

## 学位論文の要旨

論文題目 線虫 *Pristionchus pacificus* における新規摂食行動の制御および進化機構の解明  
(Molecular and evolutionary mechanisms of novel feeding behavior in the  
nematode *Pristionchus pacificus*)

広島大学大学院統合生命科学研究科  
生命医科学プログラム  
学生番号 D202139  
氏名 井下 結葵

## 背景と目的

動物は、進化の過程で多様な行動を獲得した。行動は、多様な遺伝子や細胞が制御する複雑な遺伝形質であり、その進化メカニズムを明らかにすることは進化生物学の最も重要な課題の一つである。近年、次世代シーケンサーなどの発展により、ゲノム配列や遺伝子発現量の種間における比較解析が、様々な種を用いて盛んに行われている(Niepoth and Bendesky, 2020)。しかし遺伝子配列や発現量の違いを比較しただけでは、遺伝子機能がどのように変化し、異なる行動を制御しているのかを説明することは困難である。この問題を解決するには、近縁種同士で異なる行動を示し、かつそれらの種で遺伝学的操作ができるという特徴を持つ動物モデルが必要である。

線虫 *Pristionchus pacificus* は、モデル線虫 *Caenorhabditis elegans* と比較可能なサテライトモデル生物として確立されてきた動物である。*P. pacificus* では、順遺伝学・逆遺伝学的解析を行うためのツールが整備されている (Dieterich et al., 2008; Sommer et al., 1996; Witte et al., 2015)。*P. pacificus* では、咽頭筋の収縮によってバクテリアを摂食するバクテリア摂食行動と、咽頭筋の収縮と歯の運動を同調させて他の線虫を食べる捕食行動という二つの摂食行動様式が見られる。バクテリア摂食行動は *C. elegans* を含む分類学的に同じクレードの種で広く見られる行動であるのに対し、捕食行動は *P. pacificus* が属する Diplogastridae 科でのみ見られる。したがって、*P. pacificus* の捕食行動は Diplogastridae 科で新規に獲得された行動と言える。

本研究では、遺伝学的手法を用いて *P. pacificus* の捕食行動の制御メカニズムを明らかにし、また *C. elegans* との比較によって捕食行動がどのように進化してきたかを明らかにする。これによって、進化的に新しい行動がどのように獲得されたかを解明することを目的とする。

## 結果と考察

1. *P. pacificus* におけるセロトニン受容体の機能解析

*P. pacificus* の捕食行動には神経伝達物質であるセロトニンが関与することが知られている(Wilecki et al., 2015; Okumura et al., 2017)。したがって、この下流ではセロトニン受容体とそれを発現する細胞が捕食行動に重要な機能を持つことが予想される。筆者は *C. elegans* でこれまでに報告されている 5 つのセロトニン受容体 (*ser-1*, *ser-4*, *ser-5*, *ser-7*, *mod-1*) の *P. pacificus* におけるオルソログに着目して解析を行った。RACE 法によってこれらの遺伝子配列を決定し、エクソンをターゲットに CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて 5 つのセロトニン受容体のノックアウト変異体を作製した。作製した変異体を用いて捕食行動アッセイを行った結果、*Ppa-ser-5* 変異体で捕食による殺傷が減少することがわかった。また、*Ppa-ser-1*; *Ppa-ser-7* 二重変異体では被食者への噛みつきが減少することがわかった。これらの変異体で、捕食時の歯の運動を調べると、野生型と比較して *Ppa-ser-1*; *Ppa-ser-7* 二重変異体で捕食時の歯の運動が減少した。このことから、*Ppa-ser-1* および *Ppa-ser-7* は捕食時の歯の運動を調節することが示唆された。

*P. pacificus* では、進化的に保存された摂食行動であるバクテリア摂食運動もセロトニンによって制御されていることが知られている。セロトニン受容体変異体のうち、*Ppa-ser-7* 変異体および *Ppa-mod-1* 変異体でバクテリア摂食時の咽頭運動が減少することが明らかになった。この組み合わせは捕食に関わるセロトニン受容体とは異なる組み合わせである。このことから、*P. pacificus* における 2 種類の摂食行動は異なるセロトニン受容体によって制御されていることが明らかになった。

*C. elegans* では、実験条件によって違いはあるものの *ser-1*, *ser-5*, *ser-7* がバクテリア摂食において主に機能を果たすことが知られている。セロトニン受容体の発現パターンを *P. pacificus* と *C. elegans* で比較すると、両種間で発現パターンが異なる細胞が見つかった。これらのことから、複数のセロトニン受容体が新たな発現パターンを獲得することによって捕食行動の獲得が促された可能性が示唆された。

## 2. アスタシンメタロプロテアーゼの捕食行動における機能解析

捕食行動に関連する新たな遺伝子を探索するため、順遺伝学的スクリーニングによって捕食が完全に欠失する変異体を探索した。捕食を簡便に検出することができる新規スクリーニング法を開発し、5150 系統の化学変異導入系統で捕食を調べた結果、ほぼ完全に捕食が欠失する系統を 5 系統単離した。これらの系統で遺伝子マッピングおよび全ゲノム配列の解読を行った結果、1 系統でアスタシンメタロプロテアーゼをコードする *Ppa-nas-6* 遺伝子座にミスセンス変異が入っていることがわかった。*Ppa-nas-6* のノックアウト変異体を CRISPR/Cas9 ゲノム編集法で作製し、捕食行動アッセイを行った結果、*Ppa-nas-6* ノックアウト変異体でもほぼ完全に捕食が欠失することが明らかになった。*Ppa-nas-6* 上流の配列をプロモーターとして用い、ノックアウト変異体で *Ppa-nas-6* を発現させるレスキュー実験を行った結果、捕食が部分的に回復したため、*Ppa-nas-6* は捕食に重要であることが示唆された。*Ppa-nas-6* 変異体では捕食時の歯の運動が減少したため、*Ppa-nas-6* 変異体では歯の運動が減少することによって捕食が欠失する可能性が示唆された。一方で、*Ppa-nas-6* 変異体は、走査型電子顕微鏡下で口腔形態にも異常が見られることがわかった。*C. elegans* の *nas-6* 変異体（以下、*Cel-nas-6* 変異体）では、バクテリアを粉砕するための構造であるグラインダー周辺に幼虫期のクチクラが詰まるという表現型が見られる (Park et al., 2010; Sparacio et al., 2020)。このことから、*Ppa-nas-6* 変異体で見られる口腔内の異常な構造物はクチクラの残留物であり、*C. elegans* と *P. pacificus* で *nas-6* の口腔内脱皮に関する機能が保存されていることが示唆された。

次に、*nas-6* が *P. pacificus* において捕食に関連する形質を制御するようになった進化的メカニズムを明らかにしようとした。まず、アミノ酸配列の変化が *nas-6* の新たな機能獲得に関わった可能性を検証するため、*Cel-nas-6* 変異体で *Ppa-nas-6* を発現させ表現型が回復するかを検証した。その結果、*Ppa-nas-6* の過剰発現でも *Cel-nas-6* 変異体のグラインダーの構造異常がレスキューしたことから、*NAS-6* の分子機能は *C. elegans* と *P. pacificus* で保存されていることが示唆された。次に、発現パターンの変化によって *nas-6* が新たな機能を獲得した可能性を検証するため、両種において *nas-6* のレポーター系統を作製し、*Cel-nas-6* と *Ppa-nas-6* の発現パターンを比較した。*Cel-nas-6* と *Ppa-nas-6* の発現パターンは大きく異なり、両種で *nas-6* の発現が保存されている細胞は咽頭筋のみであった。*Ppa-nas-6* 変異体で咽頭筋特異的に *Ppa-nas-6* を発現させても捕食が回復しなかったことから、*C. elegans* とは異なる細胞で *nas-6* が発現することが捕食に重要であることが示唆された。さらに、*Ppa-nas-6* プロモーターを用いて GFP を発現する *C. elegans* の系統を作製することによって、*cis* 調節配列と *trans* 調節配列のどちらが発現パターンの変化に重要であるかを検討した。この系統では、一部の個体で GFP がアーケード細胞に発現したが、*P. pacificus* における *nas-6* の発現パターンを完全に模倣することはできなかった。アーケード細胞での *nas-6* の発現は *P. pacificus* に特徴的なものであることから、*cis*, *trans* 調節配列のいずれもが新たな発現パターンの獲得に関わったことが考えられた。

以上より、*Ppa-nas-6* は捕食に必要な不可欠な歯の運動や形態形成に重要な機能を持ち、*nas-6* の発現パターンが変化することによってこれらの形質を制御するように進化してきたことが示唆された。

## 総括

本研究では、逆遺伝学的手法および順遺伝学的手法を用いて、*P. pacificus* の捕食行動に関わる遺伝子

の同定および解析を行い、また *C. elegans* との比較解析を行うことで、捕食が起こる遺伝学的メカニズムおよびその進化機構の一端を明らかにした。より具体的には、セロトニンを介した摂食運動制御やアスタシンメタロプロテアーゼを介した形態形成といった多面的な解析によって、捕食行動の獲得機構に迫っている。本成果は、新規行動の獲得メカニズムを分子遺伝学の視点から説明する知見を提供し、多様な行動が獲得された分子機構を解明する基礎となることが期待される。