

論文の内容の要旨

論文題目

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*)

氏名：佐藤博文

【序論】

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。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。

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。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、特に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。線虫は化学物質、温度、光、機械刺激など多種多様な刺激を受容することが可能であり、このうち NaCl に対しては通常の飼育条件で培養された線虫は正の走性を示す。しかしながら近年の研究でこの走性は飼育時に経験した塩濃度によって変化することが分かった。具体的には、線虫は培養時に経験した塩濃度に誘引される。このことは線虫が特定の塩濃度を記憶できること、また記憶に基づいて行動を調節できることを示唆している。

本研究では線虫の塩濃度記憶を対象とし、個々の神経細胞について塩濃度記憶に依存した神経応答や行動への役割を解析した。これによって、塩濃度記憶の制御における各神経や分子の役割を明らかにし、経験依存的な行動調節機構の神経細胞及び分子レベルでの解明を目指した。

【結果と考察】

1. 経験依存的な感覚神経と介在神経の神経応答

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、ASE と下流の介在神経について、塩濃度依存的な神経応答が観察されるかをカルシウムイメージングによって調べた。ここで行ったのは、感覚神経である ASER と ASEL、及び介在神経である AIA、AIB、AIY、AIZ の測定である。刺激には 50 mM から 25 mM への NaCl 濃度低下もしくは 25 mM から 50 mM への NaCl 濃度上昇を用いた。各神経細胞には、Ca²⁺インジケータとして GCaMP を発現させた。

実験の結果、次に述べる結果が得られた。まず ASER 神経と AIB 神経、AIZ 神経ではいずれも塩濃度低下に対する Ca²⁺応答が観察されたが、ASER は条件付け時の塩濃度が低くなるにつれ、刺激への応答が低下する傾向が見られた。一方で AIB 神経と AIZ 神経では、低い塩濃度で条件付けされた場合、応答そのものが無くなるように見えた。また ASEL 神経と AIA 神経、AIY 神経ではいずれも塩濃度上昇に対する Ca²⁺応答が見られたが、AIA 神経は条件付け時の塩濃度に応じた応答の変化は観察できず、ASEL 神経と AIY では、低塩濃度で条件付けされた場合により強い応答が観察された。これらの結果から、ASER、ASEL、AIB、AIY、AIZ が条件付け時の塩濃度の記憶に関与しており、AIA は直接的な関与はしていない可能性が示唆された。

続いて ASER 神経の応答についてより詳細な解析を行った。刺激に用いた塩濃度変化を変えた結果、ASER は低塩濃度領域での変化には強く応答し、一方で高塩濃度領域での変化には弱く応答することが分かった。次に神経細胞間の情報伝達に異常を持つ変異体を用いて、ASER の応答が他の神経からの制御を受けているか調べた。この実験ではシナプス小胞の放出に異常を持つ変異体と、有芯小胞の放出に異常を持つ変異体を用いた。実験の結果、いずれの変異体でも ASER 神経の応答は野生型と同様であった。よって、経験塩濃度依存的な ASER 神経の応答は細胞自律的であり、ASER 神経内部に塩濃度の記憶が形成される可能性が示唆された。

さらに、ASER 神経から下流の神経に情報が伝わる仕組みについて調べた。ここでは AIB 神経への情報伝達を対象とした。まず、感覚神経の感覚繊毛が欠損する *dyf-11* 変異体を用い、AIB 神経の応答の由来を調べた。実験の結果、*dyf-11* 変異体では AIB 神経は塩濃度変化に対して応答を示さなかった。ASER 神経でのみ変異をレスキューした株では、刺激に用いた濃度変化より高い塩濃度で条件付けした場合のみ塩濃度低下に対して応答を示した。よって AIB 神経は ASER 神経からの入力によって応答することが示された。次にホスホリパーゼ C のホモログである *plc-1* の *gf* 及び *lf* 変異体を用いて実験を行ったところ、いずれの変異体でも ASER 神経の応答は野生型と同様であった。一方 AIB 神経は *plc-1(gf)* 株では低塩濃度条件付けでも応答を示し、*plc-1(lf)* 株では条件付け塩濃度によらず応答が弱まる傾向が見られた。*plc-1(lf)* 株の表現型は ASER 神経特異的なレスキューにより回復した。当研究室の先行研究から、*plc-1* 変異体は経験塩濃度依存的な塩への走性に異常を持つことが分かっており、PLC-1 は ASER 神経においてカルシウム応答の下流で AIB への伝達に働いている可能性が示唆された。

2. 介在神経の遺伝学的除去による行動への寄与の解明

ASE 神経の下流に存在する介在神経について、各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により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。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 日の成虫の個体において 90%以上の割合で目的の神経の蛍光が消失していた。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。

これらの株を用いて、**mock conditioning**(NaC 無し、餌無し)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。すなわち、各神経は線虫の行動に関与しているものの、神経回路としては冗長性が存在することが示唆された。

3. 自由行動中の線虫を用いた神経応答の観察

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、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。2cm 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。刺激には 50 mM から 25 mM への塩濃度低下刺激及び 25 mM から 50 mM への塩濃度上昇刺激を用いた。

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、行動と神経応答との同時測定を行った。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 Ca^{2+} 濃度の上昇を見せた。塩濃度の上昇に対して細胞内 Ca^{2+} 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 または 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時的に負の値を示し、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 で条件付けされた場合、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、ASER 神経の応答は感覚入力と一致していること、また ASER から行動出力までの間で情報の変換が行われていることが示唆された。

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、同様に測定を行った。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、AIB 神経の応答は行動出力と一致しており、感覚神経から AIB までの間に感覚入力の情報が行動出力の情報へと変換されていることが考えられる。

最後に、AIB 神経の下流にある介在/運動神経 RIM について測定を行った。線虫の行動は ASER、AIB の実験と同様の結果であった。神経の応答は AIB 神経と同様の傾向を示した。この結果から、RIM 神経の応答も行動出力と一致しており、AIB 神経からの情報が下流へ伝わっていることが示唆される。

【結論】

以上の結果から、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 1 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。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。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。また塩濃度記憶の情報は ASER 神経で形成され、PLC-1 を介した分子経路で AIB 神経に伝わることを示唆された。本研究により、動物が経験依存的に行動を調節する機構の一端が明らかになった。今後、ASER 神経内部での記憶形成機構、及び ASER 神経から AIB 神経へのシグナル伝達機構を詳細に調べることで、記憶形成の分子機構や記憶情報の伝達機構の更なる解明が期待される。

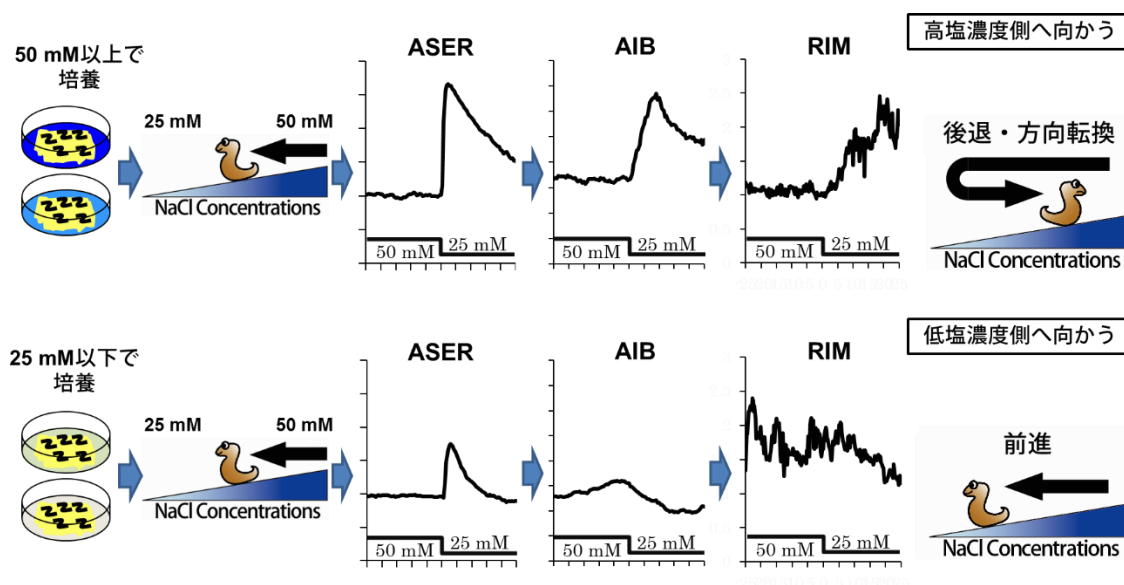


図 1：線虫が経験塩濃度依存的に行動を制御する機構のモデル図