

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870266

研究課題名(和文)線虫*C. elegans*における記憶の更新に関する分子および神経回路の解析研究課題名(英文)Molecular and neural bases of memory updating in *C. elegans*

研究代表者

青木 一郎 (Aoki, Ichiro)

名古屋大学・理学研究科・研究員

研究者番号：60725258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：絶えず変動する環境において動物が生存するためには、適切なタイミングで記憶を更新し、行動を変化させることが重要である。記憶の更新を制御する分子・神経基盤を解明するために、本研究では線虫*C. elegans*の温度走性行動の可塑性をモデルとして順遺伝学的スクリーニングを行ったところ、ヒトのてんかんに関するカリウムチャンネルSL0-2が記憶更新の速度を調節することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Updating memory and changing behavior at the right time is crucial for animals to survive in constantly fluctuating environments. In order to elucidate molecular and neural mechanisms underlying memory updating, a forward genetic screen was performed on plasticity of thermotaxis behavior of *C. elegans*. SL0-2, a potassium channel involved in a pathogenesis of several types of epilepsies, was found to regulate the speed of memory updating.

研究分野：分子神経生物学

キーワード： *C. elegans* 温度走性行動 記憶 カリウムチャンネル CNGチャンネル BKチャンネル 神経回路  
てんかん

### 1. 研究開始当初の背景

絶えず変動する環境において動物が生存するためには、適切なタイミングで記憶を更新し、行動を変化させることが重要である。しかしながら、記憶の更新を神経系がどのように制御するか、あるいはどのような分子が記憶の更新に関与するかはほとんど未解明であった。

研究代表者は記憶の更新を制御する分子・神経基盤を明らかにするために、線虫 *C. elegans* の温度走性行動の可塑性をモデルとして順遺伝学的スクリーニングを行うことにした。線虫の温度走性行動とは、線虫が飼育温度と餌の存在を関連付けて、餌のない温度勾配上において過去の飼育温度へと移動する行動のことである (Hedgecock and Russel, PNAS, 1975)。飼育温度を変化させると数時間で線虫の嗜好する温度が変化する (Hedgecock and Russel, PNAS, 1975)。線虫の温度走性はわずか 5 組のニューロンから構成される非常にシンプルな神経回路によって制御されるため (Mori and Ohshima, Nature, 1995; Kuhara et al., Science, 2008, 図 1)、神経回路による行動制御のメカニズムを解明するのに最適なシステムだと考えられる。また、線虫の神経系はわずか 302 個の同定可能なニューロンから構成されており、かつニューロン間の全接続(コネクトーム)が電子顕微鏡による解析から既に明らかになっている (White et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci., 1986)。線虫は、感覚入力から行動出力に至るまでの神経系による情報伝達を可視化し、神経系を構成する個々の細胞の振る舞いと個体の行動を統合して解析・記述することが可能な、現時点では唯一のモデル生物である。

温度走性を規定する神経回路を構成するニューロンのうち、AFD は主要な温度感覚ニューロンである。また、AFD は環境温度を感知するのみならず、過去の飼育温度を記憶することが分かってきた。カルシウムイメージングによると、AFD は飼育温度付近における温度上昇に応じてカルシウム濃度を上昇させる (Kimura et al., Curr. Biol., 2004)。さらに、飼育温度の変化に伴って AFD の反応開始温度が変化する (Biron et al., Nat. Neurosci., 2006; Kobayashi et al., Cell Rep., 2015)。つまり、AFD は記憶した過去の飼育温度と現在の温度の比較、温度情報の時間微分、および環境温度の変化の検知を行っていると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、記憶の更新を制御する分子・神経基盤を、線虫 *C. elegans* の温度走性行動の

可塑性をモデルとした順遺伝学的スクリーニングから明らかにすることを目的とした。スクリーニングから記憶の更新に関与する分子を多数同定すれば、記憶を担う分子の実態に迫れると考えられる。

### 3. 研究の方法

線虫を ethyl methanesulfonate (EMS) で処理することにより、ゲノムにランダムな変異導入を行った。線虫の飼育温度を低温(17°C)から高温(23°C)に変化させた際に、行動の変化が遅くなる変異株を単離した。単離された変異株において、行動変化が遅い表現型の原因遺伝子を、ポジショナルクローニングと全ゲノム配列の解読を組み合わせることで同定した。原因遺伝子がどの細胞において作用するかを、細胞特異的に原因遺伝子を発現することで同定した。さらに、原因遺伝子の作用部位であった、温度感覚ニューロン AFD の温度刺激に対する応答を、カルシウムイメージングによって観察した。

### 4. 研究成果

飼育温度を低温(17°C)から高温(23°C)に変化させた際に、行動の変化が遅くなる変異株を単離する順遺伝学的スクリーニングから、BK タイプのカリウムチャンネルをコードする *slo-2* 遺伝子の機能獲得(gf)変異が線虫の行動変化を著しく遅延させることを見出した(図 2 ■)。逆に、*slo-2* とともに、もう一つの BK カリウムチャンネルをコードする *slo-1* を欠損する二重変異株では、行動変化が速くなった。

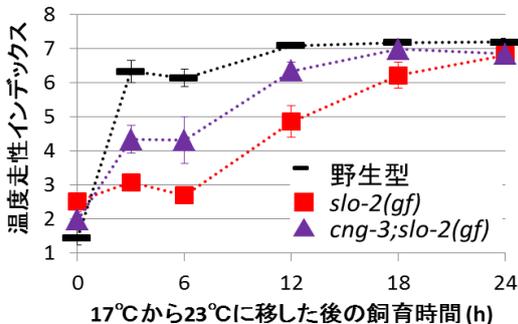


図 2 *slo-2(gf)* 株は飼育温度変化時の行動変化が遅い。*cng-3* の変異は *slo-2(gf)* 株の異常を部分的に抑圧する。

遺伝学的な結果と一致して、変異体の SLO-2 チャンネルが野生型よりも大きいコンダクタンスを持つことを、生理学研究所・久保義弘研究室との共同研究による電気生理学的な解析から明らかにした。

また、*slo-2* と機能的に相互作用する因子を同定するために、抑圧変異株の同定を行った。*slo-2(gf)* 変異株に対して EMS による変異導入を行い、*slo-2(gf)* 変異株の“飼育温度変化に伴う行動変化が遅い”表現型が抑圧される変異株を単離した。抑圧の原因遺伝子は環状ヌクレオチド作動性(cyclic nucleotide-gated, CNG)チャンネルをコードする *cng-3* であった(図 2 ▲)。

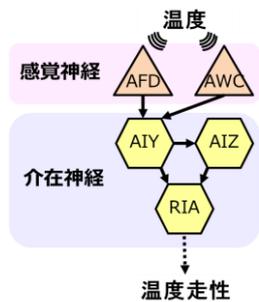


図 1 線虫の温度走性に必要な神経回路

SLO-2 チャンネルは線虫の神経系と筋肉に広く発現している。*slo-2* がどの細胞において作用するかを調べるために、野生型の線虫において細胞特異的に機能獲得型の *slo-2* を発現したところ、主要な温度感覚ニューロンである AFD において *slo-2* を発現させると、飼育温度変化に伴う行動変化が遅くなった。*cng-3; slo-2gf* 二重変異株において *cng-3* を細胞特異的に発現させる実験から、*cng-3* に関しても AFD において作用することが分かった。

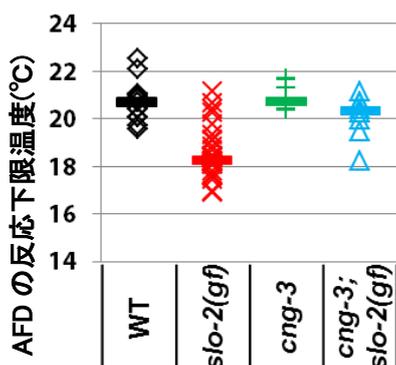


図 3 17°Cから 23°Cへ移動後 3 時間での AFD の反応下限温度

そこで、飼育温度を 17°Cから 23°Cにシフトさせた時の、AFD の温度上昇刺激に対する応答を、カルシウムイメージングによって、野生株と *slo-2(gf)* 株で比較した。その結果、野生型では、温度飼育変化後 3 時間で、新しく記憶された飼育温度付近で細胞内カルシウム濃度の上昇が見られたのに対し、*slo-2(gf)* 株では、より低い温度でカルシウム応答が開始した(図 3)。したがって、*slo-2(gf)* 株で見られた飼育温度変化時の行動変化の遅延は、AFD の温度記憶の更新の遅延に起因する可能性が示唆された。また、*cng-3* 遺伝子の変異は、*slo-2(gf)* 株が示す学習遅延のみならず、AFD がカルシウム応答する下限温度の変化の遅延をも抑圧することがわかった(図 3)。

以上の結果から SLO-1 および SLO-2 カリウムチャンネルと CNG-3 チャンネルは、温度感覚ニューロン AFD において協働して、AFD の温度記憶の更新を遅くすることで、温度変化と行動変化の間にタイムラグを生み出していることが示唆された(図 4)。

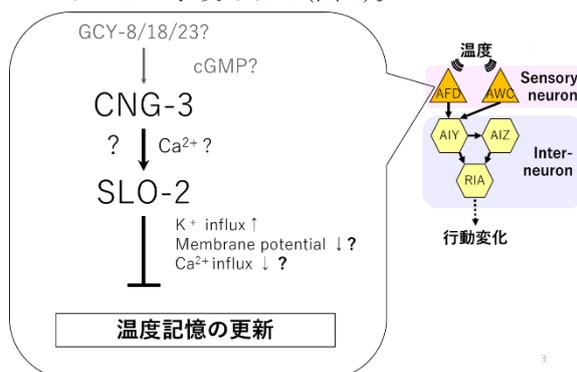


図 4 モデル

興味深いことに、SLO-2 のヒトホモログである KCNT1/Slack の機能獲得変異が、てんかんの一種である“乳児悪性焦点移動性部分発作(malignant migrating partial seizures of infancy (MMPSI))”および“常染色体優性夜間前頭葉てんかん (autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE))”の原因となっていることが近年報告された (Barcia et al., Nat. Neurosci., 2012; Heron et al., Nat. Neurosci., 2012)。てんかん患者で見られる KCNT1 の点変異を線虫 SLO-2 における相同なアミノ酸に導入し、線虫の AFD に発現させたところ、一部の変異体に関して、野生型の SLO-2 に比べて、より行動変化を遅延させる効果が観察された。この結果は、てんかんと線虫の温度記憶学習の遅延には、共通の分子メカニズムが存在する可能性を示している。*slo-2(gf)* 株の線虫をモデル系として、抗てんかん薬のスクリーニングを行ったり、さらなる抑圧変異株の単離から新たな薬剤標的を見出したりすることが可能であると考えられる。

#### 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 1 件)

1. Ichiro Aoki and Ikue Mori  
Molecular biology of thermosensory transduction in *C. elegans*  
Current Opinion in Neurobiology  
査読あり  
34(2015)117-124  
DOI: 10.1016/j.conb.2015.03.011

[学会発表] (計 9 件)

1. Ichiro Aoki, Michihiro Tateyama, Takushi Shimomura, Kunio Ihara, Yoshihiro Kubo and Ikue Mori  
BK potassium channels regulate learning speed in *C. elegans*  
第 40 回日本神経科学大会  
2017 年 7 月 20 日-23 日  
幕張メッセ
2. Ichiro Aoki, Michihiro Tateyama, Takushi Shimomura, Kunio Ihara, Yoshihiro Kubo and Ikue Mori  
BK potassium channels regulate learning speed in *C. elegans*  
21<sup>st</sup> International *C. elegans* Meeting  
2017 年 6 月 21 日-25 日  
Los Angeles
3. Ichiro Aoki, Michihiro Tateyama, Takushi Shimomura, Kunio Ihara and Ikue Mori  
Epilepsy-related mutations in SLO-2 K+ channel slow down learning speed in *C. elegans*

‘Towards elucidation of memory engram’  
NIPS International Workshop 2016  
2016年12月5日  
生理学研究所(岡崎)

4. Ichiro Aoki, Kunio Ihara and Ikue Mori  
Epilepsy-related mutations in SLO-2 BK  
potassium channel slow down a behavior  
change in *C. elegans*  
2016年線虫神経生物学国際集会(CeNeuro)名  
古屋大学神経回路国際シンポジウム(Nagoya  
BNC)合同集会  
2016年7月27日  
名古屋大学

5. Ichiro Aoki, Kunio Ihara and Ikue Mori  
Memory updating in *Caenorhabditis elegans*  
第38回日本神経科学大会  
2015年7月28日-31日  
神戸国際会議場

6. Ichiro Aoki, Kunio Ihara and Ikue Mori  
Memory updating in *Caenorhabditis elegans*  
Cutting-edge approaches towards the  
functioning mechanisms of membrane  
proteins, The 45th NIPS International  
Symposium Co-sponsored by The Journal of  
Physiology  
2014年11月25日-28日  
生理学研究所(岡崎)

7. Ichiro Aoki, Kunio Ihara and Ikue Mori  
Memory updating in *Caenorhabditis elegans*  
第37回日本神経科学大会  
2014年9月11日-13日  
パシフィコ横浜

8. Ichiro Aoki, Kunio Ihara and Ikue Mori  
Memory updating in *Caenorhabditis elegans*  
2nd Nagoya International Symposium on  
Neural Circuit  
2014年9月9日-10日  
名古屋大学

9. Ichiro Aoki, Kunio Ihara and Ikue Mori  
Memory updating in *Caenorhabditis elegans*  
11th International Congress of Neuroethology  
and 36th Annual Meeting of The Japanese  
Society for Comparative Physiology and  
Biochemistry  
2014年7月28日-8月2日  
札幌コンベンションセンター

〔図書〕(計 1件)

1. Ichiro Aoki, Shunji Nakano and Ikue Mori  
Elsevier  
Learning and Memory; A Comprehensive  
Reference 2<sup>nd</sup> Edition  
“Molecular Mechanisms of Learning in  
*Caenorhabditis elegans*”

2017年  
印刷中

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://elegans.bio.nagoya-u.ac.jp/~lab/>  
<http://researchmap.jp/i.elegans/>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
青木 一郎 (AOKI, Ichiro)  
名古屋大学・大学院理学研究科・研究員  
研究者番号：60725258