

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 特定領域研究
 研究期間： 2005 ～ 2009
 課題番号： 17024023
 研究課題名（和文） 線虫 *C. elegans* の感覚行動から探る高次神経機能の分子機構
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of neural functions underlying sensory behaviors in the nematode *C. elegans*

研究代表者
 森 郁恵 (MORI IKUE)
 名古屋大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号：90219999

研究成果の概要（和文）：本研究は、*C. elegans* の可塑的応答行動である温度走性を行動パラダイムとして、刺激受容や神経可塑性の分子機構を明らかにすることを目的とした。その結果、温度は、温度受容ニューロンである AFD と AWC で、それぞれ記憶されていること、飢餓シグナルは insulin 様ペプチドを介して、AFD と AWC の下流に存在する介在ニューロンを抑制していること、そして、躁うつ病治療薬リチウムは RIA 介在ニューロンのシナプス局在と温度走性行動に影響を与えることも明らかになった。

研究成果の概要（英文）： Animals modify their behaviors upon reception of various environmental stimuli. It however remains largely unknown how, at the molecular level, the stimuli are processed and integrated in the nervous system, thereby generating the behavioral outputs. To address molecular mechanism on sensory reception and neural plasticity, we utilized thermotaxis behavior, a temperature memory and feeding state-regulated behavior, in the small nematode *Caenorhabditis elegans*. *C. elegans* is an ideal system to elucidate molecular basis of behavioral plasticity because of its complete knowledge of neural wiring and powerful accessibility to genetic and molecular analyses. We showed here that 1) temperature is not only sensed but also remembered by AFD and AWC sensory neurons, 2) starvation signal inhibits thermotaxis interneurons that are downstream of AFD and AWC through insulin-like peptide, and 3) association between temperature and feeding state requires functional changes in thermotaxis interneurons. We also found that Lithium, a drug for patients with bipolar disorder, affects synaptic localization in RIA interneuron, which is essential for proper thermotaxis behavior.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	16,900,000	0	16,900,000
2006 年度	16,600,000	0	16,600,000
2007 年度	15,700,000	0	15,700,000
2008 年度	11,100,000	0	11,100,000
2009 年度	12,100,000	0	12,100,000
総計	72,400,000	0	72,400,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：感覚神経細胞、温度受容、温度走性、Cエレガンス、神経回路

1. 研究開始当初の背景

温度感覚は、非常に重要な感覚の1つであるにも関わらず、温度受容やその情報処理などの分子機構は、ほとんど解明されていない。線虫 *C. elegans* は、餌を与えて飼育した後、餌のない温度勾配上に置かれると、飼育温度に移動するが、餌を与えられずに飢餓を体験させた後では、飼育温度を忌避するという、温度走性と呼ばれる行動を示す。すなわち、飼育された環境の温度情報と餌環境を受容し、この飼育温度と餌状態という2つの情報を関連付けて記憶する性質を持っている。我々は、この温度走性の神経回路が明らかになっていることを利点とし (Mori and Ohshima, 1995)、また、温度走性が温度と餌情報の連合学習によって成り立つ行動であるという観点から、温度受容や神経可塑性に関与する分子機構を明らかにするために、主に分子遺伝学的手法を用いて解析を進めた。

2. 研究の目的

動物は、外界の様々な刺激に応答し、行動を変化させる。しかしながら、受容した刺激情報が、神経系においてどのように処理され、他の刺激情報と統合され、行動として出力されるかに関する分子機構は、ほとんど未解明である。そこで、本研究では、温度走性を行動パラダイムとして利用し、温度情報処理や行動の神経回路動態の基盤となるシグナル伝達経路やシナプス可塑性に関与する分子を同定し、記憶や学習の分子機構の根本原理を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

従来までの本研究者らの研究によって同定された温度走性に関与する分子群について、詳細な *in vivo* における分子遺伝学的解析やカルシウムイメージングによる分子生理学的解析も行った。

4. 研究成果

(1) *C. elegans* の温度走性には3つのグアニル酸シクラーゼ遺伝子 (*gcy-8*, *gcy-18* および *gcy-23*) が必須であり、それらがコードする3種類のタンパクは、温度受容神経細胞の感覚末端に特異的であった。各 *gcy* 遺伝子の変異体は、正常な温度走性を示したが、二重変異体および三重変異体は温度走性に顕著な異常を示した。三重変異体の温度走性の異常は、各 *gcy* 遺伝子を導入することで回復したことより、3つのグアニル酸シクラーゼは重複し

て機能することが示唆された (Inada et al., 2006)。

(2) カルシウム依存的脱リン酸化酵素である calcineurin の変異体 (*tax-6*) では、温度と餌情報の連合学習に異常を示すことを明らかにした。さらに、この異常は、温度走性の神経回路モデル (Mori and Ohshima, 1995) において温度と餌情報の記憶や学習に必須であると推測されていた AIZ と RIA という直接シナプス結合で連絡している2つの介在ニューロンの機能異常に起因することがわかった。これらの高次神経機能に重要であることが明らかになった介在ニューロンの活動を生理学的に解析する第一歩として、genetical に encodable なカルシウムセンサーである *cameleon* を成虫個体の AIZ 介在ニューロンで発現させて可視化し、温度受容感覚ニューロンを温度で刺激した時の、AIZ 介在ニューロンの活動を FRET によるイメージングによって解析した。まず、餌を与えられて 17°C で飼育された野生型個体の AIZ のイメージングを行なった結果、温度上昇 (15°C → 25°C) によって活性化し、温度下降 (25°C → 15°C) によって不活性化すること、すなわち、温度上昇においてのみ応答が見られた AFD 温度受容感覚ニューロンとは異なり (Kimura et al., 2004)、AIZ 介在ニューロンでは、温度の上昇と下降の両方に応答することがわかった。また、段階的に温度を上昇させると、それに対応して段階的な AIZ の活性化が見られた。興味深いことに、飢餓を体験させた成虫個体の AIZ では、温度上昇に対する活性化が抑制されていることも明らかになった。しかしながら、calcineurin の変異体である *tax-6* 個体では、飢餓を体験させても、AIZ は、温度上昇に対して、餌を与えて飼育された個体と同等レベルに活性化した。これらの結果は、線虫が飢餓を体験している時に、calcineurin が、未知の飢餓シグナルが AIZ 介在ニューロンに作用することを負に制御することを示唆した。従って、calcineurin の変異体 *tax-6* では、この負の制御が起こらないために、飢餓を体験している時の温度情報が、飢餓の効果を受けずにそのまま処理されているため、温度勾配上で飢餓体験温度を忌避しないどころか、飢餓体験温度に移動すると考えられた (Kuhara and Mori, 2006)。

(3) 温度と餌情報の連合学習の分子機構を明らかにするために、飢餓を体験させても飼育温度に移動する *aho* (abnormal hunger

orientation)変異体を多数単離した (Mohri et al., 2005)。そのうち、*aho-2* 変異体は、行動解析の結果から、餌情報 (餌の有無) と温度情報は、それぞれ、正常に認識できることが示唆された。*aho-2(nj32)*変異の原因遺伝子のクローニングを行なったところ、*aho-2* 遺伝子は、*C. elegans*において最もヒトの *insulin* と相溶性が高い *ins-1* 遺伝子と同一の遺伝子であった。多数の細胞特異的プロポーターを使って *ins-1cDNA* を *ins-1(aho-2)*変異体のいろいろなニューロンで発現させ、温度と餌情報の連合学習異常の回復を検証したところ、INS-1 は、基本的に細胞非自律的に作用するが、感覚ニューロンで発現することが重要であることがわかった。*ins-1* は、*C. elegans* の耐性幼虫形成機構における *insulin signaling pathway* に関与することが知られている。そこで、そのシグナル伝達を構成する遺伝子の変異体について、温度と餌情報の連合学習について解析したところ、INS-1 は、DAF-2 (*insulin receptor*) のアンタゴニストとして作用するため、AGE-1 (PI3-kinase) を抑制し、DAF-16 (FKHR) 転写因子の発現を促進するという以前の *insulin signaling pathway* と矛盾しない結果を得た。PI3-kinase の変異体である *age-1* は、*ins-1* 変異体とは逆に、短時間で飢餓の効果が表れる。そこで、*age-1* の示す連合学習異常の回復実験を行なったところ、INS-1 の作用部位は、感覚ニューロンではなく、温度と餌情報の連合学習に重要な役割を果たすと考えられる3つの介在ニューロン (AIY, AIZ, RIA) であることが強く示唆された。*ins-1* 変異体の AIZ 介在ニューロンにおいて、*cameleon* によるカルシウムイメージングを行なった。飢餓を体験した *ins-1* 変異体の AIZ は、餌を与えて飼育された *ins-1* 変異体と同様に、温度上昇によって活性化され、温度下降によって不活性化された。この結果は、未知の飢餓シグナルが INS-1 を介して、AIZ に作用することによって、連合学習を成立させていることが示唆された (Kodama et al., 2006)。

(4) 温度走性に顕著な異常を示す *ttx-7* 変異体の原因遺伝子をクローニングしたところ、inositol monophosphatase (IMPase) をコードしていた。IMPase は生体内において inositol の産生に必要であると考えられているが、*in vivo* での解析の報告は、ほとんど存在していない。*ttx-7 null* 変異体の RIA 介在ニューロンでのみ TTX-7 を発現させたところ、温度走性が正常に回復した。RIA は、温度走性神経回路において温度や餌条件の連合学習のための統合処理に重要な役割を果たしているだけでなく、シナプス入力と出力部位の数が、他のニューロンと比較して非

常に多いという特徴があるため、中枢神経系のコアをなす介在ニューロンであると考えられる。*ttx-7 null* 変異体の RIA における presynapse の局在を、synaptobrevin (SNB-1::GFP) を指標として調べたところ、野生型では、postsynapse のみが集中して存在する領域にも、SNB-1 の局在が観察され、*ttx-7* 変異体の RIA でのみ TTX-7 を発現させた場合、あるいは inositol を含む培地で *ttx-7* 変異体を飼育した場合、presynapse と postsynapse の局在が正常に戻った。さらに、外来性の LiCl は、野生型個体の RIA ニューロンの presynapse の局在異常と温度走性行動異常を引き起こした。これらの結果などから、TTX-7/IMPase は、inositol を産生することによって、成虫の成熟した神経回路におけるシナプス局在を維持し、リチウムは、IMPase を直接的に抑制することによって、躁うつ病治療薬として効果を示すと考えられた (Tanizawa et al., 2006)。

(5) *C. elegans* の温度走性異常変異 (*nj8*) の原因遺伝子を同定したところ、3 量体 G タンパク α サブユニット ($G\alpha$) の負の制御因子である RGS (EAT-16) をコードする遺伝子であることが明らかになった。この RGS 変異体の温度走性の異常は、嗅覚ニューロンとして知られていた AWC ニューロンに RGS 遺伝子を発現させることにより、正常に回復した。AWC 嗅覚ニューロンが温度刺激に応答するかを、*cameleon* を用いたカルシウムイメージングにより検証したところ、AWC は温度変化に応答し、かつ、過去の飼育温度に応じて温度応答性を変化させることが明らかになった。つまり、AWC 嗅覚ニューロンは温度を感知するだけでなく、温度記憶も行なっていることが示唆された。興味深いことに、AWC の温度応答性は、AWC の嗅覚情報伝達に関わる $G\alpha$ タンパクと cGMP 依存性チャネルの変異体で顕著に低下していた。また、RGS 変異体の温度走性行動の異常も、G タンパク-cGMP 経路の変異により抑圧された。これらの結果は、温度情報が 3 量体 G タンパクを介して伝達されることを示唆するだけでなく、AWC 感覚ニューロンが温度と匂い物質という質的に異なる 2 つの情報を、共通の G タンパク経路により伝達することを示唆する。さらに、カルシウムイメージングを駆使した実験により、AWC を介した温度情報伝達の神経回路も明らかになった。以上の結果は、嗅覚ニューロンが温度を感知し、温度情報が G タンパク経路を介して伝達されことを初めて示唆した (Kuhara et al., 2008)。

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 24 件)

1 Liu J, Ward A, Gao J, Dong Y, Nishio N, Inada H, Kang L, Yu Y, Ma D, Xu T, Mori I, Xie Z, Xu S, C. elegans phototransduction requires a G protein-mediated cGMP pathway and a taste receptor homolog (in press), Nature Neuroscience, 有, 2010

2 Jurado, P., Kodama, E., Tanizawa, Y., Mori, I., Distinct thermal migration behaviors in response to different thermal gradients in Caenorhabditis elegans. Genes, Brain and Behavior, 有, 9, 2010, 120-127

3 Kuhara, A.*, Okumura, M.*, Kimata, T., Tanizawa, Y., Takano, R., Kimura, K. D., Inada, H., Matsumoto, K., and Mori I. (*equally contributed), Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit controlling behavior of C. elegans, Science, 有, 320, 2008, 803-807

4 久原篤, 笹倉寛之, 木全翼, 森郁恵, 温度学習行動の分子神経回路メカニズム, 蛋白質核酸酵素増刊号 神経の分化, 回路形成, 機能発現, 無, 53, 2008, 580-586

5 Mori, I., Sasakura, H., Kuhara, A., "Worm thermotaxis: a model system for analyzing thermosensation and neural plasticity", Current Opinion in Neurobiology, 有, 17, 2007, 712-719

6 Kuhara, A. and Mori, I., Molecular physiology of the neural circuit for calcineurin-dependent associative learning in Caenorhabditis elegans., J Neurosci, 154, 2006, 9355-9364

7 Kodama, E., Kuhara, A., Mohri-Shiomi, A., Kimura, K. D., Okumura, M., Tomioka, M., Iino, Y., and Mori, I., Insulin-like signaling and the neural circuit for integrative behavior in C. elegans., Genes Dev, 20, 2006, 2955-2960

8 Tanizawa, Y., Kuhara, A., Inada, H., Kodama, E., Mizuno, T., and Mori, I., Inositol Monophosphatase regulates localization of synaptic components and behavior in the mature nervous system of C. elegans., Genes Dev, 20, 2006, 3296-3310

9 Inada, H., Ito, H., Satterlee, J., Sengupta, P., Matsumoto, K. and Mori, I., Identification of guanylyl cyclases that function in thermosensory neurons of Caenorhabditis elegans., Genetics, 172, 2006, 2239-2252

10 Ito, H., Inada, H. and Mori, I., Quantitative analysis of thermotaxis in the nematode Caenorhabditis elegans., J. Neurosci. Meth., 154, 2006, 45-52

[学会発表] (計 50 件)

1 Ikue Mori, Neural coding of behaviors in C. elegans, ISDB2009, 2009.9.6 -10, Edinburgh International Conference Centre (Edinburgh, UK)

2 Ikue Mori, Neural circuits regulating C. elegans memory-based behavior, 第4回 MCCS-Asia シンポジウム, 2009.9.15, 名古屋国際会議場 (名古屋)

3 Ikue Mori, Neural coding of temperature memory-regulated behavior in C. elegans, グローバル COE プログラム「システム生命科学の展開: 生命機能の設計」国際シンポジウム "Frontiers of Genes, Neural Circuits and Behavior", 2009.11.18-19, 名古屋大学 (名古屋)

4 Mori, I., Comprehensive analysis of neural circuit controlling behavior in C. elegans, Gordon Research Conference "Molecular & Cellular Neurobiology", 2008.6.8-2008.6.13, Hong Kong, China

5 Mori, I., Calcineurin is required for behavioral plasticity in C. elegans, FASEB Summer Research Conference "Calcium and Cell Function", 2008.7.6-2008.7.11, Colorado, USA

6 Mori, I., Components orchestrating the neural circuit for behavior, Janelia Farm Research Conference on Neural Circuit and Behavior in C. elegans II: Towards the Ultimate Model, 2009.3.8-2009.3.11, Virginia, USA

7 Mori, I., Comprehensive Studies on a Neural Circuit for Worm Thermotaxis, CDB Symposium: Turning Neurons into a Nervous System, 2008.3.24-3.26, Kobe, Japan

〔図書〕（計 3 件）

1 久原 篤、笹倉 寛之、木全 翼、森郁恵、蛋白質 核酸 酵素 増刊号 神経の分化、回路形成、機能発現 53(4)、温度学習行動の分子神経回路メカニズム、2008、580-586（分担）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 郁恵 (MORI IKUE)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：90219999