

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

本研究のねらいは、現在の神経科学における最重要課題の 1 つである認識、記憶、学習、情動といった行為や行動を規定する脳内情報処理メカニズムを包括的に理解するために、行動の可塑性を最も直接的に観察できる線虫 *C. elegans* の温度走性行動をモデル系として、この行動を制御する神経回路における、温度感覚、温度記憶、学習の根幹をなす神経ネットワークや分子ネットワークの動作原理を、実証科学と理論科学の両面から明らかにすることである。そのために、まず実験ツールの技術開発が必要とされたため、18 年度～20 年度にかけて、主に、複数のニューロンにおける同時 Ca^{2+} イメージングシステムの開発、温度勾配上における線虫個体の運動追尾解析システムの開発、温度走性行動中および飼育温度記憶中の神経回路人工的操作システムの開発を行った。実験は、20 年度に入ってから開始したばかりではあるが、ニューロンや神経回路に関する新しい知見を得ることができた。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シミュレーションによる *in silico* 再構築に向けて、線虫の温度走性の数理モデリングにも着手し、興味深い成果が得られつつある。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ネットワークシステムの理解に向けて解析を進めた結果、ヒートショックストレスに応答して、主にヒートショックタンパク質 (HSP) の転写を誘導すると考えられていたヒートショックファクターが、飼育温度にも応答することにより、HSP 以外の多数の遺伝子の転写を誘導し、その結果、温度走性を制御するという知見も得られた。本研究プロジェクトを遂行することにより、脳科学研究において、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

20 年度の大きな目標は、昨年度に引き続き、温度走性神経回路の活動を個々のニューロ

ンの活動として測定するだけでなく、複数のニューロンの活動を同時に測定し、神経回路全体の動態としてとらえることであった。19年度において、複数のニューロンの活動を同時に測定する多点イメージングシステム(顕微鏡システム)を企業と共同開発することに成功したので(特許出願検討中)、20年度は、これらのシステムを用いて、神経回路活動の測定を行った。また、これらの実験結果は、神経回路活動のコンピューターシミュレーションを行なうためのデータとなり、さらに、コンピューターシミュレーションによって立案したモデルを、評価、修正する上でも極めて重要なものとなる。

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

19年度に、 Ca^{2+} イメージング法を用いて、多点同時イメージングシステムの開発に成功し、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することが可能になったため、*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⁾。

神経回路人工的操作システムの構築

神経回路の新たな機能の解明には、特定のニューロンの活動を、意図した強さで、瞬間的に活性化や不活性化させる技術が有用である。近年、特定波長の蛍光により開口する陽イオンチャネル(チャネルロドプシン(ChR))とCl⁻ポンプ(ハロロドプシン(HR))を利用した神経活動の人工操作が可能となった。19年度に、ChRとHRの励起光を温度走性中の線虫にピンポイント照射する装置を開発したため、20年度では、温度走性行動中の神経回路活動の操作を試みた。温度受容ニューロンAFDにHRを発現させ、HRの励起光(20Hz, 5ms, 20mW/mm²)を照射したところ、飼育温度より「高温」に移動する好熱性異常が観察された。同様の異常が、AFDのグルタミン酸シナプス伝達の変異体においても観察された。これらの好熱性異常は、予想外にも、AFDの膜電位変化が欠損した変異体が示す「好冷性」や「温度無走性」の異常とは相反するものであった。つまり、AFDは膜電位の変化率に応じて、下流の神経回路の活動を「逆転」させている可能性が考えられる。

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

温度走性行動中の *C. elegans* の首振り運動を数値化するためには、まず、温度勾配上での線虫の移動を追尾し、画像として記録するための顕微鏡/コンピューターシステムが必要である。オリンパス社と日本モレキュラーデバイス社との共同開発により、*C. elegans* の移動を追尾するシステムを構築し、東海ヒット社との共同開発により、追尾システムの標本ステージに温度変化機能や温度勾配機能を取付けることに成功した(A. Kuhara, N. Ohnishi, T. Shimowada, I. Mori, unpublished)。さらに、温度刺激による *C. elegans* の首振り頻度と角度の変化をコンピューター処理により数値化するためのソフトウェアの開発にも成功した。

開発した温度勾配上における線虫個体の行動追尾システム



（２）温度受容と温度記憶機構の分子遺伝学的解析

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、温度受容および温度記憶に関与する分子の同定は、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の問題である。遺伝学的手法、マイクロアレイを用いた分子生物学的手法などを用い、新規分子を同定し、その機能解析を行った。

温度記憶ニューロンにおける温度受容機構の分子遺伝学的解析

AFD および AWC 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。当研究室などで得られた知見から、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おり、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が考えられた。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、昨年度に引き続き、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 (Colosimo *et al.*, 2004) の機能解析を行っている。20 年度においては、B0496.5 遺伝子のプロモーター領域に GFP を融合した遺伝子を作製し発現を確認したところ、左右両方の AFD での発現は均等に強いが、一方、AWC においては左右のいずれかのニューロン

のみで発現していること、さらに AFD の発現レベルに比べ AWC では発現が微弱であることを新たに見いだした。また、B0496.5 遺伝子の欠失変異体である *nj62* 変異体は、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、20℃または 23℃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℃で飼育された場合、野生型に比べて飼育温度より低温域に分布する顕著な異常が観察されるが、この異常は、AFD でのみ B0496.5cDNA を発現させるとほぼ完全に回復した。一方、AWC でのみ B0496.5cDNA を発現させても、全く rescue されなかった。これらの結果より B0496.5 GPCR が温度受容ニューロン AFD で機能することが、飼育された温度である 23℃に移動するのに必須であることが明らかになった (H.Sasakura *et al.*, unpublished)。

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

本研究では、温度記憶の本質をゲノムワイドに調べた。具体的には、23℃で餌のある環境で飼育し、17℃に移す直前の線虫 (17℃飼育0時間、つまり23℃を記憶した線虫) と、17℃に移して4時間後の線虫 (17℃飼育4時間、つまり23℃の記憶が17℃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。変動した79遺伝子には、複数の遺伝子のプロモーター領域に転写因子 *hsf-1* の結合エレメントが確認された。*hsf-1* (*heat shock factor-1*) は、哺乳類から酵母に至るまで高度に保存された遺伝子であり、ヒートショックに反応し、下流遺伝子の転写を活性化もしくは不活性化することが報告されているが、これまで、HSF因子が記憶形成や行動可塑性に関わるという報告は皆無であった。機能低下型変異株 *hsf-1 (sy441)* について、温度走性を調べたところ、*hsf-1* 変異体では、23℃で飼育しても、温度勾配上で、23℃に移動できないという異常を示した。この温度走性異常は、温度走性神経回路を構成する一部のニューロンあるいは体壁筋において HSF-1 を発現させることによって回復したことから、HSF-1 によって転写を制御される下流遺伝子からのシグナル経路は細胞非自律的に作用することがわかった。さらに、HSF-1 の下流遺伝子として、従来のヒートショック反応性遺伝子以外に、様々な機能性遺伝子を同定し、これらの遺伝子の変異体は温度走性行動に異常を示した。以上の研究により、我々は、生存可能な温度を受容すると、HSF-1 転写因子を介して、多くの遺伝子が転写され、行動を生み出す神経回路を制御するというパラダイムを提唱した (T.Sugi, Y. Nishida, I.Mori, unpublished)。

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. and Mori, I. Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit controlling behavior of *C. elegans*. Science 320, 803-807 (2008).

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：0 件）