

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570007

研究課題名(和文) 生殖腺によって制御される嗅覚行動の分子基盤と神経回路における情報処理機構の解析

研究課題名(英文) The molecular and neuronal mechanisms for the germline-mediated regulation of the chemotactic behavior

研究代表者

藤原 学 (Fujiwara, Manabi)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70359933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：多くの生物種は成長段階に応じて行動様式を変化させるが、そのような変化を担う神経回路や分子機構は不明な点が多い。線虫*C. elegans*は、幼虫期と成虫期で匂いの好みが変わる。幼虫期に増殖する生殖細胞を人為的に取り除くと成虫になっても幼虫期とよく似た匂いの好みを示すことから、生殖細胞からのシグナルが行動を制御していると考えられる。変異体解析やRNAiライブラリーによる網羅的遺伝子解析により、生殖細胞の増殖による化学走性の調節には、幼虫期の個体のエネルギー状態が関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The molecular and neuronal mechanisms for the germline-mediated regulation of the chemotactic behavior Animals adequately change their behavioral patterns according to their developmental stage. We found that *C. elegans* larvae show a different preference in odorant from the adult. We also found that the germline loss makes adult animals show the larva-like odorant preference. These results implicate that some signals may be released from germline cells, which proliferate through the larval stages and the adult. By mutant analyses and a genome-wide RNAi screening, the energy state of the animal during larval stages is shown to be important for the germline-mediated regulation of chemotaxis.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：行動遺伝

1. 研究開始当初の背景

生物は感覚神経系を用いて外界の物理的、化学的变化を敏感に捉えることで、外的環境に適応し生存をはかる。しかし、実際の感覚受容とは一義的なものではなく、例えば、同じ匂いでも人によって良い匂いに感じられたり悪臭に感じられたりするなど、ある「振れ」をもった神経機能の過程であると考えられる。そのような「振れ」あるいは変化を生み出す一因に、個体の内的状態の違いが挙げられる。感覚が個体の内的状態に応じて変化することは、生物がその時々々の体の状態に応じた適切な感覚行動をとることを可能にする重要な生存戦略であると思われる。しかし、このような現象の分子機構は生物種を通じてほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

申請者は、線虫 *C. elegans* を用いることで、個体の内的状態が感覚行動に及ぼす影響とそのメカニズムを明らかにできると考えた。その理由として、1) わずか数対の化学感覚神経をふくむ302個の神経からなるごく単純な神経回路をもつこと、2) イメージング技術の進展により、感覚応答時の神経回路上の情報の流れの可視化が可能となったこと、3) 感覚行動のアッセイ系が発達していること、4) 個体の内的状態を変化させる様々な処理(変異体の使用、レーザーを用いた細胞の外科的除去、薬剤の使用など)が容易であること、5) 変異体の探索を含む遺伝学的な解析によって、制御機構に関わる新規分子の同定が可能であること、があげられる。申請者は、線虫 *C. elegans* のこのような利点を活かし、個体の内的状態が感覚行動に及ぼす影響とそのメカニズムを、分子、細胞、個体レベルの解析を結びつけて明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

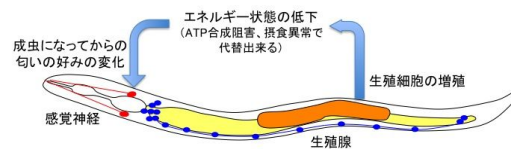
申請者は、線虫の嗅覚行動が生殖腺の有無によって変化することを見いだしており、この系を用いた解析を行った。*C. elegans* は、AWAとAWCという2対の嗅覚神経をもちいて、様々な匂い物質へ誘引行動を示す。ところが、線虫の生殖細胞を人為的に欠損させると、特定の匂い物質(ジアセチル)への反応性が低下する。このことから、生殖腺の成熟に伴う内的環境の変化(性的成熟)が線虫の走性行動に影響を与えていると考えられる。そこで本研究課題では、この制御の機構を明

らかにするために以下の解析を行った。

- (1) RNAiによる機能分子の網羅的探索
- (2) 順遺伝学的スクリーニングによる機能分子の探索
- (3) 生殖腺が未発達な幼虫期の行動の解析

4. 研究成果

本研究課題において、生殖細胞の増殖がどのようにして個体の行動パターンの変化を引き起こすのか、そのメカニズムの解析を行った。その結果、以下に詳述するように生殖細胞欠損時の匂いの好み変化には、ミトコンドリアでの正常なATP合成と正常な摂食運動が必要であることが示された。この結果は全く予想していなかったものであり、生殖細胞の増殖にともなう個体の性的成熟時に、体内ではエネルギー状態の低下が起こり、そのことが神経回路の調整と匂いの好み変化を引き起こしているのではないかというモデルが示唆された。



(1) RNAiによる機能分子の網羅的探索

RNAiによる網羅的な機能分子の探索によって、ATP synthaseなどミトコンドリアでのATP合成に関わる因子を発現阻害すると、生殖細胞のない線虫も野生型同様の走性行動を回復することが分かった。そこで、その時期的および場所的な関わりを解析した。生殖細胞を失った成虫は正常な成虫に比べて匂い物質ジアセチルへの走性が低下する。これはミトコンドリアの機能分子、例えば電子伝達系の *cco-1* 遺伝子のRNAiによる発現阻害で回復する。腸、下皮、神経系など体の様々な組織において特異的に *cco-1* 遺伝子の発現阻害を行ったところ、神経系での阻害によって最も強くジアセチルへの走性回復が見られた。また、発生の様々な時期に *cco-1* 遺伝子の発現阻害を行ったところ、幼虫期の発現阻害が最も強くジアセチルへの走性回復を引き起こした。つまり、生殖細胞が盛んに増殖しているはずの幼虫期に生殖細胞が正常に増殖しないと、この時期の神経系のミトコンドリアの働きを介して、将来成虫になった際にジアセチルへの走性が低下すると考えられた。

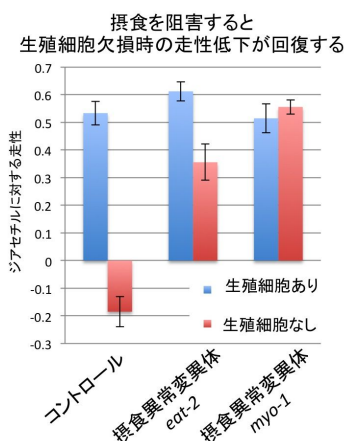
次に、なぜミトコンドリアの機能(おそらくATP合成)がこのような走性の制御に関わっているのかを明らかにするため、生殖細胞増殖時の神経でのATPレベルの可視化を試みた。

線虫にATP感受性FRETプローブATeamを導入したところ、神経細胞での発現を確認できた。さらに電子伝達系の阻害剤の投与により、生きた線虫の神経細胞内でのATPレベルの低下を確認することができた。そこでこのプローブを使って、野生型線虫と生殖細胞欠損線虫とで、複数の神経細胞種におけるATPレベルの比較を行ったが、生殖細胞の欠損に起因する差を検出する事が出来なかった。検出が困難な理由の一つに、培養温度や発生段階（幼虫と成虫）の違いによってATPレベルが変化し、また神経細胞種によっても違いがあることがあった。今後、これらの影響を勘考した上で生殖細胞の増殖による神経系でのATPレベルの変化を測定できる技術基盤を確立する必要がある。それにより、生殖細胞が増殖することによって神経系でどのようなエネルギー状態の変化が生じるかを明らかにし、なぜミトコンドリアの機能障害が神経系に対して生殖細胞増殖と同じ作用をもたらすことができるのかを明らかにすることができるであろう。

(2) 順遺伝学的スクリーニングによる機能分子の探索

生殖細胞欠損変異体に化学変異原で変異を誘発し、生殖細胞を失っていても走性が変化しない変異体 D' 4-13-7 株を得ていた。この変異体の染色体マッピングを進め、全ゲノムシークエンス解析を行った結果、この変異体の原因遺伝子が咽頭筋で働くミオシンをコードしていることを明らかにした。そこでこの変異体と同様に咽頭筋の運動が低下していることが知られている別の変異体を持ち、その生殖細胞を欠損させたところ、やはり走性の

変化が起きないことも分かった。これらの結果から、生殖細胞が欠損しても摂食運動を低下させれば野生型と同様な走性行動が回復することが分かった。

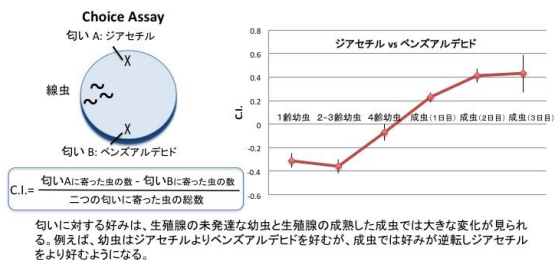


(3) 生殖腺が未発達な幼虫期の行動の解析

正常に生殖細胞が増殖した線虫と生殖細胞の増殖が妨げられた線虫では、匂いへの誘引行動に違いが見られる。このことから生殖細胞の増殖にともなって出されるなんらかの

シグナルにより走性制御に関わる神経回路が調節を受けていると予想された。これは性的成熟にともなう行動変化のひとつの基盤となっている可能性が高い。

もしそのような機構があるとすると、生殖細胞の増殖を妨げられた成虫と生殖細胞がまだ増殖していない時期の幼虫は走性行動の特徴が共通しているはずである。そこで、幼虫期の線虫の匂いへの走性を調べた。幼虫期の線虫を用いた行動測定は未開拓の分野であり、成虫と比較して運動能力が低いため幼虫に最適化した化学走性のアッセイ系を工夫する必要があった。幼虫の行動測定系の確立により、生殖細胞の未増殖な幼虫は生殖細胞を持たない成虫と同様にジアセチルに対する走性の低下が見られることが分かった。これは生殖細胞の増殖により成虫期の線虫の行動パターンを変化させる機構が存在することを強く裏付ける結果である。そこで、幼虫期から成虫期の行動変化を引き起こすのに働く分子機構を明らかにするため、幼虫期にも関わらず成虫と同様の走性行動パターンを示す変異体の単離を試みた。スクリーニングの結果、複数の候補変異体を得たので、現在、表現型の確認を行っている。



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)

(1) Inoue A, Sawatari E, Hisamoto N, Kitazono T, Teramoto T, Fujiwara M, Matsumoto K, and Ishihara T. Forgetting in *C. elegans* is accelerated by neuronal communication via the TIR-1/JNK-1 pathway. Cell Rep. 2013 Mar 28;3(3):808-19. doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.019. 査読あり

(2) Shinkai Y, Yamamoto Y, Fujiwara M, Tabata T, Murayama T, Hirotsu T, Ikeda DD, Tsunozaki M, Iino Y, Bargmann CI, Katsura I, Ishihara T. (2011) Behavioral choice between conflicting alternatives is regulated by a receptor

guanylyl cyclase, GCY-28, and a Receptor Tyrosine Kinase, SCD-2, in AIA Interneurons of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, 31, 3007-15
doi: 10.1523/JNEUROSCI.4691-10.2011.
査読あり

(3) Zhao Y, Araki S, Wu J, Teramoto T, Chang YF, Nakano M, Abdelfattah AS, Fujiwara M, Ishihara T, Nagai T, Campbell RE. (2011)
An expanded palette of genetically encoded Ca²⁺ indicators. *Science*, 333:1888-91
doi: 10.1126/science.1208592
査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

(1)藤原 学
線虫の感覚行動のライフサイクルにおける変化
第36回日本分子生物学会
神戸、2013.12.3-12.6

(2)藤原 学
線虫の成長に伴う行動変化に関わるミトコンドリアの働き
第35回日本分子生物学会年会
福岡、2012.12.11-2012.12.14

(3)藤原学
生殖細胞が制御する線虫の感覚行動
日本遺伝学会第84回大会
九州大学、2012.9.24-26

(4)M. Fujiwara
Chemotaxis behavior is regulated by germline in *C. elegans*
2012 EMBO conference series: *C. elegans* Neurobiology
Heidelberg, Thursday, 14 June - Sunday, 17 June 2012

(5)M. Fujiwara
Chemotaxis behavior is regulated by germline in *C. elegans*.
18th International *C. elegans* meeting
University of California, Los Angeles,
June 22 - June 26, 2011

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~bunsiiide/>

6. 研究組織
(1)研究代表者
藤原 学 (FUJIWARA, Manabi)
九州大学・理学研究院・助教
研究者番号：70359933