

学位論文題名

Studies on regeneration in *Enchytraeus japonensis*
(Annelida, Oligochaeta), by using
molecular biological tools

(分子生物学的手法を用いたヤマトヒメミミズの再生に関する研究)

学位論文内容の要旨

I. 再生初期に働く分子機構の解明

様々な動物種において古くから行われてきた組織学的な研究に加え、最近ではサプトラクシオン法やRNA干渉(RNAi)法などの新たな分子生物学的手法を用いた再生研究が行われ、古くからのモデル動物であるヒドラやプラナリアなどにおいては再生過程に必須な幾つかの遺伝子も明らかとなっている。一方、新しいモデル動物として提案された、全身を再生する能力を有するヤマトヒメミミズにおいては、分子生物学的手法を用いた研究は少なく、遺伝子の機能阻害実験系が存在しないこともあり、再生を支配する分子機構はまったく明らかにされていない。そこで申請者は、ヤマトヒメミミズ再生を支配する分子機構を明らかにするための研究を行った。

まずヤマトヒメミミズの再生初期過程に着目し、サプトラクシオン法により無傷個体と再生個体で発現している遺伝子を比較し、再生初期過程に発現量が増加する3クローン(*EjPsm*, *EjTuba*, *grimp*)と減少する2クローン(*horu*, *mino*)を単離した。このうち*EjPsm*と*grimp*については完全長のcDNAを得ることができ、そのうち*EjTuba*が*alpha tubulin*遺伝子と、*EjPsm*が26S proteasomeの*non-ATPase regulatory subunit*遺伝子と高い相同性を示した。得られた5つの遺伝子について*in situ hybridization*により発現部位の解析を行ったが、*EjPsm*では明確なシグナルが得られず解析できなかった。*EjTuba*、*horu*、*mino*はそれぞれ消化管の異なる領域で発現していることがわかったが、いずれも分化した組織で発現すると考えられた。一方*grimp*は、中胚葉性の幹細胞と考えられるネオブラスト、およびネオブラストより小型で形態的に良く似た体腔領域に存在する一部の細胞においてのみ、切断後3時間から12時間にかけて一過性の発現が見られ、その後速やかに発現がなくなることがわかった。また、一部の細胞では*grimp*の発現と同時にBrdUの取り込みも確認された。一方、外胚葉組織である表皮、内胚葉組織である消化管では、たとえ分裂している細胞でも*grimp*の発現は見られなかった。

次に、*grimp*の発現が再生と関係があるかどうかを確かめるべく二本鎖RNAを用いたRNAi法を開発し、環形動物の成体では世界で初めて機能阻害実験に成功した。この方法で*grimp*の機能を阻害された個体では、体腔領域にある中胚葉性細胞およびネオブラストでのBrdU陽性細胞数が減少し、再生芽の伸長および分節化が抑制された。一方、表皮、消化管における細胞分裂には影響は見られなかった。これらの結果から、*grimp*の発現がヤマトヒメミミズ再生初期の中胚葉性細胞の分裂開始に必要であり、再生初期に働く分子機構の一端を担うこと、体腔領域にはネオブラストと同じ性質を持った細胞が存在し、再

生芽の中胚葉性細胞の供給源となっていることが示された。

II. 分子マーカーを用いた形態調節過程の詳細な解析

再生は動物界に広く見られる現象であるが、その様式は動物種により異なり、たとえばプラナリアや両生類では、切断面に未分化細胞集団による再生芽が形成され、失われた構造が再構築される付加再生を行う。一方ヒドラでは、残った領域が再構成されることにより個体のプロポーションが回復する形態調節を行う。ヤマトヒメミズは両者の中間で、付加再生と形態調節の協調による再生をされているが、それを実験的に確かめた報告はない。これまでの研究から、ヤマトヒメミズでは自切により生じた各断片には、断片化後3日で尾部2体節（成長帯、尾節）が、5日で頭部（口前葉から第7体節目まで）が付加再生し、その後に形態調節が起こって全体のパターンが整えられることが示されている。しかしながら、本種においては外見上区別のつきにくい胴体部が身体の大部分を占めており、領域のパターンがどのような過程を経て回復するのかという点についての詳細は明らかとなっていなかった。そこで申請者は、消化管の異なる領域で発現する3つの遺伝子（*EjTuba*、*horu*、*mino*）を部域マーカーとして用い、再生過程におけるそれらの遺伝子の時間的・空間的な発現パターンの変化から形態調節過程の詳細な解析を行った。あわせて、正常ならば尾部が再生するはずの後方切断面から頭部が再生した両頭個体（頭部が2つ）と、胴体部の途中に第2の頭部が形成された二次軸個体（頭部が2つと尾部が1つ）を用いて、異常な場所に頭部が付加再生した場合に形態調節過程がどのように影響を受けるのかについての解析も行った。

無傷個体において、*EjTuba* は頭部、頭部直後および尾部直前の胴体部の3箇所、*mino* は頭部直後の胴体部、*horu* は胴体部中央領域で発現していた。断片化すると、これらすべての遺伝子は一旦発現を止めるが、その後部域特異的に発現を再開し、再生7日目までに無傷個体と同様のパターンが回復した。異常再生の結果である両頭および二次軸個体において、*mino* は正常な頭部のみならず異所的に形成された頭部に隣接する領域で発現していた。組織学的な観察により、両頭個体において異所的頭部に隣接することにより誘導された *mino* 発現領域では、消化管の極性が異所的頭部に従っていたが、体環構造などの外部形態は正常頭部に従っていることが知られており、両者の前後軸極性に矛盾が生じていることが新たに見出された。これらのことは、たとえどんなところに頭部が形成されようとも、その隣接部の消化管には *mino* 発現領域が誘導されること、また異所的頭部が元々の前後軸極と逆向きに形成された場合には、その頭部は外胚葉領域の極性には影響を与えないにもかかわらず、消化管の前後軸極性を逆転させる能力を有することを示している。一方、両頭個体では *horu* の発現は見られず、その発現領域は全身のプロポーションに従ってパターンニングされることが示唆された。

これらの結果から、再生時に見られる形態調節においては全身のプロポーションに従って再パターンニングが行われる領域と、隣接する頭部からの局所的支配によりパターンニングされる領域があることが明らかとなり、本種の再生が付加再生と形態調節の協調により行われることが実験的に確かめられた。

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	片 倉	晴 雄
副 査	教 授	山 下	正 兼
副 査	准教授	藤 田	知 道

学 位 論 文 題 名

Studies on regeneration in *Enchytraeus japonensis* (Annelida, Oligochaeta), by using molecular biological tools

(分子生物学的手法を用いたヤマトヒメミミズの再生に関する研究)

再生は動物界に広く見られる現象であるが、その様式は動物種により異なり、たとえばプラナリアやイモリでは、切断面に未分化細胞集団である再生芽が形成され、失われた構造が再構築される（付加再生）。一方ヒドラでは、残った領域の細胞が再構成されることにより個体のプロポーションが回復する（形態調節）。ヤマトヒメミミズを含む貧毛類ヒメミミズ科は、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持つにも関わらず、全身再生能を有する種が含まれ、その再生様式は付加再生と形態調節の中間に位置するユニークなものである。再生生物学の領域では、古くからの組織学的な研究に加え、分子生物学的な研究も盛んに行われるようになり、多くの動物種において再生に関わる遺伝子が次々と明らかにされてきている。しかし、環形動物においては、再生過程の分子生物学的研究があまり行われておらず、再生の分子機構はほとんど明らかになっていない。このような状況の下、申請者は学位論文研究として環形動物門貧毛綱に属するヤマトヒメミミズの再生機構について分子生物学的手法を用いて研究を行った。

第1章では、ヤマトヒメミミズの再生初期過程の分子機構を明らかにすることを目的に行った研究を報告している。サブトラクション法により得られた、相同遺伝子の存在しない新規遺伝子である *grimp* が、ヤマトヒメミミズにおいて中胚葉性幹細胞と考えられているネオブラスト、およびネオブラストより小型ではあるが形態的に良く似た、体腔領域に存在する一部の細胞において切断後3時間から12時間にかけてのみ発現することを見出し

た。一部の細胞では *grimp* の発現と同時に BrdU の取り込みも確認されたため、*grimp* 遺伝子の機能と再生との関係を直接確かめるために、申請者は環形動物の成体では世界で初めての成功例となる RNAi 法による機能阻害実験系を確立し、*grimp* の発現がヤマトヒメミミズ再生初期の中胚葉性細胞の分裂開始に必要であること、体腔領域にはネオブラストと同じ性質を持った細胞が存在し、再生芽の中胚葉性細胞の供給源となっていることを示した。

第2章では、無傷個体の消化管の異なる領域で発現する3つの遺伝子 (*EjTuba*、*horu*、*mino*) をマーカーとし、再生過程におけるそれらの時間的・空間的発現パターンの変化から、形態学的観察からだけでは難しかったヤマトヒメミミズにおける形態調節の詳細な観察と、異常な付加再生 (両頭、双頭) が起こった場合に形態調節過程がどのように影響を受けるのかについての解析を行っている。その結果、通常再生過程において、マーカー遺伝子の発現は再生初期に一旦消失し、その後部位特異的に発現を再開し、再生7日目までに無傷個体と同様のプロポーションを持ったパターンが回復することが示された。両頭および双頭個体において、*mino* は正常なおよび異所的に形成された頭部に隣接する領域で発現していた。組織観察から、両頭個体において異所的頭部に隣接することにより誘導されたと考えられる *mino* 発現領域では、消化管の前後軸極性が異所的頭部に従って逆転していることが見出された。これまでの研究から、異所的に形成された頭部は近傍の外胚葉領域の極性には影響を与えないことがわかっており、この領域では消化管と外胚葉の前後軸極性が逆転しているという興味深い現象が見られる。また、両頭個体では *horu* の発現は見られず、その発現領域は頭尾にはさまれることが必要であることも示唆された。

本研究を通して、申請者は環形動物の再生に関わる重要な新規遺伝子を明らかにしたばかりではなく、ネオブラストのみが中胚葉性の幹細胞であるというこれまでの「常識」を修正する重要な知見を提示している。また、今までまったく明らかになっていなかった付加再生と形態調節の相互関係の一端が明らかにされ、消化管再生に関しては頭部が形態調節過程に影響を与えるというヒドラやプラナリアとの共通性も示された。本種における再生の分子機構の詳細、付加再生と形態調節の相互作用機構などの解明にはさらなる研究が必要とされるが、ヤマトヒメミミズで得られたこれまでの結果、およびこれから得られるであろう結果を他のモデル動物と比較することで、再生様式の進化発生的な理解への貢献も期待できる。

申請者が博士研究において明らかにした、ヤマトヒメミミズの再生についての多くの知見と、成体における機能阻害実験系の確立は、広く環形動物の再生・発生研究に対して貢献するものであり、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られる。