

# 学位論文

線虫 *C. elegans* の化学感覚を制御する神経回路

Analysis of neural circuit mechanisms regulating  
chemical sensation in *C. elegans*

平成 24 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

吉田 和史

## Abstract

動物は外界からの刺激を感覚神経で受容し、その情報を神経回路上で処理することにより、刺激に対して適切な応答を行っている。例えば、線虫は **NaCl** を味覚神経 **ASE** で受容し、介在神経を含む神経回路を介してシグナルを伝達し、誘引行動を引き起こす。線虫の **NaCl** への誘引行動はピルエット機構と風見鶏機構という 2 つの機構により達成されていることが知られており、これらの機構には味覚神経 **ASE** と下流の介在神経 **AIZ** が関与することが示されている。しかし、これら 2 つの機構の神経回路基盤の全ては明らかにされていない。本研究では、特定の神経を破壊した線虫の行動を測定し、2 つの機構を制御する神経回路の同定を行った。その結果、ピルエット機構にのみ重要な介在神経 **AIA**、**AVA** と運動神経 **SMD**、風見鶏機構にのみ重要な介在神経 **AIY**、両方の機構に重要な感覚神経 **ASI** と介在神経 **AIB**、運動神経 **SMB** の存在が明らかとなった。これらのことから、**NaCl** への誘引行動の際に用いられる 2 つの機構は、部分的に異なる神経回路により制御されていることが示唆される。

前述のように、動物は外界からの刺激に対して特定の応答を示すが、その応答は刺激の強度に依存して変化することが知られている。線虫の嗅覚系でも同様に、低濃度で誘引行動を示す匂い物質に対して、高濃度では忌避行動を示す現象が報告されている。しかし、刺激強度に依存した行動変化の神経・分子メカニズムについてはあまりわかっていない。そこで本研究では、線虫の匂いの濃度に依存した行動変化を調節する神経回路・分子メカニズムの解析を行った。匂いに対する誘引行動には、前述の 2 つの行動戦略が関与していることが知られている。行動解析の結果、そのうちピルエット機構が、匂いの濃度による誘引行動から忌避行動への走性行動の切り替えを主に制御していることがわかった。さらに遺伝学的解析と神経破壊実験により、行動を引き起こすのに関わる感覚神経の組み合わせが匂いの濃度によって異なっており、低濃度と高濃度の匂いに対する行動にはそれぞれ感覚神経 **AWC** と **ASH** が特に重要であることが示された。**Ca<sup>2+</sup>** イメージングによって匂いに対する神経応答を測定した結果、**AWC** 神経は低濃度の匂いにものみ応答し、高濃度のときには他の神経からの抑制を受け、匂いには応答しないことが明らかになった。一方、**ASH** 神経は高濃度の匂いにものみ応答を示すことが分かった。これらのことから、匂いの濃度情報が感覚神経における応答の差異を生み出すことで行動が切り替えられていると考えられ、線虫における匂いの濃度情報処理の主要な部分は感覚神経で行われていることが示唆される。

## Abstract

Animals sense various environmental stimuli and process the sensory information by the neural circuits to generate appropriate behavior in response to the stimuli. The model organism *C. elegans* detects NaCl by ASE gustatory neurons and shows attraction to NaCl. It has been shown that the attraction to NaCl is generated by two behavioral strategies called pirouette and weathervane strategies and that ASE sensory neurons and their downstream interneurons AIZ are required for both of these behavioral responses. However, the rest of the neural circuits underlying these behavioral mechanisms remain largely unknown. Here I observed the behavioral responses of animals with candidate neurons killed. AIA and AVA interneurons and SMD motor neurons are responsible only for the pirouette response, whereas AIY interneurons are required only for the weathervane response. Moreover, AIB interneurons and SMB head motor neurons are responsible for both behavioral responses. These results suggest the existence of partially distinct neural circuits regulating the two behavioral strategies for attraction to NaCl.

Although animals show a specific response to each environmental stimulus as mentioned above, response to a particular stimulus can change depending on the strength of the stimulus. However, little is understood about the neural basis of this phenomenon. *C. elegans* avoids higher concentrations of odorants that are attractive at the lower concentrations. Here I analyzed this odor concentration-dependent change in olfactory preference. Behavioral analyses revealed that the odor concentration-dependent behavior is primarily generated by the pirouette mechanism. Genetic analyses and lesion experiments showed that distinct combinations of sensory neurons function at different concentrations of the odorant; AWC and ASH sensory neurons have critical roles for attraction to or avoidance of the odorant, respectively. Calcium imaging showed that AWC neuron responds to only lower concentrations of the odorant, and their responses disappear at higher concentrations probably due to a suppression effect of synaptic transmission from other neurons. On the other hand, ASH neurons responded to only higher concentrations of odorant. Hence, these results suggest that the odor concentration information in *C. elegans* is primarily modulated at the sensory neuron level.

## 目次

### 第1章 序論

1.1. 神経回路上での情報処理.....	- 1 -
1.2. 線虫の化学走性.....	- 2 -
1.3. 化学走性を行うための行動戦略.....	- 4 -
1.4. 化学受容の分子・神経メカニズム.....	- 5 -
1.5. 化学走性を制御する神経回路.....	- 8 -
1.6. 本研究の目的.....	- 10 -

### 第2章 材料と方法

2.1. 本研究に用いた線虫株.....	- 19 -
2.2. 線虫の培養.....	- 21 -
2.3. 化学走性アッセイ.....	- 21 -
2.4. プラスミドコンストラクション.....	- 24 -
2.5. マイクロインジェクション.....	- 26 -
2.6. レーザーアブレーション.....	- 27 -
2.7. 遺伝学的な細胞破壊.....	- 27 -
2.8. 遺伝子機能の細胞特異的ノックダウン(RNAi).....	- 28 -
2.9. $\text{Ca}^{2+}$ イメージング.....	- 29 -
2.10. トラッキングシステム.....	- 31 -
2.11. コンピューターシミュレーション.....	- 33 -

### 第3章 塩への化学走性を制御する神経回路の探索

3.1. 塩走性に必要な塩濃度情報を受容する感覚神経の探索.....	- 39 -
3.2. 塩濃度情報を伝達する介在神経の探索.....	- 40 -
3.3. 2つの行動応答を制御する運動神経の探索.....	- 43 -
3.4. 考察.....	- 45 -

## 第4章 匂いの濃度に依存した行動の変化を制御する神経回路メカニズムの探索

4.1. 匂いの濃度に依存した行動変化の解析 .....	- 56 -
4.2. 匂いの濃度情報を伝達する分子メカニズムの解析.....	- 59 -
4.3. 匂いの濃度による行動変化を制御する神経回路の探索 .....	- 62 -
4.4. 様々な濃度の匂いに対する神経応答の測定 .....	- 64 -
4.5. 考察：匂いの濃度に依存した行動変化を制御する神経回路メカニズム .....	- 68 -
4.6. 考察：匂いの濃度に依存した行動変化を制御する分子メカニズム.....	- 70 -
4.7. 考察：匂いの濃度の差異により起こる行動の違いを制御する行動戦略を調節する感覚神経の候補 .....	- 72 -
結論 .....	- 88 -
謝辞 .....	- 89 -
参考文献.....	- 90 -

## 第 1 章 序論

### 1.1. 神経回路上での情報処理

神経系をもつ生物において、神経回路は外界からの情報を処理し、適切な行動を出力する役割を担っている。サルやヒトでは、大脳の前頭連合野(前頭前野)が感覚、記憶、感情といった知覚情報の統合をおこない、行うべき行動の情報を高次運動野へ出力し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であるために、感覚受容から行動出力に至るまでの神経回路レベルの情報処理機構はあまり理解されていない。高等動物に比べて単純な神経系をもつ無脊椎動物においても同様に、神経回路上で感覚情報が処理され、適切な行動が出力されている。感覚受容から行動出力までの神経回路がよく理解されている数少ない例のひとつとして、アメフラシ *Aplysia* の鰓の引き込み反射が挙げられる (Kandel, 2001)。水管と呼ばれる部位に機械刺激が与えられたときに起こる鰓の引き込みは、水管の機械受容神経から鰓の筋肉を支配する運動神経へと情報が直接伝達される単シナプス反射であることが示されている。さらに、この鰓の引き込み反射には、異種の刺激を与えることで同種の刺激に対する応答が大きくなる「感作」という現象がみられ、この応答の変化は、ある介在神経から分泌されるセロトニン(5-HT)が感覚神経に働きかけ、感覚神経から運動神経へのシナプス伝達が促進されることで起きている。感覚受容から行動出力に至るまでの神経回路メカニズムが同定された例は、アメフラシの鰓の引き込み反射の例のようにアウトプットである行動が非常に単純なものに限られている。

生物は普段の環境の中で様々な化学物質に晒されており、それらを味覚や嗅覚といった化学感覚によって認識している。化学感覚は、味や匂いによって食物を認識して摂食行動につなげ、フェロモンによって異性を認識して生殖行動につなげるなど、上記のアメフラシの鰓の引き込み反射と比べてアウトプットである行動が非常に複雑である。そのため、化学感覚受容から行動出力までの神経回路メカニズムを解明することは難しく、実際、化学感覚神経や化学感覚受容のシグナル伝達経路についての知見は豊富にあるが、感覚神経より下流の情報処理に関する知見は乏しい。本研究で用いた線虫 *C. elegans* は 302 個からなる神経細胞とそれらの間の神経接続が明らかにされており、高等動物と同様に、多種多様な化学物質を識別することができる。さらに、線

虫はそれらの化学物質に対して誘引行動もしくは忌避行動を示し、その行動を詳細に解析する系が確立されている。これらの点から、線虫は行動を指標にして化学感覚を制御する神経回路メカニズムを解析するのに最適なモデル生物だと考えられる。

## 1.2. 線虫の化学走性

### 1.2.1. 化学走性

線虫は化学物質や温度、光などの外界からの刺激に応答する。化学物質の濃度勾配に対して線虫が起こす方向性をもった行動は化学走性と呼ばれている。寒天プレート上に線虫が好む化学物質を置き、別の場所に線虫を置くと、線虫はその化学物質に寄っていく。これを正の化学走性、または誘引行動と呼んでいる。逆に、嫌いな化学物質から遠ざかる場合を負の化学走性、または忌避行動と呼んでいる。線虫が化学走性を示す物質は、水溶性物質と揮発性の匂い物質に大別される。例えば、水溶性物質の場合、**NaCl** のような塩やビオチンには誘引行動を示すが、**Cu<sup>2+</sup>**などの重金属イオンやキニン、**SDS** などには忌避行動を示す(Bargmann and Horvitz, 1991; Sambongi et al., 1999; Hilliard et al., 2002)。匂い物質の場合、イソアミルアルコールやベンズアルデヒド、ジアセチルなどには誘引行動を示し、1-オクタノールや 2-ノナノンなどには忌避行動を示す(Bargmann et al., 1993; Troemel et al., 1997)。

### 1.2.3. 走性行動の可塑性

味や匂いの嗜好性は過去の経験により変化することが知られている。味覚の嗜好性の変化に関しては、塩走性学習と呼ばれる現象が過去に報告されている(Saeki et al., 2001; Tomioka et al., 2006)。線虫は、**NaCl** を含んだバッファーの中で飢餓を経験させると、**NaCl** に対して忌避行動を示す(図 1-1a 下段)。**NaCl** を含まないバッファーの中で飢餓を経験させても、**NaCl** に対する忌避行動は引き起こされないため(図 1-1a 中段)、線虫は **NaCl** と飢餓の連合学習をすると解釈されている。

嗅覚系では、線虫をある匂いに一定時間さらした後は、その匂いへの化学走性が著しく低下し、場合によっては忌避行動が起こる(Colbert and Bargmann, 1995)。このような現象はさまざま

まな生物で古くから嗅覚順応(olfactory adaptation)と呼ばれている。嗅覚順応は、一定時間の匂い刺激により匂いに対して感覚神経が応答しなくなる現象である。しかし、これとは異なり、線虫を餌の存在下でブタノンという誘引性の匂い物質に長時間さらしておくと誘引行動の増強がみられる(Torayama et al., 2007)。この現象は単なる順応の定義には当てはまらず、連合学習の一種であると考えられるため、匂いに対する化学走性の変化は嗅覚可塑性(olfactory plasticity)とも呼ばれるようになった。

#### 1.2.4. 塩濃度が塩走性に及ぼす影響

これまで、線虫の NaCl への誘引行動は生得的な嗜好性を反映し、塩走性学習による行動の切り替わりは NaCl の有無と飢餓を連合しているものであると考えられてきた。しかし、最近になって、塩の有無ではなく、塩濃度が線虫の塩走性に重要であることが明らかにされた(國友ら、未発表)。培養に用いられる培地には通常 50 mM の NaCl が含まれており、線虫は培養時の塩濃度を記憶し、その濃度に向かっていくことが示された(図 1-1b 上段)。従って、線虫が NaCl に誘引される(NaCl の濃度の高い方へと向かう)現象は、生得的な嗜好性ではなく、培養時と同じ 50 mM に近い塩濃度に移動する行動をみていたことになる。さらに、線虫は培養後に餌のない培地上で飢餓を経験させると、飢餓とともに経験した NaCl の濃度を記憶し、その塩濃度を避けることが示された(図 1-1b 下段)。従来定義されていた塩走性学習は、高い塩濃度への走性行動から低い塩濃度への走性行動へと行動が切り替わることであったが、塩濃度の記憶が塩走性を制御しているという概念の発見により、新たに以下のような 2 つの行動が観察されたことになる。ひとつは、餌のある培地上で培養された後に、培養塩濃度よりも高い領域に置かれると低濃度側へと向かう走性行動である(図 1-1b 上段)。もうひとつは、NaCl を含む培地上で飢餓を経験させた場合、経験させた塩濃度よりも高い領域に置かれると高濃度側へと向かう走性行動である(図 1-1b 下段)。

本研究を進めていく過程で NaCl への化学走性の概念が上記のように大きく変更された。本論文の第 3 章では、50 mM の NaCl を含む培地で培養した線虫に、NaCl を含まない(0 mM の NaCl の)バッファーの中で 1 時間飢餓を経験させ、塩濃度が 0mM から数 mM の NaCl の勾配上で、0



mM の NaCl を避ける行動に着目して解析を行った。しかし、この行動は塩濃度の高い方に向かう行動にもみえるため、第 3 章では、概念の変更を反映しない従来の表現の仕方「NaCl への誘引行動」と表記することで統一した。

### 1.3. 化学走性を行うための行動戦略

線虫の水溶性物質や匂い物質への誘引行動は、ピルエット機構と風見鶏機構という 2 つの機構により達成されている(図 1-2a)。ピルエット機構はクリノキネシス(klinokinesis)とも呼ばれおり、ピルエット行動という方向転換を行う頻度を調節することで化学走性の制御がなされる(図 1-2b)。化学走性の際、前進にともない線虫の進行方向の化学物質の濃度が低下したとき、ピルエット行動を行う頻度が上昇し、逆に、化学物質の濃度が上昇したときは、ピルエット行動を行う頻度が低くなる。つまり、線虫が誤った方向に進んでいると感じたときに、ピルエット行動により進行方向を修正するという機構である(Pierce-Shimomura et al., 1999)。もう一方の風見鶏機構はクリノタクシス(klinotaxis)とも呼ばれている。普段、線虫は前進中に直線的に進むのではなく、ランダムに左右にカーブしながら進んでいることが多い。しかし、進行方向と垂直な化学物質の濃度勾配を感知すると、線虫は統計的に濃度の高い方にカーブすることが多くなる(図 1-2c)。つまり、好きな化学物質の濃度の高い方にカーブするバイアスをかけるという戦略が風見鶏機構である(Iino and Yoshida, 2009)。2 つの機構の化学走性への寄与の関係はコンピューターシミュレーションにより調べられており、ピルエット機構、風見鶏機構のうち片方のみを使うことでモデル線虫は化学物質に寄っていくが、誘引の程度は不十分で、両方の機構を同時に使うことによりはじめて実際の線虫と同程度に化学物質へと誘引されることが示されている。従って、仮にこれら 2 つの行動戦略が別々の神経回路により制御されているとするならば、神経破壊により片方の機構を欠損させた線虫は化学物質に寄っていくが、その程度は不十分であると予測される。このことについては、本論文の第 3 章 3.2. でも述べる。

次に忌避行動を行うときの行動戦略について述べる。ピルエット行動は後退運動から始まり、強い後退運動はほとんどの場合ピルエット行動に繋がるため、ピルエット機構においては後退運動を引き起こすことが重要である。線虫は忌避性の匂い物質を感知すると、ピルエット行動の引

き鍵となる後退運動を行うことで反射的に忌避行動をとっている(Troemel et al., 1995)。また、第 1 章 1.2.3. で述べた塩走性学習後の線虫でみられるピルエット機構と風見鶏機構は、塩に対して誘引行動を示すときと傾向が逆転する。つまり、塩濃度が上昇したときにピルエット行動が頻繁に起こり、塩濃度の低い方にカーブすることが多くなる(lino and Yoshida, 2009)。これらのことから、化学物質に対する誘引行動、忌避行動はピルエット行動(後退運動を含む)とカーブ行動により調節されていることがわかる。

## 1.4. 化学受容の分子・神経メカニズム

### 1.4.1. 線虫の化学感覚器と化学感覚神経

雌雄同体の成虫は 959 個の細胞からなり、そのうちの 302 個が神経細胞である。透過電子顕微鏡の連続切片の再構成により、神経細胞の形態や神経細胞間のシナプス結合、ギャップ結合も全て明らかにされている(White et al., 1986)。形態的な特徴から 39 種類が感覚神経であると推定されており、体表の感覚器は図 1-3a のような分布をしている。これらの感覚器の中で、頭部に存在するアンフィド感覚器は化学走性に重要である。頭部の先端のアンフィド感覚器には、図 1-3b のようにアンフィド感覚神経の神経末端が集結しており、末端の構造や末端が外部に露出しているか否かが感覚神経ごとに異なる。線虫の感覚器では、高等生物でみられるような嗅覚器と味覚器の分化はみられず、アンフィド感覚器の中の神経細胞ごとに機能の分担が行われている(図 1-3c)。例えば、揮発性の匂い物質を受容するという特異性から感覚神経 AWA、AWB、AWC は嗅覚神経に対応し、水溶性の誘引物質を受容する感覚神経 ASE は味覚神経に対応する(Bargmann and Horvitz, 1991; Bargmann et al., 1993; Troemel et al., 1997)。しかしながら、感覚神経 ASH のように、忌避性の匂い物質や水溶性物質を受容する嗅覚神経と味覚神経の双方の機能を兼ね備えた侵害刺激受容神経も存在する(Sambongi et al., 1999; Chao et al., 2004)。また、図 1-3c のように、線虫ではそれぞれの感覚神経が複数種類の化学物質を受容する。この特徴は、多くの嗅覚神経のそれぞれが 1 種類の嗅覚受容体を発現し、特定の構造を含む匂い物質に応答するとされている哺乳類の嗅覚とは異なる点である(Malnic et al., 1999)。

線虫の多くの神経は構造的に左右対称な 1 対の神経から構成されており、機能も左右で同じ

である場合が多い。しかし、神経機能が左右非対称な例がいくつか報告されている。例えば、NaCl を受容する感覚神経 ASE の場合は、右側の ASER 神経は NaCl の濃度低下に応答するが、左側の ASEL 神経は NaCl の濃度上昇に応答する(Suzuki et al., 2008)。感覚神経 AWC の場合は、G タンパク質共役型受容体 STR-2 が左右どちらか一方の神経細胞に発現し、発現の有無でそれぞれ AWC<sup>ON</sup>、AWC<sup>OFF</sup> と呼ばれている(Troemel et al., 1999)。AWC<sup>ON</sup>、AWC<sup>OFF</sup> 神経のどちらか一方にしか感知されない匂い物質がそれぞれ存在することから、1 対の神経で重複しない機能があることが示されている(Wes and Bargmann, 2001; Chalasani et al., 2007)。

#### 1.4.2. 化学物質を受容する感覚神経と行動の対応関係

線虫の化学走性には図 1-3c に示すような感覚神経が関与することを前項で述べた。ここでは、匂い物質を受容する嗅覚神経と出力される行動の関係について示された 2 つの報告を概説する。G タンパク質共役型受容体である ODR-10 は、匂い物質ジアセチルの嗅覚受容体であることが知られている。ODR-10 は、ジアセチルへの誘引行動に重要な AWA 神経に発現しており、ODR-10 が欠損した変異体はジアセチルに誘引行動を示さない(Sengupta et al., 1996)。この変異体に、本来は ODR-10 が発現しない AWB 神経に ODR-10 を発現させたところ、この線虫はジアセチルに対して忌避行動を示した(Troemel et al., 1997)。このことから、この例では、線虫の化学物質に対する行動は受容体によって決まるのではなく、感覚神経の特異性によって決まると考えられる。

ところが、最近になって、嗅覚の嗜好性の一部は、上記の概念には当てはまらない様式で決まることが示された(Tsunozaki et al., 2008)。感覚神経 AWC<sup>ON</sup> (一対ある AWC 神経のうち、嗅覚受容体と推測されている STR-2 が発現している方の AWC 神経) は、通常、揮発性の匂い物質ブタノンへの誘引行動に重要である。しかし、gcy-28 の機能が欠損した変異体はブタノンに対して忌避行動を示し、このブタノンに対する忌避行動にも AWC<sup>ON</sup> 神経が重要であることが分かった。受容体様グアニル酸シクラーゼをコードする gcy-28 は、AWC<sup>ON</sup> 神経の軸索(下流の神経に匂いの情報を伝達する部位)に局在する。さらに、遺伝学的解析や匂い刺激に対する神経応答の測定から、AWC<sup>ON</sup> 神経の軸索において GCY-28 が下流の介在神経とのシナプス連絡の様式を

切り替えることで、匂いに対する行動が誘引から忌避に切り替わることが示唆された。つまり、限定的な場合においてであるが、単一の感覚神経が匂い物質に対する行動を切り替え得ることが示された。

#### 1.4.3. 化学感覚のシグナル伝達

主に化学走性を指標とした遺伝学的解析により、いくつかの感覚神経で水溶性物質や匂い物質のシグナル伝達経路が推定されている。水溶性物質  $\text{NaCl}$  への誘引行動に重要な味覚神経 ASE では、左の ASEL 神経と右の ASER 神経でそれぞれ異なる数種の受容体型グアニル酸シクラーゼが発現している(Ortiz et al., 2009)。また、ASE 神経では感覚受容に重要な G タンパク質が未だに見つかっていない(Jansen et al., 1999)。これらのことから、図 1-4a のように、受容体型グアニル酸シクラーゼ(GCY-22)が直接イオンを受容し、これにより産生されるサイクリック GMP(cGMP)によって TAX-2/TAX-4(CNG チャネル)が開き、 $\text{Ca}^{2+}$ が ASE 神経内に流入すると推定されている(Komatsu et al., 1996)。一方、齧歯類の塩味を受容する味覚受容細胞では、イオンチャネル型受容体の上皮性ナトリウムチャネル(ENaC)が  $\text{Na}^+$ イオンの受容に主要な役割を果たすことが示されている(Chandrashekar et al., 2010)。

図 1-4b のように、嗅覚神経 AWC では、イソアミルアルコールなどの匂いのシグナルを伝達する際、G タンパク質(ODR-3、GPA-3)、グアニル酸シクラーゼ(GCY-10、DAF-11)、CNG チャネル(TAX-2/TAX-4)が機能することが示されている(Vowels and Thomas, 1994; Coburn and Bargmann, 1996; Komatsu et al., 1996; Roayaie et al., 1998; L'Etoile and Bargmann, 2000)。哺乳類の嗅神経では、匂い物質が G タンパク質共役型受容体に受容されると、三量体型 G タンパク質  $\alpha$  サブユニット  $\text{G}\alpha_{\text{olf}}$  がアデニル酸シクラーゼを活性化し、これにより産生されるサイクリック AMP(cAMP)が CNG チャネルを開き、細胞内に  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ が流入することで嗅神経の脱分極を誘導する。それゆえに、匂いのシグナル伝達に関わる分子は感覚神経 AWC と哺乳類の嗅神経で共通するものが多い。しかし、感覚神経 AWC では脱分極のタイミングが哺乳類の嗅神経とは逆で、匂いがある状態からない状態へと変化したときに脱分極すると考えられている(Chalasani et al., 2007)。

図 1-4c のように、感覚神経 ASH では、CNG チャンネルではなく、TRP チャンネル (transient receptor potential channel) を介して陽イオンが細胞内に流入し、感覚シグナルの伝達が行われている。侵害刺激受容神経としての機能も備えもつ ASH 神経における TRP チャンネル(OSM-9/OCR-2)は TRPV ファミリーに属し、哺乳類の TRPV1 チャンネルはカプサイシン受容体として機能する。このことから、侵害刺激の情報伝達は線虫から哺乳類に至るまで保存されている (Troemel, 1999)。

## 1.5. 化学走性を制御する神経回路

線虫の化学走性に関わる神経細胞はその接続のパターンから感覚神経、介在神経(アンフィド介在神経と指令介在神経など)、運動神経の 3 グループに分類される(図 1-5a)。感覚神経で受容された外部刺激の情報は、アンフィド介在神経を経て指令介在神経などに集められ、それが運動神経に伝達されることで筋肉を制御し、行動が出力される。ここでは、どのような神経回路により線虫の化学走性行動が制御されているのかについて概説する。

### 1.5.1. 塩走性を制御する神経回路

水溶性の化学物質に対する走性行動では、塩走性を制御する神経回路がよく調べられている。神経破壊実験により、NaCl への誘引行動には感覚神経 ASE、ASI、ADF、ASG、ASH が関与し、中でも、ASE 神経が最も重要であることが示されている(Bargmann and Horvitz, 1991; Iino and Yoshida, 2009; Thiele et al., 2009)。上記の感覚神経のうち、いくつかの神経は、実際に塩濃度の変化に応答することが  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングにより確かめられている(図 1-5b)。感覚神経 ASE は左右で NaCl に対する応答が非対称で、左側の ASEL 神経は NaCl の濃度上昇に応答し、右側の ASER 神経は NaCl の濃度低下に応答する(Suzuki et al., 2008)。一方で、感覚神経 ASH は左右両方の神経が、NaCl の濃度低下に応答する(Thiele et al., 2009)。感覚神経 ADF は、左右両方の神経が NaCl の濃度上昇に応答するが、この応答は ADF 神経が直接、NaCl を感知しているものではなく、他の感覚神経からシグナルが伝達されたものである(Thiele et al., 2009)。さらに、ASEL 神経を人為的に活性化させると、前進する確率が上昇し、ASER 神経を人為的に活性化さ

せると、逆に後退運動を行う確率が上昇(つまり、前進する確率が減少)することから、ASE 神経が塩濃度変化にともない前進・後退運動を調節することで線虫は NaCl に近寄るものと考えられている(Suzuki et al., 2008)。塩濃度の低下に ASER 神経が応答すると、その応答は下流の介在神経 AIB へと伝達されることが示されており(Oda et al., 2011)、人為的に AIB 神経を活性化させるとピルエット応答に重要な後退運動が引き起こされる(Piggott et al., 2011)ことから、AIB 神経が塩走性の際のピルエット応答に関与することが示唆されている。

#### 1.5.2. 匂い物質に対する走性行動を制御する神経回路

匂い物質に対する走性行動では、嗅覚神経 AWC で受容される匂い物質への誘引行動を制御する神経回路がよく調べられている。匂いの濃度低下に対して応答する AWC 神経からシナプス入力を受ける神経はいくつか存在し、そのうちアンフィド介在神経 AIA、AIB、AIY については匂い刺激に対する応答が測定されている(図 1-5c)(Chalasani et al., 2007; Chalasani et al., 2010)。介在神経 AIB は AWC 神経と同様、匂いの濃度低下に対して応答する。一方、介在神経 AIA と AIY は、AWC 神経とは逆に匂いの濃度上昇に応答する。AWC 神経とこれらの介在神経の間のシナプス伝達にはグルタミン酸が用いられているが、それらの介在神経に発現するグルタミン酸受容体の種類が異なっており、AIB 神経では興奮性の AMPA 型グルタミン酸受容体 GLR-1 が、AIA 神経と AIY 神経では抑制性のグルタミン酸作動性 Cl<sup>-</sup>チャネル GLC-3 が機能している。つまり、これら受容体のグルタミン酸に対する反応性の違いが匂いに対する神経応答の違いを生んでいる。また、AIB 神経は後退運動を促進し、一方、AIA 神経、AIY 神経は後退運動を起こりにくくする(つまり、前進運動を促進する)働きがある(Wakabayashi et al., 2004; Gray et al., 2005)。これらのことから、匂いの濃度が低下し感覚神経 AWC が活性化すると、介在神経 AIA、AIB、AIY はいずれも後退運動が起こるように作用し、この行動によって線虫は匂いの近くにとどまることができる(図 1-5c)。上記の介在神経は直接、または他の神経を 1 つ介して後退運動を制御する指令介在神経 AVA、AVE、AVD に接続している(図 1-5a)。それゆえに、感覚神経により化学物質の濃度変化が感知されると、それが介在神経の活動状態を変化させ、指令介在神経に伝えられることで前進・後退運動による化学走性の制御が達成されていると考えられる。

## 1.6. 本研究の目的

### 1.6.1. 塩走性を制御する神経回路の探索

神経系をもつ生物では、感覚神経で受容された外界からの刺激の情報は、介在神経を含む神経回路で処理され、それが運動神経に伝達されることで筋肉を制御し、適切な行動が出力される。化学感覚において、感覚受容の仕組みについてはよく理解されているが、感覚神経より下流の神経回路メカニズムについてはあまり理解されていない。線虫は 100 種類以上の化学物質に対して誘引行動もしくは忌避行動を示し、その行動を詳細に解析する系が確立されている。そこで、本研究では、線虫の NaCl への誘引行動を制御する神経回路メカニズムを明らかにすることで、動物の化学感覚の情報処理メカニズムを理解しようと考えた。本論文の第 1 章 1.3. で述べたように、線虫の高塩濃度の方へと向かう行動は、ピルエット機構と風見鶏機構という 2 つの行動戦略により達成されている。これらの行動戦略では、線虫の進行方向とそれに垂直な化学物質の濃度勾配の情報がそれぞれ使われ(図 1-2b,c と図 2-4b)、それぞれピルエット行動とカーブ行動で制御が行われる(図 1-2b,c)。それゆえに、本研究では、2 方向の塩濃度勾配の情報が、それぞれどのような神経回路を介して伝達され、2 種類の行動が出力されているのかを明らかにしようとした。

先行研究により、NaCl への誘引行動の際、2 つの行動戦略には味覚神経 ASE と下流の介在神経 AIZ が関与することが示され、これらの行動戦略に必要な塩濃度情報は感覚神経 ASE で受容され、介在神経 AIZ へと伝達されると推定されている(lino and Yoshida, 2009)。しかし、ASE 神経と AIZ 神経の間には直接のシナプス接続はなく(図 1-5a)、ASE 神経で受容された塩濃度情報がどのような介在神経を経て AIZ 神経へと伝達されるかは不明で、また、AIZ 神経より下流の神経回路や、ピルエット行動とカーブ行動を制御する運動神経も同定されていない。

最近になって、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来の光感受性イオンチャネル ChR2(チャネルロドプシン-2)を線虫の特定の神経細胞に発現させ、光刺激によりそれらの神経を人為的に興奮させたときの行動応答が調べられた(Kocabas et al., 2012)。その結果、光刺激により、介在神経 AIY に ChR2 を発現させた線虫はピルエット応答と風見鶏応答の両方を行うことが可能で、介在神経 AIB に ChR2 を発現させた線虫はピルエット応答のみを行うことができ、介在神経 AIZ

もしくは運動神経 SMB、RME に ChR2 を発現させた線虫は風見鶏応答のみを行うことができることが明らかとなった(図 1-5d)。これらのことから、介在神経 AIY は 2 つの行動応答を引き起こすのに十分であること、介在神経 AIB はピルエット応答を、介在神経 AIZ と運動神経 SMB は風見鶏応答を引き起こすのに十分であることが示された。また、図 1-5a に示すように、NaCl への誘引行動に重要な感覚神経 ASE は介在神経 AIY や AIB とシナプス接続しており、AIY 神経は介在神経 AIZ と、AIZ 神経は運動神経 SMB とシナプス接続している。これらのことから、上記の神経細胞が塩走性の際の 2 つの行動応答の制御に関与することが予測される。本研究では、レーザーで神経破壊を破壊した線虫の NaCl に対する化学走性を解析することで、塩走性や塩走性を制御する 2 つの行動応答を制御する神経細胞の同定に取り組んだ。

#### 1.6.2. 匂いの濃度に依存した行動の変化を制御する神経回路メカニズムの探索

匂いの濃度に依存した嗜好性の変化は、ヒトを含むいくつかの生物種で経験的に知られている現象である(図 1-6) (Poucher, 1974; Laing et al., 1978; Charro and Alcorta, 1994)。この現象の非常に分かりやすい例として、匂い物質インドール(2,3-ベンゾピロール)が挙げられる。インドールは低濃度ではジャスミンのような花の良い香りがする。一方、高濃度になると大便臭のような不快な臭いがする(Poucher, 1974)。しかし、哺乳類の神経回路は非常に複雑であるために、この現象がどのような神経回路メカニズムで制御されているのかについては解析が難しく、ほとんど解明されていない。

昆虫においても、匂いの濃度により嗜好性変化が起こることが知られている(Charro and Alcorta, 1994)。ショウジョウバエ *Drosophila* はリンゴ酢など低濃度では誘引性の匂い物質に対して、その濃度が高くなるにつれて誘引行動を示さなくなる、もしくは忌避行動を示すようになる。高濃度のリンゴ酢でハエを刺激した時、低濃度で活性化が観察された糸球体に加えて、新たに別の糸球体も活性化することが明らかとなった。さらに、低濃度のリンゴ酢にのみ応答する糸球体と、高濃度のリンゴ酢にのみ応答する糸球体が、高濃度のリンゴ酢に対してそれぞれ誘引行動と忌避行動を出力していることが示された(Semmelhack and Wang, 2009)。しかし、これら 2



つの出力の統合が起きているのか、統合が起きているとすればそれがどこで起きているのかについては明らかにされていない。

線虫でも、イソアミルアルコールやベンズアルデヒドなどの低濃度では誘引行動を引き起こす匂い物質に対して、高濃度では誘引行動の減弱、もしくは弱い忌避行動がみられる(Bargmann et al., 1993)。そして、寒天プレート上に置く匂い物質の量を増やすことで匂いの濃度をさらに高くすると、線虫は誘引性の匂い物質に対して強い忌避行動を示すことが、広津崇亮博士によって見出された(広津、私信)。つまり、線虫もヒトと同様に、同じ匂い物質であっても濃度に応じて嗜好性が変わるのである。本研究では、単純な神経回路を持つ線虫の利点を生かし、匂い物質の濃度に依存した走性行動の変化をモデル系として、匂いの濃度に依存して嗜好性が変化する現象の神経回路レベルでの解明に取り組んだ。

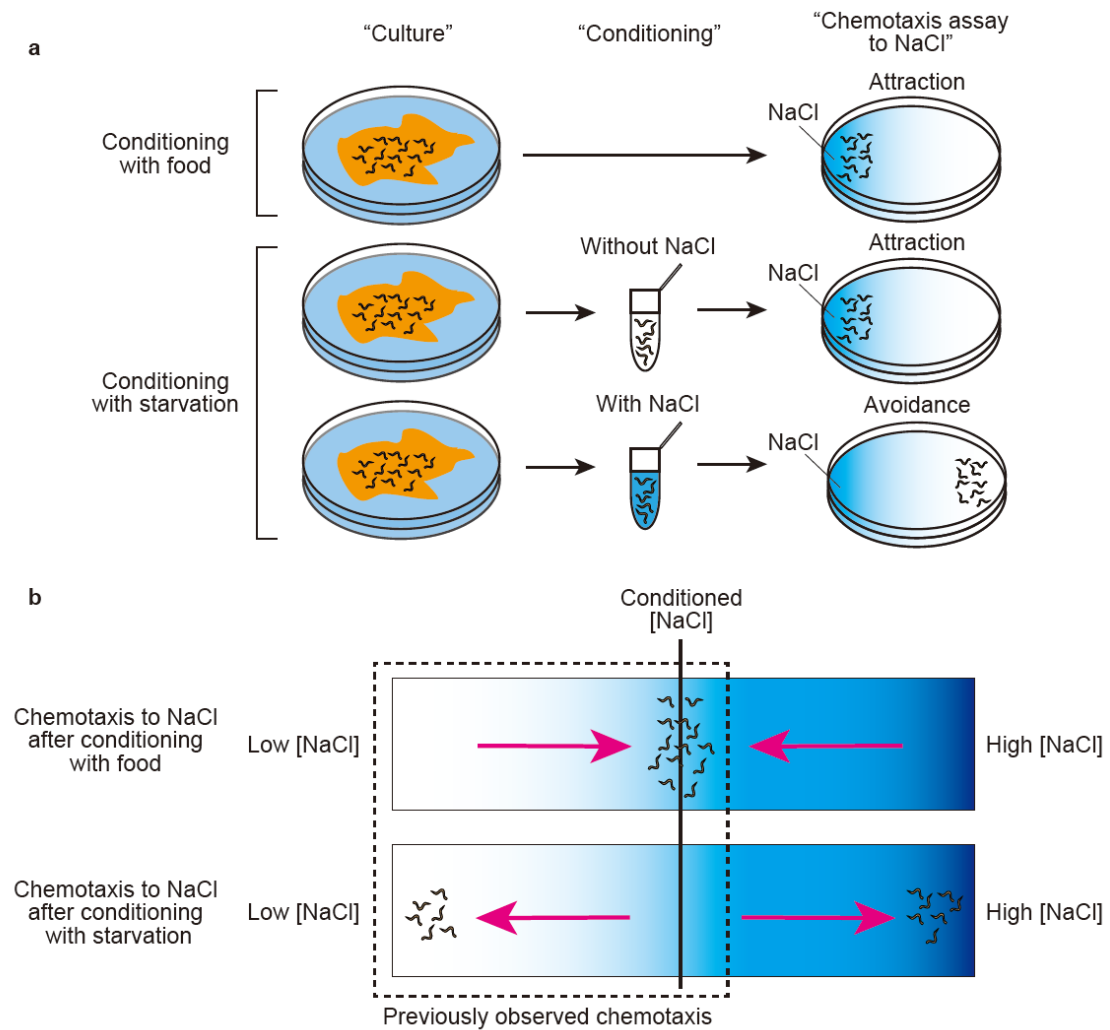


図 1-1 最近明らかになった線虫の塩走性と塩走性学習のパラダイム

(a) 従来から知られていた塩走性と塩走性学習。通常の培養条件（塩と餌の両方がある条件）で培養された線虫は、塩濃度勾配上で塩に誘引される（図の上段）。しかし、通常培養した後、塩を含んだバッファーの中で飢餓を一定時間経験させると、線虫は塩に対して忌避行動を示す（図の下段）。同じ飢餓条件であっても、塩を含まないバッファーの中に一定時間浸された線虫は、塩に誘引される（図の中段）。(b) 最近明らかになった線虫の塩走性と塩走性学習の行動。線虫は餌のある培地上で経験した塩濃度に向かい（図の上段）、飢餓とともに経験した塩濃度を避ける（図の下段）。従来からみられていた塩走性は、図の点線で囲った低塩濃度領域での走性に相当する。

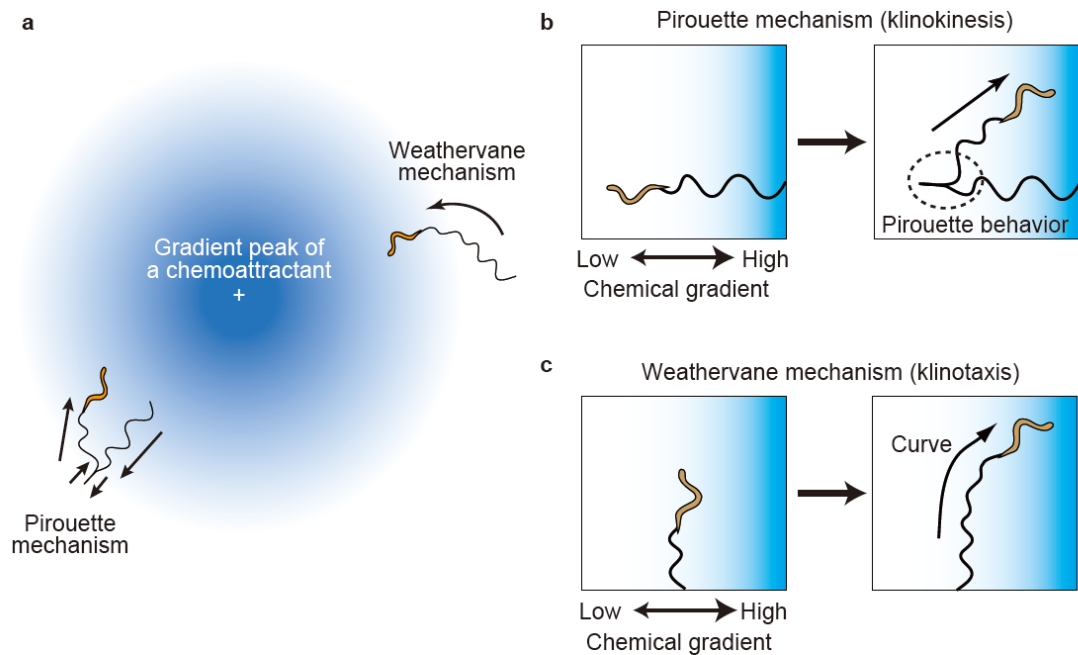


図 1-2 化学物質への誘引行動を調節する2つの行動機構  
 (a) 誘引性化学物質の濃度勾配上で、線虫が濃度勾配の高い方へ向かうように働くピルエット機構 (クリノキネシス) と風見鶏機構 (クリノタクシス)。+印は誘引性化学物質の濃度勾配のピークを示す。(b) ピルエット機構の模式図。ピルエット行動は、後退運動とターンからなる一連の行動のことで、方向転換の角度はランダムである。(c) 風見鶏機構の模式図。(a-c) 青色の勾配は、誘引性化学物質の濃度勾配を示す。

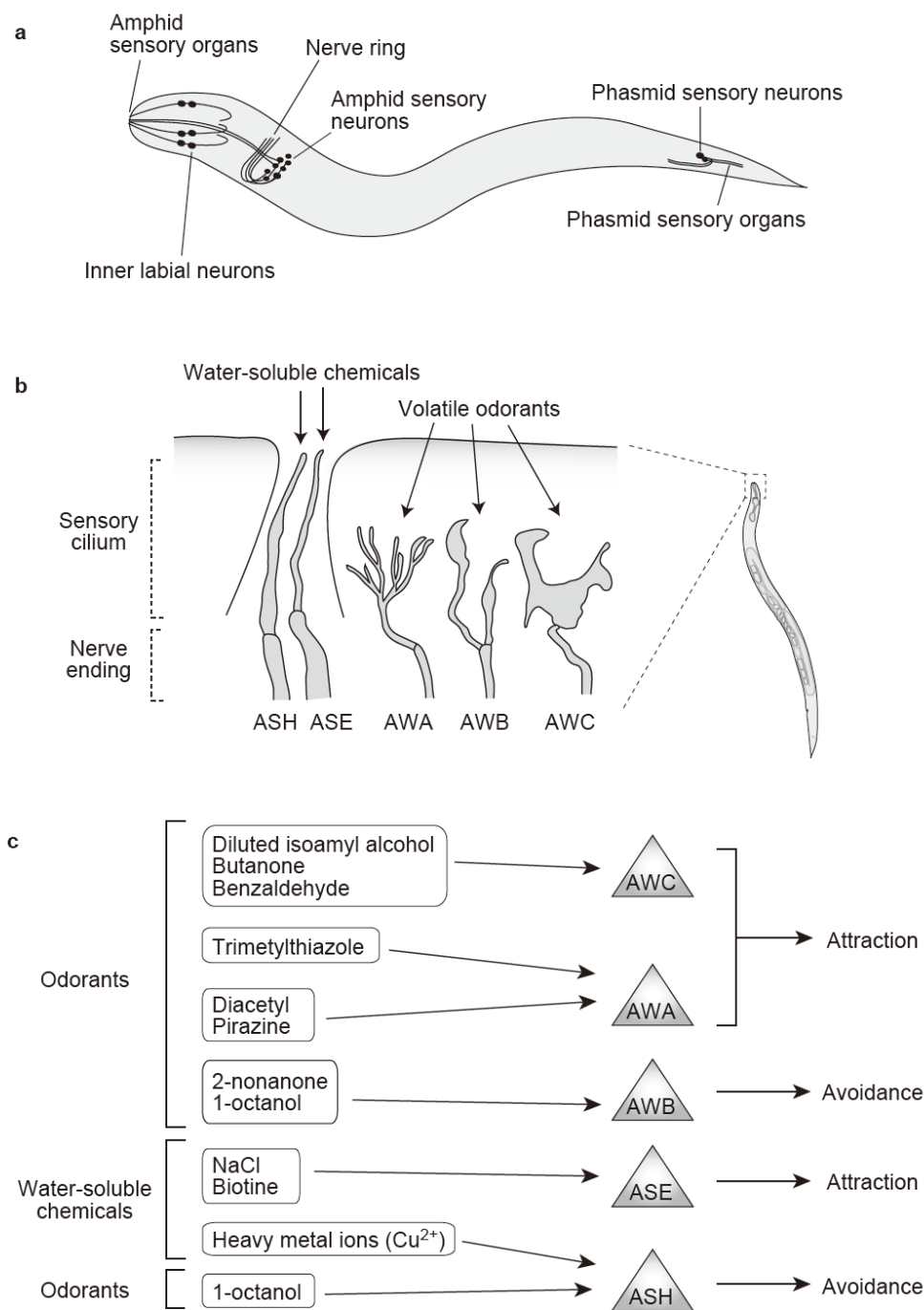


図 1-3 線虫における主な感覚器官とその特徴

(a) アンフィド感覚神経 (amphid sensory neuron) は前方に樹状突起を伸ばし、感覚繊毛 (b) を形成する。アンフィド感覚神経やインナーラビアル神経 (inner labial neuron) などの神経細胞の軸索が頭部に位置する神経環 (nerve ring) に集まり、ここで神経同士がシナプスを形成している。ファスミド感覚神経 (phasmid sensory neuron) はファスミドに樹状突起を伸ばしている。(b) 線虫の頭部のアンフィド感覚器の構造の模式図。様々な形態の感覚繊毛をもつ神経末端が集中している。(c) 化学物質の受容に関わる線虫のアンフィド感覚神経の機能分担。線虫の感覚神経は複数の化学物質を受容する。

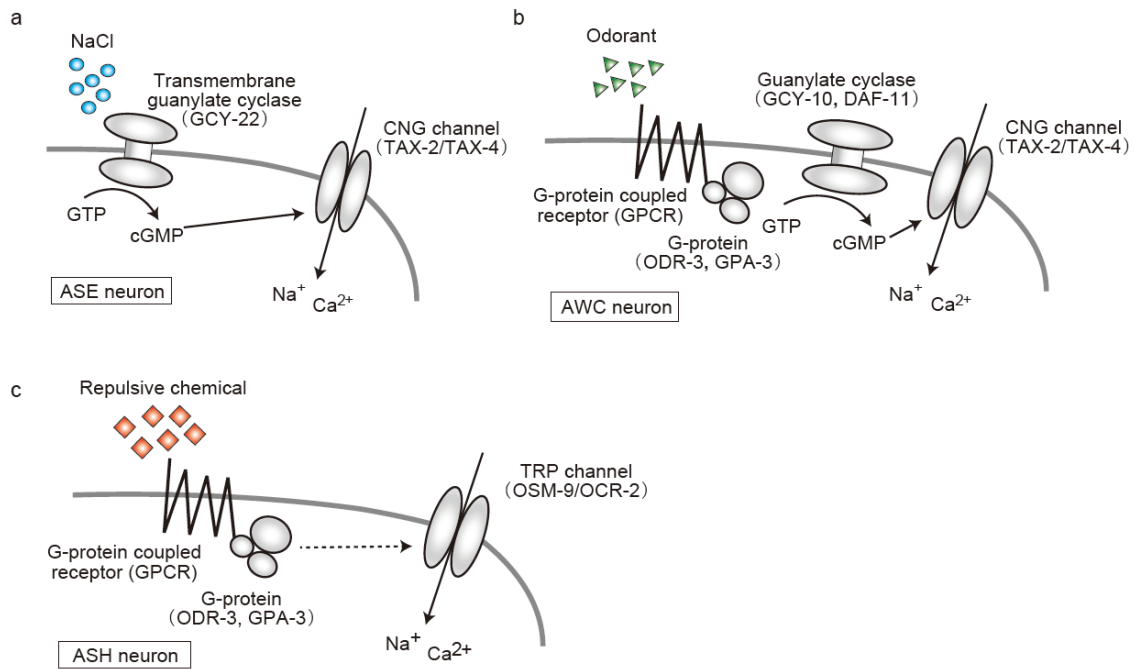


図 1-4 線虫の感覚受容の分子経路モデル  
 (a) 味覚神経 ASE において NaCl のシグナル伝達に関わる分子。(b) 嗅覚神経 AWC において匂い物質のシグナル伝達に関わる分子。(c) 感覚神経 ASH において忌避性の化学物質のシグナル伝達に関わる分子。

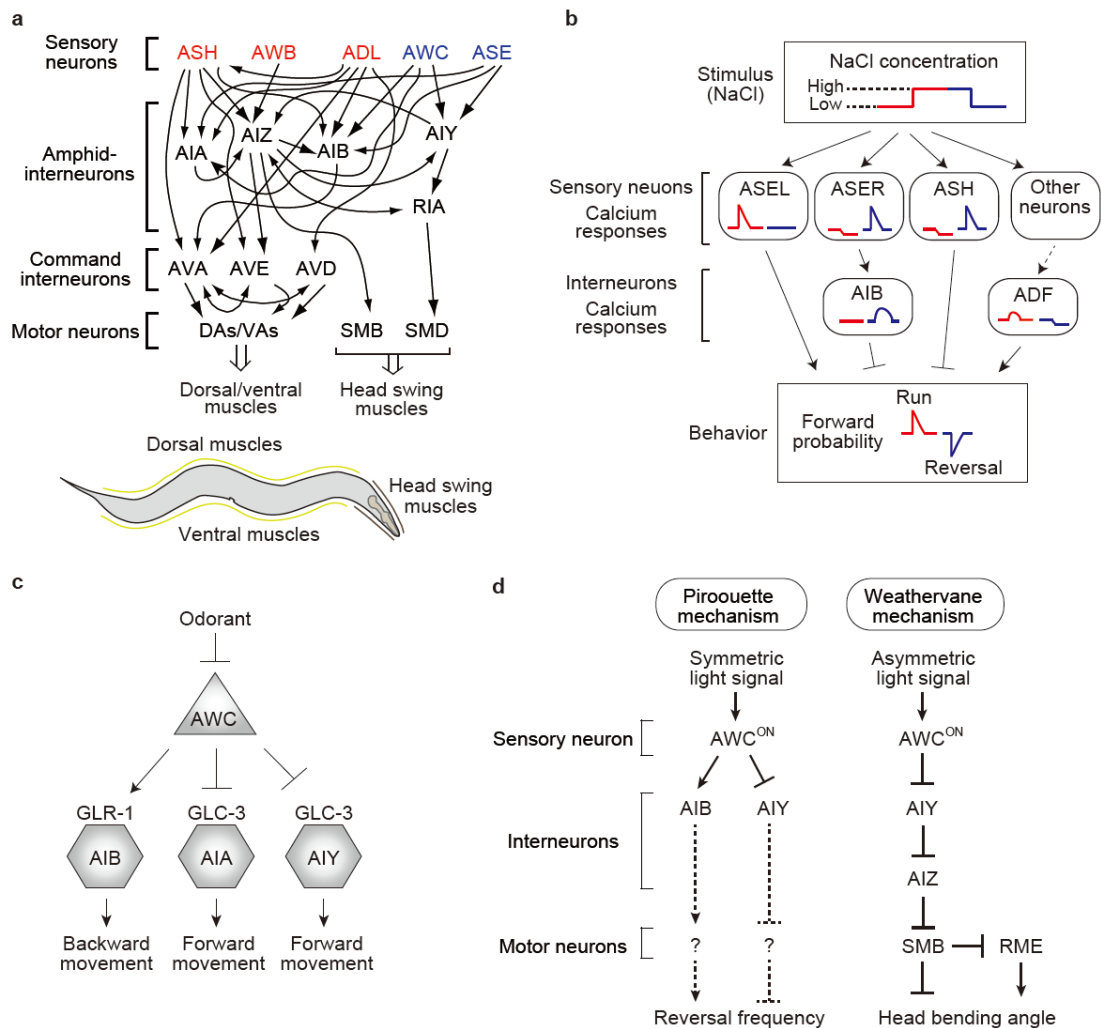


図 1-5 線虫の化学感覚に関わる神経回路

(a) 線虫の神経回路のうち、嗅覚や味覚に関与する部分を抜粋した。赤色と青色は、それぞれ忌避性の化学物質と誘引性の化学物質を受容する感覚神経を表す。感覚神経で受容された外部刺激の情報は、アンフィド介在神経を経て指令介在神経などに集められ、それが運動神経に伝達されることで、頭部の筋肉や体壁筋を制御し、行動が出力される。矢印は化学シナプス、もしくはギャップ結合を示している。(b) NaCl への誘引行動を制御する神経回路モデル。感覚神経 ASER と ASH は NaCl の濃度低下に応答し、ASEL 神経は NaCl の濃度上昇に応答する。感覚神経 ADF は NaCl の濃度上昇に応答するが、この応答は ADF 神経が直接、NaCl を感知しているものではなく、他の感覚神経からシグナルが伝達されたものである。ASER 神経の応答は介在神経 AIB に伝達される。これらの神経応答が前進運動 (Run) や後退運動 (Reversal) を調節することで、線虫は匂いに近寄ることができる。匂いの濃度低下により活性化した感覚神経 AWC は、AMPA 型グルタミン酸受容体 GLR-1 を介して介在神経 AIB を活性化し、グルタミン酸作動性 Cl<sup>-</sup> チャネル GLC-3 を介して介在神経 AIA、AIY を不活性化。これらの神経活動が前進運動もしくは後退運動を調節することで、線虫は匂いに近寄ることができる。三角形は感覚神経を、六角形は介在神経を表す。(d) チャネルロドプシン-2(ChR2) を用いた光刺激実験により推定されるピロエット応答と風見鶏応答を引き起こす神経回路モデル。図の左側に示した神経細胞は線虫の進行方向に対して対称な光勾配に応答して、後退運動の頻度を調節することでピロエット応答を行う。図の右側に示した神経細胞は線虫の進行方向に対して非対称な光勾配に応答して、首振り運動の角度を調節することで風見鶏応答を行う。介在神経 AIY はピロエット応答、風見鶏応答の両方を引き起こすのに十分である。

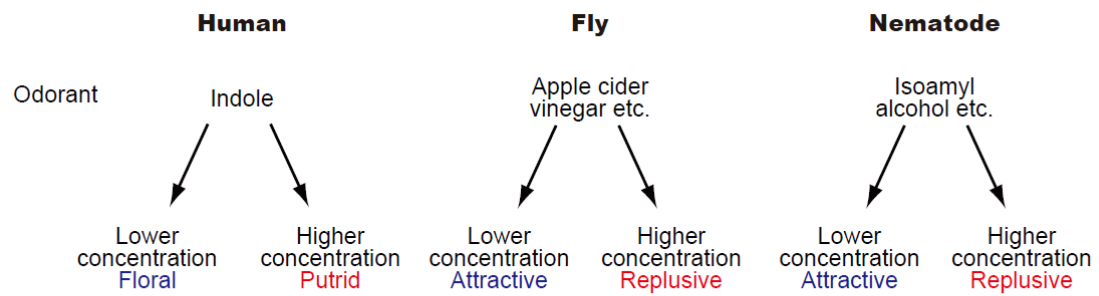


図 1-6 線虫もヒトやハエと同様に、匂いの濃度に依存して嗜好性が変化する  
 ヒトでは、ジャスミンに含まれている匂い物質インドールは低濃度では心地よい、花の香りがするが、高濃度では糞便臭がする。ショウジョウバエでは、低濃度のリンゴ酢に対して誘引行動を示すが、高濃度のリンゴ酢に対しては忌避行動を示す。線虫の嗅覚系においても、低濃度で誘引行動を示す匂い物質に対して、高濃度では忌避行動を示す現象がみられる。

## 第2章 材料と方法

### 2.1. 本研究に用いた線虫株

本研究に用いた線虫 *C. elegans* の株と用途は以下の通りである。Ex 株は導入したプラスミド DNA が染色体外に存在し、Is 株は導入したプラスミド DNA が線虫の染色体内(挿入箇所は特定していない)に挿入されていることを示している(詳細は第2章 2.7.参照)。

遺伝子型	用途
<i>Ex[odr-10p::venus]</i>	感覚神経 AWA の laser ablation
<i>Ex[gcy-10p::GFP]</i>	感覚神経 AWC の laser ablation
<i>Ex[str-1p::GFP]</i>	感覚神経 AWB の laser ablation
<i>Ex[ins-1p(short)::venus]</i>	介在神経 AIA の laser ablation
<i>Ex[glr-1p::nlsGFP] or Ex[npr-9p::venus]</i>	介在神経 AIB の laser ablation
<i>Ex[ttx-3p::GFP]</i>	介在神経 AIY の laser ablation
<i>Ex[lin-11p::nlsGFP]</i>	介在神経 AIZ の laser ablation
<i>Ex[zig-5p::venus]</i>	介在神経 RIV の laser ablation
<i>Is[ins-1p(short)::nlsGFP, ttx-3p::GFP]</i>	介在神経 AIY, AIB の laser ablation
<i>Ex[nmr-1p::nlsGFP]</i>	指令介在神経 AVA, AVE の laser ablation
<i>Ex[unc-47p::nlsGFP]</i>	運動神経 RME の laser ablation
<i>Ex[glr-1p::nlsGFP]</i>	運動神経 SMD の laser ablation
<i>Is[ceh-36p::mouse caspase1]</i>	感覚神経 AWC の機能を遺伝学的に破壊
<i>Is[str-1p::mouse caspase1]</i>	感覚神経 AWB の機能を遺伝学的に破壊
<i>Is[sra-6p::mouse caspase1]</i>	感覚神経 ASH の機能を遺伝学的に破壊
<i>Ex[str-2p::GCaMP2.1]</i>	感覚神経 AWC <sup>ON</sup> の Ca <sup>2+</sup> イメージング
<i>Ex[str-1p::GCaMP2.1]</i>	感覚神経 AWB の Ca <sup>2+</sup> イメージング
<i>Ex[sra-6p::GCaMP]</i>	感覚神経 ASH の Ca <sup>2+</sup> イメージング
<i>Ex[sro-1p::GCaMP2.1]</i>	感覚神経 ADL の Ca <sup>2+</sup> イメージング



この他に用いた変異体を以下に示す。

株名	遺伝子型	変異	変異の効果
Bristol N2	Wild-type		
CX2205	<i>odr-3(n2150)</i> V.	R180→stop	loss-of-function
NL332	<i>gpa-1(pk15)</i> V.	deleted exon 2-7	loss-of-function
NL334	<i>gpa-2(pk16)</i> V.	deleted exon 2-7	loss-of-function
NL335	<i>gpa-3(pk35)</i> V.	deleted exon 2-6	putative null
NL1137	<i>gpa-5(pk376)</i> X.	deleted exon 1-8	loss-of-function
NL1146	<i>gpa-6(pk480)</i> X.	deleted exon 6-8	loss-of-function
NL787	<i>gpa-11(pk349)</i> II.	deleted exon 1-4	loss-of-function
NL2330	<i>gpa-13(pk1270)</i> V.	deleted exon 1-8	loss-of-function
NL797	<i>gpa-15(pk477)</i> I.	deleted exon 2,3	loss-of-function
MT4866	<i>let-60(n2021)</i> IV.	G75→S	reduction-of-function
JN130	<i>let-60(n1046)</i> IV.	G13→E	gain-of-function
CX10	<i>osm-9(ky10)</i> IV.	Q173→stop	putative null
NM1380	<i>egl-30(js126)</i> I.	V180→M	gain-of-function
JN372b	<i>gpc-1(pe372)</i> X.	deleted exon1	putative null
JN5	<i>goa-1(n1134)</i> I.	M1→I	putative null
JN727	<i>tax-2(p691)</i> I.	P428→S	loss-of-function
JN730	<i>tax-4(p678)</i> III.	Q82→stop	putative null
MT7929	<i>unc-13(e51)</i> I.	R471→stop	reduction-of-function

## 2.2. 線虫の培養

本研究では、線虫株の培養は Brenner 博士が行った条件で行った(Brenner, 1974)。次頁に記述した組成の NGM プレートを作製し、24 時間ほど室温で静置後に、液体培養した大腸菌(NA22 株もしくは OP50 株)を NGM プレートに塗布した。大腸菌をさらに培養するために一晩 37°C の恒温槽に入れておいたプレートに、成体の親虫を数匹 (NA22 株の場合は 5-8 匹、OP50 株の場合は 2-3 匹) 置き、20°C の恒温槽で 4 日間培養した。実験により塗布した大腸菌株の種類を使い分けているが、特に表記がない場合は NA22 株を用いた。

### NGM プレート

3 g/l NaCl

2.5 g/l Polypepton

17 g/l Agar (台糖寒天パウダーSSP)

5mg/ml Cholesterol (in EtOH 1 ml/l)

25 mM Potassium phosphate (PH 6.0)

1 mM CaCl<sub>2</sub>

1 mM MgSO<sub>4</sub>

Potassium phosphate、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub> 以外を逆浸透水に加えてオートクレーブ滅菌し、60°C 程度になるまで冷ましてから、Potassium phosphate、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>を加えよく攪拌し、6cm シャーレに 10ml ずつ分注した。

## 2.3. 化学走性アッセイ

化学走性アッセイには次頁のような組成のアッセイプレートを用い、次頁のような組成の wash buffer で体表についた餌の大腸菌を洗い落した、富栄養状態の若い成虫の行動を室温 (23±1°C)で測定した。NaCl に対する化学走性を観測する場合は、下記の single worm tracker アッセイを、匂い物質に対する化学走性を観測する場合は、下記の population アッセイ、single

worm chemotaxis アッセイ、嗅覚順応(嗅覚可塑性)アッセイを行った。

#### アッセイプレート

20 g/l Bacto Agar

5 mM Potassium phosphate (PH 6.0)

1 mM  $\text{CaCl}_2$

1 mM  $\text{MgSO}_4$

#### Wash buffer

0.5 g/l gelatin

5 mM Potassium phosphate (PH 6.0)

1 mM  $\text{CaCl}_2$

1 mM  $\text{MgSO}_4$

Bacto Agar、gelatin それぞれを逆浸透水に加えてオートクレーブ滅菌し、60°C程度になるまで冷ましてから、Potassium phosphate、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$ を加えよく攪拌した。アッセイプレートは、9cm シャーレに 10ml ずつ分注し、6-8 時間室温に放置した後、使用するまでの間 4°Cで保存した。

#### 2.3.1. single worm tracker アッセイ

飯野博士が過去に行った方法に従って single worm tracker アッセイを行った(lino and Yoshida, 2009)。アッセイプレート上に NaCl の濃度勾配を形成させるために、行動アッセイの 1 時間前に、図 2-1a に示す grid フォーマットに 24 頁に示した組成のスポット用 NaCl 水溶液を 1  $\mu\text{l}$  ずつ 12 点スポットした。培養していたプレートから成虫を 1 匹回収し、下記のような組成の mock-conditioning buffer の中に入れ、室温で 1 時間放置した。この虫を NaCl の濃度勾配が形成された図 2-1a に示すプレートの中心に置き、20 分間行動を測定した。

### 2.3.2. population アッセイ

Bargmann 博士らが行った population assay を改変して population アッセイを行った (Bargmann et al., 1993)。集団での行動を測定する population アッセイには、主に図 2-1b に示すようなアッセイフォーマットを用いた。1 回の測定に 50-150 匹の成虫を用いた。中心に線虫を、両端に  $\text{NaN}_3$  を、左端に匂い物質を置き、1 時間後に図 2-1b に示す N +、N - の領域にいる虫の数を数えた。 $\text{NaN}_3$  は麻酔作用があるため虫の動きを止める目的で用いており、第 2 章 2.10.2. では  $\text{NaN}_3$  を使用せずに行動測定を行った。集団の線虫の行動を評価する指標として、 $\text{chemotaxis index} = [(N+) - (N-)] / [(N+) + (N-)]$  を用いた。また、図 4-4c と図 4-9a に示した結果については、それぞれ図 2-1c、図 2-1d に示すようなアッセイフォーマットを用いた。

### 2.3.3. single worm chemotaxis アッセイ

Troemel 博士らが行った avoidance assay を改変して single worm chemotaxis アッセイを行った (Troemel et al., 1997)。線虫がプレート上を這った跡が見えやすくなるように、プレートの蓋を開け 3-4 時間乾燥させたアッセイプレートを用いて、図 2-1e に示すように匂い物質と 1 匹の成虫を置き、1 時間後に虫の行動の軌跡を観察した。図 2-1e のように等間隔に区切った領域にそれぞれ点数をつけ、線虫が通った領域の点数を加算した点数を single-worm chemotaxis index とした。ただし、同じ点数の領域を何度通過しても一度しかその点数を加算しないこととした。

### 2.3.4. 嗅覚順応(嗅覚可塑性)アッセイ

広津博士らが以前行った方法を改変して嗅覚順応(嗅覚可塑性)アッセイを行った (Hirotsu T., 2009)。線虫を mock-conditioning buffer (図 4-3a の mock-conditioned)、もしくは匂い物質を mock-conditioning buffer で 10000 倍に希釈した conditioning buffer (図 4-3a の conditioned) に 1 時間浸した後、100 倍希釈した同じ匂い物質に対する化学走性を上述の population アッセイで測定した。

#### スポット用 NaCl 水溶液

200 mM NaCl

5 mM Potassium phosphate (PH 6.0)

1 mM CaCl<sub>2</sub>

1 mM MgSO<sub>4</sub>

#### Mock-conditioning buffer

5 mM Potassium phosphate (PH 6.0)

1 mM CaCl<sub>2</sub>

1 mM MgSO<sub>4</sub>

オートクレーブ滅菌した逆浸透水に Potassium phosphate、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>を加えた。さらに、スポット用 NaCl 水溶液には、オートクレーブ滅菌した 1M NaCl を上述の濃度になるように加えた。

## 2.4. プラスミドコンストラクション

標的神経細胞の可視化や細胞特異的レスキュー実験、細胞特異的ノックダウン実験などを行うために、Gateway クローニングシステム (Invitrogen) を用いて、細胞特異的に発現するプロモーターに遺伝子の ORF (open reading frame)を結合させ、プラスミド DNA を作製した。プロモーターが挿入された pENTR プラスミドと、遺伝子の ORF と *unc-54* 遺伝子の 3'-UTR をもつ pDEST プラスミドを混合し、組換え反応(LR 反応)により目的の pG プラスミドを作製した。

詳細は飯野研究室のホームページを参照。

[http://molecular-ethology.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/Gateway/Gateway\\_overview1\\_jp.html](http://molecular-ethology.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/Gateway/Gateway_overview1_jp.html)

#### 2.4.1. pENTR プラスミドの作製

1 段階目の PCR により、線虫のゲノムから目的のプロモーター領域を含む DNA 断片を増幅し、2 段階目の PCR により、組み換え反応(BP 反応)のための配列 attB1 と attB2 を付加した。

1 段階目の PCR に用いたプライマーには、それぞれ 5'末端にアダプター配列をつけたプライマーを用い、2 段階目の PCR には共通したプライマーを使用した。

1 段階目 Forward プライマー: 5'-AAAAAGCAGGCT + 特異的配列-3'

1 段階目 Reverse プライマー: 5'-AGAAAGCTGGGT + 特異的配列-3'

2 段階目 Forward プライマー: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'

2 段階目 Reverse プライマー: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'

BP 反応により、プロモーター領域の PCR 産物を pDONR201 プラスミドに組み込んだ。

pENTR プラスミドの作製に使用したプライマーは以下の通りである。

プラスミドの名称	forward プライマー	reverse プライマー
pENTR- <i>flp12p</i>	AAAAAGCAGGCTgccataacgagt cggaacta	AGAAAGCTGGGTgtttactgaaagttcag cttgtgtg
pENTR- <i>unc47p</i>	AAAAAGCAGGCTcgaaactgccaa tttgtcc	AGAAAGCTGGGTcgctgtcgtctcacagg a

作製した pENTR プラスミドが過去の報告通り発現を誘導するかについては、以下の手順で確認を行った。まず、LR 反応(第 2 章 2.4.3.参照)により蛍光タンパク質 Venus もしくは nlsGFP に各種プロモーターをつなげたコンストラクトを作製した。作製したプラスミドをマイクロインジェクション(第 2 章 2.5.参照)により野生型線虫に導入し、蛍光を指標に細胞同定を行った。上記以外で本研究に用いた pENTR プラスミドは飯野研究室の方々が作製したものを使用した。

#### 2.4.2. pDEST プラスミドの作製

PCR により、遺伝子の ORF の両端に制限酵素認識配列が付加されるように増幅し、pPD-DEST のマルチクローニングサイト(NheI、KpnI)に挿入した。mouse caspase1 ORF は若林篤光博士から譲り受けたプラスミドから増幅した。PCR による増幅に使用したプライマーは以下の通りである。

プラスミドの名称	forward プライマー	reverse プライマー
pDEST-mouse caspase1 (mCasp1)	ATAgctagcCCATGGCTGACAA GATCCT	ATAggtaccCTGGATTCTTCGTTT AATGTCC

pDEST-*odr-3*（細胞特異的レスキュー実験に使用した *odr-3* cDNA）は國友博文博士から譲り受けた。pDEST-venus、pDEST-nlsGFP、pDEST-mRFP は田中寿子氏により作製された。

#### 2.5. マイクロインジェクション

Mello 博士らが行った方法に従って雌雄同体の線虫の生殖線にプラスミド DNA をマイクロインジェクションし、染色体外に遺伝子(extrachromosomal array)が導入された形質転換体(Ex)を作製した(Mello et al., 1991)。プラスミド DNA は Qiagen Gel Extract Kit(Qiagen)を用いて精製した。インジェクションする際のプラスミド DNA の濃度は実験ごとに異なり、標的神経細胞の可視化に用いたレポータープラスミドは 10-100 ng/μl、遺伝学的な細胞破壊実験に用いたプラスミドは 100 ng/μl、フォスミド(WRM0641cC03)を含む *odr-3* 変異体の細胞特異的レスキュー実験に用いたプラスミドは 10 ng/μl になるように調整した。なお、変異体の細胞特異的レスキュー実験では、インジェクションマーカーである pG-*myo-3p::venus* (体壁筋で Venus が発現する)を 20 ng/μl で同時に注入し、変異体の異常の表現型をレスキューさせるプラスミドと空ベクターである pPD49.26 プラスミドの 3 種類を合計した濃度が 100 ng/μl になるように調整した。

## 2.6. レーザーアブレーション

Avery博士らが行った方法に従って、窒素パルス色素レーザーVSL-337ND-S(Laser Science, Inc.)を取り付けた顕微鏡(Zeiss Axio Skop)で神経破壊実験を行った(Avery and Horvitz, 1987)。神経破壊を行う際、破壊する神経細胞に応じて2齢幼虫から3齢幼虫の線虫を用いた。標的の神経細胞を可視化するために、蛍光色素DiO (3,3'-di-octadecyloxacarbocyanine) を用いて頭部の感覚神経ASI、ADL、ASHなどを化学染色する (dye filling) か、各種プロモーターにより神経細胞特異的に蛍光タンパク質を発現させた。図2-1aもしくは図2-1eのようなアッセイプレート上でレーザー照射後24時間以上経過した成虫の行動を評価した。図2-1aのアッセイフォーマットは後述の2.10.1. single worm tracking systemでNaClに対する走性行動を測定するために、図2-1eのアッセイフォーマットは高濃度のイソアミルアルコールに対する走性行動を測定するために用いた。蛍光タンパク質を発現させた形質転換体と可視化した神経細胞の対応関係は、第2章2.1. に記述している。

## 2.7. 遺伝学的な細胞破壊

標的の神経細胞を破壊した線虫を大量に用意するために、特定の神経細胞にのみmouse caspase1 (以下、mCasp1)を発現させた形質転換体を作製した。カスパーゼ(caspase)は線虫から哺乳動物に至るまで存在するタンパク質で、多くのカスパーゼがアポトーシスのシグナル伝達経路を活性化することで細胞死を誘導する。caspase1はICE(interleukin-1 $\beta$  converting enzyme)とも呼ばれているように、サイトカイン(interleukin-1 $\beta$ )の活性化を通じて炎症誘導に働くのが主な役割だとされているが、実際、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(Miura et al., 1993)。

mCasp1 に各種細胞特異的プロモーターをつなぎ、特定の細胞だけにアポトーシスを誘導するプラスミドを作製した。mCasp1 cDNAは全長1209 bpで、C57BL/6マウスのcDNAライブラリーからPCRにより増幅したものを若林篤光博士から譲り受けた。目的の神経細胞がアポトーシスしているかの指標は、神経細胞によって以下の2種類の確認方法を使い分けた。感覚神経ASHの場合は、蛍光色素Dilにより形質転換体のASH神経が染色されないことを指標に調べた。感覚



神経AWC、AWBの場合は、形質転換体を作製する際、それらの神経に蛍光タンパク質が発現するプラスミドを同時にマイクロインジェクションしておき、標的の感覚神経で蛍光タンパク質の蛍光が観察されないことを指標に調べた。これらの指標をもとに、得られた形質転換体(Ex株)の中から神経破壊の効率が高かった株を選び出し、その株に紫外線を照射することで染色体内にmCasp1遺伝子が挿入された組換え体(Is株)を作製した。Ex株では、染色体外に存在するmCasp1遺伝子が細胞分裂の際に抜け落ちてモザイク状態になる場合があるが、染色体内に遺伝子挿入することで、モザイク状態にならず遺伝子発現が安定し、神経細胞のアポトーシス効率が上昇すると考えられる。作製したIs株は、第2章2.1.に記述している。

## 2.8. 遺伝子機能の細胞特異的ノックダウン(RNAi)

特定の神経細胞で標的遺伝子の機能をノックダウンする目的で、Esposito 博士らが行った方法を改変して、細胞特異的 RNAi を行った(Esposito et al., 2007)。特定の神経細胞に発現を誘導するプロモーターと標的遺伝子の一部分(イントロンを含む約 2 kb の領域)を、それぞれプラスミド DNA とゲノム DNA から PCR で増幅した後、それらの遺伝子産物を PCR で結合させた(図 2-2)。

プロモーター領域は pENTR-*sra6p* もしくは pENTR-*str1p* を鋳型として下記の Pf プライマーと Prs もしくは Pra プライマーを用いて PCR で増幅した。標的遺伝子のコーディング領域は線虫のゲノム DNA を鋳型に下記の Tr、Tf プライマーを用いて PCR で増幅した(ここまでの 1<sup>st</sup> ステップ)。増幅したプロモーター領域と標的遺伝子のコーディング領域の遺伝子産物を混合し、第 1 ステップの PCR で用いた Pf プライマーと、Tr(センス鎖を作製するとき)もしくは Tf(アンチセンス鎖を作製するとき)プライマーで増幅することで、プロモーターとコーディング領域を結合させた(2<sup>nd</sup> step)。PCR による増幅に使用したプライマーは次頁の通りである。

プライマー名称	塩基配列
sra-6p_Pf	tcatggtcagtatttgagaag
sra-6p_Prs	TCCGTTGCTATGAAGAATTgggtggcaaaatctgaaa
sra-6p_Pra_2	GCGCTACAGACACTAATCAGtgggtggcaaaatctgaaa
str-1p_Pf	GGCTtgctttattatgggtatttgg
str-1p_Prs	TCCGTTGCTATGAAGAATTtagtcaaatagatgaagtttgt
str-1p_Pra	GCGCTACAGACACTAATCAGtagtcaaatagatgaagtttgt
odr-3_Tr	ctgattagtgtctgtagcgc
odr-3_Tf	aattcttcatagcaacggattc

## 2.9. Ca<sup>2+</sup>イメージング

### 2.9.1 Ca<sup>2+</sup>イメージング

1 波長励起(489nm)1 波長測光(509nm)のカルシウムセンサーG-CaMP(Nakai et al., 2001)を目的の感覚神経に発現させた。測定に用いた線虫株は第 2 章の 2.1.に表記している。大腸菌 OP50 株を餌として培養した成虫をシリコーン樹脂の一種ポリジメチルシロキサン (polydimethylsiloxane, PDMS)でできた図 2-3 の微小流路(microfluidic device)にはめ込み、半固定状態にした(Chronis et al., 2007)。測定を行う前に、5 分間、下記の組成の imaging buffer を鼻先に触れさせておいた。匂いを与えたとき、除去したときの神経応答を測定するために、図 2-3 のように流路を切り替えることで、線虫の鼻先に imaging buffer もしくは匂い物質を溶解させた imaging buffer のいずれかが当たるように調節した。imaging buffer の組成は次頁に記述する。

### Imaging buffer

350 mOsm glycerol

5 mM Potassium phosphate (PH 6.0)

1 mM  $\text{CaCl}_2$

1 mM  $\text{MgSO}_4$

glycerol を逆浸透水に加えてオートクレーブ滅菌し室温になるまで冷ましてから、Potassium phosphate、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$ を加えよく攪拌した。glycerol はバッファーを線虫の浸透圧と同じにする目的でバッファーに加えている(Suzuki et al., 2008)。

### 2.9.2 蛍光画像の取得と解析

蛍光画像の取得には、63倍の油浸対物レンズを取り付けた倒立顕微鏡(Leica DMI6000 B)にImagEM CCDカメラ(Hamamatsu photonics)を装着したものをを用いた。ソフトウェアMetamorph(Molecular devices)を用いて、蛍光画像は露光時間500 msecで800 msec毎に撮影、保存した。取得した各々の画像の神経細胞の細胞体を対象領域(ROI, region of interest)として、ROIの蛍光強度からバックグラウンド(線虫の体のGCaMPが発現している神経細胞以外の場所の蛍光強度)を差し引いた値を「細胞体の蛍光強度(F)」と定義した。匂い刺激を行う直前10秒間の細胞体の蛍光強度をF0として、F0に対する各画像の細胞体の蛍光強度の変化率 $\{100(\text{F}-\text{F}_0)/\text{F}_0\}$ をグラフにプロットした(図4-8)。統計学的な解析を行うために、匂いを与える瞬間を境界にした前後10秒間と、匂いを除去する瞬間を境界にした前後10秒間の細胞体の蛍光強度の平均値をそれぞれ算出し、前後の細胞体の蛍光強度の平均値をDunnett検定で比較した。

## 2.10. トラッキングシステム

線虫の行動を詳細に解析するために、カメラの画像から線虫の重心座標を抽出してくるトラッキングシステムを用いた。塩の化学走性の解析には、1匹の線虫の化学走性を比較的高解像度で観察することが可能な **single worm tracking system** を用い、匂いの化学走性の解析には、複数の線虫の化学走性を同時に観察することができる **multi worm tracking system** を用いた。

### 2.10.1. Single worm tracking system

透過照明架台(SZX-ILLB)を取り付けた実体顕微鏡(Olympus SZ60)と、電動ステージ(Chuo-Seiki SS-150)、ビデオカメラ(Tokyo Electronic Industry CS3330Bi)を用いた。Capture kit MV imaging board (Media Cybernetics)を使って線虫の画像を取り込み、Image Pro Plus (Media Cybernetics)により線虫の重心座標を抽出し、記録した。また、アッセイプレート上を這っている線虫が顕微鏡の視野からはみ出ないように、Shawn Lockery博士から頂いたプログラムを改変したVisual Basic programにより電動ステージにコマンドが送られるようにした。これらの機器のセットアップは全て飯野雄一教授が行った。画像の撮影間隔は0.4-0.6秒で、図2-1aの+印にNaClをスポットしたアッセイプレートの上に置いた1匹の線虫の行動を20分間測定した。なお、測定時間の20%以上の間動いていた虫のデータのみを後の解析に用いた。本論文の第3章では、1匹の線虫のNaClに対する走性行動を評価する指標として、 $\text{gustatory chemotaxis index} = \{(\text{NaClの勾配のピークから}\sqrt{2/\pi}\text{ cm 以内の領域にいた時間}) - (\text{その領域以外にいた時間})\} / (\text{行動測定の時間の総和})$ を用いた。距離の閾値( $\sqrt{2/\pi}\text{ cm}$ )は、図2-1aに示した4つの+印で囲まれた2 cm四方の正方形において、+印を中心に描いた円の面積の合計と残りの面積が等しくなるような値である。

### 2.10.2. Multi worm tracking system

デジタルカメラLw575M (株式会社ARGO)と、デジタル電源PD2-3024 (CCS株式会社)に接続されたLED照明HPR-150SW (CCS株式会社)を用いて、50-150匹の線虫が置かれたアッセイプレート全体の画像を0.5秒間隔で60分間撮影、保存した。Multi worm tracking systemを用いた解析

の際は、線虫の動きを止めるために用いる $\text{NaN}_3$ は使用していない。寒天プレートに照明を均一に当てることは難しく画像の中で光ムラができるため、全ての画像に対してバックグラウンドを差し引き(1枚目の画像をスムージング処理し、取得した各々の画像からこの画像を差し引き)、処理後の画像を二値化することでオブジェクト(線虫)の重心座標を抽出した。長さが1mm以上のトラックを線虫の軌跡とし、以降のデータ解析に用いた。画像処理は、Lucam Capture(株式会社ARGO)とOpenCVをベースにしたカスタムソフトウェアLuCam Tracker 2.1.1で行った。

LuCam Tracker 2.1.1は飯野雄一教授に作製して頂いた。

### 2.10.3. worm tracking system により得られたデータの解析

線虫は通常、前進運動を行っており、稀に後退運動やターン(turn) を使って方向転換する。そこで、single worm tracking system、multi worm tracking system により得られた線虫の座標データをラン(run)とそれ以外(ターンや後退運動) に分けて解析を行った(lino and Yoshida, 2009)。また、図 2-4a のように線虫の進行方向と、化学物質を置いた(スポットした)点と線虫を結ぶ線のなす角度  $\theta$  を bearing とした。

2つの行動戦略を定量化する際に、刺激の種類が水溶性物質 NaCl(第3章)の場合と匂い物質(第4章)の場合で異なる方法を用いた。ピルエット応答の際、線虫は進行方向の化学物質の濃度勾配の変化に応答する(Pierce-Shimomura et al., 1999)。一方、風見鶏応答の際、線虫は進行方向に対して垂直な方向の化学物質の濃度勾配の変化に応答する(lino and Yoshida, 2009)。それゆえに、NaCl に対する走性の際には、ピルエット応答を定量化するために、線虫が感じる進行方向の NaCl の濃度の時間的变化(図 2-4b の  $dC/dT$ )を、風見鶏応答を定量化するために、線虫の進行方向と垂直な方向の NaCl の濃度変化(図 2-4b の Normal gradient)を用いた。一方、匂いに対する走性の際には、ピルエット応答を定量化するために、 $\cos \theta$ (Bearing の匂いの方向の成分)を、風見鶏応答を定量化するために、 $\sin \theta$ (Bearing の匂いの方向に対して垂直な方向の成分)を用いた。図 2-4c(NaCl の場合)、図 2-4d(匂い物質の場合)に示すように、 $dC/dT$  もしくは  $\cos \theta$  に対してピルエット行動が起こる確率を計算した。刺激が NaCl の場合は、 $\{dC/dT \text{ が負の値のときにピルエットが起きた確率(Probability of Pirouette の値)}\} - \{dC/dT \text{ が正の値のときにピルエットが起$

きた確率(Probability of Pirouette の値)) を gustatory pirouette index と定義し、刺激が匂い物質の場合は、回帰直線の傾きに-1 をかけた値を olfactory pirouette index と定義した。図 2-4e(NaCl の場合)、図 2-4f(匂い物質の場合)に示すように、normal gradient もしくは  $\sin \theta$  に対して、線虫が 1mm 進むにあたりカーブする角度 (図 2-4a の Curving rate)を計算し、回帰直線の傾きの値をそれぞれ gustatory weathervane index、olfactory weathervane index と定義した。NaCl に対する走性の際は、single worm tracking system を用いたため、個体ごとに gustatory pirouette index と gustatory weathervane index を算出し、平均した値を第3章に示している。ただし、single worm tracking system で得られたデータから gustatory weathervane index を算出すると、個体ごとに回帰直線の信頼性にばらつきが生じる。そこで、個体ごとの gustatory weathervane index を平均する場合は、 $dC/dT$  の偏差二乗和を用いて個体ごとの gustatory weathervane index の重みに差をつけて加重平均を取った。匂い物質に対する走性の際は、multi worm tracking system を用いたため、1 回のアッセイごとに olfactory pirouette index と olfactory weathervane index を算出し、平均した値を第 4 章に示している。匂いの物質の勾配がないときのピルエットが起こる確率として、図 2-4d の回帰直線の y 切片の値( $\cos \theta = 0$  のときは、線虫が匂いの方向に対して垂直に進んでいるため、このときの進行方向の匂いの勾配は 0 でありピルエット応答に影響しないと考えられる)を olfactory basal pirouette frequency と定義し、アッセイごとの olfactory basal pirouette frequency の平均の値を第 4 章のコンピューターシミュレーションに用いた。worm tracking system により得られたデータの解析のプログラムは、全て飯野雄一教授に作製して頂いた。

## 2.11. コンピューターシミュレーション

コンピューターシミュレーションに使用したプログラムは、全て飯野雄一教授に作製して頂いた。コンピューターシミュレーションでは、モデル線虫の存在位置と進行方向が500 msec毎に変わるようにした。モデル線虫の動きはランダムウォーク理論(correlated random walk model)に基づいてモデル化され、図2-1bに示すような寒天プレートフォーマットの中央から、0.22 mm/秒(高濃度のイソアミルアルコール勾配上での野生型線虫の平均速度)で進むものとした。モデル

線虫のcurving rate(線虫が1 mm進むにあたりカーブする角度)は、次式のような1次の自己回帰モデルにより決定した。

$$\phi_i = k\phi_{i-1} + \xi_i$$

$k = 0.933$  は文献(lino and Yoshida, 2009)のSupplemental Fig. 2Aに示す減衰率から算出した崩壊定数である。 $\xi_i \in N(0,11.6)$  はガウシアンホワイトノイズで、標準偏差の値も(lino and Yoshida, 2009)の実際の線虫の値から算出した。風見鶏応答が用いられた際のカーブ行動のバイアスは次式のようにcurving rateを加算した。

$$\psi_i = \phi_i + \alpha \sin \theta$$

$\psi_i$  は実際のcurving rateを、 $\theta$  は匂いを置いた点と線虫の進行方向との角度(図2-4aのbearing)を表し、 $\alpha$  は図4-4eに示したolfactory weathervane indexを用いた。

ピルエット行動は、図2-5aに示したolfactory basal pirouette indexに基づいた確率で起こるものとした。ピルエット行動が起きた後の新たな進行方向( $\theta$ )は、図2-5bに示した分布からランダムに値を取り出し、 $\Delta \theta$  の値を加算した。ピルエット応答が用いられた際、ピルエット行動は図4-4dに示すolfactory pirouette indexに基づいた頻度で起こるようにした。

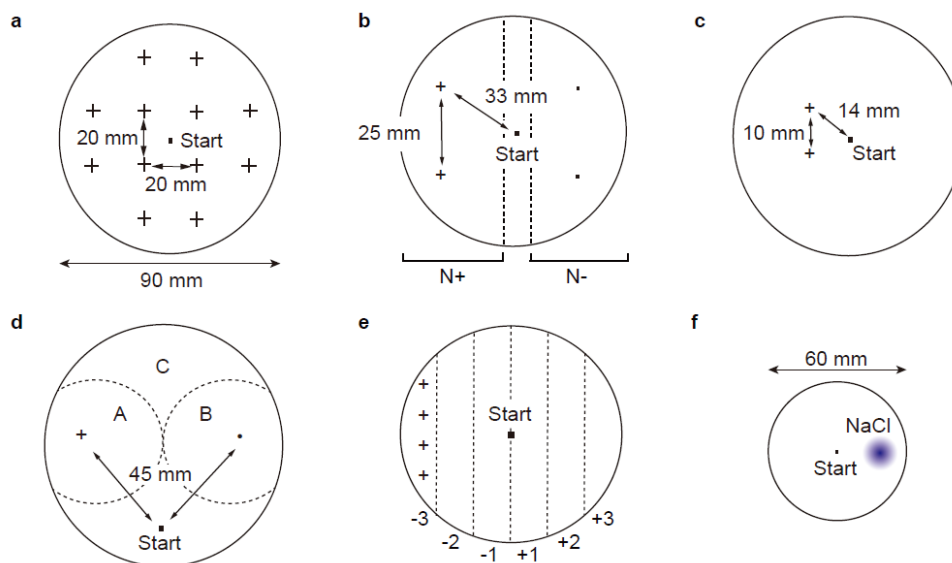


図 2-1 化学走性行動の測定に用いたプレートのアッセイフォーマット

(a) 第 3 章の NaCl に対する行動を測定するのに用いたアッセイフォーマット。+印に 200 mM NaCl 1  $\mu$ l をそれぞれスポットし、1 時間後に、プレートの中心に 1 匹の線虫を置いた (第 2 章 2.3.1. 参照)。(b) 匂い物質に対する走性行動を測定するのに用いたアッセイフォーマット (第 2 章 2.3.2. 参照)。(c) 図 4-4c で低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動の際の風見鶏応答を測定するのに用いたアッセイフォーマット。本研究で主に用いた図 2-1b のアッセイフォーマットに比べて、線虫とより接近した位置 (+印) に  $10^2$  倍希釈のイソアミルアルコールを 1  $\mu$ l 置いた。(d) 図 4-9a で化学走性を測定するのに用いたアッセイフォーマット。+印に希釈したイソアミルアルコール 1  $\mu$ l を置き、線虫の動きを止めるために両端に麻酔作用のある  $\text{NaN}_3$  を置いた。1 時間後にプレートの各領域 (A, B, C) の虫の数をカウントした。Chemotaxis index =  $(A - B) / (A + B + C)$ 。(e) 神経破壊した線虫の single worm chemotaxis アッセイ (第 2 章 2.3.3. 参照) に使用したアッセイフォーマット。原液のイソアミルアルコール 5  $\mu$ l を 4 つの + 印にそれぞれ置き、プレートの中心に神経破壊を行った線虫を 1 匹置いた。点線で区切った各領域に -3 から 3 までの点数をつけ、single worm chemotaxis index を算出した (第 2 章 2.3.3. 参照)。(f) Tomioka et al., 2006 で、介在神経 AIA、AIB が塩走性に必要かどうかを調べるために用いられた 6 cm シャーレのアッセイフォーマット。プレートの右端に 50 mM NaCl を含んだ寒天プラグを置いて塩濃度勾配を形成させた後、プレートの中心に複数の線虫を置き 15 分後の行動を測定した。



#### Templates and primers

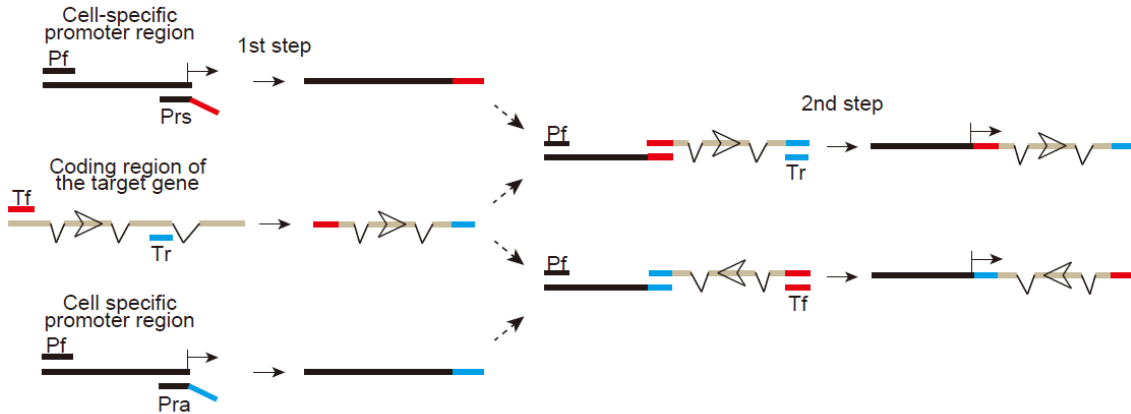


図 2-2 細胞特異的ノックダウン実験のための遺伝子産物のコンストラクション

ノックダウンする遺伝子のゲノム配列の一部 (2 kb 程度) と使用するプロモーターのゲノム配列をそれぞれ増幅する (1st step)。細胞特異的プロモーターは Pf (Promoter forward) プライマーと、Prs (Promoter reverse sense) プライマーもしくは Pra (Promoter reverse antisense) プライマーのいずれかを用いて増幅し、2 種類のコンストラクトを作製する。それぞれの細胞特異的プロモーターに、ノックダウンする遺伝子のゲノム配列が繋がるように増幅する (2nd step)。作製したコンストラクトを混合し、線虫にマイクロインジェクション (第 2 章 2.5.) することで、細胞特異的にノックダウンする遺伝子のセンス鎖とアンチセンス鎖を発現させる。

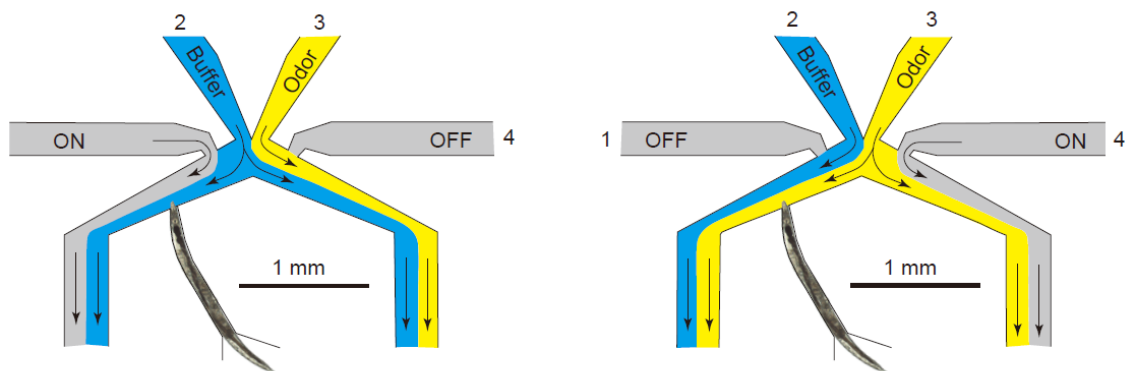


図 2-3  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行う際の匂い刺激の方法

1 と 4 の微小流路にはグリセロールが含まれていない imaging buffer (組成は第 2 章 2.9.1. 参照) を、2 の微小流路には imaging buffer を、3 の微小流路にはイソアミルアルコールを溶かした imaging buffer を流し込んだ。2 と 3 の流路は常にバッファーが下方に向かって流れており、1 と 4 の流路に流れるバッファーの ON、OFF を切り替えることで、線虫の鼻先に、匂いのないバッファーが当たる状態 (左図の状態) と、匂いが溶けたバッファーが当たる状態 (右図の状態) を作り出すことができる。1、4 に流れるバッファーと 2、3 に流れるバッファーにはグリセロールの有無により浸透圧の違いが生じ、バッファー間の境界がみえるようになっている。これにより、図のような流路が形成できているかを確認してから  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行った。

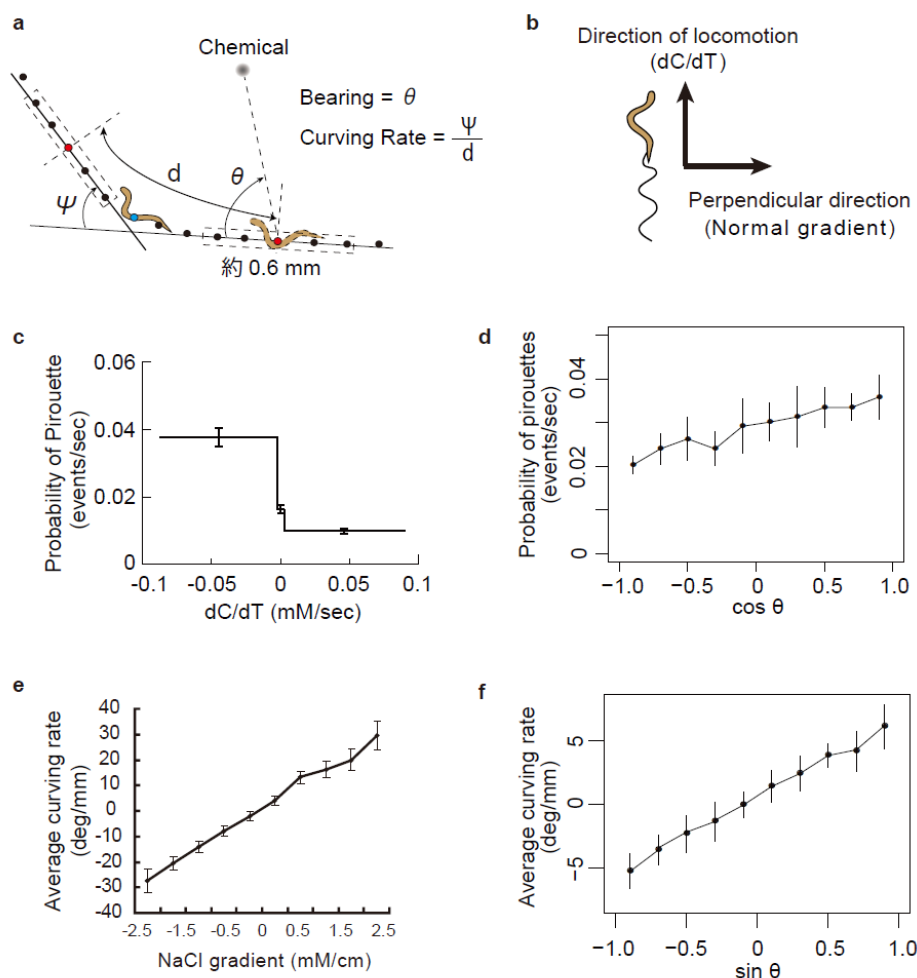


図 2-4 worm tracking system により得られたデータの解析方法

(a) bearing と curving rate の定義。点線で示した線虫の bearing ( $\theta$ ) は、点線で示した線虫の進行方向の回帰直線と、化学物質のピーク (灰色の点) と点線の線虫を結ぶ直線のなす角度を示している。実線で示した線虫 (青色のドット) の curving rate は、線虫の移動距離 1 mm 当たりの進行方向の角度変化を示している。青色のドットから前方と後方にそれぞれ 0.5 mm 以上離れているドット (赤色) における回帰直線をそれぞれ引き、それらの直線が交わる角度 ( $\psi$ ) を距離  $d$  (2 つの赤色のドット間の距離: 約 1 mm) で割った値を curving rate と定義した。回帰直線は、点線の長方形で示すような赤色のドットから 0.3 mm 以内のドットにフィットするように引いた。ドットは線虫の重心座標を表しており、距離は隣接するドット間の長さを加算することで算出した。

(b) NaCl に対する走性の際に使われる 2 つの行動戦略を定量化するために用いられた NaCl の濃度勾配の成分。進行方向の濃度勾配の成分 ( $dC/dT$ ) はピルエット応答を、進行方向に対して垂直な成分 (Normal gradient) は風見鶏応答を定量化するために用いた。

(c,d) NaCl(c)、もしくは高濃度のイソアミルアルコール (d) の濃度勾配上で、ピルエット行動が起こる確率。

(e,f) NaCl(e)、もしくは高濃度のイソアミルアルコール (f) の濃度勾配上での Curving rate (図 2-4a) の平均の値。



### 第3章 塩への化学走性を制御する神経回路の探索

#### 3.1. 塩走性に必要な塩濃度情報を受容する感覚神経の探索

第1章 1.3.で述べたように、線虫はピルエット機構と風見鶏機構という2つの行動戦略を使ってNaClに寄っていく。これらの行動戦略には、それぞれ線虫の進行方向とそれに垂直な化学物質の濃度勾配の情報が使われる(図 1-2b,c と図 2-4b)。また、アウトプットとしてそれぞれピルエット行動とカーブ行動が用いられ、塩走性の制御が行われる(図 1-2b,c)。それゆえに、本研究では、2方向の塩濃度勾配の情報が、それぞれどのような神経回路を介して伝達され、2つのアウトプットが実行されているのかを明らかにしようとした。

NaClへの誘引行動には、感覚神経ASE、ASI、ADF、ASG、ASHが関与することが知られている(Bargmann and Horvitz, 1991; Iino and Yoshida, 2009; Thiele et al., 2009)。感覚神経ASEのうち、左側のASEL神経を破壊しても、NaClへの誘引行動や2つの行動戦略に影響を及ぼさないが、右側のASER神経を破壊すると、NaClへの誘引行動や2つの行動応答が減弱する(図 3-2a-c のASEL ablation, ASER ablation)(Iino and Yoshida, 2009)。さらに、ASEL、ASER神経を同時に破壊すると、誘引行動が著しく減弱し、2つの行動応答も完全に損なわれることが知られている(図 3-2a-c のASELR ablation)(Iino and Yoshida, 2009)。これらのことから、ピルエット応答、風見鶏応答に用いられるNaClの濃度情報は、感覚神経ASE、特に右側のASER神経により主に受容されていることが明らかとなった。(※本研究で行った神経破壊実験の結果と比較する目的で、飯野雄一教授により行われた感覚神経ASEや介在神経AIZ、RIAの破壊実験の結果も、学位論文の図 3-2a-c、図 3-3a-c に挿入している。)

塩走性に関わることが知られている感覚神経ASIも、ASE神経と同様に、2つの行動戦略に用いられる塩濃度情報を受容しているか調べた。ASI神経を破壊すると、NaClへの誘引行動が僅かではあるが有意に減弱し、ピルエット応答、風見鶏応答の両方ともが減弱した(図 3-2a-c のASI ablation)。このことから、ASI神経も、ASE神経と同様に、2つの行動戦略に用いられる塩濃度情報を受容していることが明らかになった。

感覚神経の破壊実験により、NaCl への誘引行動の際のピルエット応答と風見鶏応答に使われる塩濃度情報は、感覚神経 ASE と ASI で受容され、主に ASE 神経での塩濃度の感知が 2 つの行動応答に重要であることがわかった(図 3-6a)。

## 3.2. 塩濃度情報を伝達する介在神経の探索

### 3.2.1. 2 つの行動戦略に使われる塩濃度情報を伝達するアンフィド介在神経

感覚神経で受容された化学感覚情報は、シナプス接続やギャップ結合を介して下流のアンフィド介在神経へと伝達される。図 3-1 に示すように、神経細胞間のシナプス接続やギャップ結合は、透過電子顕微鏡の連続切片の再構成により明らかにされている(White et al., 1986)。本研究では、幼虫期にレーザーで特定の神経細胞を破壊し、成虫期に神経破壊した個体の化学走性を測定している(第 2 章 2.6.参照)。そのため、神経破壊を行ってから化学走性を測定するまでの間に、特定の神経細胞の機能が消失することで神経接続のパターンや結合数が変化する可能性が考えられる。しかし、本研究では、神経破壊によって神経細胞間の接続が変化しないものと仮定し、図 3-1 に示したシナプス接続やギャップ結合をもとに、2 つの機構を制御する候補神経細胞を神経回路の中から選び出した。2 つの行動応答に使われる塩濃度情報を主に受容する感覚神経 ASE は、図 3-1 のように、アンフィド介在神経 AIA、AIB、AIY と直接シナプス接続している。そこで、これらの神経を単独で破壊した線虫の塩走性や 2 つの行動応答を測定した。

先行研究の神経破壊実験により、介在神経 AIA は NaCl への誘引行動に関与するが、介在神経 AIB は重要ではないことが示されている(Tomioka et al., 2006)。また、AIB 神経には後退運動を促進する機能がある。一方、介在神経 AIY には後退運動を抑制する働きがある(Wakabayashi et al., 2004; Gray et al., 2005)。AIA 神経を破壊したところ、NaCl への誘引行動とその際の風見鶏応答には異常がみられなかったが(図 3-3a,c の AIA ablation)、ピルエット応答は減弱した(図 3-3b の AIA ablation)。AIB 神経を破壊したときも、AIA 神経のときと同様に、NaCl への誘引行動の際のピルエット応答のみが減弱した(図 3-3a-c の AIB ablation)。一方で、AIY を破壊しても、NaCl への誘引行動とその際の 2 つの行動応答に変化はみられなかった(図 3-3a-c の AIY ablation)。先行研究でみられた AIA 神経を破壊したときの NaCl への誘引行動の減弱(Tomioka et al., 2006)は、

本研究では観察されなかった(図 3-3a の AIA ablation)。この結果の相違は、先行研究と本研究の間で、塩走性の解析に用いたアッセイフォーマットやシャーレのサイズ(図 2-1a,f)、行動を測定する際にプレートに置く線虫の数(1 匹の行動をみるか集団の行動をみるか)、行動の測定時間など様々な条件が異なることにより生じたものと考えられる。

本研究では、いくつかの神経破壊実験で、AIA 神経を破壊したときのような NaCl への誘引行動は減弱しないが、2 つの行動応答のどちらか、もしくは両方が減弱するケースがみられる。本論文の第 1 章 1.3. で述べたように、NaCl への誘引行動は 2 つの行動戦略により実現されているため、どちらか一方の行動戦略が損なわれれば、同時に化学走性に変化がみられてもおかしくはない。それゆえに、上記の AIA 神経破壊実験のような結果は、2 つの行動戦略の定量化により、これまで化学走性という指標では検出できなかった行動の差異が検出できた場合であると解釈した。従って、これまでの結果から、アンフィド介在神経 AIA、AIB は NaCl への誘引行動の際のピルエット応答に関与することが示された。

アンフィド介在神経 AIA、AIB、AIY をそれぞれ単独で破壊しても、塩走性の際の風見鶏応答に変化がみられなかったことから、ASE 神経からの塩濃度の情報が分岐している可能性が考えられた。そこで、これらのアンフィド介在神経を 2 つ、もしくは 3 つ同時に破壊した個体の塩走性を測定した。その結果、AIB、AIY 神経を 2 つ同時に破壊したときに風見鶏応答の減弱がみられた(図 3-3c の AIB, AIY ablation)。一方、AIA もしくは AIB 神経を破壊すればピルエット応答が減弱することから予測できるが、AIA、AIB、AIY 神経のうちどの 2 つを破壊してもピルエット応答が減弱した(図 3-3b の AIA, AIY ablation , AIA, AIB ablation, AIB, AIY ablation)。AIA、AIB、AIY 神経を 3 つ同時に破壊すると、AIZ 神経を破壊したときと同程度に塩走性や 2 つの行動応答が損なわれているように見えるが(図 3-3a-c の AIA, AIB, AIY ablation と AIZ ablation)、標的の神経に GFP を発現させたコントロールの株が塩走性やピルエット応答に欠陥を示したため(例えば図 3-3a,b において AIA, AIB, AIY control と AIB, AIY control を比較したときに有意な差がみられたため)、介在神経 AIA、AIB、AIY を 3 つ同時に破壊しても、コントロールと比べて塩走性やピルエット応答に有意な差は検出されなかった(図 3-3a,b の AIA, AIB, AIY control と ablation)。

介在神経 RIA は介在神経 AIZ や AIY からシナプス入力を受け取っていることから(図 3-1)、

NaCl への誘引行動への関与が予想されたが、先行研究により、RIA 神経を破壊しても誘引行動やその際の 2 つの行動応答に変化はみられないことが示されている(図 3-3a-c の RIA ablation)(Iino and Yoshida, 2009)。

アンフィド介在神経の破壊実験により、NaCl への誘引行動の際のピルエット応答には介在神経 AIA、AIB、AIZ が、風見鶏応答には介在神経 AIB、AIY、AIZ が関与することが明らかとなった(図 3-6a)。

### 3.2.2. ピルエット行動を制御する指令介在神経

アンフィド介在神経で処理された感覚情報の一部は指令介在神経を通して下流の運動神経へと伝達される。指令介在神経 AVE、AVA、AVD は、鼻先への機械刺激により引き起こされる後退運動を制御する(Chalfie et al., 1985)。ピルエット行動は後退運動とターンからなるため、これらの介在神経がピルエット応答に関与している可能性が予想される。先行研究や本研究により、アンフィド介在神経 AIZ、AIA、AIB がピルエット機構に必要な塩濃度情報を伝達していることが示唆されている(図 3-3b の AIZ ablation, AIA ablation, AIB ablation)(Iino and Yoshida, 2009)。そこで、図 3-1 に示すように、アンフィド介在神経 AIZ からシナプス入力を受け取っている指令介在神経 AVE と、アンフィド介在神経 AIB や指令介在神経 AVE からシナプス入力を受け取っている指令介在神経 AVA 塩走性の際のピルエット応答への関与を調べた。

AVE 神経を破壊した線虫の塩走性を測定したが、NaCl への誘引行動や、ピルエット応答、風見鶏応答のいずれにも異常はみられなかった(図 3-4a-c の AVE ablation)。一方、AVA 神経を破壊した線虫の塩走性を測定すると、僅かではあるが有意に NaCl への誘引行動が減弱し、ピルエット応答も減弱したが、風見鶏応答には異常がみられなかった(図 3-4a-c の AVA ablation)。さらに、AVA、AVE 神経を同時に破壊すると、NaCl への誘引行動には異常がみられなかったが、AVA 神経を破壊したときと同様に、ピルエット応答が減弱し、風見鶏応答には異常がみられなかった(図 3-4a-c の AVA, AVE ablation)。これらのことから、指令介在神経 AVA は NaCl への誘引行動の際のピルエット応答に関与することがわかった。AVE 神経を破壊してもピルエット応答が減弱しなかったことから、塩濃度情報が AIZ 神経、AVE 神経を介して伝達される可能性は低い。

AIB 神経はピルエット応答に使われる塩濃度情報を伝達しており(図 3-3b の AIB ablation)、AVA 神経とシナプス接続していることから、AIB 神経から直接 AVA 神経へと情報が伝達されているのかもしれない(図 3-6a 左側)。

### 3.3. 2 つの行動応答を制御する運動神経の探索

アンフィド介在神経や指令介在神経で処理された情報は運動神経を介して筋肉に伝えられ、行動が出力される。上述のように、ピルエット行動は後退運動とターンから構成されているため、これらの行動を制御する運動神経はピルエット応答に関与している可能性が高い。一方、風見鶏機構では、線虫は一方に偏って首を振ることによりカーブ行動にバイアスをかけている。従って、頭部の筋肉にシナプスを投射し、首振り運動を制御する運動神経は、風見鶏応答に関与している可能性が高い。そこで、本研究では、後退運動もしくはターン、首振り運動を制御する運動神経を破壊し、塩走性や 2 つの行動応答への効果を調べた。

塩走性の際のピルエット応答に関与することが明らかになった介在神経 AVA は、背腹の体壁筋にそれぞれ投射する運動神経 DA、VA と密にシナプス接続していることから(図 3-1)、これらの運動神経がピルエット応答を起こしている可能性が考えられる。しかし、これらの神経を破壊した線虫は運動全般に欠陥を示し、塩走性の測定が行えないと予想されたため、本研究では運動神経 DA、VA の塩走性や行動応答への関与の検証は行わなかった。一方、図 3-5a に示すような頭部や首の筋肉に投射する運動神経 RIV、SMD、SMB、RME は破壊しても運動性が完全に失われる可能性は低いと考えられたため、これらの運動神経の 2 つの行動応答への関与を調べた。

運動神経 RIV、SMD にはターンを促進する機能があるため(Gray et al., 2005)、これらの運動神経がピルエット応答に関与している可能性が考えられた。また、SMD 神経は介在神経 RIA からのシナプス入力により、首振り運動の制御に関与していることが示唆されている(Hendricks et al., 2012)。このことから、SMD 神経は風見鶏応答にも関与していることが予想された。しかし、RIV 神経を破壊しても、NaCl への誘引行動や 2 つの行動応答に変化はみられなかった(図 3-5c-e の RIV ablation)。一方で、SMD 神経を破壊すると、NaCl への誘引行動とピルエット応答が僅かではあるが有意に減弱した(図 3-5c,d の SMD ablation)。しかし、風見鶏応答には影響を及ぼさ



なかった(図 3-5e の SMD ablation)。これらのことから、運動神経 SMD は塩走性の際のピルエット応答に関与することがわかった。SMD 神経は RIA 神経との間に多くのシナプス結合をもつが(図 3-1)、RIA 神経を破壊してもピルエット応答は減弱しなかった(図 3-3b の RIA ablation)。一方、AIB 神経はピルエット応答に関与するため(図 3-3b の AIB ablation)、ひとつの可能性として、AIB 神経から RIM 神経を介して運動神経 SMD にピルエット応答に必要な塩濃度情報が伝達されることが考えられる(図 3-6a 左側)。

運動神経 RME は首振り運動を抑制的に制御することが知られているため(McIntire et al., 1993)、風見鶏応答への関与が予想された。しかし、RME 神経を破壊しても NaCl への誘引行動や、その際の 2 つの行動応答に変化はみられなかった(図 3-5c-e の RME ablation)。

運動神経 SMB は、NaCl への誘引行動の際の 2 つの行動応答を制御する介在神経 AIZ と直接シナプス接続している(図 3-1)。また、図 3-5a のように SMB 神経は頭部の筋肉にシナプスを投射しており、首振り運動を抑制的に制御することが知られている(Gray et al., 2005)。これらのことから、風見鶏応答に SMB 神経による首振り運動の制御が必要である可能性が予測された。そこで、SMB 神経を破壊した線虫の塩走性を測定したところ、NaCl への誘引行動が著しく減弱し、風見鶏応答が減弱した(図 3-5c,e の SMB ablation)。予想に反して、SMB 神経を破壊するとピルエット応答にも欠陥がみられた(図 3-5d の SMB ablation)。SMB 神経のピルエット応答への関わり方については第 3 章 3.4.3.に考察を記述する。これらの結果から、運動神経 SMB により制御される首振り運動は、NaCl への誘引行動の際、2 つの行動応答に重要であることが明らかになった。図 3-5b のように、SMB 神経は左右 2 組で構成され、背側、腹側それぞれの筋肉に SMB 神経が投射している。線虫は背腹方向に首振り運動しながら前進しているため、例えば背側の SMB(SMBDL、SMBDR)神経のみを破壊した線虫は背側方向への首振り運動がおかしくなると予想される。そこで、首振り運動が NaCl の化学走性に及ぼす影響を詳細に調べるために、背側のみ、腹側のみ、SMB 神経をそれぞれ破壊した。線虫の進行方向に対して左右どちらが腹側なのかを陰門(valva)を指標として判断し、それぞれを分けて定量化した。背側のみ(SMBDL、SMBDR)、腹側のみ(SMBVL、SMBVR)を破壊した個体のうち、背側の SMB 神経を破壊した個体(線虫の進行方向に対して陰門が右側にあった個体)だけで NaCl への誘引行動が減弱した(図

3-5c の SMBD (valva left) ablation, SMBD (valva right) ablation, SMBV (valva left) ablation)。しかし、この個体はピルエット応答、風見鶏応答には異常を示さなかったことから(図 3-5d,e の SMBD (valva left) ablation, SMBD (valva right) ablation, SMBV (valva left) ablation)、塩走性の減弱は試行数が少ないことが原因だと考えられる。これらのことから、背側、腹側どちらか片方の SMB 神経が機能していれば、NaCl に寄っていくことができると考えられる。

運動神経の破壊実験により、NaCl への誘引行動の際のピルエット応答には運動神経 SMD と SMB が関与し、風見鶏応答には運動神経 SMB が関与することが明らかとなった(図 3-6a)。

これまでの結果をまとめる。先行研究の神経破壊実験により、感覚神経 ASE と下流の介在神経 AIZ は NaCl に対する走性行動の際の両方の機構に関与することが示されている(lino and Yoshida, 2009)。そして、本研究の神経破壊実験により、介在神経 AIA と指令介在神経 AVA、運動神経 SMD はピルエット機構の制御にのみ関与すること、介在神経 AIY は風見鶏機構の制御にのみ関与すること、さらに、感覚神経 ASI と介在神経 AIB、運動神経 SMB は両方の機構に関与することが明らかになった。これらの結果とシナプス接続の知見(White et al., 1986)から、部分的に異なる神経回路が 2 つの機構の制御に使われていることが示唆される(図 3-6a)。

### 3.4. 考察

#### 3.4.1. NaCl への誘引行動の際の 2 つの行動戦略を制御する神経回路

ピルエット機構と風見鶏機構には、それぞれ線虫の進行方向とそれに垂直な化学物質の濃度勾配の情報が使われ、それぞれピルエット行動とカーブ行動がアウトプットに用いられる(Pierce-Shimomura et al., 1999; lino and Yoshida, 2009)。先行研究(lino and Yoshida, 2009)と本研究の神経破壊実験により、塩走性の際のピルエット機構と風見鶏機構にはそれぞれ図 3-6a の左側(Pirouette mechanism)と右側(Weathervane mechanism)に示した神経細胞が関与することが明らかになり、2 つの機構の制御には部分的に異なる神経回路が使われていることが示唆された。以下に、線虫が受容した塩濃度情報がどのような経路で伝達されているのかについて考察する。

ASE 神経と AIZ 神経の間に直接のシナプス接続はなく、ASE 神経は主に介在神経 AIA、AIB、AIY へシナプス出力を送っており、そのうち AIA、AIY 神経は AIZ 神経にシナプス出力を送っている(図 3-1)。介在神経 AIA を破壊するとピルエット応答が減弱するため(図 3-3b AIA ablation)、ピルエット応答に必要な塩濃度情報は ASE で受容され、AIA 神経を介して AIZ 神経へと伝達されると予想される(図 3-6a 左側)。しかし、風見鶏応答に関しては、介在神経 AIA と AIY の 2 細胞を同時に破壊しても AIZ 神経を破壊したときと同様の表現型にならなかったことから、以下のような相互排他的でない 2 つの可能性が考えられる。1 つ目は、ASE 以外の感覚神経が受容した塩濃度情報も AIZ 神経に伝達されているという可能性である。結合数は少ないが、AIZ 神経は感覚神経 ASI から直接のシナプス入力を受けており、感覚神経 ASH とはギャップ結合している(図 3-1)。また、ASI 神経は塩走性の際のピルエット応答と風見鶏応答の両方に重要で(図 3-2a-c の ASI ablation)、ASH 神経は塩走性の際のピルエット応答に重要な後退運動の頻度を調節している(Bargmann and Horvitz, 1991; Thiele et al., 2009)。これらのことから、ピルエット応答の場合、感覚神経 ASE や ASI、ASH からの入力が AIZ 神経で統合され(図 3-6a 左側)、風見鶏応答の場合、感覚神経 ASE、ASI からの入力が AIZ 神経で統合されているのかもしれない(図 3-6a 右側)。2 つ目は、ASE 神経で受容された塩濃度情報が、AIA や AIY 以外の神経を介して AIZ 神経へと伝達されている可能性である。図 3-6b に示すように、AIA や AIY と比べてシナプスの数は少ないが、ASE 神経は感覚神経 AWA や ADF を介して AIZ 神経へとシナプス接続しているため(White et al., 1986)、これらの神経も介在神経 AIA や AIY とともに 2 つの行動戦略の塩濃度情報の伝達に関与しているかもしれない。

図 3-6a のように、例えば、感覚神経 ASE で受容した 2 つの機構に用いられる塩濃度情報のうち、ピルエット応答に用いられる塩濃度情報は AIA 神経に伝達されるが、風見鶏応答に用いられる塩濃度情報は伝達されないと推定される。それでは、どのようにして AIA 神経はピルエット応答に用いられる塩濃度情報のみを受け取っているのだろうか。2 つの機構では、それぞれピルエット行動を起こす頻度とカーブ行動のバイアスの調節に用いられる塩濃度変化の時間スケールが異なっていることが予想される。つまり、図 2-4c のように 1 回のピルエット行動は約 10 秒から 25 秒の間に起こるため、ピルエット機構では線虫は数十秒単位で塩濃度変化を感知し

ていると予測されるが、一方で、カーブ行動に重要な首振り運動の周期は 2 秒から 4 秒程度であるため、風見鶏機構では線虫は数秒単位で塩濃度変化を感知している(数回の首振り運動により塩濃度変化を感知していたとしても、ピルエット機構のときの時間スケールより短い)と予測される。長い時間スケール(ピルエット応答に重要だと考えられる)と短い時間スケール(風見鶏応答に重要だと考えられる)の塩濃度変化のうち、どちらか一方の時間スケールにしか応答できない神経細胞が存在したとすれば、その神経細胞は上流の神経から 2 つの機構に関わる塩濃度情報が伝わってきたとしても、片方の機構に関わる塩濃度情報しか受け取ることができないと考えられる。

図 3-6a に示す 2 つの行動戦略に使われる塩濃度情報を伝達する神経回路は、主にシナプス接続の知見(White et al., 1986)と神経破壊実験の結果を元に推定したものである。この方法により 2 つの行動応答に関与する神経細胞は同定できたが、塩濃度情報がどういった経路で伝達されるかという問題については不明な点が多く残されている。従って、今後は、神経破壊実験と  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを組み合わせることで、上流の神経を破壊した線虫における下流の神経活動の測定を行い、塩濃度情報を伝達する経路を明らかにしていく必要がある。

#### 3.4.2. 本研究と過去の報告との間で神経回路に違いが生じる原因

先行研究の神経破壊実験から、介在神経 AIZ は NaCl への誘引行動を制御し、塩走性の際のピルエット応答、風見鶏応答に関与することが示されている(Iino and Yoshida, 2009)。本研究の単独の介在神経破壊実験から、介在神経 AIA、AIB は塩走性の際のピルエット応答に関与することが明らかとなった。さらに、介在神経 AIB、AIY の 2 細胞同時破壊実験から、介在神経 AIB、AIY は塩走性の際の風見鶏応答に関与することが明らかとなった。一方、光感受性イオンチャネル ChR2 を発現させた神経細胞を光刺激により興奮させ 2 つの行動応答を測定した研究(以降、光操作実験と呼ぶ)により、介在神経 AIY はピルエット応答、風見鶏応答の両方を、介在神経 AIB はピルエット応答を、介在神経 AIZ は風見鶏応答を引き起こすのに十分であることが示された(図 1-5d)(Kocabas et al., 2012)。ここでは、神経破壊実験と光操作実験から推察された 2 つの行動応答を制御する介在神経の役割に差異が生じる原因を考察する。第 3 章 3.2.1. に記述したよう

に、本研究では、神経破壊により神経回路のシナプス接続やギャップ結合が変化しないものと仮定した。しかし、神経破壊によって神経細胞間の接続が変化した場合、神経回路が神経破壊実験のときと光操作実験のときとで違い、異なる回路を介して塩濃度が伝達される、つまり、2つの実験間で異なる神経細胞がピルエット応答、風見鶏応答に関与する可能性が考えられる。以下に、2つの実験間で予想される介在神経の役割に差異が生じる原因について、それぞれの介在神経ごとの考察を記述する。

光操作実験から、介在神経 AIY はピルエット応答、風見鶏応答を引き起こすのに十分であることが示されたが、神経破壊実験からは、NaCl への誘引行動(及びそれに関わる 2つの行動応答)への AIY 神経の関与は見いだせなかった(図 3-3a-c の AIY ablation)。この原因については以下のような 2つの可能性が考えられる。ひとつは、塩走性の際 AIY 以外の介在神経も 2つの行動応答を引き起こす役割をもっているため、AIY 神経を単独で破壊しても NaCl への誘引行動や 2つの行動応答には影響を与えない可能性である。図 3-3c の AIB, AIY ablation に示すように、介在神経 AIB、AIY を 2つ同時に破壊したとき風見鶏応答が減弱したことから、NaCl への誘引行動の際の風見鶏応答は AIB、AIY 神経により冗長に制御されているため、どちらか一方の神経を破壊しても異常がみられなかったと考えられる。一方、図 3-3b の AIA ablation、AIB ablation、AIY ablation に示すように塩走性の際のピルエット応答には、AIY 神経は重要ではなく、介在神経 AIA、AIB が重要である。それゆえに、2つの実験間(神経破壊実験と光操作実験)で AIY 神経の活動状態(basal activity)や、刺激に対する応答が異なっている可能性が考えられる。第 1 章 1.2.4. で述べたように最近明らかにされた塩走性の概念では、本研究で着目した塩走性は、飢餓条件付により 0 mM NaCl を避ける行動である。一方、光操作実験では、餌が豊富に与えられた状態の線虫の行動を計測している。従って、2つの実験間では線虫の栄養状態が異なり、これが介在神経の活動状態や刺激に対する応答に違いを生じさせているために、2つの実験間で推察される神経の役割が異なるのかもしれない。この仮説を検証するためには、AIY 神経とその上流や下流の神経で  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行い、餌有り条件下と飢餓条件下で感覚刺激に対する神経応答に違いが生じているかどうかを調べるのが有効だろう。

介在神経 AIB は、光操作実験から、ピルエット応答を引き起こすのに十分であり、風見鶏応答には関与しないことが示されたが、神経破壊実験から、NaCl への誘引行動の際のピルエット応答、風見鶏応答(風見鶏応答は介在神経 AIB、AIY を 2 つ同時に破壊したときにはじめて減弱する)の両方に関与することが示された。この 2 つの実験間の結果の相違も、AIY 神経の場合と同様に、栄養状態により引き起こされる神経活動や応答の違いにより生じているのかもしれない。

介在神経 AIZ は、光操作実験では風見鶏応答を引き起こすのに十分であることが示されているが、ピルエット応答については調べられないため、今後、ピルエット応答を引き起こすのに十分であるか調べる必要がある。

#### 3.4.3. 2 つの行動応答を出力する運動神経 SMB について

図 3-5d,e の SMB ablation のように、首振り運動を抑制する運動神経 SMB を破壊すると、風見鶏応答だけでなく、ピルエット応答も減弱することが明らかとなった。このことから、首振り運動がピルエット行動に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。ピルエット行動は後退運動とターンからなり、SMB 神経と同様に頭部の筋肉に投射している運動神経 SMD(図 3-5a のように)を破壊するとターンが抑制される(Gray et al., 2005)。このことは、上記の可能性を支持するものである。今後、SMB 神経を破壊することで起こる首振りの振幅の増大により、ピルエット行動のどの部分に異常が起きているのかを詳細に解析する必要がある。

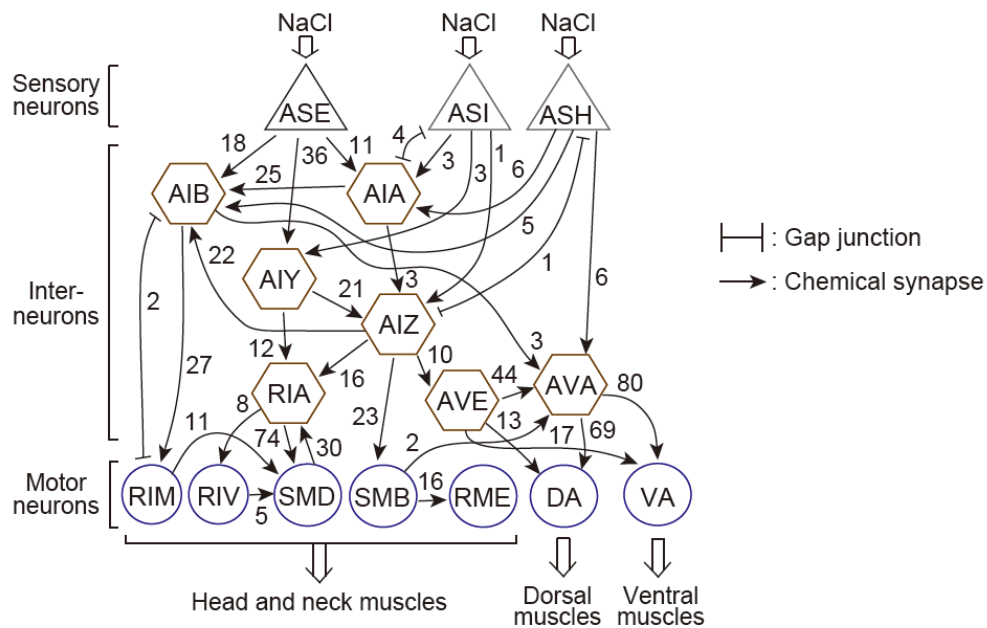


図 3-1 線虫の神経回路のうち、塩走性への関与が明らかにされている、もしくは予測される部分の抜粋  
 矢印はシナプス接続を、数字はシナプスの数を表している。線虫の頭部 (amphid) に細胞体が位置する介在神経 AIA、AIB、AIY、AIZ などはアンフィド介在神経と呼ばれている。アンフィド介在神経からの情報の一部が集められる介在神経 AVA、AVE は指令介在神経と呼ばれている。運動神経 RIM、RIV、SMD、SMB、RME は頭部の先端や首付近の筋肉に投射している。一方、運動神経 DA、VA はそれぞれ背側、腹側の体壁筋に投射している。矢印は化学シナプス、棒線はギャップ結合を表し、数値は結合数を示している。神経接続のパターンと結合数は、過去の文献 (White et al., 1986) をもとにしている。

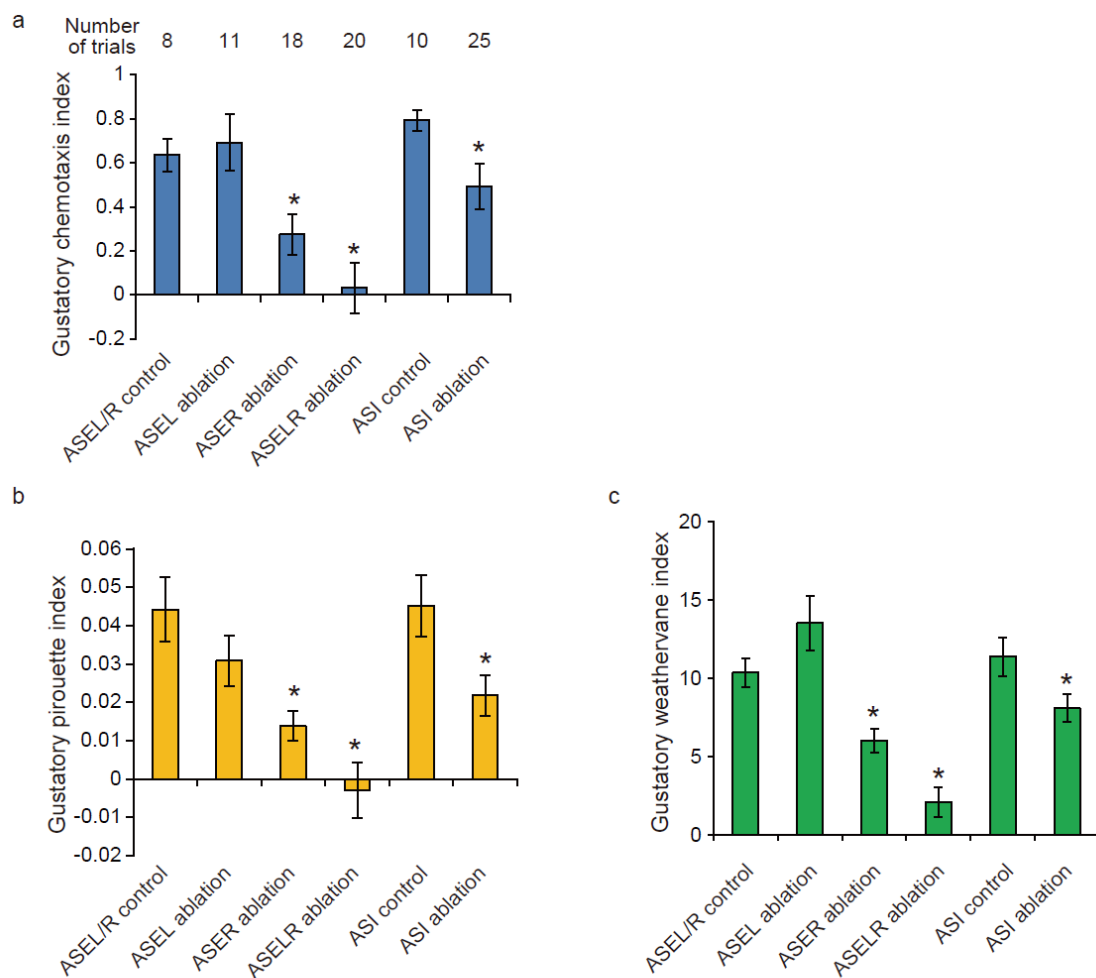


図 3-2 感覚神経を破壊した線虫の塩走性と 2 つの行動戦略

(a) 感覚神経を破壊した線虫の塩走性。上段の数値は各実験の試行数を示す。a-c に示すデータはひとつの実験から算出されるものであるため、b, c の試行数も a と同じである。(b) 感覚神経を破壊したときのピルエット応答。(c) 感覚神経を破壊したときの風見鶏応答。(a-c) \* はそれぞれの control と比べて有意に差があることを示す (t 検定で  $p < 0.05$ )。エラーバーは S.E.M. を表す。



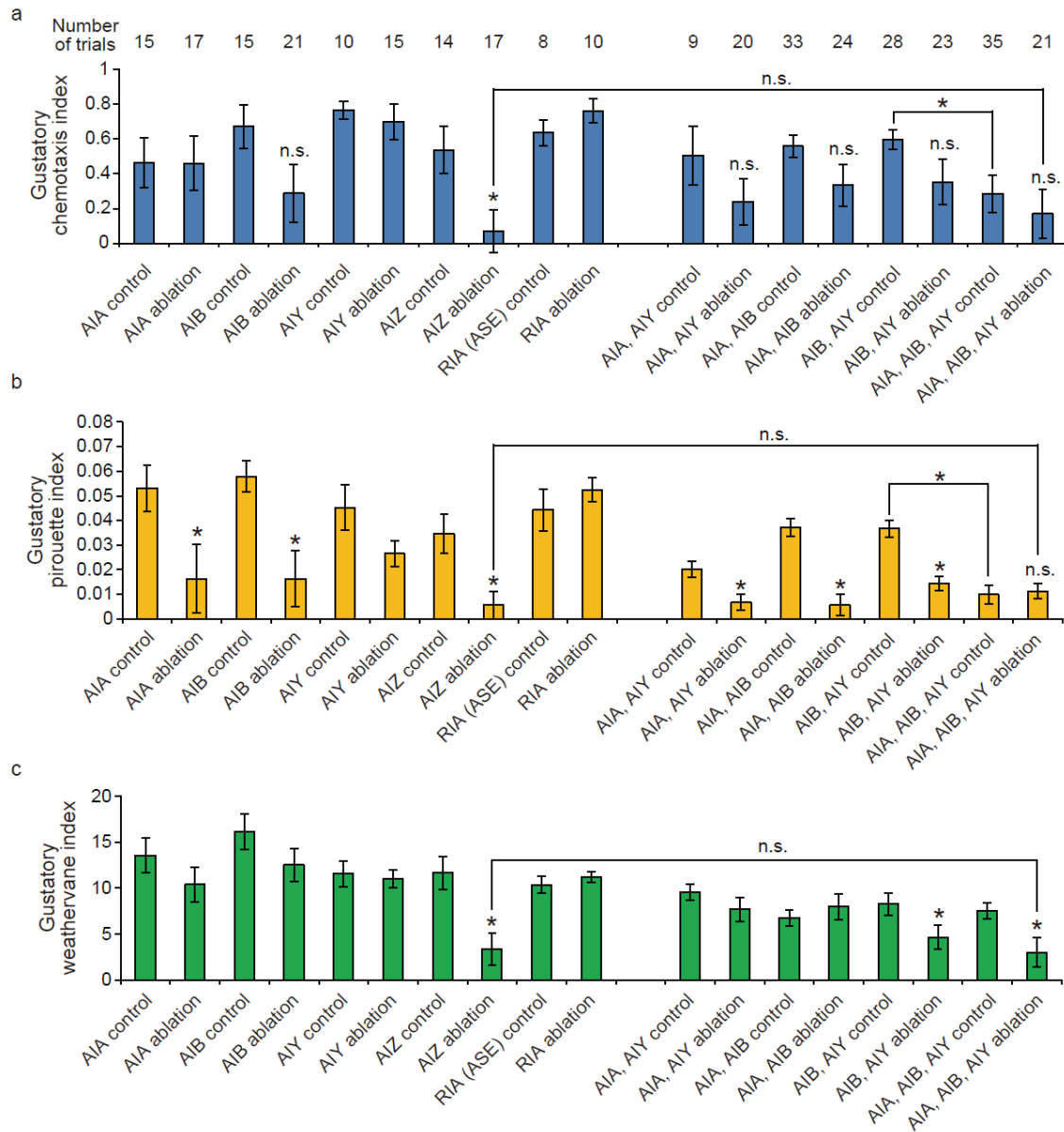


図 3-3 介在神経を破壊した線虫の塩走性と 2 つの行動戦略  
 (a) 介在神経を破壊した線虫の塩走性。上段の数値は各実験の試行数を示す。a-c に示すデータはひとつの実験から算出されるものであるため、b,c の試行数も a と同じである。(b) 介在神経を破壊したときのピルエット応答。(c) 介在神経を破壊したときの風見鶏応答。(a-c) \* はそれぞれの control (比較対象が control でない場合は、棒線で結んでいる) と比べて有意に差があることを示す (t 検定で  $p < 0.05$ )。n.s.; not significant。エラーバーは S.E.M. を表す。

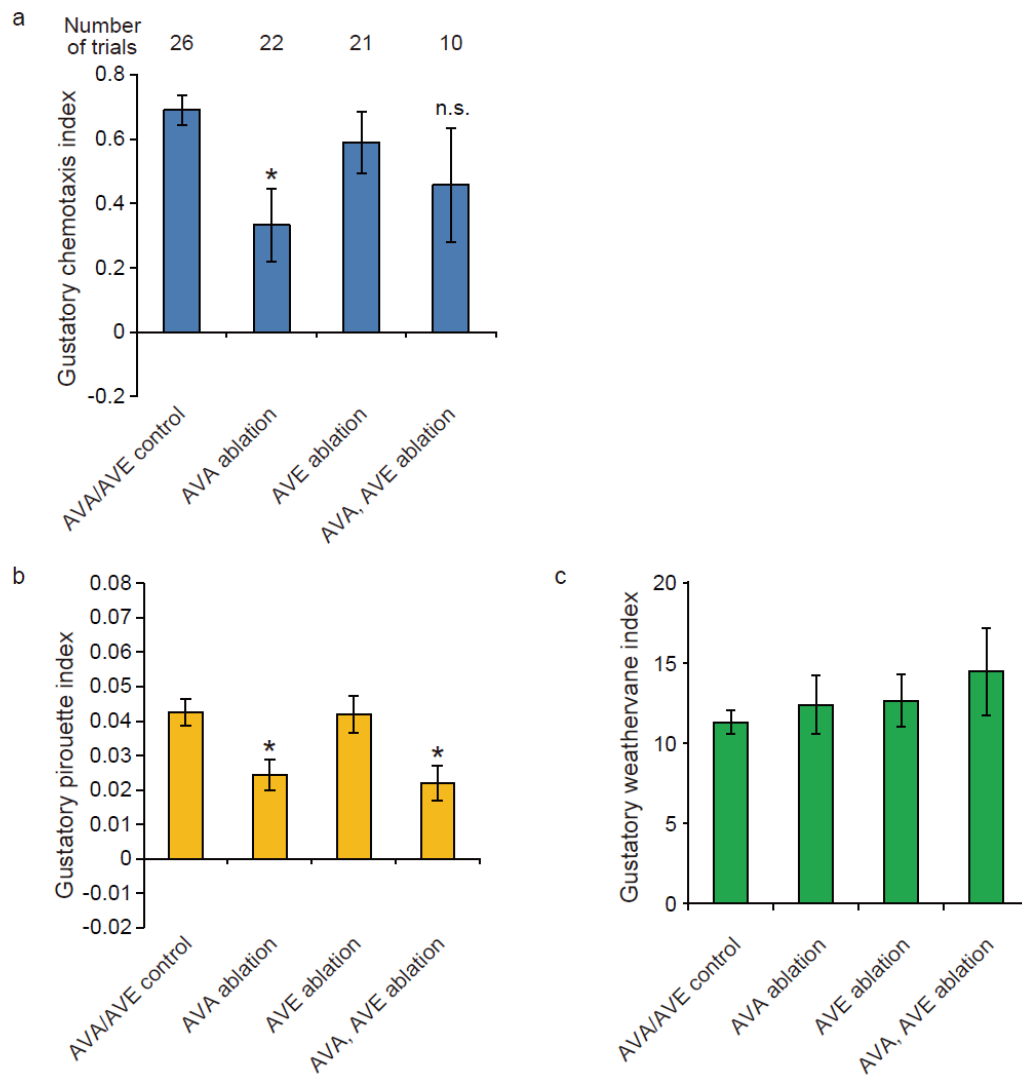


図 3-4 指令介在神経を破壊した線虫の塩走性と 2 つの行動戦略

(a) 指令介在神経を破壊した線虫の塩走性。上段の数値は各実験の試行数を示す。a-c に示すデータはひとつの実験から算出されるものであるため、b, c の試行数も a と同じである。(b) 指令介在神経を破壊したときのピルエット応答。(c) 指令介在神経を破壊したときの風見鶏応答。(a-c) \* はそれぞれの control と比べて有意に差があることを示す (t 検定で  $p < 0.05$ )。n.s.; not significant。エラーバーは S.E.M. を表す。

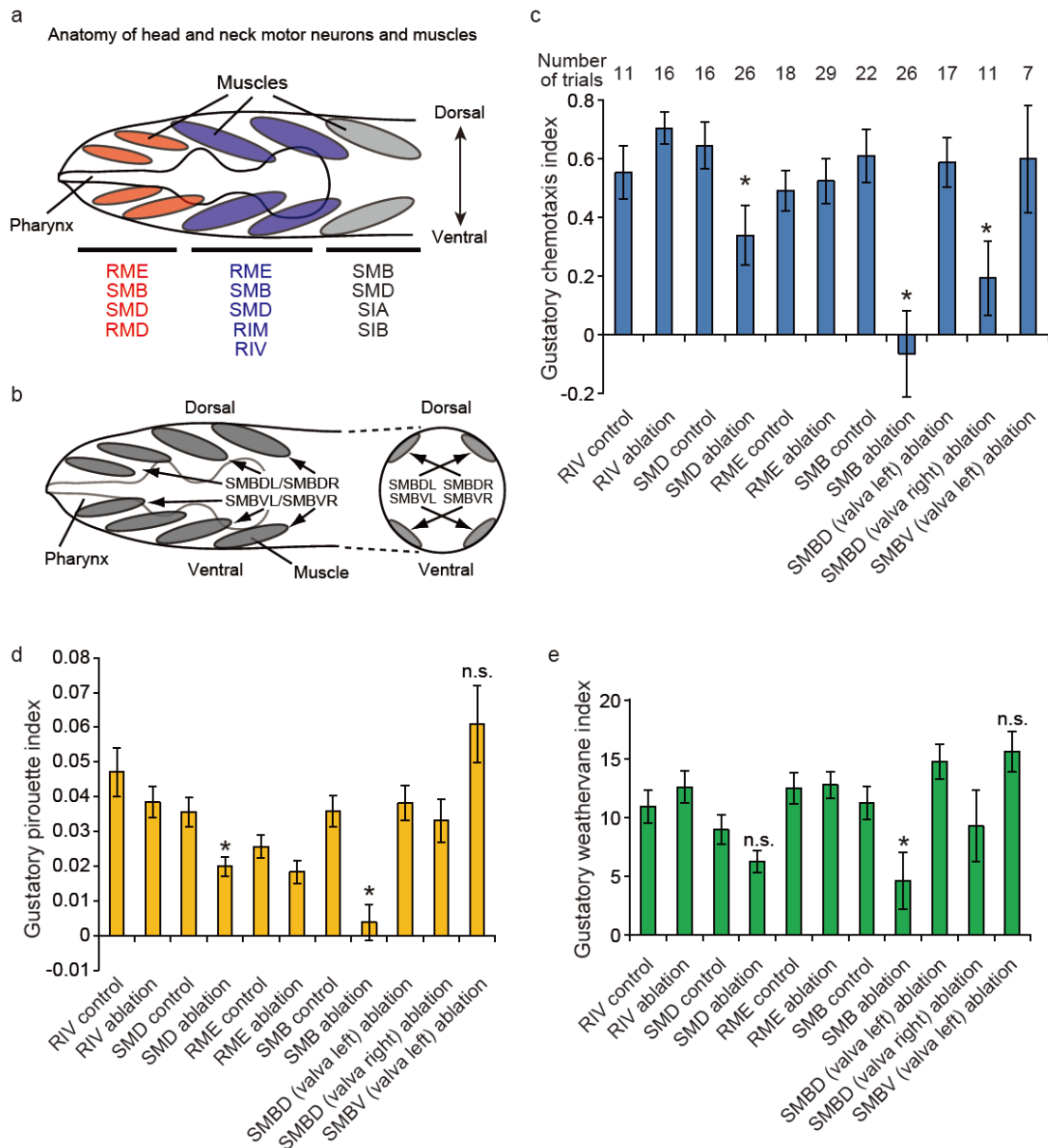


図 3-5 運動神経を破壊した線虫の塩走性と 2 つの行動戦略

(a) 頭部の先端、もしくは首付近の筋肉に投射する運動神経の概略図。図の上下方向は背腹軸を表しており、上側が背側で、下側が腹側。左側は頭部の先端。筋肉は正中線に対して対称な構造をしており、概略図では背側左の筋肉と腹側左の筋肉のみを示している。(b) 運動神経 SMB の筋肉への投射の概略図。4 種類ある運動神経 SMB は神経の名前のアルファベットの後に、背腹と左右の組み合わせで DL(dorsal-left)、DR(dorsal-right)、VL(ventral-left)、VR(ventral-right) が付けられることで区別されている。右側の図では 4 つの筋肉にそれぞれの SMB 神経が投射している様子を示している。(c) 運動神経を破壊した線虫の塩走性。上段の数値は各実験の試行数を示す。c-e に示すデータはひとつの実験から算出されるものであるため、d,e の試行数も c と同じである。(d) 運動神経を破壊したときのピロエット応答。(e) 運動神経を破壊したときの風見鶏応答。(c-e) \* はそれぞれの control と比べて有意に差があることを示す (t 検定で  $p < 0.05$ )。n.s.; not significant。エラーバーは S.E.M. を表す。



## 第4章 匂いの濃度に依存した行動の変化を制御する神経回路メカニズムの探索

### 4.1. 匂いの濃度に依存した行動変化の解析

#### 4.1.1. 線虫も匂いの濃度に依存して嗜好性を変化させる

線虫はさまざまな揮発性の匂い物質を感知することができ、それぞれの匂い物質に対して誘引行動もしくは忌避行動を示す。例えば、イソアミルアルコール(3-methyl-1-butanol)やベンズアルデヒド、ペンタンジオン、トリメチルチアゾール、ジアセチルは誘引性の匂い物質であることが知られている(Bargmann et al., 1993)。一方、1-オクタノールや2-ノナノンは忌避性の匂い物質であることが知られている(Troemel et al., 1997)。

匂いに対する化学走性を観察する際、多くの場合、EtOH で希釈した匂い物質を寒天プレート上に置く(スポットする)。興味深いことに、EtOH で希釈せずに原液のイソアミルアルコールやベンズアルデヒドを置いた場合、線虫はそれらの匂いに対して誘引行動を示さなくなる、もしくは弱い忌避行動を示すことが報告されている(Bargmann et al., 1993)。そして、寒天プレート上に置く匂い物質の量を増やすことで匂いの濃度をさらに高くすると、線虫は誘引性の匂い物質に対して強い忌避行動を示すことが、広津崇亮博士によって見出された(広津、私信)。そこで、広津博士が以前行った行動実験と同様の測定を行った結果、調べた全ての匂い物質に対して、線虫は、低濃度では誘引行動を示すが、高濃度では忌避行動を示すことを確認した(図 4-1a)。この実験では、高濃度の匂い物質を寒天プレートに直接置いているため、線虫が匂い物質により形成される浸透圧を忌避している可能性も考えられる。そこで、寒天プレートのシャーレの蓋に高濃度の匂い物質を置いて観察したところ、同様に忌避行動が観察された(図 4-1b)。このことから、線虫は浸透圧ではなく、拡散した高濃度の匂い物質に対して忌避行動を示すと考えられる。図 4-1a では、匂い物質の種類によって忌避行動が観察される匂いの濃度(匂い物質を置く量)、すなわち嗜好性が切り替わる閾値が異なっていた。これは、例えば、匂い物質の種類によりそれを受容する受容体の数やレパートリーが異なることが要因である可能性が考えられる。これ以降は、神経破壊実験や  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングなどの知見が豊富に蓄積されているイソアミルアルコールに的を絞り解析を行った(Bargmann et al., 1993; Chalasani et al., 2007)。

#### 4.1.2. 線虫は高濃度の匂い物質に一度は誘引され、その後忌避する

線虫の匂いに対する嗜好性が濃度によってどのように変化しているのかを調べるために、図 2-1b に示すアッセイプレートに匂い物質イソアミルアルコールと複数の線虫をそれぞれ置き、**multi worm tracking system** を用いて詳細に行動を測定した(第 2 章 2.10.2.参照)。低濃度のイソアミルアルコールの勾配上で、線虫は常に匂いに寄っていく行動を示した(図 4-2a)。一方、高濃度イソアミルアルコールの勾配上では、線虫は匂いに一度は誘引されるが(測定開始から 600 秒まで)、その後は忌避する行動を示した(図 4-2b,c の **Real Worms**)。この時間経過による行動の切り替わりは、嗅覚順応(嗅覚可塑性とも呼ばれている。第 1 章 1.2.3.参照)、もしくは匂いの拡散による濃度の増加によって引き起こされている可能性が考えられた。これらの可能性を区別するために、嗅覚順応(可塑性)に異常を示す変異体(Colbert et al., 1997; Hirotsu and Iino, 2005; Matsuki et al., 2006; Yamada et al., 2009)の高濃度イソアミルアルコールに対する行動を測定した(図 4-3a)。しかし、これらの変異体は高濃度イソアミルアルコールに対する忌避行動に顕著な異常を示さなかった(図 4-3b)。このことから、匂いの拡散によって線虫が感じる匂いの濃度が時間経過とともに上昇し、行動が誘引から忌避へと切り替わると推定した。

#### 4.1.3. 匂いの濃度に依存した行動変化は主にピルエット機構により制御される

第 1 章 1.3.で述べたように、線虫は化学物質に対して誘引行動を示す際、ピルエット機構と風見鶏機構を併用して、効率良く化学物質の濃度のピークに近づくことが知られている(Pierce-Shimomura et al., 1999; Iino and Yoshida, 2009)。匂いの濃度に依存した行動変化がどのような行動メカニズムにより制御されているのかを調べるために、低濃度と高濃度イソアミルアルコールの勾配上でのピルエット応答と風見鶏応答を観測した。

低濃度のイソアミルアルコールの勾配上では、ピルエット機構は行動測定開始から終了まで、風見鶏機構は行動測定開始後 1500 秒以降において、誘引行動を誘起するように働いていることが観察された(図 4-4a,b の **Lower concentration of IAA**)。誘引行動を誘起する風見鶏応答が行動測定開始から 1500 秒まで観測されなかったことは、行動測定開始からしばらくの間は匂いの拡散が不十分であるためであると考えた。そこで、図 2-1c のように匂い物質と線虫との距離がよ

り近いアッセイフォーマットを用いて風見鶏機構を測定した。その結果、行動測定開始直後から風見鶏機構が誘引行動を誘起するように働いていることが確認できた(図 4-4c)。

一方、高濃度イソアミルアルコールの勾配上では、ピルエット機構は行動測定開始から 300 秒までは誘引行動を誘起するように働くが、600 秒以降は忌避行動を誘起するように働くことが観察された(図 4-4a の **Higher concentration of IAA**)。これは、図 4-2b の **Real Worms** で観察された高濃度イソアミルアルコールに対する線虫の行動と一致している。また、観察されたピルエット応答の傾向は時間経過に依存して変化するが、線虫と匂いとの距離にはあまり依存していなかった(図 4-4d)。一方、予想に反して、風見鶏機構は行動測定開始から終了まで誘引行動を誘起するように働いていた(図 4-4b の **Higher concentration of IAA**)。観察された風見鶏応答の傾向は、線虫と匂いとの距離には依存せず同様だった(図 4-4e)。これらの結果から、匂いの濃度に依存した行動の変化は主にピルエット機構によって制御されていることが示唆された。

#### 4.1.4. 匂いの濃度に依存した行動変化は 2 つの行動戦略により制御されている

高濃度イソアミルアルコールの勾配上で観察された逆向きに作用する 2 つの行動戦略の行動への貢献度を評価するために、飯野雄一教授が作製したプログラムでコンピューターシミュレーションを行った(第2章2.11.参照)。高濃度のイソアミルアルコールに対する化学走性の際に観察されたピルエット応答(図4-4d)のみが作用する場合、モデル線虫は、匂いに一度誘引された後、忌避行動を示したが、実際の線虫よりも忌避行動の程度が強かった(図4-2b,c,dの **Pirouette strategy alone**)。高濃度のイソアミルアルコールに対する化学走性の際に観察された風見鶏応答(図4-4e)のみが作用する場合、モデル線虫は匂いに対して誘引行動を示すのみだった(図4-2b,cの **Weathervane strategy alone**)。2 つの行動戦略がともに作用する場合は、モデル線虫の行動は実際の線虫の行動と同様であった(図4-2b,c,dの **Pirouette and Weathervane strategies**)。これらのことから、ピルエット機構は高濃度イソアミルアルコールに対する化学走性の制御に主要な役割を果たしているが、風見鶏機構がピルエット機構と逆向きに作用することで、匂いに対する忌避行動を僅かに減弱させていることが明らかとなった。

これら2つの行動戦略が忌避性の匂い物質においても同様に使われているのか調べるために、ノナンンに対する行動を測定した。高濃度のイソアミルアルコールの勾配上るときとは異なり、ピルエット機構は常に忌避行動を誘起するように働いていたが、風見鶏機構の作用は観察されなかった(図4-4a,bのNonanone)。高濃度の誘引性匂い物質が存在する状況は、自然界において餌(誘引物質)と忌避物質が同時に存在する状況と類似している。もしそうだとするならば、線虫が餌場から離れすぎないようにするために2つの行動戦略が逆向きに作用しているのではないかと考えられる。

## 4.2. 匂いの濃度情報を伝達する分子メカニズムの解析

### 4.2.1. Gα である ODR-3 は低濃度、高濃度のイソアミルアルコールの匂い情報を伝達する

どのような因子がそれぞれの匂いの濃度における行動に関与しているのか明らかにするために、感覚神経において匂いのシグナル伝達に主要な役割を果たす G タンパク質の α サブユニット(Gα)の変異体の化学走性を解析した。C. elegans のゲノム配列には 20 の Gα が存在する(C. elegans Sequencing Consortium, 1998)。それらのうち、ODR-3 と GPA-3 は低濃度のイソアミルアルコールへの応答に関与することが知られている(Lans et al., 2004)。さらに、ODR-3 は高濃度のイソアミルアルコールへの応答にも関与することが広津博士によって見出された(広津、私信)。そこで、上記以外の Gα も含めて Gα の変異体のさまざまな濃度のイソアミルアルコールへの走性を調べた。その結果、odr-3 変異体は高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動に非常に強い欠陥を示すが、gpa-3 を含む他の Gα の変異体は欠陥を示さないことが明らかとなった(図 4-5a,b,c)。また、odr-3 gpa-3 二重変異体では、相加的な効果がみられ、低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動が完全に消失した(図 4-5a)。しかし、odr-3 gpa-3 二重変異体の高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動の欠損は、odr-3 変異体と同程度だった (図 4-5a)。以上の結果は、ODR-3 が低濃度と高濃度のイソアミルアルコールの両方のシグナル伝達に主要な役割を果たし、それぞれ誘引行動と忌避行動を媒介することを示している。また、odr-3 gpa-3 二重変異体が高濃度のイソアミルアルコールに誘引行動を示した(図 4-5a)ことから、イソアミルアルコールの感知と誘引行動の誘起には ODR-3 や GPA-3 以外の他の Gα も関与している



と考えられる。ODR-3 は低濃度のベンズアルデヒドやジアセチルの誘引行動の制御にも関わっていることが知られている(Tsui and van der Kooy, 2008)。しかし、イソアミルアルコールの場合とは異なり、ODR-3 は高濃度のベンズアルデヒドやジアセチルに対する忌避行動には関与しなかった(図 4-5d)。この結果は過去の報告(Nuttley et al., 2001)とも一致しており、以上の結果から、高濃度の匂いのシグナル伝達には匂いの種類によって異なる  $G\alpha$  が関与していると考えられる。

次に、低濃度や高濃度のイソアミルアルコールへの走性の際、ODR-3 が 2 つの行動応答を引き起こす匂いのシグナル伝達に関わるかどうかを調べた。低濃度のイソアミルアルコールの勾配上で、*odr-3* 変異体は 1800 秒以降のピルエット応答に欠陥を示し(図 4-5e)、どの時刻においても風見鶏応答に欠陥を示した(図 4-5f)。1800 秒より以前にピルエット機構に欠陥がみられなかった原因としては、例えば GPA-3 などの他の  $G\alpha$  が機能している可能性が考えられる。高濃度のイソアミルアルコールの勾配上では、*odr-3* 変異体は、900 秒以降の匂いから遠ざかるように働くピルエット応答に欠陥を示し(図 4-5g)、900 秒以降の匂いに近寄るように働く風見鶏応答にも欠陥を示した(図 4-5h)。これらの結果から、ODR-3 は匂いに誘引される際のピルエット応答を除き、誘引行動と忌避行動の際、ピルエット応答や風見鶏応答に必要なイソアミルアルコールのシグナル伝達に関与していることが示された。

#### 4.2.2. ODR-3 は匂いの濃度によって機能する神経細胞が異なる

高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動において ODR-3 がどの細胞で機能することが必要なかを定めるために、様々なプロモーターを用いてレスキュー実験(第 2 章 2.5.参照)やノックダウン実験(第 2 章 2.8.参照)を行った。レスキュー実験では、*odr-3* cDNA に神経細胞特異的プロモーターをつなぎ、*odr-3* 変異体に導入した。*odr-3* 遺伝子上流 2.7 kb の *odr-3* プロモーターで *odr-3* cDNA を発現させた場合、*odr-3* 変異体の高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動の欠陥が部分的に回復した(図 4-6a)。*odr-3* 遺伝子上流 2.7 kb のプロモーターに蛍光タンパク質をつないで発現細胞を可視化することで、ODR-3 は 5 対の感覚神経 AWA、AWB、AWC、ASH、ADF で発現することが明らかになっている(Roayaie et al., 1998)。これらの感覚

神経の中で、感覚神経 AWB と ASH は忌避性の匂い物質に対する行動を制御している(Troemel et al., 1995; Troemel et al., 1997; Chao et al., 2004; Luo et al., 2008)。そこで、*odr-3* cDNA を感覚神経 AWB もしくは ASH 特異的に発現を誘導するプロモーターにつないで発現させたところ、*odr-3* 変異体の忌避行動の部分的に異常が回復した(図 4-6a)。一方、図 4-6b に示すような *odr-3* 遺伝子を含むフォスミドを *odr-3* 変異体に導入すると忌避行動の欠陥が完全に回復した(図 4-6c)。このフォスミドには *odr-3* 遺伝子の上流 2.7 kb よりも長いプロモーター領域が含まれている。このことから、*odr-3* プロモーターによる忌避行動の欠陥の回復が部分的である理由は、報告されている ODR-3 の発現細胞(AWA、AWB、AWC、ASH、ADF)以外の細胞においても ODR-3 が機能しているためであると考えられる。感覚神経 AWB、ASH 以外で忌避物質に対する走性行動に関与する感覚神経として ADL 神経が知られている(Troemel et al., 1997; Sambongi et al., 1999; Chao et al., 2004)。そのため、感覚神経 ADL が ODR-3 の機能細胞である可能性が考えられる。

続いて、*odr-3* 遺伝子の機能を細胞特異的にノックダウンした株の高濃度のイソアミルアルコールに対する行動を測定した。細胞特異的レスキュー実験の結果とは異なり、野生型線虫でみられるイソアミルアルコールに対する忌避行動は ASH 神経において *odr-3* の機能をノックダウンすることで減弱したが、AWB 神経において *odr-3* の機能をノックダウンしても減弱しなかった(図 4-6d)。レスキュー実験とノックダウン実験の間で結果の相違が生じる原因は、第 4 章 4.6.1. で考察する。以上の *odr-3* の行動遺伝学的な解析の結果から、高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動の際、ODR-3 は主に感覚神経 ASH で機能していることが示唆された。このことは、水溶性物質に対する忌避行動の際に、ODR-3 が ASH 神経で機能しているという報告からも支持される(Hukema et al., 2006; Aoki et al., 2011)。一方、低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動には、誘引物質への化学走性を制御する感覚神経 AWC で ODR-3 が機能することが重要である(Bargmann et al., 1993; Lans et al., 2004)。従って、異なる感覚神経における ODR-3 の機能がイソアミルアルコールの濃度の違いにより起こる誘引行動と忌避行動それぞれに必要なであると考えられる。

### 4.3. 匂いの濃度による行動変化を制御する神経回路の探索

#### 4.3.1. 匂いの濃度によって行動に関与する感覚神経の組み合わせが異なる

上記の *odr-3* 変異体の解析から、異なる感覚神経が低濃度と高濃度のイソアミルアルコールに対する走性行動のそれぞれに必要であることが示された。高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動を制御する神経回路を同定するために、レーザーアブレーションにより候補神経細胞を破壊し(第2章 2.6.参照)、特定の神経を破壊した線虫の行動を手作業で測定した(第2章 2.3.3.参照)。

まず高濃度のイソアミルアルコールに対する走性に関与する感覚神経を調べた。感覚神経 AWC は低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動に関与する(Bargmann et al., 1993)。しかし、AWC 神経をレーザーで破壊しても高濃度イソアミルアルコールに対する忌避行動に影響を及ぼさなかった(図 4-7a)。誘引性の匂い物質を感知する感覚神経 AWA (Sengupta et al., 1996) を破壊しても、AWC 神経を破壊したときと同様に、高濃度イソアミルアルコールに対する忌避行動に影響を及ぼさなかった(図 4-7a)。これらの結果から、低濃度の匂いへの誘引行動に重要な感覚神経 AWC、AWA は高濃度のイソアミルアルコールに対する応答には関与しないことが示された。次に、忌避性の匂い物質や高濃度のベンズアルデヒドに対する忌避行動に重要な感覚神経 AWB、ADL の関与について調べた(Troemel et al., 1995; Troemel et al., 1997; Sambongi et al., 1999; Chao et al., 2004; Tsui and van der Kooy, 2008)。AWB 神経を破壊した線虫は、高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動に異常を示した(図 4-7a)。このうちいくつかの個体では、高濃度のイソアミルアルコールへの誘引が起こるがその後の忌避行動が観察されなかった(図 4-7b の AWB ablation)。この結果は、AWB 神経の機能が欠損していることで知られる *tax-2* 変異体(Troemel et al., 1997)が高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動に異常を示すことと一致する(図 4-7c)。感覚神経 ADL を破壊すると AWB 神経のときと同様に忌避行動が減弱した(図 4-7a)。次に、ODR-3 が高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動の際に主に機能する感覚神経 ASH の関与を調べた。感覚神経 ASH を破壊すると著しく忌避行動が減弱した(図 4-7a)。また、ASH 神経を破壊した個体の中には、匂いを忌避できずに、スポットした匂いに触れてしまい死んでしまうものもいた(図 4-7b の ASH ablation)。これらのことから、高濃度のイ

ソアミルアルコールに対する忌避行動には感覚神経 AWB、ADL、ASH が関与することが分かった。

これらの感覚神経のイソアミルアルコールに対する忌避行動への貢献の度合いを測るために、3 種類の感覚神経のうち 2 種類、もしくは 3 種類すべてを破壊した線虫の行動を測定した。AWB、ADL 神経を同時に破壊しても AWB、ADL いずれかを単独で破壊したときと忌避の減弱の程度が変わらなかった(図 4-7a)。さらに AWB、ADL、ASH 神経を同時に破壊しても ASH を単独で破壊したときと忌避の減弱の程度が同じであった(図 4-7a)。これらのことから、感覚神経 ASH、AWB、ADL が高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動を調節しており、中でも感覚神経 ASH は主要な役割を果たしていることが明らかになった(図 4-7d)。低濃度のイソアミルアルコールへの誘引が感覚神経 AWC により担われていることと合わせ、以上の結果より匂いの濃度に依存した嗜好性の変化は関わる感覚神経の組み合わせが変化することで調節されていると結論づけられる。

#### 4.3.2. 匂いの濃度に依存した行動は一部、共通の介在神経により調節される

次に、高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動を制御する感覚神経からシナプス入力を受け取る介在神経の関与を調べた。第 1 章 1.5.2. で述べたように、感覚神経 AWC の下流にある介在神経 AIB と AIY は低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動を制御している (Bargmann et al., 1993; Chalasani et al., 2007)。神経接続の解剖学的な知見から (White et al., 1986)、介在神経 AIB は感覚神経 ASH、ADL からシナプス入力を受け取っている(図 4-7d)。AIB 神経を破壊すると、忌避行動が減弱し、高濃度のイソアミルアルコールに誘引されるようになった(図 4-7e)。これは、介在神経 AIB が高濃度のイソアミルアルコールからの忌避行動の制御に重要な役割を果たすことを示唆している。感覚神経 ASH や AWB とシナプス接続している介在神経 AIZ を破壊してもイソアミルアルコールに対する忌避行動が減弱した(図 4-7e)。介在神経 AIY は感覚神経 AWC や介在神経 AIZ とシナプス接続している。AIY 神経を破壊した線虫はわずかなではあるが有意に忌避行動が低下した(図 4-7e)。これらのことから、介在神経 AIB、AIZ、AIY は高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動を制御しており、高濃度の匂いに対する

行動を制御する介在神経ネットワークは低濃度の匂いに対する行動を制御する介在神経ネットワークと部分的に重複していることが示された。

感覚神経 ASH は後退運動を引き起こす指令介在神経 AVA および AVE と、感覚神経 ADL は AVA 神経と直接シナプスを形成している(図 4-7d)(Chalfie et al., 1985)。AVA 神経を破壊するとイソアミルアルコールに対する忌避行動が減弱したが、AVE 神経を破壊しても影響を及ぼさなかった(図 4-7f)。さらに、AVA、AVE 神経を同時に破壊しても AVA 神経を破壊したときの効果と同程度であった(図 4-7f)。これらのことから、指令介在神経 AVA はおそらくピルエット行動の引き金となる後退運動を制御することで、高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動を調節していると考えられる。

#### 4.4. 様々な濃度の匂いに対する神経応答の測定

##### 4.4.1. 感覚神経 AWC は低濃度の匂い刺激にのみ応答する

神経破壊した線虫の行動測定から、イソアミルアルコールへの走性は濃度に依存して関与する感覚神経の組み合わせが変化することで調節されていることが明らかになった。そこで、感覚神経 AWC、ASH、AWB、ADL がイソアミルアルコールに応答するのか、もし応答するのならば、それらの応答が匂いの濃度に依存して変化するのかどうかを調べた。匂い物質を溶解させたバッファーを線虫の鼻先に当てることで刺激し、 $\text{Ca}^{2+}$ インジケータ GCaMP で神経応答をライブイメージングした(第 2 章 2.9.1.参照)。

1 対ある感覚神経 AWC は、ある嗅覚受容体の発現の有無でそれぞれ  $\text{AWC}^{\text{ON}}$ 、 $\text{AWC}^{\text{OFF}}$  と呼ばれており(Troemel et al., 1999)、 $\text{AWC}^{\text{ON}}$ 、 $\text{AWC}^{\text{OFF}}$  のいずれもイソアミルアルコールを取り除いたときに活性化する(Chalasani et al., 2007)。過去に報告されていた通り、 $\text{AWC}^{\text{ON}}$  神経の  $\text{Ca}^{2+}$  のレベルは  $10^4$ 、 $10^6$  倍に希釈したイソアミルアルコールを加えたときに低下し、除いたときに上昇した(図 4-8a,b の Wild-type)。しかし、予想に反して、 $\text{AWC}^{\text{ON}}$  神経は先ほどよりも濃い  $10^2$  倍希釈のイソアミルアルコールには応答しないことが明らかとなった(図 4-8a,b の Wild-type)。この結果からは、高濃度( $10^2$  倍希釈)のイソアミルアルコール刺激により  $\text{AWC}^{\text{ON}}$  神経が損傷し、匂いに応答できなくなった可能性も考えられる。そこで、 $10^2$  倍に希釈したイソアミルアルコー

ルを与えた後に、 $10^4$  倍に希釈したイソアミルアルコールに対する  $AWC^{ON}$  神経の応答を測定したところ、 $AWC^{ON}$  神経は  $10^4$  倍希釈したイソアミルアルコールに応答を示した(図 4-8c,d)。従って、高濃度のイソアミルアルコール刺激による  $AWC^{ON}$  神経の機能の損失が、匂いに対する応答の消失の原因である可能性は否定された。

そこで、この応答の消失が  $AWC^{ON}$  自体の制御によるものなのか、もしくは  $AWC^{ON}$  以外の神経の制御によるものなのかを調べるために、*unc-13* 変異体における  $AWC^{ON}$  神経の匂いに対する応答を測定した。*UNC-13* は、ほぼ全てのプレシナプスにおいて、シナプス小胞と細胞膜が融合する準備段階のプライミングの過程で、*UNC-64*/シンタキシンに結合している *UNC-18*/シャペロンを解離させることで、シンタキシンを膜融合が可能なコンフォメーションに変化させると考えられている(Richmond et al., 1999; Sassa et al., 1999)。*unc-13* 変異体ではシナプス小胞が細胞膜と融合できなくなり、神経伝達物質の放出が阻害される。野生型線虫のときとは異なり、*unc-13* 変異体の  $AWC^{ON}$  神経は  $10^2$  倍希釈のイソアミルアルコールに応答を示した(図 4-8e,f)。このことから、高濃度のイソアミルアルコールに対する  $AWC^{ON}$  神経の応答は、他の神経からの神経伝達物質により抑制されていることが示唆された。

#### 4.4.2. 高濃度の匂い物質からの忌避に関わる感覚神経は匂いの濃度に依存して応答が変化する

高濃度イソアミルアルコールに対する忌避行動にもっとも重要な役割を果たす感覚神経 *ASH* の応答を測定した。先行研究から、キニンや  $Cu^{2+}$  などの侵害刺激を与えたときに、*ASH* 神経の  $Ca^{2+}$  レベルが上昇することが分かっている(Hilliard et al., 2005)。感覚神経 *AWC* のときとは対照的に、感覚神経 *ASH* の  $Ca^{2+}$  レベルは  $10^2$  倍希釈のイソアミルアルコールを与えたときに上昇したが、 $10^4$ 、 $10^6$  倍希釈のイソアミルアルコールを与えても  $Ca^{2+}$  レベルの有意な上昇は観察されなかった(図 4-8g,h の Wild-type)。この結果は、*ASH* 神経を破壊すると高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動は減弱するが(図 4-7a)、低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動には効果がみられないことと一致する(図 4-9a の *Is[ASH::mCasp1]*)。また、人為的に *ASH* 神経を活性化させると、忌避行動に重要な後退運動が引き起こされることが報告されている(Guo et al., 2009)。以上のことから、感覚神経 *ASH* は高濃度のイソアミルアルコール刺激によってのみ活

性化され、匂いの濃度が濃くなったときに忌避行動に重要な後退運動を引き起こしていると考えられる。

次に、高濃度イソアミルアルコールに対する忌避行動に関与する感覚神経 AWB の応答を測定した。AWB 神経は忌避性の匂い物質である 2-ノナノンに対する忌避行動を制御しており、2-ノナノンを取り除いたときに活性化することが知られている(Troemel et al., 1995; Ha et al., 2010)。感覚神経 AWB の  $\text{Ca}^{2+}$  レベルはイソアミルアルコールを取り除いたときに上昇し、ASH 神経のときと同様、 $10^2$  倍希釈のときにのみその応答がみられ、 $10^4$ 、 $10^6$  倍希釈のときは観察されなかった (図 4-8j の Wild-type)。これらのことから、感覚神経 AWB は高濃度のイソアミルアルコールを取り除いたときのみ活性化され、この神経応答が忌避行動を制御していると考えられる。予想に反して、AWB 神経の  $\text{Ca}^{2+}$  レベルは  $10^4$  倍希釈のイソアミルアルコールを与えたときにも上昇した(図 4-8i の Wild-type)。AWB 神経を遺伝学的に破壊した線虫の低濃度のイソアミルアルコールへの化学走性を測定したところ、僅かではあるが有意に誘引行動の減弱がみられた (図 4-9a の  $\times 10^{-4}$  の *Is[AWB::mCasp1]*)。これらのことから、比較的低濃度のイソアミルアルコールを与えたときにみられる AWB 神経の活性化は、低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動と関連している可能性が考えられる(第 4 章 4.5.1.参照)。

最後に、高濃度イソアミルアルコールに対する忌避行動に関与する感覚神経 ADL の応答を測定した。ADL 神経は、雌雄同体に対して忌避性のアスカロシドというフェロモン C9(*ascr#3* と呼ばれている)を与えたときに活性化することが知られている(Jang et al., 2012; Srinivasan et al., 2012)。感覚神経 ADL の  $\text{Ca}^{2+}$  レベルは、ASH 神経のときと同様、 $10^2$  倍希釈のイソアミルアルコールを与えたときに上昇し、 $10^4$  倍希釈のときには応答が観察されなかった (図 4-8k,l)。これらのことから、感覚神経 ADL は高濃度のイソアミルアルコール刺激によってのみ活性化され、忌避行動を制御していると考えられる。

以上の結果から、イソアミルアルコールの濃度に依存して感覚神経 AWC、ASH、AWB、ADL における応答の強さ、もしくは応答のパターンが変化することが明らかとなった。このことから、匂いの濃度の違いによって生み出された感覚神経における応答の差異が、匂いに対する行動を切り替えていると推察される。

#### 4.4.3. ODR-3 は匂いの濃度に依存して異なる感覚神経で匂いのシグナルを伝達する

野生型線虫の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングにより、感覚神経 AWC、ASH、AWB でそれぞれ匂いの濃度依存的な応答が観察された。そこで次に、図 4-5a に示すように匂いの濃度に依存した行動に欠陥を示す *odr-3* 変異体において、これらの感覚神経の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行うことにした。まず始めに、*odr-3* 変異体における感覚神経 ASH、AWB のイソアミルアルコールに対する応答を測定した。その結果、ASH 神経の  $10^2$  倍希釈のイソアミルアルコールに対する応答は *odr-3* 変異体で完全に消失した(図 4-8g,h の *odr-3*)。野生型線虫のときと同様、変異体においても  $10^4$ 、 $10^6$  倍に希釈したイソアミルアルコールに対する応答はみられなかった(図 4-8g,h の *odr-3*)。これらのことから、ODR-3 は感覚神経 ASH においてイソアミルアルコールのシグナル伝達を制御していると考えられる。一方、*odr-3* 変異体における感覚神経 AWB のイソアミルアルコールに対する応答は野生型線虫の応答と変わらなかった(図 4-8i,j の *odr-3*)。しかし、*odr-3* 変異体の高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動の欠陥は AWB 神経に野生型の ODR-3 を発現させることで回復する(図 4-6a)。これら 2 つの実験から生じる矛盾の原因については第 4 章 4.6.1. に考察する。

次に、*odr-3* 変異体における感覚神経  $\text{AWC}^{\text{ON}}$  のイソアミルアルコールに対する応答を測定した。しかし、どの希釈倍率のイソアミルアルコールに対しても *odr-3* 変異体は野生型線虫と同様の神経応答を示した(図 4-8a,b の *odr-3*)。一方、*odr-3 gpa-3* 変異体では、 $10^8$  倍に希釈したイソアミルアルコールに対する  $\text{AWC}^{\text{ON}}$  神経の応答が、野生型線虫と比較して有意に低下した(図 4-8m,n の *odr-3 gpa-3*)。これらの結果は、低濃度のイソアミルアルコールへの化学走性の際、*odr-3 gpa-3* の二重変異体が、*odr-3* 変異体に比べてより強い欠陥を示すことと一致する(図 4-5a)。従って、過去の行動実験で提唱されていたように、ODR-3 と GPA-3 の両方の  $\text{G}\alpha$  が感覚神経  $\text{AWC}^{\text{ON}}$  において低濃度のイソアミルアルコールのシグナル伝達を制御していると考えられる。

以上の結果から、ODR-3 は、感覚神経 AWC で低濃度のイソアミルアルコールのシグナルを、感覚神経 ASH で高濃度のイソアミルアルコールのシグナルを伝達していることがわかった。この結果は、過去の遺伝学的な行動解析(Lans et al., 2004)や、細胞特異的レスキュー実験(図 4-6a)や細胞特異的ノックダウン実験(図 4-6d)の結果を支持するものであり、感覚神経 ASH の ODR-3



を介したシグナル伝達が、高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動に重要であることを示唆している。

#### 4.5. 考察：匂いの濃度に依存した行動変化を制御する神経回路メカニズム

##### 4.5.1. 匂いの濃度に依存した行動変化を制御する神経メカニズム

本研究では、哺乳類に比べて単純な神経回路をもつ線虫 *C. elegans* の化学走性に着目し、低濃度では誘引性の匂い物質が、高濃度では忌避行動を引き起こす現象を「匂いの濃度に依存した嗜好性の変化」のモデルにして神経回路レベルでの解析を行った。その結果、同じ匂い物質への化学走性であっても、匂いの濃度の違いにより起こる誘引行動と忌避行動には異なる組み合わせの感覚神経が関与しており、それらの感覚神経では匂いに対する応答が濃度によって変化することが明らかになった。感覚神経 AWB は低濃度の匂い物質への誘引行動に重要であることが知られている(Bargmann et al., 1993)。一方、*odr-3* 変異体の遺伝学的解析と神経破壊実験の結果から、感覚神経 ASH が高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動に最も重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングの結果から、感覚神経 AWB は低濃度のイソアミルアルコールに対してのみ応答し、一方で、感覚神経 ASH は高濃度のイソアミルアルコールに対してのみ応答を示すことがわかった。つまり、匂いの濃度に依存した行動変化の制御に主要な役割を果たす感覚神経では、神経の種類ごとに匂い物質に応答する濃度の範囲が分かれていた(図 4-10)。これにより、動物は、例えば誘引行動や忌避行動のような二者択一の行動出力を確実に遂行できるようにしていると考えられる。

感覚神経 AWB 神経を破壊した結果と感覚神経 ASH を破壊した結果を比較すると、感覚神経 AWB が高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動に及ぼす影響は感覚神経 ASH に比べて小さい(図 4-7a)。AWB 神経は忌避性の匂い物質ノナノンに対する忌避行動を制御し、ノナノンが除去されたときに活性化するため(Troemel et al., 1997; Ha et al., 2010)、図 4-8j (Wild-type) に示した高濃度( $10^2$  倍希釈)のイソアミルアルコールを除去したときの AWB 神経の活性化は、イソアミルアルコールからの忌避行動に重要であると考えられる。一方で、 $10^4$  倍希釈のイソアミルアルコールを与えたときも AWB 神経は活性化した(図 4-8i の Wild-type)。それでは、この匂

いを与えたときの AWB 神経の活性化は行動にどのような影響を及ぼしているのだろうか。AWB 神経を遺伝学的に破壊した線虫では、低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動が僅かではあるが有意に減弱した(図 4-9a)。このことから、匂いを与えたときにみられる AWB 神経の活性化は低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動に関与していると予想される。つまり、感覚神経 AWB は匂いの濃度の違いにより起こる誘引行動と忌避行動の両方の制御に関与していると考えられる。限定的な場合においてであるが、単一の嗅覚神経がある匂い物質に対する行動を誘引から忌避へと切り替え得ることが報告されている(Tsunozaki et al., 2008)。この知見は、AWB 神経が匂いの濃度に応じた誘引行動と忌避行動の両方を制御している可能性を支持しており、AWB 神経が匂いの濃度に依存した嗜好性の切り替えに寄与していると考えられる。

#### 4.5.2. 線虫ではハエとは多少異なるメカニズムで匂いの濃度に依存して嗜好性が切り替わる

最近になり、*Drosophila* において、匂いの濃度に依存した嗅覚行動の切り替えを制御する神経メカニズムが報告された(Semmelhack and Wang, 2009)。食物の匂いであるリンゴ酢は、低濃度では、誘引行動を制御するいくつかの糸球体を活性化し、誘引行動を引き起こす。一方、高濃度のリンゴ酢は忌避行動を引き起こすが、このとき忌避行動を引き起こす糸球体が活性化されることに加えて、低濃度のリンゴ酢への誘引行動を引き起こす際に活性化される糸球体の活性化も観察される。この結果とは対照的に、線虫では、高濃度のイソアミルアルコール刺激に対して、誘引行動を制御する感覚神経  $AWC^{ON}$  の応答がみられなくなる。線虫において、誘引性匂い物質を高濃度で刺激したときに観察される誘引行動に重要な感覚神経の応答の消失は、ショウジョウバエとは異なる、匂いの濃度変化に対して効率的に嗜好性を切り替えるメカニズムのひとつであると言える。

#### 4.5.3. 感覚神経 $AWC^{ON}$ の高濃度の匂いへの応答が抑制されるメカニズム

$Ca^{2+}$  イメージングの結果から、 $AWC^{ON}$  神経はイソアミルアルコールに対して  $10^2$  倍希釈のときのみ応答しなくなり、この応答の消失は  $AWC^{ON}$  以外の神経からの神経伝達物質を介した神経活動の抑制によるものであると考えられる(図 4-8a,b の Wild-type、4-8e,f の *unc-13*)。ここでは、

具体的にどの神経細胞が応答の抑制を行っているのかについて考察する。神経破壊実験と  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングにより、高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動に重要な感覚神経 ASH、AWB、ADL は、高濃度( $10^2$  倍希釈)のイソアミルアルコールに対してのみ応答するか、もしくは、高濃度( $10^2$  倍希釈)のイソアミルアルコールに対して低濃度( $10^4$  倍もしくは  $10^6$  倍希釈)のときにはみられない応答を示すことがわかった(図 4-8g-l)。これらのことから、これらの感覚神経の応答がシナプス伝達を介して、高濃度のイソアミルアルコールに対する  $\text{AWC}^{\text{ON}}$  神経の応答を抑制している可能性が考えられた。そこで、感覚神経 ASH もしくは AWB を遺伝学的に破壊した株の  $10^2$  倍希釈のイソアミルアルコールに対する  $\text{AWC}^{\text{ON}}$  神経の応答を測定した。しかし、これらの株では、*unc-13* 変異体でみられたような高濃度のイソアミルアルコールに対する  $\text{AWC}^{\text{ON}}$  神経の応答は観察されなかった(図 4-11a,b)。図 4-11c に示すように、感覚神経 AWC は、感覚神経 ADL とは直接シナプス接続しており、感覚神経 ASH とは介在神経 AIA を介して、感覚神経 AWB とは介在神経 AIZ、AIA を介してシナプス接続している。また、匂いに長時間さらされることで起こる感覚神経 AWC の匂いへの応答の消失は、介在神経 AIA から放出される神経ペプチドのネガティブフィードバックにより制御される(Chalasan et al., 2010)。これらのことから、高濃度のイソアミルアルコールに対する ADL 神経の応答が  $\text{AWC}^{\text{ON}}$  神経の応答を直接的に抑制している可能性や、ASH、AWB、ADL など複数の感覚神経の応答が AIA 神経に集約され  $\text{AWC}^{\text{ON}}$  神経の応答を抑制している可能性、もしくは、その両者の組み合わせが示唆される。これらの可能性を検証するために、上記の候補神経を破壊した状態での  $\text{AWC}^{\text{ON}}$  神経の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングや、介在神経 AIA を破壊した線虫の化学走性の測定が有効であると考えられる。

#### 4.6. 考察：匂いの濃度に依存した行動変化を制御する分子メカニズム

##### 4.6.1. ODR-3 がイソアミルアルコールのシグナルを伝達する神経細胞

*odr-3* 変異体の細胞特異的レスキュー実験の結果から、感覚神経 ASH もしくは AWB で ODR-3 が機能することが高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動には重要であることが示唆された(図 4-6a)。一方で、*odr-3* の細胞特異的ノックダウン実験や *odr-3* 変異体における  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングの結果から、高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動には、ASH 神経にお

ける ODR-3 の機能は重要であるが、AWB 神経での機能は重要でないことが示唆された(図 4-6d)。これらの実験結果から、ODR-3 は感覚神経 AWB では機能していない可能性が考えられる。*odr-3* 変異体の細胞特異的レスキュー実験において、AWB 神経に野生型の ODR-3 を発現させることで *odr-3* 変異体の異常の表現型が回復したのは、レスキュー株の AWB 神経では ODR-3 が過剰発現し、AWB 神経の忌避行動を出力する強さが正常より亢進したためかもしれない。この仮説を検証するためには、レスキュー株の AWB 神経において  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行い、 $\text{Ca}^{2+}$  応答が亢進しているか調べるのが有効であると考えられる。もちろん、AWB 神経での *odr-3* のノックダウン実験や AWB 神経での  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングにおいて、野生型線虫と差異があるものの本研究ではそれを検出できなかったことも考えられるため、ODR-3 が感覚神経 AWB においても機能している可能性を排除できるわけではない。

#### 4.6.2. イソアミルアルコールを受容する神経細胞に発現する嗅覚受容体

$\text{Ca}^{2+}$  イメージングにより、AWC 神経以外にもイソアミルアルコールに応答する感覚神経の存在が明らかになった。ASH 神経や ADL 神経は、高濃度のイソアミルアルコールに対してのみ応答を示した(図 4-8g,h,k,l)。このことから、これらの感覚神経にはイソアミルアルコールとの親和性が低い受容体が発現しており、匂い物質の濃度が濃くなることで受容体と接触する匂い分子の数が増え、これらの低親和性受容体でも受容されるようになった可能性が考えられる。実際、匂い物質ジアセチルについては、RNAi スクリーニングにより、ある G タンパク質共役型受容体の機能をノックダウンした線虫は高濃度のジアセチルに対する忌避行動に欠陥を示すことがわかり、その G タンパク質共役型受容体は、高濃度のジアセチルに対する忌避行動に重要だと考えられる感覚神経 ASH の  $\text{Ca}^{2+}$  応答には必要であるが、低濃度のジアセチルへの誘引行動に重要だと考えられる感覚神経 AWA の  $\text{Ca}^{2+}$  応答には必要でないことが明らかにされている(谷口、広津ら、私信)。このことは、イソアミルアルコールに対しても同様の低親和性受容体が存在する可能性を支持している。

感覚神経 AWB は低濃度と高濃度のイソアミルアルコール両方に対して応答し、匂いの濃度によって応答のパターンが異なっていた(図 4-8i,j)。AWB 神経における高濃度の匂いに対してのみ

みられる応答から、ASH 神経や ADL 神経のときと同様に、AWB 神経にもイソアミルアルコールの濃度が高くなければ結合しない低親和性の受容体が発現している可能性が考えられる。また、AWB 神経における低濃度の匂いに対してのみみられる応答から、AWB 神経には、イソアミルアルコールに結合する高親和性の受容体も発現していると考えられる。そして、この受容体により引き起こされるであろう  $\text{Ca}^{2+}$  応答は高濃度のときにはみられなくなる(減弱する)ことから、AWC 神経のときと同様に、高濃度の匂い刺激のときは他の神経からの抑制を受けている可能性が考えられる。

#### 4.7. 考察：匂いの濃度の差異により起こる行動の違いを制御する行動戦略を調節する感覚神経の候補

過去の報告と本研究から、低濃度と高濃度の匂いに対する走性にそれぞれ重要な感覚神経が同定され、また、それぞれの化学走性を制御する行動戦略の作用の違いも明らかになった(Bargmann et al., 1993; Pierce-Shimomura et al., 1999; Iino and Yoshida, 2009)。感覚神経 ASE は NaCl への誘引行動を制御する 2 つの行動戦略の両方を調節していることが示されている(Iino and Yoshida, 2009)。そこで、ここではどの感覚神経が匂いの走性を制御する 2 つの行動戦略を制御しているのかについて考察したい。まずは、低濃度の匂いの走性について記述する。感覚神経 AWC は低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動に重要である(Bargmann et al., 1993)。そこで、AWC 神経を遺伝学的に破壊した株の低濃度のイソアミルアルコールへの走性を測定したところ、その株では誘引行動が減弱し、匂いへ向かうように作用するピルエット応答と風見鶏応答の両方が減弱した(図 4-12a,b)。これらのことから、低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動を制御する 2 つの行動戦略は主に感覚神経 AWC によって制御されることが示唆された。本研究で、感覚神経 AWB の低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動への寄与が予想されたことから、AWB 神経の 2 つの行動戦略への関与の可能性についても調べたい。

続いて、高濃度の匂いに対する走性について記述する。高濃度のイソアミルアルコールから忌避しているとき、匂いから遠ざかるように働くピルエット応答が観察された(図 4-4a の Higher concentration of IAA)。イソアミルアルコールに対する忌避行動に最も重要な役割を果たす感覚

神経 **ASH** を遺伝学的に破壊しても、忌避行動は減弱したが、ピルエット応答に変化はみられなかった(データは示さない)。この原因として考えられるいくつかの可能性を以下に列挙する。ひとつは、匂いを忌避するピルエット応答に **ASH** 神経以外の感覚神経も関与している可能性がある。神経破壊実験の結果から、イソアミルアルコールに対する忌避行動には、感覚神経 **AWB** や **ADL** も関与していることが示された。それゆえに、**ASH** 神経と **AWB** 神経もしくは **ADL** 神経、または 3 つすべての感覚神経が匂いを忌避するピルエット応答に必要なのかもしれない。もうひとつは、**ASH** 神経の破壊により忌避行動の減弱は検出できるが、ピルエット応答の減弱は検出できていない可能性である。ピルエット行動は、図 2-4d に示すように約 0.02-0.035 回/秒の確率でしか起こらない頻度の低い行動であるため、測定する個体数を増やしたとしても、ピルエット指数(olfactory pirouette index)は少ない回数のピルエット行動から算出されることになる。

**ASH** 神経を破壊した線虫の中には、図 4-7b の **ASH ablation** に示すように、匂い付近でピルエット行動などを使った忌避行動を行わず、匂いに直進して死んでしまう個体も観察されるため、死ぬことによって匂い突入後のピルエット行動は計測されなくなる。このような要因により、**ASH** 神経を破壊したピルエット応答の分散が増し野生型線虫との差を検出できないのかもしれない。この可能性を検証するために、別のアッセイ系で行動測定を行うことが有効であると考えられる。最後に、高濃度のイソアミルアルコールから忌避しているとき、匂いに向かっていくような風見鶏応答を制御する感覚神経の候補について考察する。最も有力な候補は、低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動を主に制御し、このときの風見鶏応答に関与する感覚神経 **AWC** である。しかし、匂いをバッファーに溶かして線虫に匂いを与えたときの  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングの結果から、感覚神経 **AWC<sup>ON</sup>** は高濃度のイソアミルアルコールには応答しないことが示された。このことから、**AWC<sup>ON</sup>** 神経が匂いに向かっていくような風見鶏応答を制御している可能性は考え難いが、感覚神経 **AWC** のもう片方の **AWC<sup>OFF</sup>** 神経が高濃度のイソアミルアルコールに応答し、**AWC<sup>OFF</sup>** 神経が匂いに向かっていくような風見鶏応答を制御している可能性は考えられる。神経破壊実験により、高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動に重要な感覚神経 **ASH**、**AWB**、**ADL** が同定され、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングにより、これらの神経は高濃度のイソアミルアルコールに応答することがわかった。これらの結果から、上記の感覚神経は確かに忌避行動には重要である

が、匂いに向かっていくような風見鶏応答を制御している可能性も否定はできない。感覚神経 **ASH** を遺伝学的に破壊しても、風見鶏応答に変化はみられなかったが(データは示さない)、他の **AWB** 神経や **ADL** 神経の風見鶏応答への関与や、**ASH**、**AWB**、**ADL** の複数の感覚神経の風見鶏応答への関与の可能性はまだ検証できていないため、今後これらの神経を破壊した線虫の行動解析を行っていきたい。また、高濃度のイソアミルアルコールの勾配上で、線虫が匂いに向かっていくような風見鶏応答を行っている際に、どの感覚神経が応答を示すのかを  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングで測定することができれば、この問題の解決に貢献できるものと考えられる。

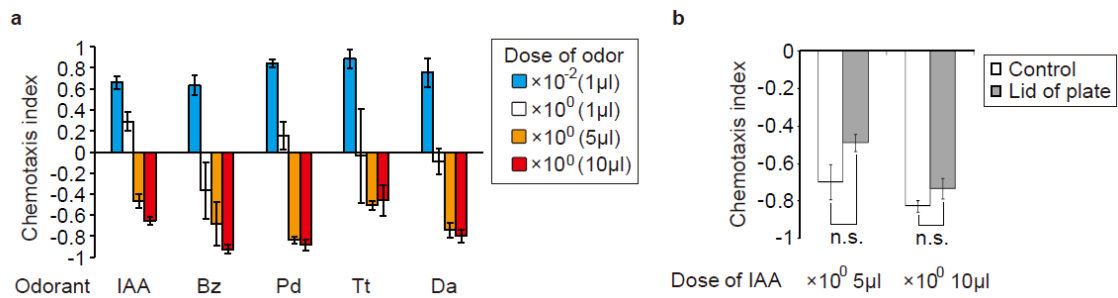


図 4-1 線虫は匂いの濃度に依存して嗜好性を変化させる  
 (a) 野生型線虫の様々な匂いに対する濃度依存的な行動の変化。略語の意味は、IAA；イソアミルアルコール (N=8-9), Bz；ベンズアルデヒド (N=8), Pd；ペンタンジオン (N=7), Tt；トリメチルチアゾール (N=3), Da；ジアセチル (N=10)。 (b) 匂い物質を寒天プレート (Control) もしくは、プレートの蓋 (Lid of plate) に置いたときの野生型線虫の高濃度のイソアミルアルコールに対する行動。N=5。Studentの t 検定では有意な差はみられなかった。n.s.；not significant。エラーバーは S.E.M. を表す。



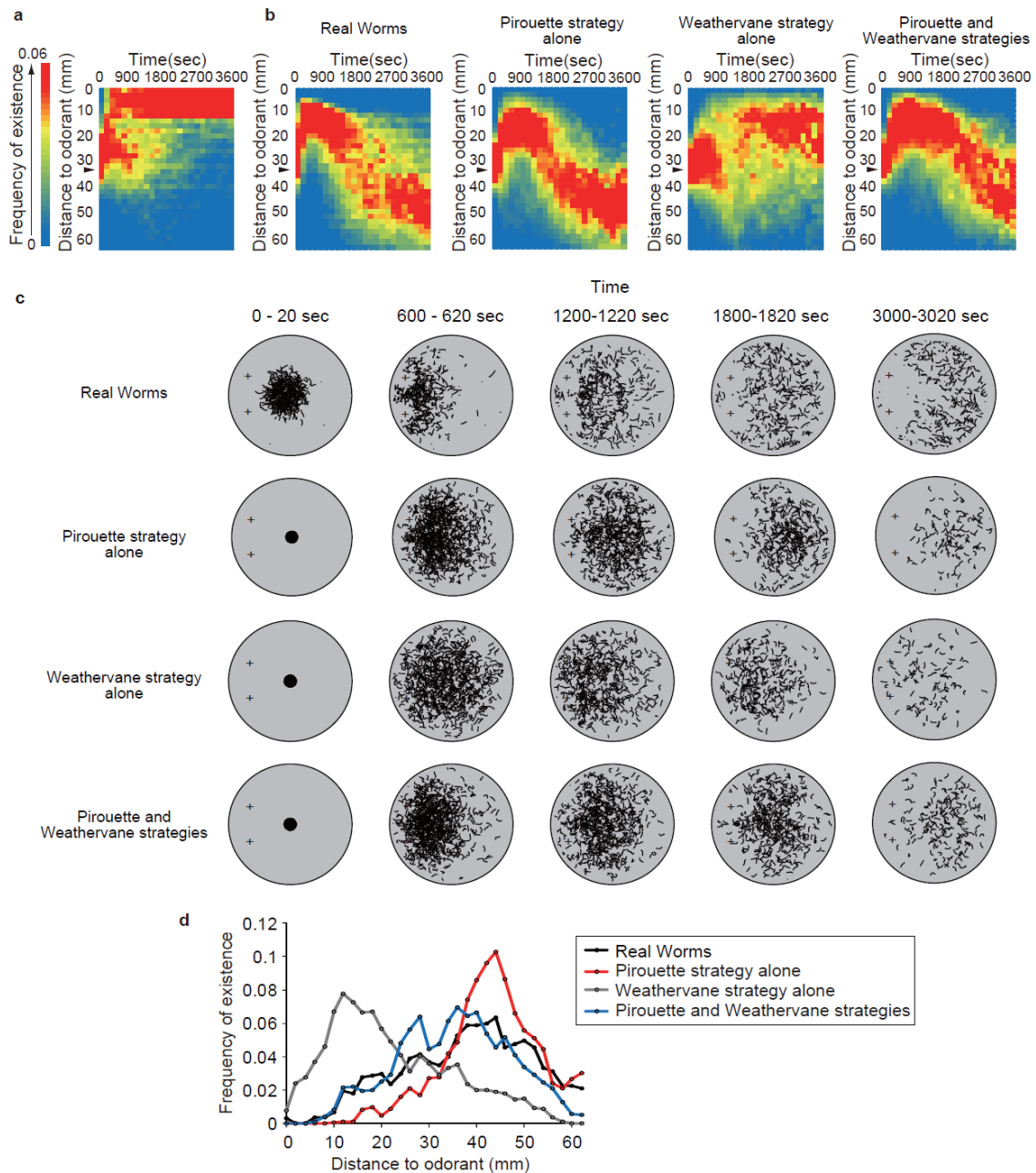


図 4-2 高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動のコンピューターシミュレーション解析

(a)  $10^2$  倍希釈した 1  $\mu$ l のイソアミルアルコールの勾配上の野生型線虫の存在頻度の分布。N=11 アッセイ。(b) 原液のイソアミルアルコール 5  $\mu$ l の勾配上での野生型線虫 (Real Worms)、もしくはコンピューターシミュレーションしたモデル線虫 (Pirouette strategy alone, Weathervane strategy alone, Pirouette and Weathervane strategies) の存在頻度の分布。野生型線虫 (Real Worms); N = 約 1000 匹 (11 アッセイ), コンピューターシミュレーションしたモデル線虫; N = 1000 匹。(a,b) 縦軸は匂いを置いた地点と個々の線虫との距離を表している。黒い三角印 (▶) は線虫のスタート地点を示す。(c) 原液の 5  $\mu$ l のイソアミルアルコールに対する野生型線虫 (Real Worms)、もしくはコンピューターシミュレーションしたモデル線虫 (Pirouette strategy alone, Weathervane strategy alone, Pirouette and Weathervane strategies) の行動の軌跡。匂い物質は 2 つの「+」マークに置いた。軌跡の表示の時間間隔は 20 秒である。すべてのモデル線虫は寒天プレートからスタートするものとした。野生型線虫 (Real Worms); N = 約 1000 匹 (11 アッセイ), モデル線虫; N = 1000 匹。(d) 原液のイソアミルアルコール 5  $\mu$ l の勾配上での 2850 秒 - 3000 秒までの間の匂いまでの野生型線虫、もしくはモデル線虫の存在頻度の分布。野生型線虫 (Real Worms); N = 約 1000 匹 (11 アッセイ), モデル線虫; N = 1000 匹。

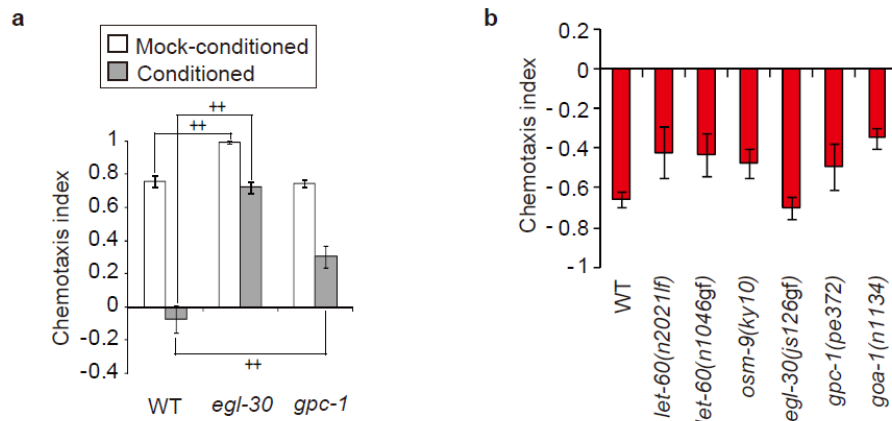


図 4-3 嗅覚順応 (嗅覚可塑性) に欠陥を示す変異体は高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動に顕著な異常を示さない

(a) 野生型線虫と *egl-30(js126 gf)* 変異体、*gpc-1(pe372)* 変異体を 60 分間、水 (Mock-conditioned) もしくはイソアミルアルコール水溶液 (Conditioned) に浸して前曝露させたときの嗅覚順応の表現型。 *egl-30* 変異体、*gpc-1* 変異体は嗅覚順応に欠陥を示した。 ++ は野生型線虫と比べて有意に差があることを示す (Dunnett 検定で  $p < 0.01$ )。  $N = 6$ 。 (b) 嗅覚順応に欠陥を示す *let-60(n2021 lf)* 変異体、*let-60(n1046 gf)* 変異体、*osm-9(ky10)* 変異体、*egl-30(js126 gf)* 変異体、*gpc-1(pe372)* 変異体、*goa-1(n1134)* 変異体の原液の 5  $\mu$ l のイソアミルアルコールに対する化学走性。これらの変異体は高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動には欠陥を示さなかった (Dunnett 検定で  $p > 0.05$ )。  $N = 6-8$ 。 (a,b) 略語の意味は WT ; wild-type。 エラーバーは S.E.M. を表す。

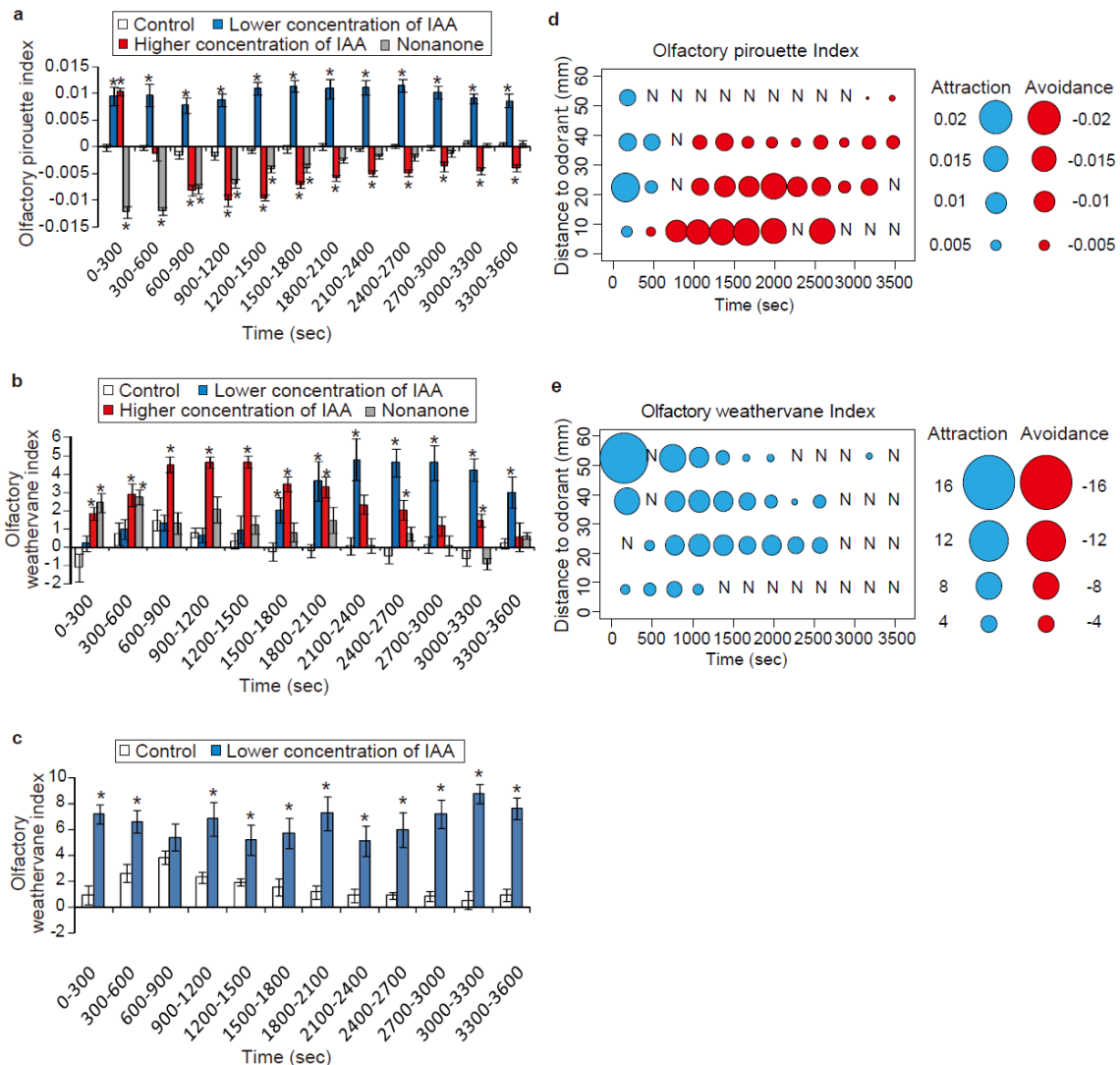


図 4-4 匂いに対する化学走性の際のピルエット応答と風見鶏応答 (a,b) 匂いのない寒天プレート上 (Control)、もしくは、低濃度のイソアミルアルコール (Lower concentration IAA;  $10^2$  倍希釈のイソアミルアルコール 1  $\mu$ l)、高濃度のイソアミルアルコール (Higher concentration IAA; 原液のイソアミルアルコール 5  $\mu$ l)、2-ノナノン (Nonanone; 10 倍希釈のノナノン 1  $\mu$ l) の濃度勾配が形成された寒天プレート上での野生型線虫のピルエット応答 (a) と風見鶏応答 (b)。N = 8-10。 (c) 図 2-1c に示すように匂いが線虫に近いところに置かれたときの、低濃度イソアミルアルコール勾配上 (Lower concentration IAA;  $10^4$  倍希釈のイソアミルアルコール 1  $\mu$ l) での野生型線虫の風見鶏応答。Control は匂いがないときの野生型線虫の風見鶏応答を示す。N = 9-10。 (a-c) \* は Control と比べて有意に差があることを示す (Dunnett 検定で  $p < 0.05$ )。略語の意味は、IAA; イソアミルアルコール。エラーバーは S.E.M. を表す。 (d,e) 野生型線虫の高濃度のイソアミルアルコール (原液のイソアミルアルコール 5  $\mu$ l) に対する走性行動の際のピルエット応答 (d) と風見鶏応答 (e)。N = 9。各円の直径は、それぞれの時間、それぞれの線虫から匂いまでの距離における olfactory pirouette index (d)、もしくは olfactory weathervane index (e) の値を示す。時間と距離の間隔はそれぞれ 300 秒と 15 mm。円のサイズはそれぞれの値の大きさを示している。青色と赤色は、各々の行動戦略がそれぞれ匂いに近寄る、もしくは匂いから遠ざかるように働くことを意味している。「N」は Student の t 検定で、olfactory pirouette index もしくは olfactory weathervane index が 0 と比較して有意な差がみられなかった ( $p > 0.05$ ) ことを示す。

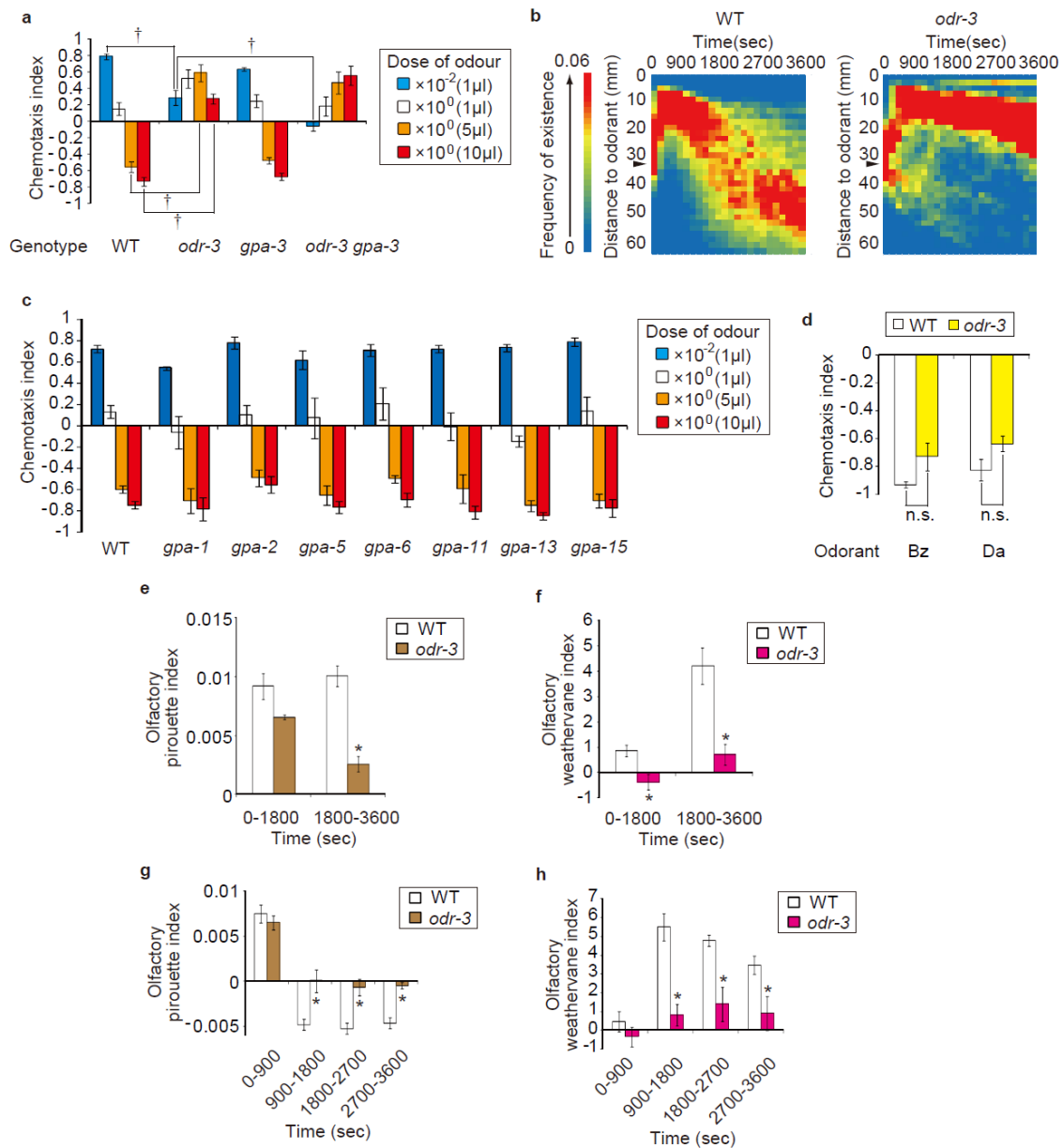


図 4-5 G タンパク質  $\alpha$  サブユニットである ODR-3 はイソアミルアルコールの濃度に依存した応答を調節する  
 (a) *odr-3* 変異体、*gpa-3* 変異体、*odr-3 gpa-3* 二重変異体の様々な濃度のイソアミルアルコールに対する走性行動の表現型。*odr-3* 変異体は低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動と高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動の両方に欠陥を示した。†は Tukey 検定で有意に差があることを示す ( $p < 0.01$ )。N = 5-7。 (b) 原液のイソアミルアルコール 5  $\mu$ l の勾配上での野生型線虫 (N = 9) と *odr-3* 変異体 (N = 7) の存在頻度の分布。縦軸は匂いを置いた地点と個々の線虫との距離を表している。黒い三角印 (▶) は線虫のスタート地点を示す。*odr-3* 変異体は、高濃度のイソアミルアルコールに誘引されるが正常に忌避できなかった。 (c) G タンパク質  $\alpha$  サブユニットをコードする遺伝子の変異体の様々な濃度のイソアミルアルコールに対する走性行動の表現型。Dunnnett 検定では有意な差は検出されなかった ( $p > 0.05$ )。N  $\geq$  4。 (d) *odr-3* 変異体の原液の 5  $\mu$ l のベンズアルデヒド (Bz; N = 6)、もしくはジアセチル (Da; N = 6) に対する走性行動の表現型。Dunnnett 検定では有意な差は検出されなかった ( $p > 0.05$ )。 (e, f)  $10^2$  倍希釈した 1  $\mu$ l のイソアミルアルコールの勾配でのビルエット応答 (e) と風見鶏応答 (f) に対する *odr-3* 変異の効果。WT; N = 11, *odr-3*; N = 8。 (g, h) 原液のイソアミルアルコール 5  $\mu$ l の勾配でのビルエット応答 (g) と風見鶏応答 (h) に対する *odr-3* 変異の効果。WT; N = 11, *odr-3*; N = 7。 (e, f, g, h)\* は Control と比べて有意に差があることを示す (Dunnnett 検定で  $p < 0.05$ )。略語の意味は WT; wild-type, n.s.; not significant。エラーバーは S.E.M. を表す。

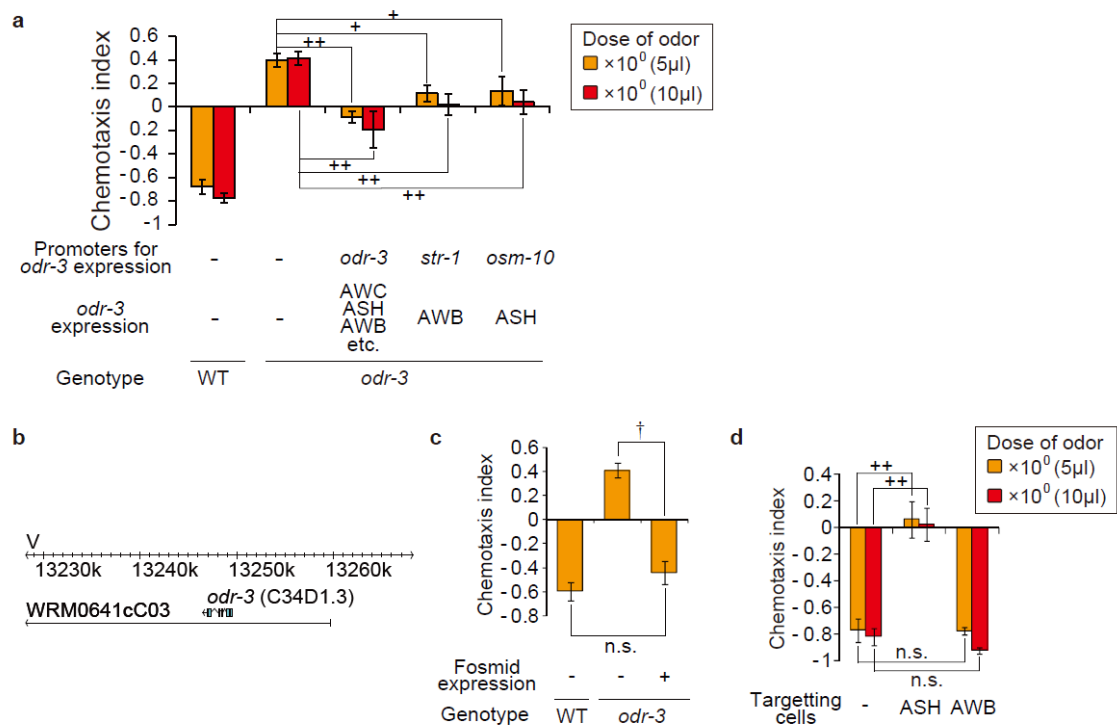


図 4-6 ODR-3 は感覚神経 ASH において高濃度のイソアミルアルコールのシグナルを伝達する  
 (a) *odr-3* 変異体に様々なプロモーターを用いて *odr-3* cDNA を発現させたときの原液のイソアミルアルコールに対する走性行動の表現型。N = 8–10。 (b) *odr-3* 遺伝子を含む fosmid (WRM0641cC03) と *odr-3* のゲノムの位置。  
 (c) *odr-3* 変異体に fosmid (WRM0641cC03) を発現させたときの高濃度のイソアミルアルコール (原液 5  $\mu$ l) に対する走性行動の表現型。N = 9。† は Tukey 検定で有意に差があることを示す ( $p < 0.01$ )。 (d) 野生型線虫において細胞特異的に *odr-3* の機能をノックダウンしたときの高濃度のイソアミルアルコール (原液 5  $\mu$ l) に対する忌避行動への効果。N = 5。略語の意味は WT; wild-type, n.s.; not significant。エラーバーは S.E.M. を表す。  
 Dunnett 検定での有意な差は ++ ( $p < 0.01$ ) と + ( $p < 0.05$ ) と表記している。



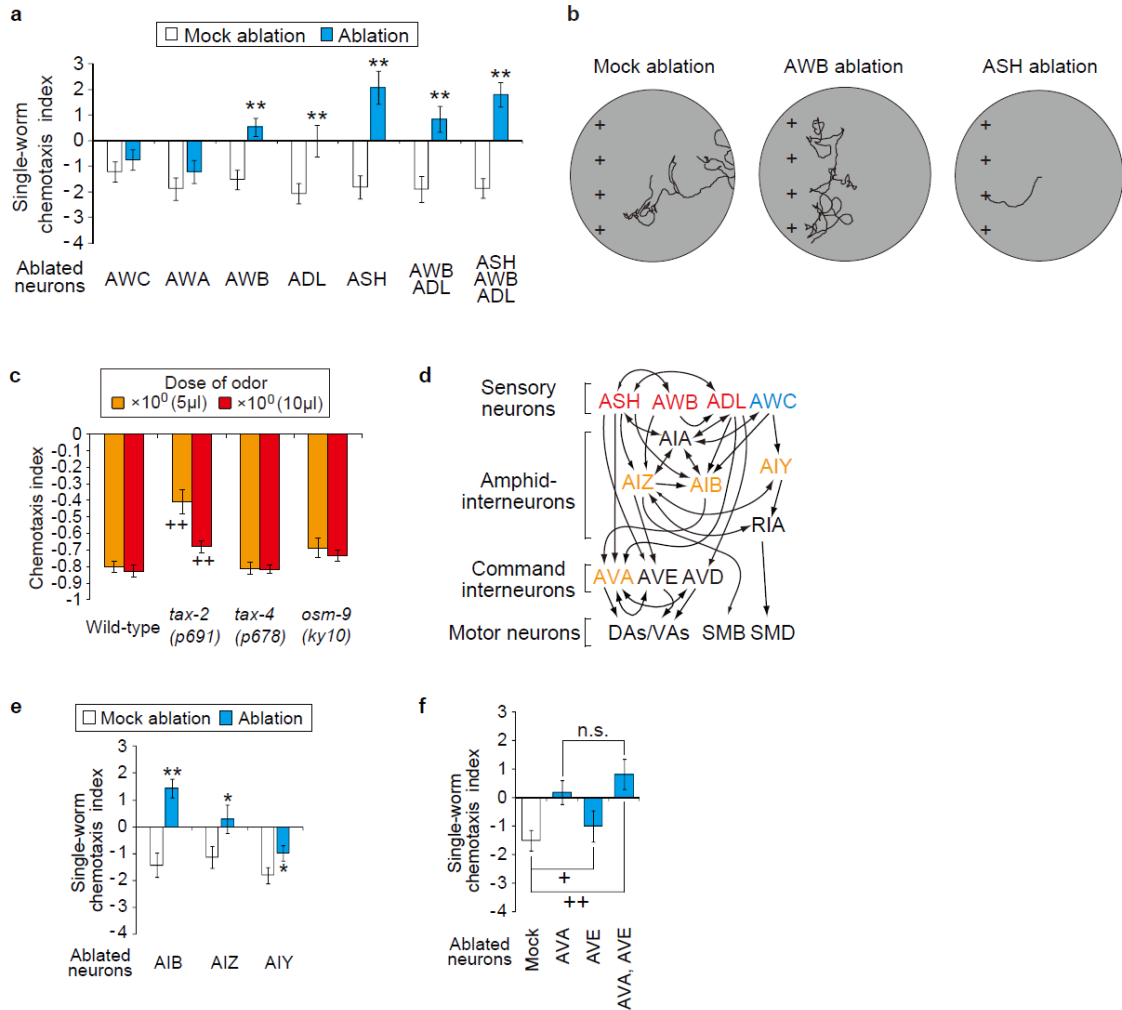


図 4-7 高濃度のイソアミルアルコールに対する走性行動を制御する神経回路

(a) 感覚神経を破壊した線虫の高濃度のイソアミルアルコール (原液 5  $\mu$ l) に対する行動の表現型。(b) 神経破壊を行っていないコントロールの線虫 (Mock ablation) と、感覚神経 AWB もしくは ASH をそれぞれ破壊した線虫の代表的な行動の軌跡。4 つの + 印それぞれに原液のイソアミルアルコール 5  $\mu$ l を置き、プレートの中に線虫を 1 匹だけ置いた。集団での行動のときと同様に、1 匹の虫も、高濃度の匂い一度は誘引されるが、その後に忌避する行動を示した (Mock ablation)。(c) *tax-2* 変異体、*tax-4* 変異体、*osm-9* 変異体の高濃度のイソアミルアルコールに対する走性行動の表現型。CNG チャネルをコードする *tax-2*、*tax-4* の変異体では、感覚神経 AWB の機能が欠損しており、TRP チャネルをコードする *osm-9* の変異体では、感覚神経 ASH の機能が欠損していることが報告されている (Troemel et al., 1995; Colbert et al., 1997)。 *tax-2* 変異体がイソアミルアルコールに対する忌避行動に弱い欠陥を示したことから、AWB 神経が高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動に関与していることが示唆された。N = 6-7。(d) 本研究の神経破壊実験で調べた神経間のシナプス接続の模式図。青色と赤色は、それぞれ低濃度、高濃度のイソアミルアルコールに対する走性行動を制御する感覚神経を表し、オレンジ色は高濃度のイソアミルアルコールに対する走性行動を制御する介在神経を表す。(e,f) 介在神経 (e)、もしくはコマンド介在神経 (f) を破壊した線虫の高濃度のイソアミルアルコール (原液 5  $\mu$ l) に対する行動の表現型。エラーバーは S.E.M. を表す (a,c,e,f)。Student の t 検定で Mock ablation した線虫 (a,e)、もしくは野生型線虫 (c) と比較して有意に差がある場合は \*\* ( $P < 0.01$ )、\* ( $P < 0.05$ ) と表記し、Tukey 検定で有意に差がある場合は ++ ( $P < 0.01$ )、+ ( $P < 0.05$ ) と表記している。Mock-ablation, N = 24-64; Ablation, N = 16-52 (a,e,f)。

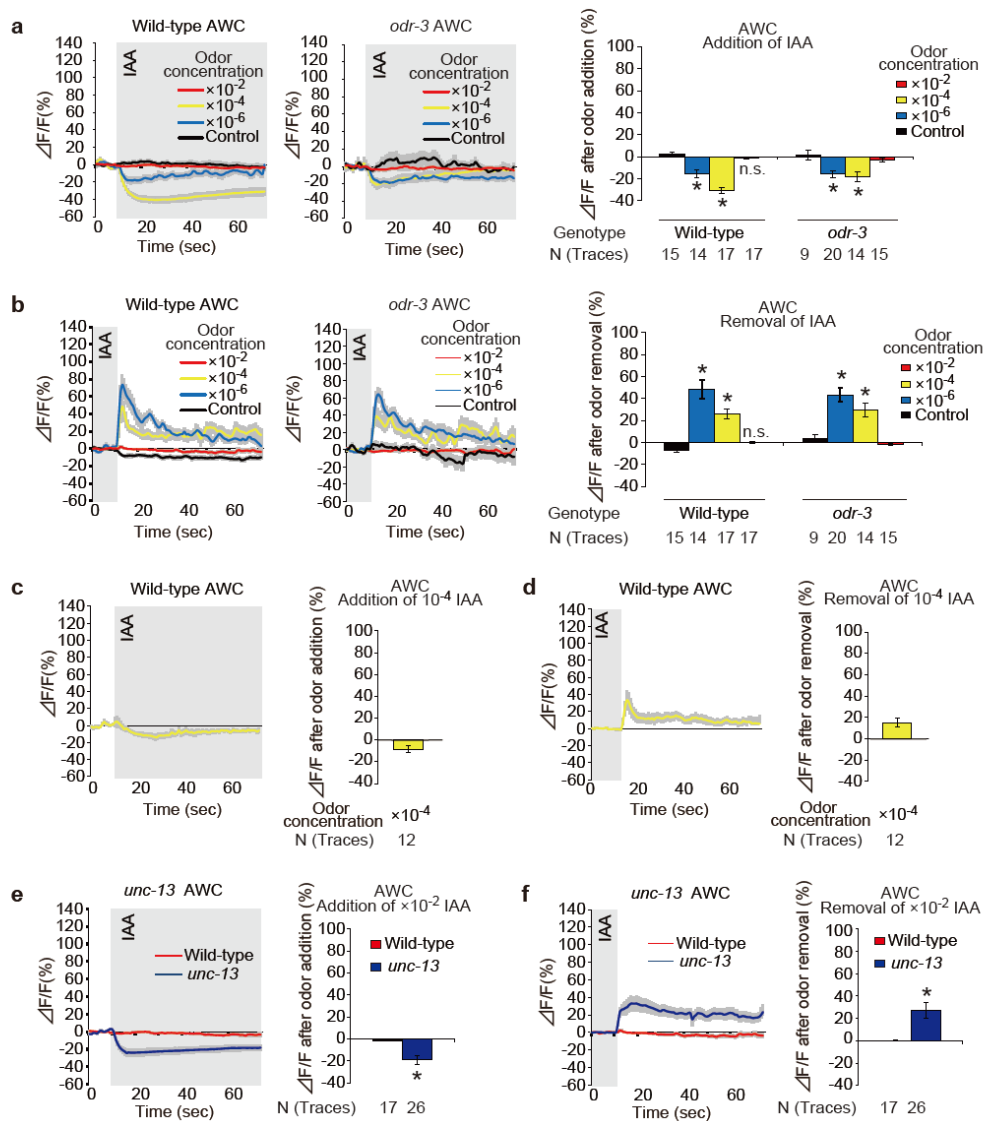


図 4-8 イソアミルアルコールに対する感覚神経の活動パターンは匂いの濃度によって変化する (a,b) 野生型線虫 (Wild-type)、もしくは *odr-3* 変異体 (*odr-3*) に、様々な希釈率のイソアミルアルコールを与えたとき (a) と除いたとき (b) の AWC<sup>ON</sup> 神経の GCaMP によるカルシウム応答。Control は匂いのないバッファーから同じ匂いのないバッファーから切り替えたときの応答を示す。 (c,d)  $10^2$  倍に希釈したイソアミルアルコールで刺激した後に、 $10^4$  倍に希釈したイソアミルアルコールを与えたとき (c) と除いたとき (d) の AWC<sup>ON</sup> 神経のカルシウム応答。 (e,f)  $10^2$  倍に希釈したイソアミルアルコールを与えたとき (e) と除いたとき (f) の *unc-13* 変異体における AWC<sup>ON</sup> 神経のカルシウム応答。 (g,h) 野生型線虫、もしくは *odr-3* 変異体に、様々な希釈率のイソアミルアルコールを与えたとき (g) と除いたとき (h) の ASH 神経のカルシウム応答。 (i,j) 野生型線虫、もしくは *odr-3* 変異体に、様々な希釈率のイソアミルアルコールを与えたとき (i) と除いたとき (j) の AWB 神経のカルシウム応答。 (k,l) 野生型線虫に様々な希釈率のイソアミルアルコールを与えたとき (k) と除いたとき (l) の ADL 神経のカルシウム応答。 (m,n)  $10^8$  倍に希釈したイソアミルアルコールを与えたとき (m) と除いたとき (n) の *odr-3* 変異体、*gpa-3* 変異体、*odr-3 gpa-3* 二重変異体における AWC<sup>ON</sup> 神経のカルシウム応答。 (a-n) グラフでは、灰色の網かけはイソアミルアルコールを与えていることを示し、波形の周辺の灰色の影は S.E.M. を示す。棒グラフは、匂いを与えた後、もしくは除いた後 10 秒間の蛍光強度の変化の平均値を示している (本論文の第 2 章 2.9.2. 参照)。エラーバーは S.E.M. を表す。棒グラフの下部に  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングの試行回数を示す。Dunnett 検定により control (a,b,g,h,i,j,k,l), もしくは wild-type (e,f,m,n) と比べて有意な差がみられた場合は \* と表記している ( $P < 0.05$ )。略語の意味は IAA; イソアミルアルコール, n.s.; not significant。

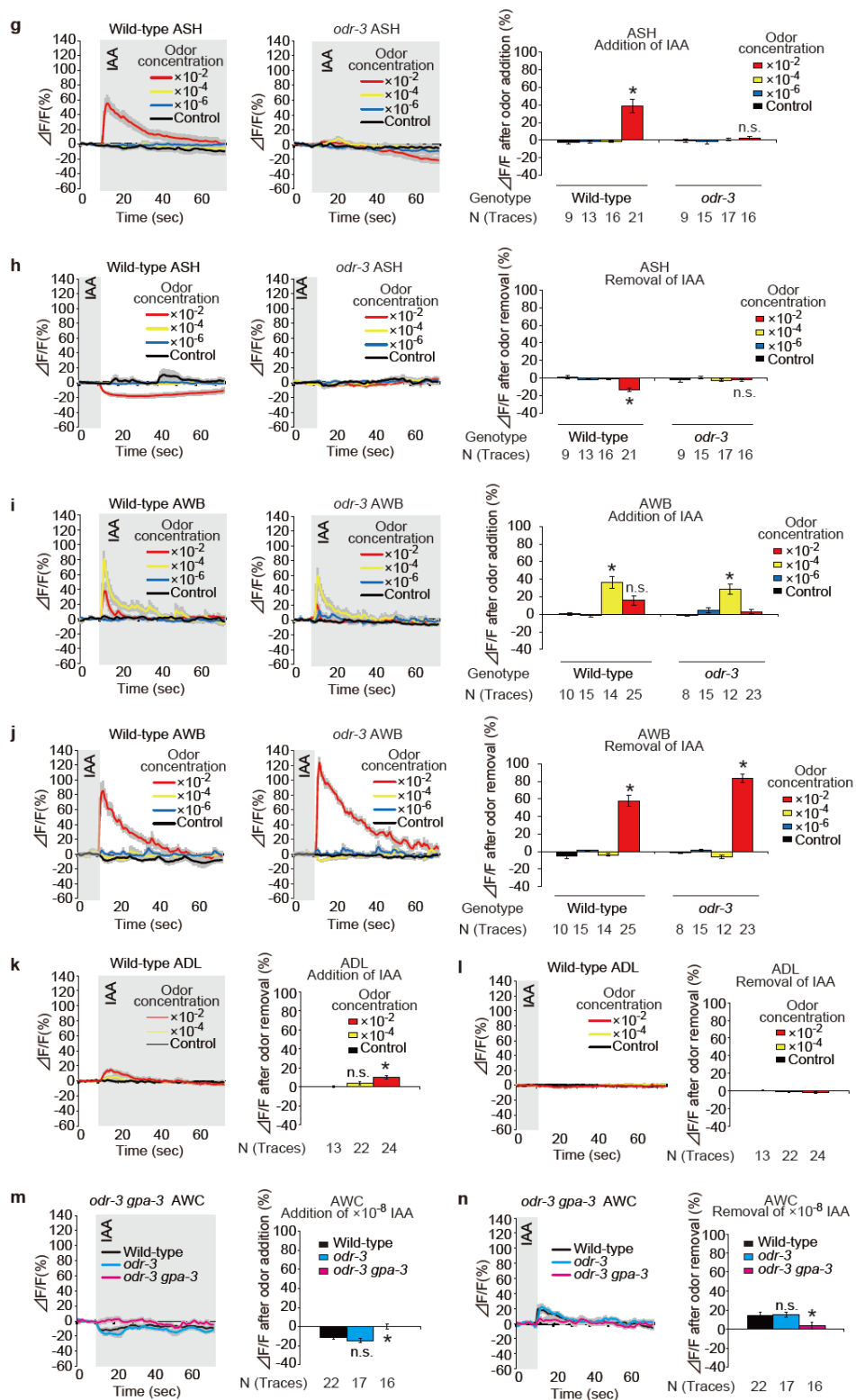


図 4-8 の続き  
図の説明は前ページに記載している。



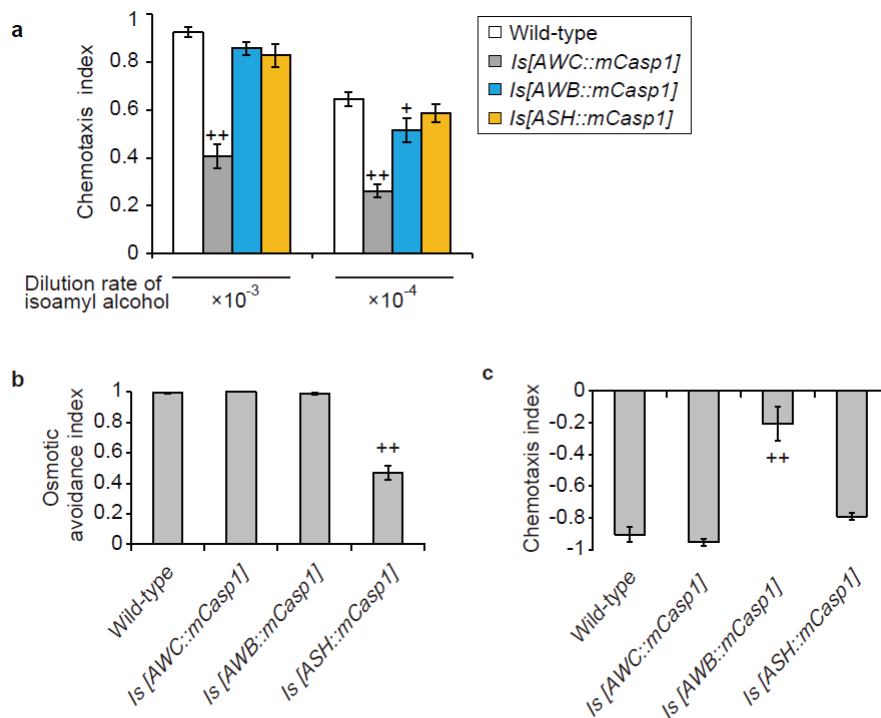


図 4-9 感覚神経 AWB を破壊した線虫では低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動が減弱する  
 (a) mouse caspase 1 (mCasp1) 遺伝子に細胞特異的プロモーター付加して線虫の染色体内に挿入し、標的の感覚神経を遺伝学的に破壊した株の低濃度のイソアミルアルコールに対する行動の表現型。過去の神経破壊実験の結果 (Bargmann et al., 1993) と同様に、AWC 神経を破壊した線虫は誘引行動が減弱した。AWB 神経を破壊した線虫は、 $10^4$  倍に希釈したイソアミルアルコールへの誘引行動に弱い欠損を示した。(b) 感覚神経を mouse caspase 1 で遺伝学的に破壊した線虫株の高浸透圧に対する忌避応答の表現型。寒天プレート上に 6M グリセロール 40  $\mu$ l でリング状の高浸透圧領域を作り、その内側に約 100 匹の線虫を置いた。10 分後に高浸透圧のリングの内側に残っていた個体の割合を osmotic avoidance index とした。過去の報告 (Hart et al., 1999) の通り、ASH 神経を破壊した線虫は高浸透圧忌避に欠陥を示した。このことから、ASH 神経に mouse caspase 1 を発現させた株では、ASH 神経の機能が失われていると考えられる。(c) 感覚神経を mouse caspase 1 で遺伝学的に破壊した線虫株の忌避性の匂い物質 2- オクタノールに対する行動の表現型。過去の神経破壊実験の結果 (Troemel et al., 1997) と同様に、AWB 神経を破壊した線虫では、10 倍希釈したノナン 1  $\mu$ l に対する忌避行動が減弱した。このことから、AWB 神経に mouse caspase 1 を発現させた株では、AWB 神経の機能が損なわれていると考えられる。(a-c) エラーバーは S.E.M. を表す。Dunnett 検定により、野生型線虫 (Wild-type) と比較して有意に差がある場合は ++ ( $p < 0.01$ ) と + ( $p < 0.05$ ) で示している。

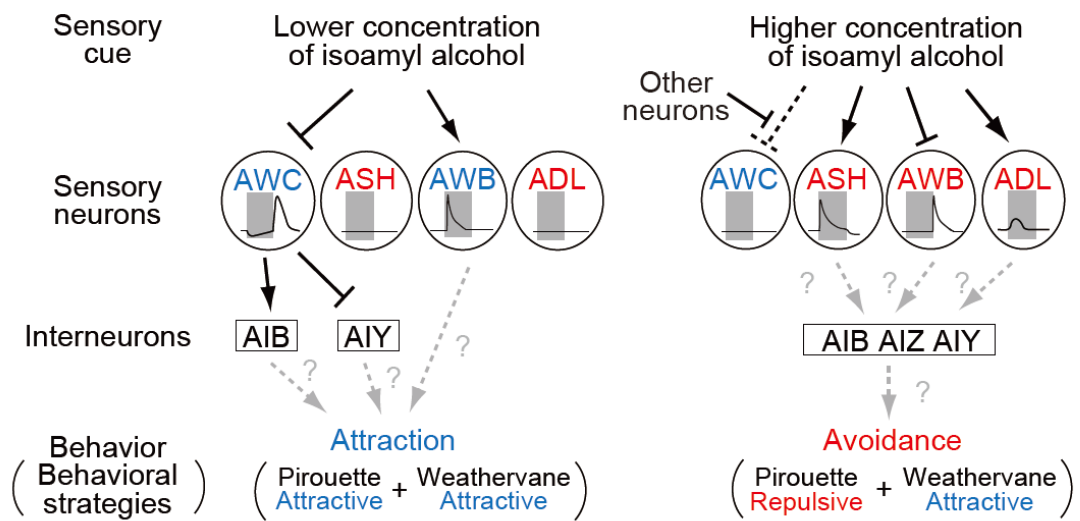


図 4-10 低濃度と高濃度のイソアミルアルコールに対する走性行動を制御する神経ネットワークモデル  
 感覚神経 AWC は低濃度のイソアミルアルコールを取り除いたときに活性化し、介在神経 AIB を正に制御、介在神経 AIY を負に制御することが報告されている (Chalasani et al., 2007)。本研究により、高濃度のイソアミルアルコールに対しては、他の神経からのシナプス伝達を介した抑制により感覚神経 AWC は応答せず、一方で、感覚神経 ASH、AWB、ADL は特徴的な応答を示すことが明らかになった。低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動は、匂いに近寄るように働くピルエット応答 (Pirouette) と風見鶏応答 (Weathervane) により調節されていた。一方で、高濃度のイソアミルアルコールに対する忌避行動は、匂いから遠ざかるように働くピルエット応答により主に制御されていた。

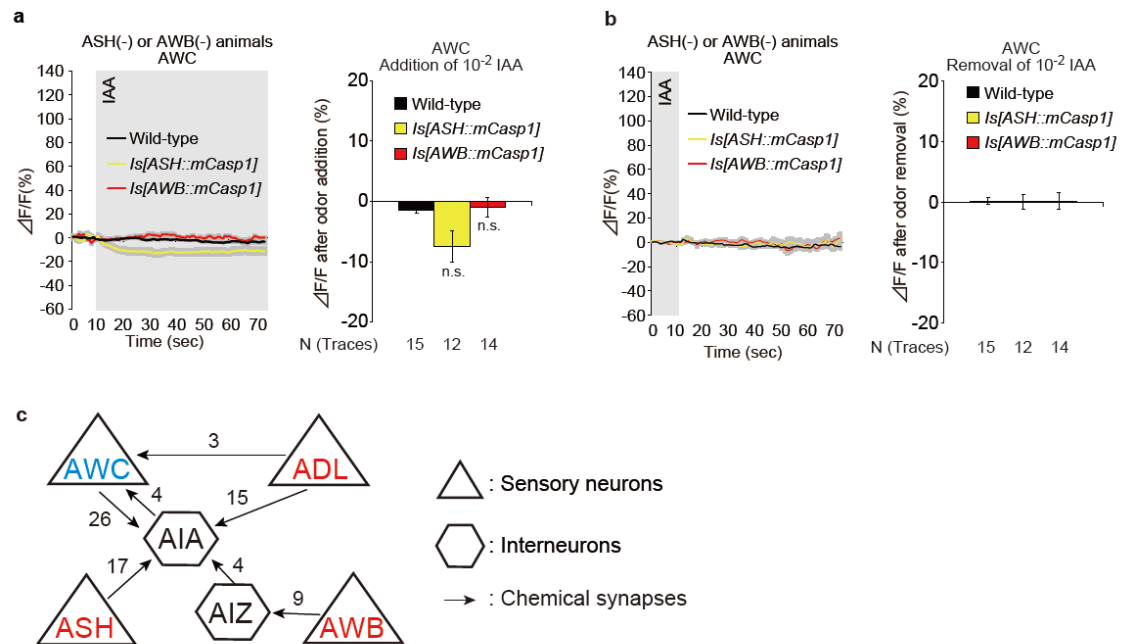


図 4-11 高濃度のイソamilアルコール刺激の際に AWC 神経の応答を抑制している神経細胞の候補 (a,b) mouse caspase1(mCasp1) により感覚神経 ASH もしくは AWB を遺伝学的に破壊した線虫に、高濃度 ( $10^2$  倍希釈) のイソamilアルコールを与えたとき (a) と除いたとき (b) の AWC<sup>ON</sup> 神経の GCaMP によるカルシウム応答。灰色の網かけはイソamilアルコールを与えていることを示し、波形の周辺の灰色の影は S.E.M. を示す。棒グラフは、匂いを与えた後、もしくは除いた後 10 秒間の蛍光強度の変化の平均値を示している (第 2 章 2.9.2. 参照)。エラーバーは S.E.M. を表す。棒グラフの下部に  $Ca^{2+}$  イメージングの試行回数を示す。Dunnett 検定では野生型線虫 (Wild-type) と比べて有意な差がみられなかった ( $P > 0.05$ )。略語の意味は IAA; イソamilアルコール, n.s.; not significant. (c) AWC 神経にシナプス接続している神経細胞のネットワーク。青色、赤色はそれぞれ低濃度のイソamilアルコールへの誘引行動、高濃度のイソamilアルコールに対する忌避行動に必要な感覚神経を示している。矢印は化学シナプスを、数字はシナプスの数を示す。

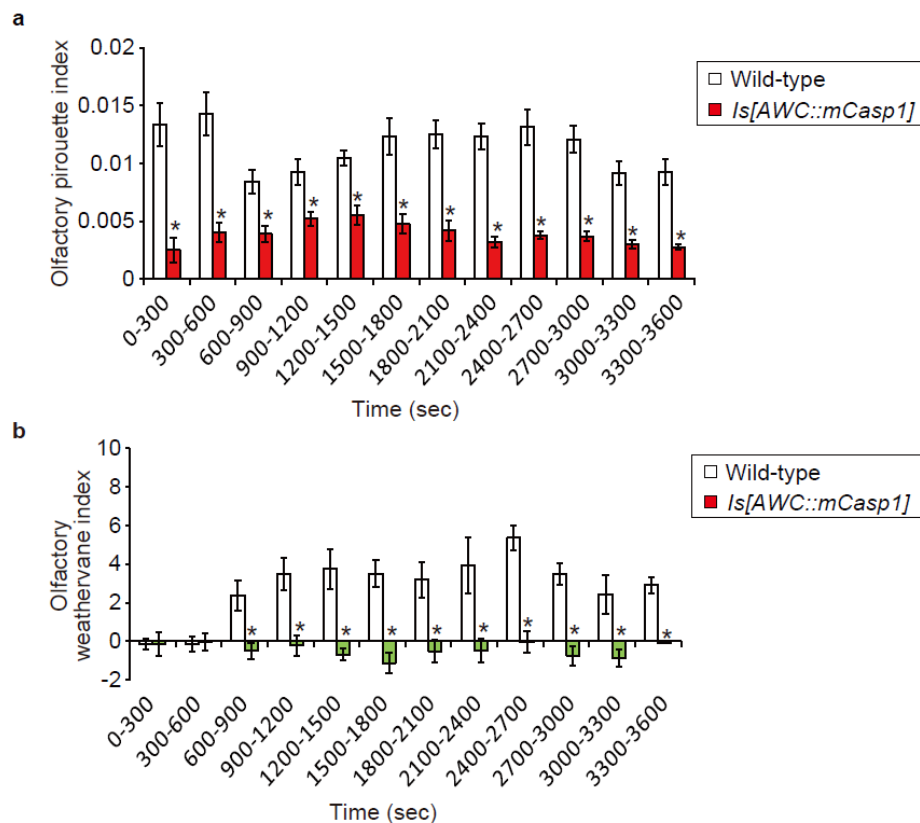


図 4-12 AWC 神経は低濃度のイソアミルアルコールへの誘引行動に使われるピルエット応答、風見鶏応答の両方に必要である  
 (a,b) 野生型線虫 (N = 8)、もしくは、AWC 神経を遺伝学的に破壊した線虫 (N = 9) の低濃度のイソアミルアルコールの勾配上 (Lower concentration IAA;  $10^2$  倍希釈のイソアミルアルコール 1  $\mu$ l) でのピルエット応答 (a) と風見鶏応答 (b)。\* は野生型線虫 (Wild-type) と比べて有意に差があることを示す (Dunnett 検定で  $p < 0.05$ )。エラーバーは S.E.M. を表す。

## 結論

化学感覚は刺激の種類や強度によって変化することが知られている。しかし、ヒトを含む高等動物は複雑な神経系を有しているために、化学感覚の神経回路上での情報処理機構を明らかにすることは困難である。本研究では、シンプルな神経系をもつ線虫の化学走性を指標として、化学感覚の神経回路メカニズムの探索を行った。

線虫はピルエット機構と風見鶏機構という 2 つの行動戦略を用いて、**NaCl** に近寄ることが知られている。本研究では、特定の神経を破壊した線虫の **NaCl** に対する行動を測定し、2 つの行動戦略を制御する神経回路の同定を行った。その結果、2 つの行動戦略に用いられる塩濃度の情報は、主に単一の感覚神経で受容されるが、部分的に異なる下流の介在神経や運動神経を介して伝達され、2 つの行動応答を引き起こすアウトプットが出力されていることが示唆された。

嗅覚系においては、匂いの濃度に依存して嗜好性が変化することが知られている。神経破壊実験や  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングの結果、線虫では、匂いの濃度によって感覚神経の応答に差異が生み出されることで、行動が切り替えられていることが示唆された。

本研究により、化学物質が受容されてから行動出力に至るまでの情報処理は、感覚神経や介在神経、運動神経といった様々なクラスの神経で行われており、刺激の種類や強度によって情報処理の様式も異なることを明らかにすることができた。今後、線虫の行動を指標にした神経回路レベルの解析により、化学感覚の情報処理メカニズムの更なる理解が期待される。

## 謝辞

*Ex[sra-6p::GCaMP]*株は Cornelia Bargmann 博士より、*flp-12p* プラスミドは Chris Li 博士より、*pDEST-odr-3* プラスミドは國友博文博士より、*mouse caspase1* cDNA は若林篤光博士より頂きました。その他の多くの線虫株は CGC (*Caenorhabditis* Genetics Center)より頂きました。ご厚意に感謝致します。

指導教員である飯野雄一先生には、本研究の行動解析やコンピューターシミュレーションに用いたプログラムを作製して頂き、実験手法、研究の進め方、論文の書き方に至るまで多くのことについてご指導して頂きました。また、国内外を問わず学会発表や研究室訪問の機会を多く与えていただきました。九州大学の石原健先生からは、研究の進め方、論文の書き方など多くの助言を頂きました。飯野研究室助教の國友博文先生、富岡征大先生からは、実験手法から研究の方向性まで多くの助言を頂きました。九州大学助教の広津崇亮先生からは、実験手法から研究の方向性や着眼点、学術的な文章の書き方、論文の書き方に至るまで多くの助言を頂きました。研究室の先輩であった山田康嗣博士、安達健博士、高山順博士、岩田遼博士、小田茂和博士、同期であった大野速雄氏、後輩であった田川嵩展氏、酒井奈緒子氏、櫻井裕樹氏、佐藤博文氏、佐藤陽介氏、田村成宏氏、土屋純一氏からは貴重な助言と指摘をいただき、また、楽しみながら研究生活を過ごさせていただきました。事務担当の岩原由加子氏、石澤和子氏には事務手続きなどにおいて大変お世話になりました。すべての面で恵まれた環境にて研究生活を送れたことを、お世話になったすべての方々に感謝致します。最後に、私のこれまでの研究生活を経済的に支え、そして精神的にも支えてくれた両親に深く感謝致します。

## 参考文献

- Aoki R, Yagami T, Sasakura H, Ogura K, Kajihara Y, Ibi M, Miyamae T, Nakamura F, Asakura T, Kanai Y, Misu Y, Iino Y, Ezcurra M, Schafer WR, Mori I, Goshima Y (2011) A seven-transmembrane receptor that mediates avoidance response to dihydrocaffeic acid, a water-soluble repellent in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 31:16603-16610.
- Avery L, Horvitz H (1987) A cell that dies during wild-type *C. elegans* development can function as a neuron in a *ced-3* mutant. *Cell* 51:1071-1078.
- Bargmann C, Horvitz H (1991) Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron* 7:729-742.
- Bargmann C, Hartweg E, Horvitz H (1993) Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* 74:515-527.
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71-94. *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282:2012-2018.
- Chalasani S, Chronis N, Tsunozaki M, Gray J, Ramot D, Goodman M, Bargmann C (2007) Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 450:63-70.
- Chalasani SH, Kato S, Albrecht DR, Nakagawa T, Abbott LF, Bargmann CI (2010) Neuropeptide feedback modifies odor-evoked dynamics in *Caenorhabditis elegans* olfactory neurons. *Nat Neurosci* 13:615-621.
- Chalfie M, Sulston J, White J, Southgate E, Thomson J, Brenner S (1985) The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 5:956-964.
- Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ, Zuker CS (2010) The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464:297-301.
- Chao M, Komatsu H, Fukuto H, Dionne H, Hart A (2004) Feeding status and serotonin rapidly and reversibly modulate a *Caenorhabditis elegans* chemosensory circuit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15512-15517.

- Charro M, Alcorta E (1994) Quantifying relative importance of maxillary palp information on the olfactory behavior of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* 175:761-766.
- Chronis N, Zimmer M, Bargmann C (2007) Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Methods* 4:727-731.
- Coburn CM, Bargmann CI (1996) A putative cyclic nucleotide-gated channel is required for sensory development and function in *C. elegans*. *Neuron* 17:695-706.
- Colbert H, Bargmann C (1995) Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans*. *Neuron* 14:803-812.
- Colbert HA, Smith TL, Bargmann CI (1997) OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 17:8259-8269.
- Consortium CeS (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282:2012-2018.
- Esposito G, Di Schiavi E, Bergamasco C, Bazzicalupo P (2007) Efficient and cell specific knock-down of gene function in targeted *C. elegans* neurons. *Gene* 395:170-176.
- Gray J, Hill J, Bargmann C (2005) A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3184-3191.
- Guo ZV, Hart AC, Ramanathan S (2009) Optical interrogation of neural circuits in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Methods* 6:891-896.
- Ha HI, Hendricks M, Shen Y, Gabel CV, Fang-Yen C, Qin Y, Colón-Ramos D, Shen K, Samuel AD, Zhang Y (2010) Functional organization of a neural network for aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* 68:1173-1186.
- Hendricks M, Ha H, Maffey N, Zhang Y (2012) Compartmentalized calcium dynamics in a *C. elegans* interneuron encode head movement. *Nature* 487:99-103.
- Hilliard M, Apicella A, Kerr R, Suzuki H, Bazzicalupo P, Schafer W (2005) In vivo imaging of *C. elegans* ASH neurons: cellular response and adaptation to chemical repellents. *EMBO J*



24:63-72.

Hilliard MA, Bargmann CI, Bazzicalupo P (2002) *C. elegans* responds to chemical repellents by integrating sensory inputs from the head and the tail. *Curr Biol* 12:730-734.

Hirotsu T, Iino Y (2005) Neural circuit-dependent odor adaptation in *C. elegans* is regulated by the Ras-MAPK pathway. *Genes Cells* 10:517-530.

Hirotsu T, Hayashi Y, Iwata R, Kunitomo H., Kage-Nakadai E., Kubo T., Ishihara T. and Iino Y. (2009) Behavioural assay for olfactory plasticity in *C. elegans*. *Nature Protocols*.

Hukema RK, Rademakers S, Dekkers MP, Burghoorn J, Jansen G (2006) Antagonistic sensory cues generate gustatory plasticity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 25:312-322.

Iino Y, Yoshida K (2009) Parallel use of two behavioral mechanisms for chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 29:5370-5380.

Jang H, Kim K, Neal SJ, Macosko E, Kim D, Butcher RA, Zeiger DM, Bargmann CI, Sengupta P (2012) Neuromodulatory state and sex specify alternative behaviors through antagonistic synaptic pathways in *C. elegans*. *Neuron* 75:585-592.

Jansen G, Thijssen K, Werner P, van der Horst M, Hazendonk E, Plasterk R (1999) The complete family of genes encoding G proteins of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* 21:414-419.

Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci Rep* 21:565-611.

Kocabas A, Shen CH, Guo ZV, Ramanathan S (2012) Controlling interneuron activity in *Caenorhabditis elegans* to evoke chemotactic behaviour. *Nature* 490:273-277.

Komatsu H, Mori I, Rhee JS, Akaike N, Ohshima Y (1996) Mutations in a cyclic nucleotide-gated channel lead to abnormal thermosensation and chemosensation in *C. elegans*. *Neuron* 17:707-718.

L'Etoile ND, Bargmann CI (2000) Olfaction and odor discrimination are mediated by the *C. elegans* guanylyl cyclase ODR-1. *Neuron* 25:575-586.

- Laing D, Panhuber H, RI B (1978) Olfactory properties of amines and n-butanol. *Chem Senses* 3:149-166.
- Lans H, Rademakers S, Jansen G (2004) A network of stimulatory and inhibitory Galpha-subunits regulates olfaction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 167:1677-1687.
- Luo L, Gabel CV, Ha HI, Zhang Y, Samuel AD (2008) Olfactory behavior of swimming *C. elegans* analyzed by measuring motile responses to temporal variations of odorants. *J Neurophysiol* 99:2617-2625.
- Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck L (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96:713-723.
- Matsuki M, Kunitomo H, Iino Y (2006) Galpha regulates olfactory adaptation by antagonizing Gqalpha-DAG signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1112-1117.
- McIntire SL, Jorgensen E, Kaplan J, Horvitz HR (1993) The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 364:337-341.
- Mello C, Kramer J, Stinchcomb D, Ambros V (1991) Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* 10:3959-3970.
- Miller E, Cohen J (2001) An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24:167-202.
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J (1993) Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75:653-660.
- Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19:137-141.
- Nuttley W, Harbinder S, van der Kooy D (2001) Regulation of distinct attractive and aversive

- mechanisms mediating benzaldehyde chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. Learn Mem 8:170-181.
- Oda S, Tomioka M, Iino Y (2011) Neuronal plasticity regulated by the insulin-like signaling pathway underlies salt chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. J Neurophysiol 106:301-308.
- Ortiz CO, Faumont S, Takayama J, Ahmed HK, Goldsmith AD, Pocock R, McCormick KE, Kunitomo H, Iino Y, Lockery S, Hobert O (2009) Lateralized gustatory behavior of *C. elegans* is controlled by specific receptor-type guanylyl cyclases. Curr Biol 19:996-1004.
- Pierce-Shimomura J, Morse T, Lockery S (1999) The fundamental role of pirouettes in *Caenorhabditis elegans* chemotaxis. J Neurosci 19:9557-9569.
- Piggott BJ, Liu J, Feng Z, Wescott SA, Xu XZ (2011) The neural circuits and synaptic mechanisms underlying motor initiation in *C. elegans*. Cell 147:922-933.
- Poucher W (1974) Perfumes, cosmetics and soaps. Seven Edition Chapman and Hall, London.
- Richmond JE, Davis WS, Jorgensen EM (1999) UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*. Nat Neurosci 2:959-964.
- Roayaie K, Crump J, Sagasti A, Bargmann C (1998) The G alpha protein ODR-3 mediates olfactory and nociceptive function and controls cilium morphogenesis in *C. elegans* olfactory neurons. Neuron 20:55-67.
- Saeki S, Yamamoto M, Iino Y (2001) Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. J Exp Biol 204:1757-1764.
- Sambongi Y, Nagae T, Liu Y, Yoshimizu T, Takeda K, Wada Y, Futai M (1999) Sensing of cadmium and copper ions by externally exposed ADL, ASE, and ASH neurons elicits avoidance response in *Caenorhabditis elegans*. Neuroreport 10:753-757.
- Sassa T, Harada S, Ogawa H, Rand JB, Maruyama IN, Hosono R (1999) Regulation of the UNC-18-*Caenorhabditis elegans* syntaxin complex by UNC-13. J Neurosci

19:4772-4777.

Semmelhack J, Wang J (2009) Select *Drosophila* glomeruli mediate innate olfactory attraction and aversion. *Nature* 459:218-223.

Sengupta P, Chou J, Bargmann C (1996) odr-10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. *Cell* 84:899-909.

Srinivasan J, von Reuss SH, Bose N, Zaslaver A, Mahanti P, Ho MC, O'Doherty OG, Edison AS, Sternberg PW, Schroeder FC (2012) A modular library of small molecule signals regulates social behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* 10:e1001237.

Suzuki H, Thiele T, Faumont S, Ezcurra M, Lockery S, Schafer W (2008) Functional asymmetry in *Caenorhabditis elegans* taste neurons and its computational role in chemotaxis. *Nature* 454:114-117.

Thiele T, Faumont S, Lockery S (2009) The neural network for chemotaxis to tastants in *Caenorhabditis elegans* is specialized for temporal differentiation. *J Neurosci* 29:11904-11911.

Tomioka M, Adachi T, Suzuki H, Kunitomo H, Schafer WR, Iino Y (2006) The insulin/PI 3-kinase pathway regulates salt chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* 51:613-625.

Torayama I, Ishihara T, Katsura I (2007) *Caenorhabditis elegans* integrates the signals of butanone and food to enhance chemotaxis to butanone. *J Neurosci* 27:741-750.

Troemel E, Kimmel B, Bargmann C (1997) Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*. *Cell* 91:161-169.

Troemel E, Chou J, Dwyer N, Colbert H, Bargmann C (1995) Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell* 83:207-218.

Troemel ER (1999) Chemosensory signaling in *C. elegans*. *Bioessays* 21:1011-1020.

Troemel ER, Sagasti A, Bargmann CI (1999) Lateral signaling mediated by axon contact and calcium entry regulates asymmetric odorant receptor expression in *C. elegans*. *Cell*

99:387-398.

- Tsui D, van der Kooy D (2008) Serotonin mediates a learned increase in attraction to high concentrations of benzaldehyde in aged *C. elegans*. *Learn Mem* 15:844-855.
- Tsunozaki M, Chalasani S, Bargmann C (2008) A behavioral switch: cGMP and PKC signaling in olfactory neurons reverses odor preference in *C. elegans*. *Neuron* 59:959-971.
- Vowels JJ, Thomas JH (1994) Multiple chemosensory defects in daf-11 and daf-21 mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 138:303-316.
- Wakabayashi T, Kitagawa I, Shingai R (2004) Neurons regulating the duration of forward locomotion in *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Res* 50:103-111.
- Wes PD, Bargmann CI (2001) *C. elegans* odour discrimination requires asymmetric diversity in olfactory neurons. *Nature* 410:698-701.
- White J, Southgate E, Thomson J, Brenner S (1986) The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 314:1-340.
- Yamada K, Hirotsu T, Matsuki M, Kunitomo H, Iino Y (2009) GPC-1, a G protein gamma-subunit, regulates olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 181:1347-1357.