

## 「光による消化管形成制御機構の解明」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：谷口 俊介

## 1. 研究のねらい

本研究では、これまでの研究により得られた、“光→消化管形成と機能” “脳→消化管形成と機能” “光受容物質が脳に発現”、の3つのポイントを実際に生体内で有機的に結びつける経路を明らかにすることを通じて、光という input に応答して動物の胚・幼生が消化管を形づくり正常に機能させるという新規経路の正確な描写と参画要素の機能解明をねらいとした。具体的には、体が非常に透明で、生きたままでも消化管を外側から丸ごと観察することができるウニ幼生を用いて、1) input である光を脳がどのように処理をするのか理解する。つまり、光刺激に対して反応する脳神経細胞やそのネットワークを明らかにする。次に、2) 脳から消化管へのシグナル経路の分子実態を明らかにする。ここでは、「脳と消化管という離れた組織同士のコミュニケーション」が何者であるのかを具体的な言葉で描写することを目的とする。光に応答する消化管内の組織の識別に加え、消化管の細胞に存在する脳からの情報受容システムの同定も行う。最後に、3) 消化管へ辿り着いた細胞外の情報を消化管機能や細胞分化への細胞内の情報伝達へと変換し、伝達する細胞内のシステムを明らかにする。これらを統合して、光刺激を解釈した脳がどのように消化管の機能と形成を制御しているのか、その生命動態を丸ごと明らかにする。

## 2. 研究成果

## (1) 概要

本さがけ研究では、光と消化管の形成と機能の関係性をテーマに以下のサブテーマを主にバフンウニ幼生を用いて展開した。また、いくつかは現在も進行中である。

「光による幽門開口の制御機構」

「ウニ幼生の脳構造の詳細な観察とその形成機構の解析」

「光による消化管形成の制御機構」

「ロックアウトウニの作製による光応答メカニズムの理解」

光応答としての幽門の開口機構に関しては、詳細な観察を地道に続けることによって偶然発見することのできた生命現象を科学の言葉で説明づけることができた。

光応答を担う脳の発生過程を axon の伸張やネットワークに着目しながら観察することを試みた。この成果によって、光応答に関して漠然と光受容細胞が大事であり脳が大事であると提案されていた分子経路に対し、詳細な説明を加えることが可能となった。

明暗サイクルの違う条件下で飼育したウニ幼生の消化管活動が見せる光応答に違いがあるため、光が消化管形成を担っていることが強く示唆されている。そこで、明暗サイクルに差をつけた個体間で全遺伝子の網羅的な比較を行っており、現在差を生み出す候補を絞りつつある。本テーマはさがけの同領域内の一期生である露崎博士と共同研究を展開している。

ウニの光応答の研究も遺伝学的に解析する必要性を感じたが、ウニのノックアウト系統作製には世界中で誰も成功していなかった。そこで、生殖サイクルの早いハリサンショウウニを偶然発見したことをきっかけに、外見から成否を判断しやすいアルビノウニを作製することにチャレンジした。CRISPR-Cas9 を利用し、ターゲット遺伝子である Pks1 を破壊したウニを系統飼育することで F2 の homozygous knock-out ウニを作製することに成功した。これはウニを用いても完全ノックアウトを作製することが可能であることを示した世界初の成果であり、今後光応答を担う分子のノックアウト作製の礎となる技術である。

## (2) 詳細

研究テーマ「光による幽門開口の制御機構」

強い光（太陽光の半分程度）を照射することで、ウニ幼生の幽門開口が約2分後に誘導されることを継続した観察により発見した（図1）。そこで、体のどの組織が光＞幽門のシグナル伝達を担っているのかを明らかにするため、脳と腕それぞれを顕微操作により切断した。その結

果、脳領域を切断した個体では、光＞幽門シグナルは見られなかった。次に、脳に発現しているセロトニンおよびその近傍細胞にある Go-Opsin の発現をそれぞれノックダウンしてシグナル伝達をチェックした。その結果、セロトニンおよび Go-Opsin は光＞幽門シグナルに必要であることが明らかになった。Go-Opsin ノックダウンはセロトニンの追加で rescue できることから、光＞Go-Opsin＞セロトニン＞幽門のシグナル伝達

が明らかになった（図2）。さらに、幽門付近にある一酸化窒素(NO)神経の活動を NO 合成酵素のノックダウンにより、NO がこの経路に必要であることを示した。以上より、光＞幽門開口のシグナル伝達経路の詳細を明らかにした。この成果は光が消化管活動を制御している強い証拠を示すとともに、棘皮動物における光応答の経路を初めて示したものになった。これらの内容は論文として公表することができたこと、また、棘皮動物界における光応答の研究に道筋をつけることができたため、さきがけ研究の目標を達成したものとなっている。

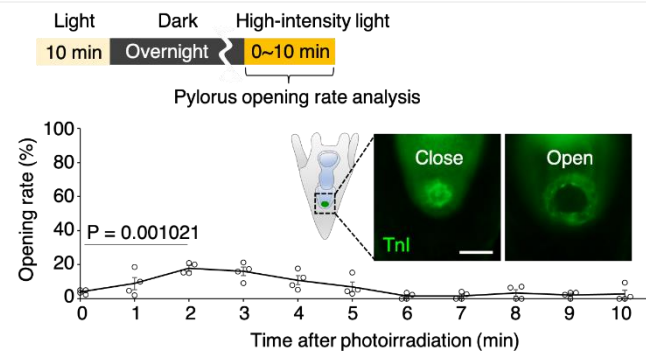


図1：光の照射によりウニ幼生の幽門が約2分後をピークに開口する

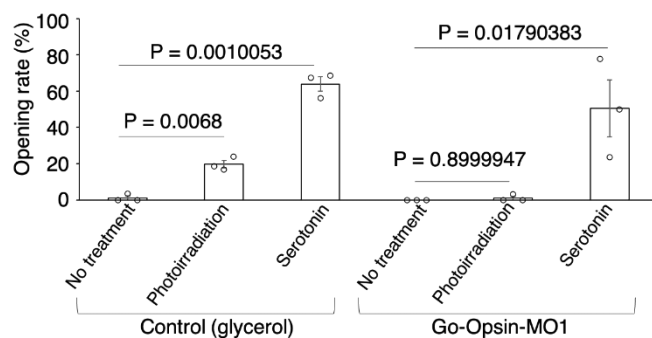


図2：Opsin3.2 (Go-Opsin)ノックダウン幼生では光による幽門開口は見られない。また、その現象はセロトニンの付加で rescue される。

#### 研究テーマ「ウニ幼生の脳構造の詳細な観察とその形成機構の解析」

光応答として幽門開口の制御を担う光受容体として脳に発現する **Go-Opsin** が同定された。また、その下流で幽門へシグナルを伝達している物質として脳のセロトニンの機能が示された。しかしながら、**Go-Opsin** 細胞とセロトニン神経の位置関係すなわち脳の構造がはっきりとわからなかったため、**Go-Opsin**→セロトニン神経のシグナルが直接的であるのか間接的であるのか判断がつかなかった。そこで、ウニ幼生の脳構造を神経の並びとその発生過程に着目して詳細に調べた。まず、成熟した脳の中で背側に並ぶセロトニン神経と腹側に並ぶアセチルコリン神経が発生過程でどのように位置を決めるのかを観察した。その結果、セロトニン神経とアセチルコリン神経はまず脳の中で左右軸に沿って一列に並んで分化することが明らかになった。この際、**Delta-Notch** が媒介する **lateral inhibition** (側方抑制) により、お互いの神経細胞は決して隣り合わせに並ばないことが明らかになった。一列に並んだセロトニン神経とアセチルコリン神経の細胞体はその後、発生が進むにつれて徐々に位置する列に違いが出てくる様子が観察された。具体的には、セロトニン神経は脳領域の背側に位置し続けるが、アセチルコリン神経は腹側へと細胞体の位置がシフトしていった。その結果、脳の中で背側にセロトニン、腹側にアセチルコリンの神経細胞がそれぞれ並行して存在することが明確化された。このシフトに関しては、細胞体が移動しているというよりは周囲の非神経細胞の分裂などの現象により相対的に動いているように見られるが、その詳細なメカニズムに関しては今後の研究により明らかになると思われる。

#### 研究テーマ「光による消化管形成の制御機構」

本さきがけ研究を計画立てるにあたり、最も強い根拠となった光による消化管形成と機能の制御のうち、機能に関しては複数の証拠とその機能を発揮する経路の詳細が明らかになりつつある。しかし、光が消化管の形成に与える影響は定量化されておらず、その仕組みも一切わかっていない。そこでまず、光の有無により発生過程に影響があることを示すために、明暗をそれぞれ12時間ずつ繰り返すサイクルで飼育を行い、受精後5日目にウニ幼生を回収後 **RNA-seq** を行った。そこで、明暗をつけたものとずっと暗条件下におかれたものを比較して差のある遺伝子発現を検出した。その結果、明暗をつけたものの方が有意に発現量の上がる遺伝子をいくつか単離しており、現在それらの結果が妥当であるのかどうかを解析している。

#### 研究テーマ「ノックアウトウニの作製による光応答メカニズムの理解」

光応答メカニズムを遺伝学により解析することを試みることを計画した。そのために上記成果で幽門の開口に関与していることが示された **Opsin3.2** ノックアウトウニの作成を **First choice** としたが、ウニを用いて世代を回してノックアウトを作った報告がこれまでなく、そもそも世代を回して研究実施した例そのものがウニ業界になかった。そこで、私が新しくモデル動物化を試みているハリサンショウウニ *Temnopleurus reevesii* を用いて、(a)世代を回して、(b)ノックアウトを作成することに挑戦した。

(a)世代を回すことに関しては、2013年よりチャレンジしていて、現在までの継続で16代目まで成功している。

(b)ノックアウト技術の応用が可能かどうか、まずは検証のために体の色素を合成する遺伝子

の polyketide synthase 1 (Pks1) のノックアウトを試みた。Pks1 のノックアウトはアルビノになるは  
ずであり、外見から判別できるため、最初のチャレンジとしては容易であった。CRISPR-Cas9  
システムを利用し、世代を回すことで、Pks1 遺伝子の一部分を欠損した白いウニ (F2) を作成  
することができた (図3)。ハリサンショウウニを用いることで、確実にノックアウト系列を維持でき  
ることが証明されたため、Opsin3.2 ノックアウトウニ作製を今後試みる。

なお、本テーマは日本ゲノム  
編集学会会長である広島大学  
の山本卓教授および遺伝研の  
池尾准教授のグループと共同  
研究を行なっている。さらに、ウ  
ニへのゲノム編集は育種の領域  
においても発展の可能性を秘  
めているため、JST の別プロジェ  
クトである A-Step (発展型) の分  
担者として研究を展開してい  
る。



図5 Pks1 のノックアウトによりアルビノになっ  
たハリサンショウウニ (手前)。奥は近交系の個体。

### 3. 今後の展開

本さがけ研究の推進により、発生過程において光が消化管の活動に明確な影響を与えて  
いることがそのシグナル経路とともに明らかになりつつある。さらに、光の有無で発生期の発現  
遺伝子に差が見られることから形態形成過程においても光が影響していることは強く示唆され  
る。今回は体が透明であり消化管を外からダイレクトに観察することが可能なウニ幼生を用い  
たからこそ、他の動物では見られない現象を発見し解析することができた。今後は、他の光応  
答現象の発見を継続しながらその仕組みをの解析を次の3年をかけて行い、光による  
幼生の制御に新たな知見を加える。また、今回発見したものを含めて、これらが全ての動物種に  
共通の現象であるのか、また、その現象を担う仕組みが同じであるのかを解析していく。その  
際、特に我々ヒトを含む哺乳類でも同様の現象が見られるのかどうかを検証することは社会に  
とって重要である。例えば、光により幽門の開口を誘導できるのであれば、幽門開口不全によ  
ってもたらされる新生児の肥厚性幽門狭窄症などを予防できる可能性もある。よって、哺乳類  
を扱う研究者との共同研究により、マウスやヒトの胎児が光による消化管制御を受けているの  
かどうかをさらに次の5年かけて確認する。

以上のように、継続して光応答を観察し続けることで、今回のさがけ研究で報告したような、  
他の動物種では見出しづらい現象をより多く発見・解析することを維持していく。

### 4. 自己評価

ウニの幼生は海洋を漂うプランクトン生活を送っており、太陽の影響を受けて生活するように  
適応している可能性が高いが、今回の研究によりその一端を垣間見ることができた。またそれ  
はウニだけに限らず、地球上全ての動物種でも保存されている可能性が高い現象といえる。  
このように、ウニだからこそ見つけることができた現象に基づき、解析し、その一部結果をさき

がけ期間中に報告できたことは科学を一步前に進めることに貢献できたと思われる。さらに、ウニから我々ヒトも含む哺乳類にまで波及する可能性のある科学的データを取得できたことは、今後共同研究を含めた拡張性を持つ内容であるため、さきがけ研究としては一定の評価に値すると思われる。一方で、すでに発見し解析を始めている他の現象も手元に抱えながらもさきがけ期間中に論文として報告完了できていないものがあることに関しては、進行計画や進捗状況が不十分であると言わざるを得なく反省点である。

本さきがけ研究の成果が認められ、国際学会である **Sea urchin meeting** には日本からの唯一の招待講演者として研究内容を発表したり、フランス **CNRS** からのグラントに採択されフランスを訪れた際には訪問先で部局セミナーに招かれるとともに、周辺の別大学からも講演依頼をされたりするなど、海産動物の光応答分野においてトップランナーの一人として注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 8件

1. **Yaguchi J, \*Yaguchi S. 2021. Sea urchin larvae utilize light for regulating the pyloric opening. BMC Biology. 19:64.**

本研究ではバフンウニの幼生に光を照射してひたすら観察したところ、ウニの幼生が光の刺激を受けると、胃の出口である幽門が開くことを発見した。このシグナル伝達には脳のセロトニン神経や哺乳類の幽門にも存在する一酸化窒素神経が関与していることから、脳腸相関の仕組みが、後口動物の共通祖先で存在していたことが強く示唆された。

2. **\*Yaguchi S, Yaguchi J, Suzuki H, Kinjo S, Kiyomoto M, Ikeo K, Yamamoto T. (2020) Establishment of homozygous knock-out sea urchins. Current Biology. 30; R427-429.**

本研究では、ハリサンショウウニが半年という比較的短い期間で世代を回せることを発見し、その性質と CRISPR/Cas-9 を利用してホモ接合型ノックアウトウニを作製することに成功した。これにより、ウニ研究業界に、分子遺伝学の導入の可能性を広く示す成果となった。この研究成果はのちに光受容体である **Go-Opisin** をノックアウトする際の礎となる。

3. **\*Yaguchi S, Taniguchi Y, Suzuki H, Kamata M, Yaguchi J. (2022). Planktonic sea urchin larvae change their swimming direction in response to strong photoirradiation. PLoS Genet. 18(2): e1010033.**

本研究では、後口動物のうち、繊毛のみで運動するプランクトン性のウニ幼生が、強い光の照射により、遊泳方向を逆転させることを発見した。後口動物では筋肉の動きが大きすぎて表在化しない、小さな繊毛の光反応が後口動物に存在し、機能することを示唆する成果であった。また、この報告は肛門の光応答が **Opisin2** によって媒介されている大きなヒントを与える結果となった。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 1) 総説(査読有) \***Yaguchi S.** (2022). *Temnopleurus reevesii* as a new sea urchin model in genetics. **Dev Growth Differ.** 64, 59-66.
- 2) 著書(査読有) \***Yaguchi S.** (2021) echinoderms: *Temnopleurus reevesii*. In Agnes B and Schierwater B (Ed.) **Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology** (CRC press) 335-339.
- 3) 著書(査読有) \*Kinjo S, Kiyomoto M, Yamamoto T, Ikeo K, \***Yaguchi S.** (2021) Usage of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* database, HpBase. **Methods in Molecular Biology.** 2219:267-275.
- 4) 著書(査読有) \***Yaguchi S,** Morino Y, Sasakura Y. (2020) Development of marine invertebrates. In Inaba K and Hall-Spencer J (Ed.) **Japanese Marine Life** (Springer). 109-124.
- 5) 特別寄稿 谷口俊介(2020)ウニの個体差はなぜ?環境が生育に及ぼす影響 河合塾みらいぶプラス