

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、認識、記憶、学習、情動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ことである。前年度までと同様に、線虫 *C. elegans* の温度走性行動をモデル系として、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。18 年度－20 年度にかけて、研究目標達成のために開発した機器を活用して実験を行い、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¹⁾ (Kuhara et al., under review)。21 年度から 22 年度にかけては、自由行動下での線虫の行動と神経活動の同時計測を行い、行動と神経活動の関係を定量的に示す実験を行った (Tsukada et al, in preparation)。その結果、興味深いことに、空間的に連続して変化する温度環境でも、温度受容ニューロン AFD は断続的に反応しており、温度を「点」として感知していると考えられる結果が得られた。また、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により、*C. elegans* の非神経系細胞を含む全身で、一過性のヒートショックに直接反応する転写因子ヒートショックファクターが、常温の変化をも感知し、新規下流遺伝子の発現を制御するという結果を得た。さらに、このヒートショックファクターを介した温度感知は、エストロゲンシグナルの変化を介し、細胞非自律的に、神経回路内の温度受容ニューロン AFD に保持された温度記憶を変化させ、行動の変化を導くという極めて新規性の高い結果を得た。従来概念では、「環境刺激は、感覚ニューロンにより受容される」というのが一般的だが、本研究により、「体細胞が、感覚ニューロンと同様に、温度を感知し、神経回路内の活動をコントロールし、個体の行動を変化させる」という新たな概念をもたらした (Sugi et al., in revision)。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。

§ 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 (名古屋大学大学院理学研究科、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

21 年度までに、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。21 年度から 22 年度にかけて、自由行動下での線虫の行動と神経活動の同時計測を行い、行動と神経活動の関係を定量的に示す実験結果を得た。

神経回路の人工操作による神経機能の新概念の創出

22 年度は、従来の Ca^{2+} インディケーターに加え、膜電位インディケーターも利用し、AFD の活動変化にともなった、興奮性と抑制性の神経伝達パターンの暗号を明らかにした(Kuhara et al., under review)。また、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をつかい、線虫の記憶を操作するための条件検討を行った。

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

21 年度までに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。22 年度には定量化した値を統計的に解析することにより、温度走性行動中の行動の時間変化について解析を行った。また、21 年度に開発した、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つかい、野生株と温度走性回路の主要ニューロンの変異体に関して、集団個体の線虫の行動の定量化をおこなった。それらの結果をもとに、個体運動の数理解析をおこなった。

温度走性行動と神経活動の同時定量解析

これまでに開発した個体追尾顕微鏡システムを利用することにより、温度走性中の *C. elegans* の行動を動画として長時間記録し、画像処理を利用してこれを定量化することで、行動の動態を解

析することが可能となった。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でき、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を可能とした²⁾。このシステムと、カルシウムイメージングによる神経活動を観測するシステムを組み合わせることで、行動の時系列解析と合わせて温度受容ニューロン AFD の神経活動を記録することが可能となった。動く標的に対するカルシウムイメージングは非常に難しく、特に長時間の計測は世界的にも例を見ない。本年度において、専用の解析手法や解析プログラムを開発することにより、これを実現した。サーモグラフィで取得した温度の空間情報と、トラッキングシステムから得られた線虫の行動軌跡から、線虫が接している温度の時系列情報を推定し、定量化した行動データと AFD の神経活動データを総合的に解析することで、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行った。興味深いことに、空間的に連続して変化する温度環境でも、温度受容ニューロン AFD は断続的に反応しており、温度を「点」として感知していると考えられる結果が得られた。また、餌と温度を条件付けた状況下で、AFD の活動と近いタイミングで方向転換行動が見られ、AFD の活動と方向転換行動が1対複数の関係で対応することが示唆された。

(2) 温度受容と温度記憶機構の分子遺伝学的解析

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

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。そこで、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、21 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* 遺伝子の欠失変異体である *nj62* 変異体の示す温度走性異常は、AFD でのみ *srtx-1cDNA* を発現させるとほぼ完全に回復した。一方、AWC でのみ *srtx-1cDNA* を発現させても、回復されなかった。温度勾配上で、過去に餌が与えられた温度付近で等温線に沿って前進運動を続けるという Isothermal Tracking 行動(IT behavior)は、*C. elegans* が温度記憶を行い、そのアウトプットを明瞭に観察できる行動である。AFD での温度受容に必須な環状ヌクレオチド依存性チャネルおよびグアニル酸シクラーゼが機能しない変異株では IT behavior は完全に失われるが、*nj62* 変異体では、IT behavior を示す個体の割合は明瞭に減少するものの、IT behavior を示す能力は保持されていた。この結果は、*srtx-1* 変異体では、外界の温度を感知する能力は完全には失われておらず、部分的に温度感知が異常であることが示唆された。カルシウムイメージングにより 23℃で飼育した場合の AFD の温度に対する応答性を調べたところ、*srtx-1* 変異体は野生型に比べ温度変化に対する応答性が低下していることが明らかになった。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、幅広い温度域の温度受容に重要であることが示唆された(Sasakura et al., in preparation)。

IT behavior は、AFD において機能するカルシウムカルモジュリンキナーゼ I の変異体である *cmk-1* 変異体において劇的に異常になるが、当研究室で単離した *nj73:cmk-1* および

nj78:cmk-1 変異体では、この異常が回復していた。*nj73* 変異の原因遺伝子は、転写メディエーターの構成分子をコードする *sur-2* 遺伝子であることがわかった (K. Kobayashi et al., unpublished)。SUR-2 は、*C. elegans* の vulva formation の系において ERK pathway (RAS, RAF, MAPK) の下流で機能することが明らかにされている。カルシウムカルモジュリンキナーゼ I と ERK pathway との間に実際に遺伝学的相互作用が存在するか検証中である。

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

本研究では、温度記憶の本質をゲノムワイドに調べた。その結果、興味深いことに、温度記憶形成過程において、*C. elegans* の非神経系細胞を含む全身で、一過性のヒートショックに直接反応する転写因子ヒートショックファクターが、常温の変化をも感知し、新規下流遺伝子の発現を制御するという結果を得た。さらに、遺伝学的な解析および、カルシウムイメージングによる解析から、ヒートショックファクターを介した温度感知は、エストロゲンシグナルの変化を介し、細胞非自律的に、神経回路内の温度受容ニューロン AFD に保持された温度記憶を変化させ、行動の変化を導くという極めて新規性の高い結果を得た。従来の概念では、「環境刺激は、感覚ニューロンにより受容される」というのが、一般的であったが、本研究から、「体細胞が、感覚ニューロンと同様に、温度を感知し、神経回路内の活動をコントロールし、個体の行動を変化させる」という新たな概念をもたらした (Sugi et al., in revision)。

当研究室の過去のカルシウムイメージングを用いた生理学的な解析から、温度受容ニューロン AFD は、温度上昇に対し、過去の飼育温度に依存した反応を示した (Kimura et al., 2004)。この結果から、AFD は、自身の中で記憶を成立させる可能性が示唆されている。この可能性の分子レベルでの実証を目指し、記憶の成立を担うことが知られる CREB タンパク質の線虫オルソログ CRH-1 が、AFD で機能するかどうか、つまり CREB 依存的な記憶が AFD に存在する可能性について検証を行なった。その結果、温度走性テストにおいて、*crh-1* を欠損した *crh-1(tz2)* 変異体で高温飼育時に顕著な温度走性行動の異常が見られた。さらに、驚くべきことに、*crh-1(tz2)* 変異体の温度走性異常は、AFD にのみに CRH-1 を発現させた場合、完全に回復が見られ、その他のニューロンに発現させた場合、全く回復が見られなかった。また、カルシウムイメージングにおいて、*crh-1(tz2)* 変異体では、AFD の飼育温度に依存した反応に異常が見られた。これらの結果は、CREB 依存的な温度記憶が、AFD のみに保持される可能性を示す画期的な結果であった (Nishida, Sugi et al., under review)。現在、CREB の下流遺伝子の候補として、Na⁺チャネルをコードする *catp-3* 遺伝子が単離されており、今後、AFD における CATP-3 の役割の解析を進める予定である。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Noriyuki Ohnishi, Atsushi Kuhara, Fumiya Nakamura, Yoshifumi Okochi and Ikue Mori, “Bidirectional regulation of thermotaxis by glutamate transmissions in *Caenorhabditis elegans*”, EMBO J. (advance online publication 8 February 2011; doi:10.1038/emboj.2011.13).
2. Akiko Miyara, Akane Ohta, Yoshifumi Okochi, Yuki Tsukada, Atsushi Kuhara, Ikue Mori, “Novel and Conserved Protein Macoilin Is Required for Diverse Neuronal Functions in *Caenorhabditis elegans*. PLoS Genetics. (in press).