

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570071

研究課題名（和文）線虫の加齢と連合学習の獲得に関する分子基盤と神経基盤の結合的解析

研究課題名（英文）Joint analysis between molecular and neuronal bases concerned with development and learning behaviors in the nematode *Caenorhabditis elegans*

研究代表者

松浦 哲也（MATSUURA TETSUYA）

岩手大学・工学部・准教授

研究者番号：30361041

研究成果の概要（和文）：線虫は、行動やそれを制御する神経系、さらには遺伝子との関連性を結びつけることのできる数少ないモデル生物の一つである。動物行動を支配する分子基盤は遺伝子であるが、線虫の発現行動を直接制御している神経系についてはほとんど知見が得られていない。その理由は、線虫の体長とニューロンの小ささにあり、技術的な困難をともなうためである。申請研究では、技術的な問題をクリアしながら、連合学習獲得における神経基盤の解明およびその加齢変化について電気生理学的解明を試みた。

研究成果の概要（英文）：The nematode *Caenorhabditis elegans* is one of ideal model organisms for neurogenetic and behavioral genetic researches, because the structure of its simple nervous system with 302 neurons is well-described and so much genetic information is available. The functions of sensory neurons and the molecular mechanisms of sensory transduction have been elucidated by genetic and behavioral studies. Although the behaviors of animals are predominated by molecular bases such as gene, they are directly regulated by neuronal bases. On the other hand, the knowledge, which is investigated neuronal bases in the nematode, is extremely little, because of difficulty of methodological technique due to small body length of the nematodes. In the present study, I tried to measure the neuronal activity in the nematodes in order to clarify the neuronal bases of learning behaviors and developmental changes in neuronal system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：線虫、化学感覚、学習、電気生理学的計測

1. 研究開始当初の背景

線虫 (*Caenorhabditis elegans*) は行動と遺伝子の関係を理解することのできる行動

遺伝学のモデル生物である。線虫を用いたこれまでの研究から、特定の行動とそれに関する遺伝子の機能について多くの知見が得

られており、その行動に関与する遺伝子の役割を明らかにする上で大きく貢献してきたといえる。突然変異体の作製は、EMSを用いた薬理的な誘発が主な手段であるが、クローニング後の塩基配列の決定が難しいという不便さがあった。それを解決する方法として、ショウジョウバエのトランスポゾンを使った突然変異体の誘発技術が開発され、有用性が検討されている。また、線虫では全てのニューロン(302個)の系譜や位置関係に加え、それら神経回路網が解剖学的に明らかにされている。これまで難しいとされてきた個々のニューロンの役割についても、ニューロン活動時のカルシウム濃度変化をイメージングすることで徐々に解明されつつある。

ニューロン活動のカルシウムイメージングは、その細胞が反応したか否かを知る手段になる。しかし、イメージング技術から得られる結果のみでは、ニューロン活動(スパイク発火頻度や膜電位の変化など)そのものを理解することは難しい。行動発現時のニューロン活動を明らかにするためには、伝統的な細胞内記録法やパッチクランプ技術の応用が必要であると考えられる。

動物行動の特徴はその複雑さにあり、研究の最終目標はその様な複雑な行動の神経基盤、さらにはそれを制御する分子機構を明らかにすることにある。したがって、行動と遺伝子の関係を明らかにすることは、その行動を支配する分子基盤を知る上で非常に重要な手掛かりとなる。しかし、それぞれの行動は特定遺伝子の発現のみで支えられているのではなく、多くの分子機構の相互作用により引き起こされていると考えるべきである。したがって、動物行動の理解には、ニューロン活動の解析が必要不可欠である。そのためには、これまでにある細胞内記録法やパッチクランプ技術を用いて、新たな応用的計測技術の開発も目指すべきである。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、線虫の化学物質に対する感覚情報の統合や物質選択に関する加齢変化についての研究、フェロモンを介した個体密度感知システム(ある種のコミュニケーション)についての研究を行い、新たな学術的知見を得た。また、加齢と関連付けた学習行動について研究を行い、記憶の保持における活性酸素やインスリンの関与についても明らかにした。加齢や老化と関連付けた行動や学習の可塑性についての新たな実験システムの立ち上げに成功したと考えている。最近では、エサのない条件下で特定の揮発性物質を経験した線虫の連合学習獲得時期は、エサのある条件下で経験した個体よりも長い(より老化した状態でも学習が行え

る)ことを見出している。これらの結果を踏まえ、現在は線虫の生存戦略の新たな可能性について研究を進めている。これまでに得られた行動遺伝学的解析の結果をもとに、加齢や老化にともなう連合学習の変化について、神経行動学や行動生理学の観点からニューロン活動の解析を行い、学習を制御する神経基盤を明らかにすることが本研究の主要な目的である。

ニューロンの可塑的变化を解析するためには、線虫がもつ302個のニューロンの中で、どのニューロンが連合学習に関与しているかを明らかにする必要がある。そのため、研究代表者がこれまでの研究で若干の知見を得ている匂い-エサ連合学習の実験系を用いて研究を進める。具体的には、連合学習に関与していると思われる候補ニューロンの活動を、学習個体群と非学習のコントロール個体群と比較し、学習関連ニューロンを電気生理学的に同定する(神経基盤の解明)。続いて、様々な成長ステージで連合学習関連ニューロンの活動を計測し、加齢や老化にともない変化する連合学習についての神経生理学的な知見を得る。最後に、匂い-エサ連合学習の成立に関与する遺伝子群を分子生物学的手法により明らかにする(分子基盤の解明)。

本研究により得られるであろう知見は、単に線虫の神経行動学的、行動遺伝学的知識の集積にとどまらず、ヒトを含めた高等動物の加齢や老化とそれにとまらぬ学習や記憶の変化が、どのような神経メカニズム、さらには分子基盤の上に成り立っているかを理解する上での重要なモデルとなるに違いない。

3. 研究の方法

線虫の匂い-エサ連合学習に関与する神経基盤と分子(遺伝子)基盤の解明には、連合学習に関与するニューロン(学習関連ニューロン)の電気生理学的計測とそれに関連した遺伝子の同定が必要となる。また、加齢や老化にともない変化する学習関連ニューロンの活動についての解析も必要である。ニューロン活動の解析には電気生理学的手法を、目的の遺伝子の同定には分子生物学的手法を用いて研究を展開させた。

GFPを発現させたニューロンの活動を連合学習獲得個体群とコントロール群で比較・解析した。具体的には、それぞれの個体群に忌避物質ノナンを与えた場合のニューロン活動を計測した。ノナンは揮発性物質であるため、人為的な個体への運動の付加を最小限に抑えることができる。実験には学習に対する効果が顕著に表れるヤングアダルトステージの個体を使用した。ニューロン活動の計測は、頭部および尾部をヒストアクリルで

固定した個体への微小電極の細胞内への挿入によって行った。線虫の体表はクチクラで覆われているため、電極の挿入はクチクラを切開した後に電極を挿入する必要がある。

線虫では分子生物学的研究の手技・手法が確立されているため、変異体を得ることは比較的容易である。今回は、我々の研究グループで既に行われているショウジョウバエのトランスポゾンを用いて変異体を作成する方法を採用した。現在は、この方法で得られた変異体について、スクリーニングおよびクローニングを行い、本学習系に關与する遺伝子について分子生物学的に分析を行っている。

以上の解析に關連して、いくつかの行動遺伝学的研究も展開した。行動学的な解析（化学走性実験など）は、野生型線虫および様々な変異体を使用し、これまでに確立された実験方法により行った。

4. 研究成果

(1) 電気生理学的計測

本研究では、技術的な問題をクリアしながら、連合学習獲得における神経基盤の解明およびその加齢変化について電気生理学的解明を試みた。研究を進める中で、忌避物質ノナンンと誘引物質ジアセチルの間に物質間相互作用が存在することを発見した。ノナンンを感知するのはAWB感覚ニューロンである。このニューロンに蛍光タンパク質GFPを発現させた変異体が存在する（図1）。この変異体を手に入れ、匂い-エサ連合学習獲得後のGFP発現AWBニューロンをターゲットとして活動記録を行った。安定した活動記録法を検討した結果、ガラス管微小電極の細胞内への挿入およびパッチクランプ法の応用によるニューロン活動の記録は非常に困難であることが明らかとなったが、部分的には記録に成功した。暗視野での電極のアプローチに工夫が必要であり、安定したデータの獲得および刺激時のニューロン活動の記録と解析が今後の課題として残されている。



図1. GFPを発現させたAWB感覚ニューロン

(2) 物質間相互作用

線虫はジアセチルおよびノナンンに対してそれぞれ誘引行動あるいは忌避行動を発現するが、これら物質の受容過程には物質間相互作用が存在することを発見した（図2）。

ジアセチルはAWA感覚ニューロンで、ノナンンはAWB感覚ニューロンで感知される。具体的には、エサ存在下でジアセチルまたはノナンンを経験させると、ジアセチルに対する誘引反応の増加とノナンンに対する忌避反応の低下が引き起こされた。逆に、エサの存在しない状態でジアセチルまたはノナンンを経験させると、ジアセチルやノナンンに対する反応の低下が認められた。さらに、変異体を用いた実験から、ジアセチル-ノナンン間の相互作用は、感覚ニューロンではなく、介在ニューロンなどより高次のネットワークレベルにおいて引き起こされていることが判明した（図3）。

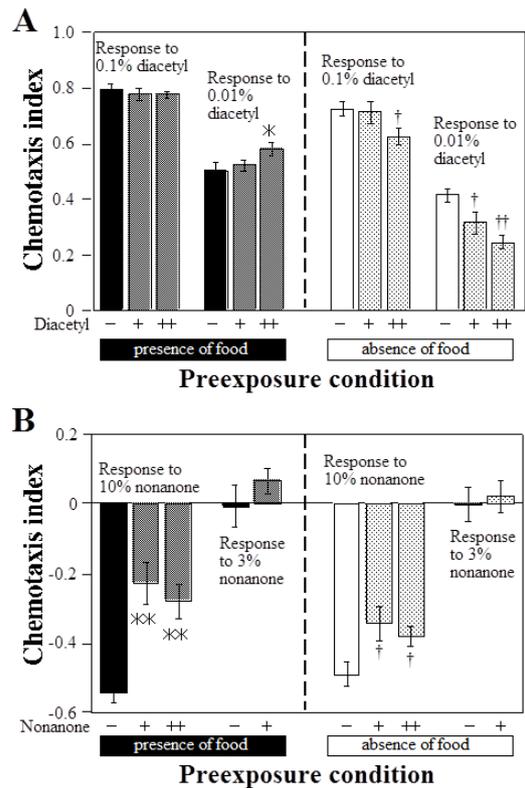


図2. ジアセチルとノナンンの物質間相互作用

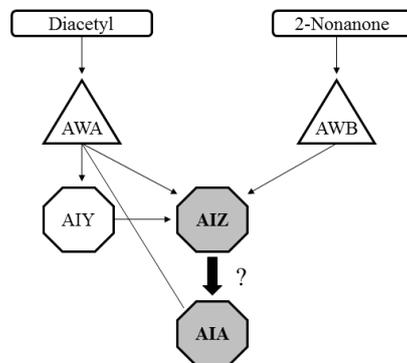


図3. 高次ネットワークで発現する相互作用

(3) 嗅覚順応における活性酸素の関与
前述のように、ジアセチルを経験させた線

虫ではこの物質に対する誘引反応が低下する(嗅覚順応)。これまでに、ジアセチル経験後の飼育温度の上昇は、順応の継続時間の延長をもたらすことを明らかにした。野生型個体を15°C、20°C、25°Cで飼育した場合の順応の継続時間は、それぞれ2時間未満、6時間、12時間である(図4)。飼育温度の上昇は体内での酸化レベルを上昇させ、線虫の成長速度を加速させる。そこで、順応の持続時間と酸化レベルの影響を調べるため、酸化ストレス受容の程度が異なる様々な変異体を用いて実験を行った。その結果、体内での酸化ストレスが少ない長寿命変異体は野生型に比べ順応の持続時間が短縮したが、酸化ストレスが多い短寿命変異体では持続時間が延長した。さらに、野生型個体にジアセチルを経験させた後、抗酸化剤 α -リポ酸を飼育プレートに添加すると、順応の持続時間が短縮した。以上のことから、線虫のジアセチルに対する順応の持続には活性酸素が関与している可能性が明らかとなった。

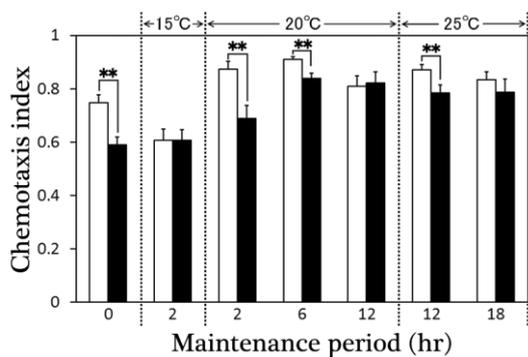


図4. 飼育温度の上昇と順応継続時間

(4) 学習の成立におけるニコチンの影響

ヒトに対して依存性薬物であり濃度によっては毒物となるニコチンが、線虫の学習行動に与える影響について調査した。線虫はNaClに対して強い誘引反応を示す。しかし、エサのない条件下でNaClを事前に経験した個体では、NaClに対する誘引反応の著しい低下を示した。また、100mM NaClとニコチン(0.1mM~3mM)を同時に経験させた後、同濃度のNaClに対する誘引行動を観察した結果、事前にNaClを経験した個体の誘引率は、ニコチンのみを経験したコントロール個体と比較し有意に低い値を示した。NaClとニコチンを同時に経験した個体の誘引率は、ニコチンの濃度に依存して上昇し、3mMニコチンを経験した線虫の誘引率はコントロール個体のそれと同様の値となった(図5)。0.1mM~3mMのニコチンを経験しても、線虫の自発運動量に変化は認められなかったことから、ニコチンの存在が線虫における連合学習の成立を阻害したものと考えられる。さらに、ニコチンの作用過程におけるセロトニン

の関与についても明らかにした。

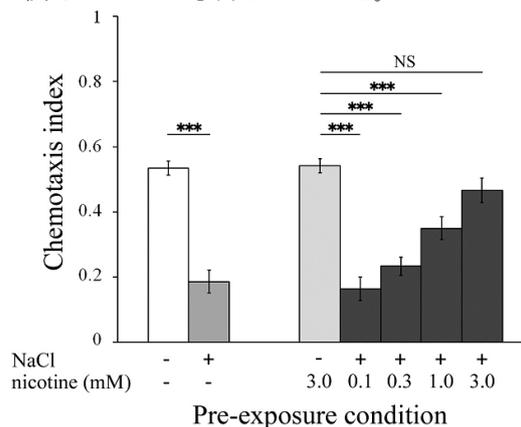


図5. ニコチンによる学習阻害

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7件)

- ① Asuka Nishino, Ryo Kanno, Tetsuya Matsuura. The role of oxygen intermediates in the retention time of diacetyl adaptation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Zoology*, 査読有, in press, 2013
DOI: 10.1002/jez.1806
- ② Tetsuya Matsuura, Junichi Izumi, Mamoru Hioki, Hiroki Nagaya, Yasuyuki Kobayashi. Sensory Interaction between attractant diacetyl and repellent 2-nonanone in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Zoology*, 査読有, 319A, 2013, 285-295
DOI:10.1002/jez.1795
- ③ Tetsuya Matsuura, Takayuki Oda, Genta Hayashi, Daisuke Sugisaki and Mitsuyuki Ichinose. Enhancement of chemotactic response to sodium acetate in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Zoological Science*, 査読有, 27, 2010, 629-637
DOI:10.2108/zaj.27.629

[学会発表] (計30件)

- ① T. Matsuura, J. Izumi Junichi, M. Hioki, H. Nagaya, Y. Kobayashi, M. Ichinose. Sensory interaction between diacetyl and nonanone in *C. elegans*. *Neuroscience 2012*, 2012.10.15, Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, USA
- ② 松浦哲也, 鈴木翼, 一ノ瀬充行. 化学受容変異体線虫の加齢にともなう化学走性行

- 動の変化. 日本動物学会第 83 回大会, 2012. 9. 15, 大阪大学 (大阪府)
- ③ 松浦哲也, 小林泰明, 一ノ瀬充行. 変異体線虫を用いた誘引物質ジアセチルと忌避物質ノナンにおける相互作用の解析. 日本動物学会第 82 回大会, 2011. 9. 21, 旭川大雪アリーナ (旭川市)
- ④ 松浦哲也, 泉潤一, 日置護, 長屋宏紀, 小林泰明, 一ノ瀬充行. 線虫の嗅覚学習における誘引物質ジアセチルと忌避物質ノナンの相互作用. 第 34 回日本神経科学大会, 2011. 9. 15, パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑤ Tetsuya Matsuura, Takayuki Oda, Genta Hayashi, Daisuke Sugisaki, Mitsuyuki Ichinose. Chemotactic response of the nematode *Caenorhabditis elegans* to sodium acetate was enhanced by pre-exposure to the same chemical. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2011.6.2. Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan
- ⑥ Asuka Nishino, Tetsuya Matsuura, Ryo Kanno, Mitsuyuki Ichinose. Extension of retention time of diacetyl-adaptation by oxygen intermediates in the nematode *Caenorhabditis elegans*. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2011.6.2. Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan
- ⑦ 松浦哲也, 泉潤一, 日置護, 長屋宏紀, 一ノ瀬充行. 線虫の揮発性誘引物質ジアセチルと忌避物質ノナンに対する学習行動. 日本動物学会第 81 回大会, 2010. 9. 25, 東京大学 (東京都)
- ⑧ 西野明日香, 菅野令, 松浦哲也, 一ノ瀬充行. 線虫嗅覚順応の持続時間における酸化ストレスの影響. 第 87 回日本生理学会大会, 2010. 5. 21, 盛岡市民文化ホール: マリオス (盛岡)
- ⑨ 松浦哲也, 佐藤文彦, 伊藤久仁子, 一ノ瀬充行. 様々な成長ステージの線虫におけるエサ-ジアセチル連合学習の獲得. 第 87 回日本生理学会大会, 2010. 5. 19, いわて県民情報交流センター: アイーナ (盛岡)

[図書] (計 1 件)

- ① 松浦哲也. 共立出版. 研究者が教える動物飼育 第 1 巻. 2012, 64-69

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 哲也 (MATSUURA TETSUYA)
岩手大学・工学部・准教授
研究者番号: 30361041