



2022年10月7日

報道機関 各位

東北大学学際科学フロンティア研究所  
東北大学大学院生命科学研究科

### クラゲ類の受精卵における初の遺伝子ノックダウン法 ～非モデル動物の遺伝子機能を解析する新規研究プラットフォーム～

#### 【発表のポイント】

- クラゲ類<sup>\*1</sup>の受精卵において RNAi 法<sup>\*2</sup>による遺伝子発現の抑制（ノックダウン<sup>\*3</sup>）に成功しました。
- 標的遺伝子の siRNA<sup>\*4</sup>をエレクトロポレーション<sup>\*5</sup>する手法は、クラゲ類を含む他の海産無脊椎動物にも適用可能です。
- マイクロインジェクション<sup>\*6</sup>が困難なエダアシクラゲの受精卵において、初めて遺伝子操作を実現しました。

#### 【概要】

海中を漂うプランクトンであるクラゲ類は、イソギンチャクやサンゴと同じ刺胞動物門に属し、動物の発生や行動の進化を理解する上で重要な研究対象です。これまでの刺胞動物を用いた細胞や分子レベルの研究では、一部のポリプ<sup>\*7</sup>型の動物を中心に展開されてきたこともあり、メデューサ<sup>\*8</sup>のステージをもつクラゲ類に特徴的な生命現象の分子レベルの理解はあまり進んでいませんでした。その理由として、マイクロインジェクションによる胚操作が困難であったことが挙げられます。

東北大学学際科学フロンティア研究所の中嶋悠一郎博士（研究当時・助教、現・東京大学大学院薬学系研究科・講師）は、小澤（増田）ときは博士（研究当時・学術研究員、現・生命科学研究科）、生命科学研究科大学院生の富士田壮佑氏、倉永英里奈教授らとともに、クラゲ類の初期胚の遺伝子を効率よく、かつシステムティックに発現抑制（ノックダウン）する手法を確立しました。

研究グループは、複数種のヒドロ虫綱<sup>\*9</sup>クラゲの受精卵を使って、RNAi法による遺伝子発現の抑制（ノックダウン）に成功しました。本研究で確立した手法は、クラゲ類だけでなく他の海産無脊椎動物にも適用可能な手法であり、初期胚の遺伝子機能を解析する上で大変有用と考えられます。

本研究成果は、国際科学誌『*Scientific Reports*』に2022年9月30日に掲載されました。

## 【詳細な説明】

海中を漂うクラゲの姿を見て、その浮遊する姿に心を奪われた人も多いのではないのでしょうか。おそらく誰もが見て聞いて少しは知っているクラゲですが、卵からの体づくりをはじめとした生物学的な特徴や性質は、現代の生命科学の共通言語である分子レベルでは、驚くほど理解が進んでいないのが現状です。そこで本研究では、遺伝子発現を抑制するノックダウン法を導入することで、クラゲにおける遺伝子操作の実現を目指しました。

イソギンチャクやサンゴ、クラゲ類は刺胞動物門に属し、約6億年前に左右相称動物(ヒトを含む脊椎動物や昆虫などの節足動物)との共通祖先から枝分かれして(図1)、様々な環境に適応して進化してきました。

刺胞動物の中でも、特にクラゲ類の多くは、一生の中で受精卵からプラヌラ幼生、固着性のポリプ、遊泳能力のあるメデューサといった複数のステージをとります(図2)。刺胞動物は、筋肉や神経をもつ原始的な動物として知られ、二胚葉性のシンプルな体や放射対称性、そして高い再生能力を特徴とします。刺胞動物は系統発生的な位置から、後生動物の発生や再生、行動の進化を理解する上で有用な研究材料として近年盛んに用いられています。また、明確な寿命を示さないポリプや若返りを示すクラゲなど、生物学的に興味深い特徴を多く備えています。

これまで刺胞動物を使った研究は、ネマトステラ(*Nematostella vectensis*)、ヒドドラ(*Hydra*)やハイドラクティニア(*Hydractinia*)といった固着性のポリプを用いて展開されてきました。これらのポリプ型動物は、ゲノム解読が完了し、ゲノム編集やトランスジェニック、ノックダウンといった遺伝子操作が導入され、モデル化された刺胞動物といえます。一方、遊泳するメデューサのステージをもつクラゲは、古くから高い再生能力やユニークな生態などが注目されてきたものの、飼育や系統維持の難しさなどから、クラゲ個体を用いた細胞や分子レベルの研究はあまり進んでいません。唯一の例外が、フランスの研究グループを中心に使われているヒドロ虫綱のクリティア(*Clytia hemisphaerica*, 図3)で、近年はゲノム解読が完了し、遺伝子操作が確立されています。世界中に数千種類いると考えられるクラゲの多様性を考えると、様々なクラゲで遺伝子操作を導入することができれば、分子レベルでの研究が大きく進展することが期待されます。

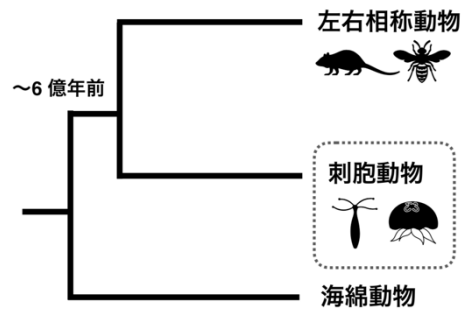


図1. 刺胞動物の系統発生位置

刺胞動物は約6億年前に左右相称動物との共通祖先から枝分かれしたと考えられている

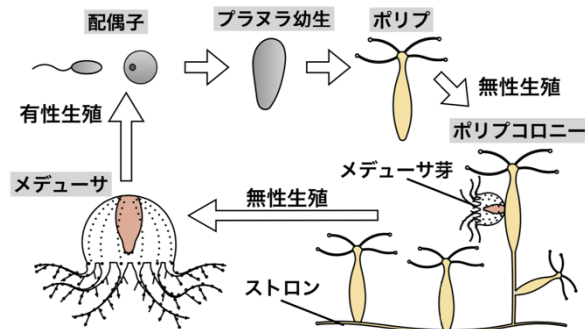


図2. ヒドロ虫綱クラゲの生活環

受精卵が幼生を経て、ポリプを形成する。ポリプは無性生殖で増え、メデューサを出芽する。メデューサは遊泳して有性生殖を行う。

中嶋博士のグループは、日本近海に生息するヒドロ虫綱のエダアシクラゲ (*Cladonema pacificum*, 図 3) を用いた研究を展開しています。エダアシクラゲは、研究室での飼育が比較的容易で、クラゲを使った形態形成や再生、神経科学の研究を行う上で有用なモデルとなることが期待されていますが、これまでに遺伝子操作を行う実験系が確立されてきませんでした。その理由の 1 つとして、受精卵が小さく (~ 60  $\mu\text{m}$ )、マイクロインジェクションが困難であった点が挙げられます。

本研究では、モデルクラゲであるクリティアと非モデルクラゲのエダアシクラゲの受精卵を使って、RNAi 法による遺伝子ノックダウンを導入することに成功しました。エレクトロポレーションで siRNA を導入することで (図 4(A))、マイクロインジェクションを回避できるだけでなく、一度に大量の受精卵にノックダウンを誘導することが可能になりました。

クリティアは生活環において緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現しており、Wnt- $\beta$  カテニン経路\*10 が胚発生に関与することが知られています。内在性の *GFP1* 遺伝子や *Wnt3* 遺伝子を標的とした siRNA を導入することで、遺伝子発現を抑制するだけでなく、幼生における GFP の消失や Wnt シグナルを介した極性の喪失という、それぞれ予想された表現型を確認することができました (図 4(B))。一方、エダアシクラゲは内在性の GFP 発現はなく、初期発生で働く遺伝子が全く知られていません。そこで、エダアシクラゲにおいても *Wnt3* を含む複数の Wnt 遺伝子が保存されていることを検証しました。さらに、*Wnt3* 遺伝子を標的とした siRNA を導入することで、Wnt シグナルの下流で発現する極性マーカー (*Brachyury* 遺伝子) が幼生で消失することが確認できました (図 4(C))。これらの結果は、エダアシクラゲにおいても



図3. クリティアとエダアシクラゲ

クリティアとエダアシクラゲは全長が1cm程度の小型クラゲ。エダアシクラゲ卵は小さくマイクロインジェクションが困難。

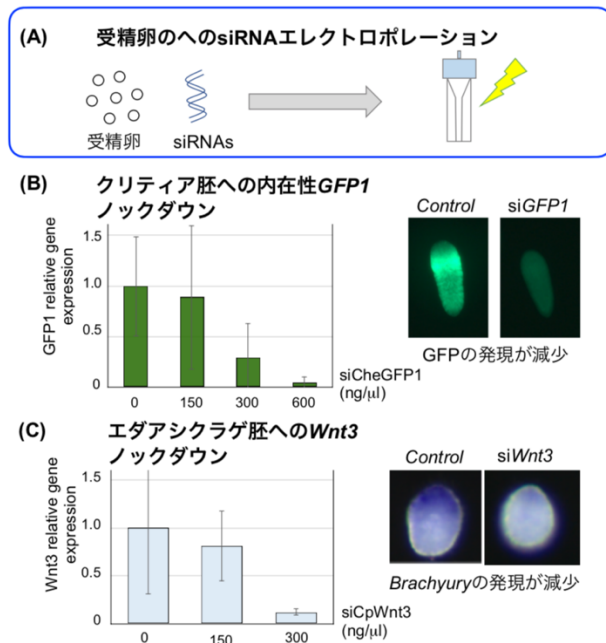


図4. クラゲ受精卵への遺伝子ノックダウンと表現型

(A) siRNAエレクトロポレーションの方法

(B) クリティアにおけるGFP1のノックダウン

(C) エダアシクラゲにおけるWnt3のノックダウン

進化的に保存された Wnt- $\beta$  カテニン経路が胚発生に関与することを示唆しています。

本研究で確立した手法は、一般的に用いられるエレクトロポレーション装置を使い、複雑な実験操作を含んでいないことから、研究対象の動物の受精卵さえ得ることができれば遂行可能です。実際に、同様の RNAi 法がイソギンチャクであるネマトステラでも有効であることを確認しています。様々なクラゲ類や他の海産無脊椎動物の受精卵に適用することで、初期発生に関与する遺伝子機能を解析可能となります。また、ポリプやメデューサといった異なるステージにおいても本手法を適用することで、クラゲを含めた非モデル動物が示す、未解明で魅力的な生命現象を分子レベルで理解するための新規研究プラットフォームとなることが期待されます。

本研究は、沖縄科学技術大学院大学(OIST)および東京大学との共同研究として行われました。また本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構の革新的先端研究開発支援事業「全ライフコースを対象とした個体の機能低下機構の解明」研究開発領域におけるソロタイプ (AMED-PRIME) の研究開発課題「原始後生動物における若返り現象の仕組みの解明とその適用による個体機能の活性化」(研究開発担当者:中嶋 悠一郎)、ならびに文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究「細胞社会ダイバーシティの統合的解明と制御」JP17H06332、挑戦的研究(萌芽) JP19K22550、基盤研究(B) JP 22H02762 の一環で行われました。

#### 【掲載論文】

題目: siRNA-mediated gene knockdown via electroporation in hydrozoan jellyfish embryos

著者: Tokiha Masuda-Ozawa, Sosuke Fujita, Ryotaro Nakamura, Hiroshi Watanabe, Erina Kuranaga, and Yu-ichiro Nakajima\*

雑誌: Scientific Reports 12, Article number: 16049 (2022)

DOI: 10.1038/s41598-022-20476-1

#### 【用語説明】

\*1 クラゲ類: 水母亜門のこと。刺胞動物門は、大きく花虫綱/花虫亜門と水母亜門の2つに分けることができる。

\*2 RNAi 法: RNA 干渉法とも言われ、標的遺伝子と相補的な配列を持つ2本鎖RNAによってその遺伝子の発現を抑制する方法。

\*3 ノックダウン: 特定の遺伝子の mRNA 量を減少させる操作の総称。現在は、RNAi 法が主な手法となっている。

\*4 siRNA: 21 塩基程度の 2 本鎖 RNA で、RNA 干渉経路において長鎖の 2 本鎖 RNA が Dicer によって切断されてできる。合成された siRNA が哺乳類培養細胞をはじめ、多くの実験系で使用されている。

\*5 エレクトロポレーション: 電気穿孔法 (でんきせんこうほう)。パルス化された電流を使用して細胞膜に細孔を導入して、核酸やタンパク質などの分子を細胞内に取り込ませる方法のこと。

\*6 マイクロインジェクション: 微小なガラス管などを用いて DNA やタンパク質などを細胞内に注入する方法のこと。

\*7 ポリプ: ヒドラ、サンゴ、イソギンチャクに代表される、刺胞動物に属する動物の多くがとる基本的な形態で生活環の 1 つ。

\*8 メデューサ: 傘と口、触手をもつ形態で生活環の 1 つ。いわゆる日本語でイメージするクラゲと同義で使われることも多い。

\*9 ヒドロ虫綱: 刺胞動物門に属する綱 (生物の分類における階級) の 1 つ。

\*10 Wnt- $\beta$  カテニン経路: 分泌性タンパク質である Wnt が活性化する経路で、 $\beta$  カテニンが核内移行して遺伝子発現を制御する。広く動物に保存されたシグナル経路の 1 つである。

#### 【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東京大学大学院薬学系研究科 講師

(研究当時 東北大学学際フロンティア研究所 助教)

中嶋 悠一郎 (なかじま ゆういちろう)

電話: 03-5841-4863

E-mail: [nakaji97@g.ecc.u-tokyo.ac.jp](mailto:nakaji97@g.ecc.u-tokyo.ac.jp)

[yuichiro.nakajima.d2@alumni.tohoku.ac.jp](mailto:yuichiro.nakajima.d2@alumni.tohoku.ac.jp)

(報道に関すること)

東北大学 学際科学フロンティア研究所

特任准教授 藤原 英明 (ふじわら ひであき)

電話: 022-795-5259

E-mail: [hideaki@fris.tohoku.ac.jp](mailto:hideaki@fris.tohoku.ac.jp)