

発生研究のモデル動物としてのミズクラゲの有用性

高村克美*

刺胞動物ミズクラゲは、無性生殖するポリプ世代と有性生殖するクラゲ世代が切り替わる世代交代を行う動物としてよく知られている。ポリプは、温度変化や飢餓などの環境の変化に良く耐え、また条件さえ整えば出芽により半永久的に増え続け、しかも得られポリプ集団は遺伝的に単一なクローンであることから、モデル生物としての系統の作製と維持が容易である。また、無性世代から有性世代への切り替えも、飼育温度の低温下により、容易に起こすことができる。しかし一方で、その切り替えのメカニズムや、有性世代への移行に伴う生殖細胞の起源および性の決定に関してはまだ十分に明らかにされていない。本研究では、発生研究におけるモデル生物としてのミズクラゲを、もう一度見直し、基本的な実験方法の開発と、それに基づいて明らかにしたストロビレーションの誘導条件、その間の形態および内部タンパク質の変化について考察したので報告する。

キーワード：ミズクラゲ、刺胞動物、真正世代交代、ストロビレーション、性決定

はじめに

クラゲは刺胞動物門と有櫛動物門に属する浮遊生物（プランクトン）の1群で、クラゲ型を持たないイソギンチャクやサンゴもこの仲間に入る。刺胞動物のクラゲの主要なものは3つのグループに分かれ、ヒドロクラゲ、鉢クラゲ、立方クラゲと呼ばれる。有櫛動物門のクラゲは体の側面に8列の繊毛列（櫛板）をもちクシクラゲと呼ばれている。このうちミズクラゲは、鉢クラゲの仲間である。鉢クラゲ類は、傘部のゼリー層が良く発達し、他のグループのクラゲに比較して大型のことが多い。そのためミズクラゲやエチゼンクラゲは大量に発生すると、発電所の冷却水の取り込み口を塞いだり、漁網に大量に入って漁業を妨害することがあり、その被害は年間かなりの額にのぼっている。しかし、その発生機構についてはまだ未知の部分が多く、大量発生の予測やその防御に対する十分な対策が行えないのが現状である。また、海水浴シーズンにはハブクラゲやアンドククラゲなど毒を持つクラゲによる刺傷事故が多くなり、ミズクラゲは比較的毒性は低いものの、クラゲ出現による海水浴場のイメージダウンは避けられない。

一方、最近ではミズクラゲだけでなく、アカクラゲ、タコクラゲ、サカサクラゲなどクラゲを常時展示する水族館が増加しており、クラゲが及ぼす癒し効果が見直されてきている²¹⁾。またペットショップでも、その飼育の容易さも手伝って、サカサクラゲやタコクラゲの一種であるカラークラゲが人気にのぼっている。

その他、クラゲの有効利用も始まっており、体から分泌される粘液が、水中の汚れを絡め取り、水中の懸濁物を除去する水質浄化作用をもつことが知られている。また、クラゲから抽出したムチンやコラーゲンが化粧品や医薬品として利用されてもいる²¹⁾。オワンクラゲから得られた GFP (緑色蛍光タンパク質) は、その有効性から基礎生物学や医療分野で幅広く活用されており、その発見者である下村修博士が、2008 年度のノーベル化学賞を受賞したのは記憶の新しいところである¹²⁾⁵⁾⁹⁻¹³⁾¹⁸⁾。さらにクラゲ型がポリプ型に再生する不老不死の研究もベニクラゲで行われている⁹⁾。

ミズクラゲは、無性生殖するポリプ世代と有性生殖するクラゲ世代が、一生の間に切り替わるという特異な生活史を持つことでよく知られている⁴⁾⁷⁾⁸⁾¹⁷⁾¹⁹⁻²⁴⁾。しかし、生殖様式の切り替えや、有性世代に移行するに当たって生殖細胞の起源や性分化に関わるメカニズムの詳細はほとんど明らかにされていない。当研究室ではこのような現象のメカニズムを、マクロな形態的な変化とミクロな分子的变化を関連づけながら明らかにすることを目的として研究している。最終的にはクラゲの大量発生に至る環境要因と遺伝的要因を関連づけ、クラゲの発生を予測あるいは人為的にコントロールするための基本的な研究としたいと考えている。

そのための手立てとして 1) ストロビレーションをおこす必要十分な条件 (飢餓状態、個体密度の増加、生息温度の低下) を検討し直し、必要なときにいつでもストロビレーションをおこすことができる実験環境を確立する。次に 2) 人為的にストロビレーションを起こし、その前後での形態的变化 (外部および内部構造) を詳細に観察し、この過程のステージングを正確に行う。さらに、3) 各ステージのサンプルから、タンパク質や RNA を抽出し解析することにより、各ステージに特異的に発現するタンパク質や遺伝子を同定する。4) このような分子をマーカーとして用い、ストロビレーション開始に必要な環境条件とその発現パターンを明らかにする、などをここ数年卒業研究の学生とともにやってきた。この報告では、これらの予備的ではあるが、非常に興味深い結果を概観し、実験動物としてのミズクラゲの有用性をあらためて検討した。

材料と方法

ミズクラゲの特徴^{3, 4, 7, 8, 14-17, 19-24)}

分類 ミズクラゲは刺胞動物門、鉢虫綱、旗口クラゲ目に属するクラゲで、学名は *Aurelia aurita* (Linné) という。現在では遺伝子解析により *Aurelia aurita* といわれるものは複数存在することが知られているようだが、形態的な区別は難しいらしい。鉢虫綱にはその他に根口クラゲ目に属するエチゼンクラゲなどがある。旗口クラゲ目と根口クラゲ目の違いは、前者では口腕が旗のように翻りその付け根に口が開口するのに対して、後者では口腕の付け根の口が融合して閉じ、口腕の先端に小さな孔が開口して口になっていることである。刺胞動物は以前は有櫛動物であるクシクラゲ類とともに腔腸動物門に分類されていたが、形態や発生の違い、なにより刺胞の有無により明確に区別されている。

生活史 クラゲ型には雌雄の区別があり (有性世代)、成熟すると 4 つの胃腔の周囲に雌は卵巣、雄は精巣を発達させる。卵巣壁で成熟した卵は、そこから遊離し生殖洞に入る。一方、精子は精巣から放精孔を通っ

て海水中に放出され、雌の生殖洞に到達し、そこで卵と受精する。受精卵は胃腔を経由して口腕基部にある保育囊（後述）に付着し、そこでプラヌラまで発生する。ふ化したプラヌラは繊毛で遊泳し、数日で岩などに付着し、口が開き触手が生えポリプとなる。ポリプは動物プランクトンなどを餌としながら成長し、出芽によって個体数を増やしていく。この時期のポリプには雌雄の分化がない（無性世代）。やがて海水温の低下のような環境条件の変化に刺激されて、ポリプの体にくびれが入り横分体（ストロビラ）になる。このくびれは、一つのポリプあたり数個から十数個であり、くびれが深くなるにつれ触手が退化し、くびれの周囲に縁弁が発達し、松かさ状になる。やがて、完全にくびれきれると、松かさの一つ一つが、稚クラゲ（エフィラ）として泳ぎ出す。この過程はストロビレーションといわれている。我々は、外部形態によってこの段階を前期、中期、後期、終期の4つの段階に分けて解析した（後述）。エフィラは、メテフィラを経て、数ヶ月で成熟した成体クラゲへと成長する。このように、ミズクラゲはその生活史の間に有性世代であるクラゲ型と無性世代であるポリプ型が交互に出現する。これを真正世代交代という。

構造 前述したようにミズクラゲはその生活史の中で、ポリプ型とクラゲ型の二形態を取る。ポリプ型は鉢ポリプといわれ、イソギンチャクやヒドラのように、足盤と呼ばれる基部部分で岩などに付着する。体は内外二層からなり、内部には大きな空所（胃腔）が存在し、4つの隔壁で区切られているのが鉢ポリプの特徴である。胃腔の上部は口として開いている。口の周りには刺胞を持った触手が環状に並び、えさを捕食し口に運ぶ。口から丸呑みされた餌は胃腔内で分泌された消化酵素により消化され、胃腔壁の細胞に吸収される。口と触手の間には漏斗と呼ばれる4つのくぼみがあり、クラゲ型になると生殖腺下腔に変化する。

クラゲ型は鉢クラゲといわれ、傘は典型的な皿状で、縁には無数の刺胞を持った触手が生えている。傘の真上から見ると4つの馬蹄形をした生殖腺が見られ、これが目のように見えることから「ヨツメクラゲ」とも呼ばれている。生殖腺の内側の空間は胃腔で、中央で融合し外界に口として開いている。口から飲み込んだ餌は胃腔内壁からのびた無数の胃糸から分泌された消化酵素により分解され、内部に伸びる胃水管系を通して体中に栄養分として運ばれる。口の周りの口唇部は、雄では4つに分かれて長く伸び、口腕と呼ばれている。この口腕の形が旗口クラゲの名の由来となっている。一方、雌の口腕基部にはバラの花びら状の保育囊が広がる（図 1A）。これはよく見ると二重になっており、内側のひだは胃糸によく似た伸縮性の管状突起が伸びている（図 1B）。外側のひだは比較的なめらかで、受精した卵はそこに付着したままプラヌラまで発生する（図 1C）。

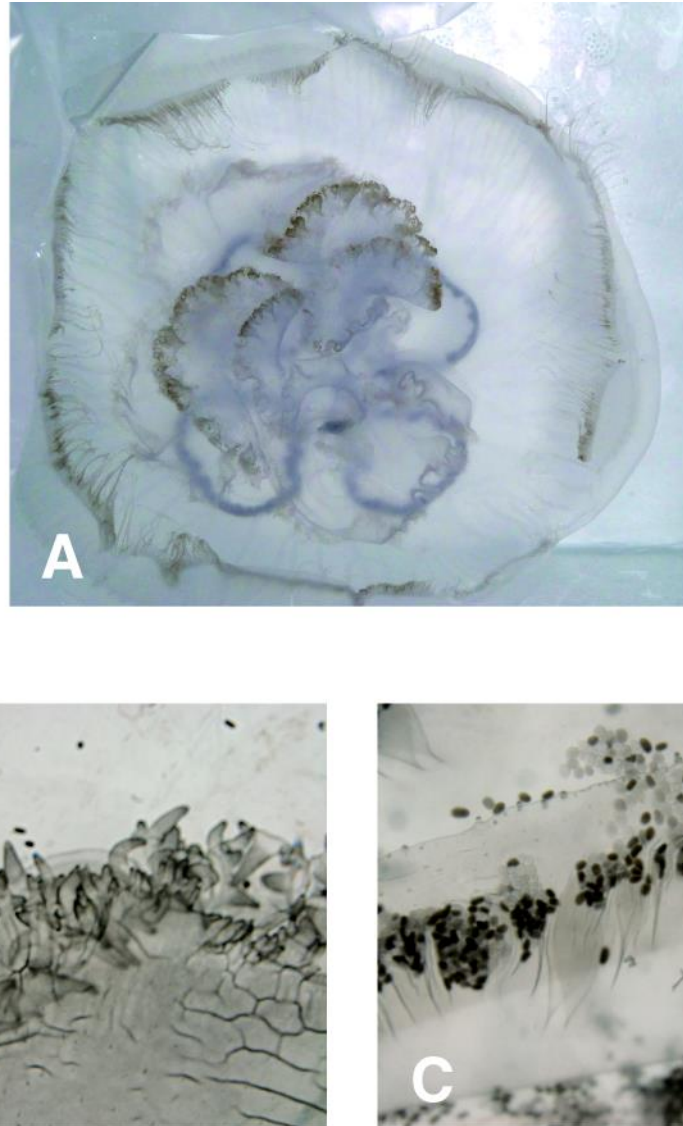


図 1. 雌の保育囊

実験動物としてのミズクラゲ

入手とポリプの飼育 発生実験のモデル生物としてミズクラゲを利用するためには、人為的な飼育環境の元でその成長や繁殖を管理できることが必用である。成体クラゲは、飼育が難しく長期維持するのは困難であるが、ポリプは比較的温度的変化や飢餓に強く、条件さえ整えば無性生殖で半永久的に維持できるので、この状態での飼育環境を整えることから始めた。基本的な飼育方法は、ペットショップのホームページ、一般的な図鑑等の文献に記載されていたので大筋ではそれを参考にした。生きたポリプは京都科学（株）より購入した（現在販売中止中）。届いたポリプは、毛筆あるいはスポイドで、人工海水を充たしたシャーレに移し、附着するまで数日 25℃のインキュベーター内で静置した。餌は卵からふ化させたアルテミア幼生を一日おきに与え、エサの食べ残しやポリプの排出物を取り除くために、給餌の数時間後に海水を新しいものと交換

した。

天然のポリプの取得は以下のような方法で行った。2013年と2014年の6月～7月に向島周辺の海岸で親の雌クラゲを捕獲した。口腕基部の保育嚢に付着しているプラヌラを、ピペットで吸引あるいは飼育容器をゆらすことで遊離させた。このようにして取得したプラヌラは粘液に包まれており塊状になっているので、十分にピペッティングしたあと、ナイロンメッシュでろ過することにより、粘液を取り除いた。集めたプラヌラは、新しい海水を入れたシャーレあるいは角形のプラ容器に移し、付着しポリプに変態するまで 20℃で保温した。最初の年には市販のポリプの飼育と同様に人工海水を用いていたが、数週間してもプラヌラが付着せず、付着しても生育が非常に良くなかった。用いる海水を親クラゲを捕獲した場所のものに置き換えたところ、生育が改善されたため、2年目には天然海水を用いてうまくいっている。個体差があるが、付着したプラヌラは細胞の塊状になり、数日で口が開口し、触手の原基が見えてきた。

人為的なストロビレーションの誘導 ポリプからストロビラへの変化は、生育環境の悪化すなわち個体密度の増加、餌の不足、海水温度の低下などが原因であるといわれている。まず手始めに我々は、給餌の有無および飼育水温の低温化の影響について調べてみた。ポリプの入ったシャーレを2系列に分け、飼育温度を25℃から15℃に切り替えるとともに、一方には餌を与え、一方には与えなかった。その結果、どちらの場合も2週間前後でストロビラがあらわれ、さらに8日ほどでエフィラが遊離した。かえって、餌を与えていた方が、1シャーレあたりのストロビラになるポリプの数やエフィラの出現数が多いという結果になった(2008年度卒業研究、図2)。

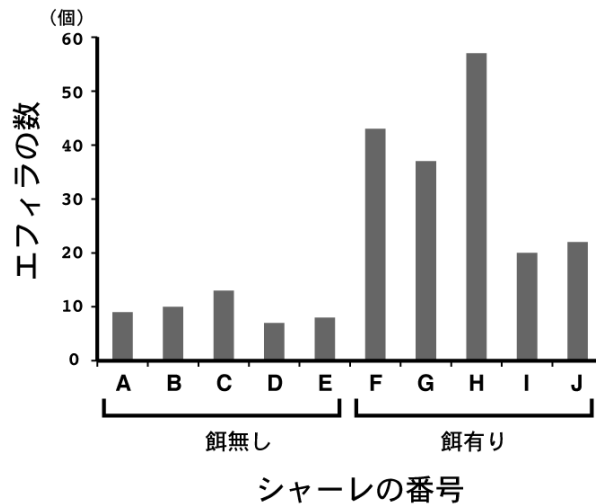


図2. 生じたエフィラの個体数と給餌の有無の関係

このことは、1ポリプあたりのエフィラ出現数は、大きなポリプほど多いといわれているが、餌を与えていたものは与えていないものに比べて低温処理中も成長が続いていたためではないかと考えられる。現在ストロビレーションの誘導では飼育の利便を考慮して、低温処理開始までに餌を十分に与え成長したポリプを用い、飼育温度を20℃から15℃に切り替えるとともに給餌は停止している。図3は低温処理開始後のストロ

ビラの出現率を示しており、3回の実験のうち1回目がポリプ 35 個体、二回目が 21 個体、3 回目が 112 個体を用いて調べた結果である。早いものでは 11 日目、遅いものでは 18 日目にストロビラになったが、ほとんどの個体は低温処理後約 2 週間前後でストロビレーションを開始している。ちなみに、20 °C で飼育を続けたものは決してストロビレーションをおこさなかった（2010 年度卒業研究）。

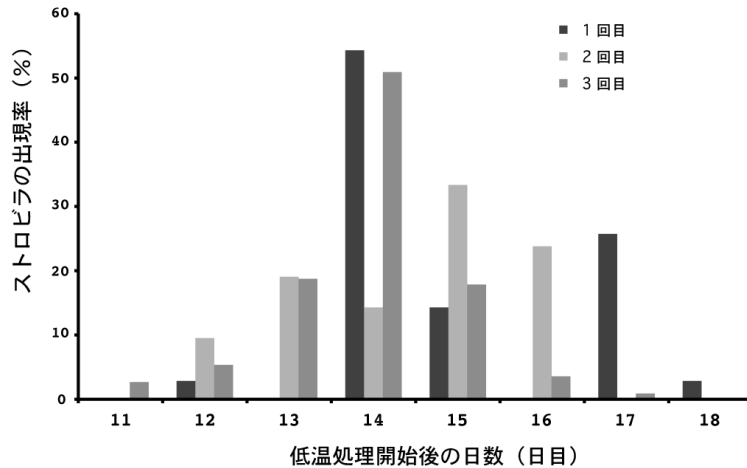


図 3. 低温処理開始後のストロビラの出現率

しかし、その後に行った低温処理実験では、早いものでは 1 週間前後、遅いもので 3 週間近く日数を要したももある。この違いが用いたポリプの遺伝的な違いなのか、個体差なのかは今後の検討課題である。

エフィラから成体クラゲまでの飼育 発生したエフィラは小型の金魚鉢に移し、エアポンプによるエアレーションで海水を循環させ、エフィラが常時浮遊している状態を維持した。餌はできるだけふ化したてのアルテミア幼生をポリプと同様の手順で与えた。ポリプから遊離したてのエフィラは、縁弁が長く発達し、中央には十字形の口柄がみえる。やがて傘のゼリー部分が発達し、色も透明になっていく。数週間でメテフィラになるが、ここから先の成長は個体差が多く、飼育日数に基づいたステージングは困難になってくる。昨年までは、なぜかこの段階まで成長すると突然死んでしまい、これ以後の成長過程が観察できなかった。（現在では、飼育方法を改善することにより、傘径 7cm ほどの幼クラゲまで飼育できるようになっている（図 4）。）

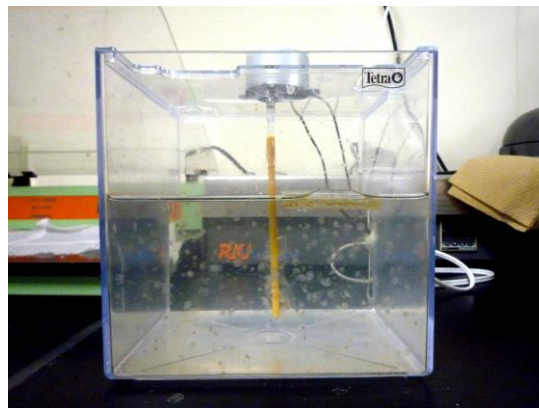


図 4. エフィラ、メテフィラの飼育水槽

形態学的観察 当研究室では、おもに無性生殖から有性生殖への転換およびそれに伴う性決定のタイミングの解明をテーマとしてきた。そのための研究方法として、ストロビレーションから、エフィラの遊離、クラゲ型の成長にいたる過程を、形態レベル、タンパク質レベル、遺伝子レベルで解析する必要がある。まず、形態学的な観察方法には、実体顕微鏡で外部形態の変化を観察するとともに、組織切片染色法による内部形態の観察も合わせて行ってきた。固定は、一般的な 10%ホルマリン/海水を用い、4℃あるいは室温で一晩固定した。このとき、ポリプおよびエフィラは、直接固定液を加えるとその刺激で、収縮あるいは丸まってしまうので、海水に飽和させたメントールをピペットで数滴ずつ加え、つついても動かないのを確認してから固定液に移した。脱水はポリプおよびエフィラでは、60、80、90 および 100%のエタノール系列を用いたが、メテフィラ以降では、ゼリー層の発達とともに水分含量が増加し、脱水による収縮が危惧されたので、25、50、75 および 80%エタノールまで徐々に脱水し、この段階で 4℃で一時的に保存した。包埋にはパラプラスチック（シグマ）又は JB-4 樹脂（フナコシ）を用い、前者ではキシレンを介してからパラプラスチックに浸透し、包埋した。包埋した試料は、マイクロトームを用いてパラプラスチック包埋では 8~10μm、樹脂包埋では 4μm の厚さで薄切した。スライドガラスへの貼り付けには、APS コート済みのスライドガラス（マツナミ）を用いた。その後、ヘマトキシリン・エオジン染色を定法通り行い、脱水後パーマウントで封入した。幼クラゲと成体クラゲでは、各個体の生殖腺を 4 つに切り分け、一部組織染色用に固定し、残りはタンパク質および核酸抽出のために -80℃保存した。

電気泳動 内部タンパク質の変動を解析するためにポリプ、ストロビラ、エフィラの電気泳動の条件を検討した。電気泳動の試薬および器具は、インビトロジェン社の NuPAGE Novex プレキャストゲルシステムを用いた。このシステムの利点はあらかじめ用意された種々のゲルと泳動バッファーを組み合わせることにより、低分子から高分子までいろいろな分画範囲でタンパク質を分析することが可能であることである。今回、主に用いた組み合わせは Tris-Acetate Gel と同 SDS 泳動バッファー（高分子の分画）、Bis-Tris Gel と MOPS SDS 泳動バッファー（中分子用）または MES SDS 泳動バッファー（低分子用）である。サンプルの調整は LDS と還元剤の入ったサンプルバッファーを用いて、変性還元状態で行った。染色は検出感度の高い銀染色法（SilverXpress Silver Staining Kit、インビトロジェン社）を用いた。

まず試料調整の条件設定としてタンパク質の抽出条件や分画法を種々試してみた。ポリプとストロビラの可溶性画分と不溶性画分（2009 年度卒業研究）、Qproteome Cell Compartment Kit（QIAGEN 社）による細胞内局在による分画および Qproteome Nuclear Protein Kit（QIAGEN 社）による核タンパク質分画（2010 年度、2011 年度卒業研究）、AllPrep DNA/RNA/Protein Kit（QIAGEN 社）による核酸とタンパク質の同時抽出（2011 年度卒業研究）、硫安沈殿分画法（2013 年度卒業研究）など一連の方法を試みた（後述）。また 2012 年度以降では、ポリプあるいはエフィラ一個体からタンパク質を抽出する方法を確立し、2013 年度からは市販ポリプから天然ポリプの使用に切り替えて実験を行っている。

遺伝的実験および遺伝子解析 ポリプ世代は無性的に出芽によって増えたクローン集団を容易に得ることができるので、遺伝的に同一のバックグラウンドでの実験が可能である。現在、2013 年に捕獲した雌 1 個体から増やした系統と、2014 年度に捕獲した雌 2 個体から増やした系統とあわせた 3 系統の維持飼育を行って

いる。このようなクローンシステムを使用することにより、遺伝的にばらつきの少ない実験結果が得られるとともに、系統間を比較することにより、系統の違いによる結果の違いを考察することが可能となると思われる。さらに、生殖細胞系列を同定するために、その指標となる遺伝子（例えば *vasa* など）をミズクラゲから単離し、その発現パターンを発生過程を通じて追跡していきたいと考えている。

結果と考察

ミズクラゲを用いた発生研究の概要

ストロビレーションの誘導条件の検討 前述したように、多くの場合、低温処理開始後2週間程度でストロビレーションが開始されることがわかったが、ストロビレーションの開始に必要な低温処理の最小日数を調べるために、以下のような実験を行った。まず、ポリプをいっせいに低温処理を開始し、その後ストロビレーションが起こるまで、毎日数個体ずつ 20 °C のインキュベーターに移した。このように低温処理を解除したのも、ストロビレーションを起こすかどうかを観察した。この実験も2回行った(2010年度卒業研究、表1)。

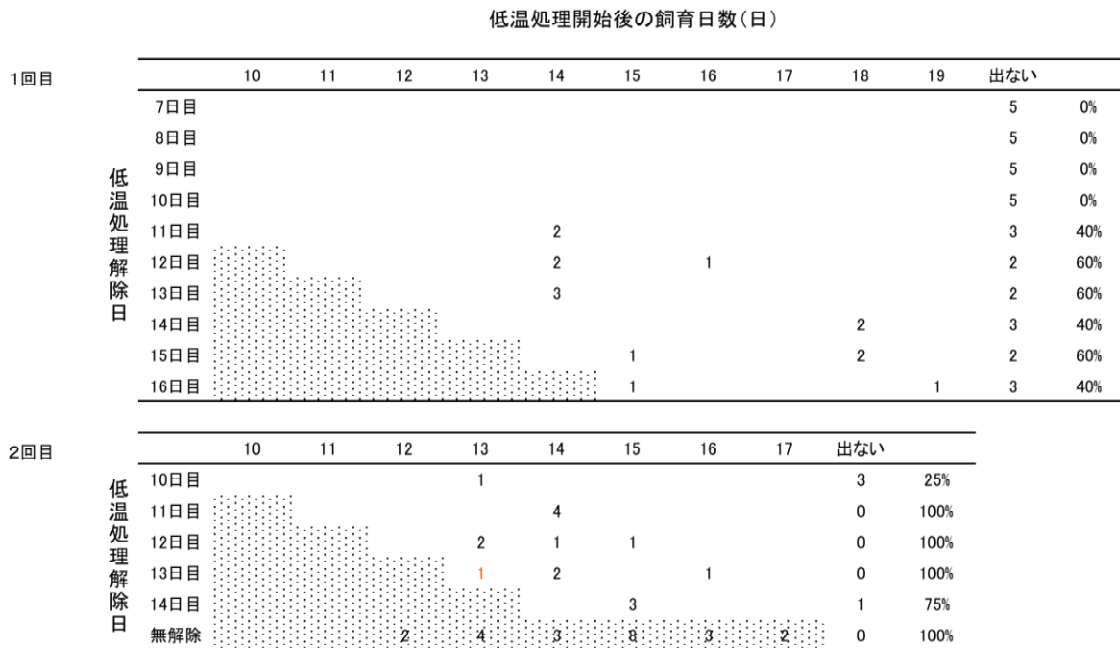


表1. ストロビレーション開始に必要な最小低温処理日数

低温処理後9日までに20 °Cに移すとストロビレーションは起こらなかったが、10日以降に解除するとストロビレーションをおこす個体が現れ、11日以降では20 °Cに移しても、高確率でストロビレーションが起こった。このことはストロビレーションが、まだ形態的に判別できない数日前(低温処理開始10日前後)に、すでにそのスイッチが入っていることを示している。

発生研究のモデル動物としてのミズクラゲの有用性

次にストロビレーション開始後の過程が、飼育温度に影響されるのかどうかを調べた。ポリプの低温処理（15℃）を開始し、ストロビレーションをおこした個体から順次 20、15 および 10℃ の各インキュベーターに移してその後の変化を観察した。図 5A はストロビレーション開始後の飼育温度とエフィラが遊離するまでの期間との関係を表したものである。エフィラが出現するまでの期間は飼育温度が高いほど短く、20℃では 4-5 日、15℃では 10 日前後、10℃では 20 日前後であった。これらのことからストロビレーションの開始には低温処理が必要であるが、それ以後の過程はむしろ温度が高いほど早く進むことがわかった。

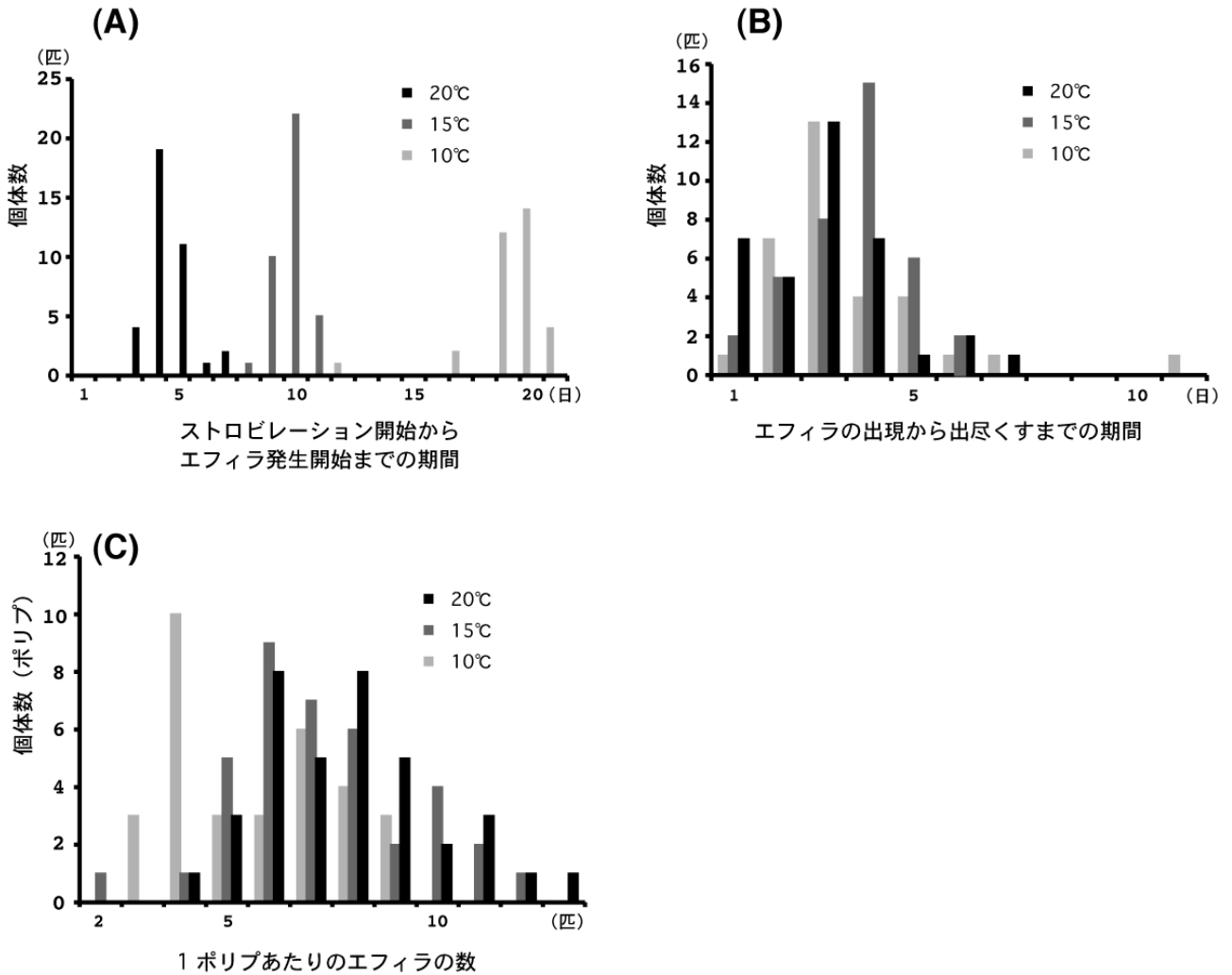


図 5. ストロビレーションの過程に及ぼす飼育温度の影響

図 5B は飼育温度とエフィラの遊離開始から出尽くすまでの期間との関係を表したものであり、多くの個体で飼育温度とは無関係に 3-5 日の間にエフィラが出尽くすことがわかった。エフィラが出尽くすまでに 10 日前後かかる個体もいたが、このような個体ではエフィラの最後の一匹が中々遊離しないことが多く、特に飼育温度と関係はないと思われる。

図 5C は飼育温度と 1 ポリプあたりのエフィラの出現数との関係を表したもので、10℃ではいくぶんエフィラの出現数が少ないように見えるが、15 と 20℃ではそれほど違いがないと思われる。

このように、ストロビレーションの開始、ストロビラの期間、エフィラの遊離期間、1ポリプあたりのエフィラの数の調節は、異なるメカニズムで調節されている可能性が示唆された（2010年度卒業研究）。

ストロビレーションのステージング ミズクラゲのストロビレーションを詳細に解析するには、その過程を正確にステージングする必要がある。そこでまず、ポリプからエフィラの放出までの過程で、外部形態にどのような変化があるのかを観察した。

図 6A はまだ低温処理を始めていないポリプで、体部はずんぐりとしており、上部からは十数本の触手が伸び、餌を盛んに取り込む姿が観察される。15℃の低温処理を始めると約2週間で、胴部の上方からくびれが生じ始める。しかしそれ以外は、体の色や触手の長さなど処理前のポリプとほとんど変わらない。もしこの時期に餌を与えると、触手を使って餌を捕らえることができる。この時期を初期ストロビラ期と名付けた（図 6B）。

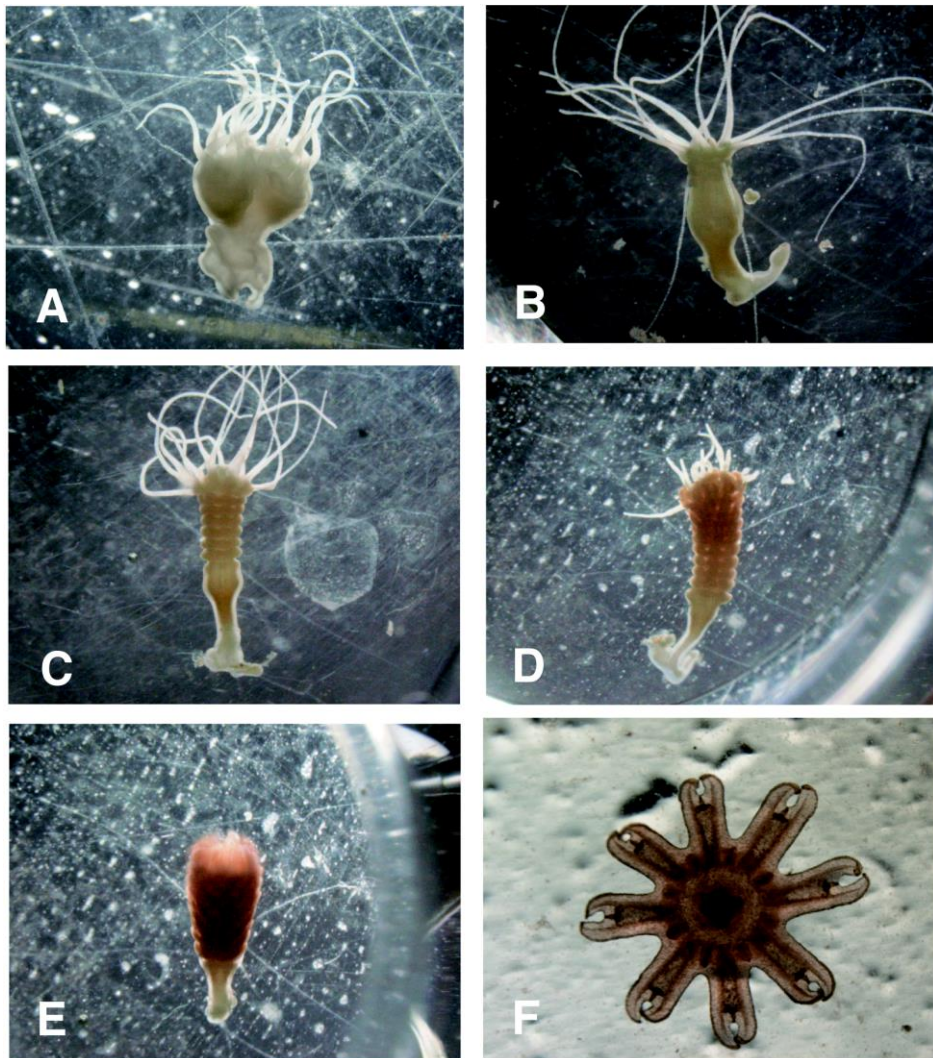


図 6。ストロビレーションにおける外部形態の変化

- (A) ポリプ (B) 前期ストロビラ (C) 中期ストロビラ
(D) 後期ストロビラ (E) 終期ストロビラ (F) エフィラ

発生研究のモデル動物としてのミズクラゲの有用性

ストロビレーションが進むにつれ、さらにくびれが増え、体の色も黒っぽく変色してくる。しかしまだ触手は長く、形態的にはポリプ時とそれほど差がない。この時期も餌をとることができる。我々はこの時期を中期ストロビラ期と名付けた (図 6C)。

さらに、ストロビレーションが経過すると、体はますます黒っぽくなり、触手が退化してくる。また触手の基部にはエフィラの縁弁の原基が現れてくる。この時期を後期ストロビラと名付けた (図 6D)。

最終的に触手は完全に退化し、一つ一つのくびれがエフィラの形態を示し、松の実あるいはミノ状に見える。各くびれの上端部には縁弁がはっきりと観察されるようになり、時々収縮運動を繰り返す。この時期を終期ストロビラと名付けた (図 6E)。終期ストロビラからは間もなくエフィラが放出され、すべてのエフィラを放出したストロビラは基部だけが残り、再びポリプの生活へと戻る。エフィラは 8 枚の縁弁を持ち、収縮運動を繰り返しながら泳いだり、餌をとることができるようになる (図 6F)。

図 7 は各段階の内部形態を切片染色により観察したものである。図 7A は初期ストロビラで、切片で見ても、胴部上方からいくつかのくびれが生じていることがわかる。中期ストロビラになるとくびれの段数も増え、くびれの深みはさらに増していくのが観察される (図 7B)。図 7C は後期ストロビラで、上から順にくびれが深くなっていることから、ストロビレーションが上から進行していることが確認できる。終期ストロビラになるとくびれの一つ一つがほぼ分離しているのが観察されるが、最下方の部分はくびれができておらず、この部分は最後のエフィラが遊離した後も固着したままで、再び触手が生えてポリプに戻る部分であるが、この写真からは他のエフィラになる部分との違いは分からない。

このようにストロビレーションの過程は外部形態だけでなく内部形態においても劇的な変化が起きていることがわかる。

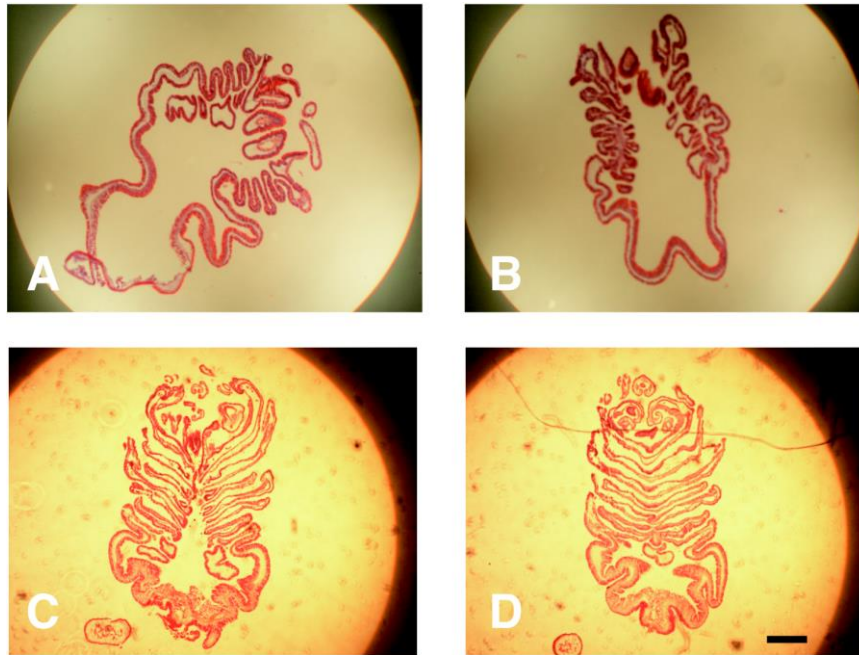


図 7. ストロビレーションにおける内部形態の変化 (スケールバーは 100 μ m)
(A) 前期ストロビラ (B) 中期ストロビラ (C) 後期ストロビラ (D) 終期ストロビラ

ストロビレーションにおける内部タンパク質の変化 前述したように、ストロビレーションの各段階毎にストロビラを採取し、タンパク質を抽出後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってバンドパターンの変化を解析した（2009年度～2013年度卒業研究）。

図8は（A）がPBSで抽出した可溶性画分、（B）が不溶性画分のタンパク質バンドパターンである。コントロールとしてレーン1には餌となるアルテミアの、レーン8にはエフィラ遊離後に残ったストロビラの基部分のタンパク質を流している。この結果、予想外にも、どちらの画分でも形態的な区別が可能なポリプと前期ストロビラの間には著しいバンドパターンの変化は観察されず、すでにストロビレーションが進んでいる中期と後期の間に大きな違いが観察された。つまり今回の方法では、ストロビレーション開始後に必用とされるタンパク質は同定できても、ストロビレーションの開始に必用なタンパク質は同定できないということである。この原因として、このようなタンパク質は、比較的マイナーであり、他のメジャーなタンパク質に邪魔されて検出できない可能性がある。そこで、細胞内局在場所によって分画する Qproteome Cell Compartment Kit (QIAGEN 社) を用いて、内部タンパク質を細胞基質画分（A）、膜タンパク質画分（B）、核タンパク質画分（C）、細胞骨格画分（D）に分け、電気泳動によって解析した（図9）。

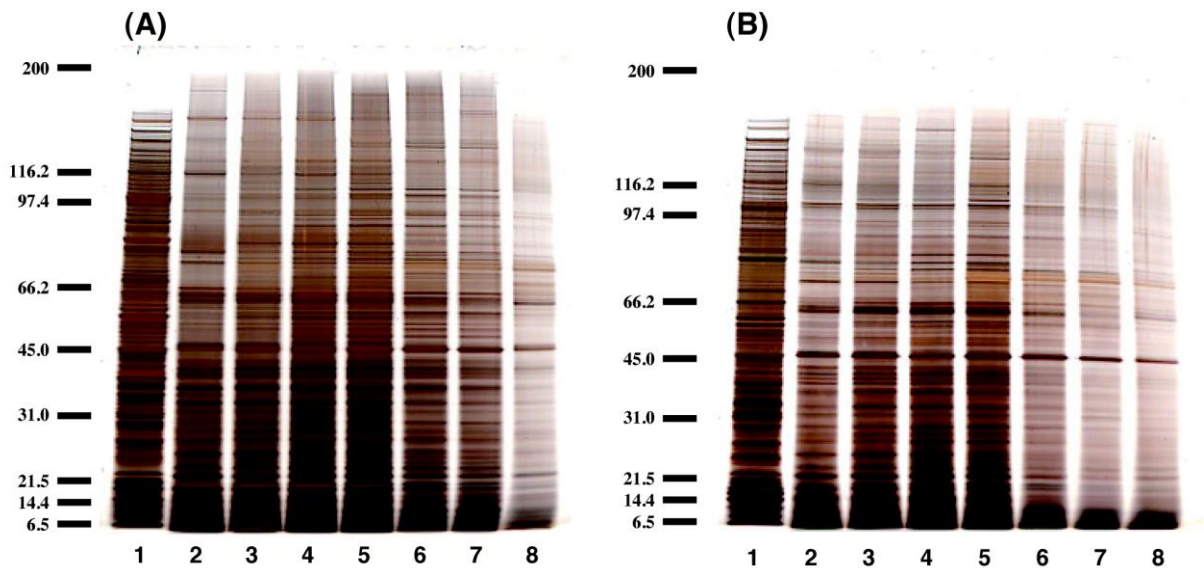


図8. ストロビレーションに伴う内部タンパク質の変化

(Nu-PAGE 4-12% Bis-Tris Gel, MOPS Buffer)

(A) 可溶性画分 (B) 不溶性画分

1. アルテミア 2. ポリプ 3. 前期ストロビラ 4. 中期ストロビラ
5. 後期ストロビラ 6. 終期ストロビラ 7. エフィラ 8. ストロビラ基部

その結果、特に核タンパク質画分で、67kDa 付近にポリプにはないが前期ストロビラから存在するバンド

発生研究のモデル動物としてのミズクラゲの有用性

が少なくとも検出された。前述したストロビレーション誘導の条件検討において、ストロビレーションが開始される数日前に低温処理を解除しても、ストロビレーションが起こるので、この時期にはすでにストロビレーション開始のスイッチが入っていることが示唆されたが、このタンパク質が低温処理後のいつの段階で現れてくるのかを詳細に調べる必要がある。

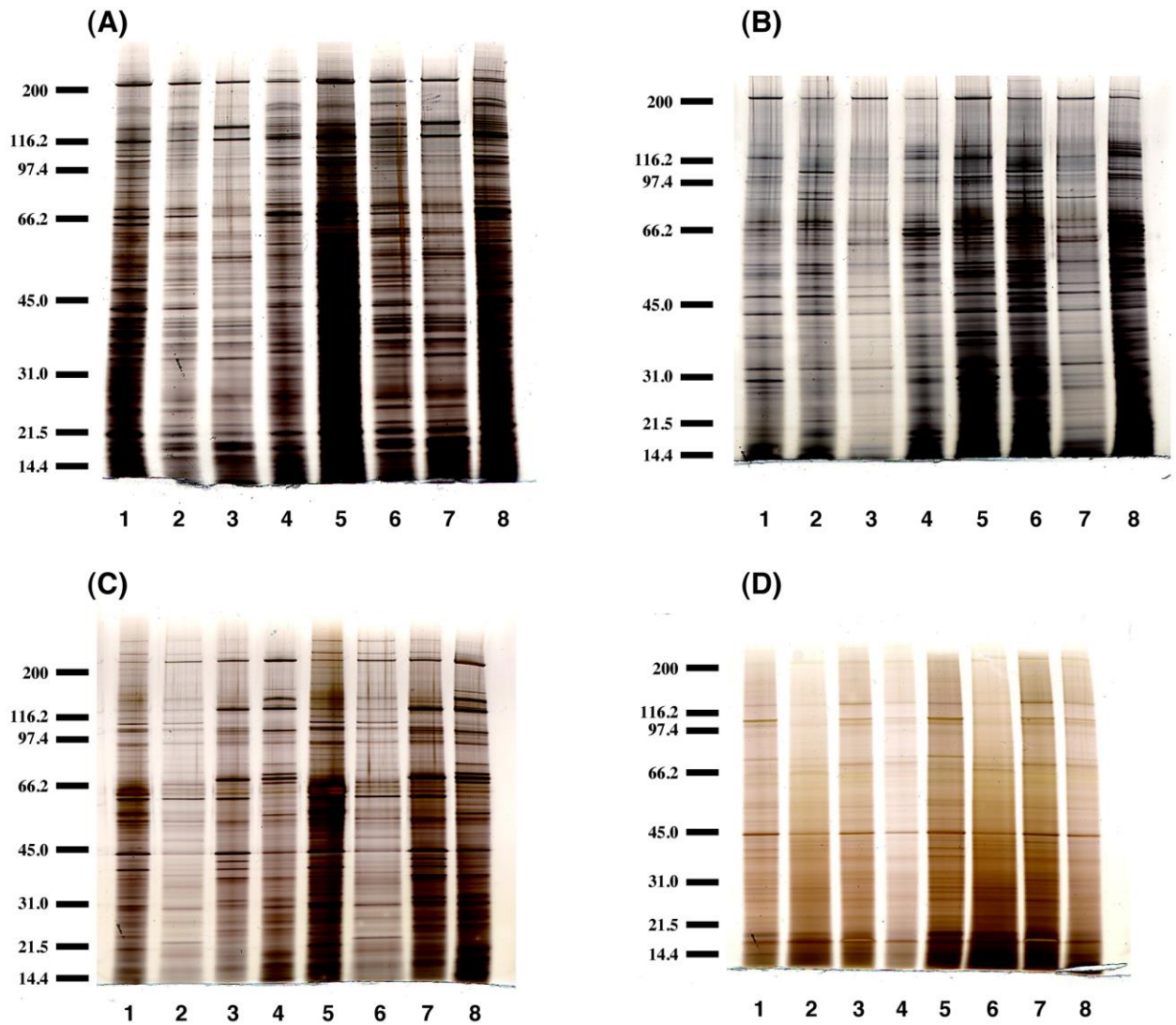


図9. ストロビレーションに伴う内部タンパク質の変化

(Nu-PAGE 4-12% Bis-Tris Gel, MOPS Buffer)

(A) 細胞基質画分 (B) 膜タンパク質画分 (C) 核タンパク質画分 (D) 細胞骨格画分

1. アルテミア 2. ポリプ 3. 前期ストロビラ 4. 中期ストロビラ

5. 後期ストロビラ 6. 終期ストロビラ 7. エフィラ 8. ストロビラ基部

高村克美

また、最終的にはこのようなタンパク質の実体を調べるためには、対象タンパク質を分析可能な量まで抽出・精製する必要があるが、ポリプおよびストロビラは非常に小さいので、必要なサンプル量を得ることはかなり困難である。そのため将来的には、他の方法、例えば遺伝子レベルでの発現パターンの変動を解析し、その遺伝子を単離・増幅・同定するような方法を用いる必要があると思われる。

おわりに

ミズクラゲは、世代交代というユニークな生活史をとるため、有性生殖、無性生殖およびその転換、有性生殖に伴う生殖細胞の起源と性分化など、発生学においてキーとなる現象が、研究できるモデル生物となる可能性がある。ここ数年、我々の研究室では、ミズクラゲを発生研究のモデル生物として使用するための、様々な条件設定を検討してきた。その結果、ポリプ世代の飼育や人為的な有性世代への導入の容易さ、一般的な研究方法が適用できること、クローン系統を良いに作製できることなどのミズクラゲ独自の有利な点があることが確かめられた。今後の課題としては、タンパク質抽出・精製のために発生段階のそろったサンプルを以下に集めたらよいか、また cDNA ライブラリーの作製やゲノム解析などの遺伝子レベルでの研究法の確立、また難しいクラゲ世代の飼育法の確立などが、挙げられる。現在、エフィラ、メティフィラを経て、7cm ほどの幼クラゲまで飼育することが可能になっているので、今後はクラゲ世代における性成熟や性決定のメカニズムを研究していきたいと考えている。

謝 辞

ミズクラゲの採集において、広島大学理学部附属向島臨海実験所のスタッフの皆様にも、大変お世話になりました。特に技術職員の山口信雄氏には、ポリプや幼クラゲの飼育法を伝授していただき、大変助かりました。この場をお借りしてお礼申し上げます。

文 献

- 1) 池田圭一、武位教子. 光る生き物 ~ここまで進んだバイオイメージング技術~ (知りたい!サイエンス)、技術評論社 (2009).
- 2) 今井一洋 (著)、近江谷克裕. バイオ・ケミルミネセンスハンドブック、丸善 (2006).
- 3) 岩槻邦男、馬渡峻輔、白山義久. 無脊椎動物の多様性と系統(節足動物を除く)(バイオダイバーシティ・シリーズ)、裳華房 (2000).
- 4) 岩間靖典. クラゲ—その魅力と飼い方、誠文堂新光社 (2001).
- 5) 近江谷克裕. 発光生物のふしぎ 光るしくみの解明から生命科学最前線まで (サイエンス・アイ新書)、ソフトバンククリエイティブ (2009).
- 6) 久保田 信. 神秘のベニクラゲと海洋生物の歌—“不老不死の夢”を歌う、不老不死研究会 (2005).
- 7) 坂田 明. クラゲの正体、晶文社 (1994).
- 8) jfish. クラゲのふしぎ (知りたい★サイエンス)、技術評論社 (2006).

発生研究のモデル動物としてのミズクラゲの有用性

- 9) 下村 脩. クラゲの光に魅せられて ノーベル化学賞の原点 (朝日選書)、朝日新聞出版 (2009).
- 10) 下村 脩. クラゲに学ぶ—ノーベル賞への道、長崎文献社 (2010).
- 11) 下村 脩. 光る生物の話 (朝日選書)、朝日新聞出版 (2014).
- 12) Zimmer, M. 光る遺伝子 オワンクラゲと緑色蛍光タンパク質 GFP、丸善 (2009).
- 13) 生化学若い研究者の会. 光るクラゲがノーベル賞をとった理由—蛍光タンパク質 GFP の発見物語、日本評論社 (2009).
- 14) 団 勝磨. 無脊椎動物の発生 (上)、培風館 (1983).
- 15) 並河 洋、楚山 勇. クラゲガイドブック、阪急コミュニケーションズ (2000).
- 16) 並河 洋. クラゲ大図鑑、PHP 研究所 (2010).
- 17) 林 勇夫. 水産無脊椎動物学、恒星社厚生閣 (2006).
- 18) ピエリボン, V., グルーバー, D. F. 光るクラゲ 蛍光タンパク質開発物語、青土社 (2010).
- 19) 平山ヒロフミ. くらげる クラゲ LOVE111、山と溪谷社 (2013).
- 20) 三宅裕志, Dhugal, J., Lindsay, D. J. (2013). 最新 クラゲ図鑑: 110 種のクラゲの不思議な生態、誠文堂新光社.
- 21) 三宅裕志. クラゲの秘密: 海に漂う不思議な生き物の正体 (子供の科学★サイエンスブックス)、誠文堂新光社 (2014).
- 22) 村上龍男、下村 脩. クラゲ 世にも美しい浮遊生活 (PHP 新書)、PHP 研究所 (2014).
- 23) 安田 徹. 海の UFO クラゲ—発生・生態・対策、恒星社厚生閣 (2003).
- 24) 安田 徹. エチゼンクラゲとミズクラゲ—その正体と対策 (ベルソーブックス)、成山堂書店 (2007).

この報告のもとになった卒業論文一覧

○2008 年度

井上貴裕 ミズクラゲのストロビラ形成条件の検討

○2009 年度

金子泰司 ヒドラの増殖と性分化に及ぼす温度と餌の影響
坂井正義 ミズクラゲのストロビレーションにおける形態的変化の観察
澤村勇人 ミズクラゲの世代交代に及ぼす温度の影響
原 和哉 ミズクラゲの世代交代に及ぼす温度の影響

○2010 年度

加藤皓治 ミズクラゲのストロビレーションに及ぼす飼育温度の影響
蓮池裕之 ミズクラゲのストロビレーションに及ぼす飼育温度の影響
藤原勇輝 ミズクラゲのストロビレーションに及ぼす飼育温度の影響
若杉麻子 ミズクラゲのストロビレーションに及ぼす飼育温度の影響

高村克美

○2011 年度

- 楠島翔太 ミズクラゲのストロビレーションにおける内部タンパク質の変化
～細胞内局在に基づく分画～
- 坂田憲太郎 ミズクラゲのストロビレーションにおける内部タンパク質の変化
～RNA とタンパク質の同時抽出～
- 宮本歩実 ミズクラゲのストロビレーションにおける内部形態の変化
- 山口友理 ミズクラゲのストロビレーションにおける内部タンパク質の変化
～可溶性タンパク質と不溶性タンパク質～

○2012 年度

- 仰 翔大 ミズクラゲのストロビレーションに伴う核タンパク質の変化
- 池本健人 ミズクラゲのエフィラ飼育とその成長に伴う形態変化
- 古城慎弥 ミズクラゲのエフィラ飼育とその成長に伴う内部タンパク質の変化
- 馬場大地 ミズクラゲのストロビレーションに伴う核タンパク質の変化

○2013 年度

- 岡本 翔 ミズクラゲのメテフィラ飼育とその成長に伴う内部タンパク質の変化の研究
- 新良貴直耶 ミズクラゲのストロビレーションに伴う内部タンパク質の変化の研究
- 関戸悠貴 ミズクラゲのメテフィラ飼育とその成長に伴う内部タンパク質の変化の研究
- 中西翔平 ミズクラゲのストロビレーションに伴う内部タンパク質の変化の研究
- 松本和樹 ミズクラゲ成体における雌雄特異的タンパク質の同定

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (13), 37-53 (2014)

Utilities of jelly fish *Aurelia aurita* as a model animal for studies of developmental biology

Katsumi Takamura

Department of Marine Biology, Faculty of Life Science and Biotechnology,
Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

Jelly Fish *Aurelia aurita* belongs to the phylum Cnidaria and is well known as the animal that alternates between sexual and asexual generation in its life cycle (metagenesis). Polyps are strong for starvation and change of temperature. If their breeding condition is best, they continue to proliferate semi-permanently by budding and the progeny produced by it have the same genotype, that is “clone”. For this reason, it is easy to make and maintain many strains that are pure genetically, as model animal. In addition, changing from asexual to sexual generation (strobilation) is induced easily by shifting breeding temperature from 20 °C to 15 °C artificially. However, its changing mechanism, the origin of germ cell and the determination of sex during sexual generation are still unclear. In this paper, we re-estimate the utilities of jelly fish *Aurelia aurita* as model animal for studies of developmental biology, and report about the establishment of fundamental experimental procedures with this jelly fish, the examination of detailed condition of strobilation inducing, the observation of morphogenetic changes and the investigation of changes of inner proteins during strobilation.

Key words: *Aurelia aurita*, Cnidaria, metagenesis, strobilation, sex determination