

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

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*

広島大学大学院生物圏科学研究科
〒739-8528 広島県東広島市鏡山1-4-4

要 旨 ミズクラゲ (*Aurelia* sp.) の生活環の中で、ポリプからストロビラを経てエフィラに形態変化する過程はストロビレーションと呼ばれる。ストロビレーションの分子機構の解明に向けて分子生物学的および生化学的研究を進めるために、瀬戸内海産のミズクラゲからポリプのクローン系統を7株確立した。実験室内でストロビレーションを誘導する条件を検討した結果、これらのクローン系統は、25°C から10°C への低温処理によって32 - 42日でストロビレーションを開始し、indomethacin (25 μ M) の投与によって25°C 条件下で4 - 8日でストロビレーションを開始した。また、短期間だけ低温処理をおこなう飼育実験の結果、ストロビレーションは一旦開始すると低温条件下でなくても正常に進行し完了することが明らかになった。さらに、分子系統解析の結果、今回確立したクローン系統が *Aurelia* sp. 1 (Dawson *et al.*, 2005) であることが示唆された。

キーワード : クローン系統, ストロビレーション, 瀬戸内海, 分子系統解析, ポリプ, ミズクラゲ

緒 言

刺胞動物ミズクラゲ (*Aurelia* sp.) の生活環は、無性世代 [プラヌラ→ポリプ→ストロビラ] と有性世代 [ストロビラ→エフィラ→クラゲ] を繰り返す。雌の成体クラゲの保育嚢で分裂を繰り返した受精卵は、繊毛を有した楕円形のプラヌラ幼生となって海水中に泳ぎ出し、貝殻や岩などの基質に着生してポリプに変態する。ポリプは小さなイソギンチャクのような形態で、出芽や分裂によって無性的に増殖する。冬期に海水温が低下すると、ポリプは有性世代の前段階であるストロビラ幼生になる (この過程を「ストロビレーション」と呼ぶ)。ストロビラは柱体部に複数の節を持ち、1つ1つの節が盤へと形態変化する (Fig. 2)。さらに盤は1枚ずつ遊離してエフィラ幼生となり、成長して成体のクラゲとなる。

近年、ミズクラゲの大量発生が社会問題になっている (上・上田, 2004)。ミズクラゲの生活環を鑑みると、クラゲの大量発生を制御する上で、ストロビレーションの理解は欠かせない。筆者らは、ストロビレーションの分子機構の解明を目指して研究を進めるにあたり、実験材料としてミズクラゲポリプのクローン系統を確立した。分子生物学的および生化学的研究をおこなう際に、遺伝的背景が多様な野外集団を材料として使うと、データのばらつきや遺伝子・タンパク質の polymorphism によるノイズによって、有意な結果が得られない場合がある。このような混乱を回避するために、多くの実験生物で inbred 系統やクローン系統が樹立され使われている。本論文では、瀬戸内海産のミズクラゲより確立したポリプのクローン系統について記載する。

また、実験室内でストロビレーションを再現するために、各クローン系統についてストロビレーションの誘導条件を検討した。一般に、ミズクラゲポリプのストロビレーションは低温刺激によって誘導されることが知られている (Kroiher *et al.*, 2000 ; Fuchs *et al.*, 2014 ; 高村, 2014)。また、筆者らは indole 化合物の一種 indomethacin がストロビレーションを誘導することを見出している (Kuniyoshi *et al.*, 2012)。それ以外にも、ヨウ化カリウムや過酸化水素水などのいくつかの化学物質がストロビレーション誘導活性を示すことが報告されている (Berking *et al.*, 2005)。クローン系統でこれら諸条件を試し、効率的で再現性の高いストロ

ピレーション誘導系を構築した。さらに、この誘導系を利用して飼育実験をおこない、ストロピレーションの性質を調べた。

ところで、ミズクラゲは世界中の広範囲に分布し、*Aurelia aurita* の単一種として記載されていたが、最近の分子系統学的な分析によって、種レベルで異なる複数の系統群が含まれていることが指摘されている (Dawson *et al.*, 2005)。そこで、本研究で確立したクローン系統について分子系統解析をおこない、*Aurelia* 属各種との系統関係を推定した。

材料と方法

ミズクラゲのポリブクローン系統の確立

瀬戸内海・倉橋島 (34°10'17" N, 132°50'17" E) にて、繁殖期のミズクラゲ (*Aurelia* sp.) の成体クラゲを採集し (2006年9月19日)、雌雄判別した後に、雌クラゲの保育嚢に付着したプラヌラ幼生を新鮮な海水で洗い流すことによって回収した。それぞれの雌クラゲから回収したプラヌラが混ざり合わないよう注意し、個別にプラスチック容器 (ペットボトルなど) に入れて研究室まで運搬した。ポリブクローン系統の確立は Fig. 1 のスキームに従っておこなった。まず、各雌クラゲ由来のプラヌラをシャーレ (直径90 mm × 10 mm、以後9 cm シャーレと呼ぶ) に移し、23 - 25°C にて数日静置した。プラヌラは2 - 3日でシャーレ底面に着生し、ポリブへと変態した。数日間 *Artemia* 幼生をエサとして与えて成長を促した。爪楊枝を使ってポリブをシャーレ底面から静かに剥がし、1匹のポリブを1枚の新しい9 cm シャーレに移した。ポリブがシャーレ底面に付着したことを確認した後、通常飼育によってポリブを無性増殖させた。この段階で、ポリブクローン系統とした。

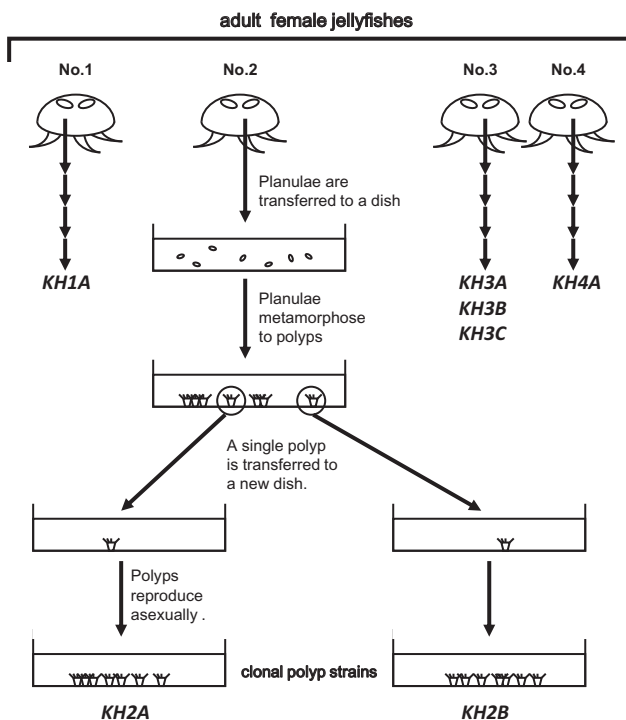


Fig. 1. Scheme for establishing clonal strains of *Aurelia* polyp. Seven clonal polyp strains (KH strains) were established from 4 adult female jellyfish which were collected on the 19th of September, 2006, at Kurahashi Island (34°10'17" N, 132°50'17" E) in the Seto Inland Sea of Japan.

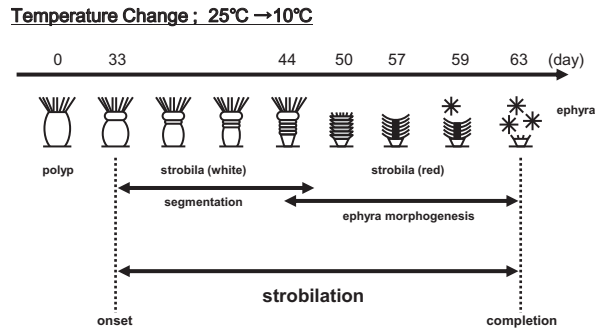


Fig. 2. Schematic view of *Aurelia* strobilation induced by a low-temperature treatment. In this paper, generation of the first constriction is defined as the onset of strobilation, and detachment of all ephyrae is defined as the completion of strobilation. When a polyp from the *KH3B* strain was subjected to a temperature change from 25°C to 10°C, strobilation was initiated on the 33rd day, and completed on the 63rd day.

ポリブの飼育

ポリブは、9 cm シャーレ内で23 - 25°C にて飼育した。エサには孵化直後の *Artemia* 幼生を使用し、給餌後3 - 5時間で飼育水の交換をおこなった。飼育海水は広島大学大学院生物圏科学研究科附属瀬戸内圏フィ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（塩分濃度：約35‰）を使用した。

低温処理によるストロビレーションの誘導

23 - 25°C にて9 cm シャーレ内で飼育したポリブクロン系統を、飼育海水を交換した後、15°C または10°C のインキュベーターに移した。低温処理中にも、1週間に1回の頻度で飼育海水の交換をおこなった。海水交換には、あらかじめ15°C または10°C に冷やした濾過海水を用いた。低温処理後、毎日、実体顕微鏡でポリブを観察し、シャーレ内で初めてストロビラが確認できた日を記録し、ストロビレーション誘導に要した低温処理日数を計算した。低温処理開始後98日経ってもストロビラが確認できなかった場合には、「ストロビレーションせず (no strobilation)」と評価し、低温処理実験を終了した。

indomethacin によるストロビレーションの誘導

23 - 25°C で飼育したポリブ3個体を、24穴マイクロタイタープレート（TPP 製）のウェルに移し、25 μM indomethacin を含む濾過海水1 mL 中で23 - 25°C にて培養し、14日間観察した。培養開始後、毎日、実体顕微鏡でポリブを観察し、ウェル内で初めてストロビラが確認できた日を記録し、ストロビレーション誘導に要した培養日数を計算した。

飼育実験

以下の飼育実験には、広島大学大学院生物圏科学研究科附属瀬戸内圏フィ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を使用した。

(飼育実験 A)

上記「低温処理によるストロビレーションの誘導」の方法に従って、*KH3B* 系統のポリブを低温処理した。低温処理開始後、17日目、21日目、24日目、28日目、31日目、35日目に、それぞれポリブを10匹ずつシャーレから回収し、新しい9 cm シャーレに移して、23 - 25°C にて培養した。低温処理開始後42日目に相当する日に各シャーレを観察し、ポリブのままの個体とストロビレーションが進行してエフィラを放出した個体の数を記録した。

(飼育実験 B)

上記「低温処理によるストロビレーションの誘導」の方法に従って、*KH1A* 系統のポリブを低温処理した。

低温処理開始後46日目に、ポリプとストロビラ（くびれの数が1個）をそれぞれ10匹以上ずつシャーレから回収し、1匹ずつ24穴マイクロタイタープレート（TPP製）のウェルに移し、23 - 25°Cにて培養した。低温処理開始後56日目に相当する日に各ウェルを観察し、ポリプのままの個体とストロビレーションが進行してエフィラを放出した個体の数を記録した。

分子系統解析

（ゲノム DNA の調製）

KHIA 系統のエフィラ100 mg（約100匹）に、Lysis buffer [8 M Urea, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 125 mM NaCl, 10 mM EDTA (pH 8.0), 1% SDS] 400 µL を加え、蓋をして激しく攪拌した後、室温で150分静置した。20 mg / mL Proteinase K を20 µL 加え、37°C で5日間インキュベートした。この間、2日目と4日目に20 mg / mL Proteinase K を20 µL ずつ追加した。エフィラ溶解液の粘性が十分低下したことを確認してから、3 M NaCl を83 µL 加え、転倒混和した後に、フェノール/クロロホルム抽出をおこない、エタノール沈殿によってゲノム DNA を回収した。ゲノム DNA の沈澱を100 µL の TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8.0)] に溶解した。その後、10 mg / mL RNase A を5 µL 加えて37°C で30分インキュベートし、遠心した後、上清を回収した。得られたゲノム DNA の総量は4.3 µg であった。

（5.8S rDNA 遺伝子の *Internal Transcribed Spacer 1 (ITS-1)* 領域のクローニング）

KHIA 系統のゲノム DNA を鋳型として、5.8S rDNA 遺伝子の *ITS-1* 領域（以後、*ITS-1/5.8S rDNA* と呼ぶ）を PCR 法で増幅した。プライマーとして、Schroth *et al.* (2002) が報告した *Aurelia* 属の *ITS-1/5.8S rDNA* 増幅用プライマーセットと同じ配列のものを用いた。PCR の反応条件は、94°C・3分、[94°C・30秒、53°C・30秒、72°C・1分] ×35サイクル、72°C・7分とした。得られた DNA 断片をプラスミドベクター pBluescript SK (+) の *EcoRV* 部位にサブクローニングし、塩基配列分析をおこなった。塩基配列分析には、広島大学自然科学研究支援開発センター 遺伝子実験部門の Applied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザを使用した。

（分子系統樹の作製）

Clustal X2を用いて、Neighbor - Joining (N - J) 法とブートストラップ法により分子系統樹を作成した。ブートストラップは1000でおこなった。分子系統樹の編集には、編集・表示プログラムの Tree View を用いた。系統樹作成に用いた *ITS-1/5.8S rDNA* の塩基配列は以下のとおりである。

Aurelia aurita (Scandinavia) [AY935206], *Aurelia labiata* (Alaska) [AY935202], *Aurelia limbata* (Japan) [AY935215], *Aurelia* sp. 1 (Miyazu Bay, Japan) [AY935214], *Aurelia* sp. 1 (California) [AY935203], *Aurelia* sp. 2 (Brazil) [AY935204], *Aurelia* sp. 3 (Palau) [AY935209], *Aurelia* sp. 4 (Palau) [AY935208], *Aurelia* sp. 5 (Adriatic Sea) [AY935210], *Aurelia* sp. 6 (Palau) [AY935207], *Aurelia* sp. 7 (Adriatic Sea) [AY935212], *Aurelia* sp. 8 (New Zealand) [AY935218], *Aurelia* sp. 9 (Gulf of Mexico) [AY935216], *Aurelia* sp. 10 (Alaska) [AY935211]

()内は採集地、【 】内は accession number を示す。

結果と考察

ポリブクローン系統の特徴

瀬戸内海・倉橋島（広島県）で採集した雌のミズクラゲ成体4個体のそれぞれからプラヌラを採取し、ポリブクローン系統7株を確立した（Fig. 1）。各系統は以下の規則に従って命名されている。系統名の最初の2文字“KH”は、由来となる母親クラゲの採集地（Kurahashi）を示し、3文字目の番号は母親クラゲの個体番号を示す。同じ母親クラゲから確立した株同士は4文字目のアルファベットで区別する。例えば、*KH2A* と *KH2B* は、ともに雌クラゲ No. 2 を母親とする姉妹関係の系統である。一方、*KH2A* と *KH3A* の場合のように、3文字目の番号が違う株同士は母親クラゲが異なり、血縁関係がほとんどないものとして扱える。

各系統について、ストロビレーションの誘導条件を検討した。ミズクラゲのストロビレーションは、ポリプを低温処理することで誘導できることが知られている（Kroiher *et al.*, 2000；Fuchs *et al.*, 2014；高村，

2014)。そこで、各系統のポリプを、25°C → 15°C（温度差：10°C）と25°C → 10°C（温度差：15°C）の2通りの条件で低温処理した（Table 1）。その結果、25°C → 15°C 条件では98日経過してもストロビレーションは誘導されず、25°C → 10°C 条件では32 - 42日でストロビレーションが開始した。その後、25°C → 10°C 条件で同様の実験を繰り返したところ、KH1AとKH3Bが最も短期間（31 - 35日）に再現性良くストロビレーションを開始した。一方、KH2AとKH4Aはストロビレーションが誘導されにくく、42日以上低温処理が必要であった。このように、系統によってストロビレーションの誘導結果が異なるのは、各系統の遺伝的背景の違いによるものと考えられる。

9 cm シャーレを用いたストロビレーションの誘導実験では、低温処理中の飼育海水の交換が必須であった。飼育海水を交換しない場合、ストロビレーションは全く開始しなかった。飼育海水中に老廃物が蓄積したか、あるいはストロビレーションに必要な成分が枯渇したためと考えられる。また、人工海水を用いて同様の実験をおこなった場合、ストロビレーションの開始までの日数はほとんど同じであったが、その後のストロビレーションの進行が、人工海水では1週間程度遅れる傾向を示した。これらの結果を総合して、ストロビレーションの誘導には天然海水（広島大学・竹原ステーションの濾過海水）を用いて、低温処理中にも1週間に1回の頻度で飼育海水を交換することにした。

これまでに報告されているストロビレーションの誘導実験と比較して、今回確立した系統は全般的にストロビレーション誘導に要する日数が長かった。例えば、North Sea 由来のポリプでは20°C → 12°C 条件下17日で（Kroiher *et al.*, 2000）、Roscoff (France) 由来のポリプでは20°C → 10°C 条件下15日で（Fuchs *et al.*, 2014）ストロビレーションが誘導される。同じ瀬戸内海（広島県・向島）由来のポリプでも、20°C → 15°C 条件下11 - 18日でストロビレーションが誘導されたことが報告されている（高村, 2014）。KH系統のストロビレーション誘導の遅さが採集地付近の個体集団の固有の性質かどうかは不明であるが、本研究で採用している誘導条件が最適でない可能性も考えられる。

筆者らは、KH3B系統のポリプに各種化合物を投与するスクリーニング研究をおこない、ストロビレーション誘導物質として indomethacin を見出した（Kuniyoshi *et al.*, 2012）。indomethacin を含む海水中でポリプを培養した場合、低温処理をしなくても、常温下でストロビレーションを誘導することができる。indomethacin によるストロビレーション誘導がKH3B系統に特有の現象である可能性も考えられたので、KH3B以外の他の系統についても indomethacin の効果を調べた（Table 1）。25 μM indomethacin を含む海水中で各系統のポリプを23 - 25°C にて培養した結果、いずれも4 - 8日でストロビレーションを開始した。このことから、indomethacin のストロビレーション誘導活性は、少なくとも瀬戸内海集団のミズクラゲに対して普遍的な効果と考えられる。indomethacin 投与からストロビレーション開始までの日数に注目すると、KH3BとKH1Aが短期間（4 - 5日）で開始したのに対して、KH2A、KH3A、KH4Aは開始が遅かった（6 - 8日）。低温処理の場合でも、KH3BとKH1Aは短期間にストロビレーションを開始し（32 - 34日）、KH2A、KH3A、KH4Aでは開始が遅かった（38 - 42日）。このように、ストロビレーション開始までに要する時間に

Table 1. Strobilation of clonal polyp strains induced by temperature changes or administration of indomethacin.

Strain	Duration to the onset of strobilation (day)		
	Temperature change (25°C to 15°C)	Temperature change (25°C to 10°C)	Indomethacin (25 μM)
KH1A	no strobilation ^{a)}	34	5
KH2A	no strobilation ^{a)}	42	6
KH2B	- ^{b)}	34	- ^{b)}
KH3A	no strobilation ^{a)}	38	8
KH3B	- ^{b)}	32	4
KH3C	- ^{b)}	34	- ^{b)}
KH4A	no strobilation a)	42	7

^{a)} Polyps did not start strobilation in 98 day.

^{b)} Not tested.

ついて、低温処理の場合と indomethacin 投与の場合との間に相関性が見られることは興味深い。

indomethacin の誘導活性は Roscoff 系統の *Aurelia* ポリプでも確認されている (Fuchs *et al.*, 2014)。さらに、ミズクラゲと同じ鉢虫綱旗口クラゲ目に属する *Chrysaora quinquecirrha* でも、indomethacin によってストロビレーションが誘導されることが報告されている (Helm *et al.*, 2015)。このように、indomethacin が *Aurelia* 系統内だけでなく他種のポリプでもストロビレーション誘導活性を示したことから、少なくとも目レベルの中では、ストロビレーションの分子機構が共通している可能性が高い。

ストロビレーションの性質

クローン系統を用いて、ストロビレーション過程における形態変化を観察した。*KH3B* を 25°C → 10°C の条件で低温処理した場合の一例を Fig. 2 に示す。低温処理開始後 33 日目に触手の直下に 1 つ目のくびれが生じ、それ以後くびれが足盤方向に向かって 1 つずつ増加し、節が形成された。節の形成が足盤部近傍まで進むと、節形成は停止した (44 日目)。節形成の停止と前後して、口丘側の節から順番に赤く色づき、触手の退縮が始まった。それぞれの節はエフィラの形態へと変化していき、濃い赤色を帯び、エフィラの器官である縁弁の形成が確認できた (50 日目)。一方、足盤部はポリプと同様の白色のままで、形態もほとんど変化しなかった。57 日目には、各エフィラの形態がほぼ完成し、遊泳のための拍動運動を始め、59 日目以降ストロビラの先端から順番にエフィラが離れていき、63 日目には全てのエフィラが分離した。全エフィラが分離した後も、足盤部はポリプ形態を維持していた。なお、本論文では、1 つ目のくびれが生じた段階をストロビレーションの開始、全エフィラが分離した段階をストロビレーションの完了と判断した。

同様の実験を何度か繰り返したところ、1 個体のポリプから放出されるエフィラの数を決まっておらず、概ね 6 - 10 匹のエフィラが生じた。また、エフィラ放出後の足盤部を 25°C の通常飼育に戻し、給餌により成長させた後、再度低温処理をおこなうと、正常なストロビレーションが誘導された。例えば、低温処理 91 日目の全エフィラ放出後の足盤部を 25°C に戻し、56 日の通常飼育をおこなった後、再度 25°C → 10°C の低温処理をおこなったところ、49 日目にはストロビラが観察された。2 度目のストロビレーション完了後にも足盤部がポリプ形態のまま残っていたことから、足盤部にはエフィラへの形態変化に抵抗性を示す機構が存在するものと考えられる。

低温処理によるストロビレーション誘導が決定づけられる時期を知るために、低温処理途中のポリプ (*KH3B*) を 25°C に戻す実験をおこなった (飼育実験 A, Fig. 3A)。25°C → 10°C の低温処理開始後、17, 21, 24, 28, 31, 35 日目のそれぞれの時点でポリプ 10 匹ずつを 25°C に戻して培養した。その結果、17, 21, 24 日のサンプルではストロビレーションが起らず、ポリプのままであったが、28 日のサンプルでは 10 匹中 1 匹がストロビレーションを開始し、31, 35 日のサンプルでは全てのポリプがストロビレーションを開始した。以上の結果と、低温処理 35 日程度でストロビレーションを開始すること (*KH3B* の場合) を考え合わせると、開始の 1 週間前から数日前にストロビレーション誘導が決定づけられることが示唆される。

このことは同時に、ストロビレーション開始の時点でエフィラへの発生運命が決定されていることを意味する。このことを確認するために、ストロビレーション開始直後のくびれが 1 個のストロビラを 25°C で培養する実験をおこなった (飼育実験 B, Fig. 3B)。その結果、全てのストロビラ (N = 11) について、25°C 培養下でも正常にストロビレーションが進行し、最終的に全てのエフィラを放出してストロビレーションが完了した。この結果から、ストロビレーションは一旦開始すると、温度に対して非依存的に進行することが明らかとなった。なお、同じ低温処理群の中で、まだストロビレーションを開始していないポリプについても 25°C 培養をおこなったところ、全てのポリプがストロビレーションを開始し、正常に完了した (N = 13)。これは、飼育実験 A から得られた「ストロビレーションが開始数日前に決定づけられる」という考察を補強する結果である。

瀬戸内海産ミズクラゲの分子系統解析

ミズクラゲ *Aurelia aurita* は世界中に広く分布する単一種と考えられていたが、近年の分子系統解析によって、種レベルで異なる系統群を含んでいることが明らかとなり (Dawson *et al.*, 2005)、世界各地の *Aurelia* 属を対象として、*rDNA* の配列を用いた分子系統解析が進められている (Schroth *et al.*, 2002; Dawson *et al.*,

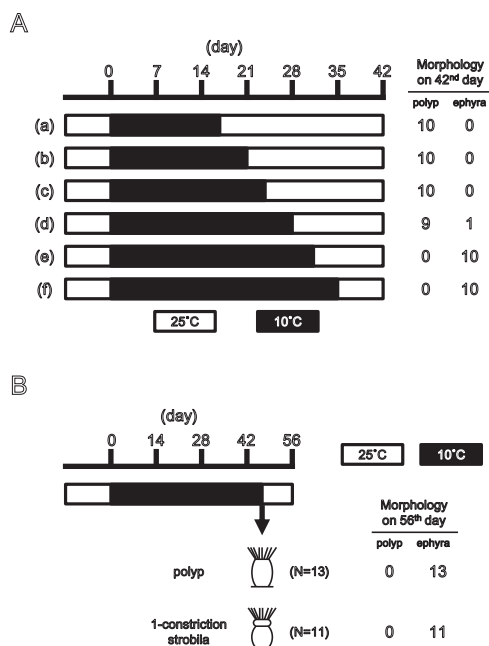


Fig. 3. Time schedules and results of the experiments in which polyps were subjected to short-term low-temperature treatments. (A) Polyps subjected to (a) 17-, (b) 21-, (c) 24-, (d) 28-, (e) 31-, or (f) 35-day low-temperature treatments were cultured at 25 °C. The number of animals that did not start strobilation (polyp) or that completed strobilation (ephyra) among tested polyps (N = 10) is shown on the right. Filled and unfilled bars respectively represent the incubation at 10 °C and 25 °C. (B) Polyps (N = 13) and strobilae with 1 constriction (N = 11) were collected from a dish that had incubated at 10 °C for 46 days, and cultured at 25 °C. The number of animals that did not start strobilation (polyp) or that completed strobilation (ephyra) among tested animals is shown on the right. Filled and unfilled bars respectively represent the incubation at 10 °C and 25 °C.

2005; Fuchs *et al.*, 2014)。そこで、今回確立したクローン系統と *Aurelia* 各種との系統関係を明らかにするために、分子系統解析をおこなった。

KHIA 系統のゲノム DNA を鋳型として PCR をおこない、*ITS-1/5.8S rDNA* をクローニングした。塩基配列分析の結果、431 bp の塩基配列が得られた (accession no.: LC081234)。

KHIA 系統の *ITS-1/5.8S rDNA* の塩基配列と Dawson *et al.* (2005) が報告した *Aurelia* 各種の *ITS-1/5.8S rDNA* の塩基配列を用いて alignment をおこない、これをもとにして分子系統樹を作成した (Fig. 4)。その結果、*KHIA* 系統は *Aurelia* sp. 1 と同じクレードに含まれた。実際、*KHIA* 系統の *ITS-1/5.8S rDNA* の塩基配列は、宮津湾 (日本) およびカリフォルニア州 (米国) で採集された *Aurelia* sp. 1 の配列と、それぞれ 99.1% および 99.4% という高い相同性を示した。*Aurelia* sp. 1 は、世界中に最も広く拡散している系統であり (Dawson *et al.*, 2005)、宮津湾を含めた日本近海に分布するミズクラゲは *Aurelia* sp. 1 と考えられる。瀬戸内海産ミズクラゲ由来の *KHIA* 系統が *Aurelia* sp. 1 に極めて近縁であるという分子系統解析の結果と考え合わせると、瀬戸内海に生息するミズクラゲが *Aurelia* sp. 1 である可能性が高いことが示唆される。

しかしながら、本研究では *ITS-1/5.8S rDNA* の解析結果しか示していないので、確定的な結論を得るためには、他の遺伝子についても分子系統解析をおこない、より詳細に調査を進める必要がある。

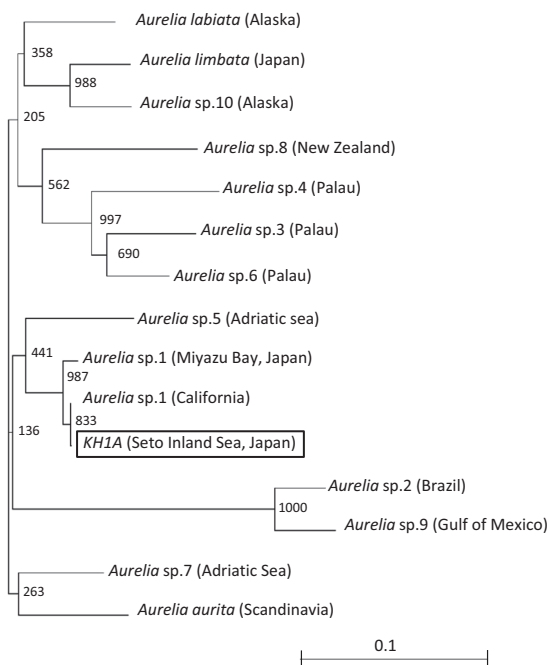


Fig. 4. Phylogenetic tree based on *ITS-1/5.8S rDNA* gene sequence showing relations among *Aurelia* strains. The tree was obtained using the neighbor-joining method (1,000 replicates). The bootstrap values are expressed as the numbers in each branch. Scale bar represents 0.1 substitutions per site. The *KHIA* strain was classified together with strains of *Aurelia* sp. 1 collected at Miyazu Bay (Japan) and California (USA).

総 括

瀬戸内海に生息するミズクラゲより、7株のポリブクローン系統（*KH* 系統）を確立した。本論文では、これらのクローン系統の出自を明記し、それぞれについてストロビレーションに関する性質を示した。また、分子系統学的には *Aurelia* sp. 1 (Dawson *et al.*, 2005) 由来のクローン系統であることが示唆された。現在、筆者らの研究室では、増殖・成長が安定していて、ストロビレーション過程の再現性が高い *KHIA* と *KH3B* を標準系統として研究に使用している。

クローン系統は遺伝的背景が単一の集団であるので、遺伝子の polymorphism が少なく、分子生物学・生化学的研究を進める上で極めて有用である。その反面、クローン系統は集団の中の特定の遺伝型のみを抽出しているため、標準的な遺伝型から逸脱した異端である可能性もあり、クローン系統で得られた知見が集団全体に共通する性質を反映していない危険性もある。このことを念頭に置いて、ある系統で得られた結果が別の系統でも再現するか確認することが重要であると考えられる。

謝 辞

本研究を始めるにあたり、ミズクラゲポリブクの飼育について多くのアドバイスを頂いた広島大学大学院生物圏科学研究科 上真一博士、河原正人博士、高尾真理子氏に深く感謝するとともに厚く御礼申し上げます。

また、ポリブクの飼育や実験には、広島大学大学院生物圏科学研究科附属瀬戸内圏フィ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を使用した。塩基配列分析には、広島大学自然科学研究

支援開発センター 遺伝子実験部門の Applied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザを使用した。この場を借りて御礼申し上げる。

本研究は、平成20年度広島大学後援会・教育研究一般助成および平成20年度広島大学大学院生物圏科学研究科・研究科長裁量経費研究助成の支援のもとで実施された。

引用文献

- Berking, S., Czech, N., Gerharz, M., Herrmann, K., Hoffmann, U., Raifer, H., Sekul, G., Siefker, B., Sommerei, A., Vedder, F. 2005. A newly discovered oxidant defence system and its involvement in the development of *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria): reactive oxygen species and elemental iodine control medusa formation. *The International Journal of Developmental Biology* **49**: 969-976.
- Dawson, M., Gupta, A., England, M. 2005. Coupled biophysical global ocean model and molecular genetic analysis identify multiple introductions of cryptogenic species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 11968-11973.
- Fuchs, B., Wang, W., Graspentner, S., Li, Y., Insua, S., Herbst, EM., Dirksen, P., Böhm, AM., Hemmrich, G., Sommer, F., Domazet-Lošo, T., Klostermeier, UC., Anton-Erxleben, F., Rosenstiel, P., Bosch, TC., Khalturin, K. 2014. Regulation of Polyp-to-Jellyfish Transition in *Aurelia aurita*. *Current Biology* **24**: 263-273.
- Helm, RR., Tiozzo, S., Lilley, MK., Lombard, F., Dunn, CW. 2015. Comparative muscle development of scyphozoan jellyfish with simple and complex life cycles. *EvoDevo* **6**: 11
- 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. *The International Journal of Developmental Biology* **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*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **76**: 1397-1400.
- Schroth, W., Jarms, G., Streit, B., Schierwater, B. 2002. Speciation and phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly, *Aurelia* sp. *BMC Evolutionary Biology* **2**: 1.
- 高村克美. 2014. 発生研究のモデル動物としてのミズクラゲの有用性. 福山大学生命工学部年報 **13**: 37-53.
- 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**: 9-19

Characterization of Clonal Polyp Strains Established from *Aurelia* sp. Inhabiting the Seto Inland Sea of Japan

Natsumi TSUJITA, Rie KURODA, Izumi OKUMURA, Sayaka YOSHIOKA, Minami NAKATANI,
Hiroki KOYAMA and Hisato KUNIYOSHI

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8528, Japan*

Abstract In the life cycle of *Aurelia* sp., the transition from polyp to strobila/ephyra is called “strobilation”. To study the molecular mechanisms of strobilation with molecular biological and biochemical approaches, we established 7 clonal polyp strains from *Aurelia* sp. inhabiting the Seto Inland Sea of Japan. In laboratory condition, the clonal strains started strobilation in 32 - 42 days by a temperature change from 25°C to 10°C, or in 4 - 8 days at 25°C by administration of indomethacin (25 µM). The experiments of short-term low-temperature treatments revealed that strobilation proceeded to the end independently of temperature after strobilation had been initiated. Further, molecular phylogenetic analysis suggested that the clonal strains could be *Aurelia* sp. 1 (Dawson *et al.*, 2005).

keywords: *Aurelia* sp., clonal strain, molecular phylogenetic analysis, polyp, strobilation, the Seto Inland Sea