

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月2日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22603010

研究課題名（和文） 無性プラナリアに生殖器官を誘導するケミカルシグナルの研究

研究課題名（英文） Study of chemical signals for the induction of reproductive organs in the asexual planarian *Dugesia ryukyuensis*

研究代表者

前澤 孝信（TAKANOBU MAEZAWA）

弘前大学・農学生命科学部・研究員

研究者番号：90548398

研究成果の概要（和文）：有性個体に含まれる化学物質の刺激により無性プラナリア(OH 株)に卵巣、精巣およびその他の生殖器官の発達を誘導できる(有性化)。我々はD体トリプトファン(D-Trp)がOH株に卵巣発達を誘導することをすでに明らかにしている。本研究ではD-Trpの分解酵素が発達中の卵巣で一過的に強く発現することを明らかにした。このことから、発達中の卵巣周囲のD-Trp量が有性化に関与することが示唆され、D-Trpが卵巣を標的にしている可能性が考えられた。さらに、D-Trp以外の有性化誘導物質の探索結果より、有性化が複数の卵巣誘導物質の相加、相乗効果で進行することが示唆された。

研究成果の概要(英文): Chemicals contained in the sexual planarians induce the development of ovaries, testes and the other reproductive organs in the asexual planarian *Dugesia ryukyuensis* (the sexual induction). We have demonstrated that, by feeding with D-tryptophan (D-Trp), the worms developed a pair of ovaries. In this study, we found that a gene encoding a D-Trp-degrading enzyme is transiently and strongly expressed in the developing ovaries during sexual induction. It suggests that the concentration of D-Trp around the developing ovaries may affect the sexual induction. Thus, it is likely that D-Trp targets to the ovaries. The isolation study of sex-inducing substances suggests that sexual induction in the asexual worms might be triggered by additive or synergistic effects of chemical compounds, which can induce the ovarian development.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,800,000 | 540,000   | 2,340,000 |
| 2011年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 2012年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：生殖器官誘導物質

## 1. 研究開始当初の背景

扁形動物、三岐腸目に属する淡水生プラナリア(和名はウズムシ)は、切っても切っても再生することでよく知られた動物である。そ

の生殖方法は種によって異なり、分裂によって個体を増やす「無性生殖」、交尾、産卵を行う「有性生殖」、さらに「無性生殖」と「有性生殖」を転換させる「生殖転換型」の3つ

に大別される。我々はこれら生殖様式の中で、無性生殖から有性生殖に転換する様式(有性化)に着目し、その転換機構に関わる研究を行ってきた。

プラナリアの生殖転換は、環境因子として水温変化や日照時間が大きく影響する(Kawakatsu, M. *et al.*, *Jap. J. Ecol.*, 1967)。これに対して、Grassoらは無性個体に有性個体(種は異なってもよい)の細片または凍結体を食べさせ、その生殖を無性から有性に転換させることに成功した(Grasso, M. and Benazzi, M., *J. Embryo. Exp. Morph.*, 1973)。この成果は、有性化を誘導する化学物質(ケミカルシグナル)の存在を示唆する初めての報告であった。しかし、分子レベルでの解明は行われておらず、その有性化誘導物質の産生細胞および標的細胞などは想像の域を出ない(Grasso, M. *et al.*, *J. Ultrastruct. Res.*, 1975; Sakurai, T., *Annot. Zool. Japan*, 1981)。

本研究では、リュウキュウナミウズムシ *Dugesia ryukyuensis* を有性化誘導試験の検体として用いる。この *D. ryukyuensis* は、沖縄で採取した1匹を無性生殖のみで20年以上維持してきたクローン集団である(以下、OH株と示す)。我々はこれまでにOH株を有性化させる方法として、イズミオオウズムシ *Bdellocephala brunnea* (有性生殖しか行わない種)を餌として与えOH株の有性化することに成功している(Kobayashi, K. *et al.*, *Zool. Sci.*, 1999)。この有性化は図1に示すように段階的に進行する。St.1では、1対の卵巢原基が形成され、肉眼による観察ができる。St.2では、その卵巢内で卵母細胞が発達する。St.3では精巣と交接器官の原基が発達。St.4では、卵黄腺というプラナリアに特徴的な生殖腺の原基が現れ、腹側に生殖孔が開く。St.5ではすべての生殖器官が成熟してプラナリア有性個体の体制が整う(約5週間)。

ステージ0 ステージ1 ステージ2 ステージ3 ステージ4 ステージ5

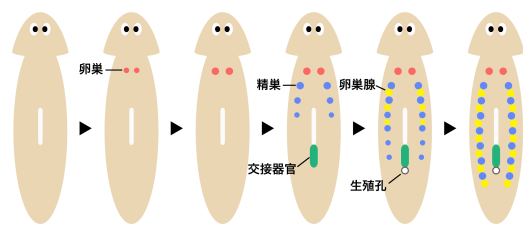


図1 プラナリアの有性化過程

我々は、この活性試験を用い *B. brunnea* の水抽出物から有性化誘導物質を探索した結果、D-トリプトファン(D-Trp)を得ることに成功した(Kobayashi, K *et al.* in preparation)。興味深いことに、この単離されたD-Trp単一化合物では、卵巢の誘導しか起こらない(St.2)。しかしながら、粗抽出物では、St.5までの発達が5週目で確認され、*B. brunnea*を直接投餌した場合と同様な結果であった。よって

D-TrpはOH株における卵巢形成誘導因子と考えられ、St.5までの生殖器官の誘導には他の化学物質の関与が強く示唆された。

図1で示したようにOH株の生殖転換は、St.1から5に分けられ、*B. brunnea*の連続的な投餌によりそのステージが進行する。これら連続的な投餌をやめると、St.2までとSt.3を境に違った現象が見られる。St.2までで投餌を止めるとOH株は無性個体へともどるが、St.3を越えた場合、投餌を止めてもSt.5まで有性化は進行する。すなわちSt.2とSt.3の間に「有性化回避不能点」が存在する(Kobayashi, K. *et al.*, *Zool. Sci.*, 2002)。申請者は、この有性化回避不能点のメカニズムとして、以下の3つの仮説を立てた。

(A)【卵巢と精巣・交接器官形成に別々の化学物質が作用する】

(B)【卵巢形成から先にステージが進行するには卵巢誘導物質の閾値が存在する】

(C)【卵巢形成から先にステージが進行するには複合系因子が必要である】

このうち、(A)は、現在までに精巣・交接器官形成だけを誘導する画分はないことから、また、(B)は、高濃度のD-TrpをOH株に与えてもSt.2を越えないことから、可能性は低いと考えている。そこで、現在(C)の仮説のもと研究を進行させている。*B. brunnea*抽出物で、OH株のSt.5まで誘導する画分(D-Trpを含む)のプロトンNMR測定では、D-Trp以外の有用なシグナルが観察されなかった。したがって、*B. brunnea*の量的供給が望まれたが、採取場所・個体の有性期間などの制限のため採取量は50g/年を越えなかった。そこで、様々な生物を用い検査した結果、オオミスジコウガイビル *Bipalium nobile* に *B. brunnea*と同程度の活性があることが判った(未発表)。

## 2. 研究の目的

本研究では有性化現象における生殖器官の誘導機構の解明を目指し、以下の2つの項目について研究を行った。

### (1) D-Trpの標的細胞の同定

D-アミノ酸はシグナル物質として働くことが報告されており、その場合、特定の受容体を介して細胞にシグナルを伝える。そのため、標的細胞表面ではD-アミノ酸が蓄積する結果となる。同様の現象がプラナリア体内のD-Trpにおいても起こっていると予想し、D-Trpの局在を明らかにできれば、標的細胞の発見につながると考えた。

### (2) 有性個体に含まれるD-Trp以外のケミカルシグナルの単離・構造決定

*B. nobile*に含まれるOH株の生殖器官誘導物質の単離を行った。特にSt. 5までの有性化を誘導できる因子を探索した。

### 3. 研究の方法

#### (1) D-Trp の標的細胞の同定

D-Trp の局在を以下の3つの手法を用いて調べた。

##### ① D-Trp 誘導体を用いる方法

蛍光標識したD-Trp誘導体(分子プローブ)を合成し、その局在を調べることを考えた。まずD-Trpの官能基を置換した場合にその活性が保持されるのか検討した。

##### ② 抗D-Trp抗体を用いる方法

市販の抗D-Trp抗体を用いてプラナリア組織の免疫染色を行った。

##### ③ D-Trpの分解酵素をコードする遺伝子

D-Trpを分解する酵素としてD-アミノ酸酸化酵素(DAO)が知られている。我々はすでにプラナリアのDAOホモログ遺伝子(*Dr-DAO*)をクローニングしていた。*Dr-DAO*の発現分布はD-Trpの局在と逆相関すると予想し、*Dr-DAO*の発現分布を*in situ* hybridization法により調べた。

#### (2) 生殖器官を誘導する *B. nobile* に含まれる活性物質の単離・構造決定

陸産プラナリア *B. nobile* に含まれるOH株の生殖器官誘導物質の単離を試みた。D-Trp以外の物質を求めするためにTrpが含まれにくい有機層を抽出する方法で行った。その後、各種溶媒での分配、シリカゲルカラムクロマトグラフィーやODSカラムを用いた分離と有性化活性の試験を組み合わせ活性物質の精製を進めた。

### 4. 研究成果

(1) ① D-Trpのどの部位に修飾を加えて分子プローブを作成すれば良いのか検討した。D-Trpのアミノ基、カルボキシル基、インドール環のC5位に修飾が加わった市販の物質を用いて、卵巣の誘導活性を調べた。アミノ基に修飾が加わった物質では卵巣が全く発達しなかった。カルボキシル基、インドール環のC5位に修飾が加わった物質は、D-Trpに比べて卵巣の発達の割合は低く、形成される卵巣の形態はD-Trpで誘導されるものとは異なっていた。これらの結果から、アミノ基、カルボキシル基、インドール環のC5位はD-Trpの卵巣誘導に必要な構造だと示唆された。よって、これらの部位に修飾を加えた分子プローブはD-Trpの機能を模倣しないと考えられた。

② 次に、抗D-Trp抗体を用いてD-Trpの局在の検出を試みた。市販のD-Trp (ADVANCED TARGETTING SYSTEMS社)を用いて有性個体に

おいて免疫染色を行ったところ、顕著なシグナルは検出できなかった。一方、抗Trp抗体(同社、L体およびD体を認識)では、卵黄腺に強く、その他の組織でも弱いシグナルが検出された。我々はHPLCを用いた解析より、有性個体にはL-Trpが豊富に、D-Trpは微量しか含まれないことが示唆された。以上より、微量であるD-Trpを検出するために感度を高める検討を行ったが良好な結果は得られなかった。

③ D-Trpを分解するD-アミノ酸酸化酵素のプラナリアホモログ(*Dr-DAO*)に着目した間接的証明を試みた。*Dr-DAO*遺伝子の発現は無性個体の体全体に見られた。有性化が進行すると全身の発現は変化せずに発達中の卵巣に一過的に強く発現した。このことから、発達中の卵巣周囲のD-Trp量が有性化に関与することが示唆され、D-Trpが卵巣を標的にしている可能性が考えられた。

(2) 大量に材料を確保できる陸産プラナリア有性個体(*B. nobile*)830gを用いてTrpが含まれにくい有機層を80% EtOHによって抽出した。その後、各種溶媒で分配、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより5つの画分に分けた。そのうち2つの画分が有性化活性を示した。一方、この5画分を同時添加すると活性が著しく上がった。これらの結果から、5画分に含まれる物質が複合的に作用し、生殖転換を誘導すると考えられた。次に、有性化活性を示す2つの画分を合わせたものに対して*Dr-DAO*処理することで生殖転換誘導活性が低下することを明らかにした。この結果から、活性画分中には*Dr-DAO*の基質が存在すると示唆された。また、我々はD-Trpの他にD-アルギニン、D-フェニルアラニン、D-ロイシン、D-アスパラギンがプラナリアに卵巣発達を誘導することを明らかにした。これらのD-アミノ酸が活性画分中に含まれる可能性が考えられた。次に、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより5つに分けた画分をさらにODSカラムにより分離した。分離した画分ではいずれも有性化活性を示さず、一部の画分で卵巣誘導活性のみが認められた。このことから、各画分に含まれる卵巣を誘導する化学物質の相加、相乗効果で有性化が進行すると考えられた。今後、卵巣を誘導する各画分をさらに精製して物質を明らかにしたい。

### 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)

① Kobayashi K, Maizawa T, Nakagawa H, Hoshi, M. Existence of two sexual races in the planarian species switching between

asexual and sexual reproduction, Zool. Sci., 査読有, Vol.29, 2012, 265-272

〔学会発表〕(計15件)

- ① プラナリアD-アミノ酸オキシダーゼのクローニングと性状解析. 西村嘉洋, 田中裕之, 石田哲夫, 前澤孝信, 小林一也, 堀池喜八郎. 2012. 12, 第85回日本生化学会大会, 福岡.
- ② プラナリア有性化に関わるD-アミノ酸酸化酵素の機能解析. 前澤孝信, 田中裕之, 中川晴香, 堀池喜八郎, 小林一也. 2012. 9, 日本動物学会第83回大会, 大阪.
- ③ リュウキュウナミウズムシ有性化因子の進化的保存性. 中川晴香, 前澤孝信, 堀口友里恵, 小林一也. 2012. 9, 日本動物学会第83回大会, 大阪.
- ④ プラナリアの生殖戦略転換機構: D-アミノ酸研究から見えてきたこと. 前澤孝信, 田中裕之, 北村誠, 中川晴香, 堀口友里恵, 本田紗綾子, 廣田洋, 小林一也. 2012. 9, 第8回D-アミノ酸研究会学術講演会, 滋賀
- ⑤ プラナリアにおけるD-アミノ酸酸化酵素の機能解析. 前澤孝信, 田中裕之, 中川晴香, 堀池喜八郎, 小林一也. 2012. 9, 第8回D-アミノ酸研究会学術講演会, 滋賀.
- ⑥ D-Amino acid oxidase is involved in sexual induction in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. Maezawa T, Tanaka H, Nakagawa H, Horiike K and Kobayashi K. 2012. 7, The 58th/60th NIBB Conference Germline, Okazaki, Japan.
- ⑦ Sex-inducing effects by “feeding”: Switching from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. Maezawa T, Tanaka H, Kitamura M, Nakagawa H, Horiguchi Y, Honda S, Hirota H and Kobayashi K. 2012. 7, The 58th/60th NIBB Conference Germline, Okazaki, Japan.
- ⑧ Cloning and characterization of D-amino acid oxidase from planarian *Dugesia ryukyuensis*. Nishimura Y, Tanaka H, Maezawa T, Ishida T, Horiike K, Kobayashi K. 2011. 11 Planarian Regeneration Research Meeting.
- ⑨ Functional characterization of D-amino acid oxidase from planarian *Dugesia ryukyuensis*: Non-Michaelis kinetics due to substrate activation. Tanaka H, Maezawa T, Nishimura Y, Yamamoto A, Ishida T, Horiike K, Kobayashi K. 2011. 11 Planarian Regeneration Research Meeting.
- ⑩ D-amino acid oxidase represses the sexual induction in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. Maezawa T, Tanaka H, Nakagawa H, Horiike K, Kobayashi K. 2011. 11 Planarian Regeneration Research Meeting.

- ⑪ Functional analysis of D-amino acid oxidase in the ovarian development of the planarian *Dugesia ryukyuensis*. Maezawa T, Tanaka T, Horiike K, Kobayashi K. 2011. 3 Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists.
- ⑫ プラナリア卵巣発達におけるD-アミノ酸酸化酵素の機能解析. 前澤孝信, 田中裕之, 中川晴香, 堀池喜八郎, 小林一也. 2011. 9, 日本動物学会第82回本大会, 旭川.
- ⑬ プラナリア有性化におけるD-アミノ酸酸化酵素の機能解析. 前澤孝信, 田中裕之, 中川晴香, 堀池喜八郎, 小林一也. 2011. 9, 第7回D-アミノ酸研究会学術講演会, 東京.
- ⑭ プラナリア卵巣発達におけるD-アミノ酸酸化酵素の機能解析. 前澤孝信, 田中裕之, 小野瑞季, 青木学, 堀池喜八郎, 松本緑, 小林一也. 2010. 9, 日本動物学会第81回本大会, 東京.
- ⑮ プラナリア卵巣発達におけるD-アミノ酸酸化酵素の機能解析. 前澤孝信, 田中裕之, 小野瑞季, 青木学, 堀池喜八郎, 松本緑, 小林一也. 2010. 9, 第6回D-アミノ酸研究会学術講演会, 富山.

〔図書〕(計0件)

〔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)  
弘前大学・農学生命科学部・研究員  
研究者番号: 90548398

(2)研究分担者

北村 誠 (MAKOTO KITAMURA)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：00436990

(3)連携研究者

なし