

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03256

研究課題名(和文) プラナリアの有性化に必要な核内受容体に対する脂溶性リガンドの同定と解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of lipophilic ligands for the nuclear receptor essential for planarian sexualization

研究代表者

小林 一也 (Kobayashi, Kazuya)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：50360110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：プラナリア有性化必須遺伝子として核内受容体遺伝子Dr-nhr1が同定され、この機構は寄生性扁形動物にも保存されていると予想された。本研究では、(1) Dr-NHR1受容体脂溶性リガンドの同定、(2)寄生性扁形動物カンテツでのDr-nhr1オルソログの同定を目指した。研究項目(1)では、核内受容体Dr-NHR1の脂溶性リガンド候補物質を検証する実験系を構築することに成功し、候補物質となりうる脂溶性化合物を7種同定することができた。研究項目(2)ではカンテツの無性世代であるミラシジウムから有性世代の初期段階であるNEJへ変態時急激に発現が上昇するDr-nhr1オルソログ候補遺伝子を3遺伝子得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一見まったく異なるように見えるプラナリアとカンテツの生殖様式転換現象であるが、本研究によってプラナリアと吸虫カンテツに共通した分子機構として核内受容体Dr-NHR1の関与がより強く示唆された。系統的にプラナリアが寄生性扁形動物の起源であることを踏まえると、プラナリアにおいて獲得された生殖様式転換機構が寄生性扁形動物の繁栄の原動力となっているという生物学的にユニークな仮説を提唱できる。その成果の先には世界規模で問題となっている吸虫類による健康被害の軽減に利用できるという社会への波及効果がある。

研究成果の概要(英文)：A nuclear receptor, Dr-nhr1 (*Dugesia ryukyuensis* - nuclear hormone receptor 1) was identified as a gene essential for reproductive mode switching in planaria. It was expected that the mechanism involved in Dr-NHR1 may also act in parasitic flatworms. This study aimed to (1) identify Dr-NHR1 receptor lipophilic ligands and (2) identify Dr-nhr1 orthologs in the parasitic flatworm *Fasciola* sp. We established a bioassay system for examining Dr-NHR1 receptor lipophilic ligands, and identified seven lipid-soluble compounds that could be candidates. We also obtained three Dr-nhr1 ortholog candidate genes that are rapidly up-regulated during metamorphosis from Miracidium, the asexual generation to NEJ, the early stage of the sexual generation in *Fasciola* sp.

研究分野：発生・生殖生物学

キーワード：核内受容体 プラナリア カンテツ 脂溶性リガンド

1. 研究開始当初の背景

環境の変化や世代などに応じて無性生殖と有性生殖の2つの生殖様式を転換する動物は少なくない。生殖様式転換現象は2つの生殖様式のメリットを生かした生存戦略になっていると考えられる。特に無性生殖から有性生殖への切り替え(有性化)では、生殖方法が有性生殖に限定された多くの動物の場合とは異なり、必要に応じて分化多能性幹細胞から postembryonic(後胚発生的)に生殖細胞を誘導するといった独特の機構が働いていると考えられる。

自由生活性の扁形動物であるプラナリアでは横分裂/再生の繰り返しで増殖している無性個体に有性個体を給餌することで、分化多能性幹細胞から卵巣や精巣といった生殖器官を誘導して実験的に有性化を引き起こせることが古くから知られている。このことは、有性個体に「有性化因子」と呼ばれる生理活性物質が含まれていることを意味している。このような生理活性物質が明らかとなれば、それを手がかりとして分化多能性幹細胞からの postembryonic な生殖細胞分化機構の解明につながると期待できる。

研究代表者は、プラナリア *Dugesia ryukyuensis* の無性個体のクローン集団(OH株)を検定個体とした「有性化系」を確立している(Kobayashi *et al.*, *Zool. Sci.*, 1999)。この有性化系では卵巣、卵黄腺、精巣、交接器官の順に規則正しく生殖器官の分化が起こる(図1)。研究代表者はこの有性化系を用いてこの有性化因子が親水性の低分子化合物であること、そして未発表のものも含めてすでにいくつか有性化因子を単離・同定している(Kobayashi *et al.*, *Sci. Rep.*, 2017; Kitamura *et al.*, *Zool. Sci.*, 2021)。また、最近、寄生性の扁形動物であるカンテツ *Fasciola* sp. にも有性化因子が含まれていることを突き止めた(Sekii *et al.* in revision)。寄生性の扁形動物は複数の宿主を持ち、宿主に依存して生殖様式を転換しているが、この結果は有性化因子の関与する有性化の仕組みが寄生性の扁形動物でも保存されていることを示唆しており、その共通の仕組みを明らかにすることで発生・生殖生物学ばかりでなく、感染症研究にも大きな知見をもたらすことが期待できる。

有性化系ではステージ3以降は有性化因子の外部投与なしでも有性化が進行する(図1)。逆

にステージ2までは有性化因子の外部投与をやめると無性状態に戻ってしまう。このことから、ステージ2と3のあいだに「有性化回避不能点」があると定義した。研究代表者は有性化因子がステージ3から分化が始まる卵黄腺に含まれていることを明らかにした(Nakagawa *et al.*, *Zool. Lett.*, 2018)。自然界で有性化が起こる時は環境要因の変化がきっかけになっており、有性個体に含まれている有性化因子の刺激による無性個体の有性化はあくまで「実験的」なもの

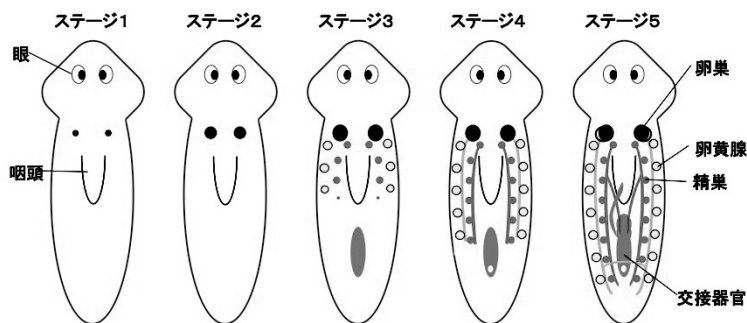


図1:有性化の5つのステージ

ある。環境要因の変化で働き始める機構の下流で、卵黄腺が分化して、そこで作り出される有性化因子がポジティブフィードバック的に有性化状態の維持に働くと考えると矛盾はない。そして、親水性である有性化因子のドーピングによって働き始める仕組みが、環境要因の変化がきっかけで直接的に働き始める本来の有性化機構であり、無性個体で有性化されないために抑制されている機構といえる。しかしながら、有性化に必要な具体的な分子機構、そして、無性状態においてどのようにその機構が抑制されているのかは全くわかっていなかった。

2. 研究の目的

先行研究において RNA-seq 解析によって有性化因子の刺激で発現が上昇する遺伝子の中で、無性個体では発現がなく、有性個体で発現が高く維持されているものを12遺伝子選び出した。12遺伝子の中に核内受容体とアノテーションがつくものが1遺伝子あり、この遺伝子(*Dr-nhr1*)を RNAi 法によってノックダウンした無性個体はたとえ有性化因子を投与しても全く生殖器官が誘導されないことがわかった(図2)。この結果は、有性化因子の刺激の下流で、「脂溶性リガンドの産生」と「核内受容体の発現」が起こっていることを示唆する。言い換えれば、この2つの仕組みが無性個体で有性化されないために抑制されている機構であり、有性化のためにはどちらか一方だけでなく、同時にこれら2つの機

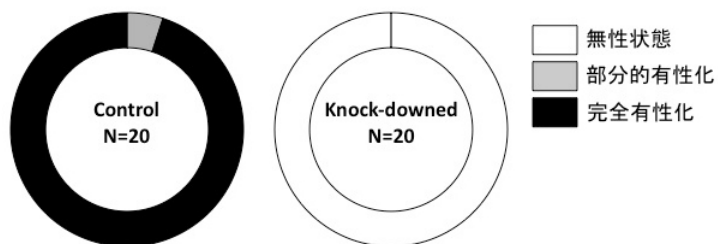


図2:核内受容体遺伝子*Dr-nhr1*のノックダウン個体では有性化因子の投与による有性化が完全に抑制される。

構がオンになる必要があると考えられる。脂溶性リガンドが結合した核内受容体はそのものが転写因子として働き、その下流で完全有性化を引き起こすための分子カスケードがオンとなっているはずである。核内受容体はステロイドやレチノイン酸といった脂溶性化合物をリガンドとし、その配列からリガンドが推定されるが、2DBD γ 型とアノテーションのつく Dr-NHR1 のリガンドは明確にされていないオーファンリガンドと分類される。そこで、本研究では、①Dr-NHR1 受容体脂溶性リガンドの同定、②寄生性扁形動物カンテツでの *Dr-nhr1* オルソログの同定、そして、③*Dr-nhr1* 標的遺伝子同定のための抗体の作成を目指した。

3. 研究の方法

①Dr-NHR1 受容体脂溶性リガンドの同定

Dr-nhr1 の発現誘導を引き起こす有性化因子を含む画分 (MOM10) と核内受容体 Dr-NHR1 の脂溶性リガンドを同時に無性個体に投与すれば、完全有性化率が上昇するという理論で、脂溶性リガンドを同定する。まずは、脂溶性リガンドは既知の化合物である可能性も考えられるので、無性個体と有性個体との間でメタボローム解析を行ない、有性個体に有意に多く含まれている脂溶性物質を候補物質として絞り込む。候補物質と MOM10 を同時に無性個体に投与することで、完全有性化率が上昇するかを検証する。

検定無性個体は 30 匹を 1 群とする。検定餌は、ニワトリレバー (通常飼育のための餌) のホモジネートに MOM10 と候補物質を混合して凍結乾燥したものとする。対照は MOM10 のみを含む凍結乾燥となる。凍結乾燥物を 28 等分し、30 匹の検定個体に毎日 1 片ずつ与える。4 週間の給餌後、実体顕微鏡下で検定個体を観察し、有性化状態を確認する。その後、定量 PCR 解析用のサンプルとして RNA 抽出を行なう。RNA サンプルから cDNA 合成し、有性化マーカー遺伝子のプライマーを用いて定量 PCR を行ない、有性化効果を評価する。もし、メタボローム解析で脂溶性リガンドを絞り込めない場合は、有性個体由来の抽出物を HPLC で分離するなどして、天然有機化学的アプローチで未知の脂溶性リガンドを精製する。分離過程では、前述の検定方法で有性化活性画分を精製していく。精製した脂溶性リガンドは TOF-MS、NMR によって構造決定する。

②寄生性扁形動物カンテツでの *Dr-nhr1* オルソログの同定

プラナリア遺伝子である *Dr-nhr1* の配列をもとに公開されているカンテツのシーケンス情報に対して一般的な BLAST サーチを行ってもホモロジーの高い配列は得られなかったため、カンテツでの *Dr-nhr1* オルソログ候補遺伝子を絞り込むために必要なプログラムの確立をまずは行う。カンテツでは、ヒメモノアラガイ中で無性的に発生させたセルカリアを単離すると即座に変態が始まりメタセルカリアとなる。自然界ではこのメタセルカリアの状態が家畜に食草とともに取り込まれ、胃で消化されることで最終変態をして未成熟な有性個体となる。共同研究者の関博士は、メタセルカリアをラットに感染させ *in vitro* で最終変態をさせ、研究室内でカンテツの生活環を再現できる。*Dr-nhr1* オルソログはカンテツの無性世代から有性世代への転換期に発現が上昇することが予想されるので、カンテツの生活環の 5 ステージから RNA を用意して定量 PCR で評価する。*Dr-nhr1* オルソログ候補遺伝子の dsRNA を作成し、ラット胆管に感染させたカンテツ幼生が通常 1 ヶ月で成熟するので、その dsRNA を注射により血中投与し、性成熟が抑制させられているかを検証する。

③*Dr-nhr1* 標的遺伝子同定のための抗体の作成

一般に、核内受容体には脂溶性リガンドが結合することで、その複合体が直接標的遺伝子の転写因子として働くことが知られている。本研究項目では、標的遺伝子同定のための抗体の作成を目指した。*Dr-nhr1* の配列から三次元構造を推定し、理想的な抗原部位を決定する。その抗原部位のペプチドを合成してウサギに免疫し、抗血清を得る。一方で、*Dr-nhr1* (コントロールにはプラナリアでは発現していない *egfp* を用いる) の dsRNA を作成し、有性化因子を含んでいるイゾミオオウズムシのホモジネートに dsRNA を混合して凍結乾燥する。凍結乾燥物を 28 等分し、30 匹の検定個体に毎日 1 片ずつ与える。4 週間の給餌後、検定個体タンパク抽出し、それをサンプルとして作成した抗血清に対するウェスタンブロット解析を行う。目的の抗体が得られている場合は、コントロールに対して *Dr-nhr1* ノックダウン個体の方で Dr-NHR1 タンパクが検出されない結果が得られるはずである。

4. 研究成果

①Dr-NHR1 受容体脂溶性リガンドの同定

有性化因子の投与により、*Dr-nhr1* 遺伝子の発現が上昇することがわかっている。無性個体に有性化因子を含む画分 (MOM10) を投与して有性化回避不能点を迎える前後の有性化状態をつくる。この条件下に、もしリガンドとして働く化合物が添加されたならば、MOM10 のみを与えられた Control 群に対して、有性化回避不能点を越える効率が上がるであろうと考え、これを検定系とした。

Dr-NHR1 受容体脂溶性リガンドは無性個体にはほとんど存在せず、有性個体に多く含まれている可能性が高い。そこで、メタボローム解析により無性個体に比べて有性個体に豊富に含まれている 15 種の化合物を選び出した。また、一般的に核内受容体のリガンドと知られる 8 種の化合物をあわせて Dr-NHR1 受容体脂溶性リガンド候補化合物とした (下表)。

リガンド候補化合物	
アビエチン酸	ネルボン酸
アラキジン酸	ベヘン酸
エイコサペンタエン酸	幼若ホルモン
エクジソン	all-trans-レチノイン酸
エルカ酸	cis-11-イコセン酸
エルゴステロール	β シトステロール
チロキシン	γ -トコフェロール
テストステロン	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
デスモステロール	7-デヒドロコレステロール
デヒドロエピアンドロステロン	9-cis-レチノイン酸
トリコサン酸	17 β -エストラジオール
トリヨードチロニン	

まず、全てのリガンド候補化合物を単体で投与した結果、有性化誘導効果をもたないことが確認された。そして、MOM10 とともにリガンド候補化合物を投与した結果、いずれも期待していた有性化回避不能点を劇的に超える効率が上がるような群は確認されなかった。しかし、有性化促進という点からみると、エルゴステロール、テストステロン、デスモステロール、デヒドロエピアンドロステロン、17 β -エストラジオール、cis-11-イコセン酸、 γ -トコフェロールの7化合物において、MOM10 単独投与と比較して有意に有性化が促進されることがわかった。本研究で Dr-NHR1 受容体脂溶性リガンドとしてこれら7化合物まで絞り込まれたが、今後リガンドになりうるか確実に証明するためには生化学的なアプローチが必要となる。

②寄生性扁形動物カンテツでの *Dr-nhr1* オルソログの同定

カンテツでの *Dr-nhr1* オルソログ候補遺伝子を絞り込むために、OrthoFinder ver. 2.3.8 を用いて公開されている47種の扁形動物の遺伝子情報をもとにプログラムを構築した。その結果、カンテツにおける *Dr-nhr1* のオルソログ候補遺伝子（ここでは、ホモログとする）が3種同定された。

カンテツの5つのライフステージからの RNA 抽出法、cDNA 合成法、定量 PCR によるライフステージを通じた遺伝子発現変動解析法を確立した。その結果、カンテツにおけるホモログ遺伝子3種の発現パターンが、「生殖様式を転換させる直前のライフステージ」で終宿主への感染を待機するメタセルカリア（図3：緑色）から、「終宿主中で生殖様式を転換するライフステージ」である NEJ（図3：橙色、感染初期幼体：Newly Excysted Juvenile）にかけて発現が上昇していることを明らかにした（図3）。この結果はホモログ遺伝子3種が「生殖様式を転換する」と期待していた機能に矛盾しない。

興味深いことに3遺伝子とも完全に成熟した成体になると発現が低下することがわかる（図3）。このことは、これらの遺伝子は生殖器官の分化過程で特異的に働いていることを示唆している。当初の予定では、機能証明するために、宿主であるラットに dsRNA を血中投与することで個体の成熟度を評価する計画であったが、数週間培養しておく NEJ に直接ソーキング法で dsRNA を処理することでノックダウン効果を確かめることが可能となった。今後、ノックダウン処理を行った NEJ をラットに感染させ、個体の成熟度を評価するというより簡便な方法で、カンテツの *Dr-nhr1* オルソログの同定を行う予定である。

③ *Dr-nhr1* 標的遺伝子同定のための抗体の作成

Dr-NHR1 の三次元構造から理想的な抗原部位が推定され、ペプチドを合成した。その合成ペプチドをウサギに免疫し、抗血清を得た。一方で、*Dr-nhr1* の dsRNA を作成し、無性個体に有性化をかけながら dsRNA を与えて、*Dr-nhr1* ノックダウン個体を得た。ウ

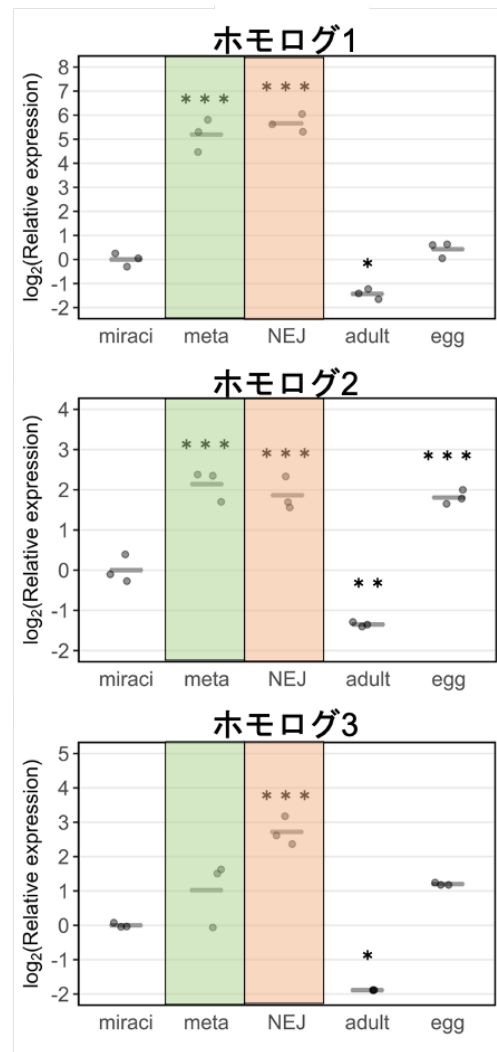


図 1. ライフステージを通じた定量 PCR 解析。

miraci：ミラシジウム, **meta**：メタセルカリア

NEJ：感染初期幼体, **adult**：成体, **egg**：卵

******* : $p < 0.001$, ****** : $p < 0.005$, ***** : $p < 0.05$

ウェスタンブロット解析で、コントロール個体では目的のバンドが得られたが、*Dr-nhr1* ノックダウン個体ではバンドの消失が確認された。このことから、Dr-NHR1 を認識する抗体が抗血清に含まれていると証明された。今後、目的抗体を精製し、別のプロジェクトで進行中の *Dugesia ryukyuensis* のゲノム解読後に ChIP アッセイを行い、標的遺伝子の同定を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kiyono Sekii, Kazuya Kobayashi	4. 巻 1
2. 論文標題 Sex-inducing substances terminate dormancy in planarian postembryonic reproductive development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Invertebrate (Neuro) Endocrinology, Volume 1: Phyla Other Than Arthropoda	6. 最初と最後の頁 25-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maezawa Takanobu, Ishikawa Masaki, Sekii Kiyono, Nagamatsu Go, Furukawa Ryohei, Kobayashi Kazuya	4. 巻 7
2. 論文標題 d-Tryptophan enhances the reproductive organ-specific expression of the amino acid transporter homolog Dr-SLC38A9 involved in the sexual induction of planarian <i>Dugesia ryukyuensis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-021-00173-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kiyono Sekii, Shunta Yorimoto, Hikaru Okamoto, Nanna Nagao, Takanobu Maezawa, Yasuhisa Matsui, Katsushi Yamaguchi, Ryohei Furukawa, Shuji Shigenobu, Kazuya Kobayashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Transcriptomic analysis reveals differences in the regulation of amino acid metabolism in asexual and sexual planarians.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 6132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-42025-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawase Osamu, Iwaya Hisashi, Asano Yoshiya, Inoue Hiromoto, Kudo Seiya, Sasahira Motoki, Azuma Nobuyuki, Kondoh Daisuke, Ichikawa-Seki Madoka, Xuan Xuenan, Sakamoto Kimitoshi, Okamoto Hikaru, Nakadate Hinaki, Inoue Wataru, Saito Ikuma, Narita Miyu, Sekii Kiyono, Kobayashi Kazuya	4. 巻 386
2. 論文標題 Identification of novel yolk ferritins unique to planarians: planarians supply aluminum rather than iron to vitellaria in egg capsules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 391-413
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-021-03506-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura Makoto, Tanaka Hiroyuki, Horiguchi Yurie, Manta Sayaka, Saito Ikuma, Iwaya Hisashi, Okamoto Hikaru, Nagao Nanna, Yanagihara Yumi, Taguchi Yu, Tezuka Rei, Maezawa Takanobu, Sekii Kiyono, Kobayashi Kazuya	4. 巻 38
2. 論文標題 Sex-Inducing Activities of the Land Planarian Bipalium nobile Extract Fractions, Obtained Using Bioassay-Guided Fractionation, in the Freshwater Planarian Dugesia ryukyuensis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 544-557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs210029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 齋藤伊玖真・齋藤由梨亜・関井清乃・古川亮平・小柳亮・佐藤矩行・小林一也
2. 発表標題 プラナリア有性化因子合成酵素の単離を目指して
3. 学会等名 日本動物学会 令和元年度東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成田美優・長尾南林・関井清乃・石田哲夫・前澤孝信・小林一也
2. 発表標題 芳香族アミノ酸水酸化酵素遺伝子の解析：プラナリアの有性化の観点から
3. 学会等名 日本動物学会 令和元年度東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田道生・成田美優・萬田冨佳・頼本隼汰・山口勝司・重信秀治・古川亮平・関井清乃・小林一也
2. 発表標題 プラナリア有性化因子の給餌刺激で発現が誘導される遺伝子について
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水辰海・江口碧唯・石川正樹・関井清乃・古川亮平・小林一也・石田哲夫・前澤孝信
2. 発表標題 プラナリア有性化におけるアミノ酸の役割
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林一也
2. 発表標題 プラナリアの生殖様式転換機構:有性化因子を手がかりにして
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会, シンポジウム「多様なアポミクシス・単為生殖システム:生殖過程の制御機構とその利用」(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	関 まどか (Seki Madoka) (20700488)	岩手大学・農学部・助教 (11201)	
研究分担者	坂元 君年 (Sakamoto Kimitoshi) (50361465)	弘前大学・農学生命科学部・准教授 (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------