

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24年6月15日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370002

研究課題名（和文）連合学習の分子機構の行動遺伝学を用いた総合的解析

研究課題名（英文）A comprehensive study of the molecular mechanisms of associative learning by a behavioral genetic approach.

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）：

線虫 *C. elegans* は塩と飢餓を同時に経験すると、塩が不快なものであると学習し、塩から逃げるようになる。塩を感じる神経は左右一対に存在するが、このうち右の神経だけが変化し、それには線虫のインスリンが必要であることがわかった。さらに、アルツハイマー病に関係すると言われているタンパク質が、インスリンによるシグナルと密接に関係していることがみつかった。

研究成果の概要（英文）：

The nematode *C. elegans* learns to avoid salt after the experience of starvation in the presence of salt. A pair of sensory neurons sense salt, but only the right member of this pair changes by learning through the effect of the *C. elegans* insulin. In addition, a protein known to be relevant to Alzheimer's disease was found closely related to the action of the insulin signal.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

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：学習記憶・線虫 *C. elegans*・化学走性行動・インスリン・PTEN・左右非対称性・

PI3 キナーゼ・カルシンテニン

1. 研究開始当初の背景

さまざまな動物が示す学習・記憶の能力は、動物が環境に適切に反応して生き延びるための最も重要な機能である。しかしそれに関わる分子経路の全貌は明らかでない。線虫 *C. e*

legans では、研究開始時までに学習記憶の実験系が整備され、変異体の分離や遺伝子の同定が急速なペースで行われるようになっていた。研究代表者らはこのような中で学習・記憶に関わる遺伝子を同定する研究を進めて

いた。その過程で、インスリン/PI3 キナーゼ経路や哺乳類カルシネニンのホモログが線虫の学習に必須であることをみつけていた。

2. 研究の目的

学習記憶の分子機能の研究は盛んに研究がおこなわれているが、学習・記憶を担う分子群の全容が明らかになったとは言いがたい。その主たる理由は新規遺伝子を発見する手法が限られていることである。そこで、本研究ではモデル生物、線虫 *C. elegans* を用いて行動遺伝学のアプローチを主体とすることにより連合学習の分子機構を解明することを目的とした。線虫は塩類と飢餓を同時に体験すると、塩類を避けるようになるという学習を示す。これを塩走性学習という。すでに、インスリンシグナル伝達経路が塩走性学習に必須の働きをすることを明らかにしており、インスリン様蛋白質 *INS-1* が感覚神経 *ASER* に働くことが行動変化に重要であることを明らかにしていた。また、膜貫通蛋白質で、アルツハイマー病原因遺伝子 *APP* とともに複合体を作るカルシネニンの線虫ホモログ *CASY-1* も、塩走性学習を含む複数の行動可塑性に必要であることを見出していた。これらの分子経路と、それと関連する分子の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) インスリン経路の機能

インスリン *INS-1* がどの神経から分泌されるかを細胞特異的レスキュー実験により明らかにする。*INS-1* は多数の神経に発現しているため、この作業は多数のプロモーターを試したり発現量を変えてみるなど、慎重かつ広範に行う。働く細胞が決定されたら、インスリンの分泌制御機構を調べる。その神経にシナプス入力する神経の機能を調べるとともに、インスリンの分泌を可視化して定量化する。インスリン分泌の測定のためには、小胞から細胞外に分泌されると蛍光を発する *pHluorin* を *INS-1* と融合蛋白質の形にして行う。

(2) 神経細胞の出力のスイッチング機構

インスリン/PI3K経路とGq/DAG/PKC経路が拮抗的に働き、行動を逆転されることがわかっている。これらの経路が実際に何を制御するかが問題である。そこでインスリン経路が昂進した *daf-18* 変異体やGq経路が昂進した *egl-30 (gf)* 株をもとに、抑圧変異体を分離し、変異遺伝子を同定することにより下流の機構を明らかにする。

(3) カルシネニンホモログ *CASY-1* の作用機序

CASY-1 の細胞外ドメインが学習に必要であることが分かっているが、この部分が分子的にどのような働きを持つかは現在のところ不明である。そこで酵母ツーハイブリッド法を用いて *CASY-1* の細胞外ドメインと相互作用するタンパク質を発見し、膜貫通領域を持つものを優先的に解析する。

また、*easy-1* 変異体の抑圧変異体を分離し、これを解析することにより、原因遺伝子を特定し、細胞特異的レスキュー実験により作用する細胞を特定する。また、その分子機能を明らかにすることにより *CASY-1* がどのようなシグナル伝達系に働き学習を制御するか、さらにそれに関わる *easy-1* の機能ドメインはどこかを中心に、*CASY-1* の機能を解析する。

(4) 塩濃度依存性の解明

塩への化学走性が塩濃度の依存性を持つことが最近明らかになった。塩濃度の勾配を計算するシステムを構築し、行動をトラッキングシステムで定量化して塩濃度の違いで行動がどう変わるかを明らかにする。また、イメージング解析を行い、塩濃度の変化に感覚神経がどう応答するかを測定する。これらすべてについて、学習による変化を測定し、変異体解析からその変化の基盤となる分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) *DAF-18* PTENの機能と神経細胞の出力のスイッチング機構

通常の線虫は塩に寄っていくが、インスリン/PI3キナーゼ経路の機能が昂進した *daf-18* 変異体は塩を忌避する。平成21年度の研究で、*daf-18* の抑圧変異体として分離されていた *egl-30Gq* と *gcy-22* グアニル酸シクラーゼがどう関与するかを検討した。左右の *ASE* 味覚神経がどちらも *ASER* または *ASEL* として分化する各変異体を用いて調べたところ、*daf-18* 変異体では *ASER* 神経が忌避行動を引き起こしていることがわかった。一方、*gcy-22* 変異体では *ASER* 神経によるさまざまなイオンの受容能がほぼ失われていることが *Oliver Hobert* 研究室の *Chris Ortiz* らとの共同研究により明らかになり、*daf-18;gcy-22* 二重変異体は、*ASER* 神経が機能しないために *ASEL* の機能により塩へ誘引されることがわかった。また、*ASER* 神経でGq/DAG/nPKC経路が活性化されると無条件に (*daf-18* バックグラウンドでも) 塩に誘引されることがわかった。感覚繊毛が欠損する変異体で *ASER* だけの機能を回復させる実験により、誘引と忌避の切り替えの大部分は感覚神経として *ASER* 単独で起こるこ

とがわかった（発表論文⑧）。

(2) 左右の感覚神経の異なる機能の同定

線虫は餌のある状態で塩を経験すると塩に誘引される。しかし、餌のない状態で塩を経験すると塩を避けるようになる。平成22年度の研究で、塩への誘引において主に働く左右一対の感覚神経、ASELとASERの双方がこの行動可塑性にも寄与することがわかった。しかし、PI3キナーゼシグナル伝達経路が活性化すると、ASERが忌避行動を引き起こすがASELは依然誘引方向に寄与することがわかった。さらに、PI3キナーゼ経路が活性化した *daf-18PTEN* 変異の抑圧変異として分離された *Gqα egl-30* と受容体型グアニル酸シクラーゼ *gcy-22* の機能を調べたところ、*Gq*、ジアシルグリセロール、nPKCからなるDAG経路がASERの誘引行動を強めるが、ASELには影響せず、*Gcy-22* はASERでのみ働き誘引も忌避にも必要であることがわかった。左右の感覚神経が異なる分子機構で行動変化を引き起こすという興味深い知見となった（発表論文⑥）。

(3) 平成 22 年度に、トロント大学の Anthony Lin, Derek van der Kooy らと共同でインスリン経路の匂いへの応答の可塑性における機能を調べた。餌のない状態で匂い物質ベンズアルデヒドに曝されると線虫はベンズアルデヒドを忌避するようになる。インスリン/PI3キナーゼ経路はこの行動可塑性にも必要であった。インスリン経路は記憶の形成時に飢餓シグナルとして働くことが推定されているが、インスリン受容体 *daf-2* の温度感受性変異体を用いた温度シフト実験の結果、DAF-2 は記憶の形成に加え記憶の想起に重要な機能を持つことが明らかとなった（発表論文③）。

(4) インスリン/PI3K経路の機能

平成21年～23年にかけて、学習により神経の活動にどのような変化が出るかを調べた。線虫をPDMSチップに固定し、20mMのNaClを10分間流す前後で、NaClの濃度変化に対する神経の応答をカルシウムレポーターGCaMPを用いて、シナプス放出をSynapto-pHluorinを用いて調べた。この結果、NaClを受容するASER感覚神経の応答は学習により大きくなる一方、シナプス放出は小さくなることがわかった。これらいずれもインスリン経路の変異体では起こらないことから、インスリン経路の作用が両者を引き起こしていることがわかった。さらに、ASERから入力を受けるAIB介在神経の応答は学習により小さくなった。これが学習による行動変化の一因と思われる（発表論文①）。

(5) CASY-1の作用機序

哺乳類の記憶にも関わると示唆されている膜貫通蛋白質カルシンテニンの線虫ホモログCAS-1が塩走性学習に必須の働きをすることがわかっているが、その作用機序は不明であった。平成22～23年度に、*casy-1* 変異体の抑圧変異のスクリーニングを行ったところ、インスリン経路の *daf-18* 変異体が複数得られたため、*casy-1* とインスリン経路との関連が示唆された。ASER神経におけるインスリン受容体DAF-2の局在を調べてみたところ、DAF-2は神経の軸索に局在すること、*casy-1* 変異体ではこの局在が失われることがわかった。さらに、この局在がキネシンに依存することと、CAS-1がこの輸送を仲介しているらしいことが明らかになった（論文投稿中）。

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 10 件）

① Oda, S., Tomioka, M., and Iino, Y. Neuronal plasticity regulated by the insulin-like signaling pathway underlies salt chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*.

J Neurophysiol (査読有) VOL. 106 (2011) 301-308

DOI:10.1152/jn.01029.2010

② Iwata, R., Oda, S., Kunitomo, H., and Iino, Y.

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 (査読有) VOL. 108 (2011) 7589-7594

DOI:10.1073/pnas.1016232108

③ Lin, C.H.A., Tomioka, M., Pereira, S., Sellings, L., Iino, Y., and van der Kooy, D.

Insulin signaling plays a dual role in *Caenorhabditis elegans* memory acquisition and memory retrieval.

Journal of Neuroscience (査読有) 30 (2010) 8001-8011

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4636-09.2010

④ Kimura, Y., Kurabe, N., Ikegami, K., Tsutsumi, K., Konishi, Y., Kaplan, O.I., Kunitomo, H., Iino, Y., Blacque, O.E., and Setou, M.

Identification of tubulin deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and mammalian cytosolic carboxypeptidases (CCPs).

J Biol Chem. (査読有) 285 (2010)
22934-22939
DOI:10.1074/jbc.C110.128280

⑤ Yamada, K., Hirotsu, T., Matsuki, M., Butcher, R.A., Tomioka, M., Ishihara, T., Clardy, J., Kunitomo, H., and Iino, Y.
Olfactory plasticity is regulated by pheromonal signaling in *Caenorhabditis elegans*.
Science (査読有) 329(2010)1647-1650
DOI:10.1126/science.1192020

⑥ Adachi, T., Kunitomo, H., Tomioka, M., Ohno, H., Okochi, Y., Mori, I., and Iino, Y.
Reversal of Salt Preference Is Directed by the Insulin/PI3K and Gq/PKC Signaling in *Caenorhabditis elegans*.
Genetics (査読有) 186(2010)1309-1319
DOI:10.1534/genetics.110.119768

⑦ Shinkai, Y., Yamamoto, Y., Fujiwara, M., Tabata, T., Murayama, T., Hirotsu, T., Ikeda, D.D., Tsunozaki, M., Iino, Y., Bargmann, C.I., Katsura, I., and Ishihara, T.,
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 (査読有) 31(2011)3007-3015
DOI:10.1523/JNEUROSCI.4691-10.2011

⑧ Ortiz, C.O., Faumont, S., Takayama, J., Ahmed, H.K., Goldsmith, A.D., Pocock, R., McCormick, K.E., Kunitomo, H., Iino, Y., Lockery, S., et al.
Lateralized gustatory behavior of *C. elegans* is controlled by specific receptor-type guanylyl cyclases.,
Current Biology (査読有) 19(2009) 996-1004
DOI:10.1016/j.cub.2009.05.043

⑨ Hayashi, Y., Hirotsu, T., Iwata, R., Kage-Nakadai, E., Kunitomo, H., Ishihara, T., Iino, Y., and Kubo, T.
A trophic role for Wnt-Ror kinase signaling during developmental pruning in *Caenorhabditis elegans*.
Nature Neuroscience(査読有)12 (2009)981-987
DOI:10.1038/nn.2347

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

(2010)131-142
DOI:10.1093/nar/gkp868

[学会発表] (計 21 件)

① 飯野 雄一, Sensing Salt: Plasticity in Sensory Systems and Behavioral Response, 18th international C. elegans meeting (招待講演), 2011年6月24日, ロサンゼルス

② 小田 茂和, Dynamics of neural activities underlying salt chemotaxis learning in *C. elegans*., 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13日, 横浜

③ 田村 成宏, プロテインキナーゼCによる線虫の塩濃度学習の制御機構の解析, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13日, 横浜

④ 酒井 奈緒子, Analyses of molecular mechanisms of information integration in food-dependent salt chemotaxis learning in *C. elegans*., 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13日, 横浜

⑤ 富岡 征大, The role of insulin/PI3-kinase pathway in food-dependent plasticity of salt chemotaxis in *C. elegans*., Neuroscience 2011, SfN's 41st annual meeting, 2011年11月16日, ワシントンDC

⑥ 大野 速雄, Axonal transport of a new DAF-2 isoform governs associative learning., 18th international C. elegans meeting, 2011年6月24日, ロサンゼルス

⑦ 飯野 雄一, Molecular pathways and neural circuit that underlie the plasticity of salt chemotaxis in *C. elegans*., BMB2010 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月8日, 神戸・神戸ポートアイランド

⑧ 富岡 征大, 線虫 *C. elegans* の学習を制御するインスリン様シグナル伝達経路の役割, 第81回 日本動物学会大会, 2010年9月24日, 東京・東京大学教養学部

⑨ 飯野 雄一, Pheromonal interactions modulate behavioral plasticity in *C. elegans*., 4th East Asia C. elegans Meeting, 2010年7月14日, 東京・オリンピック記念青少年総合センター

⑩ 岩田 遼, Synaptic regulation of DAG and phosphoinositides by M01F1.7, the conserved phosphatidylinositol transfer protein., 4th East Asia C. elegans Meeting, 2010年7月12日, 東京・オリンピック記念青少年総合センター

⑪ 大野 速雄, *C. elegans* has a memory for NaCl concentrations., 4th East Asia C. elegans Meeting, 2010年7月13日, 東京・オリンピック記念青少年総合センター

⑫吉田 和史, Neural and behavioral mechanisms of response to an odorant depending on its concentration., 4th East Asia C. elegans Meeting, 2010年7月13日, 東京・オリンピック記念青少年総合センター

⑬飯野 雄一, Ascaroside pheromones regulate olfactory plasticity through the SNT-1 peptide., Neuronal Development, Synaptic Function & Behavior C. elegans Topic Meeting 2010, 2010年6月29日, マディソン, U.S.A.

⑭吉田 和史, Neural and behavioral mechanisms of response to an odorant depending on its concentration., Neuronal Development, Synaptic Function & Behavior C. elegans Topic Meeting 2010, 2010年6月29日, マディソン, U.S.A.

⑮小田 茂和, Dynamics of neural circuit underlying salt chemotaxis learning in C. elegans., Neuronal Development, Synaptic Function & Behavior C. elegans Topic Meeting 2010, 2010年6月29日, マディソン, U.S.A.

⑯富岡 征大, The role of INS-1, an insulin-like peptide, in salt chemotaxis learning., Neuronal Development, Synaptic Function & Behavior C. elegans Topic Meeting 2010, 2010年6月29日, マディソン, U.S.A.

⑰安達健 他, 線虫 *C. elegans* の味覚神経ASERによる塩走性学習の制御とその分子メカニズム, 第32回日本分子生物学会年会, 平成21年12月13日, 横浜

⑱富岡征大 他, 線虫 *C. elegans* の塩走性学習におけるインスリン様ペプチドINS-1の分泌の役割, 第32回日本分子生物学会年会, 平成21年12月11日, 横浜

⑲國友博文 他, *C. elegans* の塩走性行動の制御機構の解明, 第32回日本分子生物学会年会, 平成21年12月11日, 横浜

⑳小野寺馨 他, Strength of salt chemotaxis learning intensity and retention of sensory signaling of memory in *Caenorhabditis elegans*, 第32回日本分子生物学会年会, 平成21年12月9日, 横浜

㉑富岡征大 他, Dopamine-dependent secretion of INS-1, an insulin-like peptide, regulates salt chemotaxis learning in *C. elegans*. 第32回日本神経科学大会, 平成21年9月16日, 名古屋

㉒Hirofumi Kunitomo 他, A combination of salt and food conditions in t

he habitat affects preference for salt in *C. elegans*. 17th International C. elegans Meeting, 平成21年6月27日, ロサンジェルス

[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

なし

(3) 連携研究者

なし