

論文の内容の要旨

論文題目 「線虫の嗅覚応答における Ras-MAPK 経路の機能に関する研究」

氏名 広津 崇亮

(序)

Ras-MAP キナーゼシグナル伝達系は、主に細胞分化や増殖において必須の働きをしている。線虫 *C. elegans* においても、この経路は陰門形成の誘導などいくつかの発生段階で機能していることが知られている。近年哺乳類では、Ras-MAPK 経路が神経系でも発生や記憶学習に関与していることが明らかにされ、脚光を浴びている。しかし、線虫におけるこの経路の神経系での働きについては、未だに全く報告されていない。そこで私は Ras-MAPK 経路の神経系での機能に注目して解析を行い、この経路が嗅覚に関与することを見出した。

(結果と考察)

線虫の揮発性物質 (匂い物質) への誘引行動には、感覚神経 AWA と AWC が関与している。AWC で受容されるイソアミルアルコールなどの揮発性物質に対して野生株は正の化学走性を示すが、Ras の機能上昇変異体 *let-60(gf)* はこの化学走性に強い欠陥を示した。この表現型は Ras の下流で働く KSR、MAPKK、MAPK の機能低下変異 *ksr-1(lf)*、*mek-2(lf)*、*mpk-1(lf)* により抑圧された。また Ras、Raf の機能低下変異体 *let-60(lf)*、*lin-45(lf)* および MAPKK の完全欠失変異体 *mek-2(0)* でも、化学走性の低下が見られた。以上の結果は、AWC を介した嗅覚応答において、Ras-MAPK 経路が機能していることを示唆するものである。また AWA で受容されるジアセチル、ピラジンや AWA、AWC 両

方で受容されるトリメチルチアゾールへの化学走性についても、同様の表現型が認められた。よって AWA を介した嗅覚応答にもこのシグナル伝達経路が働いていると考えられる。

Ras-MAPK 経路は細胞分化に働くことが知られていることから、化学走性に関わる神経の分化に関与している可能性が考えられる。そこでヒートショックプロモーターを用い、野生型で時期特異的に *let-60(gf)* を発現させ化学走性への影響を調べた。神経細胞の分化する胚発生時期での発現は化学走性に影響を与えなかったが、成虫期での発現により、匂い物質に対する走性が低下した。同様に、*let-60(lf)* 変異株において *let-60(+)* を発現させる実験でも、成虫期での発現により揮発性物質に対する走性が回復した。これらの結果より、Ras-MAPK 経路は細胞の分化に関与しているのではなく、すでに成熟した細胞において働いていることが示唆された。

次に、この経路が働いている細胞を同定する目的で、AWC 特異的に *let-60* を発現させて化学走性への影響を調べた。すると野生型の AWC での *let-60(gf)* の発現はイソアミルアルコール (AWC 受容性) に対する走性を低下させたが、ジアセチル (AWA 受容性) に対する走性には影響を及ぼさなかった。同様に *let-60(lf)* 株の AWC での *let-60(+)* の発現もイソアミルアルコールに対する走性のみ回復させた。これらの結果により Ras-MAPK 経路は感覚神経 AWC において機能していることが示された。

以上のことをまとめると Ras-MAPK 経路は既に分化を終えた成熟した感覚神経において機能していることになる。実際に感覚神経 AWC に特異的に GFP を発現させて、嗅覚に欠陥のある変異体の AWC の形態を観察したところ、大きな異常が認められなかった。また *let-60* の発現パターンについて GFP レポーターを用いて調べたところ確かに AWC での発現が認められた。これらの結果は先に述べた結論を補完するものである。

それでは、Ras-MAPK 経路はどのようなシグナルを受けて、感覚神経において活性化するのであろうか。そこで、そのシグナルを同定するために、抗活性化型 MAPK 抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、イソアミルアルコール (AWC 受容性) 刺激を与えると MAPK が AWC において活性化することが明らかとなった。この活性化は刺激後 10 秒以内に見られる非常に早い反応であり、AWC 神経の全体 (神経突起、細胞体) に活性化型 MAPK の染色が認められた。しかし、唯一感覚繊毛には見られなかった (図 1)。

次に、AWC 神経において匂い刺激の伝達経路を形成している因子の変異体についても、同様の抗体染色実験を行った。AWC 神経においては、レセプターが匂い刺激を受容すると、そのシグナルは G 蛋白質 α サブユニット ODR-3 を介して cGMP 系へと伝えられる。次に cGMP 濃度の上昇に応じて開く環状ヌクレオチド感受性イオンチャネル TAX-2/TAX-4 が働く。脱分極により生じた電気的刺激は、電位感受性カルシウムチャネル ($\alpha 1$ サブユニットは UNC-2) によって神経全体に伝えられると考えられる。*odr-3*、*tax-2*、*tax-4*、*unc-2* 変異体では、匂い刺激に応答した MAPK の活性

化は見られなかった。従って、Ras-MAPK 経路はこれらの因子の下流に位置しており、匂い刺激に応じて活性化し神経機能を制御しているのではないかと考えられる。

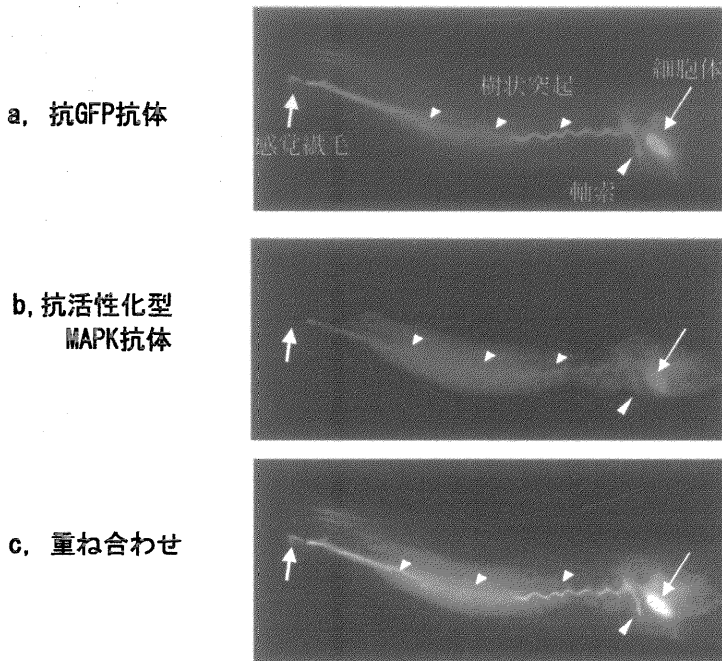


図1 匂い刺激にตอบสนองした MAPK の活性化
野生型にイソアミルアルコール (AWC 受容性) 刺激を 10 秒間与えた後に固定し、抗活性化型 MAPK 抗体を用いて免疫組織染色を行った。AWC 神経を可視化するために AWC に GFP を発現させ、抗 GFP 抗体との二重染色を行った (a)。b は抗活性化型 MAPK 抗体による染色、c は a と b を重ね合わせたもの。匂い刺激にตอบสนองして、AWC 神経において MAPK が活性化した。活性化型 MAPK の染色は AWC 神経全体 (神経突起、細胞体) で見られたが、唯一感覚繊毛には染色が認められなかった。

抗活性化型 MAPK 抗体を用いた免疫組織染色実験では、イソアミルアルコール刺激にตอบสนองして、AWC 神経だけでなく AWB 神経でも MAPK の活性化が認められた。但し、AWB では高濃度のイソアミルアルコールに対してのみ MAPK が活性化された。AWB は、揮発性物質からの忌避行動を媒介する感覚神経である。そこで、イソアミルアルコールの濃度を高くして化学走性を調べてみると、誘引行動ではなく忌避行動を引き起こすことがわかった。機能的な AWB の存在しない *lim-4* 変異体はこの忌避行動に欠陥を示した。また、*odr-3*、*tax-2*、*tax-4* 変異体なども欠損の表現型を示した。よって、高濃度イソアミルアルコールは、AWB 神経でこれらの因子を介して感知され、忌避行動を導くと考えられる。Ras-MAPK 経路の変異体のうち、*let-60(gf)*、*lin-45(lf)*、*mek-2(0)*はこの忌避行動に異常を示すことから、Ras-MAPK 経路は誘引行動だけでなく、高濃度の匂い物質からの忌避行動にも関与していることが示唆された。

一方、私は嗅覚行動の可塑性の現象を発見した。 10^{-4} のイソアミルアルコール水溶液中に線虫を 5 分間おいてあらかじめ匂いを嗅がせると、 10^{-2} という通常の条件下で強い誘引行動を引き起こす濃度のイソアミルアルコールに対して、弱い忌避行動を示すようになった。この行動の可塑性は、ベンズアルデヒドやピラジン、チアゾールでも認められた。

先述の *lim-4* 変異体は、イソアミルアルコールについての可塑性に欠陥を示した。また、感覚神経

AWC から入力を受ける介在神経 AIY の機能が欠損した *itx-3* 変異体も異常を示した。この結果は、イソamilアルコールへの誘引行動を媒介する AWC だけでなく、忌避行動を媒介する AWB および介在神経 AIY が可塑性に必要であることを示唆している。AWC、AWB で感知され下流に送られた誘引、忌避シグナルが、AIY を含む介在神経により処理され、行動変化が引き起こされるというモデルが考えられる。

Ras-MAPK 経路の変異体 *let-60(gf)*、*let-60(lf)*、*mek-2(0)* は上記のすべての揮発性物質に対する化学走性の可塑性に著しい欠陥を示した。従って、Ras-MAPK 経路は嗅覚応答の可塑性においても重要な働きをしていると考えられる。イソamilアルコールをあらかじめ嗅がせる条件下（濃度 10^{-4} 、5 分）で、活性化型 MAPK の抗体染色を行ったところ、可塑性成立に必要なことがわかっている 3 種の神経のうち、AWC、AIY で MAPK の活性化が認められた。この結果は、Ras-MAPK 経路が可塑性において、感覚神経における嗅覚受容だけでなく、介在神経における情報処理の段階でも働いている可能性を示唆している。

哺乳類のシナプス可塑性にはグルタミン酸レセプターが中心的な役割をしていることが知られている。線虫の AMPA 型グルタミン酸レセプターホモログをコードする *glr-1* の変異体は、この嗅覚応答における可塑性に欠陥を示した。よって、線虫においてもグルタミン酸レセプターがシナプス可塑性の成立に関与している可能性が考えられる。

（今後の展望）

本研究により、線虫の Ras-MAPK 経路が嗅覚に関与していることが初めて明らかとなった。この経路の嗅覚への関与は他の生物も含めて新規の知見である。他生物でも同様のメカニズムが成り立っているのかは非常に興味深い点であり、今後の解析が待たれる。Ras-MAPK 経路は電位感受性カルシウムチャンネルの下流に位置しており、匂い刺激に応答して活性化することがわかった。では、活性化した Ras-MAPK 経路はその下流で何をしているのか。その疑問点の解明が、今後の最大の課題である。それには、*let-60(gf)* 変異体を用いたサブレッサースクリーニングが最も有効であると考えられる。また、MAPK の結合部位のコンセンサス配列をもとにして、ターゲット因子をゲノム上で検索し、逆遺伝学的手法を用いることも可能かもしれない。

私は嗅覚応答の可塑性現象を発見した。今回見つけた可塑性は比較的短時間で成立すること、介在神経も含めた神経ネットワークが関与している点で大変興味深い現象だと思われる。この可塑性には Ras-MAPK 経路が重要な働きをしていることがわかった。今後は、Ras-MAPK 経路が感覚神経、介在神経どちらで、あるいは両方で働いているのかを明らかにし、実際にどのような機構を制御しているのかを解明したい。また、グルタミン酸経路との関係も明らかになれば、非常に面白いと思われる。