

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

Regulation of body size and learning by the nervous system in *C. elegans*

(線虫 *C. elegans* の神経系が体長と学習を制御する機構の解析)

氏名：永嶋宇

#### 【序論】

多くの生物は周囲の環境条件に的確に応答する生存戦略を有する。周囲の環境からの刺激を感知し、行動や発生を調節する組織の 1 つに神経系がある。哺乳類の神経系は多数の神経細胞から構成され、複雑なネットワークによって構築されている。これにより、認知機能や行動調節、発生の制御など多数の役割を担っている。しかしながら、神経系が担う機構における分子レベル、細胞レベル、個体・行動レベルの一連のメカニズムについては未解明な点が多く存在する。

本研究では、モデル動物の 1 つである線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた。線虫は、世代時間が短く、遺伝学的操作に優れているなどの利点を持ち、発生を制御する多くの因子が線虫を用いた研究により同定されてきた。また、神経系で機能する多くの因子には、哺乳類の神経系で機能する分子のホモログが存在する。これらのことから、線虫は神経系と発生との関係の解析に優れている。また、線虫は学習・記憶の仕組みを有し、さらにシンプルな神経系であることから単一細胞レベルの解析が可能である。したがって、哺乳類を用いた解析では難しいとされる学習・記憶の制御における単一神経細胞の解析が、線虫を用いたことで可能となる。

#### 【第 1 章の背景】

体のサイズは生物の基本的な形質の 1 つであり、周囲の環境条件によって影響を受けることが知られている。線虫において、環境条件による体のサイズの制御には神経系に関わることが知られている (Fujiwara, *et al.*, 2002)。しかし、これまでに具体的な神経伝達物質と体のサイズとの関係については殆ど知見がなかった。線虫において餌のシグナルを伝達する因子としてモノアミン伝達物質の 1 つであるドーパミンが知られている。ドーパミンは

餌存在下で放出され、餌の感知や餌依存的な行動の制御に関わることが知られている (Sawin *et al.*, 2000)。これまでに、ドーパミンを欠損した線虫 (*cat-2* 変異体) は体長と体の幅が共に大きくなることが示されていた。このことからドーパミンが体のサイズを負に制御することが示唆されていた。また、線虫は卵から幼虫期 (L1~L4) を経て成虫へと成長する。卵が産み落とされてから一定時間後に発生ステージを観察すると、*cat-2* 変異体は野生型に比べ発生ステージが顕著に進んでいた。一方で、L1 幼虫ステージで発生ステージを同調して一定時間後に発生ステージを観察すると、*cat-2* 変異体の発生ステージは野生型と同程度であった。このことから、卵が産み落とされた時点で *cat-2* 変異体は野生型よりも発生が進んでいる可能性が考えられていた。

第1章では、ドーパミンが体のサイズを制御する機構を明らかにするため、ドーパミンの下流で働く因子を探索した。また、産卵と発生ステージの関係も解析し、ドーパミンと産卵制御の関係を調べた。さらに、ドーパミンによる体長制御と産卵制御の関係を解析し、それぞれの役割を考察した。

### 【第1章の結果と考察】

はじめに、*cat-2* 変異体の体長を調べ、*cat-2* 変異体の体長が野生型よりも大きいことを確認した。さらに、*cat-2* 変異体に野生型の *cat-2* 遺伝子を導入したところ、体長の増大が抑圧された。これらの結果から、ドーパミンが体長を負に制御することが示唆された。

続いて、体長の制御において、ドーパミンの下流で働く分子を探索した。線虫には5つのドーパミン受容体が知られており、5つ全ての変異体の体長を調べたところ D2 様受容体の変異体 (*dop-3* 変異体) は、野生型よりも体長が大きいことがわかった。*dop-3* 変異体に野生型の *dop-3* 遺伝子を導入したところ体長の増大が抑圧された。これらの結果から、体長を負に制御するドーパミンシグナルは主に DOP-3 受容体を介して伝達されることが示唆された。

さらに、モノアミン伝達物質の1つであるオクトパミンが、ドーパミンの下流で機能することを遺伝学的解析によって明らかにした。*cat-2* 変異体で見られる体長の増大はオクトパミン合成酵素の変異体やオクトパミン受容体の変異体バックグラウンドでは抑圧された。また、インスリン様受容体の変異体バックグラウンドでも *cat-2* 変異の効果が抑圧された。さらに、筋発生に関わる因子の変異体バックグラウンドでも *cat-2* 変異の効果が観察されなかった。これらの結果から、ドーパミンの下流では、オクトパミンやインスリン様シグナルが働くことが示唆された。また、正常な筋発生がドーパミンによる体長制御に必要なことが示唆された。

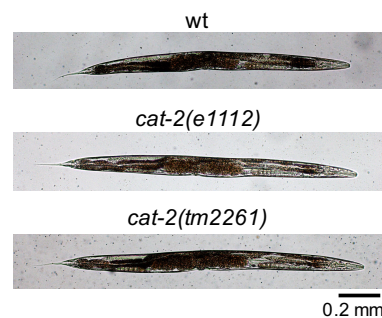


図1. 野生型と *cat-2* 変異体

*cat-2*変異体について、卵の発生ステージを調べた。産み落とされた卵の発生ステージを調べたところ、*cat-2*変異体は発生ステージの進んだ卵を産むこと、つまり産卵のタイミングが遅れていることがわかり、ドーパミンが産卵行動を促進することを見出した。ドーパミンは餌の感知によって放出されることから、餌存在下で産卵を促進させる機構と捉えることができる。餌存在下での産卵は、次世代の個体の生存を有利にしうることから、ドーパミンによる産卵の促進は合理的な機構であると考えられる。

ドーパミンにより制御を受けることが明らかになった体長と産卵について、関係性を検証した。これまでに顕著に発生が進んだ卵を産むことが知られている変異体は、必ずしも体長が大きいわけではなかった。また発生ステージを完全に揃えた条件で体長を計測しても*cat-2*変異体は野生型よりも大きいことがわかった。これらのことから、ドーパミンによる体長制御は、産卵や発生ステージの進行速度に依存しないことが示唆された。

ドーパミンシグナル伝達を構成する因子は、線虫からヒトに至る多くの生物に保存されている。ヒトにおいて、D2 ドーパミン受容体のプロモーター領域の多型が身長と相関することや (Arinami *et al.*, 1999)、先端巨大症の患者にドーパミンアゴニストを投与すると症状が緩和することが知られている (Abs *et al.*, 1998)。これらの知見を踏まえると、本研究で明らかになったドーパミンによる体長制御の機構はヒトを含む多くの生物に保存された機構である可能性が考えられる。

## 【第2章の背景】

線虫は過去の経験に依存して行動を変化させることが知られている。これまでに、飢餓とともに経験した塩 (NaCl) 濃度を記憶し、その後飢餓時の塩濃度を避ける現象 (味覚忌避学習) が知られている (Kunitomo *et al.*, 2013)。この制御には、塩濃度変化を感知する感覚神経 (ASER) で機能するインスリン様シグナル伝達に関

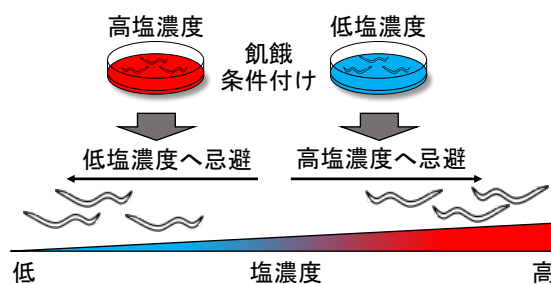


図2. 線虫の味覚忌避学習

わる (Tomioka *et al.*, 2006)。一般に寿命や発生の制御においては、インスリン様受容体の下流で FOXO 型転写因子 (DAF-16) が機能することがよく知られている。DAF-16 を欠損した変異体は、味覚忌避学習における学習能の低下を示し、ASER 神経における DAF-16 の発現により学習能が回復することが示されていた (Tomioka, 2006, 博士論文)。このように ASER 神経の DAF-16 と味覚忌避学習との関係は示唆されていたが、詳細な分子メカニズムは未解明であった。また、寿命や発生の制御におけるインスリン様経路は DAF-16 が主要な下流因子であるが、味覚忌避学習においては DAF-16 を介さないインスリン様経路の

制御機構が報告されており (Ohno *et al.*, 2014)、DAF-16 の働きとインスリン様経路との関係については未解明であった。

第 2 章 では、インスリン様経路の下流で機能する分子の候補である DAF-16 を解析することで、インスリン様経路が味覚忌避学習を制御する新たなメカニズムの解明を目指した。また、線虫を用いることで、単一神経細胞におけるインスリン様経路の作用機序の解明も目指した。

### 【第 2 章の結果と考察】

機能低下型および機能喪失型 *daf-16* 変異体は、味覚忌避学習の学習能が野生型に比べ低いことを確認し、*daf-16* が学習を制御することが示唆された。*daf-16* 遺伝子は開始コドンの位置の異なる多数のアイソフォームを持つ。*daf-16* 変異体に *daf-16*cDNA を導入した実験により、複数の *daf-16* アイソフォームが味覚忌避学習に関与しうることが示唆された。*daf-16* のアイソフォームのうち、哺乳類の FOXO 転写因子にもっとも類似している *daf-16a* について、機能細胞を解析した。*daf-16* 変異体に細胞種特異的に *daf-16a*cDNA を発現させる実験を行い、高塩濃度を忌避する学習については ASER 神経における *daf-16a* の発現で十分であることがわかった。

既に塩走性の制御に関わることが知られている遺伝子について ASER 神経で機能する *daf-16* との関係の遺伝学的解析を行った。その結果、ASER 神経で機能する *daf-16* の下流では、神経ペプチドが働く可能性が示唆された。今後は *daf-16* の下流で働く神経ペプチドを探索・解析し、味覚忌避学習を制御する *daf-16* のシグナルがどの細胞でどのように伝達されるか解析する必要がある。

### 【結論】

本研究ではまず、栄養条件のシグナルを伝えるドーパミンによる体長制御の機構を解析し、神経系で機能するドーパミンの下流でオクトパミンやインスリン様シグナル伝達が働くことを示した。ドーパミンは産卵行動も促進することを発見したが、ドーパミンによる体長制御は産卵の制御とは独立に働くことが示唆された。

第 2 章では、インスリン様シグナル伝達の下流で機能することが知られている DAF-16 転写因子について解析した。DAF-16 は、ASER 感覚神経で機能し、神経ペプチドを介して味覚忌避学習を制御することが示唆された。

ドーパミンやインスリン様シグナル伝達はヒトを含む多くの生物の神経系に存在する。本研究の内容が、ヒトの肥大型やアルツハイマー病などの神経疾患の理解に寄与する可能性が考えられる。最後に、本研究の成果が、発生や学習の制御における神経系の一般原理の解明に貢献することを期待する。