

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15845

研究課題名（和文）複数の環境刺激に晒された線虫における行動解析と行動を制御する神経基盤の解明

研究課題名（英文）Investigation of neural mechanisms that mediates behavior decision under multiple environmental stimuli in *C. elegans*

研究代表者

武石 明佳 (Takeishi, Asuka)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・理研白眉研究チームリーダー

研究者番号：30862007

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）：本研究では、複数の情報が脳内でどのように処理されるのかを調べることを目的とし、行動実験と神経細胞におけるカルシウムイメージング法を用いて、匂いと温度刺激に同時に晒された線虫が行動を決定するメカニズムの詳細を分子生物学的・遺伝学的に解析した。その結果、線虫が置かれた状況に応じて匂いもしくは温度の刺激の優先度を変化させることがわかり、さらに複数の環境情報統合に重要な役割を果たすことが示唆される遺伝子の候補を複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、単一刺激に対する個体の応答や情報処理の神経機構が解明されてきた。しかし、常に複数の刺激を受け取る脳が、いかに各情報のバランスをとり、行動を選択するのかについての多くは明らかでない。本研究では、感覚の統合に関与することが示唆される進化的に保存された遺伝子の候補を同定した。行動障害には脳内の情報処理異常が関与すると考えられており、本研究をさらに発展させることでヒトの行動障害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 order to investigate how brain processes multiple information, we used the model animal *C. elegans* and examined how it makes behavioral decisions when it is exposed to multiple environmental stimuli. Specifically, we conducted behavior assays and calcium imaging assays on single neurons on the worms that are exposed to temperature and odor stimuli simultaneously. Our results show that *C. elegans* prioritizes different environmental cue depending on the circumstance of the animal. We succeeded to identify couple candidate gene that are involved in the integration of odor and temperature stimuli.

研究分野：神経行動学

キーワード：神経 行動 線虫 イメージング 温度 匂い

## **1. 研究開始当初の背景**

全ての生き物は、より良い環境を求め、生存確率を高めるよう行動決定を行う。行動決定において特に重要なのは、周辺環境を正確に感知して判断する能力であり、情報処理は主に神経回路で行われている。これまでにモデル生物を用いて、匂いや音など、五感の各刺激を感知する仕組みは詳細が調べられ、それぞれの刺激を感知する感覚神経細胞や情報伝達の経路が明らかにされてきた。自然界において、生き物はこれら複数の刺激に同時に晒されており、情報が拮抗する条件下におかれることもある中、最適な行動を選択する必要がある。生き物は常に変化する環境において、複数の情報をいかに処理し、統合して行動の選択を行うのだろうか？

行動決定には、環境因子を感知する感覚細胞、各情報の統合とシグナル伝達を担う下流の神経細胞、行動を制御する運動神経細胞など、多数の神経細胞が関与する。感覚神経細胞の多くは特異的な刺激に応答し、情報を受け取った下流の神経回路において他の刺激の情報と統合されると考えられている。一連の情報伝達は正確かつ瞬時に行われ、多刺激を受けた場合においても、各刺激の重要さを加味して、最適な行動を選択するメカニズムが備わっている。しかしながら、生き物の行動は、多くの神経細胞やシグナル経路を介する複雑なメカニズムにより決定され、複数の環境因子の情報がいつ、どこで、どのように統合されるのかについては未だ不明な点が多い。また、ほとんどのモデル生物では全神経接続が明らかでないこと、行動実験時に各神経細胞の詳細な活動を計測することが難しいことから、異なる外部情報が神経回路でいかに相互作用を行うのかを単一神経・分子レベルで解析するのは容易ではない。

## **2. 研究の目的**

行動実験に適したモデル生物の一つに線虫 (*C. elegans*) を挙げられる。線虫の行動戦略は単純で、誘引物質に向かっている場合は前進、忌避物質の回避には旋回や後退を行う。雌雄同体で生殖を行う線虫は、個体の環境や遺伝学的バックグラウンドを厳密に制御できるため、行動実験において均一な測定結果を得やすい。虫体が透明であること、遺伝学的操作が容易であることを生かして、GCaMP 等のカルシウムセンサーを細胞特異的に発現する個体でカルシウムイメージングを行い、各神経細胞の活動を観察することができる。これら行動実験とイメージング実験を組み合わせ、刺激下で自由に走行する線虫を高解像度カメラによって撮影することにより、個体のおかれた環境と行動、神経活動を同時に測定することが可能である。さらに、線虫の全神経細胞のシナプス接続が解剖学的に解明されていることから、行動を制御する神経回路の同定が容易である。本研究は、このような実験上の利点を生かして、多刺激に晒された線虫において、その行動を詳細に観察し、同時に感覚神経から介在神経、運動神経までの神経活動を解析することにより、情報統合を行う神経回路を同定する。さらに、情報の統合に関与している可能性がある遺伝子の変異体において行動実験とカルシウムイメージングを行うことにより、多刺激の情報を受け取った神経回路においてコミュニケーションを制御する分子機構を明らかにし、行動を決定するメカニズムを解明することを目指す。

線虫は比較的単純な神経系を有するが、遺伝子やシグナル経路の多くは進化的に保存されていることから、本研究で明らかになる、異なる神経回路が相互作用を行う分子メカニズムは、哺乳類をはじめとした他の生物における多感覚統合機構の理解にも結びつくことが期待される。神経回路における情報処理機構の異常は、自閉症をはじめとした行動障害や精神疾患にも関与

すると考えられており、これら行動異常を伴う疾患の理解にも応用される可能性がある。

### 3. 研究の方法

環境因子の中で、線虫にとって特に重要な因子として温度と匂いを挙げられる。線虫は餌の感知や危険物質から回避するために嗅覚が発達しており、嗅覚シグナルの変異体では、化学物質や餌に対する走行性（化学走行性、図 1A）に異常が認められる。また、土壤に生息する変温動物であるため、体温が環境温度に依存し、生存や体内の生化学反応に大きく影響するため、温度に非常に敏感である。生存適正温度内（12-26℃）において誘引温度は飼育温度（ $T_c$ ）に依存し、温度勾配下では  $T_c$  領域に向かって移動する（温度走行性、図 1B）。通常状態の線虫は、強い化学走行性と温度走行性を示すが、刺激に長時間晒された場合や飢餓状態によってはこれらの走行性が変化することが知られている。すなわち、化学走行性と温度走行性を制御する神経回路は可塑的であり、個体の状態に応じて各シグナルのバランスをとることにより行動が決定される。

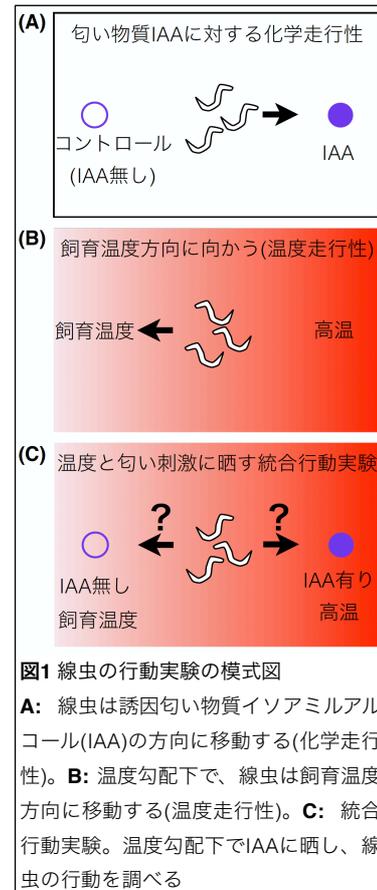
本研究では、線虫に温度と匂い刺激を同時に与える単純な行動実験系を用いて、多刺激の情報を統合する神経回路や分子機構を明らかにすることにより、進化的に保存された多感覚情報の統合と行動選択のメカニズムを解明することを目指し、以下の実験を行った。

**(1) 統合行動実験:** 匂いと温度刺激を同時に与えて行動実験を行い、線虫の化学走行性が変化する条件を探索した。匂い物質には、AWC 神経が特異的に感知する誘引物質、イソアミルアルコール（IAA）を用いた。実験条件は、①IAA と逆の方向に  $T_c$  のある温度勾配、②  $T_c$  よりも高温な均一温度とし、実験温度や IAA の濃度を検討することで再現性の高い行動実験の条件を探索した（図 1C）。

**(2) 匂いと温度情報を統合する神経回路の同定:** 温度や IAA の感知細胞として知られる AFD 細胞（温度走行性）または AWC 細胞（化学走行性）とそれらの下流の神経細胞に着目して、単一神経細胞の活動を抑制、または遺伝的に除去した変異体において統合行動実験を行うことを目指した。これまでの研究で用いられた単一神経細胞の除去系統や抑制系統を用いて、行動実験を行う計画を立てた。

**(3) GCaMP を用いたカルシウムイメージング実験:** 温度走行性や化学走行性に関与する神経細胞において、自由に走行する線虫で単一神経カルシウムイメージングを行うこと（自由行動イメージング）を目指した。温度または IAA の単一刺激時と、統合行動実験時における各神経活動のパターンを解析し、比較することにより、行動変化を生み出す神経回路（統合神経回路）を同定することが可能であると考えられる。

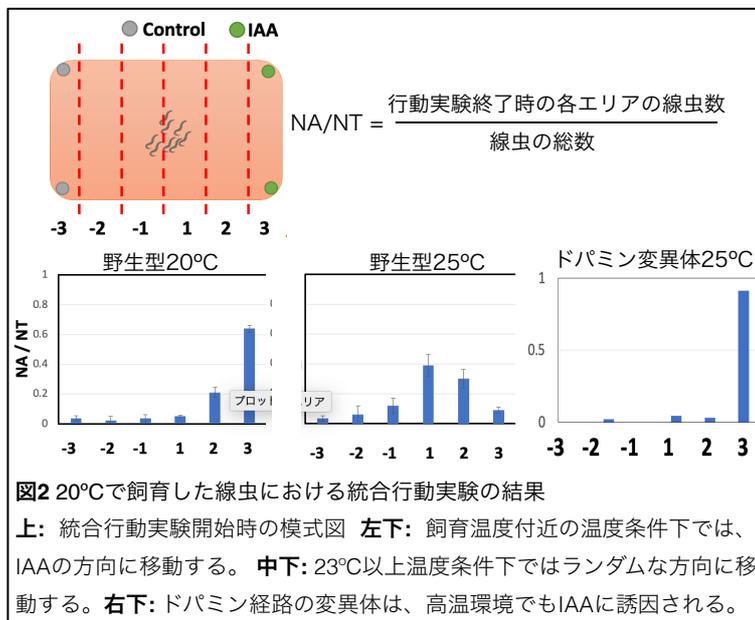
**(4) 情報の統合を担う分子の探索:** 温度または匂いの単一刺激に対する走行性は野生型と同等だが、統合行動実験で異常が認められる変異体を同定することを目指した。多刺激下における行動の決定は短時間で行われることから、遺伝子発現を介さず、シナプス伝達や神経伝達物質の分泌により制御されると考えられる。統合神経回路で発現することが示されている神経伝達物質



等の変異体を用いて、統合行動実験を行い、情報の統合を担う分子の候補を同定した。また、遺伝子変異源を用いた網羅的フォワードスクリーニングを開始した。

#### 4. 研究成果 (各項目番号は3に対応する)

(1) 線虫を 22-26 度の温度勾配プレートの上におき、IAA を高温側に配置した。IAA の濃度が  $10^{-3}$  の時には線虫は低温側 (飼育温度方向) に移動し、 $10^{-2}$  の時には高温側 (IAA 側) に移動することがわかった。高温環境で IAA への走行性が減弱することが示唆されたため、さまざまな均一温度環境において、IAA への走行性を調べた。その結果、20°C で飼育した線虫は、21.5°C では  $10^{-2}$  濃度の IAA に誘因されるが、23°C 以上では誘因されず、アッセイプレート上をランダムに走行することが分かった。これより、環境温度依存的に IAA への走行性が変化すること、すなわち、線虫が温度と IAA の刺激情報を統合して行動を変化させることが示された (図 2)。



(2) これまでの研究で用いられてきた単一神経抑制系統 (HisCl チャンネルを発現する系統)、除去系統を取り寄せて解析を行ったところ、多くの系統が複数神経を抑制または除去することが示唆された。このため、実験に必要な系統を全て作成し直した。また、単一神経を抑制して行動実験やカルシウム実験を行う条件検討を完了した。

(3) 自由行動イメージング実験の条件検討を行い、GFP のシグナル (GCaMP) を単一神経細胞のみで発現する線虫系統を用いると正確にデータ取得できることが分かった。実験に用いる GCaMP 系統を作成し、15 分以上の間、線虫頭部を自動追跡しながら、行動と神経活動をモニターすることに成功した (図 3)。さらに、得られる実験を解析するスクリプトの作成を行なった。今後、温度または IAA の単一刺激時と、統合行動実験時における各神経活動のパターンを解析し、比較することにより、行動変化を生み出す神経回路 (統合神経回路) を同定することが可能である。

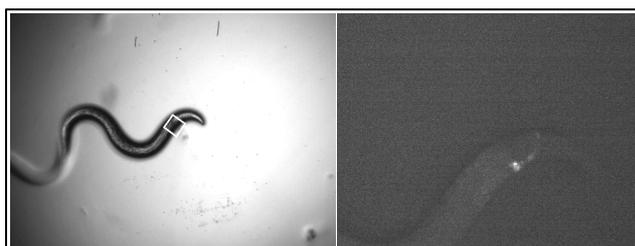


図3 自由行動イメージング

左: 低倍率レンズで個体を撮影し、自動追跡をすることにより、線虫の頭部が常にレンズの中心になる。右: 同時に高倍率レンズで取得した介在神経(AIY)のGCaMPシグナル

(4) 神経伝達物質等の変異体を用いて、統合行動実験を行った結果、ドパミン経路が温度と匂いの統合に関与していることが示唆された (図 2)。今後、単一神経における遺伝子変異体の作成やレスキュー実験を行う予定である。また、遺伝子変異源を用いた網羅的フォワードスクリーニングによって、温度と匂い情報の統合に異常を示す変異体を得た。今後、責任遺伝子を同定し、機能解析を行う。

以上より、1は研究課題申請時の研究目的を達成し、4においては当初の予定以上の成果を上げることができた。既存の線虫系統を用いることができないというトラブルにより、2と3は予定よりも進度が緩やかであるが、着実に研究を進めるための基礎データや技術の構築を完了した。今後、早期に申請時に予定していた目標を達成できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Asuka Takeishi
2. 発表標題 Neuronal mechanisms that drive starvation-dependent thermotaxis plasticity in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 第82回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Aoki, Asuka Takeishi
2. 発表標題 Behavior and neural responses under conditions where two different stimuli exist
3. 学会等名 21st International <i>C. elegans</i> Conference（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Aoki, Asuka Takeishi
2. 発表標題 Behavioral analysis and calcium imaging under simultaneous odor and temperature stimuli in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Zhenhua Shao, Yuki Aoki, Asuka Takeishi
2. 発表標題 Screening of responsible genes that regulate integration of temperature and odor stimuli in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022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
研究協力者	青木 祐樹  (Aoki Yuki)		
研究協力者	邵 震華  (Shao Zhenhua)		

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
---------	---------