

複数の神経情報の区別識別に関わる神経回路メカニズム

Neural mechanisms underlying discrimination of complicated-neural signaling

(日本遺伝学会推薦)

代表研究者 甲南大学 久原 篤 Konan University Atsushi KUHARA
協同研究者 甲南大学 太田 茜 Konan University Akane OHTA

Behavior is the ultimate consequence of orchestrated computations in neural circuits in animal. However, how an individual neuron discriminates and regulates complicated neural signaling remains to be fully determined. The temperature seeking behavior of nematode *C. elegans* is a good behavioral paradigm to understand the dynamics of neural circuits. In this study, molecular genetics and control of neural activity using a light-driven channel led us to propose that a discrimination mechanisms of sensory signaling in the simplest neural circuit, and that the discriminated-opposing neural signals direct opposite temperature-seeking behaviors. A combination of genetic analyses with the halorhodopsin technique demonstrated that a threshold level of intra-neuronal calcium alternates the mode of neural signaling onto the downstream neuron. Our observations provide a code for the discrimination of neural signaling between sensory- and inter-neurons, which can generate highly variable thermotactic behavior.

研究目的

はじめに

動物は、外界の膨大な情報を神経系で受容・処理することで、適切な応答行動をとる。この神経情報処理の基本原理の解明は、現代神経科学の重要な課題の1つである。神経情報処理の解明に向けたアプローチとして、線虫 *C. elegans* が利用されている。線虫 *C. elegans* は体長約 1mm の土壌自活性線虫である。その体は 959 個の細胞から構成されており、そのうち約 1/3 を占める 302 個が神経細胞である。また、体が透明であることから、受精卵から成虫に至るまでの全細胞分裂の系譜と、全ての細胞の位置が明らかになっている。さらに、電子顕微鏡を用いた解析により、約 5000 個の化学シナプスと約 600 個のギャップ結合から構成される全神経回路網が明らかにされている。以上の特徴から、線虫は神経情報処理の解析に適

したモデル動物といえる。線虫はわずか 302 個の神経細胞からなるシンプルな神経回路しか持たないが、化学物質、物理刺激、光、温度など様々な外部刺激を感知し、多様な応答行動をとることができる。その中でも、温度走性行動は、興味深い行動である。温度走性とは、例えば、20°C で、餌の存在する条件で飼育された個体は、温度勾配上で、飼育温度である 20°C へ移動し、20°C の温度域に留まるように行動する行動である。この行動は 1975 年に Hedgecock と Russel により公表されて以来、感覚受容や記憶学習といった神経情報処理の優れたモデル系として、主に分子遺伝学的手法を用いて解析が進められてきた。さらに近年では、神経活動の *in vivo* 光学イメージングや神経活動をリモートコントロールできる最新の光技術を用いた生理学的な解析も可能となってきたため、従来の分子レベルおよび、個体行動レベルという

各階層での解析に加えて、神経細胞レベルや神経回路レベルでの詳細な解析の進展が期待されていた。

本研究の目的

脳の神経回路を流れる複雑な情報が、個々の神経細胞内でどのように混線することなく伝達され、複雑な行動や思考を調節しているかを解明することは重要な課題である。本研究では、神経情報処理の解明に向けたアプローチとして、線虫 *C. elegans* の温度走性行動を実験系とした解析を行った。温度走性とは、線虫を一定の温度下で、餌の存在する条件で飼育すると、飼育温度と餌が豊富にあるという好ましい環境条件を関連づけて記憶し、約 0.5°C/cm の温度勾配上で過去の飼育温度に移動する行動である。この行動を解析することで、温度受容や記憶学習といった神経機能を解析可能である。本研究では、特に神経情報処理の区別や識別に関わる分子生理機構を解析することを目的とした、分子遺伝学的手法と、神経活動の *in vivo* 光学イメージングや神経活動をリモートコントロールできる最新の光技術を融合した解析をおこなった。

研究経過

結果と考察

1. 線虫の温度走性を制御する神経回路の生理的動態

外部環境の受容から適切な応答行動に至るまでの神経情報処理機構を理解するためには、まずその行動を制御する神経回路を捉える必要がある。線虫の温度走性を制御する神経回路モデルは、1995年に森と大島が行ったレーザーによるニューロン破壊実験により提唱された。このモデルでは、温度は線虫の頭部先端に軸索を伸長する AFD と呼ばれる温度受容ニューロンで受容され、その情報は、AFD とシナプス結合している介在ニューロン AIY と AIZ、RIA に伝達される。その後、筋肉行動を制御するモーターニューロンに伝達され、

温度走性を成立させていると考えられている。AFD、AIY、AIZ については、Cameleon 遺伝子を用いたカルシウムイメージングを行い、温度刺激に対して細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が起こること、すなわち温度に対して応答性を示すことが確認された。さらに、AFD の機能低下により AIY の温度刺激に対する Ca²⁺濃度の変化がなくなることから、AIY の温度に対する応答性が AFD の活性依存的であることが明らかとなった。

複数の神経情報の区別識別に関わる分子機構の探索

従来の本申請者らの解析から、単一の感覚ニューロンが、温度と匂い物質という質的に異なる 2 つの感覚情報を受容する例が見つかった (Kuhara Okumura et al., Science, 2008)。そのため、単一ニューロン内における複数の感覚情報の識別は興味深い問題であった。その分子メカニズムを明らかにするために、順遺伝学的解析をもちいた解析が行われた。その結果、従来、温度と匂いの両方の情報伝達に関わるカチオンチャネルの特定の部位に変異が入ることで、温度応答行動は正常であるが匂い応答行動が異常になるというケースが見つかった。この分子機構と生理的解析から、複数の神経情報の識別に関わる機構が明らかになると考えられる。

温度受容ニューロンから介在ニューロンへと伝達される神経情報の生理的コード

従来分子遺伝学的解析に加え、近年、神経活動をリモートコントロールできる最新の光技術として、特定の波長の光を当てることで開口するチャネル分子であるチャネルロドプシン 2 (ChR2) およびハロロドプシン (NpHR) が神経情報処理の解析に用いられている。ChR2 は青色光を照射すると開口し、Na⁺を細胞内に流入させることで神経細胞の活動を上昇させる。一方、NpHR は黄緑色光を照射すると開口し、Cl⁻を細胞内に流入させることで神経細胞の活動を低下させる。これらを使い神経

活動と行動を人工的に操作するというこれまでにない解析を行うことにより、線虫の温度走性を制御する神経回路において新たな神経機能が発見された。温度受容ニューロン AFD にハロロドプシン (NpHR) 遺伝子を発現させ、NpHR の励起光である黄緑色光を照射し、AFD の神経活動を人工的に低下させたところ、飼育温度よりも高温へ移動する好熱性異常を示した。これまで、温度受容ニューロン AFD の膜電位変化が欠損している変異体や AFD そのものを欠損した個体は、すべて好冷性もしくは温度無走性の行動異常を示すことが報告されていたため、NpHR を用いた解析結果はこれまで考えられていた AFD の機能とは相反するものであった。

AFD の活動低下が相反する行動異常を引き起こした原因を突き止めるために、AFD とそのシナプス後ニューロンである AIY の神経活動を細胞内カルシウムや膜電位のインディケーター遺伝子を使った生理学的解析が行われた。その結果、温度受容ニューロン AFD で NpHR を活性化させた個体では、AFD の温度変化に対する Ca^{2+} 濃度の変化率が、野生株に対して約 30% 低下していた。その時の介在ニューロン AIY の活動を測定すると、AIY の活動はむしろ野生株より約 30% 上昇していた。一方、AFD の膜電位変化が欠損している変異体では、AFD および AIY の温度変化に対する応答が強く低下していた。これらの解析から、AFD 温度受容ニューロンの活動低下率に応じて、シナプス後ニューロンの活動の逆転がおきる可能性が考えられた。これは、これまでの神経の機能としては知られていないケースである。

シナプスにおける神経伝達を区別伝達する分子機構

温度受容ニューロン AFD の活動に応じたシナプス後ニューロン AIY の活動の逆転現象を引き起こすシステム的一端が、AFD と AIY 間のシナプス伝達に注目した解析から明らかとなった。小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGULT) である EAT-4 の温度受容ニューロン AFD での機能を欠失

した変異体について行われた介在ニューロン AIY の Ca^{2+} イメージングでは、AIY の温度刺激に対する Ca^{2+} 濃度の変化が野生株よりも増加することが示された。反対に、AFD で特異的に発現する *eat-4cDNA* を様々な濃度でこの変異体に導入した場合、導入濃度が増加するに従って AIY の温度刺激に対する Ca^{2+} 濃度変化が低下することが明らかとなった。さらに、これらの AIY の応答性の変化は、AIY において機能する C1-チャネル型グルタミン酸受容体 (GluC1) GLC-3 依存的であった。以上の結果は、EAT-4 および GLC-3 依存的なグルタミン酸を介した抑制性のシナプス伝達が、AFD-AIY 間の情報伝達を担うことを示唆した。一方、他のグループによる ChR 2 を用いた神経活動の光操作と電気生理学的手法を用いた解析から、AFD-AIY 間に興奮性のシナプス伝達が存在することも明らかとなった。この興奮性のシナプス伝達は Ca^{2+} -Dependent Activator Protein for Secretion (CAPS) である UNC-31 依存的であった。UNC-31 は神経ペプチドを内包する有芯小胞の分泌に関与するため、この結果は神経ペプチドが AFD-AIY 間の興奮性のシナプス伝達を担うことを示唆する。これまで、単一のニューロンは、それと接続する単一のニューロンに対して、主に興奮性か抑制性のどちらかの神経伝達しか行なわないと考えられていた。しかし、AFD-AIY 間のシナプス伝達についての神経活動の光操作技術、分子遺伝学的手法、生理学的手法を組み合わせた解析から、単一のニューロン間で興奮性と抑制性の相反する神経伝達を同時に利用するケースがあること、さらに細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化パターンがこれらの神経伝達の使い分けに重要であることが明らかとなった。

考察

まとめ

脳の神経回路を流れる複雑な情報が、個々の神経細胞内でどのように混線することなく伝達され、複雑な行動や思考を調節しているかを解明することは重要な課題である。我々は、線虫

C. エレガンスをもちいて、従来の分子遺伝学と最新の光学技術を組み合わせた解析から、一对の感覚ニューロンとそれと接続する一对の介在ニューロンからなる神経回路において、異なる神経情報が区別されせめぎ合うことで、行動の逆転を引き起こす機構を、分子神経回路レベルで明らかにした。

Y., Kuhara, A., Mori, I. "Novel and conserved protein TTX-8/Macoilin is required for diverse neuronal functions in *C. elegans*"

PLoS Genetics, 7(5): e1001384, 2011

研究の発表

口頭発表

1. Molecular physiological mechanism underlying neural circuit for temperature sensing and memory in *C. elegans*、第 83 回 日本動物学会年会、大阪、2012
2. 神経活動の光操作とイメージングによる神経伝達の暗号解読、平成 23 年度 遺伝学会年会、京都、2011
3. Neural coding in neural circuit controlling seeking sensory-behavior、第 49 回日本生物物理学会年会、シンポジウム、姫路、2011
4. 感覚行動をつかさどる神経回路の情報処理の暗号、第 49 回日本生物物理学会年会、姫路、2011
5. 線虫の温度感知にかかわる神経回路の光操作、神経組織の成長・再生・移植研究会 第 26 回学術集会、シンポジウム、東京、2011

誌上発表

1. Kuhara, A., Ohnishi N., Shimowada T., Mori, I. "Neural coding in a single sensory neuron controlling opposite seeking behaviors in *Caenorhabditis elegans*"
Nature commun., 2 : 355 doi: 10.1038/ncomms1352, 2011
2. Miyara, A., Ohta, A., Okochi, Y., Tsukada,