

令和元年6月18日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07007

研究課題名(和文) 神経ネットワークで異種感覚情報を統合する普遍的メカニズムの解明

研究課題名(英文) Neural circuit basis for the behavioral decision by integration of different sensory inputs

研究代表者

村山 孝 (Murayama, Takashi)

沖縄科学技術大学院大学・情報処理生物学ユニット・技術員

研究者番号：50435921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：動物種間で普遍的な神経機能の理解を目的として、単純な神経回路をもつ線虫で味覚情報の伝達と行動決定に関わる神経機能について解析した。誘因性、忌避性の味刺激に対する行動と細胞内カルシウムイオン(Ca²⁺)動態の解析から、刺激により応答が異なる介在神経を同定した。それぞれの介在神経は異なる神経活動パターンを示したが、詳細な解析に必要な細胞の電気的特性の情報が多かった。我々は線虫の小さな神経に合わせた微小ガラス電極を作成し、線虫で味覚神経の膜電位測定に成功した。またNaCl刺激により興奮させた味覚神経において樹状突起内の信号伝達に電位依存性Ca²⁺チャンネルが必要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト脳の複雑な神経回路で起こる情報処理を直接解析することは困難である。この複雑さを回避して普遍的な神経機能を知るために、単純な線虫の神経回路で情報処理の基本的な仕組みを理解することは、ひいてはヒト脳回路の理解に繋がる。線虫では蛍光Ca²⁺プローブを利用した神経活動の測定が容易だが細胞の電気的特性は不明である。線虫にも興奮に閾値のあるデジタル型神経と入力に応じて興奮するアナログ型神経があり、これらの分布を理解することで情報処理の回路構造を明らかにできる。

研究成果の概要(英文)：To understand neuronal functions for information processing that are conserved among animal species, we analyzed gustatory signal transductions and behavioral decisions in *C. elegans*, a model organism with a simple nervous system. Results from calcium imaging and mutant analysis revealed that some interneurons show different activation patterns which were induced by different gustatory cues. Each type of interneuron showed typical and different activation pattern, however, there are a little of information of electrical properties of *C. elegans* neurons. To observe electrical properties of *C. elegans* neurons, we established a patch-clamp recording system with a small pore size glass pipette that is adjusted to *C. elegans* neurons, and succeeded to record membrane potentials from *C. elegans* gustatory sensory neurons. With this technique, we found that L-type voltage-gated calcium channels are required for signal propagate in the dendrite of the gustatory neuron for NaCl taste.

研究分野：神経科学

キーワード：線虫 化学走性 電位依存性カルシウムチャンネル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経ネットワークにおける複数の感覚情報をまとめて、適切な応答をする情報処理過程(感覚情報の統合)は脳機能の根幹をなす部分であり、認知、判断および利他的行動など人間らしさに深く関与する。この感覚情報の統合には興奮性・抑制性シナプスの正常なバランスと広域に投射される神経修飾物質の調節が重要である。しかしヒト脳の複雑な神経回路で起こる情報処理を直接解析することは困難である。一方、302個の神経細胞しか持たない線虫 *C. elegans* も多くの化学物質、温度、機械刺激に対して行動を示す。さらに線虫では全ての神経の結合パターンが明らかであること、また蛍光カルシウムプローブを用いて神経活動を容易に測定できることから、神経回路での情報処理の普遍的基盤を解析できると期待される。

(2) 線虫は少ない神経にもかかわらず多数の化学物質(味物質、匂い物質)を感知する。また、誘因性物質と忌避物質を同時に提示した場合の行動解析から、新規神経分泌タンパクやグルタミン酸作動性 Cl⁻チャネルなど神経細胞間での情報統合とその調節に関わる遺伝子が同定されている(Ishihara et al., 2002; Shinkai et al., 2011)。本研究も誘因性、忌避性刺激を提示した際の行動決定に関わる神経機能の解析を行う。本研究では、感覚情報の統合について新しい知見を得るために、先行研究とは異なる神経を介した誘因・忌避行動選択のメカニズムを解析する。今回の研究では我々が新規に報告した線虫のアルカリ性 pH に対する化学走性の知見から、pH9 と pH11 に調整したバッファーを誘因性および忌避性の味覚刺激として用いることにした。

(3) 本研究期間中に得られた線虫神経における Ca²⁺イメージングの結果から、線虫の介在神経は味覚刺激を与えた際に特有の Ca²⁺動態を示すことが分かった。しかし線虫の神経において Ca²⁺動態だけでは神経の興奮・抑制の状態を十分に説明することができなかった。これは線虫の神経で従来考えられていた緩電位応答によるアナログ的応答の神経だけでなく、閾値電位を持ち二極性の(デジタル的)応答をする神経が報告された(Mellem et al., 2008)ことに加えて、Ca²⁺動態と膜電位変化が一致しない事例が報告されたためである(Williams et al., 2018)。線虫神経の電気生理学実験は技術的に難しく、世界でもわずかな研究室でのみ成功していた。線虫の神経回路内の情報伝達を正しく理解するために、我々も独自に電気生理学解析法を確立する必要性が生じた。

2. 研究の目的

(1) 誘因性と忌避性の味覚情報が競合する条件下で線虫の神経活動と行動を比較し、刺激強度による行動選択に関わる神経ネットワークを同定する。

(2) 目的(1)を行う過程において、線虫の各神経の電気的特性を明らかにする必要性が生じたことから、線虫の神経細胞サイズに適応させたパッチクランプ法の確立を行う。

3. 研究の方法

(1) 野生型線虫は pH9 へ正の走性を示し、pH11 に負の走性を示す。この行動について変異体の解析から関与する神経を同定する。

(2) 2つのアルカリ性 pH 受容神経 ASEL と ASH の下流に位置する一連の介在神経について蛍光プローブタンパクを用いた細胞内 Ca²⁺動態を測定し、誘因性および忌避性シグナルの伝達経路を探索する。それら介在神経の内で刺激に応じて異なる Ca²⁺動態を示す神経を同定する。

(3) 線虫神経を対象としたパッチクランプ法の確立は ASEL 神経と味物質 NaCl を用いて行う。これは NaCl 刺激による ASEL の Ca²⁺応答が pH 刺激時より強く、これまで広く研究されていたためである。

4. 研究成果

(1) 我々は先行研究において線虫はアルカリ性 pH を味覚刺激として受容することを明らかにしていた。線虫は pH9 に誘引され、pH11 に対しては逆に忌避行動を示す(図 1、野生株)。この pH に依存した行動変化から、線虫頭部の 8 対の味覚受容神経のうち正の化学走性に重要な ASEL 神経および負の化学走性に重要な ASH 神経のシグナルが下流神経回路で競合し行動に影響することが予想された。実際に ASEL または ASH 神経機能が欠損した変異体のアルカリ性 pH に対する行動解析から、ASEL と ASH はそれぞれアルカリ性 pH に対する誘因、忌避行動に必要であることが見出された(図 1、欠損株)。この研究で用いた線虫の行動解析手法は Bio-protocol 誌にて掲載された。

(2) ASEL 神経と ASH 神経のシグナルが下流の神経回路で競合するという仮説から、アルカリ性 pH に対する行動選択の神経回路モデルを提唱した(図 2)。この神経回路は前進または後退を行う運動神経に直接投射することから、行動の決定はこの神経回路において行われていると考えられる。ASEL、ASH の下流に位置する各介在神経について蛍光プローブタンパクを用いた細胞内 Ca^{2+} イメージングを行った。刺激バッファの塩組成により神経の応答性が影響されるものの、A1Y、A1Z、A1B 介在神経の Ca^{2+} 応答は誘因性 pH9 刺激と忌避性 pH11 刺激で明らかに異なることを見出した。

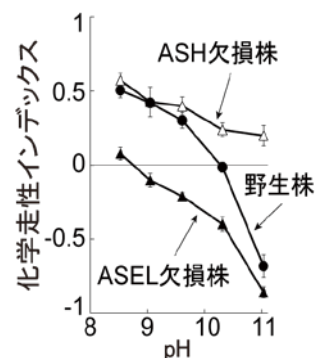


図 1. アルカリ性 pH に対する化学走性

(3) しかし、 Ca^{2+} イメージングの結果と神経の興奮について次のような問題が生じた。

① 刺激時に細胞内 Ca^{2+} 濃度の減少がみられる神経について、一般にこれが神経の不活性化の指標にされているが、この Ca^{2+} 濃度の減少と対応する過分極性の膜電位について報告はない。つまり Ca^{2+} 濃度変化について電位依存性 Ca^{2+} チャンネルと細胞内 Ca^{2+} ストアの活動を区別できていない。この点については最近 Ca^{2+} 動態と膜電位変化が一致しない事例が報告された。

② Ca^{2+} イメージングでは蛍光プローブタンパクのシグナル強度に個体差があり、一般に 20 から 100 個体ほどの測定データから平均値を求める。いくつかの神経についてはステップ状に Ca^{2+} 濃度が上昇するが、この Ca^{2+} 濃度上昇のタイミングが個体間でずれるために平均データでは緩やかなカーブとして解釈されてしまう。

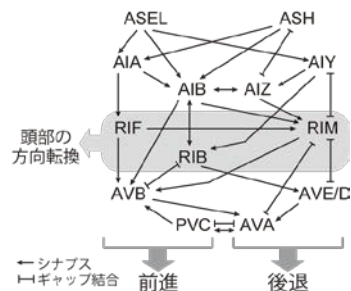


図 2. アルカリ性 pH 応答の神経回路モデル

線虫は前述した単純な神経回路、生体での蛍光イメージング、さらに遺伝学的解析も容易であるなど、神経機能を研究する上で優れたモデル生物である。しかし神経細胞が小さく、一般的なパッチクランプ電極での電気生理学手法が困難であったことから、神経細胞について電気的特性はほとんど知見がない。我々は線虫の各神経細胞の電気的特性を明らかにすることが神経回路の機能を正しく理解する最善の方法であると考え、沖縄科学技術大学院大学 Jeffery R. Wickens 教授のグループとの共同研究から線虫の神経に対するパッチクランプ測定法を確立した。

ASEL 神経はこれまで NaCl 受容神経として Ca^{2+} イメージングを含め多く解析が行われていることから、まず電流固定法により ASEL 神経の NaCl 受容による膜電位変化を測定した。ASEL は NaCl 刺激により二極性の脱分極性膜電位変化を起こし、そのピーク電位は刺激に用いた NaCl 濃度によらず同程度の大きさであった。また ASEL では刺激に用いた NaCl 濃度が高いほど閾値電位を超える大きな脱分極の発生頻度が上昇した(図 3)。先行研究では Ca^{2+} イメージングによる解析から、ASEL 神経の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が NaCl 濃度依存的であると報告されており、NaCl 刺激強度に応じたアナログ的な神経興奮が示唆されていたが、我々の研究から ASEL の NaCl 応答は全か無かの法則に従うデジタル的な神経の興奮であることが示された。

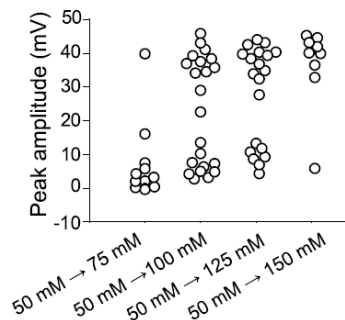


図 3. NaCl 濃度変化(横軸)に対する ASEL 膜電位変化のピークサイズ

(4) 線虫の神経は他の動物に比べ高い膜抵抗を持ち、神経突起が短いなどの理由から、神経細胞内における膜電位の伝搬はケーブル理論に基づく受動的な伝搬であると考えられていた。我々は ASEL 神経において、NaCl 受容体が局在する感覚繊毛から樹状突起を経て細胞体まで、細胞膜興奮の伝搬に関わる分子を探索した。膜電位測定、 Ca^{2+} イメージングおよび変異体解析から、ASEL の樹状突起では L 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを必要とする能動的な膜電位の伝搬が起こることを見いだした。研究成果(3)および(4)については Scientific Reports 誌に掲載した。

<引用文献>

- Ishihara et al., Cell, (2002), 109(5):639-49.
- Shinkai et al., J Neurosci., (2011), 31(8):3007-15.
- Mellem et al., Nat Neurosci., (2008), 11(8):865-7.
- Williams et al., J Neurosci., (2018), 38(8):2069-2080.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

① Tomomi Shindou, Mayumi Ochi-Shindou, Takashi Murayama, Ei-ichiro Saita, Yuto Momohara, Jeffery R. Wickens & Ichiro N. Maruyama, “Active propagation of dendritic electrical signals in *C. elegans*”, Scientific Reports, volume 9, Article number: 3430 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40158-9>, (査読有)

② Takashi Murayama & Ichiro N. Maruyama, “Plate assay to determine *Caenorhabditis elegans* response to water soluble and volatile chemicals”, Bio-protocol, volume 8(4), e2740 (2018).

DOI: 10.21769/BioProtoc.2740, (査読有)

〔学会発表〕（計5件）

① 村山 孝, “Active propagation of dendritic electrical signals in a *C. elegans* chemosensory neuron”, 第41回日本神経科学大会, (2019)

② 村山 孝, “Active propagation of dendritic electrical signals in a *C. elegans* chemosensory neuron”, 22nd International *C. elegans* conference (国際学会, Plenary lecture), (2019)

③ 村山 孝, “Neural circuit basis for the behavioral switch in *C. elegans* chemotaxis to alkaline pH”, 21st International *C. elegans* conference (国際学会), (2017)

④ 村山 孝, “Neural circuit basis for the behavioral switch in *C. elegans* chemotaxis to alkaline pH”, CeNeuro2016 (国際学会), (2016)

⑤ 村山 孝, “線虫 *C. elegans* におけるアルカリ性 pH 走性の行動選択・意思決定の神経回路基盤”, 第39回日本神経科学大会, (2016)

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

沖縄科学技術大学院大学 プレスリリース 2019-03-05

<https://www.oist.jp/ja/news-center/press-releases/33634>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：丸山 一郎

ローマ字氏名：(MARUYAMA, ichiro)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。