

59. 酸化ストレスに応答する表現型多型の制御機構

広島大学大学院統合生命科学研究科 准教授 奥村 美紗子

概要

生物の表現型は遺伝子型だけでなく、環境の影響も受ける。同じ遺伝子型でも環境によって異なる表現型を示す「表現型可塑性」があり、特に不連続な変化を示す場合を「表現型多型」という。しかし、発生過程での光環境や酸化ストレスが形態や健康に与える影響の全貌は未解明である。本研究では、幼虫期の環境に応じて口腔形態に多型を示す線虫 *Pristionchus pacificus* をモデルとした。私たちは *P. pacificus* の表現型多型決定に関わる新しい環境因子として、幼虫期における光環境や酸化ストレスを見出した（未発表データ）。*P. pacificus* は光を感知することはできるが、既知の光受容体を持たず、光感知メカニズムは解明されていない。まず、光忌避行動を用いた順遺伝学的スクリーニングにより、*P. pacificus* では cGMP 経路や GPCR キナーゼが光応答に必須であることを明らかにした (Nakayama et al. 2024)。その過程で、G タンパク質解析により G β , G γ サブユニットが光順応に関与することを見出した (Manabe et al. 2025)。cGMP 経路の変異体において口腔形態多型を調べたところ、cGMP 経路が口腔形態決定に関与することを見出した。さらに、RNA-seq 解析により、光照射条件では薬物代謝・酸化ストレス関連遺伝子が誘導されることが判明した。光照射による活性酸素種(ROS)の影響を検証するため、化学物質により ROS を増加させたところ、光照射と同様に多型に影響がみられた。また、抗酸化物質を添加すると光照射による影響が抑制された。これらの結果から、光照射による ROS 上昇が表現型多型を引き起こす可能性が示唆された。

本助成金により、実験に必要な消耗品などを購入することができ、円滑に研究を進めることができた。改めて感謝申し上げます。

背景および目的

「氏か育ちか」と古くから言われるように、生物の表現型の決定には遺伝子型だけでなく、生物が育つ環境も重要である。同じ遺伝子型であっても環境に応じて異なる表現型を示すことを表現型可塑性という。ヒトでは、胎児期や乳幼児期の環境が、将来の健康や疾患のなりやすさに影響することも報告されている。

本研究では、発生過程での環境要因として、光環境やそれに伴って発生する活性酸素(ROS)に着目する。過剰な ROS の産生による酸化ストレスは、がんや神経変性疾患など様々な疾患への関与が知られており、ROS に対して適切に応答することは生物の生存にとって必須である。一方で、発生過程における光環境や酸化ストレスが、発生や将来的な疾患や健康に対しどのように影響するか、その全貌は解明されていない。

本研究では発生過程の環境による形態形成への影響を明らかにするために、表現型多型を示す線虫 *Pristionchus pacificus* (以下、*P. pacificus*) をモデルとして用いた。表現型多型は、同じ遺伝子型を持っていても、生育環境に応じて異なる不連続的な表現型を示す生物の特性であり、生物の環境応答の顕著な例と言える。表現型多型の具体的としては、社会性昆虫のカースト形成や爬虫類の温度依存的な性決定などが知られている。*P. pacificus* は体長 1 mm ほどで飼育が容易であり、生活環が 4 日間と短い。ゲノム配列の解読や遺伝子導入、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術などの遺伝学的ツールも開発されている (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* は成虫において 2 種類の口腔形態を持

つ。同じ遺伝子型であっても幼虫期の環境により、大きな歯を2つ持ち口の幅が広い「幅広型」か、1つの歯しか持たず口の幅が狭い「狭小型」のいずれか一方の口腔形態をとる(図1)。

私たちは *P. pacificus* の表現型多型決定に関わる新しい環境因子として、幼虫期における光環境や酸化ストレスを見出した(未発表データ)。*P. pacificus* は光を感知することはできるが、既知の光受容体を持たず、光感知メカニズムは解明されていない。本研究では *P. pacificus* の表現型多型を用いることで、「酸化ストレスに応答する表現型多型の分子・神経制御機構の解明」を目指した。

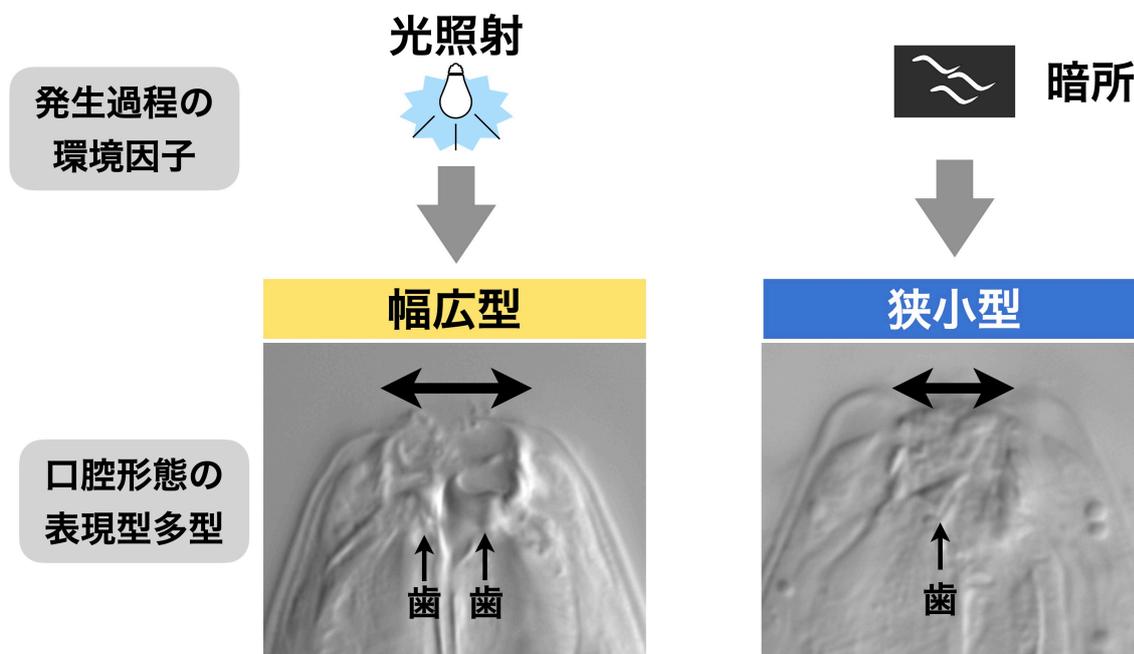


図1. *P. pacificus* は口腔形態に表現型多型を示す

1、線虫における光伝達経路の解明

光は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。動物では光受容体としてロドプシン(Gタンパク質共役型受容体(GPCR)であるオプシンと発色団レチナールの複合体)やクリプトクロムが知られている。本研究で取り扱う線形動物(線虫)では眼に相当する器官が存在せず、ゲノム中にオプシンやクリプトクロムを持たないが(図2)、光に対して忌避行動を示す(Plos Biol. 6. e198. 2008; Nat Neurosci. 11. 916-922. 2008; Int J Biol. 9. 51-55. 2017)。近年、線虫における光感知メカニズムを解明するために、線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた順遺伝学的スクリーニングが行われ、動物における第3の光受容体として LITE-1 が同定された(Plos Biol. 6. e198. 2008; Cell. 167. 1252-1263. 2016)(図2)。しかし、既知の約3万種の線虫のうち、LITE-1は *C. elegans* の近縁種(約50種)でしか確認されていない。そのため *P. pacificus* は異なる光受容機構をもつと考えられる。本研究では、まず *P. pacificus* がどのように光を感知しているのか、その分子メカニズムの解明を目指した。

その他の線虫種はどのように光を感知しているのか？

		オプシン	クリプトクロム	LITE-1	第4の 光受容体
他の動物 (ヒトなど)		あり	あり	なし	?
<i>Caenorhabditis elegans</i>		なし	なし	あり	?
<i>Pristionchus pacificus</i>		なし	なし	なし	あり?
<i>Meloidogyne incognita</i> (サツマイモネコブセンチュウ)		なし	なし	なし	あり?

図2. 動物における第4の光受容体を線虫はもっている可能性がある

前進運動する線虫の頭部や体全体に光を照射すると、後退運動を示す。この行動を光忌避行動と呼ぶ。*P. pacificus* が光忌避行動を示すか調べた結果、*P. pacificus* は光の強度や波長に依存して光忌避行動を示し、特に紫外光や青色光を感知できることを見出した(図3)。

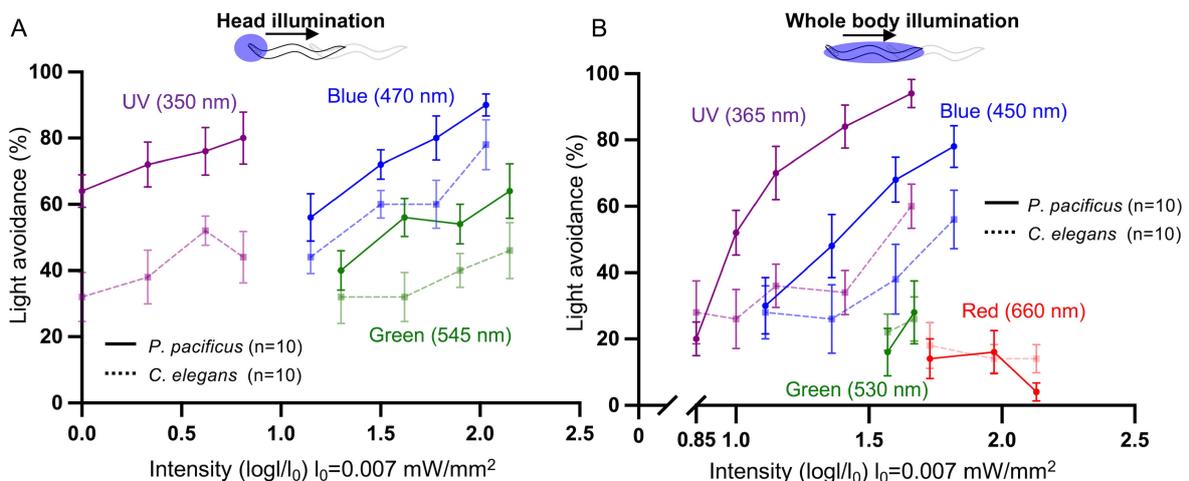


図3. *P. pacificus* は短波長の光に対し忌避行動を示す

P. pacificus における光感知メカニズムを明らかにするために、光忌避行動を用いた順遺伝学的スクリーニングを行った(図4)。メタンスルホン酸エチル(EMS)を用いてゲノム DNA 中にランダムに変異を導入し、F₂ 個体 (変異ホモ接合体が含まれる) を用いて表現型の解析を行った。

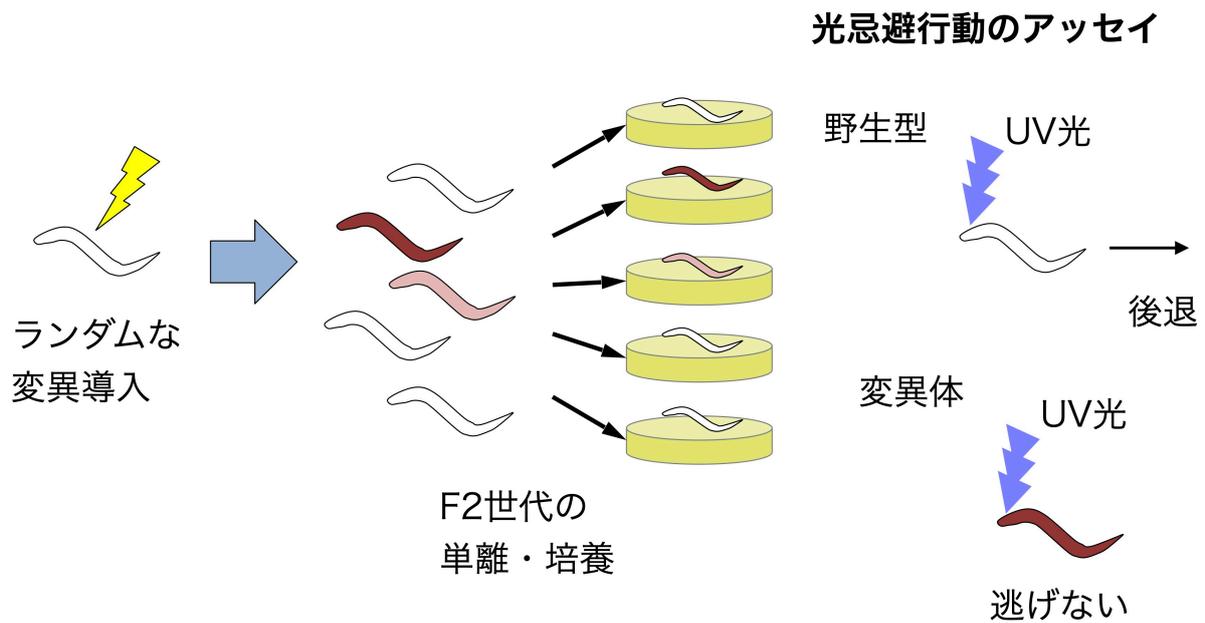


図4. 順遺伝学的スクリーニングの概要

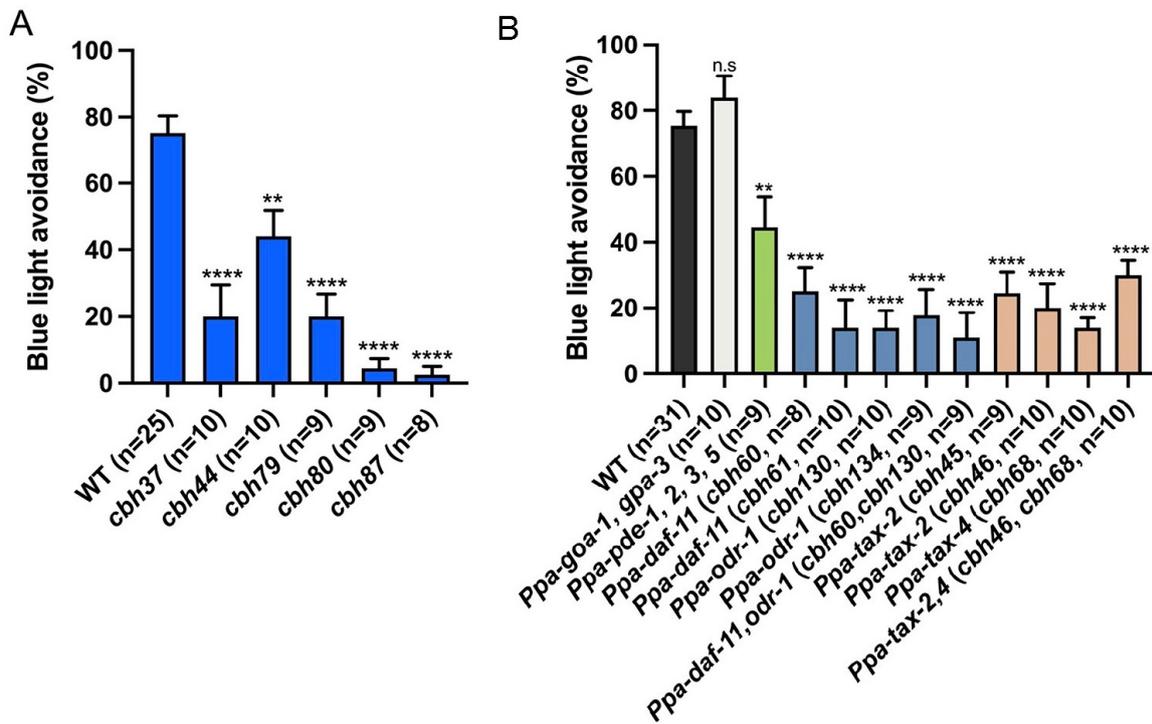


図5. 光忌避行動アッセイの結果

2万系統以上の変異体をスクリーニングし、7系統の光不感変異体の単離した(図5A)。これらの変異体の原因遺伝子を同定するために次世代シーケンサーによる遺伝子解析を行い、5系統について原因遺伝子の同定が完了した。3系統については、グアニル酸シクラーゼ(cGMP合成酵素)をコードする *Ppa-daf-11* に、2系統について

は、GPCR キナーゼをコードする *Ppa-grk-2* という遺伝子に変異が入っていることを見出した。ゲノム編集技術を用いてこれらの遺伝子の変異体を作成したところ、光忌避行動が減少する表現型が見られた(図 5B)。さらに cGMP に関わるその他の遺伝子についてもゲノム編集技術により変異体を作成し、光忌避行動アッセイを行った。その結果、グアニル酸シクラーゼである *Ppa-odr-1*、cGMP 依存性陽イオンチャネル(CNG チャネル)である *Ppa-tax-2* および *Ppa-tax-4*、ホスホジエステラーゼである *Ppa-pde-1, 2, 3, 5* の変異体では光忌避行動が優位に減少することを明らかにした(図 5B)。これらの結果から、*P. pacificus* の光伝達には、cGMP 依存性経路が関与することが示唆される(図 6)。

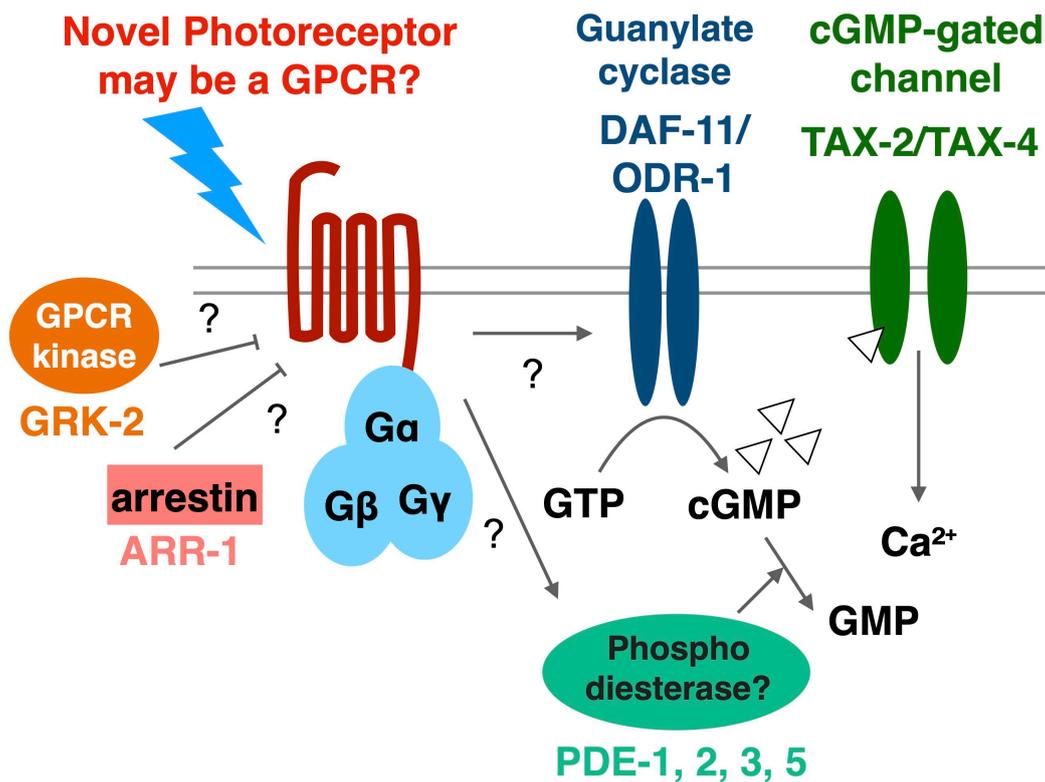


図 6. *P. pacificus* における光伝達経路モデル

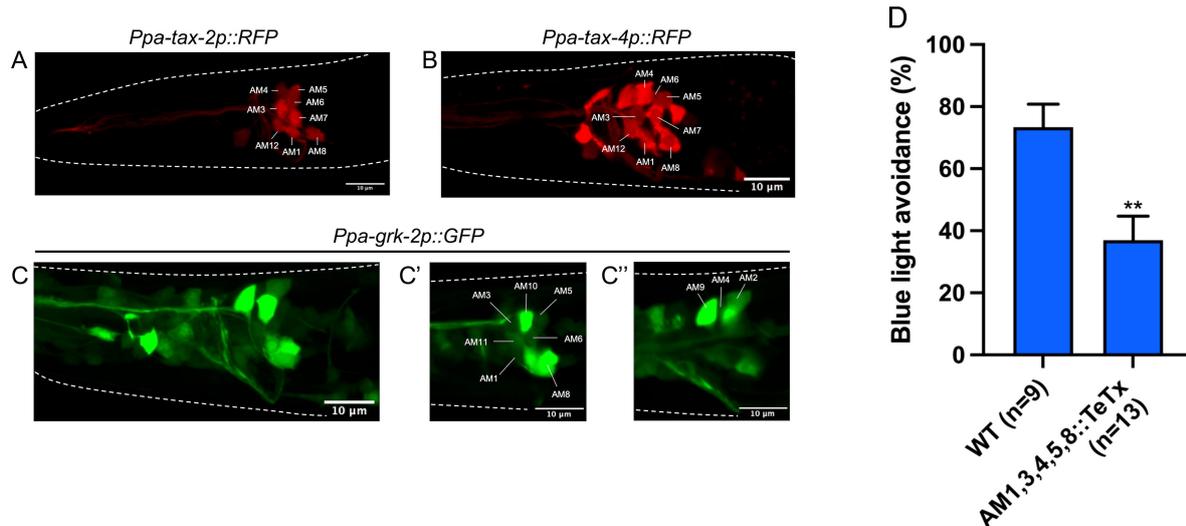


図7. 光忌避行動に関わる感覚神経の同定

次に、光受容細胞を同定するために、光伝達経路に関わる遺伝子(*Ppa-tax-2*, *Ppa-tax-4*, *Ppa-grk-2*)のレポーターシステムを作出した。*Ppa-daf-11*については、先行研究によってすでに発現パターンが報告されているため(J. Exp. Zool. B; 340. 214-224. 2023)、レポーターシステムを取り寄せ発現パターンの確認を行った。その結果、光伝達経路に関わる遺伝子は共通して感覚神経である amphid neuron(AM1, 3, 4, 5, 8)に発現していることを明らかにした(図7A-C)。これらの感覚神経が光忌避行動に必要なか明らかにするために、*Ppa-daf-11*のプロモーター領域を用いて tetanus toxin (Tetx)を発現させるシステムを確立した。Tetx は神経伝達物質の放出を抑制することが可能である。Tetx 発現システムでは、光忌避行動が優位に減少したことから、AM1, 3, 4, 5, 8 細胞が光忌避行動に重要であることを明らかにした(図7D)。

以上の成果は、PLoS Genetics, 20, e1011320 (2024)として発表することができた。

さらに *P. pacificus* の GPCR キナーゼ変異体では光忌避行動が減少することから、*P. pacificus* の光受容体は GPCR である可能性が考えられる。そのため G タンパク質である $G\alpha$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ の変異体を作出した。これらの変異体では光忌避行動に異常はみられなかったが、光順応に $G\beta$ 、 $G\gamma$ サブユニットが関わることを明らかにした。以上の成果は、Zoological Science, 42, 60-67 (2025)として発表した。

2, 酸化ストレスに応答した表現型多型制御メカニズム

本研究では発生過程における光環境や、それに伴って生じる酸化ストレスによる形態形成への影響を明らかにするために、表現型多型を示す線虫 *P. pacificus* をモデルとして用いた。私達はこれまでに線虫 *P. pacificus* の幼虫期に光を照射すると、幅広型の割合が増加することを見出している(図8)。口腔形態に影響を与える光の波長を調べたところ、青色光もしくは白色光の照射により幅広型の割合が増加したが、赤色光では変化はみられず、短波長側の光が特に口腔形態に影響することがわかった。また24時間の連続照射でも、12時間明暗条件でも同様に幅広型の割合が増加した。発生過程における光照射時期については、幼虫期3日目での光照射が優位に幅広型を増加させたが、幼虫期全般に渡って光照射をした場合のほうが幅広型の増加は大きいことがわかった。そのため、発生過程全般にわたって12時間明暗条件で光を照射し、成虫において口腔形態の観察を行うこととした。

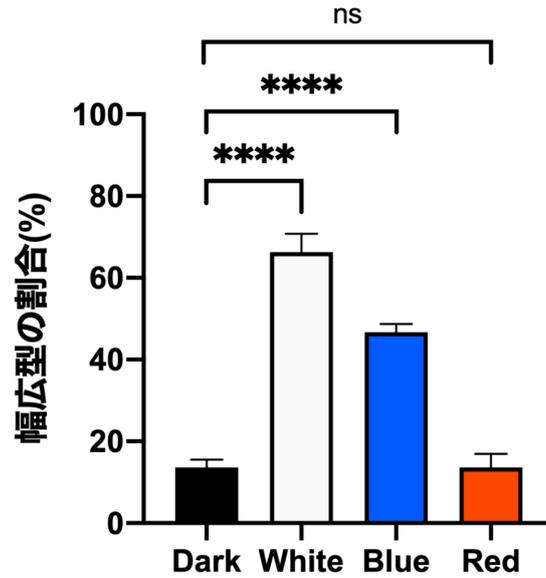


図 8. 幼虫期の青色光, 白色光の照射により幅広型の割合が増加する

先行研究により口腔形態の表現型多型決定に関わる遺伝子が複数同定されている(Nature. 466. 494–497. 2010; Cell. 155. 922–933. 2013; Curr Biol. 26. 2174–2179. 2016; Nat. Commun. 7. 12337. 2016; Cell Rep. 23. 2835–2843. 2018; Nat. Commun. 9. 4119. 2018)。スイッチ遺伝子として機能する *Ppa-eud-1* の変異体では、光照射を行っても幅広型の割合は増加せず、*Ppa-eud-1* は幅広型の増加に必須であることがわかった。また、飢餓ストレス時の幅広型の増加に重要な核ホルモン受容体である *Ppa-daf-12* の変異体では、光照射によって幅広型の割合が増加し、光に応答した幅広型の増加には *Ppa-daf-12* は必要がないことが明らかになった。これらの結果は、環境要因によって異なるシグナル伝達経路が口腔形態の表現型多型に関わっており、それらの情報が、統合され最終的な形態の決定に寄与すると示唆される。

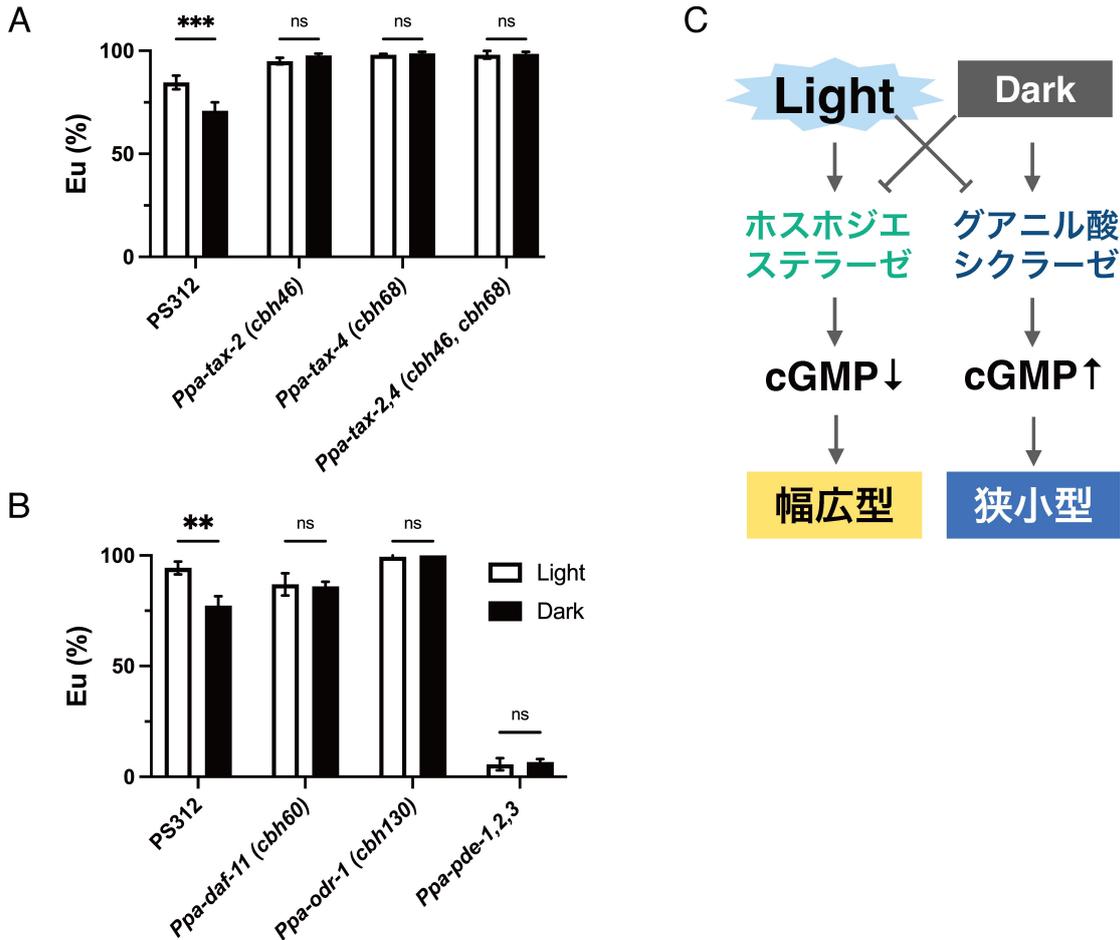


図 9. cGMP 経路による口腔形態の制御

次に、光伝達経路が口腔形態の決定に関わるか明らかにするために、前述の変異体の口腔形態の解析を行った。グアニル酸シクラーゼ(*Ppa-daf-11*、*Ppa-odr-1*)、CNG チャネル(*Ppa-tax-2*、*Ppa-tax-4*)の変異体では、明暗条件ともに高い幅広型の割合を示した(図 9A, B)。一方で、cGMP の分解に関わるホスホジエステラーゼ(*Ppa-pde-1*、2、3)の変異体では、明暗条件ともに狭小型の割合が増加する傾向がみられた(図 9B)。これらの結果から cGMP の量依存的に口腔形態の決定がなされている可能性が考えられる(図 9C)。

さらに光環境による口腔形態多型決定に関与する分子群を同定するために、光条件に晒した際の網羅的な遺伝子発現解析を行った。暗条件で飼育した場合と、12 時間明暗条件で飼育した 4 齢幼虫から RNA を回収し、次世代シーケンサーによって RNA シーケンス解析を行って発現変動遺伝子を同定した。それらの遺伝子の Gene Ontology 解析を行ったところ、薬物代謝や酸化ストレスに関わる遺伝子の発現が光照射によって増加することを見出した。

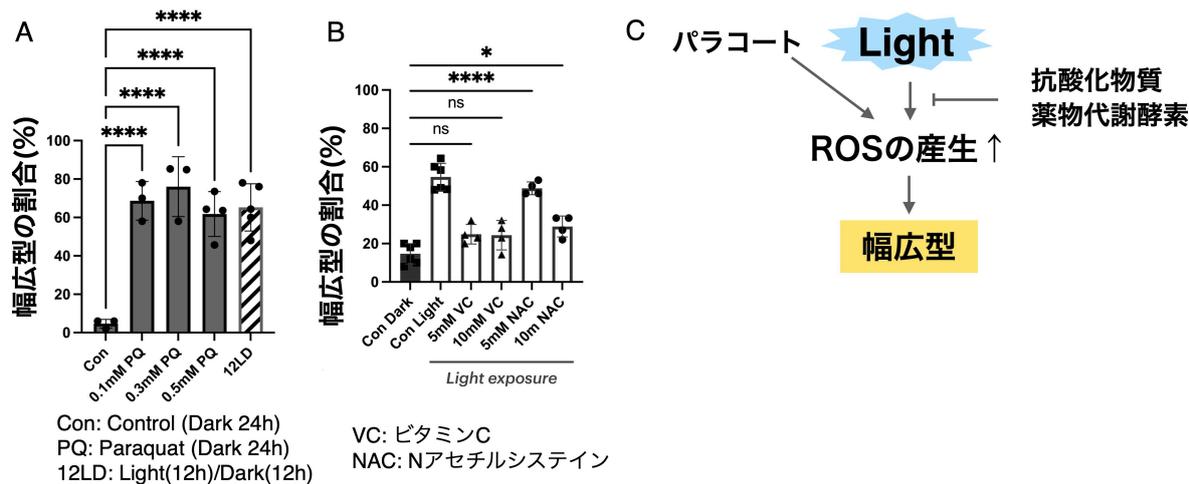


図 10. 酸化ストレスが表現型多型に影響する

RNA-seq 解析の結果より、光照射によって生じると考えられる活性酸素種 (ROS) が口腔形態に影響している可能性があると考えた。そこで ROS を発生させるパラコートを与えた際の口腔形態の解析をおこなった。パラコートを加えた培地を用いて線虫を暗闇で飼育すると、光照射時と同様に幅広型が増加した(図 10A)。一方で抗酸化物質であるビタミン C および N アセチルシステイン(NAC)を培地に加えることで、光照射の効果が抑制されるか検証を行った。その結果ビタミン C や高濃度の NAC を添加した場合、光照射による幅広型の増加が抑制された(図 10B)。さらに、薬物代謝酵素を誘導する核移行受容体の変異体、過酸化水素を分解するペルオキシダーゼの変異体においても、幅広型の増加がみられた。また、RNA-seq 解析で光により発現上昇がみられた ABC トランスポーターの変異体においても、幅広型の増加がみられた。

これらの結果は、光照射により ROS が増加することで、幅広型が増加する可能性を示唆する。RNA-seq の解析では、薬物代謝酵素の発現が光照射により増加しているが、候補遺伝子の変異体でも幅広型が増加している。薬物代謝や酸化ストレス応答に関わる因子の変異体では、暗闇の状態でも ROS のレベルが増加しており、幅広型が増加する可能と考えられる(図 10C)。今後 ROS レベルと口腔形態との相関関係や、抗酸化酵素の過剰発現の解析により、ROS による表現型多型制御メカニズムの解明を行う予定である。

まとめと展望

本研究では、cGMP 経路が光伝達および口腔形態の多型決定に関わることを明らかにした。線虫 *P. pacificus* における光伝達経路は、モデル線虫である *C. elegans* と保存されている部分と、そうでない部分があることがわかり、動物における光感知メカニズムの多様性を示唆している。今後、*P. pacificus* における光受容体を同定し、その保存性を確認する。様々な種において同定する光受容体が保存されていた場合、光による新たな生理機能の制御の解明につながると期待する。

本研究では、発生過程における光環境が発生過程にどのように影響するのかを、線虫の口腔形態の表現型多型をモデルとして用いることで解明することを目指した。その結果、光照射による活性酸素種の増加が、口腔形態に影響している可能性を見出した。近年増加している不妊治療の際には、卵子や精子が光にさらされるため、酸化ストレスを受けている可能性がある。実際にマウスの受精卵を光にさらすことで、ROS が発生し、細胞死の増加や発育率の低下を引き起こすことが報告されている(Proc Natl Acad Sci USA. 104. 14289-14293. 2007)。日本において体外受精、顕微授精などが始まったのは 40 年ほど前であり、今後疫学調査が進むことで、成人における疾患との関わりが示される可能性もある(Healthcare. 4. 51. 2016)。本研究で得られる基礎的な知見を、将来的に哺乳類などの他の動物種にも拡大することで、胎児や幼児期における適切な光環境条件、抗酸化物質などを見出し、健康・医療の質の向上に向けたシーズの創出につながると期待している。

(完)

発表論文

- 1) Nakayama, K., Hiraga, H., Manabe, A., Chihara, T., Okumura, M., “cGMP-dependent pathway and a GPCR kinase are required for photoresponse in the nematode *Pristionchus pacificus*”, PLoS Genetics, 20, e1011320 (2024)
- 2) Manabe, A., Ko, K., Nakayama, K., Chihara, T., Okumura, M., “The Nematode *Pristionchus pacificus* Requires the G β and G γ Proteins for Light Adaptation But Not For Light Avoidance”, Zoological Science, 42, 60-67 (2025)