

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、本研究で開発してきた機器を活用して20年度に入ってから開始し、神経回路動態に関する新規概念を提示することができた(Ohnishi et al., submitted; Kuhara et al., submitted)。また、線虫の温度走性の数理モデリングにも着手し、神経活動と筋肉運動における新しいパラメータの予測とその実験的検証を行いつつあり、興味深い成果が得られている。これに関連して、温度走性行動と神経活動の時系列データを定量的に解析するシステムの開発も進め、実験データと数理モデルの連携を密接にとることができるようになった。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、温度受容ニューロンである AFD と AWC 内の cGMP 依存的なシグナル伝達経路の変化を誘起することにより温度走性を制御し、行動の変化を生み出していることが明らかとなった。今後も、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、新規神経機能を見出すとともに、さらなる新概念の提示を目指したいと考える。

§ 2. 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

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(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

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、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。21 年度は、20 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を目標として実験を行い、多くの画期的結果を得た。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、立案した数理モデルを、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、Ca²⁺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、20 年度に温度走性神経回路中の複数のニューロンの活動を定量的に測定することが可能になった。そこで、21 年度は、温度情報伝達や温度記憶に異常をもつ多数の変異体に関して、神経回路動態を定量化した。その結果、神経回路における、温度情報処理や温度記憶に関わる分子の生理的な役割が明らかとなり(Sugi et al., submitted; Miyara et al., in preparation; Nishio et al., in preparation)、さらに、神経回路動態に関する新規概念を提示することができた(Ohnishi et al., submitted)。

神経回路の人工操作による神経機能の新概念の創出

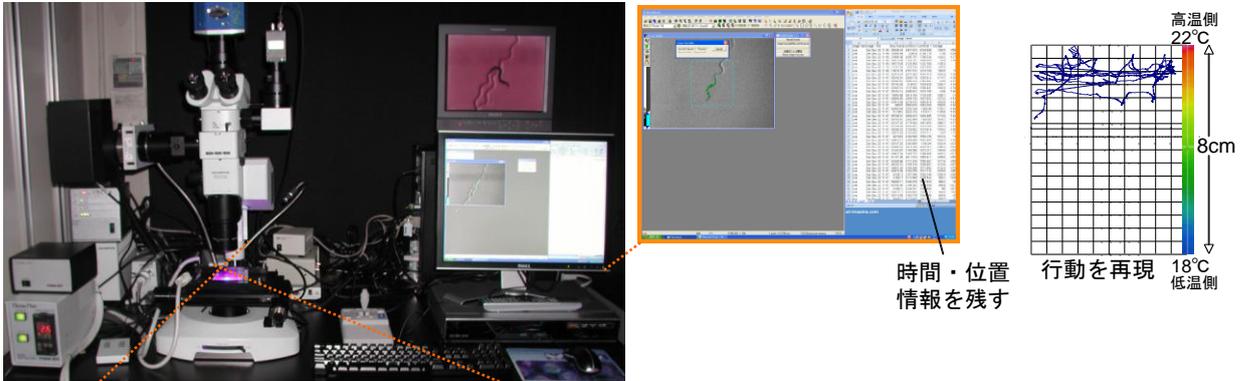
神経回路の新たな機能の解明には、特定のニューロンの活動を、意図した強さで、瞬間的に操作する技術が有用である。近年、特定の波長光により開口する陽イオンチャネル(チャンネルロドプ

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、20 年度までに、温度受容ニューロン AFD で HR をつかった解析から、AFD の Ca^{2+} 濃度の変化率に応じて、下流の介在神経の活動を逆転させている可能性が得られた。21 年度は、開発した最新光技術装置を従来の分子遺伝学と組み合わせた解析を行なった。その結果、AFD 温度受容ニューロンが AIY 介在ニューロンに対して、興奮性と抑制性の神経伝達を行なっていることが明らかとなった。この結果は、単一の感覚ニューロンが、単一の介在ニューロンに対して、興奮性と抑制性の制御を行なう例を提示した新概念の創出となった(Kuhara et al., submitted)。また、20 年度に、飼育用インキュベーターの中で特定の神経細胞の活動を人工操作する装置も開発したので、線虫の実験系に応用するための励起光照射パターンのプログラムのセットアップを行なった。

コンピュータ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。20 年度までに、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(Kuhara et al., submitted)。21 年度は、開発した装置を活用し、温度情報伝達の変異体の行動を時系列で定量化した。また、行動テストプレート上での 100 個体以上の個体の運動を同時に測定する装置を開発し、集団個体の線虫の行動の定量化に成功した。現在、得られた情報をもとにコンピュータシミュレーションに取り組んでいる。

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



温度勾配装置(拡大図)

温度走性行動と神経活動の定量解析

これまでに開発した個体追尾顕微鏡システムにより、温度走性中の *C. elegans* の行動を記録した動画データが得られるようになった。数理モデル構築のためにはこの動画データから行動パターン

①時系列画像の認識



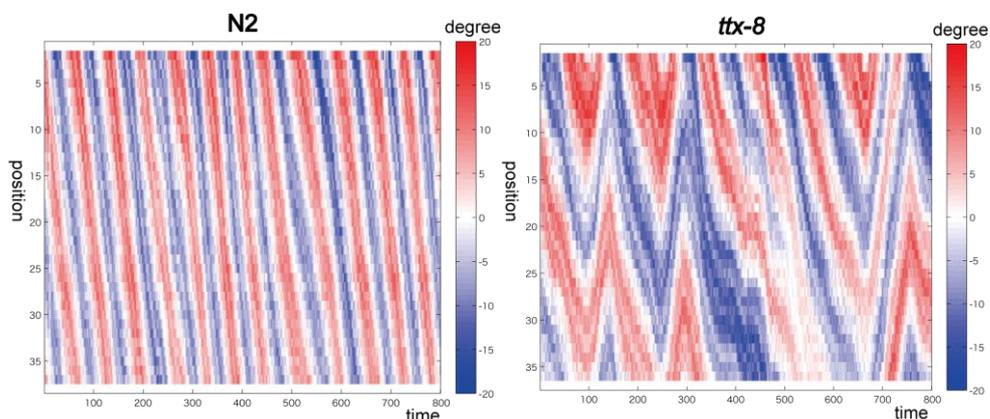
②行動出力の定量化

- ・隣合う解析点間の角度計算
- ・各解析点での輝度値の測定



ンを定量することが必須となるため、専用の解析アルゴリズムを設計し、Matlab により実装した。線虫の体は一本の線として単純化し、任意の位置に解析点を定義し、各解析点に挟まれる角度を定量した。この解析により言葉で記述しにくい行動の変化を明確にすることが可能になり、さらに大量のデータから実験者の目でみつけにくい現象を認識することが可能となった。下図では、野生型(N2)では、頭部から尾部まで角度の急な部分が滑らかに流れていることが示されるが、温度走性異常 *ttx-8* 変異体では特定の部位にてその動きが逆流する頻度が多いことを示す。この手法による長時間データの解析により、部位特異的な特徴や、行動パターンの統計的な性質とらえることが可能となった。さらに自由行動下の線虫を追尾しながらカルシウムイメージング法により神経活

動を観測するシステムの構築を進め、行動の時系列解析と合わせて温度受容ニューロン AFD と、行動に強く関わると考えられる AIY 介在ニューロンの神経活動も記録することが可能となった。現在、温度の時系列情報も含めて、温度入力、神経活動、行動出力の3つの動的な関係の解析を進めている。



(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。その問題を解明するため、昨年度までの解析に引き続き、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 *srtx-1* 遺伝子(Colosimo et al., 2004)の機能解析を行った。21 年度においては、*srtx-1* 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、*srtx-1* 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°C 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 *srtx-1*cDNA を発現させるとほぼ完全に回復した。一方、AWC でのみ *srtx-1*cDNA を発現させても、回復されなかった。17°C で飼育された場合も同様に AFD で発現させた時のみ強い回復が見られた。これらの結果より SRTX-1/GPCR が温度受容ニューロン AFD で機能し、幅広いレンジの温度受容に重要であることが示唆された (Sasakura et al., in preparation)。

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°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。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、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°C で飼育しても、温度勾配上で 23°C 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だけでなく、体壁筋、腸において、HSF-1 を発現させることによって回復したことから、HSF-1 による温度感知機構は、非神経系細胞を含む全身性で働き、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、様々な機能を持つ遺伝子を同定し、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。以上の研究から、我々は、生存可能な温度を、HSF-1 転写因子を介して受容すると、多くの遺伝子の発現が変動し、その結果、行動を生み出す神経回路が制御されるというパラダイムを提唱した。21 年度において、分子遺伝学的手法とカルシウムイメージングにより、パラダイムの検証を行った結果、HSF-1 による温度シグナルは、従来の温度走性神経回路内の AFD と AWC の cGMP 依存性シグナルを変化させることにより、行動の変化を導くという興味深い結果を得た (Sugi et al., submitted)。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Jurado P, Kodama E, Tanizawa Y, Mori I, Distinct thermal migration behaviors in response to different thermal gradients in *Caenorhabditis elegans*. *Genes, brain, and behavior* 9, 120-7 (2010)

DOI: 10.1111/j.1601-183X.2009.00549.x

2. Liu J, Ward A, Gao J, Dong Y, Nishio N, Inada H, Kang L, Yu Y, Ma D, Xu T, Mori I, Xie Z, Xu S, C. elegans phototransduction requires a G protein-mediated cGMP pathway and a taste receptor homolog. Nature Neuroscience, (accepted).