

有櫛動物クシクラゲを用いた原始的な視覚処理メカニズムの解明

Revealing primitive visual processing mechanisms in ctenophore

所属機関： University of Exeter

代表研究者氏名： 城倉 圭

研究期間： 2023年9月18日～2023年11月20日

区分： 個人 A

滞在研究機関： Michael Sars Centre, University of Bergen,
Thormøhlens gate 55, 5006 Bergen, Norway

共同研究者等： Dr. Pawel Burkhardt

Ctenophores, the most primitive group among metazoans, possess a unique nervous system. The aim of this study is to elucidate the signaling mechanisms between the light-sensitive photoreceptors in the visual system and the ciliated cells controlling swimming in ctenophores. Ultimately, by comparing the molecular-level commonalities and peculiarities of these mechanisms with the neural networks of other metazoans, the research seeks to comprehend the signal integration mechanisms in multicellular evolution.

海外研究活動概要

クシクラゲは名前に「クラゲ」と入っているが、分類としてはクラゲ類が属する刺胞動物とは別の「有櫛(ゆうしつ)動物」と呼ばれる動物群である。クシクラゲ類の多くは体表に虹色に輝く櫛板と呼ばれる複合繊毛を持っており、8列の櫛板列を成している。クシクラゲは櫛板の繊毛運動によって水流を生み出し、姿勢や遊泳方向を制御している。クシクラゲ類のカブトクラゲの行動を観察していると、口を上向きにして水面で漂ってるフェーズと口を下向きにして底でじっとしているフェーズの大きく分けて2種類の行動パターンがある。これは重力方向に対する正または負の応答ととらえることができる。クシクラゲ類の多くは口の反対側に重力を感知する平衡器官を持っている。平衡器官は小さな細胞が集まった平衡石と4本の繊毛の束(バランスー)がそれを支える支柱のように伸びている。重力によって平衡石が傾くことでバランスーが曲げられ、重力方向を検知する。バランスーの振動は繊毛の波として櫛板に伝えられる。研究代表者は明暗条件によってバランスーの振動パターンに違いがあることを見つけ、光刺激が行動を決定するための重要な情報の一つになっていると考えた。

クシクラゲの研究ができる場所は、その飼育の難しさから世界中見渡しても片手で数えられるほどである。ノルウェーのベルゲン大学にある Michael Sars センター

の Pawel Burkhardt 博士の研究室にはクシクラゲ専用の飼育施設があり、安定した室内飼育システムを確立している。そこではカブトクラゲの近縁種の *Mnemiopsis leidyi* が現在までに30世代ほど継代されている。*M. leidyi* は、有櫛動物の中で最も生物学的情報が蓄積されており、全ゲノム情報が公開されている。本研究の目的はクシクラゲ類の *M. leidyi* を用いて、重力感覚を調節している光受容体の分子実体を明らかにすることである。

成果

① 光受容タンパク質オプシンの同定

後生動物で広く保存されている光受容タンパク質のオプシンは7回膜貫通ドメインを持った G タンパク質共役型受容体に分類される。Pfam データベースから隠れマルコフモデルによって生成された7回膜貫通ドメインの多重配列アライメントを用いて、*M. leidyi* を含んだ5種の有櫛動物のトランスクリプトームデータとそのほかの後生動物45種のトランスクリプトームデータを用いてクラスター解析を行った。その中からオプシンのクラスターに含まれる配列を用いて分子系統樹を作成したところ、有櫛動物には、繊毛型オプシクレードと花虫綱型オプシン2クレードと単系統群を成す2種類のオプシンがあることが分かり、これらをオプシン1、オプシン2と名付けた。

② 平衡器官における光受容細胞の同定

光に対する応答性を持つ受精後5日の幼生に対して、2種の *opsin* 遺伝子について *in situ hybridization chain reaction* 法を用いて、平衡器官に発現している遺伝子を調べたところ、*opsin2* が平衡器官内の4つの細胞群で特異的に発現していることが分かった。そこで *M. leidyi* のオプシン2の細胞内第3ループ領域に対する抗体を作成し、免疫染色を行ったところ、4本のバランス細胞それぞれの基部領域に近接している4つの細胞群の細胞内繊毛領域に局在することが分かった。

③ CRISPR/Cas9 による *opsin2* 遺伝子ノックアウト

オプシン2の機能を調べるために CRISPR/Cas9 を用いた *opsin2* のゲノム編集を行った。CHOPCHOPを用いて *opsin2* の Exon1 領域に gRNA を設計し、Cas9 タンパクとともに *M. leidyi* の受精卵にマイクロインジェクションを行った。オプシン2抗体を用いた免疫染色によって表現型を Cas9 タンパクのみをマイクロインジェクションしたコントロール幼生と比較したところ、約25%の幼生でオプシン2のシグナルが完全になくなっている、または

一部でなくなっていることがわかった。

④ F0 Crispants のジェノタイプング

免疫染色によるオプシン2のシグナルを確認後、それぞれの個体からゲノム DNA を抽出し、Exon1 領域を増幅させ、PCR 産物から配列を決定した。PCR 産物中の挿入と欠失 (indel) の割合を ICE によって解析したところ、免疫染色でオプシン2のシグナルが消えていたサンプルにおいて 18~87% の indel 割合を得ることができた。

今後の展望

今後は今回確立した CRISPR/Cas9 を用いた F0 Crispants の系を用いて明暗条件における行動の解析を行い、重力方向に対する行動変化に光受容細胞がどのような機能を果たしているのかを明らかにしていくつもりである。また今回 CRISPR/Cas9 によってランダム配列が挿入されることが分かったので、今後は特定の外来遺伝子を導入して、トランスジェニックシクラゲの作製も進めたいと考えている。