

学 位 論 文 題 名

Studies on the mechanism of head and tail regeneration
in *Enchytraeus japonensis* (Annelida, Oligochaeta)

(ヤマトヒメミミズの頭尾再生機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

I. 両頭再生現象の解析

動物の再生は盛んに研究されている現象であるが、まだ解明されていないことも多い。申請者は、環形動物貧毛綱に属するヤマトヒメミミズを用いて再生研究を行った。貧毛類は全身再生をすることで有名な刺胞動物や扁形動物に比べると、より分化程度が高く体節などの体制を備えているにもかかわらず、全身再生能を持つ種を含む興味深い動物群である。ヤマトヒメミミズは、自切によってできた断片から全身を再生するだけではなく、断片の後方にも頭部を再生することがある。申請者はこの「両頭再生」現象に注目し、動物の再生における頭尾決定機構を、組織学及び実験形態学的手法を用いて解析した。

まず初めに、両頭再生が起こる条件について検討した。断片の切断法、麻酔の有無および断片化後の飼育法を組み合わせる比較実験の結果、人為切断が両頭再生に必須な前提条件であり、切断前の麻酔が両頭再生の出現頻度を上げることがわかった。

次に、個体の様々な部分で人為的に切断して断片をつくり、両頭再生率を比較した。7体節からなる頭部域で切断した場合は5割以上の高頻度で両頭再生が見られた。一方、胴部からの断片では、部域による有意差はなく、平均して2割程が両頭再生した。頭部と胴部で再生結果に違いが生じたため、両者の組織構築の違いを調べた結果、胴部の体節には体節毎に1ヶ所の自切部位が存在するが、頭部の第6体節までには自切部位はないことが明らかになった。

次に、人為切断直後の傷口が体節内のどこにあり、それが両頭再生と関係しているのかどうかを検討するため、胴部断片の後端の神経筋肉構築を詳細に観察した。人為切断直後には自切部位以外の場所で切れている断片がほとんどだったが、切断8時間後にはこのような断片は減少していた。これは、自切部位以外で切られた体節はその後、傷口から近い自切部位で自切が起こり、改めて切り離されたことを示していると考えた。一方、人為切断前に麻酔をかけた場合は、8時間後になっても、切断直後と同じ部位で切れている断片

がほとんどだった。さらに、自切部位以外の場所に切断面をもつ断片の割合と、その後に両頭再生が起こる割合は似た傾向を示した。

最後に、両頭個体の後方に形成された頭部の直前部分、すなわち元断片の最後部体節を詳細に観察したところ、ほとんどの両頭個体は完全な一体節の構造を持っていないことがわかった。この元の体節がどこで切断されているかによって、後方頭部がどの位置から再生したのかを推測すると、正常な自切部位以外の任意の場所から、後方に頭部が形成されていることが分かった。

以上の結果から、人為切断によって自切部位以外で切断され、その場所から再生が起こると、断片の後端から頭部が形成されることが明らかになった。

一方、断片前端の傷口については、それがどのような場所で切断された場合でも頭部しか再生せず、尾部は決して再生しなかった。また、両頭個体を中央から切断して得られた、後方に頭を持つ断片でも前端に尾部を再生することはなかった。

このことから、ヤマトヒメミズにおいては、すべての切断面にはデフォルトで頭部を再生する性質があり、特殊なケースにおいてのみ尾部を再生するしくみがあることが推測される。

II. 組織学的観察による、正常頭尾再生表の作成

ヤマトヒメミズはその高い再生能力と飼育が容易であることなどから、再生研究を実験する動物として極めて優秀であるが、本種を実験モデル動物として確立するためには、基礎的情報の蓄積、および共有が重要である。今後その発展が期待される分子生物学的な研究を行う場合にも基準となる、正常再生における組織形態を詳細に観察し、ステージ表を作成した。

はじめに、正常再生の実験にはどのような断片を用いるのが適切かということを検討するため、直径と体長の異なる個体を用いて、直径と長さの異なる断片を電気刺激で作製し、再生結果を比較した。その結果、再生実験には太った個体を電気刺激して得られた、長さが4体節以上の断片を除くと、頭部7体節の完全な再生が起こりにくいことが明らかになった。

次に、電気刺激によって得られた適切な長さおよび太さを持つ断片を 24℃で飼育し、SEM を用いて体表構造を、蛍光ラベルされたアンタゴニストを用いて筋肉及び神経筋接合部を、HE 染色パラフィン切片を用いて細胞・器官構造を、BrdU 抗体染色を用いて分裂細胞の時間・位置的分布パターンを、脂溶性色素 DiI を用いて感覚細胞から脳への投射を観察し、頭尾再生芽の特徴からステージングを行った。以下にそれを記す。

Stage 0: 再生 0-12 時間。自切と創傷治癒。自切と傷口の閉鎖は、主に自切部位の環状筋の収縮によって起こる。小さく開いた傷口は plug によって閉じられ、約 6 時間後には

体壁に付着している間充織性細胞で細胞分裂が観察されはじめる。その後、Plug は消失し、前端では表皮と表皮、腸と腸が接着し、傷口が完全に閉じる。一方、後端では表皮と腸が接着し、肛門が開く。

Stage 1: 再生 12-24 時間。再生芽の形成。前後の切断面の表皮の細胞および腸の前後端の細胞が分裂を開始する。間充織性細胞の分裂はさらに盛んになる。また、各体節の新生細胞も分裂を開始する。表皮細胞の分裂とともに、傷口の中心部から古いクチクラを破るようにして再生芽が形成されはじめる。ステージ後期には再生芽の長さと同幅がほぼ等しくなる。

Stage 2: 再生 48 時間前後。再生芽の伸長。細胞分裂はさらに盛んになり、頭部再生芽は背側にややそった形に伸長する。頭では、腹側の表皮が陥入し、腸と連絡し始め、腹側神経索が著しく伸張し、脳原基と血管も形成され始める。尾部再生芽では肛門のすぐ前方に尾節が形成される。

Stage 3: 再生 72 時間前後。再生芽の分節開始。頭部再生芽に体腔が形成され始める。頭部再生芽では体節間の溝と隔膜が形成され、体節構造が明瞭になり始める。頭部の体節間溝は一度に分節し、口前葉と 7 つの頭部体節と第 8 体節の第 1 体環になる。クチクラ層や体壁筋肉がほぼ完成し、口前葉と尾節の感覚細胞が分化し始める。尾部再生芽は成長帯が形成されて再生が完了し、新しい体節の付加が始まる。

Stage 4: 再生 96 時間前後。頭部再生芽の分節完成。頭部再生芽の体節間溝が完成し、体環間溝と剛毛、隔膜腺が形成され始める。分裂細胞がやや減少するが、腸と口前葉では活発。口前葉の感覚細胞から脳への投射が完成する。この時期には、再生個体は盛んに移動をし始める。

Stage 5: 再生 120 時間前後。再生完了。各頭部体節が伸長するとともに太さも増して、元断片部と同じ太さになる。神経筋接合部や隔膜腺の形成が完了し、頭部再生芽の再生が完了する。

学位論文審査の要旨

主 査	助 教 授	枡 内	新
副 査	教 授	馬 渡	駿 介
副 査	教 授	片 倉	晴 雄
副 査	教 授	山 下	正 兼
副 査	助 教 授	若 原	正 己
副 査	助 教 授	清 水	隆

学 位 論 文 題 名

Studies on the mechanism of head and tail regeneration in *Enchytraeus japonensis* (Annelida, Oligochaeta)

(ヤマトヒメミミズの頭尾再生機構に関する研究)

近年、再生医療への応用を視野に入れた、マウス・ラットなどのモデル動物を使った再生研究が盛んになってきているが、ヒトを含む哺乳類の再生能は極めて限られたものである。一方、無脊椎動物にはからだの断片から全身を再生する能力を持った動物も多い。そうした無脊椎動物の再生機構を解析することで、進化でつながった動物における再生機構の多様性と共通性を明らかにすることができると期待される。しかし、古くから行われているヒドラやプラナリアなどの無脊椎動物を用いた再生研究から提出された数々のモデルのほとんどは、実験的に検証されることなく、今日に至っている。

無脊椎動物の研究がこのような現況にある中、著者は環形動物貧毛類のヤマトヒメミミズを用いて頭尾再生の決定機構を実験生物学的に研究した。ヤマトヒメミミズを含む貧毛類は、中枢神経系、体節、体腔など無脊椎動物の中では高度に発達した体制をもつにも関わらず、全身再生能をもつ種が多数含まれるという、極めて興味深い動物群である。また、無脊椎動物の中では分子生物学的研究がもっとも発展しているショウジョウバエなどのエクダイソゾアに対し、本種は異なる体制をもつロフトコロゾアに属しており、無脊椎動物における発生・再生現象の幅広い理解に貢献できることも期待された。

第1章では、ヤマトヒメミミズの再生における頭尾決定の組織学的原因を探るべく研究を行った。本種では、稀に後方にも頭部が再生する両頭再生現象が知られており、著者はこの両頭再生現象に注目して、異所的な構造が形成される異常な頭部形成過程から正常な頭尾形成過程の解析を試みた。はじめに、動物の切断方法や飼育条件などの条件を検討した結果、人為的な切断が両頭再生を引き起こす必要条件であり、切断前の麻酔処理がその頻度を上げる効果があることが明らかになった。また、体の様々な領域でナイフによって人為切断した場合、7 体節からなる頭部領域で極めて高い両頭再生率が見られたが、それ以外の胴部領域ではどの部位で切断してもほぼ 2 割程度の両頭再生が見られ、部位による有意差も見られなかった。

次に、頭部体節と胴部体節を詳細に観察したところ、すべての胴部体節にはそれぞれ

1ヶ所の自切部位があることが明らかになった。人為切断後の傷口（後方切断面）を詳細に検討した結果、人為切断直後はほとんどの例で自切部位以外に切断面があったが、時間を経るにつれて後方切断面が自切部位になっている個体が増えた。これは、切断後に自切することによって人為切断による異常な切断面をもつ部分を切り捨てていることを意味している。また、自切部位以外で切れている断片の割合と断片の両頭再生の割合がつねに同じ比率を示す傾向があることと、後方に形成された頭部が自切部位ではないところから付加再生されていることも示した。

本研究をふまえて、著者はヤマトヒメミズにおいては、体節内の切断位置によって、そこから再生される構造が頭になるか尾になるかが決定されるという作業仮説を提出した。この仮説では、尾部は自切部位で切断された場合にのみ後方へ向けて再生するのに対し、それ以外の部位で切断された場合には、前方へも後方へも頭部が再生されることを予言している。

第2章では、ヤマトヒメミズの正常頭尾再生を組織学的に観察し、再生表を作成した。過去の貧毛類の再生研究では、多様な種が用いられているが、とりわけシマミズ *Eisenia foetida* が主要な材料であった。しかし、シマミズの再生能力はかなり限定的であり、実験室内での大量飼育も容易ではない。また、その他の種においても様々な再生の例が報告されているが、いずれも断片的であり、知見が散乱している。環形動物における再生研究が停滞してしまった原因のひとつは、実験動物として適切な動物を選定することと、その動物の基礎情報を共有することができなかったことにある。このことから著者は、飼育が容易で、きわめて強い再生能力をもつヤマトヒメミズを実験動物として確立させるために、詳細な正常再生表を作成することで、本種における再生研究の標準化を目指した。

まず、正常再生の観察に適した断片の条件について検討した。断片作製に用いる個体の体長、直径および断片の体節数によって、再生に違いがあるかどうかを調べた結果、やせた個体から得られた断片や、4体節未満の断片においては、完全な頭部体節を再生しない断片の割合が高くなるため、実験に使用することを避けるべきであることを示した。

さらに、多種の組織学的手法を用いて詳細に再生過程を観察し、その頭尾再生芽の組織学的特徴から、次のような再生表を作成した。Stage0 では、自切が筋肉の収縮によっておこり、自切約6時間から傷口直下の間充織性細胞で細胞分裂が観察される。Stage1 では、約12時間後から傷口の表皮細胞、各体節にある幹細胞様の新成細胞が分裂を開始し、再生芽が動き始める。Stage2 では、頭部再生芽が伸長し、内部に各原基が見えるようになる。Stage3 では、頭部再生芽に隔膜と体節間溝が形成され始める。尾部では成長帯が形成され、再生が完了する。Stage4 では、頭部体節構造が明瞭になり、外部形態はほぼ完成する。そしてStage5で隔膜腺や体壁の神経筋接合部などが完成し、再生が完了する。

再生表の記載というのは地味な仕事のように見受けられがちであるが、再生研究の基礎としては非常に重要であり、今後の本種の再生研究への貢献は計り知れない。また、この研究の過程で頭部後方の体節には再生ができない領域があることや、再生芽においてマクロファージ様細胞が存在することを見出し、新たな研究テーマも提案している。

近年、無脊椎動物においても分子生物学的再生研究が盛んになりつつあるが、頭尾再生の決定機構については、まだいずれの動物においても明らかになっていない。著者は、頭や尾といった再生される器官の決定が、体節構造と深い関係があるという新しいアイデアを提出した。現時点において、その分子生物学的機構については全く不明とはいえ、体節内の領域性と関係するこの現象は、詳細に研究されているショウジョウバエの発生における体節形成と比較することで、系統的にみて独立に進化したと考えられる両動物群における体節構造の形成に関する進化発生的な知見を得ることも貢献できるであろう。こうしたことから、著者が今回得た知見は、広い意味での動物の発生・進化研究への展開が期待できるものでもある。

博士研究において、著者はヤマトヒメミズの再生についての多くの知見を記載し、無脊椎動物とりわけ環形動物の研究に対しての貢献は大きい。よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格があるものと認める。