

論文の内容の要旨

論文題目

Deciphering roles of the ClC chloride channel CLH-1 in salt
chemotaxis of *C. elegans*.

(線虫 *C. elegans* の塩走性における ClC 型クロライドチャネル
CLH-1 の機能解明)

氏名：朴燦賢 (Park Chanhyun)

【序論・背景】

動物は経験した環境の情報を記憶し、その記憶に基づき生存に最適となるよう行動を調節する。線虫 *C. elegans* は餌の有無と環境の塩濃度とを関連付けて記憶することにより、塩 (NaCl) に対する走性を調節することが知られている。すなわち線虫は、餌がある条件下で経験した塩濃度に誘引され (図 1a、餌あり学習)、餌がない条件下で経験した塩濃度からは忌避するようになる (餌なし学習)。これまでの研究により、塩濃度を感知する味覚感覚神経 ASER 及びその下流の介在神経からなる神経回路が、餌あり学習と餌なし学習のどちらにおいても中枢的な役割を果たすことがわかっている (Kunitomo et al., 2013; Ohno et al., 2014; Tomioka et al., 2006)。塩勾配上の移動方向の決定にはジアシルグリセロールシグナル伝達経路が、また、餌なし学習における行動の制御にはインスリン様シグナル伝達経路が、いずれも ASER で機能することが明らかになっている (Adachi et al., 2010; Ohno et al., 2017)。一方、餌あり学習のみに関わる分子メカニズムは、未解明であった。

当研究室の先行研究で餌あり学習の変異体がスクリーニングされ、餌あり・低塩濃度条件を経験した後の塩走性に欠損を示す変異体 JN572 と JN577 が単離された (図 1b、Sakurai, 2010)。原因遺伝子を同定したところ、2つの変異体は ClC 型クロライドチャネルをコードする *clh-1* 遺伝子の異

なる部位にミスセンス変異をもっていた。今後 JN572 と JN577 の原因変異を、それぞれ、*clh-1(pe572)*、*clh-1(pe577)*と表す。CIC ファミリーの遺伝子は、アミノ酸配列の特徴などからチャネルとアンチポーターに分類される。線虫の CLH-1 は内向き整流性のクロライドチャネルと予想されている (Grant et al., 2015; Stölting et al., 2014)。CLH-1 の哺乳類のホモログ CIC-2 は腎臓でホルモンの調節に寄与することが知られているが (Fernandes-Rosa et al., 2018)、脳神経系における機能はよくわかっていない。

本研究は、線虫の *clh-1* 遺伝子の点変異 *pe572* と *pe577* が餌あり学習に異常をもたらす機序を明らかにした。1) *clh-1* 変異の遺伝学的性質、2) 神経系における CLH-1 の機能、3) CLH-1 の行動への寄与、について調べ、餌あり学習の制御メカニズムの解明を目指した。また、CIC チャネルの神経系における役割の解明を目指した。

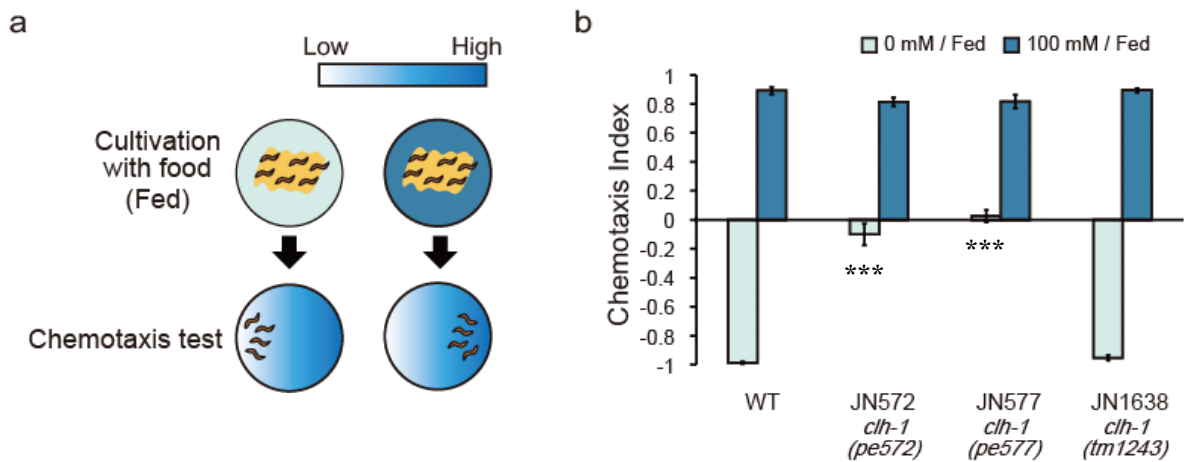


図 1. (a) 塩走性アッセイの模式図。野生型の線虫は、餌を経験した塩濃度に誘引される。(b) 野生株および *clh-1* 変異体の餌あり学習表現型。JN572 と JN577 は *clh-1* に点変異を、JN1638 は *clh-1* に欠失変異をもつ。正の Chemotaxis Index は線虫が高塩濃度に誘引されたことを、負の値は低塩濃度に誘引されたことを表す。JN572 と JN577 どちらも餌あり・低塩条件下での塩走性学習に異常を示す。(Dunnett's test (***) $p < 0.001$, $n \geq 7$)

【結果・考察】

1) *clh-1* 変異の遺伝学的性質

はじめに、*clh-1* の点変異 *pe572* および *pe577* の性質を調べるために遺伝学的解析を行った。変異型 *clh-1* と野生型 *clh-1* のヘテロ接合体が正常な学習表現型を示したことから、上記の *clh-1* 変異はどちらも潜性 (劣性) であることが示唆された。一方 *clh-1* の欠失変異体 JN1638 *clh-1(tm1243)* は、塩走性学習に異常を示さなかった (図 1b)。さらに、野生型線虫に点変異型 *clh-1* ゲノム DNA を導入すると低塩走性異常をもたらされた。これらの結果から、塩走性に異常をもたらす二つの *clh-1* 点変異は neomorphic、もしくは hypermorphic であることが示唆された。

2) 神経系における CLH-1 の機能解析

次に、神経系における CLH-1 の機能を調べた。まず、餌あり学習における CLH-1 の機能細胞を同定した。*clh-1* は神経系や表皮など多くの組織で発現する (Nehrke et al., 2000)。*clh-1* 遺伝子の発現細胞の観察と細胞特異的機能回復実験により、ASER に発現する CLH-1 が重要な機能を担うことを見出した。ASER は塩濃度低下刺激により活性化され、塩濃度上昇刺激によって不活性化される (Suzuki et al., 2008)。アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理学実験では、野生型と点変異型のクロライドチャンネルとしての性質に大きな差が見られなかった。ASER における CLH-1 の機能を調べるために、変異体を用いて ASER のクロライドイメージング実験とカルシウムイメージング実験を行った。その結果、*clh-1* 点変異体は塩濃度低下刺激による細胞内クロライド濃度の変化が大きく (図 2a)、繰り返し塩濃度変化刺激に対するカルシウム応答性が低い (図 2b) ことが見いだされた。

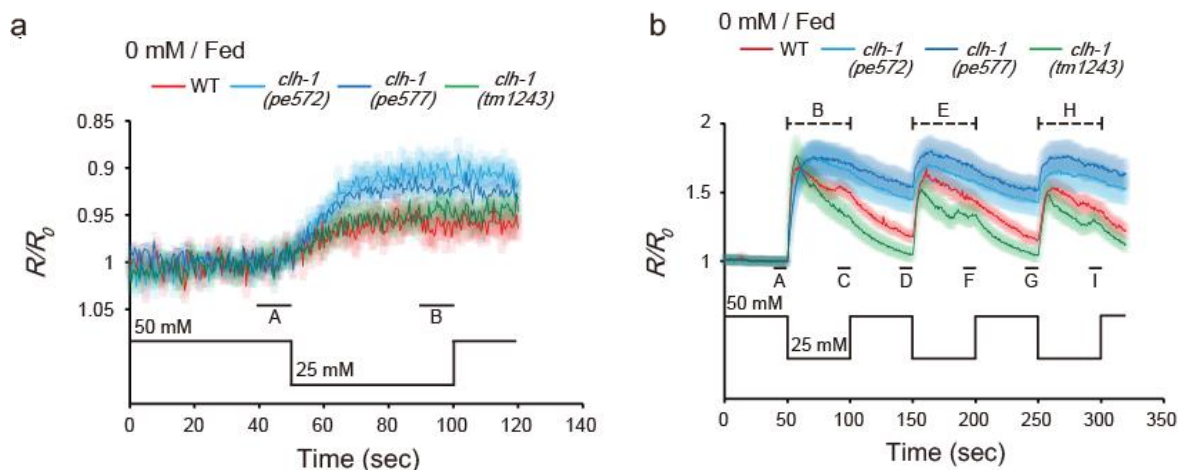


図 2. (a) ASER 神経の塩濃度低下刺激時のクロライドイメージング。クロライドイメージングには、FRET 型インジケータの Superclomeleon を用いた。Superclomeleon はクロライドと結合することにより YFP/CFP 比が減少するため、縦軸を逆転させている。(b) ASER 神経の塩濃度刺激時のカルシウムイメージング。カルシウムイメージングには、FRET 型インジケータの Yellow cameleon 2.6 を用いた。CLH-1 が脱分極後の神経機能調節に寄与する可能性を検討するために、繰り返し刺激を与えている。WT は野生型を表す。pe572 と pe577 はそれぞれ *clh-1* 点変異体、tm1243 は *clh-1* 欠失変異体である。

3) CLH-1 の行動への寄与

最後に、行動における CLH-1 の機能を調べた。塩走性アッセイ時に線虫が用いる 2 つの行動機構 klinokinesis と klinotaxis に着目し、*clh-1* 点変異体 JN572 と JN577 の行動を解析した。その結果、餌あり・低塩濃度を経験した *clh-1* 点変異体は、どちらの行動機構にも顕著な異常を示すことが明らかになった。Klinokinesis は後退行動を伴う方向転換 (ピルエット) の頻度を調節すること

により好ましい環境へ向かう行動機構である (Pierce-Shimomura et al., 1999)。ASER からのシナプス入力を受け後退行動を制御する介在神経 AIB と線虫の行動を同時にイメージングした結果、*clh-1* 点変異体は塩濃度上昇刺激に応じた AIB の神経活動や後退行動に異常を示した。これらのことは、点変異による CLH-1 の機能変化が神経系の塩刺激に対する応答を阻害し、塩走性行動に異常をもたらすことを示唆する。

【結論】

本研究では、線虫の餌あり学習を制御する新奇な分子メカニズムの解明を目指し、餌あり学習のみ異常をもたらす *clh-1* 遺伝子の変異 *pe572* と *pe577* を解析した。遺伝学的解析では、二つの点変異が neomorphic もしくは hypermorphic であることが示唆された。神経系における機能解析では、変異体は塩刺激に対する ASER の細胞内クロライド動態、および細胞のカルシウム応答に異常を示すことが明らかになった。また、*clh-1* 点変異体は低塩走性時の行動制御に大きい異常を示すことが行動解析により示された。

CIC チャンネルは多様な先天性疾患にかかわることが知られており、その機能解明のために構造生物学、生理学、そして病理学の面から様々な研究が行われている。CLH-1 と最も高い相動性を持つ哺乳類 CIC-2 は脳神経系で発現し、脳白質症 (leukodystrophy) などの神経疾患にかかわることが知られている。本研究の成果が、神経系における CIC チャンネルの機能や神経疾患の理解に貢献する可能性が考えられる。また、本研究が学習の成立における神経系の動作機構の解明に寄与することを期待する。