

## 研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		プラナリア有性化を制御する D-アミノ酸代謝機構の解明			
研究テーマ (欧文) AZ		D-Amino acid metabolism underlying sexual induction of the planarian <i>Dugesia ryukyuensis</i>			
研究氏 代表 者	カタカナ CC	姓) マエザワ	名) タカノブ	研究期間 B	2014 ~ 2015 年
	漢字 CB	前澤	孝信	報告年度 YR	2015 年
	ローマ字 CZ	MAEZAWA	TAKANOBU	研究機関名	津山工業高等専門学校
研究代表者 CD 所属機関・職名		津山工業高等専門学校・准教授			
<p>概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。)</p> <p>無性生殖と有性生殖の転換は多くの動物でみられるが、その転換機構は分子レベルではほとんど分かっていない。プラナリア無性個体に成熟した有性個体をミンチにして食べさせることで有性個体へ転換させる(有性化)実験系が確立されている。このことは有性個体中に有性化を誘導する化学物質(有性化因子)が含まれていることを意味している。私たちは、これまでに有性化因子の1つがD-トリプトファン(D-Trp)であることを明らかにしてきた。また、D-アミノ酸の分解酵素であるD-アミノ酸酸化酵素(DAO)が無性個体において有性化を抑制していることを見出した。D-Trpと同様の有性化活性をD-アルギニン(D-Arg)、D-フェニルアラニン(D-Phe)、D-ロイシン(D-Leu)、D-アスパラギン(D-Asn)も有していたため、DAOはそれら複数のD-アミノ酸の分解を介して有性化を抑制していると考えられる。</p> <p>本研究では、DAOによる有性化抑制機構を探るため、DAOが体内で主に分解するD-アミノ酸を明らかにすることを目的とした。まず、DAOの機能阻害がどのD-アミノ酸の効果に影響するかを調べた。その結果、DAOを機能阻害してもD-ArgとD-Asnの有性化活性に影響はないが、D-Trp、D-Phe、D-Leuの有性化活性が促進された。<i>in vitro</i>の実験では、D-ArgもD-AsnもDAOによく分解される。以上より、D-アミノ酸による有性化機構にはDAOに依存するものとそれ以外の複数の経路が存在すると考えられた。</p> <p>そこで、DAOの機能阻害によって実際にプラナリア体内の各アミノ酸の総量がどのように変動するのか、どのアミノ酸のD/L比が増加するのか調べるために、高感度かつ正確なアミノ酸/D-アミノ酸検出系を開発することにした。プラナリアの個体別に低分子化合物をメタノール抽出し、比較したい個体別抽出液のアミノ酸を質量差が6ある<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-ダブシルクロリドと<sup>12</sup>C-ダブシルクロリドでそれぞれ特異的にラベルした。キャピラリーLC-MS解析を行い、プラナリア1個体から、システインを除く19種類のアミノ酸を検出することにはじめて成功した。今後、キラルカラムを用いてアミノ酸をD体とL体に分離し、量比を明らかにしていきたい。</p>					
キーワード FA	プラナリア	有性化	D-アミノ酸	D-アミノ酸酸化酵素	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>	Maezawa T, Ishikawa M, Okamoto H and Kobayashi K							
	書名 <sup>HC</sup>	Reproductive and Developmental Strategies							
	出版者 <sup>HB</sup>	Springer Japan	発行年 <sup>HD</sup>	in	press			総ページ <sup>HE</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	

#### 欧文概要 EZ

Many animals switch reproductive mode between asexual and sexual reproduction. However, molecular mechanisms of the switching are remained to be unclear. We have found that an asexual population of *Dugesia ryukyuensis* (OH strain) develops reproductive organs when fed minced bodies of sexually mature *Bdellocephala brunnea* worms. This result clearly indicates that sexually mature worms contain certain substance(s) that stimulate sexual induction in the OH worms. We have identified tryptophan (Trp) as one of the sex-inducing substances. Furthermore, the repression of D-amino acid oxidase (DAO) expression in the asexual *D. ryukyuensis* worms induced ovarian development. In addition to D-Trp, four of the D-amino acids ((D-arginine (Arg), D-phenylalanine (Phe), D-leucine (Leu), and D-asparagine (Asn)) have sex-inducing activity, suggesting that DAO protein inhibits the sexual induction possibly through degradation of these D-amino acids. Since DAO is the only enzyme to degrade D-amino acids in *D. ryukyuensis*, the reduced DAO activity is expected to change the metabolic balance of L- and D-amino acids.

In the present study, we compared the effects of various D-amino acids on *DAO*-knockdown and control asexual *D. ryukyuensis* worms. *DAO*-knockdown enhanced the sexual induction by D-Trp, D-Phe, and D-Leu, whereas the induction by D-Arg and D-Asn was independent on *DAO*-knockdown. Because *in vitro* experiments *D. ryukyuensis* DAO can degrade these two amino acids as well as D-Trp, it is suggested that there are different signaling mechanisms responsible for the sexual induction by D-amino acids. To further elucidate the mechanisms, it is inevitable to measure the metabolic states of L- and D-amino acids in individual worms. Therefore, we tried to develop an accurate and sensitive method to quantify amino acids and D/L ratio of each amino acid. Low-molecular-weight compounds were extracted from individual worms by 85% methanol, and the amino acids in the extracts were labeled by <sup>13</sup>C<sub>6</sub>- or <sup>12</sup>C-dabsyl chloride. The resultant heavy- and light-labelled samples were mixed and analyzed by capillary HPLC-MS. Each amino acid detected as doublet peaks with 6 or 3 Da difference in mass, and 19 species of amino acids contained in individual worms were successfully quantified for the first time. Development of a method to measure D/L ratio of these amino acids is underway.