

# 塩化リチウムがプラナリアの頭部再生に及ぼす影響について

中村 真悠 西内 日菜 蓬莱 紫苑

## 【概要】

プラナリア(*planaria*)は扁形動物門ウズムシ綱ウズムシ目ウズムシ亜目に属する動物の総称であり、私たちはそのうちリュウキュウナミウズムシと呼ばれる種を使い、塩化リチウムがプラナリアの頭部再生に及ぼす影響について調べた。

プラナリアを眼の下で切断、再生時の飼育水に塩化リチウムをさまざまな濃度に加え、再生までの日数を観察した。結果、塩化リチウムを加えたものでは天然水で飼育したときに比べて、再生日数が遅くなることが確認できた。これらの結果から塩化リチウムはプラナリアの再生を制御している Wnt シグナルを活性化していると考えた。また、濃度によって再生日数と死亡率に変化が見られた。

Planaria are animal that can regenerate. We researched the effect of chemical substances on planaria regeneration. Our purpose was understand the Wnt signal better. We bred planaria under various each conditions in various solution of: water and Lithium Chloride, and recorded the number of day it took to regenerate. The regeneration of the head was slower in Lithium Chloride aqueous solution. According to the results of our experiment, we think Lithium Chloride may activate the Wnt signal, which controls planaria regeneration. Next we want to research the connection between regeneration of planaria and other alkali metal such as sodium chloride. We hope our result might be useful in the field of regenerative medicine.

## 【研究動機・目的】

プラナリア (*planaria*) は、扁形動物門ウズムシ綱ウズムシ目ウズムシ亜目に属する動物の総称で、広義には、ウズムシ目(三岐腸目)に属する動物の総称であり、再生能力が極めて高い。プラナリアは再生医療の分野の研究においても使用されることが多い。私たちはもともと再生医療に興味があり、プラナリアが再生動物であることに興味をもった。そこで、プラナリアの再生について研究を行うことにした。

生物には Wnt タンパク質と呼ばれる、遺伝子の発生を制御する調節タンパク質がある。この経路は Wnt シグナル経路と

呼ばれ、プラナリアの再生を制御している。また、塩化リチウムはこの Wnt タンパク質を活性化するはたらきがある。

塩化リチウムによる Wnt タンパク質の活性化については、先行研究としてアフリカツメガエルで行われた実験があり、アフリカツメガエルと同じ再生動物であるプラナリア、特に今回使用したリュウキュウナミウズムシ (*Dugesia ryukyuensis*) において、プラナリアの Wnt シグナルの活性化と塩化リチウムの濃度の関係性についての研究を行うことにした。

## 【仮説】

Wnt シグナルとは、動物の形態形成において、Wnt タンパク質が特異的な生理機能を発揮する伝達機構のことであり、プラナリアの生体内においては濃度勾配を形成している。この濃度勾配が、プラナリアの頭部、尾部の再生を制御している。

Wnt シグナルの活性は、さらに GSK3 $\beta$  と呼ばれる別のタンパク質によって抑制されることが知られている。塩化リチウムは、この GSK3 $\beta$  の活性を抑制することによって、間接的に Wnt シグナルを促進している。したがって、塩化リチウムを与えることによって、プラナリアの再生過程における GSK3 $\beta$  が抑制され、Wnt シグナルが活性化されるのである。(図 1)



図 1 塩化リチウムが Wnt シグナルを活性化する過程

プラナリアを切断した後、塩化リチウムを加えた水溶液で飼育することにより、通常時の飼育環境に比べて、プラナリアの頭部再生に遅れが見られるという仮説のもと本研究を行った。

## 【実験器具・薬品・材料】

### (1) 実験材料

今回実験に用いたのは、ドゲシア科ナミウズムシ属のリユキュウナミウズムシ (*Dugesia ryukyuensis*) であり、徳島大学渡部稔教授が培養されているものを頂き、実験に使用した。

飼育環境は以下の通り。

- 24℃に設定した定温恒温器内で飼育した。
- 餌は、鶏のレバーを週 1 回の目安で与え、3~4 時間後に水かえを行った。
- 目視で水が濁っていることを確認したときは、随時、水かえを行った。
- 実験に使用する個体については 1 週間前から絶食を行った。(消化管内に食物が残っていると、消化液によって切断面が損傷する可能性があるためである。)
- 通常の飼育水については、生物室の汲み置き水を使用した。

### (2) 実験器具・薬品

- 塩化リチウム水溶液

水溶液に使用した塩化リチウムは、ナカライテクス社の分子生物学研究用特性試薬で、純度は大変高い。1.0×10<sup>-1</sup>mol/L に調整した塩化リチウム水溶液を、実験を行う際に適宜調整した。

- 市販の天然水

実験の際には、コカ・コーラ社の「森の水だより」というミネラルウォーター(硬度/34.6、pH/7.1)を使用した。冷蔵庫や室温で保存してしまうと、普段プラナリアが生活している水温との温度差が生じてしまうため、常にプラナリアと同じ定温恒温内(24℃)で保存した。

### 【研究方法】

- 再生・死亡の定義

実験において、プラナリアを眼の下で切断した。理由としては、眼の位置は目視でも確認しやすく、切断する個人差による切断位置のばらつきがないからである。また、再生の定義を設定する際に、眼の再生が最も容易に観察できるからである。

再生の過程では、まず切断面に白い再生芽が形成され、その後再生芽に眼が形成される。顕微鏡を用いた観察で再生芽に眼が確認できたときを再生と定義した。(図2) また、本来茶色いプラナリアの体が、実験中に白くなり原形をとどめなくなった場合を死亡と定義した。

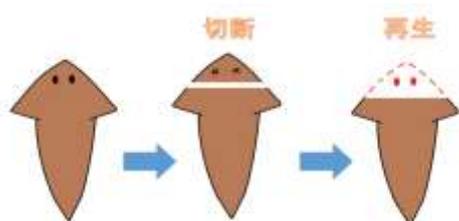


図2 プラナリア再生の定義

(実験1)  $1.0 \times 10^{-1} \text{mol/L}$ 、 $1.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$  塩化リチウム水溶液中の再生

まず、塩化リチウム水溶液の濃度を、 $1.0 \times 10^{-1} \text{mol/L}$ 、 $1.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 、そして  $1.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$  に設定した。対照実験として市販の天然水を用いた。各液の量は、 $1 \text{mL}$  とした。プラナリアの培養は、12穴プレートで行った。切断したプラナリアを1個体ずつ1つの穴に入れ、その後プラナリアの眼の再生を観察した。実験期間も通常の飼育同様、 $24^\circ\text{C}$  に設定された定温恒温器内で飼育を行い、観察方法は実体顕微鏡を使用した。観察は、1日1回行った。

(実験2)  $1.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 、 $7.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 、 $5.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 、 $3.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 、 $1.0 \times 10^{-4} \text{mol/L}$  塩化リチウム水溶液中の再生

実験1の結果、 $1.0 \times 10^{-1} \text{mol/L}$  および、 $1.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$  塩化リチウム水溶液の条件では、すべての個体が死亡した。そこで  $1.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$  を中心にさらに細かく実験

を行うことにした。

はじめ  $1.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 、 $1.0 \times 10^{-4} \text{mol/L}$  の塩化リチウム水溶液で実験を行った。その結果を踏まえ、さらに濃度を細かく設定し、 $7.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 、 $5.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 、 $3.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$  塩化リチウム水溶液で実験を行った。それぞれの条件で飼育、観察を行った。また、実験1との変更点として6穴プレートを使用するようにし、水、水溶液の量は  $10 \text{mL}$  にした。対照実験、観察方法は実験1と同様とした。

#### 【実験結果】

(実験1)

$1.0 \times 10^{-1} \text{mol/L}$ 、 $1.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$  ではすべての個体が死亡した。したがって、死亡率は  $100\%$  である。

市販の天然水では平均  $3.0$  日で、 $1.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$  では平均  $4.0$  日で再生が確認できた。 $1.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$  で一頭死亡したが、これは定温恒温器内が乾燥したために飼育水の塩化リチウム水溶液がすべて蒸発してしまい、プラナリアが干からびて死亡してしまったものである。この個体の死亡は乾燥によるものであり塩化リチウム水溶液の濃度との直接的な関係性はない。

(実験2)

水、 $1.0 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$  ではすべての個体の再生が確認できた。再生日数は水が  $3.0$  日、 $1.0 \times 10^{-4} \text{mol/L}$  が  $3.5$  日、 $1.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$  が  $3.9$  日となっている。

$3.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 、 $5.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$  では再生する個体もあったが、一部死亡する個体が現れた。再生日数と死亡率はそれぞれ、 $3.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$  が  $4.0$  日・ $16.7\%$ 、 $5.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$  が  $5.0$  日・ $66.7\%$  となっている。

$1.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 、 $7.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$  ではす

すべての個体が実験1の時と同様、全個体死亡した。したがって、死亡率はともに100%である。

また、塩化リチウム水溶液濃度と再生日数の関係を、塩化リチウム水溶液濃度と死亡率の関係をグラフ化した。(図3、図4)

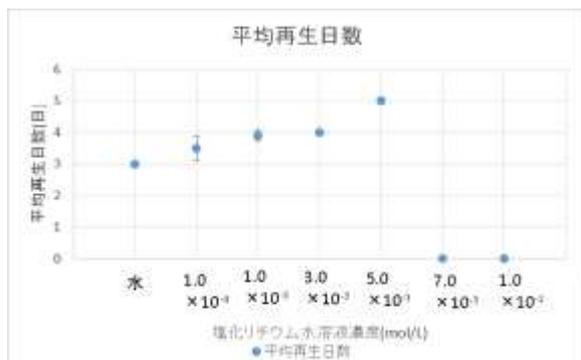


図3 塩化リチウム水溶液濃度と再生日数の関係

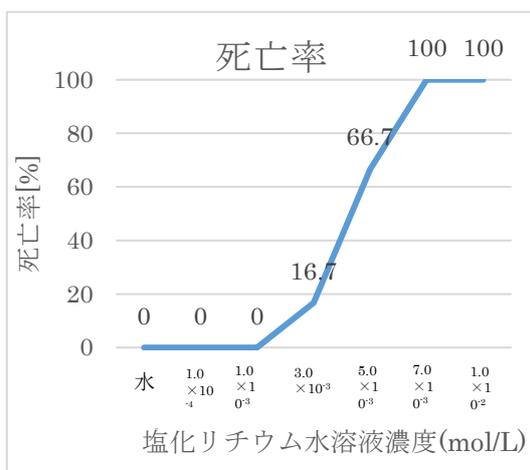


図4 塩化リチウム水溶液濃度と死亡率の関係

#### 【考察】

図3より、 $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 塩化リチウム水溶液を与えた場合、再生日数に有意な差を見ることができた。したがって、塩化リチウム水溶液によって、プラナリアの頭部再生は抑制されたことがわかった。さらに、 $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L、 $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L、 $3.0 \times 10^{-3}$  mol/L、 $5.0 \times 10^{-3}$  mol/L と塩化リチウム水溶液の濃度を変化させると、濃度に比例

して再生日数と死亡率に変化が見られた。よって、塩化リチウム水溶液の濃度は、プラナリアの再生日数と死亡率に影響を与えると考えた。これは、図1に示した経路において、塩化リチウムが GSK3 $\beta$  を抑制し、その結果 Wnt シグナルが活性化された結果であると考えられる。

一方で図4より、塩化リチウムの濃度が高くなるにつれ、死亡率が高くなることがわかる。これは、再生の抑制が強すぎるため、死亡したのではないかと推測する。つまり、塩化リチウム水溶液による Wnt シグナルの活性化が強くなりすぎると、再生にいたらないのではないかと考える。

今回の実験では有意な差こそ見られたが、データ数が少ないことが課題であり、今後多くのデータ収集を必要とする。

#### 【参考文献】

- ・秋山徹・河府和義. 阻害剤活用ハンドブック. 羊土社,2006.9
- ・宮崎武史. プラナリアって何だろう?. 幻冬舎,2012.11
- ・阿形清和[文]・土橋とし子[絵]. 切っても切ってもプラナリア. 岩波書店,2009.6
- ・手代木渉・渡辺憲二. プラナリアの形態分化ー基礎から遺伝子までー共立出版株式会社,1998.3
- ・軸パターン形成と再生における Wnt シグナル伝達. 2010.6. Edward M. De Robertis.

[http://www.cosmobio.co.jp/aaas\\_signal/archive/pp\\_20100622\\_1.asp](http://www.cosmobio.co.jp/aaas_signal/archive/pp_20100622_1.asp)

#### 【謝辞】

本研究に際し、プラナリアの提供および研究方法のご指導をいただいた、徳島大学渡部稔教授に感謝申し上げます。