

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20700290
研究課題名（和文） 線虫の神経回路を介した嗅覚順応における情報伝達の仕組みの解明および新規分子の探索
研究課題名（英文） Analysis of the molecular mechanism of signal transduction and identification of novel molecules in neural circuit-dependent odor adaptation in *C. elegans*
研究代表者
広津 崇亮（HIROTSU TAKAAKI）九州大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号：70404035

研究成果の概要（和文）：

嗅覚順応は、連続した匂い刺激が与えられるとその匂いに対する感受性が低下する現象で2つのタイプが存在する。そのうち神経回路を介した嗅覚順応について、線虫を用いた独自の系によって解析を行い、以下の重要な成果を得ることができた。この順応に中心的な役割を果たすRas蛋白質の活性化動態のライブイメージングに成功した。さらにAMPキナーゼや翻訳制御因子が順応に関与していることを見出した。また匂いシグナルのインプットの仕組みを解明するために、匂いと嗅覚受容体の対応付けを網羅的に行い、受容体候補を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

Animals decrease their sensitivity to continuous odorant stimuli to maintain their high sensitivity to changes in stimulus intensities. This phenomenon is referred to as olfactory adaptation, which occurs at two levels; the peripheral level and the central level. I have analyzed the latter type of adaptation, neural circuit-dependent adaptation, in *C. elegans*. In this study, I succeeded in live imaging of the activity of Ras, which plays major roles in this adaptation. I also found that AMP kinase and a translation initiation factor are involved in the adaptation. In addition, to reveal the mechanism of input of odorant stimuli, I tried to identify olfactory receptors for specific odorants and obtained some candidate receptor genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：嗅覚、線虫、神経可塑性、順応、シグナル伝達経路、グルタミン酸受容体、Ras-MAPK経路

1. 研究開始当初の背景

嗅覚順応は、連続した匂い刺激が与えられると、その匂いに対する感受性が低下する現象で、2つのタイプが存在する。そのうち末梢系の順応は、哺乳類などの系で多くの解析が行われてきた。一方、中枢の神経を含む神経回路レベルで成立する順応については、嗅覚システムにおける意義、重要性は広く認識されているものの、未だほとんど研究がなされていない。その原因としては、神経回路レベルでの解析が必須であり、特に高等生物での解析が困難なことが挙げられる。そこで私は神経回路レベルでの研究に優れた線虫を研究材料とし、独自のアッセイ系を使用して、神経回路レベルで成立する嗅覚順応の分子メカニズムを解明することを本研究の最大の目的とした。

これまでの研究成果により、線虫の神経回路レベルで成立する順応には、嗅覚神経からシナプス入力を受けるAIY介在神経が必須の働きをしており、Ras-MAPK経路が匂い刺激に応答してAIY神経で活性化し、グルタミン酸レセプターのシナプス局在を直接的に制御することにより、順応をコントロールすることがわかってきた。しかし、(1)Ras-MAPK経路の詳細な活性化動態は不明である。(2)順応における匂い情報の伝達において、最初のステップである匂いシグナルのインプットのしくみが全くわかっていない。(3)Ras-MAPK経路の周辺で機能する因子については未解明のままである、といった重要な未解決な点が残っており、これらを解明することが急務であると考えられた。

2. 研究の目的

これまでの成果により、Ras-MAPK経路によるグルタミン酸レセプターの制御が、神経回路を介した嗅覚順応の中心的モジュレーターであることがわかってきた。しかし、Ras-MAPK経路のON/OFFは時空間的に厳密に制御されているが、この経路の詳細な活性化動態は不明である。また順応における匂い情報の伝達において、最初のステップである匂いシグナルのインプットの仕組みという基本的な問題が未解決のままである。そこで、以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1)in vivo ライブイメージングによるRas-MAPK経路の活性の時空間的制御

Rasの恒常的活性化、不活性化が、ともに順応に著しい異常をもたらすことから、RasのON/OFFは厳密に制御されている。また順応が短時間で成立することから、Rasは速いタイムコースで制御されており、時間分解能

の高い系を用いて、ライブで経時的に活性をモニタリングする技術が必要不可欠である。そこで、FRET(蛍光エネルギー移動)を利用したRasの活性化イメージング分子Raichu-Rasを導入し、Rasの活性化動態を、ライブでモニタリングする。

(2)網羅的RNAi法を用いた匂いシグナルのインプットの仕組みの解明

神経回路を介した嗅覚順応を理解する上で、匂いシグナルがどのようにインプットされるのかを知ることは重要である。線虫は、本来誘引性の匂い物質を高濃度にするると忌避行動を示すようになることから、匂いシグナルは濃度などによって異なるレセプター、嗅覚神経に受容されると考えられる(広津、未発表)。しかし、線虫の嗅覚受容体は1つを除いて未だ匂いとの関係が明らかになっていない。そこで嗅覚受容体遺伝子の網羅的RNAiを行い、匂いとそれを受容するレセプターとの関係を明らかにする。

(3)順遺伝学、逆遺伝学的手法を用いた嗅覚順応に関わる新規分子の探索

順応を制御する分子メカニズムを明らかにするために、クローニングが容易なMos1トランスポゾンを用いた改良型スクリーニングや、データベースの情報をを用いた逆遺伝学的解析により、嗅覚順応に関わる新規分子の探索を行う。

3. 研究の方法

(1)in vivo ライブイメージングによる

Ras-MAPK経路の活性の時空間的制御

FRET(蛍光エネルギー移動)を利用したRasの活性化イメージング分子Raichu-Rasを線虫の神経系への導入を試みることにした。この系の最大の特長は、遺伝学的に細胞内に導入できること、生体内で短時間の変化をモニタリングできることであり、線虫ではその特長を最大限に生かすことができる。

Raichu-Rasを構成するRas、Raf、CFP、YFPは哺乳類由来であり、また線虫を含め生体に導入された例はない。Rasは嗅覚順応だけでなく、嗅覚神経において嗅覚受容に関わっていることがわかっていることから(Hirotsumi et al, *Nature*, 2000)嗅覚神経にRaichu-Rasを発現させる実験を既に行い、線虫の嗅覚神経においてRaichu-Rasの発光を確認することに成功している(図1)。そこでこの線虫株を用い、嗅覚神経において匂い刺激に応答したRasの活性化を観察できるかを指標にして、観察系の確立を行った。また、プローブの感度の向上を目指し、プローブの改良や解析系の改良を行った。それらの結果を踏まえて、

ttx-3 プロモーターにより AIY 神経に特異的に Raichu-Ras を発現させて、順応が成立するときの Ras の活性化動態の観察を試みた。

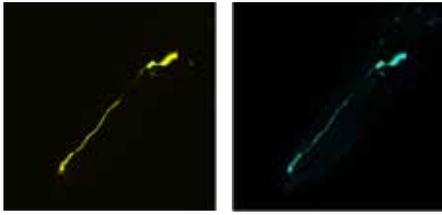


図1 線虫の嗅覚神経における Raichu-Ras の発光
(嗅覚神経では Ras-MAPK 経路は嗅覚受容に關与している)

(2)網羅的 RNAi 法を用いた匂いシグナルのインプットの仕組みの解明

線虫には匂いレセプターの候補遺伝子が約 1000 種類存在し、これらの変異体を全て作製することは困難である。一方簡便に遺伝子機能を破壊できる RNAi 法は、線虫の神経系では効きにくいとされてきた。最近、siRNA 分解酵素である *eri-1* 変異体では、神経系での RNAi の効率が改善することが報告された (Kennedy et al, *Nature*, 2004)。実際に *eri-1* 変異体でジアセチル受容体遺伝子 *odr-10* の RNAi を行ったところ、ジアセチルへの化学走性に異常が見られた。そこで、*eri-1* 変異体を用いて匂いレセプター候補遺伝子の網羅的 RNAi を行い、遺伝子機能破壊株の匂い物質への化学走性を調べることにした。RNAi の手法としては、RNAi ライブラリーを用いた feeding RNAi (二本鎖 RNA を発現する大腸菌を餌として線虫に食べさせる方法) を用いた。匂い物質には、誘引物質、忌避物質、高濃度誘引物質 (忌避を引き起こす) を用い、匂いの濃度に応じた反応するレセプターの違いについても解析を行った。統計的手法によりコントロールと有意差が認められたものに関しては、数回行動解析を繰り返し、候補遺伝子の決定を行った。

(3)順遺伝学、逆遺伝学的手法を用いた嗅覚順応に関わる新規分子の探索

Mos1 トランスポゾンを用いた順応異常変異体のスクリーニング

Mos1 トランスポゾンにより変異を誘起し、順応異常変異体のスクリーニングを行った。Mos1 はショウジョウバエ由来であり、PCR により容易に変異遺伝子の同定ができる。スクリーニングにより得られた候補遺伝子については、発現神経の同定および機能する神経の同定を行った。

逆遺伝学的手法によるデータベースを利用した新規因子の探索

嗅覚順応において、MAPK の直接下流で働く因子を同定するために、MAPK の結合サイトおよびリン酸化サイトの保存部位を持つ蛋白

質を、線虫データベースにおいて検索した。また他の生物種での報告などを元に候補遺伝子の検索も行った。得られた候補遺伝子については、変異体の表現型を解析した。変異体が順応異常の表現型を示したものについては、遺伝子導入による表現型回復実験と発現神経の同定を行った。

4. 研究成果

(1) in vivo ライブイメージングによる Ras-MAPK 経路の活性の時空間的制御

Ra-MAPK 経路は嗅覚神経において、匂い刺激に反応して 10 秒以内に活性化することが、免疫組織染色の結果示されている。そこでまず、Raichu-Ras を嗅覚神経で発現させて、匂い刺激に反応した活性化を観察した。その結果、匂い刺激に反応した Ras の活性化を観察することができた (図 2)。

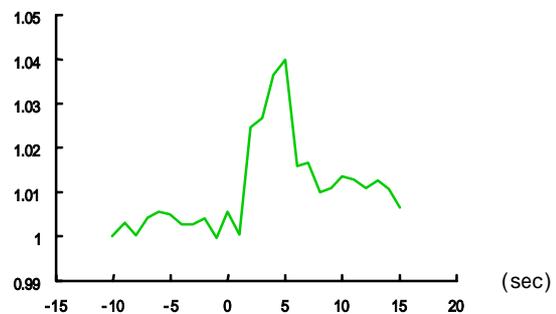


図2 匂い刺激に反応した Raichu-Ras の蛍光変化 (YFP/CFP)

この活性化は、匂い刺激を与えて 3~5 秒後であったことから、以前の結果と一致している。また興味深いことに、匂い刺激がまだ持続しているにもかかわらず、Ras は数秒以内に不活性化することもわかった。さらに、Ras の活性化が匂いの濃度変化に反応していることもわかった。三量体 G 蛋白質や cGMP 依存性チャネルの変異体では、Ras の活性化が見られる頻度が著しく低下した。従って、Ras は匂いシグナル伝達経路の下流で活性化すると考えられる。

以上の結果は、線虫において 1 つのタンパク質の活性化をライブで観察した初めての結果であり、大きなインパクトを与えうる成果である。また、これまでの Ras の活性化のライブイメージングは、培養細胞系において成長因子の刺激により数十分かけて緩やかに活性化する様子を観察したものであったが、線虫の嗅覚系で匂い刺激に反応した Ras の素早い活性化を観察することにより、Ras の新たな活性化メカニズムを明らかにすることができるかもしれない。

ここまでで、匂い刺激に反応した Ras の活性化を観察することはできたが、蛍光変化が

非常に小さく捉えるのが困難であるという問題点があった。そこで、イメージングシステムの改良、匂い刺激を与える手法の変更、Raichu-Ras プローブの改良などを行った。その結果、以前は ratio (YFP/CFP) 変化が 4% 程度だったものが、20% にまで上昇し、シグナルを的確に捉えることが可能になった (図 3)。

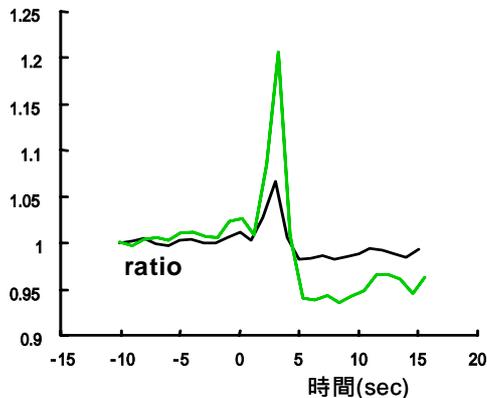


図 3 Raichu-Ras の解析系の改良。匂い刺激に反応した Raichu-Ras の ratio 変化が、以前の解析系では 4% 程度であったのが (黒線)、20% 程度にまで改良された (緑線)

次に、嗅覚順応における AIY 介在神経での Ras の活性化を調べるために、*ttx-3* プロモーターにより Raichu-Ras の発現誘導を試みた。しかし、観察可能なレベルの発現を得ることが困難であった。これについては、遺伝子を導入する時の濃度を細かく振ることにより、最適濃度を見つけ出し、観察可能な株を作製することができた。

(2) 網羅的 RNAi 法を用いた匂いシグナルのインプットの仕組みの解明

線虫のゲノム上に存在する予想嗅覚受容体遺伝子 1276 個のうち、RNAi ライブラリーに含まれていないものなどを除いた 822 遺伝子について feeding RNAi を行い、遺伝子機能阻害株の匂い物質 (11 種類) に対する化学走性を測定した。統計学的手法を用いて解析した結果、少なくとも 1 つの匂い物質に対する走性に異常を示したものは 644 遺伝子であった。これらの候補遺伝子について同様のアッセイを繰り返し行った。3 次スクリーニングまで終えた結果、194 個の候補遺伝子を得ることができた。また全ての匂い物質について、候補遺伝子を得ることに成功した。

これら 194 個の候補遺伝子については、4 次スクリーニングとして遺伝子機能阻害株の化学走性のアッセイを 3 回繰り返し行い、さらに詳細に表現型を解析した。その結果、再現性よく異常を示した株が複数得られ、例えば *srb-1*、*srh-139* RNAi 株は、ペンタジオンへの走性に著しく低下した。これらの遺伝子は、これまで発見されていないペンタ

ジオン受容体をコードしている可能性がある。 *srh-139* は頭部の感覚神経 ADL を含むいくつかの神経で発現していることがわかった。ADL は匂いの受容に関わっていることが既に報告されており、SRH-139 嗅覚受容体が ADL で働いている可能性が示唆される。

また、*sri-14* RNAi 株は高濃度ジアセチルからの忌避行動に再現性よく異常を示した。さらに、既知の変異体 *sri-14(ok2865)* も同様に異常を示すことがわかった。線虫で唯一匂いとの関係が示されている受容体として、ODR-10 ジアセチル受容体が存在する。そこで、*odr-10* と *sri-14* の関係を調べるために、様々な濃度のジアセチルに対する走性を両変異体で解析したところ、*odr-10* 変異体は低濃度ジアセチルへの誘引行動のみに、*sri-14* 変異体は高濃度ジアセチルからの忌避行動のみに異常を示すことがわかった。このことから、ジアセチルの濃度によって受容体を使い分けられている可能性が考えられる。*sri-14* の機能する神経の同定など更なる解析により、匂いの濃度に応じた行動変化が、受容体レベル、嗅覚神経レベル、神経回路レベルでどのように制御されているかを明らかにすることも期待できる。

(3) 順遺伝学、逆遺伝学的手法を用いた嗅覚順応に関わる新規分子の探索

Mos1 トランスポゾンを用いた順応異常変異体のスクリーニング

ヒートショックにより Mos1 トランスポゾンの転移を誘起し、6530 ゲノムについて順応異常変異体のスクリーニングを行った。その結果、138 株の候補株が得られた。そのうち異常の強い 6 株 (*qj79*~*qj84*) について、さらなる解析を行うことにした。この 6 株は、通常の化学走性や、嗅覚神経内で成立する順応 (末梢系順応) は正常であったことから、中枢系順応に特異的に異常を示す変異体であると考えられる。

原因遺伝子のクローニングが容易である利点を生かし、Mos1 の挿入サイトを決定したところ、*qj79* は *sos-1* 遺伝子に挿入があることがわかった。*sos-1* は Ras の GTP 交換因子 GEF をコードしており、陰門形成において Ras を制御することが報告されている。*sos-1(cs41)* 株も順応異常を示したことから、嗅覚順応においても SOS-1 が LET-60Ras の制御を行っていると予想される。

また、*qj80*、*qj81* は *aak-2* 遺伝子に挿入があることがわかった。既存の *aak-2(ok524)* 変異体も順応に異常を示すことから、AAK-2 が順応に関与していることが示唆される。*aak-2* は AMP キナーゼ (AMPK) をコードしている。*aak-2* の発現細胞を調べたところ、頭部神経系を含むいくつかの組織に発現していた。AMPK は体内時計の調節や寿命に関わるこ

とが哺乳類や線虫において報告されているが、神経系での働きはまだよくわかっていない。*aak-2* の嗅覚順応における働きを調べることにより、AMPK の新たな作用機構が明らかになると期待される。また、残りの変異株についても更なる解析を行うことにより、嗅覚順応に関わる新規分子が同定できると予想される。

逆遺伝学的手法によるデータベースを利用した新規因子の探索

MAPK の結合サイトおよびリン酸化サイトをもつ蛋白質や、過去の文献により MAPK の下流で働く蛋白質を検索した結果、98 個の候補を得ることができた。それらの中から、変異体が既に存在するものについて網羅的に嗅覚順応の表現型の解析を行い、少なくとも 4 つの遺伝子の変異体が順応異常を示すことがわかった。そのうち、*ife-2* *cgt-1* は順応に関与している可能性が高い AIZ 神経（順応に必須の働きをする AIY 神経とシナプス結合している）に発現が見られた。*ife-2* 変異体に *ife-2* 遺伝子の導入を行ったところ、表現型の回復が見られたことから、*ife-2* が原因遺伝子であることがわかった。*ife-2* は翻訳制御因子 eIF4E のホモログをコードしており、eIF4E は局所翻訳を制御していることが最近の研究からわかってきている。*ife-2* も同様に、線虫において局所翻訳を制御しているのかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Hayashi Y., Hirotsu T., Iwata R., Kage-Nakadai E., Kunitomo H., Ishihara T., Iino Y., Kubo T. A trophic role for Wnt-Ror kinase signaling during developmental pruning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Neuroscience*, 査読有, 12, 2009, 981-987

Hirotsu T., Hayashi Y., Iwata R., Kunitomo H., Kage-Nakadai E., Kubo T., Ishihara T. and Iino Y. Behavioural assay for olfactory plasticity in *C. elegans*. *Nature Protocols*, 査読無, 2009, 139

Yamada K., Hirotsu T., Matsuki M., Kunitomo H., Iino Y. GPC-1, a G Protein {gamma} Subunit, Regulates Olfactory Adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 査読有, 181, 2009, 1347-1357

[学会発表](計11件)

Hirotsu T., Yamada R., Suzuki A., Uozumi T., Ishihara T. Live imaging of Ras activity in olfactory neurons in *C. elegans*. **International Symposium on Cellular Signaling**, 2009年11月19日 茨城

広津崇亮, 山田龍司, 鈴木暁也, 石原健、線虫の嗅覚神経におけるRasの活性のライブイメージング、**日本神経科学大会**、2009年9月17日、名古屋

Hirotsu T., Yamada R., Suzuki A., Ishihara T. Live imaging of Ras activity in olfactory neurons in *C. elegans*. **International worm meeting**, 2009年6月25日, Los Angeles

Kiriyama K., Hirotsu T., Kamizaki T., Sato N., Ishihara T. Systematic identification of specific receptors for odorants in *C. elegans*. **International worm meeting**, 2009年6月25日, Los Angeles

前田恭介, 広津崇亮, 石原健、線虫 *C. elegans* の神経回路を介した嗅覚順応機構の分子遺伝学的解析、**BMB2008**、2008年12月10日、神戸

広津崇亮, 山田龍司, 紙崎智子, 佐藤則子, 石原健、線虫 *C. elegans* の嗅覚応答を制御するG蛋白質シグナル、**日本神経科学大会**、2008年6月10日、東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~bunsiide/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広津 崇亮 (HIROTSU TAKAAKI)

九州大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：70404035