

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430019

研究課題名(和文)モデル生物を用いた匂いに対する嗜好性が変化するしくみの解明

研究課題名(英文)Analysis of mechanisms of olfactory preference changes using *C. elegans*

研究代表者

広津 崇亮 (Hirotzu, Takaaki)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：70404035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：匂い経験や匂いの濃度によって嗜好性が変化する仕組みについて、線虫を用いた独自の系によって解析を行った。経験による嗜好性変化については、関与する介在神経を同定し活性変化をイメージングによって観察した。またニューロペプチドシグナル、Ras-MAPK経路の働く機構の解明を行った。匂いの濃度による嗜好性変化については、働く神経回路が変化することによって制御されていることを明らかにした。さらに、嗜好性変化に関わる因子の働きを時間、場所を同時に限定して制御する新しい技術の開発に成功した。線虫の匂いに対する嗜好性変化を医療技術に用いることを考案し、その検証も行った。

研究成果の概要(英文)：We analyzed mechanisms of olfactory preference changes after odor experiences or depending on odor concentrations with our original assay system using *C. elegans*. In this study, we identified interneurons involved in the preference change after experiences and observed switch of neural activation. We also analyzed functions of neuropeptide signals and the Ras-MAPK pathway in experience-induced olfactory preference changes. VDAC-1 channel was newly identified for a direct target of MAPK in olfactory systems. Furthermore, we elucidated the preference change depending on odor concentrations is regulated by changes of neural circuits working.

We succeeded in development of time- and cell-specific RNAi (T.C.RNAi) contributing to regulation of molecular functions at objective time and space.

We discovered olfactory preference changes in *C. elegans* can be used for a medical examination.

研究分野：総合領域

キーワード：嗅覚 線虫 嗜好性 ニューロペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

動物は匂い物質に対して、「好き」「嫌い」といった嗜好性を示す。匂いに対する嗜好性は自身に有益なものを獲得し、危険なものから回避するために必要であり、動物の生存にとって必須の機能である。嗜好性は脳で判断することから神経回路レベルでの研究が必須であり、高等生物では研究が難しく、これまでそのメカニズムの解析はあまり行われなかった。そこで、神経回路レベルでの研究に適したモデル生物、線虫 *C. elegans* を用いて、その重要課題の解明に取り組むことが有用である。

匂いに対する嗜好性は、過去の経験や周囲の環境により変化する。また同一の匂い物質でも濃度により嗜好性が変化する。我々は、線虫において過去の経験や匂いの濃度により、嗜好性が変化する現象を発見した。前者については、匂いの暴露によって匂いに対する反応が変わる点では嗅覚順応に似た現象だが、それより短い時間で、神経回路レベルで成立するという特徴を持った新規のものであった (Hayashi, Hirotsu et al, *Nature Neuroscience*, 2009、Yamada, Hirotsu et al, *Science*, 2010)。後者については、同じ匂い物質でも濃度によって応答する感覚神経が変化することを、全ての生物種を含めて初めて見出した (Yoshida, Hirotsu, et al, *Nature Communications*, 2012)。これらは動物が匂い情報をどのように受け取り情報処理しているか、その一端を明らかにする上でも重要な報告であった。

## 2. 研究の目的

神経回路研究に優れた線虫 *C. elegans* を用い、匂いに対する嗜好性が生み出され変化する仕組みについて、我々が確立した独自のモデル系を用いて解析を行う。本研究では特に重要な以下の点について解明することを目的とした。また、メカニズムを解析するための新技術の開発や、線虫の匂いに対する嗜好性の社会利用についても解析を進めた。

### 匂い経験による嗜好性変化のしくみ

-1 匂い経験による嗜好性変化を担う神経回路機能の解明

嗅覚神経から直接シナプス入力を受ける介在神経について、嗜好性変化への関与を調べ、イメージングにより嗜好性変化が起きているときの活性変化を調べる。

-2 ニューロペプチドシグナルの関与について

### -3 MAPK のターゲット分子の探索

匂い経験による嗜好性変化には、Ras-MAPK 経路の働きが必須である。しかし、MAPK のターゲット分子がわかっていないため、Ras-MAPK 経路が下流でどのような分子、機構を制御しているのかが不明なままである。そこで、線虫ではあまり行われていない生化学的手法を導入し、MAPK のターゲット分子を同定する。

### 匂いの濃度による嗜好性変化のしくみ

-1 匂いの濃度による嗜好性変化を制御する神経回路機能

匂いの濃度による嗜好性変化は、働く嗅覚神経が異なることにより制御されていることがわかってきたが、下流の介在神経の関与がわかっていない。そこで、嗜好性が変化するとき、働く介在神経群がどのように変化するのか解析する。

神経回路における分子の働きを解析するための新技術の開発

嗜好性変化で重要な働きをする Ras タンパク質のように、多種の組織で、様々なタイミングで多彩な働きをするものが多い。これらのタンパク質の機能を、時期、場所に分けて解析するためには、それらを同時に指定した遺伝子機能ノックダウン法が必要である。しかし、既存の技術では、どちらかを制御することはできるが、両方を満たすのは困難であった。そこで、時間と場所を同時に制御できる新技術の開発を行う。

線虫の匂いに対する嗜好性変化の社会利用

我々は、線虫の匂いに対する嗜好性が、被検者の病気の有無によって変化することを最近見出した。そこで、線虫の匂いに対する嗜好性変化を医療技術にも利用できるか検証する。

## 3. 研究の方法

### 匂い経験による嗜好性変化のしくみ

-1 匂い経験による嗜好性変化を担う神経回路機能の解明

嗅覚神経から直接シナプス入力を受ける介在神経 AIY、AIZ、AIA、AIB 機能を阻害した時の嗜好性変化への影響を調べ、関与する介在神経の同定を詳細に行った。

関与していることが分かった AIY、AIA 介在神経について、嗜好性変化が起こる時の活性変化をカルシウムイメージングによって調べた。以前は、YC3.60 をプローブとして使用していたが、ダイナミックレンジが小さく、活性変化を十分に捉えきれていない可能性があった。そこで、ダイナミックレンジの大きい GCaMP6 を導入して解析を行うことにした。

-2 ニューロペプチドシグナルの関与について

ニューロペプチド受容体 NPR-11 について、嗜好性変化において働く神経の同定をおこなった。さらに、NPR-11 のリガンドの探索を行った。

### -3 MAPK のターゲット分子の探索

活性化した MAPK が結合する分子を得るために、MEK および MAPK の活性化型タンパク質を線虫の神経系に発現させた。この株と野生型でリン酸化タンパク質を取得して比較し、活性化型 MAPK 発現株で有意に濃くなったバンドを切り出して、質量分析器にかけた。得られた候補分子について RNAi などにより機能阻害を行い、嗅覚への関与を調べ、絞り込み

を行った。最終的には、その中でも最も強い関与が示された VDAC-1 に集中してさらなる解析を行った。

-1 匂いの濃度による嗜好性変化を制御する神経回路機能

嗅覚神経から直接シナプス入力を受ける介在神経 AIY、AIZ、AIA、AIB にカスパーゼを発現させて細胞死を引き起こし、神経機能が阻害されたときの表現型を観察した。それにより、匂いの濃度によって機能する介在神経が変化するか解析を行った。

神経回路における分子の働きを解析するための新技術の開発

従来の RNAi では、時期特異的あるいは場所（細胞）特異的に遺伝子機能をノックダウンすることはできたが、両方は困難であった。そこで、2本鎖 RNA を発現させる際、片方の鎖を細胞特異的プロモーターで、もう一方の鎖をヒートショック（時期特異的）プロモーターで発現させることで、両者が重なる時期、場所でのみ遺伝子機能ノックダウンが起こることを発想し、その系の確立を行った。

線虫の匂いに対する嗜好性変化の社会利用

線虫が、がん細胞の培養液と、正常細胞の培養液では異なる嗜好性を示すことを発見したことから、線虫ががんの匂いを嗅覚で検知しているか検証を行った。次に、この現象を医療検査に用いるために、人間の試料を用いて解析を行った。さらに中規模の検体を取得し、その精度検証を行った。

#### 4. 研究成果

匂い経験による嗜好性変化のしくみ

-1 匂い経験による嗜好性変化を担う神経回路機能の解明

AIY、AIA 介在神経の機能阻害は嗜好性変化に異常を引き起こした。一方、AIB、AIZ については、単独および両方の機能阻害で異常が見られなかった。よって、AIY、AIA 神経が経験による嗜好性変化に重要であることが分かった。

次に AIA 神経の活性変化をイメージングによって解析した。以前は YC3.60 をプローブとして使用していたが、ダイナミックレンジが小さく、詳細に解析できない問題があった。そこで、ダイナミックレンジの大きい GCaMP6 を用いて解析を行ったところ、AIA 神経は通常の匂い刺激には応答を示すこと、匂い経験後は応答が見られないことが観察された。またその活性変化は YC3.60 を使用した時よりも数倍～10 倍大きく、神経活性の詳細解析に適していることが示唆された。

-2 ニューロペプチドシグナルの関与について

ニューロペプチド受容体 NPR-11 の変異体は嗜好性変化に異常を示した。npr-11 を ins-1

プロモーターにより AIA 神経に特異的に発現させたところ、npr-11 変異体の異常が回復したことから、NPR-11 は AIA 介在神経で重要な働きをしていることが示唆された。

NPR-11 に受容されるリガンドを探索するために、ニューロペプチドの変異体を用いて嗜好性変化の表現型を観察した。nlp-1、nlp-5、nlp-12、nlp-15、nlp-18、nlp-20、nlp-38 について解析したところ、nlp-5、nlp-12、nlp-18 変異体が有意に異常を示す結果が得られた。そのうち、nlp-5、nlp-18 は npr-11 変異体と同様にほとんど嗜好性変化が起こらない強い異常を示したことから、リガンドとして働いている可能性が示唆された。

-3 MAPK のターゲット分子の探索

活性化型 MAPK によってリン酸化が優位に強くなった候補分子を探索した結果、142 個が得られた。MAPK は線虫の嗅覚系において、嗅覚受容、嗜好性変化の両方に機能していることが知られている。まず前者におけるターゲットを同定するために、候補遺伝子の変異体および RNAi ノックダウン株の匂いに対する反応を観察した。さらに嗅覚神経特異的ノックダウン実験も行って、嗅覚神経で機能している候補を探索した。その結果、嗅覚神経において嗅覚受容に重要な働きをしていることを示すものとして、clp-7、icd-1、icd-2、vdac-1 が得られた。その中で最も顕著な異常を示した vdac-1 は電位依存性チャネルをコードしており、主にミトコンドリアで働いていることは知られている。しかし、嗅覚系における働きはまだ知られていない。vdac-1 ノックダウン株の嗅覚神経の匂いに対する反応をイメージングで調べたところ、ほとんど反応していないことがわかった。VDAC-1 は嗅覚神経のミトコンドリアに局在が見られた。また VDAC-1 は Ras-MAPK 経路の下流で機能していること、MAPK のリン酸化サイト Thr175 が活性化に重要であることがわかった。以上の結果から、VDAC-1 が MAPK のターゲット分子として嗅覚受容を制御していることが示唆された。

-1 匂いの濃度による嗜好性変化を制御する神経回路機能

AIA、AIB、AIY、AIZ 介在神経を破壊したときの、高濃度および低濃度ジアセチルに対する反応を調べ、それぞれに関与する介在神経が変化するかを調べた。その結果、高濃度ジアセチルからの忌避行動にはすべての介在神経が、低濃度ジアセチルへの誘引行動には AIY のみが関与していることがわかった（図 1）。このことから、匂いの濃度による嗜好性変化は、嗅覚神経のレパトリーだけでなく、介在神経のレパトリーも変化し、神経回路で制御されていることが示された。

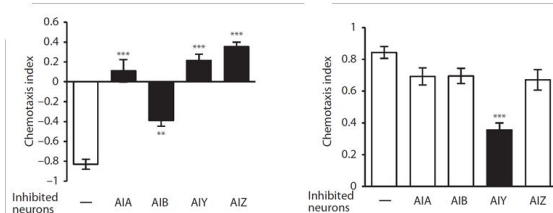


図1 介在神経を破壊したときの、高濃度ジアセチル（左）、低濃度ジアセチルに対する反応

神経回路における分子の働きを解析するための新技術の開発

RNAiにおいて2本鎖RNAを発現させる際、片方の鎖を細胞特異的プロモーターで、もう一方の鎖をヒートショック（時期特異的）プロモーターで発現させることで、両者が重なる時期、場所でのみ遺伝子機能ノックダウンが起こる新手法「T.C.RNAi法」を着想した。この技術を検証するために、AWC、AWB嗅覚神経の両方にGFPを発現させて、フォトブリーチで蛍光を一度退色させた後、GFPの発現による蛍光の回復にT.C.RNAi効果が見られるかを観察した。具体的には、フォトブリーチ後、*srd-17*プロモーターでgfpのセンス鎖をAWC神経単独に、ヒートショック（hsp）プロモーターでgfpのアンチセンス鎖を時期特異的に発現させた。これにより、AWC神経でのみRNAi効果があることが期待される。その結果、AWBでは蛍光の回復が見られたが、AWCでは回復が見られなかった（図2）。T.C.RNAiは嗅覚神経で働く*odr-3*でも検証し、効果があることを証明した。これらの結果から、T.C.RNAiが、時期、場所を限定して遺伝子機能をノックダウンできる新技術として有用であることが示唆された。

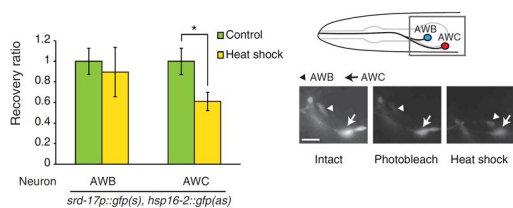


図2 AWC神経で時期、細胞特異的にGFPの発現を抑えたときの結果

次に我々は、実際に多種多様な働きをするRasタンパク質の働きをT.C.RNAiを用いて解析した。我々はRasが餌探索行動に関与することを新たに見出した。Rasは細胞増殖、分化、嗅覚等様々な働きをしていることから、それと分けて解析するためにT.C.RNAi法を用いた。その結果、Rasがいくつかの限られた神経で成虫期に働き、グルタミン酸受容体の局在を制御することで餌探索行動をコントロールしていることがわかった。

線虫の匂いに対する嗜好性変化の社会利用

先行研究により、野生型線虫ががん細胞の培養液に誘引行動を示すことがわかった。この

誘引行動は、正常細胞の培養液に対しては見られないこと、嗅覚異常の*odr-3*変異体では見られないことから、がん細胞に特有の分泌物の匂いに対して線虫が反応していると考えられた。

次に、人間由来の試料に対する線虫の反応を解析した。がん患者の尿20検体、健常者の尿10検体について線虫の反応を調べたところ、全てのがん患者の尿には誘引行動を、反対に全ての健常者の尿には忌避行動を示した。がん患者の尿に対する誘引行動は、嗅覚神経を破壊した線虫では起こらないこと、線虫の嗅覚神経はがん患者の尿に有意に強く応答したことから、線虫は尿中におけるがんの匂いを感じていることがわかった。

我々は、線虫の嗅覚を用いたがん診断テストの精度を調べるために、242検体（がん患者：24、健常者：218）の尿を用いて実験を行った。その結果、がん患者24例中23例が陽性、健常者218例中207例が陰性を示した。すなわち感度（がん患者をがんとして診断できる確率）は95.8%、特異度（健常者を健常者と診断できる確率）は95.0%であり、同じ被験者について同時に検査した他の腫瘍マーカーに比べ、感度は圧倒的であった。またステージ0、1の早期がんでも感度が低下しないことがわかった。

線虫の嗅覚を用いたがん検査は、尿を測るため苦痛がない、簡便、迅速、低コスト、多くのがんを1度に検出可能、早期発見できる、高感度といった優れた特徴を併せ持つ従来にないがんスクリーニング法である。

## 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19件）

Establishment of Time- and Cell-Specific RNAi in *Caenorhabditis elegans*.

Hamakawa M., \*Hirotsu T.

Methods in Molecular Biology, 1507, 67-79 (2016), 査読有,

DOI:10.1007/978-1-4939-6518-2\_6

\* Corresponding author

Voltage-dependent anion channel (VDAC-1) is required for olfactory sensing in *C. elegans*.

Uozumi T., Hamakawa M., Deno Y., Nakajo M., \*Hirotsu T.

Genes to Cells, 20, 802-816 (2015), 査読有, DOI: 10.1111/gtc.12269

A role for Ras in inhibiting circular foraging behavior as revealed by a new method for time and cell-specific RNAi.

Hamakawa M., Uozumi T., Ueda N., Iino Y., \*Hirotsu T.

BMC Biology, 13:6 (2015), 査読有, DOI:

10.1186/s12915-015-0114-8

A Highly Accurate Inclusive Cancer Screening Test Using Caenorhabditis elegans Scent Detection.

\*Hirotsu T., Sonoda H., Uozumi T., Shinden Y., Mimori K., Maehara Y., Ueda N., Hamakawa M.

PLOS ONE, 10(3): e0118699 (2015), 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0118699

Screening of odor-receptor pairs reveals different receptors function depending on odor concentrations.

\*Hirotsu T.

Aroma Research, 15, 242-243 (2014), 依頼執筆, DOI:なし

<https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ao9aroma&vo=15&nu=3>

〔学会発表〕(計25件)

広津崇亮、線虫によるがんの早期診断、日本消化器内視鏡学会、2016年11月27日、さいたま(招待講演)

広津崇亮、生物の嗅覚を利用したがん診断の未来、アロマサイエンスフォーラム、2016年10月13日、東京(招待講演)

広津崇亮、線虫によるがんの早期発見、日臨技関甲信支部医学検査学会、2016年10月29日、山梨(招待講演)

広津崇亮、線虫嗅覚を利用したがん診断システムの開発、第14回医療機器フォーラム、2016年9月5日、東京(招待講演)

広津崇亮、線虫の嗅覚を用いた尿1滴でのがん診断、「驚異の動物イノベーション」バイオインダストリー協会、2016年7月4日、東京(招待講演)

広津崇亮、線虫嗅覚によるがん診断の発見と未来、日本臨床プロテオーム研究会、2016年5月21日、東京(招待講演)

Takaaki Hirotsu, A highly accurate cancer diagnosis system using nematode scent detection (n-nose), AMED-NIH cancer workshop, 2016年3月8日, Tokyo (招待講演)

広津崇亮、線虫によるがんの診断、第18回UTPシンポジウム、2016年1月17日、東京(招待講演)

広津崇亮、線虫の嗅覚とその利用、日本進化学会、2015年8月21日、東京(招待講演)

Hamakawa M, Uozumi T, Ueda N, Iino Y, Hirotsu T, A novel method for Time- and Cell-specific RNAi reveals the temporal role of Ras in the motor neurons controlling exploratory behavior, Neuro2015, 2015年7月29日, kobe

Ueda N, Matsuo T, Hirotsu T, The analysis of the neuropeptide signaling in the neural circuit-dependent odor adaptation, Neuro2015, 2015年7月29日, kobe

Hamakawa M, Uozumi T, Ueda N, Iino Y,

Hirotsu T, A novel method for time- and cell-specific RNAi revealed the profile of Let-60Ras in exploratory behavior, International C. elegans meeting, 2015年6月25日, Los Angeles (USA)

Hirotsu T, Sonoda H, Uozumi T, Mimori K, Maehara Y, Hamakawa M, A highly accurate cancer diagnosis system using C. elegans scent detection, 12th ISMNTOP, 2014年11月3日, Fukuoka

Hamakawa M, Uozumi T, Ueda N, Iino Y, Hirotsu T, A novel method, time- and cell-specific RNAi, revealed the function of Ras in neurons regulating exploratory behavior oral presentation, Neuro2014, 2014年9月12日, Kyoto

Hamakawa M, Uozumi T, Ueda N, Iino Y, Hirotsu T, Analysis of functions of LET-60Ras in regulation of exploratory behavior by a novel method, time- and cell-specific RNAi., The 6th Asia-pacific C. elegans Meeting, 2014年7月17日, Nara

〔図書〕(計5件)

広津崇亮、線虫嗅覚を用いた高精度がん検出法、「ヘルスケアを支えるパイオ計測」CMC出版(2016)

広津崇亮、匂い物質によるがん診断、「Clinical Neuroscience」中外医学社(2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:A method of detecting an odorous substance

発明者:広津崇亮

権利者:九州大学

種類:特許

番号:K2016-0111

出願年月日:2016年11月30日

国内外の別:外国

〔その他〕

ホームページ等

<http://hirotsulab.org/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

広津 崇亮(HIROTSU, TAKAAKI)

九州大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号:70404035