

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22123010

研究課題名（和文）行動を制御する神経コードの分子レベルでの解読

研究課題名（英文）Deciphering neural codes underlying behavioral regulation

研究代表者

森 郁恵 (Mori, Ikue)

名古屋大学・理学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：90219999

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 74,900,000 円

研究成果の概要（和文）：線虫温度走性を司る神経回路をモデル回路とし、行動を制御する神経コードの分子レベルでの解読を目指した。AFD感覚ニューロンは、飼育温度を受容し、温度を記憶すること、そして、その記憶はCaMKIとrafの活性によって制御されることがわかった。AFDから温度情報が伝達されるAIY介在ニューロンと、AIYの下流に存在し、頭部運動ニューロン群RMDとSMDを制御するRIA介在ニューロンの神経活動をカルシウムイメージングによって測定した結果を総合し、頭部の舵取り運動と、身体全体の蛇行運動に関する外部刺激依存的な神経回路制御の全容を説明できる神経回路モデルを提唱した。

研究成果の概要（英文）：We aimed to decipher neural codes that regulate memory-based behavior, using the neural circuit underlying thermotaxis in *C. elegans*, as an ideal circuit system. We revealed that the major thermosensory neuron AFD can remember cultivation temperatures and that the temperature memory is modulated by CaMKI and raf kinase pathways in AFD neurons. Calcium imaging of AIY and RIA interneurons, which receive synaptic outputs from AFD and AIY, respectively, showed that AIY neurons convey the information of temperature memory in AFD to the downstream interneuron RIA, in which the magnitude and frequency of stochastic calcium response appeared to be shut down at the temperature that corresponds to the memorized temperature in AFD. Our results and previous studies altogether proposed the neural circuit model, in which the circuits for the head swing and dorso-ventral sinus curve body movement are coordinated through many interneurons with different functions.

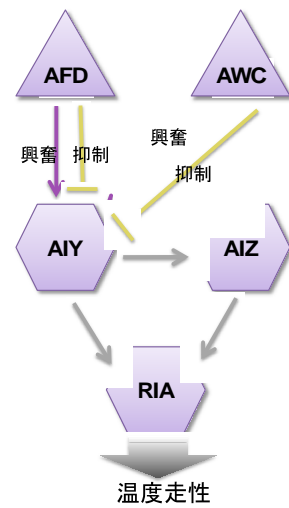
研究分野：神経科学一般

キーワード：感覚神経細胞 記憶・学習 温度走性 Cエレガンス 神経回路

1. 研究開始当初の背景

線虫 *C. elegans* では、959 個存在する全ての体細胞の細胞系譜が明らかにされており、そのうちの3割を占める302個の神経細胞を接続する化学シナプスとギャップ結合も、電子顕微鏡による解剖学的解析から、全て解明されている(White et al., *Philos. trans. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.* 314, 1-340, 1986)。胚発生期から幼虫期を経て成虫期までに形成された神経回路の接続パターンが、成虫期以後に変化するという報告はなく、成虫では神経回路網形成は完了していると考えられる。一方、線虫頭部にある感覚器官によって、味、匂い、温度といった刺激を受容した後、順応や記憶といった情報処理が神経回路において行われることがわかっている(de Bono and Maricq, *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 451-501, 2005; Mori et al., *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 712-719, 2007)。すなわち、環境刺激の入力を受けると、神経回路、および、神経回路を形成する素子である神経細胞は、その性質を変化させていることが明らかになり、最近の光技術を使った神経細胞の活動状態をモニターすることにより実証されつつある(Suzuki et al., *Neuron* 39, 1005-1017, 2003)。これらの結果は、成熟した神経細胞においても、刺激入力依存的に異なった個性を持ちうることを示している。形成された神経細胞や神経回路が、どのような分子メカニズムによって個々の神経細胞自身あるいは回路全体の性質を変化させ、その変化を行動という出力へと反映されているかという問題は、今後の神経科学において最重要課題の1つであり、この新分野において、線虫をモデル動物とした研究が非常に有効であることが、国際的に認識されている。本研究代表者は、線虫の温度に対する記憶・学習行動である温度走性の主要神経回路を明らかにし(Mori and Ohshima, *Nature* 376, 344-348, 1995)、2種類の感覚神経細胞 AFD と AWC は温度を受容するとともに温度を記憶していること(Kimura et al., *Curr. Biol.* 14, 1291-1295, 2004; Kuhara et al., *Science* 320, 803-807, 2008)、3種類の介在神経細胞 AIY、AIZ、RIA は、温度と餌状態の関連付けに重要な機能を果たしていることを明らかにしてきた(Kuhara and Mori, *J. Neurosci.* 26, 9355-9364, 2006; Kodama et al., *Genes Dev.* 20, 2955-2960, 2006)。そして最近、AFD 感覚神経細胞と AWC 感覚神経細胞、および、AFD と AWC 両方のシナプス後神経細胞である AIY 介在神経細胞から形成される局所回路における神経活動の制御メカニズムを明らかにした(Ohnishi et al., *EMBO J.* 30, 1376-1388, 2011; Kuhara et al., *Nat Commun.* 2:355 doi:10.1038/ncomms1352, 2011)、これらの研究成果は、成熟した神経細胞も、刺激入力依存的に、その性質を変化させうることを実証し、神経細胞は、それぞれ、個性を持つこ

とを示した。しかし、神経活動制御における神経伝達物質の種類や、その受容体の分子レベルでの制御メカニズムについては、まだ、ほとんど未解明のままである。そこで、これらの研究成果を踏まえ、本研究では、温度走性の主要神経回路における神経活動制御の分子メカニズムを解明し、行動を制御する神経コードとデコードの分子レベルでの解読を目指す。



2. 研究の目的

本研究では、温度走性の主要神経回路において、神経コードが神経細胞多様性の制御機構に果たす役割を、以下の項目に従って明らかにする。

(1) AFD における温度記憶を制御する分子

基盤の解明: AFD および AWC 感覚神経細胞は外界の温度を受容するだけでなく、温度情報を記憶できる(Kimura et al., *Curr. Biol.* 14, 1291-1295, 2004; Kuhara et al., *Science* 320, 803-807, 2008)。そこで、AFD の温度記憶が細胞自律的であるかを検証する。また、この温度記憶を制御する分子メカニズムを明らかにする。

(2) RIA におけるシナプス局在と細胞内区画

化機構の解明: AFD のシグナルは AIY を介して RIA 介在神経細胞に伝えられる。RIA は単極性の神経細胞であり、その神経突起におけるシナプス局在には、明確な区画化が認められる。シナプス前終末は神経突起の先端部、シナプス後終末は神経突起の基底部に分離して局在する。これまでに、*myo-inositol monophosphatase* をコードする *ttx-7* 遺伝子が、この RIA のシナプス局在の極性形成に必要であることを示した(Tanizawa et al., *Genes and Dev.* 20, 3296-3310, 2006)。そこで、*ttx-7* 遺伝子がどのような機構でシナプス局在を制御するかを明らかにする。

(3) 温度走性行動様式の分子基盤の解明:

脊椎動物から無脊椎動物にわたって、神経系に発現している分子は広く保存されている。この分子機能の解明のため、温度走性行動をモデル実験系として、その走性様式の基盤となる分子機構を解明する。

(4) 温度走性神経回路における接続様式の機

能的役割の解明: 最近、線虫の持つ4種類のアセチルコリン受容体の突然変異体、1種類の神経ペプチドの突然変異体、そして、3種類の抑制性グルタミン酸受容体の突然変異体が、温度走性行動に異常を持つこ

とがわかった。また、ごく最近、神経細胞間接続にとって重要なギャップ結合形成分子であるイネキシンの突然変異体では、温度走性が異常になっていることが明らかになった。そこで本研究では、線虫温度走性神経回路を形成する化学シナプス接続様式とギャップ結合接続様式を網羅的に明らかにし、それらの接続の機能的意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) AFD における温度記憶を制御する分子

基盤の解明: 本研究代表者らは、AFD 感覚神経細胞が温度受容のみならず、温度情報を記憶することを示唆する知見を得た (Kimura et al., *Curr. Biol.* 14, 1291-1295, 2004)。この AFD における温度記憶が細胞自律的であるかどうかを検討するために、線虫神経細胞の初代培養系を確立する。AFD 感覚神経細胞を試験管内に単離したのち、温度記憶を形成できるかどうかを検証することで、AFD が神経回路から隔離された状態でも温度を記憶するかを明らかにする。また、AFD で機能することが示唆されている分子の変異体のうち、温度記憶に関与しているものをスクリーニングする。さらに、得られた候補遺伝子がどのようなシグナル伝達経路を介して温度記憶を制御しているかを、遺伝学的スクリーニングによって解明する。

(2) RIA におけるシナプス局在と細胞内区画

化機構の解明: 本研究代表者らは、これまでに、RIA のシナプス局在の極性形成に、*myo-inositol monophosphatase* (IMPase) をコードする *ttx-7* 遺伝子が必要であり、*ttx-7* 変異体は温度走性にも異常を示すことを明らかにした (Tanizawa et al., *Genes and Dev.* 20, 3296-3310, 2006)。IMPase がどのような機構でシナプス局在の極性制御を実現するのかを明らかにするために、遺伝学的スクリーニングによって *ttx-7* 変異体の温度走性異常を抑圧する変異体を単離する。同定した遺伝子の情報をもとに、さらなる候補遺伝子の網羅的解析を行い、シナプス極性形成機構を明らかにする。

(3) 温度走性行動様式の分子基盤の解明:

線虫を一定温度で十分に餌を与えた状態で飼育し、餌のない温度勾配上に置くと、飼育温度に移動する。この正常な温度走性行動様式が異常になり、例えば餌を十分に与えていない条件で飼育してもこの性質を保ったり、飼育温度よりも高い温度へ移動するようになる変異体を探索することで、温度走性行動様式を担う分子を見つけ、その機能を解明する。蛍光タンパク質を用いた標的分子へのラベリングと共焦点顕微鏡での観察により生体内、細胞内の局在を調べ、さらに変異体におけるカルシウムイメージングで神経活動に与える影響を明ら

かにする。

(4) 温度走性神経回路における接続様式の機能的役割の解明:

神経細胞間接続にとって重要なギャップ結合形成分子であるイネキシンの突然変異体では、温度走性が異常になっていることが明らかになったため、蛍光タンパク質を用いたイネキシ分子へのラベリングを行った上で共焦点顕微鏡などを用いて発現細胞の同定を行い、さらに温度走性神経回路への影響をカルシウムイメージングによって解析する。これらのことからイネキシを通じた細胞間の接続様式が温度走性神経回路へどのように影響を与えるか解析する。

4. 研究成果

(1) AFD における温度記憶を制御する分子

基盤の解明: AFD の温度記憶が細胞自律的であるかどうかを検討するために、線虫神経細胞の初代培養系の確率に成功した。線虫胚が未分化の段階で、卵殻の除去および細胞分離を行った後、試験管内で細胞培養をしたところ、AFD マーカー遺伝子を発現する細胞を単離することに成功した。この初代 AFD 培養細胞の系を用いて、温度記憶が形成されるかを検討したところ、AFD は神経回路から単離された状態でも、温度を記憶し、かつこの記憶温度を外界の温度変化に応じて変化させることを明らかにした。さらに、AFD で機能する遺伝子の解析から、CaMKI のホモログをコードする *cmk-1* 遺伝子がこの温度記憶を制御していることを明らかにした (Kobayashi et al., in submission)。さらに、*cmk-1* の抑圧変異体をスクリーニングし、ヒトにおいても高度に保存された転写メディエーター複合体因子 Med23 のホモログをコードする *sur-2* 遺伝子を同定した。*sur-2* 変異体内の温度記憶を検証したところ、*sur-2* 遺伝子も温度記憶を制御することが明らかとなった。以上の結果から、細胞自律的な温度記憶を制御するシグナル伝達経路が明らかとなり、また、CaMKI-Med23 のシグナル伝達経路は哺乳動物においても高度に保存されていることが示唆されていることから、このシグナル伝達経路が生物種を超えて広く細胞記憶に関与している可能性が示唆された。

(2) RIA におけるシナプス局在と細胞内区画

化機構の解明: TTX-7/IMPase がどのような機構でシナプス局在の極性化を制御しているのかを明らかにするために、*ttx-7* 変異体の温度走性異常を抑圧する変異体のスクリーニングを行った。その結果、ホスホリパーゼ C ベータをコードする *egl-8* 遺伝子の変異体が単離され、*egl-8* 変異は *ttx-7* 変異体のシナプス局在の異常をも抑圧することを見いだした。*egl-8* 遺伝子の機能細胞を同定したところ、*egl-8* は細

胞自律的に RIA で機能することを見いだした。ホスホリパーゼ C ベータは細胞膜上のホスファチルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PIP₂) を分解することから、IMPase によるシナプス極性制御は PIP₂ を介していることが示唆された。そこで、この可能性をさらに検討するために、PIP₂ の代謝経路で機能する遺伝子の解析を行い、PIP₂ を脱リン酸化するシナプトジャニンをコードする *unc-26* 遺伝子の変異体が、*egl-8* 変異体と同様に *ttx-7* の異常を抑圧した。(Kimata et al., *Genetics* 191, 509-521, 2012)。以上のことから、細胞内シナプス局在の制御には IMPase を介した PIP₂ シグナル伝達経路が関与していることが明らかとなり、細胞内の局所的な PIP₂ レベルの制御が重要である可能性が示唆された。

(3) 温度走性行動を指標としたスクリーニングにより温度走性行動を制御する分子として AHO-3 が同定された。配列解析から AHO-3 は加水分解酵素をコードしており、線虫からヒトに至るまで様々な動物種で保存されている分子であることが分かった。*aho-3* 変異体は、野生型と違い、飢餓体験をすることで温度の高い方向へと移動する。興味深いことに、*aho-3* 変異体にヒトの AHO-3 ホモログを導入すると、線虫 AHO-3 と同様に野生型の行動へと回復することが明らかにされた。このことから、線虫とヒトの間で AHO-3 分子が働く作用機序としても保存されていることが実証された。温度走性行動に関わる神経回路はこれまで明らかにされているが、その中でも少なくとも AWC 感覚神経細胞でこの AHO-3 が働いていることが蛍光分子を使った観察と、細胞特異的発現実験から明らかになった。蛍光分子を用いたさらなる解析から、AHO-3 の N 末端システインクラスタが細胞内の感覚末端への局在に関与しており、この局在自体も作用機序に関与していることが明らかにされた。さらに、二重変異体を用いた遺伝学的解析から、この AHO-3 分子は三量体 G タンパク質である ODR-3 と同じシグナル経路にあることが示唆され、生体内分子シグナルの重要な位置で働くことが分かった(Nishio et al., *Genes Cells*. 17:365-386, 2012)。

(4) イネキシンの一つ、INX-4 に蛍光タンパク質を結合させた融合タンパク質を用い、生体内での局在解析を行ったところ、温度走性行動に関わるとされている複数の神経細胞で INX-4 が発現しており、さらに神経細胞内でも特徴的な局在をしていることが明らかになった。温度受容神経細胞である AFD における細胞内局在を詳しく解析すると、INX-4 は、その局在パターンから、シナプス伝達を修飾している事が示

唆された。さらに温度走性神経回路への機能的な影響を調べるためにカルシウムイメージングによって AFD と AIY の神経活動を計測したところ、AFD では *inx-4* 変異体でも温度刺激に対する応答は野生型と変わらないことが分かった。一方で AIY 介在神経細胞では *inx-4* 変異体と野生型の温度に対する応答様式に違いがあり、AFD と AIY 間の神経間接続が AIY 神経細胞の活動に対する影響が見られた。これらのことから、神経間接続の INX-4 依存的な変化が、AFD-AIY 間の情報伝達を通して、温度刺激に対する行動を制御していることが分かってきた。*inx-4* 変異体の行動異常は飼育温度より 1 度程度高い場所へ移動するという非常に特徴的な表現型を示し、その行動異常が神経間接続の変化によって引き起こされるということは神経回路の理解にとって意義深い。

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 5 件)

1. Aoki, I. & Mori, I. Molecular biology of thermosensory transduction in *C. elegans*. *Curr. Opin. Neurobiol.* **34**, 117-24, in press (2015).

2. Sasakura, H., Tsukada, Y., Takagi, S. & Mori, I. Japanese studies on neural circuits and behavior of *Caenorhabditis elegans*. *Front. Neural Circuits* **7**, doi: 10.3389/fncir.2013.00187 (2013).

3. Nishio, N., Mohri-Shiomi, A., Nishida, Y., Hiramatsu, N., Kodama-Namba, E., Kimura, D., K., Kuhara, A. & Mori, I. A novel and conserved protein AHO-3 is required for thermotactic plasticity associated with feeding states in *Caenorhabditis elegans* *Genes Cells*. **17**(5): 365-386 (2012).

4. Kimata, T., Tanizawa, Y., Can, Y., Ikeda, S., Kuhara, A. & Mori, I. Synaptic Polarity Depends on Phosphatidylinositol Signaling Regulated by Myo-inositol Monophosphatase in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **191**(2): 509-521(2012).

5. Miyara, A., Ohta, A., Okochi, Y., Tsukada, Y., Kuhara, A., & Mori, I. Novel and conserved protein macoilin is required for diverse neuronal functions in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*. doi:10.1371/journal.pgen.1001384 (2011).

[学会発表](計 62 件 基調講演および

招待講演は下記のとおり)

1. Ikue Mori: Unveiling principle of neural circuits underlying learning, memory and decision-making. 11th International Congress of Neuroethology and the 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry, 2014.7-28-8.1. Sapporo, Japan.

2. Ikue Mori: Decoding neural circuits underlying learning, memory and decision-making. Neural Circuit Basis of Behavior and its Disorders (COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES), 2014.5.12-16. Suzhou, China.

3. 森郁恵: 線虫 *C. elegans* における学習と記憶を含む行動の分子神経遺伝学. 日本遺伝学会第 86 回大会、2013.9.20、横浜.

4. 森郁恵: 線虫の温度走性神経回路における光遺伝学. 第 35 回日本神経科学大会、2012.9.18、名古屋.

5. Ikue Mori: Memory Circuits. Max Planck Institute for Developmental Biology Mittwochskolloquium MIKO, 2012.11.7. Tuebingen, Germany.

6. Ikue Mori: Dissecting information processing in neural circuits. 5th East Asia Worm Meeting. 2012.6.27.台北, 中華民國.

7. Ikue Mori: Memory, circuits and behavior. CSHL Asia Conference Invertebrate Neurobiology. 2012.6.19. 蘇州, 中華人民共和國.

8. Ikue Mori: Memory Circuits. EMBL Conference Series *C. elegans* neurobiology conference. 2012.6.16. Heidelberg, Germany.

〔図書〕(計 1 件)

1. Sasakura, H. & Mori, I. Thermosensory Learning in *Caenorhabditis elegans*. In: Invertebrate Learning and Memory (Eds: Menzel, R., Benjamin, P.), 124-139, Academic Press (2013).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://elegans.bio.nagoya-u.ac.jp/~lab/japanese/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 郁恵 (MORI IKUE)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 90219999