

氏 名 角谷 絵里

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1843 号

学位授与の日付 平成28年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Analyses of regulative strategies of moulting, reproduction
and embryo development by ecdysteroids in a crustacean
Daphnia magna

論文審査委員 主 査 教授 高田 慎治
教授 井口 泰泉
准教授 田中 実
准教授 前川 清人 富山大学大学院

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Arthropods are the most diverse animal group on the planet. Their ability to dynamically adjust to varying environments support their successful resource exploitation and reproduction. Ecdysteroids (ecdysone and 20-hydroxyecdysone, 20E) are known moulting hormones in arthropods. Insect species exploit ecdysteroids for various functions such as the regulation of reproduction and homeostasis. However, the functions and biosynthetic pathway(s) of ecdysteroids remain largely unclear in non-decapod crustaceans. A freshwater microcrustacean, *Daphnia magna*, commonly known as the water flea, exhibits characteristic features suitable for the analysis of ecdysteroids' roles in reproduction, development and the life cycle. Daphnids reproduce parthenogenetically by producing diploid females without fertilization. The reproductive cycle spans approximately three days and is precisely synchronized with the moulting cycle. Cuticle deposition and egg yolk production also occur simultaneously. Because of this association of the reproductive cycle with moulting, and the fact that ecdysteroids are known as moulting hormones in other arthropods, I hypothesized that ecdysteroids regulate the coordinated reproduction and moulting in *D. magna*. The management of embryogenesis is also critical for successful reproduction. A previous study indicated the importance of ecdysteroids in *D. magna* embryogenesis, and the fluctuation of ecdysteroids titre in decapods and daphnia species. Nonetheless, no molecular studies have yet been performed to interactively analyze the ecdysteroids titre during moults, reproduction and development.

In chapter I, I analyzed the roles of ecdysteroids in adult *D. magna*. I cloned genes known for the synthesis or inactivation of ecdysteroids (*neverland: nvd* and *shade: shd*, and *Cyp18a1*, respectively) that are conserved in other arthropods. A phylogenetic analysis revealed that these genes were also evolutionary conserved in *D. magna*, suggesting that these genes appeared in arthropods before insects radiated. The phylogenetic analysis further showed that a daphnids-specific gene duplication occurred generating *nvd1* and *nvd2*. To understand the contribution of these genes to fluctuations in the ecdysteroids titre, I measured the titre by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and analyzed spatio-temporal gene expression during the reproductive cycle. The ecdysteroids titre showed a peak in the mid-reproductive cycle, and the fluctuation pattern counteracted the gene expression pattern of *Cyp18a1*. Thus, *Cyp18a1* might be responsible for lowering the ecdysteroids titre to a basal level through inactivation. Finally, I conducted a 20E treatment to analyze a role of the ecdysteroids titre during moulting and reproduction. The 20E treatment, when the ecdysteroids titre was at the basal level, inhibited moults and/or oviposition and the meiotic process in the eggs inside the ovary. This suggests that the ecdysteroids titre

was kept low for reproduction and moulting to progress.

In chapter II, I examined the activities of ecdysteroids during *D. magna* embryogenesis. First, tissue-specific gene expression analyses of *nvd1* and *nvd2* were performed in the embryo and adult to estimate possible ecdysteroids synthetic tissue, and to compare differential expression patterns between the embryo and adult, and the two paralogues. The *nvd* enzyme acts in the ecdysteroidogenic pathway, and is expressed exclusively in the ecdysteroidogenic gland in insects. However, ecdysteroidogenic tissue is unknown in non-decapod crustaceans. The results showed that gut cells expressed *nvd1* in both the embryo and adult whereas the germ cells in the adult expressed *nvd2*. These results suggest that the gut cells were possible sites for ecdysteroidogenesis. The expression analyses of *nvd* indicated that the embryo exploited *nvd1* but not *nvd2*. To understand the roles of *nvd1* in developing embryos, *nvd1* was knocked down by RNAi. The *nvd1*-dsRNA-injected embryos could not moult, and eventually died. In addition, the ecdysteroids titre measured in the *nvd1*-dsRNA-injected embryos seemed to decrease. These results suggest that *nvd1* was critical for embryo development. The ecdysteroids titre was also measured in series during embryogenesis, and showed two different peaks. The titre declined after each peak, which coincided with the embryonic moults. Therefore, the ecdysteroids titre peaked precisely when there was a high demand of ecdysteroids for cuticle deposition, then decreased, signaling the onset of moulting. The expression of *nvd* and *shd* began to increase before the ecdysteroids titre peaked, which indicates that the embryos likely started *de novo* synthesis of ecdysteroids at this time.

In conclusion, the ecdysteroids in *D. magna* play crucial roles in the adult and embryo. The ecdysteroids titre was controlled to designated levels at specific timings to regulate the onset of moults, reproduction and embryo development. Ecdysteroidogenesis likely takes place in the gut cells of the embryo and adult. These results provide valuable insight in our understanding of the endocrine system underlying unique and fascinating features of the daphnid lifecycle.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

淡水生甲殻類に属するミジンコ類は、動物プランクトンとして湖沼生態系の食物連鎖を支える重要な役割を果たしている。ミジンコは通常、単為生殖によって約80時間毎に20-30匹ほどの産仔を繰り返す。母親ミジンコは産仔が完了して約15分後に脱皮し、背側にある育房に産卵し、そしてこの卵が約80時間で仔虫となり育房から泳ぎ出ていく。このように、ミジンコの単為生殖周期や胚発生周期は母親の脱皮周期と深く連動している。一般に、甲殻類の脱皮周期は節足動物特異的なステロイドホルモンである脱皮ホルモンによって制御されており、ミジンコ類の脱皮周期制御にも同様のメカニズムの存在が推測されている。しかし、ミジンコにおける脱皮ホルモンの生理機能に関する知見は未だ乏しく、脱皮ホルモンが脱皮周期のみならず単為生殖周期や胚発生周期の制御にも関与しているのかどうかは明らかにされていない。そこで本学位論文では、オオミジンコ (*Daphnia magna*) を用いて、脱皮ホルモン関連遺伝子や生合成器官の探索を通してミジンコの脱皮ホルモン研究の基盤を築き、脱皮・単為生殖・胚発生周期の制御における脱皮ホルモンの多様な生理機能を明らかにすることを目的とした。

出願者はまず初めに昆虫類で報告されている脱皮ホルモン生合成・分解経路遺伝子の中から、生合成の最初の反応に関与する *neverland*、脱皮ホルモンの活性化型フォーム (20E) への変換を担う *shade*、そして分解に関わる *Cyp18a1* をオオミジンコから単離した。そして、アミノ酸配列の分子系統解析やドメイン配列の比較から、これらの遺伝子がオオミジンコでも保存されていることを明らかにした。また、*neverland* に関してはオオミジンコ特異的な遺伝子重複による2つのパラログ (*neverland1*, *neverland2*) を見出した。

続いて、脱皮・生殖周期において、これらの遺伝子の発現は脱皮・生殖周期中に特徴的な発現パターンを示すことを明らかにした。さらにELISA法によって、脱皮・生殖周期中における内在性の脱皮ホルモン濃度の定量に成功し、脱皮ホルモン濃度が脱皮・生殖周期の中期にピークになり、脱皮・産卵時である後期には低くなることを見出した。この内在性脱皮ホルモン濃度のピーク直前に *neverland* と *shade* の遺伝子発現は上昇していた。さらに、脱皮ホルモン濃度は、*Cyp18a1* が低発現の時期にピークに達し、*Cyp18a1* が高発現の時期には低濃度になったことから、*Cyp18a1* が脱皮ホルモン濃度を制御している可能性が示唆された。

次に、脱皮ホルモン濃度の変動が脱皮・産卵に与える影響を明らかにするために、脱皮ホルモン (20E) を内在性脱皮ホルモン濃度のピーク時に暴露し、本来脱皮ホルモン濃度が低くなる脱皮・産卵時にも高濃度になるように維持してオオミジンコへの影響を観察した。その結果、脱皮や産卵をしない表現型を示し、卵巣内にある卵では減数分裂の進行が停止していた。これらの結果から、脱皮ホルモン濃度の減少がオオミジンコの脱皮・生殖周期の進行に必須であることを明らかにした。

続いて、脱皮ホルモンの胚発生周期への関与を調べるために、まず初めにELISA法により胚発生期における経時的な内在性の脱皮ホルモン濃度を調べた。その結果、脱皮ホルモン濃度は胚発生期中に2度のピークを形成した。オオミジンコは胚発生期に3度の脱皮をおこ

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

なうが、内在性脱皮ホルモンのピーク後の濃度が下がる時期と、胚の中期と後期に起こる脱皮時期が一致することを見出した。このことから、成体同様に胚においても脱皮ホルモン濃度の低下が脱皮を誘導していると考えられる。また、*neverland*、*shade*の発現は脱皮ホルモン濃度のピークに先立って上昇しており、これらの発現パターンは脱皮ホルモンの自発的合成の開始を示唆している。さらに、RNA干渉法による*neverland1*ノックダウン個体では脱皮ホルモン濃度が低下し、3回目の脱皮が阻害された。*shade*ノックダウン個体でも同様の脱皮阻害が見られた。これらの結果から、脱皮ホルモンはオオミジンコの胚発生においても重要な生理機能を有しており、*neverland1*が脱皮ホルモン濃度制御を介して胚の脱皮を制御していることが明らかとなった。

オオミジンコの脱皮ホルモン合成器官を明らかにするために、*neverland*の発現解析を行った。*Neverland*は脱皮ホルモン合成経路の最初の段階でコレステロールから7-dCへの変換を担っており、オオミジンコ*neverland*発現組織でコレステロール→7-dC変換が起きていると推測できる。*in situ* ハイブリダイゼーション法によって、オオミジンコ成体・胚ともに、消化管上皮組織で*neverland1*が顕著に発現していることを見出した。この結果は、消化管上皮細胞がオオミジンコの脱皮ホルモン合成器官である可能性を示唆するものである。

本研究は、オオミジンコの脱皮ホルモンが規則的な脱皮・生殖周期と胚発生周期を制御していることを明らかにし、さらに脱皮ホルモン合成器官の推定などミジンコの内分泌系の基盤整備にも大きく貢献するものであり、その成果の一部はすでに国際誌に発表されていることから、博士論文として十分値するものであると、審査員全員一致で結論した。