

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

脳・神経系における「情報の変換」の解明を目指して

### 2. 氏名

木村 幸太郎

### 3. 研究のねらい

脳・神経系という複雑なネットワークが1つの情報処理システムとしてはたつき、時々刻々と変化する入力(刺激)に対して適切に出力(行動)を行うためのルールには、さまざまな不明な点が残されている。本研究では、わずか302個の神経細胞から構成される神経回路構造が全て明らかになっている線虫 *C. elegans* の匂い忌避行動をモデルにして、脳・神経ネットワークの新たな動作原理を明らかにする事を目標とした。特に、以下の2点に重点を置いた。

○脳・神経系の機能は、「遺伝子／神経回路／個体の行動」といった複数の階層における生命活動が密接に関わっているので、それぞれの階層に対する実験系を確立し、それらの結果を有機的に結びつけた統合的理解を目指す。

○最終的には数理モデル化による理解も目標の一部とする事から、それぞれの解析において経時変化を定量的に測定する。

具体的には、以下の4つのプロジェクトを進めた。

- 1)【遺伝子】匂い忌避行動の学習(事前刺激による忌避行動の増強;後述)に関与するドーパミンシグナル伝達の遺伝学的解析
- 2)【神経回路】匂い忌避行動に関わる神経活動の光学的測定系の確立
- 3)【行動】行動の原理を明らかにするための、匂い忌避行動の数理解析
- 4)【刺激】匂い濃度変化の定量的測定

### 4. 研究成果

**背景:**私はモデル動物 *C. elegans* の見過ごされがちだった匂い忌避行動の可塑性を詳細に検討し、*C. elegans* に忌避匂い物質 2-nonanone (以下ノナン) を事前に経験させると、ノナンへの忌避行動が増強され、その結果 *C. elegans* が遠くまで逃げるようになるという興味深い現象を見いだした(図1)。またこの現象は、非連合学習として獲得される事を明らかにした(木村ら、投稿中)。事前刺激による特定の刺激への感覚応答の減少は「慣れ」と呼ばれ、これまでに様々な実験系において詳細な研究が行われている。これに対して刺激への応答の増強は、物理的侵害刺激である痛覚受容やアメフラシのエラ引き込み反射の「感作」に関しては詳しく研究されている。しかし、匂いや味といった化学刺激に対する応答増強は、行動レベル・電気生理学的解析レベルでの報告は散見されるものの、遺伝子レベルでの解析例は極めて少ない。従って、*C. elegans* の匂いに対する忌避行動増強を解析する事により、可塑的神経機能の新たな制御メカニズムを明らかにできると考えた。

本研究では、このノナン忌避行動をモデルとして、遺伝子／神経回路／行動など異なる階層からの解析を行った。

#### 1)事前刺激による忌避行動増強に関与するドーパミンシグナ

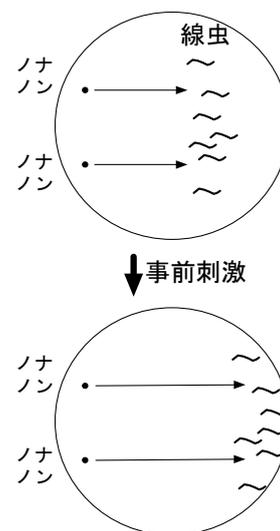


図1 *C. elegans* ノナン忌避行動。1時間の事前刺激により、12分のアッセイでより遠くまで逃げるようになる。

## ル伝達の遺伝学的解析

生命活動は遺伝子・細胞レベルのさまざまなネットワークに制御されている。その中でも、脳・神経ネットワークの最も大きな特徴は、経験によって入力に対する出力が変化する、すなわち学習するという点である。従って、学習においてどの遺伝子がネットワーク上のどの神経細胞の活動をどう変化させるか、またその変化がネットワーク全体の出力である行動にどのように影響するか、という問題は、脳・神経系の機能原理を明らかにする上で非常に重要である。以上の理由から、匂い忌避行動の経験依存的な変化に関わる遺伝子のはたらきを明らかにする事を目指した。

神経機能に関与すると考えられる遺伝子に異常を持つ突然変異体 50-60 系統の組織的な遺伝学的解析において、ドーパミン合成が忌避行動増強に必要な結果が示唆された。そこで、ドーパミン合成に特異的に必要とされるチロシン水酸化酵素 *cat-2* の点突然変異体および欠失型変異体の表現型を解析した所、ノナン忌避行動の学習に顕著な異常を示した(図2)。

なお、このプロジェクトの一部は、2007 年度から科研費基盤研究(C)「線虫 *C. elegans* の『忌避行動増強』に関する分子生物学的解析」として発展し、D2 型ドーパミン受容体 *dop-3* が忌避行動増強に関与すると解明するに至った(木村ら、投稿中)。

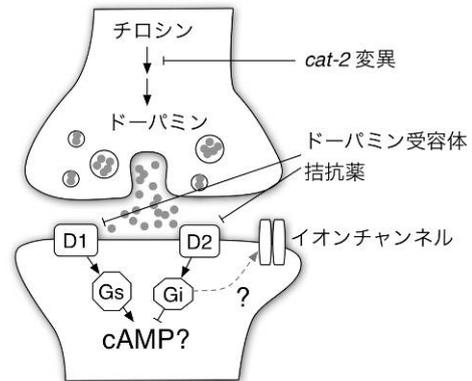


図2 ドーパミンシグナル伝達経路。ドーパミンシグナル伝達経路は、*C. elegans* と哺乳類で大部分が共通していると考えられている。*cat-2* 変異や D2 受容体拮抗薬は、忌避行動増強を特異的に阻害した。

## 2) 匂い忌避行動に関わる神経活動の光学的測定系の確立

*C. elegans* 神経活動の生理学的解析では、我々もその立ち上げ期の研究に関わった  $Ca^{++}$  イメージングが非常に有効である事が示されている(Kimura et al., Curr. Biol., 2004 など)。しかし、神経活動の本質は膜電位変化であるので、本研究では *C. elegans* 神経活動に伴う膜電位変化を光学的に検出する系の確立を目指した。

研究開始当初は GFP 誘導体と低分子化合物を組み合わせた方法(Chanda et al., Nat. Neurosci., 2005)が報告されていたが、2008 年になってホヤの膜電位感受性脱リン酸化酵素 Gi-VSP を利用した膜電位センサータンパク質が相次いで報告された(Tsusui et al., Nat. Meth., 2008 など)。これらのタンパク質は、遺伝子導入が容易な *C. elegans* での解析に適していると考えられるので、開発元の Thomas Knopfel 博士および宮脇敦史博士(共に理研 BSI)と共同研究を開始した。これまでに膜電位センサータンパク質 Mermaid を *C. elegans* 感覚ニューロンで発現させたが、aggregation が生じており、活動に伴う蛍光変化が観察できていない。現在は、アミノ酸配列の最適化などによる aggregation 解消を検討している。

また、顕微鏡上で定量的な匂い刺激を与える事も問題の一つであった。将来的には *C. elegans* がプラスチックシャーレ内の忌避行動中に経験するノナン濃度の変化を、顕微鏡での膜電位変化測定中に再現する事も目的の一つとしているため、適切な手段を検討し続けてきた。2009 年になって、*C. elegans* の研究者である de Bono 博士(英国 MRC)の研究室から、マイクロ流体装置を用いた顕微鏡上での *C. elegans* 匂い刺激装置が報告された(Persson et al., Nature, 2009)。そこで、de Bono 博士のグループと共同研究を開始し、そのマイクロ流体装置を当研究室で使用できるようにした。

なお、 $Ca^{++}$  センサーである cameleon は、特定の感覚ニューロンで発現させ、液相刺激用のマイクロ流体装置で刺激することができた(木村ら、未発表)。

## 3) 行動の原理を明らかにするための、匂い忌避行動の数理解析

動物(微生物を含む)の行動パターンには、その動物の刺激の検出方法や刺激に対する行動戦略が反映される。例えば、体長が  $\mu m$  オーダーであることから化学物質の空間勾配を検

出できないバクテリアは、biased random walk という手段で化学物質の時間勾配を検出し、誘引行動や忌避行動を行う。*C. elegans*の塩に対する誘引行動や温度走性行動も、これまでは基本的に biased random walk で説明されてきた。

従来の *C. elegans* の行動解析では、顕微鏡上での *C. elegans* の位置を画像から計算し、顕微鏡の視野から外れる場合に電動ステージで位置を調整する方法が用いられてきた。しかし、匂いの勾配を用いる本研究では電動ステージで *C. elegans* の位置を動かす事はできない。そこで、本研究では画像取得用の LED リング照明とハイビジョンを超える高解像度カメラ(2,000 x 2,000 画素)を組み合わせる事で、シンプルで安価な *C. elegans* 行動記録システムを開発した(図3)。なお、このシステムは関連研究者からの評価が高く、東京大学や米国 Rockefeller 大学の研究者からも問い合わせが来ている。この独自システムを用いた解析を行った結果、以下の事実が明らかになった。

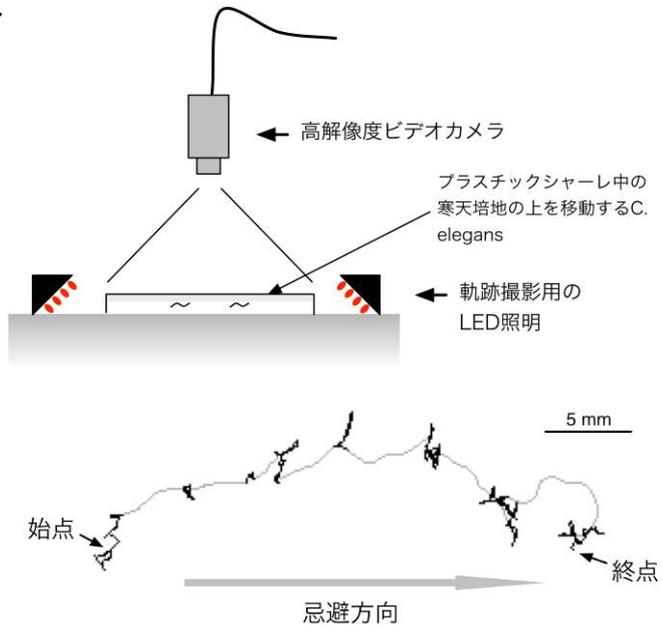


図3 (上) *C. elegans* の軌跡行動記録システム。(下) *C. elegans* のノナン忌避行動の軌跡の例。灰色の部分が直進期(ラン)、黒色部分が方向転換期(ピルエット)。

(i) ノナン忌避行動は、*C. elegans* の他の行動と同様に、直進期(ラン)と方向転換期(ピルエット)という2つの状態を繰り返す。ただし、他の行動と比べて、方向転換期の平均時間が大幅に長い(木村ら、投稿中)。

(ii) ノナン忌避では、匂いの勾配に対する感受性が高い。アッセイに用いている 9cm のプラスチックシャーレ内における局所的なノナン濃度変化のシミュレーションと測定(後述)の結果から推測すると、わずか 1%/mm 程度の濃度差を感知して匂い勾配の方向を検出していると考えられる(木村ら、投稿準備中)。

前述のように、*C. elegans* の行動は空間勾配を認識しない biased random walk であると考えられてきたが、本研究からノナン忌避は空間勾配を認識した行動("taxis")である可能性が示唆された。動物個体が空間勾配を認識するためには、空間的に充分離れた複数の点で同時に刺激を感知する stereo-sensing が必要であるはずだが、*C. elegans* の匂い受容器はこの条件を満たさない。従って、*C. elegans* のノナン忌避行動の制御基盤を明らかにするという事は、生物が刺激の勾配を認識するための新たな戦略の解明につながる可能性がある。

今後は、この空間勾配認識メカニズムの実体を、遺伝子および神経回路レベルで明らかにする事を目指す。

#### 4) 匂い刺激の定量的測定

行動の経時変化の定量的解析にあたっては、刺激であるノナンの量がどのように変化するかを理解する事が重要である。プラスチックシャーレのような微小な環境で局所的匂い濃度を測定することは困難であるが、中本高道博士(東工大)のグループおよび岩崎唯史博士(茨城大)との共同研究により、プレート中におけるノナン濃度変化の一端を明らかにすることができた(木村ら、投稿準備中)。まず、非常に微量な物質の濃度変化を測定する水晶振動子センサーをノナン計測用に最適化した。次に、このセンサーをプラスチックシャーレ内3カ所に置き、ノナンを揮発させた際の各センサーの応答変化を比較した。その結果、プレートの位置によるノナンの濃度差は、拡散だけを考慮したシミュレーションモデルよりも大きい

事が分かった(図4)。なお、今後はガスクロマトグラフィーを組み合わせる事で、より定量性の高い測定を目指す予定である。

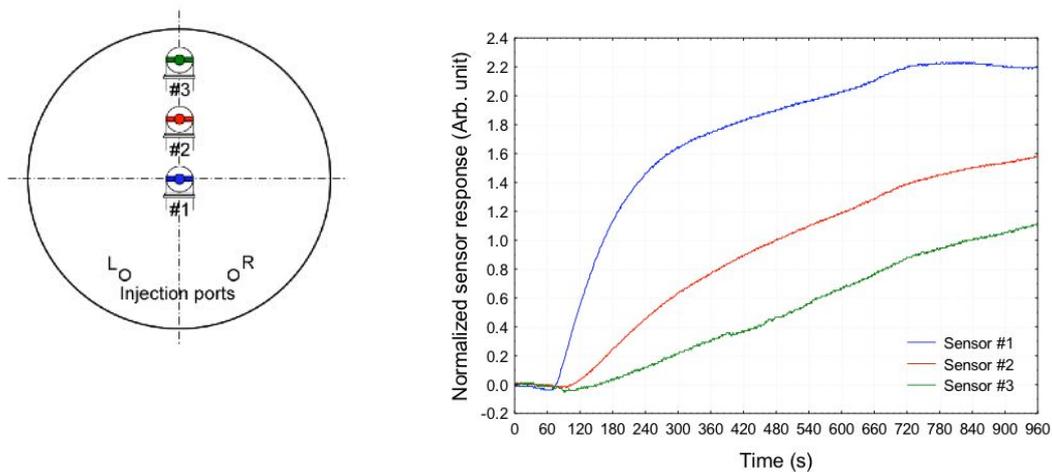


図4 9cmプラスチックシャーレ内におけるノナン濃度変化の様子。(左)#1, 2, 3がセンサーの位置。LとRにノナンをスポット。(右)センサー応答の様子。拡散だけに基づく当初の予想よりもセンサーの位置によるセンサー応答(すなわちノナン濃度)の違いが大きい。

## 5. 自己評価

研究提案時の目標は、*C. elegans*の神経回路における神経細胞活動の可視化であった。しかし領域会議でのアドバイスなどに基づき、遺伝学的解析や行動レベルの解析が容易である *C. elegans* を研究対象とする事のメリットを十分に活かすために、研究目標を「シンプルな神経回路機能の統合的理解」へと拡張することにした。具体的には、(1) 神経機能の重要な側面である学習(ノナン忌避行動増強)の遺伝学的解析、(2) 神経回路に対する入力(刺激)と出力(行動)の動的変化の定量的解析、などの目標を加えた。

結果として、忌避行動増強に関与するドーパミンシグナル伝達の遺伝学的解析はほぼ順調に進めることができた。膜電位イメージングによる *C. elegans* 神経細胞の可視化について大きな成果をあげることはまだできていないが、イメージング系の確立に加えて、定量的な匂い刺激の問題がほぼ解決されて、今後の解析への十分なメドが立った事は大きな収穫であった。また、行動レベルの解析は当初の予想を超えて、全く新たな見地から神経回路の機能、さらにこれを制御する遺伝子の機能の解析へとつながる大きな可能性を秘めていると考えている。匂い濃度変化の測定などの結果も含めて、全体的には当初の予測以上に「統合的解析」への環境が整ったと考えている。

## 6. 研究総括の見解

神経機能の重要な側面である学習(ノナン忌避行動増強)の遺伝学的解析、神経回路に対する入力(刺激)と出力(行動)の動的変化の定量的解析などの結果から、忌避行動増強に関与するドーパミンシグナル伝達の遺伝学的解析を順調に進め、目標を達成している。今後の方向を何にするのか期待と興味を持って見守っていきたい。

## 7. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

### ①論文

現在再投稿準備中。

### ②特許

研究期間累積件数: 1 件

発 明 者:木村幸太郎、桂勲

発明の名称:ドーパミンシグナル伝達阻害剤のスクリーニング法

出 願 人:JST

出 願 日:2009/1/23

③招待講演など

1. 木村幸太郎 「Enhancement of odor avoidance is regulated by dopamine signaling in the nematode *C. elegans*。」第7回国際シンポジウム—味覚嗅覚の分子神経機構 2009年11月(招待講演)
2. 木村幸太郎 「Enhancement of odor avoidance by preexposure is regulated by dopamine in the nematode *C. elegans*。」総研大国際セミナー—行動神経科学における進化研究 2008年6月 (招待講演)
3. 木村幸太郎 「線虫 *C. elegans* の匂い忌避行動の統合的解析—神経系が『系』として働くための原理解明を目指して」生理研研究会—シナプス可塑性の分子基盤 2008年6月(招待講演)
4. 木村幸太郎 「事前刺激で増強される線虫 *C. elegans* の匂い忌避行動にはドーパミンが必要である」第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同学会 シンポジウム—新世代神経行動学のストラテジー 2007年9月(招待講演)

④外部発表

1. 木村幸太郎 「Enhancement of odor avoidance by preexposure in *C. elegans*。」Gordon Research Conference: Neural Circuits & Plasticity 2007年7月

【B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】

①論文

1. Oishi A, Gengyo-Ando K, Mitani S, Mohri-Shiomi A, Kimura KD, Ishihara T, Katsura I. FLR-2, the glycoprotein hormone alpha subunit, is involved in the neural control of intestinal functions in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to cells*. 14, 1141-1154 (2009)
2. Kuhara A, Okumura M, Kimata T, Tanizawa Y, Takano R, Kimura KD, Inada H, Matsumoto K, Mori I. Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit controlling behavior of *C. elegans*. *Science*. 320, 803-807 (2008)
3. Kodama E, Kuhara A, Mohri-Shiomi A, Kimura KD, Okumura M, Tomioka M, Iino Y, Mori I. Insulin-like signaling and the neural circuit for integrative behavior in *C. elegans*. *Genes & development*. 20, 2955-2960 (2006)