

プラナリアの生殖様式制御
に関する研究

2012 年度

野殿 英恵

学位論文 博士（理学）

プラナリアの生殖様式制御
に関する研究

2012 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

野殿 英恵

主 論 文 要 旨

報告番号	㊦ 乙 第	号	氏 名	野殿 英恵
主 論 文 題 目 :				
プラナリアの生殖様式制御に関する研究				
(内容の要旨)				
<p>季節や生活環などに応じて無性生殖・有性生殖を転換する生物が広く生物界に存在する。生殖様式転換は両者の利点を状況に応じてともに活かす戦略と考えられている。生殖様式制御は生物の存続、多様性を支える根本原理だが、後生動物でその機構は不明である。本研究では生殖様式規定について調べることを目指した。</p> <p>第1章では、生殖様式制御に関する知見をまとめ、この背景に基づき本研究課題設定に至った概念について述べた。淡水棲プラナリアでは同種内に生殖戦略の異なる3集団(先天的無性 asexual; AS、先天的有性 innate sexual; InS、無性と有性の季節転換)が共存する。さらにAS個体に有性個体を投餌することで人為的有性化(acquired sexual; AqS)個体を得られる。InSは生まれながらに自律的に有性化因子の産生を開始するが、AqSは外因性の刺激により有性化するため、AqSがInS様の「有性状態を自発的に開始する能力」を獲得したか否かは不明であった。InSとAqSの比較により、これまでよくわかっていない生殖様式制御機構に新たな知見を与えることが期待された。</p> <p>そこで第2章では、まず自発的な有性状態開始能力を調べる方法として小片再生実験を考案し、両者を比較した結果、AqSは有性化刺激が無い状態では自発的に有性化を開始する能力は獲得していないと結論付けられ、有性状態の規定に2ステップモデルを提案した。また生殖様式規定の差異がneoblast自体にあると予想されたため、第3章以降でneoblast移植により検討した。第3章ではX線照射したrecipient個体にneoblast画分を移植し、そのレスキュー効果を評価した。さらにマイクロサテライトマーカーやゲノム倍数性を用いて移植細胞の生着・増殖を確認し、個体内でのdonor由来細胞の割合を定量する実験系を構築した。その結果、移植細胞が個体内で増殖し、最終的に致死線量X線照射個体への移植では全身がdonor由来細胞に置換すること、また非致死線量照射の場合はdonorとrecipientの両由来の細胞が安定して共存するキメラとなることを示した。第4章では致死線量を照射したAS recipientに対して、InSおよびAqSのneoblast画分を移植し、neoblastの有性生殖開始能を評価した。InS由来neoblastの移植でのみ有性個体となり、neoblastレベルで生殖様式規定がなされていることが明らかになった。またAqS由来neoblastの移植では有性にならなかったことから、人為的有性化で細胞レベルの先天的生殖様式規定は変化していないとわかった。第5章ではASとInSのキメラ個体を作製した結果、キメラ個体もほぼ全てが有性個体となり、AS由来細胞存在下でもInS由来neoblastは有性状態を開始できることが明らかとなった。さらにキメラ個体では卵巣が肥大し、過剰数形成された。これはInSでは見られず、内因性の有性化因子に対する卵巣形態制御の応答性がInSとASでは異なることが示唆された。</p> <p>第6章では以上の研究を総括し、プラナリアの生殖様式制御について細胞レベルおよび個体レベルから論じた。</p>				

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental Science and Technology	Student Identification Number 80845146	SURNAME, First name NODONO, Hanae
Title Study on the mechanisms underlying the switching of reproductive strategies in planarian		
Abstract <p> Most species switch their reproductive mode from asexual to sexual, and vice-versa. The switching is likely an effective strategy to achieve both advantages in response to varying circumstances. Though the mechanism underlying reproductive strategy regulation is a fundamental principle underpinning the continuation, evolution, and diversity of organisms, it is not understood in metazoans. This study aims to investigate the reproductive mode regulation. </p> <p> In Chapter 1, background knowledge from previous study was summarized. On this basis I described a concept of this research purpose. Planarians are comprised of populations with different reproductive strategies within a species: exclusively innately asexual (AS), exclusively innately sexual (InS), and seasonally switching. Moreover, AS worms can be experimentally sexualized by feeding them with sexual worms; we termed the resulting animals “acquired sexual” (AqS) worms. In contrast, InS worms initiate the sexual state spontaneously. It is unknown whether AqS worms acquire endogenous sexualizing capability like InS worms or not. Comparison between InS and AqS worms are expected to provide important clues to the poorly understood mechanism underlying the reproductive mode regulation. </p> <p> In Chapter 2, we compared endogenous sexualizing activity between InS and AqS worms by small fragment regeneration assay. The result indicated that AqS worms do not acquire the autonomous sexualizing capability. I proposed a 2-step model of sexual state regulation and neoblast-autonomous sexual mode determination. To examine these hypotheses, I performed neoblast transplantation in the following chapters. </p> <p> In Chapter 3, neoblast fractions were transplanted into X-ray-irradiated recipients. The rescue effect was evaluated. Furthermore, I traced donor-derived cells in the transplant by using microsatellite marker and genome ploidy. The temporal changes in the ratio were quantified, revealing that transplanted cells engrafted into lethally irradiated recipient and ultimately replaced all recipient cells. By contrast, transplantation into non-lethally irradiated recipients showed stable chimerism between donor and recipient. </p> <p> In Chapter 4, neoblasts obtained from InS and AqS donors were characterized by transplantation into lethally irradiated AS recipients. The recipients of InS worm neoblasts, but not those of AqS worms, became sexual, clearly showing that there is a neoblast-autonomous determination of reproductive strategy in planarians. The neoblasts from AqS donors did not show autonomous sexualization, showing that experimental sexualization does not change the stem cell level determination of innate reproductive mode. </p> <p> In Chapter 5, chimeric planarians composed of AS- and InS-derived cells were generated. The chimera became sexual, revealing that InS neoblasts can initiate the sexual state even under conditions of coexistence with AS neoblasts. Furthermore, induced ovarian morphology between the chimera and the entirely donor-derived transplant was apparently different, suggesting that responsibility to sexualizing substances differs between InS and AS worms with respect to the regulation of ovary number and size. </p> <p> On the basis of these findings and other preliminary data, in Chapter 6 I discussed the planarian reproductive mode regulation in both stem cell and individual level. </p>		

目次

略語表	v
第1章 序論	1
第2章 小片再生実験による InS 個体と AqS 個体の有性状態開始能の比較	
2.1 緒言	12
2.2 材料および方法	
2.2.1 実験動物	16
2.2.2 小片再生実験	16
2.3 結果	18
2.4 考察	
2.4.1 3断片再生実験と小片再生実験の比較	21
2.4.2 有性状態の2段階制御モデル	22
2.5 結言	25
第3章 幹細胞移植実験系の構築	
3.1 緒言	26
3.2 材料および方法	
3.2.1 実験動物	28

3.2.2	neoblast 画分移植の概要	28
3.2.3	recipient への X 線照射	30
3.2.4	移植 neoblast 画分の調製	30
3.2.5	neoblast 画分の移植	31
3.2.6	移植画分の neoblast 含有率の算出	33
3.2.7	マイクロサテライトマーカーによる donor 率の算出 (<i>msl</i> 解析)	33
3.2.8	DNA 含量の測定による donor 率の算出	35
3.3	結果	
3.3.1	移植細胞数の計数	36
3.3.2	移植画分のメッシュ濾過と切断再生による neoblast 濃縮効果	38
3.3.3	移植後の生存率と X 線照射量の関係	40
3.3.4	移植後の表皮損傷と X 線照射量の関係	42
3.3.5	マイクロサテライトマーカー <i>msl</i> による donor 率の算出	46
3.3.6	移植後個体内の donor 由来細胞の割合と X 線照射量の関係	49
3.3.7	ゲノム倍数性による移植後個体内の donor 率の算出	53
3.4	考察	
3.4.1	生存率、表皮損傷を用いた移植の救助効果の検証	54
3.4.2	移植細胞識別マーカーについて	54
3.4.3	移植後個体内での donor 率の変化	55
3.5	結言	56

第4章	幹細胞移植実験による InS 個体と AqS 個体の有性状態開始能の比較	
4.1	緒言	57
4.2	材料および方法	
4.2.1	実験動物	57
4.2.2	neoblast 画分の移植	57
4.2.3	移植後個体内の donor 率の測定	58
4.2.4	固定切片の組織観察	58
4.2.5	移植後個体の F1 個体の観察	58
4.3	結果	
4.3.1	致死線量照射 AS recipient への InS および AqS donor 由来 neoblast 画分の移植結果	59
4.3.2	移植後個体の全身より抽出したサンプルでの donor 率算出	63
4.3.3	ゲノム倍数性をマーカーとした移植後完全置換の証明	65
4.3.4	InS donor 移植後個体の組織観察	67
4.3.5	InS donor 移植後個体の交配実験	69
4.3.6	InS donor 移植後個体の小片再生実験	69
4.4	考察	72
4.5	結言	73
第5章	キメラ個体作製による InS 個体と AS 個体の卵巣形態制御の比較	
5.1	緒言	74
5.2	材料および方法	

5.2.1	実験動物	74
5.2.2	neoblast 画分の移植	75
5.2.3	移植後個体内の donor 率の測定	75
5.2.4	固定切片の組織観察	75
5.3	結果	
5.3.1	AS 個体由来細胞と InS 個体由来細胞のキメラ個体の生殖様式	76
5.3.2	AS 個体由来細胞と InS 個体由来細胞のキメラ個体の生殖器官 の組織観察	79
5.3.3	ゲノム倍数性をマーカーとした移植後キメラ化の証明	81
5.3.4	最終到達 donor 率と卵巣形態の関係	83
5.4	考察	
5.4.1	InS 個体由来細胞と AS 個体由来細胞のキメラ個体の生殖様式	89
5.4.2	InS 個体由来細胞と AS 個体由来細胞のキメラ個体の卵巣形態	89
5.5	結言	90
第6章	結論	92
	参考文献	95
	謝辞	102

略語表

AqS	acquired sexual
AS	asexual
BSA	bovine serum albumin
DNA	deoxyribonucleic acid
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
HE	hematoxylin and eosin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IgG	immunoglobulin G
InS	innate sexual
LSC	laser scanning cytometer
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RNase	ribonuclease

溶液組成

5/8 Holtfreter 氏液： 37 mM NaCl, 0.42 mM KCl, 0.57 mM CaCl₂, 1.5 mM

NaHCO₃, 20 mM HEPES, pH 7.4

PBS： 137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄

TPBS： PBS with 0.1% Triton X-100

第1章 序論

生殖とは生物が次世代をつくり出すことを意味し、その過程に「性」、つまり遺伝情報の混ぜ合わせを伴うか否かによって、無性生殖と有性生殖とに大別することができる。無性生殖は減数分裂と異系配偶子融合を伴わない生殖様式であり、生物界に広く存在している (Fig. 1-1。Bell 1982; Pearse et al. 1989)。しかしながら、ヒルガタワムシのように無性生殖のみのケースは極めて稀であり (Welch and Meselson 2000)、一般的には無性生殖をする生物の多くが一生のうちで、あるいは生活環のうちで無性・有性を転換する。各々の生殖様式には生殖コストと遺伝的多様性の面で相異なる利点があり、状況に応じて有利な方を用いると考えられている。つまり生殖様式転換は両者の利点を状況に応じて活かそうとする効率的な戦略と捉えることができる。遺伝情報を次世代に伝えることは種の存続に直結するため、生殖の成否は全ての生物にとって最も重要な問題である。そのため、生殖様式を選択／転換は生物の存続、進化、多様性を支える根本原理である。

生殖様式転換現象について既知のものを以下に挙げる。有性生殖の誘導現象はボルボックスで初めて報告された (Darden 1966)。その現象の分子実体として、*Volvox carteri* の無性生殖から有性生殖への転換刺激が 32 kDa の糖タンパク質である性誘導フェロモンであることが同定された (Mages et al. 1988; Starr and Jaenicke 1974; Tschochner et al. 1987)。また単細胞真核生物である分裂酵母は、外界の栄養条件によって体細胞分裂による栄養増殖（無性生殖）と、減数分裂

を経た胞子形成（有性生殖）を切り換えるが、減数分裂開始に *mei2* 遺伝子が関与することが明らかとなっている（Harigaya et al. 2006; Harigaya and Yamamoto 2007; Yamamoto 2010）。またアブラムシは春と秋の夜が短い間は胎生の単為生殖をし、夜が長い秋になると卵生の有性生殖に転換する。幼若ホルモン処理により生殖様式の転換が誘導されることはわかっているが（Corbitt and Hardie 1985; Hardie 1981; Hardie and Lees 1985; Mittler et al. 1976）、幼若ホルモンが生殖様式制御に直接関わっているか否かを調べることはまだできていない（Trionnaire et al. 2008）。このように生殖様式転換現象は多くの生物で知られているが、後生動物でその機構は未だよくわかっていない。

本研究では淡水棲プラナリアの *Dugesia ryukyuensis* を用いた。プラナリアの属する扁形動物門は、進化的に左右対称性、三胚葉性、中枢神経系を獲得した基部に位置する、原始的な後生動物である（Fig. 1-3 A）。プラナリアは口と肛門を兼ねる咽頭が体の中央にあり、腹側の咽頭孔から出して餌を摂取する（Fig. 1-3 B の左）。咽頭は直接腸管に繋がり、腸管は全身を走る（Fig. 1-3 B の中央）。また脳と、そこから腹側を尾部側に向けて走る 2 本の腹神経索、はしご状の神経が張り巡らされている（Fig. 1-3 B の右）。Fig. 1-3 C は Fig. 1-3 B の点線の位置の横断面であるが、表皮の直下に筋肉層があり、器官との間は間充織で満たされている。体腔はなく、neoblast と呼ばれる多能性幹細胞はこの間充織スペースに散在する。プラナリアはこの neoblast を有することで高い再生能力を持つ。

淡水棲プラナリアは、同一種内に生殖戦略の異なる 3 集団（無性生殖のみ、有性生殖のみ、無性生殖と有性生殖の季節転換）が共存することから（Curtis 1902; Kenk 1937; Kenk 1940）、生殖様式制御機構を調べるのに適した研

究対象である (Fig. 1-4)。先天的無性生殖集団 (asexual; AS) は自切によりクローン増殖する無性生殖のみを行い、生殖器官を形成しない。先天的有性生殖集団 (innate sexual; InS) は卵殻から孵化後、成長とともに雌雄同体性の生殖器官を形成し、交接し他家受精卵を産む (Hyman 1951; Newmark and Alvarado 2002)。転換集団は、季節により有性生殖・無性生殖を転換する (Curtis 1902; Kenk 1937; Kenk 1940)。個体の生き残り戦略の変化に伴い、実質的には生殖器官や配偶子の形成と退縮といった体制の劇的な変化が起こり、その転換現象は生殖生物学のみならず発生生物学的にも非常に興味深い。

プラナリアでは *neoblast* として知られる成体多能性体性幹細胞が間柔織中に散在し、その分裂子孫細胞が生理的なターンオーバーや損傷により失った細胞の代替を担っている (Agata 2008; Alvarado 2003; Alvarado and Kang 2005; Baguña et al. 1989; Bergmann and Steller 2010; De Mulder et al. 2009; Shibata et al. 2010; Wagner et al. 2011)。多くの生物では生殖細胞系列は胚発生初期において始原生殖細胞として隔離される。しかし本研究で用いたリュウキュウナミウズムシ *Dugesia ryukyuensis* を含むある種のプラナリアでは生殖細胞系列と生殖器官を除去したとしても、*neoblast* から *de novo* に再形成することが出来る (Wang et al. 2007)。生殖細胞系列は InS 個体の孵化後数日以内には存在し、さらに生殖細胞マーカー *nanos* の発現は AS 個体の始原生殖細胞にも観察される (Handberg-Thorsager and Saló 2007; Nakagawa et al, 2012a; Sato et al, 2006; Wang et al, 2007)。AS 個体では始原生殖細胞の増殖・分化は起こらないが、InS 個体では成長過程で生殖器官が始原生殖細胞と *neoblast* から形成される (Curtis 1902; Newmark and Alvarado 2002)。プラナリアの生殖細胞の発生と維持に関与する数

多くの遺伝子は同定されてきたが (Collins et al. 2010; Ishizuka et al. 2007; Wang et al. 2010; Zayas et al. 2005)、それら遺伝子の制御機構、つまり生殖戦略の制御についてはまだわかっていない。

生殖様式制御機構解明にアプローチするために重要な実験事実として、投餌による無性生殖から有性生殖への転換が報告されている。AS 個体にミンチにした有性生殖個体を投餌すると、無性生殖から有性生殖への転換を同種間、さらには異種間においても起こせる (Benazzi and Grasso 1977; Grasso and Benazzi 1973; Kobayashi et al. 2002; Kobayashi et al. 1999; Sakurai 1981)。我々の系 (Kobayashi et al. 2002; Kobayashi et al. 1999) では、全ての AS 個体が卵巢、精巢、交接器官、生殖孔、卵黄腺、貯精嚢をこの順で1か月かけて形成する (Fig. 1-2)。それぞれの生殖器官の形成を指標として有性化のステージは5段階に分けられている。この生殖器官形成過程は InS 個体の発生過程と類似の過程を経る。すなわち、始原生殖細胞の増殖・分化による生殖細胞形成と、neoblast から供給される新たな体細胞から構築される体細胞性の生殖器官形成が起こる。このように、先天的には無性生殖のみを行う AS 個体が、有性個体の投餌という外的刺激によって有性化した個体を人為的有性化 (acquired sexual; AqS) 個体と呼ぶ。AqS 個体も InS 個体と同様に有性生殖を行い、無性生殖は行わない。よって AS 個体も外部からの有性化刺激に応答して生殖細胞や生殖器官をつくり出すポテンシャルはあるが、その能力を普段は何らかの制御下で不活性化させられていると考えられる。従って、前述の3集団はいずれも有性生殖の潜在能力を持つものの、その発現を InS 個体や AS 個体は生まれながらに、また転換系統は季節に応じて、調節していると予想される。また AqS 個体同士を交配した F1 世代には AS 個体

と InS 個体が出現することが知られている (Kobayashi et al. 2009)。対照的に InS 個体同士の交配で得られる F1 世代にはほとんど InS 個体しか現れない (Kobayashi et al. 2012)。よって、先天的な生殖様式の決定には遺伝要因が強く影響すると考えられるが、その詳細は不明である。さらに遺伝要因だけでは季節転換などの後天的な現象の説明がつかないため本研究を通して InS 個体と AqS 個体の間の有性状態の制御の違いを理解することは、個体の生活史において生殖様式を制御している機構の解明につながる第一歩になると期待される。

投餌による有性化は「性的に成熟したプラナリアが体内に有性化因子を含むこと」を示す。この”有性化因子”は後生動物において無性から有性への転換に関わる初めての候補化合物であり、親水性でパパイン消化により活性を失わない分子量 500 以下の化合物であるという特徴付けはなされているもの (Kobayashi and Hoshi 2011)、その分子実体は未同定である。AqS 個体は有性化後、外因性の有性化因子を必要とせず有性状態を維持できることが知られている (Kobayashi et al. 1999)。よって有性化後の AqS 個体は内因性の有性化因子を産生していると考えられる。実際に、AS 個体に餌として与えた場合の有性化活性は InS 個体と AqS 個体のどちらも有することから (Hoshi et al. 2003)、両者ともに有性状態は自身の内因性有性化因子により維持していると示されている。また、有性化過程のステージ 3 以降では外因性の有性化因子を必要とせず有性化し、もはや無性状態に戻ることはないが、ステージ 2 までは有性化因子の投与が途切れると無性状態に戻ることが知られており、point-of-no-return と命名されている (Kobayashi et al. 1999, Fig. 1-2)。つまり、内因性の有性化因子の産生はステージ 3 以降と考えられており、「生殖様式の制御」は「内因性の有性化

因子の産生の調節」であると捉えることが出来る。InS 個体は成長過程で自発的に有性化因子産生を開始して有性状態に入るが、AqS 個体では外因性の有性化因子をトリガーとして有性化する。そのため、AqS 個体が InS 個体様の「有性状態を自発的に開始する能力」を獲得したか否かは不明であった。

本研究では、InS 個体と AqS 個体の比較を通じて、生殖様式の制御について考察した。第2章では、自発的な有性状態開始能力を調べる方法として小片再生実験を考案し、両者を比較した結果、AqS 個体は有性化刺激が無い状態では自発的に有性化を開始する能力は獲得していないと結論付けられ、有性状態の規定に2段階モデルを提案した。また生殖様式規定の差異が neoblast 自体にあると予想されたため、第3章以降で neoblast 移植により検討した。第3章では X 線照射した recipient に neoblast 画分を移植し、その救助効果を評価した。さらにマイクロサテライトマーカーやゲノム倍数性を用いて移植細胞の生着・増殖を確認し、個体内での donor 由来細胞の割合を定量する実験系を構築した。その結果、移植細胞が個体内で増殖し、最終的に致死線量 X 線照射個体への移植では全身が donor 由来細胞に置換すること、また非致死線量照射の場合は donor と recipient の両由来の細胞が安定して共存するキメラとなることを示した。第4章では致死線量を照射した AS recipient に対して、InS 個体および AqS 個体の neoblast 画分を移植し、neoblast の有性生殖開始能を評価した。InS 個体由来 neoblast の移植でのみ有性個体となり、neoblast レベルで生殖様式規定がなされていることが明らかになった。また AqS 個体由来 neoblast の移植では有性にならなかったことから、人為的有性化で細胞レベルの先天的生殖様式規定は変化していないとわかった。第5章では非致死線量を照射した AS recipient に対して

InS 個体の neoblast 画分を移植して AS 個体と InS 個体のキメラ個体を作製した結果、キメラ個体もほぼ全てが有性個体となり、AS 個体由来細胞存在下でも InS 個体由来 neoblast は有性状態を開始できることが明らかとなった。さらにキメラ個体では卵巣が肥大し、過剰数形成された。これは InS 個体では見られず、内因性の有性化因子に対する卵巣形態制御の応答性が InS 個体と AS 個体では異なることが示唆された。第 6 章では以上の研究を総括し、プラナリアの生殖様式制御について細胞レベルおよび個体レベルから論じ、今後の研究の展望を述べた。

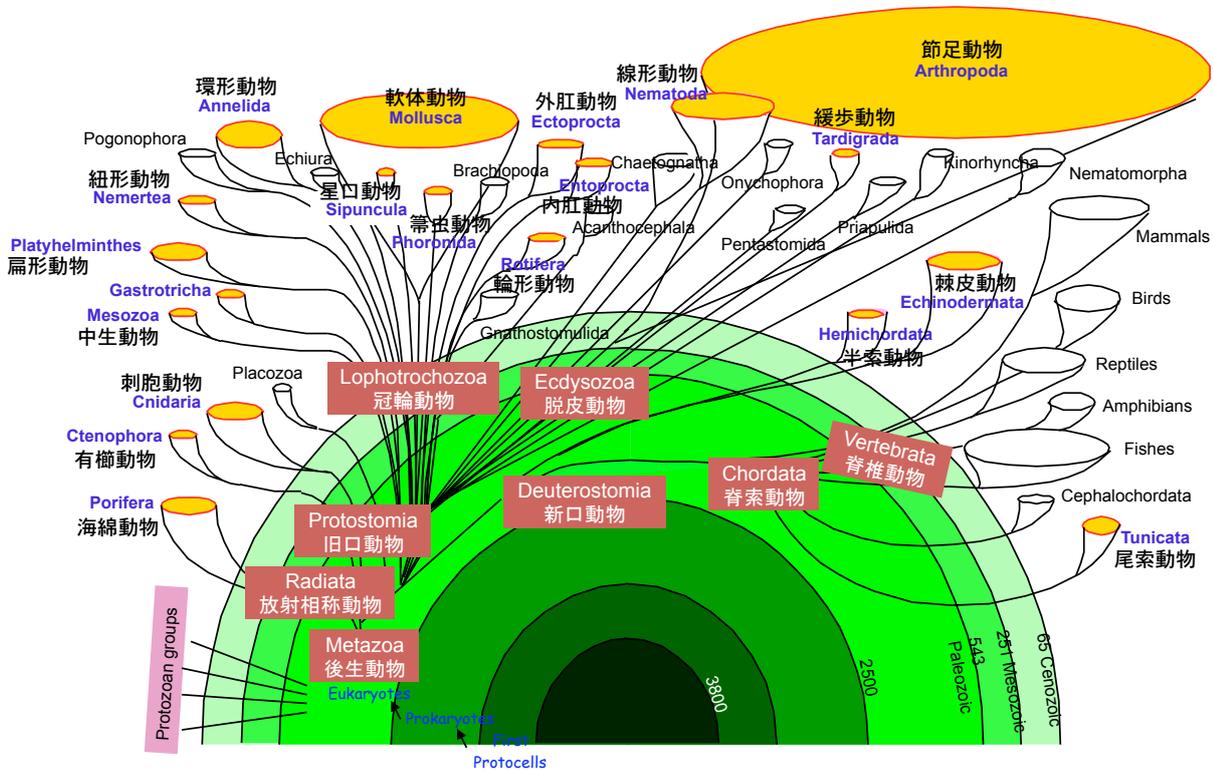


Fig. 1-1 無性生殖を行う種を含む動物門を示した系統樹

無性生殖を行う種を含む動物門を黄色で示した。

Hickman et al. 2002 からの改図。

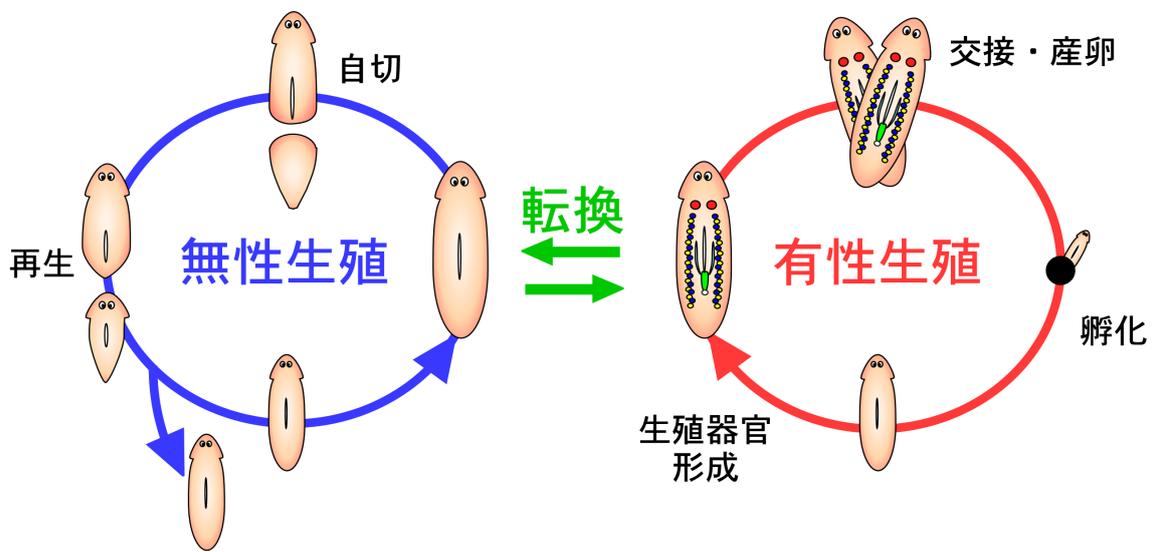


Fig. 1-2 淡水棲プラナリアの生殖様式

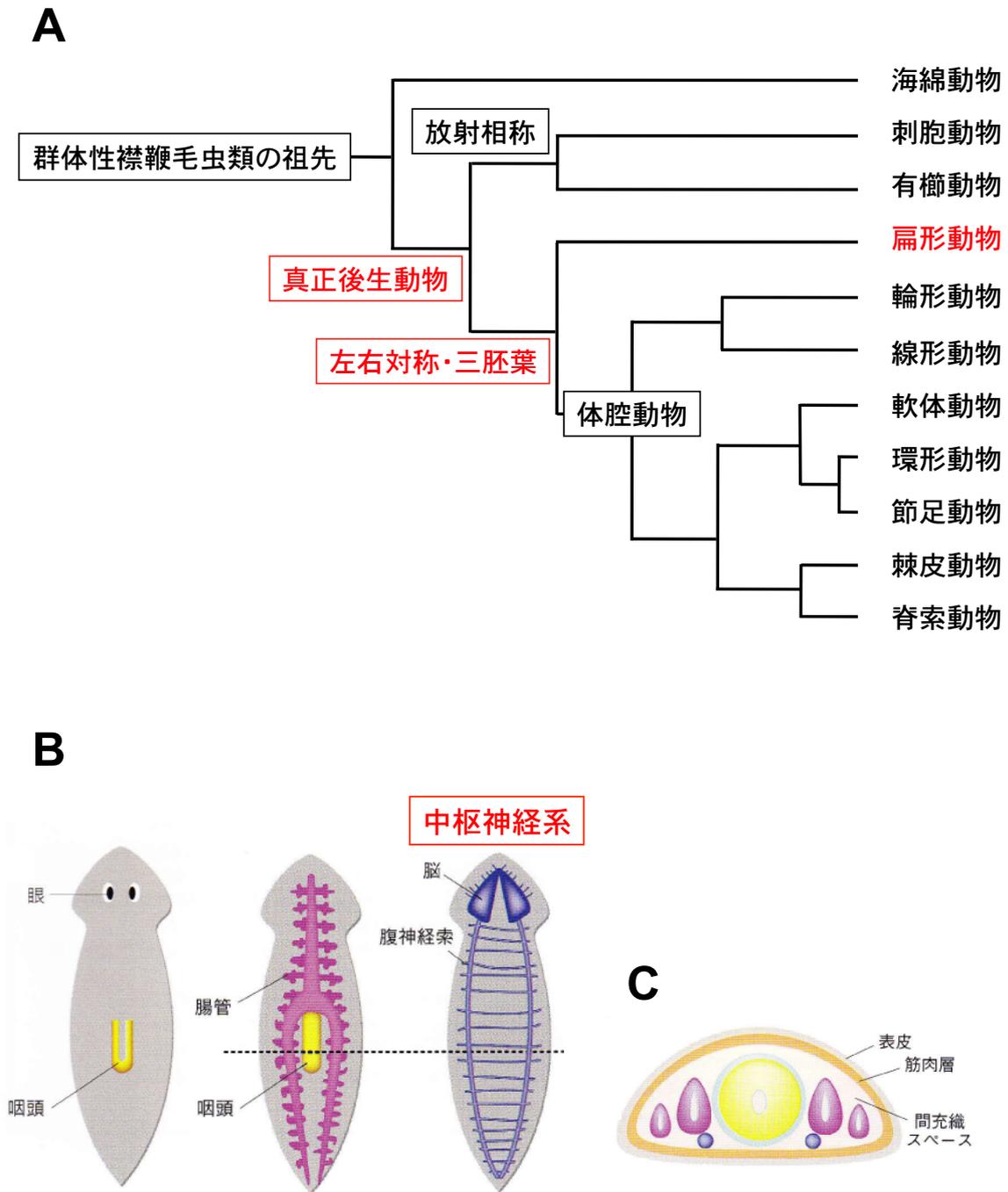


Fig. 1-3 プラナリアの進化系統的位位置と体制

(A) 系統樹。扁形動物門が進化的に初めて獲得した特徴を赤枠で示した。

(B) プラナリアの体制。小林ら (2010) から転載。

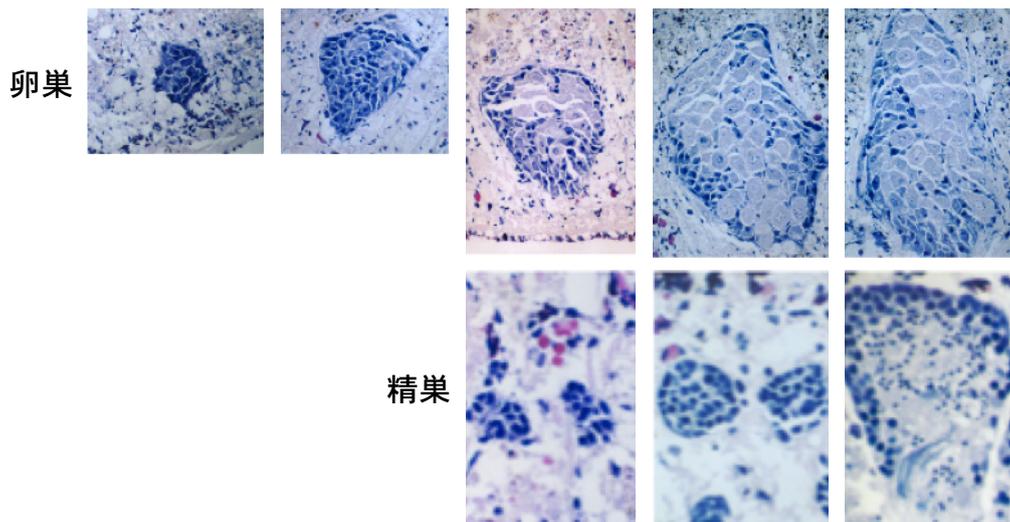
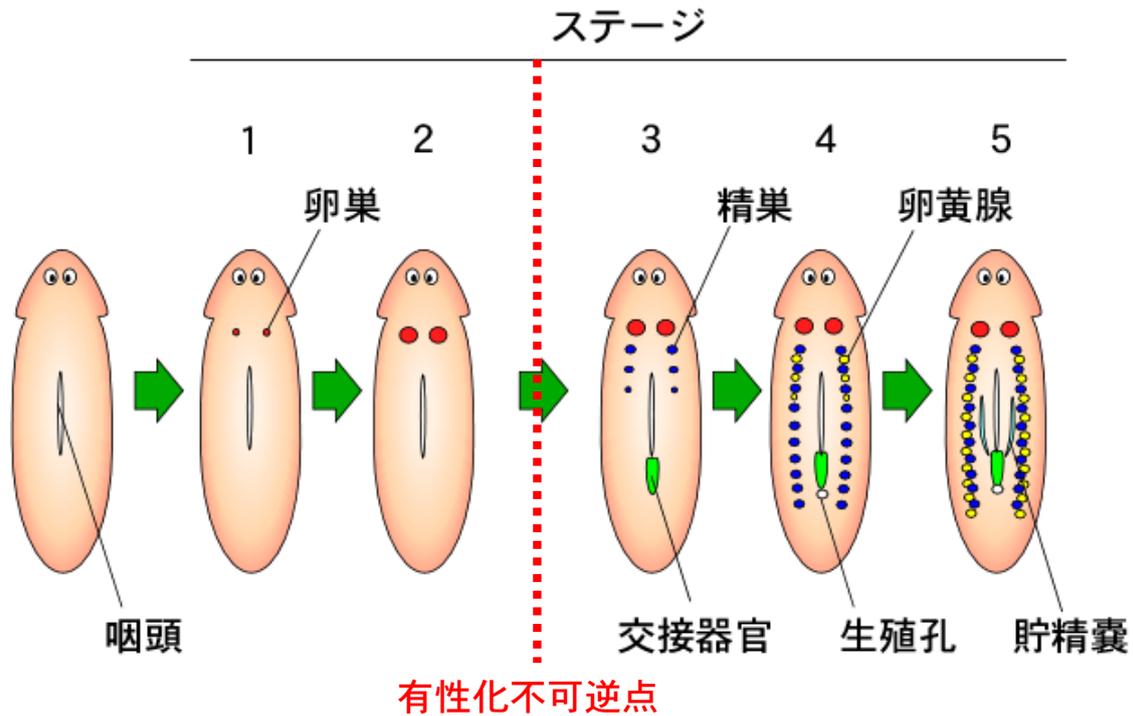


Fig. 1-4 プラナリアの人為的有性化での生殖器官形成過程

プラナリアでは有性化に伴い生殖器官が順序だって形成される。生殖器官形成を指標として有性化は5ステージに分けられる。各ステージで形成され始める生殖器官を模式図に示した。ステージ2と3の間には有性化不可逆点が存在し、この点以降は内因性の有性化因子の産生が始まると考えられている。また対応するステージの卵巢と精巢のHE染色組織像を示した(Kobayashi et al. 1999より転載)。ステージが進むほど卵巢・精巢の構成細胞数が増え、内側にいくほどより成熟した生殖細胞が形成される。

第2章 小片再生実験による InS 個体と AqS 個体の有性状態開始能の比較

2.1 緒言

AqS 個体は有性化後、有性化因子の投与を止めても自身で内因性の有性化因子を産生して有性状態を維持し続けることが知られている (Kobayashi et al. 1999)。その一方、InS 個体は生まれながらに有性化因子を自律的に産生し始め、外因性の有性化因子の投与がなくとも有性状態に入ることが出来る。それでは、いったん有性化した AqS 個体は、InS 個体と同じなのであろうか？

先行研究 (Kobayashi et al. 2012) において、内因性の有性化因子の体内分布が調べられた (Fig. 2-1)。完全に有性成熟した InS 個体と AqS 個体を 3 断片に分け、各部分 (頭部断片と、胴体部を 2 等分した断片) の抽出物を AS 個体に餌として与え、有性化を誘導するか否かを調べた結果、InS 個体と AqS 個体の両方で胴体部由来断片の抽出物の投餌では有性化 (卵巣と交接器官の形成) が起きたが、頭部断片抽出物では起きなかった。有性化過程において交接器官の形成は内因性の有性化因子の産生開始の指標であることから (Kobayashi et al. 1999)、胴体部は十分な有性化因子を含むことを意味する。よって頭部には充分量の有性化因子が含まれないが、他の部分には含まれるという体内分布に InS 個体と AqS 個体の間で差はないことが示された。

では、AqS 個体は InS 個体と同様に外因性の有性化刺激がなくとも自

律的に有性状態を開始する能力をも獲得したのだろうか？先行研究（Kobayashi et al. 2012）において、InS 個体と AqS 個体を前述と同じ 3 断片にし、再生後に再び有性状態を開始できるか否かが調べられた（Fig. 2-2）。すると頭部にのみ差が見られ、InS 個体の頭部断片は有性個体、AqS 個体の頭部断片は無性個体になったことより、頭部に両者の有性状態の規定の差異があると示唆された。対照的に胴体部はいずれも有性になり、InS 個体と AqS 個体の間に差がないように見えた。しかしながら各断片は異なる条件下で比較されていたため、この結論には疑問があった。すなわち、胴体部は頭部に比べて断片が大きく、生殖器官が退縮しきる前に再生が完了して生殖器官を再生した可能性が大きいほか、断片は有性化因子を含んでいる。そのため 3 断片の再生実験では有性化を自発的に開始する能力を正しく評価できていない可能性があった。実際に、AqS 個体を 2 断片に切断し、その再生過程を観察すると、卵巣や交接器官が消失しきらないうちに新たな体制が整い、2 断片ともに 1 か月以内には生殖器官を再生する（Fig. 2-2）。そこで本章ではこの再生実験系を修正し、頭部と同サイズの断片にした胴体部断片の再生後の生殖様式を観察するという小片再生実験系を考案した。

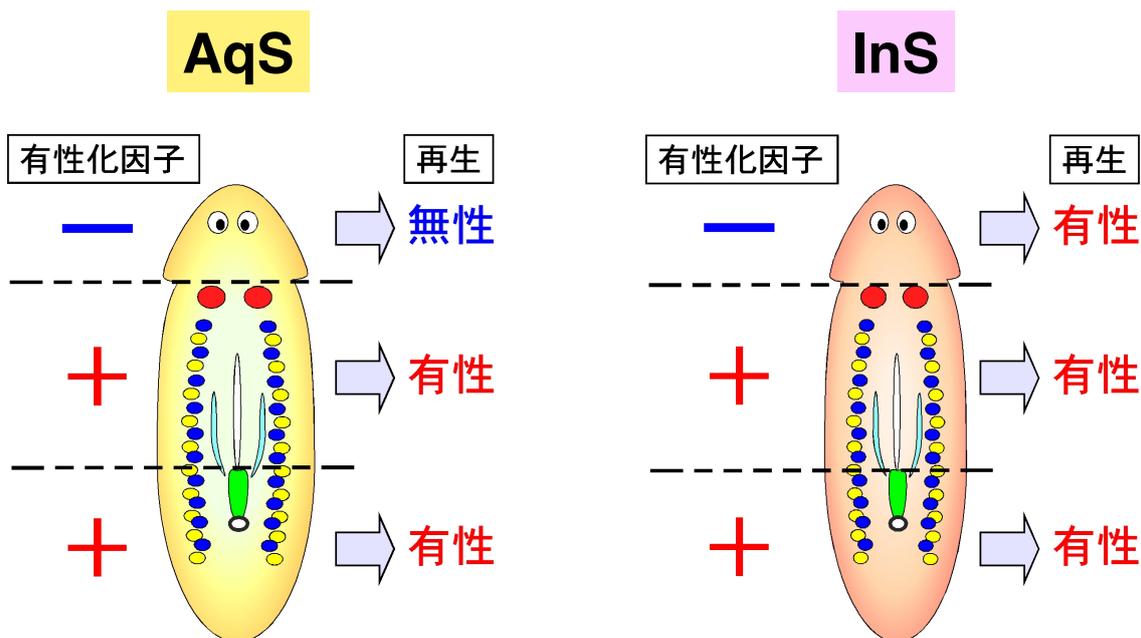


Fig. 2-1 3断片再生実験の結果のまとめ

Kobayashi et al. 2012 のデータを模式図にまとめた。各断片を AS 個体に投餌した際の有性化誘導活性の有無より判断した有性化因子の含有について+と-で示した。また再生後の生殖様式については自切により無性、交接器官の形成により有性であると判断したものを示した。

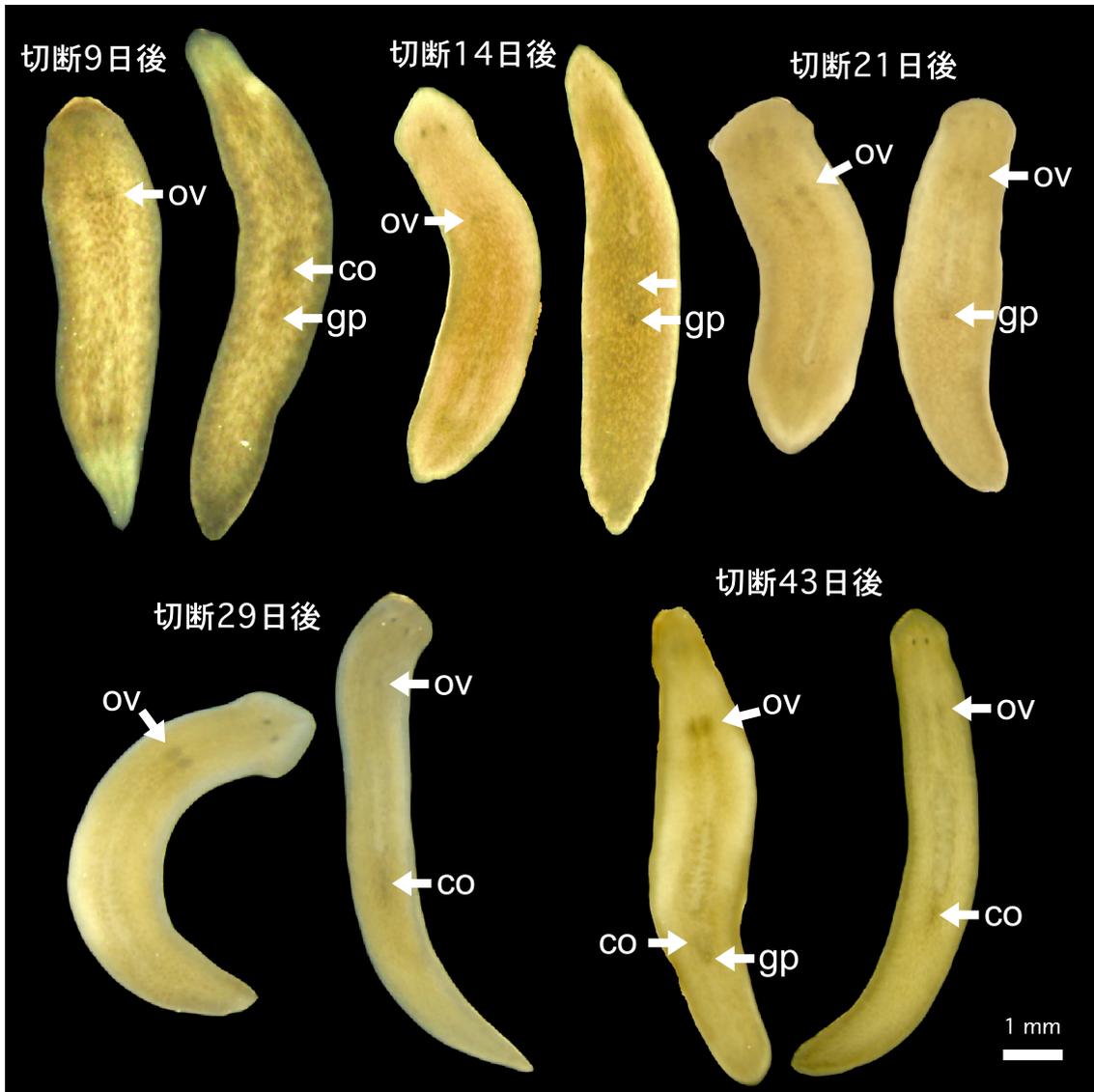


Fig. 2-2 AqS 個体を 2 断片に切断後の再生過程

ov : 卵巣、co : 交接器官、gp : 生殖孔

2.2 材料および方法

2.2.1 実験動物

D. ryukyuensis (Kawakatsu et al. 1995; Kawakatsu et al. 1976) の先天性無性系統 (AS)、先天性有性系統 (InS)、人為的有性化個体 (AqS) を用いた。AS 個体は、OH 株およびその F1 世代を用いた。OH 株とは弘前大学農学生命科学部石田幸子博士が 1986 年に沖縄本島で採集した 1 個体を切断と再生により増殖させた無性クローン集団である。AqS 個体は、小林らの方法 (Kobayashi and Hoshi 2002; Kobayashi et al. 1999) に従い、冬期に採集したイズミオオウズムシ *Bdellocephala brunnea* を AS 個体に毎日投餌することで有性化させた個体を用いた。また AqS 個体の交配で得られた F1 世代には先天性無性系統と有性系統が得られるが (Kobayashi et al. 2009)、うち前者を AS 個体、後者を InS 個体として用いた。これらの個体はチオ硫酸ナトリウムで脱塩素した水道水を飼育水として 20°C で飼育した。エサとしてニワトリの肝臓を 1~2 週間に 1 回与えた。ただし実験には 1 週間以上絶食させた個体を用いた。用いた AS 個体、InS 個体については 5 年以上の飼育中、生殖様式の転換は 1 度も確認されていない。また AqS 個体も有性化処理後は投餌を止めても有性状態が維持されることを確認した。

2.2.2 小片再生実験

実体顕微鏡観察により、生殖孔および貯精嚢が確認され十分に成熟したと判断した InS 個体と AqS 個体を、湿重量 1 mg/断片になるように 5~8 断片に切断し、再生させた。AqS 個体は 10 匹、InS 個体は頭部 15 匹分、胴体部 8

匹分を実験に用いた。切断の2週間後より通常飼育の餌であるニワトリの肝臓を毎週投餌した。再生後の生殖様式を判別するため、実体顕微鏡による外部形態の観察を毎週行った。体長が7 mm 前後に達すると、自切を行うか生殖器官の形成（卵巣と交接器官）かに分かれたため、前者を無性個体、後者を有性個体と判定し、その時点まで生存した個体について切断から判別までにかかった時間を”recovery time”として記録した。

2.3 結果

内因性有性化因子による有性状態の維持を止めることを目的に、Fig. 2-2 A の通り、InS 個体と AqS 個体を小さく切断し、生殖器官の消失後に再び生殖器官を形成するか調べた。切断後、再生個体は生殖器官を退縮させ、1 か月以内にはプロポーションの整った小さい個体を形成した (Fig. 2-3 A)。引き続き、生殖様式が判断可能になるまで飼育した。体長 7 mm 程度に達した時点で自切か交接器官形成をしたので、前者を無性、後者を有性と判断した。

切断から生殖様式の判断がつくまでの時間 (recovery time) は、咽頭・消化器系を再生して摂食を再開するまでの時間に依存してばらついた。そこで、データを recovery time ごとにまとめた (Fig. 2-3 B)。結果は InS 個体と AqS 個体で著しく異なった。InS 個体由来の断片では、recovery time の長さや断片の由来部位によらずに、全ての断片が自切なしに有性になった (Fig. 2-3 B 上段)。対照的に、AqS 個体由来の断片では recovery time の長さによって異なる運命をたどった (Fig. 2-3 B 下段)。切断から 10 週間以内で体長 7 mm に戻った個体は有性に、それ以上かかった個体は無性になった。この結果は頭部断片のみならず、全ての胴体由来断片で見られた。10 週間以上の recovery time がかかった場合の結果についてまとめると Fig. 2-4 の通りとなり、先行研究で頭部のみで見られていた、InS 個体と AqS 個体の間での切断・再生後の生殖様式の差が、胴体部全体に渡り存在することが明らかとなった。

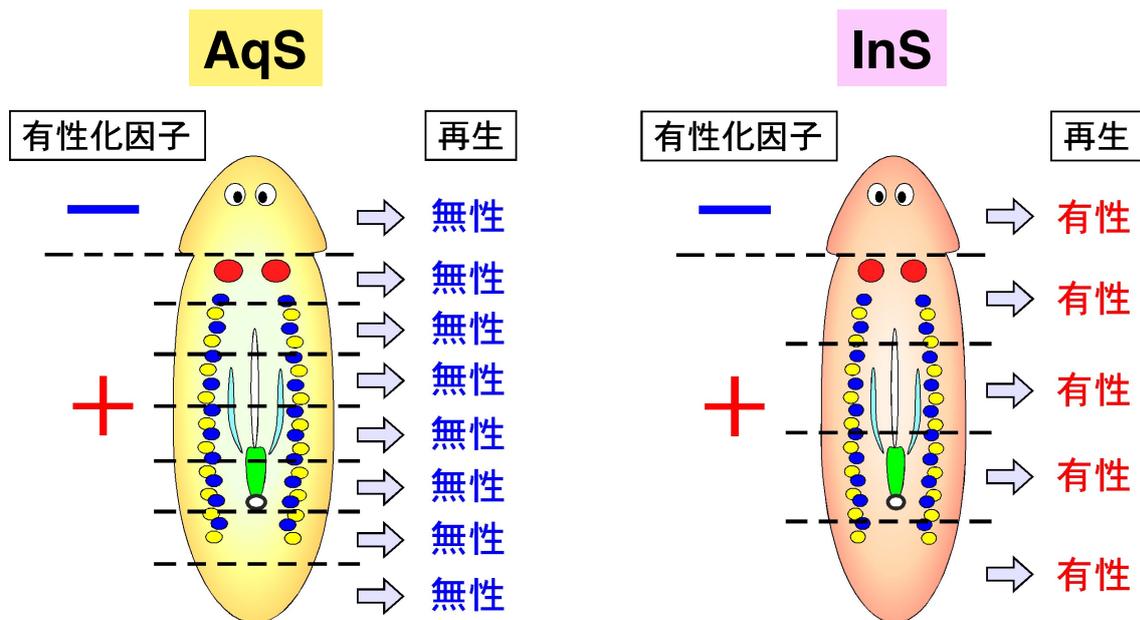


Fig. 2-4 小片再生実験の結果のまとめ

Fig. 2-3 の結果を元に、recovery time が 10 週間以上の結果について、模式図にまとめた。有性化因子の体内分布は Kobayashi et al. 2012 の結果を引用した。

2.4 考察

2.4.1 3断片再生実験と小片再生実験の比較

先行研究において明らかとなった内因性有性化因子の体内分布は、頭部以外の胴体部であり、その分布において InS 個体と AqS 個体の間で差はなかった。これは、有性状態開始の誘因が InS 個体では先天的な規定、AqS 個体では外因性の有性化因子投与と異なるものの、最終的に到達する有性状態については共に同様に分布する有性化因子を産生して維持していることを示唆する。先行研究の3断片再生実験では頭部断片でのみ InS 個体と AqS 個体の差が見られたが、頭部には十分な有性化因子が含まれていないことから、InS 個体は有性化因子が不足していても自律的に有性状態に入れるが、AqS 個体ではその自発的な開始能が無いという差が見られた結果だと考えられる。この差は胴体部においても存在するはずであるが、3断片再生実験では差は見出されなかった。しかし本研究において胴体部を小片にし、recovery time を10週間以上に延ばすことによって、この差が頭部同様に観察された。AS 個体の切断・再生の過程においては、断片のサイズが小さいほど、そこに含まれる分化器官である咽頭でのアポトーシス頻度が高まり、咽頭が退縮するという相関が示されている (Pellettieri et al. 2010)。咽頭は分化細胞のみからなり、neoblast は含まない。体制を大きく変化させるほどの切断を受けると、それまで持っていた器官を退縮させてリモデリングする一方、体制を変更する程ではない欠如の場合には、元の器官は残したまま、失った部分を再生することで体制を戻す、という2通りの対処があることが考えられる。これは有性個体の切断実験に当てはめると、3

断片再生実験の胴体部断片で見られた「切断再生後の有性状態」は、欠如した生殖器官の「再生」であり、小片再生実験で見られた「生殖器官の退縮消失後のリモデル」とは、持つ意味が異なると言える。

2.4.2. 有性状態の2段階制御モデル

小片再生実験では、InS 個体と AqS 個体の間で生殖器官退縮消失後に再び有性状態に入るか否かの点で全身に渡り明らかな差が見られた。この結果は以下のように解釈できる。切断後の個体は、10 週間以内に復帰すると残存している有性化因子や生殖器官の影響により有性状態に復帰する。しかし、10 週間以上かかると、おそらく有性化因子が代謝などにより除去され残存量が不十分になったり、消失部分の大きい生殖器官が消失したりするため、切断前の有性状態の影響だけでは有性状態の開始を誘導できなくなる。つまりこの状況での生殖様式の選択は、自律的な有性化因子産生能力の有無を反映すると考えられる。よって、切断後 10 週間を超えると有性状態を開始できなかった AqS 個体は、InS 個体とは本質的に異なり、人為的な有性化後でも InS 個体様の自発的な有性状態開始能は獲得していないことが示唆された。

この結果より、有性状態の制御について、1. 自発的な有性化因子の産生開始による有性状態開始、2. 既に存在する有性化因子に応答しての継続的産生による有性状態の維持、の2段階に分けられるというモデルを提案する (Fig. 2-5)。InS は 1. の能力を有する。それとは異なり AS 個体は 1. の能力を普段は発揮していないか、先天的に有していない。しかしながら有性化因子の投与によ

って内因性の有性化因子の産生が促されると、有性状態開始能の欠損をバイパスして有性状態の維持に入ると考えられる。しかし本質的に 1. の能力は持たないままであり、小片再生実験によって維持状態を途切れさせると自律的に有性化因子の産生を開始することはできず無性に戻ってしまうと考えられる。つまり、InS 個体と AqS 個体はともに有性生殖を行う個体ではあるが、有性化因子の自発的な産生開始能の有無という点で決定的に異なるという結論が小片再生実験により導かれた。この自発的な有性化因子の産生開始こそが有性生殖制御の本質であろう。さらに季節転換集団においては、何らかの受容機構で季節変化を察知し、この有性化因子の産生を制御しているものと予想される。生殖様式の季節転換現象を実験室内で再現するのは難しいが、1. の能力の切り替えによって生殖様式を制御していると考えられることから、InS 個体と AqS 個体を比較して差異を見出すことは、そのスイッチの解明に向けての第一歩になりうると考える。

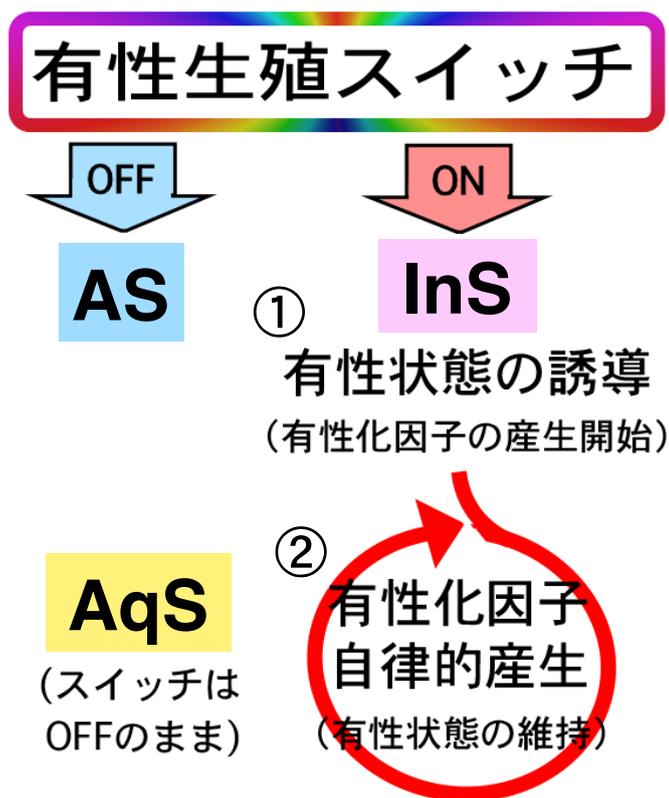


Fig. 2-5 有性状態の2段階制御モデルの概念図

2.5 結言

小片再生実験によって、自発的に有性化因子産生を開始できる InS 個体と、維持的産生は出来るが開始は出来ない AqS 個体という、生殖様式規定の差が全身にわたって存在することが明らかとなり、有性状態の 2 段階制御モデルの提案に至った。切断・再生の過程でその差が見られたが、実際に成長過程において生殖器官を形成するか否か、つまり neoblast から生殖細胞系列を分化させるか否か、という重要な分岐点においても、この差が効いていると考えられる。そこで、この差が neoblast 自体に規定されているのかを検討するため、第3章以降で AS recipient に対して有性個体由来 neoblast の移植を行うことにした。

第3章 幹細胞移植実験系の構築

3.1 緒言

第2章の小片再生実験により、全身にわたって InS 個体と AqS 個体の間に有性状態開始能力の差があることが明らかになった。切断・再生による体制のリモデル過程で新たに生殖器官をつくり出すか否かの点で差が見られたことから、neoblast 自体に生殖様式規定の差が存在するという仮説に至った。この仮説を検討するため、AS recipient に InS 個体や AqS 個体の neoblast 画分を移植し、有性状態を開始するか否かを調べることとした。

neoblast 画分移植は既に Bagnà ら (1989) や我々 (Kobayashi et al. 2008) による報告があり、その方法に倣った。我々の実験条件下で、最低致死 X 線線量は 4.4 Gy である (Kobayashi et al. 2008)。そのため 4.4 Gy を致死線量として移植に用いた。X 線照射により分裂細胞、つまり neoblast が失われ、数週以内に死に至ることが知られている (Bardeen and Baetjer 1904; Orii et al. 2005)。実際に本研究でも致死線量照射個体は表皮が黒くなり、2 週間で死亡した。この照射個体を recipient に用いた。また、本研究以前の移植では recipient の全身が donor 由来細胞で置換されているかは確認されていなかった。そこで、本研究では新たに移植細胞を追跡できるマーカーとしてマイクロサテライトマーカーとゲノム倍数性を用い、移植後個体内での donor 由来細胞の割合を見積もる手法を起ち上げた。

近縁種の *D. japonica* では非致死線量照射直後に、neoblast は一時的に激

減するものの、その後、初めの数が再構成されることが示された (Salveti et al. 2009)。そこで、非致死線量照射と neoblast 画分移植を組み合わせることで、donor 由来 neoblast と recipient 由来 neoblast の共存するキメラ個体を作製できると予想し、本研究において非致死線量照射個体への neoblast 画分の移植を試みた。プラナリアでは細胞移植によるキメラ作製の報告はこれまでに無い。

本章においては、まず移植実験系の構築を行った。本研究で用いた移植手法の効果と、donor 由来細胞の割合算出法の妥当性を検討した。また移植後の donor 由来細胞の移植後個体内での割合の経時変化を調べた。

3.2 材料および方法

3.2.1 実験動物

用いた系統および飼育法は 2.2.1 と同様である。

3.2.2 neoblast 画分移植の概要

neoblast 画分移植の全体の流れを Fig.3-1 に示す。咽頭基部で切断した recipient 個体に X 線を照射後、2 回にわたり neoblast 画分の移植を行い、その後、個体の前後端を切断した。各段階の詳細は 3.2.3 以降に示す。

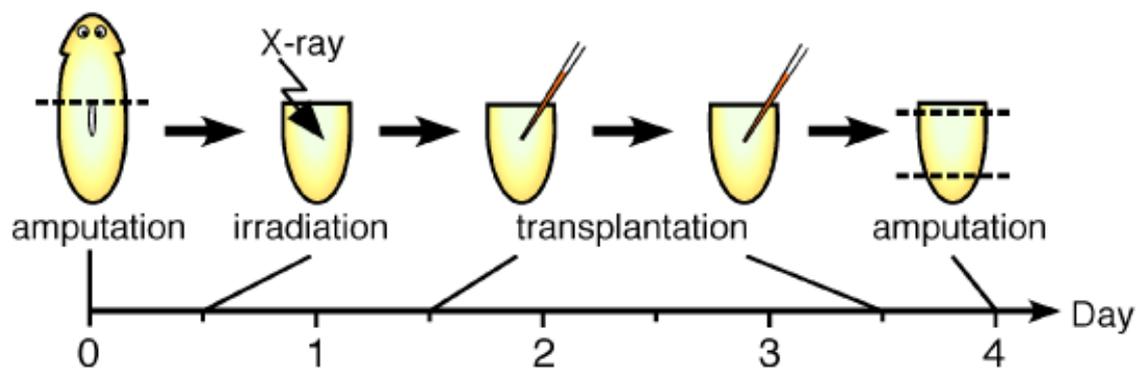


Fig. 3-1 neoplast 画分移植の全体の流れ

3.2.3 recipient への X 線照射

X 線照射量と致死率の関係は既に調べられており、*D. ryukyuensis* の AS 個体の最低致死線量（照射個体が全て死亡する）は 4.4 Gy である（Kobayashi et al. 2008）。そこで致死線量として 4.4 Gy、非致死線量として 3.3 Gy、2.8 Gy を照射することとした。十分に成長した体長 10~12 mm の AS 個体を recipient に用いた。虫体の体積を小さくして移植画分の体内での割合を高めるため、咽頭基部の位置を横断面で切断し咽頭を除いた尾部側断片を recipient として用いた。切断 12 時間後に、軟 X 線（20 kVp, 3 mA, 192 R/min）を SOFTEX® E-3 X-ray generator（SOFTEX Co., Ebina, Japan）を用いて照射した。照射後は通常の飼育条件の 20°C で維持した。

3.2.4 移植 neoblast 画分の調製

十分に成長した有性個体を donor として用いた。neoblast の分裂増殖を促すため、移植 60 時間前に小片に切断した。移植直前に再生中の donor 断片を細かく切り刻み、0.1% Bacto Trypsin 250（BD, Franklin Lakes, NJ, USA）を含む Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 欠損培地（CMF; 15 mM HEPES, 400 mg/L NaH_2PO_4 , 800 mg/L NaCl, 1,200 mg/L KCl, 800 mg/L NaHCO_3 , 240 mg/L Glucose, pH 7.3）を添加し、4°C で 1 時間、穏やかに混和し細胞を解離させた。その後ピペティングで細胞塊をほぐし、1,500×g で 5 分間遠心分離し、細胞ペレットを 1%BSA と 1%FBS を添加した CMF に再懸濁した。懸濁液を 40、20、10 μm の孔径のナイロンメッシュで順次濾過し、再度遠心分離して得られたペレットを移植用の neoblast 画分とした。

3.2.5 neoblast 画分の移植

X線照射から24時間後、氷上に置いた湿らせた濾紙上に recipient を静置した。仰向けにした recipient の咽頭孔からガラスマイクロピペット（針の先端径 50 μm 。ガラス管（Narishige G-1）をプーラー（Narishige PP-830）で引いて作製）を尾側方向に挿入し、neoblast 画分を間充織領域に油圧式のマイクロマニピュレーターを用いて注入した（Fig. 3-2 左）。ネガティブコントロールとしては空のピペットを挿入した。移植後、傷口が閉じるまで1時間濾紙上に静置した後、飼育水中に移した。2回目の移植は48時間後に同様に行った。2回目の移植の翌日、移植後個体の再生芽と尾部先端を切り落とし（Fig. 3-2 右）、細胞分裂と再生を促した。ニワトリの肝臓の投餌は移植後4週間より毎週行った。移植後1か月は毎日実体顕微鏡を用いて表皮の様子を観察した。

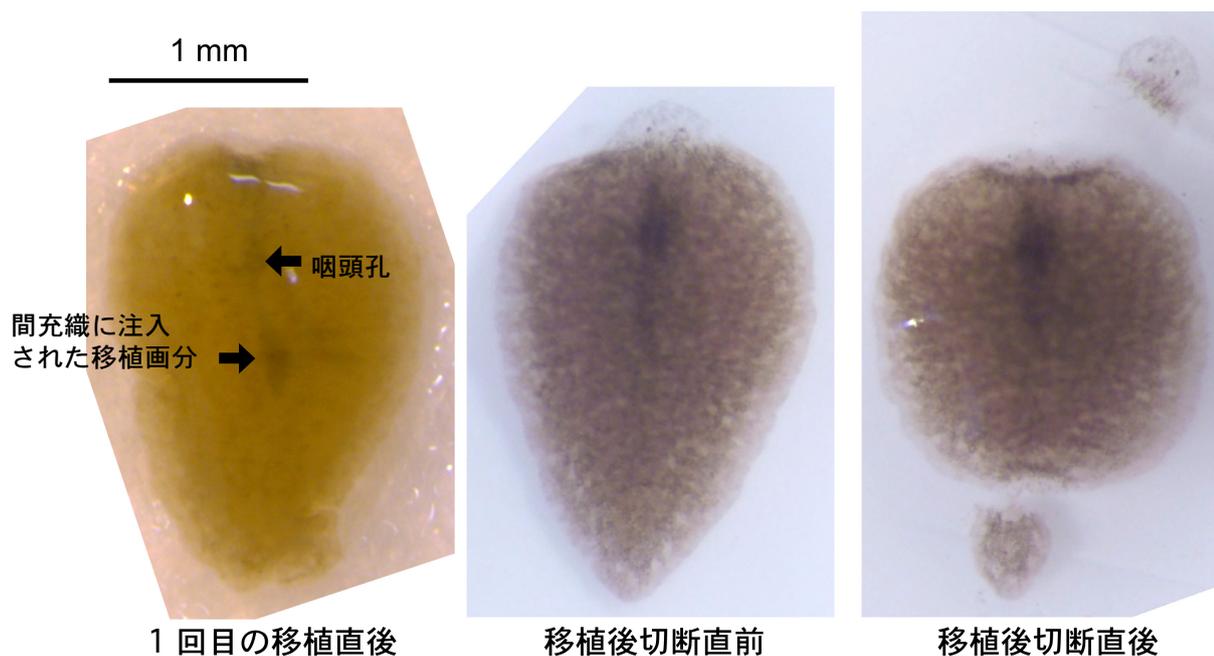


Fig. 3-2 移植実験過程の移植後個体

左：1 回目の移植直後、中：移植後切断直前、右：移植後切断直後。

左図は腹側から、他は背側から撮影。上が頭側。

3.2.6 移植画分の neoblast 含有率の算出

neoblast マーカーの DrPIWI-1 (Nakagawa et al. 2012b) を用いて、3.2.4 の方法で調製した移植画分に含まれる neoblast の割合を調べた。移植画分の調製過程のメッシュ濾過と donor を切断・再生させた処理の効果を検討するため、AS 個体と InS 個体について、切断ありとなしの個体から、メッシュ濾過を 40 μm のみあるいは 10 μm までかけたサンプルを用意した。ただしエタノール固定の際に析出するため、懸濁には BSA を除いた培地を用いた。MAS コートスライドガラス (S9215、松浪硝子工業株式会社) にメッシュ濾過後の細胞懸濁液を載せ、室温で 30 分間静置した。その後、冷エタノールで 15 分間固定し、PBS で 5 分間の wash を室温で 2 回行った。10 % goat serum/TPBS で室温、30 分間のブロッキングをした。その後、抗 DrPIWI-1 抗体の培養上清原液あるいは normal mouse IgG (1:1000) を載せ、4°C で 12~16 時間反応させた。TPBS で 10 分間の wash を室温で 3 回行った後、10 % goat serum/TPBS で室温、10 分間のブロッキングをし、Alexa 488 goat α -mouse IgG (1:400) を遮光下、室温で 3 時間反応させた。TPBS で 10 分間の wash を室温で 3 回行った後、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342/TPBS を室温で 5 分間反応させ、PBS で 5 分間の wash を室温で 2 回行った後、Vecta Shield で封入し、蛍光顕微鏡下で Hoechst (青) と Alexa 488 (緑) の蛍光シグナルを、独立した 4 回の実験それぞれにおいて複数視野で計数した。

3.2.7 マイクロサテライトマーカーによる donor 率の算出 (*ms1* 解析)

移植後個体内での donor 由来細胞と recipient 由来細胞とを識別するため、

新たに個体識別が可能なマイクロサテライトマーカー *ms1* を、Zane らの方法 (Zane et al. 2002) に従い単離した。ゲノム DNA を移植後個体の全身 (移植後 12 週間以内) あるいは尾部先端 (移植後 12 週間以降) から Gentra® Puregene® Cell Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出した。*ms1* 遺伝子座は Forward プライマー: 5'-AGAGCGGAAGTGAAATCGAA-3' と reverse プライマー: 5'-TTGTGGATTTCAATGGTTGG-3' を用いて、GoTaq® DNA polymerase (Promega Corp., Madison, WI, USA) によって以下のサイクル条件で PCR 増幅した: 94°C 2 分間、94°C・55°C・72°C 各 30 秒間を 35 サイクル、72°C 5 分間。増幅産物をポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、得られた 3 つのバンドの濃度を定量した。donor、recipient、移植後個体各々について定量を行い、3 バンドの濃度比から、移植後個体内での混合比を算出した。具体的には、Image J で測定した 3 バンド (a,b,c) についてシグナル強度を測定した。各サンプルの 3 バンドの強度の総和で割ることで正規化し、サンプル間の強度比較が出来るようにした。例えば recipient、transplant、donor のバンド a の正規化した強度を A_r , A_t , A_d と表すと、donor 率 x (%) は

$$A_t = A_d \times \frac{x}{100} + A_r \left(1 - \frac{x}{100}\right)$$

$$\therefore x = \frac{(A_t - A_r)}{(A_d - A_r)} \times 100(\%)$$

となる。そこでバンド a,b,c について同様に計算を行い、donor と recipient のバンド強度が非常に近い場合やバンドがとても薄い場合 (正規化後の強度が 0.1 以下) を除いて算出結果の平均をとり、1 回の測定結果とした。各サンプルに対して 3 回の独立した PCR 増幅を行い、平均値と標準偏差を算出した。

3.2.8 DNA 含量の測定による donor 率の算出

msl に加えて個体識別マーカーとしてゲノム倍数性を用いた。個体の尾部先端を PBS 中でホモジナイズし、解離した細胞をスライドガラス上に播き、冷エタノールで 10 分間固定した。その後 propidium iodide 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase を含む PBS を載せ、45°C で 30 分間処理した。封入後、細胞ごとの蛍光強度を LSC (Olympus Co. Ltd. Tokyo, Japan) を用いて測定した。

3.3 結果

3.3.1 移植細胞数の計数

移植には内径 0.6 mm のガラス管をプーラーで引いたピペットを用いた。ピペットに neoblast 画分を充填し 12 匹の recipient に対して注入したところ、注入前後でペレット面の高さが 1 mm 分移動したため、移植液量を算出すると 1 匹あたり 24 nL であった。またペレットの細胞密度を血球計算盤を用いて計数し、1 回あたりの 1 匹への移植細胞数を算出した結果、 7800 ± 1000 個であった。標準誤差は独立した 4 回の測定より算出した。Fig. 3-3 は 3.2.4 の方法で調製した neoblast 画分の位相差顕微鏡像であるが、直径 10-20 μm の球形細胞が大部分を占める。また neoblast の直径は 10 μm 程度という報告がある (Hayashi et al. 2006)。そこで、細胞を直径 10 μm の球と仮定すると 24 nL は 40,000 個分の体積に相当する。実際は遠心分離後に除き切れていない培地や細胞解離過程で出た細胞片などの夾雑物も含まれるため、算出した細胞数の桁数は妥当であると言える。

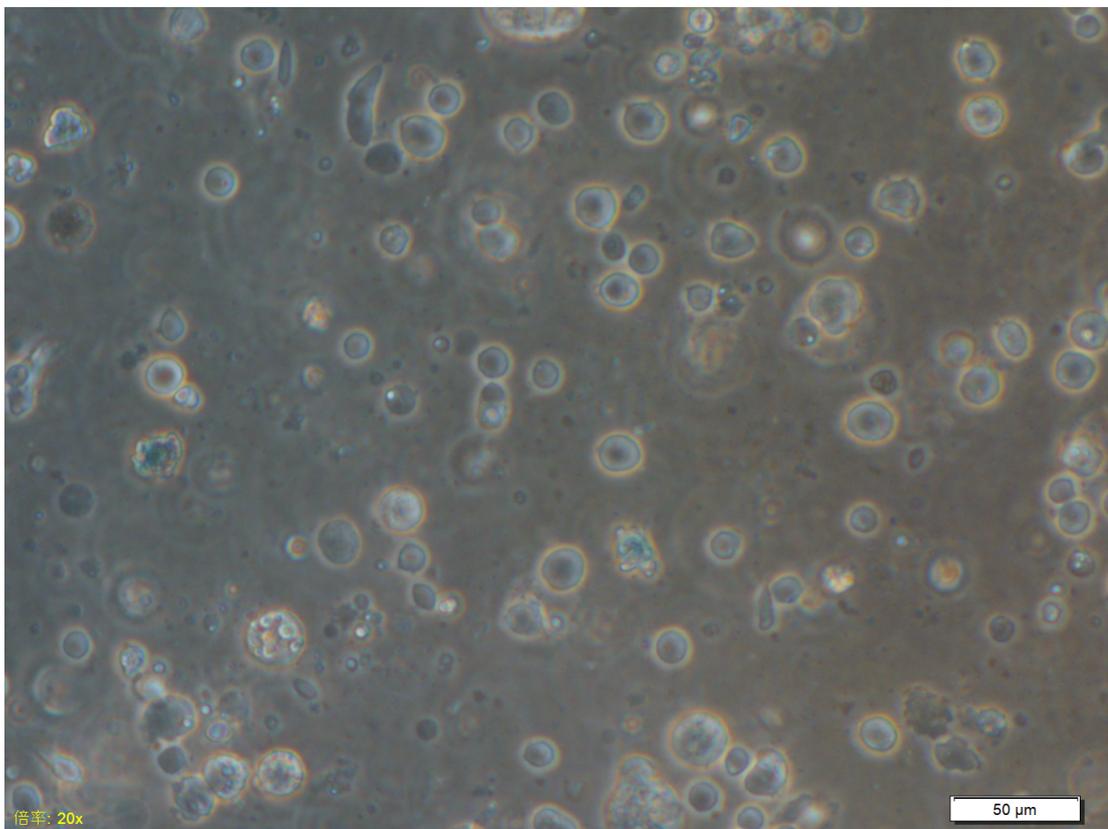


Fig. 3-3 neoblast 画分の位相差顕微鏡像

3.3.2 移植画分のメッシュ濾過と切断再生による neoblast 濃縮効果

移植画分中の neoblast の割合を高める目的で、donor の切断・再生による neoblast の分裂促進と 10 μm の孔径のメッシュでの濾過を行った。これらの処理の効果を検証するため、画分調製 60 時間前に切断した個体 (Fig. 3-4 の「cut あり」) と切断していない個体 (Fig. 3-4 の「cut なし」) それぞれより、40 μm のメッシュ濾過画分 (Fig. 3-4 の■) と 10 μm のメッシュ濾過画分 (Fig. 3-4 の□) を調製し、neoblast マーカー DrPIWI-1 発現細胞の割合を比較した (Fig. 3-4)。その結果、切断なしでは全細胞の 50%程であった neoblast の割合は、切断により 60-70%まで上昇した。またメッシュ濾過によっても 5%程度の割合上昇が見られた。AS 個体 (Fig. 3-4 左) と InS 個体 (Fig. 3-4 右) で同様の結果となった。以上より、両操作が neoblast の濃縮に効果的であることを確認した。InS 個体の方が、全体的に DrPIWI-1⁺細胞の割合が高いのは、DrPIWI-1 が卵原細胞や精原細胞においても発現するためであると考えられる。

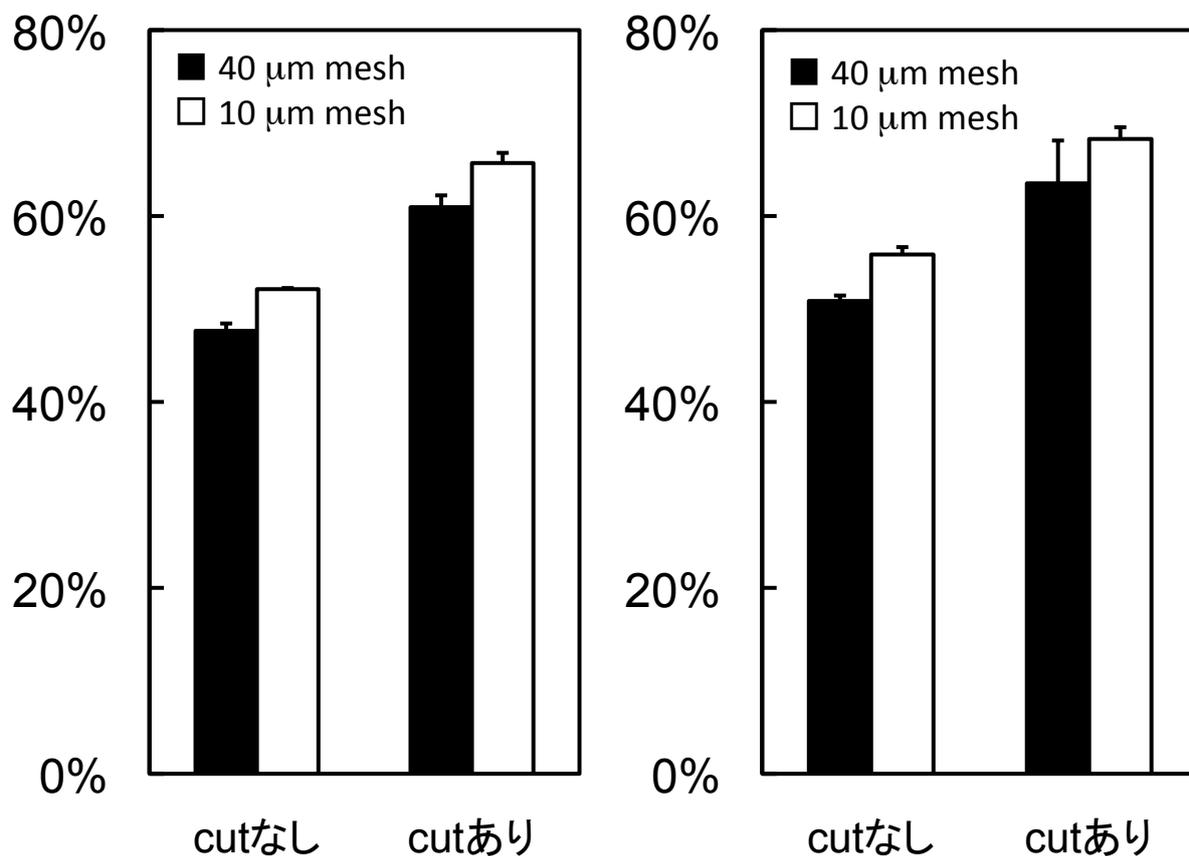


Fig. 3-4

メッシュ濾過と切断・再生による neoblast 濃縮効果の検討結果

全細胞 (Hoechst⁺) に対する DrPIWI-1⁺の割合。

左 : AS 個体、右 : InS 個体。

■ : 40 μm のメッシュ濾過画分、□ : 10 μm のメッシュ濾過画分。

3.3.3 移植後の生存率と X 線照射量の関係

neoblast 画分移植の効果を調べるため、非照射および非致死線量 (2.8 Gy、3.3 Gy) または致死線量 (4.4 Gy) 照射 AS recipient に対し neoblast 画分を移植し、移植後 30 日時点での生存率を調べた。この生存率は AqS 個体由来画分の場合と InS 個体由来画分で同じ傾向が見られたため、InS 個体の結果を Table 3-1 に示した。移植をしない場合の生存率は 4.4 Gy で 8% であり、これらも 30 日以降には全て成長がうまくいかず死亡した。一方、移植を行うと生存率は 8% から 40% へと大幅に増加した。よって 4.4 Gy での救助効果は確認できた。一方、非致死線量の 2.8 Gy と 3.3 Gy では移植をしなくても大半の個体は生き残り、生存率からは移植による救助効果ははっきりしなかった。よって生存率での評価からは、neoblast 画分移植が 4.4 Gy の X 線照射による致死の回避に効果的だったことが示された。

Table 3-1

InS donor 由来 neoblast 画分を AS recipient に移植して 30 日後の生存率

X 線照射量 (Gy)	移植なし	InS 個体由来 neoblast 画分移植
0	100% (20/20)	100% (40/40)
2.8	86% (19/22)	92% (12/13)
3.3	72% (36/50)	81% (55/68)
4.4	8% (6/74)	40% (54/134)

カッコ内は実際の匹数。

3.3.4 移植後の表皮損傷とX線照射量の関係

3.3.3において、生存率からは非致死線量照射個体に対する移植の効果がはっきりとしなかったが、死亡した個体だけでなく生存した個体においても照射から約1週間後より表皮に損傷が現れ、3週間後までには回復した(Fig. 3-5)。非致死線量照射では照射線量に相関した程度の表皮損傷が見られ、その後、回復することが報告されている(Salvetti et al. 2009)。そこでX線照射で引き起こされる表皮損傷の面から移植の救助効果を検証した。背側表皮は直接X線照射を受けることからダメージを受けやすく、また表皮はセルターンオーバーのサイクルが短いことから、X線照射による幹細胞の減少の影響が出やすいと考えた。今回、X線照射・移植後に30日目の時点で生存していた個体でも、照射後、大部分が表皮損傷を呈した(Table 3-2)。このように移植の有無や線量によらず照射後10日程で表皮損傷が見られたが、表皮損傷を呈してから完全に回復するまでにかかった時間は、いずれの線量でも移植により有意に短縮した(Fig. 3-6)。以上より、X線照射によるダメージが致死線量・非致死線量照射のいずれにおいても移植で救助されることが確かめられた。

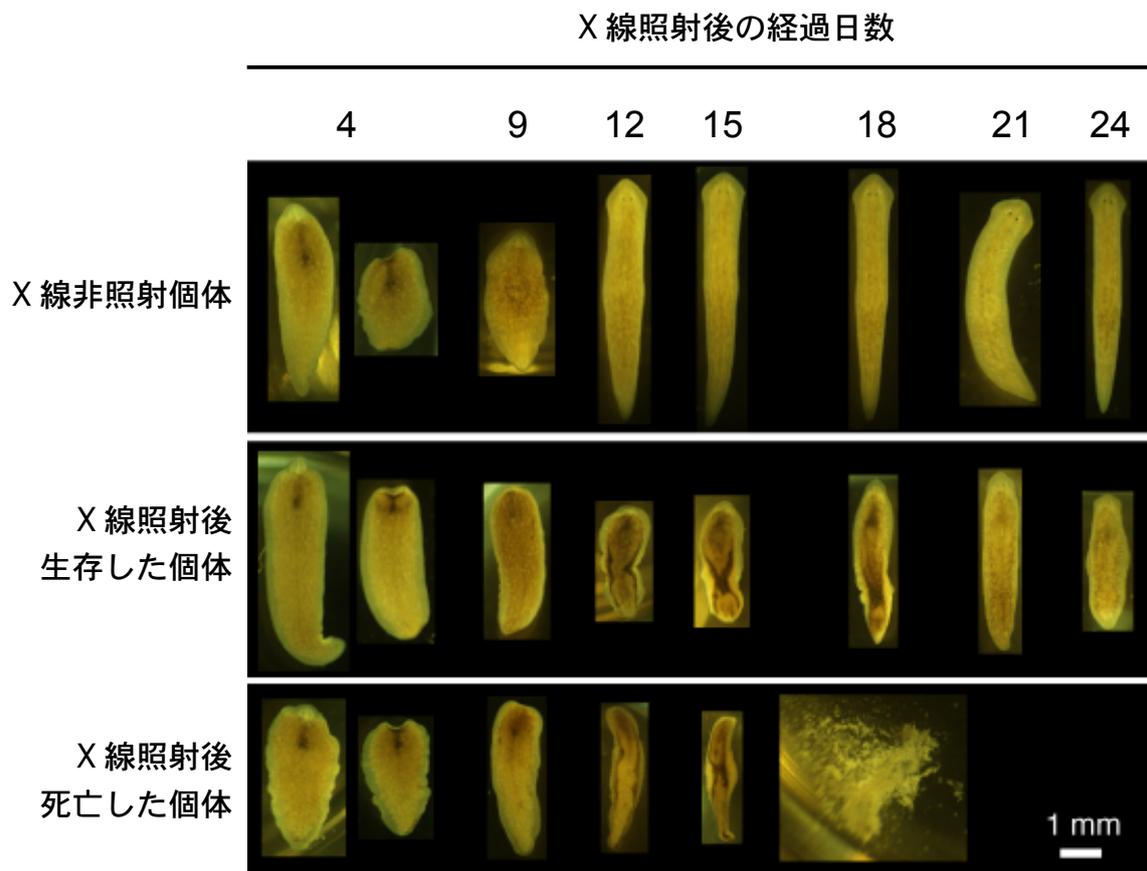


Fig. 3-5

非致死線量 X 線 (3.3 Gy) 照射 AS 個体の移植後の表皮損傷の経過

Table 3-2

**InS donor 由来 neoblast 画分を AS recipient に移植して
30 日後に生存した個体のうち表皮損傷を呈した個体の割合**

X 線照射量 (Gy)	移植なし	InS 個体由来 neoblast 画分移植
0	0% (0/20)	0% (0/40)
3.3	94% (34/36)	84% (46/55)
4.4	100% (6/6)	87% (47/54)

カッコ内は実際の匹数。

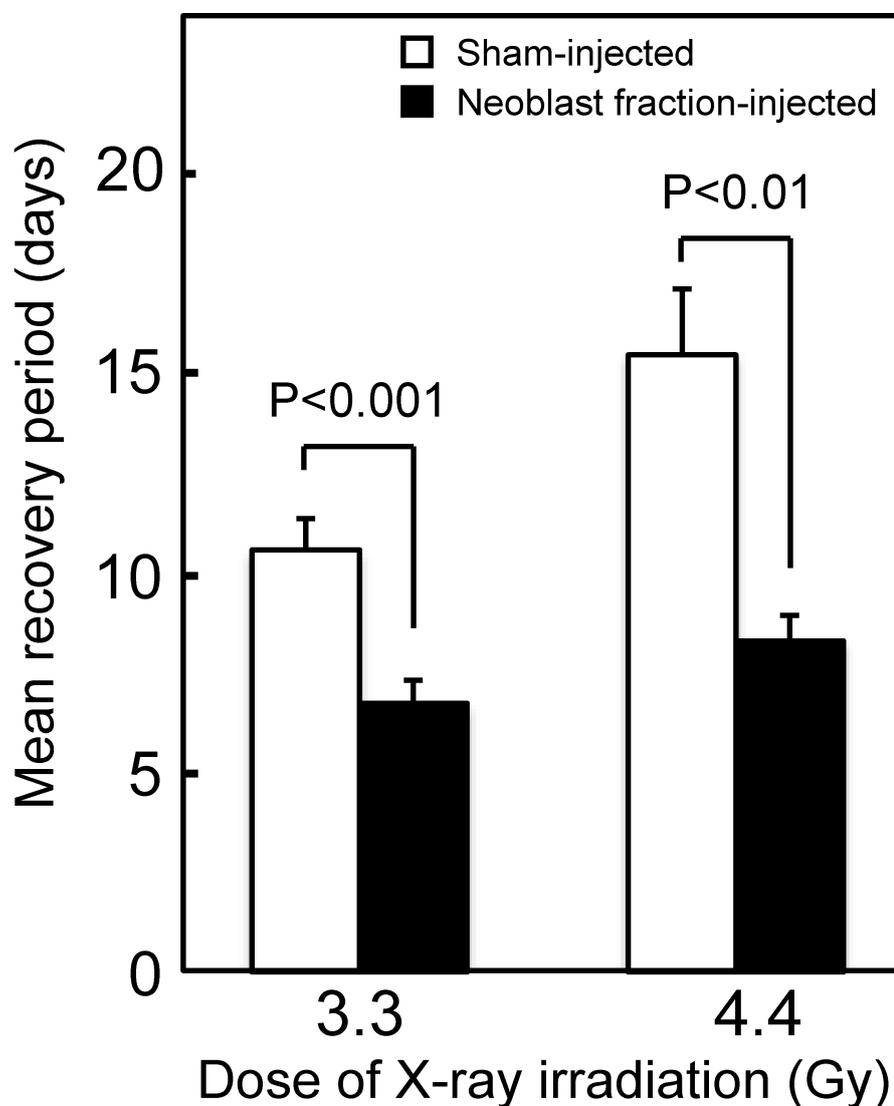


Fig. 3-6 neoblast 画分移植による表皮損傷期間の短縮効果

X 線照射後に呈する表皮損傷が継続する日数を移植の有無で比較し、移植による表皮損傷回復効果を評価した。

□：移植なし、■：移植あり。エラーバーは SEM を表す。P 値は Student's t-test により算出した。

3.3.5 マイクロサテライトマーカー *ms1* による donor 率の算出

前述の救助効果は移植細胞の生着によると考えられた。それをより確実に示すために、donor 由来細胞の追跡マーカーとしてマイクロサテライトを導入した。新たに単離したマイクロサテライト遺伝子座 *ms1* (Fig. 3-7) には3塩基 (AAT) n の繰り返し回数の多型が存在し、この部位を挟むプライマーでPCRを行うと、OH 株では3つの異なるサイズのバンドが検出される (Fig. 3-8 A)。本研究に用いた個体は OH 株もしくは OH 株を有性化して得られた AqS 個体同士の交配で得られた F1 世代の系統のため、この3バンドのうち2~3バンドを有する。そこで、このバンドパターンが異なる個体間で移植を行い、移植後個体内での donor 由来細胞を検出した。さらに *ms1* の3バンドの濃度比を用いて donor 由来細胞の移植後個体内での割合を算出する手法を起ち上げた (3.2.7 参照)。この *ms1* 解析は新規の手法であるが、移植後個体への適用に先立ち、donor 個体のゲノム DNA と recipient 個体のゲノム DNA を既知の割合で混合し、その混合比をバンド濃度から算出して *ms1* 解析の妥当性を検証し、由来の異なる細胞の混合比率を正しく見積もれることを確認した (Fig. 3-8)。また *ms1* 解析の結果は全身サンプルと尾部先端サンプルの間で差が無いことも確認した。

band a	1	AGAGCGGAAGTGAATCGAA	TTTCATATATAATTTGTGATAACAACACATGACAAATGAAT	60
band b	1	AGAGCGGAAGTGAATCGAA	TTTCATATATAATTTGTGATAACAACACATGACAAATGAAT	60
band c	1	AGAGCGGAAGTGAATCGAA	TTTCATATATAATTTGTGATAACAACACATGACAAATGAAT	60
		*****	*****	
band a	60	GTTTATCAAAAAGTAAATATAGTGAATTTATGAAATATATCTCTAATGAAAATTATAAAT		120
band b	60	GTTTATCAAAAAGTAAATATAGTGAATTTATGAAATATATTTT--AATGAAAATTATAAAT		118
band c	60	GTTTACCAAAAAGTAAATATAGTGAATTTATGAAATATATTTT--AATGAAAATTATAAAT		118
		*****.*****.*	*****.*	
band a	120	CAATGTCATTAAATAAATTTAAATAAATAATTGGTTTAAATTAATCAAATTAATATTTGGA		180
band b	118	CAATGTCATTAAATAAATTTAAATAAATAATTGGTTTAAATTAATCAAATTAATATTTGGA		178
band c	118	CAATGTCATTAAATAAATTTAAATAAATAATTGGTTTAAATTAATCAAATTAATATTTGGA		178

band a	180	ATTTAATACATTTAATTAATGAACCTGGCTGTAATGATAAATAGTAATAATAATAATAATA		240
band b	178	ATTTAATACATTTAATTAACGAACCTGGCTGTAATGATAAATAATAATAATAATAATAATA		238
band c	178	ATTTAATACATTTAATTAACGAACCTGGCTGTAATGATAAATAATAATAATAATAATAATA		238
		*****.******.******.*		
band a	240	ATAATAATGATAATAATAATAATATTATTATTATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA		300
band b	238	ATAATAAT-----AATAATAATAATTTAATAATAATTATTATTATTATTATTATTAGTA		289
band c	238	ATAATAAT-----AATAATAATAATTTAATAATAATTATTATTATTATTATTATTAGTA		289
		*****.******.******.***.***.***.***.***.***		
band a	300	TTAATAATAATAATAATAATAATAATAATTATTATTATTATTATTATTATTAGTAATCATAACAATAATCATA		360
band b	289	ATCATAACAATAATCATAATAATAATAAATTTATAATAATAATAATAATAATAATAATAAT---A		346
band c	289	ATCATAACAATAATCATAATAATAATAAATTTATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAAT---A		346
		.******.******.******.******.***.***.******.***.******.*		
band a	360	ATAACAGGTT		420
band b	346	ATAACAGGTT		406
band c	346	ATAACAGGTT		385
		*****.******.******.******.******.******.******.******.*		
band a	420	ATTGCAGAAATATCTTTAAATATTTTCAGAAATATATTTAAAATGTTTATGAACTAAAAA		480
band b	406	ATTGCAGAAATATATTTAAATATTTTCAGAAATATATTTAAAATGTTTATGAACTAAAAA		466
band c	385	ATTGCAGAAATATATTTAAATATTTTCAGAAATATATTTAAAATGTTTATGAACTAAAAA		445
		*****.******.******.******.******.******.******.******.*		
band a	480	ATAAGTTATACAAATATACATTTATTTATTTAATAAAAATCCTGTTTGGATAGTGCTCTTA		540
band b	466	ATAAGTTATACAAATATACATTTATTTATTTAATAAAAATCCTGTTTGGATAGTGCTCTTA		526
band c	445	ATAAGTTATACAAATATACATTTATTTATTTAATAAAAATCCTGTTTGGATAGTGCTCTTA		505
		*****.******.******.******.******.******.******.******.*		
band a	540	CGACATATTTTCGCATATGATTAACCAACCATTGAAATCCACAA		585
band b	526	CGACATATTTTCGCATATGATTAACCAACCATTGAAATCCACAA		571
band c	505	CGACATATTTTCGCATATGATTAACCAACCATTGAAATCCACAA		550
		*****.******.******.******.******.******.******.******.*		

Fig. 3-7 マイクロサテライト遺伝子座 *ms1* の配列

OH 系統で増幅される 3 配列 (band a, b, c) のアライメント。四角は PCR 増幅のプライマー配列。

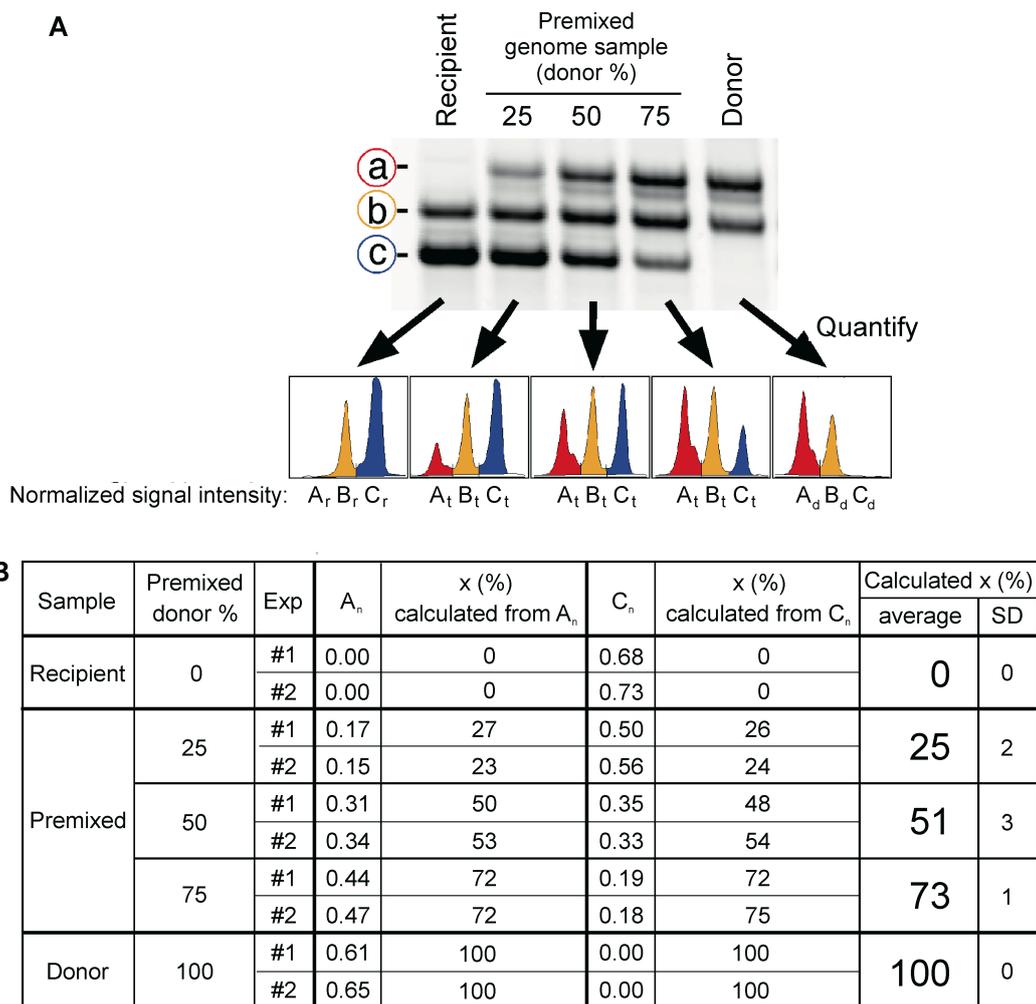


Fig. 3-8 既知混合比の DNA サンプルの混合比を *ms1* 解析で算出した結果

(A) *ms1* 解析での各バンド強度の定量の概略図

(B) donor 由来ゲノム DNA と recipient 由来ゲノム DNA を混合したサンプルについて、混合比を正しく見積もれるか否かを検証した結果。バンド a と c について 2 回の独立した実験の結果を示した。太字 (Calculated x) は平均値 (%)。

3.3.6 移植後個体内の donor 由来細胞の割合と X 線照射量の関係

まず、非致死線量 (2.8 Gy、3.3 Gy)、致死線量 (4.4 Gy) の X 線を照射した AS recipient に対して AS donor 由来の neoplast 画分の移植を行い、移植後 32 日および 52 日に donor 由来細胞の割合を調べた (Fig. 3-9)。その結果、いずれの移植後日数においても、照射線量が高い程、移植後個体内での donor 由来細胞の割合が高まるという相関が見られた。さらに各線量においては、移植後 52 日目の方が 32 日目よりも donor 率が高く、移植後の時間経過とともに donor 由来細胞が移植後個体内で占める割合を上昇させていることが示唆された。

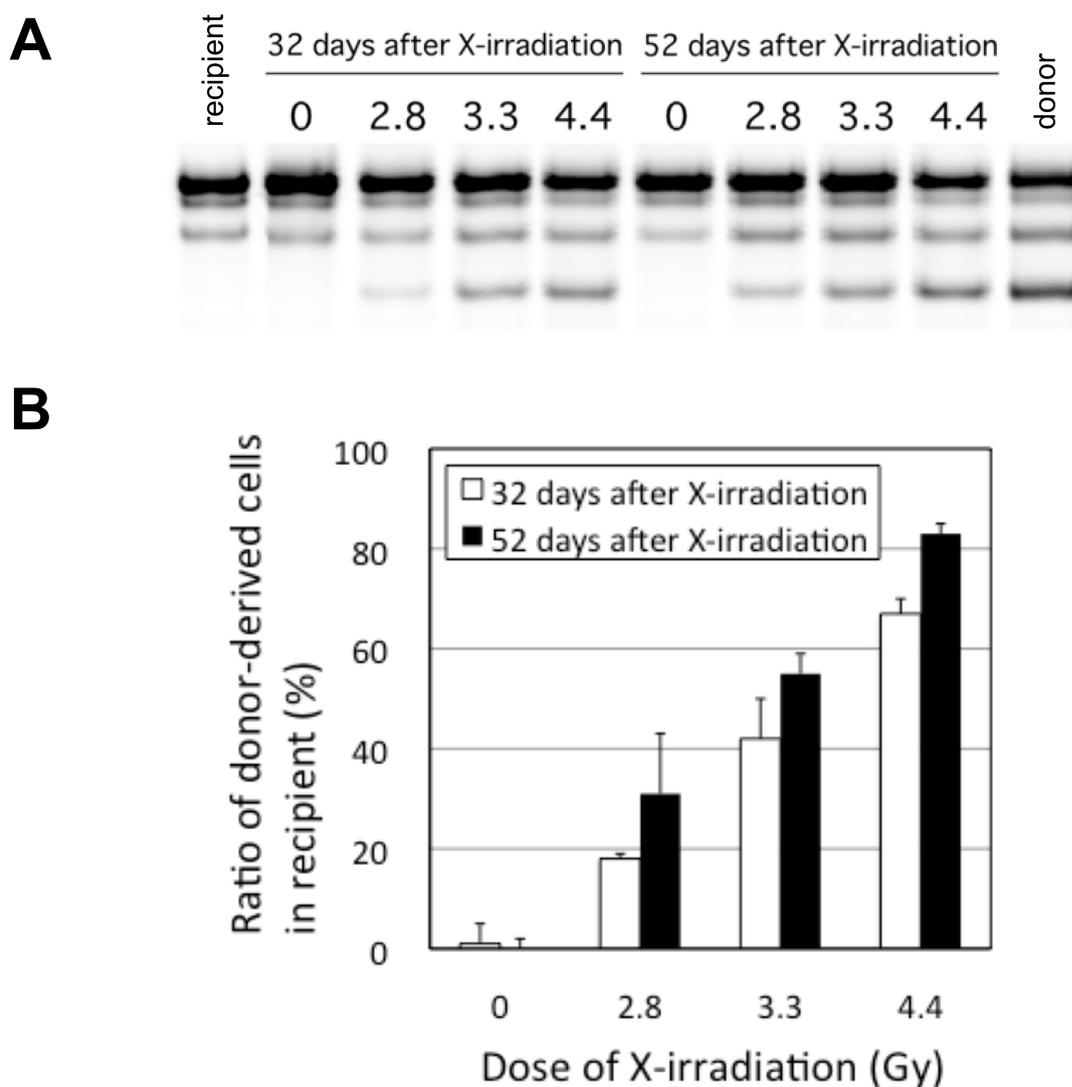


Fig. 3-9 移植から 32 日目と 52 日目の donor 由来細胞の割合

図中の線量を照射した AS recipient に対し、AS donor 由来 neoblast 画分を移植し、32 日後と 52 日後に全身よりゲノム DNA を抽出し、*msI* 解析により donor 率を算出した。

(A) : *msI* バンドパターン の 典型例。(B) : donor 率の算出結果。

□ : X 線照射から 32 日後、■ : X 線照射から 52 日後。

次に、より長期間での変化を調べるため、移植後 35 週目までの移植後個体内の donor 由来細胞の割合の経時変化を *ms1* 解析により調べた (Fig. 3-10 A)。その結果、照射ありで移植した場合 (Fig. 3-10 A の●と△) には照射線量によらず donor 率は移植後最初の 10 週間で上昇して行き、その後は一定値を保った。一定値に達するまでの時間は線量によらなかったが、最終的に安定した donor 率は照射線量によって異なった。致死線量の場合は最終的に 100%に達して一定となった。つまり移植の結果、移植細胞は際限なく増殖し、生み出された donor 由来細胞は分化して全ての recipient 由来細胞と置き換わった。一方、非致死線量の場合は最終的に donor 由来細胞と recipient 由来細胞が混合した状態で一定となった。つまり移植した neoblast は非致死線量照射個体においても生着し、体内で増殖して割合を高めていったが、同時に recipient 由来の neoblast も生存し、最終的に donor 由来細胞と recipient 由来細胞の安定なキメラとなった。対照的に、非照射 recipient に移植を行った場合には、donor 由来細胞は全く生着しなかった (Fig. 3-10 A の○)。以上より、致死線量照射個体への移植によっては donor 由来細胞による完全置換、非致死線量照射個体への移植によっては donor と recipient のキメラ個体を得ることが出来ることを、個体識別マーカーを用いて初めて示した。

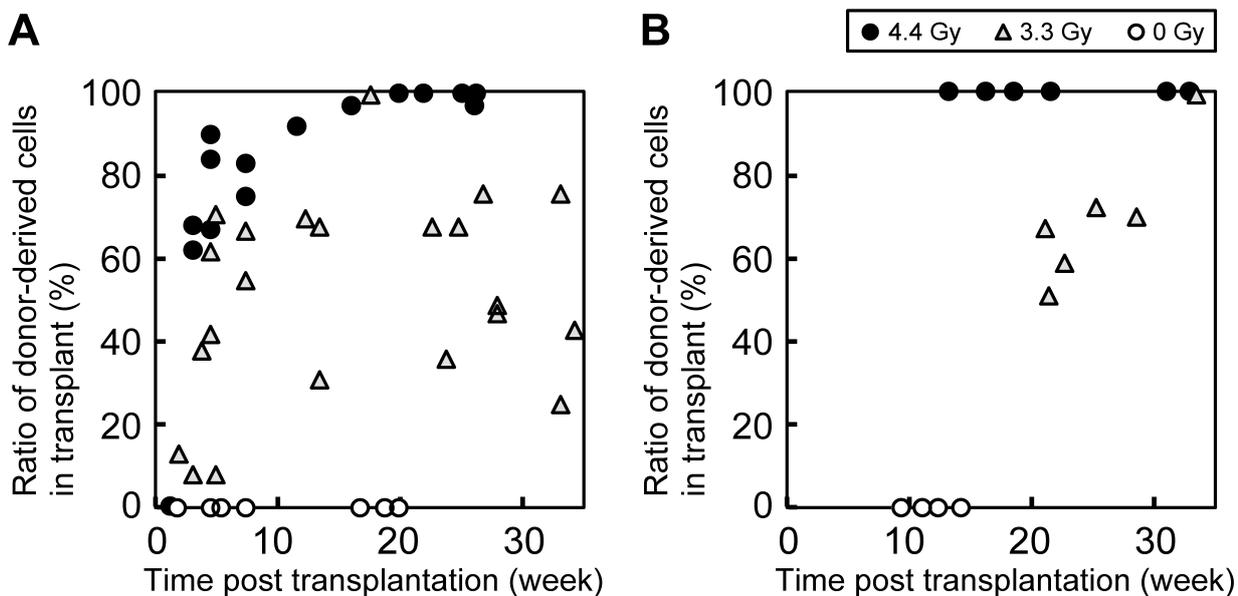


Fig. 3-10 移植後個体内の donor 由来細胞の割合の経時変化

図中に示した線量の X 線を照射した AS recipient に donor 由来 neoblast 画分を移植した。Donor 由来細胞の移植後個体内での割合を、*msI* 解析 (A) とゲノム倍数性解析 (B) により算出した。

● : 4.4 Gy (致死線量) 照射、△ : 3.3 Gy (非致死線量) 照射、○ : 非照射。

3.3.7 ゲノム倍数性による移植後個体内の donor 率の算出

マイクロサテライトを用いた donor 率の測定結果を別の手法でも確認するため、ゲノム倍数性をマーカーとして用いることとした。*D. ryukyuensis* の染色体数は $n = 7$, $2x = 14$ および $3x = 21$ である (Oki et al. 1981; Tamura et al. 1991; Tamura et al. 1995)。そこで、ゲノム倍数性が 2 倍体と 3 倍体の個体間での移植を行い、移植後個体の細胞ごとのゲノム倍数性を LSC によって測定し、移植後個体内の donor 個体由来細胞の割合を調べた (Fig. 3-10 B)。その結果、マイクロサテライトでの測定結果と同様の結果が得られ、致死線量では全身の細胞が donor 由来に置換すること、また非致死線量では安定なキメラになることを確認できた。

3.4 考察

3.4.1 生存率、表皮損傷を用いた移植の救助効果の検証

X線を照射した recipient へ neoblast 画分を移植した結果、致死線量照射個体のみでなく非致死線量照射個体においても X 線照射により引き起こされたダメージの軽減が見られ、移植による救助効果が確認できた。表皮損傷の治癒にかかる時間を指標とした、X 線照射によるダメージの評価はこれまで行われていないが、本章で示した通り、照射線量や移植の有無との明確な相関が見られ、X 線照射によるダメージおよびその回復の新たな評価指標となることが示された。

3.4.2 移植細胞識別マーカーについて

従来 of neoblast 移植においては、移植画分の生着が全身に渡り調べられてはいなかった。Baguña らは染色体転座 (Baguña et al. 1999) をマーカーとし、移植後個体で見られた体細胞分裂像がつねに donor 型であったことから、移植操作や移植細胞による host cell の生き返りを否定した (Baguña et al. 1989)。しかしその分裂像や頻度などのデータは一切示していない。さらに移植細胞が長期的に生着したのか、分化したかについても示されていない。それを受けて、我々のグループもメナシという遺伝的変異体をマーカーに用いて、眼については donor の生着・分化を証明した (Kobayashi et al., 2008)。しかしながら、移植細胞の多能性や分裂は示していなかった。加えて、眼特異的 GFP マーカーを用い

たトランスジェニックの報告 (Gonzalez-Estevez et al. 2003) はあるが、全ての細胞タイプを恒常的にラベルする方法はまだ確立されていない。このような背景のもと、本研究ではマイクロサテライトやゲノム倍数性を細胞追跡マーカーとして導入することで従来の移植法を改良し、移植後の donor 由来細胞の長期の追跡のみならず、移植後個体内の donor 由来細胞率の算出を達成した。

3.4.3 移植後個体内での donor 率の変化

移植 donor 由来細胞の個体内での比率の経時変化を調べた所、移植後 32 日目と 52 日目のいずれにおいても、X 線照射量と donor 率は相関しており、また移植後 52 日目の方が 32 日目より donor 率が上昇していた。より長期に 35 週目まで観察した結果、X 線照射量 3.3 Gy (非致死線量) と 4.4 Gy (致死線量) のいずれでも、移植後 10 週目までの期間に donor 率が上昇し、その後 donor 率は一定値を保っていた。このような移植後の donor 率の経過観察は本研究が初である。この donor 率が増えていく間というのは、移植画分に含まれる neoblast が生着し、X 線照射で選択的に失われた recipient の neoblast に代わる新たな幹細胞集団として分裂増殖して分化細胞を供給し、それが全身の recipient 由来の分化細胞とセルターンオーバーの過程で置換していく過程を反映しているものと考えられる。実際に移植画分には DrPIWI-1 発現細胞、つまり neoblast が濃縮されていた。また X 線非照射個体への移植では移植細胞が生着しなかったことも、X 線感受性の neoblast と donor 由来 neoblast の置換を傍証する。さらに致死線量照射で全身の細胞が donor 由来細胞に置換されたことは、移植画分の中に分化多

能性と幹細胞性（自らを枯渇させずに細胞を供給し続ける）をもつ細胞集団が含まれていたことを意味する。非致死線量照射個体への移植でキメラ率が一定に維持されたことは、recipient 由来 neoblast と donor 画分内の neoblast が共に等価の幹細胞として機能していることを示している。Salveti らにより、非致死線量照射では X 線への耐性が低い neoblast サブポピュレーションが消滅し、X 線耐性の高い細胞から、消滅したサブポピュレーションが再構成されることが示唆されているが (Salveti et al. 2009)、今回、非致死線量に耐性の細胞の中に真の neoblast (and/or 真の neoblast 能を再獲得しうる neoblast 子孫細胞) が含まれることが移植によるキメラ化により実証された。さらにキメラ状態では体内でどのような分布で donor 由来細胞が存在しているのか？また移植直後から donor 率の安定までの過程ではどのように分布を広げていくのか？などについて、*in vivo* または固定切片上などで細胞由来を検出できるマーカーがあると、さらに重要な知見を引き出せるだろう。

3.5 結言

本章において、移植後個体内での donor 由来細胞の割合を見積もる新たな手法を確立し、致死線量照射個体を用いた移植では移植後個体の全身が donor 由来細胞に置換されること、また非致死線量照射個体を用いた移植によって donor と recipient の細胞が長期にわたり安定的に共存するキメラ個体を作製できること、を証明した。次章以降では、この実験系を用いて InS 個体と AqS 個体の neoblast の性質を検証した。

第4章 幹細胞移植実験による InS 個体と AqS 個体の有性状態開始能の比較

4.1 緒言

第2章の小片再生実験によって、InS 個体と AqS 個体の間には、有性状態を自発的に開始できるか否かの点で、決定的な差があることが見出された。再生実験では生殖器官を *de novo* で作り出すかの点で明らかに差が見られたことから、その差異が neoblast 自体に規定されているという仮説に至った。それを検証する実験系として、第3章において neoblast 移植実験系を起ち上げた。そこで、本章では、全身が移植細胞由来に置換される条件である致死線量照射個体への neoblast 画分移植を行い、InS 個体あるいは AqS 個体由来 neoblast 画分を移植された AS recipient の生殖様式を検討した。

4.2 材料および方法

4.2.1 実験動物

用いた系統および飼育法は 2.2.1 と同様である。

4.2.2 neoblast 画分の移植

3.2.2~3.2.5 と同様の方法で移植を行った。Donor には十分に成熟し

たことを実体顕微鏡での外部形態の観察により確認した先天性有性個体 (InS) および人為的有性化個体 (AqS)、recipient には AS 個体を用いた。移植後個体は毎週、実体顕微鏡にて腹側より外部形態を観察し、生殖様式の判別を行った。

4.2.3 移植後個体内の donor 率の測定

3.2.7 と 3.2.8 の方法で、マイクロサテライトマーカー *ms1* およびゲノム倍数性を利用して、移植後個体内の donor 率を測定した。

4.2.4 固定切片の組織観察

2% HCl/5/8 Holtfreter 氏液で個体を 5 分間処理後、4%パラホルムアルデヒド/5/8 Holtfreter 氏液で固定し、パラフィンに包埋した。4 μm 厚の切片を作製し、ヘマトキシリンとエオシンで染色した。

4.2.5 移植後個体の F1 個体の観察

移植により有性個体となった個体を切断・再生させた個体同士を交配させた。得られた F1 個体についてマイクロサテライトマーカーのバンドパターンを用いた親子鑑定を行った。

4.3 結果

4.3.1 致死線量照射 AS recipient への InS および AqS donor 由来 neoblast 画分の移植結果

AqS 個体や InS 個体の neoblast が自律的な有性状態開始能力を持つか否かを調べるために、致死線量 X 線照射 AS recipient へ移植し、移植後個体の生殖様式を観察した。まず AqS donor の移植の代表的な結果を Fig. 4-1 の上段に示す。*msl* 解析により、移植による完全な細胞置換を確認したが (Fig. 4-1 A, B)、移植後個体は決して生殖器官をつくることなく、移植から 17 週目以降、自切を繰り返した (Fig. 4-1 C)。次に、InS donor の移植の代表的な結果を Fig. 4-1 の下段に示す。この場合も donor 由来細胞による完全な置換を確認した (Fig. 4-1 D, E)。AqS 個体の結果とは対照的に、InS donor を移植された個体は自切しなかった。その上、移植後 17 週目には交接器官が確認され、その後、体を大きくしながら生殖器官を発達させて行った (Fig. 4-1 F)。最終的には 30 週目には InS 個体と同様の、完全成熟した有性個体となった (Fig. 4-1 F)。完全成熟して以降も有性状態が維持された。

移植後 30 日の生存率は AqS 個体で 39% (90/229)、InS 個体移植で 40% (54/134) であったが、その後、サンプリングや成長不良のため死んで減り、最終的に生殖様式の判別ができたのは、それぞれ 14 匹、10 匹であった。それらの生殖様式は Table 4-1 に示した通りで、全てが上記の典型例と同様の結果となり、InS donor 画分の移植でのみ AS recipient の生殖様式が有性へと変化した。交接器官形成は移植後 17~42 週に観察された。それに対し、AqS donor 画分の移植は

AS recipient の生殖様式を変化させなかった。最初の自切は 15～40 週に確認された。また非照射 AS recipient に InS donor 画分の移植を行った場合には無性になった (Table 4-1)。全ての場合において、交接器官形成や自切は一定の体長 (7 mm) を超えると観察された。以上より InS 個体の neoblast 画分のみが自律的な有性状態開始能力をもつことが明らかになった。また AqS 個体と InS 個体の細胞レベルでの生殖様式決定の違いを初めて示した。

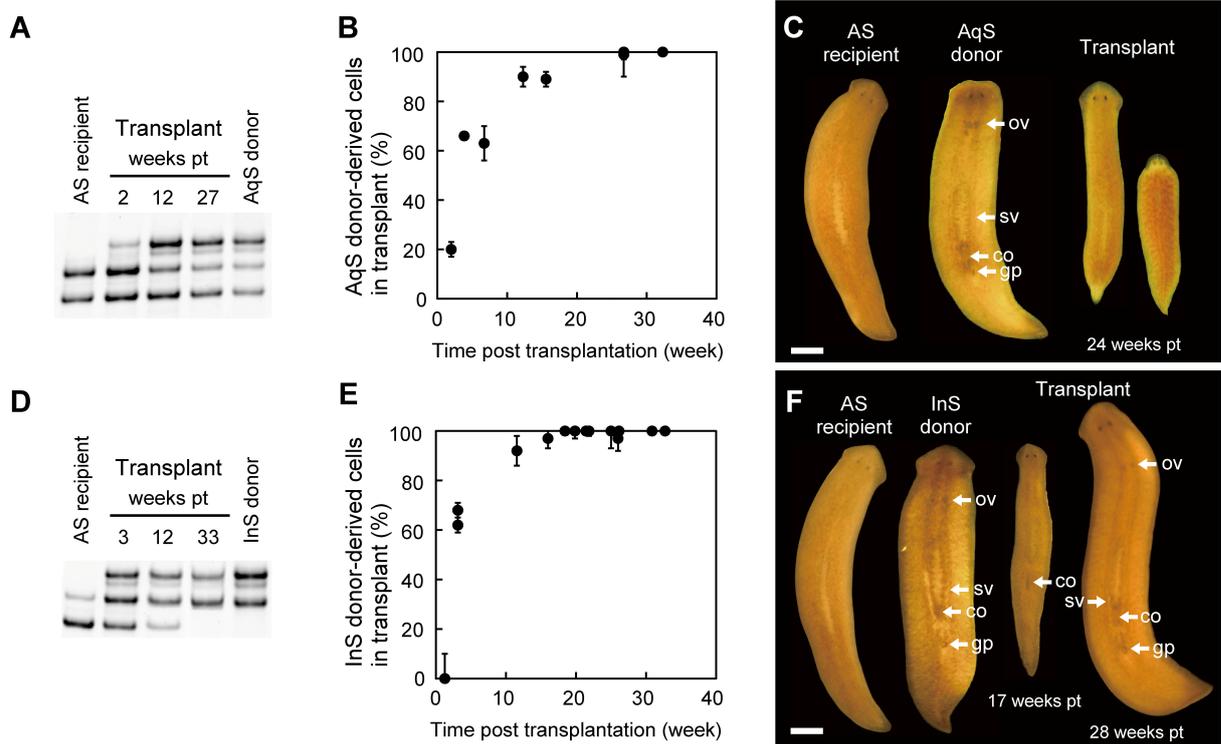


Fig. 4-1 致死線量照射 AS recipient への InS および AqS donor 由来 neoplast 画分の移植結果の典型例

(A–C) AqS donor を致死線量照射 AS recipient に移植した結果の典型例。

(D–F) InS donor を致死線量照射 AS recipient に移植した結果の典型例。

(A, D) ゲノム DNA を AS recipient、InS donor、移植後個体から抽出し、*ms1* バンドパターンの移植後の変遷を調べた結果。

(B, E) *ms1* 解析により移植後個体内での donor 由来細胞の割合の経時変化を調べた結果。データは独立した 3 回以上の測定の平均値±SD。

(C, F) インタクトの donor と recipient、図中に示した移植後経過時間の移植後個体の写真 (C の Transplant は背側から。それ以外は腹側から)。

ov : 卵巣、sv : 貯精嚢、co : 交接器官、gp : 生殖孔、pt : post-transplantation。スケールバーは 1 mm。

Table 4-1 InS および AqS donor 由来 neoblast 画分を致死線量 X 線照射／非照射 AS recipient に移植した結果の生殖様式

Recipient への 致死線量 X 線照射	Donor	生存した移植後個体の 生殖様式			死亡*	総計
		有性	無性			
+	sham	0	0	107	107	
+	InS	10	0	124	134	
+	AqS	0	14	215	229	
-	InS	0	29	0	29	

* 死亡: 飼育過程での死亡とサンプリングによる

4.3.2 移植後個体の全身より抽出したサンプルでの donor 率算出

移植後 12 週目を超えた個体については、尾部先端よりサンプルを調製して donor 率の算出を行った。そこで移植後個体内の全ての recipient 由来細胞が donor 由来細胞により完全に置換されたことを確認するため、全身由来サンプルでの donor 率の算出を行った (Fig. 4-3)。4.4 Gy 照射 AS recipient に InS donor 由来 neoblast 画分を移植して 24 週間後に交接器官形成が確認された個体 (Table 5-1 の個体 No. 29 と同一個体) について、移植後 38 週目に全身からゲノム DNA を抽出し、*msl* 解析した。この個体は移植後 25 週目に尾部先端サンプルで *msl* 解析を行い donor 率 100% と確認されたが、Fig. 4-3 の通り、全身由来のサンプルでも donor と同一の *msl* バンドパターンであり、recipient 特異的なバンドは検出されなかった。よってこの個体は全身が移植細胞に由来する細胞からなることが確かめられた。

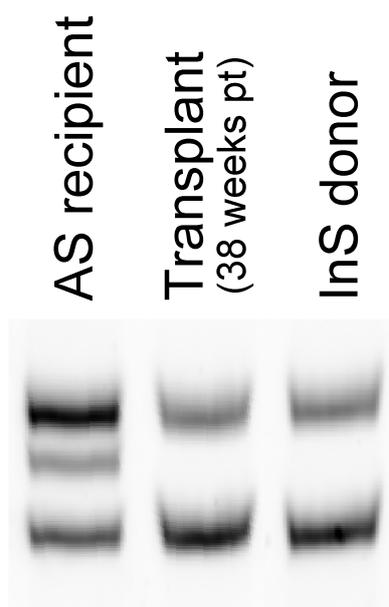


Fig. 4-3 致死線量照射 AS 個体への InS donor 由来 neoblast 画分移植後 38 週

目の個体の全身由来サンプルでの *ms1* 解析

(Table 5-1 の個体 No. 29 と同一個体)

4.3.3 ゲノム倍数性をマーカーとした移植後完全置換の証明

マイクロサテライトマーカーに加えて、ゲノム倍数性をマーカーとしての移植後個体の donor 率の評価も行った。3 倍体 AS recipient に 2 倍体 InS donor の neoblast 画分を移植した。33 週間後の移植後個体全身を解離し、各細胞の DNA 含量を LSC 解析したところ、単一の 2 倍体ピークが見られた (Fig. 4-4)。つまり 33 週後の移植後個体を構成する全細胞が donor 由来と確認できた。4.3.2 の結果と合わせて、移植した donor 細胞の生着・増殖、完全置換を証明できた。

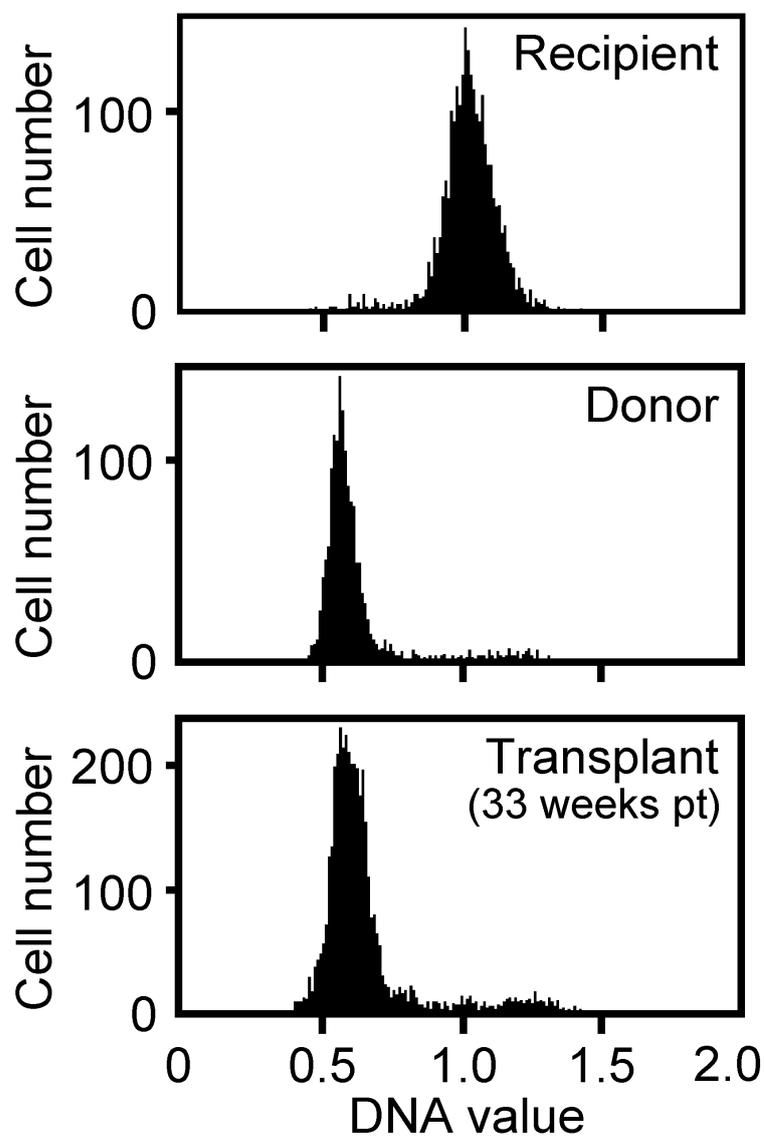


Fig. 4-4 ゲノム倍数性をマーカーとした移植置換の証明

3 倍体 AS recipient (上段) に致死線量の X 線を照射し、2 倍体 InS donor (中段) 由来 neoblast 画分を移植。移植後 33 週間後に LSC 解析 (下段)。

4.3.4 InS donor 移植後個体の組織観察

InS donor 由来 neoblast 画分を移植した個体がいずれも完全成熟したことを外部形態から観察したが、さらに詳しく調べるため、組織切片を観察した (Fig. 4-5)。AS 個体は、1 対の少数細胞の凝集 (卵巣原基) を持つ (Fig.4-5 A) 以外、生殖器官はもたない (Fig.4-5 D, G)。一方、移植後個体 (Fig. 4-5 C, F, I) は InS donor (Fig. 4-5 B, E, H) 同様の正常な形態の生殖器官を形成したことを確認できた。両者の卵巣は周縁部に卵原細胞の層と、中心部には成熟した卵母細胞を持ち (Fig. 4-5 B, C)、精巣も周縁部に精原細胞の層がある他に、内腔に向かって精母細胞、精子細胞、成熟精子の精管への放出を確認できた (Fig. 4-5 E, F)。交接器官も正常な形態であった (Fig. 4-5 H, I)。また成熟した卵黄腺も確認できた。卵黄腺は有性化の最終段階を示す。

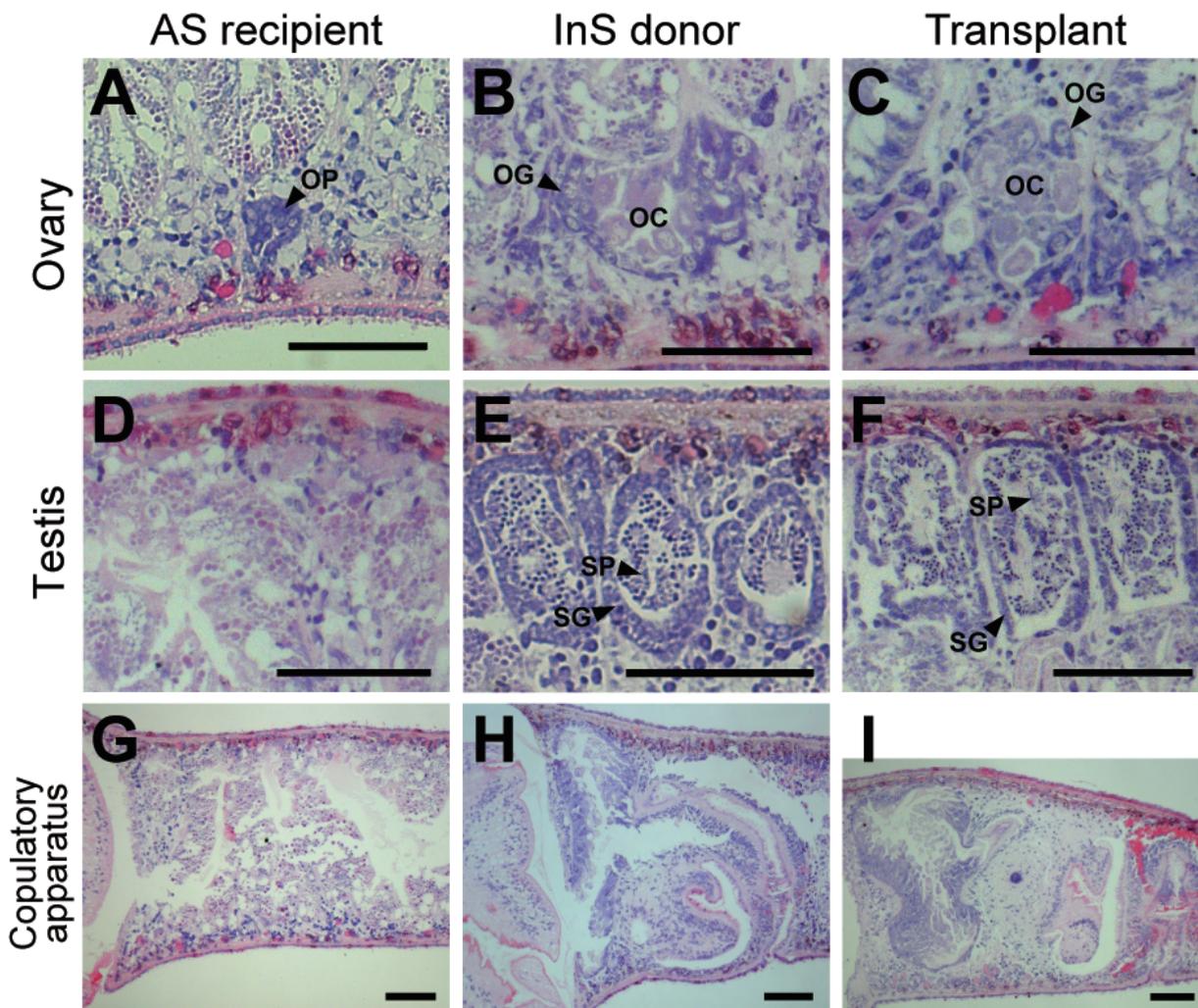


Fig. 4-5 移植後個体に形成された生殖器官の組織観察

(A-C) : 卵巣、(D-F) : 精巣、(G-I) : 交接器官。

(A, D, G) : AS recipient、(B, E, H) : InS donor、(C, F, I) : 移植後個体。

OP : 卵巣原基、OG : 卵原細胞、OC : 卵母細胞、SG : 精原細胞、SP : 精子。左が頭側、上が背側。スケールバーは 100 μm 。

4.3.5 InS donor 移植後個体の交配実験

4.3.4 の組織観察により InS donor 移植後個体と InS donor の間には生殖器官の形態的に明らかな差はないことが明らかになった。さらに繁殖可能かを調べるために移植後個体同士を掛け合わせた。その結果、移植から 11 か月後以降にコクーン（複合卵）を産み、そこから仔虫が孵化した。仔虫は正常に成長した。よって、移植後個体に形成された生殖器官は形態が正常であるだけでなく機能的でもあったことも確かめられた。さらに注目すべきはマイクロサテライト *ms1* のバンドパターンを用いた親子鑑定により、donor 特異的なマイクロサテライトバンドが仔虫に受け継がれていることを確認した。これは移植細胞由来の neoblast が機能的な配偶子に分化して次世代に受け継がれたことを実証する。

4.3.6 InS donor 移植後個体の小片再生実験

最後に、InS donor 移植後個体の小片再生実験を行った（Fig. 4-6、Fig. 4-7）。結果は Fig. 2-2 B に示した InS 個体と同様であり、切断後 10 週を超えても、断片の由来する部位によらず全ての断片が有性になった。

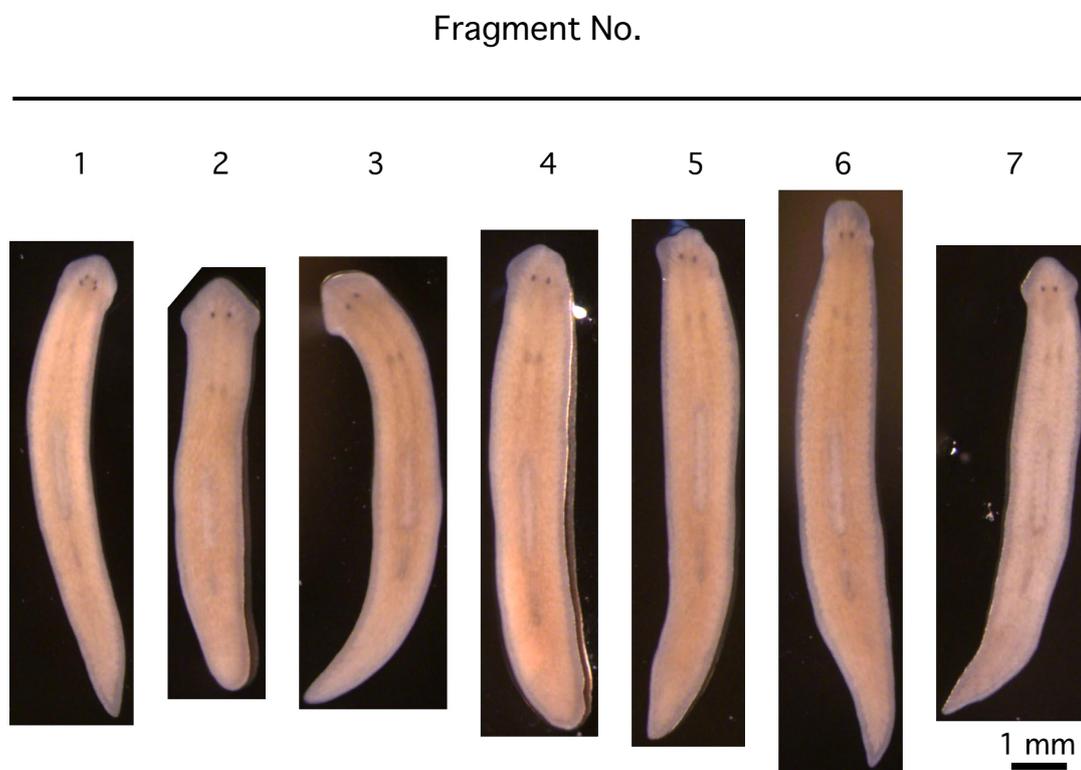


Fig. 4-7 X線照射 AS recipient に InS donor 由来 neoblast 画分を移植して有性個体になった移植後個体の小片再生実験での切断 21 週間目の個体写真 Fig. 4-6 に示した個体の腹側からの写真。Fragment No. は Fig. 2-2 A と同じく、頭部断片を No. 1 として頭から尾にかけて順番にふった。全ての断片由来の個体で 1 対の卵巢と交接器官の形成が確認できた。

4.4 考察

致死線量 X 線照射 AS recipient に InS donor の neoblast 画分を移植した結果、全ての個体で有性になったことから、InS 個体の有性状態開始能力は neoblast 自体に担われていることが証明された。さらに移植後個体同士の交配での親子解析により、donor 由来 neoblast が機能的な配偶子に分化したことも証明された。一方、AqS 個体由来の neoblast 画分も全身の recipient 由来細胞と置き換わりはしたが、有性状態の開始は見られなかった。よって第2章の小片再生実験で示された AqS の有性状態自律的開始能の欠如は、その neoblast 自体に規定されていることが示された。AqS 個体移植では有性化因子や分化細胞等の neoblast 以外の内容物も移植しているが、移植後個体は有性にならなかったことにより、InS donor の移植後個体が有性になった原因からこれらの要因は排除できる。特に有性化因子は画分調製の過程において排除できていると考えられる上、有性化実験系では2週間の連続投与が必要なことから量的にも不十分であり、有性化因子による有性化という可能性は完全に否定できる。これらを総合すると、移植画分のうち neoblast こそが有性状態を引き起こした原因である可能性が極めて高い。さらに InS donor 移植後個体の再生実験も、生着細胞の stemness および自発的な有性状態開始能力を証明しており、InS donor の neoblast の移植により AS recipient が InS 個体様の自発的な有性状態開始能力を獲得したという解釈を支持する。

本研究により生殖様式の決定は幹細胞性と多能性を併せ持つ neoblast 画分に存在することが示された。歴史的には、neoblast とは形態のみに基づいて

プラナリアの幹細胞を指す言葉とされてきた (Hori 1982; Hyman 1951)。しかしながら、最近の遺伝子発現解析や FACS に基づいた研究 (Higuchi et al., 2007) により neoblast 集団内の heterogeneity が示唆されて来た (Rossi et al., 2006; Sato et al., 2006; Salvetti et al., 2009)。生殖様式決定に関わる neoblast 集団が単一なのか複数なのかは、単一細胞や純化した画分の移植により今後検討すべき課題である。最近、Wagner らにより FACS で単離した neoblast の単一細胞移植が報告され、InS recipient に対して AS donor 由来 neoblast を 1 細胞移植することで全身が donor 由来細胞からなる AS 個体になったことから、neoblast の体細胞系列への分化多能性が示された (Wagner et al. 2011)。Wagner らは、AS 個体の X 線照射から致死までの時間が短いことから、本研究のように有性個体を donor として AS recipient に移植するという組み合わせは行っていないが、この組み合わせにおける単一細胞移植は今後検討すべき興味深い実験系である。FACS による neoblast の単離方法 (Hayashi et al. 2006) は、本研究に用いた *D. ryukyuensis* にも適用できることを確認したため、実現すれば、Wagner らの結果に加えて neoblast の生殖細胞系列への分化能を示すことができるだろう。

4.5 結言

neoblast 画分の移植の結果、InS 個体の有性状態の自律的な開始能は neoblast 自体に規定されていることが明らかになった。また第 2 章で示唆された通り、実験的有性化で獲得された有性状態は絶対的なものではないことも示された。

第5章 キメラ個体制製による InS 個体と AS 個体の卵巣形態制御の比較

5.1 緒言

これまでに知られている InS 個体と AqS 個体との差異として、卵巣の形態がある (Kobayashi et al. 2012)。InS 個体では 1 対しかない卵巣が、AqS 個体では肥大し、過剰数形成される。さらに、InS 個体に外部から有性化因子の投与を行っても卵巣の形態や数は変化しないことが示されており、AqS 個体における卵巣形態は有性化刺激の量が原因ではなく、有性化刺激に対する卵巣形成制御の応答性が InS 個体とは異なること示唆された (Kobayashi et al. 2012)。では、AS 個体の細胞が内因性の有性化刺激を受けた場合はどうなのであろうか？本章では、AS 個体に InS 個体由来の neoblast 画分を移植してキメラ個体制製することで、AS 個体由来細胞が内因性の有性化因子に曝される状況をつくり出し、InS 個体と AS 個体の卵巣形態制御について考察した。

5.2 材料および方法

5.2.1 実験動物

用いた系統および飼育法は 4.2.1 と同様である。

5.2.2 neoblast 画分の移植

4.2.2 と同様に、移植および移植後の生殖様式の判別を行った。

5.2.3 移植後個体内の donor 率の測定

4.2.3 と同様に、移植後個体内の donor 率を測定した。

5.2.4 固定切片の組織観察

4.2.4 と同様に、組織切片を作製し観察した。

5.3 結果

5.3.1 AS 個体由来細胞と InS 個体由来細胞のキメラ個体の生殖様式

第3章で確立した移植実験系を用い、「InS donor 由来細胞のみからなる個体」と「InS donor と AS recipient 由来の細胞のキメラ個体」を作製し、生殖様式を調べた。移植後の donor 率の推移と生殖様式を観察した典型的な例を Fig. 5-1 に挙げた。X 線照射なしで移植した場合、移植後個体に donor 特異的なマイクロサテライトバンドは検出されず (Fig.5-1 A)、バンドの濃度比から算出した donor 率も 0%のままであり (Fig. 5-1 B)、移植細胞は全く生着しなかった。この場合、生殖器官は形成されず、体長が一定に達した 13 週目以降、AS 個体 (Fig. 5-1 J の AS) と同様に自切を繰り返した (Fig.5-1 C)。次に致死線量の X 線を照射した AS recipient に InS donor 画分を移植した場合、マイクロサテライトパターンは移植後の経過時間とともに recipient のパターンから donor のパターンに近づいていき、最終的に donor 率は 100%になった (Fig. 5-1 D, E)。移植後 17 週目に交接器官形成が確認され、その後成熟して行き最終的に donor として用いた InS 個体 (Fig. 5-1 J の InS) と同様の完全成熟した有性個体となった (Fig. 5-1 F)。卵巣の形態は肥大しておらず、1 対のみであった。非致死線量照射の場合は、移植後個体に donor と recipient 双方に特異的なマイクロサテライトバンドが長期にわたり存在したことより、キメラになっていることを確認した (Fig. 5-1 G, H)。この場合も 17 週目に交接器官が観察された後、生殖器官を形成していき、最終的に完全成熟した有性個体となった (Fig. 5-1 I)。移植後に形成された卵巣は AqS 個体 (Fig. 5-1 J の AqS) 様で、InS 個体に比較して肥大し、過剰卵巣対もあった。

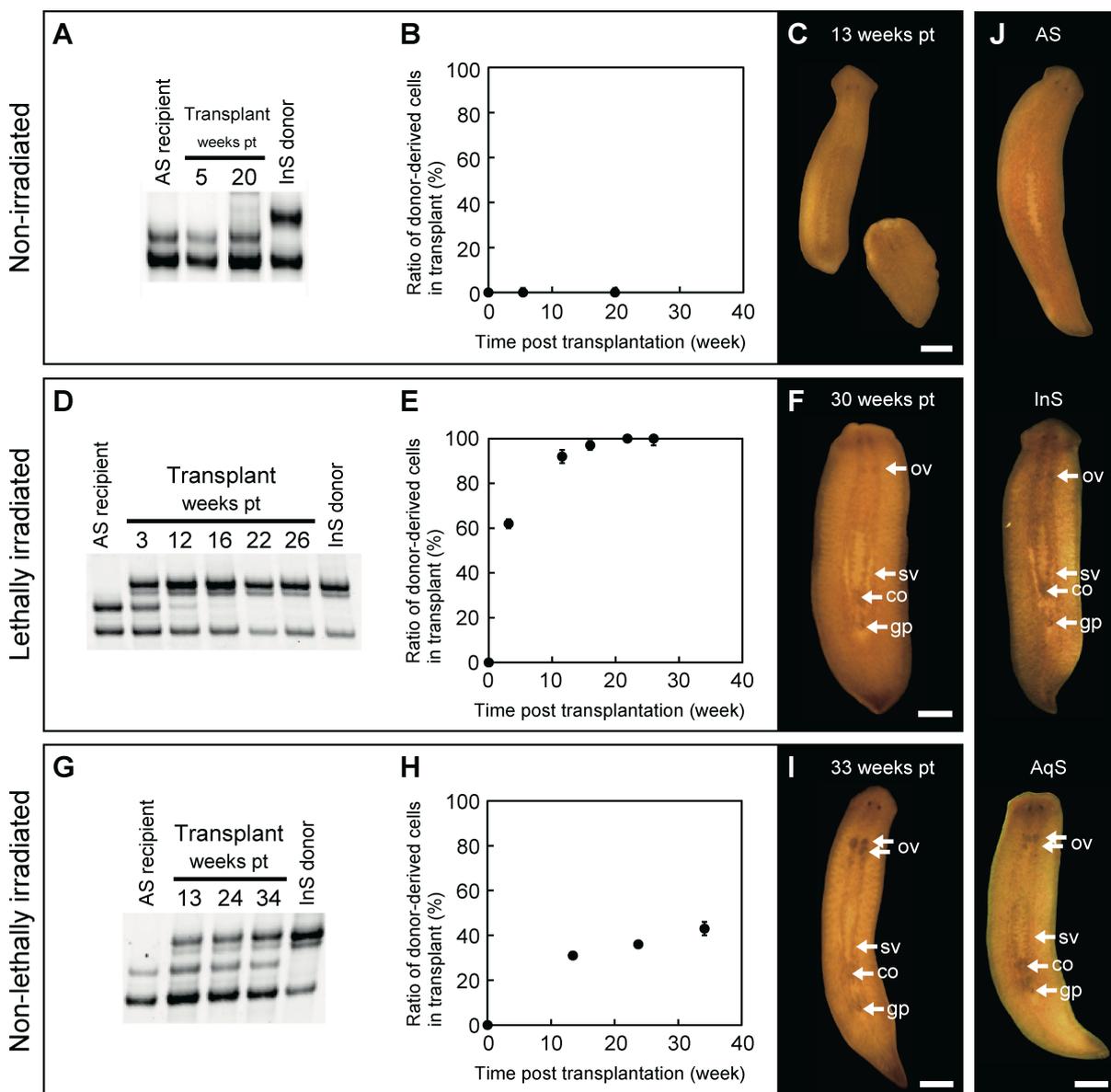


Fig. 5-1 InS donor 由来 neoblast 画分を致死線量／非致死線量 X 線照射 AS recipient への移植結果の典型例

(A–C) InS donor を非照射 AS recipient に移植した結果の典型例。

(D–F) InS donor を致死線量照射 AS recipient に移植した結果の典型例。

(G–I) InS donor を非致死線量照射 AS recipient に移植した結果の典型例。

Fig. 5-1 InS donor 由来 neoblast 画分を致死線量／非致死線量 X 線照射 AS recipient への移植結果の典型例（つづき）

(A, D, G) ゲノム DNA を AS recipient、InS donor、移植後個体から抽出し、*msl* バンドパターンの移植後の変遷を調べた結果。

(B, E, H) *msl* 解析により移植後個体内での donor 由来細胞の割合の経時変化を調べた結果。データは独立した 3 回以上の測定の平均値±SD で表してある。

(C, F, I) 図中に示した移植後経過時間の腹側からの移植後個体の写真。

(J) インタクトの AS, InS, AqS 個体の腹側からの写真。

ov : 卵巣、sv : 貯精嚢、co : 交接器官、gp : 生殖孔、pt : post-transplantation。スケールバーは 1 mm。

致死線量照射個体（中段）は Fig. 5-6 G、Table 5-1 の No. 26 個体と同一個体。

非致死線量照射個体（下段）は Fig. 5-6 C、Table 5-1 の No. 17 個体と同一個体。

5.3.2 AS 個体由来細胞と InS 個体由来細胞のキメラ個体の生殖器官の組織観察

移植後の個体の生殖器官を組織観察した (Fig. 5-2)。移植前の AS recipient には少数の卵原細胞の凝集からなる卵巣原基しか見られない (Fig. 5-2 A, F)。そこに致死線量の X 線照射後、InS donor 画分を移植した結果、形成された卵巣 (Fig. 5-2 C, H) は肥大しておらず、過剰卵巣も見られず、InS 個体 (Fig. 5-2 B, G) と同様の形態であった。一方、非致死線量の X 線照射個体に InS donor 画分を移植後形成された卵巣 (Fig. 5-2 D, I) については、インタクトの AqS 個体 (Fig. 5-2 E, J) と同様に肥大し構成細胞数も多い卵巣と、過剰卵巣が確認された。また、その他の生殖器官 (精巣、交接器官、貯精囊、卵黄腺) については、AS 個体には原基も全くないが、移植の結果、致死線量・非致死線量照射個体ともに AqS 個体や InS 個体で観察されるのと同様の形態の器官が形成されたのを確認した (精巣は Fig. 5-2 K-T)。

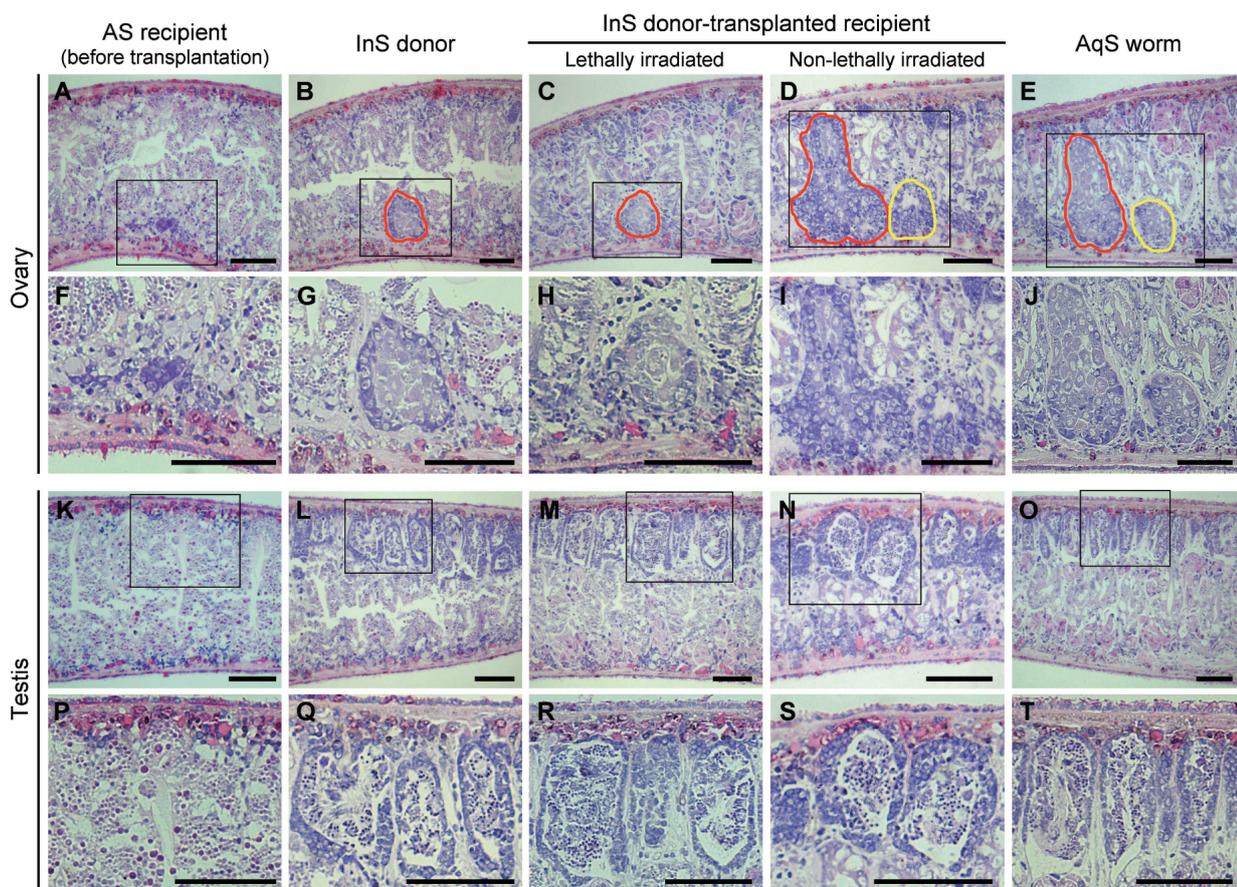


Fig. 5-2 移植後個体に形成された生殖器官の組織観察

InS donor 由来 neoplast 画分を致死/非致死線量照射 AS recipient に移植した個体の矢状方向切片の卵巣 (A-J) と精巣 (K-T) の HE 染色組織像

(A, F, K, J) : 移植前の AS recipient。

(B, G, L, Q) : InS donor。

(C, H, M, R) : 致死線量照射 AS recipient に InS donor 画分を移植した個体。

(D, I, N, S) : 非致死線量照射 AS recipient に InS donor 画分を移植した個体。

(E, J, O, T) : インタクトの AqS 個体。

赤枠内は卵巣、黄枠内は過剰卵巣。

上が背側、左が頭側。スケールバーは 100 μm 。

5.3.3 ゲノム倍数性をマーカーとした移植後キメラ化の証明

マイクロサテライトマーカーに加えて、ゲノム倍数性をマーカーとしての移植後個体の donor 率の評価も行った。非致死線量照射 3 倍体 AS recipient に、2 倍体 InS donor 由来 neoblast 画分を移植した。移植後 199 日 (2.8 Gy) と 176 日 (3.3 Gy) の十分に有性成熟した個体の尾部先端よりサンプルを調製して LSC 解析した結果、2 倍体ピークと 3 倍体ピークの両方が見られた (Fig. 5-3)。つまり donor 由来細胞と recipient 由来細胞が、移植後 25 週間と 28 週間という長期間にわたり共存していることが確認できた。これらのキメラ個体ではいずれも卵巣は肥大した AqS タイプであった (Fig. 5-3)。

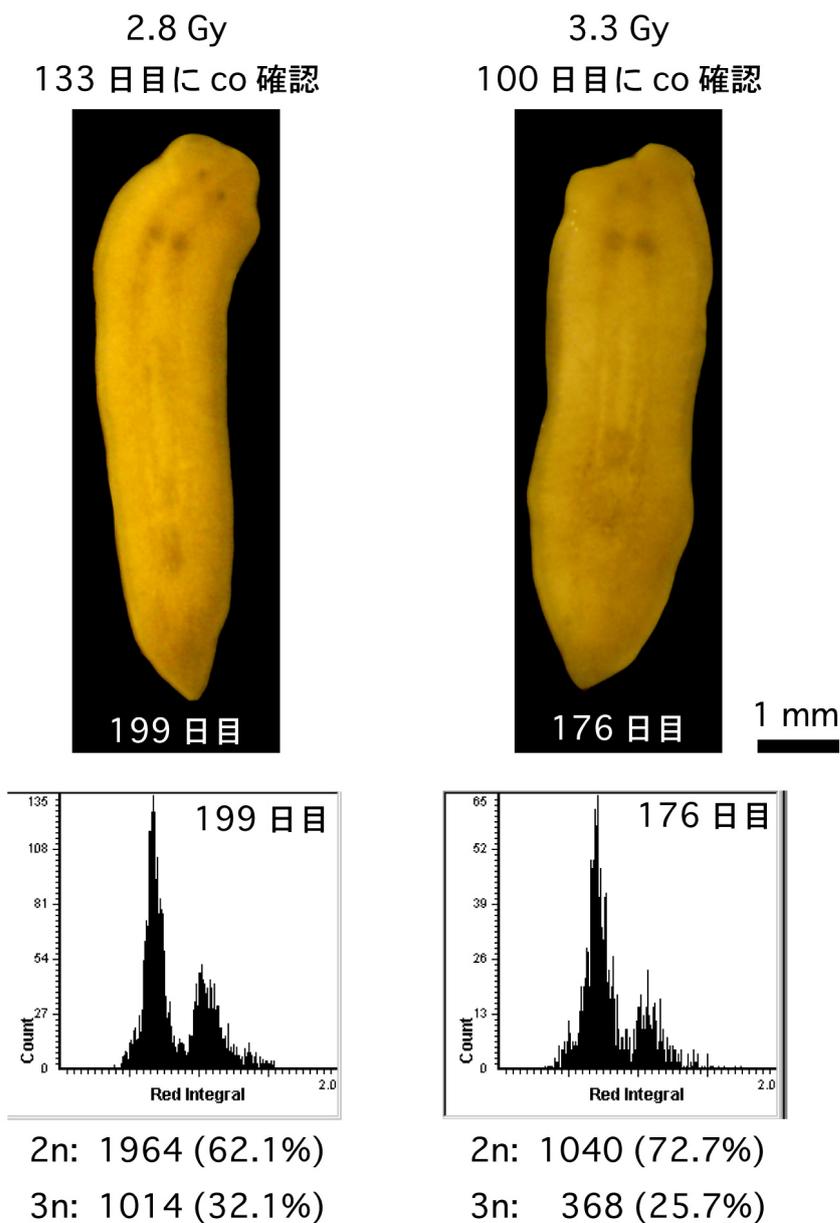


Fig. 5-3 LSC による donor と recipient の由来細胞比測定

左：2.8 Gy 照射個体 (Fig. 5-6 A と同一個体)。

右：3.3 Gy 照射個体 (Fig. 5-6 D、Table 5-1 No. 23 個体と同一個体)。

上は腹側からの個体写真。下は移植後個体をグラフ内の移植後日数において分離した細胞を PI で核染色し、細胞ごとの蛍光強度を LSC により定量して得られたヒストグラム。2 倍体細胞と 3 倍体細胞の実測数と割合も併記した。

5.3.4 最終到達 donor 率と卵巣形態の関係

移植の結果、生殖様式判別まで生存した全ての個体について、最終到達 donor 率と卵巣の形態をまとめると Table 5-1 となった。照射なしで移植すると得られた 10 匹全ての個体 (Recipient No. 1~10) で移植細胞の生着は認められず、移植から 13~29 週後に自切した。一方、X 線照射をした個体に移植した場合 (Recipient No. 11~35) は一例 (Recipient No. 18) を除き全て自切せず、有性になった。非致死線量では最終到達 donor 率が 25~100%とばらついたが、いずれも完全成熟した有性になった (Recipient No. 11~17, 19~25)。致死線量 (Recipient No. 26~35) では全ての個体で donor 由来細胞による完全置換が確認でき、完全成熟した有性になった。卵巣の形態は、キメラの場合は AqS 個体タイプの肥大・過剰卵巣、donor 率が 100%の場合は InS 個体タイプであった。また、donor 率が安定化した後、体の大きさがインタクトの InS 個体で交接器官形成が見られるようになるのと同程度 (体長 7 mm) に達すると交接器官形成が起こった (Fig. 5-4、5-5)、交接器官形成が見られた時期はキメラで移植後 12~37 週 (平均 25 週)、donor 率 100%で 17~42 週 (平均 27 週) と大差はなく、一定の体長に達したら生殖器官形成が起こった。よって卵巣の形態の差が発達の遅れや移植後の経過時間と相関するという可能性は否定され、体内に AS recipient 由来の細胞が居残っているか否かが卵巣の形態の差と相関していると言える。3.3 Gy の照射で唯一 donor 率 100%になった Recipient No. 25 の個体が InS 個体タイプの卵巣になったことから、AS 由来細胞の有無と卵巣の形態は例外無く一致した。Fig. 5-6 には非致死線量および致死線量照射 AS 個体へ InS donor 由来 neoblast 画分を移植した結果得られた有性個体の腹側からの写真を示した。

交接器官形成が確認された直後および、同一個体のその後の成熟過程を示してあるが、非致死線量照射の場合は、AqS 個体のように卵巣が肥大し、過剰卵巣も見られるが、致死線量照射の場合は十分に成熟してもそのような卵巣形態は見られず、InS 様の卵巣であった。

Table 5-1 移植後個体の X 線照射量とキメラ率、生殖様式、卵巢形態一覧

Recipient No.	X 線照射量 (Gy)	Donor 率 (%)	生殖様式の判別がついた 時点の移植後週数		移植後に形成された 卵巢のタイプ
			自切	交接器官 形成	
1	0	0	13		
2	0	0	16		
3	0	0	16		
4	0	0	18		
5	0	0	18		
6	0	0	19		
7	0	0	19		
8	0	0	19		
9	0	0	23		
10	0	0	29		

11	3.3	ND ^a		12	AqS
12	3.3	ND ^a		12	AqS
13	3.3	ND ^a		18	AqS
14	3.3	ND ^a		30	AqS
15	3.3	ND ^a		32	ND ^c
16	3.3	25		36	AqS
17	3.3	36		24	AqS
18	3.3	47	27		
19	3.3	51		14	AqS
20	3.3	53		37	AqS
21	3.3	68		25	AqS
22	3.3	70		30	AqS
23	3.3	73		14	AqS
24	3.3	76		17	AqS
25	3.3	100		36	InS

26	4.4	100		17	InS
27	4.4	100		22	InS
28	4.4	100		22	InS
29	4.4	100		24	InS
30	4.4	100		27	InS
31	4.4	100		27	InS
32	4.4	100		30	InS
33	4.4	100		42	ND ^c
34	4.4	100		31	InS
35	4.4	100		20	InS

^aキメラ解析前に死亡

^bキメラ解析できない組み合わせでの移植

^c有性成熟前に死亡

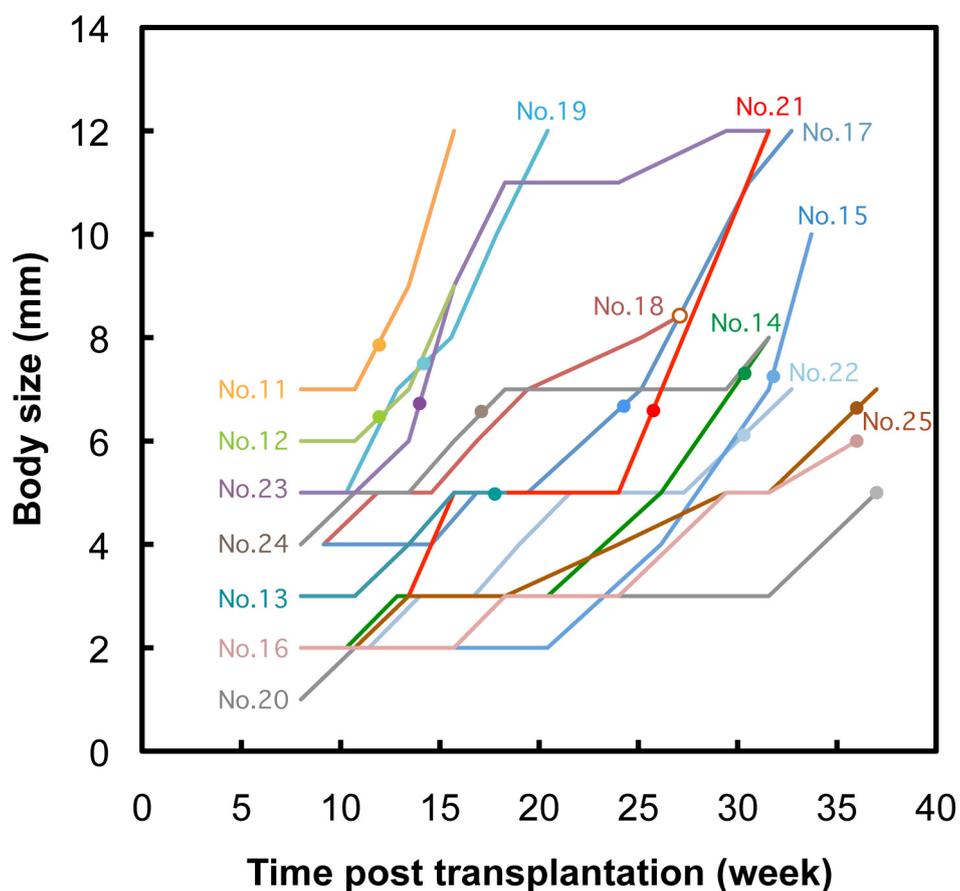


Fig. 5-4 3.3 Gy 照射 AS recipient への InS 個体由来 neoblast 画分移植後の体長変化と生殖様式判別の時期

● : 交接器官形成を確認、○ : 自切を確認。

図中の No. は Table 5-1 の個体 No. と対応。

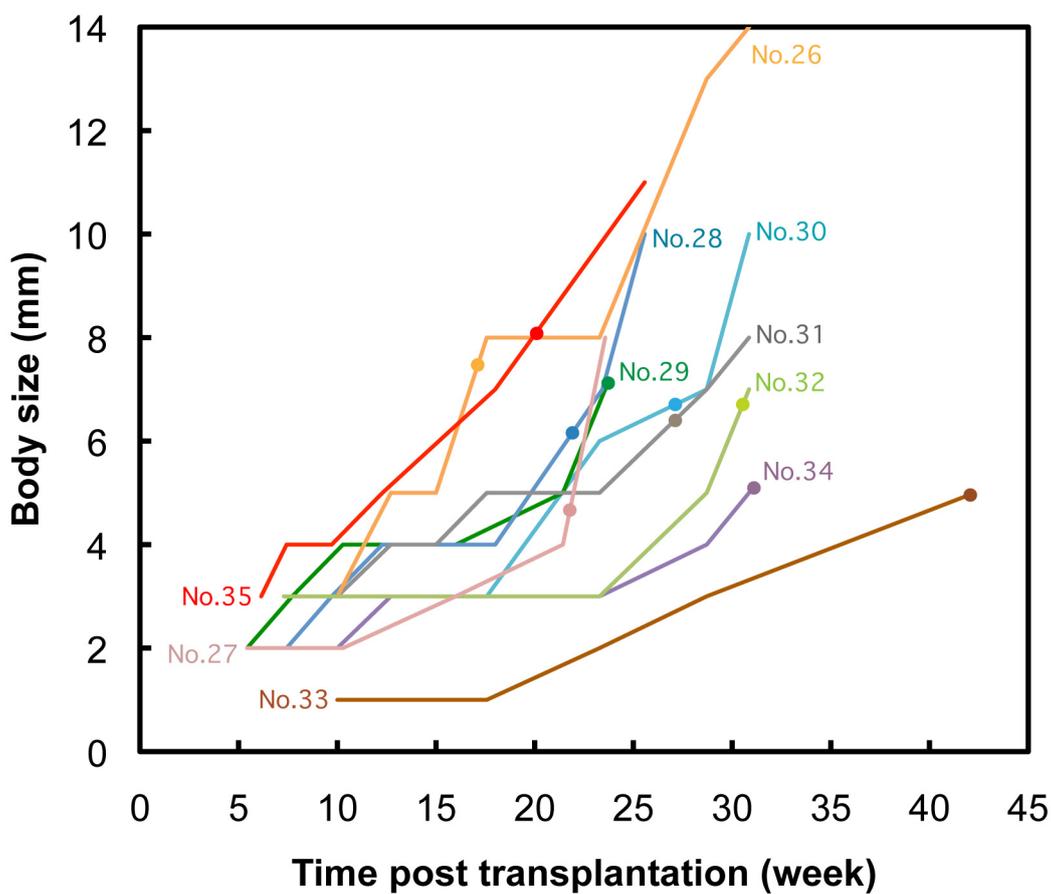


Fig. 5-5 4.4 Gy 照射 AS recipient への InS 個体由来 neoblast 画分移植後の体長変化と生殖様式判別の時期

● : 交接器官形成を確認。図中の No. は Table 5-1 の個体 No. と対応。

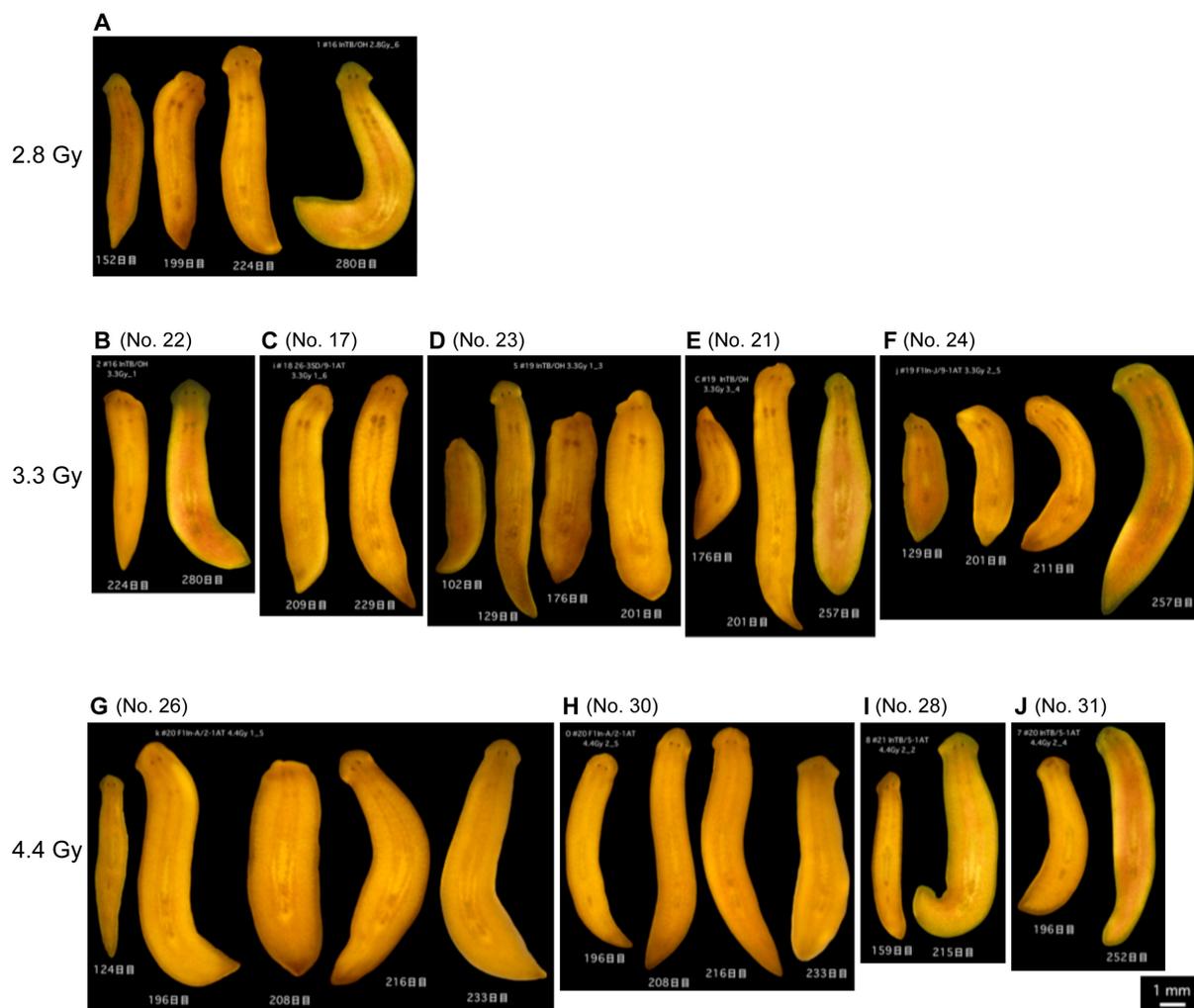


Fig. 5-6 InS donor 由来 neoblast を移植した AS recipient の移植後の生殖器官形成

図中の線量は移植前に照射した X 線照射量。各パネルには同一個体の時間経過が示してある。図中の日数は移植のための X 線照射からの経過日数。図中の個体 No. は Table 5-1 に対応。

5.4 考察

5.4.1 InS 個体由来細胞と AS 個体由来細胞のキメラ個体の生殖様式

X線照射なしで AS recipient に InS 個体画分を移植しても移植画分は生着せず、生殖様式も無性のままであった。一方、照射ありで移植を行うと 1 匹の例外を除き全ての場合に有性になったことより、生着した InS 個体由来 neoblast が有性状態を開始したと考えられる。さらに、キメラにおいては AS 由来細胞が体内の半分以上を占める場合でも有性状態を自律的に作り出したことから、「InS 個体由来細胞が内因性の有性化因子を産生開始すること」に AS 個体由来細胞が抑制的に働くのではないことを示唆する。第2章において、1. 内因性有性化因子の産生開始と 2. 有性化因子をトリガーとした維持的産生、の2段階の有性状態の制御を提唱したが、本章において InS 個体と AS 個体の両者の細胞が共存した際、必ず有性になるという結果は、有性化因子の産生の on/off で生殖様式を制御しているという仮説を支持する。AS 個体が 1. の能力を持たず（あるいは発揮せず）無性でいる機構は生殖様式制御の解明の糸口になると考えられる。

5.4.2 InS 個体由来細胞と AS 個体由来細胞のキメラ個体の卵巣形態

InS 個体画分の移植後個体内に AS 個体由来細胞が残存するか否かで、卵巣形態に明らかな差が出た。つまり、移植した InS 個体由来細胞が内因性有性化因子を産生して作り出した有性状態において、InS 個体由来細胞と AS 個

体由来細胞では卵巣形態の制御が異なることを意味する。これまで、AqS 個体と InS 個体への有性化因子の投餌により、両者には外因性有性化因子への応答性に差があることが明らかになっていたが、今回、体内で内因的に自律的に産生される有性化因子への応答を見ても AS 個体由来細胞は InS 個体由来細胞と異なったことから、有性化因子の量や質の問題ではなく、応答する細胞側の、卵巣対数や卵巣構成細胞数の制御が異なることがわかった。AS 個体は活発に分裂増殖するが、InS 個体は自切しない。AqS 個体も自切はしないが、小片再生実験により無性に戻ることから、有性化後も先天的な無性生殖能は保持していると考えられる。AqS 個体に肥大・過剰卵巣が形成されるのは、この増殖能の高さを反映しているのかもしれない。今回は卵巣を形成する各細胞が donor と recipient のどちらに由来するのかを調べてはいないが、移植後個体の固定切片から卵巣部分だけをレーザーマイクロダイセクションで切り抜き、ゲノム DNA を回収して *msl* のパターンを調べるのが可能かもしれない。今後、それを調べられたら、キメラ個体の肥大・過剰卵巣形成を促すような何らかの増殖因子が AS 個体由来細胞より分泌されて、それに応答して InS 個体由来細胞も参加するのか？あるいは InS 個体由来細胞は肥大・過剰卵巣形成には参加せず、AS 個体由来細胞のみがそのような応答能を示すのか、について新たな知見が得られるのではないかと。

5.5 結言

先天的な生殖様式が有性である InS 個体と、無性である AS からなる

キメラ個体を作製すると、ほぼ全ての場合で有性個体になり、InS 個体と AS 個体の細胞が共存する体内環境下でも InS 個体細胞が有性状態を自律的に開始できることを示した。さらに InS 個体と AqS 個体に形成される卵巣の形態の違いが、有性化因子の質や量が原因ではなく、有性化因子に応答する側の InS 個体と AS 個体の細胞自体の性質の違いであることが示された。

2 種類の由来が異なる細胞を共存させ、その相互作用を *in vivo* で検討できるキメラ個体作製は、本章で示した卵巣形態以外にも着眼点を様々に変えることで多様なアッセイを可能にする面白い実験系だと考えている。

第 6 章 結論

プラナリアにおいては、いまだ細胞培養系が確立されていない。本研究では neoblast の移植実験系を確立し、新たな細胞追跡マーカを導入することで、移植細胞の生着と増殖の経時変化を示した。さらに致死線量の X 線照射により得られる移植後個体は全身が移植細胞由来となる一方、非致死線量照射個体に対する移植では donor 由来細胞と recipient 由来細胞の安定的なキメラ個体となることが明らかとなった。移植後個体全身が移植細胞由来に完全置換される移植実験系は移植細胞の分化能の観察など細胞のキャラクタライゼーションに用いることができる。またキメラ作製は本研究が初であり、生体内において 2 種類の由来の異なる細胞の相互作用を *in vivo* で検討する有用なツールとなると言える。今回、実際に第 4 章においては前者の方法で InS 個体と AqS 個体の neoblast の自発的有性状態開始能を比較し、第 5 章においては InS 個体由来細胞と AS 個体由来細胞が共存する場合に、InS 個体由来細胞単独からなる移植後個体とは卵巣形態が異なったことから、移植細胞や残存細胞の性質が個体全体に及ぼす影響を評価できる実験系であることが示された。

本研究では AqS 個体と InS 個体の細胞レベルでの生殖様式決定の違いを初めて示した。細胞単位に解離した InS 個体の neoblast から機能的な有性個体の全身が構築されたことは、細胞自体に備わる生殖様式規定を実証した点で重要である。今回得られた InS 個体と AqS 個体の間の自発的有性状態開始能の差が neoblast にあるという知見は、生殖様式の決定／選択機構解明の第一歩である。

今後はこの差異を制御する分子機構の解明が必要である。プラナリアにおける生殖様式の制御機構については、これまで他種において倍数性や染色体変異 (Baguña et al. 1999)、fission controlling genetic factor による無性性の決定機構 (Benazzi and Lentati, 1976) が提唱されている。しかしこれら不可逆的な機構では、季節的な生殖様式転換は説明できない。また *D. ryukyuensis* では、「無性性」はメンデル遺伝する因子や倍数性、染色体変異ではない未知の因子で制御されていることが予想されている (Kobayashi et al., 2009)。さらに Tamura ら (1995) の野外調査により、近縁種である *D. japonica* では有性個体は2倍体に限定され、温度による有性化の報告もあるが、*D. ryukyuensis* では2倍体と3倍体の両方に有性・無性のいずれもが存在する。また *D. ryukyuensis* の棲息地に大きな水温変化はなく、有性化と温度の相関は見られない。よって同じ淡水棲プラナリアといっても、その生殖様式制御に関わる外因は多岐にわたるようである。私が野外において季節ごとの定点観察をした結果、*D. ryukyuensis* では、野外においては冬から春にかけて有性成熟し産卵を行う個体が見られたが、夏には生殖器官を退縮させ、更に一部の個体は自切をするという周年変化をした。またどの季節においても生殖器官を発達させずに自切を行っている個体も見られた。前者は InS 集団と転換集団、後者は AS 集団と考えられる。*Girardia tigrina* では地点ごとに集団が異なったという報告があり環境に応じた生殖様式選択が予想されるが (Curtis 1902; Kenk 1937; Kenk 1940)、*D. ryukyuensis* では同じ環境下で3集団が混棲していることから、環境以外の生殖様式制御因子があるのだろう。現在、*D. ryukyuensis* の人為的有性化過程でのトランスクリプトーム解析が進行中であり、有性化初期に関与する遺伝子の網羅的探索が行われている。

本研究で明らかとなった InS 個体と AqS 個体の差異は有性化初期に関与する遺伝子の発現制御機構にあると予想されることから、有性化因子の産生制御機構と併せて今後解明すべき課題である。また自然界での転換現象において発現が変動する遺伝子の探索や、年周期を生み出す機構についても調べる必要がある。

参考文献

Agata K. 2008. Stem Cells in Planarian. Berlin: SpringerLink.

Alvarado AS. 2003. The freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*: embryogenesis, stem cells and regeneration. *Curr Opin Genet Dev* 13:438-444.

Alvarado AS, Kang H. 2005. Multicellularity, stem cells, and the neoblasts of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Exp Cell Res* 306:299-308.

Baguña J, Carranza S, Pala M, Ribera C, Giribet G, Arnedo MA, Ribas M, Riutort M. 1999. From morphology and karyology to molecules. New methods for taxonomical identification of asexual populations of freshwater planarians. A tribute to Professor Mario Benazzi. *Ital J Zool* 66:207-214.

Baguña J, Saló E, Auladell C. 1989. Regeneration and pattern formation in planarians III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development* 107:77-86.

Bardeen CR, Baetjer FH. 1904. The inhibitive action of the Roentgen rays on regeneration in planarians. *J Exp Zool* 1:191-195.

Bell G. 1982. *The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality*. Berkeley CA: University of California Press.

Benazzi M, Grasso M. 1977. Comparative research on the sexualization of fissiparous planarians treated with substances contained in sexual planarians. *Monitore Zool Ital* 11:9-19.

Bergmann A, Steller H. 2010. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal* 3:re8.

Collins JJ, Hou X, Romanova EV, Lambrus BG, Miller CM, Saberi A, Sweedler JV, Newmark PA. 2010. Genome-wide analyses reveal a role for peptide hormones in planarian germline development. *PLoS Biology* 8:e1000509.

Corbitt TS, Hardie J. 1985. Juvenile-hormone effects on polymorphism in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Entomol Exp Appl* 38:131-135.

Curtis WC. 1902. The life history, the normal fission and the reproductive organs of *planaria maculata*. *Proc Boston Soc Nat Hist* 30:515-559.

Darden WJ. 1966. Sexual differentiation in *Volvox aureus*. *J Protozool* 13:239-255.

De Mulder K, Pfister D, Kuales G, Egger B, Salvenmoser W, Willems M, Steger J, Fauster K, Micura R, Borgonie G, Ladurner P. 2009. Stem cells are differentially regulated during development, regeneration and homeostasis in flatworms. *Dev Biol* 334:198-212.

Gonzalez-Estevez C, Momose T, Gehring WJ, Salo E. 2003. Transgenic planarian lines obtained by electroporation using transposon-derived vectors and an eye-specific GFP marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14046-14051.

Grasso M, Benazzi M. 1973. Genetic and physiologic control of fissioning and sexuality in planarians. *J Embryol exp Morph* 30:317-328.

Handberg-Thorsager M, Saló E. 2007. The planarian *nanos*-like gene *Smednos* is expressed in germline and eye precursor cells during development and regeneration. *Dev Genes Evol* 217:403-411.

Hardie J. 1981. Juvenile hormone and photoperiodically controlled polymorphism in *Aphis fabae*: prenatal effects on presumptive oviparae. *J Insect Physiol* 27:257-265.

Hardie J, Lees A. 1985. The induction of normal and teratoid viviparae by a juvenile hormone and kinoprene in two species of aphids. *Physiol Entomol* 10:65-74.

Harigaya Y, Tanaka H, Yamanaka S, Tanaka K, Watanabe Y, Tsutsumi C, Chikashige Y, Hiraoka Y, Yamashita A, Yamamoto M. 2006. Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature* 442:45-50.

Harigaya Y, Yamamoto M. 2007. Molecular mechanisms underlying the mitosis-meiosis decision. *Chromosome Res* 15:523-537.

Hayashi T, Asami M, Higuchi S, Shibata N, Agata K. 2006. Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescence-activated cell sorting. *Dev Growth Differ* 48:371-380.

Hickman CP, Roberts LS, Larson A. 2002. *Animal Diversity*. New York: McGraw-Hill.

Hori I. 1982. An ultrastructural study of the chromatoid body in planarian regenerative cells. *J Electron Microsc (Tokyo)* 31:63-72.

Hoshi M, Kobayashi K, Arioka S, Hase S, Matsumoto M. 2003. Switch from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Integr Comp Biol* 43:242-246.

Hyman LH. 1951. *The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela. The Acoelomate Bilateria*. New York: McGraw-Hill.

Ishizuka H, Maezawa T, Kawauchi J, Nodono H, Hirao Y, Nishimura O, Nakagawa H, Sekii K, Tasaka K, Tarui H, Agata K, Hoshi M, Kobayashi K, Sakakibara Y, Matsumoto M. 2007. The *Dugesia ryukyuensis* database as a molecular resource for studying switching of the reproductive system. *Zool Sci* 24:31-37.

Kawakatsu M, Oki I, Tamura S. 1995. Taxonomy and geographical distribution of *Dugesia japonica* and *D. ryukyuensis* in the Far East. *Hydrobiologia* 305:55-61.

Kawakatsu M, Oki I, Tamura S, Sugino H. 1976. Studies on the morphology, karyology and taxonomy of the Japanese freshwater planarian *Dugesia japonica* Ichikawa et Kawakatsu, with a description of a new subspecies, *Dugesia japonica ryukyuensis* subsp. nov. The Bulletin of Fuji Women's College, Ser II 14:81-126.

Kenk R. 1937. Sexual and asexual reproduction in *Euplanaria tigrina* (Girard). Biol Bull 73:280-294.

Kenk R. 1940. The reproduction of *Dugesia tigrina* (Girard). The American Naturalist 74:471-475.

Kobayashi K, Arioka S, Hase S, Hoshi M. 2002. Signification of the sexualizing substance produced by the sexualized planarians. Zool Sci 19:667-672.

Kobayashi K, Arioka S, Hoshi M, Matsumoto M. 2009. Production of asexual and sexual offspring in the triploid sexual planarian *Dugesia ryukyuensis*. Integr Zool 4:265-271.

Kobayashi K, Hashiguchi T, Ichikawa T, Ishino Y, Hoshi M, Matsumoto M. 2008. Neoblast-enriched fraction rescues eye formation in eye-defective planarian 'menashi' *Dugesia ryukyuensis*. Dev Growth Differ 50:689-696.

Kobayashi K, Hoshi M. 2002. 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.

Kobayashi K, Hoshi M. 2011. Sex-inducing effect of a hydrophilic fraction on reproductive switching in the planarian *Dugesia ryukyuensis* (Seriata, Tricladida). Front Zool 8:23.

Kobayashi K, Koyanagi R, Matsumoto M, Cabrera JP, Hoshi M. 1999. Switching from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyuensis*: Bioassay system and basic description of sexualizing process. Zool Sci 16:291-298.

- Kobayashi K, Maezawa T, Nakagawa H, Hoshi M. 2012. Existence of two sexual races in the planarian species switching between asexual and sexual reproduction. *Zool Sci* 29:265-272.
- Mages H, Tschochner H, Sumper M. 1988. The sexual inducer of *Volvox carteri* primary structure deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett* 234:407-410.
- Mittler T, Nassar S, Staal G. 1976. Wing development and parthenogenesis induced in progenies of kinoprene-treated gynoparae of *Aphis fabae* and *Myzus persicae*. *J Insect Physiol* 22:1717-1725.
- Nakagawa H, Ishizu H, Chinone A, Kobayashi K, Matsumoto M. 2012a. The *Dr-nanos* gene is essential for germ cell specification in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Int J Dev Biol* 56:165-171.
- Nakagawa H, Ishizu H, Hasegawa R, Kobayashi K, Matsumoto M. 2012b. *Drpiwi-1* is essential for germline cell formation during sexualization of the planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Dev Biol* 361:167-176.
- Newmark PA, Alvarado AS. 2002. Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nat Rev Genet* 3:210-219.
- Oki I, Tamura S, Yamayoshi T, Kawakatsu M. 1981. Karyological and taxonomic studies of *Dugesia japonica* Ichikawa et Kawakatsu in the Far East. *Hydrobiologia* 84:53-68.
- Orii H, Sakurai T, Watanabe K. 2005. Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev Genes Evol* 215:143-157.
- Pearse JS, Pearse VB, Newberry AT. 1989. Telling sex from growth: Dissolving Maynard Smith's paradox. *Bull Mar Sci* 45:433-446.

Pellettieri J, Fitzgerald P, Watanabe S, Mancuso J, Green DR, Sanchez Alvarado A. 2010. Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Dev Biol* 338:76-85.

Sakurai T. 1981. Sexual induction by feeding in an asexual strain of the freshwater planarian, *Dugesia japonica japonica*. *Annot Zool Jpn* 54:103-112.

Salvetti A, Rossi L, Bonuccelli L, Lena A, Pugliesi C, Rainaldi G, Evangelista M, Gremigni V. 2009. Adult stem cell plasticity: Neoblast repopulation in non-lethally irradiated planarians. *Dev Biol* 328:305-314.

Sato K, Shibata N, Orii H, Amikura R, Sakurai T, Agata K, Kobayashi S, Watanabe K. 2006. Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of *nanos*-related gene in planarians. *Dev Growth Differ* 48:615-628.

Shibata N, Rouhana L, Agata K. 2010. Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians. *Dev Growth Differ* 52:27-41.

Starr RC, Jaenicke L. 1974. Purification and characterization of the hormone initiating sexual morphogenesis in *Volvox carteri* f. *nagariensis* Iyengar. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:1050-1054.

Tamura S, Oki I, Kawakatsu M. 1991. Karyological and taxonomic studies of *Dugesia japonica* from the Southwest Islands of Japan-II. *Hydrobiologia* 227:157-162.

Tamura S, Oki I, Kawakatsu M. 1995. A review of chromosomal variation in *Dugesia japonica* and *D. ryukyuensis* in the Far East. *Hydrobiologia* 305:79-84.

Trionnaire G, Hardie J, Jaubert-Possamai S, Simon JC, Tagu D. 2008. Shifting from clonal to sexual reproduction in aphids: physiological and developmental aspects. *Biol Cell* 100:441-451.

- Tschochner H, Lottspeich F, Sumper M. 1987. The sexual inducer of *Volvox carteri*: purification, chemical characterization and identification of its gene. *EMBO J* 6:2203-2207.
- Wagner DE, Wang IE, Reddien PW. 2011. Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* 332:811-816.
- Wang Y, Stary JM, Wilhelm JE, Newmark PA. 2010. A functional genomic screen in planarians identifies novel regulators of germ cell development. *Genes Dev* 24:2081-2092.
- Wang Y, Zayas RM, Guo T, Newmark PA. 2007. *nanos* function is essential for development and regeneration of planarian germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5901-5906.
- Welch DM, Meselson M. 2000. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* 288:1211-1215.
- Yamamoto M. 2010. The selective elimination of messenger RNA underlies the mitosis-meiosis switch in fission yeast. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86:788-797.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11:1-16.
- Zayas RM, Hernandez A, Habermann B, Wang Y, Stary JM, Newmark PA. 2005. The planarian *Schmidtea mediterranea* as a model for epigenetic germ cell specification: Analysis of ESTs from the hermaphroditic strain. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18491-18496.
- 小林一也, 松本緑. 2010. プラナリアの生殖様式転換機構と配偶子幹細胞. *細胞工学* 29:670-674.

謝辞

本論文は、著者が慶應義塾大学大学院理工学研究科後期博士課程在学中に行った研究成果をまとめたものです。本研究を遂行するにあたり、常に深い信頼のもと多大なるチャンスを与えてくださり、また自由に研究をさせてくださった同大学理工学部准教授 松本緑博士に心より御礼申し上げます。学部生時代以来、公私にわたって受けた恩恵は計り切れません。学位請求論文審査において、貴重なご指導とご助言をいただいた同教授 岡浩太郎博士、同准教授 清水史郎博士、同准教授 宮本憲二博士、同専任講師 堀田耕司博士に深謝いたします。

D. ryukyuensis OH 株は弘前大学農学生命科学部 石田幸子博士よりご供与いただきました。*B. brunnea* の採集は、山形大学理学部 中内祐二博士ならびに中内研究室の皆様にご協力いただきました。沖縄県でのプラナリア採集は、沖縄県浦添市 田中一郎氏にご協力いただきました。また藤女子大学 川勝正治博士には、田中氏を紹介していただき、さらに野外でのプラナリアの生殖様式転換に関する多数の大変参考になる文献もいただきました。学会などで、討論や懇親会を通じて刺激を与えてくださった方々にも感謝申し上げます。特に基礎生物学研究所教授 吉田松生博士には、研究と著者自身のキャラクターを興味深く受け入れていただき、折に触れて大いなる励ましと自信を与えていただきました。京都大学教授 高橋淑子博士には、プレゼンテーションの極意を教えていただき、またその研究姿勢

からも学ぶところが多かったです。本研究を進めるにあたり、お世話になった全ての方々に心より感謝申し上げます。

放送大学 星元紀博士には、著者のくじ運の無さから卒業研究をご指導いただくことは叶いませんでしたが、修士課程以降、本研究をまとめるまでの過程では、研究成果が出た際には著者本人以上に喜んでくださり、また弱気になった際には「自分の仕事に自信をもってやりなさい」と励ましてくださり、とても支えになりました。

松本研究室の皆様には、研究面での刺激を受けただけでなく、たくさん楽しい出来事も共有して有意義な研究生活が送れました。

最後になりましたが、連日の深夜までの研究を自由にできたのは、家族の理解と協力が無いと成り立ちませんでした。著者の意思を尊重し、常に味方であり続け、博士課程まで進ませていただき、本当にありがとうございました。

本研究は、日本学術振興会 特別研究員奨励費、公益財団法人水産無脊椎動物研究所 個別研究助成、慶應義塾大学先端科学技術研究センター 後期博士課程研究助成を受けて行いました。自由な研究活動・学会活動の源となったのみならず、博士課程より研究費を申請・獲得し、個人管理のもと使用し、研究成果を報告するという経験は、研究者としての成長に有意義でした。ここに併せて感謝申し上げます。

2012年10月