

ヤマトヒメミミズ幹細胞システムを活用した 環境重金属バイオセンサー開発

野呂知加子*, 伊藤 孝**, 加瀬榛香***, 山口智也***

Development of the Eco-Bio Sensor for Heavy Metal Ions by Using Stem Cells System of *Enchytraeus Japonensis*

Chikako YOSHIDA-NORO*, Takashi ITO**, Haruka KASE*** and Tomoya YAMAGUCHI***

We aim to develop an Eco-Biosensor system by utilizing stem cell system of *Enchytraeus japonensis*, a small earthworm that proliferates mainly asexually via fragmentation and regeneration. Since this worm reproduces sexually under certain conditions, it is possible to use eggs and embryos for transgenic study. Here we made a heavy metal sensing vector by combining cysteine-rich protein (CRP; metallothionein family) promoter sequence from enchytraeid species and green fluorescent protein (GFP) cDNA from jellyfish. The sensitivity of this vector to cadmium (Cd) was examined by introducing this vector into HepG2 cells. HepG2 cells. GFP protein was induced by Cd in a dose dependent manner. Growth and regeneration of this worm were revealed to be tolerance to Cd until 60 μ M and CRP mRNA was induced by 40 μ M Cd.

Keywords: Earthworm, Eco-Biosensor, Heavy Metal

1. 緒言

我々は、碎片分離と再生による無性生殖および有性生殖の両方を行うユニークな環形動物であるヤマトヒメミミズ (*Enchytraeus Japonensis*) の幹細胞システムを活用して、環境反応をイメージング検出できる遺伝子導入個体、すなわち光るバイオセンサーミミズの開発をめざしている。

現状、環境要因の生物影響について、様々なバイオモニタリング試験が行われている。例えば経済協力開発機構 OECD の生物毒性試験では、様々な生物について増殖や繁殖試験を行う方法が定められている。その一例とし

て、ミミズ (大型のフトミミズやツリミミズ) を指標 (バイオマーカー) として、土壌中あるいは水中の成長や繁殖などに対する環境要因の影響を調べる試験があるが、個体数や忌避行動などのマクロレベルの判定法が多く、詳細で高感度の方法が必要とされている。一方、いわゆるバイオセンサーとは、酵素反応などの生化学反応を電気的信号に変換し、対象となる物質を高感度で測定・検出するシステムである。環境関連では微生物呼吸センサーなどが知られているが²⁾、多細胞動物の個体全体としての生体反応を検知し、詳細な分子解析をする様な例は見当たらない。従って、この両者の長所を併せ持つ、個体を指標とした分子レベルの環境バイオセンサーシステム開発が望まれる。

*日本大学生産工学部応用分子化学科教授

**元日本大学大学院生産工学研究科博士前期課程応用分子化学専攻

***元日本大学生産工学部応用分子化学科学部生

最近日本では、東日本大震災後の津波による重金属土壌汚染や、福島原発事故による放射性セシウム土壌汚染が問題となっている。土壌環境は地下水の水質に直結し、重金属を含んだ地下水を農作物に利用することで人体への影響が懸念されている。

ミミズは重金属を食べると言われ、重金属結合タンパク質メタロチオネイン関連遺伝子群（以下 MT）等により、土中の重金属を補足する仕組みが発達している³⁾。MT はカドミウム (Cd) などの重金属の毒性を軽減する作用があるシステインを多く含むタンパク質だが、ヒトを含む多様な生物にも存在し、特に肝臓での重金属結合、解毒や酸化ストレス軽減に関与するとされている⁴⁾。その発現は転写レベルで制御されており、金属反応配列 (MRE: Metal Responsive Element) と呼ばれる塩基配列がすべての MT プロモーターに存在し、ここに金属と結合した金属転写因子 (MTF-1: Metal Transcription Factor-1) などの因子が結合して、MT 遺伝子の転写を活性化することがわかっている⁵⁾。これまでに、ミミズの MT についても分子生物学的研究が行われており、他種とホモロジーの高い MT および MT2⁶⁾の他に、カドミウムと親和性の高いサブタイプ (CRP, cysteine-rich protein) が存在すること、重金属による発現誘導の仕組みとゲノム上の制御配列などが一部明らかになっている^{7,8,9,10)}。

ヤマトヒメミミズは、東北農業試験場の土中で見つかった、体長は 1 cm ほどでほぼ透明な体と体節構造をもつミミズである。実験室のシャーレ中の寒天上で 18–25 °C にて、オートミールを餌として飼育する。通常飼育では、「2 週間に一度、体節内の特定の位置が収縮し体を引きちぎって数片の断片となり (断片分離)、3 日ほどで頭 (脳) と肛門が前後に再生し、2 週間で元の大きさまで成長して数倍の個体数に増殖する」という無性生殖過程を繰り返す。このミミズの無性生殖子孫は、皆同じゲノム (遺伝情報) を持つ遺伝的に均一な集団クローンである¹¹⁾。断片分離は、電気刺激やメスによる切断等により人為的にも誘導でき、無性生殖を同調的に開始することができる^{12,13)}。一方、個体密度のコントロールにより有性生殖を誘導することもできる (成熟から産卵・発生まで 2 週間程度)¹⁴⁾ので、遺伝子改変体作製などの発生工学的手法も適用可能である。一度遺伝子組換え体を作成すれば、無性生殖により同じ遺伝子を持った個体を際限なく増幅できることになる。

本研究では、同じヒメミミズ属のミサカヒメミミズ (*Enchytraeus buchholzi*) の文献情報¹⁰⁾をもとに、MT の一種である CRP のプロモーター配列とクラゲの蛍光タンパク質 GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子を連結した発現ベクターを作製した。このプラスミドをヤマトヒメミミズの卵や幹細胞に導入し、重金属があると光

るトランスジェニックミミズを開発することを目的とする。本研究ノートでは、ヤマトヒメミミズの Cd 耐性と Cd 添加に伴う MT 遺伝子の発現誘導、および重金属応答性ベクターの作成とヒト肝臓がん細胞への導入による重金属による発現誘導試験について報告する。

2. 実験

2.1 ヤマトヒメミミズの無性生殖と有性生殖

ヤマトヒメミミズの通常 (無性生殖) 飼育は、直径 15 cm の培養皿に 1% 寒天 (agar) を含む Holtfreter 生理的塩類溶液 (NaCl 3.5 g, KCl 0.05 g, CaCl₂ 0.05 g, NaHCO₃ 0.2 g/L 純水) を入れて固めた培地上に 100 匹程度のミミズを入れ、粉碎したオートミールを餌として飼育した。

有性化誘導は、3 週間飢餓状態においたミミズを直径 15 cm のプレート当たり 10 匹程度と低密度で飼育し、餌を与えた。2~3 週間程度で有性化し、他家受精により 2~3 日で受精卵が産出された。

受精卵の培養には、イトミミズの文献¹⁵⁾を参考に Lehmann 液 (NaCl 0.28 g, KCl 0.09 g, CaCl₂ 0.89 g, MgSO₄ 0.24 g/L 純水) を用いた。

2.2 ヤマトヒメミミズの生存・再生に対する Cd の影響試験

Holtfreter 生理的塩類溶液と 200 mM CdCl₂ 溶液を混合し、6 cm dish に 0, 20, 40, 60, 80, 100 μM Cd 溶液 5 ml を調製した。生存影響試験では、各 dish にヤマトヒメミミズを 20 匹入れ、6 日間インキュベーター (23 °C) 内に置き、形態を観察した。また再生影響試験では、メスで切断した断片を 50 個入れ、再生に対する影響を 5 日間観察した。

2.3 メタロチオネイン遺伝子群の発現解析

ミカサヒメミミズの CRP 遺伝子、シマミミズ (*Eisenia foetida*) のメタロチオネイン (MT1) 遺伝子、フクロフトミミズ (*Metaphire formosae*) の MT2 遺伝子配列を NCBI データベースから得て、Genetyx Mac ソフトウェアにより、これらの遺伝子の種間で相同性の高い部分に対するプライマーを設計した (Table 1)。これらのプライマーを用いてヤマトヒメミミズの RNA を鋳型とし、ヤマトヒメミミズでのメタロチオネイン関連遺伝子群の発現とその Cd による誘導について RT-PCR により検討した。

6 cm dish に 0, 40, 80, 100 μM の塩化カドミウムを含む Holtfreter 溶液を調製し、各 dish にヤマトヒメミミズを 100 匹入れ、6 日間インキュベーター (23 °C) 内に置いた。7 日目にミミズを回収して RNA 抽出を行い、吸光度測定、RT-PCR、アガロースゲル電気泳動により発現の有無および強度を判定した。

Table 1 Primers for earthworm metallothioneins

Name	Sequence
CRP cDNA 171	CTGTGGCTGTGGAAGTCTGAGTGCCATTG
CRP cDNA 670comp	CCTTCTCACATGTGCACTGTGACCCGC
E. foetia MT F	CGCAAGAGAGGGATCAACTTGTTC
E. foetia MT R	GTCACCACAGCACCCCTTCTTGCATCC
M. formosae MT2 F	CGGAAAGATGTCTGACAATACCAATGCTGTGG
M. formosae MT2 R	GCTACTTGCATGATCCCTTCGCGCACTCAGT

Table 2 Primers for *Enchytraeus buchholzi* MT promoter*

	Name	Sequence (5'–3')
Forward Primer	–689 XhoI	TCTCGAGTAACCGATACCGCCTCAATAATA
	–566 XhoI	CCGCTCGAGTGATTTTAGAGTAAAGAATT
	–308 XhoI	CCGCTCGAGATAAGTCTTCTGTAAACTGC
	–165 XhoI	CCGCTCGAGGTTAAACTCTCAGCTATTCT
	MT-IIIX	CCGCTCGAGGCGGGAAGCAAGCAGGTGT
Reverse Primer	–26 compHindIII	CCCAAGCTTATATTCTCTGGATGTAAACA
	–8 compHindIII	CCCAAGCTTCAAGTTCCATTTGTTTATAT
	MT-IIH	CCGAAGCTTCGGAGGCACAGGAGCAGTT

*Schmitt-Wrede HP *et al.* (2004) *Biochimica et Biophysica Acta* 1680: 24–33.¹⁰⁾

2.4 金属応答性 GFP 発現ベクターの作製

ミサカヒメミズの CRP 遺伝子に関する論文¹⁰⁾で明らかにされているプロモーター配列 (上流-700 bp まで) には MRE が 4 箇所存在し、ここに金属と結合した MTF-1 などの転写因子が結合して、転写を活性化すると考えられている。

ミサカヒメミズは遺伝的にヤマトヒメミズに近いので、文献にある CRP プロモーター配列を利用して、プライマーを作成した (Table 2)。これらのプライマーを用い、ヤマトヒメミズのゲノムを鋳型として、PCR により MT プロモーター配列を増幅し、同定単離することを試みた。

次に、文献にあるミサカヒメミズの遺伝子プロモーター配列情報をもとに CRP 遺伝子のプロモーター配列のうち MRE を含む –8 ~ –308 bp の配列を受託 DNA 合成し、T-Vector pMD20 プラスミドに組み込んだ形で入手した (Fig. 1)。

T-Vector pMD20 プラスミドの MCS 配列を制限酵素 (BamH I, Hind III) で切断した (37°C, 2 h)。電気泳動後、ミサカヒメミズの MT プロモーターの配列の部分だけを精製し、同じ酵素で切断した GFP プラスミドベクター pAcGFP 1-1 にリガーゼを用いて繋いだ (Fig. 1)。このプラスミドは MCS (Multiple Cloning Site) にプロモーター配列を挿入することにより、GFP 発現試験が行えるようになっている (Fig. 1)。GFP とは緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein) の略称で、オ

ワンクラゲ (*Aequorea victoria*) がもつ分子量約 27 kDa の蛍光タンパク質である。GFP はリアルタイム、*in situ* で蛍光検出できるので遺伝子発現のモニターによく使われている¹⁰⁾。

2.5 ヒト肝臓培養細胞 (HepG2 cell) への発現ベクター導入と Cd による GFP タンパク質発現誘導

ヒト上皮性肝臓癌細胞株 HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line) を使用した。HepG2 は 1979 年に原発性ヒト肝臓癌 (白人男性, 15 才) から樹立された細胞株で、上皮細胞の付着性細胞であり、アルブミンや Apo-E などの肝臓特異的タンパク質を発現している。癌研究のみならず、肝臓の機能を模倣する系として国内外で幅広く使われている。メタロチオネインは、ヒトでは種々の解毒作用に関わっており、肝臓で多く発現していることが知られている。また、ミサカヒメミズの CRP 遺伝子に関する論文¹⁰⁾でも CRP プロモーター解析には同じ HepG2 細胞を用いて酵素 Luciferase の発現で確認している。そこで、構築した発現ベクターの品質検定のために、HepG2 細胞を用いて Cd による GFP タンパク質発現誘導試験を行った。

細胞培養液としては、10% の Fetal Bovine Serum, ES Cell-Qualified (GIBCO, invitrogen) と Penicillin-Streptomycin を 0.1 mg/ml になるように加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Prime, invitrogen) を使用した。細胞継代時の細胞分散には 0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO, invitrogen)、凍結時に

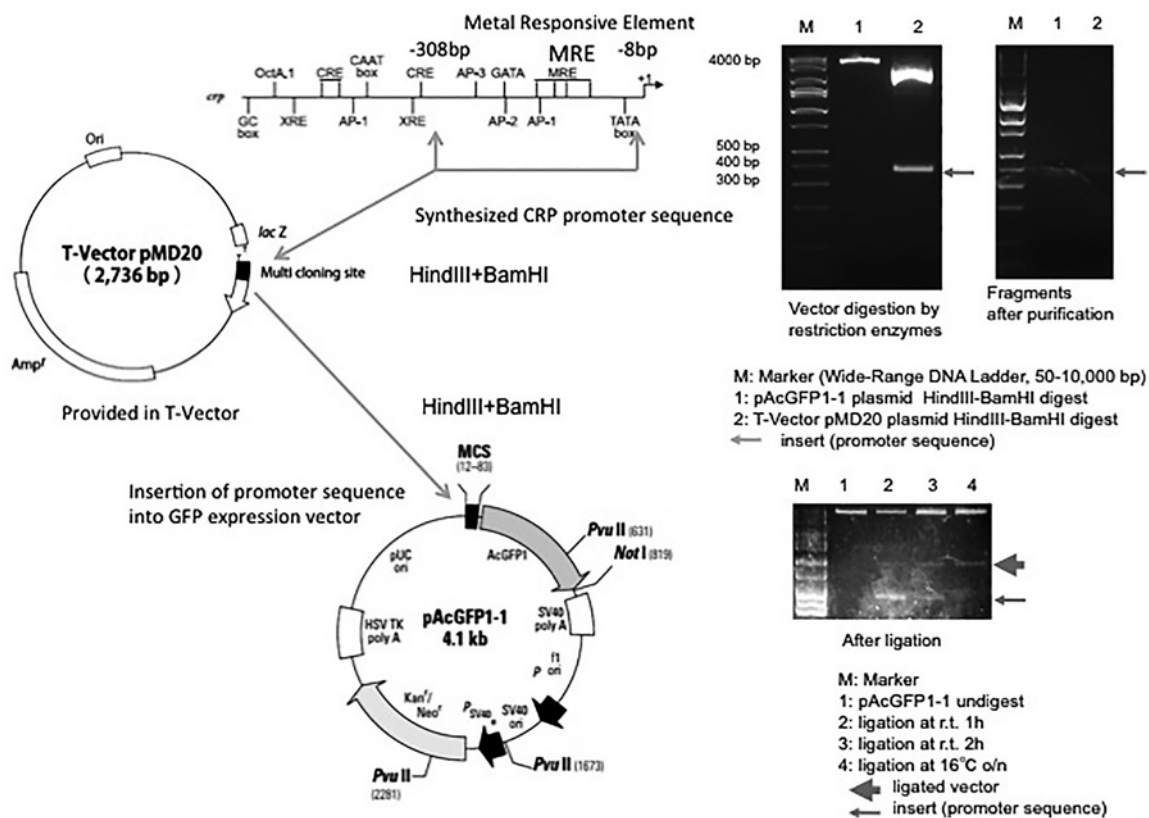


Fig. 1 Design of metal-responsive GFP expression vector

は Recovery Cell Culture Freezing Medium (GIBCO, invitrogen) を使用した。

細胞への遺伝子導入試薬として、脂質親和性試薬である Lipofectamine2000 (invitrogen), 培地 Opti-MEM I (GIBCO, invitrogen) を使用した。導入後, Cd 0, 10, 20, 40, 60 μ M を添加し, 添加 1-15 日後の GFP の発現を蛍光顕微鏡観察により比較した。

2.6 ヤマトヒメミズの卵への発現ベクター導入

GFP プラスミドを卵に導入する際は, DNA の組換えが起こりやすいようにするため, 環状の GFP プラスミドを制限酵素で切断し, 直線状にしてから, マイクロインジェクション装置 (Narishige) に取り付けたガラスキャピラリーを用いて導入を行った。GFP プラスミドを導入した卵は, 培養液 (Lehmann 液)¹⁵⁾ に入れ発生させた。1 週間後, 孵化したヤマトヒメミズを蛍光顕微鏡で観察し, GFP が発現しているか確認を行った。

3. 結果および考察

3.1 ヤマトヒメミズの生存・再生に対する Cd の影響

6 cm 培養皿に 0, 20, 40, 60, 80, 100 μ M Cd を含む Holtfreter 生理的塩類溶液 5 ml を調製し, 各培養皿にヤマトヒメミズを 20 匹入れ, 6 日間インキュベーター (23°C) 内に置いた。ヤマトヒメミズは 0 μ M

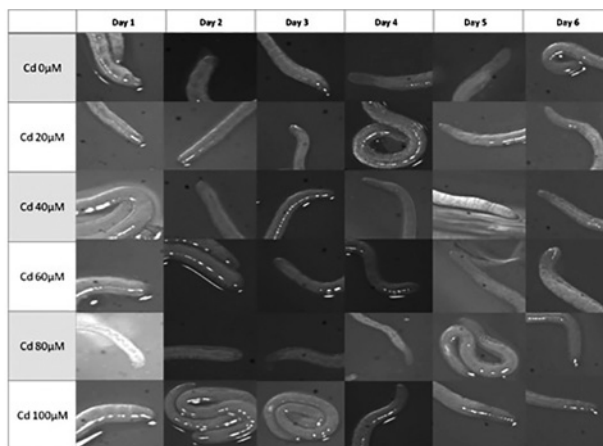


Fig. 2 Effect of Cd on the life and growth of *Enchytraeus japonensis*

~100 μ M Cd 存在下で生存し活動していたが, 60 μ M 以上では若干成長に遅れが見られた (Fig. 2)。

次に同様に培養皿に調整した溶液にメスで切断したヤマトヒメミズ断片を 50 個入れ, 再生に対する影響を観察したところ, ヒメミズは 0 μ M~100 μ M Cd 溶液中においても, 時間が経過するにつれて切口を修復し再生することを確認したが, Cd の濃度が高い程再生する速度は遅くなった (Fig. 3A Day 6 の矢印参照)。特に 60 μ M 以上の濃度で顕著に再生の遅れがみられた (Fig. 3B)。文献によれば, ミカサヒメミズの Cd 耐性限度もほぼ同じ濃度であった⁷⁾。Fig. 3B の矢印は頭部の再生度を比較したものである。

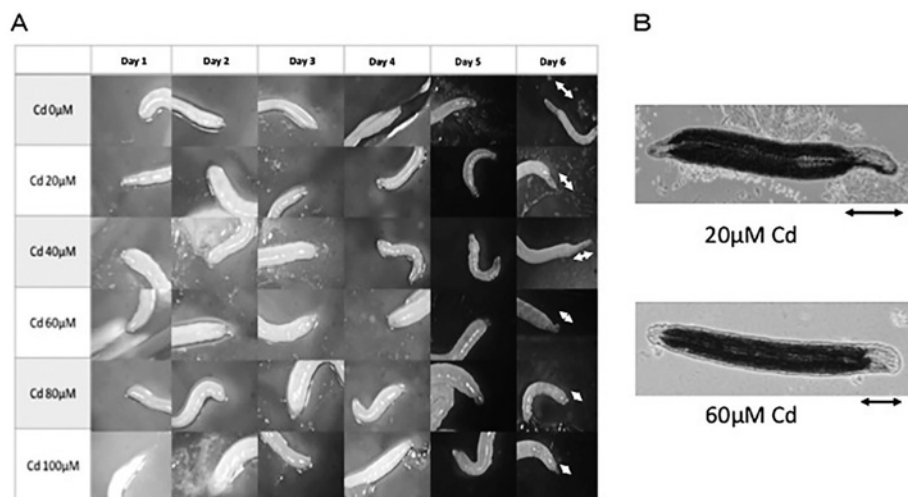


Fig. 3 Effect of Cd on the regeneration of *Enchytraeus japonensis*

3.2 メタロチオネイン遺伝子群の発現解析

ミカサヒメミズの CRP 遺伝子, シマミズ (*Eisenia foetida*) のメタロチオネイン (MT1) 遺伝子, フクロフトミズ (*Metaphire formosae*) の MT2 遺伝子配列を元に設計したプライマー (Table 1) を用いた RT-PCR を行った。0, 40, 80, 100 μ M Cd 存在下に 7 日間おいたヤマトヒメミズを比較すると, CRP cDNA (500 bp) は 40 μ M Cd 存在下で発現していた。 *E. Foetia* MT (196 bp), *M. formosae* MT2 (251 bp) では遺伝子発現が確認できなかった (Fig. 4)。これらは設計したプライマー配列がヤマトヒメミズと相同性が低かった可能性がある。改めてプライマーを設計して再度検討を行う。

3.3 環境応答性 GFP 発現ベクターの作製

ミカサヒメミズの CRP プロモーターに対するプライマー配列 (Table 2) を利用し, ヤマトヒメミズのゲノムを鋳型として, PCR により MT プロモーター配列を増幅しようとしたが, RT-PCR でバンドは出たもののクローニングには成功しなかった。

そこで, ミカサヒメミズの遺伝子プロモーター配列を受託 DNA 合成し, GFP プラスミド (pAcGFP1-1) に組み込むことにした。合成配列約 300 bp はプラスミド (T-Vector pMD20) の形で供給されたので, まずプラスミドから目的の配列部分の切り出しを制限酵素 BamH I と Hind III を用いて行い, 電気泳動 (Agarose gel 2%) を行い確認した (Fig. 1)。

pAcGFP1-1 プラスミドの MCS 配列も同じ制限酵素 (BamH I, Hind III) で切断し, 電気泳動で確認し精製を行った。精製した目的配列と GFP プラスミドをリガーゼにより結合し, 目的の環境重金属応答性 GFP 発現ベクターを作製した (Fig. 1)。

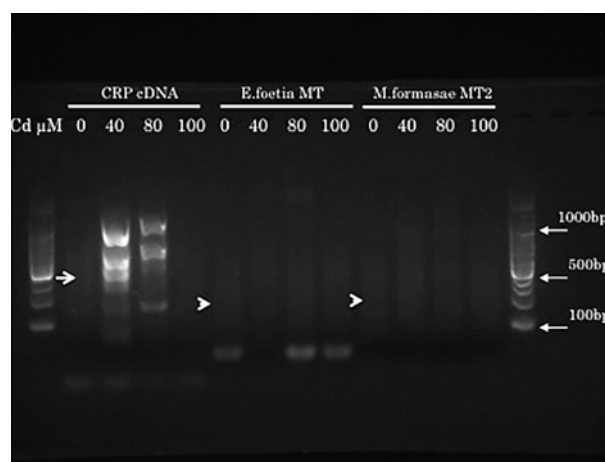


Fig. 4 Expression of metallothionein-related genes in *Enchytraeus japonensis*

3.4 HepG 2 細胞への発現ベクター導入と Cd による GFP タンパク質発現誘導

CRP-GFP プラスミドを HepG2 細胞に導入した結果, Cd によって GFP の発現誘導が起こった。培養液に Cd を添加して 1 日目, 6 日目, 15 日目の GFP タンパク質の発現を蛍光顕微鏡により確認した (Fig. 5)。Cd を添加してから 4 日目には蛍光を発する細胞が検出され, 15 日経過しても弱く発現していた (Fig. 5A)。6 日目の発現を比べると (Fig. 5B), Cd 濃度 20 μ M および 40 μ M で GFP が強く発現し, 60 μ M になると細胞毒性が観察された。発現している細胞を拡大して見ると (200 X), 細胞質に蛍光が認められた (Fig. 5B)。

3.5 遺伝子組換え動物の作製

3.5.1 ヤマトヒメミズ有性化誘導

ヤマトヒメミズの有性化誘導を行い, 卵を得ることに成功した。約 1 週間で第 7 体節あたりに精巣と卵巣を形成し, その後精巣と卵巣が発達していく様子が観察できた (Fig. 6A 上下段 矢頭は精巣と卵巣)。ヤマトヒメ

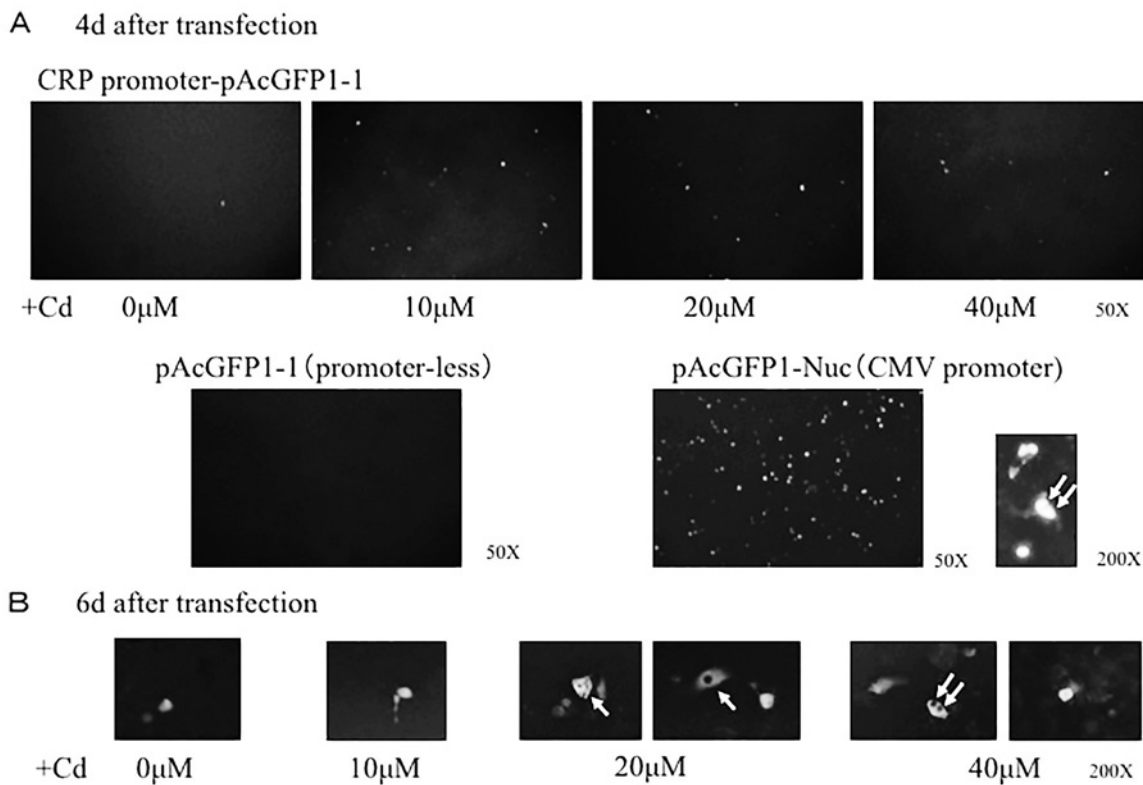


Fig. 5 GFP protein expression of HepG2 cells

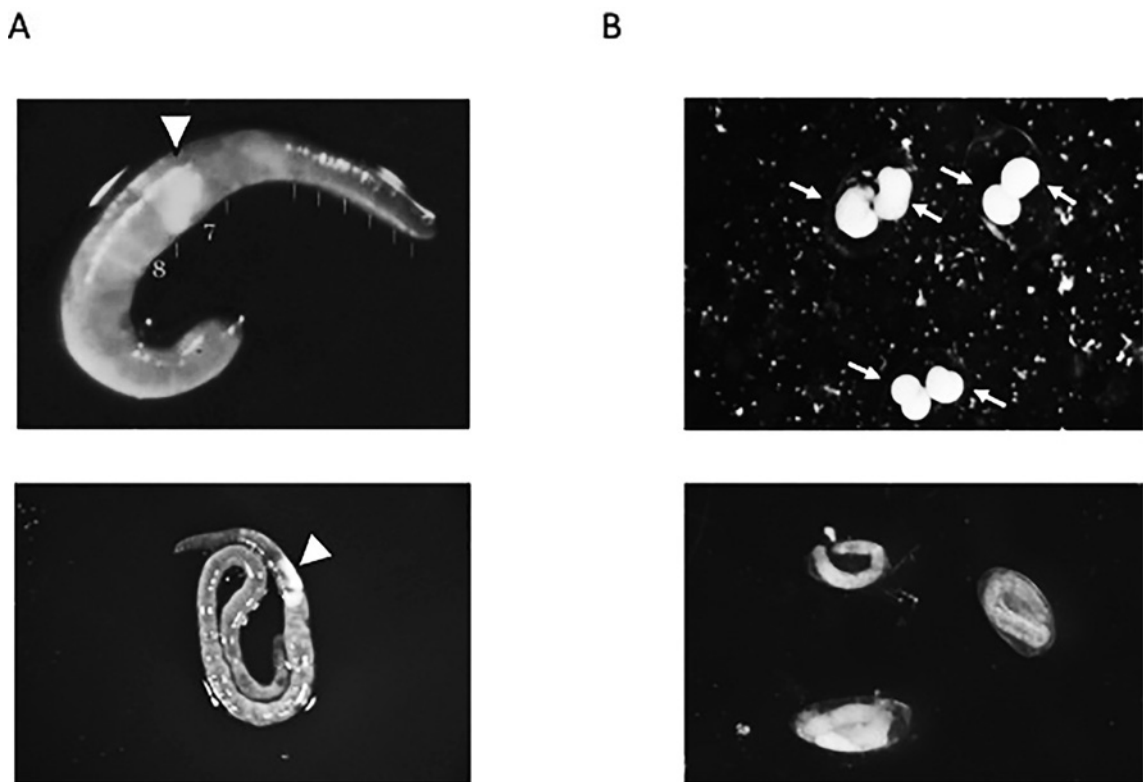


Fig. 6 Sexual reproduction and embryogenesis of *Enchytraeus japonensis*

ミミズの卵は、有性化誘導を行ってから約2週間で得ることができた (Fig. 6B 上段 矢印)。卵は約1週間で孵化し、コクーンの中で卵の胚発生の様子が観察できた (Fig. 6B 下段)。

3.5.2 ヤマトヒメミミズ卵への GFP プラスミドの導入

ヤマトヒメミミズ卵への GFP プラスミドの導入は現在のところうまくいっていない。失敗の原因として、卵

細胞の核を傷つけてしまったためか卵が孵らなかったか、卵が孵化しても GFP プラスミド溶液が十分に注入されなかったため GFP が発現しないなどの問題があった。これらを改善するため、遺伝子導入技術の向上が必要である。

4. 結言

生存・再生に対する Cd の影響試験結果より、ヤマトヒメミズは生存に関しては、ミカサヒメミズ以上の Cd 耐性を有することがわかった。しかし、ミカサヒメミズの生存率が低下し始める 60 μ M 以上では再生の遅延が見られたところから、総合的には同程度の影響を受けると考えられた。

ヤマトヒメミズに 40 μ M Cd を与えると、CRP 遺伝子の発現が誘導された。他の MT 遺伝子に関してうまく PCR 結果が出なかったのは、MT のプライマー配列を遺伝的に遠い種の配列より設計したためである可能性がある。ヤマトヒメミズ自身のライブラリー中には MT 相同遺伝子は含まれていないが、MT 1 を誘導する転写因子が見つかった。今後データベースをさらに探索し、ヤマトヒメミズの配列プライマーを用いて精度高く発現解析を行う予定である。

ミカサヒメミズの CRP 遺伝子プロモーターに GFP 遺伝子をつないで HepG2 細胞に導入すると、Cd 添加により GFP タンパク質発現が誘導された。この結果は蛍光顕微鏡観察により明らかになったが、より定量的に行うために ArrayScan (サーモサイエンティフィック) 等の蛍光定量機器を用いて数値化することを検討している。

ヤマトヒメミズの有性化誘導について、ほぼ方法が確立してコンスタントに卵を得ることができるようになった。金属応答性 GFP 発現ベクターをヤマトヒメミズの卵に導入し、培養して発生させ、重金属に反応して光るトランスジェニックミズの開発を行うために導入技術の向上が必要である。

謝辞

本研究は、平成 22-24 年度生産工学部「科研費受領者に対する研究費」の交付を受けて実施されました。ここに深く感謝致します。

本研究は日本大学遺伝子組換え実験委員会で審査、学長承認を受けた承認番号 2008 生産 2-3 の実験計画に基づいて行いました。

参考文献

- 1) OECD guidelines for the testing of chemicals: Enchytraeid Reproduction Test. OECD/OCDE 220, 13 April 2004
- 2) Nielsen M, Larsen LH, Jetten MSM, Revsbech NP. Bacterium-based NO₂-biosensor for environmental applications. Appl. Environ. Microbiol. 70 (2004) 6551-6558.
- 3) Nahmani J, Hodson ME, Black S. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. Environ. Pollut. 145 (2007) 402-424.
- 4) Thirumoorthy N, Sunder AS, Kumar KTM, Kumar MS, Ganesh GNK, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. World J. of Surg. Oncol. 9 (2011) 4
- 5) Lindert U, Cramer M, Meuli M, Georgiev O, Schaffner W. Metal-responsive transcription factor 1 (MTF-1) activity is regulated by a non-conventional nuclear localization signal and a metal-responsive transactivation domain. Olecul. Cell. Biol. 29 (2009) 6283-6293.
- 6) Demuynck S, Grumiaux F, Mottier V, Schikorski D, Lemière S, Leprêtre A. Metallothionein response following cadmium exposure in the oligochaete *Eisenia fetida*. Comp. Biochem. Physiol. part C: Toxicol. & Pharmacol. 144 (2006) 34-46.
- 7) Willuhn J, Schmitt-Wrede HP, Greven H, Wunderlich F. cDNA cloning of a cadmium-inducible mRNA encoding a novel cysteine-rich, non-metallothionein 25-kDa protein in an enchytraeid earthworm. J Biol. Chem. 269 (1994) 24688-24691.
- 8) Willuhn J, Otto A, Schmitt-Wrede HP, Wunderlich F. Earthworm gene as indicator of bioefficacious cadmium. Biochem. Biophys. Res. Comm. 220 (1996) 581-585.
- 9) Tschuschke S, Schmitt-Wrede HP, Greven H, Wunderlich F. Cadmium resistance conferred to yeast by a non-metallothionein-encoding gene of the earthworm *Enchytraeus*. J Biol. Chem. 277 (2002) 5120-5125.
- 10) Schmitt-Wrede HP, Koewius H, Tschuschke S, Greven H, Wunderlich F. Genomic organization of the cadmium-inducible tandem repeat 25-kDa metallothionein of the oligochaete worm *En-*

- chytraeus buchholzi*. Biochim et Biophys. Act. 1680 (2004) 24-33.
- 11) Yoshida-Noro C, Tochinai S. Stem cell system in asexual and sexual reproduction of *Enchytraeus japonensis* (Oligochaete, Annelida). Develop. Growth, Differ. 52 (2010) 43-55.
 - 12) Takeo M, Yoshida-Noro C, Tochinai S. Morpholactical regeneration as revealed by region specific genes expression in the digestive tract of *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelida). Develop. Dynam. 237 (2008) 1284-1294.
 - 13) Takeo M, Yoshida-Noro C, Tochinai S. Functional analysis of *grimp*: a novel gene required for mesodermal cell proliferation at an initial stage of regeneration in *Enchytraeus japonensis* (Enchytraeidae, Oligochaete). Int. J. Develop. Biol. 54 (2010) 151-160.
 - 14) Sugio M, Takeuchi K, Kutsuna J, Tadokoro R, Takahashi Y, Yoshida-Noro C, Tochinai S. Exploration of embryonic origins of germline stem cells and neoblasts in *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelida). Gene Express. Patt. 8 (2008) 227-36.
 - 15) Shimizu T. Development in the freshwater oligochaete Tubifex.: In Developmental Biology of Freshwater Invertebrates (F.W. Harrison and R. R. Cowden, eds.), (1982) pp.286-316. Alan R. Liss, New York.
 - 16) Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263 (1994) 802-805.

(H 26. 8 .10 受理)