

ヒドラ性決定及び性転換における間幹細胞の役割

藤澤千笑

博士（理学）

総合研究大学院大学

生命科学研究科 遺伝学専攻

1994 年度

## 目次

## 目次

目次.....	1
表一覧.....	5
図一覧.....	6
略語一覧.....	8

## 本論文

要旨.....	1
I 章 序論.....	5
1. ヒドラ.....	5
i. 体制、形態、上皮細胞系譜.....	5
ii. 間細胞系譜.....	7
iii. 有性生殖.....	10
2. ヒドラ間幹細胞の集団構成.....	12
3. ヒドラの性決定.....	16
II 章 材料と方法.....	23
1. ヒドラ系統.....	23
i. 温度感受性間細胞を持つ系統 chim-C1.....	23
ii. 高い有性生殖能と安定した性を示す系統.....	24
2. ヒドラの飼育.....	25
i. 標準飼育.....	25
ii. 自力捕食能のないヒドラの飼育.....	26

3.	ヒドラの生体染色.....	27
4.	間細胞の除去.....	27
5.	プロモデオキシウリジン (BrdU) によるヒドラ細胞の標識.....	28
6.	組織移植.....	28
7.	足部組織の再生.....	29
8.	有性生殖の誘導.....	29
9.	組織化学および免疫組織化学.....	30
	i. マセレーション.....	30
	ii. 間細胞の染色.....	31
	1. トルイジンブルー染色.....	31
	2. モノクローナル抗体 C41 を用いた間接蛍光抗体染色.....	32
	iii. BrdU 標識した細胞の検出.....	33
10.	光学顕微鏡観察と写真撮影.....	34
<b>III 章</b>	<b>精子限定間幹細胞のクローニング.....</b>	<b>36</b>
1.	間幹細胞クローニング法の原理.....	36
	i. 温度感受性間幹細胞を持つ chim-C1 系統の 制限温度処理によるクローニング.....	36
	ii. nem-1 (♂) 系統のヒドロキシウレア処理によるクローニング.....	37
2.	実験結果.....	37
	i. 制限温度処理による chim-C1 系統の偽上皮ヒドラの作成.....	37
	ii. ヒドロキシウレア処理による nem-1 系統の偽上皮ヒドラの作成.....	42
	iii. 偽上皮ヒドラの形態.....	44
	iv. 偽上皮ヒドラの有性生殖分化.....	44

v.	精子形成をした偽上皮ヒドラクロンの長期維持.....	49
IV章	卵子限定間幹細胞のクローニング.....	50
1.	ヒドロキシウレア処理条件の改良.....	50
2.	実験結果.....	51
i.	改良ヒドロキシウレア処理による偽上皮ヒドラの作成.....	51
ii.	ヒドロキシウレア未処理 nem-1 系統の有性生殖.....	51
iii.	偽上皮ヒドラの有性生殖.....	53
iv.	卵子形成する偽上皮ヒドラの長期維持.....	56
V章	生殖間幹細胞の性質.....	57
1.	実験結果.....	57
i.	偽上皮ヒドラの長期維持.....	57
ii.	組織学的観察.....	57
iii.	生殖間幹細胞の分化安定性.....	64
iv.	精子限定間幹細胞による雌ヒドラの雄性化.....	65
v.	その他の観察ー生殖間幹細胞と多能生間幹細胞との関係.....	67
1.	偽上皮ヒドラの正常ヒドラへの転換.....	67
2.	偽上皮ヒドラにおける刺細胞分化.....	69
VI章	多能生間幹細胞の分離と生殖分化.....	72
1.	実験結果.....	72
i.	正常組織における生殖間幹細胞の移動.....	72
ii.	足組織再生体の有性生殖.....	76

iii. 卵子限定間細胞による雄性多能性間幹細胞の精子分化抑制.....	80
<b>Ⅶ章 考察.....</b>	<b>84</b>
1. 生殖間幹細胞.....	84
i. 生殖間幹細胞の分離.....	84
ii. 生殖間幹細胞としての長期増殖能.....	86
2. 生殖間幹細胞が関与する性転換機構.....	87
i. 卵子限定間幹細胞の精子限定間幹細胞への転換.....	87
ii. 雌から雄への性転換（雄性化）.....	88
iii. 雄から雌への性転換（雄性化解除）.....	89
3. 生殖間幹細胞と多能性間幹細胞.....	92
i. 生殖間幹細胞から多能性間幹細胞への転換.....	92
ii. 多能性間幹細胞の性.....	92
iii. 卵子限定間幹細胞による雄性多能性間幹細胞の精子分化抑制.....	92
4. 性決定モデル.....	94
 引用文献.....	 98
謝辞.....	102

#### 投稿論文

1. Nishimiya-Fujisawa, C & Sugiyama, T. (1993). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. XX. Cloning of interstitial stem cells restricted to sperm differentiation in *Hydra magnipapillata*. *Dev. Biol.*, 157, 1-9.
2. Nishimiya-Fujisawa, C & Sugiyama, T. (1995). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. XXII. Two types of female germ stem cells are present in a male strain of *Hydra magnipapillata*. (accepted in *Developmental Biology*.)

## 表一覧

表Ⅲ-1	制限温度処理 (chim-C1系統) とヒドロキシウレア処理 (nem-1系統) で生じた典型的な 3 タイプヒドラの細胞組成.....	40
表Ⅲ-2	自力捕食能のないヒドラ (偽上皮ヒドラ+上皮ヒドラ) の有性生殖分化.....	48
表Ⅳ-1	nem-1 (♂) 系統の 2.5mM HU 処理で生じた、自力捕食能の ないヒドラ (偽上皮ヒドラ+上皮ヒドラ) の有性生殖誘導結果.....	55
表Ⅴ-1	一時的に雄組織を移植した雌個体の性転換.....	68
表Ⅵ-1	足組織再生体の有性生殖.....	79
表Ⅵ-2	雄ヒドラの足組織を移植した 雌の偽上皮ヒドラ及び上皮ヒドラの有性生殖.....	82

## 図一覧

図 I-1	ヒドラの体制と組織、細胞の模式図.....	6
図 I-2	チクビヒドラ nem-1 系統の写真.....	17
図 I-3	Bosch & David (1986) のヒドラ性決定モデル.....	20
図 I-4	Littlefield (1994) のヒドラ性決定モデル.....	21
図 III-1	精子限定間幹細胞のクローニング方法.....	39
図 III-2	制限温度処理法および HU 処理法で得られた 各タイプのヒドラの組織染色像.....	41
図 III-3	制限温度処理およびHU処理で生じた 3 タイプのヒドラの出現頻度.....	43
図 III-4	正常ヒドラ、偽上皮ヒドラ、及び上皮ヒドラの形態.....	45
図 III-5	正常ヒドラと偽上皮ヒドラの精巢形成.....	47
図 IV-1	2.5mM HU 処理で生じた nem-1 系統の 3 タイプのヒドラの出現頻度.....	52
図 IV-2	nem-1 系統偽上皮ヒドラの有性生殖個体の写真.....	54
図 V-1	nem-1 系統の偽上皮ヒドラクローンの継代飼育 (出芽) による長期維持.....	58
図 V-2	間細胞を特異的に認識する mab C41 を用いた 間接蛍光抗体法でホルマウント染色したヒドラ.....	60
図 V-3	mab C41 による染色個体 (図 V-2) の柄部・足盤域の拡大写真.....	61
図 V-4	mab C41 を用いて間接蛍光抗体染色したヒドラ組織の一部.....	63
図 V-5	雄性化のための雄組織と雌組織の一時的移植法.....	66
図 V-6	刺細胞を形成した nem-1 系統の雄偽上皮ヒドラのトルイジンブルー染色.....	71

図 VI-1	移植した BrdU 標識間細胞の分布を調べる実験の模式図.....	74
図 VI-2	移植した BrdU 標識間細胞の分布.....	75
図 VI-3	足組織からの再生体の性を調べる実験の模式図.....	78
図 VI-4	多能性間幹細胞と生殖間幹細胞との相互作用を 調べるための移植実験の模式図.....	81
図 VII-1	精子限定間幹細胞による雄性化作用点.....	90
図 VII-2	性決定機構のモデル.....	95

## 略語一覽

AP.....	alkaline phosphatase
BrdU.....	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA .....	bovine serum albumin
EDTA.....	ethylenediaminetetra acetate
HU.....	hydroxyurea
mab.....	monoclonal antibody
NBT.....	nitroblue tetrazolium salt
PBS.....	phosphate buffered saline
TB.....	toluidine blue
Tris .....	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
X-phosphate.....	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate <i>p</i> -toluidine salt

## 要 旨

ヒドラの間幹細胞 (interstitial stem cells) は、活発に分裂して自己増殖を行う未分化幹細胞である。出芽によって無性増殖するヒドラ組織において、間幹細胞は3種類の体細胞、すなわち神経細胞、刺細胞、腺細胞に分化する。刺細胞 (nematocytes) は、腔腸動物特有の細胞で、捕食、防御の為にトゲを発射する細胞である。ヒドラが有性生殖を開始すると、間幹細胞は、生殖細胞、すなわち精子または卵子に分化する。

本研究の開始時点において、ヒドラ間幹細胞の集団構成に関し、2つの対立説が存在していた。第1の説は、多能性間幹細胞単一集団説である。この説によれば、間幹細胞集団に含まれる全細胞は、いずれも等しい分化能を持ち、全て神経細胞、刺細胞、腺細胞の3種体細胞と、卵子、精子の生殖細胞に分化する能力を持つ (Bosch & David, 1987)。

第2の説は、複合集団説である。この説では、間幹細胞集団には、精子、または卵子のみに分化し、他細胞には分化しない精子限定、あるいは卵子限定間幹細胞の小集団 (sub-population) が含まれている (Littlefield, 1985a)。

間幹細胞集団の構成を明らかにすることは、この細胞の増殖、分化制御機構を理解する上で不可欠である。また、性分化、性決定機構を研究するためにも非常に重要である。集団構成が単一か複合かにより、実験結果の解釈は大きく異なる場合がある。しかしこの問題は、従来、重要視されていなかった。

本研究において、私はヒドラ間幹細胞の集団構成の検討をした。材料として、日本産チクビヒドラ (*Hydra magnipapillata*) を用い、従来から使用されている1方法と、新たに開発した2方法を併用し、間幹細胞のクローニング実験を行った。

ヒドラ細胞の *in vitro* 培養方法は確立されてない。そのためにクローニングは、いずれもヒドラ個体の上皮組織を、フィーダーとして用いた。第1番目の方法は、温度感受性間幹細胞を持つ突然変異系統の制限温度処理法である (Sugiyama & Fujisawa, 1978)。このヒドラは18℃で飼育すると正常に成育し、出芽によって増殖する。しかし飼育温度

を 25℃ に上げると、間幹細胞は選択的に死に、急激に減少する。処理時間が長すぎると、間幹細胞は完全に消失し、処理個体はすべて上皮組織のみからなる「上皮ヒドラ」になる。しかし、処理時間を上手に調節すると、大部分の間幹細胞は除去されるが、ごく少数（理想的には 1 個）の間幹細胞を残す事が出来る。この残された間幹細胞を増殖させ、クローン化を行なった。

第 2 番目の方法は、ヒドロキシウレア (HU) 処理法 (Littlefield, 1985a) である。この方法は、原理的に第 1 番目の方法と似ている。HU は S 期の細胞を殺す薬剤である。ヒドラを HU 処理すると、活発に分裂する間幹細胞は選択的に殺されるが、分裂の遅い上皮細胞は、あまり影響をうけない。HU 濃度と処理時間の調節により、健康な上皮組織の中に、ごく少数（理想的には 1 個）の間幹細胞を残す事ができる。残った細胞を増殖させ、クローン化を行なった。

第 3 番目の方法は、特定地域の組織小片再生法である。上記 2 方法で得た特異的分化能を示す間幹細胞は、ヒドラ個体内で局在している事が分かった。そこで、この細胞の存在しない部位から微小组織を切りだし、再生させ、再生体に存在する間幹細胞のクローン化を行なった。

上記 3 方法は、いずれも厳密な意味でのクローニング方法ではない。直接観察により 1 細胞であることを確認した上で、あるいは統計的に 1 細胞と推定した上で、その細胞を増殖、クローン化した訳ではない。しかし、結果的に判断すると、どの方法も有効であった。すなわち、3 方法の使用により、分化能の異なる 4 種類の間幹細胞小集団を分離する事に成功した。

分離した小集団の第 1 番目は、精子限定間幹細胞である。この細胞は精子のみに分化し、体細胞（神経細胞、刺細胞、腺細胞）には分化しない。第 2 番目は、卵限定間幹細胞である。この細胞は卵子のみに分化し、体細胞には分化しない。これら 2 種の間幹細胞

胞は、合わせて生殖間幹細胞と呼ぶ事ができる。上記 2 種の生殖間幹細胞のみを持つヒドラは、神経細胞、刺細胞を持たず、そのため運動も捕食も出来ない。しかし、人為的に腔腸内に餌を挿入すれば消化、吸収を行い、その結果、成長、出芽し、増殖できる。このような、生殖間幹細胞のみを持ち、多能性間幹細胞を持たないヒドラを、「偽上皮ヒドラ」(pseudo-epithelial hydra) と名付けた。

第 3 番目の小集団は、雌性多能性間幹細胞である。この幹細胞は 3 種の体細胞と卵子に分化する。第 4 番目は雄性多能性間幹細胞である。この幹細胞は 3 種の体細胞と精子に分化する。

以上クローニング実験の結果は、複合集団説を支持し、単一集団説が間違いである事を示した。しかし、単一集団説の根拠となった、体細胞と生殖細胞の両方に分化する能力を持つ多能性幹細胞の存在も確認された。

ところで、上記クローニング実験の過程で、全く予期しなかった意外な事実を明らかにすることができた。それは、雄ヒドラのうちに、卵子に分化する間幹細胞を持つ系統が存在する事である。特に、そのうちの 1 系統 *nem-1* (♂) には、精子限定間幹細胞と共に、卵子限定間幹細胞、雌性多能性間幹細胞が存在し、雄性多能性間幹細胞は存在しない事が明かとなった。

雄ヒドラの組織に、卵子に分化する能力を持つ間幹細胞が存在する事は、「雄性化現象」(masculinization) においても、認められている。雄性化とは、精子限定間幹細胞を雌組織に移入させると、移入した細胞自身が精子に分化する一方、卵子形成を抑制する、人為的性転換現象である (Sugiyama & Sugimoto, 1985; Littlefield, 1986)。この雄性化と基本的に同じ現象が、*nem-1* (♂) 組織内で人為的ではなく、偶発的に起きていると考えられる。

しかし、卵子分化能を持つ幹細胞 2 種が、雄系統組織に含まれている事実は、不思議であり、初めは理解困難であった。

以上に述べた間幹細胞集団の構成と性質を総合的に考察し、私はヒドラの性決定と性転換に関し、次のモデルを提出する。

雌は全て、生まれた時からおそらく遺伝的に雌に決定されている。雌ヒドラは雌性多能性間幹細胞をもち、この細胞から卵子限定間幹細胞が生じ、卵子形成を行う。

一方、雄には 2 つのタイプが存在する。1 つのタイプは、生まれた時からおそらく遺伝的に雄に決定されている。この雄は雄性多能性間幹細胞をもち、この細胞から精子限定間幹細胞が生じて、精子形成を行う。もう 1 つのタイプの雄は、*nem-1* (♂) の様に、初め遺伝的に雌として決定されて生まれるが、その後、性転換により雄となる。このタイプの雄は、雌性多能性間幹細胞を持っている。この細胞から卵子限定間幹細胞が分化する。しかし、卵子限定間幹細胞はまれに精子限定間幹細胞に転換する場合がある。このプロセスにより雄性化が起こり、表現型は雄となる。

卵子、精子の 2 つの性による有性生殖は、生物界における最も一般的な現象のひとつである。しかし、性決定のメカニズムは種によって実に多様である。その中にも、ヒドラの性決定機構は非常に特異的である。

## I 章 序論

## 1. ヒドラ

ヒドラは淡水産の腔腸動物 (coelenterate) である。腔腸動物の組織は、内外二胚葉の細胞層により構成され、中胚葉は存在しない。腔腸動物には、刺細胞 (nematocytes) とよばれる特殊な細胞が存在する。その細胞質に、刺糸を発射する刺胞 (nematocyst) が存在し、捕食、防御などに使われる。この為、腔腸動物は刺胞動物 (cnidaria) とも呼ばれる。腔腸動物は、神経系を持つ最も単純な動物である。また、世代交代 (alteration of generation) により、無性生殖と有性生殖の世代を繰り返す。

### i. 体制、形態、上皮細胞系譜

ヒドラの体は、基本的に細長い中空シリンダー状構造である (図 I-1)。その体の一端に口があり、周辺の盛り上がり部分は、「口丘」(hypostome) と呼ばれる。口丘を数本の触手 (tentacles) が環状に囲む。この環状構造は「触手環」(tentacle ring) と呼ばれる。触手には、多数の刺細胞が埋め込まれている。口丘と触手をあわせ、頭部 (head region) と呼ぶことがある。

シリンダー状の体の他端は、ディスク状形態をなし、「足盤」(basal disk) と呼ばれる。足盤には粘着物を分泌する細胞が多数存在し、ヒドラの体を水草などに固着させたり、気泡を付け、体を水面に漂わせたりする働きがある。頭部と足盤を除いた体の部分は、「体幹」(body column) と呼ばれる。体幹の、足盤側から距離にして約 1/3 ~ 1/4 の部域は、「出芽域」(budding region) と呼ばれる。栄養状態の良いヒドラは、この部分から出芽し、無性的に増殖する。頭部から出芽域までの体幹部は、エサの消化、吸収を行う部分で、「胃域」(gastric region) と呼ばれる。出芽域下から足盤までの、細く締めり半透明な上皮層の領域は、「柄部」(peduncle) と呼ばれる。

ヒドラの体は、総数 3 万ないし 10 万個の細胞から作られ、その細胞は 3 種類の細胞系

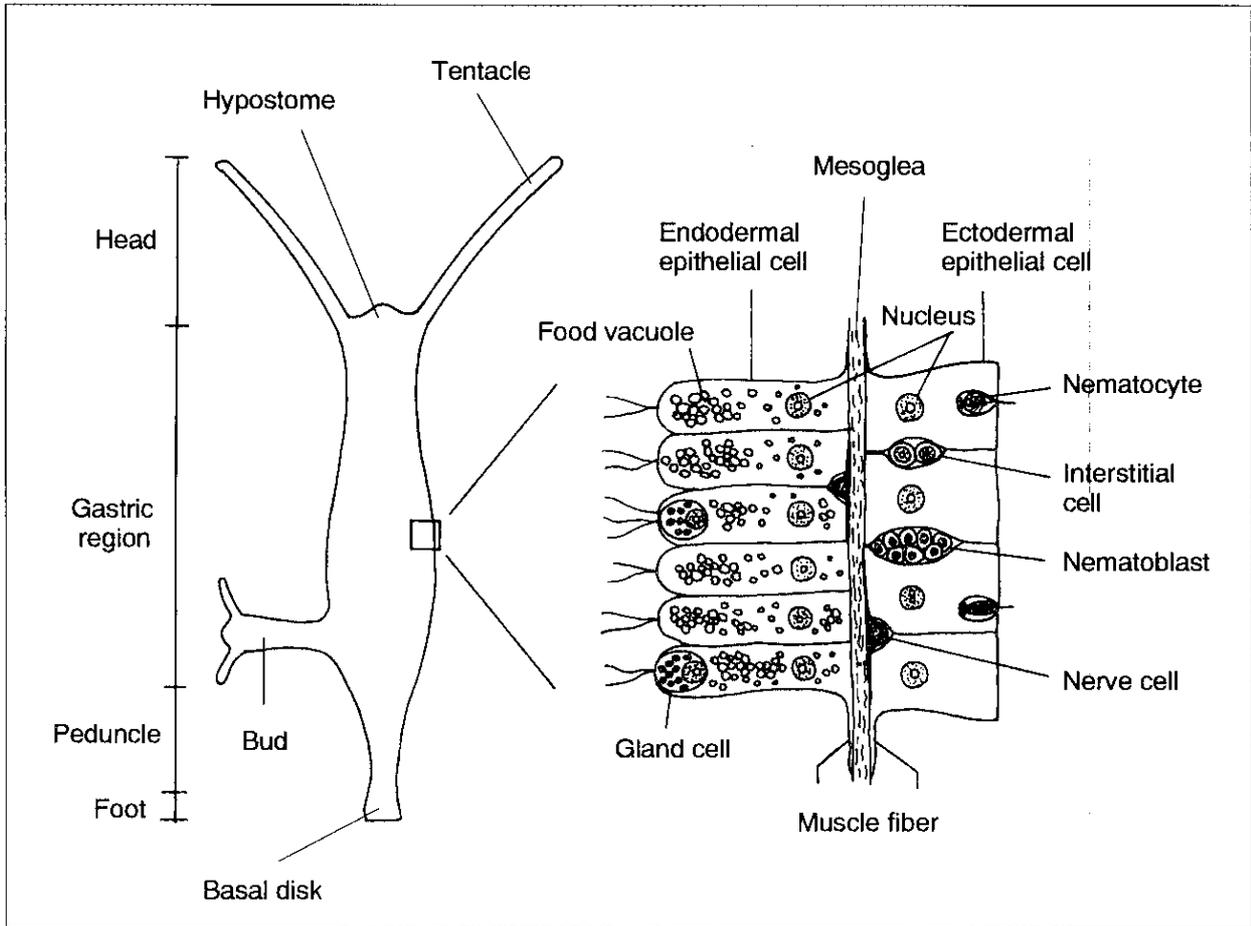


図 I-1 ヒドラの体制と組織、細胞の模式図

ヒドラの形態と、一部拡大した体幹部組織（藤沢敏孝、1992、[造血因子] 第3巻第2号より筆者の許可を得て転載）。

譜(cell lineage)により構成されている。第1は外胚葉上皮細胞系譜(ectodermal epithelial cell lineage)、第2は内胚葉上皮細胞系譜(endodermal epithelial cell lineage)、第3は間細胞系譜(interstitial cell lineage)である。3細胞系譜は、それぞれ独立に自己増殖を行い、互いに分化転換する事はない。

外胚葉上皮と内胚葉上皮は、それぞれ一層の細胞層を形成し、中膠(mesoglea)と呼ばれる細胞外基質層を挟んで平行に並び、体壁を形成している(図I-1)。体壁の外側は外界、内側は腔腸である。ヒドラの形態は、基本的に外胚葉、内胚葉の両上皮細胞層により構築され、形態形成も両上皮細胞のみで可能であり、間細胞系譜の存在は必ずしも必要でない(Sugiyama & Fujisawa, 1978; Marcum & Campbell, 1978a)。

外胚葉上皮細胞内には、多数の筋繊維が存在し、中膠に沿って体軸と平行に伸びている。内胚葉上皮細胞内にも筋繊維が存在し、中膠沿いに体軸と垂直方向に走行している。ヒドラが体を伸展する場合は、外胚葉上皮の筋繊維が弛緩、内胚葉上皮の筋繊維が緊縮し、体を収縮するときはそれぞれが反対に収縮、弛緩する。

## ii. 間細胞系譜

「間細胞」(interstitial cells)は、文字どおり上皮細胞層の、細胞と細胞の「間隙」(interstitial space)に存在する未分化細胞である(図I-1)。大多数は外胚葉に、少数は内胚葉に存在する。間細胞系譜の細胞には、未分化多能性の「間幹細胞」(interstitial stem cells)、「刺細胞前駆体」(nematoblasts)、「刺細胞」(nematocytes)、「神経細胞」(nerve cells)、「腺細胞」(gland cells)、「生殖細胞」(germ cells)が含まれる。以下、各細胞種の性質を簡単に述べる。

間幹細胞は、活発に分裂し、自己増殖すると共に、ヒドラが出芽により無性増殖する期間は、体細胞(神経細胞、刺細胞、腺細胞)に分化する。またヒドラが有性生殖するとき

には、生殖細胞（卵子、精子）に分化する。未分化の間幹細胞と、分化決定を受けた直後の間細胞は、形態的には区別できない。そのために、両者を総称して間細胞と呼ぶ場合がある。

マセレーション法の形態分類 (David, 1973) によると、間細胞は「大型間細胞」 (large interstitial cells) と、「小型間細胞」 (small interstitial cells) の2種類に区分されている。

大型間細胞は、直径  $12 - 20 \mu\text{m}$  の細胞である。大きく顕著な核 ( $8 - 12 \mu\text{m}$ )、顕著な仁、均質で顆粒状の粒子にとむ細胞質を持つ。単独の細胞、或いは細長い細胞質架橋で連結された一对の細胞（ペア）として、存在することが多い。ただし、分化経路に入った生殖限定間細胞では、細胞質架橋で繋がった細胞集団として存在することもある（I章1-iii節参照）。

小型間細胞は直径  $7 - 12 \mu\text{m}$  の細胞である。比較的小さな核を持ち ( $6 - 7 \mu\text{m}$ )、はっきりした仁は存在しない。また核と細胞質の境界が明確に区別しにくいこともある。細胞質は顆粒状に見える。小型間細胞は、単独またはペアとして存在するタイプと、4、8、16、または32個の細胞質架橋で繋がれた細胞集団になっているタイプがある。この細胞集団は、「ネスト」 (nest) と呼ばれる。単独またはペアの小型間細胞の大部分は、神経細胞に分化決定を受け、分化経路上にある細胞と考えられている (Heimfeld & Bode, 1984; Holstein & David, 1986; Bode et al., 1990)。一方4個以上のネストは、大部分は刺細胞に分化しつつある刺細胞前駆体、または精子に分化しつつある精原細胞と考えられている。

従来、未分化間幹細胞はすべて、形態的に大型間細胞に属すと考えられていた。しかし単独またはペアの小型間細胞の中に、未分化間幹細胞が含まれている例も報告されている (Holstein & David, 1990a)。

刺細胞は、細胞質に大型の細胞内小器官である刺胞をもつ。刺胞の形態により、A型

(stenotele)、B 型 (holotrichous isorhiza)、C 型 (atrichous isorhiza)、D 型 (desmoneme) に分類されている。A 型は最も大型で、刺糸はエサの小動物などの標的体内に突き刺さる（貫通刺胞）。神経毒を含み、小動物を殺すことができる。B 型と C 型の刺糸は付着性を持つ（粘着刺胞）。D 型の刺糸は、発射されると投げ縄のように巻き付く性質をもつ（捲着刺胞）。これら 4 種の刺細胞は、エサの捕獲、防御、ヒドラ個体の移動に用いられる。

刺細胞は一度刺糸を発射すると、再利用されず、使い捨てにされる。そして新しい刺細胞が間幹細胞から分化して、補充される。刺細胞の分化は体幹部で起きる。分化過程に入った間細胞は、2 - 5 回の同調分裂を繰り返し、4、8、16、または 32 個の小型間細胞ネストを形成する (Slautterback & Fawcett, 1959)。分裂停止後、ネストを形成する細胞の細胞質内に液胞状構造が形成され、この構造が徐々に発達し、刺胞が形成される。同一ネスト内の刺胞形成は、同調的に進行し、必ず同一タイプの刺胞が形成される。刺胞形成期の細胞を刺細胞前駆体と呼ぶ。刺胞形成が完了したネストは分解し、成熟刺細胞は、それぞれ単独の細胞として、触手などに移動する。

ヒドラの神経系は「散在神経系」(loose nervous system) と呼ばれる。個々の神経細胞は体全体に広く分布している。各神経細胞は細長い「突起」(process) を延ばし、突起と突起の接続によって全体として網目状構造を形成する。口丘部、触手、足盤部には、特に多くの神経細胞が集中し、特殊な構造を形成している。

神経細胞は、形態的に「感覚細胞」(sensory cells) と「神経節細胞」(ganglion cells) の 2 種類に分類されている (David, 1973)。感覚細胞は、細長い紡錘形の細胞本体 (15  $\mu$ m) を持ち、先端部の「感覚繊毛」(sensory cilia) は体表面に露出している。基部からは 1 - 2 本の突起が伸びている。感覚細胞は、主として口丘部、触手に存在する。

神経節細胞は、小さな細胞本体 (8 - 12  $\mu$ m) と、2 本 (bipolar) から数本 (multi-polar) の突起を持つ。体全体の神経系ネットワークは、主としてこの細胞種の延ばす長い突起の

接続により、形成されている。

神経細胞は、間幹細胞から分化して形成される。分化決定を受けた「神経前駆体細胞」(nerve precursor cells) は、そのまま直接、あるいは数回の分裂を経た後に、神経細胞となる (Heimfeld & Bode, 1984; Holstein & David, 1986; Bode et al., 1990)。分化した神経細胞は、上皮組織に組み込まれ、増殖に伴う上皮組織の移動と共に移動し、最終的には、ヒドラの体の両端部（触手の先端と足盤）に達し、上皮細胞と共に捨てられる。芽体形成時には、芽体に必要な大量の新しい神経細胞が生産される。いずれの場合にも、神経細胞は常に間幹細胞から分化し、補給される。

腺細胞は、内胚葉上皮細胞の間隙に存在する紡錘形（長径 20 - 50  $\mu\text{m}$ ）の細胞で、細胞質に消化酵素を含む分泌顆粒（2 - 4  $\mu\text{m}$ ）が多数存在する。腔腸に面した表面には 1 - 2 本の鞭毛が存在し、鞭毛運動により腔腸内に水流を起こし、消化を助ける。腺細胞は長期分裂能力を持つ。しかし正常ヒドラでは、常に一定割合で間幹細胞から分化し、古い細胞は新しく分化した細胞によって置き換えられる (Schmidt & David, 1986; Bode et al., 1987)。

生殖細胞は本研究の主題である。その性質に関し、次の有性生殖の項で詳述する。

### iii. 有性生殖

ヒドラは良い環境条件下では、出芽により活発に無性的増殖を行う。有性生殖は、環境条件の急激な変化によるストレスにより、誘導されると考えられている。自然界においては、温度が重要要因であると考えられている。有性生殖には、春型タイプと秋型タイプが存在する。チクビヒドラ (*Hydra magnipapillata*) は春型である。10℃ 以下（冬）では、有性生殖を行わず、水温が 15℃ 以上（春）になると有性生殖を開始する。人為的に飼育温度を 8℃ から 21℃ に急激に変えると、1 週間以内に有性生殖を始める例が報告されて

いる (Ito, 1952)。しかし、この方法は通常実験の有性生殖誘導には使用されない。8℃では、出芽増殖速度が非常に遅いためである。

寒冷地のヒドラは秋型が多い。オリガクティスグループ (*oligactis* group) のヒドラは、すべて秋型である。このグループは、18℃ 以上 (夏) では有性生殖を行わない。飼育温度を 21℃ から 8℃ に急激に低下させると、通常約 30 日で有性生殖を始める (Ito, 1954)。

腔腸動物の多くは、世代交代 (alteration of generation) を行う。始めポリプとして無性的に増殖し、その後クラゲを形成し、有性生殖を行う。しかし、ヒドラはクラゲを形成しない。おそらく先祖型はクラゲを形成したが、退化し、クラゲ形成をしなくなったと考えられる。ヒドラと近縁の海産カイウミヒドラ科 (*Hydractiniidae*) には、良く発達したクラゲを形成する種、遊泳力の低いクラゲを形成する種、ポリプから分離しない不完全クラゲを形成する種まで含まれている。ヒドラは、クラゲ形成が最も退化した種と見ることができる。

ヒドラは、一般的な生殖器官も形成しない。哺乳類などの生殖器官 (巢) は、その中に入り込む生殖細胞の増殖、分化に必須であり、生殖細胞の性分化決定にも、重要な役割を果たす。それに対し、ヒドラには特別の生殖器官は全く存在せず、生殖細胞は外胚葉上皮細胞の間隙において増殖、分化する。

精子は「精子限定間細胞」 (sperm-restricted stem cells) から分化して生産される。精子限定間幹細胞は、自己増殖して精子に分化するが、他種細胞には分化しない細胞を指す (Littlefield, 1985b; Nishimiya-Fujisawa & Sugiyama, 1993)。精子限定間幹細胞は、分化過程に入ると非同調分裂を繰り返し、刺細胞前駆体と同様の細胞質架橋で結ばれたネストを形成する。ネストの細胞数は通常30位までであるが、100を越す例もある。分裂を繰り返す間に、細胞は小型化し、鞭毛が生じる。その後、各細胞は分裂の度に、徐々に細胞

質を失い、さらに小さくなる。やがて減数分裂を行い、4細胞ごとに一重膜に包まれた「精細胞」(spermatids)となる。精細胞が成熟すると、個々の精子が生じる。

精子分化過程は、すべて外胚葉上皮層で起きる。はじめ精子限定間幹細胞は、外胚葉上皮層に広く分布している。有性生殖開始と共に、精子限定間幹細胞は増殖を始め、やがて出芽域より上部の体幹上の数カ所に集合する。多数の分裂細胞、精子前駆体細胞が外胚葉上皮下に蓄積し、多層化する。そのために、この部分の体壁は盛り上がり、外胚葉上皮の袋の中に、分裂細胞、精子前駆体細胞が詰め込まれた状態の構造となる。この構造は、便宜的に、ヒドラの精巣(testis)と呼ばれている。やがて精子分化が完了し、成熟した精子が活発な遊泳運動を始めると、精巣中央部の外胚葉上皮が破れ、精子が放出される。

卵子は「卵子限定間幹細胞」(egg-restricted stem cells)から分化して生産される(Littlefield, 1991a)。卵子限定間幹細胞は、自己増殖し、卵子に分化するが、他種の細胞には分化しない。精子形成過程の初期と同様に、卵子限定間細胞も、細胞質架橋で結ばれたまま非同調分裂を行い、大きなネストを形成する。続いて、集合細胞のうち、1細胞が卵母細胞に決定され、他はすべて哺育細胞となる。卵母細胞はやがて減数分裂前期に入る。哺育細胞は養分を生産し、特殊な方法で卵母細胞に提供する。はじめ卵母細胞は、哺育細胞が放出する細胞質の断片を、食作用によって取り込み、大きくなる。その後、哺育細胞はアポトーシスにより死ぬが、卵母細胞は、これも食作用により取り込む(Honegger et al., 1989)。卵子が完成すると、外胚葉上皮の一部が破れ、卵子は体表に露出され、受精可能となる。卵子形成過程を通じ、卵巣と呼ぶべき構造は形成されない。

## 2. ヒドラ間幹細胞の集団構成

上述の如く、ヒドラの間幹細胞は、様々なタイプの細胞に分化する能力を持つ。しかし間幹細胞集団に属する全細胞が、すべて同じ分化能を持つかどうかは明らかではない。本

研究の開始時点において、ヒドラの間幹細胞の集団構成に関し、2つの対立する説が提唱されていた。その1つは「多能性間幹細胞単一集団説」である。この説によれば、間幹細胞はすべて等しい多分化能を持ち、どの細胞も神経細胞、刺細胞、腺細胞の3種体細胞と、卵子、精子の生殖細胞に分化できる (Bosch & David 1987)。この説によれば、独立生殖細胞系列は存在しない。

もう一方の説は、「複合集団説」である。この説によれば、体細胞系列とは異なる、独立の生殖細胞系列の間幹細胞が存在する (Littlefield, 1985a)。

単一集団説の根拠は、解離細胞集合法による間幹細胞クローニング実験である。ヒドラ組織を高張塩溶液で短時間処理し、開口部の細いピペットで吸排し、機械的シェアーを加えると、単一細胞に解離する。この解離細胞を遠心分離し、団子状の細胞集合体を作らせ、その後塩濃度を徐々に下げてゆくと、細胞再集合体から完全なヒドラが再生する (Noda, 1971; Gierer et al, 1972)。David & Murphy (1977) は、この細胞再集合法を用い、初めてヒドラ間細胞のクローニング実験を行った。ブルガリス種ヒドラ (*H. vulgaris*) をあらかじめナイトロジェンマスタードで処理し、間細胞を完全に除去し、上皮細胞の分裂能も止めておく。この処理ヒドラ組織を単細胞に解離し、その中に解離した正常間細胞が統計的に1個混じる条件を設定し、再集合体を形成させた。この再集合体の組織中で、正常間細胞は増殖し、クローンを形成する。そのクローンの細胞組成を調べたところ、どのクローンにも間細胞、神経細胞、刺細胞が存在した。この結果から、正常ヒドラには、少なくとも神経細胞と刺細胞の2種に分化する多能性の間幹細胞 (multipotent interstitial stem cells) が存在することが明らかにされた。

同様の方法を用い、Bosch & David (1987) は更に、多能性間幹細胞から生殖細胞への分化について検討を行った。そのために、彼らは日本産チクビヒドラの突然変異系統2系統を利用した。その1系統は、温度感受性間細胞を持つ変異系統 sf-1 (Sugiyama &

Fujisawa, 1978)、他の 1 系統は運動能のない精子を形成する変異系統 ms-1 (Sugiyama & Fujisawa, 1977) である。前者の解離細胞多数と、その中に後者の間幹細胞が平均 1 個以下混じるように、再集合体を形成させた。そして再生ヒドラを制限温度 24℃ で処理し、系統 sf-1 由来の間細胞をすべて除去し、その上で再生ヒドラの性質を調べた。大部分の再生体は、間細胞系譜の細胞を全く持たない「上皮ヒドラ」(epithelial hydra)であった。残りの少数は、自力捕食能を持つヒドラであった。このヒドラは間細胞、神経細胞、刺細胞を持ち、誘導によって有性生殖を行った。更に精子形成をした個体の精子は、泳動能を持たず、その精子が系統 ms-1 由来の間細胞から分化している事を示した。また、多数の再生ヒドラの中に、生殖細胞には分化するが、体細胞には分化しない生殖間幹細胞を持つ再生体は見いだされなかった。

これらの結果に基づき、Bosch and David (1987) は、チクビヒドラの間幹細胞は全て多能性で、体細胞と生殖細胞の双方に分化する能力を持つと結論した(多能性間幹細胞単一集団説)。

もう一方の複合集団説の根拠は、Littlefield (1985a) の行ったヒドロキシウレア (HU) 処理によるクローニング実験である。HU は S 期の細胞を殺す薬剤である (Sinclair, 1965)。ヒドラを HU 処理すると、活発に分裂、増殖する間幹細胞(細胞周期 24 時間)は速やかに殺され、急速に数が減少する。しかし分裂速度の遅い上皮細胞(細胞周期 72 時間)の数は比較的ゆっくりと減少する。そこで処理時間の調節により、健康な上皮細胞組織に、ごく少数(理想的には 1 個)の間幹細胞が残されている個体を作成することが可能である。

この方法を使用し、Littlefield (1985a) は、始めオリガクティス種 (*H. oligactis*) (♂) の間細胞クローニングを行い、精子限定間幹細胞を持つヒドラの分離に成功した。その後更に、同方法を用い、オリガクティス種 (♀) から卵子限定間幹細胞を持つヒドラの分離

にも成功した (Littlefield, 1991)。この結果は、他の多くの多細胞生物と同様に、ヒドラにも体細胞系列とは独立の生殖系列細胞が存在することを示す。

Littlefield (1985a, 1991) のクローニング実験と、上記 Bosch & David (1987) のクローニング実験の結論は全く正反対である。後者によれば、ヒドラの間幹細胞集団は多能性間幹細胞の単一集団であり、前者によれば、限定間幹細胞を含む複合集団である。両者の結論の不一致の原因は、2通り考えられる。第1は、実験に使用したヒドラ種の違いである。Bosch & David (1987) の使用したチクビヒドラ (*H. magnipapillata*) と、Littlefield (1985a, 1991) の使用したオリガクティス種 (*H. oligactis*) は、それぞれブルガリスグループとオリガクティスグループに属し、両者間には明確な形態上の差異が多数認められている (Campbell, 1987)。従って両者間には、間幹細胞集団の構成にも差異が存在するかもしれない。

第2の原因は、クローニング方法の差異である。Bosch & David (1987) は解離細胞再集合体クローニング法を使用した。何らかの理由のために、この方法は生殖間幹細胞の分離に不適であるかもしれない。

間幹細胞集団の構成が単一か、複合か、そして種による差異が存在するか否かは、間幹細胞の増殖、分化制御機構、あるいは性決定機構を理解する上で、非常に重要な問題である。

私は、温度感受性間細胞を持つチクビヒドラ突然変異系統の性質を調べている間に、体細胞に分化しない間細胞を持つヒドラを偶然見いだした。有性生殖誘導を試みたところ、この間細胞は精子に分化する精子限定間幹細胞であることが明らかとなった。このヒドラは、捕食能も移動能もなく、外見上、「上皮ヒドラ」 (epithelial hydra, Campbell, 1976; Sugiyama & Fujisawa, 1978) と区別できない。しかしその組織には間細胞が存在する。そこでこのヒドラを「偽上皮ヒドラ」 (pseudo-epithelial hydra) と命名した (Ⅲ章)。

その後、HU 処理クローニング法を用い、チクビヒドラの他の系統 nem-1 (♂) にも、精子限定間幹細胞が存在することを示した (Ⅲ章、Nishimiya-Fujisawa & Sugiyama, 1991)。続いて、同系統から卵子限定間幹細胞を分離した。雄系統から卵子限定間幹細胞を分離したのは、本研究が初めてである (Ⅳ章)。この結果により、従来の 2 クローニング実験の結論の差異は、ヒドラ種の差異によらず、クローニング方法の差異によることが明らかとなった。

### 3. ヒドラの性決定

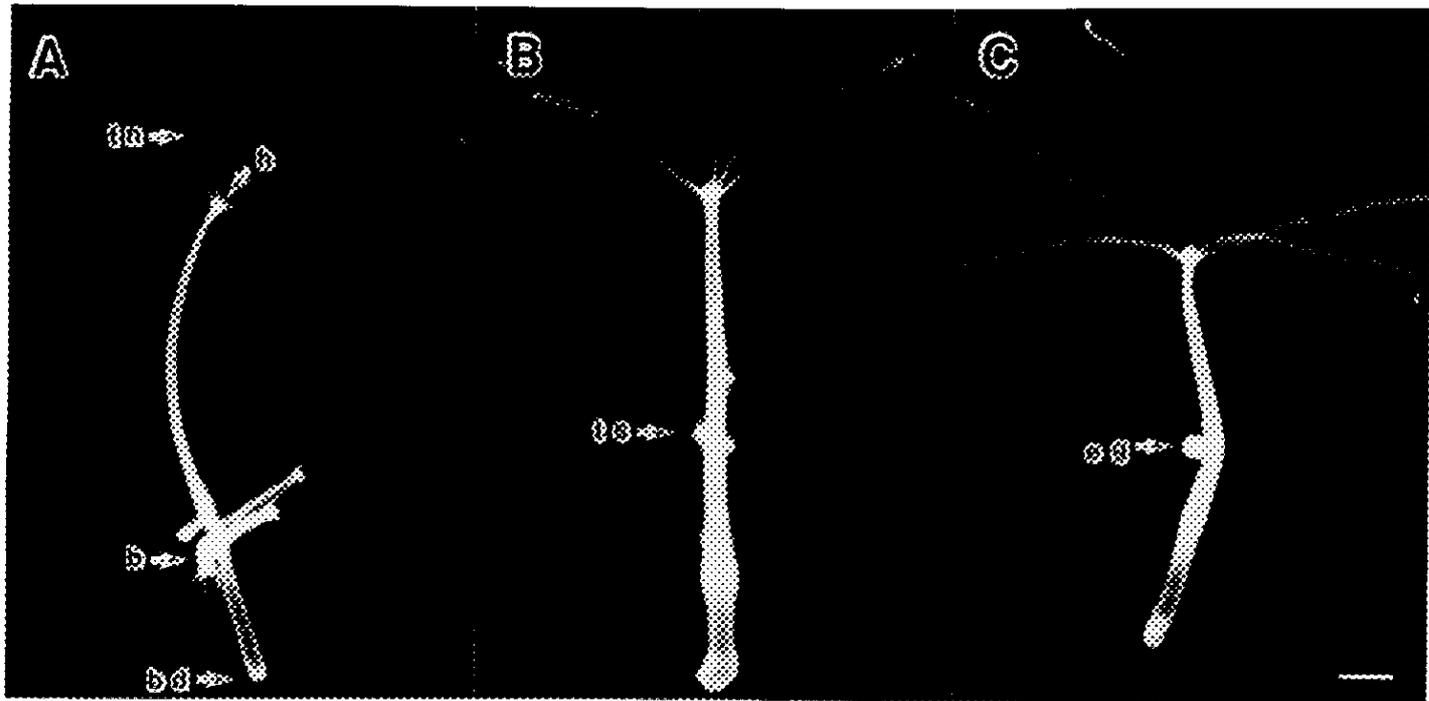
ヒドラには雌雄異体の種と、雌雄同体の種がある。日本産チクビヒドラ (*H. magnipapillata*) は雌雄異体種である。図 I-2 にチクビヒドラの雄雌それぞれの有性生殖個体を示す。卵から孵ったヒドラの性比は 1:1 で、遺伝的な性決定機構が存在すると考えられている (Littlefield, 1994)。しかしヒドラは、しばしば性転換を起こす。この転換に方向性はなく、雄から雌、あるいは雌から雄に変わることがある。また、出芽によって増殖したクローン全体が、性転換するわけではない。この点、発生段階にしたがって、雄から雌、あるいは雌から雄に性転換する連続的雌雄同体现象 (consecutive hermaphroditism) とは異なる。

雌雄異体ヒドラの性決定機構に関連し、ひとつの興味深い現象が、従来から詳細に調べられている。雌個体に雄組織を一定期間移植し、その後、雄組織を除去すると、雌個体は雄に性転換する場合がある。この現象は、「雄性化現象」 (masculinization) と呼ばれている (Goestch, 1922)。

雄性化の原因として、雄の上皮細胞が雄性化ホルモンを分泌し、このホルモンの作用により雄への性転換が起きるとする説が、はじめ有力であった (Brien, 1962, 1963)。し

図 I-2 チクビヒドラ nem-1 系統の写真

A. 出芽による無性増殖中のヒドラ。3 個のほぼ完成した芽体と 1 個の芽体突起をもつ。 B. 有性生殖中の雄個体。乳首形の精巢を 6 個形成している。 C. 有性生殖中の雌個体。1 個の大きな丸い卵が外胚葉上皮細胞を破って体外にでたところ。卵はしばらくは親個体に付着している。 tn: 触手、h: 口丘、b: 芽体、bd: 足盤、ts: 精巢、eg: 卵。スケールは 1mm。



かし、Tardent (1966a, 1968) は、X線照射により雄組織から間細胞を除去すると、雄組織は雄性化能を失うこと、従って雄性化には間細胞系譜が必須である事を示した。続いて Littlefield (1984) は、オリガクティス種の性決定において、間細胞系譜が重要であり、上皮細胞は無関係である事を示した。ヒドラでは、上皮細胞系譜と間細胞系譜とを任意の系統から組み合わせ、キメラ系統を作ることができる (Sugiyama & Fujisawa, 1978; Marcum & Campbell, 1978)。彼女は雄ヒドラの上皮細胞系譜と、雌ヒドラの間細胞系譜を組合わせたキメラ系統、又はその反対の組合わせたキメラ系統を作成し、その性を調べた。その結果、キメラヒドラの性は、間細胞系譜を供与したヒドラの性と一致し、上皮細胞系譜供与ヒドラの性とは無関係である事を明らかにした。

Sugiyama & Sugimoto (1985) は、チクビヒドラにおける雄性化において、雄の間細胞が雌組織に侵入し、侵入した雄の間細胞自身が精子に分化することを示した。彼らは上述の運動能のない精子を形成する雄組織 (ms-1) と、B型刺胞の形態異常を持つ雌系統の組織 (nem-1) を移植接合し、数日後に雄組織を切除した。残った雌組織を再生させ、有性生殖を誘導したところ、このヒドラは運動能の無い精子を形成し、また刺胞は形態異常を示した。この結果は、侵入した雄の間細胞は、雌の間細胞を駆逐することなく、卵子分化を抑制する事を示唆する。

更に Littlefield (1986) は、精子限定間幹細胞のみを持つ偽上皮ヒドラが、正常ヒドラ雄と同様に、雄性化能力を持つ事、即ち、精子限定間細胞系譜が雄性化能力を持つ事を示した。更に、精子限定間細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体 AC2 を用いて染色すると、雄性化した雌個体にも、雄と同様に AC2 で識別される間細胞が存在する事を示した。

これらの諸結果は、いずれも雄の間幹細胞、とくに精子限定間幹細胞が雄性化に重要な役割を果たすことを示す。最近 Littlefield (1994) は、精子限定間細胞系譜が直接的に、

あるいは他の細胞を通じて間接的に、卵子分化を抑制する分子 (egg-suppressing molecule) を放出するという仮説を提出している。彼女は、精子限定間幹細胞のみを持つブルガリス種の偽上皮ヒドラと、オリガクティス種の正常雌個体を移植接合した。この異種間の接合においては、前者の精子限定間幹細胞は、接合境界を越えて後者の雌組織に侵入しない。しかし、それにもかかわらず、雌組織の卵子分化は抑制される。従って、卵子分化抑制には、間幹細胞相互間の直接的作用は必須ではなく、遠距離に存在する細胞にも作用する液性因子が関与していると考えられる。

キメラ系統および雄性化に関する以上の研究から、精子限定間幹細胞が、性決定に重要な働きをしていること、そして上皮細胞は性決定に直接関与しないことが、明らかになった。しかし、どのようにして精子限定間幹細胞が生じるかという問題は不明である。この問題が、ヒドラの性決定における、現在の最も基本的な問題のひとつである。

Bosch & David (1987, 1986) は、再集合体クローニング実験の結果に基き、ヒドラの性決定機構モデルを提唱している。また Littlefield (1994) も、HU 処理クローニング実験に基くモデルを提唱している。両モデルの内容は、それぞれ図 I-3、図 I-4 に説明した。

本研究においては、チクビヒドラの系統 nem-1 (♂) 組織に、少なくとも 3 種類の間幹細胞小集団が存在することを明らかにした。第 1 は精子限定間幹細胞 (Ⅲ章)、第 2 は卵子限定間幹細胞 (Ⅳ章)、第 3 は、体細胞 (神経細胞、刺細胞) と卵子に分化する雌性多能性間幹細胞である (Ⅴ章)。なぜ卵子分化能を持つ幹細胞 2 種が、雄系統組織に存在するのか、その理解は始め非常に困難であった。この現象を理解する事を主目的として、精子限定間幹細胞、または卵子限定間幹細胞を持つ偽上皮ヒドラを長期間維持し、両限定間幹細胞の性質を詳細に調べた (Ⅴ章)。また更に、nem-1 以外の系統多数を用い、多能性間幹細胞の性質を調べる実験も行った (Ⅵ章)。その結果、多くの新知見を得ることがで

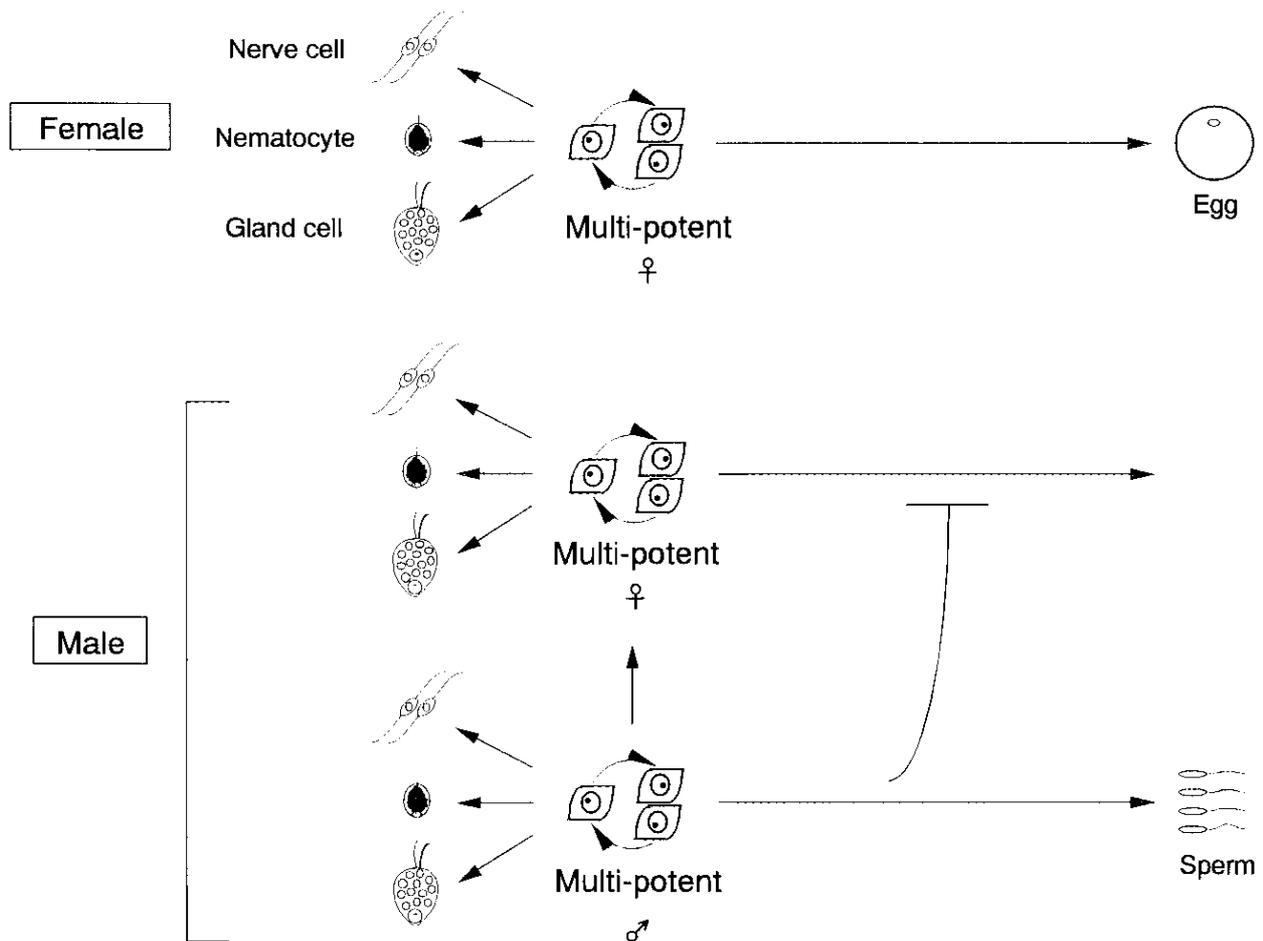


図 I-3 Bosch & David (1986) のヒドラ性決定モデル

ヒドラには雄性和雌性の2種の多能性間幹細胞が存在する。雄性多能性間幹細胞は、自己増殖すると共に3種の体細胞（神経細胞、刺細胞、腺細胞）と精子に分化する。雌性多能性間幹細胞は、自己増殖すると共に3種の体細胞と卵子に分化する。雌個体には雌性多能性間幹細胞のみが存在する。雌性多能性間幹細胞は安定で性転換しにくい。雄個体には雄性多能性間幹細胞と雌性多能性間幹細胞両方が存在する。雌性多能性間幹細胞は、性転換しやすい雄性多能性間幹細胞から生じる。雌性多能性間幹細胞は存在しても雄性多能性間幹細胞の雄性化作用で卵子への分化は抑制され、個体は雄のままである。

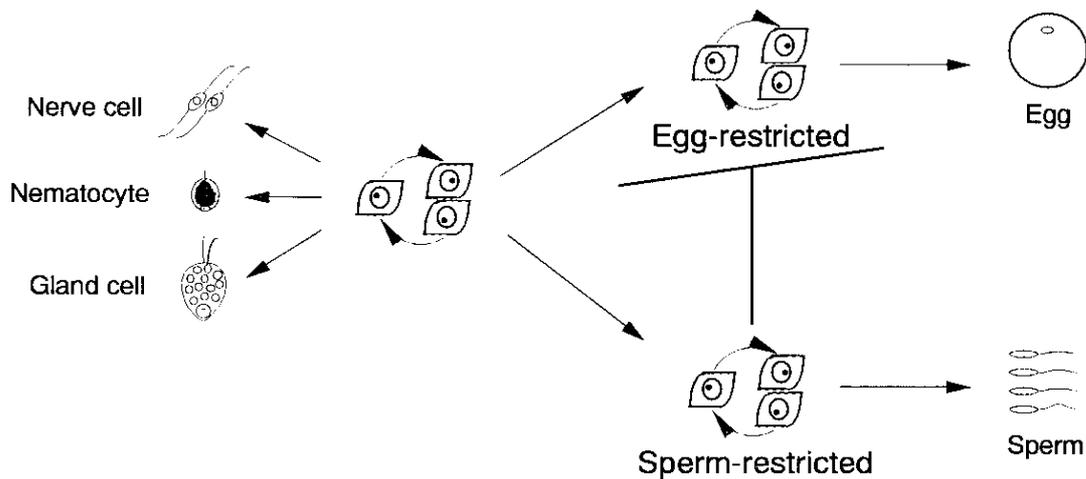


図 I-4 Littlefield (1994) のヒドラ性決定モデル

多能性間幹細胞に性はなく、自己増殖し、3種の体細胞（神経細胞、刺細胞、腺細胞）と共に、精子限定間幹細胞、卵子限定間幹細胞のどちらにも分化し得る。精子限定間幹細胞は多能性間幹細胞からの卵子限定間幹細胞の出現とその後の分化を抑制する。従って、雄個体には多能性間幹細胞と精子限定間幹細胞のみが存在する。雌個体では多能性間幹細胞と卵子限定間幹細胞のみが存在する。雄から雌への性転換は雄個体から何らかの要因（オリガクティスグループでは高温）で精子限定間幹細胞が消失したときに起こる。雌から雄への性転換は系統によって異なることから、その機構については不明であるが、遺伝的な制御の下にあるとしている。

きた。新知見は、部分的に上記 2 モデルで説明可能である。しかし、全体を矛盾なく説明する事は、困難である。

本研究の新知見に基づき、ヒドラ性決定機構の新モデルを提案する。

## II 章 材料と方法

## 1. ヒドラ系統

本研究で用いた系統は、全て日本産チクビヒドラ (*Hydra magnipapillata*) に属する。チクビヒドラは雌雄異体で、Campbell (1987) の分類によるブルガリスグループ (*vulgaris* group) に属する。

本実験に用いた系統は、使用前に全てクローン化した。系統保存用のストックカルチャーから新しい芽体 3 匹を選び、1 匹ずつ異なるビーカーに入れて出芽により増殖させた。芽体をもつ親ヒドラが 20 匹に増えたら、若い芽体を残し、親個体は性の確認のため有性生殖誘導を行った。3 クローンとも同一の性を示したときは、有性生殖率の高いクローンを 1 つ選び、残しておいたヒドラを増やして、以後、全ての実験に用いた。

### i. 温度感受性間細胞を持つ系統 chim-C1

chim-C1 はキメラ系統である。ヒドラは 3 つの独立した細胞系譜 (外胚葉性上皮細胞系譜、内胚葉性上皮細胞系譜、間細胞系譜) からなり、これらを任意の系統から組み合わせてキメラ系統を作成する事が出来る (Sugiyama & Fujisawa, 1978; Wanek and Campbell, 1982)。chim-C1 は両上皮細胞系譜が正常系統 75-23-1 (杉山) に由来し、間細胞系譜は温度感受性間細胞を持つ突然変異系統 sf-1 (Sugiyama & Fujisawa, 1978) に由来するキメラ系統である (杉山、未発表)。chim-C1 ヒドラは 18℃ では正常に成育し、出芽による活発な増殖を行う。しかし、飼育温度を制限温度の 25℃ に上げると、数日の内に間細胞は死滅する。間細胞の分化産物である神経細胞、刺細胞は徐々に失われ、やがては上皮細胞のみからなる「上皮ヒドラ」になる。

本実験では、キメラ作成後、出芽により増殖させ、数年間維持していたものを使用した。

## ii. 高い有性生殖能と安定した性を示す系統

有性生殖能はヒドラの系統により大きく異なる。チクビヒドラは比較的安定な性を示し、性転換は稀とされている。しかし、この性質にも系統による差異が存在する。本実験においては、Sugiyama & Sugimoto (1985) により報告された、高い有性生殖能をもち、かつ安定した性を示す系統を中心に選んで使用した。以下に使用した系統名を示す。

nem-1 (♂) : この系統はもともと B 型刺細胞 (holotrichous isorhiza) に形態異常のある突然変異系統として分離された (Sugiyama & Fujisawa, 1977) 。生まれたときの性は不明である。Sugiyama & Sugimoto (1985) の実験に用いられたときには nem-1 系統は雌であった。本実験に使用し始めた時は雄であった。その後、性転換によって生じた雌個体もクローン化して使用した。

nem-1·f1 (♀) : 本研究中に nem-1 (♂) から自然に性転換して生じた雌のクローン。

nem-1·f2 (♀) : nem-1 (♂) のヒドロキシウレア処理後生じた、自己捕食能のある雌個体。自然性転換個体の nem-1·f1 (♀) が得られる以前に、雌系統として使用した。

SSB (♀) および SSC (♀) : 両系統とも野生系統間の交配で得られた雌系統である (Sugiyama & Sugimoto, 1985) 。

SSE (♂) : 野生系統間の交配で得られた雄系統 (Sugiyama & Sugimoto, 1985) 。

ms-1 (♂) : 運動能力のない精子を形成する雄性不稔突然変異系統 (Sugiyama & Fujisawa, 1977) 。

nB-2 (♂) : nem-1 (♂) × SSC (♀) の F1 交配系統 (藤沢・杉本、未発表) 。本実験に使用し始めた時には雄であった。生まれた時の性は不明。

SSC·m (♂) : SSC (♀) を維持している間に性転換で生じた雄のクローン。

## 2. ヒドラの飼育

ヒドラの飼育と実験は、特記しない限り全て、年間を通じ  $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、12 時間明・12 時間暗に日周調整した恒温室でおこなった。

### i. 標準飼育

標準的には、芽体をもつ親ポリプ約 20 匹を 400ml の飼育水（後述）が入った 500ml 用ビーカーで飼育した。場合によっては、親ポリプ12 匹を 200ml の飼育水がはいった 200ml 用ビーカーで飼育した。ヒドラには毎日エサ（後述）を過剰に与え、3・4 時間後に親個体は新しい飼育水を入れたビーカーに、パスツールピペットを用いて移した。

新たに親から離れた若い個体は、飼育水交換時に集め、実験によりそのまま使用するか（例えば HU 処理等）、または、飼育水 200ml 入りのビーカーに 15 匹ずつ飼い続け、最初の芽体の突起が生じた日にエサを与える前に使用した（例えば足部再生実験）。親ポリプは約 1 カ月ごとに若いポリプを育て、新たに親になったものと取り替えた。

飼育水は Muscatine & Lenhoff (1965) の "M"solution を修正した modified "M"solution (Sugiyama & Fujisawa, 1977) を使用した。その組成は、 $1\text{mM NaCl}$ ,  $1\text{mM CaCl}_2$ ,  $0.1\text{mM KCl}$ ,  $0.1\text{mM MgSO}_4$ ,  $1\text{mM Tris}\cdot\text{Cl}$ , pH7.6 である。

飼育水用試薬は 500 倍濃縮のストック溶液 A、B、C の 3 種類に分けて作成した。A 液は  $0.5\text{M CaCl}_2$ ,  $0.5\text{M NaCl}$ ,  $0.05\text{M KCl}$  で、薬品はこの順番に蒸留水に溶かした。B 液は  $0.5\text{M Tris}\cdot\text{Cl}$ , pH 7.7、C 液は  $50\text{mM MgSO}_4$  である。ストック溶液は使用まで冷蔵保存した。

飼育水作成には、逆浸透装置（ミリポア）を通した高純水（電動度 8.0 - 16.0）を用いた。40 ℓ 用ガラスタンクに高純水を汲み上げ、3 種ストック溶液加えて、約 15 分間攪拌した。

エサとしてはブラインシュリンプの幼生を与えた。ブラインシュリンプの卵（中国産、青島交易）を 29℃、3% 食塩水中で、24 時間通気して孵化させ、孵化直後の幼生をヒドラ飼育液で入念に洗浄して用いた。

## ii. 自力捕食能ないヒドラの飼育

間細胞の除去処理（後述）によって自力捕食能を失ったヒドラは Marcum & Campbell (1978a) の強制給餌法 (forced-feeding) を改良して飼育した。改良法ではヒドラ腔腸内洗浄用と給餌用の 2 種類の器具を用いた。洗浄用器具は外径 3.6mm、給餌用は外径 2.1mm のポリエチレンチューブ (Becton Dickinson) を、ガスバーナーの弱い炎で熱して細く引き延ばし、先端をメスで切り落としたマイクロピペット状細管である。前者には外径 0.3mm の肉厚で張りのある先端を、後者には外径 0.4 - 0.5mm の肉薄の先端を作製した。それぞれを、外径 5mm、長さ 40cm のシリコンチューブの一端に装着し、他端にはマウスピースを取り付けた。

まず、飼育水を吸い込んだ洗浄用マイクロピペットを、自力捕食能を失ったヒドラの口丘から差し込み、腔腸内に飼育水を吹きつけ、水流によって前日の食物のかすを排出させた。次に、給餌用のマイクロピペットに、ビーカーの底に沈んだブラインシュリンプ幼生を飼育水ごと吸い込み、これを洗浄済みヒドラの腔腸内に吹き出し、詰め込んだ。ブラインシュリンプ幼生を軽くすり潰しミンチ状にしたエサを、同様の方法で与えることも試みた。が、ミンチでは数分後に吐き出された。一方、潰さないブラインシュリンプは形態をとどめているので、ヒドラの口に引っかかり、吐き出されにくく都合がよかった。Marcum & Campbell (1978a) のオリジナルの方法では、ブラインシュリンプを 1 匹ずつ与えるが、本改良法では一度に数匹から数十匹のブラインシュリンプを与える事ができ、多数の自力捕食能のないヒドラの飼育が可能になった。

自力捕食能のないヒドラは虚弱で、細菌感染を受けやすい。感染を防ぐため、抗生物質リファンピシン（Gruppo Lepetit）とカナマイシン（明治製薬）（各々 50mg/l）を含む飼育水中で飼育した。リファンピシンは水に溶けにくいので、マグネティックスターラーで 3 時間以上攪拌して溶かした。リファンピシンは、あらかじめ少量のアルコールに溶かしてから飼育水に加える事もできる。しかし経験上、ヒドラの健康によくないのです。勧められない。リファンピシンは 100mg/l 飼育水をストック液とし、暗所に保存して 2 週間以内に使用した。カナマイシンは 1000 倍濃度のストック液を作成し、分注して冷凍保存した。使用に際しては、ストック液と飼育液を混ぜ、1 週間以内に使用した。

### 3. ヒドラの生体染色

ヒドラのエバンスブルー生体染色には、孵化したブラインシュリンプ幼生を 0.05% エバンスブルー（Merck）を含む 3% 食塩水中で 8℃、24 時間通気飼育し、これをヒドラ飼育水で洗浄後、エサとして与えた（Sugiyama & Fujisawa, 1978）。ブラインシュリンプは通気飼育中にエバンスブルーを消化管内に取り込む。このブラインシュリンプを約 1 週間与え続けると、ヒドラの内胚葉が青色に生体染色され、通常のエサに戻しても染色は約 1 週間持続する。

### 4. 間細胞の除去

間細胞の除去には、新たに親から離れた若いポリプを使用した。

温度感受性間細胞をもつ chim-C1 系統のヒドラから間細胞を除去するには、高温処理を行った。高温処理はポリプを通常飼育温度 18℃ から、制限温度 25℃ に維持してある飼育水に移すことによって行った。処理時間は 4 日から 8 日間である。処理後ヒドラは 18℃ の飼育水に戻した。

nem-1 (♂) 系統の間細胞を除去するためには、ヒドロキシウレア (HU, Sigma) 処理 (Bode et al., 1976; Littlefield, 1985b) を行った。精子限定間幹細胞のクローニング実験には、ポリプを 5mM HU を含む飼育水で 2 日から 4 日間飼育した。卵子限定間幹細胞のクローニング実験には、2.5mM HU を含む飼育水で 2 日から 3 日間飼育した。

高温、HU いずれの処理においても、エサは通常通り毎日 1 回過剰に与え、3 - 4 時間後にポリプを各条件下の新しい飼育水に移した。ヒドらは処理期間中にも成長し、出芽を始める。この新しく生じた芽体は処理期間中、処理後いずれも捨て、はじめの個体のみを残した。

## 5. ブロモデオキシウリジン (BrdU) によるヒドラ細胞の標識

正常ヒドラの標識には、親から離れたばかりの若いポリプを、偽上皮ヒドラ (後述) の標識には、最初の芽体突起を持つポリプを用いた。6 匹のポリプを 7ml の 5mM BrdU (Aldrich) を含む抗生物質入り飼育水に入れ、暗所で 3 日間飼育した。エサは毎日 1 回普通に与え、2 - 3 時間後に BrdU 入りの飼育水も毎日新しいものと交換した。3 日後、ポリエチレンマイクロビペット (自力捕食能のないヒドラの飼育の項参照) を用い、標識したヒドラの腔腸内を抗生物質を含む飼育水で 30 分おきに 3 回洗浄した。その後、1 時間から 6 時間以内に移植実験に使用した。

## 6. 組織移植

一時的組織移植による雄性化実験 (パラビオーシス) と、BrdU 標識組織の移植実験は、Sugiyama & Fujisawa (1978) の移植法 (axial grafting) を用いて行った。

宿主ヒドラの体幹の一部を体軸に対し垂直に切って捨て、その部分に相当する組織を供与体ヒドラの体から切り出し、移植した。この様に、除去した宿主組織片と同じ位置の供

与組織片を移植すると、移植後に異常な形態形成が起こらない。ヒドラの体は中空のカラム状なので、宿主と供与体の組織を、基部-先端部の方向が元通りの正しい順序になるようナイロンの釣り糸を通した。その両側にパラフィルム（American Can Co.）の小片を通し、ヒドラ組織を軽く押さえ、固定した。この状態で4-6時間放置し、傷口どうしが完全に癒着した後、パラフィルムを除き、釣り糸を静かに抜き取った。釣り糸は移植するヒドラの大きさに応じ、5号から8号（直径0.37-0.50mm）を使用した。

## 7. 足部組織の再生

足部組織の再生実験には、最初の芽体を形成し始めた若いポリプを用いた。芽体位置から足盤までの距離の足盤側から2/5に相当する位置で、体軸に対し垂直に切断し、足部組織を分離した。この足部組織は小さく、そのまま放置した場合は、再生しない場合が多かった。そこで切断3日後から強制給餌を行った。エサのブラインシュリンプの幼生を半分から1/5に切り、その断片をピンセットの先端に突き刺し、足部組織の再生先端部分に押しつけた。そして先端組織が自然にエサを包み込むのを待ち、静かにピンセットを抜き取った。この方法で数回から十数回エサを与えると、組織は徐々に大きくなった。これらの足組織の一部は頭部再生を行い、また一部は頭部再生をしないまま出芽した。この再生体または芽体のほとんど総ては、捕食能を持っていた。これらの個体は、約10mlの飼育水を入れた直径5cmのプラスチックシャーレに1匹ずつ入れた。そして毎日1回エサを与え、飼育水を替え、数匹のクローンになるまで育てた。

## 8. 有性生殖の誘導

自力捕食能のある正常ヒドラの有性生殖誘導は、Sugiyama & Fujisawa (1977)の方法を用いて行った。この方法では、飼育水に緩やかに通気し、エサを減量し、飼育水の交換

も頻繁には行わず、やや汚れた状態でヒドラにストレスを与えつつ飼育を行う。特に最初の1週間は、給餌と飼育水交換を全く行わない。その後、ヒドラの体色と水の濁り具合を見ながら、必要に応じ飼育水を替え、ヒドラ1匹あたり3-5匹程度のブラインシュリンプ幼生を与える。

必要な有性生殖の誘導期間は、系統により差が有る。通常1週間から30日位の処理が必要であった。ただし、nem-1系統に限っては、通気無しに、減食のみで誘導可能であった。

自力捕食能のないヒドラの有性生殖の誘導は次のように行った。

chim-C1系統の捕食能のないヒドラは、抗生物質を含まない通常の飼育水に移し、通気を行った。抗生物質を含む飼育水で通気を行うと、泡が発生し、泡にヒドラが絡み取られて死ぬからである。エサは1日おきに与え、腔腸内の洗浄と飼育水交換は毎日行った。この処理を2-3週間続けると、有性生殖をする個体が多かった。有性生殖しない個体は、その後2-3週間強制給餌に切り換え、抗生物質入りの飼育水で毎日給餌して育てた。その後再び、有性生殖誘導の処理を行った。

nem-1系統の捕食能の無いヒドラの有性生殖誘導には、減食方法を用いた。エサを全く与えないか、または少量を2日おきに与え、抗生物質入りの飼育水を毎日交換し、腔腸内の洗浄を2日おきに行った。この処理を7-10日続けると、一部の個体は有性生殖を行った。行なわない個体は、毎日強制給餌の通常飼育に切り換え、2-3週間後に、再度、減食処理を行った。

## 9. 組織化学および免疫組織化学

### i. マセレーション

ヒドラ組織を構成する細胞種の定量的測定は、マセレーション法 (David, 1973) を用

いて行った。触手を切り除いたヒドラをピンセットで直径 1cm のプラスチックのサンプルカップ（サンプルテック）に入れ、ヒドラ 1 匹当たり約 40 $\mu$ l の細胞解離液（マセレーション液、酢酸：グリセリン：水=1：1：13）を加え、約 20 分間放置した。次に、サンプルカップをゴムキャップでたたいて振盪し、組織を単細胞に解離し、細胞解離液と同量の 9% ホルマリンを加え固定した。このうち 50 $\mu$ l をゼラチンコートしたスライドガラス上に 1 $\mu$ l の 1% tween 20（Sigma）と共に均一に広げ、一晚自然乾燥するか、60℃ のスライド乾燥器（Fisher Scientific）で 1 時間乾燥させた。50% グリセリン溶液で封入し、位相差顕微鏡（ $\times$ 400、Nikon）を用い、各細胞種の数セルカウンター（Clay Adams）を用いて計測した。細胞種の同定は、David (1973) の分類に従って行った。

スライドガラスのゼラチンコーティングは次のように行った。スライドガラスを洗浄機で洗浄し、乾燥させた。これを更に 99.5% エタノール中で脱脂し、風乾した。このスライドガラスを加熱溶解後冷却した 0.5% ゼラチン（Merck）、0.05% クロム硫酸カリウム溶液に浸漬し、乾燥した。

## ii. 間細胞の染色

間細胞系譜の細胞をホルマウントで検出するために、以下の 2 種の染色法を用いた。

### ii-1. トルイジンブルー染色

おもに chim-C1 系統の染色に本法を用いた。トルイジンブルー (TB) 染色は、はじめ Diehl & Burnett (1964) により報告され、後に Littlefield (1985b) によって改良された方法を用いた。

まず、ヒドラを 2% ウレタン（Sigma）を含む飼育水中で 1 分間麻酔した。このヒドラ

をパスツールベットを用いて静かに 100% エタノールに移し入れ、1 分間固定後、更に 70% エタノールで 5 分間固定した。固定ヒドラを蒸留水で 3 回洗い、1 匹当たり 1ml の TB 溶液で 1 - 2 分間染色した。染色停止は 10 倍量の蒸留水を加えて行い、続いて蒸留水で 3 回（各 1 分間）洗浄を行った。70% エタノール中で過剰の色素を洗い落とした後、95、99.5、100% のエタノールに順次移して脱水した。100% エタノール、キシレンの混合液、キシレンにくぐらせてから、Bioleit（応研商事）に封入した。

TB 染色により、大型間細胞、小型間細胞、刺細胞前駆体、成熟刺細胞内の刺胞が濃青色に染まる。

TB 溶液は 0.05% TB (Schmid GMBH) /10mM Tris·Cl (pH8.0) である。0.1M Tris·Cl (pH8.0) をストック緩衝液とし、TB は粉末のまま、最終濃度に希釈した Tris 緩衝液に溶かした。これを 1 号濾紙 (Whatman) で濾過し、冷暗所に保存し、1 週間以内に使用した。

100% エタノールとしては、広口瓶に 99.5% エタノール 1l と 150g のモレキュラーシーブス (Molecular Sieves 3A 1/16, 和光) を加えて振盪し、一晚以上おいて澄んだものを使用した。モレキュラーシーブスは初めて使用する時、倍量の 95.5% エタノールで数回洗浄した。こうしておけばエタノールが着色することはない。1 度使用したモレキュラーシーブスは、風乾後、電子レンジで乾燥すれば繰り返し使用できる。

## ii - 2. モノクローナル抗体 C41 を用いた間接蛍光抗体染色

nem-1 系統の間細胞染色には主としてこの方法を用いた。モノクローナル抗体 (mab) C41 (David et al., 1991) はミュンヘン大学の Bosch 博士と David 教授の厚意により分与されたものである。染色法は David et al. (1991) の方法を用いた。

氷冷した 2% ウレタンを含む飼育水中で、ヒドラを 2 分間麻酔した。ウレタン液を除

き、氷冷した Lavdowsky 固定液（エタノール：ホルマリン：酢酸：蒸留水 = 50：10：4：40）を加えてよくなじませた後、氷上で一晩固定した。Lavdowsky 固定液の様に穏やかな固定液を使用するときには、麻醉液及び固定液を氷冷しておく、ヒドラがよく伸展した状態で固定できる。その後の操作は、室温でローテーター（タイテク）上で振盪しながら行った。PBS（150mM NaCl, 10mM リン酸緩衝液, pH7.2）で 15 分間 2 回洗浄し、更に 0.25% Triton を含む PBS で 15 分間 2 回洗浄した。次いで、1% BSA（Fluka）、0.1% アジ化ナトリウム（NaN<sub>3</sub>）を含む PBS 中で 15 分間ブロッキング処理した。60 - 100  $\mu$ l の mab C41（原液）を加え 2 時間インキュベートした後、PBS で 15 分間 2 回洗浄した。0.25% BSA, 0.1% NaN<sub>3</sub> を含む PBS で 50 倍希釈した FITC 標識化ヤギ抗マウス Ig 抗体（Tago）溶液 60 - 100  $\mu$ l で、室温で 1 時間インキュベートするか、氷上で一晩インキュベートした。PBS で 30 分間 2 回洗浄し、緩衝グリセリン溶液（グリセリン：PBS = 3：1）に封入した。

抗体のインキュベーションには 96 穴の細胞培養皿（Falcon）を使用し、固定、洗浄には 24 穴の細胞培養皿（Falcon）を用いた。

mab C41 によって大型間細胞、小型間細胞、分化初期の刺細胞前駆体が認識される。

### iii. BrdU 標識した細胞の検出

抗 BrdU 抗体とアルカリ性フォスファターゼ (AP) を用いた酵素抗体法による染色を行った。

ヒドラを氷冷した 2% ウレタンを含む飼育水中で 2 分間麻醉し、氷冷した 70% エタノールにヒドラを移し、10 分間固定した。以下、室温に移し、ローテーター上で操作した。PBS で 15 分間 2 回洗浄後、新しい PBS に入れたヒドラを 80°C で 30 分間加熱し、内在性の AP を失活させた。氷上で室温に冷却後、3N HCl で 30 分間処理し、DNA を変

性させた。PBSで15分間3回洗浄し、0.25% Triton を含む PBS で15分間洗浄した。マレイン酸緩衝液（100mM マレイン酸・Na, pH7.5, 150mM NaCl）で5分間なじませた後、ブロッキング溶液（1% カゼイン（Boehringer-Mannheim）を含むマレイン酸緩衝液）で30分間インキュベートした。その後、間にマレイン酸緩衝液での15分間2回の洗浄をはさみながら、マウス抗 BrdU 抗体（Becton-Dickinson）、ビオチン標識化ウサギ抗マウス Ig 抗体（Amersham）、AP 標識化ストレプトアビジン（Vector）を各々ブロッキング溶液で50倍に希釈したもので次々にインキュベートした。マレイン酸緩衝液で2回の洗浄後、AP 緩衝液（100mM Tris・Cl, pH9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>）になじませた。この間に、10ml の AP 緩衝液に対し、45 $\mu$ l の NBT（Boehringer-Mannheim）溶液（75mg を 1ml の 70% ジメチルフォルムアミドに溶解）と 35 $\mu$ l の X-phosphate（Boehringer-Mannheim）溶液（50mg を 1ml の100% ジメチルフォルムアミドに溶解）を加え、AP 基質溶液を作成した。AP 基質溶液中で5・10分間インキュベートし、発色させた。実体顕微鏡下で発色具合を確かめ、ヒドラを反応停止液（10mM Tris・Cl, pH8.0, 1mM EDTA）に移し、染色を終了した。10分後に新しい反応停止液に移し替えた後、緩衝グリセリン溶液に封入した。

## 10. 光学顕微鏡観察と写真撮影

ヒドラのホールマウント染色及びマセレーション試料はいずれもニコン Microphoto-FX 顕微鏡で観察した。マセレーション試料には位相差コンデンサーと対物レンズ Plan 40 BMを使用した。ホールマウントの TB 染色及び AP 染色の試料には色温度調整（NBC）フィルターを用い、対物レンズには Plan 4、Plan 10、Plan Apo 20、Plan Apo 40を使用した。ホールマウントの FITC 蛍光染色試料には B2 フィルターブロックを用い、対物レンズには Plan 4、Plan 10、Plan Apo 20、Plan Apo 40 を使用した。

白黒の明視野顕微鏡写真は、グリーンフィルターを用い、Kodak T-Max100 フィルムを使用して撮影した。白黒の蛍光顕微鏡写真は、Kodak T-Max 100 または T-Max 400 フィルムを使用して撮影した。現像にはいずれも水で 2 倍希釈した Kodak D76 現像液を用いた。

明視野カラーネガ写真には、NCB フィルターを用い、フジ Super G フィルムを使用して撮影し、現像、焼き付けは写真屋に発注した。

生きたヒドラ全身の撮影にはマクロレンズを用い、ベローズを装着したカメラ（ニコン）で行った。照明は斜め下からのフラッシュライトを用い、フィルムは Kodak T-Max 100 を使用し、上述の白黒フィルム同様、現像処理を行った。

### Ⅲ章 精子限定間幹細胞のクローニング

ヒドラの間幹細胞 (interstitial stem cells) は、大別して生殖間幹細胞 (germ restricted interstitial stem cells) と多能性間幹細胞 (multi-potent interstitial stem cells) の 2 種類に分類できる。前者には、精子限定間幹細胞 (sperm-restricted interstitial stem cells) と、卵子限定間幹細胞 (egg-restricted interstitial stem cells) が含まれる。これらは各々、分化範囲が精子、卵子のみに限定され、3 種体細胞、即ち、神経細胞、刺細胞 (刺を発射し、捕食、防御に使われる細胞)、腺細胞には分化しない。後者は、上記の 3 種体細胞と生殖細胞の両方に分化する能力を持つ。

上皮ヒドラ (epithelial hydra) は、その組織に間幹細胞を全く含まないヒドラである。偽上皮ヒドラ (pseudo-epithelial hydra) は、その組織に生殖間幹細胞を含むが、多能性間幹細胞は含まないヒドラである。

生殖間幹細胞は、オリガクティス種ヒドラ (*oligactis* group) に存在するが、チクビヒドラ (*vulgaris* group) には存在しないと報告されていた (Littlefield, 1985; Bosch & David, 1987)。私は本研究において、日本産チクビヒドラ 2 系統から精子限定間幹細胞を持つ偽上皮ヒドラの分離に成功し、チクビヒドラにも生殖間幹細胞が存在することを明らかにした。

## 1. 間幹細胞クローニング法の原理

チクビヒドラ 2 系統につき、異なった 2 方法を用い、間幹細胞クローニングを行った。2 方法は類似の原理に基づく。その原理を以下簡単に述べる。どちら方法によっても、精子限定間幹細胞を分離する事ができた。

### i. 温度感受性間幹細胞を持つ chim-C1 系統の制限温度処理によるクローニング

本方法は、今回開発した方法である。chim-C1 系統は温度感受性間幹細胞をもつ。この

ヒドラは 18℃ では正常に成育し、出芽によって増殖する。しかし、飼育温度を制限温度の 25℃ に上げると、間幹細胞は選択的に死に、その数は急激に減少する。処理期間が長すぎると、間幹細胞は全て死滅し、上皮組織のみが残った「上皮ヒドラ」になる (Sugiyama & Fujisawa, 1978; Terada et al., 1988)。処理期間が短すぎると、多数の間幹細胞が生き残る。処理時間をうまく調節すると、大部分の間幹細胞は除去され、ごく少数 (理想的には 1 個) の間幹細胞だけが残る個体を作り出す事ができる。この残った間幹細胞を増殖させクローニングを行った。

## ii. *nem-1* (♂) 系統のヒドロキシウレア処理によるクローニング

ヒドロキシウレア (HU) 法は、Littlefield (1986) によって既にオリガクティス種ヒドラでの間幹細胞クローニングに用いられた方法である。HU は S 期の細胞を選択的に殺す (Sinclair, 1965)。処理時間が長いと、全細胞が死ぬ。処理時間をやや短くすると、急速に分裂する間細胞は全て死ぬ。しかし、比較的ゆっくり分裂する上皮細胞はあまり影響を受けずに生き残る (上皮ヒドラ)。更に短い処理では、両細胞種が生き残る。*chim-C1* 系統での制限温度処理と同様に、処理時間をうまく調節すると、健康な上皮組織にごく少数 (理想的には 1 個) の間幹細胞を残す事が出来る。残った細胞を増殖させ、クローニングを行った。

## 2. 実験結果

### i. 制限温度処理による *chim-C1* 系統の偽上皮ヒドラの作成

*chim-C1* 系統のヒドラ約 50 匹を 1 グループとし、各グループごとに、4 日から 8 日間の制限温度 (25℃) 処理を行った (材料と方法参照)。処理後直ちにヒドラを標準飼育温度 (18℃) の飼育水に移し、その後、毎日 1 回エサを与え、飼育水交換を行う通常飼

育を続けた。処理個体から出芽して生じた若い個体は飼育水交換時に捨て、処理したもとの親個体のみを維持した。処理後の実験操作は、図Ⅲ-1 A にまとめて示した。処理個体の捕食能力は、はじめ正常であったが徐々に低下した。これは間幹細胞が減少し、その分化産物である神経細胞、刺細胞も減少したためである。捕食能を失った個体は、毎日 1 回手作業による強制給餌を行った（材料と方法参照）。

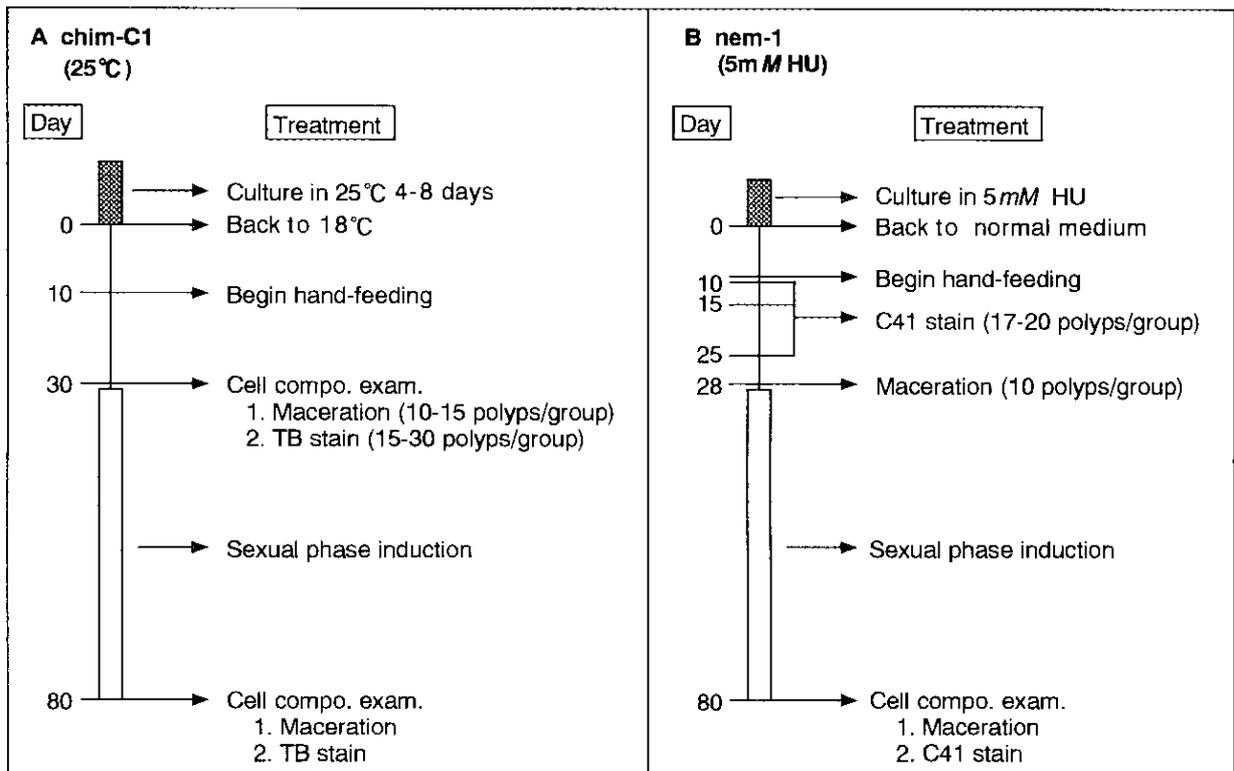
処理 30 日後に、各グループから処理個体の一部約 10 匹を無作為抽出し、各個体ごとにマセレーション法で細胞組成を調べた（材料と方法参照）。その結果、処理個体は、その細胞組成によって 3 タイプに分ける事ができた。表Ⅲ-1 に 3 タイプ各々の代表的個体の細胞組成を示す。

第 1 は不完全除去 (incomplete removal) タイプである。このタイプは多能性間幹細胞が除去されていない。そのため、神経細胞と刺細胞が残っている。このタイプには既に捕食能を回復していたものがあつた。また、この時捕食能を回復していなくても、飼育を続ければやがて回復したと考えられる。

第 2 は偽上皮ヒドラである。このタイプの組織には大型間細胞 (large interstitial cells) が残っている。しかし、小型間細胞 (small interstitial cells) や神経細胞、刺細胞前駆体、刺細胞は含まれていない。この細胞組成は、多能性間幹細胞が失われ、生殖間幹細胞が残っている事を示唆する（精子への分化能と自己増殖能については後述）。

第 3 は上皮ヒドラである。このタイプのヒドラには、大型間細胞、小型間細胞、神経細胞、刺細胞前駆体、刺細胞は、いずれも全く存在しなかった。

マセレーション検査と平行し、各グループから無作為に 15・30 匹を選び、トルイジンブルー (TB) 染色を行った（材料と方法参照）。この染色によっても、マセレーション検査の結果と同じ 3 タイプの個体が確認できた。染色結果を図Ⅲ-2 の A - D に示す。図Ⅲ-2 A はコントロールの未処理 chim-C1 の組織を示す。多数の間細胞系譜の細胞が染まっ



図Ⅲ-1 精子限定間幹細胞のクローニング方法

A. 温度感受性間細胞を持つ chim-C1 系統を用いた高温処理法。 B. nem-1 系統を用いた 5mM ヒドロキシウレア (HU) 処理法。詳細は本文参照。

表Ⅲ-1 制限温度処理 (chim-C1系統) とヒドロキシウレア処理 (nem-1系統) で生じた

典型的な 3 タイプヒドラの細胞組成

Strain	Polyp type	Total No. of cells counted	No. of cells present (ratio to epithelial cells)						
			Epithelial	Large interstitial	Small interstitial	Nemato-blasts	Nemato-cytes	Nerve	Gland
chim-C1	Control (no treatment)	4911	1972	409 (0.21)	468 (0.24)	1446 (0.73)	299 (0.15)	98 (0.05)	219 (0.11)
	Incomplete removal	2533	2010	103 (0.05)	98 (0.05)	192 (0.10)	83 (0.04)	13 (0.006)	34 (0.02)
	Pseudo-epithelial	2888	2802	43 (0.02)	0	0	0	0	43 (0.02)
	Epithelial	2813	2744	0	0	0	0	0	69 (0.03)
nem-1	Control (no treatment)	3959	1397	498 (0.36)	1204 (0.86)	541 (0.39)	61 (0.04)	68 (0.05)	190 (0.14)
	Incomplete removal	2007	1355	254 (0.20)	207 (0.15)	104 (0.08)	1 (0.001)	31 (0.02)	55 (0.40)
	Pseudo-epithelial	4464	3482	887 (0.26)	55 <sup>a</sup> (0.02)	0	1 (0.0003)	0	39 (0.01)
	Epithelial	4945	4874	0	0	0	0	1 (0.0002)	70 (0.01)

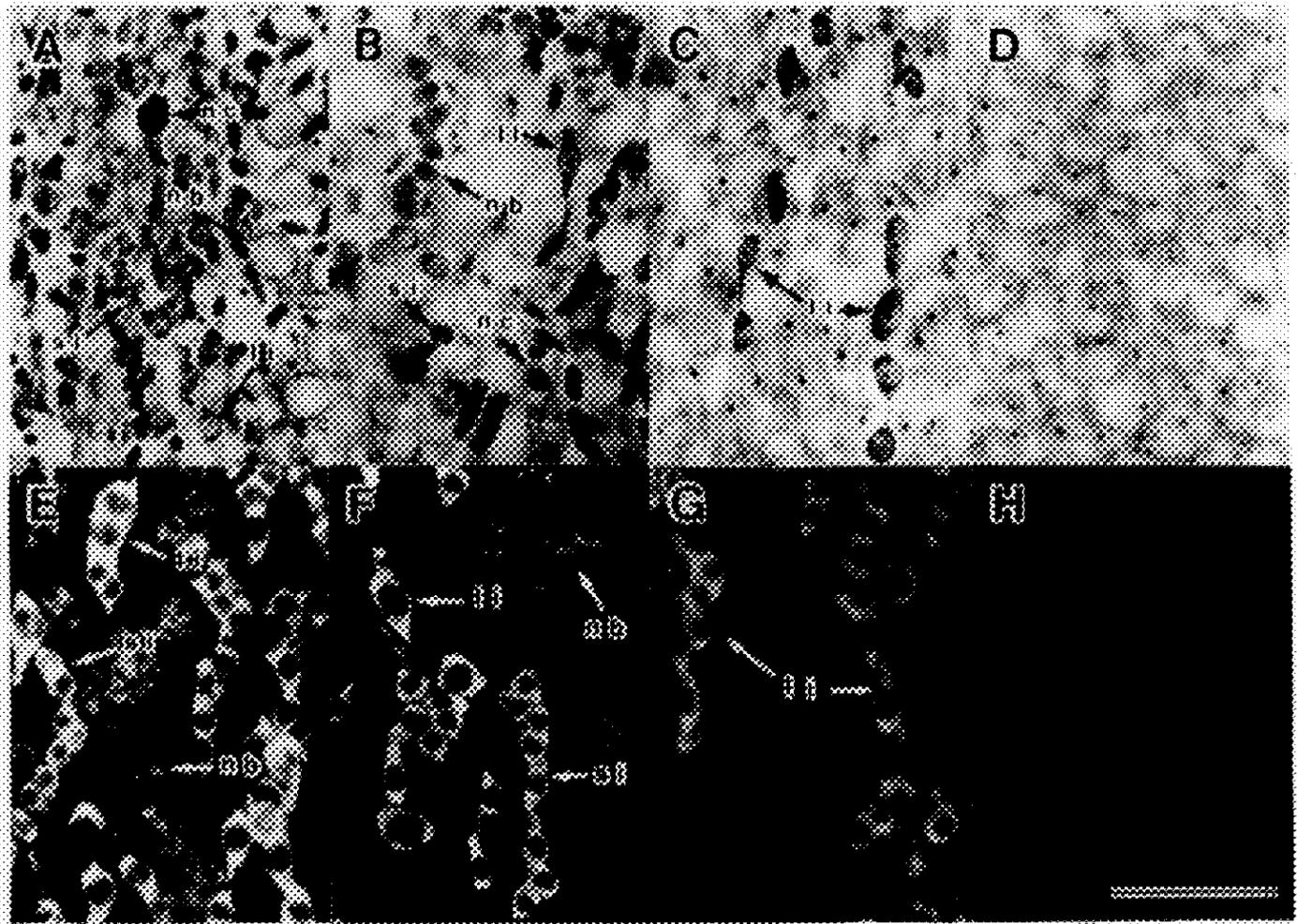
chim-C1 ヒドラは 25℃ の制限温度で、nem-1 ヒドラは 5mM HU で処理した (材料と方法参照)。

- a. nem-1 の偽上皮ヒドラにおいて小型間細胞が存在したが、刺細胞前駆体が存在しないので、これらは精子分化途上の細胞と考えられる。

図Ⅲ-2 制限温度処理法および HU 処理法で得られた各タイプのヒドラの組織染色像

A-D. chim-C1 系統。chim-C1 ヒドラを 25℃ で 5 日間処理し、30 日後にトルイジンブルー (TB) 染色した組織。この方法では、神経細胞を除いた間細胞系譜の細胞が染色される。E-H. nem-1 系統。nem-1 ヒドラを 5mM HU で 2 日間処理し、25 日後に間細胞を認識するモノクローナル抗体 C41 を用い、間接蛍光抗体染色をした組織。

A, E. コントロールの未処理ヒドラ。多数の間細胞系譜の細胞が認められる。B, F. 不完全除去ヒドラ。少数ながらコントロールと同種類の間細胞系譜の細胞が存在する。C, G. 偽上皮ヒドラ。大型間細胞のみが認められる。D, H. 上皮ヒドラ。間細胞系譜の細胞が全く存在しない。li: 大型間細胞、si: 小型間細胞、nb: 刺細胞前駆体、nc: 刺細胞。スケールは 50  $\mu$ m。



ている。図Ⅲ-2のB-Dは、処理で生じた3タイプの組織を示す。図Ⅲ-2Bは「不完全除去」タイプである。数は少ないが、図Ⅲ-2Aと同様の間細胞系譜の細胞が認められる。図Ⅲ-2Cは偽上皮ヒドラである。この組織には大型間細胞のみが存在する。図Ⅲ-2Dは上皮ヒドラである。この組織には間細胞系譜の細胞は、全く存在しない。

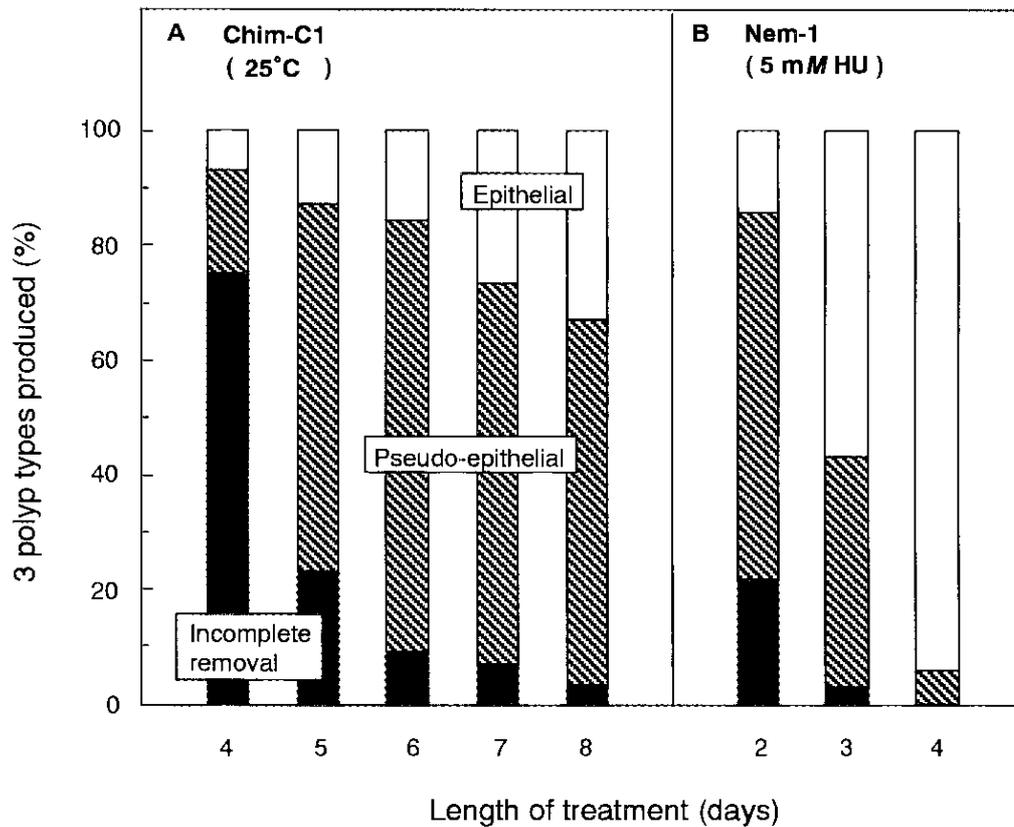
マセレーション検査とTB染色検査を統合した定量的結果を、図Ⅲ-3Aに示す。処理時間を長くすると不完全除去個体が減少し、上皮ヒドラが増加した。偽上皮ヒドラの相対数は、5日から8日間処理で60%以上と多数であった。

#### ii. ヒドロキシウレア処理による *nem-1* (♂) 系統の偽上皮ヒドラの作成

*nem-1* (♂) 系統ヒドラ 40-50匹を1グループとし、各グループごとに5mM HUで2日から4日間処理した(材料と方法参照)。処理個体は、温度処理した *chim-C1* と同様の方法で維持した。処理後の実験操作は、図Ⅲ-1Bにまとめて示す。間細胞検出のための組織染色は、TB染色の代わりに、モノクローナル抗体(mab) C41を用いた間接蛍光抗体染色を行った。処理後10日から25日にかけて3回に分けて行い、各グループごとに合計約20匹を染色した。マセレーション検査は、HU処理4週間後に1グループ当たり10個体につき、個体別に行った。

*nem-1* (♂) 系統のHU処理においても、不完全除去、偽上皮ヒドラ、上皮ヒドラの3タイプが生じた。表Ⅲ-1にマセレーションで確認された3タイプの細胞組成の例を示す。また mab C41 を用いた間接蛍光抗体染色で確認された3タイプの組織の例を、図Ⅲ-2のF-Hに示す。図Ⅲ-2EはHU未処理のコントロール組織である。

検査方法や処理後の日数の違いにより、3タイプのヒドラの割合が変わる事はなかった。マセレーションと染色検査を統合した定量的結果を、図Ⅲ-3B示す。処理期間が長くなると不完全除去が減り、上皮ヒドラが増えた。偽上皮ヒドラは2日、または3日処



図Ⅲ・3 制限温度処理およびHU処理で生じた3タイプのヒドラの出現頻度

A. chim-C1 系統を制限温度 (25°C) で 4 - 8 日間処理。 B. nem-1 系統を 5mM HU で 2 - 4 日間処理。横軸は処理日数、縦軸は処理で生じた不完全除去個体 (黒)、偽上皮ヒドラ (斜線)、上皮ヒドラ (白) の出現頻度 (%) を表す。 chim-C1 系統では TB 染色とマセレーション検査、nem-1 系統は mab C41 による間接蛍光抗体染色とマセレーション検査の結果をまとめてある。検体数は nem-1 の 4 日処理が 17 個体であるのを除いて、他は全て 28 個体以上である。

理に多かった。

### iii. 偽上皮ヒドラの形態

図Ⅲ-3 に示した結果に基づき、偽上皮ヒドラの比率が高い chim-C1 の 25℃, 5・7 日処理、nem-1 (♂) の 5mM HU, 2・3 日処理のグループを残し、他は捨てた。残したヒドラは、強制給餌を行い、処理後 80 日間維持した。図Ⅲ-5 に、維持した偽上皮ヒドラ、及び上皮ヒドラの写真を示す。偽上皮ヒドラと上皮ヒドラは、外見からは区別できない。そこで写真撮影したヒドラは、撮影後、個別にマセレーションまたは組織染色し、組織内に大型間細胞が存在するか否かを調べ、偽上皮ヒドラか上皮ヒドラかの判別を行った。

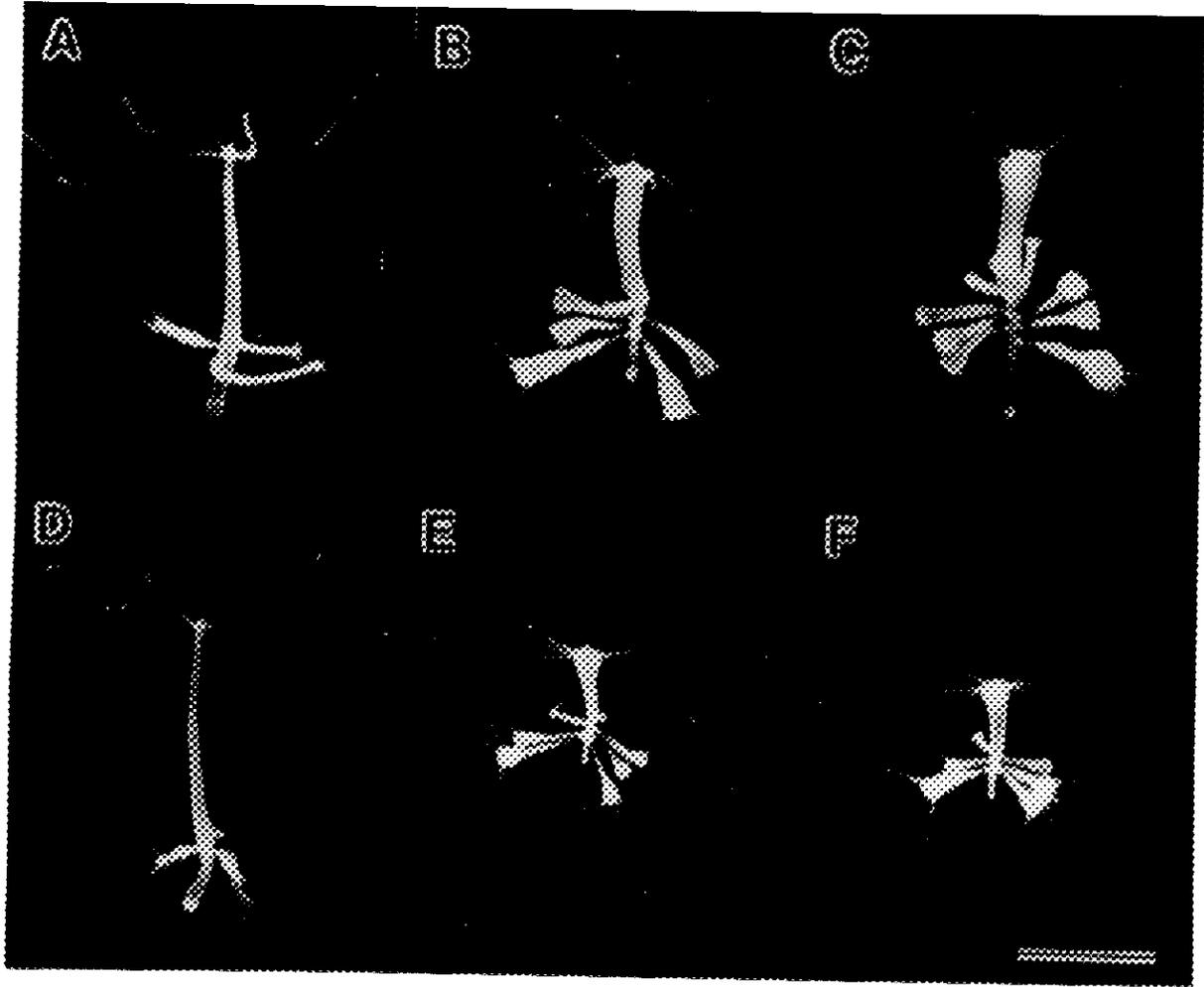
chim-C1 と nem-1 (♂) のどちらの系統においても、偽上皮ヒドラ (図Ⅲ-5 B、E) と上皮ヒドラ (図Ⅲ-5 C、F) は、コントロールの正常ヒドラ (図Ⅲ-5 A、D) と比べると、ふくらんだ体、大きな口丘 (hypostome)、細い触手 (tentacles)、多数の芽体を持つ。また、両者ともに神経細胞がないため能動的に動く事はない。

### iv. 偽上皮ヒドラの有性生殖分化

偽上皮ヒドラには、神経細胞と刺細胞は存在しない。従って、偽上皮ヒドラに存在する大型間細胞は、体細胞 (神経細胞、刺細胞) には分化しない。これらの間細胞の生殖細胞への分化能について調べるために、残したグループの個体につき、処理後 30 日から 80 日まで 50 日間、有性生殖の誘導を行った (材料と方法参照)。図Ⅲ-4 で示した通り、偽上皮ヒドラと上皮ヒドラは外見上区別できない。従って、有性生殖の誘導は、両者を合わせた自力捕食能の無い個体全てについて行った。途中、自力捕食能を回復した個体は捨てた。その結果、chim-C1 および nem-1 両系統の自力捕食能の無い個体において、精巢を形成するものが現れた。図Ⅲ-5 に、chim-C1 系統の正常ヒドラ (図Ⅲ-5 A) と偽

#### 図Ⅲ-4 正常ヒドラ、偽上皮ヒドラ、及び上皮ヒドラの形態

偽上皮ヒドラと上皮ヒドラは外見上区別がつかない。掲載したヒドラは、写真撮影後、固定して TB 染色するか、または mab C41を用いた間接蛍光抗体染色を行って、間細胞の存否を調べ、ヒドラのタイプを判定した。A. chim-C1 系統のコントロール正常ヒドラ。B. chim-C1 系統の偽上皮ヒドラ。C. chim-C1 系統の上皮ヒドラ。D. nem-1 系統のコントロール正常ヒドラ。E. nem-1 系統の偽上皮ヒドラ。F. nem-1 系統の上皮ヒドラ。スケールは 5mm。



上皮ヒドラ（図Ⅲ-5B）、*nem-1* 系統の正常ヒドラ（図Ⅲ-5C）と偽上皮ヒドラ（図Ⅲ-5D）を示す。いずれも、ニップル型の精巢を形成している。Sugiyama & Sugimoto（1985）の方法により低倍率の光学顕微鏡を用いて精巢の観察を行った。偽上皮ヒドラの精巢内においても、正常ヒドラの精巢と同様、多数の精子が活発に動いている様子が観察できた。

表Ⅲ-2に、自力捕食能の無い *chim-C1* 及び *nem-1* の処理個体について行った、有性生殖分化誘導の結果を示す。25℃で5-7日間処理した *chim-C1* では、精子形成率はどれも中程度（17-29%）であった。一方、2日間のHU処理で生じた *nem-1* 系統の自力捕食能の無い個体では13個体全てが精子形成を行った。これらの個体のうちには、特別の誘導を行わなくても、偶発的に有性生殖するものがあった。この現象は、正常 *nem-1* についてもしばしば観察される。

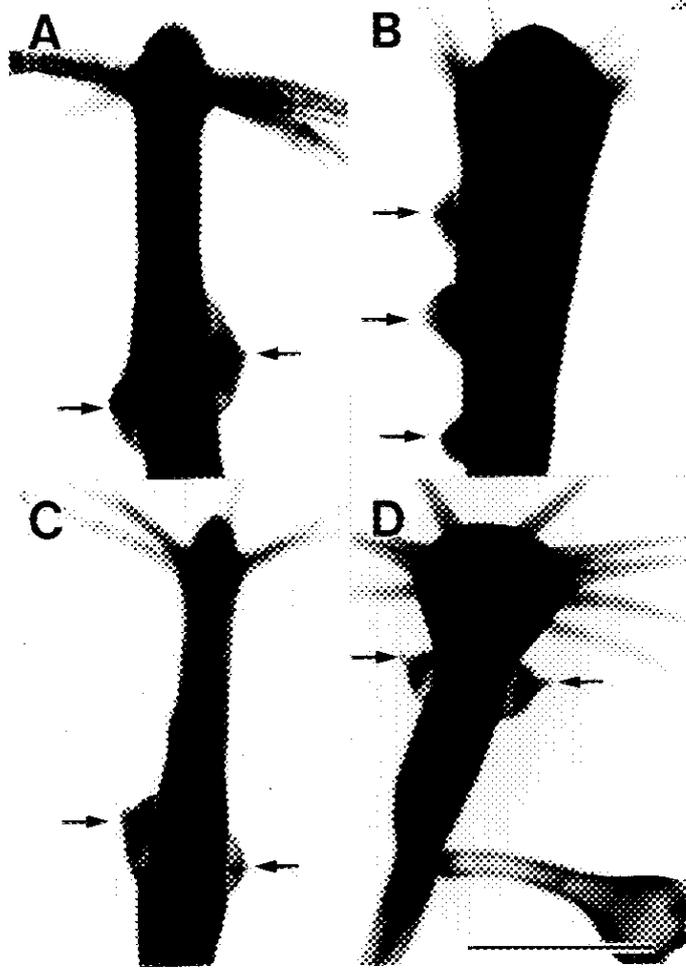
しかし、3日間のHU処理で生じた *nem-1* の自力捕食能の無い個体では、精子形成を行うものは皆無で、有性生殖誘導期間中に衰弱し、死ぬものが多数あった。その原因のひとつとして、HU処理が長すぎたため、上皮細胞に分裂停止 (mitotic arrest) が起こった可能性が考えられる (T. Holstein、私信)。

同様の実験を、両系統について数回繰り返し行い、いずれも同様の結果を得た。即ち、常にある範囲内の頻度で偽上皮ヒドラが得られ、そのうちのいくつかは精子形成を行った。

50日間の有性生殖誘導の後、*chim-C1* 由来の自力捕食能の無い個体の大部分（45クローン）について、TB染色またはマセレーション法により細胞組成を調べた。精子形成を行った11クローンには、全て大型間細胞が存在したが、刺細胞、神経細胞は存在しなかった。精子形成しなかった34クローンのうち、27クローンは間細胞が全く存在しない上皮ヒドラであった。しかし残りの7クローンには大型間細胞が存在していた。

### 図Ⅲ-5 正常ヒドラと偽上皮ヒドラの精巢形成

正常ヒドラ及び偽上皮ヒドラのニップル型精巢（矢印）。生きたヒドラをカバーガラスで軽く覆い、顕微鏡を用いて撮影した。光学顕微鏡観察により、精巢内部には多数の精子が泳いでいるのが確認された。A. chim-C1 の正常ヒドラ。B. chim-C1 の偽上皮ヒドラ。C. nem-1 の正常ヒドラ。D. nem-1 の偽上皮ヒドラ。スケールは 1mm。



表Ⅲ-2 自力捕食能のないヒドラ（偽上皮ヒドラ+上皮ヒドラ）の有性生殖分化

Strain	Treatment	No. of polyps treated	No. of self-feeding polyps produced	Non-self-feeding polyps	
				No. produced	No. forming testes (%)
chim-C1	25°C, 5days	41	23	18	3 (17)
	6	17	3	14	4 (29)
	7	16	2	14	4 (29)
nem-1	5mM HU, 2days	17	4	13	13 (100)
	3	15	0	15	0 (0)

精子形成した *nem-1* の自力捕食能の無い個体についても、mab C41 染色を行い、細胞組成を調べた。全ての個体に大型間細胞が存在していた。

これらの結果は、偽上皮ヒドラに存在する間細胞は、精子のみに分化し、神経細胞や刺細胞には分化しない事を示す。

#### v. 精子形成をした偽上皮ヒドラクロンの長期維持

精子形成した自力捕食能の無い個体は、その後、強制給餌による個別飼育を行った。そのうち、特に活発に出芽する個体を選び、長期間の強制給餌飼育を試みた。

*chim-C1* の偽上皮ヒドラは、はじめのうちは元気があり、活発に出芽をした。しかし、処理後 40・60 日頃からエサの消化力が低下し、芽体形成も行わなくなった。有性生殖は消化力低下以前（処理後 40・60 日）に限って起こり、その後は有性生殖をしなかった。

同様の傾向は、4 回の独立の実験で作成した *chim-C1* 偽上皮ヒドラの全個体で認められた。*chim-C1* 偽上皮ヒドラは最長で 130 日間維持を行った。この時点におき、全てのクロンで大型間細胞が存在している事が確認された。

*nem-1* 偽上皮ヒドラの長期間強制給餌飼育は、*chim-C1* と異なり、比較的容易であり、既に 4 年以上維持している。現在も元気で活発に出芽を続け、しかも精子への限定分化能を失っていない。この間、調べた限りどの芽体にも大型間細胞が存在していた。この結果は、偽上皮ヒドラの間細胞が、長期間にわたり分裂増殖能を維持する幹細胞である事を示す（V 章参照）。

上述の結果は、チクビヒドラにもオリガクテイス種ヒドラと同様に、精子限定間幹細胞が存在する事を示す。

## IV 章 卵子限定間幹細胞のクローニング

前章において雄系統 *nem-1* のヒドロキシウレア (HU) 処理によって、精子限定間幹細胞をクローニングした事を報告した。この章では HU 処理を改良する事により、同系統から卵子限定間幹細胞 (egg-restricted interstitial stem cells) をクローニングした事を報告する。

オリガクテイス種 (*H. oligactis*) においては、雌系統からの、卵子限定間幹細胞のクローニングが報告されている (Littlefield, 1991)。しかし、卵子限定間幹細胞が雄系統からクローニングされたのは本研究が初めてである。

### 1. ヒドロキシウレア処理条件の改良

前章において、*nem-1* 雄系統ヒドラを 5 mM HU で 2 日間処理し、精子形成する偽上皮ヒドラを得た。この処理はかなり穏やかな処理である。この時、処理個体の約 9 割の個体 (不完全除去 + 偽上皮ヒドラの割合) に間細胞が残っていた。従って、この条件では HU 処理直後に、1 個体当たり平均複数個の間細胞が残っていたと推定できる。

一方、処理日数を 3 日間に延ばした場合、有性生殖する個体、長期間維持できる個体は皆無であった。前述の通り、これは HU 処理の上皮細胞に対する影響が強すぎたためと考えられる。

この点を改善し、上皮細胞に対する影響が強すぎないように、かつ個体当たりなるべく少数 (理想的には 1 個) の間細胞が残ることを目的とし、上記 2 条件の中間的条件を採用し、処理を試みた。即ち、HU 濃度を前回の 1/2 (2.5 mM) とし、処理期間も 12 時間おきに細かく区切り、処理を行った。

## 2. 実験結果

### i. 改良ヒドロキシウレア処理による偽上皮ヒドラの作成

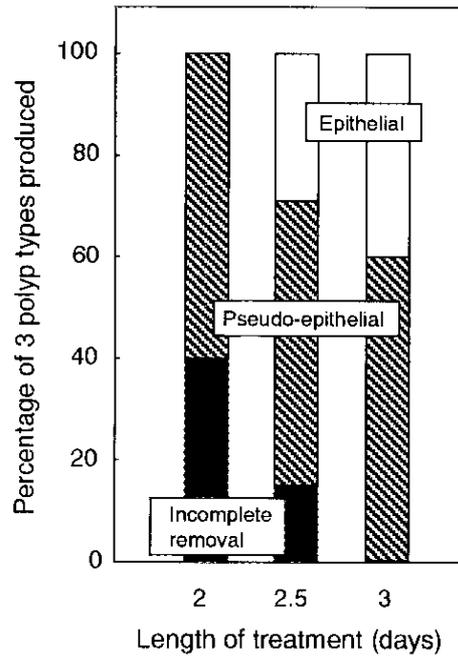
nem-1 の雄系統 30 - 40 匹を 1 グループとし、グループごとに 2.5 mM HU で、2 日、2.5 日、3 日間の処理を行った（材料と方法参照）。同時に、5 mM HU で、2 日及び 3 日間の処理も並行して行った。その後、前章の実験と同様に、処理個体から生じた新しい芽体は捨て、処理個体のみを残して通常飼育を続けた。処理後 10 日目に、各グループから 15 匹を無作為抽出し、mab C41 を用いたホルマウントの間接蛍光抗体染色を行った。前章の実験において、マセレーション法と組織染色の結果に変わりがなかったため、今回はマセレーション法は省略し、組織染色検査のみを行った。その結果、前回と同様に不完全除去、偽上皮ヒドラ、及び上皮ヒドラの 3 タイプが確認できた。

これら 3 タイプの相対数を 図 IV-1 に示す。2.5 mM HU で 2.5 日及び 3 日処理したグループにおいて、それぞれ 7 割及び 6 割の個体に間細胞が残っていた。これらの処理条件は前章の 5 mM HU 2 日処理と 3 日処理の中間的な処理である。偽上皮ヒドラの割合は、2.5 mM HU で 2 日、2.5 日及び 3 日のいずれの処理グループでも 6 割程度であった。

### ii. ヒドロキシウレア未処理 nem-1 系統の有性生殖

HU 処理に用いたヒドラは、処理開始当日または前日に、親ヒドラから分離した若い個体である。若い個体を分離した直後の親ヒドラにつき、約 1/3 に相当する 23 個体を用い、有性生殖分化を調べた。18 個体は、有性生殖の誘導を開始する前に、既に精巣を形成していた。残り 5 個体は、減食による有性生殖の誘導（材料と方法参照）をおこなったところ、5 個体全て、7 日以内に精巣形成を行った。

このように nem-1 系統は、通常飼育時にも多数の個体が有性生殖を行っている。HU 処



図IV-1 2.5mM HU 処理で生じた *nem-1* 系統の 3 タイプのヒドラの出現頻度

間細胞を認識するモノクローナル抗体 C41 を用いた間接蛍光抗体染色による検査結果を示す。検体数は各々 15 個体である。横軸は処理日数を表す。縦軸は不完全除去個体（黒）、偽上皮ヒドラ（斜線）、上皮ヒドラ（白）の出現頻度（%）を表す。

理のために集めた個体の親の中に、はじめから雌が存在していた事は考えられない。

### iii. 偽上皮ヒドラの有性生殖

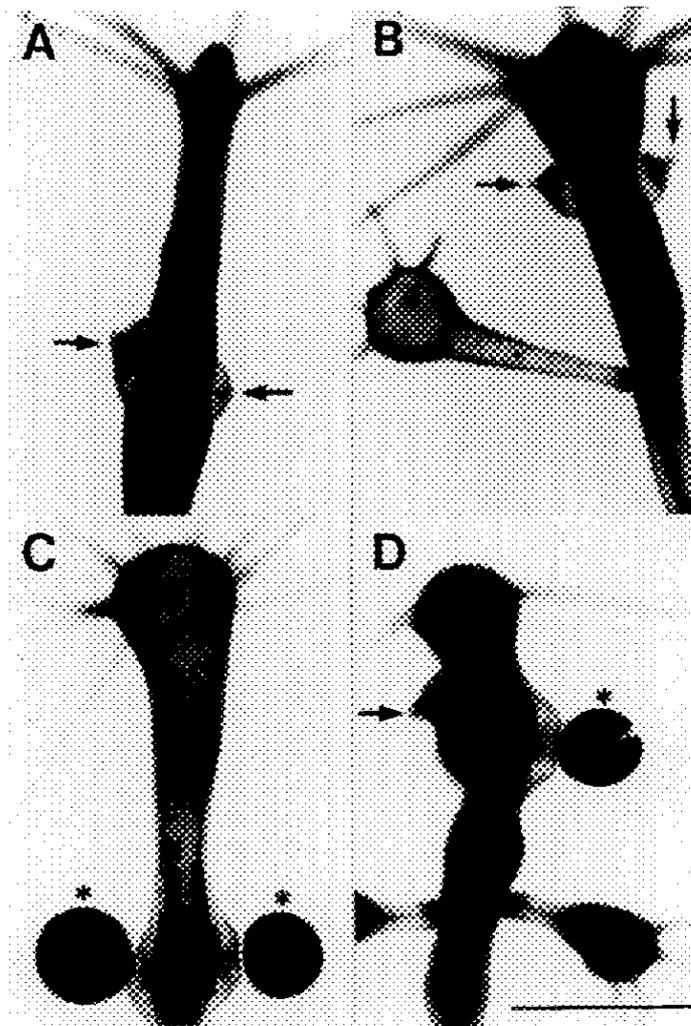
抗体染色に用いなかった HU 処理個体については、処理後 10 日目まで通常飼育、それ以降は強制給餌飼育を行った。処理後 30 日まで毎日 1 回給餌し、各個体内の間細胞数が充分回復するのを待った。HU 2 日処理個体の大部分は、この間に自然に精巢形成を行った。このうち 10 個体は、続く 60 日目までに自力捕食能を回復した。他の処理個体については、処理 30 日後から 110 日まで 80 日間、有性生殖の誘導を繰り返し行った（材料と方法参照）。一部の偽上皮ヒドラは精巢形成を行った。しかし、一部には卵子形成を行うもの、また卵子と精巢の両方を形成するものがあった。この様な偽上皮ヒドラの代表例を、図 IV-2 に示す。図 IV-2 A はコントロールの未処理 nem-1 ヒドラを示す。2 個の精巢（矢印）を形成している。図 IV-2 の B-D は偽上皮ヒドラで、各々精巢（矢印）、卵子（星印）、精巢と卵子の両方を形成している。精巢内には多数の精子が活発に動いているのが光学顕微鏡で確認できた。

精巢または卵子を形成した個体の数を表 IV-1 に示す。HU 2 日処理では、10 個体の不完全除去個体と、16 個体の偽上皮ヒドラの全てが、精巢形成を行った。処理 2.5 日と 3 日では、精子形成する偽上皮ヒドラのほかに、卵子形成をする偽上皮ヒドラも生じた。2 日、2.5 日、3 日と処理日数が長くなるに従い、卵子形成個体と精子形成個体との比は高くなった。

5mM HU で 2 日または 3 日処理する実験を再度行った。得られた不完全除去、偽上皮及び上皮各タイプの比率は、前回（図 III-3 B）とほぼ同じであった。2 日処理では全ての個体（不完全除去による回復個体 1 + 偽上皮 4）が精巢形成を行った。3 日処理では 4 個体が卵子、1 個体が卵子と精子の両方、1 個体が精子を形成し、4 個体が有性生殖をし

図IV-2 nem-1 系統偽上皮ヒドラの有性生殖個体の写真

2.5mM HU 処理で得た nem-1 系統の偽上皮ヒドラを有性生殖誘導した。矢印は精巢を、\*印は卵を示す。A. HU 未処理のコントロール雄系統。2 個の精巢を形成している。B. 2 個の精巢を形成している偽上皮ヒドラ。C. 2 個の卵子を形成している偽上皮ヒドラ。D. 精巢と卵子の両方を形成している偽上皮ヒドラ。卵子は自家受精により卵割を始めている。スケールは 1mm。



表IV-1 *nem-1* (♂) 系統の 2.5mM HU 処理で生じた、自力捕食能のないヒドラ  
 (偽上皮ヒドラ+上皮ヒドラ) の有性生殖誘導結果

HU treatment	No. of polyps treated	No. of self-feeding polyps produced	Non-self-feeding polyps				
			No. produced	No. forming testes (%)	No. forming eggs (%)	No. forming both (%)	No. forming neither (%)
2 days	28	10	18	16 (89)	0	0	2 (11)
2.5 days	23	0	23	6 (26)	2 (9)	2 (9)	13 (56)
3 days	15	0	15	3 (20)	2 (13)	0	10 (67)

なかった。

今回の実験においても、雄の *nem-1* から HU 処理で卵子形成をする偽上皮ヒドラが分離されたが、前回と今回、共に、卵子形成をした個体は、全て比較的強い HU 処理によって得られている（考察参照）。また今回は、間細胞が残っている個体の比率が 4 割しかない 3 日処理の偽上皮ヒドラにおいても、有性生殖誘導が可能であった。しかし、これらの個体は全て、最終的には衰弱、出芽不能となり、長期維持は出来なかった。

#### iv. 卵子形成する偽上皮ヒドラの長期維持

卵子形成をした偽上皮ヒドラ 4 個体のうち、3 個体について強制給餌による長期維持（材料と方法参照）を行った。長期維持は既に 3 年半以上続いているが、その間、調べたどの個体にも大型間細胞が存在した。また、有性生殖の誘導により卵子形成能を示した（詳細は V 章 1-i 節参照）。

以上の結果は、系統 *nem-1* は雄であるが、その組織には卵子限定間幹細胞が存在する事、しかしその細胞の卵子への分化は通常抑制されている事を示唆する。

## V章 生殖間幹細胞の性質

精子形成する偽上皮ヒドラを、雄の偽上皮ヒドラ、卵子形成する偽上皮ヒドラを、雌の偽上皮ヒドラと呼ぶ。雄の偽上皮ヒドラには、精子限定間幹細胞が存在し、雌の偽上皮ヒドラには、卵子限定間幹細胞が存在する。

nem-1 雄系統を HU 処理し、雄の偽上皮ヒドラと雌の偽上皮ヒドラを分離した（Ⅲ章、Ⅳ章）。本章では分離した偽上皮ヒドラに存在する生殖間幹細胞の性質について、報告する。

## 1. 実験結果

### i. 偽上皮ヒドラの長期維持

生殖間幹細胞の分裂増殖能、分化能について調べるため、雄、雌両偽上皮ヒドラの長期維持を行った。

HU 処理後の有性生殖誘導で、精巢を形成した雄の偽上皮ヒドラと、卵子を形成した雌の偽上皮ヒドラから、各々 3 個体を選び、各々を各クローンのファウンダーとした。これらのヒドラに、毎日 1 回強制給餌を行い、6-7 個の芽体を形成するまで育てた。これらの芽体の中からなるべく大きく元気の良い芽体を選び、次世代の親とした。この操作を毎世代繰り返し、偽上皮ヒドラの継代維持を行なった。全 6 クローンのうち、代表的な雄の偽上皮ヒドラクローン S1 と、雌の偽上皮ヒドラクローン E1、E2 の、2 年間のクローン系譜図を図 V-1 に示す。

### ii. 組織学的観察

偽上皮ヒドラ組織の組織学的観察を行った。その結果、正常ヒドラとは異なった間細胞の分布、配列が観察された。

偽上皮ヒドラを長期維持する間に、不要となった個体（維持個体の親や兄弟）につい

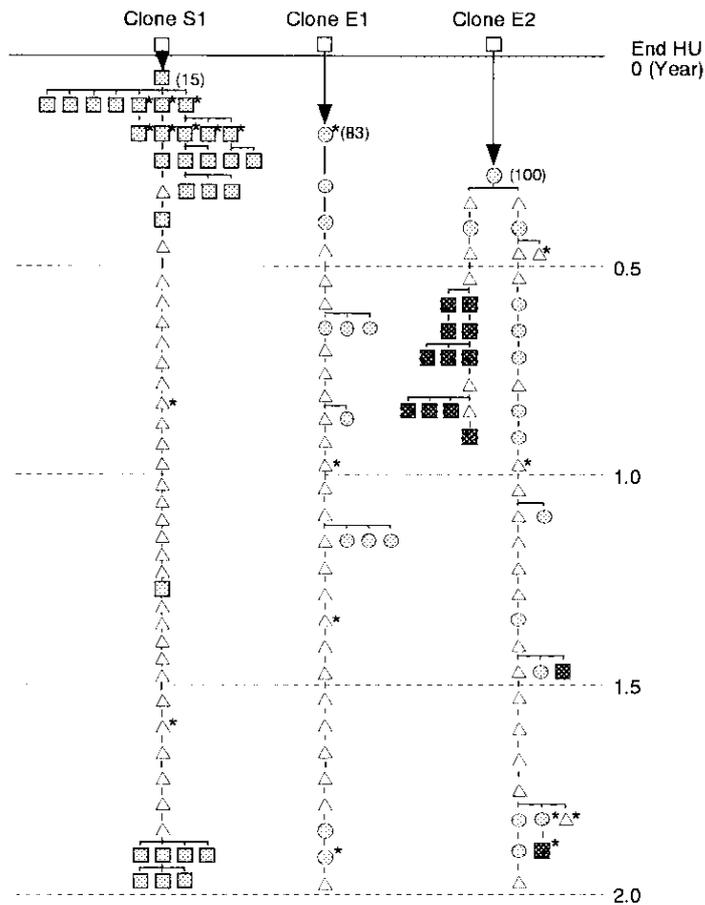


図 V-1 nem-1 系統の偽上皮ヒドラクローンの継代飼育（出芽）による長期維持

nem-1 系統を HU 処理して得た雌、雄の偽上皮ヒドラ各 3 クローンのうち代表的なものを示す。各々のクローンは HU 処理で生じた 1 匹の偽上皮ヒドラから形成された。クローン S1 は精巢を形成する個体から始まったクローンである。クローン E1 及びクローン E2 はそれぞれ卵子を形成する個体から始まったクローンである。

ヒドラは毎日の強制給餌により、数個の芽体を形成するまで育てた。それらの芽体の中から元気なものを次世代の親として選び、この個体が数個の芽体を形成するまで育てた。この繰り返しにより 2 年間維持した。

□. 精巢形成個体。○. 卵子形成個体。△. 有性生殖誘導を試みなかったか、又は、誘導に失敗した個体。ただし、クローン S1 においては精巢を形成したが記録しなかったものが多数含まれる。矢印は正常 nem-1 の雄個体が HU 処理によって偽上皮ヒドラに変化した事を示す。他の縦線は出芽による親子関係を示す。クローン E2 に現れた精巢形成個体は色濃くして表してある。★. mab C41 または TB によって間細胞染色を行った個体。各クローンには、E2 に示したように 2 世代目から始まるサブクローンが存在するが、省略した。

て、間細胞の検出を行った。検出にはホルマウントでの mab C41 を用いた間接蛍光抗体染色法、または TB 染色法を用いた。図 V-1 に示したクローン系譜図において、星印は間細胞染色を行った個体を示す。染色方法やクローン確立後の経過時間にかかわらず、偽上皮ヒドラ組織中の間細胞の分布パターンは一定であった。

mab C41 を用いた染色個体の代表例を、図 V-2 に示す。図 V-2 A は未処理の正常 nem-1 (♂) 系統である。多数の間細胞系譜の細胞が、体全体に広く一様に分布している。図 V-2 B は上皮ヒドラである。この組織には、間細胞系譜の細胞は全く検出できない。組織全体が均質に薄く染まっているのは、バックグラウンドの自家蛍光である。図 V-2 C、D は、各々雄、雌の偽上皮ヒドラである。偽上皮ヒドラでは、正常ヒドラ (図 V-2 A) と比べると数は少ないが、間細胞が存在している。

図 V-2 C、D に示す様に、nem-1 偽上皮ヒドラにおいては、どの芽体にも間細胞が存在していた。しかし芽体の間細胞数は、親ポリプの間細胞数より有意に少ない。同様の傾向は、どの偽上皮ヒドラにおいても認められた。これらの事実は、まず第 1 に、小さな芽体が親ポリプに成長するまでの比較的短い期間に、生殖間細胞は活発に分裂し、増殖する事を示唆する。第 2 に、親組織から芽体へと、生殖間幹細胞をうまく分配する仕組みが存在することを示す。この第 2 の点に関しては、次に述べる間細胞の分布域が重要な意味を持つと考えられる。

雄、雌の偽上皮ヒドラは、間細胞の局在に関し、共通の特徴を示す。図 V-2 に示したヒドラの、柄部・足盤部の拡大図を 図 V-3 に示した。正常ヒドラでは、頭部と足盤部を除く体全体に間細胞が存在しており、出芽域から足盤までの柄部 (peduncle) にも、多数の間細胞が分布している (図 V-3 A)。正常ヒドラと比べると、偽上皮ヒドラの間細胞の分布域は、有意に狭い。間細胞は、触手環のやや下から出芽域を含む体幹部分に局在し、出芽域より下部の柄部には存在しない (図 V-3 C、D)。chim-C1 偽上皮ヒドラにおいても、同様の局在が観察された (結果示さず)。

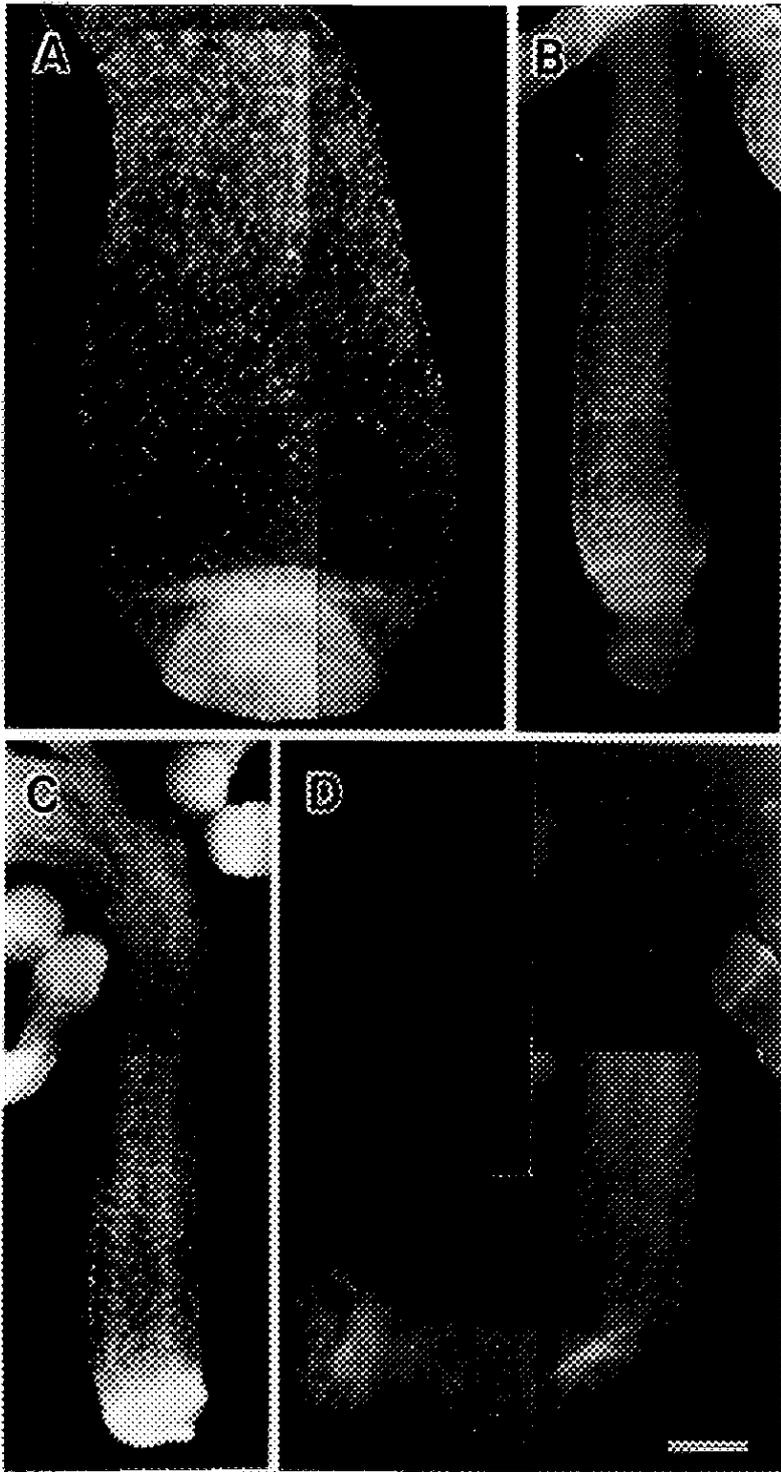
図 V・2 間細胞を特異的に認識する mab C41 を用いた間接蛍光抗体法でホルマウント  
染色したヒドラ

ヒドラは全て *nem-1* 系統である。A. 2 個の芽体を持つ雄の正常ヒドラ。 B. 6 個の芽体を持つ上皮ヒドラ。間細胞は全く存在しない。 C. 8 個の芽体を持つ雄の偽上皮ヒドラ。 D. 4 個の芽体を持つ雌の偽上皮ヒドラ。スケールは 2mm。



図V-3 mab C41 による染色個体（図V-2）の柄部・足盤域の拡大写真

A. 雄の正常ヒドラ。足盤付近を除き多数の間細胞が柄部に存在している。B. 上皮ヒドラ。間細胞は全く存在しない。C. 雄の偽上皮ヒドラ。D. 雌の偽上皮ヒドラ。C、Dでは間細胞は出芽域には存在しているが、柄部・足盤域には全く存在しない。Dの足盤付近の小さなスポットは FITC の小粒子であり、間細胞ではない。スケールは 0.2mm。



ただし、比較的新しい偽上皮ヒドラ芽体においては、例外的に、触手や足盤にまでも間細胞が存在する事があった（結果示さず）。しかし、この様な状態は、芽体形成後 4・5 日以上経過した比較的古い芽体では、観察されない。おそらく、芽体形成過程において、形成されつつある触手などの末端組織に、間細胞は受動的に取り込まれるが、本来の局在域以外に取り込まれた間細胞は、その後、速やかに排除されると考えられる。

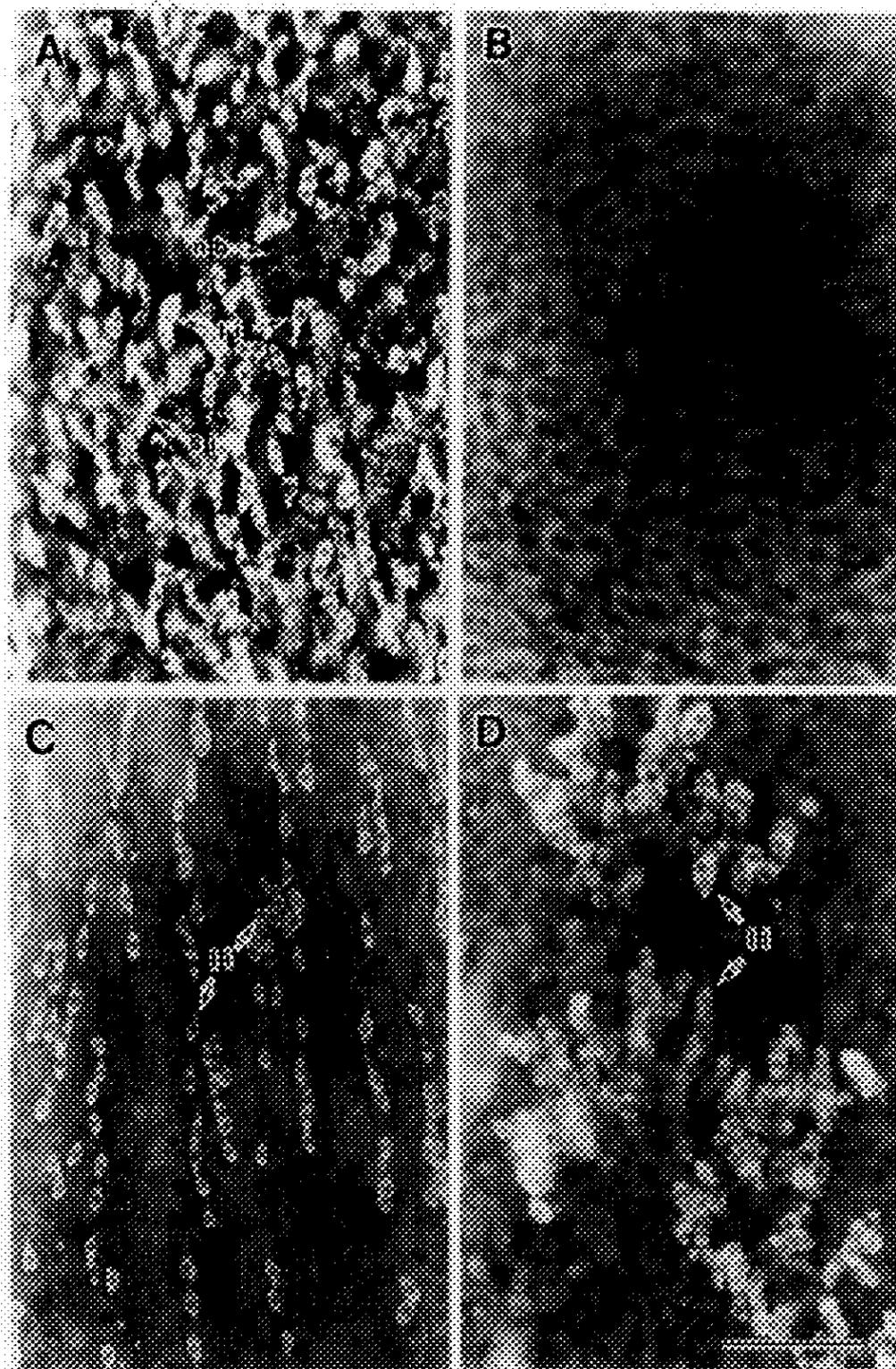
偽上皮ヒドラの間細胞は局在している。しかし、局在域が出芽域を含んでいるために、新しい芽体にも間細胞が安定に分配される可能性がある。実際、nem-1 偽上皮ヒドラの長期継代維持において、間細胞が失われる例はなかった。一方、chim-C1 偽上皮ヒドラクローンでは、出芽域付近に間細胞が存在しない個体や、間細胞が分配されていない芽体がしばしば観察された。両系統での相違は、親から芽体への生殖間細胞の分配が安定に行われる系統と不安定である系統が存在する可能性を示唆する（考察参照）。

間細胞の配列に関しては、偽上皮ヒドラにおいては雌雄間に明確な相違がみられた。図 V-4 は、ホルマウント間細胞染色した nem-1 系統のヒドラ組織の一部拡大写真を示す。雄の偽上皮ヒドラの大型間細胞 (li) は、糸状に連なり、体軸と平行に並んでいる（図 V-4 C）。一方、雌の偽上皮ヒドラの大型間細胞は、ブドウ房状の集塊 (cluster) を形成する。大きな集塊では立体的に積み上がり、盛り上がって見える（図 V-4 D）。一方、正常ヒドラにおいては雌雄の差異はあまり明確ではない。図 V-4 A は、正常雄ヒドラの組織である。多数の大型間細胞、小型間細胞 (si)、刺細胞前駆体 (nb) が混在している。大型間細胞は、概して直線上に配列しているが、雄偽上皮ヒドラに見られるような明確な糸状配列は認められなかった。また、正常雌ヒドラの組織でも、同様な配列パターンを示し、雌偽上皮ヒドラに存在するような集塊は明確には認められなかった（結果示さず）。上皮ヒドラは弱い自家蛍光を持つが、間細胞は全く存在しない（図 V-4 B）。

これらの組織学的観察結果は、オリガクティス種の偽上皮ヒドラにおいて報告されてい

図V・4 mab C41 を用いて間接蛍光抗体染色したヒドラ組織の一部

全て nem-1 系統のホルマウント試料。A. 雄の正常ヒドラ。B. 上皮ヒドラ。C. 雄の偽上皮ヒドラ。D. 雌の偽上皮ヒドラ。li:大型間細胞、si:小型間細胞、nb:刺細胞前駆体。スケールは 0.1mm。



る観察結果と、基本的に一致している (Littlefield, 1985a, 1991a)。偽上皮ヒドラにおける間細胞の分布と配列は、種を越えて共通していると考えられる。

また、モノクローナル抗体 AC2 は、オリガクティス種の精子限定間細胞系譜を特異的に識別するが、この抗体を用いて調べた結果によると、正常ヒドラと偽上皮ヒドラにおける精子限定間細胞の分布域は一致している (Littlefield, 1985a, 1986a)。この事は、チクビヒドラにおいても、正常ヒドラでの生殖間細胞は、偽上皮ヒドラでの分布と同様に局在している可能性を示唆する。

### iii. 生殖間幹細胞の分化安定性

不要となった長期維持偽上皮ヒドラの一部は、有性生殖誘導実験に用いた。nem-1 偽上皮ヒドラの有性生殖誘導は、比較的容易であった。雄の偽上皮ヒドラでは、人為的誘導をしなくとも、偶発的に精巢形成するものが多数あった。誘導を要する場合にも、ほとんどの場合、減食 4・10 日の処理で充分であった。卵子形成の場合は、更に 5 日ほど長く減食すれば、半数以上が有性生殖を行った。1 回の誘導で有性生殖しなかった個体は、再誘導を行わず、廃棄した。有性生殖誘導の結果を、図 V-1 に示す。

雄偽上皮ヒドラのクローン S1 (図 V-1) は、他の雄クローン S2 と同様、例外無く精巢のみを形成し、卵子形成する事はなかった。もう 1 つの雄クローン S3 は、HU 処理から約 1 年後に、1 個体に限り、卵と精巢の両方を形成した例があった (結果示さず)。しかし、この個体の子孫は、すべて精巢のみを形成をした。これらの事は、精子限定間幹細胞が精子に分化する性質は、比較的、安定した性質である事を示す (考察参照)。

雌の偽上皮ヒドラクローン E1 は、2 年間安定して卵形成を行った。他の雌クローン E2 と E3 (結果示さず) においても、卵子形成を行う個体が出現し続けた。これらの結果は卵子限定間幹細胞も基本的には安定した卵子分化能を持つ事を示す。

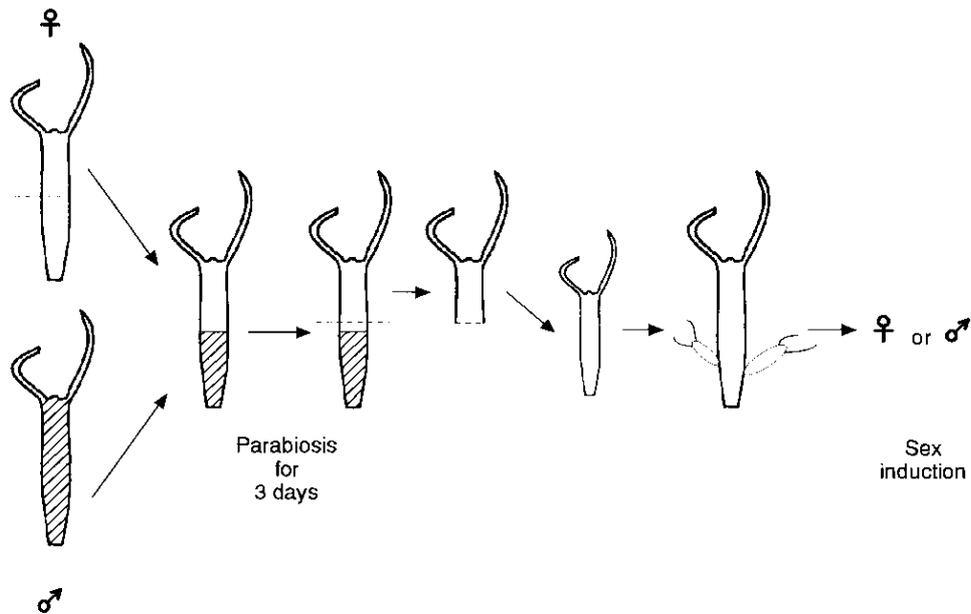
ただし、クローン E2 おいては、2 年間の維持期間に、雄の偽上皮ヒドラに変化した個体が 3 回観察された。クローン E3 においても同程度の頻度で雄へ性転換した。クローン E2 における最初の性転換個体で例示するように（図 V-1）、雌から雄への性転換は一旦起きると、不可逆的であり、再び雌に戻る事は無かった。この現象は精子限定間幹細胞の雄性化作用で説明できる（後述）。この雄性化作用を考慮すると、雌の偽上皮ヒドラに初めから精子限定間幹細胞が混在していた事は考えられない。この性転換は、卵子限定間幹細胞が精子限定間幹細胞へと分化転換したために起きたと考えられる（考察参照）。

ところで、この分化転換は、非常に顕著な現象であるが、実は 2 年間に 3 回起こったのみである。2 年間に繰り返された間幹細胞の分裂回数（約 200 回）を考慮すると分化転換の頻度は非常に低い。従って、卵子限定間幹細胞の分化能の安定性を否定する事にはならない。

i - iii の結果は以下のように総括できる。生殖間幹細胞は長期にわたり活発に分裂、増殖でき、しかも安定に出芽芽体へと分配される。また、これらの細胞は長期間生殖細胞への分化能を保持するが、少なくとも卵子限定間幹細胞においては、ごく稀に精子限定間幹細胞へ分化転換する事がある。

#### iv. 精子限定間幹細胞による雌ヒドラの雄性化

雄性化は、雄組織を一時的に雌個体に移植すると、雌が雄に変わる現象である（Goetsch, 1922）。オリガクティス種ヒドラでは、精子限定間幹細胞が雄性化能を持つことが示されている（Littlefield, 1986b）。チクビヒドラにおいても、精子限定間細胞が雌組織の雄性化を引き起こす能力があるかどうかを、一時移植（パラビオーシス）実験法（図 V-5）を用いて調べた。雄の偽上皮ヒドラの下半部と雌ヒドラの上半部（あるいはその逆）を移植接合し、3 日後に雄組織を切除した。残した雌組織を再生させて、有性生



図V-5 雄性化のための雄組織と雌組織の一時的移植法

あらかじめ、エバンスブルーによって生体染色した雄個体の下半部と雌個体の上半部を移植、接合する。接合3日後に移植境界のやや上で切断し、雌組織のみを分離する。エサを与えて再生させた後、有性生殖誘導を行う。雌組織が、雄性化され精子を形成するか、雌のままかを調べる。実験には正常の雄、雌の他、雌雄の偽上皮ヒドラも用いた。偽上皮ヒドラと正常ヒドラの間で移植するときは、正常ヒドラを生体染色した。

殖誘導を行い、雌組織の性を調べた。

雄系統として雄の偽上皮ヒドラクローン S1、S2、S3 及び正常 nem-1 (♂) 系統を用いた。雌系統としては正常雌系統の SSB、nem-1・f2 と雌偽上皮ヒドラクローン E1、E2、E3 を用いた。使用した雌の偽上皮ヒドラの親や兄弟はできる限り有性生殖の誘導を行い、雌である事を確認した。結果を表 V-1 に示す。

雄の偽上皮ヒドラ S1 は正常 nem-1 (♂) と同様に、どの雌系統をも雄性化した。コントロールの雌どうしのパラピオーシスでは雄性化は起こらない。表には雄の偽上皮ヒドラクローン S2 と S3 および雌の偽上皮クローン E2 と E3 を用いた結果を示していないが、それぞれ S1 と E1 の結果と基本的に変わらなかった。また、上半部と下半部の性を入れ換えて移植接合しても、同様に雄性化が起こった (表 V-1 下段)。この事はチクビヒドラにおいてもオリガクティス種ヒドラと同様、精子限定間細胞に雄性化能がある事を示す。

雄の偽上皮ヒドラは雌の偽上皮ヒドラをも雄性化した。この結果は、精子限定間細胞の雄性化作用点は、卵子限定間幹細胞から卵形成までの分化過程にある事を示唆する。

#### v. その他の観察—生殖間幹細胞と多能性間幹細胞との関係

生殖間幹細胞は多能性間幹細胞から生じると考えられている。しかし、この事を示す確実な実験報告はまだ無い。ここで述べる観察は、多能性間幹細胞と生殖間幹細胞が非常に近い関係にあり、通常では前者から後者へ、そしてごく稀には後者から前者へ変わり得る事を示唆するものと思われる。

##### v-1. 偽上皮ヒドラの正常ヒドラへの転換

雌の偽上皮ヒドラクローン E1、E2、E3 の長期維持中に、3 例で正常ヒドラへの転換が観察された。1 例はクローン E2 において、他 2 例はクローン E1 から生じた 3 つのサ

表 V-1 一時的に雄組織を移植した雌個体の性転換

temporary graft						Female tissue after temporary graft				
Upper half			Lower half			No. examined	No. forming testes	No. forming eggs	No. forming both	Dead or lost
Strain	Sex	Type	Strain	Sex	Type					
E1	♀	P	S1	♂	P	11	5	1	0	5
nem-1·f2	♀	N	S1	♂	P	10	8	0	1 <sup>a</sup>	1
SSB	♀	N	S1	♂	P	12	12	0	0	0
E1	♀	P	nem-1	♂	N	12	9	0	3 <sup>a</sup>	0
E1	♀	P	SSB	♀	N	13	0	12	0	1
S1	♂	P	E1	♀	P	11	10	0	0	1
S1	♂	P	nem-1·f2	♀	N	10	10	0	0	0
S1	♂	P	SSB	♀	N	12	12	0	0	0
nem-1	♂	N	E1	♀	P	12	8	1 <sup>b</sup>	1 <sup>a,b</sup>	2
SSB	♀	N	E1	♀	P	13	0	10	0	3

表の上段は雌ポリプの上半部に雄ポリプの下半部を一時的に移植し、雄組織を切除した後、雌個体を有性生殖させた結果である。下段は上半部と下半部を逆の組み合わせにしたときの雌組織の有性生殖誘導の結果である。系統 E1：雌の偽上皮ヒドラクローン E1。S1：雄の偽上皮ヒドラクローン S1。タイプ P：偽上皮ヒドラ。タイプ N：正常ヒドラ。

a：精巣と卵子を同時に形成したが、この後は精巣のみを形成した。

b：この個体は自力捕食能を回復しなかった。

ブクロンのうち 2 つ (E1-1 と E1-2) においてであった。これらの転換はいずれも HU 処理から 3 年以上維持された後で起こった。雌の偽上皮ヒドらは、初めの 2 年間は 18℃ で毎日強制給餌をして飼育したが、その後は給餌頻度を 2 日に 1 回に減らし、低温 (6.5 - 12℃) で維持した。サブクローン E1-1 とクローン E2 における転換は低温維持を 1 年間行った後、再び 18℃ で飼育を始めた直後と 3 カ月後にそれぞれ観察された。サブクローン E1-2 における転換は低温維持を 1.5 年行った時点で起こった。

初めの 1 例が観察されたときの状況は以下の通りである。多数の芽体を持った偽上皮ヒドらの親があり、その芽体の 1 つがわずかに触手を曲げる運動をしているのが見いだされた。1 週間後、この芽体は近づいたエサに反応して触手を動かし、口を開けるようになった。これは神経細胞が生じた事を示す。強制給餌を続けると、消化力も向上し体色が非常によくなった。発見から約 2 週間後、この芽体は親に成長し、自身はエサを 1 - 2 匹をやっと捕らえる程度であったが、その芽体は、自力で必要なだけエサをとらえ食べることができた。この事は刺細胞分化が起こったことを示す。初めに運動能を得た芽体の親個体や兄弟の一部も徐々に自力捕食能を得た。他の 2 例もほぼ同様に自力捕食能を獲得し、正常ヒドラとなった。

これらの転換ヒドらは、形態、細胞組成、行動において正常 *nem-1* ヒドラとなんら変わりがなかった。また、正常形質は例外なく芽体に受け継がれ、偽上皮ヒドラに戻るものはなかった。

これらの結果は、偽上皮ヒドラに存在する卵子限定間幹細胞が多能性間幹細胞に分化転換し、増殖して芽体に分配されたと考えられる。

## v-2. 偽上皮ヒドラにおける刺細胞分化

雄の偽上皮ヒドラを長期維持している間に、刺細胞を持つ個体が 2 例観察された。こ

れらは、長期維持期間に、無作為に抽出した 220 個体について、TB 染色を行った中から発見された。図 V-6 にそのうちの 1 例を示す。図 V-6 A は全体像で、雄の偽上皮ヒドラ特有の糸状に配列した間細胞と 2 個の精巢が確認できる。触手には A 型 (stenotele)、B 型 (holotrichous isorhiza) および D 型 (desmoneme) の刺胞が確認できる (図 V-6 B)。頭部のやや右下部分には、触手に向かって移動中と考えられる A 型刺胞が強く染色されているのが認められる (図 V-6 C)。しかし、多能性間幹細胞が生じたならば形成されるはずの、刺細胞前駆体を含む間細胞のバッチ状集団 (Bosch & David, 1987) は確認できなかった。またこの個体に少数の神経細胞の分化が起こっていたかどうかは不明である。刺細胞を生じた他の個体例についても同様な結果が得られた。

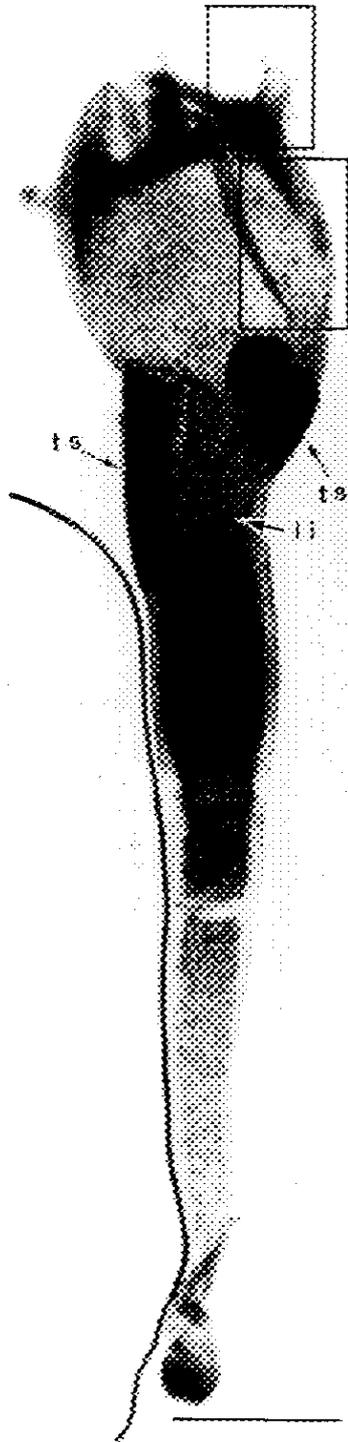
この個体は偽上皮ヒドラのクローン S1 の、HU 処理から約 2.5 年経過した 45 世代目の個体である。クローン S1 で、この個体以前には刺細胞を持つものは観察されなかったし、この個体の芽体の兄弟 2 個体を TB 染色したが刺細胞は確認されなかった。

上記観察は、生殖間幹細胞がおそらく多能性間幹細胞に分化転換した後、少数の刺細胞 (あるいは神経細胞も) を産生した事を示唆する。しかし、なぜ分化転換が一時的であったのかは不明である。

図 V-6 刺細胞を形成した *nem-1* 系統の雄偽上皮ヒドラのトルイジンブルー染色

A. 偽上皮ヒドラの全体像。雄の偽上皮ヒドラ特有の糸状に配列した大型間細胞 (li) が濃青色に染まって見える。正常ヒドラに特徴的な間細胞の染色は見られない。右側に 2 個の成熟した精巢 (ts)、左側に未成熟な精巢が濃青色に染まっている。B. パネル A の上の四角部分の拡大写真。触手に A 型 (a)、B 型 (b)、D 型 (d) の刺細胞が濃く染まって見える。B 型刺細胞は *nem-1* 特有の湾曲した形態を示している。C. パネル A の下の四角部分の拡大。移動中と思われる A 型刺細胞 (a) が濃く染まっている。頭部に近い部域であるため精子限定間幹細胞は存在しない。スケールはパネル A が 0.5mm、パネル B、C は共通で 0.1mm。

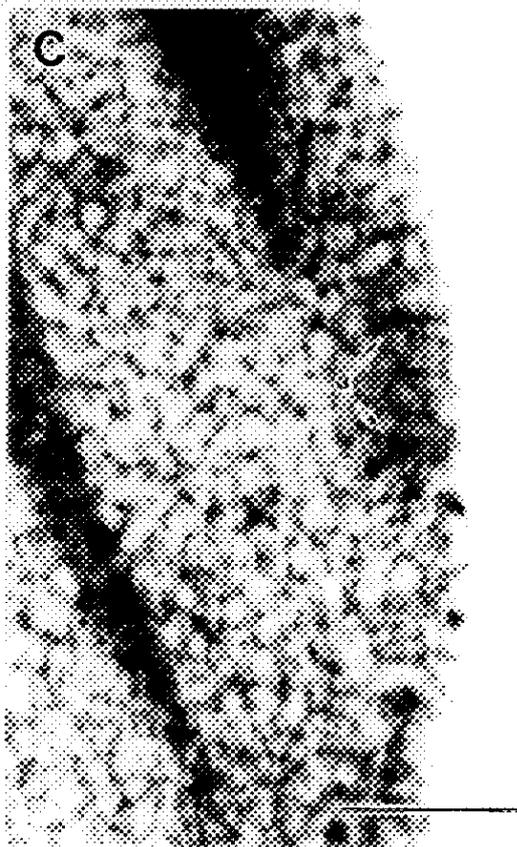
A



B



C



## VI章 多能性間幹細胞の分離と生殖分化

前章までの結果により、ヒドラの性は、精子限定間幹細胞が存在すれば必ず雄となり、卵子限定間幹細胞のみが存在すれば雌となる事が明らかとなった。精子限定および卵子限定間幹細胞は、いずれも多能性間幹細胞から分化すると考えられている (Littlefield, 1994)。この考えによれば、性決定に最も重要な過程は、多能性間幹細胞から2種の生殖間幹細胞が生ずる過程である。

この過程を調べるためには、多能性間幹細胞のみを持つヒドラを分離し、その生殖分化を解析する必要がある。多能性間幹細胞のみを持つヒドラ組織の候補として、正常ヒドラの足部 (下柄部・足盤) 組織に注目した。その理由は、足部組織には、多能性間幹細胞は存在するが、生殖間幹細胞は存在しないことを示唆する以下の様な一連の観察結果が存在するからである。

(1). チクビヒドラ種 (図 V-3 C、D) とオリガクティス種 (Littlefield, 19985a, 1986b) のどちらの偽上皮ヒドラにおいても、生殖間幹細胞は出芽域より下の足部組織には存在しない。(2). オリガクティスの精子限定間幹細胞は、正常ヒドラにおいても、足部組織に存在しない (Littlefield, 1985a, 1986b)。(3). 正常ヒドラの有性生殖分化は、足部組織には起こらない。

本章ではまず、足部組織における生殖間幹細胞の不在を支持する新結果について報告する。続いて、生殖間幹細胞が不在 (多能性間幹細胞のみ存在) と考えられる足部組織を切り出し、再生させ、その再生体の有性生殖を誘導した実験について報告する。

## 1. 実験結果

### i. 正常組織における生殖間幹細胞の移動

生殖間幹細胞は、偽上皮ヒドラの足部組織に存在しない。その理由として、足部組織の環境が、生殖間幹細胞の生存に適さないことが考えられる。生殖間幹細胞は、隣接組織か

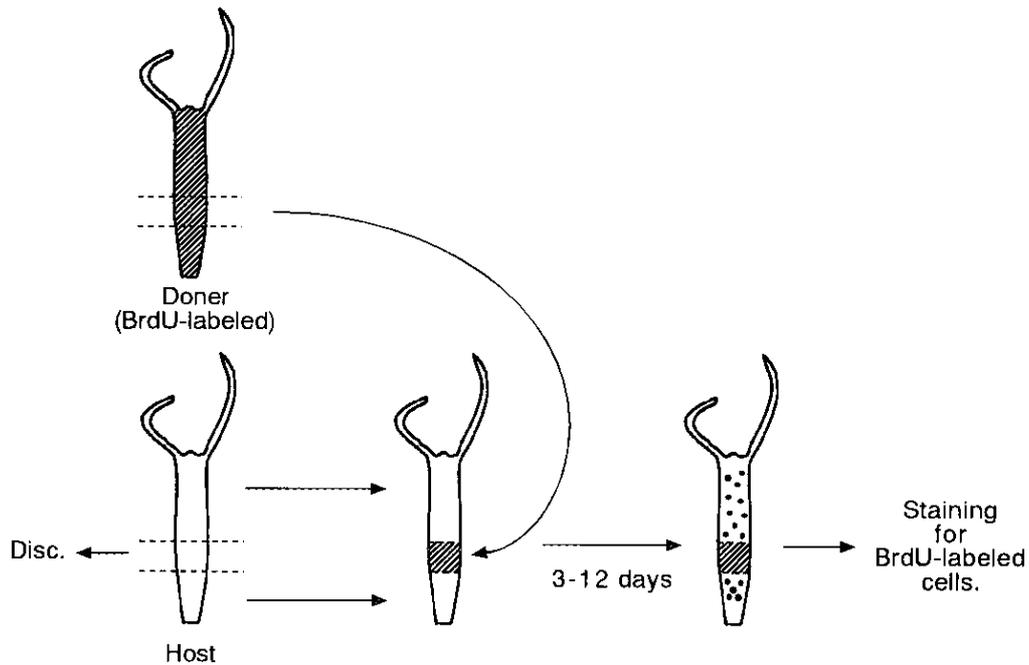
ら足部組織に移動しないか、または移動しても、死滅するか、よりよい環境を求めてすぐ出て行くと考えられる。

生殖間幹細胞は、正常ヒドラの足部組織においても、上記偽上皮ヒドラと同様の挙動を示す可能性がある。この可能性を確かめるために、偽上皮ヒドラの生殖間幹細胞を BrdU 標識し、正常ヒドラに移植し、足部組織に移動するか否かを調べた。その実験方法を図 VI-1 に示す。用いたヒドラは *nem-1* 系統の正常雄、正常雌、雌雄の偽上皮、及び上皮ヒドラである。ヒドラを 5mM BrdU を含む飼育液中で 3 日間飼育した。この方法で正常、偽上皮ヒドラいずれにおいても、98% 以上の間細胞が標識された。標識個体を供与体とし、その組織の一部を切り出し、非標識宿主ヒドラの相同域の組織と入れ替えに移植した。移植後 2 日から 12 日まで、1 日おきに数匹ずつを固定し、移植個体中の標識間細胞を、抗 BrdU 抗体を用い間接酵素抗体法で検出した。結果の代表例を図 VI-2 に示す。

偽上皮ヒドラを供与体にした場合、宿主に関係なく、足部組織（柄部-足盤域）に標識細胞は全く検出できなかった（図 VI-2 B、C、E、F）。一方、正常ヒドラを供与体にする、宿主とは無関係に、間細胞が足部組織で検出された（図 VI-2 A、D）。

この結果は、多能性間幹細胞は、足部組織（柄部-足盤域）に移動し、そこに留まるが、生殖間幹細胞はこの部域に移動しないか、移動しても留まることができない事を示す。この結果は間接的ながら、生殖間幹細胞が正常ヒドラの足部組織に存在しない事を支持する。

ところで、上記実験において、正常雌ヒドラを宿主とした場合に限って、精子限定間幹細胞と卵子限定間幹細胞は、異なった挙動を示した。雄の偽上皮ヒドラの組織を正常雌ヒドラに移植すると、多数の精子限定間細胞が正常雌ヒドラ組織内を移動した（図 VI-2 F）。その数は、偽上皮ヒドラを正常ヒドラに移植した他の組み合わせ（図 VI-2 E、その他は示さず）と比較するとはるかに多く、偽上皮ヒドラを上皮ヒドラに移植した場合

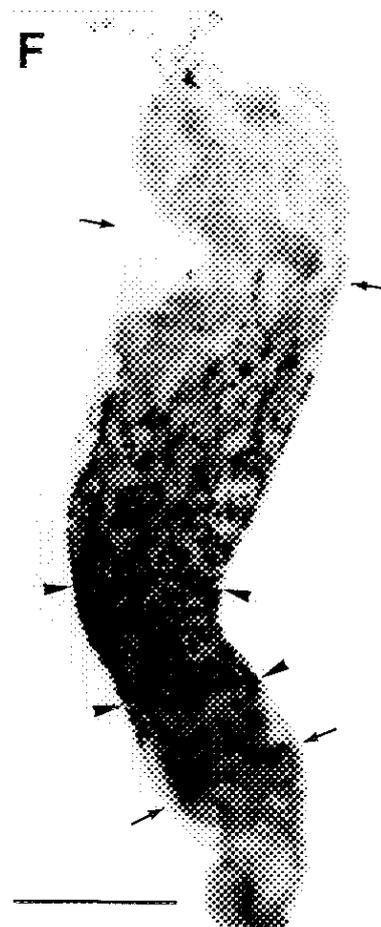
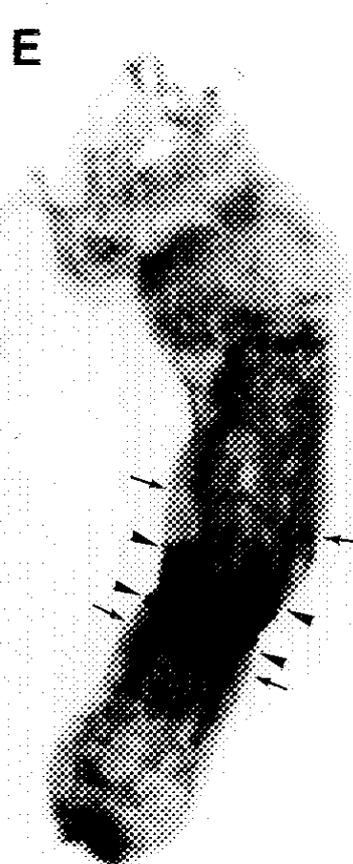
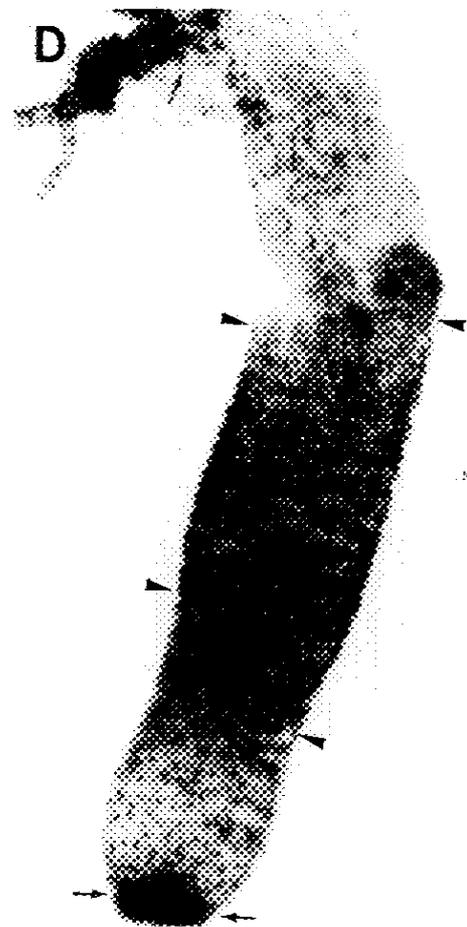
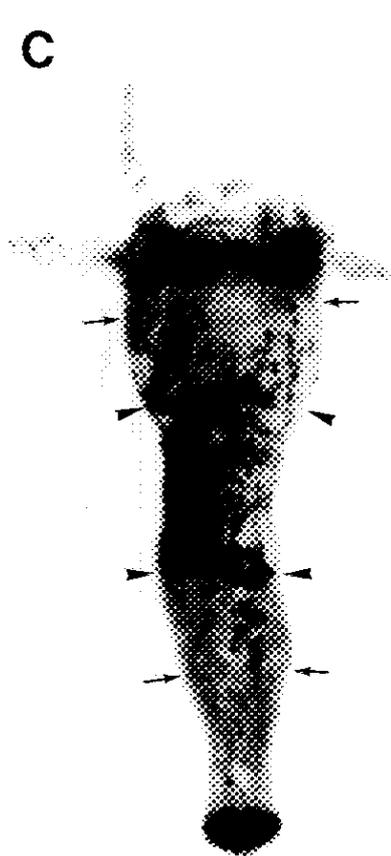
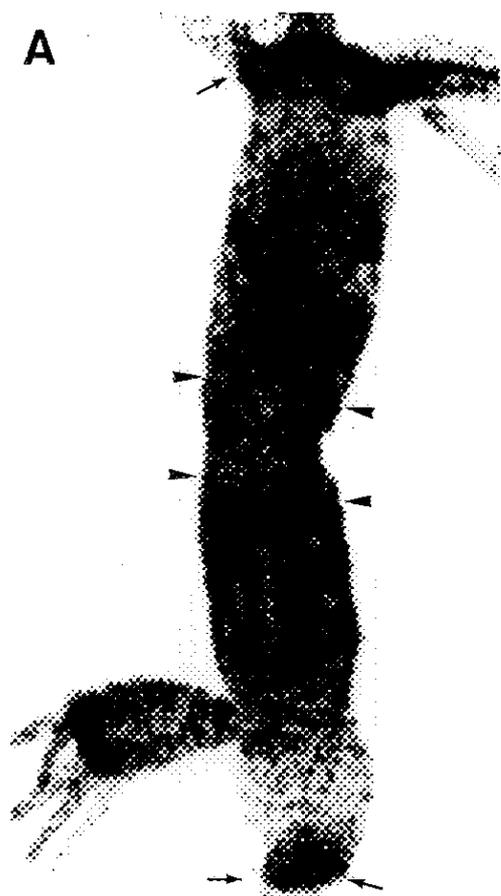


図VI-1 移植した BrdU 標識間細胞の分布を調べる実験の模式図

供与体のヒドラは、5mM BrdU を含む飼育水で 3 日間飼育し、標識した。標識後、供与体ヒドラの体幹組織の一部を切り出し、この組織を非標識の宿主ヒドラの相同部分と極性を変えずに入れ換えて接合した。この状態で 3 - 12 日間放置した。宿主ヒドラの出芽を抑えるため、移植後 6 日間はエサを与えなかった。6 日を超える移植個体については 6 日目に 1 度だけエサを与えた。移植個体は、移植後 4 日目から 1 日おきに数匹ずつ固定し、抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた酵素抗体染色法で、移植した標識細胞の全身における分布を調べた。

## 図VI-2 移植した BrdU 標識間細胞の分布

nem-1 系統のヒドラを用い、図IV-1に示した方法で標識間細胞の移植個体における分布を調べた。4つの矢頭で供与体組織を、矢印で標識間細胞の分布範囲を示す。以下は、宿主ヒドラ/供与体ヒドラ/移植期間の順を表す。A. 上皮ヒドラ/正常雄ヒドラ/6日。B. 上皮ヒドラ/雌の偽上皮ヒドラ/10日。C. 上皮ヒドラ/雄の偽上皮ヒドラ/8日。D. 正常雌ヒドラ/正常雄ヒドラ/8日。E. 正常雄ヒドラ/雌の偽上皮ヒドラ/8日。F. 正常雌ヒドラ/雄の偽上皮ヒドラ/4日。スケールは0.5mm。



(図VI-2 B、C) に匹敵した。この時、おそらく急激な細胞増殖をも伴っていたと考えられる。この精子限定間幹細胞特有の現象は、雄性化現象の細胞レベルでの現象であると考えられる。

精子限定間幹細胞が正常雌組織内に広がった状態は、雄性化のためにこの個体が正常雄に変わった状態であると考えられる。しかし、どんなに広がっても、標識細胞は柄部-足盤域には見いだされなかった。

## ii. 足組織再生体の有性生殖

上述の移植実験結果は、正常ヒドラの足部組織に、多能性間幹細胞は存在するが、生殖間幹細胞は存在しないとの考えを強く支持する。この考えを前提とし、正常ヒドラの足部組織を切り出し、再生させ、有性生殖の誘導を行なった。

この実験において、少なくとも次の3様の結果の予想が可能である。(1). 足部組織には、体細胞分化に限定された間幹細胞が存在するが、生殖細胞に分化する間幹細胞は存在しない。従って、足部組織再生体は、捕食能を持つが生殖細胞の分化は起こらない。(2). 足部組織に性未決定の多能性間幹細胞が存在する。そして再生体は捕食能を有し、卵子限定間幹細胞、あるいは精子限定間幹細胞のどちらかが分化する。その場合、いずれが先に分化するかにより、再生前の性とは無関係に、雌または雄になる可能性がある。(3). 足部組織に、性の決定された多能性間幹細胞が存在する。即ち、雄個体には雄の多能性間幹細胞が存在し、雌個体には雌の多能性間幹細胞が存在する。そして雄個体からの足部再生体は必ず雄に、雌個体からの再生体は必ず雌になる。

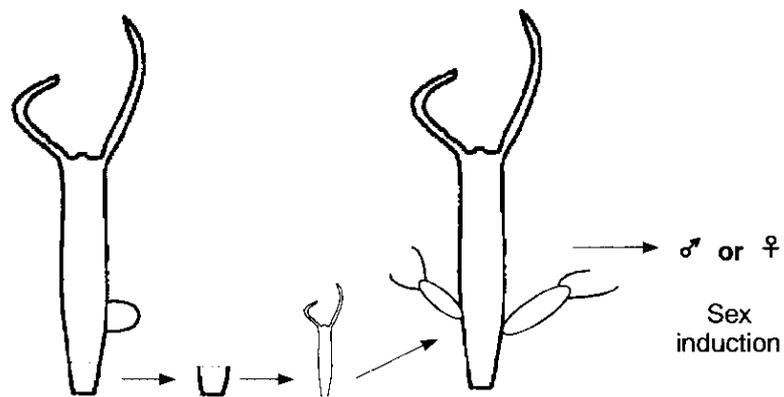
実験は、有性生殖能が高く、性の安定した系統を選んで行った。性の安定した系統を選んだ理由は、足部組織の分離から有性生殖誘導までの期間に、性転換が起こらないようにするためである。使用した系統は雌3系統 (SSB、SSC、nem-1·f1)、雄5系統 (nem-

1、SSC・m、nB-2、SSE、ms-1)である(材料と方法参照)。雌雄の決定が系統によるか、実験当時の性によるかを明らかにするため、同一系統由来で、性転換が起こったために雌雄両方が存在する2系統(nem-1とnem-1・fl、SSCとSSC・m)を加えてある。

実験法を図VI-3に示す。確実に、生殖間幹細胞を含まない足組織を得るため、出芽位置から足盤までの距離の、足盤から2/5に相当する位置で足組織を切り出した。この分離組織は、そのままでは再生しなかった。しかし、エサのブラインシュリンプ幼生を小さく切り、その1片をピンセットで腔腸内に押し込み毎日食べさせると、1週間から20日で、系統により頭部再生するか、頭部再生しないまま出芽した。この再生体または芽体のほとんどは、自力捕食能を示した。再生(芽)体は、個別に通常飼育を行い、成長、出芽し、芽体を持つ親ヒドラが3-5匹まで増えたとき、有性生殖誘導を行った。

結果を表VI-1に示す。結果は以下のように要約できる。(1) SSBの1例を除き、再生体は、全て有性生殖を行った。(2) 雌3系統の再生体は、上記の1例を除き、全て雌になった。(3) 雄系統は2つのグループに分かれた。nem-1、SSC・m、nB-2の再生体は、ほとんど全て雌になった。一方、ms-1とSSEは、SSEの1クローンを除き、全て雄になった。(4) 同一系統由来の雄と雌系統がある場合(nem-1とnem-1・fl、およびSSC・mとSSC)、再生体の性はすべて雌になった。

この結果は、実験前の予想のどれにも相当しなかった(理由は考察参照)。しかし、注目すべき結果が得られた。即ち、雄3系統(nem-1、SSC・m、nB-2)の再生体は、ほとんど全て雌となり、再生の前後で異なった性を示した。この結果は、これら3系統の足組織には、精子限定間幹細胞が存在しない事を示す。もし存在すれば、雄性化作用により再生体はすべて雄になったはずである。また、この結果は、精子限定間幹細胞の除去により、雌への性転換が起こる事を示す初めての例である。雄系統の足組織には、卵子限定間幹細胞を分化産生する雌性の多能性間幹細胞が存在するか、あるいは卵子限定間幹細胞が



図VI-3 足組織からの再生体の性を調べる実験の模式図

最初の芽体を形成し始めた若い個体を用いた。芽体突起位置から足盤までの距離の、足盤から2/5に相当する位置で切断し、足部を分離した。この足部分離片を強制給餌で育て、再生させた。再生後、芽体を持つ親ヒドラが3-5匹になった時、有性生殖誘導を行い性別を調べた。

表 VI-1 足組織再生体の有性生殖

strain	sex	No. of regenerates	No. forming			
			testes	eggs	Both	Neither
nem-1	♂	31	1	29	1 <sup>a</sup>	0
ssC·m	♂	13	0	13	0	0
nB-2	♂	22	0	22	0	0
ms-1	♂	8	8	0	0	0
ssE	♂	24	23	1	0	0
nem-1·ft	♀	19	0	19	0	0
ssC	♀	28	0	28	0	0
ssB	♀	22	0	21	0	1 <sup>b</sup>

a. このクローンでは 4 匹が精子を、1 匹が卵子を形成した。

b. このクローンは最終的には上皮ヒドラになったため、有性生殖は行わなかった。

はじめから混入していたかの、いずれかであると考えられる。しかし、足組織の分離で精子限定間幹細胞が排除された事から、卵子限定間幹細胞の混入は、おそらく無かったと考えられる。

### iii. 卵子限定間細胞による雄性多能性間幹細胞の精子分化抑制

生殖間幹細胞と多能性間幹細胞との間に、どのような相互作用があるかは興味深い問題である。この問題を明らかにするために、本実験では、多能性間幹細胞のみを持つと考えられる足組織と、雌または雄の偽上皮ヒドラ（生殖間幹細胞のみを含む）の組織を移植により接合して、有性生殖分化を調べた。実験は予備的ではあるが、興味深い結果を得たので報告する。

実験方法を図 VI-4 に示す。足組織の供与体は雄系統 SSE である。前節の結果から、その足組織には、雄の多能性間幹細胞が存在すると考えられる。偽上皮ヒドラは、nem-1 系統の雌の偽上皮ヒドラのクローン E1（E1 ヒドラと略す）を用いた。コントロールとしては、偽上皮ヒドラの代わりに、nem-1 系統の上皮ヒドラを用いた。移植個体は、移植後しばらくの間強制給餌を行った。その後、SSE 由来の多能性間幹細胞が増殖、分化し、自力捕食能を獲得した個体には、通常飼育を行った。そして移植個体が親となり、芽体を 3-5 個形成した時点で、有性生殖誘導を行った。結果を表 VI-2 に示す。

実験区でもコントロール区でも、約 4 割の移植個体は捕食能を獲得しなかった。SSE の多能性間幹細胞が失われた為と考えられる。このような現象は、神経細胞の存在しない上皮ヒドラに、ごく少数の間幹細胞を導入した時に起こることが知られている（藤沢、私信）。SSE の足組織を上皮ヒドラに移植した場合、捕食能を獲得した個体は、全て精巣を形成した。これに対し、SSE の足組織を E1 ヒドラに移植した場合、捕食能を獲得した 9 個体のうち 6 個体は卵子を形成した。この結果は、以下の事を示唆する。(1). SSE 系統の

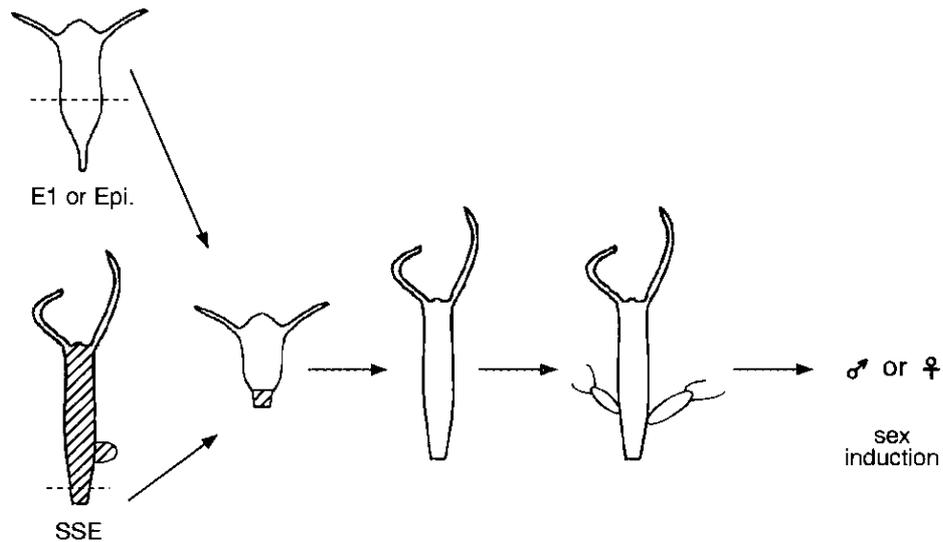


図 VI-4 多能性間幹細胞と生殖間幹細胞との相互作用を調べるための移植実験の模式図

SSE 系統の足組織を 図 VI-3 に示した方法で分離した。この組織を、体幹部で切断した *nem-1* 系統由来の雌の偽上皮ヒドラクローン E1、または上皮ヒドラの上半身に移植接合した。SSE の足組織には精子に分化する多能性間幹細胞が存在し、E1 ヒドラには卵子限定間幹細胞が存在する。SSE 由来の間細胞が、体細胞に分化して自力捕食能を回復した個体について有性生殖誘導を行い、性別を調べた。

表 VI-2 雄ヒドラの足組織を移植した雌の偽上皮ヒドラ及び上皮ヒドラの有性生殖

Graft Body/Foot	No. graft	No. non-self feeders	No. self-feeders forming		
			testes	eggs	both <sup>a</sup>
E1/SSE	16	7	3	2	4
Epi./SSE	15	6	8	0	0

系統 SSE は雄性多能性間幹細胞を持つと考えられる。 E1 は nem-1 系統の雌の偽上皮ヒドラクローンで、卵子限定間幹細胞を持つ。 Epiは上皮ヒドラ。

a. 精子形成する個体と卵子形成する個体の混合クローンである。

足組織の少なくとも一部には、精子限定間幹細胞が存在しない。もし存在すれば、SSE 足組織を E1 ヒドラに移植した個体では、雄性化の為に全てが雄になったはずである。(2). SSE 足組織には、精子に分化する雄の多能性間幹細胞が存在する。(3). 卵子限定間幹細胞は、雄の多能性間幹細胞の精子（精子限定間幹細胞）への分化を抑制する。しかし、E1ヒドラに SSE の足組織を移植した個体の全てが、雌になったわけではない。従って、この抑制力は完全ではない。

抑制力の不完全さは、次のような観察によっても示唆された。SSE 足組織と E1 体幹部を移植接合し、この移植体を出芽増殖させたところ、精巣を形成する個体と卵子を形成する個体の両方が生じたクローンがあった（表 VI-2）。そのクローンから、卵子を形成した 4 個体を選び、3カ月以上飼育をおこなった。その間、飼育水交換に際し、無作為に 10 匹を選び、飼育数を常に一定に保った。このヒドラは、有性生殖誘導なしに、自発的に有性生殖を行った。飼育開始後 36 日目に雄 2 個体が出現し、それを取り除いた。同 55 日目に、再び雄 1 個体が出現した。この時は、雌 2 個体を残し、他は全て取り除き、再び 10 匹に増やし、飼育を継続した。同 100 日目に、雄 3 個体が現れた。

同様の雄個体の高頻度出現は、SSE 系統の足組織再生体の雌個体（表 VI-1 参照）を、長期間飼育した場合にも観察された。

## Ⅶ章 考察

## 1. 生殖間幹細胞

### i. 生殖間幹細胞の分離

本研究において、チクビヒドラ (*H. magnipapillata*) から、2種の生殖間幹細胞の分離に成功した。第1は精子限定間幹細胞である(Ⅲ章、Nishimiya-Fujisawa & Sugiyama, 1993)。この細胞は、自己増殖すると共に、精子のみに分化し、体細胞(神経細胞、刺細胞)と卵子には分化しない。精子限定間幹細胞は、温度感受性間細胞を持つ *chim-C1* 系統の制限温度(25℃)処理と、*nem-1* 雄系統のヒドロキシウレア(HU)処理により、比較的高頻度に分離された(表Ⅲ・2、表Ⅳ・1)。

続いて、卵子限定間幹細胞を分離した(Ⅳ章)。卵子限定間幹細胞は、自己増殖すると共に、卵子のみに分化し、体細胞や精子には分化しない。この細胞は、*nem-1* (♂)の改良HU処理により、比較的高頻度に分離された(表Ⅳ・1)。

同様の生殖間幹細胞2種は、オリガクティス種からも、分離されている(Littlefield, 1985, 1991)。また、オリガクティス種では、精子および精子前駆体細胞を認識するモノクローナル抗体AC2が存在する。この抗体は、雄偽上皮ヒドラの大部分の間細胞を認識する(Littlefield, 1985a)と共に、正常ヒドラの間細胞の一部をも認識する。

本研究の結果と、オリガクティス種の実験結果(Littlefield, 1985a, b, 1991)を総合的に考慮すると、精子限定および卵子限定間幹細胞は、いずれもヒドラに存在する細胞であり、実験上のアーティファクトとして生じた細胞ではないと考えられる。

チクビヒドラ種の間幹細胞集団の構成は、オリガクティス種と同様に、生殖間幹細胞を含む複合集団(Littlefield, 1985b)であり、多能性間幹細胞のみの単一集団(Bosch & David, 1987)でないことが本研究で明らかとなった。

ここで本研究で使用したHU処理方法について、簡単に論ずる必要がある。HU処理に

よる生殖間幹細胞の分離は、間幹細胞集団に属す細胞を、無作為に1細胞だけ抽出し、クローン化する方法ではない。HUはS期の細胞を殺すため (Sinclair, 1965)、HU処理により分裂速度の遅い細胞が選択的に分離される。出芽による無性増殖期ヒドラにおける間幹細胞の細胞周期は、ブルガリス、オリガクティス両種で平均約24時間 (Campbell & David, 1974; Holstein & David, 1990) であるが、生殖間幹細胞の細胞周期はオリガクティス種で約3日と推定されている (Holstein & David, 1990)。この細胞周期の差のために、生殖間幹細胞がHU処理により分離されたと考えられる。

雄系統から、卵子限定間幹細胞が分離されたのは本報告が始めてである。系統 *nem-1* (♂) からは、精子限定間幹細胞と共に、卵子限定間幹細胞も分離された (Nishimiya-Fujisawa & Sugiyama, in preparation)。卵子限定間幹細胞が分離されたことも、精子限定間幹細胞との分裂速度の差を、より精密に利用した結果であるかもしれない。

*nem-1* の雄系統は、無性増殖中にも少量ではあるが精子形成を行う系統である。一方で、このヒドラにおいては、卵形成は雄性化 (後述) により抑えられている。このような系統では、精子限定間幹細胞は、分化により失われる分を補充して自己増殖するため、卵子限定間幹細胞よりも速く細胞分裂すると考えられる。従って、HU処理では、卵子限定間幹細胞は精子限定間幹細胞に比べ生き残りやすい事が示唆される。

しかし、この細胞は精子限定間幹細胞が共存すると雄性化 (後述) により分化発現できない。雌の偽上皮ヒドラを分離するためには、HU処理を改善し、卵子限定間幹細胞は生き残るが、ほとんどの精子限定間幹細胞が死滅する条件を設定する必要があった。2.5mM HU、3日処理 (図IV-1、表IV-1) はこの条件に近い。表IV-1において、HU処理が長期 (例えば3日) であるほど卵形成個体が多く、HU処理が短期 (例えば2日) であるほど、精子形成個体が多くなるのは以上の様なメカニズムによると考えている。しかし、実際には両者の細胞周期は調べられてない。

系統 chim-C1 の制限温度処理によるクローニングにおいても、間細胞の分裂速度が関与している可能性がある。系統 sf-1 は、chim-C1 と同じ温度感受性間細胞系譜を持つ。系統 sf-1 の制限温度処理による間幹細胞系譜の除去は、細胞周期の長い細胞（腺細胞）の方が、短い細胞（大型間細胞、小型間細胞）より長時間を必要とする（Marcum et al., 1980）。従って、細胞周期の長い生殖間幹細胞の方が、短い多能性間幹細胞より生き残り、分離されやすい可能性がある。

卵子限定間幹細胞の分離に関連し、未解決の問題が残されている。この細胞はチクビヒドラ種の雄から分離されたが、オリガクテイス種の雄からは分離されてない。その理由は不明であるが、3通りの可能性が考えられる。(1) オリガクテイス種にも、卵子限定間幹細胞は存在するが、従来の方法では分離できない。Littlefield (1985) が HU 処理を行った18℃では、オリガクテイス種は有性生殖を行わない。この条件下では、精子限定間幹細胞と卵子限定間幹細胞の細胞周期に有意な差は無く、HU 処理による選択的分離ができない可能性がある。両方の限定間幹細胞が混じって分離されると、雄性化のために、卵子限定間幹細胞の検出は困難である。(2) Littlefield が用いた雄ヒドラには卵子限定間幹細胞が存在しない。系統 nem-1 (♂) は、かつて雌であった記録がある。このように性転換して雄になった個体には、卵子限定間幹細胞が存在するが、孵化したときから雄である個体には、卵子限定間幹細胞は存在しない可能性がある（後記参照）。(3) オリガクテイス種では雄性化によって卵子限定間幹細胞が死滅する。チクビヒドラでは雄性化が起こっても卵子限定間幹細胞は生き残る（IV章）。

上記の可能性のうち、いずれが正しいか、今後の研究に待たねばならない。

## ii. 生殖間幹細胞としての長期増殖能

系統 nem-1 の雄から分離した雄、雌の偽上皮ヒドラは、強制給餌飼育により、2年間

以上増殖を続けた（図 V-1）。その間、無作為に選んだ個体には全て、間細胞が存在していた。この観察結果は、精子限定、卵子限定間幹細胞は、いずれも高い分裂増殖能を長期間、持続的に維持し、幹細胞としての必須条件を備えていることを示す。更にヒドラは、この幹細胞を親組織から芽体組織に確実に分配し、長期世代を通じ、安定に維持する仕組みも持つことを示す。この 2 性質が揃い、初めて出芽による長期世代を通じ、幹細胞として継続的に存在する事ができる。同様の観察結果は、オリガクティス種においても報告されている（Littlefield, 1985, 1991）。

## 2. 生殖間幹細胞が関与する性転換機構

偽上皮ヒドラの長期間維持において、卵子限定間幹細胞から精子限定間幹細胞への転換が認められた（V章）。ヒドラの細胞レベルの性転換は、この報告が初めてであり、個体レベルの性転換機構を理解する上で、重要な知見である。

### i. 卵子限定間幹細胞の精子限定間幹細胞への転換

系統 nem-1 由来の雌の偽上皮ヒドラ 3 クローンのうち、E1 の性は安定であった（図 V-1）。しかし、E2（図 V-1）及び E3（結果示さず）では、雄の偽上皮ヒドラが出現した。その原因として、E2 及び E3 の組織に、はじめから精子限定間幹細胞が混在していた可能性は考えられない。もし混在していたならば、その雄性化作用のために E2 及び E3 の卵子形成は、初めから抑制された筈である。従って、雌から雄への偽上皮ヒドラの性転換は、卵子限定間幹細胞が精子限定間幹細胞に変化した為と考えられる。この変化は、おそらく分化転換 (transdifferentiation) によると推察できる。しかし、HU 処理の後遺症や、他のメカニズムによる可能性も完全には排除できない。

系統 nem-1·f1（♀）は、nem-1（♂）が自然に性転換して生じた雌系統である。この

系統の小集団約 20 匹を、2 年間普通に飼育する間に、雄が 1 度出現した。この出現頻度は、雌偽上皮ヒドラの性転換頻度とほぼ同程度か、あるいはやや低い。この性転換は、上記の卵子限定間幹細胞から精子限定間幹細胞の転換で説明可能である。

偽上皮ヒドラの雄クローン S3 において、卵子と精巢の両方を形成する個体が、ただ 1 度だけ出現した (V 章 iii 節)。この卵子が、もともと存在したが抑制されていた卵子限定間幹細胞に由来するのか、あるいは精子限定間幹細胞が卵子限定間幹細胞に分化転換して形成されたのかは、不明である。いずれにせよ、通常、精子限定間幹細胞の存在下では、卵子限定間幹細胞の分化は雄性化のため抑制される。従って、S3 における卵子と精巢の形成は、何らかの原因で一時的に抑制が部分的に弱まり、その結果、卵子と精巢の形成が可能になったと考えられる。

この雄性化効果がある為に、雌偽上皮ヒドラの長期維持期間中に、たとえ精子限定間幹細胞が性転換し、卵子限定間幹細胞となっても、その検出は一般的に困難である。検出は、たまたま何らかの理由で雄性化抑制が解除された時のみに、可能である。従って、偽上皮ヒドラの雄クローン S1 (図 V-1)、S2 において、卵子を形成する個体は出現しなかったが (図 V-1)、これは必ずしも精子限定間幹細胞から卵子限定間幹細胞への性転換の不在を示すものではない。

## ii. 雌から雄への性転換 (雄性化)

雄性化 (masculinization) は、雌個体に雄組織を一時的に移植し (Goetsch, 1922)、雄の間細胞を導入すると (Sugiyama & Sugimoto, 1985)、雌組織が雄に性転換する現象である。オリガクテイス種 (Littlefield, 1986) およびチクビヒドラ種の雌偽上皮ヒドラ (表 V-1) は、雄性化を起こす能力を持つ。この事は、精子限定間幹細胞又はその細胞系譜が雄性化能力を持つ事を示す。

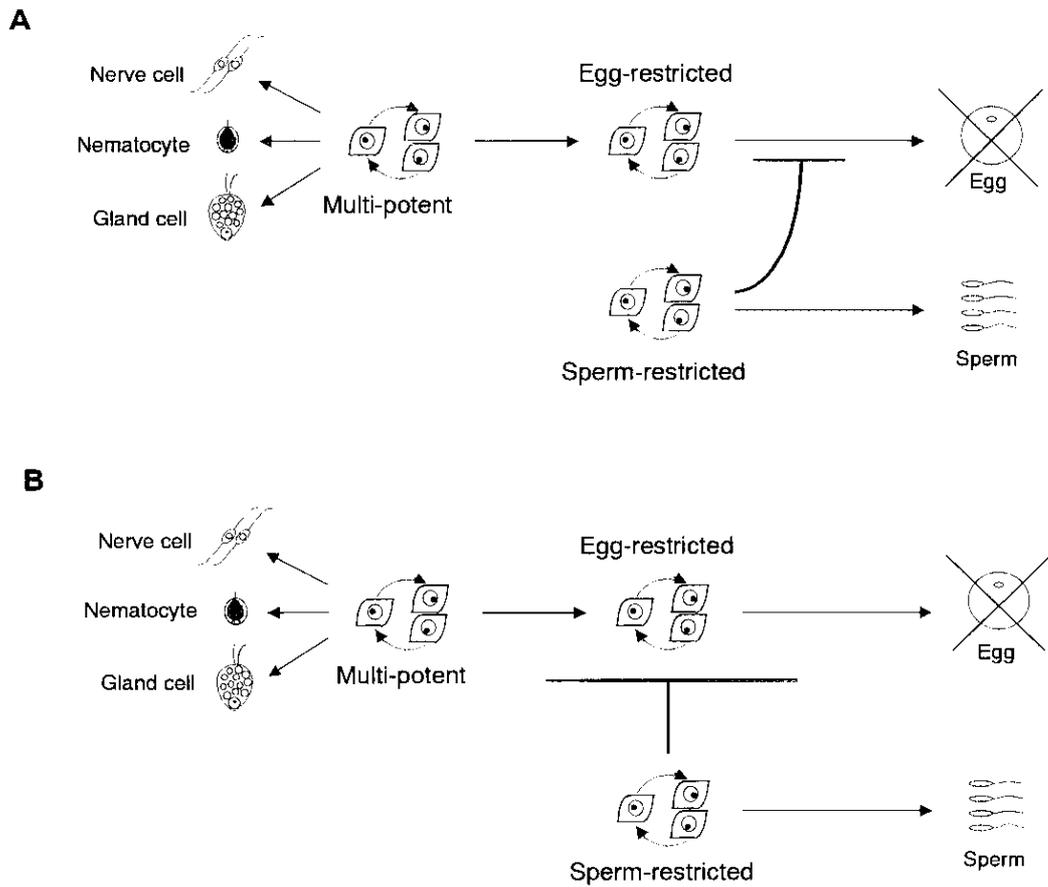
雄性化は、ヒドラの性転換の原因であろうと推察されていた (Littlefield, 1994) 。しかし従来、雄性化は実験的操作のみで観察される現象であり、雌から雄の自然性転換に本当に関与しているか否か、雄性化を起こす雄性間細胞の起源はどこか、不明であった。本研究で観察した卵子限定間幹細胞から精子限定間幹細胞への転換 (V章) は、この転換が、自然雄性化性転換のメカニズムである可能性を強く示唆する。

雄性化作用により、卵子形性のどの過程がどのような制御を受けるのかは、未解決である。Littlefield (1991) は、多能性間幹細胞から卵子限定間幹細胞が生ずる分化経路、あるいは卵子限定間幹細胞の生存を阻止し、そのため雄個体には卵子限定間幹細胞は存在しないと考えている (図VII-1B) 。しかし、本研究において雄個体の HU 処理により卵子限定間幹細胞が分離された事は、雄組織内で卵子限定間幹細胞が殺されず、生存増殖していることを示す (IV章) 。従って、少なくともチクビヒドラにおいては、雄性化の作用点は、卵子限定間幹細胞から卵形成までの分化経路であり、それ以前ではない事が示唆される (図VII-1A) 。

### iii. 雄から雌の性転換 (雄性化解除)

上述のように、雌から雄の性転換は、卵子限定間幹細胞の性転換とその後の雄性化で説明できる。しかし反対方向の雄から雌の性転換は、同じメカニズムでは説明不可能である。たとえ、細胞レベルで精子限定間幹細胞に性転換がおき、卵子限定間幹細胞に変わったとしても、両者の共存下では後者の分化は雄性化の為に抑制され、個体レベルの性転換には到らない。従って、雌から雄の性転換には、何らかの機構による雄性化の解除が必要である。

非人為的な雄性化解除の一般的メカニズムとして、出芽における精子限定間幹細胞の不等分配を考えることができる。



図Ⅶ-1 精子限定間幹細胞による雄性化作用点

A. 本研究結果から示唆される、精子限定間幹細胞による卵子分化の抑制点。卵子限定間幹細胞の自己増殖は阻害されない。 B. Littlefield により示唆された雄性化作用点。多能性間幹細胞から卵子限定間幹細胞への分化が抑制され、卵子限定間幹細胞の生存が阻止されている (Littlefield, 1991 より改編)。詳細は本文参照。

正常ヒドラの多能性間幹細胞は、体幹組織のほぼ全域に広く分布し、出芽に際しては、親組織から芽体組織に必ず分配される事が期待される。しかし、実際には、ごく稀に分配の少ない芽体、全く無い芽体（上皮ヒドラ）が形成される例も報告されている（Sugiyama, 1993）。

偽上皮ヒドラにおける生殖間細胞（生殖間幹細胞及び分化途中の細胞）の分布範囲は、比較的限定され、下限は出芽域付近にある（図 V・2 C、D；Littlefield, 1985,1991）。偽上皮ヒドラの芽体形成に際し、生殖間幹細胞は親組織から芽体組織に分配されるのが通常である（V章）。しかし、稀に全く分配の無い芽体が形成される事は充分予測できる。分布範囲が狭いため、この分配異常の起こる頻度は、正常ヒドラにおける多能性間幹細胞の分配異常の頻度より高いと考えられる。そして実際に、chim-C1 偽上皮ヒドラにおいては、生殖間幹細胞を失った個体が多数観察されている（III章）。

同様の分配異常が、正常ヒドラの精子限定間幹細胞に起こり、新しかももし、その芽体が卵子限定間幹細胞、あるいは卵子に分化する能力を有する雌性多能性間幹細胞を持っていれば、抑制解除により卵子分化が可能となり、雄から雌の性転換が成立すると考えられる。

しかし、これまで、精子限定間幹細胞の除去により、雄から雌への性転換が誘導された例は報告がなかった。本報告の足部組織再生実験（VI章）は、精子限定間幹細胞の除去による雄性化解除の初めての例である。この実験においては、雄 3 系統（nem-1、SSC・m、nB-2）の足部組織は再生後、雌に転換した（表 VI・1）。この転換は、足部組織に精子限定間幹細胞が不在のための、雄性化解除で説明可能である（後記参照）。

正常ヒドラの雄から雌の性転換が、実際に出芽におけ精子限定間幹細胞の分配異常に依るか否か、今後の検討が必要である。

### 3. 生殖間幹細胞と多能性間幹細胞

#### i. 生殖間幹細胞から多能性間幹細胞への転換

nem-1 由来の雌の偽上皮ヒドラの長期維持において、運動能、捕食能を回復し、正常ヒドラに戻った個体が 3 例観察された (V 章)。この回復は、卵子限定間幹細胞が多能性間幹細胞に転換した結果と考えられる。この観察結果は、卵子限定間幹細胞と多能性間幹細胞の細胞系譜上の関係が、非常に近い事を示唆する。従来より、卵子限定間幹細胞は多能性間幹細胞から分化して生まれると考えられてきた (Littlefield, 1991, 1994)。しかしその考えを支持する、直接的証拠は存在しなかった。この観察結果は、多能性間幹細胞から卵子限定間幹細胞に分化する経路が存在し、その分化方向は一方向的、非可逆的であるが、稀に逆戻り (脱分化) する事があることを示唆する。

#### ii. 多能性間幹細胞の性

私は、雌性および雄性の多能性間幹細胞は存在すると考える。前者は、無性増殖に際し、体細胞 (神経細胞、刺細胞) に分化し、有性生殖において (卵子限定間幹細胞を経由し) 卵子に分化する。一方後者は、体細胞と (精子限定間幹細胞を経て) 精子に分化する能力をもつ。

雌性および雄性多能性間幹細胞の存在を考える主要根拠は、足部組織再生実験である (VI 章)。足部組織には、生殖間幹細胞は存在せず、多能性間幹細胞のみが存在すると考えられる (V 章)。この足部組織を切り出し、再生させ、有性生殖の誘導を行った。その結果、使用した雄 5 系統は、2 タイプに区分できることが判明した。系統 SSC・m、nB-2、nem-1 は第 1 タイプに属す。この 3 系統は、足部切断前は雄、足部分離後はほとんど全て雌になった。系統 ms-1 と SSE は第 2 タイプに属す。この 2 系統は、切断の前後を通じ、雄であった。この結果は、以下のように解釈できる。

精子限定間幹細胞は、5 系統すべてにおいて、出芽域より上部に存在し、足部組織には存在しない。第 1 タイプの足部組織には、雌性多能性間幹細胞が存在する。そして足部組織再生体は雌となる。第 2 タイプの足部組織には、雄性多能性間幹細胞が存在する。そして足部組織再生体は雄となる。

第 1 タイプ 3 系統のうち、2 系統 (SSC・m、nem-1) には性転換の記録がある。おそらく、初め、第 1 タイプはいずれも雌であり、雌性多能性間幹細胞と卵子限定間幹細胞を持っていたが、卵子限定間幹細胞からの分化転換により精子限定間幹細胞が出現し、雄に転換した系統 (表現型雄) であると推察できる。一方、第 2 タイプは、初めから雄性多能性間幹細胞を持つ雄 (真性雄) と推察できる。

### iii. 卵子限定間幹細胞による雄性多能性間幹細胞の精子分化抑制

足部組織再生実験により、系統 SSE は雄性多能性間幹細胞を持つと判断された系統である。nem-1 由来の雌の偽上皮ヒドラに、SSE の足組織を移植すると、体細胞 (神経細胞、刺細胞) の分化は起こっても、精子形成は起こらず、卵子形成する場合があった (表 VI・2)。その個体のクローンを維持すると、雌性が維持されるが、突発的な雄個体の出現も認められた (VI 章 1・iii 節)。

この観察結果は次のように解釈できる。SSE の足部組織には雄性多能性間幹細胞が存在し、移植後の体細胞はこの多能性間幹細胞から分化する。しかし、同細胞の精子 (精子限定間幹細胞) への分化は、nem-1 偽上皮ヒドラからの卵子限定間幹細胞によって抑制される。この抑制力は完全ではなく、ときどき精子 (精子限定間幹細胞) の分化が起きる (雄が出現する)。

移植後、遅れて雄個体が度々出現する事は、SSE の足組織に残っていた精子限定間幹細胞による雄性化とは考えられない。雄性化は急激な性転換をもたらす (Tardent,

1966)。また、この雄個体の出現頻度は、*nem-1* 系統の卵子限定間幹細胞が、精子限定間幹細胞に分化転換する頻度 (図 V-1) では説明がつかないほど高い。

#### 4. 性決定モデル

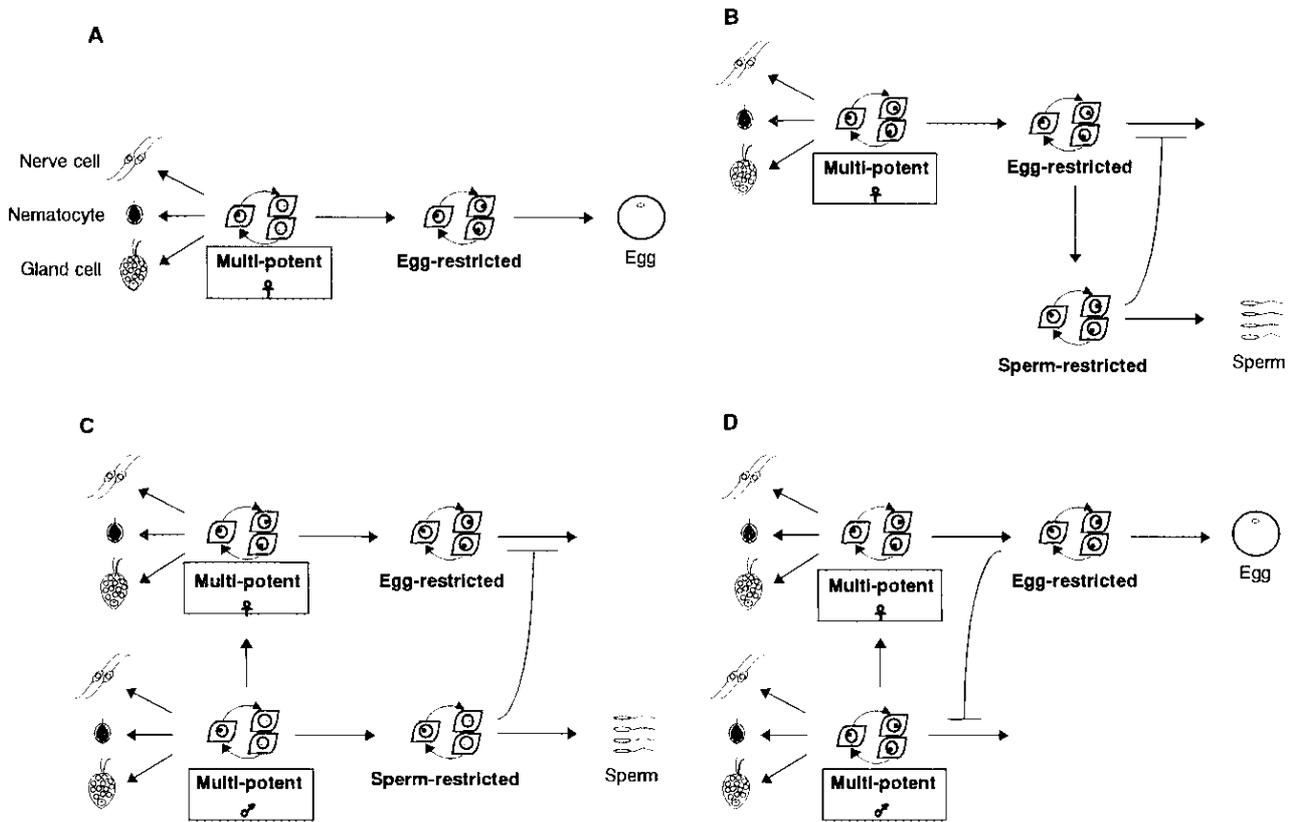
上に論じた事項を総合的に考察し、ヒドラの性決定機構のモデルを提案する (図 VII-2)。このモデルでは、性は初め出生時に決定され、その後間幹細胞の性転換により、修正、転換が起こる場合がある。そのために、生来の雌雄と、性転換により生じた雌雄とでは、間幹細胞集団の構成が異なる。

生まれたときからの雌 (図 VII-2 A) は、雌性多能性間幹細胞を持つ。この細胞から卵子限定間幹細胞が分化し、卵子形成を行う (SSB、SSC)。

上記雌から性転換により生じた雄 (図 VII-2 B) は、雌性多能性間幹細胞を持つ。この細胞から卵子限定間幹細胞が分化している。この卵子限定間幹細胞の (分化) 転換により、精子限定間幹細胞が生じ (V 章)、精子形成を行う。また精子限定間幹細胞は、卵子限定間幹細胞からの卵形成を抑制する (*nem-1*、SSC·m、nB-2)。このタイプは、分化転換により生じた精子限定間幹細胞により、偶発的に雄性化された雄である。このタイプを表現型雄 (phenotypic male)、または偶発雄性化雌 (spontaneously masculinized female) と名付ける。

精子限定間幹細胞は、その局在のために、芽体に分配されないことがある (本章)。その場合、表現型雄は、再び雌に戻る (*nem-1*·f)。

生まれたときからの雄 (図 VII-2 C) には、雄性多能性間幹細胞が存在する。この細胞から精子限定間幹細胞が分化し、精子形成を行う。Bosch & David (1986) は、体細胞突然変異により、雄性多能性間幹細胞が雌性多能性間幹細胞に変化すると推測している。この体細胞突然変異が実際に起こるか否か、今の所、不明である。しかし、仮に起きるとして



図VII-2 性決定機構のモデル

- A. 生まれた時から雌である個体。B. 生来の雌から雄へ性転換した個体（表現型雄）。
- C. 生来の雄において、一部雄性多能性間幹細胞が雌性多能性間幹細胞に転換した場合。
- D. Cの個体から精子限定間幹細胞を分配されなかったために生じた雌個体。詳細は本文参照。

も、精子限定間幹細胞が存在する限り、雄性化作用により卵形成は起こらない (ms-1、SSE)。

上記雄から性転換により生じた雌の場合 (図 VII-2D)、この雌は、出芽に際し、精子限定間幹細胞が芽体に分配されない為に生じる。その場合、あらかじめ存在したか、あるいは先に分化していた卵子限定間幹細胞により、新たな精子限定間幹細胞の分化が抑制され、卵子形成が起きる。性不安定なヒドラは、このタイプに属する可能性がある。このタイプの雌は、実験的に作成されているが (SSE 足組織を nem-1 の雌の偽上皮ヒドラに移植)、自然界に存在するか否かは、明らかでない。

上記のモデルは、本研究の結果のみならず、Littlefield がオリガクテイス種を用いて行った一連のクローニング実験 (1985a, 1985b, 1991a) と、Bosch and David (1987, 1986) の再集合体クローニング実験の主要結果も、矛盾無く説明できるモデルである。

しかし、ヒドラの間幹細胞集団の構成に関し、未解決の重要問題が残されている。

その第 1 は、多能性間幹細胞の性は、本当に雄または雌に決定されているか否かである。現在の主要実験結果は、決定されているとして矛盾無く説明可能である。しかし、足部組織再生実験以外の、より厳密な方法を用い、多能性間幹細胞のクローニングを行う必要がある。本研究の結果、ヒドラ間幹細胞の構成は、予想以上に複雑であり、しかも系統により異なることが示されている。従って、今後のクローニング実験はいろいろ性質の異なる系統を多数用いて行う必要がある。

第 2 の問題点は、体細胞限定間幹細胞が存在するか否かである。多能性間幹細胞から体細胞 (神経細胞、刺細胞) に分化する過程上に、体細胞 (神経細胞、刺細胞) のみに分化範囲の限定された間幹細胞が存在する可能性が考えられる。しかしこのタイプは未分離である。

第3の問題点は、腺細胞に分化する幹細胞である。腺細胞に分化範囲の限定された幹細胞が存在するのか、あるいは神経細胞、刺細胞に分化する幹細胞が、腺細胞にも分化するのか、全く検討されてない。

今後、新しいクローニング方法の開発を含め、これら問題点の研究が必要である。同時に、細胞レベル、組織レベルの研究と並行し、分子レベル研究も本格的に開始しなければならない。

引用文献

97-A

- BODE, H. R., FLICK, K. M. and SMITH, G. M. (1976). Regulation of interstitial cell differentiation in *Hydra attenuata*. I. Homeostatic control of interstitial cell population size. *J. Cell Sci.*, 20, 20-46.
- BODE, H. R., HEIMFELD, S., CHOW, M. A., and HUANG, L. W. (1987). Gland cells arise by differentiation from interstitial cells in *Hydra attenuata*. *Dev. Biol.*, 122, 577-585 .
- BODE, H.R., GEE L.W., and CHOW M. (1990). Neuron differentiation in hydra involves dividing intermediates *Dev. Biol.*, 139, 231-243.
- BOSCH, T. C. G. and DAVID, C. N. (1986). Male and female stem cells and sexual reversal in *Hydra polyops*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 9478-9482.
- BOSCH, T. C. G. and DAVID, C. N. (1987). Stem cells of *Hydra magnipapillata* can differentiate into somatic cells and germ line cells. *Dev. Biol.*, 121, 182-191.
- BOSCH, T. C. G., KRYLOW, S. M., BODE, H. R. and STEELE, R. E. (1988). Thermotolerance and synthesis of heat shock proteins: These responses are present in *Hydra attenuata* but absent in *Hydra oligactis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 7927-7931.
- BOSCH, T.C.G., ROLLBUEHLER, R, SCHEIDER, B. and DAVID, C.N. (1991). *Roux's Arch. of Dev. Biol.*, 200, 269-276.
- BRIDGE, D, SUGIYAMA, T. and BUSS, L.W. (1992). Variation of mitochondrial structure in *Hydra*. Manuscript in preparation.
- BURNETT, A. L. and DIEHL, N. A. (1964). The nervous system of *Hydra*. III. The initiation of sexuality with special reference to the nervous system. *J. Exp. Zool.*, 157, 237-250.
- CAMPBELL, R. D. (1976). Elimination of hydra interstitial and nerve cells by means of colchicine. *J. Cell Sci.*, 21, 1-13.
- CAMPBELL, R. D. ( 1987 ). A new species of *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa) from North America with comments on species clusters within the genus. *Zool. J. of Linnean Society*, 91, 253-263.
- CAMPBELL, R. D. and DAVID, C. N. (1974). Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. II. Interstitial cells. *J. Cell Sci.*, 16, 349-358.
- DAVID, C. N. (1973). A quantitative method for maceration of hydra tissue. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.*, 171, 259-268.
- DAVID, C. N., FUJISAWA, T. and BOSCH, T. C. G. (1991). Interstitial stem cell proliferation in hydra: Evidence for strain-specific regulatory signals. *Dev. Biol.*, 148, 501-507.
- DAVID, C. N. and MURPHY, S. (1977). Characterization of interstitial stem cells in hydra by cloning. *Dev. Biol.*, 58, 372-383.

DAVID, C. N., and PLOTNIK, I. (1980). Distribution of interstitial stem cells in *Hydra*. *Dev. Biol.*, 76, 175-184.

DIEHL, F. A. and BURNETT, A. L. (1964). The role of interstitial cells in the maintenance of hydra. I. Specific destruction of interstitial cells in normal, asexual, non-budding, animals. *J. Exp. Zool.*, 155, 253-260.

EWER R.F. (1948). A review of Hydridae and two new species of *Hydra* from Natal. *Proc. Zool. Soc. London*, 118, 226-244.

藤沢敏孝 (1992). 幹細胞研究のモデル ヒドラ. *造血因子*, 3, 71-77.

FUJISAWA, T. (1992). Homeostatic recovery of interstitial cell populations in *Hydra*. *Dev. Biol.*, 150, 185-192.

GIERER, A., BERKING, S., BODE, H., DAVID, C. N., FLICK, K., HANSMANN, G., SCHALLER, H. and TRENKNER, E. (1972). Regeneration of hydra from reaggregated cells. *Nature New Biology*, 239, 98-101.

GOETSCH, W. (1922). Gonochorismus und Hermaphroditismus bei Hydrozoen. *Zool. Anz.*, 55, 30-34.

HEIMFELD, S. & BODE, H.R. (1984). Interstitial cell migration in *Hydra attenuata*. I. Selective migration of nerve cell precursors as the basis for position-dependent nerve cell differentiation. *Dev. Biol.*, 105, 10-17.

HOLSTEIN, T.W. and DAVID, C.N. (1986). The properties of nerve cell precursors in hydra. *Dev. Biol.*, 115, 18-26.

HOLSTEIN, T.W. and DAVID, C.N. (1990a). Cell cycle length, cell size, and proliferation rate in hydra stem cells. *Dev. Biol.*, 142, 392-400.

HOLSTEIN, T.W. and DAVID, C.N. (1990b). Putative intermediates in the nerve cell differentiation pathway in hydra have properties of multipotent stem cells. *Dev. Biol.*, 142, 401-405.

HOLSTEIN, T.W., HOBMEYER, E. and DAVID, C.N. (1991). Pattern of epithelial cell cycling in *Hydra*. *Dev. Biol.*, 148, 602-611.

HONEGGER, T.G., ZUERRER, D. and TARDENT, P. (1989). Oogenesis in *Hydra carnea*: A new model based on light and electron microscopic analyses of oocyte and nurse cell differentiation. *Tissue & Cell*, 21, 381-393.

HYMANN, L.H. (1931). Taxonomic studies on the hydras of North America. III. Rediscovery of *Hydra carnea* L. Agassiz (1980) with a description of its characters. *Trans. Amer. Microscop. Soc.*, 50, 20-29.

ITO, T. (1952). Studies on the reproduction of hydras III. Sexual periodicity found on the hydra, *Hydra magnipapillata* Ito. *Meoirs of the Ehime Univ., Sect. II (Science)*, 1, 53-63.

ITO, T. (1954). Studies on the reproduction of hydras VI. Induction of the sexual reproduction in *Pelmatohydra robusta* Ito. *Memoirs of the Ehime Univ., Sect. II (sci.)*, 2, 51-60.

北村幸彦、園田隆 (1983). 血液幹細胞 - 生物学的側面 代謝、20、1637-1642.

LENTZ, T. L. (1966). "The Cell Biology of HYDRA". North Holland Publ., Amsterdam.

LITTLEFIELD, C. L. (1984). The interstitial cells control the sexual phenotype of heterosexual chimeras of hydra. *Dev. Biol.*, 102, 426-432.

LITTLEFIELD, C. L. (1985a). Spermatogenesis in *Hydra oligactis*. I. Morphological description and characterization using a monoclonal antibody specific for cells of the spermatogenic pathway. *Dev. Biol.*, 110, 308-320.

LITTLEFIELD, C. L. (1985b). Germ cells in *Hydra oligactis* males. I. Isolation of a subpopulation of interstitial cells that is developmentally restricted to sperm production. *Dev. Biol.*, 112, 185-193.

LITTLEFIELD, C. L. (1986). Sex determination in Hydra: Control by a subpopulation of interstitial cells in *Hydra oligactis* male. *Dev. Biol.*, 117, 428-434.

LITTLEFIELD, C. L. (1991a). Cell lineages in *Hydra*: Isolation and characterization of an interstitial stem cell restricted to egg production in *Hydra oligactis*. *Dev. Biol.*, 143, 378-388.

LITTLEFIELD, C. L. (1991b). Spermatogenesis in *Hydra oligactis*. II. How temperature controls the reciprocity of sexual and asexual reproduction. *Dev. Biol.*, 146, 292-300.

LITTLEFIELD, C. L. (1994). Cell-cell interactions and the control of sex determination in hydra. *Seminars in Dev. Biol.*, 5, 13-20.

LITTLEFIELD, C.L., DUNNE, J. and BODE, H.R. (1985). Spermatogenesis in *Hydra oligactis* I. Morphological description and characterization using a monoclonal antibody specific for cells of the spermatogenic pathway. *Dev. Biol.*, 110, 308-320

MARCUM, B. A. and CAMPBELL, R. D. (1978a). Development of hydra lacking nerve and interstitial cells. *J. Cell Sci.*, 29, 17-33.

MARCUM, B. A. and CAMPBELL, R. D. (1978b). Developmental roles of epithelial and interstitial cell lineages in hydra; analysis of chimeras. *J. Cell Sci.*, 32, 233-247.

MARCUM, B. A., FUJISAWA, T. and SUGIYAMA, T. (1980). A mutant hydra strain (sf-1) containing temperature-sensitive interstitial cells. In "Developmental and Cellular Biology of Coelenterates" (P. Tardent and R. Tardent, eds.), pp. 429-434. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

NISHIMIYA-FUJISAWA, C. and SUGIYAMA, T. (1993). Genetic analysis of developmental mechanisms in Hydra. XX. Cloning of interstitial stem cells restricted to the sperm differentiation pathway in *Hydra magnipapillata*. *Dev. Biol.*, 157, 1-9.

- NISHIMIYA-FUJISAWA, C. and SUGIYAMA, T. (1995). Genetic analysis of developmental mechanisms in Hydra. XXII. Two types of female germ stem cells are present in a male strain of *Hydra magnipapillata*. (accepted in *Dev. Biol.*)
- NODA, K. (1971). Reconstitution of dissociated cells of hydra. *Zool. Magazine*, 80, 99-101.
- SCHMIDT, T. and DAVID, C. N. (1986). Gland cells in *Hydra*: Cell cycle kinetics and development. *J. Cell Sci.*, 85, 197-215.
- SILAUTTERBACK, D.B. and Fawcett, D. W. (1959). The development of the cnidoblasts of Hydra. An electron microscope study of cell differentiation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5, 441-452.
- SUGIYAMA, T. and FUJISAWA, T. (1977). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. I. Sexual reproduction of *Hydra magnipapillata* and isolation of mutants. *Dev. Growth Differ.*, 19, 187-200.
- SUGIYAMA, T. and FUJISAWA, T. (1978). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. II. Isolation and characterization of an interstitial cell-deficient strain. *J. Cell Sci.*, 29, 35-52
- SUGIYAMA, T. and SUGIMOTO, N. (1985). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. XI. Mechanism of sex reversal by heterosexual parabiosis. *Dev. Biol.*, 110, 413-421.
- TARDENT, P. (1966a). Experimente zur Frage der Geschlechtsbestimmung bei *Hydra attenuata* (Pall.). *Rev. Suisse Zool.*, 73, 482-492.
- TARDENT P. (1966b). Zur Sexualbiologie von *Hydra attenuata* (Pall.). *Rev. Suisse Zool.*, 73, 357-381.
- TARDENT, P. (1968). Experiments about sex determination in *Hydra attenuata* (Pall). *Dev. Biol.*, 17, 483-511.
- TAKANO, J. and SUGIYAMA, T. (1983). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. VIII. Head-activation and head-inhibition potentials of a slow-budding strain (L4). *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 80, 155-173.
- TERAGAWA, C.K. and BODE, H.R. (1990). Spatial and temporal patterns of interstitial cell migration in *Hydra vulgaris*. *Dev. Biol.*, 138, 63-81.
- TERADA, H., SUGIYAMA, T. and SHIGENAKA, Y. (1988). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. X VIII. Mechanism for elimination of the interstitial cell lineage in the mutant strain sf-1. *Dev. Biol.*, 126, 263-269.
- WARRIOR, R. and GALL, J. (1985). The mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* and *Hydra littoralis* consists of two linear molecules. *Arch. Sc. Geneve*, 3, 439-445.

謝辭

101-A

素晴らしい環境で学び、研究する機会を与えて下さいました、指導教官の杉山勉先生に心から感謝いたします。先生はいつも暖かく励まして下さいました。先生の適切なお指導、忍耐、寛容さがなければこの研究は成り立ちませんでした。

発生遺伝研究部門の藤沢敏孝助教授、清水裕先生、服田昌之先生、客員教授の小泉修先生には、いつも適切で、親切なお指導をいただきました。心から感謝いたします。

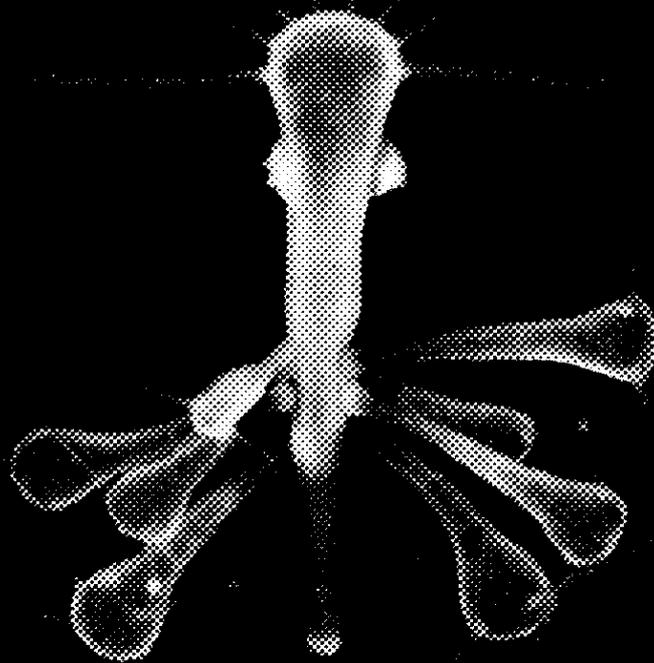
当専攻の今村孝先生、広瀬進先生、中辻憲夫先生、嶋本伸雄先生、城石俊彦先生、林茂生先生、上田均先生、以上の先生方にはプログレスレポート、セミナーなどでお世話になり、いろいろ助言をいただきました。有り難うございました。また、東谷篤先生には時間を惜しまず、初歩的な分子生物学のお指導をしていただきました。この論文の仕事にはなりませんでしたが、無駄にしないようにいたしたいと思います。どうも有り難うございました。

ミュンヘン大学の David 教授、Bosch 博士にはモノクローナル抗体 C41 を惜しみなく分けていただきました。両先生、カリフォルニア大学の Bode 教授、Littlefield 博士には、いつも有益な議論をしていただきました。有り難うございました。

発生遺伝研究部門の杉本典夫さん、渡辺たつのさん、川原昌子さん、そして増島育子さんには公私にわたりお世話になり、楽しい研究生生活を送ることができました。有り難うございました。

最後に、筑波大学の岡田益吉先生には、お会いする度に励ましのお言葉をいただきました。岡田先生は、私に発生学のおもしろさを示して下さいました先生でもあります。有り難うございました。

# Developmental Biology



ACADEMIC PRESS, INC. *Harcourt Brace & Company*  
San Diego New York Boston London Sydney Tokyo Toronto

**Cover Photo.** Pseudo-epithelial hydra containing a subset of interstitial stem cells that are capable of differentiating into sperm, but not into nerve cells or nematocytes.

Reprinted from Volume 157, Number 1, May 1993.

---

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

(ISSN 0012-1606)

Published monthly by Academic Press, Inc., 6277 Sea Harbor Drive, Orlando, FL 32887-4900

1993: Volumes 155-160. Price: \$1308.00 U.S.A. and Canada; \$1543.00 all other countries

All prices include postage and handling.

All correspondence and subscription orders should be addressed to the office of the Publishers at 6277 Sea Harbor Drive, Orlando, FL 32887-4900. Send notices of change of address to the office of the Publishers at least 6 to 8 weeks in advance. Please include both old and new addresses. POSTMASTER: Send changes of address to *Developmental Biology*, 6277 Sea Harbor Drive, Orlando, FL 32887-4900.

Second class postage paid at Orlando, FL, and at additional mailing offices.

Copyright © 1993 by Academic Press, Inc.

DEVELOPMENTAL BIOLOGY is a registered trademark  
of Academic Press, Inc. (Harcourt Brace & Company)

## Genetic Analysis of Developmental Mechanisms in Hydra

XX. Cloning of Interstitial Stem Cells Restricted to the Sperm Differentiation Pathway in *Hydra magnipapillata*CHIEMI NISHIMIYA-FUJISAWA<sup>1</sup> AND TSUTOMU SUGIYAMA*Department of Genetics, Graduate University for Advanced Studies and Laboratory of Developmental Genetics, National Institute of Genetics, Mishima 411, Japan*

Accepted January 5, 1993

*Hydra magnipapillata* polyps containing a subpopulation of interstitial stem cells restricted to the germline differentiation pathway were obtained. Chim-C1 is a chimeric strain produced by combining wild-type epithelial cell lineages with a temperature-sensitive interstitial cell lineage. It grows normally at 18°C. When cultured at 25°C, many polyps lost interstitial cells and their differentiation products (nerve cells and nematocytes), and subsequently turned into epithelial hydra unable to move or feed. Some polyps, however, turned into an unexpected type, termed "pseudo-epithelial hydra." These polyps resembled epithelial hydra in the absence of nerve cells or nematocytes in the tissue and in their inability to move or feed. In contrast to epithelial hydra, however, their tissue contained proliferating interstitial cells. Similar pseudo-epithelial hydra were also produced from another strain, nem-1, by means of hydroxyurea treatment. Clones of pseudo-epithelial hydra were maintained through force-feeding over 130 days for chim-C1 and over 2 years for nem-1. In both cases, interstitial cells proliferated throughout the period without producing any nerve cells or nematocytes. These interstitial cells, however, differentiated into sperm. Thus, the interstitial cells present in pseudo-epithelial hydra were able to differentiate into gametic cells but not into somatic cells (nerve cells and nematocytes). These observations suggest that, as Littlefield (1985, *Dev. Biol.* 112, 185-193) has shown for *H. oligactis*, the interstitial stem cell population in *H. magnipapillata* includes a subpopulation which can differentiate only into gametic cells. © 1993 Academic Press, Inc.

## INTRODUCTION

Interstitial cells in hydra are undifferentiated stem cells which divide rapidly. At the same time they give rise by differentiation to somatic (nerve, nematocyte, and gland) cells in asexual animals (David and Murphy, 1977; Schmidt and David, 1986; Bode *et al.*, 1987), and

also gametic cells in sexual animals (Lentz, 1966). Proliferation and differentiation of these cells have been the subject of extensive investigation in recent years (for example see Teragawa and Bode, 1990; Bosch *et al.*, 1991; David *et al.*, 1991; Littlefield, 1991a,b; Fujisawa, 1992).

One controversial issue exists on interstitial stem cells. These cells belong to one morphological cell type called "big interstitial cells" (David, 1973). They all look alike, and no subtypes within this type have been identified on a structural basis. However, it is not clear whether all members of the interstitial stem cells have equal differentiation capabilities. Two types of stem cell cloning experiments, which produced different results, have been carried out.

Littlefield (1985b, 1991a) used hydroxyurea (HU) treatment to reduce the interstitial cell numbers in *Hydra oligactis* and succeeded in obtaining polyps containing only a few surviving interstitial cells. Some interstitial stem cells cloned in this way differentiated only into sperm or eggs, but not into nerve cells or nematocytes. A monoclonal antibody, AC2, specifically recognizes sperm and sperm-precursor cells in sexually differentiated male polyps of *H. oligactis*. This antibody also recognized the sperm-restricted stem cells present in the HU-treated polyps. AC2-positive interstitial cells were also present in small numbers in asexual male, but not in female, polyps in this species (Littlefield, 1985a). These observations show that the interstitial stem cell population in *H. oligactis* contains a subpopulation whose differentiation is limited to gametic cells.

In another type of cloning experiment, Bosch and David (1987) used a cell reaggregation method (Noda, 1971; Gierer *et al.*, 1972) to clone interstitial stem cells in *H. magnipapillata*. They prepared aggregates using a mixture of a small number of wild-type cells (statistically less than one interstitial stem cell per aggregate) and a much larger number of cells of a mutant strain sf-1 which contained temperature-sensitive interstitial

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.

stem cells. They held the aggregates at nonpermissive temperature to eliminate all the mutant, but not the wild-type, interstitial cells. The aggregates then regenerated to yield new polyps containing wild-type interstitial stem cell clones. All the stem cells cloned in this way differentiated into both somatic (nerve cells and nematocytes) and gametic cells, suggesting that all cloned stem cells from *H. magnipapillata* are able to differentiate into both somatic and germline cells.

It is not clear why gamete-restricted stem cells were cloned from *H. oligactis*, but not from *H. magnipapillata*. This study was carried out to clarify this issue. It was started from an unexpected observation made with a chimeric strain of *H. magnipapillata*, chim-C1. This strain, like chim-B1 (previously described by Marcum *et al.*, 1980), was produced by combining the epithelial cell lineage of a wild-type strain and the temperature-sensitive interstitial cell lineage of a mutant strain sf-1 (Sugiyama and Fujisawa, 1978; Marcum *et al.*, 1980). It grew normally at a permissive temperature of 18°C. When cultured at a nonpermissive temperature of 25°C, we expected that, like sf-1 and chim-B1, it would lose all its temperature-sensitive interstitial cells and their differentiation products (nerve cells and nematocytes), and turn into epithelial hydra unable to move or feed.

When chim-C1 was subjected to 25°C culture, some polyps turned into epithelial hydra as expected. However, others turned into an unexpected type of polyp, termed "pseudo-epithelial hydra." These polyps resembled epithelial hydra in morphology, in the absence of nerve cells or nematocytes in their tissue, and by their inability to move or feed.

Surprisingly, however, their tissue contained significant numbers of interstitial cells. Furthermore, when pseudo-epithelial hydra were maintained by force-feeding (Marcum and Campbell, 1978a), their interstitial cells continued to proliferate without differentiating into nerve cells or nematocytes. We initially thought that these cells were a somatic mutant line of interstitial stem cells which had lost the ability to differentiate. However, some pseudo-epithelial hydra developed testes containing highly motile sperm, indicating the possibility that separate germline stem cells existed in *H. magnipapillata* as in *H. oligactis* (Littlefield, 1985b), and that they were present in pseudo-epithelial hydra.

To further check this possibility, we produced pseudo-epithelial hydra from another strain of *H. magnipapillata*, nem-1, by means of hydroxyurea treatment to reduce the interstitial cell numbers (Bode *et al.*, 1976; Littlefield, 1985b). The interstitial cells present in the resultant pseudo-epithelial hydra were then examined for differentiating capacity.

Evidence obtained with the pseudo-epithelial hydra produced from the two strains strongly supports the

conclusion that the interstitial stem cell population in *H. magnipapillata* includes a subpopulation which is restricted to germline differentiation.

## MATERIALS AND METHODS

### *Strains and Culture*

Two strains of *H. magnipapillata*, belonging to the *vulgaris* (common hydra) group of Campbell (1987), were used. Strain chim-C1 is a chimeric hydra, whose tissue consists of wild-type ectodermal and endodermal epithelial cell lineages of strain 75-23-1 and the temperature-sensitive interstitial cell lineage of strain sf-1 (Sugiyama and Fujisawa, 1978). It was produced by the interstitial cell elimination-reintroduction method of Marcum and Campbell (1978b) as previously described for chim-B1 (Marcum *et al.*, 1980). Strain nem-1 is a mutant strain originally isolated for altered morphology in one of the four nematocyst types (holotrichous isorhiza) (Sugiyama and Fujisawa, 1977). It also has a strong capacity to differentiate sexually (Sugiyama and Sugimoto, 1985).

Both strains were cultured under the controlled mass culture conditions described by Takano and Sugiyama (1983). Freshly hatched brine shrimp nauplii were daily given as food, and modified M-solution (Sugiyama and Fujisawa, 1977) was used as the culture solution.

Unless otherwise stated, all culture was done in a constant temperature room maintained at  $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , with 12-hr light and 12-hr dark periods.

### *Interstitial Cell Elimination*

Interstitial cell elimination was done using newly dropped young polyps collected from the mass culture described above. To reduce the number of temperature-sensitive interstitial cells in chim-C1, animals raised at 18°C (permissive temperature) were cultured at 25°C (nonpermissive temperature) for 4-8 days, and then returned to 18°C.

HU selectively kills interstitial cells in hydra (Bode *et al.*, 1976; Littlefield, 1985b). To reduce the interstitial cell number in the nem-1 tissue, polyps were treated in culture solution containing 5 mM HU for 2-4 days (Littlefield, 1985b), and then returned to the normal culture solution. Animals were fed once daily as normal during both types of the treatment.

### *Culturing of Nonfeeding Animals*

Polyps which lost self-feeding ability through treatment were maintained by the force-feeding procedure of Marcum and Campbell (1978a), using the culture solution containing the antibiotics rifampicin and kanamycin (each at 50 mg/liter). Only the original polyps sub-

jected to the treatment were kept for initial examination (see below), and buds produced and dropped from them were discarded. In later experiments, buds produced by pseudo-epithelial hydra were also maintained as clones for sexual differentiation experiments.

#### *Staining*

Two different procedures were used to visualize the interstitial cell lineage in the tissue of treated polyps. Toluidine blue staining, originally described by Diehl and Burnett (1964) and modified by Littlefield (1985b), was used for chim-C1 polyps. Large and small interstitial cells, nematoblasts, and nematocytes were strongly stained against the background of faintly stained tissue by this staining.

A monoclonal antibody C41 (David *et al.*, 1991), generously provided by Drs. T. Bosch and C. N. David, was used for nem-1 polyps. Large and small interstitial cells and nematoblasts in the early stage of development were indirectly stained with FITC using this antibody following the protocol of David *et al.* (1991).

#### *Sexual Differentiation*

Sexual differentiation of control (self-feeding) polyps was induced by the combination of gentle aeration of the culture solution and reduced feeding previously described (Sugiyama and Fujisawa, 1977). In the case of nem-1, it was also induced by starvation alone without aeration.

For nonfeeding polyps, the following procedures were used. In the case of chim-C1, a small number (1–5) of nonfeeding polyps were placed in a 200-ml beaker containing about 150 ml of culture solution, and the culture was gently aerated at 18°C. Polyps were force-fed every other day, and the culture solution was replaced with fresh solution every day. No antibiotics were added to the culture solution during this treatment (to avoid foaming). This induced sexual differentiation in 2–3 weeks in many cases. When unsuccessful, undifferentiated polyps were returned to the normal force-feeding culture which included antibiotics in the culture solution and daily feeding for 2–3 weeks. They were then subjected again to the same treatment.

Nonfeeding nem-1 polyps were kept in the culture solution containing antibiotics without any feeding. The culture solution was changed every day, and the gastric cavities of polyps were washed every other day using a polyethylene micropipet to remove brown debris accumulating in the cavity. Sexual differentiation generally occurred in about a week under these conditions. When unsuccessful, polyps were returned to normal daily force-feeding for 2–3 weeks, before subjecting them again to the same treatment.

## RESULTS

Pseudo-epithelial hydra are defined as hydra containing proliferating interstitial cells but no nerve cells, nematoblasts, or nematocytes in their tissue.

#### *Production of Pseudo-epithelial Hydra from Strain chim-C1*

Pseudo-epithelial hydra were produced from strain chim-C1 containing temperature-sensitive interstitial cells by temperature treatment at 25°C for 4–8 days (see Materials and Methods). The treated polyps lost the ability to capture and ingest food, indicating loss of nerve cells and nematocytes from their tissue. These nonfeeding polyps were maintained by force-feeding once daily (Materials and Methods).

At about 4 weeks after the end of the treatment, the treated polyps were stained with toluidine blue (Materials and Methods). (Hereafter, days or weeks in the experiment represent the time from the end of the treatment, unless otherwise stated.) This method strongly stains large and small interstitial cells, nematoblasts, and nematocytes. Figure 1A shows a control chim-C1 polyp cultured at 18°C. Strongly stained cells belonging to the interstitial cell lineage are present in large numbers. Figures 1B–1D show three types of polyps produced by the treatment. Figure 1B shows an example of the incomplete removal of the interstitial cell lineage. Large and small interstitial cells, nematoblasts, and mature nematocytes are present in lower numbers than in the control polyp (Fig. 1A). This type of polyp had already recovered self-feeding ability or would soon recover it if continued to be force-fed. Figure 1C shows tissue containing only a small number of large interstitial cells (pseudo-epithelial hydra). There is no evidence for the differentiation of small interstitial cells, nematoblasts, or nematocytes in the tissue. Figure 1D shows tissue that is completely free of strongly stained cells belonging to the interstitial cell lineage (epithelial hydra).

In a parallel experiment, cell types present in individual polyps were quantitatively examined using the maceration procedure of David (1973). Three types of polyps were again observed (Table 1). One type (incomplete removal) contained large and small interstitial cells, nematoblasts, nematocytes, nerve cells, and gland cells, but in reduced numbers. Another type (pseudo-epithelial hydra) contained a low number of large interstitial cells, but no nerve cells, nematoblasts, or nematocytes. The third type (epithelial hydra) contained only epithelial and gland cells.

The combined results of examination with toluidine blue staining and maceration are summarized in Fig. 2A. An increase in the length of the treatment decreased

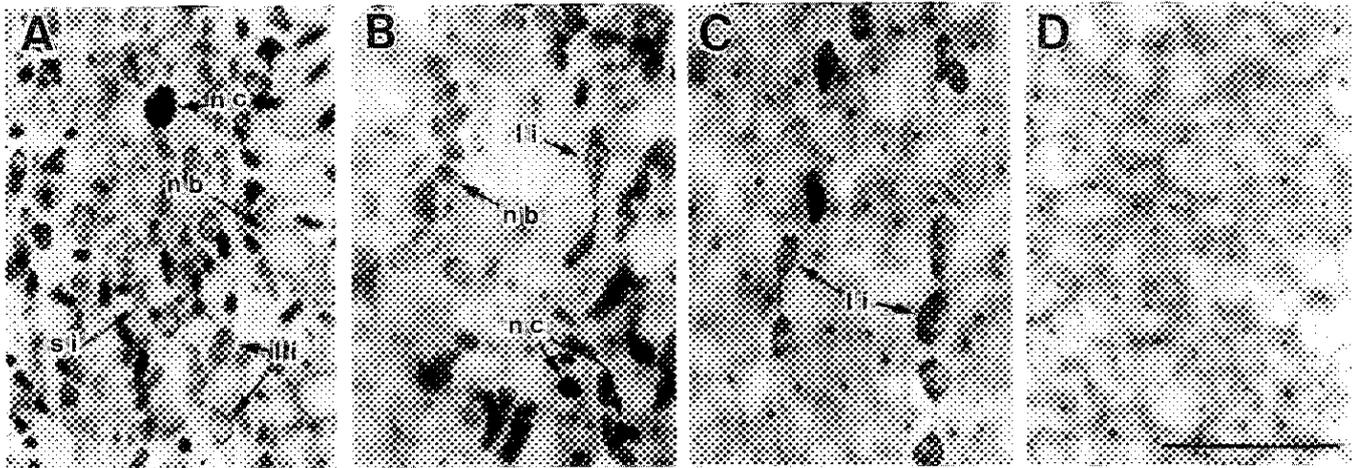


FIG. 1. Interstitial cell lineage present in the tissue of chim-C1 polyps treated at 25°C for 5 days, and stained with toluidine blue 30 days later. Large interstitial cells (li), small interstitial cells (si), nematoblasts (nb), and nematocytes (nc) are visible as strongly stained cells. Tissue of an untreated control polyp containing numerous strongly stained cells (A); tissue containing various cell types in reduced numbers (incomplete removal) (B); tissue containing only large interstitial cells (pseudo-epithelial hydra) (C); and tissue containing no interstitial cells (epithelial hydra) (D). Scale represents 50  $\mu$ m.

the number of incomplete removals and increased the number of complete removals (epithelial hydra). The number of pseudo-epithelial hydra was low after 4 days of treatment (18%), but most abundant (more than 60%) after 5 to 8 days of treatment.

#### *Production of Pseudo-Epithelial Hydra from Strain nem-1*

Pseudo-epithelial hydra were produced from nem-1 by HU treatment for 2–4 days (Materials and Methods). The treated polyps which gradually lost feeding ability were kept by force-feeding.

The interstitial cell lineage remaining in the tissue of HU-treated polyps was examined by staining and maceration at 2–4 weeks. Indirect FITC staining using a monoclonal antibody C41 (Materials and Methods) was

used in place of toluidine blue staining in this experiment.

The same three polyp types (incomplete removal, pseudo-epithelial hydra, and epithelial hydra) again occurred (data not shown). Figure 2B summarizes the combined results of examination with C41 staining and maceration. An increase in the length of HU treatment decreased the fraction of incomplete removal, but increased the fraction of complete removal (epithelial hydra). Pseudo-epithelial hydra were most abundant after 2 days of treatment (64%).

#### *Properties of Pseudo-epithelial Hydra*

Based on the results shown in Fig. 2, chim-C1 polyps treated at 25°C for 5–7 days and nem-1 polyps treated

TABLE 1  
NUMBER OF CELL TYPES PRESENT IN THE TISSUE OF INDIVIDUAL POLYPS REPRESENTING THREE POLYP TYPES PRODUCED BY TREATMENT OF chim-C1 AT 25°C FOR 6 DAYS

Polyp type	Total No. of cells counted	No. of cells present (ratio to epithelial cells)						Nerve	Gland
		Epithelial	Large interstitial	Small interstitial	Nematoblasts	Nematocytes			
Control (no treatment)	4911	1972	409 (0.21)	468 (0.24)	1446 (0.73)	299 (0.15)	98 (0.05)	219 (0.11)	
Incomplete removal	2533	2010	103 (0.05)	98 (0.05)	192 (0.10)	83 (0.04)	13 (0.006)	34 (0.02)	
Pseudo-epithelial	2888	2802	43 (0.02)	0	0	0	0	43 (0.02)	
Epithelial	2813	2744	0	0	0	0	0	69 (0.03)	

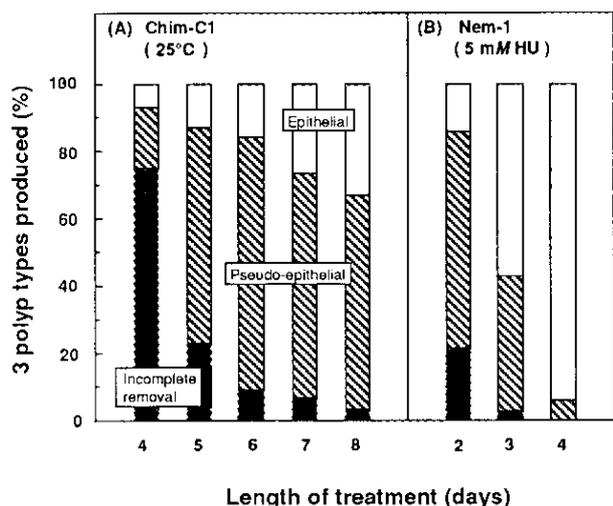


FIG. 2. Relative numbers of three polyp types produced by the treatment. The abscissa represents the length of treatment (days) at 25°C for chim-C1 (A) and in 5 mM HU for nem-1 (B). The ordinate represents relative numbers (%) of incomplete removal (solid bars), pseudo-epithelial hydra (crosshatched bars), and epithelial hydra (open bars) produced as a result of the treatment. Pooled results of examination by staining (toluidine blue staining for chim C1 (A) and FITC-staining using mab C41 for nem-1) and maceration are shown. The sample size was 28 or more, except in one case (17 for the 4-day treatment of nem-1).

with HU for 2–3 days were kept for an additional 50 days (a total of about 80 days) by force-feeding. Polyps recovering self-feeding capacity prior to or during this period (incomplete removal) were discarded.

Figure 3 shows photographs of such pseudo-epithelial and epithelial hydra. The presence or absence of large interstitial cells in their tissue was examined by sacrificing them and examining the tissue after taking photographs. The overall morphology of the two types is similar in both chim-C1 (Figs. 3B and 3C) and nem-1 (Figs. 3E and 3F). Compared to control normal polyps (Figs. 3A and 3D), both pseudo-epithelial and epithelial hydra have a bloated body column, large hypostome, thin tentacles, and more buds in the budding zone (Marcum and Campbell, 1978a; Sugiyama and Fujisawa, 1978; Littlefield, 1985b).

The localization of interstitial cells in the tissue of a typical nem-1 pseudo-epithelial hydra stained with mab C41 is shown in Fig. 4A. In the parental polyp, numerous stained cells are present in body column tissue, except near the head and below the budding zone. In newly formed buds, most stained cells occur in body column tissue, but a few occur in some tentacles. These features were observed in many other specimens.

Figure 4B shows a part of the parental tissue at a higher magnification. Large interstitial cells occur as strings of cells lined up parallel to the body axis.

### Sexual Differentiation

Nonfeeding polyps maintained by force-feeding were induced to differentiate sexually (see Materials and Methods). Figure 5 shows characteristic nipple-shaped testes which developed on the bloated body columns of pseudo-epithelial chim-C1 (Fig. 5B) and nem-1 (Fig. 5D) hydra. Large numbers of highly motile sperm were observed in these testes when the contents of the testes were examined according to Sugiyama and Sugimoto (1985).

Table 2 summarizes the results of sexual differentiation experiments carried out with nonfeeding polyps. Testis formation occurred with moderate frequency (17–29%) in nonfeeding chim-C1 clones which were produced by 5–7 days of 25°C treatment.

Nonfeeding nem-1 polyps produced variable results. Testis formation occurred in all of the 13 nonfeeding clones produced by 2 days of HU treatment. Spontaneous testis formation also occurred in some cases (as in control nontreated nem-1 polyps). However, testis formation occurred in none of 15 nonfeeding nem-1 clones which were produced by 3 days of HU treatment. Some of these clones died later. These phenomena observed after the 3-day HU treatment might be caused by mitotic arrest of epithelial cells produced by prolonged HU treatment (T. Holstein, personal communication).

All nonfeeding polyps subjected to sexual induction were later returned to the normal daily force-feeding regime. The majority (58 clones) were then sacrificed to examine the cell types present by staining or maceration. All 24 clones which formed testes contained interstitial cells. Seven clones containing large interstitial cells did not form testes (see Discussion). All 27 clones which did not contain interstitial cells did not form testes.

Experiments similar to those described above were repeated several times with both strains, with minor variations in experimental conditions in some cases. The results were similar. Pseudo-epithelial hydra were obtained in varying numbers depending on the treatment conditions. Some of them differentiated sexually when induced.

In these experiments, however, some nem-1 pseudo-epithelial hydra formed eggs instead of testes (data not shown). Untreated nem-1 polyps were consistently male throughout this experiment (although this strain was primarily female in an earlier study (Table 1 in Sugiyama and Sugimoto, 1985)). Similar sex reversal by cloning or reducing interstitial cell numbers was previously reported (Littlefield, 1985b; Bosch and David, 1986). Sex phenotype reversal in nem-1 by HU treatment will be reported in detail elsewhere.

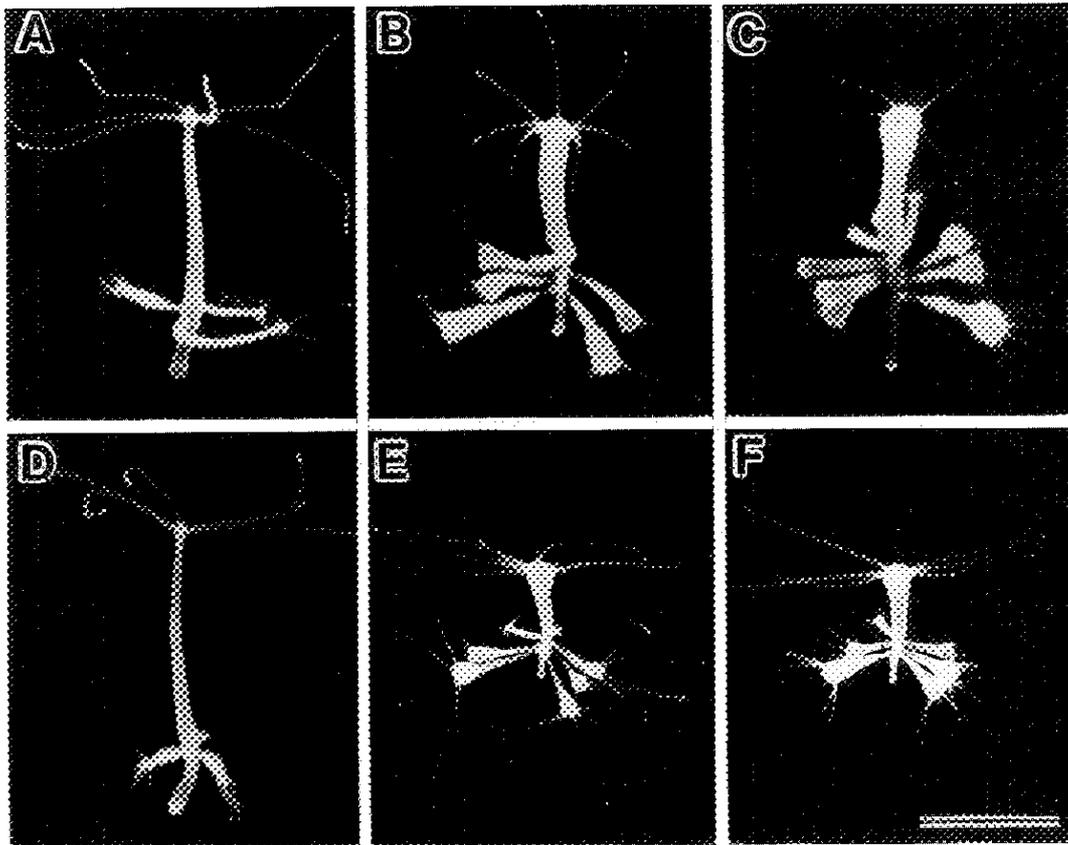


FIG. 3. Photographs of live polyps of control chim-C1 (A); pseudo-epithelial chim-C1 (B); epithelial chim-C1 (C); control nem-1 (D); pseudo-epithelial nem-1 (E); and epithelial nem-1 polyp (F). Scale represents 5 mm.

#### *Long-Term Maintenance of Pseudo-epithelial Hydra*

Several independently produced clones of pseudo-epithelial hydra were maintained for extended periods of time. The chim-C1 clones were initially vigorous, but gradually lost vigor starting at about 40–60 days. Polyp size became smaller, and budding became less frequent. Sexual differentiation occurred only before, but not after, loss of vigor (see Discussion). The maximum length of time one clone of chim-C1 pseudo-epithelial hydra was maintained was 130 days. Large interstitial cells were present in the tissue at this time.

In contrast, nem-1 clones could be maintained for a much longer time (over 2 years), without loss of vigor or the capacity to differentiate sexually.

#### DISCUSSION

Interstitial stem cells capable of differentiating into sperm, but not into nerve cells or nematocytes, were cloned in this study. These cells, cloned from strain nem-1, proliferated actively for an extended period of time (over 2 years) without loss of ability to differentiate into sperm. This suggests that *H. magnipapillata*

contains a subpopulation of interstitial stem cells which are developmentally restricted to sperm production, and that these sperm-restricted stem cells were cloned.

We believe that the sperm-restricted stem cells cloned in the present study were not created as an experimental artifact. Bosch and David (1987) have shown that *H. magnipapillata* has multipotent stem cells which can differentiate into both somatic (nerves and nematocytes) and gametic cells. These multipotent cells conceivably could give rise to sperm-restricted cells by two alternative mechanisms: by somatic mutation (selective loss of ability to differentiate into somatic types) or by epigenetic effects of the treatment (specific damage to the somatic differentiation pathway). These mechanisms could be the basis for the presence of sperm-restricted stem cells if such cells were found only very rarely. However, they cannot account for the relatively high cloning frequencies of such cells from two different strains with two different procedures (Table 2).

We conclude therefore that the interstitial stem cell population in *H. magnipapillata* is not a homogeneous collection of cells having equal differentiating capabilities. Instead, it consists of subsets of cells, one of which

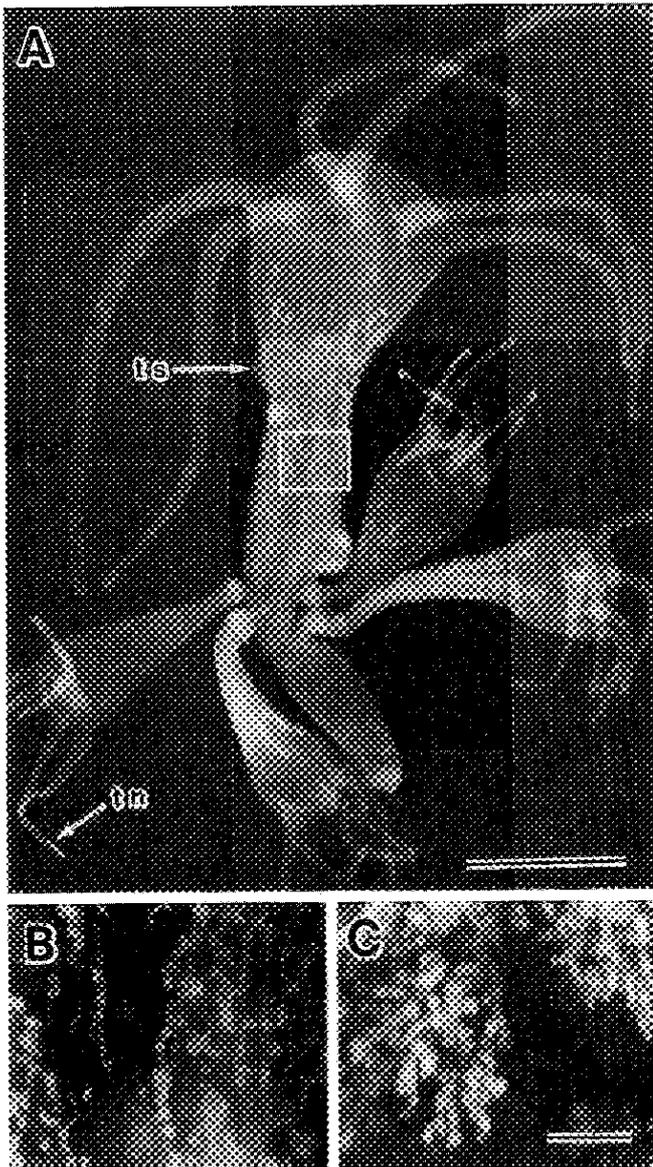


FIG. 4. Gamate-restricted stem cells present in *nem-1* pseudo-epithelial hydra indirectly stained using mab C41. (A) A parental polyp bearing four buds and a new bud protrusion (4× objective). It also bears an immature testis (ts) which is out of focus in the picture. C41-positive cells are present in the body column of both parental polyp and buds. They can be also seen in the tentacles of some buds (tn). The C41-positive cells present in the tentacles have the general morphology of interstitial cells, but they are significantly smaller ( $8.5 \pm 0.83 \mu\text{m}$  in length) than those present in the body column ( $23.1 \pm 4.4 \mu\text{m}$ ). Similar C41-positive cells are also occasionally observed in the tentacles of the young buds but not in the bud-bearing mature polyps of control untreated hydra. (B) Parental tissue marked by thin white lines in (A) at a higher magnification (20×). Stem cells which occur in strings of cells lined up along the body axis can be seen. In some specimens, however, the stem cells are arranged more randomly without forming strings (C). Similarly, two types of stem cell arrangement were observed in *chim-C1* pseudo-epithelial polyps (not shown) and described in HU-treated *H. oligactis* by Littlefield (1985b, 1991). Scale in (A) represents 1 mm; scale in (B) represents 0.2 mm for (B) and (C).

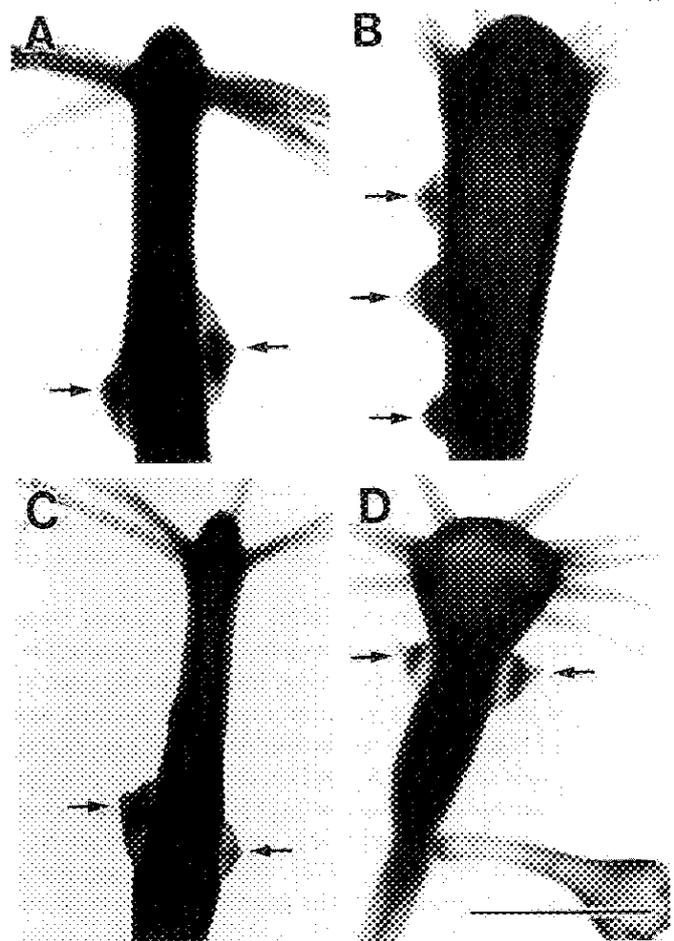


FIG. 5. Photographs of nipple-shaped testes (marked by arrows) formed by control *chim-C1* (A); pseudo-epithelial *chim-C1* (B); control *nem-1* (C); and pseudo-epithelial *nem-1* polyp (D). Live animals were gently pressed under a cover glass and photographed under a standard microscope (4× objective). Scale represents 1 mm.

can differentiate only into germline cells. Another subset is multipotent and can differentiate into both somatic and gametic cells as previously shown by Bosch and David (1987).

Sperm-restricted stem cells were not detected by Bosch and David (1987) as already mentioned. Two explanations can be considered for this observation. First, the sperm-restricted stem cells might be present in much smaller numbers than the multipotent stem cells in the tissue of asexual animals, and they might not have been represented in the limited number of stem cells cloned by Bosch and David (1987). Second, the sperm-restricted type might have significantly different properties from the multipotent type, and the latter survived, but the former might not have survived, the aggregate cloning procedure.

Sexual differentiation occurred in many, but not all, clones of pseudo-epithelial hydra. This was not surpris-

TABLE 2  
SEXUAL DIFFERENTIATION OF NONFEEDING (PSEUDO-EPITHELIAL) HYDRA

Strain	Treatment	No. of polyps treated	No. of self-feeding clones produced	Nonfeeding clones	
				No. produced	No. forming testes <sup>a</sup> (%)
chim-C1	25°C, 5 days	41	23	18	3 (17)
	6	17	3	14	4 (29)
	7	16	2	14	4 (29)
nem-1	5 mM HU, 2 days	17	4	13	13 (100)
	3	15	0	15	0 (0)

<sup>a</sup> Nonfeeding nem-1 polyps occasionally produced eggs instead of testes in other experiments (see main text). Nonfeeding chim-C1 polyps produced only testes and no eggs throughout the entire study.

ing since sexual differentiation under laboratory conditions often fails even for normal self-feeding animals in many strains of *H. magnipapillata* (Sugiyama and Fujisawa, 1977; Sugiyama, 1983).

The chim-C1 pseudo-epithelial hydra showed time-dependent changes in their properties. They multiplied vigorously initially (10–50 days), but gradually lost vigor. Polyp size became smaller and buds formed less frequently. Sexual differentiation occurred before, but not after, loss of vigor. A similar gradual loss of vigor was noted previously in epithelial hydra produced spontaneously or by temperature treatment from sf-1 (Sugiyama and Fujisawa, 1978). This loss of vigor was apparently correlated with the gradual decrease of the number of gland cells from the epithelial hydra tissue during long maintenance by force-feeding (Sugimoto and Fujisawa, personal communication). The loss of vigor and sexual differentiation ability in chim-C1 pseudo-epithelial hydra might be also caused by a similar reduction of gland cell number in the tissue. This, however, was not carefully examined.

The presence of a separate subpopulation for gametic differentiation in *H. magnipapillata* was predicted previously by Sugiyama and Sugimoto (1985). The sex phenotype of a female polyp was permanently altered to male through introduction of interstitial cells from a male polyp to the female polyp. In the masculinized polyp, the newly introduced male interstitial cells producing sperm and the original female interstitial cells producing nematocytes co-existed stably for an extended period of time. This was shown using mutant strains which had marked characteristics in their sperm or nematocyte lineages. This suggested that at least two separate subpopulations were present: one for gametic differentiation and the other for somatic (and possibly also gametic) differentiation, and that some mechanism existed for the stable maintenance of the two subpopulations. Otherwise, either the female or male population would eventually become dominant and eliminate the

other through faster proliferation rate or by chance. This, however, did not occur.

To summarize, as previously shown for the *oligactis* group by Littlefield (1985b, 1991a), the interstitial stem cell population in the *vulgaris* group (including *H. magnipapillata*) also contains at least two subpopulations. One is multipotent, giving rise by differentiation to both somatic cells and gametic cells. The second is monopotent, giving rise to only gametic cells.

Some important questions remain unresolved. We do not know whether the multipotent stem cells can directly enter the germline differentiation pathway, or whether they initially differentiate into the cells of the second subset, which then differentiate into the gametic cells. We also do not know if a third subset exists which is restricted only to somatic differentiation.

During the course of this work, sperm-restricted interstitial stem cells were also successfully cloned from *H. vulgaris* (which is closely related to *H. magnipapillata*) by the HU treatment by Littlefield (personal communication).

The authors are indebted to Dr. L. Littlefield for a critical reading of the manuscript, and to Drs. T. Bosch and C. N. David for a generous gift of a monoclonal antibody, C41. This work was supported in part by grants from the Ministry of Education and Science, Japan (Projects 02454026, 03044147, and 04044174).

#### REFERENCES

- Bode, H. R., Flick, K. M., and Smith, G. M. (1976). Regulation of interstitial cell differentiation in *Hydra attenuata*. I. Homeostatic control of interstitial cell population size. *J. Cell Sci.* **20**, 29–46.
- Bode, H. R., Heimfeld, S., Chow, M. A., and Huang, L. W. (1987). Gland cells arise by differentiation from interstitial cells in *Hydra attenuata*. *Dev. Biol.* **122**, 577–585.
- Bosch, T. C. G., and David, C. N. (1986). Male and female stem cells and sexual reversal in Hydra polyps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9478–9482.
- Bosch, T. C. G., and David, C. N. (1987). Stem cells of *Hydra magnipapillata* can differentiate into somatic cells and germ line cells. *Dev. Biol.* **121**, 182–191.

- Bosch, T. C. G., Rollbuehler, R., Scheider, B., and David, C. N. (1991). *Roux's Arch. Dev. Biol.* **200**, 269-276.
- Campbell, R. D. (1987). A new species of *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa) from North America with comments on species clusters within the genus. *Zool. J. Linnean Soc.* **91**, 253-263.
- David, C. N. (1973). A quantitative method for maceration of hydra tissue. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **171**, 259-268.
- David, C. N., Fujisawa, T., and Bosch, T. C. G. (1991). Interstitial stem cell proliferation in hydra: Evidence for strain-specific regulatory signals. *Dev. Biol.* **148**, 501-507.
- David, C. N., and Murphy, S. (1977). Characterization of interstitial stem cells in hydra by cloning. *Dev. Biol.* **58**, 372-383.
- Diehl, F. A., and Burnett, A. L. (1964). The role of interstitial cells in the maintenance of hydra. I. Specific destruction of interstitial cells in normal, asexual, non-budding, animals. *J. Exp. Zool.* **155**, 253-260.
- Fujisawa, T. (1992). Homeostatic recovery of interstitial cell populations in *Hydra*. *Dev. Biol.* **150**, 185-192.
- Gierer, A., Berking, S., Bode, H., David, C. N., Flick, K., Hansmann, G., Schaller, H., and Trenkner, E. (1972). Regeneration of hydra from reaggregated cells. *Nature New Biol.* **239**, 98-101.
- Lentz, T. L. (1966). "The Cell Biology of Hydra." North-Holland, Amsterdam.
- Littlefield, C. L. (1985a). Spermatogenesis in *Hydra oligactis*. I. Morphological description and characterization using a monoclonal antibody specific for cells of the spermatogenic pathway. *Dev. Biol.* **110**, 308-320.
- Littlefield, C. L. (1985b). Germ cells in *Hydra oligactis* males. I. Isolation of a subpopulation of interstitial cells that is developmentally restricted to sperm production. *Dev. Biol.* **112**, 185-193.
- Littlefield, C. L. (1991a). Cell lineages in Hydra: Isolation and characterization of an interstitial stem cell restricted to egg production in *Hydra oligactis*. *Dev. Biol.* **143**, 378-388.
- Littlefield, C. L. (1991b). Spermatogenesis in *Hydra oligactis*. II. How temperature controls the reciprocity of sexual and asexual reproduction. *Dev. Biol.* **146**, 292-300.
- Marcum, B. A., and Campbell, R. D. (1978a). Development of hydra lacking nerve and interstitial cells. *J. Cell Sci.* **29**, 17-33.
- Marcum, B. A., and Campbell, R. D. (1978b). Developmental roles of epithelial and interstitial cell lineages in hydra; analysis of chimeras. *J. Cell Sci.* **32**, 233-247.
- Marcum, B. A., Fujisawa, T., and Sugiyama, T. (1980). A mutant hydra strain (sf-1) containing temperature-sensitive interstitial cells. In "Developmental and Cellular Biology of Coelenterates" (P. Tardent and R. Tardent, Eds.), pp. 429-434. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Noda, K. (1971). Reconstitution of dissociated cells of hydra. *Zool. Mag.* **80**, 99-101.
- Schmidt, T., and David, C. N. (1986). Gland cells in Hydra: Cell cycle kinetics and development. *J. Cell Sci.* **85**, 197-215.
- Sugiyama, T., and Fujisawa, T. (1977). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. I. Sexual reproduction of *Hydra magnipillata* and isolation of mutants. *Dev. Growth Differ.* **19**, 187-200.
- Sugiyama, T., and Fujisawa, T. (1978). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. II. Isolation and characterization of an interstitial cell-deficient strain. *J. Cell Sci.*, **29**, 35-52.
- Sugiyama, T., and Sugimoto, N. (1985). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. XI. Mechanism of sex reversal by heterosexual parabiosis. *Dev. Biol.* **110**, 413-421.
- Takano, J., and Sugiyama, T. (1983). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. VIII. Head-activation and head-inhibition potentials of a slow-budding strain (L4). *J. Embryol. Exp. Morphol.* **80**, 155-173.
- Teragawa, C. K., and Bode, H. R. (1990). Spatial and temporal patterns of interstitial cell migration in *Hydra vulgaris*. *Dev. Biol.* **138**, 63-81.

**Genetic Analysis of Developmental  
Mechanisms in Hydra.**

**XXII. Two Types of Female Germ Stem  
Cells are Present in a Male Strain of *Hydra*  
*magnipapillata*.**

Chiemi Nishimiya-Fujisawa and  
Tsutomu Sugiyama\*

Department of Genetics, Graduate University for  
Advanced Studies and Laboratory of Developmental  
Genetics, National Institute of Genetics.  
1111 Yata, Mishima 411, Japan

Running title: Germ Stem Cells in Hydra

\* To whom correspondence should be addressed

**SUMMARY**

Three types of interstitial stem cell subpopulations were isolated from *Hydra magnipapillata*, and their roles in sex determination were examined.

A subpopulation of interstitial stem cells restricted to the sperm differentiation pathway was isolated previously from strain *nem-1* (male). Another subpopulation restricted to the egg differentiation pathway was also isolated from the same strain. Hydroxyurea treatment was used for isolation in both cases.

"Pseudo-epithelial hydra" containing only sperm- or egg-restricted stem cells but no other interstitial stem cell types were maintained by force-feeding for 2 years. Sex reversal from egg-restricted to sperm-restricted stem cells occurred 3 times during this period. Both stem cell types are numerous in the central gastric region of the pseudo-epithelial hydra, but absent in the foot region below the budding zone. Foot tissue was cut out from normal *nem-1* polyps (male), and allowed to regenerate. The regenerates produced eggs but no sperm upon sex induction. These and other results suggest that the foot tissue contains multi-potent stem cells capable of differentiating into eggs during sexual differentiation.

These observations suggest that strain *nem-1* (male) contains 3 types of interstitial stem cell subpopulations: (1) sperm-restricted stem cells, (2) egg-restricted stem cells, and (3) multi-potent stem cells capable of differentiating into nerve cells, nematocytes and eggs. Upon sex induction, however, differentiation of eggs by the latter two types is suppressed, and only sperm are produced by the sperm-restricted stem cells. Evidence is presented which suggests that similar "phenotypic males", which normally only produce sperm but contain the stem cell types capable of differentiating into eggs, occur widely in *Hydra magnipapillata*. A possible relationship between phenotypic male hydra and hermaphroditic hydra is discussed.

**INTRODUCTION**

*Hydra* reproduce asexually by budding and sexually. Interstitial stem cells give rise to three types of somatic cells, nerve cells, nematocytes and gland cells during asexual growth, and to germ cells, sperm and eggs, in sexual reproduction.

In order to examine differentiation capability of individual interstitial stem cells, cloning experiments were done. The results obtained have shown that the interstitial stem cell population contains at least two types of subpopulations. One type is sperm- or egg-restricted stem cells capable of differentiating into sperm or eggs, respectively, but not into any other types of cells. Polyps which contain only sperm- or egg-restricted stem cells in the tissue, but free from any other type(s) of interstitial stem cells, have been obtained by two different procedures. One is by treatment of normal hydra with hydroxyurea (HU) which selectively kills rapidly proliferating interstitial stem cells without severely affecting more slowly proliferating epithelial cells (Littlefield, 1985, 1991; Nishimiya-Fujisawa and Sugiyama, 1993). The other is by restrictive temperature treatment of a strain containing temperature-sensitive mutant interstitial stem cells (Nishimiya-Fujisawa and Sugiyama, 1993). In both procedures, excessive treatment eliminates the entire interstitial stem cell population, turning the treated animals into "epithelial hydra" (Campbell, 1976). Epithelial hydra lacking the interstitial stem cells and their differentiation products, nerve cells and nematocytes, can not move or feed. However, they can be maintained by force-feeding (Marcum and Campbell, 1978).

In theory, it is possible to control the treatment to produce individual polyps from which majority of interstitial stem cells are eliminated, except for only one (or a very few) cell(s). Polyps containing only sperm- or egg-restricted stem cells are produced in this way. Nonfeeding polyps produced by the treatment are maintained by force-feeding for several weeks to allow the remaining stem cells to proliferate. Any polyps recovering self-feeding capacity during this period are discarded. Nonfeeding polyps are then selected for sperm or egg production upon sex induction.

The second type of interstitial stem cell subpopulation is multi-potent stem cells which can give rise to somatic cells (nerve cells and nematocytes) during asexual growth, and also to sperm or eggs during sexual differentiation. This cell type was cloned by the procedure involving cell aggregates. *Hydra* can regenerate from the aggregates of dissociated cells (Noda, 1971; Gierer et al., 1972). Bosch and David (1986, 1987) produced aggregates of epithelial cells, to which a low number of interstitial stem cells was added. The stem cells cloned by this procedure all gave rise to both somatic cells (nerve cells and nematocytes) and gametic cells (sperm or eggs). No sperm- or egg-restricted stem cells were isolated by this procedure, presumably because either these cells are much less numerous than the multi-potent stem cells, or can not survive the aggregate cloning procedure.

In our previous study of sperm-restricted stem cells, we made an unexpected observation. HU-treatment of strain nem-1(male) produced mainly sperm-restricted stem cells. However, it also yielded egg-restricted stem cells. This observation was described as a preliminary note in Nishimiya-Fujisawa and Sugiyama (1993).

The present study is an extension of this initial observation. In this communication we first report the isolation and characterization of egg-restricted stem cells from strain nem-1 (male). We then report another unexpected observation made with this strain. In addition to the egg-restricted stem cells, this strain apparently also contains multi-potent stem cells which can differentiate into eggs but not into sperm. Thus, although male in phenotype, strain nem-1 contains 2 types of stem cells capable of differentiating into eggs. However, their differentiation into eggs is normally suppressed. We propose to call this type of hydra, which is male in phenotype but contains multi-potent stem cells capable of differentiating into eggs, phenotypic males.

Evidence will also be presented which suggests that phenotypic males are not rare but probably common in *Hydra magnipapillata*. A possible relationship between phenotypic males and hermaphroditic hydra is discussed.

## MATERIALS AND METHODS

Materials and methods described in a previous paper by Nishimiya-Fujisawa and Sugiyama (1993) were used, except for those listed below;

### (1) Strains

Ten strains belonging to *H. magnipapillata* (*vulgaris* group, Campbell, 1987) were used. The main experiments were done using strain nem-1. This strain was originally female (Sugiyama and Sugimoto, 1985), but since then had changed its sex spontaneously to male. This male nem-1 strain was used in our previous study (Nishimiya-Fujisawa and Sugiyama, 1993), and also in this study. During this study, females arose from this strain twice, one spontaneously, nem-1f1 (female), and the other by HU-treatment, nem-1f2 (female). SSB (female), SSC (female), SSE (male), and ms-1( male) were described in Sugiyama and Sugimoto (1985). SSC-m ( male) arose by spontaneous sex reversal from SSC (female). A new strain nB-2 (male) was obtained by a sexual cross of nem-1 (male) and SSC (female). All the strains were selected for their relative stability of sexual phenotypes and ready response to sex induction by a combination of gentle aeration of the culture solution and reduced feeding (Sugiyama and Fujisawa, 1977; Sugiyama and Sugimoto, 1985; Nishimiya-Fujisawa and Sugiyama, 1993).

Prior to the study, each strain was subcloned starting from a single polyp, and the sex of each subcloned population was confirmed. All experiments were done using these sub-cloned populations.

### (2) BrdU-labeling and staining of BrdU-labeled cells.

Several polyps were placed in 7 ml of culture solution containing 5 mM BrdU (Aldrich Chem.), and kept in the dark for 3 days. Polyps were fed once a day, and the culture solution containing BrdU was replaced with fresh solution a few hours later. At the end of the treatment, the gastric cavity of the polyps was washed thoroughly by flushing the fresh culture solution using a finely-drawn plastic tube. This was done 3 times at half-hour intervals, just prior to using the polyps in grafting experiment.

BrdU-labeled cells in whole mounts of hydra were examined by an immunohistochemical enzyme staining procedure using an anti-BrdU antibody and alkaline phosphatase, according to the procedure of Holstein et al. (1991).

## RESULTS

Pseudo-epithelial hydra are defined as hydra containing proliferating interstitial cells but no nerve cells, nematoblasts, or nematocytes in their tissue (Nishimiya-Fujisawa and Sugiyama, 1993). They resemble epithelial hydra (Campbell, 1976) in morphology and inability to move or eat. Unlike epithelial hydra, however, they can produce sperm or eggs during sexual differentiation.

### (1) HU-treatment.

Hydroxyurea (HU) treatment was used to produce pseudo-epithelial hydra. A population of mature nem-1 polyps was maintained, and new young polyps produced by this population were used for the treatment. Soon after collecting all the young polyps for the treatment, about 1/3 ( 23) of the parental population were subjected to induction of sexual differentiation. All of them produced testes, reconfirming that the sex of the parental population was male.

Groups of 30-40 young polyps were treated in 2.5 mM HU for 2 - 3 days. The treated animals were then maintained in the normal manner by feeding them once a day. The ability to capture and ingest food gradually decreased in the treated polyps, reflecting decreases in the numbers of nerve cells and nematocytes. A few animals which lost all feeding ability were force-fed by the procedure of Marcum and Campbell (1978). New buds which developed and detached from the initial treated polyps were discarded, and only the latter were kept.

At 10th day after the end of the HU treatment, 15 polyps were randomly selected from each group, and subjected to examination of interstitial cells in their tissue. Indirect FITC-staining was employed to visualize the interstitial cells using a monoclonal antibody C41 which specifically recognizes these cells (David et al., 1991; Nishimiya-Fujisawa and Sugiyama, 1993).

The HU-treated polyps were classified into three groups as described previously (see Fig. 1 in Nishimiya-Fujisawa and Sugiyama, 1993). Group 1:

incomplete removal. Both large and small interstitial cells are present in the tissue of this group. The latter cell type represents proliferating nematocyte precursors and indicates presence of multi-potent stem cells in the tissue. Group 2: pseudo-epithelial hydra. The tissue of these animals contains only large interstitial cells but no small interstitial cells, indicating the absence of the multi-potent stem cells. Group 3: epithelial hydra. The tissue of this type is completely free from both large and small interstitial cells.

The relative numbers of the three polyp types produced by the HU-treatment is shown in Fig. 1. With an increase in the length of treatment, the number in the incomplete removal group decreased, whereas the number of epithelial hydra increased. The number of pseudo-epithelial hydra did not change appreciably with length of treatment, remaining at about 60 %.

## (2) Sexual differentiation test

The remaining polyps were maintained for an additional 20 days, feeding each polyp once a day by force-feeding (Marcum and Campbell, 1978). The stem cells remaining in the treated polyps increased in number during this period. Some polyps recovered self-feeding capacity during this period. These animals were discarded after recording their numbers.

At about 30 days after the treatment, all non-feeding animals were subjected to sex induction by starvation (Nishimiya-Fujisawa and Sugiyama, 1993). Some polyps differentiated sexually in the first test. Others, however, failed to respond to the induction and became smaller and thinner by starvation. The non-responding polyps were returned to the daily force-feeding culture, allowed to recover to normal size, and then re-subjected to sexual induction. The same process was repeated for non-responding animals 3 or 4 times during a period of about 80 days (30 - 110 days after HU-treatment).

Examples of sexually differentiated pseudo-epithelial hydra are shown in Fig. 2. A typical male pseudo-epithelial hydra carrying 2 large nipple-shaped testis is shown in Fig. 2B. A typical female pseudo-epithelial hydra bearing 2 large round eggs is shown in Fig. 2C. Fig. 2D shows a pseudo-epithelial polyp carrying both a testis and an egg showing a cleavage furrow. All these pseudo-epithelial hydra have a larger (bloated) hypostome and thinner tentacles (Figs. 2B-D) than normal hydra (Fig. 2A).

The numbers of pseudo-epithelial hydra which produced testes or eggs are summarized in Table 1. With an increase in the length of HU-treatment, the relative number of testis-forming pseudo-epithelial decreased, whereas the relative number of the egg-producing pseudo-epithelial hydra increased.

## (3) Long-term maintenance of pseudo-epithelial hydra.

In the sex induction experiment described above, one male pseudo-epithelial polyp producing testes and 2 females pseudo-epithelial polyps producing eggs were selected, and each was used as a founder to start a clonal line. The founder was force-fed once daily until it produced several buds. One large and vigorous bud was selected and used as the polyp of the second

generation. This second generation polyp was forced to allow it to produce buds, from which the one for the third generation was selected. The same process was repeated from one generation to the next in the three independent lines for 2 years as shown in Fig. 3.

## (4) Histology.

During the passage, parental polyps after producing buds for the next generation, or siblings of the buds selected for the next generation, were not needed for line maintenance. Some of them were examined for stem cells using the indirect FITC-staining procedure described above. Polyps subjected to this examination are marked by asterisks in Fig. 3. Large numbers of C41<sup>+</sup> stem cells were found in all the specimens examined, without exception.

Fig. 4 shows photomicrographs of C41<sup>+</sup> cells present in the strain nem-1 hydra. Following features should be noted. (1) In normal hydra, the C41<sup>+</sup> cells are numerous and distributed evenly throughout the entire tissue, except for two small regions at the extreme tips of the hypostome or foot (Fig. 4A). These regions free from the interstitial cells were named "clear zones" by David and Plotnick (1980). The inset shows the foot tissue at a higher magnification. The clear zone without any C41<sup>+</sup> cells above the basal disk is clearly shown. (2) Fig. 4B shows an epithelial hydra in which the C41<sup>+</sup> cells are totally absent. (3) Fig. 4C shows a male pseudo-epithelial hydra. The C41<sup>+</sup> cells are present but less numerous than in normal hydra (Fig. 4A). They are also unevenly distributed. In the parental tissue, they are localized mainly in the central part of the body column, but absent in the upper gastric tissue near the hypostome and in the foot tissue below the budding zone. Their complete absence in the foot tissue is clearly shown in the inset in Fig. 4C. The bud tissue appears to contain less C41<sup>+</sup> cells than the parental tissue, although every bud examined contain some of these cells. (4) Fig. 4D shows a female pseudo-epithelial hydra. The C41<sup>+</sup> cells are distributed in a similar manner as in the male pseudo-epithelial hydra (Fig. 4C). They are present in the central part of the body column, but not in the upper part near the hypostome or lower part below the budding zone.

Some polyps were also examined after Toluidine blue staining (Diehl and Burnett, 1964) as in the previous study (Nishimiya-Fujisawa and Sugiyama, 1993) (not shown). No differences were noted in the distribution pattern between the Toluidine blue-positive and C41-positive interstitial cells in the pseudo-epithelial hydra. By either staining procedure, no pseudo-epithelial hydra was found which contained interstitial cells in the foot tissue below the budding zone.

## (5) Sexual differentiation.

Some polyps not needed for line maintenance were also utilized to examine their ability to differentiate sexually. Testis formation by S1 males occurred readily by 4-10 days of starvation in most cases. Egg formation in E1 and E2 females required a longer

time of starvation (10-15 days). A little over half of the polyps tested produced eggs in the first test. Those that failed to sexually differentiate in the first test were discarded without re-examination.

Individual polyps which differentiated sexually are indicated in Fig. 3 (by squares for testis formation, circles for egg formation, and triangles for failure of sexual differentiation or no testing). Two important features should be noted. (1) Gamete-restricted stem cells maintained their restricted differentiation capacity for at least 2 years. (2) Sex was stable in one male (clone S1) and one female (clone E1) line. However, sex reversal took place in the other female line (clone E2). Testes were formed instead of eggs at least 3 times in this line. In one case, offspring from the sex-reversed female was maintained for 5 generations. All offspring produced testis.

The results described in (3) to (5) show that gamete-restricted stem cells can proliferate vigorously for a long period of time, and that they are stably transmitted from parental polyp to bud in each generation. They also maintain their capacity to differentiate into gametes for a long period of time. However, sex reversal can occur, at least from female to male, in these cells.

#### **(6) Masculinization.**

Masculinization is a phenomenon of sex reversal from female to male which occurs when male tissue is temporarily grafted to female tissue (Goetsch, 1922) (see Fig. 5). The interstitial stem cells migrating from male to female tissue during grafting are thought to be responsible for the masculinization process (Sugiyama and Sugimoto, 1985).

A masculinization experiment was carried out using male pseudo-epithelial hydra (clone S1) as the interstitial stem cell donor as shown schematically in Fig. 5. The results, summarized in Table 2, show that male pseudo-epithelial hydra (clone S1) are capable of masculinizing both normal (nem-1f2 and SSB) and pseudo-epithelial female strains (clone E1). This observation suggests that sperm-restricted stem cells present in pseudo-epithelial hydra can masculinize females. A similar observation was previously reported for *H. oligactis* (Littlefield, 1986).

#### **(7) Migration of gamete-restricted stem cells.**

Histological examination described in (4) has shown that the gamete-restricted stem cells are absent from the foot tissue below the budding zone in pseudo-epithelial hydra (Fig. 4). The absence of these cells in the foot tissue may be produced by the inability of these cells to migrate into and/or to proliferate in the foot tissue. To examine their migration ability, BrdU-labeled gamete-restricted stem cells were introduced into normal hydra by grafting (Fig. 6), and their migration in the host tissue was followed by staining them using an anti-BrdU antibody. The results obtained are presented in Fig. 7. Following features should be noted in the distribution patterns exhibited by the migrating cells in the host polyps. (1) The sperm-restricted stem cells produced a distribution pattern in the new hosts closely

resembling their original distribution pattern in pseudo-epithelial hydra (Figs. 7A and B). These cells are localized mainly in the central part of the host body column, but not in the upper gastric part near the hypostome or lower part near the basal disk. This was true when the host was epithelial hydra (Fig. 7A) or normal female (Fig. 7B). It was also true when the host was normal male, although the migrating cells were less numerous (not shown). (2) The egg-restricted stem cells also produced a similar distribution pattern when the host was an epithelial hydra (Fig. 7C). (3) However, they produced a drastically different pattern when the host was a normal male (Fig. 7D) or a normal female (not shown); the number of the migrating cells was very low and their range of migration was limited to short distances from the graft border. (4) The BrdU-labeled cells from normal male hydra migrated extensively, occupying almost the entire host (Figs. 7E and F). Only the basal disk and small adjacent region (clear zone) were not occupied by them (not clearly visible in the figures). The BrdU-labeled migrating cells from the normal tissue presumably include not only interstitial stem cells, but also nerve cell precursors, and nematocytes and their precursors. All BrdU-labeled cells migrating into the tentacles are presumably nematocytes.

Similar examinations were done on many other specimens of various donor-host combinations and various periods of migration times (3-12 days). No migration of the BrdU-labeled gamete-restricted stem cells into the foot tissue was observed.

#### **(8) Foot tissue regeneration.**

Since the gamete-restricted stem cells are absent from the foot tissue of pseudo-epithelial hydra (Fig. 4), and since they do not migrate into the foot tissue of normal hydra (Fig. 7), they may be also absent from the foot tissue of normal hydra.

To examine this possibility, we cut out foot tissue from normal nem-1 polyp, and allowed it to regenerate. A number of different outcomes could be anticipated depending on the stem cell type(s) present in the foot tissue. (1) If no stem cells are present, the regenerates should turn into epithelial hydra. (2) If only gamete-restricted stem cells are present, the regenerates should turn into pseudo-epithelial hydra. (3) If only multipotent stem cells are present, the regenerates should turn into normal hydra. (4) If only somatic cell-restricted stem cells are present, the regenerates should turn into hydra that have nerve cells and nematocytes, can move and feed, but can not differentiate sexually.

To insure the absence of gamete-restricted stem cells in the regenerates, the foot tissue was obtained by an amputation made at approximately 2/5 of the length from the basal disk to the budding zone as shown in Fig. 8. The foot tissue pieces obtained in this way, if left alone, failed to regenerate. However, we succeeded to make them regenerate by force-feeding (Marcum and Campbell, 1978). A pair of fine forceps was used to gently and slowly make a small opening in the apical healing end of the excised foot tissue, and a piece of finely-chopped brine shrimp tissue was gently pushed through the opening into the

gastric cavity. When force-fed in this way once a day for about a week, regeneration occurred in some of the foot tissue. The regenerates were then fed normally. When they grew larger and produced several buds, they were induced to differentiate sexually by starvation.

The result obtained is presented in the top row in Table 3. The majority of the regenerates from the nem-1 foot tissue produced eggs. This was rather surprising since the regenerating tissue came from male polyps.

Similar foot tissue regeneration experiments were carried out using several other male and female strains (Table 3). The results obtained were also surprising. The regenerates of 2 male strains (SSC-m and nB-2) produced only eggs and no sperm. In another strain (SSE), majority of the regenerates produced testes, but one produced eggs. The regenerates of female strains produced only eggs (nem-1f1, SSC-f and SSB).

These observations demonstrate that stem cells capable of differentiating into eggs are present in some male strains of *H. magnipapillata*. A similar observation was previously made in the aggregate cloning experiment by Bosch and David (1986, 1987).

## DISCUSSION

### (1) Gamete-restricted stem cells.

Sperm-restricted and egg-restricted stem cells were isolated from strain nem-1 (male) by HU-treatment (Table 1). The same two stem cell types were previously isolated from male and female strains of *H. oligactis*, respectively (Littlefield, 1985, 1991). However, this is the first report for the isolation of both types from a single male strain.

In theory, the ideal condition for the HU treatment is that which eliminates the entire interstitial stem cell population from the majority of the treated polyps, except for one or a very few interstitial stem cells remaining in a minority of the polyps. Polyps treated under this condition have a high probability of containing a clone arising from a single stem cell. In the present study, treatment with 2.5 mM HU for 3 days was close to this ideal condition (Fig. 1). This treatment yielded only egg-restricted stem cells. Sperm-restricted stem cells were isolated mostly by a little shorter length of the treatment (Table 1).

This observation can be explained by the difference in HU sensitivity or in the numbers of stem cell types. If the sensitivity increases in the order of egg-restricted stem cells, sperm-restricted stem cells, and other stem cell type(s), or if the cell number decreases in the same order, the egg-restricted stem cells have the highest probability of being isolated under the ideal treatment condition. Sperm-restricted stem cells will be isolated under slightly gentler conditions.

### (2) Long-term maintenance and sex reversal.

Sperm-restricted and egg-restricted stem cells continued to proliferate over 2 years in force-fed pseudo-epithelial hydra (Fig. 3). Polyps randomly selected and examined during this period all contained large numbers of stem cells in their tissue. These

observations suggest that germ stem cells have a strong and long-lasting proliferating capacity, and that they are stably transmitted from parental to bud tissue from one generation to another. Similar observations were also reported for the germ stem cells in *H. oligactis* (Littlefield, 1985, 1991).

Of the 2 clones of egg-restricted stem cells, sex was stable in clone E1. In clone E2, however, sex reversal to sperm-restricted stem cells was observed 3 times (Fig. 3). Assuming the cycle time of 2 days for the stem cells (Holstein and David, 1990) and presence of 100 stem cells per polyp, the 3 reversals in the 2 egg-restricted clones in 2 years give a rate of reversal of  $4 \times 10^{-5}$  per cell per generation.

The mechanism of this sex reversal is not clear. It may be produced by somatic mutation in the gene determining sex, or alteration in the expression of the gene (transdifferentiation).

No sex reversal from sperm-restricted to egg-restricted stem cells was observed in clone S1. However, reversal occurring in this stem cell type, even if present, is hard to detect due to suppression of their differentiation by masculinization (see below).

Spontaneous sex reversal was observed in normal nem-1 hydra in routine cultures; female polyps appeared in a small population of males twice in 5 years, and males appeared in a small population of females once in 2 years. These rates seem to be comparable to, or a little lower than, the rate observed in pseudo-epithelial hydra mentioned above.

Sex reversal in gonochoristic species of hydra (species having separate male and female polyps) have been reported by many investigators (for example, see Hymann, 1931; Ewer, 1948; Tardent, 1966). The present result shows that the reversal can occur at the level of the gamete-restricted stem cells.

### (3) Masculinization.

Masculinization is a phenomenon of sex reversal from female to male which occurs when male tissue is temporarily grafted to female tissue (Goetsch, 1922). During grafting, the interstitial stem cells originally present in the male tissue migrate into the female tissue. In sexual differentiation, they differentiate into sperm, suppressing egg differentiation from the interstitial cells present in the female tissue (Sugiyama and Sugimoto, 1985). In the present study, the temporary tissue grafting experiment carried out using pseudo-epithelial hydra (Fig. 5) has shown that sperm-restricted stem cells present in these hydra can "masculinize" females, and convert them into males (Table 2). Similar observations were previously reported for *H. oligactis* (Littlefield, 1986).

### (4) Female multi-potent stem cells

In addition to sperm-restricted and egg-restricted stem cells, strain nem-1 appears to contain another stem cell type. It is female multi-potent stem cells which give rise by differentiation to somatic cells (nerve cells and nematocytes) during asexual growth, and also to eggs (via egg-restricted stem cells) in sexual differentiation.

Existence of this stem cell type in strain nem-1 was previously shown by aggregate cloning by Bosch and David (Table 4 in Bosch and David, 1987). The result of the foot regeneration experiment (Table 3) supports the presence of this stem cell type in the nem-1 foot tissue. Sperm- and egg-restricted stem cells were shown to be absent in the foot tissue of pseudo-epithelial hydra by histological examination (Fig. 4). These cells were unable to move into the foot when introduced into normal hydra by grafting (Fig. 7). These observations suggest that the foot tissue of normal nem-1 hydra may be also free from these cells.

To test this possibility, foot tissue was cut out from normal nem-1 polyps (male), allowed to regenerate, and then induced to differentiate sexually. All the regenerates could move and feed, indicating that the foot tissue contains (multi-potent) stem cells differentiating into nerve cells and nematocytes. The majority of the regenerates produced eggs but no sperm (Table 3), suggesting that sperm-restricted stem cells or male multi-potent stem cells are absent in the foot tissue. This is because, if they were present, egg differentiation should have been suppressed by masculinization.

The result also showed that the sex of the nem-1 polyps changed from male to female in the foot tissue regeneration. The simplest interpretation of this observation is to assume that the nem-1 foot tissue contains female multi-potent stem cells previously isolated by aggregate cloning by Bosch and David (1987). In normal nem-1 polyps, differentiation of these cells into eggs are suppressed by the presence of the sperm-restricted stem cells. However, this suppression is removed when the foot tissue is cut off from the rest of the polyp. Thus, these cells give rise to nerve cells and nematocytes in the regenerates and also to eggs (via egg-restricted stem cells) upon induction of sexual differentiation.

Taken together, the results of the foot tissue regeneration (Table 3) and aggregate cloning experiments (Bosch and David, 1987) suggest strongly that strain nem-1 contains female multi-potent stem cells capable of differentiating into eggs (via egg-restricted stem cells) but not into sperm.

#### **(5) Relationships of the 3 stem cell types.**

The discussion given above supports the view that 3 stem cell types are present in strain nem-1: sperm- and egg-restricted stem cells and female multi-potent stem cells. Assuming that this view is correct, we suggest that the 3 stem cell types are related to each other as schematically shown in Fig. 9.

The multi-potent stem cells give rise by differentiation to the egg-restricted stem cells. During asexual growth, both types proliferate stably, and the former differentiate into somatic cells (nerve cells, nematocytes and gland cells). The latter may, or may not, give rise (by transdifferentiation or somatic mutation) to the sperm-restricted stem cells.

Sexual differentiation differs significantly depending on whether it occurs before or after the appearance of the sperm-restricted stem cells. (a) Before their appearance, the egg-restricted stem cells differentiate

into eggs. (b) After their appearance, this process is suppressed, and sperm are produced instead of eggs.

The original nem-1 polyps used for HU-treatment correspond to (b), whereas the nem-1 foot tissue regenerates (top row in Table 3) and female nem-1 polyps (nem-1f1 in Table 3) correspond to (a). Switch from the egg-restricted to sperm-restricted stem cells was observed in clone E2 during long-term maintenance of pseudo-epithelial hydra (Fig. 3).

#### **(6) Phenotypic male (spontaneous masculinization).**

In the scheme shown in Fig. 9, sexual phenotype is initially female. However, it changes to male by "spontaneous masculinization" by appearance of the sperm-restricted stem cells. We propose to call this type of male as "phenotypic male".

Surprisingly, phenotypic males may be not rare in *H. magnipapillata*, but widely occurring. Five male strains were used in the foot tissue regeneration experiment (Table 3). Two of them (nem-1 and SSC-m) were known to have a history of sex reversal. Of the 5 strains used, nem-1 and 2 other strains (SSC-m and nB-2) produced eggs after foot tissue regeneration, suggesting that these two strains, like nem-1, are also phenotypic males containing female multi-potent stem cells.

Another strain (SSE) produced mainly sperm after regeneration. However, one of the SSE regenerates also produced eggs, suggesting that this strain also may contain stem cells capable of differentiating into eggs.

The last strain (ms-1) produced only sperm after regeneration. However, this strain was previously shown to contain female (and also male) multi-potent stem cells by aggregate cloning by Bosch and David (1986, 1987) as already discussed. This strain may be also a phenotypic male.

These observations suggest that at least 3 (nem-1, SSC-m and nB-2) of the 5 male strains used in the foot tissue regeneration experiment (Table 3) are phenotypic males. It may be interesting to examine how widely phenotypic males occur in natural populations of *H. magnipapillata*, or other gonochoristic species of hydra (hydra having separate male and female polyps).

#### **(7) Phenotypic males and hermaphrodites.**

Phenotypic males were rather puzzling to us initially. However, an intriguing similarity is present between phenotypic males and hermaphroditic species of hydra as previously suggested by Bosch and David (1986). Since hermaphrodites produce both sperm and eggs on the same individual polyps, they presumably also contain both sperm- and egg-restricted stem cells in their tissue. Littlefield (1994) described isolation of sperm-restricted stem cells from a hermaphroditic strain, *H. utahensis*. However, suppression of the egg-restricted stem cells by the sperm-restricted stem cells does not occur, and both stem cell types differentiate into gametes in hermaphrodites.

It can be realized that introduction of the suppression into hermaphrodites will convert them into phenotypic males. In theory, phenotypic males and hermaphrodites are mutually inter-convertible by

addition or removal of the suppression mechanism, suggesting a possible evolutionary relationship existing between them.

#### ACKNOWLEDGEMENT

We are indebted to Drs. L. Littlefield, T. Bosch and C. David for critically reading the manuscript and giving valuable comments. We also thank the latter two for a generous gift of the monoclonal antibody C41. This work was supported by a grant from the Japanese Ministry of Education, Science and Culture (No. 06454689) and by a grant from Sumitomo Foundation.

#### REFERENCES

- Bosch, T.C.G., and David, C.N. (1986). Male and female stem cells and sexual reversal in *Hydra* polyps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9478-9482.
- Bosch, T.C.G., and David, C.N. (1987). Stem cells of *Hydra magnipapillata* can differentiate into somatic cells and germ cells. *Dev. Biol.* **121**, 182-191.
- Campbell, R.D. (1976). Elimination of *Hydra* interstitial and nerve cells by means of colchicine. *J. Cell Sci.* **21**, 1-13.
- Campbell, R.D. (1987). A new species of *Hydra* (Cnidaria:Hydrozoa) from North America with comments on species clusters within the genus. *Zool. J. Linnean Soc.* **91**, 269-263.
- David, C.N., Fujisawa, T., and Bosch, T.C.G. (1991). Interstitial stem cell proliferation in hydra: Evidence for strain-specific regulatory signals. *Dev. Biol.* **58**, 185-192.
- David, C.N. and Plotnick, I. (1980). Distribution of interstitial stem cells in *Hydra*. *Dev. Biol.* **76**, 175-184.
- Diehl, F.A., and Burnett, A.L. (1964). The role of interstitial cells in the maintenance of hydra. I. Specific destruction of interstitial cells in normal, asexual, non-budding, animals. *J. Exp. Zool.* **155**, 253-260.
- Ewer, R.F. (1948). A review of Hydridae and two new species of *Hydra* from Natal. *Proc. Zool. Soc. London* **118**, 226-244.
- Goestch, W. (1922). Gonochorismus und Hermaphroditismus bei Hydrozoen. *Zool. Anz.* **55**, 30-34.
- Gierer, A., Berking, S., Bode, H., David, C.N., Flick, K., Hansmann, G., Schaller, H., and Trenkner, E. (1972). Regeneration of hydra from reaggregated cells. *Nature New Biol.* **239**, 98-101.
- Holstein, T.W. and David, C.N. (1990). Cell cycle length, cell size and proliferation rate in hydra stem cells. *Dev. Biol.* **142**, 392-400.
- Holstein, T.W., Hobmayer, E. and David, C.N. (1991). Pattern of epithelial cell cycling in *Hydra*. *Dev. Biol.* **148**, 602-611.
- Hyman, L.H. (1931). Taxonomic studies on the hydras of North America. III. Rediscovery of *Hydra carnea* L. Agassiz (1850) with a description of its characters. *Trans. Amer. Microscop. Soc.* **50**, 20-29.
- Littlefield, C.L. (1985). Germ cells in *Hydra oligactis* males. I. Isolation of a subpopulation of interstitial cells that is developmentally restricted to sperm production. *Dev. Biol.* **112**, 185-193.
- Littlefield, C.L. (1991). Cell lineage in hydra: isolation and characterization of an interstitial stem cells restricted to egg production in *Hydra oligactis*. *Dev. Biol.* **143**, 378-388.
- Littlefield, C.L. (1986). Germ cells control sex determination in hydra, in *Progress in Developmental Biology* (Slavkin, H.C. ed), pp 175-178. Alan R Liss, New York.
- Littlefield, C.L. (1994). Cell-cell interactions and the control of sex determination in hydra. *Seminars in Developmental Biology* **5**, 13-20.
- Marcum, B.A., and Campbell, R.D. (1978). Development of hydra lacking nerve and interstitial cells. *J. Cell Sci.* **29**, 17-33.
- Nishimiya-Fujisawa, C. and Sugiyama, T. (1993). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. XX. Cloning of interstitial stem cells restricted to the sperm differentiation pathway in *Hydra magnipapillata*. *Dev. Biol.* **157**, 1-9.
- Noda, K. (1971). Reconstitution of dissociated cells of hydra. *Zool. Mag.* **80**, 99-101.
- Sugiyama, T. and Fujisawa, T. (1977). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. I. Sexual reproduction of *Hydra magnipapillata* and isolation of mutants. *Dev. Growth Differ.* **19**, 187-200.
- Sugiyama, T. and Sugimoto, N. (1985). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. XI. mechanism of sex reversal by heterosexual parabiosis. *Dev. Bio.* **110**, 413-421.
- Tardent, P. (1966). Zur Sexualbiologie von *Hydra attenuata* (Pall.). *Rev. Suisse Zool.* **73**, 357-381.

## FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Relative numbers of three polyp types produced by treatment of nem-1 polyps in 2.5 mM HU. The abscissa represent the length of the treatment (days). The ordinate represents relative numbers (%) of incomplete removal (solid bars), pseudo-epithelial hydra (cross-hatched bars) and epithelial hydra (open bars) produced as the result of the treatment. Polyp types were examined by an indirect FITC-staining procedure using mab C41 (see main text). Sample size was 15.

Fig. 2. Photographs of sexually differentiated nem-1 polyps. (A) A normal male polyp carrying 2 nipple-shaped testes (indicated by arrows), (B) a pseudo-epithelial polyp carrying 2 testes, (C) a pseudo-epithelial polyp carrying 2 round eggs (indicated by asterisks), and (D) a pseudo-epithelial polyp bearing a testis and an egg. A cleavage furrow is visible in the egg in (D).

Live animals were gently pressed under a cover glass and photographed under a standard microscope (4x objective). When examined using a phase-contrast optics (20-40x objective), highly-motile sperm were observable in the testes (Sugiyama and Sugimoto, 1985). Scale represents 1 mm.

Fig. 3. Long-term maintenance of clonal lines of pseudo-epithelial hydra. Each line was started from a single non-feeder determined to contain germ-restricted cells in the sex induction test after HU-treatment: clone S1 from a sperm-producer, and clones E1 and E2 from egg-producers. Each generation in each line consists of a single polyp, which was force-fed daily until it grew and produced several buds, one of which was selected and used as the polyp for the next generation. This process was repeated for 2 years. Each symbol represents one generation. Squares and circles represent polyps which produced testes and eggs, respectively. Triangles represent polyps which were not subjected, or did not respond, to sex induction. Testis-producing polyps which appeared in the female line, clone E2, are shown by darkly-hatched squares. Asterisks represent polyps subjected to stem cell examination by monoclonal antibody staining.

Fig. 4. Interstitial cells present in nem-1 polyps indirectly stained using mab C41. Insets show the foot tissue below the budding zone at a higher magnification. (A) A normal male polyp bearing 2 buds. Large numbers of C41<sup>+</sup> cells are present throughout the entire body column tissue. In the foot tissue (inset), the C41<sup>+</sup> cells are numerous in the upper part, become progressively less numerous in lower part, and absent in the clear zone (David and Plotnick, 1980) adjacent to the basal disk. (B) An epithelial polyp carrying 6 buds without any C41<sup>+</sup> cells in the entire tissue. (C) A male pseudo-epithelial polyp carrying 5 buds. (D) A female pseudo-epithelial polyp (clone E1) carrying 4

buds. In (C) and (D), C41<sup>+</sup> cells occur in the body column of the parental polyp only above the budding zone. Total absence of these cells below the budding zone can be clearly seen in insets. Scales represents 1 mm in main part, and 0.2 mm in inset.

Fig. 5. Axial grafting procedure for temporary grafting of male tissue (cross-hatched) to female tissue for the masculinization experiment (Table 2).

Fig. 6. Axial grafting procedure for the interstitial cell migration experiment. Donor tissue containing BrdU-labeled interstitial cells was axially grafted into the host to allow these cells to migrate into the host tissue.

Fig. 7. Migration of interstitial cells in the normal and epithelial hydra tissue of strain nem-1. BrdU-labeled interstitial cells migrating from the donor tissue (marked by bold arrow heads) into the host tissue were examined by visualizing these cells by an indirect enzyme-staining (Materials and Methods). Front boundaries of the migrating cells are indicated by fine arrows. The graft combination (donor/host) and the length of grafting are: (A) male pseudo-epithelial hydra/ epithelial hydra, 8 days, (B) male pseudo-epithelial hydra/ female normal hydra, 4 days, (C) female pseudo-epithelial hydra/ epithelial hydra, 10 days, (D) female pseudo-epithelial hydra/ male normal hydra, 8 days, (E) male normal hydra/ epithelial hydra, 6 days, (F) male normal hydra/ female normal hydra, 8 days. Scale represents 0.5 mm.

Fig. 8. Procedure for the foot tissue regeneration experiment (Table 3).

Fig. 9. Possible relationships of the three interstitial stem cell types present in strain nem-1 (phenotypic male). During asexual growth, the multi-potent stem cells give rise by differentiation to the 3 somatic cell types and the egg-restricted stem cells. The sperm-restricted stem cells may or may not arise from the egg-restricted stem cells by transdifferentiation (or somatic mutation).

In sexual differentiation, the egg-restricted stem cells differentiate into eggs in the absence the sperm-restricted stem cells. This differentiation, however, is suppressed in the presence of the sperm-restricted stem cells, and replaced by sperm differentiation.

Table 1. Induction of sexual differentiation of non-feeding (pseudo-epithelial) hydra.

HU treatment	No. examined	No. forming testes (%)	No. forming eggs (%)	No. forming both (%)	No. forming neither (%)
2 days	18	16 (89)	0	0	2 (11)
2.5 days	23	6 (26)	2 (9)	2 (9)	13 (56)
3 days	15	3 (20)	2 (13)	0	10 (67)

Table 2. Sex reversal of females into males by temporary grafting to male tissue (masculinization).

grafting			Female tissue after temporary graft							
Upper half (host)			Lower half (donor)			No. examined	No. forming testes	No. forming eggs	No. forming both	Dead or lost
Strain	Sex	Type	Strain	Sex	Type <sup>a</sup>					
E1	♀	P	S1	♂	P	11	5	1	0	5
nem-1·f2	♀	N	S1	♂	P	10	8	0	1	1
SSB	♀	N	S1	♂	P	12	12	0	0	0
E1	♀	P	nem-1	♂	N	12	9	0	3	0
E1	♀	P	SSB	♀	N	13	0	12	0	1

<sup>a</sup>P and N stand for pseudo-epithelial and normal hydra, respectively.

Table 3. Sexual differentiation of foot tissue regenerates<sup>a</sup>

strain	sex	No. examined	No. of regenerates forming			
			testes	eggs	Both	Neither
nem-1	♂	31	1	29	1 <sup>b</sup>	0
ssC·m	♂	13	0	13	0	0
nB-2	♂	22	0	22	0	0
ms-1	♂	8	8	0	0	0
ssE	♂	24	23	1	0	0
nem-1·f1	♀	19	0	19	0	0
ssC	♀	28	0	28	0	0
ssB	♀	22	0	21	0	1 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Induction of sexual differentiation was done when each regenerate had produced several mature offspring.

<sup>b</sup>One offspring produced eggs while 4 others produced testes.

<sup>c</sup>This clone of regenerates all turned into epithelial hydra unable to move, feed or differentiate sexually.

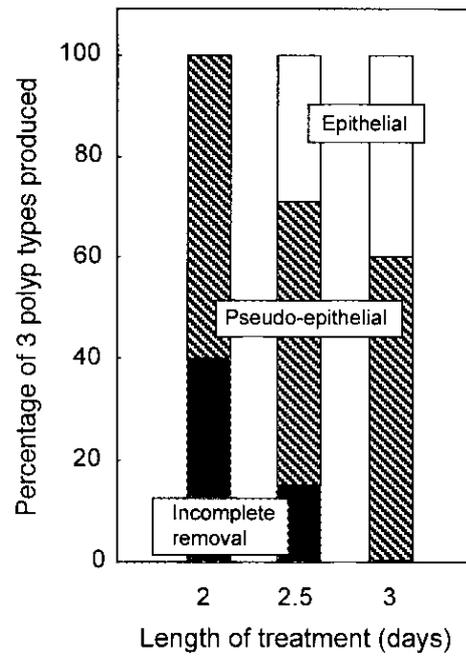


Fig.1

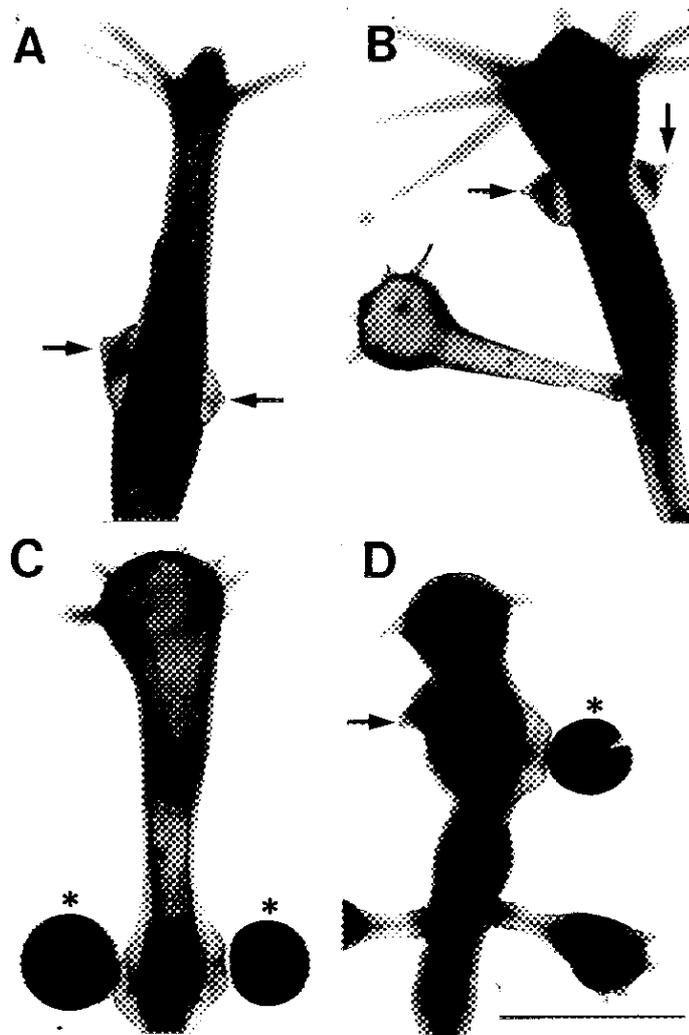


Fig.2

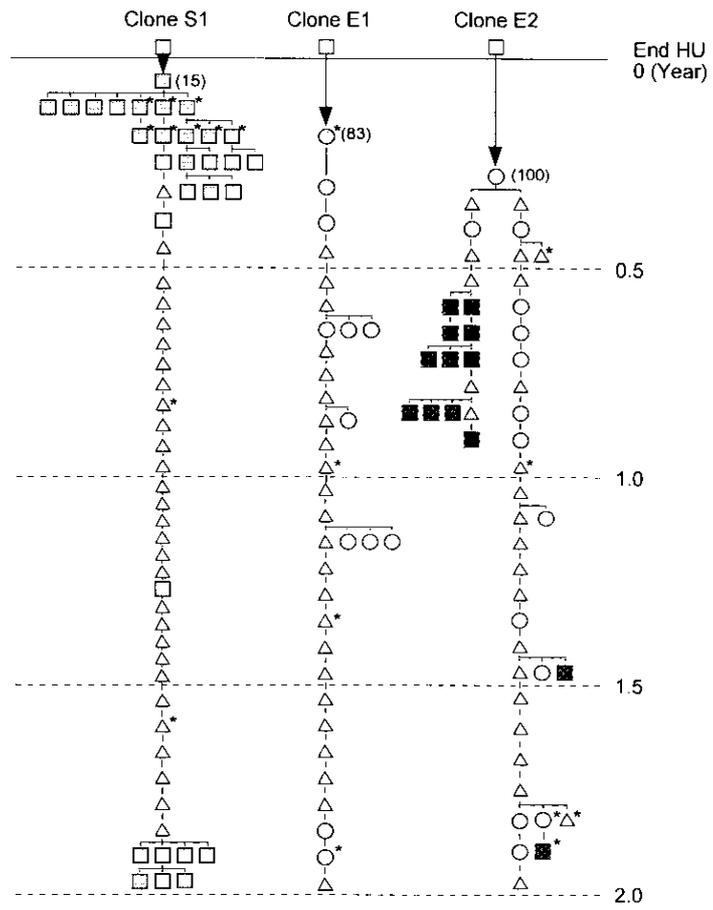


Fig. 3  
12



Fig. 4

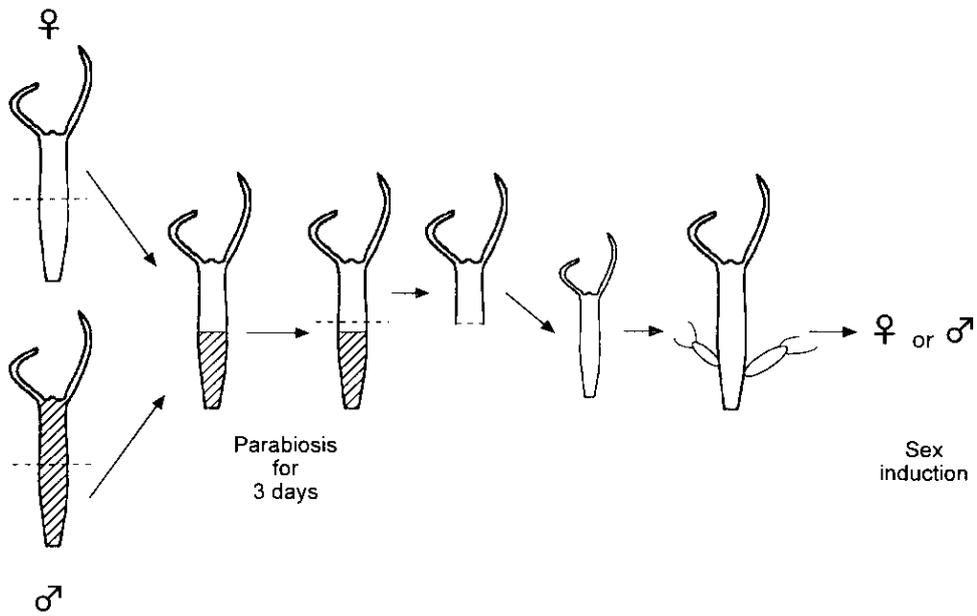


Fig. 5

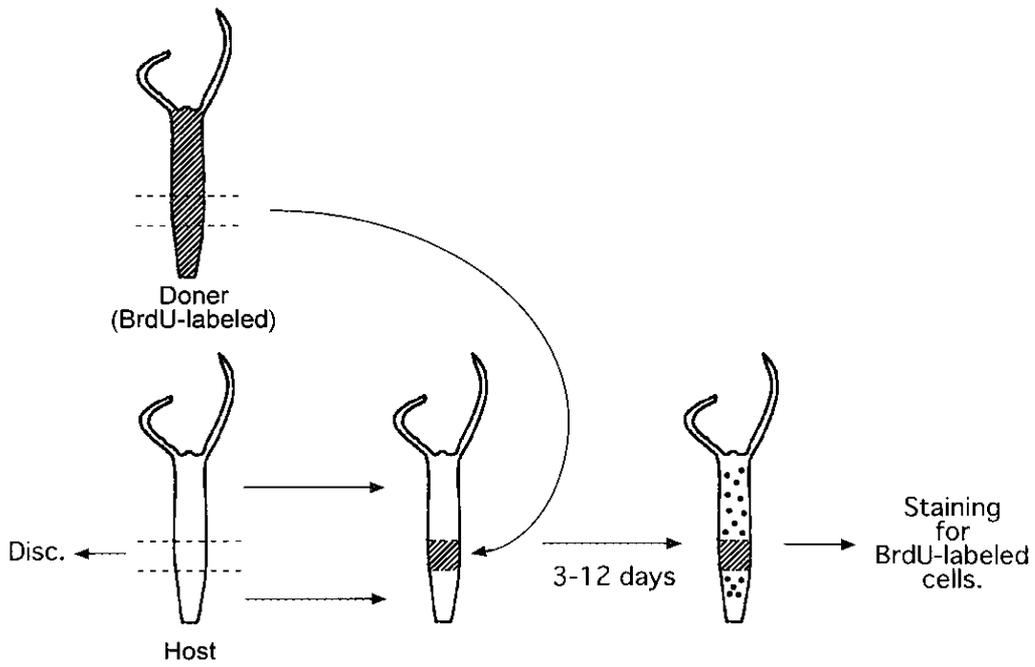


Fig. 6

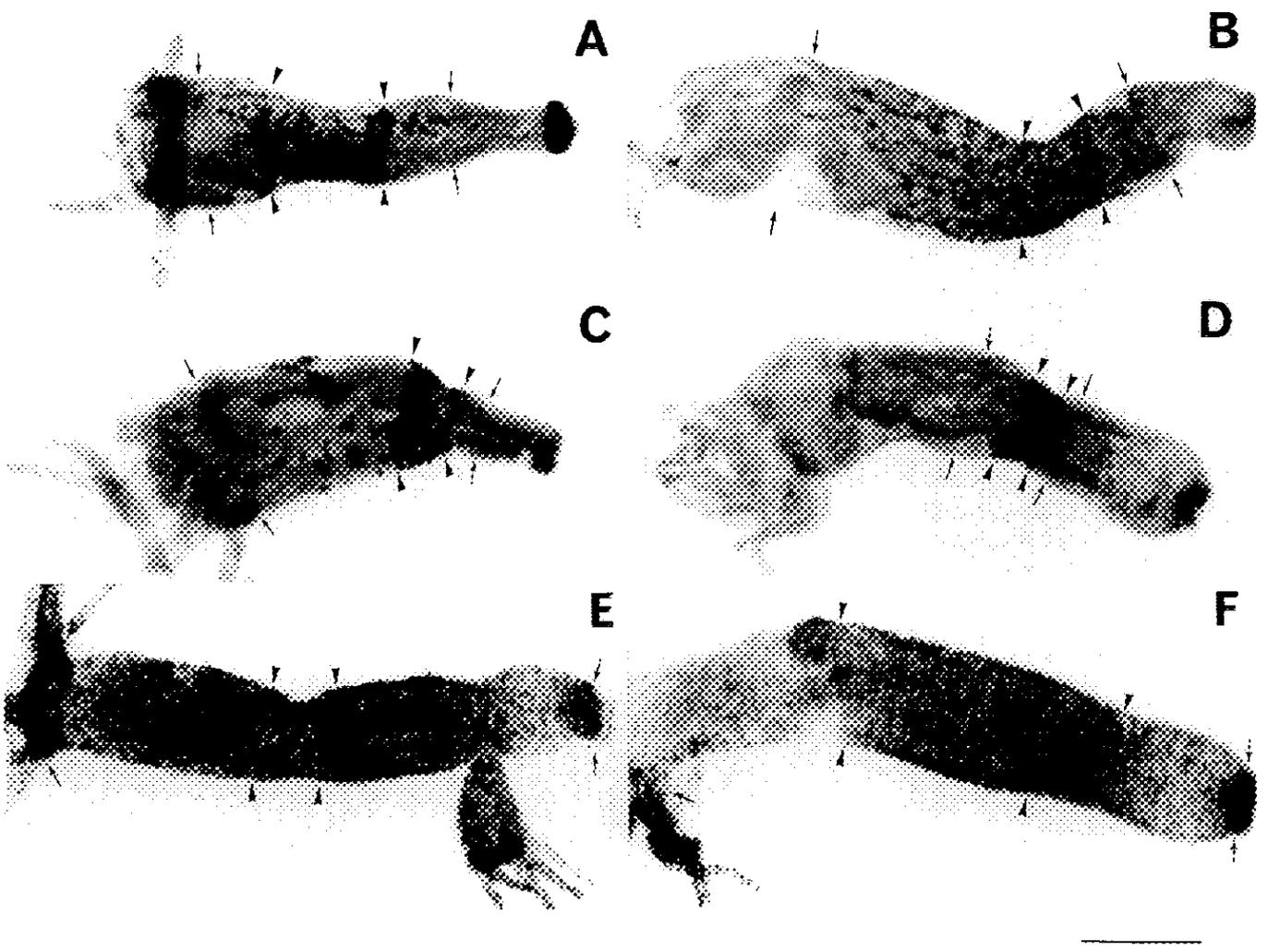


Fig. 7

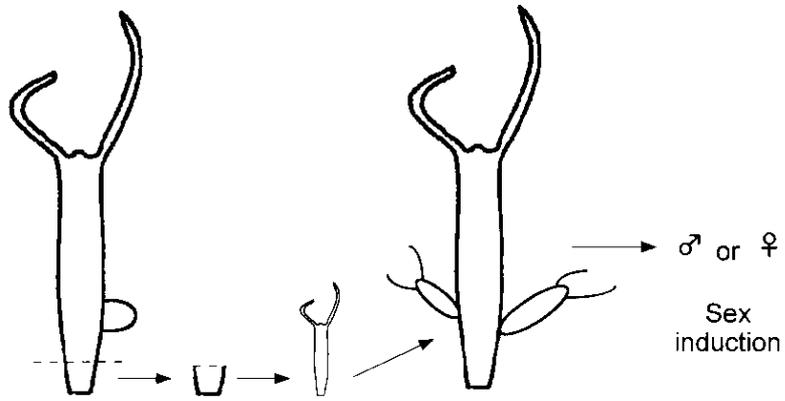


Fig.8

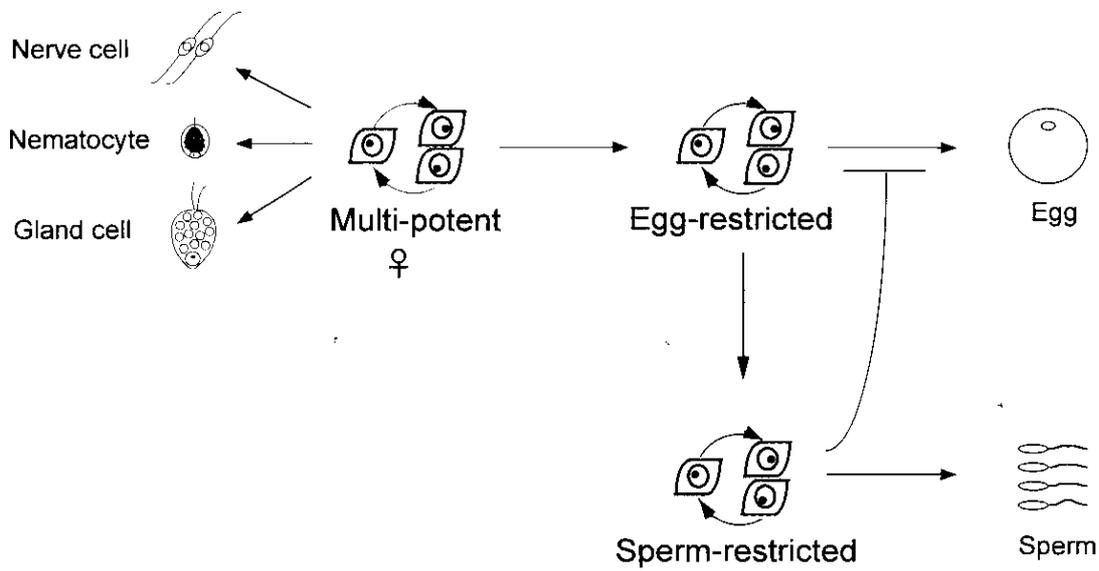


Fig. 9