

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07499

研究課題名(和文) 線虫温度応答行動から解き明かす新規シナプス伝達制御基盤

研究課題名(英文) Bidirectional regulation of synaptic transmission during *C. elegans* thermotaxis behavior

研究代表者

中野 俊詩 (Nakano, Shunji)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：60608529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス伝達は、神経系機能において最も重要で、かつ基本的な情報伝達機構である。本研究では、線虫 *C. elegans* の温度受容ニューロンと、このニューロンがシナプス接続する中枢介在ニューロンとの間の神経間情報伝達制御の分子基盤を明らかにすることを目的とした。線虫からヒトまで、進化的に高度に保存された分子が温度受容ニューロンで機能して、この神経間情報伝達を双方向的に制御していることを見出した。この成果は、シナプス伝達制御を担う新たな分子の同定であり、今後、基礎研究、および応用研究へのさらなる展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、シナプス前ニューロンにおけるシナプス伝達制御機構として、シナプス後ニューロンの活動の強度を調節することが知られていた。本研究の成果から、シナプス前ニューロンからの興奮性・抑制性シグナルのバランスを調節することによって、シナプス後ニューロンの活動が双方向的に制御されることが明らかとなった。このことは、シナプス接続をする一対のニューロン間の情報伝達が、これまでに考えられていたよりも非常にダイナミックであり、複数の神経伝達物質が単一のニューロンから放出される生物学的意義を明らかにするものである。

研究成果の概要(英文)：Synaptic transmission is fundamental in information processing in the nervous system. This study focused a thermosensory neuron in the nematode *C. elegans* and its post-synaptic interneuron and aimed to understand the molecular basis of the neural communication between these neurons. We identified a series of evolutionarily conserved molecules that function in the thermosensory neuron to bidirectionally regulate the activity of the interneuron. Our results identified previously unknown factors important for synaptic transmission and revealed the potential therapeutic targets for information processing in the nervous system.

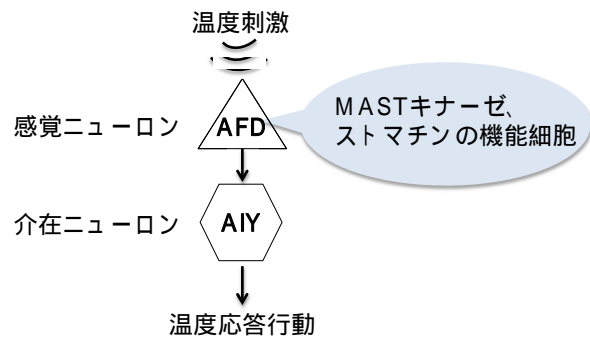
研究分野：分子遺伝学

キーワード：線虫 学習 記憶 行動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シナプス伝達は、神経系において最も基本的な情報伝達様式であり、その詳細な機構の解明は現代神経科学の最大の課題の一つである。申請者らは、線虫 *C. elegans* の温度応答行動に着目した遺伝学的スクリーニングから、MAST(Microtubule-associated serine threonine)キナーゼがこの行動に重要であることを明らかにしていた。MAST キナーゼは、線虫からヒトまで進化的に高度に保存されており、哺乳動物では脳・神経系で広く発現が認められているが、その機能はほとんど明らかとなっていなかった。申請者らの解析から、線虫 MAST キナーゼも神経系で広く発現していること、および主要な温度受容ニューロンである AFD ニューロンで作用して、温度応答行動を制御していることが示されていた。AFD ニューロンは、温度変化に対して細胞内カルシウム濃度を変動させることが知られているが、MAST キナーゼの変異体では、AFD ニューロンの温度変化に対するカルシウム応答は異常を示さなかった。このことから、MAST キナーゼは AFD ニューロンからの情報伝達に影響している可能性が考えられた。



さらに、MAST キナーゼと遺伝学的に相互作用する因子として、線虫スタマチンが同定された。スタマチンは細胞膜に局在するタンパク質であり、線虫の機械受容ニューロンでは Degenerin ファミリーのイオンチャネルの活性を制御することが報告されていた。申請者らの解析から、1) スタマチン変異は MAST キナーゼ変異による温度応答行動異常を抑圧すること、2) スタマチンも MAST キナーゼと同様に、AFD 温度受容ニューロンで機能して温度応答行動を制御すること、3) さらに AFD ニューロンの温度変化に対するカルシウム応答には関与しないこと、が明らかとなっていた。また、スタマチン変異体の温度応答行動異常を抑圧するもう一つの変異体として、*nj274* 変異体の単離に成功していた。

2. 研究の目的

本研究提案では、MAST キナーゼやスタマチンがどのようにして温度応答行動を制御しているのかを明らかにすることを目的とした。この目的のために、3つの大きな研究項目を設置した。1) これらの分子が AFD ニューロンからの情報伝達に関与している可能性を検討するために、AFD ニューロンのシナプス後ニューロンである AIY 介在神経細胞の活動を計測することを目指した。また、2) これらの分子が温度応答行動におけるどのような行動戦略を制御しているのかを明らかにし、さらに3) *nj274* 変異体の原因遺伝子を同定することで、MAST キナーゼ、スタマチン経路で機能する新規因子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 自由行動下の線虫における AIY 介在ニューロンの神経活動測定

AIY 介在ニューロンの活動測定のために、自由行動下の線虫からカルシウム動態を計測するトラッキングシステムを構築した。このシステムでは、YCX1.6 カルシウムプローブを AFD 温度受容ニューロンと AIY 介在ニューロンに特異的に発現させたシステムを作成し、このシステムを顕微鏡下で自由に行動させ、その動きを追尾した。行動中の線虫に温度摂動を与えて、AFD、AIY ニューロンのカルシウム濃度がどのように変動するかを測定した。

2) 温度応答行動における行動戦略の解析

線虫がどのような行動戦略を用いて温度応答行動を実現しているのかを明らかにするために、温度勾配上の 100-150 個体の線虫を同時に捉えて行動解析を可能とする Multi worm tracking システムを用いた。これによって前進、後退、急激な方向転換(ターン)などの行動要素を捉え、どのような行動要素がどのように制御されることによって温度応答行動を実現しているのかを解析した。また、MAST キナーゼやスタマチン変異体に関しても、Multi worm tracking による同様の計測を行い、これらの分子がどのような行動戦略の制御に関与しているのかを検討した。

3) *nj274* 変異体の原因遺伝子の同定

nj274 の原因遺伝子を同定するために、*C. elegans* の wild isolate (CB4858 株) を用いた SNP mapping と *nj274* 変異株の全ゲノムシーケンシングを行った。*nj274* 変異株と CB4858 株を掛け合わせて得られたハイブリッドシステムを用いて、*nj274* 由来の温度応答行動異常を引き起こす線虫ゲノム領域を明らかにし、この領域に存在する *nj274* 変異体内の全変異を原因変異候補とすることで、*nj274* 変異の原因遺伝子の同定を試みた。

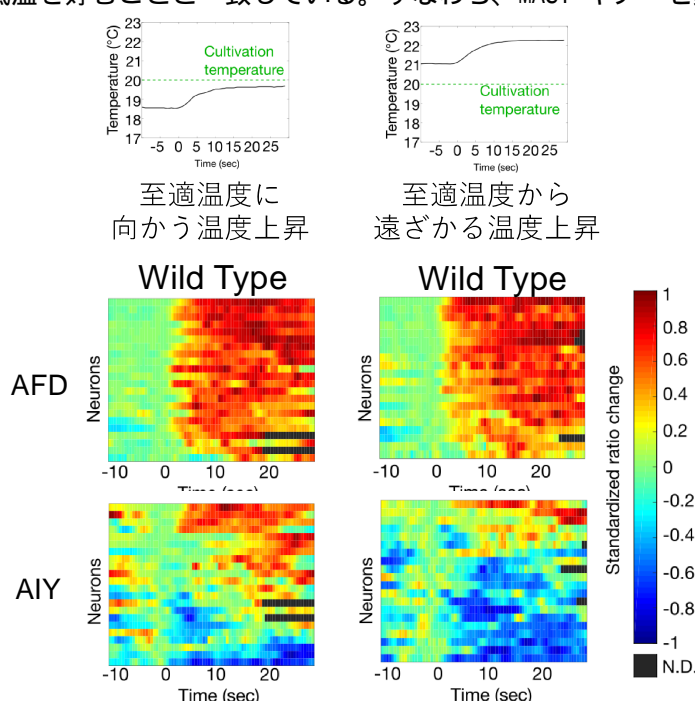
4. 研究成果

1) AIY 介在ニューロンは双方向的な活動を示した

自由行動下の線虫に温度摂動を与えて、AFD 温度受容ニューロンと AIY 介在ニューロンの活動を測定したところ、AIY ニューロンの活動は双方向的に制御されることを見出した。線虫の至適温度（過去に餌のある条件で飼育された温度）に近づいていくような温度上昇刺激を与えると、AIY 介在ニューロンの活動は確率的な挙動を示し、多くの個体の AIY ニューロンにおいて、カルシウム濃度の上昇が認められた。一方で、至適温度から遠ざかるような温度上昇刺激を与えると、AIY ニューロンのカルシウム濃度は、多くの個体で下降することが明らかとなった。AFD 温度受容ニューロンは、先行研究から温度上昇に対してカルシウム濃度を上昇させることが知られていたが、これと一致して、至適温度に近づく、あるいは至適温度から遠ざかるどちらの温度上昇刺激に対してもカルシウム濃度を上昇させることが分かった。これらのことから、AIY 介在ニューロンの活動は確率的な挙動を示すこと、および、その確率的な活動は温度刺激の値と相関することが明らかとなった。

次に、MAST キナーゼ、ストマチン変異体の AIY 介在ニューロンの活動を測定した。MAST キナーゼ変異体の AIY ニューロンは、至適温度に向かう、あるいは至適温度から遠ざかるどちらの温度上昇であっても、カルシウム濃度を低下させる傾向が見られた。このことは、MAST キナーゼ変異体の行動異常が野生株よりも低温を好むことと一致している。すなわち、MAST キナーゼ変異体の AIY ニューロンは、至適

温度よりも低い温度域であっても温度上昇を忌避的な環境入力として捉え、温度上昇を避けて温度勾配上を低温方向へと移動する、と考えられる。一方で、ストマチン変異体の AIY ニューロンでは、どちらの温度上昇であっても、カルシウム濃度を上昇させる傾向を示した。このことは、ストマチン変異体の行動異常が野生株よりも高温を好むことと一致している。また、MAST キナーゼ、ストマチン両変異体の AFD 温度受容ニューロンの温度刺激に対する応答は、野生株と大きな違いは認められなかった。さらに、これらの遺伝子は AFD 温度受容ニューロンで機能することで、AIY ニューロンの活動を制御することが、細胞特異的な発現実験によって明らかとなった。



2) 前進中の方向調節（カーブ）が温度応答行動において最も重要な行動戦略である

Multi worm tracker およびシミュレーションによる解析から、温度応答行動に最も寄与する行動要素は「カーブ」であることが明らかとなった。カーブとは、線虫が前進運動中に緩やかに進行方向を調節する制御であり、線虫はこのカーブを双方向的に調節することで、温度勾配上を至適温度へと向かっていることが分かった。

MAST キナーゼ、およびストマチン変異体において、同様の行動要素解析を行ったところ、これらの変異体ではカーブの制御が異常になっていることが明らかとなった。MAST キナーゼ変異体では、より低温に向かってカーブする異常を示し、一方で、ストマチン変異体ではより高温に向かってカーブする異常を呈した。これらのことから、AIY 介在ニューロンの双方向的な活動が温度勾配上における双方向的なカーブ制御を生み出していることが示唆された。

3) *nj274* 変異はジアシルグリセロールキナーゼをコードする *dgk-1* 遺伝子の変異である

nj274 変異の SNP mapping、および全ゲノムシーケンスから、*nj274* 変異体の原因遺伝子の候補として *dgk-1* 遺伝子が示唆された。*nj274* 変異体は *dgk-1* 遺伝子内に欠失変異を持ち、*nj274* 変異体の温度応答行動異常は、野生型 *dgk-1* 遺伝子を導入することで回復した。以上のことから、*nj274* 変異の原因遺伝子は、*dgk-1* 遺伝子であることを明らかにした。

dgk-1 変異体に対して、AIY 神経活動の測定を行ったところ、MAST キナーゼ変異体と同様に、AIY ニューロンは主に抑制性の活動を示すことが明らかとなった。また、Multi worm tracker の解析においても、*dgk-1* 変異体はカーブの制御に異常を示した。これらのことから、*dgk-1* 遺伝子は、MAST キナーゼ、ストマチンなどと、機能的に相互作用することが示唆された。

これらの研究成果を論文としてまとめ、学術雑誌に発表した(Nakano et al., PNAS, 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ikeda Muneki, Nakano Shunji, Giles Andrew C., Xu Linghuan, Costa Wagner Steuer, Gottschalk Alexander, Mori Ikue	4. 巻 117
2. 論文標題 Context-dependent operation of neural circuits underlies a navigation behavior in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 6178 ~ 6188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1918528117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsukamoto Satomi, Emmei Taishi, Nakano Shunji, Nishio Nana, Sasakura Hiroyuki, Mori Ikue	4. 巻 25
2. 論文標題 The <i>Caenorhabditis elegans</i> INX-4/Innexin is required for the fine tuning of temperature orientation in thermotaxis behavior	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 154 ~ 164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12745	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Shunji, Ikeda Muneki, Tsukada Yuki, Fei Xianfeng, Suzuki Takamasa, Niino Yusuke, Ahluwalia Rhea, Sano Ayana, Kondo Rumi, Ihara Kunio, Miyawaki Atsushi, Hashimoto Koichi, Higashiyama Tetsuya, Mori Ikue	4. 巻 117
2. 論文標題 Presynaptic MAST kinase controls opposing postsynaptic responses to convey stimulus valence in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1638 ~ 1647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1909240117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikenaka Kensuke, Tsukada Yuki, Giles Andrew C., Arai Tadamas, Nakadera Yasuhito, Nakano Shunji, Kawai Kaori, Mochizuki Hideki, Katsuno Masahisa, Sobue Gen, Mori Ikue	4. 巻 9
2. 論文標題 A behavior-based drug screening system using a <i>Caenorhabditis elegans</i> model of motor neuron disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46642-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aoki Ichiro, Tateyama Michihiro, Shimomura Takushi, Ihara Kunio, Kubo Yoshihiro, Nakano Shunji, Mori Ikue	4. 巻 1
2. 論文標題 SLO potassium channels antagonize premature decision making in <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 eCollection2018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s42003-018-0124-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 An Seon Woo A., Choi Eun-Seok, Hwang Wooseon, Son Heehwa G., Yang Jae-Seong, Seo Keunhee, Nam Hyun-Jun, Nguyen Nhung T. H., Kim Eun Ji E., Suh Bo Kyoung, Kim Youngran, Nakano Shunji, Ryu Youngjae, Man Ha Chang, Mori Ikue, Park Sang Ki, Yoo Joo-Yeon, Kim Sanguk, Lee Seung-Jae V.	4. 巻 e12906
2. 論文標題 KIN-4/MAST kinase promotes PTEN-mediated longevity of <i>Caenorhabditis elegans</i> via binding through a PDZ domain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 e12906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/ace1.12906	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamaguchi Shoichiro, Naoki Honda, Ikeda Muneki, Tsukada Yuki, Nakano Shunji, Mori Ikue, Ishii Shin	4. 巻 14
2. 論文標題 Identification of animal behavioral strategies by inverse reinforcement learning	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Computational Biology	6. 最初と最後の頁 e1006122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pcbi.1006122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Shunji Nakano, Muneki Ikeda, Yuki Tsukada, Ayana Sano, Rumi Kondo, Takamasa Suzuki, Tetsuya Higashiyama, and Ikue Mori
2. 発表標題 Alteration between positive and negative valence of a neuronal connection shapes a <i>C. elegans</i> navigation behavior
3. 学会等名 The 41st annual meeting of the Japan neuroscience society (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shunji Nakano, Muneki Ikeda, Yuki Tsukada, Ayana Sano, Rumi Kondo, Takamasa Suzuki, Tetsuya Higashiyama, and Ikue Mori
2. 発表標題 Alteration of Synaptic Valence Controls a <i>C. elegans</i> Navigation Behavior
3. 学会等名 UK-Japan Neuroscience Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunji Nakano, Muneki Ikeda, Andrew C. Giles, Takamasa Suzuki, Ayana Sano, Rumi Kondo, Tetsuya Higashiyama, Ikue Mori
2. 発表標題 The <i>C. elegans</i> MAST Kinase Acts through Stomatin and Diacylglycerol Kinase to Regulate Thermotaxis Behavior
3. 学会等名 The 21st International <i>C. elegans</i> meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shunji Nakano, Muneki Ikeda, Yuki Tsukada, Ayana Sano, Rumi Kondo, Takamasa Suzuki, Tetsuya Higashiyama, and Ikue Mori
2. 発表標題 Valence coding of thermal stimulus by bidirectional activity of a single interneuron in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 NSI workshop (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunji Nakano, Ikue Mori
2. 発表標題 Stomatin-dependent control of presynaptic release during a memory-guided navigation behavior in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunji Nakano, Muneki Ikeda, Yuki Tsukada, Ayana Sano, Rumi Kondo, Takamasa Suzuki, Tetsuya Higashiyama, and Ikue Mori
2. 発表標題 Presynaptic MAST Kinase Controls Bidirectional Post-Synaptic Responses to Convey Stimulus Valence during <i>C. elegans</i> Thermotaxis
3. 学会等名 The 22nd International <i>C. elegans</i> meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考