

論文の内容の要旨

論文題目： 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*

氏名： 大野 速雄

(序論)

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。

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、この連合学習の基盤となる分子機構を解析した。

(結果)

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 に誘引されるが、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、NaCl を忌避するように行動を変化させる (塩走性学習)。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、線虫の塩濃度嗜好性を詳細に解析した結果、「餌を与えられた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。

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。左右の ASE 神経においてそれぞれ細胞死を誘導した株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。また、ASE 神経の分化に関わる Zn フィンガータンパク質の変異体や ASER 神経のみで発現する受容体型グアニル酸シクラーゼの変異体でも塩濃度嗜好性の可塑性に異常が見られた。これらの結果から、ASER 神経が餌の有無に応じた塩濃度嗜好性の逆転に必須の役割を担うことが示唆された。

ASER 神経におけるインシュリン/PI3-キナーゼ (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。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、インシュリン/IGF-1 受容体、PI3-キナーゼ、ホスホイノシチド依存性キナーゼ、Akt/PKB キナーゼの変異体では、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。

インシュリン/IGF-1 受容体 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。しかし、RT-PCR 法により同定された新奇アイソフォームである DAF-2c 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り、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。

これらのアイソフォームに蛍光タンパク質を付加して細胞内局在を解析した結果、DAF-2c は ASER 神経の軸索領域に強く局在することが明らかとなった。さらに、線虫に 1 時間程度の飢餓を経験させると DAF-2c の軸索局在が強まることがわかった。

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であったが、飢餓を経験した塩濃度からの忌避に異常を示した。*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わかった。この結果と一致して *casy-1* 変異体では DAF-2c の軸索局在が消失することが明らかとなり、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 の選択的な軸索輸送に関与することが示唆された。

DAF-2a は軸索への局在が弱い、キネシン-1 と結合する CASY-1 の細胞内ドメインを付加することにより軸索局在が強まる。このキメラタンパク質を ASER 神経に発現させる実験により、DAF-2a と DAF-2c の機能の差が軸索局在に由来すること、さらに *casy-1* 変異体の行動異常が DAF-2 の軸索局在の消失に由来することが示された。

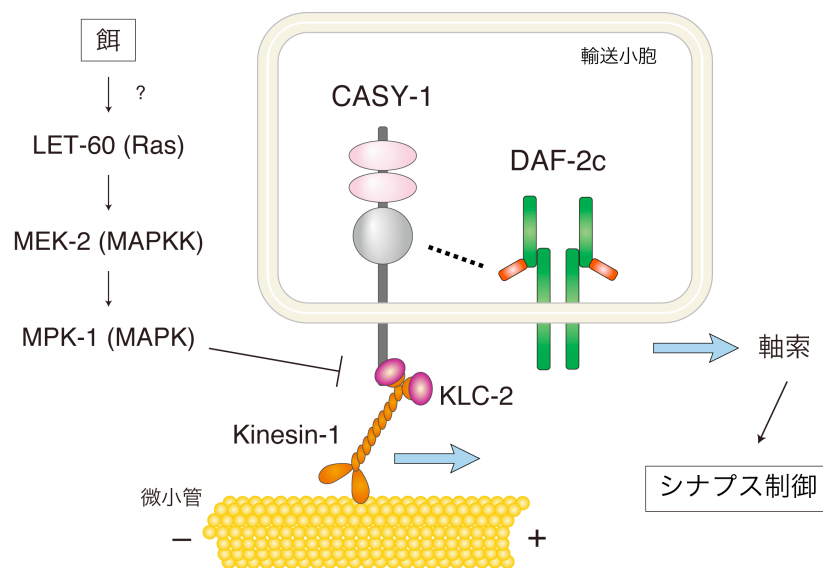
pH 感受性の GFP 改変体である pHluorin をシナプトブレビンに融合させたプローブを用いて ASER 神経からのシナプス放出の可視化を行うと、飢餓を経験した塩濃度から濃度を低下させる

ステップ刺激に対して、*daf-2* 変異体や *casy-1* 変異体では野生型よりも強いシナプス放出が見られた。*daf-2* 変異体のこの表現型は、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。これらの結果は、軸索における DAF-2c がシナプス放出の制御に関与することを示唆する。

さらに CASY-1 の上流で機能する経路の探索を行った。Ras-MAPK 経路の構成因子である Ras、ERK キナーゼ/MAPKK、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。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。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。この塩走性異常もやはり *casy-1* の欠失により抑圧された。

キネシン軽鎖 KLC-2 の ERK 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。この ASER 神経における KLC-2(S452A)の強制発現は、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。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、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、CASY-1/キネシン-1 複合体が DAF-2c を ASER 神経の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司り、この CASY-1 依存の DAF-2c 軸索輸送を Ras-MAPK 経路が負に制御することが示唆された (図)。



図： DAF-2c 軸索輸送メカニズムのモデル

(考察)

本研究では、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。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と考えられる。

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、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。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ンテ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。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。