

博士論文番号：博第 593 号

ヤマトヒメミミズの生殖細胞再生

田所 竜介

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子発生生物学講座

(高橋 淑子 教授)

平成 18 年 4 月 28 日提出

目次

1, 序論 p 5～11

- 1-1. 再生研究における環形動物の重要性
- 1-2. ヤマトヒメミミズは環形動物の再生を知る上で良いモデル系となる
- 1-3. ヤマトヒメミミズは生殖細胞を再生できる
- 1-4. 環形動物の生殖細胞再生について
- 1-5. *piwi* 遺伝子

2, 材料と方法 p 12～20

- 2-1. ミミズの飼育と維持
- 2-2. 有性化誘導
- 2-3. whole mount での有性化組織の観察
- 2-4. 有性化誘導効率の測定
- 2-5. 再生誘導
- 2-6. *piwi* 遺伝子の単離
- 2-7. ヤマトヒメミミズ - whole mount *in situ* hybridization 法の確立
- 2-8. whole mount *in situ* hybridization 法
- 2-9. *Ej-piwi* 遺伝子の発現パターン解析
- 2-10. whole mount での観察法
- 2-11. メチルグリーン染色
- 2-12. 切片 *in situ* hybridization
- 2-13. 切片 *in situ* hybridization 後の免疫染色
- 2-14. BrdU パルスーチェイス実験

3、結果 p 21～38

3-1. *piwi* 遺伝子の単離

3-2. *Ej-piwi* 遺伝子は生殖細胞に発現する

3-3. 無性生殖個体の頭部 7・8 体節には生殖細胞前駆体が存在する

3-4. 無性生殖個体の体幹部の *Piwi* 発現細胞について

3-5. 頭部 7・8 体節に存在する生殖細胞前駆体の再生

3-6. 生殖細胞前駆体は体幹部の *Piwi* 発現細胞から再生する

3-7. 切断面に近い腹側神経索上の *Piwi* 発現細胞が増殖をする

3-8. 体幹部の *Piwi* 発現細胞とは？

～ *Piwi* 発現細胞はネオブラストと別種の細胞である～

3-9. 再生中の生殖細胞と体細胞の挙動は異なる

3-9. まとめ

4、考察 p 39～50

4-1. 生殖細胞が再生する

4-2. 生殖細胞の起源

4-3. 過去の知見との比較

4-4. 他の動物における *piwi* 遺伝子発現との比較

4-5. 無性生殖から有性生殖の進化について

4-6. 再生中の生殖細胞の挙動について

～他の動物の PGCs は発生の初期に形成されるが胚帯内に侵入せずに留まる～

4-7. 成長帯から新たに形成された体に *piwi* 発現細胞はないのか？

4-8. 解析技術の必要性と現状

5、最終章 p 52-71

5-1. EST プロジェクト

5-2. サブトラクション

6、謝辞 p 72

7、参考文献 p 73-79

1, 序論

1-1. 再生研究における環形動物の重要性

本研究は、優れた再生能力を持つ環形動物“ヤマトヒメミミズ (*Enchytraeus japonensis*)”を用いて、主に生殖細胞の再生について研究を進めた。ここでまず初めに、環形動物というある意味特殊な動物を使うことの意味合いを問うため、ミミズを用いて再生（体細胞組織と生殖細胞再生を含んだ再生全般）の研究をすることの重要性と発展性について述べておきたい。

既存の動物は、その能力の大小に関わらず多かれ少なかれ失った組織を再生することができる。例えば人間であれば、肝臓や傷ついた表皮などは再生（修復）するが手足など大きく組織を欠失した場合には再生が起こらない。イモリや魚は、鰭（手足）そして心臓などを含む多くの組織・器官を再生するという優れた再生能力を持つ^{1,2,3}。ある意味、彼等は「失われた組織が再生してくれればどんなに良いか」という人間の夢と希望を持ち合わせた動物である。この再生は、筋肉細胞が脱分化して骨などを再び作り上げることで達成されると考えられている^{4,5}。さらに、強い再生能力を持つ動物として有名なプラナリアは体を切断された場合においても失った全ての組織を再生するという驚くべき能力を持っている。プラナリアの再生では、イモリのような脱分化は観察されず、体全体に散らばるネオブラストと呼ばれる幹細胞により全ての組織が作り上げられる^{6,7}。また、プラナリアと同様、特筆すべき再生能力を持つことで有名な環形動物（ミミズとゴカイ）はイモリとプラナリアの両方の特性、つまり脱分化と幹細胞システムの両方を駆使して再生をされると言われている（どちらをメインに使うかなどの詳細は未だ不明で異論が残る）^{8,9}。このように、動物種ごとに再生能力そして再生様式には非常に大きな違いが見受けられる。再生現象がどのように起こるのかという根源的な疑問についても現在ほとんどが謎であるが、将来的に様々な動物種で再生機構を理解し、それぞれの動物の再生を比較することが再生現象を包括的に理解するために重要であると信じている。上述した通り、環形動物がプラナリアとイモリの間系系の再生様式を持つこと、また同じ動物門の中に再生能力の優れた種類、再生能力の弱い種類そして再生しない種類などを含むことから、再生機構の理解はもとより、その遙か先にある「種間でなぜ再生能力が異なるのか」という疑問に対しても近縁種内の比較からアプローチできるという特性

を持つと考えられる^{10,11}。ミミズの再生については、その重要性からも非常に古くから組織学的な観察がされていたが、分子生物学の舞台に昇っていないことはもとより、組織学的な知見においても整合性の得られない部分が多く残されている。現在は、再生中にどのような現象が起こり、そこにどのような分子が関わるのかを地道に押さえてゆく必要がある。これにまつわり、本論文の主旨は2つある。1つ目は、再生中にどのような現象が起こるのかということで、私が新規に発見した生殖細胞再生の仕組みを記述する。そして2つ目として、今後ミミズの再生研究をより円滑に進めるためヤマトヒメミミズの再生時に発現する遺伝子のデータベースを作成したので巻末に記載する。

1-2. ヤマトヒメミミズは環形動物の再生を知る上で良いモデル系となる

ここで、比較的最近発見されたヤマトヒメミミズの特徴と共に実験動物としての利点を述べた後、私が生殖細胞の再生に着目した経緯を説明する。ヤマトヒメミミズは1993年に新種として記載された日本産のミミズであり、非常に強い再生能力を持つことが最大の特徴である^{12,13}。ヤマトヒメミミズは切断部位によって再生力が異なる他のミミズと異なり、体のどの部位で切断した際にも失った表皮、筋肉、血管、神経、脳そして消化管など全ての組織・器官を完全に再生する^{13,14}。また他の種類においては再生完了までに比較的長い期間を要するのに対して、ヤマトヒメミミズは約5日間という短い期間で再生を完了する¹³。これらの点からも、ヤマトヒメミミズは再生観察の困難さと複雑さを軽減させる。体長は約1cmという小型種で、他のミミズと異なり透明な表皮を持つため生体の組織や器官の観察が容易であり、さらには免疫組織染色やwhole mount *in situ* hybridization法などの観察、そして将来的には蛍光遺伝子の導入などによる生体標識などにも適していると考えられる(図1.A)。このミミズの飼育は、北大の柝内新 助教授らのグループによって既に確立されている¹³。アガープレート上に餌となるオートミールを撒いた培地を用いて、たいしたメンテナンスも無しに容易に飼育でき、さらに実験に必要な十分量のミミズを増殖させることができる。ヤマトヒメミミズは、通常、この飼育条件において自切と再生を駆使して無性生殖のみで増殖する¹³。成長したミミズは、自らの体を筋収縮により約10断片ほどに分断し、こうしてできた全ての断片が失った頭部(どこで切断した場合にも前方に約7.5体節を再生する)や尾部を約5日間で完全に再生する^{13,14}。再生完了後、再生された尾部の成長体から後方に体を伸長させて、約2週間で元の長さまで成長し再び自切をする⁹。この無性生殖のサイクルを繰り返すことで、1匹のミミズが4週間後には100匹に増殖する(図1.B)。

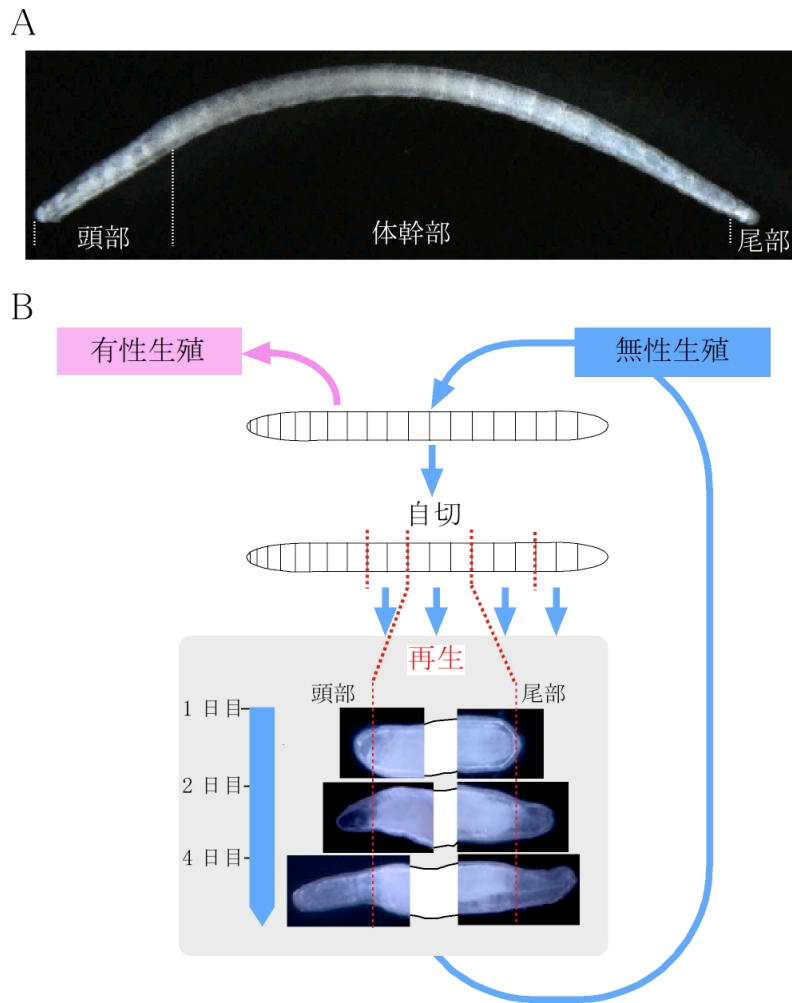


図 1. ヤマトヒメミズの特徴

A. ヤマトヒメミズの無性生殖個体（体長 1cm）

とりわけ何の処理も行わず実体顕微鏡で撮った写真を掲載した。透明な表皮を持っており、消化管などの組織が透けて観察できる。消化管周辺の脂肪細胞のせいで若干白っぽく見える。体には体節が見られる。点線は、それぞれ頭部、体幹部、尾部の境界を示す。右側に頭部 8 体節、左端に尾節（尾部）、その中間が全て体幹部である。頭部と尾部の区別は、頭部に口、口前葉（右端）、脳などがあることで容易に判別できる。

B. ヤマトヒメミズの生活環と特徴

青色矢印で無性生殖のサイクルを示す。通常の飼育環境において、ヤマトヒメミズは無性生殖のみで増殖をしている。成長したミズは、赤色点線で示すように自らの体を切断する。こうしてできた、全ての断片は約 5 日間で失った頭部や尾部を完全に再生する。どの断片についても頭部側については約 7.5 体節を再生する。再生終了後は、尾部成長帯から体を成長させ、ある程度成長すると再び自切をする。一周するのに約 2 週間かかる。飼育条件を変えることで、ピンク色で示す有性生殖モードに切り替わる。有性化した個体は卵を生み増殖する。

1-3. ヤマトヒメミミズは生殖細胞を再生できる

ヤマトヒメミミズは無性生殖で増殖をする一方、飼育条件を変えることで実験的に有性生殖を誘導することができるという特徴も持ち合わせている（図 1. B）¹³。序論の章ではあるが、便宜上、私が生殖細胞再生に着目するに至った実験結果を示しながら、本研究の問題提起へとつないでゆくことにする。性成熟個体は頭部 7 体節目に精巣と貯精嚢を左右対称に 1 ペア一ずつ、頭部 8 体節目には左右対称に 1 ペア一の卵巣を発達させる（6 体節目にも貯精嚢を発達させることがある）（図 2. A、10 日目）。これらの生殖器官は、無性生殖個体では観察されず、有性化を誘導することで初めて頭部 7・8 体節に形成されてくる（図 2. A、無性生殖個体）。図 2. A に示すように、有性化誘導から後 5 日目の頭部 7・8 体節に出現する小さな細胞塊が、日数が経つにつれてじょじょに増殖して大きくなり生殖器官ができてくる（7・8 体節にそれぞれ左右対称の細胞塊ができる）。このように生殖器官が、必ず頭部 7・8 体節のみで出現してくることから、無性生殖個体の頭部 7・8 体節には生殖器官を形成する能力つまり生殖器官の原基および生殖系列の細胞が備わっていると考えられる。ここで一つの疑問が湧き上がる。前述の通り、ヤマトヒメミミズは無性生殖を行うときに自らの体を 10 断片ほどに分断化する。この際、頭部 7・8 体節を持つ頭部断片とこれらの体節を持たない 9 断片に分かれる。このような状況の中、もし頭部 7・8 体節の生殖器官を形成する能力が再生しなければ、無性生殖を繰り返すたびに有性化能が失われて行くことになる。無性生殖個体からランダムに選んだミミズについて有性化誘導した場合、高頻度で有性化するということを私は経験的に知っている。そこで、体細胞組織の再生に伴って生殖細胞が再生するのか否かを確認するため、人為的に頭部 7・8 体節を取り除いた無性生殖個体が再生完了後に有性化できるのか否かを調べた（Fig. 3）。この結果、図 2. B で白および黄緑色で示した頭部切除断片も、頭部 7・8 体節を持つ頭部断片とほぼ同様の効率で有性化をすることがわかった（図 2. B）。これより、ヤマトヒメミミズは体のどの部位からでも生殖巣および生殖細胞を作る（再生する）ことができるという結果が示唆された。それでは、頭部 7・8 体節を持つ生殖器官形成能の実態とはなんだろうか、また体全体に広がる生殖細胞を形成する能力とはなんだろうか？

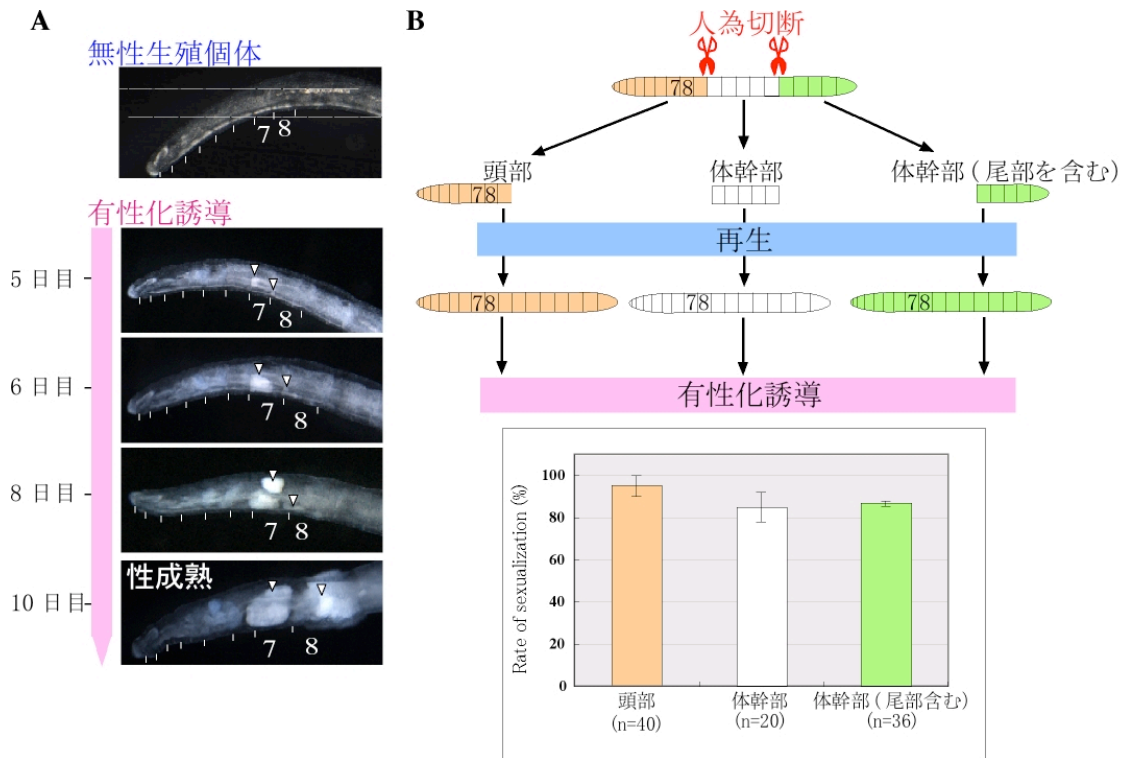


図2. ヤマトヒメミズは生殖細胞を再生する

A. 有性化過程

ピンク色の矢印は有性化過程を示す。有性化誘導を受けた個体は約10日間で性成熟して頭部7・8体節に生殖巣を持つ(10日目；白矢頭)。無性生殖個体でこれらの構造は確認できないが、有性化を誘導すると、5日目の白矢頭で示すように小さな細胞塊が頭部7・8体節に出現する。6日目、8日目と性成熟が進むにつれてこれらの細胞塊は大きくなって、最終的に生殖巣を作り上げる(5~6日目の白矢頭)。

B. ヤマトヒメミズは体のどこからでも生殖細胞を産み出せる

ミズを赤いハサミ印で示すように切断し、7・8体節を持つ頭部断片(オレンジ色)、頭部も尾部も持たない体幹部断片(白)そして頭部を持たない断片(緑色)に切り分けた。これらの7・8体節を持たない白断片と緑断片は再生して、新たな頭部7・8体節を作りだす。この後、有性化を誘導して新たに形成された頭部7・8体節に生殖細胞形成能があるか否かを調べた。グラフは、生殖巣が形成できた個体の割合を縦軸に、横軸にはそれぞれ由来する断片の種類を示す。有性化誘導率は、頭部；95%、体幹部；90%、体幹部(尾部を含む)；87.5%である。スチューデント検定の結果、頭部と体幹部； $p=0.077$ 、体幹部と体幹部(尾部を含む)； $p=0.39$ 、頭部と体幹部(尾部を含む)； $p=2.22$ であった。

1-4. 環形動物の生殖細胞再生について

環形動物の再生にける大きな疑問の一つとして前述の生殖細胞再生が挙げられる。また、動物全般を見渡したときでも、生殖細胞がいかにかに再生されるかという知見は極めて少なく、情報が枯渇している。前述したヤマトヒメミミズでの観察結果および問題提起と同様、環形動物の生殖細胞がどのように再生するかに関しては遙か昔から疑問が持たれていた。ヤマトヒメミミズを分譲して頂いた北海道大学、理学部の枅内新助教授と西野純子（旧姓；忽那純子）さんも兼ねてより私と同様の疑問を持ち、組織学的な観察を行っていたが結論が得られなかったというのが現状である。ウズマキゴカイ(*Spirorbis*)においても、生殖巢体節を持たない領域からでも生殖巢体節を再生できることが示されており、このとき筋肉および血管付近に存在するネオブラストから生殖細胞ができるという説が提唱されている^{15,16,17,18,19,20}。また、Dorsett はスピオ科のゴカイを用いた研究結果から、生殖細胞が腹側の上皮からでき、これらが再生組織に移動すると推測した²¹。これら見解に相違があるが、腹側の組織から生殖細胞が出来てくるという点に関しては両者の意見が一致している。ミミズにおいては、イトミミズ(*Tubifex*)とその近縁種で観察されており、生殖細胞が腹膜からできてくるという見解が出されている²²。また、Herlant-Meewis (1946b)と Gates (1943)は、それぞれ *Lumbricillus* と *Perionyx* において生殖細胞が隔壁周辺からできてくると記載した^{23,24}。再生するミミズの隔壁周辺にはネオブラスト（幹細胞様細胞）が存在することが知られている^{16,25,26}。さらに、ミミズと同様に生殖細胞を再生するプラナリアにおいてネオブラストから生殖細胞が再生するということが通説である^{27,28}。これらのことから、ミミズの生殖細胞がネオブラスト（幹細胞様細胞）から再生するという可能性も十分に考えられる。上記の通り、生殖細胞がどこから出てくるのかということに関しては、いろいろな説はあるものの見解に相違がある。それぞれの観察結果のいずれかが間違いなのか、はたまた種間での違いなのかは現時点では分かっていない。これに加えて、どの研究も組織学レベルの観察から得られた記述のみで、現時点で文献を読み返してもどの観察結果がより精度の高いのかを検証する術がない。私は、生殖細胞がどこからのどのように再生するのかを明らかにするため、並はずれた再生能力と手軽に有性生殖を誘導できるという特徴を兼ね備えたヤマトヒメミミズを用いて生殖細胞の再生について解析を進めた。

1-5. *piwi* 遺伝子

生殖細胞の再生を観察するにあたって、私は *piwi* 遺伝子を適切な分子マーカーとして選んだ。*piwi* 遺伝子は Cox らによってショウジョウバエから単離同定された遺伝子で、ショウジョウバエの卵巣と精巣においてそれぞれ生殖幹細胞で発現すること、幹細胞能の維持と分裂に必須であることが示されている^{29,30}。また、ショウジョウバエの *piwi* ファミリー遺伝子の1つ *aubergine* は *nanos* や *vasa* と同じく極細胞質（生殖細胞質）の構成要素であり、極細胞形成に必須であることも示されている³¹。さらに、線虫においても *piwi* と相同な遺伝子が既に発見されており、これらの遺伝子の消失で生殖細胞の不形成が確認されている³⁰。*piwi* 遺伝子がどのような分子機構で幹細胞の維持に関与するのか、生殖細胞で実際にどのように機能しているのかなどはまだ詳細に分かってはいないが、*piwi* 遺伝子が RNAi の関連分子（Dicer）と相互作用することが知られていることから、これらの機構を用いて転写後調節を行うことで生殖細胞や幹細胞で機能すると考えられている^{32,33}。最近になって、ショウジョウバエ以外にも様々な動物種で *piwi* 遺伝子と相同な遺伝子が単離され発現パターンおよびその機能が調べられつつある。脊椎動物においては、ヒト (*hiwi*)、マウス (*miwi*, *mili*) そしてゼブラフィッシュ (*ziwi*) で単離されている^{34,35,36}。*Mili* と *miwi* はそれぞれ精巣特異的に発現が確認されており、両遺伝子ともに精子形成に必須であることが明らかになっている^{35,37,38}。さらに、*mili* に関しては PGCs で発現することが知られている³⁸。ヒトそしてゼブラフィッシュにおいても、*piwi* 遺伝子は *vasa* と共に生殖細胞に発現している³⁶。これらの動物において、発生終了後、若干の例外を除き *piwi* 遺伝子は生殖細胞に特異的な発現をみせる。この一方で、比較的体制が高度でない動物、プラナリア、腔腸動物などでは *piwi* 遺伝子は成体になったのちにも生殖細胞だけでなく幹細胞にも発現することが知られている^{39,40,41}。プラナリアでは体中に散らばる幹細胞（ネオブラスト）に *piwi* 遺伝子が発現する^{39,40}。また、プラナリアにおいては生殖細胞がこれらネオブラストから作られることが通説になっている^{27,28}。これらのことより、*piwi* 遺伝子は盛んに再生を行う動物においては成体になったあとも生殖細胞、そして生殖細胞以外もしくは生殖細胞を産み出す幹細胞に発現する傾向が伺える。私は、生殖細胞およびそれを産み出す幹細胞を特定することを目的として *piwi* 遺伝子に着目して研究を行った。

2, 材料と方法

2-1. ミミズの飼育と維持

一匹のミミズから無性生殖で増殖した遺伝的に均一な系統を作成し実験に用いた。ミミズはアガープレート(1% agar/ MQ 水)上で、25°C、高密度飼育し、1週間に一度餌としてオートミール粉末を与えた。この条件において無性生殖のみで増殖する。飼育を続ける中アガープレートが液状化したら培地交換を行う。液状化した培地をミミズとともに腰高シャーレに移し、RO 水でミミズを丹念に洗い、新たなアガープレートにミミズを移す。このとき、ミミズがアガーに潜りやすいように、柄付き針でアガープレートに切れ込みを入れ、さらにミミズがシャーレから這い上がらないようにシャーレの内側に付着した水滴等をキムワイプで完全に拭き取る。

2-2. 有性化誘導

有性化誘導に必要な条件は、飢餓、低密度飼育そして餌を与えることである。無性生殖個体を一ヶ月間飢餓状態にした。有性化培地に移すにあたり、体長の長い個体だと有性化以前に自切をして低密度状態が崩れることがある。そこで頭部8体節から後方を切除し、これら飢餓ミミズの頭部断片を、10匹ずつキムタオル(Kimberly-Clarl corpotation)を敷いたφ9cm ペトリディッシュ(BIO-BIK)に移した。このとき、キムタオルを厚く敷いてしまうとミミズがキムタオルの中に複雑に潜り込んで、ミミズの有性化状況を観察しにくいばかりか単離が困難になるため、1枚のキムタオル(4層の薄皮からできている)を一層ずつ剥がして、このうちの2枚をシャーレに敷き水で湿らせておく。培地にミミズを移したら少量のオートミール粉末を与えて25°Cで低密度飼育した。餌を与えすぎると飼育環境が安定せずオートミールが腐り有性化が失敗する。このような培地は排除した。1日飼育した後、培地が土の様な香りになったら飼育環境が安定したと考えて良い。

2-3. whole mount での有性化組織の観察

ある程度大きくなった生殖器官は特別な処理なしに実体顕微鏡で観察することができる。しかしながら、本研究では生殖器官をより鮮明に観察するために下記の処理を行った。カルノア液(エタノール:酢酸:クロロホルム=6:1:3)で20分間固定する。このサンプルをAG液(グリセロール:酢酸=1:4)に浸けることで透明化した。また、この処理を通して核が白くなるため組織がより鮮明に観察できる。サンプルをシャーレに移して、

黒いフィルムを背景に実体顕微鏡で写真撮影した。

2-4. 有性化誘導効率の測定

マイクロメス(Feather K-715)を用いて無性生殖個体を、尾部のみを切除した頭部断片、頭部と尾部を切除した断片（ここでは体幹部と呼ぶ）、そして尾部を含む断片に切り分け、それぞれ別のアガープレート上で飼育した。それぞれの断片が再生を完了したことを確認したのち前述の条件で有性化を誘導した。有性化誘導後 10–15 日目までの間、それぞれの培地を観察して性成熟した個体については有性化培地から隔離しつつ個体数をカウントした。方法 2 に記述したのと同様、飼育環境が悪化したプレートは正当な結果が得られないものとして排除した。

2-5. 再生の誘導

ヤマトヒメミミズの切断法には、大きく分けて 3 種類ある。1 つ目は、アガープレート上で電気刺激を与えることによって自切を誘導する。2 つ目として、頭部を人為的に切除することで頭部を欠いたミミズの自切を誘導する。これら 2 つの方法は、より自然な切断できる手法として用いられるケースもあるが、自切がゆっくりと起こるため、自切してできた断片間に約 1 日の時間のずれができる。3 つ目は、メスで人為的に切断する方法である。この方法は、一見して本来の自切を反映していないという印象を与えるが、人為切断をされた個体は瞬時に本来の自切点で自らの体を再切断するため、自然な切断面が形成される。また、上述の方法の中では最も断片間の時間軸が同調する。そこで本研究では、全て人為切断法で再生を誘導した。無性生殖個体をマイクロメス(Feather K-715)を用いて切断したのち、素早く濾紙上(Whatman N0.3030917)に移して 25℃で飼育した。濾紙上で飼育することにより、濾紙を水に浸け洗いするのみで容易に再生個体を回収できる。

2-6. *piwi* 遺伝子の単離

切断から 0, 1, 2, 3, 4 日目の再生中ミミズから mRNA を抽出して cDNA および cDNA library を作成した。これら全てのクローンについて塩基配列を決定したのち、BlastX で同源性検索を行ってアノテーションを付けた（最終章に別途記載した）。これらのクローンから *piwi* 遺伝子と同源性の高い遺伝子を単離した。多重配列は Clustal W を用いて計算したのち GENETICS で図を作成した。系統樹には Piwi ドメインの中で特徴的な Piwi ボックスのアミノ酸配列を用いた。neighbor-joining method に基づいて Clustal W を用いて計算し、

tree viewer で系統樹を作成した。多重配列および系統樹作成にあたり下記の PIWI ホモログの配列を用いた³⁰。ヒト Hiwi (AAC97371)、マウス Miwi (NP_067286)、ゼブラフィッシュ Ziwi (NP_899181)、ショウジョウバエ Piwi (AAF53043)、ショウジョウバエ Aubergine (CAA64320)、ウニ Seawi (AAG42533)、クラゲ Cniwi (AY493987)、マウス eIF2C (NP_700452)、ショウジョウバエ Ago1 (NP523734)、シロイヌナズナ Ago1 (NP_849784)。

2-7. ヤマトヒメミミズ - whole mount *in situ* hybridization 法の確立

ミミズの遺伝子発現をするにあたり、北海道大学の武尾らと共に whole mount *in situ* hybridization 法の確立をした。本来、実験結果として取り扱うこともできるが、本論文のメインの論旨を直線的に貫くために、手法開発のための実験結果は、この章「材料と方法」に示す。*in situ* hybridization 法の条件検討するにあたり、まずポジティブコントロールに用いることを目的として再生芽に発現する遺伝子の単離を企てた。ミミズの再生芽では細胞増殖が盛んに起こることを予想し、DNA 複製に必須な PCNA 遺伝子に着目した。PCNA は酵母から高等真核生物まで高度に保存されたタンパク質であるため、既存の動物の抗体を用いておよその PCNA mRNA の発現パターンも推測できる。まず初めに PCNA 抗体 (DAKO マウス・モノクローナル抗体 PC10) で免疫組織染色を行いタンパク質が発現することと、その局在パターンを確認した。この結果、盛んに細胞増殖が起こっている尾部成長帯に PCNA タンパク質の局在が観察されたことより、使用した PCNA 抗体がミミズの PCNA タンパク質と抗体反応しうると判断した。また PCNA タンパク質が頭部再生芽内、とりわけ、脳、咽頭そして腹側神経索に発現することを確認した。これより、再生芽に発現し、かつ遺伝子の発現パターンが推測できる PCNA (600bp) を RT-PCR 法で単離し whole mount *in situ* hybridization の条件検討に用いた。次章 8 に記載したプロトコールを用いて PCNA の whole mount *in situ* hybridization を行ったところ、上述したアンチ・センスプローブ特異的に PCNA タンパク質の局在パターンと同様の発現パターンの染色が得られた。この結果から、whole mount *in situ* hybridization 法が成功しているものと判断した。(以下のプロトコールに関しては北大の武尾さんの貢献度が大きいことを記しておく)。

2-8. whole mount *in situ* hybridization 法

サンプルを 4% Paraformaldehyde/PBS で室温 2 時間固定。メタノールで脱水した。メタノールは 50%, 70%, 80%, 90%, 100% と各ステップ 5 分間処理した。100% メタノール処理は 5 分間 2 回処理をし、最終的に 100% メタノール中で 2 時間置いておいた。急激に脱水

をするとミミズが潰れるので注意する。また、脱水中にミミズの内容物が激しく出る場合は固定時間が足りない場合が多い。ここでハイブリダイゼーション時のプローブの浸透性を高めるため 100%メタノールに入ったサンプルをそのまま程度電子レンジ (200W) で5回処理した。注意点は、ビーカーに張った水道水 (600mL 程度) 上にサンプルを浮かべて処理して加熱を防ぐということである。1回の処理ごとにビーカーの水を交換して処理を行った。これらの処理後、90%、80%、70%、50%のメタノールで5分間ずつ処理して、最終的に PBST で置換した。後に 37°Cで 1 時間 PBST 処理および室温 30 分間 Proteinase K (20ug/ml)(Roche Cat. No.3 115 879) / PBST(PBS, 0.1%Tween20)処理してさらに浸透性を高めた。PBST で5分間2回洗い、4% Paraformaldehyde/PBS で5分間後固定した。PBST で5分間2回洗って Paraformaldehyde を除去。Ambion 社 ULTRAhyb Ultrasensitive hybridization Buffer を用いて 58°Cで 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。このハイブリダイゼーションバッファーは粘性が高いためできる限り液換えの回数を少なくすることが重要である。そこでプレハイブリダイゼーションを 50ul のバッファー中で行い、ハイブリダイゼーションに移る際には 50ul のプローブ入りバッファーを加えて最終量 100ul にする。プローブの終濃度を 500ng/ml になるようにして 58°Cで 16 時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、1ml の 5XSSCT/formamide(0.1% Tween20, 50% formamide)をハイブリダイゼーションバッファーのうえから加え 56°Cで 30 分間洗浄した。遠心分離 (3000rpm)をしてサンプルを沈めたあと、丹念に液を吸い取り 5XSSCT/formamid で再び 56°Cで 30 分間洗浄した。2XSSCT/ formamide (0.1% Tween20, 50% formamide) で 56°C, 30 分間 2 回、2XSSCT で室温, 5 分間 2 回洗った。室温で 10 分間 20ug/ml RNase 処理を行い余分なプローブを消化し、2XSSC, 0.1% Tween20, 50% formamide で 56°C, 30 分間 2 回、0.2XSSC, 0.1% Tween20 で 56°C, 10 分間、PBST で 5 分間、洗浄した。1% Block reagent (0.1M マレイン酸、0.15M NaCl, 0.1% Triton-X, pH7.5 with NaOH) で 1 時間ブロッキングののち、1/2000 Anti-Dig AP(Roche) in 1% Blocking reagent で 4°C, 16 時間反応、NBT/BCIP を基質にして発色を行った。

2-9. *Ej-piwi* の発現パターン解析

(whole mount *in situ* hybridization 法)

プローブ作成用のテンプレートは現在得られている 1.5kb について T7 primer; AAGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGA 、 T3 primer; GAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTA を用いて PCR で調製し

た。電気泳動後に PCR 産物を切り出して QIAGEN 社の QIA quick Gel extraction kit を用いて精製した。これら精製を終えたテンプレートを 200ng 使用して *In vitro* 転写を行い DIG-labeled RNA probe を作成した。*In vitro* 転写にはストラタジーン社の T7 RNA polymerase (anti-sense) および T3 RNA polymerase (sense) を使用し同社のプロトコールに従って作成した。反応終了後に余分な DIG-UTP を除くため、反応液をアマシャム社の G50 カラムで精製してプローブを得た。whole mount *in situ* hybridization 法は 8 の方法に従って行った。

2-10. whole mount での観察法

正立顕微鏡での観察 (図 7、図 9. B)

whole mount *in situ* hybridization を終えたサンプルを適切なオリエンテーションで観察するためにアガロースゲルに包埋して観察を行う。ホールスライドガラスに 1% 低融点アガロースを滴下し、その中にサンプルを乗せる。およそのオリエンテーションをつけたら、ゆっくりとカバーガラスを被せ、カバーガラスを少しずつらしながら最終の位置決めを行った。オリエンテーションが決定したところで、4°C のアルミプレート上にそっとスライドガラスを乗せて低融点アガロースを固めた。

倒立顕微鏡での観察 (図 10)

正立顕微鏡での観察と同様にアガロースゲルに包埋して観察を行った。異なる点は、ホールスライドガラスではなくガラスボトムディッシュ上に包埋したことである。図 10 の写真撮影にはこの方法を用いた。

実体顕微鏡での観察 (図 2. A、図 4. A、図 5)

プラスチック・ディッシュに 1% アガロースを約 5mm の厚みに注ぎ、アガロースゲルを作る。このゲル上に PBS と共にサンプルをのせる。タングステン針でゲルに切れ込みを入れて、サンプルを埋め込み角度を調整したのち写真撮影をした。

2-11. メチルグリーン染色 (図 9. B)

本論文では図 9. B でミミズの腹側神経索を観察しやすいように、メチルグリーン染色を行った。この染色は核を水色に染める。whole mount *in situ* hybridization を終えたサンプルをプラスチック・ディッシュに移し、1% メチルグリーン溶液 (MUTO) でサンプルを

約 5 分浸した。染色後、PBS で余分な染色を洗い流した。

2-12. 切片 *in situ* hybridization

切片作成)

自動 *in situ* hybridization 機 (Ventana 社 Discovery)を用いて、以下の条件で切片作成を行った。サンプルを 4% Paraformaldehyde/PBS で室温 24 時間固定した。この時、固定時間が 24 時間以内だとバックグラウンドが上がるので注意する (2 日間くらいまで固定時間が延びても問題はない)。脱水は 50% エタノール 5 分間、70% エタノール 10 分間で脱水した後、70% エタノール/酸性フクシン (70% エタノール 2ml に対して 2mg/ml 酸性フクシンを 20ml 程度加えたもの) で 10 分間色着けをした。この染色を行わないとパラフィンに包埋したときにサンプルが見分けにくくなる。実験の目的に合わせて、縦断切片および水平切片と切り方が異なってくる。この時点で、体側を下に横たわる傾向があるサンプル (縦断切片用) と腹側を下に横たわる傾向があるサンプル (水平切片用) を選別してガラスシャーレに移した。80% エタノールで余分な染色を 5 分間洗い流し、続いて 90% エタノールで 5 分間、100% エタノールで 5 分間 2 回処理したら、キシレンで置換する。この時点でアルミ皿にパラフィンを満たし、この中に少量のキシレンごとピペットで吸い取ったミミズ (複数個体) を滴下した。ここで他の動物のパラフィン包埋と異なる点を以下に記す。ミミズの直径が $100\ \mu\text{m}$ ~ $200\ \mu\text{m}$ と小さなこともあり、他の動物や組織の切片作成で行う様に、切片を切り進みながら面合わせすることが不可能である。また、ミミズが前後軸に沿って長いことから、正確に縦断切片や水平切片にならず斜め切りになってしまう可能性が高い。そこで、底が平面のアルミ皿 (テラオカ No. 2000) の底面までサンプルを沈めて、サンプルがパラフィンブロックの面と完全に平行になるようにした。68°C で 1~2 時間放置して組織に良くパラフィンを浸透させたのち、柄付き針でミミズを整列させた。冷却させ固めたパラフィンブロックをトリミングして切片作成した。前述したように、このときサンプルがパラフィンブロックの表面に位置しているため、切り始める前に丹念にマイクロトームの刃と面合わせを行い切片作成した。作成した切片は MQ 水を張ったスライドガラスの上に浮かべ、42°C のパラフィン伸展機で完全に水分が蒸発するまで伸展させた。こうして得た切片を切片 *in situ* hybridization に用いた。すぐに使用しない場合は、-80°C で保存をする。

切片 *in situ* hybridization)

自動 *in situ* hybridization 機 (Ventana Discovery)を用いて、切片 *in situ* hybridization を行う際、最も神経質にならなければならないのがプローブの濃度である。whole mount *in situ* hybridization に用いたのと同様のプローブを終濃度 0.25ng/ul で *in situ* hybridization を行った。*in situ* hybridization の各種設定 (プロトコール) を以下に記載する。Ventana Discovery を動かすソフトウェア-NEXS 9 を起動し、下記の項目にチェックおよび数値を入れてプロトコールを組んだ。

Tissue sample

Paraffin

Deparaffine

Fixative (fixative; riboPrep{4124}, 37C, 30min)

Pretreatment #1

Use EZ buffer for PT1

Heat slides for PT1-EZ (37C, Riboclear {4125}, 10min)

Cell conditioning

Conditioner # 2

Midle CC2

Pretreatment #2

Use reaction buffer for PT2

Heat slides for PT2-RB (37C, protease 2 {2019}, 2min)

Probe

Titration(Denaturation; 70C, 10min, hybridization; 68C, 6hr)

Stringency wash #1 (0.1xSSC)

High temp Stringency #2 (67C, 6min)

Stringency wash #3 (0.1xSSC)

High temp Stringency #3 (67C, 6min)

Post fixative (Fixative; ribofix {4126}, 10min)

Antibody にチェック

Antibody titration

Standard titration Ab Inc (primary antibody Plus incubation time 2min)

2nd antibody にチェックを入れる titration にする

上記のプロトコールにおいて、probe の項目まで作業が進行した時点で、手動でプローブを添加する。ベンタナ推奨のハイブリダイゼーションバッファー200ul で終濃度 0.25ng/ul になるようにプローブを希釈して添加した。また、Antibody titration の項目では 1%ペーリンガーブロッキング液で 1000 倍希釈した Anti-Dig AP(Roche)を手動で添加した。通常のプロトコールでは抗体を添加した後、自動的に発色反応まで行ってしまうが、ミミズの場合はベンタナ推奨の発色反応で非特異的な発色が見られるため自動発色の代わりに、手動で発色を行う必要がある。そこで、発色反応以前に機械を停止させる手段として、2nd antibody を titration (手動) にした (注 ; あくまで機械を停止させる目的で入れたステップであって、実際に二次抗体などを添加しているわけではない)。この時点で、サンプルを回収して PBST で 3 分間 8 回ほど良く洗った。この後、サンプルを発色液 (50mM MgCl₂, 0.1M NaCl, 0.1M Tris-Hcl pH9.5, 0.1% Tween20) に 10 分間浸けた。発色反応は通常の切片 *in situ* hybridization と全く同様に NBT/BCIP (発色液 300ml に対して 75mg/ml NBT を 94 μ l と 50mg/ml BCIP を 70ul 加えたものを使用) を基質にして発色を行った。*piwi* 遺伝子の切片 *in situ* hybridization の場合、6 時間から 1 日間ほどで発色が終了する。発色中に発色液が黄色から紫色に変化した場合には新しい発色液に交換しながら発色を遂行した。ノマルスキーおよび微分干渉で観察する場合は、脱水後に永久標本として封入した。図 6. B では ISH RED (CAT #780-2186 200) でカウンターステインした後封入した。この染色において核が濃いピンク色、その他の組織は薄いピンク色に染まる。

2-13. 切片 *in situ* hybridization 後の免疫染色

切片 *in situ* hybridization の発色を終えた切片を、PBS で洗浄したのちモイストチャンバーに移して 2 基底の塩酸で 30 分間処理した。サンプルを染瓶に移し、PBS で 5 分おきに液換えをしながら 15 分間塩酸を洗い流した。洗浄後、再びモイストチャンバーに移して、PBST/BSA(2mg/ml BSA, 0.1% triton X)で室温 1 時間ブロッキングを行った。PCNA 抗体を PBST/BSA で 300 倍希釈し、1 枚のスライドガラスに対して 300 μ l 添加した。サンプルが乾かないように、スライドガラスの上にパラフィルムを乗せて 4°C で一晩抗原抗体反応を行った。反応終了後 PBS 中でゆっくりパラフィルムを剥がし、さらに PBS で 30 分間 3 回洗浄したのち、HRP 標識された anti mouse IgG (PBST/BSA で 300 倍に希釈したものを使用) で室温 2 時間反応を行った。PBS で 30 分間 3 回洗浄して二次抗体を洗い流したの

ち、DAB 発色を行った。

2-14. BrdU パルスーチェイス実験

5 の方法に従いミミズを切断して、断片を濾紙の上で 12 時間飼育した。濾紙を水で洗い再生ミミズを回収した。これらのミミズを 20mM 5-Bromo-2'-deoxyuridine 溶液(SIGMA B5002-250MG)で浸した濾紙(Whatman N0.3030917)上に移して 12 時間飼育(25°C)した。この時使用する BrdU 溶液の濃度を中性から若干だけアルカリ性寄りに調整しておく、またミミズの完全に浸かってしまうほどの BrdU 溶液を入れてはいけない。これらの注意を欠くと、ミミズが死にやすくなる。BrdU ラベルを終えたミミズをプラスチック・デッシュに移して、RO 水で BrdU をよく洗い流し除去した。盛んに BrdU が取り込まれる再生芽を含む領域をマイクロメスで切除した。この時点で、BrdU ラベルはほぼネオブラストにのみ見られる。これらのミミズを再び濾紙の上に移して飼育を続け、新たに形成される再生芽に BrdU 陽性細胞がいつ侵入するかを調べた (図 10)。BrdU の検出は BrdU 抗体 (アマシヤム RPN202)を用いて、whole mount 免疫組織染色を行った。プロトコールを下に示す。ミミズをカルノア液 (エタノール : 酢酸 : クロロホルム = 6 : 1 : 3) で 20 分間固定した。70% エタノールでカルノア液を洗ったあと、50% エタノールを経て PBST で水和した。表皮のクチクラを緩めるため、メルカルトエタノール溶液 (5% メルカプトエタノール、1% Triton、0.1M Tris-Hcl pH7.5) で 37°C、一晩処理した。PBST で 4 回程液交換をしながら 6 時間程度洗ってメルカルトエタノールを除去した。抗体の浸透性をより上げるためにコラゲナーゼ SIGMA Type IV (1000 U/ml, 1mM CaCl₂、0.1% Triton、0.1M Tris-Hcl pH7.5) で 37°C、12 時間処理してクチクラを消化した。PBST で液交換をしながら 1 時間程度洗ったのち、PBST/BSA (2mg/ml BSA, 0.1% triton X)で室温、1 時間ブロッキングを行った。BrdU 抗体(アマシヤム RPN202)を PBST で 300 倍希釈した抗体液中で、抗原抗体反応を行った。さらに PBST で 30 分間 3 回洗浄したのち、Alexa 568 で標識された anti mouse IgG (PBST/BSA で 300 倍に希釈したものを使用) で室温 2 時間反応を行った。PBST で 12 時間くらい洗浄すると奇麗にシグナルが観察できる。観察と写真撮影は共焦点レーザー顕微鏡 (カール・ツァイス社 PASCAL) で行った。

3, 結果

3-1. *piwi* 遺伝子の単離

我々が再生中のミミズから作成した EST ライブラリーより *piwi* 遺伝子と高い相同性を持つ遺伝子を単離した。Blast X 解析の結果、最も相同性の高いゼブラフィッシュの *Ziwi* とは E value=9e-52、またそれ以外の動物の *Piwi* とはそれぞれ、マウス *Miwi* と E value=1e-49、ヒト *Hiwi* と E value=2e-49、ショウジョウバエ *Piwi* と E value=4e-35 であった。また予想されるアミノ酸配列から cDNA の長さ 1,522bp で、内 486bp が *Piwi* タンパク質に特徴的な *Piwi* ドメインの一部をコードしており、残りの領域は 3' 非翻訳領域だと判断された。*piwi* ファミリー遺伝子はその配列から *Piwi* サブファミリーと *Argonaute* サブファミリーに分類される (図 3. A)⁴²。両者の配列それぞれ特徴的で、*Piwi* ドメイン内の比較のみで十分に違いが分かる⁴²。多重配列を観て分かる通り、*Ej-piwi* と他の *Piwi* サブファミリー遺伝子は配列の保存性が高い。*Hiwi* と 63.6%、*Miwi* と 64.2%、*Ziwi* と 66.7%、*Piwi* と 49.1%、*Aubergine* と 53.1%、*Seawi* と 61.4%、*Cniwi* と 63.6%の相同性があった。これに対して *Argonaute* サブファミリーとは、マウス *eIF2C* と 27.5%、ショウジョウバエ *Ago1* と 28.5%そしてシロイヌナズナ *Ago1* と 26.9%という具合に相同性が低い (図 3. A)。また、*Piwi* サブファミリーは C 末端の配列が *LYYL* と特徴的であり、*Ej-piwi* もこれと同様の配列を持つ (図 3. A)。次に *piwi* ファミリー遺伝子に特徴的な *PIWI* ボックス領域を用いて系統樹を作成した。この結果、まず既知の *Piwi* サブファミリーと *Argonaute* サブファミリーが明瞭なクラスターを組んで分かれることから、*Piwi* ボックスを用いた系統樹で分類可能であることを確認した (図 3. B)。この解析においても *Ej-piwi* は *Piwi* サブファミリーのクラスターに分類された。以上の結果より、*Ej-piwi* がヤマトヒメミミズの *piwi* クラス遺伝子であることが示された。

A

```

Ej-piwi  ---TRDGVGDGQVQVYKVEVKQILSSFKTVS---PDYDPKFSFIIIVKKRINRFFARTNRGIT-----
Hiwi    ---YRDGVGDGQKTLVNYEVPQFLDCLKSIG---RGYNPRLTIIVVKKRINRFFAQS GGRLQ-----
Miwi    ---YRDGVGDGQKTLVNYEVPQFLDCLKSVG---RGYNPRLTIIVVKKRINRFFAQS GGRLQ-----
Ziwi    ---YRDGVGDGILQSVVDYEVPOIMQSIKTMG---QDWERKLSVVVKKRINRFFAIDGKIA-----
Piwi    ---YRDGVSSGSLKQLFEFEVKDIEKLTKEYARVQLSP---PQLAYLVVTRSMNTRFFLNGQ-----
Aubergine  ---FRDGVGDGQYQVWNSSEVNTLKDRLDEIYKSAGQEGGRMTFIIIVSKRINRFFVTGHR-----
Seawi    ---FRDGVGDGQVNLVVDYELKQIKDLDKVVYP---QGTVHKLVVVVKKRINRFFANLRGGLS-----
Cniwi    ---YRDGVGDGQNSDGYEHELPKLSAFSAAQ---ANVEPKFAMLVKKRVSRTFLAANGQYS-----
eIF2C_mouse  ---YRDGVPEGQLPQILHYELLALRDACIKLEK---DYDQGITIVVQKRHHTRFCADKNERI--GKSG
Ago1 Drosophila  ---YRDGVSEGGFPHVQLQHELTALREACIKLEP---EYRPGITFIVVQKRHHTRFCAEKKEQS--GKSG
Ago1 Arabidopsis  ---YRDGVSEGGFYQVLLYELDALRKACASLEA---GYDPPVITFVVVQKRHHTRFCAQNHNDRHSVDRSG

Ej-piwi  NPPPGTVDDSEVTHPKWYDFFLVSGVSRQGTVSPHYNYVDTSNLRPIHQORLAYKLTLLYYNMPGTIRV
Hiwi    NPAPGTVDDVEVTRPEWYDFFLVSGAVRSSEVSPHYNYVDNSGLKPDHQRORTYKLCHEYYNMPGIVRV
Miwi    NPAPGTVDDVEVTRPEWYDFFLVSGAVRSSEVSPHYNYVDNSGLKPDHQRORTYKLCHEYYNMPGIVRV
Ziwi    NPPPGTVDDVEVTRPEWYDFFLVSGAVRSEVSPHYNYVDNSGLKPDHQRORTYKLCHEYYNMPGIVRV
Piwi    NPPPGTVDDVDTLPERYDFFLVSGVROGTVSPSYNVLYSMDGLSPEKMQRLTYKLCHEYYNMPGIVRV
Aubergine  NPAPGTVDDVDTLPERYDFFLVSGAVRTGTVSPTSINVISDNNGLNADKQLQMLSYKMTHEYYNMPGIVRV
Seawi    NPPPGTVDDVDTLPERYDFFLVSGVROGTVSPTSINVISDNNGLNADKQLQMLSYKMTHEYYNMPGIVRV
Cniwi    NPAPGTVDDVDTLPERYDFFLVSGVROGTVSPTSINVISDNNGLNADKQLQMLSYKMTHEYYNMPGIVRV
eIF2C_mouse  NIPAGTIVDVTNITPPEFDFFLCSHAGIQGTSRPSHYHLWDDNRFADLEQCLTYQLCHTYVRCRVSVI
Ago1 Drosophila  NIPAGTIVDVGITPTEFDFFLCSHAGIQGTSRPSHYHLWDDNHFDSDELOCLTYQLCHTYVRCRVSVI
Ago1 Arabidopsis  NIPAGTIVDVKICTHTEFDFFLCSHAGIQGTSRPSHYHLWDDNRFADLEQCLTNNLQTYVRCRVSVI

Piwi box
Ej-piwi  PAPCQYAHKLAFLVGGSTIHPADAKLCDQLYYL
Hiwi    PAPCQYAHKLAFLVGGSTIHPENLSLSNRLYYL
Miwi    PAPCQYAHKLAFLVGGSTIHPENLSLSNRLYYL
Ziwi    PAPCQYAHKLAFLVGGSTIHPENMNLDDFLYYL
Piwi    PAPCQYAHKLAFLVGTNLSIQNALKKFYYL
Aubergine  PAPVCHYAHKLAFLVAESTINRAPSAGLQNLQYEL
Seawi    PAPCQYAHKLAFLVGGSTIHPENRADTIFYL
Cniwi    PAPCQYAHKLAFLVGGSTIHPESSHLADRLYYL
eIF2C_mouse  PAPATYARLVAFARARYHLVDKEHDSGEGSHISGGSGNRDPQALAKAVQVHQDTRLTMYFA
Ago1 Drosophila  PAPATYAHLVAFARARYHLVEKEHDSGEGSHQSGCEDRTPGAMARAITVHADTKKVMYFA
Ago1 Arabidopsis  VPAPATYAHLAFAARARFYMEPTSDSGSMASGSMARGGMAGRSTRGNVNAVRPLPALKENVKRVMFYC

```

B

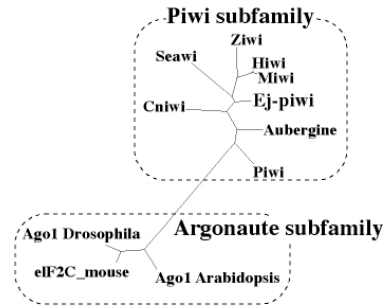


図 3. ヤマトヒメミズの *piwi* 遺伝子

A. *Ej-piwi* の遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列を元に作成した多重配列

ClastralW を用いて計算を行い、遺伝子解析ソフトウェアGenetics を用いて作図した。比較に用いた配列は、材料と方法—を参照。一番上にヤマトヒメミズの *Ej-piwi* を示す。保存されたアミノ酸配列を黒ぬり、*Piwi* ファミリー遺伝子に特徴的な *Piwi box* を赤下線で示した。**B. 系統樹**、赤下線の *Piwi box* 配列を用いて系統樹を作成した。ClastralW を用いて計算を行い、Tree viewer で作図した。*Piwi* サブファミリーと Argonaute サブファミリーをそれぞれ点線で囲んで示している。ヒト *Hiwi* (AAC97371)、マウス *Miwi* (NP_067286)、ゼブラフィッシュ *Ziwi* (NP_899181)、ショウジョウバエ *Piwi* (AAF53043)、ショウジョウバエ *Aubergine* (CAA64320)、ウニ *Seawi* (AAG42533)、クラゲ *Cniwi* (AY493987)、マウス *eIF2C* (NP_700452)、ショウジョウバエ *Ago1* (NP523734)、シロイヌナズナ *Ago1* (NP_849784)

3-2. *Ej-piwi* 遺伝子は生殖細胞に発現する

最初に *Ej-piwi* が他の動物で観察されるのと同様に、生殖細胞で発現するのか否かを検証するために、whole mount *in situ* hybridization 法を用いて性成熟個体での発現パターンを観察した。この結果、アンチ・センスプローブにおいて生殖器官が存在している頭部 7・8 体節で強い染色を確認した (図 4. A)。ちなみにセンス・プローブで全く染色が見られないことから上記の染色が *Ej-piwi* のシグナルであると判断した (図 4. A)。ここで *Ej-piwi* を発現している組織を詳細に特定するため、切片 *in situ* hybridization を行った (図 4. B)。発現パターンを記述するのに際して、まず他種のみミズの解剖学的な記載を用いて組織の説明を行う^{43,44}。基本的に例外なく全てののみミズ種で生殖組織は共通する。精巣に存在する spermatogonia (精原細胞) は、貯精嚢に放出される^{43,44}。これにより、貯精嚢内は雄の生殖細胞で満たされた状態になっている (図 4. B)。貯精嚢に放出された spermatogonia は細胞質連結を保ったまま核分裂をして、spermatogonia morula という表層に核を持った多核の毬状の細胞を形成する^{43,44}。この後にも数回の核分裂を繰り返して、最終的にこれらの核が全て精子へと分化してゆく^{43,44}。これら spermatogonia morula が他の体細胞には見られない非常に特徴的な形態を示すことから、雄の生殖細胞は容易に判別ができる (図 4. C)。一方、雌の生殖細胞は卵巣から ovisac と呼ばれる卵を蓄積する袋に放出されのち、ovisac 内で卵へと成熟してゆく^{43,44}。他の動物種と同様、卵は雄の生殖細胞より巨大であることから容易に判別できる。切片 *in situ* hybridization の結果、頭部 7 体節の発現は貯精嚢領域に観られることが明らかになった (図 4. B)。貯精嚢内が全体的に染まっており、かつ spermatogonia morula の細胞質 (Cytophore) に発現が観られることから、*Ej-piwi* が雄の生殖細胞で発現することが明らかとなった (図 4. C)。また、雌の生殖器官が存在する 8 体節において *Ej-piwi* は卵細胞に発現する。この発現は成熟した卵ではほとんど見えなくなる (図 4. B)。ちなみに切片 *in situ* hybridization、成熟した精子の輸送に関わる sperm funnel、sperm duct そしてペニスなど他の生殖器官 (体細胞系) については *Ej-piwi* 発現は観察されなかった。以上の結果から、他の動物と同様にのみミズにおいても *piwi* 遺伝子が生殖細胞に発現することが明らかとなった。

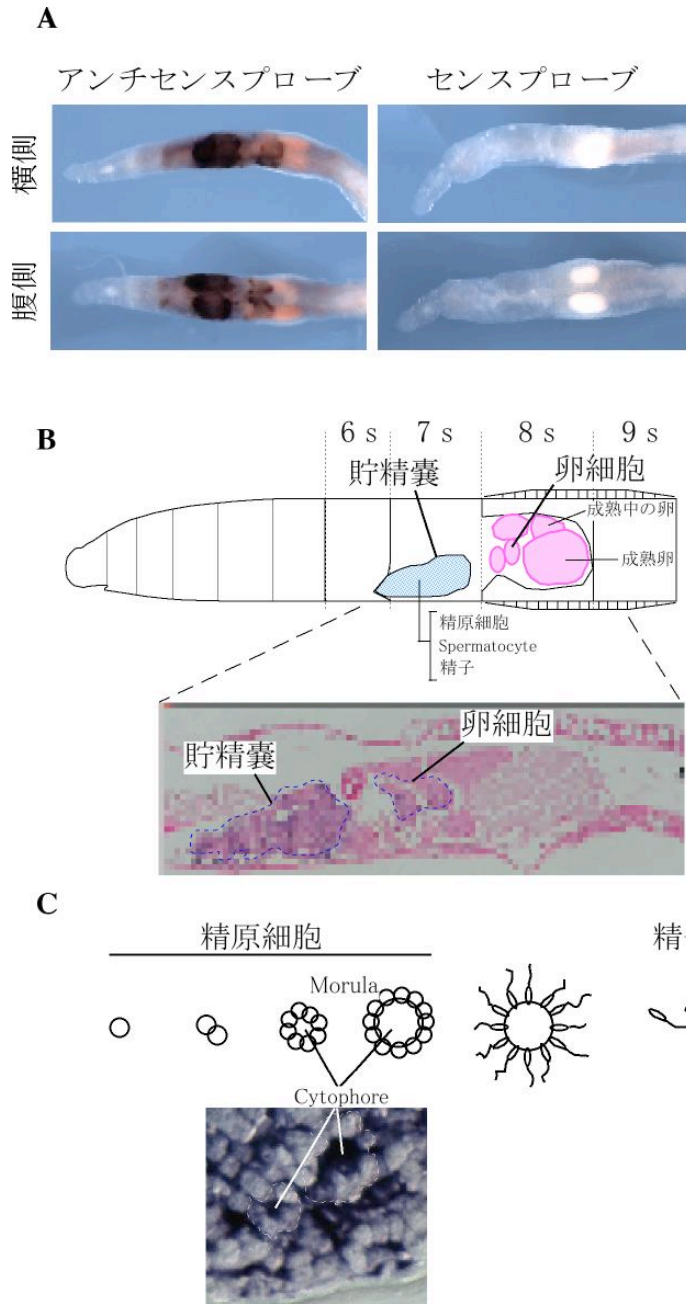


図 4. *Ej-piwi* 遺伝子は雄・雌の生殖細胞に発現する

A. 性成熟個体での *piwi* 遺伝子発現 (whole mount in situ hybridization)

図の左パネルに *Ej-piwi* アンチセンスプローブ、右パネルにセンスプローブを用いた whole mount in situ hybridization の結果を示す。アンチセンスプローブ特異的に、頭部 7・8 体節付近でシグナルが見られる。腹側からの写真 (右下のパネル) では、頭部 7・8 体節でそれぞれ左右対称に 1 対ずつシグナルが認められる。

B. 性成熟個体での *piwi* 遺伝子発現 (切片 in situ hybridization)

図上側) ヤマトヒメミズ性成熟個体の解剖図を簡略化して示す。青色で雄の生殖細胞を示した。貯精嚢は雄の生殖細胞を貯める袋であり、この中には精原細胞、spermatocyte そして精子といった様々な分化段階の生殖細胞が混在している。全てのミズは雌雄同体である。ピンク色で雌の生殖細胞 (卵細胞) を示した。卵細胞は ovisac と呼ばれる袋内で成熟する。成熟に従い卵は大きさを増してゆく。この図では割愛したが、これらの組織の周囲に成熟した精子を運ぶ管やペニスなどが存在している。

図下側写真) *Ej-piwi* 遺伝子の発現領域を青色点線で囲んだ。*Ej-piwi* 遺伝子は貯精嚢内 (雄の生殖細胞) と卵細胞に発現している。

C. 貯精嚢内での *piwi* 遺伝子発現 (切片 in situ hybridization)

上図の模式図に示すように、ミズの精原細胞は数回の細胞分裂を経ると、細胞質連結を持ったまま Morula と呼ばれる特徴的な多核の細胞になる。この時の細胞質を cytophore と呼ぶ。後に Morula の核は、それぞれ精子へと分化してゆく。下図の写真の点線枠内に morula を示す。*Ej-piwi* 遺伝子は cytophore つまり雄の生殖細胞に発現する。

3-3. 無性生殖個体の頭部 7・8 体節には生殖細胞前駆体が存在する

ここで、冒頭に述べた無性生殖個体の頭部 7・8 体節が持つ生殖器官形成能とは何かという問題にアプローチした。図 5 の無性生殖個体を観て頂くと分かる通り、無性生殖個体の頭部 7・8 体節の腹側にそれぞれ *Ej-piwi* の発現が観察される（これらの発現はそれぞれ 7・8 体節において左右対称に 1 ペア一ずつ存在するケースが多い）。これ以降、本論文では *Ej-piwi* を発現する細胞を *Piwi* 発現細胞と呼ばせて頂く。また無性生殖個体の切片 *in situ hybridization* の結果から、これらの *Piwi* 発現細胞が腹側の隔壁後方に張り付くように存在する細胞群であることを確認した（図 5、無性個体の右写真）。通常有性生殖を行っている、言い換えると常に生殖器官を持っている種類のみみずでは、どの種類についても精巣と卵巣（生殖細胞）が腹側の隔壁後方に張り付いて存在することが明らかとなっている^{43,44}。また、*Ej-piwi* の発現が生殖細胞に見られるという結果を合わせて考えると、これらの細胞が生殖系列の細胞であることが推測される。そこで次に、これらの *Piwi* 発現細胞が有性化と関連した細胞なのかを検証するために、実験的に有性化を誘導したのちに頭部 7・8 体節での *Piwi* 発現がどのように変化するかを調べた。その結果、有性化誘導から 5 日目になると、頭部 7・8 体節で *Ej-piwi* の発現がじょじょに広がり始め、6 日目、7 日目と発現が拡張してゆく（図 5、有性化誘導後）。これらの発現をさらに追って行くと、先ほど *in situ hybridization* で示した切片性成熟個体の精巣（貯精嚢）と卵での発現に辿り着く（図 5、有性化誘導後）。また、切片 *in situ hybridization* の結果から、無性生殖個体で見られた隔壁に張り付いた *Piwi* 発現細胞は有性化を誘導後に、隔壁に張り付いたまま細胞数を増してゆくことがわかる（図 5、右列の写真）。この後も細胞数が増え結果的に *Ej-piwi* の発現領域が広がる（図 5、右列の写真）。そして、有性化誘導から 7 日目になると、核（白く染色が抜けた部分）がいくらか塊って見えるようになる（図 5、右列の写真 7 日目）。これは核分裂が起き、初期の *spermatogonia morula* が形成されたためだと考えられる。9 日目になると、さらに核分裂が進み大きく丸い *spermatogonia morula* が明瞭に観察されるようになる（図 5、右列の写真 9 日目）。上記の発現パターンの推移そして形態学的な結果をまとめると、無性生殖個体の頭部 7・8 体節にみられる *Piwi* 発現細胞は生殖巣および生殖細胞の原基だと考えられる。これより無性生殖個体の頭部 7・8 体節には有性化以前から生殖細胞およびその前駆体が存在しているという結論に至った。これらの *Piwi* 発現細胞の分化段階は今のところ不明であるが、私はこれらの細胞を生殖細胞前駆体 (*Germ cell precursors*) と命名した。無性生殖メインで増殖するみみずが、無性生殖中も予定生殖巣領域に生殖細胞を備えているということが初めて分子マーカーを用いて示された。

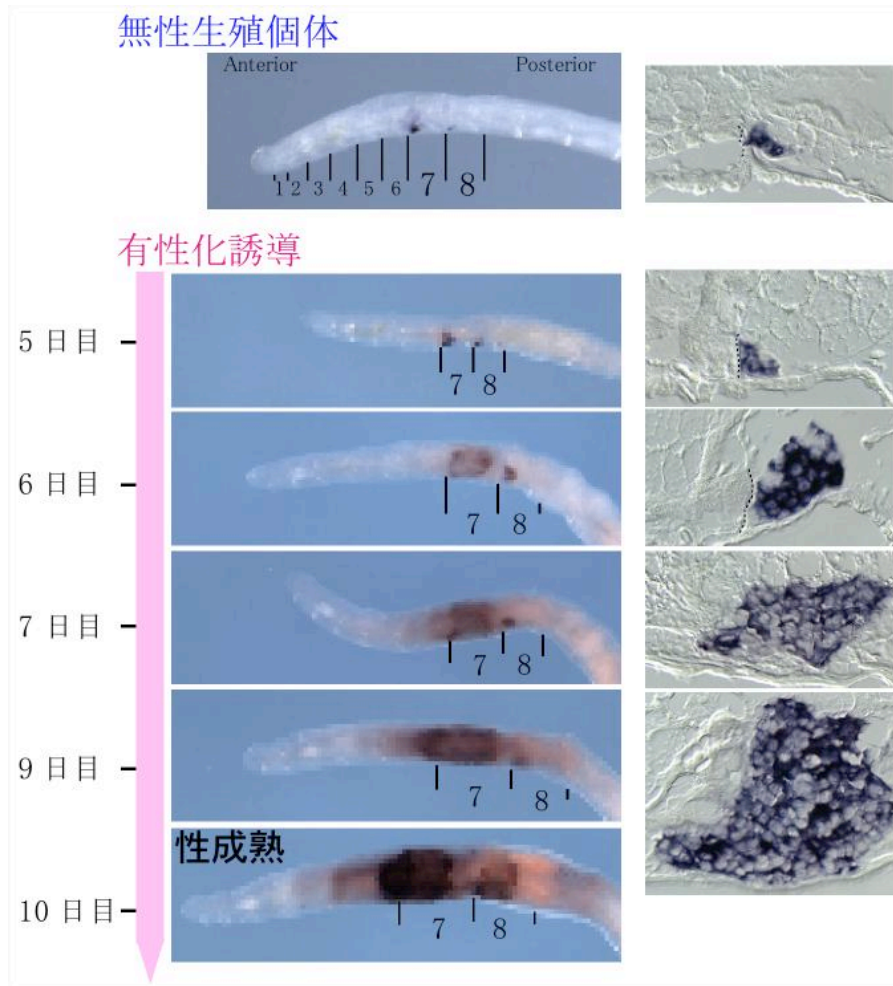


図 5. 無性生殖個体は頭部 7・8 体節に生殖細胞前駆体を持つ

左列の写真に有性化過程における頭部 7・8 体節での *Ej-piwi* 遺伝子の発現変化を示した。右列の写真には、右の写真と対応する時期の頭部 7 体節目の *Ej-piwi* 遺伝子発現を切片 *in situ* hybridization の結果により示した。左列の最上段に示す様に、無性生殖個体において頭部 7・8 体節に *Piwi* 発現細胞が存在する。また右隣りの写真に示すように、*Piwi* 発現細胞は隔壁（点線）に張り付いて存在する。有性化誘導後の写真に示すとおり、頭部 7・8 体節における *Ej-piwi* 遺伝子の発現は 5 日目から 10 日目と有性化が進むにつれて発現を広げる。切片で観察される通り、これらの細胞塊は有性化が進むにつれて隔壁周辺で細胞数を増してゆく。

3-4. 無性生殖個体の体幹部の *Piwi* 発現細胞について

ここまで無性生殖個体の頭部での発現パターンを示してきたが、*Piwi* 発現細胞は頭部の生殖細胞前駆体以外にも体幹部で認められる。図 6. A に示す通り、*Piwi* 発現細胞は体幹部の腹側に比較的ランダムに存在している（矢頭）。これらの *Piwi* 発現細胞は頭部体節にも多少存在し、体幹部には全体的に分布している。生殖細胞前駆体が数細胞のクラスターとして存在しているのに対して、体幹部の *Piwi* 発現細胞は基本的に単一の細胞として存在している。また生殖細胞前駆体は球形の細胞で腹側神経索に隣接して両脇に存在している（図 6. B）。これに対して体幹部の *Piwi* 発現細胞は細長い細胞であり腹側神経索の背側にへばりつくように存在している（図 6. B、矢頭）。両者は形態的そして位置的にみても別種の細胞だと考えられる。さらに、体幹部の *Piwi* 発現細胞は再生中の切断面付近で増殖活性を持つ傾向がある（図 8. C、結果 3-7 で別途記述）。この事実と *piwi* という分子の性質から、これら体幹部の *Piwi* 発現細胞が生殖系列の細胞もしくは幹細胞であると推測できる。

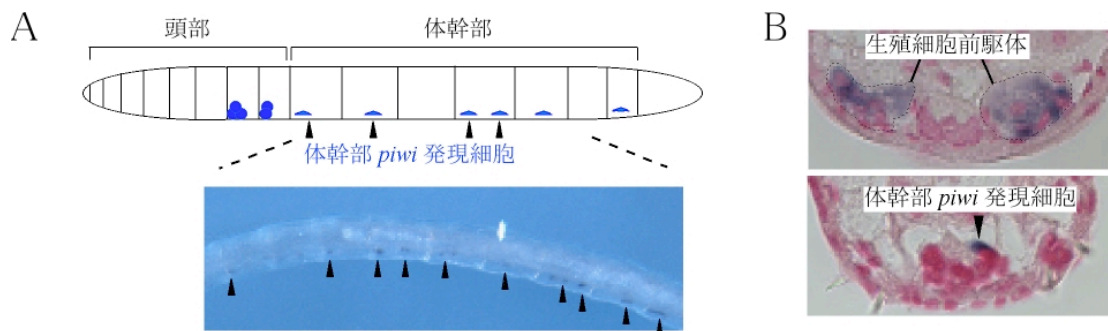


図 6. 体幹部の *Piwi* 発現細胞

A. 体幹部に存在する *Piwi* 発現細胞

ミミズの模式図中に *Piwi* 発現細胞（青色）を示した。頭部領域に存在する生殖細胞前駆体に加えて、体幹部の腹側にも *Piwi* 発現細胞（青色）が存在する。前後軸に沿った位置取りは比較的ランダムである。下の写真の矢印で体幹部 *Piwi* 発現細胞を示した。

B. 体幹部 *Piwi* 発現細胞と生殖細胞前駆体の違い

生殖細胞前駆体と体幹部 *Piwi* 発現細胞の横断切片について *in situ* hybridization を行った結果を示した。上側の写真に生殖細胞前駆体（点線囲い内）を、下段に体幹部 *Piwi* 発現細胞（黒矢頭）を掲載した。生殖細胞前駆体は腹側神経索の両脇に細胞塊を作って存在している。これに対して、体幹部 *Piwi* 発現細胞は腹側神経索上に 1 細胞で存在している。

3-5. 頭部 7・8 体節に存在する生殖細胞前駆体の再生

ここで体幹部の *Piwi* 発現細胞が再生にどう関与するのかを調べるため、頭部再生過程を通して *Ej-piwi* の発現パターンを観察した (図 7)。ハサミ印と赤矢頭は切断部位を示している (図 7)。頭部の再生組織を赤矢頭から左側に、元からあった組織を右側に示している (図 7)。切断後 0 日目にすぐさま切断面の傷が閉じる。この時点ではまだ、体幹部の *Piwi* 発現細胞に発現変化は見られない (図 7、0 日目)。再生 1 日目、再生芽が形成される (図 7、1 日目)。この時点までに、再生芽に多数の細胞が供給されるがいまだ *Piwi* 発現細胞に発現変化は見られない。再生 2 日目、再生芽は前方に伸長しかなり大きくなる (図 7、2 日目)。この時期になって、初めて切断面付近の元からあった組織に *Piwi* 発現細胞が出現するが、再生組織内に *Piwi* 発現細胞が存在することはごく稀である (図 7、2 日目)。再生 3 日目になると、2 日目にみられるような *Piwi* 発現細胞が元からあった組織から消失し、再生組織内に *Piwi* 発現細胞が見られるようになる (図 7、3 日目)。これら再生組織内の *Piwi* 発現細胞は、再生 4 日目になると再生組織のより前方まで分布するようになる (図 7、4 日目)。体節が形成され始めるのはこの時期である。そして、再生が終了する 5 日目になると、*Piwi* 発現細胞は頭部 7・8 体節でそれぞれ左右対称に 1 ペア一ずつのクラスターとして限局するようになる (図 7、5 日目)。この局在パターンからも、これら頭部 7・8 体節の *Piwi* 発現細胞が生殖細胞前駆体であると考えられる。以上に示した発現パターンの推移から推測すると、体幹部で見られた *Piwi* 発現細胞が増殖後に再生組織に侵入したのち、新たに形成された頭部 7・8 体節まで移動したという可能性が考えられる。しかしながら、序論でも述べたようにミミズの再生に脱分化が関与するとの報告もあることから、本当に上記の可能性が正しいのか、それとも移動ではなく脱分化のイベントの結果としてあたかも移動と捕らえがちな発現パターンが得られて来たのか？この点に最大の注意を払うべきであると考えている⁷。これを留意した上での、現在の私の見解を先に述べると、これらの発現パターンはやはり *Piwi* 発現細胞が移動した結果を反映していると考えている。これを示唆する結果を次に示す。

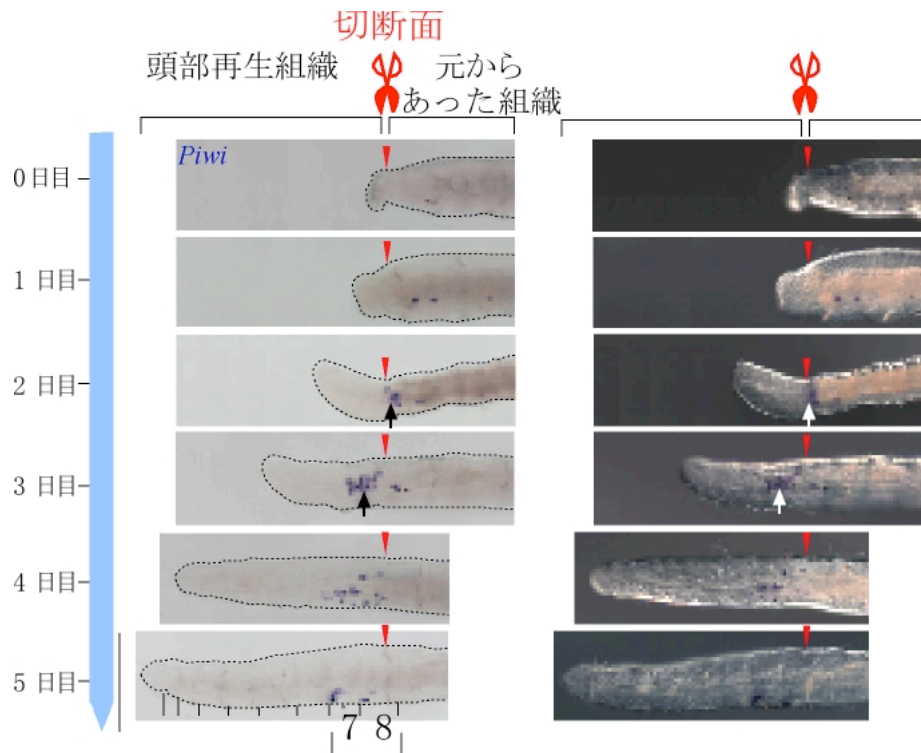


図 7. 頭部再生における *Ej-piwi* 遺伝子の発現変化

赤ハサミ印および赤矢頭で切断部位を、これより左側に頭部再生組織を示した。切断直後からの時間軸（青矢印）に沿って、頭部再生中の *Ej-piwi* 遺伝子の発現変化を写真に示した。左列の写真は、*Ej-piwi* の発現が見やすいように明視野で撮影したもの。ミミズの輪郭は点線でトレースしてある。ミミズの形状は右列の微分干渉で撮影した写真で見ていただきたい。切断後 0 日目と 1 日目) 腹側に体幹部 *Piwi* 発現細胞が見られる。切断後 2 日目) 切断面付近に *Piwi* 発現細胞が出現する。切断後 3 日目) *Piwi* 発現細胞が再生組織内に見られるようになる。2 日目に *Piwi* 発現細胞があった領域に *Ej-piwi* の発現は見られない。切断後 4 日目) *Piwi* 発現細胞は 3 日目よりも再生組織前方で見られる。切断後 5 日目) 頭部 7・8 体節に *Piwi* 発現細胞が限局する。

3-6. 生殖細胞前駆体は体幹部の *Piwi* 発現細胞から再生する

上述の発現パターンの信憑性を問うために、まず再生ステージごとに複数の個体を持つ *piwi* 発現細胞について分布図を作成した (図 8. A、左図)。分布図の作成にあたって、それぞれのステージについて解析個体中からランダムに 9 個体を選び、*Piwi* 発現細胞 (青丸) を模式図 (背側から見たもの) にプロットした。また、左隣には全解析個体から割り出した平均値、つまり 1 個体あたりがこの領域に持つ *Piwi* 発現細胞をグラフ化した (図 8. A、右のグラフ)。まずは分布図の結果から、上述したのと同様のパターンが得られたことより上述の発現パターンに個体間でのばらつきがほとんど無いことを視覚的に確認した (図

8. A、左図)。一方で、複数個体の解析（分布図とグラフ）から初めて得られた情報については以下に記述する。分布図とグラフに示す通り、再生1日目から2日目にかけて1体節目の腹側神経索上（黄色）で *Piwi* 発現細胞数が2倍強に増加する（図8. A、左図と右のグラフ）。2日目で見られた *Piwi* 発現細胞の分布が3日目になると再生組織方向に若干シフトする（図8. A、左図）。この時、1体節目の前方にはまだ *Piwi* 発現細胞が存在しているが、4日目になると、1体節目の *Piwi* 発現細胞は見られなくなる（図8. A、左、4日目）。そして、またまだ分布はまばらではあるが *Piwi* 発現細胞が頭部7・8体節に集まる傾向が示された（図8. A、左、4日目）。ここで示された発現のじょじょなる推移は、*Piwi* 発現細胞が切断面付近の組織から再生芽に移動する可能性を示唆する。さらにグラフに示す通り、発現変化が再生芽に動く2日目から4日目の間、*Piwi* 発現細胞数にはほとんど変化がみられない（図8. A、右、4日目）。ここで確率的な有意差の有無を検証するために、1と2日目、2と3日目、3と4日目、2と4日目の *Piwi* 発現細胞数について危険度5%のステューデント検定を行った（*F*検定によりこれら全ての集団が等分散であることは確認している）。この検定において、*p*値が0.05以上のとき2つの集団に有意差がないとみなされる。結果、1と2日目については *p*値=0.000027でグラフの見た目通り有意差が認められた。一方、2と3日目（*p*=0.86）、3と4日目（*p*=0.68）、2と4日目（*p*=0.78）に確率的な有意差が認められない。以上の結果から1日目から2日目にかけて細胞数が増加して、2日目から4日目の発現が推移するあいだは *Piwi* 発現細胞数が変化しないことが示された。これらの結果を統合すると、今回得られた *piwi* の発現変化から、「2日目；1体節目で *piwi* の発現が ON→3日目；1体節目で *piwi* の発現が OFF→再生芽にあった別の細胞で *piwi* の発現が ONになる→4日目；頭部7・8体節で新たに *piwi* が発現し始める」ということを反映した結果であるとは考えづらく、もう一つの可能性「2日目；腹側神経索で増えた *Piwi* 発現細胞→3日目；再生芽内へ進入→4日目；頭部7・8体節まで移動して生殖細胞前駆体を作る」と考えることが合理的である。この結果から、体幹部にある *Piwi* 発現細胞が生殖細胞前駆体を作ることが強く示唆された。言い換えると、体幹部にある *Piwi* 発現細胞が生殖細胞の起源であると考えられる。

3-7.切断面に近い腹側神経索上の *Piwi* 発現細胞が増殖をする

これまで、1体節目と再生組織のみに着目して *Piwi* 発現細胞数の変化を観てきた。ここでは、より後方の体節について詳しく調べるために、再生組織と1体節目から4体節目に分けて、それぞれに含まれる *Piwi* 発現細胞をグラフ化した (図 8. B)。横軸にはカウントした領域 (再生芽、1-4体節) を、縦軸にはその領域に含まれる *Piwi* 発現細胞数を示している (図 8. B)。まず、1体節目での *Piwi* 発現細胞数に着目する。再生1日目から2日目の間に、*Piwi*細胞数が 2.11 から 5.44 と2倍強まで増加する ($p=0.0043$ 有意差あり)。そして2日目から3日目には 5.44 から 1.15 まで減少する ($p=0.0000015$ 有意差あり)。この1体節目での *Piwi* 発現細胞の減少に伴って、逆に再生芽では 0.166 (2日目) から 4.69 (3日目) と *Piwi* 発現細胞数の増加が見られる。1体節目で 4.29 減少し、再生芽で減少したのと同様数の 4.52 増加する。この結果から、図 8. A の分布図で視覚的に見られたのと同様に統計的にも、1体節目にある *Piwi* 発現細胞が3日目に再生芽に移動するということが示唆された (図 8. A、左図と B)。これに加えて、1体節目以外の体節では *Piwi* 発現細胞数にほとんど変化がないことが新たに分かってきた。1体節目で *Piwi* 発現細胞数の変動が起こる再生1日目と2日目の間、2体節目では *Piwi* 発現細胞数の変化がみられない。また各個体の2体節目から4体節目が持つ *Piwi* 発現細胞もほぼ同数であり、さらに各体節に含まれる *Piwi* 発現細胞数を異なる再生ステージ間を比較しても数はほとんど変動しない。これらの結果を以下にまとめる。

1、切断面に最も近い体節の *Piwi* 発現細胞が再生に応答して増加する。

図 8. B で得た結果に加えて図 8. C にも示すように、実際、再生 1.5 日目の切断面付近で *Piwi* 発現細胞は DNA 合成期のマーカーである PCNA 陽性になることから、切断面付近の *Piwi* 発現細胞が分裂に備えていることが確認された。

2、2日目から3日目の1体節目で減少する *Piwi* 発現細胞数と3日目の再生芽に出現する *Piwi* 発現細胞数がほぼ同数である。この結果は、1体節目で増加した *Piwi* 発現細胞が再生芽に進入することを強く示唆する。

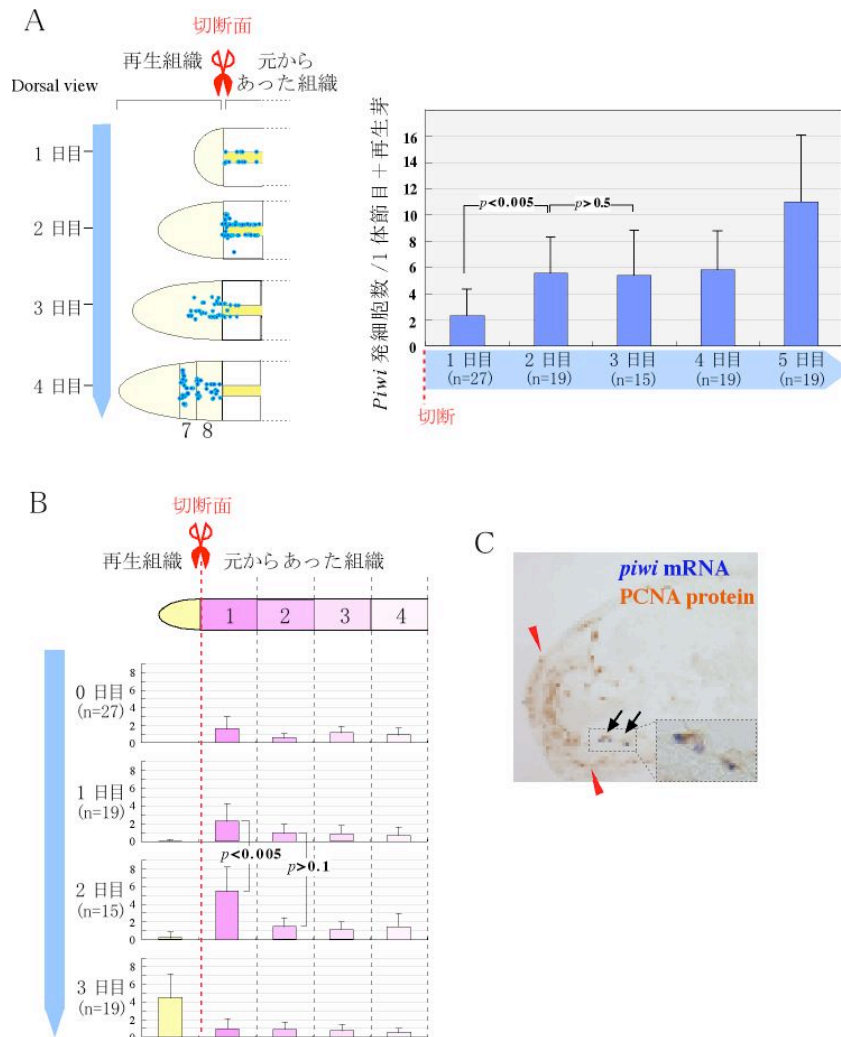


図 8. 生殖細胞前駆体は体幹部の *Piwi* 発現細胞から再生される

A. 分布変化中に *Piwi* 発現細胞数は変動しない

左図) 再生の各ステージについて作成した *Piwi* 発現細胞である。それぞれ 9 個体分の *Piwi* 発現細胞を青丸として、ミミズを背側からみた模式図にプロットしてある。模式図内の黄色帯は腹側神経索を示す。*Piwi* 発現細胞は 2 日目までに腹側神経索周辺で数を増す。3 日目には赤ハサミ印で示した切断面を跨いで再生組織内にも分布するようになる。4 日目にはなると、頭部 7・8 体節に集まって分布する。右グラフ) 解析したそれぞれのステージの個体について、上記の領域が含む *Piwi* 発現細胞数をカウントしグラフ化した。縦軸は再生組織と 1 体節目に含まれる *Piwi* 発現細胞数を、横軸は切断後の日数を示す。*Piwi* 発現細胞数はそれぞれ 1 日目 (2.3±2.02 個)、2 日目 (5.58±2.73 個)、3 日目 (5.4±3.39 個)、4 日目 (5.84±2.95 個)、5 日目 (11±5.09 個)。スチューデント検定の結果、1 日目と 2 日目 ; $p=0.000026$ 、2 日目と 3 日目 ; $p=0.86$ 、3 日目と 4 日目 ; $p=0.68$ であった。

B. 切断部位近傍の *Piwi* 発現細胞数が増殖し移動する

再生組織と切断面から 4 体節後方までに含まれる *Piwi* 発現細胞数をグラフで示した。横軸はグラフ上側の模式図として示した。黄色が再生組織、赤ハサミ印と赤点線が切断面、ピンク色内の数字 (1-4) は切断面から数えた体節数を示す。この領域についてカウントした *Piwi* 発現細胞数を、再生ステージごとに合計 4 つのグラフとして下に示してある。各グラフ内の縦軸は、1 個体のその領域に含まれる *Piwi* 発現細胞数を示す。ステージ間の 2 体節目の比較結果についてのスチューデント検定結果は以下の通り。1 日目と 2 日目 ; $p=0.11$ 、2 日目と 3 日目 ; $p=0.10$ 。

C. 切断面近傍の *Piwi* 発現細胞は増殖細胞マーカーを発現する

再生 1.5 日目のミミズについて、*Piwi* 遺伝子の切片 *in situ* hybridization と PCNA (DNA 合成期のマーカー) の免疫組織染色を行った結果。青い染色が *Piwi* mRNA、オレンジ色が PCNA タンパク質を示す。赤矢頭が切断部位を示す。黒矢印の部分に、*Piwi* 発現細胞が存在する。この領域の拡大図を右下に示した。*Piwi* 発現細胞が PCNA 陽性であることから、これらの細胞が分裂に備えていることが分かる。

3-8. 体幹部の *Piwi* 発現細胞とは？

ー*Piwi* 発現細胞はネオブラストとは別種の細胞であるー

ここまでの結果から、無性生殖個体の頭部 7・8 体節が持つ生殖細胞前駆体が体幹部の *Piwi* 発現細胞から出来てくることが強く示唆された。それでは、これらの *Piwi* 発現細胞が現在までに特定されているネオブラスト (幹細胞様細胞) なのだろうか、ということに関して検証を行った。序論に記した通り、再生能力の強いミミズにはネオブラスト (幹細胞様細胞) が存在することが知られている^{16,25}。ミミズの腹側の隔壁基部に細胞質に比べて核と小胞の大きな大型の細胞があり、これらの細胞で盛んに転写が起こる、再生中に盛んに分裂をするなどのことから、これらが再生に関与する幹細胞 (ネオブラスト) と呼ばれるに至った^{16,25}。他に幹細胞様細胞つまり別種のネオブラストが存在するか否か現時点で定かではないが、便宜上、本論文ではこれらの細胞のみをネオブラストと呼ぶことにする。これらネオブラストはヒメミミズ属でも Christensen, B により観察されており、同様に腹側の隔壁基部に存在している²⁶。またヤマトヒメミミズにおいてもやはりネオブラストが隔壁基部に存在している^{13,14}。体が切断されるとこれらの細胞が BrdU を取り込むことが知られており (北大、杉尾ら未発表)、次章 3-9 でも紹介するが、これら BrdU ラベルされたネオブラスト由来の細胞が切断面に移動して再生芽を作ることも示された (図 10)。これらの観察結果からも、ネオブラストが再生に寄与することは明白である。ここで、私は体幹部の *Piwi* 発現細胞 (生殖細胞の起源) がネオブラスト自身なのかということについて検証を進めた。体幹部の *Piwi* 発現細胞はネオブラストと同様にミミズの腹側に存在している (図 6. A)。しかしながら、ネオブラストは頭部 8 体節以降の各体節に 1 対ずつ規則正しく配置された細胞であるのに対して、私が見いだした体幹部の *Piwi* 発現細胞はランダムに分布する (図 9. A)。この事実から *Piwi* 発現細胞とネオブラストが同一細胞ではない可能性が浮上した。そこで、本当に *Piwi* 発現細胞とネオブラストが別種の細胞であるのかを様々な角度から検証した。まず図 9. B に *Piwi* 発現細胞とネオブラストの位置関係を腹側から観察した結果を示す。

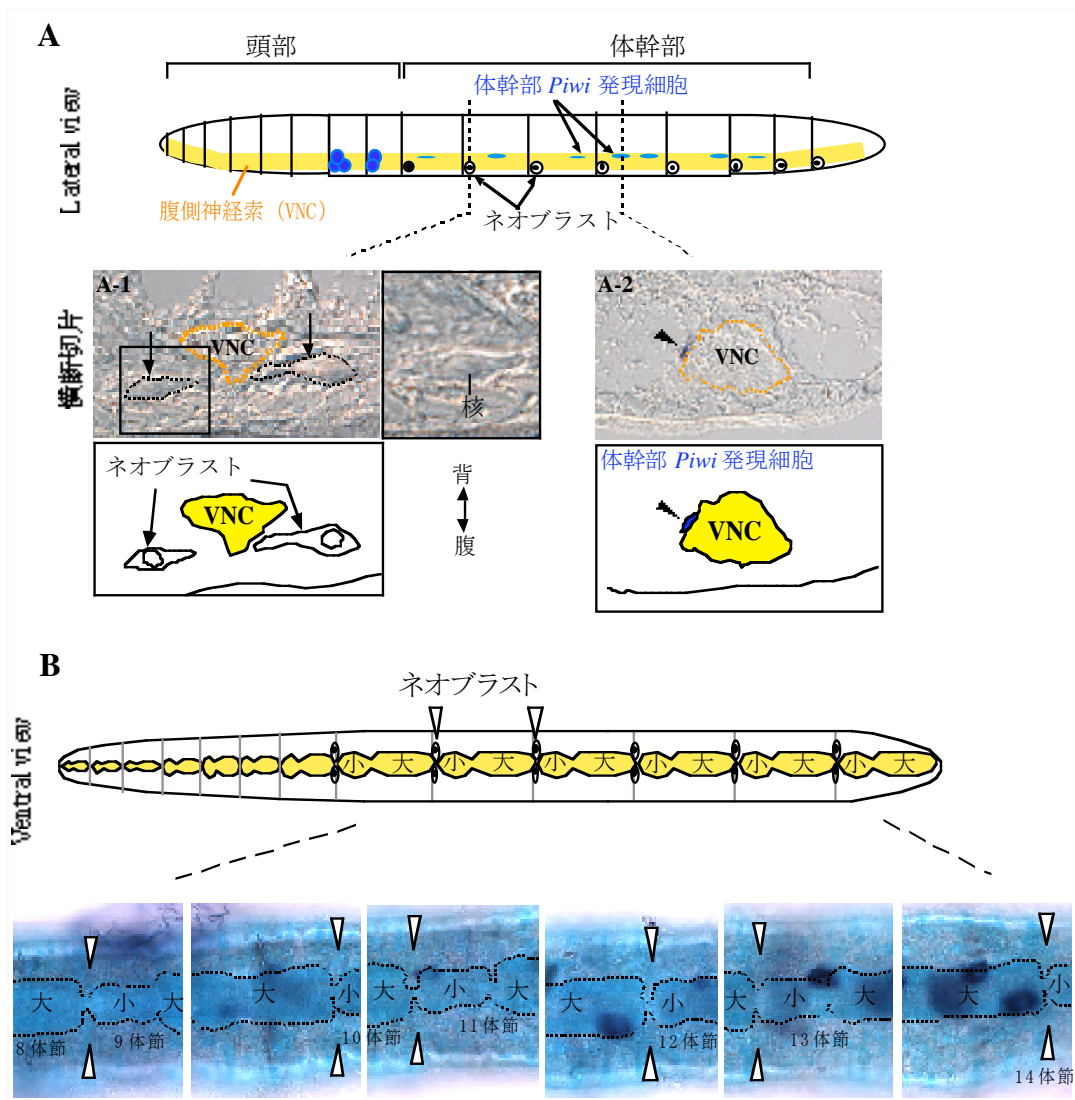


図 9. *Piwi* 発現細胞とネオブラストは別種の細胞

A. 上側の模式図に、体幹部 *Piwi* 発現細胞とネオブラストを示した。ネオブラストは各体節の隔壁基部に規則正しく 1 対ずつ存在する。*Piwi* 発現細胞は腹側神経索（黄色帯）上にランダムに存在する。図中点線の部位、A-1 と A-2 の横断切片を下の写真に示した。A-1) 黒矢印が指すようにネオブラストが腹側神経索（VNC, 黄色点線内）の両側に見える。ネオブラストは他の細胞に比べて大型で特徴的な形態の細胞である。A-2) *Piwi* 発現細胞（矢頭）は腹側神経索の背側に張り付いて存在している。

B. 模式図はミミズを腹側から見たもので、腹側神経索のパターンとネオブラストの位置関係を示している。腹側神経索（黄色）の 1 体節につき小さいユニットと大きなユニットから成る（小・大）。白矢頭で示すように、ネオブラストの存在位置は小・大のパターンを指標に知ることができる。下写真に、腹側神経索のパターンを指標にネオブラストと *Piwi* 発現細胞示した。写真のサンプルは腹側神経索を見易くするためメチルグリーン染色を施している。ネオブラストの位置は白矢頭で指した。*Piwi* 発現細胞（濃紺色）はネオブラストと異なる場所に存在している。

腹側からの観察の場合、組織切片だと微妙な存在位置のズレから観察が、困難なため whole

mount で観察を行った。難点として、Whole mount レベルの観察では隔壁とネオブラストが見付けにくい。ここでネオブラストの位置を知る指標として腹側神経索の構造を用いた。腹側神経索は明瞭な分節構造を持つ組織で、それぞれの体節に「小さなユニットと大きなユニット」から成る1セットの神経節がある(図 9. B の模式図)。隔壁とネオブラストは、この各セットの神経節の狭間に必ず存在する(図 9. B)。よって腹側神経索のパターンを指標に *Piwi* 発現細胞とネオブラストの位置関係を調べることができる(図 9. B の模式図)。再生していない個体を用いた結果を次に示す。写真にはネオブラストを欠いている頭部体節を削除し、9 体節目から尾部までを掲載、腹側神経索は観察しやすいようにメチルグリーンで核染色を施した(図 9. B 写真)。ネオブラストが存在する神経節の切れ目を矢頭で示している。写真に示すように各体節において、*Piwi* 発現細胞の存在位置はネオブラストが存在する場所とは明らかに前後軸方向に異なる(図 9. B 写真)。これより、*Piwi* 発現細胞とネオブラストが異なる細胞であることが示された。*Piwi* 発現細胞は左右対称性に存在するわけではなく、前後軸に対する存在位置においても比較的ランダムな分布を示す(図 9. B 写真)。11 体節目に見られるようにネオブラストに近い領域に見られることもあるが、この場合においても *Piwi* 発現細胞とネオブラストとは異なる細胞である。また必ずネオブラストの近くに存在するという傾向も見出せない。ただし、頭部よりも尾部近傍領域に *Piwi* 発現細胞が多く見られる傾向があるようである(4-7 で考察)。

2 つ目は、*Piwi* 発現細胞とネオブラストの位置関係を別の角度からみることと、ネオブラストに *Ej-piwi* が発現していないのか、これら 2 つを検証するために横断切片を作成して切片 *in situ* hybridization を行った(図 9. A)。組織切片での観察では、細胞の位置、そして、他に比べて大きな細胞であるという形態的な特徴をもってネオブラストを容易に特定できる。図 9, A-1 の横断切片で腹側神経索の両脇に左右対称に存在している細胞がネオブラストである。これらネオオブラストに *Ej-piwi* の発現は見られない。一方、*Piwi* 発現細胞は腹側神経索の背側に張り付くように存在している細胞で、ネオオブラストの様に左右対称に存在する細胞ではない(図 9, A-2)。また、横断切片で見た場合 *Piwi* 発現細胞はネオブラストに比べて小型の細胞である(図 9, A-1 と A-2 の比較)。これらのことから *Piwi* 発現細胞はネオブラストとは形態的に別種の細胞であることが示された。

3-9. 再生中の生殖細胞と体細胞の挙動は異なる

これまでの結果から体幹部の *Piwi* 発現細胞が形態的にネオブラスト自身でないことは明白である。ここで、さらにネオブラスト由来の細胞の挙動と *Piwi* 発現細胞の挙動の違

いからも両者の違いを検証した（図 10）。技術的に特異的な細胞ラベルができない中で、唯一ネオブラストだけは他の細胞と染め分けることが可能である。共同研究者である北海道大学の杉尾むつ美らによって、ネオブラストを BrdU でパルスラベルする方法が確立された（未発表）。杉尾むつ美らはこの手法でラベルしたときに染色される細胞を詳細に調べており、ミミズを切断後 12 時間から 24 時間までの間 BrdU ラベルした場合、ネオブラストが優位に BrdU ラベルされることを確かめている（未発表）。この手法に従って BrdU パルスラベルを行った結果、ネオブラストが BrdU でラベルされることを確認した（図 10）。一方 BrdU ラベルを終える再生 24 時間の時点で頭部再生芽が既に形成されているため、再生芽内にはおそらくネオブラスト由来であろう BrdU 陽性細胞で満たされている。このままでは、既に再生芽に進入してしまっている BrdU シグナルが邪魔になり、ネオブラスト由来の再生中の挙動を追跡できない。これに加えて切断時からネオブラスト由来の細胞の挙動を調べるため、既にラベルの入った頭部再生芽を切除し、この時点タイムゼロとして新たに起こる頭部再生においてネオブラスト由来細胞の挙動を調べた（図 10）。この時点で BrdU ラベルはネオブラストとネオブラスト由来と考えられる細胞のみに見られる。図 10 の 0 日目の白矢印に示す通り、再切断直後は BrdU でラベルされたネオブラストが腹側に見られるが、切断面付近には全く BrdU 陽性細胞が存在しない。ちなみに背側にわずかながら見られる BrdU 陽性細胞はネオブラスト由来の細胞（スモールネオブラスト）と考えられている（北大、杉尾ら未発表）。切断から 0.5 日経つと、既に BrdU 陽性細胞が切断面付近に多数出現して再生芽を形成していることが確認できる（図 10）。これより、ネオブラスト由来の細胞が切断から 0.5 日目という早い時期に再生芽に移動することが示された（図 10）。一方、*Piwi* 発現細胞は切断から 1 日目までは全く変化せずに腹側神経索上に留まっている（図 7）。2 日目においても、*Piwi* 発現細胞は元からあった組織内で分裂こそするものの再生芽内に認められず、切断から 3 日経ってようやく再生芽内に出現する。*Piwi* 発現細胞は、ネオブラスト由来の細胞が再生芽に出現する時期より 2.5 日間も遅れて再生芽に出現する（図 11 と図 7 の比較）。以上の結果から、挙動の違いから観ても、*Piwi* 発現細胞はネオブラストおよびネオブラスト由来の細胞とも別種の細胞であると考えられる。

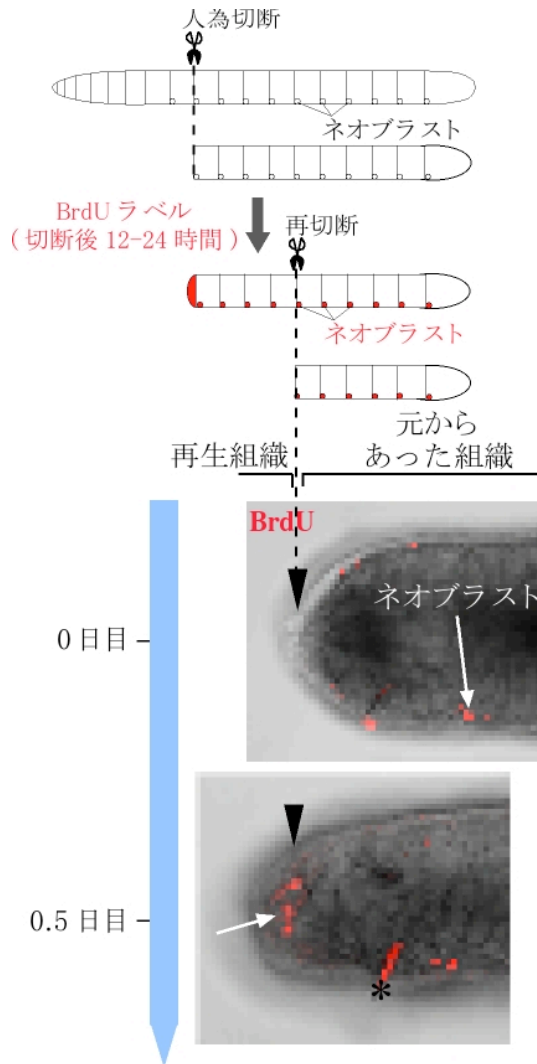
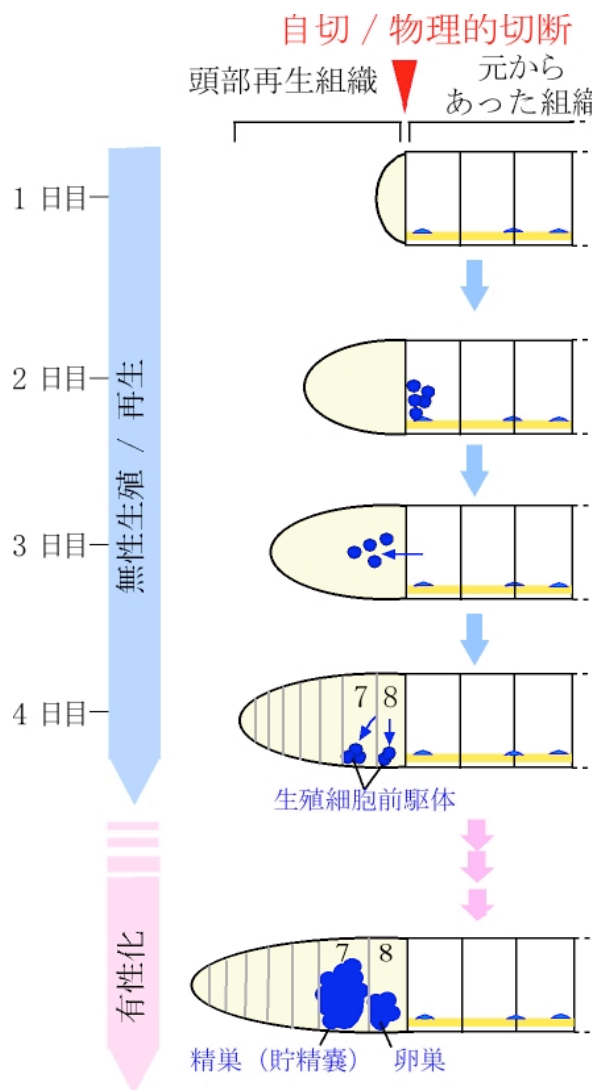


図 10. *Piwi* 発現細胞とネオブラストは挙動が異なる

BrdU でネオブラストをパルスラベルし、再生中のネオブラストの挙動を調べた。写真上側にラベル方法を示した。頭部を人為切断して再生を誘導する。切断から 12 時間後に BrdU 溶液に浸けて、12 時間ラベルをする。この時点で、ネオブラストが BrdU ラベルされる。後により後方で再切断し、新たに始まる再生中のネオブラストの挙動を調べた。0 日目) 再切断直後のミミズでは、ネオブラストが BrdU でラベルされている (赤く染色)。この時点では、黒矢印で示した切断面に BrdU 陽性細胞は見られない。0.5 日目) 白矢印で示す通り BrdU 陽性細胞は切断面付近に出現する。アスタリスク (*) は剛毛の自家蛍光である。

3-9. まとめ

本研究の結果から、ヤマトヒメミミズの生殖細胞再生のモデルを提唱する（図 11）。ヤマトヒメミミズは無性生殖に加えて有性生殖を行う。いつでも有性生殖にスイッチできるように、無性生殖個体の頭部 7・8 体節に生殖細胞前駆体を持っていることが示された。ヤマトヒメミミズは無性生殖時の自切によって、これら生殖細胞前駆体を日常的に失ってゆくわけだが、切断後にすぐさま生殖細胞前駆体を再生できるように体全体に生殖系列の幹細胞を分布させている（図 11、1 日目）。生殖細胞前駆体を失ったのち、体細胞系の幹細胞等の働きで再生芽（クリーム色）を作り上げる（図 11、1 日目）。ある程度、再生組織ができてくる時期になると、腹側神経索に控えていた生殖系列幹細胞（体幹部 *Piwi* 発現細胞）が切断面付近で増殖をする（図 11、2 日目）。これらの細胞はある時期になると再生組織内に侵入し予定生殖巣領域（頭部 7・8 体節）まで移動して（図 11、4 日目）、生殖細胞前駆体を形成する。このようにして再生された生殖細胞前駆体は有性化誘導により、成熟し雄と雌の生殖巣を形成する（図 11、有性化）。



現細胞）が切断面付近で増殖をする（図 11、2 日目）。これらの細胞はある時期になると再生組織内に侵入し予定生殖巣領域（頭部 7・8 体節）まで移動して（図 11、4 日目）、生殖細胞前駆体を形成する。このようにして再生された生殖細胞前駆体は有性化誘導により、成熟し雄と雌の生殖巣を形成する（図 11、有性化）。

図 11. 生殖細胞再生のモデル

自切もしくは物理的切断を受けた部位を赤矢頭で示した。生殖細胞前駆体を失って2日経つと腹側神経索上（黄色帯）の *Piwi* 発現細胞が増殖・移動して7・8 体節に生殖細胞前駆体を再生する。有性化が誘導されると（ピンク矢印）、生殖細胞前駆体が成熟して精巣（貯精囊）と卵巣を作る。

4、考察

4-1. 生殖細胞が再生する

序論で記述したように、ヤマトヒメミミズは体全体に生殖細胞を形成する能力を有している。これより、当初の問題提起においてミミズの生殖細胞形成と再生について2通りの可能性があった。1つ目は、有性化以前の頭部体節に既に生殖細胞が備わっておりいつでも有性化できる状態を整えているという可能性。2つ目は有性化されてから新規にどこからか頭部に生殖細胞が作り出されるという可能性。前者の場合、自切から体細胞組織の再生が完了するまでに頭部の生殖細胞が再生される必要がある。「もともと存在していた物が失われそれを再び作り上げることが再生である」という言葉の意味を念頭に置くと、後者の場合は有性化誘導後にその都度新規に生殖細胞が産み出されれば良いということで、再生という言葉は似つかわしくない。本研究により初めて、無性生殖をメインに増殖するミミズにおいて、有性生殖以前から頭部の生殖巣体節に生殖細胞前駆体が存在することが示された(図5)。ちなみに、これらと同じ形態の細胞はけして他の体節に見られることはない(図6)。まず解析の前提として他の動物と同様にヤマトヒメミミズ(性成熟個体)においても *Ej-piwi* 遺伝子が生殖細胞に発現することを図4で示したが、*Ej-piwi* 遺伝子が発現するならば生殖細胞であるという命題は成り立たない。その点を十分踏まえた上で、結果(3-2, 3-3)に示したように、*Ej-piwi* 遺伝子の発現、有性化過程での発現解析、そして他のミミズと比較したときの組織学的相同性などの証拠を元にして、頭部7・8体節に生殖細胞前駆体が存在すると結論付けた。これにより初めて頭部体細胞組織が再生し終わるまでに生殖細胞前駆体が再生すると結論付けられた。再生される対象組織の存在と実態を明確にした本論文は、同時にミミズの生殖細胞の再生現象が存在することを明確に示した最初の論文であると考えても差し支えない。

4-2. 生殖細胞の起源

ここでは再生中に生殖細胞を産み出す細胞を「生殖細胞の起源」と呼ばせていただく。本研究の一連の実験から、生殖細胞の起源が体幹部に存在する *Piwi* 発現細胞であることが強く示唆された。この結論を導くにあたって、本論文で前提としているのが腹側神経索で増殖した *Piwi* 発現細胞が新たに再生された頭部7・8体節まで移動するということがある。やや結果の反復にはなるが、本論文で得られた再生中の *Ej-piwi* 遺伝子の発現パタ

ーン変化は、あたかも *Piwi* 発現細胞の移動を反映するかの様な発現変化を示した。しかしながら、これらはいくまでも遺伝子の発現変化を観ているにすぎず、*Ej-piwi* 遺伝子が同一の細胞に発現し続けている保証は無いという点に注意を払うべきである。また、ミミズの再生に脱分化が関与するという見方もあるため、突如 *Ej-piwi* 遺伝子を発現し始める細胞が出現する可能性も危惧するべきかもしれない。

現時点で、ヤマトヒメミミズにおいて細胞ラベル、RNAi そして遺伝子強制発現などの技術は未開発であり、直接的な証明ができない状態にある。これらを除いた上で考えられる解析手段として、頭部 8 体節内に体幹部 *Piwi* 発現細胞が全く存在しないならば、8 体節より後方を切除することで生殖細胞の起源の無い個体を作成することができる。そして再度これらの個体の頭部を切除して生殖細胞前駆体が再生するか否かを検証する術がある。しかしながら、実際は頭部体節（頭部 6-8 体節）にも生殖細胞とは異なる体幹部と同様の *Piwi* 発現細胞が存在するため、上記の解析手法では体幹部 *Piwi* 発現細胞が生殖細胞の起源であることを証明するのは困難である。また、*Piwi* 発現細胞が再生芽内に侵入していない再生 2 日目に、*Piwi* 発現細胞を含む元からあった組織を切除して再生芽を観察しようと試みた。しかしながら、切り取られた再生芽は切断面を閉じることができず速やかに死に至る。さらに、再生 2 日目に *Piwi* 発現細胞が存在する最も近い元からあった組織に UV を照射して、再生芽に侵入前の *Piwi* 発現細胞を殺そうと試みたが、麻酔を効かせたミミズでもいざ UV を照射すると動いてしまうため、このように繊細な UV 照射が不可能である。このような状況であるため、本実験の観察結果を踏まえて体幹部の *Piwi* 発現細胞が生殖細胞の起源であると結論する正当性について議論をする必要がある。

1、細胞増殖のパターンより

マウスにおいて始原生殖細胞は形成されてから分裂をしてその数を増し、胚体内へ侵入するために移動する際に分裂を休止する⁴⁵。その後、生殖巣に入った始原生殖細胞は再び分裂をする⁴⁵。同様のことが、ショウジョウバエでも観察されている⁴⁶。卵の後端で形成された極細胞はその場で分裂をするが、生殖巣へと移動する過程では細胞数が増さない⁴⁶。マウスの場合と同様に、生殖巣の中に入った極細胞は分裂を行う⁴⁶。このようにこれらの現象は進化的に大きく離れた動物において共通する。本研究結果から、再生 1 日目から 2 日目にかけて、*Piwi* 発現細胞数は約 2 倍に増加し、この時に 1 回分裂が起こったと考えられる（図 8. A）。この後、発現が再生芽に移る際には *Piwi* 発現細胞数が一定になる（図 8. A）。そして、頭部 7・8 体節（生殖巣体節）に落ち着いた再生 5 日目に再び *Piwi* 発現

細胞数は倍になる（図 8. A）。この観察結果は、上記の動物に見られる生殖細胞の特徴に酷似している。

2、細胞組織再生の進行状況より

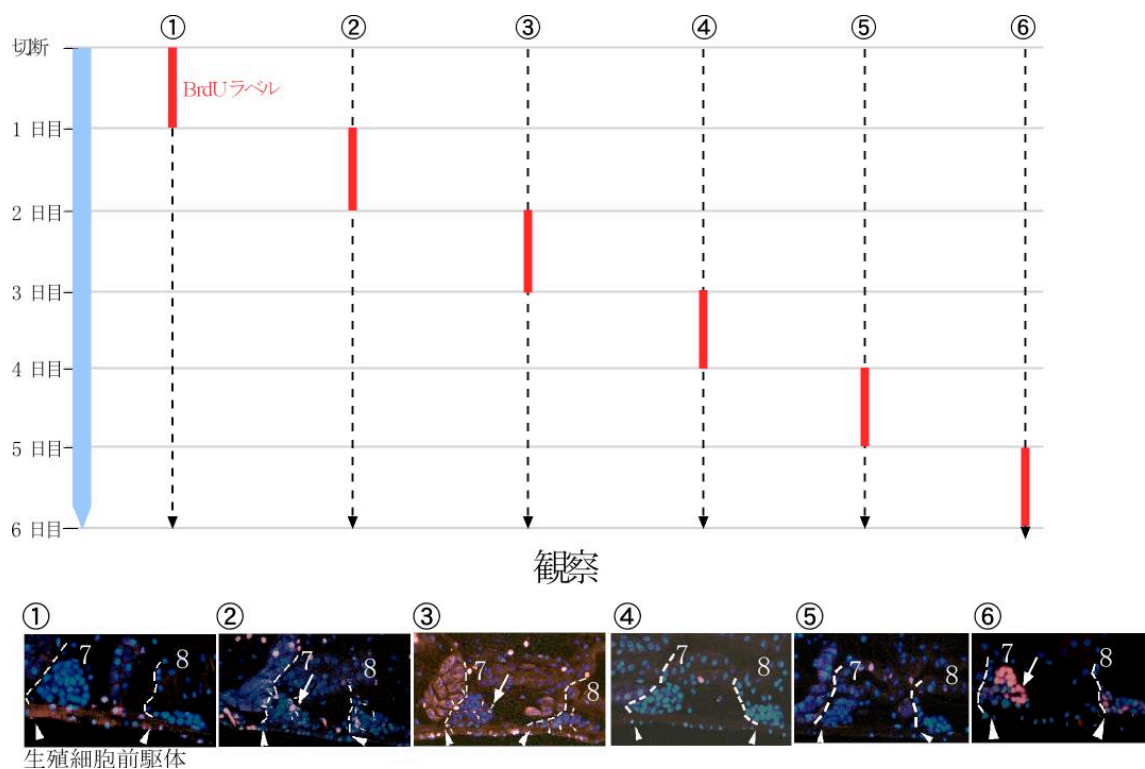
ここでは体細胞組織再生の進行と比較しながら、*Piwi* 発現細胞を生殖細胞ではないと仮定してどう解釈できるかを考えてみる。切断を受けたミミズは速やかに傷を閉じ、切断後約 6 時間後からネオブラストの増殖が開始する（図 10）。切断から 1 日経つと既に形態的に未分化な細胞が多数切断面に集結して再生芽を作り上げる¹⁴。これらの細胞はこれ以降も再生芽内で分裂を繰り返す。再生 2 日目になると背側に脳が形成される。腹側神経索の神経繊維は再生芽が伸張するのと同時に再生芽に侵入するのでこの時期には既に神経も再生芽に通っている⁴⁷。消化管（口、食道、咽頭）、血管も既に形成されている¹⁴。このように、体細胞組織の主要な再生イベントは再生 2 日目にしてほぼ終了している^{14,47}。私が観察した *Piwi* 発現細胞はまだ再生芽に侵入するどころか、この時期になって初めて切断面付近で増殖をする（図 11）。体細胞組織の再生に寄与する細胞の増殖時期に比べると *Piwi* 発現細胞の増殖時期は非常に遅いといえる（図 7）。再生 3 日目では、2 日目にほぼ完成した組織たちがより大きくなり組織ごとに明瞭に区別できる¹⁴。この時期には体細胞組織の分化が進んでいると考えられる。この時期に初めて *Piwi* 発現細胞は再生芽内に見られるようになる。クラゲから昆虫とほ乳類に至まで *piwi* 遺伝子は例外なく幹細胞か分化程度の低い細胞に発現する^{39,40,41,48}。体細胞組織のミニチュアが出来上がった時期に、再生芽内に出現する未分化細胞が、わざわざ分化の進んだ組織に侵入してその構成要因になるとは考え辛い。それでは *Piwi* 発現細胞が寄与できる他の体細胞組織とは何か考えたときに、候補となる組織が見当たらない。以上の考察は、再生 2 日目から 4 日目までの一連の発現変化を通して見た場合の希望的観測ではなく、各ステージの発現パターンを全く独立に見た場合においても、それぞれのステージにおいて上記の考察に至る。これらのことと再生 5 日目の最終の発現パターンを踏まえて解釈をすると、2・3・4 日目の再生芽に見られる *Piwi* 発現細胞が移動中の生殖系列の細胞であると考えるのが妥当である。

3、BrdU ラベル実験より

ここでは共同研究者の忽那純子さんの行った実験結果を紹介し、私の研究結果との整合性を問うことにする（参考図）。本実験とは独立の実験結果であり、かつ論文として未発

表のため許しを得てこの章で図を掲載し本研究結果との比較を行うことにする。この実験の意図は、再生中のいつ生殖細胞を産み出す細胞が作り出されるのかを知るところにある。そこで切断直後から1日目まで、1日目から2日目までという様にそれぞれ各1日間の BrdU パルスラベルを再生6日目まで行う（参考図、上図）。再生中のどの時期に BrdU ラベルすると、再生後（6日目）の生殖細胞前駆体にラベルが入るのかということを観察している。結果、切断直後から1日目まで BrdU ラベルをした個体では、再生完了後の生殖細胞前駆体に BrdU 陽性細胞が観察されない（参考図、①）。これに対して、1～2日目および2～3日目の間ラベルした個体では、再生を完了した生殖細胞前駆体に BrdU 陽性細胞が見いだされるようになる（参考図、②③）。しかしながら、3～4日目と4～5日目にラベルしても再生された生殖細胞前駆体にラベルが検出されなくなる（参考図、④⑤）。これらの結果から、生殖細胞前駆体を作る細胞群は7・8体節に生殖細胞前駆体が出現する時期にその場で産み出されるのではなく、また、ネオブラストが盛んに分裂をする再生初期に産み出された細胞が生殖細胞前駆体を作り上げるわけでもない。再生1日目から3日目の間に既に産み出されているということを示す（参考図、②③）。本研究からもこれと同様に、生殖細胞前駆体を作る *Piwi* 発現細胞が、再生のごく初期でも生殖細胞前駆体が出現する再生終了の時期でもなく、再生の中頃（2日目）に産み出されることが強く示唆された（図7、図11）。上述の BrdU パルス追跡実験の結果とは、多少の時間のズレがあるもののほぼ同様の結果が得られている。また BrdU の実験から5～6日目にラベルした個体では再び生殖細胞前駆体にラベルが入るようになるという結果が出ている（参考図、⑥）。若干の時間のズレがあるものの上述のパターンは前述した *Piwi* 発現細胞の「再生1～2日目に増殖→再生3～4日目に増殖停止→再生5日目に増殖」という増殖パターンに酷似している。この実験結果では、再生6日目に生殖細胞前駆体が現れる。これを考えると、温度条件や BrdU などの影響で再生にかかる時間が1日間ほど長くなっている可能性が考えられる。この可能性を考慮すると、上述の実験結果は、我々が観察した *Piwi* 発現細胞が示す結果とつじつまの合う結果である。

以上のことから、体幹部の *Piwi* 発現細胞が生殖細胞を産み出すと考えることが最も合理的かつ正当であると考えられる。



参考図) いつ生殖細胞前駆体を作る細胞が生まれるのか (BrdU パルスラベル実験より)

切断後それぞれ赤色バーで示した期間 BrdU ラベルを行った。写真は、ラベルから 6 日目まで飼育して生殖細胞前駆体にラベルが入ったかを観察した結果を示した。下図の写真に頭部 7・8 体節を拡大した領域を掲載しており、白矢頭で生殖細胞前駆体を示している。BrdU ラベルされた細胞は赤く染色される (白矢印)。①切断直後から 1 日目までのラベルでは、再生後の生殖細胞前駆体にラベルが入らない。②③切断から 1 日目から 3 日目までラベルしたものに生殖細胞前駆体にラベルが見られた。④⑤ 3 日目から 5 日目までのラベルでは、再びラベルが入らなくなる。⑥ 5 日目から 6 日までラベルをすると生殖細胞前駆体がラベルされる。

4-3. 過去の知見との比較

序論でも述べたように、古い文献で数種類の多毛類 (ゴカイを含むグループ) と貧毛類 (ミミズ) において、再生中に生殖細胞がどこから生まれてくるのかという記載がなされている^{15,16,17,18,19,20,21,22}。本論文の結論は、過去の知見のどれにも当てはまらない。多毛類については、腹側に存在する血管、原側筋肉付近に存在するネオブラスト、腹側の表皮とこの 3 つの組織が、生殖細胞を産み出す細胞の候補として挙げられている^{15,16,17,18,19,20,21}。これの違いが種類の違いに機縁するの否かを判断するすべは無いが、少なくとも同種のウズマキゴカイにおいてさえ血管とネオブラストのどちらから生殖細胞ができて来るか特定しきれていないというのが事実である。ここに挙げられた 3 つの組織は非常に近接した

組織であり、このため上記の見解の相違が各研究者の観察の振れを反映している可能性もあると考えている。表皮のすぐ内側のレイヤーに筋肉が張り巡らされておりネオブラストがこの周辺にある。また血管や神経もそのすぐ内側に隣接して存在する組織である。これらの結果の共通性をおおまかに捉えるならば、どの観察結果も生殖細胞は体の腹側にある組織から出来てくるということで意見の一致が得られていると言えよう。本研究から得られた結果も、腹側の組織から生殖細胞が生まれるとした点では上記の結果と類似している。ゴカイの生殖細胞が、実はヤマトヒメミミズと同様に腹側神経索上の細胞から出来てくるという可能性も十分にあると考えている。次に、より近縁にあたるミミズの知見と比較をする。イトミミズ (*Tubifex*) では腹膜周辺から、*Lumbricillus* と *Perionyx* では隔膜周辺から、それぞれ生殖細胞が再生してくるというように意見が分かれている^{22,23,24}。*Lumbricillus* はヤマトヒメミミズに近縁な種であり隔壁の基部にネオブラストを持っている⁵⁰。ヤマトヒメミミズにおいて隔壁は謎に満ちた領域である。隔壁基部にはネオブラストが存在し、隔壁の背側にかけてネオブラストより小型だが比較的核の大きな細胞が存在することが多い(北大、杉尾ら、未発表)。これらの細胞が移動中のネオブラスト由来細胞であると考えられている(北大、杉尾らが BrdU パルスチェイス実験で検証、未発表)。再生中のミミズでは、隔膜および腹膜周辺はこのような細胞で混沌としており分子マーカーおよび細胞特異的ラベルなしに観察することが困難に思われる。図 9. B に示すように、*Piwi* 発現細胞は腹側神経索上にランダムに存在し、つまり 11 体節目に見られるように隔壁周辺部に位置するものもあれば、そうでないものもある。これら *Piwi* 発現細胞を隔壁周辺の生殖細胞発信源として観察した可能性は否定できない。またヤマトヒメミミズの *Piwi* 発現細胞の移動ルートは定かではないが、分布を観ると背腹左右方向に比較的ランダムなルートを通して移動するように思われる(図 8. A)。腹膜周辺を移動中の *Piwi* 発現細胞と捉えて生殖細胞の起源とした可能性も考えられる。この一方で、もちろん種類の違いが反映する可能性は無論否定できない。興味深い点として、イトミミズにネオブラストが認められないのに対し、*Lumbricillus* とヤマトヒメミミズは隔膜の腹側周辺にネオブラストを持つという根本的な違いがある^{14,50}。イトミミズは自切をできない種類である。このようなミミズとヤマトヒメミミズで生殖細胞の再生にどのような違いがあるのかという点については興味深い問題である。ヤマトヒメミミズでも証明に至っていないこともあり、種の違いによる差異と観察結果の是非を問うのはまだ先になるが、これらの種で *piwi* 遺伝子の発現を観察することで異論の残るこの問題を解決できるかもしれない。

4-4.他の動物における *piwi* 遺伝子発現との比較

今回、腹側神経索上および生殖細胞前駆体で *piwi* 遺伝子の発現が見られた。*piwi* 遺伝子は解析されている全ての動物において、生殖系列の細胞もしくは幹細胞に発現し幹細胞の維持や適切な分裂に関与することが示されている^{29,30}。この時の発現の特徴を以下に記述する。ショウジョウバエの生殖幹細胞での *piwi* 遺伝子発現は、幹細胞から産み出された細胞でも発現するが、分化が進むにつれて発現が弱くなってゆく^{29,30}。また、マウスの *piwi* 遺伝子ホモログである *mili* と *miwi* も、分化程度の低い精原細胞で強い発現を見せるが、精子へと分化するに従って発現が消失してゆく^{35,37,38}。ここでは、ミミズと他の動物の *piwi* 遺伝子発現を比較し類似点と相違点について議論したい。環形動物において *piwi* 相同遺伝子を初めて単離し、さらにヤマトヒメミミズにおいて *piwi* 相同遺伝子は成熟した生殖細胞に強い発現を見せることから、環形動物においても *piwi* 相同遺伝子が生殖細胞に発現することが明らかになった (図 4、5)。雌の生殖細胞において、*piwi* 遺伝子は未熟な卵細胞に発現するものの成熟した卵にはほとんど発現が検出されなくなる (図 4、B)。雄の生殖細胞においても精原細胞およびより分化の進んだ生殖細胞にも、*piwi* 遺伝子は発現を続けるが精子では発現が消失する。これより、他の動物にみられるのと同様、環形動物においても *piwi* 相同遺伝子が未分化状態の維持に関与すると推測できる。

次に、他の動物の *piwi* 遺伝子発現との相違点について議論する。*piwi* 遺伝子の機能が最も詳細に解析されているショウジョウバエの生殖幹細胞において、*piwi* が生殖幹細胞を未分化状態に保つのに必須であることが示されている^{29,30}。また、この時に *piwi* は生殖幹細胞自身と生殖幹細胞が接する微小環境 (ニッチ) に発現し、双方の相互作用により幹細胞を維持するという機能を持つ^{30,49}。これより、ヤマトヒメミミズの *Ej-piwi* 遺伝子が幹細胞自身に発現しているのか、はたまたニッチに発現しているのかという点を議論しておく必要がある。

まず始めに腹側神経索上の *Piwi* 発現細胞がネオブラストのニッチに成り得るのかという点から論じたい。結果に示した通り、体幹部の *Piwi* 発現細胞は比較的ランダムに存在している (図 9. A)。言い換えると図 9. A で見られるように *Piwi* 発現細胞がネオブラスト近傍に存在することもあるが、存在しないこともある (図 9. B)。この様な状況があるものの、ネオブラストはどの体節においても常に存在している。さらに、横断切片で *Piwi* 発現細胞とネオブラストの位置関係を観ると、前後軸に沿って両者が似通った位置にいる場合においても、背側に背腹軸に沿っては双方離れた位置に存在している (図 9. A)。これらの状況証拠から、*Piwi* 発現細胞がネオブラストを維持するためのニッチとなる可能性

は考えにくい。それでは次に腹側神経索上の *Piwi* 発現細胞が未知の幹細胞のニッチに成り得るかという点を考える。腹側神経索上の *Piwi* 発現細胞は単一の細胞で分布しているため、私が発見した *Piwi* 発現細胞の近傍に *piwi* を発現している幹細胞が存在する可能性はないと考えられる。それでは *piwi* 遺伝子を発現しない幹細胞が *Piwi* 発現細胞と接して存在する可能性はあるかと問われれば、答えはノーである。*Piwi* 発現細胞が存在する腹側神経索上は細胞に乏しい組織である。また、背側は体腔であり浮遊細胞は有るものの腸や血管とは隔たりがある。*Piwi* 発現細胞をニッチと仮定したときに、その近傍に接して存在する幹細胞の候補が見出せない。また、腹側神経索上の *Piwi* 発現細胞はそれ自身増殖活性を持ち、実際に再生 2 日目の切断面付近で *Piwi* 発現細胞数が増す (図 8. C)。もしも腹側神経索上の *Piwi* 発現細胞をニッチと仮定するならば、*Ej-piwi* を発現していない幹細胞がこれら *Piwi* 発現細胞を産み出すことを意味する。他の動物において、*piwi* 遺伝子は幹細胞自体にも発現して、この幹細胞から産み出された細胞は分化が進むにつれて徐々に発現が薄れて行くことはあっても、元々 *piwi* を発現していない細胞が *Piwi* 発現細胞を産み出すという報告はない^{29,30,35}。以上より、腹側神経索上の *Piwi* 発現細胞は幹細胞自身であると考えられる。ヤマトヒメミミズの *Ej-piwi* は、ショウジョウバエに見られるような細胞間相互作用を介した幹細胞維持に効いていない可能性がある。*piwi* 遺伝子の発現と機能を考えるとき、常にニッチと幹細胞の議論に辿り着く傾向があるが、実際はプラナリア、マウスの *miwi*、ゼブラフィッシュそしてクラゲなどでは *piwi* 遺伝子がニッチに発現するという報告がないのが現状である^{39,40,41}。ヤマトヒメミミズの *Ej-piwi* 遺伝子は、上記の *piwi* ファミリー遺伝子と同様に、幹細胞自身内で幹細胞の維持や分裂し関与しているのかもしれない。

次に議論すべき点は、クラゲとプラナリアとの相違点である。クラゲにおいて *piwi* 遺伝子は生殖細胞以外に幹細胞が存在する領域にも発現が見られる⁴¹。また、プラナリアにおいてもネオブラストで発現することが調べられている^{39,40}。生殖細胞に *piwi* 遺伝子が発現するという点に関しては、これらの動物とヤマトヒメミミズで共通している。一方、ヤマトヒメミミズのネオブラストに *piwi* 遺伝子が発現しないという点で、これらの動物とは発現が異なる。これらの動物とヤマトヒメミミズにはどのような違いがあるのだろうか。この点に関しては生殖細胞の進化という点を絡めて次項で記述する。

4-5. 無性生殖から有性生殖の進化について

本研究により、ヤマトヒメミミズでは体細胞系の幹細胞と生殖系の幹細胞が別々に存在する可能性が強く示唆された。この一方、プラナリアのネオブラストは生殖細胞と体細胞の両方を作ることができるとされている²⁷。また *Ej-piwi* 遺伝子が生殖系の幹細胞のみに発現する一方、プラナリアにおいて *piwi* 相同遺伝子は生殖細胞のみならずネオブラストにも発現がみられるというように、ヤマトヒメミミズとプラナリアには観察結果に違いが認められる^{39,40}。このような発現の違い及び生殖細胞と幹細胞のあり方の違いはなぜ生み出されたのだろうか。両者の決定的な違いが生殖細胞の形成時期に隠されていると考えられる。多くの動物では生殖細胞が初期発生中に体細胞から分離するが、プラナリアにおいて生殖細胞は発生終了後にネオブラストから産み出される^{27,28}。一方、環形動物では一般的に生殖細胞は発生中に形成されることが知られている^{51,52}。しかしながらヤマトヒメミミズは日常的に自切再生を繰り返す種類であり、この過程で日常的に頭部の生殖巣体節を失うわけである。このような状況の中、せっかく作った生殖細胞を頭部の特定の位置のみに配置するというのは合理性に欠けると思われる。この場合、一度作った生殖細胞を自切の度に失い、ネオブラストなどからわざわざ再度作り直すことを意味している。そこで何時どの位置で自切しても良いように、生殖系の幹細胞 (*Piwi* 発現細胞) をネオブラストとは独立に体中に配置していると考えられる。あくまで推測だが、このような幹細胞の使い分けが進化する中、*piwi* 遺伝子の発現が生殖細胞で優先的に見られるようになったのかもしれない。例えば高度に進化したなマウスでは *piwi* 相同遺伝子は生殖細胞特異的な遺伝子ととらえられている^{35,37}。

現時点で議論は続くため一概には言えないがプラナリアがおおよそ1種類の幹細胞を持つ(サブポピュレーションの有無は議論されている)のに対して、より分化の進んだ高等動物では生殖細胞に加えて様々な種類の幹細胞を体内にリザーブしている。ミミズが何種類の幹細胞を持つのかは未だ謎であるが、少なくとも生殖系列と体細胞系列の幹細胞を分け持っていることが分かってきた。本研究で初めて、生殖細胞と体細胞の分離が初期発生中に起こり、かつ生殖細胞を再生できる動物においてその再生が観察された。このような動物の研究は、幹細胞システムをフル活用した無性生殖から有性生殖メインの増殖へと動物が進化してゆく過程を知る上でも重要な知見を与えるかもしれない。

そもそも、幹細胞(無性生殖に使われる幹細胞)と生殖細胞は全能性を持って体を作り上げるという意味で類似した細胞である。裏を返せば、両者ともある一定の時間、分化を抑制しておかなければならず、分化をする際にも未分化状態の細胞が枯渇しないように自

己複製をする細胞であるという点でも類似性がある。また、形態的にも類似点がみとめられる。生殖細胞には分化した体細胞には決して見られないナージと呼ばれる電子密度の高い構造が見られる⁵³。一方、幹細胞にはクロマトイド小体というナージと類似した構造が存在している^{54,55,56}。下等真核生物から高等真核生物へと進化するにつれ有性生殖のみで増殖するようになることを考えると、これらの幹細胞は動物の進化過程のある時に有性生殖を遂行するための生殖細胞へと姿を変えたのではないかと推測される。ミミズはこの問題にアプローチするためにも適した実験動物であると考えられる。まずはヤマトヒメミミズを拠点として、本研究で発見した *Piwi* 発現細胞とネオブラストが初期発生中にどのように形成されてくるのかということの詳細に調べること、そして、有性生殖のみで増殖するミミズと無性生殖のみしか確認できないミミズと何が異なるのかという点を研究してゆくことが有用であると考え。今後、本研究結果についても確かめなければいけないことが多いのが現状であるが、本論文の結果を起点として上記の発展性を提唱しつつ、再度ミミズが有用な実験動物であることを強調しておく。

4-6. 再生中の生殖細胞の挙動について

ー他の動物の PGCs は発生の初期に形成されるが胚帯内に侵入せずに留まるー

本研究で生殖細胞がどこから再生するのかが分かってきた。これと同時に、再生中の生殖細胞がどのような挙動をするのかについても見えてきた。体細胞組織の再生に寄与すると考えられているネオブラストは、切断から1日目には既に分裂をして切断面に移動している(図10)。これに対して *Piwi* 発現細胞は再生後1日目までは元からあった組織に静かに留まっている(図7、図11)。切断から1〜2日目に切断面付近で増殖をするが、再生芽内には侵入せずに元からあった組織に留まる(図7、図11)。これらの細胞たちは再生の比較的后期になって初めて再生芽内に侵入してゆく(図7、図11)。多くの動物の初期発生でもこれに類似した生殖細胞の挙動が観察される。有性生殖で増殖する動物は発生の早い時期に体細胞と生殖細胞の分離が起こる⁵⁷。例えばショウジョウバエでは、まだパターン形成も起きていない時期に卵後端の胚体外に生殖系列の細胞が形成される。また、マウスにおいても発生初期の胚体外組織に始原生殖細胞(PGCs)が形成される⁵⁸。それ以外にもニトリや魚においても、PGCs は胚体とは隔離された胚体外組織で作られる⁵⁷。そして、これら全ての動物において生殖系列の細胞は、ある時期まで胚体内に侵入せずに胚体外に留まる⁵⁷。なぜ全ての動物に共通して生殖細胞はわざわざ胚体外で形成されるのか、なぜある時期まで胚体内に侵入してゆかないのか、動物はその発生においてなぜこのよう

なことをする必要があったのか、という点については考えても謎が深まるばかりである。ここで一つの可能性を示す。発生中の胚は形態形成が非常に盛んで、つまり様々なシグナルが飛び交っている状態であると考えられる。次世代を担う大切な生殖細胞はこれらのシグナルの影響を受けることを極力避けるために生殖細胞は胚体外で形成され、安全な領域つまり生殖巣が形成されるまでその場に留まるのかもしれない。生殖巣ができると生殖巣に辿り着くまでしばしの我慢だと足早に目的地まで移動するのかもしれない。このような推測のもと再生中の生殖系列の細胞の挙動を見てみるとつじつまが合う。再生中のヤマトヒメミミズには、言うまでもなく胚体外組織などは存在しない。状況証拠にはすぎないが、このような環境においても生殖細胞がある時期までは元からあった組織に留まり再生芽内に侵入しないということは興味深い。言うまでもなく再生組織内は、再生中の個体において形態形成が盛んに起こっている組織である。一方、既に形態形成の済んでいる元からあった組織は、これらの個体の中では比較的 안전한場所と考えられる。これらの細胞たちは、再生芽の形態形成がほぼ終了する時期、かつ再生組織に分節構造が出現し始める時期に頭部7・8体節に向けて再生芽に侵入してゆく（図7、図11）。

4-7. 成長帯から新たに形成された体に *Piwi* 発現細胞はないのか？

自切再生を終えたヤマトヒメミミズは尾部にある成長帯から体を成長させて元の長さに戻る。それでは、新たに形成された体幹部の *Piwi* 発現細胞はどこから出現するのだろうか？この点に関してはこれまでに観察が進んでおらず、今後の研究課題である。しかしながら、ここでは予想と現在得ている状況証拠を元に考察を進めたい。結論を先に言うと、全身に散らばっている *Piwi* 発現細胞（生殖細胞の起源）が、尾部成長帯から新たにできた組織に細胞を供給すると考えるのが自然である。前述の議論に従って考えるならば、せっかく作りリザーブしてある生殖系の幹細胞を差し置いて、他の細胞群が *Piwi* 発現細胞を作り新たに形成された体にこれらを分配すると考えるのは少々まわりくどく感じる。*Piwi* 発現細胞はそれ自体分裂能力を持つ細胞である故、体幹部に存在する *Piwi* 発現細胞が分裂して新たにできた体幹部に *Piwi* 発現細胞を分配配置する方が合理的だと考えられる（図9.C）。図9.Aに示すように体幹部全体に *Piwi* 発現細胞が広がっているが、新たに体が形成される尾部領域には比較的多くの *Piwi* 発現細胞が存在していることが多い（図9.B）。これは、成長帯から作り続けられる体に *Piwi* 発現細胞を分配するための備えかもしれない。最後に、尾部においては再生中も成長中も頭部で見られるように腹側神経索から遊離して移動するという発現変化は見られない。尾部にある *Piwi* 発現細胞が腹側神経

索をレールにして1つ2つと少数ずつ移動してゆくのかもしれない。

4-8. 解析技術の必要性と現状

本研究から初めて、生殖細胞の再生現象が分かってきた。また、生殖細胞を産み出す細胞を発見すると同時に、裏を返せば特異的な発現を見せる遺伝子が見つかったわけである。ヤマトヒメミミズでは、現在のところ、本論文に記述した結論を証明する手段が無い。分子レベルで機能解析法を確立することが急務である。また、最終章で示すように本研究で再生機構の理解を目指して多量の遺伝子を得たことで、分子レベルの解析に向けて周りの環境が整い出した。現在の段階で最も早急に確立する必要があるのは RNAi である。現在までに私が用いた手法では遺伝子注入が困難である。ミミズの体腔を満たす体液は粘性が高く、ガラスキャピラリーが非常に詰まり易い。ガラスキャピラリーの先端をできる限り斜めに磨ぎ、鋭く針穴を大きくしたキャピラリーを用いてなんとか溶液を注入することができた。しかし多くの場合において注入部位から自切をして注入した液体を出してしまうことが多い。よりミミズに負担の少ない針を用いて、ミミズにとって低刺激な液体とともに siRNA を注入することが必要である。刺激を少なくするために、線虫の RNAi で用いられる方法と同様にして dsRNA を食べさせてみた。dsRNA の取り込みを検証できるように蛍光色素で標識したネガティブコントロールの dsRNA を使用した。この結果、dsRNA 溶液に浸け込んでから1時間くらいで、腸内、血液そして腎管に dsRNA が入り込む。表皮と血管付近のほんの数細胞のみが dsRNA を取り込むものの、まだまだ実用まで至らない。今後、より様々な条件で検証してゆく必要がある。

5、最終章（付録）

ミミズの再生を理解する足がかりとしての発現遺伝子データベース

ミミズを用いて再生の研究をすることの重要性については序論で既に述べた。この一環として、ここまでに生殖細胞再生という再生中の一現象について掘り下げてきた。この生殖細胞再生を含め、今後ミミズの再生を包括的に理解してゆくにあたって、再生中に起こる現象の詳細な観察はもちろんのこと、これらの現象を浮き立たせて発見するという意味でも、また機能解析を考える上でも、再生中に発現する遺伝子を網羅的に単離解析してゆくことが有用であると考えている。この章では、ミミズの再生を理解するための足がかりとして私が作成した再生中に発現する遺伝子のデータベース及びサブトラクションライブラリーについて紹介する（これらのライブラリーは株式会社タカラバイオに受託して作成）。さらに、現在までに得た発現パターンの中で特徴的な発現を示す遺伝子に関しては、プレリミナリーではあるが簡単に将来性やアイデアなども盛り込んで将来の研究に繋げて行こうと考える。

5-1、EST プロジェクト

EST データベースを作成する目的は2つある。まず、前述したように遺伝子情報が枯渇している環形動物において再生中に発現する遺伝子の情報が少しでも多い方が研究の進歩に繋がると考えた。欲しい遺伝子を検索し、いつでも利用できるようにすることが目的の一つ目である。EST もう一つの目的としては、再生中のミミズ特異的に発現する遺伝子をサブトラクション法で選別することにあつた。次章に記載するが、使用したサブトラクション法では比較的短い遺伝子断片が得られるため、他の動物の遺伝子と相同性検索をしてもアノテーションが付かない可能性が多い。そこでサブトラクションで得られた遺伝子と EST を比較しアノテーションを付けるという風に、サブトラクションライブラリーを充実させるためのデータベースとして利用することが2つ目の目的である。

方法・結果)

本章はライブラリー作成自体が結果であるため、方法と結果を共に記述する。方法5で示した方法でミミズを人為的に切断して、切断後 0, 1, 2, 3, 4 日目のミミズを回収した。全てのミミズを混合し (約 1.0 g; 約 10,000 匹)、ニッポンジーン社の ISOGEN を用いて Total RNA を抽出した。この状態でドラゴンジェノミクス株式会社に cDNA ライブラリーの作成および塩基配列の決定を受託し下記の作業を行った。

Poly (A) RNA の精製)

Total RNA 300 μ g を、Oligotex-MAG mRNA Purification Kit (TAKARA)で精製した。この結果、3 μ g の poly (A) RNA を得た。この時点で rRNA の混入が高いと予想されたため、それ以上の改善が見られなくなるまで再精製を行った。この poly (A) RNA を用いて cDNA ライブラリーの作成を行った。

cDNA ライブラリーの作成)

STRATAGENE 社の cDNA Synthesis kit を使用して、Unidirectional な cDNA ライブラリーを作成した。2 μ g の poly (A) RNA、Oligo (dT)18 アンカープライマー {(GA)₁₀ACTAGTCTCGAG(T)₁₈V} 及び MMLV-Rtase を用いて 1st strand cDNA を合成した。後の制限酵素反応で切断されてしまわないように、1st strand cDNA の合成にはメチル化された dCTP (5-methyl dCTP)を使用した。2 nd strand cDNA を合成した後、末端を平滑化し EcoRI アダプターをライゲーションした。末端をリン酸化し、制限酵素 XhoI で切断して、スピンカラム (CLONTECH 社 CHROMA SPIN-1000)で低分子量 DNA を除去した。こうして作った cDNA を pBluescript II SK(+) (EcoRI-XhoI 切断及び脱リン酸化処理をしたもの)にライゲーションした。ライゲーション産物は *E. coli* DH10B に形質転換した。前述したように、poly (A) RNA に Ribosomal RNA の混入が予想されたため、384 クローンについてテストシーケンスを行っておよその混入率を調べた。その結果、cDNA ライブラリー中に約 30~35%の rRNA が混入していることが予想された。ここで得られた rRNA の配列を *in silico* で取り除くこととして、次の行程に進むこととした (詳細は後に記述)。

塩基配列の決定)

Q-Bot (GENETIX 社)を用いて、大腸菌コロニーをランダムにピッキングし、384 穴のプレートに分注した TB (100ug/ml アンピシリン) 50 μ l に植菌し、37°Cで培養を行った。ピックアップしたクローンの総数は 14,592 クローンである。シーケンス用のプレートは TempliPhi DNA Sequencing Template Amplification Kit (アマシャムバイオサイエンス社)を用いて調整した。こうして得られたテンプレートを鋳型として、T7 Promoter primer と T3 Promoter primer を用いて塩基配列解析作業を行った。シーケンス反応は Dye terminator 法を用いて下記の要領で行った。液量 5 μ l の反応系の内訳は Template DNA (3 倍希釈) 2 μ l、ET dye terminator (アマシャムバイオサイエンス社) 2 μ l、Primer (10pmol/ μ l) 0.125ul、MQ 水 0.875 μ l である。反応は 95°C 30sec, 60°C 50sec /40 cycle で行った。シーケンス反応産物は、Magnetic Carboxylate-Modified Besda (Seradyn 社) で精製を行った後、MegaBACE4000 (アマシャムバイオサイエンス社) を用いて解析した。

塩基配列の解析)

得られた波形データから信憑性のない配列データを取り除いた結果、有効な総リード数は 23,990 リードであった (phred 値 15 未満を除いた)。また、前述のように ribosomal RNA の配列を in silico で出来る限り除いた (図 12)。これに際して、ランダムに選んだ 384 配列中に含まれた ribosomal RNA を参考にした。384 リード中に 77 リード、19 種類の ribosomal RNA 配列が含まれており、これらの配列を in silico でフィルターアウトした。さらに他種のみミズの ribosomal RNA (earthworm ribosomal RNA と *Lumbricus* ribosomal RNA) 10 配列に関しても取り除いた。これらの作業の結果、8,141 リードが取り除かれた (図 12)。残り 15,849 リードについてクラスター解析を行った結果、クラスターを構成するリード数が 2,279 リードとクラスターを構成しな

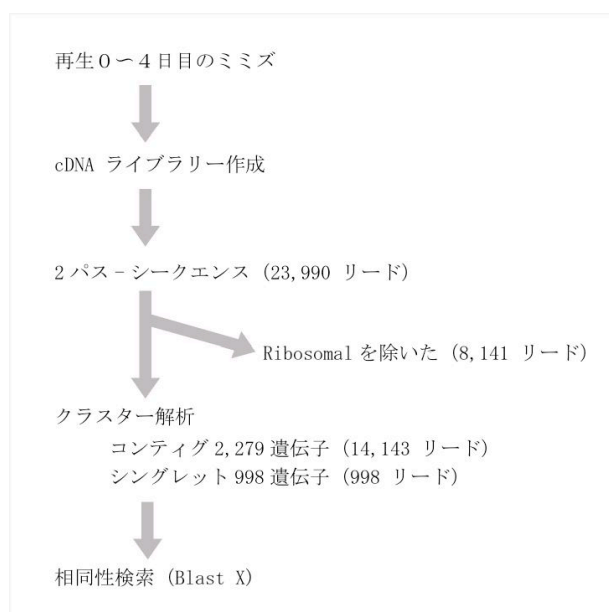


図 12、EST 作成の作業工程

かったリード数が (Singlet) 998 リードであった (図 12)。これらの配列について、全て BlastX を用いて相同性検索を行った。以上の作業までをドラゴンジェノミクス株式会社に依頼して行った。これらの配列情報および相同性検索の結果は、ソフトウェア (EST viewer) 上にまとめてあり、遺伝子名でキーワード検索が可能である。

分類)

上記の解析で得られた、相同性検索結果とそこに含まれるリード数を全て EXCEL に打ち込んだ。相同性検索で同じ遺伝子として分類されたものに関しては、上記の結果クラスターを組まなかったものも含め一括りにして分類を進めた。また、 $1e-10$ よりも E-value が大きかったものに関しては Low similarity として分類した。この結果、相同性の低いものと相同性が得られないものが、全体の 64.1% (1,0173 リード)であった(図 13, A)。さらに、残りの 5,676 リードについて現時点で名前が付いていないものや名前から機能や発現場所を推測できない遺伝子を、unnamed, Unknown & hypothetical protein 0.8% (135 リード), 他の動物の EST 3.5% (547 リード)として分類した。また、極めて発現量が多いと考えられる、ribosomal RNA 9.45% (1,497 リード), actin 1.28% (202 リード), myosin 0.92% (145 リード), tublin 1.99% (316 リード)を除外して、出来る限り再生等に関わる可能性がある遺伝子の抽出を試みた(図 2 A)。図 13, A の円グラフに黄色で示す通り、遺伝子名の付いた 17.9% (2,834 リード)を更なる解析の対象とした。

Biological process での分類)

上記の作業で抽出した 2,834 リードの遺伝子について、一般公開されている Gene ontology 解析サイト AmiGO (<http://www.geneontology.org/>)を用いて、これらの遺伝子が生命現象のどのようなプロセス(biological process)に関与するかを調べ分類した。作業内容としては、EXCEL に打ち込んだ Blast X の結果を元にして重複を除いたのち、それぞれの遺伝子名を一つ一つ検索していった。この解析の目的は再生に関与しそうな遺伝子を抽出することゆえ、1つの遺伝子について複数の Biological process が存在した場合は最も再生に関与しそうな Biological process を優先的に選択して分類に用いた。この結果、development 10.8% (306 リード), cellular process 59.1% (1675 リード), cellular component 10.8% (306 リード), response to stimulus 1.34% (38 リード), physiological process 1.09% (31 リード), regulation of biological process 0.04% (1 リード),そして biological process 不明のものが 16.8% (477 リード)存在した (図 13, B)。再生現象とりわけ再生時のパターン形成

において、初期発生で使用された遺伝子が再び活躍するという報告例が多数ある。例えば、イモリの足再生において、初期発生の四肢形成に必須な *sonic hedgehog (shh)* や *Hox* 遺伝子が再び働く^{1,59,60}。そこで **development** に含まれる遺伝子たちは注目に値する。また、**cellular process** に分類された遺伝子たちにも重要な遺伝子が含まれるため以下に別途取り上げる。

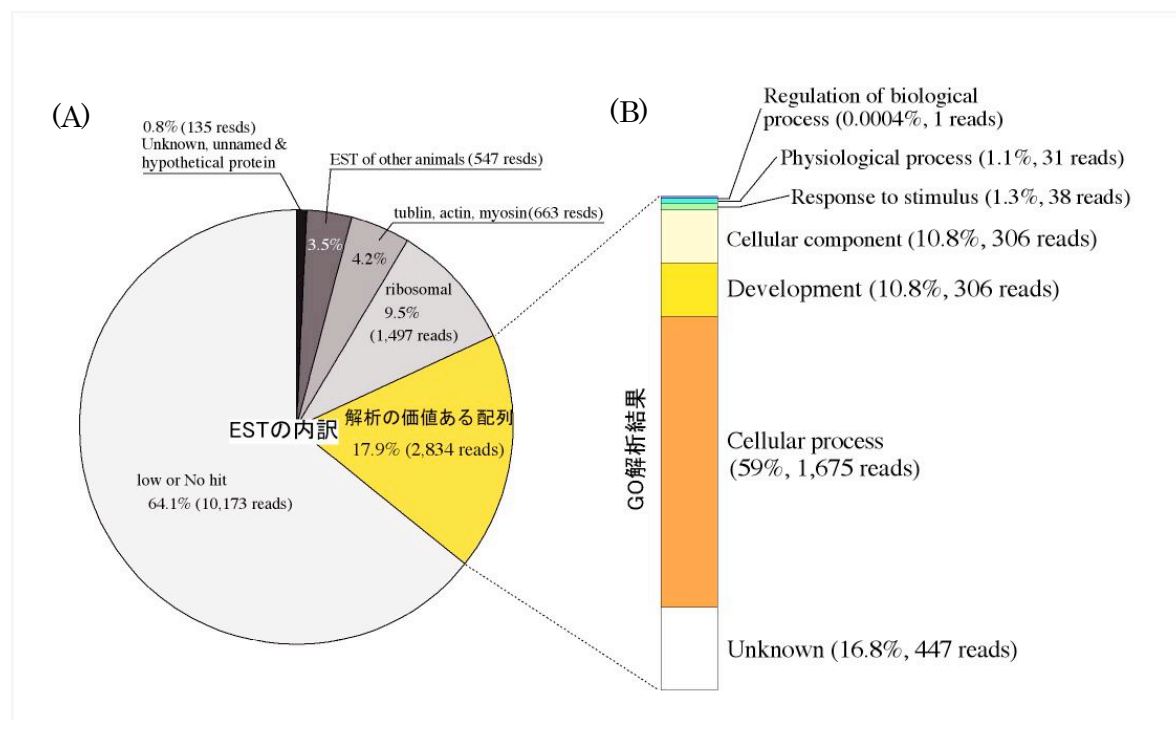


図 13、EST で得られた遺伝子の内訳

A, 円グラフは全遺伝子の内訳を示した。BlastX の結果、アノテーションの付いた遺伝子のうち、さらなる分類を行う必要のある遺伝子が 2,834 reads 存在した (黄色領域)。B, 2,834 reads について Gene ontology 解析を行った結果得られた GO カテゴリーの内訳。

Development に分類された遺伝子)

GO 解析の分類上、生殖細胞および幹細胞に関与する遺伝子が、11 遺伝子、脳・神経系の発生に関与するものが 9 遺伝子 (*notch*, *delta* を入れると 11 遺伝子)、表皮の発生に関わる 4 遺伝子、骨の発生に関わるものが 3 遺伝子、中胚葉系の発生に関わるものが 1 遺伝子、そしてそれ以外にも様々な発生現象に関与する遺伝子が 17 遺伝子得られた (表 1)。これらの遺伝子は再生中の形態形成を遺伝子レベルで調べるのに有用だと考えられる。数もさほど多くないため、全て解析するという方針で良いと考える。ここではとりわけ注目するもの数遺伝子のみを抜粋して簡単に記述し、その他の遺伝子につい

ては表1にまとめるに留める。本研究で得られた生殖細胞再生および分化等を詳細に解析する上で、*Piwi* 遺伝子以外の発現パターン解析も重要である。EST ライブラリー中に生殖細胞や幹細胞の維持等に関与する 13 遺伝子が含まれていた。本研究では、ここで得られた *Piwi* (*Ej-piwi*) を用いた。これ以外にもう一つの *Piwi* ファミリー遺伝子 (表 1 では *Hiwi* と記述) も得ているが、この遺伝子に関しては *Ej-piwi* のように限局した発現が得られないこともあり、発現パターンの規則性を特定できていないのが現状である。こちらの *Piwi* 遺伝子に関してはプラナリアと同様、ネオブラストにも発現するのではないかという期待が高まる^{39,40}。また、DEAD/H box 型の遺伝子も含まれた。この遺伝子が生殖細胞のマーカージェンである *vasa* タイプに属するかに期待がかかるが、現時点で完全長の配列が得られておらず *vasa* に特徴的な配列があるか否かは確認できていない。この DEAD/H box 型遺伝子は *Ej-piwi* に加えて生殖細胞及びネオブラストの良いマーカージェンとなる可能性も考えられる^{28,61}。これに加えて、ショウジョウバエの極細胞 (生殖系列細胞) の形成およびショウジョウバエと線虫の性決定に必須な *mago-P1* (*mago nashi*) は生殖細胞のマーカージェンになるだけでなく、再生中に予定生殖巣領域まで移動した細胞が、いつ雄と雌の生殖細胞へと分化してゆくのかという点を調べる上で有用かもしれない^{62,63}。再生中に体幹部から移動してきた *Piwi* 発現細胞がどのようなタイミングで、7 体節目で雄性生殖細胞そして 8 体節目で雌性生殖細胞へと分化するのかが興味深い。また、これらのことは GO 解析結果から性決定に関与する遺伝子として分類された *shavenbaby*, *androgen receptor*, *Kakapo gene product (shot)*, そして *transformer-2* にも期待できる。とりわけ *transformer-2* に関してはショウジョウバエのみならず、進化的に大きく離れたメダカにおいても性決定に関与することが示されている⁶⁴。さらに、雄雌の分化が起こる少し前から生殖細胞に発現をし始めるという知見があることから、ヤマトヒメミミズの性分化がいつ起こるのかを知る一つの指標になるかもしれない⁶⁴。幹細胞維持およびパターン形成への関与が期待できる分子として、とりわけ *notch* とそのリガンド *delta*、そして Janus kinase (JAK) は注目する価値があると考えている。*Notch/delta* のシグナル経路や JAK/STAT シグナル経路は、血球系の幹細胞や神経幹細胞を初めとして、様々な組織の幹細胞維持に関与することが知られている⁶⁵。これらの遺伝子はネオブラストを観察する上で有用かもしれない。これに加えて、*Notch/delta* の解析は分節機構の進化という観点で見た場合にも重要な意味を持っている。分節とは体に見られる繰り返し構造で、脊椎動物で言えば脊椎骨、昆虫で言えば体の節構造が分節パターンニングの末に出来てくる。これら分節構造は、初期発生の非常に早い時期に形成され、体全体のパ

ターニング（例えば体の何処に足を生やすか、特定の臓器を作るか）にも関与する。分節構造という幾何学的な構造が一体どのように作られるのかという？また進化的に大きく離れた動物（昆虫、人そしてミミズ）において、どのように分節という現象が獲得されてきたのか？前者の問題については、ショウジョウバエそして脊椎動物で長年に渡って解析されてきた^{66,67}。ショウジョウバエの分節については、Gap 遺伝子、Pair-rule 遺伝子群が時間空間的に秩序立って働き分節パターンが作られる⁶⁶。一方、脊椎動物においては *Notch/delta* のシグナル経路が分節の鍵となることが明らかにされている⁶⁷。2 番目の疑問については、遥か昔から疑問が持たれているにも関わらず未だ知見が少ない。この疑問にアドレスするためには主要な動物群の間で、分節機構を比較することが大切である。近年、3 つある動物群のうちの 2 つ、脊椎動物を含む動物群 (deuterostomia) と節足を含む動物群 (Ecdysozoa) の分節に共通の分子つまり *Notch/delta* が働くことが分かってきた⁶⁷。これより遥か昔（カンブリア紀以前）の分節を持った共通祖先から、既存の動物の分節（分節機構）が進化してきたのではと推測され出している⁶⁸。これらの仮説を考える上で、上記の 2 動物群に加えて環形動物を含む動物群 (Lophotrochozoa) でも分節に *Notch/delta* が寄与するのかを調べる必要性がある。ちなみに、環形動物の分節機構についてはほとんど解析が進んでいないのが現状である。以上のことから、発生中および再生中のヤマトヒメミミズで *Notch/delta* がどのような発現パターンをとるかを調べるのが有意義であると考えられる。

表1、Developmentに含まれる遺伝子

| 遺伝子名 | Contig数 | リード数 | Development内の分類 | |
|--|---------|------|--|---------------|
| ciboulot | 2 | 2 | brain development, central nervous system remodeling (sensu Insecta) | brain, nerve |
| serine proteinase inhibitor (serine (or cysteine | 1 | 1 | positive regulation of neurogenesis | brain, nerve |
| LINC-5 homolog | 1 | 1 | brain development, cell migration, signal transduction | brain, nerve |
| gephyrin | 1 | 1 | establishment of synaptic specificity at neuromuscular junction, Mo-molybdopterin cofactor biosynthesis | brain, nerve |
| FEZ2 (Fasciculation and elongation protein ze | 1 | 1 | axon guidance, nervous system development, signal transduction | brain, nerve |
| cysteine-rich motor neuron 1 | 1 | 1 | nervous system development | brain, nerve |
| gamma filamin | 1 | 2 | nervous system development | brain, nerve |
| iroquois homeobox protein Ziro1 | 1 | 1 | central nervous system development, embryonic eye development, embryonic pectoral fin morphogenesis | brain, nerve |
| filamin B | 1 | 3 | nervous system development | brain, nerve |
| filamin A | 1 | 1 | nervous system development | development |
| notch | 4 | 4 | development | development |
| Ras homolog enriched in brain | 3 | 3 | development | development |
| Evi-5 | 1 | 1 | development | development |
| FGFR | 1 | 1 | development | development |
| frizzled | 1 | 1 | development | development |
| MAP kinase-interacting kinase1 | 1 | 1 | signal transduction, development | development |
| seven-up alpha | 1 | 1 | development, regulation of transcription | development |
| wnt13 | 1 | 1 | development | development |
| wnt7B | 1 | 1 | development | development |
| delta | 2 | 2 | development | development |
| calreticulin precursor | 1 | 1 | development, secretory pathway | development |
| fatty acid desaturase 1 | 1 | 1 | development | development |
| T-box transcription factor Tbx2/3 | 1 | 1 | growth, larval development, positive regulation of growth rate, locomotory behavior | development |
| MUP-4 protein | 1 | 1 | determination of adult life span, growth, larval development, locomotion | development |
| SRC-1 | 1 | 1 | embryonic development | development |
| C-terminal binding protein | 1 | 1 | embryonic development, negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter | development |
| alpha 1 type XII collagen long isoform | 7 | 12 | epidermis development | epidermis |
| collagen alpha chain precursor | 4 | 8 | epidermis development | epidermis |
| collagen type XII | 1 | 1 | epidermis development | epidermis |
| collagen type XIV | 14 | 47 | epidermis development | epidermis |
| Xbtg1 | 1 | 1 | spermatid development | germ |
| DEAD/H box polypeptide | 2 | 2 | protein from <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group), data from Gramene(QSZBH4) | germ |
| mago-P1 | 1 | 1 | gamete generation, sex determination (germ) | germ |
| piwi | 1 | 1 | germ-line stem cell maintenance, germ-line stem cell division, RNA interference | germ |
| shavenbaby | 1 | 1 | female germ-line sex determination, oogenesis (germ), regulation of transcription | germ |
| transformer 2a | 1 | 1 | sex determination (germ), spermatogenesis, RNA splicing | germ |
| HIWI | 1 | 1 | germ-line stem cell maintenance, germ-line stem cell division, RNA interference | germ |
| beta-G spectrin | 1 | 1 | cell-cell adhesion, cytoskeleton organization and biogenesis, germ-line cyst formation, larval development | germ |
| kakapo gene protein (shot) | 1 | 1 | muscle development, mushroom body development, oocyte fate determination, sensory organ development | germ |
| RABIT protein kinase C beta type | 1 | 1 | establishment of cell polarity, neuroblast division, oocyte axis determination, oocyte fate determination | germ |
| janus like (drosophila sex regulated protein) | 1 | 1 | signal transduction, development, differentiation, germ cell | germ |
| transducin-like enhancer of split 3 E(spl) | 1 | 1 | cell fate commitment, Development, Notch signaling pathway | germ |
| androgen receptor-interacting protein | 1 | 1 | androgen receptor signaling pathway, male gonad development | germ |
| overgrown hematopoietic organ-23 | 1 | 1 | lymph gland development, protein biosynthesis | lymph gland |
| paramyosin | 16 | 31 | mesoderm development | mesoderm |
| fibrillin 2 | 1 | 1 | morphogenesis | morphogenesis |
| tyrosine 3-monooxygenase | 1 | 1 | morphogenesis | morphogenesis |
| Pix1 | 1 | 1 | morphogenesis, skeletal development | skeletal |
| 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate synt | 1 | 1 | skeletal development | skeletal |
| cartilage matrix protein | 16 | 152 | skeletal development | skeletal |

Cellular process に分類された遺伝子)

Cellular process に含まれたより細かなカテゴリーは、cell adhesion, detection of stimulus, cell proliferation & cell cycle, cell death, differentiation, cellular metabolism, cell motility, cell organization & biogenesis, signal (signal transduction, cell-cell signal), transport, nuclear division であった (図 14, A)。もちろん上述の development に分類された遺伝子たちの中にも、これらのカテゴリーのいずれかに分類されるものも数多く含まれている。しかしながら前述のように development というカテゴリーを優先的に分類したため、例えば development に分類された遺伝子で signal transduction や differentiation に関わるものがあった場合は、cellular process 中の signal および differentiation といったカテゴリー内に分類されていないことを断っておく。Cellular process 中のカテゴリーにおいて、注目すべきは cell proliferation & cell cycle, cell death, differentiation, cell motility, signal である (表 2)。ここに含まれる遺伝子は表 2 に記載した。また cell metabolism の中には転写因子が含まれている (図 14, B)。これらについては表 3 にまとめた。

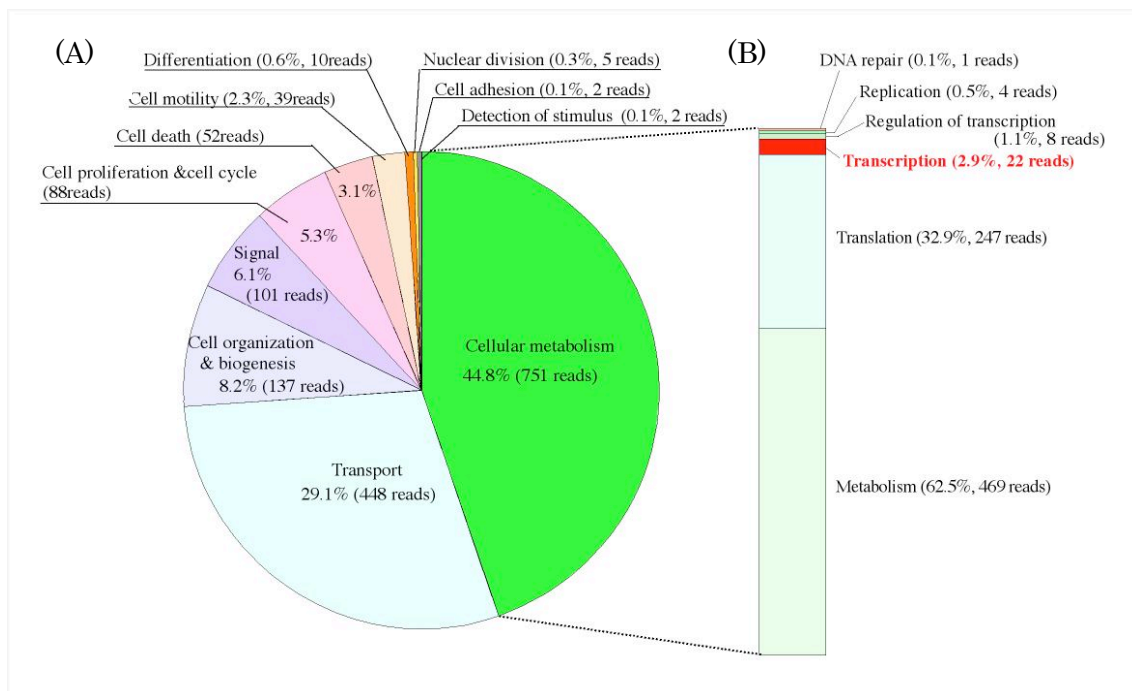


図 14、Cellular Process に分類された遺伝子の内訳

A, Cellular Process に含まれる遺伝子をより細かい GO カテゴリーに分類した結果を示した。

B, 円グラフ中、黄緑色で示した Cellular metabolism の内訳。注目すべき転写因子を赤色で示した。

表2、Cellular Process 内で注目すべきカテゴリー

| 遺伝子名 | Contig数 | リード数 | 詳細な分類 |
|---|---------|------|---|
| (cell cycle) | | | |
| block of proliferation | 2 | 2 | ribosomal large subunit biogenesis |
| cyclin 1 | 7 | 14 | cell cycle |
| cyclin B3 | 1 | 1 | cell cycle |
| caltractin | 1 | 1 | mitosis |
| centrin1 | 1 | 3 | mitosis |
| centromere/kinetochore protein zw10 homolog | 1 | 1 | meiosis, mitosis, transport, cell cycle |
| discoidin domain receptor family member 2 | 1 | 1 | positive regulation of cell proliferation, tyrosine kinase signaling pathway |
| MAD2 (mitotic arrest deficient) | 1 | 1 | cell cycle, mitotic checkpoint, mitotic spindle checkpoint |
| NIMA-interacting 1 | 1 | 1 | regulation of mitosis |
| pLK (putative polo family protein kinase) | 1 | 1 | cell cycle |
| RABIT T-complex protein 1 zeta subunit | 1 | 1 | regulation of progression through cell cycle |
| RAD21 | 1 | 1 | mitosis, nucleotide-excision repair |
| RAD23 | 1 | 1 | mitosis, nucleotide-excision repair |
| serine-threonin protein kinase pim-2 isoform 2 | 1 | 2 | cell proliferation, male meiosis |
| Xpd-1 | 1 | 2 | regulation of mitosis |
| ZW10 homolog | 1 | 1 | meiosis, mitotic checkpoint, regulation of exit from mitosis |
| allograft inflammatory factor 1 | 2 | 2 | cell cycle arrest |
| nucleoside diphosphate kinase B | 1 | 1 | negative regulation of cell proliferation |
| nucleoside diphosphate kinase-z4 | 1 | 1 | negative regulation of cell proliferation |
| granulin | 2 | 2 | positive regulation of epithelial cell proliferation, lipid catabolism, blastocyst hatching |
| tropomyosin | 27 | 47 | cytokinesis |
| XDRP1 (DPR1) | 1 | 1 | cytokinesis |
| (differentiation) | | | |
| c-Jun | 1 | 2 | leading edge cell differentiation (13) |
| caveolin-3 | 1 | 1 | muscle cell fate commitment |
| 14-3-3 protein | 6 | 7 | cell proliferation |
| (cell death) | | | |
| mitochondrial carrier homolog 1 | 1 | 1 | positive regulation of apoptosis, regulation of signal transduction |
| glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 14 | 28 | apoptosis |
| ALG-2 interacting protein 1 | 1 | 1 | actin filament polymerization, apoptosis, positive regulation of JNK cascade |
| Clast3 protein | 1 | 1 | apoptosis, mitotic spindle checkpoint |
| glutathione peroxidase1 | 1 | 3 | induction of apoptosis by oxidative stress |
| programmed cell death 4 isoform 2 | 1 | 1 | apoptosis |
| thioredoxin peroxidase 2 | 1 | 1 | removal of superoxide radicals, apoptosis |
| toll-like receptor | 1 | 1 | signal transduction, induction of apoptosis |
| cyclophilin A | 8 | 10 | nuclear mRNA splicing, via spliceosome |
| cyclophilin G | 1 | 1 | nuclear mRNA splicing, via spliceosome |
| cyclophilin | 1 | 2 | nuclear mRNA splicing, via spliceosome |
| 2-Cys thioredoxin peroxidase | 1 | 1 | response to oxidative stress |
| death-associated protein | 1 | 1 | apoptosis |
| (cell motility) | | | |
| F-actin capping protein alpha-1 | 1 | 1 | cell motility, protein complex assembly |
| IL-16 | 2 | 2 | immune cell chemotaxis |
| intermediate filament | 6 | 9 | nuclear migration |
| intermediate filament filarin | 1 | 1 | nuclear migration |
| intermediate filament gilarin | 2 | 10 | nuclear migration |
| intermediate filament macrolin | 1 | 2 | nuclear migration |
| intermediate filament protein | 7 | 11 | nuclear migration |
| slf-3P | 1 | 3 | axon guidance, cell migration |
| (signal) | | | |
| DJ-1 | 1 | 1 | Ras protein signal transduction |
| DnaJ (Hsp40) | 1 | 1 | small GTPase mediated signal transduction |
| EGF | 2 | 2 | epidermal growth factor receptor signaling pathway |
| fibropellin Ib (EGF) | 1 | 3 | epidermal growth factor receptor signaling pathway |
| fibropellin III (EGF) | 1 | 1 | epidermal growth factor receptor signaling pathway |
| FMRF amide | 3 | 3 | neuropeptide signaling pathway |
| BIOGL Guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein | 18 | 78 | signal transduction |
| APLCA cAMP-dependent protein kinase regulatory chain kinase | 1 | 1 | signal transduction |
| ASPG SPOFR N(4) | 1 | 1 | neuropeptide signaling pathway |
| colon cancer-associated protein Mic, (growth differentiation factor 15 (GDF15)) | 1 | 1 | signal transduction, TGFbeta receptor signaling pathway |
| G protein-coupled receptor kinase 7 | 1 | 1 | signal transduction |
| myo-inositol-1-monophosphatase (IMPase) | 1 | 1 | signal transduction |
| neuronal acetylcholine receptor protein, alpha-2 chain | 1 | 1 | signal transduction, synaptic transmission |
| sialic acid-binding lectin 2 | 1 | 1 | signal transduction |
| dopamine beta hydroxylase | 2 | 2 | synaptic transmission |
| acetylcholine esterase | 1 | 1 | acetylcholine catabolism |
| gap junction protein pannexin | 1 | 1 | cell-cell signaling |
| glutathione-requiring prostaglandin D synthase | 1 | 1 | cell-cell signaling, signal transduction, locomotory behavior |

表3、Transcription Factor

| 遺伝子名 | Contig数 | リード数 | 分類 |
|--|---------|------|--|
| activating transcription factor ATF-4 | 2 | 3 | regulation of transcription, DNA-dependent |
| RNA polymerase | 1 | 2 | transcription from RNA polymerase I promoter |
| RNA polymerase II | 1 | 1 | transcription from RNA polymerase I promoter |
| RNA polymerase II | 1 | 1 | transcription from RNA polymerase I promoter |
| haywire | 1 | 1 | regulation of alternative nuclear mRNA splicing, via spliceosome, transcription initiation from RNA polymerase II promoter |
| metallothionein-I gene transcription activator | 1 | 1 | transcription factor |
| multiple ankyrin repeat signal KH domain protein | 1 | 1 | regulation of transcription, DNA-dependent |
| oocyte zinc finger protein XLOCu-28 | 1 | 1 | transcription |
| TBP-associated factor 13 | 1 | 1 | transcription initiation from RNA polymerase II promoter |
| TFIID 20/15kDa subunit | 1 | 1 | transcription from RNA polymerase II |
| TFR domain | 1 | 1 | regulation of transcription, DNA-dependent |
| transcription factor AP-1 | 1 | 1 | transcription |
| transcription factor CA150 | 1 | 1 | transcription |
| transcription factor HpLim | 1 | 1 | transcription |
| transcription initiation factor TFIID | 1 | 1 | transcription initiation from RNA polymerase II promoter |
| zinc finger like protein | 1 | 1 | transcription |
| zinc finger protein 35 (Zfp-35) | 1 | 1 | transcription |
| zinc finger protein MA23 | 1 | 1 | transcription |
| zinc finger protein XLCGF26.1 | 1 | 1 | transcription |

5-2、サブトラクション

EST ライブラリーの解析から注目した遺伝子は、名前をもとにした GO 解析結果であるため、セレクトの度に重要な遺伝子を逃している可能性がある。例えば、今回のセレクトでは相同性が得られたものに関して解析を進めてきた。このような状況の中、相同性の低いものや相同性が得られなかった遺伝子にも重要なものが含まれる可能性は十分に考えられる。この一方で、上記の EST ライブラリーは、再生時特異的に発現する遺伝子のみならず再生していないミミズに発現する遺伝子も数多く含まれると考えられるため、網羅的な解析に要する労力・マンパワーと結果がどれほど結びつくかは不明である。ミミズ研究においてそれだけの労力を費やす環境は整っていないというのが実状である。故に前章に記述した EST データベースに加えて、サブトラクション法を用いて再生組織に発現する遺伝子を得ることが有効であると考えた。再生時特異的に発現する遺伝子を得るために、再生中のミミズと再生していないミミズを用いてサブトラクションを行った。サブトラクションはタカラバイオ株式会社に依頼して、マイクロビーズアレイ解析法を使用して行った。再生中サンプルに関しては EST に使用したのと全く同様の RNA を用いた。再生していない個体については、無性生殖個体の中から自切した個体と再生中の個体を注意深く取り除いたのち、ISOGEN を用いて total RNA を精製して用いた。EST で示したのと、同様の方法で poly (A) RNA を精製した。ここでマイクロビーズアレイ解析法の原理を簡単に説明する。第一のステップとして図 15 に示すように、再生個体から採った再生(+)RNA と再生していない個体の再生(-) RNA の混合物から合成した cDNA をビーズに結合させる。これに際して、まず cDNA とマイクロビーズに結合するための糊しろとなる Tag 配列と Anti-Tag 配列をそれぞれ付ける (図 15, ステップ 1 の緑、青、黄色のボックス)。cDNA を、Tag 配列を持つベクターに組み込み、後に PCR で cDNA+Tag 配列領域を増幅することで Tag-cDNA を得る。これら Tag 配列は 1,700 万通りあるため、確率的にそれぞれの遺伝子ごとに重複のない Tag 配列が付加される。一方、ビーズ表面にはこれらの Tag 配列と相補的な Anti-Tag 配列を吸着させておく (図 15, ステップ 1 の緑、青、黄色のボックス)。こちらにも特殊な手法を用いて、それぞれのビーズに他のビーズ上の Anti-Tag 配列とは重複しない Anti-Tag 配列を付けておく (図 15, ステップ 1) ⁶⁹。これらをハイブリダイズしてビーズと cDNA を結合させる。この結果として、理論上 1 つのビーズ上には 1 種類の cDNA のみが吸着する。また Tag 配列を持った cDNA を PCR で増幅させたのちビーズへの結合を行っているため 1 つのビーズに $10^4 \sim 10^5$ 分子の同じ種類の cDNA が結合する。この作業と平行

してステップ2では、再生(+)**RNA**と再生(-)**RNA**由来の**cDNA**をそれぞれ別の蛍光色素(**cy-5**と**Fluorescein**)でラベルしてプローブを作成する(図15, ステップ2)。便宜上図15では、再生(+)**プローブ**の標識を紫星印で、再生(-)**プローブ**については水色星印で示した。ステップ3では、こうして得た**cDNA-マイクロビーズ**と**プローブ**を混合して競合ハイブリダイゼーションを行う。この結果、再生(+)**のみ**に発現している遺伝子(**GeneA**)には紫星印の**プローブのみ**が、そして再生(-)**のみ**に発現する遺伝子(**GeneC**)には青星印の**プローブのみ**がハイブリダイズすることになる。両方に発現する**GeneB**に関しては、両方の**プローブ**でラベルされる。また、存在する遺伝子(**プローブ**)の量比により個々のビーズは、赤と青のどちらで強くラベルされるかに差が見られるため、各サンプル間での発現量比が細かく調べられる(図15, ステップ3)。こうして蛍光標識されたビーズをフローサイトメトリーで、それぞれの蛍光強度を指標に分離する。なお、詳細な原理とプロトコールは、(タカラ-マイクロビーズアレイのホームページ、http://bio.takara.co.jp/catalog/catalog_d.asp?C_ID=C1987を参照)を参照して頂きたい⁶⁹。

これらの作業を経て得られた実際の結果を図15, ステップ4に示す。蛍光標識を指標にフローサイトメトリーで分けたときに、図15-ステップ4のパターンを得た。図中ではビーズ数が多いところから順に、青色、黄色、オレンジ色そして赤色と色分けされている(図15, ステップ4)。グラフの対角線上に青色で示される領域があるが、ここには再生時と再生していない個体ともに発現している遺伝子が含まれる。この領域から離れて存在する分画、紫枠内に再生(+)**に特異的な発現**をする遺伝子が含まれる。この手法では、ここでまず分布図のどの領域の**cDNA-マイクロビーズ**を回収するかを設定する。青色間際まで採ればノイズが高くなるというリスクが上がる。一方、青色からあまりに離れたところのみを回収すれば、本来発現に差の見られたものも失う可能性がある。そこで、我々は再生中のミミズに発現すると考えられる2つの領域、青色から遠ざかった領域U1とより近い領域まで含むU2について、それぞれビーズを回収した。これに加えて、再生していないミミズに特異的な発現を見せる遺伝子、つまり再生時に発現が下がる遺伝子についても回収した(D1)。全ビーズ数711,000個の内、U1には1,153ビーズ、U2には2,669ビーズそしてD1には8,474ビーズが含まれる。それぞれのビーズを約200個ずつ分注した。現時点でU1, U2, D1について、それぞれ192個ずつシーケンスを行った状態にあり、これらの配列データのうち解析の信頼性に悪影響を及ぼすと考えられるものを除き、最終的に551配列が残った。またこれらの配列に関してクラスター解析を行った結果、コンティグ63遺伝子とシングレット81遺伝子が含まれることが明らか

かとなった。これらのうち再生時特異的な U1 と U2 に含まれるものがコンティグ 38 遺伝子とシングルレット 39 遺伝子であった。シングルレットはその名の通り、シーケンス結果 1 リードしか見られなかった遺伝子である。よってより多くのシーケンス解析を行わないと本当に再生時特異的に発現するのか、もしくは発現量の低い遺伝子でたまたま再生中のフラクション (U1,U2) で検出されたのか、信憑性が得られない。この時点で発現に差がある遺伝子として信憑性が高いのはコンティグを形成した遺伝子群である。U1, U2 に含まれる遺伝子のほと

んどが、再生していない個体のフラクション D1 に含まれていないことから、サブトラクションが上手くできていると判断できる。次に、

実際に U1, U2 に含まれる遺伝子が再生組織に発現しているかを調べることでサブトラ

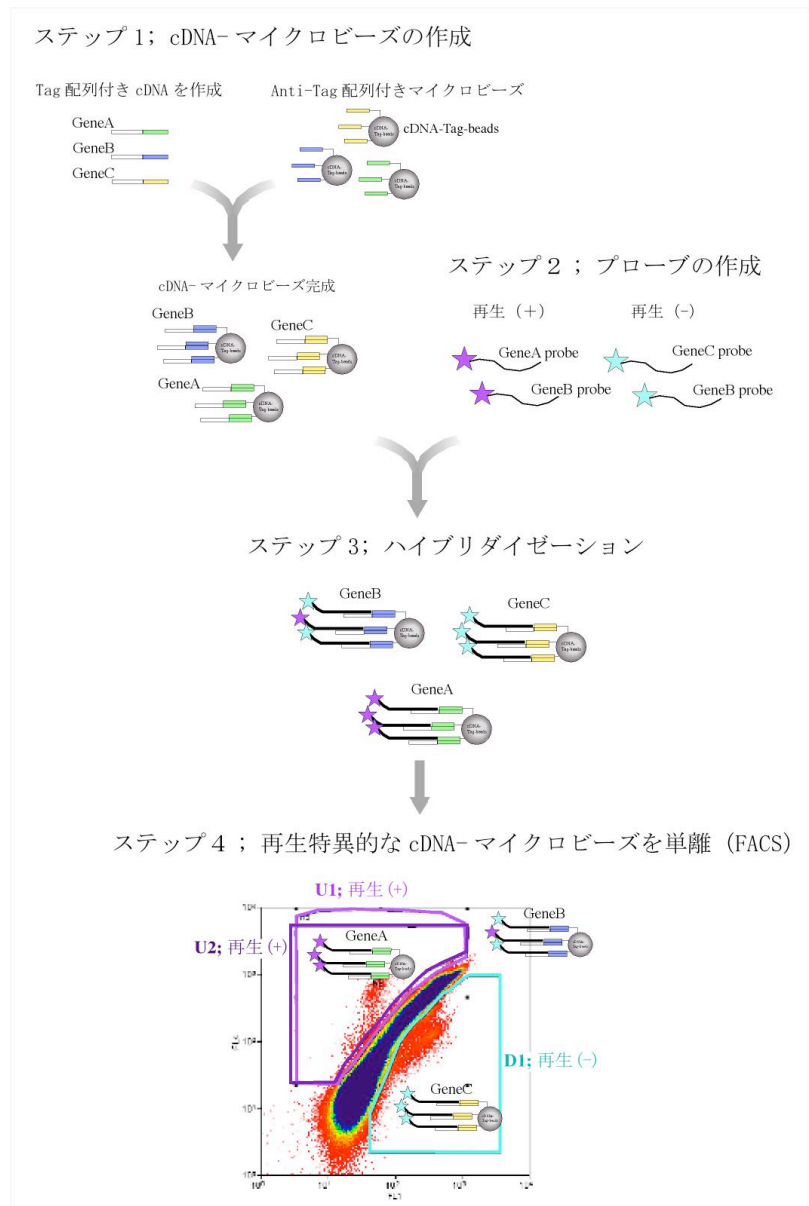


図 15、マイクロビーズ法の原理

ステップ 1～4に分けて、マイクロビーズ法を用いたサブトラクションについて図説した。マイクロビーズを灰色の円で示した。ステップ 1 の図では、ビーズに cDNA を吸着させる。これに必要な、Tag 配列をそれぞれ黄緑、青そして黄色で示した。また、これらに対する Anti-Tag 配列に関しても、それぞれ同様の色で示した。同じ色の Tag と Anti-Tag 配列がハイブリダイズできる。ステップ 2 のプローブに関しては、再生 (+) と再生 (-) のラベルをそれぞれ紫星印と水色星印で示した。ステップ 3 には、cDNA-マイクロビーズとプローブをハイブリダイズした図を示す。再生 (+) と再生 (-) の両方に発現する Gene B には、水色と紫のプローブがハイブリダイズする。ステップ 4 で、再生 (+) と再生 (-) の cDNA-マイクロビーズを選別する。図はプローブの蛍光標識を指標にして FACS を選別した結果である。

クションライブラリーの検証を行った。これに際して、まず2つの解析を行った。1つ

目の解析として EST ライ
ブラリーから得た配列デー
タとの相同性検索を行っ
た。このサブトラクション
で得られた配列は3'末端側
の数十から数百ベースペア
のみであるため、*in situ*
hybridization を行うに当た
りプローブが短すぎる。そ
こで、サブトラクションで
得られた配列と一致する
EST の遺伝子をプローブと
して用いることにした。こ
の時点で EST データ上に
存在しない遺伝子が4遺伝
子含まれており、これらに
関しては発現解析不能であ

表4、再生 (+) フラクション U1&U2 に含まれる遺伝子

| | U1 | U2 | D1 | clone name | micro bead clone ID | EST sequence ID | Blast X |
|-------------|----|----|----|------------|-------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| (Contig) | 4 | 0 | 0 | #1 | 38 contig1 | 000038-F12 | no hit |
| | 0 | 2 | 0 | #2 | 57 contig1 | 000020-D18 | no hit |
| | 12 | 47 | 3 | #3 | 42 contig1 | 000002-I04 | cytochrom oxidase |
| | 2 | 0 | 0 | #4 | 44 contig1 | 000004-D07 | ubiquitin |
| | 4 | 0 | 0 | #5 | 41 contig1 | 000026-E13 | no hit |
| | 0 | 2 | 0 | #6 | 56 contig1 | 000030-M12 | no hit |
| | 0 | 2 | 0 | #7 | 40 contig1 | 000014-M07 | no hit |
| | 2 | 0 | 0 | #8 | 37 contig3 | 000014-M21 | no hit |
| | 0 | 2 | 0 | #9 | 59 contig1 | 000003-L05 | CG16726-PA [Drosophila |
| | 2 | 5 | 0 | #10 | 32 contig2 | 000005-K23 | no hit |
| | 2 | 1 | 0 | #11 | 49 contig1 | 000002-D19 | Globin III, extracellular precursor |
| | 13 | 24 | 0 | #12 | 34 contig1 | 000003-M12 | collagen protein |
| | 2 | 0 | 0 | #13 | 48 contig1 | 000003-N22 | no hit |
| | 3 | 0 | 0 | #14 | 43 contig1 | 000034-E06 | polyA |
| | 0 | 2 | 0 | #15 | 61 contig1 | 000002-O16 | low |
| | 3 | 0 | 0 | #16 | 37 contig2 | 000038-F17 | no hit |
| | 9 | 6 | 7 | #17 | 15 contig1 | 000034-M13 | no hit |
| | 7 | 0 | 0 | #18 | 37 contig4 | 000033-G06 | no hit |
| | 4 | 0 | 0 | #19 | 37 contig1 | 000036-F02 | no hit |
| | 2 | 0 | 0 | #20 | 50 contig1 | 000028-H18 | plasminogen, serine proteinase |
| | 3 | 0 | 0 | #21 | 39 contig1 | 000038-J24 | no hit |
| | 4 | 0 | 0 | #22 | 45 contig1 | 000002-L13 | low |
| | 0 | 12 | 0 | #23 | 53 contig1 | 000038-J10 | no hit |
| | 13 | 0 | 0 | #24 | 33 contig1 | 000038-O09 | no hit |
| (Ribosomal) | 52 | 0 | 0 | #25 | 35 contig1 | 000010-B14 | ribosomal |
| | 2 | 3 | 0 | #26 | 46 contig1 | 000012-G19 | ribosomal L6 |
| | 0 | 2 | 0 | #27 | 60 contig1 | 000012-A16 | ribosomal S21 or 40s |
| | 2 | 0 | 0 | #28 | 47 contig1 | 000025-O11 | ribosomal L11 |
| | 3 | 31 | 0 | #29 | 32 contig1 | 000033-E07 | ribol19 |
| | 0 | 9 | 0 | #30 | 55 contig1 | 000032-B09 | ribosomal protein L18a |
| (Singlet) | 1 | 0 | 0 | #31 | S652_U1L1_P01_P2_B12 | 000015-N15 | no hit |
| | 1 | 0 | 0 | #32 | 40 S652_U1L1_P01_P1_B12 | 000034-N05 | riboL11 |

注) U1 と U2 は再生中、D1 は再生していないミミズに含まれる遺
伝子。表中の数値は、それぞれのフラクションに含まれたリード数
を示す。シングレットに関しては、解析に用いたクローンのみを記
述した。

った。また、この相同性検索の作業を通してアノテーションを付けた。ちなみに3'末端
側の短い配列のみでは公開されている既存のデータベースを用いて相同性検索を行っ
ても解析が困難であるため、アノテーション付けには EST で得た遺伝子との相同性検索
が必須である。2つ目の解析として、相同性検索の結果から、同じ遺伝子と相同性を持
ったものはコンティグを組んだか否かに関わらず重複を除いた (表4)。この結果、当
初の U1&U2 に含まれたコンティグ 31 遺伝子を 24 遺伝子まで絞り込まれた (表4)。ま
たアノテーションが付かなかったものに関しても発現パターンの解析は行うものとし
た。発現解析には、その時点で我々が最も発現パターンの解析に慣れていた再生2日目
のミミズを用い、必要に応じて再生1日目のミミズについても解析を行った。再生時特
異的な発現であるか否かは、同一個体内の体幹部 (元からある組織) と再生組織での発
現の比較で判断した。

サブトラクションライブラリーの検証には、再生時特異的な発現をするであろう 24
遺伝子を用いた。これに加えて、数多く含まれるリボソーマル RNA が果たしてノイズ

なのか否かを検証するため 3 種類のリボソーマル RNA について発現解析を行った。さらに、信憑性が薄いシングレットに関しても 2 遺伝子のみ発現解析を行った。この結果、図 16 のピンク色領域に示したように再生時特異的な発現をするであろう 24 遺伝子のうち 18 遺伝子 (75%) が切断後 1 日目もしくは 2 日目の再生組織に発現する。再生 3, 4 日目について検証すればさらにパーセンテージが上がるかもしれない。リボソーマル RNA に関しても 3 遺伝子中 2 遺伝子が再生組織に強い発現をすることより、これらの遺伝子が単なるノイズでないことが示唆された。さらに、シングレットに関しても 2 遺伝子中 1 遺伝子が再生組織特異的な発現をみせる (図 16, 黄色領域)。総合して、72.4% (25/33 遺伝子) が再生組織特異的な発現をすることが分かった。これに加えて、再生芽で発現が確認できないものの、擬陽性としては #19、#20 と #21 が挙げられる (図 16)。#20 は再生組織でシグナルが見えないものの、元からあった組織の腹側神経索で染色がみられる (図 16)。また、#21 に関しては再生 2 日目に元からあった組織の表皮に若干の染色が見られる (図 16)。現在までの解析では、これらの染色が再生 1 日目で観察されない。これらの遺伝子が再生特異的な発現をする遺伝子である可能性がある。以上の結果を踏まえて、マイクロビーズアレイ法により再生時に発現する遺伝子が有意に得られたと判断した。

次に上記の検証の結果得られてきた遺伝子の発現時期と発現パターンを記載する。まず再生 1 日目について記載する。この時期は、ネオブラストなどの幹細胞様の細胞から多数の未分化細胞が産出されて再生芽を形成するステージである¹⁴。よって、再生初期から発現する遺伝子の中にはネオブラストもしくは未知の幹細胞などに発現する遺伝子が含まれる可能性がある。再生 1 日目に発現が見られる遺伝子は U1&U2 中 16 遺伝子存在し、Ribosomal には現在わかっているものとして 1 遺伝子が存在する (図 16)。これらの内、#5、#6、と #26 がネオブラストに発現することが明らかになった (図 17) (詳細は後に記述する)。再生 1 日目において、ほとんどの遺伝子は再生芽全体に発現する (図 16)。この中で比較的の特徴ある発現パターンを示すものとして、#2、#5、#10、#13 が挙げられる (図 16)。#2 と #5 は将来脳ができる領域付近で発現が見られる (図 16)。#10 は再生芽の表層の一部の細胞で発現がみられる。そして #13 は表皮で強い発現が確認される (図 16)。前述したように、ミミズの再生芽形成にネオブラストだけでなく表皮からの脱分化が関与する可能性もあることから、再生初期の表皮で発現する遺伝子も注目に値すると考えられる (#13 に関しては、再生 1 日目と 2 日目の両方で表皮に強い発現を見せるため単純に表皮形成に関与する遺伝子かもしれない)^{8,9}。再生 2 日目にな

って初めて発現するものは3 遺伝子存在し、1 日目の発現未確認のものが2 遺伝子存在する (図 16)。再生2 日目は、再生芽に集まった細胞が分裂して分化をしてゆくステージであると考えられるため、2 日目に発現する遺伝子たちにはこのようなイベントに関与するものが含まれると考えられる¹⁴。再生2 日目に発現する遺伝子も再生1 日目と同様に、大多数が再生芽全体で発現する (図 16)。一方、#14 のように表皮で発現がほとんど確認されないものや、これとは逆に#12 や#13 の様に表皮で強い発現がみられるものなど組織特異的発現を示すものが得られてきた (図 16)。しかしながら、上述の遺伝子は発現領域が広すぎるため、再生現象をピンポイントで観察するには適さない。そこで次に、解析遺伝子の中で極めて特徴的なパターンを示すもののみを抜粋し記載する。

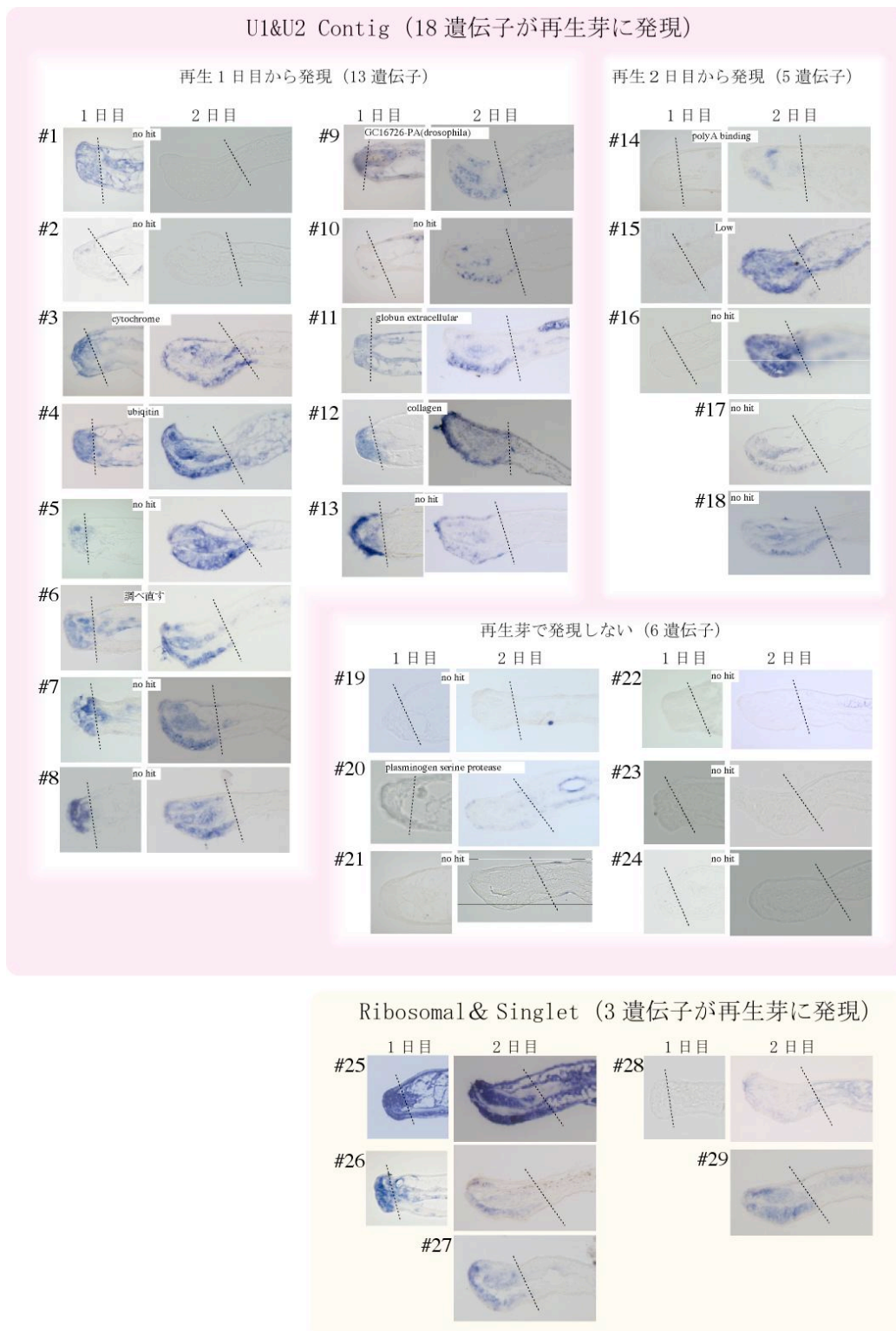


図 16、発現パターンの解析

サブトラクションが上手くできているか否かを検証するため、表 4 で示した遺伝子が再生芽に発現するかを確認した。ピンク色領域に Contig を、黄色領域に Singlet とリボソーマル RNA を解析した結果を示した。Contig に関しては、再生芽に発現するものと発現が認められないものを、区別して載せてある。写真中の点線は切断部位を示す。点線より左側が再生組織である。

ネオブラストに発現する遺伝子)

上記に示した通り、#5、#6、と#26は再生芽での発現に加えて、ネオブラストでも発現する。図17に示すように、点線で示した隔壁の腹側基部に存在するネオブラストで染色が見られる。現時点で、腹側神経索上の *Piwi* 発現細胞での発現は認められていない。ネオブラストに加えて、隔壁付近に付着する小型の細胞にも発現が認められる (図17, #6の矢頭)。北海道大学の杉尾らがスモールネオブラストと命名したが、未だこれらの細胞がネオブラスト由来の細胞なのか、はたまたネオブラストとは異なる新種の幹細胞なのかは全くもって不明である (未発表)。上記の遺伝子が再生芽の細胞のみならずネオブラストにも発現すること

から、これらの遺伝子は成体内で未分化もしくは分化程度の低い細胞で発現すると考えられる。現時点で、これらの遺伝子が切断前の個体でもネオブラストに発現するのか、また切断直後から再生1日目までにどのような発現変化を示すのかなど発現の詳細は未解析である。切断直後から経時的に発現変

化を追うことで、再生芽を構成する細胞の由来を知るための手がかりが得られるかもしれない。

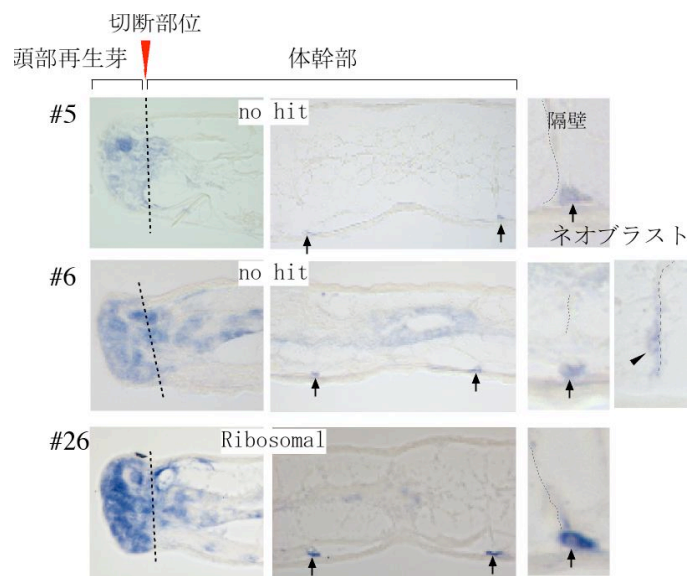


図17、ネオブラストに発現する遺伝子

赤矢頭および点線で切断部位より左側に再生組織を、中央に元からあった体幹部を示す。右側の写真はネオブラストを拡大したものである。隔壁基部に存在することからも、黒矢印で示した細胞がネオブラストであることが容易に判断できる。#6に関しては、一枚の写真に隔壁が入りきらなかったため、2枚写真を掲載した。#5、#6、#26はネオブラスト(黒矢印)に発現することが見て取れる。矢頭はスモールネオブラストを示す。

特徴的な発現を示す遺伝子)

#19 について

写真(縦断切片)に示すように、腹側に並んで点状の発現を見せる(図18、#19)。剛毛を目印にして、必ずその腹側に発現がみられることから等間隔に並んだ特定の細胞で発現すると考えられる。等間隔に存在するという特徴から、ネオブラストが染まっているという可能性も浮上したが、拡大図に示す通り発現細胞の正体は表皮にある特定の細胞である(図18、#19右側の写真)。ちなみに、この遺伝子は頭部尾部ともに再生組織での発現は認められない。現時までの解析では、1日目にこのような発現パターンは見られないため再生の比較的后期に発現し始める遺伝子かもしれない。

#8 について

体幹部での発現は#19と類似した発現パターンを示す

(図18、#8)。写真中の黒矢印で示した剛毛の位置を目印にして観察すると、#19と全く同様の細胞で発現が見られる

ことが分かる(図18、#19と#8を比較)。ただし、この遺伝子に関しては頭部再生組織と尾部においても強

い発現がみられる(図18、#19と#8の左側の写真を比較)。現在のところ、#19および#8の遺伝子の正体はわからない。また、数ある表皮細胞の中で染まってくるこれらの細胞が何であるのかも謎である。一つの可能性として、表皮にある何らかの分泌腺の細胞が染まっているという可能性が考えられる。しかしながら、再生1日目にこれらの細胞では発現が見られないようである。まだ解析数がわずかなためはっきりしたことは言えないが、再生依存的に表皮の特定の細胞で発現してくる遺伝子とも考えられる。これらの遺伝子が発現する表皮の細胞は、再生中の組織ではなく元から存在する組織に存在している。もし、これらの遺伝子が分泌腺の細胞で発現する遺伝子ならば再生の有無に関わらず発現し続けてもよさそうなものである。また、もう一つの可能性として、これらの細胞が再生に関与する可能性も否定できない。環形動物の再生に表皮から脱分化した細

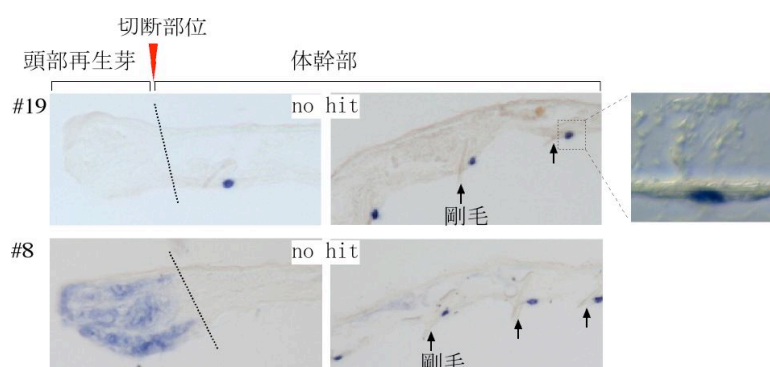


図18、特定の表皮細胞に発現する遺伝子

黒矢印で剛毛を示す。ここに示す遺伝子は剛毛のすぐ後ろに規則正しく点状に発現する。右に示した発現細胞の拡大写真から、これらの遺伝子が表皮の特定の細胞に発現することがわかる。#8については、再生芽にも発現が見られる。

胞が関与するという可能性がある⁸⁹。しかしながら、果たして本当に脱分化なのか、それとも比較的分化程度の低い細胞をリザーブしているのかという点について明快な結論は得られていない。よって、これらの遺伝子を発現している細胞たちが再生に備えてリザーブされている細胞である可能性も十分考えられる。以上の点を留意しながら、今後解析を行う必要がある。

表皮で特徴的な発現パターンを示す遺伝子)

#21 は尾部の表皮および腸において、強く発現する領域と発現の見られない領域が交互に見られる (図 19)。ちなみに写真の尾部は再生中ではない。最も強い発現が見られる領域は尾部成長帯であり、ここで細胞増殖が起こった結果、体幹部が伸長してゆく。また再生 2 日目の再生芽には発現が観られないが、元からあった組織の表皮には同様のパターンが見受けられる (図 19, 左写真のブロック囲い)。発現は弱いものの、体幹部でも同様のパターンが観察される (図 19)。現時点で、この発現が表皮のどの領域に観られるのかなど、発現の規則性は未確認である。しかしながら、これよりこの遺伝子が体節を反映した繰り返りパターンで発現し、体節形成もしくは体節組織の分化などに関与する可能性も考えられる。また、再生時に必要と考えられる位置価の形成に関与する可能性もある。ヤマトヒメミズが再生する際、切断された個体の元々の頭部側に頭部を、尾部側に新たな尾部を再生する。またヤマトヒメミズは明瞭な体節を持ち、これら各体節内に自切点を持つことが知られている。興味深いことに、人為的に操作して間違えた自切点からの再生を促すと、本来尾部が再生するほうの切り口から頭部が再生されてしまうという報告がある⁷⁰。これよりヤマトヒメミズの体節内には前後軸を規定する位置価が存在すると考えられている。この遺伝子が体節に対応して規則的に発現するかは興味深い。上述の可能性を踏まえた上、解析をする価値のある遺伝子である。

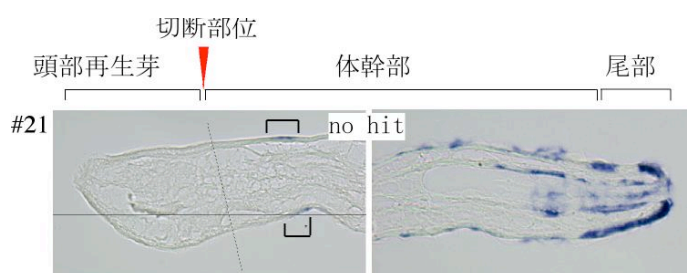


図 19、表皮で特徴的な発現パターンを示す遺伝子

表皮でまだらな発現パターンを示す。再生芽で発現は見られず、元からあった組織で発現をする。写真に示すように尾部で強い発現をし、前方でも弱いながら発現が見られる (ブロックで囲った)。

まとめ)

以上、マイクロビーズアレイ法によるサブトラクションライブラリーの作成ライブラリーの検証を行ってきた。この方法で得た遺伝子が再生組織に有意に発現することからも、信憑性のあるサブトラクションライブラリーを作成できたと結論付けられた。また、今回解析した再生時特異的フラクション U1&U2 に含まれる 384 配列（ビーズ）と全ビーズ数（3,822 ビーズ）の約 1/10 に過ぎないが、この中にも上に示したように興味深い発現をする遺伝子が 6 遺伝子（20 ビーズ）含まれていることが分かって来た。一方、現時点で再生時に発現が下がる遺伝子も再生に重要な働きをする可能性が十分に考えられるが、これらの遺伝子（8,474 ビーズ）については現在未解析である。今後、このサブトラクションライブラリーの解析を行うことで興味深い遺伝子の単離、および発現パターンを指標にした再生現象の観察が期待できると考える。

本研究により、環形動物の再生過程での遺伝子データベースおよび再生時特異的に発現する遺伝子ライブラリーが作成された。現在までに、ヒルの消化そしてミミズの代謝等についてのデータベースは存在していたものの、再生に関してのデータベース作成は本研究が初めてである。今後、環形動物の発生・再生現象解明に役立つものと考えられる。その手始めとして本研究で得られた EST ライブラリーに関しては、環形動物を用いている数少ない研究室の一つ北海道大学理学部の柘内新 助教授の研究室や、ヒルの発生生物学の世界的権威 Prof. David Weisblat（カリフォルニア大学 バークレー校）にも分譲しており、現在利用されつつある。

6、謝辞

本研究をするにあたり、ヤマトヒメミズを分譲して下さった、また惜しめない情報提供とアドバイスをしてくださった北海道大学の柄内新助教授、ヤマトヒメミズの飼育から組織観察まで教えてくださった西野純子（旧姓；忽那純子）さん、データ提供をしてくださった杉尾むつ美さん、そして良き議論を交わしてくださった川本思心博士、に言葉では語りつくせぬ感謝を申し上げます。また、環形動物の様々な知識と技術そして的確なアドバイス下さったカリフォルニア大学バークレー校の Prof. David Weisblat にはアメリカまで届くほど大きな声で感謝の意を伝えたく思います。本研究を始めから最後まで辛抱強く私を見守り教育してくださった高橋淑子教授には語り尽くせぬ感謝をしております。私は高橋教授の教えを今後の研究人生の根元に常に持ち続けることでしょう。今後の頑張り感謝の気持ちをお伝え致したく思います。そして、父を亡くしたあと女手一つで私を大学から大学院まで通わせてくれた母（田所祥子）と、天国の父（田所豊）には胸が熱くなるほどなみなみならぬ感謝の気持ちでいっぱいです。また本研究をするにあたり私を気持ちの面から支えてくれた弟（田所雄介）そして婚約者（長谷朋子）にも感謝致します。最後に、この論文を読み将来ミミズの再生に取り組んで頂ける全ての人々に感謝とエールを送らせて頂きます。

7、参考文献

- 1, D. L. Stocum. (2004). *Regeneration; Stem Cells and Beyond*, E. Heber-Katz ed. (New York: Springer), pp5-9.
- 2, Poss, K. D., Wilson, L. G., Keating, M. T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298, 2188-2190.
- 3, Poss, K. D., Keating, M. T., Nechiporuk, A. (2003). Tales of regeneration in zebrafish. *Dev. Dyn.* 226, 202-210.
- 4, Lentz TL. (1969). Cytological studies of muscle dedifferentiation and differentiation during limb regeneration of newt *Triturus*. *Am. J. Anat.* 124, 447.
- 5, Lo DC, Allen F. & Brockes JP. (1993). Reversal of muscle differentiation during urodele limb regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 9159.
- 6, Baguna, J. (1998). Planarians. In *Cellular and Molecular Basis of Regeneration: From Invertebrates to Humans*. P. Ferretti and J. Geraudie ed. (New York: Wiley & Sons Ltd), pp136-165.
- 7, Baguna, J., Salo, E. and Romero, R. (1989b). Effects of activators and antagonists of neuropeptides substance P and substance K on cell proliferation in planarians. *Int. J. Dev. Biol.* 33, 261-264.
- 8, Harlant-Meewis. H. (1964). Regeneration in annelids. *Adv. Morphogen.* 4. 155-215.
- 9, Hammerling, J. (1924). Die ungeschlechtliche forpflanzung und regeneration bei *Aeolosoma Hemphrichii*. *Histologische und experimentelle untersuchungen.* *Zool. Jahrb. allg. Zool. physiol.* 41, 581-652.
- 10, CHARLES E. DINSMORE and ANTHONY L. MESCHER. (1998). *Cellular and Molecular Basis of Regeneration: From Invertebrates to Humans*. Part1, 4.4.3, PATRIZIA FERRETTI and JACQUELINE GERAUDIE. Ed. (JOHN WILEY & SONS), pp91

- 11, Chapron, C. and Chapron, J. (1973). Induction de la regeneration posterieure chez les Annelides du genre Lumbricus. C. R. Acad. Sci. Paris 276, 2691-2694.
- 12, Nakamura, Y. (1993). A new fragmenting enchytraeid species, *Enchytraeus japonensis* from cropped Kuroboku soil in Fukusima, Northern Japan (*Enchytraeids in Japan* 5). *Edaphologia* 50, 3-39.
- 13, Myohara, M., Yoshida-Noro, C., Kobari, F., Tochinai, S. (1999). Fragmenting oligochaete *Enchytraeus japonensis*: a new material for regeneration study. *Dev. Growth Differ.* 41, 549-555.
- 14, Myohara, M. (2004). Differential tissue development during embryogenesis and regeneration in an Annelid. *Dev. Dyn.* 231, 349-358.
- 15, Vannini, E. (1947). Neoplasti e regenerazione dei segmenti genitali nel Serpulide ermafrodita *Salmacina incrustans* Clop. Nota preliminare. *Ist Veneto di S. L. ed. A* Vol 105, 50-56.
- 16, Stolte, H. A. (1936). Die Herkunft des Zellmaterials bei regenerativen Vorgangen der wirbellosen. *Tiere. Biol. Rev* 11, 1-49.
- 17, Stagni, A. (1961a). Ancora sulla genesi e sessualizzazione degli elementi germinali in esemplari rigeneranti di *Spirorbis pagenstecheri*. *Rend. Accad. Naz. Lincei, ser. 8, Issue 30*, 928-932.
- 18, Stagni, A. (1961b). Notazioni sulla morfologia vasale in *Spirorbis pagenstecheri* (Polichete Serpulide) e rapporti dei vasi con gli elementi germinali. *Ann. Univ. Ferrara, ser 13 Anat. Fisiol. compar.* 1, 99-108.
- 19, Reggiani, M. P. (1957). Osservazioni sull'origine delle cellule germinali e il differenziamento dei gameti nel policheti ermafrodita *Spirorbis pagenstecheri*. *Quatr. Rev. Biol.* 49, 245-261.
- 20, Reggiani, M. P. (1956). Origine delle cellule germinali e maturazione dei gameti in *Spirorbis pagenstecheri*. *Boll. Zool.* 23, 581-587.

- 21, Dorsett, D. A. (1961). The reproduction and maintenance of *Polydora ciliata* (Johnst.) at Whitstable. *J. Mar. Biol. Ass.* 41, 383-396.
- 22, Iwanoff, P. P. (1928). Die Entwicklung der Larvalsegmente bei den Anneliden. *Z. Morphol. Okol.* 10, 62-161.
- 23, Herlant-Meewis, H. (1964b). Contribution a l'etude de la regeneration chez les Oligochetes. Reconstitution du germen chez *Lumbricillus lineatus* (Enchytraeides). Premiere partie: elements regenerateurs. *Ann. Soc. Zool. Belg.* 77, 5-47.
- 24, Gates, G. E. (1943). Some further notes on regeneration in *Perionyx excavatus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. Amer.* 241, 90-98.
- 25, Berrill, N. J. (1952). Regeneration and budding in worms. *Biol. Rev.* 27, 401-448.
- 26, Bent Christensen. (1964). Regeneration of a new anterior end in *Enchytraeus bigeminus* (Enchytraeidae, oligochaeta). *Videnskabelige meddelelser fra dansk naturhistorisk foreningi Kobenhavn.* 127, 259-273.
- 27, Lender, T. (1962). Factors in morphogenesis of regenerating freshwater planarians. *Adv. Morphogen.* 2, 305-331.
- 28, Shibata N, Umesono Y, Orii H, Sakurai T, Watanabe K, Agata K. (1999). Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. *Dev. Biol.* 1;206(1), 73-87.
- 29, Cox, D. N., Chao, A., Lin, H. (2000). piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development* 127, 503-514.
- 30, Cox, D. N., Chao, A., Baker, J., Chang, L., Qiao, D., Lin, H. (1998). A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes. Dev.* 12, 3715-3727.
- 31, Harris, A. N., Macdonald, P. M. (2001). Aubergine encodes a *Drosophila* polar granule component required for pole cell formation and related to eIF2C. *Development* 128, 2823-2832.

- 32, Jaronczyk, K., Carmichael, J. B., Hobman, T. C. (2005). Exploring the functions of RNA interference pathway proteins: some functions are more RISCy than others? *Biochem. J.* 387, 561-571.
- 33, Lingel, A., Sattler, M. (2005). Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 107-115.
- 34, Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., Shimizu, N. (2003). Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics* 82, 323-330.
- 35, Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Yomogida, K., Kuroiwa, A., Tadokoro, Y., Fujita, Y., Sato, M., Matsuda, Y., Nakano, T. (2001). Two mouse piwi-related genes: miwi and mili. *Mech. Dev.* 108, 121-133.
- 36, Tan, C. H., Lee, T. C., Weeraratne, S. D., Korzh, V., Lim, T. M., Gong, Z. (2002). Ziwi, the zebrafish homologue of the *Drosophila* piwi: co-localization with vasa at the embryonic genital ridge and gonad-specific expression in the adults. *Mech Dev* 119, Suppl 1, S211-214.
- 37, Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T. W., Isobe, T., Asada, N., Fujita, Y., Ikawa, M., Iwai, N., Okabe, M., Deng, W., Lin, H., Matsuda, Y., Nakano, T. (2004). Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 131, 839-849.
- 38, Deng, W., Lin, H. (2002). miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev. Cell.* 2, 819-830.
- 39, Reddien, P. W., Oviedo, N. J., Jennings, J. R., Jenkin, J. C., Sanchez Alvarado, A. SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* 310, 1327-1330.
- 40, Rossi L., Salvetti A., Batistoni R., Deri P., Pugliesi C., Loreti E., Gremigni V. (2006). DjPiwi-1, a member of the PAZ-Piwi gene family, defines a subpopulation of planarian stem cells. *Dev. Genes. Evol.* 216(6):335-46.
- 41, Seipel, K., Yanze, N., Schmid, V. (2004). The germ line and somatic stem cell gene Cniwi in the jellyfish *Podocoryne carnea*. *Int. J. Dev. Biol.* 48, Issue 1, 1-7

- 42, Sasaki T., Shiohama A., Minoshima S., Shimizu N. (2003). Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics*. 82(3), 323-30.
- 43, Richard C. Brusca & Gary J. Brusca. (1990). *Invertebrates*. Andrew D. Sinauer ed. (SINAUER Associates, Inc.), pp427-431.
- 44, B.G.M. Jamieson. (1992). *Microscopic Anatomy of invertebrates*. Frederic W. Harrison ed. (WILEY-LISS). pp217.
- 45, Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., Matsui, Y. (2005). Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev. Biol.* 278, Issue 2, 440-458.
- 46, Asaoka-Taguchi, M., Yamada, M., Nakamura, A., Hanyu, K., Kobayashi, S. (1999). Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos. *Nat. Cell. Biol.* 1, 431-437.
- 47, Yoshida-Noro, C., Myohara, M., Kobari, F., Tochinai, S. (2000). Nervous system dynamics during fragmentation and regeneration in *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelida). *Dev. Genes. Evol.* Vol. 210, Issue 6, 311-319.
- 48, Benfey, P. N. (1999). Stem cells: A tale of two kingdoms. *Curr. Biol.* R171-172.
- 49, Jones, L. (2001). Stem cells: so what's in a niche? *Curr. Biol.* 11, R484-486.
- 50, Herlant-Meewis, H. (1964). Regeneration in annelids. In *Advances in Morphogenesis*, Vol. 4, Eds M. Abercrombie & J. Brachet ed, (Academic Press, New York), pp. 155-215.
- 51, Shimizu, T. (1982). *Developmental biology of freshwater invertebrates; Development in freshwater Oligochaete Tubifex*. Harrison, F. W. and R. R. Cowden. ed. (New York: A. R. Liss).
- 52, Kang, D., Pilon, M., Weisblat, D. A. (2002). Maternal and zygotic expression of a nanos-class gene in the leech *Helobdella robusta*: primordial germ cells arise from segmental mesoderm. *Dev. Biol.* 245, 28-41.

- 53, Eddy, E. M. (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.* 43, 229-280.
- 54, Sato, K., Sugita, T., Kobayashi, K., Fujita, K., Fujii, T., Matsumoto, Y., Mikami, T., Nishizuka, N., Nishizuka, S., Shojima, K., Suda, M., Takahashi, G., Himeno, H., Muto, A., Ishida, S. (2001). Localization of mitochondrial ribosomal RNA on the chromatoid bodies of marine planarian polyclad embryos. *Dev. Growth Differ.* 43, 107-114.
- 55, Hori, I., Kishida, Y. (2003). Quantitative changes in nuclear pores and chromatoid bodies induced by neuropeptides during cell differentiation in the planarian *Dugesia japonica*. *J. Submicrosc Cytol. Pathol.* 35, 439-444.
- 56, Coward, S. J. (1974). Chromatoid bodies in somatic cells of the planarian: observations on their behavior during mitosis. *Anat. Rec.* 180, 533-545.
- 57, Scott F. Gilbert. (2003). *Developmental biology* 7th edition. Andrew D. Sinauer ed. (SINAUER Associates, Inc.), pp617-624.
- 58, Ginsburg, M., Snow, M. H., McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110, 521-528.
- 59, Muneoka K, Sassoon D. (1992).
Molecular aspects of regeneration in developing vertebrate limbs. *Dev Biol.* 152, 37-49.
Review.
- 60, Imokawa Y, Yoshizato K. (1997).
Expression of Sonic hedgehog gene in regenerating newt limb blastemas recapitulates that in developing limb buds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 9159-64.
- 61, Mochizuki K, Nishimiya-Fujisawa C, Fujisawa T. (2001).
Universal occurrence of the vasa-related genes among metazoans and their germline expression in *Hydra*. *Dev. Genes. Evol.* 211, 299-308.

- 62, Weiqing Li¹, Robert Boswell and William B. Wood. (2000).
mag-1, a Homolog of *Drosophila mago nashi*, Regulates Hermaphrodite Germ-Line Sex Determination in *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. 218, 172-182
- 63, Phillip A. Newmark and Robert E. Boswell. (1994).
The *mago nashi* locus encodes an essential product required for germ plasm assembly in *Drosophila*. Development 120, 1303-1313.
- 64, Shiraishi E, Imazato H, Yamamoto T, Yokoi H, Abe S, Kitano T. (2004).
Identification of two teleost homologs of the *Drosophila* sex determination factor, transformer-2 in medaka (*Oryzias latipes*). Mech Dev. 121, 991-996.
- 65, Linheng Li and Ting Xie. (2005). Stem Cell Niche: Structure and Function. Annu. Rev. Cell. Biol. 21, 605-631. Review.
- 66, Scott F. Gilbert. (2003). Developmental biology 7th edition. Andrew D. Sinauer ed. (SINAUER Associates, Inc.), pp278-289.
- 67, Scott F. Gilbert. (2003). Developmental biology 7th edition. Andrew D. Sinauer ed. (SINAUER Associates, Inc.), pp467-469.
- 68, Stollewerk A, Schoppmeier M, Damen WG. (2003).
Involvement of Notch and Delta genes in spider segmentation. Nature. 423, 863-865.
- 69, Brenner S, Williams SR, Vermaas EH, Storck T, Moon K, McCollum C, Mao JI, Luo S, Kirchner JJ, Eletr S, DuBridgde RB, Burcham T, Albrecht G. (2000).
In vitro cloning of complex mixtures of DNA on microbeads: physical separation of differentially expressed cDNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. Amer. 97, 1665-1670.
- 70, Kawamoto S, Yoshida-Noro C, Tochinai S. (2005).
Bipolar head regeneration induced by artificial amputation in *Enchytraeus japonensis* (Annelida, Oligochaeta). J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol. 303, 615-627.