

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830018

研究課題名(和文) 逃避行動を規定する神経回路発生の分子機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel functions of an atonal homolog in aversive behavior and gap junction formation

研究代表者

堀 沙耶香(Hori, Sayaka)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20470122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス結合選択性の分子機序の解明は、脳の理解や医療を見据えた基礎研究として重要だが、中枢神経系では不十分である。申請者は、全シナプス結合が既知の唯一のモデル生物 線虫を対象に、重要行動の逃避のシナプス形成機構を解析した。まず、神経系に発現する転写因子217種類を解析し、逃避に関わる18種類の候補を得た。中でも、lin-32(atonalホモログ)について、選択的な電気シナプス形成異常を見出した。哺乳動物では、atonalホモログと電気シナプスが聴神経機能に関わり、関連が示唆される。本研究は、今後、普遍的な分子機序を明らかにできると期待される。

研究成果の概要(英文)：Animals alter their behavior in response to stimulus strength. Meanwhile, detailed analysis of neural circuit is complicated circuits. So to clarify the neural mechanism of the behavioral switch for danger, we choose *C. elegans* as a model system, because of advantage for analysis in molecular, circuit, and behavior level. We had screened for genes required for such behavior using optogenetics and RNAi screening, and showed that a transcription factor lin-32, *Drosophila* atonal homolog, is required for U-turn. Especially, the lin-32 mutants fail to express a gap junction channel *inx-1*, showing electrical synapse defects. Our finding will clarify the atonal regulation of gap junction formation.

研究分野：神経行動学

キーワード：synaptogenesis gap junction Optogenetics *C. elegans* Aversive behavior atonal

1. 研究開始当初の背景

侵害刺激からの逃避は生物間で保存される基本行動の1つである。生命維持に重要ゆえに、複数の独立した神経回路が存在し、損傷時には補償し合う安全機構が働く。これまで、線虫と小型魚類を解析モデルに、細胞レベルでの回路の同定や、細胞破壊や電気生理学、Ca²⁺イメージングによる機能解析が行われた (Piggott, *et al.*, 2011; Kohashi and Oda, 2008)。しかし、逃避回路の細胞レベルでの発生の分子機序や、補償回路の構築機序は不明だった。

そこで申請者は、「逃避行動を規定する神経回路発生の分子機序の解明」を目的とし、2010年から独自の遺伝子解析系を確立してきた。方法は、線虫にRNAi法を行い、チャネルロドプシン2 (ChR2) による光刺激誘発逃避行動の異常を指標とする (図1)。

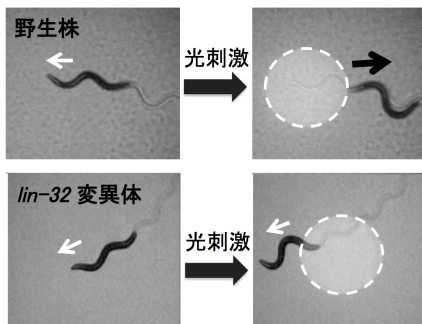


図1 ChR2 誘発逃避行動。野生株は光刺激で逃避するが(上段黒矢印)、候補転写因子の1つ *lin-32* 変異体は前進を続ける (下段白矢印)。

この系の特色は以下の3点にある。

(1) シンプルなモデル生物、線虫 *C. elegans*

全神経の細胞系譜とシナプス結合が明確な唯一のモデル生物である。申請者の所属研究室はナショナルバイオリソースプロジェクト「線虫」の拠点であり、5000種類以上の変異体を利用できる。

(2) ChR2 を利用した単純な回路

線虫も複数の逃避回路を持つ。そこで申請者は、ChR2 を1種類 (2細胞) の主要な侵害刺激受容神経だけに発現させることで、主要な2回路 (図2) に絞って解析している。本回路は僅か4種類 (8個) の介在神経からなり、異常細胞の同定も容易である。

(3) 行動を指標にする機能解析

本研究は、まず行動異常を押さえ、生物学的意義を明確にする。従来、神経発生異常の検出法として利用されてきた分化マーカーの発現解析法では、回路や分子の補償作用に

よって行動異常と直接結びつかない場合があったためである。

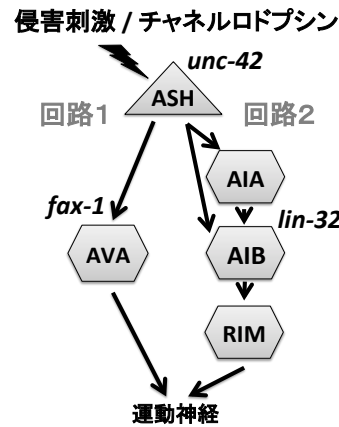


図2 逃避回路と候補転写因子。補償し合う2回路からなる。

申請者は、神経系に選択的な転写因子217種類を解析し、逃避行動異常を起こす18種類の候補を得た。中には、回路1の介在神経 (AVA) の分化に必要な *fax-1* (ヒト NR2E3 ホモログ) (Wightman *et al.*, 2005) が含まれ、逃避行動への関与を本研究で初めて示した。さらに、*lin-32* (ヒト MATH1 ホモログ) が、回路2の介在神経 (AIB) の細胞系譜または分化に必須であることを見出した。*lin-32* の逃避行動、回路における関与は初めての知見であった。

2. 研究の目的

fax-1 と *lin-32* の変異体を利用することで、回路間の補償作用を無くし、神経機能を検出しやすくする。この系を用い、*fax-1*、*lin-32* の逃避回路発生の分子機序の同定と、各回路に及ぼす機能解明を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、(1) *fax-1*、*lin-32* の回路発生の分子機序の同定と、(2) 各逃避回路に及ぼす機能を明らかにする。

(1) について：*fax-1* または *lin-32* 変異体で、細胞系譜の異常か分化異常かを同定した。分化異常の場合は下流候補の機能分子の発現を解析した。機能分子の逃避行動における関与の有無を、*fax-1* または *lin-32* 変異体を用いて補償回路を潰した状態で解析した。

(2) について：*fax-1* または *lin-32* 変異体で、各逃避回路の最下流の介在神経 (AVA または RIM) (図2) の Ca²⁺濃度変化を観察した。分化異常の場合は、異常神経でも観察し、神経機能に及ぼす影響を解析した。

また、本研究では、逃避行動に関わる *lin-32* の下流制御遺伝子を同定した。さらに、神経

回路と行動の中間段階である筋の Ca²⁺濃度変化も解析し、*fax-1* や *lin-32* 変異体で見られる神経回路異常が、アウトプットである筋と行動に及ぼす影響を包括的に解析した。

4. 研究成果

(1) *fax-1*、*lin-32* の回路発生の分子機序の同定

両因子の回路発生における分子機序の解明を研究目標とし、まずは *lin-32* 変異体における逃避回路の中心的な介在神経 AIB の詳細な遺伝子発現解析と形態観察を行った。AIB 神経の分化マーカーとして、イネキシン 1 (*inx-1*)、グルタミン酸受容体 (*glr-1*)、嗅覚受容体 (*odr-2*) を用いた。その結果、9 割の個体で発現が消失していたが、発現が観察される個体も存在することがわかった (図 3)。しかし、その形態は、異常な感覚神経様に変容していた (図

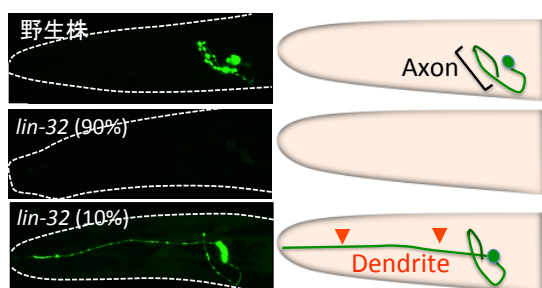


図 3 *lin-32* 変異体の AIB 神経の分化異常。異常な樹状突起を持つ個体もいた。

3)。 *lin-32* は、AIB 神経の介在神経としての分化に必須の因子であることを示唆する。なお、逃避行動に関わる他の神経 (AVA/AIA 介在神経、DA/VA 運動神経、RIM 介在/運動神経) や、AIB 神経の細胞系譜の姉妹細胞等には分化異常は観察されなかった。

一方で、*fax-1* 変異体は、先行研究で AVA 介在神経の分化異常が知られていたが (Wightman *et al.*, 2005)、他の神経の異常の有無が未解析だった。そこで、*fax-1* 変異体でも上記神経群の分化異常の有無を解析し、全て正常であることを確認した。これらの結果は、*lin-32* と *fax-1* が逃避の 2 つの異なる回路で特異的に働き、回路の補償性を担っていることが明らかになった。

(2) 各逃避回路に及ぼす機能

AIB 神経の分化異常が逃避回路に及ぼす影響を知る目的で、*lin-32* 変異体の分化異常をきたした AIB 神経と、その直下の RIM 介在/運動神経、確認のための ASH 侵害刺激受容神経の侵害刺激に対する神

経応答をカルシウムイメージング法により解析した。その結果、予想に反し、いずれも正常な反応が観察された。この結果は、*lin-32* 変異体ではいずれの神経も応答に大きな異常は観察されなかった。この結果は、AIB 神経は、感覚神経との間のシナプスや、細胞内カルシウム応答系は正常であり、下流の介在/運動神経間シナプスの機能異常であることが示唆される。

そこで我々は、*lin-32* 変異体の AIB 神経でのギャップ結合構成因子 *inx-1* の発現低下に着目し、AIB と下流神経との間のギャップ結合不全が逃避異常の原因ではないかと推測した。そこで、*inx-1* 変異体を作成し、逃避行動を詳細に解析した。まず、*lin-32* 変異体では、強い侵害刺激に対する逃避行動の一種である U ターンの低下と、軽い刺激に対する逃避行動である近距離の後退の上昇が観察され、*lin-32* 変異体は自閉症スペクトラム等で好発する感覚鈍麻が生じていることを明らかにした。次に、*inx-1* 変異体でも同様の表現型になることを確認した。一方で、AIB のカスパーゼを用いた遺伝学的細胞除去では表現型が異なり、U ターンの低下はあるが近距離の後退頻度の増加は観察されなかった。これらの結果から、*lin-32* の転写制御因子の標的の 1 つは *inx-1* であり、AIB でのギャップ結合不全が逃避行動異常の要因であることが示された。

fax-1 と *lin-32* のほ乳類ホモログは、胚の中枢性侵害受容路 (前頭前野、帯状回皮質、側頭皮質) で発現している (Ben-Arie *et al.*, 2004)。しかし、null 変異マウスは致死であり、中枢性侵害受容路のコンディショナルノックアウトマウスや、下流遺伝子の探索報告は無い。本研究は、*atonal* ホモログの逃避行動への機能を示す初の報告であり、*lin-32* の新たな生物学的重要性を提唱する。

また、本研究は *lin-32* によるギャップ結合制御を初めて明らかにした。哺乳動物では、*atoh1* とギャップ結合因子 (Cx26, 30, 31) がいずれも聴神経機能に関わり、聾の原因遺伝子でもあることから、重要な関連性が示唆される。本申請では、*lin-32* が制御する、普遍的な分子機序を明らかにできると期待される。

<引用文献>

- ① Piggott BJ, Liu J, Feng Z, Wescott SA, Xu XZ. The neural circuits and synaptic mechanisms underlying motor initiation in *C. elegans*, *Cell*, 2011, 147(4), 922-33.
- ② Kohashi T, Oda Y. Initiation of Mauthner- or non-Mauthner-mediated fast escape evoked by different modes of sensory input, *J Neurosci.*, 2008,

- 28(42), 10641-53.
- ③ Wightman B, Ebert B, Carmean N, Weber K, Clever S. The *C. elegans* nuclear receptor gene *fax-1* and homeobox gene *unc-42* coordinate interneuron identity by regulating the expression of glutamate receptor subunits and other neuron-specific genes, *Dev Biol.*, 2005, 287(1), 74-85.
- ④ Miller JA, Ding SL, Sunkin SMth KA, Ng L, Szafer A, Ebbert A, Riley ZL, Royall JJ, Aiona K, Arnold JM, Bennet C, Bertagnolli D, Brouner K, Butler S, Caldejon S, Carey A, Cuhaciyani C, Dalley RA, Dee N, Dolbeare TA, Facer BA, Feng D, Fliss TP, Gee G, Goldy J, Gourley L, Gregor BW, Gu G, Howard RE, Jochim JM, Kuan CL, Lau C, Lee CK, Lee F, Lemon TA, Lesnar P, McMurray B, Mastan N, Mosqueda N, Naluai-Cecchini T, Ngo NK, Nyhus J, Oldre A, Olson E, Parente J, Parker PD, Parry SE, Stevens A, Pletikos M, Reding M, Roll K, Sandman D, Sarreal M, Shapouri S, Shapovalova NV, Shen EH, Sjoquist N, Slaughterbeck CR, Smith M, Sodt AJ, Williams D, Zöllei L, Fischl B, Gerstein MB, Geschwind DH, Glass IA, Hawrylycz MJ, Hevner RF, Huang H, Jones AR, Knowles JA1, Levitt P, Phillips JW, Sestan N, Wahnoutka P, Dang C, Bernard A, Hohmann JG, Lein ES. Transcriptional landscape of the prenatal human brain. *Nature*, 2014, 508, 199-206.
- ⑤ Wingard JC and Zhao HB, Cellular and Deafness Mechanisms Underlying Connexin Mutation-Induced Hearing Loss - A Common Hereditary Deafness, *Front Cell Neurosci*, 2015, 9, 202.

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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 堀 沙耶香、小田 茂和、末廣 勇司、三谷 昌平、刺激強度に応じた行動切り替えにおける神経回路機序の解析、日本神経科学学会、2015年7月28日、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)
- ② 堀 沙耶香、小田 茂和、末廣 勇司、三谷 昌平、Transcription factor *lin-32* is essential for synaptogenesis in AIB interneuron, sustained neck muscle contraction and aversive behavior、20th International *C. elegans* Meeting、2015年

6月28日、カリフォルニア大学ロサンゼルス校(米国・カリフォルニア州)

③ 堀 沙耶香、小田 茂和、末廣 勇司、三谷 昌平、線虫 *C. elegans* を解析システムとして用いた神経回路網形成の分子機序の解析、包括脳ネットワーク冬のシンポジウム、2014年12月12日、東京医科歯科大学(東京都・文京区)

④ 堀 沙耶香、小田 茂和、末廣 勇司、三谷 昌平、*atona1*, *math1* ホモログの転写因子 *lin-32* は線虫 *C. elegans* の逃避行動における介在神経の分化に必要、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月4日、(兵庫県・神戸)

⑤ 堀 沙耶香、小田 茂和、末廣 勇司、三谷 昌平、Combination of optogenetics and reverse genetics: novel behavior screening for regulators of neural differentiation、19th International *C. elegans* Meeting、2013年6月28日、カリフォルニア大学ロサンゼルス校(米国カリフォルニア州)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 沙耶香 (HORI, Sayaka)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20470122

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

三谷 昌平 (MITANI, Shohei)

飯野 雄一 (IINO, Yuichi)

小田 茂和 (ODA, Shigekazu)

末廣 勇司 (SUEHIRO, Yuji)