線虫 *C. elegans* における感覚情報の 統合と学習にかかわる 分子メカニズム

国立遺伝学研究所 構造遺伝学研究センター
総合研究大学院大学遺伝学専攻
石原 健

1. はじめに

動物は、環境からさまざまな刺激(情報)を受容している。脳・神経系は、その中から状況に応じて必要な情報を選択・抽出し、適切に処理して行動を決定している。その過程で、情報は過去の経験や記憶などに応じて適切な修飾を受ける場合がある。高等生物では、このような処理過程を非常に複雑に組み合わせて、高度な神経活動を行い行動していると考えられる。このような情報処理のメカニズムを分子レベルで明らかにすることは、神経回路の機能、ひいては脳の機能を理解するうえで重要なことである。我々は、このような複雑な神経機能を明らかにすることをめざして、単純な神経系をもつ線虫 *Caenorhabditis elegans* をモデルとして研究を行っている。

C. elegans の雌雄同体の成虫の959個の体細胞のうち302個が神経細胞であり、生きたまま微分干涉顕微鏡で観察可能である^{1,2)}。これらの神経細胞からなる回路の全構造は電子顕微鏡により明らかにされ、約5000の化学シナプス、約600のギャップジャンクションにより回路を形成していることが示された³⁾。また、行動の解析が比較的容易で、遺伝学により行動と分子とを結びつけることが可能である。さらに、ゲノムの全塩基配列も決定されている⁴⁾。このように線虫は、行動をつかさどる神経回路における情報処理機構について、分子・細胞・回路のそれぞれのレベルを結びつけて解析するの

に適したモデル生物である。

2. *C. elegans* における行動の解析

C. elegans においては、運動、化学走性、温度走性、接触刺激回避応答などのさまざまな行動^{5,6)}に関する研究が、おもに2つの方法で進められてきた。1つは、特定の神経細胞をレーザー破壊した線虫の行動を解析し、その行動における神経の機能を明らかにするというアプローチである。たとえば、特定の感覚神経をレーザーで破壊し、誘引性匂い物質に対する化学走性を調べることにより、AWAとAWCとよばれる2対の感覚神経が、匂い物質を受容していることが示された⁷⁾。もう1つは、特定の遺伝子に異常をもつために行動異常を示すような変異体を解析することにより、その行動を制御する分子メカニズムを明らかにするというアプローチである。薬剤などにより突然変異を誘起した線虫を、誘引性匂い物質に対する化学走性を指標にしたスクリーニングにより得られた変異体の解析から、匂い受容感覚神経(AWA, AWC)の分化や細胞内のシグナル伝達機構が明らかになった^{7,8)}。しかし、遺伝学的解析においては強い表現型を示す変異体が同定しやすいため、比較的単純な行動である化学走性を指標にした場合、おもに感覚神経に異常がある変異体が単離・解析されることとなった。一方、感覚情報の神経回路上での情報処理に異常を示す変異体では、化学走性における表現型が弱く同定されにくかったと考えられる。

このように、行動を指標として神経系の解析を行ううえで、どのような行動に着目して解析を進めるかが重要である¹⁰⁾。我々は、“2つの入力から1つの出力”という最も単純な情報処理の1つとして、情報の統合にかかわる行動に着目して遺伝学的解析をすすめ、情報処理の制御の分子機構の一端を明らかにしたので紹介したい¹¹⁾。

3. 感覚情報統合の行動測定系

C. elegans は、ジアセチル(2,3-butanedione, バターのような香り)などの匂い物質に正の走化性を示し⁷⁾、銅イオンなどの重金属イオンを忌避する¹²⁾。細胞破壊実験などにより、それぞれの応答にかかわる感覚神経は異なっている(Fig.1B)ことが知られている。我々は、この2つの刺激を用いて感覚情報の統合を測定する行動測

Molecular Mechanisms Involved in Sensory Integration and Learning in *C. elegans*

Takeshi ISHIHARA

Structural Biology Center, National Institute of Genetics, Department of Genetics, The Graduate University for Advanced Studies

Fig.1 The interaction assay for the sensory integration and a phenotype of *hen-1* in the assay¹¹⁾. A : Copper acetate solution was spread on the midline of the assay plate. After 18-22 hr, various concentration of diacetyl was spotted on the one side and about 50 worms were put on another side. After 90 min, index was calculated. B : Putative neuronal circuit for the interaction of two sensory signals and for two types of behavioral plasticity. Triangles and hexagons represent sensory neurons and interneurons, respectively. Arrows represent chemical synapses and their direction, and H shapes represent gap junctions. The neurons expressing the HEN-1 protein are shaded. C : The sensory signal of chemotaxis toward diacetyl and that of the avoidance of Cu^{2+} ion inhibit each other. D : *hen-1* animals showed weaker tendency to go over the Cu^{2+} barrier to the diacetyl than wild type animals. E, F : The phenotypes of the wild type and *hen-1* in the interaction assay. Dose response curves of wild type and *hen-1* to diacetyl with (+) or without (-) 100 mM Cu^{2+} ion and to Cu^{2+} ion with (+) or without (-) 10^{-2} diacetyl.

定系 (interaction assay とよぶ) を開発した (Fig.1A)。寒天培地の中央に銅イオンを塗り、その片側に匂い物質を、その反対側に線虫をおき、90分後にそれぞれの側の虫の数を数える。この測定では、匂い物質と銅イオンの濃度に依存して、どれだけの線虫が匂い物質の側へ動くかが変わることから、これらの感覚情報の間にはお互いの出力を抑制する仕組みがあると考えられる (Fig.1C)。また、匂い物質に対する走化性や銅イオンからの忌避反応のそれぞれに関しては精度良く測定する方法が確立されており、この測定系での行動変異体に感覚受容の異常があるかどうか容易に調べられる。したがって、この測定系を用いることによって、“2つの入力から1つの出力”という情報処理過程を、感覚入力の異常と切り離して解析できる。これまでの感覚神経のマッピング^{7), 12)}と神経の回路図³⁾から、この行動は感覚神経を含めて十数対からなる微小な神経回路によ

り制御されていると推定できる (Fig.1B)。

4. *hen-1* 変異体の情報の統合と学習にかかわる表現型

我々は、感覚情報の統合の行動測定系において、銅イオンを越えて匂い物質のほうへ行きにくい変異体 *hen-1* を同定した (Fig.1D)。*hen-1* 変異体は銅イオンからの忌避反応、匂い物質ジアセチルへの化学走性のそれぞれには、異常がみられなかった。しかし、銅イオンと匂い物質の両者の存在下で行動を測定した場合にのみ、野生型に比べ銅イオンからの忌避反応が優先され、大きな差がみられた (Fig.1E, Fig.1F)。これらの結果は、*hen-1* 変異体が、ジアセチルと銅イオンに対する感覚受容には異常がみられないが、これらの2つの情報の統合には異常があることを示している (Fig.1C)。

感覚情報の統合に異常がある *hen-1* 変異体には、2つ

Fig.2 *hen-1* mutants show defects in two types of learning paradigms¹¹⁾. A : Chemotaxis toward NaCl of wild type and *hen-1* animals conditioned without food and without NaCl(mock-conditioned) or without food and with NaCl(conditioned). *hen-1*(+) indicates the wild type *hen-1* transgene. B, C : Thermotaxis of wild type and *hen-1* animals cultivated at 17 (B) or 25 (C) under well-fed and starved conditions.

の刺激の対提示後の学習にも異常があった。 *C. elegans* は、条件付けなどをしないと NaCl に寄っていくが、餌のないプレートで NaCl で条件付けしたのちには、NaCl を避けるようになる¹³⁾。 *hen-1* 変異体では、条件付けをしないと NaCl への化学走性は正常だが、条件付け後の走性の変化が小さいことがわかった (Fig.2A) また、 *C. elegans* は、餌が十分にある条件で育つと、その温度を好み正の温度走性を示すが、同じ温度で飢餓を体験すると反対にその温度を忌避するようになる^{9), 14)} (毛利, 森 私信)。 *hen-1* 変異体は、通常の温度走性に異常はないが、飢餓体験後も温度走性に変化がなかった (Fig.2B, Fig.2C)。これらの条件付けには飢餓を用いているので、 *hen-1* 変異体が飢餓を感じているかを測定したところ、飢餓による単純な行動変化には異常がみられなかった。このことは、 *hen-1* 変異体は、NaCl、温度、飢餓それぞれに対する感覚受容は正常であるが、NaCl と飢餓、温度と飢餓による条件付け後の学習に異常があることを示している。これらの学習には2つの感覚情報が必要なことを考えると、それらの情報から記憶を形成する過程に異常がある可能性もある。

5. HEN-1 の働くメカニズム

hen-1 変異を遺伝学的にマップした後、その領域の DNA 断片の表現型回復性を指標にして原因遺伝子を同定した。その結果、 *hen-1* 遺伝子は、分子量約1万の分泌タンパク質をコードしていた。この分子は LDL 受容体リガンド結合モチーフを1つもつがそれ以外の相同性はみられなかった。また、免疫染色により、HEN-1 タンパク質は、感覚神経 ASE と介在神経 AIY の2対の神経のみで発現し (Fig.3A), nerve ring とよばれるシナ

Fig.3 Expression of the HEN-1 protein¹¹⁾. Transparent images of wild type(A) and *unc-104*(B) by immunostaining. The arrows indicate punctuated staining of the HEN-1 in the nerve ring. Scale bars indicate 10 μm.

プスが多い領域の神経軸索で点状に局在していることが明らかになった。シナプス小胞の輸送が行われない *unc-104* (KIF1A キネシンホモログをコード) 変異体¹⁵⁾ では、軸索での HEN-1 の局在がみられない (Fig.3B) ことから、HEN-1 タンパク質はシナプス小胞と同じ分子機構を用いて輸送されていると考えられた。

HEN-1 が発現している AIY 神経は、LIM タイプホメオボックス遺伝子変異体 *ttx-3* では分化に異常がみられる¹⁶⁾。 *ttx-3* 変異体は、interaction assay において *hen-1* 変異体と同様の表現型を示したことから、AIY が感覚情報の統合に重要な役割を果たしていることが示唆された。

HEN-1 分子の働くメカニズムを解析するため、さまざまなプロモーターの制御下で野生型 HEN-1 を *hen-1* 変異体に発現させ、表現型の回復を調べた。HEN-1 が本来発現している ASE や AIY 神経で発現させた場合だけでなく、AWC 感覚神経やタッチ神経 (接触刺激を受容する) で発現させた場合にも表現型の回復がみられたが、筋肉で発現させた場合には表現型の回復がみられ

Fig.4 HEN-1 functions cell-non-autonomously in the mature nervous system¹¹⁾. A : The *hen-1* mutant expressing the wild type HEN-1 protein in specific neurons or muscles was analyzed by the interaction assay. B : *hen-1* mutant animals carrying *phsp::HEN-1* were heat shocked at various stages and analyzed by the interaction assay at the adult stage.

なかった (Fig.4A)。表現型の回復に適した発現時期を調べるために、熱ショックプロモーターの制御下に野生型 HEN-1 をつないだコンストラクトを導入した *hen-1* 変異体において、さまざまな時期に HEN-1 の発現を誘導し、成虫での行動を測定した。神経回路が形成される胚発生後期や幼虫期に発現させても表現型の回復はみられず、成虫期に発現誘導した場合にのみ表現型の回復がみられた (Fig.4B)。これらの結果から、HEN-1 は成熟した神経系において細胞非自律的に機能していると推定され、神経機能やシナプス伝達の修飾を通じて情報処理を制御している可能性があると考えられる。今後、HEN-1 と相互作用する分子の同定や、*hen-1* と類似の表現型を示す変異体の解析などにより、感覚情報の統合や学習の分子メカニズムがさらに明らかになることが期待される。

6. おわりに

感覚情報の統合は、“2つの情報から1つの出力”という最も簡単な情報処理の1つである。このような情報処理を組み合わせるとより高次の情報処理が行われていると考えられることから、*C. elegans* の神経回路のような単純なシステムで明らかになったメカニズムは、哺乳類の脳などの情報処理を解析するうえでの基盤として重要であると考えている。また、近年 *C. elegans* の高次行動にかかわる測定系が次々に開発されてきており、今後の解析により高次神経機能の分子メカニズムに迫れるのではないかと期待している。

文 献

- 1) Sulston, J. E. and Horvitz, H. R. (1977) *Dev. Biol.* **56**, 110-156.
- 2) Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. and Thomson, J. N. (1983) *Dev. Biol.* **100**, 64-119.
- 3) White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N. and Brenner, S. (1986) *Phil. Trans. Royal Soc. London* **314B**, 1-340.
- 4) *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) *Science* **282**, 2012-2018.
- 5) Bargmann, C. I. (1993) *Annu. Rev. Neurosci.* **16**, 47-71.
- 6) Rankin, C. H. (2002) *Nat. Rev. Genet.* **3**, 622-630.
- 7) Bargmann, C. I., Hartwig, E. and Horvitz, H. R. (1993) *Cell* **74**, 515-527.
- 8) Bargmann, C. I. and Kaplan, J. M. (1998) *Annu. Rev. Neurosci.* **21**, 279-308.
- 9) Mori, I. (1999) *Annu. Rev. Genet.* **33**, 399-422.
- 10) Hobert, O. (2003) *J. Neurobiol.* **54**, 203-223.
- 11) Ishihara, T., Iino, Y., Mohri, A., Mori, I., Gengyo-Ando, K., Mitani, S. and Katsura, I. (2002) *Cell* **109**, 639-649.
- 12) Sambongi, Y., Nagae, T., Liu, Y., Yoshimizu, T., Takeda, K., Wada, Y. and Futai, M. (1999) *Neuroreport* **10**, 753-757.
- 13) Saeki, S., Yamamoto, M. and Iino, Y. (2001) *J. Exp. Biol.* **204**, 1757-1764.
- 14) Hedgecock, E. M. and Russell, R. L. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4061-4065.
- 15) Hall, D. H. and Hedgecock, E. M. (1991) *Cell* **65**, 837-847.
- 16) Hobert, O., Mori, I., Yamashita, Y., Honda, H., Ohshima, Y., Liu, Y. and Ruvkun, G. (1997) *Neuron* **19**, 345-357.

線虫 *C. elegans* における感覚情報の統合と学習にかかわる分子メカニズム

石原 健 (いしはら たけし)

国立遺伝学研究所構造遺伝学研究センター、総合研究大学院大学遺伝学専攻 助手

連絡先：〒411-8540 三島市谷田1111 国立遺伝学研究所

E-mail: tishihar@lab.nig.ac.jp