

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16086209

研究課題名（和文） プラナリアにおける生殖戦略転換機構 —無性生殖から有性生殖へ—

研究課題名（英文） Studying on Switching of Reproductive System in Planarian

研究代表者

松本 緑 (MATSUMOTO MIDORI)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：00211574

研究成果の概要：

独自に開発したプラナリア無性生殖個体を有性生殖個体に転換させる系（有性化）を用いて、①有性化因子の単離、②有性化関連遺伝子群の解析、③全能性幹細胞ネオブラストの生殖細胞分化能について研究を進めてきた。有性化因子の一つとして D-Trp が卵巣の顕著な発達と異所的な卵巣形成を誘導することを示し、有性化誘導初期に発現する遺伝子群を探索し見いだした。また、誕生時の生殖様式によってネオブラストの生殖細胞への分化能が異なることが示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	9,600,000	0	9,600,000
2005年度	9,600,000	0	9,600,000
2006年度	9,600,000	0	9,600,000
2007年度	9,600,000	0	9,600,000
2008年度	9,600,000	0	9,600,000
総計	48,000,000	0	48,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：無性生殖、有性生殖、プラナリア

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、多細胞動物における無性生殖から有性生殖への転換機構について解明するために、1個体に由来し、20年近くにわたって一度も有性個体を生じたことの無いリュウキュウナミウズムシ (*Dugesia ryukyuensis*) の無性系クローン (OH株) 個体に、有性生殖のみを行うとされているイズミオオウズムシ (*Bdellocephala brunnea*) の成熟個体を餌として与えることによって、比較的速やか (1週間程度の処理) かつ確実に (有性化率 100%) に有性化させる実験系を確立した。この実験系の開発により、現代生

物学的手法を用いてプラナリアの有性化機構を解析することが可能になった。この実験的有性化は有性系個体の正常発生と同じ順序で器官形成が進行し、投餌開始後約5週間で生殖孔が開いて完成する。この過程を器官形成と生殖細胞の状態から五段階に分け、卵巣が発達した後でも、精巣が発達するまではイズミオオウズムシの投餌を止めると卵巣が退化して無性状態に戻ってしまうが、精巣が発達してくると (投餌開始後2週目)、イズミオオウズムシの投餌を止めても有性化は最後まで進行する。この境界点を有性化回避不能点 (point-of-no-return) と名付けた。

有性化は有性個体内にある有性化因子により誘導されると考えられる。

## 2. 研究の目的

本申請は、生殖様式転換機構を明らかにするために(1)有性化因子の完全精製と構造の決定、(2)卵巣誘導物質の単離・同定、(3)有性化に係わる遺伝子群の網羅的解析、(4)致死量X線照射個体へのネオプラストの移植実験を用いた多能性幹細胞といわれるネオプラストの生殖細胞分化能力の解析、(5)染色体の異常な挙動の解析、について解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) 有性化因子の精製-逆相、イオン交換、ゲル濾過 HPLC により分画した。
- (2) 卵巣誘導物質の同定-無性個体への投餌により検定した。
- (3) 有性化に係わる遺伝子群の網羅的解析-有性化プラナリア EST-データベースを作成し、各有性化段階でマイクロアレイ解析を行った。
- (4) ネオプラストの生殖細胞分化能力の解析-断片再生実験、ネオプラスト移植実験を行った。
- (5) 染色体の異常な挙動の解析-FISH 法により染色体を識別し核型解析を行った。

## 4. 研究成果

- (1) 有性化因子の精製(2) 卵巣誘導物質の同定-有性化を誘導する因子を単離し、構造解析を行い、この誘導分子の一つがトリプトファン(Trp)の単分子であることを示した。市販の L-Trp 及び D-Trp の無性個体への投餌により、D-Trp が卵巣の顕著な発達と異所的な卵巣形成を誘導することを示した。しかし、完全な有性生殖個体への転換は誘導しなかった。
- (3) 有性化に係わる遺伝子群の網羅的解析-バイオインフォマティクス的手法により、有性化誘導初期に発現する遺伝子群を探索し見いだした。
- (4) ネオプラストの生殖細胞分化能力の解析-①実験的に有性化させた個体(acquired sexual, AcS)が交尾して産んだ仔虫の約3分の2は、有性化物質を摂食しなくても有性個体となる。このように、生得的に有性となる個体を innate sexual (InS) と命名した。AcS に有性化因子を与え続けると過剰卵巣を形成するが、同様な処置を施しても InS は決して過剰卵巣を形成しない。②AcS と InS を小断片に切断して再生させると、InS の断片はすべて有性個体になるが、AcS の断片では、再生時間が3ヶ月以上かかったものは無性個体となった。個体内に存在する有性化因子が再生中に分解されたため有性生殖できない

いと考えられた。③致死線量の X 線を照射した OH 個体に AcS と InS のネオプラストリッチ画分の移植実験を行ったところ、AcS 由来の画分を移植した個体は再生後無性個体となったが、InS 由来の画分を移植した個体は再生後、生殖器官を形成し、卵殻を産み、次世代を形成した。

(5) 染色体の異常な挙動の解析-実験的有性化で用いた OH 株の核型は混数性 ( $3n=21$ ) かつ染色体多型であるが、卵巣、精巣のいずれにおいても減数分裂とみなされる像は  $2n$  由来の像を示した。得られた個体を統計学的に処理した結果、2倍体の卵は第1減数分裂後の極体が再び融合することで形成されていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- (1) Kazuva Kobayashi, Sachiko Arioka, Motonori Hoshi, Midori Matsumoto Production of asexual and sexual offspring by inbreeding of the triploid sexual planarian *Dugesia ryukyuensis* 査読有 International Journal of Zoology (in press)
- (2) Kazuva Kobayashi, Toshiyuki Hashiguchi, Taiichiro Ichikawa, Yugo Ishino, Motonori Hoshi, Midori Matsumoto Neoblast-enriched fraction rescues eye formation in eye-defective planarian 'menashi' *Dugesia ryukyuensis* Development, Growth and Differentiation 査読有 50 2008 689-696
- (3) Kazuva Kobayashi, Hirotsugu Ishizu, Sachiko Arioka, Jocelyn Padilla Cabrera, Motonori Hoshi, Midori Matsumoto Production of diploid and triploid offspring by inbreeding of the triploid planarian *Dugesia ryukyuensis* Chromosoma 査読有 117 2008 289-296
- (4) Sumitaka Hase, Emiko Kashiwagi, Kazuva Kobayashi, Motonori Hoshi, Midori Matsumoto Characterization of novel genes expressed specifically in the sexual organs of the planarian *Dugesia ryukyuensis* 査読有 Int. J. Dev. Biol., 51 2007 345-349
- (5) Hideyuki Ishiduka, Takanobu Maezawa, Junpei Kawauchi, Hanae Nodono, Yukako Hirao, Osamu

- Nishimura, Haruka Nakagawa, Kiyono Sekii, Kenta Tasaka, Hiroshi Tarui, Kiyokazu Agata, Motonori Hoshi, Kazuya Kobayashi, Yasufumi Sakakibara and Midori Matsumoto. The *Dugesia ryukyuensis* Database as a Molecular Resource for Studying on Switching of Reproductive System 査読有 Zoological Science 24 2007 31-37
- (6) Sumitaka Hase, Kazumasa Wakamatsu, Kengo Fujimoto, Akemi Inaba, Kazuya Kobayashi, Midori Matsumoto, Motonori Hoshi, Sumiko Negishi Characterization of the pigment produced by the planarian, *Dugesia ryukyuensis* 査読有 Pigment Cell Res 19 2006 248-249
- (7) Yukiko Sato, Kazuya Kobayashi, Midori Matsumoto, Motonori Hoshi and Sumiko Negishi Comparative study of eye defective worm 'menashi' and regenerating wild-type in planarian, *Dugesia ryukyuensis* Pigment cell research 査読有 18 2005 86-91
- [学会発表] (計 44 件)
- (1) Kazuya Kobayashi, Manabu Aoki, Motonori Hoshi, Midori Matsumoto Identification of the sexualizing-substance from sexual planarian International Symposium for Gonad and Brain Sex Differentiation Sep. 16 2008 Fukuoka
- (2) 石津 大嗣、茅根 文子、小林 一也、松本 緑 3 倍体プラナリアの生殖様式の解明、日本動物学会第 7 9 回大会 2008 年 9 月 7 日、福岡
- (3) 中川 晴香、石津 大嗣、小林 一也、松本 緑、リュウキュウナミウズムシの生殖細胞特異的に発現する *piwi* 遺伝子の解析 日本動物学会第 7 9 回大会 2008 年 9 月 7 日、福岡
- (4) 石津大嗣, 中川晴香, 小林一也、松本緑 リュウキュウナミウズムシの生殖細胞形成における *nanos* 遺伝子の解析日本動物学会第 7 9 回大会 2008 年 9 月 7 日、福岡
- (5) 野殿 英恵・小林 一也・松本 緑、プラナリア人為的有性化個体と先天的有性個体の比較: エピジェネティクスと幹細胞に着目して 日本動物学会第 7 9 回大会 2008 年 9 月 7 日、福岡
- (6) 松本 緑 プラナリア生物学の新展開 日本動物学会第 7 9 回大会関連集会 2008 年 9 月 5 日、福岡
- (7) 青木 学、小林 一也、大貫 裕之、廣田 洋、星元紀・松本 緑 プラナリアの生殖様式を転換する鍵物質の探索: 無性生殖から有性生殖へ第 3 回化学生態学研究会 2008 年 7 月 5 日 函館
- (8) 松本 緑 プラナリアの生殖方法を無性生殖から有性生殖に転換させる物質 新規素材探索研究会 第 7 回セミナー 2008 年 6 月 6 日 横浜
- (9) 大須賀啓輔、河内淳平、小林一也、星元紀、松本緑、プラナリア生殖細胞分化に関与する DEAD-box gene の発現解析、日本動物学会第 7 8 回大会 2007 年 9 月 20 日、弘前
- (10) 石野雄吾、小林一也、竹田典代、星元紀、松本緑、X 線致死線量照射プラナリアのネオプラスト移植による致死回避、日本動物学会第 7 8 回大会 2007 年 9 月 20 日、弘前
- (11) 松本 緑 プラナリアの子孫の作り方〜一匹で殖えたり、つがいで増えたり〜 日本動物学会関東支部公開講演会〜今、こんな動物がおもしろい!〜さまざま生殖様式 2007 年 7 月 21 日 東京
- (12) 松本 緑 生き物達の生殖戦略 平成 1 9 年度大学教養研究センター 極東証券寄附講座 生命の教養学 誕生と死-その間にいる君たちへ 2007 年 6 月 14 日 横浜
- (13) Kiyono Sekii, Sumitaka Hase, Kazuya Kobayashi, Motonori Hoshi, Midori Matsumoto, Differential Expression of a HSP20-related gene Durgon1 in gonads and yolk glands during sexualization of planarian, 第 4 0 回日本発生生物学会、第 5 9 回日本細胞生物学会合同大会、2007 年 5 月 29 日、福岡
- (14) Kazuya Kobayashi, Manabu Aoki, Motonori Hoshi, Midori Matsumoto, Identification of the sexualizing-substance from sexual planarian, 第 4 0 回日本発生生物学会、第 5 9 回日本細胞生物学会合同大会、2007 年 5 月 28 日、福岡
- (15) 松本 緑 プラナリアにおける生殖細胞の再生 成茂シンポジウム「再生現象の多様性-生物はいかなる修復メカニズムを駆使して生きのびてきたのか?」日本動物学会第 7 7 回大会 2006 年 9 月 23 日、松江
- (16) 渡邊かおり、野島久美恵、小林一也、松本緑 プラナリア全能性幹細胞に

- おける重粒子線の影響 日本動物学会第77回大会2006年9月22日、松江
- (17) 松本 緑 プラナリア生殖戦略転換機構-無性生殖から有性生殖へー第99回日本繁殖生物学会大会シンポジウム「性の戦略」2006年9月8日 名古屋
- (18) 松本 緑 プラナリア生殖戦略転換機構-有性化因子の探索 サントリー生物有機科学研究所コロキウム2006年6月20日 大山崎
- (19) Kenta Tasaka, Naoki Yokoyama, Kazuva Kobayashi, Motonori Hoshi, Midori Matsumoto Relationship between sexual mode and telomere maintenance in planarian *Dugesia ryukyuensis* 3<sup>rd</sup> International Conference on Functional Genomics of Aging Mar.30 2006 Palermo Italy
- (20) Kiyono Sekii, Sumitaka Hase, Kazuva Kobayashi, Midori Matsumoto, Motonori Hoshi Differential expression of a novel gene *durgon1* in gonads and yolk glands during sexualization of planarian The 52<sup>nd</sup> NIBB Conference Reproductive Strategies Jan. 21 2006 Okazaki
- (21) Kenta Tasaka, Naoki Yokoyama, Kazuva Kobayashi, Motonori Hoshi, Midori Matsumoto Relationship between sexual mode and telomere maintenance in planarian *Dugesia ryukyuensis* The 52<sup>nd</sup> NIBB Conference Reproductive Strategies Jan. 21 2006 Okazaki
- (22) 河内淳平、前澤孝信、安島宏、小林一也、榊原康文、樽井寛、阿形清和、星元紀、松本緑 マイクロアレイによるプラナリア有性化における mRNA 発現解析 第28回日本分子生物学会2005年12月9日、福岡
- (23) 中川晴香、前澤孝信、石塚秀行、安島宏、榊原康文、樽井寛、阿形清和、小林一也、星元紀、松本緑 プラナリアの生殖器官形成における内分泌関連分子の解析 日本動物学会第76回大会2005年10月7日、つくば
- (24) 関井清乃、長谷純崇、小林一也、松本緑、星元紀 プラナリアの有性化初期に発現する *Durgon1* の機能解析 第38回日本発生生物学会2005年6月2日、福岡
- (25) 田坂健太、横山尚毅、小椋加奈子、小林一也、星元紀、松本緑 プラナリア無性及び有性化抗体のテロメア維持能力による比較 第27回日本分子生物学会2004年12月10日、神戸
- (26) 有岡幸子、小林一也、松本緑、星元紀 DNA 含量からみたプラナリアの倍数性 日本動物学会第75回大会2004年9月12日、神戸
- (27) 中川晴香、前澤孝信、安島宏、榊原康文、樽井寛、阿形清和、小林一也、星元紀、松本緑 プラナリアに内分泌系はあるか 日本動物学会第75回大会2004年9月11日、神戸
- (28) 長谷純崇、若松一雅、伊藤祥輔、小林一也、佐藤由紀子、松本緑、星元紀、根岸寿美子 プラナリア (リュウキュウナミウズムシ) に含まれる色素成分の同定 日本動物学会第75回大会2004年9月11日、神戸
- (29) 松本 緑 プラナリアにおける無性生殖から有性生殖への転換 シンポジウム 4D 動物の性決定および性分化機構-性決定の進化を探る 日本動物学会第75回大会2004年9月11日、神戸
- (30) Midori Matsumoto, Kazuva Kobayashi, Motonori Hoshi, Comprehensive studies in planarians. 10th International Congress of Reproduction and Development Jun. 21 2004, Newcastle-upon-Tyne UK
- (31) Matsumoto, M., Nakagawa, H., Miyashita, H., Kobayashi K., and Hoshi M. Expression of nuclear receptor gene during sexualizing process in planarian. 10th International Congress of Reproduction and Development Jun. 20 2004, Newcastle-upon-Tyne UK
- (32) Kobayashi, K., Arioka, S., Matsumoto, M., Hoshi, M. Transition between asexual and sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyuensis* - Sexualization of exclusively asexual worms by a putative sexualizing substance in sexual worms. 10th International Congress of Reproduction and Development Jun. 19, 2004 Newcastle-upon-Tyne UK
- (33) 中川晴香、宮下仁志、小林一也、星元紀、松本緑 プラナリアのステロイドホルモン受容体遺伝子の生殖器官における発現 第37回日本発生生物学会2004年6月4日、名古屋

〔図書〕(計 4 件)

- (1) 小林一也、松本 緑 プラナリアの生殖方法を無性生殖から有性生殖に

転換させる化学物質 生物と化学  
学会出版センター (in press)

- (2) 小林一也、松本 緑 プラナリア  
身近な動物を使った実験 2 鈴木範  
男編 三共出版 2009 1-20
- (3) 松本 緑、小林一也、星 元紀 プ  
ラナリア生殖戦略転換における生殖  
細胞の起源 蛋白質核酸酵素 共立出  
版 50 2005 541-545
- (4) 小林一也、松本 緑、星 元紀 プ  
ラナリアにおける生殖戦略転換機構  
蛋白質核酸酵素 共立出版 49 2004  
102-107

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 緑 (MATSUMOTO MIDORI)  
慶應義塾大学・理工学部・准教授  
研究者番号：00211574

### (2) 研究分担者

星 元紀 (HOSHI MOTONORI)  
放送大学・教養学部・教授  
研究者番号：20012411  
小林 一也 (KOBAYASHI KAZUYA)  
慶應義塾大学・理工学部・助教  
研究者番号：50360110  
竹田 典代 (TAKEDA NORIYO)  
慶應義塾大学・理工学部・助手  
研究者番号：40433742

### (3) 連携研究者

該当なし