

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570187

研究課題名（和文）線虫 *C. elegans* の忌避行動を制御するドーパミンシグナル伝達の逆遺伝学的解析研究課題名（英文）Genetic analysis of dopamine signaling that regulates avoidance behavior in the nematode *C. elegans*

研究代表者

木村 幸太郎 (KIMURA KOTARO)

大阪大学・大学院理学研究科・特任准教授

研究者番号：20370116

研究成果の概要（和文）：モデル動物・線虫 *C. elegans* は、忌避匂い物質 2-ノナンオンを嗅ぐとこの匂いを学習して、行動パターンを変える事で遠くまで逃げるようになる。本研究では、*C. elegans* のこの匂い学習が、左右1対の介在ニューロン RIC に対するドーパミンの作用によって制御される事などを明らかにした。本研究の成果は、いまだ不明な点が多い「哺乳類の脳におけるドーパミンの作用メカニズム」の解明に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Avoidance behavior of the nematode *C. elegans* to 2-nonanone is significantly enhanced, rather than reduced, after 1 hr-preexposure to the odor. In this project, we found that the D2-like dopamine receptor DOP-3 is required in a couple of interneurons RIC to regulate the enhancement to repulsive odor 2-nonanone in the animals. Our result may shed light on molecular mechanism of dopamine signaling that plays significant roles in regulating locomotion, emotion and learning in mammalian brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：分子間相互作用、神経機能の可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の中樞神経系において、ドーパミンは知覚・感情・報酬などの制御に関与し、その機能異常は統合失調症や薬物中毒に関与する事が知られている。このような重要な神経伝達物質であるにも関わらず、ドーパミン受容体から下流の遺伝子群がどのように神経細胞活動を制御するかについては、不明な

点が多い。その主たる原因は、ドーパミン受容体の下流遺伝子の解析はその多くが培養細胞などを用いた過剰発現系などによって行われたものであり、実際の神経細胞の状態を反映していない可能性が高いためである。さらに、ドーパミンシグナル伝達系には遺伝子レベルの解析が容易な実験系がほとんど確立されておらず、*in vivo* での解析はノックアウトマウスに大きく依存しているため、

解析が進んでいない。

研究代表者は、*C. elegans* を忌避匂い物質 2-nonanone (以下 2-ノナン) で事前に刺激すると、2-ノナンへの応答行動が増強され、その結果 *C. elegans* が遠くまで逃げるようになるという非連合学習現象を独自に見だしていた (図 1)。「慣れ」や「順応」など非連合学習による感覚応答の減少は、さまざまな実験系において詳細な解析が行われている。これに対して感覚応答の増強は、現象レベルでは幾つかの報告があるが、分子レベルの解析は哺乳類の痛覚受容またはアメフラシのエラ引き込み反射といった 2 つの限られた実験系でしか行われていない。従って、*C. elegans* の匂い忌避行動増強の遺伝学的解析を行う事で、新たな神経機能に関わる遺伝子群を明らかにできると考えた。そこで、この「忌避行動増強」に関与する遺伝子を明らかにするために遺伝学的解析を行った結果、D2 型ドーパミン受容体 DOP-3 が必要である事が明らかになっていた。従って、*C. elegans* の 2-ノナン忌避行動増強をモデル実験系としてドーパミンの分子レベルの作用メカニズムを迅速に明らかにすれば、哺乳類の脳におけるドーパミンの作用メカニズム解明の手がかりが得られると考えた。

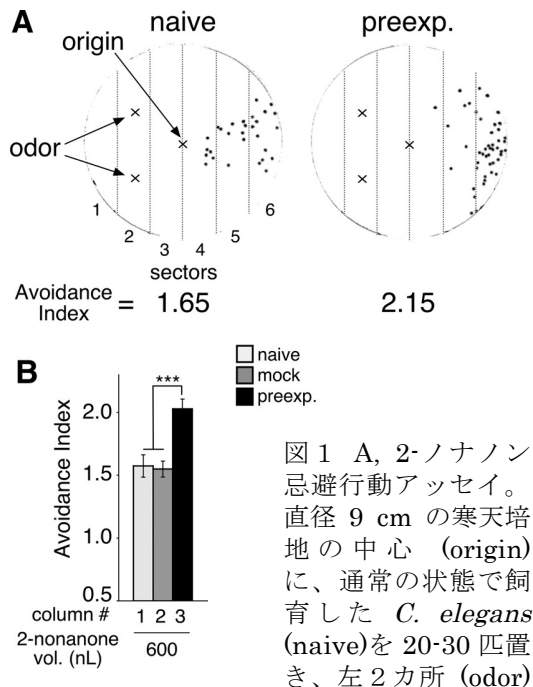


図 1 A, 2-ノナン忌避行動アッセイ。直径 9 cm の寒天培地の中心 (origin) に、通常の状態に飼育した *C. elegans* (naive) を 20-30 匹置き、左 2 カ所 (odor)

に 300  $\mu$ L ずつの 2-nonanone をスポットし、12 分後の位置を示した。事前刺激された虫 (preexp.) はより遠くまで逃がっている。B, 1 枚のアッセイごとの忌避距離の平均値の比較。事前刺激によって有意に遠くまで逃がっている事が分かる。発表論文 4 より改変。

## 2. 研究の目的

(1) *C. elegans* の D2 型受容体 DOP-3 がどの細胞で機能する事で、2-ノナン忌避行動増強を制御するのかを明らかにする。

(2) DOP-3 が機能する細胞の何をどう変化させるかを解明する。

## 3. 研究の方法

(1) *C. elegans* の忌避行動増強に関与するドーパミン受容体 *dop-3* が機能する細胞の同定

既に単離されていた *dop-3* cDNA (Sugiura et al., J. Neurochem., 2005) を分与していただき、*dop-3* 機能欠失型変異体の特定の神経細胞において *dop-3* cDNA を発現する形質転換株を多数樹立した。いずれかの形質転換株において匂い忌避行動増強の異常が回復すれば、その神経細胞で DOP-3 が機能する事が必要であると考えられた。

(2) ドーパミン下流で機能する神経伝達物質受容体の同定

上記の方法で DOP-3 が機能する細胞を同定した事により、ドーパミンの下流で別の神経伝達物質オクトパミンが拮抗的に機能していることが明らかになった。そこで、分子遺伝学的手法を用いて、ドーパミンの下流で機能するオクトパミン受容体を同定することを目指した。

## 4. 研究成果

(1) D2 型ドーパミン受容体 DOP-3 機能細胞の同定

*C. elegans* の忌避行動増強に関与するドーパミン受容体 *dop-3* が機能する細胞の同定を行うために、*dop-3* 変異体において *dop-3* cDNA を特定の神経細胞のみに発現させて、*dop-3* 変異体の 2-ノナン忌避増強異常という表現型が回復するかどうかを測定した。幾つもの神経細胞特異的な発現を検討した結果、左右一対の介在神経細胞 RIC で *dop-3* cDNA が発現することで *dop-3* 変異体の 2-ノナン忌避増強異常が回復した (図 2)。さらに、RIC 細胞特異的に *dop-3* 遺伝子の RNAi を行うことでその機能を低下させた所、2-ノナン忌避増強が抑圧された。以上の結果により、2-ノナン忌避増強は RIC 細胞で発現するドーパミン受容体 DOP-3 によって制御されていることが示された。

RIC 細胞は、神経伝達物質オクトパミンを分泌することが知られていた。オクトパミンは無脊椎動物において、脊椎動物のノルアドレ

ナリンに相当する役割を果たすと考えられ、ドーパミン伝達との役割を解明することは重要である。そこで、遺伝学的解析を行った所、オクトパミンはドーパミンの下流で拮抗的にはたらくことが明らかになった (図3)。

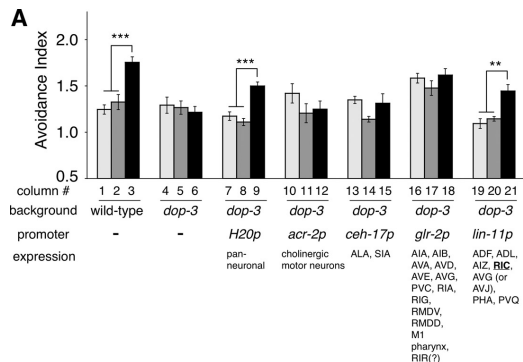


図2 細胞特異的な cDNA 発現による、DOP-3 機能細胞の同定。全神経細胞で発現する H20 プロモータ、または *lin-11* プロモータで、2-ノナノン忌避増強が回復する。これ以外に、RIC 細胞特異的な *tbh-1* プロモータでも表現型が回復したことから、RIC 細胞で DOP-3 が機能することが、2-ノナノン忌避増強に必要な充分であることが明らかになった。発表論文 4 より改変。

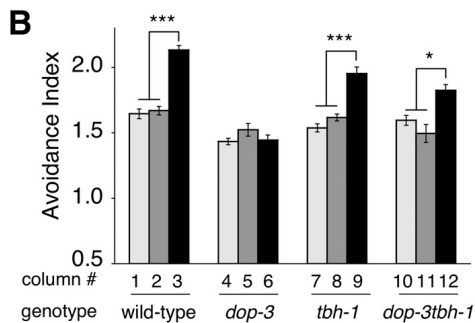


図3 ドーパミンとオクトパミンの相互作用の遺伝学的解析。2-ノナノン忌避行動増強は、ドーパミン受容体 *dop-3* 遺伝子の機能欠失で抑圧される (lanes 4-6)。一方、オクトパミン合成に必要な *tbh-1* 遺伝子の機能欠失は、2-ノナノン忌避増強に影響しない (lanes 7-9)。しかし、*dop-3* と *tbh-1* 遺伝子の二重変異体は 2-ノナノン忌避増強が正常であった。これらの結果は、*tbh-1* 遺伝子は *dop-3* 遺伝子の下流で 2-ノナノン忌避増強に抑制的にはたらく事を強く示唆する。*dop-3* 遺伝子および *tbh-1* は RIC 細胞で機能する事から、DOP-3 受容体からのシグナルが、オクトパミン分泌を抑制している可能性が高い。発表論文 4 より改変。

そこで、匂い忌避行動の増強のためにドーパミンシグナルの下流で機能するオクトパミン受容体を同定することを目指した。C. *elegans* ゲノムには3つのオクトパミン受容体が存在しているので、これらの変異株を入手して行動解析を行った結果、特定のオクトパミン受容体がドーパミンシグナル伝達の下流で機能する事が強く示唆された (木村ら、投稿準備中)。今後は、このオクトパミン受容体がどの神経細胞で機能する事で忌避行動増強に影響を与えるのかを明らかにしたい。

## 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5件)

① Kawazoe K, Yawo H, Kimura KD. A simple optogenetic system for behavioral analysis of freely moving small animals. *Neuroscience Research (in press)* 査読有

② Nishio N, Mohri-Shiomi A, Nishida Y, Hiramatsu N, Kodama-Namba E, Kimura KD, Kuhara A, Mori I. A novel and conserved protein AHO-3 is required for thermotactic plasticity associated with feeding states in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells*, 17, 365-386 (2012) 査読有

③ Kobayashi Y, Kimura KD, Katsura I. Ultradian rhythm in the intestine of *Caenorhabditis elegans* is controlled by the C-terminal region of the FLR-1 ion channel and the hydrophobic domain of the FLR-4 protein kinase. *Genes to Cells*, 16, 565-575 (2011) 査読有

④ Kimura KD, Fujita K, Katsura I. Enhancement of Odor-avoidance regulated by Dopamine Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience*, 30, 16365-16375 (2010) 査読有

⑤ Oishi A, Gengyo-Ando K, Mitani S, Mohri-Shiomi A, Kimura KD, Ishihara T, Katsura I. FLR-2, the glycoprotein hormone alpha subunit, is involved in the neural control of intestinal functions in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to cells*, 14, 1141-1154 (2009) 査読有

〔学会発表〕（計6件）

① 木村幸太郎、線虫の匂い忌避学習を制御するドーパミンの作用メカニズム、京都大学霊長類研究所共同利用研究会「ドーパミンの役割：運動機能から高次機能へ」、2012. 3. 15、愛知県犬山市・京都大学霊長類研究所

② 木村幸太郎、Repulsive odor learning regulated by dopamine signaling in worms、包括脳ワークショップ・シンポジウム「報酬系・罰系とモノアミンシグナル伝達」、2011. 8. 22、兵庫県神戸市・神戸国際会議場

③ 木村幸太郎、An integrative and quantitative analysis of dopamine-dependent odor avoidance behavior of the nematode *C. elegans*、第8回国際比較生理生化学会議、2011. 6. 2、愛知県名古屋市・名古屋国際会議場

④ 木村幸太郎、忌避行動の学習を制御する神経回路～線虫 *C. elegans* をモデルとして～、立命館大学シンポジウム「感覚器と神経回路のサイエンス」、2010. 9. 10、滋賀県草津市・立命館大学びわこ・くさつキャンパス

⑤ 木村幸太郎、Enhancement of odor avoidance regulated by dopamine signaling in the nematode *C. elegans*、第87回日本生理学会大会・シンポジウム「比較的単純なモデル動物を用いた運動・行動研究」2010. 5. 21、岩手県盛岡市・盛岡市民文化ホール

⑥ 木村幸太郎、Enhancement of odor avoidance is regulated by dopamine signaling in the nematode *C. elegans*、第7回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」2009. 11. 3、福岡県福岡市・九州大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 幸太郎 (KIMURA KOTARO)

大阪大学・大学院理学研究科・特任准教授

研究者番号：20370116