

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07121

研究課題名(和文) プラナリアの生殖様式を無性生殖から有性生殖に転換させる化学物質の単離・同定

研究課題名(英文) Identification of sex-inducing substances that can trigger the switching from asexual to sexual reproduction in planarians.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：プラナリアにおいて、無性状態から有性状態に転換させることのできる有性化因子の同定を目指した。有性化因子を無性個体に投与すると多能性幹細胞(ネオプラスト)から卵巢、卵黄腺、精巢、交接器官の順に規則正しく生殖器官が誘導される。先行研究で有性化因子のひとつ(卵巢誘導因子)として同定されていたトリプトファンが卵黄腺に大量に含まれているという発見から、有性化因子の候補化合物として卵黄腺に含まれている低分子化合物に注目した。本研究では、メタボローム解析で候補物質として絞りこんだ低分子化合物から、トリプトファンを含めて16種の卵巢誘導因子と2種の完全有性化に必須な因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：We tried to identify “sex-inducing substances” that can switch from an asexual to a sexual state in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. The administration of the sex-inducing substances induces the differentiation of ovaries, yolk glands, testes and a copulatory apparatus in turn from the pluripotent stem cells called neoblasts. In the previous study, we identified tryptophan as a sex-inducing substance (an ovary-inducing substance), which is contained in a large amount in the yolk glands. This finding led us to focus on low-molecular weight compounds contained in the yolk glands as candidates for the sex-inducing substances. In the present study, we identified 16 ovary-inducing substances including tryptophan and two crucial sex-inducing substances among the candidate compounds narrowed down by metabolomic analysis.

研究分野：生殖生物学、生殖生物学

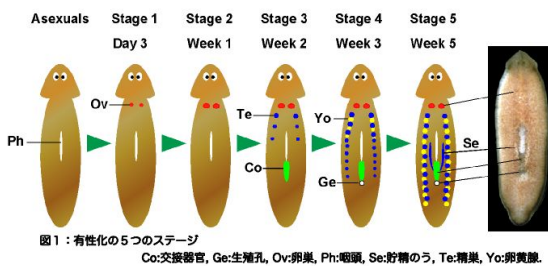
キーワード：プラナリア 生殖様式 生殖細胞 有性化因子

1. 研究開始当初の背景

性を伴わない生殖様式である無性生殖では、個体は普通、多能性幹細胞を有しており、それから組織や器官を新生して新たな個体をかたちづくる(例:カイメン/芽球形成;ヒドラ/出芽;プランナリア/横分裂後に再生;ヤマトヒメミズ/断片化後に再生;群体ホヤ/血管出芽)。実は、哺乳類のように有性生殖しかできない後生動物は思いのほか少数派であるし、逆に全く有性生殖を行わないと考えられる生物も例外的である。多くの動物は、無性生殖と有性生殖のどちらも行う能力があり、世代、系統、環境条件などに応じて両者を使い分けているのである。子孫を残す際のも多様性の創出・生殖コストという点で相反する特徴を持つ二つの生殖様式を転換する機構は、いわば両者のいいとこ取りをした都合のよい生殖戦略といえる。

ある種のプランナリアでは、自然界で水温の変化が大きな要因となって生殖様式を転換するが、研究室でもその無性個体は有性個体を餌として摂食すると多能性幹細胞ネオプラストから雌雄同体性の生殖器官の分化が postembryonic (後胚発生的) に起こり、分裂による無性生殖をやめて有性生殖を行うようになる (Grasso and Benazzi, J. Embryo. Exp. Morphol., 1973)。この実験的有性化は、有性個体に、無性生殖から有性生殖への転換に関わる化学物質(有性化因子)が含まれていることを意味している。この有性化因子が同定されれば、これを手がかりとして生殖様式転換機構や後胚発生的な生殖細胞分化機構に関する共通原理が明らかになると期待できる。

私たちは *Dugesia ryukyuensis* の無性クローン集団 (OH 株) の迅速かつ安定な有性化系を確立している (図 1) (Kobayashi et al., Invert. Rep. Dev., 1999; Kobayashi et al., Zool. Sci., 1999)。



約 1 ヶ月間での有性化因子の刺激で、卵巣、卵黄腺、精巣、交接器官の順に規則正しく生殖器官が分化してくる。卵巣だけが分化している stage 2 までは有性化因子の刺激を止めると無性状態に戻ってしまうが、一旦、stage 3 になり卵黄腺や精巣の分化が始まるともはや有性化因子の外部投与無しに有性化が進行する。これらの観察から、stage 3 以降に分化してくる生殖器官が完全有性化に必要な有性化因子を産生し、その生殖器官の分化には卵巣の分化・成熟が必要であることが示

唆されていた (Kobayashi and Hoshi, Zool. Sci., 2002, Kobayashi et al., Zool. Sci., 2002a)。

これらの背景のもとで本研究開始当初には次のことがわかっていた。

a) 完全有性化に必要な有性化因子とは別に卵巣誘導にのみ関わる有性化因子があり、そのひとつとしてトリプトファン (Trp) を同定していた (Kobayashi et al., Sci. Rep., 2017)。

b) 有性個体には無性個体に比べて約 125 倍量の Trp が含まれており、卵黄腺に主に存在していることがわかっていた (Kobayashi et al., Sci. Rep., 2017)。

c) 無性個体と有性個体を材料にメタボローム解析を行ったところ、Trp の代謝物として、5-ヒドロキシトリプトファン (5-HTP) が有性個体に多く含まれており、5-HTP にも卵巣誘導活性があることがわかっていた。

d) 卵黄腺組織だけを集めて無性個体に給餌すると完全な有性化が起こることがわかっていた。この結果より、有性化因子は卵黄腺で産生されていると考えられる (Nakagawa et al., Zool. Lett., in press)。

2. 研究の目的

卵黄腺に含まれている完全有性化の決定に働く有性化因子を同定する。

有性化因子として、Trp あるいは 5-HTP を基質にした代謝産物が候補としてあげられる。RNA シーケンス情報から Trp を含めた芳香族アミノ酸の代謝に関わる酵素遺伝子を選び出して、有性化現象との関連性について検証する。

3. 研究の方法

私たちは完全有性化活性を示す MOM10Fr. と呼ぶ親水性画分の粗精製法を確立している (Kobayashi and Hoshi, Front. Zool., 2011)。MOM10Fr. には Trp が含まれていること、また、MOM10Fr. 中の複数の化合物の相加・相乗効果によって完全な有性化が引き起こされることが示唆されている (Kobayashi et al., Sci. Rep., 2017)。当初、天然有機化学的手法で MOM10Fr. をさらに分画していくことで完全有性化の決定に働く有性化因子を同定することを進めていた。一方、卵黄腺に完全な有性化が起こすために必要な有性化因子群が含まれるという発見 (Nakagawa et al., Zool. Lett., in press) があってので、メタボローム解析で無性個体、有性個体に比べて卵黄腺組織に圧倒的に多く含まれている低分子化合物の中で親水性でかつ分子量 500 以下の 32 種を有性化因子の候補物質とした。

天然有機化学的手法でのアプローチに対して、メタボローム解析でのアプローチの方が良好な結果が得られたので、本研究後半はメタボローム解析でのアプローチで研究を進めた。32 種の有性化因子の候補物質を、無

性個体 20 匹に対して、14.5ng/worm/day、145ng/worm/day、1450ng/worm/day の 3 点の濃度で 4 週間給餌したのち、外部形態の変化および有性化マーカー遺伝子の発現を定量 PCR で評価した。

Trp を含めた芳香族アミノ酸の代謝に関わる遺伝子ホモログを得るために RNA シーケンスライブラリーを作成した。

無性個体と有性個体から total RNA を調整し、illumina TruSeq® RNA のプロトコールに従って、RNA シーケンス用の cDNA ライブラリーを作成した。4 セットの cDNA ライブラリーに関して、HiSeq Sequencing を行った。Trinity を使った全サンプルのリード全ての de novo assembly、および coding sequence の予測を行った。de novo assembly で得たリファレンス配列に、各サンプルのリードをマッピングし、その後、eXpress を用いて contig 毎にリード数をカウントして FPKM 値を求めた。Differentially expressed genes (DEG) の計算は edgeR を用い、解析は全て R を用いて行った。また、coding sequence 予測配列に関して NCBI nr-aa BLAST に対して blast をかけ、各配列のホモロジー情報の上位 20 位の情報をもとに annotation をつけて、pathway enrichment 解析を行った (Sekii et al., in preparation)。

本研究では、Trp や 5-HTP を基質として酵素活性をもつ可能性のある遺伝子ホモログに注目した。pathway enrichment 解析や Blast 解析で選び出した Trp を含めた芳香族アミノ酸の代謝に関わる遺伝子ホモログに関して、定量 PCR、*in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析を行い、卵黄腺に高発現している遺伝子を絞り込んだ。その完全長を TOPO® Cloning vector (pET101/D-TOPO) に組み込み、レコンピナント産生用の大腸菌を作成した。精製したレコンピナントに対して基質となりうる Trp や 5-HTP と補因子となりうるテトラヒドロピオプテリンを加えて、代謝物が精製されるかを検証する。

4. 研究成果

メタボローム解析で無性個体、有性個体に比べて卵黄腺組織に圧倒的に多く含まれている低分子化合物の中には予想通り、Trp と 5-HTP が含まれていた。

メタボローム解析で有性化因子の候補物質として絞られた 32 種 (Trp と 5-HTP を含む) を無性個体に給餌したところ、18 種に卵巣誘導活性が認められた (図 2、注 5-HTP の結果が含まれていない)。そして、この 18 種の化合物の中に低頻度ではあるものの、完全に有性化を引き起こすものが 2 種あった。

完全有性化因子には卵黄腺由来の Trp や 5-HTP の代謝物があると考えていたが、研究項目 で同定に成功した完全有性化因子 2 種 (ここで便宜的に物質 X と Y とする) は直接的な Trp 代謝物ではなかった。物質 X や Y と Trp や 5HTP を含めた卵巣のみを誘導するこれ

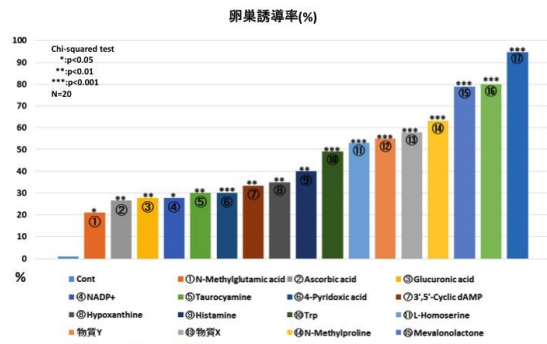


図 2: メタボローム解析で絞られた有性化因子候補物質のなかで卵巣誘導活性を示した化合物は 18 種類あった

らの因子と同時に無性個体に投与すると有性化活性が上昇することがわかった。「背景」でも説明したように、有性化では必ず卵巣の分化・成熟がまず起こり、有性化因子産生の場と考えられる卵黄腺も含めた他の生殖器官の分化が始まる (図 1)。つまり、卵巣誘導因子は、物質 X と Y のように完全有性化に必要な因子と同時に無性個体に投与させることで、有性化のエンハンサーとして働いていると考えられる。

卵黄腺に多く含まれる低分子化合物の中で Trp 代謝物はキヌレニンと 5-HTP があつた。キヌレニンには有性化活性がなかったが、先述のように 5-HTP は Trp と同様に卵巣誘導活性がある。Trp から 5-HTP の合成に働く酵素は TPH (トリプトファンヒドロキシラーゼ) であるが、RNA シーケンス情報の解析および、定量 PCR、*in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析により、卵黄腺で発現している芳香族アミノ酸の代謝酵素遺伝子は PAH (フェニルアラニンヒドロキシラーゼ: フェニルアラニンをチロシンに代謝する酵素) ホモログのみであることがわかった。さらにプラナリア PAH ホモログにはアイソフォームが 2 種類あり、卵黄腺で発現している PAH ホモログは卵黄腺特異的であることがわかった。卵黄腺にはチロシンも多く含まれており、卵黄腺特異的 PAH ホモログは PAH 活性と TPH 活性の双方を併せ持つ酵素であるという意外な結果が示唆された。そこで、卵黄腺特異的 PAH ホモログのレコンピナントの酵素活性の検証も行える段階にした (残念ながら本研究期間中に検証結果を得られなかった。)

無性個体と有性個体の RNA シーケンス情報を用いた pathway enrichment 解析を行ったところ、無性状態と有性状態それぞれ特異的な Trp 代謝が有意に働いていることが示唆された。卵黄腺特異的ではなかったが、5-HTP からセロトニン (5-HT) に代謝する酵素遺伝子ホモログが有性個体で有意に発現していることがわかった。そこで、無性個体に 5-HT を投与したところ、卵巣が誘導されることがわかった。

以上の結果から、プラナリアは無性状態から有性状態に移行する時に、Trp 代謝を劇的に変化させることで、その代謝物を有性化エンハンサーとして利用していることが示唆

された。

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 4 件)

Haruka Nakagawa, Kiyono Sekii, Takanobu Maezawa, Makoto Kitamura, Soichiro Miyashita, Marina Abukawa, Midori Matsumoto, Kazuya Kobayashi, A comprehensive comparison of sex-inducing activity in asexual worms of the planarian *Dugesia ryukyuensis*: The crucial sex-inducing substance appears to be present in yolk glands in Tricladida. Zoological Letters, in press. 査読有り

Takanobu Maezawa, Kiyono Sekii, Masaki Ishikawa, Hikaru Okamoto, Kazuya Kobayashi, Reproductive strategies in planarians: Insights gained from the bioassay system for sexual induction in asexual *Dugesia ryukyuensis* worms. In Reproductive and Developmental Strategies eds by K. Kobayashi, T. Kitano, M. Iwao, M. Kondo. Springer Japan, in press. 査読有り

Kazuya Kobayashi, Takanobu Maezawa, Hiroyuki Tanaka, Hiroyuki Onuki, Yurie Horiguchi, Hiroshi Hirota, Tetsuo Ishida, Kihachiro Horiike, Yasutoshi Agata, Manabu Aoki, Motonori Hoshi, Midori Matsumoto, The identification as a bioactive substance for postembryonic ovarian development in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. Scientific Reports 7 (2017) DOI:10.1038/srep45175. 査読有り

Daisuke Okano, Sachiko Ishida, Seiichi Ishiguro, Kazuya Kobayashi. Light and electron microscopic studies of intestinal epithelium in *Notoplana humilis* (Plathelminthes, Polycladida): The contribution of mesodermal/gastrodermal neoblasts to intestinal regeneration. Cell Tissue Research 362:529-540(2015) DOI:10.1007/s00441-015-2221-9. 査読有り

〔学会発表〕(計 2 1 件うち招待講演 7 件 / うち国際学会 8 件)ここでは招待講演のみ記載する。

Kiyono Sekii, Soichiro Miyashita, Miyu Narita, Mizuki Sasaki, Madoka Seki, Kazuya Kobayashi. Sex-inducing substances are widely conserved among Platyhelminthes, including parasitic flatworms, The International Research Symposium on Germness and Pluripotency of the Planarians in comparison with the Fly and Mouse Systems (2018) Hirosaki, Japan

小林一也. プラナリアの生殖様式転換機構の解明を目指して、第 6 回生殖若手の会

(2018)下田

小林一也. プラナリアにおいて無性生殖から有性生殖への転換を誘導する低分子化合物について、日本動物学会第 88 回富山大会関連集会「生殖戦略-さまざまな動物の次世代創発システム」(2017)富山

Kazuya Kobayashi. Switching from an asexual to a sexual state in freshwater planarians: Identification of sex-inducing substances, The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro (2017) Fukuoka, Japan

Kazuya Kobayashi. Reproductive switching in freshwater planarians: Asexuals *Dugesia ryukyuensis* worms are experimentally sexualized by administration of substances contained in yolk glands. The 22nd International Congress of Zoology (2016) Okinawa, Japan

Kazuya Kobayashi. Yolk glands containing a large amount of tryptophan have a set of sex-inducing substances to fully sexualize asexual worms of *Dugesia ryukyuensis*. International Symposium of Flatworm Biology (2015) Oxford, UK

小林一也. プラナリア生殖様式転換現象における精巢の重要性、第 47 回精子研究会 (2015)秋田

〔図書〕(計 2 件)

Kazuya Kobayashi, Takeshi Kitano, Yasuhiro Iwao, Mariko Kondo, Reproductive and Developmental Strategies: the Continuity of Life, Diversity and Commonality in Animals, Springer Japan, in press.

小林一也・関井清乃「シリーズ・生命の神秘と不思議 プラナリアたちの巧みな戦略」裳華房 (2017)総ページ数 167 ページ

〔産業財産権〕

なし

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

小林一也 (KOBAYASHI KAZUYA)
弘前大学・農学生命科学部・准教授
研究者番号：50360110

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

坂元君年 (SAKAMOTO KIMITOSHI)
弘前大学・農学生命科学部・准教授
研究者番号：50361465

(4)研究協力者

なし