

腸管形態形成における内腔液の流体力学的役割の解明

Hydrodynamic roles of fluid flow of gastrovascular cavity in the primary polyp formation of a jellyfish *Clytia hemisphaerica*

兵庫県立大学
研究期間
滞在研究機関

鹿谷 有由希
2024年6月1日～2025年3月20日
UMR7009, The Villefranche-sur-mer Developmental Biology
Laboratory (LBDV), Institute de la Mer de Villefranche
(IMEV), Sorbonne University/CNRS
Villefranche-sur-mer, 06230, France

共同研究者等
区分

Dr. Tsuyoshi Momose
個人 B

The hydrozoan jellyfish *Clytia hemisphaerica* has a life cycle consisting of a planula stage, a polyp stage and a jellyfish stage. During metamorphosis, the settled planula elongates the tubular stalk from the basal blob, which has a lumen space with a growing fluid volume. We addressed how this process is mechanically controlled. Live imaging revealed that the epithelial muscle of the settled planula (basal blob) exhibits rhythmic contractions, and the polyp stalk extension was coupled to the contraction cycle. This suggests that the contraction plays a mechanical role in stalk elongation. To test this, we blocked the epithelial muscle contraction at the basal blob with an L-type Ca^{2+} channel blocker, nifedipine, which entirely arrested the stalk elongation. By deep-learning image segmentation of time-lapse film, we demonstrated that the epithelial muscle contraction is initially asynchronous and progressively becomes synchronized at the basal blob before stalk protrusion. With nifedipine treatment, the contraction pattern was disturbed and became asynchronous, consistent with the stalk elongation defect, while contraction still occurred. This shows that synchronous muscle contraction plays a key role in stalk elongation. We propose that lumen hydraulic pressure oscillation is a mechanical force necessary for stalk elongation.

研究目的

腸管における蠕動運動は消化吸収に欠かせないものであるが、近年、摂食を必要としない胚発生中の腸管においても蠕動運動が見られることが明らかとなった。加えて蠕動運動の機械的な刺激が腸管自身の形態形成に重要な役割を果たす可能性が示唆され、腸管形態形成の物理学的理解が強く求められている。しかし従来の脊椎動物をモデルとした解析では、その腸管構造の複雑さのために、腸管形態形成に関わる物理的な要素を解析することは困難である。そこで本研究では、刺胞動物の一種であるクラゲ *Clytia hemisphaerica* (和名マルバウミコップ、以下 *Clytia*) のポリプに着目した。

Clytia は、プラヌラ幼生、ポリプ、クラゲの時期をもち、プラヌラ幼生から変態した直後のポリプはプライマリポリプと呼ばれる。プライマリポリプは、固着したプラヌラ幼生の中心から、内部に腸管として機能する胃水管腔を持つポリプ茎を伸ばすことで形成される。ポリプ茎は、上皮と筋肉の機能を兼ね備えた表皮および腸管上皮の2つの上皮層と、そこに散在する少数の神経細胞から成り、脊椎動物と共通の構成要素でありながら非常に簡潔な構造である。

予備実験から、ポリプ茎の伸長中にはポリプ茎の根元で周期的な収縮が見られ(約4分)、根元が収縮するタイミングとポリプ茎が伸長するタイミングが一致していることが見出された。加えて、ポリプ茎

の内腔を満たす管内腔液が、筋収縮と同調してポリプ茎の先端方向および根元方向へと周期的に流向が入れ替わる様子も観察された。このことから、ポリプ茎根元の筋収縮と、それに伴う管内腔液の移動がポリプの形態形成の物理的な原動力として関与しているとの仮説が示唆された。そこで *Clytia* プライマリポリプ形成過程を新たなモデルとし、腸管形態形成の物理学的理解、特に管内腔液の流体力学的な作用の解明を目指した。

研究経過

1. ライブイメージング手法の確立

プライマリポリプ形成過程では、扁平な形状のプラヌラ幼生から細長い筒状のポリプ茎が伸長し、その形態が3次元的に大きく変化する。そこで、プライマリポリプ形成過程における *Clytia* の細胞レベルでの動態解析を目指して、*Clytia* を底面、側面、上面から観察するためのライブイメージング手法を確立した。特に底面、側面からのライブイメージングでは、プラヌラ幼生からプライマリポリプが形成されるまでの48時間のイメージングを高倍率で捉えることに成功した。

2. プライマリポリプ形成における筋収縮パターンの解析

管内腔液の往復がポリプ茎の伸長に果たす役割を調べるために、管内腔液の移動の駆動力となっていると考えられる筋収縮を、L型カルシウムチャネル阻害剤であるニフェジピンによって抑制することを試みた。その結果、ポリプ茎の伸長前からニフェジピン処理を行った場合ポリプ茎はほとんど伸長せず、ポリプ茎の伸長開始後にニフェジピン処理を行った場合ポリプ茎の伸長は停止した。また、海水からニフェジピンを取り除くとポリプ茎の伸長が再開し、最終的にプライマリポリプを形成することができたため、ニフェジピンが *Clytia* に対して深刻なダメージを与えている可能性は低いと考えられる。

次に、遊泳性のプラヌラ幼生が定着しポリプ茎が伸びていく過程の *Clytia* の動きを、本研究にて確立したライブイメージング手法を用いて底面および側面から観察した。すると、*Clytia* はポリプ茎の伸長前から活発な筋収縮を示すことが明らかとなった。そこでライブイメージングによって観察された筋収縮のパターンを定量化するため、DeepLabCutを用い

た深層学習によるタイムラプス画像の解析を試みた。その結果、ポリプ茎が伸長する前には部分的で散発的な収縮が見られる一方で、ポリプ茎が伸長する時期には幼生全体が同調して収縮することが明らかとなった。加えて、筋収縮が同調するのと同時に一定の収縮周期(約4分に1回)を示すようになり、これはポリプ茎の伸長中に見られる管内腔液の往復周期と一致している。また、ニフェジピン処理個体でも、ポリプ茎の伸長前は通常個体と同じように部分的で散発的な筋収縮が見られたが、通常であればポリプ茎が伸長し始める時期になっても筋収縮が同調せず、散発的な収縮が続くことが明らかとなった。

3. カルシウムイメージング手法の確立

細胞内のカルシウムは、筋収縮やシグナル伝達に重要な働きをもつ。そこで *Clytia* プライマリポリプ形成過程において、細胞内カルシウム濃度の変化を可視化することを試みた。カルシウムインジケータの候補として、カルシウムと結合することで緑色の蛍光を発するタンパク質 GCaMP、GCaMPの改変型であり黄色の蛍光を発する YCaMP、赤色の蛍光を発する RCaMPの3種類のmRNAを用意し、それぞれを *Clytia* 卵へマイクロインジェクションすることによって発現させた。その結果、GCaMPで最も強い蛍光が得られたが、*Clytia* は内在性 GFPを発現しているため、両者のシグナルを区別する必要が生じた。そこで、*Clytia* 内在性 GFPに対する siRNA と GCaMP mRNAを同時に卵へ注入することで、プライマリポリプ形成におけるカルシウムイメージングに成功した。その結果、ポリプ茎の伸長前、つまり筋収縮がランダムな時期では、幼生全体で散発的なカルシウムシグナルが検出された。一方で、ポリプ茎が伸長する時期になると、幼生の中央部分、つまりポリプ茎が形成される部分で周期的なカルシウムシグナルが検出され(約4分に1回)、これは筋収縮の周期と一致した。また、伸長中のポリプ茎では、ポリプ茎先端で管内腔液の往復周期と同調したカルシウムシグナルが観察された。

考察

ニフェジピンを用いたプライマリポリプ形成過程における筋収縮の阻害実験において、定着したプラヌラ幼生で見られる筋収縮のパターンが乱れ、同時にポリプ茎の伸長が大幅に阻害されたことから、ポ

リプ茎の伸長には、幼生全体で筋収縮が同調することが重要であることが示唆された。

プライマリポリプ形成初期では、将来的に腸管上皮となる内胚葉はまだ上皮構造を形成していないため、流動的な状態であると考えられる。したがって、内胚葉および内腔内の液体は筋収縮によって移動するものの、筋収縮が同調していない場合、幼生の一部に圧力が集中する可能性は低いと考えられる。一方で筋収縮が同調すると、内胚葉および内腔内の液体が幼生の中央部分へと押し出され、局所的に圧力が高まることが予想される。この局所的な圧力の高まりが、ポリプ茎の伸長の物理的な原動力となると推察される。

さらに、筋収縮と同じ周期でカルシウムシグナル

が観察されたことから、幼生全体での同調した筋収縮による局所的な圧力の高まりが、機械刺激チャンネルなどを介することでカルシウムシグナルに変換され、ポリプ茎の伸長を促進しているのではないかと考えられる。

研究の発表

口頭発表

1. Shikaya Y. and Momose T. Synchronization of rhythmic contraction in primary polyps of *Clytia hemisphaerica* (クラゲ *Clytia hemisphaerica* のプライマリポリプ形成における筋収縮の同調) 第 47 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表) 博多、2024 年 11 月