

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570171

研究課題名（和文） 線虫 *C. elegans* の「忌避行動増強」に関する分子生物学的解析研究課題名（英文） Molecular analysis of the enhancement of odor avoidance 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：神経機能が経験により変化する事、すなわち神経機能の可塑性は高次神経機能の基盤である。本研究では、神経機能可塑性の新たな基本原理を明らかにするために、線虫 *C. elegans* の匂い忌避行動の増強を制御する遺伝子の解析を行った。*C. elegans* の匂い忌避行動の増強とは、*C. elegans* に嫌いな匂いを事前に経験させると、非連合学習としてその匂いに対する忌避行動が増強されるという現象である。本研究により、この匂い忌避行動増強にはドーパミンシグナル伝達が必要である事、特にドーパミン受容体として D2 受容体相同遺伝子が必要である事を明らかにした。ドーパミンは哺乳類の中樞神経系においてさまざまな高次神経機能に関与しているが、その分子レベルの作用メカニズムには不明な点が多い。本研究成果に基づいて *C. elegans* でさらなる解析を行う事によって、ドーパミンシグナル伝達の分子レベルでの新たな理解を得ることができると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：ドーパミン・非連合学習・Gタンパク質共役型受容体・受容体アンタゴニスト

1. 研究開始当初の背景

私はモデル動物 *C. elegans* の見過ごされがちだった匂い忌避行動の可塑性を詳細に検討し、*C. elegans* に忌避匂い物質 2-nonanone (以下ノナン) を事前に経験させると、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興味深い現象を見いだした(次ページ図1)。またこの現象は、非連合学習として獲

得される事が明らかになった(木村ら、投稿中)。事前刺激による特定の刺激への感覚応答の減少は「慣れ」と呼ばれ、これまでに様々な実験系において詳細な研究が行われている。これに対して刺激への応答の増強は、物理的侵害刺激である痛覚受容やアメフラシのエラ引き込み反射の「感作」に関して詳しく研究されている。しかし、匂いや味といった化学刺激に対する応答増強に関しては、行

動レベル・電気生理学的解析レベルでの報告は散見されるものの、遺伝子レベルでの解析例は極めて少ない。従って、*C. elegans* の匂いに対する忌避行動の増強を解析する事により、可塑的神経機能の新たな制御メカニズムを明らかにできると考えた。

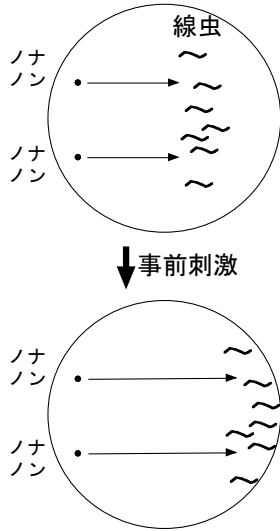


図1 *C. elegans* ノナノン忌避行動。1時間の事前刺激により、12分のアッセイでより遠くまで逃げるようになる。

2. 研究の目的

本研究では、*C. elegans* の匂い忌避行動の増強に関与する遺伝子を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

本研究開始以前に、*C. elegans* のドーパミン合成が忌避行動増強に必要である事を示唆する結果を得ていた(図2)。この結果を検証するために薬理的解析を行った(研究成果1)。さらにこの結果に基づき、

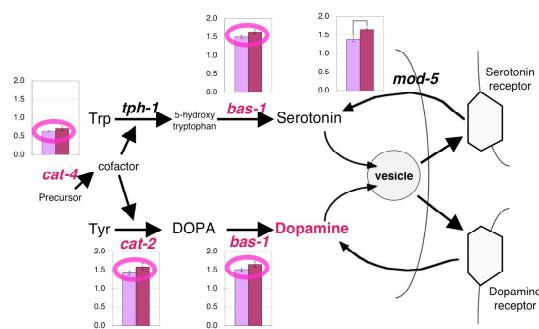


図2 ドーパミン合成経路の遺伝学的解析。ドーパミン合成に関わる遺伝子の異常は、ノナノン忌避行動増強の異常を引き起こした。薄紫色のグラフは事前刺激処理時にノナノンなし(対照群)、濃紫色のグラフはノナノンでの事前刺激あり。

C. elegans のドーパミン受容体遺伝子の変異体の表現型解析を行った(研究成果2)。

4. 研究成果

(1) **薬理的解析**：哺乳類の5つのドーパミン受容体はD1型とD2型に分類され、それぞれGsまたはGiを活性化するという拮抗的役割を果たす(図3)。

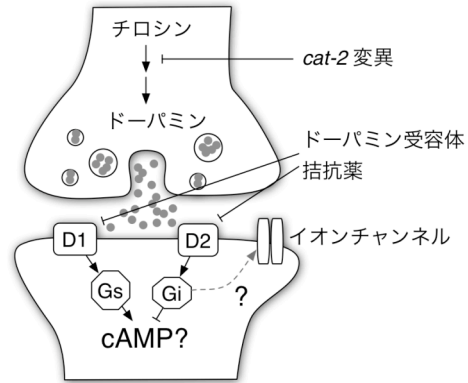


図3 ドーパミンシグナル伝達経路。ドーパミンシグナル伝達経路は、*C. elegans* と哺乳類で大部分が共通していると考えられている。D2受容体拮抗薬は、忌避行動増強を特異的に阻害した。

これら哺乳類のドーパミン受容体に対する拮抗薬(antagonist)で*C. elegans* を数時間処理した後にノナノン忌避行動を解析した。その結果、抗精神病薬としても知られるD2型受容体拮抗薬は、コントロール条件下におけるノナノン忌避行動そのものは阻害しなかったが、事前刺激による忌避行動増強を特異的に阻害した(図4)。

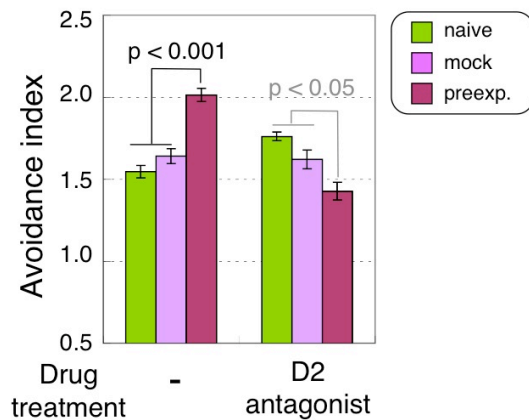


図4 ノナノン忌避行動増強に関する薬理的解析の結果。グラフ縦軸は*C. elegans* の忌避距離を示す。グラフは、"naive"は事前刺激なし、"mock"は事前刺激処理時にノナノンなし(対照群)、"preexp"がノナノンでの事前刺激あり。薬剤なしの実験では、ノナノン事前刺激によって忌避距離が伸びているが、D2拮抗薬の処理によって、忌避距離が伸びなくなっている。(木村ら、投稿中)

これに対して、D1 型受容体拮抗薬は、全く影響を与えなかった。以上の結果は、ノナノン忌避行動の増強に D2 型受容体を介したドーパミンシグナル伝達が必要である事、またこのドーパミンシグナル伝達は成虫の神経系での機能に必要な（神経系の発生に必要なのではない）ことを強く示唆した（木村ら、投稿中）。

(2) 変異体の表現型解析：薬理的解析によって、D2 型受容体がノナノン忌避行動増強に必要な可能性が強く示唆された事から、*C. elegans* の D2 型受容体のノナノン忌避行動について解析した。*C. elegans* のゲノム中には 1 つの D1 受容体 (*dop-1*) と 2 つの D2 型受容体 (*dop-2*, *dop-3*) が存在しており、それぞれについて機能欠失型変異体が単離されている。これら変異株を入手して解析を行った。

D1 型受容体 *dop-1* の忌避行動増強に異常は観察されなかった。これに対して、D2 型受容体 *dop-3* の変異体では、忌避行動増強が大きく低下した。また、無脊椎動物特異的ドーパミン受容体 *dop-4* およびドーパミンチャンネルである *lgc-53* についても単変異体および二重変異体を作成して表現型解析を行ったが、顕著な異常は認められなかった（木村ら、未発表）。以上の結果から、*C. elegans* のノナノン忌避行動増強には、D2 型受容体 *dop-3* が重要な役割を果たしている事が明らかになった。

これまでも *C. elegans* でドーパミンの機能は研究されてきたが、そのほとんどは餌となるバクテリアの存在下でのドーパミンの効果であった。すなわち、ドーパミン作動性ニューロンは機械刺激受容ニューロンであり、*C. elegans* の体壁にバクテリアが接触するのを機械的に感知して、ドーパミンを放出する。このドーパミン放出に応じて、*C. elegans* の前進/後退の切り替えなどが制御される事が明らかになっていた。しかし、本研究対象であるノナノン忌避行動の増強は餌の存在に依存しない事が明らかになっているので、新たなメカニズムにおいてドーパミンが *C. elegans* の神経機能を制御していると考えられる。

ドーパミンは哺乳類の中枢神経系において、認識・感情・報酬・薬物中毒といったさまざまな高次神経機能に関与しているが、その *in vivo* における分子レベルの作用メカニズムには不明な点が多い。本研究結果に基づいて *C. elegans* でさらなる解析を行う事によって、ドーパミンシグナル伝達の分子レベルでの新たな理解を得ることができると考

えられる。

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 1 件)

① Kuhara A, Okumura M, Kimata T, Tanizawa Y, Takano R, Kimura KD, Inada H, Matsumoto K, Mori I. Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit controlling behavior of *C. elegans*. *Science*. 320, 803-807 (2008)、査読有り

[学会発表] (計 4 件)

① 木村幸太郎 「Enhancement of odor avoidance by preexposure is regulated by dopamine in the nematode *C. elegans*.」総研大国際セミナー行動神経科学における進化研究 2008 年 6 月 (招待講演)

② 木村幸太郎 「線虫 *C. elegans* の匂い忌避行動の統合的解析—神経系が『系』として働くための原理解明を目指して」生理研研究会—シナプス可塑性の分子基盤 2008 年 6 月 (招待講演)

③ 木村幸太郎 「事前刺激で増強される線虫 *C. elegans* の匂い忌避行動にはドーパミンが必要である」第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会合同学会 シンポジウム—新世代神経行動学のストラテジー 2007 年 9 月 (招待講演)

④ 木村幸太郎 「Enhancement of odor avoidance by preexposure in *C. elegans*.」Gordon Research Conference: Neural Circuits & Plasticity 2007 年 7 月 (口頭発表)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：ドーパミンシグナル伝達阻害剤のスクリーニング法

発明者：木村幸太郎、桂勲

種類：特許権

番号：特願 2009-008572

出願年月日：2009/1/23

国内外の別：国内

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

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし