

Molecular mechanisms of environmentally cued hatching in false clownfish

(カクレマノミの環境キュー依存的孵化の分子機構に関する研究)

山中 朔人

要旨

孵化は胚が卵膜を破り、外の世界へと出ていく過程である。その中で、重要な役割を果たすのは卵膜内層を消化する孵化酵素とそれを分泌する孵化腺である。魚類の中には環境の変化によって迅速に孵化が誘導される種もあり、環境キュー依存型孵化（ECH：Environmentally cued hatching）と呼ばれる。しかし ECH における環境因子と生理学的な制御プロセスの間の分子メカニズムは明らかにされてこなかった。カクレマノミは岩やサンゴのような基質に付着卵を産み、7~9 日目の日没後に親魚が卵に激しく水流を送り孵化を促す。これらからカクレマノミの孵化は光環境や水流のような環境因子によって制御される ECH 戦略を持っていると考えられる。本論文では、カクレマノミをモデルとして、ECH の分子メカニズムに迫った。主な内容は以下のように要約される。

1. カクレマノミへの遺伝子改変技術の適用方法を確立するため、マイクロインジェクション法、人工培養・人工孵化法などの基盤的な諸技術の確立を行い、カクレマノミにおける遺伝子改変操作に必要な一連の技術基盤を確立した。これらの技術を用いて、本種において遺伝子ノックアウトや外来遺伝子導入が可能であることを示した。また *tol2* トランスポゾンを用いることで、孵化に重要な孵化腺細胞を蛍光標識したトランスジェニック個体の作出に成功した。これらの遺伝子操作プラットフォーム技術はカクレマノミの孵化の分子機構の解明だけでなく、クマノミ類の模様形成や性転換といった興味深い生物学的現象の理解にも貢献できる。
2. 環境因子がどのようにカクレマノミの ECH を誘導するのかを明らかにした。カルシウム蛍光指示分子である GCaMP6s を用いた孵化腺のカルシウムイメージングおよび卵膜消化分析から、孵化日に胚が 30 分以上の暗闇に晒されると、孵化腺のカルシウムイオン濃度が上昇し、孵化酵素の分泌が開始され、卵膜が消化されることが分かった。一方で、暗闇は卵膜消化を促すが、胚が卵膜の外に脱出する孵化行動には影響を与えず、水流を与えることで孵化行動が起こった。以上から、カクレマノミの ECH において、暗闇は孵化酵素分泌の、水流は孵化行動のトリガーであることが分かった。このような光環境の変化と親魚から送られる水流という環境キューに対する生理学的な応答が迅速かつ同期した孵化に寄与していることを明らかにした。
3. 魚類において孵化腺から孵化酵素を分泌させる分子メカニズムについては、中枢からの神経投射やホルモン制御が示唆されていたが、長らく不明であった。しかし最近になって、視床下部から分泌される TRH（甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン）が血流を介して孵化腺を刺激し、孵化酵素の分泌を開始させることがゼブラフィッシュで発見された。そこで、カ

クレクマノミでも TRH の効果を検証したところ、TRH を作用させると、明条件でも即時的に孵化腺が活性化され、孵化酵素の分泌に至ることが分かった。さらに孵化腺細胞では TRH 受容体の 1 つである *trhra* の発現が見られた。*trhra* を CRISPR/Cas9 によってノックアウトした胚では、暗条件に応答した卵膜消化が起こらなくなった。*trhra* はホスホリパーゼ C- β を介して細胞内カルシウムシグナルを活性化する G タンパク (Gq) と共役することが知られている。これらのことから、カクレクマノミの孵化では、まず何らかの光受容器によって暗闇を認識し、視床下部から TRH が分泌され血流によって孵化腺まで運ばれる。その後、TRH は孵化腺の *trhra* によって受容され、Gq 経路を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させ、孵化酵素の分泌が開始されるという一連の分子シグナル経路を明らかにした。

4. 孵化前の胚においてどこでどのような光受容体が光（暗闇）を認識しているのかを調べた。眼の形成に重要な遺伝子である *pax6b* と *strip1* を CRISPR/Cas9 によって機能阻害した胚を作出した。眼の形成が顕著に阻害された個体でも、野生型と同様に暗闇に応答した卵膜消化が起こったことから、孵化時に暗闇を認識する光受容分子は眼ではなく、松果体や脳などの中枢神経系に存在することが示唆された。次に、孵化がどのような波長の光で抑制されているのかを調べた。弱い単波長光を胚に照射し、卵膜消化度を定量した結果、500~550nm の波長光で最も孵化酵素の分泌が抑制された。このことは TRH の分泌を制御している光受容体が 500~550nm に最も感受性があることを示唆している。脳領域でのトランスクリプトーム解析と分子スペクトル測定から、*opn5L1*・*exorhodopsin*・*parietopsin*・*VAopsin*・*rh2a*・*rh2b* をカクレクマノミの暗闇による TRH 分泌および孵化酵素分泌を制御する光受容体の候補として同定した。

以上より、本論文ではカクレクマノミにおいてゲノム編集による遺伝子ノックアウトやトランスジェニックの適用を可能にした。さらにこれらの技術を用いて、カルシウムイメージングを行い、カクレクマノミの胚が暗闇を認識し、孵化酵素を分泌する制御機構の一端を明らかにした。また遺伝子ノックアウトやアクションスペクトル、分子スペクトルからこのような ECH に非視覚型を含むいくつかの光受容体が関連している可能性を示した。このように、カクレクマノミの ECH では、親魚から送られる水流の機械刺激が神経を介して胚の孵化行動を誘導すること、暗闇が生理学的な制御に関わることを明らかにした。これらの知見は魚類の ECH の分子レベルの理解を提供し、魚類の初期生活における生存戦略と孵化における環境因子の制御との関連を理解することに貢献するものである。