

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700439

研究課題名（和文） *C. elegans* を用いた新規アミンシグナル調節因子の同定研究課題名（英文） Identification of regulators of biogenic amine signaling in *C. elegans*

研究代表者

周防 諭 (SUO SATOSHI)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：20596845

研究成果の概要（和文）：ドーパミン、ノルアドレナリン、セロトニンといったアミン神経伝達物質は動物の行動や代謝の制御に重要な役割を果たす。本研究では、モデル生物 *C. elegans* を用いて、アミンによる神経伝達を制御する因子の同定を行った。その結果、ニューロペプチドによるシグナル伝達によってアミンシグナルが制御されていることを明らかにするとともに、新たなアミン受容体を同定し解析した。

研究成果の概要（英文）：Biogenic amine neurotransmitters, such as dopamine, noradrenaline, and serotonin, play important roles in regulating behaviors and metabolism of animals. In this study, we used a model animal *Caenorhabditis elegans* to identify novel factors that regulate amine signaling and found that neuropeptide signaling regulates amine signaling. We also identified and characterized an amine neurotransmitter involved in this signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経伝達物質、受容体、モデル生物、ドーパミン、  
オクトパミン、ニューロペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

#### アミンシグナル調節因子と精神疾患

ドーパミン、ノルアドレナリン、セロトニンといったアミン神経伝達物質は動物の行動や代謝の制御に重要な役割を果たす。多くの抗精神病薬や抗うつ薬はアミンのレセプターやトランスポーターを標的とすることから、これらの神経伝達物質によるシグナル伝達の異常は統合失調症やうつ病といった精神疾患の原因の一つであると考えられている。多くの精神疾患は遺伝性であるので、アミンシグナル異常にも遺伝的原因があり、これが疾患の発症しやすさを規定していると考えられる。従って、神経伝達に関する基

礎的な理解を深めるとともに、これら精神疾患の発症メカニズムを理解し、より効果的な治療・予防法を開発するには、アミンシグナルを調節する遺伝的因子の同定が非常に重要である。しかし、ヒトや哺乳類モデル生物を用いて多くの研究が行われてきたにも関わらず、アミンシグナルを調節する因子はほとんど見つかっていない。

### 2. 研究の目的

#### （1）アミン神経伝達物質シグナルのモデルシステムとしての *C. elegans*

*C. elegans* は神経系の発達や機能を遺伝学的に解析する上で、非常に優れたモデル生物

である。*C. elegans*においては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る。実際にこれまで *C. elegans* を用いた遺伝学的スクリーニングにより、神経機能に関わる多くの重要な因子が同定されている。また、*C. elegans*においてはドーパミンが神経伝達物質として機能することが示されている (Chase and Koelle 2007 Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*, WormBook)。さらに、ドーパミン合成やシグナルに関わる遺伝子が同定されているが、それらは哺乳類のものとはよく保存されていることもわかっている (Suo et al. 2004 Eur J Pharmacol 500, 159-166.)。同じくアミン神経伝達物質であるオクトパミンも *C. elegans* において神経伝達物質として機能することが示されている。オクトパミンはノルアドレナリンと化学構造、生理的作用、さらにその受容体の構造が似ていることから、脊椎動物におけるノルアドレナリンと相同な物質と考えられている (Roeder 1999 Prog Neurobiol 59, 533-561)。以上のことから、*C. elegans*は哺乳類と似たアミン神経伝達物質システムを持っており、アミンシグナル調節に関わる分子的・神経的メカニズムを遺伝学的手法によって解析するモデルとして有効であることがわかる。

#### (2) 蛍光レポーターとアミン調節因子のスクリーニング

最近我々は *C. elegans* 生体内でアミン神経伝達物質のシグナルを検出できる蛍光レポーターシステムを開発した。このシステムでは cAMP 応答因子 (CRE) と GFP 遺伝子の融合遺伝子 *cre::gfp* を用いている。このレポーターを形質転換した *C. elegans* 株では CREB (CRE 結合タンパク質) の活性化により GFP が発現するので、蛍光により CREB の活性化を検出できる (Kimura et al. 2002 EMBO rep 3, 962-966)。我々はこの株を用いて、餌がないときはオクトパミンにより SIA というニューロンで CREB が活性化されることを明らかにした (Suo et al. 2006 J Neurosci 26, 10082-10090)。さらなる遺伝学的解析により、オクトパミンの下流でオクトパミンレセプター SER-3 と Gq  $\alpha$  サブユニット EGL-30 が働いていることを明らかにした。これに対し、ドーパミンシグナルは餌があるときにオクトパミンシグナルを抑制することで CREB の活性化を抑制することも発見した (Suo et al. 2009 EMBO J 28, 2437-2448)。さらに、ドーパミンの下流では 2 つの Gi/o 共役レセプター DOP-2 と DOP-3 及び Gi/o  $\alpha$  サブユニット GOA-1 が働き、オクトパミンの放出及び下流の情報伝達を抑制していることを明らかにした。

以上の結果から *cre::gfp* を用いることでドーパミンとオクトパミンのシグナルがモニターできることがわかる。本研究では、我々が見出したこのレポーターシステムをスクリーニングに応用し、CREB 活性に異常が見られる変異体を単離することで、アミンシグナルを調節する新たな因子の同定及び遺伝学的解析を行う。

#### 3. 研究の方法

本研究では前述のレポーターを用いたアミンシグナルを調節する因子のスクリーニングと機能解析を行う。まず、SIA ニューロンにおいて CREB の恒常的活性化が見られる変異体のスクリーニングに着手する。具体的には *cre::gfp* をもつ株に変異を導入した後、餌存在下で SIA ニューロンにおいて GFP の発現が見られる個体を、蛍光顕微鏡を用いて単離していく。このスクリーニングでは主に、(1) ドーパミンシグナルを弱くする変異、(2) オクトパミンシグナルを異常に強くする変異、という 2 種類の変異を同定するはずである。次に SNP を用いたマッピングにより、変異がどの染色体のおよそどの位置にあるか決定する。その後、変異がマップされた領域のゲノム DNA の一部分を持つコスミドやフォスミドを変異体に導入し、表現型が回復するか調べることで、変異遺伝子がどの遺伝子であるのか特定する。

スクリーニングとは別に、候補遺伝子を解析する手法 (候補遺伝子アプローチ) によりドーパミン・オクトパミンシグナルに関与する新規遺伝子を探索していく。これまでの研究で、この手法により、*egl-21* の変異体では SIA ニューロンにおける CREB の恒常的活性化が見られることを明らかにしている。*egl-21* はニューロペプチドのプロセッシングに必要なカルボペプチダーゼ E をコードしている。従って、何らかのニューロペプチドがアミンシグナルを制御していることが予想される。そこで、ニューロペプチドによる CREB 制御についてより詳細な解析を行う。*C. elegans* にはゲノム上に多数のニューロペプチド遺伝子・ニューロペプチド受容体遺伝子が存在するが、その中のどれが CREB の調節に関っているか同定する。さらに、このニューロペプチドシグナルに関しても詳細な遺伝学的解析を行うことにより、ニューロペプチドがアミンシグナルを制御するメカニズムを明らかにしていく。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝学的スクリーニングによる解析

遺伝学的スクリーニングによってアミン神経伝達物質で制御されている CREB が恒常的に活性化している変異体を単離した。さら

に、その過程で、アミンシグナルによって CREB が制御されている神経細胞とは別の感覚神経細胞にて CREB が恒常的に活性化される変異体も一株単離した。同じような感覚神経において熱刺激によって CREB が活性化することから、熱刺激応答に関与する因子の発見につながる可能性があり興味深い。

これらの株についてのマッピングは完了していない。マッピングには通常 CB4856 という株を用いるが、この株自身に npr-1 遺伝子の変異が存在する。npr-1 が CREB 活性化に関与しているため（後述）、この株を用いたマッピングは困難であると考えられる。今後は、別の株を用いたマッピングか、次世代シーケンス法による解析が必要だと考えられる。

### (2) ニューロペプチドとアミンシグナルの相互作用

これまでの予備的実験により、ニューロペプチドのプロセッシングに関わるカルボペプチダーゼ E をコードする egl-21 遺伝子の変異体でも CREB の活性化が起こることを見出ししていた。今回、egl-21 変異体についてより詳細な解析を行い、ニューロペプチドによる CREB の制御はドーパミンとは並列に働き、オクトパミンの上流で機能していることを明らかにした（図1）。すなわち、egl-21 遺伝子はドーパミンとは独立したメカニズムによって、餌依存的にオクトパミンシグナルを抑制していることが明らかとなった。さらに、egl-21 と同じようにニューロペプチドのプロセッシングに重要な egl-3 遺伝子の変異体についても同じ表現型が見られたことから、ニューロペプチドがアミンシグナルの制御を行っていることが明らかとなった（図1）。

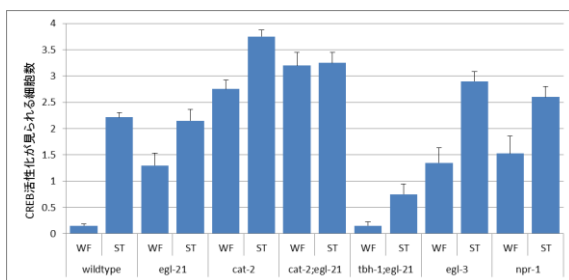


図1. ニューロペプチドによるアミンシグナルの制御

egl-21、egl-3、npr-1 変異体では CREB の活性化が上昇している。egl-21 で見られた活性化は、cat-2（ドーパミン欠損株）ではみられるが、tbh-1（オクトパミン欠損株）では見られないことから、ニューロペプチドはオクトパミンの上流で働いていると考えられる。

WF: well-fed、餌あり

ST: starvation、餌なし

*C. elegans* は非常に多くの種類のニューロペプチドとニューロペプチド受容体を持つが、解析の結果、npr-1 というニューロペプチド受容体の遺伝子がこの制御に関与することを明らかにした（図1）。NPR-1 は餌によるシグナルに関与していることが示唆されているので、同じく餌により制御されるドーパミンシグナルと並列に働くことで重複した制御が行われていることが示唆された。

npr-1 は *C. elegans* で、行動や代謝、免疫などに重要な役割を果たす遺伝子で、哺乳類のニューロペプチド Y やニューロペプチド FF の受容体と相溶性が高い受容体である。ニューロペプチドによるアミンシグナルの制御が示されたことは興味深く、今後はこの実験系を用いて、その制御機構の解明が期待される。

### (3) オクトパミン受容体 ser-6 の解析

egl-21 を同定したのと同様に候補遺伝子アプローチにより、ser-6 遺伝子がオクトパミンシグナルに関与していることを明らかにした。これまでに、オクトパミンによる CREB の活性化には受容体である SER-3 が必要であることがわかっていた。まず我々は、配列解析により、SER-6 は SER-3 と相溶性が高く同じグループに属する受容体であることを明らかにした（図2）。

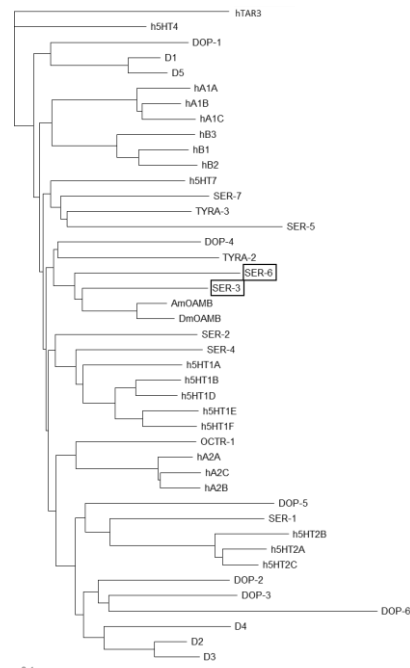


図2. アミン受容体の系統樹

ser-6 変異体について、オクトパミンや飢餓条件依存的な CREB 活性化に必要なか調べたところ、ser-3 変異体同様 ser-6 変異体では CREB 活性化が減少していた（図3）。

このことから、SER-6 受容体はオクトパミンシグナル伝達に働いていることを明らかにした。SER-3 と SER-6 は同じような受容体であるにもかかわらず、片方がなくなっただけでもシグナル伝達に異常が見られるは興味深く、このメカニズムの解析を行うことにした。SER-3 は CREB の活性化の見られる SIA ニューロンで働くことが既に明らかになっている。まず、SER-6 の発現部位を解析したところ、SIA ニューロンを含む多数のニューロンで発現していることが明らかになった (図 4)。次に、SER-6 を ser-6 変異体の SIA ニューロンだけで発現させたところ、ser-6 変異体の表現型が回復したので、SER-6 が SER-3 と同様に SIA ニューロンで働いていることが明らかとなった (図 5)。この結果から、SER-3 と SER-6 は同様の機能をもつ受容体であると考えられ、同じ細胞で機能しているのに、片方でも存在しないとシグナル伝達に異常が見られることが明らかとなった。

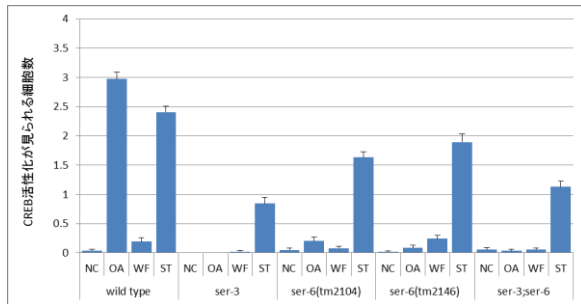


図 3. ser-3 と ser-6 変異体における CREB 活性化  
NC:オクトパミンなし、OA:オクトパミン処理、WF:餌あり、ST:餌なし

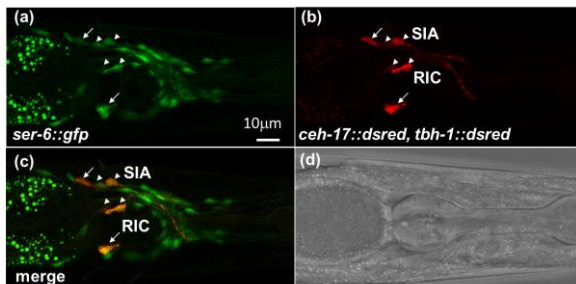


図 4. ser-6 の発現部位  
(a)ser-6::gfp レポーターにより ser-6 発現部位を標識した。(b)ceh-17::dsred、tbh-1::dsredにより SIA ニューロンと RIC ニューロンを標識した。(c)結合画像(d)微分干渉像

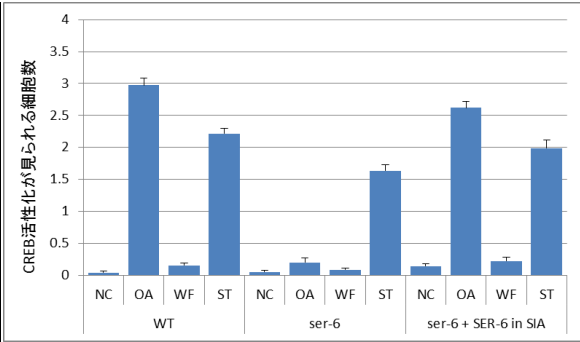


図 5. ser-6 の細胞特異的レスキュー実験  
ser-6 遺伝子を SIA ニューロン特異的に発現させると、ser-6 変異体で見られていた異常が回復し、野生型同様の表現型を示した。NC:オクトパミンなし、OA:オクトパミン処理、WF:餌あり、ST:餌なし

次に、SER-3 と SER-6 の量を人為的に操作し、その影響を調べた。その結果、SER-3 が存在しないときに、SER-6 が過剰に存在しても CREB の活性化は見られないが、SER-6 非存在下で SER-3 を過剰に発現させると CREB の活性化が見られることを明らかにした。このことから、通常 CREB の活性化に SER-6 は必要であるが、SER-3 が過剰に存在するときは、SER-6 非依存的なシグナル伝達が行われるので、SER-3 は単独でも働くことができ、SER-6 は SER-3 を補助する働きをしていることが示唆された。さらに、この制御にβアレスチンによる脱感作が関与していることを示唆する結果が得られている。

機能の重複する受容体は普遍的に存在している。培養細胞を用いた実験などから、それらの受容体の機能的な相互作用が報告されているが、生体内での重複する受容体の存在意義と、その働きの様式はほとんど明らかになっていない。今回明らかとなった SER-3 と SER-6 の関係は、機能の重複した受容体の存在意義を理解するうえで興味深く、本研究の目的であるアミンシグナル制御の理解に貢献するものである。

## 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)

[学会発表] (計 7 件)

(1) 周防論、石浦章一「Dopamine and octopamine regulate acetylcholine signaling in *C. elegans*」日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜、横浜

(2) 大網栄太郎、周防論、石浦章一「Dopamine regulates the body length through two dopamine receptors in *C.*

*elegans*] 日本分子生物学会年会、2011年  
12月14日、パシフィコ横浜、横浜

(3) 吉田碧、周防諭、石浦章一「*C. elegans*  
における2種のGq共役型オクトパミン受容  
体を必要とする飢餓依存的なシグナル伝達  
の解析」日本分子生物学会年会、2011年12  
月14日、パシフィコ横浜、横浜

(4) 周防諭、石浦章一「Bioamine-  
regulation of acetylcholine signaling in  
*C. elegans*] East Asia *C. elegans* Meeting、  
2012年6月28日、劍潭海外青年活動センタ  
ー、台北、台湾

(5) 大網栄太郎、周防諭、石浦章一  
「Dopamine regulates the body length in *C.*  
*elegans*] East Asia *C. elegans* Meeting、  
2012年6月27日、劍潭海外青年活動センタ  
ー、台北、台湾

(6) 吉田碧、周防諭、石浦章一「Analysis of  
starvation-mediated signaling that  
requires two Gq-coupled octopamine  
receptors in *C. elegans*] East Asia *C.*  
*elegans* Meeting、2012年6月27日、劍潭海  
外青年活動センター、台北、台湾

(7) 大網栄太郎、周防諭、石浦章一「ドー  
パミンとオクトパミンによる線虫 *C. elegans*  
の体のサイズ制御」日本分子生物学会年会、  
2012年12月12日、福岡国際会議場、福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

周防 諭 (SUO SATOSHI)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：20596845