

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06952

研究課題名（和文）記憶の形成と適応行動生成の制御メカニズム

研究課題名（英文）Mechanisms of memory formation and generation of adaptive behavior

研究代表者

國友 博文（Kunitomo, Hirofumi）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・准教授

研究者番号：20302812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：記憶と学習は、生物が環境に適応し繁殖するために必要な能力である。経験から記憶が形成され、その記憶に基づいて行動が調節される時、脳神経系ではどのような生理的な変化が起こっているか、十分にはわかっていない。これを遺伝子レベルで理解することを目的として、本研究は線虫*C. elegans*の味覚学習の機構を調べた。その結果、行動の制御に関わる神経回路のはたらきや、神経伝達可塑性の新たな機構を明らかにした。また、味覚学習に必要な新規遺伝子を見出し、その役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
神経細胞間の情報伝達の変化は、記憶や学習のしくみの一つと考えられている。本研究は線虫の味覚学習をモデルとして、感覚受容を担う味覚神経と、その情報を処理する介在神経との間の情報伝達が経験に依存して変化する機構を遺伝子レベルで明らかにした。また、線虫の学習に必要な新規遺伝子として、神経や筋の興奮性を調節する塩化物イオンチャンネルを同定し、それが行動の制御に果たす役割を明らかにした。これらの遺伝子はヒトを含む多くの動物種で保存されている。本研究で明らかになった神経伝達調節機構や遺伝子の機能は、記憶と学習のしくみをより深く理解することにも貢献した。

研究成果の概要（英文）：Learning and memory are the abilities necessary for an organism to adapt to its environment and successfully reproduce. It is not fully understood what physiological changes in the brain occur when memories are formed depending on experience and behavior is modulated based on those memories. To address this at the genetic level, we investigated the mechanism of taste learning in the nematode *C. elegans*. We revealed the regulatory mechanisms of the neural circuit that play a pivotal role in behavioral control and reported a new mechanism of synaptic plasticity. We also revealed the roles of genetic pathways required for taste learning.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：記憶と学習 線虫 化学感覚 シナプス 塩化物イオンチャンネル 神経ペプチド

1. 研究開始当初の背景

学習は生物が環境に適応し繁殖するために必要な能力である。経験に依存して記憶が形成され、その記憶に基づいて行動が調節されるとき、いかなる生理的な変化が脳神経系で起こっているか、分子・細胞レベルでの理解は十分ではない。これを調べるには、遺伝学的アプローチによる新規因子の同定に優れ、感覚受容とその情報処理、運動出力に伴う神経回路の活動を正確に計測できる実験系が適している。我々は線虫 *C.エレガンス* を用いて味覚学習の機構の解明に取り組んできた。行動制御に関わる主要な神経回路を同定し、味覚記憶の形成や行動の調節に関するシグナル伝達経路を明らかにしていた。

線虫の味覚学習(塩濃度学習)において、ASER と呼ばれる味覚神経細胞と AIB と呼ばれる一次介在神経の間のシナプス伝達に可塑性があり、これが行動の制御に重要なことが明らかになっていた。しかし、その分子機構の解明は不十分であった。また、学習に関与する新規遺伝子を同定するため変異体スクリーニングを実施し、原因遺伝子をいくつか同定していた。

2. 研究の目的

線虫をさまざまな塩 (NaCl) 濃度に晒した後に塩の濃度勾配上に置いて行動を観察すると、線虫は餌を得ていた塩濃度に向かい飢餓を経験した塩濃度を避ける(塩濃度学習、図1)。この実験系を用いて、記憶と学習の分子・細胞機構を理解することを目標とした。

(1) ASER 神経から AIB 神経へのグルタミン酸シナプス伝達の符号は、学習の条件に依存して興奮性または抑制性となることがわかった。学習の前後でシナプスの性質がこれほど顕著に変化する例はあまり知られていない。関与する分子を同定し、シナプスの極性が反転する仕組みを明らかにすることを目的とした。

(2) 学習変異体の原因遺伝子として、CIC 型クロライドチャンネル *CLH-1* を同定した。学習や塩走性における機能を明らかにすることを目的とした。

(3) ASER 神経からの情報は、AIB 神経以外の介在神経にも伝達され並列して処理される。これらの神経回路のはたらきを明らかにすることを目的とした。

(4) 変異体の行動解析から、神経ペプチドが塩濃度学習に関与することが示唆された。とくに顕著な表現型を示した神経ペプチド *NLP-3* について、作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シナプスの符号を反転させる機構として、後シナプス細胞に発現する受容体が複数あり、それらが使い分けられることで応答性が変わる可能性が考えられた。受容体遺伝子の変異体を用いて AIB 介在神経の塩応答を調べた。

(2) *clh-1* の 2 つの点変異が低塩濃度と餌の連合学習に欠損を示した。電気生理学実験により変異がチャンネルの性質に与える影響を調べた。また変異株を用いて ASER 神経の塩応答を調べ、行動を定量して、変異が神経応答および行動に与える影響を解析した。

(3) ASER 神経から入力を受け、殺傷すると塩走性に異常を示すことがわかっていた AIB 介在神経について、塩刺激に対する応答機構と行動への関与を調べた。

(4) ASER 神経で発現する神経ペプチド、*NLP-3* が塩走性に関与することを見出した。遺伝学的スクリーニングを行って受容体遺伝子の同定を試みた。また、神経ペプチド遺伝子変異体を実施し、塩走性に関わるほかの神経ペプチド遺伝子を探索した。

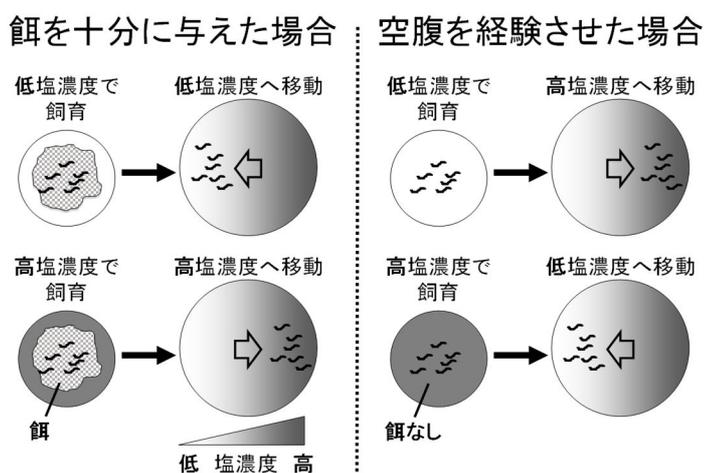


図1 線虫の塩濃度学習
経験した塩濃度の高低(図の上下)と餌の有無(左右)に依存して塩濃度勾配における移動方向が逆転する。

4. 研究成果

(1) シナプス伝達可塑性の分子機構の解明

自由に行動している線虫個体の特定の部位を追尾できる顕微鏡システムを用いて、ASER 味覚神経、および ASER 神経とシナプス接続する AIB 介在神経について、塩刺激に対する応答を観察した。その結果、ASER 神経から AIB 神経へのシナプス伝達は、飼育されていた塩濃度が高いと興奮性、低い場合には抑制性となることがわかった。AIB 神経の活動パターンは塩走性の移動方向を決定することから、このシナプス伝達の調節機構の解明が学習に依存した行動制御の理解に直結すると考えられた。また、興奮性と抑制性の両方の性質を示すシナプス伝達は珍しく、シナプス可塑性のメカニズムとしても興味深い課題であった。

各種の変異体を用いた表現型の解析から、興奮性、抑制性いずれの伝達にも ASER 神経からのグルタミン酸の放出と、AIB 神経で発現する AMPA 型グルタミン酸受容体が関与することが明らかになった。これに加えて、低塩濃度飼育後の抑制性の伝達には、AIB 神経で機能するグルタミン酸依存性塩化物イオンチャンネルが機能することが明らかになった (Sato et al., 2021、図 2)。

以上の成果は、後シナプス細胞で発現する受容体の使い分けによってシナプス伝達の極性が制御される新たな機構を提案した。シナプス可塑性の機構、および塩濃度学習における行動制御の分子機構の理解に大きく貢献した。

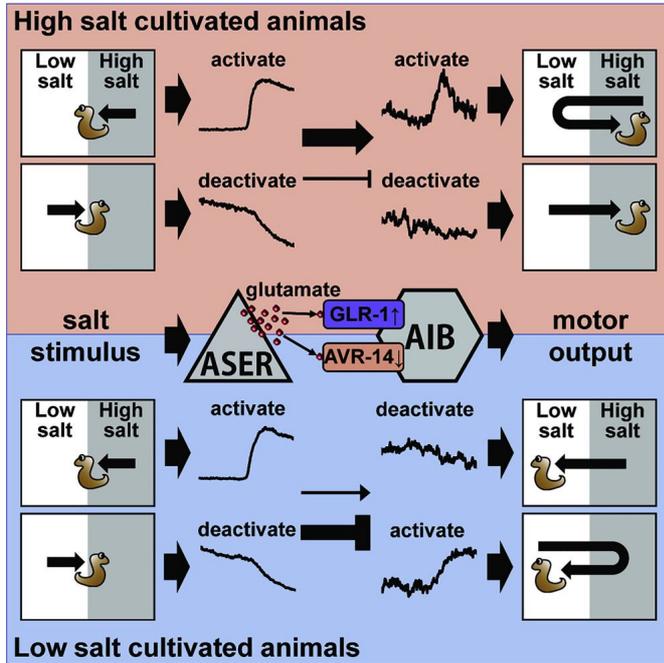


図2 ASER 味覚神経と AIB 介在神経の間のシナプス伝達調節機構
AIB 神経で発現する、性質の異なる複数のグルタミン酸受容体のはたらきにより、過去に経験した塩濃度が高い場合には興奮性、低い場合には抑制性の伝達を示す (Sato et al., 2021)。

(2) 塩走性における CIC 型塩化物イオンチャンネルの役割の解明

CIC 型クロライドチャンネルは線虫からホニュウ類まで保存された陰イオンチャンネルファミリーである。細胞膜や細胞小器官の膜で機能し、筋や神経の応答を調節する。このファミリーに属するヒト CIC-1 遺伝子の変異は、先天性ミオトニアと呼ばれる遺伝病を引き起こす。

線虫はゲノム上に 6 個の CIC チャンネルの遺伝子をもつ。そのひとつ、*clh-1* 遺伝子のミスセンス変異体が塩走性に異常を示すことを見出していた。興味深いことに、*clh-1* 遺伝子の機能が完全に欠損した線虫株の塩走性は正常であり、変異型 CLH-1 チャンネルは野生型 CLH-1 チャンネルとは異なる性質をもつことが示唆された。変異型チャンネルの性質を遺伝学的に調べるため、線虫の塩走性表現型を指標とした相補性試験を行った。その結果、ミスセンス変異アリルは野生型アリルに対して潜性であるが、変異型チャンネルの発現量が野生型に対して多い場合には変異表現型を示した。また、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学実験の結果、変異型チャンネルは過分極に依存した細胞内への電流の流入量が小さくなることが明らかになった。

細胞特異的な機能回復実験から、*clh-1* は ASER 神経で機能することがわかった。変異による

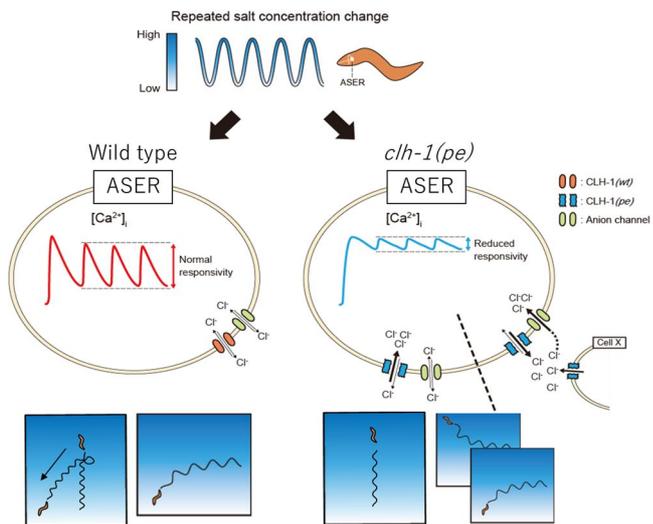


図3 塩走性における CIC 型塩化物イオンチャンネル CLH-1 の役割
CLH-1 は ASER 神経の応答性に寄与する。*clh-1* 変異体では塩濃度の変化に対して ASER 神経の応答が弱く、目的の塩濃度に向かうための方向転換やカーブ追加に影響を受ける (Park et al., 2021)。

チャンネルの性質の変化が神経細胞の活動に与える影響を調べるため、塩化物イオン濃度レポーターClomeleonを用いてASER神経における細胞内塩化物イオン濃度測定を行った。その結果、変異体ではASER神経が活動したときの塩化物イオンの透過性が大きいことが明らかになった。

さらに、塩走性におけるCLH-1の役割を明らかにするため、行動の定量解析、味覚神経およびその下流ではたらく介在神経の神経活動の測定を行った。その結果、CLH-1は味覚神経が塩濃度の変化を正確に感知するのに必要であり、個体が示す塩走性の欠損は、味覚神経および介在神経の塩応答の異常によってもたらされることが明らかになった (Park et al., 2021、図3)。

この研究成果は、塩濃度学習に関わる新規遺伝子CIC型クロライドイオンチャンネルを見出し、その役割を明らかにした。線虫の*in vivo*での塩化物イオン濃度測定は初の報告例である。

(3) AIY 介在神経の役割の解明

ASER神経で感知された塩濃度変化の情報は、おもに3対の介在神経、AIB、AIY、AIAに伝達される。AIB神経は塩濃度変化に伴う方向転換頻度の制御に関与する。一方、塩走性におけるAIY神経の役割は不明であった。餌を経験した塩濃度に向かう行動において、AIY神経は、特に低塩濃度への走性に必要であった。またこのとき、AIY神経の塩応答は、個体が経験した塩刺激の履歴に応じて変化した。但し、これは塩刺激のパターンに依存し、塩濃度が緩やかに変化する刺激では経験に依存した応答の変化が観察された。一方、急な塩濃度変化を刺激として与えた場合には、AIY神経は過去の経験によらず一定の応答性を示した。また、AIY神経の塩応答は、ASER感覚神経のグルタミン酸性神経伝達に依存した。以上の結果から、AIY介在神経はASER神経が個体の移動に伴う自然な塩濃度変化を感知したときに塩刺激に対して可塑的な応答を示し、低い塩濃度への走性に寄与することが示唆された (Mabardi et al., 2023)。

(4) 塩濃度学習に関わる神経ペプチドの同定と機能の解明

神経ペプチドは神経伝達物質として機能するほか、シナプス外で作用して神経活動を調節する修飾因子としてもはたらく。神経ペプチドのプロセシングに必要な *egl-3* や *egl-21* の変異体が塩走性に欠損を示すことから、神経ペプチドが塩走性に関与することが示唆されていた (Nagashima et al., 2019)。同様に変異体を用いた実験から、神経ペプチドが飢餓条件によるASER-AIB神経間のシナプス伝達を調節する可能性が示唆されていた (未発表)。

塩走性に関わる神経ペプチドを特定するため、神経ペプチド遺伝子の変異体を用いて塩走性の表現型を観察した。その結果、ASER神経で発現することが知られていたNLP-3が高塩濃度への走性に寄与することを見出した。NLP-3の受容体やシグナル経路の遺伝子を同定する目的で、NLP-3過剰発現株の抑圧変異体を得た。

別途、FLP-2と呼ばれる神経ペプチドが過剰に生成されると、飢餓に伴う学習が顕著に弱まることを見出した。FLP-2受容体として知られていたFRPR-18を欠損すると表現型が見られなくなることから、塩走性においてもFRPR-18がFLP-2の受容体としてはたらく。一方で、*flp-2* または *frpr-18* の変異体は塩走性に顕著な欠損を示さなかった。以上のことから、FLP-2の過剰発現による塩走性の欠損は、生理的な制御を逸脱したFLP-2がFRPR-18受容体を介して飢餓後の塩走性を攪乱することが原因であると推測された。FRPR-18の機能細胞を決定し、そのシグナルがいかに行動に寄与するか明らかにする研究を進めている。餌の認識に関与しFLP-2の分泌を促進することが示唆されているPDF-1について調べたところ、FLP-2と同様に、過剰発現により塩走性が欠損した。こちらも受容体の機能細胞を同定する実験を進めている。飢餓条件による行動の調節には、インスリンシグナル伝達経路が関与している (Ohno et al., 2014, Nagashima et al., 2019, Tomioka et al., 2022)。ペプチドの過剰発現はこれを抑制しているかもしれない。両者の遺伝学的な関係を調べている。FLP-2とPDF-1は、個体の活動レベル(静止と覚醒)の調節に関与することが知られている (Chen et al., 2016)。また最近、介在神経から分泌されるFLP-2が飢餓やストレスによる耐性幼虫形成の制御に関与することが報告された (Chai et al., 2022)。これらの研究は、FLP-2やPDF-1が他のシグナルと並行して、餌のシグナルとしてはたらく考えと矛盾しない。この可能性についても検討している。

(5) 当初の研究計画ではASER神経の軸索におけるDAGレベルの制御機構を明らかにすることも目指したが、類似する研究課題が研究室内で進んでいたため中止した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Mabardi Llian, Sato Hirofumi, Toyoshima Yu, Iino Yuichi, Kunitomo Hirofumi	4. 巻 186
2. 論文標題 Different modes of stimuli delivery elicit changes in glutamate driven, experience-dependent interneuron response in <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 33 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Hirofumi, Kunitomo Hirofumi, Fei Xianfeng, Hashimoto Koichi, Iino Yuichi	4. 巻 35
2. 論文標題 Glutamate signaling from a single sensory neuron mediates experience-dependent bidirectional behavior in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109177 ~ 109177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Hirofumi, Kunitomo Hirofumi, Fei Xianfeng, Hashimoto Koichi, Iino Yuichi	4. 巻 2
2. 論文標題 Simultaneous recording of behavioral and neural responses of free-moving nematodes <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101011 ~ 101011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.101011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ide Soichiro, Kunitomo Hirofumi, Iino Yuichi, Ikeda Kazutaka	4. 巻 12
2. 論文標題 <i>Caenorhabditis Elegans</i> Exhibits Morphine Addiction-like Behavior via the Opioid-like Receptor NPR-17	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.802701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Park Chanhyun, Sakurai Yuki, Sato Hirofumi, Kanda Shinji, Iino Yuichi, Kunitomo Hirofumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Roles of the CIC chloride channel CLH-1 in food-associated salt chemotaxis behavior of <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.55701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kunitomo Hirofumi, Iino Yuichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Caenorhabditis elegans che-5 is allelic to gcy-22	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 MicroPubl Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17912/micropub.biology.000313	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jang MS, Toyoshima Y, Tomioka M, Kunitomo H, Iino Y.	4. 巻 116
2. 論文標題 Multiple Sensory Neurons Mediate Starvation-Dependent Aversive Navigation in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A .	6. 最初と最後の頁 18673-18683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1821716116.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yucheng Xie, Koji Yamada, Takeshi Adachi, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino
2. 発表標題 FMRFamide-like neuropeptide FLP-2 may modulate salt chemotaxis of <i>C. elegans</i> by mediating food signals
3. 学会等名 NEURO2022 (第45回日本神経科学大会・第65回日本神経化学学会大会・第32回日本神経回路学会大会 合同大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yucheng Xie, Koji Yamada, Takeshi Adachi, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino
2. 発表標題 FMRamide-like neuropeptide FLP-2 and pigment dispersing factor-like neuropeptide PDF-1 may modulate salt chemotaxis of <i>C. elegans</i> by mediating food signals
3. 学会等名 CeNeuro2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 児玉未来、安達健、山田康嗣、飯野雄一、國友博文
2. 発表標題 Roles of the nlp-3 neuropeptide gene in salt chemotaxis in <i>C. elegans</i> .
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sayako Satomi, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino
2. 発表標題 ASEL神経における塩応答機構の解明
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yucheng Xie, Koji Yamada, Takeshi Adachi, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino
2. 発表標題 塩走性に働く神経ペプチドの同定と機能の解明
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 児玉未来、安達健、山田康嗣、飯野雄一、國友博文
2. 発表標題 線虫の塩走性におけるnlp-3の役割の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirofumi Kunitomo, Hirofumi Sato, Hinako Mitsui, Yuichi Iino
2. 発表標題 Molecular and neural mechanisms of salt concentration memory-dependent chemotaxis of <i>Caenorhabditis elegans</i>
3. 学会等名 48th Naito Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國友博文、山田康嗣、安達健、飯野雄一
2. 発表標題 線虫の塩濃度走性に関与する神経ペプチドの同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Moon Sun Jang, Yu Toyoshima, Masahiro Tomioka, Hirofumi Kunitomo*, Yuichi Iino*
2. 発表標題 Multiple sensory neurons mediate starvation-dependent aversive navigation in <i>Caenorhabditis elegans</i> .
3. 学会等名 22th International C. elegans Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Sato, H. Kunitomo, X. Fei, K. Hashimoto, Y. Iino
2. 発表標題 Neural dynamics for bidirectional regulation of experience-dependent gustatory behavior.
3. 学会等名 22th International C. elegans Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤博文、國友博文、Xianfeng Fei、橋本浩一、飯野雄一
2. 発表標題 経験塩濃度依存的な行動を制御する神経回路の動態
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>飢餓を感知する感覚神経は新たな行動戦略を生み出す https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2019/6508/</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------