

学位論文

線虫 *C. elegans* の連合学習を制御する
TOR シグナル伝達経路の機能解析

(The molecular mechanisms of TOR signaling pathway
regulating associative learning in *C. elegans*)

平成 27 年 12 月博士 (理学) 申請

東京大学大学院理学系研究科
生物化学専攻

酒井奈緒子

Abstract

これまでに多くの神経科学者が連合学習のメカニズムの解明を目指して取り組んできたが、未だに詳細なメカニズムは明らかになっていない。*Caenorhabditis elegans* (以下線虫と呼ぶ) は、連合学習の機構を調べるのに適したモデル生物である。線虫は餌のある塩濃度を記憶し、その塩濃度に誘引される一方、飢餓を経験した塩濃度を避ける行動を示す(味覚忌避学習)。これまでに、インスリン経路や Gq α /DAG 経路がこの連合学習の制御に関わることが明らかにされてきたが、本研究では新たに TOR (Target of Rapamycin) シグナル伝達経路がこの連合学習に必要であることを明らかにした。

TOR は高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼであり、TORC1 と TORC2 と呼ばれる、構成分子の異なる二種類の複合体を形成する。本研究では、薬理的解析と遺伝学的解析により、TORC1、TORC2 がともに味覚忌避学習に関与していることを明らかにした。TORC1 の主要な下流分子の一つである S6 キナーゼのホモログ *rsk-1* の変異体では、線虫の低塩濃度への移動に異常が見られた。一方で、TORC2 の構成分子や、その下流分子と考えられる PKC-2 (cPKC のホモログ) と SGK-1 (SGK のホモログ) が欠損した線虫は、高塩濃度への移動が異常になったことから、味覚忌避学習においては TORC1 と TORC2 が逆の働きを持つことが示唆された。

pkc-2 変異体の異常は神経での cDNA 発現で、*sgk-1* 変異体の異常は腸での cDNA 発現で回復した。これより神経での TORC2/PKC-2 経路の機能と腸での TORC2/SGK-1 経路の機能がそれぞれ味覚忌避学習を制御しているというモデルを示した。

本研究は、これまで特異的阻害剤がなかったために機能解析が困難であった TORC2 の連合学習における重要性を示すことができた点で意義深い。また、味覚忌避学習における腸での TORC2 経路の重要性を示せたことで、非神経細胞の連合学習への寄与を解明する手がかりになることが期待される。

Abstract

Understanding the mechanisms underlying associative learning has been a great problem for many neuroscientists. *Caenorhabditis elegans* is a model organism to study the mechanisms of associative learning because of its compact nervous system. Worms migrate to a salt concentration to which exposed during feeding, whereas they come to avoid it if experienced under starvation conditions (taste avoidance learning). Though it has been shown that insulin and Gq α /DAG signaling contribute to taste avoidance learning, the mechanisms underlying this associative learning are still unclear. In this study, I newly found that TOR signaling regulates taste avoidance learning.

TOR, or target of rapamycin, is a highly conserved serine/threonine kinase and exists as two structurally distinct complexes TOR complex 1 (TORC1) and TOR complex 2 (TORC2). In this study, I showed that both TORC1 and TORC2 contribute to regulating taste avoidance learning using pharmacological inhibitors and genetic analyses. The mutant of *rsk-1*, which encodes the ortholog of S6 kinase (S6K) and a putative downstream molecule of TORC1, showed defects in migration to lower salt levels. On the other hand, worms lacking the TORC2 components or its putative downstream molecules showed increased preferences for low salt levels, suggesting that TORC1 and TORC2 have opposite roles in taste avoidance learning. Cell-specific rescue experiments showed that *sgk-1* functions in the intestine, whereas *pkc-2* is required in the nervous system, suggesting that they mediate distinct signals downstream of TORC2 to regulate associative learning.

This study is significant because I pointed the importance of TORC2 signaling in the nervous system, which had been hard to study because of lack of specific inhibitors. Furthermore, our findings provide clues to understand the way in which information sensed in the non-neuronal cells affects the nervous system to modulate food-associative behaviors.

目次

Abstract	2
目次	4
第一章 序論	6
1.1 線虫 <i>C. elegans</i> のモデル生物としての有用性	
1.2 線虫の神経構造	
1.3 線虫の連合学習	
1.4 塩と飢餓の連合学習 (味覚忌避学習)	
1.5 匂いと餌の連合学習	
1.6 TOR シグナル伝達経路	
1.7 本研究の目的	
第二章 材料と方法	18
2.1 用いた線虫株	
2.2 線虫培養の基本的操作と使用した試薬	
2.3 ゲノム DNA の抽出	
2.4 cDNA ライブラリの作製	
2.5 塩走性アッセイ	
2.6 嗅覚可塑性アッセイ	
2.7 <i>daf-18</i> 抑圧変異体スクリーニング	
2.8 原因変異のマッピング	
2.9 ラパマイシン、TORIN の添加実験	
2.10 変異体の掛けあわせ、戻し交配	
2.11 塩基配列決定	
2.12 組織特異的機能回復実験用プラスミドの作製	
2.13 アミノ酸置換を導入したコンストラクトの作製	
2.14 組織特異的 RNAi	
2.15 CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集	
2.16 トランスジェニックラインの作製	
2.17 共焦点顕微鏡での線虫の観察	
第三章 結果 順遺伝学的スクリーニングを用いた AKT-1 下流分子の探索	35

3.1	AKT-1 の下流分子の順遺伝学的スクリーニング	
3.2	<i>age-1</i> 、 <i>goa-1</i> 変異体は <i>daf-18</i> の塩走性異常を抑圧する	
3.3	GOA-1 は ASE 神経で機能する	
3.4	RGS タンパクも塩走性制御に関わっている	
第四章	第三章の考察	43
4.1	味覚忌避学習における GOA-1、EGL-30 の役割	
4.2	GOA-1 の機能部位	
4.3	味覚忌避学習における RGS、 $G\beta$ の役割	
第五章	結果 味覚忌避学習における TOR シグナル伝達経路の機能解析	45
5.1	TOR は味覚忌避学習に関与している	
5.2	S6K のホモログ <i>rsks-1</i> の変異体は飢餓後の味覚忌避学習に異常を示す	
5.3	TORC2 経路の変異体は味覚忌避学習と匂いの連合学習に異常を示す	
5.4	<i>akt-1</i> は味覚忌避学習において TORC2 と並行、または下流で機能する	
5.5	低塩濃度・飢餓後の塩走性制御において <i>pkc-2</i> は神経で機能する	
5.6	UNC-18 の S322 のリン酸化状態が味覚忌避学習制御に関わっている	
5.7	味覚忌避学習制御では SGK-1 は腸において TORC2 の下流で機能する	
5.8	DAF-16 と SGK-1 は味覚忌避学習において並行に機能している	
第六章	第五章の考察	71
6.1	味覚忌避学習における TORC1 と TORC2 の役割	
6.2	TORC1 の神経における機能について	
6.3	腸における TORC2/SGK-1 経路の役割	
6.4	腸における環境刺激の受容	
6.5	神経における PKC-2 の役割	
6.6	TORC2 シグナル伝達経路と AKT-1 の関係	
6.7	AKT-1 の下流分子	
6.8	線虫の神経における TOR の機能解析の展望	
第七章	結論	78
第八章	謝辞	79
第九章	引用文献	80

第一章 序論

過去の経験に基づいて行動を変化させることは、多くの生物の生存にとって重要である。とりわけ捕食者などの危険の回避や餌の獲得は動物の生存に直結した課題であり、これらを効率よく成し遂げるために経験依存的に行動を変化させることで、動物は自身の生存確率を上昇させていると考えられる。では動物は一体どのような仕組みで行動を変化させているのだろうか？この疑問の解消のため、これまで多くの神経科学者がこの課題に取り組んできたものの、未だ解決には至っていない。

私はモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて、経験依存的な行動変化のメカニズムを解明しようと試みた。本研究は、線虫をモデル動物として、連合学習、特に塩と餌情報を関連付けた連合学習において、TOR 経路が関与していることを示したものである。本項目では、本研究に取り組むに至った背景を説明する。

1.1 線虫 *C. elegans* のモデル生物としての有用性

線虫は体長 1 mm ほどの非寄生性の多細胞生物である。Sydney Brenner らによりモデル生物として確立されたこの動物は、その形態のシンプルさ、生活環の短さ、実験室での扱いやすさ、遺伝学的ツールの充実などを背景に、様々な現象をあきらかにするためのモデルとして世界で広く使われている(Brenner, 1974)。

現在、世界の多くの研究室においてイギリスで採取された Bristol N2 と呼ばれる線虫株を野生型標準株として用いている。線虫は NGM と呼ばれる栄養を含んだ寒天培地(第二章にて後述)上で、大腸菌を餌に培養される。継代による維持が容易な上に、ディープフリーザーで半永久的に保存できるため、株が失われにくい。まず特筆すべきは、この N2 が持つすべての神経細胞の位置と接続が電子顕微鏡写真の再構築により明らかになっている点である(White et al., 1986)。N2 の雌雄同体は生殖細胞を除いて 959 個の体細胞からなり、うち 302 個を占める神経細胞のギャップ結合、化学シナプス結合が判明している。線虫は全神経の接続が判明している唯一の多細胞生物であり、このことが行動制御の神経メカニズムを研究する上で大きな利点となっている。

また、遺伝学的解析をし易いのも特徴である。線虫は 1 世代のサイクルが約 3 日半と短く、1 匹の親虫から約 300 匹の子を得ることができる。N2 の殆どは雌雄同体であり、一個体内で卵と精子を形成し、体内で自家受精を行って子孫を作ることができる。

この特徴により、劣性変異を効率よく得ることができ、順遺伝学的スクリーニングや原因遺伝子の同定を比較的容易に行える(Brenner, 1974)。さらに、ゲノムサイズが 100 Mb と比較的小さい、各種遺伝子の変異体が手軽に入手できる、RNAi などの遺伝子ノックダウンの手法や CRISPR-Cas9 などのゲノム編集手法が発達している、トランスジェニック個体が簡単に得られる、などの特長により、遺伝子の機能解析を行うのに適した動物であると言える。これら神経機能、遺伝子機能の解析における簡便さから、行動を分子、神経、個体レベルで包括的に調べられる点が、線虫で行動メカニズムを調べることの利点である。

1.2 線虫の神経構造

線虫の身体は主に下皮、筋肉、生殖組織、腸、そして神経によって形作られている。線虫の雌雄同体の神経は 302 個存在し、この内 60 あまりが感覚神経であると考えられている(White et al., 1986)。コンパクトな神経系を持つ線虫だが、水溶性物質や揮発性物質、酸素や温度など、多様な環境刺激に対して応答することができる(表 1-1)。

水溶性物質 (味覚、フェロモン)	揮発性物質 (匂い)	酸素	侵害刺激	浸透圧	温度	接触
ADF	AWA	AQR	ASH	ASH	AFD	ALM
ASE	AWB	PQR			AWC	AVM
ASG	AWC	URX			FLP	PLM
ASH	ASH	BAG			PVD	PVM
ASI					PHC	ILI
ASJ						CEP
ASK						OLQ
ADL						OLL
IL2						ADE
PHA						PDE
PHB						ASH
						FLP
						PVD

<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/nervous/Images/neurotable1leg.htm> より編集

表 1-1 線虫が受容する主な環境刺激とそれを受容すると考えられている感覚神経。(Altun and Hall, 2011)より編集

線虫の化学受容は、主に頭部に集中する、感覚繊毛を有する複数のアンフィド感覚神経によって行われると考えられている(図 1-1A)。頭部に存在する 12 クラスのアンフィ

ド感覚神経は左右対称に存在するが、それぞれの対となる神経の機能は微妙に異なっている(Ortiz et al., 2006)。例えば ASEL/R の両神経は NaCl への化学走性に最も寄与の大きい味覚神経だと考えられているが、ASEL が塩濃度の上昇に応答するのに対し、ASER は塩濃度の減少に応答すること(Suzuki et al., 2008)、ASEL が NaCl のうち主に Na⁺を受容するのに対し ASER は Cl⁻を受容すること(Pierce-Shimomura et al., 2001)が知られており、化学刺激の受容に関わるとされるグアニル酸シクラーゼ(GCY)についても左右で発現する GCY の種類が異なる場合がある(Ortiz et al., 2006)。

アンフィド感覚神経は、細胞体と二本の神経突起を持ち、一方の神経突起を頭部先端に、もう一方の神経突起を咽頭周辺の神経環に伸ばしている。頭部先端に伸びた神経突起の先にはソケット細胞、鞘細胞などのグリアに保護された感覚繊毛 (Cilia) と呼ばれる構造が存在し、おもにこの構造を介して外部の環境刺激を受容していると考えられる(図 1-1B)(Perkins et al., 1986)。もう一方の神経突起の投射先である神経環は、線虫の中で最も多くの神経が集まる部位であり、約 180 もの神経がここに神経突起を投射している(White et al., 1986)。これらの神経同士が神経環で多くのシナプスを生成していることから、神経環で多くの情報の処理が行われていると考えられている。

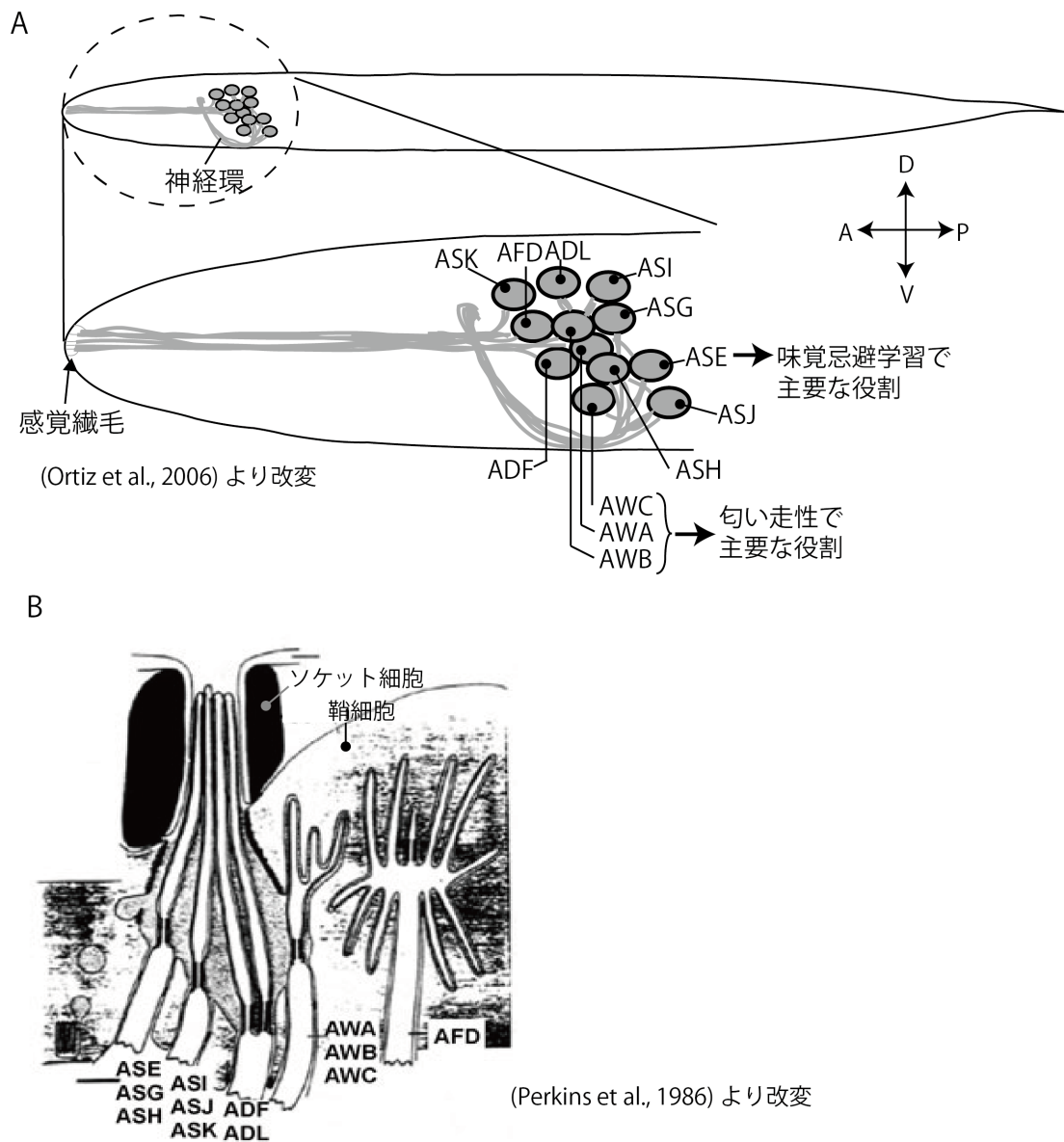


図 1-1 線虫の頭部にある感覚繊毛を持つ感覚神経 A)頭部に 12 クラス存在するアンフィド感覚神経の模式図。図には線虫の左側に存在する 12 細胞のみを示したが、実際には右側にも同数の神経細胞が存在する。B)多くの感覚繊毛の先端はソケット細胞と呼ばれるグリア細胞に保護された状態で外界に露出している。揮発性物質への走性に関わる AWA、AWB、AWC と温度走性に関わる AFD 神経の先端は外界に露出せず、鞘細胞と呼ばれるグリア細胞に覆われている。

1.3 線虫の連合学習

前述のとおり、線虫は多様な環境条件に対して走性を示すことが知られている。また、

線虫がこれらの環境条件を餌の有無と関連付けて学習していることも明らかになっている (Chi et al., 2007; Colbert and Bargmann, 1997; Hedgecock and Russell, 1975; Nuttley et al., 2002; Saeki et al., 2001; Torayama et al., 2007)。本研究では塩（水溶性物質）もしくはベンズアルデヒド（揮発性物質）と餌の有無との連合学習について扱った。詳細を下記で述べる。

1.4 塩と飢餓の連合学習（味覚忌避学習）

通常培養条件で育てられた野生型線虫は塩に対して正の走性を示すのに対し、塩とともに飢餓を経験した線虫は、塩を避けるよう行動することがわかっている。この行動変化のメカニズムの解明のため、当研究室では精力的に研究が行われてきた (Saeki et al., 2001; Tomioka et al., 2006)。近年の研究から、線虫は塩の有無だけでなく、塩の濃度を餌の有無と関連付けて学習するという複雑な行動戦略をとっていることが明らかになった (Kunitomo et al., 2013; Ohno et al., 2014)。線虫は、餌とともに経験した塩濃度を記憶し、その塩濃度に誘引されるようになる一方、飢餓とともに経験した塩濃度は避けるようになることが分かったのである (図 1-2)。この飢餓依存的な塩濃度忌避行動を味覚忌避学習と呼ぶ。味覚忌避学習への寄与が大きいと考えられる分子群について簡単に説明する。

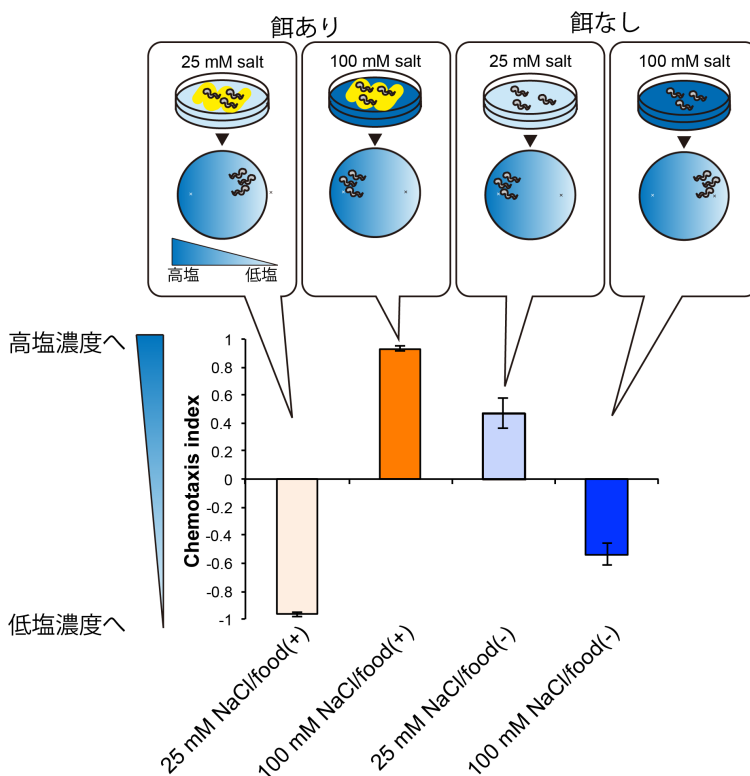


図 1-2 味覚忌避学習 線虫は餌とともに経験した塩濃度には誘引されるが、飢餓を経験すると一転してその塩濃度を忌避するようになる。線虫の塩走性は Chemotaxis index で評価した (第二章にて後述)。

・インスリン/PI3 キナーゼ経路

インスリン/PI3 キナーゼ経路は、生物種間で高度に保存された分子経路であり、代謝、発生や腫瘍形成において重要な役割を果たしていることからよく調べられている (Liu et al., 2009)。この経路の作用機序は以下のように考えられている。インスリン様成長因子やインスリンがインスリン/IGF 受容体に結合することによりインスリン/IGF 受容体が活性化し、PI3 キナーゼ(PI3K)が活性化する。活性化した PI3K は細胞膜上の PI(4,5)P₂ から PI(3,4,5)P₃ を産生し、セカンドメッセンジャーとして機能する PIP₃ により膜に誘導された Akt1 の活性化が起こることで、Akt1 の下流の複数の分子が活性化される。Akt1 の下流分子としては、MDM2、FOXO、NF κ B、BAD、GSK3 β 、mTOR など多くが知られている。

線虫においてもこの経路の分子はよく保存されており、耐性幼虫形性、寿命などを制御している (Hu, 2007; Kenyon et al., 1993; Kimura et al., 1997; Paradis et al., 1999)。耐性幼虫形性と寿命制御においては、FOXO のホモログである DAF-16 が Akt1 のホモログ AKT-1 の主要な下流分子であることがわかっている (Kwon et al., 2010; Lin et al., 1997; Ogg et al., 1997)。味覚忌避学習においては、インスリン/IGF 受容体ホモログである *daf-2*、PI3K の p110 サブユニットのホモログである *age-1*、Akt1 のホモログである *akt-1* の変異体では、飢餓時の塩走性が異常になることがわかっている (Kunitomo et al., 2013; Ohno et al., 2014; Tomioka et al., 2006)。しかし、耐性幼虫形性、寿命制御においては *daf-16* 変異が *daf-2* などのインスリン経路分子の表現型を抑圧するのに対し、塩走性の表現型においては *daf-16* 変異が *daf-2* などの表現型を抑圧しないことから、味覚忌避学習においては、DAF-16 以外の分子がインスリン経路の下流で機能していると考えられている (Tomioka et al., 2006)。

前述のように、NaCl は主に頭部にある一対の感覚神経 ASER/R で受容されている。*daf-2* や *age-1* の飢餓経験後の塩走性異常が、ASER 特異的な cDNA 発現により回復することから、インスリン/PI3 キナーゼ経路は主に ASER 感覚神経で機能していることが示唆されている (Tomioka et al., 2006)。

・Gq/DAG 経路

Go タンパク質 α サブユニットをコードする *goa-1* 及び Gq タンパク質 α サブユニットをコードする *egl-30* もまた味覚忌避学習に関わることが知られている (Adachi et

al., 2010; Matsuki et al., 2006; Tomioka et al., 2006)。 *goa-1* の機能低下型変異体と *egl-30* の機能獲得型変異体は餌の有無にかかわらず高塩濃度に誘引されることから、これらの分子は餌情報の伝達ではなく塩濃度情報の伝達または線虫の行動決定に関与していると考えられる。*goa-1* と *egl-30* の下流ではジアシルグリセロール(DAG)や PKC ϵ ホモログの PKC-1、シナプス放出に関わる UNC-18 や UNC-13 が機能すると予想される(Palfreyman and Jorgensen, 2007; Tanis et al., 2008)。機能獲得型 EGL-30 または機能獲得型 PKC-1 をコードする cDNA を ASER に発現させることで線虫が高塩濃度に誘引されることから、Gq/DAG シグナル伝達経路もまた ASER で機能していると考えられる(Adachi et al., 2010; Iwata et al., 2011; Matsuki et al., 2006)。

・その他の分子群

モノアミン神経伝達物質の一種であるオクトパミンの合成に関わる *tbh-1* の変異体は塩走性に異常を示す(安達健・川崎瑞己ら、未発表)ほか、外部からセロトニンを投与すると飢餓時の塩走性が異常になることがわかっており(Saeki et al., 2001)、生体モノアミンが味覚忌避学習に関わっていると考えられる。また、味覚忌避学習と似たアッセイ系である gustatory plasticity の系では、高度不飽和脂肪酸 (PUFA) の合成に関わる *fat-1*、*fat-3*、*fat-4*、G タンパク質 γ サブユニットの *gpc-1*、TRPV チャネルサブユニットの *osm-9* などの変異体が飢餓経験後の塩走性に異常を示すことが知られている(Hukema et al., 2006)。

1.5 匂いと餌の連合学習

N2 はベンズアルデヒドやジアセチル、2,3-ペンタンジオン、イソアミルアルコールなどの揮発性物質に対して正の走性を示す。これらの匂い走性に重要な役割を果たすのは AWA、AWC 両神経で、AWC ではベンズアルデヒド、ブタノン、イソアミルアルコール、ペンタンジオンなどが、AWA ではジアセチル、ピラジンなどが受容されることがわかっている(Bargmann et al., 1993)。本研究では TOR が匂いと餌の連合学習 (嗅覚可塑性) に寄与しているかを調べるために AWC で受容されるベンズアルデヒドを用いた。餌のない条件でベンズアルデヒドに一定時間曝露された線虫は、ベンズアルデヒドへの走性が著しく低下する(Colbert and Bargmann, 1995)。このベンズアルデヒドへの走性の低下は餌存在下でのベンズアルデヒド曝露後には観察されないため、ベンズ

アルデヒドに対して順応(adaptation)が起きているわけではなく、匂いと餌情報を関連付けた連合学習が起きていると考えられている(Nuttley et al., 2002)。この匂いの連合学習においても、GOA-1、EGL-30、DAG などが関わっていることが明らかになっており、EGL-30/DAG 経路の機能が亢進した線虫では飢餓経験後も匂いに対して正の走性を示す(Matsuki et al., 2006)。

1.6 TOR シグナル伝達経路

本研究で新たに味覚忌避学習への寄与が明らかになった TOR シグナル伝達経路について簡単に説明する。

・発見の経緯

ラパマイシンがイースター島由来の土壌細菌 *Streptomyces hygroscopicus* から抗菌作用を持つ化合物として精製されたのは 1970 年代のことである。このラパマイシンに対する耐性を持つ変異体の原因遺伝子として、1991 年に出芽酵母の研究から Target of Rapamycin (TOR)が発見され、さらにその 3 年後にはラットでも TOR の存在が報告された(Heitman et al., 1991; Sabatini et al., 1994)。これ以降、ガンを含む各種疾患、寿命制御における TOR の関与が明らかになった(Beauchamp and Platanias, 2013; Evans et al., 2011; Laplante and Sabatini, 2012)ことから、酵母から哺乳類まで様々な生物を用いてこのキナーゼ及びラパマイシンの影響が調べられてきた。これまでに、TOR が PI3K-related kinase family に属するセリン・スレオニンキナーゼであり、機能の異なる二種類の複合体 TOR complex1 (TORC1)と TOR complex2 (TORC2)を形成して機能することが明らかになっている(Loewith et al., 2002)。

・2つの複合体の役割

TORC1 と TORC2 の構成分子は生物種間でよく保存されており、それは線虫と哺乳類間でも例外ではない(Laplante and Sabatini, 2012; Takahara and Maeda, 2013) (表 1-2)。この 2 つの複合体は、薬剤感受性や機能が異なることが知られている。ラパマイシンは TOR 特異的な阻害剤であり、TORC1 を特に効率よく阻害できる(Loewith et al., 2002)ため、TORC1 の役割はよく調べられている。TORC1 は TOR の他に、LST8、Deptor、PRAS40、Raptor、tti1、tel2 と呼ばれる分子群と複合体を形成する(Laplante

and Sabatini, 2012; Takahara and Maeda, 2013)。ラパマイシンはFKBP12 と結合して TORC1 の機能を阻害することが知られているが、ラパマイシンが TORC1 を阻害する詳細なメカニズムは今日に至るまで明らかになっていない(Laplante and Sabatini, 2012)。TORC1 はエネルギー状態、酸素、アミノ酸、成長因子、ストレスなどのシグナル入力を受けて、タンパク合成や脂質合成、オートファジーなどを制御している(Laplante and Sabatini, 2012; Takahara and Maeda, 2013)。また、TORC1 の機能を阻害することにより寿命が延長することがハエやマウスなど多くの生物で確かめられている(Evans et al., 2011)。一方、TORC2 はラパマイシンの影響を受けにくい(Loewith et al., 2002)。TORC2 は特異的阻害剤が存在しないことや、マウスでの TORC2 の機能を阻害すると致死になってしまうことから、機能解析が困難である(Cybulski and Hall, 2009)。TORC2 は TORC1 と共通した構成因子である TOR、LST8、Deptor、tti1、tel2 のほかに、TORC2 に特徴的な Rictor、Sin1、protor1/2 を含む複合体である(Laplante and Sabatini, 2012; Takahara and Maeda, 2013)。TORC2 は Akt1 や PKCs などの AGC キナーゼのリン酸化を介して、代謝制御や細胞骨格制御、生存の制御を行っていると考えられている(García-Martínez and Alessi, 2008; Kamada et al., 2005)。TORC2 の下流分子はいくつか明らかになっているものの、TORC2 の活性を制御する上流分子は未だによくわかっていない(Cybulski and Hall, 2009)(図 1-3)。

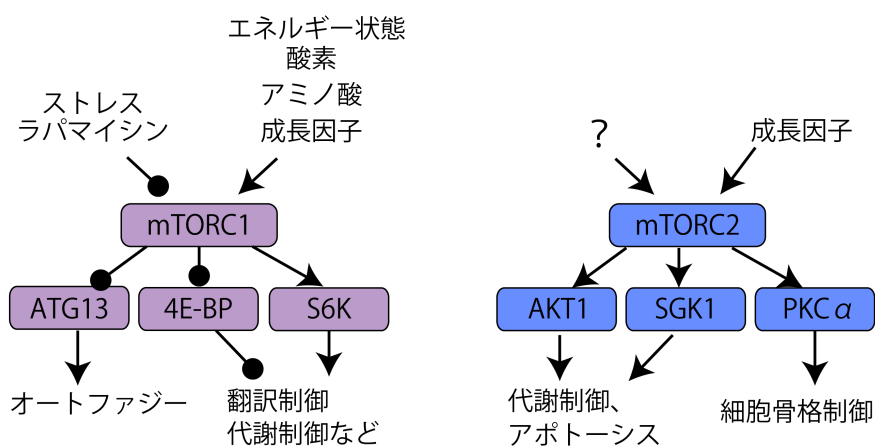


図 1-3 TORC1 と TORC2 は異なる機能を持つ。TORC1 は栄養シグナルや酸素などに応答し、タンパク合成を促進しオートファジーを抑える。TORC2 の上流因子は未だによくわかっていないが、下流では Akt1、SGK1、PKC α が機能し、代謝や細胞骨格を制御していることが知られている。(→: 促進 ●: 抑制)

哺乳類	正式名	線虫	機能
TORC1	mTOR Raptor PRAS40 DEPTOR mLST8 Tti1/Tel2 complex	LET-363* DAF-15** not found not found C10H11.8* not found LET-363* RICT-1 SINH-1 not found not found C10H11.8 not found not found	セリン/スレオニンキナーゼ TORC1の組み立て、局在、基質との結合を制御すると考えられるScaffold Protein mTORC1 inhibitor mTOR inhibitor 機能不明。mTORC2のキナーゼ活性に必須 TORC1の組み立てと安定に関わるScaffold Protein セリン/スレオニンキナーゼ TORC2の組み立て、局在、基質との結合を制御すると考えられるScaffold Protein mTORC2の組み立てやSGK1との相互作用を制御するScaffold protein mTORC2依存のSGK1の活性に関与 mTOR inhibitor 機能不明。mTORC2のキナーゼ活性に必須 TORC2の組み立てと安定に関わるScaffold Protein Rhebに対してGAP活性を持ち、Rhebを不活性化する方向に働く
TORC2	Rictor mSin1 protor1/2 DEPTOR mLST8 Tti1/Tel2 complex	not found not found C10H11.8* not found LET-363* RICT-1 SINH-1 not found not found C10H11.8 not found not found	mechanistic Target of Rapamycin regulatory associated protein of mammalian target of rapamycin proline-rich Akt substrate 40 kDa DEP domain containing mTOR-interacting protein mammalian lethal with sec-13 protein mechanistic Target of Rapamycin rapamycin-insensitive companion of mTOR mammalian stress-activated map kinase-interacting protein1 protein observed with rictor1 and 2 DEP domain containing mTOR-interacting protein mammalian lethal with sec-13 protein
TORC1上流	TSC1/2 Rheb S6K ATG13 4EBP-1 Akt1	not found not found RHEB-1* RSKS-1 ATG-13 not found AKT-1	tuberous sclerosis 1 Ras homolog enriched in brain ribosomal S6 kinase Autophagy-related protein 13 eIF4E binding protein 1 protein kinase B
TORC2下流	PKC-alpha SGK1	PKC-2 SGK-1	AGCキナーゼ 代謝、細胞分裂などの制御 AGCキナーゼ 細胞骨格の制御 AGCキナーゼ 代謝、細胞分裂などの制御

*: 線虫において欠損すると致死表現型となる **欠損すると耐性幼虫となり成虫まで成長できない

表1-2 TORC1とTORC2の構成分子、主要な上流、下流因子とその役割 TORは、TORC1とTORC2という機能と構成分子の異なる二種類の複合体を形成しており、その構成分子は種間でよく保存されている。

・学習との関わり

TOR の神経機能における役割もよく調べられている。ラパマイシンなどを用いた薬理的な解析から、TORC1 が軸索伸長、シナプス可塑性制御、神経新生などの形態形成制御にとどまらず、長期記憶の形成などにも関与していることが明らかになっている (Graber et al., 2013; Stoica et al., 2011)。また、TORC1 の特異的活性化は神経変性を促進することも知られている (Kassai et al., 2014)。TORC2 についての報告は少ないが、Forebrain でのコンディショナルノックアウト実験から、TORC2 が PKC α を介したアクチン骨格制御により長期記憶を制御していることが報告されている (Huang et al., 2013)。

・線虫における TOR の機能

線虫の TORC1 の主な構成分子の変異体はすべて成虫になるまで成長できない(表 1-2)ため、変異体の解析はあまり進んでいない。これまでヘテロ変異体の解析や RNAi 実験から、TORC1 の機能が低下すると寿命が延長すること、耐性幼虫が形成されることが明らかになっている (Jia et al., 2004)。一方、TORC2 に関しては、TORC2 を特徴づける構成分子である Rictor のホモログ *ric-1* の生存可能な変異体が幾つか報告されている。*ric-1* 変異体は N2 に比べて脂肪の蓄積量が多くなる変異体のスクリーニングにより発見された (Jones et al., 2009; Soukas et al., 2009)。体脂肪の蓄積量の他に体長が小さい、子虫の数が少ない、成長が遅い、寿命が短くなるなどの表現型が報告されている (Jones et al., 2009; Soukas et al., 2009)。*ric-1* 変異体では餌の摂取速度には異常が見られないことや、栄養価の高い餌で育てた場合にはこれらの異常が軽減することから、*ric-1* 変異体は摂取した栄養を貯蔵と利用に効率よく分配できていないのではないかと考えられている (Jones et al., 2009)。これらの表現型においては、SGK-1 が TORC2 の主要な下流因子であることがわかっている (Chen et al., 2013; Jones et al., 2009; Soukas et al., 2009)。

1.7 本研究の目的

前述のとおり、線虫の味覚忌避学習にはインスリン/PI3K 経路、Gq/DAG 経路などが機能していることが明らかにされていたが、これらの分子が具体的にどのように神経活性に影響を与え、行動を制御しているかは詳細には明らかになっていない。本研究では、味覚忌避学習に関わる未知の分子を探索し、味覚忌避学習の分子メカニズムを明らかにすることを目的に実験を行った。

第二章 材料と方法

2.1 用いた線虫株

特に表記がない限り、野生型標準株として N2 を用いた。本研究で用いた株を以下に示す。

株名	遺伝子型	変異	変異の効果	入手先
Bristol N2	野生型	-	-	CGC
Hawaiian CB4856	野生型	-	-	CGC
JN2410	<i>let-363(pe410) I.</i>	エキソン領域に欠失	なし?	本研究
JN771	<i>goa-1(pe771) I.</i>	ミスセンス	機能低下型	本研究
JN772	<i>goa-1(pe772) I.</i>	ミスセンス	機能低下型	本研究
JN773	<i>goa-1(pe773) I.</i>	ミスセンス	機能低下型	本研究
JT603	<i>gpb-2(sa603) I.</i>	ナンセンス	機能低下型	CGC
LX280	<i>gpb-2(vs23) I.</i>	欠失変異	機能低下型	Dr. M. Koelle
JN1034	<i>gpb-2(ad541) I.</i>	ミスセンス	機能低下型	CGC、松木博士
KG571	<i>eat-16(ce71) I.</i>	不明	機能低下型	CGC
JT609	<i>eat-16(sa609) I.</i>	ミスセンス	機能低下型	CGC
JN714	<i>daf-16(mgDf47) I.</i>	欠失変異	機能欠失型	CGC、富岡博士
KQ1366	<i>rict-1(ft7) II.</i>	ナンセンス	機能低下型	CGC
TM4017	<i>rict-1(tm4017) II.</i>	イントロン内欠失	機能低下型	NBRP
KQ6	<i>rict-1(mg360) II.</i>	ミスセンス	機能低下型	CGC
JN2411	<i>sinh-1(pe420) II.</i>	欠失変異	機能欠失型	本研究
RB1206	<i>rsk-1(ok1255) III.</i>	欠失変異	機能欠失型	CGC
HZ1688	<i>atg-13(bp414) III.</i>	イントロン内ミスセンス	機能低下型	CGC
JN713	<i>daf-18(e1375) IV.</i>	ミスセンス、挿入変異	機能低下型	CGC、富岡博士
RB759	<i>akt-1(ok525) V.</i>	欠失変異	機能欠失型	CGC
GR1310	<i>akt-1(mg144) V.</i>	ミスセンス	機能獲得型	CGC
MT8504	<i>egl-10(md176) V.</i>	不明		CGC
	<i>sgk-1(mg455) X.</i>	ナンセンス	機能欠失型	Dr. A. Soukas
KQ1564	<i>sgk-1(ft15) X.</i>	ナンセンス	機能獲得型	CGC
VC345	<i>sgk-1(ok538) X.</i>	欠失変異	機能欠失型	CGC
VC127	<i>pkc-2(ok328) X.</i>	欠失変異	機能欠失型	CGC
TM0409	<i>pkc-2(tm409) X.</i>	欠失変異	機能欠失型	NBRP

表 2-1

株名	遺伝子型	変異	変異の効果	入手先
	<i>daf-16(mgDf47) I; sgk-1(ft15) X.</i>			本研究
	<i>daf-16(mgDf47) I; rict-1(mg360)II.</i>			本研究
JN774	<i>age-1(pe774) II; daf-18(e1375)IV.</i>	欠失(pe774)	機能欠失型	本研究
	<i>rict-1(mg360) II; akt-1(ok525)V.</i>			本研究
	<i>rict-1(mg360) II; akt-1(mg144)V.</i>			本研究
	<i>rict-1(mg360) II; pkc-2(ok328)X.</i>			本研究
	<i>rict-1(mg360) II; sgk-1(ok538)X.</i>			本研究
	<i>rict-1(mg360) II; sgk-1(ft15)X.</i>			本研究
	<i>Ex[P_{gcy-51} ::Cas9;P_{U6} ::goa-1 sgRNA;P_{myo3} ::venus].</i>			大野博士
	<i>Ex[P_{H20} ::nCre;P_{myo3} ::venus].</i>			金森氏
	<i>Ex[P_{ges-1} ::nCre;P_{myo3} ::venus].</i>			金森氏
	<i>Ex[P_{casv-1} ::nCre;P_{myo3} ::venus].</i>			金森氏
	<i>Ex[P_{gcy-51} ::nCre;P_{myo3} ::venus].</i>			金森氏
	<i>Ex[P_{sgk-1a} ::venus].</i>			本研究
	<i>Ex[P_{sgk-1 b}::venus].</i>			本研究
	<i>let-363(pe410) I; Ex[P_{H20} ::nCre;P_{myo3} ::venus].</i>			本研究
	<i>let-363(pe410) I; Ex[P_{ges-1} ::nCre;P_{myo3} ::venus].</i>			本研究
	<i>let-363(pe410) I; Ex[P_{casv-1} ::nCre;P_{myo3} ::venus].</i>			本研究
	<i>let-363(pe410) I; Ex[P_{gcy-5} ::nCre;P_{myo3} ::venus].</i>			本研究
	<i>goa-1(pe773) I; Ex[P_{goa-1} ::goa-1; P_{myo3} ::venus].</i>			本研究
	<i>goa-1(pe773) I; Ex[P_{gcy-5} ::goa-1; P_{myo3} ::venus].</i>			本研究
	<i>goa-1(pe773) I; Ex[P_{np-6} ::goa-1; P_{myo-3} ::venus].</i>			本研究
	<i>sinh-1(pe420) II; [P_{ges-1} ::sinh-1; P_{myo-3} ::venus].</i>			本研究
	<i>rict-1(mg360) II; Ex[P_{ges-1} ::sgk-1(S424A,T444A);P_{myo-3} ::venus].</i>			本研究
	<i>rict-1(mg360) II; Ex[P_{ges-1} ::sgk-1(S424E,T444E);P_{myo-3} ::venus].</i>			本研究

表 2-1(続き)

株名	遺伝子型	変異	変異の効果	入手先
	<i>rsk-1(ok1255) III; Ex[P_{H20}] ::rsk-1; P_{myo-3} ::venus].</i>			本研究
	<i>rsk-1(ok1255) III; Ex[P_{gcy-5}] ::rsk-1; P_{myo-3} ::venus].</i>			本研究
	<i>sgk-1(ok538) X; Ex[P_{sgk-1a}] ::sgk-1b; P_{myo-3} ::venus].</i>			本研究
	<i>sgk-1(ok538) X; Ex[P_{sgk-1b}] ::sgk-1b; P_{myo-3} ::venus].</i>			本研究
	<i>sgk-1(ok538) X; Ex[P_{ges-1}] ::sgk-1b; P_{myo-3} ::venus].</i>			本研究
	<i>sgk-1(ok538) X; Ex[P_{H20}] ::sgk-1b; P_{myo-3} ::venus].</i>			本研究
	<i>pkc-2(ok328) X; Ex[P_{H20}] ::pkc-2; P_{myo3} ::venus].</i>			本研究
	<i>pkc-2(ok328) X; Ex[P_{gcy-5}] ::pkc-2; P_{myo-3} ::venus].</i>			本研究
	<i>pkc-2(ok328) X; Ex[P_{ges-1}] ::pkc-2; P_{myo-3} ::venus].</i>			本研究

表 2-1(続き)

2.2 線虫培養の基本的操作と使用した試薬

本研究で用いた線虫の株は、NGM と呼ばれる寒天培地上で、培養温度 20°Cで飼育した。線虫の餌として、*E. coli* NA22 株をプレートに塗り広げて培養したものを使用した。線虫は、野生型の場合、親虫 6 匹を植え次いでから 4 日間培養した成虫を用いた。変異体では、親虫が産む卵の量に合わせて 8-12 匹を植えつぎ、成長速度に合わせて 4-12 日間培養した。

・ NGM (Nematode Growth Medium) プレートの作製

NGM の組成は、Brenner らの方法に従った(Brenner, 1974)。塩化ナトリウム、ポリペプトン、寒天、コレステロールを逆浸透水に溶解、懸濁し、オートクレーブ滅菌した後、60°C程度まで冷ました。その後、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、リン酸カリウムを加えてよく混和し、6 cm シャーレに 10 ml ずつ分注した後、常温で固めた。

NGM プレートの組成

ポリペプトンまたはハイポリペプトン(WAKO)	2.5 g/l
スプーン寒天 (タイショーテクノス)	17 g/l
コレステロール (WAKO)	5 mg/l
塩化ナトリウム (マナック)	50 mM
塩化カルシウム (WAKO)	1 mM
硫酸マグネシウム (WAKO)	1 mM
リン酸カリウムバッファー	25 mM

なお、コレステロールは 5 mg/ml で 100%エタノールに溶解したものをオートクレーブ前に添加した。

リン酸カリウムバッファー (1M) の組成

リン酸水素二カリウム (シグマアルドリッチ)	22.96 g/l
リン酸二水素カリウム (シグマアルドリッチ)	118.14 g /l

・フリージングストックの作製

線虫の特に L1 幼虫は、ディープフリーザーで長期間保存することができる。線虫株を保存する際には、フリージングソリューションと M9 バッファーを 1:1 で混ぜあわせたもので L1 幼虫をプレートから回収し、セラムチューブに入れ-80°Cで保存した。

M9 バッファーの組成

リン酸二水素カリウム(シグマアルドリッチ)	3 g/l
リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (WAKO)	15.2 g/l
塩化ナトリウム(マナック)	5 g/l
硫酸マグネシウム (WAKO)	1 mM
ゼラチン (ナカライテスク)	0.5 g/l

フリージングソリューション

塩化ナトリウム (マナック)	100 mM
リン酸カリウムバッファー	50 mM
100%グリセロール (シグマアルドリッチ)	300 ml/l(v/v)
硫酸マグネシウム (WAKO)	300 μ M

2.3 ゲノム抽出

NGM プレートで培養した成虫を集め、TEN バッファーでよく洗浄した後、1.5 ml のチューブに移し、TEN バッファーの液量を 500 μ l とした。10% SDS 25 μ l、20 mg/ml プロテイナーゼ K 2.5 μ l、 β -メルカプトエタノール(ナカライテスク) 1 μ l を加え、55°C で 3 時間線虫を溶かした。その後、液量と等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール 25:24:1 (ナカライテスク) を加え、室温 15,000rpm で 10 分遠心分離した後、上層を回収した。液量の 2 倍量の冷 100%エタノールを加えゆるやかに混和した後、4°C、15,000rpm で 10 分間遠心した。上清を除き、冷 70%エタノールでリンスした後、上清を除き、風乾した。TEN バッファー500 μ l を加え、一晩かけて溶解させた。溶解後、終濃度 40 μ g/ml になるように RNaseA (シグマアルドリッチ)を添加し、37°Cで 30 分インキュベートした後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿の操作を再び行い、風乾後 100 μ l の TE バッファーに溶解した。

TEN バッファー

Tris-HCl pH7.5	20 mM
EDTA \cdot 2Na (同人化学研究所)	50 mM
塩化ナトリウム (マナック)	100 mM

10% SDS

ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) (ナカライテスク) 10%(w/v)

2.4 Total cDNA の作製

- ・ TRIZOL 処理による RNA 抽出

成虫になるまで培養した線虫を M9 バッファーで洗い取り、1.5 ml チューブに回収

した。M9 バッファーで複数回洗浄して大腸菌を除いた後、上清を捨てて液量を 50 μ l 程度にした。液量の 4 倍量の TRIzol® Reagent (Life Technologies)を加え、5 分程度ボルテックスと転倒混和を繰り返した後 5 分間静置し、虫をよく溶解した。4°C、15,000rpm で 10 分間遠心分離した後、上清を新しいチューブに移し、200 μ l のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールを加え、ボルテックスでよく懸濁した。室温に 3 分間静置した後、4°C、15,000rpm で 15 分間遠心操作を行い、上清を新しいチューブに回収した後、500 μ l のイソプロパノールを加えて転倒混和した。室温で 10 分程度静置した後に、15,000rpm、4°Cで 10 分間遠心操作した。1 ml の 75%エタノールでリンスした後、上清を除き風乾した。これ以降の DNaseI 処理、精製の手順は RNeasy mini kit (QIAGEN)の説明書に従った。

- ・逆転写反応

SuperScriptIII (Thermo Fischer Scientific)の説明書にしたがって行った。逆転写反応後、1 μ l の RNaseH を加え、37°Cで 20 分間反応させた。

2.5 塩走性アッセイ

塩走性アッセイは、國友らが発表した系を改変して行った(Kunitomo et al., 2013)。具体的には、塩濃度勾配をつけたアッセイプレートで、線虫の走性を観察し、それを化学走性指数 (Chemotaxis index)で評価するという方法で行った。

- ・塩濃度勾配を持つアッセイプレートの作製

塩濃度勾配をもつアッセイプレートは、50 mM の塩化ナトリウムを含むアッセイプレートに 0 mM、150 mM の塩化ナトリウムを含む寒天プラグを置くことで作製した。アッセイプレート (BG50) と各プラグプレートは、バクタアガー、塩化ナトリウムを逆浸透水に溶解、懸濁したものをオートクレーブし、それが 60°C位までさめた後に残りの溶液を加えて、直径 10 cm のプレートに分注して固めた。アッセイプレートは各プレートあたり 10 ml、プラグプレートは各プレートあたり 30 ml 分注した。それぞれ、サランラップで包装したのち、4°Cで保存した。

行動アッセイの 18~22 時間前に、次のような操作でアッセイプレート上に塩濃度勾配をつけた。アッセイプレートの中心から 3 cm の点をそれぞれ A、B とし(図 2-1)、A 点にはプラグプレートからコルクポラーでくり抜いて直径 14 mm、高さ 5 mm にし

た 150 mM プラグを、B 点には同じサイズの 0 mM プラグを置いて、常温で放置した。
用いたプレートの組成を以下に示す

アッセイプレート(BG 50)

バクトアガー (Difco)	20g/l
塩化ナトリウム (マナック)	50 mM
塩化カルシウム (WAKO)	1 mM
硫酸マグネシウム (WAKO)	1 mM
1M リン酸カリウムバッファー	25 ml/l

0 mM、150 mM のプラグプレートは、アッセイプレート (BG 50)の塩化ナトリウム濃度をそれぞれ 0 mM、150 mM にしたものの。

・ 線虫の条件付けと行動アッセイ(プレート条件付け)

線虫は、NGM で 4 日間培養した成虫を用いた。線虫を洗浄バッファーでプレートから洗いとり、エッペンドルフチューブに回収した。線虫がチューブの底に沈むまで約 30 秒放置し、上清をのぞいた後に新しい洗浄バッファーを加えて洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、0 mM、50 mM、100 mM の NaCl を含む餌あり、または餌なしの NGM プレートに線虫を置き、5-6 時間、20°C で培養した。それぞれの塩濃度の NGM プレートの作製手順は前述の NGM プレートと同様に塩化ナトリウム濃度のみを変えて作製した。餌ありプレートは、アッセイ前日に大腸菌液を塗布し、37°C で一晩培養したものをを用いた。

アッセイを始める前に、アッセイプレートからプラグを外し、A 点、B 点に麻酔剤として 0.5 M の NaN_3 (ナカライテスク) を 1 μl スポットした。条件付けした線虫を洗浄バッファーで洗いとり、エッペンドルフチューブに回収した。約 30 秒程放置し、線虫がチューブの底に沈んだら、上清を除いた後、新しい洗浄バッファーを加えて洗浄した。この操作を 3 回繰り返した後、虫をアッセイプレート上に移して、余分な水分をキムワイプで拭き取ってアッセイを開始した。常温で 40 分放置した後、プレート上の線虫の各領域の個体数から Chemotaxis Index (図 2-1A) を算出した。

・化学走性指数 (Chemotaxis index) の算出

アッセイ終了後のプレート上の線虫の分布から、Chemotaxis index を算出することによって線虫の NaCl への走性を評価した。直径 9 cm のアッセイプレート上で、150 mM のプラグを置いた A 点から半径 2 cm 以内の領域を A 領域、0 mM のプラグを置いた B 点から半径 2 cm 以内の領域を B 領域とし、アッセイ後のそれらの領域内の虫の数をそれぞれ N_A 、 N_B とした(図 2-1A)。また、アッセイ開始時に線虫を置く領域を O 領域とし、アッセイ後の O 領域内の虫の数を N_O とした。Chemotaxis index (C.I.)は $C.I.=(N_A-N_B)/(N_{all}-N_O)$ の式で算出した。ただし、 N_{all} はプレート上の虫の総数。Chemotaxis index の値が高ければ高い程、高塩濃度に誘引されていることを、低ければ低塩濃度に誘引されていることを表す。

2.6 嗅覚可塑性アッセイ

・匂い勾配を持つアッセイプレートの作製

本研究ではベンズアルデヒドに対する走性を、匂いの濃度勾配を持つアッセイプレートを用いて評価した。嗅覚可塑性用のアッセイプレートは、NaCl を含まないアッセイプレートの片側二箇所 に 100%エタノールで 1:100 に希釈したベンズアルデヒド (WAKO) を 1 μ l ずつスポットし、逆側二箇所にコントロールとして 100%エタノールを 1 μ l ずつスポットして作製した (図 2-1B)。ベンズアルデヒドまたはエタノールをスポットした計 4 箇所に、線虫の動きをとめるための 0.5 M NaN_3 1 μ l を追加してスポットした。

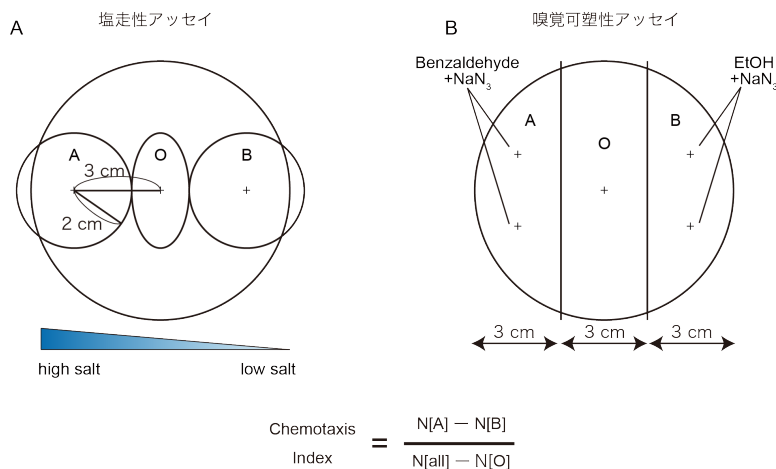


図 2-1 塩走性アッセイ (A) 及び嗅覚可塑性 (B) アッセイに用いたプレートの模式図。

Chemotaxis index は下に示す式で算出した。

アッセイプレートの組成を以下に示す。

アッセイプレート(BG 0)

バクトアガー (Difco)	20g/l
塩化カルシウム (WAKO)	1 mM
硫酸マグネシウム (WAKO)	1 mM
1M リン酸カリウムバッファー	25 ml/l

・嗅覚条件付けと嗅覚可塑性アッセイ

このアッセイは、培養した線虫をそのまま用いる未処理 (Naïve) と 1 時間ほど匂いに暴露する嗅覚条件付け後 (Conditioned) の 2 条件で行った。まず、成虫になるまで通常の NGM プレート上で培養した線虫を洗浄バッファーで洗い取り、1.5 ml チューブに回収し、虫が沈んだら上清を除去し、新しい洗浄バッファーを加えた。この操作を 3 回繰り返して大腸菌を洗い流したら、半量の虫を Naïve 条件の虫として、嗅覚可塑性用のアッセイプレートの中央に置き、余分な水分をキムワイプで取り除いてから 30 分、虫を自由に行動させた。残った半量の虫は、ベンズアルデヒドを洗浄バッファーで 1:10000 に希釈した溶液 500 μ l が入った 1.5 ml チューブに入れ、ローテーターで 1 時間ゆるやかに転倒させながら条件付けした。1 時間経ったらローテーターから降ろし、一度手早く洗浄バッファーで洗浄した後、嗅覚可塑性用のアッセイプレートの中央に置き、Naïve の虫と同様に 30 分間自由に行動させた。Naïve、Conditioned いずれの場合も、30 分のアッセイが終了したところで 4°C でプレートを冷やし、虫の動きを止めた。

以下に、洗浄バッファーの組成を示す。

洗浄バッファー (BG0)

ゼラチン (ナカライテスク)	0.05%
塩化カルシウム (WAKO)	1 mM
硫酸マグネシウム (WAKO)	1 mM
1M リン酸カリウムバッファー	5 ml/l

2.7 *daf-18* 抑圧変異体スクリーニング

*daf-18; lsy-6*変異体の若い成虫 (P0) を50 mM エチルメタンスルホン酸を含むM9バッファーに1.5 ml チューブ内で4 時間曝した。この間、室温にてローテーターを使用し、よく攪拌した。EMS 処理から16 時間後にP0集団に対してブリーチ液 (花王キッチンハイター0.2ml、1 M NaOH 0.5mlを混和したもの)を用いて溶解し、卵のみを回収した。F1が成虫に育った段階で、再びブリーチ液により溶解して卵のみを回収し、次世代を育て、F3が成虫になるまで培養した。

なお、独立性を保つため、F1 で 50 グループに分けて飼育した。F3 の集団に対してグループごとに高塩濃度・餌あり条件付け後の塩走性の表現型を確認し、目的とする表現型を示す個体を変異体候補として単離した。

2.8 原因変異のマッピング

前項で獲得した変異体は N2 由来であったが、N2 との間に多くの SNP を持つことが知られる CB4856 株との掛け合わせにより、SNPs をマーカーとした原因変異のマッピングを行った(Wicks et al., 2001)。*daf-18(e1375)* 変異体を CB4856 によってアウトクロスし、CB4856 バックグラウンドを持つ *daf-18(e1375)*変異体を作製し、これを取付した変異体と掛け合わせた。この掛け合わせを行った後、F2、24 匹を単離し、これらを 8 世代独立に植え次ぐことにより、染色体の SNPs が様々に組み変わった RIL (recombinant inbred lines)を得た。これらの SNP とそれぞれのラインの表現型を比較することで、原因変異と連鎖がある SNP の位置を決定した。

2.9 ラパマイシン、TORIN の添加実験

・ラパマイシン添加実験

ラパマイシン添加プレートの作製には、予め寒天培地にラパマイシンを混ぜて作製する方法と、ラパマイシンを入れずに作製したプレートにあとからラパマイシンを塗布する方法の二通りを試した。ラパマイシン (LC ラボラトリー) の粉末を、DMSO または 10%ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート (ナカライテスク)・90%エタノール (シグマアルドリッチ) 溶液に溶解し、50 mg/ml の溶液を作って-30 °Cで保存した。予め培地にラパマイシンを入れる場合には、オートクレーブ後に 60 °C程度まで冷めた培地に終濃度 100 μM となるようにラパマイシン溶液を入れ、以後、NGM プ

プレートと同様に作製し、4°Cで保存する。あとからラパマイシンを塗布する場合には、アッセイの前日に終濃度 100 μM となるようにラパマイシン溶液をプレートに入れ、滅菌したスプレッダーで伸ばした。餌ありプレートに関しては、大腸菌培養後のプレートにラパマイシン溶液を塗り広げた。

・ Torin1、Torin 2 添加実験

Torin1 (Tocris 4247)または Torin2 (Chem Scene CS-0236)の粉末を DMSO に溶解し、10 $\mu\text{mol/ml}$ の溶液をストック溶液として作製して-30°Cで保存した。Torin1 は非常に溶解しづらいため、50°Cで温めながら溶解した。アッセイの前日にプレートに溶液を添加し、スプレッダーで伸ばして塗り広げた。コントロールとしては、溶媒のみをラパマイシン溶液と同量添加したものをを用いた。以後の操作は、普通の塩走性アッセイと同様に行った。

2.10 変異体の掛けあわせ、戻し交配

掛けあわせ及び戻し交配は、それぞれ変異体同士、あるいは変異体に N2 株を交配して行った。F1 個体の成虫を単離して、36~48 時間後に虫が卵を産んでいるのを確認後、親虫をジェノタイピングして、掛けあわせが行われていることを確認した。F2 が成虫になった後に複数の F2 を単離し、約 24 時間後に線虫が卵を産んでいるのを確認後、親虫をジェノタイピングした。ジェノタイピングは、成虫をリシスバッファー10 μl に入れ、60°Cで 1 時間かけて溶解した後、Taq ポリメラーゼを用いて PCR 反応を行い確かめた。リシスバッファーと PCR 反応液の組成を次ページに示す。

リシスバッファー

塩化カリウム (WAKO)	50 mM
Tris-HCl pH8.3	10 mM
塩化マグネシウム (WAKO)	2.5 mM
IGEPAL CA-630 (シグマアルドリッチ)	0.45%(v/v)
ポリオキシエチレン (20)ソルビタンモノラウレート (ナカライテスク)	0.45%(v/v)
ゼラチン(ナカライテスク)	0.01%

使用の直前に proteinase K を終濃度 60 µg/ml となるように加えた。

PCR 反応液

10xPCR バッファー	1 µl
2.5 mM dNTPs	1 µl
線虫リシス液	1 µl
10 µM プライマー液	各 0.5 µl
Taq DNA ポリメラーゼ	0.01 µl
水	up to 10 µl

10x PCR バッファー

Tris-HCl pH 8.3	0.1 M
塩化カリウム (WAKO)	0.5 M
塩化マグネシウム (WAKO)	15 mM
ゼラチン (ナカライテスク)	0.01%

Tris-HCl pH8.3

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (ナカライテスク) 1M

塩酸 (WAKO) により pH8.3 になるように調整した。

2.11 塩基配列決定

BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit のプロトコールに従い反応を行った。PCR 反応により目的の遺伝子座の DNA を増幅後、QIAquick Gel Extraction Kit を用いて Big Dye 反応の鋳型となる DNA を精製した。なお、鋳型がプラスミドである場合はこの工程を飛ばしてプラスミドから直接 Big Dye 反応を行った。その後、指示に従ってエタノール沈殿を行った後、ジェネティックアナライザ (ABI 3100)で塩基配列を決定した。

2.12 組織特異的機能回復実験用プラスミドの作製

組織特異的機能回復実験用のプラスミドは、Gateway®システム (Thermo Fisher Scientific) を用いて作製した (詳細は

http://molecular-ethology.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/Gateway/Gateway_overview1_jp.html を参照)。このシステムは、エントリープラスミド (pENTR) とディステーションプラスミド (pDEST) という二種類のプラスミドの間で起こる、LR 反応と呼ばれる組み換えを利用したものであり、pENTR の特定の箇所に挿入された配列を、pDEST プラスミドの特定の位置に簡単に挿入することができる。当研究室では、pENTR プラスミドに遺伝子のプロモーター配列を、pDEST プラスミドに cDNA を挿入し、cDNA につなげるプロモーターを組み替えることで、異なる組織での cDNA 発現を誘導する複数のコンストラクトを作製している。

・ pENTR プラスミドの作製

pENTR プラスミドは、pENTR1A プラスミド (Thermo Fisher Scientific) のマルチクローニングサイトに、PCR により N2 ゲノムから増幅した各遺伝子のプロモーター領域を挿入することで作製した。PCR には KOD FX または KOD plus NEO (TOYOBO) を用いた。ライゲーション後、コンピテントセル DH5 α に形質転換し、LB 液体培地で 30 分、37°C で培養し、リカバリーをかけたあとに、15 μ g/ml のカナマイシン硫酸塩 (ナカライテスク) を含む LB 寒天培地で培養した。翌日、コロニーをピックし、カナマイシンを含む LB 液体培地で 37°C で 18 時間程度培養したのち、GENE-PREP-SYSTEM (KURABO) によりプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドは逆浸透水に溶解した。LB 培地は、Miller LB (Millipore) を逆浸透水に溶解して作製した。

以下に、本研究でプロモーター領域の増幅に使用したプライマーを示す。

プライマー名	配列	使用した領域	使用した制限酵素
unc18_promoter_F	tcaGGTACCggaataccttttgaggagtgac	上流1.8 kb	KpnI
unc18_promoter_R	tatCTCGAGcactcaaaaatcctcgtcgtg		XhoI
sgk-1promA_F	cccGGATCCtgagccgtgataagaagacaag	上流2.1kb	BamHI
sgk-1promA_R	gggCTCGAGtctcgactctgaaatattcaaaaattaaattatattaaaac		XhoI
sgk-1promB_F	cccGGATCCtgctatgcgtgacattcgtg	上流2.5kb	BamHI
sgk-1promB_R	gggGTCGACgtgcacagtaatgctcctcgt		Sall(XhoI部位へ)
riect-1promA_F	gtgtAGATCTagcaagataaatggccgctg	上流3.4kb	BamHI
riect-1promA_R	gtgtCTCGAGtttcgacgagtgctccTtcgcctgaaaattg		XhoI

これ以外の pENTR プラスミド、pENTR-H20 (全神経への発現を誘導)、pENTR-ges1

(腸への発現を誘導)、pENTR-gcy5 (ASER 神経への発現を誘導)、pENTR-flp6 (ASEL, ASER 神経への発現を誘導)については、飯野研に元から存在していたものを使用した。

・ pDEST プラスミドの作製

cDNA を含む pDEST プラスミドは、pPD-DEST プラスミドのマルチクローニングサイトに、PCR により cDNA ライブラリより増幅された cDNA 領域を挿入することにより作製した。PCR には KOD FX または KOD plus NEO (TOYOBO) を用いた。ライゲーション後、コンピテントセル DB3.1 に形質転換し、40 µg/ml のアンピシリンナトリウム (MeijiSeika ファルマ、商品名ビクシリン®注射用) が入った LB 寒天培地で培養した。翌日、コロニーをピックし、アンピシリンを含む LB 液体培地で 37°C で 18 時間程度培養したのち、GENE-PREP-SYSTEM (KURABO) によりプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドは逆浸透水に溶解した。Big-Dye sequence kit ver 2.1 により遺伝子の ORF 塩基配列が正しいことを確認してから用いた。

・ pG プラスミドの作製

pG プラスミドは、pENTR プラスミドと pDEST プラスミドを、LRClonase™ 酵素 (Thermo Fisher Scientific) の説明書にしたがって反応させて作製した。反応液をコンピテントセル DH5α に形質転換後、アンピシリン入り LB 寒天培地で培養した。翌日、コロニーをピックし、アンピシリンを含む LB 液体培地で 37°C で 18 時間程度培養したのち、GENE-PREP-SYSTEM (KURABO) によりプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドは逆浸透水に溶解した。

2.13 アミノ酸置換を導入したコンストラクトの作製

本研究では、リン酸化部位のアミノ酸が置換された UNC-18 と SGK-1 を発現するコンストラクトを作製した。アミノ酸置換型 cDNA は、pDEST プラスミドを鋳型にインバース PCR を行うことにより作製した。PCR の後、T4 Polynucleotide Kinase 処理 (Takara)、T4 DNA Ligase (Takara) によるライゲーション反応を行い、コンピテントセル DB3.1 に形質転換した。以降の操作は pDEST プラスミドの作製と同様。以下に、PCR に用いたプライマーの配列を示す。

プライマー名	配列
sgk-1T444A_F	CACTCATCGAGATCACGATTTTGAGAACTTTgccTTCGTCGACA
sgk-1S424A_R	ACAGCAAGTTGTTGCGGTGCCAACGAggcTGGATCAATT
sgk-1T444E_F	CACTCATCGAGATCACGATTTTGAGAACTTTgaaTTCGTCGACA
sgk-1S424E_R	ACAGCAAGTTGTTGCGGTGCCAACGAttcTGGATCAATT
unc-18_F	ATCAAGGATCTATCGATGCTCA
unc-18_S322A_R	ggcTTTGGAGTCCATCGTTCCC
unc-18_S322E_R	ctcTTTGGAGTCCATCGTTCCC

2.14 組織特異的 RNAi

RNAi 実験は、Esposito らの方法を参考にデザインした (Esposito et al., 2007)。まず、*gcy-5* プロモーター領域を pENTR-*gcy-5* プラスミドを鋳型に PCR で増幅したものを作製した。この際、二種類の異なるリンカー配列 A、B をつけたリバープライマーを作製し、*gcy-5* プロモーター+リンカーA と *gcy-5* プロモーター+リンカーB の二種類の PCR アンプリコンを得た。標的遺伝子については、コード領域の比較的上流側のイントロンの少ない配列 2,000~3,000bp をターゲットに、フォワードプライマーにリンカーA を、リバープライマーにリンカーB を繋いだプライマーで PCR により標的配列の増幅を行った。次に、二種類のリンカーのついたプロモーターと、標的配列のアンプリコンを鋳型に PCR を行い、プロモーター下に配列の向きが異なる二種類の標的配列が繋がったアンプリコンを作製した。これを線虫に導入し、特定の組織で相補的な 2 種類の RNA が転写されるようにした (図 2-2)。

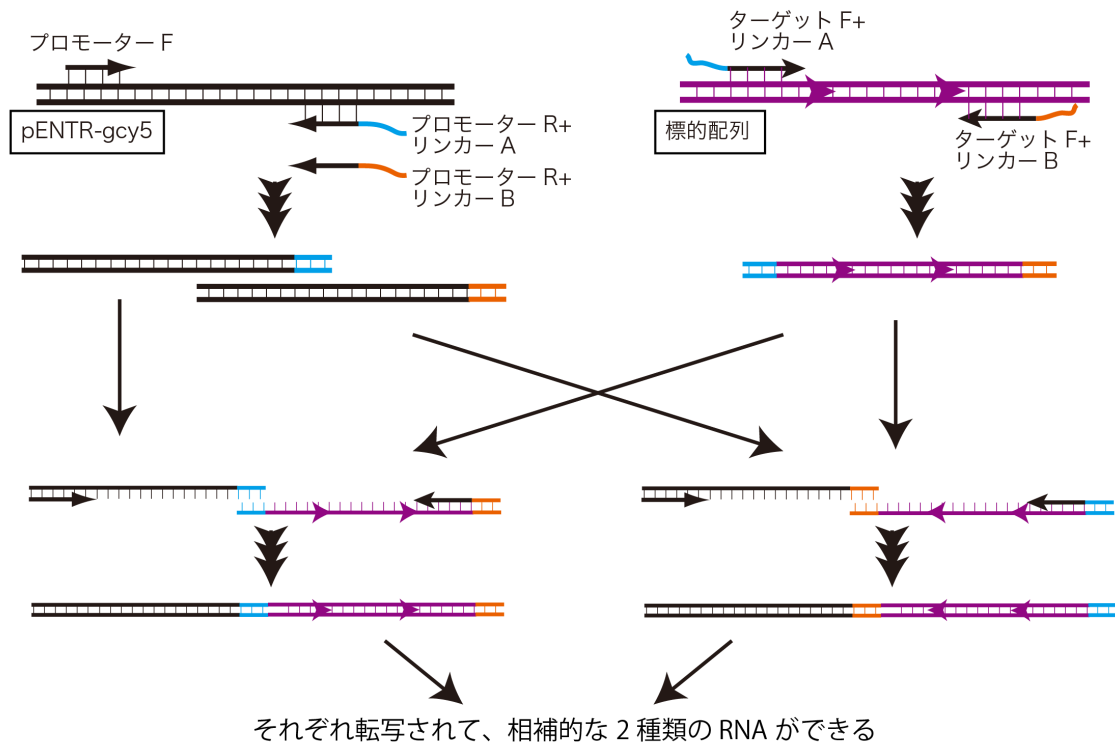


図 2-2 細胞特異的 RNAi のための PCR アンプリコン作製過程。2 段階の PCR により、順方向、逆方向 2 種類の標的配列がプロモーター下についたアンプリコンを得る。これにより、相補的な 2 種類の RNA が転写され、二本鎖 RNA による RNAi が起きることが期待できる。

RNAi に使用したプライマーを以下に示す。

プライマー名	配列
gcy5p_F	tatacatgaaatacatacatag
gcy5p_Rセンス	AGTCGACCTGCAttttcatcagaataagta
gcy5p_Rアンチ	GGCATGCAAGCTttttcatcagaataagta
(RNAi)daf-15F	gatgaaaaTGCAGGTCGACTcgaactgcatctgtcgccatc
(RNAi)daf-15R	gatgaaaaAGCTTGCATGCCttgtggctgtgcattcgttg
(RNAi)let-363F	gatgaaaaTGCAGGTCGACTcgagcggcatcgtaaacaag
(RNAi)let-363R	gatgaaaaAGCTTGCATGCCgcatcaatcgaagacgtggc

2.15 CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集

CRISPR-Cas9 システムを利用したゲノム編集は、大野速雄博士、実験補助の金森真奈美氏の協力を得て行った。Dickinson ら、Liu らの報告を参考に、作製したコンスト

ラクトを遺伝子導入することによりゲノム編集個体を得た(Dickinson et al., 2013; Liu et al., 2014)。Target 配列の選択には、CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu>) を用いた。

2.16 トランスジェニックラインの作製

マイクロインジェクションによる線虫への遺伝子導入は、Mello らの方法に従って行った(Mello et al., 1991)。トランスジーンを含むプラスミド DNA は 10-20 ng/ μ l の濃度で導入し、導入する DNA の合計の濃度が 100 ng/ μ l になるように空ベクター pPD49.26 を加えた。

2.17 共焦点顕微鏡での線虫の観察

線虫の蛍光レポーターの観察には、TCS-SP5 (Leica)を用い、画像の解析は LAS AF (Leica)で行った。通常培養で成虫になるまで培養した線虫を、10 mM NaN_3 を含む、厚さ 2 mm 程度に伸ばした寒天上に載せ、カバーガラスをかけて観察した。

第三章 結果

順遺伝学的スクリーニングを用いた AKT-1 下流分子の探索

インスリン/PI3K 経路とその下流で機能する AKT-1 が味覚忌避学習の制御、特に飢餓シグナルの伝達に関わることが先行研究より明らかになっていた(Kunitomo et al., 2013; Ohno et al., 2014; Tomioka et al., 2006)が、その更に下流でどのような分子が機能しているのかは不明である。本研究では、順遺伝学的スクリーニングを用いて AKT-1 の下流分子の探索を試みた。

3.1 AKT-1 の下流分子の順遺伝学的スクリーニング

線虫の寿命制御、耐性幼虫形成など多くの現象にインスリン/PI3K 経路が関わっており、それらの現象ではインスリン受容体 *daf-2* の変異体の表現型を *daf-16* 変異体が抑圧することから、インスリン/PI3K 経路の下流で DAF-16 が様々な標的遺伝子の転写活性を調節すると考えられている(Kwon et al., 2010; Lin et al., 1997; Ogg et al., 1997)。一方、味覚忌避学習では *daf-16* 変異体は *age-1* や *daf-2* 変異体の表現型を抑圧しないことから、*daf-16* 以外の下流分子の重要性が指摘されていた(Tomioka et al., 2006)。今回改めて *akt-1; daf-16* 変異体の味覚忌避学習の表現型を確認したところ、やはり *akt-1; daf-16* 二重変異体は *akt-1* 様の表現型を示した (図 3-1)。

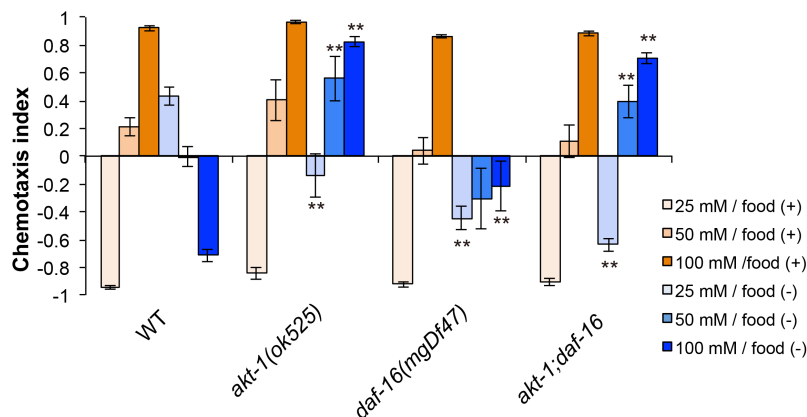


図 3-1 AKT-1 の下流では DAF-16 以外の分子も味覚忌避学習に関与している

daf-16 の欠損は、*akt-1* 変異体の表現型異常を抑圧しない。このことから、DAF-16 以外の分子が AKT-1 の下流で味覚忌避学習の制御に関与していると考えられる。(Error bars, $N \geq 3$, SEM. ** $p < 0.01$ Dunnett's test)

AKT-1 の下流分子を同定するために、*daf-18;lsy-6* 二重変異体に対して EMS により変異原処理を行い、*daf-18* 変異体の塩走性異常を抑圧する変異体を得た。ガン抑制遺伝子 PTEN のホモログである *daf-18* 変異体では、インスリン/PI3K 経路が異常に亢進した状態であると予想される。*daf-18* 変異体は餌の有無にかかわらず低塩濃度に誘引されるため、最も表現型が顕著でわかりやすい高塩・餌あり後の表現型を指標にスクリーニングを行うことにした。

先行研究で安達健博士らによって行われた *daf-18* 変異体に対する抑圧変異体のスクリーニングでは、ASER 神経で CI の受容に欠損を示す *gcy-22* 変異体が取得された (Adachi et al., 2010)。これは ASER での塩の受容に欠損がある個体において、ASEL での塩の受容により塩に対する正の走性が促されてしまうためであった。本研究では、ASER 神経でインスリン/PI3K 経路の下流で機能する分子を効率よく同定するため、ASEL の代わりに ASER 様の神経が分化する *lsy-6* 変異体 (2ASER 変異体とも呼ばれる; Johnston and Hobert, 2003) を *daf-18* 変異体に掛けあわせ、この株に対して EMS 処理を行った (図 3-2A、B)。このスクリーニングの結果、4 株の独立した *daf-18;lsy-6* 抑圧変異体を得て、これらの原因変異を *pe771-pe774* と命名した (図 3-2C)。

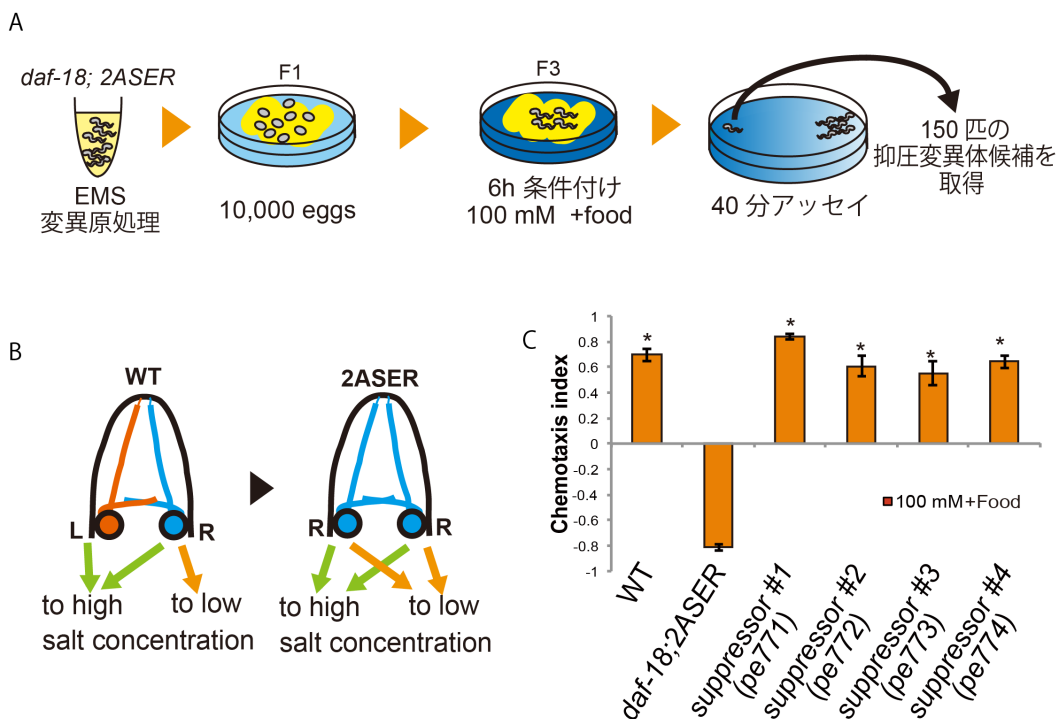


図 3-2 インスリン/PI3K 経路の抑圧変異体のスクリーニング 説明は次頁

図3-2 インスリン/PI3K経路の抑圧変異体のスクリーニング A) スクリーニング手順の模式図。10,000 ゲノムに対して変異原処理を行い、高塩・餌あり条件後に低塩濃度に誘引される *daf-18;lsy-6* 変異体の表現型を抑圧して高塩濃度に誘引される個体をスクリーニングした。B) *lsy-6* 変異体では、ASEL 神経の代わりに ASER 様の神経が分化する。この変異体を用いることで、ASER 内で機能する未知分子を効率よくスクリーニングできると考えた。C) スクリーニングの結果、*daf-18;lsy-6* の異常を抑圧する 4 株の変異体を取得した。(Error bars; SEM, $N \geq 6$, ** $p < 0.01$ Dunnett's test)

3.2 *age-1*、*goa-1* 変異体は *daf-18* の塩走性異常を抑圧する

取得した 4 株の原因変異をマッピング、塩基配列決定した結果、*pe771-pe773* はいずれも *goa-1* 遺伝子座のエキソン上にミスセンス変異を持っていた(図 3-3)。*goa-1(pe771)* と *goa-1(pe772)* は成長が非常に遅かったが、*goa-1(pe773)* の成長速度は野生株 N2 と変わらなかった(データ不記載)。*pe771* は C 末端側にミスセンス変異を持つが、 $G\alpha$ タンパク質の C 末端側は結合する受容体との特異性を決めると考えられている(Conklin et al., 1993; Liu et al., 1995)ことから、この変異体では GPCR との相互作用に欠損があるために強い異常が生じている可能性がある。*pe772* は N 末端のグリシンにミスセンス変異を持つ。ここでは $G\alpha$ タンパク質のミリストイル化が起きると予想されており(Mumby et al., 1990)、ミリストイル化を介した GOA-1 の膜への輸送の異常のために GOA-1 の機能が低下しているのかもしれない。また、*pe774* 変異は *age-1* 遺伝子座に欠失変異を持っており、第二エキソン中にストップコドンを生じていると考えられる(図 3-3)。*daf-18;suppressor#4(pe774)* の *daf-18* 変異をアウトクロスにより除くと、*age-1* 変異体の既知アリルと同様に、全個体が耐性幼虫を形成した(データ不記載)。

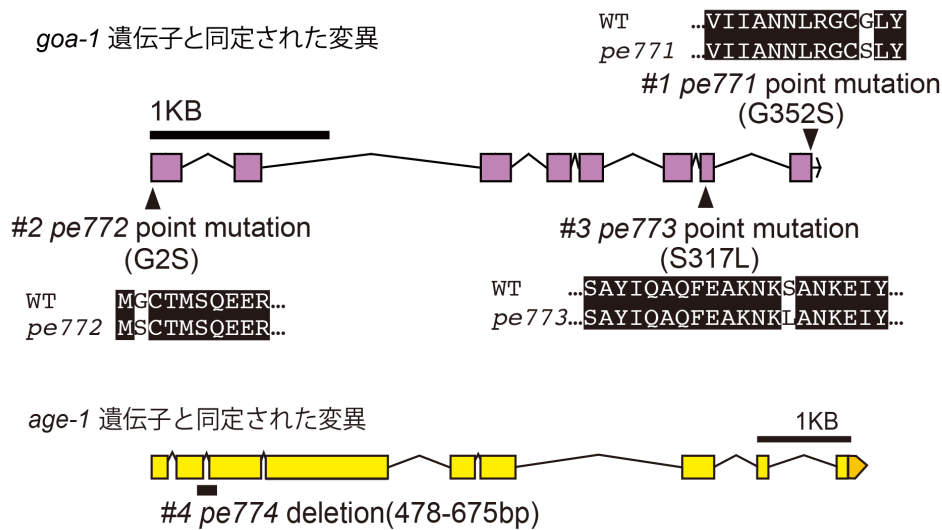


図 3-3 スクリーニングにより得られた変異体 スクリーニングの結果、*pe771-pe773*は *goa-1* 遺伝子座に、*pe774*は *age-1* 遺伝子座に変異を持っていた(詳細は本文参照)。

3.3 GOA-1 は ASE 神経で機能する

最も生育がよく、行動評価のしやすかった *goa-1(pe773)*をもちいて詳細な行動評価を行った。*goa-1(pe773)*変異体は、他の研究室に由来する *goa-1(n1134)*変異体によく似た表現型を示し、餌の有無にかかわらず高塩濃度に誘引される表現型を示した(図 3-4A)。*goa-1* 変異体は産卵のタイミングが早く、子宮内の受精卵の数が少ないことが知られている(Tanis et al., 2008)ため、各変異体の子宮内の卵の数を測定した。その結果、*goa-1(pe773)*変異体においても、野生型に比べて卵の数が少なくなる表現型を示した(図 3-4B)。また、*pe771;daf-18*、*pe772;daf-18*、*pe773;daf-18* 二重変異体でも子宮内の卵数の減少が観察された。

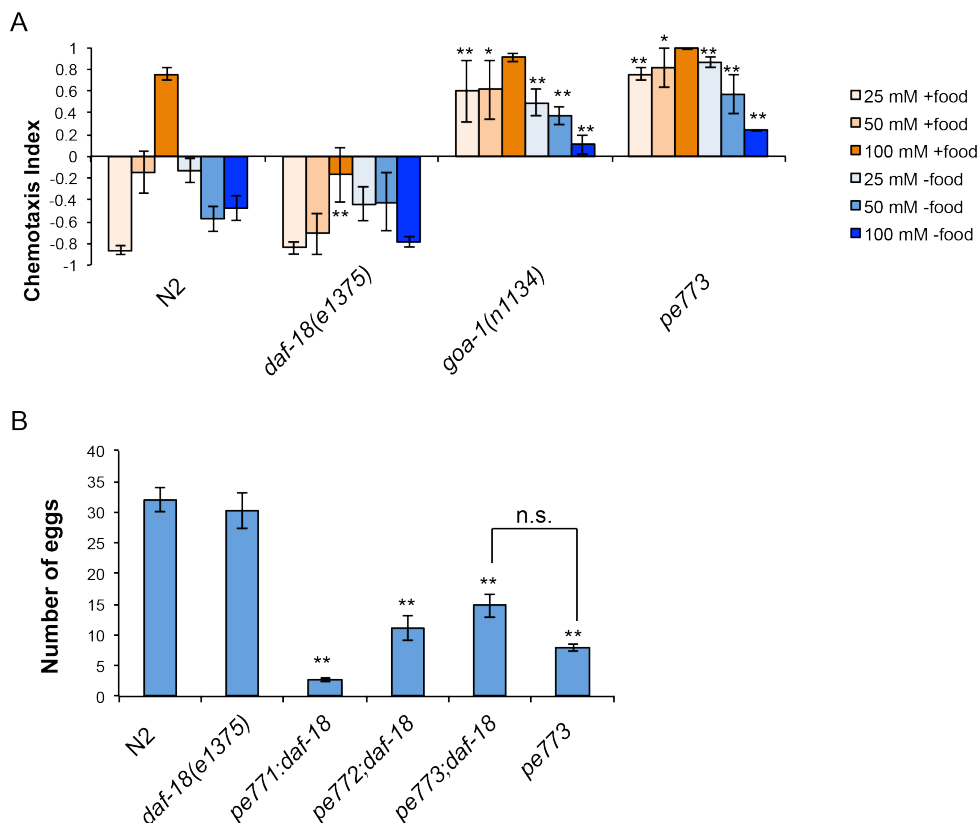


図 3-4 *pe773* は味覚忌避学習、産卵において *goa-1* 様の表現型を示した A) 味覚忌避学習における *pe773* の表現型を調べた。機能低下型変異体である *goa-1(n1134)* は高塩濃度に誘引される表現型を示し、*pe773* 変異体でも同様の表現型が観察された。(Error bars; SEM、 $N \geq 3$ 、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、Dunnett's test) B) *goa-1* 変異体は親虫が子宮内に持つ卵の数が少なくなる表現型を示すことが知られている。今回取得された *pe771;daf-18*、*pe772;daf-18*、*pe773;daf-18* 全てで、N2 に比べて子宮内の卵の数が有意に少なかった。*daf-18* 変異体ではこの表現型は観察されなかった。*daf-18* をアウトクロスして除いた *pe773* 変異体の卵の数は *pe773;daf-18* と同程度であった。(Error bars; SEM、 $N \geq 20$ 、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、t test)

GOA-1 の機能部位を確かめるため、部位特異的に cDNA を発現させて表現型を観察した。*goa-1* のプロモーター下で *goa-1* の cDNA を発現させた場合には、*goa-1* 変異体の表現型異常が不完全にはあるが回復した(図 3-5A)。しかし、ASER 特異的に発現を誘導する *gcy-5* プロモーターの下で発現させた場合には表現型は回復せず、*goa-1(pe773)* とほぼ同様の表現型が観察された。この結果は、GOA-1 が ASER 以外の神経で機能することが必要であることを示唆している。ASEL/ASER 両神経を含む少数

の頭部感覚神経での発現を誘導する *flp-6* プロモーターの下で発現を誘導した際には、全体的に低塩濃度に誘導されるような表現型を示すようになり、これらの頭部感覚神経で GOA-1 が機能していることを示唆する結果が得られた(図 3-5B)。

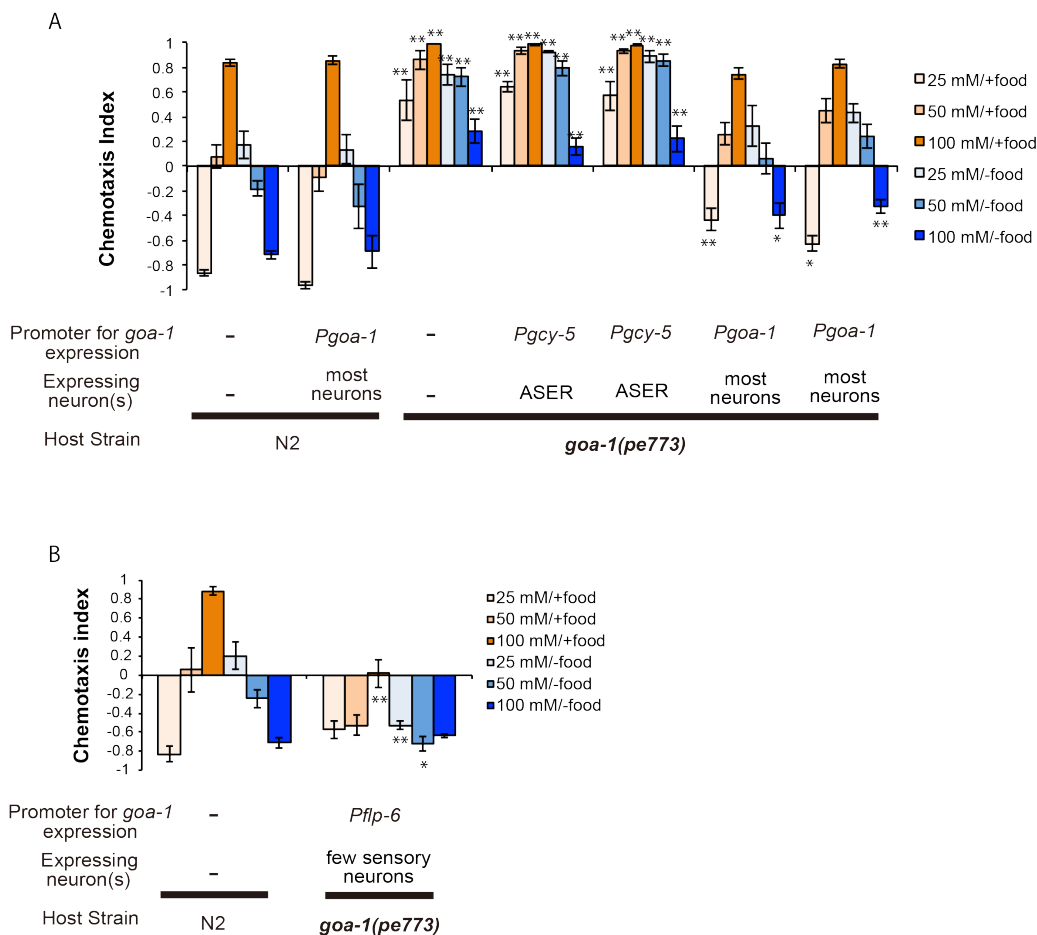


図 3-5 GOA-1 は感覚神経で機能する A) *goa-1* cDNA を *goa-1* プロモーター下で発現させると、部分的ではあるが *goa-1* 変異体の異常が回復した。一方、ASER のみで *goa-1* cDNA を発現させても、*goa-1* の機能は回復しなかった。*Pgcy-5*、*Pgoa-1* での *goa-1* cDNA 発現は 2 ラインずつ行った。B) ASER/R を含む少数の感覚神経で遺伝子発現を誘導する *flp-6* プロモーター下で *goa-1* cDNA を発現させると、N2 以上に低塩濃度側に誘引されるようになった。(Error bars; SEM、 $N \geq 4$ 、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、Dunnett's test)

ここまでは部位特異的に cDNA を発現させる手法で *goa-1* の機能部位を確かめたが、部位特異的に *goa-1* の機能をノックアウトする方法でも、ASER において GOA-1 が機能するかどうかを確かめた。細胞特異的 CRISPR-Cas9 システム(Shen et al., 2014)を用いて、Cas9 を *gcy-5* プロモーター下で発現させ、ASER 特異的に GOA-1 の機能を

ノックアウトした。その結果、N2 に比べてやや高塩濃度に誘引されるような表現型を示した (図 3-6)。これより、GOA-1 は ASER で機能していることが示唆された。

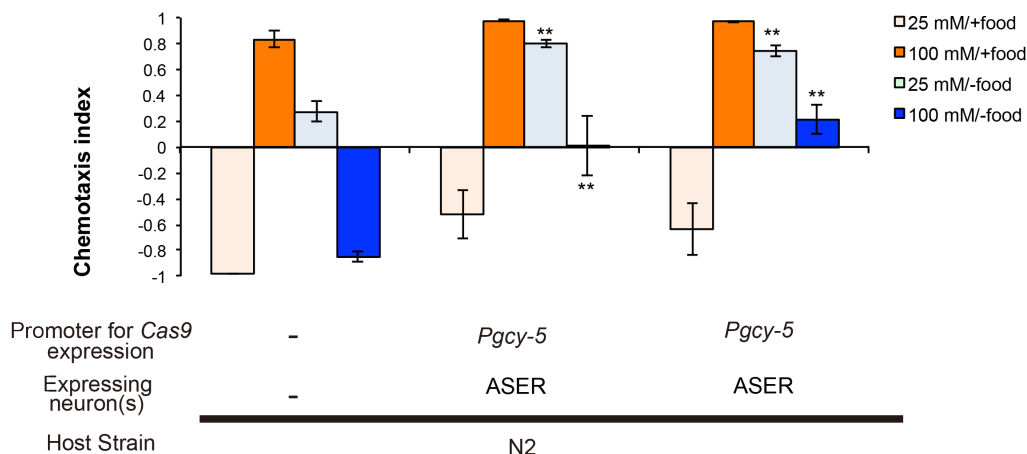


図 3-6 ASER 特異的に *goa-1* をノックアウトすると高塩濃度に誘引される *goa-1* をターゲットに CRISPR-Cas9 システムを用いて ASER 神経特異的に Cas9 を発現させ、*goa-1* をノックアウトしたところ、N2 とくらべて有意に高塩濃度側に誘引された。2 系統作成して表現型を確認した(Error bars; SEM、N \geq 3, **p<0.01、Dunnett’s test)。

3.4 RGS タンパクも塩走性制御に関わっている

GOA-1 はこれまでに嗅覚可塑性制御や産卵の制御、自律運動の制御に関わっていることが報告されている(Koelle and Horvitz, 1996; Matsuki et al., 2006; Tanis et al., 2008)。これらの系では、EGL-10 や EAT-16 などの RGS (Regulator of G protein Signaling)タンパクが $G\beta$ をコードする GPB-2 と協調して機能し、EGL-30 や GOA-1 の活性を制御していると考えられている(Hajdu-Cronin et al., 1999; Koelle and Horvitz, 1996; Reynolds et al., 2005)。機能欠失型変異体である *eat-16(ce71)* と、 $G\alpha$ との相互作用に重要だと思われる RGS ドメイン中にミスセンス変異を持つ (Hajdu-Cronin et al., 1999)*eat-16(sa609)* 変異体は、*goa-1* 変異体や *egl-30* の機能獲得型変異体と似たような塩走性を示した。一方、機能欠失型変異体である *egl-10(md176)* 変異体では、*goa-1* 変異体とは逆に、全体的に低塩濃度側に誘引される表現型を示した。これは、*egl-30* の下流で機能する *pkc-1* の変異体と類似した表現型である(Adachi et al., 2010)。産卵や自律運動制御、嗅覚可塑性では、EAT-16 が EGL-30 を、EGL-10 が GOA-1 を抑圧していると考えられており、その関係が塩走性の制御においても保存されていることが確かめられた(図 3-7B)。RGS である EGL-10、EAT-16

は G タンパク質 β サブユニットである GPB-2 によって安定化されることがわかっている。そこで、GPB-2 の塩走性への寄与も評価したところ、3 種の変異体で全体的に高塩濃度側に誘引される異常が観察された(図 3-7A)。これより、GPB-2 も味覚忌避学習制御に関与していることが明らかとなった。

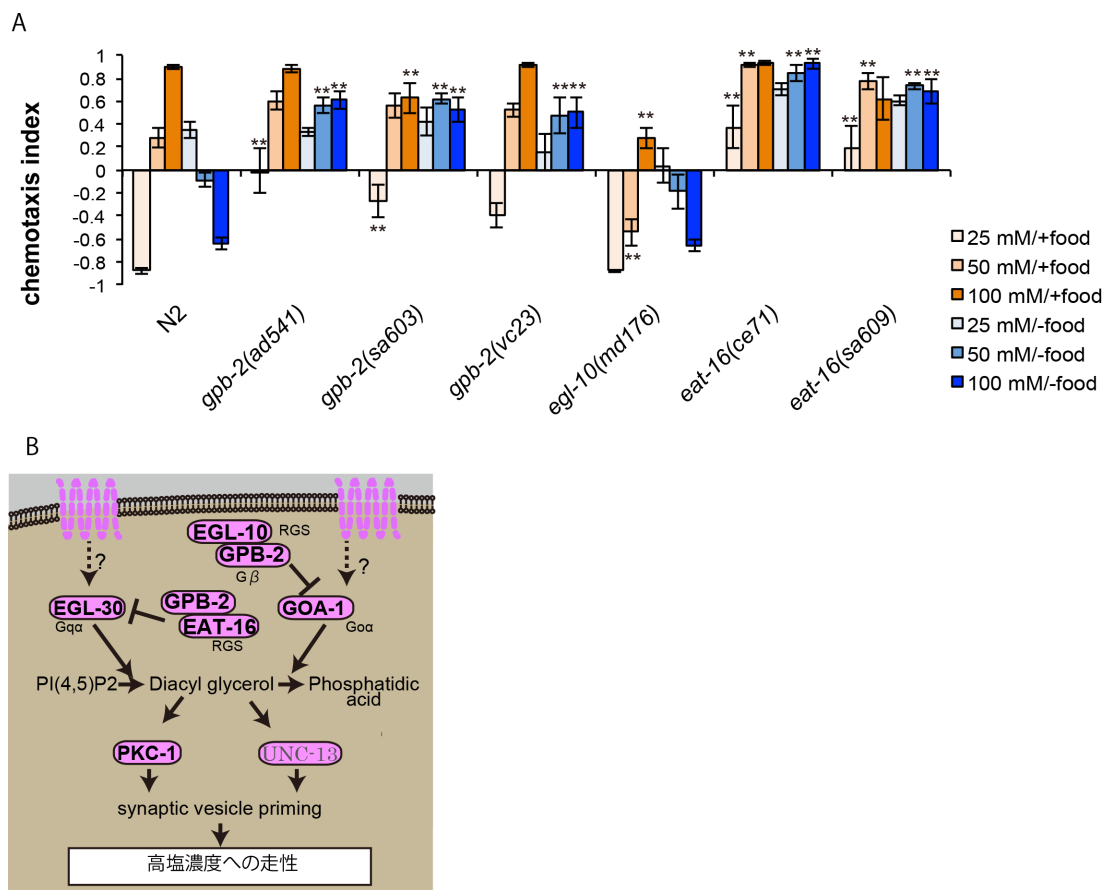


図 3-7 RGS タンパク、G β も味覚忌避学習に寄与している A) G β をコードする *gpb-2*、RGS をコードする *eat-16* の変異体は、N2 に比べて高塩濃度側に誘引された。一方、RGS をコードする *egl-10* の変異体は、N2 に比べて低塩濃度側に誘引された。(Error bars; SEM, N \geq 3, *p<0.05, **p<0.01, Dunnett's test) B) 予想される味覚忌避学習を制御する Go/Gq/DAG 経路の模式図。DAG は nPKC である PKC-1 を活性化すると考えられているほか、シナプス小胞の膜融合を促す UNC-13 のシナプス局在にも関与することが知られている。GOA-1、EGL-30 による DAG レベルの制御が PKC-1 の活性や UNC-13 の細胞内局在を介して線虫の向かう塩濃度を決定している可能性が高い。

第四章 第三章の考察

味覚忌避学習における GOA-1、EGL-30 の役割

これまでの報告でも、Gq/DAG 経路が味覚忌避学習に関与していることは示されてきた(Adachi et al., 2010; Matsuki et al., 2006; Tomioka et al., 2006)。本研究で、*daf-18* の抑圧変異体スクリーニングにより複数の *goa-1* 変異体が取得されたことで、改めて GOA-1 の味覚忌避学習への寄与が確認できた。また、Go 経路がインシュリン経路の遺伝学的上位に機能することが示された。これまでは、塩の有無と餌情報の連合学習を調べる系において Gq/DAG 経路の表現型が確かめられていた(Adachi et al., 2010; Matsuki et al., 2006)が、今回、塩濃度情報と餌の有無の連合学習を調べる系をもちいて *goa-1* 変異体の表現型を解析したことで、より詳細な *goa-1* 変異体の特徴が明らかになった。*goa-1* 変異体は、餌の有無や塩濃度条件によらず、常に高い塩濃度に誘引された。この表現型は、*egl-30(gf)* 変異体の表現型に類似している(Kunitomo et al., 2013)。また、*egl-30(lf)* 変異体は前進、後退運動に欠損があるため行動評価が困難であるが、EGL-30/DAG の下流で機能する *pkc-1* の変異体が条件によらず低塩濃度に向かう走性を示すことから、EGL-30/DAG/PKC-1 経路が欠損すると線虫は低塩濃度に向かうようになると考えられる。これは *goa-1* 変異体で観察される、条件によらず高塩濃度に向かう表現型とは逆の表現型である。これらを考慮すると、GOA-1 と EGL-30 が味覚忌避学習においても拮抗して機能していることが予想される。

インスリン/PI3K 経路の変異体が飢餓後の塩走性にのみ異常を示すのに対し、*goa-1* 変異体や *egl-30* 変異体は、餌の有無によらず高塩濃度、低塩濃度に向かう表現型を示す。このことから、GOA-1 や EGL-30 は連合学習というよりは寧ろ、塩濃度の感知や線虫の向かう塩濃度の決定などに関与しているのではないかと考えられる。

GOA-1 の機能部位

CRISPR-Cas9 システムを用いて ASER 特異的に *goa-1* をノックアウトした際には、N2 に比べて有意に高塩濃度に誘引された。これより、線虫の向かう塩濃度の決定において GOA-1 が ASER で機能していることが示唆された。ASER 特異的 *goa-1* ノックアウト個体では、GOA-1 の活性低下により DAG レベルが上昇していることが予想される。過去の研究からは、味覚忌避学習において、EGL-30(*gf*)や PKC-1(*gf*)を ASEL 特異

的に発現させても N2 と同様の表現型を示すが、ASER 特異的に発現させると、高塩濃度側への塩走性が促進されることがわかっていた(Adachi et al., 2010)。これらの結果を総合して考えると、ASER での Gq/DAG 経路の活性化は線虫を高塩濃度に移動させるのに十分なのだろう。

一方で、*gcy-5* プロモーター、*flp-6* プロモーター下での *goa-1* cDNA 発現の結果(図 3-5)は、GOA-1 の ASER のみの発現では線虫を低塩濃度に移動させるのに不十分であるものの、ASEL/R を含む幾つかの神経で GOA-1 を発現させれば、低塩濃度への走性を誘導できることを示している。おそらく、線虫の低塩濃度への走性を促すには、ASER 以外の神経でも GOA-1 の機能が亢進することが重要なのだろう。今回用いた *flp-6* プロモーターは GOA-1 の機能細胞を絞り込むには不十分であった。GOA-1 の機能細胞を確認するためには、更に詳細な細胞特異的機能回復実験が必要である。

味覚忌避学習における RGS、G β の役割

本研究により、RGS をコードする EAT-16、EGL-10、G β をコードする GPB-2 が味覚忌避学習に関わっていることが明らかになった。*eat-16* 変異体が *goa-1* 変異体様の、*egl-10* 変異体が *egl-30* 変異体様の表現型を示すという結果は、過去に産卵、自律運動、嗅覚可塑性の系において観察された関係と一致しており(Hajdu-Cronin et al., 1999; Koelle and Horvitz, 1996; Matsuki et al., 2006)、EAT-16 と EGL-10 がそれぞれ EGL-30、GOA-1 の RGS として機能することを示唆する結果となっている。RGS と相互作用することが酵母 two-hybrid 法により確認されており、RGS の安定化に必要だと考えられている *gpb-2*(Van der Linden et al., 2001; Reynolds et al., 2005)の変異体もまた、味覚忌避学習に欠損を示した。これにより、GPB-2 も味覚忌避学習に関与していることが示されたが、G β が味覚忌避学習においても RGS と協調して機能しているかは本研究では確認できていない。G β 、RGS、GOA-1、EGL-30 が他の現象において報告されたのと同様の機序で働いているかどうかを調べるには、多重変異体の作製や DAG レベルの測定などによる更に詳細な解析が必要である。

第五章 結果

味覚忌避学習における TOR シグナル伝達経路の機能解析

第三章では味覚忌避学習に関わる未知遺伝子を順遺伝学的に探索した。その結果、*goa-1*、*age-1* という既に味覚忌避学習への寄与が明らかになっている遺伝子の変異体が複数獲得された。順遺伝学的手法には、成長速度の遅い変異体や生殖能力の低い変異体、表現型がそれほど強くない変異体を単離しづらいという欠点がある。一方、逆遺伝学的手法をとれば、順遺伝学的手法では同定が難しいようなこれらの遺伝子についても味覚忌避学習への寄与を調べられる可能性がある。そこで、変異体解析や薬剤阻害により AKT-1 の下流分子となりそうな分子の機能を解析することで、未知の味覚忌避学習を制御する遺伝子を探索することにした。

5.1 TOR は味覚忌避学習に関与している

Akt1 はがん原遺伝子としてよく知られており、哺乳類細胞を用いてその標的分子が詳細に調べられている。Akt1 はキナーゼとして多くの分子をリン酸化することが知られているが、中でも MDM2、FOXO1、NF κ B、BAD、GSK3 β 、mTOR、Huntingtin 等は AKT-1 の標的分子としてよく知られている(Liu et al., 2009)。この内 MDM2、NF κ B に関してはこれまでのところ、線虫におけるオーソログは見つかっていない。線虫における唯一の FOXO 型転写因子のホモログである DAF-16 は、耐性幼虫形成や寿命のコントロールにおいては AKT-1 の主要な下流分子であることが知られているが、前述のように味覚忌避学習においては *daf-16* の欠損が *akt-1* や *daf-2* 変異体の表現型異常を抑圧しないことから、*daf-16* 以外の分子が *akt-1* の下流分子として機能していると考えられている。また、GSK3 β のホモログである *gsk-3*、*C44H4.6*、*Y106G6E.1*、*C36B1.10* の変異体に関しては味覚忌避学習に異常がないことがわかっている(安達ら、未発表)。そこで、残る AKT-1 下流分子のホモログについて表現型を確かめた。

Huntingtin のホモログである *F21G4.6(tm1959)*、BAD と同様に BH3-only protein family に属する *egl-1* と *ced-13*(Adachi and Imai, 2002; Nehme and Conradt, 2008)の変異体解析(データは示さない)、およびラパマイシンによる TOR シグナル伝達経路の阻害を行った。

線虫の mTOR ホモログである *let-363* は致死遺伝子であるために変異体の行動評価

が不可能である。そのため、TOR 特異的阻害剤であるラパマイシンを用いて、TOR が味覚忌避学習に関与しているかを評価した。線虫において 100 μ M のラパマイシン処理により TORC1 の機能が阻害されるという報告があった(Robida-Stubbs et al., 2012) ため、100 μ M のラパマイシンで線虫を処理することにした。培養時からアッセイ時まで 100 μ M のラパマイシンに晒され続けた線虫は、溶媒であるエタノールに晒され続けた線虫に比べて有意に飢餓後の走性に異常を示した(図 5-1A、B)。NGM プレート、アッセイプレートを作る際に予めラパマイシンを入れる方法 (図 5-1A)と、プレートを別に作成し、アッセイの前日にラパマイシンを塗布する方法 (図 5-1B) を検討したが、あとからラパマイシンを塗布したもののほうがラパマイシンの効果が強かったため、以降の実験ではラパマイシンを塗布する手法を用いた。

アポトーシス関連分子の BH3-only protein をコードする *egl-1*、*ced-13* の変異体は飢餓後にやや低塩濃度に誘引されたが (データ不掲載)、これらの変異体では神経細胞などの発生が異常になっているために正常な塩走性を行えない可能性があった。本研究では正常に発生した神経系における味覚忌避学習の制御機構を明らかにしたいと考え、神経発生への影響がより少なそうな TOR 経路に着目して研究をすすめることにした。

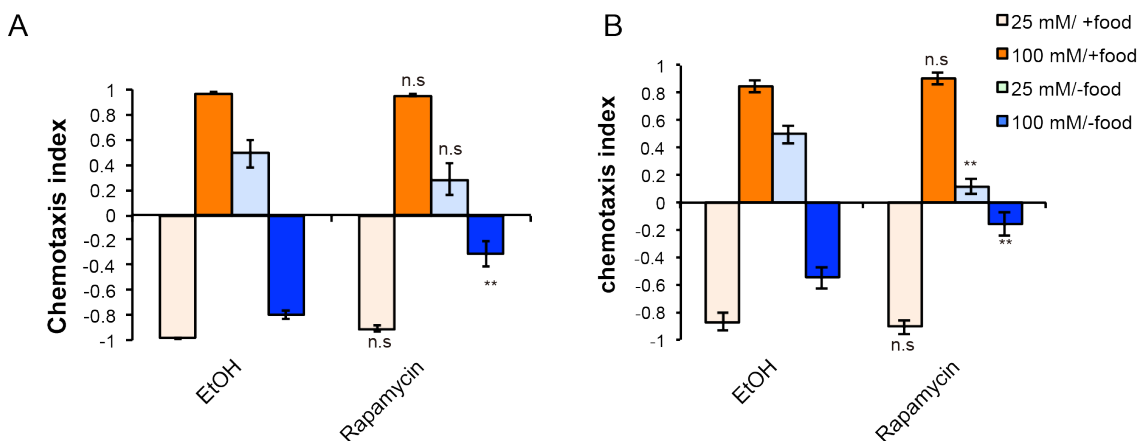


図 5-1 ラパマイシンは線虫の味覚忌避学習を阻害する N2 を 100 μ M のラパマイシン存在下で培養、条件付け、行動評価すると、溶媒のみ添加した線虫に比べて有意に味覚忌避学習が欠損した。A)ラパマイシンを予め入れた NGM、アッセイプレートを使用した場合の塩走性。B) ラパマイシンをアッセイ前日にプレートに塗布した場合の塩走性。(Error Bars: SEM, N \geq 6, **:p<0.01 vs EtOH, Dunnett's test)

ラパマイシンにより誘導される味覚忌避学習異常が神経などの発生異常によるもの

ではないことを確かめるため、ラパマイシンを含まない NGM 培地で成虫になるまで培養した線虫を条件付けとアッセイ時の約 6 時間のみラパマイシンに晒し味覚忌避学習異常が見られるか調べたところ、確かに飢餓後の学習に異常が見られた (図 5-2A、B)。更に、条件付け時のみ、またはアッセイ時のみラパマイシンに暴露した線虫の行動を調べたところ、条件付け時のみラパマイシンに暴露した線虫で塩走性が異常になったのに対し、アッセイ時のみのラパマイシン暴露ではコントロールとの間に差が見られなかった (図 5-2A、B)。条件付け時間 5-6 時間に対し、アッセイ時間が 40 分と短いため、ラパマイシンへの暴露時間の差が味覚忌避学習異常の有無の差につながっている可能性もある。この実験のみで TOR 経路が条件付け時に機能しているかどうかを結論付けることはできないが、この実験から、ラパマイシン暴露による味覚忌避学習の異常が少なくとも発生異常によるものではないことが確認できた。

ラパマイシンとは異なり ATP 競合阻害による TOR 阻害作用を持ち、TORC1 だけでなく TORC2 の機能も阻害すると報告されている Torin1、Torin2 (Liu et al., 2013; Takahara and Maeda, 2013; Thoreen et al., 2009) を用いての実験もおこなった。条件付け時とアッセイ時に Torin1、Torin2 で処理した線虫は、餌の有無や条件付け塩濃度にかかわらず、低塩濃度側に誘引される走性を示した (図 5-2C)。

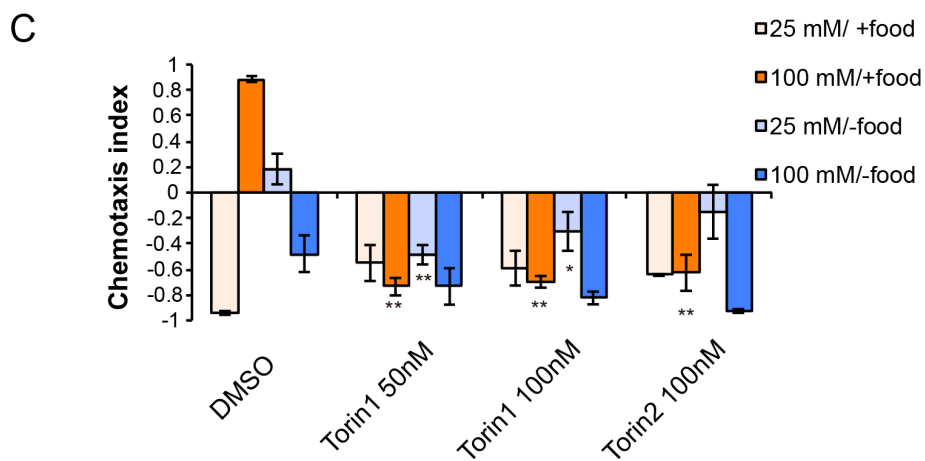
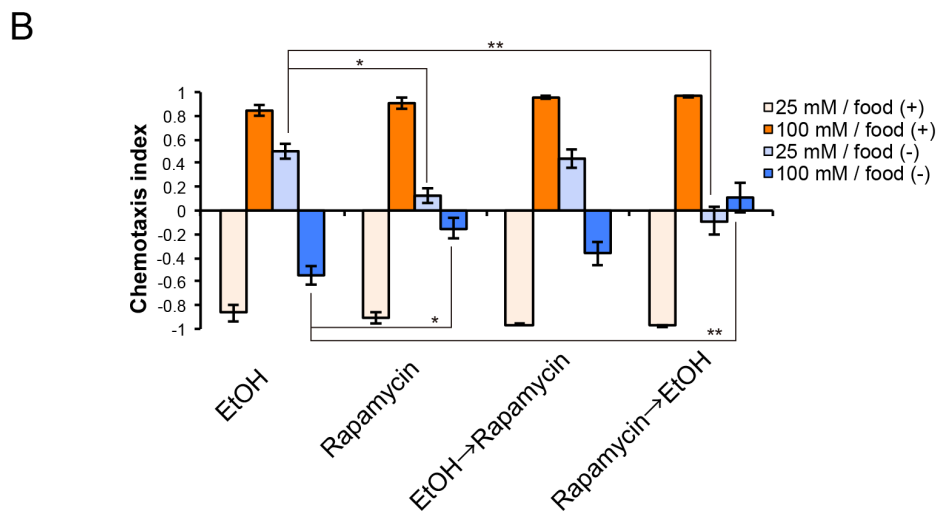
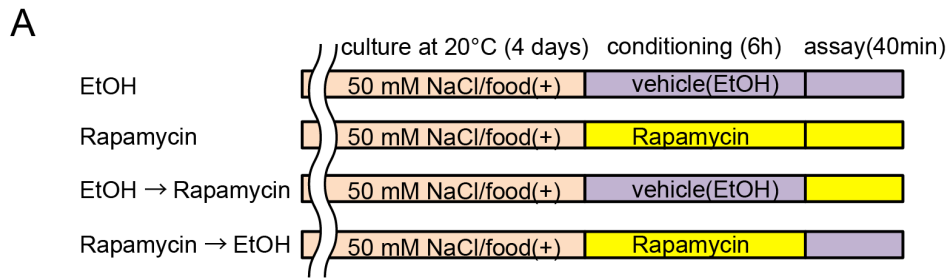


図 5-2 成虫において TOR を阻害することで味覚忌避学習は欠損する。A) 線虫のラパマイシン処理実験行程の模式図。条件付け時、またはアッセイ時にラパマイシンを培地に添加した場合の味覚忌避学習の表現型を調べた。B) 条件付け時のみラパマイシンに暴露した線虫では味覚忌避学習に異常が見られた。C) ラパマイシンよりも強力な阻害剤である Torin で処理した線虫は、餌の有無にかかわらず低塩濃度に誘引された。(Error Bars: SEM, $N \geq 6$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ Dunnett's test)

5.2 S6K のホモログ *rsks-1* の変異体は飢餓後の味覚忌避学習に異常を示す

前述のように、TOR は TORC1 と TORC2 と呼ばれる構成因子の異なる 2 種類の複合体を形成している(Loewith et al., 2002)。ラパマイシンは、主に TORC1 の機能を選択的に阻害すると考えられていることから、まずは TORC1 の味覚忌避学習への寄与を検討した。TORC1 の構成分子である LET-363 (TOR ホモログ)、C10H11.8 (LST8 ホモログ)、DAF-15 (Raptor ホモログ)はいずれも線虫で保存されているが、すべて致死遺伝子であるために変異体の行動評価をすることができない。そこで、まずは細胞特異的 RNAi、およびコンディショナルノックアウトの手法を用いて細胞特異的に TORC1 の機能をなくし、TORC1 の機能を評価しようと試みた。細胞特異的 RNAi(Esposito et al., 2007)により、ASER 神経特異的に *let-363* と *daf-15* をノックダウンしたが、WT との間に有意な表現型の差は見られなかった(図 5-3)。

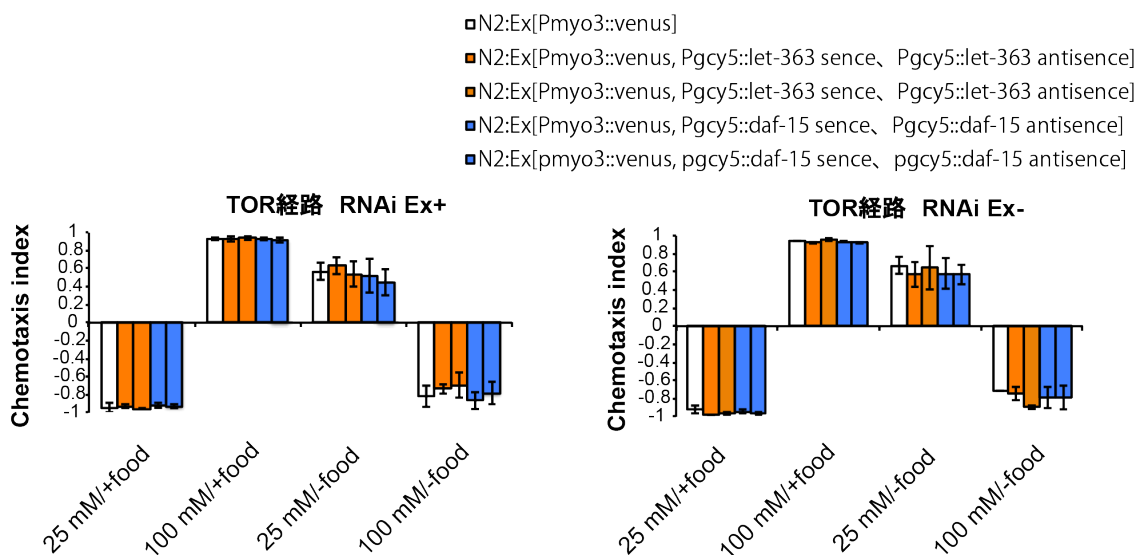


図 5-3 RNAi による ASER 特異的 TORC1 ノックダウン RNAi により、ASER 特異的に *let-363*、*daf-15* をノックダウンする株を作成したが、RNAi の効果は見られなかった。「Ex+」と「Ex-」は、それぞれ導入遺伝子を持つ個体と持たない個体を表す。白いバー；コントロール、オレンジ；*let-363*KD、青；*daf-15*KD *let-363* KD、*daf-15*KD については 2 系統作成し、塩走性を調べた。(Error Bars: SEM, N=3 コントロールとの間に有意差は見られなかった。Dunnett's test)

また、Cre-*loxP* システムを用いて神経特異的、腸特異的に *let-363* に欠失変異が入るコンディショナルノックアウト株を作製した(この株は、大野速雄博士、技官の金森真奈美氏の協力を得て作製された。図 5-4A)。PCR によって確かに *let-363* のエキソンが欠

失していることが確認できた(図 5-4B)が、いずれも N2 との間に顕著な差は見られなかった(図 5-4C)。コンディショナルノックアウトの効果が見られなかった原因としては、神経や腸では TORC1 が機能していない可能性や、神経や腸のごく一部でしか Cre が機能しなかったために TORC1 の機能が多くの神経または腸で残ってしまっている可能性などが考えられる。以上の結果から、細胞特異的ノックダウン、ノックアウトの結果から TORC1 の機能を評価するのは困難と考え、別の方法を探ることにした。

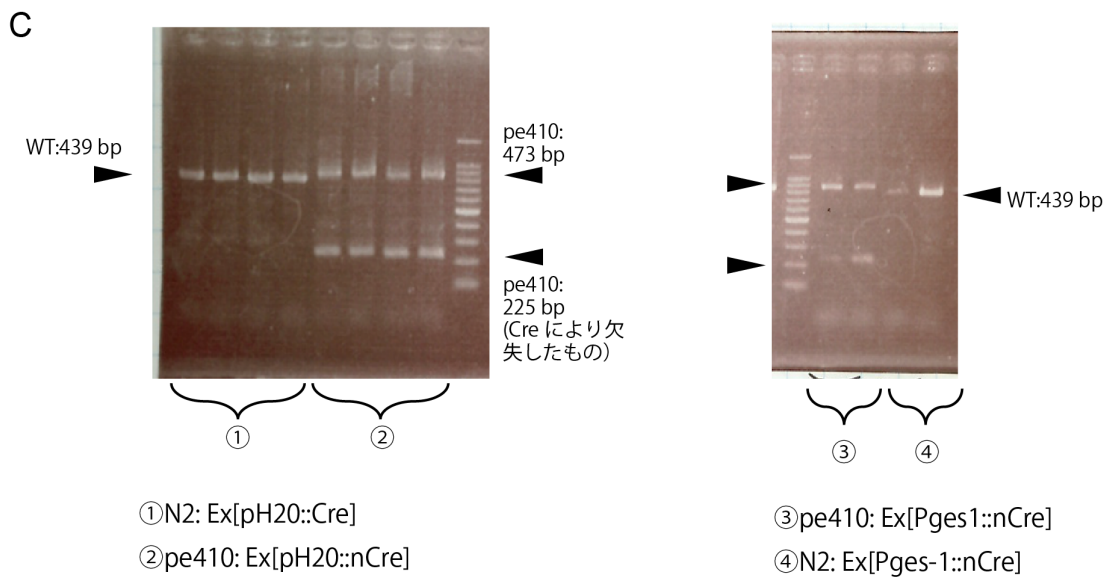
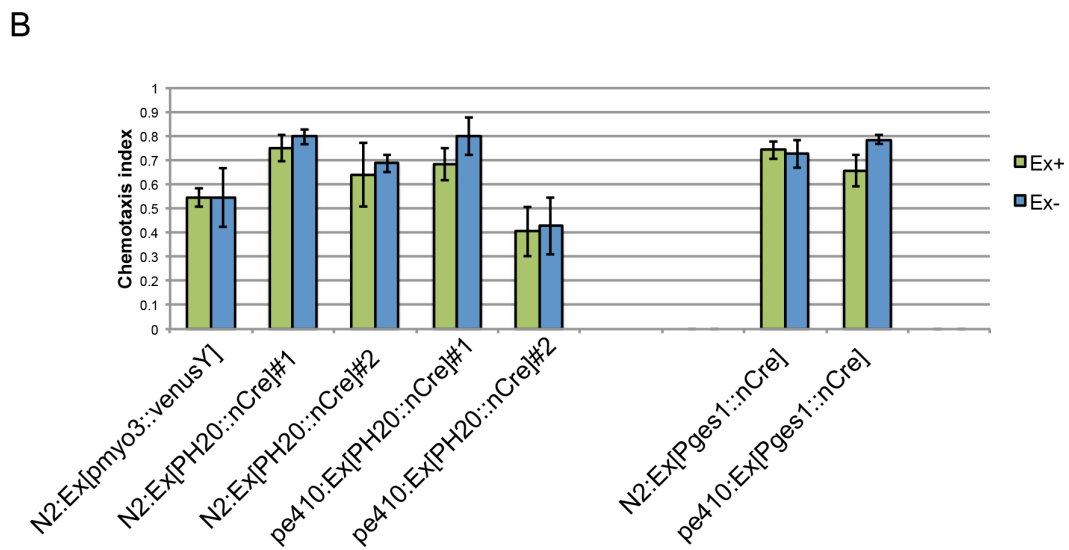
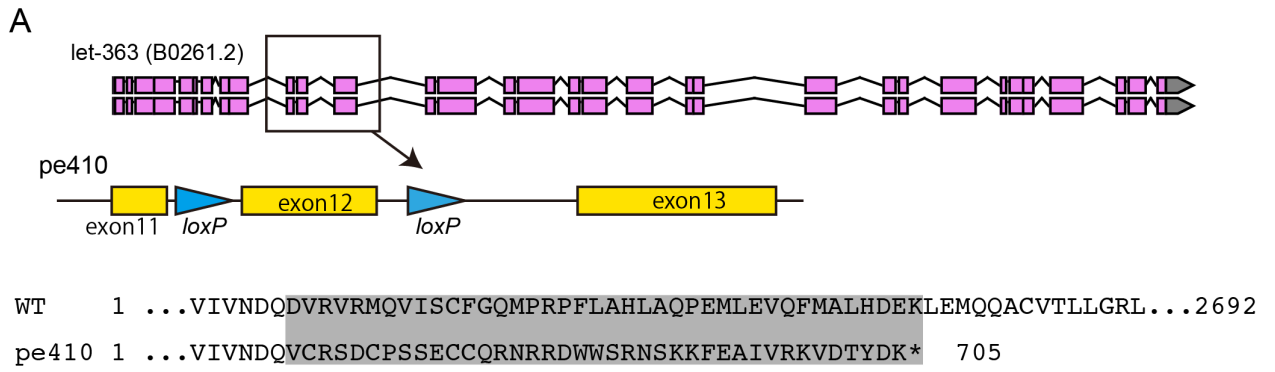


図 5-4 Cre-*loxP*システムを用いた TOR ノックアウト 説明は次頁

図 5-4 Cre-*loxP* システムを用いた TOR ノックアウト A) CRISPR-Cas9 システムを用いて、*let-363* の exon12 の上下流に *loxP* 配列を挿入した。この変異を *let-363(pe410)* と名付けた。*loxP* 間の組換えにより exon12 がスキップした場合、フレームシフトにより N 末端から 705 アミノ酸の位置にストップコドンが入ると予想される。 B) H2O プロモーター、*ges-1* プロモーターによりそれぞれ神経、腸特異的に Cre を発現させ *let-363* をノックアウトしたが、低塩・飢餓条件後の表現型ではコントロールとの間に差は見られなかった。(Error Bars: SEM, N=3, 有意差は見られなかった。Dunnett's test) C) PCR により、Cre-*loxP* システムが機能しているかを検出したところ、確かに Cre により欠失が起こっていることが確認できた。

酵母や哺乳類細胞を用いた研究から、TORC1 の下流では翻訳調節に関わる S6 キナーゼやオートファジーを制御する Atg13 が機能することが知られている(Laplante and Sabatini, 2012)(図 5-5A)。そこで、線虫における S6 キナーゼホモログである *rsks-1*、Atg13 のホモログである *atg-13* の変異体の表現型を調べた。イントロン領域にミスセンス変異を持ち、オートファジー制御に欠損を持つことが知られる *atg-13(bp414)* 変異体(Tian et al., 2009)は N2 と同様の表現型を示した(図 5-5B)。一方、欠失変異を持ち機能欠失型変異体であると予想される *rsks-1(ok1255)* 変異体は、高塩濃度/飢餓条件付け後に N2 に比べて有意に高塩濃度側に誘引される表現型を示した(図 5-5C)。これは、*rsks-1* が飢餓後の低塩濃度への移動に関与していることを示唆するデータである。

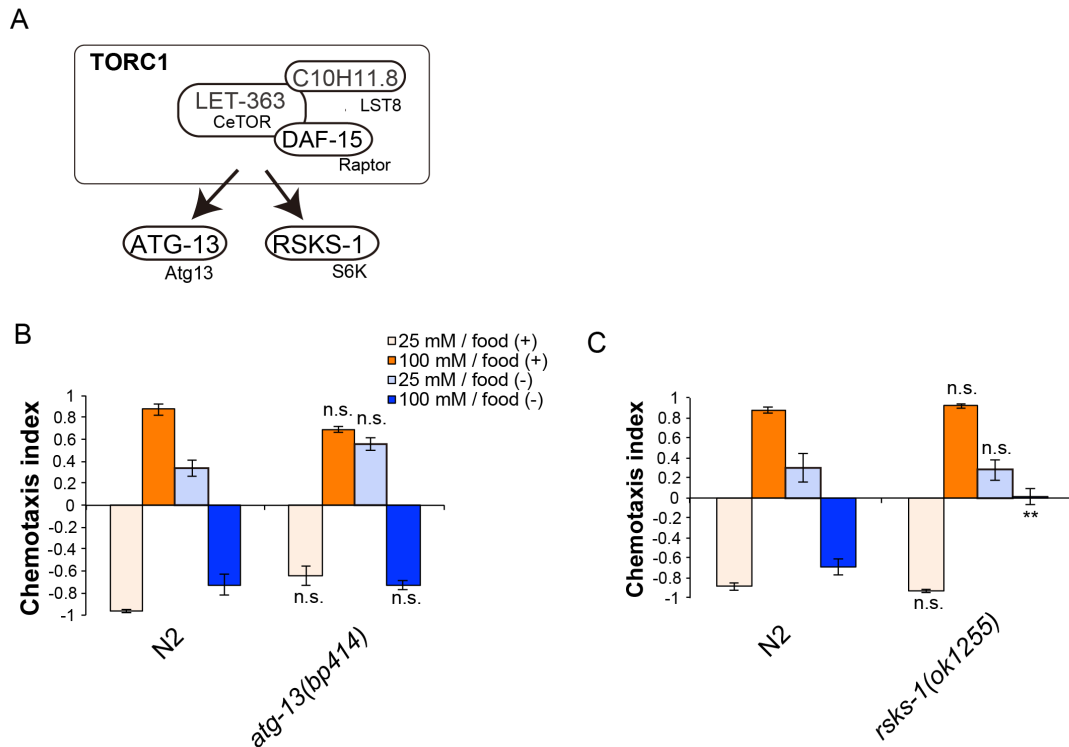


図 5-5 *rsk-1* 変異体は高塩・飢餓条件付け後の塩走性に欠損がある A) 線虫の TORC1 とその下流分子の模式図。哺乳類で TORC1 の基質として報告されている 4E-BP は線虫では見つかっていない。B) *atg-13(bp414)* 変異体では、味覚忌避学習に異常は見られなかった。C) *rsk-1(ok1255)* 欠失変異体は、高塩・飢餓条件付け後に N2 に比べて高塩濃度に誘引される異常を示した。(Error Bars: SEM, $N \geq 6$, **: $p < 0.01$ Dunnett's test)

rsk-1 の機能部位を明らかにするために、部位特異的に *rsk-1* cDNA を発現させ、塩走性の異常が回復するか調べた。全神経で遺伝子の発現を誘導する H20 プロモーターの下で *rsk-1* の cDNA を発現させると、*rsk-1* の塩走性異常が N2 と同程度まで回復した(図 5-6)。更に、ASER 特異的に発現を誘導する *gcy-5* プロモーター下で cDNA を発現させた場合にも、Chemotaxis index の低下が見られた。これらの結果から、*rsk-1* は、ASER を含む神経で機能し、高塩濃度・飢餓条件付け後に低塩濃度側に向かう行動に寄与していると考えられた。

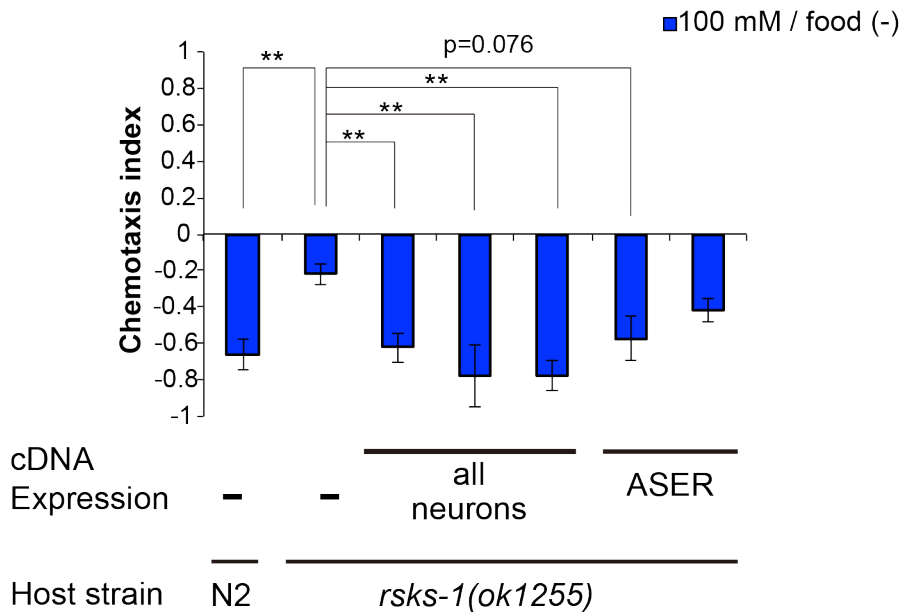


図 5-6 *rsk-1* 変異体の異常は、神経での cDNA 発現により回復する *H2O* プロモーターにより神経特異的に *rsk-1* cDNA を発現させると、高塩・飢餓条件付け後の *rsk-1* 変異体の異常が回復した。(Error Bars: SEM, $N \geq 6$, **: $p < 0.01$ Dunnett's test)

5.3 TORC2 経路の変異体は味覚忌避学習と匂いの連合学習に異常を示す

前項で S6K のホモログである *rsk-1* の味覚忌避学習への関与について述べたが、Rapamycin 添加実験で見られた塩走性異常を *rsk-1* 変異体の表現型では説明できない。ラパマイシン添加により高塩濃度・飢餓、低塩濃度・飢餓条件付け後のどちらの塩走性も異常になるのに対し、*rsk-1* 変異体では、高塩濃度・飢餓条件付け後にしか異常が見られないからである。そこで、ラパマイシンによって阻害される他の分子経路が低塩濃度・飢餓条件付け後の走性の制御に関与しているのではないかと考えた。ラパマイシンは TORC1 を特に強く阻害することが知られているが、長期に渡るラパマイシン処理は、TORC2 に対しても影響をあたえることがわかっており (Sarbasov et al., 2006)、線虫を用いた過去の研究でも、ラパマイシンが TORC2 の活性を阻害する可能性が示唆されている (Robida-Stubbs et al., 2012) ため、TORC2 の味覚忌避学習への寄与を調べることにした。TORC2 は TORC1 と共通の TOR、LST8 などの他に、TORC2 特異的な構成分子である Rictor, Sin1 をその構成分子として持つことが知られている (Cybulski and Hall, 2009; Laplante and Sabatini, 2012) (図 5-7A)。これらの分子は種間でよく保存されており、哺乳類の Rictor や出芽酵母における Rictor のホモログである Avo3

が欠損した個体は致死になる(Cybulski and Hall, 2009; Shiota et al., 2006)が、ショウジョウバエや分裂酵母、線虫においてはRictor 欠損個体も生存可能である(Cybulski and Hall, 2009; Hietakangas and Cohen, 2007; Jones et al., 2009; Soukas et al., 2009)。線虫のRictorである *rict-1* について、3つの異なる位置に変異を持つ変異体の表現型を調べた。*rict-1(ft7)*はアイソフォーム a,b の第三エクソンにナンセンス変異を持ち、機能欠失型変異体であると考えられる(図 5-7D)。*rict-1(mg360)*は報告されているすべてのアイソフォームが共通して持っているエクソンである第11エクソンにミスセンス変異を持ち、機能低下型もしくは機能欠失型変異体だと考えられる(図 5-7D; Jones et al., 2009)。*rict-1(ft7)*と *rict-1(mg360)*は非常に成長が遅く、通常N2が卵から成虫になるのに3-4日ほどしかかからないのに対し、これらの株は7-10日ほどかかる上に、子虫の数も少ない(Jones et al., 2009)。一方、イントロン領域に欠失変異を持つ *rict-1(tm4017)*は成長速度、子虫の数ともにN2と同程度である。この3つの変異体はいずれも低塩濃度・飢餓条件付け後にN2に比べて有意に低塩濃度側に向かう走性を示した(図 5-7C)。これは、ラパマイシンの暴露がTORC1だけでなくTORC2にも影響をあたえるのではないかという仮説を支持する結果である。また、*rict-1(ft7)* 変異体、*rict-1(tm4017)* 変異体では、高塩濃度・餌あり条件付け後にも異常を示した(図 5-7C)。

変。

ラパマイシンが TORC1、TORC2 双方の機能を阻害しているという仮説を更に検証するために、*rsks-1* 変異体、*rict-1* 変異体をラパマイシンで処理し、ラパマイシンにより各条件付け後の塩走性が影響を受けるかどうかを調べた。ラパマイシン処理された *rsks-1(ok1255)* は、低塩濃度・飢餓条件付け後に N2 と同程度まで Chemotaxis index が低下したが、高塩濃度・飢餓条件付け後はラパマイシン処理されたものと溶媒の DMSO で処理されたもの間に差は見られなかった(図 5-8)。このことから、TORC1 を介した *rsks-1* の活性制御が高塩濃度・飢餓条件付け後の塩走性に寄与していると考えられる。ラパマイシン処理された *rict-1(mg360)* は、低塩濃度・飢餓条件付け、高塩濃度・飢餓条件付け後のいずれも溶媒との間に差は見られなかった(図 5-8)。これは、味覚忌避学習制御においてラパマイシンが TORC2 の機能を阻害していることを裏付けている。

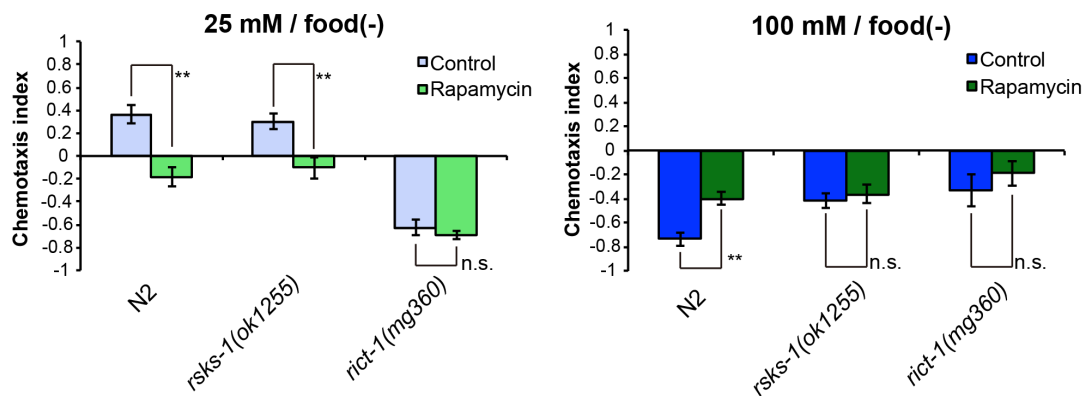


図 5-8 *rsks-1* は TORC1 経路の下流で機能する。 *rsks-1* 変異体を条件付け時とアッセイ時にラパマイシンで処理した場合、低塩・飢餓条件付け後にはラパマイシンの影響を受けたが、高塩・飢餓条件付け後にはラパマイシンは *rsks-1* の表現型異常を亢進させなかった。これより、*rsks-1* が TORC1 の下流で機能して味覚忌避学習を制御していることが示唆された。一方、*rict-1(mg360)* もラパマイシン処理個体群とコントロール (DMSO 処理) 群の間で差が見られなかったことから、TORC2 の活性もラパマイシンにより阻害されていると考えられる。(Error Bars: SEM, $N \geq 6$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs N2, Dunnett's test)

TORC2 を特徴づける構成分子として、Rictor のほかに Sin1 が挙げられる。線虫にも Sin1 のホモログである *sinh-1* が存在する(Hansen et al., 2005)が、変異体は報告さ

れていない。そこで、近年確立された CRISPR-Cas9 システム(Dickinson et al., 2013; Liu et al., 2014)を用いて、*sinh-1* 遺伝子の第一エクソン内に 22 bp の欠失変異を導入し、この変異を *pe420* と名付けた(図 5-7B)。この欠失によるフレームシフトにより、欠失部位の直後にストップコドンが生じることから、*sinh-1(pe420)*は機能欠失型変異体であると考えられる。*sinh-1(pe420)*の表現型を調べた結果、*rict-1(ft7)*と同じように、高塩濃度・餌あり条件付け後と低塩濃度・飢餓条件付け後に N2 と比べて低塩濃度側に向かう表現型を示した(図 5-7C)。*rict-1* 変異体の表現型と合わせて考えると、TORC2 は味覚忌避学習に於いて、線虫の高塩濃度側への移動に寄与していると考えられる。

主要な TORC2 の下流分子としては、Akt1、SGK1、cPKC が知られており、これらの分子は線虫でも保存されている。Akt1 のホモログである *akt-1* が味覚忌避学習に異常を示すことは先述のとおりである。SGK1 ホモログの *sgk-1*、cPKC ホモログの *pkc-2* について表現型を確認したところ、*rict-1* 変異体や *sinh-1* 変異体で見られたのと同様に、低塩濃度・飢餓条件付け後に低塩濃度側に誘引される表現型を示した(図 5-7C)。*sgk-1(ok538)*変異体は欠失変異によるフレームシフト、*sgk-1(mg455)*変異体はナンセンス変異によりいずれもアクチベーションループの手前で翻訳が終了するはずであるため、機能欠失型だと考えられる。*pkc-2(ok328)*変異体はフレームシフトにより 24 残基で転写終結を迎えるため機能欠失型変異体だと考えられるが、*pkc-2(tm409)*変異体は、欠失によるフレームシフトが起らず、キナーゼドメイン中の 22 残基の欠失部位を除いては翻訳されると予想されるため、機能が完全には失われていないかもしれない(Steinberg, 2008)。*sgk-1(mg455)*変異体と *pkc-2(tm409)*変異体は *rict-1(ft7)*変異体、*sinh-1(pe420)*変異体と類似して、高塩濃度・餌あり条件付け後にも低塩濃度側に誘引された(図 5-7C)。これら結果は、*sgk-1* と *pkc-2* が味覚忌避学習において TORC2 の下流で機能する可能性を示唆するものである。

ここまで、*rsk-1* と複数の TORC2 経路関連分子が味覚忌避学習に関与することを示すデータを紹介してきたが、これらの分子は味覚忌避学習においてのみ機能しているのだろうか。TOR 関連分子が他の連合学習の制御にも関わっている可能性を検討するため、飢餓と匂いの連合学習についても変異体の表現型を確認することにした。通常培養条件では、N2 は揮発性の匂い物質であるベンズアルデヒドに対して正の走性を示すが、餌のない条件下でベンズアルデヒドに暴露することにより、ベンズアルデヒドを忌避す

るようになることが知られている(Bargmann et al., 1993; Colbert and Bargmann, 1995)。

この行動変化は餌の存在下では起こらないことから、順応ではなく匂いと餌情報の連合学習であると考えられている(Nuttley et al., 2002)。先行研究の通り、N2 を 1 時間、餌のない状態でベンズアルデヒドに晒すとベンズアルデヒドを忌避する傾向が見られた。*rsk-1* 変異体、*pkc-2* 変異体でも N2 と同程度、ベンズアルデヒドへの走性の低下が見られたが、*rict-1* 変異体、*sgk-1* 変異体では条件付け後のベンズアルデヒドからの忌避が弱まる傾向が見られた(図 5-9)。この結果より、*rict-1*、*sgk-1* は、塩と飢餓の連合学習以外の連合学習にも寄与していることが示された。

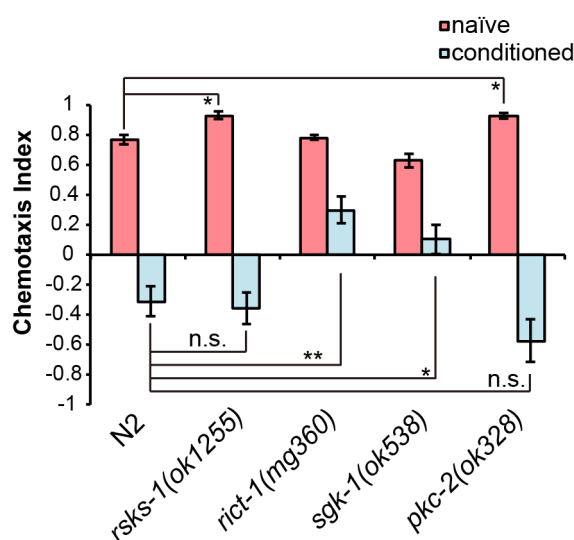


図 5-9 RICT-1 と SGK-1 はベンズアルデヒドに対する嗅覚可塑性にも関与している
*rict-1(mg360)*及び *sgk-1(ok328)*変異体は、naïve 条件でのベンズアルデヒドへの走性には異常を示さなかったが、ベンズアルデヒド曝露後に N2 に比べて有意にベンズアルデヒドに誘引される走性を示した。(Error Bars: SEM, N \geq 6, *:p<0.05 **:p<0.01 Dunnett's test)

5.4 *akt-1* は味覚忌避学習において TORC2 と並行、または下流で機能する

TORC2 の下流分子と予想される *akt-1*、*pkc-2*、*sgk-1* の 3 分子の変異体はいずれも、飢餓後の味覚忌避学習に異常が見られているが、これらの分子が TORC2 の基質として機能しているかはわからない。そこで、多重変異体を作製し、これらの遺伝学的相互作用を調べることにした。機能低下型変異である *rict-1(mg360)*と機能喪失型変異である

*akt-1(ok525)*の二重変異体は、低塩濃度・飢餓条件付け後に *akt-1(ok525)*、*rict-1(mg360)*単独変異体よりも有意に低塩濃度側に誘引された(図 5-10A)。この結果は、*akt-1* と *rict-1* が低塩濃度・飢餓条件付け後の塩走性において並行して機能していることを示唆しているように見える。一方で、*akt-1* の機能獲得型変異と考えられている *akt-1(mg144)*(Paradis and Ruvkun, 1998)は、*rict-1(mg360)*の塩走性異常を抑圧した(図 5-10B)。これらの結果より、*akt-1* は TORC2 と並行、または TORC2 の下流で機能していると考えられる。

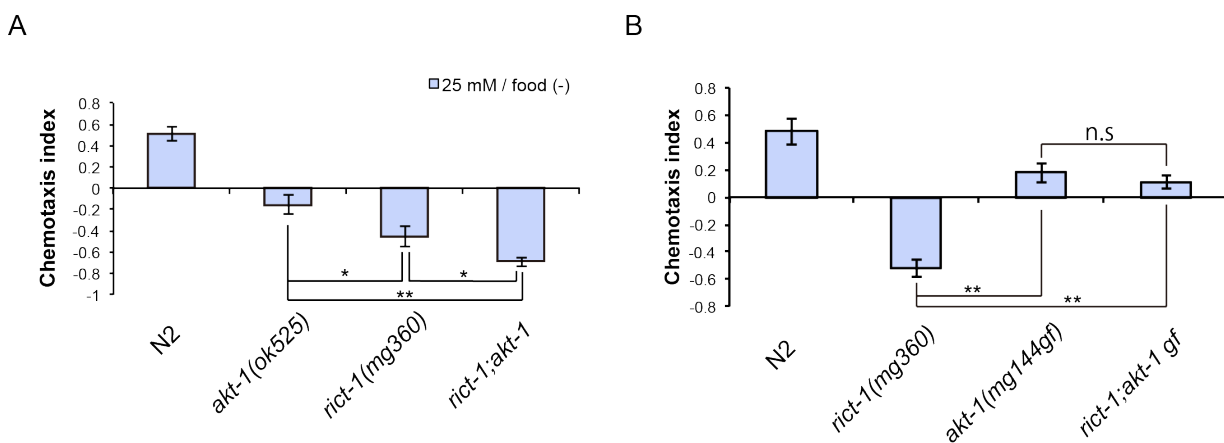


図 5-10 AKT-1 は TORC2 の下流または並行に機能している A) 低塩・飢餓条件付け後、*rict-1; akt-1* 変異体はそれぞれの単独変異より有意に低塩濃度に誘引された。B) 低塩・飢餓条件付け後、*akt-1(gf)*変異は *rict-1* 変異体の表現型異常を抑圧した。(Error Bars: SEM, $N \geq 6$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ Dunnett's test)

5.5 低塩濃度・飢餓後の塩走性制御において *pkc-2* は神経で機能する

次に *pkc-2* と *rict-1* の関係について調べた。低塩濃度・飢餓条件付け後の条件においては、*rict-1(mg360)* と *pkc-2(ok328)* はいずれも低塩濃度に誘引されるが、*rict-1(mg360); pkc-2(ok328)* 二重変異体で、更に低塩濃度への走性が強まることはなかった(図 5-11A)。このことは、この条件下で *rict-1* と *pkc-2* が同一経路内で機能していることを示唆している。

A

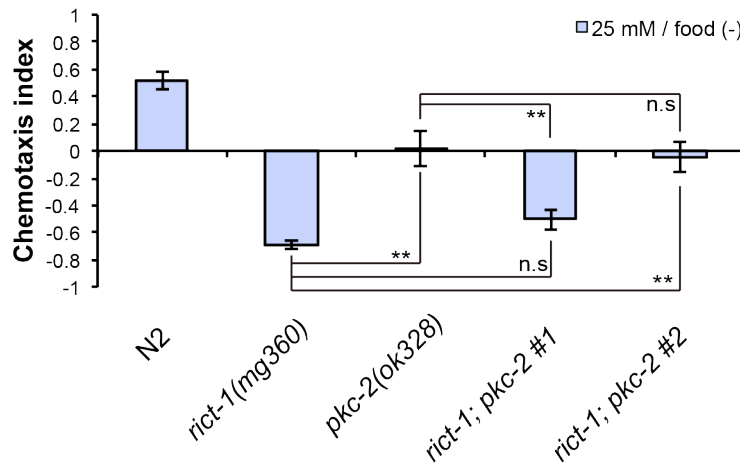


図 5-11 RICT-1 と PKC-2 は同一経路で機能している 低塩・飢餓条件付け後に、*rict-1;pkc-2* 二重変異体はそれぞれの単独変異よりも低塩濃度側に誘引されることはなかった。 *mg360; ok328* 二重変異体については 2 系統作成して表現型を観察した。(Error Bars: SEM, $N \geq 9$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ Dunnett's test)

pkc-2 がどこで機能しているかを調べるため、部位特異的に cDNA を発現させ、*pkc-2* の走性異常が回復するかどうかを観察した。*pkc-2* は多くの神経、筋肉、卵巣、腸などで発現する (Islas-Trejo et al., 1997; Tabuse, 2002)。全神経での遺伝子発現を誘導する H20 プロモーター下で *pkc-2* cDNA を発現させると、低塩濃度・飢餓条件後の *pkc-2* の塩走性異常は完全に回復した。また、*gcy-5* プロモーターを用いて ASER 神経のみに発現を誘導した場合にも、高塩濃度への走性が N2 と同程度まで回復した (図 5-12)。一方で、*ges-1* プロモーターにより腸特異的に cDNA の発現を誘導した際には、異常は回復しなかった (図 5-12)。これより、*pkc-2* の ASER を含めた神経での活性が、低塩濃度・飢餓条件付け後の塩走性制御に関わっているといえる。

一方、高塩・飢餓条件付け後には *pkc-2(ok328)* 変異体は塩走性異常を示さないが、神経特異的 cDNA 発現、及び *ges-1* プロモーター下での腸特異的 cDNA 発現により、有意に高塩濃度側に誘引されるようになった (図 5-12)。*pkc-2* が高レベルで発現すると、線虫の高塩濃度への移動が引き起こされるのかもしれない。

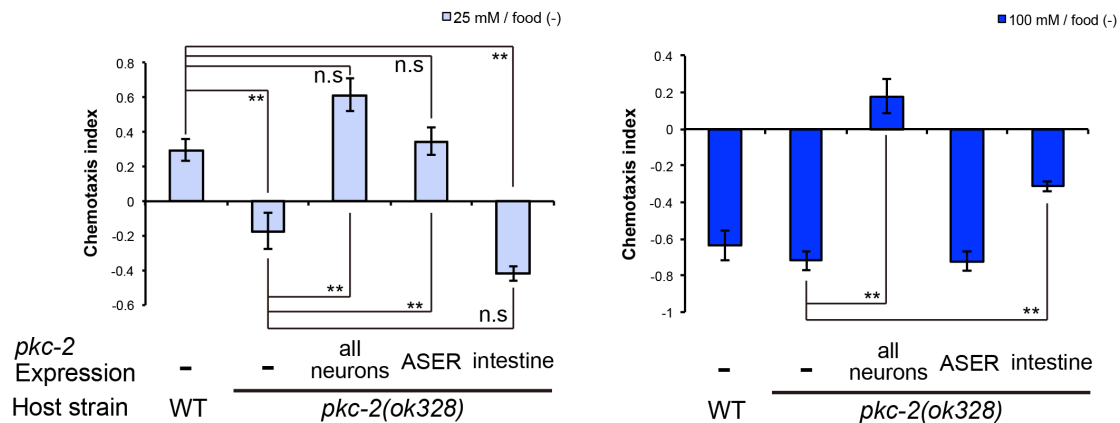


図 5-12 PKC-2 は ASER を含む神経で機能する 低塩・飢餓条件付け後の *pkc-2(ok328)*変異体の表現型異常は、*H2O* プロモーター下での神経特異的 cDNA 発現により回復した。ASER 特異的に遺伝子発現を誘導する *gcy-5*プロモーター下でも N2 と同程度まで表現型の回復が見られた。一方、高塩・飢餓条件付け後には *pkc-2(ok328)*変異体は塩走性異常を示さないが、神経特異的 cDNA 発現、及び *ges-1* プロモーター下での腸特異的 cDNA 発現により、有意に高塩濃度側に誘引されるようになった。(Error Bars: SEM, N≥6, 但し 100/food(-)の腸特異的発現のみ N=3 *:p<0.05, **:p<0.01 Dunnett's test)

3.6 UNC-18 の S322 のリン酸化状態が味覚忌避学習制御に関わっている

UNC-18 は、シナプトブレビンやシンタキシンなどの SNARE タンパクと相互作用し、プレシナプス部位においてシナプス小胞を膜に融合させる役割を担っており、神経伝達物質の放出に必要である(Südhof, 2013)。PKC-2 がこの UNC-18 の S322 をリン酸化するという報告があった(Edwards et al., 2012)ため、PKC-2 が UNC-18 S322 のリン酸化を介したシナプス放出の制御により塩走性を制御しているのではないかと考え、*unc-18* 変異体に S322 を擬似リン酸化、あるいはアラニン置換した UNC-18 を発現させて、表現型を確認した。*unc-18(e81)*変異体は、正常に前進・後退運動を行うことができない uncoordinated (Unc) 表現型を示すが、*unc-18* プロモーター下で *unc-18* cDNA を発現させることにより、運動異常の表現型が野生株と同レベルまで回復した (データ不記載)。また、S322 非リン酸化型 UNC-18(UNC-18 S322A)や S322 擬似リン酸化型 UNC-18(UNC-18 S322E)を発現させた個体でも、N2 と同様に正常な前進・後退運動を行えるようになった (データ不記載)。そこで、これらの株を用い

味覚忌避学習の表現型を確認したところ、非リン酸化型(S322A)UNC-18 を発現させた個体では、N2 に比べて有意に高い塩濃度に誘引された(図 5-13)。擬似リン酸化型 (S322E) UNC-18 や野生型 UNC-18 を発現させた個体では、有意差はないものの、N2 に比べて飢餓条件付け後に低塩濃度側に誘引されやすいように思われた(図 5-13)。これより、UNC-18 の S322 のリン酸化状態が飢餓時の塩走性に関わっていることが示唆された。この実験は、PKC-2 が UNC-18 の S322 をリン酸化しているのではないかとこの仮説のもと行われた実験であるが、*pkc-2* 変異体が低塩濃度に向かう傾向が強まるのに対し、非リン酸化型 UNC-18 を発現させた株では逆に高塩濃度へ向かう傾向が強まっており、当初の予想とは反対の結果である。このことから、PKC-2 非依存に制御される UNC-18 の S322 リン酸化が味覚忌避学習には重要なのではないかと考えられる。

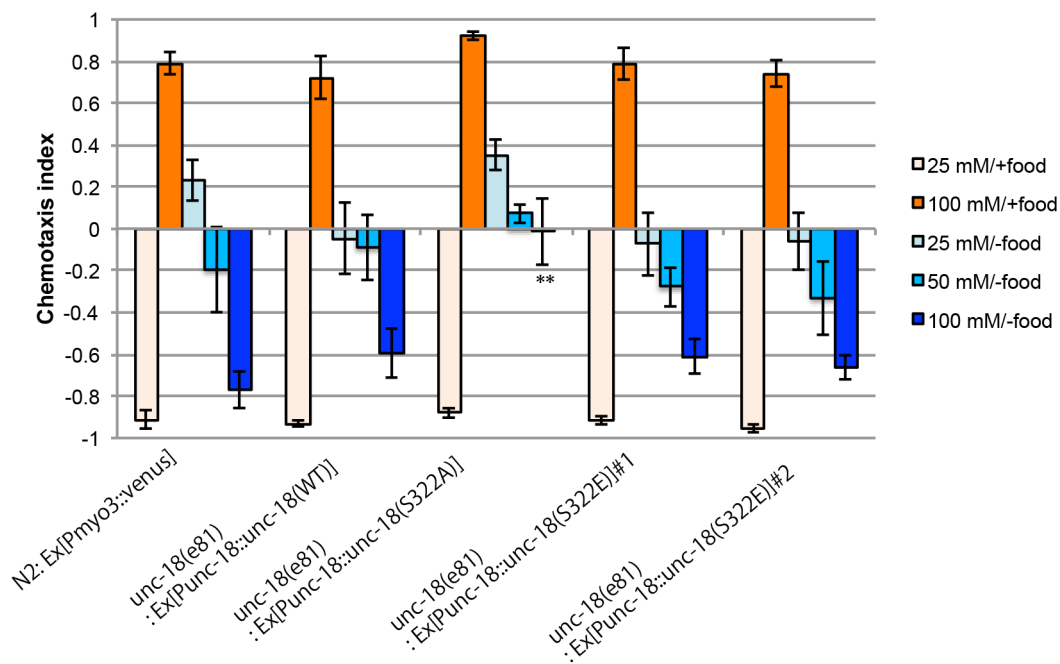


図 5-13 UNC-18 の S322 のリン酸化が味覚忌避学習に重要である S322 をグルタミン酸置換、またはアラニン置換した UNC-18 を発現させた *unc-18* 変異体は、正常に前進後退運動をすることができた。UNC-18(S322A)発現個体は、高塩・飢餓条件付け後に高塩濃度側に誘引される走性を示した。(Error Bars: SEM, N \geq 5 *:p<0.05, **:p<0.01 Dunnett's test)

5.7 味覚忌避学習の制御では SGK-1 は腸において TORC2 の下流で機能する

次に、TORC2 と SGK-1 の遺伝学的相互作用を調べるため、多重変異体を作製して塩走性の表現型を確かめた。*rict-1(mg360); sgk-1(ok538)*の Chemotaxis index と *rict-1(mg360)*、*sgk-1(ok538)*各単独変異体の Chemotaxis index との間には有意差は見られなかった(図 5-14A)。これより、TORC2 と SGK-1 が同一経路で機能していることが示唆された。

*sgk-1(ft15)*変異は、*rict-1* 変異体で観察される脂質の蓄積量が増加する表現型を抑圧する変異体のスクリーニングで得られた変異であり、*sgk-1* の機能獲得型変異であると考えられている(Jones et al., 2009)。*sgk-1(ft15)*単独変異体は、味覚忌避学習において N2 とほぼおなじ表現型を示した(図 5-14B)。*sgk-1(ft15)*は、*rict-1(mg360)*の塩走性異常を抑圧した(図 5-14C)ことから、SGK-1 が TORC2 の下流で機能していることが確かめられた。

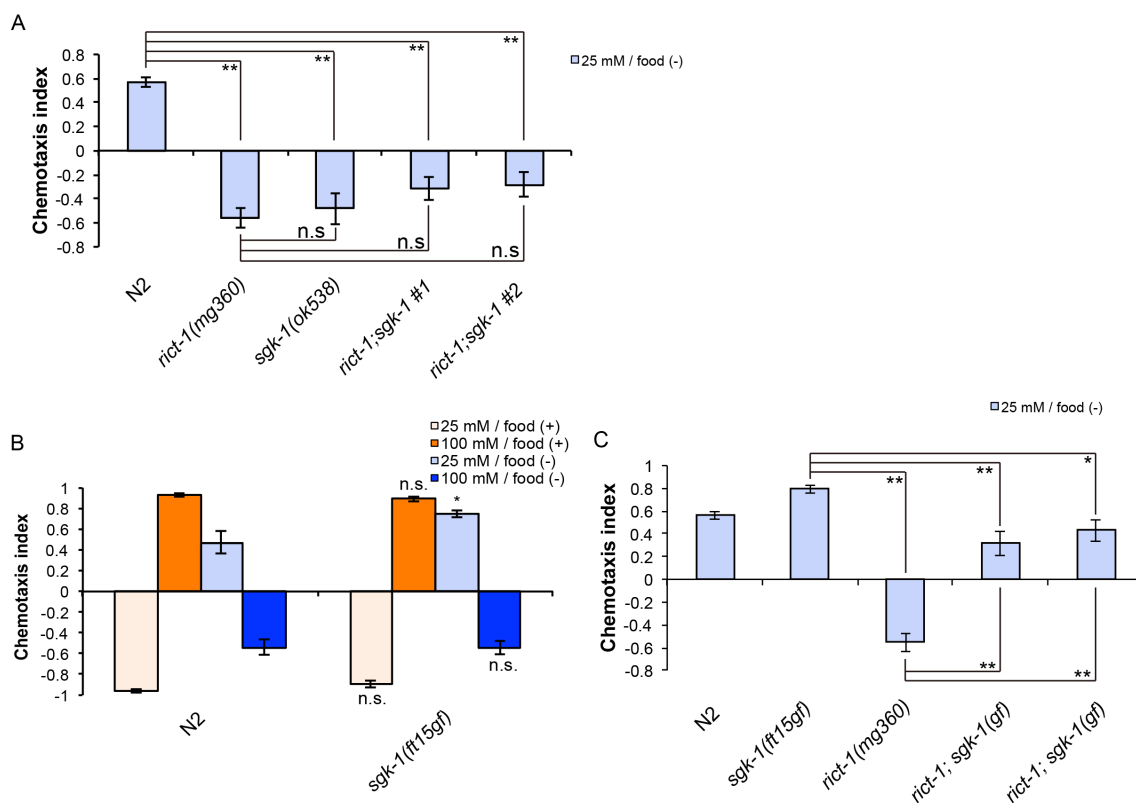
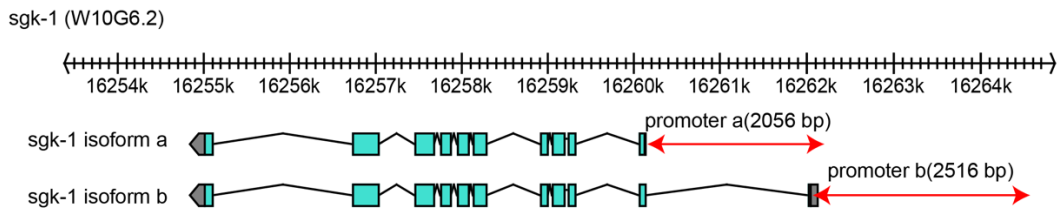


図 5-14 味覚忌避学習において SGK-1 は TORC2 の下流で働いている A) *rict-1(mg360);sgk-1(ok538)*二重変異体は、それぞれの単独変異と同様の表現型であったことから、これらの分子は同一経路で機能していると考えられる。B) *sgk-1(gf)*変異体は N2 と同様の表現型を示した。C) *sgk-1(gf)*変異は *rict-1(mg360)*の表現型異常を抑圧した。*rict-1; sgk-1(gf)*二重変異体については 2 系統作成して表現型を観察した。(Error Bars: SEM, N \geq 6 *: $p < 0.05$,

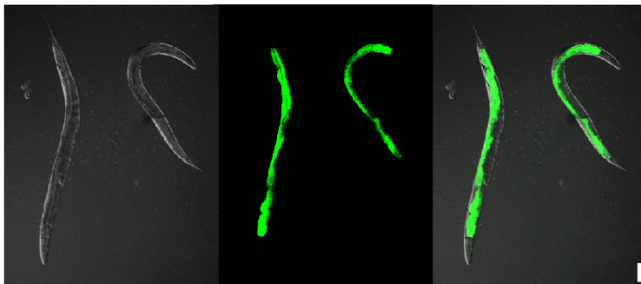
**: $p < 0.01$ Dunnett's test)

次に SGK-1 の機能部位を調べた。先行研究によれば、SGK-1 は腸と幾つかの神経で発現していると報告されていた(Hertweck et al., 2004)。SGK-1 には 2 種類のアイソフォームが報告されており、今回、アイソフォーム a とアイソフォーム b の間で発現部位に差があるかを検証するために 2 種類のプロモーターに蛍光タンパク質 venus を繋いだものを発現させ、観察した(図 5-15A)。*sgk-1* プロモーター a 下で venus を発現させた個体では、腸で強い蛍光が見られたが神経細胞での蛍光は観察できなかった(図 5-15B、C)。また、*sgk-1* プロモーター b 下で venus を発現させた個体でも、腸や頭部の幾つかの細胞において蛍光が見られたものの神経細胞での蛍光は見られなかった(図 5-15D、E)。先行研究と異なり神経での発現がいずれのプロモーターでも見られなかった原因として、Hertweck らが *sgk-1* の上流領域に加えてイントロン領域の一部も用いていたのに対し、本研究ではこの領域を利用しなかったためである可能性がある。

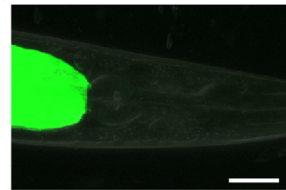
A



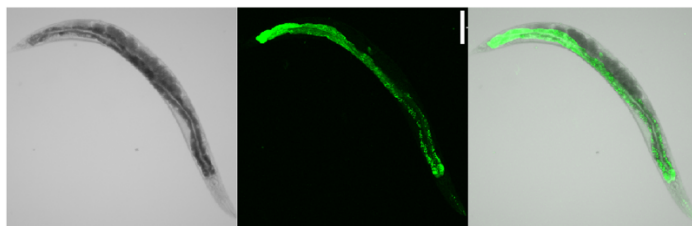
B



C



D



E

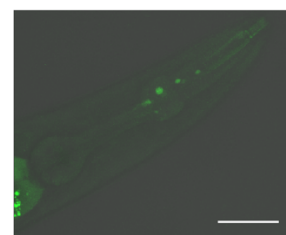


図 5-15 本研究で作製した *sgk-1* プロモーターは腸での遺伝子発現を誘導する 説明は次頁

図 5-15 本研究で作製した *sgk-1* プロモーターは腸での遺伝子発現を誘導する A) *sgk-1* isoform a、isoform b それぞれのプロモーターとして設定した X 染色体上領域の模式図。B) *sgk-1* プロモーター-a 下で *venus* を発現させると、腸で強い蛍光が観察された。左：明視野 中央：*venus* の蛍光 右：重ねあわせ 白バー；100 μm C) *sgk-1* プロモーター-a::*venus* 発現個体の頭部拡大画像。神経での発現は観察されなかった。白バー；30 μm D) *sgk-1* プロモーター-b 下で *venus* を発現させると、腸で蛍光が観察された。A に比べて頭部側の蛍光はやや弱いように見えた。左：明視野 中央：*venus* の蛍光 右：重ねあわせ 白バー；100 μm E) *sgk-1* プロモーター-b::*venus* 発現個体の頭部拡大画像。神経での発現は観察されなかった。白バー；30 μm

sgk-1a プロモーター下で *sgk-1* アイソフォーム a を発現させた場合も、*sgk-1b* プロモーター下で *sgk-1* アイソフォーム b を発現させた場合も、低塩・飢餓後の *sgk-1(ok538)* の塩走性異常を有意に回復した(図 5-16A、B)。腸特異的に発現誘導する *ges-1* プロモーター下で *sgk-1* isoform b を発現させた場合には N2 と同程度まで塩走性異常が回復したが、神経特異的に発現誘導する *H20* プロモーター下で発現させた際には、有意な塩走性異常の回復は見られなかった(図 5-16A)。これより、神経ではなく腸での *sgk-1* の機能が味覚忌避学習に重要であることが確かめられた。また、*sinh-1* についても機能回復実験を行ったところ、腸のみでの cDNA の発現により、変異体の塩走性異常が完全に回復した(図 5-16C)。

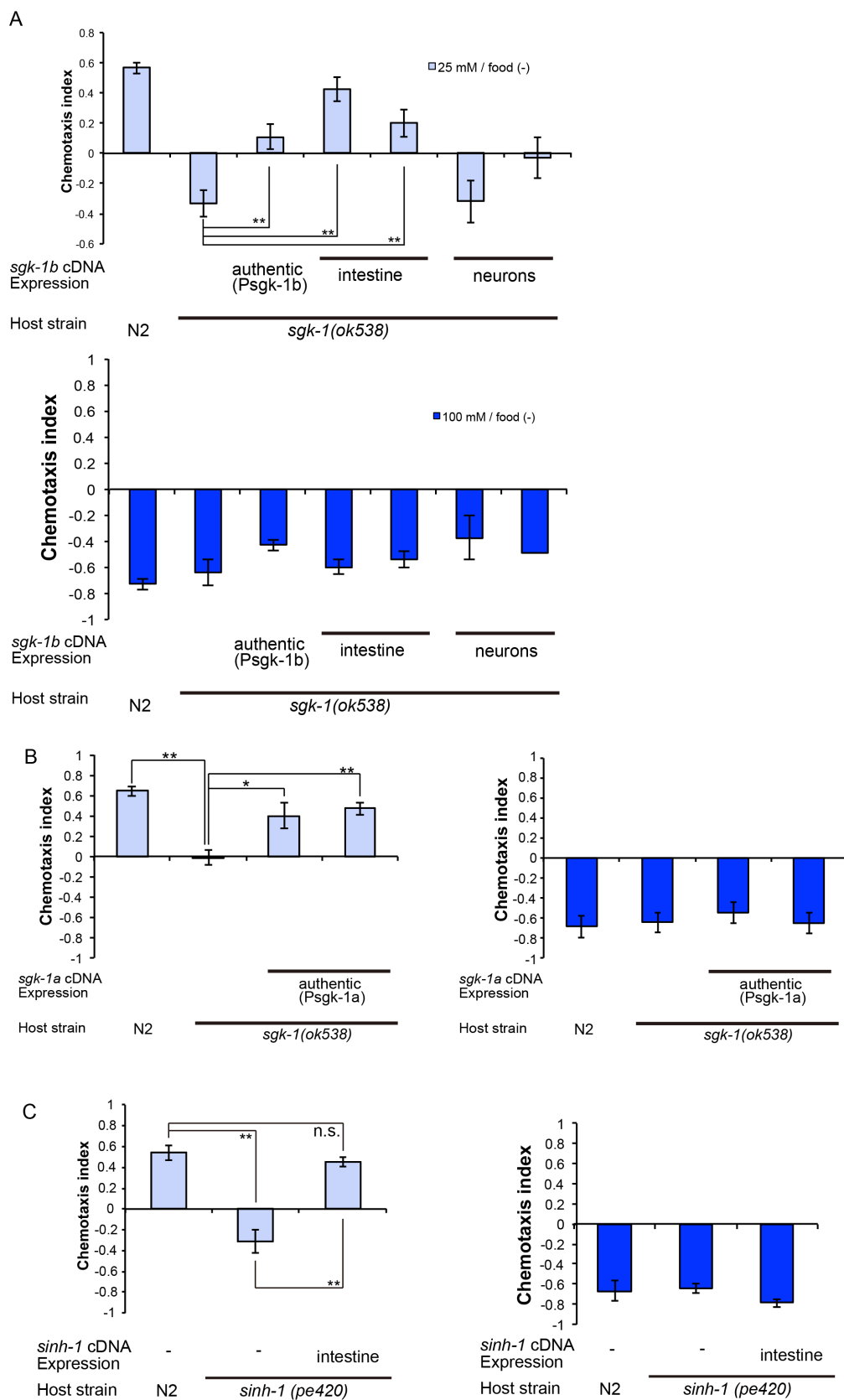


図 5-16 TORC2 と SGK-1 は味覚忌避学習制御において腸で機能する 説明は次ページ

図 5-16 TORC2 と SGK-1 は味覚忌避学習制御において腸で機能する A) *sgk-1 b* プロモーター下、及び腸で遺伝子発現を誘導する *ges-1* プロモーター下で *sgk-1 isoform b* を発現させると、低塩・飢餓条件付け後の *sgk-1* 変異体の表現型異常が有意に回復したが、神経特異的に発現誘導する *H20* プロモーター下では、回復は見られなかった。B) *sgk-1 a* プロモーター下で *sgk-1 isoform a* を発現させると、低塩・飢餓条件付け後の *sgk-1* 変異体の表現型異常が N2 と同程度まで回復した。C) TORC2 の構成分子である *sinh-1* の cDNA を *ges-1* プロモーター下で発現させた場合も、低塩・飢餓条件付け後の *sinh-1* 変異体の表現型異常が N2 と同程度まで回復した。(Error Bars: SEM, N \geq 6, 但し A の 100 mM/-food の神経特異的発現のライン#2 のみ N=1 *:p<0.05, **:p<0.01 Dunnett's test)

TORC2 は Akt1 や cPKC、Sgk1 などの AGC キナーゼの疎水性モチーフ (HM: Hydrophobic motif) とターンモチーフ (TM: Turn motif) をリン酸化することが知られている (Cybulski and Hall, 2009; García-Martínez and Alessi, 2008)。SGK-1 のリン酸化状態が味覚忌避学習に関与しているかを調べるために、擬似リン酸化型、または非リン酸化型 SGK-1 を *riect-1* 変異体に発現させて表現型を調べることにした。線虫の SGK-1 においては S424 が TM のリン酸化部位、T444 が HM のリン酸化部位と考えられる (図 5-17) ため、これらのリン酸化部位をアラニンに置換してリン酸化が起こらないようにした SGK-1 (S424A、T444A) と、擬似リン酸化型の SGK-1 (S424E、T444E) を腸のみで発現するようにしたコンストラクトを *riect-1(mg360)* 変異体に導入した。その結果、非リン酸化型 SGK-1 を発現させた個体では *riect-1* 変異体と同様の表現型を示したのに対し、擬似リン酸化型の SGK-1 を発現させた個体では *riect-1* 変異体の塩走性異常が部分的に回復した (図 5-18)。これより、腸で SGK-1 が TORC2 の下流で機能していることが確かめられ、また、TORC2 により SGK-1 が直接リン酸化されている可能性が示唆された。

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Sgk1_mouse      MTVKAEAAAR-----STLTYSRMRGMVAILIAFMKQRR---MGLNDFIQKIASNTYAC
sgk-1_worm      MVRKDEVTCNVIIGDDKKTVVYALRIGNGPIMQKTFEYERFFTTTEKDMIPATIFTAPKK
*. * *.:          .*:.*:  * .*:  ::: .          :*: *   .:

Sgk1_mouse      KHAEVQS-----ILKMS-HPQPEPELMNANP-----SPPSPSQQINLGPSSNPHA
sgk-1_worm      KFLQADSKFYEKRRVWILVISOHLVDNLRSEDVRRFFHLESPDDDENNVLDLGPSEKTA
*. :.:*          ** : * *  : : * . :          .* . .: : : * * * . *

Sgk1_mouse      KPSDFHFLKVIKGSFGKVLARHKAEEVFYAVKVLQKKAAILKKKEEKHIMSERNVLLKN
sgk-1_worm      TANDFDYLTITIGKGSFGRVYQVRHKETKKIYAMKILSKEHIRKKNEVKHVMAERNVLINN
...*.:*..*****:* .*** : :*:*:*.*: * **:* **:*:*****:*

Sgk1_mouse      VKHPFLVGLHFSFQTADKLYFVLDYINGGELFYHLQRERCFLEPRARFYAAEIASALGYL
sgk-1_worm      FKHPFLVSLHFSFQNKELYFVLDHNLGGELFSHLQREKHFSESRRFYAAEIALALGYL
.*****.*****. :*****:***** *****: * *.:*****.*****
                                         T256
Sgk1_mouse      HSLNIVYRDLKPENILLDSQGHIVLTDGFLCKENIEHNGTTST256TFCGTPEYLAPEVLHKQP
sgk-1_worm      HEKNIIYRDLKPENLLDDKGYLVLTDGFLCKEDMQGSKTTST256TFCGTPEYLAPEIILKKP
*. **:*:*****:***.:*:*****: : . *****: : *:*

                                         T283
Sgk1_mouse      YDRTVDWWCLGAVLYEMLYGLPPFYSRNTAEMYDNILNKPLQLKPNITNSARHLEGLLO
sgk-1_worm      YDKTVDWWCLGSVLYEMIFGLPPFYSKDHNEMYDKIINQPLRLKHNISVPCSELITGLLO
**:*:*****:*****:*****: : *****:*:*:*:* * * . . .*: ****

Sgk1_mouse      KDRTKRLGAKDDFMEIKSHIFFSLINWDDLINKKITPPFNPVSGPSDLRHFDPFEFTEEP
sgk-1_worm      KDRSKRLGHRNDFRDIRDHPFFLPVDWDKLLNRELKAPFIPKVKNAMDTSNISKEFVEIQ
***:*:* * :*: * : * * * :*: * : : . * * * : * . . * : : . * * *

S397          S422
Sgk1_mouse      VPSSIGRSPDSILVTASVKEAAEFLGFSYAPPVDSFL
sgk-1_worm      IDPSS-LAPQQLAVTH----RDHDFENFTFVDTNRVLV
: .* :*: : * * . * .*: . . : :
S424          T444

```

図 5-17 線虫の SGK-1 とマウスの Sgk1 の比較 解析は Clustal W(<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)、Weight Matrix は GONNET を用いて行った。マウス T256 は activation loop の活性部位(Wang et al., 2004)、マウス S397 が Turn Motif、マウス S422 が Hydrophobic Motif の活性部位と考えられている(García-Martínez and Alessi, 2008)(Chen et al., 2009)。

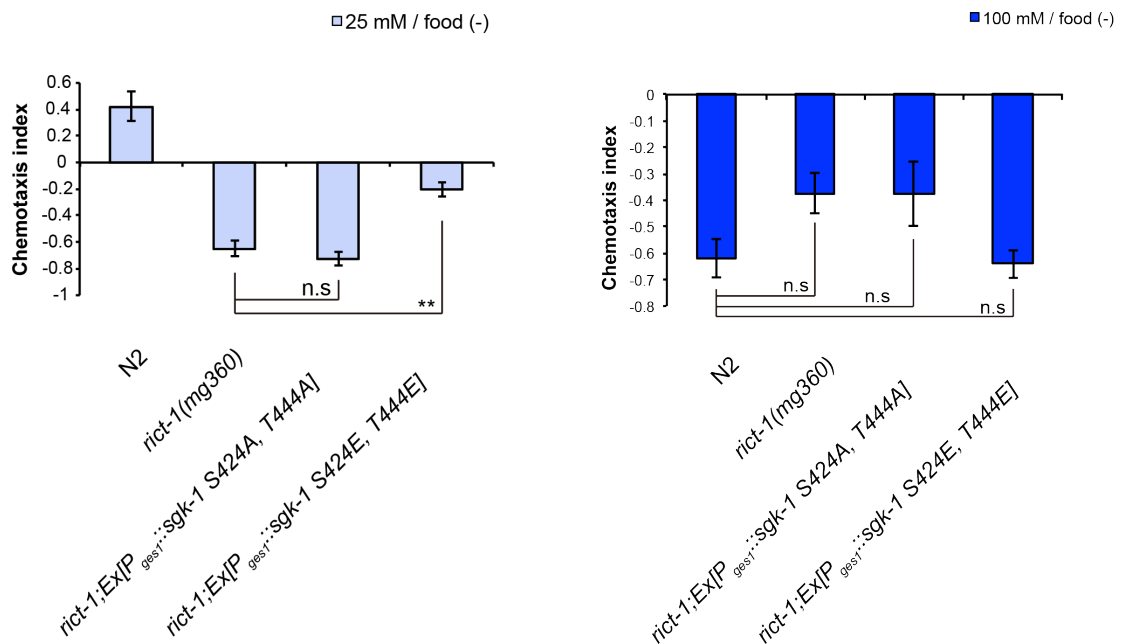


図 5-18 擬似リン酸化型の SGK-1 は *rict-1* の表現型異常を抑圧する SGK-1 の HM と TM の活性部位をアラニンに置換したものを *rict-1* 変異体の腸で発現させても、低塩・飢餓条件付け後の *rict-1* 変異体の表現型は変わらなかったが、HM と TM の擬似リン酸化型を腸特異的に発現させると *rict-1* 変異体の異常を抑圧する。(Error Bars: SEM, $N \geq 6$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ Dunnett's test)

5.8 DAF-16 と SGK-1 は味覚忌避学習において並行に機能している

SGK-1、DAF-16 共に寿命制御や耐性幼虫形性に関わることが知られており、*sgk-1* 変異体の異常を *daf-16* 変異体が抑圧することから、これらの現象については SGK-1 の下流で DAF-16 が機能すると考えられている (Hertweck et al., 2004; Xiao et al., 2013a)。そこで、味覚忌避学習においても DAF-16 が TORC2 や SGK-1 の下流で機能しているか確かめた。*daf-16* の機能欠失型変異である *daf-16(mgDf47)* は、単独でも味覚忌避学習に異常を見せる (図 5-19A)。*daf-16(mgDf47);rict-1(mg360)* の二重変異体は、*daf-16(mgDf47)*、*rict-1(mg360)* 各単独変異よりも有意に低塩濃度側に誘引される表現型を示したことから、TORC2 と DAF-16 は並行に機能していることが示唆された (図 3-19A)。また、*sgk-1(gf)* が *daf-16(mgDf47)* の表現型を有意にサプレスしたことから、味覚忌避学習は少なくとも DAF-16 が SGK-1 の下流で機能するという寿命制御や耐性幼虫形性制御とは異なる機構で制御されているようだ (図 5-19A)。これらの結果か

ら、TORC2/SGK-1 経路と DAF-16 が並行して機能していると考えられる。

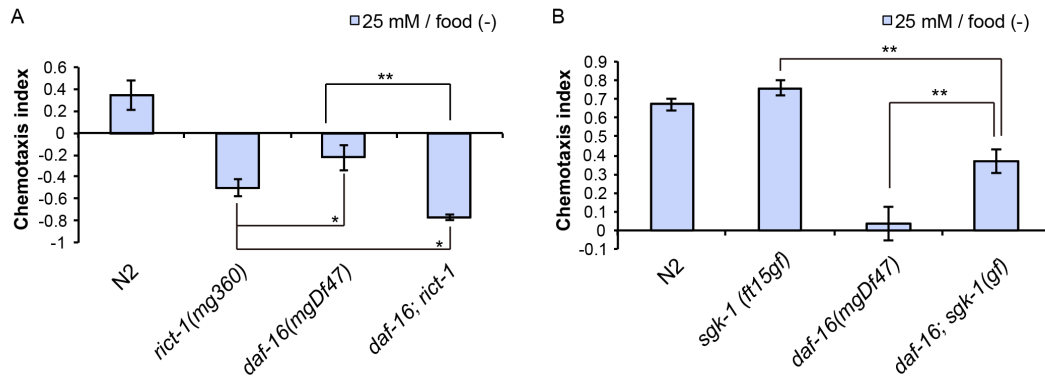


図5-19 *rict-1*と*daf-16*はおそらく並行に機能している A) *daf-16; rict-1*二重変異体の表現型は、それぞれの単独変異体に比べて有意に低塩濃度側に誘引された。B) *sgk-1(gf)*変異体は、*daf-16*変異体の表現型異常を抑圧した。(Error Bars: SEM, $N \geq 6$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ Dunnett's test)

第六章 第五章の考察

6.1 味覚忌避学習における TORC1 と TORC2 の役割

TORC1 の下流分子 S6K のホモログである *rsks-1* の変異体は、飢餓条件付け後に N2 に比べて高塩濃度に寄りやすい表現型を示した(図 5-5)。一方で、TORC2 の構成分子である *rict-1* や *sinh-1*、下流分子と思われる *sgk-1* や *pkc-2* の変異体は、N2 よりも低塩濃度側に誘引される行動を示した(図 5-7)。この結果より、TORC1 は線虫の低塩濃度への移動に、TORC2 は線虫の高塩濃度への移動に寄与していることがうかがえ、TORC1 と TORC2 が味覚忌避学習の制御において逆の機能を持っているように見える。

TORC1 と TORC2 が逆向きに機能する例はショウジョウバエや酵母などの他の生物でも報告されている。例えば野生型の分裂酵母では、栄養枯渇条件では G1 期で停止し有性生殖を行うようになるが、TORC2 が欠損すると G1 期に適切な停止を行うことができないのに対し、TORC1 が欠損すると栄養が十分にある状態でも G1 期の停止が起こり有性生殖を始めることが知られている(Otsubo and Yamamoto, 2015)。また、ショウジョウバエの軸索伸長に関して、TORC1 が軸索伸長を促進するように機能するのに対し、TORC2 が軸索伸長を抑えるように機能することが明らかになっている(Koike-Kumagai et al., 2009)。他の生物で見られる TORC1 と TORC2 が逆方向に現象を制御する機構が、線虫でも保存されているのかもしれない。

TORC1 シグナル伝達経路が栄養情報を伝達する分子経路として有名であることを考えると、TORC1 が餌と塩濃度の連合学習である味覚忌避学習に関与しているのは自然の事のように思われる。もし味覚忌避学習においても TORC1 が、酵母や哺乳類の研究から明らかになっているように周囲の栄養状態を感知し、伝達する役割を担っているとすると、変異体の表現型は餌あり条件付け後に異常を示すと考えられる。しかし、実際には、RSKS-1 が欠損した際に飢餓後の条件で顕著な異常を示している。また、TORC2 経路の変異体は、餌の有無にかかわらず低塩濃度に誘引されていることから、TORC2 は栄養状態とは無関係に、塩濃度の感知か線虫の向かう塩濃度の決定に関与しているように思われる。線虫の走性制御においては、栄養シグナルとは別のシグナル入力が、TORC1、TORC2 の活性を制御することにより下流の S6 キナーゼ、SGK-1、PKC-2 の活性を制御していると考えられる。

6.2 TORC1 の神経における機能について

TORC1 の機能部位を調べるためには、Raptor をコードする *daf-15* の機能部位を調べるのが最良の方法だが、*daf-15* の致死性がこれを非常に困難にしている。TORC1 の下流分子 S6 キナーゼをコードする *rsks-1* 変異体の味覚忌避学習異常が神経細胞特異的な cDNA 発現により回復したことから、*rsks-1* が神経において機能していることが明らかになった (図 5-6)。また、*rsks-1* 変異体の塩走性異常がラパマイシン処理により更に亢進しなかったことは RSKS-1 が TORC1 の下流で機能していることと矛盾しない。これより、TORC1/S6 キナーゼ経路が神経で機能していることが確かめられた (図 5-8)。S6 キナーゼの下流では mRNA の翻訳が制御されていることが知られており (Laplante and Sabatini, 2012; Takahara and Maeda, 2013)、TORC1/S6 キナーゼ経路が神経において翻訳段階でタンパク合成を制御することで塩走性をコントロールしている可能性が考えられる。

daf-15 変異体は餌が豊富にある条件下でも耐性幼虫を形成し、L3 でアレストする (Jia et al., 2004)。一方で *rsks-1* 変異体や *atg-13* 変異体は耐性幼虫を形成せず成虫まで成長し、ほぼ正常に繁殖する。このことから、TORC1 の下流では *rsks-1*、*atg-13* 以外に、耐性幼虫形性に重要な未知の分子が機能していることが示唆される。この未知分子の探索のためには、耐性幼虫形性の表現型を抑圧する変異体のスクリーニングなどが有効であると考えられる。

6.3 腸における TORC2/SGK-1 経路の役割

sinh-1 変異体と *sgk-1* 変異体の味覚忌避学習異常は腸特異的な cDNA 発現により N2 と同程度まで回復したことから、TORC2/SGK-1 経路の腸での機能が味覚忌避学習に重要であることがわかる (図 5-16)。これまでの塩と匂いの連合学習に関連した分子はいずれも神経での機能が重要であることが示されてきた (Ikeda et al., 2008; Iwata et al., 2011; Matsuki et al., 2006; Tomioka et al., 2006) が、本研究において *sgk-1* 変異体の異常は、神経での cDNA 発現では完全には回復しなかった。神経でなく非神経である腸において SGK-1 が機能するという事実は、神経活動により行動が出力されることを考えると非常に興味深い。*sgk-1(mg455)* 変異体は飢餓条件においても餌あり条件においても低塩濃度側に誘引されることから、SGK-1 が餌情報でなく塩濃度情報を伝えていることがうかがえる (図 5-7)。腸が線虫の行動出力を直接的に制御しているとは考

えにくいので、腸における SGK-1 はおそらく塩濃度情報の感知に関与しているのだろう。

6.4 腸における環境刺激の受容

線虫の腸が外部環境刺激を受容している例として、腸が温度変化を受容していることを示す知見が報告されている(Sugi et al., 2011; Xiao et al., 2013a)。温度感受性の転写因子である HSF-1 は温度走性に異常を示すが、この異常は腸または体壁筋での cDNA 発現により回復することから、温度変化が神経ではなくこれらの組織で受容されていることが示唆されていた(Sugi et al., 2011)。*hsf-1* 変異体では温度受容神経である AFD 神経の温度上昇への応答が弱くなること、エストロゲン受容体 *nhr-69* の欠損によりこの応答減弱が抑圧されることから、腸や体壁筋からのエストロゲンを介した AFD 応答の制御が温度走性の制御に重要であることがわかっている。また、腸にカルシウムインジケータ-G-CaMP を発現させて観察すると、温度低下時に腸でのカルシウム濃度が増加することがわかっている(Xiao et al., 2013b)。この腸における温度低下の感知は、温度感受性 TRP チャンネルである TRPA-1 を介していると示唆されている。味覚忌避学習においても、腸で塩濃度情報が受容され、SGK-1 を介してエストロゲンのような内分泌ホルモンの放出が行われることで神経機能が調節され、行動変化に結びついているのかもしれない(図 6-1)。

腸で機能する SGK-1 の機能としてもう一つ考えられるのは、脂質代謝を介して味覚忌避学習を制御しているという可能性である。*rict-1* や *sgk-1* の変異体では、線虫体内の脂質の蓄積量が増加する表現型が報告されている(Jones et al., 2009; Soukas et al., 2009)。同様の表現型は、すでに味覚忌避学習の欠損が明らかになっていたインスリン/PI3K 経路の変異体でも観察される(Ashrafi, 2007)。インスリン/PI3K 経路と拮抗して機能することが知られる *daf-18* の変異体では、餌の有無にかかわらず低塩濃度に誘引される表現型を示す(Kunitomo et al., 2013)が、この変異体では脂肪の蓄積量が減少することがわかっている(Soukas et al., 2009)。この他にも、PUFA の合成に関わる *fat-1*、*fat-3*、*fat-4* など、脂質代謝に関わる遺伝子の変異体が塩と餌の連合学習に異常を持つ例がいくつか知られている(Hukema et al., 2006)。また、当研究室では、線虫の塩走性制御においてジアシルグリセロール(DAG)が重要な役割を果たすことを示してきた。Gq/DAG 経路が活性化すると線虫は高塩濃度に向かいやすくなり、逆に不活性化する

と低塩濃度に向かうようになる(Adachi et al., 2010; Iwata et al., 2011; Kunitomo et al., 2013; Matsuki et al., 2006; Tomioka et al., 2006)。さらに、インスリン経路においては膜脂質である PIP2 や PIP3 がシグナルを伝達している。以上のことを踏まえると、塩走性において細胞内の脂質組成が果たす役割は大きそうに思える。TORC2/SGK-1 経路が腸で線虫の脂質代謝を介して細胞の脂質代謝を制御し、細胞の脂質構成を変化させて行動制御に影響を与えているという仮説は、突飛なようだが検討の余地があるかもしれない。

6.5 神経における PKC-2 の役割

SGK-1 が腸で機能するのに対し、PKC-2 は神経で機能することが示された(図 5-12)。また、神経で PKC-2 を過剰に発現すると、野生型よりも更に高塩濃度に誘引されることも分かった。この結果より、PKC-2 は神経で機能して、線虫を高塩濃度へ向かわせていると考えられる。これまでに明らかになっている PKC α の主な役割は、アクチン骨格の制御であり、実際マウスの神経では PKC α がアクチン骨格制御によりスパインの大きさを変化させていることが確かめられている(Huang et al., 2013)。線虫においてはスパインのような構造は報告されていないが、アクチン骨格制御によりプレシナプスやポストシナプスの構造変化を制御している可能性は十分に考えられる。

PKC-2 が UNC-18 の活性を制御しているという仮説も考えられる。UNC-18 はシンタキシンやシナプトブレビンと結合し、シナプス小胞のプライミングを制御していると考えられている(Südhof, 2013)。UNC-18 の活性化には PKCs が必要であることが分かっており(Edwards et al., 2012; Palfreyman and Jorgensen, 2007; Sassa et al., 1996)、線虫で PKC として報告されている PKC-1、PKC-2、TPA-1 のいずれか、あるいはすべてが UNC-18 の活性を制御しているのではないか。PKC-2 が UNC-18 の S322 をリン酸化するという報告があったため(Edwards et al., 2012)、この残基の味覚忌避学習への寄与を調べたが、PKC-2 が UNC-18 を制御しているという証拠は得られなかった(図 5-13)。UNC-18 の S322 をアラニン置換すると N2 に比べて有意に高塩濃度に誘引された。これは、N2 よりも低塩濃度に誘引される *pkc-2* 変異体の表現型と真逆であったことから、PKC-2 が UNC-18 の S322 リン酸化を介して味覚忌避学習を制御しているとは考えづらい。PKC-2 にリン酸化される UNC-18 の残基はいまのところ S322 以外には知られていないが、他の残基のリン酸化を介して UNC-18 の活性を制御している

可能性は否定されていない。

PKC-2 が TORC2 の下流で働いているという主張は、今のところ *rikt-1;pkc-2* 二重変異体で表現型が相加的にならないという結果にもとづいており、根拠としてはやや弱い。PKC-2 も SGK-1 と同様、HM と TM が TORC2 によりリン酸化されることが知られており (García-Martínez and Alessi, 2008)、もしリン酸化ミミック型 PKC-2 を TORC2 の変異体で発現させて TORC2 の異常を抑圧するならば、TORC2/PKC-2 経路が神経で機能しているという主張をより強固にすることができるだろう。また、現在までに TORC2 が神経で機能しているという証拠も得られていない。*sinh-1* 変異体の神経特異的機能回復実験などを通して、TORC2 が神経で機能しているか否かを確認する必要がある。

6.6 TORC2 シグナル伝達経路と AKT-1 の関係

PKC-2 と SGK-1 以外に、AKT-1 もまた TORC2 の有力な下流分子候補である。*akt-1* の機能獲得型変異体が低塩・飢餓条件付け後の *rikt-1* 変異体の塩走性異常を抑圧したことは、AKT-1 が TORC2 の下流で機能するという仮説を支持するが、*akt-1* と *rikt-1* が相加的に機能しているように見える条件もある (図 5-10)。この結果は、TORC2 以外の上流経路も AKT-1 の制御に関わっていることを意味している。先行研究より AKT-1 がインスリン/PI3K 経路の下流で機能している可能性が示されており (Tomioka et al., 2006) おそらく AKT-1 はインスリン/PI3K 経路の下流で PDK-1 によるリン酸化を受けているのだろう。本研究で示したデータのみでは、AKT-1 が TORC2 の下流で機能すると主張するには不十分であるものの、インスリン/PI3K 経路と TORC2 経路という 2 つの経路の制御を同時に受けている可能性は否定出来ない。

6.7 AKT-1 の下流分子

本研究の目的の一つは、味覚忌避学習において AKT-1 により制御される下流分子を探索することであった。AKT-1 などインスリン/PI3K 経路の分子が餌情報の伝達に関与していると考えられているのに対し、本研究で新たに味覚忌避学習への寄与が明らかになった RSKS-1 と TORC2 経路の分子は、塩濃度の情報を伝えているように見えることから、今回見つかった分子は、AKT-1 の主要な基質ではなさそうである。TOR の他にも幾つかの下流分子候補を調べたが、*akt-1* 変異が示す最も顕著な異常である高塩・

飢餓条件付け後に高塩濃度に誘引される表現型は今回調べたいいずれの変異体においても見られなかった。以上のことを踏まえると、これまでに見つかっている AKT-1 の下流分子候補から逆遺伝学的に AKT-1 の基質を見つけるのは困難であると予想される。

また、これまで当研究室では塩走性に関わる順遺伝学的スクリーニングが複数回試みられており、単純な順遺伝学的スクリーニングで取得される変異体が飽和してきていることから、単純な順遺伝学的スクリーニングによる下流分子の探索も困難が予想される。

AKT-1 の下流分子候補の一つとして、Gq/DAG 経路が挙げられる。第三章で述べたように、Gq/DAG 経路の変異は、PTEN/DAF-18 を欠損した変異体の異常を抑圧する。これに加え、Gq/DAG 経路は UNC-13 や UNC-18 などのシナプス放出の制御に関わる分子を制御すること (Palfreyman and Jorgensen, 2007)、インスリン/PI3K 経路、Gq/DAG 経路が共に ASER で機能していること (Adachi et al., 2010) を考えると、インスリン/PI3K 経路の下流で Gq/DAG 経路を介したシナプス放出制御により線虫の好む塩濃度を変化させている可能性は濃厚である。インスリン/PI3K の下流で機能する PDK1 は PKCs のアクチベーションループをリン酸化することが知られており (Toker and Newton, 2000)、PKCs のリン酸化状態が線虫の味覚忌避学習制御の鍵になっているかもしれない。

6.8 線虫の神経における TOR の機能解析の展望

線虫の Raptor をコードする *daf-15* や Rictor をコードする *ric1-1* が発見されて (Jia et al., 2004; Jones et al., 2009; Soukas et al., 2009) 以降、線虫の TORC1 と TORC2 の代謝や寿命制御、発生における役割は比較的よく調べられてきたが、神経におけるこれらの分子の機能を調べた例はなかった。今回、本研究で初めて *C. elegans* の TOR の連合学習への寄与が明らかになった。シンプルな神経系を持つ線虫での研究が進むことで、*in vivo* での神経における TOR の普遍的な機能の解明に繋がることが期待される。特に TORC2 の機能解析については、線虫の変異体が生存可能であるという利点が活かされるだろう。

Rictor のホモログの *ric1-1* でこれまで報告されてきた変異体はすべてミスセンス変異であり、機能低下型変異体だと考えられている。一方、本研究で作製した *sinh-1(pe420)* 変異は 22 bp の欠失変異によりフレームシフトが起き、ストップコドンにより転写が終結する機能欠失型変異であると予想される。ハエやヒトの培養細胞で

Sin1 が TORC2 の機能に必須であることから(Jacinto et al., 2006; Yang et al., 2006)、*sinh-1(pe420)*変異体では TORC2 の機能が完全に失われている可能性が高い。*sinh-1(pe420)*変異体を用いることで、TORC2 の機能に対する理解がより深まることが期待される。

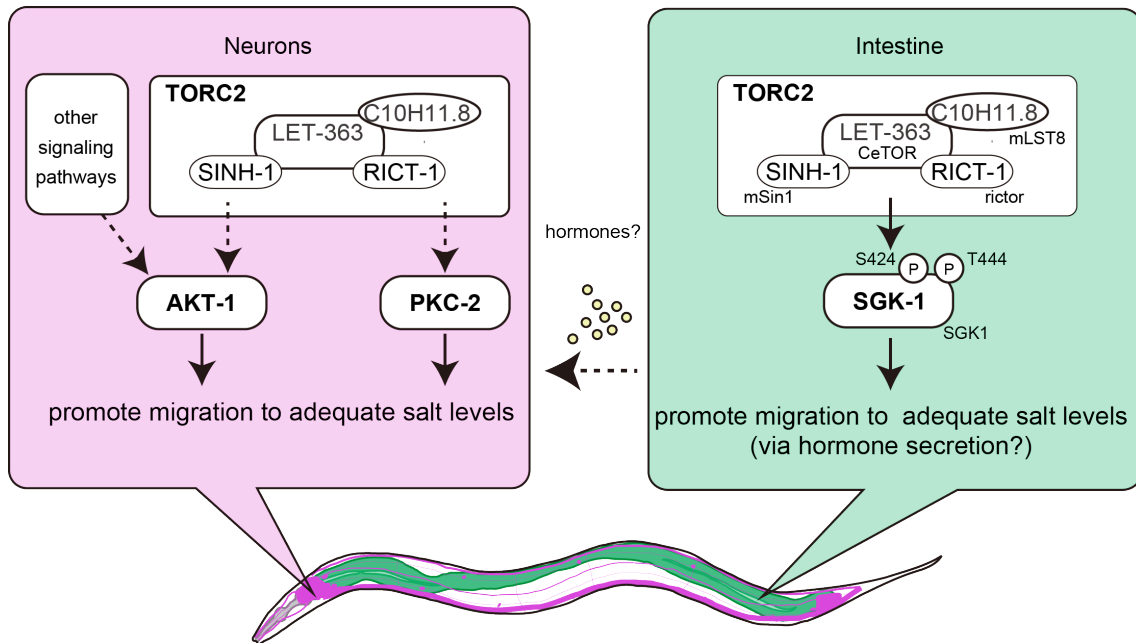


図 6-1 味覚忌避学習を制御する TORC2 シグナル伝達経路のモデル

第七章 結論

本研究では、味覚忌避学習における TORC1 と TORC2 の関与を明らかにした。S6K のホモログをコードする *rsks-1* は、TORC1 の下流で機能し、飢餓後に N2 に比べて高塩濃度に誘引される行動を示した。一方、TORC2 の構成分子である *rict-1* と *sinh-1*、TORC2 の下流で機能すると予想されている *sgk-1* と *pkc-2* の変異体は、N2 に比べて低塩濃度に誘引される行動を示した。このことから、TORC1 と TORC2 が味覚忌避学習制御を逆の方向に制御していることが示唆された。

組織特異的機能回復実験の結果から、RSKS-1 は神経で機能していることが明らかになった。RSKS-1 はその下流で mRNA の翻訳を制御することが知られており、翻訳調節が味覚忌避学習制御に関与していることが示唆された。一方、TORC2 の下流分子と予想される SGK-1 と PKC-2 は、それぞれ腸と神経という別々の組織で機能することが明らかになった。TORC2/SGK-1 経路は腸において塩濃度シグナルの伝達を仲介し、内分泌など何らかの方法で塩濃度情報を神経に伝えていることが予想される。神経においては PKC-2 はおそらく TORC2 の下流で機能し、アクチン骨格の制御やシナプス放出の制御などを通して塩走性を制御しているかもしれない。

本研究は、*C. elegans* で初めて TOR の連合学習への寄与を明らかにした点で意義深い。シンプルな神経系を持ち、TORC2 の機能が欠失しても生存可能な線虫での研究が進めば、*in vivo* での神経における TOR の普遍的な機能の解明に繋がることが期待できる。

第八章 謝辞

本研究に用いた線虫株の多くは Caenorhabditis Genetics Center (CGC)、および NBRP : National BioResource Project により提供していただきました。また、*rict-1* の機能回復実験に用いた cDNA は高木新博士に、*sgk-1(mg455)* は Alex Soukas 博士にいただきました。この場を持ちましてご厚意に感謝いたします。

本研究は東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻の飯野雄一研究室にて行われました。実験の考察を始め様々な面で研究生活を支援してくださった飯野雄一教授に心から感謝いたします。また、本研究において技術面での指導、実験デザインの提案、ディスカッションなどを通して中心的に研究を支えて下さった富岡征大助教、大野速雄博士に深く御礼申し上げます。実験補助の金森真奈美氏と小野口航氏には、株の作製やプレート作製において多大な協力をしていただきました。学部4年次には、早稲田大学教育学部の並木秀夫教授、蓮沼至助教（現・東邦大学理学部助教）に分子生物学実験の基本的な操作を教わりました。秘書の岩原由加子氏を始め、生化学務室の方々には事務手続き等で大変お世話になりました。また、飯野研究室のメンバーとは、互いに切磋琢磨しあい、共に悩んだり喜んだりして、自分の研究生活において大いに刺激を受けました。皆様のご協力に感謝いたします。最後に、生活面、精神面から私を支えてくれた友人、家族に心から感謝いたします。

第九章 引用文献

Adachi, M., and Imai, K. (2002). The proapoptotic BH3-only protein BAD transduces cell death signals independently of its interaction with Bcl-2. *Cell Death Differ.* *9*, 1240–1247.

Adachi, T., Kunitomo, H., Tomioka, M., Ohno, H., Okochi, Y., Mori, I., and Iino, Y. (2010). Reversal of salt preference is directed by the insulin/PI3K and Gq/PKC signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *186*, 1309–1319.

Altun, Z.F., and Hall, D.H. (2011). Nervous system, general description. *WormAtlas*.

Ashrafi, K. (2007). Obesity and the regulation of fat metabolism. *WormBook* 1–20.

Bargmann, C.I., Hartwig, E., and Horvitz, H.R. (1993). Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* *74*, 515–527.

Beauchamp, E.M., and Platanias, L.C. (2013). The evolution of the TOR pathway and its role in cancer. *Oncogene* *32*, 3923–3932.

Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *77*, 71–94.

Chen, A.T.Y., Guo, C., Dumas, K.J., Ashrafi, K., and Hu, P.J. (2013). Effects of *Caenorhabditis elegans* *sgk-1* mutations on lifespan, stress resistance, and DAF-16/FoxO regulation. *Aging Cell* *12*, 932–940.

Chen, W., Chen, Y., Xu, B., Juang, Y.-C., Stippec, S., Zhao, Y., and Cobb, M.H. (2009). Regulation of a third conserved phosphorylation site in SGK1. *J. Biol. Chem.* *284*, 3453–3460.

Chi, C.A., Clark, D.A., Lee, S., Biron, D., Luo, L., Gabel, C. V, Brown, J., Sengupta, P., and Samuel, A.D.T. (2007). Temperature and food mediate long-term thermotactic behavioral plasticity by association-independent mechanisms in *C. elegans*. *J. Exp. Biol.* *210*, 4043–4052.

Colbert, H.A., and Bargmann, C.I. (1997). Environmental signals modulate olfactory acuity, discrimination, and memory in *Caenorhabditis elegans*. *Learn. Mem.* *4*, 179–191.

Colbert, H.A., and Bargmann, C.I. (1995). Odorant-Specific Adaptation Pathways Generate Olfactory Plasticity in *C. elegans*. *Neuron* *14*, 803–812.

Conklin, B.R., Farfel, Z., Lustig, K.D., Julius, D., and Bourne, H.R. (1993). Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq alpha to that of Gi alpha. *Nature* *363*, 274–276.

Cybulski, N., and Hall, M.N. (2009). TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends Biochem. Sci.* *34*, 620–627.

Dickinson, D.J., Ward, J.D., Reiner, D.J., and Goldstein, B. (2013). Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat. Methods* *10*, 1028–1034.

Edwards, M.R., Johnson, J.R., Rankin, K., Jenkins, R.E., Maguire, C., Morgan, A., Burgoyne, R.D., and Barclay, J.W. (2012). PKC-2 phosphorylation of UNC-18 Ser322 in AFD neurons regulates temperature dependency of locomotion. *J. Neurosci.* *32*, 7042–7051.

Esposito, G., Di Schiavi, E., Bergamasco, C., and Bazzicalupo, P. (2007). Efficient

and cell specific knock-down of gene function in targeted *C. elegans* neurons. *Gene* 395, 170–176.

Evans, D.S., Kapahi, P., Hsueh, W.-C., and Kockel, L. (2011). TOR signaling never gets old: Aging, longevity and TORC1 activity. *Ageing Res. Rev.* 10, 225–237.

García-Martínez, J.M., and Alessi, D.R. (2008). mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem. J.* 416, 375–385.

Graber, T.E., McCamphill, P.K., and Sossin, W.S. (2013). A recollection of mTOR signaling in learning and memory. *Learn. Mem.* 20, 518–530.

Hajdu-Cronin, Y.M., Chen, W.J., Patikoglou, G., Koelle, M.R., and Sternberg, P.W. (1999). Antagonism between G(o)alpha and G(q)alpha in *Caenorhabditis elegans*: the RGS protein EAT-16 is necessary for G(o)alpha signaling and regulates G(q)alpha activity. *Genes Dev.* 13, 1780–1793.

Hansen, M., Hsu, A.-L., Dillin, A., and Kenyon, C. (2005). New Genes Tied to Endocrine, Metabolic, and Dietary Regulation of Lifespan from a *Caenorhabditis elegans* Genomic RNAi Screen. *PLoS Genet.* 1, e17.

Hedgecock, E.M., and Russell, R.L. (1975). Normal and mutant thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 4061–4065.

Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905–909.

Hertweck, M., Göbel, C., and Baumeister, R. (2004). *C. elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span.

Dev. Cell 6, 577–588.

Hietakangas, V., and Cohen, S.M. (2007). Re-evaluating AKT regulation: role of TOR complex 2 in tissue growth. *Genes Dev.* 21, 632–637.

Hu, P.J. (2007). Dauer. *WormBook* 1–19.

Huang, W., Zhu, P.J., Zhang, S., Zhou, H., Stoica, L., Galiano, M., Krnjević, K., Roman, G., and Costa-Mattioli, M. (2013). mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory. *Nat. Neurosci.* 16, 441–448.

Hukema, R.K., Rademakers, S., Dekkers, M.P.J., Burghoorn, J., and Jansen, G. (2006). Antagonistic sensory cues generate gustatory plasticity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 25, 312–322.

Ikeda, D.D., Duan, Y., Matsuki, M., Kunitomo, H., Hutter, H., Hedgecock, E.M., and Iino, Y. (2008). CASY-1, an ortholog of calsynenins/alcadeins, is essential for learning in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5260–5265.

Islas-Trejo, A., Land, M., Tcherepanova, I., Freedman, J.H., and Rubin, C.S. (1997). Structure and expression of the *Caenorhabditis elegans* protein kinase C2 gene. Origins and regulated expression of a family of Ca²⁺-activated protein kinase C isoforms. *J. Biol. Chem.* 272, 6629–6640.

Iwata, R., Oda, S., Kunitomo, H., and Iino, Y. (2011). Roles for class IIA phosphatidylinositol transfer protein in neurotransmission and behavioral plasticity at the sensory neuron synapses of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7589–7594.

Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., and Su, B. (2006). SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and

Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell* 127, 125–137.

Jia, K., Chen, D., and Riddle, D.L. (2004). The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* 131, 3897–3906.

Johnston, R.J., and Hobert, O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 426, 845–849.

Jones, K.T., Greer, E.R., Pearce, D., and Ashrafi, K. (2009). Rictor/torc2 regulates *Caenorhabditis elegans* fat storage, body size, and development through sgk-1. *PLoS Biol.* 7, 0604–0615.

Kamada, Y., Fujioka, Y., Suzuki, N.N., Inagaki, F., Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., and Ohsumi, Y. (2005). Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7239–7248.

Kassai, H., Sugaya, Y., Noda, S., Nakao, K., Maeda, T., Kano, M., and Aiba, A. (2014). Selective Activation of mTORC1 Signaling Recapitulates Microcephaly, Tuberous Sclerosis, and Neurodegenerative Diseases. *Cell Rep.* 7, 1626–1639.

Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461–464.

Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., and Ruvkun, G. (1997). *daf-2*, an Insulin Receptor-Like Gene That Regulates Longevity and Diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (80-.). 277, 942–946.

Koelle, M.R., and Horvitz, H.R. (1996). EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian

proteins. *Cell* 84, 115–125.

Koike-Kumagai, M., Yasunaga, K., Morikawa, R., Kanamori, T., and Emoto, K. (2009). The target of rapamycin complex 2 controls dendritic tiling of *Drosophila* sensory neurons through the Tricornered kinase signalling pathway. *EMBO J.* 28, 3879–3892.

Kunitomo, H., Sato, H., Iwata, R., Satoh, Y., Ohno, H., Yamada, K., and Iino, Y. (2013). Concentration memory-dependent synaptic plasticity of a taste circuit regulates salt concentration chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* 4, 2210.

Kwon, E.-S., Narasimhan, S.D., Yen, K., and Tissenbaum, H.A. (2010). A new DAF-16 isoform regulates longevity. *Nature* 466, 498–502.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–293.

Lin, K., Dorman, J.B., Rodan, A., and Kenyon, C. (1997). daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 278, 1319–1322.

Van der Linden, A. M., Simmer, F., Cuppen, E., and Plasterk, R.H. a (2001). The G-protein beta-subunit GPB-2 in *Caenorhabditis elegans* regulates the G(o)alpha-G(q)alpha signaling network through interactions with the regulator of G-protein signaling proteins EGL-10 and EAT-16. *Genetics* 158, 221–235.

Liu, J., Conklin, B.R., Blin, N., Yun, J., and Wess, J. (1995). Identification of a receptor/G-protein contact site critical for signaling specificity and G-protein activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11642–11646.

- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., and Zhao, J.J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* *8*, 627–644.
- Liu, P., Long, L., Xiong, K., Yu, B., Chang, N., Xiong, J.-W., Zhu, Z., and Liu, D. (2014). Heritable/conditional genome editing in *C. elegans* using a CRISPR-Cas9 feeding system. *Cell Res.* *24*, 886–889.
- Liu, Q., Xu, C., Kirubakaran, S., Zhang, X., Hur, W., Liu, Y., Kwiatkowski, N.P., Wang, J., Westover, K.D., Gao, P., et al. (2013). Characterization of Torin2, an ATP-Competitive Inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. *Cancer Res.* *73*, 2574–2586.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M.N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* *10*, 457–468.
- Matsuki, M., Kunitomo, H., and Iino, Y. (2006). Go α regulates olfactory adaptation by antagonizing Gq α -DAG signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 1112–1117.
- Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D., and Ambros, V. (1991). Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* *10*, 3959–3970.
- Mumby, S.M., Heukeroth, R.O., Gordon, J.I., and Gilman, A. G. (1990). G-protein alpha-subunit expression, myristoylation, and membrane association in COS cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 728–732.
- Nehme, R., and Conradt, B. (2008). *egl-1*: a key activator of apoptotic cell death in

C. elegans. *Oncogene 27 Suppl 1*, S30–S40.

Nuttley, W.M., Atkinson-leadbeater, K.P., and van der Kooy, D. (2002). Serotonin mediates food-odor associative learning in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 12449–12454.

Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissenbaum, H. A., and Ruvkun, G. (1997). The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* *389*, 994–999.

Ohno, H., Kato, S., Naito, Y., Kunitomo, H., Tomioka, M., and Iino, Y. (2014). Role of synaptic phosphatidylinositol 3-kinase in a behavioral learning response in *C. elegans*. *Science*. *345*, 313–317.

Ortiz, C.O., Etchberger, J.F., Posy, S.L., Frøkjær-Jensen, C., Lockery, S., Honig, B., and Hobert, O. (2006). Searching for neuronal left/right asymmetry: genomewide analysis of nematode receptor-type guanylyl cyclases. *Genetics* *173*, 131–149.

Otsubo, Y., and Yamamoto, M. (2015). TOR Signaling in Fission Yeast. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *43*, 277–283.

Otsubo, Y., Yamashita, A., Ohno, H., and Yamamoto, M. (2014). *S. pombe* TORC1 activates the ubiquitin-proteasomal degradation of the meiotic regulator Mei2 in cooperation with Pat1 kinase. *J. Cell Sci.* *127*, 2639–2646.

Palfreyman, M., and Jorgensen, E.M. (2007). PKC defends crown against Munc13. *Neuron* *54*, 179–180.

Paradis, S., and Ruvkun, G. (1998). *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from age-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription

factor. *Genes Dev.* *12*, 2488–2498.

Paradis, S., Ailion, M., Toker, A., Thomas, J.H., and Ruvkun, G. (1999). A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* *13*, 1438–1452.

Perkins, L. A., Hedgecock, E.M., Thomson, J.N., and Culotti, J.G. (1986). Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* *117*, 456–487.

Pierce-Shimomura, J.T., Faumont, S., Gaston, M.R., Pearson, B.J., and Lockery, S.R. (2001). The homeobox gene *lim-6* is required for distinct chemosensory representations in *C. elegans*. *Nature* *410*, 694–698.

Reynolds, N.K., Schade, M.A., and Miller, K.G. (2005). Convergent, RIC-8-Dependent G α Signaling Pathways in the *Caenorhabditis elegans* Synaptic Signaling Network. *Genetics* *169*, 651–670.

Robida-Stubbs, S., Glover-Cutter, K., Lamming, D.W., Mizunuma, M., Narasimhan, S.D., Neumann-Haefelin, E., Sabatini, D.M., and Blackwell, T.K. (2012). TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell Metab.* *15*, 713–724.

Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S.H. (1994). RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* *78*, 35–43.

Saeki, S., Yamamoto, M., and Iino, Y. (2001). Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Biol.* *204*, 1757–1764.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* *22*, 159–168.

Sassa, Ogawa, Kimoto, and Hosono (1996). The synaptic protein UNC-18 is phosphorylated by protein kinase C. *Neurochem. Int.* *29*, 543–552.

Shen, Z., Zhang, X., Chai, Y., Zhu, Z., Yi, P., Feng, G., Li, W., and Ou, G. (2014). Conditional Knockouts Generated by Engineered CRISPR-Cas9 Endonuclease Reveal the Roles of Coronin in *C. elegans* Neural Development. *Dev. Cell* *30*, 625–636.

Shiota, C., Woo, J.T., Lindner, J., Shelton, K.D., and Magnuson, M. a. (2006). Multiallelic Disruption of the rictor Gene in Mice Reveals that mTOR Complex 2 Is Essential for Fetal Growth and Viability. *Dev. Cell* *11*, 583–589.

Soukas, A. A., Kane, E. A., Carr, C.E., Melo, J. A., and Ruvkun, G. (2009). Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* *23*, 496–511.

Steinberg, S.F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol. Rev.* *88*, 1341–1378.

Stoica, L., Zhu, P.J., Huang, W., Zhou, H., Kozma, S.C., and Costa-Mattioli, M. (2011). Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 3791–3796.

Südhof, T.C. (2013). A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nat. Med.* *19*, 1227–1231.

Sugi, T., Nishida, Y., and Mori, I. (2011). Regulation of behavioral plasticity by systemic temperature signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Neurosci.* *14*, 984–992.

Suzuki, H., Thiele, T.R., Faumont, S., Ezcurra, M., Lockery, S.R., and Schafer, W.R. (2008). Functional asymmetry in *Caenorhabditis elegans* taste neurons and its computational role in chemotaxis. *Nature* *454*, 114–117.

Tabuse, Y. (2002). Protein kinase C isotypes in *C. elegans*. *J. Biochem.* *132*, 519–522.

Takahara, T., and Maeda, T. (2013). Evolutionarily conserved regulation of TOR signalling. *J. Biochem.* *154*, 1–10.

Tanis, J.E., Moresco, J.J., Lindquist, R. A., and Koelle, M.R. (2008). Regulation of serotonin biosynthesis by the G proteins Galphao and Galphaq controls serotonin signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *178*, 157–169.

Thoreen, C.C., Kang, S. A., Chang, J.W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L.J., Sim, T., Sabatini, D.M., and Gray, N.S. (2009). An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J. Biol. Chem.* *284*, 8023–8032.

Tian, E., Wang, F., Han, J., and Zhang, H. (2009). *epg-1* functions in autophagy-regulated processes and may encode a highly divergent Atg13 homolog in *C. elegans*. *Autophagy* *5*, 608–615.

Toker, A., and Newton, A.C. (2000). Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* *103*, 185–188.

- Tomioka, M., Adachi, T., Suzuki, H., Kunitomo, H., Schafer, W.R., and Iino, Y. (2006). The Insulin/PI 3-Kinase Pathway Regulates Salt Chemotaxis Learning in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* *51*, 613–625.
- Torayama, I., Ishihara, T., and Katsura, I. (2007). *Caenorhabditis elegans* Integrates the Signals of Butanone and Food to Enhance Chemotaxis to Butanone. *J. Neurosci.* *27*, 741–750.
- Wang, G.X., McCrudden, C., Dai, Y.P., Horowitz, B., Hume, J.R., and Yamboliev, I.A. (2004). Hypotonic activation of volume-sensitive outwardly rectifying chloride channels in cultured PSMCs is modulated by SGK. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* *287*, H533–H544.
- White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., and Brenner, S. (1986). The Mind of a Worm. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *314*, 1–340.
- Wicks, S.R., Yeh, R.T., Gish, W.R., Waterston, R.H., and Plasterk, R.H. (2001). Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat. Genet.* *28*, 160–164.
- Xiao, R., Zhang, B., Dong, Y., Gong, J., Xu, T., Liu, J., and Xu, X.Z.S. (2013). A genetic program promotes *C. elegans* longevity at cold temperatures via a thermosensitive TRP channel. *Cell* *152*, 806–817.
- Yang, Q., Inoki, K., Ikenoue, T., and Guan, K.L. (2006). Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev.* *20*, 2820–2832.