

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15903

研究課題名(和文)線虫を用いた新規光受容体の探索

研究課題名(英文)Identification of novel photoreceptors in the 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)・准教授

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)：線形動物である *Pristionchus pacificus* は目を持っておらず、既知の光受容体もゲノム上に存在しないが、光に反応し忌避行動を示す。本研究では、線虫 *P. pacificus* がどのように光を感知しているか明らかにすることを目指した。これまでに、光忌避行動のアッセイ系を確立し、*P. pacificus* は短波長の光に対して忌避行動を示すことを明らかにした。順遺伝学的スクリーニングを行い、光忌避行動を示さない変異体を6系統単離し、5系統の変異体について原因遺伝子を同定した。さらに、光感知細胞の候補を見出し、今後それらの細胞が光感知に関わるか確認し、光感知の分子・神経機構の全貌解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって新規光受容体を同定することは、動物の光感知の考え方を大きく転換させる可能性を秘める。本研究で同定する光受容体は線虫以外の動物にも保存されている可能性があり、光による新たな生理機能制御の解明につながると考えている。一方、本研究で同定する光受容体は線虫でのみ保存されている可能性もあるが、新しい特性をもつ光受容体の同定は、チャンネルロドプシンのような新しい光遺伝学的手法の開発にもつながる。本研究により *P. pacificus* を用いて光感知の分子基盤を明らかにすることは、線虫における光感知機構の解明だけでなく、動物における新たな光受容体の発見や、光受容体の進化の解明に重要な知見を与える。

研究成果の概要(英文)：The nematode *Pristionchus pacificus* has no eyes and no known photoreceptors in its genome, but it can respond to light and exhibits light avoidance behavior. In this study, we aimed to clarify how the nematode *P. pacificus* senses light. We have established an assay system for light avoidance behavior and found that *P. pacificus* exhibits avoidance behavior in response to short-wavelength light. We conducted a forward genetic screening and isolated six mutant lines that did not show light-avoidance behavior, and identified the causal genes in five mutant lines. In addition, we identified candidate light-sensing cells and will confirm whether these cells are involved in light sensing, aiming to elucidate the molecular and neural mechanisms of light sensing.

研究分野：神経科学

キーワード：線虫 *Pristionchus pacificus* 光忌避行動 光受容体 順遺伝学的スクリーニング ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

光は植物における光合成や概日リズムの調整のように生命にとって不可欠だが、光自体が身体に対して有害な場合もある。そのため光を受容し応答することは動物の生存にとって極めて重要である。動物は主に光受容体であるロドプシン(G タンパク質であるオプシンと小分子レチナールの複合体)によって光を感知している。本研究で取り扱う線形動物(線虫)では一部の種を除き眼に相当する組織が存在せず、動物の光受容体であるロドプシンは存在しない。しかしモデル動物である *Caenorhabditis elegans* や植物寄生性線虫サツマイモネコブセンチュウは光を感知し忌避行動を示すことが知られている (*Plos Biol.* 6. e198. 2008; *Nat. Neurosci.* 11. 916-922. 2008; *Int. J. Biol.* 9. 51-55. 2017)。透明な体をもつ線虫では、可視光の照射であっても酸化ストレスを生じ、寿命低下をも引き起こすことから、光応答は線虫の生存にとって不可欠であると考えられる(*Nat. Commun.* 9. 927. 2018)。

線虫における光感知システムのメカニズムを解明するために、*C. elegans* を用いた順遺伝学スクリーニングが行われ、*C. elegans* において光(UV)は7回膜貫通型タンパク質である LITE-1 によって感知されることが明らかとなった(*Plos Biol.* 6. e198. 2008; *Cell*, 167, 1252-1263, 2016)。興味深いことに、LITE-1 は *C. elegans* が属する *Caenorhabditis* 属でしか同定されていない。そのため LITE-1 以外に新たな光受容体が存在することが示唆されるが、その他の線虫種において光感知がどのように制御されているのかは明らかになっていない。

#### 2. 研究の目的

本研究は、線虫を用いて動物界における新規光受容体を同定し、光感知システムの制御機構を明らかにすることを目的とする。

#### 3. 研究の方法

線虫における新規光受容体の探索を行うために、本研究では、*Pristionchus pacificus* という線虫をモデルとして採用する。*P. pacificus* は光応答性のメカニズムを解明する上で様々な利点をもつ。*P. pacificus* はバクテリアを餌として容易に飼育可能であり、生活環も4日間と短い。ゲノム配列や遺伝子導入、CRISPR/Cas9 法などの遺伝学的ツールを利用できるため、分子・細胞・個体レベルでの解析が可能である(*Nat. Genet.* 40. 1193-1198, 2008; *Genetics.* 47. 300-304. 2009; *Dev. Genes Evol.* 225. 55-62. 2015)。

*P. pacificus* のゲノムには光受容体であるロドプシンや *C. elegans* の光受容体である LITE-1 は存在しないが、光に応答することはできる(未発表データ)。しかし *P. pacificus* がどのように光を感知しているかは全く明らかとなっていなかった。本研究により新規光受容体や光忌避行動に関わる分子を同定し、線虫における光感知システムの分子機構の解明を目指した。

#### 4. 研究成果

##### 【 光感知システムに関わる遺伝子の同定 】

*P. pacificus* における光感知システムの分子機構を明らかにするために、EMS を変異原とした順遺伝学的スクリーニングを行った。スクリーニングでは、変異を誘導した線虫に UV 光または青色光を照射し、光忌避行動の頻度を計測することで、光に反応を示さない変異体系を6系統単離した。光忌避反応を示さない変異体における原因遺伝子を同定するために、次世代シーケンサーを用いてゲノム配列を解読し、野生型系統との比較を行った。変異が見つかった候補となる遺伝子については、CRISPR/Cas9 法により変異体の作出を行い、光忌避反応がみられるか確認することで、5系統に関して原因遺伝子の同定が完了した。

#### 【 光感知システムに関わる神経回路の解明】

で同定した光感知に関わる遺伝子がどの細胞で発現しているか確認するために、候補遺伝子のプロモーターと蛍光タンパク質を結合させたレポーター系統を作出し、発現パターンを観察した。それにより、複数の感覚神経において光伝達に関わる遺伝子が発現していることを明らかにした。その中には、*C. elegans* の光受容細胞と相同な神経も含まれている。これらの細胞が、光を感知しているか明らかにするために、カルシウムイメージを行う。これまでに、*P. pacificus* で GCaMP を行った例は報告されていなかったが、*P. pacificus* におけるカルシウムイメージ法の確立を行っている。すでに、遺伝子組換え線虫を得ており、イメージングの条件検討を行っている。これにより光感知に関わる神経回路を明らかにする。

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 1件）

1. 著者名 Hiraga Hirokuni, Ishita Yuuki, Chihara Takahiro, Okumura Misako	4. 巻 63
2. 論文標題 Efficient visual screening of CRISPR/Cas9 genome editing in the nematode <i>Pristionchus pacificus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth and Differentiation	6. 最初と最後の頁 488 ~ 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12761	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 Ishita Yuuki, Chihara Takahiro, Okumura Misako	4. 巻 11
2. 論文標題 Different combinations of serotonin receptors regulate predatory and bacterial feeding behaviors in the nematode <i>Pristionchus pacificus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 G3 Genes Genomes Genetics	6. 最初と最後の頁 jkab011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/g3journal/jkab011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中山賢一, 千原崇裕, 奥村美紗子
2. 発表標題 線虫における光忌避行動の分子・神経基盤の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山賢一, 千原崇裕, 奥村美紗子
2. 発表標題 cGMP経路は線虫 <i>Pristionchus pacificus</i> の光伝達に関わる
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野寺揚羽, 井下結葵, 中山賢一, 甲斐千夏, 千原崇裕, 奥村美紗子
2. 発表標題 Forward genetic screening to reveal the molecular mechanism of polyphenism in <i>Pristionchus pacificus</i>
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chinatsu Kai, Takahiro Chihara, Misako Okumura
2. 発表標題 Exposure of light affects the mouth form dimorphism in the nematode <i>Pristionchus pacificus</i>
3. 学会等名 第54回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山賢一, 千原崇裕, 奥村美紗子
2. 発表標題 Forward and reverse genetic approaches to understand light avoidance behavior in <i>Pristionchus pacificus</i>
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井下 結葵, 千原 崇裕, 奥村 美紗子
2. 発表標題 Astacin metalloprotease is required for predatory feeding in the nematode <i>Pristionchus pacificus</i> .
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井下 結葵, 千原 崇裕, 奥村 美紗子
2. 発表標題 Role of an astacin metalloprotease in evolutionally novel feeding behavior in the nematode <i>Pristionchus pacificus</i> .
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 郭 潤昭, 寺田 富美, 藤土 竜司, 中串 実姫子, 奥村 美紗子, 千原 崇裕, 濱生 こずえ
2. 発表標題 Dynamin-2 regulates microtubule stability by an endocytosis-independent mechanism.
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山賢一, 千原崇裕, 奥村美紗子
2. 発表標題 cGMP phototransduction pathway is involved in light avoidance behavior in the nematode <i>Pristionchus pacificus</i>
3. 学会等名 23rd international <i>C. elegans</i> conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井下 結葵, 千原 崇裕, 奥村 美紗子
2. 発表標題 Predatory feeding behavior is modulated via three serotonin receptors and other genetic factors in the nematode <i>Pristionchus pacificus</i> .
3. 学会等名 23rd international <i>C. elegans</i> conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ken-ichi Nakayama, Ageha Onodera, Chinatsu Kai, Takahiro Chihara, Misako Okumura
2. 発表標題 Forward genetic screening to understand the molecular mechanism responding to light in <i>P. pacificus</i>
3. 学会等名 2nd International Pristionchus meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村美紗子
2. 発表標題 光環境による表現型多型の制御機構
3. 学会等名 第6回HiHA Young Researchers Workshop 東広島統合生命科学・霞医系科学横断若手ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村美紗子, 千原崇裕
2. 発表標題 表現型多型に影響する光環境条件の検討
3. 学会等名 線虫学ミーティング2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山賢一, 千原崇裕, 奥村美紗子
2. 発表標題 <i>Pristionchus pacificus</i> を用いた新規光受容機構の探索
3. 学会等名 線虫学ミーティング2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山賢一, 千原崇裕, 奥村美紗子
2. 発表標題 Genetic approaches to understand the novel light-sensing mechanism using the nematode <i>Pristionchus pacificus</i>
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山賢一, 千原崇裕, 奥村美紗子
2. 発表標題 Elucidation of a novel light-sensing mechanism in the nematode <i>Pristionchus pacificus</i>
3. 学会等名 広島大学先端人材育成プログラム 令和2年度国際シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平賀裕邦, 千原崇裕, 奥村美紗子
2. 発表標題 インスリンシグナル経路が <i>Pristionchus pacificus</i> の表現型多型に与える影響の解析
3. 学会等名 線虫学ミーティング2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuuki Ishita, Takahiro Chihara and Misako Okumura
2. 発表標題 Three distinct serotonin receptors modulate predatory feeding behavior in the nematode <i>Pristionchus pacificus</i>
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020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における行動多型制御メカニズムの神経遺伝学的解析
3. 学会等名 線虫学ミーティング2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井下結葵, 千原崇裕, 奥村美紗子
2. 発表標題 Two distinct feeding behaviors are regulated via different combinations of serotonin receptors in the nematode Pristionchus pacificus
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	Max Planck Institute			
米国	California State University, Northridge			