

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700345

研究課題名（和文）記憶学習において働くインスリンシグナル伝達経路の新奇制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of a novel mechanism regulated by insulin signaling pathway in learning and memory

研究代表者

富岡 征大（TOMIOKA MASAHIRO）

東京大学・理学系研究科・助教

研究者番号：40466800

研究成果の概要（和文）：インスリンシグナル伝達は、エネルギー代謝などの末梢における働きに加えて、中枢神経系においても働く重要な分子経路である。私は、線虫の摂食に関連した学習において働くインスリン様シグナル伝達経路に着目し、その詳しい制御機構を明らかにすることを目的として研究を行った。主な研究成果として、線虫のインスリン様分子 INS-1 は餌の感覚応答に関わる神経から分泌され、学習に必要な化学物質受容神経に作用し、この神経の機能を修飾しているという制御モデルを得た。本研究で得られた結果を元に、今後、哺乳類の脳など、より複雑な神経系におけるインスリン経路の働きが解明されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Insulin signaling is one of the most important molecular pathways that act not only in the peripheral organ but also in the central nervous system. We focused on the insulin-like signaling pathway that regulates food-related learning behaviors in the nematode *C. elegans*, and attempted to find a novel regulatory mechanism of the insulin-like pathway. One of the major achievements is that we obtained a model in which an insulin-like peptide INS-1 is secreted from sensory neurons that receive food information from the environment and acts on chemosensory neurons required for the learned behavior to modulate the neuronal functions. Based on this model, we hope to further examine regulatory mechanisms of the nervous system by the insulin pathway using *C. elegans* as well as the other organisms including mammals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：インスリン、PI3 キナーゼ、シグナル伝達、感覚応答、行動、学習、線虫、イメージング

1. 研究開始当初の背景

インスリンシグナル伝達は、進化的に保存された生存に必須なシグナル伝達経路である。近年、哺乳類を用いた研究を中心に、摂食行動の制御や記憶学習など、末梢のみならず中枢神経系においてもこのシグナル伝達経路が重要な機能を持つことがわかってきている。摂食行動の制御に関しては、詳しい制御機構がわかっているが、記憶学習における制御機構として、次に示すような未解決の問題が残されている。

(1) 記憶学習におけるインスリンの分泌制御機構

脳内に存在するインスリンは末梢から流入したものと脳内で合成されたものの2つの経路が考えられる。記憶学習において働くインスリンの作用機構として、末梢から分泌されて神経細胞に作用する可能性（ホルモン様の働き）と、シナプス接続を介して働く可能性（神経修飾物質様の働き）の大きく2つに分けられる。

(2) 記憶学習においてインスリンシグナル伝達が修飾する神経機能

インスリン経路が直接シナプス伝達の制御因子に作用する可能性と、グルコース代謝などを調節して細胞内のエネルギー状態を制御することで間接的に神経細胞の活性を変化させている可能性が考えられる。

我々は、線虫 *C. elegans* の示す学習においてインスリン/PI3 キナーゼ (PI3K) シグナル伝達経路が枢軸的な働きを持つことを示している。線虫は、飢餓条件に長時間置かれると、飢餓条件下の環境（化学物質の組成）を記憶し、その環境から逃げるような行動を

示すようになる。この学習（以後、化学走性学習と呼ぶ）に、インスリン/PI3K シグナル伝達経路の変異体は著しい欠損を示す。インスリン受容体とその下流で働く PI3K 経路は、化学物質を受容する感覚神経で働く。一方、インスリンリガンド INS-1 は数種類の神経と腸において発現がみられるが、神経からの INS-1 の分泌が学習の制御に必要である。また、細胞内で INS-1 は細胞質とプレシナプス部位の両方に局在する。しかし、INS-1 の神経細胞からの分泌制御機構や、インスリン受容体/PI3K シグナル伝達経路の感覚神経における機能修飾機構は明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) 学習を制御するインスリン様分子 INS-1 の分泌制御機構

INS-1 の神経細胞からの分泌を調節する外部シグナルとそれを調節する分子経路を明らかにする。

(2) PIP₃ 依存性キナーゼの下流で線虫の学習を制御する分子機構

インスリン/PI3K 経路に依存して線虫の学習を制御する PIP₃ 依存性キナーゼの下流分子を探索し、インスリン/PI3K 経路が記憶学習の制御において、どのような分子機構に働きかけるのかを明らかにする。以上の解析から、記憶学習においてインスリンシグナル伝達経路が神経系を調節する機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 学習を制御するインスリン様分子 INS-1 の分泌制御機構

① 化学走性学習に異常を示す *ins-1* 変異体において、細胞特異的レスキュー実験を

行い、INS-1の分泌により学習を制御できる神経細胞を特定する。

- ② INS-1の分泌に関わる神経細胞がどのような刺激に応答してINS-1の分泌を制御しているのか、カルシウム指示タンパク質 (GCaMP) やpH感受性緑色蛍光タンパク質融合INS-1 (INS-1::pHluorin) を用いた *in vivo* ライブイメージングにより明らかにする。
- ③ INS-1の分泌に関わる神経細胞を人為的に活性化させた時の学習への影響を調べる。人為的な活性化には、哺乳類カプサイシン受容体(VR1)を特定の神経で異所発現させ、カプサイシンを与えることで行う (カプサイシンに対して野生株線虫は反応を示さない)。この実験において、INS-1の分泌がいつ、どのような刺激により分泌されることが必要なかを調べる。

(2) PIP₃依存性キナーゼ (AKT-1) の下流で線虫の学習を制御する分子機構

PI3キナーゼが産生するPIP₃により活性化されるAKT-1は化学走性学習に異常を示す。先行研究において、発生や寿命の制御におけるAKT-1のターゲット分子DAF-16 (FOXO型転写因子) の学習への関与を調べたが、AKT-1の主要なターゲットはDAF-16以外の分子であることがわかっている。そこで、AKT-1の新規下流分子を以下の手法により探索し、AKT-1が制御する分子機構を明らかにする。AKT-1の機能が喪失した変異体は学習異常を示す。そこで、*akt-1*変異体を変異原処理することにより学習異常を抑圧する変異体を獲得し、その原因遺伝子を同定する。それらの遺伝子にはAKT-1により活性が調節される学習制御因子をコードするものが含まれると期待される。

4. 研究成果

(1) 学習を制御するインスリン様分子INS-1の分泌制御機構

- ① 限られた神経細胞で発現を誘導する約20種類の細胞特異的プロモーターを用いて、*ins-1*変異体の様々な神経細胞にINS-1::VENUS (INS-1と蛍光タンパク質VENUSの融合タンパク質) を発現させた。発現させた細胞からのINS-1::VENUSの分泌を確かめると同時に、*ins-1*変異体の学習異常をレスキューするか否かを調べた。その結果、発現させた殆どの神経からINS-1::VENUSの分泌がみられた。従って、多くの神経細胞はINS-1::VENUSを分泌する性質をもつといえる。一方で、INS-1::VENUSの発現により、*ins-1*変異体の学習異常をレスキューした神経細胞は数種類に限られた。その細胞は、外部環境の化学物質を受容する複数の感覚神経と、飢餓情報の伝達に関わる1種類の介在神経であった。

- ② ①の解析から、INS-1は主に感覚神経 (と1種類の介在神経) から分泌されることがわかったので、INS-1が感覚刺激に依存して分泌される可能性を調べた。まず、カルシウム指示タンパク質GCaMPを感覚神経に発現させて、餌に対する反応性を調べた。その結果、INS-1が主に働く感覚神経の殆どは、飢餓刺激に依存して活性が上昇することがわかった。また、飢餓情報の伝達に関わる介在神経も、予想通り飢餓刺激に依存して活性が上昇した。一方、INS-1が働く幾つかの感覚神経や介在神経において、NaCl (化学走性学習において飢餓と連合して記憶される物質の1つ) に対する応答を調べたが、明らかな応答は見られなかった。以上の結果から、INS-1の働く神経細胞は飢餓情

報に依存して活性化される神経群であることが明らかになった。

次に、INS-1::pHluorinをINS-1が働く感覚神経や介在神経に発現させてINS-1の分泌を可視化する試みを行った。INS-1は神経細胞のシナプス小胞に含まれており、酸性条件のシナプス小胞から中性条件の細胞外に放出される際に、pH依存性のINS-1::pHluorinの蛍光強度が上昇することが期待される。現在までの所、餌刺激に依存したINS-1::pHluorinの明らかな蛍光強度変化は観察されていない。線虫のシナプス領域に存在するシナプス小胞の数が少ない為、INS-1::pHluorinの蛍光強度とシグナル・ノイズ比は、共に低い。このことは、微小の分泌量変化を捉えることの弊害となっている可能性がある。今後、蛍光プローブや実験条件の改良を行うことで、INS-1の分泌を可視化したい。

- ③ INS-1が働く介在神経に接続する感覚神経にVR1を発現させ、カプサイシン刺激を与えることでこの介在神経の活性を制御できる線虫を作成した。この線虫に、条件付け後の行動テスト時にカプサイシン刺激を与えたところ、化学走性学習の著しい異常が引き起こされた。一方で、条件付け時のカプサイシン刺激は効果が見られなかった。さらに、*ins-1*変異体ではカプサイシン刺激の効果は見られず、*ins-1*変異体に介在神経特異的にINS-1を発現させた場合のみ、このような学習異常が観察された。従って、行動テスト時のINS-1の正常な分泌が化学走性学習に必要であることが明らかになった。

以上の結果から、INS-1は飢餓刺激により分泌が促され、その分泌は行動テスト時の記憶の保持や呼び出しに必要であるというモ

デルが示唆された。最近、ラットのIGF-IIが記憶の保持に働くという報告があり、記憶の保持に関わるインスリン関連ペプチドの働きは進化的に保存された機構であるのかもしれない。

以上の結果は、国内外の学会発表において高い評価を得ており、現在、学術誌に投稿するための準備中である。

(2) PIP₃依存性キナーゼ (AKT-1) の下流で線虫の学習を制御する分子機構

PIP₃依存性キナーゼ *akt-1* (Aktの線虫ホモログ) の変異体を用いて、*akt-1* 変異による学習異常を抑圧する変異体をスクリーニングした。*akt-1* 変異体に対して化学変異原処理を行い、およそ30万ゲノムをスクリーニングしたところ、11系統の学習異常抑圧変異体を獲得した。これらの変異体の詳しい表現型を解析した結果、3つの変異体群、すなわち、①化学物質 (NaCl) に対する応答性が異常な変異体群、②飢餓情報伝達に異常を示す変異体群、③化学物質 (NaCl) からの忌避行動が亢進した変異体群、に分けられることがわかった。

変異体群③の中から、表現型の最も顕著であった1系統に着目し原因遺伝子のマッピングを行ったところ、原因遺伝子はI番染色体の中央領域の約6.7メガベースの範囲内にあることがわかった。今後、詳細なマッピングや表現型のレスキュー実験により原因遺伝子を同定する予定である。

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 Oda S, Tomioka M, Iino Y
Neuronal plasticity regulated by the insulin-like signaling pathway underlies salt chemotaxis learning in

Caenorhabditis elegans.

J. Neurophysiol. *in press* (2011) 査読有

② Adachi T, Kunitomo H*, Tomioka M*, Ohno H, Okochi Y, Mori I, Iino Y. (*equally contributed)

Reversal of salt preference is directed by the insulin/PI3K and Gq/PKC signaling in *Caenorhabditis elegans*.

Genetics 186: 1309-1319 (2010) 査読有

③ Lin CH*, Tomioka M*, Pereira S, Sellings L, Iino Y, van der Kooy D. (*equally contributed)

Insulin signaling plays a dual role in *Caenorhabditis elegans* memory acquisition and memory retrieval.

J. Neurosci. 30 :8001-11 (2010) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

① 富岡 征大

「線虫 *C. elegans* の学習を制御するインスリン様シグナル伝達経路の役割」
第 81 回 日本動物学会大会
2010 年 9 月 24 日 東京

② 富岡 征大

「The role of INS-1, an insulin-like peptide, in salt chemotaxis learning」
Neuronal Development, Synaptic Function & Behavior *C. elegans* Topic Meeting 2010
2010 年 6 月 29 日 マディソン (USA)

③ 富岡 征大

「線虫 *C. elegans* の塩走性学習におけるインスリン様ペプチド INS-1 の分泌の役割」
第 32 回 日本分子生物学会年会
2009 年 12 月 11 日 横浜

④ 富岡 征大

「Dopamine-dependent secretion of INS-1, an insulin-like peptide, regulates salt chemotaxis learning in *C. elegans*」
第 32 回 日本神経科学大会
2009 年 9 月 16 日 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富岡 征大 (TOMIOKA MASAHIRO)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：40466800

(3) 連携研究者

飯野 雄一 (YUICHI IINO)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：40192471