

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12769

研究課題名(和文)持続的な後退運動の神経基盤

研究課題名(英文)A study on the neural basis of sustained reversal movement

研究代表者

高木 新 (Takagi, Shin)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：90171420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：後退運動の制御および前進・後退の切り替え機構には未知の点が多い。本研究では後退運動制御機構の解明を目指して、線虫*C. elegans*においてチャネルロドプシンによる特定の神経細胞群の活性化が持続的な後退運動を誘発することを手掛かりに、この運動に関わる細胞の同定を試みた。チャネルロドプシン発現細胞種と持続的後退との相関を解析し、AVA、AVD、RIMに加えてSMDあるいはRMDを持続的後退に必要な細胞の候補として絞り込んだ。チラミンには持続的後退を抑制する効果があり、その作用の一部は塩化物チャネルLGC-55を介すことを見出した。

研究成果の概要(英文)：Certain artificial stimuli can induce sustained backward locomotion (SBL) in animals. Taking advantage of the fact that optogenetic activation of a subset of neurons expressing the *glr-1* gene induces sustained locomotion, we tried to elucidate the underlying cellular mechanisms. Activation of RIM neurons in addition to the command interneurons AVA and AVD is necessary for SBL. For longer SBL, activation of SMD and/or RMD appears to be critical. Although exogenous tyramine at a high concentration was reported to induce SBL, we found that *tdc-1* mutants defective for the tyramine-synthesis performed longer SBL when *glr-1* positive neurons were activated.

研究分野：発生生物学 ・神経科学

キーワード：運動制御 *C. elegans* 光遺伝学 生体アミン

### 1. 研究開始当初の背景

多くの動物において移動運動の大半は前進であり、自発的あるいは刺激によって誘発される後退は、頻度が低いという共通性がみられる。また、後退運動は動物の生存に直接かわる逃避運動の基本的な要素のひとつであり、このことから、前進運動と後退運動との切り替え、さらに後退運動の調節には、種を超えて共通な進化的に保存された神経回路が存在する可能性がある。

寒天培地上で *C. elegans* は通常は前進しており、1分間に数回だけ後退する。後退運動は体前半部への接触刺激などでも引き起こされるが、虫は数秒間の後退後に体を深く屈曲させて進行方向を転換した後に前進を再開する。このように正常な状態では後退は一過性であり、虫が長時間持続的に後退することはない。しかし、特殊な状況下で持続的な後退が引き起こされることが知られている。

AMPA 型グルタミン酸受容体をコードする *glr-1* 遺伝子機能獲得型変異体の運動表現型であり、*glr-1* 発現細胞の過剰興奮が原因と考えられる (Zheng et al., (1999) *J Neurosci* 24: 347)。私たちも *glr-1* プロモーター (*glr-1p*) を用いて *glr-1* 発現細胞特異的にチャンネルロドプシン ChR2(C128S) を発現させた系統 Ex[*glr-1p::ChR2(C128S)*] に青色光を照射すると、数十秒以上に渡り連続的な後退を行うことを確認した。生体アミンであるチラミンを高濃度含有する培地上で虫は数十秒連続的に後退した後、不動化することが知られている (Pirri et al., (2009) *Neuron* 62, 56)。これらの現象は、*C. elegans* が持続的な後退運動に関わる回路を内蔵することを示唆している。

### 2. 研究の目的

後退運動を制御する神経回路を解明することを目的とする。このために、光遺伝学的手法を用いた特定の神経細胞群の活性化操作が移動運動に及ぼす影響を調べ、持続的な後退運動の特徴を調べる。具体的には ***glr-1* 遺伝子発現神経細胞群の人工的活性化で誘発される持続的な後退運動を手掛かりとして、この現象に関わる神経細胞の絞り込み・同定を行う。** 細胞群の中で *glr-1* 発現かつ *nmr-1* 非発現の 11 種の非コマンド介在神経細胞を候補とし、IR-LEGO を活用してチャンネルロドプシン (ChR2) を発現させて運動を解析する。高濃度のチラミンを与えると持続的な後退運動が引き起こされるという先行研究の結果から、神経細胞の活性化による持続的な後退運動にも内因性のチラミンが関係しているのではないかと考えられる。そこで、**チラミン生合成が出来ない *tdc-1* 変異体や、3 種類のチラミン受容体をコードする遺伝子の変異体を用いて光遺伝学的操作を行い神経細胞の活性化を行って持続的な後退が起こるか調べ、チラミンが神経細胞群活性化による持続的な後退に関係するか調べる。**

### 3. 研究の方法

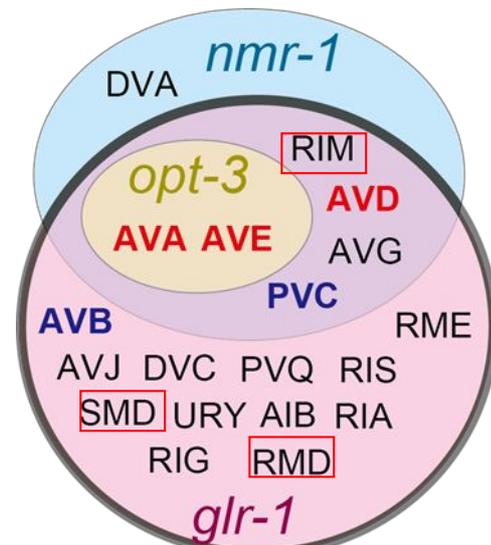
今回の研究で使用したのは ChR2(C128S) という変異型 ChR2 である。ChR2(C128S) は 128 番目のアミノ酸残基をシステインからセリンに置換した長期開口型変異である。青色光を一度照射すると照射終了後も長期的にチャンネルが開口して細胞が活性化され続け、黄色光を照射することでチャンネルが閉口し細胞が不活性化される。*C. elegans* においても、この変異型 ChR2(C128S) によって神経細胞を長期的に活性化させることが可能であると報告されている。(Schultheis et al., 2011)。ATR を含まない培地で飼育した線虫はコントロールとして用いた。

行動観察は MVX100 蛍光実体顕微鏡 (OLYMPUS、日本) を用いた。個体には、青色光 (470 ± 10 nm) 約 0.23 mW/mm<sup>2</sup> ~ 0.57 mW/mm<sup>2</sup> を BSH-Demo ソフト (SIGUMAKOKI、東京、日本) で SHUTTER CONTROLLER SSH-C2B (SIGUMAKOKI、東京、日本) を操作して、指定した時間長の照射を行った。光照射の前後を含め行動を観察し、ビデオカメラ GZ-HM570 (JVC、横浜、日本) を用いて動画撮影を行った。

### 4. 研究成果

#### ***glr-1* 発現細胞群中の候補細胞の特定:**

*opt-3* 遺伝子プロモーターにより後退運動の制御に関わると言われているコマンドインターニューロンである AVA, AVE に特異的に ChR2(C128S) を発現させた系統では、青色光照射は一過性の後退は引き起こしたが、後退は持続せず、ほとんどが 10 秒以内に前進に転じた。これは頭部への機械刺激による後退の時間的パターンとほぼ同一であった。これまでの私たちのグループの観察結果を十分な個体数・試行数により確認した。



*nmr-1* 遺伝子は NMDA 型イオンチャンネル型グルタミン酸受容体サブユニットをコードしており、AVA、AVD、AVE、AVG、DVA、PVC、RIM で発現している。AVA、AVD、AVE は後退運動、PVC は前進運動の制御に関わると言われているコマンドインターニューロンである。

nmr-1 遺伝子プロモーターにより ChR2(C128S) を発現させた系統では、41% が10秒以上の持続的後退を行った。多くは10-20秒の後退であったが30秒以上にわたる後退を示す例もあった。

glr-1 遺伝子は AMPA 型イオンチャネル共役型グルタミン酸受容体サブユニットをコードしており、AIB、AVA、AVB、AVD、AVE、AVG、AVJ、DVC、PVC、PVQ、RIA、RIG、RIM、RIS、RMD、RME、SMD、URY で発現している(図9)。この中で、AVA、AVD、AVE は後退運動、AVB、PVC は前進運動の制御に関わると言われているコマンドインターニューロンである。

glr-1 遺伝子プロモーターにより ChR2(C128S) を発現させた系統では、11秒以上後退した割合は87%となり、35秒間の観察した時間中、後退し続けたものもいた。しかし、ある試行では持続的に後退した個体でも、別の試行では持続的に後退しない時があったり、細胞活性化で後退運動が引き起こされる個体でも別の試行では後退自体をしない時もあったりするなど、同じ個体の中で試行ごとに後退時間にはばらつきがあった。

染色体外で維持されるトランスジーンであるため、ChR2 発現にモザイク性があることを利用して、30秒以上の持続的後退に関わる神経細胞の絞り込み・同定を試みた。持続的個体を行う個体ではほとんどの場合 SMD や RMD と思われる位置で蛍光が観察でき、AVA、AVD、RIM に関してはそれぞれ必ず1つ以上の細胞が、ChR2 を発現していた。一方、AIB、AVE、AVG、RIG、AIB、URY、AVB、RIS、AVJ、RIA、RME 細胞に関しては、ChR2 発現が見られなくても長期的に後退運動を行う虫が観察された。前進運動に関係するコマンドインターニューロンとして知られる AVB で ChR2 発現が見られても、持続的な後退運動を行う虫がいた。

以上の結果から、後退に関わるコマンドニューロンの活性化だけでは一過性の後退しか生き起こせない事が確認された、10秒以上の後退には AVA、AVD、RIM、さらに、30秒以上の後退にはこれらに加えて SMD あるいは RMD の活性化が必要である可能性が示唆された。

**チラミンの持続的後退への関与の検討:** チラミンを合成出来ない tdc-1 変異背景で神経細胞の活性化を行い、nmr-1 遺伝子プロモーターにより ChR2(C128S) を発現させた系統で、持続的な後退運動が起こるか調べた。予想に反して、持続的な後退運動を行った割合や後退時間の平均は tdc-1 変異によって増加し、11秒以上継続した後退運動を行った虫は6割以上にもなった。また、tdc-1 変異背景で glr-1 発現細胞群活性化を行った場合も、持続的後退の長さが30秒以上後退する虫が増加し、全体的に後退時間が長くなり、11秒以上継続した後退運動を行った割合は94%にもなった。

C. elegans には LGC-55、SER-2、TYRA-3、

TYRA-2 という4種類の受容体が存在するが、lgc-55 変異体では、野生型に比べて後退時間が長くなり、ser-2 変異体、tyra-3 変異体は野生型で神経細胞群活性化を行った時の後退時間と差がなかった。しかし、lgc-55 変異体も、tdc-1 変異体での結果に比べると、後退時間が全体的に短かった。

以上の結果からチラミンには本来持続的後退を抑制する効果があると考えられる、lgc-55 は AVB、SMD、RMD を含む7種類の神経細胞と筋細胞で発現することが知られているが、LGC-55 はアミン作動性塩化物チャネルであることから、チラミンはこれらの細胞を抑制する効果があると考えられる。前項の結果と合わせると SMD、RMD の活性調節がチラミンの効果に關与するかもしれない。

本研究では、持続的後退に關与する細胞の特定にまでは至らなかったが、候補としてコマンドインターニューロンに加えて RIM、SMD、RMD を示すことができた。これらの細胞が持続的後退に關与する可能性を、今後 IR-LEGO や2個のプロモーターを利用した intersectional strategy を用いた単一種細胞活性化実験で検証する必要である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件 全て査読有)

1. Optical silencing of body wall muscles induces pumping inhibition in *Caenorhabditis elegans*  
Megumi Takahashi, & Shin Takagi  
PLoS Genet. 2017 Dec 27;13(12):e1007134.  
doi: 10.1371/journal.pgen.1007134.

2. X-ray Crystallographic Structure of Thermophilic Rhodopsin: IMPLICATIONS FOR HIGH THERMAL STABILITY AND OPTOGENETIC FUNCTION.

Tsukamoto T, Mizutani K, Hasegawa T, Takahashi M, Honda N, Hashimoto N, Shimono K, Yamashita K, Yamamoto M, Miyauchi S, Takagi S, Hayashi S, Murata T, Sudo Y. J Biol Chem. (2016) 3;291(23):12223-32.  
doi: 10.1074/jbc.M116.719815.

3. Dissection of local Ca(2+) signals inside cytosol by ER-targeted Ca(2+) indicator.

Niwa F, Sakuragi S, Kobayashi A, Takagi S, Oda Y, Bannai H, Mikoshiba K. Biochem Biophys Res Commun. (2016);479(1):67-73. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.034.

[学会発表](計 6件)

1. 山梨 太郎, 真木 美紗代, 小島 慧一, 高木 新, 須藤 雄気  
アニオンチャネルロドプシン 2 (ACR2) の線

虫における超高感度光神経抑制活性  
第 55 回・生物物理学会 熊本 2017 年 9 月

2. Takashi Tsukamoto, Kenji Mizutani, Taisuke Hasegawa, Megumi Takahashi, Naoya Honda, Naoki Hashimoto, Kazumi Shimono, Seiji Miyauchi, Shin Takagi, Shigehiko Hayashi, Takeshi Murata, Yuki, Sudo.  
Structural basis for high thermal stability and efficient optogenetic function of thermophilic rhodopsin  
つくば市 つくば国際会議場  
2016 年 11 月

3. Sugioka, T., Andoh, K., Nakai, J., Takagi, S  
An optogenetic analysis of forward and backward locomotion in *C. elegans*  
第 39 回 日本神経科学大会  
横浜市、パシフィコ横浜  
2016 年 7 月

4. Sugioka, T., Andoh, K., Nakai, J., Takagi, S  
An optogenetic analysis of forward and backward locomotion in *C. elegans*  
CeNeuro2016 & NagoyaBNC Joint Meeting  
名古屋市、名古屋大学 豊田講堂  
2016 年 7 月

5. 梶岡拓弥、豊田直弥、中井淳一 安藤恵子、高木 新  
光遺伝学的手法による線虫 *C. elegans* の移動運動調節の解明  
第 38 回日本分子生物学会年会  
神戸ポートアイランド 2015 年 12 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻  
発生成長グループ  
<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~zootwo/170313%20HP.htm>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授  
高木 新 (Takagi Shin)  
研究者番号：90171420

(2) 研究分担者  
該当無し  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
該当無し  
( )

(4) 研究協力者  
梶岡 拓己 (Sugioka Takumi) 加藤 小春 (Kato Koharu)