

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640018

研究課題名(和文)フェロモン感知ニューロンにおける温度感知とそれらの情報の識別

研究課題名(英文)Discrimination of sensory signaling in pheromone and temperature-sensing neuron

研究代表者

久原 篤 (Kuhara, Atsuhi)

甲南大学・理工学部・准教授

研究者番号：00402412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞において複数の情報が神経細胞内でどのようにして区別やクロストークされるかを解析することは重要であると考えられる。本研究では、シンプルに複数の神経情報処理を解析できる実験系を確立するための解析を行った。その結果、従来線虫において耐性幼虫からのリカバリーや光受容に関与することが知られていた感覚ニューロンが温度も感知することが明らかとなった。このニューロン内におけるフェロモンや光の情報伝達に関して、単一の感覚ニューロンにおいて、感覚刺激の種類に応じて、Gタンパク質やグアニル酸シクラーゼが使い分けられている可能性が示唆された。また、個体レベルでの温度応答適応でも加算性が確認された。

研究成果の概要(英文)：How multiple neural signaling is discriminate and crosstalk in the neuron is important question. Here we established experimental system for analyzing their processing of multiple neural signaling. We found that a sensory neuron known as pheromone and light sensing-neuron acts as a thermosensory neuron. In this multi stimuli common sensory neuron, trimeric G protein, our calcium imaging revealed that guanylyl cyclase and phosphodiesterase regulates pheromone, light and temperature signaling. However, we found that GPA-1 encoding G protein alpha subunit and PDE-3 encoding phosphodiesterase control temperature signaling specifically. These results suggest that commonalities and differences in the molecular components concerned with pheromone, light and temperature signaling in a single sensory neuron.

研究分野：分子神経遺伝学

キーワード：C. elegans 区別識別 線虫 3量体Gタンパク質 カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

動物の脳の神経回路において、たくさんの神経情報が、どのように混線することなく区別されているかを解析することは、重要である。しかし、生体内で神経情報の区別を解析するには、その情報処理の複雑さから解析に困難をとまらしている。我々はこれまでに、単一の感覚ニューロンが2つ以上の情報を感知しているケースを線虫の温度に対する応答の解析から明らかにしてきた(Kuhara et al., *Science*, 2008)。本研究では、線虫の神経回路をつかい、温度とフェロモンや光という複数の神経情報がどのような分子と生理的機構により識別や統合されるかについて、分子生理学的手法を駆使して調べることを目的とした。本研究から、脳神経系における情報の識別や統合に関して分子生理のレベルで新しい知見が得られると予想した。

脳神経科学では、環境応答を制御する神経回路システムを、分子-神経細胞-神経回路-個体の4つのレベルを結びつけて解析が行なわれている。我々は、シンプルな実験動物である線虫 *C. elegans* をつかい、感覚受容と記憶学習の分子神経メカニズムを解析してきた (Kuhara et al., *Science*, 2008; Kuhara et al., *Nature commun*, 2011; Kuhara et al., *Neuron*, 2002)。しかし、これまでに解析してきた、10個以下の神経細胞からなるシンプルな神経回路であっても、その情報処理機構を解析する中で未知の点が大きいと感じてきた。特に、神経細胞に入力される複数の情報が、どのように細胞内や回路内で区別や識別やクロストークされるのかに関して、分子生理メカニズムが未解明であることが大きな課題であると考えられた。それらの課題を調べるために、線虫のシンプルな実験系をもちいた。具体的には、単一の感覚ニューロン(ASJ)が、温度とフェロモンと光といった質的に違う2つ以上の情報を感知する可能性が予備的な解析から得られていたため、その細胞をもちいて複数の神経情報の識別や統合などの情報処理の基本的な機構が解析できるのではないかと着想していた。

2. 研究の目的

脳において、多量の情報が神経細胞内で混線することなくどのようにして区別や統合されるかを解析することは重要であると考えられる。これまでに多くの動物において、神経情報の区別が解析されてきたが、未知の点も多数残っている。本研究では、シンプルな線虫の実験系をつかい、神経情報の識別に関わる情報処理機構を詳しく解析することを目的とした。これまでに、線虫の温度に対する走性行動を実験系として、単一の感覚ニューロンが2つ以上の情報を感知し、区別識別しているケースを明らかにしたが、本研究では、行動に頼らずに、よりシンプルに複数の神経情報処理を解析できる実験系を確立し、その実験系をもちいて、

複数の神経情報がどのような分子と生理的機構により識別や統合されるかについて、分子生理学的手法を駆使して明らかにすることを旨とした。具体的には、線虫の頭部に存在する ASJ と呼ばれる感覚ニューロンに着目して、ASJ が複数の感覚刺激を認識することや、その際の分子生理機構をカルシウムイメージングで測定することを目指した。本研究から、脳神経系における情報の識別や統合というテーマについて、新しい知見が得られることを期待した。

ASJ 感覚ニューロンは、フェロモンと光を感知するニューロンであることがすでに報告されており、ASJ 感覚ニューロン内に存在する分子情報伝達経路は、脊椎動物の分子経路と類似していることが分かっていた。しかし、光情報を受け取った際の膜電位の変化が、脊椎動物と線虫では逆である(Liu et al., 2010)。具体的には、脊椎動物では、光を受容すると3量体Gタンパク質(Gα)であるトランスデュースインとホスホジエステラーゼ(PDE)が活性化し、cGMPを分解してcGMP依存性チャンネル(CNGチャンネル)が閉じる。一方、*C. elegans* では、ASJ 感覚ニューロンで光を受容されると、Gαタンパク質がグアニリル酸シクラーゼ(GC)を活性化し、cGMP濃度を上昇させることでCNGチャンネルを開口させる。

3. 研究の方法

ASJ ニューロン内において、様々な感覚情報の伝達に関わる3量体Gタンパク質(Gα)の機能欠失変異(*goa-1*, *gpa-1*, *gpa-3*)と、グアニリル酸シクラーゼ(GC)の機能欠失変異(*odr-1*, *daf-11*)と、ホスホジエステラーゼ(PDE)の機能欠失変異(*pde-1*, *pde-5*, *pde-3*, *pde-2*)と、cGMP依存性チャンネル(CNG)の機能欠失変異(*tax-4*)を用いた。これらの単独の変異体や多重変異体をもちいて、それらの感覚応答を測定した。

4. 研究成果

これまでに光やフェロモンを受容する感覚ニューロンとして知られていたASJ感覚ニューロンが、低温耐性に関与することが示唆された。そこで、ASJ 感覚ニューロンが、温度刺激を受け取る感覚ニューロンであるかどうかを測定するために、ASJの温度応答性を、cameleonと呼ばれるカルシウムインディケーター遺伝子を用いて解析した。その結果、フェロモンや光受容ニューロンとして知られたたASJ感覚ニューロンが温度にも反応する温度受容ニューロンであることが示唆された。

ASJ 感覚ニューロン内において光やフェロモンの情報伝達に関わる分子経路が明らかとなっている(Liu et al., 2010)。光に関しては、頭部ASJニューロンの樹状突起先端に局在している光受容体LITE-1で受け取られ、3量体Gタンパク質αサブユニットであ

る GOA-1 と GPA-3 を活性化し、グアニル酸シクラーゼである DAF-11 と ODR-1 を介して細胞内 cGMP 濃度を変化させ、それによって cGMP 依存性チャネル TAX-4 の開口を制御することで細胞内情報伝達を引き起こす。また、cGMP を加水分解するホスホジエステラーゼ PDE-1、PDE-2、そして PDE-5 も ASJ 内において機能している。フェロモンに関しては光受容体以外はほぼ同様の経路で伝達される。これら ASJ 感覚ニューロンのフェロモンや光受容情報伝達で機能する分子が温度の情報伝達の制御に共通しているかどうかを調べるため、ASJ の光受容情報伝達に関わる分子の変異体について温度応答を調べた。ASJ に存在する唯一の光受容体である LITE-1 を欠損した *lite-1* 変異体は、野生株とほぼ同様の温度応答を示したことから、光受容体は温度応答に関与しないことが示唆された。

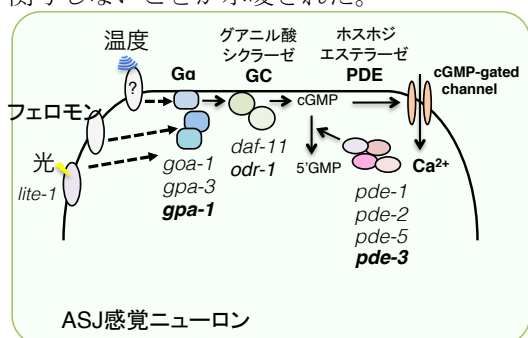


図 1: ASJ 感覚ニューロンにおける温度とフェロモンと光の感覚情報に関する分子制御機構。GPA-1 (Gα), PDE-3 (PDE) は温度情報伝達に特異的に働く。

ASJ の光情報伝達に関わる 3 つの Gα タンパク質 (*goa-1*, *gpa-1*, *gpa-3*) の変異体や、2 つのグアニル酸シクラーゼ (*odr-1* と *daf-11*) のそれぞれの変異体は、20°C 飼育後に低温刺激を与えても生存できる異常が観察された。さらに、ホスホジエステラーゼの変異体においても異常が観察された。以上のことから、ASJ 感覚ニューロンの光情報伝達に関わる分子が低温耐性にも関わることが示唆され、光と温度の受容は、共通の分子による G タンパク質経路で伝達される可能性が考えられた。さらに、Gα タンパク質の変異体である *goa-1* または *gpa-1* の低温耐性の異常は、二重変異体や三重変異体にすることでより強い低温耐性の異常が見られた。同様に、グアニル酸シクラーゼの変異体である *daf-11* と *odr-1* の低温耐性の異常も *daf-11*; *odr-1* 二重変異にすることで、ほぼ 100% の生存率を示す異常が観察された。つまり、これら Gα タンパク質やグアニル酸シクラーゼは、複数の分子がそれぞれ共同して機能していると考えられた。

温度の情報伝達に関して、ASJ 温度受容ニューロンにおける 3 つの Gα タンパク質の共同的な制御が必須であることが示唆されたため、次に、ASJ ニューロンの神経活動のレベルでも複数の分子が共同して機能してい

るかをカルシウムイメージング法を用いて解析した。ASJ ニューロンの温度応答性解析に用いた温度刺激は 17°C→23°C→17°C という温度刺激パターンに加え、23°C→17°C→23°C という温度刺激パターンも用いた。このとき注目した値として、細胞内カルシウム濃度が最も高くなったポイントである Maximum (Max) と、反対に最も低くなったポイントである Minimum (Min)、そして最大変化値と最小変化値の差である Max-Min が挙げられる。Max は、17°C から 23°C に温度を変化させた際の神経活動の変化を表しており、Min は 23°C から 17°C へ温度を戻したときの定常状態への戻り具合を表している。また、17°C から 23°C への温度変化を 1 次温度刺激とし、23°C から 17°C への温度変化を 2 次温度刺激と見なし、この 2 次温度刺激に対する反応性を Max-Min とした。23°C→17°C→23°C の温度刺激を与えた場合も同様に、最大変化値を Max、最小変化値を Min とし、これらの差を Min-Max とした。20°C で飼育した野生株に 17°C→23°C→17°C の温度刺激を与えると、温度上昇に伴い約 10% の YFP/CFP の上昇がみられたが、23°C→17°C→23°C の温度刺激を与えると温度低下に伴い約 10% の YFP/CFP の低下がみられた。この 17°C→23°C→17°C と 23°C→17°C→23°C の温度刺激を Gα タンパク質、グアニル酸シクラーゼ、ホスホジエステラーゼの各変異体に加え、ASJ 感覚ニューロンの温度応答性を解析した。

まず、17°C→23°C→17°C の温度刺激を与えた際に、Gα タンパク質の変異体である *goa-1*、*gpa-1*、*gpa-3* それぞれの ASJ 感覚ニューロンにおけるカルシウム濃度の変化を調べたところ、*gpa-1* 変異体のみで Max にわずかな異常が見られた。一方で、23°C から 17°C への刺激に対しては、*goa-1*、*gpa-1*、*gpa-3* 変異体すべてにおいて Min または Max-Min の異常が見られた。つまり、これらの Gα タンパク質は細胞内のカルシウム濃度を定常状態へ戻す際に機能している可能性が考えられた。グアニル酸シクラーゼの変異体についても解析を行ったところ、17°C→23°C→17°C の温度刺激に対して *daf-11* 変異体は Max に異常を示し、*odr-1* 変異体は Min と Max-Min に異常を示した。一方、23°C→17°C→23°C の温度刺激に対しては、*daf-11* 変異体においてのみ Min-Max に異常が見られた (Ujisawa *et al.*, 2016)。

ホスホジエステラーゼ (PDE) はグアニル酸シクラーゼの機能とは逆に、cGMP を加水分解することで細胞内へのカルシウム流入を抑制することで知られている。17°C→23°C→17°C の刺激を与えた条件において、*pde-2* 変異体と *pde-3* 変異体において Max の異常が観察された。この傾向は *pde-1* *pde-5*; *pde-2* 三重変異体でも見られ、さらに *pde-1* *pde-5*; *pde-3*; *pde-2* 四重変異体では、異常が増強された。さらに、*pde-1* *pde-5*; *pde-3*; *pde-2* 四重変異体では、Min と Max-Min

の値も低くなった。通常、PDE が欠損することで、感覚ニューロン内の cGMP が分解されず、CNG チャネルが開いた状態になるため、*pde-5* の変異体に見られるように細胞内カルシウム濃度が高い状態が維持されると想定される。しかし、今回のカルシウムイメージングの結果から、PDE が欠損すると、感覚ニューロン内カルシウム濃度が低下していることが示された。脊椎動物の視細胞では、細胞内へのカルシウムイオンの異常な流入がカルシウム結合タンパク質などを介して GC を抑制し、その結果、カルシウムイオンの流入を妨げることが報告されている (Koch and Stryer, 1988; Nakatani and Yau, 1988)。このことから、*C. elegans* においても、PDE の欠損により細胞内へのカルシウムイオンの異常な流入が起こり、これが GC を抑制することにより、ASJ 感覚ニューロンの不活性化が起きている可能性が考えられた。このような現象は 23°C→17°C→23°C の刺激を与えた結果にも見られ、*pde-3* 変異体では野生株よりも Max の値が高くなる異常が見られたが、*pde-1 pde-5; pde-3; pde-2* 四重変異体では値が低くなっていた。

ASJ 感覚ニューロンのカルシウム濃度は 17°C から 23°C への warming 時に上昇し、23°C から 17°C への cooling 時には減少する。*pde-3* 変異体では、23°C→17°C→23°C の cooling 刺激を与えた場合に野生株よりも反応性が弱くなった。一方、*pde-5* 変異体では、17°C→23°C→17°C の warming 刺激を与えた場合に野生株よりも反応性が強くなった。これは、PDE-3 が cooling 刺激に対する抑制因子として機能し、PDE-5 が warming 刺激に対する抑制因子として機能していることを表していると考えられた。これらの結果は、多くの動物において、PDE がカルシウム流入を抑制するという機能をもつことと矛盾しなかった。

ASJ 感覚ニューロンの光やフェロモンの情報伝達に関わる分子経路と今回見つけた温度情報伝達の経路を比較してみると、光は光受容体 LITE-1 で受け取られ、Gα タンパク質として GOA-1 と GPA-3、グアニル酸シクラーゼとして DAF-11 と ODR-1、ホスホジエステラーゼとして PDE-1、PDE-2、PDE-5 が機能するが、温度情報伝達には GPA-1 と PDE-3 も機能することがわかった。さらに、*pde-3* 変異体は cooling 刺激に、*pde-5* 変異体は warming 刺激に対して異常を示したことから、温度刺激の種類によって機能する分子が異なる可能性も考えられた。以上の結果から、ASJ におけるフェロモンや光と温度が、同じ分子経路と異なる分子経路を組み合わせて伝達することが示唆された (図 1)。

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 7 件)

(1) Sonoda S., Ohta, A., Maruo, A., Ujisawa T., Kuhara, A.

Sperm affects head sensory neuron in temperature tolerance of *Caenorhabditis elegans*

Cell Reports, 16, 1, 56-65, 2016 (査読有)

(2) Ujisawa, T., Ohta, A., Uda-Yagi, M., Kuhara A.

Diverse Regulation of Temperature Sensation by Trimeric G-Protein Signaling in *Caenorhabditis elegans*.

PLoS ONE, 11(10): e0165518., 1-20, 2016 (査読有)

(3) Okahata M., Ohta, A., Mizutani, H., Minakuchi, Y., Toyoda, A., Kuhara, A.

Natural variations of cold tolerance and temperature acclimation in *Caenorhabditis elegans*

Journal of Comparative Physiology B, 186, 8, 985-998, 2016 (査読有)

(4) Kage-Nakadai E., Ohta, A., Ujisawa T., Sun S., Nishikawa Y., Kuhara A., Mitani S. A *Caenorhabditis elegans* homolog of Prox1/Prospero is expressed in the glia and is required for sensory behavior and cold tolerance.

Genes to Cells, 21, 9, 936-948, 2016 (査読有)

(5) 久原 篤, 宇治澤 知代, 太田 茜
線虫 *Caenorhabditis elegans* の温度適応を制御する神経と腸を介した情報処理
比較生理生化学, Vol.32 No.2, p67-75, 2015 (査読有)

(6) Ohta A., Ujisawa T., Sonoda S., Kuhara A.

Light and pheromone-sensing neuron regulates cold habituation through insulin signaling in *C. elegans*

Nature commun, 5, 4412, 1-12, 2014 (査読有)

(7) Ujisawa T., Ohta A., Kuhara A.

Long-term calcium imaging of ASJ sensory neuron controlling cold tolerance in *C. elegans*

Protocol Exchange,

doi:10.1038/protex.2014.034, 2014 (査読無)

[学会発表 (主に招待講演と査読有の講演を記載)] (計 10 件)

(1) 大西 康平、宇治澤 知代、太田 茜、久原 篤
線虫から探る温度応答の分子神経メカニズム
統合ニューロバイオロジー研究所 第4回シンポジウム
(招待講演 国内シンポジウム)
2017年1月16日
甲南大学、神戸、兵庫

(2) 久原篤、太田茜
線虫から学ぶ温度応答の制御機構
第1回 Biothermology Workshop - 生命システムの熱科学 -
(招待講演 国内ワークショップ)
岡崎コンファレンスセンター、岡崎、愛知
2016年12月10-11日

(3) 久原篤、宇治澤知代、太田茜
線虫から探る温度応答と記憶のエッセンス
動物学会近畿支部会 秋期講習会/
統合ニューロバイオロジー研究所 第3回シンポジウム
(招待講演 国内シンポジウム)
2015年12月5日
甲南大学、神戸、兵庫

(4) 宇治澤 知代、宇多美里、井伊辰也、井伊美紀、太田 茜、久原 篤
温度適応における温度受容ニューロンと下流組織の分子制御機構
分子生物学会年会
(口頭発表、査読有)
2015年12月1-4日
国部国際会議場、神戸、兵庫

(5) 久原 篤、宇治澤知代、太田 茜
Regulatory system for temperature response in nematode *C. elegans*
動物学会 ホメオスタシスバイオロジーシンポジウム
(招待講演 国内シンポジウム)
2015年9月18日
朱鷺メッセ、新潟

(6) Tomoyo Ujisawa, Kohei Ohnishi, Tohru Miura, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
Temperature experience-dependent cold acclimation in nematode *C. elegans*
生物物理学学会
(招待講演 国内シンポジウム)
2015年9月13日
金沢大学、金沢、石川

(7) Atsushi Kuhara, Tomoyo Ujisawa, Tohru Miura, Misato Uda, Akane Ohta
Temperature experience-dependent cold habituation in *C. elegans*
神経科学学会
(口頭発表、査読有)

2015年7月28-31日
国部国際会議場、神戸、兵庫

(8) Atsushi Kuhara, Tomoyo Ujisawa, Satoru Sonoda, Misaki Okahata, Akane Ohta
light and pheromone sensoryneuron regulates temperature habituation in *C. elegans*
ISMNTOP2014(The 12th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2014))
(招待講演 国際シンポジウム)
2014年11月2-3日
九州大学、福岡

(9) 宇治澤 知代、園田 悟、太田茜、久原 篤
線虫 *C. elegans* における温度適応を制御する神経システム
遺伝学会
(Best ペーパー賞受賞(口頭発表、査読無))
2014年9月17-19日
長浜バイオ、長浜、滋賀

(10) Akane Ohta, Tomoyo Ujisawa, Misato Uda, Makoto Ioroi, Natsune Takagaki, Mai Kimura, Satoru Sonoda, Atsushi Kuhara
Systematic regulation of memory-linked temperature tolerance in *C. elegans*
神経科学学会
(口頭発表、査読有)
2014年9月11-14日
パシフィコ横浜、横浜、神奈川

[図書] (計2件)

(1) 太田茜、園田悟、久原 篤
匂いに慣れたらどうなるの? センチュウの匂い順応テスト: 嗅覚順応行動の測定
研究者が教える動物実験 第1巻 感覚, p42-45, 共立出版, 2015

(2) 太田茜、園田悟、久原 篤
好きなにおいに向かっていく行動を見てみよう センチュウの走化性テスト: 嗅覚応答行動の測定
研究者が教える動物実験 第3巻 行動, p32-35, 共立出版, 2015

[その他]
ホームページ等
久原研究室ホームページ
<http://kuharan.com/index.html>

甲南大学研究者紹介
http://researchers.adm.konan-u.ac.jp/html/100000141_ja.html

6. 研究組織
(1) 研究代表者

久原 篤(KUHARA ATSUSHI)

甲南大学・理工学部・准教授

研究者番号：00402412