

学位論文の要旨

論文題目 線虫 *Pristionchus pacificus* における光シグナル伝達機構の解明
(Elucidation of a phototransduction 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 D212686
氏名 中山 賢一

光の感知は多くの生物が持つ重要な感覚系の一つである。光受容細胞の光受容タンパク質によって光を受容し、光情報が一連の酵素反応により伝達され、細胞応答が起きる。この過程を光シグナル伝達経路と呼ぶ（以後、光伝達経路）。光伝達経路は種間で非常に多様化しており、ゲノム解析によって様々な生物種で比較解析が行われている。

筆者は線形動物（線虫）の光伝達経路に着目した。線虫は地球上で最も多様な動物門の一つで、土壌や海中、植物や動物体内の寄生など様々な生息地を持ち、それに伴って、感覚系も非常に多様化していることが予想される。また、眼と言った特定の光受容器官を持たないにも関わらず、一部の線虫では光反応性が確認されている。その中でもモデル生物である *Caenorhabditis elegans* では、これまで動物の光受容タンパク質として知られている典型的オプシンやクリプトクロムに依存しない *Cel-LITE-1* を介したユニークな光伝達経路を用いている (Edwards et al. 2008; Ward et al. 2008; Liu et al. 2010; Gong et al. 2016)。しかし、LITE-1 は既知の線虫約 30000 種の内、*C. elegans* が属する *Caenorhabditis* 属（約 50 種）の間でしか保存されていないため、他の線虫種がどのような光伝達経路を持つのか分かっていない。

そこで、*C. elegans* と比較可能なモデル生物として確立されている *Pristionchus pacificus* を用いた。*P. pacificus* はゲノム情報が利用可能、CRISPR/Cas9 システムや遺伝子導入などの遺伝学的ツールが使用可能、大腸菌上で容易に飼育できる、*C. elegans* と保存された頭部感覚神経系を持つ、といった様々な実験学的利点がある (Sommer et al. 1996; Dieterich et al. 2008; Hong et al. 2019)。

本研究では、典型的な光受容タンパク質が見つかっていない *P. pacificus* において、光受容機構の解明を目的とした。まず、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集において、変異誘導の有無を簡便にスクリーニングする方法を確立し、変異体作製を容易に行えるようにした。開発した方法による逆遺伝学、順遺伝学的手法、神経活動制御を用いて *P. pacificus* の光受容機構を明らかにした。

結果と考察

1. 線虫 *Pristionchus pacificus* における Co-CRISPR システムの確立

CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集法は、*P. pacificus* の様々な研究に活用されている。*P. pacificus* では、guide RNA (gRNA) と Cas9 タンパク質を生殖腺にマイクロインジェクションすることで、変異を誘導することができる (Witte et al. 2015)。しかし、*P. pacificus* においては有用なインジェクションマーカーが確立されておらず、標的変異のスクリーニングには多大な労力とコストがかかる。そこで、筆者は *P. pacificus* において変異導入を簡便にスクリーニングするための Co-CRISPR システムの確立を行った。先行研究から、変異ヘテロ接合体でらせん状にねじれる動き（ローラー）を示す *Ppa-prl-1* の 65 番目のアルギニンからシステインへのアミノ酸変異に着目した (Kramer and Johnson 1993;

Kenning et al. 2004; Schlager et al. 2009)。CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集によって、*Ppa-prl-1* 変異ヘテロ接合体においてローラー表現型が誘導されることが分かった。次に、*Ppa-prl-1* に対する gRNA、標的遺伝子に対する gRNA、Cas9 タンパク質を同時にインジェクションした後、ローラー個体とその兄弟の標的遺伝子の塩基配列を heteroduplex mobility assay (HMA) と DNA シーケンスによって調べた。その結果、ローラー個体とローラー個体の兄弟において、標的配列に変異があることがわかった。また、Cas9 濃度がゲノム編集効率に影響を与えるかを調べるために複数の Cas9 濃度で Co-CRISPR システムを行ったところ、Cas9 濃度が高くてもゲノム編集効率に影響は無かった。これらの結果から、*Ppa-prl-1* は *P. pacificus* における Co-CRISPR システムの有用なインジェクションマーカーとして活用できることが分かった。

2. 線虫 *Pristionchus pacificus* における光シグナル伝達機構の解明

P. pacificus が光に反応するかを調べるために、*C. elegans* の先行研究 (Ward et al. 2008) を基に光忌避行動アッセイを行った。その結果 *P. pacificus* は短波長側の光 (紫外光や青色光) によく反応し、さらに *C. elegans* よりも光に対する反応性が高いことが分かった。次に、行動を制御する上で重要とされる神経伝達物質関連の変異体 6 系統、外界の環境を認知する際に重要な繊毛関連の変異体 5 系統 (Moreno et al. 2017) を用いて光忌避行動アッセイを行った。繊毛関連の変異体は通常的光忌避行動の頻度を示したが、GABA およびグルタミン酸の変異体において光忌避行動の頻度の低下 (以後、光忌避の低下) が見られた。

P. pacificus における光伝達経路探索のため、メタンスルホン酸エチル (EMS) を用いてランダムに変異を導入した系統に対して、光忌避行動アッセイによる順遺伝学的スクリーニングを行った。約 20000 系統以上を調べ、4 系統の光不感系統を単離した。全ゲノム配列の解読および染色体マッピングの結果、3 系統で cGMP 経路の遺伝子 (*Ppa-daf-11*) に変異があることを確認した。cGMP 経路は *C. elegans* の光伝達経路にも使用されており (Ward et al. 2008; Liu et al. 2010)、光伝達経路が *C. elegans* と *P. pacificus* で保存されている可能性が示唆された。そこで *C. elegans* の光伝達経路遺伝子のホモログを *P. pacificus* において Co-CRISPR システムによってノックアウトした。その結果、グアニル酸シクラーゼ (*Ppa-daf-11*, *Ppa-odr-1*)、cGMP 依存性チャネル (*Ppa-tax-2*, 4)、ホスホジエステラーゼ (*Ppa-pde-1*, 2, 3, 5) の変異体で光忌避が低下したが、G タンパク質 α の変異体 (*Ppa-goat-1*, *Ppa-gpa-3*) では野生型と同様の光忌避を示した。これらの結果から、*C. elegans* と *P. pacificus* では一部の光伝達経路が保存されていることが示唆された。

また、スクリーニングで得られた 1 つの光不感系統において GPCR キナーゼをコードする *Ppa-grk-2* に変異が確認された。GPCR キナーゼは活性化した GPCR をリン酸化することによりエンドサイトーシスを引き起こし、GPCR を脱感作することが知られている。Co-CRISPR システムによって種々の *Ppa-grk-2* 変異体を作製したところ光忌避が低下した一方で、*C. elegans* の *Cel-grk-2* 変異体では野生型と同様の光忌避を示した。

光受容神経同定のために、光伝達経路の発現パターンの解析を行った。cGMP 経路の遺伝子は外界環境感知に働くとされている amphid neuron において発現が確認された一方で、*Ppa-grk-2* は amphid neuron 以外の細胞においても発現が見られた。この結果から、*Ppa-grk-2* は amphid neuron 以外の組織で光忌避行動を制御している可能性もあることが分かった。さらに amphid neuron 特異的なプロモーターを使って、神経伝達を阻害する tetanus toxin を発現させたところ、光忌避が低下し、amphid neuron の一部が光受容神経である可能性が示唆された。

総括

本研究では、順遺伝学的手法と本研究で新たに開発した Co-CRISPR システムによる逆遺伝学的手法を用いて *P. pacificus* における光伝達経路の解明を行った。既存の光受容体を持たない *P. pacificus* において光反応性を確認し、*P. pacificus* の光反応に GABA、グルタミン酸、cGMP 経路、GPCR キナーゼが必要であることを発見した。cGMP 経路は *C. elegans* の光伝達経路においても採用されているが、GPCR キナーゼは *C. elegans* の光反応に必要ではなかった。このことから、*P. pacificus* と *C. elegans* の光反応の保存性と相違点が明らかとなった。さらに、発現解析、神経活動制御により頭部感覚神経

である amphid neuron が光反応を制御していること発見した。本研究は線虫の光受容機構の多様性を初めて明らかにした研究であり、線虫が光受容研究の新しいモデルとなることを示した。