

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16175

研究課題名(和文) プラナリアの生殖様式を操作する共生細菌の存在とその機能の解明

研究課題名(英文) Towards the elucidation of factors affecting the reproductive modes of the planarian *Dugesia ryukyuensis*.

研究代表者

関井 清乃 (SEKI, Kiyono)

慶應義塾大学・商学部(日吉)・助教

研究者番号：50786358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リュウキュウナミウズムシは無性生殖と有性生殖をつかいはけることができ、実験的に無性個体を有性個体に転換させる系が確立されている(有性化)。先行研究により、リュウキュウナミウズムシの無性個体と有性個体の細菌叢は大きく異っており、宿主の無性状態を維持する共生細菌が存在することが示唆された。本研究ではこのリュウキュウナミウズムシに共生する菌の同定に成功した。また蛍光 *in situ* hybridizationによってそれらが腸内細菌であることを明らかにした。さらに、その機能を推定するためにゲノム解析を行い、この細菌が宿主に及ぼす影響を考える上で重要な経路についていくつかの候補遺伝子を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ボルバキアのように、宿主のオスとメスの比を自分の都合良く操作する共生細菌の存在はすでに知られているが、無性・有性という宿主の生殖様式を変えられる共生細菌の存在はこれまでまだ報告がない。受精卵を経て次世代をのこす有性生殖にくらべ、分裂・再生によって数を増やすプラナリアの無性生殖は共生細菌の増殖にとっても有利となり、そのように自分の利益のために宿主の生殖様式を操作する共生細菌は興味深い報告となる。

研究成果の概要(英文)：Some flatworms can reproduce both asexually and sexually, and switch their reproductive modes based on environmental changes, life cycle stages, or both. However, the mechanisms by which they switch between asexual and sexual reproductive modes are not well understood.

In the planarian *Dugesia ryukyuensis*, an experimental system has been established to convert asexually reproducing worms into sexual worms (sexualization), by feeding them sexually mature planarians. This feeding assay system enables us to study the factor that suppresses germ cell differentiation and keeps planarians in an asexual state. In the current study, I investigated the factors involved in the mechanism that maintains the asexual state, by using the feeding assay system, fluorescence *in situ* hybridization, and genomic analysis.

研究分野：動物学

キーワード：プラナリア 生殖様式

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

扁形動物プラナリアには、無性生殖と有性生殖を使い分けるものがある。この生殖様式の転換を可能にしているのが、プラナリアが全身に有する分化多能性幹細胞であり、ここから生殖細胞を含めたすべての組織を形成できる。しかし無性個体は分裂後、脳も含めてすべて再生するのに、生殖細胞・器官だけは作らず、無性状態を維持し続ける。このプラナリアが無性状態のままの仕組みに、最近、共生細菌が関与している可能性が示された。共生細菌にとっては、宿主の生殖細胞になんとか感染して数を増やしていくよりも、宿主が分裂による無性生殖で共生細菌とともに増えていくほうが効率良く数を増やせるため、都合が良いと考えられる。ボルバキアのように、宿主のオスとメスの比を自分の都合良く操作する共生細菌の存在はすでに知られているが、無性・有性という宿主の生殖様式を変えられる共生細菌の存在はこれまでまだ報告がない。本研究では、この宿主であるプラナリアの無性状態に関与する細菌の存在とその機能を明らかにすることを目指す。

### 2. 研究の目的

(1) 宿主を無性状態にさせる細菌の候補について、細菌特異的(配列特異的)にその増殖を阻害することで卵巣誘導が見られるかどうかを検証し、プラナリアを無性状態にさせている細菌(以下、細菌Xとする)を特定する。

(2) 特定した細菌Xのプラナリアにおける局在場所を明らかにする。

(3) 細菌Xのゲノム配列を解析することで、細菌Xがプラナリア無性個体の細菌叢においてどのような役割を担っているのか、その機能の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) プラナリアの卵巣誘導につながる細菌Xを特定するため、先行研究で得られた細菌Xの候補となりうる細菌について、核酸ペプチド(PNA)を用いて種特異的(配列特異的)に細菌の増殖を抑制する方法を試みた。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、ターゲットの細菌がもつ塩基配列に対して相補的なPNAを設計することで、種特異的(配列特異的)にその増殖を抑えられる可能性がある(Górska et al. 2016 *J. Phys. Chem. B.*)。プラナリアでは無性個体の有性化やdsRNAを用いたRNAiノックダウンはすべて食べさせて成功していることから、PNAは確立された給餌アッセイの系を用いて体内に導入した。またPNAの阻害効果は、定量PCRで細菌数の変化を調べることで評価した。

(2) 特定した細菌Xのプラナリアにおける局在場所を明らかにするため、プラナリアのホールマウント(whole mount)サンプルについて、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。本研究で用いるリュウキュウナミウズムシでは蛍光*in situ*ハイブリダイゼーションの系がまだ確立されていなかったため、まずは系の確立をおこなった。

(3) 特定した細菌 X のプラナリアについて、ゲノム解析を行うため、細菌 X のゲノムの単離を行った。方法としては、まずメッシュを用いて細菌と宿主であるプラナリアの細胞を大きさによって分別した。分別した細菌から細菌 X のみを単離し、ゲノム解読のためにロングリード用 DNA 抽出を行った。当初は数十 kb という長い DNA 配列を一度に読める、ナノポアシーケンサーを用いてゲノム解読を試みたが、最終的には PacBio シーケンスによってゲノム解読に成功した。

#### 4. 研究成果

(1) 細菌 X を特定するために、PNA を用いた種特異的 (配列特異的) な細菌の増殖抑制を試みた。その結果、先行研究で得られていた候補の細菌のなかから卵巣誘導につながる細菌 X を特定することができた。この細菌は未記載種であったため、先行研究の配列解

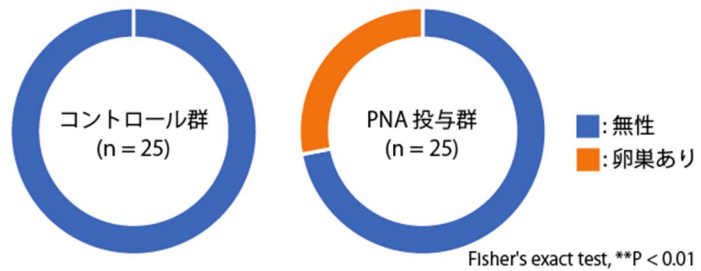


図 1. denovo276 をターゲットとした PNA の投与で卵巣が誘導される

析データから便宜的に denovo276 とした。denovo276 をターゲットにした PNA 投与群では、4 週間後の給餌アッセイで 28% (7/25) の個体に卵巣が誘導された (図 1)。一方、コントロール群ではそのような個体は見られなかった。しかしこのときの denovo276 の細菌数を qPCR によって検証したところ、PNA 投与群での細菌数は、コントロール群と比較して約 48% の減少にとどまり、増殖抑制の効果としては弱いものであった。これらの結果は以下に述べる (3) ゲノム解読の前に行われたものであったため、今後は得られたゲノム配列をもとにして細菌の生存に必要な遺伝子について PNA を設計し、より効率の良い増殖抑制の方法を試みることで再検証する予定である。

(2) リュウキュウナミウズムシのホールマウント (whole mount) サンプルについて、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。用いたプローブは、(i) まずリュウキュウナミウズムシで蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションの系を確立するため、また (ii) その他の細菌との類似性が少ない特異的な配列を持つプローブの設計が困難であったため、denovo276 を含めた細菌全般を検出できるものを用いた。その結果、蛍光シグナルは腸管のみで検出されたことから、denovo276 は腸内細菌であることが示唆された。血管系をもたないプラナリアにとっては、全身に存在する腸管や神経系が代謝・分泌するシグナル伝達物質が、生体機能の制御に重要な役割を担っていると考えられる。denovo276 が腸内細菌だったという結果は、この細菌が何らかの代謝産物を介してリュウキュウナミウズムシの多能性幹細胞に働きかけて有性化を抑えているという可能性を示唆しており、将来、そのメカニズムの解明を進めていくにあたって重要な知見であると考えられる。

(3) denovo276 のゲノム解読を行い、配列解析を行った結果、この細菌は約 2.2Mb の環状ゲノムをもつことがわかり、その中から CDS 予測のついた領域が 1,987 個見つかった。バイオインフォマティクス解析によって、既知の二次代謝産物合成遺伝子クラスターを検出するアプローチを試みたところ、相同性は低かったものの、生理活性物質として機能しうる非リボソーム性ペ

プチドやポリケチドの合成に関与し得る遺伝子の候補を、複数得ることができた。また、細菌の遺伝子発現の調節に関与する遺伝子についても、その候補を得ることができた。今後は、単離した denovo276 についてメタボローム解析を行い、これらの結果と組み合わせることで、どのような遺伝子や代謝産物によって宿主であるリュウキュウナミウズムシの生殖様式を操作しているのか、そのメカニズムの検証に役立つと考えられる。

<引用文献>

Górska A., Zagrajek A.M., Równicki M., Trylska J. Scanning of 16S ribosomal RNA for peptide nucleic acid targets. *J. Phys. Chem. B.* 120:8369-8378. (2016) doi: 10.1021/acs.jpcc.6b02081.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 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)
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(6)
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 Dugesia ryukyuensis	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 Sekii Kiyono, Kobayashi Kazuya	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 In book: Advances in Invertebrate (Neuro) Endocrinology.	6. 最初と最後の頁 25-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1201/9781003029854-2	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 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 K. Sekii, S. Miyashita, K. Yamaguchi, I. Saito, Y. Saito, S. Manta, M. Ishikawa, M. Narita, T. Watanabe, R. Ito, M. Taguchi, R. Furukawa, A. Ikeuchi, K. Matsuo, G. Kurita, T. Kumagaya, S. Shirakashi, K. Ogawa, K. Sakamoto, R. Koyanagi, N. Sato, M. Sasaki, T. Maezawa, M. Ichikawa-Seki, and K. Kobayashi	4. 巻 26(1)
2. 論文標題 Sex-inducing effects toward planarians widely present among parasitic flatworms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105776	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7件 (うち招待講演 0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 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 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 渡邊太朗・伊藤陸・山口健太郎・池内葵・北村誠・関井清乃・関まどか・坂元君年・小林一也
2. 発表標題 扁形動物に広く保存されたプラナリアの有性化因子の抽出・精製方法について
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会，早稲田.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田島玲音・黒田道夫・萬田冴佳・池内葵・北島ちひろ・熊谷信是・関井清乃・関まどか・小林一也
2. 発表標題 プラナリア有性化に必要な核内受容体遺伝子は吸虫カンテツの生殖様式転換に関与するか?
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会，早稲田.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川瀬撰・岩谷尚・浅野義哉・井上博元・工藤誠也・笹平素生・東信行・近藤大輔・関まどか・玄学南・坂元君年・岡本光・中舘雛姫・井上航・齋藤伊玖真・成田美優・関井清乃・小林一也
2. 発表標題 プラナリアの卵カプセルに蓄積しているアルミニウムと卵黄フェリチンの関係
3. 学会等名 令和4年度日本動物学会東北支部大会，弘前
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------