

研究課題別評価

1. 研究課題名 : プラナリアにおける生殖戦略転換機構

2. 研究者氏名 : 小林一也

3. 研究の狙い :

ほとんどの動物群で無性生殖と有性生殖とを転換する種が知られているにもかかわらずこの機構に関する研究がほとんど行われておらず、未だに転換にかかわる化学物質は見つかっていない。扁形動物プラナリアのいくつかの種では、自然界で水温の変化が大きな要因となって生殖様式を転換するが、研究室内でも無性個体は有性個体を餌として摂食すると有性化することが古くから知られている。この実験的有性化は有性個体に有性生殖誘導因子が含まれていることを意味している。私はさきがけ研究採用以前にリュウキュウナミウズムシ *Dugesia ryukyuensis* OH株(無性生殖で増殖したクローン集団)に有性生殖のみを行うイズミオオウズムシ *Bdellocephala brunnea* を餌として与えることによる有性化系を確立していた。

本研究は第1に生殖戦略転換現象の一般的理解を深めることを目的に有性生殖誘導因子の同定を目指し、生殖戦略転換機構における因子の生物学的意義を検討した()。

有性化系は無性個体では全く観察されない複雑な生殖器官が全能性幹細胞から分化してくるといふ発生生物学的に興味深い現象を含んでおり、因子の投与によって発現する遺伝子群は生殖器官分化に関与している可能性が高いといえる。そこで第2の目的として有性化特異的遺伝子の探索を行った()。また、全能性幹細胞から生殖器官へ分化の実験的解析を実現させるために全能性幹細胞の培養・ラベル化を試み、移植実験の条件検討を行った()。

プラナリアでは有性生殖しか行わない種はいわゆる二倍体種がほとんどであるが、生殖戦略を転換するタイプの種では倍数体・異数体がしばしば観察され、生殖戦略転換現象との関連を想像させる。予備的調査からOH株の無性個体は三倍体種であることが示唆されており、有性化に伴う核型解析を行った()。

4. 研究結果 :

- 1有性化不可逆状態と有性生殖誘導因子の関係

有性化過程(形態的变化をもとに5段階のステージにわけてある)には有性化回避不能点と名付けた特異点がステージ2と3の間にある。この点を超えるまではイズミオオウズムシの投与をやめると無性状態に戻ってしまう。一方、有性化回避不能点を越えると、もはやその投与は必要なく、いわば自律的に有性化が進行するようになる。有性化個体中の有性生殖誘導因子の存在を調査したところ、頭部を除く領域に多く含まれていることがわかった。この結果をふまえて有性化個体を人為的に切断したところ、唯一、頭部断片由来の再生個体だけが再生して無性個体になった。この無性化頭部再生体は因子をあたえると再び有性化された。これらの結果は、有性化の不可逆状態がリュウキュウナミウズムシ自身で産生しはじめた有性生殖誘導因子に依存していることを意味している。一方、無性生殖の能力はステージ4まで維持されていることから、この因子の発現の下流機構によって無性生殖は停止させられると考えられる。以上のことから、たとえイズミオオウズムシのような有性生殖しか行わない非転換種に含まれている化学物質がこの実験的有性化の引き金ではあっても、自己生産されるようになった有性生殖誘導因子そのものがプラナリアにおける無性生殖から有性生殖への転換という現象の鍵物質である断言できる。

- 2有性生殖誘導因子の精製

- 1の結果から、材料として有性化個体を用いて有性生殖誘導因子を単離することにした。有性化個体をPBS中でホモジナイズし、それに16,000 x g, 30 minの遠心処理を施した。その上清画分に含まれている不溶性の浮遊物を除去するために、0.2 μm フィルターを通し、さらに超遠心100,000 x g, 1 hrを行った。この超遠心上清をSep-pak (C18)の逆相カラムで分画した。有性化活性は、10%メタノール溶出画分に認められることから有性生殖誘導因子は若干の疎水的性質をもつことがわかった。このM 1画分を陽性対照として以下の実験を行った。

a. 限外濾過 (5kDa)を行ったところ、有性生殖誘導因子の活性は5kDa以下の画分に認められた。

b. パパイン (タンパク質分解酵素)処理を行ったところ、有性生殖誘導因子の活性は全く低下しないことがわかった。

c. 透析 (500Da)を行ったところ、透析内液 (500Da?5kDa)画分には有性生殖誘導因子の十分な活性は認められないことから因子は500Da以下の低分子であることが示唆された。

d. 中性条件下で陰イオン交換樹脂に吸着することから酸性物質であることがわかった。

現在、M 1画分に対して Smart System (Pharmacia Biotech)を用いて、逆相クロマトグラフィー (C18)および陰イオン交換逆相クロマトグラフィーを行っており、精製は最終段階にある。

有性化特異的遺伝子群の探索

有性化現象では無性個体では全く観察されない複雑な生殖器官が全能性幹細胞から分化してくる。それゆえに有性生殖誘導因子の投与によって発現する遺伝子群は生殖器官分化に関与している可能性が高いといえる。Differential Screening法によって、プラナリアに特有な分泌腺である卵黄腺に発現する遺伝子 Dryg (ホモロジーはない)を単離した。Drygは組織学的にその原基さえ認められないステージ3から、いくつかの全能性幹細胞に発現しはじめることから、卵黄腺の分化決定に重要な役割をしていることが考えられる。

本研究ではまた、有性化という点で劇的な変化が起こっているステージ3以降に注目し、有性化の不可逆状態を遺伝子発現のレベルで解析し、プラナリア有性化現象の一般的理解を目指した。Drygはステージ3以降のマーカーとしても利用できるが、さらにステージングに利用できる遺伝子を必要とした。そこで、無性個体と有性化個体を用いてDifferential Displayを行ったところ、ステージ4以降に発現するクローンが2つ (D80とD92)、ステージ5以降に発現するクローンが4つ (D38、D72、D95、D104)得られた。ホモロジーに関しては、D80がアミノ酸レベルでTubulin alpha chain, testis-specific (Rainbow trout)と56%、D104がRibose-phosphate pyrophosphokinase (Human)と60%の相同性があった。それ以外に関しては相同性のある遺伝子はなかった。結果的にDrygも含めてこれらの遺伝子を組み合わせることで、不可逆状態を形態だけでなくステージングすることが可能になった。

最近、Differential Display法によって有性化をかけた4日目に発現しはじめる遺伝子E4-8を単離した。この遺伝子の発現のレベルは有性化4日目に比べて弱い但有性化個体でも発現している。E4-8の塩基配列は1080塩基対であり、そのアミノ酸配列にはHSP20のモチーフが存在している。この遺伝子の発現は-2で述べた有性化活性を示す画分と一致している。HSP20はいわゆる分子シャペロンとして機能するHSP70や90といったLarge HSPと区別され、Small HSPと呼ばれその機能もほとんど明らかにされていない。興味深いことにショウジョウバエではEcdysoneの影響で直接的にHSP20の発現が生殖巣や神経系に誘導され、胚発生時に重要な役割を示すという報告がある。Ecdysoneは昆虫の脱皮ホルモンとして有名だが、化学物質としてはEcdysteroidに分類される。Ecdysteroidは動物のみならず植物にも広く含まれているもので、動物では腔腸動物や線形動物といった下等動物でもその存在の報告がある。-1で述べた有性生

殖誘導因子の特徴は Ecdysteroid の可能性を否定するものではない。有性生殖誘導因子の候補として哺乳類の性ステロイドホルモンの調査は過去にも行われているが（すべてネガティブ）、Ecdysteroid の場合はない。今後、有性生殖誘導因子の候補として考慮してゆく。

生殖始原細胞の実験的解析

全能性幹細胞の培養に関しては過去の知見をこえることは結果的にできなかった。GFP導入全能性幹細胞の作製も試みたがこちらとも思うように進展しなかった。今のところベクターのプロモーターとしてハウスキープ遺伝子 EF2 の上流解析を行っている。一方、生殖始原細胞の実験的解析を行うにあたって、全能性幹細胞を多く含む集団の移植系を確立した。X線を照射し即死はしないもののいずれ死滅する運命となった無性個体に、X線照射を施していない無性個体由来のネオプラスト分画を移植することによって引き続き生存可能にするもので、約 50% の確率で X線照射無性個体を生存可能にできた。

有性化に伴う核学的研究

OH株の無性個体は異質三倍体種であることを示した。有性化後、雄性・雌性生殖系列において同質二倍体性の減数分裂像が確認された。この結果は、配偶子が同質の一倍体であることを示唆しているが、有性化個体同士の交配によって得られるF1世代には異質二倍体種と異質三倍体種が存在することがわかった。F1世代には有性仔虫と無性仔虫とが 1 : 2 の割合いで出現する（で述べる）が、染色体数やその形態という点では生殖戦略とは関係がなかった。

有性化個体と有性個体に関する研究（採用時には提出しなかったテーマ）

有性化個体同士の交配で、無性仔虫と有性仔虫が 2 : 1 の割合いで出現することに気づき、有性生殖誘導因子の外部投与を行わなくとも生殖器官を発達するこの有性仔虫に注目した。この有性仔虫は、本来は無性仔虫であったものが、親由来の有性生殖誘導因子にさらされて有性化したものなのか、それとも、生まれながらに有性系統として決定されているのか？という疑問が生じた。この生まれながらの有性個体は通常形態的に有性化個体と区別することができない。しかし、有性生殖誘導因子を投与しつづけると、有性化個体では過剰対の卵巣が誘導されてくるのに対し有性個体では決して起こらないことがわかった。ここでは評価のしやすい（カウントしやすい）卵巣で表現しているが、有性化個体では卵巣以外の生殖器官も過剰に発達してくる。これらの結果は、有性化個体と有性個体の間に、有性生殖誘導因子に対する応答や生殖器官の分化・発達に関して異なる制御が行われていることを示唆している。さらに、-1で説明したような切断による有性化個体の無性化実験が有性個体には適応しないことが分かった。有性化個体の有性化状態は有性生殖誘導因子によって維持されているため、この因子の含有量の乏しい頭部再生体は無性化した。ところが、有性個体の場合、たとえ頭部再生体であっても無性化しないのである。有性個体における有性生殖誘導因子の局在は有性化個体の場合と変わらないことから、有性個体の全能性幹細胞は、外部投与の有性生殖誘導因子の刺激を受けなくとも自立的に因子を発現し有性状態を再現したと考えられる。

リュウキュウナミウズムシのようなプラナリアでは、すべての個体が無性生殖と有性生殖を転換しているという印象を与えるが、実際のところ、同一種内でも、水温の変化に応じて生殖様式を季節的に転換する個体が確かに存在している一方で、無性生殖のみ、あるいは有性生殖のみで繁殖する個体も存在することが古くから観察されている。もちろん実験的根拠はないが、無性生殖のみを行う個体は無性系統、そして有性生殖のみを行う個体は有性系統とよばれ、彼らの生殖様式は遺伝的に限定されていると信じられている。それに対して、季節的に転換する個体は生理学

的系統と呼ばれている。私は、「有性化個体と有性個体に関する研究」の結果から、これらの系統に関して次のようなモデルをたてることができた。

無性系統 :有性生殖誘導因子の発現に至るカスケードのどこかに異常があり「オフ」の状態、結果的に生殖細胞や生殖器官が形成されない。本研究の実験動物OH株がこの系統に該当する。OH株では、外部からの有性生殖誘導因子の刺激によって、その異常を回避して自己の因子を発現しはじめることが可能になったと説明できる。

有性系統 :有性生殖誘導因子の発現が常に「オン」になる。

生理学的系統 :有性生殖誘導因子の発現が温度変化などで「スイッチ」する。

5. 自己評価： ～ 、 は上記の研究テーマをあらわし、カッコ内の数字は独断で5段階評価したものである。

有性生殖誘導因子の同定には至らなかったが、実現可能な段階にまで発展することができた。

(4)

有性化現象を評価する遺伝子群を得ることができた。とくに Dryg は幹細胞から卵黄腺への分化初期に責任がある遺伝子であり、プラナリアの分化全能性細胞の能力を探究するという点で興味深い。そして当初の目的でもあった有性生殖誘導因子の投与直後に発現する遺伝子も単離することができた。卵巣 (卵子) 精巣 (精子) といった動物に共通する生殖器官 (生殖細胞) にかかわる重要な遺伝子が単離できなかったことは残念である。研究上のポリシーもあって、いわゆる「ホモログトリ」を行わなかったが、やはり馴染みの薄い生殖戦略転換機構を一般化するためにも、また単離した新規遺伝子に意味付けするためにもそれは必要であったと反省している。(3)

最も進展しなかったテーマである。戦略としては問題ないがラベル化にはもう少し時間がかかりそう。しかし、移植系や交配系はもはや確立しておりGFP導入全能性幹細胞の作製は現実的な段階にはいっていると判断している。(1)

プラナリアにおいて生殖戦略を転換するタイプの種では倍数体・異数体がしばしば観察されることから生殖戦略転換現象との関連を想像し調査をはじめたが、結果的に染色体数やその核型という点で生殖戦略とは関係がなかった。しかし、異質三倍体種であるOH株の生殖系列は同質二倍体性の減数分裂を示す事実や有性化個体同士の交配によって得られるF1世代には異質二倍体種と異質三倍体種が存在するものの、その生殖系列でも同質二倍体性の減数分裂像が観察されたことから、転換種では同質二倍体細胞が生殖細胞として維持され、次世代において倍数・異質化した細胞が体細胞となるという生殖生物学的に興味深いモデルがたてられた。(2)

観察上信じられてきたプラナリアの系統が実験的に証明できた初めての例である。見かけ上、区別のできない有性化個体と有性個体との本質的な差は有性生殖誘導因子の発現の制御という点で説明可能であり、彼等を比較することで将来的に無性生殖とは？有性生殖とは？という問題、そしてその転換機構が解明されていくと考えている。採用時には提出しなかったテーマであるが将来性ありとの独断で研究を行った。(3)

6. 研究総括の見解：

生物が無性生殖から有性生殖に進化した仕組みはまったく不明である。本研究では、両方の生殖をおこなうプラナリアを用いて、無性生殖体を有性生殖体に変える因子を発見し、物質の同

定寸前まで進展している。有性生殖誘導因子が同定されればビッグ・ニュースとなろう。その意味で、本研究はさきがけ研究 21 の支持があって可能となったもので、高く評価したい。これからの発展を大いに期待する。

7. 主な論文等：

(1) 論文

1. Kobayashi, K. and Hoshi, M. Switching from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyuensis* Change of the fissiparous capacity along with the sexualizing process. *Zool. Sci.* 19, 661-666, 2002
2. Kobayashi, K., Arioka, S., Hase, S. and Hoshi, M. Signification of the sexualizing substance produced by the sexualized planarians. *Zool. Sci.* 19: 667-672, 2002
3. Kobayashi, K., Arioka, and Hoshi, M. Seasonal changes in the sexualization of the planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Zool. Sci.* 19, 1267-1278, 2002
4. Hase, S., Kobayashi, K., Koyanagi, R., Matsumoto, M. and Hoshi, M. Transcriptional pattern of a novel gene, expressing specifically after the point-of-no-return during sexualization, in planaria. *Dev. Gen. Evo.* 212, 585-592, 2003

(2) 総解説

1. Hoshi, M., Kobayashi, K., Arioka, S., Hase, S. and Matsumoto, M. Switch from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Amer. Zool.* in press

(3) 口頭発表

- ・ 小林一也、有岡幸子、星元紀：「3倍体種有性化プラナリアに由来する F1 世代の倍数性について」日本動物学会第 73 回大会 (2002 年 9 月) 金沢
- ・ 宮下仁志、小林一也、松本緑、星元紀：「プラナリア生殖器官における内分泌攪乱物質ビスフェノール A の及ぼす影響」日本動物学会第 73 回大会 (2002 年 9 月) 金沢 小林一也：「プラナリアにおける無性生殖から有性生殖への転換」岡山大学生物学教室セミナー (2002 年 3 月) 岡山
- ・ 小林一也：「プラナリアにおける無性生殖から有性生殖への転換」岡山大学生物学教室セミナー (2002 年 3 月) 岡山
- ・ Hoshi, M., Kobayashi, K., Arioka, S., Hase, S. and Matsumoto, M.: "Switch from asexual to sexual reproduction" Symposium on "The Promise of Integrative Biology", The Annual Meeting of the Society for Integrative and Comparative Biology (Jan. 2002) California
- ・ 小林一也、有岡幸子、星元紀：無性系リュウキュウナミウズムシ (OH 株) の核型解析」日本動物学会第 72 回大会 (2001 年 10 月) 福岡
- ・ 小林一也、有岡幸子、星元紀：「プラナリアにおける有性生殖誘導因子について」日本動物学会第 72 回大会 (2001 年 10 月) 福岡
- ・ Kobayashi, K.: "Transition between asexuals and sexuals in the planarians" IIAS Symposium on "Conflict and Compromise between Parent and Offspring" in Conjunction with The IIAS Project "Friction and Cooperation of Germ with Soma in The Individual" (Sep. 2001) Nara
- ・ Hoshi, M., Kobayashi, K., Arioka, S., Hase, S. and Matsumoto, M.: "Switching from asexuals to sexuals in the planarian *Dugesia ryukyuensis* (Jul. 2001) South Africa
- ・ Kobayashi, K., Arioka, S. and Hoshi, M.: "A sexualizing substance in the planarians" 14th International Congress of Developmental Biology (Jul. 2001) Kyoto
- ・ 小林一也：「プラナリアにおける無性個体の実験的有性化」第 4 回岡崎機構セミナー統合バイオサイエンス (2001 年 2 月) 岡崎

- ・ 小林一也、有岡幸子、星元紀：「プラナリアの有性化個体と有性個体の違い」日本動物学会第71回大会 (2000年9月)東京
 - ・ 小林一也、有岡幸子、星元紀：「プラナリア有性化個体に観察される過剰卵巣の意味」日本動物学会第71回大会 (2000年9月)東京
 - ・ 長谷純崇、松本緑、小林一也、星元紀：「プラナリアの性誘導に伴い発現する遺伝子の解析」第22回日本分子生物学会 (1999年12月)福岡
 - ・ Kobayashi, K. and Hoshi, M.: "Switching from asexual to sexual reproduction in the planaria" Symposium on "Alternative Reproductive Strategies" (Nov. 1999) Hayama
 - ・ Hase, S., Matsumoto, M., Kobayashi, K. and Hoshi, M.: "A gene expressed specifically in sexualized planaria" Symposium on "Alternative Reproductive Strategies" (Nov. 1999) Hayama
- (招待講演 4件)