

「生命システムの動作原理と基盤技術」

平成 18 年度採択研究代表者

森 郁恵

名古屋大学大学院理学研究科・教授

行動を規定する神経回路システム動態の研究

## 1. 研究実施の概要

認識、記憶、学習といった行為や行動を決める脳内情報処理のメカニズムを包括的に理解することは、現在の神経科学において、最重要課題の1つである。本研究では、行動の可塑性を最も直接的に観察できる線虫 *C. elegans* の温度走性に着目し、この行動を規定する神経回路を1つのシステムとして捉え、実験科学と理論科学を融合させた総合的機能解析を行うことによって、記憶や学習の根幹となる神経ネットワーク機能を理解することを目的とする。目標の達成に向けて研究を進めた結果、現段階においては、温度変化に依存した神経回路活動変化の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを実施し、温度勾配上における線虫個体の行動を追跡し筋肉運動を定量化するシステムの開発に成功した。さらに、行動中の神経回路機能を人工的に操作するシステムの構築を行なう段階に達することができた。また、温度走性の神経回路動態と筋肉運動のコンピューターシミュレーションによる *in silico* 再構築に向けて、数理モデリングによる取り組みを開始した。さらに、温度走性を制御する神経回路活動の基盤となる分子・遺伝子ネットワークシステムの理解に向け、解析を進めている。このような成果を積み重ねることにより、神経科学における新技術が創出されるとともに、記憶や学習、および神経回路動態の本質を明らかにし、脳神経系の機能について、新概念を提言できるものと期待している。

## 2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は4.(1)に対応する)

(1)「実験科学」と「理論科学」の相互フィードバックによる温度走性行動と神経回路システムの統合的理解

### カルシウムイメージングによる温度走性に関与する神経回路の活動測定

*C. elegans* の温度走性研究の最大の利点は、温度刺激の入力場所である感覚ニューロンから、その情報の処理や統合を行い、走性行動に反映させる介在ニューロンに至るまで、1つの行動を支配する神経回路の骨格が、ほぼ明らかにされている点にある。本研究では、温度走性行動を司るすべてのニューロンの活動状態を計測し、どのような動作原理によって神経回路が働くかを明らかにすることを解明することを目標としている。19年度は、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法を用いて、*C. elegans* の温度受容ニューロンである AWC とその下流の介在ニューロンからなる神経回路を明らかにし、その活動状態の測定に成功した (1)。また、温度走性神経回路中の複数のニューロンの活動を同時に測定し、回路全体の動態としてとらえるための、多点イメージングシステム(顕微鏡システム)の開発に成功した。現在、開発した装置をもちいて、神経回路活動の数理モデリングのための神経活動のパラメータを、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングによって抽出している。

### 温度走性時の筋肉運動の数値化

温度走性神経回路におけるすべての温度情報は、RIA 介在ニューロンに統合されている。RIA 介在ニューロンは、主に、SMD, RMD モーターニューロンとシナプス接続していることが既に電子顕微鏡解析から明らかになっている。SMD, RMD モーターニューロンは、*C. elegans* の体全体の動きではなく、頭部先端部における「首振り運動」を制御する筋肉に軸索を投射していることから、温度走性の成立には、頭部首振りによる周辺温度の感知と、それによる移動角度の変化が重要であると予想される。19年度は、温度走性の筋肉運動レベルでの数値化に向け、温度走性時の線虫を自動追尾記録するための顕微鏡コンピューターシステムの開発に成功した。さらに、温度刺激による首振り頻度と角度の変化をコンピューター処理により数値化するためのソフトウェアの開発にも成功した。現在、開発した装置を用いて、線虫行動の数理モデリングのために、従来の技術では不可能であった非常に精密な行動のパラメータを抽出している。

### コンピューターシミュレーションの実践

温度走性行動の数理モデリングの構築に関しては、望月敦史研究グループ(基礎生物学研究所)との共同研究により、温度勾配というバイアスを与えられた際の Biased Random Walk Model に基づいた運動方程式を用いて、コンピューターシミュレーションを行なった(K. Nakazato, A. Mochizuki, A. Kuhara, I. Mori, unpublished)。その結果、これまでに

5つ以上の研究室によって、線虫の「高温へ向かう行動がそもそも存在するかしないのか」に関して、それぞれ矛盾する結果が発表されていたが、その矛盾は、線虫が温度勾配上において温度走性行動を行っている時の、線虫の周辺温度の温度勾配率が、各研究室によって異なることに起因するのではないかという仮説が、*in silico*解析によって提唱された。驚いたことに、同時期に、独立に当研究室において行なっていた行動解析の結果、線虫の高温への行動が、実際に温度勾配率によって劇的に変化することが明らかとなった (P. Jurado et al., in preparation)。つまり、*in vivo*の行動を、*in silico*で予想することに成功した。現在、今年度開発した温度勾配上での線虫行動を追尾するシステムを用いて、筋肉運動レベルで、温度勾配上での線虫行動を詳細に解析することによって、よりポリッシュされた数理モデルの構築とその検証を行なっている。神経回路活動の数理モデリングの構築に関しては、Ca<sup>2+</sup>イメージングによって得られた神経活動の情報をパラメータとし、神経回路活動の数理モデルの構築を行なっている。

#### コンピューターシミュレーション結果の *in vivo* 実験系での再現に向けたシステムの構築

コンピューターシミュレーションで予測された温度走性の神経回路活動の数理モデルは、*in vivo* 実験系で再現することにより初めて証明することができる。つまり、*in silico*での計算予測に基づき、*in vivo*で神経活動を人工的に変化させ、*in silico*の予測が再現可能であるか、検証する必要がある。*in silico*の計算予測を再現するためには、「1. 行動中の個体」における、神経回路上の「2. 特定のニューロン」の活動のみを、「3. 瞬間的」に「4. 意図した強さ」で、活性化もしくは不活性化させる技術が必要である。従来、このような技術は存在しなかったが、最近、特定の蛍光波長の照射により開閉するチャネル(チャネルロドプシン ChR とハロロドプシン HR)が発表された。19年度は、ChR と HR の励起波長をそれぞれミリ秒のオーダーで照射制御し、そのエネルギー値を調節するための装置を開発し、温度走性中の *C. elegans* を自動的追尾システムに装着した。現在、開発した装置をもちいて、温度走性行動中に神経回路の活動を操作することを試みている。

#### (2) 温度受容と温度記憶機構の分子遺伝学的解析

##### GPCR をコードする温度受容体候補遺伝子 B0496.5 の機能解析

温度受容体分子の同定は、刺激が入力する分子の特性を理解することであり、*C. elegans*の温度走性を規定する神経回路システム動態研究を進める上で、重要な目標の1つである。現在までの分子遺伝学的研究により、AFD 温度受容ニューロンにおいて、温度受容に必須の因子が複数同定されているが、現在に至るまで温度受容体をコードする分子は未同定のままである。AWC ニューロンにおける温度受容は、G タンパク質を介していることが、最近、当研究室の研究により明らかになった (1)。したがって、温度受容機構は、哺乳類の視細胞、嗅細胞、そして、*C. elegans*の嗅細胞で起こるシグナル伝達経路に極めて類似している可能性が高いと考えられる。これらの感覚システムとの比較から、七回膜貫通タンパク

質 (GPCR) が *C. elegans* の温度受容体分子として機能している可能性を検証するために、AFD および AWC 温度受容ニューロンに特異的に発現する GPCR をコードする B0496.5 遺伝子の機能解析を行った。

B0496.5 遺伝子は AFD と AWC で特異的に発現し、いずれのニューロンにおいても、外界の温度を受容する神経末端に局在していることが報告されている (Colosimo et al., 2004)。本年度において、我々の研究室で、B0496.5 遺伝子のプロモーター領域に GFP を融合した遺伝子は、AFD と AWC に発現していた。B0496.5 遺伝子のコードする GPCR が、AFD と AWC の神経末端に局在していることは、温度受容体の有力な候補となるため、B0496.5 遺伝子全長に GFP を融合した遺伝子を導入した株では、AFD と AWC の神経末端に局在していることも確認した。前年度は、B0496.5 遺伝子の機能を解析する目的で、欠失部位が異なる二つの独立な遺伝子破壊株 *nj62* および *nj63* 変異体を作製し、それらが、直線上の温度勾配装置を用いた集団温度走性テストにおいて、ともに、20°C または 23°C で飼育されると、野生型に比べて飼育温度より低温域に分布し、特に 23°C で飼育された場合、顕著な異常が観察されたことを報告した (H. Sasakura et al., unpublished)。そこで、B0496.5 遺伝子破壊株に、B0496.5 遺伝子を導入したところ、この温度走性行動異常は、ほぼ野生型に回復することが明らかになった。現在、AFD および AWC 特異的に B0496.5 遺伝子をレスキューさせた系統の行動解析を行っている。

#### 温度受容と温度記憶機構解明のためのマイクロアレイ解析

温度受容体分子の同定は、刺激が入力する分子の特性を理解することであり、温度走性を規定する神経回路システム動態研究を進める上で、重要な目標の 1 つである。しかし、現在に至るまで温度受容体をコードする遺伝子は未同定であり、温度受容後、記憶がどのように形成されるかも未解明である。温度と餌情報の連合学習に転写因子 *daf-16* を含むインスリン様シグナリング (Insulin/IGF-1-like signaling、以下 IIS) 経路が重要な役割を果たすことが示唆されたことから (Kodama et al., 2006)、転写が記憶の形成に関わると予想し、本研究では、温度記憶の本質をゲノムワイドに調べた (T. Sugi and I. Mori, unpublished)。具体的には、23°C で餌のある環境で飼育し、17°C に移す直前の線虫 (17°C 飼育 0 時間、つまり 23°C を記憶した線虫) と、17°C に移して 4 時間後の線虫 (17°C 飼育 4 時間、つまり 23°C の記憶が 17°C の記憶に変化した線虫) の間の遺伝子発現の差をマイクロアレイ法により調べた。これにより 17°C、もしくは 23°C の温度記憶の形成に必須の遺伝子が同定されると予想した。

変動した 78 遺伝子には、IIS 経路に関わる遺伝子が 38% 含まれていた。この結果は、IIS 経路が連合学習に重要であるという結果と一致しており、転写因子が温度記憶に重要であることを改めて裏付けている。このことから、現在、他の発現変動した遺伝子のプロモーター領域にも、他の転写因子の結合エレメントの探索を行っている。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「森」グループ

①研究分担グループ長:森 郁恵(名古屋大学大学院、教授)

#### ②研究項目

・行動を規定する神経回路システム動態の研究

### 4. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

(1) Kuhara, A., Okumura, M., Kimata, T., Tanizawa, Y., Takano, R., Kimura, KD., Inada, H., Matsumoto, K. & Mori, I. Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit controlling behavior of *C. elegans*. *Science*, in press.