

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06352

研究課題名(和文) 3倍体プラナリアの有性生殖を可能にする減数分裂における染色体削減の雌雄差

研究課題名(英文) Mechanism of meiosis in triploid planarian- Different chromosome elimination between sex.

研究代表者

松本 緑 (Matsumoto, Midori)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授

研究者番号：00211574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：有性生殖プラナリアでは体細胞性全能性幹細胞ネオプラストから生殖細胞が形成される。有性生殖が可能な3倍体プラナリアでは、精子が1倍体であるのに対して、雌性生殖細胞系列は減数第一分裂中期まで3倍体が維持されている。FACSにより3倍体個体の精巣領域細胞の核相を調べたところ、4nの細胞のみが存在したことから、ネオプラストから精原細胞に分化する際に1セット削減され2倍体となっていた。一方、卵母細胞の分裂装置中の紡錘体と染色体の挙動を観察すると、減数第一分裂では3セットのうち2セットの染色体が分裂装置に組み込まれ、対合・分配するが、対合しない1価染色体は分裂装置から外れているが、微小管とは結合していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物には2倍体のものが多いが、異数体も存在する。3倍体個体は減数分裂対合時に異常が発生して正常な2価染色体が出きないために正常な配偶子ができず、有性生殖できないというのが生物学の常識である。研究代表者はプラナリアでは3倍体個体でも減数分裂を行い、ゲノムの混合を伴う有性生殖を行うことを発見した。本課題では、生物学の常識を覆し、3倍体プラナリアの雌性生殖細胞が行う減数分裂を分子レベルで明らかにすることができた。これは学術的意義が十分に高い成果であると研究代表者は考えている。

研究成果の概要(英文)：In sexual planarian, germ cells are formed from somatic pluripotent stem cell neoblasts. In triploid planarian capable of sexual reproduction, the sperm are monoploid, whereas the female germ line is maintained triploid until metaphase I of meiotic division. FACS examination of the nuclear phase of the testicular germ cells of triploid sexual worms revealed that only 4n cells were present, indicating that the cells were reduced by one set during differentiation from neoblasts to spermatogonia and became diploid. Observation of spindle dynamics and chromosome behavior in the mitotic apparatus revealed that in female meiosis I, two out of three sets of chromosomes are incorporated into the mitotic apparatus and are paired and distributed, while unpaired monovalent chromosomes are disconnected from the mitotic apparatus but associated with microtubules.

研究分野：発生生殖学

キーワード：有性生殖 減数分裂 3倍体 プラナリア 染色体削減

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

「3倍体の生物は有性生殖ができない」というのが生物学の定説である。研究代表者は、自然界に無性系統と有性系統、さらに転換系統が共存するリュウキュウナミウズムシ *Dugesia ryukyuensis* を用いて、常時性系統である異種のプラナリアを餌として与えることにより、人為的に生殖転換させる系(有性化)を構築した。*D. ryukyuensis* は同一種内に2倍体や3倍体など異数体や混数体など多型が存在する。有性化の系の構築の際に使っていた OH 株も3倍体であったため、生殖器官は形成しても、単為生殖により仔虫は生まれてきたのではないかとの意見もあった。しかし、転換個体同士から生まれた仔虫を継続的に観察すると、それらの仔虫の中には2倍体と3倍体が共存することがわかった。この発見は、親子でゲノムが異なることを意味している。精子の核相は1倍体であることが分かっていたので、卵子の核相が1倍体のものと2倍体のものが存在するために2倍体と3倍体の仔虫が生まれてくると考えられた。

そこで、2系統の3倍体プラナリアをそれぞれ有性化して、2系統の有性化個体間で掛け合わせを行い、親のゲノムと仔虫のゲノムに対してマイクロサテライト遺伝子を用いて、親子鑑定を行い、すべての仔虫のゲノムに両親それぞれのゲノムが混在していることを示した。これにより、3倍体プラナリアは有性生殖により次世代を産出することを証明することができた。その過程で、3倍体のプラナリアの雄性生殖細胞では減数第一分裂前期で既に染色体が1セット削減され2倍体となっているのに対し、雌性生殖細胞では減数第一分裂中期まで3倍体が維持されていることを見出し、3倍体の有性生殖は雌雄で異なる減数分裂機構の存在で可能になることを示した。

この発見は、研究代表者が世界で初めてプラナリアで示したものである。

### 2. 研究の目的

3倍体プラナリアが有性生殖するメカニズムを解明するために、染色体削減に着目し、雄性生殖細胞においては、染色体削減のタイミングを明らかにし、また雌性生殖細胞においては、減数第一分裂時の紡錘体の動態と染色体の挙動を詳細に観察することにより染色体削減への紡錘体の関与を明らかにすることを目指した。これらにより、「3倍体に正常な子孫ができない」という生物学の定説を覆すメカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 雌性生殖細胞系列の減数第一分裂における染色体削減の機構を明らかにするために、以下の方法を開発した。

減数分裂を盛んに行う完全成熟有性化個体の胸部の卵巣領域を切断し、一晩かけて細胞を解離し、パラホルムアルデヒドで固定後、メタノールで後固定し、細胞内部を可視化した。微小管を抗チューブリン抗体、染色体をPIで二重染色を行い、蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡で、減数第一分裂中期、後期の細胞の微小管の動態と染色体の挙動を観察した。

(2) 雄性生殖細胞系列の染色体削減の時期を明らかにするために、生殖系列細胞マーカーを用いて蛍光 *in situ* hybridization (FISH)を行い、雄性生殖細胞の分化ステージを決定するとともに、精子を1nとして、PI染色した雄性生殖細胞のDNA量を数値化し2n,3n,4n,6nの核相を定義した。さらに、精巣領域細胞を分画し、核をPIで染色し、FACSにかけることにより、2n,3n,4n,6nの細胞集団の比率を正確に求め、その分離条件で、セルソーターにより分画した。

(3) 雌性生殖細胞の減数第一分裂前期における染色体の対合に必須とされるシナプトネマ複合体タンパク質(SYCP)に着目し、候補遺伝子の単離し、SYCP1遺伝子をRNAiによりノックダウンした有性化個体において雌性生殖細胞の減数第一分裂期での染色体への影響を調べた。さらに、SYCP1抗体を用いて免疫染色を行った。

(4) 姉妹染色分体に接着するコヒーシンは減数分裂期に特有のコヒーシン複合体に置き換わる。研究代表者はプラナリアの生殖細胞に発現する *Rec8* 遺伝子 (*DrRec8*) を同定している。*DrRec8* 遺伝子を RNAi によりノックダウンした有性化個体において雌性生殖細胞の減数第一分裂期での染色体への影響を調べた。

(5) *piwi* (P-element induced wimpy testis) は 生殖細胞の形成や維持を担う。*D. ryukyuensis* では 4 種の *Piwi* ホモログ (*Drpiwi-1, -2, -3, -4*) が単離されており、これらは多能性幹細胞 *neoblast* や生殖細胞に発現することがわかっている。さらに、RNAi により *Drpiwi-1* では精巣不形成、*Drpiwi-2* と *Drpiwi-3* では再生不能で致死となることが示されている。そこで、*DrPiwi-1* と *DrPiwi-2* の抗体を作製し、卵巣と精巣におけるタンパク質の局在を調べ、生殖細

胞分化への作用について検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 雌性生殖細胞の減数第一分裂における染色体削減の機構を明らかにするために、染色体と微小管との結合およびその位置を中心に観察したところ、減数第一分裂の中期では分裂装置に組み込まれない染色体が観察され、装置の中と外の DNA 量比が 1:2 であったことから 2 セットの染色体が分裂装置に組み込まれ、分離するが、1 セットは組み込まれないで存在していることが示唆された。また、後期の細胞では 3 つの紡錘体極と 3 つの染色体の塊が観察され、1 つの染色体の塊は  $1n$  と推測でき、極体として放出される際に、1 つの塊のみが放出されるか、2 つの塊が放出されるかにより、1 倍体の卵になるか 2 倍体の卵になるかが決まると予想された。

(2) 雄性生殖細胞系列の染色体削減の時期は、雄性生殖細胞系列を生殖系列細胞マーカー (*nanos*) と核相を用いて、染色体削減の時期を検討した結果、*nanos* 陽性の生殖幹細胞と精原細胞は核相が  $4n$  の細胞のみ観察され、 $2n$  の細胞は観察されなかった。これは、雄性生殖細胞の染色体削減はネオプラストから精原細胞の時期に生じていることを示しており、生殖幹細胞は体細胞分裂せずに直接減数分裂に移行していると考えられた。

(3) SYCP1 候補遺伝子を探索し、アノテーションと相同性から comp16445 に候補を絞った。comp16445 の無性個体と有性個体の発現量の差を比較するため、RT-PCR により解析を行った結果、無性個体と比較して有性個体の発現量が 2.3 倍高く、comp16445 が減数分裂特異的に働くことが示唆された。

Whole mount *in situ* hybridization により *DrSYCP1* (comp16445) の発現部位を確認したところ、卵巣と精巣部位にシグナルが見られたことから、*SYCP1* が減数分裂に関与している可能性が示唆された。

卵母細胞における SYCP1 の発現部位を確認するために、SYCP1 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。糸状の DNA の中心を通るように SYCP1 のシグナルが確認できたことから、プラナリアの減数分裂においても相同染色体が形成されていることが考えられる。有性個体において *DrSYCP1* をノックダウンし、ギムザ染色を行ったところ、減数第一分裂パキテン期には対合が確認できず、ディプロテン期にはキアズマはみられず、多くの染色体が 1 価のままであった。雌性減数分裂の対合には *DrSYCP1* が必須であることが示された。

(4) RNAi により有性化個体の *DrRec8* を機能障害すると、雄の減数分裂像は正常であるが、雌の減数第一分裂パキテン期には対合が確認できないことがわかった。雌性減数分裂の対合には *DrRec8* が必須であることが示された。

(5) *DrPiwi-1* と *DrPiwi-2* の挙動を生殖細胞分化に対して調べたところ、雌性生殖細胞 *DrPiwi-1* と *DrPiwi-2* は減数分裂前の未分化な状態で複合体を形成していたが、雄性生殖細胞では *DrPiwi-1* は減数分裂前の未分化な細胞、*DrPiwi-2* は減数分裂後の分化した細胞に発現しており、雌雄の生殖細胞で発現様式が異なっていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Chiaki Kimoto, Haruka Nakagawa, Reiko Hasegawa, Hanae Nodono, Midori Matsumoto   | 4. 巻<br>167          |
| 2. 論文標題<br>Co-localization of DrPiwi-1 and DrPiwi-2 in the oogonial cytoplasm is essential for oocyte differentiation in sexualized planarians | 5. 発行年<br>2021年      |
| 3. 雑誌名<br>Cells & Development  | 6. 最初と最後の頁<br>203710 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.cdev.2021.203710  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-            |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>鍋木百、松本緑                               |
| 2. 発表標題<br>3倍体プラナリアの雌性減数分裂における染色体分配機構の解明         |
| 3. 学会等名<br>日本動物学会第90回大阪大会、1F1600、大阪、2019年9月、口頭発表 |
| 4. 発表年<br>2019年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>鍋木百、松本緑                                   |
| 2. 発表標題<br>3倍体プラナリアの雌性減数分裂における染色体分配機構の解明             |
| 3. 学会等名<br>日本分子生物学会年会福岡大会 3P-0388 福岡 2019年12月 ポスター発表 |
| 4. 発表年<br>2019年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>鍋木百、松本緑  |
| 2. 発表標題<br>3倍体プラナリアの雌性減数分裂における染色体分配機構の解明                      |
| 3. 学会等名<br>日本分子生物学会年会福岡大会 3PW-20-3 福岡 2019年12月 シンポジウム発表（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Momo Kaburaki, Kazuki Nakanishi, Midori Matsumoto                |
| 2. 発表標題<br>The mechanism of female meiosis in triploid sexualized planarian |
| 3. 学会等名<br>2018 International Planarian Meeting, Wisconsin, USA, (国際学会)     |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>鎗木百, 中西一輝, 松本緑                |
| 2. 発表標題<br>3倍体プラナリアの雌性減数分裂における染色体削減機構の解明 |
| 3. 学会等名<br>日本動物学会 第89回 札幌大会              |
| 4. 発表年<br>2018年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>鎗木百, 松本緑                      |
| 2. 発表標題<br>3倍体プラナリアの雌性減数分裂における染色体分配機構の解明 |
| 3. 学会等名<br>日本動物学会 関東支部会                  |
| 4. 発表年<br>2019年                          |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Midori Matsumoto   |
| 2. 発表標題<br>DrPiwi-2 differentiates neoblasts into germ stem cells within the DrPiwi-1 complex |
| 3. 学会等名<br>2018 International Planarian Meeting, Wisconsin, USA, (招待講演) (国際学会)                |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Midori Matsumoto  |
| 2. 発表標題<br>Tryptophan induces the proliferation of germ stem cells in planarians                   |
| 3. 学会等名<br>The 15th International Society for Tryptophan Research Conference, Hikone (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| Reproductive strategy: Adapt or go extinct!<br><a href="https://research-highlights.keio.ac.jp/2019/09/a.html">https://research-highlights.keio.ac.jp/2019/09/a.html</a><br>世界初、3倍体生物が有性生殖を行うことを証明 同時にプラナリアの新奇な減数分裂システムの発見<br><a href="https://www.keio.ac.jp/ja/press_release/2013/kr7a430000czeci-att/140121_1.pdf">https://www.keio.ac.jp/ja/press_release/2013/kr7a430000czeci-att/140121_1.pdf</a> |
|---|

|                           |                       |    |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織                   |                       |    |
| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|