

テロメア維持機構の進化 –無性・有性生殖様式との関係に着眼して–

The evolution of telomere maintenance in light of asexual and sexual reproductive modes

慶應義塾大学	野殿 英恵
派遣期間	2013年10月3日～2014年4月3日
研究機関	Department of Zoology, University of Oxford Tinbergen Building, South Parks Road, Oxford, OX1 3PS, UK
研究指導者	Prof. Aziz A. Aboobaker

In the previous study, the host lab studied the telomere biology of planarian *Schmidtea mediterranea*. They showed that somatic telomere maintenance is different in asexual and sexual animals. Asexual animals maintain telomere length somatically during regeneration, whereas sexual animals only achieve telomere elongation through sexual reproduction. They demonstrated that this difference was reflected in the expression and alternate splicing of the protein subunit of the telomerase enzyme *tert*. Asexual adult planarian stem cells appear to maintain telomere length over evolutionary timescales without passage through a germ-line stage. In this study, we examined telomere biology of *Dugesia ryukyuensis*. This species can switch reproductive mode between sexual and asexual. When sexualization was induced to asexual animals, their telomere length was same as asexual animals. After cycles of amputation and regeneration, sexual worms did not showed dramatic telomere shortening, which is apparently different from sexual strains of *S. mediterranea*. These results indicates that telomere maintenance capacity is not correlate with reproductive mode in *D. ryukyuensis*. Corresponding to the capacity of telomere maintenance in *D. ryukyuensis*, *Dryu-tert* expression during regeneration is higher than intact state in all reproductive modes. *Dryu-tert* has one splicing site and active isoform is always highly expressed than negative form.

研究目的

生殖とは次世代を創ることを指し、その様式はゲノムの混合（広義の「性」）の有無により無性生殖と有性生殖に大別できる。各生殖様式には、生殖コストや遺伝的多様性の創出といった点において相異なる利点・欠点があるが、自然界では多くの生物が環境条件等に応じて両生殖様式を転換し、相異なる利点を享受している。有性生殖を行う生物では個体の死が不可避である。体細胞は寿命を持ち、生殖細胞を次世代へ繋ぐ。一方、無性生殖を行う生物に個体の死は無い。このように性と寿命は深く関わっている。原核生物から真核生物への進化の際、生物は子孫に多様性を生むため有性生殖を獲得したが、ゲノムの巨大化に伴い染色体は環状から棒状に変化した。これによりテロメア複製問題が生まれた。すなわち

体細胞では細胞分裂時にテロメアの短縮が起こるため、細胞分裂回数の上限＝寿命ができた。一般に有性生殖と引き換えに生物は寿命をもったと考えられているが、寿命がうまれた理由にまだ定説は無い。果たして生殖様式と寿命は相関するのか？有性生殖に老化は不可避だったのか？この問題に対し、無性個体は無限の再生能力をもち不死であり、ある有性種は有限の寿命を持ち、さらには一個体において無性生殖と有性生殖を転換可能な種も存在するという、種によって多様な生殖様式と寿命をもつプラナリアを用いて挑む。

派遣先研究室は *Schmidtea mediterranea* において、無性系統と有性系統の間にテロメア維持能の差異を見出し、その差を生む分子機構を明らかにした¹。無性系統では無性生殖（切断・再生）を経ると、徐々

に短くなっていたテロメアが元の長さに戻るのに対し、有性系統では年齢とともにテロメア長は短くなり、また切断と再生を経てもテロメア長はリセットされず、有性生殖（交雑・産卵）でのみリセットされた。この差異はテロメア配列伸長酵素であるテロメラーゼの構成サブユニット *tert* (*telomerase reverse transcriptase*) 活性型アイソフォームの発現量と関連し、無性系統の再生時にのみ活性型の発現比が高まることが見出された。

上記 *S. mediterranea* の生殖様式は染色体転座の有無により先天的に決定しているのに対し、筆者の扱う *Dugesia ryukyuensis* においては生殖様式に關する染色体転座は存在しない。さらに *D. ryukyuensis* は同一個体が生殖様式を転換できることから、生殖様式とテロメア維持能および機構の關係について新たな知見が期待できると考えた。

D. ryukyuensis では、同種内に先天的無性系統、先天的有性系統、そして生殖様式を季節転換する系統が共存する。有性系統は成長とともに雌雄同体性の生殖器官を形成し、他個体との交雑・産卵を経て次世代を形成するが、無性系統は生殖器官を形成すること無く、自切・再生によりクローン増殖する。さらに本種を用いる最大の利点として人為的有性化実験系² (Fig. 1) が確立していることが挙げられる。

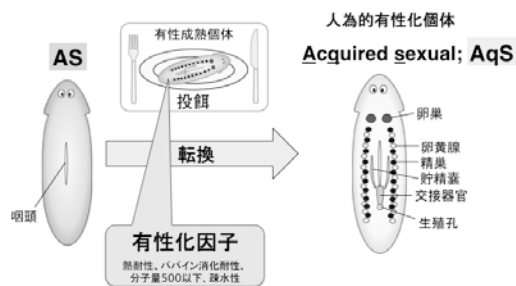


Fig. 1 Experimental induction of sexualization

無性系統に対して有性成熟個体のミンチを毎日投餌すると、生殖器官が順序だてて形成されていき有性生殖可能な個体となる。このように先天的には無性生殖のみを行う無性系統が人為的な刺激により有性生殖するようになった個体を人為的有性化個体 (Acquired Sexual) と命名した。いったん有性化した個体は、投餌をやめても無性状態に戻ることはない。これは餌として与えていた有性生殖個体内に含まれる「有性化因子」を自身の体内で産生するようになるためである。

本研究では、年齢や再生過程におけるテロメア長の変化や *tert* の発現変動について、*S. mediterranea*

と *D. ryukyuensis* を並行解析して比較し、1 個体が生殖様式を転換する際にテロメア維持能 (寿命) も変えるのか否か? すなわち「生殖様式 (性)」と「寿命」は不可分なのか考察する。

研究経過

D. ryukyuensis のテロメア長については、無性系統では年齢や再生過程でのテロメアの短縮は一切見られず、先天的有性系統では年齢に応じてテロメア長が短縮し、人為的有性化個体ではテロメア長の短縮は見られないことが、テロメア配列を含む terminal restriction fragment (TRF) のサザンハイブリダイゼーション解析により示された³。よって「有性生殖」と「テロメア短縮」は定説に反して必ずしも関連しない可能性が示唆された。そこで両種を同時に同じ手法で解析し、種間での比較を行うことにした。また *D. ryukyuensis* については、*tert* の同定や発現解析など分子的な解析は行われていなかったため、本研究において取り組んだ。

1. 生殖様式とテロメア長の關係

生殖様式や生殖からの経過時間 (齡) とテロメア長の關係を調べるため、数か月の間自切をしていない無性個体、年齢の異なる先天的有性個体、人為的有性化個体について、テロメア長を測定した。テロメア長の測定には定量的 PCR による手法^{4,5}を用いた。またそれら各生殖様式個体について切断・再生を短期間に繰り返した場合についても解析し、テロメア維持能の差異を検討した。その結果、*S. mediterranea* においては有性系統と無性系統の間にはテロメア長に明確な差があり、無性系統の方が長かった。一方、*D. ryukyuensis* では、先天的無性、有性、人為的有性化の3系統間に明確な差は見られず、いずれも *S. mediterranea* の無性系統と同程度の長さのテロメアを有していた。さらに切断・再生を繰り返した場合、*D. ryukyuensis* では *S. mediterranea* の有性系統で見られるような劇的なテロメア短縮は見られず、有性生殖個体においても再生時の細胞分裂においてテロメア長を回復する能力があることが示唆された。

2. TRAP 法によるテロメア伸長活性測定

テロメア長維持能に差が見られたため、テロメア伸長活性を Telomere Repeat Amplification Protocol

(TRAP) 法により比較することを試みた。本法では虫体ホモジネートに基質プライマーを添加し、インキュベートすることでテロメアリピート配列の伸長活性を検出する。その結果、HeLa 細胞を用いたポジティブコントロール実験は成功したものの、プラナリア試料を用いた場合に有意な活性を検出できなかった。先行研究においてプラナリア試料でも活性が見られたことから、プラナリア個体のホモジネート調製に問題があると思われる。本研究では *D. ryukyuensis* でのテロメア伸長活性測定および *S. mediterranea* との比較はできなかった。

3. *D. ryukyuensis* の *tert* (*Dryu-tert*) のクローニング

S. mediterranea の *tert* 遺伝子 (*Smed-tert*) は 16 個のエキソンから成り、ORF は 1878 bp で 2 か所の alternative splicing 部位 (Alt I = exon 4~6, Alt II = exon 11~12) があるために 4 つの splicing variant が存在する。スプライシングによるエキソン欠損は活性に重要な機能ドメインの欠失やストップコドンの挿入を引き起こすため、全長型のみが活性を持つと考えられている。そこで、*D. ryukyuensis* の *tert* を同定し、スプライシングの有無を検討することとした。

筆者らの構築した *D. ryukyuensis* のトランスクリプトームデータベース中には、*tert* の部分配列 (*Smed-tert* における exon 9 の途中に対応する部分以降、3'UTR の途中まで) が含まれていたため、それを元に RACE 法により *S. mediterranea* で見出されている 2 か所の alternative splicing 部位を含むほぼ全長を同定した。

4. *tert* の isoform 発現比の定量

D. ryukyuensis においても *tert* が同定されたので、各生殖様式と切断・再生前後での isoform の発現を比較した。Fig. 2, 3 はエキソンの模式図中に矢印で示した位置のプライマーで+型と-型を同時に RT-PCR した結果である。厳密な発現量の定量は各 isoform を識別して増幅するプライマーセットを別途設計し、qPCR を行った。その結果、無性・先天的有性・人為的有性化のいずれの系統においても Alt I 部位の欠失は見られず、Alt II 部位では *Smed-tert* と同じ部位での欠失が見られ、*Dryu-tert* では Alt I+/Alt II+ と Alt I-/Alt II- という 2 種類の splicing variant の発現が確認された。また切断・再生により全 isoform の総発現量、Alt I+型、Alt II+型の発現量は増大した。ま

た Alt II 部位の isoform の比は変化せず、常に Alt II+ が大半であった。

Smed-tert ではこれまで Alt I 部位の isoform 発現比は調べられており、インタクトでは Alt I+が優位に発現するが、無性個体の切断時にのみ、+型と-型の発現比が逆転し、Alt I+型が発現上昇することが知られていた。今回、その再現が取れ (Fig. 2 の右図)、さらに新たに Alt II 部位についても再生前後で isoform 発現比を調べた結果、*Dryu-tert* と同様に常に Alt II+ が優位に発現しており、再生による isoform 比の逆転は見られなかった (Fig. 3)。しかし *S. mediterranea* は再生過程において、総発現量が無性個体では増加するのに対し有性個体では減少した点で、生殖様式に関わらず再生過程で上昇した *D. ryukyuensis* とは異なっていた。これは先行研究で示唆された、*S. mediterranea* では有性個体で齢とともにテロメア長が短くなり、切断・再生によっても短縮化が進むが、無性では再生過程を経ることでテロメア伸長が起こること、それに対し *D. ryukyuensis* ではいずれの生殖様式においても齢によるテロメア短縮化が比較的緩やかであることや、切断・再生を繰り返しても *S. mediterranea* のような有性系統でのテロメアの劇的な短縮が見られないこととも相関した。

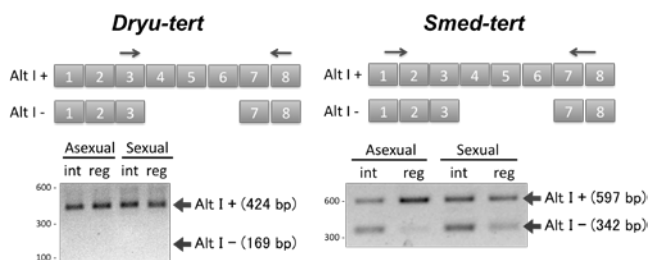


Fig. 2 RT-qPCR analysis of the ratio of *tert* alternate region 1-positive and -negative transcripts. int, intact; reg, 72h regeneration.

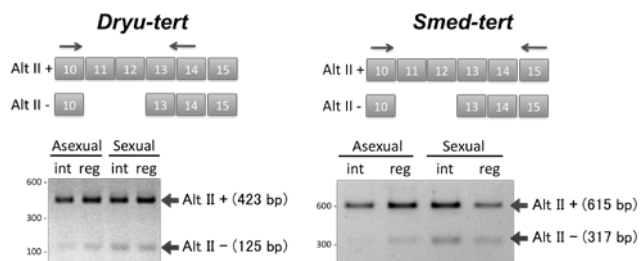


Fig. 3 RT-qPCR analysis of the ratio of *tert* alternate region 2-positive and -negative transcripts. int, intact; reg, 72h regeneration.

5. *tert* の発現部位解析

Smed-tert は、無性個体では成体多能性幹細胞に高く発現しているのに対し、有性個体では卵巣・精巣に高発現し、体性幹細胞での発現は高くない¹。*Dryu-tert* についても *in situ hybridization* 法により同様に発現部位を調べたところ、無性・有性のいずれでも間充織領域の成体多能性幹細胞に発現しており、卵巣・精巣では高い発現は見られなかった。

考察

S. mediterranea と *D. ryukyuensis* のテロメア維持能と *tert* 発現調節を比べた結果、両種間で生殖様式との関係に明確な差異が見出された。*S. mediterranea* では無性系統の再生時には活性型 isoform の *tert* の発現が上昇しテロメア伸長が起こるが、有性系統の再生時にはテロメアは短縮する。一方、生殖様式の転換が可能な *D. ryukyuensis* においては、先天的無性・有性、人為的有性化の生殖様式に関わらず、常に活性型の *tert* が優先的に発現し、再生時には発現上昇し、かついずれの生殖様式個体においても成体多能性幹細胞に発現が局在していた。特に *S. mediterranea* で alternative splicing の劇的な違いが見られた Alt I 領域については、*D. ryukyuensis* では欠失型が見られず、常に+型が発現していた。つまり *D. ryukyuensis* においては、再生の有無や生殖様式に関わらず、常に *S. mediterranea* の再生中の無性系統のような *tert* 発現制御がなされており、この活性型 *tert* の発現量や発現細胞種における明確な差が、*D. ryukyuensis* と *S. mediterranea* のテロメア維持能の差を生んでいると考えられる。本研究で *D. ryukyuensis* の有性生殖個体でもテロメア維持能および活性型 *tert* の多能性幹細胞での発現が見られたのは、生殖様式とテロメア維持の関係性に、従来とは異なる新たな一面を見出した点で、意義深い。

このように2種間に明確な差が見られたことより、派遣前の計画では2種間比較であったが、派遣中に解析対象を近縁・遠縁種 (Fig. 4) に拡大した。その中には年周期の有性生殖後に寿命を迎える種や、雌性単為生殖を行う種など多様な生殖様式をとるものがあるため、これらの解析も通じて生殖様式と寿命の関係について統合的・進化的考察を目指したい。

これまでに、これらの種について染色体標本作製し、各生殖様式について核型解析した。さらに、

テロメア配列 (TTAGGG)_n に対する蛍光標識ペプチド核酸プローブを用いて蛍光 *in situ hybridization* 法を行い、染色体上でのテロメア配列の局在を調べた。その結果、全種および生殖様式において染色体末端にテロメア配列が存在することを確認できた。現在、*tert* の isoform の発現解析を行っている。

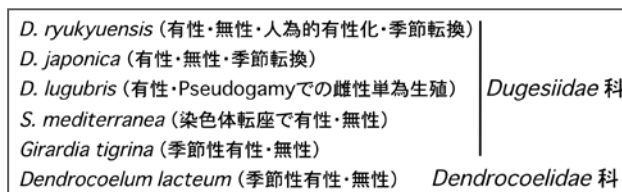


Fig. 4 Target species in this project

参考文献

1. Tan TC, Rahman R, Jaber-Hijazi F, Felix DA, Chen C, Louis EJ, Aboobaker A. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 4209-4214 (2012).
2. Kobayashi K, Koyanagi R, Matsumoto M, Cabrera JP, Hoshi M. *Zool Sci* **16**: 291-298 (1999).
3. Tasaka K, Yokoyama N, Nodono H, Hoshi M, Matsumoto M. *Int J Dev Biol* **57**(1): 69-72 (2013).
4. Cawthon RM. *Nucleic Acids Res* **30**: e47 (2002)
5. Gil ME, Coetzer TL. *Mol Biotechnol* **27**(2):169-172 (2004).

研究の発表

誌上発表

1. Tasaka K, Yokoyama N, Nodono H, Hoshi M, Matsumoto M. Innate sexuality determines the mechanisms of telomere maintenance. *Int J Dev Biol* **57**(1): 69-72 (2013).
2. Chinone A, Nodono H, Matsumoto M. Triploid planarian reproduces truly bisexually with euploid gametes produced through a different meiotic system between sex. *Chromosoma* **123**(3): 265-72 (2014).

ポスター発表

1. Takagi S, Kouda Y, Nodono H, Aoto Y, Yoshitake K, Gojbori T, Sato K, Sakakibara Y, Matsumoto M. Comprehensive screening of peptide hormones that induce planarian sexualization. 1st Asian Planarian Meeting, Hong Kong, China, May 2014