

# 線虫の化学走性行動の分子遺伝学： 神経回路の形とはたらき

「形とはたらき」領域 古賀 誠人

## 要 旨

線虫の化学走性行動異常の突然変異体を多数分離し、原因遺伝子のクローニングを目指して遺伝的マッピングを行った。その中には既知の遺伝子の変異もあったが、新規な遺伝子の変異によるものも分離できた。化学走性遺伝子 *che-1* のクローニングに成功し、CHE-1タンパク質は水溶性物質に対する主要な化学感覚神経 ASE で発現している Zinc フィンガー型の転写因子であり、ASE 細胞において化学受容の信号伝達に直接的に関わるレセプターやチャンネル、セカンドメッセンジャー系の酵素などの発現制御を行っていることを明らかにした。餌信号の情報伝達に膜貫通型Gタンパク質結合型サイクレーズ DAF-11 が ASI 化学感覚神経で働いていることを明らかにした。

## 1. 研究のねらい

線虫 *C. elegans* は雌雄同体の成虫で302個の神経細胞を持ち、これら神経の全てのつながり方が連続超薄膜切片の電顕写真から再構成されている。すなわち、個体の持つ全神経回路網が「形」としては完ぺきに記述されている。このような生物は *C. elegans* 以外にはない。しかし、実際の「はたらき」、具体的に何処がどの様に機能しているかは末梢の一部を除いてまだほとんどわかっていない。この神経回路網の働きの結果として個体の行動があるわけであるが、線虫には化学走性というおもしろい行動がある（図1）。なかでも NaCl 等の塩やアミノ酸、cAMP 等の水溶性物質に対する化学走性行動は餌を探し当てるという線虫にとって生死に関わる最重要な行動だと考えられる。線虫はこれらの誘引物質にいつでも闇雲に寄っていくわけではなく、それまでその個体の置かれた環境によって変化する。また、誘引されていった先に実際餌があればそこに留まり、そこに餌がなければしばらくすると何処かへ行ってしまう。つまり可塑性、結果の評価、判断などの要素を含んでいる。この化学走性行動に異常を示す突然変異体を徹底的に分離し、その原因遺伝子をクローニング、その発現場所、機能について主に分子遺伝学的方法で解析する。これにより、化学走性行動を産み出す機構を神経回路の形と働きの両面から明らかにすることがねらいである。この研究が将

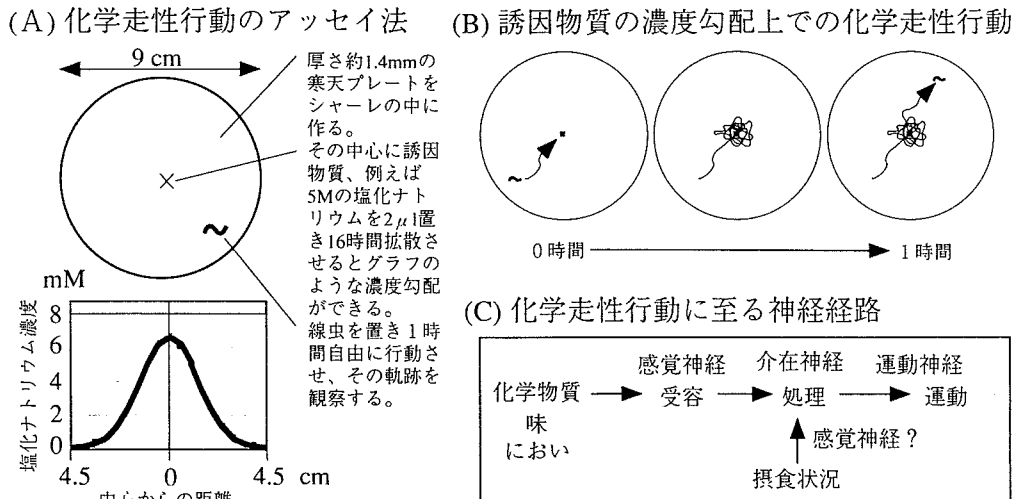


図1：線虫の化学走性行動

来、一般的な神経の可塑性、行動の結果に対する評価、判断などの神経回路及びその分子的基盤についての重要な発見につながることを期待している。

## 2. 研究方法と成果

### 2-1 Na<sup>+</sup> イオンに対する化学走性変異体の分離と解析

*C. elegans* では突然変異によってNaCl等の水溶性物質に対する化学走性に異常を起こす遺伝子として*che*、*tax*等20余り知られているが、その多くは構造の異常を伴うものであり、神経機能の異常と考えられるものは少数でしかない。まだ多数の神経機能に関わる未知の遺伝子があると考えられる。そこで、Na<sup>+</sup> イオンに対する化学走性に異常のあるミュータントを新たにスクリーニングした。エチルメタンスルホン酸で変異誘発した約15万ゲノム相当から、126株のミュータントを分離した。その内、蛍光色素の感覚神経への取り込みに異常を示すことから感覚器の構造異常を伴うと考えられるものが47株あった。それ以外の株に関して戻し交配を行い、匂い物質に対する化学走性行動も調べた。その結果、4つのクラスに分類することができた(表1)。SNP (single nucleotide polymorphism) を利用した遺伝的マッピングを行った(図2)。比較的狭い範囲にマップされた#148, #516, #302, #286, #622, #287, #217については原因遺伝子のクローニングを目指してさらなる詳細なマッピングと該当領域のコスミドクローン、YACクローンによる遺伝子導入による相補実験を進めている。#148は既知の*tax-2* 遺伝子の変異であった。*tax-2* 遺伝子は感覚神経で発現するcGMP依存性チャンネルをコードしており、味や匂いの感知に関わることが知られている。その他はマップされた領域に既知の化学走性遺伝子はないか、あっても相補性検

定で相補したことから新規なものであると考えられる。

## 2-2 餌（大腸菌）に対する行動異常変異体の分離と解析

線虫は研究室内の餌である大腸菌に対して非常に強い走性を示し、一旦餌に到達すると長時間そこから離れることがない。大腸菌の所から離れてしまう突然変異体をスクリーニングし、計14株の変異体を分離した（表2）。1つは *che-2* 遺伝子（感覚繊毛の形成に必要な新規 WD40 タンパク質）、1つは *eat-4* 遺伝子（Na<sup>+</sup> 依存性 inorganic phosphate cotransporter）、1つは *egl-19* 遺伝子（電位依存性 Ca<sup>2+</sup> channel）の変異であった。*che-2* 変異体で餌の感知や化学走性が異常になるのは、全ての感覚繊毛が形成不全になることによる感覚神経の異常が原因であると考えられる。*egl-19* と *eat-4* はこれまで主に咽頭筋の活動について研究され、化学走性の観点からは研究されていない。現在、*egl-19* と *eat-4* 変異体の化学走性異常の原因はどの神経細胞に求められるかは明らかではないが、今後それを明らかにすることによって神経ネットワークのはたらしに迫っていけるのではないかと考えている。*ks69* 変異による化学走性異常は YAC クローン Y74E4 によってレスキューされた（図3）。この範囲には *ks69* のような表現形を示す既知の遺伝子はないので *ks69* は新規な遺伝子の変異である。原因遺伝子の同定までもう一息である。

## 2-3 *che-1* のクローニングと解析

1970年代に分離され、その後手つかずだった

表1：新たに分離した変異体の化学走性行動異常であるところを網掛けで示す。

strain	誘因物質			
	Na+ ASEで感知	diacetyl AWAで感知	isoamylalcohol AWCで感知	
野生型	+++	+++	+++	
148-3	(+)/-	+++	+++	
153-3	+/-	+++	+++	
184-1	+/(-)	+++	++	
237-1	+/-	+++	+++	
247-1-3	-	+++	++	
268-3-3	-	+++	++'	
275-1	+/-	+++	++	
286-1	+/(-)	+++	+++	
287-1	(+)/-	+++	+++	
292-4	-	+++	++	
299-1-4	+/-	+++'	+++'	
430-1	+/(-)	+++	+++	
434-1	-	+++	++	
516-2	-	+++	++	
530-1	+/(-)	+++	+++	
547-3	(+)/-	+++	+++	
572-1-6	+/-	+++	+++	
582-2	-	+++	+++	
586-4	-	+++	+++	
606-3	+/(-)	+++	++	
622-1	+/-	+++	+++	
677-2	+/-	+++	+++	
721-1-5	+/-	+++	++	23
159-3	+/-	-	-	
200-3	+/-	-	-	
217-1	-	-	-	
285-2-4	+	-	+	
293-2	(+)/-	-	+/-	
302-2	-	-	-	
221-3	+	+	++	
462-2	+/-	+/-	+++?	
487-1	+/-	+/-	+/-	
493-2	+/-	+/-	+	
511-13	+/-	+/-	+/-	
514-2	+/-	+/-	+/-	
565-2	-	+/-	-	
578-1	+/-	-	-	
399-2	+/-	+	+	
684-3	(+)/-	+/-	+/-	
634-2-5	++	-	-	
690-3-5	++	+	+/-	18
240-3	+/-	-	+++'	
317-4	+	+	+++	2
256-3	+/-	+++	-	
291-3	+	+++	+	
394-1-5	+/-	+++	+/-	
427-1-4	+/-	+++	-	
442-2	+/-	+++	-	
450-2	++	+++	-	
552-1	-	+++	-	
579-3	(+)/-	+++	+/-	
617-1	-	+++	-	
626-2	-	++	+/-	
667-4-3	+	+++	+/-	11

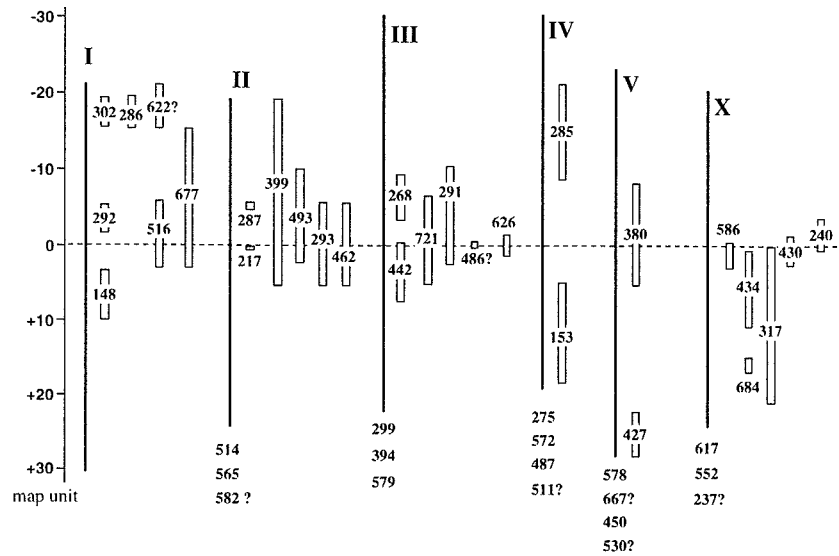


図 2 : 化学走性変異の遺伝学的マッピング

表 2 : 餌から出るスクリーニングで得られたミュータント

strain	Fraction of animals moving out of food (%)	chemotaxis to NaCl	Dye-filling in sensory neurons	map position
N2 (wild type)	<0.1	+	+	
FK247( <i>ks68</i> )	5.3 ± 2.1	-	-	X = <i>che-2</i>
FK248( <i>ks69</i> )	3.4 ± 2.0	-	partially -	II -3.6 ~ -2.5
FK249( <i>ks70</i> )	4.6 ± 3.0	-	+	III = <i>eat-4</i>
FK250( <i>ks71</i> )	2.4 ± 1.3	+	+	
FK251( <i>ks72</i> )	7.4 ± 4.9	+	+	IV 4-6
FK302( <i>ks75</i> )	1.3	-	-	
FK303( <i>ks76</i> )	4.8	-	+	
FK304( <i>ks77</i> )	0	-	+	IV = <i>egl-19</i>
FK305( <i>ks78</i> )	1.6	-	+	
FK306( <i>ks79</i> )	0	-	+	
FK307( <i>ks80</i> )	2.8	+/-	+	
FK308( <i>ks81</i> )	3.4	-	-	
FK309( <i>ks82</i> )	3.4	-	+	
FK310( <i>ks83</i> )	0.7	-	+	

*che-1* という化学走性変異体の原因遺伝子のクローニングを行った (図 4)。*che-1* は Zinc フィンガーを持つ転写因子をコードし (図 5)、NaCl などの水溶性物質に対する化学走性行動に重要な ASE 化学感覚神経で発現していることを明らかにした (図 6)。*che-1* 変異体においては ASE 感覚神経の形態は正常であるが、ASE で発現が見られる 2 つの 7 回膜貫通型レセプター及び 3 つの膜貫通型 guanylyl cyclase の発現が消失していることを見いだした (図 7)。

以上の結果から、CHE-1 タンパク質は ASE 感覚神経でのレセプターやチャンネル、セカンドメッセンジャー系の酵素など化学受容の信号伝達の実働部隊をコードする遺伝子の発現に直接あるいは間接的に必要な転写因子であると考えられる。

## 2-4 餌の信号を仲介するグアニレートサイクレース DAF-11

線虫は餌が欠乏するなど悪い環境になると耐性幼虫になり休眠する。*daf-7* 遺伝子は耐性幼虫化を抑制する TGF- $\beta$  様因子をコードしている。*daf-7* 遺伝子は ASI 化学感覚神経で特

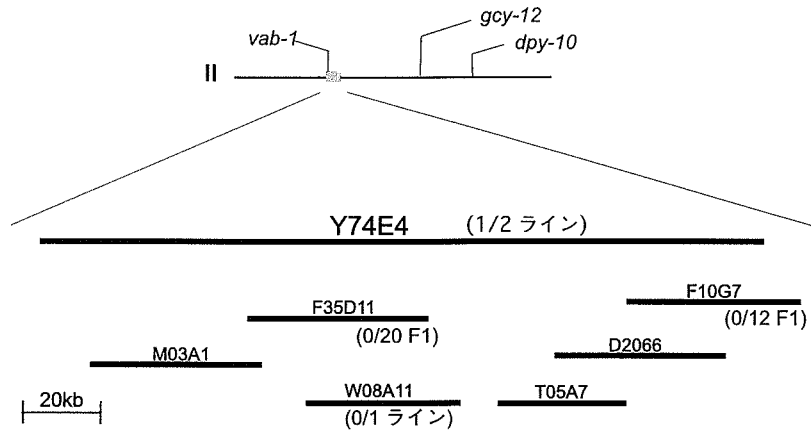


図 3 : *ks69* のクローニング

*ks69* 突然変異体の化学走性異常は YAC クローン Y74E4 でレスキューされた。

上段は遺伝地図、下段は整列化 YAC、コスミドによる物理地図。

カッコ内の数字は(レスキューされたライン数/そのクローンを遺伝子導入したライン数)

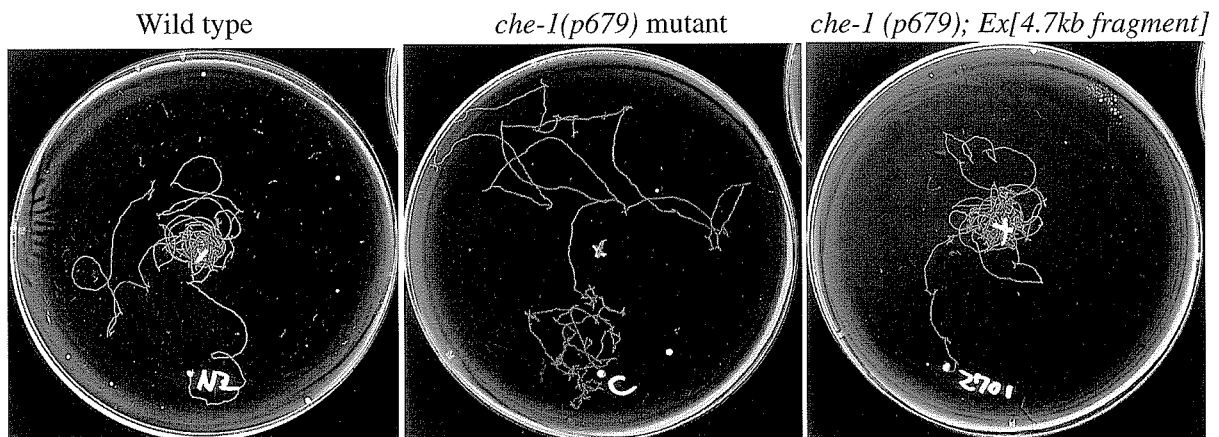


図 4 : 塩化ナトリウムの濃度勾配上の軌跡

左から、野生型、*che-1* 変異体、4.7kb の DNA の導入でレスキューされた *che-1* 変異体

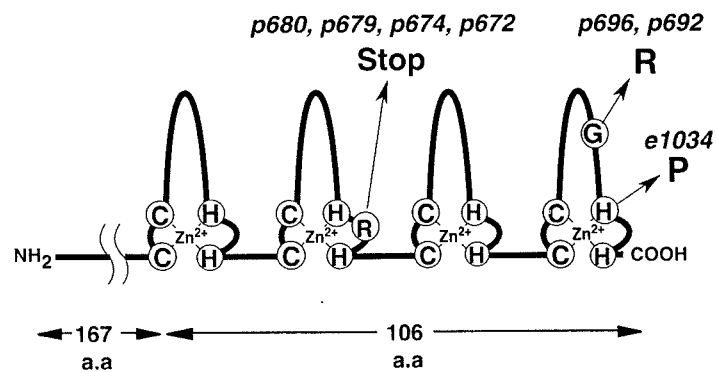


図 5 : CHE-1 タンパク質の構造と変異部位

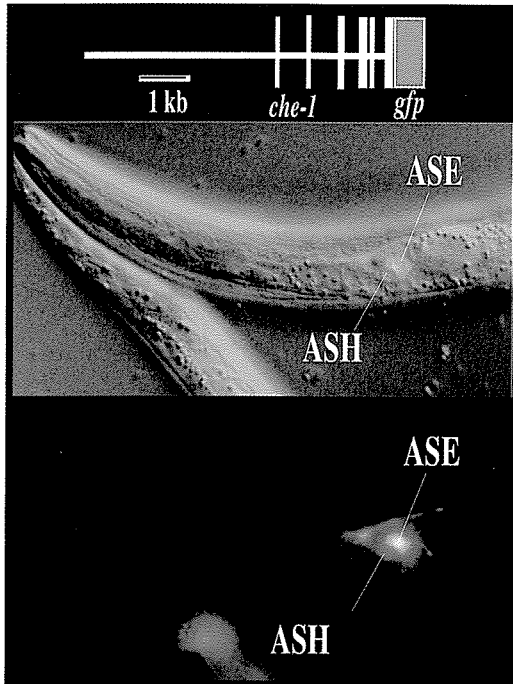


図6 : *che-1* 遺伝子の発現  
*che-1* 遺伝子と緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*gfp*) の融合遺伝子 (上段) を線虫に導入、ASE 化学神経細胞で発現が見られた (中段: 蛍光像と微分干渉像の重ね合わせ、下段: 蛍光像のみ)。

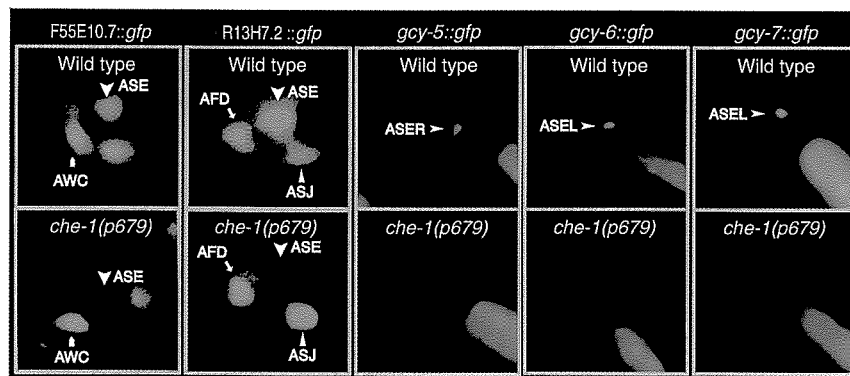


図7 : *che-1* 変異による信号伝達遺伝子の発現の消失  
 7回膜貫通型レセプター遺伝子 (F55E10.7、R13H7.2)、グアニレートサイクレス遺伝子 (*gcy-5*、*gcy-6*、*gcy-7*) の発現を *gfp* レポーターを使って調べた。*che-1* 変異体ではこれらの遺伝子発現が ASE 細胞特異的に消失している。

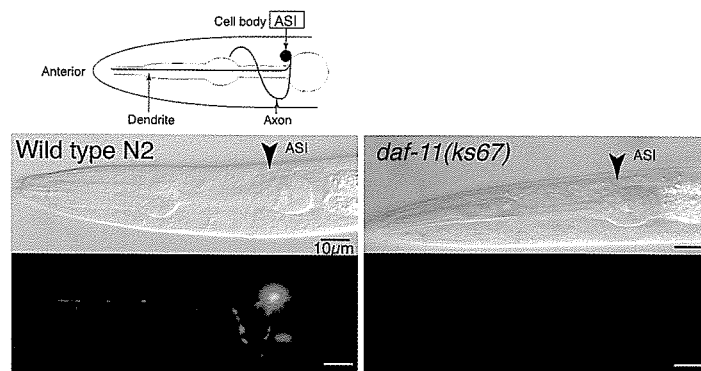


図8 : *daf-11* グアニレートサイクレスの変異による *daf-7* 遺伝子発現の消失  
*daf-7* 遺伝子のプロモーターと *gfp* の融合遺伝子の発現は野生型 (左) では ASI 感覚神経で見られるが *daf-11* ミュータント (右) では消失している。

異的に発現し、その発現は餌が豊富だと高く、少ないと低く制御される。*daf-7* 遺伝子の発現が構成的に低下する突然変異体をとれば餌信号受容に必要な遺伝子を見つけることができると考えた。エチルメタンスルホン酸で変異誘発した約60万ゲノム相当から、そのような変異体を3株分離した。その内の1つ *ks67* は膜貫通型グアニレートサイクレーズをコードする *daf-11* 遺伝子の変異であることを見いだした。DAF-11 は ASI 化学感覚神経で細胞自立的に *daf-7* 遺伝子発現に必要なことを明らかにした (図8)。このことは餌の感知から *daf-7* 遺伝子発現に至る信号伝達をcGMPをセカンドメッセンジャーする信号伝達系が行っていることを示している。

### 3. 今後の展望

本研究でかなりたくさん化学走性異常突然変異体を分離できた。マッピングもかなり進めることができた。今後1つ1つ原因遺伝子のクローニングを行っていくことによって多くの未知な化学走性遺伝子を明らかにしていきたい。そしてその遺伝子産物がどの神経細胞でどのように働くことによって化学走性行動に寄与しているのかを明らかにしていきたい。「神経細胞のネットワークがこう働くことによって線虫はこう行動するのだ」と具体的に説明できるようになりたいと思っている。それが我々の脳の中でおきていることの理解につながるのではないだろうか。

### 4. 発表リスト

#### 論文

1. Mayumi Murakami, Makoto Koga and Yasumi Ohshima. (2001) DAF-7/TGF- $\beta$  expression required for larval development in *C. elegans* is controlled by presumed guanylyl cyclase DAF-11. Mechanisms of Development (in press).

#### 口頭発表

1. 古賀誠人、村上真弓、間瀬慶子、大島靖美. 日本遺伝学会第73回大会 (2001)  
線虫 *C. elegans* の化学走性ミュータントの分離と解析。
2. Hiroyuki Nakano, Okiko Uchida, Makoto Koga and Yasumi Ohshima. 14th International Congress of Developmental Biology, symposium (2001). CHE-1, a zinc-finger transcriptional factor regulates expression of signaling molecules in ASE chemosensory neurons in *C. elegans*.

3. Makoto Koga and Yasumi Ohshima. 13th International *C. elegans* Meeting (2001). Isolation and analysis of chemotaxis mutants in *C. elegans*.
4. Takashi Murayama, Makoto Koga and Yasumi Ohshima. 13th International *C. elegans* Meeting (2001). Isolation and analysis of mutants abnormal in orientation to food.
5. Mayumi Murakami, Makoto Koga and Yasumi Ohshima. 13th International *C. elegans* Meeting (2001). DAF-7/TGF- $\beta$  expression required for larval development in *C. elegans* is controlled by presumed guanylyl cyclase DAF-11.
6. 古賀誠人、大島靖美. 第23回日本分子生物学会年会 (2000年)  
線虫 *C. elegans* の化学走性ミュータントの分離と解析
7. 村山孝、古賀誠人、大島靖美. 第23回日本分子生物学会年会 (2000年)  
*C. elegans* の餌に対する行動異常変異体の単離と解析
8. 村上真弓、古賀誠人、大島靖美. 第23回日本分子生物学会年会 (2000年)  
線虫 *C. elegans* のDAF-11グアニル酸シクラーゼは dauer 幼虫形成を抑える DAF-7/TGF- $\beta$  の発現に必要である
9. 中野寛之、内田興子、古賀誠人、大島靖美. 第23回日本分子生物学会年会 (2000年) 線虫 *C. elegans* の化学走性に関わる *che-1* 遺伝子の機能解析
10. M. Murakami, M. Koga, Yasumi Ohshima. 第2回 *C. elegans* 日本集会 (2000). DAF-11 guanylyl cyclase is required for DAF-7 TGF- $\beta$  expression to inhibit dauer-larva formation in *C. elegans*.
11. Hiroyuki Nakano, Okiko Uchida, Makoto Koga and Yasumi Ohshima. 第2回 *C. elegans* 日本集会 (2000). Functional analysis of the *che-1* gene involved in chemotaxis of *C. elegans*.
12. 村上真弓、古賀誠人、大島靖美. 第22回日本分子生物学会年会 (1999年)  
線虫 *C. elegans* の *daf-7* 遺伝子の発現調節機構の解析
13. 内田興子、中野寛之、古賀誠人、大島靖美. 第22回日本分子生物学会年会 (1999年) 線虫 *C. elegans* の化学走性に関わる遺伝子 *che-1* は GLASS に似た zinc-finger 型転写因子をコードしている。
14. Okiko Uchida, Makoto Koga and Yasumi Ohshima. 12th International *C. elegans* Meeting (1999). Cloning of *che-1* gene involved in chemotaxis of *C. elegans*