

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870126

研究課題名(和文) 神経系による動物の成長速度の制御

研究課題名(英文) Regulation of the grow rate by the nervous system

研究代表者

周防 諭 (Suo, Satoshi)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：20596845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：動物の体の大きさはその環境に影響されるが、この制御には神経系が重要な働きを担う。しかし、神経系による成長制御の分子機構には不明な点が多い。本研究では、線虫*C. elegans*を用いて、神経伝達物質のドーパミンがその受容体であるDOP-3を介して体の大きさを負に制御していることを明らかにした。さらに、ドーパミンによる体長の制御には、別の神経伝達物質であるオクトパミンやインシュリン/IGF受容体のDAF-2が必要であることから、ドーパミンの下流ではオクトパミンとインシュリン/IGFが働くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Animal body size is regulated by their environment and the nervous system plays a critical role in this regulation. However, the specific neurotransmitter signaling that regulates body size is not well-understood. In this study, we show that an amine neurotransmitter dopamine negatively regulates body size through a D2-like dopamine receptor, DOP-3, in *C. elegans*. Dopamine regulates body size through the suppression of signaling by octopamine and Gq-coupled octopamine receptors, SER-3 and SER-6. The body size regulation by dopamine also requires the insulin/IGF receptor DAF-2, suggesting that insulin/IGF signaling works downstream of dopamine. In *C. elegans*, dopamine is required for the tactile perception of food. Our results demonstrate that dopamine and octopamine regulate the body size of *C. elegans* and suggest a potential role for perception in addition to ingestion of food for growth.

研究分野：神経科学

キーワード：サイズ 成長速度 ドーパミン オクトパミン *C. elegans* 神経伝達物質 受容体

1. 研究開始当初の背景

動物の成長は、遺伝と環境によって制御されている。動物は形態的变化を伴いながら成体へと成長していくが、その発達の速度や、体が大きくなっていく成長の速度は、その個体の置かれている環境により変化する。成長の制御に関わる因子には、神経系において機能するものが存在することから、成長の制御の少なくとも一部は神経系により行われていると考えられている。しかし、そのメカニズムには未知な部分が多い。

線虫 *C. elegans* は遺伝学的解析に有用なモデル生物で、形態観察が容易であるなどの利点があり、発生分野で多くの研究に用いられてきた。さらに、神経系が非常に単純であるため、神経伝達の解析にも非常に有用である。また、特定の生命現象に関わる新しい因子を遺伝学的スクリーニングによって無作為に探索することができ、このモデル生物を用いて様々な生命現象に関わる新規の遺伝子が同定されてきた。

これまでに *C. elegans* を用いた遺伝学的解析により、体の大きさの制御に関わるいくつかの遺伝子が同定されており¹、特に Transforming Growth Factor β 経路が重要な働きをすることが知られている。TGF β 経路の構成因子 DBL-1 (リガンド)、SMA-6 (受容体)、SMA-2~4 (Smad 転写因子) の変異体は全て体が小さく、DBL-1 経路は体のサイズを正に制御している。DBL-1 は神経細胞で発現しているのに対し、SMA-6 受容体や Smad は真皮細胞で働いていることから、神経細胞から放出された DBL-1 が真皮細胞に働き、この細胞の伸長を促進していると考えられている。

また、餌は体のサイズに大きな影響を与える因子である。*eat-2* のような餌の取り込み運動に異常のある変異体では体のサイズが小さいが、これは餌の摂取量が減少しているためだと考えられている。

このように体のサイズの制御に関しては線虫を用いて様々な知見が得られていた。しかし、神経系による成長の制御については不明な部分も多く、特に具体的にどのような神経伝達物質がどのように成長の制御に関わっているのかはわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、神経系による成長速度の制御のメカニズムを線虫 *C. elegans* を用いて明らかにすることを目的とした。

これまでの予備的な研究で、神経伝達物質ドーパミンが成長の制御を行っていることを見出していた。しかし、この神経伝達物質の作用するメカニズムは不明であったので、遺伝学的手法および薬理学的手法を用いて

解明することを目的とした。そのために、ドーパミンの下流で働く因子を明らかにしていき、成長の制御に関わる分子経路を明らかにすることとした。

成長速度を制御することは動物にとって根本的で重要な性質である。動物が外部環境に対応して成長速度を変化させるときには、神経系が重要な役割を果たす。この研究により、成長の制御における神経系の働き、特にドーパミンの作用機構が解明され、環境に応答した成長制御のメカニズムが明らかにすることが期待された。

3. 研究の方法

(1) 線虫の体長測定

本研究では *C. elegans* 野生株 N2 およびその変異体を用い、飼育は NGM プレートを使用して 20 で行った。通常の実験では、産卵後 96 時間の線虫を、50 mM の NaN₃ 溶液を加えて麻痺させて、アガロースゲルを敷いたスライドガラス上に線虫を置き、顕微鏡で線虫の全体像を撮影した。撮影した線虫の体長は解析ソフト ImageJ を用いて計測した。発達段階をそろえて測定を行う実験では、L4 ステージ特有の形態を有している線虫を新しいプレートに移し、その 48 時間後に線虫を回収して体長を計測した。

(2) 卵の発生ステージの観察

10 匹から 15 匹の L4 ステージの幼虫を新しいプレートに移し、24 時間生育させた。8 匹から 10 匹の成虫を新しいプレートに移し、2 時間卵を産ませた。成虫を取り除きさらに 2 時間待った後、顕微鏡で卵の発生ステージを観察した。発生ステージの分類は先行研究の方法を参照した²。

(3) 発達速度の測定

産卵後 48 時間飼育した後、プレパラートを作製し、産卵口の形態を観察した。*C. elegans* は餌が十分にある環境では脱皮を繰り返して、L1、L2、L3、L4 ステージを経て成虫になる。L4 ステージでは産卵口の形態が大きく変化するため、これを観察することで発生段階を厳密に見分けることができる。形態の分類は先行研究³に従って行った。

産卵時の発生ステージの違いに影響されずに発達速度の測定を行うために、L1 ステージから飼育を開始して、43 時間後の個体について同様の測定を行った。

(4) 遺伝子導入株の作出

cat-2 遺伝子のコード領域と、その上流 2 kb と下流 0.5 kb を含む領域を PCR により増幅した。この PCR 産物を、マーカー遺伝子、pBluescript とともにマイクロインジェクションにより *cat-2* 変異体に導入した。マーカーとしては、RIA ニューロンで蛍光タンパク質 mCherry を発現させる *glr-3::mCherry* を

用いた。

4. 研究成果

(1) ドーパミンは体のサイズを負に制御する。

線虫におけるドーパミンの体の成長に対する影響を調べるために、ドーパミン合成に以上のある *cat-2* 変異体の体の大きさを解析した(図1)。 *cat-2* 遺伝子は、ドーパミン合成に必要な酵素であるチロシンヒドロキシラーゼをコードしており、 *cat-2* 変異体ではドーパミンの合成量が少ない。 *cat-2* 遺伝子の2種類のアレルで解析したところ、いずれについても体の大きさが野生型よりも体の長さや幅が大きくサイズが大きくなっていることを明らかにした。この変異体に、野生型の *cat-2* 遺伝子を導入すると野生型の個体と同程度まで体長が減少した。さらに、 *cat-2* 変異体を、ドーパミンを含むプレートで飼育すると、体長が減少することが確認された。また、線虫のドーパミン受容体はこれまでに5つ同定されているが、これらの受容体の変異体について体長を解析したところ、特に *dop-3* の変異体について *cat-2* 変異体で見られたような体長の増加が確認された。 *dop-3* 変異体についても、野生型の *dop-3* 遺伝子を *dop-3* 変異体に導入すると、体長の減少がみられた。以上の結果から、ドーパミンが線虫の体の大きさを負に制御していることが明らかとなった。

(2) 産卵および発達速度とドーパミンの関係とその体のサイズに対する影響

線虫は産卵後、幼虫期を経て、成虫になる。幼虫期での発達速度は野生型と *cat-2* 変異体では差がないことを明らかにした。 *cat-2* 変異体は野生型と比較して、より発達が進んだ卵を産むことを見出した。この結果は、 *cat-2* が正常な産卵に必要であることを示している。また、この結果から *cat-2* の体長が大きいのは、産卵が遅れたことが原因である可能性がある。そこで、産卵が遅れることの影響がないように、幼虫期の特定の段階で体長を測定した。この条件で測定しても、 *cat-2* 変異体は野生型よりも体長が大きく、ドーパミンは発達速度に影響を与えずに、体のサイズが大きくなる速度を増加させていることを明らかにした。

(3) ドーパミンの下流で体のサイズの制御に働く因子

オクトパミン

オクトパミンの合成に必要なチラミン β-ヒドロキシラーゼの変異体 *tah-1*、オクトパミン受容体の変異体 *ser-3* および *ser-6* について、 *cat-2* 変異体との2重変異体を解析したところ、これらの変異体のバックグラウンドでは *cat-2* 変異体で見られた体長の増加が抑制されることを明らかにした(図2)。この結果から、ドーパミンによる情報伝達が存

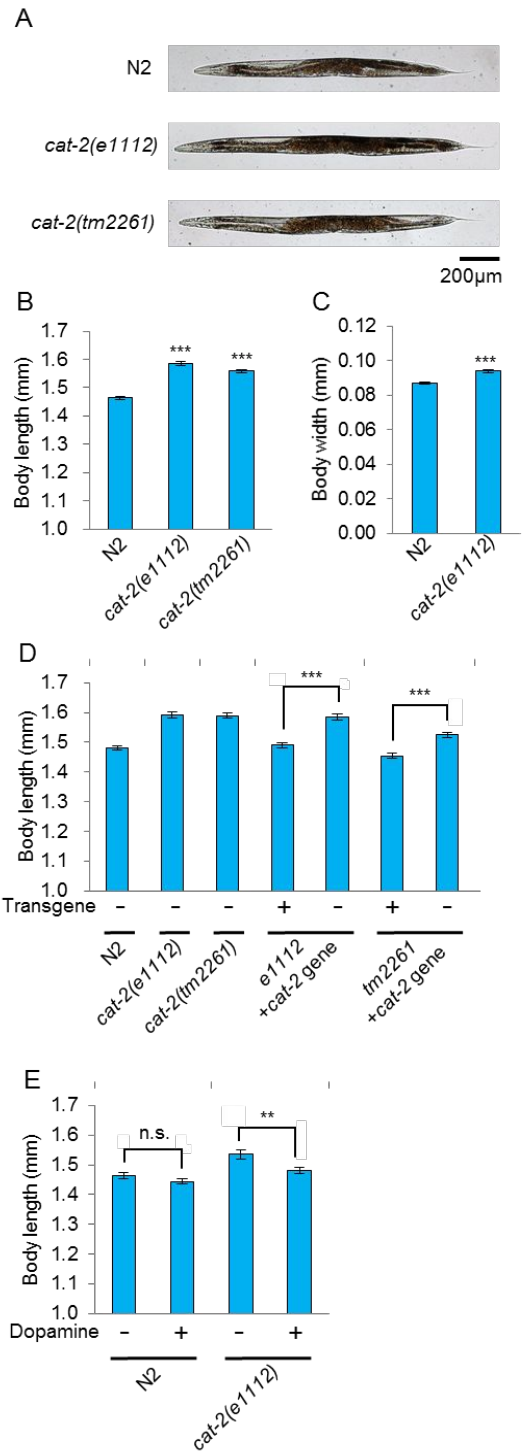


図1. ドーパミンによる体長制御

野生型と *cat-2* 変異体の顕微鏡写真(A)、体長(B)、幅(C)。D. *cat-2* 変異体に *cat-2* 遺伝子を導入した際の体長。E. ドーパミンを含むあるいは含まないプレート上で野生型と *cat-2* 変異体を飼育した際の体長。

在しないときに、オクトパミンによるシグナル伝達が活性化して、体のサイズを正に制御していると考えられる。

インシュリン/IGF シグナル

インシュリン/IGF 受容体の変異体である *daf-2* においても、 *cat-2* 変異による体長の増加は抑制されていた(図3)。この結果から、

cat-2 は体長の増加に *daf-2* が必要であり、ドーパミンの下流でインシュリン/IGF シグナル伝達が働いていることが示唆された。

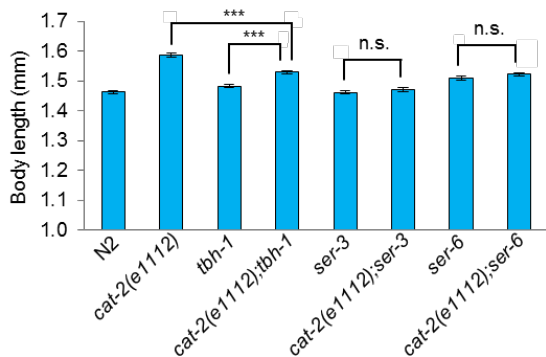


図2 . ドーパミンとオクトパミン経路
野生型、*cat-2*、*tbh-1*、*ser-3*、*ser-6* 変異体と2重変異体の体長。

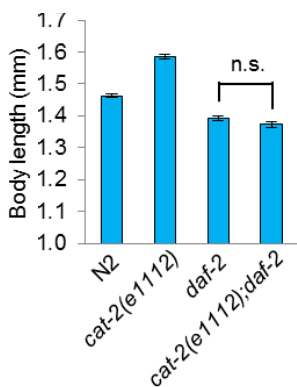


図3 . ドーパミンとインシュリン/IGF 経路
cat-2、*daf-2* 変異体と2重変異体の体長。

TGF 経路との関係

体長制御に働くことがすでに知られていた TGF 経路との関係を調べた。TGF リガンドの変異体 *dbl-1* や、受容体の変異体 *sma-6*、その下流で働く SMAD の変異体 *sma-2* や *sma-3* と *cat-2* 変異体の2重変異体を解析した(図4)。ほとんどの場合で、TGF 経路の変異があっても *cat-2* 変異は体長の増加を引き起こした。この結果は、ドーパミンの経路は TGF 経路とは独立に働いていることを示唆している。しかし、一部の組み

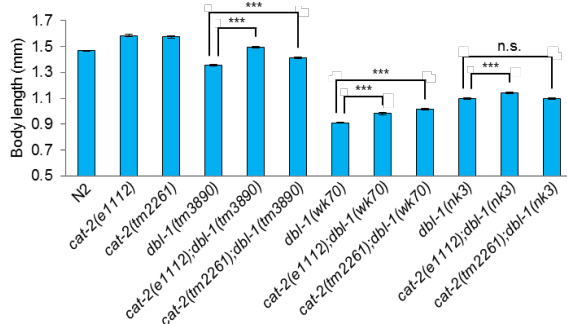


図4 . ドーパミンと TGF β 経路
cat-2 および TGF β 経路の変異体と2重変異体の体長。

合わせて *cat-2* の効果の抑制が見られた。これらの組み合わせでは、理由は不明であるが、2重変異体の生育に異常が見られたので、その結果、見かけ上抑制が見られていると考えられるが、TGF 経路がドーパミン経路に何らかの作用を持っている可能性が完全には否定されなかった。

遺伝学的スクリーニング

遺伝学的スクリーニングによって単離された変異体を解析することで、さらに下流で働く因子を明らかにすることを試みた。ドーパミン - オクトパミン経路に異常があると考えられる変異体が単離されているが、現在までその変異遺伝子の特定には至っていない。

体長を制御する物質

実験条件の検討の過程で、培地に含まれるペプトンの種類によって体の大きさが異なるということを見出した。通常線虫は、獣肉を原料としたバクトペptonを含むプレートに線虫の餌となる大腸菌を培養して、そのプレート上で飼育する。しかし、牛乳を原料とするカゼインペptonを含むプレートで飼育すると、線虫がより小さく成長した。バクトペpton、カゼインペpton両方を含むプレートで培養しても、体のサイズは小さいことから、カゼインペptonに体のサイズを負に制御する物質が存在することが示唆された。牛乳そのものや牛乳に多く含まれるビタミンの体長に対する影響を調べたところ、牛乳により体長が減少すること、さらに、パントテン酸で体長が減少することを明らかにした。ただし、パントテン酸はバクトペptonにもカゼインペptonにも同程度の量が含まれているので、ペptonの種類の違いによる体長の変化は別の物質に起因するものと考えられる。

(4) まとめ

以上の結果から、ドーパミンはオクトパミンとインシュリン/IGF の経路を介して線虫の体の成長を負に制御していることが明らかになった。摂食量によって、体のサイズが影響されることはよく知られている。線虫では、ドーパミンニューロンは機械刺激受容ニューロンであり、(餌の取り込みではなく)餌に触れることによって、餌を感知していることが知られている。本研究から、餌は栄養素として線虫の体のサイズに影響を及ぼすだけでなく、ドーパミンニューロンによる餌の認識によっても体長が制御されていることが示唆された。

<引用文献>

Savage-Dunn C, et al. (2003) *Genesis* 35(4):239-247.
Chin-Sang, I.D., and Chisholm, A.D. (2000). *Trends in genetics* 16, 544-551.

MacNeil LT, et al. (2013) Cell 153:240-252.

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 2件)

Nagashima, T., Ishiura, S., and Suo, S. (2017). Regulation of body size in *Caenorhabditis elegans*: effects of environmental factors and the nervous system. Int J Dev Biol. 印刷中. 査読あり

Nagashima, T., Oami, E., Kutsuna, N., Ishiura, S., and Suo, S. (2016). Dopamine regulates body size in *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. 412, 128–138. 査読あり
DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.02.021.

[学会発表](計 7件)

永嶋宇、大網栄太郎、石浦章一、周防諭、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日「パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)」

Suo, S., Nagashima, T., Oami, E., and Ishiura, S., Dopamine and octopamine regulate body size of *C. elegans*.

CeNeuro2016, 2016 年 7 月 28 日「名古屋大学(愛知県、名古屋市)」

Nagashima, T., Oami, E., Iino, Y., Ishiura, S., and Suo, S. (2016)

Dopamine regulates body size in *C. elegans*. CDB Symposium 2016, 2016 年 3 月 28 日「理化学研究所多細胞システム形成研究センター(兵庫県、神戸市)」

周防諭、吉田碧、石浦章一 (2016) 線虫 *C. elegans* において二種類の同一サブクラス G タンパク質共役型受容体の共存により引き起こされる飢餓シグナル伝達. 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 10 日「パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)」

周防諭、吉田碧、石浦章一 Two Gq-coupled octopamine receptors function non-redundantly to mediate food deprivation signaling of *C. elegans*. 第 58 回日本神経化学会大会, 2015 年 9 月 12 日「大宮ソニックシティ(埼玉県、さいたま市)」

Nagashima, T., Oami, E., Suo, S., and Ishiura, S., Dopamine regulates body size independently of TGF pathway in *C. elegans*. *C. elegans* Development, Cell Biology & Gene Expression Meeting in association with

Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 2014 年 7 月 17 日「奈良県新公会堂(奈良県、奈良市)」

Suo, S., Yoshida, M., and Ishiura, S. Non-redundant function of two subtypes of octopamine receptors in food deprivation-mediated signaling in *C. elegans*. *C. elegans* Development, Cell Biology & Gene Expression Meeting in association with Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 2014 年 7 月 17 日「奈良県新公会堂(奈良県、奈良市)」

[その他]

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/yakuri>

6. 研究組織

(1)研究代表者

周防 諭 (SUO, Satoshi)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：20596845