

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14310

研究課題名(和文)行動を作り出す最小神経回路の構築

研究課題名(英文)Construction of minimal circuits that can support behaviors

研究代表者

飯野 雄一 (IINO, YUICHI)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：40192471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経系の情報処理のしくみを理解する手法として破壊や機能阻害があるが、神経回路を細胞のレベルで解析する際には、神経系に冗長性や並列処理が存在するために細胞破壊の効果が現れない場合がある。そこで、回路をゼロから作っていく合成生物学的アプローチを用いた。シナプス伝達変異体と細胞特異的レスキューを用い、生育不可能なところから生育可能、前進後退運動可能、機械刺激への応答可能と順次再構成に成功した。

研究成果の概要(英文)：To avoid intrinsic problem of functional redundancy and parallel processing pathways in analyzing neural circuits, we generated neural circuits from starting null circuit by using synaptic transmission mutant. We successfully regenerated growth, locomotion and mechanical responses.

研究分野：神経科学

キーワード：最小回路 合成生物学 化学走性 シンタキシン 行動 走化性

1. 研究開始当初の背景

脳神経系は生命が進化の過程で獲得した最も高度な情報処理系であり、神経細胞が相互に接続して情報を伝え合うことによって、感覚受容、認識、思考や行動制御など、動物が生きていく上で必須な情報処理を行っている。その特徴は、それぞれの神経細胞が個性をもち、特定の位置に配置され、特定の複数の結合相手と結合してネットワークを構成していることである。神経系の情報処理のしくみを理解し、人間の思考の特性を理解し、一方では精神神経疾患の治療に結びつけるためには、神経系の回路としての働きと其中での個々の神経の役割を理解する必要がある。そのために用いられる一つの手法は特定の神経または神経集団を破壊する方法である。古くは脳の一部分を破壊することが行われてきた。海馬(の一部)が破壊されたことにより記憶が障害されたHM患者やRB患者の観察から海馬がエピソード記憶に重要な部位であることがわかった例は有名である。以来、実験動物での破壊実験は常套手段として用いられ、脳科学の大きな進歩をもたらした。近年では、マウスなど遺伝子改変が可能な動物を用いて遺伝学的に特定の細胞を破壊または機能障害する方法が使われ、一定の成果を収めている。しかし、神経回路を細胞のレベルで解析する際には、神経系に冗長性や並列処理が存在するために細胞破壊の効果が現れない場合が多くみられ、その際には機能障害の方法だけでは回路の理解が困難となる。本研究で用いる線虫 *C. elegans* でも特定の神経細胞を機能破壊または障害する方法は一般的に用いられているが、同様の問題が存在した。

2. 研究の目的

そこで、動物の持っている神経系全体から一個ずつ引いていくアプローチではなく、ゼロから作っていく合成生物学的アプローチを用いることで、これまでの神経科学が攻めあぐねて来た問題に新たな解法が与えられるのではないかと考えた。

生物の情報処理システムとしての神経系は、数百～数千億の神経細胞からなる極めて複雑精緻なシステムであり、このシステムの理解は生命科学の1つの大きな課題である。これまで、神経系における各神経細胞(集団)の役割を調べる研究が精力的に行われて来た。そのための主たる研究手法が破壊実験、すなわちその神経(集団)を破壊したときに、行動がどのように障害されるかを調べる方法である。これに対して、本研究計画では全く逆のアプローチを提案する。すなわち、ゼロから神経回路を構築していき、最小の神経回路を作製する方法である。このためのモデル系として線虫 *C. elegans* を用いる。本研究ではそのような合成生物学的アプローチにより化学走性行動と学習によるその変化を再現することに挑戦する。次項に述べるよう

な方法で神経回路を合成的に構築する実験を実施し、まず前進後退運動(歩行運動にあたる)を作りだし、簡単な反射ができるようにした上で、化学走性行動を再現することを目指した。合成的に機能的な神経系を作り出す研究はこれまで全くなく、本研究は世界初の試みである。これが成功すると神経回路の理解のための強力な方法論が提供できると予想される。学習記憶の研究においては、学習の成立により作られる「記憶痕跡」と呼ばれるシナプス可塑性は、脳のいろいろなところで生じていると言われており、いずれが重要かを示す決定的な方法がない。もし本研究がうまくいけば、初めて機能的な記憶の場が特定できることになる。

3. 研究の方法

神経回路の再構成を行うために、まずはいずれの神経細胞も働かない状態からスタートする。このためにシナプス伝達に必要な蛋白質であるシタキシンの欠損変異体からスタートする。この変異体は孵化直後に致死となる。これに細胞特異的プロモーターを用いて特定の神経細胞にのみシタキシンを発現させ、これを順次積み重ねて致死性を回復させ、さらに前進運動、後退運動、スムーズな運動、機械刺激に対する単純な後退反射を引き起こさせる。その上で、化学感覚神経から運動神経までの経路を働かせ、化学走性行動が引き起こせるかを調べる。この経路にはいくつかの可能性があるので順次試行錯誤を行う。これに成功したら、塩の濃度と餌の有無を連合して化学走性を変化させる塩走性学習を再現する。

4. 研究成果

unc-64 はシナプス小胞の放出に必要なシタキシンをコードする唯一の遺伝子である。従って、unc-64 遺伝子の機能を欠くと化学シナプスの伝達ができなくなる。unc-64 を完全に機能を欠失した変異体は致死である。この変異体をベースとして、細胞特異的にunc-64 a フォームのcDNAを発現させることにより神経回路を再構成することを目指した。頭部のコリン作動性神経に発現するunc-17 プロモーター、頭部コマンド神経で発現するglr-1 プロモーター、GABA作動性神経に発現するunc-47 プロモーター、体幹部の運動神経に発現するacr-2 プロモーターでそれぞれunc-64aを発現するコンストラクトを作成し、MosSCI法を用いてゲノムに1コピーで挿入した。unc-17pによる発現で、致死性がなくなり生存できるようになった。さらにunc-47 プロモーターでは前進後退運動がゆっくり起こった。さらに、unc-17p, unc-47p, acr-2pでの発現によりかなり前進後退運動が回復した。unc-17p, glr-1p, acr-2pでは前進後退に加え、機械刺激への応答も回復した。しかしここまでで発現細胞が多くなりすぎて、発現部位の確認が難しい状況となった。

この段階で化学走性行動は回復していないにもかかわらず、非常に多くの神経への発現が必要であることがわかった。

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 3 件)

1. Ohno Hayao, Sakai Naoko, Adachi Takeshi, Iino Yuichi, Dynamics of Presynaptic Diacylglycerol in a Sensory Neuron Encode Differences between Past and Current Stimulus Intensity. Cell Reports, 査読有, 20, 2017, 2294-2303, 10.1016/j.celrep.2017.08.038
2. Tanimoto Y, Yamazoe-Umemoto A, Fujita K, Kawazoe Y, Miyanishi Y, Yamazaki SJ, Fei X, Busch KE, Gengyo-Ando K, Nakai J, Iino Y, Iwasaki Y, Hashimoto K, Kimura KD. Calcium dynamics regulating the timing of decision-making in *C. elegans*. eLife, 査読有, 6, 2017, e21629, DOI: 10.7554/eLife.21629
3. Lifang Wang, Hirofumi Sato, Yohsuke Satoh, Masahiro Tomioka, Hirofumi Kunitomo and Yuichi Iino, A Gustatory Neural Circuit of *Caenorhabditis elegans* Generates Memory-Dependent Behaviors in Na⁺ Chemotaxis. J Neurosci, 査読有, 37, 2017, 2097-2111, 10.1523/JNEUROSCI.1774-16.2017

[学会発表](計 7 件)

1. Hirofumi Kunitomo, Hirofumi Sato and Yuichi Iino. Roles of primary interneurons that regulate memory-dependent salt concentration chemotaxis in *C. elegans*. 第40回日本神経科学大会, 2017
2. Hirofumi Sato, Hirofumi Kunitomo, Xianfeng Fei, Koichi Hashimoto, Yuichi Iino, A gustatory neural circuit for experience-dependent behavioral plasticity. 21st International *C. elegans* Meeting, 2017
3. Keita Mori, Yu Toyoshima, Yuichi Iino, Labeling of active neural circuits by the calcium probe CaMPARI. The 21st International *C. elegans* Conference, 2017
4. YUICHI IINO, Molecular and neural circuit mechanisms for experience-dependent behavioral switching in *C. elegans*. Molecular and neural circuit mechanisms for

experience-dependent behavioral switching in *C. elegans*, 2017

5. Risshun Chin, Yutaro Ueoka, Chihiro Uchiyama, Keita Katae, Masahiro Tomioka, Yuichi Iino, Neural circuits underlying glucose chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. 第15回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」, 2016
6. Hirofumi Sato, Hirofumi Kunitomo, Xianfeng Fei, Koichi Hashimoto, Yuichi Iino, A neural circuit for experience-dependent salt chemotaxis in *C. elegans*. CeNeuro2016 (*C. elegans* Topic Meeting: NEURONAL DEVELOPMENT, SYNAPTIC FUNCTION & BEHAVIOR), 2016
7. Lifang WANG, Hirofumi Sato, Yohsuke Sato, Masahiro Tomioka, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino, A neural circuit for memory-dependent Na⁺ chemotaxis dissected in *Caenorhabditis elegans*. 17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2016), 2016

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

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

(3)連携研究者

大野 速雄 (OHNO, Hayao)

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教

研究者番号： 00747272