

## 論文の内容の要旨

線虫 *C. elegans* における嗅覚順応異常変異体の単離と解析

(Isolation of mutants defective in olfactory adaptation in *C. elegans*)

動物は、様々な感覚により周囲の環境を認識し、それに対する応答を示す。その中で嗅覚は、広く動物に保存された感覚であり、餌の匂いや危険を知らせる匂いなど、生存、繁殖に直接結びつくような重要な情報を与える。嗅覚応答の可塑性である嗅覚順応は、匂いに連続的に曝されることによって匂いに対する応答が減弱する現象である。これは、動物が匂いに対する感度を調節するためのメカニズムであり、様々な濃度の匂いを適切に感知するために必要である。嗅覚順応は神経の性質の短時間での可塑的な変化の結果であり、哺乳類では感覚神経内での  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを介したフィードバックなどが関与することが知られる。

線虫 *C. elegans* は寒天プレート上で、好きな匂いに対して寄って行く行動を示すが、あらかじめその匂いを嗅がせておくと、その後には匂いに寄らなくなる。この行動変化が線虫における嗅覚順応である。これまで、遺伝学的解析に適する実験動物であるという利点をもとに、線虫の嗅覚順応に関与する新たな分子、メカニズムが明らかにされてきた。例えば、ベンズアルデヒドによる嗅覚順応には、EGL-4 (cGMP 依存性キナーゼ)、GOA-1/EGL-30 ( $G\alpha o/G\alpha q$ )、TBX-2 (TBX2/TBX3 転写因子) ARR-1 ( $\beta$ -アレスチン) が必要であり、これらの分子は匂いを受容する嗅覚神経内で働くことが報告されている。一方、介在神経での Ras-MAPK 経路の働きが必要であることも報告されており、線虫の嗅覚順応は神経回路レベルでの制御も受けていることが示唆される。しかしながら、線虫の嗅覚順応のメカニズムは、まだ不明なことが多く、他にも未知の分子が関与していると考えられる。そのため、本研究では嗅覚順応のメカニズムをより詳細に理解するために、ベンズアルデヒドを匂いとして用いたときの嗅覚順応の順遺伝学的な解析を行い、関与する新奇の遺伝子の探

索を行った。その結果、*gpc-1* と *nep-2* を嗅覚順応に必要な遺伝子として新たに同定した。

*gpc-1* は  $G\gamma$  (Gタンパク質 $\gamma$ サブユニット) の一つをコードする遺伝子であった。線虫のゲノムには  $G\gamma$  をコードする遺伝子として *gpc-1* と *gpc-2* の二つがあり、*gpc-2* は全神経、筋肉で発現するのに対して、*gpc-1* は感覚神経特異的に発現することが知られている。細胞特異的発現によるレスキュー実験の結果、*gpc-1* は匂いを受容する感覚神経内で働くことがわかった。 $G\gamma$  は通常  $G\beta$  (Gタンパク質 $\beta$ サブユニット) と  $G\beta\gamma$  二量体を形成して働く。線虫は 2 つの  $G\beta$ 、GPB-1 と GPB-2 を持つが、GPC-1 は GPB-1 と共に  $G\beta\gamma$  二量体を形成し嗅覚順応を制御していることを遺伝学的に示した。GPB-1 は、GPC-2 とともに  $G\beta\gamma$  二量体を形成することができ、細胞分裂の際に紡錘体の配向の決定に働くことが知られる。発生の完了した神経細胞内での GPC-2 の働きは知られていなかったが、細胞特異的 RNAi の結果、GPB-1 と GPC-2 からなる  $G\beta\gamma$  二量体は匂いの感知に必要であることが示唆された。つまり、GPB-1 は GPC-1、GPC-2 のそれぞれに結合して、結合した  $G\gamma$  によって嗅覚順応と匂いの感知の両方の機能を発揮することができる。また、それぞれの  $G\beta\gamma$  二量体は、他方の機能も弱く補うことも示唆された。 $G\beta\gamma$  二量体は様々なエフェクターをとることが知られているが、結合する  $G\alpha$  の機能を促進、または抑制することも報告されている。既知の嗅覚順応に関連する遺伝子との遺伝学的関係を調べた結果、 $G\beta\gamma$  GPB-1/GPC-1 は  $G\alpha_o$  GOA-1 と並行して  $G\alpha_q$  EGL-30 の働きを抑えることによって嗅覚順応を制御していることが示唆された。

NEP-2 は哺乳類ネプリライシンと全長にわたって相同な分子であった。ネプリライシンは 750 アミノ酸からなる II 型膜貫通タンパク質であり、N 末の短い細胞内ドメインと膜貫通領域、そして大きな細胞外ドメインからなる。細胞外ドメインには Zn メタロプロテアーゼに共通するモチーフである HExxH と ExxA/GD が存在しており、さらに活性中心部分が別のドメインに覆われているため、基質としてペプチドだけをとる細胞外ペプチダーゼとして働くと考えられている。実際に、ネプリライシンはエンケファリンやサブスタンス P などを分解することが生化学的に示されている。このため線虫でも、嗅覚順応を抑制するペプチドが存在し、NEP-2 はそのペプチドを分解することによって嗅覚順応を制御している可能性が考えられた。ネプリライシンの HExxH モチーフは、活性中心に  $Zn^{2+}$  を保持するために必

須であり、このモチーフのヒスチジンをフェニルアラニンに置換するとペプチダーゼ活性が完全に無くなるのが生化学的に示されている。NEP-2 でもこのモチーフが存在したので、同様の置換を施した *nep-2* 遺伝子を発現させ、*nep-2* 変異体のレスキュー実験を行ったところ、NEP-2 は置換により完全に機能を失うことが確認された。このことから、嗅覚順応の制御において NEP-2 のペプチダーゼ活性が重要であることが示唆された。*nep-2* のプロモーターが発現を誘導する細胞を、Venus をレポーターとして使い確認すると、筋肉と一部の神経で発現が誘導されることがわかった。さらに、細胞特異的プロモーターを用いて *nep-2* 変異体のレスキュー実験をすると、神経での機能が重要であることがわかった。しかしながら、特定の神経に発現していることが必要なわけではなく、不特定の神経で発現していれば十分であった。これは NEP-2 の基質が体腔全体に広がるホルモン様のペプチドであることを示唆する。

NEP-2 の嗅覚順応に関与する機能をより詳細に知るために、*nep-2* 変異体の嗅覚順応異常を抑圧する変異を獲得した。その結果、*nep-2* の異常を抑圧する遺伝子として *snet-1* と *snet-2* を同定した。*snet-2* は線虫にだけ存在するタンパク質をコードする遺伝子であり、下皮で発現し機能することがわかった。一方 *snet-1* は 101 アミノ酸からなるタンパク質をコードする遺伝子であり、アメフラシの L11 precursor に一部相同である。L11 precursor は前半部分が切り出され、神経ペプチドとして働くことが示唆されている。SNET-1 は L11 precursor のうちペプチドとして切り出されると予想されている部分と相同性があり、ペプチドが切り出されるための塩基性アミノ酸が連続した配列と、細胞外に放出されるためのシグナル配列とが存在する。このため、SNET-1 も L11 precursor と同様に神経ペプチドとして働くことが予想された。Venus を融合させた SNET-1 を発現させると、体腔に存在する貪食細胞であるシーロモサイトに Venus の蛍光が見られた。一方で、*snet-1* のプロモーターは、感覚神経 ASK と介在神経 AIB、AIM、PVQ などに発現を誘導したが、シーロモサイトに発現を誘導しなかった。このことから、SNET-1 のシグナル配列は実際に機能し、細胞外への放出に働くことがわかった。*nep-2*; *snet-1* 二重変異体において細胞特異的レスキュー実験を行うと、*snet-1* は本来発現するなどの細胞で発現させても嗅覚順応が抑圧された状態から回復することがわかった。このことから、SNET-1 はシナプスで働くシグナル分子ではなく、ホルモン様に働くことが予想される。SNET-1 ペプ

チドを NEP-2 の基質と仮定すると NEP-2 の基質がホルモン様に働くという予想と一致する結果である。さらに、SNET-1 の cDNA を様々に欠失させ、それを用いてレスキュー実験を行った。その結果アメフラシの L11 precursor と相同性のある前半部分だけで機能することができ、後半部分は必須ではないことがわかった。このことは前半部分がペプチドとして切り出されてシグナルとして機能することを示唆する。*snet-1* が発現する細胞のうち、感覚神経 ASK と介在神経 AIM、PVQ はギャップ結合や化学シナプスにより、密接に関連している。線虫の嗅覚順応は、餌の存在や、味などの手がかりの影響を受けることが報告されているので、SNET-1 は主に感覚神経 ASK へ入力された情報にตอบสนองして分泌される環境シグナルと予想される。近年、感覚神経 ASK では餌の情報を感知することが示唆されており、SNET-1 が餌シグナルとして働く可能性が考えられる。実際に *snet-1* 変異体では、嗅覚順応に対する餌シグナルの影響が小さくなっている結果が得られた。

本研究では *gpc-1* が感覚神経内において働き、Go/Gq 経路との遺伝学的相互作用により嗅覚順応を制御することが示唆された。また *nep-2* と *snet-1* の嗅覚順応への関与を示すことにより、嗅覚順応が神経回路レベルの制御を受けることが確認され、NEP-2 と SNET は他の感覚シグナルが嗅覚順応に影響を与えるための経路であることが示唆された。