

In Vivo Imaging of Ras and Identification of Novel Signaling Molecules in Olfactory Neurons Reveal Regulatory Mechanisms of Olfactory Sensory Signaling in *C. elegans*

魚住, 隆行

<https://hdl.handle.net/2324/1500533>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（理学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 魚住 隆行

論 文 名 : *In Vivo* Imaging of Ras and Identification of Novel Signaling Molecules in Olfactory Neurons Reveal Regulatory Mechanisms of Olfactory Sensory Signaling in *C. elegans*
(生体イメージングと新規シグナル分子の探索による
嗅覚情報伝達メカニズムの解明)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

生物は環境からの情報を正確に捉え、それに対して的確な応答を示すことで生存している。嗅覚は重要な感覚受容機構の一つで、多くの動物は嗅覚によって食べ物の位置や外敵の接近を知覚し、誘引行動や回避行動といった応答を示す。外界からの刺激の受容から応答までの情報伝達は、主に神経系を介して行われる。さらに、神経細胞内では種々のシグナル伝達経路を駆使することにより、細胞内外からの刺激を受容・伝達し、遺伝子発現や神経伝達物質の放出などのさまざまな細胞応答が引き起こされる。

Ras-MAPK経路は、細胞内情報伝達を担う重要なシグナル伝達経路のひとつである。Rasは低分子量Gタンパク質の一種で、細胞の増殖や分化を制御する分子スイッチとしての働きがよく知られている。細胞外からの刺激で活性化したRasは、下流のエフェクターであるRaf、MEKを介してMAPKを活性化する。MAPKには転写因子や細胞骨格因子など数多くの基質が存在し、細胞増殖・分化や生存などに関与している。近年、このRas-MAPK経路が、シナプス可塑性や記憶など神経系でも機能することが報告された。さらに線虫の誘引行動を制御するAWC嗅覚ニューロンでも働き、嗅覚行動に重要であることが見出された。しかし、その制御機構や機能については、不明な点が多く残されていた。そこで、Rasシグナルを介した嗅覚シグナル伝達を詳細に理解するために、【1】AWC嗅覚ニューロンにおけるRasの活性変化メカニズムと【2】MAPKのリン酸化ターゲットの同定が必要であると考えられた。

【1】本研究では、まず生体イメージングを用いて、線虫のAWC嗅覚ニューロンにおけるRasタンパク質の活性変化をリアルタイムで観察した。これによりRasの活性制御メカニズムと、嗅覚系における機能の解明を目指した。Rasの活性化インジケータとしては、FRETを利用した蛍光イメージング分子Raichu-Rasを用いた。Raichu-Rasを線虫のAWCニューロンに導入し、Rasの活性化の生体イメージングを試みた。その結果、匂い刺激を与えた2~3秒後に、Rasが急速に活性化することを捉えることに成功した。この反応は、これまでに報告されていたRasの活性化時間(数分~数十分)と比較して、極めて速い反応である。シグナル伝達分子の各種変異体を用いて、Rasの活性変化を観察したところ、Rasの活性化は、嗅覚シグナル伝達経路、ジアシルグリセロール経路及びRasGRPによって制御されることが分かった。また、興味深いことに、Rasは匂い刺激に反応して素早く活性化した後、匂い刺激が続いているにも関わらず2~3秒で不活性化することが観察された。そこで、MAPKの機能喪失型変異体でRasの活性動態を観察したところ、野生型に比べて活性

化が長時間持続した。この結果から、Rasの素早い不活性化は下流からのネガティブフィードバックによって制御されていることが示唆された。

次に、AWC嗅覚ニューロンにおけるRasシグナルが、どのように線虫の嗅覚行動を制御しているかについて解析を行った。カルシウムイメージングを用いて、AWCニューロンの神経応答を測定したところ、Rasの変異体と野生型の間で差はみられなかった。一方、AWCニューロンからシナプス入力を受けるAIB介在ニューロンは、Rasの機能低下型変異体において、匂い刺激に対して不安定な応答を示した。以上の結果から、AWC嗅覚ニューロンにおけるRasシグナルは、下流の介在ニューロンの神経応答を安定化させることによって、適切な嗅覚応答を引き起こしていることが示唆された。

【2】嗅覚系におけるRas-MAPK経路の働きを明らかにする上で残された問題点は、AWC嗅覚ニューロン内でどのような分子を制御しているのかが分かっていないことである。そのため、MAPKが直接リン酸化する分子を同定し、その機能を解析することが必要と考えられた。そこで、嗅覚ニューロンにおいてMAPKのターゲットとなり、匂いシグナル伝達を担う分子を、プロテオミクス解析によってスクリーニングした。その結果、VDAC-1(電位依存性アニオンチャネル)が嗅覚シグナル伝達分子の候補として得られた。VDAC-1はミトコンドリア外膜タンパク質で、ATPなどのミトコンドリア代謝物やイオンを通すポアを形成することが知られている。主にエネルギー産生やアポトーシスに関与し、中枢神経ではシナプス可塑性や学習にも関与している。しかし、VDAC-1の感覚受容における働きは明らかにされていない。

線虫の*vdac-1*遺伝子の発現パターンを調べたところ、AWC嗅覚ニューロンでの発現が認められた。そこでAWCニューロン特異的に*vdac-1*遺伝子をノックダウンさせたところ、AWC感受性の匂い物質への化学走性を示さなくなった。次に、*vdac-1*のRNAiを施した線虫を用いて、AWCニューロンの神経応答の測定を行った。その結果、AWC感受性の匂い物質への神経応答がほとんどみられなくなった。このことから、*vdac-1*ノックダウンによる化学走性の異常は、AWCの神経応答の低下によるものと考えられる。また、AWCニューロンにおけるVDAC-1の局在を調べたところ、VDAC-1は感覚繊毛、細胞体および軸索に局在していることが分かった。このことは、嗅覚ニューロンにおいて、VDAC-1は感覚情報のインプットとアウトプットの両方に関与していることを示唆している。さらに、CRISPR-Cas9システムを用いて*vdac-1*変異体を作製した。*vdac-1*変異体は、AWC感受性の匂い物質への走性に異常を示した。この異常は、AWC特異的にVDAC-1を発現させることで、レスキューした。以上の結果から、VDAC-1はAWC嗅覚ニューロンで働き、嗅覚受容に重要な働きを持つことが明らかになった。

本研究は、Rasの活性変化の生体イメージングとMAPKの下流因子探索という2つのアプローチから、線虫の嗅覚シグナルの解明に迫った。生体イメージング実験では、Rasタンパク質の新規の活性動態と機能および制御機構を明らかにした。また、MAPKの下流因子探索では、新規シグナル分子としてVDAC-1を同定し、嗅覚受容に重要な働きを見出した。本研究で確立したタンパク質の活性の生体イメージングの手法や得られた研究成果は、嗅覚シグナル伝達メカニズムの解明に、大きく貢献できると期待される。