

論文内容の要旨

線虫の化学走性学習におけるインスリン/PI 3 キナーゼシグナル伝達経路の機能の遺伝学的解析
(Genetic analysis of the function of insulin/PI 3-kinase pathway in the regulation of salt chemotaxis learning in the nematode *Caenorhabditis elegans*)

富岡 征大

インスリンは筋肉、脂肪細胞、肝臓などのインスリン受容体に作用し、代謝、細胞増殖、遺伝子発現などを制御するシグナル伝達を引き起こすことが広く知られている。一方、インスリンやインスリン受容体は脳においても発現し、また、インスリンは末梢から脳内に入ることが知られている。近年、インスリンシグナル伝達経路がヒト、マウス、ラットなどにおける記憶学習に関与することが示唆されているが、これらの知見は断片的なものであり生体内における記憶学習を制御するインスリン経路の作用メカニズムはまだ確立されていない。

線虫 *Caenorhabditis elegans* においてもインスリン様シグナル伝達経路が存在し、耐性幼虫形成、代謝、寿命などを制御することが知られている。これらの制御において、インスリン受容体ホモログ DAF-2 の下流で、AGE-1(PI 3 キナーゼ)、PDK-1(ホスホイノシチド依存性キナーゼ)、AKT-1/2 (Akt/PKB)よりなるキナーゼカスケードが DAF-16(FOXO 型転写因子)を負に制御するシグナル伝達が働く (図 1)。当研究室により *daf-2* の機能低下型変異体は線虫における行動可塑性現象に欠損を示すことが明らかとなり、インスリン様シグナル伝達経路が線虫における学習行動に関与する可能性が示唆されている。線虫は遺伝学的操作が容易なことに加え、少数の神経細胞からなる単純な神経系を持つことから、学習行動を分子レベルまたは神経回路レベルで解析する上

で有用なモデル生物である。私は、この単純なモデル生物である線虫を用いて学習行動に関与するインスリン様シグナル伝達経路の制御メカニズムの解析を行った。

線虫は NaCl などの水溶性物質に対して誘引行動を示す。一方、線虫を一定時間 NaCl に曝すと NaCl に対する走性は誘引から忌避へと変化する。この現象は餌が豊富にある条件下では成立しないことから、「飢餓」と「水溶性物質」の2つの情報の統合が行動可塑性に必要であることが推定される(以下では、この現象を化学走性学習と呼ぶ)。上述の通り *daf-2* 変異体は化学走性学習に著しい欠損を示す。すなわち、*daf-2* 変異体は飢餓条件下で NaCl に曝した後も依然として NaCl に対して誘引行動を示し、条件付けによる化学走性の可塑的变化を殆んど示さない。耐性幼虫形成などの制御において *daf-2* の下流で機能するシグナル伝達因子の変異体において化学走性学習を調べたところ、*age-1*、*pdk-1*、*akt-1* の機能低下型変異体において *daf-2* 変異体と同様の学習欠損が見られた。従って、化学走性学習においても *daf-2* の下流で *age-1/pdk-1/akt-1* よりなる PI3 キナーゼシグナル伝達経路が働く可能性が示唆された。一方、*daf-2* 変異体の学習欠損は *daf-16* の機能喪失型変異により抑圧されないことから、化学走性学習においては *daf-2* が制御するシグナルカスケードには *daf-16* 非依存の経路が存在する可能性が示唆された。

C. elegans のゲノム上でインスリンと相同なペプチドをコードする遺伝子が約 40 種類予測されている。その中で、DAF-28 は耐性幼虫形成や寿命制御において DAF-2 の主なりガンドの1つであることが示唆されている。しかし、*daf-28* 変異体は正常な化学走性学習を示した。一方、ヒトインスリンと最も相同性の高いインスリン様ペプチドをコードする *ins-1* の変異体は耐性幼虫形成、寿命制御ともに正常であるが、化学走性学習に顕著な欠損を示した。更に、*ins-1* 変異は *age-1* 機能喪失型変異体の学習欠損を増強しないことから、*ins-1* と *age-1* は同経路で機能することが示唆された。以上の結果より、化学走性学習において INS-1 は DAF-2 の主なりガンドとして働き、異なる生命現象では異なるリガンドによりインスリン様シグナル伝達経路が制御されている可能性が示唆された。

daf-18 は PI3 キナーゼの逆反応を触媒する酵素である PTEN のホモログをコードしており、*daf-18* 変異体では PI3 キナーゼの主な生成物である $PI(3,4,5)P_3$ の量が上昇している。*daf-18* の機能低下型もしくは機能喪失型変異体は NaCl に対する化学走性の顕著な低下を示した。*daf-18* 変異体の化学走性欠損は *daf-2*、*age-1*、*akt-1* の変異により抑圧され、逆に、*daf-2* や *age-1* の変異体の学習欠損は *daf-18* 変異により抑圧された。従って、*daf-2/age-1* 経路と *daf-18* の拮抗する活性により化学走性の強さや方向性が制御されることが示唆された。一方、*age-1(null)*

と *daf-18(null)* の 2 重機能喪失型変異体は顕著な学習欠損を示すことから、*daf-2/lage-1* 経路は化学走性学習の制御において重要な働きをしていると考えられる。

化学走性学習においてインスリン様シグナル伝達経路が機能する時期を調べるために、*ins-1* 変異体の時期特異的レスキュー実験を行った。*ins-1* 変異体に *ins-1* cDNA を成虫期のみにおいて発現させることによりその学習欠損がレスキューされた。従って、INS-1 は成虫期において機能することが示唆された。同様の時期特異的レスキュー実験を *daf-18* 変異体においても行ったところ、*daf-18* 変異体の化学走性欠損も成虫期における *daf-18* の発現によりレスキューされた。以上の結果より、インスリン様シグナル伝達経路と DAF-18 はともに神経発生の完了した成虫期において機能することが示唆された。

化学走性学習においてインスリン様シグナル伝達経路が機能する細胞を調べるために、インスリン様シグナル伝達経路の変異体における細胞特異的レスキュー実験を行った。*age-1* 変異体の学習欠損は、主たる水溶性物質受容性の感覚神経である ASE 神経において *age-1* cDNA を発現させることにより完全にレスキューされた。一方、その他の水溶性物質受容性の感覚神経や、一群の介在神経、腸などにおける発現では学習欠損はレスキューされなかった。従って、化学走性学習において *age-1* は主に ASE 感覚神経において機能することが示唆された。ASE 神経は左右対称な位置にある ASER と ASEL の 2 種類の神経よりなる。これらの神経は細胞の形態や連結する神経回路は似ているが、受容する化学物質の相違など、いくつかの異なる機能を持つことが明らかになってきている。化学走性学習において *age-1* が ASER と ASEL で異なる機能を持つ可能性を調べるために、ASER もしくは ASEL 神経に特異的に発現を誘導するプロモーターを用いて、*age-1* 変異体の細胞特異的レスキュー実験を行った。その結果、*age-1* を ASER 神経において発現させることにより、*age-1* 変異体の学習欠損は完全にレスキューされた。一方、*age-1* の ASEL 神経における発現によっては学習欠損はレスキューされなかった。従って、*age-1* は ASE 神経の中でも ASER 神経において主に機能することが示唆された。*daf-18* 変異体の化学走性欠損も ASER 神経における *daf-18* の発現により完全にレスキューされ、ASEL 神経における *daf-18* の発現によってはレスキューされなかった。従って、DAF-18 も AGE-1 と同様に ASER 感覚神経において主に機能することが示唆された。

INS-1::Venus 融合タンパク質は ASER 神経を含む多くの介在神経からの入力を受ける AIA 介在神経において強い発現が見られた。更に、INS-1::Venus は AIA 介在神経のプレシナプス部位に局在が見られた。*ins-1* 変異体に AIA 介在神経を含む一群の神経において *ins-1* を発現させることによりその学習欠損がレスキューされた。

一方、化学物質受容性の感覚神経や、AIA 以外の一群の介在神経、腸などにおける *ins-1* の発現によっては学習欠損はレスキューされなかった。従って、*ins-1* の AIA 介在神経における発現は化学走性学習に重要であると考えられる。AIA 介在神経の化学走性学習における必要性を調べるために AIA 介在神経をレーザー照射により除去し、化学走性学習への影響を調べた。その結果、AIA 介在神経を除去した線虫は顕著な学習欠損を示した。従って、AIA 介在神経とおそらく AIA 介在神経からの INS-1 の分泌が化学走性学習に必要であることが示唆された。

以上の解析より、「化学走性学習において AIA 介在神経より放出された INS-1 ペプチドが ASER 感覚神経における DAF-2 受容体に作用し、下流の AGE-1 PI 3 キナーゼによるシグナル伝達経路を活性化することで化学走性の強さや方向性を制御する」という線虫の学習行動におけるインスリン様シグナル伝達経路の制御モデル (図 2) が示唆された。

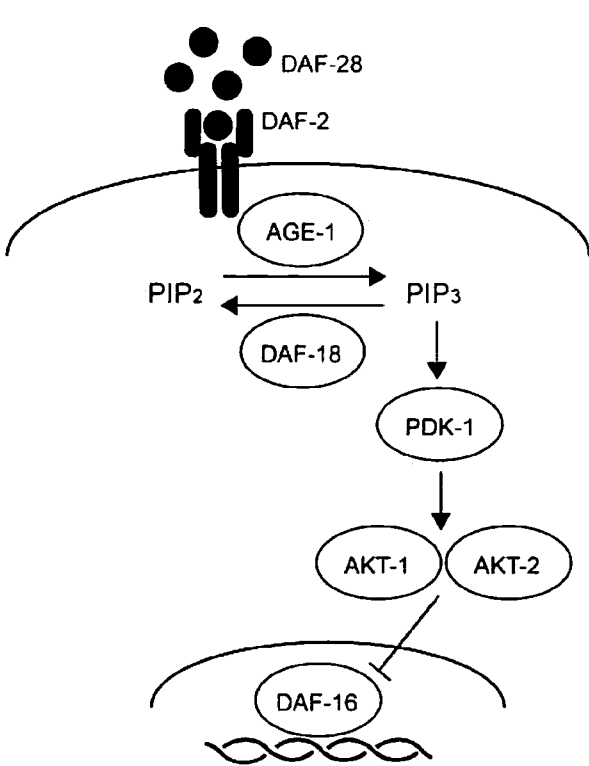


図 1 線虫において耐性幼虫形成、脂質代謝、寿命などを制御するインスリン様シグナル伝達経路

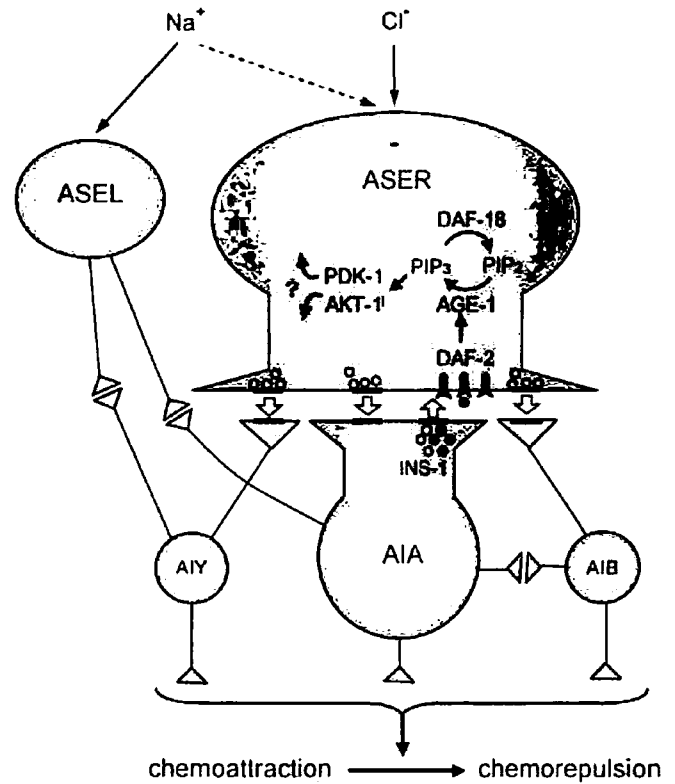


図 2 線虫の化学走性学習におけるインスリン様シグナル伝達経路の制御モデル