

学位論文題名

Developmental Regulation and Underlying Molecular Mechanisms of the Predator-Induced Polyphenism in the Water Flea *Daphnia pulex*

(ミジンコにおける捕食者に誘導される
表現型多型の発生制御とその分子機構)

学位論文内容の要旨

生物は環境シグナルを受容して生理条件を変化させ、発生プロセスを改変することにより表現型を可塑的に変化させている。環境に応じて表現型が不連続に変化する現象は、表現型多型 "polyphenism" として知られており、変動する環境条件下で生物が適応度を上げる上で重要な役割を果たす。また、表現型の可塑性は生物多様性を生む重要な進化的要因として考えられ、近年そのメカニズムの解明が行われ始めている。

湖沼で多く見られる枝角類ミジンコ属 *Daphnia* は表現型多型を示す代表的な動物であり、捕食者の存在下で防御形態を可塑的に構築し被食を回避している。ミジンコ *D. pulex* は、捕食者であるフサカ幼虫 *Chaoborus* sp. の匂い物質(カイロモン)にさらされると、単為生殖により生じる次世代個体の後頭部に neckteeth (ネックティース)と呼ばれる突起を形成する。本研究では、表現型可塑性の発生メカニズムを明らかにするため、捕食者に対して顕著な表現型多型を示す *D. pulex* を用いて、その防御形態形成を中心としたミジンコの表現型多型の発生制御とその分子機構について解析を行った。

CHAPTER 1

Elaborate developmental regulations of the predator-induced polyphenism in the waterflea

Daphnia pulex

【胚・後胚発生過程における防御形態形成】第1章では、ミジンコの表現型多型における分子機構解明の基盤とするため、胚発生・後胚発生過程における防御形態形成と感受時期について調べた。*D. pulex* の防御形態形成については、ネックティースが1齢に形成されることは既に知られていたが、胚発生期における形成過程については未だ報告されていない。そのため、走査電子顕微鏡や共焦点顕微鏡を用いた観察により、防御形態形成に先立って起こる組織改変の過程を詳細に整理した。観察の結果、まず胚期の stage4 で後頭部上皮組織が肥厚し、ネックティースの土台となるクレストが出来始めることが明らかとなった。この肥厚は孵化後、後発生期の1齢で最大になった。また1齢でネックティースが形成され始め、成長とともにネックティースの本数が増加し、およそ3-4齢で最大となった。加えて、尾刺も伸長することが明らかになった。上皮組織の厚さは2齢以降で減少し始め、5齢になるとネックティースも消失した。

【カイロモン感受期と防御形態形成・維持】胚発生期にカイロモンを感受しネックティースを形成すること

がこれまでに知られていたが、後胚発生期にもネックティースの形成・維持のためにカイロモン曝露が必要かどうかについて検討するため、曝露時期および期間と防御形態形成との関係についても詳細に調べた。これにより、胚の時期の曝露がネックティース形成に必須であることが示された。さらに、1 齢以降もカイロモンを感受し、その曝露期間の長さによってネックティースの本数を変化させることが分かった。これにより、カイロモン曝露は後胚発生期にもネックティースの形成・維持に必要であることが明らかになった。

【カイロモン応答様式とトレードオフ】カイロモンに対する応答性は防御形態形成のみに現れるわけではない。これまで、カイロモンの曝露によって仔虫の体長や抱卵数に影響を与えることが知られており、カイロモン曝露を受けた母親から仔虫への間接的な影響が推測されていた。しかしこれまで正確にこの母性効果について調べた報告例はない。本研究では、卵に直接カイロモンを曝露する「直接曝露」、母親に曝露することで卵に間接的にカイロモンを曝露する「間接曝露」という異なる処理を行った。これにより、発生ステージによるカイロモン応答の違いを比較し、表現型改変に関する母性効果の影響の評価することに初めて成功した。母性効果を排除した直接曝露の場合、防御形態は形成されるが、ネックティース形成のコストとして体サイズが減少することが示された。一方、間接曝露処理の場合、同様にネックティースは形成されたが、抱卵数は減少し、逆に仔虫サイズは増加した。これは、カイロモンを感受した親が、防御形態を持ったより大きな仔虫を少なく産むという、より適応的な繁殖戦略へ転換したためであると考えられる。*Daphnia* はカイロモンの存在下で、卵や胚の時期から成熟するまでは、成長速度とトレードオフを行って防御形態を形成し、成熟後は仔虫の数や大きさを変化させていた。このようにして、*Daphnia* は生活史全体を通して表現型を可塑的に改変していることが示された。

CHAPTER 2

Screening of genes expressed in response to the predator kairomones in the water flea *Daphnia pulex*

第1章で明らかにした形態変化過程の観察結果に基づいて、第2章では防御形態形成に関わる発生・生理機構の解明を目的として分子生物学的な解析を行った。第1章の結果から、1 齢のカイロモン曝露個体はカイロモン感受と形態形成を同時に行っていることが示唆されたため、この個体をコントロール1 齢個体と比較することで、防御形態形成に関わる遺伝子の探索を行った。条件特異的な遺伝子発現の差を検出する Differential Display 法により、カイロモン曝露個体に特異的な候補遺伝子を複数得ることに成功した。さらに Real-Time 定量 PCR によって、カイロモン処理で発現が上昇する13個の遺伝子と、発現が減少する1個の遺伝子が同定された。データベース上の類似配列から機能を推定したところ、これらの候補遺伝子はそれぞれ、酵素活性を示すものが3遺伝子、シグナル伝達関連因子が2遺伝子、核酸結合タンパク、細胞代謝に関わる因子、酵素活性制御因子、イオントランスポーター、細胞分化に関わる因子が各1遺伝子ずつ、機能が未知のタンパクが4遺伝子（その中の2遺伝子はストレス応答性であるとされる）であることが分かった。これらは細胞増殖や代謝・転写調節・受容などに関わると考えられる。また、得られた14の遺伝子は、コントロールとカイロモン処理で発現量にかなり大きな差が認められた。同じ発生ステージである1 齢個体であるにもかかわらず、カイロモン処理の有無で発現量にこれだけ差がある遺伝子が存在していることは、非常に興味深い。

本研究によって、*D. pulex* の防御形態形成過程には精巧な制御機構が存在することが示唆された。また、防御形態を形成する個体に特異的に発現するいくつかの遺伝子を得ることができた。これらの遺伝子のうち、細胞増殖に関わる遺伝子などは、上皮組織肥厚やネックティースの形成・尾刺の伸張・体サイズの変化などの形態変化とそれらの制御機構に関わることが推測される。また、代謝関連の遺伝子は、これまでに報告のある

摂食速度や行動・生活史の変化と関連しているかもしれない。本研究で得られた結果をもとに、分子機構を中心としたミジンコの表現型可塑性のメカニズムの解明が進展することが今後期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 三 浦 徹
副 査 教 授 大 原 雅
副 査 教 授 岩 熊 敏 夫
副 査 准教授 柄 内 新 (大学院理学研究院)

学 位 論 文 題 名

Developmental Regulation and Underlying Molecular Mechanisms of the Predator-Induced Polyphenism in the Water Flea *Daphnia pulex*

(ミジンコにおける捕食者に誘導される
表現型多型の発生制御とその分子機構)

ミジンコは、環境に応じて表現型を不連続に変化させ、予測不可能な状況の変化にも順応可能である、表現型多型“polyphenism”という性質を示す代表的な生物である。可塑性は新奇形質の進化に重要な要因であり多様性を生む原動力になりうると言われ注目されているが、発生制御メカニズムは明らかにされていなかった。枝角類ミジンコ属 *Daphnia* も表現型多型を示し、捕食者の存在下で防御形態を可塑的に構築し被食を回避している。ミジンコ *D. pulex* は、捕食者であるフサカ幼虫 *Chaoborus*. sp の匂い物質(カイロモン)にさらされると、次世代個体は後頭部に突起 neck teeth を形成する。本研究では、*D. pulex* の防御形態形成を中心とした表現型の可塑性の発生制御機構を解明することを目的とした。本研究によってミジンコの捕食者に誘導される表現型多型について、その詳細な防御形態の形成過程とカイロモン感受と応答様式、それらの制御に関連があると推測される遺伝子が明らかにされた。

第1章では、*Daphnia* の防御形態が形成される時期とその過程を明らかにするため、胚発生および後胚発生における形態や、生活史の変化過程が、走査電子顕微鏡や共焦点顕微鏡などを用いて詳細に整理された。また、形態変化だけでなく、カイロモン受容時期についても観察された。発生過程を通じ、カイロモンを受容して、防御形態だけでなく生活史や卵形成様式などを可塑的に変化させていることが明らかとなった。

ネックティースが1齢に形成されることは既に知られていたが、胚発生期における形成過程に関する先行研究はない。本研究では防御形態形成に先立って起こる組織改変の過程が詳細に整理された。また、胚発生期にカイロモンを感受しネックティースを形成することはこれまでに知られていた。これに加えて本研究では、後胚発生期にもカイロモン曝露が必要かど

うかついて、曝露時期および期間と防御形態形成との関係についても詳細に調べられていた。これにより、カイロモン曝露は後胚発生期にもネックティースの形成・維持に必要であることが明らかになった。

また、これまでカイロモンの曝露によって仔虫の体長や抱卵数に影響を与えることが知られており、カイロモン曝露を受けた母親から仔虫への間接的な影響が推測されていた。しかしこれまで正確にこの母性効果について調べた報告例はなかった。本研究では、卵に直接カイロモンを曝露する処理、母親に曝露することで卵に間接的にカイロモンを曝露する処理という異なる2種類の処理が行われた。これにより、本研究によって、発生ステージによるカイロモン応答の違いを比較し、表現型改変に関する母性効果の影響が評価された。*Daphnia* はカイロモンの存在下で、卵や胚の時期から成熟するまでは、成長速度とトレードオフを行って防御形態を形成し、成熟後は仔虫の数や大きさを変化させていた。このようにして、*Daphnia* は生活史全体を通して表現型を可塑的に改変していることが示された。

第2章では、第1章で決定した形態変化過程の観察に基づいて、カイロモン曝露個体で特異的に発現している遺伝子をDifferential Display法によって同定し、捕食者の感受と形態形成に関わると考えられる遺伝子候補を探索していた。Real-Time 定量 PCR により、13の遺伝子がカイロモン処理で発現量上昇し、1つの遺伝子が発現低下することが確認された。これらは、代謝や転写調節、受容や細胞増殖などに関する遺伝子と相同であることが示唆された。本研究によって、*D. pulex* の防御形態形成過程には精巧な制御機構が存在することが示唆された。また、防御形態を形成する個体に特異的に発現するいくつかの遺伝子が得られた。これらの遺伝子のうち、細胞増殖に関わる遺伝子などは、上皮組織肥厚やネックティースの形成・尾刺の伸張・体サイズの変化などの形態変化とそれらの制御機構に関わることが推測された。また、代謝関連の遺伝子は、これまでに報告されていた摂食速度や行動・生活史の変化と関連している可能性がある。

これまで、誘導防御に関する生態学的な研究は多くあったが、分子発生的な研究はほとんどなかった。本研究で初めて、ミジンコの表現型多型の発生制御様式が整理され明らかになり、それに関わる候補遺伝子が得られた。本研究の結果をもとに、分子機構を中心としたミジンコの表現型可塑性のメカニズムの解明が進展することが期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。