

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 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：2013～2017

課題番号：25115009

研究課題名(和文)線虫*C. elegans*の忘却制御機構から探る記憶のダイナミズム研究課題名(英文)Memory dynamism elucidated by studying on the mechanisms of forgetting in *C. elegans*

研究代表者

石原 健(Ishihara, Takeshi)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：10249948

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 57,200,000円

研究成果の概要(和文):動物は、感覚ニューロンで受容した様々な情報を、経験に基づいて記憶として保持する。しかし、その記憶の大部分は、固定されることなく数時間で失われる。私達は、線虫の嗅覚学習をモデルとして、能動的な忘却の分子・神経回路メカニズムを解析している。本研究では、哺乳動物まで広く保存されている複数のタンパク質が、嗅覚ニューロンやその下流の神経回路で働くことによって、忘却が適切に制御されていることを明らかにした。

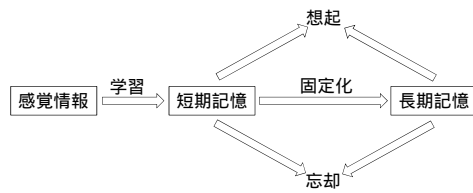
研究成果の概要(英文):Animals make memories depending on the sensory information and their environments, although most such memories are forgotten within a few hours as short term memories. We study on the molecular and neuronal mechanisms of active forgetting by using the olfactory learning in *C. elegans* as a model. In this study, we found that the signaling pathway that are conserved from nematodes to vertebrates properly regulates active forgetting of olfactory learning in the olfactory neurons and their downstream interneurons.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：記憶 忘却 線虫 カルシウムイメージング 行動遺伝学

1. 研究開始当初の背景

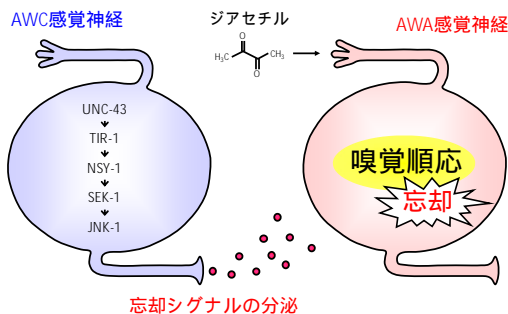
動物は、獲得した記憶を適切な時間保持することによって、刻々と変化する環境に適応した行動をとることができる。例えば、餌の場所の記憶を必要以上に長く保持すると、餌がなくなっても餌があった場所へ行ってしまう可能性がある。また、一方で飢餓状態にさらされていれば、餌の場所の記憶を長く保持している方が、生存の可能性が高まると考えられる。従って、記憶の保持時間を適切に制御するためには、記憶の獲得だけではなく、忘却も能動的に制御されている必要がある。これまで、記憶の形成やその保持に関わる研究に比べ、忘却に関わる分子・神経回路メカニズムに関わる研究は非



記憶の形成・保持・忘却に関わる概念図

常に少なかった。そこで、私達は、線虫 *C. elegans* の嗅覚可塑性や塩走性学習をモデルとして主に用い、記憶を忘れにくい変異体を単離・解析することによって、忘却を制御する分子・神経回路メカニズムの研究を進めていた。

本研究を開始するまでに、私達は、嗅覚学習の忘却に異常がある変異体の同定とその解析から、AWC 嗅覚ニューロンの TIR-1/JNK-1 経路が神経分泌を制御することによって、AWA 嗅覚ニューロンのカルシウム応答を適切に変化し、その結果行動可塑性としての忘却を制御していることを明らかにした。さらに、忘却時に餌の有無によって、記憶の保持時間が制御されていることを明らかにしていた。また、ショウジョウバエを用いた研究によって、神経細胞内の細胞骨格の制御が忘却に重要であることを示すことが知られていた。



線虫の嗅覚順応の忘却機構の基本モデル

2. 研究の目的

本研究では、ほとんど明らかになっていなかった能動的忘却 (active forgetting) の実行・制御メカニズムを分子・神経回路レベルで詳細に明らかにすることを目的とした。そ

のために、これまでの成果に基づき、忘却細胞 (AWC 嗅覚ニューロン) の下流でどのように忘却が制御されているのか、また、餌シグナルによりどのように忘却が制御されているのか、忘却が実際に制御されているのいつか、など嗅覚の忘却機構を明らかにすることを目指した。

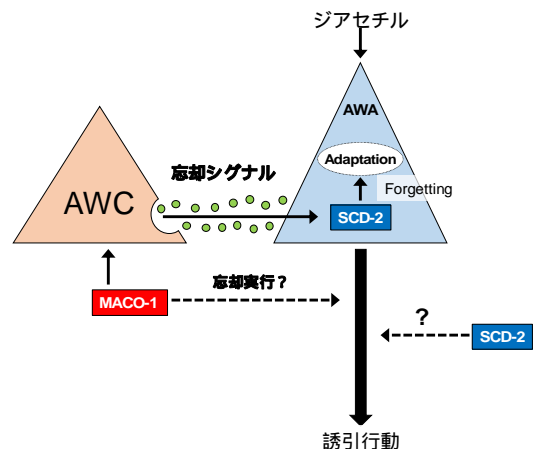
3. 研究の方法

私達は、忘却のモデル系として、嗅覚順応を用いた。線虫を、強いにおい物質に曝すとその匂いに対する応答が弱くなる嗅覚順応を示す。この行動可塑性は、餌のある条件で飼育すると数時間で失われる。そこで、嗅覚順応の条件付けをしたあと4時間飼育したのちに、匂い物質に対する応答性を調べることによって、忘却が起きているかどうかを解析した。

線虫の *tir-1* 変異体の行動表現型をもとに、そのサプレッサー変異体のスクリーニングにより、下流の変異体を単離する。その原因遺伝子の分子遺伝学的解析から、忘却を制御するシグナル経路を明らかにすることを目指した。また、忘却に関与するニューロンを、ショウジョウバエのヒスタミン作動性クロライドイオンチャネルを用いて、時期特異的に不活性化することによる忘却に対する影響を解析することによって、忘却がそのニューロンによって、いつ制御されているのかを明らかにすることを目指した。さらに、カルシウムイメージングにより、記憶の形成と忘却過程における感覚ニューロンの応答の変化を明らかにする。

4. 研究成果

線虫において、嗅覚順応の記憶の忘却は、AWC ニューロンで働く TIR-1/JNK-1 経路が神経分泌を制御することによってすすむ。この TIR-1/JNK-1 経路の下流の因子を同定するために、忘却が過剰に起こる *tir-1* 機能獲得型変異体のサプレッサーを探索した。その結果、膜タンパク質 MACO-1、受容体チロシキナーゼ SCD-2、そのリガンド HEN-1 が嗅覚順応の忘却に重要であることがわかった。



嗅覚記憶の忘却を実行する分子機構モデル

TIR-1/JNK-1 経路の変異体は、AWA 嗅覚ニューロンで受容されるジアセチルと AWC 嗅覚ニューロンで受容されるイソアミルアルコールのいずれの匂い物質に対する忘却が起きにくい。そこで、新たに同定した変異体の表現型を解析したところ、*maco-1* 変異体は、ジアセチルとイソアミルアルコールのいずれの嗅覚順応の忘却が起きにくかったが、*scd-2* 変異体と *hen-1* 変異体では、ジアセチルに対する嗅覚順応の忘却にのみ異常があった。これらのことから、AWC 感覚ニューロンの下流で、忘却を促進する経路が二つに分かれていて、*hen-1/scd-2* 遺伝子は、AWA 嗅覚ニューロンにおける順応の忘却にのみかかわっていると考えられた。

次に、これらの変異体において、カルシウムイメージングによって、嗅覚ニューロン AWA のジアセチル応答性を調べると、条件付け後に減弱した応答が時間をおいても戻りにくく、行動表現型と一致していた。しかし、細胞特異的な表現型回復実験を行うと、*maco-1* 変異体では、行動表現型は回復しても感覚応答は回復しない場合があり、*scd-2* 変異体では感覚応答が回復しても行動表現型が回復しない場合があることから、嗅覚ニューロン AWA の感覚応答の下流で、忘却行動を制御している機構があることを示唆している。

そこで、感覚ニューロンがシナプスを形成している下流の介在ニューロンが忘却に与える影響を解析した。その結果、一对のアンフィッド介在ニューロンが失われると、記憶が忘却されないことが明らかになった。さらに、アンフィッド介在ニューロンの活動を時期特異的に抑制することによって、AWC 嗅覚神経細胞の場合と同じように、実際に忘却している時の活動が重要であることも明らかになった。

AWC 嗅覚ニューロン（忘却細胞）からの忘却促進シグナルがいつ働いているかについても、AWC ニューロンの活動を時期特異的に抑制した線虫の忘却を解析した。その結果、記憶を形成するときに、抑制しても記憶の形成や忘却に対する影響はないが、学習後に忘却をしている時期に抑制すると、忘却が阻害された。このことは、記憶を形成するときに忘却されるかどうかが決まっているのではなく、学習したあとに忘却細胞からの忘却促進シグナルが分泌されるかどうかによって、忘却が起こるかどうかが決まることがわかった。

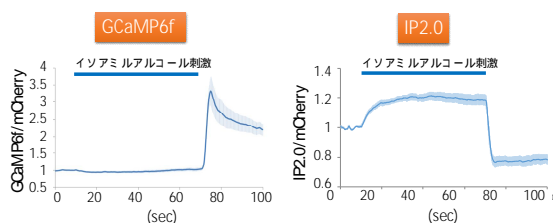
動物が記憶を適切な時間だけ保持するためには、このような忘却を実行する経路が適切に制御される必要がある。そこで、環

境シグナルが忘却を制御する機構を分子遺伝学的に解析した。その結果、モノアミン神経伝達物質が、神経伝達を制御することによって、忘却が制御されていることがわかった。さらに、忘却の制御が異常になる変異体をスクリーニングし、忘却の制御に複数のニューロンにおけるジアセチルグリセロールシグナルが関与していることが明らかになった。

線虫は、匂い物質ブタノンに対して弱い化学走性を示すが、ブタノン存在下で餌の上で飼育すると、ブタノンに対する応答が強くなるブタノンエンハンスメントという連合学習が知られている。この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、ブタノンを忌避するようになる。これは、単なる記憶の忘却ではなく、記憶の消去が起きていると考えられる。そこで、その記憶の消去に異常がある変異体を単離・解析したところ、シナプトタグミンと相同性を持つタンパク質に変異があると、記憶の消去が起りにくいことが分かった。このたんぱく質はほとんどの神経細胞で発現していたので、運動神経と筋肉の間の神経伝達に与える影響を解析したところ、シナプス伝達を負に制御しているタンパク質であることがわかった。このことは、シナプス分泌が過剰になった結果、記憶の消去が起きにくくなったことを示唆している。

さらに、ブタノンを受容する嗅覚ニューロンの応答を解析したところ、ブタノンエンハンスメントにより、ブタノンに対する感覚応答は強くなるが、それは記憶が消去されても維持されていることがわかった。このことは、記憶の形成後にその下流で記憶の消去が起きていることが示唆される。

カルシウムイメージングを用いて神経活動を測定する際には、カルシウムイオン濃度が高くなると蛍光強度が強くなる GCaMP6f (及びその改変体) が用いられることが多かった。私達は、カルシウムイオン濃度が低くなると蛍光強度が高くなるプロンプ IP2.0 を開発した。この IP2.0 を線虫の感覚ニューロンに発現させても、行動には影響がないことがわかった。そこで、IP2.0



神経活動の抑制を鋭敏に捉える IP2.0

を用いて神経活動の測定を行うと、刺激に依存した神経活動の興奮だけでなく、抑制も鋭敏に観察することが可能であった。IP2.0を用いることによって、神経活動の詳細な変動を測定することが可能になると考えている。

このように、本研究では、これまで解析が進んでいなかった能動的な忘却の分子・神経回路機構について、線虫の嗅覚可塑性をモデルにすることによって、主に行動表現型の分子遺伝学的な解析と、カルシウムイメージングによる神経活動の解析によって明らかにしてきた。PTSDや健忘症などのように、記憶の保持時間の適切な制御ができないことにより、様々な影響がある。今後、このようなヒトを含む高等動物における記憶の保持時間の制御機構の研究の基盤として、本研究で得られた成果は重要な知見であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. “An improved inverse-type Ca²⁺ indicator can detect putative neuronal inhibition in *Caenorhabditis elegans* by increasing signal intensity upon Ca²⁺ decrease” Hara-Kuge S, Nishihara T, Matsuda T, Kitazono T, Teramoto T, Nagai T, Ishihara T, PLOS ONE, 13 巻, 2018, :e0194707, doi: 10.1371/journal.pone.0194707, 査読有
2. “Multiple Signaling Pathways Coordinately Regulate Forgetting of Olfactory Adaptation through Control of Sensory Responses in *Caenorhabditis elegans*.” Kitazono T, Hara-Kuge S, Matsuda O, Inoue A, Fujiwara M, Ishihara T, Journal of Neuroscience, 37 巻, 2017, 10240-10251, DOI:10.1523/JNEUROSCI.0031-17.2017, 査読有
3. “Gonadal maturation changes chemotaxis behavior and neural processing in the olfactory circuit of *Caenorhabditis elegans*” Fujiwara M, Aoyama I, Hino T, Teramoto T, Ishihara T, Current Biology, 26 巻, 2016, 1522-1531, DOI:10.1016/j.cub.2016.04.058, 査読有
4. “The importance of cGMP signaling in sensory cilia for body size regulation in *Caenorhabditis elegans*.” Fujiwara M, Hino T, Miyamoto R, Inada H, Mori I, Koga M, Miyahara K, Ohshima Y, Ishihara T, Genetics, 201 巻, 2015, 1497-1510, DOI:10.1534/genetics.115.177543, 査読有

〔学会発表〕(計54件)

1. Jamine H. Teo, “Analyses in forgetting of an olfactory memory in *C. elegans*”, 21st International C.elegans Conference, 2017
2. Sayuri Kuge, “An inverse-type of fluorescent Ca²⁺ indicator for detecting neuronal inhibition”, 21st International C.elegans Conference, 2017
3. Mary Arai, “Analysis of the regulation of forgetting by the food signals in the olfactory learning of *C. elegans*.”, 21st International C.elegans Conference, 2017
4. N. Iwase, “Mechanisms of holding memory of butanone enhancement of *C. elegans*”, 21st International C.elegans Conference, 2017
5. Ryo Takahashi, “Effects of monoamine neurotransmitters on forgetting of olfactory adaptation in *C. elegans*”, 21st International C.elegans Conference, 2017
6. 北園 智弘, “線虫 *C. elegans* において、嗅覚順応の忘却は複数のシグナル伝達経路による感覚応答の調節により、協調的・時間的に制御される”, 第40回日本神経科学大会, 2017
7. Jamine H Teo, “Cellular and molecular analyses in forgetting of an olfactory memory in *C. elegans*”, 第40回日本神経科学大会, 2017
8. 新井 美存, “*C. elegans* の嗅覚学習をモデルとした餌シグナルを介した忘却の制御機構の解析”, 第40回日本分子生物学会年会, 2017
9. 北園 智弘, “線虫 *C. elegans* において、記憶の忘却は、感覚応答をコントロールを介して、複数のシグナル伝達経路により、協調的・時期特異的に行われる”, 第40回日本分子生物学会年会, 2017
10. 石原 健, “線虫における嗅覚記憶の忘却とその制御”, 情動研究会, 2017
11. Takeshi Ishihara, “Whole brain imaging reveals the roles of gap junctions for the synchronized oscillatory activity”, CeNeuro and Nagoya BNC, 2016
12. Manabi Fujiwara, “Gonadal maturation changes chemotaxis behavior and neural processing in the olfactory circuit of *C. elegans*”, CeNeuro and Nagoya BNC, 2016
13. Mary Arai, “Analyses of the regulation of forgetting by the food signals in the olfactory learning of *C. elegans*” CeNeuro and Nagoya BNC, 2016
14. Tomohiro Kitazono, “The novel components regulating forgetting of the olfactory adaptation at the downstream of the TIR-1/JNK-1 pathway” CeNeuro and Nagoya BNC, 2016

15. Takahiro Hino, "The change of odor preference over development in *C. elegans*", CeNeuro and Nagoya BNC, 2016
16. Jamine H. Teo, "AIA interneurons are required for normal forgetting of an olfactory memor", CeNeuro and Nagoya BNC, 2016
17. 新井 美存, "C. elegans の嗅覚学習をモデルとした餌シグナルを介した忘却の制御機構の解析", 第 39 回日本分子生物学会, 2016
18. Jamine H. Teo, "Neuronal circuitry for normal forgetting of an olfactory memory in *C. elegans*", 第 39 回日本分子生物学会, 2016
19. Manabi Fujiwara, "The germline growth affects the neuronal circuits and the behavioral patterns of worms.", 20th *C. elegans* International Meeting, 2015
20. Tomohiro Kitazono, "Analysis of downstream regulatory components of the TIR-1/JNK-1 pathway for forgetting of the olfactory adaptation in *C. elegans*", 20th *C. elegans* International Meeting, 2015
21. 北園 智弘, "線虫 *C. elegans* において、嗅覚順応の忘却を制御する TIR-1/JNK-1 経路の下流制御因子", 第 38 回日本神経科学大会, 2015
22. 新井 美存, "線虫 *C. elegans* の嗅覚学習をモデルとした餌シグナルを介した忘却の制御機構の解析", 日本分子生物学会, 2015
23. 北園 智弘, "線虫 *C. elegans* における嗅覚順応の記憶の忘却を制御する新規因子の解析", 日本分子生物学会, 2015
24. Tomohiro Kitazono, "Downstream regulatory components of the TIR-1/JNK-1 pathway for forgetting in *C. elegans*", *C. elegans* Neuro 2014, 2014
25. Manabi Fujiwara, "How does the animal change its behavioral patterns during growth?", *C. elegans* Development, Cell Biology and Gene Expression Meeting in associated with The 6th Asia-Pacific *C. elegans* meeting, 2014
26. Takeshi Ishihara, "Active forgetting of the olfactory memory in *C. elegans*", *Neurobiology: Diverse Species & Conserved Principles*, 2014
27. 藤原 学, "線虫の感覚行動のライフサイクルにおける変化", 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013
28. 北園 智弘, "線虫 *C. elegans* における忘却を制御する TIR-1/JNK-1 経路の下流院試の探索", 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013
29. Tomohiro Kitazono, "Identification of regulatory factors for forgetting in *C. elegans*", 19th International *C. elegans* Meeting, 2013

〔その他〕
ホームページ等

九州大学大学院理学研究院生物科学部門分子遺伝学研究室
<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~bunsiide/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 健 (ISHIHARA, Takeshi)
九州大学・理学研究院・教授
研究者番号: 10249948

(2) 連携研究者

寺本 孝行 (TERAMOTO, Takayuki)
九州大学・理学研究院・准教授
研究者番号: 90571836

藤原 学 (FUJIWARA, Manabi)
九州大学・理学研究院・助教
研究者番号: 70359933

猿渡 悦子 (SAWATARI, Etsuko)
九州大学・基幹教育院・助教
研究者番号: 60456605

久下 小百合 (KUGE, Sayuri)
九州大学・理学研究員・学術研究員
研究者番号: 50260104

(4) 研究協力者

新井 美存 (ARAI, Miari)
九州大学・理学研究院・学術研究員

北園 智弘 (KITAZONO, Tomohiro)
九州大学・理学研究院・学術研究員