

プラナリアのストレス受容と個体崩壊の関係

宮城県仙台第三高等学校

17 班

プラナリアは高い再生能力を持つ生物としてよく知られている。しかしプラナリアは高温ストレス下で個体崩壊し、ワサビから逃避行動をおこす。そこで、プラナリアのストレス受容と個体崩壊の関係性を明らかにすることを目的とし、ワサビの辛み成分である AITC を用いた実験を行った。その結果、AITC を添加したプラナリアは個体崩壊した。また、個体崩壊したプラナリアは輪郭が不明瞭になる。そこで、アクチンを染色する蛍光試薬を用いた観察を行った。その結果、プラナリアは AITC の影響で細胞が離れることにより個体崩壊すると推測できた。

1 背景

プラナリア (*Dugesia japonica*) は全国的に水質の良い環境下に生息し、全能性幹細胞による高い再生能力があることで一般に知られている。しかし先輩方が夏季に白神山地からプラナリアの一種であるカズメウズムシを採取し持ち帰る際、外気の温度の影響を受けやすいペットボトルに入れたプラナリアの輪郭が不鮮明になり個体がバラバラになって死亡する現象がみられた。なお、保冷水筒に入れた個体は生存していた。この事例をもとに先行研究では一般的なプラナリアとして扱われるナミウズムシは高温条件下では熱ストレスにより TRPM チャネルを通じて細胞がバラバラになる現象が起きることが解明された¹⁾。また他の先行研究により、プラナリアはワサビ刺激を与えると逃避行動を起こす²⁾という報告がある。プラナリアが熱ストレスの影響を受けるときの条件や仕組みは多くの解明がされているが、ワサビ刺激がプラナリアに与える影響においては知見が乏しい。興味を持った私たちはプラナリアのストレス受容と個体崩壊の関係を明らかにすることを目的に研究を行った。

熱などの特定の刺激を授与するとプラナリアの輪郭が不鮮明になり再生せずに死亡する現象がみられる。その状態を個体崩壊と定義した (Fig.1)。

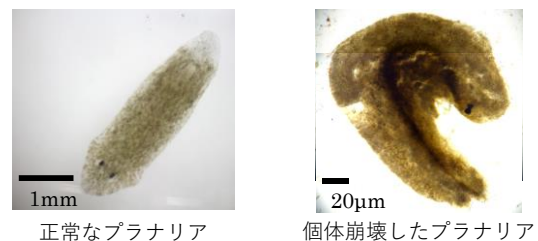


Fig.1 プラナリアの個体崩壊の定義

2 材料と方法

プラナリアは宮城県佐沼高校からいただいた一般的なプラナリアとして扱われるナミウズムシを用いた。プラナリアは3~5匹ずつ飼育カップに分け、飼育水にはコープ水を用いた。餌には冷凍赤虫を使用した。

○実験 1 ワサビを用いた個体崩壊

加工本ワサビとプラナリア飼育水を用いて 10.0 g/L ワサビ溶液①、5.0 g/L ワサビ水溶液②を作成した。プラナリアを①、②のワサビ水溶液に1匹ずつ入れ20分間観察を行った。この時水温は18℃で一定にした。

○実験 2 DMSO を用いた実験

実験1をふまえ、加工本ワサビには多くのワサビ添加物が含まれている (Fig.2) ことからワサビの辛味成分である Allyl isothiocyanate (以下 AITC とする) に着目し、この成分がプラナリアの個体崩壊に関与すると仮説を立て AITC 実験を用いた実験を行った。

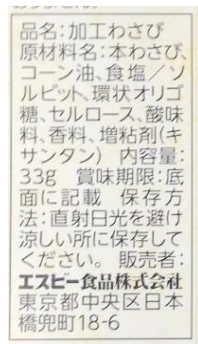


Fig.2 ワサビの成分表示

AITC は水に溶けにくく、Dimethyl sulfoxide (以下 DMSO とする) に溶けやすい。一度 DMSO に溶かした後、濃度調整を行うため DMSO からプラナリアへの影響を調べた。

DMSO 溶液 15.0% にプラナリアを入れ 15 分間観察を行った。この時水温は 18°C で一定にした。

○実験3 AITC を用いた実験

2.0mol/L の AITC 溶液をプラナリア飼育水を用いて 10.0%AITC 溶液③、5.0%AITC 溶液④、2.5%AITC 溶液⑤に希釈する。③、④、⑤の溶液に 2 匹ずつプラナリアを入れ 15 分間観察を行う。この時水温は 18°C で一定にした。

○観察1 プラナリアのアクチン染色

プラナリアは個体崩壊時に輪郭が不鮮明になるため細胞のアクチン接着を確認するためプラナリアのアクチン染色を行った。個体崩壊をしたプラナリアは細胞がバラバラになるため作業はすべてスライドガラス上で微生物観察用リングを用いて行った。正常なプラナリア A 個体と AITC10mmol に 1 分間入れ、個体崩壊を起こした B 個体をそれぞれカルノア溶液で固定した。

その後 A 個体、B 個体を洗浄し、蛍光 Phalloidin で染色した後正立光学顕微鏡 (OLIMPUS BX41)、蛍光顕微鏡で観察をした (Fig.3)。

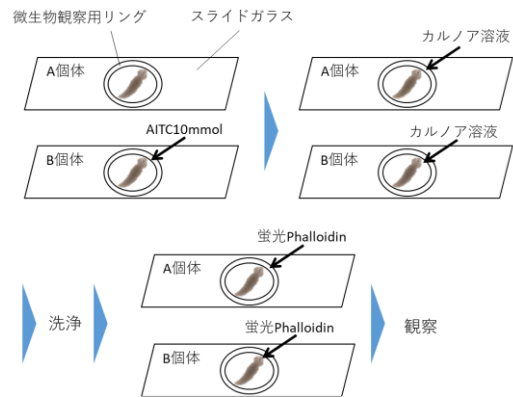


Fig.3 観察1の実験風景

3 結果と考察

○実験1 ワサビを用いた個体崩壊

10.0%ワサビ溶液①のプラナリアは 18 分後に個体崩壊をした。5.0%ワサビ溶液②のプラナリアは実験終了まで生存し飼育水に移したところ、実験後の翌日に飼育水中で個体崩壊を確認した。プラナリアはワサビを添加されると個体崩壊し、ワサビ溶液の濃度が高いほど個体崩壊が速く進むと考えられる。また、プラナリアはワサビを添加されると後に飼育水に移してもワサビ刺激の影響で個体崩壊が起こる可能性があるとし唆される (Fig.4)。



Fig.4 ワサビで個体崩壊したプラナリア

○実験 2 DMSO を用いた実験

DMSO 溶液 15.0%に入れたプラナリアは 2 匹とも生存した。DMSO 溶液はプラナリアの個体崩壊に関与しないと考えられる。

○実験 3 AITC を用いた実験

10.0% AITC 溶液③のプラナリアは 2 分後に個体崩壊をし、 5.0%AITC 溶液④のプラナリアは 4 分後に個体崩壊をし、 2.5% AITC 溶液⑤のプラナリアは 9 分後に個体崩壊をした。ワサビ溶液よりも AITC 単体のほうがプラナリアの個体崩壊が速く濃度が高いほど個体崩壊が速く進むと考えられる。これよりワサビ添加によりプラナリアが個体崩壊を起こすのは AITC が要因であると示唆される (Fig.5)。

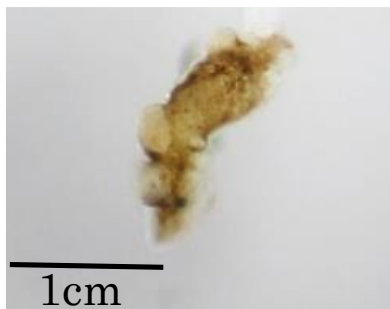


Fig.5 AITC で個体崩壊したプラナリア

○観察 1 プラナリアのアクチン染色

光学顕微鏡の観察により正常なプラナリア A 個体ではプラナリアの体表面が鮮明であるのに対して個体崩壊をしたプラナリア B 個体では輪郭が不鮮明だった (Fig.6)。

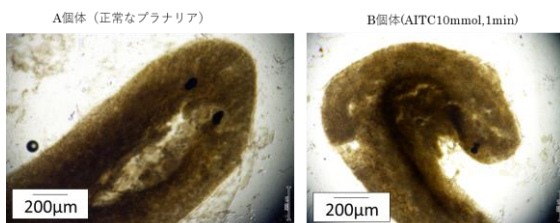
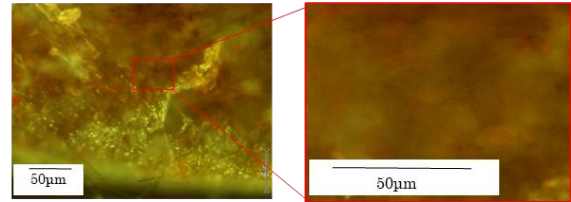


Fig.6 光学顕微鏡で観察したプラナリア

蛍光顕微鏡の観察により正常なプラナリア A 個体ではプラナリアの密になった細胞が観察され

た。個体崩壊をしたプラナリア B 個体ではバラバラになった細胞が観察された。これよりプラナリアは細胞が密になった状態から AITC などの作用があると離れてバラバラになり個体崩壊をすと考えられる (Fig.7)。

A個体 (正常なプラナリア)



B個体(AITC10mmol,1min)

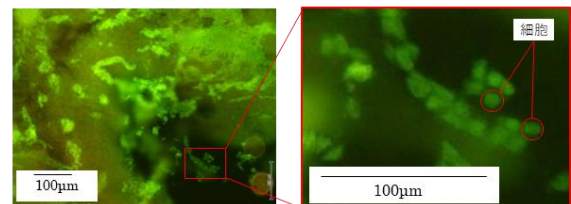


Fig.7 蛍光染色したプラナリア

4 まとめ・展望

以上のことから、プラナリアは AITC の影響で、細胞が離れることによって個体崩壊を引き起こすことが分かった。しかし、なぜ個体崩壊の際に細胞が離れるのか、 AITC がどのような経路で細胞に影響を及ぼすのかは未解明である。そこで個体崩壊の仕組みについて、「AITC による影響でプラナリアの TRPA1 チャンネルが活性化し、それにより細胞が離れる、もしくは細胞が離れるかつアポトーシスを引き起こし、個体崩壊する」という仮説を立てた(Fig.8)。

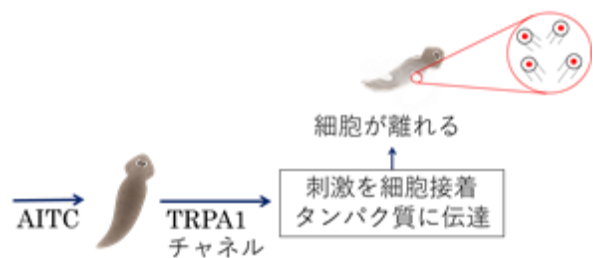


Fig.8 プラナリアの個体崩壊のプロセスの仮説

1つ目は、ストレス受容機構である TRPA1 チャンネルの関与である。プラナリアは熱の刺激を TRPA1 チャンネルで受容し、回避行動をとる³⁾ということが報告されている。実験3で用いた AITC は、TRPA1 チャンネルのリガンドとして知られる物質である。故に AITC による個体崩壊にも TRPA1 チャンネルが関与している可能性がある。プラナリアが TRPA1 チャンネルを介して個体崩壊するかを明らかにするために、TRPA1 チャンネル阻害剤を用いた実験が必要である。

2つ目はアポトーシスの有無である。参考として、高温ストレス下で個体崩壊したプラナリアにはアポトーシスは確認されていないが、切断されたプラナリアの切断面にはアポトーシスが確認されている⁴⁾。

沼田朋大ら 生化学 第81巻 第11号, pp 962-983, 2009

4) Jason Pellettieri, Patrick Fitzgerald, Shigeki Watanabe, Joel Mancuso, Douglas R. Green, Alejandro Sanchez Alvarad : Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration -Developmental Biology (2010)

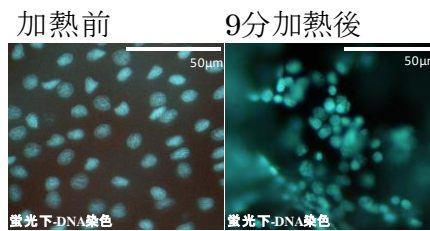


Fig.9 加熱後のプラナリアの切断面

そこで、AITC の影響で個体崩壊したプラナリアの細胞にはアポトーシスが起きているのかを明らかにするために、核を染色し観察することが必要である。これにより、高温ストレス下での個体崩壊プロセスと AITC の影響による個体崩壊プロセスとの差異を調べることが可能である。

5 参考文献

- 1) プラナリアの生と死の境 平成 29 年度 仙台 三高 芦立美春他
- 2) ‘Wasabi receptor’ for pain discovered in flatworms
- 3) TRP チャンネルの構造と多様な機能