

タマクラゲの GFP 様物質：発現の時期・部位の調査と教材化に向けた取り組み

*出口 竜作・**小野寺麻由・***並河 洋

Green fluorescent protein (GFP)-like substance in the hydrozoan jellyfish *Cytaeis uchidae*:
Examination of timing and localization of its expression and utilization for biological education

DEGUCHI Ryusaku, ONODERA Mayu and NAMIKAWA Hiroshi

要 旨

刺胞動物門ヒドロ虫綱に属すタマクラゲ (*Cytaeis uchidae*) は、生体内に緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein; GFP) 様の物質を持ち、青色光を照射すると緑色の蛍光を発する。本研究では、タマクラゲの GFP 様物質がどのような時期に、どのような部位で発現しているのかを詳しく調査するとともに、GFP を題材とした授業の立案および実践を行った。まず、共焦点レーザー顕微鏡を用い、タマクラゲのクラゲにおける GFP 様物質の局在について調べたところ、緑色蛍光は主に傘の外側と内側の上皮、および生殖巣の上皮に見られることが分かった。次に、ライフサイクルの各段階における緑色蛍光の有無と分布について調べたところ、配偶子 (卵・精子)、受精卵、初期胚、プラヌラ幼生には、蛍光の発現が認められなかったのに対し、プラヌラ幼生が変態して生じるポリプには、主に体壁の上皮に蛍光が見られた。また、クラゲ芽 (後にクラゲとして遊離) も蛍光を持っていたが、ポリプどうしを繋ぐストロン (走根) は持たなかった。古川黎明高等学校の生徒を対象に行った授業実践では、蛍光や GFP について基礎的な説明を行った後、青色の発光ダイオード (LED) を用いた光源を自作してもらい、それをクラゲやポリプに照射して GFP 様物質の観察をしてもらった。事後に行ったアンケート調査からは、この授業が生徒の興味・関心を引きつけ、生徒にとって理解しやすい内容であったことが判断できた。

Key words : 刺胞動物 Cnidarian
ヒドロ虫 Hydrozoan
クラゲ Medusa
ポリプ Polyp
共焦点レーザー顕微鏡 Confocal laser scanning microscope
教材 Educational material
発光ダイオード Light-emitting diode (LED)

1. はじめに

タマクラゲ (*Cytaeis uchidae*) は、刺胞動物門ヒドロ虫綱花クラゲ目に属している (並河・楚山, 2000)。フィールドにおけるタマクラゲは、ムシロガイ

(*Niotha livescens*) という巻貝の殻上に特異的にポリプの群体を形成する (Hirai and Kakinuma, 1973; 図 1)。ポリプの群体には夏期に多数のクラゲ芽が形成され、クラゲとして群体から遊離していく。遊離したクラゲは雌雄異体であり、2~3 mm 程度までしか成長しな

* 宮城教育大学理科教育講座
** 宮城教育大学大学院理科教育専修
*** 国立科学博物館動物研究部

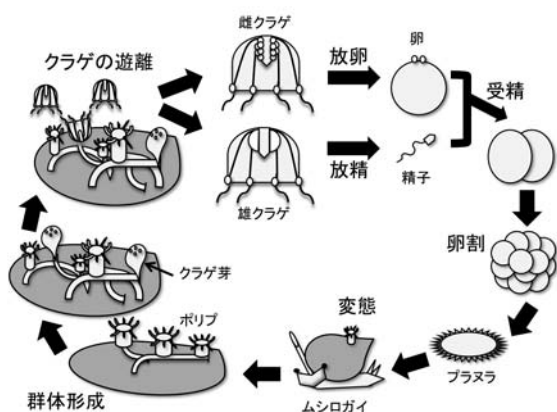


図1 タマクラゲのライフサイクル

光刺激により雌雄のクラゲから放出された卵と精子は海水中で受精する。受精卵は卵割を繰り返し、24時間後までにはプラナラと呼ばれる幼生になる。プラナラ幼生は、宿貝であるムシロガイの殻上で変態してポリプとなる。ポリプは餌を捕食して、ポリプとストロン（走根）から成る群体を広げていく。やがて、ストロン上にクラゲ芽が形成され、クラゲとして遊離する。遊離したクラゲは、餌を捕食して成長し、再び卵や精子を放出するようになり、ライフサイクルが一巡する。

いが、光周期に応じて毎日放卵・放精を繰り返す。受精卵は卵割を経てプラナラ幼生へと発生し、プラナラ幼生はムシロガイの殻上で変態してポリプとなる。このようなライフサイクルが研究室内で制御でき、1年を通してクラゲが得られる点、光刺激によって卵・精子の放出が確実に誘起できる点、卵が透明で、発生過程の観察に適している点などから、タマクラゲは研究分野（Takeda et al., 2006; 出口ら, 2011）のみならず、教育分野（出口ら, 2002）でも活用されている。

緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein; GFP）は、ヒドロ虫綱軟クラゲ目に属すオワンクラゲ（*Aequorea victoria*）で発見され、単離された（Shimomura et al., 1962; 下村, 1998）。オワンクラゲGFPは238個のアミノ酸から成る分子量2万7千のタンパク質であり、65～67番目の3つのアミノ酸（セリン・チロシン・グリシン）が環状化し、さらに酸化されることによって発色団を形成する（宮脇, 2000）。野生型のGFPは、長波長紫外線や青色光で励起され、緑色の蛍光を発する。現在では、野生型GFPの改変や他の刺胞動物からのクローニングなどにより、様々な波長特性を持った蛍光タンパク質の利用が可能になっている（宮脇, 2010）。GFPや他の類似蛍光タンパク質は、それらの遺伝子を導入するだけで（他に特別な発光素や補助因子などを必要とせずに）、様々な生物の細

胞に発現させることができ、生きたまま（固定せずに）蛍光として観察できるという極めて好都合な特徴を示す。これにより、GFPや他の蛍光タンパク質は、医療を含む最先端の研究現場において、今やなくてはならないツールになっている（石浦・生化学若い研究者の会, 2009）。なお、オワンクラゲからGFPを単離した下村博士、他の生物の細胞へGFPを導入することに成功したチャルフィー博士、GFPの発色団形成の機構を解明し、GFP遺伝子を改変して種々の蛍光タンパク質を作り出したチェン博士の3名は、2008年にノーベル化学賞を受賞している。

GFPは、研究分野だけでなく、教育分野でも盛んに活用され始めている（石澤・知識, 2009など）。GFP遺伝子を導入し、形質転換させた大腸菌のコロニーに、紫外線ライトやブラックライトを照射して緑色蛍光を観察することで、GFPのタンパク質としての発現を確認するという内容が主に実施されており、そのためのキットもいくつかの試薬会社から販売されている。一方で、GFPの由来となったクラゲ類に着目した授業はほとんど行われておらず、オワンクラゲだけでなくヒドロ虫綱に属す多くの種のクラゲがGFP様の物質を発現している点（Kubota, 2010）、GFPやGFP様物質の生理的意義が実は不明である点（石浦・生化学若い研究者の会, 2009）などは、あまり知られていない。

本研究では、タマクラゲの持つGFP様物質に着目し、その発現の時期や場所について詳しく解析した。また、このような内在性のGFP様物質を実際に観察する授業を立案し、高校生を対象に実施した。

2. 材料と方法

タマクラゲについては、研究室で長年にわたって維持している2つの系統（メス：♀17、オス：♂A7）を用いた。研究室でのライフサイクルの制御方法や受精・発生の誘起方法は、基本的に過去の報告（出口ら, 2002）に従った。また、授業実践の際に使用したフサウミコップ（*Clytia languida*）のクラゲは、宮城県塩竈市浦野々島で採集した群体から遊離させたものであり、アルテミアのノープリウス幼生を餌に飼育し、成熟させてから用いた。

GFP様物質の観察・撮影のためには、クラゲやポリプなどをカバーガラス上に置き、透過照明の付いた実

体顕微鏡 (SMZ745, Nikon) の下で方向を整えた後、もう 1 枚のカバーガラスを適当な厚さの両面テープで貼り合わせてチャンバーを作製した。このようなチャンバーを、倒立型蛍光顕微鏡 (Ti, Nikon) をベースとした共焦点レーザー顕微鏡システム (C1, Nikon) のステージに載せ、青色 (488 nm) のレーザー光を照射し、透過光像 (白黒で表示) と蛍光像 (緑色で表示) を同時取得した。

授業実践の際には、正立型蛍光顕微鏡 (80i, Nikon) でクラゲやポリプを観察し、透過光像・蛍光像を、デジタルカメラ (DS-5M-L1, Nikon) を介してモニターに映し出し、参加者全員が同時に観察できるようにした。また、青色 (LP-50SB3, LED パラダイス) と緑色 (LP-5HGW4, LED パラダイス) の発光ダイオード (LED) をスイッチ・カバー付きの電池ケース (KIT-UM32SK, オーム電機) に接続し、単三電池 2 本を入れたものを光源として、クラゲやポリプに照射した。

3. GFP 様物質の発現の時期と場所

タマクラゲの成熟したクラゲは、口柄の周囲に生殖巣 (卵巣または精巣) を発達させている (図 2 A, 2 B)。このようなクラゲを通常の蛍光顕微鏡で青色光

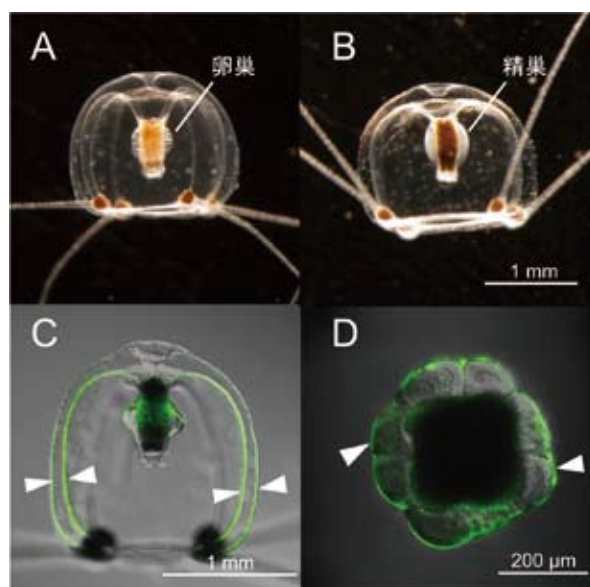


図 2 クラゲにおける GFP 様物質の局在

メスクラゲ (A) とオスクラゲ (B) の口柄の周囲には、卵巣と精巣が、それぞれ発達する。共焦点レーザー顕微鏡でメスクラゲを観察すると、GFP 様物質の緑色蛍光は、傘の内側と外側の上皮 (C, 矢じり) や卵巣の上皮 (D, 矢じり) に認められる。A~C はクラゲを横から、D は口柄の部分を垂直方向から撮影した図である。

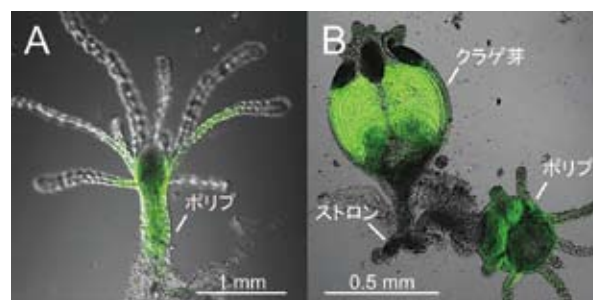


図 3 ポリプ、クラゲ芽、ストロンにおける GFP 様物質の局在
共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、ポリプ (A・B) の体壁の上皮や触手の根元などに緑色蛍光が見られる。また、クラゲ芽 (B) にも緑色蛍光が見られるが、ストロン (B) には見られない。

を照射して観察すると、傘や口柄が緑色蛍光を発することが分かる。今回、共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP 様物質の局在について詳しく解析したところ、傘の緑色蛍光は外側と内側の上皮の両方に存在し、その間の間充ゲルの部分には見られないこと、外側よりも内側のほうがより強い蛍光を示すことが分かった (図 2 C)。また、卵巣の上皮にも強い蛍光が見られたが、その内側に存在する卵母細胞には蛍光は認められなかった (図 2 D)。精巣においても、やはり上皮に強い蛍光が観察された (data not shown)。

次に、ライフサイクルの各段階における GFP 様物質の有無と分布について調べた。光刺激によって放出された卵や精子、受精卵、受精後の初期胚、プラヌラ幼生では緑色蛍光は観察できなかったが、プラヌラ幼生が変態して生じた初期ポリプにはわずかながら蛍光が認められた (data not shown)。成長したポリプでは、主に体壁の外胚葉上皮や触手の根元に緑色蛍光が見られたが、ポリプどうしを繋ぐストロン (走根) には蛍光は認められなかった (図 3 A, 3 B)。また、ストロンから生じたクラゲ芽は、後に遊離してクラゲとなるが、この段階ですでに傘の内側に相当する位置に強い蛍光を持っていた (図 3 B)。

4. 授業実践

授業に先立って、生物顕微鏡や双眼実体顕微鏡上で青色光を照射することにより、蛍光顕微鏡などを用いずにタマクラゲの GFP 様物質を観察することができないかを検討した。光源には LED を使用することにしたが、その利点としては、安価であること、コンパクトであること、高輝度であること、様々な波長 (青

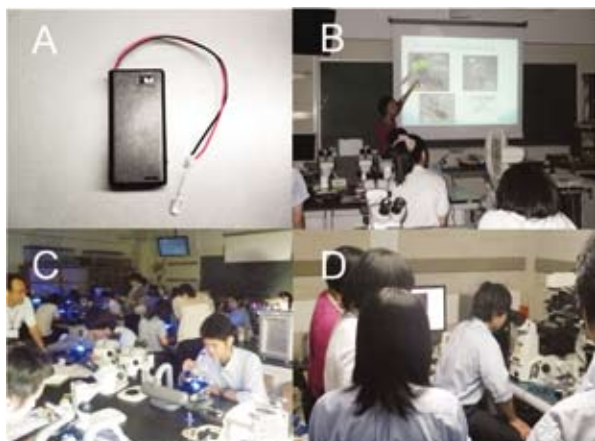


図4 授業実践の様子

2012年8月3日と4日に、古川黎明高等学校の生徒17名を対象に、クラゲの発生とGFPの蛍光をテーマにした授業を行った。写真は、作製したLED光源 (A)、GFPについてスライドで説明している場面 (B)、青色LEDの照射によってクラゲの蛍光を観察している場面 (C)、共焦点レーザー顕微鏡の仕組みを説明している場面 (D) を示している。

色を含む) のものを選べることの4つが挙げられる。検討を重ねた結果、単三電池2本を入れたスイッチ・カバー付き電池ケースにLEDを繋いだだけの簡易なLED光源 (図4A) を作製し、クラゲやポリプに対し横方向など適当な角度から青色光を照射することにより、青色の視野の中にGFP様物質の緑色蛍光を観察できることが分かった (図5参照)。

続いて、クラゲの発生過程の観察とGFPの学習を組み合わせた授業を立案し、2012年8月3日と4日の2日間にわたって、今年度からスーパーサイエンスハイスクール (SSH) の指定を受けている宮城県古川黎明高等学校の1年生と2年生を対象に実施した。初日は、タマクラゲの放卵・放精、受精・卵割などの発生過程を生物顕微鏡で観察した後、ムシロガイの殻上やプラスチック容器上に形成されたポリプの群体を双眼実体顕微鏡で観察し、ライフサイクルについて理解してもらった。2日目の最初には、オワンクラゲGFPの発見に至った経緯、蛍光が生じる仕組み、蛍光顕微鏡の仕組みなどをスライドを用いて解説した (図4B)。その後、蛍光顕微鏡に接続されたモニター上でタマクラゲのクラゲを観察し、紫外線や緑色光を照射した時には蛍光を生じないが、青色光を照射すると緑色蛍光を発することを参加者全員に確認してもらった。次に、簡易LED光源を生徒が自作し、生物顕微鏡や双眼実体顕微鏡上で青色光を照射して、タマクラゲやフサウミコップのクラゲ (図5A, 5B)、タマクラゲのポリプ

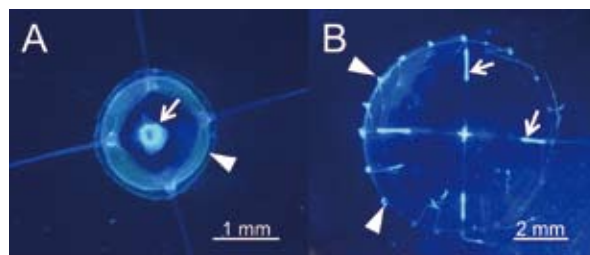


図5 LED照射によるクラゲのGFP様物質の観察

タマクラゲのクラゲ (A) に青色LEDを照射すると、傘 (矢じり) や口柄の周囲の生殖巣 (矢印) がうすうすと緑色に光るのに対し、フサウミコップのクラゲ (B) では、傘の縁にある多数の眼点 (矢じり) や放射管上の4つの生殖巣 (矢印) が蛍光を発する。

などの観察を行った (図4C)。青色LEDを緑色LEDに置きかえて、クラゲやポリプに緑色光を照射した時の様子を観察している生徒もいた。また、LEDによる観察と並行する形で、班ごとに別室に移動してもらい、共焦点レーザー顕微鏡による蛍光観察を行って最先端の機器の「威力」について感じてもらった (図4D)。

授業の後に行ったアンケート調査からは、クラゲの蛍光を初めて見た生徒が多いこと、分かりやすく、興味を引きつけられる内容であったことなどがうかがえた (図6)。また、アンケートの自由記述欄には、「光るクラゲを見るのを楽しみにしていたので、緑色の光を見た時には感動した」「クラゲや卵・精子など、教科書に載っているものが間近で見られて良かった」「青色、紫外線など種によって反応する色や場所が違っていて関心が深まった」「設備が整った大学だからこそ体験できることができて楽しかった」などの感想のほか、「タマクラゲは何のために光るのか?」「人間にGFPを入れると蛍光人間のように光るようになるのか?」「青い光で緑色に光ったが、実際はどのような時に光るのか?」といった疑問も書かれてあった。参加してくれたのが元々生物分野の学習に対する意識が高い生徒であった点を考慮しても、今回の授業は参加者の興味・関心や学習意欲を高めるような内容であったのではないかと感じている。

5. おわりに

オワンクラゲでは、GFPはイクオリンというタンパク質と共局在している (宮脇, 2000など)。イクオリンは、本来、 Ca^{2+} 依存的に青色光を発する発光タンパク質であるが、イクオリンとGFPとの間で蛍光のエネルギー

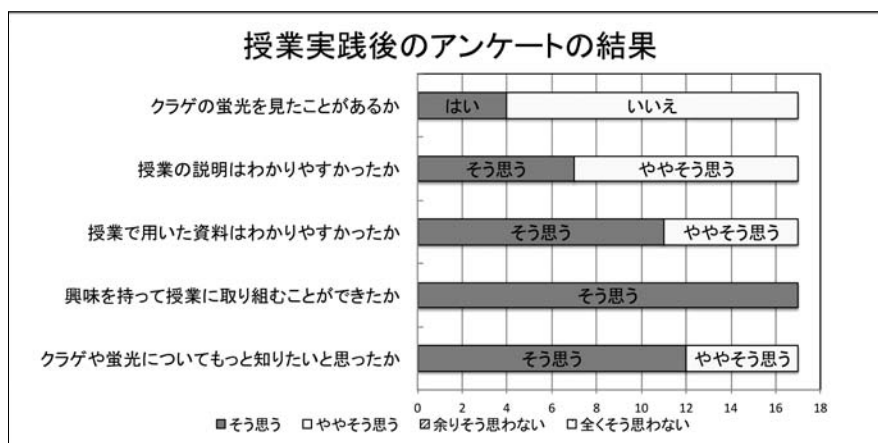


図6 アンケート調査の集計結果

古川黎明高等学校の生徒17名を対象に行った授業実践の終了後にアンケートを行い、その結果をグラフで示した。

ギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET) が起こるため、イクオリンが発光すると GFP の蛍光である緑色が発せられる。すなわち、オワンクラゲは暗闇で自ら緑色に発光することになる。生物が発光することの生理的意義としては、求愛、被食の回避、捕食などが挙げられているが (石浦・生化学若い研究者の会, 2009)、オワンクラゲについては、何のために発光するのか、何のために青色光をわざわざ緑色に変換しているのかなど全く分かっていない。

タマクラゲをはじめ、発光タンパク質とは共局在しない形で GFP 様物質を発現している刺胞動物は多い。本研究において、タマクラゲはライフサイクルの各段階や部位ごとに GFP 様物質の発現をダイナミックに変化させていることが分かった。また、同じクラゲの段階でも、種ごとに GFP 様物質の発現部位は全く異なっており、タマクラゲのように傘には蛍光を持つが、触手の付け根には持たないものから、フサウミコップのように傘には蛍光を持たないが、触手の付け根 (眼点が存在) には持つものなど様々である (図5; Kubota, 2010)。サンゴにおいては、特に浅海に生息する種に蛍光タンパク質を持つものが多く、このタンパク質はサンゴと共生している褐虫藻を強い日光から保護していると考えられている (Salih et al., 2000; 宮脇, 2002)。同様に、GFP にも発現部位を強い日光などから保護するという役割があるのかもしれないが、現段階では直接的証拠が得られているわけではない。GFP の生理的意義の解明というのは、実はかなり困難なテーマなのかもしれない。

今回の授業実践は、SSH の取り組みの一環として大学で行ったが、クラゲの GFP に着目した観察・実験は、探求活動の一つのテーマとして、学校現場でも実施可能であると考えている。本年度 (平成24年度) より先行実施されている新しい高等学校学習指導要領では、科目名とともに生物分野の学習内容の枠組みが大きく変更され、従来は『生物II』で扱われていたセントラルドグマ (DNA の情報が RNA に転写され、タンパク質へと翻訳される一連の流れ) が生物分野の最初の履修科目である『生物基礎』で扱われるようになった。このことは、以前よりも多くの高校生がタンパク質合成のしくみを学習するようになったことを意味する。上述した GFP 遺伝子を大腸菌に導入する実験などは、今後より多くの高等学校で実施されるようになり、大腸菌から発せられる「ノーベル化学賞の光」「最先端の研究に利用されている光」に引きつけられる生徒も多くなるのではないかとと思われる。一方で、この実験で見ることでできる光は、あくまでも「人工的な光」であり、クラゲが持っている「本物の光」ではない。生物の観察・実験を行っているという意識を持っていない生徒も出てくるのではないかと考えられる。『生物基礎』に関しては、「本物」に触れる機会の少ない内容であるという声が学校現場からは聞こえてくる。神秘的で美しい実物のクラゲを見て、未知なる GFP の生理的機能に思いを馳せることで、生物や生物現象に対する興味・関心が高まり、結果として生物分野の各科目や課題研究に対する学習意欲が高まる可能性もあるのではないだろうか。

蛍光顕微鏡、ましてや共焦点レーザー顕微鏡は、非常に高価な機器であり、高等学校への導入は一般には困難である。本研究で行ったように、光源にLEDを使用することで、より安価に、クラゲが持つ蛍光に迫れるのではないかと考えている。また、近年の生物分野の研究においては、蛍光観察が多用されており、指示薬やトレーサーなど様々な用途、様々な波長特性を持った蛍光試薬が開発され、販売されている。LEDにも様々な波長のものがあるため、これらをうまく組み合わせることによって、これまで困難と思われてきた蛍光を利用した観察・実験が実現する可能性もある。今後、色フィルターなどを用いて視野に入ってくる励起光をカットするなど、蛍光をより見やすくする方法を検討していく必要がある。

タマクラゲのGFP様物質は、長波長紫外線では励起されないことなどから、オワンクラゲGFPとは若干性質が異なっていると考えられる。今後、遺伝子をクローニングすることにより、オワンクラゲGFPとの配列の違いなどについて明らかにしていきたい。また、タマクラゲなど、GFP様物質を持ったクラゲを多くの学校に提供する方法を構築し、クラゲの蛍光を扱った授業を学校現場に導入する道を開きたいと考えている。

謝 辞

宮城県塩竈市にある東北区水産研究所からは、濾過海水を定期的に譲っていただいた。また、宮城県古川黎明高等学校には、SSH事業の中でタマクラゲのGFP様物質を題材とした授業を实践する機会をいただいた。深く感謝申し上げます。本研究は、国立科学博物館館長支援経費（学校教育における海産無脊椎動物の理解促進のための学習教材プログラム開発）の助成を受けて行われたものである。

文 献

- Hirai, H. and Kakinuma, Y. (1973). Differentiation and symbiosis in two hydrozoans. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.* 20, 257-273.
- Kubota, S. (2010). Various distribution patterns of green fluorescence in small hydromedusae. *Kuroshio Biosphere* 6, 11-14.
- Salih, A., Larkum, A., Cox, G., Kühl, M. and Hoegh-Guldberg, O. (2000). Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature* 408, 850-853.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, 223-239.
- Takeda, N., Kyozuka, K. and Deguchi, R. (2006). Increase in intracellular cAMP is a prerequisite signal for initiation of physiological oocyte meiotic maturation in the hydrozoan *Cyrtia uchidae*. *Dev. Biol.* 298, 248-258.
- 石浦章一・生化学若い研究者の会 (2009). 光るクラゲがノーベル賞をとった理由 (わけ). 日本評論社.
- 石澤公明・知識麻友子 (2009). 組換え GFP (緑色蛍光タンパク質) を用いたタンパク質の学習プログラムの開発. 宮城教育大学紀要 44, 39-52.
- 下村脩 (1998). イクオリンと GFP の発見. *バイオサイエンス最前線* 22, 2-12.
- 出口竜作・竹田典代・伊藤順子 (2002). シャーレの中の小さなクラゲ—タマクラゲの採集・飼育の方法と生物教育への活用の可能性—. *生物教育* 43, 16-24.
- 出口竜作・荒川美緒・金洋太・小野寺麻由・石森彩希・並河洋 (2011). クラゲ卵における極体形成および精子付着・融合過程のビデオ撮影. 宮城教育大学紀要 46, 97-106.
- 並河洋・楚山勇 (2000). クラゲガイドブック. TBS プリタニカ.
- 宮脇敦史 (2000). GFP とバイオイメージング—蛍光タンパク質の発現と検出の基本から生体機能の可視化まで—. 羊土社.
- 宮脇敦史 (2002). 刺胞動物と蛍光タンパク質. *みどりいし* 13, 1-4.
- 宮脇敦史 (2010). 蛍光イメージング革命—生命の可視化技術を知る・操る・創る—. 秀潤社.

(平成24年9月28日受理)