

学位論文

線虫 *C. elegans* の経験依存的な化学走性行動を制御する
神経回路

(A neural circuit for experience-dependent chemotaxis in
C. elegans)

平成 27 年 12 月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科
生物化学専攻

佐藤博文

Abstract

多くの生物は周囲の環境を記憶し、その情報に基づいて行動を調節する。線虫 *C. elegans* は NaCl 濃度を記憶することができ、餌と共に経験した塩濃度に誘引される。本研究では、線虫が経験塩濃度に基づき行動を調節する仕組みを神経回路レベルで明らかにすることを目的とした。

線虫の塩濃度記憶には、味覚神経 ASER が重要であることが分かっている。そこで、まず ASER 神経とその下流の介在神経を対象とし、塩濃度が変化した際の Ca^{2+} 応答を観察した。その結果、ASER 神経と介在神経 AIB、AIY、AIZ において、餌と共に経験した塩濃度に応じて応答が変化することが分かった。このうち AIB 神経は線虫の後退運動に重要であることが知られているため、特に ASER-AIB 間の接続に注目した。変異体を用いた解析の結果、ASER 神経内部でのホスホリパーゼ $\text{C}\epsilon$ の働きが、塩濃度低下時の AIB 神経の応答に重要であることが示された。

次に各神経の応答が線虫の行動とどのように関係しているかを直接的に調べるため、線虫の行動と神経応答とを同時に記録できる手法を取り入れた。線虫は、刺激として与えた塩濃度変化よりも高い濃度で培養された場合、塩濃度の低下に対してのみ後退・方向転換を行う傾向を示した。低塩濃度で培養された場合には、逆に塩濃度の上昇に対してのみ後退・方向転換する傾向を示した。一方 ASER 神経は、培養時の塩濃度によらず常に塩濃度の低下に対して応答を示し、その応答は行動ではなく刺激と一致すると考えられる。これに対して下流の AIB 神経、及び AIB の下流の介在/運動神経である RIM 神経は、行動と一致する応答を示した。これらの結果から、ASER-AIB-RIM という神経回路を通じて行動調節が行われること、また感覚神経から介在神経へのシグナル伝達の過程において、塩濃度変化の情報が行動出力の情報へと変換されることが示唆される。

Abstract

Most animals memorize environmental cues and change their behavior based on the memory. *Caenorhabditis elegans* shows experience-dependent behaviors in response to many environmental cues. For sodium chloride, worms are known to memorize a particular salt concentration and approach the memorized concentration. In this study, I searched for the neural circuit required for the memory of salt concentration.

First, I conditioned worms in different salt concentrations, and monitored the activity of the salt-sensing chemosensory neuron ASER and downstream interneurons. I found that ASER, AIB, AIY, and AIZ changed the responses depending on the previously exposed salt concentrations. I investigated the response of ASER and AIB in *plc-1* mutants, and found that PLC-1 in ASER is required for the response of AIB.

Next, I investigated the relationship between the neural response and locomotion of worms. I used a tracking-imaging system, and recorded neural responses and locomotion of worms simultaneously. The result showed that the speed of worms decreased only when salt concentration was decreased below cultivation concentration. However, ASER always showed an off-response to salt, indicating that there is an experience-dependent plasticity in the process that links the ASER response to moving velocity. On the other hand, the responses of AIB and RIM neurons were correlated with behavioral output. Therefore, it seems that the neural circuit ASER-AIB-RIM modulates experience-dependent salt chemotaxis. It also seemed that the sensory information is processed and converted into behavioral output between sensory neuron and interneuron.

目次

Abstract	1
目次	3
第 1 章 序論	5
1.1. 経験依存的な行動の可塑性	
1.2. 線虫の感覚受容と行動制御	
1.3. 化学物質の受容とシグナル伝達	
1.4. 線虫の行動戦略	
1.5. 塩走性学習と塩濃度学習	
1.6. Ca^{2+} イメージング	
1.7. 本研究の目的	
第 2 章 材料と方法	16
2.1. 本研究で使用した線虫株	
2.2. 線虫の培養条件	
2.3. プラスミドコンストラクション	
2.4. 形質転換株の作製	
2.5. 遺伝学的な細胞破壊	
2.6. 行動アッセイ	
2.7. Ca^{2+} イメージング	
2.8. トラッキングイメージング	
第 3 章 経験依存的な神経応答の変化	31
3.1. 感覚神経 ASE の応答	
3.2. ASER 神経の応答の特性	
3.3. ASER 神経の経験依存的な神経応答を制御する機構	
3.4. 介在神経の応答	
3.5. 介在神経 AIB の応答を制御する機構	
3.6. 介在神経 AIY の応答を制御する機構	
3.7. 考察	

第4章 行動を制御する神経回路の探索	55
4.1. 介在神経除去株の作製	
4.2. 介在神経の除去が行動に与える影響	
4.3. 考察	
第5章 神経応答と行動との相関	61
5.1. ASER 神経の応答と行動との相関	
5.2. AIB 神経の応答と行動との相関	
5.3. RIM 神経の応答と行動との相関	
5.4. 考察	
結論	81
謝辞	82
参考文献	83

第1章 序論

1.1. 経験依存的な行動の可塑性

多くの生物は、環境の変化に対して自律的に応答し、その代謝や行動を変化させることができる。特に神経を持つ生物では、過去の経験から学習することで、外界からの刺激に対し適切に応答を変えることができる。この現象については古くから研究が行われており、パブロフの犬などの条件刺激と無条件刺激を組み合わせた古典的条件付けがよく知られている。しかしながら、学習を制御する機構については未だ多くの事が解明されていない。大きな理由の一つは、感覚受容から行動出力への情報処理機構が完全には明らかになっていないためである。哺乳類の脳では、視覚からの入力を受容体の位置を基準として脳に投射されるのに対し、嗅覚からの入力は受容体の種類に応じて投射先が分けられる(Luo and Flanagan, 2007)。またサルやヒトの脳においては、大脳の前頭連合野が情報の統合と運動野への出力を担っていると考えられている(Miller and Cohen, 2001)。しかし高等動物の神経系は非常に複雑なため、これらの入出力系が神経回路レベルでどのように動いているかあまり理解されていない。一方で無脊椎動物でも経験依存的な行動の変化は研究されており、代表的な例としてアメフラシ *Aplysia* の鰓引き込み反射の研究が挙げられる(Kandel)。無脊椎動物の神経系は高等動物と比較して単純なため、感覚受容と行動出力を結びつける神経回路についてもある程度の事が調べられている。例えば先に挙げたアメフラシの場合、水管の機械刺激受容神経が鰓の筋肉の運動神経へとシナプス伝達を行い、鰓の引き込みが起きる。また別の介在神経からのセロトニン分泌により、このシナプス伝達が促進される事も分かっている。しかし、現時点でこのような神経回路が明らかになっている例は、機械刺激に対する反射などの単純な行動に限られている。

線虫 *C. elegans* は 302 個の神経を持ち、神経細胞同士の接続がほぼ全て明らかにされている(White et al., 1986)。そのネットワークは極めて単純ではあるが、脊椎動物と同様の機能を多く備えている。刺激に対する学習もその一つであり、餌と連合させた学習についてはこれまでに多くの研究が為されている。

1.2. 線虫の感覚受容と行動制御

線虫は多くの化学物質、温度、湿度、機械刺激、光など、多種多様な刺激を受容しそれに応答することができる。外界からの刺激はまず感覚神経で受容され、介在神経、指令介在神経、運動神経などを介して行動出力が制御されると考えられている。前述の様に線虫の神経系は構成する細胞とその接続が明らかになっているため、刺激を受容する感覚神経から運動神経までを結ぶ神経回路図を描く事が可能である(図 1-1)。これを基にして個々の神経の役割を調べることで、目的的刺激に対する応答を制御する神経回路を同定する研究も行われている(Macosko et al.)。レーザーによって個々の神経を殺傷し、その役割を調べる研究もおこなわれており、単純な前進後退運動を制御する神経回路については、その同定と機能の解明がなされている(Chalfie et al., 1985; de Bono and Maricq, 2005)。

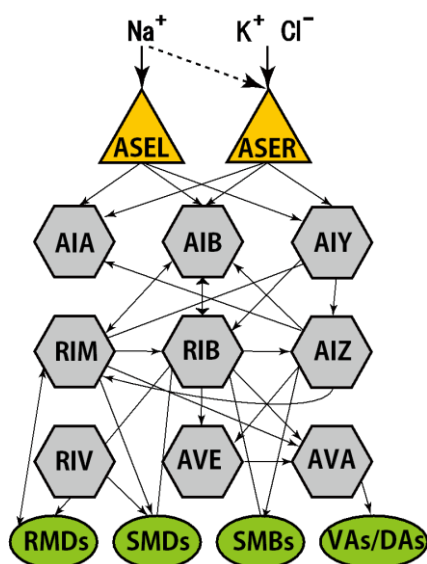


図 1-1 ASE 神経と下流の神経回路

三角形は感覚神経を、六角形は介在神経を、楕円形は運動神経を表している。また、神経間の矢印はシナプス結合を示している。

より複雑な行動を制御する神経回路については、嗅覚、温度、塩などに対する行動を用いて研究が行われている。嗅覚行動では AWA 嗅覚神経が誘引性の匂い物質を、AWB 嗅覚神経が忌避性の匂い物質を受容するが、2つの神経が制御する誘引行動と忌避行動は受容体の違いではなく細胞・回路レベルで決定されると示唆されている(Troemel et al., 1997)。温度に対する行動では、線虫は餌と共に経験した特定の温度に誘引されることが報告されている(Mori & Ohshima, 1995; Mori, 1999)。温度変化を受容する神経としては AFD 感覚神経が主要な役割を果たしていると考えられている。近年の研究から、温度を徐々に上げた場合、AFD 神経は条件付け時の温度が低いほど応答を開始する温度も低くなることが報告されている(Kobayashi et al., 2015)。

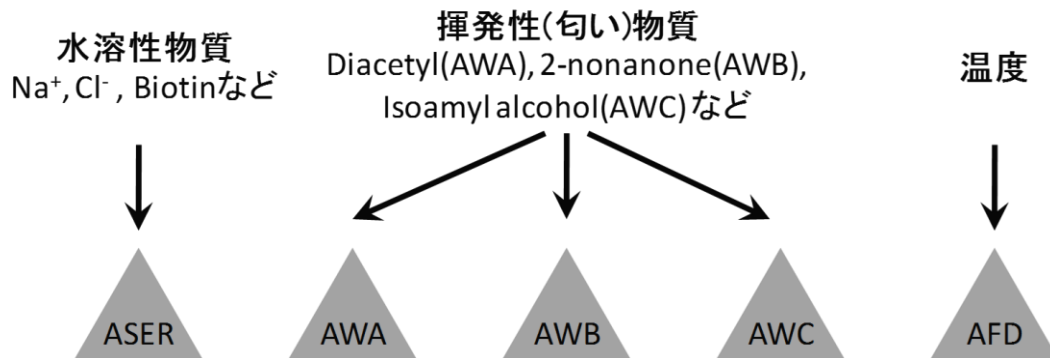


図 1-2 線虫が走性を示す代表的な刺激と、それを受容する感覚神経

線虫は様々な環境刺激に対して走性を示すが、感覚神経によって受容する刺激が異なっており、機能を分担していると考えられる。またそれぞれの神経は、図に示されたもの以外にも複数の刺激を受容する。

塩に対する行動について、通常の飼育条件下で培養された線虫は、NaCl に対して正の走性を示す(Ward, 1973; Bargmann & Horvitz, 1991)。これには ASE、ADF、ASG、ASI、ASH の各感覚神経が関わっており、特に ASE が最も大きな役割を果たしている(Bargmann & Horvitz, 1991; Iino & Yoshida, 2009)。ASE 神経は左右一対存在するが、遺伝子発現や機能に非対称性が見られる。NaCl の受容については、塩化物イオンが主に右側の ASER 神経に、ナトリウムイオンが主に左側の ASEL 神経に受容される事が分かっている(Suzuki et al., 2008; Pierce-Shimomura et al., 2001)。また、ASER は NaCl 濃度の低下に応答して興奮し、一方 ASEL は NaCl 濃度の上昇に応答して興奮する(Suzuki et al.)。ASER と ASEL では神経が興奮した際に引き起こされる行動も異なっており、ASER 神経の興奮が方向転換を促進するのに対し、ASEL の興奮は方向転換を抑制すると言われている(Suzuki et al., 2008)。そのため ASER と ASEL では異なる機構で NaCl への誘因を制御しており、両者の働きが合わさることで、より効率的に高い塩濃度へと向かうことが可能になると考えられている。

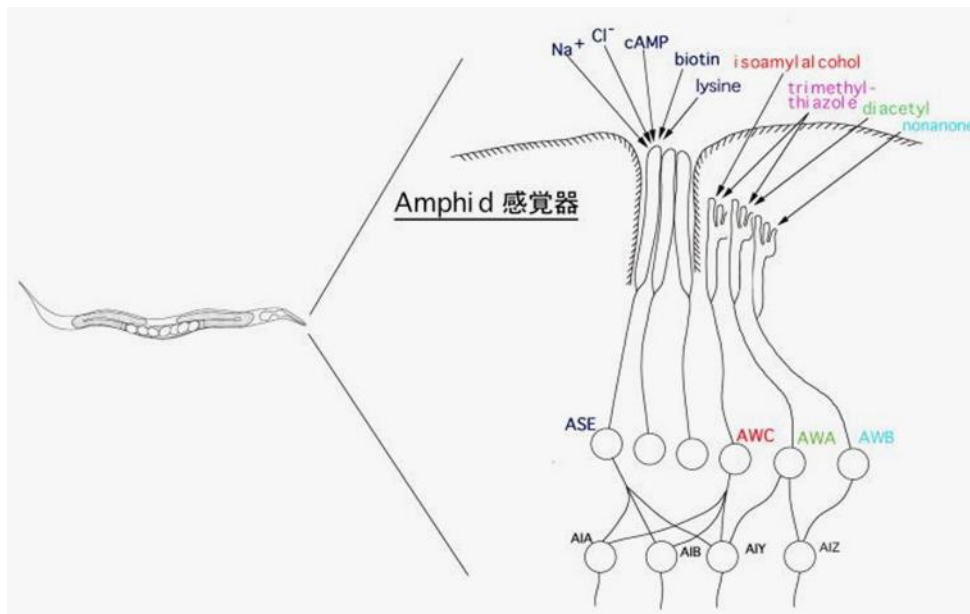


図 1-3 線虫の感覚器

アンフィドの化学感覚神経の末端部にある感覚繊毛(sensory cilia)の模式図。AWA、AWB、AWC 神経の末端部は sheath cell に埋まっている。その他の化学感覚神経の感覚繊毛は外界に露出している。

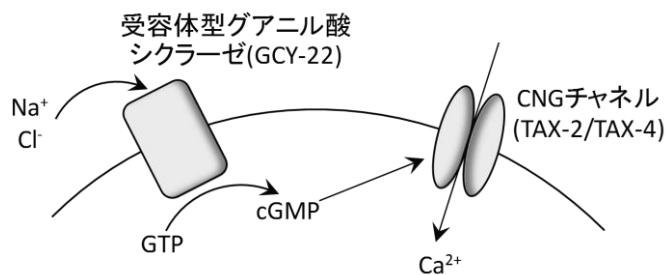
1.3. 化学物質の受容とシグナル伝達

これまでに行われた研究から、線虫の感覚受容とシグナル伝達に関わるいくつかの分子が同定されている。これらは主に化学物質に対する走性行動を指標として解析されており、特に匂い物質の受容に関する分子が良く調べられている。例えば匂い物質の一種であるジアセチルは、G タンパク質共役型受容体である ODR-10 によって受容されることが分かっている(Troemel, et al., 1999)。嗅覚神経 AWC には、様々な匂い受容体が発現しており、これらによって受容された情報は、G タンパク質(ODR-3、GPA-3 など)を介して受容体型グアニル酸シクラーゼ(DAF-11、ODR-1 など)へと伝えられると推定される。グアニル酸シクラーゼはサイクリック GMP の濃度を上昇させ、それによりサイクリックヌクレオチド依存性チャネル(CNG チャネル、TAX-2, 4 など)を開口させる。結果として細胞内にカルシウムイオンが流入し、神経の脱分極を導くと考えられている。

一方塩の受容に関しては、前述のように味覚神経 ASE が主な感覚受容を担っていると考えられている。ASE 神経は左(ASEL)と右(ASER)でそれぞれ複数の異なるグアニ

ル酸シクラーゼを発現していることが明らかになっており (Ortiz et al., 2009)、また塩の受容を担う G タンパク質共役型受容体が見つかっていない (Jansen et al., 1999)。そのため、受容体型グアニル酸シクラーゼ自身 (GCY-22 など) が直接イオンの受容を行い、サイクリック GMP の合成とそれによる CNG チャネル (TAX-2, 4) の開口、細胞内へのカルシウムイオンの流入を制御する可能性が考えられる (Komatsu et al., 1996; Ortiz et al., 2009; Smith HK et al., 2013)。

A



B

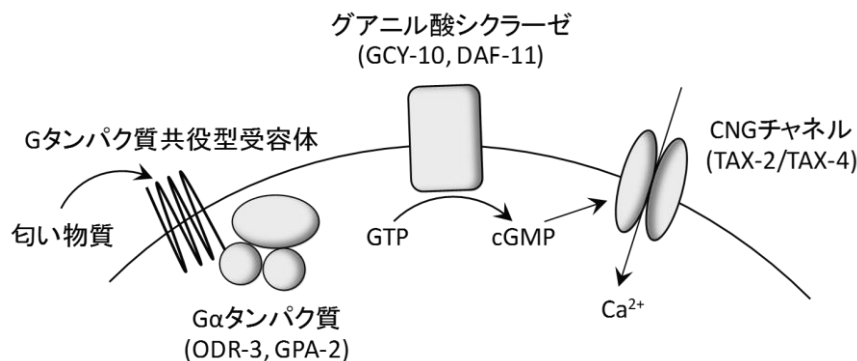


図 1-4 ASE 神経と AWC 神経における感覚受容の分子メカニズム

A: ASE 神経が NaCl を受容する際の分子メカニズム

B: AWC 神経が匂い物質を受容する際の分子メカニズム

どちらもグアニル酸シクラーゼによって産生された cGMP が CNG チャネルに作用し、Ca²⁺を細胞内に流入させるが、ASE 神経の場合は受容体型グアニル酸シクラーゼが直接化学物質を受容するのに対し、AWC 神経の場合は G タンパク質共役型受容体が化学物質を受容すると考えられている。

1.4. 線虫の行動戦略

線虫が化学走性行動を行う際の戦略として、これまでにピルエット機構(Pierce-Shimomura et al., 1999)と風見鶏機構(Iino & Yoshida 2009)が提唱されている。ピルエット機構は klinokinesis と呼ばれ、線虫の進行方向の化学物質の勾配に依存して、線虫は後退運動と急な方向転換を行う。一方で風見鶏機構は klinotaxis と呼ばれ、線虫の進行方向に垂直な化学物質の濃度勾配に依存し、線虫は前進しながら化学物質の濃度勾配に応じた方向と強度でカーブしていく。

NaCl に対する走性については、ASER、ASEL 神経をそれぞれ単独でレーザー破壊した場合、ASER を破壊したときのみピルエット機構と風見鶏機構に強い異常が出る事が分かっている。また ASER と ASEL を両方破壊した場合は、どちらの機構も完全に失われた(Iino & Yoshida, 2009)。これらによって、線虫の NaCl に対する走性行動は、感覚神経 ASE のうち特に右側の ASER が重要な働きを担っている事が分かる。

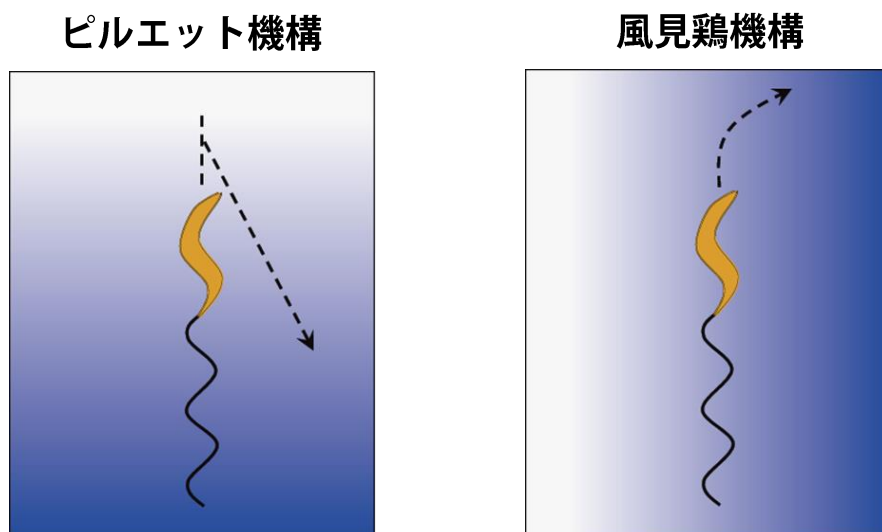


図 1-5 線虫が用いる 2 つの行動戦略

左：ピルエット機構の模式図。線虫は進行方向の濃度勾配を感知して動き、後退と方向転換を連続して行う。

右：風見鶏機構の模式図。線虫は進行方向に垂直な濃度勾配を感知して動き、前進しながら方向を変える。

1.5. 塩走性学習と塩濃度学習

1.5.1. 塩走性学習

通常線虫は塩に誘引されるが、塩の存在下で飢餓を経験すると忌避するようになる (Saeki et al., 2001; Tomioka et al., 2006)。この現象は塩走性学習と呼ばれ、「塩」と「飢餓」の一方が欠けた場合には成立しない。そのため、線虫は塩の情報と飢餓情報を連合して学習することができると考えられている。同様の現象は匂い物質や温度に対する走性においても報告されている (Nuttley et al., 2002; Hedgecock and Russell, 1975)。

1.5.2. 塩走性学習に関わる神経回路

1.2. で述べた様に、揮発性の匂い物質に対する行動については、刺激の種類によって応答する神経が変わると考えられている (Troemel et al., 1997)。また、AWC 神経は誘引行動を、ASH 神経は忌避行動を引き起こす事が分かっており、おおそラベルドライン説に従うと考えられている (Yoshida et al., 2012)。しかし、塩に対する行動については、誘引行動も忌避行動も ASE 神経からの入力で引き起こされる証拠が存在する (Adachi et al., 2010)。ASE 神経の発生異常を示す *che-1* 変異体では、誘引行動と忌避行動の両方が消失する。一方で感覚繊毛の形成異常を示す *dyf-11* 変異体を用いた実験では、ASER 神経特異的レスキュー株は塩に対する誘引行動がほぼ完全に回復するものの、学習後の忌避行動については完全には回復しなかった。すなわち、学習後の忌避行動には他の感覚神経も関与する可能性が考えられる。塩に対する行動に関わる他の感覚神経については、ASH 神経が塩濃度の低下に対して神経応答を示し、忌避行動に関与する可能性が示唆されている (Suzuki et al., 2008)。また ADF 神経は塩濃度の上昇に対して神経応答を示すが、これは他の神経からの入力によるものであると考えられている (Thiele et al., 2009)。

ASE 神経の下流にはいくつかの介在神経が存在している。主な介在神経は AIA、AIB、AIY、AIZ であり、神経細胞のレーザー除去実験から、これらの神経が塩に対する行動に関与することが示唆されている (Iino & Yoshida, 2009)。また AIA 神経は塩濃度の上昇に対して神経応答を示し、AIB 神経は塩濃度の低下に対して応答を示すことが観察されている (Oda et al., 2011)。さらに AIB 神経を人為的に活性化することで、

後退運動が誘発されることが報告されている(Piggott et al., 2011)。そのためこれらの神経が塩走性学習を制御する可能性が考えられる。

1.5.3. 塩走性学習に関わる分子

塩と飢餓とを連合させて学習するメカニズムには、ホスファチジルイノシトール(PtdIns)を中心とした分子経路が重要であると考えられている。以下、それらの分子経路について述べる。

DAG/PKC 経路

ジアシルグリセロール(DAG)は PtdIns(4,5)P₂ からホスホリパーゼ C β (PLC β) によって産生され、細胞内シグナル伝達を担う二次メッセンジャーの一種として機能する。線虫の塩走性学習においては、ASER 神経で DAG 生産経路の異常を引き起こすと学習異常が見られる(Tomioka et al., 2006)。また、PLC β の一種 EGL-8 の活性化による DAG 合成の促進が、神経筋接合部におけるシナプス伝達効率の上昇に寄与することが分かっている(Lackner et al., 1999)。DAG の下流ではプロテインキナーゼ C(nPKC) が働くと考えられ、ASER 神経に恒常活性化型の *ttx-4*nPKC を発現させることで塩走性学習の阻害が引き起こされる(Adachi et al., 2010)。

インスリンシグナル伝達経路

インスリンを介したシグナル伝達は、古くから肝臓などの臓器で代謝制御、細胞増殖、遺伝子発現の調節を行う分子経路として調べられていた(Saltiel et al., 2001)。一方で、哺乳類の脳内においてもインスリンシグナル伝達に関わる分子が発現していることが示され、この経路が記憶形成に関与している可能性も示唆されている(Abbott et al., 1999)。線虫においても同様の分子経路が見つかっており、この経路の変異体はいずれも塩走性学習に異常を示す(Tomioka et al., 2006)。変異体の表現型から、塩走性学習時にはインスリン様ペプチド INS-1 が神経細胞のインスリン受容体 DAF-2 によって受容され、さらに PI3 キナーゼである AGE-1 が活性化されることで PtdIns(4,5)P₂ から PtdIns(3,4,5)P₃ が産生され、その後下流の AKT-1 などにシグナルが伝わっていくと考えられている。

細胞外分泌因子

上記のインスリン様ペプチド以外にも、塩走性学習時には細胞外分泌因子が関与していると考えられている。代表的なものが LDL モチーフを持つ HEN-1 であり、感覚神経 ASE と下流の介在神経 AIY に発現している。*hen-1* 変異体は学習に異常を持ち、この機能に関して HEN-1 は細胞非自律的に働く (Ishihara et al., 2002)。そのため HEN-1 は ASE 神経や AIY 神経から分泌されて機能すると考えられる。また、塩走性学習の条件付け時にセロトニンを投与することで、学習が阻害される現象が報告されている (Saeki et al., 2001)。

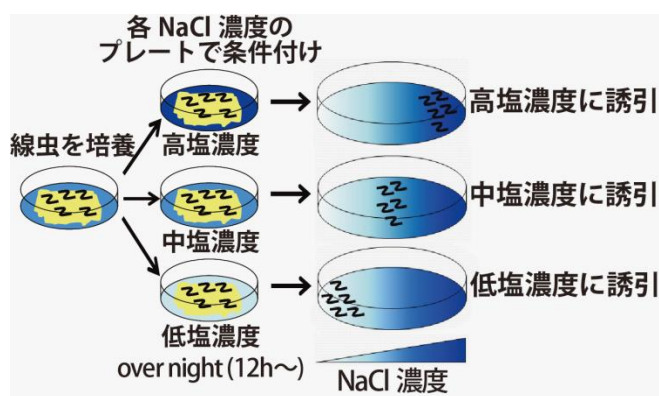


図 1-6 塩濃度記憶の模式図

線虫を様々な NaCl 濃度で餌と共に培養した時、高塩濃度で培養された個体は高塩濃度に、低塩濃度で培養された個体は低塩濃度に誘引される。

1.5.4. 塩濃度学習

従来観察されていた塩走性学習では、線虫は餌の有無と塩の有無とを連合させて学習していると考えられていた。一方で、近年の研究から、塩への走性は条件付け時の塩の濃度に強く依存することが分かった (Kunitomo et al., 2013)。すなわち、餌のある環境において線虫は単純に塩に対して誘引されるのではなく、餌と共に経験した塩濃度に誘引される (図 1-6)。飢餓と共に経験した塩濃度に対しては忌避するが、その際は低濃度側だけでなくより高濃度側にも逃げる。このことから、線虫は過去に経験した特定の塩濃度を記憶することが可能であり、その濃度に対して誘因・忌避の走性を示すと考えられる。この現象を塩濃度学習と呼び、本研究では線虫が餌と共に経験した塩濃度に誘引される現象を対象として、その神経回路・分子経路の解明を目指した。

1.6. Ca^{2+} イメージング

本研究では、 Ca^{2+} イメージングのために数種類の Ca^{2+} インジケータを用いた。代表的な Ca^{2+} インジケータは GCaMP(Nakai et al., 2001) 及び Yellow Cameleon(Miyawaki et al., 1997)である。G-CaMP は circularly permuted GFP、カルモデュリン、M13 ペプチドから構成されており、 Ca^{2+} が結合することで蛍光強度が増加する性質を持つ。一方で Yellow Cameleon は YFP と CFP の間にカルモデュリンと M13 がつながっており、 Ca^{2+} が結合することで YFP と CFP の距離が変化して FRET 現象が起きる。これらの Ca^{2+} インディケータはいずれもタンパク質であるため、 Ca^{2+} インジケータの配列を含むプラスミドを導入することで in vivo での発現が期待でき、また適切なプロモーターを選ぶことで部位特異的に発現させることも可能である。GCaMP には Ca^{2+} との親和性や蛍光比変化を変えた改変型がいくつか存在し、本研究では GCaMP1、GCaMP2、GCaMP3、GCaMP6s の 4 種類を用いている。Yellow Cameleon は YC2.12 を用いている。

1.7. 本研究の目的

記憶形成と記憶に基づく行動調節メカニズムについては、未だ多くの謎が残されており、この全体像を解明することは包括的な脳の理解に繋がると考えられる。線虫の神経系は単純ではあるが、そのために個々の神経細胞を対象とした解析を行うことが可能である。そこで、本研究では線虫の塩濃度記憶を対象とし、以下に述べる方向から研究を行った。

・塩濃度の記憶を形成する神経機構の探索

線虫は過去に経験した特定の塩濃度を記憶することができるが、その記憶形成機構についてはほとんど明らかになっていない。そこで、まずは塩濃度の記憶がどの神経で形成されるのかを明らかにすることを目的とした。その後、記憶の形成に必要な神経回路・分子経路を調べるために、塩濃度学習に異常を示す変異体を用いて解析を行った。実験は神経細胞のカルシウムイメージングを主な手法として用い、様々な条件における神経応答を比較することで、目的とする神経や分子の機能を解明することを試みた。

- ・経験依存的な行動調節を行う神経機構の解明

形成された記憶に基づき適切に行動を調節することは、学習において非常に重要なプロセスである。すでに各種の変異体や神経細胞をレーザー除去した個体を用いた実験から、塩に対する走性に関わる神経・分子はある程度予測されている。しかしながら、それらの神経・分子が経験依存的な走性に対してどのような機能を持つのかは解明されていない点が多い。そこで、記憶情報の伝達を担う分子経路、及び記憶に基づき行動を制御する神経回路を明らかにすることを目的とした。実験手法としてはこちらも神経細胞のカルシウムイメージングを主として用いたが、行動との関連をより深く追求するために、自由行動中の線虫を用いて神経応答と行動とを同時に測定する手法を取り入れた。

第2章 材料と方法

2.1. 本研究で使用した線虫株

本研究で使用した線虫 *C. elegans* 株及び使用目的は以下に示した通りである。

Strain name	Genotype	Allele information	Provider
N2	Standard reference strain/Bristol isolate	wild-type	CGC
	<i>Ex[gcy-5p::GCaMP2.1; lin-44p::gfp].</i>		Dr. Shigekazu Oda
	<i>Ex[odr-2p::GCaMP; unc-122p::gfp].</i>		Dr. Cori Bargmann
	<i>Ex[lins-1(short)p::GCaMP2.1; lin-44p::gfp].</i>		Dr. Shigekazu Oda
	<i>Ex[ttx-3p::GCaMP3; lin-44p::gfp].</i>		
TQ5023	<i>xuIs272 [Pser-2(2)::ftr::Gcamp3.0, Podr-2(2b)::flp, lin-15(+)]; lite-1.</i>		Dr. Shawn Xu
	<i>Ex[gcy-5p::YC2.12ce; unc-122p::mCherry].</i>		Dr. Shigekazu Oda
JN554	<i>dyf-11(pe554).</i>	insertion/deletion	Dr. Hirofumi Kunitomo
	<i>dyf-11(pe554); Ex[gcy-5p::dyf-11; unc-122p::mCherry].</i>		Dr. Hirofumi Kunitomo
	<i>dyf-11(pe554); Ex[gcy-7p::dyf-11; unc-122p::mCherry].</i>		Dr. Hirofumi Kunitomo
JN1239	<i>plc-1(pe1237).</i>	gain of function	Dr. Ryo Iwata
JN1240	<i>plc-1(pe1238).</i>	loss of function	Dr. Ryo Iwata
	<i>plc-1(pe1238); Ex[gcy-5p::plc-1; unc-122p::mcherry].</i>		Dr. Hirofumi Kunitomo
MT7929	<i>unc-13(e51).</i>	loss of function	CGC

DA509	<i>unc-31(e928).</i>	loss of function	CGC
	<i>gcy-22; Ex[gcy-5p::GCaMP2.1; lin-44p::gfp].</i>		Dr. Hirofumi Kunitomo
	<i>eat-4(ky5) III; Ex[gcy-5p::GCaMP2.1; lin-44p::gfp].</i>		Dr. Hirofumi Kunitomo
	<i>ttx-4(nj3) V; Ex[gcy-5p::GCamp2.1, lin-44p::gfp].</i>		Dr. Hirofumi Kunitomo
	<i>Ex[gcy-5p::ttx-4(gt); unc-122p::mCherry]; Ex[gcy-5p::GCaMP2.1; lin-44p::gfp]</i>		Dr. Hirofumi Kunitomo
	<i>Is[ins-1(short)p::mouse caspase1; ins-1(short)p::venus; unc-122p::venus].</i>		
	<i>Is[npr-9p::mouse caspase1; npr-9p::venus; unc-122p::mCherry].</i>		
	<i>Is[ttx-3p::mouse caspase1; ttx-3p::venus; lin-44p::gfp].</i>		
	<i>Is[npr-9p::venus].</i>		Dr. Kazushi Yoshida
	<i>Ex[gcy-5p::GCaMP6s; gcy-5p::mCherry; lin-44p::gfp]</i>		
	<i>Ex[tdc-1p::GCaMP6s; tdc-1p::mCherry; lin-44p::gfp]</i>		
	<i>Ex[npr-9p::GCaMP6s; npr-9p::mCherry; lin-44p::gfp]</i>		
	<i>Ex[gcy-5p::InversePericam-216a, gcy-5p::mCherry, lin44-mCherry].</i>		

2.2. 線虫の培養条件

本研究では、Brenner 博士によって確立された手法(Brenner, 1974)に従い、線虫を培養した。まず、下に示した組成の NGM プレートを作製し、室温で一晩静置した。次に、餌となる大腸菌 OP50 株を LB 液体培地で飽和するまで培養し、NGM プレートに塗布した。その後、37℃で一晩静置して大腸菌をさらに培養した。各プレートには親虫として若い成虫を 4 匹移し、20℃で 4 日間培養した。

NGM プレート

2.5 g/l Polypepton

3 g/l NaCl

17 g/l Agar

5 mg/l Cholesterol

1 mM CaCl₂

1 mM MgSO₄

25 mM K-PO₄(pH=6.0)

CaCl₂、MgSO₄、K-PO₄ 以外を RO 水に加えてオートクレーブ滅菌し、60℃程度まで冷めてから CaCl₂、MgSO₄、K-PO₄ を上記の濃度になるように加えた。その後、直径 6cm のプラスチックシャーレに 10 ml ずつ注ぎ、室温で一晩静置した。

2.3. プラスミドコンストラクション

プラスミドの作製は Invitrogen 社の Gateway システムによる組み換え反応を利用して行った。線虫に発現させるためのプロモーターを pENTR ベクターに、遺伝子を pPD-DEST ベクターにクローニングし、2 種類のベクター間で LR 反応を起こす事で任意のプロモーターと遺伝子の組み合わせを持つプラスミドを作成できる。Gateway システムについての詳細は飯野研究室 HP に記載されている。

http://molecular-ethology.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/Gateway/Gateway_overview1_jp.html

pENTR-ins-1(short)p は山田康嗣博士、*pENTR-npr-9p* は小田茂和博士、*pENTR-ttx-3p* は田中寿子さんによって作成された。*pDEST-GCaMP3* は富岡征大博士、*pDEST-mouse caspase1* は吉田和史氏によって作製された。*pG-lin-44p-gfp* は石原研からいただいたものを使用した。*pG-unc-122p::venus*、*pG-unc-122p::mCherry* は富岡征大博士によって作製された。本研究で作製されたプラスミドは、*pG-gcy7p::GCaMP3*、*pG-ttx-3p::GCaMP3*、*pG-inc-1(short)p::mouse caspase1*、*pG-ttx-3p::mouse caspase1*、*pG-ttx-3p::venus*、*pG-gcy-5p::GCaMP6s*、*pG-npr-9p::GCaMP6s*、*pG-tdc-1p::GCaMP6s* である。

2.3.1. pENTR プラスミド

本研究で用いた pENTR プラスミドは、飯野研究室の方々が過去に作製したものを使用した。以下に用いたプラスミドと発現細胞を述べる。

プラスミド名	発現細胞
<i>pENTR-gcy-5p</i>	ASER
<i>pENTR-ins-1p(short)</i>	AIA、(腸)
<i>pENTR-npr-9p</i>	AIB
<i>pENTR-ttx-3p</i>	AIY
<i>pENTR-tdc-1p</i>	RIM、(RIC)

2.3.2. pDEST プラスミドの作製

本研究で作製された pDEST プラスミドは、*pDEST-GCaMP6s* である。まず GCaMP6s の配列を線虫に最適化した後、人口遺伝子合成した。合成された配列を既存の pDEST-GCaMP プラスミドの GCaMP 部と入れ替えて作製した。他の pDEST プラスミドは、過去に言いの研究室の方々が作製したものを使用した。

2.4. 形質転換株の作製

2.4.1. マイクロインジェクション

マイクロインジェクションは、Mello 博士らによって確立された手法(Mello et al., 1991)を用いて行った。雌雄同体の生殖腺にプラスミド DNA を注入すると、染色体外 DNA 配列(extrachromosomal array)として一定の割合で次の世代に受け継がれる。目的の遺伝子を発現するプラスミドとマーカーを発現するプラスミドを混合して注入し、マーカー遺伝子の発現により形質転換株(Ex 株)を選別した。本研究で用いたマーカーは、*pG-lin-44p-gfp*(尾部に GFP を発現)、*pG-unc-122p-venus*(coelomocyte に venus を発現)、*pG-unc-122p-mCherry*(coelomosyte に mCherry を発現)である。Ca²⁺イメージング株の作製に用いたプラスミドの濃度は 10-100 ng/ μ l、遺伝学的な細胞破壊株作成に用いたプラスミドの濃度は 100 ng/ μ l で調整した。

2.4.2. インテグランド株の作製

マイクロインジェクションによって得られた Ex 株では、全ての個体が導入された遺伝子(Ex array)を持つわけではなく、また各個体の持つ外来遺伝子のコピー数にもばらつきがある。一部の実験では、Ex array を UV 照射により染色体内に挿入する方法でインテグレーションを行った。まず若い adult ステージの個体を餌の塗られていない NGM プレートに置き、UV を照射した後餌の塗られた NGM プレートで培養した。その後 F2 世代を単離し、各個体の子孫を観察することで、染色体内に遺伝子が挿入された事を確認した。得られたインテグランド株(Is 株)は UV の照射によって染色体内に変異が発生している可能性があり、これを取り除くために野生株(N2 株)とのバッククロスを行った。

2.5. 遺伝学的な細胞破壊

特定の神経細胞が破壊された線虫を多数得るため、mouse caspase1(mCasp1)を目的の神経に発現させた形質転換株を作製した。カスパーゼ(caspase)は線虫から哺乳動物に至るまで保存されているタンパク質で、その多くはアポトーシスを誘導するシグナル伝達経路に関わっていることが分かっている。mouse caspase1 は ICE(interleukin-1 β converting enzyme)であり、サイトカインの活性化によって炎症を誘導するのが主な役割だとされている。しかし、培養細胞では mouse caspase1 を過剰発現させることでアポトーシスが誘導されることが示されており(Miura et al., 1993)、アポトーシスを誘導する機能も持っていると考えられる。

本研究では、AIA、AIB、AIY の各神経について、目的の神経に発現するプロモーターに mouse caspase1 を繋いだプラスミドを作製し、それを生殖腺にマイクロインジェクションすることで Ex 株を作製した。この際、同じプロモーターに蛍光タンパク *venus* を繋いだプラスミドと共に導入することで、神経の除去を蛍光によって確認できるようにした。続いて高い効率で神経が除去できていた株を用い、UV 照射によって Is 株の作製を行った。作製された株はいずれも成体において 90%以上の効率で目的の神経が除去されていた。

2.6. 行動アッセイ

本研究では線虫の NaCl に対する走性を見るため、Agar で固めたアッセイプレートを用いた行動アッセイを行った。線虫の条件付けは全て NaCl を含まないバッファー(mock conditioning buffer)を用いて行った。まずアッセイプレートにスポット用 NaCl buffer を 1 μ l ずつ、図 2-1 の+印の 12 点にスポットした。直後に線虫をプレートからピックし、mock conditioning buffer で条件付けを開始した。1 時間後、線虫を wash buffer で洗い、アッセイプレートをワームトラッカーに設置し、プレートの中心に線虫を 1 匹置いて撮影を開始した。画像の撮影間隔は 0.4~0.6 秒で、測定時間は 1 サンプルあたり 20 分で行った。なお、測定時間の内 20 %以上の時間動いていた虫のデータのみを後の解析に用いた。NaCl に対する走性を数値化するために、 $\{(NaCl \text{ の勾配のピークから } \sqrt{2/\pi} \text{ cm 以内の領域にいた時間}) - (\text{その領域以外にいた時間})\} / (\text{行動測定の時間の総和})$ を Chemotaxis Index(=C.I.)と定義した。

実験によって得られたデータは、線虫が前進している **run** とそれ以外に分けて解析した(Iino & Yoshida, 2009)。ピルエット応答を定量化するために、まず線虫の進行方向と水平な NaCl の濃度の時間的变化を用い、それぞれの時間的变化に応じたピルエット応答の発生確率を求めた。次に得られたピルエット発生確率の最大値と最小値の差を **Pirouette Index** とした。また風見鶏応答を定量化するためには、線虫の進行方向と垂直な方向の NaCl の濃度変化を用い、それに対して線虫が 1 mm 進むごとに曲がる角度を求めて回帰直線を引き、その傾きを **Weathervane Index** とした。

・行動アッセイに用いたプレートと試薬の組成は以下の通りである。

mock conditioning buffer

1 mM CaCl₂

1 mM MgSO₄

5 mM K-PO₄(pH=6.0)

wash buffer

1 mM CaCl₂

1 mM MgSO₄

5 mM K-PO₄(pH=6.0)

0.5 g/l ゼラチン

スポット用 NaCl buffer

200 mM NaCl

1 mM CaCl₂

1 mM MgSO₄

5 mM K-PO₄(pH=6.0)

アッセイプレート

20 g/l Bacto Agar

1 mM CaCl₂

1 mM MgSO₄

5 mM K-PO₄(pH=6.0)

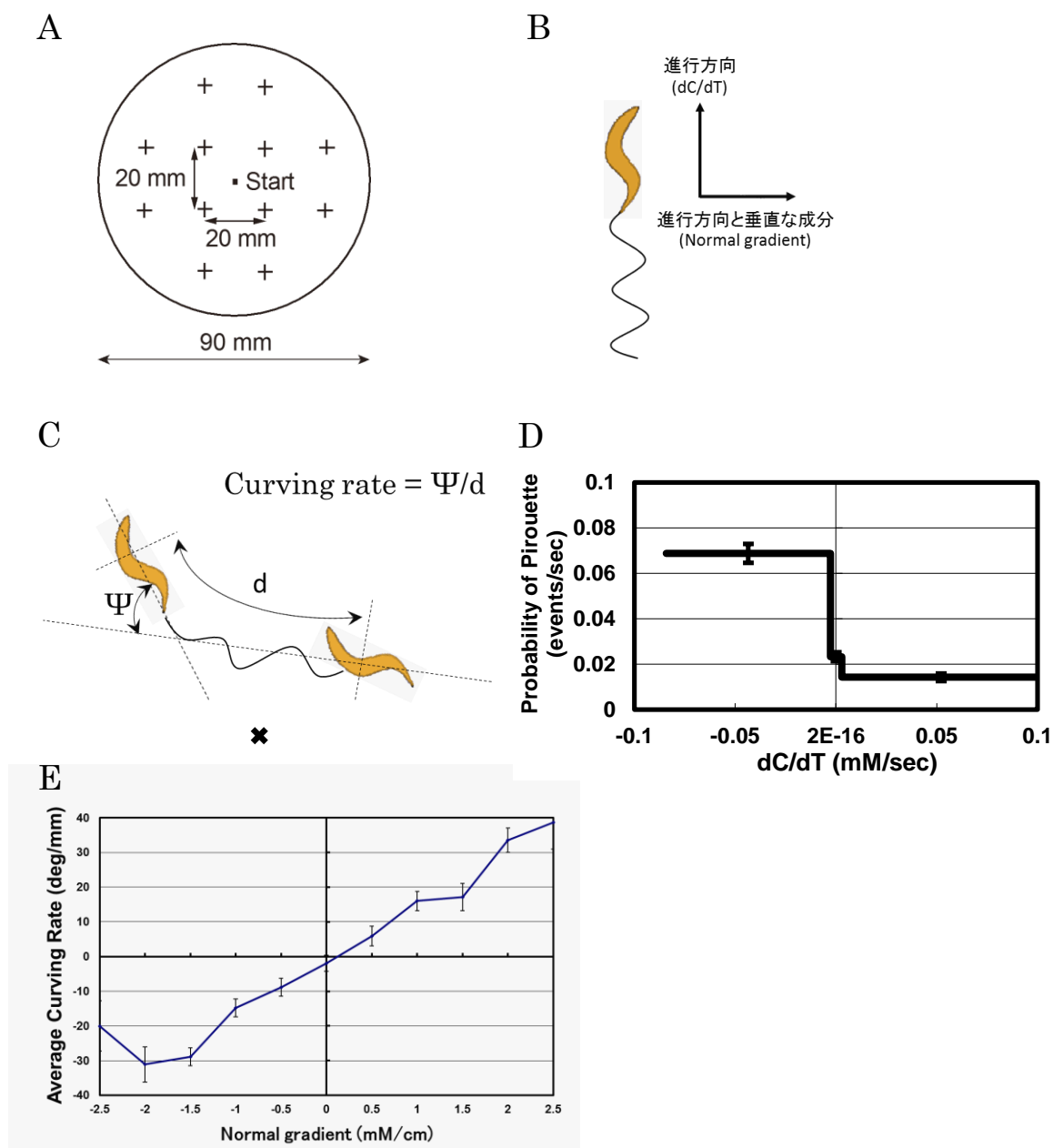


図 2-1 single worm tracker を用いて得られたデータとその解析方法

(A) assay に用いたプレートフォーマット。+印の 12 点に NaCl buffer をスポットし、中心の start 部に線虫を 1 匹置いて測定を開始した。

(B) 線虫の行動を定量化するために用いた NaCl の濃度勾配成分。本研究では、進行方向の濃度勾配(dC/dT)と進行方向に垂直な濃度勾配(Normal gradient)の 2 種類を用いた。

(C) Curving rate の求め方を示した図。線虫が 1mm 動いた際の進行方向の角度変化である。ある時点(x印)での curving rate は、その前後 0.5mm 以上離れた 2 地点での線虫の進行方向の角度(Ψ)を、その 2 地点の距離(d)で割った値となる。

(D) NaCl の濃度勾配に応じたピルエット行動の発生確率。 dC/dT が負の時と正の時のピルエット行動発生確率の差が Pirouette index となる。

(E) NaCl の濃度勾配に応じた curving rate を示したグラフ。グラフの回帰直線の傾きが Weathervane Index となる。

2.7. Ca^{2+} イメージング

神経細胞のカルシウムイメージングは、目的の神経細胞に Ca^{2+} インジケーターを発現させ、細胞内カルシウム濃度の変化を蛍光の変化として測定した。後述のトラッキングイメージング以外の実験は全て(Chronis et al., 2007)を改変した半固定方式で行った。具体的な手法は以下の通りである。

①線虫サンプルの調整

実験日の4日前に、大腸菌 OP50 株を塗布した NGM プレートに測定する線虫株を植え継いだ。実験日の前日に使用する線虫を M9 buffer でプレートから洗い取り、餌として OP50 を塗った条件付け用 NGM プレートに移した。条件付けの期間は 12 時間以上とした。

②装置のセットアップ

プレートから線虫をピックし、体表に付着している菌を落とすため、測定用の buffer で洗った。この時用いた buffer は、イメージング開始時に線虫に触れる buffer と同じものを用いた。洗浄した線虫は注射器で吸い、PDMS 微小流路チップ(Chronis et al., 2007)にはめ込む事で固定した。その後他の流路にチューブを繋ぎ、顕微鏡にセットした。図 2-2 の流路①②③もしくは②③④を開き、正常に buffer が流れているかを確認した。

③測定と解析

Ca^{2+} イメージングの測定方法は、前述の通り EM-CCD を使い、2 枚/秒の速度で撮影した。②で線虫をピックして洗浄用 buffer に入れてから、撮影開始までの時間は 8 分とした。得られた画像データの解析は MetaMorph 付属の track object 機能を用いて、目的とする神経の細胞体又は神経突起の蛍光強度を測定した。その後線虫の体内で蛍光を発していない部位をバックグラウンドとして差し引き、GCaMP の蛍光強度を求めた。相対蛍光強度は、ASER、ASEL、AIA、AIY の各神経については測定開始後 4 秒から 14 秒までの 20 フレーム分の蛍光強度の平均値を 1 として算出した。AIB 及び AIZ 神経については刺激を与える前の 50 秒間において、自発発火の見られない連続した 10 秒間(20 フレーム分)の蛍光強度の平均値を 1 とした。第 3 章に示すグラフはこの相対蛍光強度を示している。

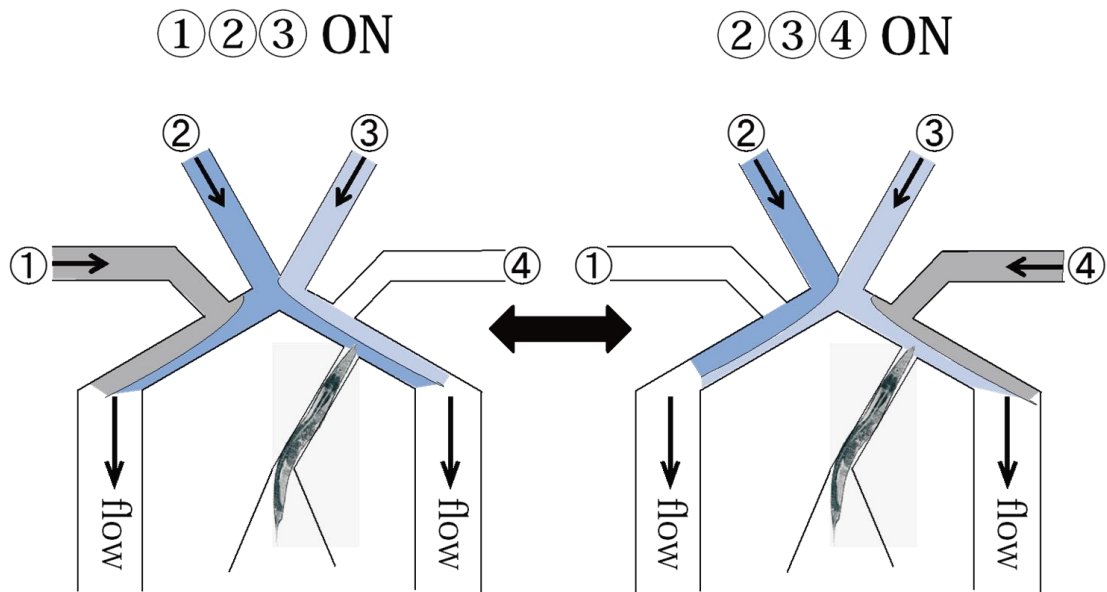


図 2-2 PDMS 微小流路の構造

PDMS 微小流路は、①～④の 4 つの流路から buffer を流す構造になっている。①と④には流路切り替え用 buffer を、②と③には刺激用の buffer を流す。②と③の流路は常に開いており、①と④の流路を開閉することで線虫に触れる buffer を切り替える。①、②、③の流路が開いている時は②の buffer が、②、③、④の流路が開いている時は③の buffer が線虫に触れる。

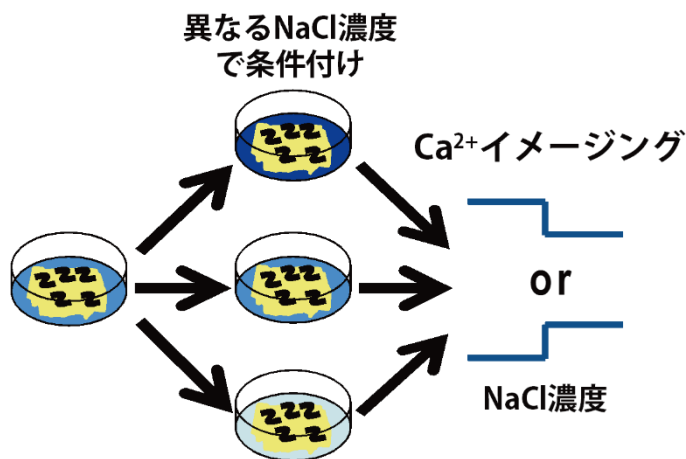


図 2-3 イメージング実験の模式図

線虫を 50 mM NaCl 条件で 3 日間培養した後、様々な NaCl 濃度のプレートに移し、条件付けを行った。その後、目的の神経に対して Ca^{2+} イメージングにより神経応答の観察を行った。その際に用いた刺激は、神経によって NaCl の濃度上昇と濃度低下を使い分けた。

実験に用いたバッファー及びプレートの組成は以下の通りである。

<u>0 mM NaCl solution</u>	<u>100mM NaCl solution</u>
1 mM CaCl ₂	100 mM NaCl
1 mM MgSO ₄	1 mM CaCl ₂
25 mM K-PO ₄ (pH=6.0)	1 mM MgSO ₄
0.2 g/l ゼラチン	25 mM K-PO ₄ (pH=6.0)
0.31 M グリセロール	0.2 g/l ゼラチン
	0.11 M グリセロール

※これら 2 種類の溶液を混合することで、NaCl 濃度が 25, 50, 75 mM の溶液を作製した。

<u>流路切り替え用 buffer</u>	<u>M9 buffer</u>
50 mM NaCl	3 g/l KH ₂ PO ₄
1 mM CaCl ₂	15.2 g/l NaHPO ₄ (12H ₂ O)
1 mM MgSO ₄	5 g/l NaCl
25 mM K-PO ₄ (pH=6.0)	0.5 g/l ゼラチン
0.2 g/l ゼラチン	2 mM MgSO ₄

- ・条件付け用プレート(0, 25, 50, 75, 100 mM NaCl)

NGM プレートの組成に各濃度の NaCl を加え、さらに浸透圧が 350 mOsm になるようにグリセロールを添加した。

- ・光学系

本研究で行った Ca²⁺イメージングには倒立顕微鏡(LEICA DMI 600B)を用い、カメラには EM-CCD(HAMAMATSU ImagEM C9100-13)を用いた。また、流路をコントロールするために、電磁弁とバルブコントローラー(WARNER INSTRUMENTS VC-8 VALVE CONTROLER)を用いた。これらの制御はソフトウェア(MetaMorph)上から行った。

2.8. トラッキングイメージング

本研究では、個々の神経の応答と行動との相関を直接的に調べるため、限られた領域内を自由に行動する線虫に対し、その動きと神経応答とを同時に観察した。実験手法は(Albrecht et al., 2011)を改変して行った。

装置の概要は図 2-4 に示した通りである。微小流路系では、シリンジポンプから押し出されたバッファーが PDMS 製微小流路内を流れ、ペリスタポンプによって排出される。光学系では、近赤外光と赤外線カメラによって明視野像を取得し、キセノンランプと EM-CCD カメラによって蛍光画像を取得する。具体的な手順は以下の通りである。

①線虫サンプルの調整

Ca²⁺イメージングと同様の手法で線虫を条件付けした。本実験では線虫の頭部が大きく動くため、目的とする神経にカルシウムインジケーター(GCaMP6s)と mCherry を共発現させた株を用いた。

②装置のセットアップ

PDMS 製微小流路を 2 枚のガラス板で挟み、クリップで固定した後真空ポンプで脱気した。イメージングに用いたバッファーは、真空ポンプで脱気した後、シリンジポンプにセットした。本実験では、50 mM と 25 mM の NaCl solution のみを用いた。シリンジポンプ、電磁弁、PDMS 製微小流路、ペリスタポンプをポリエチレンチューブで接続し、溶液が流路内を正常に流れていることを確認した。

プレートから線虫をピックし、体表に付着している菌を落とすため、測定用のバッファーで洗った。この時用いたバッファーは、イメージング開始時に線虫に触れるバッファーと同じもの(50 mM NaCl solution)を用いた。洗浄した線虫は高所に設置したシリンジ内に入れ、重力によって微小流路内に導入した。

③測定と解析

明視野像を用いて微小流路内を動いている線虫の頭部を視野に収め、咽頭部を指定して線虫の追跡を開始した。それと同時に蛍光画像の取得を開始した。明視野像は 33 枚/秒、蛍光画像は 4 枚/秒の速度で撮影した。得られた画像データの解析方法はそれぞれ次の通りである。

・明視野像

画像間の相互相関を調べることで、前の画像とのずれ(=線虫の移動距離)を求めた。次に各画像における線虫の体の向きを解析し、線虫が前進しているか、後退しているかを調べた。これらの結果を合わせ、各フレームでの線虫の速度を求めた。

・蛍光画像

蛍光画像の解析は、目的とした神経の部位ごとに異なる手法を用いて行った。神経の細胞体を解析した際には、まず画像全体のバックグラウンドを引き、MetaMorph 付属の track object 機能を用いて細胞体の mCherry の蛍光強度を測定した。その後 mCherry の座標を基に GCaMP の蛍光強度を測定し、それを mCherry の蛍光強度で割って補正した。一方神経突起を解析した際には、まず画像全体のバックグラウンドを引き、ImageJ を用いて mCherry の撮影範囲で一定値以上の輝度を持つ領域を検出した。次に各領域を大きさ及び平均輝度でふるいにかけ、神経突起の部分のみを抽出した。得られた領域の輝度を測定し、各画像における mCherry の輝度とした。また各領域の座標を一定値ずらした場所を GCaMP の領域とし、各画像における輝度を測定した。最後に GCaMP の輝度を mCherry の輝度で割って補正した。補正された蛍光強度に対し、刺激を加える前における自発発火の見られない連続した 20 フレームの蛍光強度の平均値を 1 として相対蛍光強度を求めた。第 5 章に示すグラフはこの相対蛍光強度を示している。

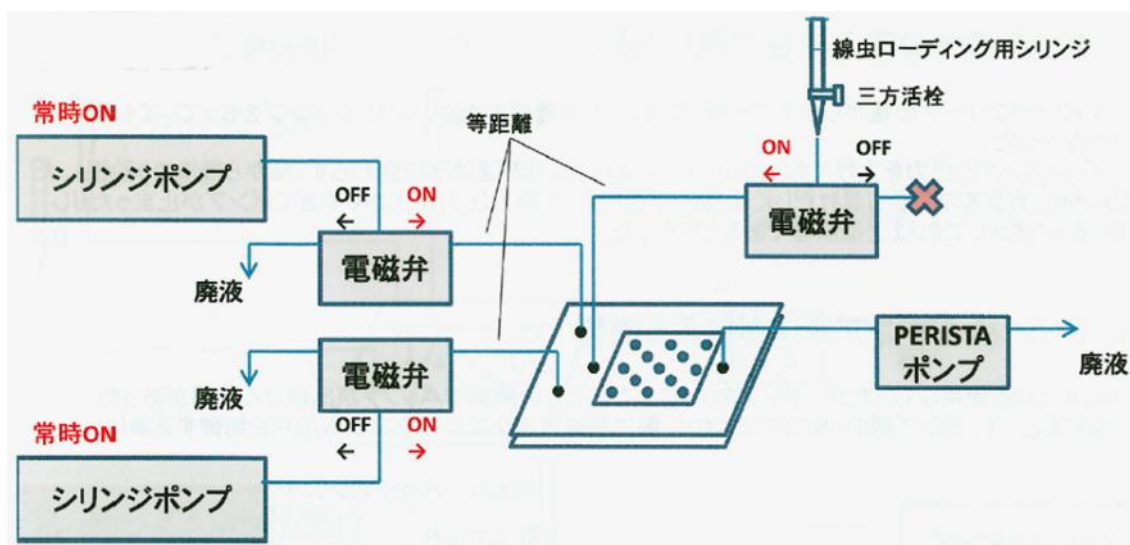


図 2-4 トラッキングイメージングシステムの概要

本研究で用いられたトラッキングイメージングシステムでは、左端のシリンジポンプから電磁弁を介してイメージング用 buffer が微小流路内に送り込まれる。このポンプは常に ON になっており、電磁弁の切り替えによってどちらの buffer が微小流路に入るかが決まる。buffer 流入口の反対側からは PERISTA ポンプで吸引しており、一定の速度の流れを作っている。線虫は高所に置かれたシリンジ内に入れられ、重力によって微小流路内に導入される。

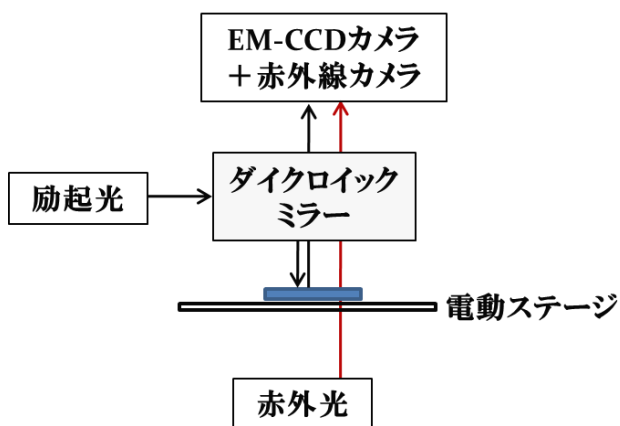


図 2-5 トラッキングイメージング用ステージの模式図

本研究で用いられたシステムでは、励起光を上から照射して蛍光画像を取得すると同時に、下から赤外光を照射して明視野像を取得した。明視野像を用いたトラッキングにより、線虫の動きに合わせて電動ステージを動かし、常に線虫を視野の中心に維持した。

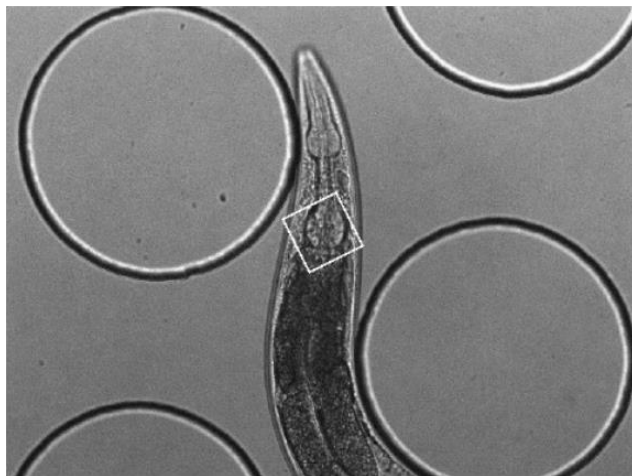
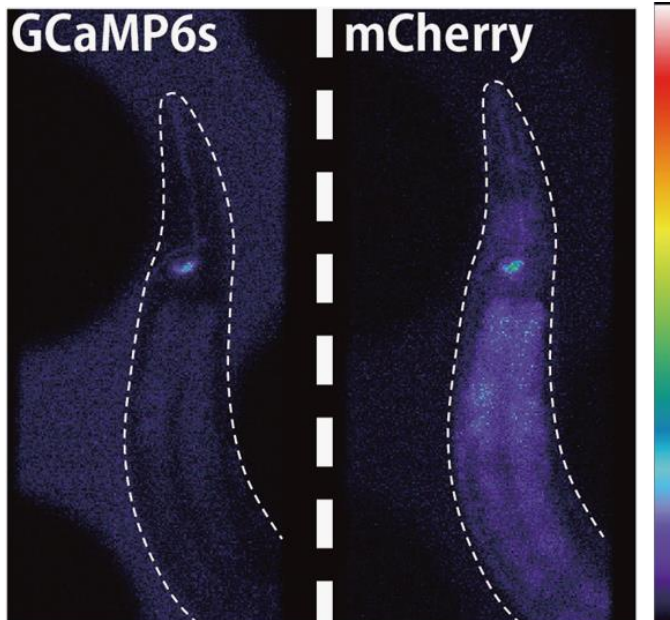


図 2-6 トラッキングイメージング時に得られる画像

上段: 明視野像。トラッキングプログラムは、画像の中心にある白い四角形の内部の模様を追跡する。本研究では線虫の咽頭部を追跡対象として用い、常に線虫の頭部が視野内に収まるようにした。

下段: 蛍光画像。左半分が GCaMP、右半分が mCherry の画像である。ASER 神経の細胞体と軸索が観察できる。GCaMP 側の画像で線虫の周囲が明るくなっているのは、フルオレセインの蛍光によるものである。



第3章 経験塩濃度依存的な神経応答の変化

3.1. 感覚神経 ASE の応答

塩濃度の記憶の所在を明らかにするため、塩の受容に関わる神経回路の上流から探索を行うことにした。線虫は NaCl を主に左右一対の ASE 感覚神経で受容する。そこで、まずは ASE 神経について、経験塩濃度に依存した神経応答が観察されるか調べた。先行研究から、ASER 神経は塩濃度の低下に対して応答し、ASEL 神経は逆に塩濃度の上昇に対して応答することが分かっている(Suzuki et al., 2008)。そのため、ASER 神経には 50 mM から 25 mM への濃度変化を刺激として与え、ASEL 神経には 25 mM から 50 mM への濃度変化を刺激として与えた。どちらの神経も細胞体での蛍光強度変化を観察した。その結果を図 3-2 及び図 3-3 に示す。ASER 神経では、従来の研究結果と同様に塩濃度の低下に対してカルシウム応答が観察されたが、条件付け時の塩濃度が低下するにつれて、刺激に対する応答も低下する傾向が見られた。ASEL 神経でも先行研究と同様に塩濃度の上昇に対するカルシウム応答が観察されたが、0 mM 条件付け時に 50 mM と 100 mM 条件付け時よりも高い応答が見られた。これらの結果から、神経回路の最も上流に位置する感覚神経において、経験依存的に神経応答が変化することが示された。

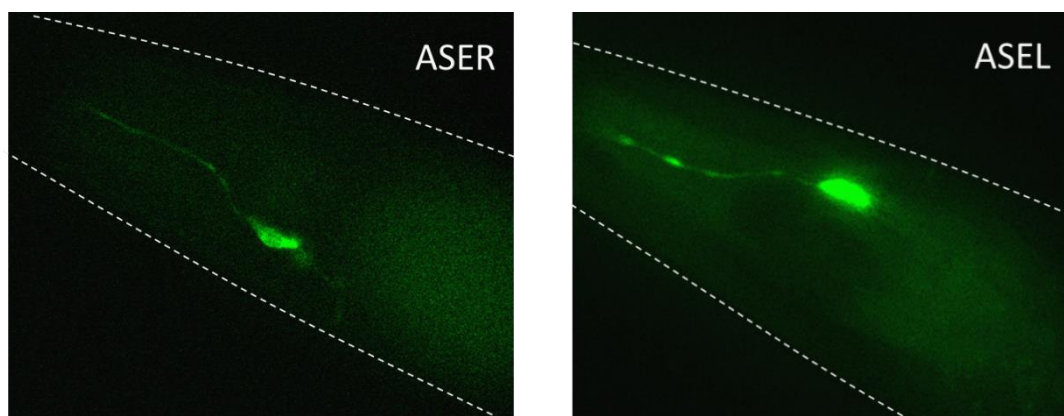


図 3-1 ASE 神経の写真

(左)ASER 神経の写真。画像中央付近の細胞体から、頭部先端方向(画像左上方向)に樹状突起が、画像右下方向に軸索が伸びている。

(右)ASEL 神経の写真。ASER 神経と同様に、画像中央付近の細胞体から前後に神経突起が伸びている。

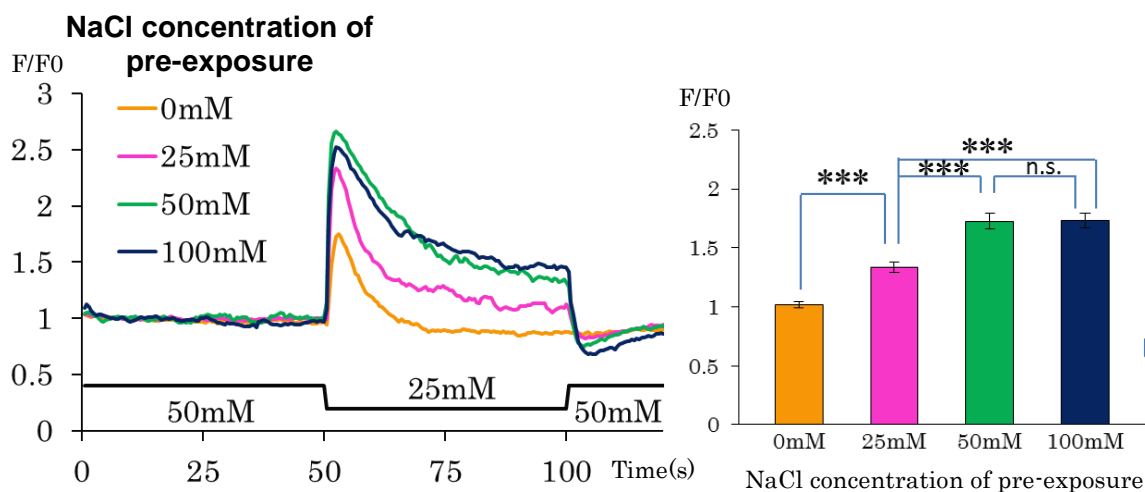


図 3-2 ASER 神経のカルシウム応答

左側のトレースは、図中に示した各塩濃度で条件付けした個体の相対蛍光強度の平均値を表している。イメージングのタイムコースは、0~50 秒が 50mM、50~100 秒が 25mM、100~120 秒が 50mM。右側の棒グラフはイメージング開始後 50~100 秒の間の蛍光強度の平均値を表している。
n=20~24

エラーバーは S.E.M.を表している。*** : p<0.001

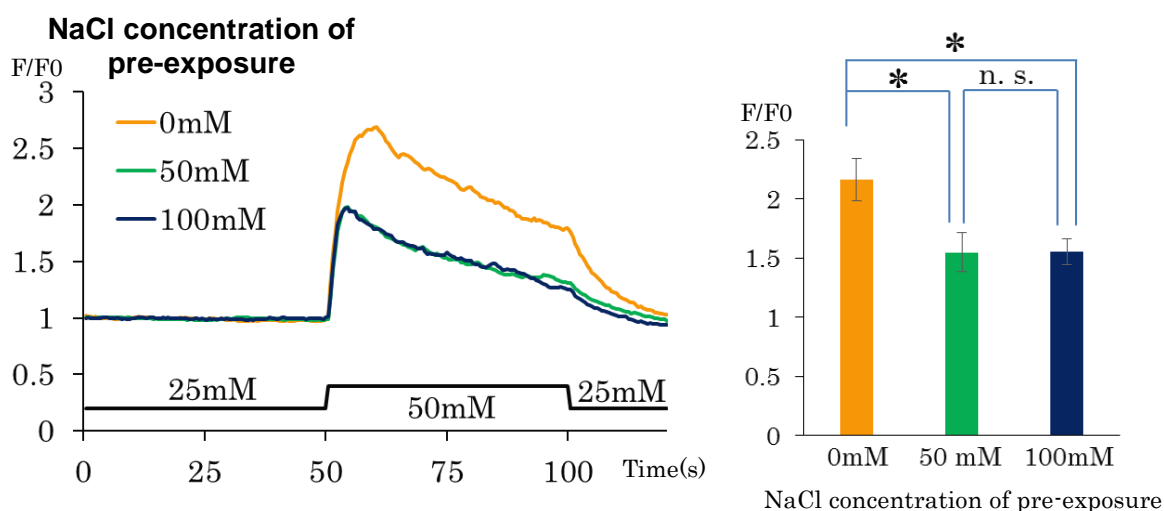


図 3-3 ASEL 神経のカルシウム応答

左側のトレースは、図中に示した各塩濃度で条件付けした個体の相対蛍光強度の平均値を表している。イメージングのタイムコースは、0~50 秒が 25 mM、50~100 秒が 50 mM、100~120 秒が 25 mM。右側の棒グラフはイメージング開始後 50~100 秒の間の蛍光強度の平均値を表している。
n=7~10、エラーバーは S.E.M.を表している。* : p<0.05

3.2. ASER 神経の応答の特性

これまでの研究結果から、NaCl に対する走性は、左右一対の ASE 神経のうち右側の ASER 神経が主要な役割を果たすことが分かっている (Adachi et al., 2010; Kunitomo et al., 2013)。そこで、ASER 神経を対象として、その神経応答の特性を調べることにした。まず、3.1 で刺激として与えた 50 mM-25 mM 以外の NaCl 濃度領域での変化を用いて応答を調べた。ここでは、100 mM から 75 mM、および 25 mM から 0 mM への NaCl 濃度変化に対する応答を観察した。その結果、100 mM-75 mM の刺激に対しては条件付け時の塩濃度によって応答に差があるものの、どの条件でも 50 mM-25 mM 刺激時よりも弱い応答が見られた (図 3-4)。一方で 25 mM-0 mM の刺激に対してはどの塩濃度で条件付けしても強く応答する事が分かった (図 3-5)。この結果については、レスポンスの大きさがイメージングに用いた G-CaMP の蛍光強度の変化域を超えたために変化比が頭打ちになった等の理由が考えられる。以上の結果より、ASER は同じ 25 mM 差の塩濃度変化に対して、高い塩濃度領域においてはより弱く、低い塩濃度領域においてはより強く応答することが示唆された。

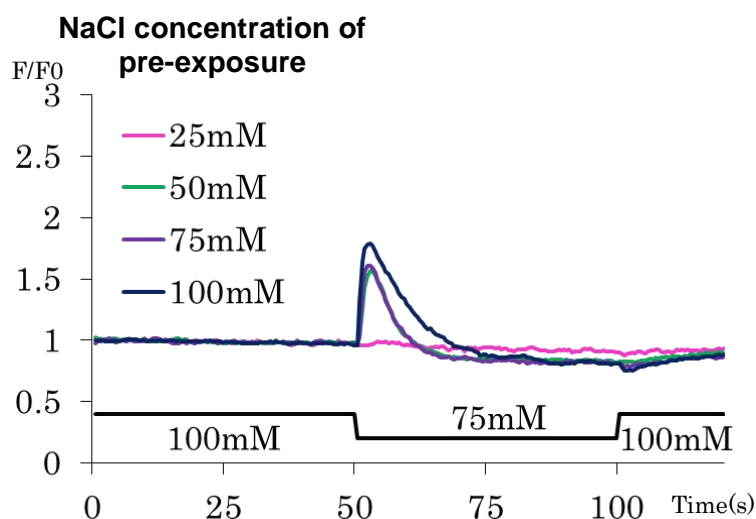


図 3-4 ASER 神経の 100 mM から 75 mM への塩濃度低下に対するカルシウム応答

トレースは、図中に示した各塩濃度で条件付けした個体の相対蛍光強度の平均値を表している。イメージングのタイムコースは、0~50 秒が 100 mM、50~100 秒が 75 mM、100~120 秒が 100 mM。n=13~21

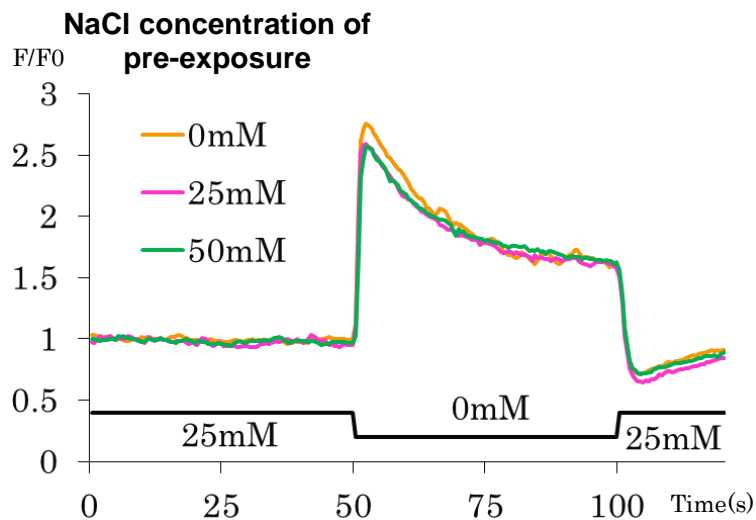


図 3-5 ASER 神経の 25 mM から 0 mM への塩濃度低下に対するカルシウム応答

トレースは、図中に示した各塩濃度で条件付けした個体の相対蛍光強度の平均値を表している。イメージングのタイムコースは、0~50 秒が 25 mM、50~100 秒が 0 mM、100~120 秒が 25 mM。n=20~22

次に、これまでの実験では線虫に与えた刺激は 1 ステップのみであったため、NaCl 濃度を 100 mM から 50 秒毎に 25 mM ずつ段階的に下げた場合の応答を観察した。ここでは 100 mM NaCl で条件付けされた個体と 25 mM NaCl で条件付けされた個体を用いた。その結果図 3-6 のような結果が得られ、各ステップに対する応答はおおむね 1 ステップの刺激を与えた場合と同様の応答が観察された。ただし 100 mM 条件付けの個体では、NaCl 濃度を 50 mM から 25 mM に低下させた時の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が起きていない。これは、前のステップで与えられた刺激(75 mM→50 mM)に対する応答が十分に収束していないことが原因と推察される。

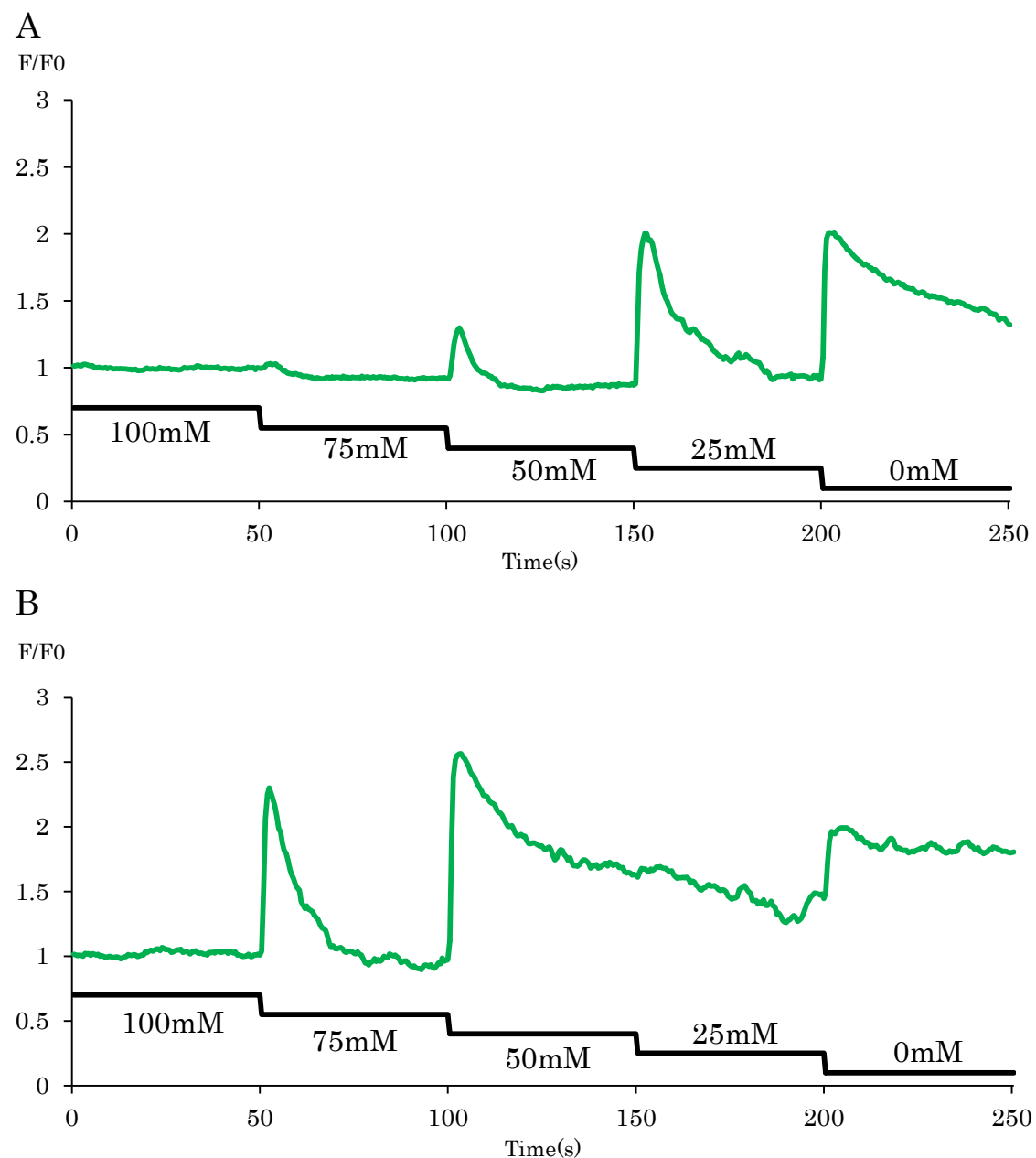


図 3-6 NaCl 濃度を段階的に下げた際の ASER 神経の応答

(A): 25mM 条件付けされた個体の ASER 神経の応答。タイムコースは、0~50 秒が 100mM、50~100 秒が 75mM、100~150 秒が 50mM、150~200 秒が 25mM、200~250 秒が 0mM である。n=16

(B): 100mM 条件付けされた個体の ASER 神経の応答。タイムコースは A と同様である。n=10

続いて、塩濃度の上昇に対して ASER 神経がどのような応答を示すかを調べた。ASER 神経は塩濃度の低下に対して細胞内カルシウム濃度が上昇するため、塩濃度の上昇に対しては応答を示さない、もしくは逆に細胞内カルシウム濃度が低下することが予想された。既存の GCaMP 発現株ではこれらの検出は難しいと考えられたため、GCaMP とは逆に Ca^{2+} が解離した際に蛍光強度が上昇する Inverse Pericam をインディケーターとして用いることにした。九州大学石原研究室より、Inverse Pericam の改良版(IP2.0)をいただいたため、これを ASER 神経に発現させ、イメージングを行った。その結果、図 3-7 に示す結果が得られた。ASER 神経は 25 mM から 50 mM への塩濃度上昇に対し、IP2.0 の蛍光強度が上昇し、すなわち細胞内カルシウム濃度が低下することが示された。よって ASER 神経は塩濃度の上昇に対しても機能することが考えられる。

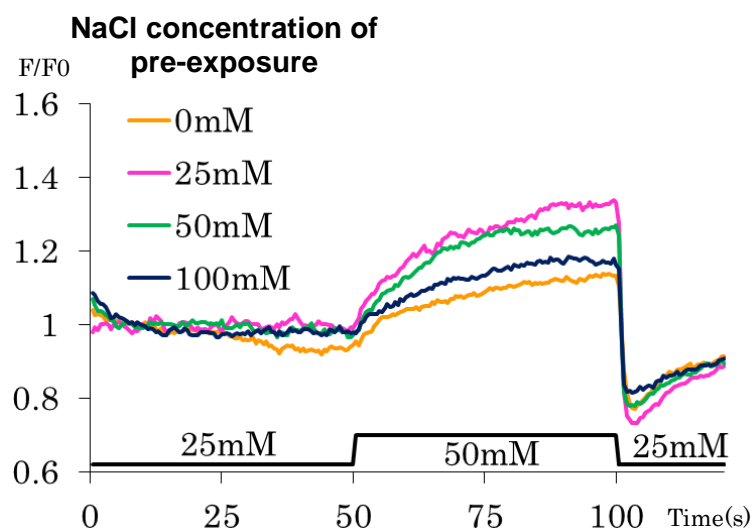


図 3-7 ASER 神経の 25 mM から 50 mM への塩濃度上昇に対するカルシウム応答

トレースは、図中に示した各塩濃度で条件付けした個体の相対蛍光強度の平均値を表している。イメージングのタイムコースは、0~50 秒が 25 mM、50~100 秒が 50 mM、100~120 秒が 25 mM。
n=19~20

3.3. ASER 神経の経験依存的な神経応答を制御する機構

3.1 で見られた ASER 神経の経験塩濃度依存的な神経応答の変化が、他の神経からのフィードバックによりおこる可能性を想定し、神経間のシグナル伝達に異常を持つ変異体を用いた実験を行った。ここで用いたのは、*unc-13(e51)*変異体および *unc-31(e928)*変異体である。UNC-13 は syntaxin と相互作用するタンパク質で、正常なシナプス小胞の放出に必要とされる(Madison et al., 2005)。また UNC-31 は CAPS (calcium-dependent activator protein for secretion)のオルソログであり、有芯小胞の放出に必要である(Spees et al.)。これらの変異体を用いて 3.1 と同様の実験を行ったところ、図 3-8 に示す結果が得られた。*unc-13(e51)*変異体および *unc-31(e928)*変異体のいずれにおいても、ASER 神経の応答は野生型のものと同様であった。この結果から、経験塩濃度依存的な ASER 神経の応答は、他の神経からの調節に依存しないことが示唆された。

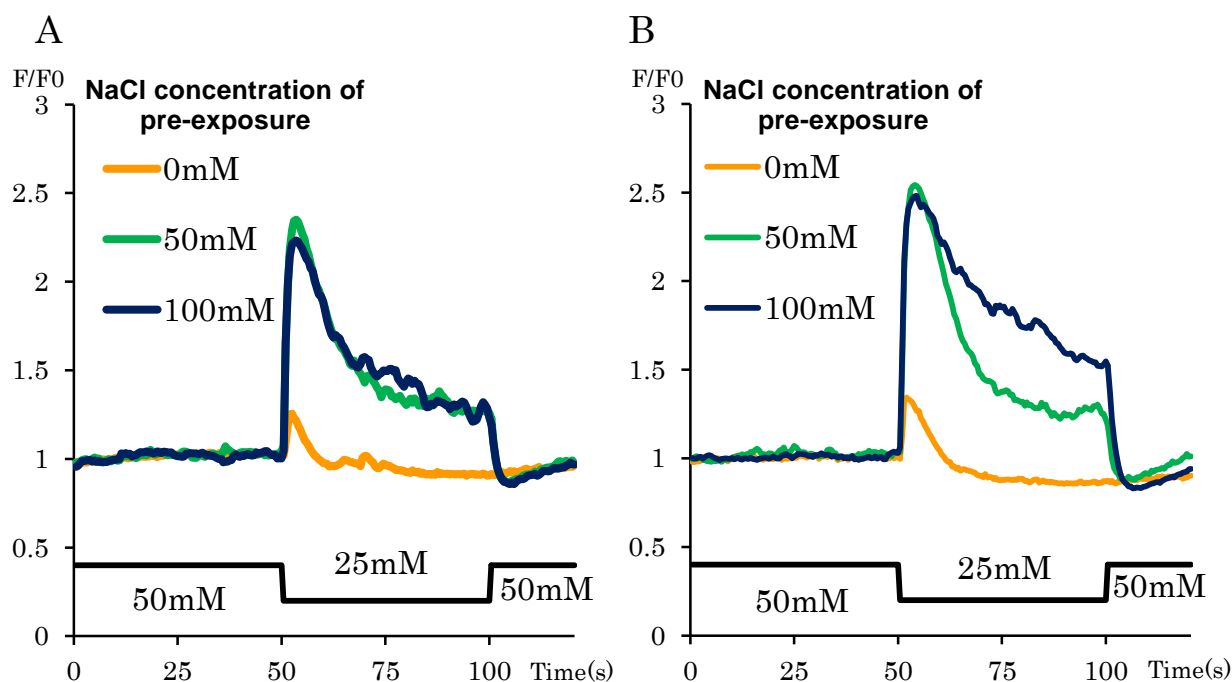


図 3-8 *unc-13* 変異体と *unc-31* 変異体における ASER 神経の応答

(A): *unc-13(e51)* 変異体における ASER 神経の応答。タイムコースは 0~50 秒が 50mM、50~100 秒が 25mM、100~120 秒が 50mM。n=20~22

(B): *unc-31(e928)* 変異体における ASER の応答。タイムコースは(A)と同様。n=19~25

次に、刺激を与える前の時点での ASER 神経の細胞内カルシウム濃度を比較することにした。3.1 で用いたカルシウムインジケータは GCaMP であり、異なる個体において細胞内カルシウム濃度を比較することはできない。そのため、本実験では Yellow Cameleon を用いた。条件付け時の塩濃度と YFP/CFP の関係は図 3-9 に示す結果となった。0 mM 条件付け時と 25 mM 条件付け時には、50 mM 及び 100 mM 条件付け時よりも細胞内のカルシウム濃度が低くなっている可能性が示唆された。

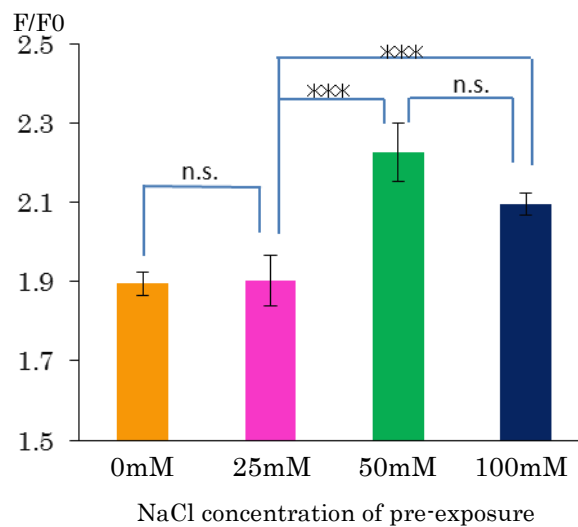


図 3-9 ASER 神経の細胞内カルシウム濃度の比較

ASER::YC2.12 株を用いたイメージングを行った際の、撮影開始時点の YFP/CFP 比を条件付け塩濃度ごとに比較している。比の値が大きいくほど、細胞内カルシウム濃度が高いことを示している。エラーバーは S.E.M.を表している。* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$

続いて、*gcy-22* 変異体を用いたイメージングを行った。*gcy-22* はグアニル酸シクラーゼの一種であり、過去の研究から、ASER 神経での塩の受容において最も上流に位置する可能性が示唆されている (Ortiz et al., 2009)。実験の結果、*gcy-22* 変異体では条件付け時の塩濃度に関わらず、塩濃度変化の刺激に対して細胞内カルシウム濃度が変化しないことが示された (図 3-10)。この結果から、GCY-22 は ASER 神経のカルシウム応答よりも上流で働いている可能性が示唆された。

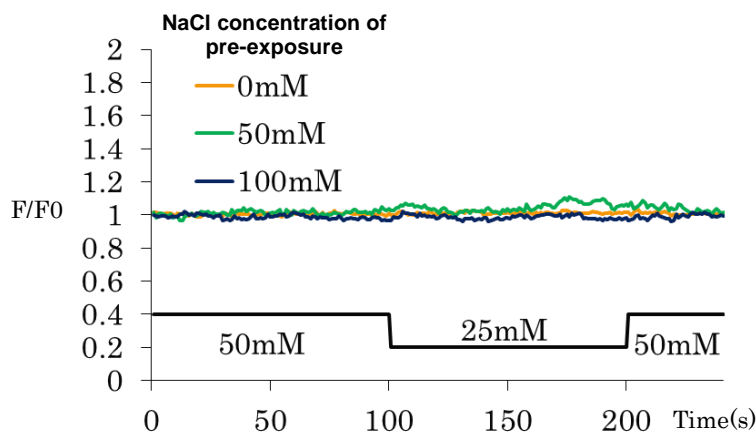


図 3-10 *gcy-22* 変異体における ASER 神経の応答

gcy-22 変異体における ASER 神経の応答。タイムコースは 0~50 秒が 50mM、50~100 秒が 25mM、100~120 秒が 50mM。n=15~20

さらに、*ttx-4* 変異体を用いて ASER 神経の応答を観察した。TTX-4 は線虫の nPKC-epsilon/eta であり、様々な感覚神経において刺激の受容とシグナル伝達に関わっていると考えられている (Okouchi et al., 2005)。本研究では、恒常活性化型の *ttx-4(gf)* 株と欠失変異型の *ttx-4(nj3)* 株を用いてイメージングを行った。その結果、どちらの変異体でも ASER 神経の応答は野生型と同様であった (図 3-11)。

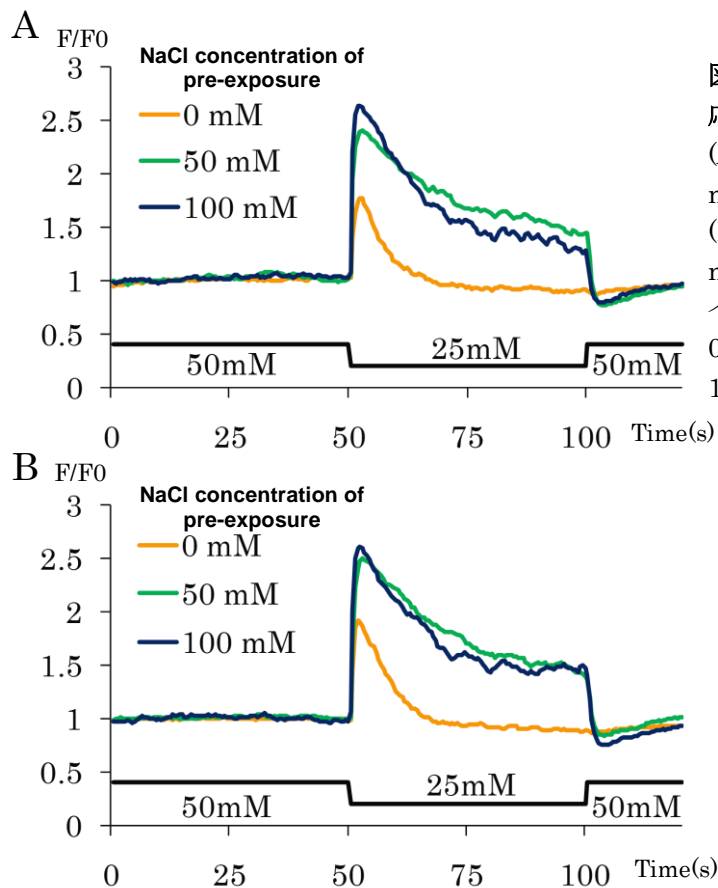


図 3-11 *ttx-4* 変異体における ASER 神経の応答

(A): *ttx-4(gf)* 株における ASER 神経の応答。
n = 21~22

(B): *ttx-4(nj3)* 株における ASER 神経の応答。
n = 20~21

イメージングのタイムコースはいずれも
0~50 秒が 50mM、50~100 秒が 25mM、
100~120 秒が 50mM。

3.4. 介在神経の応答

ASE 神経の下流には複数の介在神経が存在し、中でも NaCl に対する走性に重要な働きをしていると考えられているのが AIA、AIB、AIY、AIZ 神経である(Iino and Yoshida 2009)。これらの介在神経について、条件付け塩濃度を変えて神経応答を観察した。

3.4.1. AIA 神経の応答

先行研究から、AIA 神経は NaCl の濃度上昇に対して興奮することが分かっていた(Oda et al., 2011)。よって、AIA 神経のカルシウムイメージングには 25 mM から 50 mM への NaCl 濃度上昇を刺激として用いた。GCaMP の蛍光強度変化は細胞体では観察できず、神経突起のみで観察された。解析の際には神経突起を対象とした。

実験結果は、図 3-12 に示した通りである。AIA 神経は過去の結果と同様に NaCl の濃度上昇に対して神経応答を見せたが、いずれの条件付け塩濃度においても同様の応答を示した。この結果から、AIA 神経は経験塩濃度依存的な行動の変化には直接関与せず、単に塩濃度変化をそのまま下流に伝えていると考えられる。

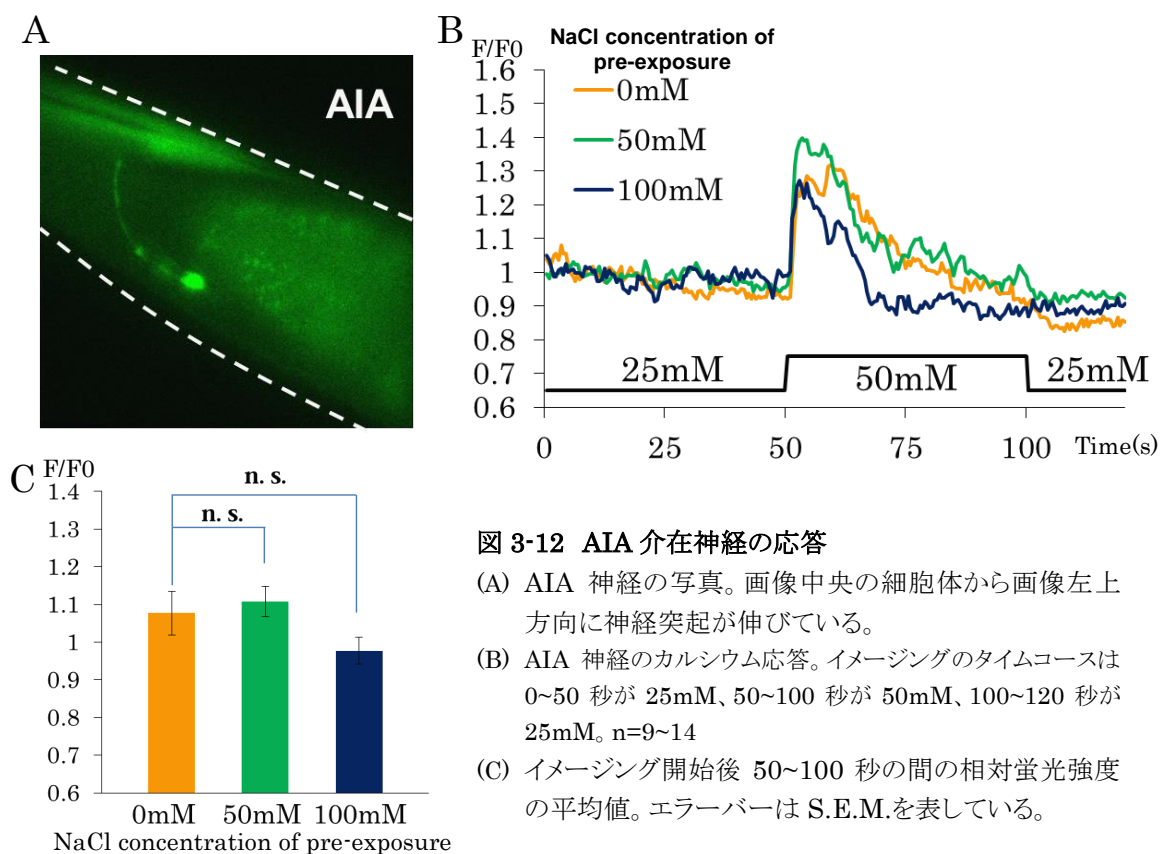


図 3-12 AIA 介在神経の応答

- (A) AIA 神経の写真。画像中央の細胞体から画像左上方向に神経突起が伸びている。
- (B) AIA 神経のカルシウム応答。イメージングのタイムコースは 0~50 秒が 25mM、50~100 秒が 50mM、100~120 秒が 25mM。n=9~14
- (C) イメージング開始後 50~100 秒の間の相対蛍光強度の平均値。エラーバーは S.E.M.を表している。

3.4.2. AIB 神経の応答

AIB 神経は先行研究から NaCl 濃度の低下に対して興奮することが分かっている (Oda et al., 2011)。そのため刺激には 50 mM から 25 mM への塩濃度低下を用いた。GCaMP の蛍光強度変化は細胞体で観察した。

条件付け時の塩濃度に応じた神経応答は、図 3-13 に示す結果となった。AIB 神経の応答は各個体間で大きく異なっており、塩濃度変化の刺激を与えていない時にも細胞内カルシウム濃度が変化するケースが確認された。各条件付け塩濃度における F/F₀ の平均値のグラフを比較すると、50 mM 以上の塩濃度で条件付けされた場合、AIB 神経は先行研究と同様に塩濃度の低下に対して神経応答を示した。一方で 25 mM 及び 0 mM NaCl で条件付けされた場合、AIB 神経は刺激に対して有意な応答を示さなかった。そのため、AIB 神経は刺激よりも高い塩濃度で条件付けされていた場合のみ、塩濃度の低下に対して応答すると考えられる。この結果から、AIB 神経は経験塩濃度依存的な行動の変化に関与していることが示唆された。

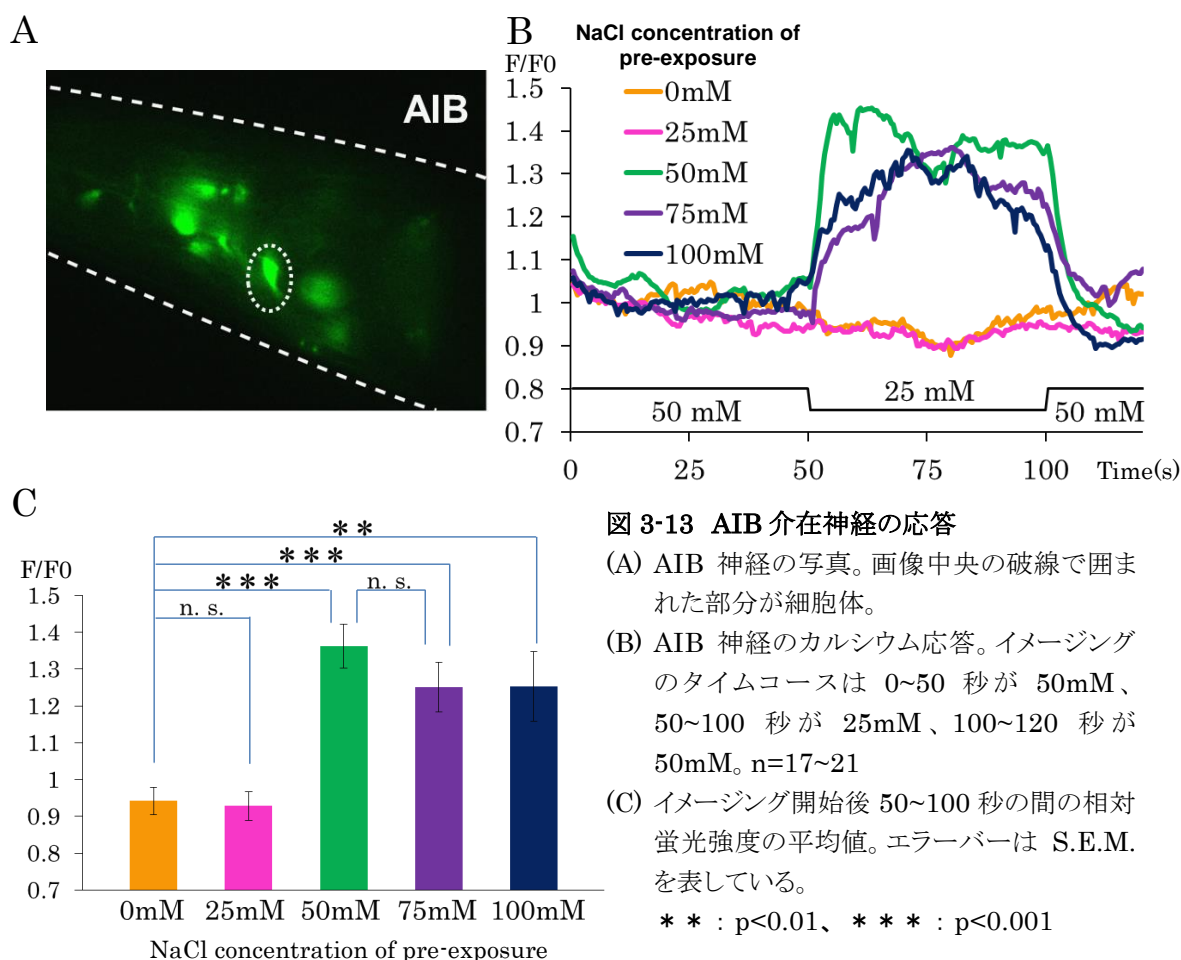


図 3-13 AIB 介在神経の応答

- (A) AIB 神経の写真。画像中央の破線で囲まれた部分が細胞体。
- (B) AIB 神経のカルシウム応答。イメージングのタイムコースは 0~50 秒が 50mM、50~100 秒が 25mM、100~120 秒が 50mM。n=17~21
- (C) イメージング開始後 50~100 秒の間の相対蛍光強度の平均値。エラーバーは S.E.M. を表している。

** : p<0.01、*** : p<0.001

3.4.3. AIY 神経の応答

AIY 神経は、既存の GCaMP2.1 発現株では塩濃度の変化に対する GCaMP の蛍光強度変化が観察できなかった。そのため、新たに GCaMP3.0 を発現させた株を作成し、塩濃度変化に対する神経応答の観察を行った。その結果、神経突起の部位において塩濃度の上昇に対する GCaMP の蛍光強度増加が観察された。この結果から、AIY 神経は塩濃度の上昇に対して興奮することが考えられるため、刺激として 25 mM から 50 mM への NaCl 濃度上昇を用いた。

経験塩濃度に応じた AIY 神経の応答は図 3-14 に示す結果となった。AIY 神経の応答は刺激より低い濃度で条件付けした際に、刺激より高い塩濃度で条件付けした場合よりも強く興奮する傾向が見られた。この結果から、AIY 神経も経験塩濃度依存的な行動調節に関与している可能性が考えられる。

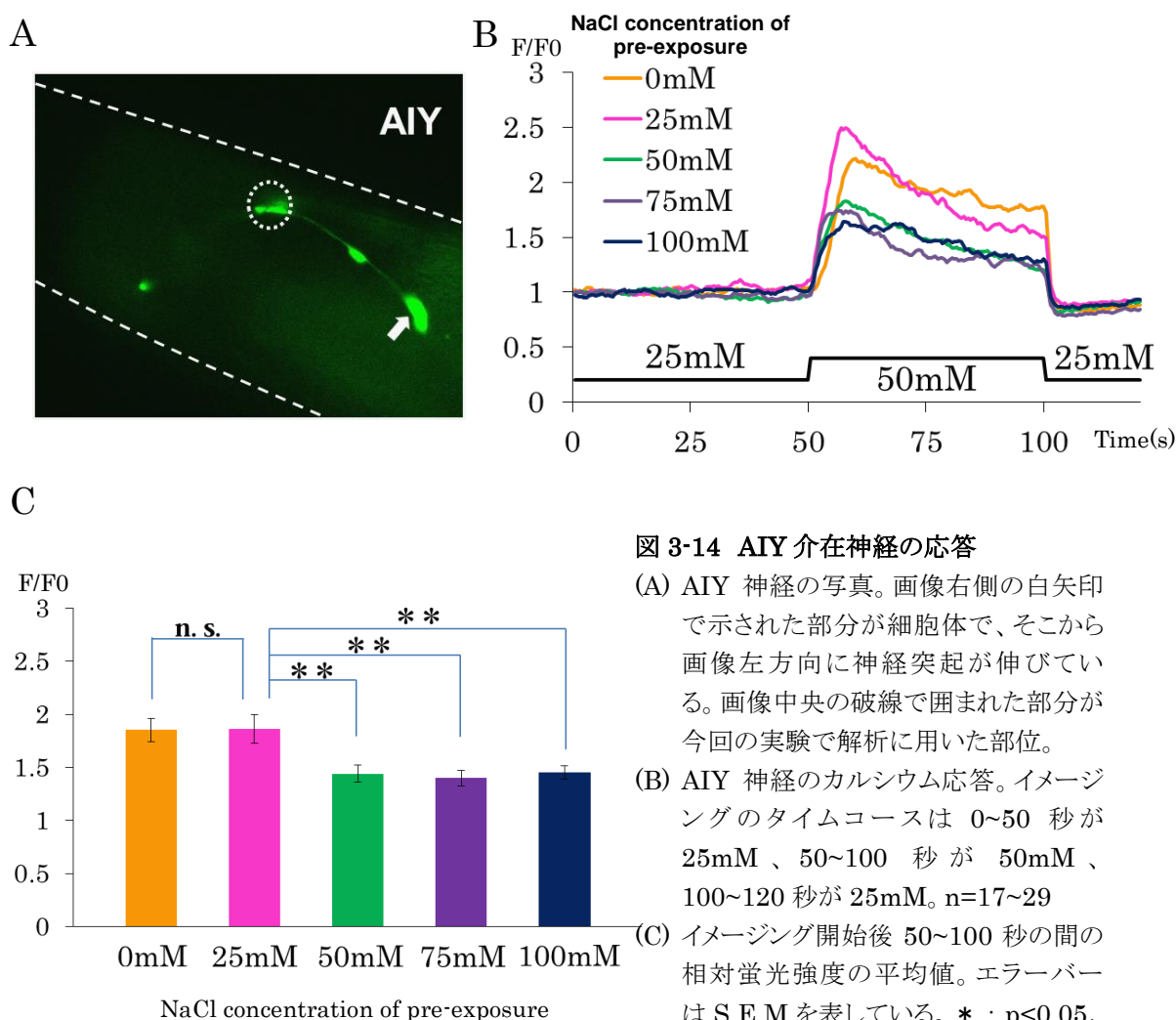


図 3-14 AIY 介在神経の応答

- (A) AIY 神経の写真。画像右側の白矢印で示された部分が細胞体で、そこから画像左方向に神経突起が伸びている。画像中央の破線で囲まれた部分が今回の実験で解析に用いた部位。
- (B) AIY 神経のカルシウム応答。イメージングのタイムコースは 0~50 秒が 25mM、50~100 秒が 50mM、100~120 秒が 25mM。n=17~29
- (C) イメージング開始後 50~100 秒の間の相対蛍光強度の平均値。エラーバーは S.E.M.を表している。* : $p<0.05$ 、** : $p<0.01$ 、*** : $p<0.001$

3.4.4. AIZ 神経の応答

AIZ 神経のイメージングには、Shawn Xu ラボよりいただいた株を用いた。予備実験の結果、塩濃度の低下に対して応答を示すことが分かったため、50 mM から 25 mM への NaCl 濃度低下を刺激として用いた。蛍光強度の測定は神経突起で行った。

実験の結果、図 3-15 のような結果が得られた。100 mM 条件付け時に NaCl 濃度低下に対して最も強い神経応答を示した。50 mM 条件付け時はやや弱い応答を示し、0 mM 条件付けされた個体では有意な変化は観察されなかった。

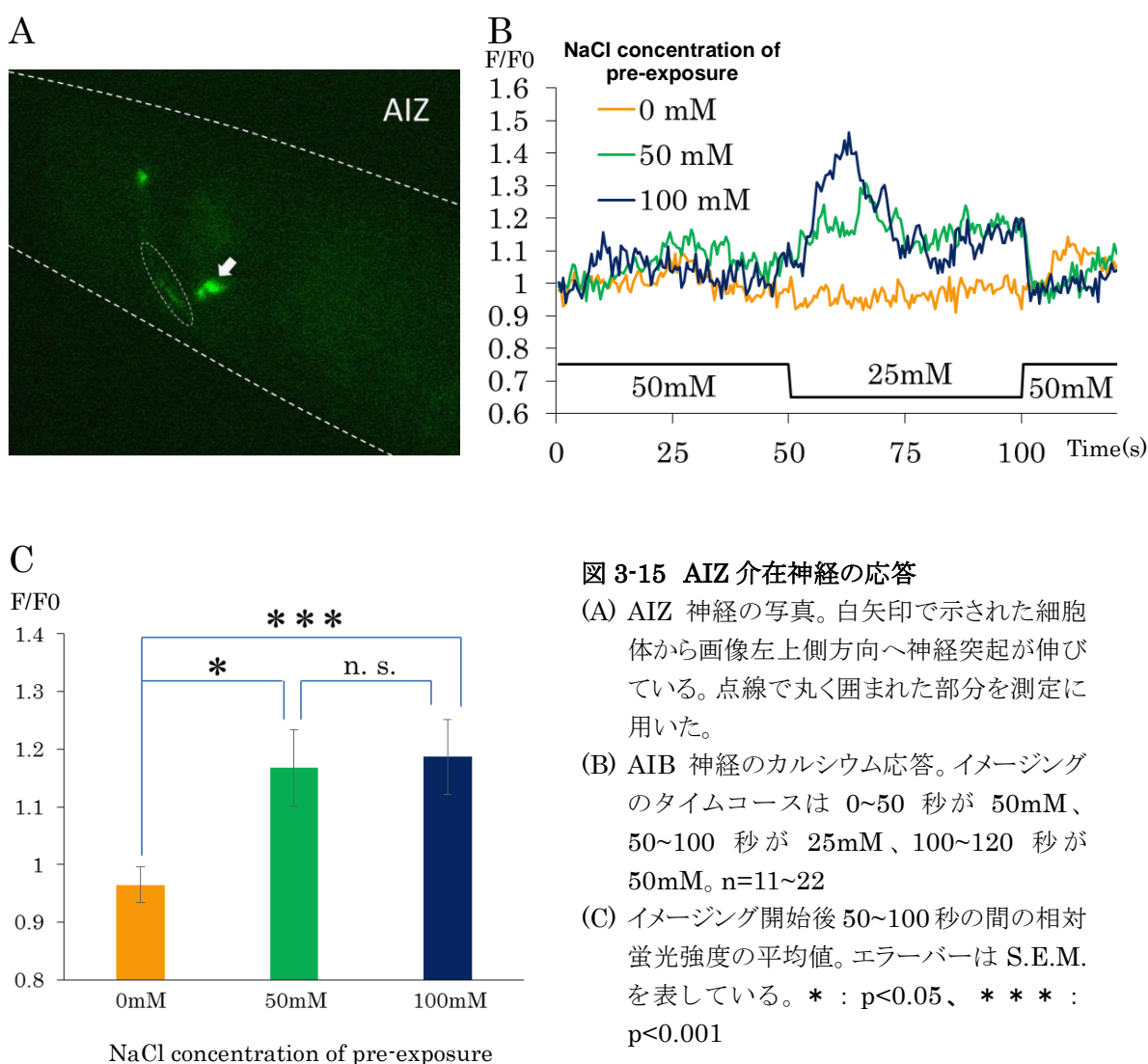


図 3-15 AIZ 介在神経の応答

- (A) AIZ 神経の写真。白矢印で示された細胞体から画像左上側方向へ神経突起が伸びている。点線で丸く囲まれた部分を測定に用いた。
- (B) AIB 神経のカルシウム応答。イメージングのタイムコースは 0~50 秒が 50mM、50~100 秒が 25mM、100~120 秒が 50mM。n=11~22
- (C) イメージング開始後 50~100 秒の間の相対蛍光強度の平均値。エラーバーは S.E.M. を表している。* : $p < 0.05$ 、*** : $p < 0.001$

3.5. 介在神経 AIB の応答を制御する機構

ここまで行った感覚神経及び介在神経のカルシウムイメージングの結果から、AIB 神経に経験塩濃度の情報が伝わっていることが示唆された。そこで、AIB 神経の応答がどのようにして調節されるか調べることにした。

3.5.1. AIB 神経の応答の特性

まず、3.2.で行った様に、100 mM から 75 mM、および 25 mM から 0 mM への NaCl 濃度変化に対する応答を観察した。その結果、図 3-16 に示す結果が得られた。100 mM-75 mM の刺激に対しては、50 mM 及びそれ以下の塩濃度で条件した場合に応答が見られなかった。一方で 25 mM-0 mM の刺激に対しては条件付け時の塩濃度によって応答の大きさに差があるものの、全ての条件において応答が観察された。

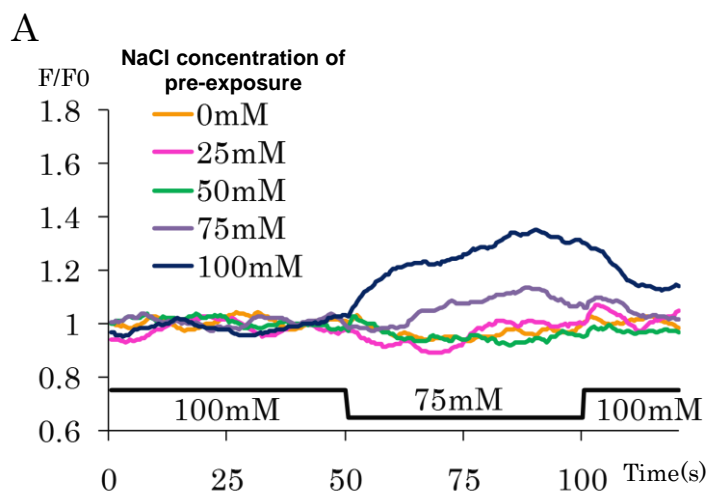
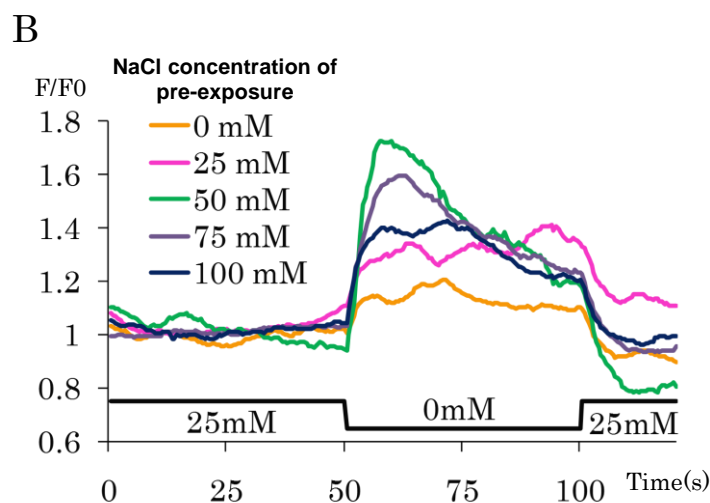


図 3-16 AIB 介在神経の応答

(A) AIB 神経の 100 mM-75 mM 間の塩濃度変化に対する応答。イメージングのタイムコースは、0~50 秒が 100 mM、50~100 秒が 75 mM、100~120 秒が 100 mM。
n = 20~22



(B) AIB 神経の 25 mM-0 mM 間の塩濃度変化に対する応答。イメージングのタイムコースは、0~50 秒が 25 mM、50~100 秒が 0 mM、100~120 秒が 25 mM。
n = 19~21

3.5.2. 感覚入力神経の検討

続いて、ASER 神経及び AIB 神経の応答変化が ASER 神経に入る感覚入力に依存するかを確かめるため、*dyf-11* 変異体及び *dyf-11* 変異を ASER でレスキューした株を用いて実験を行った。*dyf-11* 変異体は、感覚繊毛が維持されないため、頭部の感覚器で NaCl の受容ができなくなっていると考えられる。これに対して ASER レスキュー株では、ASER のみで正常な DYF-11 を発現させているため、ASER だけは正常に NaCl を受容できると考えられる(図 3-17)。まず、*dyf-11* 変異体で ASER 神経の Ca^{2+} イメージングを行ったところ、刺激に対する僅かな応答は見られたものの、条件付け塩濃度に依存した応答の変化は観察されなかった。一方で *dyf-11* 変異を ASER でレスキューした株では、ほぼ野生型と同様の Ca^{2+} 応答が観察された(図 3-18)。これらの結果から、ASER の応答変化は感覚繊毛が正常でなければ起こらず、また ASER 自身の入力のみではほぼ十分であるということが示された。次に *dyf-11* 変異体で AIB の Ca^{2+} イメージングを行ったところ、NaCl 濃度の低下に対する応答は観察されなかった。一方で *dyf-11* 変異を ASER でのみレスキューした株では、AIB は経験塩濃度に応じた応答の変化を示したが、野生型と同じ応答ではなかった(図 3-19)。そのため、ASER からの入力によって AIB は応答することが示されたが、同時に他の神経からの入力も AIB の応答には寄与している事が示唆された。

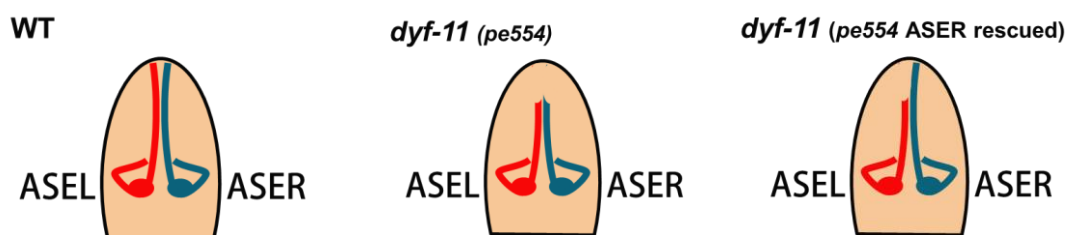


図 3-17 *dyf-11(pe554)*変異体及び ASER 特異的レスキュー株の模式図

この模式図では、簡略化のため ASE 神経のみを描いている。(左)野生型では、頭部の先端に感覚神経の感覚繊毛が伸び、ここで化学物質の受容を行う。(中)一方 *dyf-11(pe554)*変異体では、全ての感覚神経の感覚繊毛が欠損しており、そのため感覚神経は化学物質を受容できないと考えられる。(右) *dyf-11(pe554)*変異体の ASER 特異的レスキュー株では、ASER のみ正常な感覚繊毛を持っており、化学物質の受容を行うことができると考えられる。

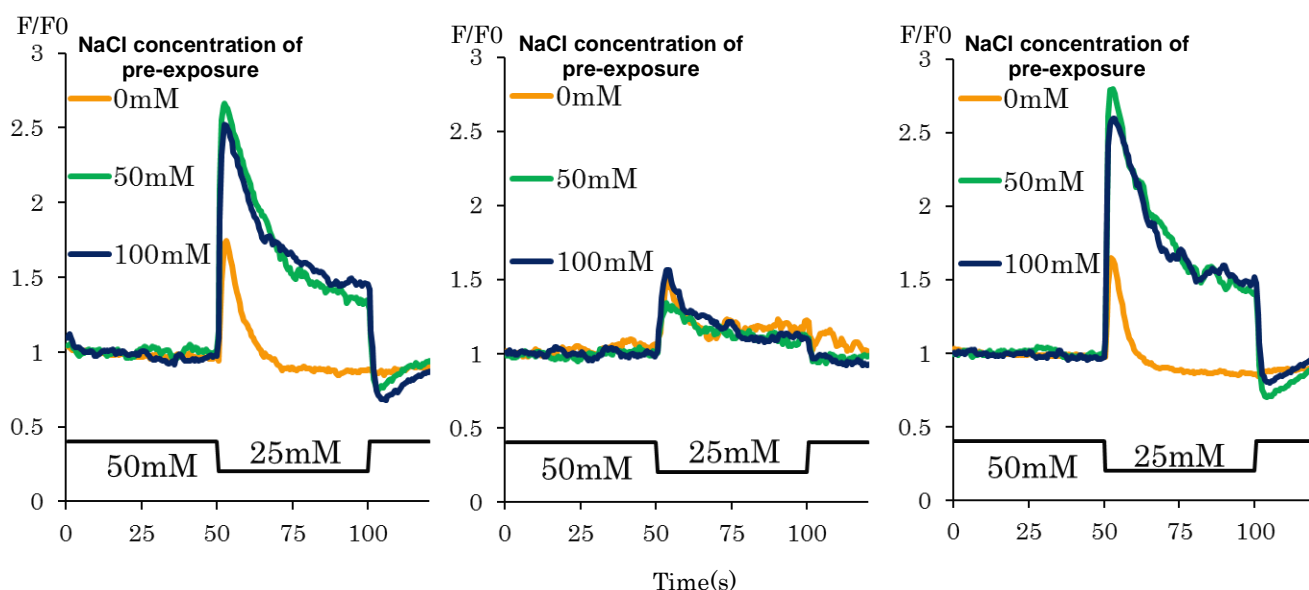


図 3-18 *dyf-11(pe554)*変異体及び ASER 特異的レスキュー株における ASER 神経の応答

(左) WT の ASER 神経の応答。図 3-1 に示したデータと同じもの。

(中) *dyf-11(pe554)*変異体の ASER 神経の応答。WT と比較して大幅に応答が落ちており、また条件付け塩濃度に応じた変化も見られなかった。

(右) *dyf-11(pe554)*変異を ASER 特異的にレスキューした株の ASER 神経の応答。WT と同様の応答が見られた。

イメージングのタイムコースはいずれも図 3-1 に準拠している。n = 18~21

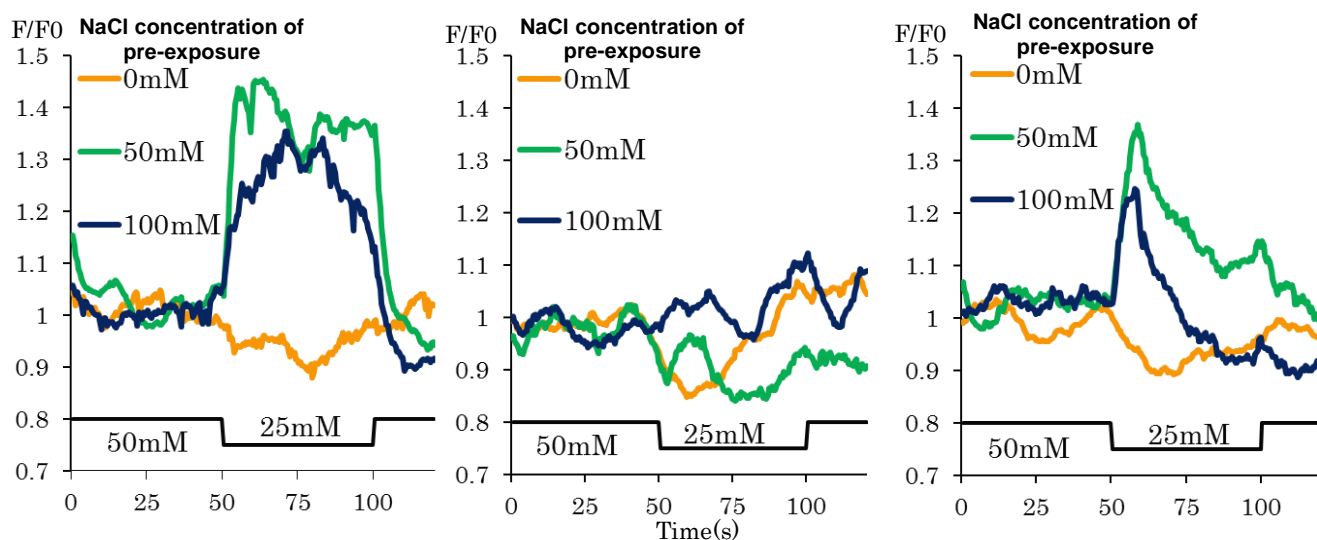


図 3-19 *dyf-11(pe554)*変異体及び ASER 特異的レスキュー株における AIB 神経の応答

(左) WT の AIB 神経の応答。図 3-12 に示したデータと同じもの。

(中) *dyf-11(pe554)*変異体の AIB 神経の応答。いずれの条件付け塩濃度でも、塩濃度変化に対する応答は見られなかった。

(右) *dyf-11(pe554)*変異を ASER 特異的にレスキューした株の AIB 神経の応答。50 mM 及び 100 mM 条件付けで塩濃度低下に対する応答が観察できたが、WT と同様の応答ではなかった。

イメージングのタイムコースはいずれも図 3-12 に準拠している。n = 13~21

3.5.3. *eat-4* 変異体における ASER 神経と AIB 神経の応答

eat-4 は哺乳類の BNP I 型小胞グルタミン酸輸送体のオーソログをコードしており、過去の研究から、線虫の神経においてグルタミン酸による神経伝達に必要であることが分かっている (Lee et al., 1999)。*eat-4* は ASE 神経にも発現しており (Serrano-Saiz et al., 2013)、ASER からの伝達にも関わっていることが予想される。そこで、*eat-4* 変異体を用いて ASER 神経と AIB 神経のカルシウム応答を観察した。その結果、ASER 神経の応答は野生型と同等であったが、AIB 神経の応答は減弱することが分かった。以上の結果より、ASER 神経から AIB 神経へのシグナル伝達には EAT-4 を介したグルタミン酸放出が関わっていることが示唆された。

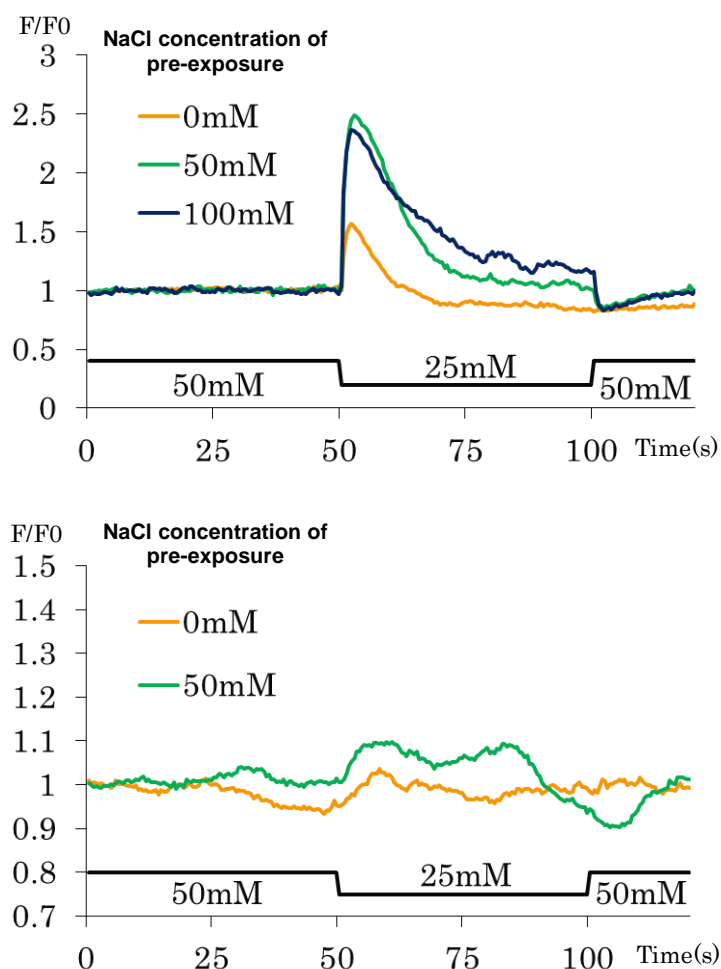


図 3-20 *eat-4* 変異体における ASER 神経と AIB 神経の応答

上段:*eat-4* 変異体の ASER 神経の応答。野生型の応答(図 3-1 参照)とほぼ同様であった。

イメージングのタイムコースは図 3-1 に準拠している。n = 20~21

下段:*eat-4* 変異体の AIB 神経の応答。野生型の応答(図 3-12 参照)と比較して、応答の強度が落ちていた。イメージングのタイムコースは図 3-12 に準拠している。n = 19~20

3.5.4. *plc-1* 変異体

ASER と AIB の接続について調べるため、*plc-1* 変異体を用いて実験を行った。*plc-1* はホスホリパーゼ C をコードしており、ホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 (PIP₂) をジアシルグリセロール(DAG)およびイノシトール-1,4,5-三リン酸(IP₃)へと切断する。ここで生成した DAG はカルシウムと共にプロテインキナーゼ C(PKC)を活性化し、PKC はさらに他の分子をリン酸化する。当研究室の先行研究から、線虫の PKC をコードする *ttx-4* の変異体は NaCl に対する走性に異常を持つ事が分かっている (Adachi et al.)。また、塩濃度記憶に異常を持つ変異体のスクリーニングにより、*plc-1* 変異体(*gf*及び*lf*)が得られている。そこで、これらの変異体を用いて ASER 及び AIB で Ca²⁺イメージングを行った。

イメージングの結果、ASERは*plc-1(pe1237, gf)*、*plc-1(pe1238, lf)* いずれにおいても野生型と同様の応答を示した(図3-21)。よって、*plc-1*はASERのカルシウム応答の下流で機能している事が示唆された。一方でAIBは、*plc-1(gf)* 株では50 mMおよび100 mM 条件付けにおいて応答が観察されたことに加え、0 mM 条件付けでもわずかな蛍光強度の上昇が見られた(図3-22左)。*plc-1(lf)* 株では50 mM 条件付け、100 mM 条件付け共に応答の低下が見られた(図3-22右)。そのため、AIB のカルシウム応答の上流でDAG/PKC経路が関わっている可能性が考えられた。

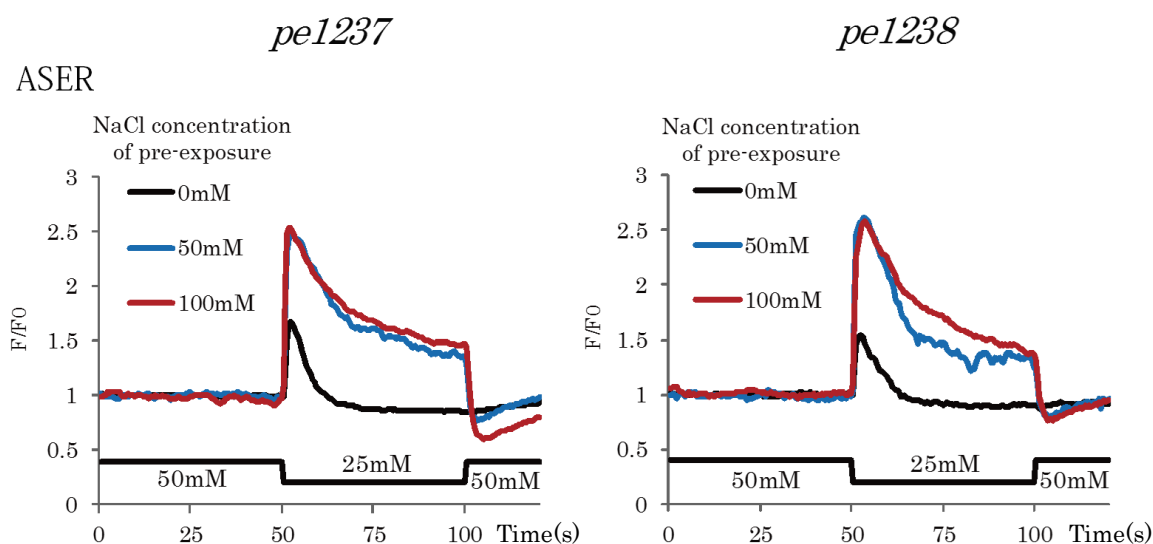


図 3-21 *plc-1(gf)*変異体及び *plc-1(lf)*変異体における ASER 神経の応答

2 つの *plc-1* 変異体 *pe1237(gf)* 株と *pl1238(lf)* 株における ASER 神経の応答。野生型の応答 (図 3-1)と比較して、どちらの変異体でもほぼ同様の応答が見られた。タイムコースは図 3-1 に準拠する。n=15~21

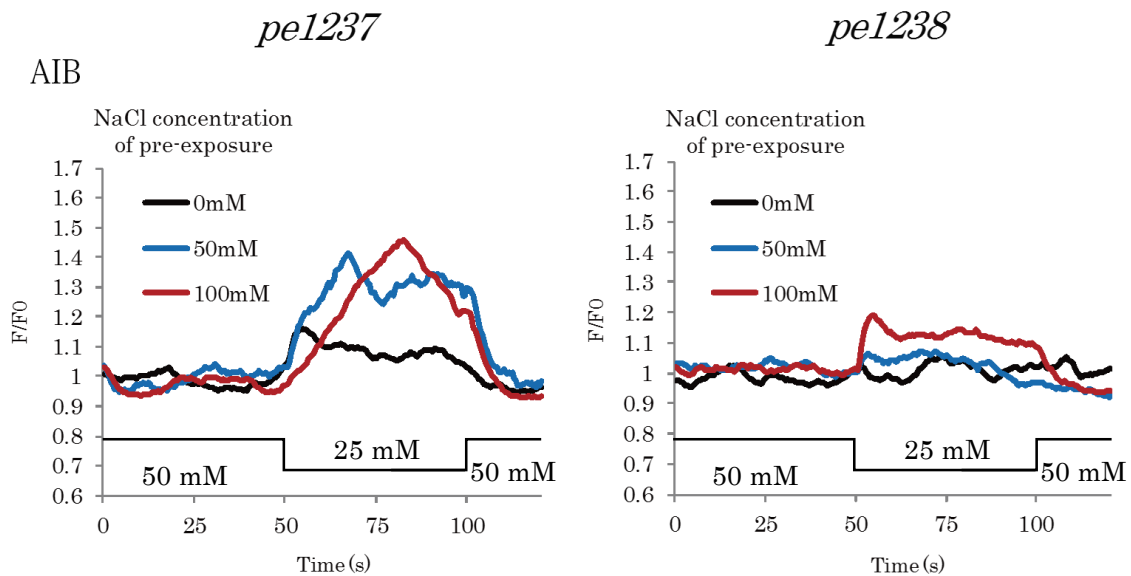


図 3-22 *plc-1(gf)*変異体及び *plc-1(lf)*変異体における AIB 神経の応答

2つの *plc-1* 変異体 *pe1237(gf)* 株と *pl1238(lf)* 株における AIB 神経の応答。野生型の応答(図 3-12)と比較して、*pe1237(gf)* 株では 0 mM 条件付けでも塩濃度低下に対する応答が観察され、一方 *pl1238(lf)* 株では 50 mM 及び 100 mM 条件付けでの応答が低下していた。タイムコースは図 3-12 に準拠する。n=18~26

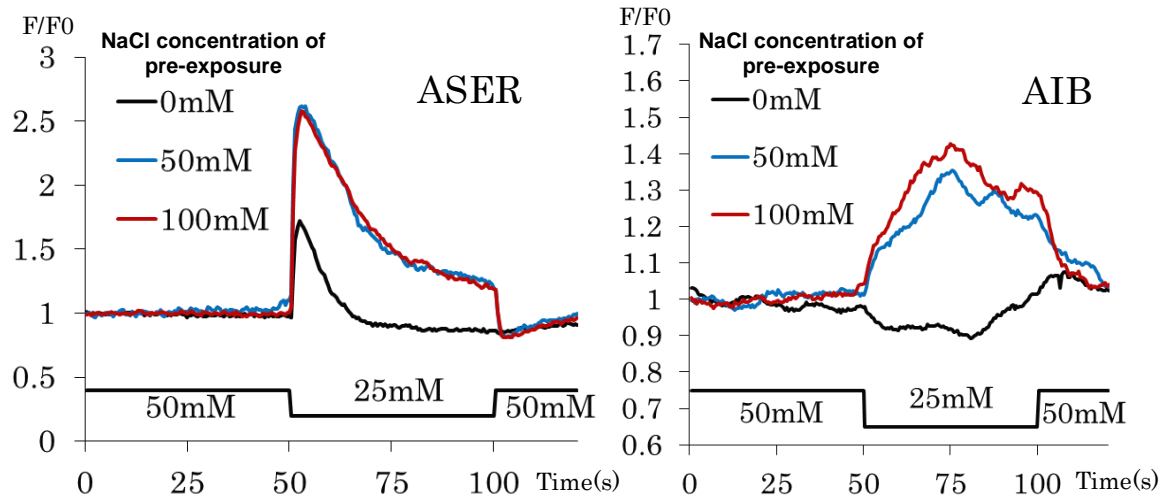


図 3-23 *plc-1(lf)*変異体の ASER 特異的レスキュー株における ASER 神経と AIB 神経の応答

pl1238(lf) 株に ASER 特異的に *pcl-1* を発現させ、レスキューを行った株を用い、ASER 神経(左)と AIB 神経(右)の応答を観察した。図 3-20 と比較すると、AIB 神経の 50 mM 及び 100 mM 条件付けにおいて、塩濃度低下に対する応答が観察されるようになった。タイムコースは図 3-1 及び図 3-12 に準拠。ASER: n = 18~24, AIB: n = 19~22

3.6. 介在神経 AIY の応答を制御する機構

AIY 神経も経験塩濃度に応じて応答に差が見られた。そこで、前述の *dyf-11(pe554)* 変異体を用いて AIY 神経の応答の由来を調べた。AIY 神経は塩濃度の上昇に対して応答するため、レスキュー株については ASEL 特異的レスキュー株を用いた。実験の結果、*dyf-11(pe554)* 変異体では AIY 神経の応答はほぼ完全に消失した。*dyf-11(pe554)* 変異の ASEL 特異的レスキュー株では、塩濃度の上昇に対する応答は観察されたものの、経験塩濃度に応じた応答の変化は見られなかった。そのため、ASEL 神経からの入力 AIY 神経の応答を引き起こすことが可能ではあるものの、経験塩濃度に依存した応答には他の神経からの入力が必要であると考えられる。

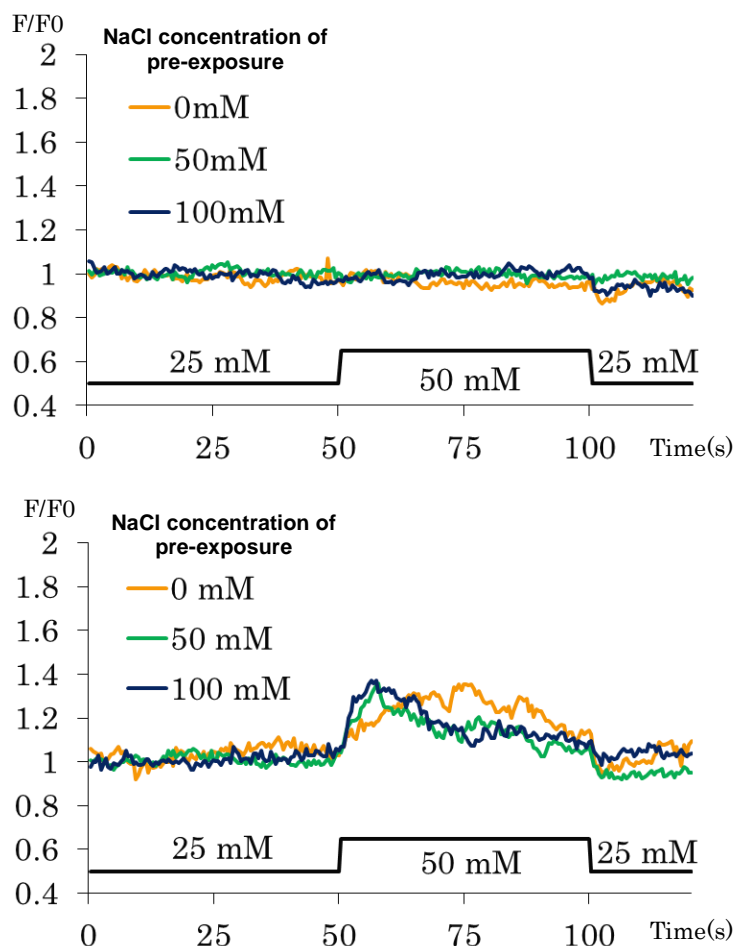


図 3-24 *dyf-11(pe554)* 変異体及び ASEL 特異的レスキュー株における AIY 神経の応答

上段: *dyf-11(pe554)* 変異体の AIY 神経の応答。WT の応答(図 3-13)と比較して、いずれの条件付け塩濃度でも塩濃度上昇に対する応答が見られなくなった。n = 18~20

下段: *dyf-11(pe554)* 変異を ASEL 特異的にレスキューした株の AIY 神経の応答。塩濃度上昇に対する応答が観察されたが、WT の応答と比較すると弱く、また条件付け塩濃度による差も見られなかった。n = 19~20

3.7. 考察

3.7.1. 経験塩濃度依存的に ASER 神経の応答が変化する機構

神経間のシグナル伝達に異常を持つ *unc-13* 変異体と *unc-31* 変異体を用いた実験の結果(図 3-7)から、ASER 神経は他の神経からの調節を受けなくても神経応答を変化させることができることが示唆された。このことは、ASER 神経の細胞内部で何らかの変化が起きていることを意味する。具体的には、①NaCl の受容に関わる分子、②塩濃度変化シグナルを伝える分子経路の因子、③カルシウムチャネル・ポンプの活性、などの変化が考えられる。

①については、受容体型グアニル酸シクラーゼである GCY-22 が有力な候補として考えられている。実際に *gcy-22* 変異体では、ASER 神経は経験塩濃度によらず塩濃度変化に対する応答が消失した。しかしながら、GCY-22 は単に NaCl の受容のみに関与し、実際に経験塩濃度に応じた神経応答の調節を行うのは下流の分子である可能性も考えられる。

②については、先行研究から DAG/PKC 経路が線虫の塩に対する走性に寄与していることが分かっている(Iwata et al., 2011)。*plc-1* 及び *ttx-4* 変異体を用いた実験では、ASER 神経の応答は野生型と同等であった。よって、これらの分子経路の因子は ASER 神経のカルシウム応答の下流で機能しており、3.8.2.で述べるように経験塩濃度依存的な ASER 神経の応答を下流の神経へ伝達する役割を持つと考えられる。

③については、YC2.12 を ASER 神経に発現させた株の実験から、刺激を与えていない時の ASER 神経の細胞内カルシウム濃度が、条件付け時の塩濃度に応じて変化していることが分かった。そのため、細胞内カルシウム濃度を制御する機構が経験塩濃度に応じて調節を受けている可能性が考えられる。より詳細な検証を行うため、現在チャネルロドプシン(ChR2)を ASER に発現させ、青色光を照射する事で人為的にカルシウム流入を引き起こす実験を予定している。この時の ASER の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を観察することで、条件付け時の塩濃度に応じて流入するカルシウム量に変化があるかを調べる。この実験によって、ASER のカルシウム応答を調節する機構が感覚受容の段階で働いているのか、あるいは細胞体で働いているのかが推測できると思われる。

3.7.2. ASER 神経から AIB 神経に塩濃度変化の刺激が伝わる機構

plc-1 変異体(gf 及び lf)を用いたイメージングの結果から、AIB の応答には DAG/PKC 経路が関わっている可能性が示唆された。*plc-1* 変異体での ASER の応答が gf と lf 共に野生型と同様であったことから、PLC-1 は恐らく ASER のカルシウム応答の下流から AIB のカルシウム応答の上流までの間で働くと考えられる。実際に、*plc-1* 変異体(lf)を ASER でレスキューした株では、AIB の応答が回復したことからも、この仮説が裏付けられる。また *ttx-4* 変異体を用いた実験から、PKC も ASER のカルシウム応答の下流で働くと考えられる。

神経間の情報伝達には幾つかの様式があるが、ASER 神経と AIB 神経はシナプス接続しているため、恐らくはシナプス放出によって情報伝達が行われていると考えられる。両神経とも塩濃度の低下に対して神経応答を示すため、ASER-AIB 間のシナプス接続は興奮性であると考えられる。*eat-4* 変異体を用いた実験からは、ASER 神経から AIB 神経にグルタミン酸作動性のシナプスによってシグナルが伝えられていることが示唆された。また、両神経が塩濃度変化に対して示す応答のパターンから、ASER 神経が強く応答した場合に AIB 神経も応答する可能性が考えられる。ASER 神経からのシナプス放出を直接可視化することでこの仮説を検証でき、経験塩濃度依存的な神経応答の調節機構をより明らかにできると考えられる。現在、pH 感受性 GFP 誘導体タンパク質 pHluorin を ASER のシナプス小胞内に発現させた株を用いて、培養時の塩濃度に応じて ASER からのシナプス放出量に変化するかを調べる実験を予定している。

3.7.3. 各介在神経の応答の違いとその原因

本研究では、ASE 神経の下流にあり、かつ塩に対する走性に寄与していると考えられる介在神経について、経験塩濃度に応じた神経応答を観察した。それぞれの介在神経は塩濃度の上昇または低下に対して神経応答を示したが、そのパターンは異なっていた。この原因として、各介在神経に ASE 神経から接続するシナプスの数や種類が違いうこと、また他の神経からの入力に影響していることなどが考えられる。AIA 神経と AIY 神経は共に塩濃度の上昇に対して神経応答を見せるが、AIA 神経では経験塩濃度に応じた神経応答の変化が見られなかった。AIA 神経には ASE 神経からのシナプス接続が 6 個存在するのに対し、AIY 神経には 18 個存在する。この数の違いが ASE 神経から受け取る情報量の違いとして、AIA 神経と AIY 神経の応答に表れている可能性

が考えられる。また AIB 神経は ASER 神経と同様に塩濃度の低下に対して細胞内カルシウム濃度が上昇するが、*dyf-11* 変異体と ASER レスキュー株の実験から、ASER 神経からの入力だけでは野生型の応答を再現することはできなかった。そのため、野生型の AIB 神経では ASER 神経以外からの入力も影響していると考えられる。AIZ 神経は ASE 神経からの直接のシナプス接続を受けておらず、AIY 神経から入力を受けている。しかしながらその神経応答は AIY 神経と逆方向(塩濃度低下時に応答)を示した。塩や温度に対する走性においては、AIY 神経と AIZ 神経が逆方向に働くことが示唆されており(Iino and Yoshida, 2009; Kuhara et al., 2008)、おそらく AIY 神経から AIZ 神経へのシナプス接続は抑制性である可能性が考えられる。一方 AIZ 神経からは AIB 神経にシナプス接続がなされているが、両者とも塩濃度の低下に対して神経応答を示すため、こちらは興奮性であると考えられる。

3.7.4. 経験塩濃度依存的な行動調節における DAG/PKC 経路の役割

先行研究から DAG/PKC 経路の分子の変異体が塩に対する走性に異常を持つことが明らかになっている(Adachi et al., 2010)。また *plc-1(gf)* 変異体と *plc-1(lf)* 変異体ではそれぞれ高塩濃度及び低塩濃度を好むようになる(Kunitomo et al., 2013)。PLC-1 が DAG の生産を担っていると仮定した場合、DAG の量と線虫が好む塩濃度とが比例関係にある可能性が予測される。

近年の研究から、塩濃度低下刺激により ASER 神経の細胞内カルシウム濃度が上昇すると、細胞内の DAG 量も増加することが分かった(大野ら、未発表)。このことから細胞内カルシウム濃度と DAG 量が相関することが考えられる。また図 3-9 から、ASER 神経の細胞内カルシウム濃度は、低塩濃度で条件付けされると低くなり、高塩濃度で条件付けされると高くなることが示唆された。以上より次の仮説が考えられる。

- ・線虫が低塩濃度を経験した場合、ASER 神経の細胞内カルシウム濃度が低くなり、その結果 DAG 量も減少し、低塩濃度を好むようになる。
- ・線虫が高塩濃度を経験した場合は ASER 神経の細胞内カルシウム濃度が高くなり、その結果 DAG 量も増加し、高塩濃度を好むようになる。

この仮説を検証するためには、一時的な塩濃度変化による細胞内カルシウム濃度変化と長期的な塩濃度変化によるものが DAG に対して同じ働きをするのかを確かめる必要がある。

3.7.5. 他の刺激に対する応答との比較

線虫は様々な匂い物質に対して正または負の走性を示すが、ある種の物質に対しては濃度依存的に走性が変化することが知られている。例えば低濃度のイソアミルアルコールに対しては誘引されるが、高濃度になると忌避行動を示す。この嗜好性の変化を引き起こす機構として、感覚神経の応答の変化が考えられており、AWC 感覚神経は低濃度のイソアミルアルコールに対してのみ応答を示し、ASH 感覚神経は高濃度の場合のみ応答を示すことが分かっている(Yoshida et al., 2012)。すなわち、AWC 神経の興奮が誘因行動を、ASH 神経の興奮が忌避行動を引き起こすと考えられる。温度に対する走性については、線虫は餌と共に経験した温度に誘引されることが知られている。温度変化を受容する AFD 感覚神経は、培養時の温度が低いほどより低い温度域での変化に応答できることが分かっており、これが温度嗜好性を制御していると考えられている。一方で塩に対する ASE 感覚神経の応答は、低塩濃度を好む条件(0 mM 条件付け)と高塩濃度を好む条件(100 mM 条件付け)とで同じ方向の応答を示し、応答の大きさが異なっていた(図 3-2, 3-3)。このような応答パターンの違いを生む原因として、それぞれの刺激を受容する受容体の違いが可能性として考えられる。

また、シナプス放出に異常を持つ *unc-13* 変異体では、AWC 神経は高濃度イソアミルアルコールに対しても応答を示すことが分かっている。すなわちイソアミルアルコールに対する AWC 神経の応答変化は他の神経からの抑制によるものであると考えられる。一方で *unc-13* 変異体における ASER 神経は、野生型とほぼ同様の応答パターンを示す(図 3-7)。AFD 神経については、単離培養された場合にも野生型に近い応答パターンを示すことが分かっている(Kobayashi et al., 2015)。よって、ASER 神経と AFD 神経の応答の変化は、共に自身の内部で制御されていると考えられる。そのため、両者の応答制御機構には、共通している部分が存在するかも知れない。

第4章 行動を制御する神経回路の探索

4.1. 介在神経除去株の作製

ASE 神経の下流に存在する介在神経の行動への寄与を明らかにするためには、これらを人為的に除去した際の影響を確認する必要がある。そこで、AIA、AIB、AIY の各神経について、マウスのカスパーゼを発現させる事で各神経が除去された株を作製した。カスパーゼ(caspase)は線虫から哺乳動物に至るまで保存されているタンパク質で、殆どのカスパーゼはアポトーシスを誘導するシグナル伝達経路に関わっている。mouse caspase1 は ICE(interleukin-1 β converting enzyme)であり、in vivo ではサイトカインの活性化によって炎症を誘導するのが主な役割だとされている。しかし、培養細胞では mouse caspase1 を過剰発現させるとアポトーシスが誘導されることが示されているため(Miura et al., 1993)、アポトーシスを誘導する機能も持っていると考えられる。本研究では、各神経に発現するプロモーターに mouse caspase1 を繋いだプラスミドを作製し、それを生殖腺にマイクロインジェクションすることで線虫に導入した。この際、同じプロモーターに蛍光タンパク *venus* を繋いだプラスミドと共に導入することで、神経の除去を蛍光によって確認できるようにした。

作製された株はいずれも生後4日の adult の個体において90%以上の割合で目的の神経の蛍光が消失していた(図4-1)。よって、これらの株では高い効率で目的の神経を除去出来ていると考えられる。なお、AIA 神経除去株では、L1、L2 期の幼虫は多くの個体で頭部神経の蛍光が観察できた(図4-2)。よってこの時期にはまだ AIA 神経が除去されていないが、その後に除去が成立するものと考えられる。また AIB 神経除去株では、マウスのカスパーゼを発現させるためのプロモーターとして *npr-9p* を用いた。このプロモーターは AIB 特異的に発現するとされていたが(Bendena et al., 2008)、当研究室で作製された *Is[npr-9p::venus]* 株で確認したところ AIB 以外にも複数の神経で弱く発現が見られた。そのため、AIB 神経除去株と *Is[npr-9p::venus]* 株とを比較する事にした。その結果、AIB 神経除去株ではほぼすべての個体で AIB 以外の神経における蛍光が残っている事が分かった(図4-3)。これは、AIB に発現したカスパーゼの量が他の神経よりも多かったためではないかと予想される。

除去された神経	○○	○×	×	除去割合
AIA	0	1	58	98.3%
AIB	0	1	40	97.6%
AIY	0	7	93	93.0%

図 4-1 作製した介在神経除去株の除去効率

線虫の AIA、AIB、AIY 神経はいずれも左右 1 対存在する。○○:1 対の神経の両方とも *venus* の蛍光が観察できる。○×:片方の神経のみで *venus* 蛍光が観察できる。××:どちらの神経にも蛍光は観察できない。今回の研究で作成された株は、いずれの介在神経除去株とも目的の神経の除去割合が 90%を超えており、非常に高い効率で細胞の除去ができていると考えられる。

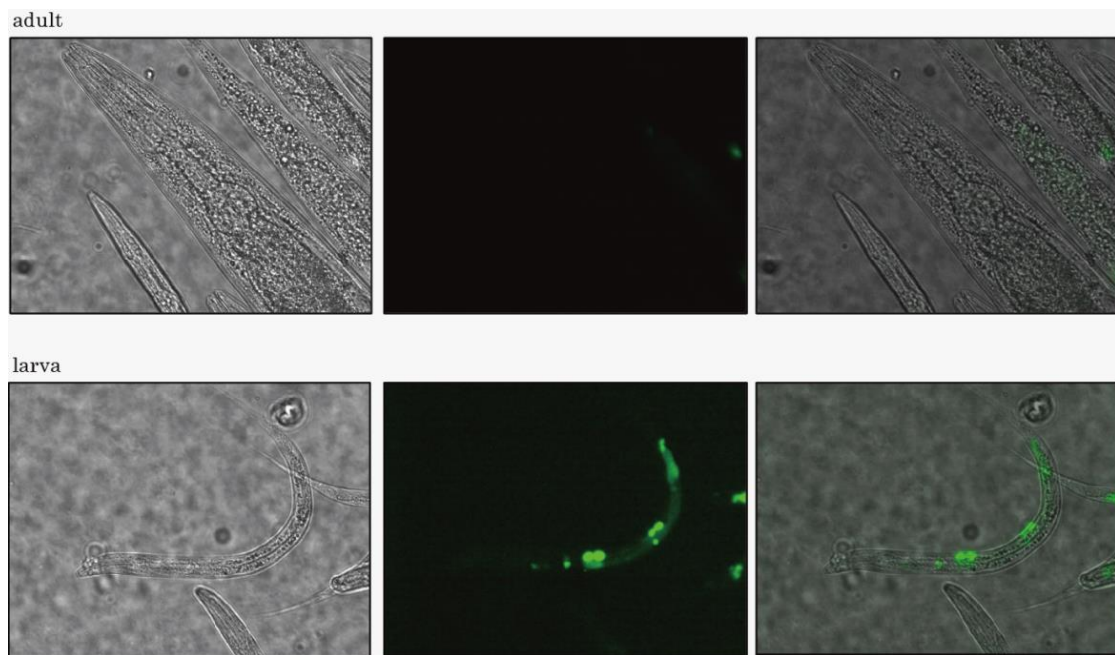


図 4-2 AIA 神経除去株の蛍光画像

上段:adult 個体の頭部の写真。緑色の蛍光を発している神経は観察できない。

下段:larva 個体の全身写真。頭部の先端に *venus* を発現している神経が確認できる。

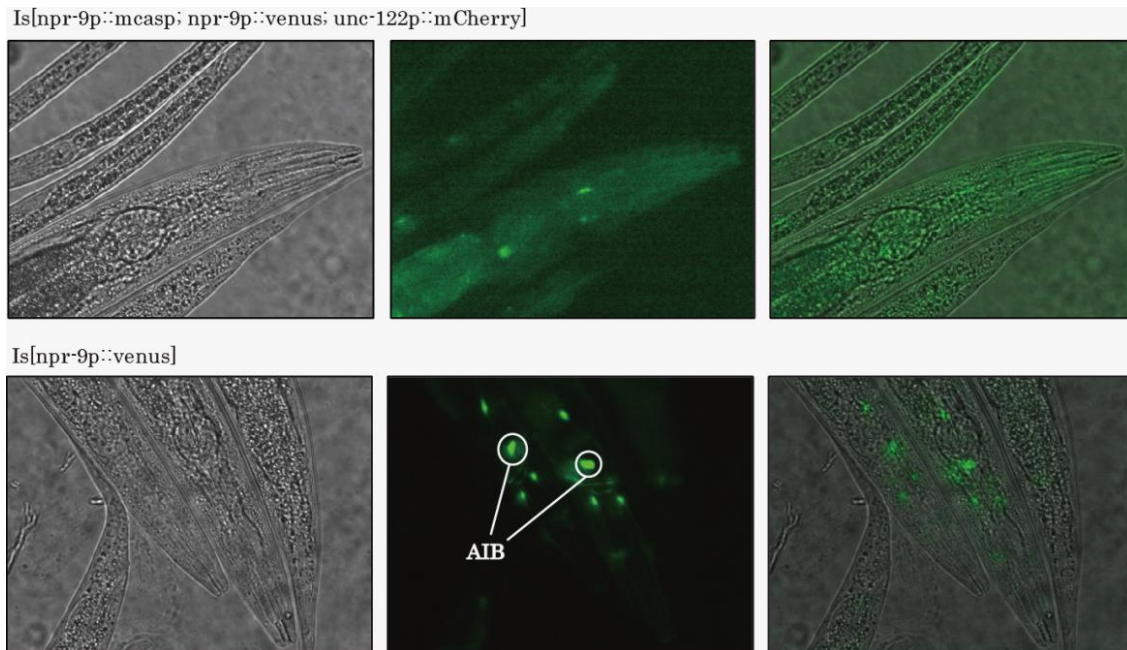


図 4-3 AIB 神経除去株の蛍光画像

上段:本研究で作製した AIB 神経除去株の頭部蛍光画像。adult 個体のもの。

下段:AIB 神経特異的に発現するプロモーターを用い、蛍光タンパク venus のみを導入したコントロール株の頭部蛍光画像。上段の写真と比較すると、AIB 神経除去株では AIB の蛍光(点線部位)のみが消えている事が分かる。

4.2. 介在神経の除去が行動に与える影響

これらの株を用いて、mock conditioning 時における NaCl への走性を観察した。その結果、いずれの株も NaCl への走性は残っていたものの、後退・方向転換の頻度などが野生型と異なっている事を確認した(図 4-4)。AIA 神経除去株は Chemotaxis Index、Weathervane Index、Pirouette Index 共に野生型と有意差は無かったが、Short Reversal の頻度が上がっていた。AIB 神経除去株は Pirouette index と Short Reversal の頻度が野生型と比較して著しく低下し、また Weathervane Index もやや下がっていたが、Chemotaxis Index には差は無かった。AIY 神経除去株は AIA と同様に Chemotaxis Index、Weathervane Index、Pirouette Index が野生型と有意差が無く、Short Reversal の頻度が上がっていた。

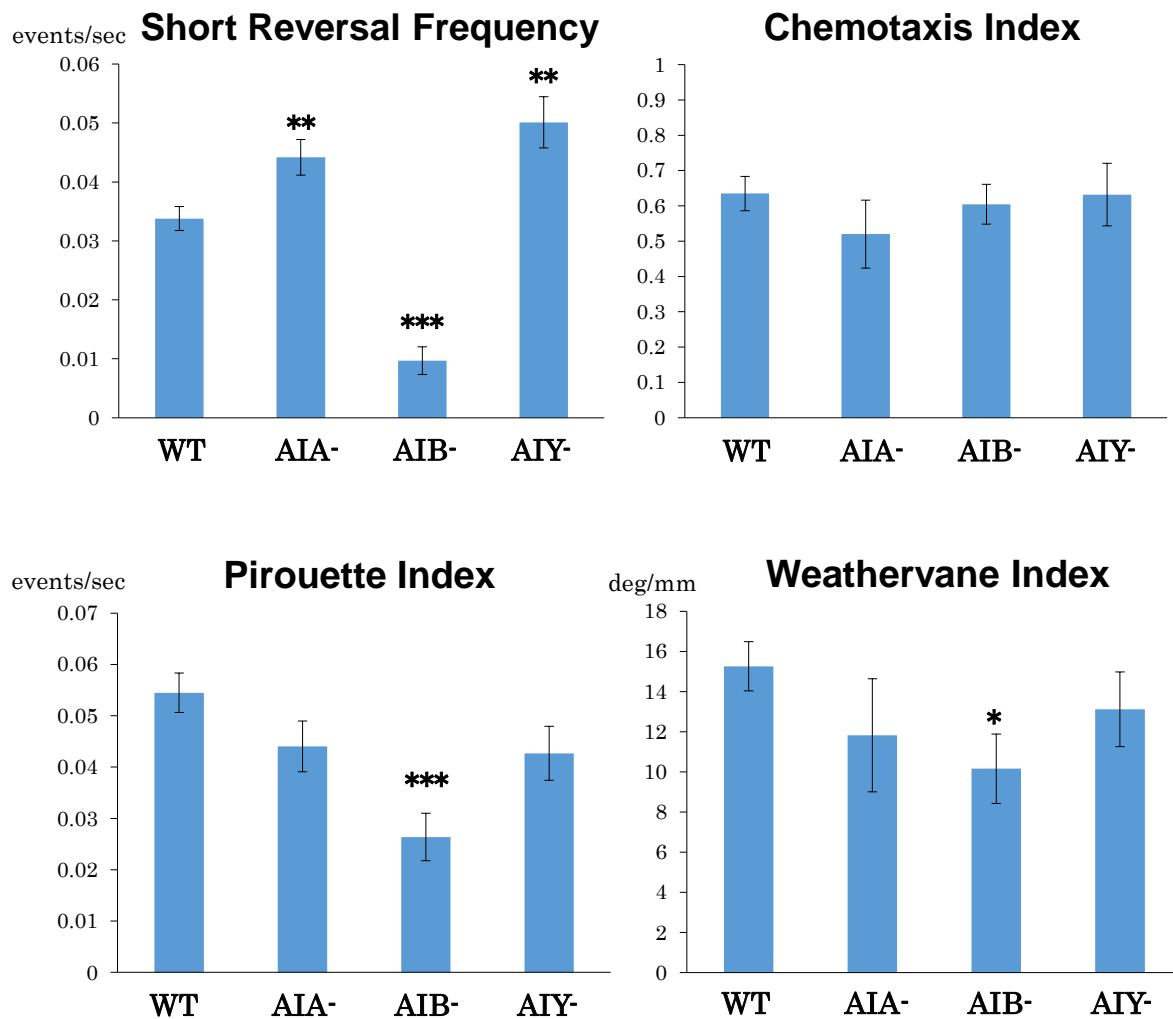


図 4-4 介在神経除去株の NaCl への走性行動

グラフ中の AIA- は AIA 神経除去株を、AIB- は AIB 神経除去株を、AIY- は AIY 神経除去株を表している。

各グラフは、野生型と介在神経除去株の (A): Chemotaxis Index、(B): Weathervane Index、(C): Pirouette Index、(D): Short Reversal Frequency を比較している。WT: n=52, AIA 除去株: n=21, AIB 除去株: n=24, AIY 除去株: n=17 エラーバーは S.E.M. を表している。

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$

4.3. 考察

4.3.1. 塩に対する走性における介在神経の役割

過去の知見から、ASE 神経の機能が失われた *che-1* 変異体では、NaCl に対する走性が失われることが分かっている。また ASE 神経からのシナプスは、多くが本研究で対象とした介在神経に接続している。しかしながら、本研究において作成された介在神経除去株は、いずれも mock conditioning での NaCl に対する走性において野生型と有意な差を示さなかった。そのため、塩濃度変化を伝えるシグナル伝達経路に冗長性がある可能性が示唆された。これについて検証するため、作成された介在神経除去株同士を交配させ、共同研究者がこれらの株を用い、また条件付け時の塩濃度を変えて詳細な行動解析を行った。その結果、高塩濃度条件付け時の走性には AIA 神経が、低塩濃度条件付け時の走性には AIY 神経が関与していることが示唆された。AIA 除去株では高塩濃度条件付け時、AIB 除去株と AIY 除去株では低塩濃度条件付け時のピルエット行動に欠損があることも分かった。また二重及び三重除去株の表現型は、概ねそれぞれの神経を単独で除去した株の表現型の和となった(國友ら、未発表)。今回の実験において、AIB 神経除去株は野生型と比較して Pirouette Index と Short Reversal の頻度が著しく減少していた。AIB 神経を ChR2 で人工的に刺激すると後退運動を引き起こすことから(Kocabas et al., 2012)、AIB 神経は線虫の後退・方向転換に重要な役割を果たしている事が考えられる。また AIA 神経と AIY 神経の除去株はいずれも Short Reversal の頻度が上昇していた。そのため、AIA 神経と AIY 神経は線虫の後退運動を抑制し、前進行動に寄与していることが考えられる。

4.3.2. 各介在神経の神経応答と除去株の行動との比較

第 3 章で示された各介在神経の神経応答から、AIA 神経と AIY 神経は塩濃度の上昇に対して応答し、AIB 神経は低下に対して応答することが分かった。また本実験で行われた mock conditioning では、野生型の線虫は高塩濃度を好む傾向を示した。この行動について次のような仮説が考えられる。

- ・ mock conditioning された線虫が塩濃度上昇方向へ進むと、AIA 神経及び AIY 神経が応答し、後退運動が抑制・前進行動が促進される。結果としてより塩濃度上昇方向へ進む。

- ・塩濃度低下方向に進んだ場合、AIB 神経が応答し、後退・方向転換を誘発する。結果として塩濃度上昇方向へ進行方向を変える。

この仮説については、線虫が低塩濃度を好む場合の神経応答と行動とを説明する必要がある。

第 3 章の実験において 0 mM 条件付けを行った場合、AIA 神経と AIY 神経は塩濃度の上昇に対して応答を示し、AIB 神経は塩濃度の低下に対して応答を示さなかった。この応答からどの様に行動が説明できるのかを、第 5 章に述べるトラッキングイメージングシステムを用いて検証する予定である。

第5章 神経応答と行動との相関

ここまで行ってきた実験では、経験塩濃度に依存した各神経の応答と、行動への寄与とを別個に観察していた。これらの実験から得られた知見を統合するため、トラッキングイメージングシステムを用いて自由行動中の線虫に対して神経応答と行動とを同時に観察した。2 cm 四方の PDMS 製微小流路を用い、内部を自由に動く線虫を追跡して各時刻での速度を求めると同時に、蛍光画像を撮影することでその時点での神経の細胞内カルシウム濃度の変化(相対量)を求めた。

5.1. ASER 神経の応答と行動との相関

まず、神経回路の最も上流に位置する ASER 感覚神経について、トラッキングイメージングを行った。ASER 神経は条件付け時の塩濃度によらず、常に塩濃度低下刺激に対して細胞内カルシウム濃度の上昇を見せた。塩濃度の上昇に対して細胞内カルシウム濃度は低下した。一方で線虫の移動速度の変化は、条件付け時の塩濃度によって異なっていた。100 mM と 50 mM の NaCl で条件付けされた場合、塩濃度の低下に対して速度が一過的に負の値を示し、すなわち後退する傾向を見せた。塩濃度の上昇に対しては速度にほとんど変化は無く、前進傾向を示した。0 mM NaCl で条件付けした場合、逆に塩濃度の低下に対して前進傾向を、塩濃度の上昇に対して後退傾向を示した。この結果から考えられることは以下の通りである。

- ・条件付けされた塩濃度に応じて、同じ刺激に対しても線虫の行動は逆転する。
- ・条件付け塩濃度よりも低い領域では、塩濃度が低下した場合、線虫は後退し方向を変える。一方で条件付け塩濃度よりも低い領域で塩濃度が上昇した場合、線虫は前進する。この機構により線虫は条件付け塩濃度よりも低い領域から、より高い領域へと向かい、条件付け塩濃度へと近づく。
- ・条件付け塩濃度よりも高い領域では、逆に塩濃度が低下した場合に線虫は前進し、塩濃度が上昇した場合は線虫は後退し方向を変える。この機構により線虫は条件付け塩濃度よりも高い領域から、より低い領域へと向かい、条件付け塩濃度へと近づく。
- ・ASER 神経のカルシウム応答の方向は行動出力ではなく感覚入力と一致する。
- ・ASER 神経のカルシウム応答より下流において、刺激の情報から行動出力の情報への変換が行われている。

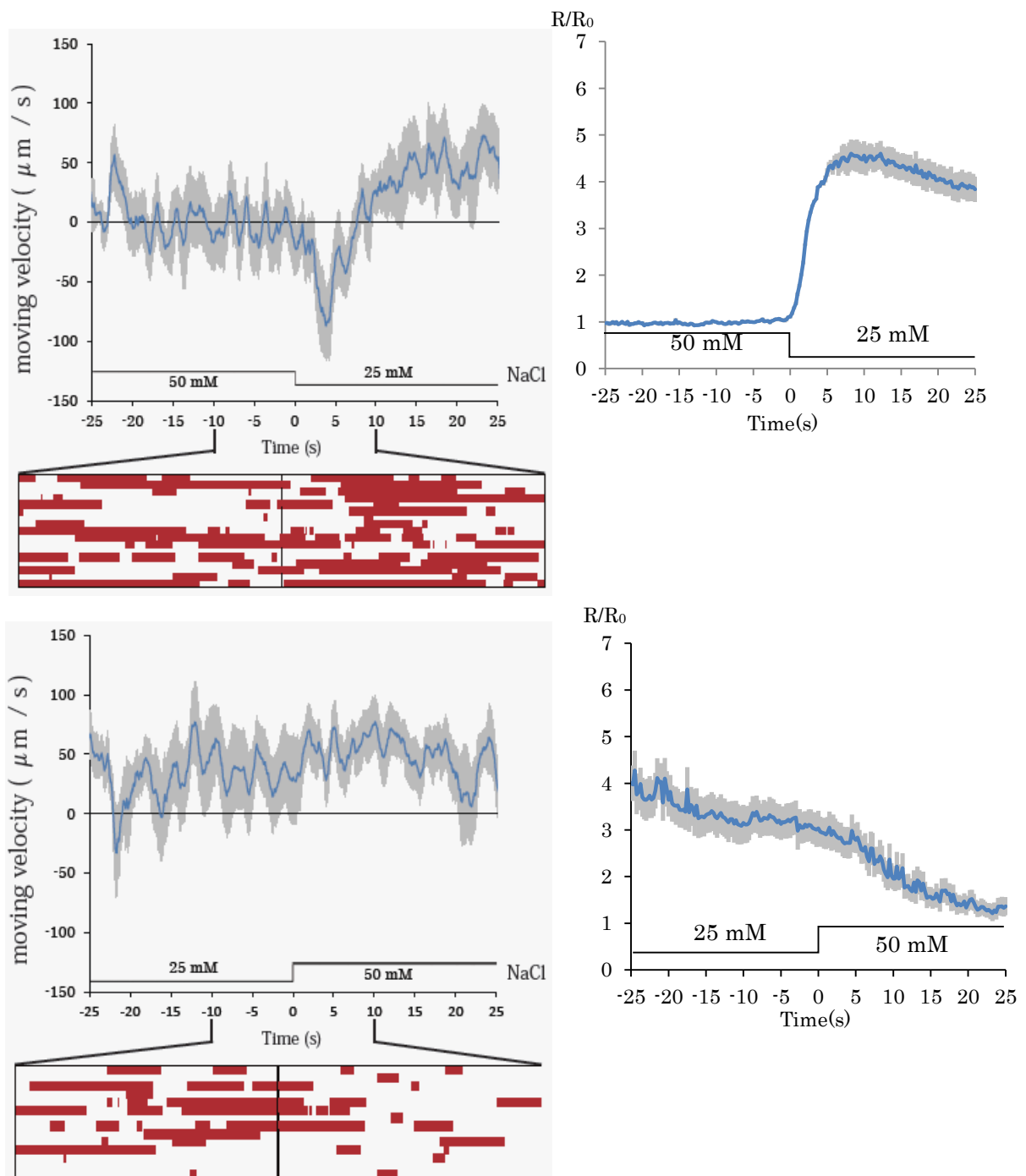


図 5-1 100 mM 条件付け個体の行動と ASER 神経の応答

上段: 塩濃度低下時の線虫の移動速度(左)と ASER 神経の応答(右)。それぞれ青のトレースが移動速度及び ASER 神経の相対蛍光強度の平均値で、S.E.M.がグレーで示されている。移動速度が正の値の場合は前進傾向、負の値の場合は後退傾向を示している。移動速度グラフ下部のヒートマップは、刺激前後 10 秒間の各個体の速度を並べている。1 行が 1 個体のデータであり、赤い部分はその個体の速度が負の値(後退)であることを示している。塩濃度低下に対して線虫は後退傾向を示し、その際 ASER 神経では細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた。

下段: 塩濃度上昇時の線虫の移動速度と ASER 神経の応答。塩濃度上昇に対して線虫は前進傾向を示し、その際 ASER 神経では細胞内カルシウム濃度の低下が見られた。

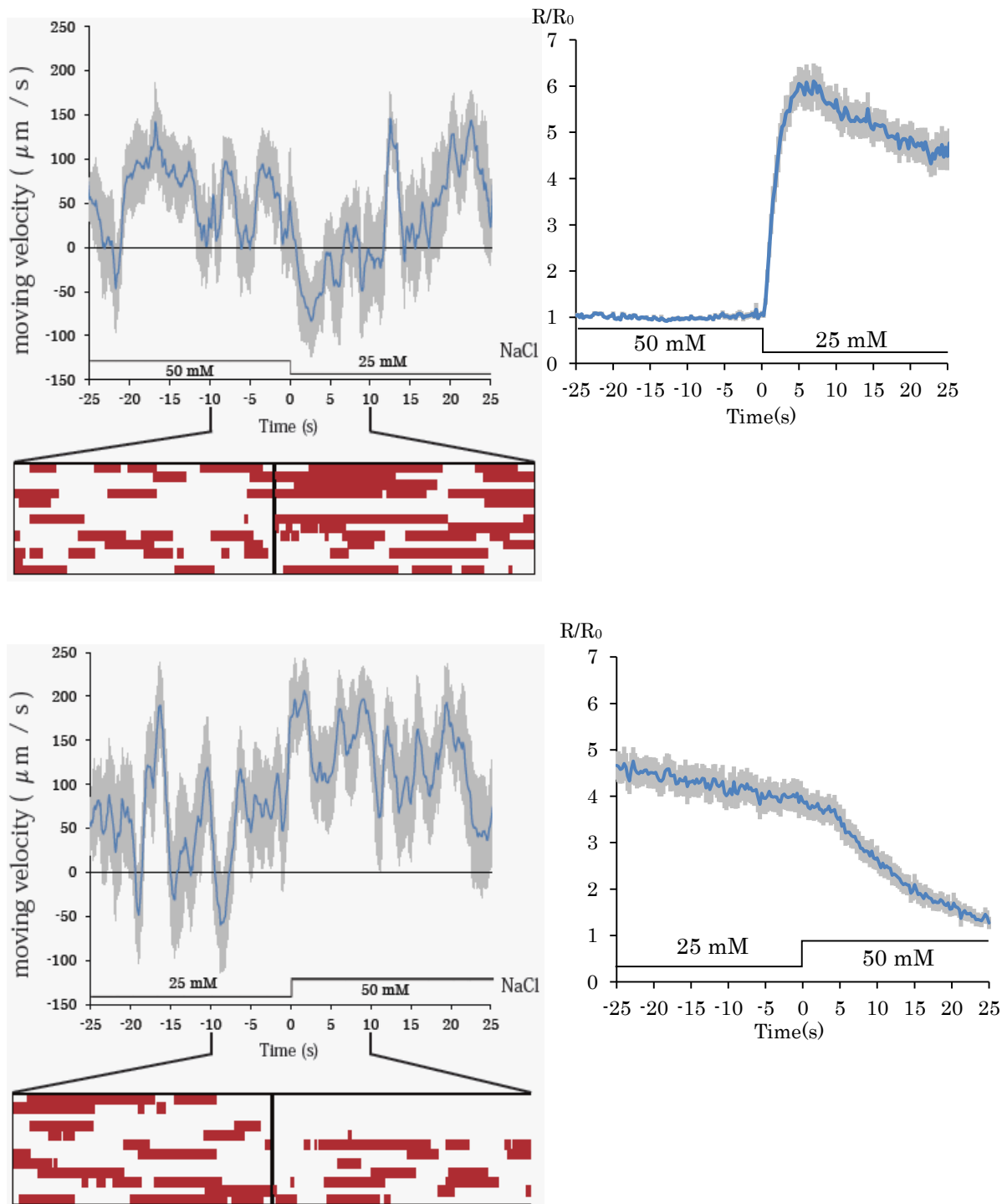


図 5-2 50 mM 条件付け個体の行動と ASER 神経の応答

上段: 塩濃度低下時の線虫の移動速度(左)と ASER 神経の応答(右)。塩濃度低下に対して線虫は後退傾向を示し、その際 ASER 神経では細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた。

下段: 塩濃度上昇時の線虫の移動速度と ASER 神経の応答。塩濃度上昇に対して線虫は前進傾向を示し、その際 ASER 神経では細胞内カルシウム濃度の低下が見られた。

エラーバー(灰色)は S.E.M.を表している。

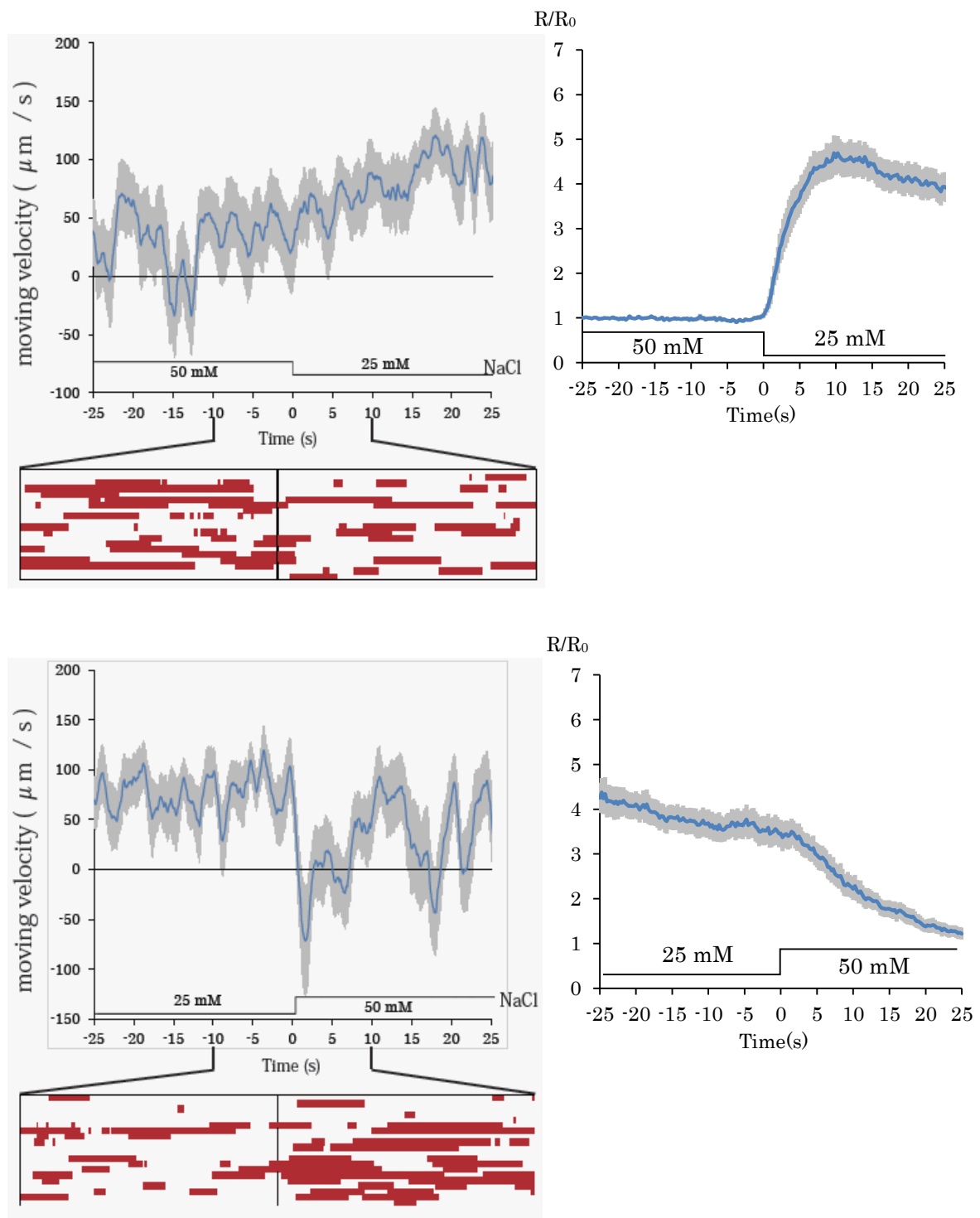


図 5-3 0 mM 条件付け個体の行動と ASER 神経の応答

上段: 塩濃度低下時の線虫の移動速度(左)と ASER 神経の応答(右)。塩濃度低下に対して線虫は前進傾向を示し、その際 ASER 神経では細胞内カルシウム濃度の低下が見られた。

下段: 塩濃度上昇時の線虫の移動速度と ASER 神経の応答。塩濃度上昇に対して線虫は後退傾向を示し、その際 ASER 神経では細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた。

エラーバー(灰色)は S.E.M. を表している。

5.2. AIB 神経の応答と行動との相関

続いて、ASER 神経からの入力を受けていると考えられる介在神経 AIB について、同様にトラッキングイメージングを行った。線虫の行動は ASER 神経の時と同様の結果を示した。神経の応答は、50 mM と 100 mM の NaCl で条件付けされた場合、塩濃度の低下に対して細胞内カルシウム濃度の上昇を示した。塩濃度の上昇に対しては変化が見られなかった。一方で 0 mM NaCl で条件付けされた場合、塩濃度の低下に対して細胞内カルシウム濃度は変化せず、塩濃度が上昇した際に細胞内カルシウム濃度も上昇した。この結果から考えられることは以下の通りである。

- ・条件付け時の塩濃度に応じて、同じ刺激に対しても AIB 神経の応答は逆転する。
- ・条件付け時の塩濃度より低い領域では、塩濃度が低下した際に AIB の細胞内カルシウム濃度が上昇し、塩濃度が上昇した際には変化を見せない。
- ・条件付け時の塩濃度より高い領域では、塩濃度が低下した際に AIB の細胞内カルシウム濃度は変化せず、塩濃度が上昇した際に応答を見せる。
- ・AIB 神経の応答は、感覚入力ではなく行動出力と一致する。
- ・AIB 神経のカルシウム応答の時点では、すでに感覚入力が行動出力の情報に変換されている。よって情報の変換機構はここより上流に存在する。

AIB 100 mM

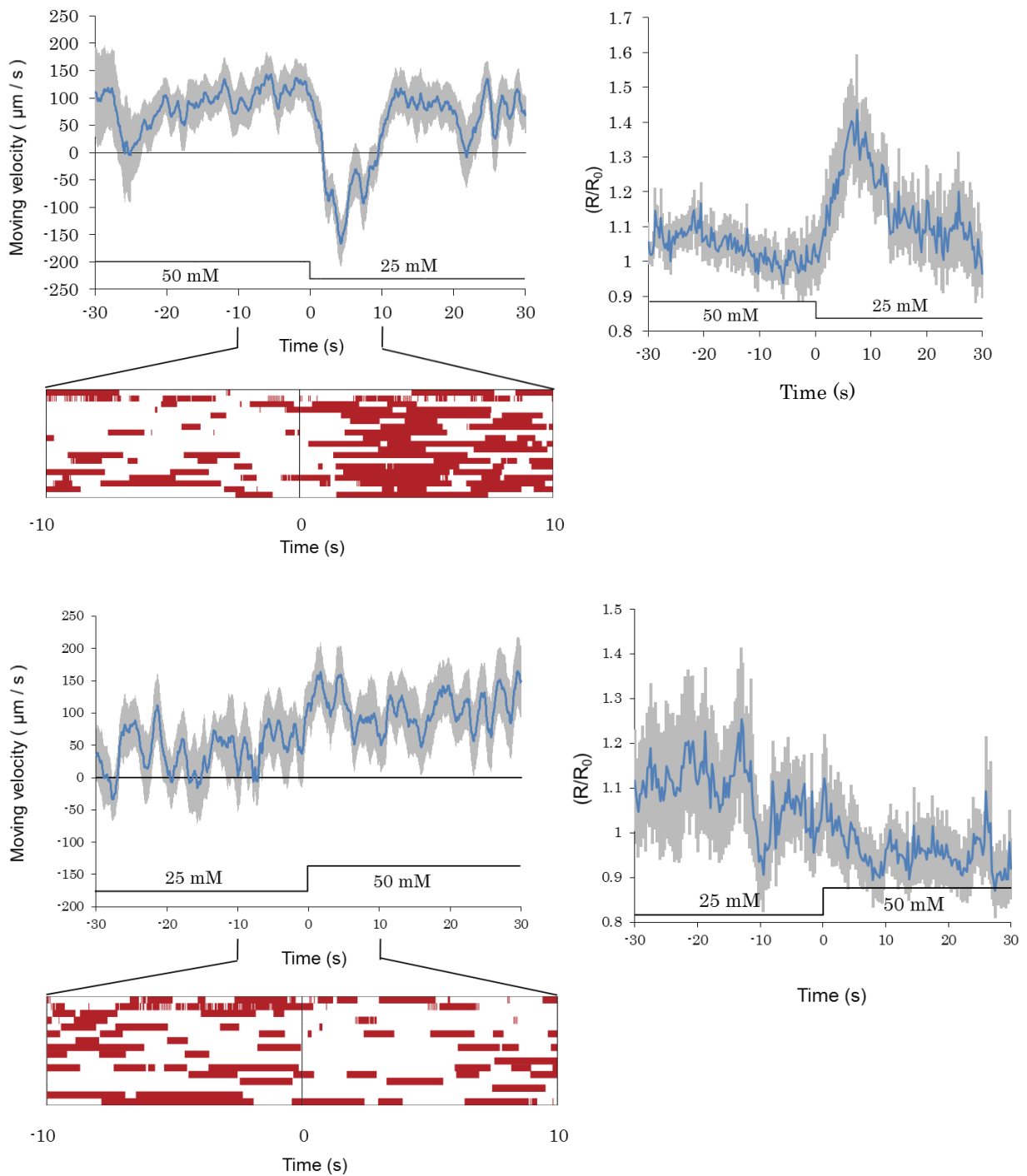


図 5-4 100 mM 条件付け個体の行動と AIB 神経の応答

上段: 塩濃度低下時の線虫の移動速度(左)と AIB 神経の応答(右)。塩濃度低下に対して線虫は後退傾向を示し、その際 AIB 神経では細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた。

下段: 塩濃度上昇時の線虫の移動速度と AIB 神経の応答。塩濃度上昇に対して線虫は前進傾向を示し、その際 AIB 神経では細胞内カルシウム濃度はほぼ変化しなかった。

エラーバー(灰色)は S.E.M.を表している。

AIB 50 mM

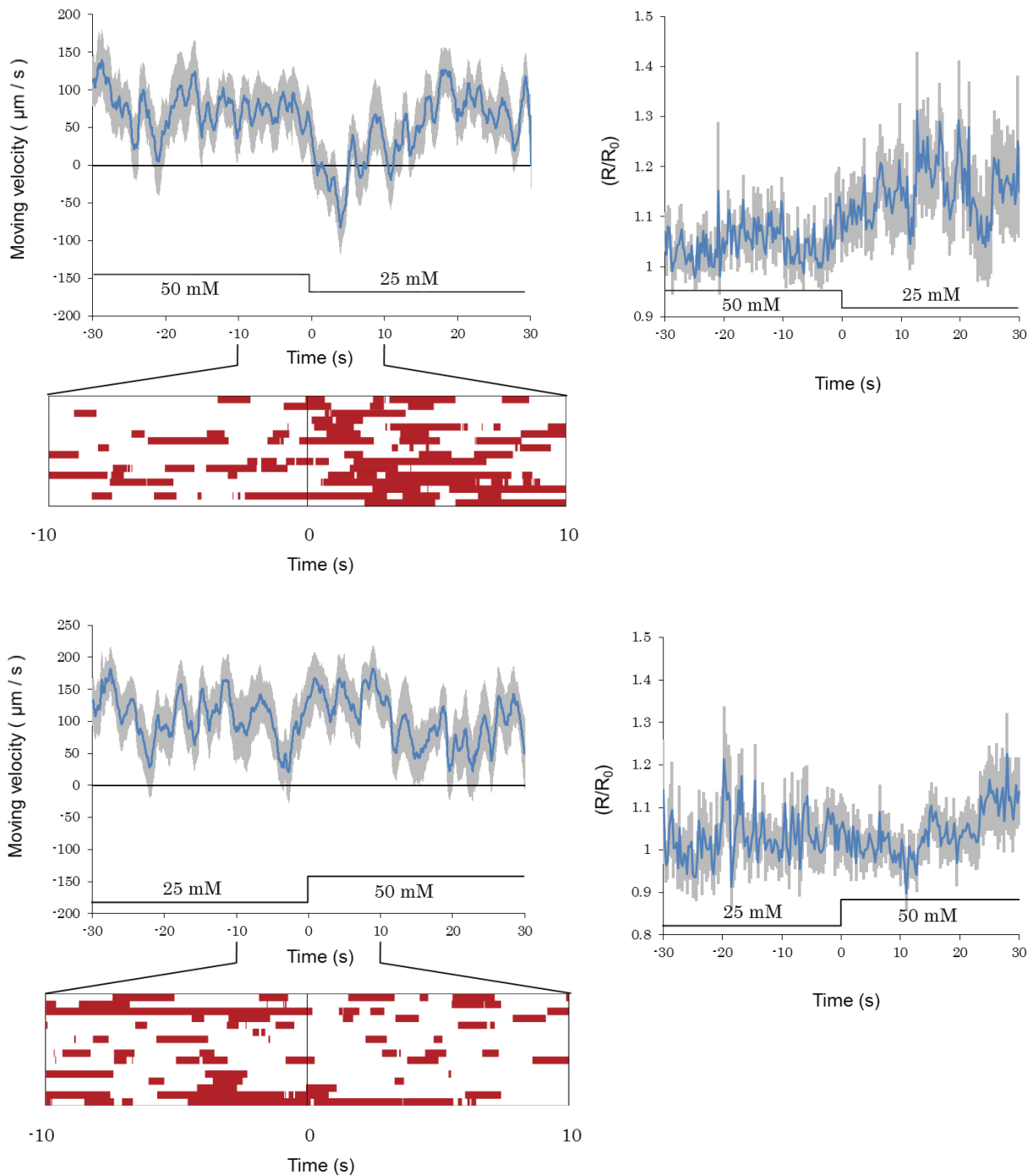


図 5-5 50 mM 条件付け個体の行動と AIB 神経の応答

上段: 塩濃度低下時の線虫の移動速度(左)と AIB 神経の応答(右)。塩濃度低下に対して線虫は後退傾向を示し、その際 AIB 神経では細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた。

下段: 塩濃度上昇時の線虫の移動速度と AIB 神経の応答。塩濃度上昇に対して線虫は前進傾向を示し、その際 AIB 神経では細胞内カルシウム濃度はほぼ変化しなかった。

エラーバー(灰色)は S.E.M.を表している。

AIB 0 mM

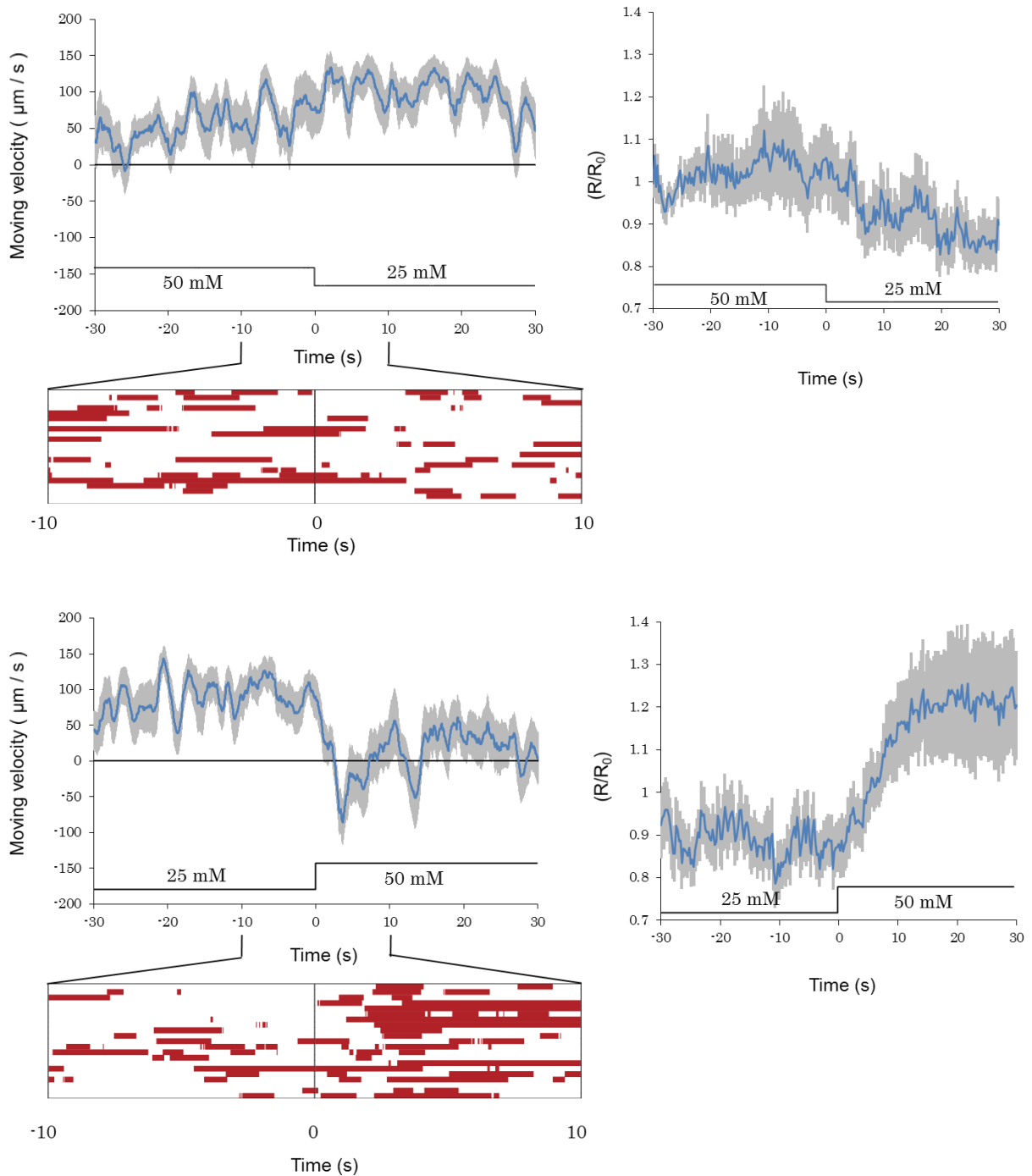


図 5-6 0 mM 条件付け個体の行動と AIB 神経の応答

上段: 塩濃度低下時の線虫の移動速度(左)と AIB 神経の応答(右)。塩濃度低下に対して線虫は前進傾向を示し、その際 AIB 神経では細胞内カルシウム濃度はほぼ変化しなかった。

下段: 塩濃度上昇時の線虫の移動速度と AIB 神経の応答。塩濃度上昇に対して線虫は後退傾向を示し、その際 AIB 神経では細胞内カルシウム濃度は上昇した。

エラーバー(灰色)は S.E.M.を表している。

5.3. RIM 神経の応答と行動との相関

最後に、AIB 神経の下流にある介在/運動神経 RIM について、トラッキングイメージングを行った。RIM 神経は、AIB 神経からのシナプス出力の大部分を受けている神経であり、また頭部の筋肉に接続する運動神経でもあることから、ASER-AIB 神経からの情報を基に行動出力を行っていることが予想された。事前に固定式の PDMS 微小流路を用いて塩濃度変化に対する神経応答の観察を試みたが、有意な応答は得られなかった。一方トラッキングイメージングによって行動と神経応答の観察を行ったところ、図 5-7~9 に示す結果が得られた。線虫の行動は ASER 神経・AIB 神経の時と同様の結果であり、神経応答は 50 mM と 100 mM の NaCl で条件付けされた場合、塩濃度の低下に対して細胞内カルシウム濃度の上昇を示した。塩濃度の上昇に対しては変化が見られなかった。一方で 0 mM NaCl で条件付けされた場合、塩濃度の低下に対して細胞内カルシウム濃度は変化せず、塩濃度が上昇した際に細胞内カルシウム濃度も上昇した。傾向としては AIB 神経と同様であり、よって以下のことが考えられる。

- ・条件付け時の塩濃度に応じて、同じ刺激に対しても RIM 神経の応答は逆転する。
- ・条件付け時の塩濃度より低い領域では、塩濃度が低下した際に RIM の細胞内カルシウム濃度が上昇し、塩濃度が上昇した際には変化を見せない。
- ・条件付け時の塩濃度より高い領域では、塩濃度が低下した際に RIM の細胞内カルシウム濃度は変化せず、塩濃度が上昇した際に応答を見せる。
- ・RIM 神経の応答は、感覚入力ではなく行動出力と一致する。また AIB 神経と傾向が一致しており、AIB 神経からの入力によって動いている可能性が示唆される。

RIM 100 mM

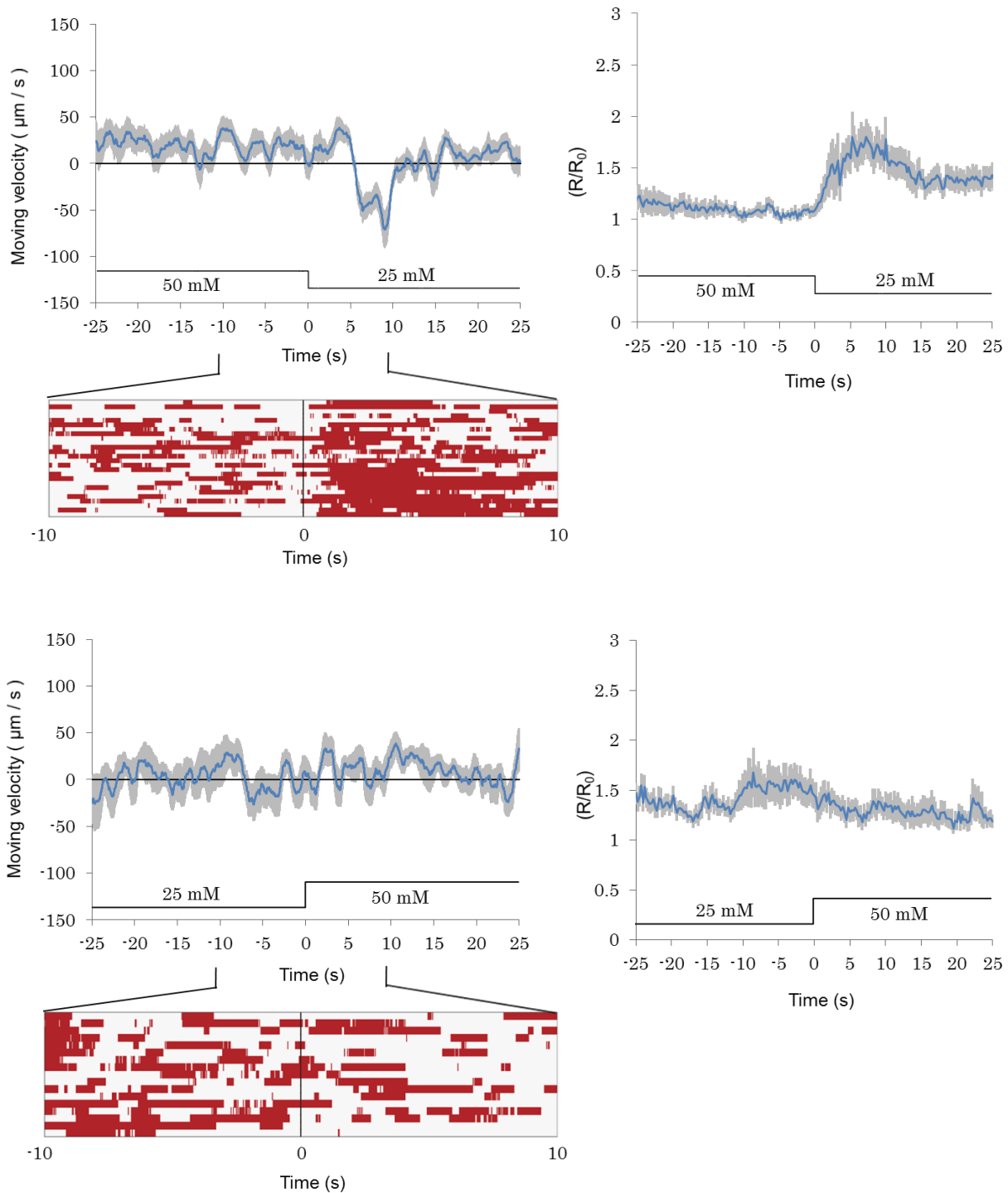


図 5-7 100 mM 条件付け個体の行動と RIM 神経の応答

上段: 塩濃度低下時の線虫の移動速度(左)と RIM 神経の応答(右)。塩濃度低下に対して線虫は後退傾向を示し、その際 RIM 神経では細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた。

下段: 塩濃度上昇時の線虫の移動速度と RIM 神経の応答。塩濃度上昇に対して線虫は前進傾向を示し、その際 RIM 神経では細胞内カルシウム濃度はほぼ変化しなかった。

エラーバー(灰色)は S.E.M. を表している。

RIM 50 mM

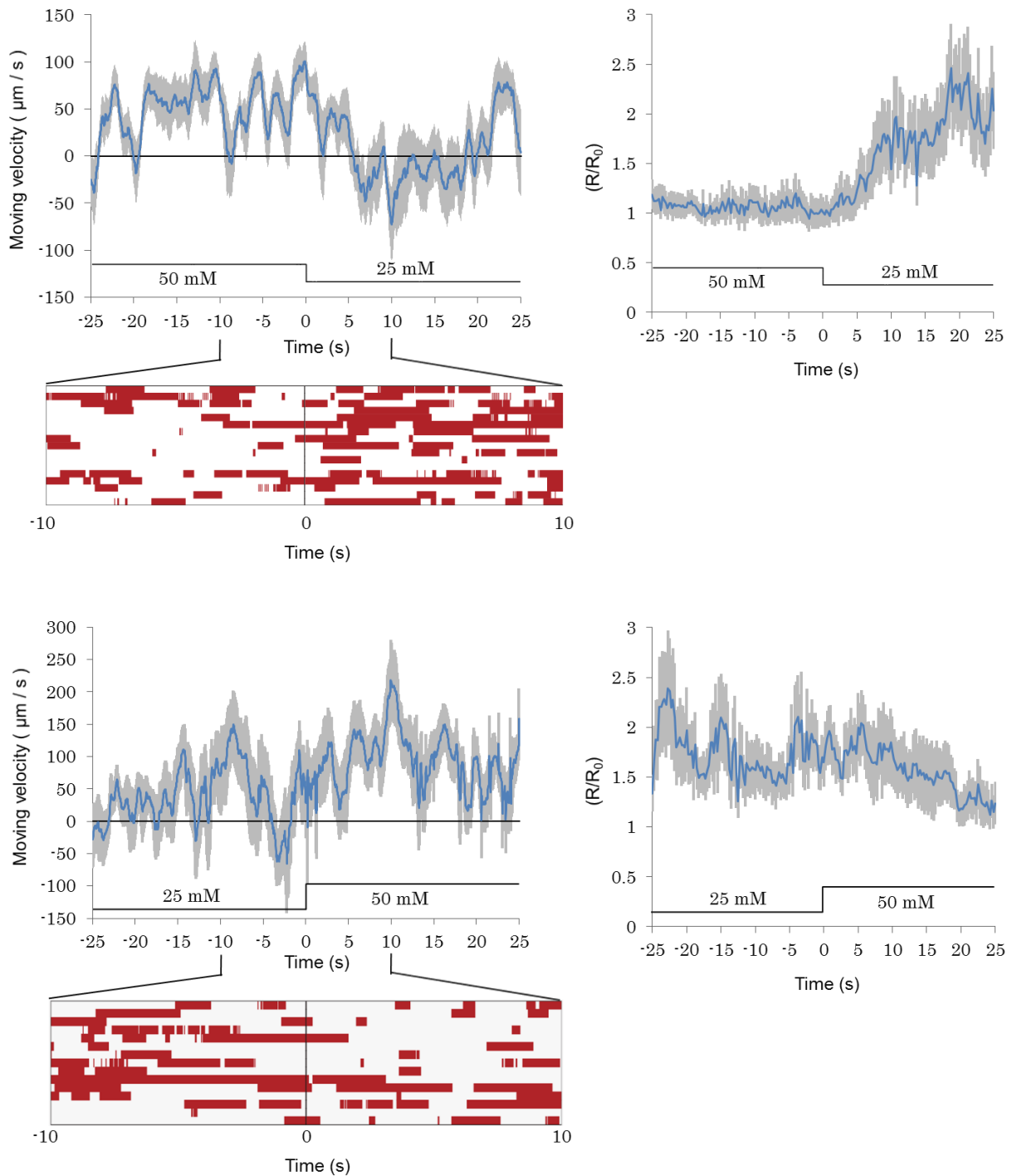


図 5-8 50 mM 条件付け個体の行動と RIM 神経の応答

上段: 塩濃度低下時の線虫の移動速度(左)と RIM 神経の応答(右)。塩濃度低下に対して線虫は後退傾向を示し、その際 RIM 神経では細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた。

下段: 塩濃度上昇時の線虫の移動速度と RIM 神経の応答。塩濃度上昇に対して線虫は前進傾向を示し、その際 RIM 神経では細胞内カルシウム濃度はほぼ変化しなかった。

エラーバー(灰色)は S.E.M.を表している。

RIM 0 mM

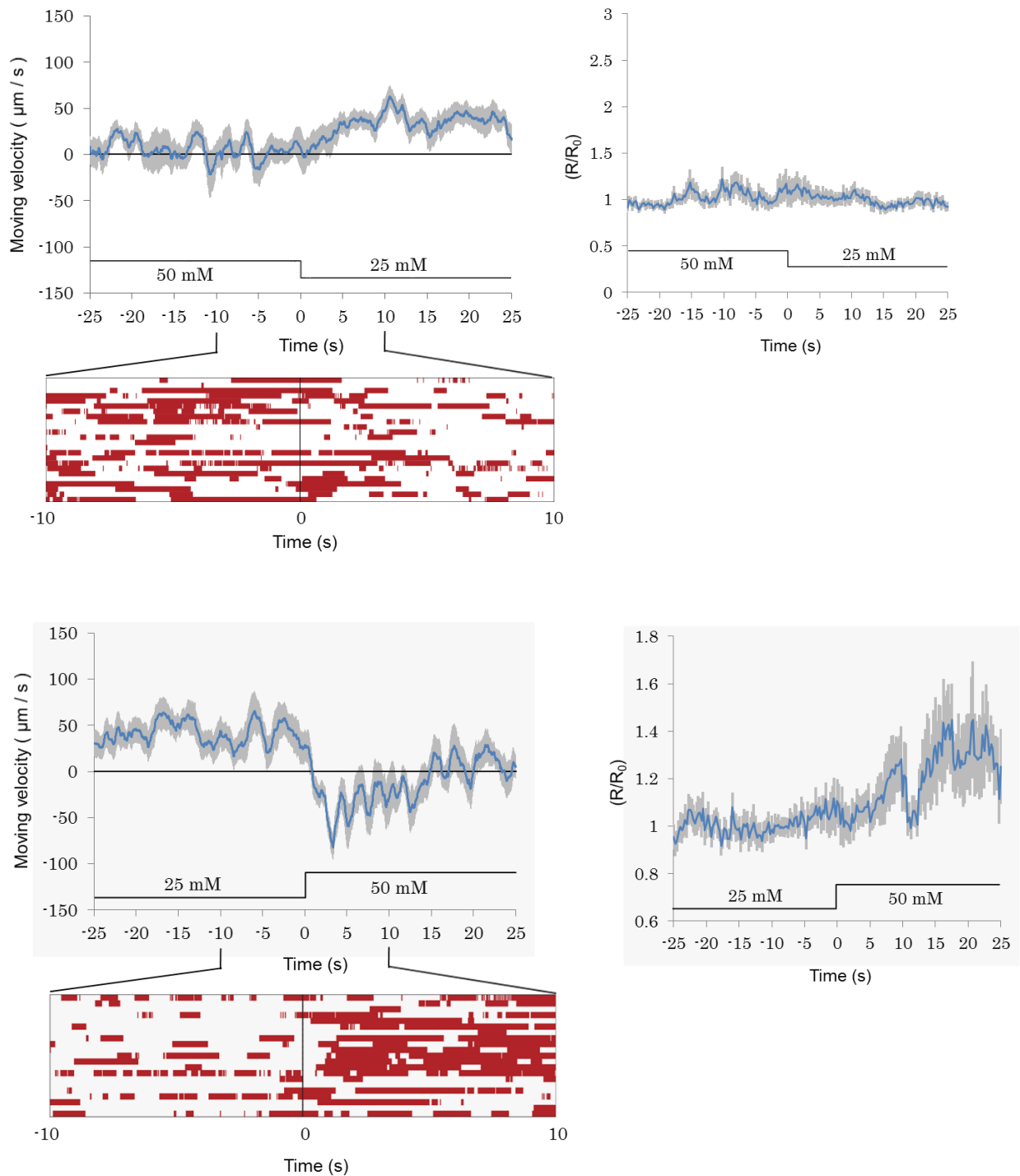


図 5-9 0 mM 条件付け個体の行動と RIM 神経の応答

上段: 塩濃度低下時の線虫の移動速度(左)と RIM 神経の応答(右)。塩濃度低下に対して線虫は前進傾向を示し、その際 RIM 神経では細胞内カルシウム濃度はほぼ変化しなかった。

下段: 塩濃度上昇時の線虫の移動速度と RIM 神経の応答。塩濃度上昇に対して線虫は後退傾向を示し、その際 RIM 神経では細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた。

エラーバー(灰色)は S.E.M. を表している。

5.4. 考察

5.4.1. 各神経の応答と行動との関係

本実験で測定した各神経応答と行動とを図 5-10 に示した。塩濃度低下刺激に対しては、ASER 神経は常に細胞内カルシウム濃度の上昇を示し、AIB 神経と RIM 神経は線虫が後退傾向を示す条件でのみ神経応答を示した。一方で塩濃度上昇刺激に対しては、ASER 神経は常に細胞内カルシウム濃度の低下を示し、AIB 神経と RIM 神経は線虫が後退傾向を示す条件でのみ神経応答を示した。よって、ASER 神経は感覚入力に、AIB 神経以下は行動出力に一致した神経応答であり、ASER-AIB 間で感覚入力の情報が行動出力に変換されていると考えられる。

この機構には、第 3 章で考察された DAG/PKC 経路が関わっていることが示唆されている。また ASER-AIB 間の情報伝達はグルタミン酸作動性のシナプスによって行われていると考えられる。

NaCl downstep (50 mM → 25 mM)

条件付け塩濃度	0 mM	50 mM	100 mM
線虫の行動	前進	後退	後退
ASERの応答	(↑)	↑	↑
AIBの応答	—	↑	↑
RIMの応答	—	↑	↑

NaCl upstep (25 mM → 50 mM)

条件付け塩濃度	0 mM	50 mM	100 mM
線虫の行動	後退	前進	前進
ASERの応答	↓	↓	↓
AIBの応答	↑	—	—
RIMの応答	↑	—	—

図 5-10 各条件における線虫の行動と神経応答

上段は塩濃度低下時の線虫の行動と神経応答、下段は塩濃度上昇時の線虫の行動と神経応答を表している。ASER 神経は塩濃度変化刺激に応じて応答し、AIB 神経と RIM 神経は線虫の行動と一致する応答を示している。塩濃度低下刺激に対して、0 mM 条件付け時の ASER 神経は GCaMP6s の蛍光強度上昇を示したが、図 3-2 の結果から実際の細胞内カルシウム濃度の上昇は 50 mM 及び 100 mM 条件付け時よりも低い可能性が考えられる。

5.4.2. 固定式イメージングとトラッキングイメージング時の ASER の応答の違い

線虫を固定して行ったイメージング実験では、ASER 神経は経験塩濃度依存的に神経応答の大きさが変化しており、低い塩濃度で条件付けすると応答の大きさも小さくなることが観察された(図 3-2)。しかしながら、トラッキングイメージングでは、0 mM 条件付け時にも 50 mM 及び 100 mM とほぼ同程度の応答が見られた(図 5-1, 2, 3)。この原因として、以下の可能性が考えられる。

・実験に用いたプローブの違い

実験条件の大きな違いとして、まず ASER 神経に発現させたプローブの違いが挙げられる。トラッキングイメージング実験では、固定式のイメージングと比較して用いたレンズの倍率が低く、また動いている線虫を撮影するため、カメラの露光時間も短い。そのため撮影画像において神経は小さく、かつ暗く写ることになる。従来の固定式イメージングで用いられていた GCaMP2.1 では良好な S/N 比が得られないと考えられたため、トラッキングイメージング実験では感度の高い GCaMP6s を用い、また mCherry を共発現させ比をとることで動きの影響を除いた。一方で、GCaMP6s は少しのカルシウム濃度変化でも大きく蛍光強度が変化するため、実際には細胞内カルシウム濃度が少しか上昇していなくても、GCaMP6s の蛍光強度は上限まで上がってしまう可能性が考えられる。

・固定された線虫と行動中の線虫の違い

実験条件のもう一つの大きな違いとして、線虫が固定されているか自由行動中かの違いが存在する。そのため、(図 3-2)で見られた ASER 神経の応答の変化は、自由行動中には起こらず、線虫を固定した場合のみ見られる現象である可能性が考えられる。

いずれの仮説についても、それを検証する実験を行う必要がある。現時点では以下の実験を予定している。

・固定式イメージングとトラッキングイメージングで同じプローブを使う

固定式イメージングで用いた GCaMP2.1 を使ってトラッキングイメージングを行う。ただし、従来の株はそのままではトラッキングイメージングに使用できないため、

発現量を増やし、かつ mCherry を共発現させた株を新たに作成する。また、GCaMP6s を使って固定式イメージングを行い、ASER 神経の応答の変化が線虫の体が固定されることに起因するのかどうかを検証する。

- ・ 刺激の大きさを調節する

今回のトラッキングイメージング実験では、刺激は 50 mM–25 mM 間の塩濃度変化を用いた。もし GCaMP6s の蛍光強度変化が上限に達しているのが原因であるならば、刺激の濃度変化を小さくすることで検証できると考えられる。

5.4.3. 経験塩濃度依存的な可塑性の存在する場所

本研究により、線虫が経験塩濃度依存的に行動を調節する機構について、いくつかの示唆が得られた。まず、神経回路の最も上流に位置する ASER 神経が経験塩濃度依存的に応答の大きさを変化させることが分かった。この変化は塩濃度の記憶を反映していると思われ、また ASER 神経の内部で制御される。よって ASER 神経の中に塩濃度の記憶が保存されており、おそらくはカルシウム応答の上流に可塑性が存在すると考えられる。この場合、神経応答を制御する機構として感覚繊毛における受容体やチャネルの活性の調節などが考えられる。しかしながら、行動の変化との対応を考えた時、ASER 神経は常に塩濃度の低下に対して応答するのに対し、線虫の行動は逆転する傾向を見せた。そのため ASER 神経の応答の変化だけでは行動の逆転について完全には説明できない。一方で AIB 神経の応答は行動と相関しており、経験塩濃度依存的に応答が逆転する傾向が見られた。よって、ASER 神経から AIB 神経までの間に別の制御機構が存在し、感覚入力と相関する応答を行動と相関する応答へと変換している可能性が考えられる。具体的にどこに存在しているのか、またどのようにして ASER-AIB 間の応答を逆転させているのかについては、以下の仮説が挙げられる。

- ・ ASER 神経の細胞内カルシウム濃度の基底値

Yellow Cameleon を用いた実験では、刺激を加えていない時の ASER 神経の細胞内カルシウム濃度が経験塩濃度依存的に変化するという結果が得られた(図 3-8)。この結果から、ASER 神経の細胞内カルシウム濃度の違いが経験塩濃度の記憶を反映しており、これに基づいてシナプス放出が制御されている可能性が考えられる。

- ・プレシナプス側の制御

神経応答の強さがシナプス放出の量と相関していると仮定すると、ASER 神経の経験塩濃度依存的な応答の違いによって、シナプス放出の量もしくは有無が制御されると考えられる。一方で、5.3.2.で述べた様に、行動中の線虫では ASER 神経の応答がほぼ変化しない可能性も示唆されている。すなわち ASER の応答が変化せずとも経験塩濃度依存的にシナプス放出が変化する可能性も考えられる。

シナプス放出の可塑性を制御する機構としては、PKC を介した経路と Munc13 を介した経路の 2 つが良く知られている。これらは独立に働くと考えられているが、どちらもジアシルグリセロール(DAG)及びホルボールエステルによって活性化されることが分かっている(Stevens and Sullivan, 1998; Rhee et al., 2002)。PKC は Munc18 をリン酸化することで、Munc13 はカルモジュリンと複合体を形成することで、それぞれ即時放出可能なシナプス小胞プール(readily releasable pool, RRP)の増加に寄与している(Junge et al., 2004; Wierda et al., 2007)。RRP が増加すれば、同程度のカルシウム流入に対してより多くのシナプス放出が行われることになる。第 3 章で述べた様に、経験塩濃度依存的な行動、及び ASER 神経から AIB 神経へのシグナル伝達に DAG/PKC 経路が関わっている可能性が示唆されており、前述の分子経路がシナプス放出の制御を担っている可能性が考えられる。

また第 3 章の結果から、高塩濃度条件付け個体における塩濃度低下時の AIB 神経の応答には EAT-4 を介したグルタミン酸放出が必要だと考えられる(図 3-20)。AIB 神経にはグルタミン酸受容体が発現しており(Brockie et al., 2001)、おそらく ASER-AIB 間の伝達にもグルタミン酸が用いられていると思われる。一方で ASER 神経には複数の神経ペプチドが発現しており、これらも神経伝達物質として機能すると考えられている(Li and Kim, 2008)。そのため低塩濃度条件付け個体における AIB 神経の応答には、例えば抑制性の神経ペプチドなどグルタミン酸以外の伝達物質が寄与している可能性が考えられる。この場合、ASER 神経は経験依存的に興奮性と抑制性の神経伝達物質を使い分け、それにより AIB 神経の応答の逆転が引き起こされると考えられる。また AIB 神経の側ではリガンドの異なる興奮性と抑制性の 2 種類の受容体が機能することになる。

・ポストシナプス側の制御

ASER 神経からのシナプス放出量が経験依存的に変化しない、もしくは応答の変化と同様に量が増減するのみであった場合、AIB 神経の応答の変化はポストシナプス側の制御である可能性が考えられる。すなわち、AIB 神経は一定以上のシナプス入力が入らないと応答しない、もしくは同じ入力に対しても経験依存的に応答が変わることが考えられる。

前者の場合、AIB の応答の閾値そのものが変化しないのであれば、経験塩濃度依存的な行動を制御する主要な機構は ASER 神経に存在すると言える。しかしこれだけでは低塩濃度条件付け個体で AIB 神経の応答が逆転する機構は説明できない。仮説の一つとして、低塩濃度条件付け個体では ASER 神経以外からの入力が必要である可能性が挙げられる。実際に *dyf-11* 変異体を用いた実験の結果からは、野生型の AIB 神経の応答には ASER 神経以外の入力も寄与することが示唆されている(図 3-19)。また ASEL 神経は塩濃度の上昇に対して細胞内カルシウム濃度が上昇し、また低塩濃度条件付け個体の方がより大きな応答を示す(図 3-3)。よって、例えば高塩濃度条件付け個体では ASER 神経が、低塩濃度条件付け個体では ASEL 神経が、それぞれ AIB 神経の応答を引き起こす主要な役割を担っている、などの可能性が考えられる。

一方で後者の場合は、AIB 神経の中に塩濃度の記憶が存在する可能性が考えられる。仮説としては、AIB 神経の応答の閾値が変化する、あるいは AIB 側で異なる受容体を用いられる、などが挙げられる。応答の閾値が変化する場合、AIB 神経におけるチャネルの活性化状態が経験塩濃度依存的に変化するなどの可能性が考えられる。また前述の様に、高塩濃度条件付け個体では、ASER-AIB 間の伝達にはグルタミン酸が用いられることが示唆されている。もし低塩濃度条件付け個体においても ASER-AIB 間の伝達にグルタミン酸が用いられていた場合、AIB 神経の側に興奮性と抑制性の 2 種類のグルタミン酸受容体が存在し、経験依存的に使い分けられることで応答が逆転する可能性が考えられる。線虫には興奮性の NMDA 型及び非 NMDA 型グルタミン酸受容体の他に、抑制性のグルタミン酸作動性 Cl^- チャンネルが存在する(Cully et al., 1994)。ただし AIB 神経には複数のグルタミン酸受容体が発現しているものの、いずれも興奮性であり、現時点では抑制性の受容体は見つかっていない。

なお、これらの仮説はそれぞれ背反するものではなく、両立する場合もある。例えば、ASER 神経の細胞内カルシウム濃度に応じて塩濃度変化時のシナプス放出量が調節され、一定以上のシナプス放出が行われると AIB 神経が応答する、などの可能性が考えうる。これらの仮説について検証するためには、次の実験が考えられる。

・ ASER 神経からのシナプス放出の可視化

線虫にはヒトのシナプトブレブリンのオーソログである SNB-1 が存在し、シナプス小胞に局在する。これに pH によって蛍光強度の変化する pHluorin を繋げることで、シナプス放出に応じて蛍光強度が上昇するインディケーターとして用いることが出来る。現在 SNB-1-pHluorin を ASER 神経に発現させ、経験塩濃度によってシナプス放出に違いが出るか、もし違う場合どのように変化するかを調べる実験を計画している。これにより、経験塩濃度依存的な行動調節が ASER 神経で完結するのか、あるいは AIB 神経にも調節機構が存在するのかが明らかになると思われる。

・ ASER 神経の応答の人為的な調節

本研究では刺激として 25 mM 差の塩濃度変化を用いたが、この差を小さくすればそれに応じて ASER 神経の応答も小さくなると考えられる。あるいは、チャネルロドプシンを用いることで塩濃度を変化させずに直接 ASER 神経を興奮させることが可能である。ASER 神経の応答の大きさがどのような役割を担っているか、これらの手法を用いることにより検証できると考えられる。

5.4.4. 経験塩濃度依存的に行動を調節する神経回路

ここまで行ってきた実験結果から、線虫が餌と共に経験した塩濃度に向かう機構のモデルを作成した。図 5-11 では、線虫が 50 mM から 25 mM への塩濃度低下方向に進んでいる場合を想定している。この時、刺激よりも高塩濃度(50 mM 以上)で培養された線虫は ASER 神経が比較的強く興奮し、下流の AIB 神経、RIM 神経も興奮する。そのため線虫は後退・方向転換を行い、より塩濃度の高い方へ向かうと考えられる。一方低塩濃度(25 mM 以下)で培養された線虫は、ASER 神経が比較的弱く興奮するが、AIB・RIM 神経は興奮しない。そのため線虫は前進を続け、より塩濃度の低い方へ向かうと考えられる。いずれの場合も結果として条件付け時の塩濃度に近付くことになる。

塩濃度上昇時には、逆に低塩濃度で培養された線虫のみで AIB・RIM 神経が興奮し、後退・方向転換を行うことでより低塩濃度へ向かう。高塩濃度で培養された個体は AIB・RIM 神経が興奮せず、塩濃度上昇方向へ進み続ける。結果としてこちらも条件付け時の塩濃度へ近づくことになる。

このモデルにおいて残された問題は、塩濃度上昇時に低塩濃度条件付け個体において AIB 神経を興奮させる機構である(図 5-10 色付き部)。本研究から、ASER 神経は条件付け時の塩濃度によらず、常に塩濃度上昇に対しては細胞内カルシウム濃度が低下することが分かった。そのため塩濃度上昇時には ASER 神経から AIB 神経へのシナプス入力とは低下すると予測される。それにも関わらずこの時 AIB 神経が応答する理由として、5.4.3.で述べた様に ASER 神経以外の神経からの入力を受けているか、もしくは ASER 神経からのシナプス放出が細胞内カルシウム濃度と単純には一致していないなどの可能性が考えられる。5.4.3.と同様に、ASER 神経からのシナプス放出を可視化したり、ASER 神経をチャンネルロドプシンなどで直接興奮させた際の AIB 神経の応答を観察したりすることで、この問題について検証できると期待される。

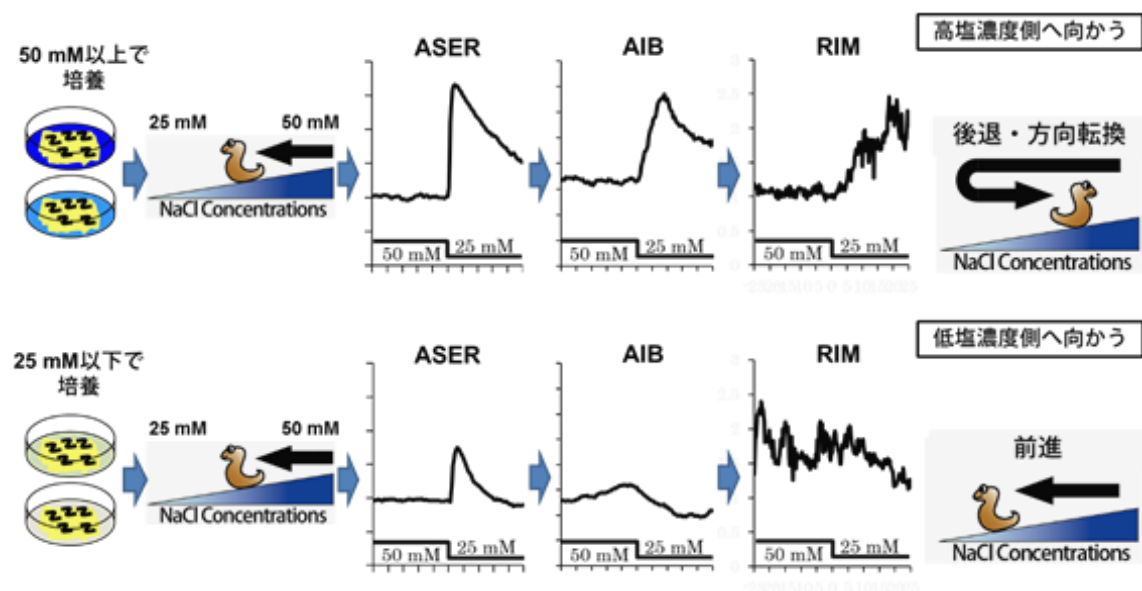


図 5-11 線虫が経験塩濃度依存的に行動を調節する機構

この図では線虫が塩濃度低下方向に進んでいる状況を想定している。上段は刺激より高塩濃度(50 mM 以上)で培養された場合を、下段は刺激より低塩濃度(25 mM 以下)で培養された場合を示している。

5.4.5. 匂い物質又は温度刺激に対する行動を制御する神経回路との比較

序章及び第 3 章の考察(3.7.5.)において触れた様に、匂い物質に対する行動は、それを受容し興奮する神経によって行動が決定されと考えられる。AWC 感覚神経については、長時間匂い物質に暴露することで応答が消失することが知られており、これは AIA 介在神経からの神経ペプチド放出によって制御される(Chalasani et al., 2010)。またフェロモンに対する走性では、指令介在神経が情報のハブとなり、複数の感覚神経や介在神経に働きかけるハブ&スポーク型の神経回路が提唱されている(Macosko et al., 2009)。このように、嗅覚行動においては、感覚神経よりも下流の神経が主要な情報の処理を担っていると考えられる。一方で温度に対する走性については、AFD 感覚神経に経験温度の記憶が形成され、それに基づいて感覚入力に対する適切な出力を行っている可能性が示唆されている。AFD 神経からの情報は AIY 介在神経に伝達され、さらに AIY 神経が RIA 指令介在神経を制御することで行動を調節されている(Kobayashi et al., 2015)。また RIA 神経の制御には AIZ 介在神経も関わっていると示唆されている。本研究の結果から、塩濃度変化に対する行動において、感覚神経直下の介在神経の時点で既に感覚入力の情報から行動出力の情報への変換が行われていることが示唆された。第 3 章の結果(図 3-2, 3-3, 3-8)とも合わせ、ASE 感覚神経に経験塩濃度の記憶が形成され、感覚入力に対する主要な情報処理を行っていることが考えられる。また AIY 神経と AIZ 神経は塩濃度の変化に対して経験依存的な応答を示し、塩走性学習についても関与していると思われる(図 3-14, 3-15)。よって塩走性行動は、感覚神経に記憶が形成されるという点で嗅覚行動よりも温度走性行動に近い現象であると考えられる。また介在神経より下流においては、塩に対する行動と温度に対する行動とは回路レベルで共通している可能性も考えられる。

結論

線虫の塩に対する走性は良く研究されており、関与する神経の同定も進められている。しかしながら、経験塩濃度依存的な行動において、それらの神経の動きは明らかになっていない。本研究では、線虫が経験した塩濃度に応じて神経応答が変化する神経を同定し、各神経の応答の特徴を詳細に調べた。その結果、感覚神経の段階で経験依存的に神経応答が変化し、かつその制御機構は感覚神経内部に存在することが示唆された。シグナル伝達経路の変異体を用いた実験から、感覚神経からの情報は PLC-1/ホスホリパーゼ $C\epsilon$ を含む分子経路を介し、グルタミン酸作動性の神経伝達によって下流の介在神経に伝えられると考えられる。介在神経を除去する実験から、それぞれの介在神経は、線虫の前進もしくは後退・方向転換に寄与していると示唆された。しかしながら、一種類の介在神経を除去しただけでは塩に対する走性行動に影響は見られなかった。そのため、神経回路レベルでは冗長性が存在すると考えられる。

自由行動している線虫を用いて神経応答を観察した結果、感覚神経 **ASER** は刺激の入力と一致する応答を示し、一次介在神経 **AIB** 及びその下流の神経では行動出力と一致する応答を示した。この結果から、感覚入力から行動出力への情報変換機構が **ASER** 神経と **AIB** 神経の間に存在することが示唆された。

本研究により、経験塩濃度依存的に行動を調節する神経回路が明らかになり、その分子機構も示唆された。今後、感覚神経－介在神経間の情報変換・伝達機構が解析されることにより、経験依存的な行動調節メカニズムが更に明らかになると思われる。

謝辞

*Ex[odr-2p::GCaMP; unc-122p::gfp]*株は Cornelia Bargmann 博士より、*xuIs272* [*Pser-2(2)::frt::Gcamp3.0, Podr-2(2b)::flp, lin-15(+)*]; *lite-1*株は Shawn Xu 博士より、その他多くの線虫株は CGC (*Caenorhabditis* Genetics Center)よりいただきました。Inverse Pericam2.0 のプラスミドは石原健先生よりいただきました。またトラッキング・イメージングに用いた線虫追跡用プログラムは、橋本浩一先生、費仙鳳先生に作成していただきました。ご厚意に感謝致します。

指導教員の飯野雄一先生には充実した設備と刺激的な環境を与えていただき、研究の方向性や実験の組み立て方についても重要なご助言をいただきました。また行動解析に用いるプログラムを作成していただいたり、多くの重要な情報や資料を入手していただいたりと、研究において様々なサポートをしていただきました。心より御礼申し上げます。助教の國友博文先生には、様々な実験手法を教えていただき、また日々のディスカッションにおいても有益なご助言をいただきました。小田茂和博士にはイメージングの基礎と実験技術を教えていただきました。助教の豊島有先生および同期の佐藤陽介氏には特にデータの解析手法などについてご助力いただきました。同じく同期の澤村佳之氏には、トラッキング・イメージングシステムの導入時に多くの事を行っていただきました。また、飯野研究室の方々及び過去に在籍されていた多くの方々にも、様々な助言と支えをいただきました。皆様のおかげで恵まれた研究生生活を送れたこと、深く感謝致します。最後に、これまで経済的・精神的に自分を支えてくれた家族に、感謝したいと思います。

参考文献

1. Abbott, M.−, Alice, Wells, D. G. & Fallon, J. R. The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J. Neurosci.* **19**, 7300–7308 (1999).
2. Adachi, T. *et al.* Reversal of Salt Preference Is Directed by the Insulin/PI3K and Gq/PKC Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **186**, 1309–1319 (2010).
3. Albrecht, D. R. & Bargmann, C. I. High-content behavioral analysis of *Caenorhabditis elegans* in precise spatiotemporal chemical environments. *Nat. Methods* **8**, 599–605 (2011).
4. Bargmann, C. I. & Horvitz, H. R. Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron* **7**, 729–742 (1991).
5. Bendena, W. G. *et al.* A *Caenorhabditis elegans* allatostatin / galanin-like receptor NPR-9 inhibits local search behavior in response to feeding cues. **105**, 1339–1342 (2008).
6. Bono, M. De & Villu Maricq, A. NEURONAL SUBSTRATES OF COMPLEX BEHAVIORS IN *C. ELEGANS*. *Annu. Rev. Neurosci.* **28**, 451–501 (2005).
7. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71–94 (1974).
8. Brockie, P. J., Madsen, D. M., Zheng, Y., Mellem, J. & Maricq, a V. Differential expression of glutamate receptor subunits in the nervous system of *Caenorhabditis elegans* and their regulation by the homeodomain protein UNC-42. *J. Neurosci.* **21**, 1510–1522 (2001).
9. Chalasani, S. H. *et al.* Neuropeptide feedback modifies odor-evoked dynamics in *Caenorhabditis elegans* olfactory neurons. *Nat. Neurosci.* **13**, 615–621 (2010).

10. Chalfie, M. *et al.* The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **5**, 956–964 (1985).
11. Chronis, N., Zimmer, M. & Bargmann, C. I. Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Methods* **4**, 727–731 (2007).
12. Cully, D. F. *et al.* Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **371**, 707–711 (1994).
13. Hedgecock, E. M. & Russell, R. L. Normal and mutant thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 4061–4065 (1975).
14. Iino, Y. & Yoshida, K. Parallel use of two behavioral mechanisms for chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **29**, 5370–5380 (2009).
15. Ishihara, T. *et al.* HEN-1, a secretory protein with an LDL receptor motif, regulates sensory integration and learning in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* **109**, 639–649 (2002).
16. Iwata, R., Oda, S., Kunitomo, H. & Iino, Y. Roles for class IIA phosphatidylinositol transfer protein in neurotransmission and behavioral plasticity at the sensory neuron synapses of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 7589–7594 (2011).
17. Jansen *et al.* The complete family of genes encoding G proteins of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* **21**, 414–419 (1999).
18. Junge, H. J. *et al.* Calmodulin and Munc13 form a Ca²⁺ sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity. *Cell* **118**, 389–401 (2004).
19. Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**, 1030–8 (2001).
20. Kobayashi, K. *et al.* Single-Cell Memory Regulates a Neural Circuit for Sensory Behavior. *Cell Rep.* 1–11 (2015). doi:10.1016/j.celrep.2015.11.064

21. Kocabas, a, Shen, C. H., Guo, Z. C. V & Ramanathan, S. Controlling interneuron activity in *Caenorhabditis elegans* to evoke chemotactic behaviour. *Nature* **490**, 273–+ (2012).
22. Kocabas, A., Shen, C.-H., Guo, Z. V & Ramanathan, S. Controlling interneuron activity in *Caenorhabditis elegans* to evoke chemotactic behaviour. *Nature* **490**, 273–7 (2012).
23. Komatsu, H., Mori, I., Rhee, J. S., Akaike, N. & Ohshima, Y. Mutations in a cyclic nucleotide-gated channel lead to abnormal thermosensation and chemosensation in *C. elegans*. *Neuron* **17**, 707–18 (1996).
24. Kuhara¹, A. *et al.* Temperature Sensing by an Olfactory. *Science* **320**, 803–808 (2008).
25. Kunitomo, H. *et al.* Concentration memory-dependent synaptic plasticity of a taste circuit regulates salt concentration chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* **4**, 2210 (2013).
26. Lackner, M. R., Nurrish, S. J. & Kaplan, J. M. Facilitation of Synaptic Transmission by EGL-30 Gq α and EGL-8 PLC β *Neuron* **24**, 335–346 (1999).
27. Lee, R. Y., Sawin, E. R., Chalfie, M., Horvitz, H. R. & Avery, L. EAT-4, a homolog of a mammalian sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in *caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **19**, 159–167 (1999).
28. Li, C. & Kyuhyung, K. Neuropeptides. *WormBook* 1–36 (2008).
doi:10.1895/wormbook.1.142.1
29. Luo, L. & Flanagan, J. G. Development of Continuous and Discrete Neural Maps. *Neuron* **56**, 284–300 (2007).
30. Macosko, E. Z. *et al.* A hub-and-spoke circuit drives pheromone attraction and social behaviour in *C. elegans*. *Nature* **458**, 1171–1175 (2009).

31. Madison, J. M., Nurrish, S. & Kaplan, J. M. UNC-13 interaction with syntaxin is required for synaptic transmission. *Curr. Biol.* **15**, 2236–42 (2005).
32. Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D. & Ambros, V. Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* **10**, 3959–70 (1991).
33. Miller, E. K. & Cohen, J. D. A N I NTEGRATIVE T HEORY OF P REFRONTAL C ORTEX F UNCTION. 167–202 (2001).
34. Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E. a & Yuan, J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* **75**, 653–60 (1993).
35. Miyawaki, a *et al.* Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882–887 (1997).
36. Mori, I. & Ohshima, Y. Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **376**, 344–348 (1995).
37. Mori, I. Genetics of Chemotaxis and Thermotaxis in the Nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Annu. Rev. Genet.* **33**, 399–422 (1999).
38. Nakai, J., Ohkura, M. & Imoto, K. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **19**, 137–41 (2001).
39. Nakai, J., Ohkura, M. & Imoto, K. A high signal-to-noise Ca 2 + probe composed of a single green fluorescent protein. **3**, 137–141 (2001).
40. Nuttley, W. M., Atkinson-Leadbeater, K. P. & Van Der Kooy, D. Serotonin mediates food-odor associative learning in the nematode *Caenorhabditiselegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12449–12454 (2002).

41. Oda, S., Tomioka, M. & Iino, Y. Neuronal plasticity regulated by the insulin-like signaling pathway underlies salt chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurophysiol.* **106**, 301–308 (2011).
42. Okochi, Y., Kimura, K. D., Ohta, A. & Mori, I. Diverse regulation of sensory signaling by *C. elegans* nPKC-epsilon/eta TTX-4. *EMBO J.* **24**, 2127–2137 (2005).
43. Ortiz, C. O. *et al.* Lateralized Gustatory Behavior of *C. elegans* Is Controlled by Specific Receptor-Type Guanylyl Cyclases. *Curr. Biol.* **19**, 996–1004 (2009).
44. Pierce-Shimomura, J. T., Faumont, S., Gaston, M. R., Pearson, B. J. & Lockery, S. R. The homeobox gene *lim-6* is required for distinct chemosensory representations in *C. elegans*. *Nature* **410**, 694–698 (2001).
45. Pierce-Shimomura, J. T., Morse, T. M. & Lockery, S. R. The fundamental role of pirouettes in *Caenorhabditis elegans* chemotaxis. *J. Neurosci.* **19**, 9557–9569 (1999).
46. Piggott, B. J., Liu, J., Feng, Z., Wescott, S. A. & Xu, X. Z. S. The Neural Circuits and Synaptic Mechanisms Underlying Motor Initiation in *C. elegans*. *Cell* **147**, 922–933 (2011).
47. Rhee, J. S. *et al.* ?? phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell* **108**, 121–133 (2002).
48. Saeki, S., Yamamoto, M. & Iino, Y. Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Biol.* **204**, 1757–1764 (2001).
49. Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799–806 (2001).
50. Serrano-Saiz, E. *et al.* Modular control of glutamatergic neuronal identity in *C. elegans* by distinct homeodomain proteins. *Cell* **155**, 659–673 (2013).

51. Smith, H. K. *et al.* Defining specificity determinants of cGMP mediated gustatory sensory transduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **194**, 885–901 (2013).
52. Speese, S. *et al.* UNC-31 (CAPS) is required for dense-core vesicle but not synaptic vesicle exocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **27**, 6150–62 (2007).
53. Stevens, C. F. & Sullivan, J. M. Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron* **21**, 885–893 (1998).
54. Suzuki, H. *et al.* Functional asymmetry in *Caenorhabditis elegans* taste neurons and its computational role in chemotaxis. *Nature* **454**, 114–117 (2008).
55. Thiele, T. R., Faumont, S. & Lockery, S. R. The neural network for chemotaxis to tastants in *Caenorhabditis elegans* is specialized for temporal differentiation. *J. Neurosci.* **29**, 11904–11911 (2009).
56. Tomioka, M. *et al.* The Insulin/PI 3-Kinase Pathway Regulates Salt Chemotaxis Learning in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* **51**, 613–625 (2006).
57. Troemel, E. R., Kimmel, B. E. & Bargmann, C. I. Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*. *Cell* **91**, 161–9 (1997).
58. Troemel, E. R., Sagasti, a & Bargmann, C. I. Lateral signaling mediated by axon contact and calcium entry regulates asymmetric odorant receptor expression in *C. elegans*. *Cell* **99**, 387–398 (1999).
59. Troemel, E. R., Kimmel, B. E. & Bargmann, C. I. Reprogramming chemotaxis responses: Sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*. *Cell* **91**, 161–169 (1997).
60. Ward, S. Chemotaxis by the nematode *Caenorhabditis elegans*: identification of attractants and analysis of the response by use of mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 817–21 (1973).

61. White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N. & Brenner, S. The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **314**, 1–340 (1986).
62. Wierda, K. D. B., Toonen, R. F. G., de Wit, H., Brussaard, A. B. & Verhage, M. Interdependence of PKC-Dependent and PKC-Independent Pathways for Presynaptic Plasticity. *Neuron* **54**, 275–290 (2007).
63. Yoshida, K. *et al.* Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*. *Nat. Commun.* **3**, 739 (2012).