

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430007

研究課題名(和文) 感覚刺激強度の記憶と行動選択の分子・神経機構の解明

研究課題名(英文) Molecular and neural mechanisms for a memory of sensory stimulus and behavioral choice

研究代表者

國友 博文 (KUNITOMO, Hirofumi)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：20302812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：学習は動物が環境に適応し生存競争を勝ち抜くために必須な能力であり、比較的単純な神経系をもつ動物にも備わっている。土壌線虫C.エレガンスは過去に餌を経験した塩濃度に向かい飢餓を経験した塩濃度を避ける。この味覚学習に必要な遺伝子と神経回路のはたらきを調べた。その結果、味覚神経と一次介在神経の間のシナプス伝達が経験に依存して変化し、このシナプス可塑性はグルタミン酸を介した神経伝達の符号が反転することによって生じることが明らかになった。また3種類ある一次介在神経は一部重複する機能をもちながらそれぞれ特定の条件で強く塩走性に寄与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Learning ability is essential for animals to better adapt and survive in variable environment, and such ability is implemented even in animals with simple neural circuit. Salt chemotaxis of the soil nematode *Caenorhabditis elegans* is a memory-dependent navigation behavior: animals are attracted to the salt concentration at which they have been fed, whereas they avoid it if they have been starved. We characterized the genes and neural mechanisms required for this learning. Synaptic transmission from the taste receptor neuron ASER to a pair of interneurons AIB has been implicated as the site of modulation in salt chemotaxis learning. We here revealed that the sign of synaptic transmission reverses according to salt experience, which might generate migration toward opposite directions on the salt gradient. Both excitatory and inhibitory transmissions were at least partially glutamatergic and dependent on EAT-4 (VGLUT) that act in ASER and GLR-1 (AMPA receptor) in AIB.

研究分野：神経科学

キーワード：記憶と学習 線虫 走化性 シナプス可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

記憶と学習のメカニズムの解明は神経科学の重要な課題の一つである。哺乳類の海馬を用いた研究により、シナプス可塑性の分子・細胞レベルでの理解は格段に進んだ。またショウジョウバエや線虫などのモデル生物を用いた研究も進展が著しく、記憶・学習に関わる新規分子が次々に見出された。

一方、神経回路に生じた生理的な変化、すなわち記憶が、いかに行動を調節するか証明することは困難であった。しかし近年、光遺伝学的手法を用いて特定の神経細胞の活動を人為的に操作できるようになり、記憶が神経回路のどこにあるのか、また神経回路の動作のいかなる変化が行動を制御しているのか検証できるようになった。さらに、シナプスではたらく分子を任意のタイミングで、しかも特定の細胞のみで機能調節する手法も開発され、記憶と学習の仕組みを神経回路レベルで解析することが可能となった。

線虫 *C.エレガンス* は接続が完全にわかっているシンプルな神経系をもち定量に適した種々の行動を示すことから、神経回路の動作と行動との関係を調べるのに適したモデル生物である。塩化ナトリウムの濃度勾配上に置かれると、線虫は餌を経験した塩濃度に向かい飢餓を経験した塩濃度を避けるように移動する。餌と塩濃度いずれの条件を変更しても行動が変化することから、線虫の塩走性は餌の有無と塩濃度を関連付けて記憶する連合学習と考えられる(塩走性学習)。本研究では線虫の塩走性学習を記憶と学習のモデルとして、味覚刺激の強度が記憶される分子機構、およびその記憶に基づいて適応行動が生じる神経機構の解明に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

動物にとって、経験した感覚刺激の強さを記憶することは、刺激に対する応答性を維持すると共に環境の変化にうまく適応するために必須な能力である。しかし、神経系が感覚刺激の強度を記憶する分子機構は良くわかっていない。また学習の前後では同じ感覚刺激に対して異なる行動が観察されるようになる。記憶に基づく適応行動の生成機構について、分子・細胞レベルの理解は十分ではない。本研究はこれらの点を明らかにすることを目的とした。

線虫の塩走性学習の分子・神経機構に関して、以下のことが既にわかっていた。餌を経験した塩濃度に向かう走性には、個体の頭部にある1個の味覚神経 ASER からの塩情報の入力が必要十分である。ASER と一次介在神経 AIB の間のシナプス伝達の可塑性が行動を変化させる原因のひとつである。味覚神経におけるジアシルグリセロール(DAG)シグナル伝達経路の活性が高いと線虫は高い塩濃度に向かい、その活性が低いと低い塩濃度に向かって移動する。

塩走性学習の機構について未解明の問題のひとつは、ASER 神経への塩情報の入力が行動を変化させる機構である。線虫は低塩濃度飼育後は塩濃度勾配を下り、高塩濃度飼育後にはそれを上る。線虫はこのとき、濃度の経時変化に応じて方向転換の頻度を調節して進路を決定する(この行動戦略はクリノキネシスと呼ばれる)。ASER は環境の塩濃度の変化に計量的に応答し、塩濃度が上昇すると過分極、濃度が低下すると脱分極する。従って、低塩濃度飼育後は ASER が塩濃度の上昇を感知して過分極すると方向転換が促進され、逆に高塩濃度飼育後には ASER が塩濃度の低下を感知して脱分極すると方向転換する仕組みが必要となる。つまり、飼育塩濃度の高低に依存して ASER からの情報の価値が反転しなければならない。神経活動と行動の同時記録によりこの神経機構について検討した。

次に、塩濃度を記憶する機構が不明であった。ASER 細胞内の DAG シグナル伝達経路の活性が塩濃度勾配上の移動方向を決定することから、飼育塩濃度と現在の塩濃度の差が ASER における DAG レベルに反映されている可能性が示唆されていた。連携研究者らは、遺伝子コード型 DAG インジケータを用いてこれを確かめた。

記憶と学習に必要な新規遺伝子を探索するため塩走性学習変異体をスクリーニングし、複数の変異体を得ていた。それらの原因遺伝子を同定し機能解明を進めた。

## 3. 研究の方法

### (1) シナプス可塑性の機構の解明

ASER の神経応答が経験塩濃度に依存して逆方向への移動を生じる神経伝回路構を明らかにするため、ASER および介在神経の神経活動と方向転換行動との関係を調べた。

神経活動の観察には遺伝子コード型カルシウムインジケータを用いた。自由に行動している線虫に任意の環境刺激を与えることができる微小流路アリーナに個体を挿入し、トラッキングシステムを備えた顕微鏡下で神経活動を観察した。トラッキングシステムは赤外光によって線虫頭部の動きをモニターし、その移動をキャンセルするようにステージを動かして観察対象を視野の中心に保持する。記録されたステージの移動度から線虫の移動速度等を算出した。異なる塩濃度で飼育した個体に塩濃度上昇、または塩濃度低下の刺激を与え、行動と神経活動を同時に記録した。神経伝達に関与する遺伝子の変異体を用いて同様の実験を行い、シナプス可塑性の分子機構を検討した。

### (2) 介在神経の役割の解明

ASER はおもに3種類の介在神経、AIA、AIB、および AIY にシナプス接続している。これらの役割を明らかにするため、それぞれ

を個別に、または組み合わせて破壊した個体の塩走性を観察した。細胞破壊は、細胞特異的プロモーターでカスパーゼを発現させることにより細胞死を誘導した。トラッキングシステムを用いて野生型および神経破壊株の行動を観察し、行動のパラメータを比較した。

### (3) 感覚刺激の強度を記憶する分子機構

ASER 細胞内の DAG レベルが塩濃度の履歴を反映している可能性を検討するため、遺伝子コード型 DAG インジケーター Downward DAG2 を用いて ASER の DAG レベルを測定した。DAG の生合成に関わる遺伝子や塩走性学習に必要な遺伝子の変異体を用いて DAG レベルへの影響を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) ASER-AIB 間の神経伝達可塑性の機構

線虫が餌を経験した塩濃度に向かう行動には、ASER からの塩情報の入力が必要十分である。上述したように、ASER は飼育時の環境によらず塩濃度が低下すると脱分極する。線虫はこの味覚神経の応答でいかに塩濃度勾配を上ったり下ったりできるのだろうか。ASER から AIB への神経伝達の可塑性が行動の変化に関わることが示唆されていたが、その機構は十分には明らかになっていなかった。そこで、自由に行動している線虫に塩濃度変化の刺激を与えて行動と神経活動を同時に計測し、ASER および AIB の神経活動と個体の行動との関係を調べた。

餌を経験した塩濃度から遠ざかるような濃度変化刺激を与えると、線虫の方向転換頻度が上昇した。このとき、ASER の活動は感覚入力と、AIB の活動は行動出力とそれぞれ良く相関し、両者間の接続関係は高塩濃度飼育後は興奮性、低塩濃度飼育後には抑制性であることが明らかになった。

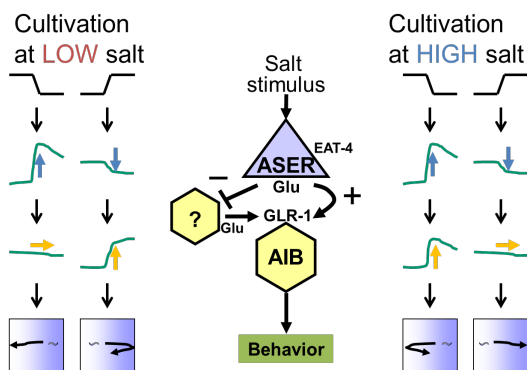


図1 ASER-AIB 間のシナプス可塑性

ASER と AIB の間のシナプス接続は高塩濃度飼育後には興奮性、低塩濃度飼育後には抑制性であることが明らかになった。いずれの伝達にも ASER からのグルタミン酸放出と AIB の AMPA 受容体に関与する。両神経の接続はポリシナプティックな可能性も考えられる。

また変異体の観察および細胞特異的な機能回復実験から、ASER と AIB のシナプス伝達はグルタミン酸によって担われており、ASER における小胞性グルタミン酸トランスポーター-EAT-4、および AIB における AMPA 型グルタミン酸受容体 GLR-1 のはたらきが興奮性、抑制性どちらの伝達にも寄与することが示唆された(図1)。

学習に伴い極性が逆転する神経接続を細胞レベルで同定した例はほとんどない。また興奮性のグルタミン酸伝達に必要なとされる因子が抑制性の伝達に関与する点も興味深い。このシナプス可塑性の機構を分子レベルで明らかにしたい。

### (2) 介在神経の役割の解明

上記(1)の結果から、ASER から AIB へのシナプス伝達の可塑性が経験に依存した行動の変化を引き起こすことが示唆された。また他の介在神経、AIY や AIZ も塩応答を示し、その大きさは飼育塩濃度に依存して変化することが明らかになった(佐藤、Mabardi、飯野ら、未発表)。

塩走性における介在神経の役割について調べるため、AIA、AIB、AIY それぞれを個別に、または組み合わせて破壊した個体の行動を調べた。その結果、AIY は低塩濃度への走性、AIA は高塩濃度への走性に必須な役割をもつことが明らかになった。また AIB は他の介在神経と協調して高塩、低塩両方向への走性に寄与した。従って、塩の情報処理において、3種の介在神経はある程度役割分担をしながら並列してはたらき塩走性を制御していることが示された(図2)。

塩濃度勾配上の行動を分析しクリノキネシスへの影響を調べた。AIA は高塩濃度飼育後に塩濃度の低下に応じて方向転換の頻度を上げる制御に、一方 AIY は低塩濃度飼育後に塩濃度の低下に応じて方向転換の頻度を下げる制御にそれぞれ必要なことがわかつ

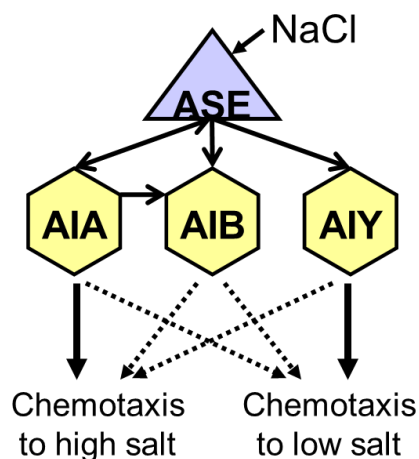


図2 塩走性における介在神経の寄与

AIA は高塩濃度への走性、AIY は低塩濃度への走性にそれぞれ必要であり、逆方向の走性にも寄与する。AIB は他の介在神経と協調して両方向の走性に寄与する。

た。これより、AIA と AIY はいずれも塩濃度の低下に応じた行動の制御に関与するが、異なる条件で塩情報を伝えて進路決定にはたらくことが示唆された。

(3) 味覚神経の DAG レベルは経験塩濃度の履歴を反映する

ASER の DAG レベルは神経応答に依存して変化し、塩濃度の低下により DAG レベルが上昇、塩濃度の上昇により DAG レベルは低下した。ホスホリパーゼ C- $\gamma$  やジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) の変異体では DAG レベルの変化が抑制され、これらの DAG 生合成・分解因子が塩濃度に依存した ASER の DAG レベルの変化に関与することが明らかになった。

以上の結果は、塩濃度の変化が DAG レベルに変換されて ASER 味覚神経に記憶されていることを示すと同時に、ASER における DAG シグナル経路の活性が塩濃度勾配上の移動方向を決定するという知見をうまく説明できる。すなわち、ASER が塩濃度の低下を感知して脱分極すると ASER 内の DAG レベルが上昇し、塩濃度勾配を上る行動が誘導される。塩濃度の上昇を感知した場合はこの逆である。DAG は UNC-13 や PKC に作用して小胞の放出を促進することから、ASER の出力制御によって移動方向が決定されていることが示唆される。これは神経系が感覚刺激の強度を記憶する分子機構を示したインパクトのある研究成果である (雑誌論文)

(4) 塩走性学習に必要な新規遺伝子の探索と機能解析

学習に関わる新規遺伝子を探索するため、塩走性に欠損を示す変異体を単離し原因遺伝子を同定した。その結果、CLC 型クロライドチャンネルをコードする *clh-1* と DGK をコードする *dgk-1* が塩走性に必要なことが明らかになった。組織特異的機能回復実験から、*clh-1* と *dgk-1* はいずれも ASER で機能することが示唆された。

CIC チャンネルは種を越えて広く保存されており、CLH-1 と相同性を示す哺乳類の CIC-2 は、膜電位を過分極させ神経細胞の興奮を抑制することが示されている。興味深いことに、CLH-1 の機能が喪失する欠失変異体では、塩走性の異常は見られなかった。また遺伝学的解析の結果、変異アリルは野生型アリルに対して劣性であった。これらの結果は、ミスセンス変異を持つ CLH-1 は野生型とは性質の異なるチャンネルを形成し、野生型分子の存在下ではその性質が現れないことを示唆する。CIC チャンネルは 2 量体を形成するため、ミスセンス型分子がホモ 2 量体となったときのみ変異型の性質を示す可能性が考えられる。

DGK は DAG をリン酸化して PA に変換することにより DAG シグナルを負に制御する。ASER の DAG シグナル経路を活性化すると

AIB へのシナプス伝達が亢進することがわかっている。*dgk-1* 変異体は野生型に比べ高塩濃度への走性を示し、その表現型は ASER で正常な *dgk-1* を発現させることにより部分的に回復した。これより、ASER における DAG シグナルの亢進が変異体の表現型の原因であると推察された。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 5 件)

Dynamics of Presynaptic Diacylglycerol in a Sensory Neuron Encode Differences between Past and Current Stimulus Intensity.

Ohno H, Sakai N, Adachi T, Iino Y.

*Cell Rep.* 20(10):2294-2303 (2017).

doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.038. 査読有

A Gustatory Neural Circuit of *Caenorhabditis elegans* Generates Memory-Dependent Behaviors in Na+ Chemotaxis.

Wang L, Sato H, Satoh Y, Tomioka M, Kunitomo H, Iino Y.

*J Neurosci.* 37(8):2097-2111 (2017).

doi:

10.1523/JNEUROSCI.1774-16.2017.

査読有

Regulation of experience-dependent bidirectional chemotaxis by a neural circuit switch in *Caenorhabditis elegans*.

Satoh Y, Sato H, Kunitomo H, Fei X, Hashimoto K, Iino Y.

*J Neurosci.* 34(47):15631-7 (2014).

doi:

10.1523/JNEUROSCI.1757-14.2014.

査読有

Role of synaptic phosphatidylinositol 3-kinase in a behavioral learning response in *C. elegans*.

Ohno H, Kato S, Naito Y, Kunitomo H, Tomioka M, Iino Y.

*Science.* 345(6194):313-7 (2014).

doi: 10.1126/science.1250709. 査読有

(学会発表) (計 25 件)

Roles of the CLC chloride channel *clh-1* in food-associated salt chemotaxis learning of *Caenorhabditis elegans*.

ChanHyun Park, Yuki Sakurai, Yuichi Iino, Hirofumi Kunitomo

21st International *C. elegans* Meeting (2017)

A gustatory neural circuit for experience-dependent behavioral plasticity.

Hirofumi Sato, Hirofumi Kunitomo, Xianfeng Fei, Koichi Hashimoto, Yuichi

Iino

21st International *C. elegans* Meeting  
(2017)

Roles of primary interneurons that  
regulate memory-dependent salt  
concentration chemotaxis in *C.*  
*elegans*.

Hirofumi Kunitomo, Hirofumi Sato,  
Yuichi Iino

第 40 回 日本神経科学大会 (2017)

線虫 *C. エレガンス* の塩濃度の記憶と走  
化性の分子・神経機構

國友博文、佐藤博文、飯野雄一

次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウ  
ム (2017)

ほか

〔その他〕

ホームページ：

[http://molecular-ethology.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/IINO\\_lab\\_J.html](http://molecular-ethology.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/IINO_lab_J.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

國友 博文 (KUNITOMO, Hirofumi)  
東京大学・大学院理学系研究科・准教授  
研究者番号：20302812

(3)連携研究者

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

(4)研究協力者

佐藤 博文 (SATO, Hirofumi)  
東京大学・大学院理学系研究科・研究員

朴 燦賢 (PARK, ChanH)  
東京大学・大学院理学系研究科・大学院生