

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 2 日現在

機関番号：34506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657004

研究課題名（和文） 複数の神経情報を細胞内で区別・識別するための分子生理機構

研究課題名（英文） Molecular physiological mechanism for discrimination of multiple neural signaling in neural circuit

研究代表者

久原 篤 (KUHARA ATSUSHI)

甲南大学・理工学部・准教授

研究者番号：00402412

研究成果の概要（和文）：

線虫 *C. elegans* において、温度情報等の識別に関わるシンプルな局所回路をつかい、温度などの神経情報の区別・識別の分子機構と生理的暗号を解明することをめざした。解析方法としては、分子遺伝学や行動学に加え、神経活動の光イメージングや光操作を導入した。得られた結果としては、複数の温度域の情報を識別するためのグルタミン酸を介した神経回路情報処理の分子と生理的な暗号の解読と、感覚情報の識別の分子機構、そして、軸索内の情報の識別に関わるシナプスの局在機構が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

To identify molecular and physiological mechanisms for discrimination of neural information, we used simple local neural circuit underlying temperature sensation and processing. We utilized molecular genetics, behavioral analysis and optical imaging and manipulation of neural activity. We found that neural coding for discrimination of multiple temperatures signaling through glutamate neurotransmission, molecular mechanism for discrimination of sensations, and localization mechanisms of synapses involved in information discrimination in axon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,500,000	450,000	1,950,000

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：線虫、*C. elegans*、温度応答、神経回路、カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

近年の脳神経科学において、行動や思考を司る神経回路システムは、「分子」-「神経細胞」-「神経回路」-「個体」の4つのレベルを結びつけて解析が行なわれている。これまでに、本申請者らは、高等動物の研究に先駆けて、線虫 *C. elegans* をつかい、感覚受容と記憶学習の分子神経メカニズムの新しい概念を創出してきた(Kuhara et al., *Science*, 2008; Kodama et al., *Genes Dev.*, 2006)。しかし、これまでに同定された、10個以下の神経細胞からなる非常にシンプルな神経回路であっ

ても、その情報処理機構を解析する中で大きな壁に直面している。特に、神経細胞に入力される複数の情報が、どのように細胞内や回路内で区別や識別され統合されるののかに関して、分子生理メカニズムが未解明であることが大きな障壁となっていた。ところが近年、本申請者の解析から、神経情報の区別・識別の解析に適したシンプルな実験系が発見された。具体的には、単一の感覚ニューロンが、「匂い」と「温度」という質的に違う2つの情報を感知し、5個以下の神経細胞の回路で区別・識別することが、線虫の行動解析から明

らかとなった(Kuhara et al., *Science*, 2008)。さらに、この神経回路において、温度域に応じた温度情報の識別がおきていることがわかってきた。そこで、この局所神経回路を使い、情報の区別・識別の解析をおこなうことを着想した。

2. 研究の目的

動物は、多くの情報を目や耳などの感覚神経で感知し、脳の神経回路内で混線することなく区別・識別している。このような神経情報の区別・識別の分子生理基盤の解明は、数億から1千億という神経細胞からなる高等動物の脳の解析からだけでは、困難な状況である。そのため、神経情報の区別や識別を解析できるシンプルな神経回路をもちいることが重要である。そこで、本研究では、線虫の温度情報伝達に関わるシンプルな神経回路をつかい、神経情報の区別・識別の分子生理機構の新しい概念を創出する。

3. 研究の方法

近年同定した嗅覚情報と温度情報の識別に関わるシンプルな局所回路をつかい(Kuhara et al., *Science*, 2008)、複数の神経情報の区別・識別や統合の「分子機構」と「生理的暗号」を解明する。

方法としては、温度と他の刺激や、異なる温度域を識別するための神経回路機構を、線虫の温度応答行動をモデル実験系として解析をおこなう。具体的には、温度域や温度と他の刺激の感知行動に異常をもつ変異体を単離し、その責任遺伝子の同定と、神経情報処理における役割を明らかにする。さらに、既存の分子遺伝学や行動学に加え、最近開発した装置をつかい、最新の神経活動の光イメージングや光操作を導入し、情報の区別・識別に関わる神経生理機構を明らかにする。

感覚情報が、局所回路内の個々のニューロンにおいて、どのような生理学的な暗号により識別されているのかを神経活動イメージングにより調べる。具体的には、温度刺激と匂い物質を同時に与えたときの神経活動を、genetically encodable Ca^{2+} インディケータ(Yellowameleonなど)や膜電位インディケータ(Mermaid)で測定する。

情報の識別を人工的に再構築する光駆動性チャンネル(チャンネルロドプシンやハロロドプシン)をもちいて、温度と他の感覚情報の識別に異常をもつ変異体に、温度識別や複数の刺激の識別に関わる神経活動パターンを外部から特定のパルスや強度であたえ、情報の識別や相互作用が人工的に再構築されるかを検証する。

4. 研究成果

温度と匂い物質の識別に関わる分子-チャ

ネルを介したイオン流入の強弱や時系列変化について以下の結果が得られた。温度と嗅覚情報の伝達に関わる共通分子として、cGMP依存性チャンネルであるTAX-2とTAX-4が同定されている。興味深いことに、単離されたtax-2とtax-4変異体のうち、弱い点変異をもつものは、温度応答行動は異常であるが、嗅覚応答行動は正常であることが見つかった。このことから、チャンネルを透過するイオンの濃度の強弱や、時系列での開口パターンの違いが、温度と嗅覚情報の識別に関与している可能性が考えられた。今後の課題としては、変異型チャンネルをもつ変異体に、温度と嗅覚情報を与えたときの神経活動を Ca^{2+} や膜電位のイメージングで測定し、温度と嗅覚情報の識別パターンを詳細に解析し、その暗号パターンを明らかにすることがあげられる。

シナプス部位における神経情報の識別について以下の結果が得られた。温度情報伝達と匂い情報伝達の両方に関わり、シナプス情報の識別に関わるグルタミン酸シグナリングとして、グルタミン酸開口性C1-チャンネルの神経回路上での働きを明らかにした。新規の温度走性変異体を単離し責任遺伝子を同定した所、グルタミン酸をシナプス小胞内へ輸送する輸送体VGLUT (Vesicular Glutamate Transporter)であるEAT-4をコードする遺伝子であった。eat-4 cDNAを用いてeat-4変異体の示す温度走性異常の回復実験を行なったところ、eat-4 cDNAをAFD, AWC, RIAで同時に発現させた場合に、eat-4変異体の温度走性異常が回復した。

生理学的側面からAFD, AWCが放出するグルタミン酸を介した情報を検証するために、AFDとAWC両方の温度受容ニューロンのシナプス後ニューロンであるAIY介在ニューロンのカルシウムイメージングを行なった。その結果、AFDからのグルタミン酸はAIYの温度刺激に対する反応を抑制し、AWCからのグルタミン酸はAIYの反応を促進すること、さらにAIYの反応性と線虫の行動に強い相関関係があることが示唆された。次に、温度走性の神経回路におけるグルタミン酸受容体の探索を行なったところ、C1-チャンネルタイプのグルタミン酸受容体GLC-3がAFDからのグルタミン酸を受容することでAIYの温度刺激に対する反応を抑制することが示唆された。さらに、複数の温度受容ニューロンからの異なる温度情報が、単一の介在ニューロンAIY内において、バランスをとりせめぎ合うことで、AIYの活動を上下させ、温度に対する行動を逆転させることがみつかった。

ここまでの解析から、感覚情報の識別に関わる生理的な情報処理とその分子機構が、特にシナプスのレベルで見つかった。さらなる解析のために、新規の解析系を模

索し、温度と化学物質の両者を受容する新しいニューロンを同定した。そのニューロン内において、温度と化学物質の情報がともに共通した、分子経路で伝達されることが分かってきた。カルシウムイメージング法を用いることで、個体レベルでの表現型だけでなく、細胞レベルでの感覚応答に関して温度と化学物質の両者を感じていることが明らかとなった。シナプス部位における神経情報の識別の解析のため、異なる役割を持つシナプスの特徴的な局在に異常をもつ変異体の異常を抑圧する変異を個体の行動とシナプスの表現型を指標に単離した。その責任遺伝子を野生株間の塩基多型を利用して染色体上のマッピングと、DNA フラグメントをもちいたレスキュー実験から明らかにした。責任遺伝子は、ホスホリパーゼベータの線虫ホモログであり、既知のシナプス局在の変異体であるイノシトールモノフォスファターゼの変異体が示すシナプス異常を抑圧することや、他の薬理的解析から、シナプスの特徴的な局在に必須であることが明らかとなった。シナプス部位のイメージングと遺伝学的解析から、シナプス部位における神経情報の識別に関わる可能性のある遺伝子が他にも複数単離された。

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 9 件)

(1) Kimata T., Tanizawa Y., Can Y., Ikeda S., Kuhara A., Mori I.
Phosphatidylinositol signaling regulated by myo-inositol monophosphatase is essential for synaptic polarity in *Caenorhabditis elegans*
Genetics, 191, 2, 509-521, 2012
doi: 10.1534/genetics.111.137844 (査読有)

(2) Nishio, N., Mohri-Shiomi, A., Nishida, Y., Hiramatsu, N., Kodama, E., Kimura, K., Kuhara A., Mori, I.
A Novel and Conserved Protein AH0-3 Is Required for Thermotactic Plasticity Associated with Feeding States in *Caenorhabditis elegans*
Genes to Cells, 17(5), 365-386, 2012
doi: 10.1111/j.1365-2443.2012.01594.x.
(査読有)

(3) 大西 憲幸、久原 篤
線虫 *Caenorhabditis elegans* の温度応答を制御する神経情報処理メカニズム
比較生理生化学, 29, 3, 112-120, 2012 (査

読有)

(4) 久原 篤
線虫の温度応答の分子生理メカニズム
生物物理, 52, 4, 200-202, 2012 (査読有)

(5) 久原 篤
神経活動の光操作とイメージングによる神経伝達の暗号解読
Genes & Genetic Systems, 86, 6, suppl, 4, 2012 (査読有)

(6) Kuhara, A., Ohnishi N., Shimowada T., Mori, I.
Neural coding in a single sensory neuron controlling opposite seeking behaviors in *Caenorhabditis elegans*
Nature commun., 2 : 355, 1-12, 2011
doi: 10.1038/ncomms1352 (査読有)

(7) Miyara, A., Ohta, A., Okochi, Y., Tsukada, Y., Kuhara, A., Mori, I.
Novel and conserved protein TTX-8/Macoilin is required for diverse neuronal functions in *C. elegans*
PLoS Genetics, 7(5), 1-14, 2011
doi:10.1371/journal.pgen.1001384 (査読有)

(8) Ohnishi N., Kuhara, A., Nakamura, F., Okochi, Y., Mori, I.
Bidirectional regulation of thermotaxis by glutamate transmissions in *Caenorhabditis elegans*
The EMBO Journal, Vol. 30, 1376-1388, 2011
doi:10.1038/emboj.2011.13 (査読有)

(9) Kuhara, A., Ohnishi N., Shimowada T., Mori, I.
Neural coding of opposite seeking behaviors by stimulatory and inhibitory neurotransmission in a single sensory neuron
Genes & Genetic Systems, 86, 6, 437, 2011(査読なし、紀要)

[学会発表] (計 11 件)

(1) Akane Ohta, Tomoyo Ujisawa, Takuro Inoue, Naoto Kuwahara, Naho Inoue, Atsushi Kuhara
神経からのエンドクリンシグナルを介した温度応答の分子遺伝学的解析
分子生物学会
2012年12月11日~2012年12月14日
福岡

(2) 久原 篤

動物の温度応答の分子遺伝学
遺伝学会 (招待講演)
2012年09月25日~2012 年09月25日
九州大学

(3) 太田 茜, 宇治澤 知代, 木下 ゆかり,
水谷 仁美, 井上 琢朗, 井上 奈穂, 久原 篤
Insulin-mediated neural signals
negatively regulate temperature tolerance
in *C. elegans*
第 50 回日本生物物理学会年会
2012年09月23日~2012 年09月24日
名古屋

(4) 久原 篤

Molecular physiological mechanism
underlying neural circuit for temperature
sensing and memory in *C. elegans*
第 83 回 日本動物学会年会
2012年09月13日~2012 年09月15日
大阪

(5) 園田悟, 大久保 幸恵, 木下 ゆかり, 水
谷 仁美, 長屋 ひろみ, 宇治澤 知代, 太田 茜,
久原 篤
線虫の温度適応に関わる新規遺伝子の単離
と進化的解析
第 83 回 日本動物学会年会
2012年09月13日~2012 年09月15日
大阪

(6) 久原 篤

行動に関わる神経回路の生理暗号をさぐる
第 4 回 甲南大学生物学シンポジウム(招待講
演)
2012 年 1 月 13 日
神戸

(7) 宇治澤知代, 井上奈穂, 前田諒, 太田茜,
久原篤

Adaptation and evolution against
environmental temperature-changes in *C.*
elegans
第 34 回日本分子生物学会年会
2011 年 12 月 13 日
横浜、パシフィコ横浜

(8) Atsushi Kuhara, Noriyuki Ohnishi,
Tomoyasu Shimowada, and Ikue Mori
Excitatory and inhibitory
neurotransmission in a single sensory
neuron direct opposite temperature-
seeking behaviors
第 34 回日本分子生物学会年会
2011 年 12 月 13 日
横浜、パシフィコ横浜

(9) 久原篤

暑がり屋さんの脳・寒がり屋さんの脳~温度
感知と脳の仕組み~
日本動物学会 近畿支部講演会(招待講演)
2011 年 11 月 5 日
神戸

(10) 久原篤、大西憲幸、下和田智康、森郁
恵

Neural coding in neural circuit
controlling seeking sensory-behavior
第 49 回日本生物物理学会年会(招待講演)
2011 年 9 月 16 日
姫路、兵庫県立大学

(11) 久原 篤

光技術と分子遺伝学から探るシナプス伝 達
の暗号
生理研研究会「シナプス可塑性の分子基盤」
(招待講演)
2011. 6. 16
岡崎、生理学研究所

〔図書〕(計 1 件)

(1) 久原 篤

Someone、リバナス、 Vol. 22, p17, 2012

〔その他〕

ホームページ等

久原研究室ホームページ

<http://kuharan.com/index.html>

甲南大学研究者紹介

[http://researchers.adm.konan-u.ac.jp/ht
ml/100000141_ja.html](http://researchers.adm.konan-u.ac.jp/html/100000141_ja.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久原 篤(KUHARA ATSUSHI)

甲南大学・理工学部・准教授

研究者番号：00402412