

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16286

研究課題名（和文）経験依存的な行動調節を制御する分子・神経機構の包括的解明

研究課題名（英文）Comprehensive investigation of molecular and neural mechanisms controlling experience-dependent behavior.

研究代表者

佐藤 博文（Hirofumi, Sato）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：40779435

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、まず感覚神経では過去に経験した塩濃度に関わらず常に塩濃度の低下に対して興奮が見られた一方で、一次介在神経とその下流の神経群については、経験塩濃度依存的に塩濃度変化に対する応答が逆転することを明らかにした。この機構においては感覚神経からのグルタミン酸放出、および介在神経における興奮性と抑制性の2種類のグルタミン酸受容体が寄与することを解明した。さらに神経細胞内の各種分子や受容体などについて、変異体や強制発現株などを用いて経験依存的な行動や神経活動の変化に寄与するかをより高等な動物も含めて調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

餌と周囲の環境情報との連合学習は、動物に普遍的な学習機構ではあるが、その仕組みについては不明な点が多かった。本研究課題は線虫*C. elegans*という単純な神経系を持つ生物をモデル生物として用いることで、動物が過去に経験した状況に応じて刺激に対する行動を逆転させる機構を分子レベルで明らかにした。線虫の神経系はヒトをはじめ高等動物の神経系と比べて極めて単純ではあるものの、神経細胞の機能やそれを担う分子については共通するものが多い。そのため本研究課題によって得られた成果は普遍的な学習機構の解明に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we first showed that sensory neurons always show excitation in response to a decrease in salt concentration regardless of the salt concentration experienced in the past, while the primary interneurons and downstream neurons show a reversal in response to changes in salt concentration in a concentration-dependent manner. We found that glutamate release from sensory nerves and two types of glutamate receptors, excitatory and inhibitory, in interneurons contribute to this mechanism. Furthermore, we investigated the contribution of various molecules and receptors in neurons to experience-dependent changes in behavior and neural activity using mutants and forced-expression strains, including those in higher animals.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：感覚受容 記憶 塩走性 ナビゲーション 線虫

## 1. 研究開始当初の背景

動物は生きるために餌を求めて移動し、餌のない環境からは立ち去る。この際、餌の有無と周囲の環境情報とを組み合わせることで学習することにより、効率的に餌を探索することが可能となる。この連合学習の機構については今日まで数多くの研究がなされており、様々な知見が得られているものの、未だ全貌の解明には至っていなかった。大きな問題点の一つは、高等な動物であるほど脳や神経系の構造・機能が複雑になることにある。そのため本研究では線虫 *C. elegans* をモデル生物として用い、線虫が餌の有無と周囲の塩濃度をどのようにして記憶し、行動の調節を行っているのかを解明することを目的とした。線虫の神経系は脊椎動物と比較すると単純ではあるが、味覚や嗅覚をはじめ様々な環境刺激を受容し、またそれらに対して学習行動を示すことが明らかになっている。神経活動の制御に関わる遺伝子も数多く明らかになっており、哺乳類と共通するものも多い。塩(NaCl)と餌との連合学習においては、線虫は餌と共に経験した塩濃度に誘引され、逆に飢餓と共に経験した塩濃度を忌避する。すなわち、過去に経験した特定の塩濃度を記憶し、その情報を餌の有無と組み合わせることで行動出力を決定していると考えられる。どのようにして過去に経験した塩濃度を記憶しているのか、またどのようにして過去に経験した餌の有無に基づいて行動を逆転させているのか、これらの問題を明らかにすることが本研究の根幹となる課題であった。本研究によって、動物が過去の記憶をたよりに目的地(=餌場)にたどり着くための神経基盤が明らかになることが期待された。

## 2. 研究の目的

学習に関する研究はこれまでに数多く行われてきているが、感覚受容から行動出力までの機構を通して明らかにした例は少ない。本研究で用いる線虫の神経系はわずか 302 個の神経細胞によって構成されており、各神経間の接続が明らかになっている。そのため感覚神経から運動神経まで全てを対象とした解析が可能である。また神経機能に関わる遺伝子はヒトをはじめとする高等動物とも高い共通性を持っている。餌と関連付けた連合学習についても、塩や匂いなどの化学物質や温度などさまざまな環境要因に対して示すことが知られている。これらの特長により、線虫は記憶形成の機構や餌の有無による行動調節機構を解明するためのモデルとして優れている。

本研究の目的は、線虫の経験塩濃度に対する走性を対象として、大まかに(1)感覚入力から行動出力までを結ぶ神経回路の動態の解析、(2)感覚神経-介在神経間のシナプス極性を反転させる機構の解明、(3)経験依存的な神経応答を制御する細胞内分子機構の解明、の大きく3つの内容から構成されていた。過去に餌の存在していた環境を求めるといった行動は動物において広く観察される。本研究によって、動物が餌を探索する際の普遍的な行動原理が明らかになることが期待されていた。

### 3. 研究の方法

本研究では一般的な分子生物学的手法、遺伝学的手法、および線虫を用いた基本的な実験法が多用された。本研究で開発・改良されたものなど特筆すべき手法としては、下記のもの挙げられる。

#### (1) トラッキングイメージング

神経細胞が興奮すると細胞内カルシウム濃度が上昇する。これをカルシウムプローブによって可視化することで、刺激に対する神経活動をイメージングできる。我々は新たに開発された微小流路とこのカルシウムイメージング系、および線虫の行動を追尾することのできるトラッキングステージを組み合わせることで、自由行動中の線虫に刺激を加え、それに対する線虫の行動と神経活動とを同時に測定できる系を構築した。このシステムを用い、目的とする遺伝子型や条件付けされた線虫に対し、塩濃度変化などの刺激を加えた際の行動と神経活動を観測することで、各神経や分子が経験塩濃度依存的な行動へもたらす寄与を解析した。

#### (2) 4D イメージング

線虫の神経系は全部で 302 個の神経細胞から構成されており、そのうち頭部には約 200 個が位置している。これらの神経細胞について、3次元タイムラプス撮影 (= 4D イメージング) を行うことで、刺激に対する全脳レベルでのカルシウムイメージングを行った。

### 4. 研究成果

前述の研究課題(1)~(3)について、下記の成果が得られている。

(1) について、まず線虫の神経回路を構成する細胞のうち、塩を受容する感覚神経から行動を出力する指令介在神経までを結ぶ経路に位置する細胞を対象として、トラッキングイメージングにより塩濃度変化に対する神経活動パターンを詳細に解析した。その結果、感覚神経では過去に経験した塩濃度に関わらず常に塩濃度の低下に対して興奮が見られた。一方で一次介在神経とその下流の神経群については、経験塩濃度依存的に塩濃度変化に対する応答が逆転することが明らかになった。また 4D イメージングを用いて全脳レベルで神経活動を観察することで、線虫が塩濃度変化の刺激を受容した際、神経回路内のどの神経がどの様に応答し、それがどの様に伝わっていくかを包括的に明らかにした。

(2) について、感覚神経からのグルタミン酸放出、および介在神経における興奮性と抑制性の 2 種類のグルタミン酸受容体が寄与することを明らかにした。これによって前述の感覚神経-介在神経間でのシナプス極性が反転する機構を説明することが可能となった。

(3) について、神経細胞内の各種分子や受容体などについて、変異体や強制発現株などを用いて経験依存的な行動や神経活動の変化に寄与するかを調べた。また一部の分子については、より高等な動物でもその寄与があるかを調べるため、マウスを用いた解析系を立ち上げた。

これらの成果は下記の論文として出版されている。

1). **Hirofumi Sato**, Hirofumi Kunitomo, Xianfeng Fei, Koichi Hashimoto, Yuichi Iino., "Simultaneous recording of behavioral and neural responses of free-moving nematodes

*C. elegans*", STAR Protocols, 2021 Dec 3;2(4):101011.

2). **Hirofumi Sato**, Hirofumi Kunitomo, Xianfeng Fei, Koichi Hashimoto, Yuichi Iino., " Glutamate signaling from a single sensory neuron mediates experience-dependent bidirectional behavior in *Caenorhabditis elegans*", Cell Reports, 2021 May 25;35(8):109177

3). Mabardi L, **Sato H**, Toyoshima Y, Iino Y, Kunitomo H., "Different modes of stimuli delivery elicit changes in glutamate driven, experience-dependent interneuron response in *C. elegans*", Neuroscience research, 2023, Volume 186, January 2023, Pages 33-42.

4). Shingo Hiroki, Hikari Yoshitane, Hinako Mitsui, **Hirofumi Sato**, Chie Umatani, Shinji Kanda, Yoshitaka Fukada & Yuichi Iino., "Molecular encoding and synaptic decoding of context during salt chemotaxis in *C. elegans*", Nature Communications, 2022, 13, Article number: 2928.

5). Chanhyun Park, Yuki Sakurai, **Hirofumi Sato**, Shinji Kanda, Yuichi Iino, Hirofumi Kunitomo., " Roles of the ClC chloride channel CLH-1 in food-associated salt chemotaxis behavior of *C. elegans*", eLife, 2021, 2021;10:e55701.

6). Yu Toyoshima, Stephen Wu, Manami Kanamori, **Hirofumi Sato**, Moon Sun Jang, Suzu Oe, Yuko Murakami, Takayuki Teramoto, Chanhyun Park, Yuishi Iwasaki, Takeshi Ishihara, Ryo Yoshida, Yuichi Iino., " Neuron ID dataset facilitates neuronal annotation for whole-brain activity imaging of *C. elegans*", BMC Biology, 2020, 18, Article number: 30.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

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 飯野雄一、佐藤博文	4. 巻 280
2. 論文標題 線虫 <i>C. elegans</i> を用いた学習を制御する神経機構の解明	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 243 - 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Park Chanhyun, Sakurai Yuki, Sato Hirofumi, Kanda Shinji, Iino Yuichi, Kunitomo Hirofumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Roles of the Cl <sup>-</sup> 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 1-27
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 Toyoshima Yu, Wu Stephen, Kanamori Manami, Sato Hirofumi, Jang Moon Sun, Oe Suzu, Murakami Yuko, Teramoto Takayuki, Park Chanhyun, Iwasaki Yuishi, Ishihara Takeshi, Yoshida Ryo, Iino Yuichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Neuron ID dataset facilitates neuronal annotation for whole-brain activity imaging of <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Biology	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) 10.1186/s12915-020-0745-2	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 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 無
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 Hiroki Shingo, Yoshitane Hikari, Mitsui Hinako, Sato Hirofumi, Umatani Chie, Kanda Shinji, Fukada Yoshitaka, Iino Yuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Molecular encoding and synaptic decoding of context during salt chemotaxis in <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-022-30279-7	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 佐藤博文
2. 発表標題 線虫の経験依存的な塩走性行動はグルタミン酸シグナルによって制御される
3. 学会等名 MBSJ2020 (第43回日本分子生物学会)
4. 発表年 2020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 22nd International C. elegans Conference (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 線虫の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

1. 発表者名 Yu Toyoshima, Stephen Wu, Manami Kanamori, Hirofumi Sato, Moon Sun Jang, Suzu Oe, Yuko Murakami, Takayuki Teramoto, Yuishi Iwasaki, Takeshi Ishihara, Ryo Yoshida, Yuichi Iino
2. 発表標題 Cell identification and whole-brain activity imaging of C. elegans
3. 学会等名 CREST"生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出"第7回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊島 有, 佐藤 研, 三上 秀治, Stephen Wu, 佐藤 博文, Jang Moon-Sun, 金森 真奈美, 滝沢 拓己, 大江 紗, 寺本 孝行, 徳永 旭将, 広瀬 修, 合田 圭介, 石原 健, 吉田亮, 飯野 雄一
2. 発表標題 線虫の塩走性行動の包括的理解に向けた全中枢神経活動と行動の高精度同時計測
3. 学会等名 新学術領域研究「生物移動情報学」領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊島 有, Stephen Wu, 佐藤 研, 滝沢 拓己, 徳永 旭将, 広瀬 修, 金森 真奈美, 佐藤 博文, 寺本 孝行, Jang Moon-Sun, 久下 小百合, 石原 健, 吉田 亮, 飯野 雄一
2. 発表標題 自由行動中の生物の機能的全脳計測に適した高精度な細胞追跡手法
3. 学会等名 新学術領域「レゾナンスバイオ」班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯野 雄一、豊島 有、佐藤 博文、ウ ステファン、ジャン ムンソン、金森 真奈美、寺本 孝行、大江 紗、村上 悠子、久下 小百合、広瀬 修、徳永 旭将、岩崎 唯史、吉田 亮、石原 健
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> の神経ネットワークのダイナミクス
3. 学会等名 第90回日本動物学会大会
4. 発表年 2019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 第48回 内藤コンファレンス (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu Toyoshima, Stephen Wu, Manami Kanamori, Hirofumi Sato, Moon Sun Jang, Yuko Murakami, Suzu Oe, Terumasa Tokunaga, Osamu Hirose, Sayuri Kuge, Takayuki Teramoto, Yuishi Iwasaki, Ryo Yoshida, Takeshi Ishihara, Yuichi Iino
2. 発表標題 Bio-image informatics for whole-brain activity imaging of <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 22nd International <i>C. elegans</i> Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 豊島 有, Wu Stephen, 金森 真奈美, 佐藤 博文, Jang Moon Sun, 村上 悠子, 大江 紗, 徳永 旭将, 広瀬 修, 久下 小百合, 寺本 孝行, 岩崎 唯史, 吉田 亮, 石原 健, 飯野 雄一
2. 発表標題 線虫全脳の機能的イメージングと動態解析
3. 学会等名 第44回レーザー顕微鏡研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu Toyoshima, Hirofumi Sato, Manami Kanamori, Stephen Wu, Moon Sun Jang, Suzu Oe, Yuko Murakami, Terumasa Tokunaga, Osamu Hirose, Sayuri Kuge, Takayuki Teramoto, Yuishi Iwasaki, Ryo Yoshida, Takeshi Ishihara, Yuichi Iino
2. 発表標題 Exploring the origin of brain and central nervous system through monitoring the neural activity of the whole animal
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu Toyoshima, Stephen Wu, Manami Kanamori, Hirofumi Sato, Moon Sun Jang, Yuko Murakami, Suzu Oe, Terumasa Tokunaga, Osamu Hirose, Sayuri Kuge, Takayuki Teramoto, Yuishi Iwasaki, Ryo Yoshida, Takeshi Ishihara, Yuichi Iino
2. 発表標題 Bio-image informatics for whole brain activity imaging and analysis of neural activity of C. elegans
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu Toyoshima, Stephen Wu, Manami Kanamori, Hirofumi Sato, Moon Sun Jang, Yuko Murakami, Suzu Oe, Terumasa Tokunaga, Osamu Hirose, Sayuri Kuge, Takayuki Teramoto, Yuishi Iwasaki, Ryo Yoshida, Takeshi Ishihara, Yuichi Iino
2. 発表標題 Bio-image informatics for whole brain imaging and analysis of neural activity of C. elegans
3. 学会等名 Resonance Bio International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Yu Toyoshima, Stephen Wu, Manami Kanamori, Hirofumi Sato, Moon Sun Jang, Yuko Murakami, Suzu Oe, Terumasa Tokunaga, Osamu Hirose, Sayuri Kuge, Takayuki Teramoto, Yuishi Iwasaki, Ryo Yoshida, Takeshi Ishihara, Yuichi Iino
2. 発表標題	A pipeline of bio-image informatics for whole-brain imaging of <i>C. elegans</i> and analysis of the neural activity
3. 学会等名	The 20th International Conference of Systems Biology (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Yuichi Iino, Yu Toyoshima, Hirofumi Sato, Stephen Wu, Yuishi Iwasaki, Manami Kanamori, Moon-Sun Jang, Suzu Oe, Yoko Murakami, Sayuri Kuge, Osamu Hirose, Terumasa Tokunaga, Takayuki Teramoto, Ryo Yoshida, Takeshi Ishihara
2. 発表標題	Conservation and variability in the neural sub-networks in the whole nervous system of <i>C. elegans</i>
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	大江 紗, 村上 悠子, 寺本 孝行, 豊島 有, 徳永 旭政, Wu Stephan, 広瀬 修, Moon-Sun Jang, 佐藤 博文, 金森 真奈美, 久下 小百合, 岩崎 唯史, 吉田 亮, 飯野 雄一, 石原 健
2. 発表標題	線虫の連合学習の記憶に基づく行動スイッチング: 中枢神経回路活動可視化による解析
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	村上 悠子, 大江 紗, 寺本 孝行, 豊島 有, 徳永 旭政, Stephan Wu, 広瀬 修, Jang Moon-Sun, 佐藤 博文, 金森 真奈美, 久下 小百合, 岩崎 唯史, 吉田 亮, 飯野 雄一, 石原 健
2. 発表標題	全脳カルシウムイメージングによる線虫の神経動態解析
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 一ノ瀬 元成, 村上 悠子, 豊島 有, 大江 紗, Stephen Wu, 金森 真奈実, 寺本 孝行, Moon-Sun Jang, 佐藤 博文, 吉田 亮, 飯野 雄一, 石原 健
2. 発表標題 嗅覚応答にかかわる機能的神経回路の可塑性はいかにして行動を制御するのか
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〕

-

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