

学位論文

線虫 *C. elegans* の連合学習を制御するインシュリン/
IGF-1 受容体のアイソフォーム特異的な軸索輸送機構

The molecular mechanism of isoform-specific
axonal transport of the insulin/IGF-1 receptor
involved in associative learning in *C. elegans*

平成 24 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

大野 速雄

Abstract

線虫 *Caenorhabditis elegans* は比較的シンプルな神経系を持ちながらも多様な行動可塑性を示し、生物が環境の変化に応じて適切に行動を選択するメカニズムを研究する上で極めて有用なモデル生物である。本研究では、*C. elegans* を含む線虫が外界の塩濃度を記憶して飢餓を経験した塩濃度を忌避するという行動戦略をとることを発見し、この行動可塑性の基盤となる分子機構を解析した。

神経機能に欠損を示す変異株の解析から、水溶性イオンを感知する感覚神経である ASER 神経が餌の有無に応じた塩濃度嗜好性の逆転に必須であることが明らかとなった。ASER 神経内ではインシュリン/PI3-キナーゼ (PI3K) 経路と CASY-1 が機能し、飢餓とともに経験した塩濃度の忌避を司る。

CASY-1 は神経系で発現するカドヘリン様 I 型膜タンパク質であるカルシンテニンの線虫ホモログである。*casy-1* 変異体に対するサプレッサースクリーニングの結果、*casy-1* とインシュリン/PI3K 経路の間に遺伝学的相互作用があることが明らかとなった。*casy-1* 変異体では、最近になって単離されたインシュリン/IGF-1 受容体の新奇アイソフォームである DAF-2c の軸索局在が消失していた。さらなる解析により、CASY-1 が DAF-2c とキネシン-1 複合体の間の分子リンカーとして機能することで DAF-2c の軸索輸送に関与することが示唆された。

DAF-2c の軸索局在は飢餓とともに強まり、この軸索局在は ASER 神経からのシナプス伝達の制御と塩濃度嗜好性の逆転に必須の役割を果たすことがわかった。さらに CASY-1 の上流で機能する経路の探索を行い、Ras-MAPK 経路がキネシン軽鎖をリン酸化標的とすることで CASY-1 依存の DAF-2c 軸索輸送を負に調節していることを見出した。

これらの結果は、Ras-MAPK 経路によって制御された CASY-1 とキネシン-1 がアイソフォーム特異的な軸索輸送によってインシュリン/IGF-1 受容体に機能の多様性を付与していることを示し、ともにヒトの学習能への関与が示唆されてきたカルシンテニンとインシュリン/PI3K 経路の密接な関係性を明らかにした。

Abstract

The nematode *Caenorhabditis elegans*, which exhibits a rich repertoire of behavioral plasticity despite its simple nervous system, is a useful model organism to study the mechanisms by which animals properly modify their behavior in response to environmental changes. In this study, I found that nematodes including *C. elegans* memorize external salt concentrations and avoid them when they have been starved, and investigated the molecular basis of this behavioral plasticity.

Genetic analyses indicated that the salt-sensing ASER sensory neuron has an essential role in the reversal of salt concentration preferences. In the ASER neuron, the insulin/PI3K pathway and CASY-1 act for the avoidance of the salt concentration experienced during starvation.

CASY-1 is the *C. elegans* homolog of Calsyntenins/Alcadeins, which are cadherin-like type I transmembrane proteins highly expressed in the nervous system. A genetic suppressor screen for *casy-1* mutants identified a genetic interaction between *casy-1* and the insulin/PI3K pathway. In the *casy-1* mutant background, the axonal localization of a novel isoform of the DAF-2 insulin/IGF-1 receptor, DAF-2c, was completely abolished. Further experiments suggested that CASY-1 is involved in the axonal transport of DAF-2c by acting as a molecular linker between DAF-2c and the kinesin-1 complex.

The axonal localization of DAF-2c increases in response to starvation, and this DAF-2c translocation is essential for the regulation of synaptic transmission from ASER and the reversal of salt concentration preferences. I further explored the upstream pathway of CASY-1 and found that the Ras-MAPK pathway negatively controls the CASY-1-dependent axonal transport of DAF-2c by targeting kinesin light chain.

These results suggest that the CASY-1 and kinesin-1 complex regulated by the Ras-MAPK pathway confers the functional diversity to the insulin/IGF-1 receptor gene through the isoform-specific axonal transport, and shed light on the unexpected relationship between insulin signaling and calsyntenin, both of which are considered relevant to human memory performance.

目次

Abstract	2
目次	4
第 1 章 序論	6
1.1 行動遺伝学のモデル生物としての線虫 <i>C. elegans</i>	
1.2 線虫の化学感覚受容	
1.3 線虫の行動可塑性	
1.4 神経系におけるインシュリン/PI3-キナーゼ経路の機能	
1.5 哺乳類におけるカルシニン/アルカデインの機能	
1.6 本研究の目的	
第 2 章 材料と方法	20
2.1 用いた線虫株と飼育	
2.2 塩濃度嗜好性の評価試験	
2.3 蛍光顕微鏡法	
2.4 耐性幼虫形成率の測定	
2.5 寿命の測定	
2.6 高温耐性の測定	
2.7 変異体のスクリーニングと原因変異の同定	
2.8 酵母ツーハイブリッド法	
2.9 免疫沈降法	
2.10 感覚神経におけるシナプス放出の可視化	
2.11 プラスミドの作製	

2.12	形質転換株の作製	
2.13	データの解析	
第 3 章	線虫の塩走性学習	33
3.1	線虫は塩濃度と餌の有無を関連づける連合学習を行う	
3.2	ASER 感覚神経が塩濃度嗜好性の調節に必須である	
3.3	塩濃度嗜好性の調節に関わる分子基盤	
第 4 章	インシュリン受容体新奇アイソフォーム DAF-2c の解析	41
4.1	インシュリン/PI3K 経路が飢餓を経験した塩濃度からの忌避に必須である	
4.2	DAF-2c が飢餓を経験した塩濃度からの忌避を制御する	
4.3	DAF-2c は寿命・発生・ストレス耐性の制御においても機能し得る	
4.4	DAF-2c は飢餓に応答して ASER 神経の軸索に局在する	
第 5 章	カルシンテニンホモログ CASY-1 の解析	52
5.1	<i>casy-1</i> はインシュリン/PI3K 経路と遺伝学的に相互作用する	
5.2	CASY-1 は DAF-2c の軸索局在に必須である	
5.3	CASY-1 は DAF-2c とキネシン-1 の間の分子リンカーとして機能する	
5.4	DAF-2c の軸索局在が塩走性の制御に重要である	
5.5	軸索の DAF-2c は ASER 神経からのシナプス放出を制御する	
5.6	Ras-MAPK 経路が CASY-1 依存の DAF-2c 軸索輸送を制御する	
考察		71
結論		77
謝辞		78
引用文献		79

第1章 序論

1.1 行動遺伝学のモデル生物としての線虫 *C. elegans*

ヒトを含めた動物は外界からの情報を処理し適切に応答することにより、生存や繁殖に有利な行動をとっている。このような動物の感覚処理や行動を支配するメカニズムを理解することは生命科学者にとって重要な目標の一つである。特に動物が環境の変化に応じて経験依存的に行動を変える現象は、ヒトの記憶・学習を支える神経可塑性の理解につながると考えられ、霊長類や齧歯類をはじめとする種々の実験生物を対象に精力的な研究が行われてきた。しかし、それらの高等動物の神経系は極めて複雑で、神経回路の細胞レベルでの解析は困難である。またマウスなどごく少数の生物種を例外とすれば、遺伝学をはじめとする分子レベルでの解析手法が未発達な状況にある。

一方で線虫 *Caenorhabditis elegans* (以降、単に線虫と呼ぶ) は、遺伝学的解析手法が高度に発達しているとともに比較的シンプルな神経系を有しており (White et al., 1986)、動物の行動を分子・細胞レベルで理解するために非常に優れたモデル生物である。線虫の神経系は 302 個の神経細胞 (雌雄同体成虫の場合) からなり、個体差のない発生過程をたどる。これらの神経細胞の位置と接続が全て明らかになっている点が他のモデル生物にはない特長であり、感覚刺激の入力から情報処理・出力に至るまでに機能する神経回路の包括的理解を目指すことができる。

さらに線虫は、縦横な分子遺伝学の適用を可能にする多くの利点を備えている。例として、①導入遺伝子を発現するトランスジェニック株の作製が容易 (Mello et al., 1991)、②雌雄同体における自家受精と雄との交配による他家受精の双方が可能、③大量培養による遺伝学的スクリーニングが可能、④世代期間が短く飼育が容易、⑤個体を半永久的に凍結保存できる、⑥標準株はもちろん複数の近縁株までもゲノムがいち早く解読されている (Hillier et al., 2008; The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998)、⑦ゲノム領域断片 (数十 kb 程度) がクローニングされたフォスミド・コスミドのライブラリーが整備されている、⑧利用可能な変異体や cDNA のリソースが充実している、といったことが挙げられる。線虫の身体が透明であることも、遺伝子発現の確認 (Chalfie et al., 1994) や細胞レベルでの *in vivo* 分子イメージング、光遺伝学的手法の

適用 (Nagel et al., 2005; Zhang et al., 2007)が容易なことから大きな魅力の一つである。

一方で線虫は酵母やマウスのように遺伝子のノックインやノックアウトを起こさせることがこれまで困難であったが、近年ではゲノムの特定の位置に挿入されたトランスポゾン *Mos1* の切り出しを利用してゲノム DNA を改変する方法が使われ始めている (Frøkjær-Jensen et al., 2012; Frøkjær-Jensen et al., 2010; Frøkjær-Jensen et al., 2008; Robert and Bessereau, 2007)。また、FLP-FRT システムや Cre-LoxP システム、Q システムなどを用いて導入遺伝子の発現時期や発現部位を自在にコントロールすることも可能となってきた (Davis et al., 2008; Macosko et al., 2009; Wei et al., 2012)。

1.2 線虫の化学感覚受容

1.2.1 感覚神経とその機能

線虫は多くの化学物質を感知し、それらに対する走性 (化学走性) を示す (Bargmann et al., 1993; Ward, 1973)。

雌雄同体では、外界の化学物質を受容すると考えられている化学感覚神経が 32 個存在する (Ward, 1973)。このうち 22 個の神経は、頭部の左右に一对存在するアンフィド (Amphid) と呼ばれる感覚器に集中している (図 1A)。アンフィドには化学感覚神経の他に、温度変化を受容する AFD 感覚神経が 1 対存在する。アンフィドの感覚神経群とその周辺の介在神経は、化学走性、温度走性、耐性幼虫形成、社会性行動、身体のサイズ調節、脂肪代謝、寿命、産卵、咽頭運動、雄の交尾行動など多様な現象を制御する中枢である (Bargmann, 2006; de Bono and Maricq, 2005; Sengupta, 2007)。アンフィドの感覚神経の構造を図 1B、個々の化学感覚神経の主な機能 (Bargmann, 2006; de Bono and Maricq, 2005)を表 1 に示した。

線虫の化学感覚受容は、主に化学物質の濃度勾配を形成した寒天プレート上での走性を調べるアッセイ系や、カルシウムイメージングによる化学物質投与時の神経活性測定により評価されている。線虫はナトリウムイオン、塩化物イオン、cAMP、リジンなどの水溶性化学物質に対して正の走性を示す (Bargmann and Horvitz, 1991; Ward,

1973)。特に NaCl への走性に関わるのは ASE、ADF、ASG、ASI、ASH の各感覚神経である (Bargmann and Horvitz, 1991; Iino and Yoshida, 2009; Thiele et al., 2009)。このうち ASE は NaCl への化学走性に最も大きな寄与がある感覚神経である (Bargmann and Horvitz, 1991; Iino and Yoshida, 2009)。ASE 神経は構造的に対称な左右一つずつの神経からなるが、機能的には非対称性を持ち、左側の ASEL は塩濃度の上昇に、右側の ASER は塩濃度の低下に応答する (Suzuki et al., 2008)。感知する物質の選択性も異なり、塩化物イオンやカリウムイオンは主に ASER 神経で、ナトリウムイオンは主に ASEL 神経で受容される (Ortiz et al., 2009; Pierce-Shimomura et al., 2001; Suzuki et al., 2008)。

揮発性の化学物質を受容する主要な神経としては、嗅覚神経 AWA、AWB、AWC がある (Bargmann et al., 1993)。AWA、AWC は誘引物質の受容に、AWB は忌避物質の受容に関わる (Bargmann, 2006; Troemel et al., 1997)。

線虫は餌の少ない環境下で個体群密度が高くなると、耐性幼虫と呼ばれるストレス耐性の高い発生段階に移行する (Hu, 2007)。このときに個体群密度の指標となるのが、線虫が恒常的に分泌しているアスカロシドと総称される糖化合物である (Butcher et al., 2007; Jeong et al., 2005)。これらのフェロモンは ASK 神経と ASI 神経に発現している複数の G タンパク質共役受容体 (GPCR) が受容する (Kim et al., 2009; McGrath et al., 2011; Park et al., 2012)。

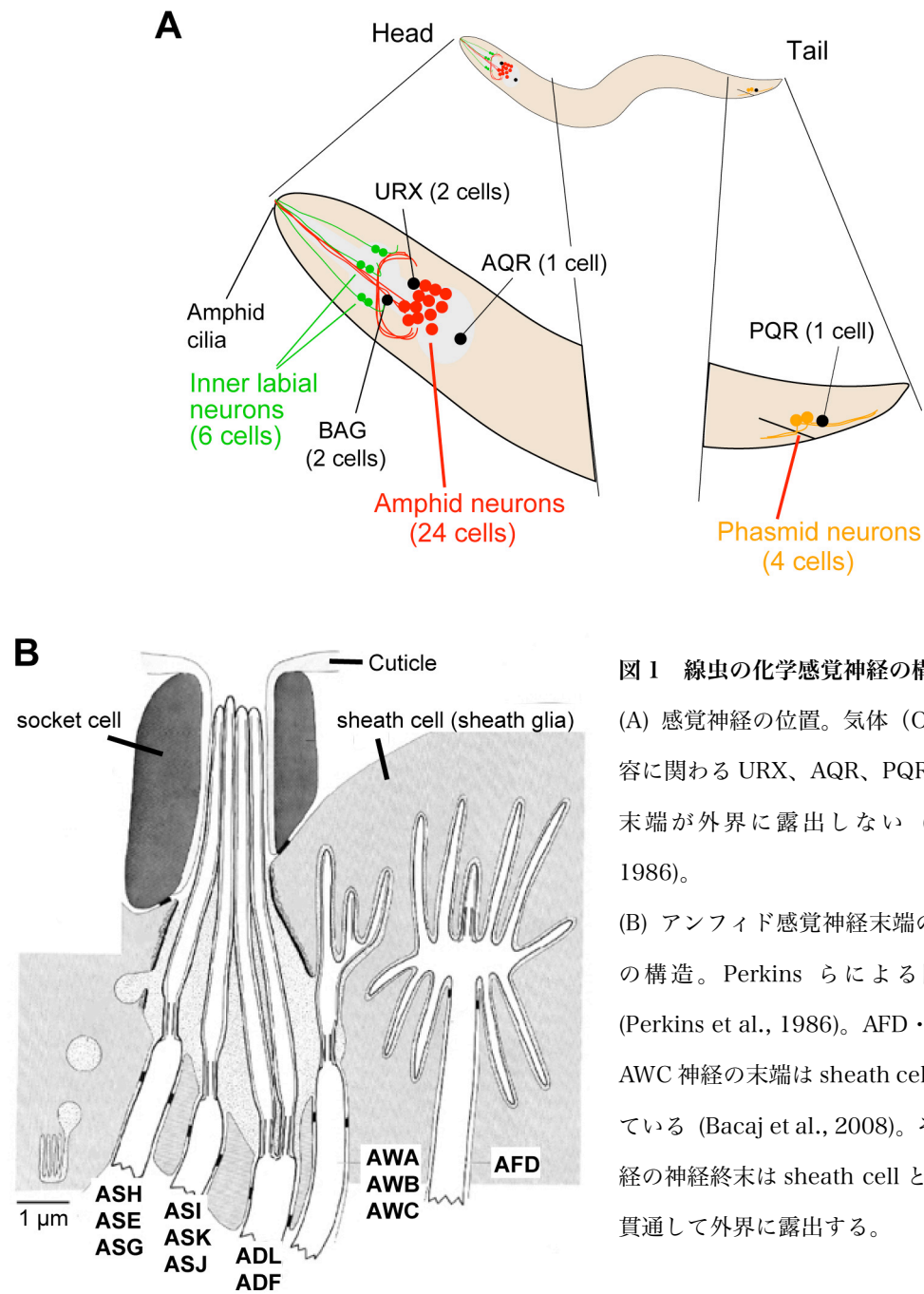


図1 線虫の化学感覚神経の構造

(A) 感覚神経の位置。気体 (O_2 や CO_2) の受容に関わる URX、AQR、PQR、BAG 神経は末端が外界に露出しない (White et al., 1986)。

(B) アンフィド感覚神経末端の繊毛 (cilia) の構造。Perkins らによる図を改変した (Perkins et al., 1986)。AFD・AWA・AWB・AWC 神経の末端は sheath cell に埋め込まれている (Bacaj et al., 2008)。その他の感覚神経の神経終末は sheath cell と socket cell を貫通して外界に露出する。

表 1 化学感覚神経と主な機能

神経	機能
アンフィド感覚神経	
AWA	揮発性物質への誘引、寿命制御
AWB	揮発性物質からの忌避
AWC	揮発性物質への誘引、温度走性
AFD	温度走性
ASE	化学走性
ADF	耐性幼虫形成、化学走性
ASG	耐性幼虫形成、化学走性、寿命制御
ASH	化学物質や機械刺激などからの忌避、社会性行動の調節
ASI	耐性幼虫形成、化学走性
ASJ	耐性幼虫形成、耐性幼虫からの復帰、化学走性
ASK	耐性幼虫形成、化学走性、寿命制御
ADL	化学物質などからの忌避、社会性行動の調節
ファスミド感覚神経	
PHA、PHB	化学物質などからの忌避
酸素受容神経	
URX、AQR、PQR	酸素走性、社会性行動の調節

1.2.2 感覚受容に関与するシグナル伝達経路

線虫のゲノムは 1,000 以上もの G タンパク質共役型受容体をコードしており、多くは感覚神経において化学物質の受容に関わると考えられている (Bargmann, 2006; Robertson and Thomas, 2006)。1 つの感覚神経には複数の受容体分子が発現していて、1 つの感覚神経が複数の化学物質を受容することが可能である (Bargmann et al., 1993; Troemel et al., 1995)。

受容体の下流で神経を活性化させる機構として、感覚神経の種類に応じて二種類のシグナル伝達経路のいずれかが機能すると推定されている。一つは cGMP をセカンドメッセンジャーとする経路で、グアニル酸シクラーゼもしくは cGMP ホスホジエステラーゼの制御により増加した cGMP に応答して cGMP 依存性チャネルが開き神経が活性化する (Coburn and Bargmann, 1996; Komatsu et al., 1996; L'Etoile and Bargmann, 2000; Vowels and Thomas, 1994)。二つ目は TRPV チャネル依存の経路で、エイコサ

ペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid) やアラキドン酸 (arachidonic acid) などのポリ不飽和脂肪酸 (PUFA) もしくはその誘導体が TRPV チャンネルを活性化すると考えられている (Colbert et al., 1997; Kahn-Kirby et al., 2004; Tobin et al., 2002)。

水溶性化学物質を受容する ASE 神経におけるシグナル伝達経路では、cGMP 依存性チャンネル (TAX-2、TAX-4、CHE-6/CNG-4) や、GCY-1、GCY-14、GCY-22 などの受容体型グアニル酸シクラーゼが関与すると考えられている (Ortiz et al., 2009; Suzuki et al., 2008; H.K. Smith and O. Hobert, personal communication)が、その他の詳細についてはほとんど明らかになっていない。既知の G タンパク質シグナリングに関わる因子の変異体が水溶性物質への走性に異常を示さないことから、受容体型グアニル酸シクラーゼが水溶性物質を直接受容する可能性が考えられている (Bargmann, 2006; Ortiz et al., 2009)。

1.2.3 化学走性に関わる介在神経

感覚神経からのシグナルを伝達して化学走性行動を引き起こす介在神経についても、レーザーによる細胞破壊やカルシウムイメージング、光遺伝学的手法による神経活性操作といった手法を用いて解析が行われ始めている。多くのアンフィド感覚神経は AIA、AIB、AIY、AIZ といった共通の介在神経に接続しており (図 2)、これらの介在神経が様々な物質に対する走性に関わることが報告されている (Chalasani et al., 2007; Chalasani et al., 2010; Iino and Yoshida, 2009; Kocabas et al., 2012; Tomioka et al., 2006)。

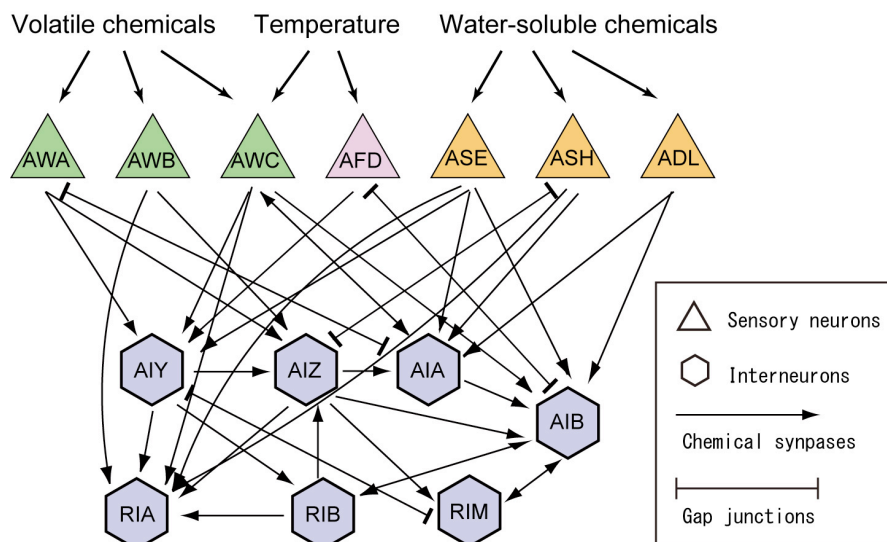


図2 アンフィド感覚神経と下流介在神経の神経回路図（一部）

神経間の化学シナプス接続とギャップ結合は White らの報告に基づく (White et al., 1986)。

1.3 線虫の行動可塑性

1.3.1 塩走性学習とその関連因子

飯野雄一研究室における先行研究で、通常は塩に誘引される線虫が塩の存在と飢餓を同時に経験することで塩を忌避ようになる「塩走性学習 (salt chemotaxis learning)」が報告された (Saeki et al., 2001; Tomioka et al., 2006)。他の研究室からも類似した現象の報告があり、味覚順応 (gustatory adaptation) や味覚可塑性 (gustatory plasticity)、あるいは飢餓による味覚可塑性増強 (starvation-enhanced gustatory plasticity) などと呼ばれる (Hukema et al., 2006; Hukema et al., 2008; Jansen et al., 2002)。これらの塩走性の可塑性には数多くの因子が関与することが報告されてきた。以下に代表的な因子についてまとめた。

CASY-1

CASY-1 は本研究において中心的に解析された分子である。線虫からヒトまで高度に保存されたカルシンテニン/アルカデインのホモログで、カドヘリン様ドメイン、LG/LNS 様ドメイン、膜貫通領域、酸性アミノ酸に富む細胞内ドメインを持つ I 型膜貫

通タンパク質である (図 14A、p. 61)。 *casy-1* は塩走性学習に欠損を生じる変異体のスクリーニングで単離された (Ikeda et al., 2008)。 *casy-1* 変異体は塩走性学習の他にも、ベンズアルデヒドやジアセチルに対する嗅覚順応(後述)、温度学習(後述)、ジアセチルと銅イオンの感覚統合に異常を示す (Hoerndli et al., 2009; Ikeda et al., 2008)。哺乳類のカルシニン/アルカデインに関する知見については後述する (1.5)。

インシュリン/PI3K 経路

INS-1 (インシュリンペプチド)、DAF-2 (インシュリン/IGF-1 受容体)、AGE-1 (ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ)、PDK-1 (ホスファチジルイノシトール依存性キナーゼ)、AKT-1 (Akt/PKB キナーゼ) といったインシュリン/ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (以下 PI3-キナーゼ、あるいは PI3K) 経路の因子は、塩走性学習や温度学習、嗅覚順応に関わる (Kodama et al., 2006; Lin et al., 2010; Tomioka et al., 2006)。塩走性学習において DAF-2 や AGE-1 は ASER 感覚神経で機能する (Tomioka et al., 2006)。

HEN-1・SCD-2

HEN-1 は LDL 受容体モチーフを持つ分泌タンパク質で、塩走性学習のほか温度学習や2つの感覚情報の統合、耐性幼虫形成に関わる (Ishihara et al., 2002; Reiner et al., 2008)。ショウジョウバエでは HEN-1 ホモログである Jeb の受容体として、受容体型チロシンキナーゼの Alk が同定されており (Bazigou et al., 2007; Englund et al., 2003; Lee et al., 2003; Stute et al., 2004)、 *C. elegans* においても Alk オーソログである SCD-2 が HEN-1 の受容体と考えられている (Reiner et al., 2008)。

Go/Gq-DAG-PKC シグナリング

Go タンパク質 α サブユニットをコードする *goa-1* の変異体や、Gq タンパク質 α サブユニットをコードする *egl-30* の機能獲得型変異体は、塩走性学習に強い欠損を示す (Adachi et al., 2010; Matsuki et al., 2006; Tomioka et al., 2006)。Gq シグナリングは ASER 感覚神経で働いており、その下流ではジアシルグリセロール (DAG)・nPKC

(*ttx-4*によりコードされる) が制御され则认为られている (Adachi et al., 2010)。

また、クラス IIA ホスファチジルイノシトール輸送タンパク質をコードする *pitp-1* の変異体は条件に寄らず常に塩への弱い誘引行動が観察される (Iwata et al., 2011)。この異常の一部は DAG シグナリングを活性化させることで抑圧されることから、PITP-1 は DAG 産生を助ける機能を担っていると认为られている (Iwata et al., 2011)。

生体アミン

生体アミンの一種であるセロトニン (5-HT) は、咽頭運動や産卵、温度走性などにおいて餌シグナルを伝達すると认为されている (Colbert and Bargmann, 1997; Mohri et al., 2004; Nuttley et al., 2002; Zhang et al., 2005)。塩走性学習においても、飢餓条件付け時にセロトニンを投与することにより学習が大きく弱まる (Saeki et al., 2001)。

やはり生体アミンの一種であるオクトパミンは、逆に飢餓シグナルを伝達すると认为されている (Alkema et al., 2005; Mohri et al., 2004)。オクトパミンで処理した線虫は、餌が与えられていても、飢餓を経験した線虫と同様に培養温度を避けるようになる (Mohri et al., 2004)。オクトパミン合成酵素をコードする *tbh-1* の変異体は、塩走性学習に異常を示す (安達ら、未発表)。

その他の因子

その他の塩走性の可塑性に関わる因子として、NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニットの NMR-1 (Kano et al., 2008)、グアニル酸シクラーゼの GCY-28 (Tsunozaki et al., 2008)、三量体型 G タンパク質サブユニットの GPC-1 (Hukema et al., 2006)、PDZ ドメインを持つ MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) ホモログの MAGI-1 (Stetak et al., 2009)、プロテインキナーゼ D ホモログの DKF-2 (Fu et al., 2009)、バソプレッシン/オキシトシンペプチドファミリーに属するネマトシン NTC-1 とその受容体 NTR-1 (Beets et al., 2012)、DEF/ENaC (degenerin/epithelial sodium channel) ホモログの ASIC-1 (Voglis and Tavernarakis, 2008) などが報告されている。

上記のような多数の先行研究が塩走性の可塑性に関わる遺伝子について報告しているが、一方でこれらの報告の大半は塩走性に異常を示す変異体を同定する遺伝学的解析にとどまっており、細胞生物学的手法や生化学的手法、生理学的手法を組み合わせ分子の動態や分子間の相互作用を記述した例は少ない。特定細胞内でどのような変化が起こるかをタンパク質レベル、もしくはさらに詳細なアミノ酸残基レベルで解析し、個体の行動と結びつけて記述することに成功した例は極めて希少である。

1.3.2 塩走性学習に関わる神経

塩走性の可塑性に関わる神経細胞についても解析が進められている。

塩を受容する ASER 感覚神経は塩走性の可塑性に重要な役割を果たすと考えられている。塩走性学習において NaCl と飢餓で条件付けした後の NaCl からの忌避には、ASER 神経の機能が必要である (Adachi et al., 2010)。また、塩走性学習に必須な CASK-1 やインシュリン/PI3K 経路の因子は、ASER 神経で機能する (Ikeda et al., 2008; Tomioka et al., 2006)。ASER 神経が接続する介在神経の中では、AIA 神経をレーザー破壊することで塩走性学習が妨げられることが示されている (Tomioka et al., 2006)。

一方で、ASI、ASH、ADF、ADL の各感覚神経や、酸素を受容する AQR、PQR、URX 神経の機能も塩走性の可塑性に関わることが指摘されている (Hukema et al., 2006)。

1.3.3 線虫のその他の行動可塑性

嗅覚順応

野生型線虫はベンズアルデヒドやイソアミルアルコール、ジアセチルなどの揮発性化学物質に正の化学走性を示す (Bargmann et al., 1993)が、これらの物質に長時間曝すことにより化学走性が低下、もしくは負に逆転する (Colbert and Bargmann, 1995)。この現象は嗅覚順応 (olfactory adaptation) もしくは匂い順応 (odor adaptation) と呼ばれる。餌の存在下では匂い物質への走性の低下が見られないことから、順応というよりもむしろ匂い物質と飢餓を関連づける連合学習の要素が強いという指摘もなされ

ている (Nuttley et al., 2002)。

嗅覚順応に関わる分子として、アレスチンの ARR-1 (Palmitessa et al., 2005)、cGMP 依存性プロテインキナーゼの EGL-4 (L'Etoile et al., 2002)、Tbx2 ファミリーの転写因子 SDF-13 (Miyahara et al., 2004)、Go タンパク α サブユニットの GOA-1 (Matsuki et al., 2006)、介在神経 AIY における Ras-MAPK 経路の因子 (Hirotsu and Iino, 2005)、Puf ファミリーの RNA 結合タンパク質 FBF-1 (Kaye et al., 2009)、ネプリライシンホモログの NEP-2 (Yamada et al., 2010)などがある。

温度学習

線虫は温度勾配を形成したプレート上で、培養された温度に向かって移動する温度走性を示す (Hedgecock and Russell, 1975)。しかし数時間の飢餓を経験することで、培養温度を避けるようになる (Mohri et al., 2004)。ここではこの飢餓と温度を関連づける行動可塑性を温度学習 (temperature learning) と呼ぶ (Ikeda et al., 2008)。前述したように CASY-1 や HEN-1、INS-1 は温度学習に関与する (Ikeda et al., 2008; Ishihara et al., 2002; Kodama et al., 2006)。

1.4 神経系におけるインシュリン/PI3K 経路の機能

近年、哺乳類を中心に、インシュリン/PI3K 経路がシナプス可塑性や認知機能に関与するとの報告が多数なされている (Chiu and Cline, 2010; McNay and Recknagel, 2011; Schiöth et al., 2012)。インシュリン受容体は哺乳類の脳に広く発現しており (Havrankova et al., 1978)、インシュリンは NMDA 受容体、AMPA 受容体、ATP 依存性カリウムチャネルといった神経系に存在するイオンチャネルの機能を調節する作用を持つ (Chiu and Cline, 2010; McNay and Recknagel, 2011)。ヒトにおいてはインシュリンの鼻腔内投与が健常者やアルツハイマー病患者の記憶能力を向上させるといった知見がある (Ott et al., 2012; Schiöth et al., 2012)。また最近ではアルツハイマー病は「3 型糖尿病」とさえ呼ばれ、その発症にインシュリン経路の異常が関与する可能性が指摘されている (Freude et al., 2009; McNay and Recknagel, 2011; Schiöth et al., 2012; Steen et al., 2005)。

一方で、インシュリン/PI3K シグナル伝達経路は細胞の発生や成長、代謝など多数のプロセスに関わっているため、神経系における *in vivo* の機能解析は困難である。PTEN などインシュリン/PI3K シグナル伝達経路の構成因子を条件的にノックアウトするアプローチ (Sperow et al., 2012; Takeuchi et al., 2013) や PI3K 阻害剤を時期特異的に投与するアプローチ (Brüel-Jungerman et al., 2009; Castillo and Escobar, 2011; Grillo et al., 2009; Horwood et al., 2006; Kritman and Maroun, 2013; Lin et al., 2001; Sanna et al., 2002; Yang et al., 2008) を用いた実験によって、インシュリン/PI3K シグナル伝達経路が細胞の発生や形態制御とは無関係に長期増強 (LTP) や長期抑圧 (LTD) などのシナプス可塑性を制御することが示唆されている。しかしながら、インシュリン/PI3K シグナル伝達経路がどのようにシナプス可塑性を制御するかについては未知の部分が多い。例えば、哺乳類の神経系においてインシュリン受容体はシナプス領域に局在する (Abbott et al., 1999) が、インシュリン/PI3K 経路の機能を細胞体とシナプス領域に分離して解析した例は報告されていない。インシュリン/PI3K 経路がシナプス可塑性を制御するために、細胞体において転写など遺伝子発現に関わるのか (Salih et al., 2012; Yang et al., 2008)、もしくはシナプス領域において局所的にシナプス構造の変換 (Arendt et al., 2010; Chan et al., 2011; Lee et al., 2011; Lee et al., 2005) などに関わるのかは不明である。また、膵臓からのインシュリンの分泌や培養細胞におけるインシュリン経路の活性調節といった現象に比べて、神経系におけるインシュリン様リガンドの分泌制御やその下流の活性調節については研究が進んでおらず、インシュリン/PI3K 経路が神経系を含む様々な組織において多彩な機能を発揮するメカニズムについては大きな研究課題となっていた。

線虫においても、神経系におけるインシュリン/PI3K シグナル伝達経路は重要な役割を担っている。線虫に 40 種類存在すると考えられているインシュリン様ペプチドの多くは神経系で発現する (Cornils et al., 2011; Pierce et al., 2001)。また、モザイク解析や変異体に対する組織特異的レスキュー実験により、インシュリン/PI3K シグナル伝達経路の活性を神経系でのみ回復させることが寿命や耐性幼虫形成を制御するのに十分であることが示されている (Apfeld and Kenyon, 1998; Wolkow et al., 2000)。塩走性学習や嗅覚順応、温度学習においてもインシュリン/PI3K 経路は神経系で機能する

と考えられている (Kodama et al., 2006; Lin et al., 2010; Tomioka et al., 2006)。

1.5 哺乳類におけるカルシンテニン/アルカデインの機能

カルシンテニン/アルカデインは、カドヘリンスーパーファミリーに属する I 型膜タンパク質である。哺乳類のカルシンテニン/アルカデインは海馬と新皮質を含む中枢神経系で広く発現し (Hintsch et al., 2002; Vogt et al., 2001)、ヒトのカルシンテニン-2 遺伝子に存在する SNP は単語の記憶能力と連鎖することが報告されている (Papassotiropoulos et al., 2006; Preuschhof et al., 2010)。カルシンテニンの細胞内ドメインはキネシン-1 の軽鎖と相互作用し、2 つ存在する WD モチーフがこの相互作用に必要である (Araki et al., 2007; Dodding et al., 2011; Konecna et al., 2006)。カルシンテニンで最初に見つかったこのタイプのキネシン結合モチーフは、キネシン-1 依存の輸送に特異性を付与すると考えられる多くのヒトタンパク質に存在していることが明らかとなっている (Dodding et al., 2011)。また、カルシンテニンはアルツハイマー病の原因タンパク質 APP やアダプタータンパク質 X11/X11L とともに複合体を形成し、X11/X11L が解離するとカルシンテニンと APP はセクレターゼによる切断を受ける (Araki et al., 2004; Araki et al., 2003; Vogt et al., 2001)。この切断によりカルシンテニンの細胞外領域はシナプス間隙に放出され、 Ca^{2+} 結合能を持つ C 末端側の領域が細胞内へと移行する (Araki et al., 2004; Vogt et al., 2001)。培養神経におけるカルシンテニンのノックダウンは APP のプロセシングパターンに影響を及ぼし、アルツハイマー病に特徴的なアミロイド斑の主成分であるアミロイド β の産生を増大させる (Steuble et al., 2012; Vagnoni et al., 2012)。また、アルツハイマー病や脳血管性認知症と並んで三大認知症の一つに数えられるレビー小体型認知症では、患者の脳脊髄液でカルシンテニン-1 の量が顕著に上昇する可能性が示唆されている (Dieks et al., 2012)。これらの生化学的な知見が集積する一方で、カルシンテニンの生理的な機能については未知の部分が多い。

1.6 本研究の目的

上記のように、塩走性学習を始めとする線虫の行動可塑性には哺乳類にも保存された

多くの遺伝子が関与しており、これらの現象の解析は記憶・学習を司る普遍的なメカニズムの理解へとつながることが期待される。本研究では、線虫の塩走性の可塑性について、行動レベルで詳細に解析してこの現象の本質を理解するとともに、モデル生物としての線虫の利点を最大限に発揮して基盤となる分子メカニズムを解明することを目指した。

第2章 材料と方法

2.1 用いた線虫株と飼育

線虫は 20°C のインキュベーター内で NGM プレートを用いて培養した。ただし、温度感受性の *daf-2(e1370)* 変異体を用いた実験では 15°C で、*C. briggsae* の野生株は 22°C でそれぞれ培養した。線虫の餌として主に大腸菌株 NA22 を用いた。ただし、寿命の測定、高温耐性の測定、ASER 神経におけるシナプス放出の測定においては餌として大腸菌株 OP50 を用いた。本研究で用いた線虫株は表 2 にまとめた。

線虫の培養・行動評価実験に用いたプレートおよびバッファの組成を以下に示す。

- ・ NGM プレート

2.5 g/l ポリペプトン、3 g/l 塩化ナトリウム、25 mM リン酸カリウム (pH 6.0)、1 mM 塩化カルシウム、1 mM 硫酸マグネシウム、5 mg/l コレステロール、17 g/l スプーン寒天

- ・ M9 バッファ

3 g/l リン酸二水素カリウム、6 g/l リン酸水素二ナトリウム、5 g/l 塩化ナトリウム、1 mM 硫酸マグネシウム

- ・ CTA プレート (Chemotaxis assay plate) / 条件付けプレート

5 mM リン酸カリウム (pH 6.0)、1 mM 塩化カルシウム、1 mM 硫酸マグネシウム、2% バクトアガー (Becton, Dickinson and Company)

- ・ 洗浄バッファ/条件付けバッファ

5 mM リン酸カリウム (pH 6.0)、1 mM 塩化カルシウム、1 mM 硫酸マグネシウム、0.05% ゼラチン

表 2 本研究で用いた線虫株

Strain	Genotype	Source
N2	<i>C. elegans</i> wild type	CGC
AF16	<i>C. briggsae</i> wild type	CGC
PS312	<i>P. pacificus</i> wild type	CGC
PR674	<i>che-1(p674)</i> I.	CGC
FX02364	<i>gcy-22(tm2364)</i> V.	NBRP
OH8585	<i>otIs4[Pgcy-7::gfp]; otEx382[Pceh-36::CZ-caspase3(p17); Pgcy-7::caspase3(p12)-NZ; Pmyo-3::mCherry]</i> .	From O. Hobert
OH8593	<i>ntIs1[Pgcy-5::gfp] V; otEx3830[Pceh-36::CZ-caspase3(p17); Pgcy-5::caspase3(p12)-NZ; Pmyo-3::mCherry]</i> .	From O. Hobert
–	<i>ins-1(nr2091)</i> IV.	From G. Ruvkun
CB1370	<i>daf-2(e1370)</i> III.	CGC
JN1489	<i>daf-2(pe1230)</i> III.	Isolated by R. Iwata
TJ1052	<i>age-1(hx546)</i> II.	CGC
JT709	<i>pdk-1(sa709)</i> X.	CGC
RB759	<i>akt-1(ok525)</i> V.	CGC
JN1483	<i>daf-18(pe407)</i> IV.	This study
JN1484	<i>daf-18(pe408)</i> IV.	This study
RB712	<i>daf-18(ok480)</i> IV.	CGC
GR1309	<i>daf-16(mgDf47)</i> I; <i>daf-2(e1370)</i> III.	CGC
JN765	<i>daf-16(mgDf47)</i> I; <i>akt-1(ok525)</i> V.	This study
JN714	<i>daf-16(mgDf47)</i> I.	This study
JN433	<i>casy-1(tm718)</i> II.	NBRP
JC2154	<i>hen-1(tm501)</i> X.	NBRP
JN1481	<i>casy-1(tm718)</i> II; <i>daf-18(pe407)</i> IV.	This study
JN1482	<i>casy-1(tm718)</i> II; <i>daf-18(pe408)</i> IV.	This study
JN473	<i>casy-1(tm718)</i> II; <i>daf-18(ok480)</i> IV.	This study
JN1498	<i>daf-2(e1370)</i> III; <i>daf-18(pe407)</i> IV.	This study
JN1499	<i>daf-2(e1370)</i> III; <i>daf-18(pe408)</i> IV.	This study
JN1500	<i>daf-2(pe1230)</i> III; <i>daf-18(pe407)</i> IV.	This study
JN1501	<i>daf-2(pe1230)</i> III; <i>daf-18(pe408)</i> IV.	This study

MT4866	<i>let-60(n2021) IV.</i>	CGC
–	<i>mek-2(ku114) I.</i>	From M. Han
–	<i>mpk-1(n2521) III.</i>	CGC
JN1502	<i>casy-1(tm718) II; let-60(n2021) IV.</i>	This study
JN1503	<i>mek-2(ku114) I; casy-1(tm718) II.</i>	This study
JN1504	<i>casy-1(tm718) I; mpk-1(n2521) III.</i>	This study
JN1505	<i>Ex[Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1506	<i>daf-2(pe1230) III; Ex[Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1507	<i>daf-2(pe1230) III; Ex[Pgcy-5::daf-2a; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1508	<i>daf-2(pe1230) III; Ex[Pgcy-5::daf-2b; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1509	<i>daf-2(pe1230) III; Ex[Pgcy-5::daf-2c; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1510	<i>daf-2(pe1230) III; Ex[Pgcy-5::daf-2d; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1511	<i>daf-2(pe1230) III; Ex[Pgcy-5::daf-2e; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1512	<i>daf-2(pe1230) III; Ex[Pgcy-5::daf-2a(o.e); Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1513	<i>daf-2(pe1230) III; Ex[Pgcy-5::daf-2a::CICD; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1514	<i>daf-2(e1370) III; Ex[Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1515	<i>daf-2(e1370) III; Ex[Pdpy-30::daf-2a; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1516	<i>daf-2(e1370) III; Ex[Pdpy-30::daf-2b; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1517	<i>daf-2(e1370) III; Ex[Pdpy-30::daf-2c; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1518	<i>daf-2(e1370) III; Ex[Pdpy-30::daf-2d; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1519	<i>daf-2(e1370) III; Ex[Pdpy-30::daf-2e; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1520	<i>daf-2(e1370) III; Ex[Pdpy-30::daf-2a; Pdpy-30::daf-2c; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1521	<i>daf-2(e1370) III; Ex[Pdpy-30::daf-2a; Pdpy-30::daf-2c; Pdpy-30::daf-2d; Pdpy-30::daf-2e; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1522	<i>Is[Pgcy-5::daf-2a::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1523	<i>casy-1(tm718) II; Is[Pgcy-5::daf-2a::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1524	<i>Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1525	<i>casy-1(tm718) II; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1526	<i>Ex[Pgcy-5::daf-2a::Venus(o.e); Punc-122::mCherry].</i>	This study
JN1527	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1528	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pcasy-1::casy-1; Pmyo-3::venus].</i>	This study

JN1529	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pcasy-1::casy-1(ΔLG); Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1530	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pcasy-1::casy-1(ΔCads); Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1531	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pcasy-1::casy-1(ΔTM); Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1532	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pcasy-1::casy-1(WAWA); Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1533	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pcasy-1::casy-1(WAWA; ΔCads); Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1534	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pgcy-5::daf-2a; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1535	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pgcy-5::daf-2c; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1536	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pgcy-5::daf-2a::CICD; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1537	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pgcy-5::daf-2c::CICD; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1538	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pgcy-5::casy-1; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1539	<i>unc-116(e2310) III; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1540	<i>klc-2(km11) V; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1541	<i>klc-1(ok2609) IV; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1542	<i>unc-104(e1265) II; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1543	<i>klp-4(tm2114) X; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1544	<i>klp-6(sy511) III; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1545	<i>let-60(n2021) IV; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1546	<i>mek-2(ku114) I; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1547	<i>mpk-1(n2521) III; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1548	<i>casy-1(tm718) II; let-60(n2021) IV; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1549	<i>mek-2(ku114) I; casy-1(tm718) II; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1550	<i>casy-1(tm718) II; mpk-1(n2521) III; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Is[Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1551	<i>Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Ex[Pgcy-5::klc-2; Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1552	<i>Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Ex[Pgcy-5::klc-2(S452A); Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1553	<i>Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Ex[Pgcy-5::klc-2(S452D); Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1554	<i>Ex[Pgcy-5::klc-2; Pmyo-3::Venus].</i>	This study

JN1555	<i>Ex[Pgcy-5::klc-2(S452A); Pmyo-3::Venus].</i>	This study
JN1556	<i>Ex[Pgcy-5::klc-2(S452D); Pmyo-3::Venus].</i>	This study
JN1557	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pgcy-5::klc-2; Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1558	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pgcy-5::klc-2(S452A); Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1559	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pgcy-5::klc-2(S452D); Pmyo-3::venus].</i>	This study
JN1560	<i>casy-1(tm718) II; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Ex[Pcasy-1::casy-1; Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1561	<i>casy-1(tm718) II; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Ex[Pcasy-1::casy-1(ΔLG); Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1562	<i>casy-1(tm718) II; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Ex[Pcasy-1::casy-1(ΔCads); Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1563	<i>casy-1(tm718) II; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Ex[Pcasy-1::casy-1(ΔTM); Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1564	<i>casy-1(tm718) II; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Ex[Pcasy-1::casy-1(WAWA); Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1565	<i>casy-1(tm718) II; Is[Pgcy-5::daf-2c::Venus; Punc-122::mCherry]; Ex[Pcasy-1::casy-1(WAWA; ΔCads); Pgcy-5::mCherry; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1566	<i>casy-1(tm718) II; Is[Pcasy-1::SP::Myc::casy-1; Plin-44::gfp].</i>	This study
JN1567	<i>casy-1(tm718) II; Is[Pcasy-1::SP::flag::exon11.5; Punc-122::mCherry].</i>	This study
JN1568	<i>casy-1(tm718) II; Is[Pcasy-1::SP::Myc::casy-1; Plin-44::gfp]; Is[Pcasy-1::SP::flag::exon11.5; Punc-122::mCherry].</i>	This study
JN1569	<i>Ex[Pgcy-5::snb-1::pHluorin; Plin-44p::gfp]; Ex[Punc-122::mCherry].</i>	From S. Oda
JN1570	<i>casy-1(tm718) II; Ex[Pgcy-5::snb-1::pHluorin; Plin-44::gfp]; Ex[Punc-122::mCherry].</i>	This study
JN1571	<i>daf-2(pe1230) III; Ex[Pgcy-5::snb-1::pHluorin; Plin-44p::gfp]; Ex[Punc-122::mCherry].</i>	This study
JN1572	<i>daf-2(pe1230) III; Ex[Pgcy-5::snb-1::pHluorin; Plin-44p::gfp]; Ex[Pgcy5::daf-2a; Punc-122::mCherry].</i>	This study
JN1573	<i>daf-2(pe1230) III; Ex[Pgcy-5::snb-1::pHluorin; Plin-44p::gfp]; Ex[Pgcy5::daf-2c; Punc-122::mCherry].</i>	This study
JN1574	<i>daf-2(pe1230) III; Ex[Pgcy-5::snb-1::pHluorin; Plin-44p::gfp]; Ex[Pgcy5::daf-2a::CICD; Punc-122::mCherry].</i>	This study
JN554	<i>dyf-11(pe554) X.</i>	From H. Kunitomo
–	<i>dyf-11(pe554) X; Ex[Pmyo-3p::Venus].</i>	From H. Kunitomo
–	<i>dyf-11(pe554) X; Ex[Pdyf-11::dyf-11; Pmyo-3p::Venus].</i>	From H. Kunitomo
–	<i>dyf-11(pe554) X; Ex[Pgcy-5::dyf-11; Pmyo-3p::Venus].</i>	From H. Kunitomo
–	<i>dyf-11(pe554) X; Ex[Pgcy-7::dyf-11; Pmyo-3p::Venus].</i>	From H. Kunitomo
JN1478	<i>dpy-20(e2017) IV; Ex[Pcasy-1::venus; P dpy-20::dpy-20(+)].</i>	This study

2.2 塩濃度嗜好性の評価試験

50 mM の NaCl を含む厚さ 2 mm の CTA プレートを手横 5.6 cm × 縦 3.8 cm の長方形のプラスチックシャーレ内に作製し、横 1.4 cm × 縦 3.8 cm × 高さ 6 mm で NaCl 以外は CTA プレートと同じ組成の寒天片を左右の両端に置いた (図 3A、p. 34)。左側の寒天片は NaCl を含まず、右側の寒天片は 100 mM の NaCl を含む。20~24 時間静置してプレート全体にわたる塩濃度勾配を形成させ、アッセイの 15 分前に左右の寒天片を取り除いて塩濃度嗜好性アッセイプレートとした。

NGM プレート上で培養した線虫を洗浄バッファーで洗いとり、さらに洗浄バッファーで 3 回洗ってから 0 mM、50 mM、100 mM のいずれかの NaCl 濃度を含む条件付けプレート上に移し、余分なバッファーをキムワイプで吸い取った後に餌もしくは飢餓を 4 時間経験させた。条件付けプレート上で餌を与える際は、NaCl を含まない LB 液体培地 (10 g/l バクトトリプトン、5 g/l 酵母エキス) で培養した大腸菌株 NA22 を水で 3 回洗った後、OD₆₀₀ が 300 になるように水で懸濁した菌液を 15 µl スプレッターで広げたものを用いた。

塩濃度嗜好性アッセイは、若い成虫を白金線ですばやく 1 匹ずつ 5~9 匹拾い、塩濃度嗜好性アッセイプレートの中央に置いて開始した。条件付けプレート上に餌が存在するときは、餌のないプレートに置いて 5~10 秒間這わせることで線虫の身体に付着した餌を除いてからアッセイプレートに移した。23°C で 10 分間静置した後に、アッセイプレート上のどの領域に虫がいるかを調べ、約 20 mM (プレートの左側四分の一の領域)、約 50 mM (プレートの中央半分領域)、約 80 mM (プレートの右側四分の一の領域) の NaCl を含む領域に移動した虫をそれぞれ「20」、「50」、「80」と分類した。線虫の培養に最も一般的に用いられる NGM 培地は約 50 mM の NaCl を含むため、主に 50 mM の NaCl で条件付けした線虫の行動を解析した。

塩濃度嗜好性アッセイプレートにおける塩化物イオン濃度の勾配の測定は、プレート上の計測位置にあたる部分をコルクボーラーでくり抜き 13 ml のイオン強度調整剤 (ISA-Cl、DKK-TOA) 中で一晩振盪して平衡化してから、イオン電極法を用いたイオンメーター (IM22P/CL-2021、DKK-TOA) でこの溶液の塩化物イオン濃度を計測して行った。異なる複数の標準 NaCl 濃度で作製したプレートについても同様に塩化物イオン

ン濃度を測定し、検量線法によりアッセイプレート上の塩化物イオン濃度を算出した。検量線は最小二乗法により得た。

2.3 蛍光顕微鏡法

蛍光タンパク質の局在観察は、麻酔剤として 10 mM のアジ化ナトリウムを含む 5% 寒天をスライドグラス上に広げ、NGM プレートで培養した成虫を載せて行った。ただし、線虫に飢餓を経験させる際は 50 mM NaCl を含む条件付けバッファー中で緩やかに回転攪拌してから観察を行った。画像の取得は TCS-SP5 共焦点顕微鏡 (Leica) で行い、対物レンズとして HCX PL APO 63×/1.30 (Leica) もしくは HCX PL APO 40×/0.85 (Leica) を用いた。画像の解析は LAS AF (Leica) で行った。蛍光強度の定量は、神経の細胞体や軸索に対して垂直な直線を対象領域 (region of interest) として、ピークの蛍光強度からバックグラウンドの蛍光強度を引いた値を用いた。軸索における蛍光強度の定量については、細胞体からの距離が約 30 μm から 60 μm の領域にある 4 点で測定しそれらの平均値を算出して行った。

2.4 耐性幼虫形成率の測定

耐性幼虫形成率の測定は、十分に抱卵した成虫を新しいプレートに移して 7 時間産卵させてからこれらの虫を除き、22.5°C で培養して孵化した幼虫の中から 70 時間後に耐性幼虫となった虫の割合を算出して行った。

2.5 寿命の測定

線虫の寿命の測定は Wolkow らの方法に従って行った (Wolkow et al., 2000)。15°C で L4 幼虫まで培養した線虫を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 5-fluorodeoxyuridine (FUdR) を含む NGM プレートに移し、大腸菌 OP50 株とともに 25.5°C で培養した。2 日おきに生死を判定し、生存率を測定した。線虫が白金線で軽く刺激を受けても応答しなくなった時点で死亡したとみなした。

2.6 高温耐性の測定

線虫の高温耐性の測定は Lithgow らの方法に従って行った (Lithgow et al., 1995)。15°Cで成虫まで培養した線虫を 35°Cに温めた NGM プレートに 10 匹から 40 匹程度移し、大腸菌 OP50 株とともに 35°Cで 12 時間培養してから生存率を測定した。自発運動、白金線による刺激に対する応答、咽頭運動のいずれも示さなかった線虫を死亡したとみなした。

2.7 変異体のスクリーニングと原因変異の同定

*casy-1(tm718)*変異体に対する突然変異原処理は、Brenner の方法に基づいて行った (Brenner, 1974)。10,000 匹程度の L4 幼虫を M9 バッファーで洗いとり、さらに M9 バッファーで 3 回洗った。この個体群を 50 mM のエチルメタンスルホン酸 (EMS) を含む M9 バッファー中で緩やかに回転攪拌 (4 時間・室温) した。この P0 (親) 世代を F2 (孫) 世代まで培養し、40,000 匹の線虫を 40 の独立な群に分けて化学走性アッセイを行い、飢餓を経験した塩濃度を忌避することができる抑圧変異体を選択した。6 ～8 世代にわたって培養と化学走性アッセイを繰り返すことで抑圧変異体を濃縮した後、各群から一匹ずつ単離してクローンを得た。なお P0 (親)・F1 (子) 世代の培養では、世代を同調させるために次亜塩素酸ナトリウム溶液でブリーチ処理することにより卵を回収して培地を新しいものに替えた。

抑圧変異体のスクリーニングの結果、独立の 3 ラインが得られた。このうちの 1 ラインについては親株の *casy-1(tm718)*変異体と戻し交配を行なっても孫世代で表現型が正常に分離しなかったため、原因変異の同定を見送った (データ不記載)。残りの 2 ラインについては抱卵数が増大する表現型 (Egl-d) が弱く見られ、この表現型と塩濃度忌避異常抑圧の表現型に強い連鎖が見られた (データ不記載) ことから、この Egl-d 表現型を指標にしてマッピングを行った。

抑圧変異体の原因変異のマッピングのために、N2 株由来の *casy-1(tm718)*変異体を CB4856 株で繰り返し掛け合わせを行い、II 番染色体中央の *casy-1(tm718)*付近を除く全てのゲノム領域の SNP が CB4856 型になった株を作製した。この株と抑圧変異体の間に存在する SNP を利用してマッピングを行った (Wicks et al., 2001)。

*pe407*変異は IV 番染色体左腕の約 3.5 cM (−27.07～−23.57) の領域にマッピング

され、サンガー法による配列決定により *daf-18* 遺伝子内の点変異と同定された。*pe408* 変異についてもサンガー法による配列決定により *daf-18* 遺伝子内の点変異と同定された。*daf-18* 遺伝子内に同定された変異を指標として、元株の *casy-1(tm718)* 変異体を用いて 6 回から 10 回戻し交配を行なっても、塩濃度忌避異常抑圧の表現型は維持された。また、ASER 神経に *daf-18(+)* 遺伝子を発現させることで、塩濃度忌避異常抑圧の表現型がいずれの抑圧変異体においても回復した（データ不記載）。これらの結果から、抑圧変異体の原因変異は確かに *daf-18* 遺伝子内の変異であると結論づけた。

2.8 酵母ツーハイブリッド法

酵母ツーハイブリッド法は、Matchmaker GAL4 Two-hybrid System 3 (Invitrogen) を用いて行った。CASY-1 の細胞内ドメイン（アミノ酸番号 872 から 984）について、野生型と WAWA 変異を持つコーディング領域をそれぞれ pGBKT7 の *NdeI/EcoRI* 部位にクローニングした。野生型 *klc-2a* と 452 番目のセリンに変異を導入した *klc-2a* については、pGADT7 の *NdeI/XhoI* 部位にクローニングした。アッセイはアデニンとヒスチジンを含まない選択培地において行った。

2.9 免疫沈降法

NGM プレートで培養した線虫を M9 バッファーで洗いとり、さらに 4 回 M9 バッファーで洗った。その後氷冷した IP 溶解バッファー（20 mM HEPES-NaOH [pH 7.4]、100 mM NaCl、10% glycerol、0.5% Triton X-100、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1× protease inhibitor cocktail [cOmplete Ultra EDTA-free; Roche]）で 2 回洗ってから -80°C のフリーザーで凍結させた。この線虫に 150 µl の IP 溶解バッファーと約 0.3 g のガラスビーズ（Sigma, G-8772）を加えてボルテックスにより破碎した（FastPrep FP100A instrument, Q-bio 101 を使用）。チューブの底に注射針で穴を開けて遠心することで新しいチューブに溶解物を回収し、さらに遠心して上清を得た。

得られた上清のうち 20 分の 1 を Input として保存し、残りを免疫沈降に供した。30 µl の抗 Myc タグ磁気ビーズ（MBL、clone PL14、M047-9）と 450 µl の IP 洗浄バッファー（20 mM HEPES-NaOH [pH 7.4]、100 mM NaCl、10% glycerol、0.1% Triton

X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1× protease inhibitor cocktail [cOmplete Ultra EDTA-free; Roche]) を各サンプルに加えて 4°C で 20 分間緩やかに回転攪拌し、IP 洗浄バッファーで 3 回洗浄した。この免疫沈降物を 10–20% グラディエントゲルを用いて SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜に転写してウェスタンブロットを行った。検出用の一次抗体として抗 Myc マウス抗体 9E10 (Santa Cruz、1000 倍希釈) もしくは抗 FLAG マウス抗体 M2 (Sigma、1000 倍希釈) を用いた。二次抗体としては Alexa Fluor 488 標識 抗マウス IgG ヤギ抗体 (Molecular Probes、5000 倍希釈) を使い、Typhoon FLA 9500 scan system (GE Healthcare) により蛍光シグナルを検出した。

2.10 感覚神経におけるシナプス放出の可視化

pHluorin (Miesenböck et al., 1998; Sankaranarayanan et al., 2000) によるシナプス放出の可視化は小田らの方法に従って行った (Oda et al., 2011)。ASER 神経に SNB-1::pHluorin を発現する株を NGM プレートで培養し、洗浄バッファーで 3 回洗ってから 50 mM NaCl を含む条件付けバッファー (50 mM 塩化ナトリウム、5 mM リン酸カリウム [pH 6.0]、1 mM 塩化カルシウム、1 mM 硫酸マグネシウム、0.05% ゼラチン、浸透圧はグリセロールで 350 mOsm に調整した) 中で 30 分間飢餓条件付けた。線虫は PDMS (polydimethylsiloxane) 製のチップ (Chronis et al., 2007) で生きたまま静止させた。蛍光画像の取得は TCS-SP5 共焦点顕微鏡 (Leica) で行い、対物レンズとして HCX PL APO 63×/1.30 (Leica) を用いた。PDMS 内の流路を切り替えることで線虫の鼻先に当てる溶液 (50 mM もしくは 25 mM 塩化ナトリウム、5 mM リン酸カリウム [pH 6.0]、1 mM 塩化カルシウム、1 mM 硫酸マグネシウム、浸透圧はグリセロールで 350 mOsm に調整した) を入れ替えて、50 mM から 25 mM に NaCl 濃度を低下させる刺激を与えた。NaCl 刺激を与える直前に、小胞内に含まれない SNB-1::pHluorin を光褪 (退) 色させるため、通常の 10 倍程度の強度で蛍光を励起する操作を行った。ASER 神経軸索の相対蛍光強度変化 (RFC) は以下の式で算出した。

$$\text{RFC} = [f(t) - f_p] / [f_i - f_p]$$

ここで、 f_i は光褪色前の蛍光強度、 f_p は光褪色直後の蛍光強度、 $f(t)$ は NaCl 刺激後の時

刻 t における蛍光強度である。

2.11 プラスミドの作製

2.11.1 概要

線虫に導入遺伝子を発現させるプラスミドは、細胞・組織特異的な発現を誘導するプロモーターの下流に人工イントロンと各遺伝子の cDNA を接続して作製した。ただし、Venus、mCherry、GFP といった蛍光タンパク質については、発現量を増加させるために 51 bp 程度の人工イントロンが複数挿入されている。終止コドンの下流には *unc-54* 遺伝子の 3'UTR 配列が付加されている。PCR を用いて作製した全てのプラスミドについて、コーディング領域の配列が正しいことをクローニング後のシーケンス解析により確かめた。

多くの発現ベクターは GATEWAY システム (Invitrogen) を用いて作製した。このシステムにおいては、線虫に発現させる遺伝子を pPD-DEST (pDEST) ベクターにクローニングし、様々な細胞特異的発現を可能にするプロモーター領域を pENTR ベクターにクローニングする。この 2 種類のベクター間で組換えを起こさせることにより、任意の遺伝子を特定の細胞で発現させるプラスミドを作製できる。その詳細は飯野雄一研究室のウェブページに記載されている。

http://molecular-ethology.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/Gateway/Gateway_overview1_jp.html

2.11.2 プロモーター配列を含むプラスミド

pENTR-Pgcy-5、pENTR-Punc-122 の各プラスミドは富岡征大博士によって作製された。pENTR-Pmyo-3 は田中寿子氏によって作製された。pENTR-Pcasy-1 は PCR で増幅した *casy-1* のプロモーター領域 (5.1 kb) を pENTR1A ベクターの *SalI*-*XhoI* 部位に挿入して作製した。

2.11.3 DAF-2 に関連するプラスミド

pBS-*daf-2a* と pBS-Pgcy-5::*daf-2a* は、木村幸太郎博士より譲り受けた pKDK33

(*daf-2a* cDNA を含むプラスミド) をもとに富岡征大博士によって作製された。
pBS-*daf-2b/c/d/e* と pBS-Pgcy-5::*daf-2b/c/d/e*、pBS-Pdpy-30::*daf-2a/b/c/d/e*、
pBS-Pgcy-5::*daf-2a/c::venus* は加藤紳也氏によって作製された。

pBS-Pgcy-5::*daf-2a/c::CICD* は CASY-1 の細胞内ドメイン (アミノ酸番号 872 から 984) をコードする cDNA 断片を pBS-Pgcy-5::*daf-2a/c* の終止コドンの直前に挿入して作製した。pDEST-SP::*flag::exon11.5* は *daf-2* のエクソン 11.5 付近の配列 (DAF-2c のアミノ酸番号 919 から 1006 をコードする部分) の上流に細胞外に分泌させるためのシグナル配列と FLAG タグをコードする断片を付加して作製した。

2.11.4 CASY-1 に関連するプラスミド

pDEST-*casy-1* は小原雄治博士より譲り受けた cDNA クローンをもとに、池田大祐博士によって作製された。pDEST-*casy-1*(ΔLG)、pDEST-*casy-1*($\Delta Cads$)、pDEST-*casy-1*(ΔTM)、pDEST-*casy-1*(WAWA)、pDEST-*casy-1*(WAWA; $\Delta Cads$) は、pDEST-*casy-1* に欠失変異や点変異を導入して作製した。pDEST-SP::*Myc::casy-1* は pDEST-*casy-1* の N 末端シグナルペプチドをコードする配列の 6 塩基後に Myc タグをコードする配列を挿入して作製した。

2.11.5 KLC-2 に関連するプラスミド

pDEST-*klc-2a* は線虫の total cDNA から PCR で増幅した *klc-2* (a アイソフォーム) の cDNA を pPD-DEST2 ベクターの *KpnI-EcoRV* 部位に挿入して作製した。pDEST-*klc-2*(*S452A*) と pDEST-*klc-2*(*S452D*) は 452 番目のセリンがアラニンもしくはアスパラギン酸に置換されるように pDEST-*klc-2a* に変異を導入して作製した。

2.11.6 その他のプラスミド

pDEST-*mCherry* は線虫用に最適化された mCherry の cDNA (Karen Oegema 博士からの許可を得て Erik Jorgensen 博士から譲り受けたもの) を pPD-DEST ベクターの *KpnI-SacI* 部位に挿入して作製した。pDEST-*snb-1::pHluorin* は富岡征大博士により作製された。Plin-44::*gfp* プラスミドは石原健博士から頂いた。

2.12 形質転換株の作製

マイクロインジェクションによる生殖腺への外来遺伝子の導入は、Mello らの方法に基づいて行った (Mello et al., 1991)。各遺伝子発現プラスミドの濃度は 20–50 ng/μl とした。形質転換マーカーとして、*Pmyo-3::venus*、*Punc-122::mCherry*、*Plin-44p::gfp* のいずれかを 10–20 ng/μl の濃度で用いた。キャリアー DNA として pPD49.26 をともにインジェクションし、プラスミド DNA の合計濃度が 100 ng/μl となるようにした。

Pgcy-5::daf-2a/c::venus、*Pgcy-5::mCherry*、*Pcasy-1::SP::Myc::casy-1*、*Pcasy-1::SP::flag::exon11.5* の各導入遺伝子と共形質転換マーカーのゲノム DNA への挿入は、UV 照射 (400 μJ/cm²) もしくは γ 線照射により行った。導入遺伝子をゲノム DNA に挿入した形質転換株は、少なくとも 4 回戻し交配を行ってから用いた。

2.13 データの解析

統計処理は Prism v.5 (GraphPad software) を用いて行った。検定には両側 t 検定、Dunnett 検定、Tukey 検定、Bonferroni 検定、Log-rank (Mantel-Cox) 検定のいずれかを用いた。グラフ中のエラーバーは図 3B を除いて標準誤差 (SEM) を表す。

アミノ酸配列のアラインメントは Clustal Omega プログラム (Sievers et al., 2011) を用いて行った。

第3章 線虫の塩走性学習

3.1 線虫は塩濃度と餌の有無を関連づける連合学習を行う

前述したように、通常の条件で培養した線虫は、塩を殆ど含まない寒天プレート上で NaCl に誘引される (Bargmann and Horvitz, 1991; Ward, 1973)。しかし、10~100 mM 程度の NaCl を含む寒天プレート上もしくは液体バッファー中で飢餓を経験することにより、線虫は NaCl を忌避するように学習する (Jansen et al., 2002; Saeki et al., 2001; Tomioka et al., 2006)。この飢餓と塩を関連づける塩走性学習において、線虫は塩の「有無」を認識し、塩の存在を忌避するようになると考えられてきた。しかし、野生の線虫が生息する土壤中において水溶性イオンが消失することは考えにくく、むしろ連続的に変化する「塩濃度」に対して適切な応答行動をとった方が合理的であるように思われる。

そこで線虫の塩濃度に対する嗜好性を詳細に解析するため、新しいアッセイ系を開発した。このアッセイ系では、横 5.6 cm × 縦 3.8 cm の寒天プレートの全体にわたって NaCl 濃度勾配を形成させたアッセイプレートを作製し、この上で線虫がどの NaCl 濃度領域に誘引されるかを調べる。アッセイプレート上の塩濃度勾配は、50 mM の NaCl 濃度を含むプレートの左右両端に NaCl 濃度の異なる寒天片 (0 mM、100 mM) を静置することによって形成させた (図 3A)。アッセイプレートの位置ごとに塩化物イオン濃度を測定し、プレートの中央を約 50 mM とする、約 20 mM から 80 mM までの急激な塩濃度勾配が形成されていることを確かめた (図 3B)。

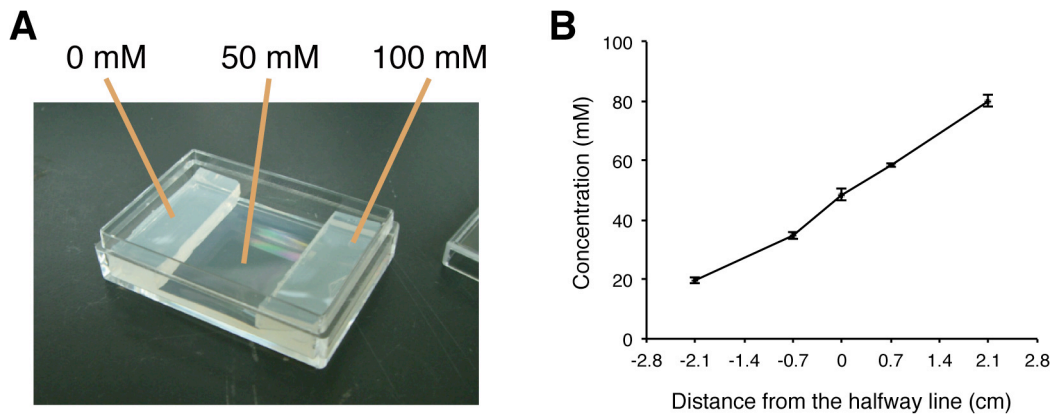


図3 塩濃度嗜好性アッセイプレートの作製

(A) アッセイプレートにおける塩濃度勾配の形成法。50 mM の NaCl を含む寒天プレートの両側に 0 mM、100 mM の NaCl を含む寒天片を置き、20～24 時間静置する。両側の寒天片はアッセイの 15 分前に取り除く。

(B) イオン電極法を用いて測定したアッセイプレート上の塩化物イオン濃度の勾配。エラーバーは標準偏差 (SD) を表す。

この行動アッセイプレートを用い、様々な NaCl 濃度 (0 mM、50 mM、100 mM) で 4 時間の餌もしくは飢餓を経験した線虫がどの塩濃度領域を好むかを解析した(図 4A)。その結果、「餌を与えられた野生型線虫は経験した濃度に近い NaCl 濃度領域へと誘引され、逆に飢餓を強いられた野生型線虫は経験した NaCl 濃度を忌避するように移動する」という傾向が明らかとなった (図 4B)。この行動可塑性は、外界の塩濃度を条件刺激 (CS: conditioned stimulus)、餌もしくは飢餓を無条件刺激 (US: unconditioned stimulus) とする連合学習として捉えることができる。

この生物学的特性が他の種にも保存されているかを確かめるため、*C. elegans* とは異なる土壌性線虫についても塩濃度の嗜好性を解析した。インドのアーメダバードで単離された *Caenorhabditis briggsae* の野生株 (Gupta et al., 2007) では、餌を経験した塩濃度への誘引が見られず、高塩濃度領域へと移動する傾向があった。しかしながら飢餓を経験した場合は *C. elegans* と同様に条件付けされた塩濃度の忌避が見られた(図 4C)。

また、アメリカ合衆国のカリフォルニアで単離された *Pristioncus pacificus* の野生株 (Dieterich et al., 2006) では、直前に餌を経験した際は運動性の欠損が見られ塩濃度嗜好性を解析することが出来なかったが、やはり *C. elegans* と同様に、飢餓とともに経験した塩濃度を忌避した (図 4D)。これらの結果は、飢餓と塩濃度を関連づけるこの学習様行動が多くの土壌性線虫にとって進化的意義を有した可能性を示唆する。

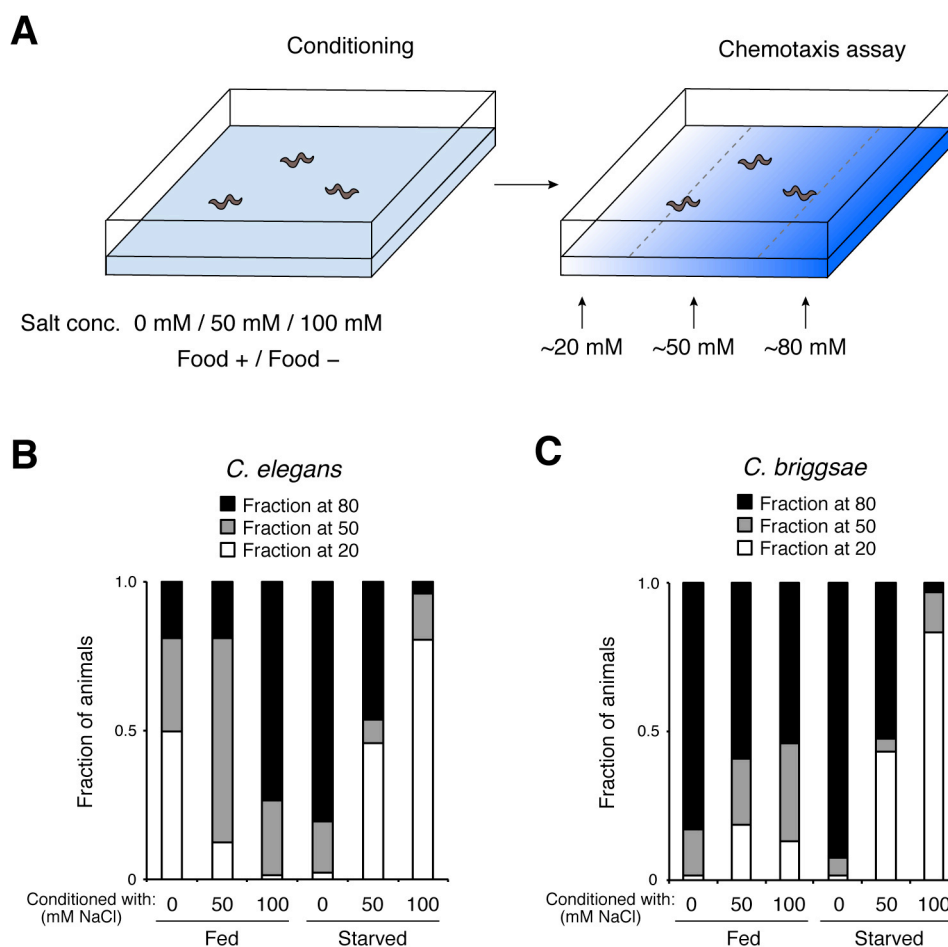
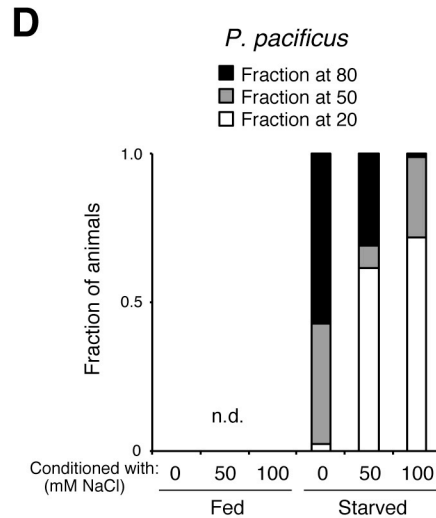


図 4 線虫は外界の塩濃度を記憶し、餌の有無に応じて塩濃度に対する嗜好性を変化させる

(A) 塩濃度嗜好性評価試験の概要。餌もしくは飢餓とともに様々な NaCl 濃度で条件づけした後、NaCl 濃度勾配が形成されたアッセイプレートに線虫を移した。

(B) 野生型 *C. elegans* (N2 株) の塩濃度嗜好性。各塩濃度領域に移動した線虫の割合を示した。n ≥ 225 個体。

(C) 野生型 *C. briggsae* (AF16 株) の塩濃度嗜好性。n ≥ 59 個体。



(D) 野生型 *P. pacificus* (PS312 株) の塩濃度嗜好性。n ≥ 61 個体。n.d.は未測定 (not determined) であることを示す。

この行動戦略の基盤となるメカニズムを解明するために、線虫が①どのように外界の塩濃度を感知・記憶しているのか、また②どのように餌の有無に応じて塩濃度に対する嗜好性を逆転させているのかという二点が重要な問題となる。本研究では後者の、餌の有無に応じて塩濃度嗜好性を切り替える機構に焦点をあてて分子遺伝学的な解析を行った。

3.2 ASER 感覚神経が塩濃度嗜好性の調節に必須である

塩濃度嗜好性の変化を司る感覚神経を同定するため、感覚神経の機能に欠損を持つ変異株を用いて解析を行った。

前述したように、水溶性化学物質を感知する代表的な神経である ASE 神経は、左の ASEL 神経と右の ASER 神経からなる (Suzuki et al., 2008; White et al., 1986)。ヒトの Caspase-3 の改変体 (Chelur and Chalfie, 2007) を左右の ASE 神経でそれぞれ発現させて細胞死を誘導した株 (Ortiz et al., 2009) の塩走性行動を解析すると、ASEL 神経が細胞死を起こした株では顕著な異常は見られなかったが、ASER 神経が細胞死を起こした株では塩濃度嗜好性の可塑性が消失する異常が見られた (図 5A)。

また、ASE 神経の分化に関わる Zn フィンガータンパク質をコードする *che-1* の変異体 (Uchida et al., 2003) や ASER 神経のみで発現する受容体型グアニル酸シクラーゼをコードする *gcy-22* の変異体 (Ortiz et al., 2009) でも塩濃度嗜好性の可塑性に異常が見られた (図 5B、C、D)。これらの結果から、ASER 神経が塩濃度嗜好性の制御に必須の役割を担うことが示唆された。

dyf-11 は感覚繊毛の形成に必要な MIP-T3 オーソログをコードし、その変異体は水溶性化学物質への応答に異常を示す (Kunitomo and Iino, 2007)。塩濃度嗜好性の調節において ASER 神経以外の感覚神経が塩を受容する必要性の有無を調べるため、*dyf-11* 変異体に細胞特異的に *dyf-11(+)* を発現させた株、すなわち化学感覚神経のうち特定の感覚神経のみへの感覚入力を回復させた株の学習能を調べた。その結果、ASER 神経のみで感覚繊毛を回復させた株でも飢餓条件づけ後の経験塩濃度からの忌避が見られ (図 5E)、この行動については ASER 神経への感覚入力のみである程度の十分性が得られることが示唆された。一方で餌を経験した塩濃度への誘引行動については ASER 神経のみで感覚繊毛を回復させた株では表現型の回復が見られず (図 5E)、ASER 神経以外の感覚神経が機能する可能性がある。

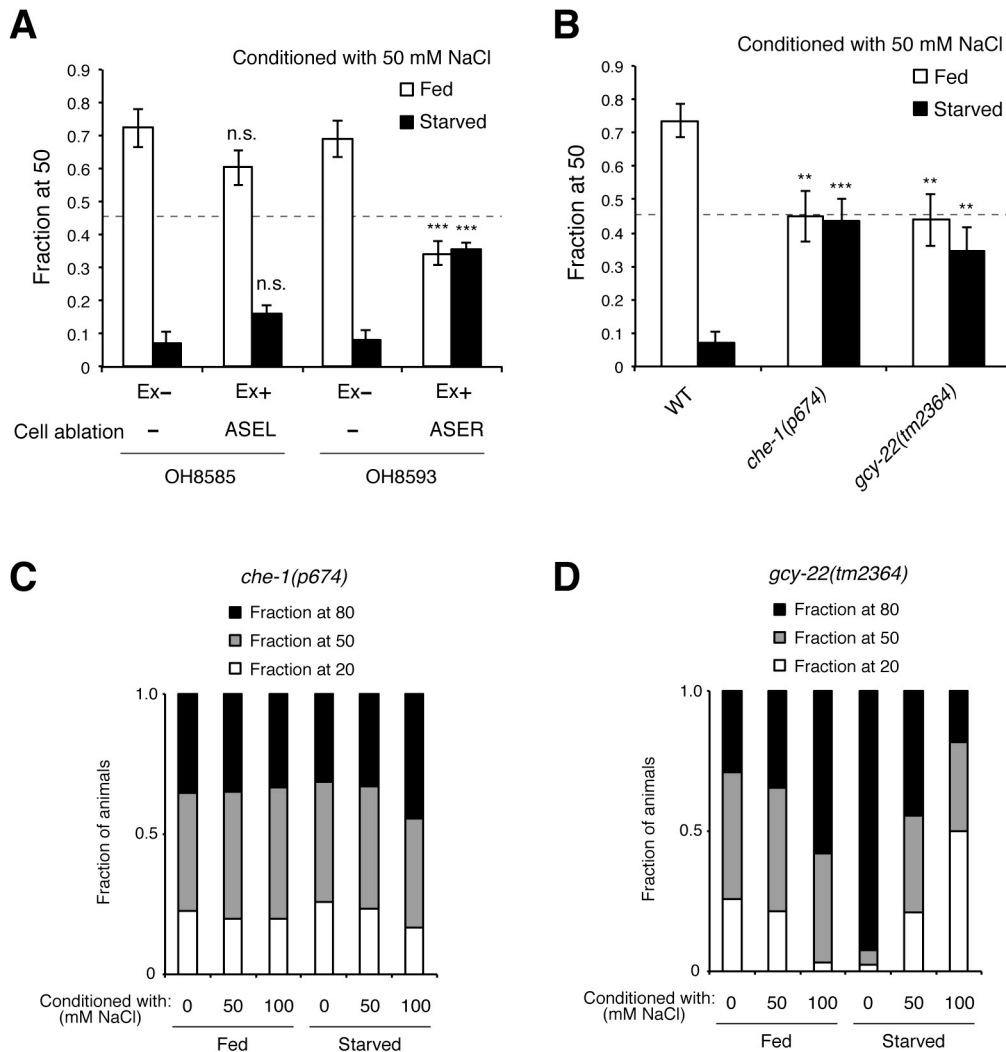
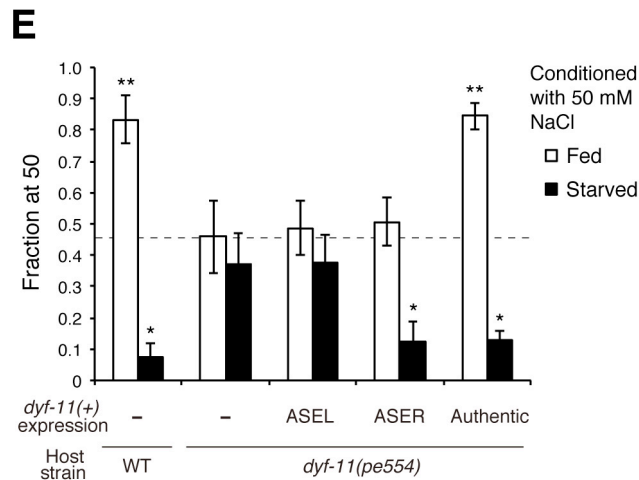


図5 ASER 神経の機能が塩濃度嗜好性の逆転に必須である

(A) OH8585 株 (ASEL が消失する) と OH8593 株 (ASER が消失する) において、50 mM の NaCl で条件付けした後に約 50 mM の NaCl を含む領域への嗜好性を調べた。「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。n = 21 アッセイ。***p < 0.001 (Ex-との比較、Tukey 検定)。n.s.は有意差がない (not significant) ことを示す (以降の図においても同様)。点線は、NaCl 濃度勾配のないアッセイプレートにおける、50 mM NaCl と餌で条件付けされた野生型株の結果を示す (0.45 ± 0.03 , n = 14、以降の図においても同様)。エラーバーは標準誤差 (SEM) を表す (以降の図においても同様)。

(B) *che-1* 変異体と *gcy-22* 変異体において、50 mM の NaCl で条件付けした後に約 50 mM の NaCl を含む領域への嗜好性を調べた。n = 12 アッセイ。***p < 0.001、**p < 0.01 (Dunnett 検定)。

(C)、(D) *che-1* 変異体と *gcy-22* 変異体に対する塩濃度嗜好性アッセイの結果。n ≥ 30 個体。



(E) *dyf-11* の細胞特異的レスキュー株の塩濃度嗜好性。n ≥ 11 アッセイ。**p < 0.01、*p < 0.05 (形質転換マーカ以外の導入遺伝子を持たない *dyf-11* 変異体 (-) との比較、Dunnett 検定)。

3.3 塩濃度嗜好性の調節に関わる分子基盤

前述したように、生体アミンの一種であるセロトニン (5-HT) とオクトパミンは、咽頭運動や産卵、温度走性などにおいてそれぞれ餌と飢餓のシグナルを伝達すると考えられている (Alkema et al., 2005; Colbert and Bargmann, 1997; Mohri et al., 2004; Nuttley et al., 2002; Zhang et al., 2005)。野生型線虫の塩濃度嗜好性アッセイにおいて、3 mg/ml (8 mM) のセロトニンを含むプレートで飢餓を経験させると、経験塩濃度からの忌避が弱まった (図 6A)。また、2 mg/ml (11 mM) のオクトパミンを含むプレートで餌を経験させると経験塩濃度への誘引が弱まった (図 6B)。これらの結果から、塩濃度嗜好性の調節においてもセロトニンやオクトパミンが餌や飢餓のシグナルを伝達することが示唆される。しかしながら、セロトニンやオクトパミンの合成に欠損を示す変異体では顕著な塩走性の異常は観察されず (データ不記載)、複数のシグナルが冗長的に餌/飢餓シグナルを伝達するといった複雑な制御が行われている可能性がある。

また、耐性幼虫形成を促進するシグナルを伝達すると考えられている分泌タンパク質をコードする *hen-1* の変異体は、飢餓を経験した塩濃度からの忌避が弱まる表現型を示した (図 6C)。生体アミンや HEN-1 はいずれも細胞外に分泌されて働くと考えられ、塩走性を制御する神経を含む細胞群にこれらのホルモン様シグナルが餌/飢餓シグナル

を伝達する可能性が考えられる。

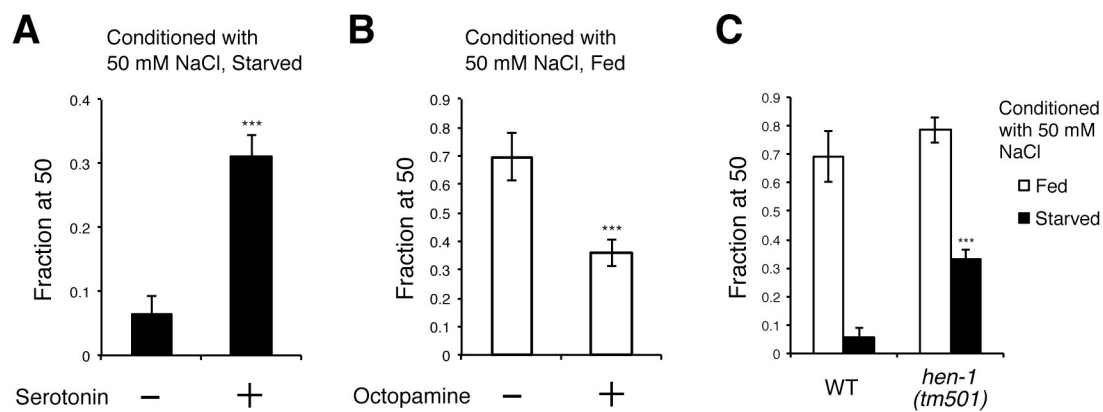


図6 分泌性のシグナルが餌の有無に応じた塩濃度嗜好性の調節に関わる

(A) 3 mg/ml のセロトニンを添加して飢餓条件付けを行った際の野生型線虫の塩濃度嗜好性。n ≥ 14 アッセイ。***p < 0.001 (両側 t 検定)。

(B) 2 mg/ml のオクトパミンを添加して餌条件付けを行った際の野生型線虫の塩濃度嗜好性。n ≥ 14 アッセイ。***p < 0.001 (両側 t 検定)。

(C) *hen-1(tm501)*変異体の塩濃度嗜好性。n ≥ 12 アッセイ。***p < 0.001 (両側 t 検定)。

第4章 インシュリン受容体新奇アイソフォーム DAF-2c の解析

4.1 インシュリン/PI3K 経路が飢餓を経験した塩濃度からの忌避に必須である

ASER 神経におけるインシュリン/PI3K 経路は、塩走性の可塑性を制御することが報告されている (Tomioaka et al., 2006)。インシュリン/PI3K 経路の構成因子の変異体について塩濃度嗜好性を解析すると、インシュリンペプチド *ins-1*、インシュリン/IGF-1 受容体 *daf-2*、PI3-キナーゼ *age-1*、ホスホイノシチド依存性キナーゼ *pdh-1*、Akt/PKB キナーゼ *akt-1* の変異体では、餌とともに経験した塩濃度への誘引が正常な一方で、飢餓とともに経験した塩濃度からの忌避が弱まることがわかった (図 7A-E)。

インシュリン/PI3K 経路は、耐性幼虫形成や寿命、ストレス応答など多くの現象を制御しており (Kenyon et al., 1993; Kimura et al., 1997; Lithgow et al., 1995)、これらの制御においては主に FOXO ファミリー転写因子の DAF-16 がインシュリン/PI3K 経路の標的因子として機能する (Kwon et al., 2010)。しかし、*daf-16(mgDf47)*変異は *daf-2(e1370)*変異体や *akt-1(ok525)*変異体の塩濃度忌避異常を抑圧せず (図 7F)、DAF-16 とは異なる因子がインシュリン/PI3K 経路の下流で機能することが示唆された。また、DAF-2 は線虫に存在する唯一のインシュリン/IGF-1 受容体であるが、そのリガンドとして、異なる機能を有することがわかっているペプチド群を含む 40 種類のインシュリン様ペプチドが予測されている (Cornils et al., 2011; Pierce et al., 2001)。以上のことから、DAF-2 は多様なリガンドがコードするシグナルを複数の下流因子に伝えるシグナル伝達因子として機能すると考えられる。

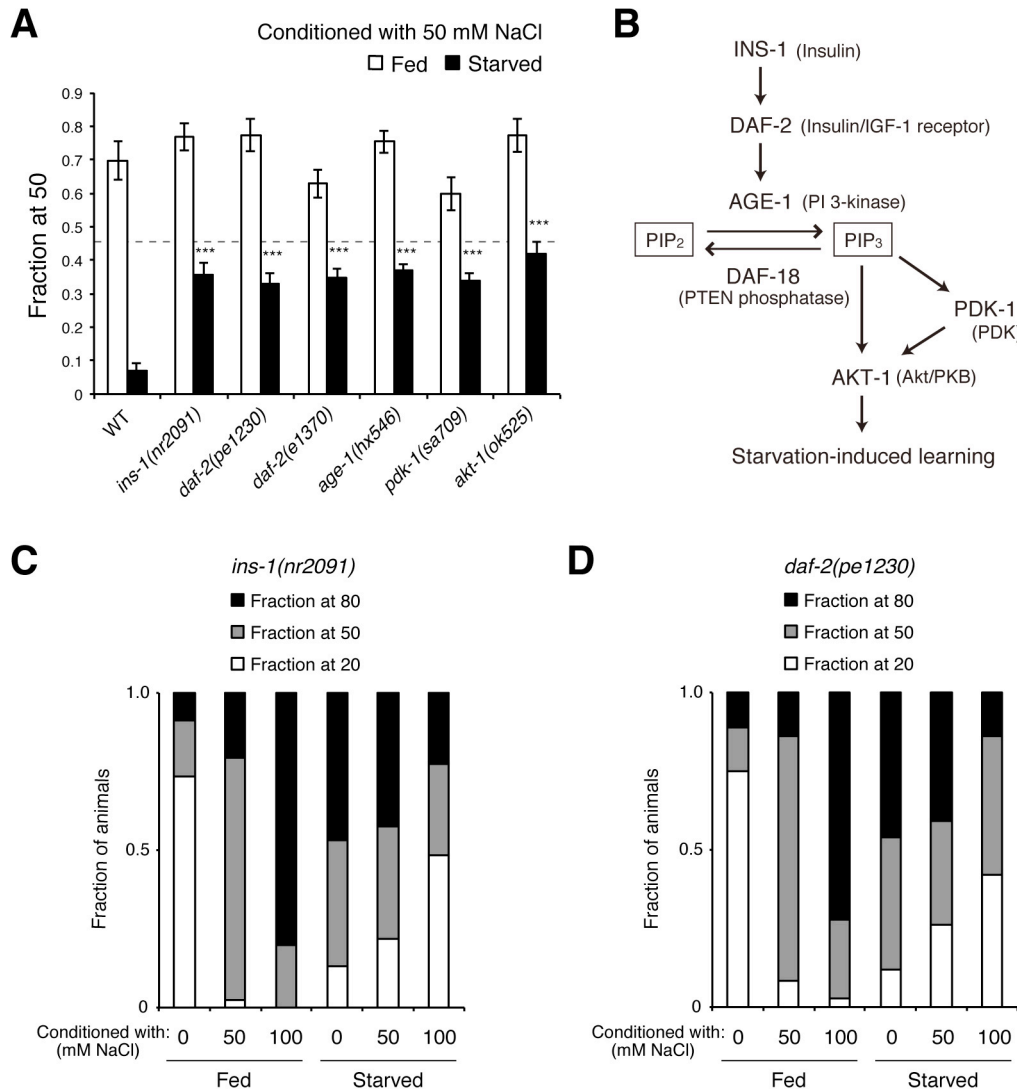
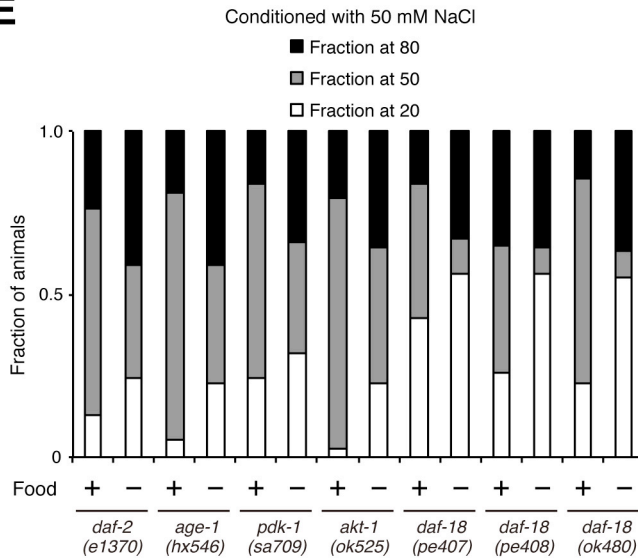
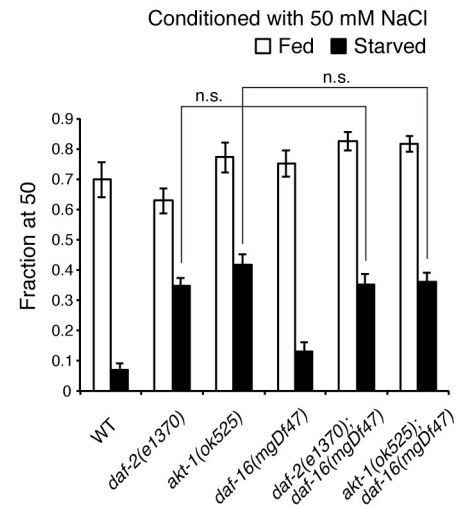


図7 インシュリン/PI3K 経路が飢餓とともに経験した塩濃度からの忌避に必要である

(A) インシュリン/PI3K 経路の構成因子の変異体を 50 mM の NaCl で条件付けした際の、50 mM 付近の NaCl 濃度領域に対する嗜好性。n ≥ 14 アッセイ。***p < 0.001 (Dunnett 検定)。

(B) 塩走性を制御するインシュリン/PI3K 経路のモデル図。PIP₂ はホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸、PIP₃ はホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸、PDK はホスファチジルイノシトール依存性キナーゼ、PKB はプロテインキナーゼ B を表す。

(C)、(D) *ins-1(nr2091)* 変異体、*daf-2(pe1230)* 変異体に対する塩濃度嗜好性アッセイの結果。n ≥ 36 個体。

E**F**

(E) *daf-2(e1370)*、*age-1(hx546)*、*pdk-1(sa709)*、*akt-1(ok525)*、*daf-18(pe407)*、*daf-18(pe408)*、*daf-18(ok480)* の各変異体に対する塩濃度嗜好性アッセイの結果。n ≥ 70 個体。

(F) *daf-2(e1370)*、*akt-1(ok525)*、*daf-16(mgDf47)*、*daf-2(e1370); daf-16(mgDf47)*、*akt-1(ok525); daf-16(mgDf47)* の各変異体において 50 mM の NaCl で条件付けした際の、50 mM 付近の NaCl 濃度領域に対する嗜好性。n ≥ 14 アッセイ。Tukey 検定による。

4.2 DAF-2c が飢餓を経験した塩濃度からの忌避を制御する

上記のように単一の *daf-2* 遺伝子が多様な機能を発揮する機構として、異なる機能を有する複数のアイソフォームが存在する可能性が考えられる。特に選択的スプライシングは、一つの遺伝子に複数の遺伝子産物を生じさせる主要なメカニズムである。DAF-2 には 2 種類のアイソフォーム *daf-2a*、*daf-2b* が知られていた (図 8A) が、これらのアイソフォームの cDNA を *daf-2* 変異体に導入しても塩濃度忌避異常の表現型は回復しなかった (図 8E)。最近になって加藤紳也氏は RT-PCR 法による DAF-2 アイソフォームの探索を行い、新奇アイソフォームとして *daf-2c*、*daf-2d*、*daf-2e* を同定した (図 8A)。*daf-2c* と *daf-2e* は、*daf-2a* のエクソン 11 とエクソン 12 の間に 246 bp からなる一つの選択的エクソン (以降、エクソン 11.5 と呼ぶ) が挿入されるスプライシングパターンを示す (図 8A、8B)。DAF-2 や他のインシュリン受容体ホモログはフリンプロテアーゼによって α 鎖と β 鎖に切断され α - β - β - α 四量体を構成すると考えられて

いるが (Bravo et al., 1994; Kimura et al., 1997; Patel et al., 2008; Robertson et al., 1993)、DAF-2c ではエクソン 11.5 がコードする 82 アミノ酸からなる断片が α 鎖の C 末端から 3 アミノ酸だけ前に挿入され、細胞外に露出するように位置することが予測される (図 8C、D; Patel et al., 2008)。*daf-2d* と *daf-2e* では、3' 端のエクソンが 3 つ欠失し、*daf-2a* の 14 番目のエクソンにあたるエクソンの伸長が見られる (図 8A)。このスプライシングパターンにより、C 末端に存在する IRS-1 (insulin receptor substrate-1) 様ドメイン (Kimura et al., 1997) を失ったアイソフォームとして DAF-2d と DAF-2e が産生されると予測される。

塩濃度嗜好性の制御におけるこれらのアイソフォームの機能を解析するため、変異体に各アイソフォームの cDNA を発現させるレスキュー実験を行った。その結果、ASER 神経で DAF-2c アイソフォームを発現させた形質転換株では *daf-2* 変異体の塩濃度忌避異常が回復することが明らかとなった (図 8E)。一方で他の 4 種類のアイソフォーム (DAF-2a、DAF-2b、DAF-2d、DAF-2e) の発現では *daf-2* 変異体の塩濃度忌避異常が回復せず (図 8E)、DAF-2c は塩走性の制御において他のアイソフォームには見られない特有の機能を持つことが示唆された。

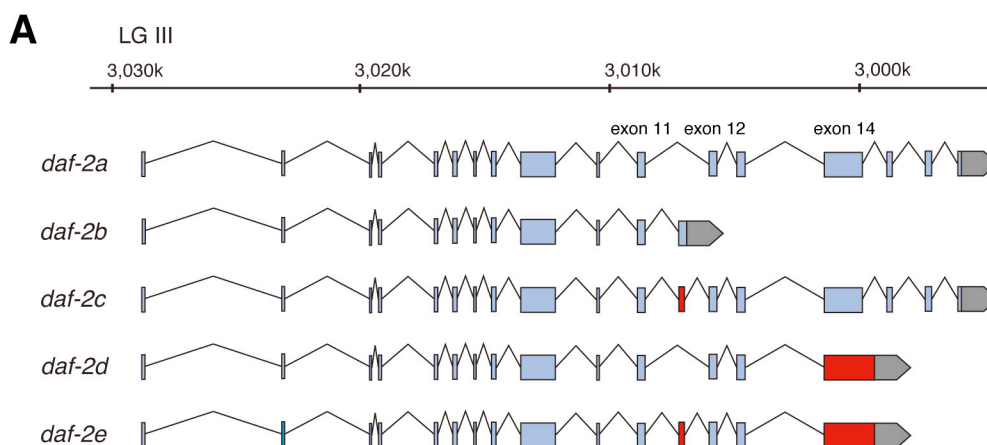
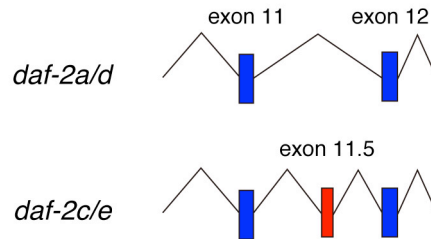


図8 インシュリン受容体新奇アイソフォーム DAF-2c が塩走性の可塑性を制御する

(A) *daf-2* アイソフォームの構造。新奇エクソンを赤、3'UTR を灰色で表した。III 番染色体上の位置を上部に示した。

B



```

III 3009012 ggaaaaacaagcaagataaaatggcgctgaaacttgtcgccctgggccatggcctagaaaccacttttctcgtccct
III 3008932 cgtgaggaaaaaggtgcagtttctcagcacaattgtgtgtctctccagCAAGCACCCCGCAATCGACAACACAGAAA
III 3008852 GATCCGAAGAGACGATTGTAGCCGATAAGCCAGTCGATATTCGTCATCAGCTACCGTAGCTCCGACACTTTTGACTAT
III 3008772 GATGGGTCACGAAGATCAGCAGAAAACGTGCGCTGCAACGCCCGGTTGTTGTTCTGTTTCGGCTATCGAAGAATCATCGG
III 3008692 AACAGAACAGAAGAAGCGACCGGATCCGATGTCGGCGATCGAATCATCTGCATTTGAGAATAAGCTGTTGGATGAGGTT
III 3008612 TTAATGCCGAGgtatgtactggaattacgggattctggaataaaaaataagatgaatgatataactttctgaaagcttct
III 3008532 tggtaggcagggtctcagagcctggcgctgacctgaaacctgcgcgctcttttttgccttttctagatgaattaaaaaa
III 3008452 aagaaattttctcatttctatcaatttgatgaaatcacaaatttttagcaaatgggtggcacaataatgagggcaagcca
III 3008372 ggcgaaagtgcgcttcagggtcaggcagaggcaggcgcttctgatggaagccctagtcgtaggggaagtataaggatttta
III 3008292 attctgcaatttaatttcgctcgaaaaatttaattgcaaaaaaaaagtggcgaatggagtgcagtggttcccttccacctt
III 3008212 atgatttgattagatttgaactgatttttttttctgcggttattttttctgttttcccccgtagatcacccgtccctcc
III 3008132 acttctctctccagtcctctatcactttttatataatgaatgtgcttttttgatgggaaatttggttttttgcgcgct
III 3008052 tttttgggatttttttaaatagatttttcaaaaaatagttctgaaaaaaaatgttcgaaaaaaaattttctgataact
III 3007972 tttttgtcaattgtggcgagattatataaatttgcaattttttcgacaaaatgggtttttgaatttttagcccaaaaacta
III 3007892 ccgaatttcataatggcggtgaaaaatttgcaaaaattggccgaatttttagctaaaatctattatctattgccgattt
III 3007812 gccggaagtccaattccggcaatttgccgaattaccgtaatttaaatccgacaatttgccgatttgccggaaatttta
III 3007732 aattccggcaatttgctaatttgcgtaaattagattacggcaatttcccgatttgccggaattttcaattatcaatt
III 3007652 ccggcaatttgctcatttaccggaatttcaattccggcgaaattgcctatttaccggaatttcaatttagcaatttg
III 3007572 ctaatttgccgtacatttgaattccggcaatttgctgatttgccggaatttcaattgtcaattccggcaatttgcccat
III 3007492 ttgcccgaatttcaattccggcgattttgcccatttgccgctgtgacacgaaaaagttggcaaaattggagattttacct
III 3007412 aaaaattccggcggttttttccattttttgtccattttgaatccaaaaagcagattttcaaaaaaaattccaaatttcc
III 3007332 ctctgaattcaactattcaattatgttttaatttgagtttttcgatgcttttcggcccccgcgccctctctcgtag
III 3007252 atctttgtctcccggttacatagaaaacgtacacagATCGACATAAAAAATGATCCTGTTGGATGTGCAATGCTTCTTC
III 3007172 TACCACCTGAAATGATGATTCTGATGTTGGTGATGACGATGAAGAGCCGGCGGAGGCAGTGAGCAACACACGCGATT
III 3007092 CTACGAAATTCGAGATTCTGAAACGGCAAAAACGTGAGATTGTTGGGGCGCAGCCTTGGTGGAAATTCATGGAATTCGATC
III 3007012 GATTGGACGGAAGAATATGAACAGTTTGTCTGATATGATTTTgtatggaaatttgcattgattgatgtctgtaattgc
III 3006932 atgattaggcgcaaatttgaatttttcaaaaaaaattcgaaatttttgcggacttgctctatttattagatttttagca
III 3006852 tattaaaaagtggaataatgaatttcaaaaattgttttcgagaatttaatttttaataattacagtacatattacattcga
III 3006772 aatactttttgtgtacgaaagttaattgattaaaaatttttagacatttttttagacatttctccttactatctgtttg
III 3006692 gaacactgaattctgagaatgcgtatttgacaacaaatttgacgcgcaaaaatctcgtagcgaaaactacagtaattc
III 3006612 ttgtaataactactgtacgcgtgtatttttgatgtgtacttgataatcgtgatgaaaaagtaattataaacgacat
III 3006532 gaatgagataataaattttgtgtcgattttacgggtacgatattcgaaaagaaaagaaattcatttcgaatatcgagccg
III 3006452 taaatcgacacaaaattttattctcattcattgctgttttaattattacttttttcgtcacaaataagtaacatacaata
III 3006372 cagcgctacagtagtcattactgtagttttcgctacgagatattttgcgcgtcaaatctgttgctcaaatatgcattct
III 3006292 cagaatttcgcttcccgtaataataaataagaacaattgtttataagtcgcacaaaatttgataaattgttttctcgaaa
III 3006212 aattccaatttcccttttccgactcttctctattctgcctatgcctgctccaagcctatttaacaattatctatatt
III 3006132 ttttttccggttctatcatttccagtggtgtttttgtaatttcaaaaaaaaagagagaatccttttttttaatttaa
III 3006052 tcaaaaaattgtgccatttttagAGACACGATGCGAGTGAGACGATCAATTGAAGACGCGAATCGAGTCAGTGAAGAGTT
III 3005972 GGAAAAAGCTGAAAAATTTGGGAAAAGCTCCAAAACTCTCGGTGGAAGAAGCCGCTGATCCATATTTGGAAGAAGAAGC
III 3005892 CGTCGAGCAGCAGCACCATCCACACCGGCTCCAACGATCGCATCAATGTATGCCTTAACAAGGAAACCGACTACGGTG
III 3005812 CCGGGAACAAGGATTCGGCTCTACGAGATCTACGAACCTTTACCCGGAAGCTGGGCGATTAAATGTATCAGCTCTGGCATT
III 3005732 GGATAATAGTTATGTGATACGAAATTTGAAGCATTACACACTTTATGCGgtgagtttttatatttcgaatttttgagatt
III 3005652 tttaatgtaattggaaaaaaagtatttttacaggtgggtaccgaaattcgagactttgcttttttagacccaaaatgg

```

(B) *daf-2c/e* に特異的なエクソン、イントロンの配列。エクソンの配列を青色もしくは赤色の大文字で表した。Ⅲ番染色体上の位置を左部に、エクソン 11.5 の選択的スプライシングの様式を上部に示した。

C

```

C. elegans      RPDPMSAIESSAFENKLLDEVLMPRCDIKNDFVGCAMLLLPPEIDSDSVGDDDEFPGG-
C. briggsae   TPD-----PDKSHGCDYDADPIGCAIRRRPMESEVFEHET-----PGED
C. remanei     PIDADATVETSSFENELMDTIIITPRCDIEKDPMGCVMSRAPEHENMSDDDEGNPDGD
C. brenneri    PPDHATVEQANFENTVMDTVLVQRCDIEKDPMGCTMGSRPPEQEIIHEEEDEDSTP--

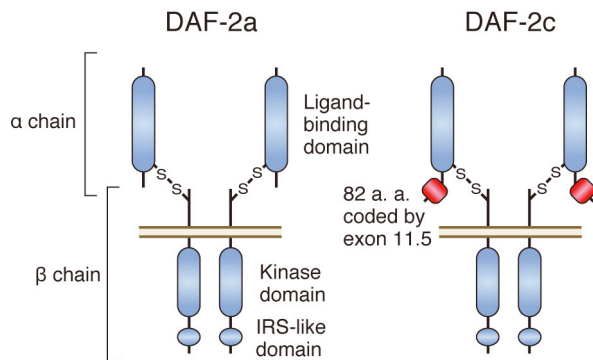
C. elegans      ---SEQQQRILRNSEILKRQKROILGR-SLGCGTHGIRS--IGRKEYEQFADMTLDTMRVR
C. briggsae   AEDVEEHLRVKRNTEALERRRQAILRGEEEGQSHAIRCADIDDEQYERFSALILANIREK
C. remanei     EDSEGQQLRMKRNAEAFERQRROLY----LDCNHAIRE--TSRRQYEQFTALISEIRSR
C. brenneri    -----SGPREEEAFRRHKRSIL-----MDDVHGLRA--TSRRQYDQFTALIDTLRSR

C. elegans      RSIEDANRVSEELEKAENLGKAPKT-LGGKKPLTHISKKKPSSSSSTTST-
C. briggsae   RSIONAKEQDEMLARKEKKFFKKSPETSQTDTPN-EKDQDIGKETTDEE
C. remanei     RSIRTIEEMDKOLEQNEKNRVSTSTVKPSKKPLIYVDTKKPKGTTTTT--
C. brenneri    RSIENANRVSKELEREEAKERKQOKKAP-PRKLVYKDKKTTPTTTTTTTT

```

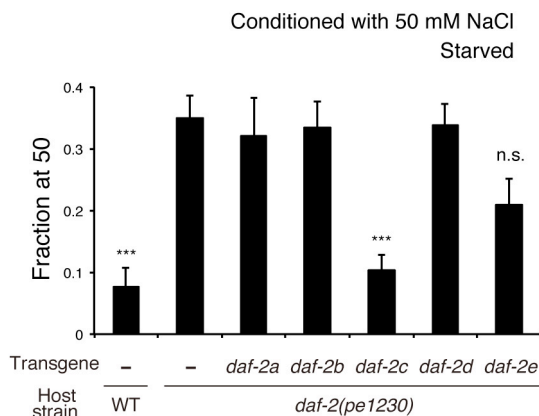
(C) *Caenorhabditis* 属の4種類の線虫のインシュリン/IGF-1 受容体について、*C. elegans* の *daf-2* のエクソン 11.5 にコードされる付近の配列の多重アラインメントを行った。*daf-2* のエクソン 11.5 にコードされる付近の配列は *Caenorhabditis* 属の線虫に保存されており、フリンプロテアーゼの認識部位、すなわち α 鎖の C 末端から 3 アミノ酸だけ前 (DAF-2a のアミノ酸番号 921 と 922 の間) に挿入されると予測される。同一のアミノ酸残基は黒で、類似したアミノ酸残基は灰色で表した。アミノ酸配列上部の赤線はエクソン 11.5 によりコードされる配列、青線はフリンプロテアーゼの認識部位 (RX[K/R]R) を示す。

D



(D) DAF-2a と DAF-2c の予測される構造の差異の模式図。エクソン 11.5 によりコードされる領域を赤で示した。S-S は α 鎖と β 鎖間のジスルフィド結合を表す。

E



(E) 各 *daf-2* アイソフォームを ASER 神経で発現する形質転換株の塩濃度嗜好性。導入遺伝子を ASER 神経で発現させるために *gcy-5* プロモーターを用いた。n \geq 20 アッセイ。***p < 0.001 (形質転換マーカーのみを持つ *daf-2* 変異体 (-) との比較、Dunnnett 検定)。

4.3 DAF-2c は寿命・発生・ストレス耐性の制御においても機能し得る

*daf-2(e1370)*変異体は、制限温度下で耐性幼虫に似た L3 幼虫となって発生を停止させる (Gems et al., 1998)。この表現型は DAF-2a もしくは DAF-2c を全身で発現させることにより回復した (図 9A)。しかし DAF-2d や DAF-2e の発現では表現型の回復は弱く、また β 鎖をすべて欠失する DAF-2b の発現では表現型の回復は全く見られなかった (図 9A)。

daf-2 変異体は成虫まで発生を完了させた場合、寿命が顕著に伸びる表現型を示す (Kenyon et al., 1993)。寿命の制御に関しても、耐性幼虫形成の場合と同様に DAF-2c を全身で発現させることで DAF-2a と同等の表現型の回復が見られた (図 9B、表 3)。やはり DAF-2d や DAF-2e の発現では表現型の回復は非常に弱く、DAF-2b の発現では効果は見られなかった (図 9B、表 3)。*daf-16* については複数のアイソフォームを同時に発現させることで寿命制御の効果が強まることがわかっているが (Kwon et al., 2010)、*daf-2* については複数のアイソフォームを共発現させても表現型の回復は強まらなかった (表 3)。

daf-2 変異体は上記の 2 つに加え、熱ストレスに対する耐性が強まる表現型を示す (Lithgow et al., 1995)。この表現型についても、DAF-2c の発現は DAF-2a の発現と同等の効果が見られた (図 9C)。他の 3 つのアイソフォーム (DAF-2b、DAF-2d、DAF-2e) の発現では表現型の回復は見られなかった (図 9C)。

以上の結果は、インシュリン/PI3K 経路が関与する多くの現象に DAF-2c が機能する可能性を示す。DAF-2b、DAF-2d、DAF-2e の各アイソフォームが何らかの生理的役割を果たす可能性は否定できないが、十分な機能を有することが確認された DAF-2a と DAF-2c に着目して以降の解析を行った。

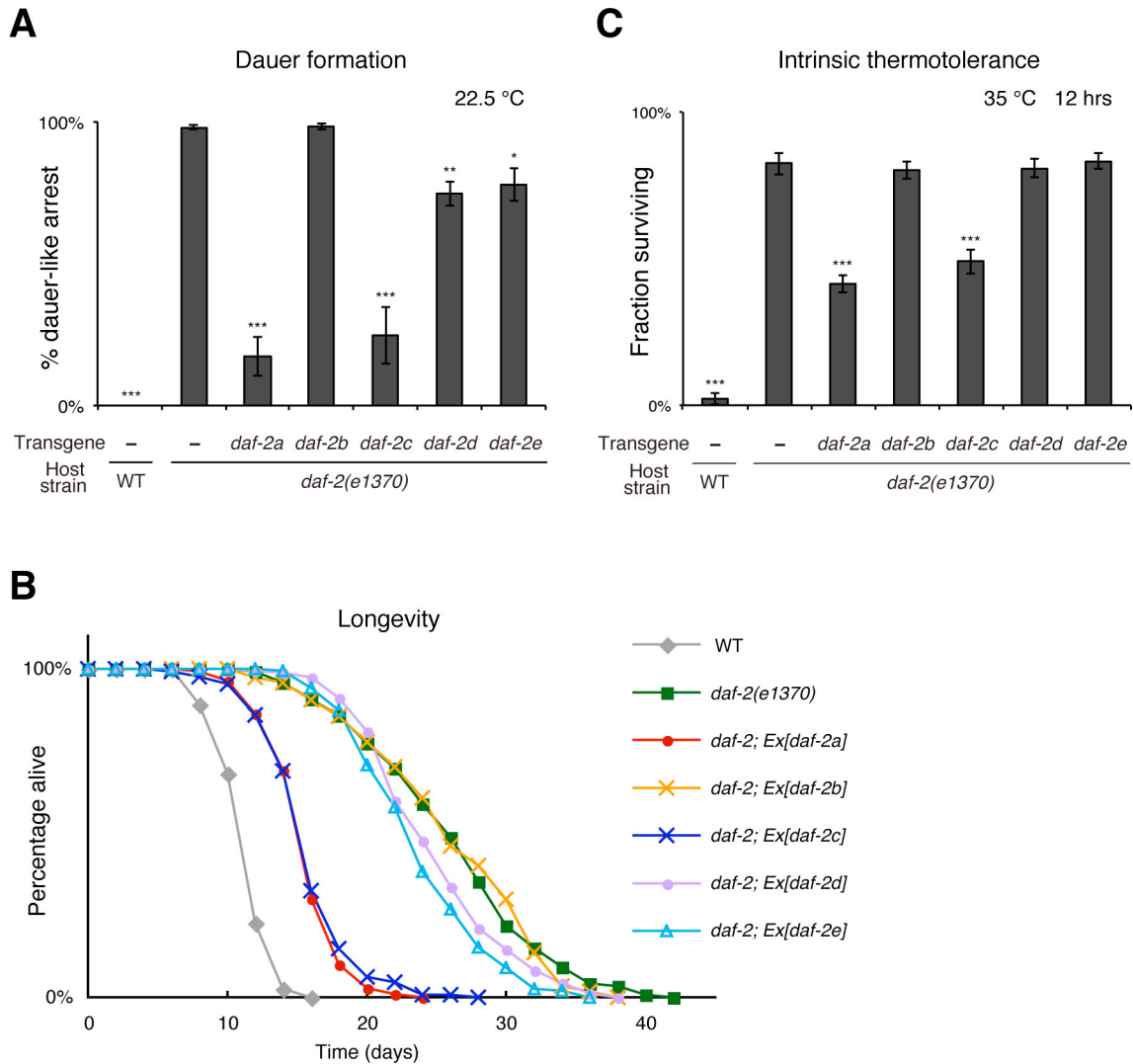


図9 DAF-2cは寿命・発生・ストレス耐性の制御においても機能する

- (A) 各 *daf-2* アイソフォームを全身で発現する形質転換株の耐性幼虫形成率。n = 4 アッセイ。***p < 0.001、**p < 0.01、*p < 0.05 (形質転換マーカーのみを持つ *daf-2* 変異体 (-) との比較、Dunnnett 検定)。
- (B) 各 *daf-2* アイソフォームを全身で発現する形質転換株の寿命。n ≥ 110 個体。
- (C) 各 *daf-2* アイソフォームを全身で発現する形質転換株の熱ストレス耐性。n ≥ 6 アッセイ。***p < 0.001 (形質転換マーカーのみを持つ *daf-2* 変異体 (-) との比較、Dunnnett 検定)。

表3 <i>daf-2</i> アイソフォーム発現株の寿命解析					
Background	Transgene	Mean LS \pm SEM (days)	Number of worms	% change versus control	P value versus control
N2	– (marker only)	11.6 \pm 0.2	119	–55.7	< 0.0001
<i>daf-2(e1370)</i>	– (marker only)	26.3 \pm 0.6	119	–	control
<i>daf-2(e1370)</i>	<i>daf-2a</i>	15.9 \pm 0.3	110	–39.6	< 0.0001
<i>daf-2(e1370)</i>	<i>daf-2b</i>	26.3 \pm 0.6	117	–0.2	0.7641
<i>daf-2(e1370)</i>	<i>daf-2c</i>	16.1 \pm 0.3	129	–38.7	< 0.0001
<i>daf-2(e1370)</i>	<i>daf-2d</i>	25.2 \pm 0.4	157	–4.4	0.0157
<i>daf-2(e1370)</i>	<i>daf-2e</i>	24.1 \pm 0.4	157	–8.6	< 0.0001
<i>daf-2(e1370)</i>	<i>daf-2a, daf-2c</i>	16.0 \pm 0.3	153	–39.2	< 0.0001
<i>daf-2(e1370)</i>	<i>daf-2a, daf-2c, daf-2d, daf-2e</i>	15.8 \pm 0.4	70	–39.9	< 0.0001

LS は寿命を表す。統計解析は Log-rank (Mantel-Cox) 検定による。

4.4 DAF-2c は飢餓に応答して ASER 神経の軸索に局在する

DAF-2a と DAF-2c の機能の差を生み出す原因として、例えば受容するリガンドの親和性が異なるといった質的な制御の差異、もしくは細胞内のある領域における存在量が異なるといった量的な制御の差異の 2 点が考えられる。後者の可能性を検討するため、DAF-2a と DAF-2c の C 末端に蛍光タンパク質 Venus を融合させたタンパク質を ASER 神経で発現する株でこれらのタンパク質の局在を調べた。ASER 神経は、頭部の先端に伸びる一本の神経突起（ここでは樹状突起と呼ぶ）と咽頭を囲むように伸びる一本の神経突起（ここでは軸索と呼ぶ）を有する（図 10A）。DAF-2a::Venus は主に ASER 神経の細胞体と樹状突起に局在した（図 10B）が、DAF-2c::Venus はこれらの領域に加えて、軸索の遠位側～中央付近の領域に強く局在した（図 10C、初期の解析は内藤泰樹氏らによって行われた）。DAF-2c は軸索において、各種のシナプスマーカー（一例と

して図 12D の SNB-1) のように点状に局在するのではなく、軸索に沿って均一に近い状態で局在していた (図 10C)。さらに、線虫に 1 時間程度の飢餓を経験させると、DAF-2a::Venus の局在に変化が見られない一方で DAF-2c::Venus の軸索局在が強まることがわかった (図 10D-G)。

ASER 神経の軸索は、シナプス伝達を含む様々な細胞間コミュニケーションが行われる神経環 (nerve ring) と呼ばれる部位に投射しており、軸索局在の差が DAF-2a/DAF-2c アイソフォーム間の機能の差を生み出している可能性が有力だと考えられた。

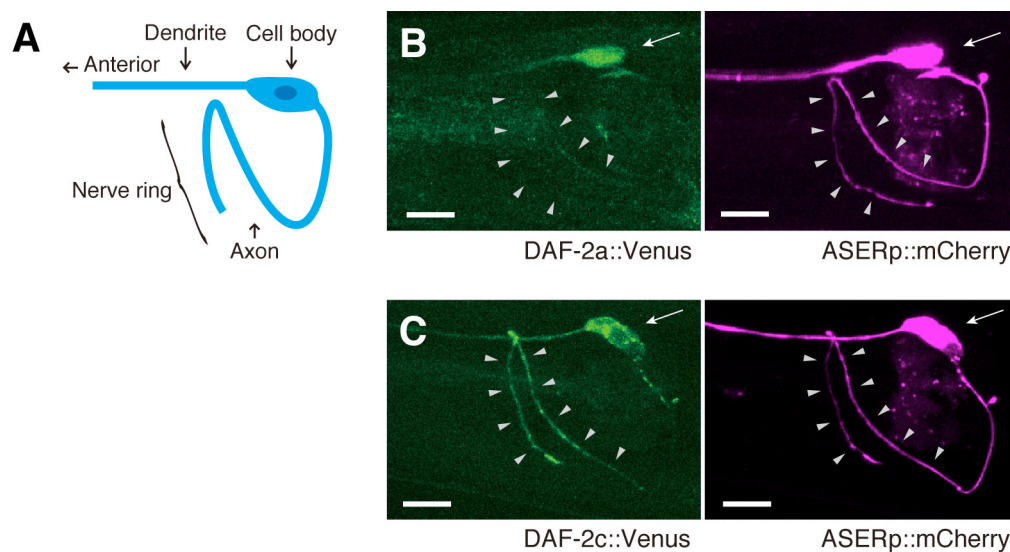
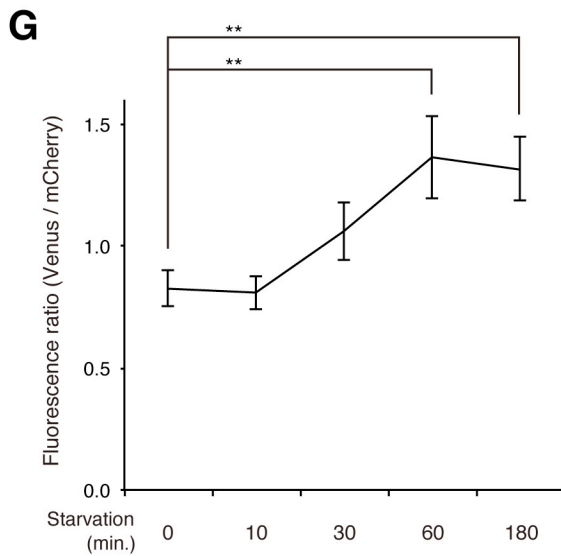
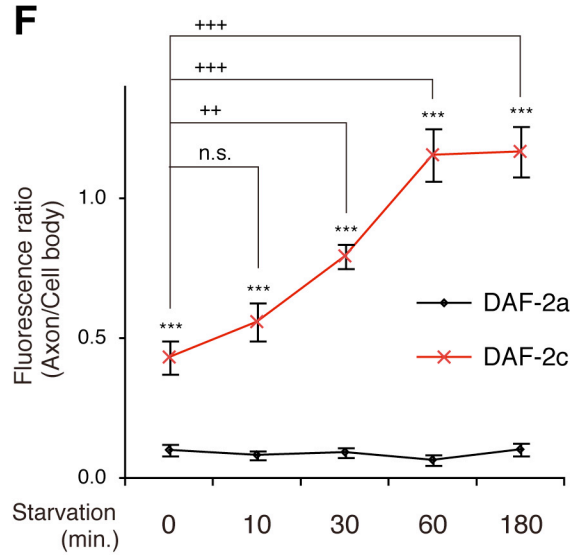
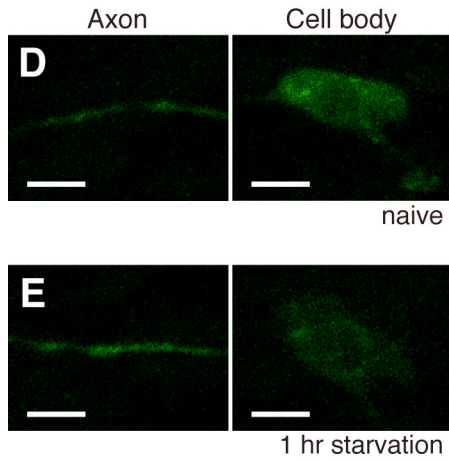


図 10 DAF-2c は飢餓に応答して ASER 神経の軸索に局在する

(A) ASER 神経の形態の模式図。ASER 神経は頭部前方に伸びる樹状突起 (dendrite) と神経環 (nerve ring) に伸びる軸索 (axon) を持つ。

(B)、(C) ASER 神経における DAF-2a::Venus (B) と DAF-2c::Venus (C) の細胞内局在。右のパネルは mCherry で標識した ASER 神経。矢印は細胞体、矢尻は軸索を表す。スケールバーは 10 μm。



(D)、(E) 飢餓条件付けされていない (naive) 線虫と 1 時間の飢餓を経験した線虫の ASER 神経における DAF-2c::Venus の局在。スケールバーは 5 μm。

(F) 0～3 時間の飢餓を経験した線虫の ASER 神経における DAF-2a/c::Venus の軸索局在を、軸索と細胞体の蛍光量の比で表した。各条件について $n \geq 16$ 個体。アイソフォーム間の比較については*** $p < 0.001$ (Bonferroni 検定)、各時刻の比較については*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ (時刻 0 との比較、Dunnett 検定)。

(G) DAF-2c との融合タンパクとして発現させた Venus と単独で発現させた mCherry (コントロール) の蛍光量の比で表した、DAF-2c::Venus の軸索局在の変化。0 から 3 時間の飢餓を経験した線虫の ASER 神経軸索で測定した。各条件について $n \geq 16$ 個体。** $p < 0.01$ (時刻 0 との比較、Dunnett 検定)。

第5章 カルシンテニンホモログ CASY-1 の解析

5.1 *casy-1* はインシュリン/PI3K 経路と遺伝学的に相互作用する

カルシンテニンホモログ *casy-1* は塩走性の可塑性を始めとする複数の行動可塑性と感覚統合に関わることが報告されている (Hoerndli et al., 2009; Ikeda et al., 2008)。*casy-1* 変異体はインシュリン/PI3K 経路の変異体と同様に、餌とともに経験した塩濃度への誘引行動は正常だったが、飢餓を経験した塩濃度からの忌避に異常を示した (図 11A、B)。*casy-1* プロモーターは神経系を中心に広く発現を誘導するが (図 11C; Ikeda et al., 2008)、*casy-1(+)* を ASER 神経で発現させることで塩濃度忌避異常の回復が見られ、この行動については CASY-1 がインシュリン/PI3K 経路と同様に ASER 神経内で機能する可能性が示唆された (図 14C)。

casy-1 の機能を明らかにするため、*casy-1* 変異体に対してサプレッサースクリーニングを行い、上記の塩濃度忌避異常を抑圧するような変異体の取得を行った。まず *casy-1* 変異体に対しエチルメタンスルホン酸 (EMS) で変異原処理し、その孫世代にあたる 40,000 個の卵 (20,000 一倍体ゲノムに相当) を培養した。この個体群に低塩濃度 (20 mM) の NaCl を含むバッファー中で飢餓を経験させ、50 mM の NaCl を含むプレート上で野生型線虫と同様に高塩濃度の領域に誘引される線虫を選択して培養した。次に高塩濃度 (100 mM) の NaCl を含むバッファーで飢餓を経験させ、50 mM の NaCl を含むプレート上で低塩濃度の領域に誘引される線虫を選択して培養した。このサイクルを 3 回から 4 回繰り返し、野生型線虫と同じように飢餓を経験した塩濃度を忌避することができる表現型を示す抑圧変異体を濃縮した。上記のスクリーニングの結果、3 ラインの抑圧変異体 (*casy-1*; *sup-1*~3) の単離に成功したが、*sup-1* については、親株との戻し交配後に表現型がメンデル遺伝に従って分離しなかったため、解析を中断した (データ不記載)。*sup-2* については遺伝学的マッピングの結果、IV 番染色体左腕の -27.07~-23.57 cM の領域に原因変異の位置が絞りこまれ、正常な遺伝子を導入するレスキュー実験とシーケンス解析により *daf-18* の 140 番目のプロリンがセリンに置換するミスセンス変異 (*pe407*) を同定した (図 11D)。*sup-3* についても、シーケンス解析により *daf-18* の 319 番目のバリンがメチオニンに置換するミスセンス変異

(*pe408*) を同定した (図 11D)。*daf-18* の既知の機能減少型変異である *ok480* 変異 (図 11D) も、*casy-1* の表現型を抑圧した (図 11A)。

daf-18 はホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸の脱リン酸化反応を触媒する PTEN (phosphatase and tensin homolog) のホモログをコードし、インシュリン/PI3K 経路において PI3-キナーゼの *age-1* と拮抗的に機能している (Solari et al., 2005)。*daf-18* 変異体は、*daf-2* 変異体や *casy-1* 変異体とは逆に、飢餓を経験した塩濃度からの忌避は正常だったが、餌を経験した塩濃度への誘引に異常を生じる表現型を示した (図 11A、図 7E)。興味深いことに、*casy-1; daf-18* の二重変異体は、餌条件付け時と飢餓条件時のいずれも野生型と同様の塩走性を示した (図 11A)。すなわち、餌とともに経験した塩濃度への誘引については *casy-1* が *daf-18* に対して遺伝学的上位だが、飢餓を経験した塩濃度からの忌避については *daf-18* が *casy-1* に対して遺伝学的上位だった。*daf-2; daf-18* 変異体でも同様の傾向が見られ、餌とともに経験した塩濃度への誘引については *daf-2* が *daf-18* に対して遺伝学的上位だが、飢餓を経験した塩濃度からの忌避については *daf-18* が *daf-2* に対して遺伝学的上位だった (図 11A)。これらの *casy-1; daf-18* もしくは *daf-2; daf-18* の二重変異体では、拮抗的に機能する PI3-キナーゼと PTEN ホスファターゼの活性がバランスされることにより正常な塩走性を示した可能性が考えられる。

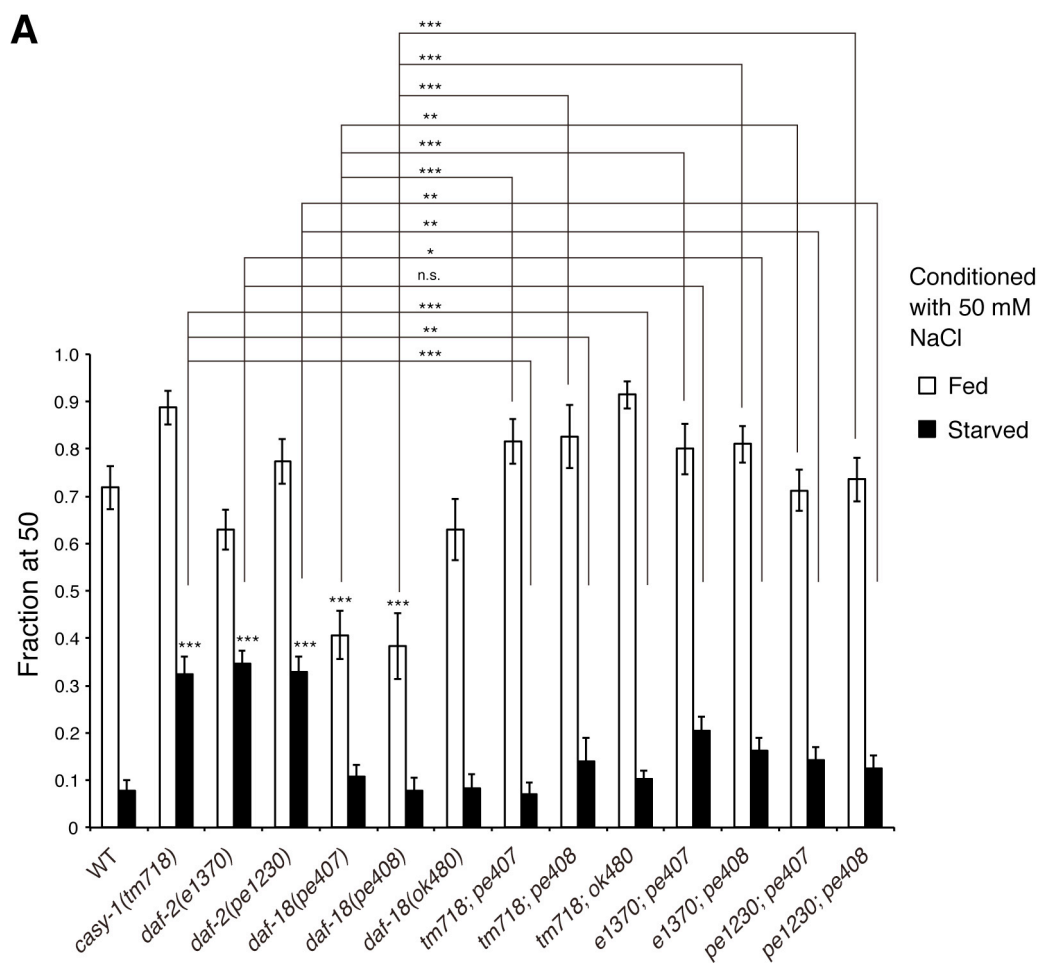


図 11 *casy-1* はインシュリン/PI3K 経路と遺伝学的に相互作用する

(A) 50 mM NaCl で条件付けした、野生型と *casy-1*、*daf-2*、*daf-18*、*casy-1; daf-18*、*daf-2; daf-18* 変異体の塩濃度嗜好性。n ≥ 12 アッセイ。***p < 0.001、**p < 0.01、*p < 0.05 (比較対象を示さない場合は野生型との比較、Tukey 検定)。

DAF-2c::Venus は細胞体と樹状突起には正常に局在した (図 12A)。また、*casy-1* 変異体では DAF-2a::Venus の軸索局在には影響はなく (図 12B)、CASY-1 が DAF-2 のアイソフォーム特異的な輸送に機能することが示唆された。

なお *casy-1* 変異体では ASER 神経の形態には異常が見られず (図 12A、10C)、軸索の長さも野生型と変わらなかった (図 12C)。さらに、プレシナプスで機能するシナプトブレビンホモログ SNB-1 (Nonet et al., 1998) の軸索における局在も正常だった (図 12D、E、F) ことから、*casy-1* 変異体における DAF-2c の軸索局在異常は、神経軸索内の構造が非特異的に影響を受けるために生じるのではないことが示唆された。

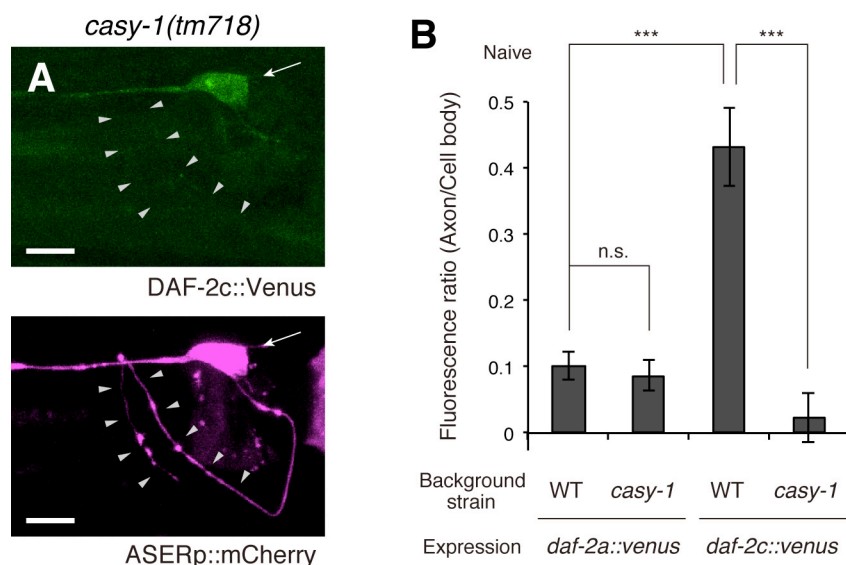
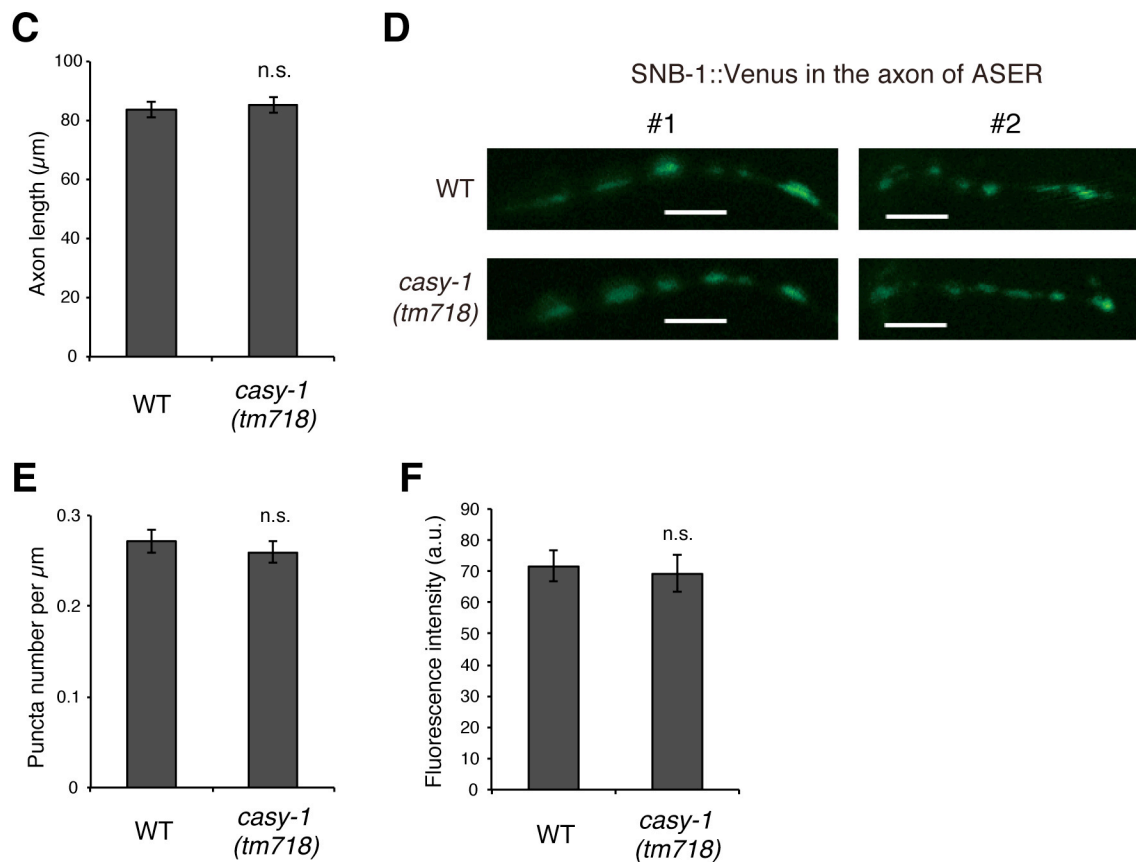


図 12 CASY-1 は DAF-2c の軸索局在に必須である

(A) *casy-1(tm718)* 変異体の ASER 神経における DAF-2c の局在。下のパネルは mCherry で標識した ASER 神経。矢印は細胞体、矢尻は軸索を表す。スケールバーは 10 μ m。

(B) 野生型と *casy-1(tm718)* 変異体の ASER 神経で測定した、DAF-2a::Venus と DAF-2c::Venus の軸索局在。軸索と細胞体の蛍光量の比をとった。n \geq 12 個体。***p < 0.001 (Tukey 検定)。



(C) 顕微鏡写真から測定した、野生型と *casy-1(tm718)*変異体の ASER 神経の軸索の長さ。n ≥ 13 個体。両側 t 検定による。

(D) 野生型と *casy-1(tm718)*変異体の ASER 神経軸索における SNB-1::Venus の局在。スケールバーは 5 μm。

(E) 野生型と *casy-1(tm718)*変異体の ASER 神経軸索で測定した、軸索の長さあたりの SNB-1::Venus 蛍光ドットの密度。n ≥ 14 個体。両側 t 検定による。

(F) 野生型と *casy-1(tm718)*変異体の ASER 神経軸索で測定した、SNB-1::Venus の蛍光強度。n ≥ 56 ドット。両側 t 検定による。

5.3 CASY-1 は DAF-2c とキネシン-1 の間の分子リンカーとして機能する

DAF-2c と CASY-1 の間における物理的相互作用の有無を調べるため、免疫沈降実験を行った。Myc タグを N 末端に付加した CASY-1 を免疫沈降により精製すると、*daf-2* のエクソン 11.5 によりコードされる断片にシグナル配列を付加して分泌型にしたポリ

ペプチドの共沈が見られた (図 13A)。この結果は、DAF-2c がエクソン 11.5 によりコードされる領域を介して小胞内もしくは細胞外で CASY-1 と相互作用し、軸索に特異的に輸送される可能性を示唆する。

キネシン-1 (KIF5) 複合体とキネシン-3 (KIF1) は、順行性の軸索輸送に関わる主要なモータータンパク質である (Hirokawa et al., 2009)。キネシン-1 複合体は 2 つのキネシン重鎖と 2 つのキネシン軽鎖からなる 4 量体であり、線虫はキネシン重鎖として *unc-116*、キネシン軽鎖として *klc-1* と *klc-2* を持つ (Sakamoto et al., 2005)。線虫におけるキネシン-3 のホモログとしては *unc-104*、*klp-4*、*klp-6* が知られている。これらのキネシン変異体のうち、*unc-116* と *klc-2* の機能減少型変異体 (Sakamoto et al., 2005) では DAF-2c の軸索局在が減弱し (図 13B)、キネシン-1 複合体が DAF-2c の軸索輸送に少なくとも部分的に関わることが示唆された。一方、*klc-1* やキネシン-3 ホモログの変異体では DAF-2c の軸索局在の減弱は見られなかった (図 13B)。

KLC-2 の哺乳類におけるオーソログである KLC1 はカルシンテニンの細胞内ドメインと結合することが報告されている (Araki et al., 2007; Konecna et al., 2006)。この KLC1 との相互作用に必要なカルシンテニンの 2 つの WD モチーフは、線虫の CASY-1 にも保存されている (図 13C)。これらの知見と一致して、CASY-1 の細胞内ドメイン (CICD: CASY-1 intracellular C-terminal domain) と KLC-2 の間の相互作用が酵母ツーハイブリッドアッセイで検出された (図 13D)。2 つの WD モチーフに存在するトリプトファンをアラニンに置換した変異型の CICD である CICD(WAWA) では、KLC-2 との相互作用は消失した (図 13D)。

CASY-1 が DAF-2 の軸索局在を制御する機構を解析するため、CASY-1 の様々な部位に変異を導入したコンストラクトを *casy-1* 変異体に導入してレスキュー実験を行った。DAF-2c の軸索局在の制御と飢餓を経験した塩濃度からの忌避の制御の双方において、中央の LG/LNS ドメインを欠失させた変異型 CASY-1(Δ LG)では機能が失われた (図 14A(2)、図 14B、図 14C)。一方、N 末端付近に 2 つ存在するカドヘリンドメインを欠失させた変異型 CASY-1(Δ Cads)では機能は失われなかった (図 14A(3)、図 14B、図 14C)。細胞内ドメインの WD モチーフに存在するトリプトファンをアラニンに置換したコンストラクトである CASY-1(WAWA) や、細胞外ドメインのみを分泌型にしたコン

ストラクトである CASY-1(Δ TM)でも機能は失われなかった (図 14A(4)・(5)、図 14B、図 14C)。しかしながら、WD モチーフのトリプトファンをアラニンに置換する点変異とカドヘリンドメインの欠失の双方を導入した CASY-1(WAWA; Δ Cads)の発現では *easy-1* 変異体の表現型の回復は見られず (図 14A(6)、図 14B、図 14C)、キネシン-1 に結合する細胞内ドメインはカドヘリンドメインと冗長的に機能することが示唆された。このことは、細胞内ドメインを介したキネシン-1 との結合と細胞外のカドヘリンドメインを介した他の未知タンパク質との結合に依存した二種類の機構で CASY-1 が DAF-2c の軸索輸送に関わると仮定すると説明することができる (図 14D、14E)。

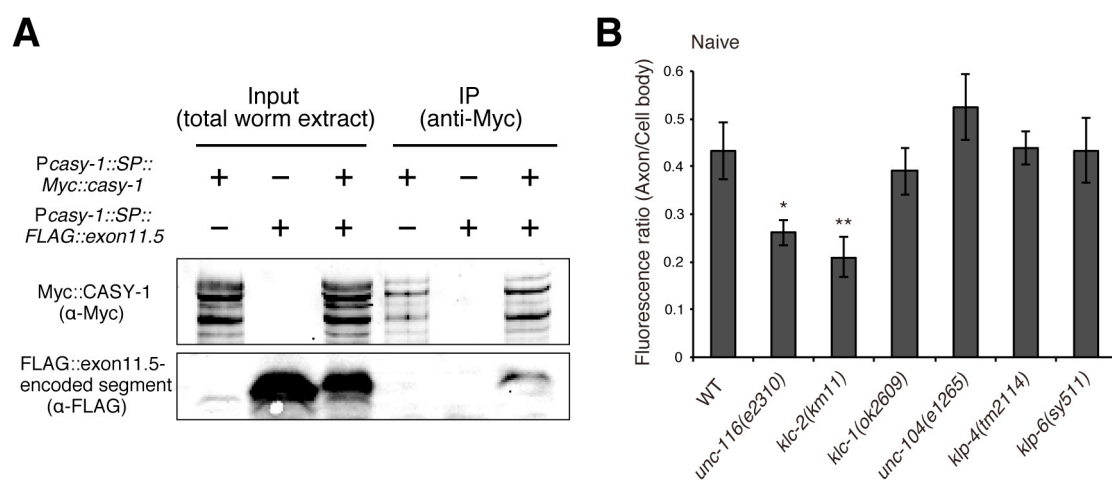
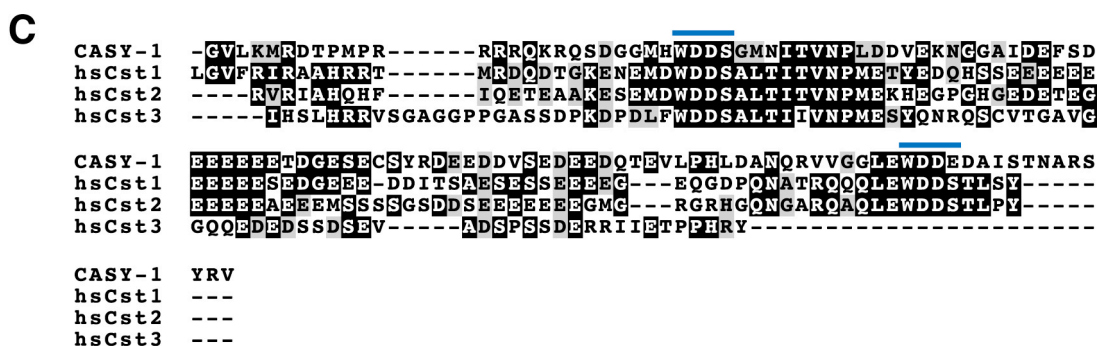



図 13 CASY-1 は DAF-2c とキネシン-1 に結合する

(A) 各導入遺伝子を発現するトランスジェニック線虫の全抽出物 (可溶画分) と抗 Myc 免疫沈降物に対して、抗 Myc 抗体と抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。SP は小胞内あるいは細胞外に移行するためのシグナルペプチド配列を表す。

(B) キネシン-1、キネシン-3 の変異体の ASER 神経における DAF-2c::Venus の軸索局在。軸索と細胞体の蛍光量の比をとった。n ≥ 12 個体。**p < 0.01、*p < 0.05 (野生型との比較、Dunnett 検定)。



D

Y2H Ade ⁻ His ⁻	
Bait	Prey
CICD(WT)	KLC-2 
CICD(WT)	—
—	KLC-2
CICD(WAWA)	KLC-2

(C) 線虫とヒトのカルシンテニンファミリーに属するタンパク質の細胞内ドメインのアミノ酸配列に対して行った多重アラインメント。hsCst1 はヒトのカルシンテニン-1（別名：アルカデイン α ）、hsCst2 はヒトのカルシンテニン-2（別名：アルカデイン γ ）、hsCst3 はヒトのカルシンテニン-3（別名：アルカデイン β ）である。同一のアミノ酸残基は黒で、相同なアミノ酸残基は灰色で表した。保存された WD モチーフをアミノ酸配列上部の青線で表した。

(D) CASY-1 の細胞内ドメイン（CICD）と KLC-2（a アイソフォーム）に対して行った酵母ツーハイブリッド（Y2H）アッセイ。

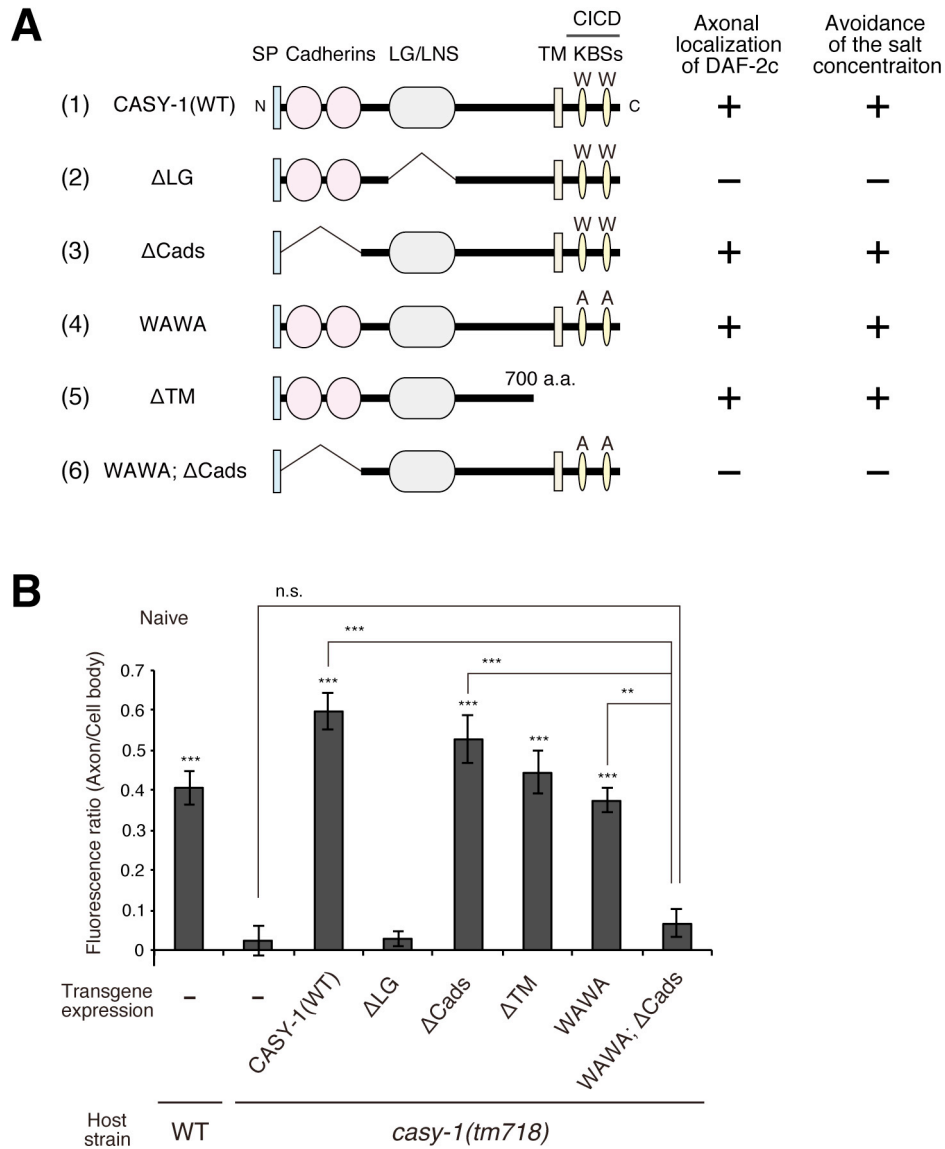
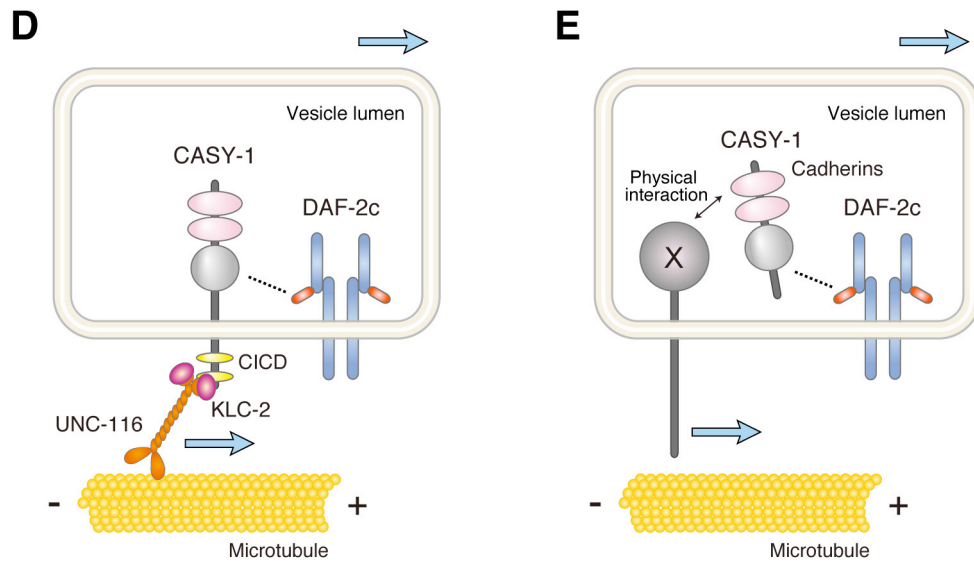
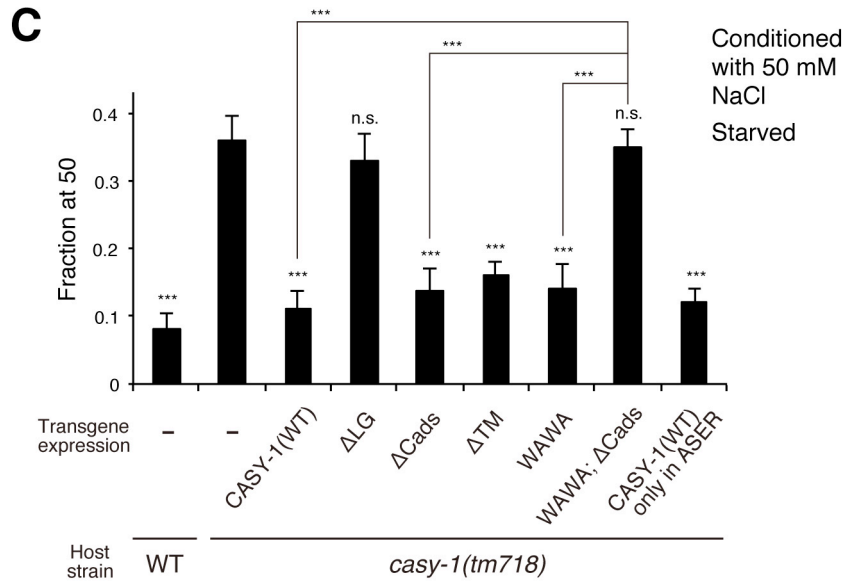


図 14 CASY-1 と KLC-2 の相互作用が DAF-2c の軸索輸送に関与する

(A) CASY-1 の変異型コンストラクトとその機能。+（プラス）はその導入遺伝子の発現により *casy-1* 変異体の表現型が回復したこと、-（マイナス）は回復しなかったことを示す。SP はシグナルペプチド、Cadherins はカドヘリンドメイン、LG/LNS は LG/LNS 様ドメイン、TM は膜貫通領域、KBSs はキネシン結合配列を表す。

(B) 野生型線虫と、(A)で示した CASY-1 の変異型コンストラクトを発現する *casy-1* 変異体の ASER 神経において DAF-2c::Venus の軸索局在を定量した。各変異型コンストラクトは *casy-1* プロモーターを用いて発現させた。n ≥ 9 個体。***p < 0.001、**p < 0.01（特に示さない場合は形質転換マーカーのみを持つ *casy-1* 変異体 (-) との比較、Tukey 検定)。



(C) 野生型線虫と、(A)で示した CASY-1 の変異型コンストラクトを発現する *casy-1* 変異体の塩濃度嗜好性。ASER 神経のみで *casy-1* 遺伝子を発現させる場合を除き、各変異型コンストラクトは *casy-1* プロモーターを用いて発現させた。n ≥ 21 アッセイ。***p < 0.001 (特に示さない場合は形質転換マーカーのみを持つ *casy-1* 変異体 (-) との比較、Tukey 検定)。

(D)、(E) CASY-1 が DAF-2c の輸送に関する様式についてのモデル図。CASY-1 は細胞内ドメインを介してキネシン-1 複合体と、またカドヘリンドメインを介して未知の軸索タンパク質と相互作用し、DAF-2c とともに軸索に輸送される。

5.4 DAF-2c の軸索局在が塩走性の制御に重要である

さらに DAF-2 の軸索局在の意義を明らかにするため、強制的に DAF-2a を軸索に局在させる効果について検討した。DAF-2a は DAF-2c と比べて軸索に局在しないが (図 10B、10C、12B)、キネシン-1 に結合する CASY-1 の細胞内ドメイン (CICD) を DAF-2a に融合させてキメラにしたタンパク質 (DAF-2a::CICD) では野生型の DAF-2a よりも軸索への強い局在が見られた (図 15A)。このキメラタンパク質を ASER 神経に発現させると、*daf-2* 変異体の塩濃度忌避異常が回復した (図 15B)。

また、このキネシン-1 との結合能を有する DAF-2a::CICD キメラタンパク質を ASER 神経に発現させると *casy-1* 変異体の塩濃度忌避異常が回復した (図 15C)。一方、軸索への局在が弱い野生型 DAF-2a や、CASY-1 の非存在下では軸索に局在しない DAF-2c を ASER 神経に発現させても、*casy-1* 変異体の学習異常は回復しなかった (図 15C)。DAF-2c::CICD キメラタンパク質の発現でも *casy-1* 変異体の表現型の回復が見られたが、その程度は DAF-2a::CICD とほぼ同等だった (図 15C)。これらの結果は、以下の 2 点を裏付ける。まず、DAF-2a が軸索に局在した場合は DAF-2c と同等に機能する、すなわち 2 つのアイソフォームの機能の差は軸索局在の差に由来する。また、DAF-2 を軸索に局在させることによって *casy-1* 変異体の学習異常は回復する、すなわち *casy-1* 変異体の学習異常は DAF-2 の軸索局在異常に由来するということである。

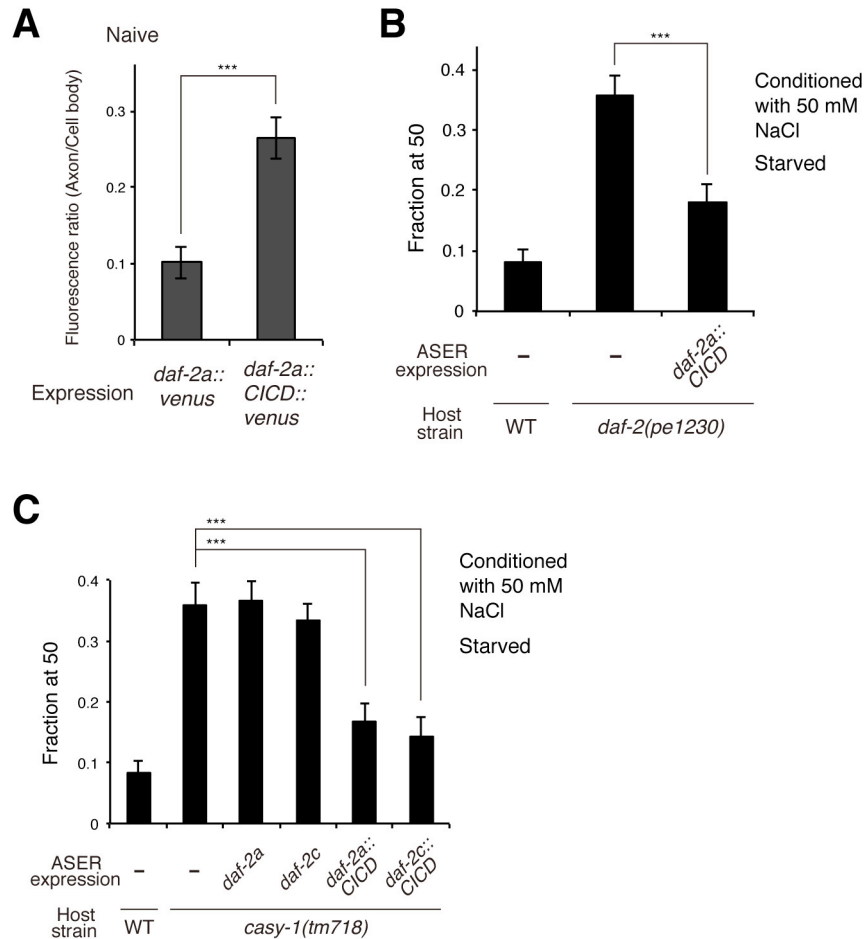


図 15 DAF-2 の軸索への強制局在により *daf-2* 変異体と *casy-1* 変異体の行動異常が回復する

(A) CASY-1 の細胞内ドメイン（アミノ酸番号 872–984）と融合させた DAF-2a（DAF-2a::CICD）にさらに Venus を付加して ASER 神経における軸索局在を定量した。n ≥ 20 個体。***p < 0.001（両側 t 検定による）。

(B) DAF-2a::CICD キメラタンパク質を ASER 神経に発現する *daf-2* 変異体の塩濃度嗜好性。n ≥ 20 アッセイ。***p < 0.001（Dunnett 検定による）。

(C) 野生型 DAF-2a/c もしくは DAF-2a/c::CICD キメラタンパク質を ASER 神経に発現する *casy-1* 変異体の塩濃度嗜好性。n ≥ 20 アッセイ。***p < 0.001（Dunnett 検定による）。

5.5 軸索の DAF-2c は ASER 神経からのシナプス放出を制御する

ASER 神経の軸索にプレシナプスが散在していること (White et al., 1986)、さらに ASER 神経におけるインシュリン/PI3K 経路はシナプス放出を制御すること (Oda et al., 2011)を考慮すると、DAF-2c が軸索に局在することは ASER 神経からのシナプス伝達の調節に重要である可能性が考えられる。

この可能性を検討するため、pH 感受性の GFP 改変体である pHluorin (Miesenböck et al., 1998; Sankaranarayanan et al., 2000)をシナプトブレビンホモログの SNB-1 に融合させたプローブ (SNB-1::pHluorin) を用いて ASER 神経からのシナプス放出の可視化を行った。シナプス小胞内の pH は比較的低く保たれているために、このプローブがシナプス小胞内に存在する場合は pHluorin の蛍光活性が小さいが、シナプス小胞が開口放出することでプローブが細胞外に露出すると pH の上昇に伴って pHluorin の蛍光が増大する (図 16A)。以前の報告 (Oda et al., 2011)と一致して、飢餓を経験した塩濃度から濃度を低下させるステップ刺激 (50 mM → 25 mM) に対して、*daf-2* 変異体では野生型よりも強いシナプス放出が見られた (図 15B)。この表現型は、ASER 神経で DAF-2c を発現させることで回復したが、DAF-2a の発現では回復しなかった (図 16B)。また、DAF-2c が軸索に局在しない *casy-1* 変異体では、*daf-2* 変異体と同様のシナプス放出の増大が見られた (図 16B)。キネシンとの結合能を有し軸索への局在が見られる DAF-2a::CICD の発現でも *daf-2* 変異体のシナプス放出異常が回復した (図 16B)。これらの結果は、軸索における DAF-2c が ASER 神経からのシナプス放出の制御に関与することを示唆する。

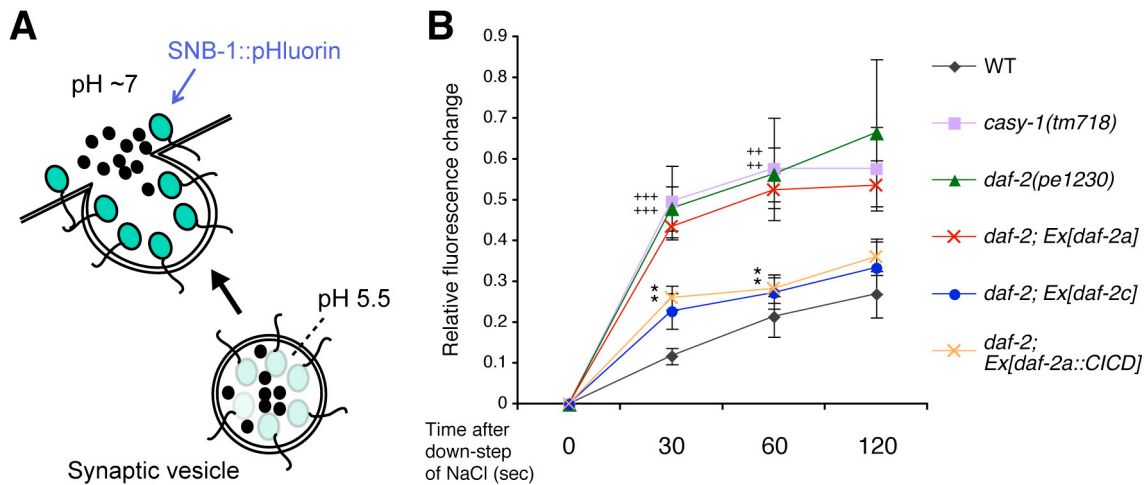


図 16 DAF-2 の軸索への局在が ASER 神経からのシナプス伝達の制御に必要である

(A) SNB-1::pHluorin を用いたシナプス放出測定原理。シナプス小胞のエクソサイトーシスに伴って起こる pH の上昇により pHluorin の蛍光が増大する。*C. elegans* の細胞外液の pH は明らかでないが、回虫 (*Ascaris suum*) の偽体腔液の pH は 6.5 で中性に近い (Lee, 2002)。

(B) 50 mM NaCl を含むバッファー中で 30 分の飢餓を経験させた線虫に対し、外界の NaCl 濃度を 50 mM から 25 mM に低下させる刺激を与えて ASER 神経の軸索で SNB-1::pHluorin の蛍光変化を測定した。n ≥ 8 個体。***p < 0.001、**p < 0.01 (野生型との比較、Tukey 検定による)。*p < 0.05 (形質転換マーカーのみを持つ *daf-2* 変異体との比較、Tukey 検定による)。

5.6 Ras-MAPK 経路が CASY-1 依存の DAF-2c 軸索輸送を制御する

哺乳類では、MAP キナーゼの ERK (extracellular signal-regulated kinase) が KLC1 の 460 番目のセリンをリン酸化し、このリン酸化によってカルシンテニンの細胞内ドメインとの結合が負に制御されるとの知見がある (Vagnoni et al., 2011)。このリン酸化部位付近の配列は、KLC1 の線虫ホモログである KLC-2 においてもほぼ完全に保存されている (図 17A)。また、KLC-2 は ERK との基質相互作用に重要だと考えられている、KIM (kinase interaction motif) と称される ERK 結合モチーフ (MacKenzie et al., 2000) を有している (図 17A)。さらに、KLC-2 の ERK リン酸化部位として予測された 452 番目のセリンは、線虫におけるリン酸化プロテオーム解析において *in vivo* でリン酸化が報告されている (Zielinska et al., 2009)。哺乳類での知見と同様に、

KLC-2 の ERK による予測リン酸化部位 (KLC-2ser452) をアスパラギン酸に置換して恒常的リン酸化型を模した変異型 KLC-2(S452D)では、CASY-1 の細胞内ドメインとの結合が減弱した (図 17B)。

これらの知見に基づき、ERK が CASY-1 依存の DAF-2c 輸送と塩濃度嗜好性の可塑性を *in vivo* で制御する可能性を探った。Ras-MAPK 経路の構成因子である *let-60*(Ras)、*mek-2* (ERK キナーゼ/MAPKK)、*mpk-1* (ERK/MAPK) の機能減少型変異体では、DAF-2c 軸索局在の増大が見られた (図 17C)。この表現型は *casy-1* の欠失変異により抑圧され、CASY-1 が Ras-MAPK 経路の下流で機能することが示唆された (図 17C)。また DAF-2 の軸索局在の増大と一致して、これらの Ras-MAPK 経路の変異体ではいずれも餌とともに経験した塩濃度への誘引が弱まった (図 17D)。この塩走性異常もやはり *casy-1* の欠失により抑圧された (図 17D)。

続いて KLC-2 の 452 番目のセリンのリン酸化が DAF-2c の軸索局在に及ぼす影響を検討した。KLC-2 の予測リン酸化部位をアラニンに置換して非リン酸化型状態を模した変異型 KLC-2 である KLC-2(S452A)を ASER 神経で発現させると、DAF-2c の軸索局在が増大した (図 17E、F)。野生型 KLC-2 や KLC-2(S452D)の発現ではこのような効果は見られなかった (図 17E、F)。この ASER 神経における KLC-2(S452A)の強制発現は Ras-MAPK 経路の変異体の場合と同様に、餌とともに経験した塩濃度への誘引を弱める異常を引き起こした (図 17G)。一方 *casy-1* 変異体においては KLC-2(S452A)を ASER 神経に発現させても DAF-2c の軸索局在の増大や塩走性の異常は見られず (図 17E、G)、この機能獲得型の KLC-2 が CASY-1 を介して機能することが示唆された。

以上の結果から、Ras-MAPK 経路が KLC-2 の 452 番目のセリンを標的とすることで CASY-1 依存の DAF-2c 軸索輸送を負に制御していることが示唆された (図 18)。

A

```

KLC-2  405  HEREFGQISGENKPIWQIAEEREENKHK-GEATANEQAGWAKAAKVDSPVTVTTLKNLG
hsKLC1 412  HEREFGSVDDENKPIWMHAEEREERCGRKQKDGTSFGGEYGGWKACKVDSPVTVTTLKNLG

KLC-2  464  ALYRRQGGYEAAETLEDVALRAKKQHEPLRSGAMGGIDEMSQSMMASTIGGSRNSMTTST
hsKLC1 472  ALYRRQGGFEAAETLEEAAMRSRKQGLD-----NVHKQRVAEVLNDPENMEKRR

```

B

Bait	Prey	Y2H	Ade ⁻	His ⁻
CICD	KLC-2(wt)			
CICD	KLC-2(S452A)			
CICD	KLC-2(S452D)			

C

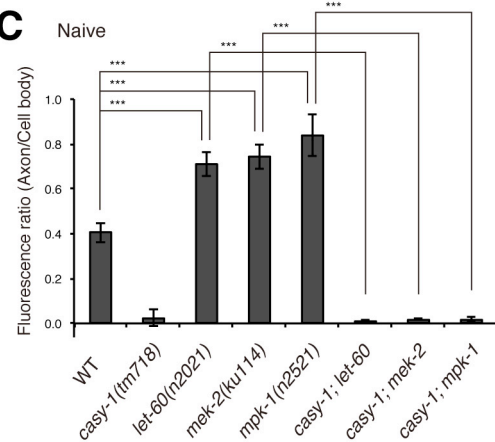
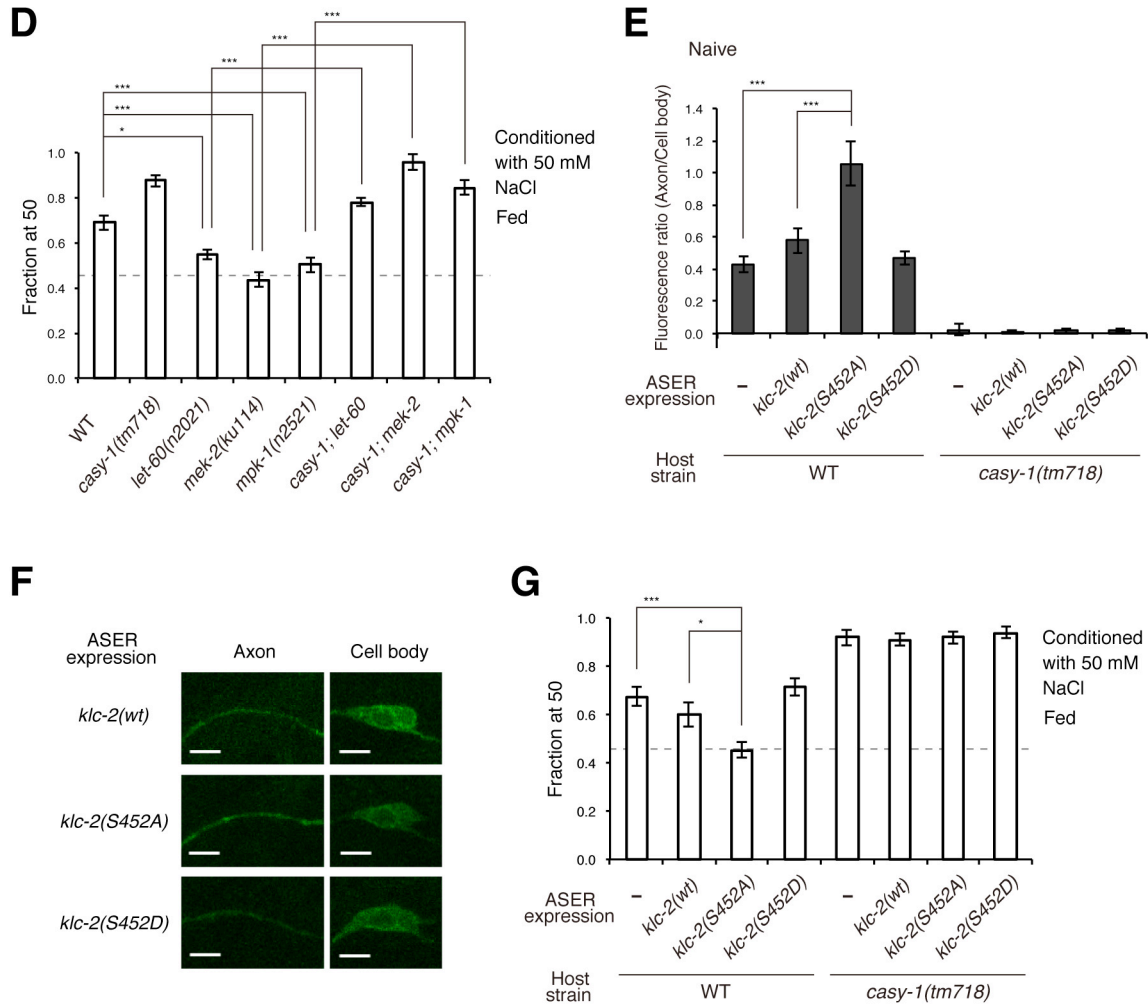


図 17 Ras-MAPK 経路が CASY-1 依存の DAF-2c 軸索輸送を制御する

(A) KLC-2 とヒト KLC1 の ERK 予測リン酸化部位付近のアミノ酸配列アラインメント。ERK リン酸化モチーフ (V-X-[S/T]-P) を赤線、ERK 予測リン酸化部位をアスタリスク、KIM と呼ばれる ERK 結合モチーフ ([V/L]-X₂-[R/K]-[R/K]-X₃₋₆-L) を青線で表した。

(B) CASY-1 の細胞内ドメインと、ERK 予測リン酸化部位に変異を導入した変異型 KLC-2 の酵母ツーハイブリッドアッセイ。細胞濃度を 20 倍ずつ薄めてアデニン・ヒスチジンを含まない選択培地にスポットした。培地は HIS3 の遺伝子産物の阻害剤として 0.2 M の 3-アミノ-1,2,4-トリアゾール (3-AT) を含む。

(C) Ras-MAPK 経路の構成因子の変異体と、これらの変異に加えて *casy-1* 変異を含む二重変異体について、DAF-2c::Venus の軸索における局在を ASER 神経で定量した。n ≥ 21 個体。***p < 0.001 (Tukey 検定による)。



(D) Ras-MAPK 経路の構成因子の変異体と、これらの変異に加えて *casy-1* 変異を含む二重変異体について、50 mM の NaCl と餌で条件付けした際の 50 mM 付近の塩濃度に対する嗜好性を調べた。 $n \geq 14$ アッセイ。

*** $p < 0.001$ 、* $p < 0.05$ (Tukey 検定による)。

(E) 野生型 KLC-2 や ERK 予測リン酸化部位に変異を導入した変異型 KLC-2 が ASER 神経で発現する株について、DAF-2c::Venus の軸索における局在を ASER 神経で定量した。 $n \geq 21$ 個体。*** $p < 0.001$ 、(Tukey 検定による)。

(F) 野生型 KLC-2 や ERK 予測リン酸化部位に変異を導入した変異型 KLC-2 が ASER 神経で発現する株の ASER 神経における DAF-2c::Venus の局在。スケールバーは 5 μm 。

(G) 野生型 KLC-2 や ERK 予測リン酸化部位に変異を導入した変異型 KLC-2 が ASER 神経で発現する株について、50 mM の NaCl と餌で条件付けした際の 50 mM 付近の塩濃度に対する嗜好性を調べた。 $n \geq 20$ アッセイ。*** $p < 0.001$ 、* $p < 0.05$ (Tukey 検定による)。

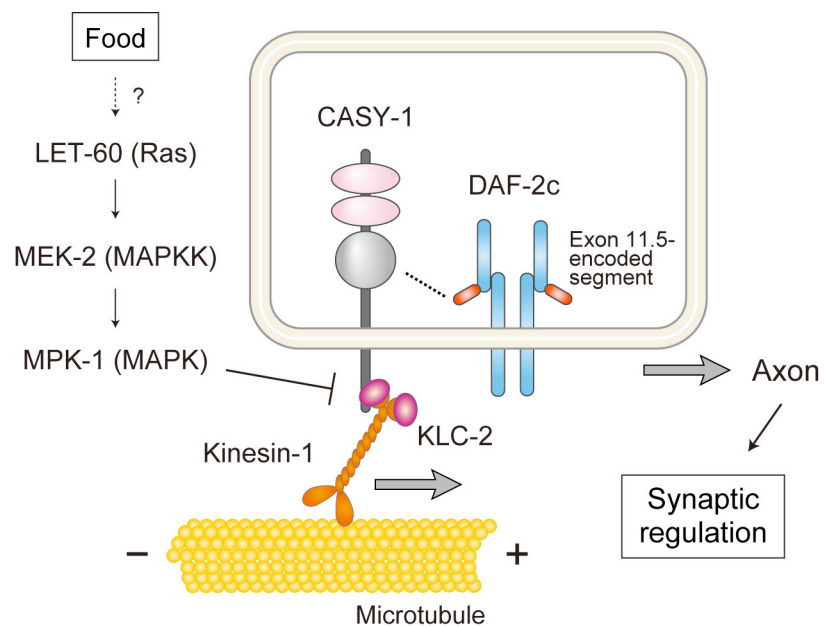


図 18 DAF-2c 軸索輸送メカニズムのモデル図

Ras-MAPK 経路によって制御された CASY-1/キネシン-1 複合体が、DAF-2c を軸索に移行させることで塩濃度と飢餓を関連づける連合学習を可能にする。

考察

1. 土壌性線虫の塩濃度走性とその生物学的意義

本研究により、*C. elegans* を含む土壌性線虫は、過去の塩濃度を記憶してそれに対する嗜好性を餌の有無に応じて変化させる行動戦略をとっていることが明らかとなった。餌の有無に応じて行動を変化させる現象は自然界の動物に広く見られ、餌を得るために適切な行動を選択する能力は生存や繁殖に有利に働くと考えられる (Begon et al., 2005; Bowler and Benton, 2005; Kamil and Roitblat, 1985; McCue, 2010)。線虫は視覚や空間認識能力が十分に発達しておらず、餌のある場所に留まるために、もしくは飢餓を経験した場所から離れて新たな環境を探索するために外界の塩濃度を感知して移動の手がかりとして利用する戦略は合理的であると考えられる。

2. 塩濃度嗜好性の調節に関わる感覚神経

神経機能に異常を有する変異株の解析から、ASER 神経が塩濃度嗜好性の調節に必須の役割を担うことがわかった (図 5A-D)。しかしながら、過去の論文においては ASER 神経が欠損した変異株の塩走性が完全に消失しないケースが存在する (Adachi et al., 2010; Bargmann and Horvitz, 1991; Ortiz et al., 2009)。この違いが生じた原因として、線虫の塩走性を解析する際のバックグラウンドに含まれる塩濃度の違いが機能する感覚神経に影響した可能性がある。過去の多くの論文では、線虫の塩走性を通常の培養条件に比べて非常に低い塩濃度領域で解析しており (Adachi et al., 2010; Bargmann and Horvitz, 1991; Ortiz et al., 2009)、このような塩濃度領域では水溶性イオンに対する感度が比較的低い感覚神経の寄与が強く見られるのかもしれない。過去の論文において塩走性への関与が報告されている ASEL 神経や ASH 神経 (Adachi et al., 2010; Bargmann and Horvitz, 1991; Hukema et al., 2006; Thiele et al., 2009) などの感覚神経の役割とこれらの神経で働く分子機構を明らかにするためには、さらなる解析が必要となる。

3. 外界の塩濃度を感知・記憶するメカニズム

感覚繊毛の形成に異常を示す *dyf-11* 変異体を用いた解析から、ASER神経以外への感覚入力を阻害してもある程度の塩濃度走性が保持されることが示唆された (図5E)。それでは、単一の感覚神経が外界の塩濃度を感知・記憶することがどのようにして可能となるのだろうか？一つの可能性として、ASER神経内に濃度センサーとして機能する分子が存在し、その量もしくは活性が外界の塩濃度に応じて変化することが考えられる。

ジアシルグリセロール (DAG) はそのような濃度センサーの候補である。ASER 神経内で Go/Gq-DAG-PKC 経路を人為的に活性化させると線虫は常に高塩濃度に向かうが、逆にこの経路が不活性化すると線虫は常に低塩濃度に向かうようになる (Adachi et al., 2010; Iwata et al., 2011; Tomioka et al., 2006; 國友ら、投稿中)。外界の塩濃度が増加したときに Go/Gq-DAG-PKC 経路の活性が適切に制御される機構が存在すれば、現在の塩濃度と過去の塩濃度の差を記憶して過去の塩濃度に向かう、もしくは避ける行動が説明できる。Go/Gq-DAG-PKC 経路の活性変化のモニタリングや、この経路を制御する機構の解明は今後の重要な研究課題である。

4. インシュリン受容体の機能の多様性を生み出す機構

daf-2 のエクソン 11.5 によってコードされる 82 アミノ酸からなる断片は α 鎖の C 末端付近に付加され、CASY-1 と相互作用することで DAF-2c の細胞内局在を変化させる (図 8C、8D、10C、10F、12A、12B、13A)。興味深いことに、哺乳類のインシュリン受容体も選択的カセットエクソンを有し、このエクソンによってコードされる 12 アミノ酸からなる断片はやはり α 鎖の C 末端付近に付加されて B アイソフォームを産生する (Belfiore et al., 2009)。また、ショウジョウバエやニワトリなどのインシュリン受容体では、固有のアミノ酸配列が α 鎖の C 末端付近に挿入される (Garza-Garcia et al., 2007)。 α 鎖の C 末端付近に付加されるこれらのアミノ酸配列の機能が生物種間で保存されているかは不明だが、上記の知見は、特有の性質を持つペプチドを進化過程でインシュリン受容体に付加して新たな機能を生み出すためにこの部位が適していたことを示唆しているかもしれない。

5. DAF-2アイソフォーム間の機能分担

塩濃度嗜好性の制御においてDAF-2c以外のアイソフォームが機能しない一方で、寿命制御、耐性幼虫形成、熱ストレス耐性制御においてはDAF-2aとDAF-2cの双方が機能し得ることがアイソフォーム特異的レスキュー実験によって示唆された（図8E、9A–C）。寿命制御、耐性幼虫形成、熱ストレス耐性制御では、いずれもインシュリン/PI3K経路の下流でFOXOファミリー転写因子であるDAF-16が制御される（Kwon et al., 2010）。細胞核内で働くDAF-16を制御するためにはインシュリン受容体が核の付近に存在していればよく、軸索への局在が弱いDAF-2aでも機能することができると推論することができるだろう。

蛍光タンパク質を用いたスプライシングレポーターを用いた解析から、エクソン 11.5 の挿入は感覚神経を中心とした神経系の一部で主に起こり、逆にエクソン 11.5 の脱落は腸・筋組織・咽頭・表皮・下皮などで起こることが示唆されている（富岡ら、未発表）。インシュリン/PI3K 経路が軸索など長い細胞突起で作用するような細胞では DAF-2c が機能し、逆にこの経路が核内に作用するような細胞では DAF-2a が機能するという可能性が考えられる。軸索においてインシュリン/PI3K 経路の下流で制御される分子の同定については、今後の研究の進展が待たれる。

6. DAF-2c の軸索局在の意義

前述のように哺乳類のインシュリン受容体でも選択的カセットエクソンの有無が異なる二種類のアイソフォームが存在するが、これらのアイソフォームでは受容するリガンドの特異性が異なることが報告されている（Belfiore et al., 2009）。線虫の DAF-2a と DAF-2c でも特定のリガンドに対する親和性が異なるなど伝達するシグナルが異質である可能性は否定できない。しかし、本研究における解析の結果、塩濃度嗜好性の制御のために重要なのは各アイソフォームの軸索における存在量であることが強く示唆された（図 10B、10C、15A、15B、15C）。

DAF-2 の軸索への局在が塩走性の制御に重大な影響を与える原因として、多くのシナプスが散在している軸索に DAF-2 が局在することでシナプス伝達を至近距離から効果的に制御できるようになるという可能性がある。この仮説と矛盾しないもう一つの可能性として、塩走性の制御に機能する INS-1 のようなインシュリン様リガンドが、神

経環付近に限られた部位にしか作用しないということも予想される。INS-1 が神経環付近の神経突起においてプレシナプス領域に局在する (Tomioka et al., 2006)ことは、後者の仮説を支持する知見である。

それでは、なぜインシュリン様リガンドの量ではなく軸索におけるインシュリン受容体の量を変化させるようなメカニズムが存在するのだろうか。一つの可能性として、受容体の量を制御するメカニズムにはリガンドが作用する細胞(すなわち連合学習を行う感覚種 [modality]) の特異性が高まるメリットがあると考えられる。もし他細胞から放出されるリガンドの量を調節すると、ASER 神経と異なる近傍の細胞にまで影響が及び、例えばインシュリン/PI3K 経路が ASER とは異なる細胞で機能して制御される嗅覚可塑性(Lin et al., 2010)や温度走性(Kodama et al., 2006)まで変化してしまう可能性がある。塩を受容する ASER 神経において塩濃度と餌の変化をモニターして軸索におけるインシュリン受容体の量を変化させる機構が存在すれば、塩受容以外の感覚種に影響することなく塩濃度と餌/飢餓の連合学習を制御することが可能となるだろう。また、本研究における DAF-2 アイソフォームの機能解析から示唆されたようにインシュリン/PI3K 経路が細胞内の領域ごと(細胞体、軸索)に異なる機能を有していることを考えると、インシュリンリガンドの量を調節するような機構では細胞全体のプロセスが影響を受けてしまう。インシュリン受容体の細胞内局在を変化させるという本研究が明らかにした機構の存在により、特定の細胞内領域における機能のみを調節することができると考えられる。

インシュリン/PI3K 経路がどのようにシナプス伝達を制御するのか、また ASER 神経からのシナプス伝達の量の変化がどのように塩走性の逆転に結びつくのかといった問題は今後の研究課題である。

7. 哺乳類神経におけるインシュリン受容体の機能

哺乳類の神経においてもインシュリン受容体はシナプス領域に局在することが報告されており (Abbott et al., 1999)、ヒトを含めた他の生物種においてもインシュリン受容体のシナプス領域への局在が重要な意義を有する可能性がある。

もし本研究が明らかにしたような、カルシンテニン/キネシン-1 複合体依存的なイン

シュリン受容体の輸送が Ras-MAPK 経路の下流で制御されてシナプス伝達に変化するような機構が哺乳類の脳において存在した場合、インシュリン様リガンドが作用できる領域の神経群の機能をまとめて調節することができる。また、Ras-MAPK 経路・インシュリン経路共に多くの上流シグナルによって制御されうるので、複数の情報を統合してシナプス可塑性に反映させるような機能を持つことができると考えられる。

8. キネシン-1 と CASY-1 の相互作用の意義

*unc-116(e2310)*と *klc-2(km11)*の変異体では、*casy-1* 変異体とは異なり DAF-2c の軸索局在が完全に消失しなかった(図 13B)。これらの変異体が完全な機能喪失型ではなかったことを原因としている可能性も考えられるが、一方でこの結果は CASY-1 と DAF-2c の輸送が完全にキネシン-1 に依存しておらず、他のモータータンパク質が関与する可能性を否定しない。しかし、CASY-1 細胞内ドメインのキネシン-1 結合モチーフに点変異を導入することでカドヘリン欠失型コンストラクトの機能が失われた (図 14A(6)、14B、14C) ことや、ERK 予測リン酸化部位をアラニンに置換した機能獲得型 KLC-2 が CASY-1 依存的に DAF-2c の軸索局在を増強させたことから、DAF-2c の軸索輸送は少なくとも部分的に CASY-1 と KLC-2 の物理的相互作用に依存していると考えられる。

9. 塩走性の制御における Ras-MAPK 経路の役割

CASY-1 と KLC-2 の相互作用に依存した DAF-2c の軸索輸送は、Ras-MAPK 経路により負に制御されている (図 17)。興味深いことに、ERK の活性化を検出するプローブ (ERKy) を用いた *in vivo* イメージングにおいては、線虫が約 40 分程度の飢餓を経験することで ASER 神経内の ERK 活性が徐々に減少した (富田ら、私信)。これらの知見を考え合わせると、Ras-MAPK 経路が餌シグナルを伝達し、飢餓に応答した DAF-2c の軸索移行、ひいては飢餓に依存した塩濃度嗜好性の可塑性を負に制御している可能性が高い。今後の研究により、ASER 神経内で Ras-MAPK 経路の活性を制御する分子機構とその意義が明らかになることが期待される。

10. 餌の有無を伝達する複数のシグナルの関係

餌の存在や飢餓がどのように線虫に認識されているのかについてはほとんど未知である。餌の匂い、咽頭における餌の物理的な刺激、個体密度の指標となるフェロモン、あるいは体内の栄養状態をモニターする因子などを感知している可能性が考えられる。

本研究で解析を行った塩濃度嗜好性の制御においては、インシュリン、HEN-1、セロトニン、オクトパミンといった分泌性のシグナルが餌の有無を伝達する可能性が示唆された（図 6A、6B、6C、7A、7C）。しかしながら、これらのシグナルがどのように相互作用するのかは明らかになっていない。それぞれの因子について、どのように分泌が制御されるのか、どのような細胞がこれらのシグナルを受容するのか、またそれによりどのような生理作用がもたらされるのか、といった点を解明することが、線虫の塩濃度嗜好性の可塑性を理解する上で重要な手がかりとなるだろう。

結論

本研究では、選択的スプライシングにより産生されるインシュリン受容体 DAF-2 の新奇アイソフォームである DAF-2c が、軸索に局在することで線虫 *C. elegans* の連合学習を制御することを見出した。DAF-2c はエクソン 11.5 にコードされる領域を介して CASK-1 と物理的に相互作用し、感覚神経の軸索に選択的に輸送されることでシナプス伝達を制御する。Ras-MAPK 経路はキネシン軽鎖 KLC-2 を標的とすることで CASK-1 とキネシン-1 複合体の相互作用を負に調節し、DAF-2c の軸索移行を制御する。このアイソフォーム特異的な輸送メカニズムにより、神経系における役割の重要性 (Kodama et al., 2006; Tomioka et al., 2006; Wolkow et al., 2000) が指摘されている *daf-2* 遺伝子に機能の多様性が付与されることが考えられる。

哺乳類においてもインシュリン受容体はシナプス領域に局在し (Abbott et al., 1999)、さらに DAF-2c と類似した様式でインシュリン受容体の B アイソフォームが産生される (Belfiore et al., 2009)。これらのことを考慮すると、神経のシナプス領域においてインシュリン受容体の特定のアイソフォームの量が制御されるという、本研究により解明されたメカニズムが生物種間で保存されている可能性の検討は興味深い。

加えて、本研究で密接な関係性を明らかにしたカルシネニンとインシュリン経路は、ともにヒトの記憶能力やアルツハイマー病との関連が指摘されている (Chiu and Cline, 2010; McNay and Recknagel, 2011; Papassotiropoulos et al., 2006; Preuschhof et al., 2010; Schiöth et al., 2012; Vagnoni et al., 2012)。本研究における発見が、学習・記憶の基盤となる普遍的なメカニズムや神経変性疾患の機序の理解に新たな知見をもたらすことが期待される。

謝辞

本研究で用いた株の一部は、三谷昌平博士、松本邦弘博士、Oliver Hobert 博士、Min Han 博士、Gary Ruvkun 博士、戸井基道博士、岩田遼博士、小田茂和博士より頂きました。その他の多くの株は Caenorhabditis Genetics Center より頂きました。PDMS チップの設計データは Nikos Chronis 博士、*daf-2a* cDNA は木村幸太郎博士に頂きました。ご厚意に感謝致します。

本研究は東京大学遺伝子実験施設および東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻（現・生物科学専攻）飯野研究室において行われました。研究室主宰者の飯野雄一先生には、全体的な研究の方向性から日々の考察に至るまで幅広く御指導いただきました。深く感謝申し上げます。

飯野研究室に在籍されている方々、また過去に在籍されていた方々にも多くの貴重な助言と御指導を頂きました。学部四年次において、分子生物学の基礎的な実験手法や考察について山本正幸研究室の皆様にご指導いただきました。理学系研究科生物化学専攻や薬学系研究科の皆様も本研究に助言を下さいました。事務的手続きにおいて、研究室事務と生物化学専攻事務の皆様にお世話になりました。皆様のご協力に心より御礼申し上げます。最後に、私を生活面・精神面から支えてくれた家族と友人に感謝致します。

引用文献

Abbott, M.A., Wells, D.G., and Fallon, J.R. (1999). The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J. Neurosci.* *19*, 7300–7308.

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.

Alkema, M.J., Hunter-Ensor, M., Ringstad, N., and Horvitz, H.R. (2005). Tyramine Functions independently of octopamine in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Neuron* *46*, 247–260.

Apfeld, J., and Kenyon, C. (1998). Cell nonautonomy of *C. elegans daf-2* function in the regulation of diapause and life span. *Cell* *95*, 199–210.

Araki, Y., Kawano, T., Taru, H., Saito, Y., Wada, S., Miyamoto, K., Kobayashi, H., Ishikawa, H.O., Ohsugi, Y., Yamamoto, T., *et al.* (2007). The novel cargo Alcadein induces vesicle association of kinesin-1 motor components and activates axonal transport. *EMBO J.* *26*, 1475–1486.

Araki, Y., Miyagi, N., Kato, N., Yoshida, T., Wada, S., Nishimura, M., Komano, H., Yamamoto, T., De Strooper, B., Yamamoto, K., *et al.* (2004). Coordinated metabolism of alcadein and amyloid β -protein precursor regulates FE65-dependent gene transactivation. *J. Biol. Chem.* *279*, 24343–24354.

Araki, Y., Tomita, S., Yamaguchi, H., Miyagi, N., Sumioka, A., Kirino, Y., and Suzuki, T. (2003). Novel cadherin-related membrane proteins, Alcadeins, enhance the X11-like protein-mediated stabilization of amyloid beta-protein precursor metabolism. *J. Biol. Chem.* *278*, 49448–49458.

Arendt, K.L., Royo, M., Fernández-Monreal, M., Knafo, S., Petrok, C.N., Martens, J.R., and Esteban, J.A. (2010). PIP3 controls synaptic function by maintaining AMPA receptor clustering at the postsynaptic membrane. *Nat. Neurosci.* *13*, 36–44.

Bacaj, T., Tevlin, M., Lu, Y., and Shaham, S. (2008). Glia Are Essential for Sensory Organ Function in *C. elegans*. *Science* *322*, 744–747.

Bargmann, C.I. (2006). Chemosensation in *C. elegans*. In: The *C. elegans* Research Community (Ed.). WormBook [doi/10.1895/wormbook.1.123.1](https://doi.org/10.1895/wormbook.1.123.1).

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

Bargmann, C.I., and Horvitz, H.R. (1991). Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron* *7*, 729–742.

Bazigou, E., Apitz, H., Johansson, J., Lorén, C.E., Hirst, E.M., Chen, P.L., Palmer, R.H., and Salecker, I. (2007). Anterograde Jelly belly and Alk receptor tyrosine kinase signaling mediates retinal axon targeting in *Drosophila*. *Cell* *128*, 961–975.

Beets, I., Janssen, T., Meelkop, E., Temmerman, L., Suetens, N., Rademakers, S., Jansen, G., and Schoofs, L. (2012). Vasopressin/oxytocin-related signaling regulates gustatory associative learning in *C. elegans*. *Science* *338*, 543–545.

Begon, M., Townsen, C.R., and Harper, J.L. (2005). *Ecology: From Individuals to Ecosystems*, 4th Edition (New York, John Wiley & Sons Inc).

Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., and Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr. Rev.* *30*, 586–623.

Bowler, D.E., and Benton, T.G. (2005). Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics. *Biol. Rev.* *80*, 202–225.

Bravo, D.A., Gleason, J.B., Sanchez, R.I., Roth, R.A., and Fuller, R.S. (1994). Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin. *J. Biol. Chem.* *269*, 25830–25837.

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

Bruel-Jungerman, E., Veyrac, A., Dufour, F., Horwood, J., Laroche, S., and Davis, S. (2009). Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *PLoS ONE* *4*, e7901.

Butcher, R.A., Fujita, M., Schroeder, F.C., and Clardy, J. (2007). Small-molecule pheromones that control dauer development in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 420–422.

Castillo, D.V., and Escobar, M.L. (2011). A role for MAPK and PI-3K signaling pathways in brain-derived neurotrophic factor modification of conditioned taste aversion retention. *Behav. Brain Res.* *217*, 248–252.

Chalasani, S.H., Chronis, N., Tsunozaki, M., Gray, J.M., Ramot, D., Goodman, M.B., and Bargmann, C.I. (2007). Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *450*, 63–70.

Chalasani, S.H., Kato, S., Albrecht, D.R., Nakagawa, T., Abbott, L.F., and Bargmann, C.I. (2010). Neuropeptide feedback modifies odor-evoked dynamics in *Caenorhabditis elegans* olfactory neurons. *Nat. Neurosci.* *13*, 615–621.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* *263*, 802–805.

Chan, C.B., Chen, Y., Liu, X., Tang, X., Lee, C.W., Mei, L., and Ye, K. (2011). PIKE-mediated PI3-kinase activity is required for AMPA receptor surface expression. *EMBO J.* *30*, 4274–4286.

Chelur, D.S., and Chalfie, M. (2007). Targeted cell killing by reconstituted caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 2283–2288.

Chiu, S.-L., and Cline, H.T. (2010). Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev.* *5*, 7.

Chronis, N., Zimmer, M., and Bargmann, C.I. (2007). Microfluidics for *in vivo* imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Methods* *9*, 727–731.

Coburn, C.M., and Bargmann, C.I. (1996). A putative cyclic nucleotide-gated channel is required for sensory development and function in *C. elegans*. *Neuron* *17*, 695–706.

Colbert, H.A., and Bargmann, C.I. (1995). Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans*. *Neuron* *14*, 803–812.

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., Smith, T.L., and Bargmann, C.I. (1997). OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* *17*, 8259–8269.

Cornils, A., Gloeck, M., Chen, Z., Zhang, Y., and Alcedo, J. (2011). Specific insulin-like peptides encode sensory information to regulate distinct developmental processes. *Development* *138*, 1183–1193.

Davis, M.W., Morton, J.J., Carroll, D., and Jorgensen, E.M. (2008). Gene activation using FLP recombinase in *C. elegans*. *PLoS Genet.* *4*, e1000028.

de Bono, M., and Maricq, A.V. (2005). Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. *Annu. Rev. Neurosci.* *28*, 451–501.

Dieks, J.K., Gawinecka, J., Asif, A.R., Varges, D., Gmitterova, K., Streich, J.H., Dihazi, H.,

Heinemann, U., and Zerr, I. (2013). Low-Abundant Cerebrospinal Fluid Proteome Alterations in Dementia with Lewy Bodies. *J. Alzheimers Dis.* *34*, 387–397.

Dieterich, C., Roeseler, W., and Srinivasan, J. (2006). *Pristionchus pacificus* genomics: from genetics to genome sequence. In: The *C. elegans* Research Community (Ed.). WormBook doi/10.1895/wormbook.1.116.1.

Dodding, M.P., Mitter, R., Humphries, A.C., and Way, M. (2011). A kinesin-1 binding motif in vaccinia virus that is widespread throughout the human genome. *EMBO J.* *30*, 4523–4538.

Englund, C., Lorén, C.E., Grabbe, C., Varshney, G.K., Deleuil, F., Hallberg, B., and Palmer, R.H. (2003). Jeb signals through the Alk receptor tyrosine kinase to drive visceral muscle fusion. *Nature* *425*, 512–516.

Freude, S., Schilbach, K., and Schubert, M. (2009). The role of IGF-1 receptor and insulin receptor signaling for the pathogenesis of Alzheimer's disease: from model organisms to human disease. *Curr. Alzheimer Res.* *6*, 213–223.

Frøkjær-Jensen, C., Davis, M.W., Ailion, M., and Jorgensen, E.M. (2012). Improved *Mos1*-mediated transgenesis in *C. elegans*. *Nat. Methods* *9*, 117–118.

Frøkjær-Jensen, C., Davis, M.W., Hollopeter, G., Taylor, J., Harris, T.W., Nix, P., Lofgren, R., Prestgard-Duke, M., Bastiani, M., Moerman, D.G., *et al.* (2010). Targeted gene deletions in *C. elegans* using transposon excision. *Nat. Methods* *7*, 451–453.

Frøkjær-Jensen, C., Davis, M.W., Hopkins, C.E., Newman, B.J., Thummel, J.M., Olesen, S.P., Grunnet, M., and Jorgensen, E.M. (2008). Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* *40*, 1375–1383.

Fu, Y., Ren, M., Feng, H., Chen, L., Altun, Z.F., and Rubin, C.S. (2009). Neuronal and intestinal protein kinase d isoforms mediate Na⁺ (salt taste)-induced learning. *Sci. Signal.* *2*, ra42.

Garza-Garcia, A., Patel, D.S., Gems, D., and Driscoll, P.C. (2007). RILM: a web-based resource to aid comparative and functional analysis of the insulin and IGF-1 receptor family. *Hum. Mutat.* *28*, 660–668.

Gems, D., Sutton, A.J., Sundermeyer, M.L., Albert, P.S., King, K.V., Edgley, M.L., Larsen, P.L., and Riddle, D.L. (1998). Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *150*, 129–155.

Grillo, C.A., Piroli, G.G., Hendry, R.M., and Reagan, L.P. (2009). Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Res.* *1296*, 35–45.

Gupta, B.P., Johnsen, R., and Chen, N. (2007). Genomics and biology of the nematode *Caenorhabditis briggsae*. In: The *C. elegans* Research Community (Ed.). WormBook [doi/10.1895/wormbook.1.136.1](https://doi.org/10.1895/wormbook.1.136.1).

Havrankova, J., Roth, J., and Brownstein, M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* *272*, 827–829.

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

Hillier, L.W., Marth, G.T., Quinlan, A.R., Dooling, D., Fewell, G., Barnett, D., Fox, P., Glasscock, J.I., Hickenbotham, M., Huang, W., *et al.* (2008). Whole-genome sequencing and variant discovery in *C. elegans*. *Nat. Methods* *5*, 183–188.

Hintsch, G., Zurlinden, A., Meskenaite, V., Steuble, M., Fink-Widmer, K., Kinter, J., and Sonderegger, P. (2002). The calyntenins-a family of postsynaptic membrane proteins with distinct neuronal expression patterns. *Mol. Cell. Neurosci.* *21*, 393–409.

Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 682–696.

Hirotsu, T., and Iino, Y. (2005). Neural circuit-dependent odor adaptation in *C. elegans* is regulated by the Ras-MAPK pathway. *Genes Cells* 10, 517–530.

Hoerndli, F.J., Walser, M., Fröhli Hoier, E., de Quervain, D., Papassotiropoulos, A., and Hajnal, A. (2009). A conserved function of *C. elegans* CASY-1 calsyntenin in associative learning. *PLoS One* 4, e4880.

Horwood, J.M., Dufour, F., Laroche, S., and Davis, S. (2006). Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 23, 3375–3384.

Hu, P.J. (2007). Dauer. In: The *C. elegans* Research Community (Ed.) WormBook, doi/10.1895/wormbook.1891.1144.1891.

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

Hukema, R.K., Rademakers, S., and Jansen, G. (2008). Gustatory plasticity in *C. elegans* involves integration of negative cues and NaCl taste mediated by serotonin, dopamine, and glutamate. *Learn. Mem.* 15, 829–836.

Iino, Y., and Yoshida, K. (2009). Parallel Use of Two Behavioral Mechanisms for Chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 29, 5370–5380.

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

Ishihara, T., Iino, Y., Mohri, A., Mori, I., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., and Katsura, I. (2002). HEN-1, a secretory protein with an LDL receptor motif, regulates sensory integration and learning in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 109, 639–649.

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.* *108*, 7589–7594.

Jansen, G., Weinkove, D., and Plasterk, R.H. (2002). The G-protein gamma subunit *gpc-1* of the nematode *C.elegans* is involved in taste adaptation. *EMBO J.* *21*, 986–994.

Jeong, P.Y., Jung, M., Yim, Y.H., Kim, H., Park, M., Hong, E., Lee, W., Kim, Y.H., Kim, K., and Paik, Y.K. (2005). Chemical structure and biological activity of the *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone. *Nature* *433*, 541–545.

Kahn-Kirby, A.H., Dantzer, J.L., Apicella, A.J., Schafer, W.R., Browse, J., Bargmann, C.I., and Watts, J.L. (2004). Specific polyunsaturated fatty acids drive TRPV-dependent sensory signaling in vivo. *Cell* *119*, 889–900

Kamil, A.C., and Roitblat, H.L. (1985). The ecology of foraging behavior: Implications for animal learning and memory. *Annu. Rev. Psychol.* *36*, 141–169.

Kano, T., Brockie, P.J., Sassa, T., Fujimoto, H., Kawahara, Y., Iino, Y., Mellem, J.E., Madsen, D.M., Hosono, R., and Maricq, A.V. (2008). Memory in *Caenorhabditis elegans* is mediated by NMDA-type ionotropic glutamate receptors. *Curr. Biol.* *18*, 1010–1015.

Kaye, J.A., Rose, N.C., Goldsworthy, B., Goga, A., and L'Etoile, N.D. (2009). A 3'UTR pumilio-binding element directs translational activation in olfactory sensory neurons. *Neuron* *61*, 57–70.

Kenyon, C., Jean, C., Erin, G., Adam, R., and Ramon, T. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* *366*, 461–464.

Kim, K., Sato, K., Shibuya, M., Zeiger, D.M., Butcher, R.A., Ragains, J.R., Clardy, J., Touhara, K., and Sengupta, P. (2009). Two chemoreceptors mediate developmental effects of dauer pheromone in *C. elegans*. *Science* *326*, 994–998.

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* 277, 942–946.

Kocabas, A., Shen, C.H., Guo, Z.V., and Ramanathan, S. (2012). Controlling interneuron activity in *Caenorhabditis elegans* to evoke chemotactic behaviour. *Nature* 490, 273–277.

Kodama, E., Kuhara, A., Mohri-Shiomi, A., Kimura, K.D., Okumura, M., Tomioka, M., Iino, Y., and Mori, I. (2006). Insulin-like signaling and the neural circuit for integrative behavior in *C. elegans*. *Genes Dev.* 20, 2955–2960.

Komatsu, H., Mori, I., Rhee, J.S., Akaike, N., and Ohshima, Y. (1996). Mutations in a cyclic nucleotide-gated channel lead to abnormal thermosensation and chemosensation in *C. elegans*. *Neuron* 17, 707–718.

Konecna, A., Frischknecht, R., Kinter, J., Ludwig, A., Steuble, M., Meskenaite, V., Indermöhle, M., Engel, M., Cen, C., Mateos, J.-M., *et al.* (2006). Calsyntenin-1 docks vesicular cargo to Kinesin-1. *Mol. Biol. Cell* 17, 3651–3663.

Kritman, M., and Maroun, M. (2013). Inhibition of the PI3 kinase cascade in corticolimbic circuit: temporal and differential effects on contextual fear and extinction. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 825–833.

Kunitomo, H., and Iino, Y. (2007). *Caenorhabditis elegans* DYF-11, an orthologue of mammalian Traf3ip1/MIP-T3, is required for sensory cilia formation. *Genes Cells* 13, 13–25.

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

L'Etoile, N.D., and Bargmann, C.I. (2000). Olfaction and odor discrimination are mediated by the *C. elegans* guanylyl cyclase ODR-1. *Neuron* 25, 575–586.

L'Etoile, N.D., Coburn, C.M., Eastham, J., Kistler, A., Gallegos, G., and Bargmann, C.I. (2002). The cyclic GMP-dependent protein kinase EGL-4 regulates olfactory adaptation in *C. elegans*. *Neuron* 36, 1079–1089.

Lee, C.C., Huang, C.C., and Hsu, K.S. (2011). Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. *Neuropharmacology* 61, 867–879.

Lee, C.C., Huang, C.C., Wu, M.Y., and Hsu, K.S. (2005). Insulin stimulates postsynaptic density-95 protein translation via the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 18543–18550.

Lee, D.L. (2002). *The Biology of Nematodes* (London, CRC press).

Lee, H.H., Norris, A., Weiss, J.B., and Frasch, M. (2003). Jelly belly protein activates the receptor tyrosine kinase Alk to specify visceral muscle pioneers. *Nature* 425, 507–512.

Lin, C.H., Yeh, S.H., Lin, C.H., Lu, K.T., Leu, T.H., Chang, W.C., and Gean, P.W. (2001). A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron* 31, 841–851.

Lin, C.H.A., Tomioka, M., Pereira, S., Sellings, L., Iino, Y., and van der Kooy, D. (2010). Insulin signaling plays a dual role in *Caenorhabditis elegans* memory acquisition and memory retrieval. *J. Neurosci.* 30, 8001–8011.

Lithgow, G.J., White, T.M., Melov, S., and Johnson, T.E. (1995). Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 7540–7544.

MacKenzie, S.J., Baillie, G.S., McPhee, I., Bolger, G.B., and Houslay, M.D. (2000). ERK2 mitogen-activated protein kinase binding, phosphorylation, and regulation of the PDE4D cAMP-specific phosphodiesterases. *J. Biol. Chem.* 275, 16609–16617.

Macosko, E.Z., Pokala, N., Feinberg, E.H., Chalasani, S.H., Butcher, R.A., Clardy, J., and Bargmann, C.I. (2009). A hub-and-spoke circuit drives pheromone attraction and social behaviour in *C. elegans*. *Nature* *458*, 1171–1175.

Matsuki, M., Kunitomo, H., and Iino, Y. (2006). $G\alpha$ regulates olfactory adaptation by antagonizing $Gq\alpha$ -DAG signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 1112–1117.

McCue, M.D. (2010). Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* *156*, 1–18.

McGrath, P.T., Xu, Y., Ailion, M., Garrison, J.L., Butcher, R.A., and Bargmann, C.I. (2011). Parallel evolution of domesticated *Caenorhabditis* species targets pheromone receptor genes. *Nature* *477*, 321–325.

McNay, E.C., and Recknagel, A.K. (2011). Brain insulin signaling: A key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes. *Neurobiol. Learn. Mem.* *96*, 432–442.

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.

Miesenböck, G., De Angelis, D.A., and Rothman, J.E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* *394*, 192–195.

Miyahara, K., Suzuki, N., Ishihara, T., Tsuchiya, E., and Katsura, I. (2004). TBX2/TBX3 transcriptional factor homologue controls olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurobiol.* *58*, 392–402.

Mohri, A., Kodama, E., Kimura, K.D., Koike, M., Mizuno, T., and Mori, I. (2004). Genetic control of temperature preference in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *169*, 1437–1450.

Nagel, G., Brauner, M., Liewald, J.F., Adeishvili, N., Bamberg, E., and Gottschalk, A. (2005). Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr. Biol.* *15*, 2279–2284.

Nonet, M.L., Saifee, O., Zhao, H., Rand, J.B., and Wei, L. (1998). Synaptic transmission deficits in *Caenorhabditis elegans* synaptobrevin mutants. *J. Neurosci.* *18*, 70–80.

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

Oda, S., Tomioka, M., and Iino, Y. (2011). Neuronal plasticity regulated by the insulin-like signaling pathway underlies salt chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurophysiol.* *106*, 301–308.

Ortiz, C.O., Faumont, S., Takayama, J., Ahmed, H.K., Goldsmith, A.D., Pocock, R., McCormick, K.E., Kunitomo, H., Iino, Y., Lockery, S., *et al.* (2009). Lateralized gustatory behavior of *C. elegans* is controlled by specific receptor-type guanylyl cyclases. *Curr. Biol.* *19*, 996–1004.

Ott, V., Benedict, C., Schultes, B., Born, J., and Hallschmid, M. (2012). Intranasal administration of insulin to the brain impacts cognitive function and peripheral metabolism. *Diabetes. Obes. Metab.* *14*, 214–221.

Palmitessa, A., Hess, H.A., Bany, I.A., Kim, Y.M., Koelle, M.R., and Benovic, J.L. (2005). *Caenorhabditis elegans* arrestin regulates neural G protein signaling and olfactory adaptation and recovery. *J. Biol. Chem.* *280*, 24649–24662.

Papassotiropoulos, A., Stephan, D.A., Huentelman, M.J., Hoerndli, F.J., Craig, D.W., Pearson, J.V., Huynh, K.D., Brunner, F., Corneveaux, J., Osborne, D., *et al.* (2006). Common kibra alleles are associated with human memory performance. *Science* *314*, 475–478.

Park, D., O'Doherty, I., Somvanshi, R.K., Bethke, A., Schroeder, F.C., Kumar, U., and Riddle, D.L. (2012). Interaction of structure-specific and promiscuous G-protein-coupled receptors mediates small-molecule signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 9917–9922.

Patel, D.S., Garza-Garcia, A., Nanji, M., McElwee, J.J., Ackerman, D., Driscoll, P.C., and Gems, D. (2008). Clustering of genetically defined allele classes in the *Caenorhabditis elegans* DAF-2 insulin/IGF-1 receptor. *Genetics* *178*, 931–946.

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, S.B., Costa, M., Wisotzkey, R., Devadhar, S., Homburger, S.A., Buchman, A.R., Ferguson, K.C., Heller, J., Platt, D.M., Pasquinelli, A.A., *et al.* (2001). Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and *ins-1*, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. *Genes Dev.* *15*, 672–686.

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.

Preuschhof, C., Heekeren, H.R., Li, S.-C., Sander, T., Lindenberger, U., and Bäckman, L. (2010). KIBRA and CLSTN2 polymorphisms exert interactive effects on human episodic memory. *Neuropsychologia* *48*, 402–408.

Reiner, D.J., Ailion, M., Thomas, J.H., and Meyer, B.J. (2008). *C. elegans* anaplastic lymphoma kinase ortholog SCD-2 controls dauer formation by modulating TGF-beta signaling. *Curr. Biol.* *18*, 1101–1109.

Robert, V., and Bessereau, J.L. (2007). Targeted engineering of the *Caenorhabditis elegans* genome following *Mos1*-triggered chromosomal breaks. *EMBO J.* *26*, 170–183.

Robertson, B.J., Moehring, J.M., and Moehring, T.J. (1993). Defective processing of the

insulin receptor in an endoprotease-deficient Chinese hamster cell strain is corrected by expression of mouse furin. *J. Biol. Chem.* *268*, 24274–24277.

Robertson, H.A., and Thomas, J.H. (2006). The putative chemoreceptor families of *C. elegans*. In: The *C. elegans* Research Community (Ed.) WormBook, doi/10.1895/wormbook.1891.1866.1891.

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*, 1751–1764.

Sakamoto, R., Byrd, D.T., Brown, H.M., Hisamoto, N., Matsumoto, K., and Jin, Y. (2005). The *Caenorhabditis elegans* UNC-14 RUN domain protein binds to the kinesin-1 and UNC-16 complex and regulates synaptic vesicle localization. *Mol. Biol. Cell* *16*, 483–496.

Salih, D.A., Rashid, A.J., Colas, D., de la Torre-Ubieta, L., Zhu, R.P., Morgan, A.A., Santo, E.E., Ucar, D., Devarajan, K., Cole, C.J., *et al.* (2012). FoxO6 regulates memory consolidation and synaptic function. *Genes Dev.* *26*, 2780–2801.

Sankaranarayanan, S., De Angelis, D., Rothman, J.E., and Ryan, T.A. (2000). The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys. J.* *79*, 2199–2208.

Sanna, P.P., Cammalleri, M., Berton, F., Simpson, C., Lutjens, R., Bloom, F.E., and Francesconi, W. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J. Neurosci.* *22*, 3359–3365.

Schiöth, H.B., Craft, S., Brooks, S.J., Frey, W.H., and Benedict, C. (2012). Brain insulin signaling and Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Mol. Neurobiol.* *46*, 4–10.

Sengupta, P. (2007). Generation and modulation of chemosensory behaviors in *C. elegans*. *Pflugers Arch.* *454*, 721–734.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., *et al.* (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539.

Solari, F., Bourbon-Piffaut, A., Masse, I., Payrastre, B., Chan, A.M., and Billaud, M. (2005). The human tumour suppressor PTEN regulates longevity and dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Oncogene* 24, 20–27.

Sperow, M., Berry, R.B., Bayazitov, I.T., Zhu, G., Baker, S.J., and Zakharenko, S.S. (2012). Phosphatase and tensin homologue (PTEN) regulates synaptic plasticity independently of its effect on neuronal morphology and migration. *J. Physiol.* 590, 777–792.

Steen, E., Terry, B.M., Rivera, E.J., Cannon, J.L., Neely, T.R., Tavares, R., Xu, X.J., Wands, J.R., and de la Monte, S.M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer’s disease – is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers Dis.* 7, 63–80.

Stetak, A., Hörndli, F., Maricq, A.V., van den Heuvel, S., and Hajnal, A. (2009). Neuron-specific regulation of associative learning and memory by MAGI-1 in *C. elegans*. *PLoS One* 4, e6019.

Steuble, M., Diep, T.-M., Schätzle, P., Ludwig, A., Tagaya, M., Kunz, B., and Sonderegger, P. (2012). Calsyntenin-1 shelters APP from proteolytic processing during anterograde axonal transport. *Biol. Open* 1, 761–774.

Stute, C., Schimmelpfeng, K., Renkawitz-Pohl, R., Palmer, R.H., and Holz, A. (2004). Myoblast determination in the somatic and visceral mesoderm depends on Notch signalling as well as on milliways(mili(Alk)) as receptor for Jeb signalling. *Development* 131, 743–754.

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.

Takeuchi, K., Gertner, M.J., Zhou, J., Parada, L.F., Bennett, M.V., and Zukin, R.S. (2013). Dysregulation of synaptic plasticity precedes appearance of morphological defects in a Pten conditional knockout mouse model of autism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 4738–4743.

The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* *282*, 2012–2018.

Thiele, T.R., Faumont, S., and Lockery, S.R. (2009). The neural network for chemotaxis to tastants in *C. elegans* is specialized for temporal differentiation. *J. Neurosci.* *29*, 11904–11911.

Tobin, D.M., Madsen, D.M., Kahn-Kirby, A., Peckol, E.L., Moulder, G., Barstead, R., Maricq, A.V., and Bargmann, C.I. (2002). Combinatorial expression of TRPV channel proteins defines their sensory functions and subcellular localization in *C. elegans* neurons. *Neuron* *35*, 307–318.

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.

Troemel, E.R., Chou, J.H., Dwyer, N.D., Colbert, H.A., and Bargmann, C.I. (1995). Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell* *83*, 207–218.

Troemel, E.R., Kimmel, B.E., and Bargmann, C.I. (1997). Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*. *Cell* *91*, 161–169.

Tsunoaki, M., Chalasani, S.H., and Bargmann, C.I. (2008). A behavioral switch: cGMP and PKC signaling in olfactory neurons reverses odor preference in *C. elegans*. *Neuron* *59*, 959–971.

Uchida, O., Nakano, H., Koga, M., and Ohshima, Y. (2003). The *C. elegans che-1* gene encodes a zinc finger transcription factor required for specification of the ASE

chemosensory neurons. *Development* 130, 1215–1224.

Vagnoni, A., Perkinton, M.S., Gray, E.H., Francis, P.T., Noble, W., and Miller, C.C.J. (2012). Calsyntenin-1 mediates axonal transport of the amyloid precursor protein and regulates A β production. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2845–2854.

Vagnoni, A., Rodriguez, L., Manser, C., De Vos, K.J., and Miller, C.C.J. (2011). Phosphorylation of kinesin light chain 1 at serine 460 modulates binding and trafficking of calsyntenin-1. *J. Cell Sci.* 124, 1032–1042.

Voglis, G., and Tavernarakis, N. (2008). A synaptic DEG/ENaC ion channel mediates learning in *C. elegans* by facilitating dopamine signalling. *EMBO J.* 27, 3288–3299.

Vogt, L., Schrimpf, S.P., Meskenaite, V., Frischknecht, R., Kinter, J., Leone, D.P., Ziegler, U., and Sonderegger, P. (2001). Calsyntenin-1, a proteolytically processed postsynaptic membrane protein with a cytoplasmic calcium-binding domain. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 151–166.

Vowels, J.J., and Thomas, J.H. (1994). Multiple chemosensory defects in *daf-11* and *daf-21* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 138, 303–316.

Ward, S. (1973). Chemotaxis by the nematode *Caenorhabditis elegans*: identification of attractants and analysis of the response by use of mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 817–821.

Wei, X., Potter, C.J., Luo, L., and Shen, K. (2012). Controlling gene expression with the Q repressible binary expression system in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Methods* 9, 391–395.

White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., and Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Phil. Tran. R. Soc. Lond. B* 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. Genetics* 28, 160–164.

Wolkow, C.A., Kimura, K.D., Lee, M.-S., and Ruvkun, G. (2000). Regulation of *C. elegans* life-span by insulin like signaling in the nervous system. *Science* 290, 147–150.

Yamada, K., Hirotsu, T., Matsuki, M., Butcher, R.A., Tomioka, M., Ishihara, T., Clardy, J., Kunitomo, H., and Iino, Y. (2010). Olfactory plasticity is regulated by pheromonal signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 329, 1647–1650.

Yang, P.C., Yang, C.H., Huang, C.C., and Hsu, K.S. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for stress protocol-induced modification of hippocampal synaptic plasticity. *J. Biol. Chem.* 283, 2631–2643.

Zhang, F., Wang, L.P., Brauner, M., Liewald, J.F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P.G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A., *et al.* (2007). Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446, 633–639.

Zhang, Y., Lu, H., and Bargmann, C.I. (2005). Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 438, 179–184.

Zielinska, D.F., Gnad, F., Jedrusik-Bode, M., Wiśniewski, J.R., and Mann, M. (2009). *Caenorhabditis elegans* has a phosphoproteome atypical for metazoans that is enriched in developmental and sex determination proteins. *J. Proteome. Res.* 8, 4039–4049.