

プラナリアにおける生殖戦略転換機構

「形とはたらき」領域 小林 一也

要 旨

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あまり行われていない理由は、実験室でこの現象を安定して再現することが困難であったり、途方もない観察時間を要することにあるようだ。プラナリアでは有性個体に含まれている有性生殖誘導因子の刺激で、いつ何時でも無性生殖から有性生殖への転換を引き起こすことができる。本研究は、無性生殖から有性生殖への転換現象、いわゆる有性化現象の一般的理解を深めるために、有性生殖誘導因子の同定を目指したものである。同定には至っていないがその精製も最終段階にあり、また生殖戦略における有性生殖誘導因子の生物学的意義を検討した。有性化現象は視点を変えてみると、生殖生物学的側面だけでなく発生生物学的側面も伺い知ることができる。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。本研究ではまた、Differential Screening 法、Differential Display 法を用い、これらの遺伝子の探索を行った。

1. 研究の背景

私達、ヒトを含む哺乳類の生殖方法が有性生殖に限定しているために看過されがちだが、性と生殖は不可分な現象ではない。例えば、単細胞生物であるゾウリムシは分裂で増殖する。ここでは「生殖」は行われているが、遺伝子の混合すなわち「性」は起こっていない。このような意味の生殖方法を有性生殖に対して無性生殖とよんでいる。また、ゾウリムシは時に個体数は増やさずに核の交換だけを行う。この接合とよばれる現象では「性」はあるが「生殖」は行われていないことがわかる。無性生殖する生物は皆、ゾウリムシのような単細胞生物を想像するかもしれないが、実際のところ後生動物では、脊椎動物を除くほとんどの動物群で有性生殖だけでなく無性生殖も行う種が確認されている。しかも、この2つの生殖戦略を環境・世代交代あるいは発生段階に応じて巧みに変換しているのである。この転換が子孫を残すという重大な使命を持つ生物の現在の繁栄に大きく貢献してきたことは容易に想像で

きる。しかしながら、この生命現象の根幹に関わる研究はほとんど進んでいないのが現状である。

進化系統上、原始的かつ重要な位置にある扁形動物プラナリアでは、生殖器官を欠いて分裂・再生をくりかえして増殖している無性個体に有性個体を餌として与えると有性生殖へと転換することが知られている (Grasso et al., 1973)。このことは有性個体中に有性生殖誘導因子が存在していることを意味している。しかし、この報告がなされてからすでに四半世紀が経過しているが、優れた有性化系が確立されていなかったためこの化学物質の精製のみならず現象の詳細な調査も行われていなかった。さきがけ研究以前に、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、ちなみにプラナリアのことを和名で渦虫と呼ぶ) 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、有性化現象をその形態変化から5段階に分類していた (図1)。ステージ1では、発達してきた一对の卵巢が肉眼で見えるようになるが、まだ卵原細胞様の細胞の塊で、いわゆる卵巢原基の状態になっている。ステージ2では、その卵巢内に卵母細胞が発達してくる。ステージ3では精巢と交接器官の原基が現れ、ステージ4では、卵黄腺というプラナリアという動物に特徴的な生殖腺の原基が現れ、腹側に生殖孔が開く。そして、ステージ5では、すべての生殖器官が成熟して一般的なプラナリア有性個体の体制が整う。ここまでにかかる時間はおおよそ1ヶ月である (生理活性物質の単離という立場でみると気の遠くなるくらい長い検定時間だか、過去の報告に比べてはるかに短い)。本研究では、この系を用いて生殖様式転換機構の鍵物質である有性生殖誘導因子の単離を試み、またこの機構の一般的な理解を深めるために有性生殖誘導因子の役割を詳細に解析した。

2. 研究方法と成果

2-1 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




		再生させた時の 生殖様式	餌として与えた時の 検定個体の生殖様式
	頭部断片	無性	無性
	中部断片	有性	有性
	尾部断片	有性	有性

図2

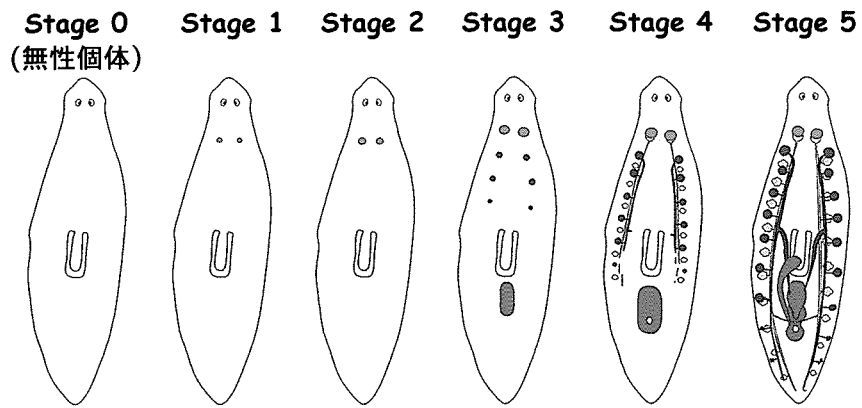


図 1

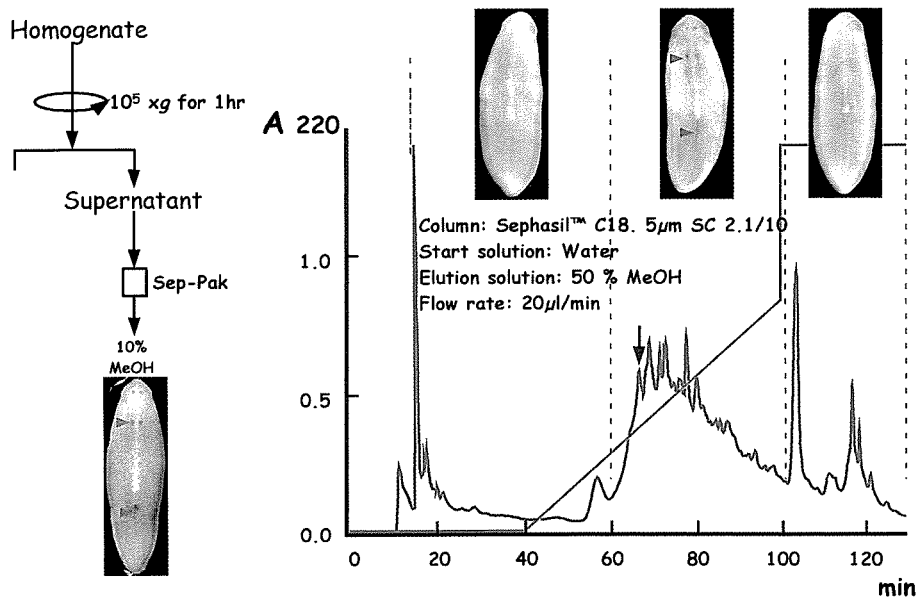


図 3

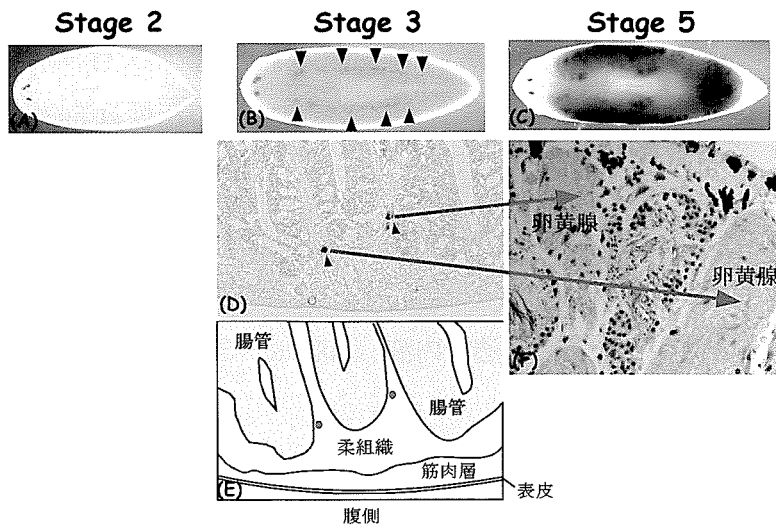


図 4

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無性個体に再生した（図2）。この無性化頭部再生体は有性生殖誘導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ステージ3以降に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停止させられると考えられる。以上のことから、たとえ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。

2-2 有性生殖誘導因子の精製

2-1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, 30minの遠心処理を施した。その上清画分に含まれている（おそらく糖タンパク質と考えられる不溶性の）浮遊物を除去するために、0.2 μ m フィルターを通し、さらに超遠心100,000 x g, 1hr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M1画分を陽性対照として以下の実験を行った。

1. 活性の限界値（最低材料量）を知ることは重要である。M1画分を用いた場合、有性化個体5匹-検定個体1匹の割合が完全に有性化を起こすことのできる限界量であることがわかった。以下の実験は有性化個体10匹-検定個体1匹の割合で行った。
2. 限界濾過（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。
3. 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。
4. 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かった。

以上のことから、有性生殖誘導因子は500Da以下の低分子であり、パパインに対して非感受性であることがわかった。

M1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) を行った。分離20-40分、分離40-100分、分離100-120分とわけそれぞれの画分の有性化活性を調査したところ、分離20-40分回収物を与えた時のみ、完全な有性化が確認された(図3)。現在、図中、青色の矢印で示した約7%MeOHで溶出する単一ピーク付近に有性化活性が認められている。有性生殖誘導因子は中性条件下で陰イオン交換樹脂に吸着することから負電荷をもつ物質であることが予想される。現段階で因子がどのような物質であるかは明言できないが、ペプチドだとすると3もしくは4個のアミノ酸から構成されていると考えられる。この因子は260nmの吸収波長を持つことから核酸誘導体の可能性もあると考えている。

2-3 有性化特異的遺伝子群の研究

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。これまで、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) を単離している。*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(図4)。

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て用いるこ

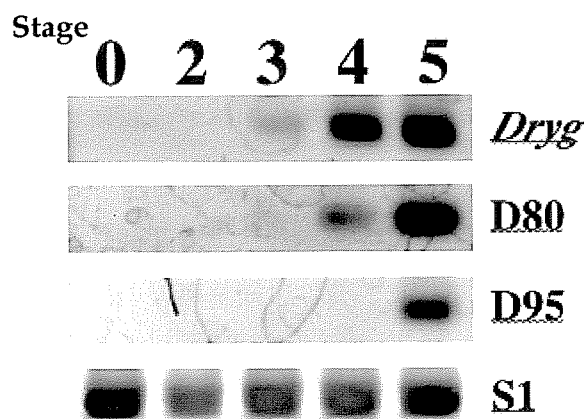


図5

とにより、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。図5はRT-PCR法を用いて簡便に不可逆状態のステージを評価できることを示したものである。

2-4 有性化個体と有性個体に関する研究

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、これらの系統に関して、次のようにモデルをたてた。

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。

このような概念のもと、無性系統に由来する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付き、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（図6）。ここでは、評価の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、図2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（図6）。先述したように、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

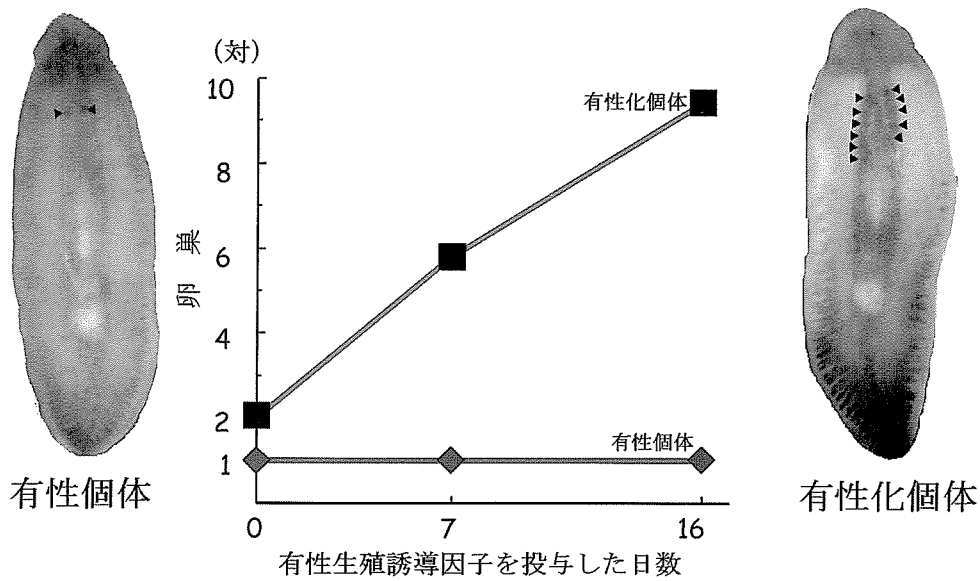


図6

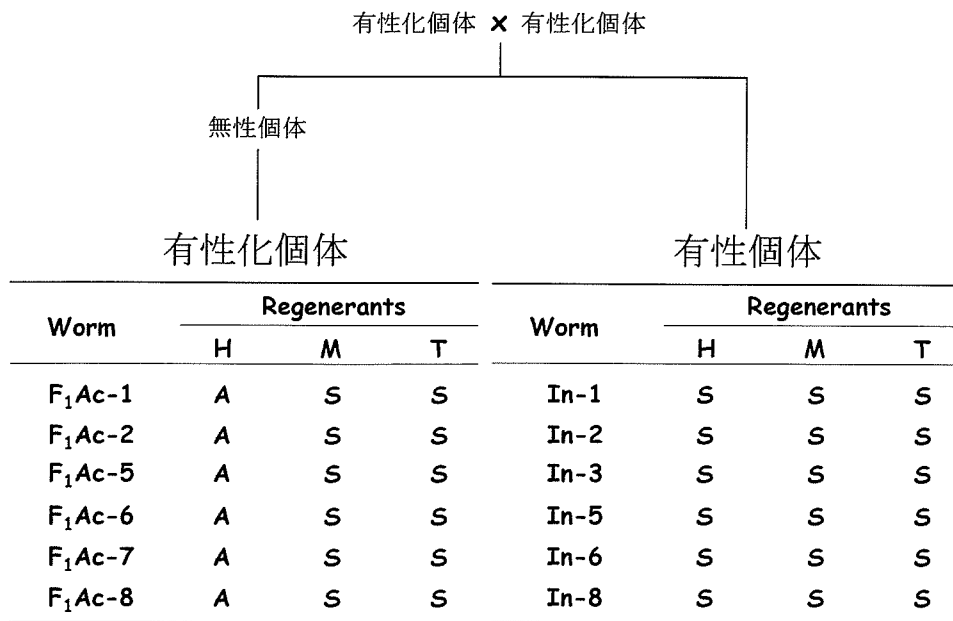


図7

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（図2）、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。以上の結果から有性個体が有性化された無性仔虫ではなく、上述の概念に適合する有性系統とみなすこと

ができる。さらに注目すべきことは、無性系統であった OH 株から本質的に異なる有性系統の子どもが生じていることである。プラナリアで観察される複雑な生殖戦略はこのように有性生殖を通して発達・伝播してきたと考えられる。

3. 今後の展望

重大な生物学的問題である生殖様式転換という現象を一般化するために、このプラナリアにおける有性生殖誘導因子は絶大な宣伝効果を有しており、この因子の同定が本研究の本当のはじまりともいえる。有性生殖誘導因子は、生殖様式を転換するリュウキュウナミウズムシだけでなく、転換をしないイズミオオウズムシにも含まれている。つまり、転換タイプの動物以外にも生殖細胞や生殖器官の分化に関与していることが予想され、プラナリアという動物群だけでなく、さまざまな動物を用いて有性生殖誘導因子の動物界における意味を探る必要性がある。実際、有性化現象で魅力的な出来事のひとつに、無性個体ではまったく観察されない複雑な生殖器官が発達してくることがあげられる。プラナリア無性個体では生殖細胞に分化する潜在能力のある幹細胞が存在しているものの何らかの理由で停止しており、有性生殖誘導因子の影響があつて初めて生殖細胞の分化が起こるといえる。進化系統上、原始的でかつ重要な位置にあるプラナリアから生殖細胞決定に関与している遺伝子群を発信することも夢ではない。有性化個体と有性個体に関する研究において述べたように、有性個体では発生運命的に有性生殖誘導因子の産生がプログラムされていて、結果的に常に有性状態を維持していると考えられる。一方、無性個体では有性生殖誘導因子の産生に関する機構のどこかに欠陥があるために有性状態になれないと考えられる。有性化個体は外部からの有性生殖誘導因子の刺激を受けることにより、これらの欠陥を回避して自身の有性生殖誘導因子を産生できるようになったと考えられる。生殖細胞分化の引き金となる有性生殖誘導因子の産生に関わる機構は、無性生殖なのか有性生殖なのか、いかえると個体が不死なのか死なのか決定される段階ともいえ、この因子をキーワードに生殖戦略と生死の関連性を理解していくことが可能であろう。

4. 発表リスト

(1) 論文

1. Kobayashi, K., Arioka, S. and Hoshi, M. Seasonal changes in the sexualization of the planarian *Dugesia ryukyuensis*. Zool. Sci. in press
2. 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

3. 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

(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 : 「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 grative 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

謝 辞

本研究は多くの方々の協力のもと遂行することができました。慶応義塾大学大学院理工学研究科 星元紀教授、松本緑助教授、そして研究室の学生の皆様に大変お世話になりました。実験材料のOH株を提供して頂き、私にプラナリアの魅力を教えてくれた師でもある弘前大学農学生命科学部 石田幸子助教授に感謝します。ここに名のあげられぬすべての方にも心より感謝の意を表します。

図の説明

図1 有性化段階

赤：卵巣、青：精巣、緑：交接器官、黄：卵黄腺。卵巣と交接器官（生殖孔）は肉眼で確認できる。

図2 有性生殖誘導因子と有性化不可逆状態との関係

有性生殖誘導因子がほとんど含まれていない頭部断片は再生して無性個体になる。

図3 有性生殖誘導因子精製の図説

M1画分（図中左側の10%MeOH画分）の逆相クロマトグラフィー。図中の写真は分画物を与えた検定個体の外部形態。有性化が起こると卵巣（赤い矢尻）と生殖孔（緑の矢尻）が現れてくる。青矢印は有性化活性の認められるピークのあたり（推定）。

図4 *Dryg* の発現解析

(A)-(C)：ホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション。ステージ2までは発現が認められない。ステージ3から腹側の腹神経索に沿ってシグナルがあらわれはじめ（矢尻）、ステージ5では頭部以外のほとんどの領域で強い発現が観察された。(D)：ステージ3個体のセクション *in situ* ハイブリダイゼーション。腹側の柔組織スペースに散在している全能性幹細胞のいくつかに発現が認められた（矢尻）。将来、卵黄腺が発達する予定領域の全能性幹細胞だけにこの遺伝子は発現している。見かけ上は未分化細胞の特徴を持つが、すでに何らかの細胞に分化することが決定されていると考えられる。(E)：(D)の図説、*Dryg* が発現している全能性幹細胞を橙色で示している。(F)：ステージ5個体のエオシン・ヘマトキシリン染色像。*Dryg* がステージ3以降、発現していた器官は卵黄腺であった。

図5 RT-PCRによる有性化段階のステージング。

下線が引かれた文字はOH株から単離された遺伝子の名前。S1はコントロールでプラナリア腸管に特異的に発現する Actin-like protein。

図6 有性化個体と有性個体の違い－1

有性個体には過剰な生殖器官（卵巣）が誘発されない。

写真は2週間の実験経過後の外部形態（腹側）。矢尻は1つの卵巣を示す。

図7 有性化個体と有性個体の違い－2

有性個体の頭部再生体は無性化しない。

H：頭部再生体、M：中部再生体、T：尾部再生体、A：無性個体に再生した場合、S：有性個体に再生した場合。