

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 9 日現在

機関番号：32610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650085

研究課題名(和文) ヤマトヒメミミズに見る有性生殖と無性生殖を転換する機構とその意義の探究

研究課題名(英文) Exploring the meaning of the conversion mechanism of sexual and asexual reproduction in Enchytraeus japonensis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヤマトヒメミミズは日本ではじめて無性生殖で殖えるpotwormとして見出されたが、生育環境に応じて、有性生殖と無性生殖を切り換えることができるという特徴があり、無性生殖で自切したミミズの断片を有性化誘導条件で飼うと生殖巣が分化する。これまで無性生殖にネオブラストの関与が示唆されているが有性生殖はネオブラストとは異なる機構が考えられている。しかし、ヤマトヒメミミズの遺伝情報は極めて乏しく、二つのライフサイクルを説明するには十分ではない。本研究では有性化を誘導した細胞を材料に相補DNAを作成し、de novo RNA シークエンシングを行い、有性生殖の細胞分化に関連する遺伝子の同定を試みた。

研究成果の概要(英文)：The Oligochaete Enchytraeus japonensis was found as potworm to aggrandize the first time asexual reproduction in Japan, depending on the growth environment, it has a feature that can be switched sexual or asexual reproduction. Fragments of autotomy the earthworm in the asexual reproduction are, and gonads differentiate keep in sexual-inducing conditions. Although the involvement of neoblast that were placed in the regeneration process of asexual reproduction has been suggested is considered a different mechanism than neoblast in sexual reproduction. Genetic information for Enchytraeus japonensis is very poor, not sufficient to explain the two life cycles. In this study, we created a complementary DNA cells was induced sexual into the material, it performs a de novo RNA sequencing. We attempted to identify genes associated with sexual differentiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヤマトヒメミミズ 有性生殖 無性生殖 生殖器分化

## 1. 研究開始当初の背景

ヤマトヒメミミズ (*Enchytraeus japonensis*) は無性生殖で殖えるミミズとして我が国ではじめて 1993 年にされた。その後、自切断片化後に再生して殖える無性生殖と有性生殖を共にもつ貧毛類である事が明らかとなり、茗原らにより新たな再生・分化のモデル生物として無性生殖の生活史で発現する遺伝子解析や野呂らにより再生に関するテロメアの関与についての研究が進められていた。

ヤマトヒメミミズの再生は、自切したすべての断片で観察できる。頭部を含む断片は後方に尾部分の次に胴体部分が再生され、胴体部分の断片からは頭部に次いで尾部、同体部分と再生され、摂食をはじめ。5 日程度で完全な成虫体となると、7 日から 10 日で再び自切、再生を繰り返す。無性生殖がみられる他の生物と同様にネオプラストと呼ばれる新生芽細胞が細胞の再生および分化への関与することが示唆されている。ヤマトヒメミミズの再生過程でネオプラストが生殖巣へ分化するのか、或いは脱無性化の機構が存在するのか詳細は明らかではない。

ヤマトヒメミミズの有性および無性生殖の生活史を遺伝子レベルで研究するために必要な既知遺伝子の情報は乏しく、EST 情報も充分ではなかった。

本研究の前に我々は生活史を 5 つに分け、再生期に特異的に発現する遺伝群の特定と個々の遺伝子の発現パターン解析を試みた。その際、有性生殖時期と無性生殖時期を明確に区別することが出来ず、有性化を誘導しても生殖巣が分化する個体は 20% にとどまっていた。

## 2. 研究の目的

無性生殖生活史から有性生活史への転換は言い換えれば、生物が無性生殖から始原生殖細胞の決定機構への転換を明らかにするモデルとなる。本研究では無性生殖から始原生殖細胞の決定機構への転換を明らかにするための基本となる有性化の条件を検討すると共に有性化誘導に必要な因子を探る。本研究を進める過程で無性生殖生活史と有性生殖生活史のステージ毎に特異的に発現する遺伝子が明らかになり、遺伝情報などゲノム生物学的研究基盤の集積が期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 有性化誘導条件の確立

ヤマトヒメミミズは、通常 25 に保温した暗所で寒天や保湿した沱紙の上でオートミールを飼料に実験室内で飼育することができる。低密度の環境で飼育すると有性個体を観察できる事は知られていた。これまでの実験で低密度飼育に加えて高栄養化の飼料を与えることで有性化を誘導できることがわかった。実験室内での飼育では、主に粉末にしたオートミールが用いるが、更にドライイ

ースト添加した飼料を与えると、オートミールのみするときよりも有性化率が 20% 上がることを先の実験から確認しており、本実験ではより効率的には有性化誘導の方法を検討した。

直径 60 mm のシャーレに 4~10 匹の自切直後の断片個体をおき、種々の組成の飼料を与えて 25 で観察した。粉末のオートミール (Snow Brand, 0) にイースト抽出物 (Difco, YEx) やドライイースト (Y) を重量比で混合し飼料とした。

### (2) 有性化誘導のマーカー遺伝子のクローニング

ヤマトヒメミミズの再生過程で発現が認められている遺伝子には vasa 遺伝子のホモログである vlg1 と vlg2、や piwi が同定されている。本研究では有性化の指標マーカーとして vlg1 と vlg2 の転写レベルの発現を RT-PCR 法で検出し有性化の誘導の指標マーカーとした。さらに指標となるマーカーを得る為、ショウジョウバエの nanos 遺伝子のホモログのクローニングを試みた。

### (3) 無性生殖ステージおよび有性化誘導過程の cDNA ライブラリーの作成と de novo RNA シークエンシング解析による有性化関連因子の検索

極めて遺伝情報の少ないヤマトヒメミミズではゲノム生物学的な研究基盤である cDNA のライブラリー化、無性過程の再生・分化過程および有性化分化過程の遺伝子発現プロファイルの解析が必要である。我々はこれまで無性成熟個体や碎片期の無性生活史と有性成熟個体を各クローン分け、それぞれから特異的な均質化 cDNA クローン作成との塩基配列決定を進めており、無性成熟期 (M)、無性再生期 (R) の cDNA ライブラリーを作成してきた。本研究では、有性化を誘導した再生期個体の転写産物を出発材料に cDNA ライブラリーを作成し 1900 クローンについてサンガーシークエンスを行った。無性成熟期 1536 クローンや無性再生期で発現していた 1920 クローンの解析から、それぞれのステージで発現がみられた遺伝子を抽出し発現プロファイルを試みた。

de novo RNA シークエンス解析および既知情報のアノテーション解析はレファレンスデータの少ない生物種において目的の候補遺伝子を見出す有効な手段となる。有性化を誘導した個体の転写産物を用いて de novo シークエンス解析および既知情報のアノテーション解析を行い、既知遺伝子のホモログと推定される転写産物を見出した。

## 4. 研究成果

### (1) 有性化誘導条件の確立

本研究では無性生殖で自切した断片から有意に有性化個体を得るため、はじめに飼育条件を検討した。有性化の初期段階で生殖過

程の個体の80%以上を有性化することを可能にした。各個体数条件で生殖器の分化が見られたが、6断片で飼育した場合が最も有性化効率が高く46.7% (n=80)であった。オートミールにイースト抽出物を重量比6:1に添加した飼料を与えた個体群では高い有性化誘導(88.3%)が観察された(図1)。

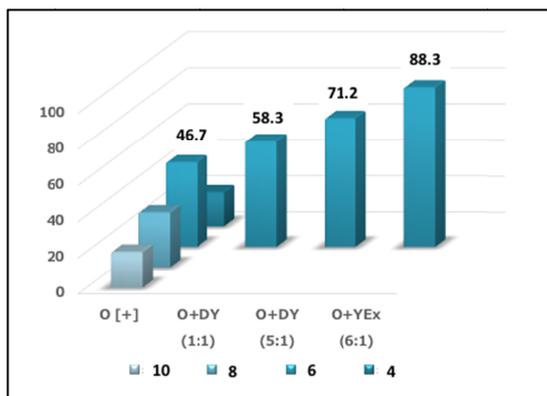


図1

(2) 有性化誘導過程で高発現が見込まれる遺伝子 nanos ホモログのクローニング

ヤマトヒメミズズの nanos 遺伝子はショウジョウバエ nanos 遺伝子(nos)の塩基配列を primer に C 末領域をクローニングした。塩基配列を確認したところショウジョウバエ nanos 遺伝子 exon3 の99%一致していた。有性化誘導の効果を確認するため、性腺での特異的発現が知られる vasa や nanos のホモログである vlg1、vlg2、nanos の転写産物を RT-PCR 法で検出したところ、vlg2 と nanos の誘導に発現量の増加認められたが、各ステージを通して顕著な変化は認められなかった(図2)。

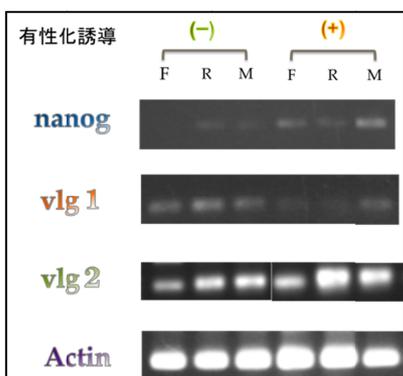


図2

有性化を誘導した個体群(+)と無性生殖群(-)の RT-PCR 法による各ステージの vlg1、vlg2、nanos 遺伝子の転写発現。自切直後(F)、再生過程(R)、成熟個体(M)

(3) 有性化関連遺伝子の検索

無性再生期個体群(R)、無性成熟個体(M)および有性化誘導再生期個体群(SR)の転写産物からそれぞれ cDNA ライブラリーを作成し

た。各 cDNA ライブラリーのクローンについてサンガーシーケンス解析を行った(表1)。平均400 bpの配列について Blast 解析を行いからそれぞれの比較解析では有性化を誘導した個体群で細胞増殖関連遺伝子の発現が顕著であった。

有性化誘導した再生期個体群において再生への関与が示唆される Ejrup 遺伝子やユビキチンの転写発現が顕著であることが判った。

有性化を誘導した再生期の個体の転写産物を出発材料に用い、イルミナ社シーケンサーによる de novo RNA-シーケンス解析を行った。既知の73,710のORF(既知cDNAを含む)を見出した(表2)。自切断片化直後から顕著に発現する遺伝子(Ref.1-3)の他、生殖器分化に参与する相同遺伝子と推定される遺伝子が見出された。

表1 有性化誘導再生期個体群(SR) cDNA ライブラリーを用いた転写遺伝子のシーケンシング解析

|                            |              |
|----------------------------|--------------|
| コンティグ数(フィルタリング後)           | 70           |
| シングルリード                    | 1,693        |
| リボソーム                      | 145          |
| ミトコンドリア遺伝子                 | 187          |
| Unknown                    | 1,312        |
| <b>解析総数(平均インサート450 bp)</b> | <b>1,763</b> |

表2 有性化誘導再生個体の de novo RNA シーケンス解析結果

|                      |             |
|----------------------|-------------|
| シーケンスフラグメント数         | 149,467,621 |
| フラグメント数(フィルタリング後)    | 132,536,721 |
| コンティグ数               | 232,095     |
| Isoform をまとめたコンティグ数  | 122,027     |
| ORF 数                | 73,710      |
| 再生・分化に関連が推定される ORF 数 | 50          |

#### References

1. Myohara M, Niva CC, Lee JM. Dev Dyn. 235 (2006) 2051-70.
2. Sugio M, Takeuchi K, Kutsuna J, Tadokoro R, Takahashi Y, Yoshida-Noro C, Tochinal S. Gene Expres. Patt. 8 (2008) 227-36.
3. Yoshida-Noro C, Tochinal S. Dev Growth Differ. 2010 Jan;52(1):43-55.

#### 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) 村田麻喜子: “ヤマトヒメミミズの生殖器官分化に関わる因子の探索”. 第 38 回日本分子生物学会年会. (2015.12.03). 神戸ポートアイランド.

(2) 村田麻喜子, 大迫俊二: “ヤマトヒメミミズの再生・分化に関する遺伝子探索と発現プロファイル”. 第 37 回日本分子生物学会年会. (2014.11.26). パシフィコ横浜

## 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

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: