

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：55301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650103

研究課題名(和文) プラナリア生殖様式転換は共生細菌がコントロールしているのか？

研究課題名(英文) Role of commensal bacteria in the switch of reproductive modes of planarians

研究代表者

前澤 孝信 (MAEZAWA, TAKANOBU)

津山工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：90548398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：プラナリアの無性個体が有性個体へと転換する(有性化)過程では雌雄同体性の生殖器官が秩序だって発達する。これまでに有性化の初期段階である卵巣の発達を誘導する物質としてトリプトファン(Trp)が同定されている。また、Trpは無性個体に比べて有性個体に多く含まれることも明らかになっている。我々は、必須アミノ酸であるトリプトファンの体内濃度が有性化に伴い増加する原因として共生細菌の関与を予想した。本研究では、抗生物質処理の実験から、有性化初期の卵巣形成に細菌が必要であることが示唆された。さらに、細菌種の解析から、特定の細菌種の割合が有性化に伴って増加することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the process of conversion from asexual to sexual reproduction (sexual induction), hermaphroditic sexual organs are gradually developed in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. Tryptophan (Trp) has been identified as an inducing factor of ovary, which is firstly developed during the sexual induction. Sexual planarians contain higher concentration of Trp than that of asexual planarians. We expected that symbiotic bacteria are concerned with increasing concentration of Trp, an essential amino acid, during sexual induction. In this study, the experiment of treatment of an antibiotic suggested that the bacteria are required for ovarian development at the initial step of sexual induction. Moreover, by comparing bacteria species between asexual and sexual planarians, we found that the rate of a particular bacterium become increased during sexual induction.

研究分野：発生・生殖生物学

キーワード：プラナリア 生殖様式転換 共生細菌

## 1. 研究開始当初の背景

生命はその誕生から現在に至るまで、生殖によって連続と受け継がれてきた。生殖の様式は無性生殖と有性生殖に大別され、それぞれ生殖コストあるいは多様性創出の面で利点がある。多様性創出は進化の原動力と考えられ、ほとんどの後生動物はその生活環の中で必ず有性生殖を行うため、必要な時期に生殖細胞を作り出すことは生物の存続に重要であると考えられる。しかしながら、後生動物において生殖様式の転換機構はほとんど分かっていない。扁形動物プラナリア(リュウキュウナミウズムシ *Dugesia ryukyuensis*)の無性系統(クローン集団: OH株)に有性種のプラナリア(イズミオオウズムシ *Bdellocephala brunnea*)を餌として与えることで雌雄同体性の生殖器官を誘導して有性個体へ転換させる系(物質刺激による有性化系)が確立されている(図1, Kobayashi et al. *Zool. Sci.* 1999)。さらに、有性種プラナリアの抽出液を精製した画分より、有性化を誘導する因子の構成要素としてL体およびD体トリプトファン(Trp)が同定された(Kobayashi, Maezawa et al. in preparation)。無性個体から有性個体へ切り換わるとTrpは体内濃度が25倍も増大し、卵黄腺に濃縮される。そのことが有性化の引き金になると考えられるが、体内Trp量変化のメカニズムは明らかになっていない。トリプトファンは動物における必須アミノ酸であり、プラナリアのゲノムに合成酵素遺伝子が存在しないことから、外部から供給されると考えられる。供給源の候補の1つとして、細菌が合成酵素を有する細菌類が予想される。共生細菌は多くの動物で有性生殖と密接に関係しているため、細菌と有性化が関連するかどうかは興味深い。

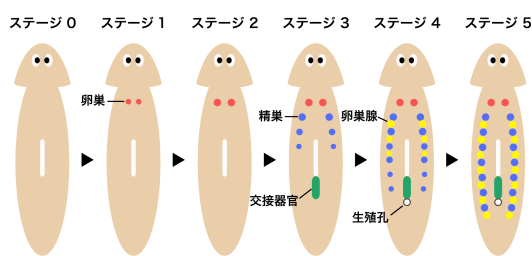


図1 プラナリアの有性化過程

## 2. 研究の目的

多くの後生動物は、無性生殖と有性生殖を環境に応じて転換し、それぞれの利点を生かして子孫を繁栄させてきたと考えられる。申請者らは、扁形動物プラナリアが無性生殖から有性生殖へ転換する(有性化)過程でトリプトファン(Trp)が増大すること、そのTrpの作用によって有性化が誘導されることを明らかにした。このことは、Trp量の変化が有性化の引き金になることを示唆している。しかしながら、その変化の誘導機構は分かっていない。本研究では、多くの動物で有性生

殖と密接に関係している共生細菌がTrp量の変化および有性化へ関与するのかを検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗生物質処理による初期有性化への影響

プラナリア有性化に対する抗生物質の影響を調べた。低分子化合物は投餌することで、プラナリアに作用することが分かっている。そのため、低分子である抗生物質を餌に混ぜて食べさせる方法を実施した。幅広い細菌に対する抗生物質オキシテトラサイクリン(OCT:主としてグラム陽性・陰性菌、リケッチア、クラミジアに作用する)を有性種イズミオオウズムシ片に混ぜて餌を作成する。その餌を無性プラナリア(OH株)に毎日与え有性化を誘導する。通常の有性化で卵巣の発達する2週間後、卵巣、交接器官および生殖孔を外部形態から観察し、実験群とコントロールで差があるかを調べた。

### (2) 抗生物質処理による後期有性化への影響

次に有性化後期への影響を調べるために、有性個体の投餌なしでも自律的に有性化が進行するステージ3(全5ステージ中)以降の個体に抗生物質処理を行うことにした。まず、OH株に有性種イズミオオウズムシ片を3週間与えステージ3の個体を誘導した。その後、レバーにOCTを混ぜた餌を4週間与えた。4週間経過後にコントロールと実験群の卵巣の外部形態を観察した。

### (3) プラナリアの共生細菌の同定

プラナリア有性化に伴い増加する共生細菌を同定を試みた。まず、無性および有性化プラナリアから NucleoSpin Tissue (TaKaRa社)を用いてDNAを抽出した。得られたDNAをテンプレートにして、16S rDNAの保存領域に特異的なプライマーを用いてPCRを行い、細菌由来の16S rDNA断片を増幅した。無性個体のDNAに対しては515FWと806rbc0のプライマーセットを、有性化個体のDNAに対しては515FWと806rbc1のプライマーセットを用いた。配列を以下に示す。

515FW:

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATGGTAATT  
GTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA

806rbc0:

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCCTTGTCTCCAGT  
CAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT

806rbc1:

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACGAGACTGATTAGT  
CAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT

増幅されたDNA断片を元にTaKaRa社の受託サービスにて次世代シーケンサーを用いた細菌叢解析を実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 抗生物質処理による初期有性化への影響

抗生物質処理しながら有性化をかけて2週間後に外部形態を観察した所、実験群において卵巣の発達した個体の割合が有意に低下した。また、交接器官の発達した個体の割合も有意差は認められなかったものの実験群で低下した。これらの結果は、抗生物質処理が、有性化初期におこる卵巣形成を阻害することを示唆している。

##### (2) 抗生物質処理による後期有性化への影響

有性化後期への影響を調べるために、有性個体の投餌なしでも自律的に有性化が進行するステージ3(全5ステージ中)以降の個体に抗生物質処理を行った。その結果、実験群では、過剰に卵巣対が形成される個体が多く見られた。この結果より、抗生物質処理が、有性化後期では卵巣形成の促進を促すことが示唆された。

##### (3) プラナリアの共生細菌の同定

(1)(2)の研究成果から、細菌の有性化への関与の可能性が考えられたため、プラナリア個体内の細菌を明らかにすることにした。無性および有性プラナリアからDNAを抽出し、原核生物のリボソームDNAを特異的に増幅させるプライマーを用いて、PCRを行った。PCR産物を次世代シーケンサーによって配列解析し、無性および有性プラナリアに存在する細菌の種類を調べた。OTU (operational taxonomic unit) 解析の結果、スピロプラズマに配列類似性の高い菌種の割合が無性と比べて有性では顕著に増加することがわかった。スピロプラズマはハエの卵子に感染し、子孫の性比を制御することが知られている。菌種の同定のためにはさらなる解析が必要であるが、プラナリアにおいてもスピロプラズマが生殖細胞形成に影響を与えるのかはとても興味深い。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計1件)

Planarian D-amino acid oxidase is involved in ovarian development during sexual induction. Maezawa T\*, Tanaka H\*, Nakagawa H, Ono M, Aoki M, Matsumoto M, Ishida T, Horiike K, Kobayashi K. (\*equal contribution). Mech. Dev., 査読有, Vol.132, 2014, 69-78

##### [学会発表](計6件)

Tryptophan enhances the reproductive organs-specific expression level of an amino acid transporter homolog,

Dr-SLC38A9 to promote sexual induction of the planarian *Dugesia ryukyuensis* Maezawa T, Ishikawa M, Nagamatsu G and Kobayashi K. 2015. 8 International Symposium of Flatworm Biology, Oxford

Tryptophan enhances the reproductive organs-specific expression level of an amino acid transporter homolog, Dr-SLC38A9 to promote sexual induction of the planarian *Dugesia ryukyuensis* Maezawa T, Ishikawa M, Nagamatsu G and Kobayashi K. 2015. 8 International planarian/regeneration meeting, Oxford

プラナリア生殖器官特異的に発現するアミノ酸輸送体ホモログの解析  
石川正樹, 前澤孝信, 小林一也  
2014. 9 日本動物学会第84回大会 仙台

トリプトファンは Dr-SLC38A9 の発現誘導を介してプラナリアの有性化を進行させる  
前澤孝信, 石川正樹, 小林一也  
2015. 9 日本動物学会第85回大会 新潟

プラナリア生殖器官に特異的に発現するアミノ酸トランスポーターホモログ遺伝子の機能解析  
前澤孝信, 石川正樹, 小林一也  
2014. 5 日本動物学会 平成26年度中国・四国支部大会 岡山

プラナリア生殖器官に特異的に発現するアミノ酸トランスポーターホモログ遺伝子の機能解析  
前澤孝信, 石川正樹, 小林一也  
2015. 5 日本動物学会平成27年度中国・四国支部大会 愛媛

##### [図書](計1件)

Reproductive and Developmental Strategies  
Maezawa T, Sekii K, Ishikawa M, Okamoto H and Kobayashi K  
in press Springer Japan

##### [産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

前澤 孝信 (TAKANOBU MAEZAWA)  
津山工業高等専門学校・総合理工学科・  
准教授  
研究者番号：90548398

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

小林 一也 (KAZUYA KOBAYASHI)  
弘前大学・農学生命科学部・准教授  
研究者番号：50360110