

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14716

研究課題名（和文）表現型多型に伴った行動多型を制御する神経回路とその形成機構の解明

研究課題名（英文）Neural mechanism of behavioral plasticity in nematode *Pristionchus pacificus*

研究代表者

奥村 美紗子 (Okumura, Misako)

広島大学・統合生命科学研究科（理）・助教

研究者番号：40806486

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：環境に応答して複数の不連続な形態をとりうる「表現型多型」に伴う行動多型のメカニズムを明らかにするために、線虫 *Pristionchus pacificus* の摂食行動の多型に着目して研究を行った。本研究ではまず摂食行動の1つである捕食行動がどのように制御されているか明らかにすることを目指した。神経伝達物質に関わる変異体をゲノム編集技術によって作出し解析した結果、セロトニンや一部のセロトニン受容体が捕食行動において機能していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、捕食行動には神経調節因子であるセロトニンと、その下流において一部のセロトニン受容体が重複して機能することを見出した。表現型多型は進化過程において表現型の多様性を促進していると考えられていること、*P. pacificus* の捕食行動は進化的には新規に獲得された行動であることから、本研究により *P. pacificus* の捕食行動がどのように制御されているか明らかにしたことによって、行動の進化の分子メカニズムの解明に迫ることができる。

研究成果の概要（英文）：Polyphenism is a phenomenon that organisms show distinct phenotypes depending on the surrounding environment. Animals exhibiting polyphenism often show behavioral plasticity but the neural mechanism of behavioral plasticity is largely unknown. To address this question, we focused on behavioral plasticity in feeding behaviors in nematode *Pristionchus pacificus*, which shows polyphenism in its mouth form. We generated mutants in neurotransmitter-related genes by CRISPR/Cas9 genome editing method and found that serotonin and subset of serotonin receptors are involved in feeding behaviors in *P. pacificus*.

研究分野：神経科学

キーワード：線虫 *Pristionchus pacificus* 捕食行動 セロトニン セロトニン受容体 表現型多型

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物が受精卵から成体へと成長していく発生過程では、親から受け継ぐ遺伝子だけでなく、温度や栄養状態など様々な環境からの影響をも受ける。環境に依存して表現型が変化することを「表現型可塑性」と呼び、特に、同一の遺伝子型であっても、環境に応答して不連続的に形態が変化しうることを「表現型多型」という。さらに生育環境は形態的な表現型多型だけでなく、行動の違いも生み出すことから、環境に応じて神経回路にも変化が生じていると考えられる。しかしどのような神経系の違いが異なる行動を制御しているのか、またそのような神経回路が環境に応答し、形態と同調しながらどのように形成されているかは明らかとなっていない。それは表現型多型を示すことが明らかになっている種の多くは非モデル動物であり、分子レベル・細胞レベルでの解析が困難であったためである。

本研究では、表現型多型を示し、それに伴った行動の多型もみられる線形動物(線虫)*Pristionchus pacificus* をモデルとして用いる。体長 1 mm ほどの *P. pacificus* は、飼育が容易であり、生活環が 4 日間と短く、ゲノム配列や遺伝子導入、ゲノム編集技術などの遺伝学的ツールを利用できる進化生物学のモデルである(*Nat Genet.* 40. 1193–1198, 2008; *Genetics.* 47. 300–304, 2009; *Dev Genes Evol.* 225. 55–62, 2015)。興味深いことに、*P. pacificus* は 2 パターンの口腔形態が存在し、同じ遺伝子型をもっていても集団密度などの生育環境に依存していずれか一方の口腔形態をとる。さらにその口腔形態によって摂食行動にも違いがみられる。2 つの大きな歯を持ち、口の幅が広い「幅広型」は、「他の線虫に対する捕食行動」に適している。それに対し、1 つの歯しか持たず口の幅が狭い「狭小型」はバクテリア食性であり、捕食行動はみられない。私は *P. pacificus* の摂食行動の神経制御機構を明らかにするために、様々な神経伝達物質の合成酵素やトランスポーターの変異体を CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術によって作出した。さらに再構成カスパーゼを用いて遺伝学的に特定の細胞を除去する方法を *P. pacificus* において初めて確立した(*G3.* 7. 3744–3755, 2017)。これらを用いて、幅広型線虫の「他の線虫に対する捕食行動」に着目して研究を開始し、捕食行動の制御にセロトニン作動性神経が関与していることを明らかにしている(*G3.* 7. 3744–3755, 2017)。しかし、摂食行動の多型がどのように制御されているか、また摂食行動の制御に関わる神経系の違いがどのように形成されているのかは未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、幅広型・狭小型線虫における神経系の違いを明らかにするために、幅広型線虫における摂食行動に着目し、その神経制御メカニズムの解明を目指す。摂食行動を制御する神経回路を候補として、幅広型・狭小型線虫における神経系の違いを見出し、行動多型の神経制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

行動多型を制御する神経回路の候補としてセロトニンに着目した。神経調節物質であるセロトニンが *P. pacificus* における摂食行動やバクテリア食性の制御に関与していることは明らかになっている(*G3.* 7. 3744–3755, 2017)。しかしセロトニンの下流において、どのようなセロトニン受容体が、どの細胞において摂食行動に関与しているか明らかになっていない。本研究ではセロトニン受容体の変異体をゲノム編集技術を用いて網羅的に作出し、摂食行動の観察を行った。さらにセロトニン受容体の発現パターンを解析するために、レポータートランスジェニック系統を作製した。

本研究の過程ではゲノム編集技術によって変異体の作出を行ったが、その際にゲノム編集が起こっている個体を効率的に識別するためのインジェクションマーカーの開発を行った。

4. 研究成果

(1) セロトニン受容体の変異体の作出

神経調節因子であるセロトニンは多くの動物で摂食行動に関与することが明らかになっている。*C. elegans* では5種類のセロトニン受容体が報告されており、それぞれに対して *P. pacificus* のオルソログが存在している。最初に RACE 法によって *P. pacificus* のセロトニン受容体の配列を決定した。次に CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、*P. pacificus* において5つのセロトニン受容体すべての変異体を作成した。これらのセロトニン受容体変異体の行動解析を行った。捕食行動のアッセイを行った結果、1種類のセロトニン受容体の変異体と、2種類のセロトニン受容体を同時にノックアウトした二重変異体において捕食行動が優位に減少することがわかった。さらに捕食行動の際にみられる歯の動きとポンピング(咽頭筋の収縮)の頻度をそれぞれの変異体で観察したところ、二重変異体では優位に歯の動きの減少がみられた。また幅広型・狭小型線虫の両方で見られるバクテリアに対する摂食行動にも一部のセロトニン受容体が関与することを見出した。これらの結果は、一部のセロトニン受容体が重複して捕食行動およびバクテリア摂食に関与することを示唆している。本研究の過程においてセロトニン受容体に関する知見を整理し、国際学術雑誌に線虫におけるセロトニンによる摂食行動制御に関する総説を発表した (*Neuroscience Research*, 154, 9–19, 2020)

(2) セロトニン受容体の発現パターンの解析

セロトニン受容体がどこで発現し、捕食行動やバクテリア食性を制御しているか明らかにするために、セロトニン受容体の上流領域をプロモーター領域の候補として蛍光タンパク質の上流に挿入したレポータートランスジェニック系統を作成した。その結果、咽頭筋や咽頭神経、感覚神経などにセロトニン受容体が発現していることを見出した。その中には、捕食行動の際に重要な咽頭筋や、その咽頭筋にシナプス結合することが知られている咽頭神経も含まれていた。今後これらの細胞の活動を光遺伝学的手法を用いて抑制することや、遺伝学的細胞除去法を用いて候補となる細胞を除くことで、捕食行動に関わる神経細胞を同定する。

(3) CRISPR/Cas9 法におけるインジェクションマーカーの確立

P. pacificus において CRISPR/Cas9 法を利用する際は、雌雄同体個体の生殖腺に Cas9 タンパク質と標的遺伝子に対する guide RNA (gRNA) をマイクロインジェクションによって導入する。さらに F1 個体において、ゲノム編集によって変異が入っているか確認を行う必要がある。これまで *P. pacificus* では CRISPR/Cas9 法のためのインジェクションマーカーが存在せず、多くの F1 個体を単離し遺伝子型を確認する必要があった。私達は変異体において roller 表現型(体が回転する表現型)を示す *Ppa-prl-1* 遺伝子に着目した。*Ppa-prl-1* の gRNA を標的遺伝子の gRNA とともにインジェクションすることで、インジェクションが成功しゲノム編集が起こっている個体は roller 表現型を示すことを見出した。この個体とその姉妹の F1 個体の遺伝子型を調べることによって、ゲノム編集が起こっている個体を効率的に同定することに成功した。この方法は、今後の *P. pacificus* のゲノム編集技術の発展に貢献することができる。この成果は国際学術雑誌に論文として発表した (*Development Genes and Evolution*, 230, 257–264, 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishita Yuuki, Chihara Takahiro, Okumura Misako	4. 巻 154
2. 論文標題 Serotonergic modulation of feeding behavior in <i>Caenorhabditis elegans</i> and other related nematodes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 9 ~ 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.neures.2019.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Ken-ichi, Ishita Yuuki, Chihara Takahiro, Okumura Misako	4. 巻 230
2. 論文標題 Screening for CRISPR/Cas9-induced mutations using a co-injection marker in the nematode <i>Pristionchus pacificus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development Genes and Evolution	6. 最初と最後の頁 257 ~ 264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1007/s00427-020-00651-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Misako Okumura, Yuuki Ishita, Ralf J Sommer, Takahiro Chihara
2. 発表標題 Neural regulation of the predatory feeding behavior in <i>Pristionchus pacificus</i>
3. 学会等名 8th Asia Pacific Worm Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥村美紗子
2. 発表標題 Neuro Evo Devoモデルとしての線虫 <i>Pristionchus pacificus</i> の魅力と展望
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥村美紗子, 井下結葵, Ralf J Sommer, 千原崇裕
2. 発表標題 線虫を食べる線虫における捕食行動の神経制御メカニズム
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井下結葵, 千原崇裕, 奥村美紗子
2. 発表標題 線虫Pristionchus pacificusの捕食行動におけるセロトニン受容体の機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井下結葵, 千原崇裕, 奥村美紗子
2. 発表標題 捕食性線虫Pristionchus pacificusにおけるセロトニン受容体変異体の作出と機能解析
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Misako Okumura, Ken-ichi Nakayama, Yuuki Ishita, Takahiro Chihara
2. 発表標題 Screening for CRISPR/Cas9-induced mutations using microchip electrophoresis in the nematode <i>Pristionchus pacificus</i>
3. 学会等名 22nd International C. elegans Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山賢一、千原崇裕、奥村美紗子
2. 発表標題 線虫Pristionchus pacificusを用いた新規光受容体の探索
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuuki Ishita, Takahiro Chihara, Misako Okumura
2. 発表標題 Dissecting the function of serotonin receptors in predatory feeding behavior in the nematode Pristionchus pacificus
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山賢一、井下結葵、千原崇裕、奥村美紗子
2. 発表標題 線虫Pristionchus pacificusにおけるCRISPR/Cas9インジェクションマーカ-の確立
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山賢一、千原崇裕、奥村美紗子
2. 発表標題 線虫Pristionchus pacificusにおける光忌避行動制御機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

行動の多様性を制御する神経回路とは？
<http://chihara-lab.hiroshima-u.ac.jp/research04/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----