

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840125

研究課題名(和文)線虫C.elegansの嗅覚学習をモデルとした忘却の制御メカニズム

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms for the forgetting of the olfactory learning in C.elegans

研究代表者

猿渡 悦子(Sawatari, Etsuko)

九州大学・基幹教育院・助教

研究者番号：60456605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：動物の神経系では、入手した情報の重要性に応じて記憶の形成・保持・忘却が適切に制御されている。必要な記憶を保持する一方で、不必要な記憶を忘れることは、常に変化する環境に適応するためのみならず、不必要な記憶の蓄積により必要な記憶の想起が阻害されることを防ぐためにも重要である。本研究では線虫C.elegansの嗅覚学習を用いて、忘却の制御メカニズムの解析を行った。カルシウムイメージングや行動解析により、シナプス放出に関わる分子が神経回路上で嗅覚学習の忘却を制御していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In animal neuronal circuit, their memory are controlled appropriately according to the importance of the information. The forgetting processes are important for adaptation to changing environment. Our interest is how animals forget the memories. We used olfactory learning as a model for behavioral plasticity in C. elegans. By calcium imaging and behavior analyses, a novel molecule working in the synaptic release is shown to regulate the forgetting in the neural circuit.

研究分野：生物学

キーワード：学習 記憶 カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

動物の神経系では、入手した情報の重要性に応じて記憶の形成・保持・忘却が適切に制御されている。必要な記憶を保持する一方で、不必要な記憶を忘れることは、常に変化する環境に適応するためのみならず、不必要な記憶の蓄積により必要な記憶の想起が阻害されることを防ぐためにも重要である。これまで行われてきた記憶に関する研究は、記憶がどのように形成・保持されるのかに着眼点が置かれており、記憶を忘れるメカニズムはあまり明らかにされていない。そこで本研究は、単純な神経系を持ち遺伝学的解析が容易な線虫 *C. elegans* を用いて、記憶の忘却に関わる新規因子やその制御メカニズムの解明を目指している。本研究開始までに、「ブタノンエンハンスメント」と呼ぶ、匂いと餌の連合学習の記憶の保持時間が長くなる変異体をスクリーニングにより単離し、その原因遺伝子 *snt-3* の同定に成功していた。

2. 研究の目的

「記憶を忘れるメカニズム」の解明に向けて、*SNT-3* が神経回路上で忘却を制御する仕組み、特に感覚神経と介在神経の間でやりとりされる神経伝達に注目し、*SNT-3* による忘却制御に関わる神経回路を明らかにすることを目的とした。さらに、餌シグナルによる忘却の制御機構を解析し、*SNT-3* によるシナプス放出制御を介した忘却シグナルと餌シグナルによる記憶の忘却メカニズムを総合的に理解することを目指した。

3. 研究の方法

ブタノンエンハンスメントとは、餌がある条件下で匂い物質ブタノンに曝すと、ブタノンに対する誘引行動が強くなる行動可塑性である。この行動可塑性は野生型では約 90 分で失われ、ブタノンへの応答は弱くなる。一方 *snt-3* 変異体は、強い応答が維持されたままであり、記憶を忘れにくい表現型を示す。また、野生型線虫を用いて条件付け前、記憶を獲得後、忘却を誘起後の各ステップで、ブタノンに対する AWC 感覚神経の応答をカルシウムイメージングにより解析した。その結果、ブタノンエンハンスメントの忘却が AWC 感覚神経の感覚応答の変化によるものではないことを見出ししていた。そこで本研究課題では、このブタノンエンハンスメントの記憶がどのように神経回路内に保持され、忘却が制御されているか、また、餌シグナルの関与を明らかにするために、カルシウムイメージングと行動測定により以下の解析を行った。

(1) 野生型と *snt-3* 変異体で神経活動に差が見られる神経細胞の探索

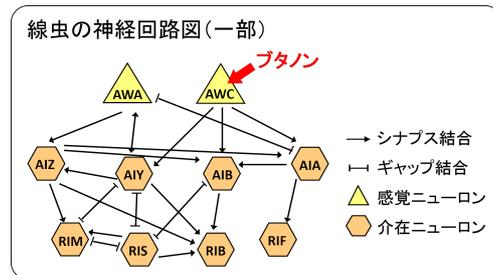
(2) AWC 感覚神経より下流の介在神経の活動を人為的に操作した線虫の行動測定を行い、忘却に与える影響を解析

(3) 飼育条件の変化が記憶の忘却に与える影響を解析

さらに、(4) *SNT-3* による忘却制御機構が他の行動可塑性の記憶にも存在するか否かを確認し、*SNT-3* と忘却の関わりを解析した。

4. 研究成果

(1) カルシウムイメージングにより野生型と *snt-3* 変異体で神経活動に差が見られる神経細胞の探索を行った。ブタノン感知する AWC 感覚神経は、一定時間ブタノン刺激を行った後にその刺激が消失すると、細胞内カルシウム濃度が上昇するという応答を示す。野生型においてこの神経応答は、ブタノンエンハンスメントの条件付け直後に変化量が大きくなり、忘却誘起後にもそれが維持されていた。*snt-3* 変異体での神経応答を確認するために、AWC 感覚神経でカルシウムセンサーを発現させた *snt-3* 変異体を作成し、ブタノン刺激により得られる神経応答を解析した。その結果、*snt-3* 変異体でも野生型の神経応答と同様の傾向を示し、ブタノンエンハンスメントの忘却が AWC 感覚神経より下流で制御されている可能性が強く支持された。続いて、AWC 感覚神経の下流に位置するいくつかの介在神経において特異的にカルシウムセンサーを発現させた線虫を作成し、その神経応答を比較した。これらのうち、AIB 介在神経は後退運動を制御する神経細胞であるため、ここで変化が見られると期待していたが、野生型と *snt-3* 変異体の神経応答に差を検出することができなかった。AWC 感覚神経からの入力に対する応答には、AIB 介在神経・AVA 介在神経・RIM 介在神経の各活動のバランスが重要であることが報告されている (Gordus *et al.*, Cell, 2015)。そのため、現在解析中の介在神経を含め、今後は上記神経細胞についても解析を進める必要がある。



(2) AWC 感覚神経と直接シナプスを形成する介在神経 (AIB, AIA, AIY) に対して神経活動の制御を行った線虫を用いて、ブタノンエンハンスメントの行動解析を行い、忘却に与える影響を解析した。抑制性の制御として、過分極または細胞死を誘発、興奮性の制御として、シナプス放出を促進するといった遺伝子操作を加えた。AIA 介在神経や AIY 介在神経の神経活動を制御した場合、顕著な行動異常は認められなかった。一方 AIB 介在神経の活動を抑制した場合、記憶が長続きする傾向が観察され、AIB 介在神経がブタノンエンハンスメントの記憶の保持に重要な役割を果たすことが示唆された。カルシウムイメージ

ングによる解析では、AIB 介在神経の活動に可塑的な変化は認められなかったことから、AIB 介在神経よりさらに下流に位置する神経細胞において可塑的な変化が見られる可能性が高い。今後、候補となる神経細胞についてカルシウムイメージングと行動解析を組み合わせた同様の解析を行うことで、神経回路内での情報処理の詳細が明らかになると考えられる。

(3) 飼育条件の変化が記憶の忘却に与える影響を解析した。ブタノンエンハンスメントの記憶は、条件付け後の餌がある条件下では消失し、餌がない(飢餓)条件下では維持されるため、忘却には「餌シグナル」の関与が重要であることが分かっていた。この、条件付け後に餌なし条件下で記憶が長く続く現象は、記憶が維持されているわけではなく飢餓を経験することでブタノンへの感受性が上昇している可能性があると考えられた。そこで、条件付けをしていない線虫に飢餓を経験させ、ブタノンに対する行動測定を行った。その結果、飢餓を経験した線虫はブタノンに強く誘引されることが明らかとなった。続いて、上述の飢餓だけを経験した線虫の AWC 感覚神経のブタノンに対する神経応答を解析した。興味深いことに、野生型では飢餓を経験した場合の感覚応答は低下するが、反対に *snt-3* 変異体では上昇する傾向があった。この結果より、*snt-3* 変異体が餌の感知が異常になっている可能性が考えられたため、餌を咀嚼する際の咽頭筋の運動回数 (pumping 回数) を計測した。結果として、*snt-3* 変異体の pumping 回数に異常は認められず、*snt-3* 変異体が正常に餌を感知していることが推測された。さらに、ブタノンエンハンスメントの条件付け後、飢餓条件下で飼育した線虫の AWC 感覚神経のブタノンに対する神経応答を解析したところ、条件付け直後の大きな変化量が飢餓を経験した後でも維持されていた。

【行動測定とカルシウムイメージングの結果】

		野生型		<i>snt-3</i> 変異体	
		行動	AWC 応答	行動	AWC 応答
条件付け前	条件付け前 (naive)	誘引	弱い	誘引	弱い
	条件付け直後 (enhance)	強く誘引	強い	強く誘引	強い
	餌あり飼育 (忘却誘起)	忌避	強い	誘引	強い
	餌なし飼育 (記憶維持)	強く誘引	強い	強く誘引	強い
	餌なし飼育 (飢餓のみ)	強く誘引	naiveより弱い	強く誘引	naiveより強い

これまでに得られた、行動解析とカルシウムイメージングの結果を上記の表に示したが、SNT-3 と餌シグナルによる忘却機構のモデルを作ることは困難である。*snt-3* 変異体が餌があるのにない状態と誤認識し、記憶が長続きしている可能性も考えられたが、正常に餌を感知していることが示唆されたため、より複雑な制御がなされていると考えられる。今後、餌シグナルの受容に異常がある変異体などを用いて解析を行うことで、SNT-3

と餌シグナルによる忘却制御機構が解明されると期待される。

(4) SNT-3 による忘却制御機構が他の行動可塑性の記憶にも存在するか否かを確認し、SNT-3 と忘却の関わりを解析した。ジアセチルおよびイソアミルアルコールを用いた嗅覚順応と、塩走性学習の行動測定を行った。その結果、*snt-3* 変異体の記憶の保持時間は野生型とほぼ同じであり、記憶を忘れにくい表現型を示すことはなかった。これまでのところ *snt-3* 変異体においてブタノンエンハンスメントの記憶の保持時間以外の異常は見つかっておらず、SNT-3 がブタノンエンハンスメントの忘却に関わる情報処理においてユニークなシナプス放出制御を行っていることが予想された。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Takeshi Ishihara, Akitoshi Inoue, Etsuko Sawatari, Tomohiro Kitazono, Manabi Fujiwara, Takayuki Teramoto. 「Active forgetting of the olfactory memory in *C. elegans*」 NEUROBIOLOGY: DIVERSE SPECIES & CONSERVED PRINCIPLES. Cold Spring Harbor Conferences Asia Cold Spring Harbor Laboratory. 2014年9月

〔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

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~buns>

[i ide/](#)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

猿渡 悦子 (SAWATARI, Etsuko)

所属研究機関：九州大学

部局：基幹教育院

職名：助教

研究者番号：60456605