線虫 *Caenorhabditis elegans* の感覚応答と学習を制御する機構

富岡 征大*

線虫 *Caenorhabditis elegans* はわずか302個のコンパクトな神経系を持つ。その構造は脊椎動物や昆虫などの脳と大きく異なるが、そこで働く神経回路の様式や分子経路は種を超えて共通したものが多くみられる。線虫は、餌の匂いへの誘引行動や侵害刺激からの忌避行動など、様々な外部刺激に対する応答を示す。さらに、個体群密度や餌の有無など複数の情報を統合し記憶することで、状況に適した行動パターンを選択する。同種他個体から放出される線虫フェロモンにより個体群密度の認識がなされており、フェロモンの作用は幼虫期の発生や、社会性行動、学習など多岐に渡る。学習により後天的に獲得される行動には、インスリン様シグナル伝達やモノアミンシグナル伝達などの種を超えて保存された重要な分子経路が働く。線虫は、遺伝学的解析に有用なモデル生物として古くから用いられてきたが、近年ではそれに加えて神経活動のイメージングによる生理学的な解析も広く行われている。本稿では、線虫の神経系の構造を概説し、化学物質に対する感覚応答や記憶学習を制御する神経回路と分子機構について紹介したい。

1. はじめに

線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) は、土壌に生息する体長1 mm 程の線形動物であり、発生や神経系の研究をはじめ、遺伝学や分子生物学などの様々な研究分野でモデル動物として用いられている(図1)。細菌類を餌として摂取しており、実験室では寒天培地上に塗り広げられた大腸菌を餌として飼育されている。蛇行運動による前進運動や、後退運動、旋回運動などをする。このような運動パターンの組み合わせにより、匂いを頼りに離れた所に存

図1 微分干渉顕微鏡で観察した線虫 *Caenorhabditis elegans* 上: 雌雄同体の線虫。下: 雄の線虫。尾部にある交尾器が拡大してある。

在する餌を探し当てそこに留まる²⁾。生存に適さない環境からの逃避行動もみられ、物理的な侵害刺激や毒性のある化学物質を避ける行動を示す。逃避行動には、生得的なものに加え、後天的に学習により獲得されるものがある。例えば、線虫は飢餓を避けるために飢餓条件下で経験した化学物質や温度の情報を記憶し、後の行動を変化させる学習をすることが出来る^{21, 26, 38)}。さらに、異なる種の細菌を嗅ぎ分け、それぞれの細菌に対して嗜好性を示す。すなわち、寄生性と非寄生性の細菌を同時に与えて培養した後は、大腸菌などの非寄生性細菌の方に好んで移動する。このような細菌に対する嗜好性は寄生性細菌の感染を経験しないと見られないことから、感染の経験とその際に感じた匂いを関連付けた学習であるといえる⁵¹⁾。線虫で見られる記憶は数分から数時間で忘れてしまうものが殆どであるが、繰り返し刺激により24時間以上持続する「長期記憶」や、幼虫期の経験が成虫期の行動に影響を及ぼす「刷り込み(imprinting)」と呼ばれる現象も知られている^{18, 36)}。*C. elegans*は古くから遺伝学的な解析に用いられてきたが、近年ではそれに加えて神経活動のライブイメージングによる生理学的な解析も盛んに行われている。これらの解析から、線虫の示す走性行動と行動可塑性(学習)において働く神経回路と分子機構の働きが明らかになってきている。本稿では線虫の感覚応答とその可塑性(学習)に焦点を当てて、それらの現象を支配する神経系の働きや分子機構について紹介したい。

2. 線虫の感覚応答とそれを支配する神経回路

2-1. 線虫の神経系の構造

線虫は959個の体細胞(雌雄同体の線虫の場合)からなるが、その中の302個は神経細胞である。個々の神経細胞には名前が付けられており、細胞体の位置と細胞系譜が明らかになっている¹⁴⁾。また、電子顕微鏡による観察から全ての神経細胞間の物理的な接続がわかっており、様々な行動や学習における神経回路の働きを詳しく解析することが可能である⁴⁸⁾。近年では、2つに分断した緑色蛍光タンパク質を2種の神経群のシナプス領域にそれぞれ発現させて、再構成した時の蛍光を観察する手法(GFP Reconstitution Across Synaptic Partners, GRASP)により目的の神経間の物理的な接続を生きたまま確認することも可能である⁹⁾。線虫の神経細胞は頭部に集中しており、頭部と尾部に存在する神経節から伸びた神経突起が頭部の神経環(Nerve ring)と呼ばれる領域で集まる(図2)。神経環では神経突起同士がシナプス結合やギャップ結合を作っており、様々な情報処理を行う中枢領域となっている。線虫の多くの神

*Masahiro TOMIOKA, 東京大学理学系研究科付属遺伝子実験施設(〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1)

Received 31 May 2011, Accepted 1 July 2011

図2 線虫の神経系 A, B: 全神経にGFPを発現させた線虫 (A: 微分干渉像, B: 蛍光像)。C, D: 頭部に存在する数種類の感覚神経にGFPを発現させた線虫 (C: 微分干渉像, D: 蛍光像)。

経突起は枝分かれがなく、隣り合った突起間でシナプス結合が作られる (*en passant* シナプス結合)。更に、同一の神経突起内にプレシナプスとポストシナプスが混在しており、必ずしも神経間の情報伝達に活動電位を必要としない⁴⁸⁾。

線虫の頭部に存在するアンフィド (amphid) や尾部に存在するファスミド (phasmid) と呼ばれる感覚器は外部に露出した感覚繊毛を持ち、環境中の様々な化学物質を受容している。アンフィド感覚器には、受容される刺激や構造が異なる12種類の感覚神経の感覚繊毛が、ファスミド感覚器には2種類の感覚繊毛が存在する²⁾。各種の感覚神経は、性質や神経接続が類似している左右対称な一対からなっている。感覚神経は感覚器に伸ばすプロセスに加えて、神経環にもプロセスを伸ばしており、ここで介在神経へと情報を伝達している (図2)。

2-2. 各種の感覚神経の機能分担

レーザー照射による細胞殺傷実験により、各種の感覚神経がどのような刺激を受容するか調べられており、例えば、水溶性物質を受容する主たる感覚神経である ASE 味覚神経を除去すると水溶性物質に対する化学走性が著しく損なわれる²⁾ (表1)。GCaMPやカメレオン (Cameleon) などの

Ca²⁺ 指示タンパク質を用いたライブイメージングにより、感覚神経の外部刺激に対する応答性が調べられている。ASE 味覚神経は左右一対の ASEL (左側の ASE 神経) と ASER (右側の ASE 神経) 神経からなるが、それぞれ水溶性物質の濃度変化に対する応答が異なり、ASELは水溶性物質の濃度上昇により、ASERはその濃度低下により活性化する³⁴⁾。さらに、それぞれの感覚神経で受容されるイオンの種類も異なり、ASELは主に Na⁺, Li⁺, Mg²⁺などの陽イオンを、ASERは主に Cl⁻, Br⁻, I⁻などの陰イオン受容することがわかっている³⁴⁾。

ASE 味覚神経の他、餌の匂いを受容する AWC 嗅覚神経や、温度を受容する AFD 温度受容神経、侵害刺激を受容する ASH 感覚神経などの働きも詳しく解明されている (表1)。AWC 神経は、アルコールやケトンなどの様々な揮発性匂い物質を受容し、それらの物質に対する誘引行動に必要な神経である²⁾。また、AFD 温度受容神経と共に温度変化も感知することができ、線虫にとって適切な温度に移動する行動においても働く²³⁾。ASH 感覚神経は鼻先に与えられた機械刺激や、キニーネなどのアルカロイド、高浸透圧といった侵害刺激に反応し、後退や旋回運動を誘導することで危険を回避する行動に必要な神経である²⁾。侵害刺激となる化学物質は、AWBやADL 感覚神経、尾部に存在する PHAやPHB 感覚神経などの神経でも受容されることが知られている²⁾。

2-3. 感覚シグナルの情報処理

感覚神経における情報処理機構は、主に遺伝学的解析によりそれに関わる分子経路が明らかになってきている。線虫のゲノムに27種類存在する受容体型グアニル酸シクラーゼ (Receptor-type guanylyl cyclase, rGC) をコードする遺伝子は、ASE 神経や、AWC 神経、AFD 神経などの各種の感覚神経に発現しており、その機能欠損が様々な感覚応答の異常をもたらす^{2, 34, 47)}。これらのグアニル酸シクラーゼにより産生されるサイクリック GMP (Cyclic GMP, cGMP) は感覚繊毛にあるサイクリックヌクレオチド依存性チャネル (Cyclic nucleotide gated channel, CNG channel) の TAX-2/TAX-4複合体を介して働くと考えられている²⁾。TAX-2やTAX-4の変異体は、水溶性物質や、匂い、温度などの様々な感覚応答に異常を示す。TAX-2はAWC 感覚神経において匂いの順応にも関わり、長時間の匂い物質の曝露は EGL-4 (プロテインキナーゼ G ホモログ) を介して TAX-2 のリン酸化を引き起こし、匂い物質に対する感覚応答の低

神経の名称	受容される化学物質	応答	出力
AWA	揮発性物質 (Diacetyl, Pyrazine, Trimethylthiazole等)		誘引
AWB	揮発性物質 (2-nonanone, 1-octanol等)	オフ応答	忌避
AWC	揮発性物質 (Benzaldehyde, Isoamyl alcohol, Butanone, Trimethylthiazole等)	オフ応答	誘引, 又は忌避 ^(注1)
ASE	塩 (NaCl, LiBr, MgI ₂), ビオチン, cAMP	オン応答 (ASEL), 又はオフ応答 (ASER)	誘引, 又は忌避 ^(注1)
ASK	フェロモン (Ascaroside), リジン	オフ応答	誘引
ASH	苦味物質 (Quinine, Denatonium等)	主にオン応答	忌避
ADF	高浸透圧, SDS, Cu ²⁺ , NaCl		
ASG	NaCl	オン応答	誘引
ADL	1-octanol		誘引
PHA/PHB	SDS		忌避 ^(注2)

表1 化学物質を受容する各種の感覚神経の性質 各種の感覚神経で受容される化学物質、化学物質の濃度変化に対する応答の性質、感覚応答により出力される行動を示した。^(注1) 飢餓と化学物質による条件付けにより、忌避行動を出力する。^(注2) PHA と PHB 感覚神経は忌避行動に対して拮抗的に働く。

下を引き起こす³⁹⁾(図3A)。哺乳類の主嗅球でも線虫と同様にCNGチャネルを介した分子経路が使われており、ここではサイクリックAMP(Cyclic AMP, cAMP)がチャネルを開くセカンドメッセンジャーとして働いている⁴⁴⁾。

一方、CNGチャネルを介さない情報処理機構も知られており、ASHやADL感覚神経などの侵害刺激受容神経では、OCR-2やOSM-9などのTRPVファミリーの陽イオンチャネルが働く。線虫のTRPチャネルも哺乳類やショウジョウバエなどと同様に高度不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid, PUFA)により調節されており、様々な脂肪酸合成酵素の変異体で侵害刺激に対する応答に異常がみられる²⁾(図3B)。哺乳類の痛み受容においても、熱やカプサイシンなどの受容体としてTRPV1チャネルが働くことが知られており、線虫から哺乳類に至るまで侵害刺激の情報処理機構は進化的に保存されている⁴⁴⁾。

図3 感覚入力を伝える分子機構 A: AWC 嗅覚神経において匂い物質の情報を伝達する分子経路。B: ASH 感覚神経において忌避性の化学物質の情報を伝達する分子経路。

2-4. 嗅覚受容体

線虫には、化学物質を受容するGタンパク質共役型受容体(化学受容体, Chemoreceptor)の候補分子が約1,500種類予測されており、これは線虫ゲノムに存在する遺伝子のおよそ10%に当たる³⁹⁾。多くの化学受容体がアンフィド感覚神経に発現しており、ショウジョウバエやマウスの嗅覚神経と異なり一種類の感覚神経に数種類の発現が見られる。AWA 嗅覚神経の感覚繊毛に局在するODR-10は化学走性異常の順遺伝学的スクリーニングにより発見され、酵母や乳酸菌の発酵の際に生成されるジアセチル(2,3-butanedione)に特異的に反応する嗅覚受容体である²⁾。野生型の線虫は

ジアセチルに対して誘引行動を示すが、ODR-10を本来は発現しないAWB 嗅覚神経に異所発現することにより、ジアセチルに対して忌避行動を示すようになる⁴³⁾。AWB 嗅覚神経は2-ノナンやオクタノールなどからの忌避行動に必要な感覚神経である(表1)。このODR-10を用いた実験により、線虫の匂い物質に対する応答は受容体の種類により決められている訳ではなく、個々の感覚神経の性質(例えば、AWA 神経は誘引応答でAWB 神経は忌避応答)により決められているというモデルが提唱された。

2-5. 感覚神経に接続する介在神経の働き

線虫の生体内におけるカルシウムイメージング技術の確立により、感覚神経の下流における介在神経群の働きの解明が進んでいる。AWC 嗅覚神経は3種類の介在神経AIA, AIB, AIY 神経と物理的な接続を持つ。この中でAIB 介在神経はAWC 嗅覚神経と同様に匂い物質の濃度低下により活性化される。一方、AIAやAIY 介在神経はAWC 嗅覚神経と逆の反応、すなわち匂い物質の濃度上昇により活性化が見られる^{4,5)}(図4A)。これらの神経間ではグルタミン酸が神経伝達物質として用いられているが、AIB 介在神経においてはAMPA型グルタミン酸受容体GLR-1が用いられているのに対して、AIAやAIY 介在神経ではグルタミン酸依存性塩化物イオンチャンネル(Glutamate-gated chloride channel)GLC-3が働き、グルタミン酸に対する反応性の違いにより、それぞれの細胞での応答性の違いが生まれている。このような神経接続の様式は脊椎動物の光受容細胞とそれに接続する2種類の双極細胞(ON bipolar cellとOFF bipolar cell)との間にも見られる⁴⁾。感覚神経の下流で相反する方向の伝達経路があることで、外部刺激の入力に対する出力を増幅させる働きがあるのかもしれない。AIB 介在神経を殺傷した線虫は後退や旋回運動の頻度が低下することから、この神経は後退や旋回を正に制御している^{12,45)}。逆に、AIAやAIY 介在神経を殺傷した線虫は前進運動の継続時間が低下することから前進運動を正に制御しているといえる^{12,45)}。匂い物質の濃度が低下すると、AWC 嗅覚神経でそれを感じ、下流の3種類の介在神経の働きにより匂い物質濃度の高い方へ方向転換し、前進運動を継続するような信号へと変換される⁴⁾(図4A)。

水溶性物質を主に受容するASE 味覚神経の下流においてもAIAやAIBなどの介在神経が働く。ASE 味覚神経は、AWC 嗅覚神経と異なり左右のASE 神経(ASELとASER)で化学物質に対する反応性が逆転している³³⁾。AIB 介在神経はASER 感覚神経からの入力により水溶性物質の濃度低下に反応して活性化される³³⁾。逆に、AIA 介在神経は濃度上昇により活性化される。この応答は、ASER 感覚神経非依存であることからASEL 感覚神経からの入力に依存していると推測される³³⁾。ASE 味覚神経による水溶性物質に対する応答は、左右で反応性の異なるASELとASER 神経が別々の働きをもつ介在神経へと情報を伝達することで、AWC 嗅覚神経と同様の誘引行動を引き起こすような運動を出力していると考えられる(図4B)。長時間の水溶性物質への曝露はその物質に対する誘引行動を著しく低下させる。長時間水溶性物質に曝された線虫は、AIB 介在神経の水溶性物質に対する応答が著しく低下することから、このAIB 介在神経の応答低下が誘引行動への出力低下の原因の一つになっているのであろう³³⁾。

図4 感覚神経に接続する介在神経の働き A: AWC 嗅覚神経の下流で働く介在神経群の機能。B: ASE 味覚神経 (ASEL 神経と ASER 神経) の下流で働く介在神経群の機能。

2-6. 筋肉を制御する運動神経

介在神経から運動神経に伝えられた情報は、各種の筋肉へと伝えられる。線虫の化学走性は、蛇行と旋回からなる一連の運動で制御されているが、空間的な濃度勾配変化に基づいて蛇行運動の方向を変化させる機構 (屈曲走性, Klinotaxis) と時間的な濃度勾配変化に基づいて旋回運動の頻度を変化させる機構 (クリノキネシス, Klinokinesis) が存在する^{16, 35)}。コンピューターシミュレーションにより、これら2つの機構により線虫の水溶性物質に対する誘引行動を再現することができる¹⁶⁾。線虫の蛇行運動を制御する体壁筋は GABA 作動性運動神経とアセチルコリン作動性運動神経の働きにより制御されている。更に、これらの運動神経にはコマンド介在神経と呼ばれる神経が接続しており、

図5 線虫の運動神経とそれに接続する介在神経群 線虫の様々な運動を支配する運動神経群とそれに接続する主な介在神経間の神経接続の模式図。前進と後退運動はコマンド介在神経と呼ばれる介在神経群に主に制御されている。

前進と後退をそれぞれ異なる介在神経群で制御している¹⁰⁾ (図5)。また、蛇行運動の振幅は SMB と呼ばれる運動神経とそれに支配される頭部筋肉により制御されている¹²⁾。線虫の旋回運動を支配するのは頭部の筋肉を制御する RIV や SMD などの運動神経と頭部筋肉の働きである¹²⁾ (図5)。

3. フェロモンによる多彩な制御機構

3-1. 耐性幼虫形成を制御するフェロモン

線虫は同種の線虫が分泌するフェロモンを受容することにより、個体群密度の認識を行っている。発生期の幼虫において、高密度の個体の存在や、飢餓状態、高温条件など、生存に不利な環境では生殖能力を持たず、餌のない環境で数ヶ月生きながらえることが出来る耐性幼虫 (Dauer) を形成し、それ以上の発生を停止する¹⁵⁾。この発生プログラムの切り替えにフェロモンによる個体群密度の認識が必要である。このフェロモンはアスカロシドと呼ばれる糖の誘導体から成る混合物であり、ダウアーフェロモン (Dauer pheromone) と呼ばれている。耐性幼虫形成の制御において、ダウアーフェロモンは ASK 感覚神経に発現する G タンパク質共役型受容体 (G protein coupled receptor, GPCR) の SRBC-64/SRBC-66 複合体で受容され、G α タンパク質 GPA-3 を介したシグナル伝達経路を誘導する¹⁹⁾。ASK 感覚神経に入力したフェロモンのシグナルは ASI 感覚神経へと伝えられ、この神経に発現する DAF-7 (TGF β ホモログ) や DAF-28 (インスリン様ペプチド) などの耐性幼虫形成制御に関わる分子の発現量を調節する^{25, 37)} (図6C)。

図6 発生や行動に影響を及ぼすフェロモンの作用機構 A: 単生行動を示す N2 株。B: 社会性行動を示す CB4856 株。培養プレート上に塗り広げられた大腸菌の緑の部分で線虫同士が集まり凝集体を形成している。C: フェロモンによる凝集行動や、耐性幼虫形成、匂い学習の制御機構。

3-2. 性フェロモン

雄の線虫は、異なる性の存在を異性から放出されるフェロモンにより認識している。線虫には雌雄同体と雄の2つの性が存在する(図1)。雌雄同体は自家受精により子孫を生むが、その子孫には約0.1%の確率で雄が含まれる。雄は雌雄同体と交尾することにより、他家受精できる。雄は雌雄同体から出される交尾フェロモンを受容しそれに対して誘引行動を示す^{40, 49)}。交尾フェロモンもダウアーフェロモンと同様のアスカロシドの混合物である⁴⁰⁾。交尾フェロモンに対する応答は、成虫の雄のみに見られ、雌雄同体との交尾の確率を上げる為の応答であると考えられる。このフェロモンに対する応答には、雄のみに存在する感覚神経であるCEM神経の働きが必要である^{40, 49)}。興味深いことに、この応答にはCEM神経以外にも雌雄同体にも存在する感覚神経であるASK感覚神経の働きも必要である⁴⁰⁾。雌雄同体はこのフェロモンには誘引されないことから、ASK感覚神経の関わる神経回路は、性的二型を持っており、雄の回路のみがフェロモンに対する誘引を引き起こす性質を有していると考えられる。体細胞の性を決定するタンパク質FEM-3の異所発現により、雌雄同体の神経を強制的に雄に変化させた個体は雌雄同体のフェロモンに対して誘引行動を示すという興味深い結果もこの説を強く支持する⁴⁹⁾。

3-3. 社会性行動を促すフェロモンの働き

世界各地の土壌で *C. elegans* の野生株が単離されており、それらの株は培養プレート上で示す習性により、社会性行動を示す株(社会性株, Social strain)と単生行動を示す株(単生株, Solitary strain)に分けられる⁸⁾(図6 A, B)。社会性株は、プレートに塗り広げられた大腸菌の縁の部分(酸素濃度が低い領域)に集まり線虫同士が凝集して存在しているが、単生株は培養プレート全体に広がっている¹¹⁾。多くの実験で標準的に用いられている野生株は、N2株と名付けられたイギリスの土壌で単離されたものであり、この株は単生行動を示す。一方、今まで集められた野性株の中では社会性を示す株の方が多く存在し、自然界ではこちらの株が主流となっている⁸⁾。このような社会性行動はフェロモンによる個体間認識により調節されていることがわかっている。先に述べたように、実験室で標準的に用いられている単生株N2を用いた場合、雄は雌雄同体から出されるフェロモンに誘引されるが、雌雄同体ではむしろフェロモンから忌避行動を示す。一方、面白ことに社会性株の雌雄同体はこのフェロモンに対して誘引行動を示し、この性質により線虫同士が固まる行動(凝集行動)が促進されている。社会性株は線虫フェロモンであるアスカロシドをASK感覚神経で受容し、この神経の活性化が凝集行動を促進する²⁷⁾。社会性株と単生株では、ニューロペプチドY受容体ホモログをコードする *npr-1* 遺伝子に一塩基多型(Single nucleotide polymorphism, SNP)が存在する。全ての社会性株ではNPR-1の活性が失われており、逆に単生株では活性が保たれており、この違いが両株の習性の違いを引き起こす大きな原因となっている⁸⁾。単生株ではRMG介在神経のNPR-1の働きによりギャップ結合を介してASK感覚神経のフェロモンに対する感覚応答が抑えられている。一方、社会性株ではNPR-1の活性が失われている為、ASK感覚神経がフェロモンに対して強く反応し、それにより凝

集行動が促進される²⁷⁾(図6 C)。

4. 飢餓と化学物質との情報統合による学習

後天的な学習により成立する行動として、飢餓と外部環境とを関連付けた学習が知られている。例えば、線虫をNaCl入りの寒天培地の上で一定時間飢餓を経験させた後に、NaClなどの塩による濃度勾配が作られたプレートの上に置くと、高塩濃度領域を避けるような行動を示す³⁸⁾(図7)。NaClと共に餌がある環境や、NaClを含まない培地上で飢餓を経験した線虫は高塩濃度領域を好むことから、線虫は飢餓とNaClの情報を連合させて、高塩濃度領域を避けるように学習しているといえる。匂い物質などのNaCl以外の誘引性の化学物質と飢餓との対提示によっても、提示された化学物質からの忌避行動を起こすようになる²⁶⁾。また、同様の現象として、飢餓条件下で経験した温度を記憶し、その温度から避けるような行動を示すことも知られている³¹⁾。

図7 線虫のNaClへの走性行動 A: アッセイプレートの模式図。矢印で示された付近を中心にNaClの濃度勾配が形成されている。B: アッセイプレートの上に線虫を移した直後の様子。C: 通常培養を行った後の線虫のNaClへの誘引行動。D: 飢餓条件下でNaClを曝した後の線虫のNaClに対する応答。NaCl濃度の高い領域を避けるような行動を示す。

4-1. インスリン/PI3キナーゼシグナル伝達経路が学習後の忌避行動を引き起こす

インスリンシグナル伝達経路は、代謝制御をはじめ個体の生命維持に必要なシグナル伝達経路であるが、線虫にも進化的に保存されたインスリン様シグナル伝達経路が代謝や、発生、寿命など様々な生命現象に必要である(図8 A)。このインスリン様シグナル伝達経路の神経系における働きは、飢餓と化学物質との連合学習にも必要である(図8 B)。インスリン受容体ホモログDAF-2や、DAF-2の下流で働

図8 線虫の様々な現象に関わるインスリン様シグナル伝達経路 A: 寿命や、発生、代謝などを制御するインスリン様シグナル伝達経路。B: ASER味覚神経とAWC嗅覚神経において、化学物質からの忌避行動を制御するインスリン様シグナル伝達経路。C: 予想されるタンパク質分解酵素部位を元に分けられた3種類のインスリン様ペプチドの構造(文献25より改変)。

くPI3キナーゼシグナル伝達経路の構成分子の変異体では、飢餓と化学物質の対提示による学習に異常を示し、条件付けを行っても化学物質を避けるような行動を示さない⁴¹⁾。また、PI3キナーゼの逆反応を触媒する酵素であるPTENホモログDAF-18の変異によりPI(3,4,5)P₃レベルを強制的に上昇させると、学習の有無に関わらず塩や匂い物質からの忌避行動が引き起こされる^{1, 26)}。従って、PI3キナーゼとPTENの活性に依存したPI(3,4,5)P₃のレベルが化学物質に対する応答を決めているといえる。

PI3キナーゼとPTENは連合学習において化学物質受容性の感覚神経で働く。NaClと飢餓との連合学習においてはNaClを受容するASER味覚神経で、匂い物質と飢餓との連合学習においては、匂い物質を受容するAWC嗅覚神経で、PI(3,4,5)P₃が上昇すると塩や匂い物質からの忌避行動が引き起こされる⁴¹⁾。ASER神経やAWC神経を殺傷すると、先天的な化学物質に対する応答のみならず、条件付け後の忌避行動も見られなくなる。従って、これらの感覚神経は、通常状態における誘引行動と連合学習後にみられる忌避行動の両方の出力をしているといえる(図8B)。

4-2. インスリン様ペプチドの多彩な働き

線虫のゲノム上には約40種類のインスリン様ペプチドをコードする遺伝子が存在するが、その中で最もヒトインスリンと相同性の高いINS-1が飢餓と化学物質との連合学習に必要である⁴¹⁾(図8B, C)。INS-1は数種類の感覚神経や介在神経において発現が見られ、神経細胞内のシナプス

領域に局在が見られる。発生や寿命の制御においては、INS-1とは異なるインスリン様ペプチドDAF-28やINS-7などが働く^{25, 32)}(図8C)。ASIやASJ感覚神経で発現するDAF-28はフェロモンや飢餓などの刺激により発現量が変わることが知られており、個体群密度や飢餓などの情報を伝える物質として働くと考えられている(図6C)。一方、INS-3やINS-33などのインスリン様ペプチドは生殖細胞の増殖を制御していることが知られている³⁰⁾(図8C)。連合学習においてINS-1の分泌がどのように制御されているのか定かではないが、INS-1は飢餓と温度との連合学習にも働くこと²¹⁾や、学習制御において特定の神経細胞から分泌されることが必要であることなどから、餌の有無を伝える神経伝達物質として、若しくは飢餓と感覚情報の統合が行われた後の行動パターン変化を促進する物質として機能していることが推測される。

4-3. 哺乳類の学習におけるインスリンシグナル伝達の働き

線虫のみならず、ヒトを含む哺乳類における学習でもインスリンシグナル伝達経路が関与しているという報告がなされている。学習記憶障害や痴呆の症状を示すアルツハイマー病患者の脳内のインスリン量を測ると、健常者と比べて低下が見られる²²⁾。更に、アルツハイマー病患者にインスリンを投与すると学習記憶障害に改善が見られる²²⁾。膵臓からのインスリン分泌を阻害したラットは空間学習や神経可塑性に異常を示し³⁾、逆にマウスの鼻腔からインスリンを脳内に投与すると記憶力の上昇が見られる²⁹⁾。海馬スライス標本やアフリカツメガエル(*Xenopus*)幼生を用いた実験により、インスリンシグナル伝達はシナプス可塑性を制御することが示されている^{7, 28)}。動物が外部環境と調和を取りながら生存していく為に必要な「学習」というプロセスにおいて、インスリンシグナル伝達経路は種間を越えて重要な役割を担っているであろう。

5. モノアミンシグナル伝達の関わる学習

セロトニンやドーパミンなどのモノアミンは、軟体動物、昆虫、哺乳類など様々な生物で記憶学習において働くことが知られている。線虫では、セロトニン、ドーパミン、オクトパミン、チラミンの4種類のモノアミンが神経伝達物質として働く⁶⁾。セロトニンやドーパミンは餌の存在を伝える物質として、また、チラミンやオクトパミンは餌が無いことを伝える物質として、代謝や行動などの活動を制御すると考えられている。一方、線虫においても、以下に示すようなモノアミンシグナル伝達の関わる学習が報告されている。

5-1. 嗅覚嫌悪学習とセロトニン

線虫は様々な細菌を餌として摂取するが、生存を脅かすような感染菌は好んで摂取しようとはしない。例えば、線虫に非感染性の腸菌と感染性の緑膿菌のどちらを選択するか試験した場合、腸菌の方に好んで寄っていく。このような行動は学習により後天的に獲得されることがわかっており、緑膿菌に対する感染の経験がない線虫はそれを避けるような行動は示さない。この学習は、「嗅覚嫌悪学習(Aversive olfactory learning)」と呼ばれており、同様の

現象は哺乳類などの高等動物でも見られる⁵¹⁾。セロトニンの合成やセロトニン依存性塩化物イオンチャネル (Serotonin-gated chloride channel) に欠損のある線虫は、この嗅覚嫌悪学習に異常を示し、感染の経験をして依然として感染性細菌に誘引される。セロトニンは ADF と呼ばれる化学物質受容性の感覚神経で産生されることが必要であり、感染の経験により ADF 神経におけるセロトニンの発現量が増加する⁵¹⁾。従って、セロトニンは細菌感染の経験により分泌が増加し、他の神経に情報を伝達する物質として働いていると考えられる。

餌の匂いは AWB や AWC などの嗅覚神経で受容され、これらの感覚神経は餌に対する誘引行動や嗅覚嫌悪学習に必要である。これらの嗅覚神経は、緑膿菌の感染経験の有無に関わらず、大腸菌と緑膿菌の匂いの違いを識別し、与えられた細菌の種類の変化に応答する¹³⁾。感染菌から忌避する行動を起こす為には、介在神経 RIA の働きが重要である¹³⁾。RIA 神経は、旋回運動を支配する SMD 運動神経に出力しており、旋回運動の頻度を上げることで感染菌から逃げるような行動に関わっていると考えられる (図5)。また、RIA 神経は ADF 感覚神経からシナプス入力を受けている。ADF 神経は、感染経験に依存したセロトニン放出を介して、RIA 神経の機能を調節しているであろう。

5-2. 感覚応答の増強とドーパミン

AWB 嗅覚神経は、2-ノナン (heptyl methyl ketone) などの忌避性の化学物質に対する応答に必要な神経である (表1)。AWB 神経の2-ノナンに対するカルシウム応答は餌である細菌に対するものと同様であり、この神経は細菌に含まれる忌避性の化学物質を受容していると推測される¹³⁾。線虫は、高濃度の2-ノナンに曝されると麻痺して動けなくなる。従って、生存を脅かす侵害刺激として、生得的に2-ノナンから逃げる性質を持つのであろう。この2-ノナンに対する忌避応答の強度は過去の経験に依存して変化することがわかっており、2-ノナンを予め嗅がせておいた線虫は2-ノナンからの忌避応答が上昇し、匂い源からより遠くに逃げるようになる²⁰⁾。この現象は痛み応答やアメフラシ (*Aplysia*) のエラ引っ込め応答などで見られる感作 (Sensitization) と同様の学習の一種であると考えられている¹⁷⁾。

ドーパミンや DOP-3 (D2型ドーパミン受容体ホモログ) が欠損した線虫は2-ノナンに対する忌避応答の増強を示さないことから、この現象にはドーパミンによるシグナル伝達が必要である²⁰⁾。忌避応答の増強において DOP-3 は RIC と呼ばれる介在神経で働く²⁰⁾。RIC 介在神経はオクトパミンやチラミンを産生する神経であることから、複数のモノアミンがこの学習に関与している可能性が考えられる。一方で、RIC 介在神経は、線虫の前進や後退を支配する介在神経群の1つ AVA 神経に多くのシナプス出力を持つ (図5)。従って、ドーパミンシグナル伝達は AVA 介在神経への出力を調節することで、学習後の2-ノナンに対する忌避応答の増強を引き起こしているのかもしれない。

モノアミンは神経細胞に作用し、プレシナプスやポストシナプスの働きを調節する神経修飾物質として様々な生物で働くことが知られている¹⁷⁾。線虫の学習においても、モノアミンによる進化的に保存された制御機構が感覚応答の

多様性や強度の調節を行っていると推測される。

6. 個体群密度に依存した嗅覚応答の可塑性

先に述べたように、飢餓環境下で匂い物質に一定時間曝されると、本来は誘引性の匂い物質を避けるような行動に変化する学習が知られている。この匂い学習は、培養時の線虫の個体群密度により影響を受ける。すなわち、培養時の個体群密度が高い線虫は、個体群密度が低い環境にいた線虫と比べて匂い学習が強く引き起こされる⁵⁰⁾。この現象の生物学的な意義は、以下のように考察されている。線虫は餌に含まれる匂い物質に寄っていくような先天的な性質を持っているが、餌がない環境で誘引性の匂い物質に曝されるとその環境では餌を得ることが出来ないことを学習し、一定時間後にその匂い物質から離れて他の餌場を探しに行く。同じ餌場にいる同種個体群の密度が高い場合は、匂い源からより早く、より遠くに逃げることで、餌を獲得する確率を上げようとしているのではないかと。

この現象において、個体群密度の認識に線虫フェロモン (アスカロシドの混合物) が使われる。フェロモンを線虫に与えると、ASI 感覚神経における SNET-1 という神経ペプチドの発現量が低下する⁵⁰⁾。SNET-1 は、アメフラシ *Aplysia* の L11 ペプチドと相同な分子であり、*snet-1* 変異体では匂い学習の強度が上昇する。逆に SNET-1 の過剰発現により匂い学習の強度は低下する⁵⁰⁾。従って、この SNET-1 が匂い学習において個体群密度を伝達し、学習の強度を調節しているといえる (図6 C)。幼虫期の耐性幼虫形成において働く SRBC-64/SRBC-66 複合体以外の受容体が匂い学習においては働くことがわかっているが、その実体は明らかにされていない。

SNET-1 を負に制御する分子として NEP-2 (ネプリライシンホモログ) が働いている。NEP-2 の変異体では過剰に放出された SNET-1 が原因で匂い学習に欠損が生じる⁵⁰⁾。ネプリライシンは哺乳類のペプチダーゼであり、細胞外のペプチドを分解することが知られている。NEP-2 のペプチダーゼ酵素活性部位を潰すと、学習への制御機能が消失することから、NEP-2 もペプチダーゼとして SNET-1 の分解を制御していると考えられる⁵⁰⁾ (図6 C)。SNET-1 は哺乳類に相同分子は存在しないが、哺乳類のネプリライシンはアルツハイマー病に関与するアミロイド β を分解する。ネプリライシンによる学習能の制御は進化的に保存された機構である可能性が考えられる。

7. 長時間持続する匂いの記憶

今まで紹介してきた線虫の学習に伴う行動変化は、数分~数時間程度持続する短期的なものである。一方で、長時間 (十数時間~数日) 持続する記憶も報告されている。

幼虫発生期にベンズアルデヒド (Phenylmethanal) などの匂い物質を経験すると、幼虫期に経験した匂い物質への誘引行動の増強や匂い物質に依存した産卵運動の上昇がみられる。この現象は匂いの刷り込み (olfactory imprinting) と呼ばれており、刷り込みが起こる時期は幼虫期の一定期間に限られ、成虫期で同様の処理を行っても行動変化を引き起こさない³⁶⁾。従って、幼虫期から成虫期までの数日間持続する長期記憶であるといえる。匂いの刷り込みは餌の

存在に依存して起こり、刷り込みが起こる時期に匂い物質を与えても、同時に餌が存在しないと行動変化は引き起こされないことから、匂いと生存に有利な餌のある環境とを関連付けて記憶しているのかもしれない。匂いの刷り込みの分子メカニズムは殆ど分かっていないが、AWC 嗅覚神経の下流で働く AIY 介在神経とそこで発現する G タンパク質共役型受容体 SRA-11 の働きが必要であり、発生期において AWC と AIY 神経間の接続が刷り込みに依存して変化している可能性が考えられる³⁶⁾。

成虫期においても、匂い物質ブタノン (Methyl ethyl ketone) と餌の組み合わせによる繰り返し刺激により長期間持続する匂いに対する化学走性の可塑的变化が見られる。餌の存在下でブタノンを 1 時間程曝露するとブタノンに対する誘引行動の増強が見られ、この行動変化は 1～2 時間程度持続する⁴²⁾。一方で、餌+ブタノン曝露を 30 分の時間間隔で 7 回以上繰り返すとブタノンに対する誘引行動の増強が 24 時間以上持続するようになる¹⁸⁾。この記憶は転写や翻訳を阻害すると形成されないことから、アメフラシや、ショウジョウバエ、マウスなどで見られるものと同様の長期記憶であると考えられる。また、他のモデル生物と同様に CRH-1 (CREB 転写因子ホモログ) の変異体において、匂いの長期記憶に異常が見られ、逆に CRH-1 の過剰発現により学習能の上昇が見られることから、線虫の長期記憶も種を通じて保存されたメカニズムが働いているといえる¹⁸⁾。

8. おわりに

Samuel Ward により、1973 年に *C. elegans* の水溶性物質 (ヌクレオチドや、アミノ酸、無機塩など) に対する走性行動が報告されてから約 40 年の年月が経つ⁴⁶⁾。その間に、感覚応答を制御する神経系の構造や分子機構、様々な外部刺激に対する感覚応答や学習の現象が明らかになっている。線虫は脊椎動物や昆虫の脳と比べて極めて少ない神経細胞集団で情報処理を行っており、ニューロンの構造やシナプス接続の様式も異なっている。このように動物間で神経系の構造が異なるにも関わらず、行動や学習を制御する神経回路や分子経路は種を越えて類似の機構が多く用いられている。一方で、フェロモンによる発生や行動の多彩な制御は、多くの外敵から身を守り、餌の少ない苛酷な環境で生き抜く為に獲得された線虫独自の生存戦略であると予想される。線虫には 250 種類以上のニューロペプチドが発現しており²⁴⁾、これらのペプチドによる神経修飾機構は、現在までにその一端のみしか明らかになっていない。今後、分子生物学や遺伝学のみならず、分子イメージングやコンピュータシミュレーションなど、多方面から解析を進めることで新たな神経システムの基本原理が明らかになることが期待される。

文 献

- 1) Adachi, T., Kunitomo, H., Tomioka, M., Ohno, H., Okochi, Y., Mori, I., & Iino, Y.: Genetics, 186, 1309-1319 (2010)
- 2) Bargmann, C. I.: WormBook, 1-29 (2006)
- 3) Biessels, G. J., Kamal, A., Urban, I. J., Spruijt, B. M., Erkelens, D. W., & Gispen, W. H.: Brain Res, 800, 125-135 (1998)

- 4) Chalasani, S. H., Chronis, N., Tsunozaki, M., Gray, J. M., Ramot, D., Goodman, M. B., & Bargmann, C. I.: Nature, 450, 63-70 (2007)
- 5) Chalasani, S. H., Kato, S., Albrecht, D. R., Nakagawa, T., Abbott, L. F., & Bargmann, C. I.: Nat Neurosci, 13, 615-621 (2010)
- 6) Chase, D. L., & Koelle, M. R.: WormBook, 1-15 (2007)
- 7) Chiu, S. L., Chen, C. M., & Cline, H. T.: Neuron, 58, 708-719 (2008)
- 8) de Bono, M., & Bargmann, C. I.: Cell, 94, 679-689 (1998)
- 9) Feinberg, E. H., Vanhove, M. K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R. D., Shen, K., & Bargmann, C. I.: Neuron, 57, 353-363 (2008)
- 10) Goodman, M. B.: WormBook, 1-14 (2006)
- 11) Gray, J. M., Karow, D. S., Lu, H., Chang, A. J., Chang, J. S., Ellis, R. E., Marletta, M. A., & Bargmann, C. I.: Nature, 430, 317-322 (2004)
- 12) Gray, J. M., Hill, J. J., & Bargmann, C. I.: Proc Natl Acad Sci USA, 102, 3184-3191 (2005)
- 13) Ha, H. I., Hendricks, M., Shen, Y., Gabel, C. V., Fang-Yen, C., Qin, Y., Colon-Ramos, D., Shen, K., Samuel, A. D., & Zhang, Y.: Neuron, 68, 1173-1186 (2010)
- 14) Hobert, O.: WormBook, 1-24 (2010)
- 15) Hu, P. J.: WormBook, 1-19 (2007)
- 16) Iino, Y., & Yoshida, K.: J Neurosci, 29, 5370-5380 (2009)
- 17) Kandel, E. R.: Science, 294, 1030-1038 (2001)
- 18) Kauffman, A. L., Ashraf, J. M., Corces-Zimmerman, M. R., Landis, J. N., & Murphy, C. T.: PLoS Biol, 8, e1000372 (2010)
- 19) Kim, K., Sato, K., Shibuya, M., Zeiger, D. M., Butcher, R. A., Ragains, J. R., Clardy, J., Touhara, K., & Sengupta, P.: Science, 326, 994-998 (2009)
- 20) Kimura, K. D., Fujita, K., & Katsura, I.: J Neurosci, 30, 16365-16375 (2010)
- 21) Kodama, E., Kuhara, A., Mohri-Shiomi, A., Kimura, K. D., Okumura, M., Tomioka, M., Iino, Y., & Mori, I.: Genes Dev, 20, 2955-2960 (2006)
- 22) Kroner, Z.: Altern Med Rev, 14, 373-379 (2009)
- 23) Kuhara, A., Okumura, M., Kimata, T., Tanizawa, Y., Takano, R., Kimura, K. D., Inada, H., Matsumoto, K., & Mori, I.: Science, 320, 803-807 (2008)
- 24) Li, C.: Parasitology, 131 Suppl, S109-127 (2005)
- 25) Li, W., Kennedy, S. G., & Ruvkun, G.: Genes Dev, 17, 844-858 (2003)
- 26) Lin, C. H., Tomioka, M., Pereira, S., Sellings, L., Iino, Y., & van der Kooy, D.: J Neurosci, 30, 8001-8011 (2010)
- 27) Macosko, E. Z., Pokala, N., Feinberg, E. H., Chalasani, S. H., Butcher, R. A., Clardy, J., & Bargmann, C. I.: Nature, 458, 1171-1175 (2009)
- 28) Man, H. Y., Lin, J. W., Ju, W. H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L. E., Sheng, M., & Wang, Y. T.: Neuron, 25, 649-662 (2000)
- 29) Marks, D. R., Tucker, K., Cavallin, M. A., Mast, T. G., & Fadool, D. A.: J Neurosci, 29, 6734-6751 (2009)
- 30) Michaelson, D., Korta, D. Z., Capua, Y., & Hubbard, E. J.: Development, 137, 671-680 (2010)

- 31) Mohri, A., Kodama, E., Kimura, K. D., Koike, M., Mizuno, T., & Mori, I.: Genetics, 169, 1437-1450 (2005)
- 32) Murphy, C. T., Lee, S. J., & Kenyon, C.: Proc Natl Acad Sci USA, 104, 19046-19050 (2007)
- 33) Oda, S., Tomioka, M., & Iino, Y.: J Neurophysiol (2011)
- 34) Ortiz, C. O., Faumont, S., Takayama, J., Ahmed, H. K., Goldsmith, A. D., Pocock, R., McCormick, K. E., Kunitomo, H., Iino, Y., Lockery, S., & Hobert, O.: Curr Biol, 19, 996-1004 (2009)
- 35) Pierce-Shimomura, J. T., Morse, T. M., & Lockery, S. R.: J Neurosci, 19, 9557-9569 (1999)
- 36) Remy, J. J., & Hobert, O.: Science, 309, 787-790 (2005)
- 37) Ren, P., Lim, C. S., Johnsen, R., Albert, P. S., Pilgrim, D., & Riddle, D. L.: Science, 274, 1389-1391 (1996)
- 38) Saeki, S., Yamamoto, M., & Iino, Y.: J Exp Biol, 204, 1757-1764 (2001)
- 39) Sengupta, P.: Pflugers Arch, 454, 721-734 (2007)
- 40) Srinivasan, J., Kaplan, F., Ajredini, R., Zachariah, C., Alborn, H. T., Teal, P. E., Malik, R. U., Edison, A. S., Sternberg, P. W., & Schroeder, F. C.: Nature, 454, 1115-1118 (2008)
- 41) Tomioka, M., Adachi, T., Suzuki, H., Kunitomo, H., Schafer, W. R., & Iino, Y.: Neuron, 51, 613-625 (2006)
- 42) Torayama, I., Ishihara, T., & Katsura, I.: J Neurosci, 27, 741-750 (2007)
- 43) Troemel, E. R., Kimmel, B. E., & Bargmann, C. I.: Cell, 91, 161-169 (1997)
- 44) Troemel, E. R.: Bioessays, 21, 1011-1020 (1999)
- 45) Wakabayashi, T., Kitagawa, I., & Shingai, R.: Neurosci Res, 50, 103-111 (2004)
- 46) Ward, S.: Proc Natl Acad Sci USA, 70, 817-821 (1973)
- 47) Wasserman, S. M., Beverly, M., Bell, H. W., & Sengupta, P.: Curr Biol, 21, 353-362 (2011)
- 48) White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., & Brenner, S.: Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 314, 1-340 (1986)
- 49) White, J. Q., Nicholas, T. J., Gritton, J., Truong, L., Davidson, E. R., & Jorgensen, E. M.: Curr Biol, 17, 1847-1857 (2007)
- 50) Yamada, K., Hirotsu, T., Matsuki, M., Butcher, R. A., Tomioka, M., Ishihara, T., Clardy, J., Kunitomo, H., & Iino, Y.: Science, 329, 1647-1650 (2010)

- 51) Zhang, Y., Lu, H., & Bargmann, C. I.: Nature, 438, 179-184 (2005)

Abstract

Regulatory mechanisms of neural circuits and molecular pathways in innate and learned behaviors in *Caenorhabditis elegans*

Masahiro TOMIOKA

Molecular Genetics Research Laboratory, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033 Japan

The nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans* is comprised of 302 neurons. Although the structure of the nervous system is quite different from that of vertebrates or insects, many evolutionally conserved molecules are used in the neural circuits. *C. elegans* use chemosensation to survive in a continuously changing environment. They migrate to comfortable places by smelling for bacterial food and approaching the source of the smell. They also sense noxious stimuli, such as toxic chemicals and mechanical stimuli, and avoid them. Some of the chemotaxis responses are altered by prior chemical exposure in a given context (i. e., high population density, bacterial infection, and food status). Sugar derivatives termed ascarosides are continuously secreted from *C. elegans* and used as mediators of population density information in the plasticity of chemotaxis response. Evolutionally conserved molecules, such as components of insulin and monoamine signaling pathways, function in neural circuits to regulate chemotaxis plasticities.

C. elegans has been used as a useful model animal not only in molecular genetics studies but also in physiological studies using live imaging of neurons. In this review, I introduce the overall structure of the nervous system and regulatory mechanisms of neural circuits and molecular pathways in chemical sensation and information processing to generate an appropriate sensory response.

Key words: *Caenorhabditis elegans*, sensory response, learning and memory, neural circuit, molecular pathway