

自己評価報告書

平成 23 年 5 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20116007

研究課題名（和文） プラナリア有性化に伴う GSC / ニッチ・システムの誘導機構

研究課題名（英文） The mechanism underlying regulation of gamete stem cells/niche system in the sexual induction of planarians

研究代表者

小林 一也 (KOBAYASHI KAZUYA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50360110

研究分野：発生生物学・進化生態学

科研費の分科・細目：生物学-基礎生物学-形態・構造

生物学-生物科学-発生生物学

キーワード：配偶子形成・幹細胞・ニッチ・生殖様式・プラナリア

1. 研究計画の概要

(1) プラナリアにおける GSC および ニッチ細胞の同定：プラナリア有性化系を用いて基礎的な組織学的研究を行い、プラナリア生殖腺の分化過程を詳細に示す。ショウジョウバエの GSC / ニッチ細胞に発現する遺伝子情報をもとに、プラナリアにおける相同遺伝子を単離し、GSC と ニッチ細胞を同定する。単離した遺伝子は、RNAi 法により機能解析を行う。

(2) 有性化に伴う GSC / ニッチ・システムの誘導過程の解析：蛍光タンパク質 (CFP) 発現ベクターを用いたプラナリア細胞標識法を確立したのちに、標識したプラナリア全能性幹細胞ネオプラストの有性化過程の挙動を調査して、GSC / ニッチ・システムの誘導過程を解析する。

(3) GSC / ニッチ・システムを誘導する有性化因子の同定：有性種に含まれている化学物質を決定する。

2. 研究の進捗状況

(1) プラナリアにおける GSC および ニッチ細胞の同定：プラナリアでは、配偶子幹細胞およびニッチ細胞の存在は明らかになっていない。プラナリア配偶子幹細胞 / ニッチ細胞解析のための基盤とするために、有性化過程での発現解析から、有性化現象に関わると考えられる遺伝子 10 種 (FGFR 3 種：卵巣および交接器官に発現；Pum: 生殖巣に発現； β -Catenin: 生殖巣および交接器官に発現；Wnt3, Patched, HH: 交接器官に発現；セロトニン受容体 2 種：卵巣に発現) を同定した。

(2) 有性化に伴う GSC / ニッチ・システム

の誘導過程の解析：これまで、発現ベクターをエレクトロポレーション法でプラナリアのゲノムに導入する系の構築が達成できていない。21年度までは、ハウスキーピング遺伝子である *Dref2* (タンパク翻訳時に必要なタンパク) の予想プロモーター配列を用いて構築したベクターのみで実験を進めていたが、22年度に、ハウスキーピング遺伝子である *Dractin* (アクチンタンパク) と生殖細胞特異的な発現をする *Drnos* (ナノスタンパク) の予想プロモーター配列を決定したので、この 2 遺伝子の発現ベクターも加える用意をしている。

(3) GSC / ニッチ・システムを誘導する有性化因子の同定：これまでに、有性種の脂溶性画分に強い有性化活性を示す物質が含まれていて、少なくとも 4 種類の異なる物質が複合的に働き、有性化を引き起こしていることがわかった。

3. 現在までの達成度

(1) プラナリアにおける GSC および ニッチ細胞の同定：おおむね順調に進展している。(理由) 単離・同定した有性化に関わる遺伝子の数や生物学的重要度は、この後の研究の発展に妥当なものと判断できる。

(2) 有性化に伴う GSC / ニッチ・システムの誘導過程の解析：遅れている。(理由) プラナリアではネオプラストの培養および、受精卵へのインジェクションが困難であるので、未だ、トランスジェニックプラナリアを得ることができていない。しかし、配偶子幹細胞機構を解析するためには、必須な技術なので系確立に臨んでいるのが現状である。有性化系を持ち、交配させて次世代を得るこ

とができるのが、本研究の優位点なので、継続してトランスジェニックプラナリア作製を目指す。発現ベクターの数も増やすことで対応していく。

(3) GSC/ニッチ・システムを誘導する有性化因子の同定： おおむね順調に進展している。(理由)有性化因子の分離・精製とそれに続く検定には約1ヶ月かかる。それを鑑みると進行のペースは評価できる。今後このペースを守り、材料が不足しないように努め、研究期間内での目的達成に臨む。

4. 今後の研究の推進方策

(1) プラナリアにおける GSC およびニッチ細胞の同定： RNAi による遺伝子ノックダウン解析により、これまでに単離した遺伝子が生殖細胞/生殖器官分化に影響を及ぼすか検証する。これらの結果をプラナリア配偶子幹細胞/ニッチ解析のための基盤とする。その後、ショウジョウバエの GSC/ニッチ細胞に発現する遺伝子情報をもとに、プラナリアにおける相同遺伝子を単離し、GSC とニッチ細胞を同定していく。

(2) 有性化に伴う GSC/ニッチ・システムの誘導過程の解析： *Dref2* の予想プロモーター配列に加えて、*Dractin* と *Drnos* の予想プロモーター配列を組み込んだ発現ベクターも用いて作業に取りかかる。遺伝子導入は、従来通りにセルソーターで分画したネオプラストにエレクトロポレーション法で行ない、そのネオプラスト画分を無性個体に移植する。移植後、切断・再生を繰り返して、プラナリア体内でネオプラストの増殖を促す。遺伝子導入が確認された後、有性化して交配し、F1 世代にトランスジェニックプラナリアが現れるかを検証する。また、発現ベクターをプラナリア生殖巣に直接インジェクションした個体にエレクトロポレーションをかけることで遺伝子導入を試みる。これらの個体を交配し、F1 世代にトランスジェニックプラナリアが現れるかを検証する。

(3) GSC/ニッチ・システムを誘導する有性化因子の同定：引き続き、高精度の逆相 HPLC カラムやゲル濾過カラムを用いて、有性化因子の単離/精製を進める。その後、質量分析や NMR により精製物質の構造決定を行う。

5. 代表的な研究成果

(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6件)

1. H. Miyashita, H. Nakagawa, K. Kobayashi, M. Hoshi, M. Matsumoto: Effects of 17 β -estradiol and bisphenol A on the formation of reproductive organs in planarian. *Biol. Bull.* 220, 47-56 (2011) (査読有り)

2. 小林一也：本邦初報告となる海水棲マクロストムム2種について 金沢大学環日本海域環境研究センター臨海実験施設研究概要・年次報告 第7

号, 20-23, (2010) (査読無し)

3. 小林一也・松本緑：プラナリアの生殖様式転換機構と配偶子幹細胞 細胞工学 29, 670-674, (2010) (査読無し)

4. 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 47, 672-673, (2009) (査読無し)

5. 小林一也：海水氷法により見つけ出した海に棲む扁形動物マクロストムム

つみうし通信 64, 4-5, (2009) (査読無し)

6. K. Kobayashi, S. Arioka, M. Hoshi and M. Matsumoto: Production of asexual and sexual offspring by inbreeding of the triploid sexual planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Integ. Zool.* 4, 265-271 (2009) (査読有り)

[学会発表](計19件)招待講演のみ以下に記載する。

1. K. Kobayashi: Sexual induction in the asexual form of the planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists*, 24 Mar, 2011, Dresden, Germany

2. 松本緑：プラナリアの生殖幹細胞増殖因子としての D-トリプトファン 第33回日本分子生物学会、2010年12月7日、神戸

3. K. Kobayashi: Sexual induction in the asexual form of the planarian. *Satellite Symposium to SDB and Japanese SDB Joint Meeting*, 5 Aug, 2010, Albuquerque, USA

4. K. Kobayashi: Sexual induction by feeding in an asexual strain of the planarian, *Dugesia ryukyuensis*. *The 1st International Meeting on Planarian Biology*, 27 May, 2010, Münster, Germany

5. 小林一也：プラナリア有性化に伴う配偶子幹細胞制御機構解明にむけて 日本動物学会第80回本大会、2009年9月17日、静岡

[図書](計1件)

1. 小林一也・松本緑：鈴木載男編「身近な動物を用いた実験書2」— プラナリア 三共出版 pp 1-20, (2009)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]