

論文の内容の要旨

論文題目

線虫 *C. elegans* の嗅覚応答を調節する G タンパク質シグナルの遺伝学的機能解析

Functional and genetic analysis of G protein signaling that modulates

olfactory responses in *C. elegans*

氏名 松木 正尋

線虫 *C. elegans* は 959 個の細胞から構成されており、その約 3 分の 1 が神経細胞である。高等動物と比べると線虫には驚くほど少数の神経細胞しか存在しないにも関わらず、線虫は多種の感覚受容に基づいた走性行動を行うことができる。中でも、嗅覚行動（匂い物質に対する化学走性行動）は比較的研究の歴史が古く、嗅覚行動に欠陥を示す変異体の解析から匂いの受容に関与する遺伝子が複数同定されてきた。我々の研究室でも、線虫の Ras-MAPK 経路が嗅覚行動に関わることを既に報告している。しかしながら、線虫における嗅覚行動の制御メカニズムには未解明な部分が多く、その全容は未だ明らかになっていない。

そこで私は、線虫の嗅覚行動を制御する新たな機構の同定とその解明を目的として本研究を始めた。既存の変異体の中から嗅覚行動に異常を示す変異体を探索したところ、私は線虫の G_{α} をコードする *goa-1* (G_{α} protein, α subunit) 遺伝子の変異体が興味深い表現型を示すことを発見した。*goa-1* 変異体では、AWC 感覚神経で受容される匂い物質に対する化学走性が亢進していたが、一方 AWB 感覚神経で受容される匂い物質に対する忌避行動に欠陥があった。

G_{α} は哺乳類の神経系で最も豊富に存在する G タンパク質であり、神経活性を調節する重要な因子であると考えられている。 G_{α} の分子機能に関して *in vitro* の系ではこれまでに広く解析が進んでおり、 G_{α} が $\beta\gamma$ サブユニットを介して神経細胞のカリウムチャネルやカルシウムチャネルを直接的に制御することなどが知られている。しかしながら *in vivo* における G_{α} の生理的機能はほとんど理解されていない。そこで私は、線虫の嗅覚行動に関与する GOA-1 G_{α} の機能に注目して以後の解析を行った。

1) *goa-1* が関与する嗅覚順応欠陥の解析

goa-1 変異体では特に濃い匂い物質に対する化学走性が亢進していた。過去の知見から、線虫を高濃度の匂い物質に一定時間曝すとその匂い物質に順応し（嗅覚順応）、結果的に化学走性が著しく減衰することが知られている。このような知見と *goa-1* 変異体の特徴から、私は GOA-1 が嗅覚順応に関与しているのではないかと考えた。そこで *goa-1* 変異体の嗅覚順応を調べたところ、*goa-1* 変異体は AWC 感覚神経で受容されるベンズアルデヒド、イソアミルアルコール、ブタノンに対する嗅覚順応に異常を示した。この嗅覚順応欠陥は *goa-1* 遺伝子の導入により完全に回復したことから、*goa-1* は AWC 感覚神経受容性の匂い物質に対する嗅覚順応に必要であることが確認された。

次に、*goa-1* が線虫のどの神経細胞で機能するのか調べるため、特定の神経細胞（群）で発現を誘導するプロモーターを用いたレスキュー実験を行った。*goa-1* 遺伝子を AWC 感覚神経で発現させたところ、*goa-1* 変異体の嗅覚順応欠陥は有意に回復した。これに対し、*goa-1* 遺伝子を AWC 感覚神経の下流に位置する介在神経で広く発現させても嗅覚順応欠陥は回復しなかった。この結果より、AWC 感覚神経での *goa-1* の機能が嗅覚順応の制御に重要であることが示唆された。

運動や産卵行動では、EGL-30 $G_q\alpha$ が GOA-1 $G_o\alpha$ と拮抗して機能することが知られている。そこで、複数の *egl-30* の機能獲得型変異体における嗅覚順応を調べたところ、それらはいずれも著しい嗅覚順応を示した。さらに、野生型の AWC 感覚神経で恒常的活性化型の EGL-30 タンパク質である EGL-30(Q205L) を発現させても同様の順応欠陥が観察された。したがって、GOA-1 と EGL-30 は AWC 感覚神経でそれぞれ嗅覚順応を正と負の両面から拮抗的に調節していると考えられる。

通常、 $G_q\alpha$ の下流では PLC β が機能し、産生される IP₃ やジアシルグリセロール (DAG) がセカンドメッセンジャーとして働くことが知られている。実際に、線虫の前進後退運動は DAG で制御されている。そこで嗅覚順応の制御にも DAG が機能している可能性を考え、DAG のアナログであるホルボールエステル (PMA) を線虫に与えたところ、嗅覚順応が著しく阻害された。この結果から、 $G_q\alpha$ の過剰な活性化は DAG レベルの上昇を引き起こし、その結果として嗅覚順応が抑制されると考えられる。

DAG は PLC β によって産生される一方、ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) によってリン酸化されホスファチジン酸へと変換される。つまり DGK には DAG シグナルを終結させる役目がある。線虫の運動神経では、DGK θ をコードする DGK-1 が機能していることが見出されているが、予想に反して *dgk-1* 変異体の嗅覚順応はほとんど正常であった。そこで別の DGK の関与を疑い、哺乳類の DGK ϵ に相同性の高い DGK-2 の変異体と、DGK $\alpha/\beta/\gamma$ に相同性の高い DGK-3 の変異体を得て嗅覚順応を調べたが、どちらの変異体も嗅覚順応に欠陥を示さなかった。しかしながら *dgk-1* と *dgk-3* の二重変異体 (*dgk-3; dgk-1*) では強い嗅覚順応欠陥が観察された。つまり、DGK-1 と DGK-3 の重複した機能が正常な嗅覚順応に必要であると考えられる。

嗅覚順応における GOA-1 と DAG シグナル経路の関係性を探るために、*dgk-3; dgk-1* 変異体の AWC 感覚神経で GOA-1(Q205L) を発現させたところ、*dgk-3; dgk-1* 変異体の嗅覚順応欠陥は有意に抑圧された。この結果から、GOA-1 は DAG レベルを下げることで順応を制御しているということが強く示唆された。一方、EGL-30(Q205L) が発現している株で GOA-1(Q205L) を発現させても嗅覚順応欠陥を抑圧する効果

がなかったことから、GOA-1はEGL-30の上流で機能していることが示唆された。

以上の結果から、GOA-1 $G_0\alpha$ がEGL-30 $G_q\alpha$ の活性を抑制することでDAGの産生を負に制御することが線虫の嗅覚順応に重要であると考えられる。

2) *goa-1* が関与する嗅覚忌避行動欠陥の解析

goa-1 変異体はADL感覚神経で受容されるオクタノールに対して忌避行動の亢進を示したが、AWB感覚神経で受容されるノナノンに対しては逆に忌避行動の欠陥を示した。もし*goa-1* 変異体の忌避行動欠陥の原因がノナノンに対する感受性低下であるならば、オクタノールとノナノンが同時に存在していても忌避行動に欠陥は生じないと予想される。そこで、オクタノールとノナノンを同時に置いて化学走性のアッセイを行ったところ、*goa-1* 変異体は忌避行動に著しい欠陥を示した。この結果から、*goa-1* 変異体はノナノンを受容できないために忌避行動に欠陥を示すのではなく、ノナノンの異常なシグナルが*goa-1* 変異体の忌避行動を攪乱するため、結果的に忌避行動に欠陥を示すのだと考えられる。

ノナノンからの忌避行動において*goa-1*が機能する神経細胞を同定するために、前述と同様のレスキュー実験を行った。まずポジティブコントロールとして神経系で広範囲に*goa-1*遺伝子を発現させるところ、ノナノンに対する忌避行動欠陥は完全にレスキューされた。次に、嗅覚順応の解析で用いた*gpa-13*プロモーターを用いてAWC感覚神経とASH感覚神経で*goa-1*遺伝子を発現させたところ、忌避行動欠陥はほとんど回復しなかった。しかし、*ins-1*プロモーターを用いてAIA介在神経を含む神経細胞群で*goa-1*遺伝子を発現させたところ、忌避行動欠陥は有意に回復した。これらの結果から、嗅覚順応と忌避行動においてGOA-1はそれぞれ別の神経細胞(群)で機能していると考えられる。

線虫では、これまでも G_0 - G_q 経路が神経筋接合部で機能することは既に報告されている。しかしながら、感覚神経や介在神経における G_0 の機能はほとんど未知である。本研究では G_0 が感覚神経や介在神経で機能し、化学走性やその行動可塑性の調節因子として機能していることを示した。哺乳類では中枢神経系でも $G_0\alpha$ が強く発現していることから、本研究を通じて得られた知見は、哺乳類における*in vivo*での $G_0\alpha$ 機能の理解につながると期待される。