

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
TOR シグナル伝達経路の機能解析
(The molecular mechanisms of TOR signaling pathway
regulating associative learning in *C. elegans*)

氏名：酒井奈緒子

【序論】

過去の経験に基づいて行動を変化させることは、多くの生物の生存に重要である。では動物は一体どのような仕組みで行動を変化させているのだろうか？この疑問の解消のため、これまで多くの神経科学者がこの課題に取り組んできたものの、未だ完全な解決には至っていない。

私はモデル生物である体長 1 mm ほどの線虫 *Caenorhabditis elegans* (以下単に線虫と呼ぶ) を用いて、経験依存的な行動変化のメカニズムを解明しようと試みた。線虫は、野生型標準株の N2 ではすべての細胞が個体差のない発生運命をたどることが知られており、雌雄同体が持つ全 302 個の神経細胞の位置や接続が明らかになっているほか、遺伝学的ツールが発達しており、分子、神経、個体レベルで行動メカニズムを探るのに適したモデル生物である。単純な形態を持つ一方で、線虫は匂い、化学物質、温度などと餌の情報を組み合わせる連合学習を行うことが知られている。これまでに、当研究室の先行研究により、線虫が塩の濃度と餌の有無を関連付けて学習し、飢餓とともに経験した塩濃度を避けるようになる味覚忌避学習が明らかになっていた。本研究では味覚忌避学習に関わる未知の分子を探索し、学習の機構を解明することを目的に研究を進めた。

【結果】

(1) TOR シグナル伝達経路が正常な味覚忌避学習に必要である

これまでにインスリン受容体の下流で機能するセリン/スレオニンキナーゼ AKT-1 が飢餓後の塩走性制御に関与することが知られていたが、AKT-1 の下流で機能する分子については不明であった。*akt-1* はがん原遺伝子としてよく知られる哺乳類の Akt1 のホモログである。哺乳類細胞を用いた研究により、複数の主要な Akt1 の基質が明らかになっており、そのうち幾つかは線虫でも保存されている。線虫の Akt1 下流分子のホモログの変異体解析や薬剤による機能阻害を行ったところ、TOR シグナル伝達経路の阻害により飢餓後の塩走性が異常になることが明らかになった。TOR(Target of Rapamycin)は免疫抑制剤ラパマイシンの耐性遺伝子として酵母で発見されたキナーゼであり、栄養源シグナルの伝達や寿命の制御において重要な役割を果たしていることが知られている。条件付けと行動テストの計約 6 時間、線虫を TOR の特異的な阻害剤であるラパマイシンに曝したところ、餌がある条件下での塩走性は野生型と変わらなかったが、飢餓を経験した線虫は、低塩濃度・飢餓条件付け後、高塩濃度・飢餓条件付け後いずれの条件下でも異常を示した。

(2) S6 キナーゼのホモログである *rsk-1* は飢餓後の低塩濃度への走性制御に重要である

TOR は、TORC1 と TORC2 という構成分子と機能の異なる二種類の複合体を形成するが、ラパマイシンは特に TORC1 を選択的に阻害すると言われている。TORC1 の構成分子である *let-363* (TOR のホモログ) や *daf-15*(Raptor のホモログ)の変異体はいずれも致死表現型を示すため行動評価ができない。そこで、TORC1 の基質である S6 キナーゼのホモログ *rsk-1* 変異体の味覚忌避学習を確認したところ、飢餓条件付け後に野生型に比べて有意に高塩濃度に誘引される表現型を示した。この塩走性異常は、全神経に *rsk-1* cDNA を発現させることにより完全に回復したため、*rsk-1* の神経での機能が、飢餓後に低塩濃度側に向かう走性に重要であることが示唆された。

(3) TORC2 は飢餓後の高塩濃度への走性制御に重要である

長時間のラパマイシンの暴露は TORC2 の活性をも阻害するという知見があるため、TORC2 の味覚忌避学習への寄与も調べることにした。TORC2 の主要な構成分子である Rictor が欠損すると、多くの生物では致死になるが、線虫の Rictor のホモログ *rict-1* には生存や繁殖が可能な変異体が存在する。調べた 3 つの *rict-1* 変異体全てにおいて、飢餓条件付け後に低塩濃度に誘引される異常が観察されたほか、変異体によっては餌あり条件付け後にも低塩濃度に向かいやすい表現型を示した。

Sin1 もまた TORC2 を特徴づける構成分子の一つである。これまで Sin1 のホモログである *sinh-1* の変異体は報告されていなかったため、ゲノム編集ツールである CRISPR-Cas9 システムを用いて *sinh-1* のエキソンに欠失変異を導入して塩走性を確認したところ、*rict-1* 変異体に非常によく似た表現型を示した。これらの結果から、TORC2 が、飢餓後に高塩濃度に向かう走性に

重要であることが示唆された。

(4) SGK-1 とおそらく PKC-2 も味覚忌避学習において TORC2 の下流分子として機能する

TORC2 の下流分子としては Akt1、SGK1、cPKC が知られており、線虫の形態形成や寿命制御においてこれらの分子が TORC2 の下流で機能することも確かめられている。そこで、味覚忌避学習において *pkc-2*(cPKC のホモログ)と *sgk-1*(SGK1 のホモログ)が TORC2 の下流で機能しているかを調べた。*pkc-2*、*sgk-1* 共に低塩濃度・飢餓条件付け後に低塩濃度に寄りがちな走性を示し、変異の位置によっては高塩濃度・餌あり条件後にも異常を示したことから、これらが TORC2 の下流で機能するという仮説と矛盾のない結果になった。また、先行研究により味覚忌避学習への寄与が明らかになっていた AKT-1 についても TORC2 との遺伝学的相互作用を調べたところ、AKT-1 の機能獲得型変異体が *riect-1* の味覚忌避学習の欠損を抑圧した。本研究開始時には AKT-1 の下流分子として TOR に着目したが、この結果により、AKT-1 が TORC2 の下流で機能することが示唆された。次に、多重変異体を作成して TORC2 との遺伝学的相互作用を調べた。*riect-1* と *pkc-2* は互いに相加的な効果を示さなかったことから、同一経路で機能していることが示唆された。また、*sgk-1* の機能獲得型変異である *sgk-1(ft15)* は *riect-1* の塩走性異常を抑圧したことから、味覚忌避学習において *sgk-1* が *riect-1* の下流で機能することが確かめられた。

(5) 味覚忌避学習の制御において PKC-2 は神経で、SGK-1 は腸で機能する。

TORC2 の下流因子と考えられる *pkc-2* と *sgk-1* の機能部位を調べるために、各遺伝子の cDNA を用いて組織特異的機能回復実験を行った。*pkc-2* 変異体の学習異常は、神経特異的な cDNA 発現または ASER 特異的な cDNA 発現により野生型と同程度まで回復したが、腸特異的に cDNA を発現させた株では回復しなかった。これより、*pkc-2* の ASER を含む神経細胞での機能が味覚忌避学習の制御に重要であることがわかった。一方、*sgk-1* 変異体の塩走性異常は全神経への cDNA 発現では回復せず、腸特異的な cDNA 発現により回復した。*sinh-1* についても機能回復実験を行った結果、腸への cDNA 発現のみで塩走性異常が完全に回復した。これより、TORC2/SGK-1 経路が腸で機能していることが明らかになった。

TORC2 は *sgk-1* の Hydrophobic Motif と Turn Motif をリン酸化することが知られている。この部位を擬似リン酸化した SGK-1(S424E, T444E)をコードする cDNA を腸のみで発現させると、*riect-1* 変異体の塩走性異常が部分的に回復した。以上の結果は、線虫の腸で SGK-1 が TORC2 に直接リン酸化されることが低塩濃度・飢餓条件付け後の塩走性制御に必要であることを示唆している。

【考察】

TOR 経路は栄養情報の伝達や寿命制御を担うことが知られているが、これらは主にラパマイシンを用いた TORC1 の機能解析により明らかにされてきた。TORC2 の機能については特異的阻害剤がなく、マウスでは TORC2 の欠損が致死に繋がるため、その機能を調べるのが困難であった。本研究では線虫で初めて TOR 経路の学習における機能を解明した。線虫を用いた TORC2 の機能解析は、学習メカニズムの解析のみならず、TORC2 の未知なる機能の解明にも貢献する可能性がある。

また、味覚忌避学習において TORC2 の下流で SGK-1 とおそらく PKC-2 が機能し、PKC-2 は神経で、SGK-1 が腸で機能していることを示した。TORC2/SGK-1 が非神経細胞である腸で機能するという事実は興味深い。幾つかの先行研究は、線虫が腸で温度変化を受容していることを示している。塩濃度や餌情報も腸で受容され、SGK-1 を介した内分泌制御を介して神経に情報を伝えることで、正常な味覚忌避学習を制御している可能性がある(図 1)。神経や腸での TORC2 シグナル伝達経路の役割を明らかにすれば、神経以外の器官での感覚受容により行動変化を引き起こすメカニズムが明らかになるかもしれない。

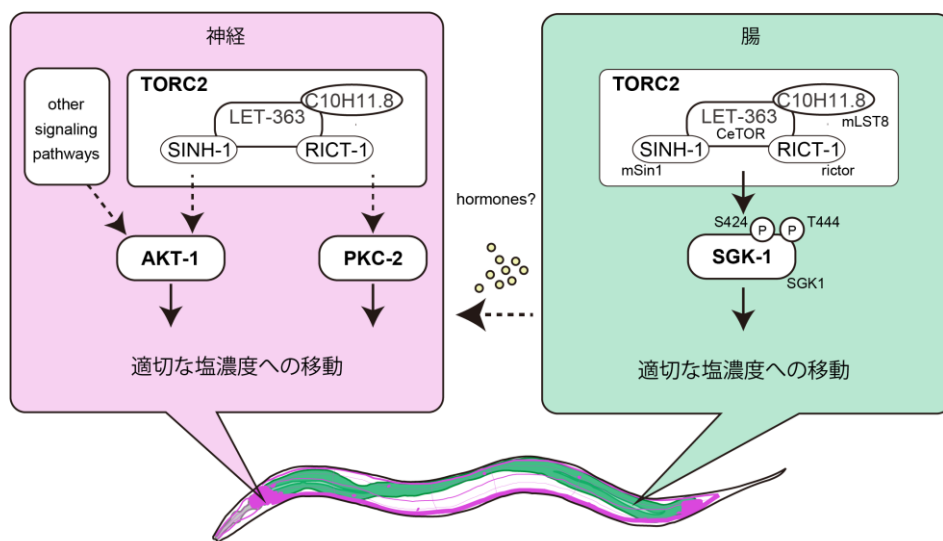


図 1 TORC2/PKC-2 経路と TORC2/SGK-1 経路は異なる組織で味覚忌避学習を制御している