した後、DEPC 処理水 50  $\mu$ L を加えて溶解した。そのうち 1  $\mu$ L をとって分光光度計 Nanodrop2000 (Thermo

SCIENTIFIC 社) を用いて 260nm の吸光度を測定し、濃度を算出した。残りの 49  $\mu\text{L}$  は  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  で保存した。

#### 4-1-2E. total RNA の精製

抽出した total RNA のうち、各サンプル 10  $\mu\text{g}$  相当量に DNase I (Recombinant DNase I (RNase-free), タカラバイオ) 2  $\mu\text{L}$ 、10  $\times$ DNase buffer 5  $\mu\text{L}$ 、DEPC 処理水を加えて合計 50  $\mu\text{L}$  に調製し、 $37\text{ }^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベートした。0.5 M EDTA 2.5  $\mu\text{L}$  を加え、 $80\text{ }^\circ\text{C}$  で 2 分間インキュベートした後、DEPC 処理水 47.5  $\mu\text{L}$  を加えて合計 100  $\mu\text{L}$  にした。さらに、3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 10  $\mu\text{L}$  と冷やしておいたエタノール 250  $\mu\text{L}$  を加えて、 $-80\text{ }^\circ\text{C}$  で 20 分間静置した。 $4\text{ }^\circ\text{C}$  で 10 分間遠心 [12,000 rpm (13,200  $\times$  g)] した。沈殿に 70% エタノール 200  $\mu\text{L}$  を加えてリンスし、室温で 5 分間遠心 [14,000 rpm (16,870  $\times$  g)] し、上清を捨てて沈殿を得た。

NucleoSpin RNA Clean-up XS (タカラバイオ) を用いて、得られた total RNA の精製を行った。沈殿に DEPC 処理水 100  $\mu\text{L}$  を加え、さらに付属の Buffer RCU 100  $\mu\text{L}$  を加えた後、5 秒 $\times$ 2 ホモジナイズし、スピンドウンした。サンプルを Binding Column に load し、室温で 30 秒間遠心 [11,000 rpm (10,410  $\times$  g)] した。液を捨て、Buffer RA3 400  $\mu\text{L}$  を加え、室温で 30 秒間遠心 [11,000 rpm (10,410  $\times$  g)] した。再度液を捨て、Buffer RA3 200  $\mu\text{L}$  を加え、室温で 2 分間遠心 [11,000 rpm (10,410  $\times$  g)] した。Binding Column を付属の collection tube にセットし、RNase-free  $\text{H}_2\text{O}$  10  $\mu\text{L}$  を加え、室温で 30 秒間遠心 [11,000 rpm (10,410  $\times$  g)] した。これを 3 回繰り返し行った。

精製後の各サンプルの total RNA は、電気泳動によるクオリティーチェックの後、約 1/3 量をドライアイスとともに梱包し、eurofins Genomics に送付した。

#### 4-1-2F. RNA sequencing

本研究の RNA-Seq 解析は、eurofins Genomics の受託解析サービスを利用して行った。精製後の total RNA サンプルは、eurofins Genomics にて PolyA 精製された後、Strand-specific mRNA-Seq ライブラリーが作製され、NovaSeq6000 (Illumina 社) を用いて配列が決定された。

#### 4-1-2G. Bioinformatics 解析

本研究では、Fig. 27 に示した流れで RNA sequencing によって得られた配列のバイオインフォマティクス解析を行った。

##### [アダプター配列の除去]

RNA sequencing によって得られた paired-end read は、150 塩基に断片化した目的配列のほかに、フローセル結合部位 (P5、P7)、シーケンシングプライマー結合部位 (Rd1 SP、Rd2 SP)、複数サンプルを同時に解析する際に各サンプルを識別するための目印配列 (In1、In2) が含まれている (Fig. 28)。FastQC を用いてリードのクオリティーチェックを行った後、paired-end read から目的配列以外の部分 (アダプター配列) (Table 3) を取り除くため、flexbar を用いてトリミングを行った。再度、FastQC を用いて、得られたリードのクオリティーチェックを行った。

##### [De novo assembly]

本研究で調製した 4 サンプルに加えて、先行研究で RNA sequencing が行われたポリブおよびストロビラ (whole mount) [辻田, 2018] を合わせた 6 サンプルの reads を用いて *de novo assembly* を行った。Assembly には、Trinity [Grabherr *et al.*, 2011] を用いた。Assembly により得られた配列のうち、CD-HIT-EST を用いて相同性が 95 %以上のものをまとめて最も長いものを contig とした。

##### [Mapping]

Bowtie を用いて 6 サンプルの read を contig にそれぞれマッピングし、eXpress によりリードカウントを行った。これを用いて、以下の式により相対発現量 transcripts per million (TPM) 値を算出した。

$$T = \frac{10^3 C}{L} \quad TPM = \frac{10^6 T}{\sum T}$$

C:ある遺伝子の領域にマッピングされたリードの数

L:ある遺伝子配列の塩基数

本研究では、各サンプルでの発現量の差は、(Sample A の TPM 値) / (Sample

B の TPM 値) で表し、この値が 0.5 より小さい場合は「Sample A での発現量が Sample B での発現量より少ない」、2 より大きい場合は「Sample A での発現量が Sample B での発現量より多い」と評価した。

#### [アミノ酸への翻訳]

得られた各 contig について、TransDecoder を用いて 6 通りの読み枠でアミノ酸配列に翻訳し、100 アミノ酸残基以上に翻訳される配列を抽出した。これらのうち、CD-HIT を用いて相同性が 90 %以上の配列をまとめて最も長いものを残した。

#### [annotation]

eggNOGmapper (v2) [Cantalapiedra *et al.*, 2021] および BlastX を用いて annotation 情報を付加した。

なお、flexbar、Trinity、Bowtie、eXpress、BlastX は、生命情報・DDBJ センターの Maser を利用した。

#### 4-1-2H. 「分節形成誘導因子」の候補の探索

「分節形成誘導因子」の候補として、(A) 分泌タンパク質、(B) 低分子性二次代謝産物について検討した。

##### (A) 分泌タンパク質の推定

翻訳したアミノ酸配列を Signal P6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) を用いて解析し、シグナルペプチド配列の有無を調べた。さらに、SOSUISignal ([http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignal\\_submit.html](http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignal_submit.html)) を用いてシグナルペプチド配列および膜貫通ドメインの有無を調べた。

##### (B) 低分子性二次代謝産物生合成酵素の探索

「分節形成誘導因子」の候補となる低分子性二次代謝産物として、(1) エイコサノイド、(2) 生理活性アミン、(3) ステロイド、(4) レチノイドを想定

し、*Homo sapiens* の以下の配列を query として、本研究のアミノ酸配列データに対して local BLAST をおこなった。Table 10 に各 query 配列の accession number を示す。

- (1) エイコサノイド (Fig. 29)
  - cyclooxygenase1, 2 (COX1, 2)
  - arachidonate 5-lipoxygenase
- (2) 生理活性アミン (Fig. 30)
  - aromatic-L-amino-acid decarboxylase
- (3) ステロイド (Fig. 31)
  - cholesterol side-chain cleavage enzyme
  - 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase
  - steroid 17  $\alpha$  -monooxygenase
- (4) レチノイド (Fig. 32)
  - retinol dehydrogenase (RDH)
  - alcohol dehydrogenase (ADH)
  - aldehyde oxidase (AOX)
  - all-trans-retinol dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) (SDR16C5)
  - dehydrogenase/reductase SDR family member (DHRS)
  - $\beta$ -carotene 15,15'-dioxygenase (BCDO1)

#### 4-1-3. 結果

低温処理で誘導した分節 1~2 個のストロビラに TAM を投与し、10 °C で 3 日間培養した。培養後の分節の数は、1~3 個であった。TAM 処理ストロビラと正常なストロビラをそれぞれ次の分節が形成される予定領域より下で切断し、口側と足側に分け、RNA 抽出を行った (以後、4 つのサンプルをそれぞれ TAM 口側、TAM 足側、正常口側、正常足側とする)。抽出した total RNAのうち、10  $\mu$ g 相当量を精製し、約 3  $\mu$ g を eurofins Genomics に送付して、RNA sequencing を行った。

その結果、paired-end reads が 4 サンプルで合計 214,350,644 reads 得られた (Table 4)。これらの paired-end reads から flexbar を用いてライブラリー調製時に用いられたアダプター配列の除去を行い、4 サンプルで合計の 214,328,544 個

の Clean Read を得た (Table 4)。

*de novo assembly* の結果、最短配列長 201 塩基、平均配列長 937.1 塩基、最大配列長 44,023 塩基の配列が 220,040 個得られ、合計 206,188,731 塩基の塩基配列情報を得た。これらの配列について相同性が 95 %以上のものをまとめ、最短配列長 201 塩基、平均配列長 743.8 塩基、最大配列長 44,023 塩基の contig を 181,271 個得た。塩基配列情報は、合計 134,835,869 塩基得られた (Table 5)。

TransDecoder を用いて contig をアミノ酸に翻訳した。その結果、31,683 個の contig が 100 個以上のアミノ酸をコードしていた。翻訳されたアミノ配列を CD-HIT を用いて相同性が 90 %以上の冗長な配列をまとめた結果、読み枠違いのものも含めて 44,594 個のアミノ酸配列を得た (Table 6)。これを本研究におけるアミノ酸配列データセットとした。最短配列長 100 aa (アミノ酸残基)、平均配列長 285.7 aa、最大配列長 12,564 aa であった。

#### [発現パターンによる候補遺伝子の抽出]

181,271 個の contig のうち、ポリプ (whole body) とストロビラ (whole body) の TPM 値を比較し、ポリプでの発現量がストロビラでの発現量より多いものを「ポリプ特異的配列」、ストロビラでの発現量がポリプでの発現量より多いものを「ストロビラ特異的配列」とした。その結果、ポリプ特異的配列が 22,157 個、ストロビラ特異的配列が 48,996 個あった。これらうち、ポリプ特異的配列 5,601 個、ストロビラ特異的配列 13,206 個が 100 個以上のアミノ酸に翻訳された。読み枠が異なるものも含めて、ポリプ特異的配列 6,102 個、ストロビラ特異的配列 17,998 個のアミノ酸配列が得られた (Table 7)。

ストロビラ特異的配列について、本研究で RNA sequencing を行った 4 サンプル (TAM 口側、TAM 足側、正常口側、正常足側) を用いて、さらに発現パターンの解析を行った。

ストロビラ切断実験 (第 2 章) の結果から、すでに形成されてい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」を分泌していることが示唆された。このことから、まず、正常口側と比較して正常足側での発現量が減少している配列を抽出した。その結果、23,164 個の contig が正常口側で多く発現していた。これらの contig を翻訳した結果、8,270 個がアミノ酸配列に翻訳され、11,427 個のアミノ酸配列が得られた。さらに、これらの contig の正常口側と TAM 口側の発現量を比較した。正常口側と TAM 口側で同程度発現している

ものは、TAMの影響を受けず、ストロビラの口側で高発現していると考えられる。この発現パターンを示すものを「TAM非応答性口側特異的配列」と呼ぶこととする。正常口側と比べてTAM口側で発現量が減少しているものは、口側で発現が多い配列のうちTAMの分節形成阻害により発現量が減少するものと考えられる。この発現パターンを示すものを「TAM抑制性口側特異的配列」と呼ぶこととする。TAM非応答性口側特異的配列が5,677個、TAM抑制性口側特異的配列が1,602個であった。これらをアミノ酸に翻訳した結果、TAM非応答性口側特異的配列8,055個、TAM抑制性口側特異的配列2,158個のアミノ酸配列が得られた (Table 7)。

### [分泌タンパク質の探索]

TAM非応答性口側特異的配列およびTAM抑制性口側特異的配列のアミノ酸配列について、まず、Signal P6.0を用いてシグナルペプチド配列の有無を調べた。さらに、SOSUisignalを用いて膜貫通ドメインの有無を調べ、シグナルペプチドを持つが膜貫通ドメインを持たないものを分泌タンパク質として同定した。その結果、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。これらの分泌タンパク質のうち、eggNOGmapper (v2) を用いて annotation 情報を付加した結果、TAM非応答性口側特異的分泌タンパク質のうち42個、TAM抑制性口側特異的分泌タンパク質11個に annotation 情報があった。既知の、TAM非応答性口側特異的配列 (E-value が小さい上位10個) とTAM抑制性口側特異的配列をTable 8に示す。一方、eggNOGmapper (v2) およびBlastXの両方で annotation のない未知の分泌タンパク質は、TAM非応答性口側特異的配列で79個、TAM抑制性口側特異的配列で23個あった。

Annotation 情報が付加された既知のTAM非応答性口側特異的分泌タンパク質の中には、Wnt (comp100259\_c0\_seq4.p1)、bone morphogenetic protein (BMP) (comp96118\_c0\_seq1.p1)、fibroblast growth factor (FGF) (comp94023\_c0\_seq4.p1) が含まれていた (Table 9)。既知のTAM抑制性口側特異的分泌タンパク質には、FGF (comp102828\_c2\_seq6.p1) が含まれていた。これらのアミノ酸配列を query とし、NCBI (National Center for Biotechnology Information; [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) のデータベース上で *Homo sapiens* のアミノ酸配列を対象としたBLAST検索の結果、それぞれ、Wnt/ BMP/ FGF タンパクと相同性を

有していた (Table 9)。また、Wnt と相同性を示した comp100259\_c0\_seq4.p1 と先行研究 [Khalturin *et al.* 2019]で報告されている *Aurelia* (Atlantic, Baltic sea) Wnt タンパクと配列を比較した結果、Wnt11b と高い相同性 (95 %) を示した。

### [低分子性二次代謝産物生合成酵素の探索]

本解析データにおける低分子性二次代謝産物生合成酵素をコードする遺伝子を同定するため local BLAST 検索を行った。

#### (1) エイコサノイド

アラキドン酸からプロスタグランジン類を合成する COX1, COX2 と相同性を持つ配列は、本解析において見つからなかった (Fig. 29)。一方、4 個の配列 (comp104864\_c0\_seq6.p1、comp104864\_c0\_seq2.p2、comp100782\_c1\_seq5.p1、comp104864\_c0\_seq4.p5) がアラキドン酸からロイコトリエン類を合成するための arachidonate 5-lipoxygenase と相同性を示した (Table 11)。ステージ別の発現量を比較した結果、これらの配列はいずれもポリプ (whole body) とストロビラ (whole body) の TPM 値の間に差異は見られなかった (Fig. 29)。

#### (2) 生理活性アミン

dopamine、serotonin、melatonin、tryptamine などの生理活性アミンを合成する aromatic-L-amino-acid decarboxylase と相同性を持つ配列は、本解析において見つからなかった (Fig. 30)。

#### (3) ステロイド

コレステロールの側鎖を切断する cholesterol side-chain cleavage enzyme と相同性を持つ配列が 1 個 (comp103728\_c0\_seq2.p1) 得られた (Table 11)。ステージ別の発現量を比較した結果、ポリプ (whole body) とストロビラ (whole body) の TPM 値の間に差異は見られなかった (Fig. 31)。

コレステロールの側鎖が切断された後、3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase と steroid 17 $\alpha$ -monooxygenase により、17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone が合成される。3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase と相同性を持つ配列は、本解析において見つからなかった。一方、comp101076\_c2\_seq14.p1 と comp100558\_c1\_seq2.p1 が steroid 17 $\alpha$ -monooxygenase と相同性を示した (Table 11)。この配列のステージ別の発現量を比較した結果、前者はポリプ (whole body) とストロビラ (whole

body) の TPM 値の間に差異は見られなかった。一方、後者はポリプ特異的配列であった (Fig. 31)。

#### (4) レチノイド

レチノイン酸 (retinoic acid) は、(a1) retinol から retinal / (a2) 9-*cis*-retinol から 9-*cis*-retinal、(b) retinal / 9-*cis*-retinal から retinoic acid / 9-*cis*-retinoic acid の 2 段階の酸化還元反応により合成される (Fig. 32)。(a1) の反応を触媒する酵素と相同性を持つ配列が 13 個得られ、これらのうち 7 個がストロビラ特異的配列、1 個がポリプ特異的配列であった (Table 12)。(a2) の反応を触媒する酵素と相同性を持つ配列が 7 個得られ、これらのうち 3 個がストロビラ特異的配列であった。これらのストロビラ特異的配列のうち、4 個 (comp94617\_c0\_seq1.p1, comp103421\_c1\_seq3.p1, comp103889\_c0\_seq5.p1, comp104127\_c0\_seq1.p1) は、TAM 非応答性口側特異的配列であった。また、comp94413\_c0\_seq1.p1 は、TAM 抑制性口側特異的配列であった (Table 12)。(b) の反応を触媒する酵素と相同性を持つ配列が 4 個得られ、これらのうち 1 個がポリプ特異的配列であった (Table 12)。先行研究 [Fuchs *et al.* 2014]で報告されている *Aurelia* (Atlantic, Baltic sea) retinol dehydrogenase 2 タンパクと配列を比較した結果、comp99197\_c0\_seq8.p1 が高い相同性 (99%) を示した。しかし、この配列はポリプ (whole body) とストロビラ (whole body) の TPM 値の間に差異は見られなかった。

また、retinoic acid は、(c) BCDO1 ( $\beta$ -carotene 15,15'-dioxygenase) により  $\beta$ -carotene から合成される。comp83816\_c0\_seq1.p1 と comp83816\_c0\_seq1.p2 が BCDO1 と相同性を持ち、ポリプ特異的配列であった (Table 12)。

なお、見つかった配列については、それらのアミノ酸配列を query とし、NCBI のデータベース上で *Homo sapiens* のアミノ酸配列を対象とした BLAST 検索を行い、その生合成酵素がヒットすることを確認した。

#### 4-1-4. 考察

本研究では、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「分節形成誘導因子」の候補となる因子を探索するため、transcriptome 解析を行った。4 つのサンプルから合計して約 2 億個の read が得られ、これらを用いて *de novo assembly* により contig を生成した。冗長な配列を取り除き、合計 181,271

個の contig を得た (Table 5)。先行研究の結果では、ビゼンクラゲ *Rhopilema esculentum* の transcriptome 解析により、約 1.6 億個の read から 124,831 個の contig が生成された[Ge *et al.*, 2018]。ミズクラゲの例では、生活環における各ステージ (プラヌラ、ポリプ、分節形成期ストロビラ、エフィラ形態形成期ストロビラ、エフィラ、クラゲ) の transcriptome 解析の結果、約 1.6 億個の read から 252,170 個の contig を得た[Brekman *et al.*, 2015]という例があるため、妥当な数の contig が得られたと考えられる。本研究で得られた contig をアミノ酸配列に翻訳した結果、31,683 個の contig が 100 個以上のアミノ酸をコードしていた (Table 6)。先行研究におけるゲノム解析により、*Aurelia* (Atlantic, Baltic sea)、*Aurelia* (Pacific, Roscoff strain) および箱虫綱 *Morbakka virulenta* について、それぞれ 28,625 個、30,166 個、24,278 個の遺伝子が得られたという報告[Khalturin *et al.*, 2019]がある。これら結果と比較しても、本研究の transcriptome 解析において妥当な数の遺伝子が得られたものと考えられる。

得られた配列のうち「分節形成誘導因子」の候補として、(A) 分泌タンパク質、(B) 低分子性二次代謝産物を想定して検討を行った。

#### (A) 分泌タンパク質

本研究では、TPM 値の比が 2 倍より大きいものを発現量に差がある遺伝子とした。その結果、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、合計 18,807 個の遺伝子がステージ特異的な発現パターンを示した。さらにストロビラ特異的遺伝子のうち、正常なストロビラの足側と比べて口側で高発現している遺伝子が 8,720 個見出された (Table 7)。これらのうち、TAM 投与により分節形成を阻害した個体の口側でも正常なストロビラの口側と同程度発現している遺伝子は、5,677 個であり、これらのうち 232 個が分泌タンパク質をコードしていると推定された。これらの遺伝子は、TAM がストロビレーションを阻害する作用点よりも上流のステップに関与している可能性が考えられる。TAM 投与個体の細胞増殖の解析 (第 3 章) において、TAM により分節形成が阻害された個体でも細胞増殖が観察された。このことから、TAM は細胞増殖よりも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と考えられる。そのため、分節形成に関わる因子のうち、細胞増殖の誘導に関わる因子はこれらの中に含まれると考えられる。一方、TAM 投与個体の口側で発現量が減少する

遺伝子は、1,602 個見出され、これらのうち 58 個が分泌タンパク質をコードしていた。これらの遺伝子は、TAM がストロビレーションを阻害する作用点よりも下流のステップに関与している可能性が考えられ、上皮細胞層の陥入を誘導する因子などはこれらの中に含まれることが予想される。

Annotation 情報が付加された TAM 非応答性口側特異的分泌タンパク質 42 個の中に、Wnt、BMP、FGF が含まれていた。これらは、細胞増殖の誘導に関わる因子の候補と考えられる。TAM 抑制性口側特異的分泌タンパク質の中には、FGF が含まれていた。Wnt ファミリー、TGF- $\beta$  ファミリー、FGF ファミリーに属する分泌タンパク質は、他種生物の変態や形態形成において重要な役割を果たしていることが知られている。次節では、これらの分泌タンパク質のストロビレーションへの関与について検討する。

これまでに Fuchs らにより、CL390、CL112、および CL631 がストロビラで発現量が高い分泌タンパクをコードする遺伝子として報告されている [Fuchs *et al.*, 2014]。これらは、本研究の transcriptome 解析データにおいても TAM 抑制性口側特異的配列 (CL390) および TAM 非応答性口側特異的配列 (CL112、CL631) に含まれていた。このことから、本研究における分節形成を制御する「分節形成誘導因子」をコードする候補遺伝子の絞り込みは有効なものと考えられる。

## (B) 低分子性二次代謝産物

エイコサノイドは、アラキドン酸から合成され、傍分泌や自己分泌によって作用する生理活性物質である。プロスタグランジン類を合成する COX1,2 を query として BLAST 検索をした結果、相同性を持つ配列は見つからなかった。当研究室における先行研究により、COX 阻害剤として知られる indomethacin がストロビレーションの開始を誘導することが明らかとなっている。一方で、他のプロスタグランジン類の生合成阻害剤はストロビレーションの開始を誘導しないことから、プロスタグランジン類の生合成経路はストロビレーションに関与していない可能性が示唆される [Kuniyoshi *et al.*, 2012]。アラキドン酸からロイコトリエン類を合成するための arachidonate 5-lipoxygenase と相同性を示す配列は、4 個見つかった。しかし、これらの配列はいずれもポリプとストロビラ間に発現変動は見られなかった。一般的に、ある現象の前後で発現が変動する遺伝子は、その現象に関与している可能性が高いと考えられ、ロイコトリエン類はストロビレーションに積極的に関与しているものではないと考えられる。

dopamine や serotonin、melatonin などの生理活性アミンは、神経伝達に関与し、多くの動物種で生理活性物質として知られている。tryptamine (TAM) は、ストロビレーションの開始、分節形成、エフィラ形態形成を阻害することが明らかとなった (第 3 章)。しかし、tryptophan から TAM を合成する aromatic-L-amino-acid decarboxylase と相同性を持つ配列は、本解析において見つからなかった。そのため、ミズクラゲにおいてはこの生合成経路によりアミン類が合成されておらず、TAM は内因性のストロビレーション阻害物質ではない可能性が考えられる。

ステロイドホルモンは、コレステロールから合成され、生命維持や性ホルモンとしての働きを持つ。昆虫においては、ステロイドホルモンである ecdysteroid が脱皮や変態に関与していることが知られている。*Homo sapiens* の cholesterol side-chain cleavage enzyme、 $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase、steroid  $17\alpha$ -monooxygenase のアミノ配列を query として BLAST 検索をした。その結果、cholesterol side-chain cleavage enzyme、steroid  $17\alpha$ -monooxygenase と相同性を持つ配列が、それぞれ 1 個見つかった。しかし、これらの配列はいずれもストロビラ特異的配列ではなかった。また、 $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase と相同性を持つ配列は見つからなかった。以上のことから、ステロイドホルモンの生合成経路はストロビレーションに積極的に関与しているものではないと考えられる。

レチノイン酸 (retinoic acid) は、胚発生の軸形成において重要な役割を果たすことが知られている。レチノイン酸 (retinoic acid) は、レチノール (retinol) から 2 段階の酸化還元反応により合成される。レチノール (retinol) からレチナール (retinal) を合成する retinol dehydrogenase とレチナール (retinal) からレチノイン酸 (retinoic acid) を合成する retinal/ aldehyde dehydrogenase のアミノ配列を query として BLAST 検索をした。その結果、retinol dehydrogenase と相同性を持つ配列が合計 20 個得られ、これらのうち 10 個がストロビラ特異的配列、1 個がポリプ特異的配列であった。retinal/ aldehyde dehydrogenase と相同性を持つ配列が 4 個得られ、これらのうち 1 個がポリプ特異的配列であった。また、 $\beta$ -carotene からレチノイン酸 (retinoic acid) を合成する BCDO1 と相同性を持つ配列が 2 個見つかり、ポリプ特異的配列であった。レチノールからレチノイン酸を合成する反応のうち、2 段階目の反応を触媒する酵素はポリプ特異的配列またはステージ特異的な発現変動のない配列であったが、1 段階目の反応を触媒する酵素のうち 50% はストロビラ特異的配列であった。Fuchs らにより、バルト海由来 *Aurelia*

(Roscoff strain) において、retinol および 9-*cis*-retinoic acid が内在性のストロビレーション開始誘導因子として働くことが示唆され、retinol dehydrogenase 2 と retinoic X receptor がポリプと比べてストロビラで多く発現していることが報告されている [2014]。これらのことから、レチノイドがストロビレーションに関与している可能性が考えられる。次節では、薬剤投与実験によりレチノイドの分節形成への関与についても検討する。

## 第2節 分節形成における既知シグナル伝達経路の関与

### 4-2-1. 目的

第1節で絞り込んだ他種動物において発生や変態に関与していることが知られる因子について、ミズクラゲのストロビレーションにおける分節形成への関与を検討した。

### 4-2-2. 材料と方法

#### 4-2-2A. ストロビラアッセイ

##### 試料物質

- ・ IWR-1-endo (Cayman Chemical)

5 mg を DMSO 244  $\mu$ L に溶解した stock 溶液 (50 mM) を調製し、-30  $^{\circ}$ C で保存した。

- ・ 1-azakenpauillone (1-AZP, Adipogen Life Sciences)

1 mg を DMSO 609  $\mu$ L に溶解した stock 溶液 (5 mM) を調製し、-30  $^{\circ}$ C で保存した。

- ・ infigratinib (MedChemExpress)

5 mg を DMSO 1.78 mL に溶解した stock 溶液 (50 mM) を調製し、-30  $^{\circ}$ C で保存した。

- ・ mirdametinib (MedChemExpress)

5 mg を DMSO 2.07 mL に溶解した stock 溶液 (50 mM) を調製し、-30  $^{\circ}$ C で保存した。

- ・ DMH1 (Selleck)

5 mg を DMSO 244  $\mu$ L に溶解した stock 溶液 (50 mM) を調製し、-30  $^{\circ}$ C で保存した。

- ・ UVI3003 (Selleck)

5 mg を DMSO 229  $\mu$ L に溶解した stock 溶液 (50 mM) を調製し、-30  $^{\circ}$ C で保存した。

3-1-2C.と同様の方法でストロビラアッセイを行った。分節の数および分節数の増加 ( $\Delta$ segment) の検定には Mann-Whitney *U* test (Bonferroni 法による補正)

を用いた。また、1-AZP を投与した個体の写真を撮影し、Imae J を用いて分節の幅を計測した。分節の幅の検定には、Wilcoxon の符号順位和検定を用いた。また、外部形態で異常を示した個体については、固定した後、切片標本作製し (1-2-2B.)、HE 染色 (1-2-2C.) を行った。

#### 4-2-2C. 薬剤投与個体の抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色

ポリプ/CS で誘導した分節形成期ストロビラ (くびれ 1-3 個) に 4-2-2B. の阻害剤または活性化剤を投与し、10°C で培養した。培養後は、1-2-2B. と同様の方法で固定した。切片標本作製し、2-1-2B. と同様の方法で抗 PCNA 抗体および二次抗体 (HRP 標識抗 Rabbit IgG 抗体) を用いて免疫組織染色を行い、DAB で発色を行った。

#### 4-2-3. 結果

他種動物において、Wnt ファミリー、TGF- $\beta$  ファミリー、FGF ファミリーに属する分泌タンパク質は、発生や変態に関与していることが知られる。第 1 節で絞り込んだ TAM 非応答性/抑制性口側特異的配列の中にもこれらの分泌タンパク質と相同性を持つ配列が見つかった。これらの分泌タンパク質の分節形成への関与を検討するため、薬剤投与実験を行った。

#### [Wnt シグナル活性化剤/阻害剤の投与実験]

分節形成と Wnt の関連について調べるため、Wnt シグナル阻害剤および Wnt シグナル活性化剤の投与実験を行った。分節形成に対する影響については、分節の数、投与後の分節数の増加 ( $\Delta$  segment) および分節の幅を計測することで評価した。

Wnt シグナル阻害剤である IWR-1-endo (最終濃度 50  $\mu$ M) を分節形成期ストロビラ (くびれ 1-2 個) に投与し、ストロビラアッセイを行い、30 日間 10°C で培養した。

阻害剤を投与しない control 群では、分節の形成が進行し、観察期間中に 1-5 個の分節が形成され (Fig. 33b)、3-7 個体のエフィラが遊離した。

IWR-1-endo 投与群 (n = 6) では、観察期間中に形成された分節の数は control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 33a)。IWR-1-endo 投与後

の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) は、0個または1個であり、control群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 33b)。全ての個体で、エフィラへの形態形成が進行せず、正常なエフィラを遊離した個体はいなかった。IWR-1-endo を投与した分節形成期ストロビラについて、抗 PCNA 抗体を用いて細胞増殖を検出した (Fig. 34)。その結果、IWR-1-endo 投与個体では、口側の IWR-1-endo 投与前に形成された分節、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、正常な分節形成期ストロビラ (Fig. 11g, h) と比較すると少ない傾向が見られた (Fig. 34b, c)。

分節形成期ストロビラ (くびれ1-2個) に Wnt シグナル活性化剤である 1-AZP (最終濃度 2  $\mu$ M) を投与し、ストロビラアッセイを行い、30日間 10°C で培養した。

1-AZP を投与しない control 群では、分節の形成が進行し、観察期間中に 2-6 個の分節が形成され (Fig. 35b)、4-7 個体のエフィラが遊離した。

1-AZP 投与群 ( $n = 6$ ) では、観察期間中に形成された分節の数は control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 35a)。1-AZP 投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) は、1個または2個であり、control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 35b)。6 個体中 1 個体で、1-AZP 投与後に形成された分節は、投与前に形成された分節と比べて幅が大きくなる形態異常が見られた (Fig. 36a)。

再度、分節形成期ストロビラ (くびれ3-5個) に 1-AZP (最終濃度 2  $\mu$ M) を投与し、ストロビラアッセイを行った ( $n = 6$ )。その結果、6 個体全てで 1-AZP 投与後に形成された分節が投与前に形成された分節と比べて大きくなる形態異常が見られた。これらの個体の分節の幅を写真上で計測した結果、各個体の 1-AZP 投与後に形成された分節の幅が、投与前に形成された分節の幅より有意に大きくなっていた (Fig. 36b)。1-AZP 投与により分節の幅が大きくなる形態異常を示した個体について、パラフィン切片を作製して HE 染色を行い、内部形態を観察した。その結果、外胚葉・内胚葉の上皮細胞層は正常な分節と同様に二層構造を維持しており、HU 投与で見られたような中膠の肥大は確認されなかった (Fig. 36c)。

1-AZP を投与した分節形成期ストロビラおよびポリプについて、抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色を行い、細胞増殖を検出した。その結果、1-AZP を投与した分節形成期ストロビラでは、幅が大きくなった分節のさらに下側の反口側の

領域でも細胞増殖が検出された (Fig. 37a, b)。

1-AZP をポリプに投与し、6日間培養した (絶食期間計 15 日)。培養期間中、外部形態の変化は観察されなかった。この個体について、抗 PCNA 抗体を用いて細胞増殖を検出した結果、同一期間、絶食をしたポリプ (薬剤非投与: Fig. 11a, e) と比べて、シグナルが多く観察された (Fig. 37c)。1-AZP を投与したポリプでは、外胚葉層・内胚葉層の両方で細胞増殖は起きており、反口側の領域でもシグナルが検出された (Fig. 37d)。

### [FGF シグナル阻害剤の投与実験]

分節形成と FGF の関連について調べるため、FGFR1/2/3 チロシンキナーゼの阻害剤 *infigratinib* [Guagnano *et al.*, 2011] および ERK 阻害剤 *mirdametininib* [Barrett *et al.*, 2008] の投与実験を行った。分節形成期ストロビラ (くびれ 1–3 個) に *infigratinib* (最終濃度 25  $\mu\text{M}$ ) または *mirdametininib* (最終濃度 12.5  $\mu\text{M}$ ) を投与し、ストロビラアッセイを行い、10 日間 10°C で培養した。分節の数および投与後の分節数の増加 ( $\Delta$  segment) を計測し、分節形成に対する影響を評価した。

阻害剤を投与しない control 群では、分節の形成が進行し、観察期間中に 2–3 個の分節が形成され (Fig. 38b)、4–7 個体のエフィラが遊離した。

*infigratinib* 投与群 (n = 6) では、観察期間中に形成された分節の数は control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 38a)。*infigratinib* 投与後の分節数の増加 ( $\Delta$  segment) は、0 個または 1 個であり、control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 38b)。培養開始後、6 日程度で触手が崩壊し、死亡する個体が観察され、10 日では 6 個体中 4 個体で触手およびストロビラ口側が崩壊した。

*mirdametininib* 投与群 (n = 6) では、観察期間中に形成された分節の数は control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.05$  vs control) (Fig. 38a)。*mirdametininib* 投与後の分節数の増加 ( $\Delta$  segment) は、0 個または 1 個であり、control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 38b)。培養開始後、7 日程度で触手が崩壊し、死亡する個体が観察され、10 日では 6 個体全てで触手およびストロビラ口側が崩壊した。

## [BMP シグナル阻害剤の投与実験]

分節形成と BMP の関連について調べるため、BMP レセプター阻害剤の投与実験を行った。分節形成期ストロビラ (くびれ 1–3 個) に DMH1 (最終濃度 50  $\mu\text{M}$ ) を投与し、ストロビラアッセイを行い、30 日間 10°C で培養した。分節の数および投与後の分節数の増加 ( $\Delta\text{segment}$ ) を計測し、分節形成に対する影響を評価した。

DMH1 を投与しない control 群では、分節の形成が進行し、観察期間中に 2–4 個の分節が形成され (Fig. 39b)、3–6 個体のエフィラが遊離した。

DMH1 投与群 ( $n=6$ ) では、投与後、2–4 個の分節が増加し、30 日間の観察中に形成された分節の数は control 群と比べて有意な差は見られなかった (Fig. 39a)。DMH1 投与後の分節数の増加 ( $\Delta\text{segment}$ ) についても、control 群と比べて有意な差は見られなかった (Fig. 39b)。正常なストロビレーションでは、分節形成の後、エフィラ形態形成初期に触手が退縮する。DMH1 を投与した全ての個体で、分節形成期に触手が退縮する異常が見られた。一方で、分節形成およびエフィラ形態体形成には著しい異常は観察されなかった。

## [レチノイドシグナル阻害剤の投与実験]

バルト海由来 *Aurelia* (Roscoff strain) において、レチノイン酸がストロビレーションの開始を誘導することが報告されている [Fuchs *et al.*, 2014]。第 1 節で探索したレチノール (retinol) からレチナール (retinal) を合成する酵素をコードする遺伝子のうち、4 個が TAM 非応答性口側特異的配列、1 個が TAM 抑制性口側特異的配列であった。レチノイドの分節形成への関与を検討するため、レチノイドレセプター阻害剤の投与実験を行った。分節形成に対する影響については、分節の数、投与後の分節数の増加 ( $\Delta\text{segment}$ ) および分節の幅を計測することで評価した。

レチノイドレセプター阻害剤である UVI3003 (最終濃度 5  $\mu\text{M}$ ) を分節形成期ストロビラ (くびれ 1–3 個) に投与し、ストロビラアッセイを行い、16 日間 10°C で培養した。

阻害剤を投与しない control 群では、分節の形成が進行し、観察期間中に 2–4 個の分節が形成され (Fig. 40b)、4–5 個体のエフィラが遊離した。

UVI3003 投与群 ( $n=6$ ) では、観察期間中に形成された分節の数は control 群

と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 40a)。UVI3003 投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) は、全ての個体で 0 個であり、control 群と比べて有意に少なかった ( $p < 0.01$  vs control) (Fig. 40b)。全ての個体で、エフィラへの形態形成が進行せず、正常なエフィラを遊離した個体はいなかった。

#### 4-2-4. 考察

##### [Wnt シグナルの分節形成への関与]

Wnt シグナルは、胚発生や器官形成などに大きな役割を果たしていることが知られており、ショウジョウバエから線虫、ヒトに至るまで広く保存されたシグナル伝達経路である。刺胞動物においても、花虫綱、箱虫綱、鉢虫綱、ヒドロ虫綱で Wnt が保存されている。ミズクラゲにおいては、近年のゲノム解析により Wnt (A, 1-8, 11,16) が存在していることが報告された [Khalturin *et al.*

2019]。本研究においても、Wnt タンパクと相同性を持つ配列

(comp100259\_c0\_seq4.p1) が TAM 非応答性口側特異的配列に含まれていた。

Wnt シグナル伝達経路の分節形成に対する影響を調べるため、Wnt シグナル阻害剤と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た (Fig. 33)。抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色の結果、Wnt シグナル阻害剤投与個体では、分節および次の分節が形成される予定領域で観察されたシグナルは少なかった (Fig. 34)。

Wnt シグナル活性化剤投与個体では、抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色により、反口側の領域でも細胞増殖が検出された (Fig. 37b)。正常な分節形成期ストロビラ (Fig. 11c) では、反口側の領域ではほとんど細胞増殖は検出されない。また、Wnt シグナル活性化剤をポリプに投与した場合、正常なポリプと比べて細胞増殖が多く検出された (Fig. 11a, e vs Fig. 37c, d)。これらの事から、ミズクラゲのポリプ/ ストロビラにおいても、Wnt シグナルにより細胞増殖が誘導されることが確認された。

以上の結果から、Wnt シグナル伝達経路が分節形成における細胞増殖に関与していることが示唆された。

Wnt シグナル活性化剤を投与した場合でも、分節の形成が阻害され (Fig. 35)、活性化剤の投与後に形成された分節の幅が広がる形態異常が観察された (Fig. 36)。ストロビラの分節は、通常、等間隔に形成されることが知られてい

る [Kroiher et al., 2000]。形態異常を示した個体について、パラフィン切片を製作して内部形態を観察した。その結果、外胚葉・内胚葉の上皮細胞層は二層構造を維持しており、くびれの位置が反口側にずれたことにより、分節の幅が広がったことが明らかとなった (Fig. 36c)。Wnt シグナル活性化剤の投与により、幅が広い分節が形成された後、次の分節が形成されなかった。その結果、正常なストロビラと比べて形成された分節の数が少なくなったと考えられる。このことから、正常な分節が形成されることが、次の分節を形成するために必要であることが示唆された。

### [FGF シグナルの分節形成への関与]

FGF は、胚発生、組織の発達や修復などに関連することが知られており、広汎な細胞プロセスにおいて重要な役割を果たす多機能性細胞間シグナル因子である。刺胞動物においては、*N. vectensis* の幼生において原腸陥入や神経発達 [Matus et al., 2007]、感覚器官の形成 [Rentzsch et al., 2008] に関与することが報告されている。本研究で検出した FGF と相同性を持つ配列のうち、1 個 (comp94023\_c0\_seq4.p1) は TAM 非応答性口側特異的配列、1 個 (comp102828\_c2\_seq6.p1) は TAM 抑制性口側特異的配列であった。FGF の分節形成に対する影響を調べるため、FGFR1/2/3 チロシンキナーゼ阻害剤およびその下流で働く ERK 阻害剤の投与実験を行った。その結果、FGFR1/2/3 チロシンキナーゼ阻害剤、ERK 阻害剤を投与した群の両方で分節形成が阻害された (Fig. 38)。このことから、FGF シグナル伝達経路が分節形成に関与している可能性が考えられる。一方で、阻害剤の投与により触手および口側が崩壊して死亡する個体が観察された。FGF シグナル伝達は、分節形成以外にも広汎な生体活動に影響を与えると考えられる。これらの阻害剤は、ストロビラの生命維持に必要な反応も阻害し、その結果、ストロビラが死亡したものと考えられる。

### [BMP シグナルのストロビレーションへの関与]

軟骨組織や骨形成の制御因子として発見された BMP は、TGF- $\beta$  と配列の類似性を持ち、TGF- $\beta$  スーパーファミリーに含まれ、胚発生や、組織や器官の形態形成に関与することが明らかとなっている。ショウジョウバエの *Decapentaplegic (Dpp)* は、哺乳類 *BMP2/4* の機能性オホログであり、胚の背腹軸形成を制御し、形態形成や成長に必須である。刺胞動物においては、サン

ゴにおける *dpp/BMP2/4* 遺伝子の発現局在の解析が行われている [Hayward et al., 2002]。 *N. vectensis* においては、筋肉の発育抑制遺伝子である *myostatin* 遺伝子が同定されている [Saina and Technau, 2009]。

本研究においても、BMP と相同性を持つ配列 (comp96118\_c0\_seq1.p1) が TAM 非応答性口側特異的配列に含まれていた。BMP の分節形成に対する影響を調べるため、BMP レセプター阻害剤の投与実験を行った。その結果、分節形成の阻害活性は見られなかった (Fig. 39)。一方で、エフィラ形態形成に著しい異常は見られないものの、エフィラ形態形成の初期段階である触手の退縮が、通常よりも早く起こることが観察された。このことから、BMP はエフィラ形態形成期に関与する可能性が考えられる。

#### [レチノイドのストロビレーションへの関与]

レチノイン酸は、バルト海由来 *Aurelia* (Roscoff strain) においてストロビレーション開始誘導因子として働くことが示唆されている [Fuchs et al., 2014]。レチノイドシグナル伝達経路の分節形成に対する影響を調べるため、レチノイドレセプター阻害剤の投与実験を行った。その結果、阻害剤の投与により分節の形成が阻害された (Fig. 40)。このことから、レチノイドシグナル伝達経路が分節形成に関与している可能性が考えられる。一方で、Fuchs らがストロビラで発現量の多い遺伝子として報告した retinol dehydrogenase 2 (Table 12; comp99197\_c0\_seq8.p1) および retinoic X receptor (data not shown) は、本解析データではポリプとストロビラの間で発現量の差は見られなかった。また、当研究室の *A. coerulea* (KH5A 株) では、retinol によりストロビレーションは誘導されなかった [鈴木, 2017]。中国膠州湾由来の *A. coerulea* に対しても、retinol および retinoic acid は開始誘導活性を示さなかった [Wang et al., 2020]。バルト海などのヨーロッパ周辺の海域に生息するミズクラゲと、日本・中国周辺に生息するミズクラゲでは、遺伝的背景が大きく異なっている可能性がある [Dawson et al., 2001, Scorrano et al., 2016]。以上のことから、レチノイドはストロビレーションに関与していると考えられるが、種または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

### 第1章

・ストロビレーションの形態変化を観察し、ステージ分けを行った。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、ストロビレーションを誘導してから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。エフィラ形態形成期は、触手退縮中の初期、触手退縮後に各分節がディスク状に形態を変える中期、拍動を開始する後期に分けられる。ストロビレーションの最終段階は、エフィラ遊離期と呼び、口側から順にエフィラが遊離する。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。

・内部形態の変化は、次の通りである。プレストロビラの内部形態は、ポリプと比較して差異が見られない。ストロビレーションが開始すると、上皮細胞層は外胚葉細胞層と内胚葉性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(分節形成期)。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る。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。

### 第2章

・ポリプでは、ほとんど細胞増殖が検出されなかった。

・ストロビレーションの開始において、くびれの陥入に先立ち、分節1が形成される予定領域で細胞増殖が起きていることが明らかとなった。分節1が形成されれば、その後のストロビレーションは誘導刺激非依存的に進行することから、細胞増殖は、ストロビレーションの開始において分節1を形成するために重要な役割を果たしていると考えられる。

・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、プレストロビラの触手のすぐ下の領域でくびれが生じる前に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る。

・分節形成において、次の分節が形成される予定領域で細胞増殖が起きており、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ストロビラの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る。

・細胞増殖阻害剤の投与により、エフィラ形態形成には異常が見られたが、異常を生じた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る。

・ストロビラ切断実験の結果、すでに形成された口側の分節が、反口側の領域の分節形成を誘導する「分節形成誘導因子」を分泌している可能性が示唆された。

### 第3章

・ tryptamine (TAM)、 *N*-acetyltryptamine (AcTAM)、 5-methoxyindole (5MeOIn) の3つのインドール化合物は、「ストロビレーション開始阻害活性」に加えて、「分節形成阻害活性」、「エフィラ形態形成阻害活性」を持つことを確認した。

・ 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。

・ TAMは50  $\mu$ Mの投与で分節形成阻害活性を示し、投与から3日でcontrol群と比べて有意な分節形成阻害活性を示すことが明らかとなった。

・ TAM、AcTAM、5MeOInにより分節形成が阻害された場合、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、エフィラ形態形成は分節形成が完了する前に開始している可能性が示唆された。

・ TAMをエフィラ形態形成初期ストロビラに投与しても阻害活性を示さなかったことから、TAMは触手退縮前に起きるステップに作用することが予想される。

・ TAM、AcTAM、5MeOInの投与により、分節間のくびれから触手様の突起が生じた。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。

## 第4章

・次世代シーケンサーを用いた transcriptome 解析の結果、約2億個の read から平均配列長 743.8 塩基の contig が 181,271 個得られた。これらのうち、31,683 個の contig が 100 個以上のアミノ酸をコードしていた。

・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。

・ストロビラの部位別の発現量の比較により、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多く発現していた。

・TAM の影響を受けず、ストロビラの口側で多く発現している TAM 非応答性口側特異的配列が 5,677 個、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が 1,602 個見出された。

・「分節形成誘導因子」の候補となる分泌タンパク質について検討した結果、TAM 非応答性口側特異的配列のうち 42 個、TAM 抑制性口側特異的配列のうち 11 個が分泌タンパク質と推定された。これらの中に Wnt 遺伝子ホモログ、BMP 遺伝子ホモログ、FGF 遺伝子ホモログが含まれていた。

・Wnt シグナル阻害剤の投与により分節形成が阻害され、分節および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が少なかった。また、Wnt シグナル活性化剤の投与により、分節形成期ストロビラの反口側の領域およびポリプでも細胞増殖が観察された。これらの結果から、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 シグナル阻害剤投与により、分節形成が阻害されたが、触手および口側が崩壊してストロビラが死亡した。このことから、FGF は分節形成に関与している可能性が示唆された。一方、FGF は分節形成以外の生体活動においても重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

・BMP シグナル阻害剤投与では、分節形成阻害活性は確認されず、触手の退縮が分節形成期で起きた。そのため、BMP はエフィラ形態形成に関与している可能性が考えられる。

・「分節形成誘導因子」の候補として、低分子性二次代謝産物 (エイコサノイド、生理活性アミン、ステロイド、レチノイド) の検討を行った。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可能性が示唆された。一方で、先行研究で報告されているバルト海由来 *Aurelia* (Roscoff strain) と日本近海の *A. coerulea* では、作用機序に差異がある可能性が考えられた。

## 総合考察

### [ストロビレーションにおける分節形成モデルの提案]

ミズクラゲのストロビレーションが開始すると、ストロビラの触手のすぐ下に第1くびれができる。そのくびれの下に、さらに新たなくびれが形成され、それを繰り返して口側から反口側に向かって順に複数の分節が形成される。刺胞動物のポリプからクラゲへの変態様式は極めて多様であるが、中でもミズクラゲなどのポリディスクストロビレーションは複数の分節が形成される点でユニークな変態様式である。

先行研究の知見として、低温処理によりストロビレーションを誘導した場合、第1分節が形成された後は、室温に戻しても、分節形成は正常に進行すること [辻田ら, 2015]、indomethacin によりストロビレーションを誘導した場合でも、第1分節が形成された後は、indomethacin を除去しても分節形成は正常に進行すること [Kuniyoshi et al., 2012]が明らかとなっている。第2章第2節のストロビラの切断実験では、すでに形成された分節のすぐ下に新たな分節が形成されることが明らかとなった。これらのことから、すでに形成された口側の分節から、次の分節ができる反口側の領域に向かって新しい分節の形成を誘導する「分節形成誘導因子」が分泌されることが示唆された。第2章の BrdU labeling および抗 PCNA 抗体を用いた免疫組織学的観察から、細胞増殖はすでに形成された分節と次の分節が形成される予定領域で起きていることを明らかにした。さらに、HU 投与によりストロビラの分節形成が阻害されたことから、細胞増殖が分節形成に必要であることが分かった。また、第1章第2節では、パラフィン切片標本の組織化学的観察により、分節間のくびれは上皮細胞層が陥入してできていることを明らかにした。

これらの知見から、以下のような分節形成モデルが考えられる (Fig. 17)。まず、(a) 口側の分節から隣接する反口側の領域に向かって分節の形成を誘導する「分節形成誘導因子」が分泌される。(b) 「分節形成誘導因子」を受け取った、次の分節ができる予定領域で細胞増殖が起こる。そして、(c) 上皮細胞層が陥入してくびれが生じ、新たな分節が完成する。(a)~(c) を繰り返すことで複数の分節が形成される。

(b) 次の分節ができる予定領域で起こる細胞増殖を誘導する因子として、第4章第2節の薬剤投与実験および免疫染色の結果から、Wnt シグナルが関与し

ている可能性が示唆された。また、TAMにより分節形成が阻害された個体でも細胞増殖が観察されたことから、TAMは細胞増殖よりも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と考えられる。

### [Wntファミリータンパクと細胞増殖]

Wntシグナル伝達経路のうち、最もよく研究されている $\beta$ -カテニン経路は細胞の増殖や分化を制御することが知られている。刺胞動物においては、花虫綱の *Nematostella vectensis* において、7個の *Wnt* ファミリー遺伝子のホモログ (*WntA*, 1, 5–7, 9–10) の存在が報告されている [Kusserow et al., 2005, Lee et al., 2006]。ヒドロ虫綱の *Hydra magnipapillata* では、8個の *Wnt* ファミリー遺伝子のホモログ (*Wnt1–3*, 5, 7, 8, 11, 16) と、他種の *Wnt9/10* と類似性はあるものの相同性が低い *HyWnt9/10a*, *9/10b*, *9/10c* が見つかっている [Lengfeld et al., 2009]。ミズクラゲにおいては、ゲノム配列が公開され、*Wnt-9* と *Wnt-10* 以外の *Wnt* 遺伝子ファミリーが存在することが報告されている [Gold et al., 2019; Khalturin et al., 2019]。本研究の transcriptome 解析においても、ミズクラゲ *Wnt 11b* と高い相同性 (identity 95%) を持つ配列が見出され、TAMの影響を受けず分節形成期ストロビラの口側領域で多く発現していた。

細胞増殖は、動物の変態において重要な役割を果たすことが知られており、刺胞動物の変態においても細胞増殖が関与している [Plickert et al., 1988, Balcer and Black, 1991, Gurska and Garm, 2014, Gold et al., 2016, Fujita et al., 2019]。ヒドロ虫綱の *Hydra vulgaris* では、頭部の再生においてアポトーシスの刺激に応答して *Wnt-3* タンパクが細胞増殖を誘導することが報告されている [Chera et al., 2009]。本論文第2章では、ミズクラゲの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について検討した。その結果、分節形成において上皮細胞層の陥入に先立ち、次の分節が形成される予定領域で細胞増殖が起きていることを見出した。第4章では、*Wnt* シグナル阻害剤の投与により、分節形成が阻害されることを明らかにした。また、*Wnt* シグナル阻害剤投与個体の分節および次の分節が形成される予定領域では、検出された細胞増殖シグナルが少なかった。*Wnt* シグナル活性化剤の投与により、分節形成期ストロビラの反口側の領域およびポリプでも細胞増殖が観察された。これらの領域は、薬剤非投与個体では、ほとんど細胞増殖が検出されない部分である。以上のことから、ミズク

ラゲの分節形成においても Wnt シグナルが細胞増殖を誘導している可能性が示唆される。

### [分泌性シグナルタンパク質と体軸形成]

Wnt ファミリータンパクや TGF- $\beta$  ファミリータンパクは、体軸形成にも関与している。ショウジョウバエなど完全変態昆虫では、幼虫の段階で成虫のどの器官に分化するか運命決定されている成虫原基という組織を持つ。ショウジョウバエの成虫原基の形成において、*Wnt-1* および *BMP* のショウジョウバエのホモログである *Decapentaplegic (dpp)* が体軸形成において重要な役割を果たすことが知られている [Cohen *et al.*, 1993]。また、コオロギの脚の再生においては、*wingless* と *dpp* がそれぞれ脚芽の腹側、背側で発現することが知られている [Mito *et al.*, 2002, Nakamura *et al.*, 2008]。

刺胞動物においても口-反口軸の形成において Wnt が関与していることが知られている [Holstein, 2022]。*H. magnipapillata* では、Wnt シグナル伝達経路は、頭部オーガナイザーの形成および口-反口軸の形成に関与している [Broun *et al.*, 2005]。ミズクラゲなどのポリディスクストロビレーションにおいて形成された各分節は、エフィラとなって遊離し、最終的には1個体の成体クラゲとなる。つまり、分節形成はストロビラの口-反口軸を分割し、分節ごとに口-反口軸を再形成していると解釈することができたため、Wnt シグナルは、分節形成において分節ごとの口-反口軸の形成に関与している可能性も考えられる。

### [FGF ファミリータンパクとストロビレーション]

細胞や組織の動きにより三次元的な器官や個体を形成する「形態形成」は細胞の成長や分化と並び、発生において重要な現象である。ショウジョウバエの気管原基の陥入においては、細胞増殖の分裂期に入った後、EGF シグナルと FGF シグナルはそれぞれ独立に上皮細胞層の陥入を補助する役割を持ち、気管原基の陥入に必要であることが報告されている [Kondo and Hayashi, 2013]。

ミズクラゲのストロビレーションにおける分節形成では、次の分節が形成される予定領域で細胞増殖が起き、その下側で上皮細胞層が胃腔側へ陥入することで分節間のくびれが形成されていた。TAM 投与により分節形成を阻害した個体でも細胞増殖が観察されたことから、TAM は細胞増殖よりも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と考えられる。本論文第4章の

transcriptome 解析で絞り込んだ、TAM の投与により分節形成期ストロビラの口側での発現量が減少する TAM 抑制性口側特異的配列には、上皮細胞層の陥入に関与する因子が含まれることが予想される。本解析で検出した FGF と相同性を有する配列の 1 つは、TAM 抑制性口側特異的配列であった。また、FGF シグナル伝達経路の阻害剤投与により分節形成が阻害されたことから、FGF シグナルが分節形成に関与している可能性が考えられる。

一方で、TAM を分節形成期に投与した場合、投与前に形成された分節でもエフィラ形態は形成されず、TAM は分節形成の阻害に加えて、エフィラ形態形成も阻害していた。TAM 抑制性口側特異的配列の中には、先行研究 [辻田, 2018]において 1 つ目の分節の形態形成に関与することが見出された *aspartylglucosaminidase* も含まれていた。これらのことから、TAM 抑制性口側特異的配列の中には、エフィラ形態形成に関与するものも含まれていると考えられる。刺胞動物のクラゲ形態の形成を誘導する因子に関する先行研究は多くないものの、エダアシクラゲ *Cladonema pacificum* の触手の枝分かれ構造の形成に FGF シグナルが関与することが報告されている [Hou, 2021]。

以上のことから、ミズクラゲのストロビレーションに FGF シグナル伝達経路が関与している可能性はあるものの、さらなる研究によりその役割の解明が望まれる。

## [今後の展望]

本論文第 4 章の結果から、Wnt シグナル伝達経路は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。しかしながら、上皮細胞層の陥入など細胞増殖後のステップを誘導する因子については、さらなる解析が必要である。

本研究の transcriptome 解析により、ストロビラ特異的遺伝子 13,206 個、これらのうち、正常なストロビラの分節を含む口側で発現量が多い配列が 8,720 個とストロビレーションに関連することが予想される遺伝子が多数見つかった。それらのうち、TAM 非応答性口側特異的分泌タンパク質および TAM 抑制性口側特異的分泌タンパク質に絞り込んだ結果、それぞれ 42 個、11 個の配列が得られた。これらの遺伝子のストロビレーションへの関与を詳細に調べるためには、局在解析による絞り込みが有効であると考えられる。具体的には、ストロビレーションのステージ別の組織切片を作製し、各配列に対する抗体を用いた

免疫組織染色によるタンパク質の局在解析と、*in situ* hybridization 法による mRNA の局在解析を行う。先行研究では、whole-mount での染色例がほとんどであり、内胚葉層で発現していた場合などは観察が困難である。本研究では、ミズクラゲのポリプ/ストロビラにおける組織学的観察の手法を整え、固定・パラフィン切片の作製およびパラフィン切片上での免疫染色を可能にした。また、TAM 抑制性口側特異的配列の FGF ホモログ (comp102828\_c2\_seq6.p1) については、抗体を作製済みである。今後は、免疫染色の条件検討を行い、局在を組織切片上で観察することが必要である。

*in situ* hybridization 法については、ミズクラゲストロビラの whole-mount での先行研究による実施例がある [Fuchs *et al.*, 2014]。パラフィン切片における条件検討が必要ではあるものの、これらの手法を用いて各配列のストロビレーションのステージおよび部位による局在を調べることが望まれる。

さらに、分節形成における役割を明らかにするためには、絞り込んだ配列情報を基にした機能解析が必要である。実験系の確立が課題であるが、RNAi や TALEN、CRISPR/Cas9 などのゲノム編集技術を用いた loss-of-function 実験により、候補遺伝子の機能解析を行いたい。ミズクラゲにおける RNAi の手法は Fuchs らによる報告例がある[2014]。ゲノム編集については、刺胞動物では *N. vectensis* において成功例がある [Ikmi *et al.*, 2014]。また、遺伝子導入や組み換えタンパク質の投与実験などの gain-of-function 実験により、得られた候補因子の機能を確認することも必要となると考えられる。

また、分節形成に特異的に作用する遺伝子を同定するためには、新たな活性物質の発見が手掛かりになると考えられる。ストロビレーション開始誘導物質である indomethacin [Kuniyoshi *et al.*, 2012] や本研究で特徴付けを行った TAM は、当研究室で行った NPDepo 化合物ライブラリー [Osada, 2010] に含まれる化合物のスクリーニングによって見出された。また、広島大学菌株コレクション (HUT) の放線菌株の二次代謝産物のスクリーニングにより、ストロビラの形態異常を引き起こす物質も見つかった [Misaki *et al.*, 2023]。このような、大規模なスクリーニングを行うことで新たなストロビレーション関連物質を発見することが期待される。分節形成のみを阻害する、つまり、新たな分節は形成されないが、すでに形成された分節はエフィラとなるような活性を持つ化合物を発見することができれば、分節形成に特異的にはたらくシグナル因子の同定に活用できると考えられる。本研究では、ストロビレーションの各過程に対する化

化合物の影響を調べるバイオアッセイ系を整備した。形成された分節の数および投与後の分節数の増加を調べることで、分節形成に対する影響を定量的に評価することができる。また、ストロビレーションのステージを定義したことにより、化合物の投与タイミングを変え、活性を示すステージを詳細に検討することも可能である。これらのバイオアッセイ法を用いて、ストロビレーション関連物質の特徴づけを行うことが期待される。

本研究では、得られた transcriptome 解析データに対して、分節形成誘導因子をコードする遺伝子を同定する目的でバイオインフォマティクス解析を行った。そのため、ストロビラ特異的配列であり、かつ、ストロビラの口側領域で高発現している遺伝子に絞って解析を進めた。しかし、得られた配列情報の中には、ポリプ特異的配列やストロビラの足側で発現が多い遺伝子も多数含まれており、これらの活用が望まれる。ミズクラゲのストロビレーションにおいて、反口側の末端はエフィラにならず、残体となりポリプに再生する。ポリプとストロビラの反口側で共通して発現量が多い遺伝子は、ポリプ形態の維持に関与している可能性があり、ポリプのステージマーカーとして活用できると考えられる。さらに、この遺伝子が TAM を投与した個体の分節領域でも発現しているのであれば、TAM 投与により異所性触手を生じ、各分節がポリプ様になる現象についても、理解が深まることが期待される。

また、本研究のバイオインフォマティクス解析を通して当研究室におけるドライ解析の基盤を構築できたものとする。近年の次世代シーケンサーの発展と普及により、RNA sequencing はますます安価かつ迅速になっている。公共データベース上に様々な RNA sequencing データが登録されており、これを活用した解析を行うことも可能である。例えば、ミズクラゲと同じくストロビレーションにおいて複数の分節を形成 (ポリディスクストロビレーション) する別種のクラゲの遺伝子発現データと比較することで、ポリストロビレーションを行う種に共通するストロビレーション制御因子を探索することができる。一方、分節が1つのみ形成されるモノディスクストロビレーションをする種と比較することで、ポリディスクストロビレーションにおいて複数の分節が形成されるメカニズムについても知見を得ることができると考える。

刺胞動物ミズクラゲは、外胚葉・内胚葉性上皮細胞層から構成される袋状のシンプルな構造を持つ。しかし、ポリプ世代とクラゲ世代からなる複雑な生活環を持ち、その世代交代に伴う形態変化は多数のステップからなる。中でも、

ストロビレーションにおける分節形成は、将来的に1個体のクラゲとなる分節が、1個体のストロビラの胴体に複数形成される大変興味深いステップである。本研究では、分節の形成に先立ち、新たな分節が形成される予定領域で細胞増殖が起きることを明らかにした。さらに、分節形成を誘導するシグナル因子を transcriptome 解析により網羅的に探索し、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、本研究は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ている。

## 謝辞

本論文は、著者が広島大学大学院統合生命科学研究科 水族生化学研究室において、2017年から2024年までおこなった研究成果を、同研究室 国吉久人准教授のご指導のもとにまとめられたものです。本研究の遂行および本博士論文の作成にあたり、終始変わらぬ丁寧なご指導とご教授を賜りました国吉久人准教授に心より感謝申し上げます。

同研究科 細胞機能化学研究室 荒川賢治准教授には、副査としてご助言と御高閲を賜り、また、生物有機化学分野の実験手法に関して多大なご尽力を頂きました。同研究科 分子栄養学研究室 矢中規之教授には、副査としてご指導と御高閲を賜り、また蛍光顕微鏡観察および BrdU labeling に関して多大なご助言を賜りました。本研究を遂行するにあたり、同研究科 免疫生物学研究室 堀内浩幸教授には、本博士論文作成にあたり副査として多くのご助言と御高閲を賜りました。この場を借りて深謝申し上げます。

組織切片作製や染色を行うにあたり懇切丁寧な指導をしてくださり、幾度となくミクロトームをお貸しくいただきました、同研究科 生物生殖学研究室 島田昌之教授、川合智子博士には厚くお礼申し上げます。

本論文第2章の免疫組織染色につきまして、多大なご助言およびご協力を賜りました同研究科 家畜生体機構学研究室 磯部直樹教授に心よりお礼申し上げます。

また、本研究に関してアドバイスをいただきました東京海洋大学海洋生命科学部 小山寛喜助教に深く感謝いたします。

本研究において使用された濾過海水は、広島大学瀬戸内 CN 国際共同研究センター ブルーイノベーション部門水産実験所で調製されたものを使用させていただきました。同実験所 大塚攻教授、岩崎貞治氏に心よりお礼申し上げます。

本研究の一部は、日本科学協会の笹川科学研究助成および水産無脊椎動物研究所個別研究助成による助成を受けたものです。本論文第4章のバイオインフォマティクス解析を行うにあたり、生命情報・DDBJセンターの Maser を利用しました。この場を借りて、お礼申し上げます。

最後に、本研究を行うにあたり多大なご協力をいただきました、辻田菜摘博士をはじめとする水族生化学研究室の皆様、長きに渡る学生生活を支えてくれた家族に感謝いたします。

## 引用文献

Adler L, Jarms G (2009) New insights into reproductive traits of scyphozoans: special methods of propagation in *Sanderia malayensis* GOETTE, 1886 (Pelagiidae, Semaestomeae) enable establishing a new classification of asexual reproduction in the class Scyphozoa. *Mar Biol* 156:1411 – 1420. doi: 10.1007/s00227-009-1181-6

Balcer LJ, Black RE (1991) Budding and strobilation in *Aurelia* (Scyphozoa, Cnidaria): functional requirement and spatial patterns of nucleic acid synthesis. *Roux's Arch Dev Biol* 200:45 – 50. doi: 10.1007/BF02457640

Barrett SD, Bridges AJ, Dudley DT, Saltiel AR, Fergus JH, Flamme CM, Delaney AM, Kaufman M, LePage S, Leopold WR, Przybranowski SA, Sebolt-Leopold J, Becelaere KV, Doherty AM, Kennedy RM, Marston D, Howard Jr. WA, Smith Y, Warmus JS, Tecle H (2008) The discovery of the benzhydroxamate MEK inhibitors CI-1040 and PD 0325901. *Bioorganic Med Chem Lett* 18:6501 – 6504. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.10.054

Bode HR, Flick KM, Smith GS (1976) Regulation of Interstitial cell differentiation In *Hydra attenuata*. *J Cell Sci* 20:29 – 46

Brekhman V, Malik A, Haas B, Sher N, Lotan T (2015) Transcriptome profiling of the dynamic life cycle of the scyphozoan jellyfish *Aurelia aurita*. *BMC Genom* :16 – 74. doi: 10.1186/s12864-015-1320-z

Broun M, Gee L, Reinhardt B, Bode HR (2005) Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway. *Development* 132:2907 – 2916. doi: 10.1242/dev.01848

Cantalapiedra CP, Hernandez-Plaza A, Letunic I, Bork P, Huerta-Cepas J (2021)

eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Mol Biol Evol* 38(12):5825 – 5829. doi: 10.1093/molbev/msab293

Chera S, Ghila L, Dobretz K, Wenger Y, Bauer C, Buzgariu W, Martinou JC, Galliot B (2009) Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. *Dev Cell* 17:279 – 289. doi: 10.1016/j.devcel.2009.07.014

Cohen B, Simcox AA, Cohen SM (1993) Allocation of the thoracic imaginal primordia in the *Drosophila* embryo. *Development* 117(2):597 – 608. doi: 10.1242/dev.117.2.597

Collins AG, Schuchert P, Marques AC, Jankowski T, Medina M, Schierwater B (2006) Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Syst Biol* 55(1):97 – 115. doi: 10.1080/10635150500433615

Dawson MN, Jacobs DK (2001) Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Biol Bull* 200:92 – 96

Dequeant ML, Pourquie O (2008) Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nature* 9:370 – 382. doi: 10.1038/nrg2320

Fuchs B, Wang W, Graspentner S, Li Y, Insua S, Herbst EM, Dirksen P, Bohm AM, Hemmrich G, Sommer F, Domazet-Lošo T, Klostermeier UC, Anton-Erxleben F, Rosenstiel P, Bosch TCG, Khalturin K (2014) Regulation of polyp-to-jellyfish transition in *Aurelia aurita*. *Curr Biol* 24:263 – 273. doi: 10.1016/j.cub.2013.12.003

Fujita S, Kuranaga E, Nakajima Y (2019) Cell proliferation controls body size growth,

tentacle morphogenesis, and regeneration in hydrozoan jellyfish *Cladonema pacificum*.  
PeerJ 7:e7579 – . doi: 10.7717/peerj.757

Ge J, Liu C, Tan J, Bian L, Chen S (2018) Transcriptome analysis of scyphozoan jellyfish *Rhopilema esculentum* from polyp to medusa identifies potential genes regulating strobilation. *Dev Genes Evol* 228:243 – 254. doi: 10.1007/s00427-018-0621-z

Gold DA, Nakanishi N, Hensley NM, Cozzolino K, Tabatabaee M, Martin M, Hartenstein V, Jacobs DK (2015) Structure and developmental disparity in the tentacles of the moon jellyfish *Aurelia* sp.1. *PLoS ONE* 10(8):e0134741. doi: 10.1371/journal.pone.0134741

Gold DA, Nakanishi N, Hensley NM, Hartenstein V, Jacobs DK (2016) Cell tracking supports secondary gastrulation in the moon jellyfish *Aurelia*. *Dev Genes Evol* 226:383 – 387. doi: 10.1007/s00427-016-0559-y

Gold DA, Katsuki T, Li Y, Yan X, Regulski M, Ibberson D, Holstein T, Steele RE, Jacobs DK, Greenspan RJ (2019) The genome of the jellyfish *Aurelia* and the evolution of animal complexity. *Nat Ecol Evol* 3:96 – 104. doi: 10.1038/s41559-018-0719-8

Grabherr MG (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* 29:644 – 652. doi: 10.1038/nbt.1883

Gratzner HG, Leif RC, Ingram DJ, Castro A (1975) The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Exp Cell Res* 95:88 – 94

Guagnano V (2011) Discovery of 3-(2,6-Dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-

ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), A Potent and Selective Inhibitor of the Fibroblast Growth Factor Receptor Family of Receptor Tyrosine Kinase. *J Med Chem* 54:7066 – 7083. doi: 10.1021/jm2006222

Gurska D, Garm A (2014) Cell proliferation in cubozoan jellyfish *Tripedalia cystophora* and *Alatina moseri*. *PLoS One* 9(7):e102628. doi: 10.1371/journal.pone.0102628

Hayward DC, Samuel G, Pontynen PC, Catmull J, Saint R, Miller DJ, Ball EE (2002) Localized expression of a dpp/BMP24 ortholog in a coral embryo. *PNAS* 99(12):8106 – 8111. doi: 10.1073/pnas.112021499

Helm RR, Tiozzo S, Lilley MKS, Lombard F, Dunn CW (2015) Comparative muscle development of scyphozoan jellyfish with simple and complex life cycles. *EvoDevo* :6 – 11. doi: 10.1186/s13227-015-0005-7

Helm RR, Dunn CW (2017) Indoles induce metamorphosis in a broad diversity of jellyfish, but not in a crown jelly (Coronatae). *PLoS One* 12(12):e0188601. doi: 10.1371/journal.pone.0188601

Helm RR (2018) Evolution and development of scyphozoan jellyfish. *Biol Rev* 93:1228 – 1250. doi: 10.1111/brv.12393

Hofmann DK, Neumann R, Henne K (1978) Strobilation, budding and initiation of scyphistoma morphogenesis in the rhizostome *Cassiopea andromeda* (Cnidaria: Scyphozoa). *Mar Biol* 47:161 – 176

Holstein TW (2022) The role of cnidarian developmental biology in unraveling axis formation and Wnt signaling. *Dev Biol* 487:74 – 98. doi: 10.1016/j.ydbio.2022.04.005

Hou S (2021) Regulation of interstitial cell behaviors during branching morphogenesis of medusa tentacles in the jellyfish, *Cladonema pacificum*. 東北大学大学院 生命科学 学研究科博士論文

Houliston E, Momose T, Manuel M (2010) *Clytia hemisphaerica* a jellyfish cousin joins the laboratory. *Trends Genet* 26(4):159 – 167. doi: 10.1016/j.tig.2010.01.008

Ikmi A, McKinney SA, Deventhal KM, Gibson MC (2014) TALEN and CRISPR/Cas9-mediated genome editing in the early-branching metazoan *Nematostella vectensis*. *Nat Commun* 5:5486 – . doi: 10.1038/ncomms6486

Ishizuya-Oka A, Ueda S (1996) Apoptosis and cell proliferation in the *Xenopus* small intestine during metamorphosis. *Cell Tissue Res* 286:467 – 476. doi: 10.1007/s004410050716

Jufri AW (2001) Description of the asexual reproduction and strobilation of the scyphistomae stage of *Phyllorhiza punctata*. *Biota* 6(2):49 – 56

Khalturin K, Shinzato C, Khalturina M, Hamada M, Fujie M, Koyanagi R, Kanda M, Goto H, Anton-Erxleben F, Toyokawa M, Toshino S, Satoh N (2019) Medusozoan genomes inform the evolution of the jellyfish body plan. *Nat Ecol Evol* 3:811 – 822

Kondo T, Hayashi S (2013) Mitotic cell rounding accelerates epithelial invagination. *Nature* 494:125 – 130. doi: 10.1038/nature11792

Kraus JEM, Fredman D, Wang W, Khalturin K, Technau U (2015) Adoption of conserved developmental genes in development and origin of the medusa body plan. *EvoDevo* 6:23. doi: 10.1186/s13227-015-0017-3

Kroiher M, Siefker B, Berking S (2000) Induction of segmentation in polyps of *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria) into medusae and formation of mirror-image medusa anlagen. *Int J Dev Biol* 44:485 – 490

Kuniyoshi H, Okumura I, Kuroda R, Tsujita N, Arakawa K, Shoji J, Saito T, Osada H (2012) Indomethacin induction of metamorphosis from the asexual stage to sexual stage in the moon jellyfish *Aurelia aurita*. *Biosci Biotechnol Biochem* 76(7):1397 – 1400. doi: 10.1271/bbb.120076

Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hroudá M, Lentfer J, Schmidt HA, Technau U, Haeseler AV, Hobmayer B, Martindale MQ, Holstein TW (2005) Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 433:156 – 160

Lee PN, Pang K, Matus DQ, Martindale MQ (2006) A WNT of things to come: Evolution of Wnt signaling and polarity in cnidarians. *Semin Cell Dev* 17:157 – 167. doi: 10.1016/j.semcd.2006.05.002

Lengfeld T, Watanabe H, Simakov O, Lindgens D, Gee L, Law L, Schmidt HA, Özbek S, Bode H, Holstein TW (2009) Multiple Wnts are involved in *Hydra* organizer formation and regeneration. *Dev Biol* 330:186 – 199. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.02.004

Matus DQ, Thomsen GH, Martindale MQ (2007) FGF signaling in gastrulation and neural development in *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarian. *Dev Genes Evol* 217:137 – 148. doi: 10.1007/s00427-006-0122-3

Milán M, Campuzano S, García-Bellido A (1996) Cell cycling and patterned cell proliferation in the *Drosophila* wing during metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci* 93:11687 – 11692. doi: 10.1073/pnas.93.21.11687

Misaki Y, Hirashima T, Fujii K, Hirata A, Hoshino Y, Sumiyoshi M, Masaki S, Suzuki T, Inada K, Koyama H, Kuniyoshi H, Arakawa K (2023) 4-Methoxy-2,2'-bipyrrole-5-carbaldehyde, a biosynthetic intermediate of bipyrrole-containing natural products from the *Streptomyces* culture, arrests the strobilation of moon jellyfish *Aurelia coerulea*. *Front Mar Sci* 10:1198136. doi: 10.3389/fmars.2023.1198136

Mito T, Inoue Y, Kimura S, Miyawaki K, Niwa N, Shinmyo Y, Ohuchi H, Noji S (2002) Involvement of hedgehog, wingless, and dpp in the initiation of proximodistal axis formation during the regeneration of insect legs, a verification of the modified boundary model. *Mech Dev* 114:27 – 35

Mostovshchikova PS, Saidovb DM, Kosevichb IA (2022) Morphological Deviations in Ephyrae after Chemical Induction of Strobilation in *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria). *Russ J Dev Biol* 53(2):82 – 98. doi: 10.1134/S1062360422020084

Nakamura T, Mito T, Bando T, Ohuchi H, Noji S (2008) Dissecting insect leg regeneration through RNA interference. *Cell Mol Life Sci* 65:64 – 72. doi: 10.1007/s00018-007-7432-0

Osada H (2010) Introduction of new tools for chemical biology research on microbial metabolites. *Biosci Biotechnol Biochem* 74(6):1135 – 1140. doi: 10.1271/bbb.100061

Peel AD, Chipman AD, Akam M (2005) Arthropod segmentation beyond the *Drosophila* paradigm. *Nat Rev Genet* 6:905 – 916. doi: 10.1038/nrg1724

Plickert G, Kroiher M, Munck A (1988) Cell proliferation and early differentiation during embryonic development and metamorphosis of *Hydractinia echinata*. *Development* 103:795 – 803

Rentzsch F, Fritzenwanker JH, Scholz CB, Technau U (2008) FGF signalling controls formation of the apical sensory organ in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Development* 135:1761 – 1769. doi: 10.1242/dev.020784

Saina M, Technau U (2009) Characterization of myostatin/gdf8/11 in the Starlet Sea Anemone *Nematostella vectensis*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312B:780 – 788

Scorrano S, Aglieri G, Boero F, Dawson MN, Piraino S (2016) Unmasking *Aurelia* species in the Mediterranean Sea: an integrative morphometric and molecular approach. *Zool J Linn Soc.* doi: 10.1111/zoj.12494

Sinclair WK (1965) Hydroxyurea: differential lethal effects on cultured mammalian cells during the cell cycle. *Science* 150(3704):1729 – 1731. doi: 10.1126/science.150.3704.1729

Spangenberg DB (1991) Rhopalium development in *Aurelia aurita* ephyrae. *Hydrobiologia* 216/217:45 – 49

Straehler-Pohl I, Jarms G (2005) Life cycle of *Carybdea marsupialis* Linnaeus, 1758 (Cubozoa, Carybdeidae) reveals metamorphosis to be a modified strobilation. *Mar Biol* 147:1271 – 1277. doi: 10.1007/s00227-005-0031-4

Sugiura Y (1964) On the Life History of Rhizostome Medusae II. Indispensability of zooxanthellae for strobilation in *Mastigias papua*. *Embryologia* 8(3):223 – 233

Sukhoputova AV, Kraus YA (2017) Environmental factors inducing the transformation of polyp into medusae in *Aurelia aurita* (Scyphozoa). *Russ J Dev Biol* 48(2):106 – 116. doi: 10.1134/S1062360417020072

Tsujita N, Kuwahara H, Koyama H, Yanaka N, Arakawa K, Kuniyoshi H (2017) Molecular characterization of aspartylglucosaminidase a lysosomal hydrolase upregulated during strobilation in the moon jellyfish *Aurelia aurita*. *Biosci Biotechnol Biochem* 81(5):938 – 950. doi: 10.1080/09168451.2017.1285686

Ulrich T, Grigory G, Kraus JEM (2015) *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 1 Cnidaria*. 115 – 163

Wang N, Wang M, Wang Y, Li C (2020) Inductive effect of bioactive substances on strobilation of jellyfish *Aurelia coerulea*. *J Oceanol Limnol* 38(5):1548 – 1558. doi: 10.1007/s00343-020-0053-2

Werner B (1971) Life Cycle of *Tripedalia cystophora* Conant (Cubomedusae). *Nature* 232:582 – 583

上真一, 上田有香 (2004) 瀬戸内海におけるクラゲ類の出現動向と漁業被害の実態. *水産海洋研究* 68(1):9 – 19

柿沼好子 (1988) 海産無脊椎動物の発生実験. 培風館, 東京 第3章腔腸動物・有櫛動物:22 – 51

久米又三, 団勝麿 (1957) 無脊椎動物発生学. 培風館

黒田理絵 (2014) ミズクラゲに対する変態調節物質の探索と構造活性相関. 広島大学大学院生物圏科学研究科修士論文

鈴木将司 (2018) ミズクラゲの内在性変態誘導物質の検討. 広島大学大学院生物圏科学研究科修士論文

田中一成 (1991) 抗 PCNA 抗体による細胞増殖核の染色—パラフィン切片への応用—. *病理と臨床* 9(6):791 – 798

辻田菜摘, 黒田理絵, 奥村衣澄, 吉岡沙弥香, 中谷みなみ, 小山寛喜, 国吉久人  
(2015) 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. 生物圏科学  
54:45-54

辻田菜摘 (2018) 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. 広島大学大学院生物圏科学研究科博士論文

安田徹 (2003) 海の UFO クラゲ 発生・生態・対策. 恒星社厚生閣, 東京

# 刺胞動物門 Cnidaria

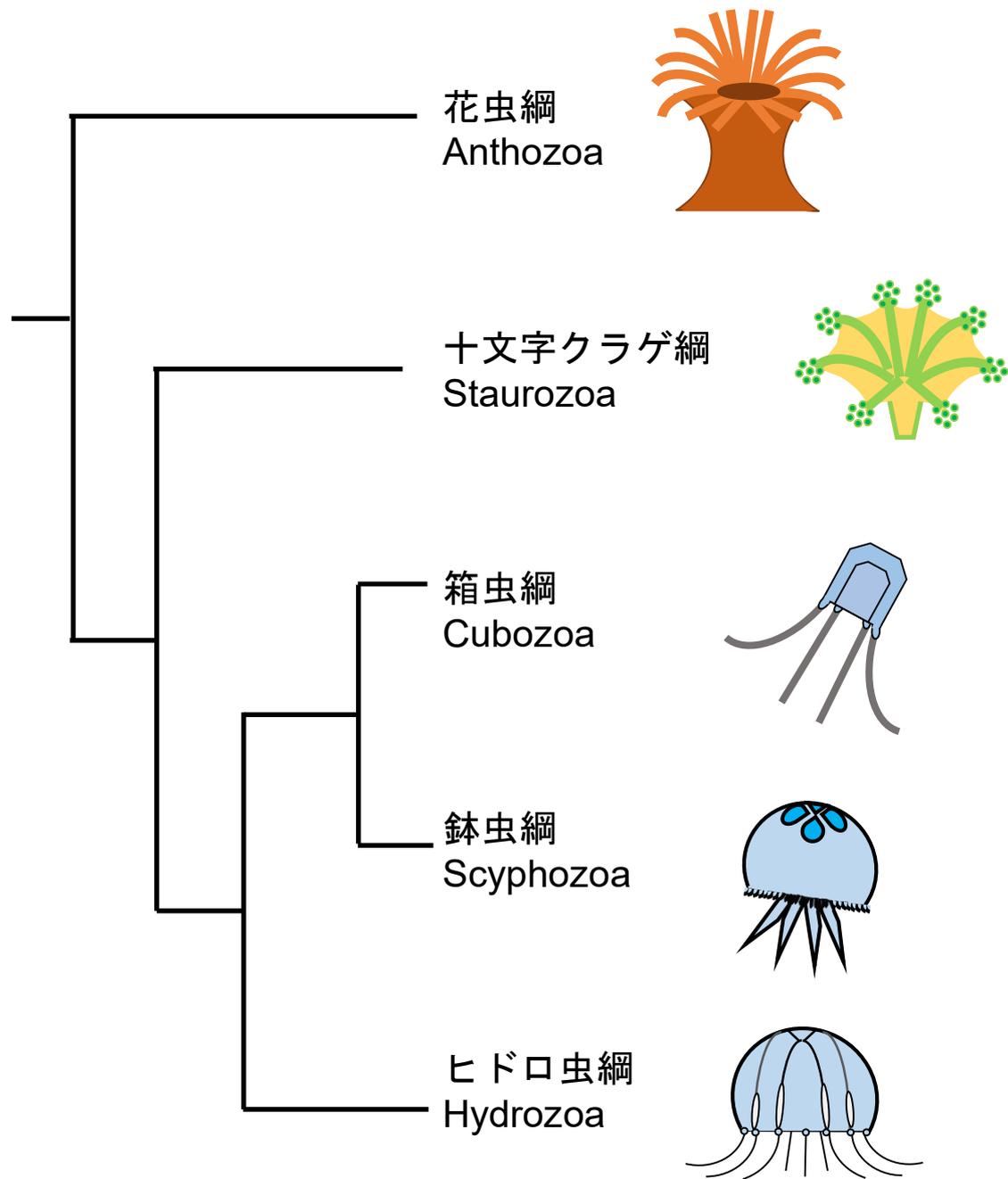


Fig. 1 刺胞動物門の分類

刺胞動物門は、サンゴやイソギンチャクなどの花虫綱 (Anthozoa)と、ヒドラやクラゲ類の4綱[十文字クラゲ綱 (Staurozoa)、箱虫綱 (Cubozoa)、鉢虫綱 (Scyphozoa)、ヒドロ虫綱 (Hydrozoa)]を含むMedusozoaからなる [Collins et al., 2006]。

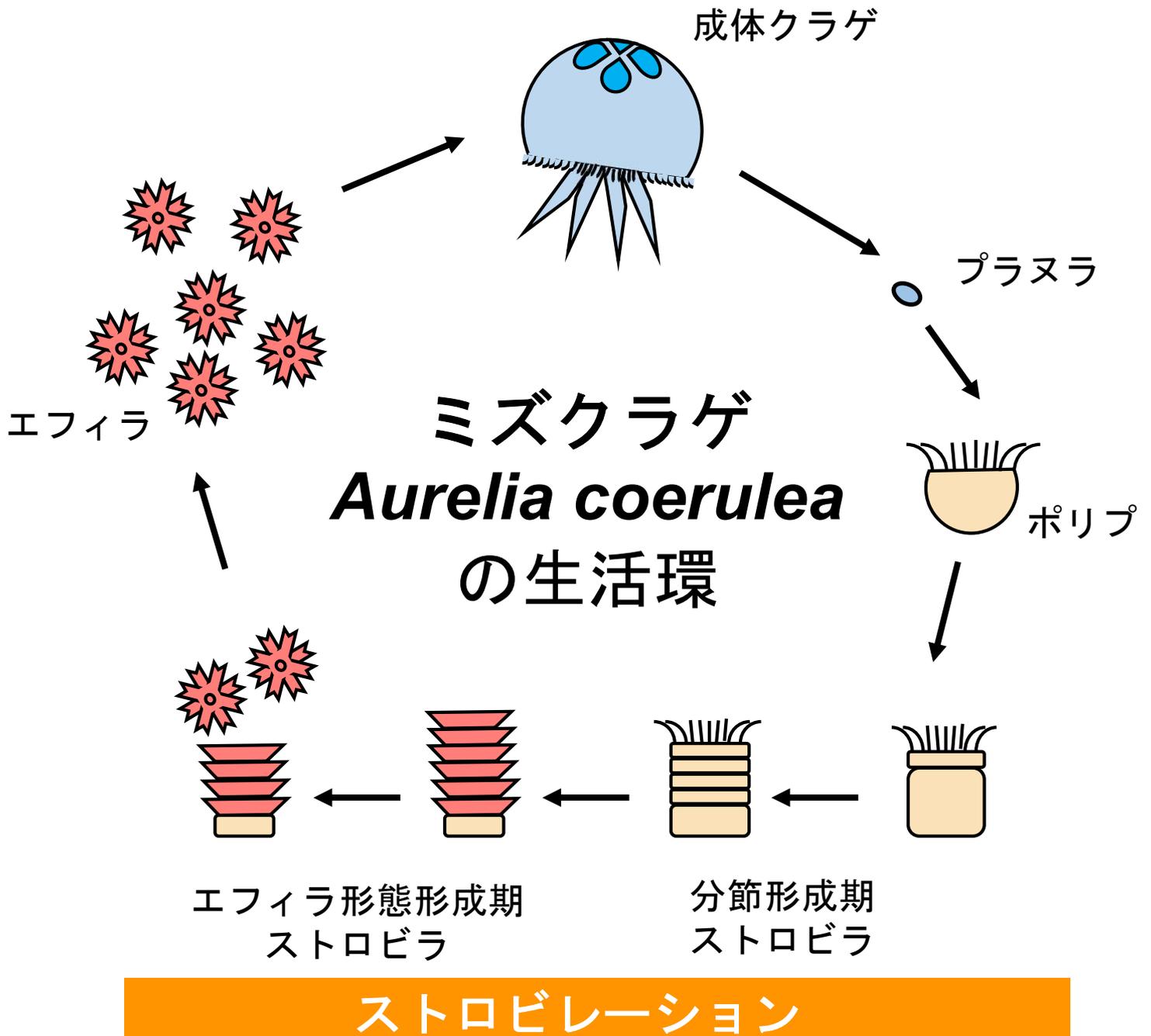


Fig. 2 ミズクラゲの生活環

繊毛を有したプラヌラは適当な基質に着生し、固着性のポリプに変態する。海水温が低下すると、ポリプの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。口側から反口側に向かって順に複数のくびれが形成される。各分節は8対の縁弁を持ったディスク状になり、クラゲの最初期幼生であるエフィラ形態を形成する。エフィラ形態を形成した各分節は、口側から1枚ずつ順に遊離し、浮遊生活を開始する。このようなポリプからストロビラを経て、クラゲとなる鉢虫綱の変態過程をストロビレーションと呼ぶ。

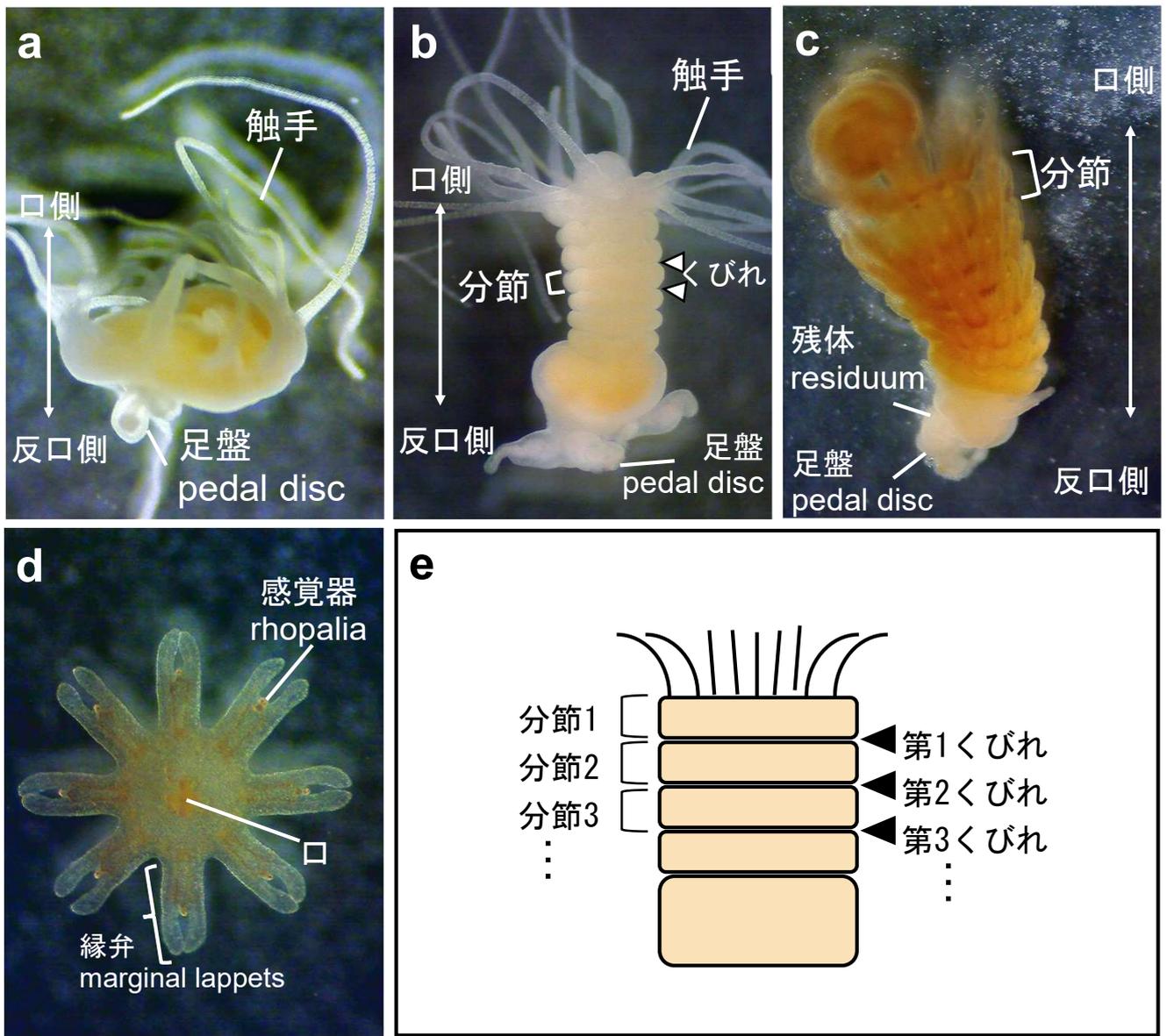


Fig. 3 ミズクラゲの各部の名称

(a) ポリプ; 口の周囲に触手があり、足盤で基質に付着する。(b) 分節形成期ストロビラ; 2つのくびれの間領域を分節と呼ぶ(角括弧)。(c) エフィラ形態形成期ストロビラ; 各分節がエフィラ形態を形成する。分節が形成されない残体ができる。(d) エフィラ; 8対の縁弁を持ち、各対の間に感覚器 (rhopalia)がある [安田, 2003]。(e) くびれおよび分節は口側から反口側に向かって一つ目、二つ目と数える。第1くびれより口側の領域を分節1、第1くびれと第2くびれの間を分節2と呼ぶ [Tsuji et al., 2017]。

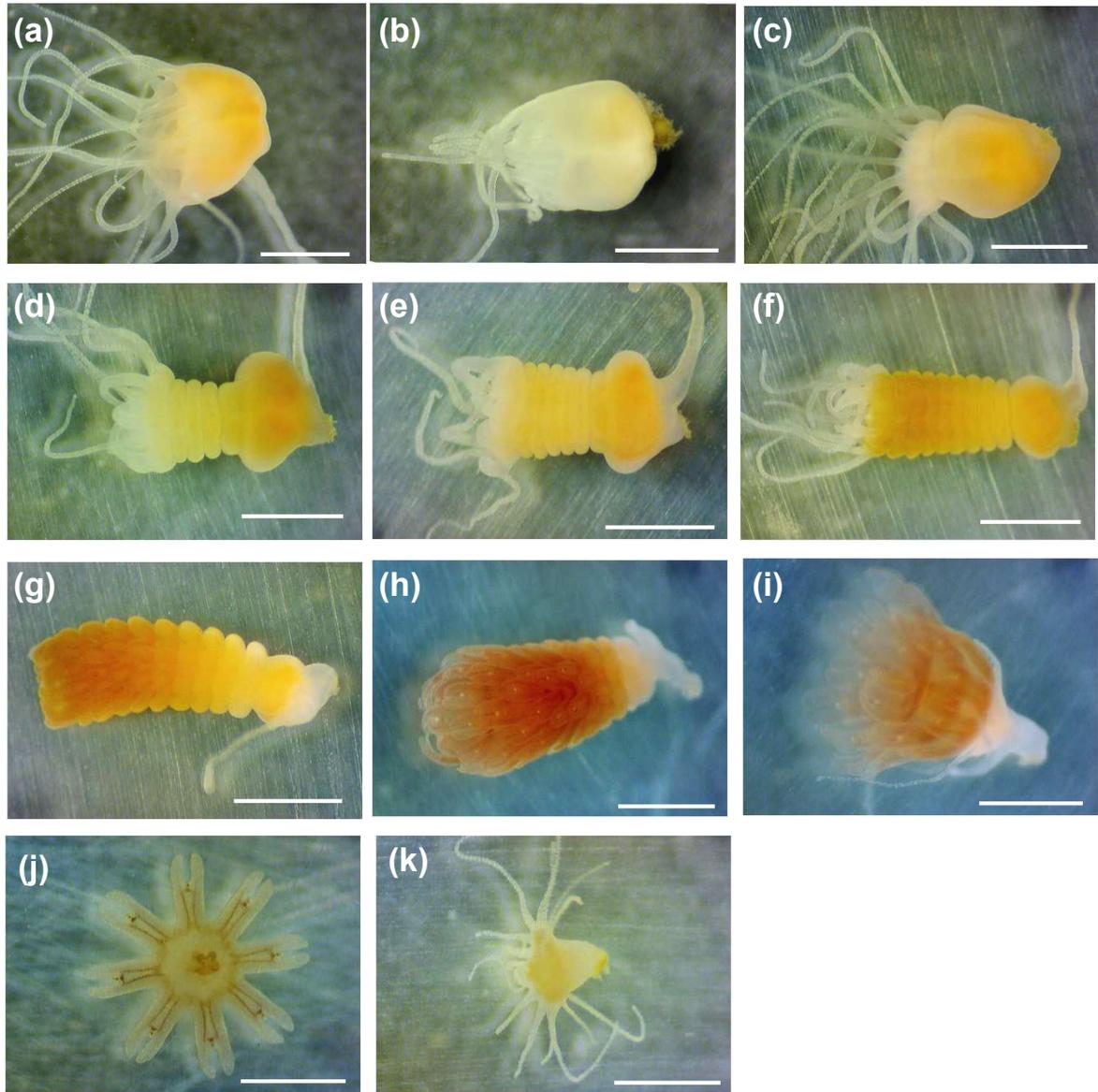


Fig. 4 低温処理 (CS)によるストロビレーションの誘導

(a) ポリプ (b) プレストロビラ (ストロビレーション開始前) (c) くびれが1個形成された分節形成期ストロビラ (d) くびれが5個形成された分節形成期ストロビラ (e) くびれが7個形成された分節形成期ストロビラ (f) エフィラ形態形成初期ストロビラ (触手退縮中) (g) エフィラ形態形成中期ストロビラ (触手退縮後) (h) エフィラ形態形成後期ストロビラ (拍動する) (i) 口側7個の分節がエフィラとして遊離したエフィラ遊離期ストロビラ (遊離前のエフィラ3個体) (j) 遊離したエフィラ (k) エフィラ遊離後にポリプに再生する残体部  
Scale bar 1 mm.

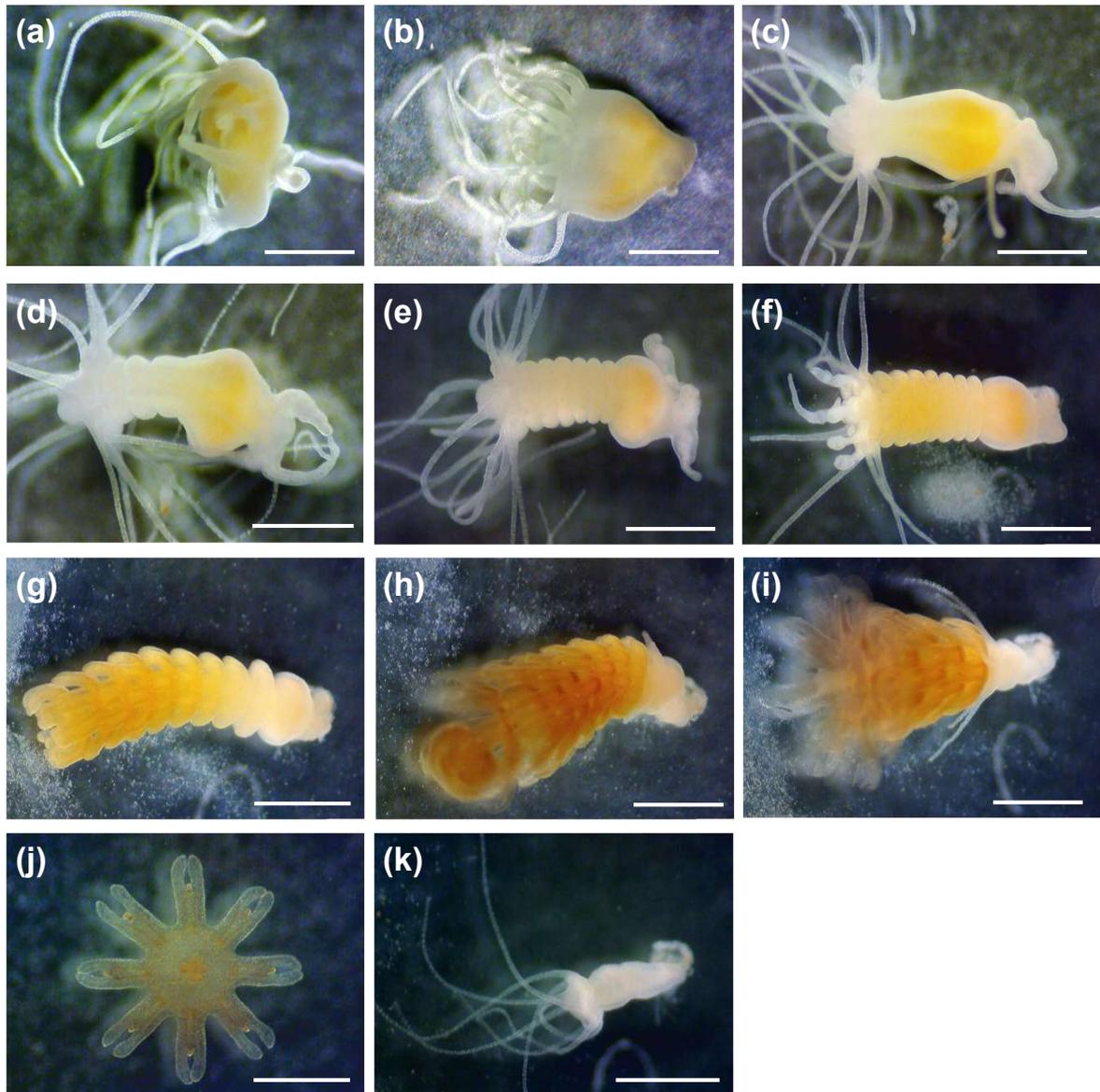


Fig. 5 MMI投与によるストロビレーションの誘導

(a) ポリプ (MMI投与後0時間) (b) プレストロビラ (MMI投与後24時間; ストロビレーション開始前) (c) くびれが1個形成された分節形成期ストロビラ (MMI投与後36時間) (d) くびれが3個形成された分節形成期ストロビラ (MMI投与後48時間) (e) くびれが7個形成された分節形成期ストロビラ (MMI投与後72時間) (f) エフィラ形態形成初期ストロビラ (MMI投与後84時間; 触手退縮中) (g) エフィラ形態形成中期ストロビラ (MMI投与後104時間) (h) エフィラ形態形成後期ストロビラ (MMI投与後125時間; 拍動する) (i) 口側3個の分節がエフィラとして遊離したエフィラ遊離期ストロビラ (MMI投与後144 h; 遊離前のエフィラ6個体) (j) 遊離したエフィラ (MMI投与後176時間) (k) エフィラ遊離後にポリプに再生する残体部 Scale bar 1 mm.

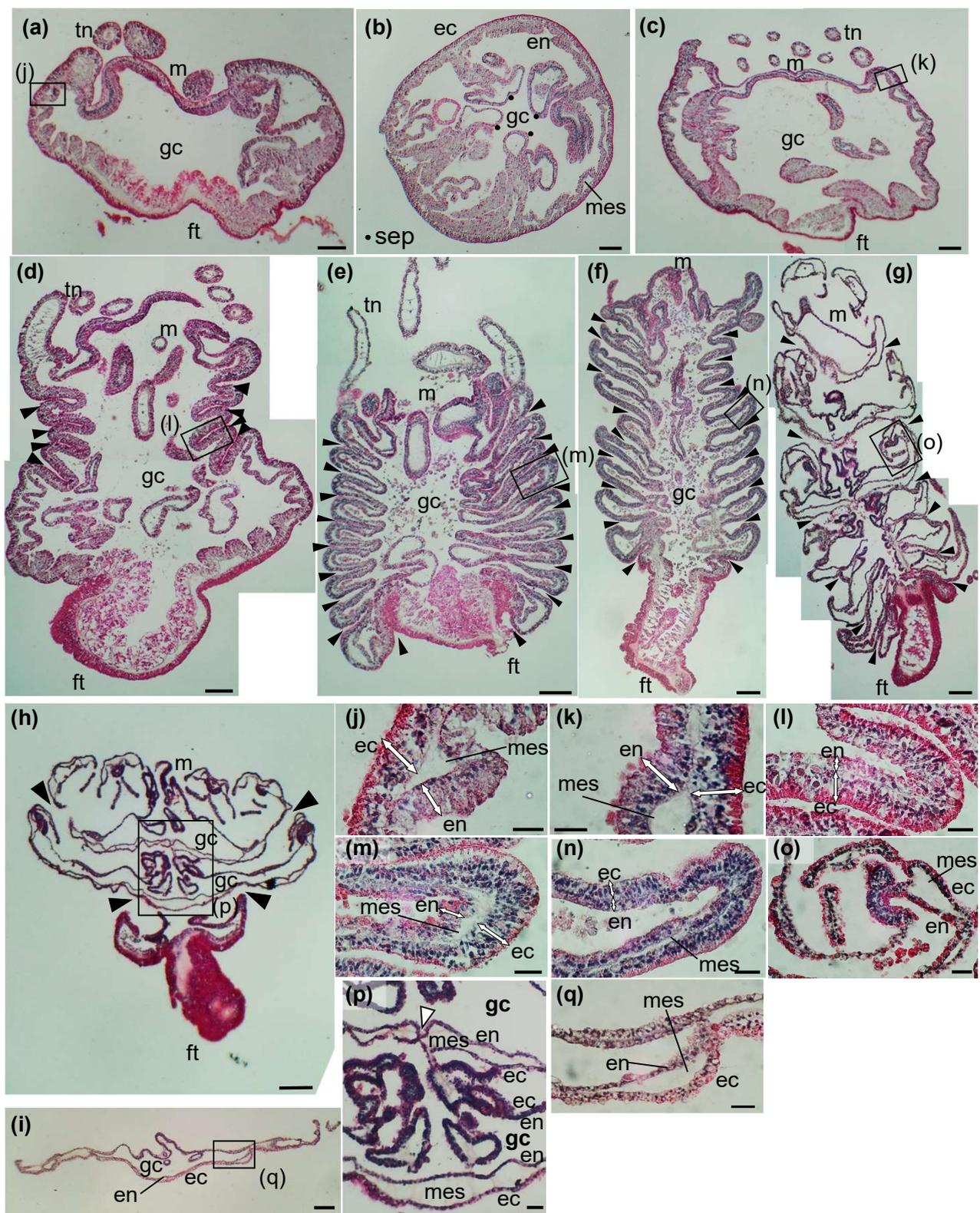


Fig. 6 ポリプ/ストロビラのHE染色

(a) ポリプ縦断切片。(b)ポリプ横断切片。(c) プレストロビラ、(d) 分節形成期ストロビラ (分節4個)、(e) エフィラ形態形成初期ストロビラ (分節9個)、(f) エフィラ形態形成中期ストロビラ (分節9個)、(g) エフィラ形態形成後期ストロビラ (分節6個)、(h) エフィラ遊離期ストロビラ (遊離前のエフィラ2個)、(i) エフィラの縦断切片。(j)-(q) (a), (c)-(i) の四角で囲んだ範囲の拡大写真。(a), (c)-(i) は写真上部が口側であり、黒い矢じりはくびれの位置を示す。(j)-(n) の白い両矢印は外胚葉・内胚葉上皮細胞層を表す。(p) の白い矢じりは陥入の先端が融合した部分を示す。ec: ectoderm, en: endoderm, mes: mesoglea (中膠:外胚葉・内胚葉性上皮細胞層の間のゼラチン様間充ゲル層), gc: gastric cavity (胃腔), sep: septum (隔壁: 胃腔を仕切る膜), tn: tentacles, m: mouth, ft: foot. Scale bar (a)-(i) 100  $\mu$ m, (j)-(q) 20  $\mu$ m.

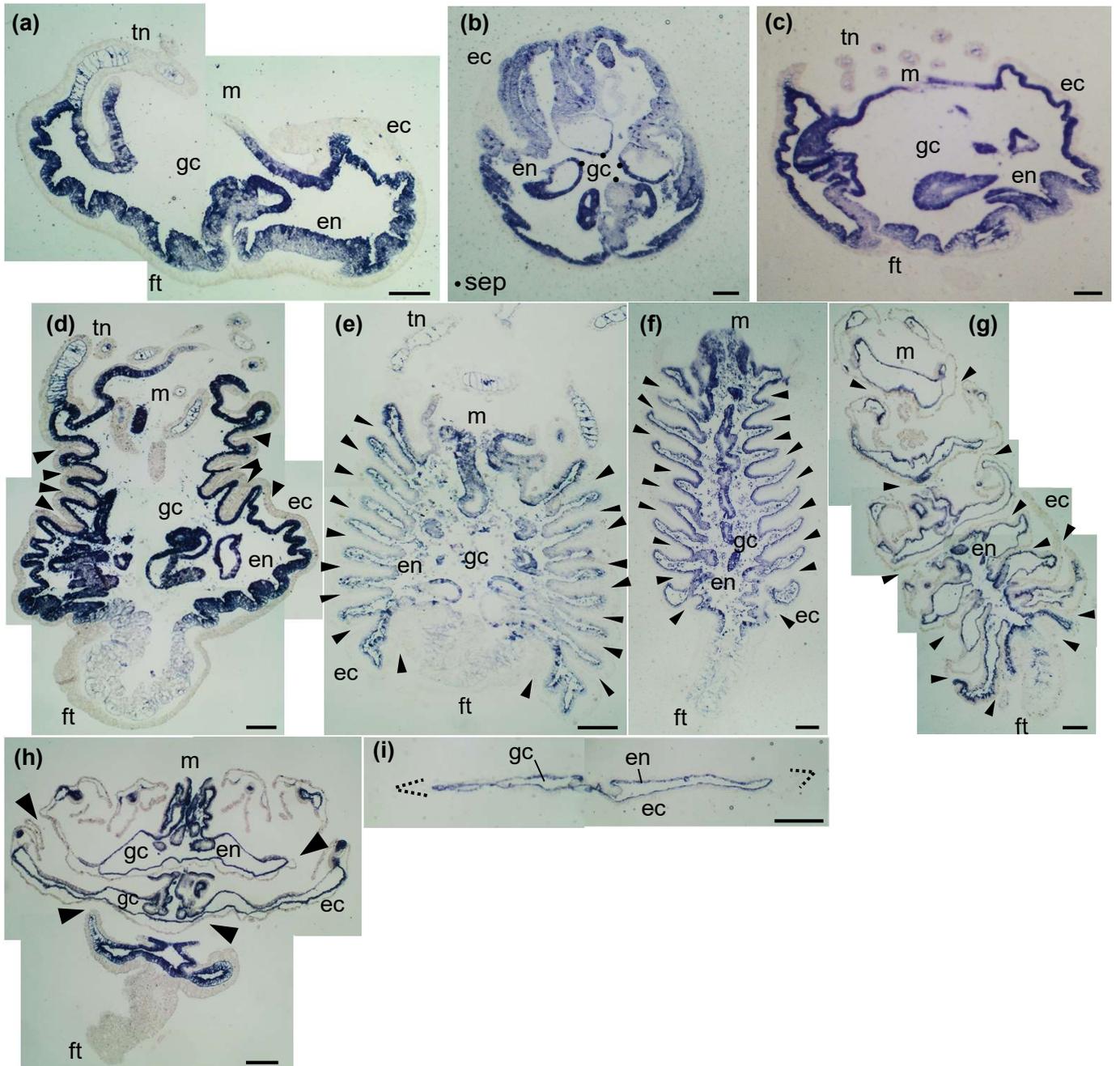


Fig. 7 ポリプ/ストロビラの内在性alkaline phosphatase (ALP) 活性染色

(a) ポリプ縦断切片。(b)ポリプ横断切片。(c) プレストロビラ、(d) 分節形成期ストロビラ (分節4個)、(e) エフィラ形態形成初期ストロビラ (分節9個)、(f) エフィラ形態形成中期ストロビラ (分節9個)、(g) エフィラ形態形成後期ストロビラ (分節6個)、(h) エフィラ遊離期ストロビラ (遊離前のエフィラ2個)、(i) エフィラの縦断切片。(a), (c)-(i) は写真上部が口側であり、黒い矢じりはくびれの位置を示す。ec: ectoderm, en: endoderm, mes: mesoglea (中膠:外胚葉・内胚葉性上皮細胞層の間のゼラチン様間充ゲル層), gc: gastric cavity (胃腔), sep: septum (隔壁: 胃腔を仕切る膜), tn: tentacles, m: mouth, ft: foot. Scale bar 100 μm.

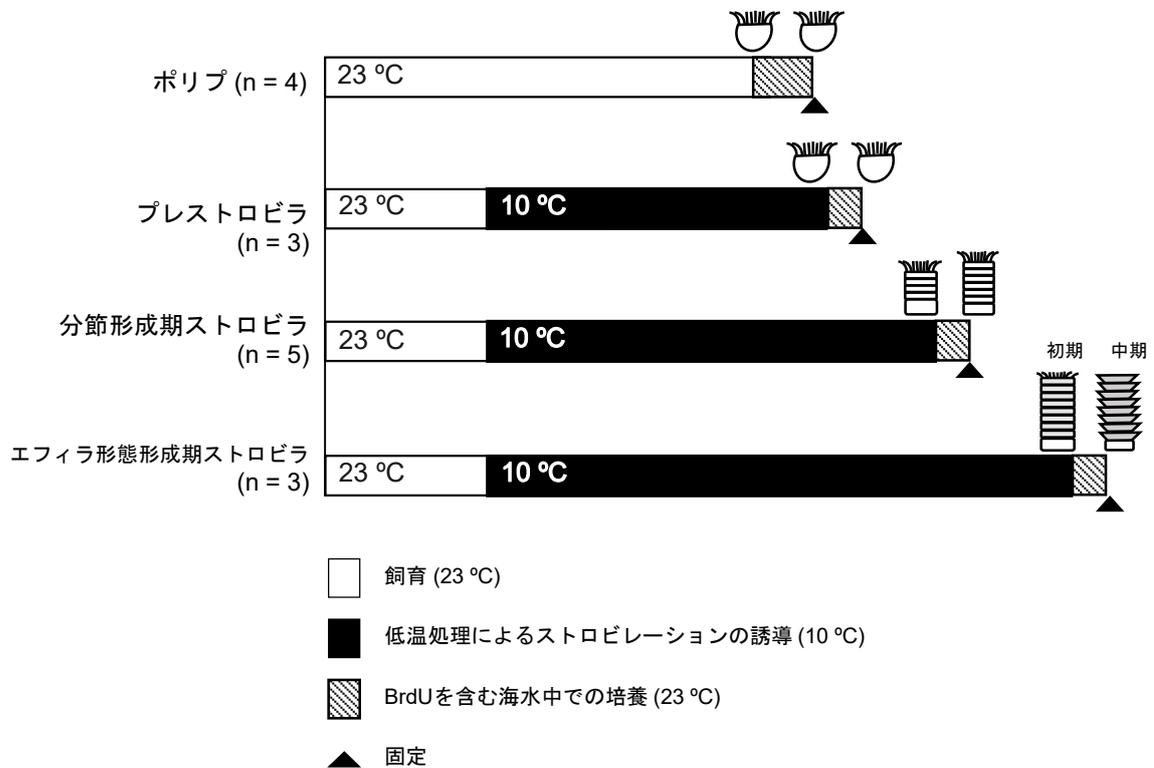


Fig. 8 BrdUの投与スケジュール

(a) 23 °Cで飼育したポリプをシャーレから集めた。低温処理でストロビレーションを誘導し、10 °Cで38–50日間培養したシャーレから (b) プレストロビラおよび (c) 分節形成期ストロビラを、64日間培養したシャーレから (d) エフィラ形態形成期ストロビラを集めた (黒塗部)。10 mM BrdUを含む海水中で48時間 (ポリプ) / 24時間 (プレストロビラ、ストロビラ)、23 °Cのインキュベーター内で培養した (斜線部)。その後、4 % formaldehyde / ASWで固定した (三角形)。斜線部上のポリプ / ストロビラの図は、BrdU投与時 (左) と固定時 (右) の形態を表す。

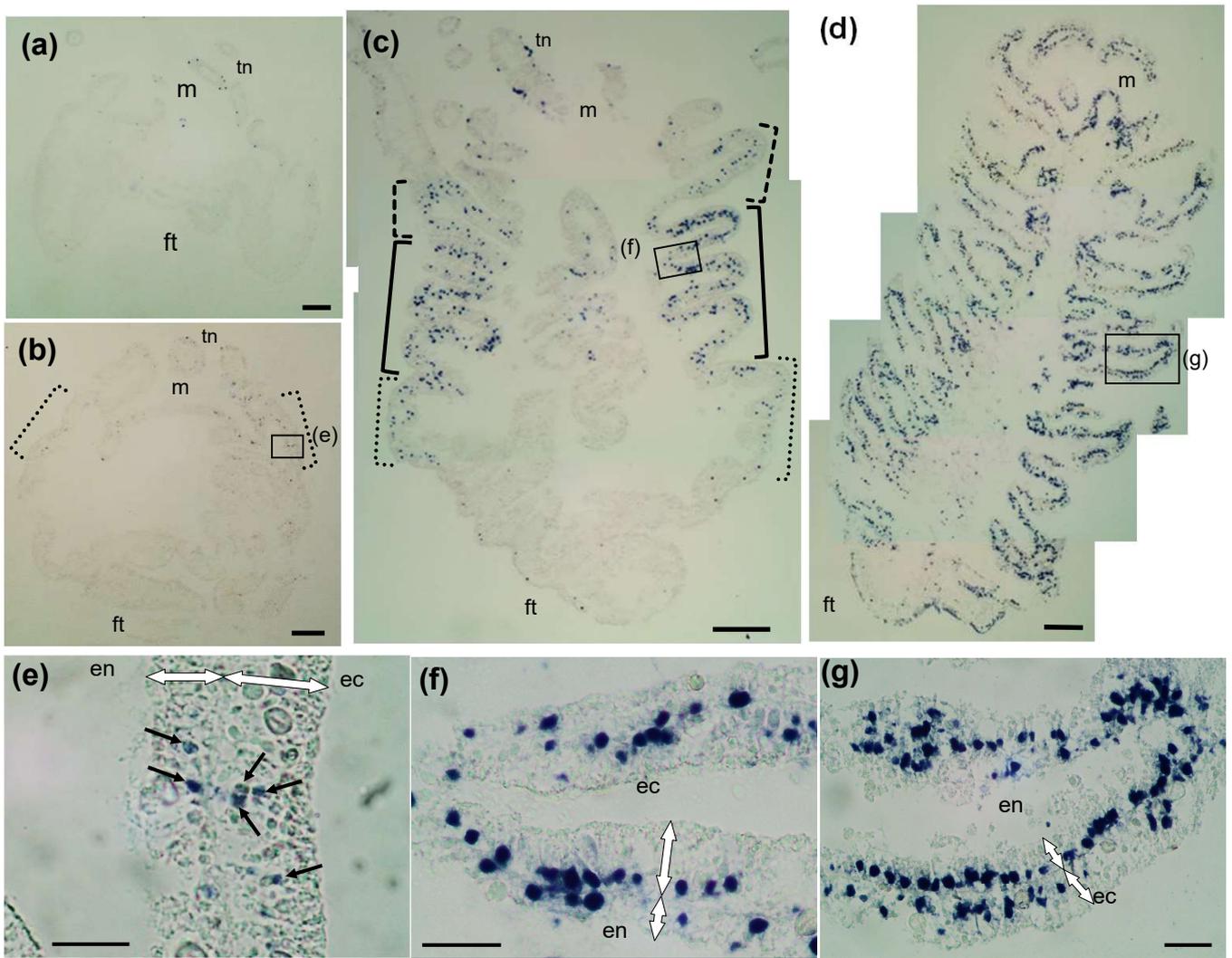


Fig. 9 ポリプ/ストロビラのBrdUラベル法による細胞増殖の可視化

BrdUでラベルした (a) ポリプ、(b) プレストロビラ、(c) 分節形成期ストロビラ、(d) エフィラ形態形成中期ストロビラの縦断切片を抗BrdU抗体およびalkaline phosphatase標識二次抗体を用いて染色した。(a)-(d) 写真上部が口側である。

(e)-(g) はそれぞれ (b)-(d) の四角で囲んだ範囲の拡大写真である。破線の角括弧はBrdU取り込み前に形成された分節、実線の角括弧はBrdU取り込み中に形成された分節、点線の角括弧は次の分節が形成される予定領域を示す。BrdU取り込み中に分裂した細胞の核が青紫色のスポットとして検出される。(b)-(d) の白い両矢印は外胚葉・内胚葉上皮細胞層を表す。(e) の黒い矢印は、染色された核を示す。触手のスポットは、抗BrdU抗体を用いないnegative controlでも観察されるため、二次抗体による非特異的染色と考えられる。tn: tentacles, m: mouth, ft: foot. Scale bar (a)-(d) 100  $\mu$ m, (e)-(g) 20  $\mu$ m.

<i>H.sapiens</i>	M F E A R L V Q G S I L K K V L E A L K D L I N E A C W D I S S S G V N L Q S M	40
comp97985_c0_seq3.p1	M L E A R L T Q G N Y L K K C V E A M K D F V T E C N F D C S S S G I S A Q A M	40
	* : * * * * . * * . * * * : * * : * * : : . * . : * * * * * : . * : *	
<i>H.sapiens</i>	D S S H V S L V Q L T L R S E G F D T Y R C D R N L A M G V N L T S M S K I L K	80
comp97985_c0_seq3.p1	D S S H V S L V F L A L N A D G F D P Y R C D R T M T L G L S L A S L S K I L K	80
	* * * * * * * * * : * . : : * * * . * * * * * . : : : * : . * : * : * * * * *	
<i>H.sapiens</i>	C A G N E D I I T L R A E D N A D T L A L V F E A P N Q E K V S D Y E M K L M D	120
comp97985_c0_seq3.p1	C G S N D D I V T I K A E D N A D T V Q I I F E S P N Q E K V S D Y E I K L M D	120
	* . . * : * * : * * : : * * * * * * * : : : * * : * * * * * * * * * : * * * *	
<i>H.sapiens</i>	L D V E Q L G I P E Q E Y S C V V K M P S G E F A R I C R D L S H I G D A V V I	160
comp97985_c0_seq3.p1	I D A E H L G I P D Q E Y E A I I R M P S A E L Q R I C R D L T Q I G D S V N I	160
	: * . * : * * * * : * * * . . : : : * * * . * : * * * * * * : : * * * : * *	
<i>H.sapiens</i>	S C A K D G V K F S A S G E L G N G N I K L S Q T S N V D K E E E A V T I E M N	200
comp97985_c0_seq3.p1	A C T K D G I R F S C S G G L G T G N I T L R Q N T A V D K E E D Q V S I E L N	200
	: * : * * * : : * * . * * * * * . * * * . * * . : * * * * * : * : * * : *	
<i>H.sapiens</i>	E P V Q L T F A L R Y L N F F T K A T P L S S T V T L S M S A D V P L V V E Y K	240
comp97985_c0_seq3.p1	E P V T Q T Y A L R F L N F F T K A T P L A S S V T M S I C K D V P L V L E Y K	240
	* * * * * : * * * : * * * * * * * * * * : * : * * : * : . * * * * * : * * *	
<i>H.sapiens</i>	I A D M G H L K Y Y L A P K I E D E E G S - - - - -	261
comp97985_c0_seq3.p1	M E N L G H I R F Y L A P K I E E E D S T Q T N S A E	267
	: : : * * : : : * * * * * * * : * : . :	

Fig. 10 ミズクラゲPCNAとヒトPCNAの推定アミノ酸配列の比較

上段は、*Homo sapiens* proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (accession number: NP\_002583.1) の推定アミノ酸配列である。下段は、本研究のトランスクリプトーム解析により得られたヒトPCNAと相同性を持つ配列である。

\*は同一のアミノ酸残基を示し、ドットは保存的置換の起きているアミノ酸残基を示す。

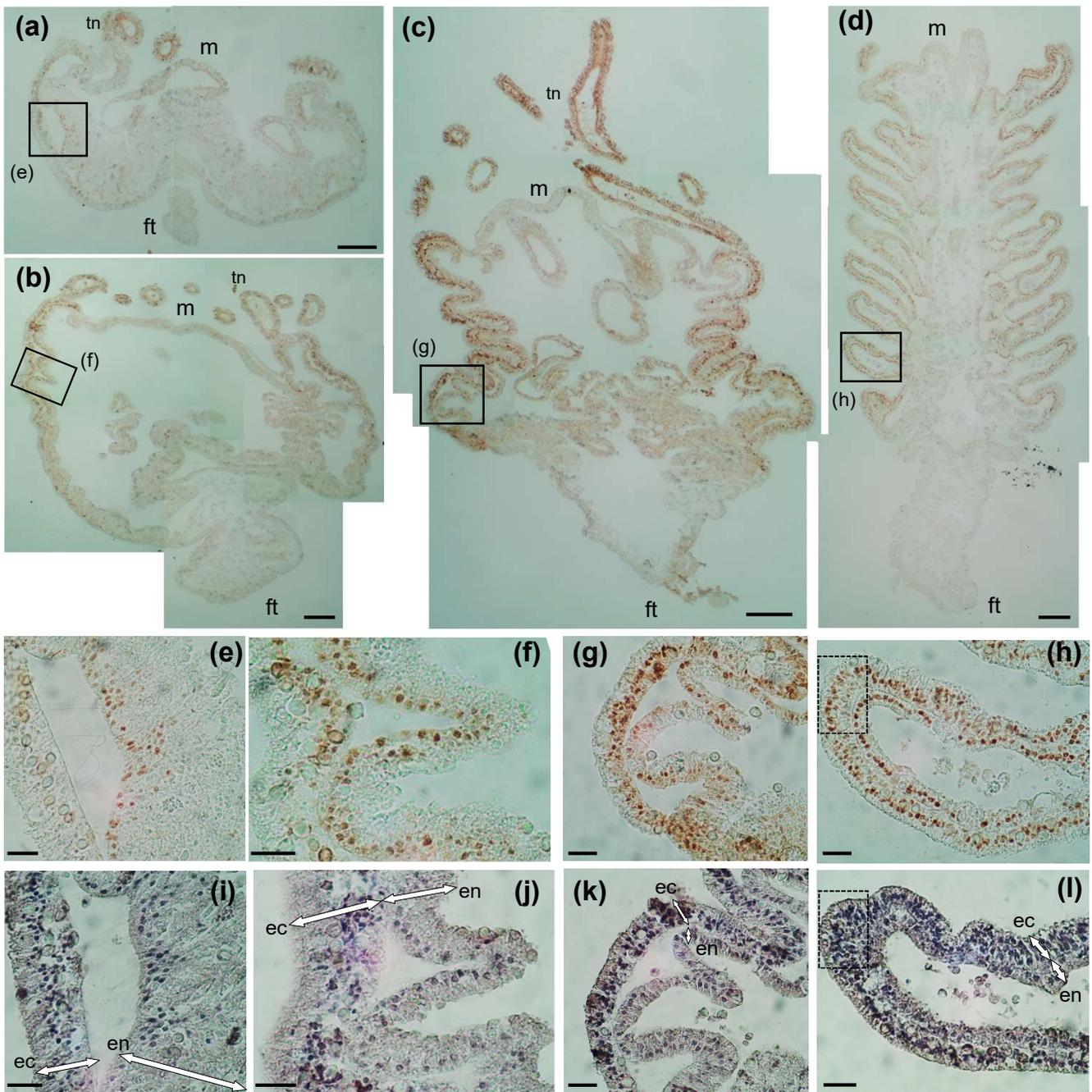


Fig. 11 ポリプ/ストロビラの抗PCNA抗体による免疫染色

(a) ポリプ (絶食15日間)、(b) プレストロビラ、(c) 分節形成期ストロビラ、(d) エフィラ形態形成中期ストロビラの縦断切片を抗PCNA抗体およびhorse radish peroxidase標識二次抗体を用いて染色した。(a-d) 写真上部が口側である。(e)-(h) は、それぞれ(a)-(d)の四角で囲んだ範囲の拡大写真である。(i-l) は、それぞれ(e-h)と同じ個体の切片をヘマトキシリンで染色した。白い両矢印は外胚葉・内胚葉上皮細胞層を表す。(h, i)の点線で囲んだ部分には、抗PCNA抗体-二次抗体で染色されていない細胞核が見られた。  
 tn: tentacles, m: mouth, ft: foot. Scale bar (a)-(d) 100  $\mu$ m, (e)-(l) 20  $\mu$ m.

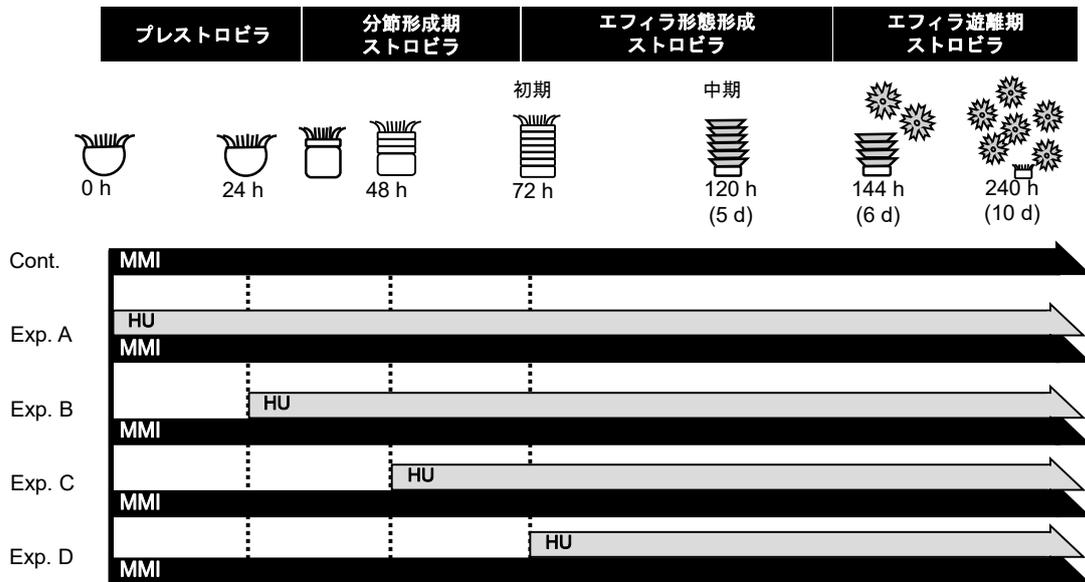


Fig. 12 細胞増殖阻害剤hydroxyurea (HU) の投与スケジュール

ストロビレーションを誘導するため、MMIを投与した(黒矢印)。上部のイラストは、左から順にMMIで誘導したストロビレーションの進行[ポリプ(0 h)、プレストロビラ(24 h)、分節形成期ストロビラ(48 h; くびれ2-4個)、エフィラ形態形成初期ストロビラ(72 h)、エフィラ形態形成中期ストロビラ(120 h)、エフィラ遊離期ストロビラ(144 h)、エフィラ遊離の完了(240 h)]を示す。(Exp. A) HUをポリプにMMIと同時に投与した。(Exp. B) MMI投与から24 h後にHUをプレストロビラに投与した。(Exp. C) MMI投与から48 h後にHUを分節形成期ストロビラに投与した。(Exp. D) MMI投与から72 h後にHUをエフィラ形態形成初期ストロビラに投与した。HUを投与しない群をcontrol (Cont.)とした。

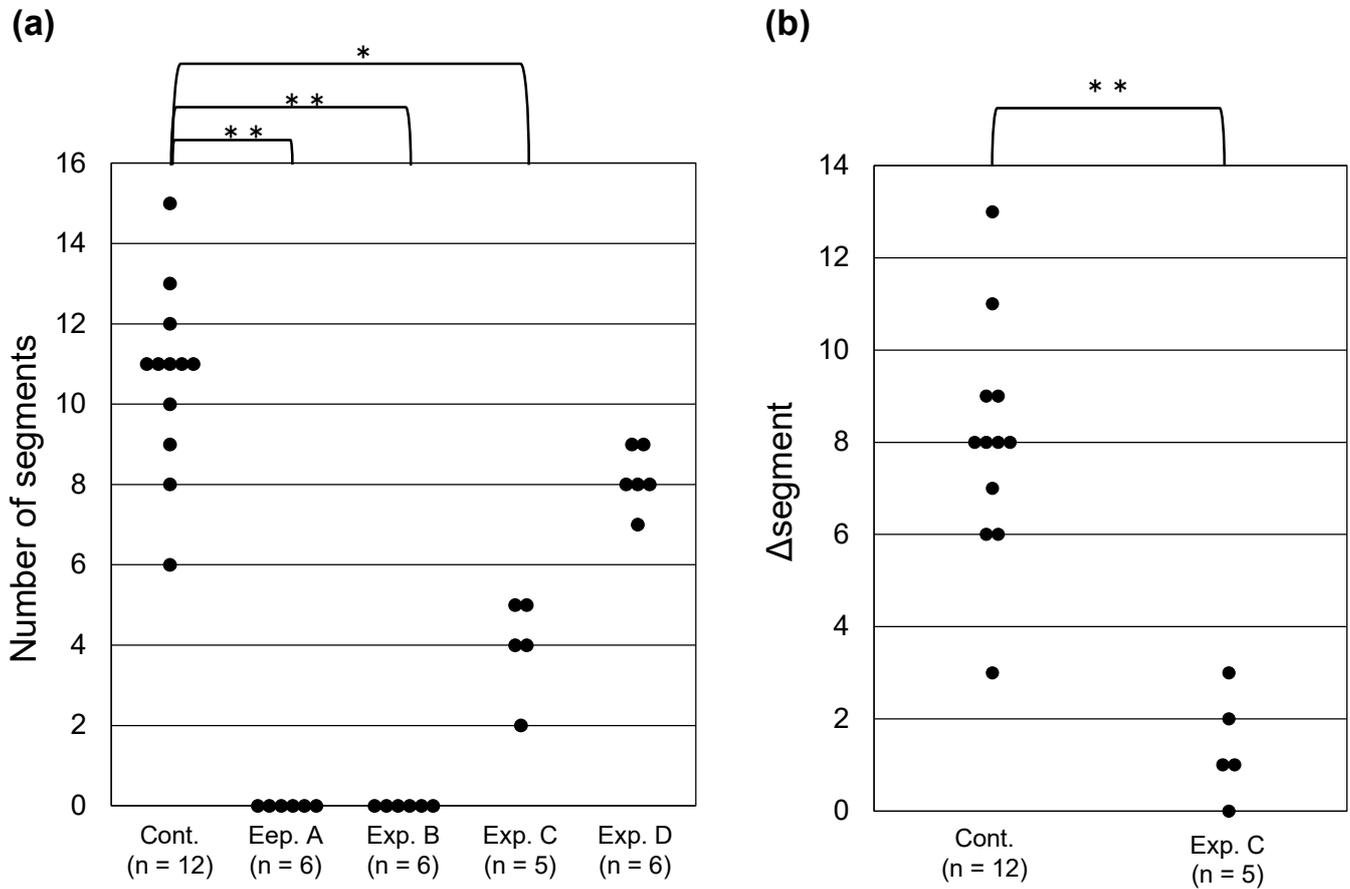


Fig. 13 MMI誘導ストロビラに対するHUによる分節形成の阻害

MMIおよびHUをFig. 11に示したスケジュールに従って投与した。HUはMMI投与から0時間後 (Exp. A)、24時間後 (Exp. B)、48時間後 (Exp. C)、72時間 (Exp. D) に投与した。HUを投与しない群をcontrol (Cont.)とした。

(a) 縦軸は、MMI投与から10日間の観察中に形成された分節の数を示す。(b) Exp. C のHU投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment)を示す。横軸の括弧内のnはサンプルサイズを表している。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs control, Mann-Whitney  $U$  test with Bonferroni correction.

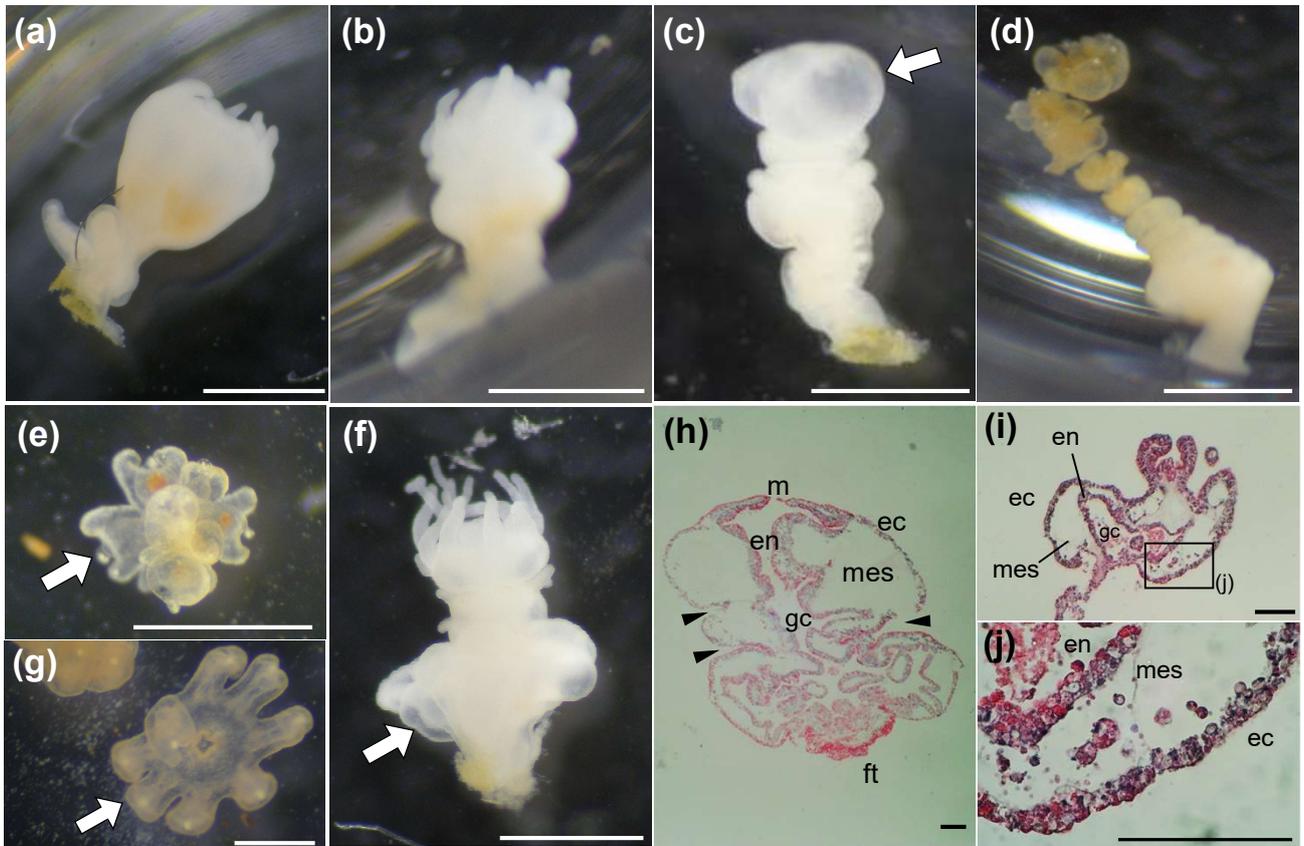


Fig. 14 HU投与によるストロビレーション阻害

(a-e) 時間差投与アッセイExp. A~Dで観察されたMMI投与から10日目の典型的な形態。(f, g) CS誘導ストロビラのステージ別アッセイで観察されたHU投与から8日目の典型的な形態。(a) HUをポリプに投与した場合(Exp. A)、ストロビレーションが開始しなかった。(b) HUをプレストロビラに投与した場合(Exp. B)、分節が形成されなかった。(c) HUを分節形成前期に投与した場合(Exp. C)、体の一部が膨張した(白色矢印)。(d) HUをエフィラ形態節形成初期に投与した場合(Exp. D)、各分節は正常なエフィラ形態を形成しなかった。(e) (d)のストロビラから遊離した奇形のエフィラ。(f) HUをCSで誘導した分節形成前期に投与した場合、(c)と同様に体の一部が膨張した。(g) HUを投与したエフィラ形態節形成期ストロビラから遊離したエフィラ。縁弁の先端部分が膨張し、丸まっていた。(h) (c)に示した奇形ストロビラの切片をHE染色した。矢じりはくびれの位置を示し、写真上部が口側である。(i) 奇形のエフィラの切片をHE染色した。(j) (i)の四角で囲んだ範囲の拡大写真。(h)と同様に中膠が膨張した。ec: ectoderm, en: endoderm, mes: mesoglea (中膠:外胚葉・内胚葉性上皮細胞層の間のゼラチン様間充ゲル層), gc: gastric cavity (胃腔), m: mouth, ft: foot. Scale bar (a-g) 1 mm, (h-j) 100  $\mu$ m.

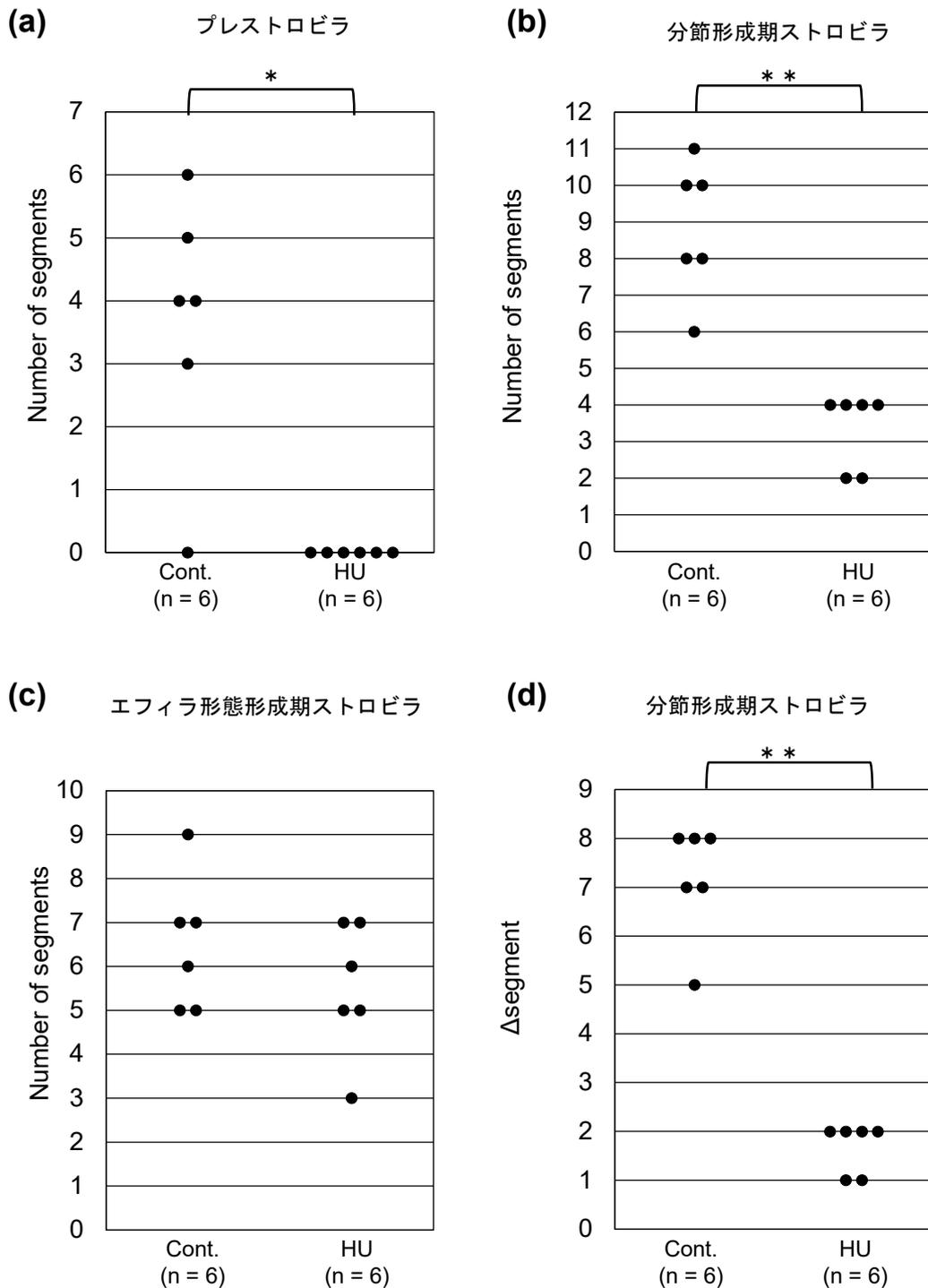


Fig. 15 CS誘導ストロビラに対するHUによる分節形成の阻害

10 mM HUを低温処理で誘導した(a) プレストロビラ、(b) 分節形成期ストロビラ (くびれ1-3個)、(c) エフィラ形態形成期ストロビラに投与し、23 °Cで培養した。それぞれ同ステージの試料物質を投与しない群をcontrol (Cont.)とした。縦軸は、(a-c) HU投与から8日間の観察中に形成された分節の数、(d) (b)分節形成期ストロビラのHU投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment)を示す。横軸の括弧内のnはサンプルサイズを表している。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs control, Mann-Whitney  $U$  test.

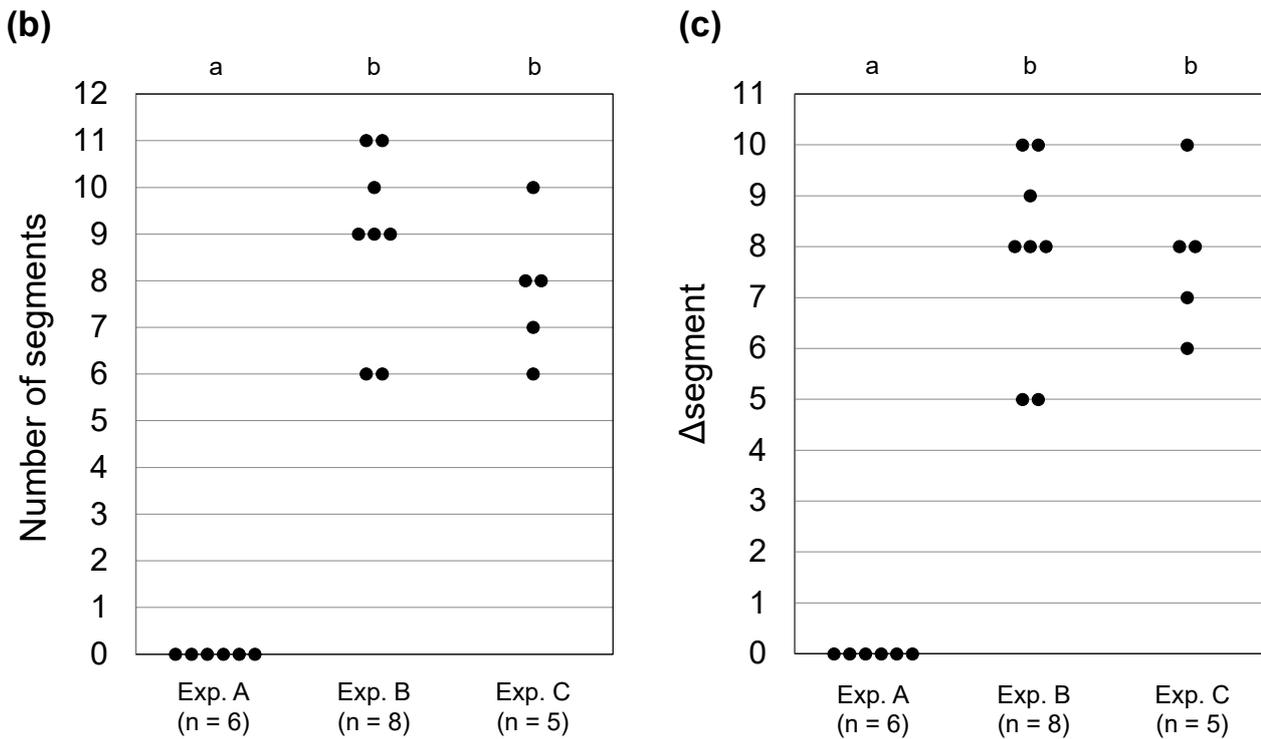
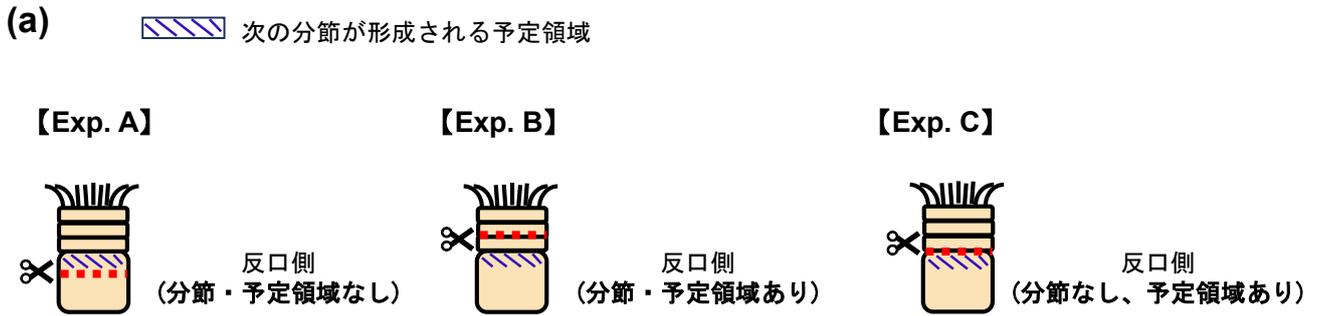


Fig. 16 ストロビラの切断実験

(a) 切断実験A-Cの切断位置。分節形成期ストロビラ(くびれ1-4個)を、(Exp. A) 分節および次の分節が形成される予定領域が反口側に含まれないように、予定領域より下で切断した。(Exp. B) 分節1個が反口側に含まれるように最も反口側の分節のすぐ上で切断した。(Exp. C) 反口側に分節は含まれず、予定領域は含まれるように最も反口側の分節のすぐ下で切断した。(b) 切断した反口側をそれぞれ培養し、反口側で形成された分節の数を示す。(c) 反口側で形成された分節の数から切断時に反口側に含まれていた分節の数(Exp. A; 0個、Exp. B; 1個、Exp. C; 0個)を引いた、分節数の増加( $\Delta$ segment)を示す。異なるアルファベット間に有意差があったことを示す(Steel-Dwass test, 有意水準  $p < 0.05$ )。

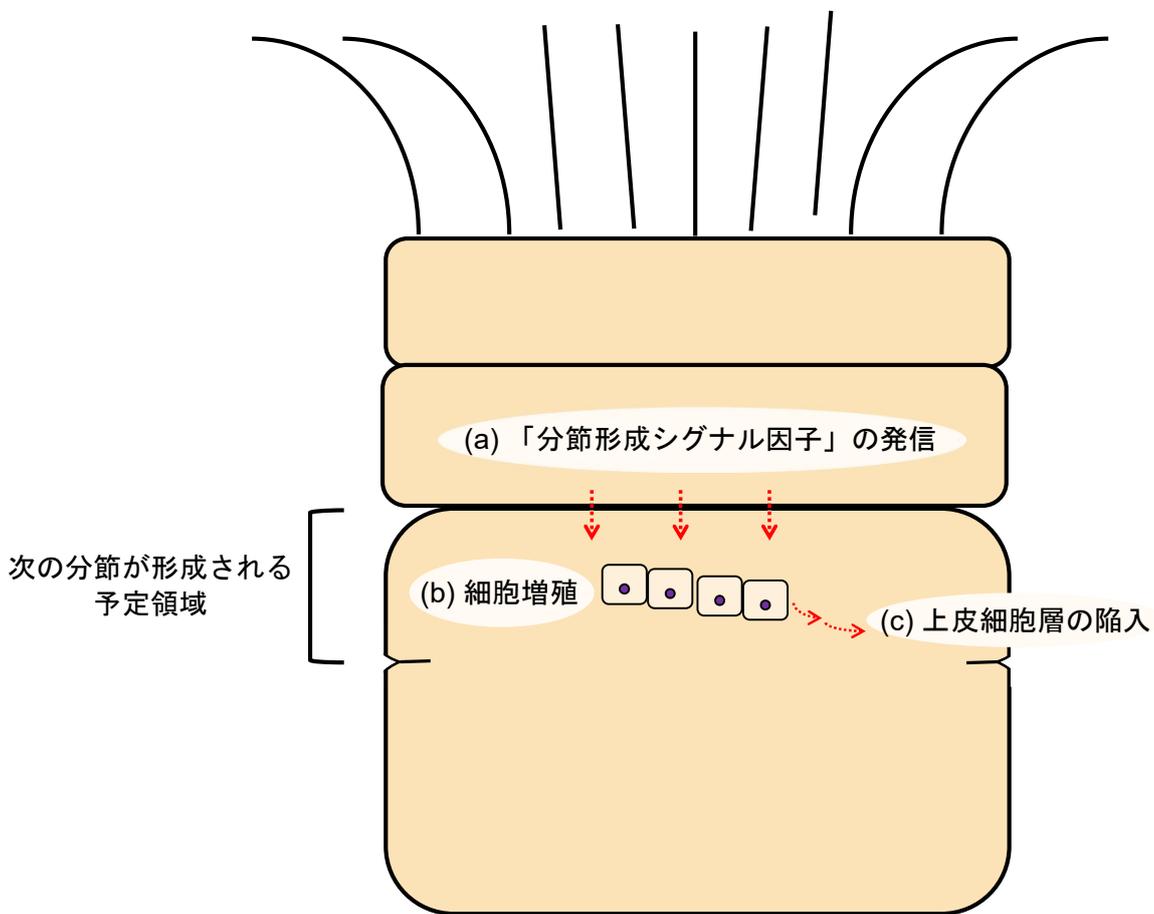


Fig. 17 ストロビレーションにおける分節形成のモデル

(a) 形成された分節から隣接する反口側の領域に向かって「分節形成誘導因子」が分泌される。(b) 「分節形成誘導因子」を受け取った新しい分節ができる予定領域で細胞増殖が起きる。その後、(c) 上皮細胞層が陥入してくびれが形成される。(a) ~ (c) を繰り返すことで複数の分節が形成される。

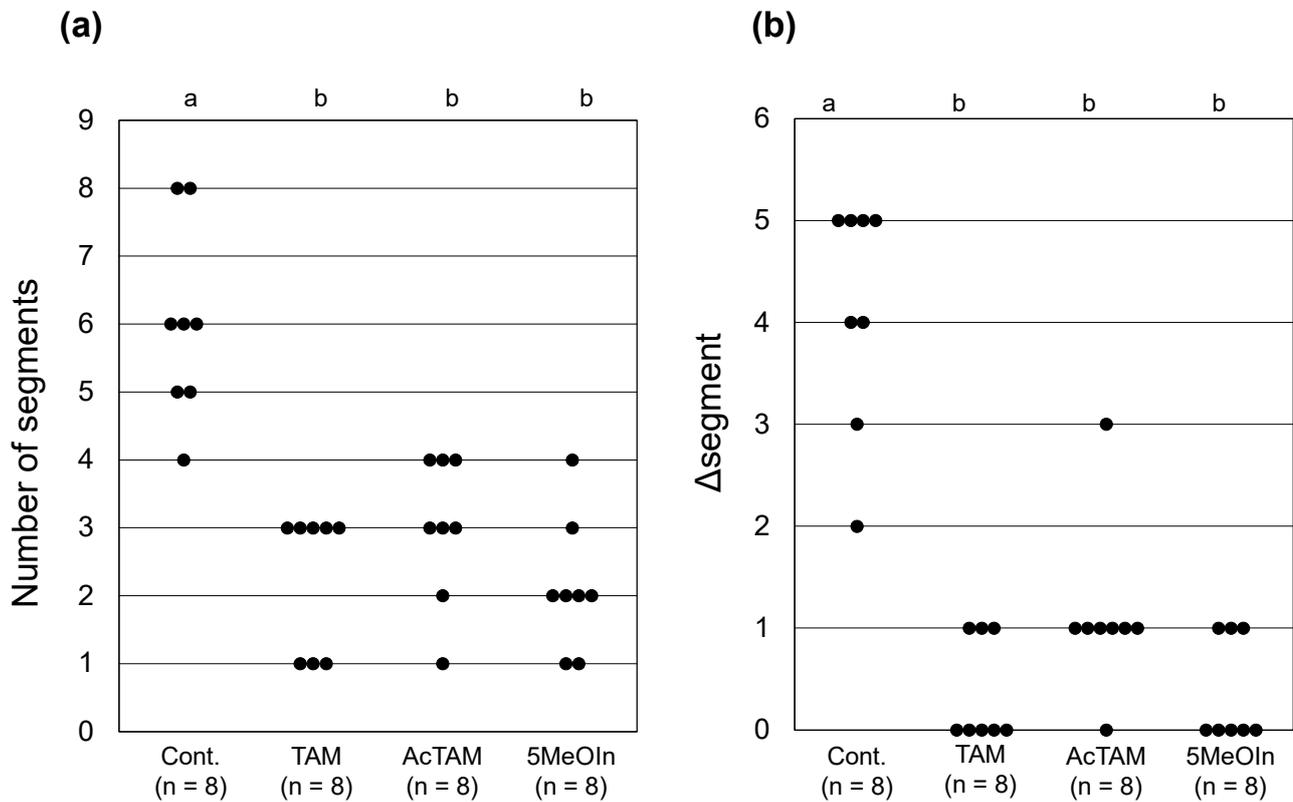


Fig. 18 インドール化合物による分節形成の阻害

50  $\mu$ MのTAM、AcTAM、5MeOInを低温処理で誘導した分節形成期ストロビラ (くびれ1-3個) に投与し、10  $^{\circ}$ Cで培養した。試料物質を投与しない群をcontrol (Cont.) とした。縦軸は、(a) 試料物質投与から25日間の観察中に形成された分節の数、(b) 試料物質投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) を示す。横軸の括弧内のnはサンプルサイズを表している。異なるアルファベット間に有意差があったことを示す (Steel-Dwass test, 有意水準  $p < 0.05$ )。

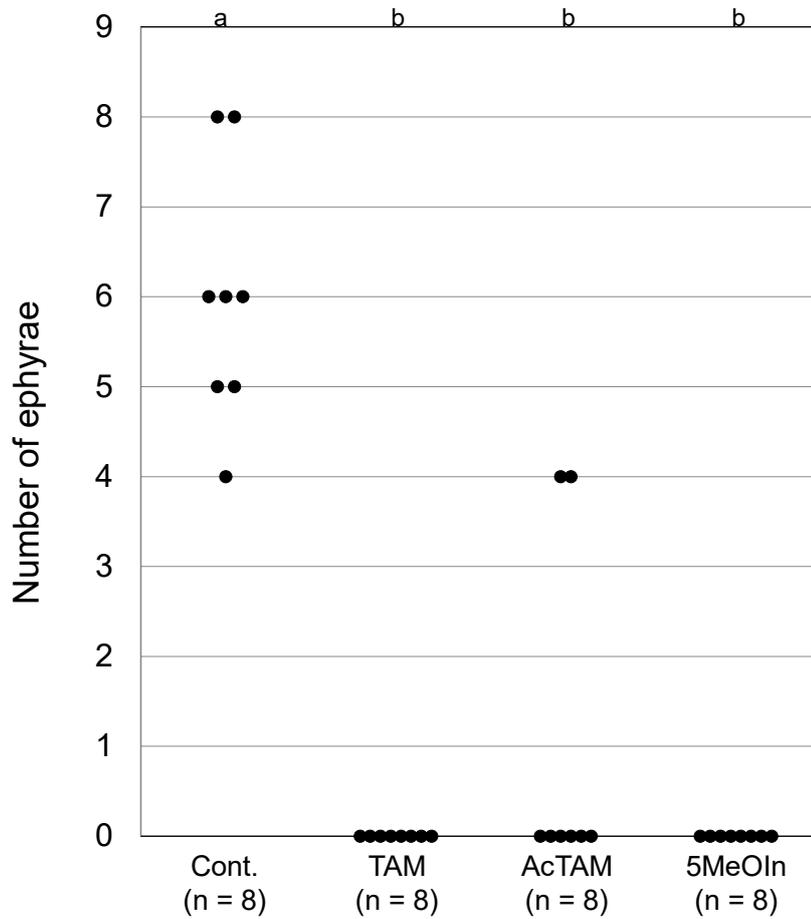


Fig. 19 インドール化合物によるエフィラ形態形成の阻害

50  $\mu$ MのTAM、AcTAM、5MeOInを低温処理で誘導した分節形成期ストロビラ (くびれ1-3個)に投与し、10  $^{\circ}$ Cで培養した。試料物質を投与しない群をcontrol (Cont.)とした。縦軸は、試料物質投与から25日間の観察中に正常に遊離したエフィラの数を示す。Control群では、形成された全ての分節は正常にエフィラになり、遊離した。異なるアルファベット間に有意差があったことを示す (Steel-Dwass test , 有意水準  $p < 0.05$ )。

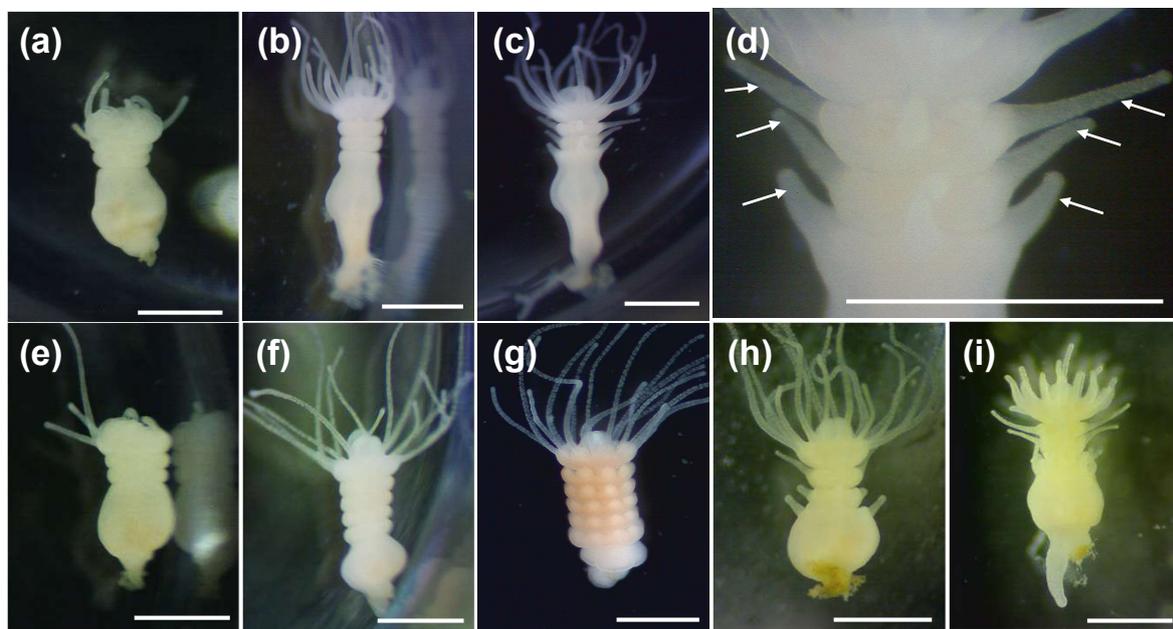


Fig. 20 インドール化合物投与によるストロビレーション阻害

50  $\mu$ M TAMを低温処理で誘導した分節形成期ストロビラ (くびれ1-3個) に投与し、10  $^{\circ}$ Cで培養した。TAMを投与しない群をcontrol群とした。TAM投与後、(a) 0日、(b) 3日、(c) 8日の形態。(d) (c) の分節間のくびれから生じた触手様突起 (白い矢印) の拡大写真。(e) control群の(e) 0日、(f) 3日、(g) 8日の形態。(h) AcTAM投与後、10日の形態。(i) 5MeOIn投与後、10日の形態。Scale bar 1 mm.

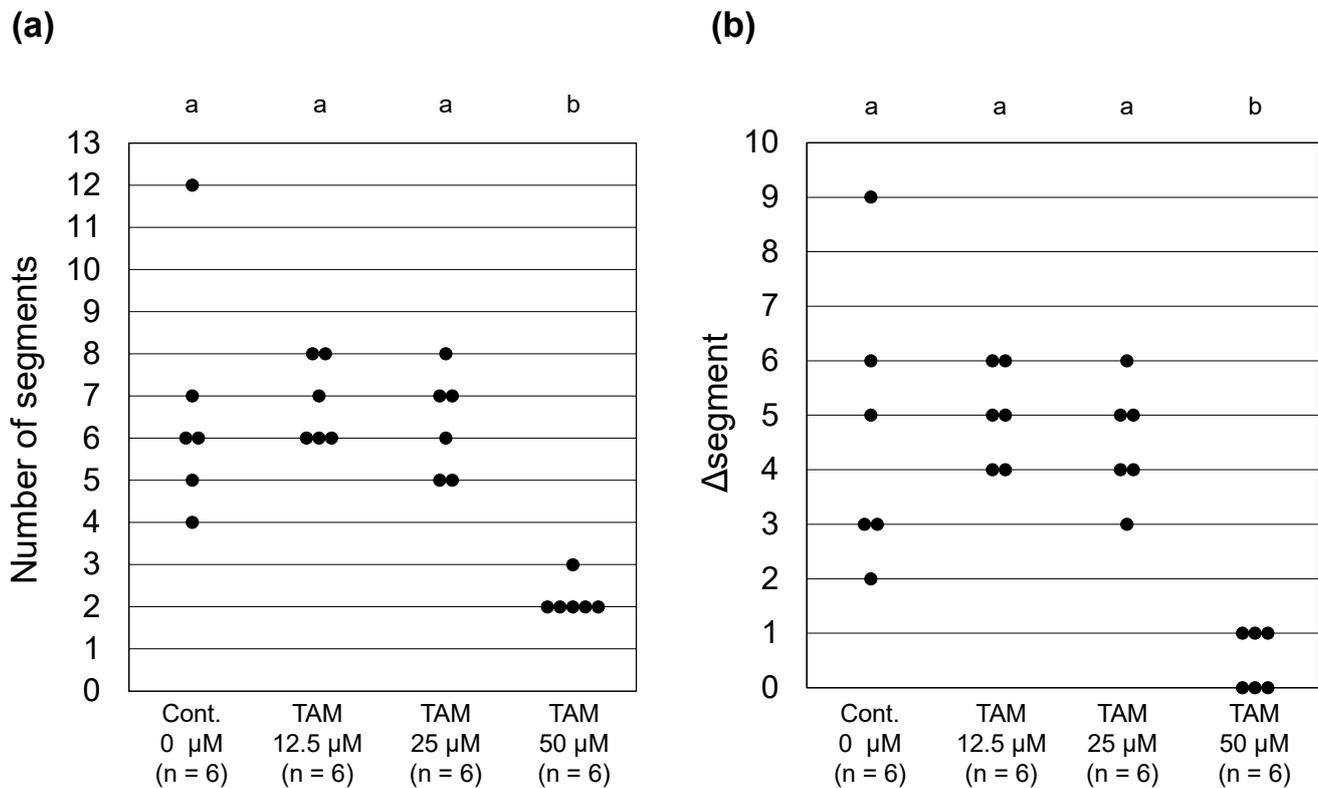


Fig. 21 TAMの用量依存的分節形成阻害活性

TAM (0 μM (control)、12.5 μM、25 μM、50 μM) を低温処理で誘導した分節形成期ストロビラ (くびれ1-3個) に投与し、10 °Cで培養した。縦軸は、(a) 試料物質投与から30日間の観察中に形成された分節の数、(b) 試料物質投与後の分節数の増加 (Δsegment) を示す。横軸の括弧内のnはサンプルサイズを表している。異なるアルファベット間に有意差があったことを示す (Steel-Dwass test, 有意水準  $p < 0.05$ )。

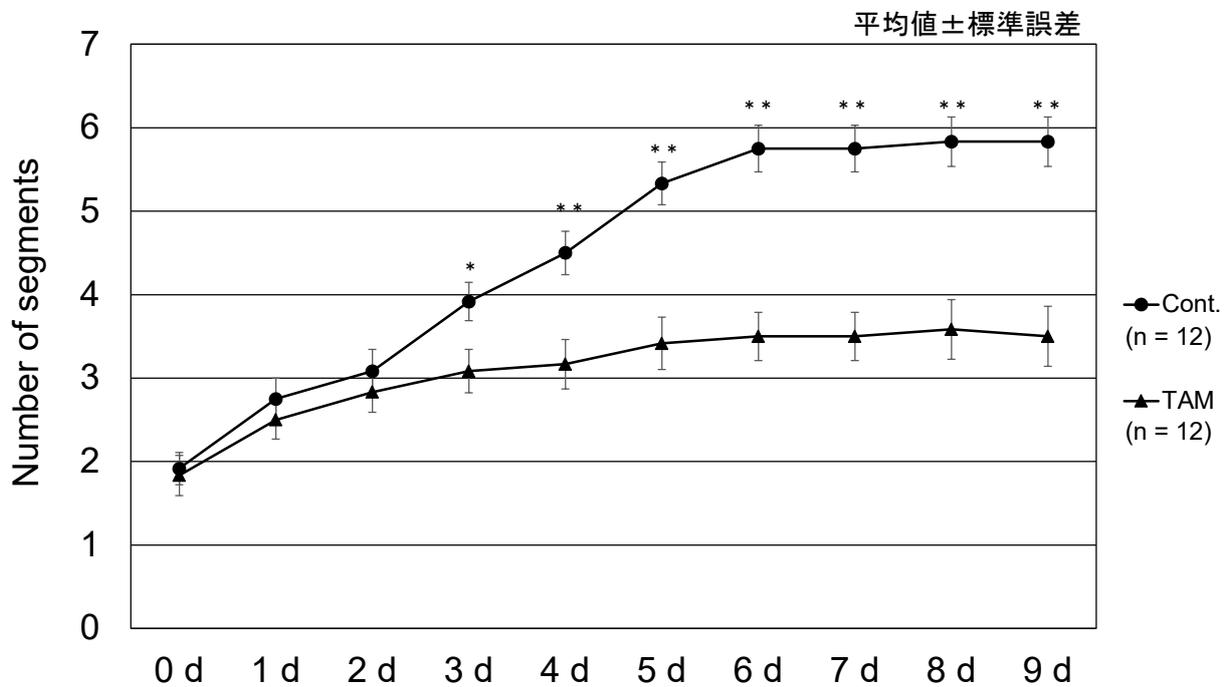


Fig. 22 TAM投与個体の分節数の推移

50  $\mu$ MのTAMを低温処理で誘導した分節形成期ストロビラ (くびれ1-3個) に投与し、10  $^{\circ}$ Cで培養した。試料物質を投与しない群をcontrol (Cont.) とした。縦軸は、TAM投与後0-9日の各日の分節数の平均値を示す (n = 12)。同日のcontrol群とTAM投与群の分節数の平均値を比較した。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs Welch's  $t$  test.

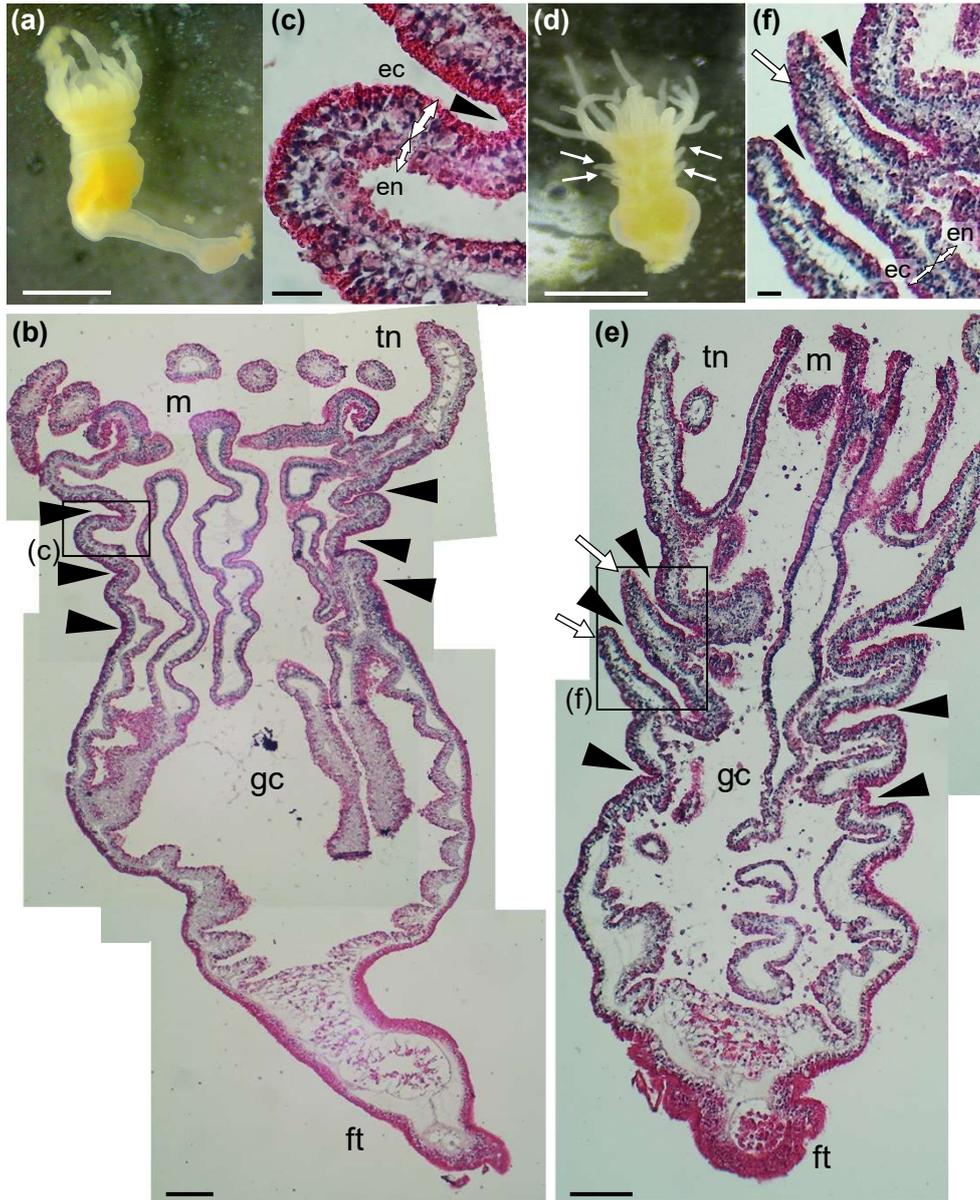


Fig. 23 TAM投与による異所性触手の形成

50  $\mu$ M TAMを低温処理で誘導した分節形成期ストロビラ (くびれ1-3個) に投与し、10  $^{\circ}$ Cで培養した。TAM投与後、(a) 3日、(d) 8日の形態。(b, e) (a)、(d) に示したストロビラの切片をHE染色した。(c, f) (b)、(e) の四角で囲んだ範囲の拡大写真。黒い矢じりはくびれの位置を示し、写真上部が口側である。白い両矢印は外胚葉・内胚葉上皮細胞層を表す。(d-f)の白い矢印は、分節間のくびれから生じた触手様突起を示す。ec: ectoderm, en: endoderm, mes: mesoglea mesoglea (中膠:外胚葉・内胚葉性上皮細胞層の間のゼラチン様間充ゲル層), gc: gastric cavity (胃腔), tn: tentacles, m: mouth, ft: foot.  
Scale bar (a, d) 1 mm, (b, e) 100  $\mu$ m, (c, f) 20  $\mu$ m.

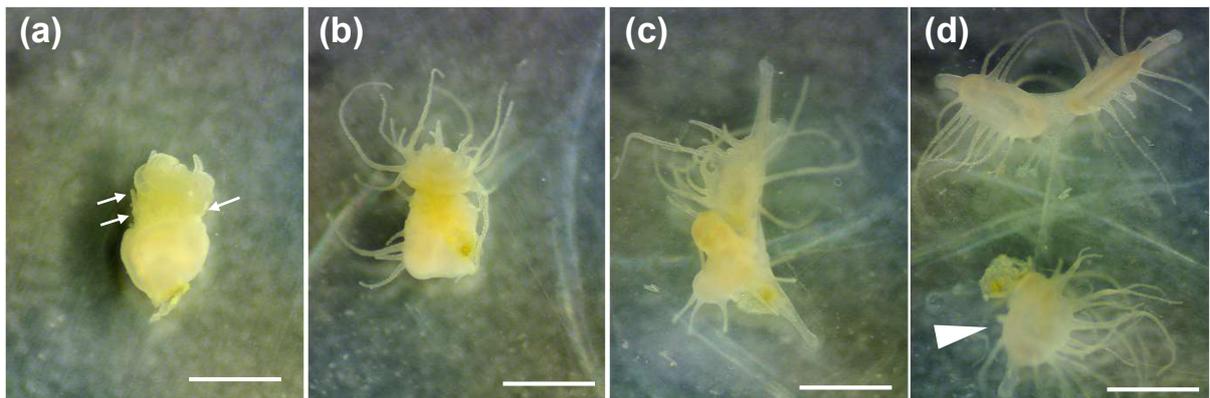


Fig. 24 TAM投与により分節がポリプ化した

50  $\mu$ M TAM投与により分節間のくびれ部分から触手様突起 (白い矢印)が生じた。その後、各分節が分離してポリプ化した (矢じり)。リンス後、(a) 0日、(b) 4日、(c) 12日、(d) 18日の形態。Scale bar 1 mm.

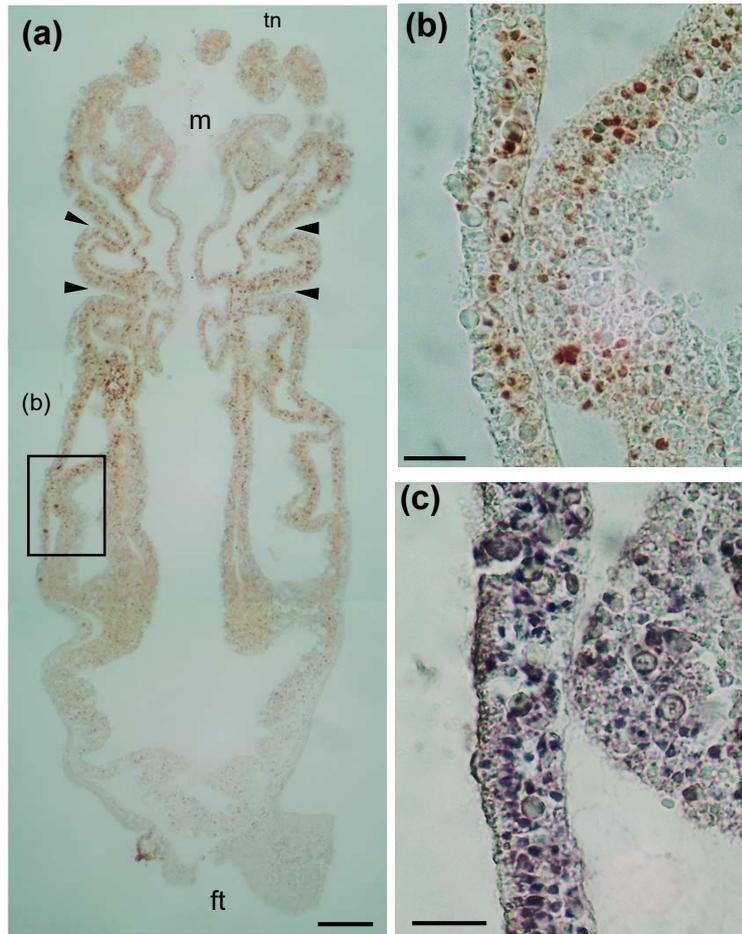


Fig. 25 TAM投与個体の細胞増殖の検出

50  $\mu$ M TAMを低温処理で誘導した分節形成期ストロビラに投与し、10  $^{\circ}$ Cで培養した。4 % formaldehyde/ ASWで固定後、パラフィン切片を作製し、抗PCNA抗体および二次抗体 (HRP標識抗Rabbit IgG 抗体) を用いて免疫組織染色を行い、DABで発色を行った。(a) TAM投与により分節形成が停止したストロビラ。黒い矢じりはくびれの位置を示し、写真上部が口側である。(b) (a) の四角で囲んだ範囲の拡大写真。(c) (b)と同じ個体の切片をヘマトキシリンで染色した。

tn: tentacles, m: mouth, ft: foot. Scale bar (a) 100  $\mu$ m, (b, c) 20  $\mu$ m.

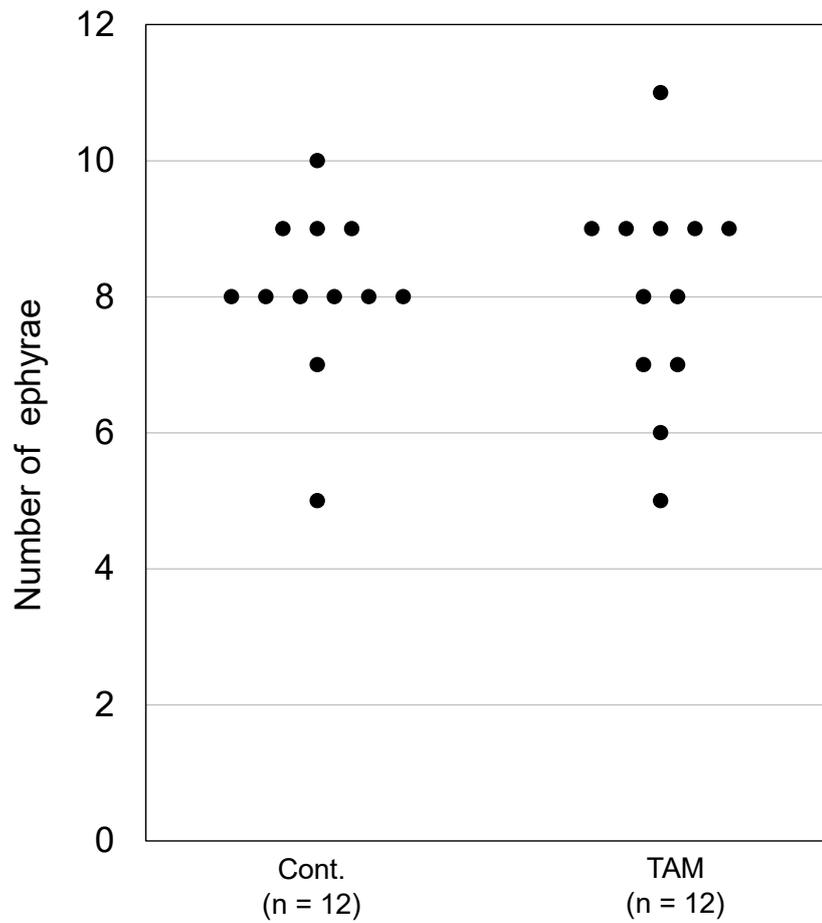


Fig. 26 TAMのエフィラ形態形成期ストロビラへの影響

50  $\mu$ MのTAMを低温処理で誘導したエフィラ形態形成初期ストロビラに投与し、10  $^{\circ}$ Cで培養した。試料物質を投与しない群をcontrol (Cont.) とした。縦軸は、TAM投与から25日間の観察中に正常に遊離したエフィラの数を示す。横軸の括弧内のnはサンプルサイズを表している。

Mann-Whitney *U* testを用いて統計学的解析を行った (有意水準  $p < 0.05$ )。

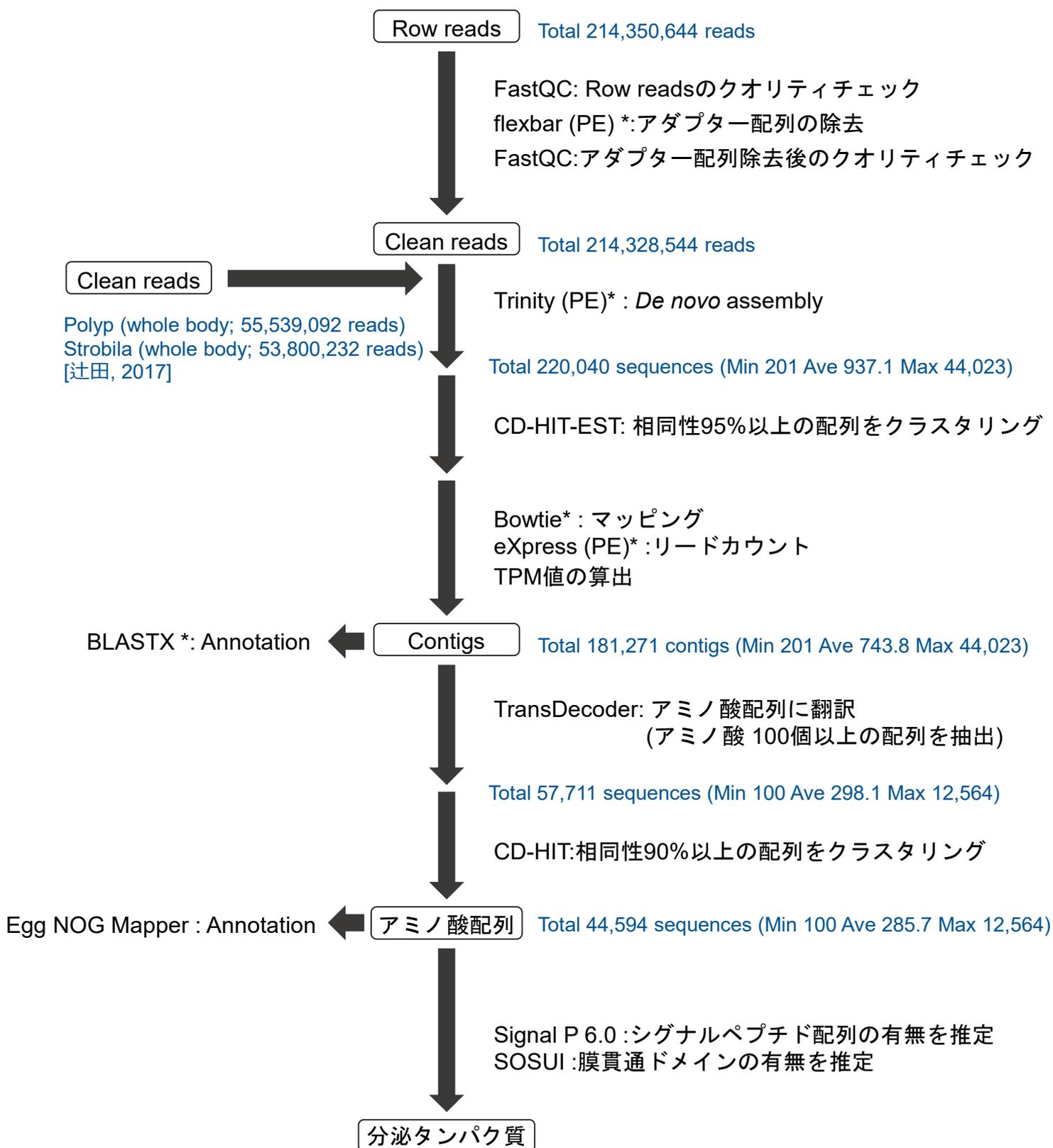


Fig. 27 バイオインフォマティクス解析の流れ

RNA sequencing により得られたrow readsからアダプター配列を除去し、*de novo* assemblyを行った。相同性の高い配列をクラスタリングし、アミノ酸配列への翻訳、アノテーション情報の付加、分泌タンパク質の推定を行った。

P5 In2 Rd1 SP DNA insert Rd 2 SP In1 P7



Fig. 28 pair-end readの構造

精製したmRNA を cDNA化し、アダプタを付加することにより、mRNA-Seq (Strand Specific) ライブラリが調製された。

DNA insert: 150 bpに断片化した目的配列, P5, P7:フローセルへの結合部位, Rd1 SP, Rd2 SP: シーケンシングプライマー結合部位, In1, In2:複数サンプル同時解析用の目印配列

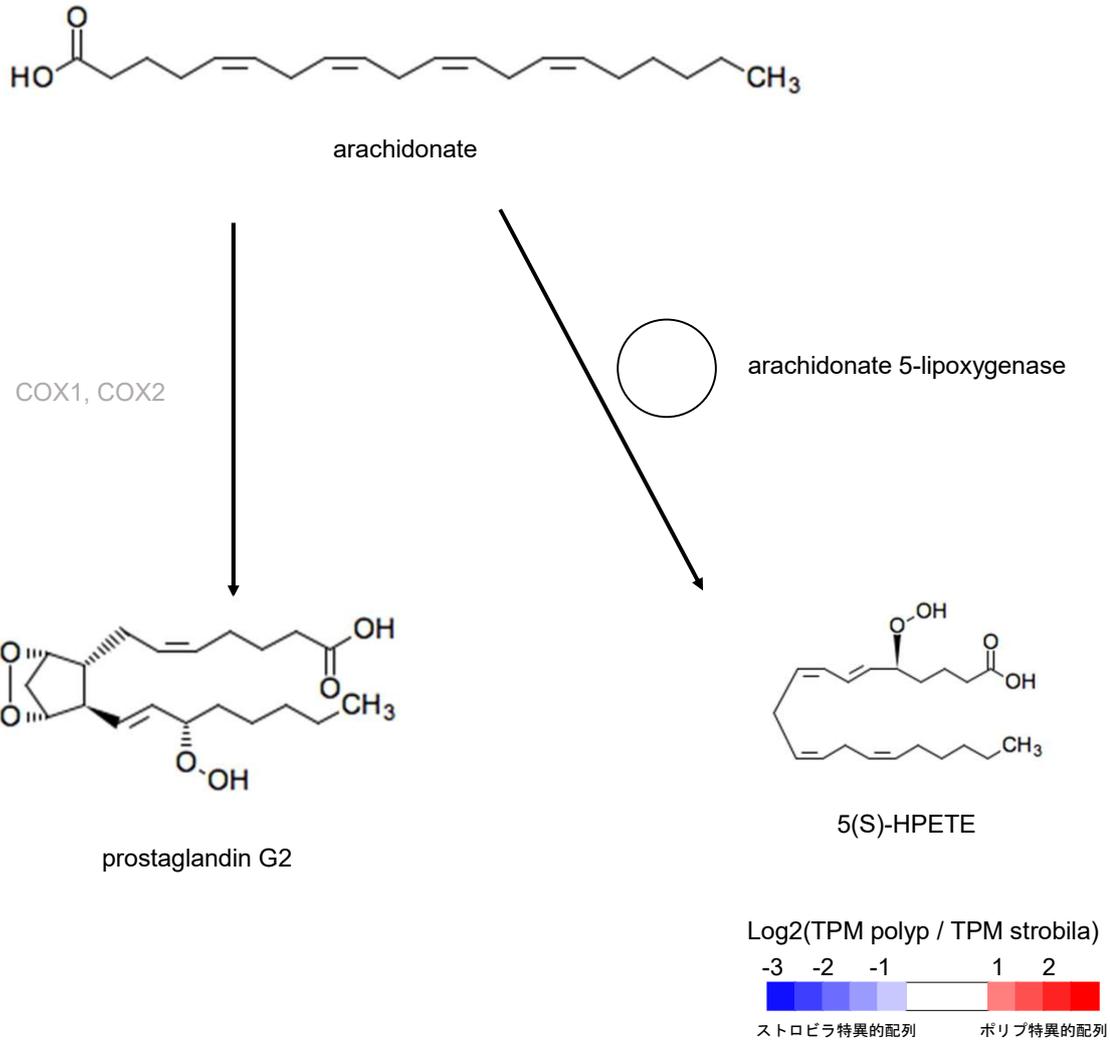


Fig. 29 エイコサノイドの生合成経路

cyclooxygenase (COX)によりアラキドン酸からプロスタグランジン類が合成される。また、lipoxygenaseによりロイコトリエン類が合成される。矢印横の円グラフは、ミズクラゲhomologのステージ別発現パターンを示す (赤: ポリプ特異的配列、青: ストロビラ特異的配列、白: 発現差異なし)。酵素名が灰色のものは、本研究のトランスクリプトーム解析において相同性を持つ配列が見つからなかったことを示す。

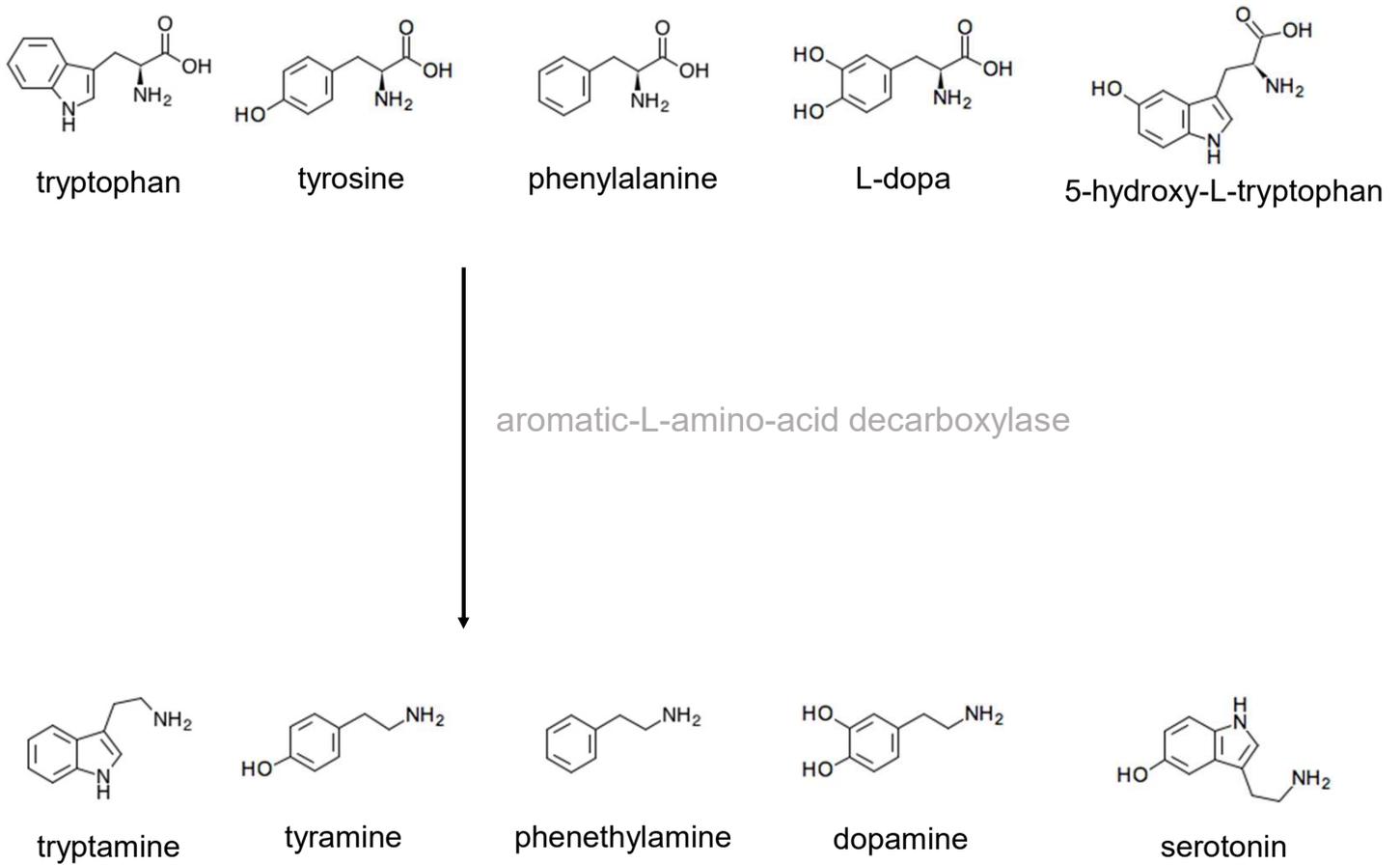


Fig. 30 生理活性アミンの生合成経路

aromatic-L-amino-acid decarboxylaseによりtryptamine、dopamine、serotoninなどの生理活性アミンが合成される。本研究のトランスクリプトーム解析において、芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素のミズクラゲhomologは見つからなかった。

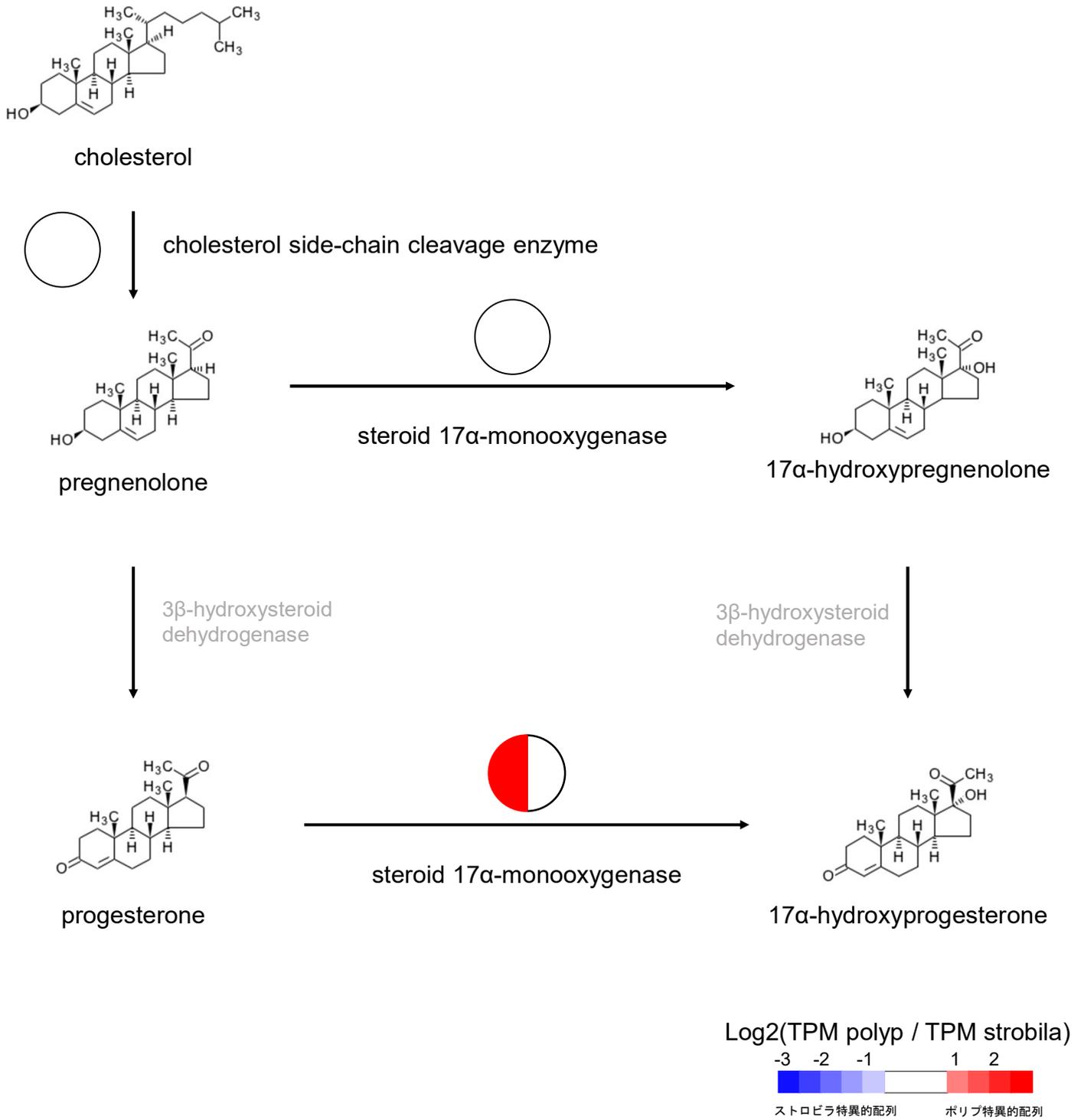


Fig. 31 ステロイドの生合成経路

cholesterol side-chain cleavage enzymeにより、側鎖が切断されてprogesteroneとなる。さらに、3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenaseとsteroid 17 $\alpha$ -monooxygenaseにより、17 $\alpha$ -hydroxyprogesteroneが合成される。矢印横の円グラフは、ミズクラゲhomologのステージ別発現パターンを示す(赤: ポリプ特異的配列、青: ストロビラ特異的配列、白: 発現差異なし)。酵素名が灰色のものは、本研究のトランスクリプトーム解析において相同性を持つ配列が見つからなかったことを示す。

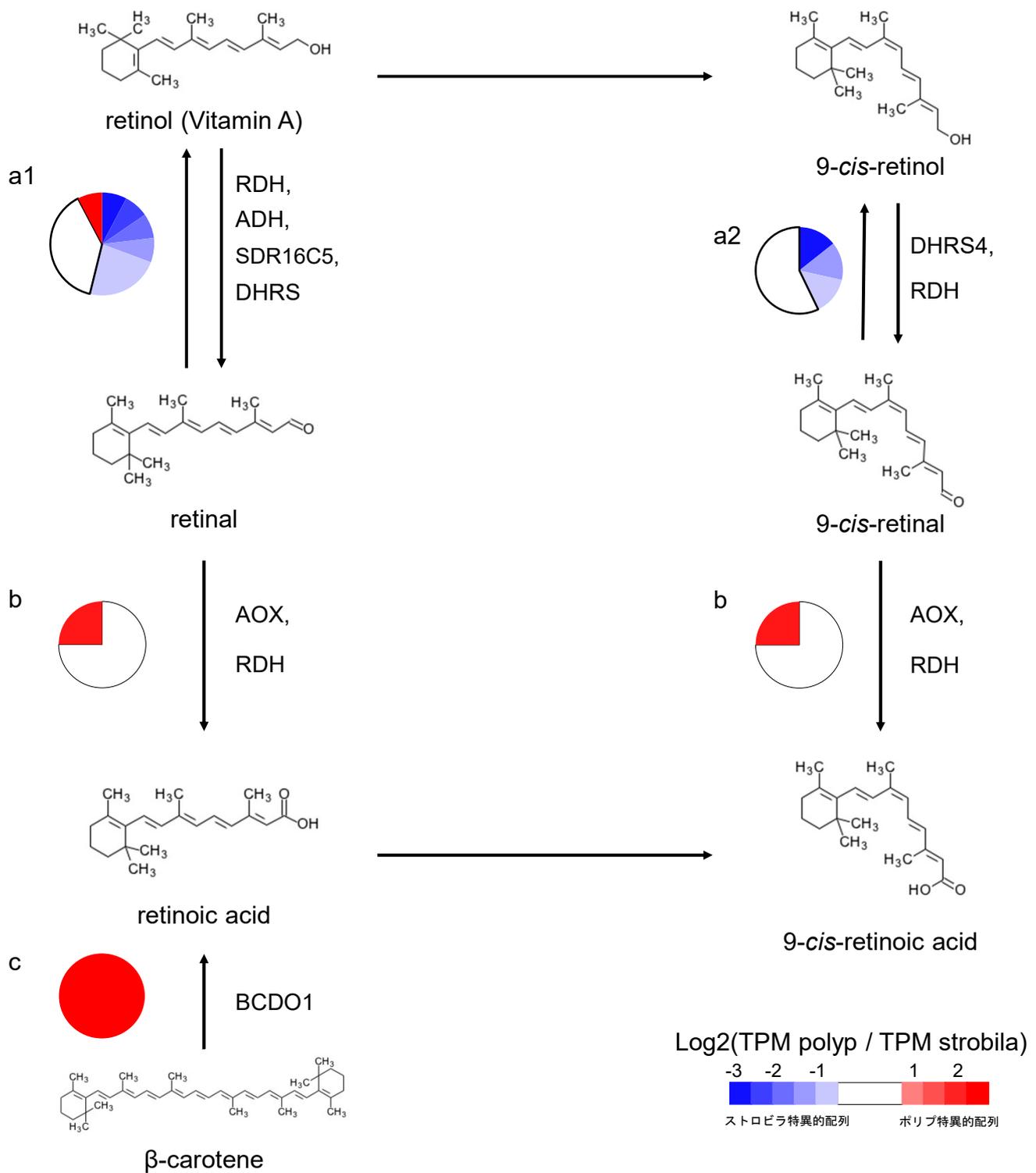


Fig. 32 レチノイン酸の生合成経路

レチノールからレチナルを介してレチノイン酸が合成される。矢印横の円グラフは、ミズクラゲhomologのステージ別発現パターンを示す (赤: ポリプ特異的配列、青: ストロビラ特異的配列、白: 発現差異なし)。RDH: retinol dehydrogenase, ADH: alcohol dehydrogenase, AOX: aldehyde oxidase, SDR16C5: all-trans-retinol dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>), DHRS: dehydrogenase/reductase SDR family member, BCDO1:  $\beta$ -carotene 15,15'-dioxygenase

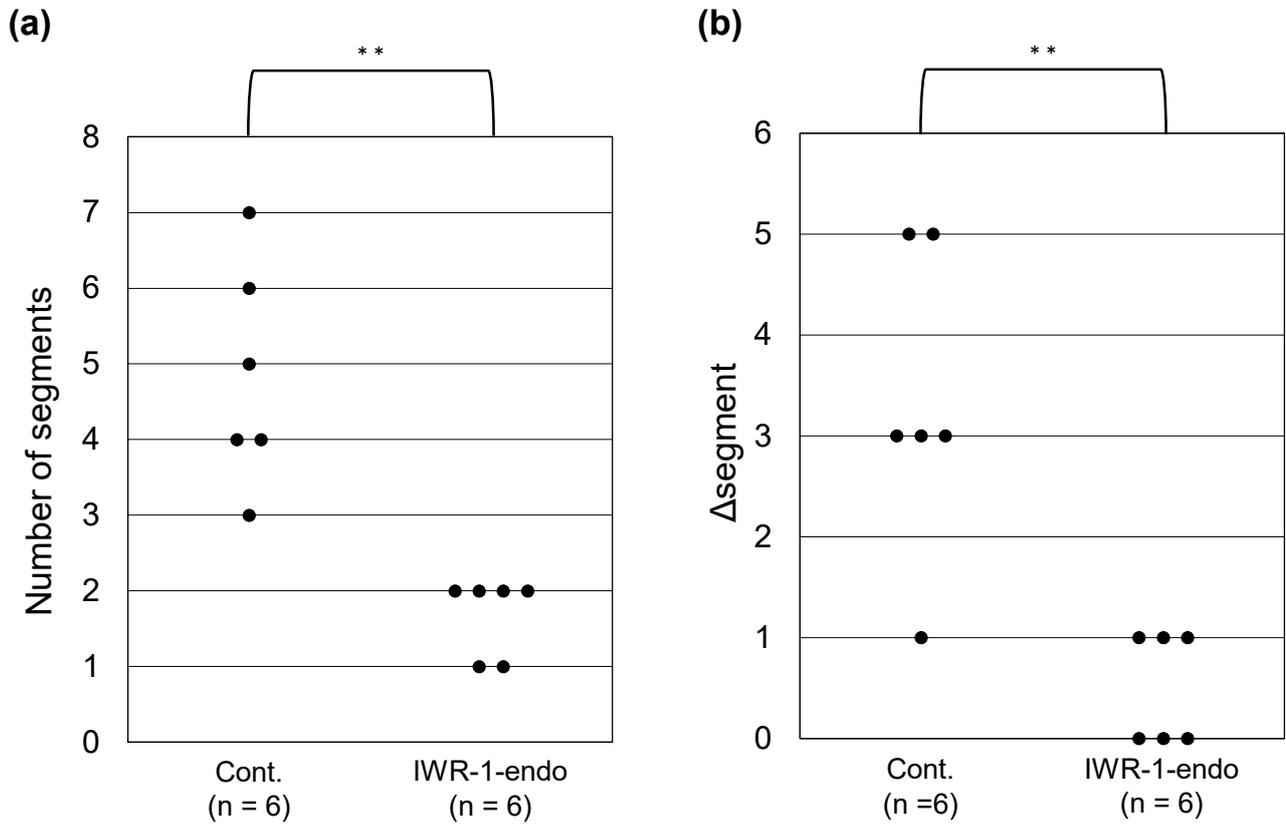


Fig. 33 Wntシグナル阻害剤による分節形成の阻害

50  $\mu$ MのIWR-1-endoを低温処理で誘導した分節形成期ストロビラ (くびれ1-3個) に投与し、10  $^{\circ}$ Cで培養した。IWR-1-endoを投与しない群をcontrol (Cont.) とした。縦軸は、(a) IWR-1-endo投与から30日間の観察中に形成された分節の数、(b) IWR-1-endo投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) を示す。横軸の括弧内のnはサンプルサイズを表している。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs control, Mann-Whitney  $U$  test.

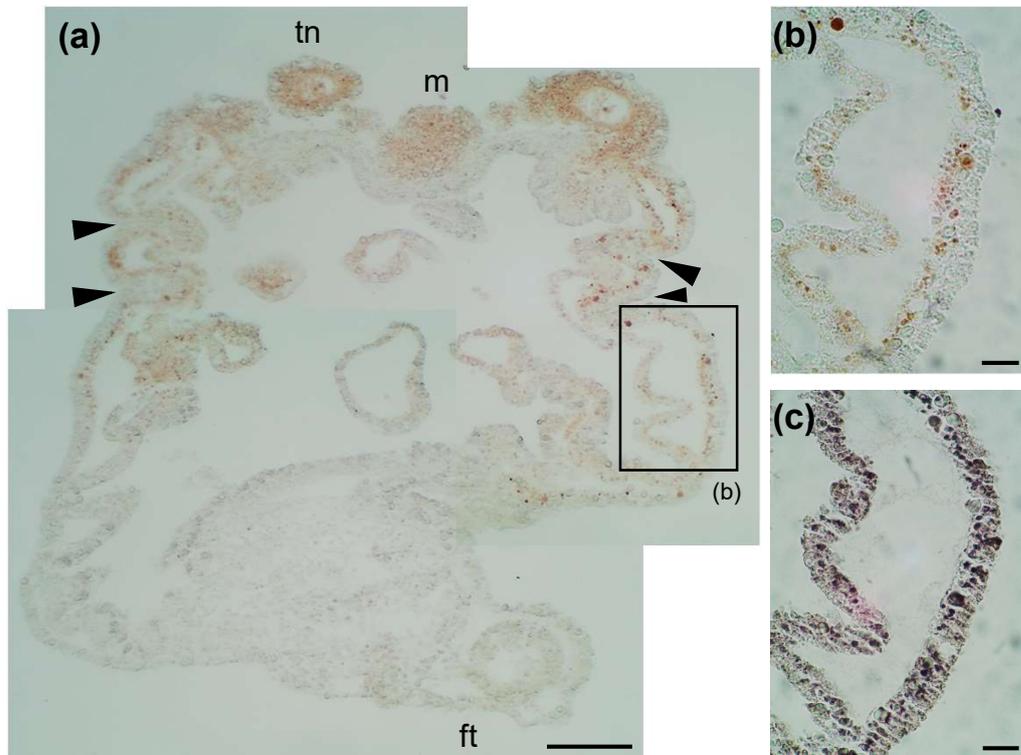


Fig. 34 Wntシグナル阻害剤投与個体の細胞増殖の検出

(a) 50  $\mu$ M IWR-1-endoを低温処理で誘導した分節形成期ストロビラに投与し、10  $^{\circ}$ Cで培養した。4 % formaldehyde/ ASWで固定後、パラフィン切片を作製し、抗PCNA抗体および二次抗体 (HRP標識抗Rabbit IgG 抗体) を用いて免疫組織染色を行い、DABで発色を行った。黒い矢じりはくびれの位置を示し、写真上部が口側である。(b) (a) の四角で囲んだ範囲の拡大写真。(c) (b)と同じ個体の切片をヘマトキシリンで染色した。

tn: tentacles, m: mouth, ft: foot. Scale bar (a) 100  $\mu$ m, (b, c) 20  $\mu$ m.

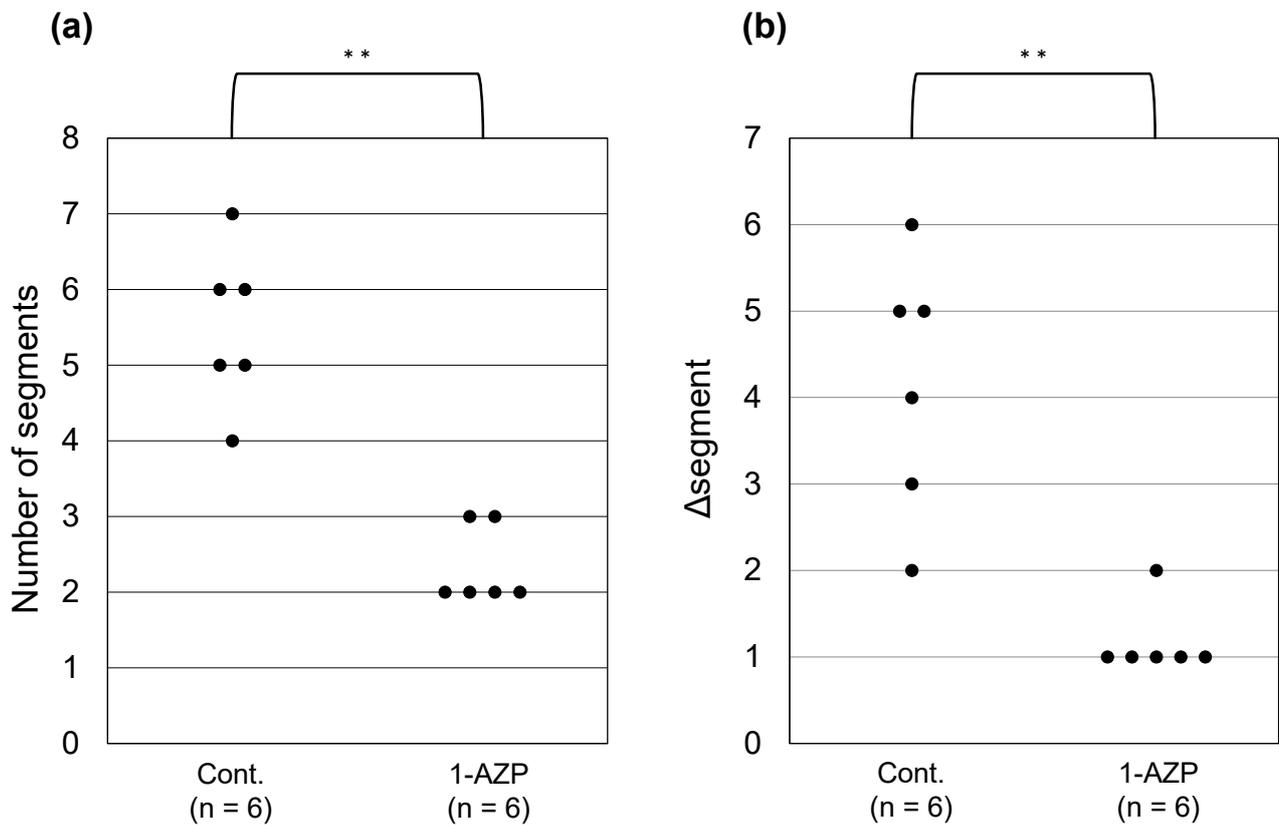


Fig. 35 Wntシグナル活性化剤による分節形成の阻害

2  $\mu$ Mの1-AZPを低温処理で誘導した分節形成期ストロビラ (くびれ1-3個) に投与し、10  $^{\circ}$ Cで培養した。1-AZPを投与しない群をcontrol (Cont.) とした。縦軸は、(a) 1-AZP投与から30日間の観察中に形成された分節の数、(b) 1-AZP投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) を示す。横軸の括弧内のnはサンプルサイズを表している。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs control, Mann-Whitney  $U$  test.

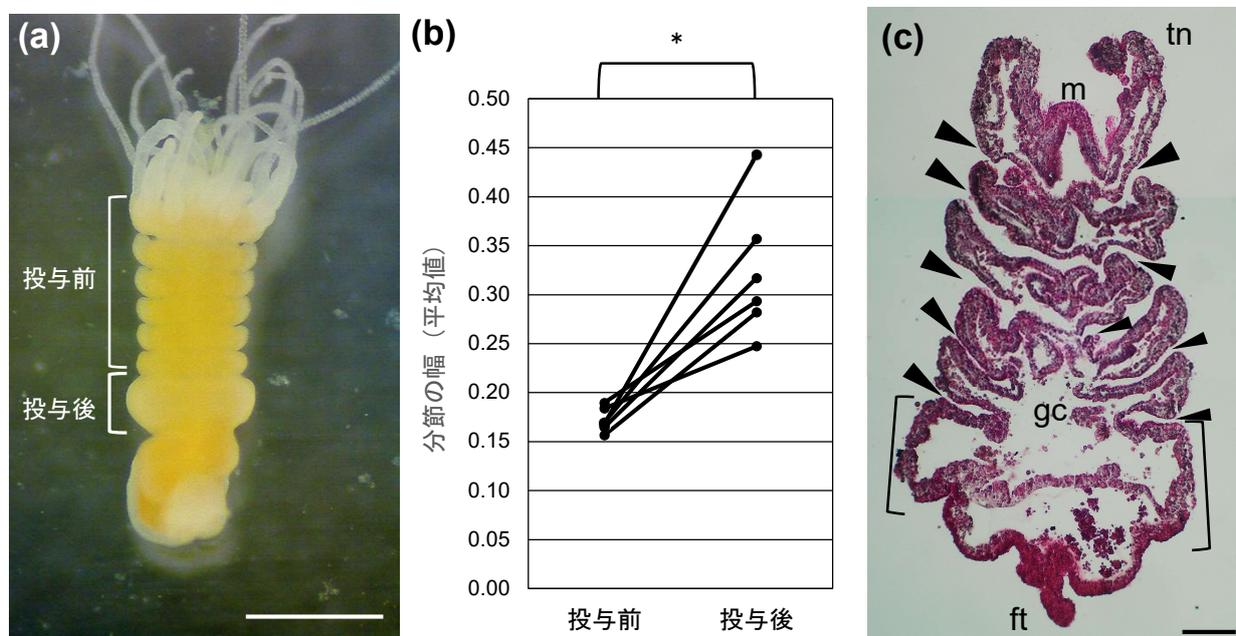


Fig. 36 Wntシグナル活性化剤投与による形態異常

2  $\mu$ M 1-AZPを低温処理で誘導した分節形成期ストロビラに投与し、10  $^{\circ}$ Cで培養した。(a) 1-AZP投与後、5日の形態。投与後に形成された分節が、投与前に形成されていた分節よりも大きくなる形態異常が見られた(白い角括弧)。(b) 各個体 (n = 6) の1-AZP投与前に形成されていた分節(左)と投与後に形成された分節(右)の幅の平均値を比較した。\*  $p < 0.05$  Wilcoxon signed-rank sum test. (c) 1-AZP投与により形態異常が見られた個体のHE染色。黒い矢じりはくびれの位置を示し、写真上部が口側である。角括弧は、1-AZP投与後に形成され、幅が広がった分節を示す。tn: tentacles, gc: gastric cavity (胃腔), m: mouth, ft: foot. Scale bar (a) 1 mm, (b) 100  $\mu$ m.

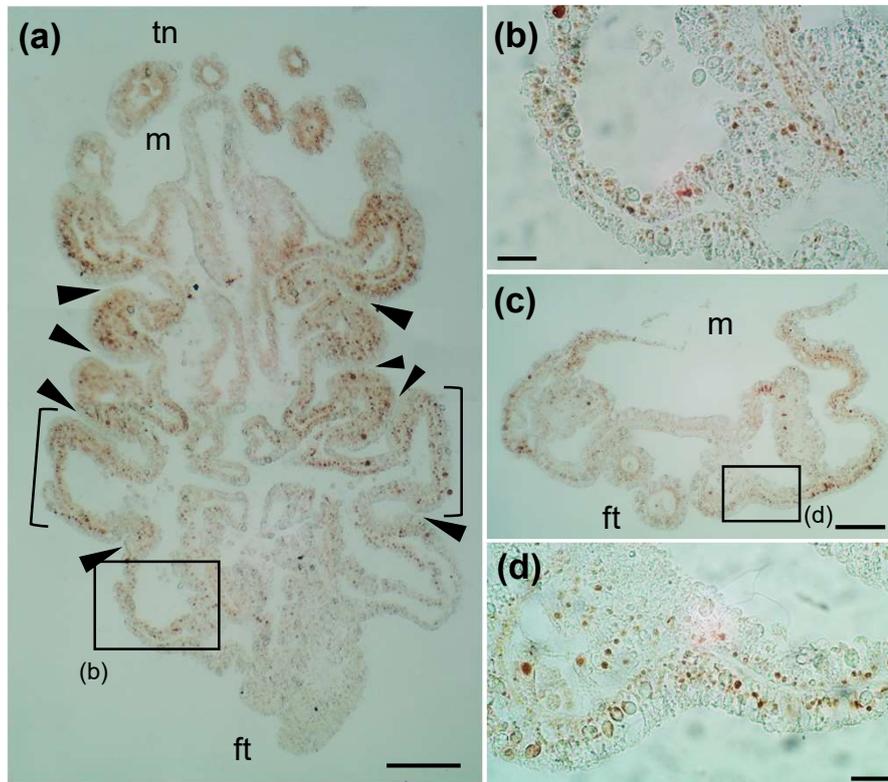


Fig. 37 Wntシグナル活性化剤投与個体の細胞増殖の検出

(a, b) 2  $\mu$ M 1-AZPを低温処理で誘導した分節形成期ストロビラに投与し、10  $^{\circ}$ Cで6日間培養した。(c, d) 2  $\mu$ M 1-AZPを9日間絶食したポリプに投与し、23  $^{\circ}$ Cで6日間培養した(絶食期間計15日)。4 % formaldehyde/ ASWで固定後、パラフィン切片を作製し、抗PCNA抗体および二次抗体 (HRP標識抗Rabbit IgG 抗体) を用いて免疫組織染色を行い、DABで発色を行った。黒い矢じりはくびれの位置を示し、写真上部が口側である。(a) 黒い角括弧は、1-AZP投与後に形成され、幅が広がった分節を示す。(b, d) それぞれ(a, c) の四角で囲んだ範囲の拡大写真。tn: tentacles, m: mouth, ft: foot. Scale bar (a, c) 100  $\mu$ m, (b, d) 20  $\mu$ m.

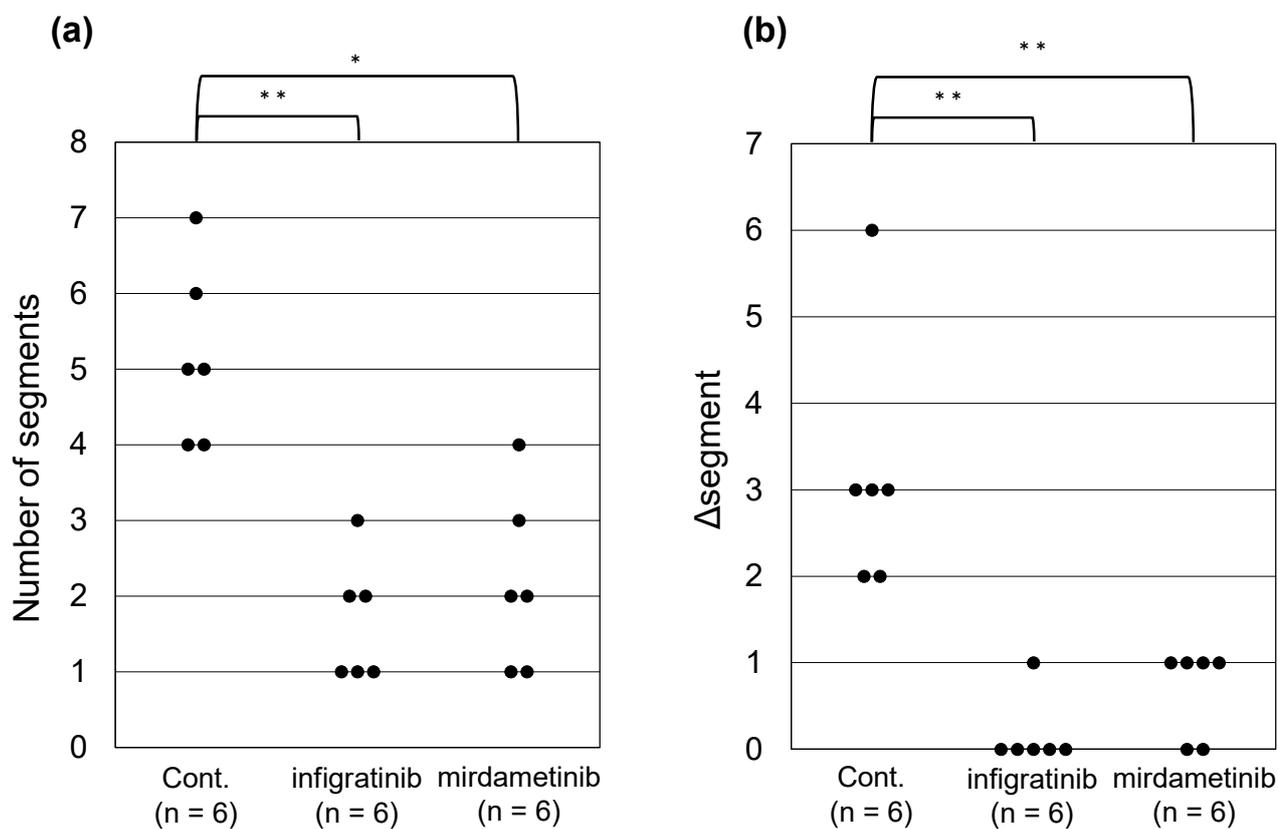


Fig. 38 FGFR阻害剤/ ERK阻害剤による分節形成の阻害

25  $\mu$ M ifigratinib および 12.5  $\mu$ M mirdametinibを低温処理で誘導した分節形成期ストロビラ (くびれ1-3個) に投与し、10  $^{\circ}$ Cで培養した。試料物質を投与しない群をcontrol (Cont.) とした。縦軸は、(a) 試料物質投与から10日間の観察中に形成された分節の数、(b) 試料物質投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) を示す。横軸の括弧内のnはサンプルサイズを表している。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs control, Mann-Whitney  $U$  test with Bonferroni correction.

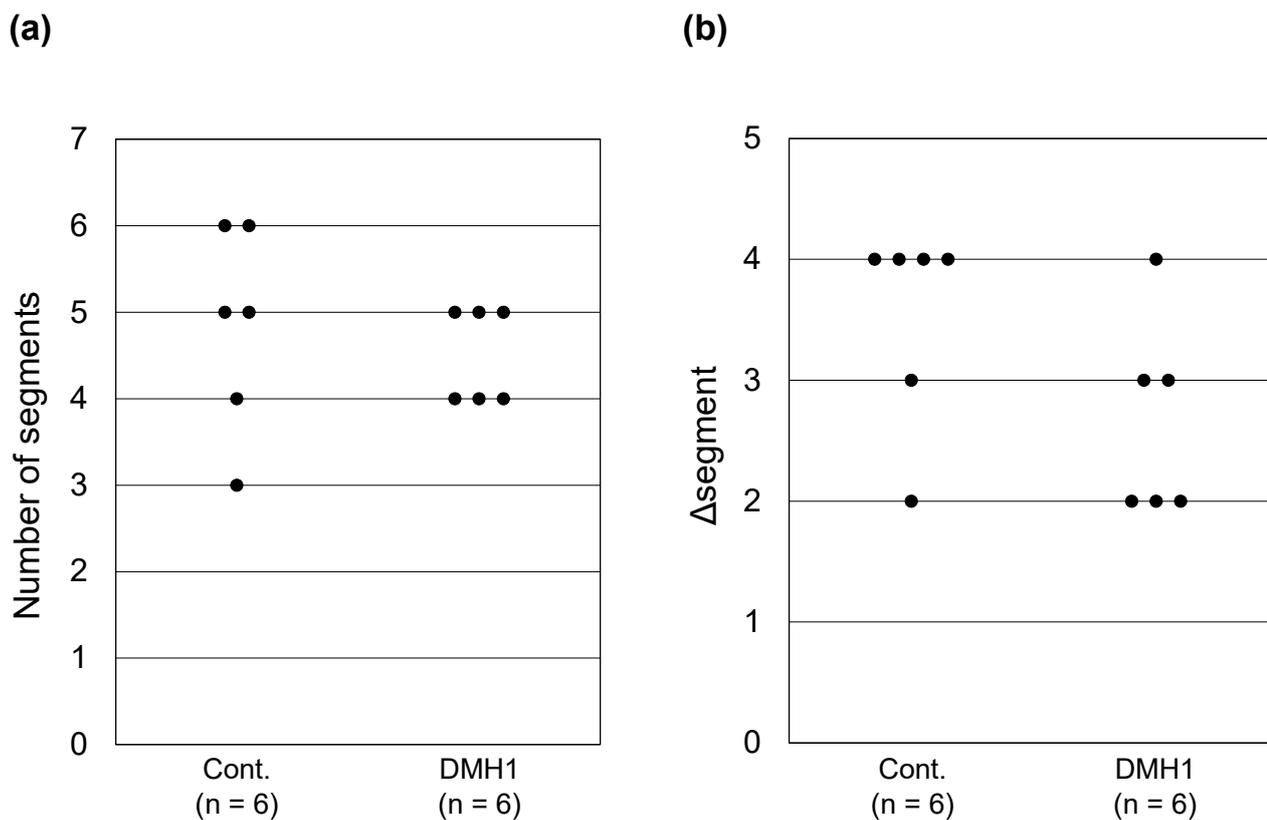


Fig. 39 BMP レセプター阻害剤による分節形成の阻害

50  $\mu$ M DMH1を低温処理で誘導した分節形成期ストロビラ (くびれ1-3個) に投与し、10  $^{\circ}$ Cで培養した。DMH1を投与しない群をcontrol (Cont.) とした。縦軸は、(a) DMH1投与から30日間の観察中に形成された分節の数、(b) DMH1投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) を示す。横軸の括弧内のnはサンプルサイズを表している。Mann-Whitney  $U$  testを用いて統計学的解析を行った (有意水準  $p < 0.05$ )。

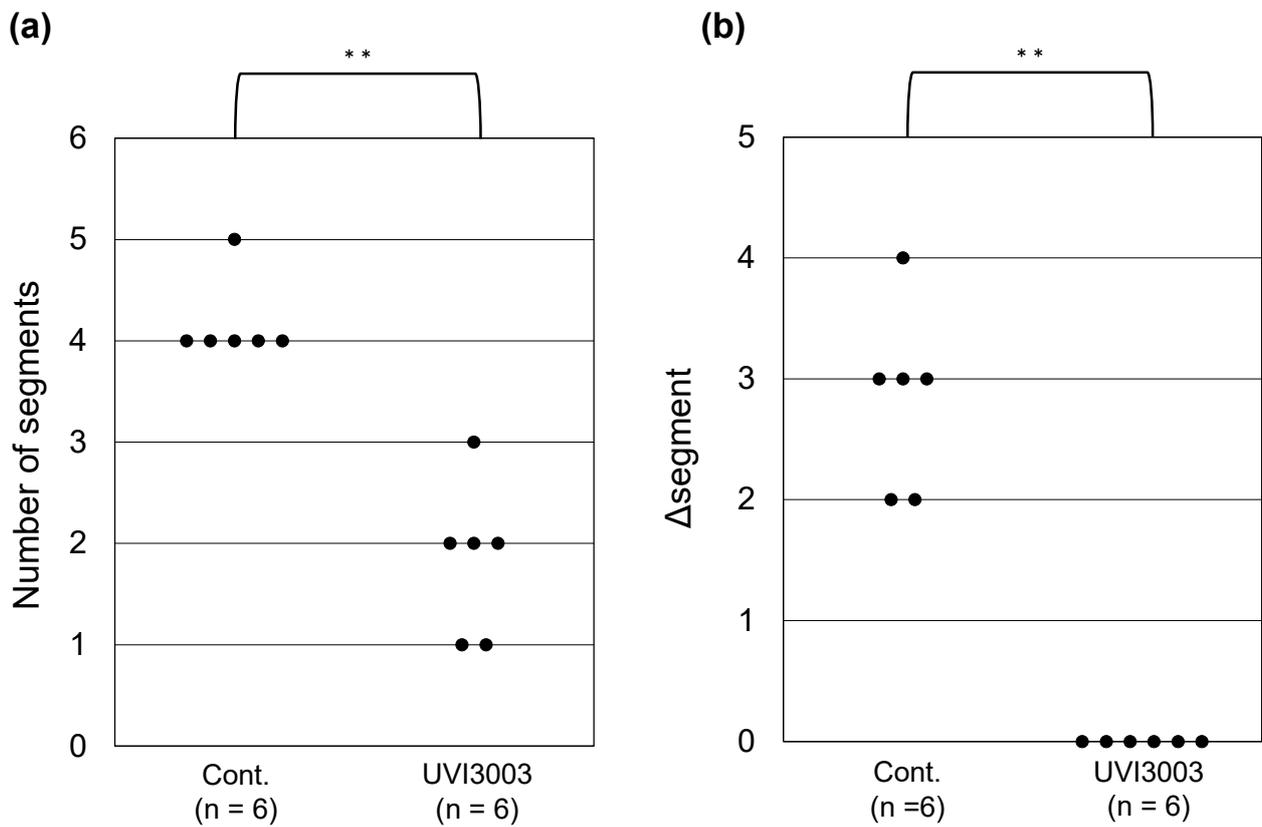


Fig. 40 レチノイドレセプター阻害剤による分節形成の阻害

5  $\mu$ MのUVI3003を低温処理で誘導した分節形成期ストロビラ (くびれ1-3個) に投与し、10  $^{\circ}$ Cで培養した。UVI3003を投与しない群をcontrol (Cont.) とした。縦軸は、(a) UVI3003投与から16日間の観察中に形成された分節の数、(b) UVI3003投与後の分節数の増加 ( $\Delta$ segment) を示す。横軸の括弧内のnはサンプルサイズを表している。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs control, Mann-Whitney  $U$  test.

Table 1 ミズクラゲのproliferating cell nuclear antigen (PCNA)

配列ID	TPM						homolog	
	ポリプ	ストロビラ	正常口側	正常足側	TAM口側	TAM足側	<i>Homo sapiens</i> (accession number)	Identity (%)
comp97985_c0_seq3.p1	12.888	162.993	99.931	25.290	74.272	10.599	proliferating cell nuclear antigen (NP_002583.1)	62%

Table 2 インドール化合物のエフィラ形態形成阻害活性

	エフィラ形態形成阻害活性	異所性触手活性
TAM	8 / 8	6 / 8
AcTAM	5 / 8	5 / 8
5MeOIn	8 / 8	7 / 8

TAM, tryptamine; AcTAM, *N*-acetyltryptamine; 5MeOIn, 5-methoxyindole

Table 3 アダプター配列

Rd1 SP		AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA
Rd2 SP		AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
正常口側	In1	TGGAAGCA
	In2	GAGAGTAC
正常足側	In1	CAATAGCC
	In2	TCTACGCA
TAM口側	In1	CTCGAACA
	In2	CGCAATTCC
TAM足側	In1	GATAGCCA
	In2	CAACACAG

Table 4 RNA sequencingの結果

	Samples				Total
	正常口側	正常足側	TAM口側	TAM足側	
Row Reads	55,931,302	50,653,000	52,241,506	55,524,836	214,350,644
Called Bases (Mbp)	8,390	7,598	7,836	8,329	32,153
Q30 (%)	93.68	93.98	93.61	93.83	94
Clean Reads	55,926,226	50,648,348	52,236,298	55,517,672	214,328,544

Table 5 assemblyの結果

	assembled reads	contigs
配列数	220,040	181,271
塩基配列情報 (nt)	206,188,731	134,835,869
配列長：最小値 (nt)	201	201
配列長：平均値(nt)	937.1	743.8
配列長：中央値 (nt)	450	385
配列長：最大値 (nt)	44,023	44,023
N50 (nt)	1,819	1,284

Table 6 アミノ酸翻訳の結果

アミノ酸(100aa以上)をコードするcontig	31,683
アミノ酸配列数 (読み枠違い含)	44,594
総アミノ酸残基数 (aa)	12,742,366
配列長：最小値 (aa)	100
配列長：平均値(aa)	285.7
配列長：中央値 (aa)	158
配列長：最大値 (aa)	12,564

Table 7 発現パターンの解析結果

	contig	アミノ酸(100aa以上)を コードするcontig	アミノ酸配列 (読み枠違い含)
Total	181,271	31,683	44,594
ポリプ特異的配列	22,157	5,601	7,829
ストロビラ特異的配列	48,996	13,206	17,998
正常口側>正常足側 <sup>a)</sup>	23,164	8,720	11,427
TAM非応答性口側配列	12,749	5,677	8,055
TAM抑制性口側配列	5,514	1,602	2,158

<sup>a)</sup> TPM値 (正常口側) / TPM値 (正常足側) > 2

Table 8 TAM非応答性口側配列 / TAM抑制性口側配列のannotation

TAM非応答性口側配列 (E-value 上位10個)		
配列ID	Annotation	E-value
comp100490_c1_seq3.p1	galactosidase beta 1	0
comp65494_c0_seq1.p1	glucuronidase beta	0
comp99519_c0_seq1.p2	hephaestin like 1	0
comp100180_c0_seq13.p1	heat shock protein 90 beta family member 1	0
comp88792_c0_seq1.p1	endoplasmic reticulum protein 44	1E-159
comp96575_c0_seq7.p1	legumain	1E-156
comp65202_c0_seq1.p1	fucosyltransferase 11	8E-154
comp86866_c0_seq3.p2	canopy FGF signaling regulator 2	1E-143
comp99676_c0_seq4.p1	protein O-fucosyltransferase 2	4E-134
comp97407_c0_seq1.p1	sulfatase modifying factor 1	2E-127
TAM抑制性口側配列		
配列ID	Annotation	E-value
comp96074_c0_seq3.p1	aspartylglucosaminidase	9E-137
comp100801_c4_seq16.p1	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1	5.8E-128
comp95317_c0_seq1.p1	pappalysin 1	5.01E-95
comp97408_c0_seq4.p1	stromal cell derived factor 2	4.23E-84
comp92854_c0_seq1.p1	chymotrypsin like elastase 2A	5.91E-50
comp99623_c0_seq1.p1	OS9 endoplasmic reticulum lectin	3.34E-47
comp103660_c1_seq2.p1	thioredoxin domain containing 12	2E-36
comp100500_c0_seq2.p1	C1q and TNF related 12	4.58E-30
comp95796_c0_seq2.p1	gremlin 1, DAN family BMP antagonist	3.99E-17
comp102828_c2_seq6.p1	fibroblast growth factor 12	5.35E-14
comp92625_c1_seq1.p1	LDL receptor related protein associated protein 1	9.05E-11

Table 9 ミズクラゲの既知分泌性タンパク質

○TAM非応答性口側特異的配列

配列ID	TPM						homolog	
	ポリプ	ストロビラ	正常口側	正常足側	TAM口側	TAM足側	<i>Homo sapiens</i> (accession number)	Identity (%)
comp100259_c0_seq4.p1	1.337	12.456	16.163	0.694	11.467	0.316	Wnt 4 (NP_110388.2)	31%
comp94023_c0_seq4.p1	0.096	5.571	9.535	2.021	7.595	0.796	FGF 17 (NP_003858.1)	36%
comp96118_c0_seq1.p1	2.200	4.985	5.809	2.659	5.334	2.780	BMP 4 (NP_001193.2)	30%

○TAM抑制性口側特異的配列

配列ID	TPM						homolog	
	ポリプ	ストロビラ	正常口側	正常足側	TAM口側	TAM足側	<i>Homo sapiens</i> (accession number)	Identity (%)
comp102828_c2_seq6.p1	0.000	16.357	14.185	2.925	6.502	0.306	FGF 20 (NP_062825.1)	33%

Table 10 低分子性二次代謝産物生合成酵素の探索に用いたquery配列

エイコサノイド		
species	protein	accession number
<i>Homo sapiens</i>	COX1, 2 (cyclooxygenase 1,2 )	NP_000953.2 NP_000954.1
	arachidonate 5-lipoxygenase	NP_000689.1
生理活性アミン		
species	protein	accession number
<i>Homo sapiens</i>	aromatic-L-amino-acid decarboxylase	NP_000781.2
ステロイド		
species	protein	accession number
<i>Homo sapiens</i>	cholesterol side-chain cleavage enzyme	NP_000772.2
	3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase	NP_000853.1 NP_000189.1
	steroid 17 $\alpha$ -monooxygenase / 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone deacetylase	NP_000093.1
レチノイン酸		
species	protein	accession number
<i>Homo sapiens</i>	retinal dehydrogenase (RDH)	NP_000680.2
		NP_000684.2
		NP_003879.2
		NP_742034.1
		NP_057110.3
		NP_689656.2
		NP_003699.3
		NP_056540.3
	alcohol dehydrogenase (ADH)	NP_000658.1
		NP_000663.1
		NP_000661.2
		NP_000659.2
		NP_000660.1
		NP_001159976.1
		NP_000662.3
aldehyde oxidase (AOX)	NP_001150.3	
all-trans-retinol dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> ) (SDR16C5)	NP_620419.2	
lehydrogenase/reductase SDR family member (DHRS)	NP_066284.2	
	NP_001135742.1	
	NP_932349.2 NP_004744.2	
$\beta$ -carotene 15,15'-dioxygenase	NP_059125.2	

Table 11 既知低分子生理活性物質の生合成酵素 (1)

## ○エイコサノイド

query	配列ID	log2(polyp / strobila)	homolog	
			<i>Homo sapiens</i> (accession number)	Identity (%)
COX1, 2	No hit			
	comp104864_c0_seq6.p1	0.2444	polyunsaturated fatty acid 5-lipoxygenase isoform 1 (NP_000689.1)	29%
arachidonate 5-lipoxygenase	comp104864_c0_seq2.p2	-0.2237	arachidonate 12-lipoxygenase, 12R-type (NP_001130.1)	35%
	comp100782_c1_seq5.p1	-0.0321	polyunsaturated fatty acid 5-lipoxygenase isoform 1 (NP_000689.1)	31%
	comp104864_c0_seq4.p5	-0.6915	arachidonate 12-lipoxygenase, 12R-type (NP_001130.1)	38%

## ○生理活性アミン

query	配列ID	log2(polyp / strobila)	homolog	
			<i>Homo sapiens</i> (accession number)	Identity (%)
aromatic-L-amino-acid decarboxylase	No hit			

## ○ステロイド

query	配列ID	log2(polyp / strobila)	homolog	
			<i>Homo sapiens</i> (accession number)	Identity (%)
cholesterol side-chain cleavage enzyme	comp103728_c0_seq2.p1	-0.021	cholesterol side-chain cleavage enzyme, mitochondrial isoform a precursor (NP_000772.2)	29%
3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase	No hit			
	comp101076_c2_seq14.p	-0.308	steroid 17-alpha-hydroxylase /17,20 lyase precursor (NP_000093.1)	35%
steroid 17 $\alpha$ -monooxygenase	comp100558_c1_seq2.p1	2.022	steroid 17-alpha-hydroxylase /17,20 lyase precursor (NP_000093.1)	35%

log2(polyp / strobila) > 1 : ポリプ特異的配列、log2(polyp / strobila) < -1 : ストロビラ特異的配列

Table 12 既知低分子生理活性物質の生合成酵素 (2)

## ○レチノイン酸

query	配列ID	log2(polyp / strobila)	homolog	
			<i>Homo sapiens</i> (accession number)	Identity (%)
(a1)	comp88281_c0_seq1.p1	-3.180	retinol dehydrogenase 12 precursor (NP_689656.2)	43%
(a1)	comp103889_c0_seq5.p1	-2.848	retinol dehydrogenase 14 (NP_065956.1)	49%
(a1)	comp97561_c0_seq1.p1	-2.220	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 13 isoform A precursor (NP_835236.2)	41%
(a1)	comp94617_c0_seq1.p1	-1.802	retinol dehydrogenase 8 (NP_056540.3)	41%
(a1)	comp94413_c0_seq1.p1	-1.611	alcohol dehydrogenase class-3 (NP_000662.3)	72%
(a1)	comp103421_c1_seq3.p1	-1.466	retinol dehydrogenase 12 precursor (NP_689656.2)	43%
(a1)	comp104127_c0_seq1.p1	-1.189	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 isoform 1 (NP_000404.2)	37%
(a1)	comp101974_c0_seq10.p1	-1.170	retinol dehydrogenase 12 precursor (NP_689656.2)	43%
(a1)	comp103421_c0_seq1.p1	-0.835	retinol dehydrogenase 12 precursor (NP_689656.2)	58%
(a1)	comp93510_c0_seq1.p1	-0.724	epidermal retinol dehydrogenase 2 isoform 2 (NP_620419.2)	54%
(a1)	comp94265_c0_seq1.p1	-0.496	dehydrogenase/reductase SDR family member 4 isoform 1 (NP_066284.2)	53%
(a1)	comp99176_c0_seq1.p1	0.042	retinol dehydrogenase 11 isoform 1 precursor (NP_057110.3)	52%
(a1)	comp99357_c0_seq4.p1	0.956	epidermal retinol dehydrogenase 2 isoform 2 (NP_620419.2)	42%
(a1)	comp104127_c0_seq3.p1	2.176	retinol dehydrogenase 8 (NP_056540.3)	39%
(a2)	comp88281_c0_seq1.p1	-3.180	retinol dehydrogenase 12 precursor (NP_689656.2)	43%
(a2)	comp103421_c1_seq3.p1	-1.466	retinol dehydrogenase 12 precursor (NP_689656.2)	43%
(a2)	comp101974_c0_seq10.p1	-1.170	retinol dehydrogenase 12 precursor (NP_689656.2)	43%
(a2)	comp103421_c0_seq1.p1	-0.835	retinol dehydrogenase 12 precursor (NP_689656.2)	58%
(a2)	comp94265_c0_seq1.p1	-0.496	dehydrogenase/reductase SDR family member 4 isoform 1 (NP_066284.2)	53%
(a2)	comp99176_c0_seq1.p1	0.042	retinol dehydrogenase 11 isoform 1 precursor (NP_057110.3)	52%
(b)	comp99197_c0_seq8.p1	-0.384	retinal dehydrogenase 2 isoform 1 (NP_003879.2)	68%
(b)	comp99197_c0_seq7.p1	0.832	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial isoform 1 precursor (NP_000681.2)	68%
(b)	comp103679_c0_seq2.p1	0.871	aldehyde oxidase (NP_001150.3)	40%
(b)	comp101292_c0_seq1.p1	2.116	aldehyde oxidase (NP_001150.3)	43%
(c)	comp83816_c0_seq1.p1	2.373	beta,beta-carotene 15,15'-dioxygenase (NP_059125.2)	35%
(c)	comp83816_c0_seq1.p2	2.373	carotenoid-cleaving dioxygenase, mitochondrial isoform a (NP_114144.5)	48%

log2(polyp / strobila) > 1 : ポリプ特異的配列、log2(polyp / strobila) < -1 : ストロピラ特異的配列

(a1) retinol→retinalを合成

(a2) 9-cis-retinol→9-cis-retinalを合成

(b) retinol→retinoic acid / 9-cis-retinol→9-cis-retinoic acidを合成

(c) β-carotene→retinoic acidを合成