

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21657054

研究課題名（和文） ミジンコで発見された単為生殖と有性生殖を切り替え可能にする減数分裂の解析

研究課題名（英文） Analysis of meiosis in *Daphnia pulex*, which enables to switch between parthenogenesis and sexual reproduction.

研究代表者

栃内 新 (TOCHINAI SHIN)

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：20111148

研究成果の概要（和文）：同じ個体が有性生殖と単為生殖を使い分けるミジンコの単為生殖過程では、‘減数しない減数分裂’により 2 倍体となった卵が発生を開始することがわかった。卵巣では、成熟卵が第 1 減数分裂中期で受精を待ち、精子の侵入がないまま排卵されると分裂を途中で停止し並び直した染色体が次の分裂を行い、単為発生する。一方、受精が起こると減数分裂が進行し、卵核と精子が融合して 2 倍体となって発生するという仮説を立て、検証中である。

研究成果の概要（英文）：From this project, it was concluded that diploid progeny are produced by non-reductional division in parthenogenetic *Daphnia pulex*. When a parthenogenetic egg entered the first meiosis, division was arrested in the early first anaphase, and move back to the equatorial plate. Then, the sister chromatids were separated in the same manner as the second meiotic division. On the other hand, normal meiosis may well occur resulting in a diploid embryo if the ovarian egg is fertilized.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	0	1,700,000
2010 年度	700,000	0	700,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	210,000	3,310,000

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：ミジンコ・有性生殖・単為生殖・相同染色体・対合・減数分裂・2 倍体卵・進化

1. 研究開始当初の背景

単為生殖では有性生殖と同じように卵を介して次世代をつくるが、精子による受精を必要としない。哺乳類を除く動物群においてそれぞれ独立に獲得された単為生殖は、有性生殖機構の一部を改変することで実現されていることは共通しているが、その細かい様式はきわめて多様である。しかし、単為生殖につ

いての研究の多くは古く行われたものであり、その現象を新しい顕微鏡技術を用いて詳細に記載し、さらには分裂様式を支配する分子メカニズムまで明らかにした研究はほとんどない。

ミジンコは、通常は単為生殖で増殖しているが、環境が悪化するとオスを産み有性生殖

をするため、単為生殖と有性生殖の両方の分裂様式の比較研究およびそれら生殖様式の切り換え機構を研究するのに適している。また、ミジンコは甲殻類で初めて全ゲノムが解読され、進化発生学の新しいモデル生物として注目され始めている。しかし、他の動物と同様に研究の基盤となる各生殖様式の詳細な記述はなされていなかった。

2. 研究の目的

ミジンコを単為・有性という2つの生殖様式を研究するための最先端モデル動物として確立するために、まずミジンコを実験室条件下で継代して飼育する方法を確立することと、その生活環を解析し単為生殖と有性生殖それぞれを誘導する環境条件を確定することを目指した。その後実験モデルの基盤となる生殖過程の組織形態学的研究を行い、世界中の研究者がミジンコの生殖研究をする際の基本となるデータを提供することを目的とした。

3. 研究の方法

通常の光学顕微鏡・位相差顕微鏡・蛍光顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡を用いて、切片およびホルマウント標本に対し、卵形成時の減数分裂の詳細なステージ分けを行った。同じ手法で抗リン酸化ヒストン抗体、抗各種チューブリン抗体、Hoechst33342で染色を用い、蛍光抗体法によって分裂装置の挙動も調べた。また、染色体の展開標本を作成して、対合がいつどのように起こっているかを検討した。電子顕微鏡により、卵巣卵のシナプトネマ複合体の様子を観察した。

飼育条件やホルモン処理などの条件を検討し、オスを誘導し有性生殖を行わせる条件を確率した(図1)。

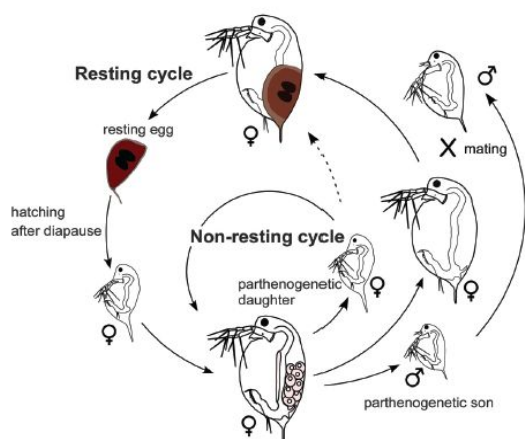


図1 ミジンコの生活史

4. 研究成果

最初に、実験室条件下での継代飼育法を確立した。さらに、生活環を解析し、単為生殖と有性生殖それぞれを誘導する条件を検討し、確立した。

次に、単為発生卵の形成過程を明らかにするため、組織形態学的な解析を行った(図2)。

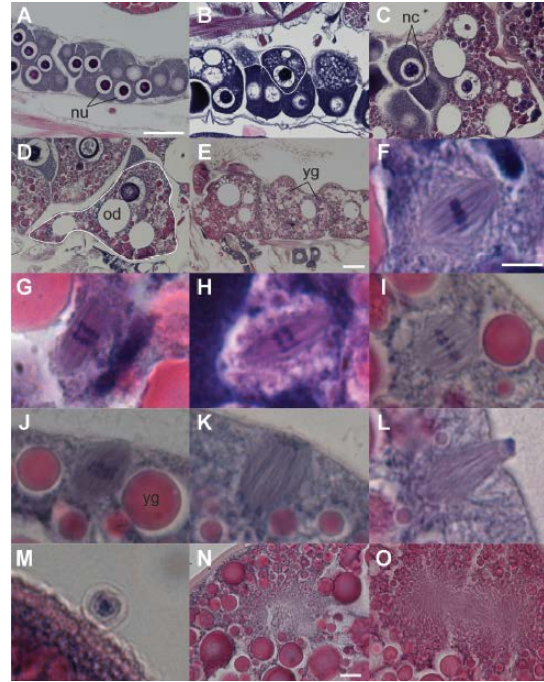


図2 ミジンコ単為生殖過程の核周期

その結果、ミジンコの単為発生卵は‘減数しない’減数分裂によって形成されることが明らかとなった。詳細に説明すると、まず第1減数分裂中期までは、正常な減数分裂と同じ様相で進行する。しかし、後期の途中で分裂は停止し、分かれかけた染色体は再び赤道面に戻って並び直し、その後第2減数分裂に相当する分裂を行って2倍体卵となって卵割を開始した。これを、通常の減数分裂と比較すると、第1減数分裂に相当する分裂が後期の途中で停止し、スキップされていることになる。この発見は、有性生殖と単為生殖において減数分裂と体細胞分裂という全く異なる細胞分裂機構を使い分けるとされていた先行研究結果を覆すものである(図3)。

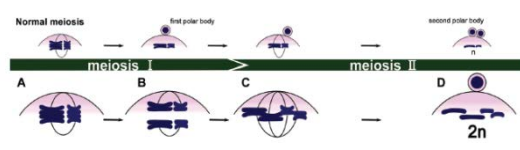


図3 減数しない減数分裂

続いて、単為発生を可能にする‘減数しない減数分裂’と通常の減数分裂とで、分裂様式の違いを生み出す原因を明らかにする目的で紡錘体の構成や挙動に焦点をあてた解析を行った。紡錘糸を構成する α チューブリン、中心体を構成する γ チューブリンの免疫組織化学染色を行った結果、単為発生する卵には中心体のない樽型の紡錘体が観察された。驚いたことに γ チューブリンは中心体があるはずの両極ではなく紡錘糸上の両極側に寄って広く分布していた(図4A)。単為発生卵では

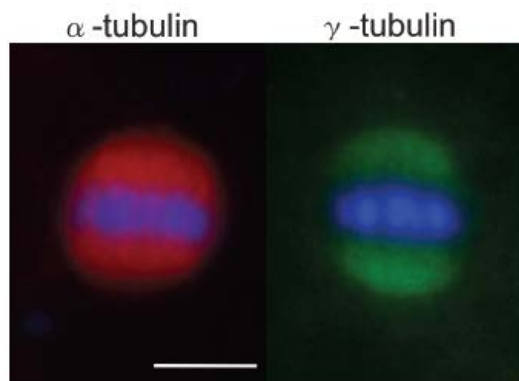


図4A 中心体のない分裂装置

卵割(体細胞分裂)が開始すると中心体のある紡錘型の紡錘体が見られるようになる(図4b)ため、それまでの間に中心体が形成(再生)されることになる。

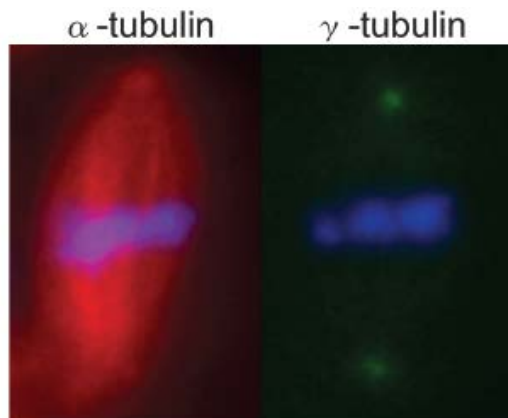


図4B 中心体のある体細胞分裂

最後に、単為生殖でみられる‘減数しない減数’分裂と普通の減数分裂を比較研究するため、有性生殖過程の組織形態学的な解析を行った。まず、オスを誘導し生殖器官の特徴を観察したところ、精子は鞭毛を持たない棒

状の形態をしており、活発な運動をしないことが明らかとなった。交尾行動を観察したところ、オスはメスの生殖口および育房周辺に

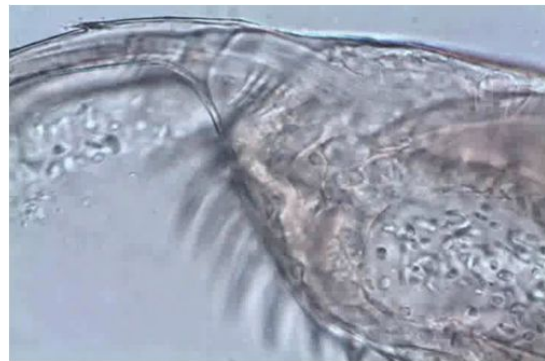
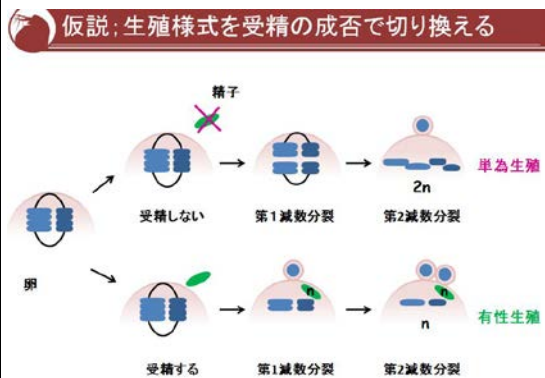


図5 オスの放精

放精(図5)していたので、受精は卵巣内で起こるか、産卵直後に育房内で起こることが推測された。一方、卵成熟過程を見ると、第1減数分裂は卵巣卵で起こり、産卵後の卵において第2減数分裂が起こっていることがわかった。産卵直後の卵内には侵入した精子も確認できたことから、第1減数分裂過程のどこかで受精が起こると考えられる。

これらの実験・観察結果をふまえて、次のような作業仮説を構築した。成熟卵は、第1減数分裂中期か後期で受精を待ち、受精が起こらないと第1減数分裂を途中で停止した後、第2減数分裂に相当する分裂のみを行う(単為生殖)。それに対して、受精が成立すると正常な減数分裂が進行し、1倍体の卵と1倍体の精子が融合して2倍体となって発生する(有性生殖)。つまり、減数分裂の進行と停止が受精の成否で切り換わるということで、これは卵が受精してもしなくても、その後の発生が保証されるというきわめて効率のよい生殖様式であることがわかる。

図6 結論としての作業仮説



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 2 件)

- ① Chizue Hiruta, Chizuko Nishida, Shin Tochinai, Spindle assembly and spatial distribution of γ -tubulin during abortive meiosis and cleavage division in the parthenogenetic water flea *Daphnia pulex*. *Zoological Science*, accepted for publication, 2012 査読あり
- ② Chizue Hiruta, Chizuko Nishida, Shin Tochinai, Abortive meiosis in the oogenesis of parthenogenetic *Daphnia pulex*. *Chromosome Research*, 18(7): 833-840, 2010 査読あり
DOI: 10.1007/s10577-010-9159-2

[学会発表] (計 6 件)

- ① Hiruta C, Tochinai S: Comparative approach to the evolution of 'abortive meiosis' found in asexual reproduction of the water flea *Daphnia pulex*. ミジンコの単為生殖で起こる「減数しない減数分裂」と有性生殖で見られる「減数分裂」の比較研究に向けて 第 44 回日本発牛生物学会 5/20, 2011 (宜野湾市、沖縄コンベンションセンター)
- ② Hiruta C, Nishida C, Tochinai S: 'Non-reductional meiosis' found in parthenogenetic *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera) ~ Does sperm penetration induce the switching to normal meiosis? ~ 単為生殖を行うミジンコで見発見された減数しない減数分裂 -受精により通常の減数分裂が進行するか? - 第 43 回日本発牛生物学会 6/21-22, 2010 (京都市、国立京都国際会館)
- ③ Hiruta C, Nishida C, Tochinai S: A novel type of 'meiosis' found in parthenogenetic *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera) The Crustacean Society Summer Meeting 9/22, 2009 (Tokyo, Shinagawa Campus; Tokyo University of Marine Science and Technology)

[図書] (計 1 件)

- ① Chizue Hiruta and Shin Tochinai: How does the alteration of meiosis evolve to parthenogenesis? - Case study in a water flea, *Daphnia pulex* -.

In: *Meiosis* (Swan, A. (ed.)). pp.109-122,
2012 査読あり
ISBN 978-953-307-775-8
DOI: 10.5772.29558

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

・研究室ホームページ

<http://www.sci.hokudai.ac.jp/~st/shinka3/welcome.html>

・生物科学科ホームページ

<http://www.sci.hokudai.ac.jp/bio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柄内 新 (TOCHINAI SHIN)

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：20111148

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし