

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 9日現在

機関番号：17102

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：20115003

研究課題名（和文） 神経回路における感覚情報処理の制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulatory mechanisms for the sensory processing in the neuronal circuit

研究代表者

石原 健（ISHIHARA TAKESHI）

九州大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：10249948

研究成果の概要（和文）：

動物は、環境からの情報を神経回路で処理することによって、適切に行動している。本研究課題では、2つの異なる感覚刺激に対する応答を制御する分子を同定し、それが働く神経回路を明らかにすることによって、行動選択を制御する神経回路モデルを提唱した。また、記憶を忘れにくい変異体の解析により、神経細胞間のシグナルによって、積極的に忘却が促進されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Animals process sensory information in neuronal circuits for proper behavior. In this research, we identified signaling molecules and neurons to regulate sensory integration of cross modal stimuli and, depending on those results, we proposed a neuronal circuit model to regulate the behavioral choice. By analyzing mutants showing the prolonged retention of memory, we found that forgetting is accelerated by neuronal communication.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009年度	14,800,000	4,440,000	19,240,000
2010年度	14,800,000	4,440,000	19,240,000
2011年度	18,700,000	5,610,000	24,310,000
2012年度	14,800,000	4,440,000	19,240,000
総計	68,800,000	20,640,000	89,440,000

研究分野：行動遺伝学

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：情報処理、中枢神経、線虫、イメージング

1. 研究開始当初の背景

動物は、外界からの感覚情報を中枢神経系で処理することによって、適切に行動している。しかし、情報処理の制御に関わる分子メカニズムと神経回路メカニズムとを結びつけて研究されることが少なく、その全体像が明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、感覚情報の統合や学習など、比較的高次の情報処理の制御機構の解明を目指した。そのために、302個神経細胞からなる単純な神経回路を持つ線虫 *C. elegans* をモデルとして、行動遺伝学的な解析とイメージングによる神経活動の解析とを組合せ、感覚情報処理の制御機構を分子レベル・神経回

路レベルを結びつけて明らかにすることを目的とした。

(1) 行動選択に関わる感覚情報の統合の制御機構：二つの情報から一つの出力という最も単純な情報処理の一つについて、行動選択の測定系を用いて、分子遺伝学的解析を進める。これにより、情報処理の制御を担う分子・神経回路を明らかにする。

(2) 記憶の忘却の制御機構：感覚情報に基づいて記憶が形成される。この記憶は、固定化され長期記憶となる場合もあるが、多くは時間とともに忘れられる。これまで、学習に関わるメカニズムは様々な系で解析されてきたが、忘却の制御に関わるメカニズムはほとんど明らかになっていなかった。そこで、線虫の行動可塑性を用いた遺伝学的解析により、忘却を制御する分子・回路メカニズムを明らかにすることを旨とした。

(3) 線虫における多数のニューロン活動の同時計測：カルシウム感受性蛍光タンパク質を用いたカルシウムイメージングにより線虫の神経活動を測定することが行われていたが、顕微鏡で同時に観察できるのは同一平面上にある神経細胞だけである。そのため、線虫の中枢神経系のように、3次元的に配置されていると、複数の神経細胞を同時に観察することができなかつた。そこで、3次元に配置された中枢神経系全体を高速に観察するシステムを構築し、複数の神経細胞の同時観察を旨とした。

3. 研究の方法

(1) 行動選択に関わる感覚情報の統合の制御機構：本研究では、二つの異なる感覚刺激に対する応答の選択のメカニズムを解析した。線虫は、匂い物質ジアセチルに対して誘引応答を示し、銅イオンに対して忌避応答を示す。そこで、銅イオンを越えないとジアセチルに近づけない行動測定系を用いて、銅イオンに対する忌避応答をジアセチルに対する誘引応答より優先する変異体を解析することにより、行動選択に関わる遺伝子を同定するとともに、それが働くニューロンを同定した。さらにその行動選択を制御するニューロンの機能を人為的に改変することにより、行動制御に果たす役割を解明した。

(2) 記憶の忘却の制御機構：線虫では、ほとんどの行動可塑性は数時間以内に失われる。本研究では、強い匂い刺激に曝した結果起こる嗅覚順応をモデルとして、野生型では約4時間で失われる記憶を長時間保持できる変異体の原因遺伝子を同定しその機能解析を進めた。さらに、嗅覚ニューロンのカルシウ

ムイメージングにより、行動の可塑的な変化に伴う感覚応答の変化を解析した。

(3) 線虫における多数のニューロン活動の同時計測：線虫の中枢神経系は、40倍の対物レンズを用いて観察した際に、一つの視野に収まる。従って、画像取得と同期した対物レンズの高速移動とニポウディスク式共焦点装置を組み合わせることにより、多数の焦点面の画像を撮影し、3次元に配置された神経活動の全体像を細胞レベルで観察することができるシステムを確立した。

このシステムを用いて、PDMSで作成した微小流路に、カルシウム感受性タンパク質を発現させた線虫を導入し、その活動を測定した。

4. 研究成果

(1) 行動選択に関わる感覚情報の統合の制御機構：誘引性匂い物質ジアセチルに対する応答に比べ忌避物質銅イオンに対する応答を優先する変異体 *gcy-28* を同定していた。この原因遺伝子は、受容体型グアニル酸シクラーゼをコードしている。この遺伝子の発現解析や、細胞特異的な表現型回復実験によって、AIA 介在ニューロンで GCY-28 が機能することによって、感覚情報の統合が制御されていることが明らかになった。さらに、GCY-28 の下流で、cGMP 依存性カチオンチャンネルが働いていることも明らかにした。一方、我々が以前に同定した HEN-1 の受容体と推定される受容体チロシンキナーゼ SCD-2 も AIA 介在ニューロンで機能することによって、感覚情報の統合を制御していることがわかった。

そこで、分子遺伝学的手法を用いて、AIA 介在ニューロンをなくした線虫や、AIA を不活性化した線虫を作成し、行動選択を行わせたところ、ジアセチルへの誘引より銅イオンからの忌避を優先していることがわかった。AIA ニューロンは、ジアセチルを受容する AWA ニューロンとのギャップジャンクションで、銅イオンを受容する ASH ニューロンからシナプス結合でつながっている。これらのことから、AIA ニューロンで二つの感覚情報の統合が起きていると推定される。そこで図1のようなモデルを提案した。

野生型 (図1A) では、AIA ニューロンが GCY-28 や SCD-2 に依存して、AIB ニューロンを抑制することによって、銅イオンからの行動を抑制している。一方、*gcy-28*・*scd-2* 変異体や、AIA ニューロンを不活性化した場合には、AIB ニューロンの抑制機構が働かないために、銅イオンからの忌避反応が抑制される (図1B)。

本研究成果は、高等動物における意思決定 (Decision making) の制御に関わる神経・分子メカニズムを研究する上での基盤として重要であると考えている。

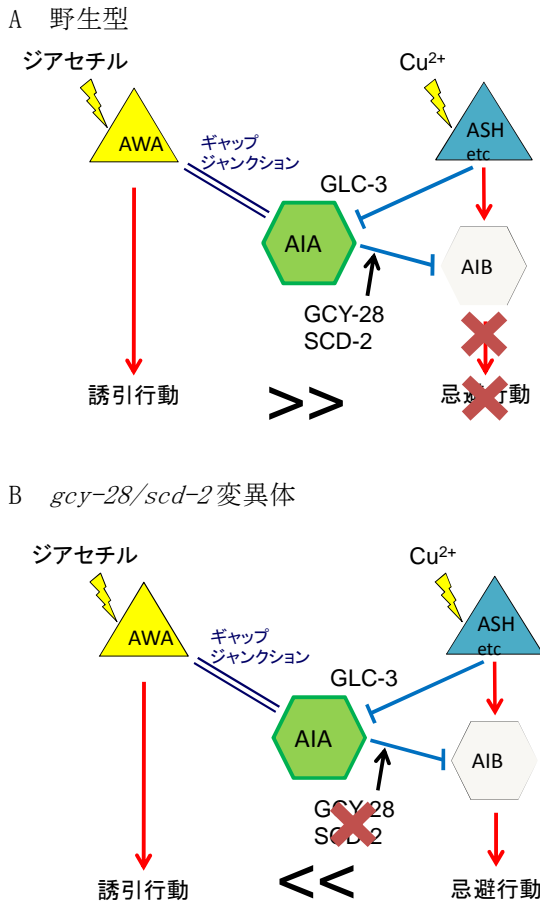


図1 行動選択を制御する神経回路モデル

(2) 記憶の忘却の制御機構: AWA ニューロンで受容される匂い物質ジアセチルに対する嗅覚順応の記憶は、4 時間程度で失われる。そこで、この記憶が長く保持される変異体を単離したところ、*tir-1* というアダプタータンパク質をコードする遺伝子の欠失変異体であることがわかった。この TIR-1 は、p38MAPK の上流で働き、このシグナル経路を活性化することから、このシグナル経路が記憶の忘却を制御しているかを解析した。分子遺伝学的なエピスタシス解析の結果、NSY-1, SEK-1, JNK-1 がこの順に働いて、忘却を制御していることがわかった。このシグナル経路が働くニューロンを、神経細胞特異的な表現型回復実験によって調べたところ、AWC ニューロンで働いていることが明らかになった。

次に、ジアセチルを受容する AWA ニューロンにおける、ジアセチル刺激に対する神経応答をカルシウムイメージングによって測定した。野生型および *tir-1* 変異体において、嗅覚順応の条件付け前は、ジアセチル刺激により細胞内カルシウム濃度が上昇したが、条件付け後にはそのような応答が観察されなかった。その後、4 時間餌の上で飼育すると、野生型では、ジアセチルに対する応答は回復

したが、*tir-1* 変異体では応答は回復しなかった。これらのことは、嗅覚順応とその回復は、主に AWA ニューロンの神経応答によって制御されていることを示している。

そこで、AWC ニューロンで働く TIR-1/JNK-1 経路が、どのようにして AWA ニューロンにおける神経応答の回復を制御しているのかを明らかにするために、AWC ニューロンを不活性化させた線虫を作成して忘却を調べたところ、記憶を忘れにくくなっていた。さらに、AWC ニューロンからの分泌を抑制した場合にも記憶を忘れにくくなるのに対し、分泌を促進すると *tir-1* 変異体の忘れにくくなる表現型が回復した。これらのことは、AWC から記憶の忘却を促進するシグナルが分泌されることによって、忘却が制御されていることを示している(図2)。

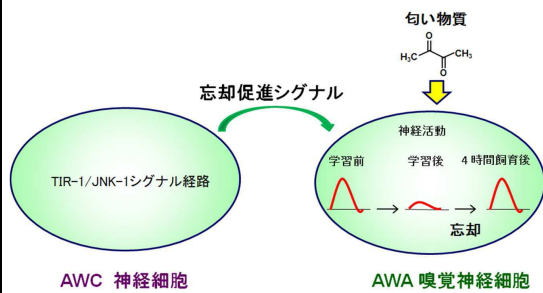


図2 忘却を制御するメカニズム

これらの結果は、忘却には能動的な制御メカニズムが存在していること、それが神経間コミュニケーションによって担われていることを示している。本研究の成果は、高等動物で忘却を制御するメカニズムを解析する基盤として重要であると考えている。

ブタノンエンハンスメントは、ブタノンと餌との連合学習と考えられる行動可塑性であり、ブタノン存在下に餌の上で飼育するとブタノンに対する誘引性が強くなる現象である。我々は、ブタノンエンハンスメントの条件付け後に餌の上で飼育すると、条件付け前にはみられないブタノンに対して忌避するようになるという行動変化を見いだした。これが、記憶の書き換えに伴う消去のモデルとなるのではないかと考えて、研究を進めている。このブタノンエンハンスメント後の行動変化が起きない変異体 *qj74* を同定し、その原因遺伝子を同定したところ、シナプス分泌に関係するタンパク質と相同性を持つタンパク質をコードする遺伝子であった。

(3) 線虫における多数のニューロン活動の同時計測: ニポウ式共焦点顕微鏡と高速対物レンズ移動を同期することによって、毎秒約3立体の立体的な画像を取得するシステムを確立した。(図3)

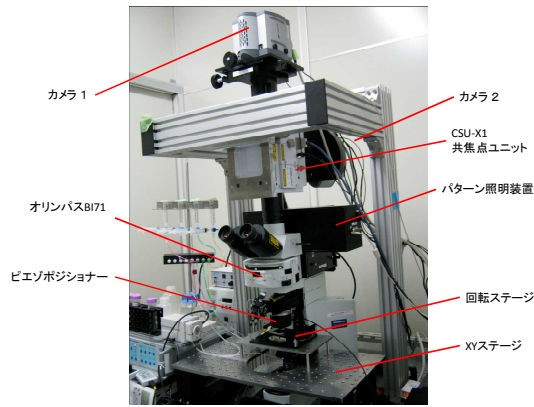


図3 4Dイメージングシステム

このシステムを用いて、PDMSで作成した微小流路中の線虫の中樞神経系の神経活動を、カルシウム感受性蛍光タンパク質を用いて、測定した。この撮影画像から神経活動を解析するために、この撮影中に線虫が移動することを補正するための神経細胞のトラッキングや立体画像で FRET 解析を行うためのプログラムを作成した。これにより、3次元的に配置された複数の神経細胞の活動を同時に測定することができるようになった。

このシステムを用いて、行動選択を担う情報の統合に関わる神経回路について、複数ニューロンの同時観察をおこなった。その結果、AWA ニューロンと AIA ニューロンとは、ジアセチル刺激によって同時に活性化すること、AIA ニューロンと AIB ニューロンとは、鏡像のように、片方が活性化しているときには、もう一方が抑制されているという応答を示した。これらの結果から、図1のモデルが行動選択の制御をよく説明していると考えられた。

次に、多数のニューロンの活動の同時イメージングを行った。pkc-1 プロモーターを用いて数十個のニューロンに Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質を発現させた線虫を、このシステムで観察した。図4のように、多数の神経細胞の同時イメージングを行うことができた。

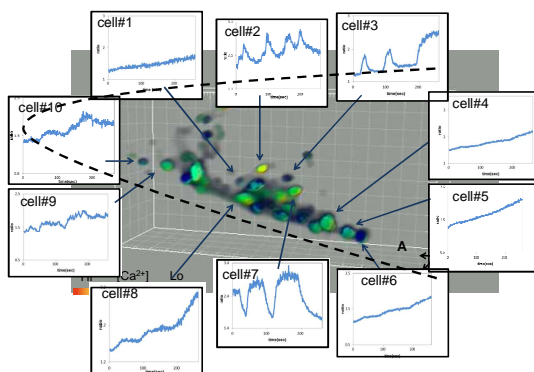


図4 多数のニューロンの活動の同時測定

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 11 件)

1) Inoue, A., Sawatari, E., Hisamoto, N., Kitazono, T., Teramoto, T., Fujiwara, M., Matsumoto, K., Ishihara, T. (2013)

Forgetting in *C. elegans* is accelerated by neuronal communication via the TIR-1/JNK-1 pathway. *Cell Reports*. 3 (3) . 808-819. doi:10.1016/j.celrep. 査読有

2) Sasaki, O., Yoshizumi, T., Kuboyama, M., Ishihara, T., Suzuki, E., Kawabata, S., Koshiba, T. (2013) A structural perspective of the MAVS-regulatory mechanism on the mitochondrial outer membrane using bioluminescence resonance energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1833(5). 1017-1027. doi 10.1016/j.bbamcr. 査読有

3) Uozumi, T., Hirotsu, T., Yoshida, K., Yamada, R., Suzuki, A., Taniguchi, G., Iino, Y., Ishihara, T. (2012) Temporally-regulated quick activation and inactivation of Ras is important for olfactory behaviour. *Scientific Reports*. 2:500. doi 10.1038/srep00500 査読有

4) Yoshida, K., Hirotsu, T., Tagawa, T., Oda, S., Wakabayashi, T., Iino, Y., Ishihara, T. (2012) Odour concentration-independent olfactory preference change in *C. elegans*. *Nature Communications*. 3:739. doi: 10.1038/ncomms1750. 査読有

5) Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang, YF., Nakano, M., Abdelfattah AS., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T. CampbellRE. (2011) An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. *Science* 333(6051), 1888-1891. doi10.1126/science.1208592 査読有.

6) Shinkai, Y., Yamamoto, Y., Fujiwara, M., Tabata, T., Murayama T., Hirotsu, T., Ikeda, D., Tsunozaki, M., Iino, Y., Bargmann, C., Katsura, I., and Ishihara, T. (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 *C. elegans*. *J. Neuroscience*. 31(8), 3007-3015. doi 10.1523/JNEUROSCI. 4691-10.2011. 査読有

7) Fujiwara, M., Teramoto, T., Ishihara, T., Ohshima Y. and McIntire, S. L. (2010) A novel zf-MYND protein, CHB-3, mediates guanylyl cyclase localization to sensory

cilia and controls body size of *C. elegans*. PLoS Genetics. 6, e1001211. doi:10.1371/journal.pgen.1001211 査読有
 8) Yamada, K., Hirotsu, T., Matsuki, M., Butcher R. A., Tomioka, M., Ishihara, T., Clardy J., Kunitomo, H., Iino, Y. (2010) Olfactory plasticity is regulated by pheromonal signaling in *Caenorhabditis elegans*. Science, 329, 1647-1650. doi 10.1126/science.1192020. 査読有
 9) Hirotsu, T., Hayashi, Y., Iwata, R., Kunitomo, H., Kage-Nakadai, E., Kubo, T., Ishihara, T. and Iino, Y. (2009) Behavioural assay for olfactory plasticity in *C. elegans*. Nature Protocols. 139. 査読無 doi:10.1038/nprot.2009.139
 10) 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*. Nature Neuroscience. 12, 981-987. doi: 10.1038/nn.2347. 査読有
 11) Oishi, A., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Mohri-Shiomi, A., Kimura, K. D., Ishihara, T., Katsura, I. (2009) FLR-2, the glycoprotein hormone alpha subunit, is involved in the neural control of intestinal functions in *Caenorhabditis elegans*. Genes to Cells. 14, 1141-1154 doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01341.x. 査読有

[学会発表] (計 63 件)

1) 寺本 孝行, 山本 悠太, 石原 健, 4-D Ca²⁺ イメージングによる線虫 *C. elegans* の行動選択を制御する複数ニューロンの活動の可視化と計測, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 14 日, 福岡
 2) 藤原 学, 佐藤 則子, 石原 健, 線虫の成長に伴う行動変化に関わるミトコンドリアの働き, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 13 日, 福岡
 3) 北園 智弘, 井上明俊, 石原 健, 線虫 *C. elegans* を用いた忘却シグナルの探索, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日, 福岡
 4) 井上 明俊, 猿渡悦子, 寺本 孝行, 石原 健, 線虫 *C. elegans* において記憶の忘却は ASK/JNK 経路を介した神経間シグナル分泌により促進される, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日, 福岡
 5) 石原 健, Acceleration of forgetting by neuronal communication in *C. elegans*. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ORGANIZATION AND FUNCTION OF THE NERVOUS SYSTEM. 2012

年 11 月 27 日, 東京大学

6) 石原 健, 線虫 *C. elegans* の神経回路における忘却の制御機構, 記憶回路研究会, 2012 年 11 月 21 日, 岡崎
 7) 北園 智弘, 井上 明俊, 石原 健, 線虫 *C. elegans* を用いた忘却シグナルの探索, 日本遺伝学会第 84 回大会, 2012 年 9 月 24 日, 九州大学
 8) 藤原 学, 佐藤 則子, 石原 健, 生殖細胞が制御する線虫の感覚行動, 日本遺伝学会第 84 回大会, 2012 年 9 月 24 日, 九州大学
 9) 石原 健, 線虫の行動選択を制御する神経回路とその活動の可視化, 文部科学省新学術領域研「システム分子行動学」班会議, 2012 年 7 月 26 日, 仙台
 10) Fujiwara M., Sato N, Maruyama S, Ishihara T. Chemotaxis behavior is regulated by germline in *C. elegans*. EMBO Conference Series *C. elegans* Neurobiology 2012 年 6 月 16 日 EMBL Heidelberg, Germany
 11) Sawatari E., Kaieda K., Teramoto T., Ishihara T.. *snt-3* regulates memory erasing for butanone enhancement in *Caenorhabditis elegans*. 2012 年 6 月 16 日 EMBL Heidelberg, Germany
 12) Inoue A. , Sawatari E., Teramoto, T. Ishihara T.. Forgetting in *C. elegans* is accelerated by neuronal communication via the p38 MAPK pathway. 2012 年 6 月 15 日 EMBL Heidelberg, Germany
 13) Teramoto T., Yamamoto Y., and Ishihara T.. 4-D Ca²⁺ imaging of the multiple neurons that regulate the sensory integration underlying behavioral choice. 2012 年 6 月 14 日 EMBL Heidelberg, Germany
 14) 有井 照剛, 藤原 学, 石原 健, 線虫 *C. elegans* における cGMP 依存性タンパク質キナーゼ EGL-4 による特定の匂いへの走性制御機構の解析, 第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日, 横浜
 15) 山本 悠太, 新海 陽一, 猿渡 悦子, 寺本 孝行, 石原 健, 線虫 *C. elegans* における感覚情報の統合の分子メカニズムの解析, 第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日, 横浜
 16) 寺本 孝行, 石原 健 4D *in vivo* Ca²⁺ imaging of the *C. elegans* neural network. 第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日, 横浜
 17) Ishihara, T. Molecular and neural mechanisms of behavioral choice in *C. elegans*. Systems Molecular Ethology and Beyond. 2011 年 11 月 10 日 東京大学
 18) 石原 健, 新海 陽一, 山本 悠太, 寺本 孝

行、線虫 *C. elegans* の行動選択に関わる感覚情報の統合を制御するメカニズム、日本神経科学大会 シンポジウム「化学感覚の情報処理の分子神経機構」S4-G-1-3 2011年9月17日、横浜

19) 寺本 孝行、石原 健、*C. elegans* 神経ネットワークの4次元Ca²⁺イメージング、第34回日本神経科学大会 2011年9月15日、横浜

20) Swatari E., Kaieda K., Ishihara T. Changes in responsivity of olfactory neurons to odor during olfactory adaptation and recovery in *Caenorhabditis elegans*. 18th International C. elegans Meeting Los Angeles U.S.A. 2011年6月22-26日

21) Fujiwara M., Ishihara T. Chemotaxis behavior is regulated by germline in *C. elegans* 18th International C. elegans Meeting Los Angeles U.S.A. 2011年6月22-26日

22) Inoue A., Ishihara T. The P38/JNK MAP kinase pathway regulates forgetting in *Caenorhabditis elegans*. 18th International C. elegans Meeting Los Angeles U.S.A. 2011年6月22-26日

23) Ishihara, T. Molecular and neural mechanisms for behavioral choice between two conflicting alternatives in *C. elegans*. The 3rd International Conference on Cognitive Neurodynamics 2011年6月12日 Hilton Niseko Village, Hokkaido, Japan

24) Inoue, A. and Ishihara, T. The P38/JNK MAP kinase pathway regulates forgetting in *Caenorhabditis elegans*. NEURONAL DEVELOPMENT, SYNAPTIC FUNCTION & BEHAVIOR *C. elegans* Topic Meeting 2010年6月26日-7月2日 Madison, USA

25) 石原 健、線虫の神経回路における感覚情報の統合と記憶の忘却のメカニズム、日本分子生物学会第10回春季シンポジウム、2010年6月7-9日、松島

26) Shinkai, Y. and Ishihara, T. MOLECULAR ANALYSES OF THE INTEGRATION OF TWO SENSORY SIGNALS IN *C. ELEGANS*. 2010 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Neuronal Circuit, 2010年03月10日, Cold Spring Harbor U.S.A.

27) 海江田 兼次、石原 健、線虫 *C. elegans* におけるブタノンエンハンズメントに関わる記憶の消去の解析、第32回日本分子生物学会、2009年12月9日-12日、横浜

28) 井上 明俊、石原 健、線虫を用いた記憶を忘れるメカニズムの遺伝学的解析、第32回日本分子生物学会、2009年12月9日-12日、横浜

29) Fujiwara, M., Sato, N., Maruyama, S.,

Akamine, T. and Ishihara, T. Chemotactic control by a germline signal in *C. elegans* 17th International C. elegans Meeting 2009年6月24-28日 Los Angeles U.S.A.

30) Shinkai, Y., and Ishihara, T. Molecular analysis of the integration of two sensory signals in *C. elegans*. 17th International C. elegans Meeting, 2009年6月24-28日 Los Angeles U.S.A.

31) 海江田 兼次、石原 健 線虫 *C. elegans* におけるブタノンエンハンズメントに関わる記憶の消去の解析、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日-12日、神戸

[その他]
ホームページ等

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~bunsiide/>

新聞記事

H25. 4. 25 「卓上四季」北海道新聞 (朝刊)

H25. 4. 12 「積極的に記憶の消去促す神経細胞と制御機構発見」科学新聞

H25. 3. 25 「記憶忘却促す細胞発見」産経新聞 (朝刊)

H25. 3. 22 「記憶を忘れさせる細胞」西日本新聞 (朝刊)

H25. 3. 22 「記憶忘却促す神経細胞」日本経済新聞 (夕刊)

H25. 3. 22 「忘却の仕組み解明へ」毎日新聞 (朝刊)

H25. 3. 22 「記憶の忘却促す細胞を発見」共同通信

H25. 3. 22 「記憶の忘却促す細胞を発見」東京新聞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 健 (ISHIHARA TAKESHI)
九州大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号：10249948

(2) 連携研究者

藤原 学
九州大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号：70359933
広津 崇亮
九州大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号：70404035
寺本 孝行
九州大学・大学院理学研究院・学術研究員
研究者番号：90571836
猿渡 悦子
九州大学・基幹教育院・助教
研究者番号：60456605