

氏名	竹本基樹	学籍番号	250036
----	------	------	--------

主テーマ指導教員	佐藤賢二	副テーマ指導教員	本多卓也
主指導教員	小長谷明彦	副指導教員	佐藤賢二

<研究テーマ>

アカテガニ幼生の孵化に関与する遺伝子群の探索と機能特定

<研究の目的>

アカテガニ *Sesarma haematocheir* は、河口付近の土手や草むらに棲息するイワガニ科の十脚目である。成体は陸棲だが、幼生期(孵化時からメガロパ幼生まで)は海中生活を営む。胚は、受精後約 1 ヶ月間雌親に抱卵されゾエア幼生となり、大潮の夜、満潮に同期して孵化する。雌 1 匹当たり約 5 万の胚が、極めて短時間で水中に放出されるが、この高い同調性を示す孵化のタイミングは、雌親の潮汐時計により制御されることが実験で確かめられている。しかし、胚を孵化過程に誘導するメカニズム、および潮汐に同期し孵化時刻を制御するメカニズムは分かっていない。

本研究は、分子生物学的手法を用いた孵化メカニズムの解明を目的とする。孵化過程の分子機構の解明は、体内時計(潮汐時計)のメカニズムを知るうえで非常に重要な研究であり、幼生の孵化調節以外にも未知の部分が多い体内時計の分子機構解明に役立つ研究である。

<研究の背景・特色>

本研究の背景

周期的に活性が変動する生理現象は、多くの生物種で知られている。陸上生物には、概日リズムと呼ばれる日周変化に対する内在的な生理的リズムが見られる。また、潮間帯や河口域に棲息する生物は、潮の干満により行動および生態に大きな影響を受けることが知られている。これら、海産生物に見られる潮汐リズムは、潮汐の影響を受ける条件下で獲得したものだと考えられる。

モデル生物を対象とした概日リズムの研究は多数行われており、一定の成果をあげているが、潮汐リズムの研究は進展していない。そこで、本研究では潮汐リズム研究の対象として、アカテガニを試料として用いることにした。近年の分子生物学的手法、およびバイオインフォマティクスツールの進歩により、非モデル生物における研究の利便性の向上を背景とし、本研究を計画した。

本研究の特色

1)潮汐時計の分子機構の解明

潮汐時計の局在を調べるため組織切除実験をした結果、眼柄神経節終髄下部を焼灼すると、孵化が異常になった。この研究より、幼生の孵化は抱卵雌の眼柄に局在する潮汐時計により制御され、何らかの因子が腹部の胚に作用し孵化過程が誘導されることが判明した。本研究では、潮汐時計による潮汐リズム発現の分子機構を解明するため、孵化過程に誘導された胚と対照群の胚を用い、孵化時に発現する遺伝子群の探索を計画している。

2)バイオインフォマティクスツールを用いた遺伝子の機能解析

アカテガニをはじめとした非モデル生物では、cDNA の塩基配列は大半が不明である。しかし、実験で得たクローンのシーケンスデータを、既知配列のデータベースと比較することで、有意な類似性を示す配列の発見が容易となった。それにより、未知の新規遺伝子の機能予測が可能となり、分子生物学的研究に必須のツールとなった。また、配列の相同性より分子進化の探索への応用も可能になると考えられる。本研究では、実験で得られたシーケンスデータの解析にバイオインフォマティクスツールの利用を計画している。

<研究計画・方法>

本研究は、以下の四項目を並行して行うこととする。

1)幼生の孵化に関する生態の研究

従前の研究より、アカテガニ胚は孵化の約 49.6 時間(二晩)前に雌親より切り離すと、発生ステージに係わらず孵化できないことから、雌親の制御を受けることが分かった。また、抱卵雌の卵塊交換移植実験により、胚を孵化過程に誘導する因子の存在が強く示唆された。そこで、本研究では雌親の組織をホモジェナイズし、胚が雌親より受ける影響を確かめる実験、および各種薬剤を用いたスクリーニング実験を計画している。

2)孵化過程に誘導された胚に発現する遺伝子群に関する研究

孵化の分子機構を解明するため、孵化過程に特異的に発現している遺伝子群の探索を計画している。薬品を用いて人為的に孵化過程に誘導した胚の誘導直後、過程中盤、孵化直後の胚、および同一雌親より採取した対照群を試料とし、subtractive hybridization(差し引き法)を用い発現遺伝子を調べる。対照群との間で発現に差異が見られる mRNA は、孵化に関与する可能性が高く、分子機構の解明に重要であると考え。孵化への関与が疑われる遺伝子をクローン化し、シーケンスデータの採取を試みる。

3)孵化関与物質 OHSS に関する研究

幼生の孵化時に採取される機能未知タンパク質 OHSS(Ovigerous-Hair Stripping Substance)と孵化の関連を調べるため、分子生物学的研究を計画している。OHSS は、一般に胚脱落作用が示唆されているが、アタッチメントシステムの溶解のみならず、孵化の調節や脱皮への関与も指摘されている。本研究では、幼生孵化時に hatch water を採取し、FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography)、および HPLC(High-performance Liquid Chromatography)によりペプチド分画、単利した OHSS からプライマーを設計し、cDNA のシーケンスデータの採取を試みる予定である。生化学的研究と分子生物学的研究の結果を比較し、OHSS の産生部位および産生時期、機能の特定を予定している。

4)バイオインフォマティクスツールを用いた遺伝子の機能解析

研究を進めるにあたり、各所にバイオインフォマティクスツールの利用を計画している。ゲル式およびキャピラリー式 DNA シーケンサースキャニングソフト、プライマー設計支援ソフト、プロンプデザイン支援ソフト、配列相同性検索ソフト等の利用を計画している。特にシーケンスデータの相同性解析は、機能未知遺伝子を探索する本研究にとって重要なツールである。孵化過程の胚を用いた subtractive hybridization 実験、および OHSS のシーケンスで得られる配列は、アカテガニにおいては新規であっても、近縁他種と配列比較を行うことで、機能予測が可能となるからである。実験で得られた知見を基にバイオインフォマティクスツールを用い、解析結果を実験にフィードバックすることで、省コストで高効率に研究が進められると考えている。

<現在までに単位取得した専門教科>

概論：3 科目、方法論：2 科目、専門：2 科目

K215 イノベーション概論 B K216 知能科学概論 B K217 物理科学概論 A
K212 知識ベース方法論 A K213 システム科学方法論
K412 知識社会論 K418 知識表現論