

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06761

研究課題名(和文)線虫の体壁筋弛緩によって誘導される咽頭運動停止の機構解明

研究課題名(英文)A mechanism of pumping-inhibition

研究代表者

高木 新 (Takagi, Shin)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：90171420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、線虫*C. elegans*における体壁筋の活動鎮静化による摂食運動(咽頭ポンピング)阻害という現象に着目し、体壁筋活動鎮静化に始まるシグナルの受容機構解明、ポンピング阻害に関わる内分泌的制御を司る細胞と物質の特定、を目指した。その結果、感覚受容に関わる複数の遺伝子の変異は、単独では咽頭ポンピング阻害を低下させず、受容機構の解明には至らなかった。遅いポンピング阻害にペプチドホルモンが関与する事が確認できたが、特定のペプチドの同定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

摂食は動物の生存に必須であり、動物の内的環境および外的環境に応じて制御される。このため、摂食行動調節機構の解明は生理学の重要な課題である。また、ヒトの肥満・摂食障害治療などの面から社会的にも関心が寄せられている。私たちは単純な線虫*C. elegans*を用いて、摂食に関わる新規現象の調節機構解明を目指した。今回、感覚受容に関わる単一遺伝子変異では咽頭ポンピング阻害を低下しなかったことから、受容機構に関しては、予想以上に複雑であることが示唆された。また、遅いポンピング阻害にペプチドホルモンが関与する事が確認できたが、残念ながら予定した実験系が機能せず特定のペプチドの同定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of the regulatory mechanism of feeding behavior is an important issue in physiology. Previously we showed that optogenetic silencing of the body wall muscles lead to the inhibition of pharyngeal pumping in *C. elegans*. In this study, we focused on elucidation of (1) the receptors that mediate the change caused by the silencing of the body wall muscles, and (2) endocrine factors involved in the slow pathway for inhibition of pumping. As a result, we found that (1) mutations in 11 genes, which are known to be involved in sensory reception, did not reduce the degree of pharyngeal pumping inhibition, and (2) whereas the involvement of peptide hormones in slow pumping inhibition was confirmed, no specific peptide was identified.

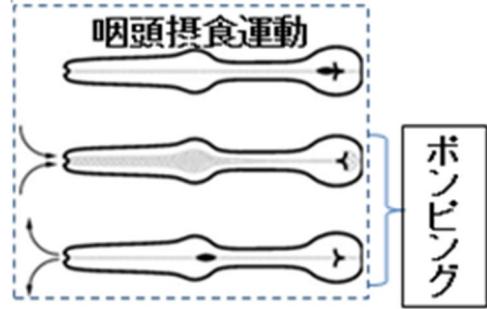
研究分野：神経科学

キーワード：摂食運動 *C. elegans* 神経ペプチド

1. 研究開始当初の背景

摂食は動物の生存に必須の行動であり、動物の内的環境および外的環境に応じて、複雑に制御されている。このため、摂食行動の調節機構の解明は生理学の重要な課題である。また、ヒトの肥満・摂食障害治療などの面から近年、社会的にも関心が寄せられている。しかし哺乳類の摂食運動は複数のステップで構成され、かつ神経系・神経内分泌系の多重的な制御を受けるため、制御機構解明は容易ではない。私たちは細胞数が少なく行動様式も単純な線虫 *C. elegans* を用いて、摂食行動の調節機構解明を目指した。

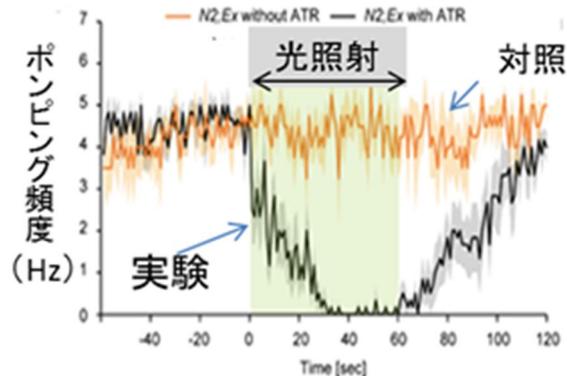
C. elegans は咽頭と呼ばれる摂食器官のポンピング運動によって餌を取り込む(図)。ポンピングの制御にも哺乳類と同様に神経系と神経内分泌系の両者が独立に関わることが明らかとなっており、摂食行動調節機構の一つのプロトタイプと位置づけることができる。この動物のポンピング調節系の全貌解明から、他の動物種の摂食運動調節機構解明に有用なヒントが得られると期待できる。



C. elegans はいわゆるモデル動物であり、遺伝学的、分子生物学的な知見の蓄積がある。 *eat* 遺伝子に代表されるように、摂食行動に関しても、重要な遺伝子が明らかにされている。

C. elegans において、摂食運動は咽頭筋、体の移動運動は体壁筋が司る。咽頭筋と体壁筋は互いに独立した組織であり、両者は異なる制御を受けると考えられている。しかし、私たちは光作動性プロトンポンプ *Arch* を利用した体壁筋の活動鎮静化によって咽頭ポンピングが停止する、という新奇な現象を見出した(Takahashi & Takagi (2017) PLoS Gen

13(12):e1007134)。即ち、*Arch* を体壁筋特異的プロモーター *myo-3p* によって発現させた線虫 *C. elegans* 個体に緑色光を照射して体壁筋を鎮静化すると、虫は弛緩し移動運動を停止するが、このとき咽頭ポンピングも停止することを偶然発見した。野生型個体では照射開始後ポンピング頻度は徐々に低下し、約30秒後に完全に停止する。照射終了後、ポンピング頻度は徐々に上昇し数分後に元に戻る(図)。



これまで体壁筋の活動が摂食行動に直接影響することは知られておらず、独自性が高い発見であった。光遺伝学的体壁筋鎮静化という人工的な操作がもたらすポンピング停止は、虫に具わる生理的な摂食運動調節機構を反映する現象だと期待され、この現象に関わる刺激入力から出力までの詳細解明が本研究の目標である。先行研究での変異体の解析は、体壁筋弛緩からポンピング停止までの信号伝達に2つの経路が存在することを明らかにした。即ち、

(1) ギャップジャンクション構成タンパク質であるイネキシン/*UNC-7* に依存し、光の **ON/OFF** に対する反応潜時が短い経路、(2) **dense core vesicle release** に働く *CADPS/CAPS/UNC-31* に依存し、反応潜時が長い経路である。前者は *RIP* 細胞-*I1* 細胞間の電気シナプスを経由し、後者は液性因子を介して咽頭外から咽頭内に作用すると考えられる。すなわち、光無照射時にはポンピングを促進する因子、光照射時にはポンピングを促進する因子が分泌され、これら光の **on/off** の後もしばらく滞留すると考えると、後者の反応潜時の特性が説明できる。この経路に関しては、カテコールアミンもしくは神経ペプチドが関与すると考えられるが、カテコールアミン産生・機能に関わるいくつかの遺伝子 (*cat-1* (VMAT), *tdc-1* (tyrosine decarboxylase), *tph-1* (tryptophan hydroxylase)) の変異

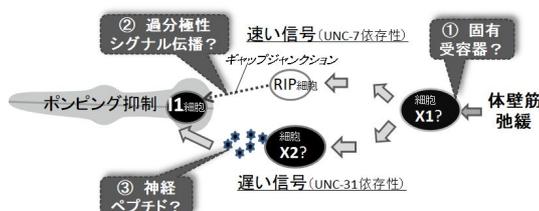
はポンピング阻害の開始・回復の時間的経緯に明瞭な影響を与えないことが先行実験から判明していた。(とくにセロトニンは *C. elegans* ポンピングに対する影響が古くから知られているが、セロトニン機能を阻害する *cat-1*, *tph-1* の両変異で変化が見られないのは予想外の結果であった)。 *C. elegans* には 250 種以上の神経ペプチドが存在すると言われていたが、その多くは機能が不明である。咽頭運動制御に関わるペプチドの役割も、一部しか解明されていない。

2. 研究の目的

本計画ではこの実験系でのポンピング抑制機構の全体像解明に向けて、受容機構の解明と受容器細胞の特定、内分泌性制御に関わる細胞と物質の特定、を目指した

体壁筋弛緩自体が引き金となってポンピングが停止することを確認しており、この現象に固有受容覚が関わることが強く示唆される。

ポンピングに対する遅い抑制性制御(長潜時経路)には神経ペプチドなどの液性因子が関わる。また、抑制性の液性制御に加えて、ポンピングは通常状態では興奮性の液性制御を受けていると思われる。(図)



3. 研究方法

実験には *C. elegans* ST322 系統 : *ncls53 (myo-3p::Arch::gfp, rig-3p::mCherry)* を用いた。この系統は光作動性プロトンポンプ Arch に GFP を融合した遺伝子 *Arch::gfp* を体壁筋特異的ミオシン遺伝子 *myo-3* のプロモーター下流に組み込んだトランジェニック系統であり、緑色光照射によって一時的な体壁筋弛緩を引き起こすことができる。また、後述するように、RNAi 実験では ST411 : *eri-1(mg366) lin-15(n744) ncls-53(myo-3p::Arch::gfp, rig-3p::mCherry)* を用いた。

感覚受容に関わることが知られている変異を交配によって ST322 に導入し、実験に用いた。

feeding RNA interference(RNAi)によりペプチド遺伝子の発現阻害を試みた。これは線虫 *C. elegans* において、二本鎖 RNA(dsRNA)を発現する大腸菌を摂食によって体内に取り込むことで、その配列に相補的な内在性の遺伝子の不活性化を起こす手法である。

*egl-3(RNAi)*は、大腸菌 HT115(DE3)に *egl-3* 遺伝子の *exon1* を挿入(*egl-3-3ex1_ΔSac2, egl3-3ex1_rXho*)した **feeding vector L4440** を導入し、形質転換を行った。

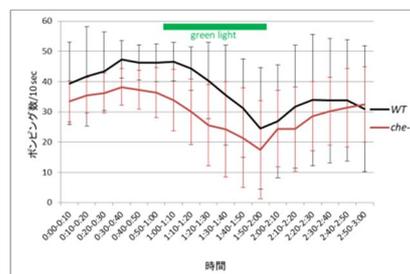
検索には神経ペプチド遺伝子の dsDNA をプラスミドとして導入した大腸菌系統を使用した(Cheong et al., eLIFE 2015)。大腸菌ライブラリーは Young-Jai You 博士から譲渡されたもので、29 個の FMRF 様ペプチド遺伝子、42 個の神経ペプチド様タンパク質遺伝子、32 個のインスリン様ペプチド遺伝子の合計 102 個の遺伝子に対する **feeding RNAi** 用の大腸菌系統を含む。

4. 研究成果

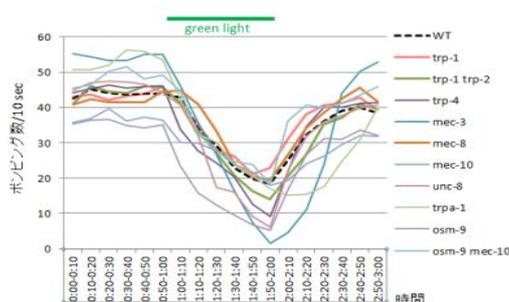
受容機構と受容器細胞の解明

感覚繊毛形成に必須とされる 2 遺伝子 (*che-2, che-3*) の変異体は化学受容、温度受容、そして一部の機械受容に異常を示すことが知られている。これらの変異をそれぞれ ST322 系統に導入したが、光照射に対する咽頭ポンピングの応答に大きな変化はなかった(図 *che-3*)。

更に、これまで機械受容、固有受容に関係すると報告



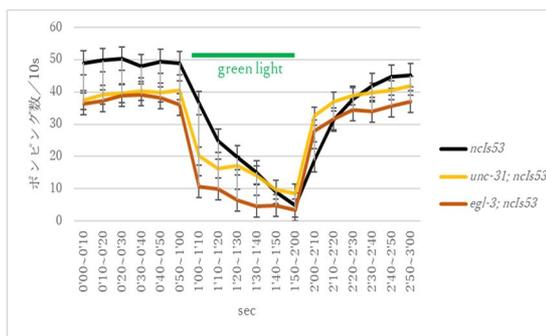
された9遺伝子 (*mec-3*, *mec-8*, *mec-10*, *unc-8*, *trp-1*, *trp-2*, *trp-4*, *osm-9*, *trpa-1*) に関して、それぞれの変異を ST322 系統に導入して、光照射に対する咽頭ポンピングの応答を調べた(図)。FLP 神経細胞による **harsh touch** の受容に関わることが報告されている *mec-10* 遺伝子変異で、応答が低下する傾向がみられるなど、対照と若干異なる結果もえられたが、いずれの変異によっても光照射に対する咽頭ポンピングの阻害応答に大きな変化は引き起こせなかった。このことから、もし受容機構にこれらの遺伝子産物が関わるとしても、それは単一でなく複数遺伝子産物として関わっている可能性が考えられる。



内分泌性制御に関わる物質の解明

i) “遅い”ポンピング阻害への神経ペプチドの関与。

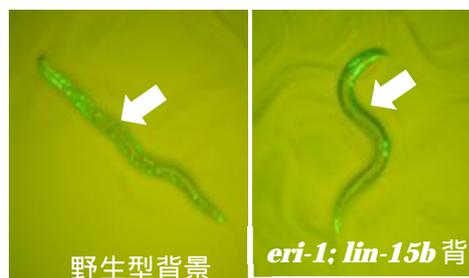
“遅い”ポンピング阻害にはペプチドが関与すると可能性が示唆されていた。しかし、その一方で、以前の実験では、多くのペプチドホルモンの産生に必要である **proprotein convertase** をコードする *egl-3 n729* (ミスセンス変異) がポンピング阻害の開始・回復に影響しないという結果も得ており、これはペプチドホルモン仮説と適合しない。ただ、*n729* は2個存在する *egl-3 mRNA* スプライシングバリエーションの内、一方には影響を与えないことが予想されるため、完全機能欠失ではない可能性がある。そこで今回 *egl-3(gk238)* を ST322 系統に導入して実験を行なった。*gk238* は約 1.4 kb の欠失アリルであるため完全機能欠失であることが期待できる。その結果、*gk238* 存在下では消灯時のポンピング回復遅滞が減少するという *unc-31* 変異と同様の効果が見られ、“遅い”ポンピング阻害へのペプチドの関与が裏付けられた(図 茶色線分赤矢印)。



ii) “遅い”ポンピング阻害に関わる神経ペプチド同定の試み

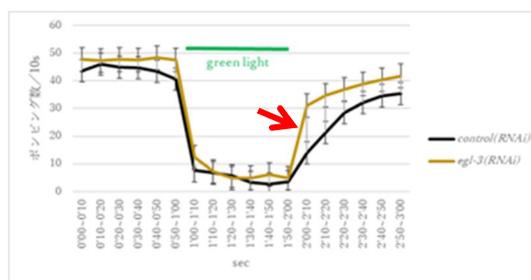
C. elegans の神経系では通常の状態では RNAi を引き起こすことが困難であることが知られている。そこでまず、神経細胞への dsRNA の導入を図るために *sid-1* 遺伝子を異所発現するトランスジェニック系統 *uls60(unc-119p::sid-1)* を利用することを試みた。しかし *uls60* を *ncls53* に導入して *unc-31* 遺伝子に対する **feeding RNAi** を行ったが、遺伝子変異で見られるような運動異常 (**Unc**) 表現型が観察されず、また神経系で発現する **mCherry** に対する RNAi でも蛍光がほとんど低下しなかった。

先行研究 (Cheong et al., eLIFE 2015) にならって RNAi に対する感受性を向上させる *eri-1; lin-15b* 二重変異を ST322 系統に導入した系統 ST411 を作成し、実験に使用することにした。しかし、ST411 では、通常条件で光照射を行っても体壁筋弛緩による移動抑制がほとんど見られなかった。ST411 での Arch の発現を GFP 蛍光によって確認すると、成虫において *ncls53* を単独でもつ ST322 系統と比べて、体壁筋での Arch の発現が大きく低下していた(図 *eri-1; lin-15b* 背景では胴体部分の緑色蛍光(矢印)がほとんど見られなくなっている)。



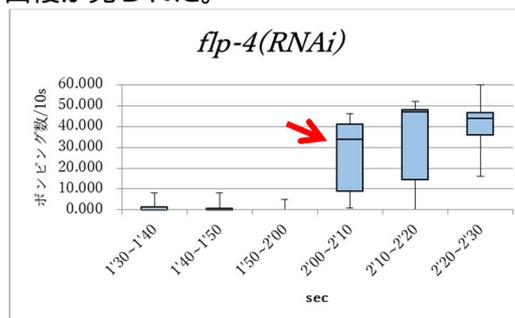
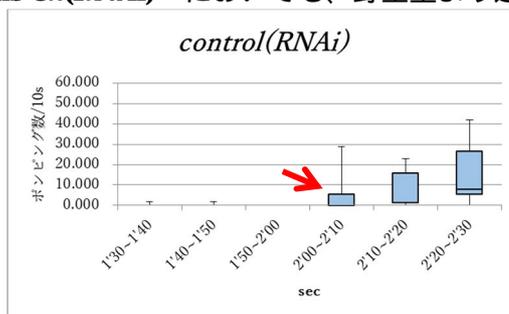
独立して作成した **3** 系統を作成したが、いずれにおいても特に成虫での **Arch::GFP** の発現が顕著に減少していた。 **eri-1; lin-15b** をアウトクロスによって除くと **GFP** 蛍光も体壁筋弛緩反応も野生型背景と同程度まで回復したため、 **eri-1; lin-15b** 変異に成虫でのトランスジーン発現抑制効果があると考えられる。一方、幼虫期では **ST411** での **Arch** の発現低下は比較的小さかった。そこで従来の実験で用いていた成虫に代えて **4** 齢幼虫 (**L4**) 個体を用いることとした。結果としては、 **ST411** では **ST322** と同程度まで **1** 分間の照射によってポンピング頻度が減少し、照射停止によるポンピング頻度の回復が見られた。

この **L4** 個体を用いる実験条件で検索が可能かどうかを検討するために、 **egl-3(RNAi)** がポンピング阻害の開始・終了に、 **egl-3** 遺伝子変異と同様に影響するかどうかを調べた。その結果、ポンピング阻害の終了が対照と比べて早くなるという結果が得られた (図 **egl-3(RNAi)** 赤矢印)。



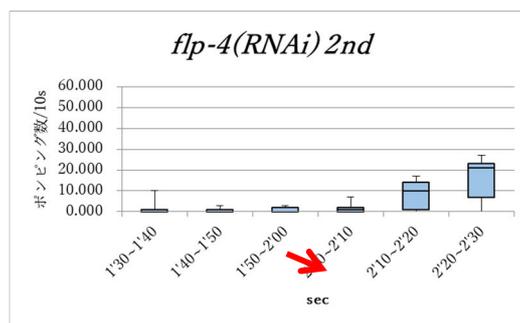
これは、野生型ではポンピング阻害を引き起こすペプチドが照射後もすぐには消失せず残存するが、 **egl-3(RNAi)** 個体ではそのようなペプチドが分泌されないためだと考えられる。そこで、照射終了後のポンピング阻害からの回復の速さに着目して検索する事とし、合計 **102** 個のペプチド遺伝子の **feeding RNAi** を行った。

1 次検索では **flp-4**, **flp-5**, **ins-27** の 3 遺伝子の **RNAi** によって **egl-3(RNAi)** と同様の速い回復が見られた (図 赤矢印 **flp-4(RNAi)** の例を示す)。また、その他 8 個 **flp-15(RNAi)**, **ins-4(RNAi)**, **ins-14(RNAi)**, **ins-17(RNAi)**, **ins-21(RNAi)**, **ins-24(RNAi)**, **ins-25(RNAi)**, **ins-32(RNAi)** においても、野生型より速い回復が見られた。



1 次検索では 5 ~ 7 個体を実験に用いた。そこで実験個体数を増やして、2 次検索として上記の候補遺伝子に対する **RNAi** を行ったが、回復が早くなるという 1 次検索の結果を再現できなかった (図 “**flp-4(RNAi) 2nd**”)。

その後、実験者を交代して、**L4** 期の幼虫を対象にして再度実験条件を検討したが、対照群でも実験ごとに結果がばらつき、再現性が得られないことがわかった。**L4** 期の幼虫中で **Arch::GFP** 発現量にバラつきがあることが原因と思われる。



このように、本研究によって、神経ペプチドが遅いポンピング阻害に関わることを示すことはできたが、成虫での **RNAi** および幼虫での照射では、いずれも適切に機能する実験系を作成することができず、関与する神経ペプチドを同定することはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------