

3 倍体プラナリアの生殖戦略

2013 年度

茅根 文子

主 論 文 要 旨

報告番号	㊦ 乙 第	号	氏 名	茅根 文子
主 論 文 題 目： 3 倍体プラナリアの生殖戦略				
(内容の要旨) ゲノムの倍数化は多くの植物と一部の動物でよく見られる現象であり、種分化と進化を促進する要因の一つと考えられているが、しばしば生殖における障害をもたらす。特に3倍体は、減数分裂時に染色体の対合と分離を正確に成すことが難しく異数体配偶子を形成し易いため、多くが不稔である。したがって、一般に3倍体生物は無性生殖しか行わないと考えられている。しかしながら、扁形動物門に属するプラナリアでは、3倍体の個体が減数分裂を経て配偶子を形成し、有性生殖を行うことが示唆されている。本研究では、3倍体プラナリアにおける特異な有性生殖のメカニズムについて明らかにすることを目指した。 第1章では、本研究の背景となる倍数体に関する知見、およびプラナリアにおける先行研究についてまとめた。プラナリアでは同種内に異なる生殖戦略（無性生殖、有性生殖、および両者の季節転換）をもつ集団が共存し、倍数体や異数体が多く見られる。3倍体のプラナリアには生殖器官を持たず無性生殖を行う個体と、生殖器官を持ち産卵する個体が存在する。さらに、生殖器官を持たない個体も有性個体の投餌により有性化し、交配と産卵を行うようになる。 第2章では、まず3倍体プラナリアの有性生殖を確かめるため、マイクロサテライトマーカーを用いて親子間でのゲノムの遺伝を解析した。有性化した3倍体プラナリア同士の交配によって得られたF ₁ 世代は、全ての個体が両親由来のゲノムを併せ持っており、有性生殖の特徴であるゲノムの混合が生じていることが示された。 第3章では、3倍体プラナリアにおける配偶子形成機構を解明するため、減数分裂時の染色体挙動を調べた。減数第一分裂前期の染色体像の観察から、雄性生殖系列では減数分裂前に染色体が削減されて2倍体となっているのに対し、雌性生殖系列では減数第一分裂中期まで3倍体が維持されていることが示唆された。多くの卵母細胞では3つの相同染色体のうち2つずつが対合して七組の二価染色体を形成し、残りの7本は1価染色体として観察された。また、2倍体卵の形成にこの1価染色体が関わることを示唆された。 第4章では、減数第一分裂前期の染色体挙動をさらに詳細に調べるため、相同染色体間の組換えに関与する遺伝子 <i>rad51</i> に着目した。 <i>rad51</i> ホモログは無性個体のネオブラストおよび有性化個体の卵巣・精巣の生殖細胞で発現が確認された。さらに有性化の過程でRNAiにより <i>rad51</i> をノックダウンすると生殖器官の形成に異常が生じた。RNAi 個体の卵母細胞では相同染色体の対合は見られたがキアズマ形成はほとんど見られず、プラナリアの減数分裂においては相同染色体間の組換えが対合の開始に必要なでないことが示唆された。 以上の研究を総括し、第5章で結論を述べた。				

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name CHINONE, Ayako
Title Study on the reproductive strategies of triploid planarian		
Abstract <p>While polyploidization is a common phenomenon among plants and some animals, and considered a major speciation and evolution mechanisms, it often causes reproductive failure. Triploids in particular have the problems of chromosomal pairing and segregation during meiosis, which may cause aneuploid gametes and result in sterility. Thus, in generally triploids are considered to reproduce only asexually. However, the previous studies suggested that triploid planarians are able to produce gametes by meiosis and reproduce sexually. This study aims to elucidate the mechanisms of specialized sexual reproduction in triploid planarian.</p> <p>In Chapter 1, I summarized the background knowledge from previous studies on polyploids and on planarians. Some planarians are comprised of populations with different reproductive strategies, namely asexual, sexual, and seasonally switching, and exhibit various types of ploidy among individuals of the same species. Populations with triploid karyotypes are normally found in nature as both fissiparous and oviparous triploids. Fissiparous triploids can also be experimentally sexualized if they are fed sexual planarians, and begin reproducing by copulation.</p> <p>In Chapter 2, bisexual reproduction of triploid planarian was confirmed by genetic analysis using a microsatellite marker. I examined the genotypes of the offspring obtained by breeding sexualized triploids and found that the offspring inherited genes from both parents, indicating that the mixture of genomes, which is a characteristic of sexual reproduction, had occurred.</p> <p>In Chapter 3, in order to investigate the mechanisms of gametogenesis in triploid planarian, chromosome behaviors in spermatocytes and oocytes at meiotic prophase I were observed. The results suggested that female germ-line cells remained triploid until prophase I, while male germ-line cells appeared to become diploid before entry into meiosis. Most of the oocytes contained not only paired bivalents but also unpaired univalents. Moreover, it was suggested that the univalents were involved in the production of diploid eggs.</p> <p>In Chapter 4, for further analysis of meiotic chromosome behavior, I focused on the <i>rad51</i> gene which is known to function in homologous recombination. The expression of <i>rad51</i> mRNA was found in neoblasts in asexual planarian and in germ cells in ovaries and testes in sexualized planarian. The knockdown of <i>rad51</i> during sexualization affected the formation of germinal genital organs. In <i>rad51</i> (<i>RNAi</i>) oocytes chiasma formation was rarely observed while synapsis occurred normally, suggesting that homologous recombination is not required for meiotic synapsis in planarian.</p> <p>On the basis of these findings, Chapter 5 gives the conclusions of this dissertation.</p>		

学位論文 博士（理学）

3 倍体プラナリアの生殖戦略

2013 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

茅根 文子

目次

略語表	iv
第1章 序論	1
第2章 3倍体有性化個体の生殖様式	
2.1 緒言	5
2.2 材料および方法	
2.2.1 実験動物	5
2.2.2 有性化プラナリアの交配	6
2.2.3 マイクロサテライト多型解析	6
2.2.4 染色体標本の作製	7
2.2.5 蛍光 <i>in situ</i> hybridization (FISH)	7
2.3 結果	
2.3.1 3倍体系統の交配におけるマイクロサテライト多型解析	9
2.3.2 F ₁ 個体の核型と <i>msl</i> マイクロサテライト型の関係	14
2.4 考察	16
2.5 結言	17
第3章 3倍体有性化個体の減数第一分裂における染色体挙動	
3.1 緒言	19

3.2	材料および方法	
3.2.1	実験動物	20
3.2.2	染色体標本の作製、FISH	20
3.2.3	核相解析	20
3.3	結果	
3.3.1	精巣で観察された減数分裂像	20
3.3.2	卵巣で観察された減数分裂像	21
3.4	考察	
3.4.1	3 倍体 <i>D. ryukyuensis</i> における精子形成過程	25
3.4.2	3 倍体 <i>D. ryukyuensis</i> における卵形成過程	26
3.5	結言	27
第4章 減数第一分裂における Rad51 遺伝子の解析		
4.1	緒言	29
4.2	材料および方法	
4.2.1	実験動物	30
4.2.2	<i>rad51</i> 遺伝子の同定と系統解析	30
4.2.3	X 線照射	31
4.2.4	total RNA の抽出	31
4.2.5	RT-PCR	31
4.2.6	Whole-mount <i>in situ</i> hybridization (WISH)	33
4.2.7	組織観察	35
4.2.8	RNAi 法	36
4.2.9	染色体標本の作製、FISH	38

4.3	結果	
4.3.1	<i>D. ryukyuensis</i> における <i>rad51</i> ホモログおよびパラログの同定	38
4.3.2	<i>Dr-rad51</i> の発現解析	41
4.3.3	<i>Dr-rad51B</i> および <i>Dr-rad51C</i> の発現解析	45
4.3.4	生殖細胞形成過程における <i>DrRad51</i> の機能解析	45
4.3.5	減数分裂における <i>DrRad51</i> および <i>Rad51</i> パラログの機能	46
4.4	考察	
4.4.1	<i>D. ryukyuensis</i> における <i>Rad51</i> ファミリータンパク質	51
4.4.2	体細胞系列における <i>DrRad51</i> の機能	51
4.4.3	生殖系列における <i>DrRad51</i> の機能	52
4.4.4	減数分裂期相同組換えの必要性	53
4.5	結言	54
	第5章 結論	57
	参考文献	59
	公刊論文および学会発表の目録	67
	謝辞	71

略語表

AP : alkaline phosphatase

BCIP : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate

bp : base pair

DABCO : 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane

DEPC : diethyl pyrocarbonate

Dig : digoxigenin

Dryg : *Dugesia ryukyuensis* yolk gland

DSB : double strand break

dsRNA : double strand RNA

DTT : dithiothreitol

EST : expressed sequence tag

FISH : fluorescence *in situ* hybridization

HE 染色 : hematoxylin and eosin stain

HEPES : 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid

HRP : horse radish peroxidase

mRNA : messenger ribonucleic acid

NBT : nitro blue tetrazolium

PI : propidium iodide

PCR : polymerase chain reaction

PFA : paraformaldehyde

PPD : *p*-phenylene diamine

rDNA : ribosomal DNA

RNAi : RNA interference

RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction

SC : synaptonemal complex

6-FAM : 6 - carboxyfluorescein

溶液組成

HEPES-5/8Holt (HEPES-buffered 5/8 Holtfreter 氏液) : 20 mM HEPES、40 mM NaCl、420 μ M KCl、

150 mM NaHCO₃、pH 7.4

MABT : 100 mM マレイン酸、150 mM NaCl、0.1% Tween20、pH 7.5

PBS (phosphate-buffered saline) : 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、

4.3 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O、1.4 mM KH₂PO₄、pH 7.3

20×SSC : 300 mM クエン酸ナトリウム、3 M NaCl

TE : 10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)、pH 8.0

TMN : 100 mM Tris、100 mM NaCl、50 mM MgCl₂

PBTw : PBS、0.1% Tween-20

PBTx : PBS、0.1% TritonX-100

第1章 序論

生殖とは生物が次世代を創出する過程を指し、遺伝情報の混合を伴うか否かによって有性生殖と無性生殖の二つの様式に大別される。一般的な有性生殖では、減数分裂によって染色体数を半減した配偶子が形成され、異個体由来の配偶子と融合（受精）することにより両親のゲノムが混合された新たな個体が生み出される。この方法には、生殖器官の形成や配偶者の探索といった生殖コストが高いというデメリットはあるものの、遺伝的多様性の創出や有害変異の除去が可能であるという大きなメリットがある。一方、無性生殖とはつまりクローン増殖であり、自身と全く同じ遺伝情報を持つ個体を生み出す生殖様式である。無性生殖を行う生物には配偶子を介さず出芽や分裂等によって増えるものや、減数分裂を経ずに形成された配偶子を介し受精せずに発生する単為生殖を行うものがある。無性生殖は生殖コストが低く短期間で多くの子孫を残すことができるが、遺伝的多様性は低く環境の変化に弱いというデメリットがある。このように、それぞれの生殖様式には相異なるメリット・デメリットがあり、どれを選択するかは種の存続や進化にとって非常に重要な意味を持つ。

有性生殖を行う生物の多くは基本数の染色体セットから成るゲノムを2組もつ2倍体であるが、自然界には3組以上のゲノムを持つ倍数体の生物も存在することが知られている。ゲノムの倍数化は植物では非常によく見られる現象であり、被子植物では60~70%の種がゲノムの倍数化によって派生したと推測されている。また、動物界でも進化の過程では度々ゲノムの倍数化が生じていることが明らかになっている (Otto and Whitton 2000; Kuraku et al. 2009; Van de Peer et al. 2009; Jiao et al. 2011)。ゲノムの倍数化はしばしば遺伝子重複による新機能獲得やエピジェネティックな遺伝子発現制御の変化などを伴い、種分化および進化を促進する大きな要因の一つであると考えられている (Otto and Whitton 2000; Comai 2005)。

しかしながら、ゲノムの倍数化にはデメリットもある。その1つが減数分裂の阻害であり、特に3倍体となった場合には減数第一分裂中期に3価染色体が形成され、染色体の分離が乱れて異数体配偶子が形成されるために不稔・不妊になる傾向にあり (Comai 2005)、実際3倍体生物は大部分が無性生殖を行うことが知られている (Otto and Whitton 2000)。有性生殖は減数分裂と受精を通じたゲノムの混合により遺伝的多様性を生むため、進化的適応には必要であるとされている。したがって、一般に無性生殖のみを行う3倍体は“進化の行き止まり”であると考えられている。

扁形動物門に属するプラナリアには有性生殖と無性生殖の両方を行う種が多く存在し、それらの種内では倍数性にも多様性があることが知られている (Benazzi 1966; D'Souza et al. 2004; Lázaro et al. 2009)。無性生殖には分裂と単為生殖の2タイプがあり、分裂のみを行う個体は生殖器官を持たず、単為生殖を行う個体は雌雄同体型の生殖器官を持つ。単為生殖においては、精子の役割は卵の活性化に限られており、遺伝的な寄与はない。無性生殖と有性生殖を季節や環境に応じて切り替えて行う個体も存在する。3倍体を含む個体群は野外に普通に見られるが、そのほとんどは無性生殖を行う個体 (無性個体) で構成されている (Lázaro et al. 2009)。

本研究は淡水生プラナリアの一種であるリュウキュウナミウズムシ *Dugesia ryukyuensis* を対象としているが、この種は自然界に2倍体 ($2n=14$)、3倍体 ($3n=21$) および2倍体と3倍体の混数体が存在し、3倍体個体の中にも生殖器官を持たず分裂により増殖する無性個体と、生殖器官を持ち産卵する個体が存在する (Tamura et al. 1995)。無性の3倍体 *D. ryukyuensis* に有性生殖するプラナリアを餌として摂取させると生殖器官が発達し、これを利用して実験的に有性化させる系が確立されている (Kobayashi et al. 1999)。この実験系では、摂取した有性プラナリアに含まれる“有性化因子”が引き金となって有性化が開始され、ある程度有性化が進むと体内の有性化因子に応答して有性化因子を自ら産出するようになることで、有性化状態が維持されることが示唆されている (Nodono et al. 2012)。有性化の

過程では、プラナリアに特徴的な多能性幹細胞であるネオブラストから生殖系列細胞と生殖器官が形成されると考えられている。完全に有性化した個体 (acquired sexuals) は増殖のために分裂することはなくなり、代わりに交配と産卵を行うようになる (Kobayashi et al. 1999; Kobayashi and Hoshi 2002; Hoshi et al. 2003)。従来、3 倍体の *D. ryukyuensis* の中で生殖器官を持ち産卵する個体は単為生殖を行うと考えられてきたが (Tamura et al. 1995)、近年の研究では有性化した 3 倍体同士の交配により産まれた子の中に遺伝的多様性があることが示唆されている。先行研究では、変異染色体の分離パターンを利用した統計的解析により、3 倍体 *D. ryukyuensis* が有性生殖を行っていることが示唆された (Kobayashi et al. 2008)。また、有性化 3 倍体個体が産生する精子は専ら 1 倍体であるのに対し、卵は 1 倍体だけでなく 2 倍体卵も形成されることが予測された (Kobayashi et al. 2008)。しかしながら、3 倍体の多能性幹細胞から機能的な配偶子を形成する機構について、詳細は明らかになっていない。

そこで本研究では、有性化 3 倍体プラナリアの有性生殖について確証を得ること、さらにその特異な配偶子形成機構を明らかにすることを目指した。第 2 章では、2 系統の 3 倍体 *D. ryukyuensis* の交配において、マイクロサテライト多型を利用してゲノムの遺伝を解析し、有性生殖が行われていることを確認した。第 3 章では 3 倍体 *D. ryukyuensis* における配偶子形成機構について手がかりを得るため、生殖系列細胞内の染色体挙動に着目して観察し、雄性生殖系列と雌性生殖系列で減数第一分裂時の染色体挙動に明らかな差があることを見出した。第 4 章では、減数第一分裂前期の染色体挙動についてさらに詳細に調べるため、相同染色体間の組換えに関与する遺伝子 *rad51* に着目して発現・機能解析を行った。以上の研究について、第 5 章で総括し、今後の展望について述べた。

第2章 3倍体有性化個体の生殖様式

2.1 緒言

有性生殖の特徴は2個体間でゲノムの混合が生じることである。先行研究(Kobayashi et al. 2008)では変異染色体を利用した解析により、3倍体 *D. ryukyuensis* の自家交配においてゲノムが混合されていることが統計的に示唆された。しかしながらこの方法では、変異の生じた1本の変異染色体しか識別できず、また自家交配であるために、ゲノムの混合に対する直接的な証明には至っていなかった。そこで本章では、まず有性生殖を証明するため、異なる系統の3倍体 *D. ryukyuensis* 同士の交配で生まれた仔虫のゲノムの由来をマイクロサテライト多型マーカーを利用して解析し、さらに核型解析を行うことで染色体の遺伝パターンを調べた。

2.2 材料および方法

2.2.1 実験動物

無性系統の3倍体リュウキュウナミウズムシ *D. ryukyuensis* のOH株は、1986年に沖縄本島で採取された1匹の無性個体を弘前大学の石田幸子教授がクローン化した株である。また、W-2株は沖縄本島で採取された1匹の無性個体を当研究室において株化したクローン集団である。有性化個体は、小林らの方法(Kobayashi et al. 1999)に従い、無性個体に有性生殖のみを行うイズミオオウズムシ *Bdellocephala brunnea* またはオオミスジコウガイビル *Bipalium nobile* を約1ヶ月間毎日投餌することによって有性化させた個体である。

D. ryukyuensis はチオ硫酸ナトリウムで1週間程度脱塩素した水道水中で、20℃前後で飼育した。通常の餌としては鶏レバーを1~2週間に一度与え、実験に用いる際は異物の混入

を防ぐため1週間以上絶食させた個体を用いた。

2.2.2 有性化プラナリアの交配

有性化し生殖孔が開いた直後の OH 株および W-2 株のプラナリア各 1 匹を、小石の入ったビン 9 本にそれぞれ入れて交配させた。有性化プラナリアがコクーンを産まなくなるまで約 6 ヶ月間、小石に産み付けられたコクーンを回収し、1 個ずつ 12 穴プレートに入れて孵化させた。孵化した仔虫には鶏レバーを 1 週間に 1 度与え、成長して分裂（無性個体）もしくは自然に生殖器官が発達した個体（先天的有性個体）を 1 匹ずつ分離して以下に示す解析を行った。

2.2.3 マイクロサテライト多型解析

Gentra Puregene Tissue Kit (QIAGEN)を用いてゲノム DNA を抽出した。*D. ryukyuensis* 1 匹を Cell Lysis Solution 300 μ l に入れてホモジナイズし、Proteinase K 1.5 μ l を加えて 25 回転倒混和した。55°C で 3 時間処理した後、RNase 1.5 μ l を加え 37°C で 1 時間処理した。Protein Precipitation Solution を 100 μ l 加え、vortex ミキサーで 20 秒間攪拌した。氷上で 5 分間静置した後、室温で 15000 rpm、5 分間遠心し、上清を回収した。2-プロパノール 300 μ l を加え、50 回転倒混和し、4°C で 15000 rpm、5 分間遠心した。上清を捨てて 70%エタノールを 300 μ l 加え、軽く混合した後、4°C で 15000 rpm、5 分間遠心した。上清を捨て、沈澱を風乾し、dH₂O に溶解した。

D. ryukyuensis OH 株からは、3つの対立遺伝子間で ATA の 3 塩基の繰り返し回数が異なり、その長さから各ゲノムを区別できるマイクロサテライトマーカー *ms1* が単離されている (Nodono et al. 2012)。*ms1* 座位を PCR によりゲノム DNA から増幅した。ゲノム DNA 100 ng、2×Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO) 10 μ l、10 μ M フォワードプライマー(5'-TAACGAACTTG GCTGTAATG-3') 1 μ l、10 μ M リバースプライマー(5'-GCTAAAAGCACTATCCAAACGG-3')

1 μ l を含む 20 μ l の反応液を、94°C 2分 (1 サイクル)、94°C 30 秒・58°C 30 秒・68°C 30 秒 (30 サイクル)、68°C 5分 (1 サイクル) 反応させた。PCR 産物 5 μ l を、5%ポリアクリルアミドゲルを用いて 200 V 定電圧で 45 分間電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、Molecular Imager FX (BIO-RAD)で解析した。さらに遺伝子型を決定するために、6-FAM 標識したプライマー (配列は前述の通り) と KOD-plus-ver. 2 (TOYOBO)を用いて 94°C 2分 (1 サイクル)、94°C 15 秒・56°C 30 秒・68°C 30 秒 (35 サイクル)、68°C 5分 (1 サイクル) 反応させた産物のフラグメント解析を行った。解析はシグマアルドリッチジャパン合同会社に委託し、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer と GeneMapper Software ver. 4.0 (Applied Biosystems) を用いて行われた。

2.2.4 染色体標本の作製

プラナリアを前後軸に対して垂直に 3~4 断片に切断し、室温で約 50 時間再生させた。虫片をさらに 1 mm 角に切り、40 μ g/ml コルヒチン - 0.35% KCl 溶液に入れて 15°C で 1 時間低張処理をした。虫片を室温の低張液に移してさらに 30 分間処理した後、前固定液 (メタノール : 酢酸 : 蒸留水 = 3:3:4) で 30 分間、および後固定液 (メタノール : 酢酸 = 1:1) で 2 時間以上固定した。虫片を 60 μ l の固定液中でピペッティングして解離し、スライドグラスに滴下した。固定液が完全に蒸発する前に酢酸を 1 滴落とし、一晩室温で乾燥した。標本の一部をリン酸緩衝液で 3%に希釈したギムザ液で 5 分間染色し、水洗して風乾した後、顕微鏡観察した。また、一部を後述の蛍光 *in situ* hybridization (FISH)に用いた。

2.2.5 蛍光 *in situ* hybridization (FISH)

18S rDNA は、*D. ryukyuensis* のゲノム DNA からユニバーサルプライマー (forward, 5'-TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG-3'; Reverse, 5'-GATCCTTCCGCAGGTTACCTAC-3') を用いて増幅された DNA 断片約 1.8 kb を pGEM-T Vector (Promega) に組み込み、大腸菌

DH-5 α に形質転換してクローニングした。プラスミドを抽出し、同ユニバーサルプライマーを用いて PCR によりインサートを増幅し、PCR 産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega)を用いて精製した。得られた DNA 600 μ g を Nick Translation Mix (Roche)を用い、添付のマニュアルに従って、Biotin-16-dUTP (Roche) で標識した。プローブ DNA はエタノール沈澱して 50 μ l のホルムアミドに溶かし、 -30°C で保存した。

染色体標本に 500 μ g/ml RNase 100 μ l を載せ、パラフィルムを被せて 37°C で 1 時間インキュベートした。パラフィルムを取り除き、 $2\times\text{SSC}$ の入った容器にスライドを浸して室温で 3 分間揺らし、洗浄した。この操作を 3 回行った後、70%、85%、100%のエタノールに 5 分ずつ浸し、風乾した。 70°C の 70%ホルムアミド- $2\times\text{SSC}$ に 2 分間浸し変性させ、直ちに 4°C の 70%エタノールに移して 5 分間静置した。70%エタノール中に軽く出し入れして洗浄し、100%エタノールで 5 分間脱水して風乾した。

20 mg/ml ウシ血清アルブミン、 $20\times\text{SSC}$ 、滅菌水、50%硫酸デキストランを 1:1:1:2 の割合で混和し、 $2\times$ ハイブリダイゼーションバッファーとした。 75°C で 10 分間処理後、氷中で急冷することにより変性させた標識プローブ DNA と、 $2\times$ ハイブリダイゼーションバッファーを等量ずつ混和し、変性した染色体標本に載せ、パラフィルムで覆った。スライドを湿箱に入れ、 37°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

パラフィルムを取り除き、スライドを 37°C の 50%ホルムアミド- $2\times\text{SSC}$ に 20 分間浸した。 $2\times\text{SSC}$ に 20 分間、2 回浸漬した後、TSA Kit #22 with HRP-streptavidin and Alexa Fluor 488 tyramide (Molecular Probes) を用い、添付のマニュアルに従ってシグナルの検出と増感を行った。DABCO 溶液 (12.5 mg/ml DABCO, 90% (v/v) glycerol, PBS) で 1 μ g/ml に濃度調整した PI 溶液と PPD 溶液 (1 mg/ml PPD, 90% (v/v) glycerol, PBS, pH 9.0) を 3 : 1 の割合で混合した染色液 40 μ l を滴下し、カバーガラスを載せて 15 分間遮光して対比染色した。蛍光シグナルの観察には Carl Zeiss Axio Imager M1 を用い、撮影には AxioCam MRm カメラと Axio Vision 4.5 ソフトウェアを用いた。

2.3 結果

2.3.1 3倍体系統の交配におけるマイクロサテライト多型解析

OH株とは別に沖縄本島から採取された3倍体無性 *D. ryukyuensis* をクローン増殖させた系統の中から、OH株とはマイクロサテライト座の増幅産物バンドパターンの異なる W-2株を見出した。フラグメント解析およびシーケンス解析により、W-2株の個体は、OH株の *ms1* マイクロサテライト座にある3つのアレル (346 / 334 / 313 bp; 以後それぞれ O1、O2、O3と表記) とはATAの反復回数が異なる6つのアレル (397 / 382 / 367 / 361 / 319 / 289 bp; 以後 W1、W2、W3、W4、W5、W6と表記) を持つことが確かめられた (Figs. 1a, 2)。これらの2系統の個体をそれぞれ有性化して交配した結果、得られた F₁ 個体は両親由来のアレルで構成された様々な遺伝子型を示した (n=59; Figs. 1b, c; Tables 1, 2, 3)。従って、3倍体有性化 *D. ryukyuensis* がゲノムの混合を伴う有性生殖を行うことが証明された。

F₁ 個体には両親の持つ全てのアレルが現れていたが、それぞれの出現頻度にはばらつきがあった (OHアレル間では $\chi^2 = 12.7$, d.f. = 2, P < 0.01; W-2アレル間では $\chi^2 = 25.7$, d.f. = 5, P < 0.01)。W2のように生殖様式によって出現頻度に差があるものも見られた (Z = 5.61, P < 0.01) (Table 4)。

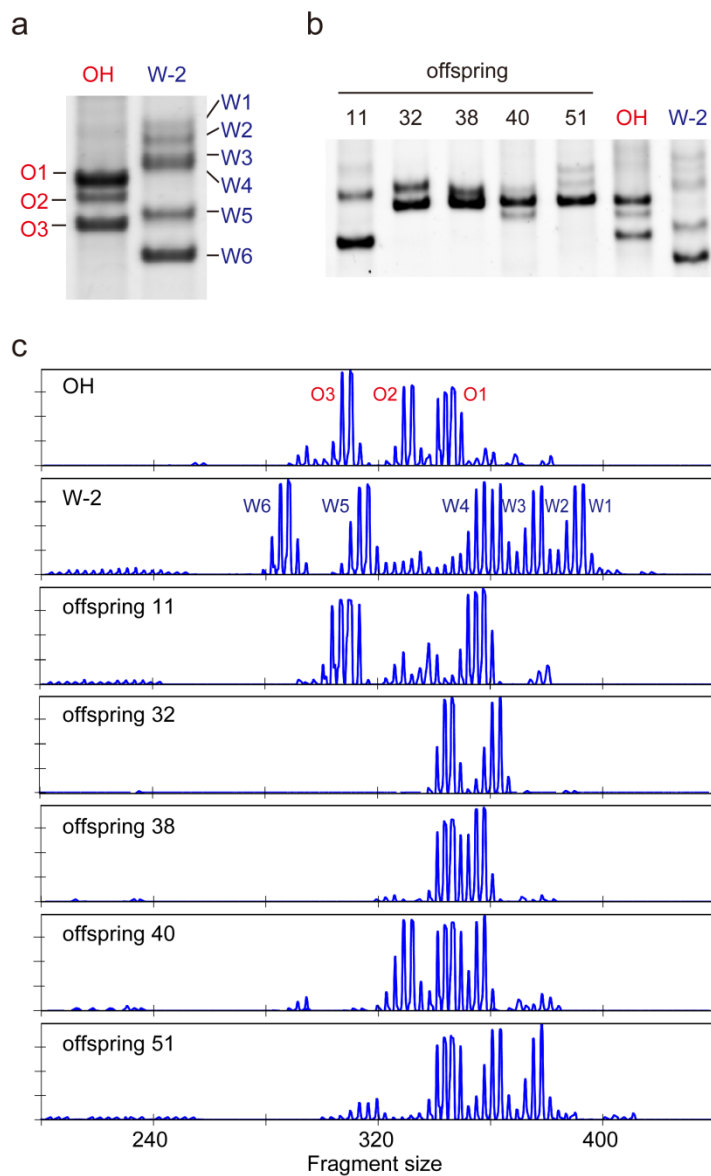


Fig. 1 3倍体 *D. ryukyuensis* の交配におけるマイクロサテライト多型解析

(a) 交配に用いた2系統の *msI* マイクロサテライト座位の増幅産物のバンドパターン。OH株の個体は3つのアレル（‘O1’‘O2’‘O3’）を、W-2株の個体は6つのアレル（‘W1’‘W2’‘W3’‘W4’‘W5’‘W6’）を持つ。

(b) 交配によって得られた F_1 個体（offspring）の *msI* バンドパターンの例。個体番号は Table 1 に対応。

(c) フラグメント解析の結果の例。(b)で示した個体における結果を各パネルに1個体分ずつ示している。

縦軸は蛍光強度、横軸はフラグメントサイズ (bp)。

```

O1 TAATGAACTTGGCTGTAATGATAATAGTAATAATAATAATAATAATAATAATGATAATAA 60
O2 TAACGAACTTGGCTGTAATGATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 60
O3 TAACGAACTTGGCTGTAATGATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 60
W1 TAACGAACTTGGCTGTAATGATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 60
W2 TAACGAACTTGGCTGTAATGATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 60
W3 TAACGAACTTGGCTGTAATGATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 60
W4 TAACGAACTTGGCTGTAATGATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 60
W5 TAACGAACTTGGCTGTAATGATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 60
W6 TAACGAACTTGGCTGTAATGATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 60

O1 TAATAATATTATTATTAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 120
O2 TAATATTAATAATAAT----- 76
O3 TAATATTAATAATAAT----- 76
W1 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA 120
W2 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA 94
W3 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA 100
W4 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA 106
W5 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA 82
W6 T----- 61

O1 TAATAATAAATTATTATTATTATAGTAATCATACAATAATCATATAATAATAATAATAATAA 180
O2 -----TATTATTATTATTATAGTAATCATACAATAATCATATAATAATAATAATAATAA 129
O3 -----TATTATTATTATTATAGTAATCATACAATAATCATATAATAATAATAATAATAA 129
W1 T-----TATTATTATTATTATAGTAATCATACAATAATCATATAATAATAATAATAATAA 174
W2 -----TATTATTATTATTATAGTAATCATACAATAATCATATAATAATAATAATAATAA 147
W3 -----TATTATTATTATTATAGTAATCATACAATAATCATATAATAATAATAATAATAA 153
W4 -----TATTATTATTATTATAGTAATCATACAATAATCATATAATAATAATAATAATAA 159
W5 -----TATTATTATTATTATAGTAATCATACAATAATCATATAATAATAATAATAATAA 135
W6 -----TATTATTATTATTATAGTAATCATACAATAATCATATAATAATAATAATAATAA 114

O1 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 218
O2 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 189
O3 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 185
W1 TTATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 234
W2 TTATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 207
W3 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 213
W4 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 219
W5 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 191
W6 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 164

O1 -----CAGGTTATTGCA 231
O2 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 219
O3 -----CAGGTTATTGCA 198
W1 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 282
W2 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 267
W3 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 252
W4 TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 246
W5 -----CAGGTTATTGCA 204
W6 -----CAGGTTATTGCA 177

O1 AAATATCTTTAAAATATTTTCAGAAATATATTTAAAATGTTTATGAACTAAAAAATAAGTT 291
O2 AAATATCTTTAAAATATTTTCAGAAATATATTTAAAATGTTTATGAACTAAAAAATAAGTT 279
O3 AAATATCTTTAAAATATTTTCAGAAATATATTTAAAATGTTTATGAACTAAAAAATAAGTT 258
W1 AAATATCTTTAAAATATTTTCAGAAATATATTTAAAATGTTTATGAACTAAAAAATAAGTT 342
W2 AAATATCTTTAAAATATTTTCAGAAATATATTTAAAATGTTTATGAACTAAAAAATAAGTT 327
W3 AAATATCTTTAAAATATTTTCAGAAATATATTTAAAATGTTTATGAACTAAAAAATAAGTT 312
W4 AAATATCTTTAAAATATTTTCAGAAATATATTTAAAATGTTTATGAACTAAAAAATAAGTT 306
W5 AAATATCTTTAAAATATTTTCAGAAATATATTTAAAATGTTTATGAACTAAAAAATAAGTT 264
W6 AAATATCTTTAAAATATTTTCAGAAATATATTTAAAATGTTTATGAACTAAAAAATAAGTT 237

O1 ATACAAATATACATTTATTTATTTAATAAAAAATCCTGTTTGGATAGTGCTTTTACG 346
O2 ATACAAATATACATTTATTTATTTAATAAAAAATCCTGTTTGGATAGTGCTTTTACG 334
O3 ATACAAATATACATTTATTTATTTAATAAAAAATCCTGTTTGGATAGTGCTTTTACG 313
W1 ATACAAATATACATTTATTTATTTAATAAAAAATCCTGTTTGGATAGTGCTTTTACG 397
W2 ATACAAATATACATTTATTTATTTAATAAAAAATCCTGTTTGGATAGTGCTTTTACG 382
W3 ATACAAATATACATTTATTTATTTAATAAAAAATCCTGTTTGGATAGTGCTTTTACG 367
W4 ATACAAATATACATTTATTTATTTAATAAAAAATCCTGTTTGGATAGTGCTTTTACG 361
W5 ATACAAATATACATTTATTTATTTAATAAAAAATCCTGTTTGGATAGTGCTTTTACG 319
W6 ATACAAATATACATTTATTTATTTAATAAAAAATCCTGTTTGGATAGTGCTTTTACG 292

```

Fig. 2 OH株およびW-2株の *msl* アレルの配列。影部は ATA/ATT の反復配列。

Table 1 F₁ 個体の解析結果一覧

#	ペア No. ^a	コクーン No. ^b	生殖様式	倍数性	核型 ^c	<i>msl</i> アレル ^d								
						O1	O2	O3	W1	W2	W3	W4	W5	W6
1	1	1	無性	3n	17m+4st+4B	-	+	+	+	-	-	-	-	-
2	1	2	無性	2n	12m+2st	+	-	-	-	-	+	-	-	-
3	1	3	有性	2n	12m+2st+1B	-	-	+	-	-	-	+	-	-
4	1	4	無性	3n	17m+4st+3B	-	+	+	+	-	-	-	-	-
5	1	5	有性	ND	ND	+	-	-	-	-	+	-	-	-
6	2	1	無性	3n	17m+4st+3B	+	-	-	-	+	-	+	-	-
7	2	1	有性	2n	12m+2st+1B	+	-	-	-	-	-	+	-	-
8	2	2	有性	2n	12m+2st+1B	-	+	-	-	-	+	-	-	-
9	2	2	有性	2n	11m+3st	+	-	-	-	-	+	-	-	-
10	2	3	有性	3n	17m+4st+4B	+	+	-	+	-	-	-	-	-
11	2	4	有性	ND	ND	-	-	+	-	-	-	+	-	-
12	2	5	有性	3n	17m+4st+4B	+	-	+	+	-	-	-	-	-
13	2	6	無性	ND	ND	+	+	-	+	-	-	-	-	-
14	3	1	有性	2n	11m+3st	-	-	+	-	-	+	-	-	-
15	3	2	有性	3n	17m+4st+2B	+	-	+	+	-	-	-	-	-
16	3	2	有性	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	+	-
17	3	3	有性	2n	12m+2st+1B	+	-	-	-	-	-	+	-	-
18	3	4	無性	3n	17m+4st+3B	+	-	-	-	+	-	+	-	-
19	3	5	有性	ND	ND	-	-	+	-	-	+	-	-	-
20	3	5	有性	ND	ND	-	-	+	-	-	-	-	-	+
21	4	1	有性	2n	11m+3st	-	-	+	-	-	-	+	-	-
22	4	2	有性	2n	12m+2st	-	+	-	-	-	-	+	-	-
23	4	3	有性	ND	ND	-	-	+	-	-	+	-	-	-
24	4	4	有性	3n	18m+3st+2B	+	+	-	-	-	-	-	+	-
25	4	5	無性	3n	17m+4st+2B	+	+	-	-	-	+	-	-	-
26	4	6	有性	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	-	+
27	5	1	有性	2n	11m+3st	+	-	-	-	-	-	+	-	-
28	5	2	有性	2n	12m+2st+1B	-	-	+	-	-	-	+	-	-
29	6	1	無性	3n	17m+4st+3B	-	-	+	-	+	-	+	-	-
30	6	1	無性	3n	17m+4st+3B	-	-	+	-	+	+	-	-	-
31	6	1	有性	ND	ND	-	-	+	+	-	-	-	-	-
32	6	2	有性	ND	ND	+	-	-	-	-	+	-	-	-
33	6	2	有性	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	-	+
34	6	2	無性	3n	17m+4st+3B	-	-	+	-	+	+	-	-	-
35	6	2	無性	3n	18m+3st+3B	-	+	-	-	+	+	-	-	-
36	6	2	無性	ND	ND	-	-	+	-	+	+	-	-	-
37	6	3	無性	3n	17m+4st+4B	-	+	+	-	-	-	+	-	-
38	6	4	有性	ND	ND	+	-	-	-	-	-	+	-	-
39	6	5	無性	ND	ND	-	-	+	-	+	-	+	-	-
40	6	6	有性	ND	ND	+	+	-	-	-	-	+	-	-
41	7	1	無性	3n	17m+4st+3B	-	-	+	-	+	-	+	-	-
42	7	2	無性	3n	17m+4st+4B	+	-	+	-	-	-	-	-	+
43	7	3	有性	ND	ND	+	-	-	-	-	-	+	-	-
44	7	4	有性	ND	ND	-	+	+	-	-	-	-	-	+
45	8	1	有性	2n	12m+2st	+	-	-	+	-	-	-	-	-
46	8	1	無性	3n	17m+4st+3B	+	-	-	+	-	-	-	-	+
47	8	2	有性	ND	ND	-	-	+	-	-	-	-	+	-
48	8	3	無性	3n	18m+3st+3B	-	-	+	-	+	+	-	-	-
49	8	4	無性	ND	ND	-	-	+	-	+	+	-	-	-
50	8	4	無性	ND	ND	-	-	+	-	+	+	-	-	-
51	8	5	無性	ND	ND	+	-	-	-	+	+	-	-	-
52	8	6	無性	ND	ND	+	+	-	-	+	-	-	-	-
53	9	1	有性	2n	11m+3st	+	-	-	-	-	+	-	-	-
54	9	1	有性	2n	11m+3st+1B	+	-	-	-	-	-	+	-	-
55	9	2	有性	2n	11m+3st	+	-	-	-	-	-	+	-	-
56	9	2	有性	2n	12m+2st	+	-	-	-	-	-	+	-	-
57	9	3	無性	3n	17m+4st+3B	+	-	-	-	+	+	-	-	-
58	9	4	有性	ND	ND	-	-	+	-	-	-	-	+	-
59	9	5	有性	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	+	-

^a 交配した OH×W-2 ペアの No. ^b その個体が孵化したコクーンの No.

^c m, 中部動原体型; st, 次端部動原体型; B, B 染色体; ND, not determined.

^d +, 検出; -, 不検出。アレル名は Fig. 1 および Fig. 2 に対応。

Table 2 OH株とW-2株の交配で得られた仔における *msl* マイクロサテライト座の遺伝子型 (アレル名は Fig. 1 および Fig. 2 に対応)

W-2 アレル	OH アレルの遺伝子型 (個体数)						計
	O1	O2	O3	O1/O2	O2/O3	O1/O3	
W1	1	0	1	2	2	2	8
W2	0	0	0	1	0	0	1
W3	5	1	3	1	0	0	10
W4	8	1	4	1	1	0	15
W5	2	0	2	1	0	0	5
W6	2	0	1	0	1	1	5
W1/W6	1	0	0	0	0	0	1
W2/W3	2	1	6	0	0	0	9
W2/W4	2	0	3	0	0	0	5
計	23	3	20	6	4	3	59

Table 3 交配ごとの OH アレルの現れ方 (アレル名は Fig. 1 および Fig. 2 に対応)

ペア No.	アレルを持つ仔の数							計
	O1	O2	O3	O1/O2	O2/O3	O1/O3	O1/O2/O3	
1	2	0	1	0	2	0	0	5
2	3	1	1	2	0	1	0	8
3	3	0	3	0	0	1	0	7
4	1	1	2	2	0	0	0	6
5	1	0	1	0	0	0	0	2
6	3	1	6	1	1	0	0	12
7	1	0	1	0	1	1	0	4
8	3	0	4	1	0	0	0	8
9	6	0	1	0	0	0	0	7
計	23	3	20	6	4	3	0	59

Table 4 F₁の生殖様式とOH由来(O1 - O3)および W-2由来(W1 - W6)のそれぞれのアレルの出現頻度の関係 (アレル名は Fig. 1 および Fig. 2 に対応)

生殖様式	アレルを持つ仔の割合										n*
	O1	O2	O3	W1	W2	W3	W4	W5	W6		
無性	10 (43%)	7 (30%)	13 (57%)	4 (17%)	15 (65%)	11 (48%)	6 (26%)	0 (0%)	2 (9%)	23	
有性	22 (61%)	6 (17%)	14 (39%)	5 (14%)	0 (0%)	8 (22%)	14 (39%)	5 (14%)	4 (11%)	36	
計	32 (54%)	13 (22%)	27 (46%)	9 (15%)	15 (25%)	19 (32%)	20 (34%)	5 (8%)	6 (10%)	59	

*n: 解析した個体数.

2.3.2 F₁ 個体の核型と *msl* マイクロサテライト型の関係

F₁ 個体への染色体の遺伝パターンについてさらに調べるため、核型解析を行った。*D. ryukyuensis* OH 株の染色体は、17 本の中部動原体型染色体 (metacentric chromosome; m) と、4 本の次端部動原体型染色体 (subtelocentric chromosome; st) から構成される。4 本の次端部動原体型染色体のうち、3 本は相同な 7 番染色体であるが、1 本は本来中部動原体型である 4 番染色体に挟動原体型逆位が生じ形態が変化したものである (Kobayashi et al. 2008)。一方、W-2 株には OH 株のような変異は無く、全体では 18 本の中部動原体型染色体と 3 本の次端部動原体型染色体が観察される (Fig. 3a)。有性化したこれら 2 つの系統を掛け合わせて得られた F₁ 世代では、先行研究 (Kobayashi et al. 2008) 同様 3 倍体 (3n=21) と 2 倍体 (2n=14) の個体が見られ、それぞれに変異 4 番染色体を 1 本もつものともたないものの 2 通りが存在した (Fig. 3b、Table 1)。核型を特定できた F₁ 個体は全て正倍数体だった。

2 倍体の F₁ 個体は全て OH アレルと W-2 アレルを 1 つずつ受け継いでいたが、3 倍体の F₁ 個体は一方の親から 2 つ、もう一方の親から 1 つのアレルを受け継いでいた。OH アレルを 2 つ持つ 3 倍体 F₁ 個体の多くは変異 4 番染色体を持っていた (Table 5)。

Table 5 OH × W-2 の F₁ 世代における倍数性と *msl* マイクロサテライト座の遺伝子型の関係

倍数性	核型*	OH アレルの現れ方 (仔の個体数)	
		1 allele	2 alleles
2 倍体	11m+3st	7	0
	12m+2st	9	0
3 倍体	17m+4st	8	8
	18m+3st	2	1

*m, 中部動原体型; st, 次端部動原体型

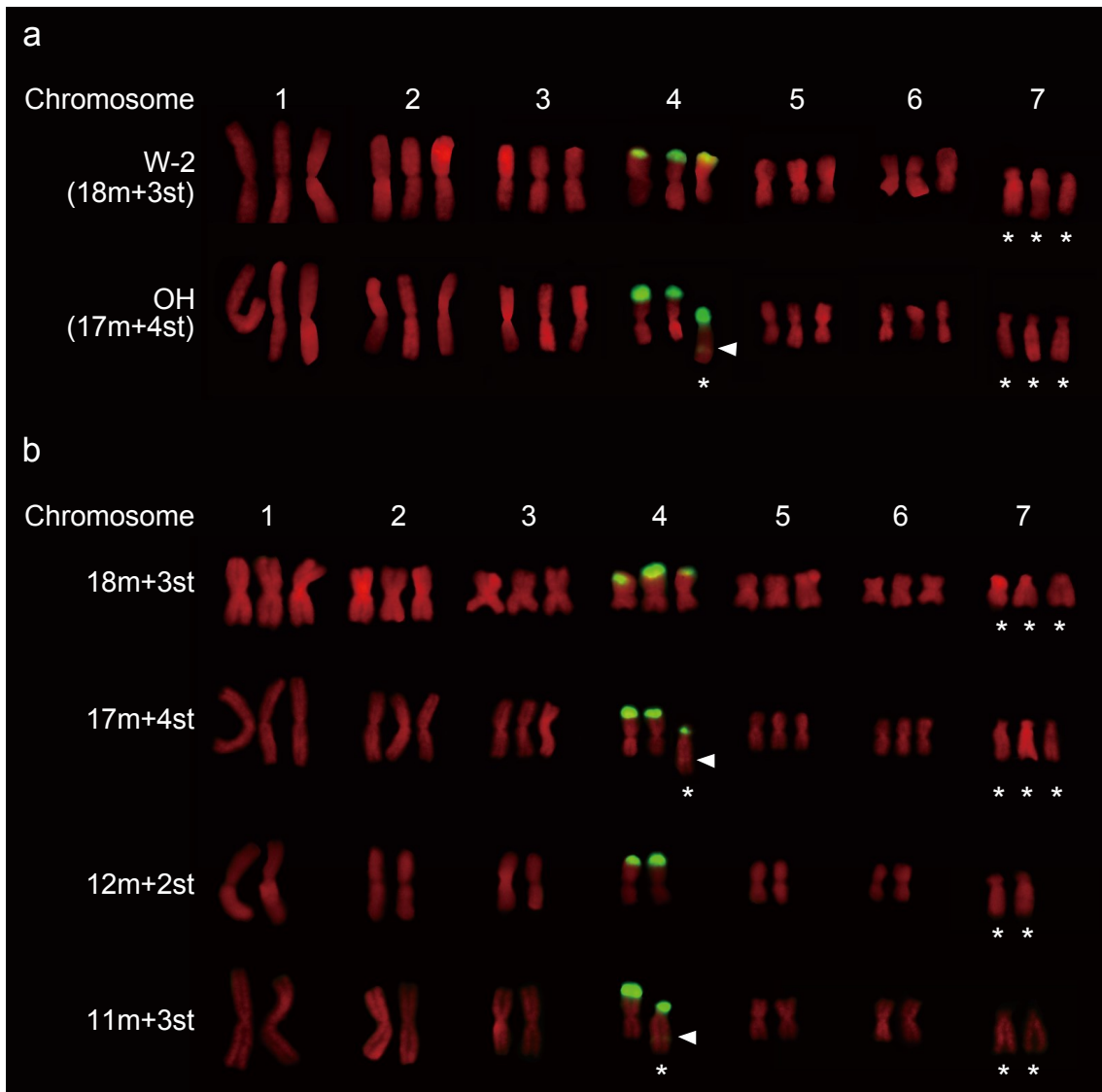


Fig. 3 OH 株と W-2 株の交配における核型解析

(a) 交配に用いた 2 系統の核型。 (b) 交配によって得られた F₁ 個体の核型。

18S rDNA プローブは Alexa Fluor 488 (緑) でラベルし、DNA を PI (赤) で対比染色した。次端部動原体型染色体をアスタリスクで示した。OH 株では 4 番染色体のうち 1 本が次端部動原体型に変化し、18S rDNA 座位の一部が転座している (矢頭)。m, 中部動原体型染色体; st, 次端部動原体型染色体。

2.4 考察

3 倍体有性化個体同士の交配で生まれた F_1 世代では *msl* マイクロサテライト座の遺伝子型は多様であり、必ず両親由来のアレルが並存していたことから、確かに有性生殖が行われていることが示された。*msl* アレルの出現頻度にはアレル毎に差が見られ、さらに個体の生殖様式によって出現頻度に差のあるアレルもあったが、これは *msl* マイクロサテライト座の近傍に個体の生存や発生、生殖様式の決定などに関わる遺伝子座が存在するためと推測される。また、W-2 株には 6 つの *msl* アレルが存在したが、 F_1 世代では W-2 株由来のアレルは 1 つか 2 つ (3 倍体の場合のみ) で必ず同時に遺伝するような組合せはなかったことから、幹細胞のモザイク性に因るものである可能性が考えられる。全ての F_1 個体に現れるアレルや、逆に全く受け継がれないアレルはなく、配偶子形成時の染色体の分配が基本的にはランダムに行われることが示唆される。

核型解析では F_1 個体に 2 倍体と 3 倍体が存在することが示されたが、異数体は見つからなかった。今回の解析は成熟した個体に限られており、異数体が発生に異常を来たすために検出されなかった可能性はある。しかし、3 倍体有性化プラナリアが、少なくともある程度は正倍数体の配偶子を形成することができるのは確実であると思われる。3 倍体の F_1 個体は必ず一方の親から 2 種類のアレルを受け継いでいたが、先行研究では有性化 3 倍体個体が専ら 1 倍体精子を形成することが示されていることから (Kobayashi et al. 2008)、これらは遺伝的に異なる 2 種類のゲノムを含む 2 倍体卵に由来すると考えられる。つまり、2 倍体 F_1 個体は 1 倍体卵との受精によって、3 倍体 F_1 個体は 2 倍体卵との受精によって生まれたと推測される。この 2 倍体卵形成のメカニズムを含め、3 倍体有性化個体における配偶子形成過程については、第 3 章以降でさらに考察する。

2.5 結言

マイクロサテライト多型解析によって、3倍体有性化 *D. ryukyuensis* が有性生殖を行うことが確認された。3倍体プラナリアが有性化する際には生殖系列細胞は3倍体のネオブラストから分化すると考えられる。一般的には3倍体細胞から正倍数体の配偶子を形成することは困難であるとされているにも拘らず、3倍体有性化 *D. ryukyuensis* では少なくともある程度の割合で正倍数体の配偶子が形成され、有性生殖を可能にしていることが示された。

第3章 3倍体有性化個体の減数第一分裂における 染色体挙動

3.1 緒言

第2章で述べた交配実験により、3倍体 *D. ryukyuensis* は有性生殖を行っていることが確実になった。先行研究 (Kobayashi et al. 2008) では *D. ryukyuensis* の有性化3倍体個体の生殖巣において減数分裂が観察されている。つまり、*D. ryukyuensis* は3倍体であっても減数分裂で機能的な配偶子を形成できると推測される。しかし、どのような機構で3倍体の幹細胞から正倍数体の配偶子を形成するのかは不明である。

減数分裂は染色体数を半減した配偶子を形成するための特殊な細胞分裂であり、減数第一分裂、減数第二分裂の2段階の分裂により相同染色体が分配される。減数第一分裂の前期は染色体の形態変化によってさらに5つのステージ、すなわち、レプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期、ディプロテン期、ディアキネシス期に分けられる (Jordan, 2006; モーガン, 2008)。レプトテン期には染色体は細い糸状に観察され、相同染色体のペアリングと組換え反応が開始される。続くザイゴテン期には相同染色体間にシナプトネマ複合体 (synaptonemal complex; SC) と呼ばれるタンパク質の架橋構造が形成され (対合)、パキテン期には SC は染色体の全域に及ぶ。パキテン期の終わりに SC は解体され、クロマチンが劇的に脱凝縮する。ディプロテン期からディアキネシス期にかけて染色体は高度に凝集し、交差がキアズマとして観察されるようになる。その後、減数第一分裂中期から後期にかけて相同染色体が分離され、減数第二分裂で各々の姉妹染色分体が分離されて半数体配偶子が生じる。本章では、有性化3倍体個体における減数分裂機構解明の手がかりを得るため、減数第一分裂前期における染色体挙動に着目して観察した。

3.2 材料および方法

3.2.1 実験動物

用いた系統と有性化、飼育方法、交配については第2章を参照。

3.2.2 染色体標本の作製、FISH

D. ryukyuensis の卵巣もしくは精巣の周辺をスカルペルで切り出し、再生させずに 2.2.4 と同様に染色体標本を作製した。作製した標本は、ギムザ染色、倍数性の測定（後述）、および FISH（2.2.5 参照）に用いた。

3.2.3 核相解析

染色体標本に PI 50 $\mu\text{g/ml}$ と RNase 80 $\mu\text{g/ml}$ を含む PBS を載せ、37°C で 30 分間処理した。PBS で洗浄後、DABCO 溶液と PPD 溶液（2.2.5 参照）を 3:1 の割合で混合した液を滴下し、封入した。蛍光像を Carl Zeiss Axio Imager M1 と AxioCam MRm カメラを用いて撮影し、ImageJ の integrated density measure を利用して定量した。同条件で撮影した同一スライド上の精細胞における蛍光量の平均値を 1 として相対値を算出した。

3.3 結果

3.3.1 精巣で観察された減数分裂像

有性化 3 倍体個体（OH 株）の精巣領域の細胞では、サイゴテン期に 2 倍体有性個体の精巣で観察されるものと同様に染色体のペアリングが生じ（Figs. 4a, 5a）、パキテン期にはほぼ全ての染色体が対合している様子が観察された（Fig. 4b）。ディプロテン期には 90.5%（19/21）の減数分裂細胞で 2 倍体有性個体同様 7 本の 2 価染色体のみが観察され（Figs. 4c,

5b)、9.5% (2/21) でそれに加えて過剰な 1 価染色体が存在していた (Fig. 6a)。さらに核相解析により、サイゴテン期の精母細胞の DNA 含量はディプロテン/ ディアキネシス期における DNA 含量とは差が無いが(スチューデントの t 検定で $P>0.75$)、体細胞分裂細胞よりは少なくなっていることが示された ($P<0.01$) (Fig. 4d)。これらの結果は先行研究 (Kobayashi et al. 2008) と一致し、雄性生殖系列細胞において減数分裂開始前に 1 セットの染色体が削減され、2 倍体となっていることを示唆している。

3.3.2 卵巣で観察された減数分裂像

OH 株の雌性生殖系列では、2 倍体有性個体 (Figs. 5c, d) とは異なり、対合していない染色体がパキテン期にも存在し (Figs. 4e, f)、ディプロテン期の卵母細胞の 64.8% (46/71) で 7 つの 2 価染色体と 7 本の 1 価染色体が観察された (Figs. 4g, 4g')。ディプロテン期の卵母細胞の 25.4% (18/71) では 2 価染色体・1 価染色体に加えて 1~3 つの 3 価染色体が、9.9% (7/71) では 4 価以上の多価染色体がそれぞれ観察された (Fig. 6b)。W-2 株の有性化個体でも同様の減数分裂像が観察された。従って、3 倍体有性化個体の雌性生殖系列では、雄性生殖系列とは異なり減数第一分裂前期まで 3 倍体性が維持されることが示唆された。

さらに 3 つの相同染色体の間で対合と分配がどのように起こっているかを調べるため、OH 株で 1 本に変異の生じている 4 番染色体に着目した。ディプロテン期の卵母細胞に対し、4 番染色体にハイブリダイズする 18S rDNA プローブを用いて FISH を行った結果、81.1% (43/53) で野生型の 4 番染色体同士が 2 価染色体を形成し、変異 4 番染色体が 1 価染色体として観察された (Fig. 4h)。17% (9/53) では 4 番染色体は 3 価染色体として観察され、野生型と変異型とで 2 価染色体が形成されていた細胞は 53 個中 1 つのみだった。

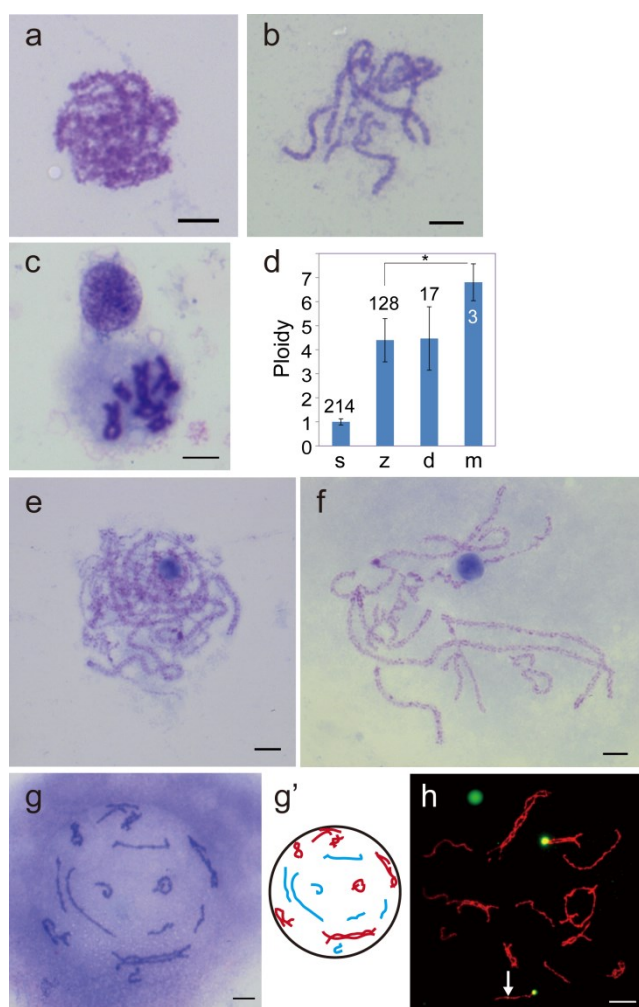


Fig. 4 有性化した OH 個体で観察された減数分裂像

(a-c) 精巣領域で得られた減数分裂像（ギムザ染色）。形態から、それぞれザイゴテン期（a）、パキテン期（b）、ディプロテン期後期（c）の精母細胞と推測される。

(d) 雄性生殖系列細胞における核相の比較。s、精細胞；z、ザイゴテン期；d、ディプロテン/ディアキネシス期；m、体細胞分裂細胞。グラフ中の数字はサンプル数。精細胞(s)の倍数性の平均値を1として平均 ± 標準誤差を示した。アスタリスクはステューデントの t 検定で有意に差があることを示す(* $P < 0.01$)。

(e-h) 卵巣領域で得られた減数分裂像。(e-g) ギムザ染色。形態から、ザイゴテン期（e）、パキテン期（f）、ディプロテン期（g）の卵母細胞と推測される。(g')は(g)の模式図。青、1価染色体；赤、2価染色体。

(h) ディプロテン期の卵母細胞に対する 18S rDNA プローブを用いた FISH。対比染色は PI (赤)。18S rDNA は緑のシグナルとして観察される。矢印は変異 4 番染色体に特徴的な転座したシグナルを示す。

スケールバー：10 μm

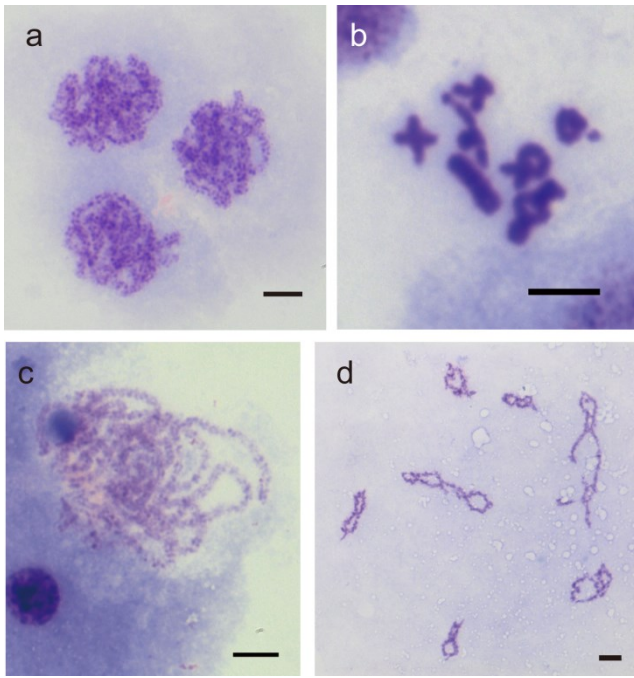


Fig. 5 2倍体有性個体で観察された減数分裂像

(a-b) 精巣領域の細胞で観察された減数分裂像。形態から、それぞれザイゴテン期 (a)、ディプロテン期後期 (b) の精母細胞と推測される。

(c-d) 卵巣領域の細胞で観察された減数分裂像。形態から、それぞれザイゴテン期後期 (c)、ディプロテン期後期 (d) の卵母細胞と推測される。

スケールバー : 10 μm

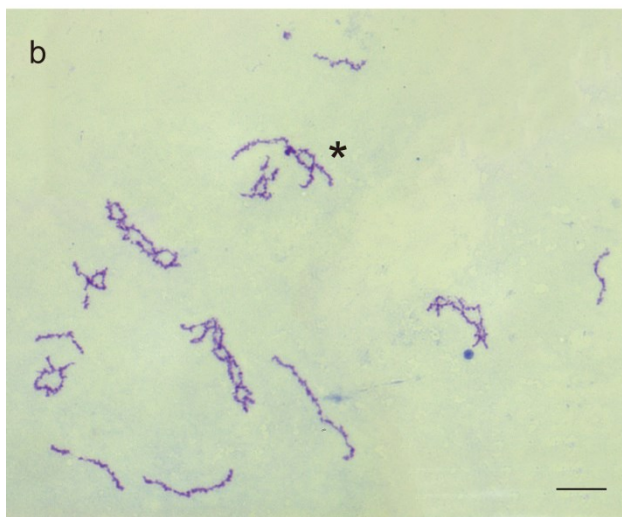
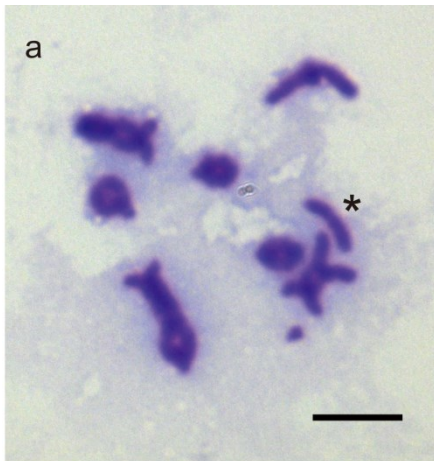


Fig. 6 3倍体個体で稀に観察される減数分裂像

(a) 精巣から得られた、過剰な1価染色体(アスタリスク)を含む精母細胞の減数分裂像。

(b) 3価染色体 (アスタリスク) を形成した卵母細胞。

スケールバー : 10 μm

3.4 考察

3.4.1 3倍体 *D. ryukyuensis* における精子形成過程

精巣領域における減数分裂像の観察から、3倍体有性化個体の雄性生殖系列では減数分裂に入る前に1セットの染色体が削減されていることが示唆された。配偶子形成過程における染色体削減は複数の動物種で報告されており、例えば雑種の魚類や両生類の中には、減数分裂直前に単極の紡錘体を形成することによって (Cimino 1972)、あるいは、生殖原細胞が増殖する間に一部の染色体を徐々に消失させることによって (Tunner and Heppich 1981; Tunner and Heppich-tunner 1991)、一方の親由来の染色体セットを特異的に削減するものが存在する。特に、3倍体の雑種の脊椎動物 [例、*Rutilus alburnoides* Complex (Alves et al. 1998), ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* (Arai and Mukaino 1998; Zhang et al. 1998; Morishima et al. 2008), ヨーロッパトノサマガエル *Pelophylax esculentus* (*Rana esculenta*) (Günther et al. 1979; Christiansen 2009) など] では、3組のゲノムのうち異質な1組が削減され、残った同質な2組の染色体が対合して減数分裂が起こることにより半数体配偶子が形成される“meiotic hybridogenesis”と呼ばれる現象が知られている。観察された減数分裂像からは、3倍体 *D. ryukyuensis* における1倍体精子の形成は meiotic hybridogenesis に近いメカニズムで行われているように推測される。しかしながら第2章で述べたように、3倍体 *D. ryukyuensis* の精子形成では染色体はランダムに削減・分配され、meiotic hybridogenesis に見られる選択的な染色体の遺伝は起きていないようである。したがって、3倍体 *D. ryukyuensis* ではこれらの生物とは異なる未知の機構で染色体削減が生じている可能性があるが、その解明にはさらなる研究が必要である。

3.4.2 3 倍体 *D. ryukyuensis* における卵形成過程

雄性生殖系列とは異なり、3 倍体 *D. ryukyuensis* の雌性生殖系列では減数第一分裂前期まで 3 倍体性が維持されており、ディプロテン期には 2 価染色体とともに 1 価染色体が観察された。この結果は先行研究 (Kobayashi et al. 2008) とは一致しないが、様々な 3 倍体生物、例えばキク科植物 *Crepis capillaris* (Vincent and Jones 1993) やカイコ *Bombyx mori* (Rasmussen 1977)、カレイの一種 *Scophthalmus maximus* (Cunado et al. 2002) で同様の染色体像が観察されている。しかしながら、多くの場合減数分裂時における 1 価染色体の存在は異数体配偶子が形成される原因となるため、3 倍体 *D. ryukyuensis* のように正倍数体の配偶子が高い割合で形成される生物は珍しいといえる。3 倍体のドジョウ *M. anguillicaudatus* の卵母細胞では、減数第一分裂時に対合せずに残った 1 価染色体が赤道面から排除され、やがて消失する様子が観察されている (Zhang et al. 1998)。3 倍体 *D. ryukyuensis* でも同様に、減数第一分裂中期以降に 1 価染色体が削減され、残る 2 価染色体が分配されることによって 1 倍体卵が形成されている可能性がある。

一方、OH 株のディプロテン期の卵母細胞に対する FISH 解析では、多くの細胞で変異 4 番染色体が 1 価染色体として存在することが示唆された。先行研究 (Kobayashi et al. 2008) では、1 セットの染色体が削減された後、減数第一分裂で分離された極体が再び融合することにより 2 倍体卵が形成されることが示唆されているが、もしそうであれば、2 倍体卵には減数第一分裂前期に対合した染色体の両方が含まれることになる。つまり、OH 由来の 2 倍体卵から産まれた子の間では、野生型の 4 番染色体のみを持つ子の方が変異 4 番染色体を持つ子よりも頻度が高くなるはずである。しかし、Table 5 に示したように、OH 由来の *msl* アレルを 2 種類持つ 3 倍体 F_1 個体、すなわち、OH 由来の 2 倍体卵から産まれたと考えられる個体の多くは変異 4 番染色体を持っていた。したがって、今回得られた結果は寧ろ、2 価染色体が減数第一分裂で分離される一方で、対合しなかった 1 価染色体が減数第二分裂時まで卵内に残ることによって 2 倍体卵が形成されることを示唆している。この仮説は、2

倍体卵に異なる 2 セットのゲノムが含まれているというマイクロサテライト多型解析の結果とも矛盾しない。卵巣領域では、今までのところ減数第一分裂前期の染色体像しか観察されていないが、1 倍体卵と 2 倍体卵が形成されるメカニズムを明らかにするためには、減数第一分裂中期以降の卵母細胞についても染色体挙動を調べる必要がある。

3.5 結言

3 倍体有性化 *D. ryukyuensis* の配偶子形成において、雄性生殖系列と雌性生殖系列は異なる染色体挙動を示すことが明らかになった。特に、精子形成過程では減数分裂前に 1 セットの染色体が削減され、減数分裂自体は始めから 2 倍体として進行するのに対し、卵形成過程では少なくとも減数第一分裂前期まで 3 倍体性が維持されている点は大きく異なる。卵母細胞では 3 つの相同染色体が 3 価染色体として存在するよりも 2 価染色体と 1 価染色体として存在することの方がはるかに多かったが、相同染色体の対合の過程で何らかの制御機構が働いているのかもしれない。また、一部の卵母細胞では減数第一分裂中期以降に 1 セットの染色体が削減されることにより 1 倍体卵となり、染色体削減が起こらなかった場合には 2 倍体卵となる可能性が示唆された (Fig. 7)。

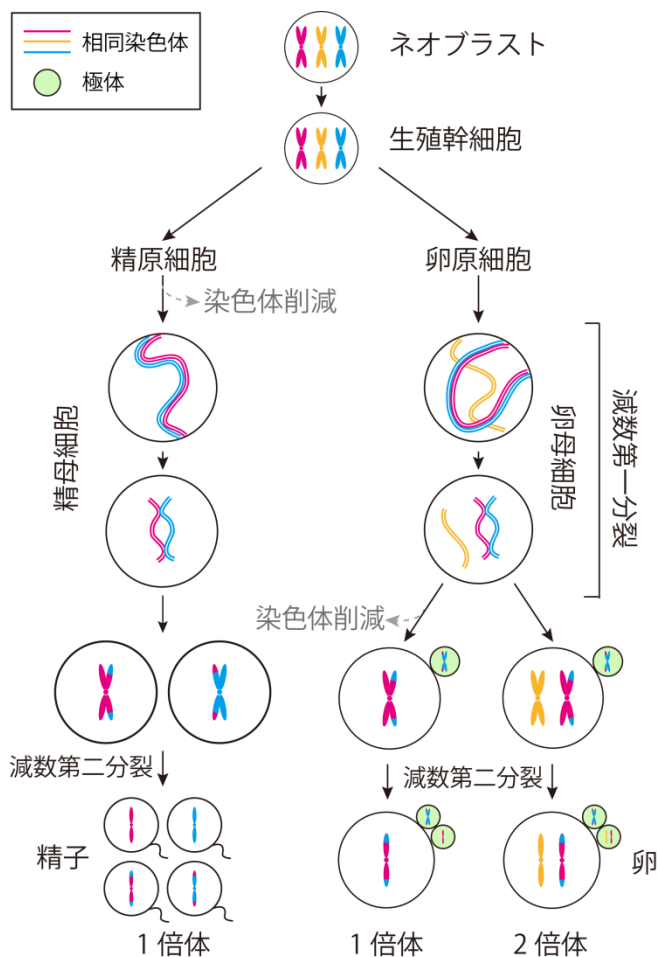


Fig. 7 3倍体 *D. ryukyuensis* における配偶子形成過程に対する仮説

1組の相同染色体を紅、橙、青で区別し、2本ずつの姉妹染色分体は同色で示した。

まず生殖系列幹細胞がネオブラスト（3倍体）から分化する。精巣（左）では、生殖系列幹細胞から精原細胞が分化し、減数分裂に入るまでに相同染色体のうち1つ（橙）が削減される。そして連続する2回の分裂によって4つの1倍体精細胞が形成される。これに対し、卵巣（右）では減数第一分裂中期まで全ての染色体が保持される。その後、1つの相同染色体（橙）を削減したものが1倍体卵となり、削減が起きなかったものが2倍体卵となる。

第4章 減数第一分裂における Rad51 遺伝子の解析

4.1 緒言

第3章では3倍体 *D. ryukyuensis* において特殊な減数分裂によって正倍数体の配偶子が形成されることが示唆された。特に雌性生殖系列では、減数第一分裂前期の段階では3組の相同染色体が存在するにも拘らず、3価染色体が形成される頻度は低く、2価染色体が形成されて分離されることによって1倍体もしくは2倍体の卵が形成される。この機構を明らかにするには、減数第一分裂における染色体挙動をより詳細に知る必要がある。

減数分裂において染色体の分配が正確に行われるためには、減数第一分裂中期に2つの相同染色体が物理的に接着していることが重要である。多くの生物では、相同染色体間の物理的接着は減数第一分裂前期に生じる3つの過程、すなわち、相同染色体のペアリング、組換え、および対合 (synapsis) によって保証される。相同染色体のペアリングはレプトテン期に起こり、相同染色体が平行に整列する。対合とは、ザイゴテン期からパキテン期にかけて相同染色体間にシナプトネマ複合体 (SC) と呼ばれるタンパク質構造が形成されることで相同染色体同士が全長にわたって堅固に結合する過程を指す (Zickler and Kleckner 1998; Zickler and Kleckner 1999)。また、レプトテン期には進化的に保存されたII型トポイソメラーゼ様タンパク質 SPO11 (Keeney 2001) によってDNA2本鎖が切断され (double strand break; DSB)、その修復のために組換え反応が開始される。組換えはザイゴテン期からパキテン期にかけて生じ、交差が形成され、ディプロテン期にはキアズマとして観察されるようになる。SCはディプロテン期には解体されるが、キアズマは減数第一分裂後期に入るまで維持され、相同染色体を物理的に繋ぐ役割を果たす。

多くの生物では、組換え反応がペアリングと対合にも必要であることが示されている。そこで本章では、3倍体 *D. ryukyuensis* の卵母細胞における2価染色体の形成過程の解明を

目指し、相同組換えに着目した。相同組換えにおいて重要な役割を持つタンパク質の一つが Rad51 である。Rad51 はバクテリアに見られる組換え酵素 RecA のホモログであり、RecA と同様、ATP の存在下で 1 本鎖 DNA に結合し、相同な DNA 分子間での鎖交換反応を触媒する。Rad51 はほとんどの真核生物で保存されており、体細胞分裂時には DNA 複製の際あるいは電離放射線によって形成された DSB の修復に、減数分裂時にはそれに加えて SPO11 によって形成された DSB の修復に必要である (Shinohara et al. 1992; Shinohara et al. 1993; Rinaldo et al. 1998; Staeva-Vieira et al. 2003)。多くの真核生物は Rad51 に加えて減数分裂特異的なホモログである Dmc1 や、Rad51 パラログとして知られ Rad51 の機能を促進するタンパク質群を含む。Rad51 パラログの数は生物種によって異なり、例えば出芽酵母では RAD55 と RAD57 の 2 つ、脊椎動物では RAD51B、RAD51C、RAD51D、XRCC2、XRCC3 の 5 つが同定されている (Sung et al. 2003; Shinohara et al. 2004)。本章では *D. ryukyuensis* から 3 つの Rad51 ホモログを単離し、減数分裂における機能を調べることを目的として発現解析および機能解析を行った。

4.2 材料および方法

4.2.1 実験動物

用いた系統と有性化、および飼育方法については第 2 章を参照。

4.2.2 *rad51* 遺伝子の同定と系統解析

Dr-rad51 ホモログ遺伝子の塩基配列は *D. ryukyuensis* の有性化過程のトランスクリプトームデータから取得した。アミノ酸配列のアライメントには Clustal Omega (ver. 1. 2. 0) (Silvers et al. 2011) を用いた。分子系統樹は、MEGA5 (ver. 5.2.2) (Tamura et al. 2011) を利用

して WAG+G+I+F モデル (5 discrete gamma categories; Whelan and Goldman 2001) に基づいた最尤法で作成し、ブートストラップ法 (500 回反復) で解析した。

4.2.3 X 線照射

氷を詰めた径 9 cm シャーレ上に飼育水で湿らせた濾紙を敷き、プラナリアを重ねないように載せ、X 線発生装置 SOFTEX E-3 (SOFTEX Co., Ebina, Japan) を用いて 10 Gy の軟 X 線を照射した。照射 1 日後のプラナリアを後述の RNA 抽出または *in situ* hybridization に用いた。

4.2.4 total RNA の抽出

セパゾール RNA I Super (nacalai tesque) 200 μ l 中でプラナリアをホモジナイズし、室温で 5 分間静置した後、クロロホルム 40 μ l を加えよく混合した。室温で 3 分間静置し、15000 rpm で 15 分間、4°C で遠心した。上層のみを取り出して 2-プロパノール沈澱し、DEPC H₂O 10 μ l で溶解した。抽出した RNA は -80°C で保存した。

4.2.5 RT-PCR

D. ryukyuensis から抽出した total RNA 1 μ g を RQ1 RNase-Free DNase (Promega) で処理し、9 mer Random primer および Rever Tra Ace (TOYOBO) を用いて cDNA を合成した。この cDNA をテンプレートとし、2 \times Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO) を用いて PCR を行った。インターナルコントロールには *GAPDH* を用いた。*Drpcna* は増殖能を持つ X 線感受性の細胞、つまりネオプラストなどの幹細胞で発現する *Djpcna* のホモログである (Orii et al. 2005)。また、DrC_00456 は *D. ryukyuensis* の EST データベースから得られた精巢の生殖細胞特異的に発現する遺伝子 (Ishizuka et al. 2007)、*Dryg* は卵黄腺特異的に発現する遺伝子である (Hase et al. 2003)。使用したプライマーは以下の通りである。

Dr-rad51 forward: 5'-CCGGAAAGATTACTCGCTGT-3'

Dr-rad51 reverse: 5'-GGCACCATCAACTTGTGCTA-3'

Dr-rad51B forward: 5'-ATTGAGTGTTCTGCTTTAGATTTACA-3'

Dr-rad51B reverse: 5'-ATGCTGCTCCAAATTGATGA-3'

Dr-rad51C forward: 5'-CAATTGGCCATTGTCAGAAA-3'

Dr-rad51C reverse: 5'-CGGCTGTGAGACATGCTTTA-3'

DrGAPDH forward: 5'-AGTCGATGGTCATGCAATGTCTGT-3'

DrGAPDH reverse: 5'-TAATATTCTGAGCTGCACCTCTGCC-3'

Drpcna forward: 5'-CCTCGGAAGTAACGACTCTC-3'

Drpcna reverse: 5'-ATAGCCTCACCCATCTGACT-3'

DrC_00456 forward: 5'-GGATAGTAGACCCGGTCCAG-3'

DrC_00456 reverse: 5'-TCTGGTTGCTTTTCGGCATCC-3'

Dryg forward: 5'-TCATCGGGAATTGACAGAGA-3'

Dryg reverse: 5'-TCGGCAAAGTCGATTTTCTT-3'

PCR 産物は 5%ポリアクリルアミドゲルを用いて 200 V 定電圧で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、Molecular Imager FX (BIO-RAD)で撮影した。

定量的 real-time PCR は LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I および LightCycler 1.5 system (Roche Applied Science)を用いて行った。使用したプライマーの配列は以下の通りである。

Dr-rad51 forward: 5'-ATTATTAGTTACAGCAGCGGC-3'

Dr-rad51 reverse: 5'-CCAAACTCATCTGCTAGTCG-3'

Dr-rad51B forward: 5'-GATACGAACGGAAATTTTTCAATGAC-3'

Dr-rad51B reverse: 5'-GCTCCAAATTGATGAATATTTGATAGAATG-3'

Dr-rad51C forward: 5'-CTTTCAGCTGAAGAATTACAACAAGTTG-3'

Dr-rad51C reverse: 5'-TAATTAACGAACCTTGGGATGAG-3'

Drpcna forward: 5'-CCTCGGAAGTAACGACTCTC-3'

Drpcna reverse: 5'-ATAGCCTCACCCATCTGACT-3'

転写量は *DrGAPDH* をインターナルコントロールとして標準化した (forward, 5'-CTGT TGTCGATTTGACCTG-3'; reverse, 5'-AAAGTCTTGACTGACCACTTC-3')。

4.2.6 Whole-mount *in situ* hybridization (WISH)

RNA プローブの作製

RT-PCR により増幅した DNA 断片を Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) を用いて精製し、pGEM-T Vector (Promega) に組み込み、大腸菌 DH-5 α に形質転換してクローニングした。大腸菌から抽出したプラスミド 10 μ g を制限酵素 (アンチセンスプローブは Nco I、センスプローブは Not I、いずれも TOYOBO) で切断し、フェノール / クロロホルム抽出およびエタノール沈澱により精製した。得られた鋳型 DNA 1 μ g に Transcription optimized 5 \times buffer (Promega) 4 μ l、100 mM DTT 2 μ l、DIG-RNA labeling Mix (Roche) 2 μ l、RNase Inhibitor (nacarai tesque) 0.5 μ l、RNA Polymerase (アンチセンスプローブは SP6 ポリメラーゼ、センスプローブは T7 ポリメラーゼ、いずれも Promega) 1.5 μ l、および DEPC H₂O を加えて 20 μ l とし、37°C で 3 時間転写反応を行った。RQ1 DNase (Promega) 4 μ l を加え 37°C で 30 分間反応させた後、エタノール沈澱により精製し、DEPC H₂O 50 μ l で溶解した。プローブは -30°C で保存し、使用する直前に 65°C で 10 分間変性させた。

ハイブリダイゼーション

D. ryukyuensis を 2% 塩酸 / HEPES-5/8Holt に入れ、4°C で 5 分間、ローターで緩やかに攪拌し、粘液を除いた。カルノア液 (60% エタノール、30% クロロホルム、10% 酢酸) に交換し、ローターで緩やかに攪拌しながら 4°C で約 3 時間固定した後、脱色液 (メタノール : 過酸化水素水=5:1) に交換し、室温で蛍光灯を照射して 14 時間脱色反応を行った。十分に脱色されたら 70% エタノール / PBTx、50% エタノール / PBTx、30% エタノール / PBTx、PBTx で各 30 分、室温で処理した。以下の作業は、55°C で、2 ml エッペンドルフチューブ

を用いて行った。

D. ryukyuensis をプローブごとに 2 ml チューブに分け、プレハイブリダイゼーション溶液 (50% ホルムアミド、5×SSC、100 µg/ml Yeast tRNA、10 µg/ml Heparin、0.1% Tween20、10 mM DTT) を 1 ml 入れて 1 時間処理した。1 ml の RNA プローブ (約 200 ng 分) / ハイブリダイゼーション溶液 (50% ホルムアミド、5×SSC、100 µg/ml Yeast tRNA、10 µg/ml Heparin、0.1% Tween20、10 mM DTT、10% Dextran sulfate) に交換して、16 時間ハイブリダイゼーションを行った。プラナリアを 1 匹ずつ 6 穴プレートに移し、50% ホルムアミド / 0.1% Tween20 / 5×SSC で 30 分×2 回、20% ホルムアミド / 0.1% Tween20 / 2×SSC で 30 分×2 回、2% ホルムアミド / 0.1% Tween20 / 0.2×SSC で 30 分×2 回、55°C で洗浄した。

検出

サンプルを室温に戻し、MABT で 10 分間 3 回洗浄し、ブロッキング液 (1% Blocking reagent (Roche Applied Science) / MABT) で 30 分間処理した。ブロッキング液で 2000 倍希釈した Anti Dig-AP Fab Fragments (Roche) に交換して 3 時間処理した後、MABT で 15 分間 4 回、30 分間 4 回洗浄した。TMN で 15 分間洗浄後、BCIP と NBT をそれぞれ 175 µg/ml、200 µg/ml の濃度になるように加えた TMN に交換し、発色させた。

十分に発色したのを確認してから、PBTw で 1 時間洗浄することにより発色を停止させ、50% エタノール / PBTw で 5 分間洗浄した後 100% エタノールに入れ替えて脱色を行った。バックグラウンドが抜けたら 50% エタノール / PBTw に入れ替えて 5 分洗浄した後、PBTw で 2 回洗浄して脱色を止めた。25%グリセロール / PBTw と 50% グリセロール / PBTw 中で 5 分ずつ振盪し、50%グリセロール / PBTw に入れ替えて 4°C で保存した。観察は実体顕微鏡を用いて行った。

4.2.7 組織観察

組織切片の作製

WISH と同様の試薬、方法で粘液を除き、固定液（4% PFA / 30% (v/v) エタノール-HEPES-5/8Holt）に交換して室温で 3 時間固定した。30%、50%、70%、80%、90%エタノールで各 30 分、100%エタノールで 30 分×3 回処理し、脱水した。エタノール-キシレン（1:1）で 30 分、100%キシレンで 30 分×2 回処理した（透徹）。42℃のパラフィン-キシレン（1:1）で 1.5 時間、60℃のパラフィンで 1 時間×2 回処理し、パラフィン Paraplast Plus（Sherwood Medical）に包埋した。ミクロトームを用いて 6 μm 厚の切片を作製し、HE 染色用には卵白アルブミンを塗ったスライドガラス（松浪硝子）に、*in situ* hybridization 用には MAS コートスライドガラス（松浪硝子）に、それぞれ MilliQ 水を少量滴下した上に浮かべて伸展器で乾燥させた。

HE 染色

サンプルを 100%キシレン 5 分×3 回で脱パラフィンし、エタノール-キシレン（1:1）5 分、100%エタノールで 5 分×2 回、95%、90%、80%、70%エタノールに各 5 分、MilliQ 水に 10 分間通して再水和した後、マイヤーヘマトキシリン溶液で 5 分間染色し、流水に 15 分間浸して発色させた。0.5%エオシンで 3 分間染色した後、MilliQ 水で 1 分洗浄し、70%、80%、90%、95%エタノールで各 1 分、100%エタノールで 1.5 分×2 回脱水処理した。エタノール-キシレン（1:1）で 5 分、100%キシレンで 5 分×2 回処理した後、Permount（FALMA）で封入し、光学顕微鏡 Carl Zeiss Axio Imager M1 で観察した。

In situ hybridization

RNA プローブは WISH に用いたものと同じものを用いた。サンプルを 100%キシレン 10 分×3 回で脱パラフィンし、100%エタノールで 10 分×3 回、90%、80%、70%、50%エタノール

ルで各 10 分、PBS で 10 分×2 回処理した。内在性のアルカリフォスファターゼを除去するため、1.5%トリエタノールアミン-0.25% HCl 水溶液に浸漬して攪拌しながら 1 ml の無水酢酸を 5 分間かけて滴下した後、液中に 10 分間放置した（アセチル化）。2×SSC で 10 分×2 回処理後、プレハイブリダイゼーション溶液（50%ホルムアミド、5×SSC、1×デンハルト）を載せて 55 °C で 1.5 時間処理し、RNA プローブ 50 ng / ハイブリダイゼーション液（50%ホルムアミド、5×SSC、1×デンハルト、1 mg/ml Yeast tRNA、0.1 mg/ml Heparin、0.1% Tween-20、10%(w/v)デキストラン）100 μl に交換して 55 °C で 16 時間反応させた。ハイブリダイゼーションの後、洗浄液（50%ホルムアミド、5×SSC、1×デンハルト、0.1% Tween-20）で 55 °C、20 分×3 回洗浄した。サンプルを室温に戻し、2×SSC、MABT で各 15 分間処理してから、ブロッキング液（1% Blocking reagent (Roche Applied Science) / MABT）で 30 分間処理した。ブロッキング液で 1000 倍希釈した Anti Dig-AP Fab Fragments（Roche）に交換して 3 時間処理した後、MABT で 15 分×8 回洗浄した。TMN で 10 分間処理後、BCIP と NBT をそれぞれ 175 μg/ml、200 μg/ml の濃度になるように加えた TMN に交換し、発色させた。十分に発色したのを確認してから、TE で 15 分間洗浄し発色を停止させ、50%グリセリン/ TE 溶液で封入し、光学顕微鏡で観察した。

4.2.8 RNAi 法

RT-PCR により増幅した DNA 断片を Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) を用いて精製し、pBluescript II SK (+) Phagemid Vector に組み込み、大腸菌 DH-5α に形質転換してクローニングした。PCR に用いたプライマーは以下の通りである。

Dr-rad51 dsRNA forward: 5'-AACTGCTGGTATTAGTTCAATGG-3'

Dr-rad51 dsRNA reverse: 5'-ATCATCGCCGCTGCTGTAACTA-3'

Dr-rad51B dsRNA forward: 5'-TGTTTATTCAAAGGCAGGAAGC-3'

Dr-rad51B dsRNA reverse: 5'-CATGTCAGCAATCGTCCGAATA-3'

Dr-rad51C dsRNA forward: 5'-CAATGAGCATGAAACTTGACGA-3'

Dr-rad51C dsRNA reverse: 5'-TGCTCATATTTTGCCCGAAAAC-3'

dsRNA 合成のためのテンプレートは、T7 プロモーターを 5' 末端に持つように、上記のプラスミドから以下のプライマーセットを用いて PCR 増幅し、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega)を用いて精製した。

dsRNA template-1 forward (M13 forward primer): 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

dsRNA template-1 reverse: 5'-GGAACAAAAGCTGGAGCTCC-3'

dsRNA template-2 forward:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGGGAACAAAAGCTGGAGCTCC-3'

dsRNA template-2 reverse: 5'-CCTCGAGGTCGACGGTATCG-3'

それぞれの テンプレートから T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (Promega)を用いて転写した RNA をフェノール・クロロホルム抽出し、混合して 70°Cで 15 分間処理して変性させた後、40°Cまで段階的に冷却することによりアニーリングさせた。dsRNA はエタノール沈澱により精製し、ホモジナイズした鶏レバーまたは *B. brunnea* に 0.5 mg/ml の濃度で混合し、パラフィルム上に 10 µl ずつ滴下して-80°C で保存した。

再生過程におけるロックダウンでは、無性個体に鶏レバーで作製した RNAi 用餌を 2 日おきに 3 回与え、3 回目の投餌の翌日に頭部と尾部を切断除去した。切断 8 日後に RNAi 用餌を与え、翌日再生した頭部と尾部を再度切断除去した。コントロールには dsRNA を含まないレバーホモジェネートを与えた。

有性化過程におけるロックダウンでは、無性個体に鶏レバーで作製した RNAi 用餌を 2 日おきに 3 回与え、その 3 日後から *B. brunnea* で作製した RNAi 用餌を週 6 日、5 週間与えた。その後は鶏レバーで作製した RNAi 用餌を週 3 回与えた。生殖能を調べるため、有性化した *D. ryukyuensis* は 5 匹ずつ小石の入った 3 つのタッパーに分けて飼育した。

4.2.9 染色体標本の作製、FISH

3.2.2 および 2.2.4、2.2.5 参照。

4.3 結果

4.3.1 *D. ryukyuensis* における *rad51* ホモログおよびパラログの同定

D. ryukyuensis の有性化過程のトランスクリプトームからは、他生物の Rad51 と相同性の高い RNA の配列が 3 種得られた。そのうち、酵母およびマウスの Rad51 と最も高い相同性（それぞれ 63.9% および 78.1%）を示した 338 アミノ酸をコードする遺伝子を *Dr-rad51* と名付けた (Figs. 8a、9)。系統解析からも、*Dr-rad51* が酵母およびマウスの Rad51 タンパク質に対するオーソログであることが示唆された (Fig. 8b)。他の 2 種の配列から予測されたアミノ酸配列は、系統解析の結果 Rad51 のアクセサリータンパク質である Rad51B および Rad51C のホモログと推測されたため、それぞれ DrRad51B、DrRad51C と名付けた (Fig. 8b)。

a

ScRad51	MmRad51	MmRad51B	MmRad51C	DrRad51	DrRad51B	DrRad51C	
100.0	66.7	28.0	29.3	63.9	24.2	29.0	ScRad51
	100.0	28.9	30.5	78.1	24.3	29.8	MmRad51
		100.0	28.8	28.9	28.8	32.3	MmRad51B
			100.0	28.3	24.6	41.8	MmRad51C
				100.0	22.8	28.7	DrRad51
					100.0	27.0	DrRad51B
						100.0	DrRad51C

b

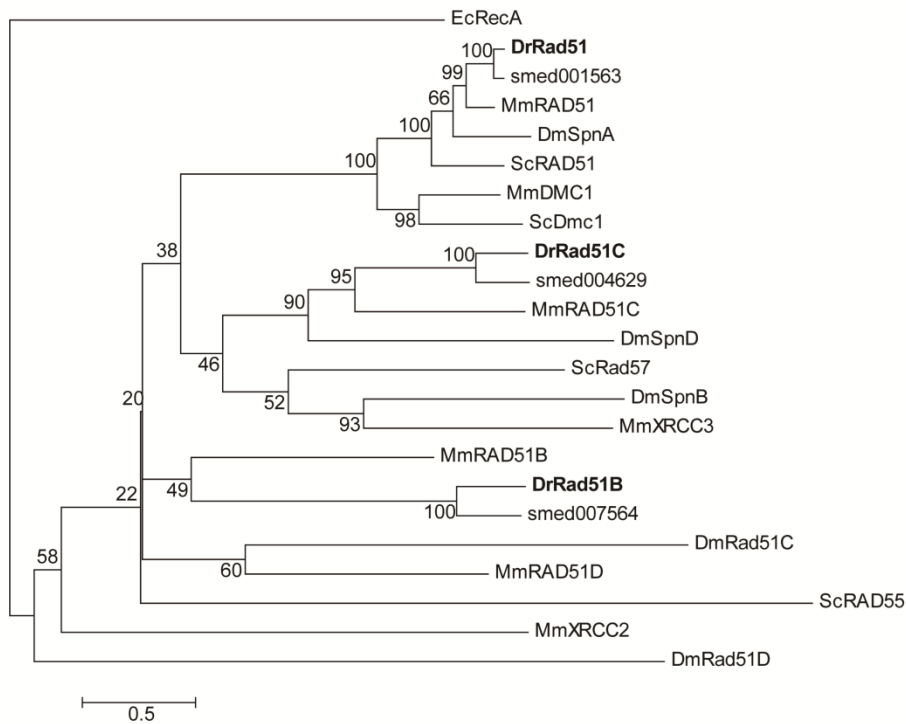


Fig. 8 Rad51 ホモログタンパク質の系統解析

(a) *D. ryukyuensis* の Rad51 タンパク質と酵母(Sc)およびマウス(Mm)における相同タンパク質の配列の比較。数字は相同性。

(b) recA/Rad51 ファミリータンパク質の分子系統樹。スケールは座位あたりの置換数、分岐点の数字はブートストラップ値(500 回反復)。解析に用いた配列の種名と NCBI データベースにおける accession number は以下の通り ; Ec, *Escherichia coli* (YP_853918.1); Dr, *D. ryukyuensis*; smed, *Schmidtea mediterranea* (smed001563, GAKN01013087.1; smed004629, GAKN01014219.1; smed007564, GAKN01016001.1); Sc, *Saccharomyces cerevisiae* (RAD51, CAA45563.1; Dmc1, P25453.1; Rad55, BAA01284.1; Rad57, P25301.1); Mm, *Mus musculus* (RAD51, NP_035364.1; DMC1, NP_034189; RAD51B, NP_033040.2; RAD51C, NP_444499.1; RAD51D, AAC40093.1; XRCC2, NP_065595.2; XRCC3, NP_083151.1); Dm, *Drosophila melanogaster* (SpnA, AAF57005.1; SpnB, AAF55050.1; SpnD, AAN14399.1; Rad51C, AAF58973.2; Rad51D, AAF48852.1).

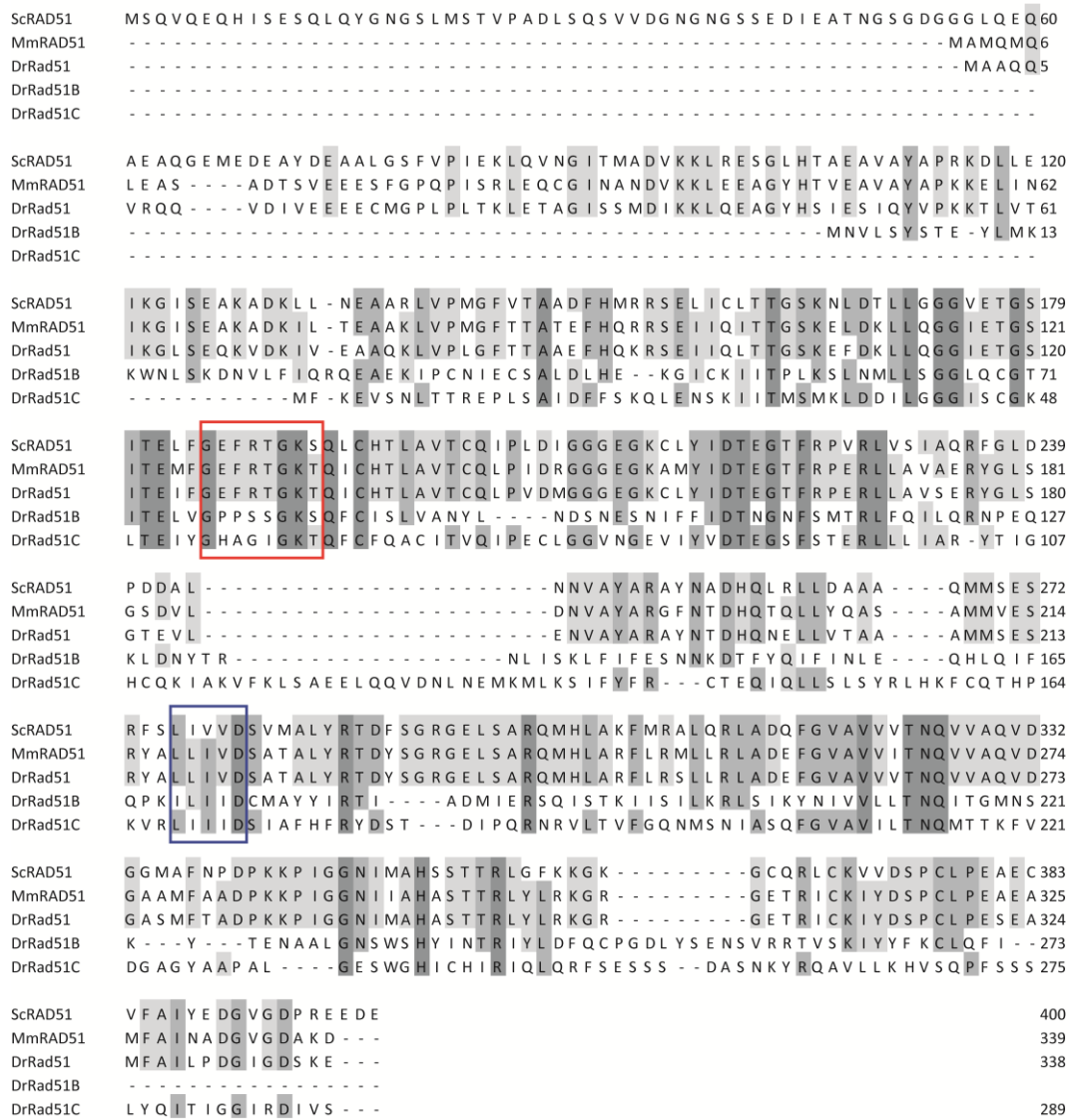


Fig. 9 Rad51 ホモログタンパク質のアライメント

Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Mm, *Mus musculus*; Dr, *D. ryukyensis*. Walker-A box モチーフを赤枠、Walker-B box モチーフを青枠で示した。

4.3.2 *Dr-rad51* の発現解析

Dr-rad51 の生殖系列における発現を確かめるため、有性化個体において *in situ* hybridization を行った。WISH では *Dr-rad51* mRNA が卵巣と精巣で高発現していることが確認され (Figs. 10a-c)、組織切片の *in situ* hybridization により卵巣内の卵原細胞と未成熟な卵母細胞、および精巣内の精原細胞と精母細胞で発現していることが確かめられた (Figs. 10d-g)。

多くの生物で Rad51 は体細胞分裂と減数分裂の両方に必要である。*D. ryukyuensis* でも、生殖器官を持たない無性個体においても *Dr-rad51* が発現していることが RT-PCR により示された (Fig. 11a)。無性個体に対する WISH では、*Dr-rad51* は眼の前方と咽頭を除く全身に発現していた (Fig. 11b)。さらに組織切片の *in situ* hybridization を行ったところ、*Dr-rad51* が高発現している細胞は背側の間充織に存在し、眼の前方や咽頭、表皮、および腸管には見られなかったことから (Figs. 11c-e)、*Dr-rad51* の発現細胞はネオブラストであると予想された。プラナリアに X 線を照射するとネオブラストが特異的かつ速やかに消失し、再生能力が失われることが知られているが (Wolff et al. 1948; Baguña et al. 1989; Oriei et al. 2005)、WISH および定量的 real-time PCR では *Dr-rad51* が X 線照射後に速やかに減少することが示され (Figs. 11b, f)、このことから無性個体における *Dr-rad51* の発現細胞のほとんどがネオブラストであることが示唆された。しかし、再生過程での RNAi による *Dr-rad51* のノックダウンでは、2 回の切断後も再生への影響は見られなかった (Figs. 12a-d)。

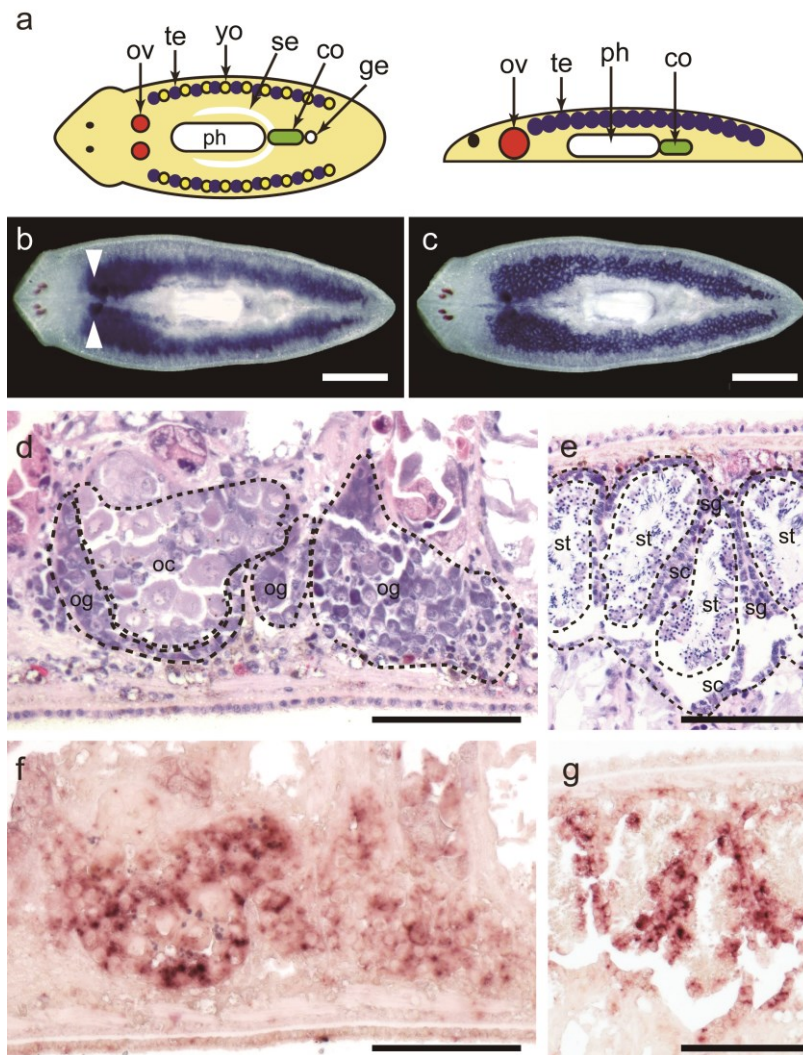


Fig. 10 有性化個体における *Dr-rad51* の発現

(a) 有性化個体の全身(左)および矢状断面(右)の模式図。ph, 咽頭; ov, 卵巣; te, 精巣; yo, 卵黄腺; se, 貯精嚢; co, 交接器官; ge, 生殖孔

(b-c) WISH. (b) 腹側像、(c)背側像。卵巣を矢頭で示した。スケールバー: 1 mm。

(d-g) 生殖系列細胞における *Dr-rad51* の発現。矢状切片の HE 染色(d-e)と *in situ* hybridization (f-g)。異なるステージの細胞は破線で区切った。(d, f) 卵巣。og, 卵原細胞; oc, 卵母細胞。(e, g) 精巣。sg, 精原細胞; sc, 精母細胞; st, 精細胞。スケールバー: 100 μm。

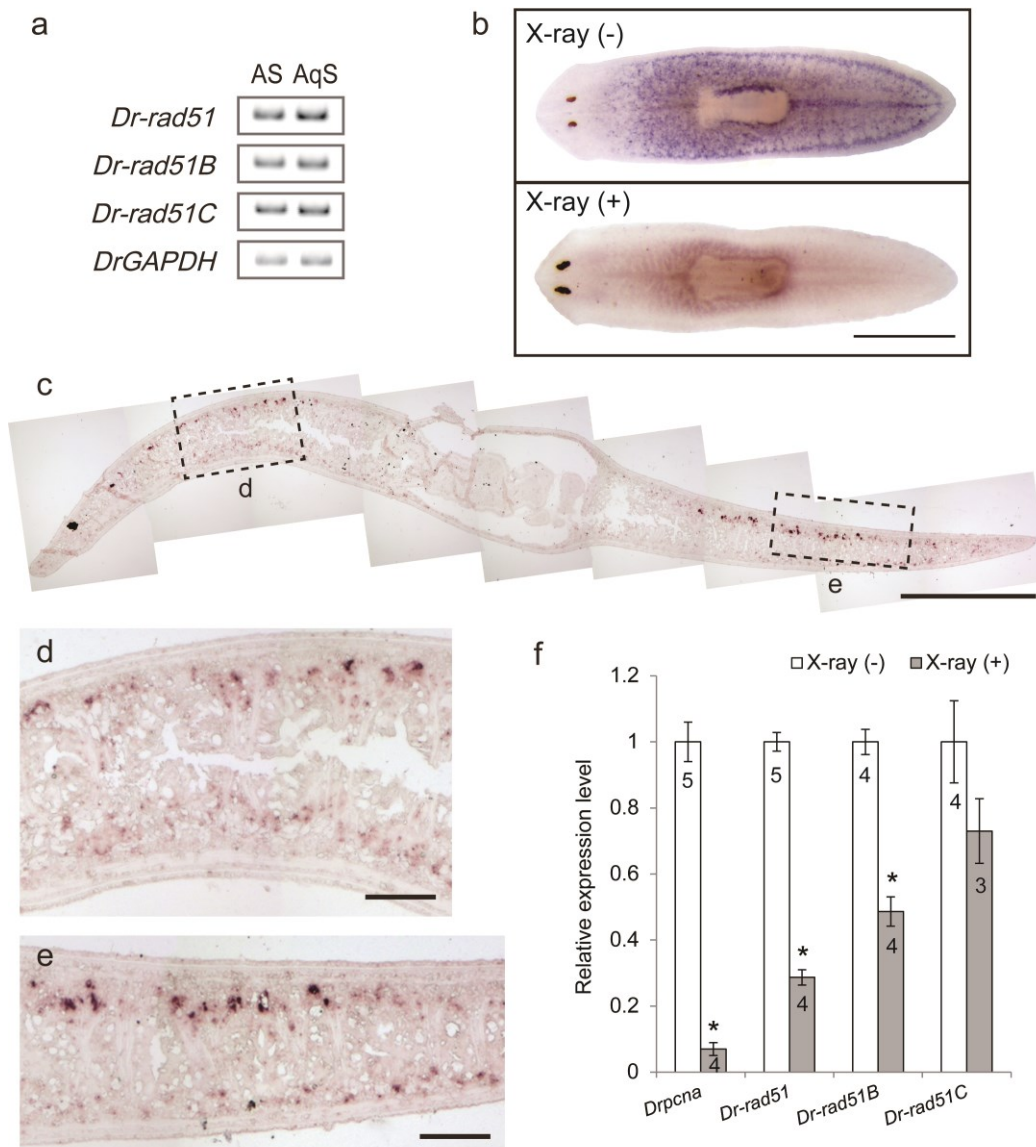


Fig. 11 無性個体における *Dr-rad51* の発現解析

(a) 無性個体 (AS) と有性化個体 (AqS) における発現レベル (RT-PCR)

(b) X線非照射個体[X-ray (-)]と X線照射 1 日後の個体[X-ray (+)]における WISH。スケールバー: 1 mm

(c) 矢状切片における *In situ* hybridization。スケールバー: 1 mm

(d, e) (c)の破線枠の拡大図。スケールバー: 100 μ m。

(f) X線非照射個体[X-ray (-)]と X線照射 1 日後の個体[X-ray (+)]における発現量の比較 (定量的 real-time PCR)。グラフ中の数字はサンプル数。非照射個体における発現量を 1 として平均 \pm 標準誤差を示した。

アスタリスクはステューデントの t 検定で非照射個体に対して有意に差があることを示す(* $P < 0.01$)。

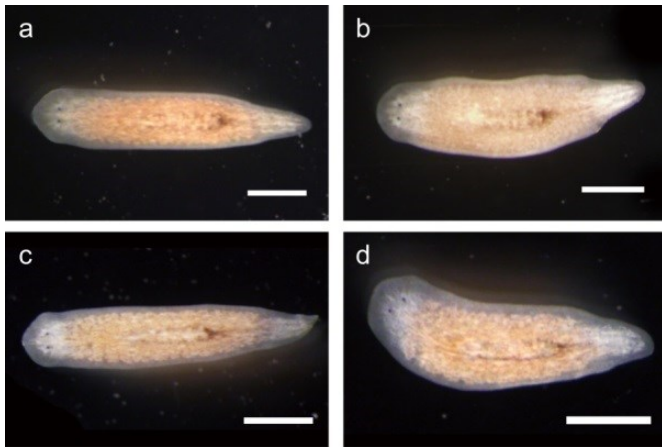


Fig. 12 無性個体の再生における *Dr-rad51* の機能解析

(a-b) 1 度目の切断 8 日後、 (c-d) 2 度目の切断 1 週間後の外部形態 (背側像)。

(a, c) コントロール; (b, d) *Dr-rad51* ノックダウン。スケールバー: 1 mm

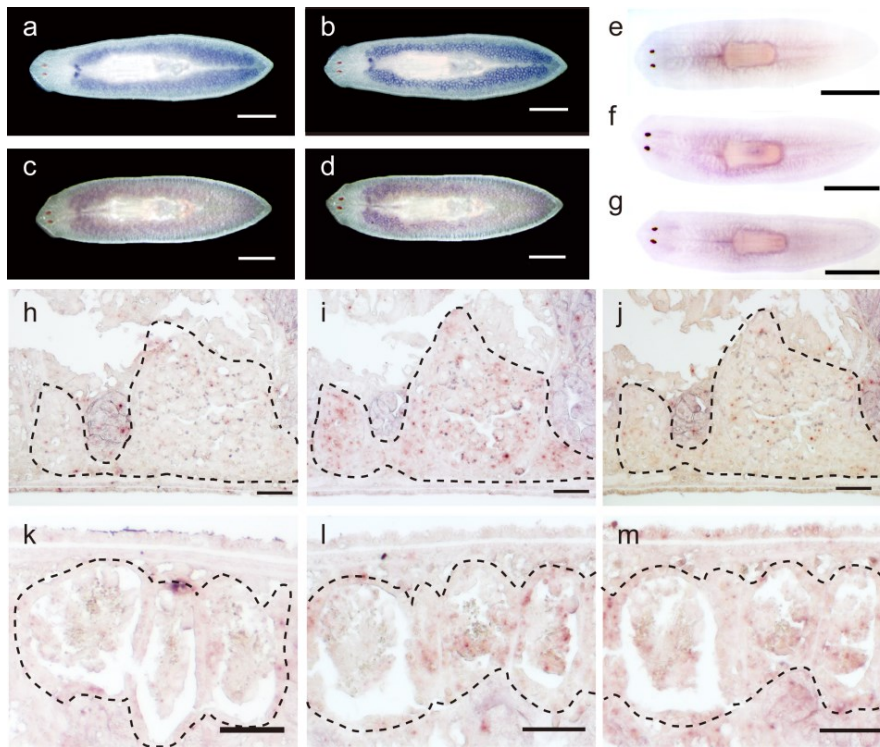


Fig. 13 *rad51* パラログの発現解析

(a-g) WISH. (a-d) 有性化個体、(e-g) 無性個体。(a, b, e) *Dr-rad51B*、(c, d, f) *Dr-rad51C*、(g) ネガティブコントロール (*Dr-rad51* センス鎖)。(a, c) 腹側像、(b, d, e-g) 背側像。スケールバー: 1 mm.

(h-m) 矢状切片における *in situ* hybridization. スケールバー: 100 μ m. (h-j) 卵巣領域 (破線内: 卵巣)、(k-m) 精巣領域 (破線内: 精巣)。(h, k) *Dr-rad51B*、(i, l) *Dr-rad51C*、(j) ネガティブコントロール (*Dr-rad51* センス鎖)、(m) ネガティブコントロール (*Dr-rad51C* センス鎖)。

4.3.3 *Dr-rad51B* および *Dr-rad51C* の発現解析

有性化個体に対する WISH では、*Dr-rad51B* および *Dr-rad51C* の発現は *Dr-rad51* と同様卵巣と精巣で検出された (Figs. 13a-d) が、発現レベルはどちらも *Dr-rad51* に比べて低く、組織切片の *in situ* hybridization では検出されなかった (Figs. 13h-m)。また、RT-PCR ではどちらの遺伝子も無性個体においても発現していることが示されたが (Fig. 11a)、*in situ* hybridization では検出されなかった (Figs. 13e-g)。*Dr-rad51B* の mRNA の発現レベルは X 線照射によって減少したことから (Fig. 11f)、*Dr-rad51B* はネオブラストと X 線非感受性の分化細胞の両方に発現していることが示唆された。一方、*Dr-rad51C* に関しては X 線照射後も有意な減少は見られなかったことから、無性個体における *Dr-rad51C* の発現細胞はほとんどがネオブラストではなく分化細胞であることが示唆された。

4.3.4 生殖細胞形成過程における *DrRad51* の機能解析

生殖細胞形成過程における *Dr-rad51* の機能を調べるため、有性化実験系を利用して RNAi を行い、有性化過程において *Dr-rad51* をノックダウンした。*Dr-rad51 (RNAi)* 個体の卵巣では、卵母細胞は形成されていたが卵原細胞がほとんど見られなくなり、サイズもコントロールに比べて非常に小さくなっていた (Figs. 14a-e)。また、*Dr-rad51 (RNAi)* 個体では精巣の発達に遅れが見られ (Figs. 14f-g, i-j)、精子形成は観察されたものの、成熟した精巣特異的に発現する遺伝子である *DrC_00456* (Ishizuka et al. 2007; Salvetti et al. 2002) の発現が極端に低くなっていた (Fig. 15)。体細胞系列の生殖器官である交接器官と卵黄腺は形態的に正常に形成された (Figs. 14h, k)。*Dr-rad51 (RNAi)* 個体は互いに交接し、15 匹が計 80 個のコクーンを産んだが、孵化したものは無かった。一方、コントロールでは 15 匹が産んだ計 283 個のコクーンのうち 238 個 (84.1%) から 1114 匹の仔が孵化した (Table 6)。形態的に異常なコクーンの割合には有意な差はなかった ($Z = 1.89, 0.05 < P < 0.98$)。RNAi を開始してから約 20 週後に、頭部が縮む、咽頭周辺や尾部が白く膨らむなどの異常が生じた個体が

現れ始め、9ヶ月後までに全ての個体が死亡した (n=13)。

4.3.5 減数分裂における DrRad51 および Rad51 パラログの機能

減数分裂における DrRad51 の機能を明らかにするため、卵母細胞内の染色体の挙動を調べた。 *Dr-rad51 (RNAi)* 個体では、サイゴテン期の卵母細胞における染色体の対合はコントロール個体と同様に生じているように見えた (Figs. 16a, 16c, 17a, 17c)。しかし、コントロールではディプロテン期の全ての細胞で2価染色体が形成されていた (Figs. 16b, 17d) のに対し、 *Dr-rad51 (RNAi)* 個体ではほぼ全ての染色体が1価染色体として存在しており、キアズマ構造もほとんど観察されなかった (Figs. 16d, 16h, 16i, 17b)。

Dr-rad51B (RNAi) 個体および *Dr-rad51C (RNAi)* 個体でもサイゴテン期の染色体の対合はコントロールと同様に観察された (Figs. 16e, g)。 *Dr-rad51B (RNAi)* 個体のディプロテン期の卵母細胞では2価染色体とキアズマも正常に形成されていた (Figs. 16f, j, k)。一方、 *Dr-rad51C (RNAi)* 個体では *Dr-rad51 (RNAi)*ほどではないがキアズマの形成が阻害され、1価染色体の割合が高くなっていた (Figs. 16h-k)。

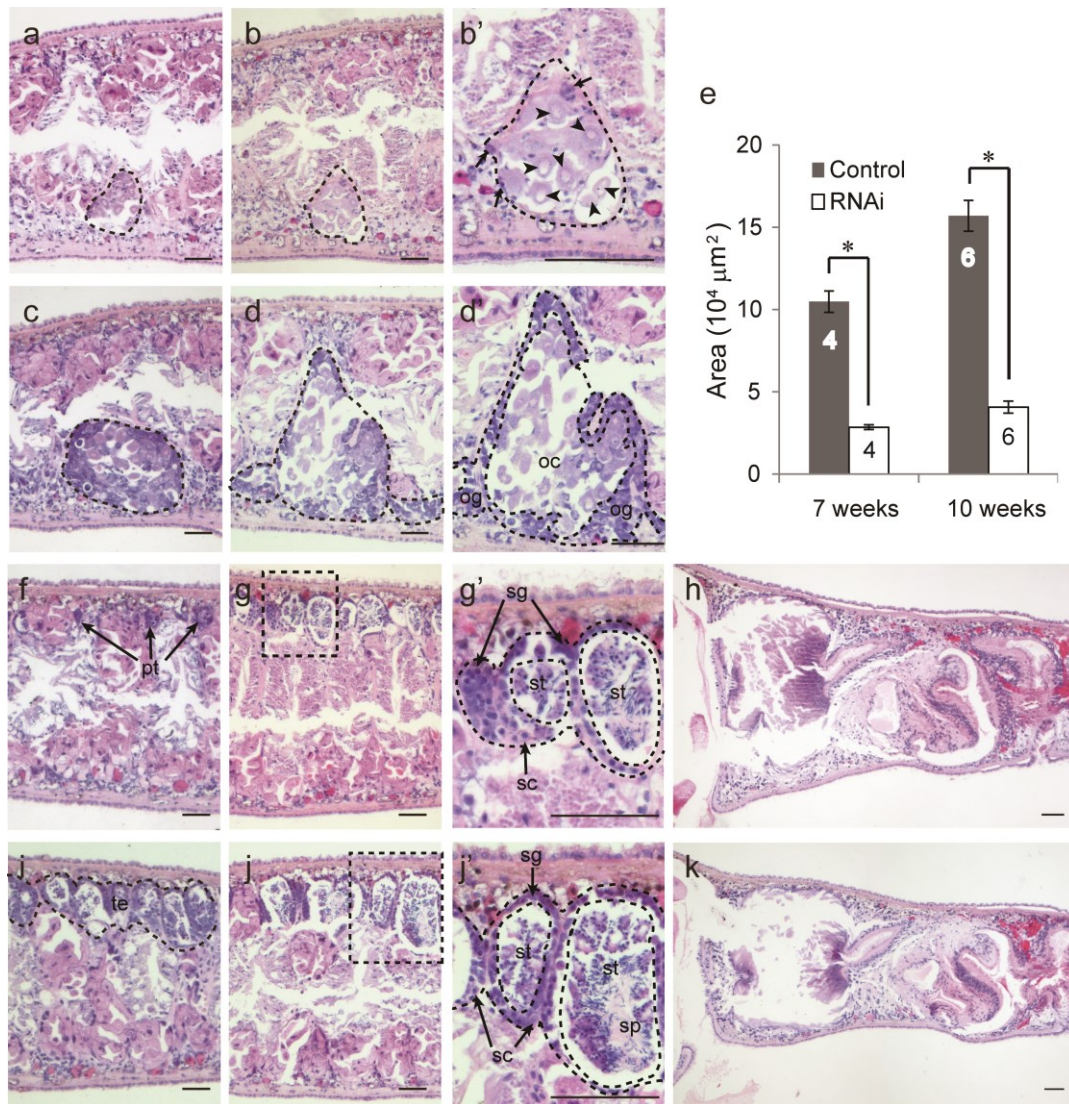


Fig. 14 有性化過程における *Dr-rad51* の機能解析

有性化開始7週後(a, c, f, h, i, k)および10週後(b, d, g, j)の矢状切片のHE染色像。

(a, b, f, g, h) *Dr-rad51 (RNAi)*、(c, d, i, j, k) コントロール。

(a-d) 卵巣領域 (破線枠)。(b')と(d')はそれぞれ(b)および(d)の図内の卵巣の拡大図。矢印, 卵原細胞; 矢頭, 卵母細胞; og, 卵原細胞; oc, 卵母細胞。

(e) 卵巣の大きさの比較。各々の卵巣で最も大きい断面の面積を測定し、平均値±標準誤差を示した。グラフ内の数字はサンプル数。アスタリスクはステューデントのt検定で有意に差があることを示す(* $P < 0.01$)。

(f, g, i, j) 精巣領域。(g')と(j')はそれぞれ(g), (j)の破線枠内の拡大図。pt, 精巣原基; te, 精巣; sg, 精原細胞; sc, 精母細胞; st, 精細胞; sp, 精子。

(h, k) 交接器官。スケールバー: 100 μm 。

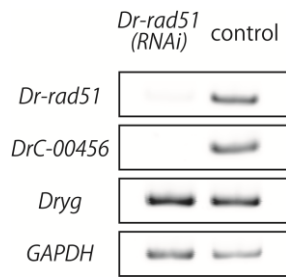


Fig. 15 *Dr-rad51* ノックダウンによる遺伝子発現の変化 (RT-PCR)

DrC-00456、精巣マーカ-; *Dryg*、卵黄腺マーカ-

Table 6 *Dr-rad51* のノックダウンによる産卵への影響

	回収された コク-ンの数	異常なコク-ン の数 (%)	孵化した コク-ンの数(%)	仔の数
control	283	39 (13.8)	238 (84.1)	1114
RNAi	80	18 (22.5)	0 (0)	0

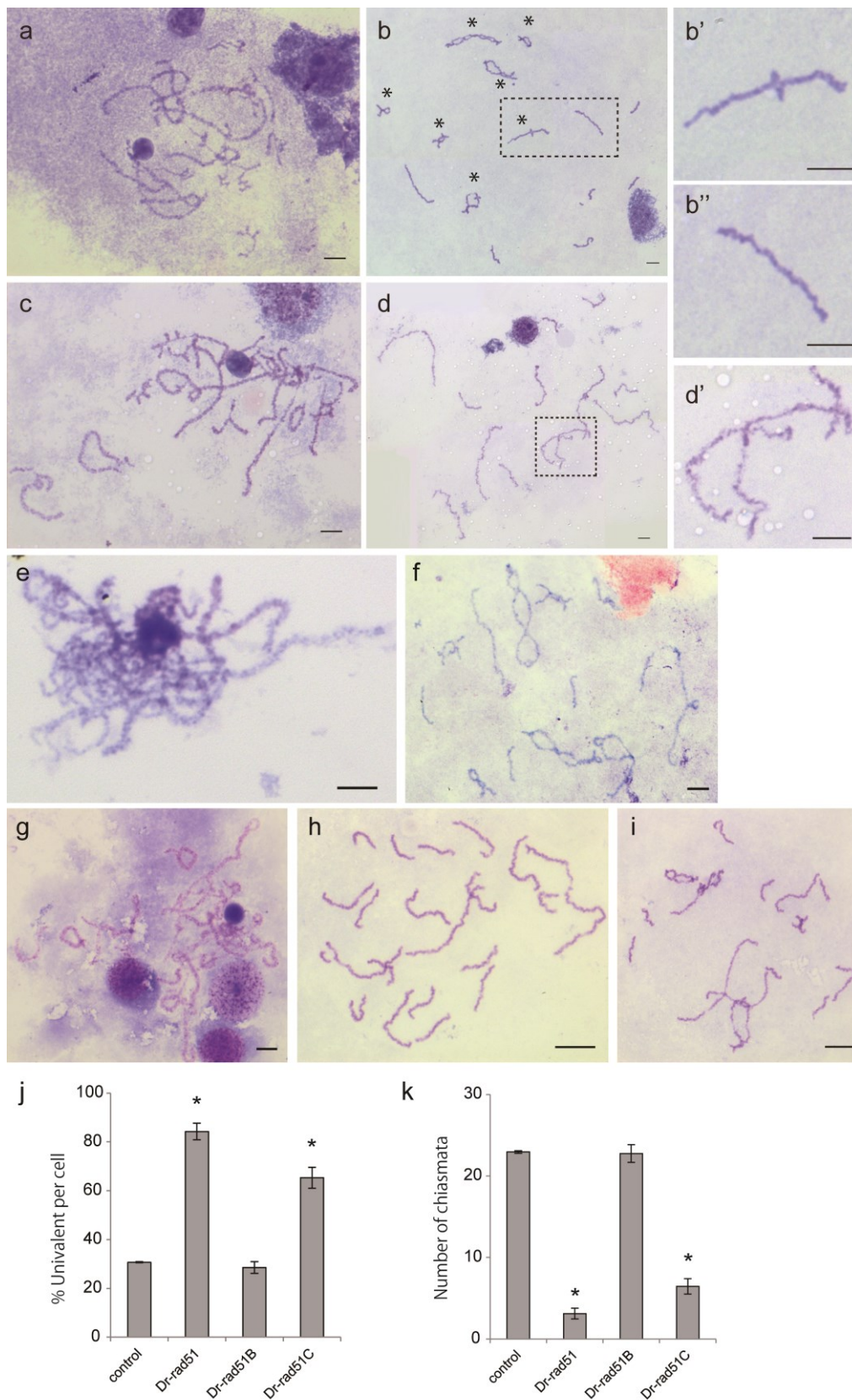


Fig. 16 Rad51 遺伝子のノックダウンによる減数分裂への影響

(a-i) 卵巣領域で観察された減数分裂像（ギムザ染色）。(a, b)コントロール; (c, d) *Dr-rad51* ノックダウン; (e, f) *Dr-rad51B* ノックダウン; (g-i) *Dr-rad51C* ノックダウン。(a, c, e, g)パキテン期、(b, d, f, h, i)ディプロテン期。(b'), (b''), (d')はそれぞれ(b)、(d)の破線枠内の拡大図。スケールバー: 10 μm

(j) 核あたりの一価染色体の割合、(k) 核あたりのキアズマの数の比較。平均値 \pm 標準誤差を示した。サンプル数は以下の通り; コントロール, 18; *Dr-rad51 (RNAi)*, 8; *Dr-rad51B (RNAi)*, 4; *Dr-rad51C (RNAi)*, 18。アスタリスクはステューデントの t 検定でコントロールに対して有意に差があることを示す(* $P < 0.01$)。

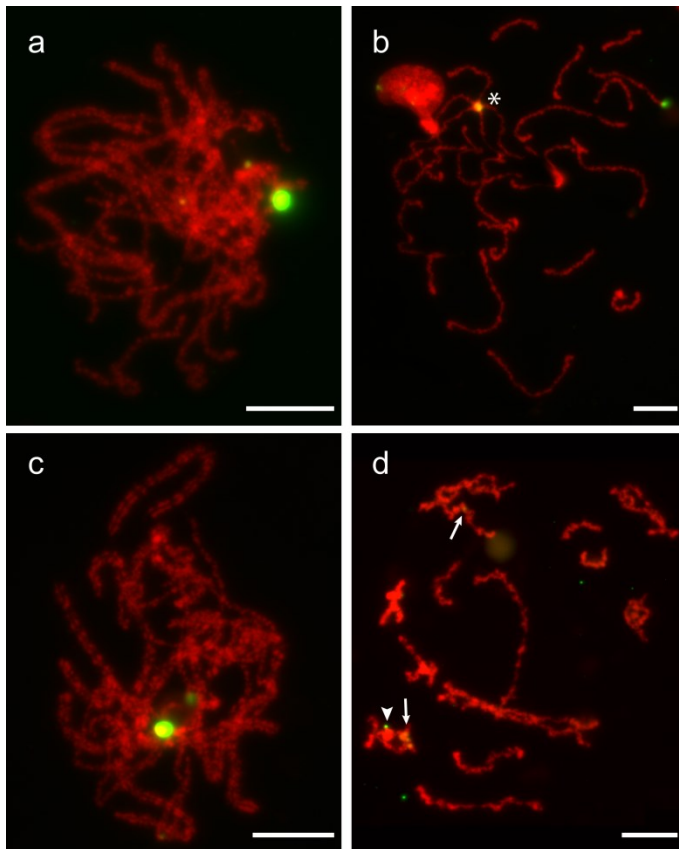


Fig. 17 *Dr-rad51 (RNAi)* 個体における 18S rDNA 遺伝子座のペアリング

(a, c) パキテン期の卵母細胞に見られる染色体像の例。(a) RNAi 個体、(c) コントロール。RNAi 個体でもコントロールと同様 2~4 個の 18S rDNA シグナルが観察された (それぞれ $n=21$, $n=11$)。

(b, d) ディプロテン期の卵母細胞に見られる染色体像の例。(b) RNAi 個体、(d) コントロール。RNAi 個体ではほとんどの染色体が 1 価染色体として存在し、一部が rDNA 座(アスタリスク)で集合していた。一方、コントロールでは常に 2 価染色体と 1 価染色体が存在していた。18S rDNA 座を矢印で、OH 株に特徴的な 18S rDNA 座の転座 (Kobayashi et al. 2008) を矢頭で示した。スケールバー: 10 μm 。

4.4 考察

4.4.1 *D. ryukyuensis* における Rad51 ファミリータンパク質

D. ryukyuensis の有性化過程におけるトランスクリプトームデータからは、3 つの Rad51 ファミリータンパク質が発見され、系統解析からそのうちの 1 つが Rad51 オーソログ、他の 2 つは哺乳類の RAD51B と RAD51C に関連する Rad51 パラログであることが示唆された。これらの 3 つの遺伝子と相同性の高い配列は近縁種である *Schmidtea mediterranea* のトランスクリプトームにも含まれており、これらの Rad51 ファミリー遺伝子がプラナリアの種間で保存されていることが示唆される。センチュウ *C. elegans* における Rad51 ホモログのノックダウンではキアズマ形成に異常が生じるが (Takanami et al. 1998, 2003)、これに一致して *Dr-rad51* の RNAi でも卵母細胞におけるキアズマ形成が著しく阻害された。また、キアズマ形成は *Dr-rad51C* の RNAi によっても阻害されたが、*Dr-rad51B* の RNAi では正常だった。ヒトの Rad51C と Rad51B に関する *in vitro* 解析では Rad51C のみが DNA 鎖交換反応を促進し、Rad51B にはそのような機能がないことが示されており (Lio et al. 2003)、今回の結果はこれと一致する。さらに、ヒトの細胞では Rad51B と Rad51C は安定な複合体を形成し、Rad51 による DNA 鎖交換反応を促進することが知られている (Masson et al. 2001; Sigurdsson et al. 2001)。有性化個体においては *Dr-rad51B* と *Dr-rad51C* も *Dr-rad51* と同様の発現パターンを示したことから、これら 2 つのパラログが *D. ryukyuensis* においても Rad51 と協調的に機能している可能性がある。

4.4.2 体細胞系列における *DrRad51* の機能

無性個体における *Dr-rad51* の発現細胞は、その X 線照射に対する感受性からほとんどがネオブラストであると考えられた。近縁種 *S. mediterranea* のトランスクリプトーム解析でも *rad51* ホモログがネオブラスト特異的に発現していることが示されており (Önal et al. 2012;

Solana et al. 2012)、今回の結果と一致する。

脊椎動物の培養細胞を用いた研究では、Rad51 が細胞分裂時に偶発的に生じる染色体切断の修復に必要であることが示唆されており (Sonoda et al. 1998)、Rad51 ノックアウトマウスは胚性致死である (Lim and Hasty 1996; Tsuzuki et al. 1996)。これに対し、*Dr-rad51* をノックダウンした *D. ryukyuensis* は体組織の再生能力に関しては特に異常はなく、*D. ryukyuensis* の細胞増殖において Rad51 タンパク質が必ずしも必要でないことが示唆された。*D. ryukyuensis* の 2 つの Rad51 パラログと DrRad51 との相同性はそれほど高くはないが、Rad51 ファミリータンパク質の機能にある程度リダンダンシーがあるか、あるいは別の相補的な DNA 修復機構が働いている可能性がある。例えば、ショウジョウバエでは個体の状態に応じて、相同組換え、一本鎖アニーリング、非相同末端再結合の 3 つの修復機構が働いており (Preston et al. 2006a, b; Wang and Agrawal 2012)、Rad51 null 変異体も成虫まで生存可能である (Staeva-Vieira et al. 2003)。ただ、有性化した *D. ryukyuensis* に対する長期にわたる *Dr-rad51* の RNAi 処理では体細胞系列に異常が生じたことから、DrRad51 のノックダウンによってネオプラストの DNA に徐々にダメージが蓄積し、細胞の増殖と維持に深刻な影響を及ぼした可能性は考えられる。プラナリアにおける DNA 修復機構は未だよく分かっておらず、これらの可能性を検証するためにはさらなる研究が必要である。

4.4.3 生殖系列における DrRad51 の機能

有性化過程における *Dr-rad51* のノックダウンでは生殖器官の形成に影響が見られ、*Dr-rad51* が生殖細胞の増殖と維持に必要であることが示唆された。特に卵巣の細胞が減少したのは、DNA に損傷の蓄積した卵原細胞が除去されたためと推測される。また、減数分裂時の組換えの異常は、パキテンチェックポイントまたは減数分裂組換えチェックポイントと呼ばれるチェックポイントを活性化し、パキテン期における細胞周期の停止とアポトーシスを引き起こす (Roeder and Bailis 2000)。したがって、そのようなチェックポイントが

働いて RNAi により相同組換えが阻害された卵母細胞が除去された可能性も考えられる。

精巢の形成は *Dr-rad51* のノックダウンによって阻害されたが、RNAi 個体で形成された精巢内には精原細胞、精母細胞、および精細胞がコントロールと同様に観察された。精巢の発達の遅れに関して *DrRad51* の欠失が直接の原因となったかは定かでなく、有性化過程で精巢に先立って発達するはずの卵巢の形成における異常が原因となった可能性もある。しかしながら、いずれにせよ雄性生殖系列と雌性生殖系列とでは *Dr-rad51* のノックダウンに対する感受性に差があるようである。第 3 章で述べたように、精母細胞と卵母細胞では倍数性が異なるため、DNA 損傷の蓄積に対する感受性にも差があるのかもしれない。また、相同組換えの頻度に性差のある生物が存在する。例えばヒトでは卵母細胞における組換えの頻度の方が精母細胞よりも高く、その違いと SC の長さとの間に正の相関があることが報告されている (Tease and Hultén 2004)。実際、*D.ryukyuensis* のパキテン期の卵母細胞で見られる染色体の長さは精母細胞で観察されるものより大幅に長く、したがって、組換えの頻度における性差が *Dr-rad51* の RNAi に対する感受性に影響した可能性も考えられる。

4.4.4 減数分裂期相同組換えの必要性

減数分裂期の相同組換えは、酵母や植物、哺乳類などでは SC 形成に必要であるが、センチュウやショウジョウバエでは対合に必ずしも必要でない (Dernburg et al. 1998; McKim et al. 1998)。センチュウやショウジョウバエではその代わりに DSB 非依存的な染色体整列の機構が存在するが、そのような機構の存在は、多くの真核生物で相同染色体間の鎖交換反応を担う Dmc1 オーツログ (MacQueen et al. 2002; Neale and Keeney 2006; Kurzbauer et al. 2012) をこれらの生物が持たないことと関連している可能性がある。

Dr-rad51 ノックダウン個体ではキアズマ形成が見られなくなったが、サイゴテン期後期からパキテン期初期にかけての相同染色体の対合は正常に生じているようであった。また、有性化した *Dr-rad51* (RNAi) 個体はコクーンを産んだが、それらは 1 つも孵化しなかったこ

とから、体細胞系の生殖器官（交接器官および卵黄腺）は正常に機能しているが機能的な卵が形成されていないと推測される。これらの結果は、*D. ryukyuensis* において相同組換えが相同染色体の対合には必要でないが、交差の形成と相同染色体の正確な分離には重要であることを示唆する。さらに、今回 *D. ryukyuensis* のトランスクリプトームからは Dmcl1 ホモログは見つからなかった。したがって、*D. ryukyuensis* でもセンチウやショウジョウバエと同様、相同組換えに依らないペアリングの機構が存在する可能性が考えられる。そのような機構によって、3 倍体の卵母細胞内でも 3 つの相同染色体のうちの 2 つのみが優先的に対合して 2 価染色体を形成することが可能になっているのかもしれない。

4.5 結言

Dr-rad51 のノックダウンにより、*D. ryukyuensis* には相同組換えに依存しない相同染色体のペアリングと対合のメカニズムが存在する可能性が示唆された。今後、減数第一分裂前期の染色体挙動に関わる他の分子についても調べることによって、3 倍体 *D. ryukyuensis* における正倍数体卵形成機構解明の手がかりが得られると思われる。

第 5 章 結論

本研究では、3 倍体 *D. ryukyuensis* において雄性生殖系列と雌性生殖系列で大きく異なる機構によって機能的な配偶子が形成され、有性生殖が可能になっていることが示唆された。特に雄性生殖系列における減数分裂前のランダムな染色体削減と、雌性生殖系列における 3 倍体卵母細胞の減数分裂および 1 倍体卵と 2 倍体卵の形成は、あまり類例を見ないユニークな機構である。プラナリアでは生殖系列細胞の細胞系譜がまだ明らかになっておらず、雄性生殖系列での染色体削減が起こる時期やメカニズムについて解明するためには、生殖系列幹細胞から精母細胞が分化する過程をより詳細に調べる必要がある。また、1 倍体卵と 2 倍体卵の形成機構の解明には、本研究で染色体マーカーとして用いた *ms1* と 18S rDNA の他にもより多くのマーカーを用いて染色体の分離のされ方を明らかにすること、および減数第一分裂中期以降の卵母細胞についても染色体挙動を調べることが必要である。さらに紡錘体の形状とクロマチンの修飾状態などを併せて調べることによって、染色体削減の分子機構解明の手がかりが得られるかもしれない。

卵母細胞における減数第一分裂時の染色体挙動については、有性化過程における *rad51* 遺伝子の機能解析により、相同組換えに依存しない機構で相同染色体間のペアリングが起こっていることが示唆された。そのような機構が存在することで、卵母細胞内に 3 つの相同染色体が存在する場合でも、そのうちの 2 つのみで対合が起こる頻度が高くなっている可能性が考えられる。ショウジョウバエやセンチュウでは相同組換えに依存しないペアリングの分子機構が明らかになってきているが、プラナリアでもそのような機構があるとなれば進化的に非常に興味深いと思われる。減数第一分裂前期の相同染色体の対合に関わることが知られる遺伝子は他にも多数あり、これらの解析を進めることによって分子機構の解明に繋がることが期待される。

本研究における解析には、主に実験的に有性化したプラナリアを用いたが、研究室で生まれた3倍体の先天的有性個体でも有性化3倍体個体と同様の減数分裂像が得られており、自然界で見られる有性の3倍体*D. ryukyuensis*においても同様の機構が働いていると推測される。*D. ryukyuensis*は特殊な配偶子形成機構をもつことによって、倍数体としての強みを維持したまま“進化の行き止まり”を回避することを可能とし、種としての適応度を高めているのかもしれない。

参考文献

- Alves MJ, Coelho MM, Collares-Pereira MJ (1998) Diversity in the reproductive modes of females of the *Rutilus alburnoides* complex (Teleostei, Cyprinidae): A way to avoid the genetic constraints of uniparentalism. *Mol Biol Evol* 15: 1233-1242.
- Arai K, Mukaino M (1998) Electrophoretic analysis of the diploid progenies from triploid \times diploid crosses in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Pisces: Cobitidae). *J Exp Zool* 280: 368-374.
- Baguña J, Saló E, Auladell C (1989) Regeneration and pattern-formation in planarians III. Evidence that neoblasts are totipotent stem-cells and the source of blastema cells. *Development* 107: 77-86.
- Benazzi M (1966) Considerations on the neoblasts of planarians on the basis of certain karyological evidence. *Chromosoma* 19: 14-27.
- Christiansen DG (2009) Gamete types, sex determination and stable equilibria of all-hybrid populations of diploid and triploid edible frogs (*Pelophylax esculentus*). *BMC Evol Biol* 9: 135.
- Cimino MC (1972) Egg-production, polyploidization and evolution in a diploid all-female fish of the genus *Poeciliopsis*. *Evolution* 26: 294-306.
- Comai L (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature reviews. Genetics* 6: 836-846.
- Cunado N, Terrones J, Sanchez L, Martinez P, Santos JL (2002) Sex-dependent synaptic behaviour in triploid turbot, *Scophthalmus maximus* (Pisces, Scophthalmidae). *Heredity* 89: 460-464.
- Dernburg AF, McDonald K, Moulder G, Barstead R, Dresser M, Villeneuve AM (1998) Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94: 387-398.
- D'Souza TG, Storhas M, Schulenburg H, Beukeboom LW, Michiels NK (2004) Occasional sex in an 'asexual' polyploid hermaphrodite. *Proc Biol Sci* 271: 1001-1007.

- Günther R, Uzzell T, Berger L (1979) Inheritance patterns in triploid *Rana "esculenta"* (Amphibia, Salientia). *Mitt Zool Mus Berlin* 55: 35-57.
- Hase S, Kobayashi K, Koyanagi R, Hoshi M, Matsumoto M (2003) Transcriptional pattern of a novel gene, expressed specifically after the point-of-no-return during sexualization, in planaria. *Dev Genes Evol* 212: 585-592.
- Hoshi M, Kobayashi K, Arioka S, Hase S, Matsumoto M (2003) Switch from Asexual to Sexual Reproduction in the Planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Integr Comp Biol* 43: 242-246.
- Ishizuka H, Maezawa T, Kawauchi J, Nodono H, Hirao Y, Nishimura O, Nakagawa H, Sekii K, Tasaka K, Tarui H, Agata K, Hoshi M, Kobayashi K, Sakakibara Y, Matsumoto M (2007) The *Dugesia ryukyuensis* database as a molecular resource for studying switching of the reproductive system. *Zool Sci* 24: 31-37.
- Jiao Y, Wickett NJ, Ayyampalayam S et al. (2011) Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* 473: 97-100.
- Jordan P (2006) Initiation of homologous chromosome pairing during meiosis. *Biochemical Society Transactions* 34: 545-549.
- Keeney S (2001) Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol* 52: 1-53.
- Kobayashi K, Koyanagi R, Matsumoto M, Cabrera JP, Hoshi M (1999) Switching from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyuensis*: Bioassay system and basic description of sexualizing process. *Zoolog Sci* 16: 291-298.
- Kobayashi K, Hoshi M (2002) Switching from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyuensis*: change of the fissiparous capacity along with the sexualizing process. *Zoolog Sci* 19: 661-666.
- Kobayashi K, Ishizu H, Arioka S, Cabrera JP, Hoshi M, Matsumoto M (2008) Production of diploid and triploid offspring by inbreeding of the triploid planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Chromosoma* 117: 289-296.

- Kuraku S, Meyer A, Kuratani S (2009) Timing of genome duplications relative to the origin of the vertebrates: did cyclostomes diverge before or after? *Mol Biol Evol* 26: 47-59.
- Kurzbauer MT, Uanschou C, Chen D, Schlogelhofer P (2012) The recombinases DMC1 and RAD51 are functionally and spatially separated during meiosis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 2058-2070.
- Lázaro EM, Sluys R, Pala M, Stocchino GA, Baguna J, Riutort M (2009) Molecular barcoding and phylogeography of sexual and asexual freshwater planarians of the genus *Dugesia* in the Western Mediterranean (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesiiidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 835-845.
- Lim DS, Hasty P (1996) A mutation in mouse *rad51* results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in *p53*. *Mol Cell Biol* 16: 7133-7143.
- Lio YC, Mazin AV, Kowalczykowski SC, Chen DJ (2003) Complex formation by the human Rad51B and Rad51C DNA repair proteins and their activities in vitro. *J Biol Chem* 278: 2469-2478.
- MacQueen AJ, Colaiacovo MP, McDonald K, Villeneuve AM (2002) Synapsis-dependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*. *Genes Dev* 16: 2428-2442.
- Masson JY, Tarsounas MC, Stasiak AZ, Stasiak A, Shah R, McIlwraith MJ, Benson FE, West SC (2001) Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev* 15: 3296-3307.
- McKim KS, Green-Marroquin BL, Sekelsky JJ, Chin G, Steinberg C, Khodosh R, Hawley RS (1998) Meiotic synapsis in the absence of recombination. *Science* 279: 876-878.
- Morishima K, Yoshikawa H, Arai K (2008) Meiotic hybridogenesis in triploid *Misgurnus* loach derived from a clonal lineage. *Heredity* 100: 581-586.
- Neale MJ, Keeney S (2006) Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nature* 442: 153-158.

- Nodono H, Ishino Y, Hoshi M, Matsumoto M (2012) Stem cells from innate sexual but not acquired sexual planarians have the capability to form a sexual individual. *Mol Reprod Dev* 79: 757-766.
- Önal P, Grun D, Adamidi C, Rybak A, Solana J, Mastrobuoni G, Wang Y, Rahn HP, Chen W, Kempa S, Ziebold U, Rajewsky N (2012) Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells. *EMBO J* 31: 2755-2769.
- Orii H, Sakurai T, Watanabe K (2005) Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev Genes Evol* 215: 143-157.
- Otto SP, Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics* 34: 401-437.
- Preston CR, Flores CC, Engels WR (2006a) Differential usage of alternative pathways of double-strand break repair in *Drosophila*. *Genetics* 172: 1055-1068.
- Preston CR, Flores C, Engels WR (2006b) Age-dependent usage of double-strand-break repair pathways. *Curr Biol* 16: 2009-2015.
- Rasmussen SW (1977) Chromosome pairing in triploid females of *Bombyx mori* analyzed by three dimensional reconstructions of synaptonemal complexes. *Carlsberg Res Commun* 42: 163-197.
- Rinaldo C, Ederle S, Rocco V, La Volpe A (1998) The *Caenorhabditis elegans* RAD51 homolog is transcribed into two alternative mRNAs potentially encoding proteins of different sizes. *Mol Gen Genet* 260: 289-294.
- Roeder GS, Bailis JM (2000) The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 16: 395-403.
- Salvetti A, Lena A, Rossi L, Deri P, Cecchetti A, Batistoni R, Gremigni V (2002) Characterization of DeY1, a novel Y-box gene specifically expressed in differentiating male germ cells of planarians. *Gene Expr Patterns* 2: 195-200.
- Shinohara A, Ogawa H, Ogawa T (1992) Rad51 Protein involved in repair and recombination in *Saccharomyces Cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69: 457-470.

- Shinohara A, Ogawa H, Matsuda Y, Ushio N, Ikeo K, Ogawa T (1993) Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nat Genet* 4: 239-243.
- Shinohara A, Shinohara M (2004) Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination. *Cytogenet Genome Res* 107: 201-207.
- Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins D (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Systems Biol* 7: 539.
- Sigurdsson S, Van Komen S, Bussen W, Schild D, Albala JS, Sung P (2001) Mediator function of the human Rad51B-Rad51C complex in Rad51/RPA-catalyzed DNA strand exchange. *Genes Dev* 15: 3308-3318.
- Solana J, Kao D, Mihaylova Y, Jaber-Hijazi F, Malla S, Wilson R, Aboobaker A (2012) Defining the molecular profile of planarian pluripotent stem cells using a combinatorial RNA-seq, RNA interference and irradiation approach. *Genome Biol* 13: R19.
- Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM, Bezzubova O, Shinohara A, Ogawa H, Takata M, Yamaguchi-Iwai Y, Takeda S (1998) Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J* 17: 598-608.
- Staeva-Vieira E, Yoo S, Lehmann R (2003) An essential role of DmRad51/SpnA in DNA repair and meiotic checkpoint control. *EMBO J* 22: 5863-5874.
- Sung P, Krejci L, Van Komen S, Sehorn MG (2003) Rad51 recombinase and recombination mediators. *J Biol Chem* 278: 42729-42732.
- Takanami T, Sato S, Ishihara T, Katsura I, Takahashi H, Higashitani A (1998) Characterization of a *Caenorhabditis elegans* recA-like gene *Ce-rdh-1* involved in meiotic recombination. *DNA Res* 5: 373-377.
- Takanami T, Mori A, Takahashi H, Horiuchi S, Higashitani A (2003) *Caenorhabditis elegans* *Ce-rdh-1/rad-51* functions after double-strand break formation of meiotic recombination. *Chromosome Res* 11: 125-135.

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
- Tamura S, Oki I, Kawakatsu M (1995) A review of chromosomal variation in *Dugesia japonica* and *D. ryukyuensis* in the Far East. *Hydrobiologia* 305: 79-84.
- Tease C, Hultén MA (2004) Inter-sex variation in synaptonemal complex lengths largely determine the different recombination rates in male and female germ cells. *Cytogenet Genome Res* 107: 208-215.
- Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, Sekiguchi M, Matsushiro A, Yoshimura Y, Morita T (1996) Targeted disruption of the *Rad51* gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6236-6240.
- Tunner HG, Heppich S (1981) Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta*. *Die Naturwissenschaften* 68: 207-208.
- Tunner HG, Heppich-Tunners S (1991) Genome exclusion and two strategies of chromosome duplication in oogenesis of a hybrid frog. *Die Naturwissenschaften* 78: 32-34.
- Van de Peer Y, Maere S, Meyer A (2009) The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nature reviews Genetics* 10: 725-732.
- Vincent JE, Jones GH (1993) Meiosis in autopolyploid *Crepis capillaris*. I. Triploids and trisomics; implications for models of chromosome pairing. *Chromosoma* 102: 195-206.
- Wang AD, Agrawal AF (2012) DNA repair pathway choice is influenced by the health of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 192: 361-370.
- Whelan S and Goldman N (2001) A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol Biol Evol* 18: 691-699.
- Wolff E (1948) Sur la migration des cellules de regeneration chez les planaires. *Rev Suisse Zool* 55: 218-227.

Zhang QQ, Arai K, Yamashita M (1998) Cytogenetic mechanisms for triploid and haploid egg formation in the triploid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *J Exp Zool* 281: 608-619.

Zickler D, Kleckner N (1998) The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* 32: 619-697.

Zickler D, Kleckner N (1999) Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* 33: 603-754.

デービッド O. モーガン. 中山敬一・中山啓子監訳 (2008) カラー図説 細胞周期 細胞増殖の制御メカニズム. *メディカル・サイエンス・インターナショナル*. pp176-193.

公刊論文および学会発表の目録

本論文に関する原著論文

第2章・第3章

Chinone A, Nodono H, Matsumoto M (2014) Triploid planarian reproduces truly bisexually with euploid gametes produced through a different meiotic system between sex. *Chromosoma*, in press. DOI: 10.1007/s00412-013-0449-2

第4章

Chinone A, Matsumoto M (2014) DrRad51 is required for chiasmata formation in meiosis in planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Mol Reprod Dev*, in press.

その他の論文

Nakagawa H, Ishizu H, Chinone A, Kobayashi K, Matsumoto M (2012) The *Dr-nanos* gene is essential for germ cell specification in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Int J Dev Biol* 56: 165-171.

国際会議発表

Chinone A*, Ishizu H, Kobayashi K, Matsumoto M. “Analysis of reproductive mode of the triploid planarian.” Germ Cells Satellite Symposium to SDB and Japanese SDB Joint Meeting, Albuquerque (USA). 2010年8月5日ポスター発表.

Chinone A*, Ishizu H, Kobayashi K, Matsumoto M. “Analysis of reproductive mode of the triploid planarian.” Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting Jointly with the Japanese Society of Developmental Biologists, Albuquerque (USA). 2010年8月8日ポスター発表.

Chinone A*, Matsumoto M. “Sexual reproduction of triploid planarian.” Planarian Regeneration

Research Meeting in Kyoto, Kyoto (Japan). 2011年11月20日ポスター発表.

Chinone A*, Matsumoto M. “Meiotic chromosome behavior in the triploid planarian: Function of rad51 homolog in gametogenesis.” 17th International Congress of Developmental Biology, Cancun (Mexico). 2013年6月16日ポスター発表.

国内学会発表

口頭発表

石津大嗣, 茅根文子*, 小林一也, 松本緑「3倍体プラナリアの生殖様式の解明」日本動物学会第79回大会, 3A1345, 福岡, 2008年9月7日.

茅根文子*「3倍体リュウキュウナミウズムシの生殖戦略」日本発生生物学会夏季シンポジウム2012, 下田, 2012年9月4日.

茅根文子*, 松本緑「*rad51* 遺伝子を用いた3倍体リュウキュウナミウズムシの配偶子形成機構の解析」日本動物学会第83回大会, 1M1000, 大阪, 2012年9月13日.

茅根文子*, 松本緑 “Meiotic chromosome behavior in the triploid planarian (3倍体プラナリアの減数分裂における染色体挙動)” 第46回日本発生生物学会大会, SW1-02, 松江, 2013年5月28日.

茅根文子*「3倍体プラナリアの生殖戦略」第一回生態進化発生コロキウム, 東京, 2013年12月27日.

ポスター発表

茅根文子*, 石津大嗣, 小林一也, 松本緑「3倍体リュウキュウナミウズムシの生殖戦略」第43回日本発生生物学会大会, P-137, 京都, 2010年6月21日.

茅根文子*, 松本緑「3倍体プラナリアの有性生殖」日本動物学会第82回大会, 1P224, 旭川, 2011年9月21日.

茅根文子*, 松本緑 “Meiotic chromosome behavior in the triploid planarian” 第46回日本発生生物学会大会, P-009, 松江, 2013年5月30日.

茅根文子, 松本緑* 「3倍体プラナリアの有性生殖」新学術領域研究「動植物に共通するアロ認証機構の解明」第8回領域会議, P-25, 名古屋, 2014年1月9日.

謝辞

本論文は、著者が慶應義塾大学大学院理工学研究科後期博士課程在学中に行った研究成果をまとめたものです。本研究を遂行するにあたり、終始温かいご指導とご鞭撻をいただいた同大学理工学部准教授 松本緑博士に心より感謝の意を表します。また、学位請求論文審査において、貴重なご指導とご助言をいただいた同学部准教授 清水史郎博士、同准教授 土居信英博士、同専任講師 堀田耕司博士に深く感謝申し上げます。

D. ryukyuensis OH 株は弘前大学農学生命科学部生物学科 石田幸子博士よりご供与いただきました。沖縄本島で採集された *D. ryukyuensis* は独立行政法人海洋研究開発機構 伊勢戸徹博士より頂きました。*B. brunnea* の採集では、山形大学理学部生物学科助教 中内祐二博士ならびに中内研究室の皆様にご協力いただきました。北海道教育大学准教授 村上貴弘博士には蛍光 *in situ* hybridization の手法についてご教授いただきました。東京工業大学大学院生命理工学研究科教授 岩崎博史博士、同助教 筒井康博博士には、Rad51 の解析においてご指導、ご支援をいただきました。また、階層生物学研究ラボ 団まりな博士、Brown University, Department of Molecular Biology, Cell Biology and Biochemistry 教授 Gary Wessel 博士には論文執筆に際して貴重なご意見を頂きました。本研究を進めるにあたり、お世話になった沢山の方々に心より御礼申し上げます。

東京工業大学地球生命研究所特任教授 星元紀博士には、本研究についてご助言をいただき、さらに生物学の奥深さ、研究に対する姿勢を教えていただきました。弘前大学農学生命科学部生物学科准教授 小林一也博士には、プラナリア研究についてご指導、ご討論いただきました。また、研究生活を共に過ごし、多くの刺激をいただいた松本研究室の皆様に、心より感謝申し上げます。

なお、本研究の一部は日本学術振興会 特別研究員奨励費 (No. 25-5247)、および慶應義塾大学先端科学技術研究センター 後期博士課程研究助成を受けて行いました。

最後に、このような機会を与えて下さり、常に支え見守ってくれた家族に感謝致します。

2014年2月