

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19318

研究課題名（和文）プラナリアの生殖様式は共生細菌によって制御される：有性排除の仕組みの解明

研究課題名（英文）Mechanism involved in the biosynthesis of a sex-inducing substance in the planarian *Dugesia ryukyuensis*

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） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：多くの動物は有性生殖だけではなく無性生殖も行なうことができ、2つの生殖様式を転換することで、それぞれの生殖戦略のメリットをうまく利用していると考えられる。しかしながら、生殖様式転換機構の研究はほとんど進んでいない。私たちは、扁形動物プラナリアの無性個体を実験的に有性化する実験系を確立している。本研究では、この実験系を用いてプラナリアの生殖様式転換機構において、有性化を抑制する共生細菌が存在していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では扁形動物プラナリアに、宿主の生殖細胞の分化を抑制して「無性化」を促進する共生細菌が存在し有性化を阻害する、いわゆる「性殺し（有性排除）」という仕組みを新たな概念として提案することができた。将来的にハエやマウスなどの生殖細胞分化でも検証することで、生殖細胞を誘導する仕組みに共生細菌の存在が関与しているという、生物学全体にインパクトを与える新しい共通原理を提案できるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Metazoans occasionally switch their mode of reproduction on the basis of environmental changes, life cycle phase, or both. However, the mechanisms underlying the switch from an asexual to a sexual mode of reproduction and vice versa are poorly understood. We established an assay system for sexualization in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. In this assay system, asexual worms were stimulated to develop hermaphroditic reproductive organs by being fed sexually mature planarians. This means that sexually mature planarians contain sex-inducing substances. In the current study, using this assay system, we suggested a mechanism involved in the biosynthesis of a sex-inducing substance.

研究分野：生殖生物学

キーワード：プラナリア 有性生殖 無性生殖 生殖様式転換 共生細菌

1. 研究開始当初の背景

生物の歴史は常に生き残りをかけての他個体との競争である。特に進化スピードの早い細菌やウイルスからの攻撃に対して淘汰されずに生き残るには、進化学で有名な「赤の女王仮説」にあるように、常に宿主自身が進化し続けなければならないため、有性生殖というシステムが維持されてきたとされている。しかし、長い進化の歴史の中で、敵対から協力へと関係性をシフトさせ、宿主と共生関係を結んだ細菌も多く存在する。近年、生物の体に生息する細菌を網羅的に調べる技術が発展したことにより、細菌叢が宿主の代謝の補助や免疫機能、健康状態に深く関与していることが報告されている。共生細菌が昆虫の有性生殖を制御する例としてボルバキアやスピロプラズマが挙げられる。

多くの動物は有性生殖だけではなく無性生殖も行なうことができ、2つの生殖様式を転換することで、それぞれの生殖戦略のメリットをうまく利用していると考えられるが、無性生殖という点で共生細菌の役割が研究された例はない。本研究では扁形動物プラナリアに、宿主の生殖細胞の分化を抑制して「無性化」を促進する共生細菌が存在し、有性化を阻害する、いわゆる「性殺し(有性排除)」という仕組みがあることを生物学全体にインパクトを与える新たな概念として提案することを目指した。

研究代表者は、プラナリア有性個体の給餌(有性化因子の刺激)によって全ての無性個体が4週間で雌雄同体性の生殖器官を発達させて有性化する実験系を確立した(Kobayashi et al., *Zool. Sci.* 1999)。そして、この実験系を用いて有性化因子を同定し、これを手がかりにすることで生殖様式転換機構の共通原理の解明につながるのではないかと考えた。本研究開始直前に本研究の立案のきっかけとなる完全有性化を引き起こす化合物としてL-ホモセリンラクトン(L-HSL)(図1A)を同定することに成功した。

L-HSLはクオラムセンシング(quorum sensing 以下、QS)とよばれるグラム陰性菌のコミュニケーション機構でオートインデューサーとして働くアシル化L-HSL(AHL)(図1B)に由来する代謝物であり、これまで細菌での合成経路しか報告がない。また、プラナリアのゲノム/トランスクリプトーム情報にはAHL合成酵素ホモログは見当たらないことから、プラナリアに含まれているL-HSLは細菌由来と考えられる。QSは細菌が周囲に存在する同種の密度を感知することで発動し、自らの増殖を制御し、さらには遺伝子発現を調節する仕組みである。QS下流での現象の具体的な例では、発光細菌のルシフェラーゼ産生、緑膿菌の毒性発現、そしてバイオフィーム産生制御などがある。AHLはアシル化にバリエーションがあつて(図1B)天然から同定されたもの、有機合成によるものと多数知られていて、QSの細菌特異的な活性はこのアシル化の状態とAHL受容体との特異的な結合に関係がある。

先行研究で有性化因子として同定したL-HSL自体にはQSの誘導能はないとされている。むしろ大量のLHSLの投与はAHL受容体に対する競合(阻害)物質として働く可能性がある。予想通り、市販のQS阻害剤でも有性化が起きた。これらのことから無性個体では、ある種の共生細菌のQSの働きによる有性化抑制の仕組みが存在していることが予想できた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、①メタゲノム解析によって無性化に働く共生細菌の探索・同定をまず目指し、②無性化に働く共生細菌の培養系確立し、無性化に働くAHLの単離・同定することを目的とした。

3. 研究の方法

①メタゲノム解析によって無性化に働く共生細菌の探索・同定

宿主であるプラナリアはリュウキュウナミウズムシ(*Dugesia ryukyuensis*)の無性クローン集団(OH株)を無性個体として用いた。また、これを実験的に有性化した個体を有性個体とした。

16SrRNA配列情報をもとに無性個体と有性個体の組織由来の細菌叢を比較して、無性個体に特異的、あるいは有意に存在する細菌を同定し、その中でグラム陰性菌を無性化共生細菌の候補とし、候補細菌の16SrRNA配列を決定する。候補細菌が目的の無性化共生細菌であるかを検証するために、核酸ペプチド(PNA)を用いる。PNAはDNAとよく似た構造をもち、相補的なDNA配列に強くハイブリダイズすることができるため、候補細菌の配列特異的な16S rRNA領域に対して相補的なPNAを設計することで、種特異的にその増殖を抑えることができる(Górska et al., *J. Phys. Chem. B*, 2016)。候補細菌の16S rRNA領域の全長配列を決定しPNAを設計・合成する。PNAを無性個体に投与して、候補細菌が減少するかを定量PCRで評価するとともに、有性化が引き起こされているかを検証する。細菌数が減少し、かつ有性化が起きた場合に候補細菌を無性化共生細菌と判定する。

②無性化に働く共生細菌の培養系確立し、無性化に働くAHLの単離・同定

市販の栄養培地や無性個体の抽出物などを添加することで培養方法を検討する。研究項目①で決定された無性化共生細菌を大量培養し、すでに報告のあるAHLの分離法に従って分離する。

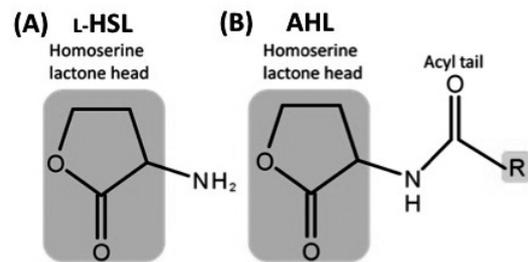


図1:L-HSLとAHLの化学構造

AHL のレポーター細菌(大抵の AHL に反応して呈色する)を使って候補物質の選別を行なう。精製・単離した AHL の構造を NMR や LC/MS で決定する。構造決定した AHL を有機合成し、無性個体への QS 阻害剤や L-HSL の投与による有性化を競合的に阻害するかを検証し、無性化 AHL の決定とする。

4. 研究成果

16SrRNA 配列の比較による細菌叢解析により、遺伝的背景や飼育環境が同一であるにもかかわらず、無性個体と有性個体に共生している細菌叢が有意に異なること、そして、抗生物質テトラサイクリン処理で部分的有性化(卵巣)が誘導されるだけでなく、細菌叢のパターンが有性個体の場合に近づくことを明らかにした(図 2A)。さらに、有性個体比べて無性個体に有意に存在し、テトラサイクリン処理で減少するグラム陰性菌を 3 種絞り込んだ(図 2B)。

これらの候補細菌が目的の有性化阻害細菌であるかを検証するために、PNA を用いたノックダウンを行ったところ、プロテオバクテリア門ベータプロテオバクテリア綱パークホルデリア目コマモナス科に属するグラム陰性細菌(ここでは便宜的に *denovo276* と称する)が有意に減少するとともに、無性個体に卵巣が誘導されることがわかった。以上の結果から、*denovo276* を無性化共生細菌と判断した。

表 1 *denovo276* の固形培養条件の検討

温度	気相条件	<i>denovo276</i> 検出頻度	
		Holt	LB
30°C	好気条件(2日間)	0/5	
	微好気条件(2日間)	0/2	
	嫌気条件(1週間)		1/1
25°C	好気条件(2日間)	5/7	0/3
	微好気条件(3日間)	2/4	1/1
	嫌気条件(1週間)	1/2	
20°C	好気条件(3日間)	4/5	0/1
	微好気条件(3日間)	3/7	1/1
	嫌気条件(1週間)		

(*denovo276*検出数/バンド検出数)

嫌気条件ではほとんどコロニーは形成されなかった。好気条件・微好気条件では多数のコロニーが形成されたので、16SrRNA 配列の中でも特に細菌特異性の高い領域で、*denovo276* の配列が増幅される可能性が高いプライマーを設計し、コロニーPCRを行なった。その結果、LB 培地に比べて Holtfreter 氏液培地の方で目的の PCR バンドが多く検出された。さらにこの PCR 産物のシーケンスの結果、*denovo276* は 20°C、好気条件、Holtfreter 氏液培地でよく検出されることがわかった。

固形培養条件が整ったので、次に液体培養条件の検討に入ったが、これまでのところ、*denovo276* は液体培養をすとうまく生育しないことがわかった。ここに無性個体の抽出液を入れるなど現在、検討を重ねている。液体培養系確立後は予定通り、無性化に働く AHL の単離・同定に臨みたい。

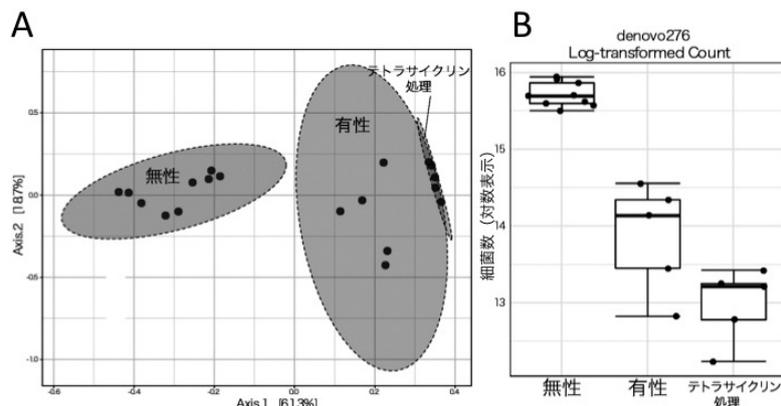


図2 A: テトラサイクリン処理は有性化を引き起こし、細菌叢のパターンが無性個体から有性個体の状態に近づくことを示す主座標分析図。
B: 無性個体に有意に多く存在する細菌種(*denovo276*)を示す箱ひげ図。

続いて、無性化に働く AHL の単離・同定のために *denovo276* の培養系確立を目指した(表 1)。温度は宿主であるプラナリアの飼育温度(20°C)を基準に3点とった。気相条件は通常の大気条件を「好気条件」とし、嫌気培養キット・アネロパック(三菱ガス化学)を用いて「微好気条件」と「嫌気条件」を設定した。培地は大腸菌培養で一般的に用いられている LB 培地とプラナリア生理食塩水(両生類生理食塩水である Holtfreter 氏液を 5/8 に希釈したもの)をベースにした培地の2種を用いた。

これらの条件で各培地に無性個体のホモジネートを薄く塗りつけ、一定期間静置した。どの温度・培地条件でも

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Haruka Nakagawa, Kiyono Sekii, Takanobu Maezawa, Makoto Kitamura, Soichiro Miyashita, Marina Abukawa, Midori Matsumoto, Kazuya Kobayashi	4. 巻 4
2. 論文標題 A comprehensive comparison of sex-inducing activity in asexual worms of the planarian <i>Dugesia ryukyuensis</i> : the crucial sex-inducing substance appears to be present in yolk glands in <i>Tricladida</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Zoological letters	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-018-0096-9	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 Sekii Kiyono, Yorimoto Shunta, Okamoto Hikaru, Nagao Nanna, Maezawa Takanobu, Matsui Yasuhisa, Yamaguchi Katsushi, Furukawa Ryohei, Shigenobu Shuji, Kobayashi Kazuya	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 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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1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 黒田道生・成田美優・萬田冴佳・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 Maezawa Takanobu, Shimizu Tatsumi, Egawa Aoi, Ishikawa Masaki, Sekii Kiyono, Kobayashi Kazuya
2. 発表標題 Mechanisms in ovarian development during sexual induction of the planarian <i>Dugesia ryukyuensis</i>
3. 学会等名 2018 International Planarian Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加納沙也佳・関井清乃・小林一也・梅園良彦・織井秀文
2. 発表標題 プラナリア生殖腺発達におけるFGFシグナルの機能解析
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前澤孝信・清水辰海・江川碧唯・石川正樹・関井清乃・小林一也
2. 発表標題 プラナリア有性化過程における卵巣形成機構
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kazuya Kobayashi, Takeshi Kitano, Yasuhiro Iwao, Mariko Kondo	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 789
3. 書名 Reproductive and Developmental Strategies The Continuity of Life	

〔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
研究協力者	坂元 君年 (Sakamoto Kimitoshi) (50361465)	弘前大学・農学生命科学部・准教授 (11101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	前澤 孝信 (Maezawa Takanobu) (90548398)	津山工業高等専門学校・その他部局等・准教授 (55301)	

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