

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 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20115002

研究課題名（和文）化学走性行動と連合学習の分子神経機構の解明

研究課題名（英文）A study on the molecular and neural mechanisms of chemotaxis and associative learning

研究代表者

飯野 雄一 (IINO YUICHI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：40192471

研究成果の概要（和文）：

本研究においては、線虫 *C. elegans* の化学走性行動と連合学習の分子神経機構の解明を目指した。行動定量化により化学走性の二つのメカニズムが明らかになり、一方、突然変異体の分離によりインスリン/PI3 キナーゼシグナル伝達経路、Gq/ホスホリパーゼ C/ジアシルグリセロール経路が、塩の濃度と餌の有無とを連合して学習する行動可塑性に重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに、この行動可塑性を引き起こす神経回路の変化についても明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

In this study we aimed at understanding the mechanisms of chemotaxis and associative learning in the nematode *C. elegans*. By quantification of behavior, two mechanisms of chemotaxis were found. On the other hand, mutant isolation revealed that insulin/PI 3-kinase pathway and Gq/phospholipase C/diacylglycerol pathways are important for associative learning of salt concentration and availability of food. Further, changes in the neural circuits that generate the behavioral plasticity was identified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	39,400,000	11,820,000	51,220,000
2009年度	21,200,000	6,360,000	27,560,000
2010年度	21,200,000	6,360,000	27,560,000
2011年度	19,200,000	5,760,000	24,960,000
2012年度	19,200,000	5,760,000	24,960,000
総計	120,200,000	36,060,000	156,260,000

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：脳・神経、神経科学、行動学、線虫、化学走性

1. 研究開始当初の背景

動物の行動が遺伝子産物の機能変化に依存してどう変化するかを理解するためには、

神経系の動作の基本原理の根底からの理解が必要である。哺乳類を中心に、既知分子については多くの知見が蓄積されていたが、新

規の機能分子、特に学習などの制御機構に関わる未知の分子を発見することは容易ではなかった。

一方、我々は研究開始前に、線虫 *C. elegans* の遺伝学を用い、化学走性の学習に関わるいくつかの分子経路の同定に成功していた。

2. 研究の目的

このような基盤のもと、本研究では神経科学における重要問題のうち、以下の4点に焦点を絞った問題認識と目標を設定し、これを達成することを目的とした。

(1) 連合学習の機構、特に、学習の成立機構、学習に依存した行動のスイッチ機構、記憶の持続時間を決定する機構、学習能力を制限する機構の解明

(2) 走性行動の機構、特に単一の感覚入力から複数の情報を抽出する機構の解明

(3) 個体間の行動の差異の分子的基盤と自発的神経活動の意義の解明

(4) 多様な走性行動に関わる全神経回路の動作機構の解明

3. 研究の方法

以下の各項目に沿って研究を進めることとした。

(1) マルチワームトラッカーの開発

研究の準備として、プレート上の線虫の行動を高解像度カメラで連続的に撮影し、定量化する装置を開発する。

(2) 学習の成立維持機構

塩および匂いに対する化学走性においては、これらの化学物質と餌の有無の組み合わせによって学習が起これ、化学走性行動が変化する。本研究はこれらの学習をモデル系として用い、行動変化の機構を次の分子経路を手がかりとして明らかにする。

① インスリン/PI3-キナーゼ経路

② *CASY-1*

以上2つはいずれも塩の学習および匂いの学習の双方に必要な分子(経路)として同定していたので、これらがいかに働いて学習のどの局面を司っているかを明らかにする。

③ *Go/Gq* 経路

Go と *Gq* の α サブユニットおよび γ サブユニットの変異体が化学走性や学習について特徴的な異常を示すので、それぞれの機能解析とこれらの分子による行動制御機構を明らかにする。

④ ニューロペプチド、モノアミンのシグナル

これらは神経回路の調節の役割を担うことが多い。我々の研究で学習に関わることが明らかになった分子について機能解析を進める。

⑤ 新規変異体

学習にさまざまな異常を来す新たな変異体を分離し、原因遺伝子を決定することにより新たな制御機構を発見する。

(3) 走性行動の機構

化学走性の際に、線虫が化学感覚を受容し、それをどう処理し、いかなる行動を起こすことにより走性が達成されるかを明らかにする。

(4) 個体間の行動の差異の分子的基盤と自発的神経活動の意義

遺伝的バックグラウンドが全く同一の線虫間で行動に差異が生じる原因を、神経細胞レベルで解析し、さらには関与する分子をみつける。

(5) 多様な走性行動に関わる全神経回路の動作機構の解明

神経回路がさまざまな情報をどう処理するか、回路の動作機構を解明する。

4. 研究成果

(1) 走性行動の機構について

まず研究項目(1)、(3)について本項で記載する。

平成20年~21年に電動ステージにより一匹の線虫の動きを追跡するシングルワームトラッカーを用いて行動を定量的に解析した結果、以前に報告されていたピルエット機構に加え、風見鶏機構と名づけた機構が存在することが見つかった(雑誌論文17)。

本領域計画研究班員の大久保、増田との共同研究で、寒天平板上の線虫の行動をより詳細に数理的に解析した結果、線虫のランダムウォークの際の曲率の分布が、通常仮定される正規分布ではなくロングテール分布に従うことがわかった(雑誌論文11)。

一方、平成20年~24年に、計画研究の石原らと共同で、線虫が濃い匂いから忌避行動を行う際には、線虫は誘引時とは逆転したピルエット行動を示すことがわかった。面白いことに、風見鶏機構は誘引方向に働いており、忌避方向に働くピルエット機構と拮抗する形で行動を制御することがわかった(雑誌論文1)。

(2) 学習の機構について

次に研究項目(2)について記載する。

① 飢餓による学習

塩の存在下で線虫に飢餓を経験させると塩を忌避するようになる学習に欠損を持つ変異体を分離してその解析を進め、哺乳類のカルシンテニンのホモログをコードする *casy-1* 遺伝子に変異が起こっていることが見つかった(雑誌論文1)。

平成21年以降、*CASY-1* の機能を探る研究を続けた。*casy-1* 変異の抑圧変異体を分離したところ、PI3 キナーゼの逆反応を司る *daf-18/PTEN* の変異体が複数分離された。こ

のことは CASY-1 とインスリン/PI3 キナーゼ経路の間に密接な関係があることを示唆した。

一方、インスリン受容体 DAF-2 のアイソフォーム (DAF-2c) は、特異的に ASER 神経の軸索部位に濃縮されて局在することがわかった。CASY-1 はキネシン 1 による DAF-2c の輸送の仲立ちをする積荷アダプターとして機能していることが明らかになった (未発表)。

インスリン/PI3 キナーゼ経路の活性が上昇した *daf-18* 変異体は、飢餓を経験させなくとも塩を忌避する。*daf-18* を抑圧する変異体を分離したところ、*egl-30* と *gcy-22* の変異体が分離された。*egl-30* は Gq α サブユニットをコードする遺伝子であり、分離された変異は活性化型変異であった。一方、*gcy-22* は受容体型グアニル酸シクラーゼをコードし、ASER 感覚神経の感覚受容に必須である。これらの解析の結果、飢餓学習により恐らく ASER の働きが変化することに加え、学習後の塩忌避行動には ASER のみならず、他の感覚神経の活動が必要であることが示唆された (雑誌論文 14)。

② 塩濃度の学習

従来、線虫は生得的に塩 (NaCl) を好むものと考えられてきた。しかし、これは学習により獲得された行動であることがわかった。さらに、線虫は塩の有無だけでなく、塩の濃度を学習することがわかった。すなわち、線虫は以前に餌と共に飼育されていた塩濃度を好み、その塩濃度に向かうことがわかった。

以降、研究期間の終了まで、この学習の分子神経機構の解析を進めた。まず、どの感覚神経が関わるかを調べたところ、ASER 感覚神経が必要十分であることがわかった。次に ASER 神経の感覚受容をカルシウムプローブ GCaMP を用いて測定した。ASER 神経は塩濃度の低下に応答するが、応答の大きさは、それまで培養されていた際の塩濃度が高いほど大きいことがわかった。ASER 感覚神経は主に 3 つの介在神経、AIA, AIB, AIY にシナプス出力を送っている。これら 3 神経についても塩濃度変化に対する応答を測定したところ、特に AIB について面白い変化が見られた。AIB は ASER と同様に塩濃度の低下に応答するが、この応答は飼育された塩濃度が刺激に用いる塩濃度より高いときに起こり、より低い塩濃度で飼育された線虫においては AIB の応答が見られないことがわかった。

この結果を受けて、上述の Gq 経路について再度調べたところ、Gq/DAG/PKC 経路が活性化されると線虫は無条件に高い塩濃度に向かうことがわかった。また、これらの分子は ASER 神経で働くこともわかった。逆に、この経路を ASER 神経特異的に不活化すると、線虫は低い塩濃度に向かう。このことから、

ASER 神経における Gq 経路の活性が線虫が向かう塩濃度を強く制御することがわかる。さらに、AIB 神経の応答は ASER 神経での Gq 経路の活性に依存して変わった。Gq/DAG/PKC 経路は他の神経で知られているように、ASER 神経のシナプス出力を制御することにより、塩走性行動を制御していると推定される (未発表)。

③ 嗅覚学習

嗅覚学習の程度が、飼育時の線虫の個体数 (個体群密度) によって変わることをみつけた。より詳しい解析の結果、この現象にはフェロモンが関わっていることが明らかになった。フェロモン受容のシグナルは体内ペプチド SNET-1 により行動制御に結びつけられることが分かった。線虫は個体群密度の高低によって微妙に行動を制御し、集団としての種の生存に有利なように行動していることが推定された (雑誌論文 9)。

(3) 走性行動に関わる神経回路について

本領域公募班員の橋本らと共同で、線虫を追尾しながら光照射を行う装置を平成 22 年度に作成した。この装置は、線虫の姿勢を自動認識し、リアルタイムに判断を行って特定のタイミングでのみ光照射を行うことができる。この装置を用い、チャンネルロドプシンを ASER または ASEL 神経に発現させた線虫に光照射を行ってその神経を活性化させる実験を行った。これによって、風見鶏行動を再現させることができた (未発表)。

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 20 件)

1) Yoshida, K., Hirotsu, T., Tagawa, T., Oda, S., Wakabayashi, T., Iino, Y., and Ishihara, T. (2012). Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*. Nat Commun 3, 739. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms1750

2) Yamada, K., Tsuchiya, J., and Iino, Y. (2012). Mutations in the *pqe-1* gene enhance transgene expression in *Caenorhabditis elegans*. G3 (Bethesda) 2, 741-751. 査読有
DOI: 10.1534/g3.112.002832

3) Uozumi, T., Hirotsu, T., Yoshida, K., Yamada, R., Suzuki, A., Taniguchi, G., Iino, Y., and Ishihara, T. (2012). Temporally-regulated quick activation and inactivation of Ras is important for olfactory behaviour. Sci Rep 2, 500. 査

読有 DOI: 10.1038/srep00500

4) Tomida, T., Oda, S., Takekawa, M., Iino, Y., and Saito, H. (2012). The temporal pattern of stimulation determines the extent and duration of MAPK activation in a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Sci Signal* 5, ra76. 査読有

DOI: 10.1126/scisignal.2002983

5) Shinkai, Y., Yamamoto, Y., Fujiwara, M., Tabata, T., Murayama, T., Hirotsu, T., Ikeda, D.D., Tsunozaki, M., Iino, Y., Bargmann, C.I., et al. (2011). Behavioral Choice between Conflicting Alternatives Is Regulated by a Receptor Guanylyl Cyclase, GCY-28, and a Receptor Tyrosine Kinase, SCD-2, in AIA Interneurons of *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 31, 3007-3015. 査読有

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4691-10.2011

6) Oda, S., Tomiooka, M., and Iino, Y. (2011). Neuronal plasticity regulated by the insulin-like signaling pathway underlies salt chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurophysiol* 106, 301-308. 査読有

DOI: 10.1152/jn.01029.2010

7) Iwata, R., Oda, S., Kunitomo, H., and Iino, Y. (2011). Roles for class IIA phosphatidylinositol transfer protein in neurotransmission and behavioral plasticity at the sensory neuron synapses of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7589-7594. 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1016232108

8) Aoki, R., Yagami, T., Sasakura, H., Ogura, K.I., Kajihara, Y., Ibi, M., Miyamae, T., Nakamura, F., Asakura, T., Kanai, Y., et al. (2011). A Seven-Transmembrane Receptor That Mediates Avoidance Response to Dihydrocaffeic Acid, a Water-Soluble Repellent in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 31, 16603-16610. 査読有 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4018-11.2011

9) Yamada, K., Hirotsu, T., Matsuki, M., Butcher, R.A., Tomiooka, M., Ishihara, T., Clardy, J., Kunitomo, H., and Iino, Y. (2010). Olfactory plasticity is regulated by pheromonal signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 329, 1647-1650. 査読有 DOI: 10.1126/science.1192020

10) Takayama, J., Faumont, S., Kunitomo, H., Lockery, S.R., and Iino, Y. (2010). Single-cell transcriptional analysis of taste sensory neuron pair in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res* 38, 131-142. 査読有

DOI: 10.1016/j.jtbi.2010.08.020

11) Ohkubo, J., Yoshida, K., Iino, Y., and Masuda, N. (2010). Long-tail behavior in locomotion of *Caenorhabditis elegans*. *J Theor Biol* 267, 213-222. 査読有 DOI: 10.1016/j.jtbi.2010.08.020

12) Lin, C.H., Tomiooka, M., Pereira, S., Sellings, L., Iino, Y., and van der Kooy, D. (2010). Insulin signaling plays a dual role in *Caenorhabditis elegans* memory acquisition and memory retrieval. *J Neurosci* 30, 8001-8011. 査読有

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4636-09.2010

13) Kimura, Y., Kurabe, N., Ikegami, K., Tsutsumi, K., Konishi, Y., Kaplan, O.I., Kunitomo, H., Iino, Y., Blacque, O.E., and Setou, M. (2010). Identification of tubulin deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and mammalian cytosolic carboxypeptidases (CCPs). *J Biol Chem* 285, 22936-22941. 査読有

DOI: 10.1074/jbc.C110.128280

14) Adachi, T., Kunitomo, H., Tomiooka, M., Ohno, H., Okochi, Y., Mori, I., and Iino, Y. (2010). Reversal of Salt Preference Is Directed by the Insulin/PI3K and Gq/PKC Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 186, 1309-1319. 査読有 DOI: 10.1534/genetics.110.119768

15) Yamada, K., Hirotsu, T., Matsuki, M., Kunitomo, H., and Iino, Y. (2009). GPC-1, a G Protein γ -Subunit, Regulates Olfactory Adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 181, 1347-1357. 査読有 DOI: 10.1534/genetics.108.099002

16) Ortiz, C.O., Faumont, S., Takayama, J., Ahmed, H.K., Goldsmith, A.D., Pocock, R., McCormick, K.E., Kunimoto, H., Iino, Y., Lockery, S., et al. (2009). Lateralized gustatory behavior of *C. elegans* is controlled by specific receptor-type guanylyl cyclases. *Curr Biol* 19, 996-1004. 査読有 DOI: 10.1016/j.cub.2009.05.043

17) Iino, Y., and Yoshida, K. (2009). Parallel use of two behavioral mechanisms for chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 29, 5370-5380. 査読有 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3633-08.2009

18) Hayashi, Y., Hirotsu, T., Iwata, R., Kage-Nakadai, E., Kunitomo, H., Ishihara, T., Iino, Y., and Kubo, T. (2009). A trophic role for Wnt-Ror kinase signaling during developmental pruning in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Neurosci* 12, 981-987. 査読有 DOI: 10.1038/nn.2347

19) Kano, T., Brockie, P.J., Sassa, T., Fujimoto, H., Kawahara, Y., Iino, Y.,

Mellem, J.E., Madsen, D.M., Hosono, R., and Maricq, A.V. (2008). Memory in *Caenorhabditis elegans* Is Mediated by NMDA-Type Ionotropic Glutamate Receptors. *Curr Biol* 18, 1010-1015. 査読有
DOI: 10.1016/j.cub.2008.05.051
20) Ikeda, D.D., Duan, Y., Matsuki, M., Kunitomo, H., Hutter, H., Hedgecock, E.M., and Iino, Y. (2008). CASY-1, an ortholog of calyntenins/alcadeins, is essential for learning in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5260-5265. 査読有 DOI: 10.1073/pnas.0711894105

[学会発表] (計 71 件)
(2012 年以降のみ記載。)

1) Yohsuke Satoh, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino 「Optogenetic analysis of the mechanism for sensing chemical gradient in *C. elegans*」第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡
2) 吉田和史、飯野雄一「線虫の塩への化学走性を調節する神経回路の同定」日本味と匂学会第 46 回大会、2012 年 10 月 4 日、大阪
3) Masahiro Tomioka, Hayao Ohno, Shinya Kato, Yasuki Naito, Hirofumi Kunitomo and Yuichi Iino 「The role of a splicing isoform of insulin receptor in starvation-induced behavioral plasticity in *C. elegans*」第 35 回 日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)
4) Kunitomo, Hirofumi, Sato Hirofumi, Satoh Yohsuke, Iino, Yuichi 「Neural coding of the homeostatic salt chemotaxis based on salt-concentration memory in *C. elegans*」第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋
5) Yohsuke Satoh, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino 「Optogenetic analysis of the mechanism for sensing chemical gradients」5th East Asia Worm Meeting、2012 年 6 月 28 日、台北、Taiwan
6) Hirofumi Kunitomo, Hirofumi Sato, Ryo Iwata, Takeshi Adachi, Hayao Ohno and Yuichi Iino 「Roles of diacylglycerol signaling in migration toward preferred salt concentration in *C. elegans*」International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)、2012 年 6 月 25 日、Stockholm
7) Kazushi Yoshida, Takaaki Hirotsu, Takanobu Tagawa, Shigekazu Oda, Tokumitsu Wakabayashi, Yuichi Iino, and Takeshi Ishihara 「Neuronal mechanisms underlying olfactory preference change depending upon odor concentration」XVI International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)、

2012 年 6 月 25 日、Stockholm、Sweden
8) Hayao Ohno, Masahiro Tomioka, Shinya Kato, Yasuki Naito, Hirofumi Kunitomo and Yuichi Iino 「Axonal transport of a novel isoform of the Insulin/IGF receptor regulates gustatory plasticity in *Caenorhabditis elegans*」XVI International Symposium on Olfaction and Taste、2012 年 6 月 24 日、ストックホルム、スウェーデン
9) Yuichi Iino, Hirofumi Kunitomo, Masahiro Tomioka, Hayao Ohno, Hirofumi Sato, Ryo Iwata, Shigekazu Oda, Yohsuke Sato and Takeshi Adachi 「Molecular and neuronal mechanisms for experience-dependent gustatory behavior in *Caenorhabditis elegans*.」XVI International Symposium on Olfaction and Taste、2012 年 6 月 24 日、ストックホルム、スウェーデン
10) Hayao Ohno, Masahiro Tomioka, Shinya Kato, Yasuki Naito, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino 「Axonal transport of a novel DAF-2 isoform regulates associative learning」EMBO Conference Series *C. elegans Neurobiology*、2012 年 6 月 15 日、ハイデルベルク、ドイツ
11) Masahiro Tomioka, Yasuki Naito, Shinya Kato, Hayao Ohno, Yuichi Iino 「A Molecular Machinery that Determines Alternative Splicing Patterns of Insulin Receptor in *C. elegans* Chemosensory Neurons.」RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II、2012 年 6 月 11 日、RIKEN CDB (神戸)

[その他]
ホームページ等
http://molecular-ethology.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/IINO_lab_J.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯野 雄一 (IINO, YUICHI)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：40192471

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

國友 博文 (KUNITOMO, HIRODFUMI)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：20302812
富岡 征大 (TOMIOKA, MASAHIRO)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：40466800