

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650240

研究課題名（和文） 再生・分化のモデル生物ヤマトヒメミズの生活史における遺伝子発現プロファイル作成

研究課題名（英文） The gene expression profiling in the life cycle of the model organism *Enchytraeus japonensis* of reproduction and differentiation.

研究代表者

村田 麻喜子 (MURATA MAKIKO)

杏林大学・保健学部・講師

研究者番号：00276205

研究成果の概要（和文）：

ヤマトヒメミズは環境に応じて無性生殖と有性生殖二つの生活史を使い分け繁殖する日本産の環形動物である。本研究では再生・分化のモデル生物としての研究環境の充実を目的に二つの生活史を5つのステージに区分し cDNA ライブラリーの作成と塩基配列決定を試みた。成熟期と再生期の完全長 cDNA ライブラリーの約 3800 個について塩基配列を決定した結果、ライブラリーはヤマトヒメミズと他の貧毛類の既知遺伝子 32 個を含む 236 個の相同遺伝子を含んでいた。

研究成果の概要（英文）：

Enchytraeus japonensis is a unique earthworm which undergo asexual and sexual life cycles. It can be a good experimental animal not only for regeneration but also differentiation. It is important to investigate and establish gene expression profiles throughout their life cycle. We constructed the cDNA Libraries from the regenerating and asexual mature worms in asexual cycle, and sequenced approximately 3800 clones. 236 sequences were found to be homologues to those from other species, and 32 sequences were unique to *E. japonensis* and other Oligochaeta species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：ヤマトヒメミズ、分化、再生、発現プロファイル

1. 研究開始当初の背景

(1) ヤマトヒメミズ (*Enchytraeus japonensis*) は中村好男が 1991 年に発見して 1993 年に記載した体長約 1cm の小型ミズである。寒天プレート上にオートミールを餌として容易に飼育が可能で、成熟すると自らの体を数体節毎の約 10 断片へと自切し、各断片からもとと同じ個体が再生される。すなわち約 2 週間で一個体から 10 個体のクローンが再生産される。断片分離での増殖中は生殖巣や生殖付属器官を持たないが、低密度条件下で各断片を再生させれば、雌雄両性の

生殖巣が形成されて(生殖細胞系列の維持と生殖細胞の分化)、有性生殖を行い、受精卵を含む卵包を形成(初期発生)し、次世代が生じる。ヤマトヒメミズの生活史には組織の再生・分化のあらゆる過程が含まれており、飼育が容易なことから新たな実験動物として極めて有望であるが、NCBI データベース上に登録された遺伝子および EST の数は遺伝子:38、EST:365 とその研究基盤はと貧弱であった。

(2) ヤマトヒメミミズはその発見以来、その特異な生活史が注目され、我々も含め幾つかの研究室で実験動物として維持されていた。特に碎片分離という増殖法は生物学的に興味深く、幾つかの研究成果が報告されており、新しい再生・分化の実験動物としてきわめて有望であることが示唆されていた。

(3) siRNA を用いた遺伝子破壊による遺伝子発現抑制実験が可能であり、再生過程に発現を増加する遺伝子の局在と機能について解析が行われていた。

(4) 2000年初頭より多くのモデル生物について、個体全体の網羅的解析が複数の研究グループが分担し完成され、現在では技術的にもほぼ完成されている。ヤマトヒメミミズのゲノム生物学的な研究の基盤を整備すると共に、我々が貧毛類のゲノム解析で培ってきたシーケンス技術を用い、可能な限り最大数の遺伝子発現プロファイルの作成がヤマトヒメミミズ研究の基礎情報になることは必至であり、当該生物の新たな実験動物として広い分野での利用が期待された。

2. 研究の目的

本研究ではヤマトヒメミミズの研究基盤を確立すると共にその生活史における遺伝子の発現プロファイルの作成と表現型との関連付けを目指す。

(1) 無性および有性生活史の cDNA ライブラリーの作成：

無性生活史を無性成熟期、破断期、再生期の3ステージ、有性生活史を有性化個体と卵胞中の初期発生胚の2ステージの計5つのステージに区分し、各ステージの均質化 cDNA を作製し、各 384 wells plate にクローンを単離、シーケンス材料とすると共に、随時提供可能な研究資源化する。

(2) 発現プロファイル作成：各ステージから約 3,000 個合計約 15,000 個の cDNA 配列を決定し、生活史を通した遺伝子発現プロファイルを作成する。

(3) RNA 干渉法による表現型解析：各ステージに特異的に発現する遺伝子(合計 20)を RT-PCR で確認し siRNA によって遺伝子発現を抑制し表現型を観察し、機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヤマトヒメミミズの無性生活史を①無性成熟個体、②碎片期、③再生期、有性生活史を④有性期、⑤卵胞中の初期発生個体とし、合計 5 ステージに分け、それぞれのステージの個体を回収し、順次均質化 cDNA ライブラ

リーを作製した。5つのステージごとの個体を検鏡下で分類、転写産物を調整した。発現遺伝子を十分にカバーするのに必要な転写産物として約 2 µg の総 RNA を確保した。Clone Miner II cDNA Library Construction Kit (Invitrogen)を用いて均質化 cDNA ライブラリーを作製した。

(2) 無性生殖ステージの個体は直径 6cm のシャーレに適度に湿度を持たせたキムタオル1枚を敷き、粉末にしたオートミールを餌に 10~15 匹を入れ、25°C で飼育した。破断期の個体に破断直後から 2 日以内、再生期個体には破断直後から 4 日から 5 日経過し再生芽形成後で 4~6 mm まで再生したものとした。無性成熟個体には破断直後から 7 日以降経過し、かつ生殖器が分化していない 8-10 mm の個体とした。有性個体は生殖期が確認できる再生期から成熟個体とした。卵胞

(3) 有性個体の誘導条件の検討：

本研究をはじめ前の予備実験から無性個体の飼育条件と同一の餌や温度で個体数をシャーレあたり 4~8 匹に減らすことで有性化の誘導した方法としていた。より効率的に有性個体を確保する目的で有性化の条件を検討した。

(4) 個々のクローンは 384 wells plate 中に単離しライブラリーソースとした。シーケンスは illustra TempliPhi DNA Amplification Kit (GE ヘルスライフサイエンス)を用いて増幅した DNA を鋳型にベクターの配列をプライマーに一方の DNA 鎖のみの塩基配列を決定した。

(5) 300 bp 以上のシーケンスデータを有効データとして順次解析を行った。本研究ではクローニングが均一に行われたと仮定し、同一の配列が複数クローンとして集積された場合にはクローン数は発現量に相当すると考え、複数クローンが重複したものを 1 遺伝子として解析した。Blast データに対してホモロジー検索を行った。

4. 研究成果

(1) 5つの cDNA ライブラリーのうち、無性生活史の破断期、成熟個体および再生期について cDNA ライブラリーを作製した。有性生活史の2ステージはライブラリー作製に十分な転写産物を得るための飼育条件の検討し、ライブラリー作製のための試料の回収を継続して行っている。

(2) 成熟期と再生期の完全長 cDNA ライブラリーについてそれぞれ 384 well plate 5 枚分のクローンについて塩基配列を行った。各ラ

イブラリーの挿入断片は平均 600bp であった。

(3) Blast 解析の結果は以下のとおりであった。ただし、解析数は少数あること、更にリボゾーム遺伝子やミトコンドリア由来の配列は予想以上に大量であったため、各段階での遺伝子発現を特徴付けることは出来なかった。

①成熟個体と再生期の両方で発現既知遺伝子は 23 個 (90 クローン) であり、そのうちの 8 遺伝子はヤマトヒメミミズを含む貧網類の既知遺伝子であった。

②両ステージで共通して複数個のクローンとして集積されたシーケンスデータのうち 76 個は相同性の無いユニークな配列であり、これらは EST データとして有効であると考えられる。

③再生ステージでのみ多く発現していた遺伝子は 96 遺伝子、そのうち 13 遺伝子は同一の配列が複数得られていることから発現量が高いと考えられた。

④成熟個体から既知遺伝子は 115 個であった。多くがアクチンや酵素類で恒常的に発現する遺伝子類であった。

(4) 有性化誘導の条件検討

有性個体および卵胞期初期胚回収ライブラリー作成に必要な転写産物を得るため、有性化の誘導条件を検討した。

本研究を始めるにあたり、個体数を減らし、給餌量を増やすことで有性化を誘導していた。さらに餌 (粉末オートミール: 図 1, O) にドライイースト (図 1, Y) を加えることでの栄養価を上げることで有性化が飛躍的に上げることができた (図 1)。

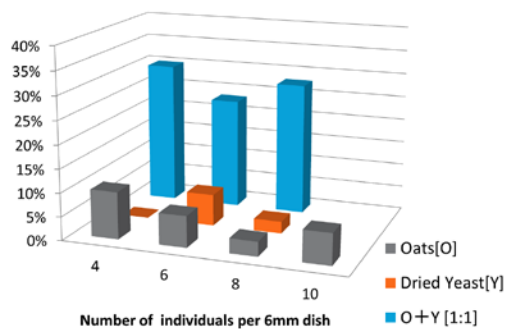


図 1

(5) 有性化誘導を vasa 遺伝子のホモログ *vlg1* および *vlg2* の発現を RT-PCR 法で確認し

た。

①イーストを添加した餌を与えた個体では有意に *vlg1* および *vlg2* の発現が増加しており、有性化が誘導されたことが確認された。②無性生殖の破断期では有性化を誘導していない場合でも *vlg1* および *vlg2* が発現していることを確認した (図 2)。

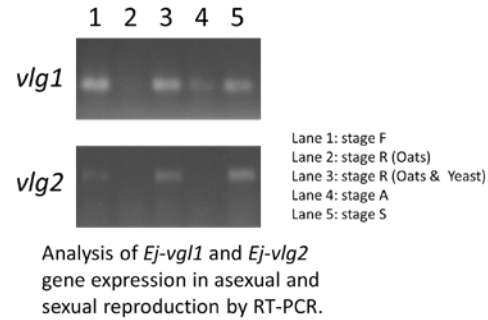


図 2

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)

[学会発表] (計 2 件)

(1) MURATA M., GAMOU S.: “Search for Novel genes Related to reproduction and differentiation: gene expression profiles of *Enchytraeus japonensis*.” 第 35 回日本分生生物学会年会. (20121212). 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡.

(2) 村田 麻喜子: “ヤマトヒメミミズの cDNA ライブラリーの作成～再生分化の新たなモデル生物の遺伝子発現プロファイルの構築を目指して～.” 第 41 回杏林医学会 (20121117)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 麻喜子 (MURATA MAKIKO)
杏林大学・保健学部・講師
研究者番号：00276206

(2) 研究分担者

蒲生 忍 (GAMOU SHINOBU)
杏林大学・保健学部・教授
研究者番号：90122308

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：