

令和元年6月8日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06175

研究課題名(和文) 行動可塑性を規定する動的分子機構の解明

研究課題名(英文) Understanding molecular dynamics underlying behavioral plasticity

研究代表者

杉 拓磨 (Sugi, Takuma)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・助教

研究者番号：70571305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：動物は過去の経験をもとに行動を可塑的に変え、環境に適応する。これまで、行動の可塑性機構に関わる多くの生体分子や翻訳後修飾が同定された。本研究では可塑性機構を真に理解するため、新たな行動の獲得過程で起こる、生体分子自体の可塑的で「動的」な化学・物理変化に着目した研究を行なった。その結果、線虫*C. elegans*のMAPキナーゼp38の活性が動的に変動し、その時間波形の変化が力学刺激応答行動の可塑的变化を導く結果を得た。さらに(1)入力刺激がp38活性の時間波形へ変換される機構と(2)p38の活性が遺伝子発現と行動へ出力される機構を解析した。本研究結果は現在論文投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

p38は別名ストレス応答性キナーゼと呼ばれ、ストレス応答を制御するマスターレギュレーターである。本研究で注目した力学刺激は1つの物理的ストレスともみなすことができ、その処理機構の一端を示したことも同義である。現在、他のストレス刺激下における動的変化の時間パターンの違いからのストレス刺激識別機構の解明しつつある。

研究成果の概要(英文)：Animals cope with environmental stimuli through its own behavioral plasticity. In this study, I investigated the mechanism underlying the behavioral plasticity in *C. elegans*. I first found that an activity of a MAP kinase oscillates in vivo. Therefore, I analyzed this oscillation using biochemical and imaging techniques. As a result, I showed that the oscillation of MAP kinase activity underlies plasticity of *C. elegans* mechanosensory behavior. I further analyzed the coding and decoding mechanism of the oscillation during establishment of behavioral plasticity. I summarized these results and am now submitting manuscript in a journal.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：線虫 行動 記憶

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

動物が示す行動には、生来もつプログラム化された反射などの本能的行動と、外部からの刺激を経験したのち、新たに獲得する行動がある。前者から後者への、外部刺激の経験に基づく行動パターンの変化を行動の可塑的变化といい、環境へ適応し、自らの生存を保障する必要不可欠な生理機能である。行動遺伝学の分野において、古くから、行動の可塑性機構に関わる生体分子が同定されてきたが、これらの分子を介した、刺激情報の行動可塑性への変換機構は未解明である。その理由は、通常、動物は膨大な数の細胞からなるため、新たな行動を獲得する過程における分子自体の動的で可塑的な状態を定量化することが難しいためである。

線虫 *C. elegans* はわずか 959 個の体細胞からなり、非侵襲に 1 細胞単位の分解能で、遺伝子発現・抑制、細胞死誘導、蛍光発色などの遺伝学的手法を利用可能である。一方、個体まるごとで破碎・ウエスタンブロットィングが行え、分子の状態を迅速に定量化可能である。さらに、*C. elegans* には明確な行動の可塑的变化が知られる。そこで、*C. elegans* を利用することにより、過去の技術的問題を克服し、行動可塑性機構を明らかにすることが可能と考えた。

2. 研究の目的

C. elegans は通常、振動や接触などの物理刺激に対し、後ずさりの逃避行動を示す。一方、約 6 時間定期的に物理刺激によるトレーニングを経験すると、刺激に馴れて記憶し、24 時間後に再び刺激を受容しても、後ずさり距離の減少・消失が見られる。つまりトレーニングの有無における後ずさり距離を計測することで、行動の可塑的变化（記憶）を定量化可能と知られていた。

そこで、本申請者は振動刺激に対する応答行動をハイスループットに定量化する装置を開発し、この行動の可塑的变化を担う記憶細胞として、後ずさを指令する介在神経細胞 AVA と AVD を同定した (Sugi* et al. *PNAS*, 2014)。AVA と AVD には、哺乳類の興奮性神経伝達を担う AMPA 受容体の線虫オルソログ GLR-1 が特異的に高発現しており、*C. elegans* のトレーニング過程で、その発現量が減少することが知られていた (Rose et al. *J Neurosci*, 2003 他)。そこで、本研究ではこの GLR-1 の発現を制御する因子の探索から行動可塑性機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

まず GLR-1 のプロモーターに結合する分子の酵母ワンハブリッドスクリーニングと遺伝学的解析を行った。さらに、*C. elegans* 集団を回収・破碎し、p38 のリン酸化の経時変化を追跡するため生化学的手法と分子イメージングを利用した解析を行なった。また行動の解析は Sugi* et al. *Anal Sci*, 2016 の記載の力覚応答行動実験系を用いた。さらに最終段階では数理モデルを作成し、数値シミュレーションを行なった。

4. 研究成果

GLR-1 のプロモーターに結合する分子の酵母ワンハブリッドスクリーニングと遺伝学的解析を行った結果、転写因子 ATF2 と p38 MAP キナーゼの分子経路が、*glr-1* 遺伝子発現との間にフィードバック機構を形成していることを見出した。さらに生化学的解析と分子イメージング技術

を用いた時系列解析により p38 の活性は通常飼育環境下で経時的に変動する可能性を得ていた。そこで (1) 変動パターンの物理刺激依存性の解析及び行動解析と (2) p38 の経時的変動による AMPA 受容体遺伝子発現制御のメカニズムの解明、の 2 つの計画を実施した。

その結果、次の成果を挙げた。まず計画(1)については(1a)p38 の活性変動パターンが物理刺激に依存して減衰パターンへ変化し、行動を抑制することを見出した。さらに(1b)p38 の活性定量化用の KTR プローブを作製し、p38 活性変動を 1 神経細胞レベルで非侵襲に計測する顕微鏡を開発した。計画(2)については(2a)細胞特異的に AMPA 受容体のエピゲノムを消去・書き込みするツールを開発し、力学刺激依存的な AMPA 受容体の遺伝子発現抑制を人為的に誘起することに成功した。(2b)この遺伝子発現は当初の予想どおりネガティブフィードバックで抑制されるだけでなく、発現量がデジタルに双安定な可能性があり、これが力学刺激への行動可塑性に重要であると示された。

以上の結果をもとに数理モデルを作成するとともに、変異体実験とシミュレーションにより、そのモデルの妥当性を検証した結果、シミュレーション結果は変異体実験の結果を概ね再現したことから、行動可塑性を規定するモデルとして同数理モデルを提案した。

以上の成果を取りまとめ、論文として投稿する段階まで達した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

1) **Sugi T***, Igarashi R*, Nishimura M

Noninvasive mechanochemical imaging in unconstrained *Caenorhabditis elegans*

Materials Vol. 11 No.6, 1034, 2018 (原著論文, 査読有)

2) **Sugi T***

Genome editing of *C. elegans*

Methods Mol Biol Vol. 1630, 247-254, 2017 (総説論文, 査読無)

3) **Sugi T***, Okumura E, Kiso K, Igarashi R

Nanoscale mechanical stimulation method for quantifying *C. elegans* mechanosensory behavior and memory

Analytical Sciences Vol. 32 No.11, 1159-1164, 2016 (原著論文, 査読有)

〔学会発表〕 (計 2 件)

杉 拓磨

「*In vivo*における細胞特異的機能解析から明らかにする記憶の仕組みとその応用」

第 7 回産と学をつなぐ SENRI の会、大阪、2017 年

杉 拓磨

「動物 1 個体と集団レベルの行動を規定する力学的制御機構」

ERATO・さきがけジョイントシンポジウム、筑波、2017 年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。