

学位論文題名

The stem cell systems for asexual and sexual reproduction  
in an enchytraeid oligochaete, *Enchytraeus japonensis*

(ヤマトヒメミミズの生殖を支えている幹細胞システムに関する研究)

学位論文内容の要旨

地球上に現存するほとんどの動物は有性生殖によって子孫を作っている。分裂、出芽、断片化による無性生殖を行なっている動物も数多く見つけられているが、これらの動物のほとんどは有性生殖も行なっており、成育している周りの環境や生活史に対応して生殖方法を切り替えている。本研究で用いるヤマトヒメミミズ (*Enchytraeus japonensis*) は、高密度飼育条件下では、無性生殖のみを行なっている。ミミズはある程度の大きさになると自切し、各断片の前後に再生芽をつくり、それぞれが頭尾へと分化することによって完全な個体へと再生する。一方、低密度で十分に餌のある条件では、頭部第7・8体節にそれぞれ精巣と卵巣を再生し、精子と卵を作ることで有性生殖も行なっている。申請者は、ヤマトヒメミミズの生殖がどのようなメカニズムによって支えられているのかを明らかにすることを目的に、以下の3つのテーマについて研究を行った。

I. 再生芽形成における中胚葉性幹細胞 (ネオプラスト) の役割の解明

ヤマトヒメミミズの胴体体節のすべての隔壁の腹側にはネオプラストと呼ばれる未分化細胞の形態的特徴を持った細胞が付着している。また、ネオプラストよりも背側にサイズは小さいがネオプラストの形態とよく似た細胞 (N-cell) も付着している。第一章では、これらの細胞に注目しながら、再生芽形成に参加している細胞について調べた。

最初に the thymidine analog である 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を用いて、無傷個体と再生個体の BrdU<sup>+</sup>細胞 (S 期を通過した細胞) の分布を調べた。十分に成長した無傷個体を 24 時間 BrdU 溶液で飼育すると、N-cell での BrdU の取り込みが確認されたが、ネオプラストでは 48 時間飼育しても BrdU の取り込みは観察されなかった。一方、再生個体のネオプラストと N-cell では再生 1 日目 (自切後 6-24 時間) に BrdU の取り込みが観察され、N-cell ではネオプラストでの取り込みが見られなくなった再生 2 日目以降も引き続き BrdU の取り込みが確認された。以上のことからネオプラストはインタクトにおいては slow-cycling 又は休止状態であるが、頭部と尾部のどちらかあるいは両方の切断によって DNA 合成が誘導されることがわかった。また、N-cell はネオプラストよりも活発に分裂をしていることがわかった。

次に、ネオプラストと N-cell が再生芽形成に参加しているかどうかを確かめるため、ネオプラストと N-cell を含む再生初期に DNA 合成を行っている細胞のパルス-チェイス実験を行った。自切後 9-21 時間の 12 時間ミミズを BrdU 溶液中で飼育することで、S 期の細胞を BrdU でラベルし、その断片の前後両再生芽を

切断除去することで、再生開始をリセットすることを試みた。その結果、切断直後は切り口付近に BrdU<sup>+</sup>細胞はほとんどなかったが、再生が経過するに従って、切り口付近に存在する BrdU<sup>+</sup>細胞の数が増加した。また、BrdU<sup>+</sup>細胞は主に再生芽の中胚葉領域に存在しており、その領域で活発に分裂していることも明らかとなった。これらの結果から、ネオブラストと N-cell は再生芽の中胚葉領域の形成に参加していることが示唆された。同様の実験から、再生芽の外胚葉組織の形成には傷口付近に存在している表皮細胞が、内胚葉領域の形成には腸に存在する未分化細胞が参加していることが示唆された。今回の結果から、ネオブラストは中胚葉性の幹細胞であり、N-cell はネオブラスト系列の TA 細胞 (transit amplifying cells) であると考えられた。

## II. 生殖巣の再生における生殖細胞の起源の解明

ヤマトヒメミミズは有性化を誘導すると無性個体が有性個体に変わるということが知られている。この生殖巣を再生することができる能力は予定生殖巣領域の第 7・8 体節に限られているのか、又は全ての体節が有しているものなのかを調べるために、元の個体の頭部・胴部・尾部にあたる断片を再生させ、有性化を誘導し、各断片の有性個体の発生率を求めた。その結果、どの領域の断片からでも高い割合で有性個体が生じたため、生殖巣を再生する能力は全身に備わっていることがわかった。

次に、生殖巣の再生過程において、生殖細胞がどの細胞に由来しているのかを調べるため、生殖細胞のマーカーとしてヤマトヒメミミズの *piwi* 遺伝子 (*Ej-piwi*) を単離し、その発現パターンを調べた。その結果、*Ej-piwi* は生殖巣中の生殖細胞で発現している他、腹側神経索上に散在している細胞でも発現していることがわかった。これらの細胞が生殖細胞の起源であるかを確かめるため、頭部再生中の *Ej-piwi* 発現細胞の挙動を調べた。その結果、切り口付近に存在していた *Ej-piwi* 陽性細胞は再生 1~2 日目に分裂増殖し、3 日目に新たに形成された頭部再生芽に移動し、5 日目には予定生殖巣領域でクラスターを作ることがわかった。これらのことから、ヤマトヒメミミズの生殖細胞の起源は腹側神経索上に散在する *Ej-piwi* 陽性細胞であり、頭部の再生に関与しているネオブラストとは別の細胞集団であることが示唆された。

## III. 生殖幹細胞とネオブラストの発生起源の探求

ネオブラストと腹側神経索上の *Ej-piwi* 陽性細胞 (生殖幹細胞) の発生起源および形成過程を明らかにするために 2 つの *vasa* 関連遺伝子 (*Ej-vlg1*, *Ej-vlg2*) を単離し、それらの遺伝子と *Ej-piwi* の発現解析を行った。成体において、生殖幹細胞では *Ej-piwi* とともに *Ej-vlg1* と *Ej-vlg2* が発現しており、ネオブラストでは *Ej-vlg2* の発現のみが検出された。胚発生における発現パターンを解析した結果、発生後期に胚の後部腹側で *Ej-vlg1* と *Ej-vlg2* を強く発現している少数の細胞が、胚発生終了後のステージに *Ej-piwi* を発現し、生殖幹細胞になることが示唆された。

次に成体ネオブラストの分布場所である隔壁腹側領域に *Ej-vlg2* の発現とネオブラストの形態的特徴を持つ細胞 (neoblast-like cell) が観察されるタイミングを調べたところ、発生終了後の 14・15 体節期に *Ej-vlg2* 発現細胞と neoblast-like cell を始めて観察できたが、それ以前の系譜をたどることはできなかった。最初に出現した neoblast-like cell は成体ネオブラストと比較すると核と核小体が小さく細胞自体も小さかったため、はっきりした特徴を持たない小型の細胞が隔壁腹側に定着した後に、典型的なネオブラストの形態的特徴を獲得することが推測された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 准教授 栃 内 新  
副 査 教 授 馬 渡 駿 介  
副 査 教 授 山 下 正 兼  
副 査 教 授 清 水 隆

## 学位論文題名

### The stem cell systems for asexual and sexual reproduction in an enchytraeid oligochaete, *Enchytraeus japonensis*

(ヤマトヒメミミズの生殖を支えている幹細胞システムに関する研究)

ヤマトヒメミミズは、高密度飼育条件下では断片化と再生によって無性的に繁殖し、わずか 2 体節からでも再生が可能という強い再生能力を持っている。また、人為的に切断しても正常に再生するため、再生現象を研究する上で極めて有用な実験動物である。更に、飼育条件を変えることで人為的に有性生殖も誘導できるため、頭尾など一般の器官再生と生殖器官の再生との比較研究のみならず、再生過程と発生過程との比較も容易に行える好個の実験動物である。申請者の博士論文研究では、上記のヤマトヒメミミズの特徴を十分に活かし、頭尾再生芽および生殖巣内に出現する体細胞および生殖細胞の由来を明らかにするとともに、それらの細胞が胚発生過程でどのように形成されるのかを調べている。

ヤマトヒメミミズにはネオブラストと呼ばれる未分化な形態的特徴を持った細胞が胴体体節の隔壁に付着している。申請者はまずこの細胞に注目し、再生芽形成への関与を調べる実験を行った。細胞の増殖を調べた結果、断片化後 1 日以内にネオブラストの DNA 合成が活発になることが明らかとなった。また、再生初期の特定の時期に DNA 合成をしているネオブラストを含む細胞をラベルして追跡した結果、分裂したネオブラストが移動して再生芽の中胚葉領域を形成することが示唆された。同様の追跡実験から、再生芽の外胚葉領域は付近の表皮細胞に由来し、内胚葉領域は付近の腸組織の細胞から形成されることも明らかにした。

次に申請者はネオブラストの遺伝子マーカーを得るため、ヤマトヒメミミズの *vasa* 関連遺伝子 (*Ej-vlg1*, *Ej-vlg2*) を単離し、発現解析を行った。*Ej-vlg1* はネオブラストでは発現しておらず、*Ej-vlg2* はネオブラスト以外の未分化細胞でも発現していたため、残念なことに *Ej-vlg1* と *Ej-vlg2* をネオブラストの特異的マーカーとして使うことはできなかった。しかし、共同研究者によってヤマトヒメミミズの *piwi* 関連遺伝子 *Ej-piwi* が単離され、それが生殖細胞のマーカーとなることが明らかとなり、さらに遺伝子の発現パターンにより

生殖系列の細胞 ( $Ej-piwi^+/Ej-vlg1^+/Ej-vlg2^+$ ) とネオプラスト ( $Ej-vlg2^+$ ) が区別できることがわかったため、それを利用して生殖巣再生に関わる細胞を解析した。

ヤマトヒメミミズの無性個体に有性化を誘導すると、第7体節に精巣、第8体節に卵巣が再生する。また、生殖巣が形成される第7・8体節を持っていない体幹部や尾部の断片からでも生殖細胞を持った生殖巣が再生する。生殖巣に出現する生殖細胞の由来を明らかにするため、頭部を切断し、再生している個体の遺伝子発現パターンを調べた結果、腹側神経索上に存在する  $Ej-piwi^+/Ej-vlg1^+/Ej-vlg2^+$  細胞が、生殖細胞の起源であることが示唆された。また、これらの細胞の挙動は、再生時のネオプラストの挙動と大きく異なっていることも明らかとなった。これらの結果から、ヤマトヒメミミズの成体体幹部では、生殖幹細胞 (腹側神経索上の  $Ej-piwi^+/Ej-vlg1^+/Ej-vlg2^+$  細胞) が  $Ej-vlg2^+$  ネオプラストを含む体性幹細胞とは独立の集団として維持されていることが明らかとなった。

最後に、生殖幹細胞とネオプラストが発生過程でどのように形成されるかを明らかにするために、発生過程での  $Ej-vlg1$ 、 $Ej-vlg2$ 、 $Ej-piwi$  の発現パターンを解析した。その結果、生殖幹細胞は有性生殖を行う多くの動物と同様に発生過程で他の細胞から区別され、胚発生終了時までには生殖系列細胞として分化することが明らかとなった。また、ネオプラストは生殖幹細胞の形成後、かなり経ってから出現することもわかった。今回の実験からは、ヤマトヒメミミズの生殖系列の細胞は胚発生中に体細胞系列の細胞から分離することが強く示唆されたが、無性生殖と有性生殖の両方を行なうヒドラやプラナリアと同様に生殖系列の細胞と体細胞の両方を作り出す多能性幹細胞が成体内に存在している可能性は否定できなかった。しかし、無性生殖と有性生殖の両方を行なうヤマトヒメミミズで、有性生殖を行なう多くの動物と同様に生殖細胞系列と体細胞系列が発生初期に分離され、その後も独立に行動していることが明らかとなったことは、生殖細胞の進化を考える上で有意義な発見と言える。

以上、本論文は環形動物貧毛類の頭尾および生殖器官の再生過程と、体性幹細胞と生殖幹細胞の発生および再生過程における挙動を、分子マーカーを用いて実験形態学的に詳細に記述した論文であり、動物の生殖細胞形成のメカニズムや生殖細胞の進化過程を知る上でも重要な知見を提供している。よって申請者は、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。