

線虫単一神経細胞での部位特異的応答の  
蛍光イメージング法による解明

2017年度

設樂 久志

学位論文 博士（理学）

線虫単一神経細胞での部位特異的応答の  
蛍光イメージング法による解明

2017 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

設楽 久志

# 目次

第1章 緒言.....	1
1.1 神経細胞の情報処理.....	1
1.1.1 単一神経細胞で行われる情報処理.....	1
1.1.2 局所で行われる情報処理を明らかにする上での問題点.....	5
1.2 線虫神経細胞の情報処理.....	6
1.2.1 線虫を用いた神経機能解明の背景.....	6
1.2.2 イメージングや光遺伝学を用いた神経機能の解明.....	6
1.2.3 線虫における単一神経細胞の機能解析.....	7
1.3 本研究の目的.....	12
参考文献.....	13
第2章 膜電位イメージングによる介在神経細胞 AIY のにおい応答の解析.....	16
2.1 背景.....	16
2.2 方法.....	18
2.2.1 株と飼育条件.....	18
2.2.2 VSFP2.42 を発現した線虫の共焦点顕微鏡観察.....	18
2.2.3 高濃度 KCl 刺激を用いた膜電位・Ca <sup>2+</sup> イメージング.....	18
2.2.4 IAA 刺激を用いた膜電位・Ca <sup>2+</sup> イメージング.....	19
2.3 結果.....	20
2.3.1 VSFP2.42 を用いた膜電位イメージング系の確認.....	20
2.3.2 IAA 刺激に対する AIY の膜電位と Ca <sup>2+</sup> 応答.....	22
2.3.3 高濃度 KCl 刺激に対する AIY 内 Ca <sup>2+</sup> 応答.....	23
2.4 考察.....	24
参考文献.....	26
第3章 cGMP イメージングによる嗅覚感覚神経細胞 AWC の部位特異的応答.....	29
3.1 背景.....	29
3.2 方法.....	31
3.2.1 株と飼育条件.....	31
3.2.2 AWC 感覚神経細胞に発現した cGi500 の共焦点顕微鏡観察.....	31
3.2.3 測定装置.....	31

3.2.4 cGMP と Ca <sup>2+</sup> イメージング .....	32
3.2.5 データ解析.....	32
3.3 結果.....	34
3.3.1 AWC 嗅覚神経細胞での部位特異的な cGMP 応答.....	34
3.3.2 ODR-1 と DAF-11 は AWC 内の cGMP 応答で異なる役割を持つ.....	41
3.3.3 長時間のにおい刺激は cGMP 応答性を変化させない.....	44
3.3.4 連続したにおい刺激は繊毛での cGMP 応答性を減少させる.....	46
3.3.5 相対濃度の変化に対する cGMP 応答 .....	49
3.4 考察.....	51
参考文献.....	57
第 4 章 結言.....	60
4.1 本研究のまとめと意義.....	60
4.2 線虫単一神経細胞の機能解明における今後の展望.....	62
参考文献.....	69

公刊論文目録および口頭発表目録

謝辞

# 第1章 緒言

## 1.1 神経細胞の情報処理

### 1.1.1 単一神経細胞で行われる情報処理

生物は神経回路を構成する個々の神経細胞で情報のやり取りを行い、最終的に行動などの出力を行う。神経細胞の情報のやり取りでは、電気的な性質がその主たる役割を担っており、情報はシナプスを介して次の神経細胞へと伝えられていく。一方でこうした情報伝達の制御は細胞内タンパク質のリン酸化や遺伝子発現の変化によって行われ、神経回路レベルでの情報処理に影響を与える。つまり、単一神経細胞で行われる情報処理は、神経回路レベルでの情報処理や最終的な行動出力の観点で重要になることを意味している。そのため、単一神経細胞内で行われる情報処理の様式を明らかにすることは、神経科学分野における大きな課題の一つといえる。

神経細胞は一般的に樹状突起、細胞体、軸索に区分けされ、それぞれの領域で異なる情報処理を行う。これまでさらに区画分けされた局所での情報処理の事例が報告されている (Branco and Häusser, 2010)。局所で行われる情報処理のうち、特に樹状突起上で行われる情報処理について様々な知見がある (図 1.1)。例えば、電気的な情報の統合は、神経細胞が空間上の異なる位置から入力を受け、入力に伴う膜電位変化が神経細胞の物理化学的な特性によって加算されることで起こる (図 1.1 a) (Stuart and Spruston, 2015)。この様に神経細胞は空間上で異なるシナプス前細胞から入力を受けるが、その際にシナプス後細胞が神経伝達物質を放出させたり、一酸化窒素のような分子状ガスを発生させたりすることでシナプス前細胞に局所レベルで逆行性のシグナルを送る (図 1.1 b) (Regehr et al., 2009)。また、電気的な情報統合だけでなく、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化などといった生化学的な情報の統合も樹状突起の局所で行われ、局所レベルでシナプス可塑性等の性質を変化させる (図 1.1 c and d) (Chen and Sabatini, 2012; Shah et al., 2010)。このようなシナプス性質の変化はシナプス内のタンパク質翻訳を伴う (図 1.1 e) (Bramham and Wells, 2007; Sutton and Schuman, 2006)。

こうした局所での情報処理は、主にマウスを用いた実験から明らかにされてきた。例えば、マウスに視覚刺激を与えたとき、一次視覚野神経細胞の樹状突起局所での応答を明らかにし、神経細胞の視覚刺激に対する方向選択性について調べた研究がある (Jia et al., 2010) (図 1.2 A)。また、マウス以外の多くの生物でも局所で行われる情報処理について調べられている。ショウジョウバエのキノコ体にあるケニオン細胞は、嗅覚情報を受けた二次投射神経の入力を樹状突起上で加算することで、におい選択的な応答を示す (Li et al.,

2013) (図 1.2 B)。また、コオロギでは気流刺激の方向情報が最終腹部神経節の巨大介在ニューロンでトポロジカルに表現され(Ogawa et al., 2006; Paydar et al., 1999)、こうした入力情報が統合され方向選択性を持った出力を示す(Ogawa et al., 2008)。異なる感覚モダリティではあるが、同様にアフリカツメガエルやバツタを用いた研究では、視覚刺激の入力が空間的に保存され、介在神経細胞の樹状突起上にマッピングされる(Bollmann and Engert, 2009; Peron et al., 2009)。一方で、樹状突起上への局所入力や情報統合だけではなく、タンパク質のリン酸化や局所翻訳について明らかにした研究もある。マウス海馬の培養細胞では、局所的な入力とタンパク質のリン酸化がシナプスの増大化を引き起こす(Sutton et al., 2007)。マウス以外の例では、アフリカツメガエルの視蓋神経細胞で、樹状突起上に局在する mRNA-タンパク質複合体顆粒から放出された mRNA のタンパク質合成が行われ、樹状突起のダイナミクスが変わる(Bestman and Cline, 2009) (図 1.2 C)。

ここまで樹状突起上の局所で行われる情報処理について紹介してきたが、こうした例は主に介在神経細胞における情報処理に関するものである。一方で、外界からの情報を受け下流へ情報を伝える感覚神経細胞についても、刺激を電気信号に変えるという役割の特殊性から、単一神経細胞内の部位ごとに大きく異なる役割を持つ。例えば視覚系については、視細胞の一部である外節で外界から入ってきた光子を受容し、セカンドメッセンジャーを介してイオンチャネルを制御する(Meister and Tessier-Lavigne, 2013)。また、嗅覚系では外部に露出した嗅細胞の一部に発現しているにおい受容体において分子が結合し、イオンチャネルを制御することで情報を伝える(Buck and Bargmann, 2013)。こうした例は、単一神経細胞内の特定部位で情報処理が行われているということを示している。

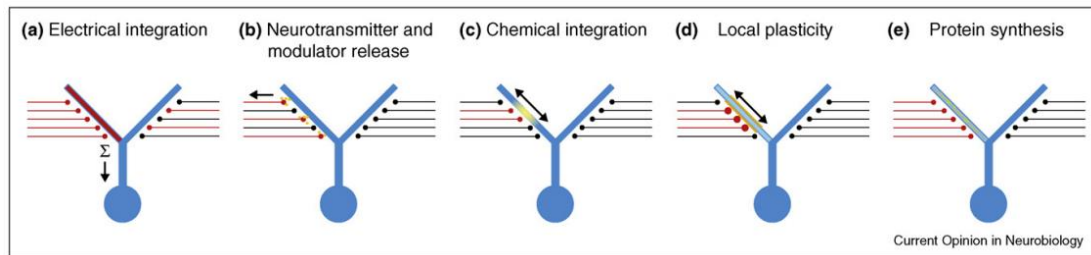


図 1.1 樹状突起上の局所で行われる異なる情報処理様式

(a) 樹状突起への入力は電氣的に統合されて神経細胞内で広がる。(b) 逆行性の情報伝達は制限された領域内で生じる。(c) 入力を受けた近辺で生化学的な情報統合が生じる。(d) 入力を受けた領域の広範囲で可塑性は変化する。(e) 樹状突起の応答により局所でタンパク質が合成される。(Branco and Häusser, 2010 より)

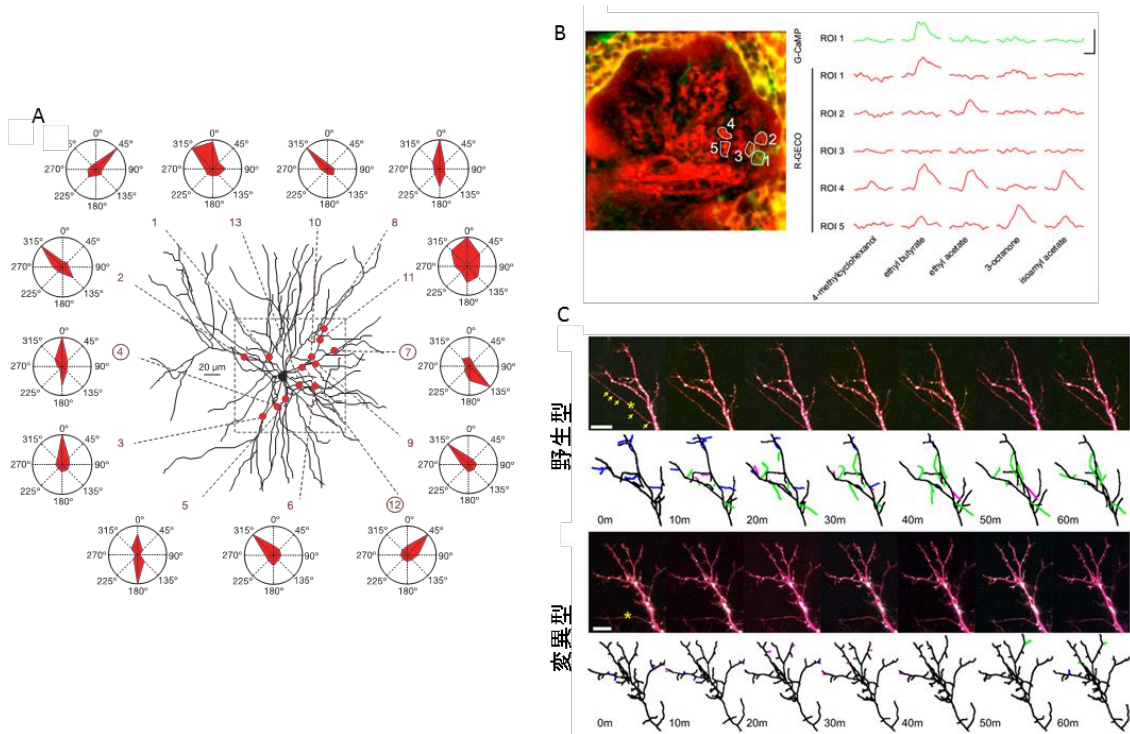


図 1.2 局所的な神経情報処理の例

(A) マウス一次視覚野の神経細胞が受ける入力。様々な方向の視覚刺激の入力に対して、樹状突起上のどの部分が応答するかを示している。(Jia et al., 2010) (B) ショウジョウバエにおいて刺激を与えたとき、異なる投射神経細胞からの入力 ( $\text{Ca}^{2+}$ 感受性赤色蛍光タンパク質 R-GECO の ROI がそれぞれ異なる投射神経細胞からの入力を意味している) の合計が閾値をこえると、出力としての応答 ( $\text{Ca}^{2+}$ 感受性緑色蛍光タンパク質 G-CaMP の ROI1) が観察される。(Li et al., 2013) (C) アフリカツメガエル視蓋神経細胞で起こる mRNA の局所翻訳は樹状突起の伸張等(青や緑の部分)が樹状突起の変化を意味している) に影響を与える。上段は正常な RNA 結合タンパク質を発現させており、下段は変異の入ったタンパク質が発現しているため、下段では樹状突起のダイナミクスが観察されない。(Bestman and Cline, 2009)



### 1.1.2 局所で行われる情報処理を明らかにする上での問題点

これまで述べてきた通り、様々な生物種の単一神経細胞で部位ごとに着目した情報処理様式の解明が行われてきた。しかしながら、こうした研究では神経系の複雑さから生じる問題を抱えている。例えば、マウスは脳皮質だけでも 1 千万以上の神経細胞があり、シヨウジョウバエなどの昆虫も数万個の神経細胞を持つ。従って、昆虫の一部の神経では可能であるものの、同定された特定の一細胞に限定して情報処理様式を明らかにすることは困難である。また、昆虫系では同定された特定の神経細胞の情報処理は明らかにできても、神経系の複雑さから、その神経細胞に対する入出力まで詳細に調べることは難しい。こうした問題点を克服するためには、神経系がシンプルである線虫の様な生き物で単一神経細胞の機能を理解する必要がある。しかしながら、線虫において単一神経細胞の部位について調べた研究は少ない（後述）。線虫の様な神経細胞数が少なく、遺伝情報が明らかとなっている生き物で単一神経細胞の局所で行われている情報処理を明らかにすることができれば、情報処理についての研究はよりいっそう進むと考えられる。

## 1.2 線虫神経細胞の情報処理

### 1.2.1 線虫を用いた神経機能解明の背景

*Caenorhabditis elegans* は全長約 1 mm で透明な、非寄生性の土壌線虫の 1 種である。1960 年代に Sydney Brenner がこの生物に注目し、モデル生物として遺伝学を中心に様々な研究で用いられることとなった(Brenner, 1974)。線虫がモデル生物として用いられるのは、飼育の容易さやライフサイクルが短いことにある。また、多細胞生物として初めて全ゲノム配列が解析された生物でもある。線虫は初期の研究で細胞系譜が明らかにされ(Sulston and Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983)、発生生物学の分野で広く用いられてきた。また、神経科学分野でも線虫は非常に有用なモデル生物として用いられている。こうした背景には、線虫は全部で 302 個の神経細胞の投射関係が電子顕微鏡を用いた実験より明らかにされている(White et al., 1986)ことがある。そのため、神経回路と行動をつなぐ研究を行う上で有用なモデル生物として考えられている。

この様に神経回路が簡単で遺伝情報が早い段階から明らかにされてきた線虫は、行動のシンプルさもあって、行動遺伝学で広く用いられることとなった。線虫神経系は簡単でありながらも、様々な感覚刺激を受容することができる。そのため、変異体で行動実験を行うことで、遺伝子レベルで行動との関係を明らかにできると考えられた。例えば、線虫が飼育環境の温度を好む性質を利用し、特定温度への走性ができなくなった変異体から遺伝子と行動の関係を結びつけた実験がある(Hedgecock and Russell, 1975)。また、線虫実験系においてにおいと定義される揮発性物質に対する化学走性を利用して、遺伝子と行動の関係を結びつけた実験もある(Bargmann et al., 1993)。この実験では変異体だけではなくレーザーによる神経破壊法も併用することで、より詳細に神経と行動を結びつけている。こうした変異体やレーザーによる神経破壊法を用いた行動解析から、これまで線虫における遺伝子と行動の関係や神経回路と行動の関係が明らかにされてきた(Bargmann, 2006; de Bono and Maricq, 2005)。

### 1.2.2 イメージングや光遺伝学を用いた神経機能の解明

前項で述べたとおり、遺伝学を中心に線虫の神経回路は理解されてきたが、2000 年代に入ってからには蛍光イメージング法を用いて詳細な神経機能の解明が行われてきた。線虫は形質転換が容易であり(Evans, 2006; Mello and Fire, 1995; Mello et al., 1991)、体が透明であるため、蛍光タンパク質を発現させ観察する実験が古くから行われてきた(Chalfie et al., 1994)。こうした経緯もあり、遺伝子導入型の蛍光タンパク質を導入し神経活動を測定する

方法は線虫で広く用いられている。特に、遺伝子導入型インディケータを用いた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  測定法は線虫でよく使われる手法である。線虫はゲノム情報から、哺乳類が持つような膜電位依存性ナトリウムチャンネルを持たないことが示唆されており、スパイク様な膜電位変化は示さない(Goodman et al., 1998)。また、 $\text{Ca}^{2+}$ が主な膜電位を変化させる電荷のキャリアであることが知られている。こうした経緯から、 $\text{Ca}^{2+}$ 測定は線虫神経活動測定と同義であると考えられており(Kerr et al., 2000)、 $\text{Ca}^{2+}$ イメージングが広く用いられる理由となっている。

従来イメージングはアガーパッドに線虫を接着剤で固定し、刺激を与えることで行われてきた(Clark et al., 2006; Kimura et al., 2004)が、マイクロ流体デバイスの開発によりデバイス内に線虫を固定しイメージングを行う手法も用いられている(Chalasanani et al., 2007; Chronis et al., 2007)。さらに、光遺伝学的手法を組み合わせることにより、複数神経間の機能的な結合を調べる研究も行われ、神経回路のより詳細な記述が行われている(Fang-Yen et al., 2015)。近年ではさらに、固定した線虫だけではなく自由行動下の線虫でも神経活動の測定が可能となっており、具体的に行動と神経回路の関係が示され始めている(Faumont et al., 2011; Luo et al., 2014)。

### 1.2.3 線虫における単一神経細胞の機能解析

遺伝学的なアプローチに始まり、レーザーによる神経破壊やイメージング手法等を用いた実験を通して線虫神経細胞の機能は明らかにされてきた。しかし、これらの手法を元に研究が進められてきた歴史的な背景から、イメージングを利用した線虫神経系の機能を明らかにする研究では、神経細胞一つを均一な機能を持つ一つのユニットとして考え、一般的に細胞体での  $\text{Ca}^{2+}$ 応答を神経活動と考える傾向がある(集中定数系的な考え方)。こうした考え方は運動ニューロンなどの比較的機能がシンプルな神経細胞の行動出力を考える上では特に問題がないと思われる(Kato et al., 2015)。しかし、介在神経細胞など様々な情報の入力を受けて出力を行う神経細胞では、必ずしもこの考え方は当てはまらない。近年、介在神経細胞 RIA は領域特異的に異なる  $\text{Ca}^{2+}$ 応答を示し、こうした領域特異的な  $\text{Ca}^{2+}$ 変動が首振り制御していることが示された(Hendricks et al., 2012) (図 1.3 A)。他にも、感覚神経細胞 ALM の軸索修復にはリアノジン受容体を介した局所的な軸索内の  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇が必要であることが知られている(Sun et al., 2014) (図 1.3 B)。つまり、このような結果は線虫の神経細胞を単一ユニットとして見なす考え方に疑問を投げかけるものである。

こうした疑問を支える事例として、特に細胞体で  $\text{Ca}^{2+}$ 応答を示さず、各神経細胞の神経

線維が密集する神経環(図 1.4)でのみ  $\text{Ca}^{2+}$ 応答を示す神経細胞の例が挙げられる。例えば、介在神経細胞 AIY は、におい刺激や温度刺激を受けたときに、神経線維でのみ  $\text{Ca}^{2+}$ 応答を示す(Chalasanani et al., 2007; Clark et al., 2006)。また、介在神経細胞 AIA についても味覚刺激に対して神経線維のみで  $\text{Ca}^{2+}$ 応答が見られる(Oda et al., 2011)。多くの線虫神経細胞は神経環上にシナプス投射があり情報のやり取りをしている(図 1.5)。こうした知見を踏まえ先述した他の生物での例を考えてみれば、細胞体も含め単一神経細胞上で部位特異的な情報処理が起こると考えることは自然である。

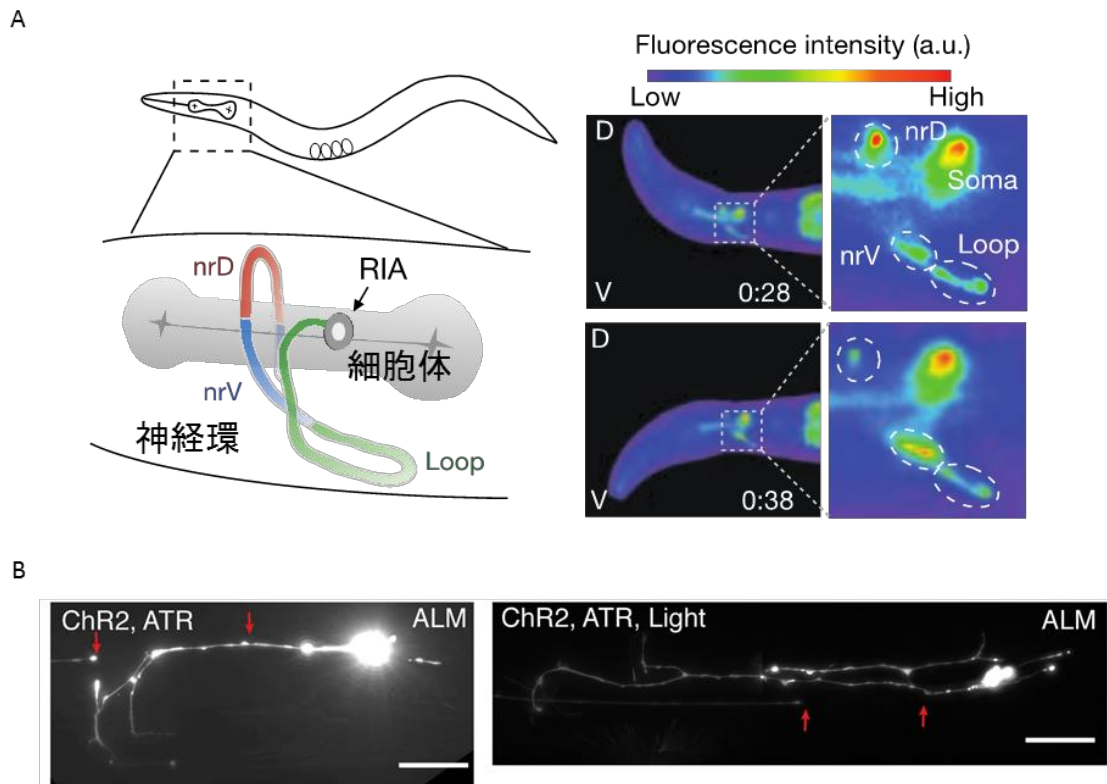


図 1.3 線虫神経細胞における部位特異的な応答の例

(A) 介在神経細胞 RIA の部位特異的な応答。左図は RIA の構造を示している。nrD と nrV はそれぞれ神経環 (nerve ring) の背側 (dorsal) か腹側 (ventral) を意味している。右図は首を振った時の応答例。背側に首を振った時は nrD の  $\text{Ca}^{2+}$  が上昇し、腹側に首を振った時は nrV の  $\text{Ca}^{2+}$  が上昇する。(Hendricks et al., 2012 より)

(B) ALM の軸索修復に局所的な  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が必要である。図の赤い矢印はレーザーで軸索を切断した箇所を示している。光活性化陽イオンチャネルである ChR2 を発現させている神経細胞は光を当てることによって、局所的に  $\text{Ca}^{2+}$  を上昇させることができる。コントロール (左) に比べて光刺激を与えた ALM (右) では軸索が伸びている。(Sun et al., 2014 より)

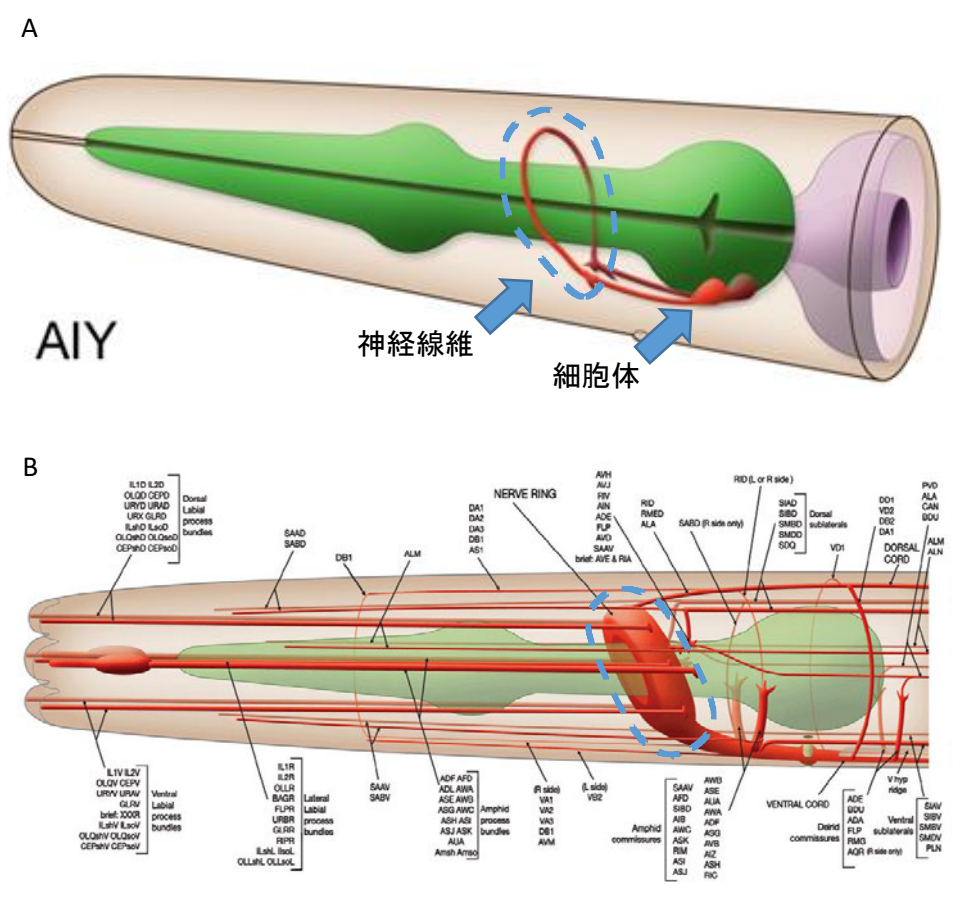


図 1.4 介在神経細胞 AIY と神経環

図中の線虫は線虫頭部を示している。(A) 赤い領域は介在神経細胞 AIY を示す。点線で囲まれている部分は神経線維である。(B) 赤い領域は神経細胞を示す。点線で囲まれている部分が神経環と呼ばれる部位で、AIY の神経線維の位置と同じ位置にある。(Wormatlas より)

# AIY

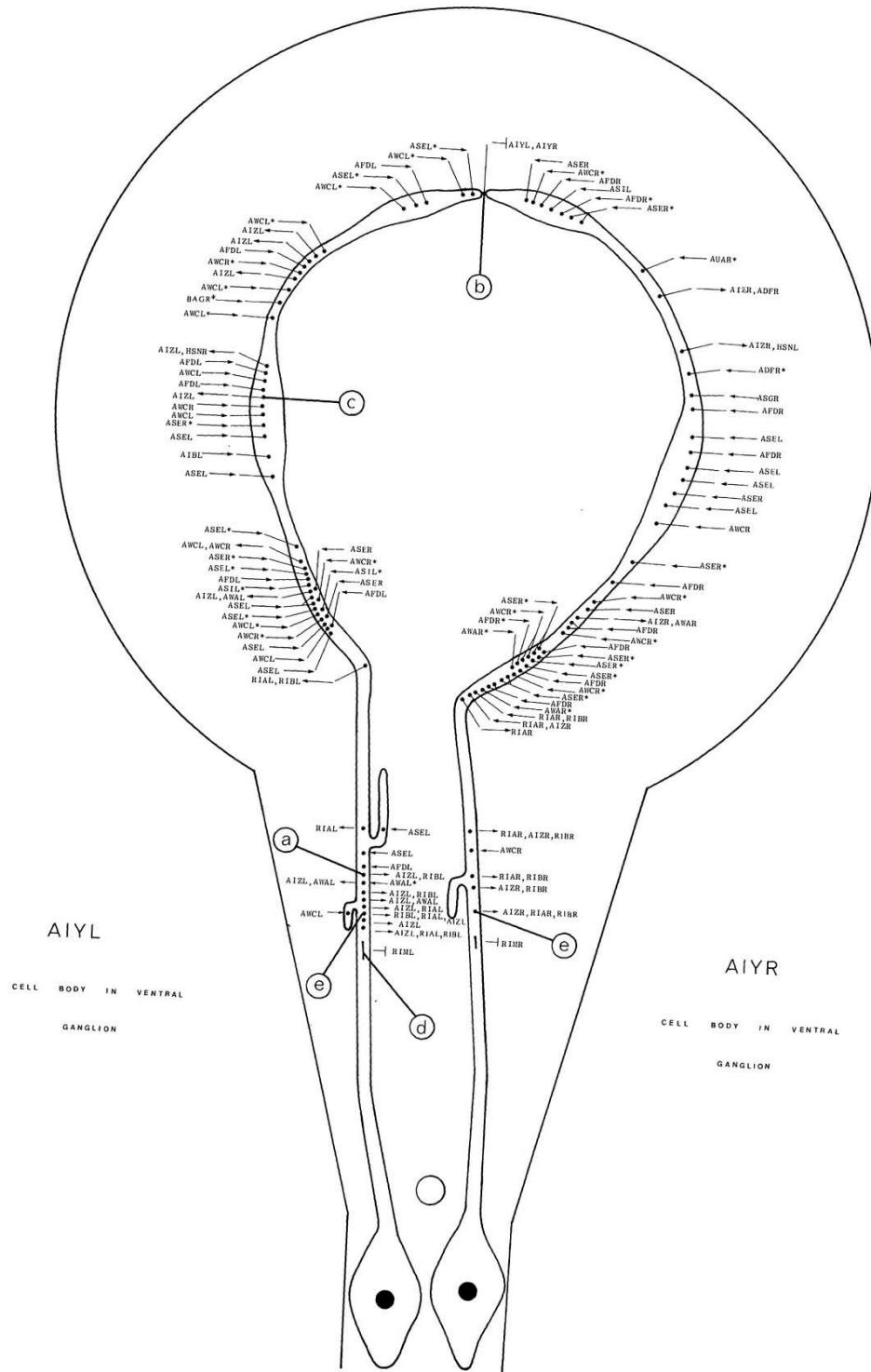


図 1.5 AIY のシナプス接続

それぞれの点はAIYとシナプス接続をしている神経細胞を示している。(Wormatlasより)

### 1.3 本研究の目的

1.1 で述べたように、単一神経細胞の局所で行われる情報処理を明らかにすることは重要である。しかしながら、マウスや昆虫ではこうした研究が進められてきたものの、線虫では一部の神経細胞でのみしか明らかにされていない。そこで本研究では、におい神経回路に関わる介在神経細胞 AIY と感覚神経細胞 AWC に注目し、それぞれの神経細胞で行われる局所的な情報処理を、イメージング法を用いて明らかにしていく。先行研究から、それぞれの神経細胞は局所的に異なる神経応答を示すことが示唆されている。例えば、AIY は神経線維でのみ  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示す神経細胞である。前述の通り、 $\text{Ca}^{2+}$  応答と膜電位応答は一致するものと考えられているが、実際に膜電位応答との比較を行った研究はない。そこで、膜電位イメージングと  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行うことで両者の関係を調べ、 $\text{Ca}^{2+}$  応答を示さない細胞体でも膜電位応答を示さないのかを明らかにする。また、AWC は、におい物質を感受する感覚神経細胞の一つであり、cGMP が神経細胞内のシグナル伝達に重要な役割を持っていることが知られている。しかし、遺伝学的手法から AWC 内の cGMP レベルは、におい刺激に対して増加と減少の異なる 2 つの応答を示すことが示唆されている。こうした、異なる cGMP 応答は細胞内の局所性によるものであると考えることができるが、こうした cGMP の挙動を可視化して明らかにした研究はない。そこで、cGMP イメージングを行い、AWC 内の局所で行われる cGMP の役割を明らかにする。

この様にそれぞれの細胞で種々のイメージング手法を用い単一神経細胞の部位特異的な応答を明らかにすることが本研究の目的となる。



## 参考文献

- Bargmann CI (2006) Chemosensation in *C. elegans*. WormBook:1–29.
- Bargmann CI, Hartweg E, Horvitz HR (1993) Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. Cell 74:515–527.
- Bestman JE, Cline HT (2009) The Relationship between Dendritic Branch Dynamics and CPEB-Labeled RNP Granules Captured in Vivo. Front Neural Circuits 3:10.
- Bollmann JH, Engert F (2009) Subcellular topography of visually driven dendritic activity in the vertebrate visual system. Neuron 61:895–905.
- Bramham CR, Wells DG (2007) Dendritic mRNA: transport, translation and function. Nat Rev Neurosci 8:776–789.
- Branco T, Häusser M (2010) The single dendritic branch as a fundamental functional unit in the nervous system. Curr Opin Neurobiol 20:494–502.
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 77:71–94.
- Buck LB, Bargmann CI (2013) Smell and Taste: The Chemical Senses. In: Principles of Neural Science, Fifth Edition, 5th ed. (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, eds), pp 712–735. McGraw-Hill Medical.
- Chalasani SH, Chronis N, Tsunozaki M, Gray JM, Ramot D, Goodman MB, Bargmann CI (2007) Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. Nature 450:63–70.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263:802–805.
- Chen Y, Sabatini BL (2012) Signaling in dendritic spines and spine microdomains. Curr Opin Neurobiol 22:389–396.
- Chronis N, Zimmer M, Bargmann CI (2007) Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. Nat Methods 4:727–731.
- Clark DA, Biron D, Sengupta P, Samuel ADT (2006) The AFD sensory neurons encode multiple functions underlying thermotactic behavior in *Caenorhabditis elegans*. J Neurosci 26:7444–7451.
- de Bono M, Maricq AV (2005) Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. Annu Rev Neurosci 28:451–501.
- Evans T (2006) Transformation and microinjection. WormBook.
- Fang-Yen C, Alkema MJ, Samuel ADT (2015) Illuminating neural circuits and behaviour in *Caenorhabditis elegans* with optogenetics. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 370:20140212.
- Faumont S, Rondeau G, Thiele TR, Lawton KJ, McCormick KE, Sottile M, Griesbeck O,

- Heckscher ES, Roberts WM, Doe CQ, Lockery SR (2011) An image-free opto-mechanical system for creating virtual environments and imaging neuronal activity in freely moving *Caenorhabditis elegans*. PLoS One 6:e24666.
- Goodman MB, Hall DH, Avery L, Lockery SR (1998) Active currents regulate sensitivity and dynamic range in *C. elegans* neurons. Neuron 20:763–772.
- Hedgecock EM, Russell RL (1975) Normal and mutant thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A 72:4061–4065.
- Hendricks M, Ha H, Maffey N, Zhang Y (2012) Compartmentalized calcium dynamics in a *C. elegans* interneuron encode head movement. Nature 487:99–103.
- Jia H, Rochefort NL, Chen X, Konnerth A (2010) Dendritic organization of sensory input to cortical neurons in vivo. Nature 464:1307–1312.
- Kato S, Kaplan HS, Schrödel T, Skora S, Lindsay TH, Yemini E, Lockery S, Zimmer M (2015) Global brain dynamics embed the motor command sequence of *Caenorhabditis elegans*. Cell 163:656–669.
- Kerr R, Lev-Ram V, Baird G, Vincent P, Tsien RY, Schafer WR (2000) Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. Neuron 26:583–594.
- Kimura KD, Miyawaki A, Matsumoto K, Mori I (2004) The *C. elegans* thermosensory neuron AFD responds to warming. Curr Biol 14:1291–1295.
- Li H, Li Y, Lei Z, Wang K, Guo A (2013) Transformation of odor selectivity from projection neurons to single mushroom body neurons mapped with dual-color calcium imaging. Proc Natl Acad Sci U S A 110:12084–12089.
- Luo L, Wen Q, Ren J, Hendricks M, Gershow M, Qin Y, Greenwood J, Soucy ER, Klein M, Smith-Parker HK, Calvo AC, Colón-Ramos DA, Samuel ADT, Zhang Y (2014) Dynamic encoding of perception, memory, and movement in a *C. elegans* chemotaxis circuit. Neuron 82:1115–1128.
- Meister M, Tessier-Lavigne M (2013) Low-Level Visual Processing: The Retina. In: Principles of Neural Science, Fifth Edition, 5th ed. (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, eds), pp 575–601. McGraw-Hill Medical.
- Mello C, Fire A (1995) DNA transformation. Methods Cell Biol 48:451–482.
- Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V (1991) Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. EMBO J 10:3959–3970.
- 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.
- Ogawa H, Cummins GI, Jacobs G a, Oka K (2008) Dendritic design implements algorithm for synaptic extraction of sensory information. J Neurosci 28:4592–4603.
- Ogawa H, Cummins GI, Jacobs GA, Miller JP (2006) Visualization of ensemble activity patterns of mechanosensory afferents in the cricket cercal sensory system with calcium imaging. J Neurobiol 66:293–307.
- Paydar S, Doan CA, Jacobs GA (1999) Neural mapping of direction and frequency in the cricket cercal sensory system. J Neurosci 19:1771–1781.
- Peron SP, Jones PW, Gabbiani F (2009) Precise subcellular input retinotopy and its computational consequences in an identified visual interneuron. Neuron 63:830–842.
- Regehr WG, Carey MR, Best AR (2009) Activity-dependent regulation of synapses by retrograde messengers. Neuron 63:154–170.
- Shah MM, Hammond RS, Hoffman DA (2010) Dendritic ion channel trafficking and plasticity. Trends Neurosci 33:307–316.
- Stuart GJ, Spruston N (2015) Dendritic integration: 60 years of progress. Nat Neurosci 18:1713–1721.
- Sulston JE, Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 56:110–156.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 100:64–119.
- Sun L, Shay J, McLoed M, Roodhouse K, Chung SH, Clark CM, Pirri JK, Alkema MJ, Gabel C V. (2014) Neuronal regeneration in *C. elegans* requires subcellular calcium release by ryanodine receptor channels and can be enhanced by optogenetic stimulation. J Neurosci 34:15947–15956.
- Sutton MA, Schuman EM (2006) Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. Cell 127:49–58.
- Sutton MA, Taylor AM, Ito HT, Pham A, Schuman EM (2007) Postsynaptic decoding of neural activity: eEF2 as a biochemical sensor coupling miniature synaptic transmission to local protein synthesis. Neuron 55:648–661.
- White JG, Southgate E, Thomson JN, 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.

## 第2章 膜電位イメージングによる介在神経細胞AIYのにおい応答の

### 解析

#### 2.1 背景

細胞内の局所に注目して神経活動を明らかにすることは、単一神経細胞内での局所的な機能を理解するために重要である。細胞内の機能を理解するために、例えばラット新皮質の錐体神経細胞に電流刺激を与えたときの部位特異的な膜電位応答を電気生理学的に明らかにした研究がある(Larkum and Zhu, 2002)。また、電気生理学的手法と  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを組み合わせることにより、局所的な  $\text{Ca}^{2+}$  と膜電位の関係を明らかにした研究もある(Koester and Sakmann, 2000; Takahashi and Magee, 2009)。昆虫を扱った研究では、感覚情報が樹状突起上にトポロジカルに表現され処理されていることも明らかになっている(Ogawa et al., 2008; Single and Borst, 1998)。これらの研究により単一神経細胞上の局所で行われる情報処理は重要であることが示されているものの、神経系の複雑さからより詳細なメカニズムを明らかにすることは困難である。そのため、単一神経細胞内の部位特異的な特徴や機能を理解するためには、遺伝的に扱いやすい生物での研究が必要である。

線虫は神経活動と行動の関係を理解する上で非常に有用な生物である(Bargmann, 2012; Lockery, 2011)。線虫を用いた研究では、変異体を用いた解析や特定の神経をレーザー破壊する手法が以前より用いられてきた(Gray et al., 2005)。また、近年では遺伝型  $\text{Ca}^{2+}$  インドイケーターや、channelrhodopsin2 (ChR2) や halorhodopsin (NpHR) 等の光遺伝学的手法を用いることで、行動に関わる神経回路の解明が進められている(Faumont et al., 2011; Kuhara et al., 2011; Piggott et al., 2011)。これらの研究は共通して、神経細胞を単一ユニットと見なし行動と神経細胞の関係が考えられている。しかしながら、近年の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングと詳細な行動解析より、他の生物同様に線虫の単一神経細胞でも部位特異的に応答や役割を見ることの重要性が報告されてきた。例えば介在神経細胞 RIA は神経線維上で部位特異的に異なる  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示し、こうした神経活動が首振りを制御している(Hendricks et al., 2012)。

この様に、単一神経細胞でも部位ごとに神経応答が異なることに注目すると、介在神経細胞 AIY や AIA も線虫神経系において興味深い特徴を持つといえる。これらの神経細胞は線虫が外界刺激を受けると、他の神経細胞と異なり細胞体では  $\text{Ca}^{2+}$  応答は見られず、神経線維でのみ  $\text{Ca}^{2+}$  応答する(Chalasanani et al., 2007; Clark et al., 2006; Oda et al., 2011)。ま

た、外部環境に依存して、温度刺激を受けた AFD 感覚神経細胞からの入力、同一の AIY 内で異なる情報として処理されることも知られている(Kuhara et al., 2011)。これらの結果は、例に挙げた介在神経細胞が単一神経細胞内で空間的に異なる情報処理を行っていることを示唆している。しかしながら、こうした介在神経細胞の部位特異的な  $\text{Ca}^{2+}$  応答や膜電位応答に対する知見はほとんどない。特に、線虫では  $\text{Ca}^{2+}$  が膜電位を変化させる主な電荷キャリアであると考えられている(Goodman et al., 1998)が、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  と膜電位の挙動を比較した研究はない。そこで、介在神経細胞 AIY の細胞内領域に注目し、特に膜電位と  $\text{Ca}^{2+}$  の挙動に違いがないか明らかにしようと考えた。

第 2 章では、遺伝子導入型膜電位インディケータである voltage-sensitive fluorescent protein (VSFP) 2.42 を用いて AIY の膜電位を可視化した。VSFP2 シリーズは電位依存型  $\text{K}^+$  チャンネルのホモログとして発見されたホヤ (*Ciona intestinalis*) voltage sensor containing phosphatase (Ci-VSP) (Murata et al., 2005) の voltage-sensitive domain (VSD) と蛍光タンパク質をつなぎ作製された第 2 世代の VSFP である(Mutoh et al., 2009)。特に VSFP2.42 は膜電位変化を感受する VSD と 2 つの蛍光タンパク質 Citrine, mKate2 からなるタンパク質である(Akemann et al., 2010)。膜電位が変化することで VSD が移動し、それに伴い蛍光タンパク質が膜近辺に移動することで 2 つの蛍光間の距離が変化し、FRET が生じると考えられている(Perron et al., 2009)。先行研究に従えば、膜電位変化のキャリアが  $\text{Ca}^{2+}$  であるため AIY での膜電位応答は  $\text{Ca}^{2+}$  応答が確認される神経線維でのみ観察されると推測される。しかしながら、膜電位変化は神経線維と細胞体の 2 箇所を観察された。この結果は  $\text{Ca}^{2+}$  応答性と膜電位応答性は異なるものであり、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  変化が単に膜電位変化を示しているものではないことを示している。

## 2.2 方法

### 2.2.1 株と飼育条件

全ての線虫株は大腸菌 (OP50) が塗布された NGM (Nematode Growth Medium) 上に 20°C で飼育された。またそれぞれの株は野生型 N2 より派生しており、*ttx-3* プロモータを用いて AIY に VSFP2.42 と YC3.60 を発現させた。

### 2.2.2 VSFP2.42 を発現した線虫の共焦点顕微鏡観察

オリンパス倒立型共焦点顕微鏡 (FV1000) を用いて、AIY に発現する VSFP2.42 の画像を取得した。画像取得には 60 倍の油浸レンズを使用した。VSFP2.42 を発現した線虫を 50 mM アジ化ナトリウム水溶液の入ったガラスボトムディッシュ内に入れて麻酔した後、上からカバーガラスを置いて固定し観察した。観察における条件は以下の通りである：励起波長 488 nm、ダイクロイックミラー 405/488、吸収波長 510-550 nm, 580-680 nm。

### 2.2.3 高濃度 KCl 刺激を用いた膜電位・Ca<sup>2+</sup>イメージング

膜電位と Ca<sup>2+</sup>イメージングには *okaEx1[pttx-3::YC3.60]* と *okaEx2[pttx-3::VSFP2.42]* を用いた。それぞれの線虫はカバーガラス上に接着剤で直接固定し、先行研究にならって解剖した (Faumont et al., 2006)。固定した線虫の腹部にインジェクション用の針を刺し、まず線虫体内の圧を抜いた。次に、頭部咽頭近辺に針をさし頭部の外皮をはいだ。線虫外部は細胞外溶液 (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH7.2) で満たした (Goodman et al., 1998)。AIY の脱分極を引き起こすための高濃度 KCl 溶液は刺激後の最終濃度が 80 mM になるように調製した。オリンパス倒立型顕微鏡 (IX71) を用いて 60 倍の対物レンズに 1.6 倍のリレーレンズを併用して観察した。褪色を避けるために、LED 光源 SOLA (Lumencor) を用いて励起光を調整した。蛍光画像は 200 ms 毎に 3CCD カメラ (C7800-20、浜松ホトニクス) で取得した。また、観察における条件は以下の通りである：YC3.60 励起波長 400-440 nm、ダイクロイックミラー 455 nm、吸収波長 455-490 nm, 490-570 nm ; VSFP2.42 励起波長 490-500 nm、ダイクロイックミラー 510 nm、吸収波長 510-570 nm, 570-630 nm。画像取得には Aquacosmos (浜松ホトニクス) を用い、解析は Aquacosmos と Excel (Microsoft) を用いた。レシオ値の規格化は刺激を入れる 10 秒前のレシオ値の平均値でそれぞれのデータを割ることで行った。イメージング中の部屋の温度は 20°C にした。

#### 2.2.4 IAA 刺激を用いた膜電位・Ca<sup>2+</sup>イメージング

線虫は先行研究で用いられているマイクロ流体デバイス内に固定し刺激を与えた (Chronis et al., 2007)。観察では S-basal を 4 分間線虫に与えた後、三方活栓で流路を切り替えて 10<sup>-4</sup>IAA もしくは S-basal を与えた。得られたレシオ値から褪色による成分を取り除くため、デバイスに固定しただけの線虫からレシオを測定して、褪色曲線として刺激を与えたときの応答波形から引いた。

## 2.3 結果

### 2.3.1 VSFP2.42 を用いた膜電位イメージング系の確認

VSFP2.42 を用いて線虫介在神経細胞 AIY で膜電位変化を検出するために、*ttx-3* プロモーターで AIY に VSFP2.42 を発現させ実験を行った (図 2.1 a)。VSFP2.42 の様な遺伝型膜電位プローブは細胞体内で凝集することが知られている (Akemann et al., 2010) ので、実験を行う前に AIY の細胞膜に VSFP2.42 が局在しているか確認した。10 匹中 1 匹の割合で VSFP2.42 が細胞質中に強く凝集している個体が確認された (図 2.1 b) ので、S/N 比を上げるためにこうした個体は除いて以下の実験を行った。

線虫は  $K^+$  チャンネルを発現している (Faumont et al., 2006) ため、高濃度の KCl 溶液で AIY の脱分極を誘発することができる。そこで、膜電位変化を測定し系の健全性を確かめようと考えた。KCl 溶液で脱分極を誘発するために、VSFP2.42 が発現した線虫をカバーガラスに接着剤で固定し、神経細胞を体壁外へ露出させた。そこに高濃度の KCl 溶液を加えたところ、RFP/YFP シグナルは細胞体と神経線維で上昇した (図 2.1 c)。膜電位の上昇は 30 秒から 1 分以内にピークとなった。各個体の膜電位変化は様々であったが、全ての線虫で脱分極が確認された (図 2.1 d)。以上より、線虫介在神経細胞 AIY の膜電位変化を可視化するのに VSFP2.42 が有用であることがわかった。



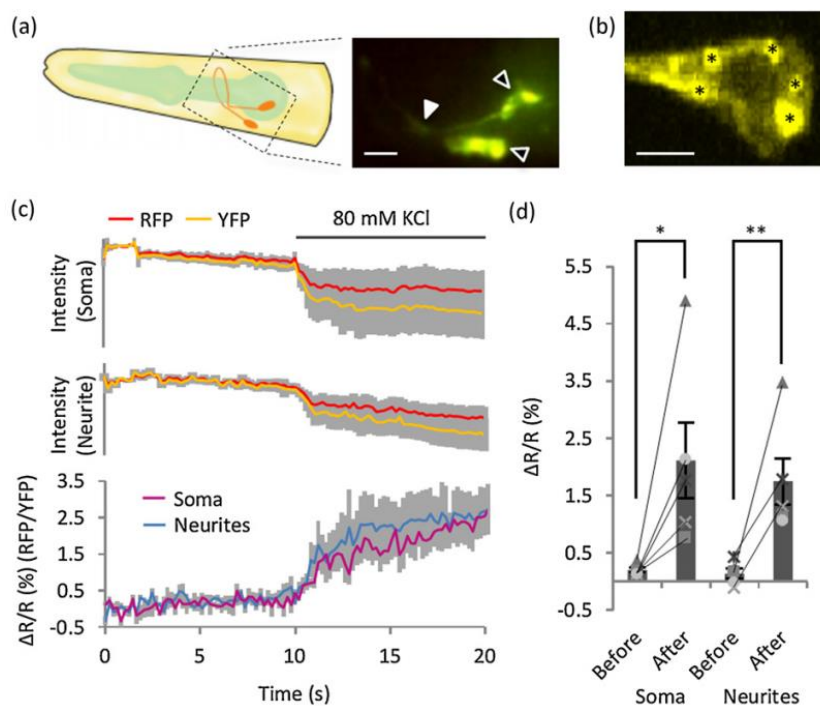


図 2.1 高濃度 KCl 刺激による細胞体と神経線維での脱分極

(a) VSFP2.42 を発現した AIY の画像。黒矢印は細胞体、白矢印は神経線維を表している。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。(b) AIY 内で VSFP2.42 が凝集している画像。アスタリスク (\*) は凝集を表す。スケールバーは 2  $\mu\text{m}$ 。(c) 80 mM KCl 刺激後の蛍光強度変化の平均 (上段が細胞体; 中段が神経線維) と RFP/YFP レシオ変化の平均 (下段) ( $n=5$ )。波形の影は標準誤差を示す。(d) 刺激前後の膜電位の平均。プロットされている点はそれぞれの個体の膜電位の平均 (前後 10 秒間) を表している。エラーバーは標準誤差を示している。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  で有意に差がある。

### 2.3.2 IAA 刺激に対する AIY の膜電位と $\text{Ca}^{2+}$ 応答

介在神経細胞 AIY には刺激や温度刺激に対して神経線維でのみ  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示すことが先行研究で報告されている (Chalasanani et al., 2007; Clark et al., 2006)。実際にレシオメトリック  $\text{Ca}^{2+}$  インディケータである YC3.60 で  $\text{Ca}^{2+}$  を可視化すると、におい刺激に対して神経線維では  $\text{Ca}^{2+}$  応答が確認されたが、細胞体では  $\text{Ca}^{2+}$  応答は確認されなかった (図 2.2 a)。次に、 $\text{Ca}^{2+}$  応答と膜電位変化を比較するため、同様にしておい刺激に対する膜電位変化を測定した (図 2.2 b)。神経線維では  $\text{Ca}^{2+}$  と同様に刺激後に膜電位が上昇した。一方、細胞体で  $\text{Ca}^{2+}$  応答は確認されなかったにもかかわらず、膜電位ではにおいに対する応答が確認された。これらの結果は脱分極が神経線維だけではなく細胞体でも起こることを示している。つまり、AIY ではにおい刺激に対して、膜電位と  $\text{Ca}^{2+}$  でそれぞれ違う挙動を示すことが明らかとなった。

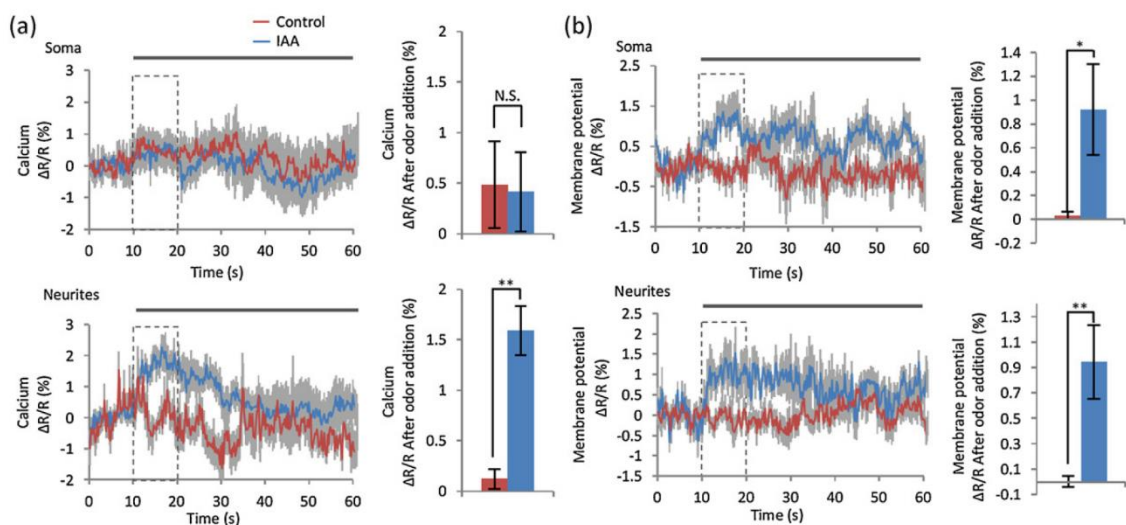


図 2.2 IAA 刺激を与えたときの AIY 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  と膜電位応答

(a and b) IAA もしくは S-basal (コントロール) 刺激を与えた後の  $\text{Ca}^{2+}$  (a) と膜電位応答 (b) の変化 (n=8)。波形の影は標準誤差を示す。バーグラフは刺激後 10 秒間の平均値を表している。エラーバーは標準誤差を示す。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  で有意に差がある。

### 2.3.3 高濃度 KCl 刺激に対する AIY 内 $\text{Ca}^{2+}$ 応答

これまでの結果から、におい刺激に対する  $\text{Ca}^{2+}$  応答は神経線維でのみ確認された一方で、膜電位応答は細胞体と神経線維のどちらにおいても確認された。これらの結果より、におい刺激を与える様な自然環境下に近い条件では細胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  応答は見られないことがわかったが、細胞体がどのような条件においても  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示さないかどうかまでは明らかにされていない。そこで、高濃度 KCl 溶液で AIY の脱分極を強制的に引き起こしたときに  $\text{Ca}^{2+}$  変化が見られるか調べた(図 2.3)。高濃度 KCl 刺激は神経線維だけではなく細胞体での  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を引き起こし、 $\text{Ca}^{2+}$  変化は膜電位変化と同様に刺激後 30 秒から 1 分間の間にピークを迎えた。この結果は AIY が実際に細胞体でも  $\text{Ca}^{2+}$  を変化させる機能を有することを示している。

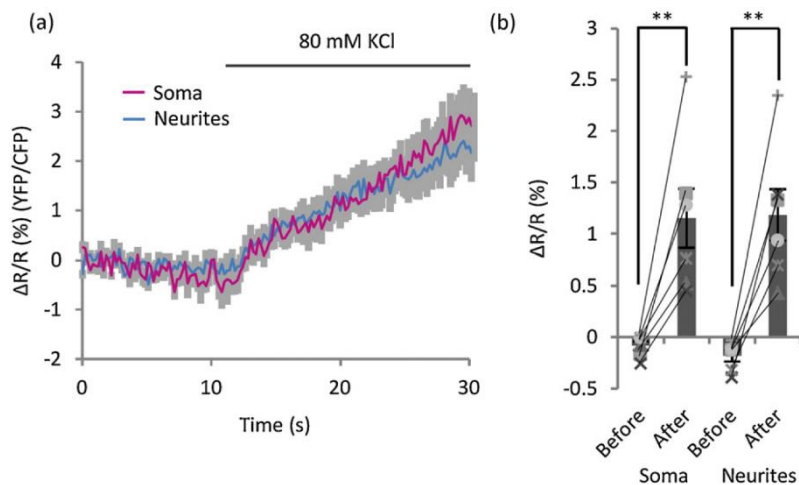


図 2.3 高濃度 KCl 刺激による細胞体と神経線維での  $\text{Ca}^{2+}$  応答

(a) 80 mM KCl 刺激後の  $\text{Ca}^{2+}$  応答。波形の影は標準誤差を示す。(b) 刺激前後の  $\text{Ca}^{2+}$  の平均 (刺激前：10 秒、刺激後：20 秒)。プロットされている点はそれぞれの個体の  $\text{Ca}^{2+}$  の平均を表している。エラーバーは標準誤差を示している。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  で有意に差がある。

## 2.4 考察

部位特異的な  $\text{Ca}^{2+}$  と膜電位応答の特徴を理解することは単一神経細胞の機能を理解する上で必要な要素となる。AIY は神経線維でのみ  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示すという特徴を持つ (Chalasanani et al., 2007; Clark et al., 2006)。本章では、この介在神経細胞の特徴をより理解するために VSFP2.42 を用いた膜電位イメージングを行った。本研究が VSFP2.42 を用いた線虫系での初めてのイメージングであったため、はじめに高濃度 KCl 溶液で強制的に脱分極を引き起こし、膜電位を測定することが可能であるか調べた。次に、におい刺激に対してどのような膜電位応答を示すのか調べたところ、 $\text{Ca}^{2+}$  同様の応答を示すことが予想されていたが実際は異なる応答を示した。また、細胞体はにおい刺激に対して  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示さないものの、 $\text{Ca}^{2+}$  が変化する可能性があることも明らかにした。こうした膜電位に注目した領域による応答性の違いは、本研究により線虫神経細胞においてはじめて明らかにされた。

本研究の結果より、VSFP2.42 が細胞体や樹状突起の神経活動を測定する上で有用であることがわかった。膜電位を測定するのに従来から用いられる電気生理学的手法は、線虫系において細胞膜の静電容量やイオンチャネルの特性を明らかにしてきた (Faumont et al., 2006; Goodman et al., 1998; Narayan et al., 2011)。しかしながら、こうした手法は線虫を解剖する必要があり、*in vivo* で単一神経細胞の部位特異的応答を測定することは難しい。一方で、VSFP2.42 を用いた *in vivo* イメージングは部位特異的な膜電位応答測定を可能にする。

また、本研究の結果は線虫系における単一神経細胞の役割について新たな考え方を示した。先行研究で用いられた GCaMP (Nakai et al., 2001) とは異なる  $\text{Ca}^{2+}$  インディケータ YC3.60 (Nagai et al., 2004) を用いたが、本研究でも先行研究で示された通り神経線維でのみ  $\text{Ca}^{2+}$  が検出されることを示した。VSFP2.42 の増加と減少の時定数はそれぞれ 100 ms 以下であり (Mutoh et al., 2009)、YC3.60 も時定数は明らかにされていないものの数ミリ秒以下の分解能が必要とされる比較的速い  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング測定が可能である (Nagai et al., 2004)。従って、VSFP2.42 と YC3.60 のレシオ変化は IAA に対する応答を正確に表している。線虫神経系は電位依存型  $\text{Ca}^{2+}$ 、K チャネルを有しており、電位依存性  $\text{Na}^{+}$  チャネルは存在しないことが知られている (Faumont et al., 2006; Goodman et al., 1998)。膜電位の変化幅や応答性はそこに発現しているイオンチャネルによって決まるが、線虫は  $\text{Ca}^{2+}$  が主な電荷キャリアとして考えられているため、これまで  $\text{Ca}^{2+}$  応答が見えない領域では膜電位が変化しないと考えられてきた。つまり、AIY の細胞体では膜電位応答は見られないと考えら

れていた。しかしながら、本章の結果は細胞体と神経線維のどちらにおいても膜電位が変化することを明らかにし (図 2.2)、細胞体で  $\text{Ca}^{2+}$  が変化しないことは別の理由によるものであることを示した。理由の一つとして、膜電位を変化させる上で  $\text{Ca}^{2+}$  以外の別の電荷キャリアが関わっている可能性が挙げられる。これまで AIY では L-グルタミン酸開閉型  $\text{Cl}^-$  チャネルサブユニット GLC-3 (Horoszok et al., 2001) やグルタミン酸受容体と推定される受容体の発現 (Ohnishi et al., 2011) が報告されているが、陽イオンチャネルについての知見はほとんどない。そのため、明らかにされていない他のチャネルやキャリアが膜電位を生じさせている可能性がある。また、細胞体でも  $\text{Ca}^{2+}$  をキャリアとした膜電位変化が起きているにも関わらず、細胞体内での  $\text{Ca}^{2+}$  変化は小さいために  $\text{Ca}^{2+}$  インディケータが検出することができなかった可能性もある。細胞体は神経線維と比較して体積が大きいため相対的に局所の  $\text{Ca}^{2+}$  変化が小さくなると考えられる。また、こうした大きさの違いに加えて、細胞体と異なり神経線維では  $\text{InsP}_3$  受容体が発現しており (Baylis et al., 1999) (図 2.4)、神経線維では  $\text{InsP}_3$  が誘発する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  放出が起こる可能性がある。その結果、神経線維での  $\text{Ca}^{2+}$  応答は細胞体に比較して相対的に大きくなったのかもしれない。

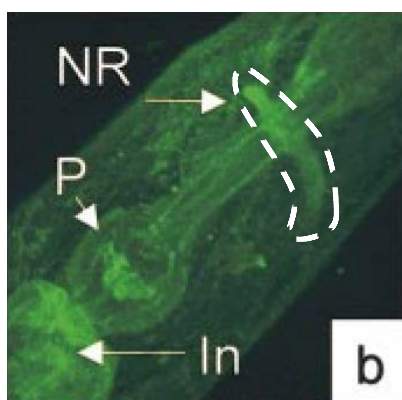


図 2.4  $\text{InsP}_3$  受容体の発現部位

$\text{InsP}_3$  受容体の抗体染色の結果。図の破線部分は神経環 (NR) を指しており、神経線維はこの部位にあたる。一方、細胞体近辺には  $\text{InsP}_3$  受容体が存在しないことがわかる。(Baylis et al., 1999 より)

## 参考文献

- Akemann W, Mutoh H, Perron A, Rossier J, Knöpfel T (2010) Imaging brain electric signals with genetically targeted voltage-sensitive fluorescent proteins. *Nat Methods* 7:643–649.
- Bargmann CI (2012) Beyond the connectome: how neuromodulators shape neural circuits. *Bioessays* 34:458–465.
- Baylis HA, Furuichi T, Yoshikawa F, Mikoshiba K, Sattelle DB (1999) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are strongly expressed in the nervous system, pharynx, intestine, gonad and excretory cell of *Caenorhabditis elegans* and are encoded by a single gene (*itr-1*). *J Mol Biol* 294:467–476.
- Chalasanani SH, Chronis N, Tsunozaki M, Gray JM, Ramot D, Goodman MB, Bargmann CI (2007) Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 450:63–70.
- Chronis N, Zimmer M, Bargmann CI (2007) Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Methods* 4:727–731.
- Clark DA, Biron D, Sengupta P, Samuel ADT (2006) The AFD sensory neurons encode multiple functions underlying thermotactic behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 26:7444–7451.
- Faumont S, Boulin T, Hobert O, Lockery SR (2006) Developmental regulation of whole cell capacitance and membrane current in identified interneurons in *C. elegans*. *J Neurophysiol* 95:3665–3673.
- Faumont S, Rondeau G, Thiele TR, Lawton KJ, McCormick KE, Sottile M, Griesbeck O, Heckscher ES, Roberts WM, Doe CQ, Lockery SR (2011) An image-free opto-mechanical system for creating virtual environments and imaging neuronal activity in freely moving *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 6:e24666.
- Goodman MB, Hall DH, Avery L, Lockery SR (1998) Active currents regulate sensitivity and dynamic range in *C. elegans* neurons. *Neuron* 20:763–772.
- Gray JM, Hill JJ, Bargmann CI (2005) A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3184–3191.
- Hendricks M, Ha H, Maffey N, Zhang Y (2012) Compartmentalized calcium dynamics in a *C. elegans* interneuron encode head movement. *Nature* 487:99–103.
- Horoszok L, Raymond V, Sattelle DB, Wolstenholme AJ (2001) GLC-3: a novel fipronil and BIDN-sensitive, but picrotoxinin-insensitive, L-glutamate-gated chloride channel subunit from *Caenorhabditis elegans*. *Br J Pharmacol* 132:1247–1254.
- Koester HJ, Sakmann B (2000) Calcium dynamics associated with action potentials in

- single nerve terminals of pyramidal cells in layer 2/3 of the young rat neocortex. *J Physiol* 529 Pt 3:625–646.
- Kuhara A, Ohnishi N, Shimowada T, Mori I (2011) Neural coding in a single sensory neuron controlling opposite seeking behaviours in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* 2:355.
- Larkum ME, Zhu JJ (2002) Signaling of layer 1 and whisker-evoked Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> action potentials in distal and terminal dendrites of rat neocortical pyramidal neurons in vitro and in vivo. *J Neurosci* 22:6991–7005.
- Lockery SR (2011) The computational worm: spatial orientation and its neuronal basis in *C. elegans*. *Curr Opin Neurobiol* 21:782–790.
- Murata Y, Iwasaki H, Sasaki M, Inaba K, Okamura Y (2005) Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* 435:1239–1243.
- Mutoh H, Perron A, Dimitrov D, Iwamoto Y, Akemann W, Chudakov DM, Knöpfel T (2009) Spectrally-resolved response properties of the three most advanced FRET based fluorescent protein voltage probes. *PLoS One* 4:e4555.
- Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10554–10559.
- Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca<sup>2+</sup> probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19:137–141.
- Narayan A, Laurent G, Sternberg PW (2011) Transfer characteristics of a thermosensory synapse in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9667–9672.
- 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.
- Ogawa H, Cummins GI, Jacobs G a, Oka K (2008) Dendritic design implements algorithm for synaptic extraction of sensory information. *J Neurosci* 28:4592–4603.
- Ohnishi N, Kuhara A, Nakamura F, Okochi Y, Mori I (2011) Bidirectional regulation of thermotaxis by glutamate transmissions in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 30:1376–1388.
- Perron A, Mutoh H, Akemann W, Gautam SG, Dimitrov D, Iwamoto Y, Knöpfel T (2009) Second and third generation voltage-sensitive fluorescent proteins for monitoring membrane potential. *Front Mol Neurosci* 2:5.

- Piggott BJ, Liu J, Feng Z, Wescott SA, Xu XZS (2011) The neural circuits and synaptic mechanisms underlying motor initiation in *C. elegans*. *Cell* 147:922–933.
- Single S, Borst A (1998) Dendritic integration and its role in computing image velocity. *Science* 281:1848–1850.
- Takahashi H, Magee JC (2009) Pathway interactions and synaptic plasticity in the dendritic tuft regions of CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 62:102–111.



## 第3章 cGMP イメージングによる嗅覚感覚神経細胞 AWC の部位特異的応答

### 3.1 背景

セカンドメッセンジャーの一つである環状グアノシンリン酸 (cGMP) は感覚神経のシグナル伝達を制御する上で必要不可欠な役割を持つ。例えば、感覚神経系で cGMP は光や嗅覚シグナル伝達で外部刺激からのシグナルを仲介し、記憶と学習などの細胞内の生理的な機能の調整を行う (Fu and Yau, 2007; Kaupp and Seifert, 2002; Kots et al., 2009)。こうした様々な異なる役割を単一細胞内でコントロールするためには、時空間的な cGMP の制御が必要となり (Arora et al., 2013; McCormick and Baillie, 2014)、時空間的な cGMP 応答の役割を明らかにするためにイメージング法が発展してきた (Sprenger and Nikolaev, 2013)。近年では、cGMP イメージングは培養細胞やスライス標本への薬理刺激に対する cGMP 応答だけではなく、*in vivo* での内因的な応答を調べるために用いられてきた (Couto et al., 2013; Sprenger and Nikolaev, 2013)。しかし、単一神経細胞内での cGMP の部位特異的な応答や機能については明らかにされていない。

線虫感覚神経細胞においても、cGMP はシグナル伝達経路において重要な役割を果たす (Bargmann, 2006; de Bono and Maricq, 2005; O'Halloran et al., 2009, 2012)。特に、嗅覚感覚神経細胞 AWC において cGMP は単一神経細胞内で、におい感受と順応の異なる役割を持つ。におい感受については、におい受容体の下流で受容体様グアニル酸シクラーゼによって産出される cGMP が、cGMP 開閉チャネル制御していると考えられている (Bargmann, 2006; de Bono and Maricq, 2005)。におい順応については、cGMP が cGMP 依存型プロテインキナーゼ G (PKG) と結合し、核内へ PKG が移動することで細胞内の生理的機能が制御されると考えられている (L'Etoile et al., 2002; O'Halloran et al., 2009)。この PKG の核移行は細胞内 cGMP レベルに依存し (Lee et al., 2010)、におい刺激を与えたときに AWC 内で cGMP が上昇することを示唆している。しかし、AWC ではにおい刺激を与えると cGMP 開閉型イオンチャネルは閉じ細胞内  $Ca^{2+}$  が減少すると考えられている (Chalasanani et al., 2007) ため、におい刺激によって cGMP レベルが減少するのではないかと考えられている。こうしたにおい刺激による一見して相反する cGMP 応答ではあるが、実際は部位特異的な cGMP 応答によって説明することができる。具体的には、におい感受の情報処理が行われる繊毛では cGMP が減少し、核移行が起こる細胞体では cGMP が上昇

するということである。しかしながら、実際に cGMP が部位特異的にどのような挙動を示しているかは明らかにされていない。

そこで、遺伝子導入型 cGMP インディケーター cGi500(Russwurm et al., 2007)を嗅覚感覚神経細胞 AWC に導入し、部位特異的な cGMP 応答を可視化した。先行研究では、線虫の O<sub>2</sub> 感受感覚神経細胞が刺激に対して、cGMP 濃度が上昇するときと減少するときがあることがすでに示されている(Couto et al., 2013)。本研究では AWC の部位に注目して、神経細胞内での刺激に対する部位特異的な cGMP 応答を示した。次に、Ca<sup>2+</sup>イメージングと比較して、AWC 内の cGMP と Ca<sup>2+</sup>応答の間に相関があることを示した。こうした、領域で異なる cGMP 応答はグアニル酸シクラーゼの働きによって生じる。加えて、様々な刺激条件に対して cGMP 応答がどの様になるのか明らかにした。今回得られたこれらの結果をまとめると、AWC 内の cGMP が担う役割は脊椎動物の嗅覚受容細胞よりはむしろ視覚細胞と相同性があることが示唆された。

## 3.2 方法

### 3.2.1 株と飼育条件

全ての線虫株は大腸菌 (OP50) が塗布された NGM (Nematode Growth Medium) 上に 20°C で飼育された。野生株は N2 を使用している。本研究では遺伝子導入型インディケータとして cGMP イメージングには cGi500 (Russwurm et al., 2007)、Ca<sup>2+</sup> イメージングには GEM-GECO1.0 (Zhao et al., 2011) を使用している。実験に使用した変異体株は次の通りである ; *oka6Ex[pstr-2::cGi500]*, *oka4Ex[pstr-2::GEM-GECO1.0]*, *oka7Ex[odr-1; podr-3::cGi500]*, *oka8Ex[daf-11; podr-3::cGi500]*。マイクロインジェクションに使用したプラスミドは Gateway システム (Thermo Fisher) を用いて作製した。cGi500 (Russwurm et al., 2007) のデスティネーションベクター (pDEST-cGi500) は、cGi500 センサーを PCR で増幅し pDEST ベクターにライゲーションすることで作製した。その他のデスティネーションベクターとエントリーベクターは包括型脳科学研究推進支援ネットワークを通して取得した。インジェクションに使用した濃度はそれぞれ以下の通りである : *pstr-2::cGi500*, 50 ng/μl ; *pstr-2::GEM-GECO1.0*, 100 ng/μl ; *podr-3::cGi500*, 50 ng/μl。

### 3.2.2 AWC 感覚神経細胞に発現した cGi500 の共焦点顕微鏡観察

AWC に発現した cGi500 の共焦点画像は、オリンパス倒立型共焦点顕微鏡 (FV1000) を使い、40 倍の油浸レンズを使用して取得した。50 mM アジ化ナトリウム水溶液が滴下された 2% アガーパッド上に cGi500 を発現した線虫を移し、上からカバーガラスで押さえて固定した。観察における条件は以下の通りである : 励起波長 515 nm、ダイクロイックミラー 405-440/510、吸収波長 510-550 nm, 530-630 nm。

### 3.2.3 測定装置

オリンパス倒立型顕微鏡 (IX71) を用いて 60 倍のレンズ (LUCPlanFLN) を使用し画像を取得した。ミラユニットは U-MWBV2 (オリンパス) を使用し、励起光は LED 光源 SOLA (Lumencor) を用いた。細胞内の詳細な cGMP イメージング (図 3.1 I) を除いて、画像取得のカメラは 3CCD カメラ (C7800-20, 浜松ホトニクス) を使い、Aquacosmos (浜松ホトニクス) を使用して画像を取得した。

細胞内の詳細な cGMP イメージング (図 3.1 I) については、CMOS カメラ ORCA-Flash 4.0 V2 (C11440, 浜松ホトニクス) を W-VIEW GEMINI (A12801-01, 浜松ホトニクス) との組合せで使い、HCLImage Live (浜松ホトニクス) を使用して画像を取得した。W-VIEW

GEMINI 内で使用したフィルターセットは以下の通りである：ダイクロイックミラー FF509-FDi01 (Semrock)、蛍光フィルター FF01-483/32-25 (Semrock) , FF01-542/27-25 (Semrock)。

### 3.2.4 cGMP と Ca<sup>2+</sup>イメージング

線虫を流体デバイス(Chronis et al., 2007)に固定し、以下の実験を行った。線虫の動きを抑え S/N 比を上げるために、全ての溶液にはコリン作動性チャネルのアゴニストであるレバミゾール (2 mM) を混ぜた。イメージングで使用する IAA と Bz は S-basal で希釈した。

長時間のイメージング (図 3.1 B-G, 3.2-4) については、露光時間を 200 m とし 600 m 毎に画像を取得した。線虫に 4 分間 S-basal を与えた後に、画像取得をスタートした。短時間のイメージング (図 3.1 H, I, 3.5-7) については、露光時間を 100 m とし 100 m 毎に画像を取得した。特に断らない限り、長時間のイメージング同様線虫に 4 分間 S-basal を与えた後に、画像取得をスタートした。相対濃度変化に対する cGMP 応答を調べる実験 (図 3.7) では、事前に 10<sup>-4</sup>IAA 刺激を 2 分間与えた後に観察を行った。

長時間のにおい刺激の実験 (図 3.5) と繰り返し刺激を与える実験 (図 3.6) で用いた IAA の濃度は 10<sup>-4</sup>倍である。10 回刺激を与える条件 (図 3.6 D) では、4 回刺激の条件と同様に 10 回刺激を与えた。ただし、cGMP センサーの光褪色を避けるために、観察は最初の 3 回と 10 回目のみ行った。

### 3.2.5 データ解析

解析には Matlab (MathWorks) で作成した、解析を半自動化したプログラムを使用した。Matlab のプログラムについては、基本的に手動で Region of Interests (ROIs) を決めることで関心領域の蛍光強度を取得した。ROIs の位置は細胞の形を参考にして決めた (図 3.1)。ただし、細胞体の様に閾値を任意に設定することで他の領域と区別することのできる部分の ROI は一部自動化して ROI の位置を決定した。はじめに、手動で ROI を決定し、それ以降は ROI の中心と閾値処理で区画化された領域の中心の距離を計算し、距離が最も近い部分に ROI の中心がくるように自動化した。cGMP 応答と Ca<sup>2+</sup>応答はそれぞれ、CFP/YFP, Blue/Green を計算することで取得した。詳細な cGMP イメージング (図 3.1 I) を除いて、全てのレシオメトリックデータは 5 つのタイムポイントを使用した移動平均で平滑化している。また、全てのデータは刺激を与える前の値の平均値で割り規格化している。

細胞内の詳細な cGMP イメージング (図 3.1 I) については、図の上段にある様に ROI

を囲み解析を行った。ROI を囲んだ部分については、まず縦軸（背腹軸）に沿って蛍光値の平均を取った。次に、横軸（前後軸）に沿って 5 ポイント毎に平均値を取得した。こうして得られた蛍光値の平均値を時間軸にそって 5 ポイントで移動平均をかけて平滑化を行い、その後 CFP/YFP を計算することで cGMP 応答を取得した。

統計処理は、Student's t-test については Excel2013 (Microsoft) を用い、Dunnett's test については R ver. 2.15.2 を使用した。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 AWC 嗅覚神経細胞での部位特異的な cGMP 応答

AWC 感覚神経細胞で cGMP は部位特異的に様々な役割を持っていると考えられるので、AWC を繊毛、樹状突起、細胞体の 3 つに区別して (図 3.1 A) それぞれに注目して応答を取得した。体積の違いより細胞体での cGMP センサーの発現量は繊毛と樹状突起での発現量と比較して高く蛍光強度に大きな差があったため、全ての部位で同時に cGMP イメージングを行うことはできなかった。そこで、画像の取得については細胞体と頭部先端 (繊毛と樹状突起) の 2 箇所に分けて行った (図 3.1 A)。

まず、線虫に  $10^4$  倍希釈したにおい刺激 (イソアミルアルコール, IAA) を与えたとき、それぞれの箇所での様な cGMP 応答示すのか調べた (図 3.1 B-G, 紫色の波形)。繊毛では、におい刺激を与えると、一過的な cGMP 減少が観察された (図 3.1 B and C)。この一過的な cGMP 減少は 10 秒間でベースラインまで戻り、その後少しだけ上昇した。ただし、この上昇はコントロールと比較して有意ではなかった (図 3.1 C, 右)。一方で、樹状突起と細胞体では、におい刺激を与えている間 cGMP 濃度は上昇した (図 3.1 D-G)。また、におい刺激を取り除くと cGMP は徐々に減少した。これまでに AWC はにおい刺激を与えると  $\text{Ca}^{2+}$  が減少し、においを取り除くと  $\text{Ca}^{2+}$  が上昇することが知られている (Chalasanani et al., 2007) (図 3.3)。cGMP と  $\text{Ca}^{2+}$  の挙動を比較すると、細胞体と樹状突起で見られた cGMP の挙動はにおい刺激に対する cGMP と  $\text{Ca}^{2+}$  の増減は逆であるものの、におい刺激の有無に依存する点で  $\text{Ca}^{2+}$  応答と似ていた。一方で、繊毛での cGMP 応答は  $\text{Ca}^{2+}$  応答と全く異なる挙動を示した。こうした点から、今回得られた結果は AWC での cGMP 応答が部位特異的に異なることを示している。

先に示した先行研究では  $\text{Ca}^{2+}$  応答の大きさは直前に線虫へ与えた刺激の時間に依存することも報告されている (Chalasanani et al., 2007)。このことから、繊毛でにおいを取り除いた後に cGMP 応答が見えないのは、事前にかがせているにおい刺激の時間が短いためではないかとも考えられる。そこで、事前においをかがせる時間を長くした際の cGMP 応答を調べた。5 分間におい刺激を与えた後の cGMP 変化を見てみたところ、においを取り除いても全く応答は示さなかった (図 3.1 H)。従って、においを取り除いても繊毛では cGMP 応答を示さないということがわかった。次に、空間的な cGMP 応答を明らかにする目的で、線虫頭部の広範囲な領域での cGMP イメージングを行った (図 3.1 I, 上段)。この cGMP 応答は  $2.17 \mu\text{m}$  の分解能で取得している。図 3.1 I のヒートマップより、頭部から約  $11 \mu\text{m}$  の位置を境目にして、刺激後に cGMP が減少している側と上昇している側に分けることが

できた。つまり、AWC 感覚神経細胞は cGMP 応答に関して区画分けすることができた。さらに、こうした部位特異的な cGMP 応答がにおい濃度に依存するのかが調べた(図 3.1 B-G)。繊毛では  $10^{-4}$  IAA 刺激の時に最も cGMP 応答が大きくなった。同様に、細胞体でも cGMP 応答は  $10^{-4}$  IAA 刺激の時に大きくなった。しかし、樹状突起ではこうした濃度依存性は見られなかった。

一方で、IAA と同様に AWC の cGMP シグナル経路を介して感受されるベンズアルデヒド (Bz) (L'Etoile and Bargmann, 2000) に対する cGMP 応答についても調べた (図 3.2)。Bz に対する cGMP 応答は IAA に対する応答と同様の応答性を示した。ただし、繊毛と樹状突起の応答の仕方は IAA と Bz で少し異なった。繊毛では、cGMP レベルがにおい刺激によって上昇し、特に  $10^{-3}$  と  $10^{-4}$  Bz ではにおい刺激を取り除くと減少していく様子が観察された (図 3.2 A)。また、樹状突起ではにおい刺激を与えた直後に、繊毛ほどではないものの cGMP は少し減少した (図 3.2 B and D)。一方で、細胞体では IAA で見られたものと似た応答が観察され (図 3.2 C)、cGMP 応答の大きさは Bz 刺激の濃度に依存した (図 3.2 E and F)。従って、2 つのにおい刺激に対する応答性は異なるものの、AWC 内で cGMP を介して感受される区画化された cGMP 応答は共通した性質を持っているといえる。

繊毛では cGMP 濃度が cGMP 開閉型イオンチャネルを制御し、細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  を流入させると考えられている (Bargmann, 2006; O'Halloran et al., 2009)。そこで、 $\text{Ca}^{2+}$  応答が cGMP 応答と対応するのかが調べた (図 3.3)。先行研究で示されている細胞体と樹状突起の  $\text{Ca}^{2+}$  応答の様に (Chalasanani et al., 2007; Kato et al., 2014) (図 3.3 C-F)、繊毛でもにおい刺激を与えると  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は減少し、におい刺激を取り除くと  $\text{Ca}^{2+}$  は上昇した (図 3.3 A and B,  $10^{-3} \sim 10^{-5}$  IAA)。繊毛の cGMP 応答と比較すると、繊毛の  $\text{Ca}^{2+}$  応答は一過的に落ちる変化を示さず、IAA の濃度にも依存しなかった。つまり、繊毛では  $\text{Ca}^{2+}$  応答は cGMP 応答と一致しないことを示している。これらの結果より  $\text{Ca}^{2+}$  応答は cGMP 応答の様に部位特異的に区切られていないことが明らかとなった。また、繊毛での  $\text{Ca}^{2+}$  応答では刺激濃度依存性は見られなかったものの、細胞体での  $\text{Ca}^{2+}$  応答は cGMP 応答と同様に刺激濃度依存性が確認された (図 3.3 F)。一方で、 $10^{-2}$  IAA の刺激に対して 3 つの領域でにおい刺激を取り除いても  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は確認されなかった。先行研究より、高濃度の誘引物質に対する応答は低濃度時の応答と異なることが知られている (Yoshida et al., 2012)。その他の先行研究でも、誘引物質に対する高濃度の刺激は、低濃度時と異なる神経回路を用いて感受されることが報告されている (Leinwand and Chalasanani, 2013; Taniguchi et al., 2014)。繊毛における cGMP においてもこうした高濃度の IAA 刺激が他の濃度条件と比較して異なる応答性を示した。こ

の点において繊毛の cGMP 応答と  $\text{Ca}^{2+}$  応答は似ていた。



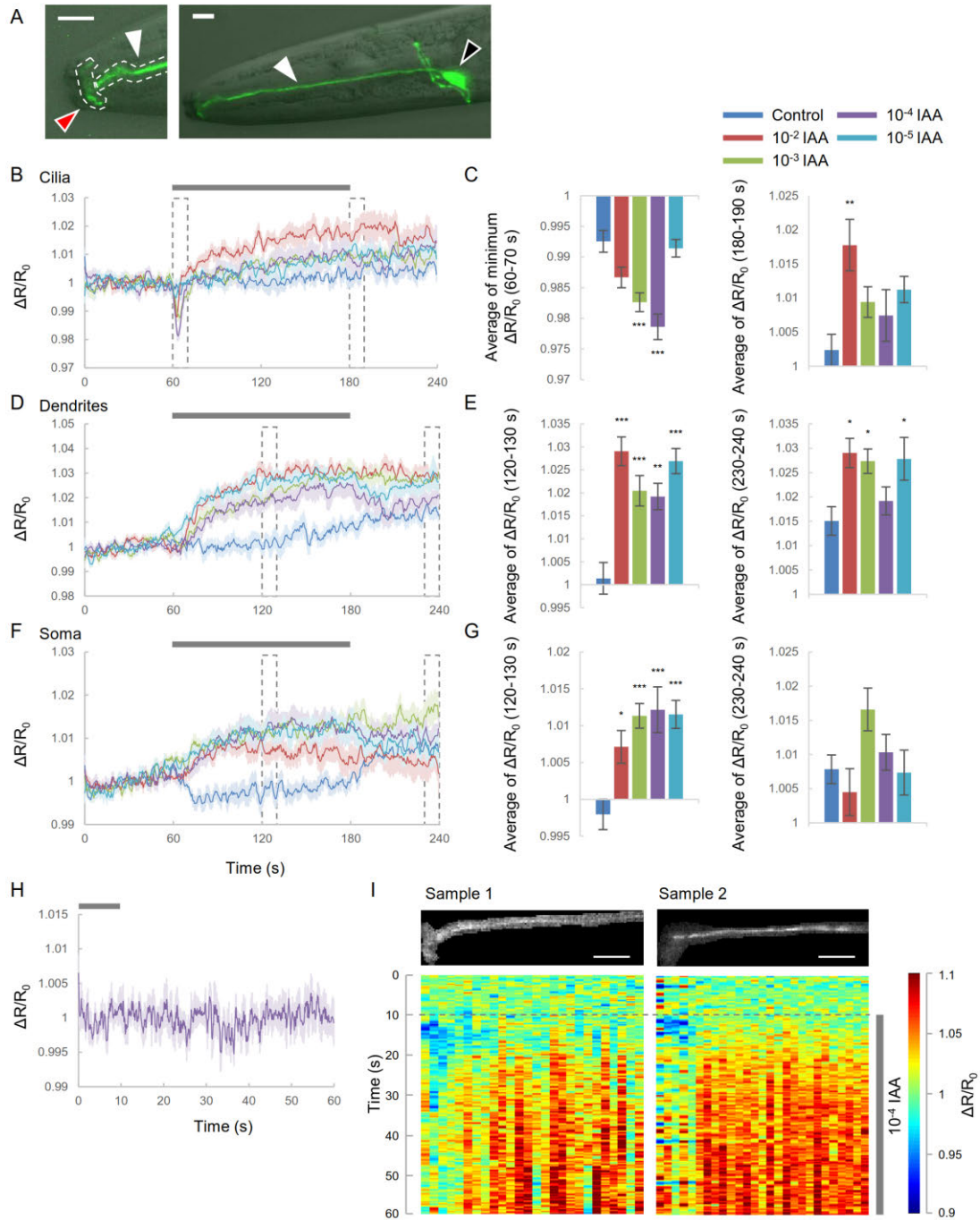


図 3.1 AWC 感覚神経細胞内の区画化された cGMP 応答

**A**, *pstr-2::cGi500* の共焦点顕微鏡による取得画像。黒矢印は細胞体；白矢印は樹状突起；赤矢印は繊毛をそれぞれ表す。破線で囲まれている部分は繊毛、もしくは樹状突起の ROI を示している。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。 **B-G**, AWC 内の区画化された cGMP 応答。 **B**, **D** and **F**, AWC の繊毛 (**B**)、樹状突起 (**D**) と細胞体 (**F**) の cGMP

応答の時間変化。時間変化は相対蛍光強度比 (CFP/YFP) の平均。灰色のバーはに  
おい刺激を与えた時間である。波形の影は標準誤差を示し、破線で囲まれた領域は  
棒グラフにおいて注目した時間帯を示す。 **C**, **E** and **G**, 特定の時間帯における繊毛  
(**C**)、樹状突起 (**E**) と細胞体 (**G**) の cGMP 応答のまとめ。エラーバーは標準誤  
差を示している。データセットは以下の通りである (コントロール,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  
 $10^{-5}$  IAA の順になっている。) : 繊毛と樹状突起, N = 8, 9, 11, 9, 11 ; 細胞体, N = 10,  
11, 11, 10, 10。 (**C**, 左, p = 0.0801, < 0.001, < 0.001, = 0.9686; **C**, 右, p = 0.00287,  
0.25269, 0.56314, 0.10763; **E**, 左, p < 0.001, < 0.001, = 0.0017, < 0.001; **E**, 右, p =  
0.0261, 0.0449, 0.8123, 0.0355; **G**, 左, p = 0.019, < 0.001, < 0.001, < 0.001; **G**, 右,  
p = 0.841, 0.132, 0.939, 1.000;  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  IAA; Dunnett's test) \*p < 0.05,  
\*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 で有意に差がある。 **H**, におい刺激を取り除いた時の繊毛  
における cGMP 応答。直前に 5 分間  $10^{-4}$  IAA を与えている。N = 8。 **I**, 頭部近辺の  
細胞内 cGMP 応答。ヒートマップは cGMP 応答を示している。ヒートマップの横軸  
は上段の画像の横軸に対応している。横軸の解像度は  $2.17 \mu\text{m}$  でスケールバーは  $10 \mu\text{m}$ 。

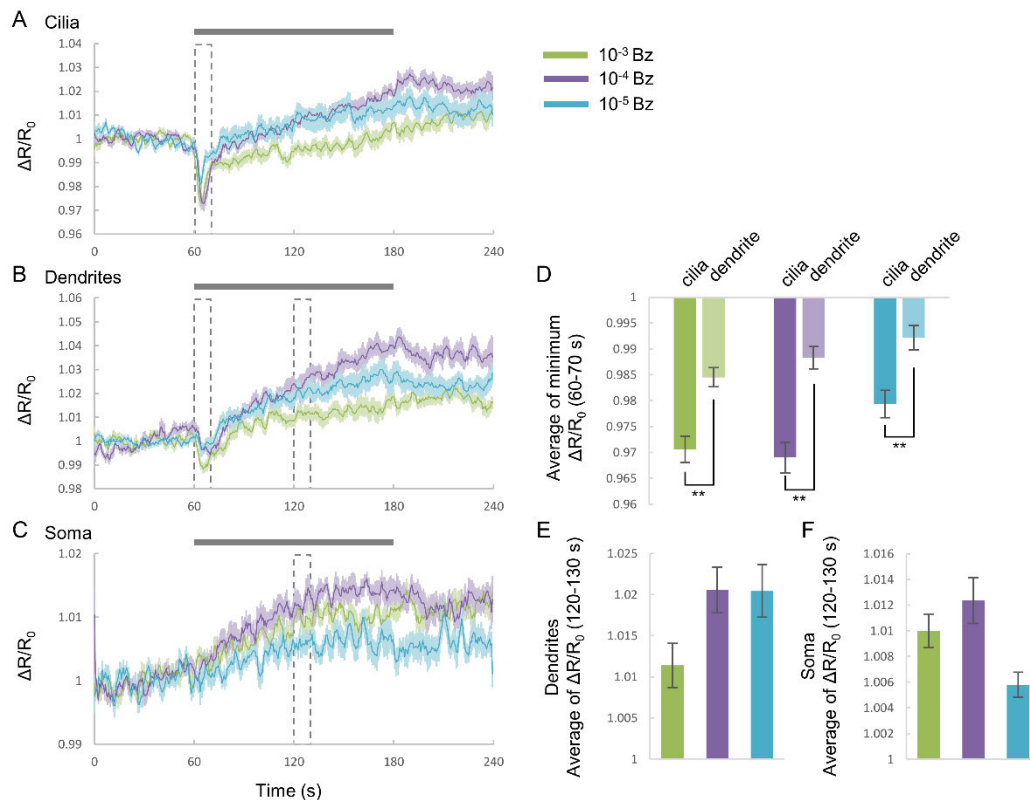


図 3.2 AWC 感覚神経細胞のベンズアルデヒドに対する区画化された cGMP 応答

**A-C**, AWC の繊毛 (**A**)、樹状突起 (**B**) と細胞体 (**C**) における cGMP 応答の時間変化。時間変化は相対蛍光強度比の平均。灰色のバーはにおい刺激を与えた時間である。波形の影は標準誤差を示し、破線で囲まれた領域は棒グラフにおいて注目した時間を示す。**D**, 繊毛と樹状突起における一過的な cGMP 減少のまとめ。(p = 0.004111, 0.004191, 0.003277;  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  IAA) **\*\***p<0.01 で有意に差がある。**E** and **F**, 120-130 秒の樹状突起と細胞体における cGMP 応答のまとめ。エラーバーは標準誤差を示している。それぞれの領域で N = 10。

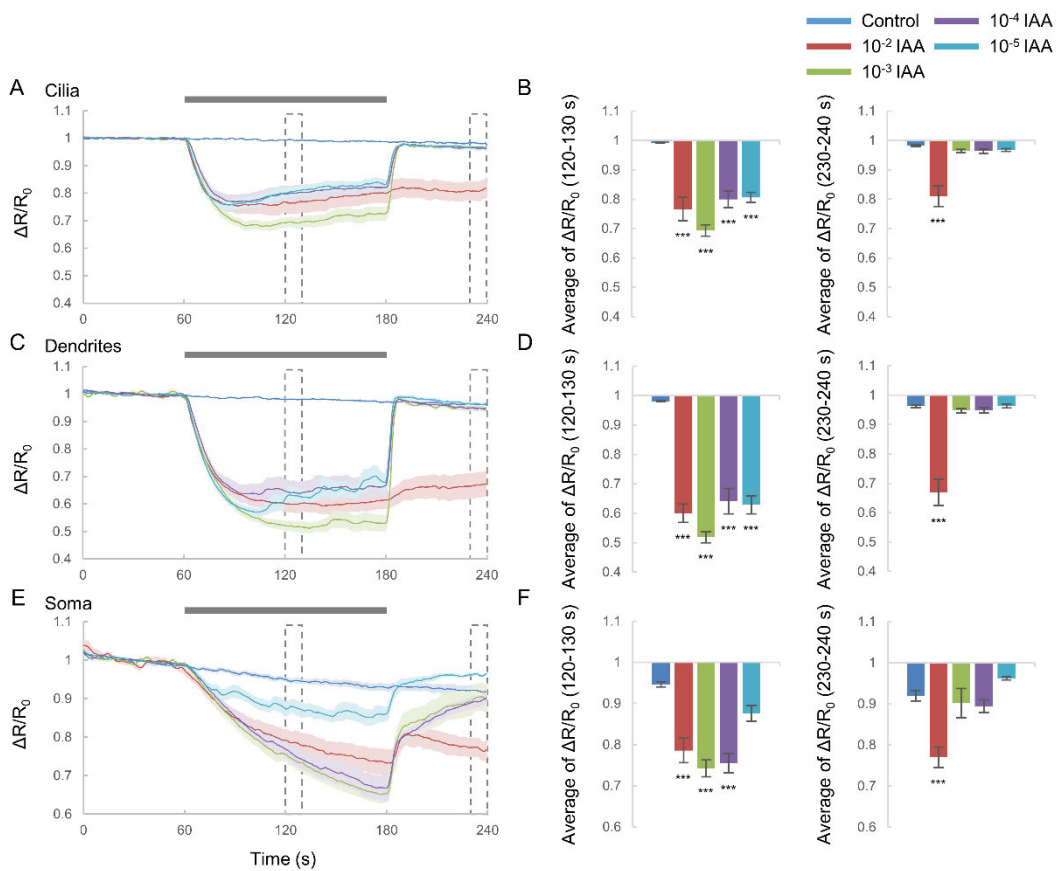


図 3.3 AWC 感覚神経細胞内において刺激に対する  $\text{Ca}^{2+}$  応答

**A**, **C** and **E**, AWC の繊毛 (**A**)、樹状突起 (**C**) と細胞体 (**E**) における IAA に対する  $\text{Ca}^{2+}$  応答の時間変化。時間変化は相対蛍光強度比 (Blue/Green) の平均。灰色のバーはにお刺激を与えた時間である。波形の影は標準誤差を示し、破線で囲まれた領域は棒グラフにおいて注目した時間を示す。**B**, **D** and **F**, それぞれの時間帯の繊毛 (**B**)、樹状突起 (**D**) と細胞体 (**F**) における  $\text{Ca}^{2+}$  応答のまとめ。エラーバーは標準誤差を示している。N = 10。(**B**, left,  $p < 10^{-5}$ ,  $< 10^{-5}$ ,  $< 10^{-5}$ ,  $< 10^{-5}$ ; **B**, right,  $p < 10^{-4}$ , = 0.866, = 0.851, = 0.925; **D**, left,  $p < 10^{-9}$ ,  $< 10^{-9}$ ,  $< 10^{-9}$ ,  $< 10^{-9}$ ; **D**, right,  $p < 10^{-4}$ , = 0.968, = 0.970, = 1.000; **F**, left,  $p < 0.001$ ,  $< 0.001$ ,  $< 0.001$ , = 0.0778; **F**, right,  $p < 0.001$ , = 0.934, = 0.812, = 0.448;  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  IAA; Dunnett's test) \*\*\* $p < 0.001$  で有意に差がある。

### 3.3.2 ODR-1 と DAF-11 は AWC 内の cGMP 応答で異なる役割を持つ

先行研究より、AWC を介した化学受容には ODR-1 と DAF-11 の 2 つのグアニル酸シクラーゼが必要であることが知られている (Birnby et al., 2000; L'Etoile and Bargmann, 2000)。領域毎に異なる cGMP 応答を引き起こす背景を明らかにするため、これらのグアニル酸シクラーゼを欠損させた変異体での cGMP 応答を調べることにした (図 3.4)。*odr-1* 変異体ではある時間帯で樹状突起の cGMP レベルがにおい刺激とコントロールで差があったものの (図 3.4 B and D)、どの部位もおい刺激に対して cGMP 応答を示さなかった (図 3.4 A-D)。一方で、*daf-11* 変異体では、繊毛の cGMP がにおい刺激後に減少し (図 3.4 E and H)、樹状突起と細胞体の cGMP は変化しなかった (図 3.4 F-H)。野生株の結果 (図 3.1 B) と比較すると、*daf-11* 変異体の繊毛における cGMP 応答は緩やかであり、野生株の応答とは異なった (図 3.4 E)。これらの結果は 2 つのグアニル酸シクラーゼが cGMP 応答を引き起こす上で異なる役割を担うことを示している。また、*daf-11* 変異体では、樹状突起と細胞体の cGMP 応答のみが完全に欠失したことから、特に DAF-11 は領域毎で異なる応答を引き起こす上で重要であると考えられる。

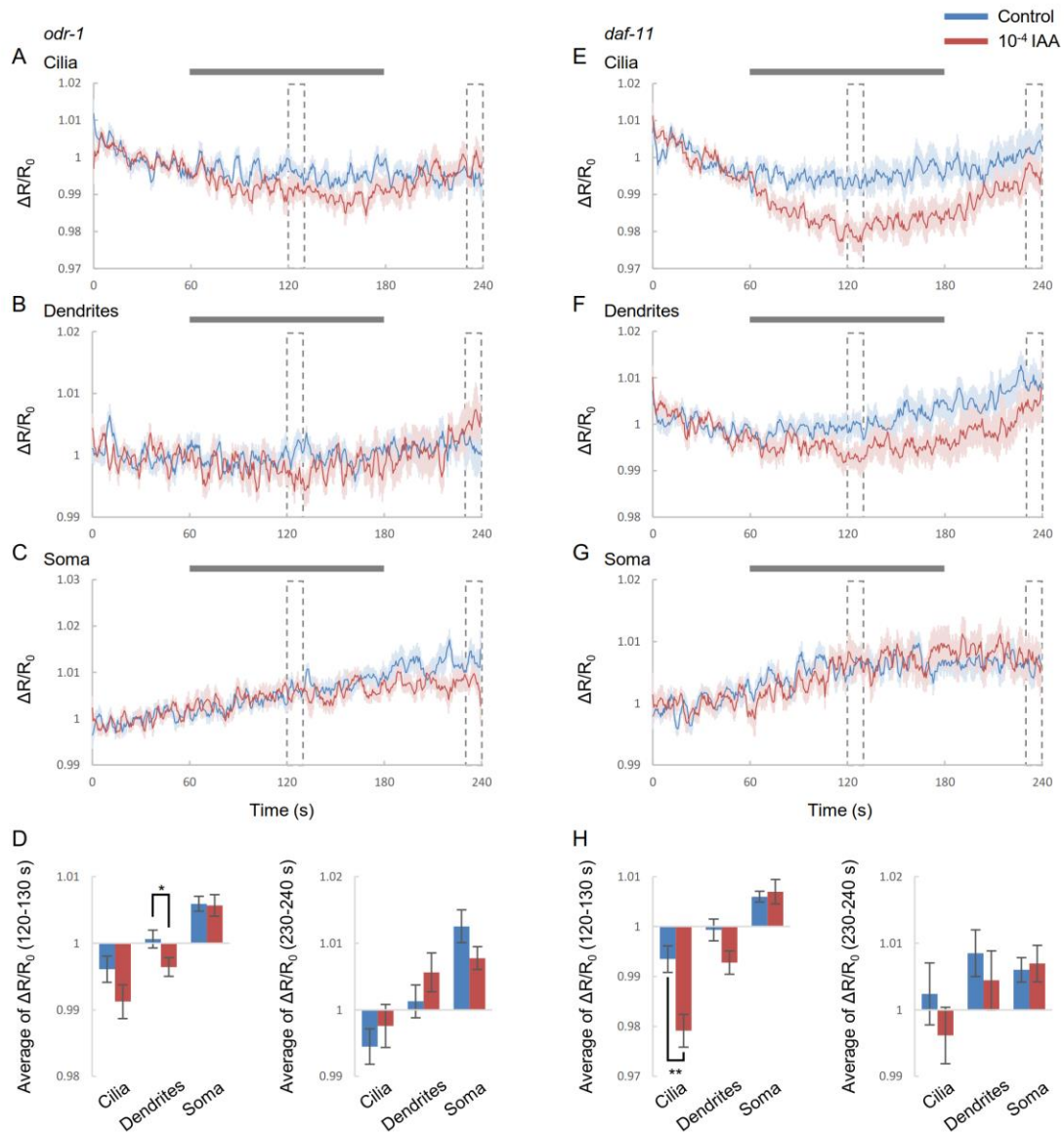


図 3.4 AWC の cGMP 応答に関わるグアニル酸シクラーゼの役割

**A-C**, *odr-1* 変異体における IAA に対する繊毛 (**A**)、樹状突起 (**B**)、細胞体 (**C**) の cGMP 応答の時間変化。灰色のバーはにおい刺激を与えた時間である。波形の影は標準誤差を示し、破線で囲まれた領域は棒グラフにおいて注目した時間帯を示す。

**D**, *odr-1* 変異体における cGMP 応答のまとめ。エラーバーは標準誤差を示している。

**E-G**, *daf-11* 変異体における繊毛 (**E**)、樹状突起 (**F**)、細胞体 (**G**) の cGMP 応答の時間変化。**H**, *daf-11* 変異体における cGMP 応答のまとめ。それぞれの領域で N =

10。 (**D**, 左,  $p = 0.149, 0.0432, 0.902$ ; **D**, 右,  $p = 0.467, 0.269, 0.130$ ; **H**, 左,  $p = 0.00321, 0.0556, 0.712$ ; **H**, 右,  $p = 0.334, 0.482, 0.780$ ; それぞれ繊毛、樹状突起、

細胞体の順; Student's t-test) \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  で有意に差がある。

### 3.3.3 長時間のにおい刺激は cGMP 応答性を変化させない

長時間のにおい刺激によって cGMP シグナル経路を通して AWC にはおおいに順応する (L'Etoile and Bargmann, 2000; Lee et al., 2010)。しかしながら、AWC 内の cGMP 濃度の違いが直接 cGMP 開閉型イオンチャンネルを制御し、結果として順応が引き起こされているかどうかは明らかにされていない。そこで、長時間におい刺激を与えることで cGMP 応答が変わるのかを調べた。におい刺激前後の cGMP 応答を比較するために、個々の線虫に対して 2 セットのイメージングを行った (図 3.5 A)。最初のトライアルでは個々線虫がおいに対して応答を示すことを確認した (図 3.5 B, D and F)。2 つ目のトライアルでは、線虫に 15 分間におい刺激を与えてから応答を観察したにも関わらず、1 つ目のトライアル同様に cGMP 応答が観察された (図 3.5 B, D and F)。この様に繊毛と細胞体での cGMP 応答には違いが見られなかったが (図 3.5 C and G)、樹状突起では差が見られた (図 3.5 E)。以上より、15 分以下の時間で線虫ににおい刺激を与えた場合、繊毛と細胞体では変化が見られず、樹状突起では変化が見られるということがわかった。先行研究より、線虫は一定時間のにおい刺激を与えられると、プロテインキナーゼ G の 1 つである EGL-4 が cGMP 依存型チャンネルである TAX-2 をリン酸化し、順応を引き起こすのではないかと考えられている (L'Etoile et al., 2002)。以上より 15 分間のにおい刺激では繊毛の cGMP 応答に変化は見られなかったが、順応はその下流のチャンネルレベルで生じている可能性がある。



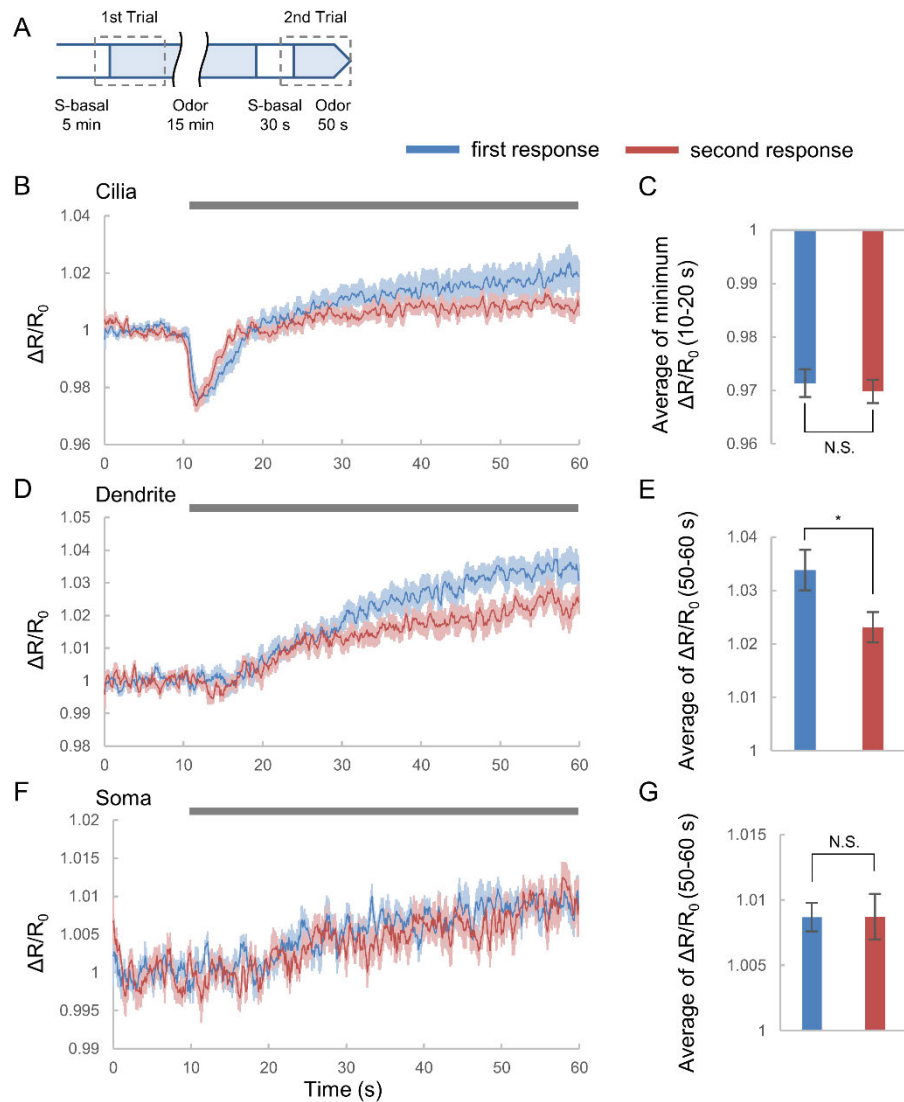


図 3.5 15 分間におい刺激を与えた後の cGMP 応答

**A**, 実験の手順。 **B**, **D** and **F**, 15 分間の  $10^{-4}$  IAA 刺激を与えた前後での繊毛 (**B**)、樹状突起 (**D**) と細胞体 (**F**) における cGMP 応答。灰色のバーはにおい刺激を与えた時間である。波形の影は標準誤差を示す。 **C**, **E** and **G**, 繊毛 (**C**)、樹状突起 (**E**) と細胞体 (**G**) における cGMP 応答のまとめ。エラーバーは標準誤差を示す。青は 1 回目のトライアルの cGMP 応答を示し、赤は 2 回目のトライアルの cGMP 応答を示す。データセットは以下の通りである：繊毛と樹状突起,  $N = 9$ ; 細胞体,  $N = 8$ . (**C**,  $p = 0.5565$ ; **E**,  $p = 0.02493$ ; **G**,  $p = 0.9856$ ; Student's  $t$ -test)  $*p < 0.05$  で有意に差がある。

### 3.3.4 連続したにおい刺激は繊毛での cGMP 応答性を減少させる

脊椎動物の嗅覚受容細胞や視細胞では繰り返しの刺激に対してセカンドメッセンジャーを介したメカニズムで外部刺激に対する応答性を減少させる(Nikonov et al., 2000; Zufall and Leinders-Zufall, 2000)。そこで、長時間のにおい刺激は線虫の cGMP 応答性を変化させなかったものの (図 3.5)、連続刺激を与えた場合 cGMP 応答性が変化するのではないかと考えた。まず、線虫に 2 パターンの刺激を入れた時の cGMP 応答を調べた (図 3.6 A)。4 回刺激を与える条件では 30 秒毎に計 4 回の刺激を線虫に与え、2 回刺激を与える条件では 4 回刺激のうち最初の 1 回と最後の 1 回をそれぞれ与えた。4 回刺激を与えた条件では刺激を与えるのに従い、徐々に応答が減少する傾向が見られたのに対し、2 回刺激を与えた条件では多少応答が減少しているものの 2 回目の応答に大きな減少は見られなかった (図 3.6 B)。それぞれの応答の変化幅を最初の応答の変化幅で規格化し比較してみたところ、4 回刺激条件の 3 番目と 4 番目の刺激は 2 回刺激条件の 2 番目の応答よりも小さかった (図 3.6 C)。これらの結果は連続したにおい刺激があるレベルまで cGMP 応答性を変化させることを示している。一方で、4 回刺激を与えた条件では、cGMP の減少度合いはほとんど同じであった。そこで、より多くの刺激を入れた場合、さらに cGMP の減少が生じるのか調べるために、10 回刺激の条件で 10 回目の応答を観察することにした (図 3.6 D)。10 回目の応答の大きさは 3 回目の応答と比較して有意差は見られなかった。このことから、さらに同様な刺激を加えても、これ以上の応答性の減少は見られないと結論づけた。

4 回刺激を与えた条件では、cGMP 応答の変化幅が 2 回目の刺激の段階ですでに後半の 2 つの刺激とほとんど同じ大きさになっていた。そこで、刺激間のインターバルが後に続く cGMP の応答強度に影響を与えるのではないかと仮説を立てた。この仮説を明らかにするため、線虫に与える 2 つの連続する刺激のインターバルを変えると、応答強度がどのように変わるのか調べた (図 3.6 E)。インターバルの時間が長くなるにつれて、応答幅が大きくなっていく様子が観察された。この結果は cGMP 応答の大きさが刺激間の時間間隔に依存することを示している。

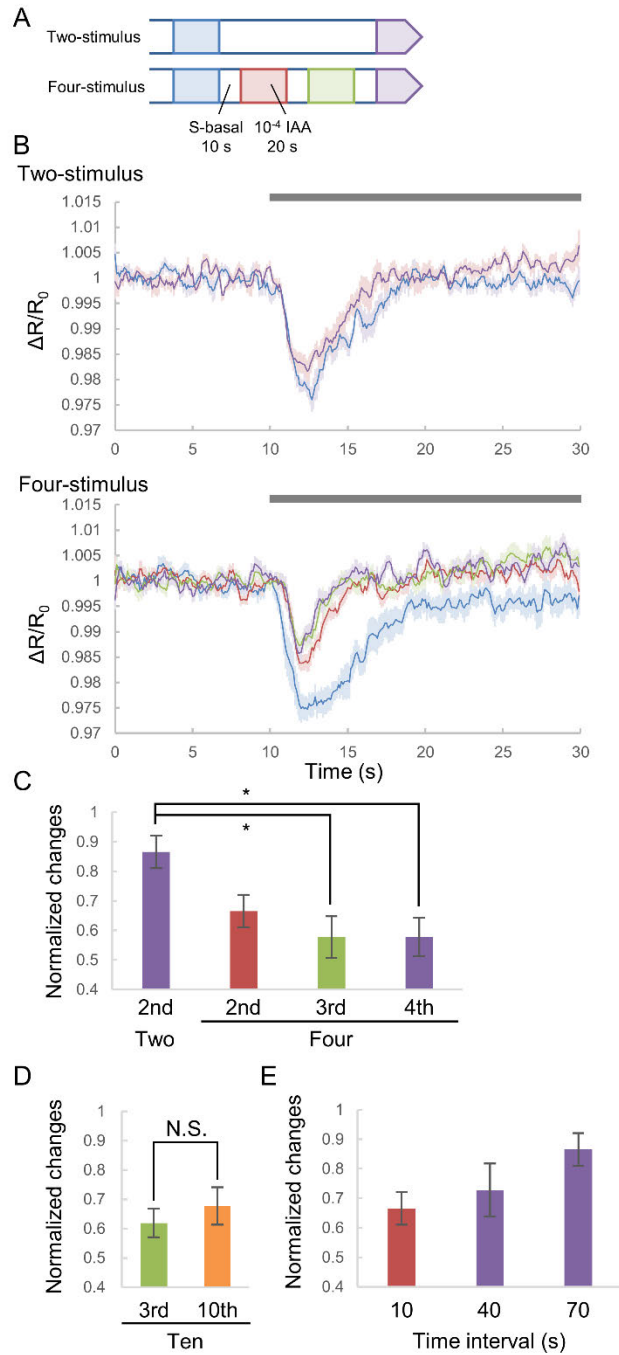


図 3.6 連続刺激に対する繊毛における cGMP 応答

**A**, 実験の手順。線虫は 2 回、もしくは 4 回 30 秒毎に 20 秒のにおい刺激にさらされた。**B**, 2 回刺激 (上段) と 4 回刺激 (下段) に対する cGMP 応答。それぞれの時間変化はにおい刺激を与える前の 10 秒間と、におい刺激を与えた後の 20 秒間の 30 秒間から得ている。灰色のバーはにおい刺激を与えた時間である。波形の影は標準

誤差を示す。**C**, cGMP 応答のまとめ。それぞれの cGMP の変化分は最初の応答の変化分で規格化されている。**D**, 10 回刺激を与えたときの 3 回目と 10 回目の cGMP 応答。**E**, 異なる時間間隔で刺激を与えた際の cGMP 応答。それぞれの応答は 2 回目（もしくは最後）の応答であり、最初の応答変化分で規格化されている。10 秒と 70 秒のデータは **C** のグラフのデータと同じである。エラーバーは標準誤差を示す。N = 10, 11, 11, 10 (それぞれの個体数は 2 回, 4 回, 10 回刺激と 40 秒の時間間隔で刺激を与えたときに対応する)。( **C**,  $p = 0.01977, 0.004951, 0.003289$ ; 2 回目のトライアルと最後のトライアル; **D**,  $p = 0.3652$ ; Student's *t*-test) \* $p < 0.05$  で有意に差がある (Bonferroni 補正を用いた)。

### 3.3.5 相対濃度の変化に対する cGMP 応答

におい刺激に対する cGMP 応答は絶対濃度に依存する (図 3.1)。こうした濃度依存的な応答が相対濃度の変化に対しても見られるかどうか明らかにするため、相対濃度の変化に対する cGMP 応答を測定した (図 3.7)。ここでは、はじめに  $10^{-5}$ ~ $10^{-4}$  IAA を線虫にかがせておき、次に  $10^{-4}$  IAA に切り替えて刺激を与えた。 $10^{-5}$ ~ $0.2 \times 10^{-4}$  IAA 刺激に対しては、繊毛と樹状突起の両方で cGMP 応答がほとんど全ての個体から観察された。しかし、 $0.5 \times 10^{-4}$  刺激に対して線虫は cGMP 応答を示さなかった。相対濃度変化に対して cGMP 応答を示す線虫の割合は相対的に濃度が大きくなるにつれて多くなった。これらの結果は、cGMP 応答性が絶対濃度だけではなく相対濃度に依存することを示している。

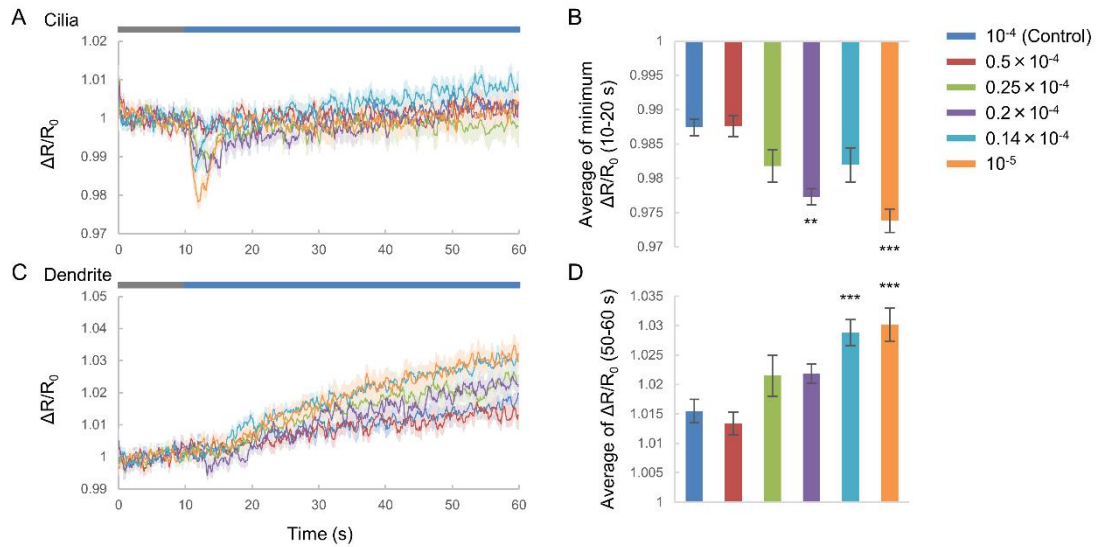


図 3.7 相対的な刺激に対する cGMP 応答

**A and C**, 繊毛 (**A**) と樹状突起 (**C**) における相対的な IAA 変化に対する応答。青いバーは  $10^{-4}$  IAA を加えている時間を示す。また、灰色のバーは特定の濃度において刺激を与えている時間を示す。波形の影は標準誤差を示す。**B and D**, cGMP 応答のまとめ。エラーバーは標準誤差を示す。データセットは以下の通りである ( $10^{-4}$ ,  $0.5 \times 10^{-4}$ ,  $0.25 \times 10^{-4}$ ,  $0.2 \times 10^{-4}$ ,  $0.14 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  IAA の順になっている。) : 繊毛と樹状突起,  $N = 10, 10, 9, 9, 11, 10$ ; 細胞体,  $N = 10, 10, 9, 9, 11, 10$ . (**B**,  $p = 1.00000, = 0.14898, = 0.00176, = 0.13384, < 0.001$ ; **D**,  $p = 0.953, = 0.296, = 0.249, < 0.001, < 0.001$ ;  $0.5 \times 10^{-4}, 0.25 \times 10^{-4}, 0.2 \times 10^{-4}, 0.14 \times 10^{-4}, 10^{-5}$  IAA IAA; Dunnett's test) \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  で有意に差がある。

### 3.4 考察

部位特異的な cGMP 応答を可視化するために遺伝子導入型 cGMP インディケーター cGi500 を使用した。cGMP イメージングはにお刺激を与えると繊毛で一過的な cGMP 減少が起こる一方で、にお刺激を与えている間、細胞体の cGMP 濃度が高いレベルにあることを示した。cGMP 応答と比較して、Ca<sup>2+</sup>応答に部位特異性はなかったが、細胞体の Ca<sup>2+</sup>は cGMP 同様ににお刺激に対する濃度依存した (図 3.3)。また、長時間のにお刺激を与えても cGMP の応答性を変えることができなかったが、連続した刺激は cGMP の脱感作を引き起こした。そして、この脱感作の度合いは刺激間のインターバルに影響を受けた。加えて、cGMP の応答の大きさは絶対濃度だけではなく相対濃度にも依存した。

AWC 感覚神経細胞内で cGMP は感覚情報の伝達 (にお感受) と細胞機能の調整 (にお順応) をそれぞれ行う (Bargmann, 2006; de Bono and Maricq, 2005; O'Halloran et al., 2009, 2012)。先行研究で明らかにされてきたこうした結果は、にお刺激に対する相反する cGMP 応答を引き起こすことを示唆する。すなわち、にお感受に関して cGMP レベルは減少し、にお順応に関して cGMP レベルが上昇するということである。こうした相反する cGMP 応答は同時に AWC 内で部位特異的に起こることが今回の結果からわかった。加えて、部位特異的な cGMP 応答が単一神経細胞ではっきりと分かれていることについても明らかとなった (図 3.1 I)。こうした部位特異性の背景にはホスホジエステラーゼ (PDE) やグアニル酸シクラーゼ (GC) の分布の違いがあると考えられる (図 3.8 and 9)。本章ではにお刺激に対する cGMP 制御に関して ODR-1 と DAF-11 が異なる機能を持っていることを示した。ODR-1 は AWC の繊毛に局在しており (L'Etoile and Bargmann, 2000) (図 3.8 左)、このことは受容体が繊毛に位置することから ODR-1 がにお感受に決定的な役割を持つと推測される。実際、*odr-1* 変異体は AWC のどの領域においても、にお刺激に対応した cGMP 応答を示さなかった。一方で、DAF-11 は AWC 内に広く発現している (Birnbay et al., 2000) (図 3.8 右)。野生株と比較すると、*daf-11* ではにお刺激に対する樹状突起と細胞体内の cGMP 上昇が見られなくなっており、DAF-11 が樹状突起と細胞体の cGMP レベルに影響を与えていることが示唆された。加えて、DAF-11 は ODR-1 とヘテロ二量体を形成すると考えられている (Morton, 2004)。それゆえ、DAF-11 の欠損により繊毛にある ODR-1 との機能が阻害され、繊毛での cGMP 減少の応答様式が変わってしまったかもしれない。また、多くの知見はないものの線虫で発現する 6 種類の PDE についても、種類によって発現部位が異なるということが知られている (Liu et al., 2010; Wang et al., 2013) (図 3.9)。先行研究でガス感受性神経細胞でも示唆されていたように (Couto et al.,

2013)、cGMP シグナル経路に関わるこうしたタンパク質の局在はにおい刺激に対する部位特異的な cGMP 応答を決めていると考えられる。この様なタンパク質の局在は IAA と Bz の応答性の違いを引き起こす原因にもなっている可能性がある。どちらのにおい感受にも cGMP シグナル経路が介在しているものの(L'Etoile and Bargmann, 2000)、線虫はこれらにおいをかぎ分けることができる(Bargmann et al., 1993)。故に、それぞれのにおいを感受するために必要な細胞内の要素は異なり、このことが異なる応答性を生み出す要因になっている可能性がある。

また、先述した単一神経細胞内のグアニル酸シクラーゼが持つ役割の違いにより、cGMP 応答と  $\text{Ca}^{2+}$  応答のより詳細な関係を考察することができる。これまで繊毛の cGMP レベルはイオンチャネルを制御していると考えられていたが(Bargmann, 2006; de Bono and Maricq, 2005)、繊毛の  $\text{Ca}^{2+}$  応答と cGMP 応答は異なる応答様式を示した(図 3.1 and 3.3)。もし、繊毛に局在する ODR-1 と DAF-11 のヘテロ二量体で形成されるグアニル酸シクラーゼと、繊毛を含め AWC 全体に存在する DAF-11 がそれぞれ異なる cGMP 制御を行っていた場合、繊毛での cGMP レベルはそれぞれのグアニル酸シクラーゼによって制御された cGMP 変化の足し合わせと考えることができる(図 3.10)。つまり、イメージングによって明らかにされた cGMP 応答は、さらに cGMP の足し合わせの結果であると考え、より局所で cGMP 応答を見たとき ODR-1 が関わる cGMP 応答を示す領域が存在する可能性がある。もし、この様な仮定が正しければ膜電位の減少 ( $\text{Ca}^{2+}$  の減少) は cGMP の減少が背景にあると結論づけることができるだろう。一方で、この様な現象が実際に繊毛で起きていた場合、繊毛で cGMP が一過的な応答を見せた後、cGMP レベルが少しだけ上昇することは DAF-11 の役割によるものであると考えることができる。

連続してにおい刺激を与える実験においては 10 回刺激を与えても cGMP 応答は消失しなかった(図 3.6 D)。先行研究より連続した 1 秒間隔で IAA のパルス刺激を線虫に行うと、はじめはある程度まで AWC の  $\text{Ca}^{2+}$  が減少するものの、応答は消えないということが知られている(Kato et al., 2014)。この結果は連続でにおい刺激を与えた後でも線虫はにおい刺激を感受できることを意味しており、cGMP 応答が 10 回の連続刺激で消えないことと一致する。一方で、線虫は首を振ってにおいの濃度勾配を感知し化学走性を示す(Iino and Yoshida, 2009; Pierce-Shimomura et al., 1999)。そのため、もし連続刺激によって完全に応答が見られなくなってしまうと、線虫は濃度勾配を感受できなくなってしまう可能性がある。こうした点からも、連続した刺激が繊毛の cGMP 応答を完全に消失させないことはもっともらしいといえる。



cGMP 応答と比較して、AWC 内で  $\text{Ca}^{2+}$  応答に部位特異性はないものの、cGMP と  $\text{Ca}^{2+}$  間で観察された刺激依存性は似ていた。具体的には、細胞体では両者に濃度依存性が観察された一方で、樹状突起では濃度依存性はなかった。また、高濃度の刺激に対する繊毛での cGMP と  $\text{Ca}^{2+}$  は低濃度の刺激とは異なる応答性を示した。このような結果は AWC 内の cGMP と  $\text{Ca}^{2+}$  の関係を示唆するものであり、その関係性は脊椎動物の嗅覚受容細胞よりは、視細胞で見られる応答と類似している (図 3.11)。視細胞では細胞内の cGMP レベルが細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  レベルと密接に関わっている (Gross et al., 2015; Kaupp and Seifert, 2002; Meister and Tessier-Lavigne, 2013) (図 3.11 左)。こうした神経細胞では、 $\text{Ca}^{2+}$  の減少が GC を活性化し cGMP レベルを高くするが、こうした関係は AWC 内で見られる両者の関係と合致する。一方で、嗅覚細胞はにおい刺激によってセカンドメッセンジャーは上昇し、 $\text{Ca}^{2+}$  の流入を引き起こすことから AWC で見られている応答性とは一致しない (Buck and Bargmann, 2013) (図 3.11 右)。過去の研究でも AWC 感覚神経細胞が脊椎動物の視細胞の様に振る舞うことは言及されている (Chalasan et al., 2007)。こうした事実は、今回の結果は AWC が視細胞と類似であることをさらに強調する。

近年の研究より、線虫単一神経細胞内の部位特異的な神経活動を起こすことが示されている (Hendricks et al., 2012; Shidara et al., 2013)。本研究では新たに AWC 内の部位特異的な cGMP 応答を示した。過去の線虫系で cGMP 挙動を明らかにした論文においても細胞内の異なる cGMP 応答性については示唆されている (Couto et al., 2013)。しかし、先行研究は同一神経細胞が同一刺激条件で cGMP が上昇もしくは減少することを示しただけであり、本研究の様な部位特異性を示したものではない。また、他の研究 (Sprenger and Nikolaev, 2013) と比較しても、こうした *in vivo* での単一神経細胞部位特異的な cGMP 応答を明らかにした研究は本研究が初めてである。

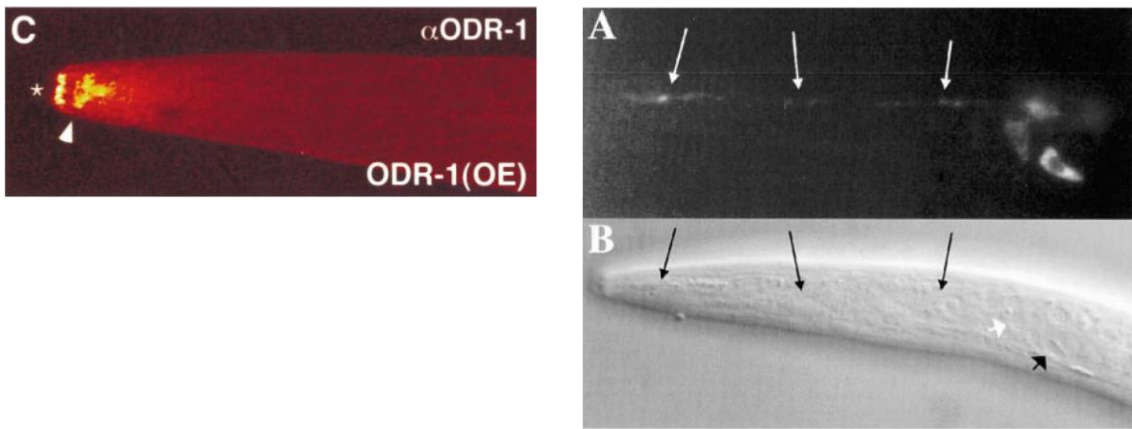


図 3.8 AWC に発現するグアニル酸シクラーゼ

(左) 膜貫通型グアニル酸シクラーゼ ODR-1 の発現。繊毛部分にのみ発現している。

(L'Etoile and Bargmann, 2000 より) (右) 膜貫通型グアニル酸シクラーゼ DAF-11 の発現。AWC 全体に発現している。(Birnby et al., 2000 より)

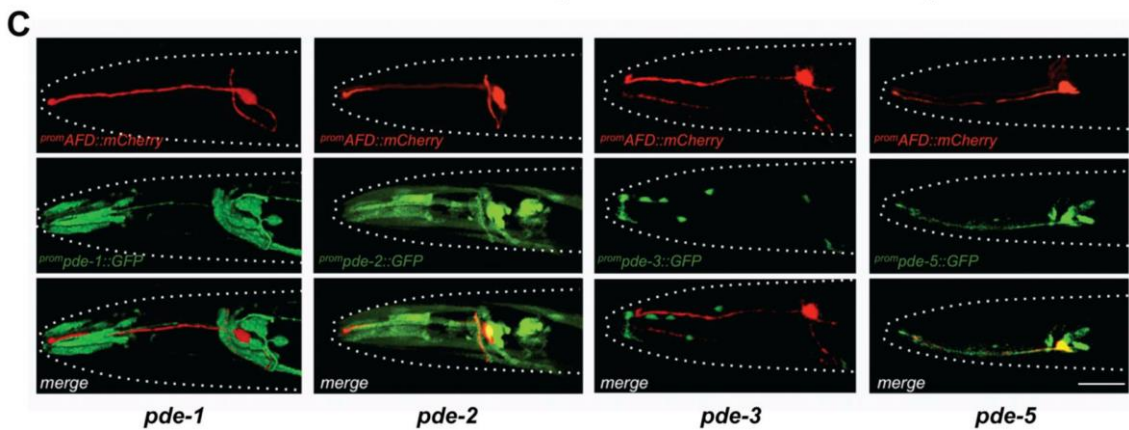


図 3.9 PDE の発現

上段は温度を感受する感覚神経細胞 AFD の発現 (赤)。中段は PDE の発現を (緑)。

下段は上段と中段を重ねた結果。PDE の種類によってそれぞれ発現部位が異なっている。(Wang et al., 2013 より)

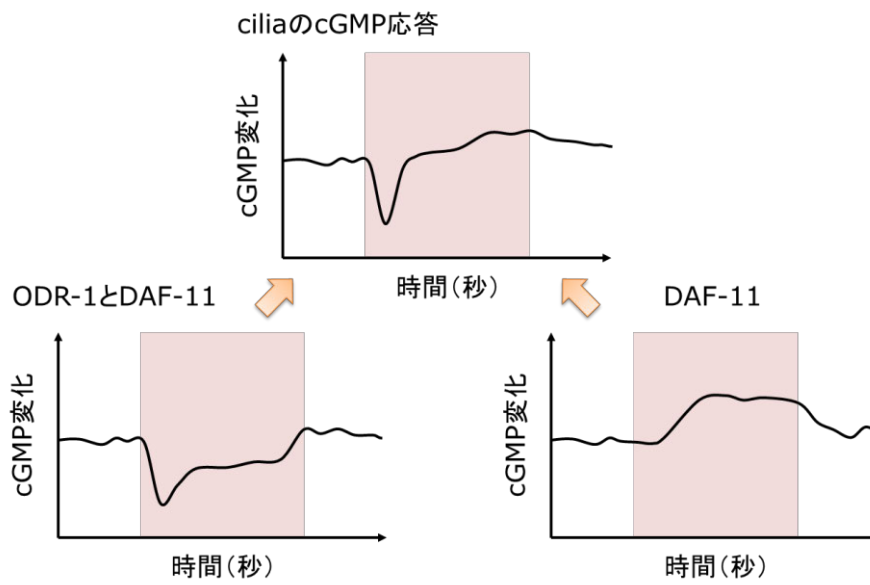
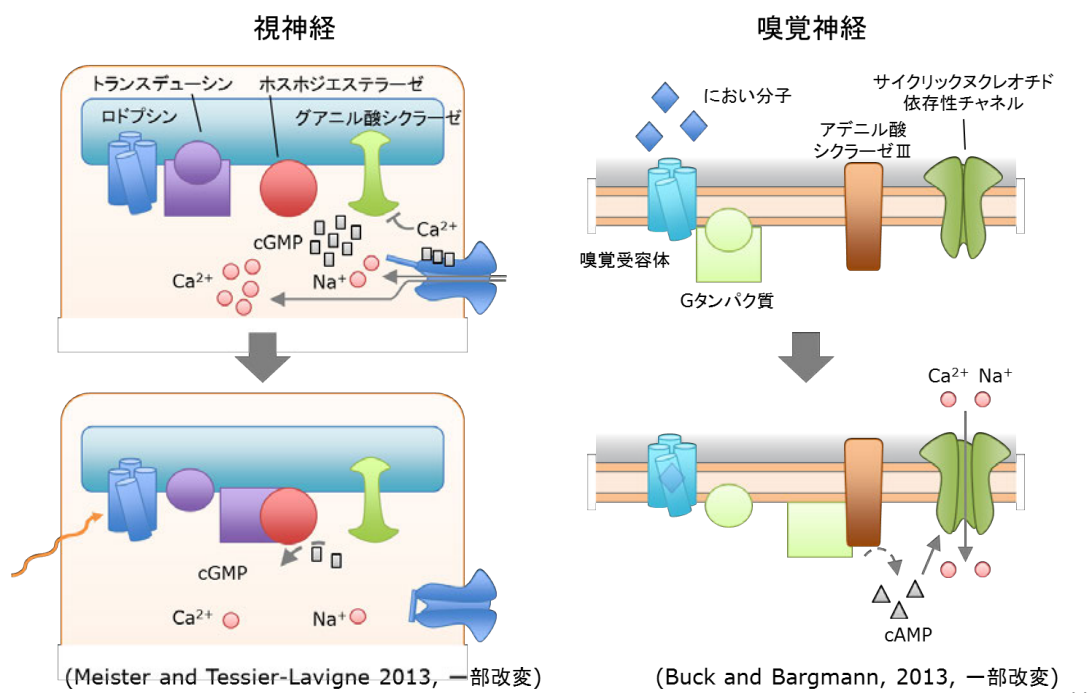


図 3.10 繊毛における cGMP 応答の内訳

cGMP イメージングによって得られた cGMP 応答は ODR-1 と DAF-11 によって生じる cGMP 減少と DAF-11 によって生じる cGMP 上昇の足し合わせによるものではないかと推察される。



44

図 3.11 哺乳類の視神経細胞 (左) と嗅覚神経細胞 (右) の細胞内シグナル

(左) 視細胞ではロドプシンで光を感受し、トランスデュースンを介してホスホジエステラーゼを活性化し細胞内 cGMP を減少させる。細胞内 cGMP が減少することで cGMP 依存型チャネルは閉じ、細胞内の  $Ca^{2+}$  や  $Na^+$  濃度が減少する。グアニル酸シクラーゼは  $Ca^{2+}$  によって抑制されるため、 $Ca^{2+}$  の減少に伴い活性化される。

(Meister and Tessier-Lavigne, 2013 より) (右) 嗅覚細胞では、におい受容体ににおい分子が吸着すると G タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼ III が活性化され cAMP が産出される。これに伴いチャネルが開き、 $Ca^{2+}$  や  $Na^+$  濃度が上昇する。(Buck and Bargmann, 2013 より)

## 参考文献

- Arora K, Sinha C, Zhang W, Ren A, Moon CS, Yarlagadda S, Naren AP (2013) Compartmentalization of cyclic nucleotide signaling: a question of when, where, and why? *Pflügers Arch Eur J Physiol* 465:1397–1407.
- Bargmann CI (2006) Chemosensation in *C. elegans*. *WormBook*:1–29.
- Bargmann CI, Hartwig E, Horvitz HR (1993) Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* 74:515–527.
- Birnby DA, Link EM, Vowels JJ, Tian H, Colacurcio PL, Thomas JH (2000) A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155:85–104.
- Buck LB, Bargmann CI (2013) Smell and Taste: The Chemical Senses. In: Principles of Neural Science, Fifth Edition, 5th ed. (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, eds), pp 712–735. McGraw-Hill Medical.
- Chalasan SH, Chronis N, Tsunozaki M, Gray JM, Ramot D, Goodman MB, Bargmann CI (2007) Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 450:63–70.
- Chronis N, Zimmer M, Bargmann CI (2007) Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Methods* 4:727–731.
- Couto A, Oda S, Nikolaev VO, Soltesz Z, de Bono M (2013) In vivo genetic dissection of O<sub>2</sub>-evoked cGMP dynamics in a *Caenorhabditis elegans* gas sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E3301-10.
- de Bono M, Maricq AV (2005) Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. *Annu Rev Neurosci* 28:451–501.
- Fu Y, Yau K-W (2007) Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflügers Arch : Eur J Physiol* 454:805–819.
- Gross OP, Pugh EN, Burns ME (2015) cGMP in mouse rods: the spatiotemporal dynamics underlying single photon responses. *Front Mol Neurosci* 8:6.
- Hendricks M, Ha H, Maffey N, Zhang Y (2012) Compartmentalized calcium dynamics in a *C. elegans* interneuron encode head movement. *Nature* 487:99–103.
- Iino Y, Yoshida K (2009) Parallel use of two behavioral mechanisms for chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 29:5370–5380.
- Kato S, Xu Y, Cho CE, Abbott LF, Bargmann CI (2014) Temporal responses of *C. elegans* chemosensory neurons are preserved in behavioral dynamics. *Neuron* 81:616–628.
- Kaupp UB, Seifert R (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82:769–

- Kots AY, Martin E, Sharina IG, Murad F (2009) A short history of cGMP, guanylyl cyclases, and cGMP-dependent protein kinases. *Handb Exp Pharmacol*:1–14.
- L'Etoile ND, Bargmann CI (2000) Olfaction and odor discrimination are mediated by the *C. elegans* guanylyl cyclase ODR-1. *Neuron* 25:575–586.
- L'Etoile ND, Coburn CM, Eastham J, Kistler A, Gallegos G, Bargmann CI (2002) The cyclic GMP-dependent protein kinase EGL-4 regulates olfactory adaptation in *C. elegans*. *Neuron* 36:1079–1089.
- Lee JI, O'Halloran DM, Eastham-Anderson J, Juang B-T, Kaye JA, Scott Hamilton O, Lesch B, Goga A, L'Etoile ND (2010) Nuclear entry of a cGMP-dependent kinase converts transient into long-lasting olfactory adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6016–6021.
- Leinwand SG, Chalasani SH (2013) Neuropeptide signaling remodels chemosensory circuit composition in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Neurosci* 16:1461–1467.
- Liu J, Ward A, Gao J, Dong Y, Nishio N, Inada H, Kang L, Yu Y, Ma D, Xu T, Mori I, Xie Z, Xu XZS (2010) *C. elegans* phototransduction requires a G protein-dependent cGMP pathway and a taste receptor homolog. *Nat Neurosci* 13:715–722.
- McCormick K, Baillie GS (2014) Compartmentalisation of second messenger signalling pathways. *Curr Opin Genet Dev* 27:20–25.
- Meister M, Tessier-Lavigne M (2013) Low-Level Visual Processing: The Retina. In: *Principles of Neural Science, Fifth Edition, 5th ed.* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, eds), pp 575–601. McGraw-Hill Medical.
- Morton DB (2004) Invertebrates yield a plethora of atypical guanylyl cyclases. *Mol Neurobiol* 29:97–116.
- Nikonov S, Lamb TD, Pugh EN (2000) The role of steady phosphodiesterase activity in the kinetics and sensitivity of the light-adapted salamander rod photoresponse. *J Gen Physiol* 116:795–824.
- O'Halloran DM, Altshuler-Keylin S, Lee JI, L'Etoile ND (2009) Regulators of AWC-mediated olfactory plasticity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 5:e1000761.
- O'Halloran DM, Hamilton OS, Lee JI, Gallegos M, L'Etoile ND (2012) Changes in cGMP levels affect the localization of EGL-4 in AWC in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 7:e31614.
- Pierce-Shimomura JT, Morse TM, Lockery SR (1999) The fundamental role of pirouettes in *Caenorhabditis elegans* chemotaxis. *J Neurosci* 19:9557–9569.

- Russwurm M, Mullershausen F, Friebe A, Jäger R, Russwurm C, Koesling D (2007) Design of fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based cGMP indicators: a systematic approach. *Biochem J* 407:69–77.
- Shidara H, Kobayashi J, Tanamoto R, Hotta K, Oka K (2013) Odorant-induced membrane potential depolarization of AIY interneuron in *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Lett* 541:199–203.
- Sprenger JU, Nikolaev VO (2013) Biophysical techniques for detection of cAMP and cGMP in living cells. *Int J Mol Sci* 14:8025–8046.
- Taniguchi G, Uozumi T, Kiriya K, Kamizaki T, Hirotsu T (2014) Screening of odor-receptor pairs in *Caenorhabditis elegans* reveals different receptors for high and low odor concentrations. *Sci Signal* 7:ra39.
- Wang D, O'Halloran D, Goodman MB (2013) GCY-8, PDE-2, and NCS-1 are critical elements of the cGMP-dependent thermotransduction cascade in the AFD neurons responsible for *C. elegans* thermotaxis. *J Gen Physiol* 142:437–449.
- Yoshida K, Hirotsu T, Tagawa T, Oda S, Wakabayashi T, Iino Y, Ishihara T (2012) Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*. *Nat Commun* 3:739.
- Zhao Y, Araki S, Wu J, Teramoto T, Chang Y-F, Nakano M, Abdelfattah AS, Fujiwara M, Ishihara T, Nagai T, Campbell RE (2011) An expanded palette of genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators. *Science* 333:1888–1891.
- Zufall F, Leinders-Zufall T (2000) The cellular and molecular basis of odor adaptation. *Chem Senses* 25:473–481.

## 第4章 結言

### 4.1 本研究のまとめと意義

神経系全体の機能を理解する上で、単一神経細胞の異なる部位レベルで情報処理様式を明らかにすることは大きな課題である。これまで、マウスを中心とした様々な生物種で単一神経細胞の部位特異的な機能について調べられてきた。しかし、線虫では単一神経細胞の部位ごとで行われる情報処理に注目した研究はほとんどない。第2章では、細胞体で  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示さず、神経線維でのみ  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示す介在神経細胞 AIY (Chalasan et al., 2007; Clark et al., 2006) に注目し、部位特異的に  $\text{Ca}^{2+}$  応答と膜電位応答が異なることを示した (図 4.1)。線虫神経系において  $\text{Ca}^{2+}$  は膜電位を変化させる主な電荷キャリアであると考えられている (Goodman et al., 1998) ため、 $\text{Ca}^{2+}$  が応答しないことは膜電位が変化しないことを意味すると考えられてきた。従って、AIY の細胞体は膜電位変化が生じないと思われていたが、本研究により膜電位変化が生じていることが明らかとなった。また、 $\text{Ca}^{2+}$  応答が膜電位変化に対応する訳ではないということも示された。第3章では、感覚神経細胞 AWC に注目し、セカンドメッセンジャーである cGMP イメージングを行い、におい刺激に対して部位特異的に生じる異なる cGMP 応答を明らかにした (図 4.1)。AWC では cGMP がにおい感受と学習の異なる2つの情報処理に関わると考えられてきた (Bargmann, 2006; de Bono and Maricq, 2005)。cGMP イメージングの結果より、同一のセカンドメッセンジャーによるこうした異なる情報処理は、部位特異的な応答性の違いによって行われているということが示唆された。また、cGMP の応答性より AWC は哺乳類の嗅覚細胞よりむしろ、視細胞に近いということも示された。

第2章と第3章の結果は一貫して線虫神経系においても、他の生物同様に単一神経細胞の部位毎で行われる情報処理に着目して機能を理解する必要があることを示している。従来、線虫は遺伝子と行動を結びつける手法に則って研究が進められてきたため、神経細胞を神経回路内の単一ユニットとする立場で神経機能が同定されてきた。そのため  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングが線虫で可能になった以降も、細胞体や神経線維全体で変化する  $\text{Ca}^{2+}$  応答が神経活動と同義であると見なされていた。近年、首振りに対応して、RIA 神経線維上 (神経環) で領域特異的に  $\text{Ca}^{2+}$  が変化する例が報告された (Hendricks et al., 2012) が、本研究も同様に単一神経細胞内の異なる領域での応答の差を示したものである。ただし、Hendricks らとは異なり  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングだけではなく膜電位イメージングや cGMP イメージングを組み合わせることで、局所的に異なる情報処理が行われている可能性を示した点は本研究の特徴である。



この様に  $\text{Ca}^{2+}$ イメージング法以外のイメージング法を組み合わせることで局所的な情報処理について調べることで、これまで線虫で一般的に考えられてきた  $\text{Ca}^{2+}$ 変化と神経活動が同義であるという考えに疑問を投げかける。AIY における膜電位と  $\text{Ca}^{2+}$ 応答の差はもちろんのこと、AWC の cGMP 応答も  $\text{Ca}^{2+}$ 応答が膜電位応答と異なるということを示唆している。繊毛の cGMP レベルは cGMP 依存型チャネルを制御するため cGMP 応答が  $\text{Ca}^{2+}$ 応答を決めると考えられていた(Bargmann, 2006; de Bono and Maricq, 2005; Usuyama et al., 2012)が、実際は異なる応答を示した。つまり、cGMP がチャネルを制御していると仮定するならば、 $\text{Ca}^{2+}$ イメージングで見ている  $\text{Ca}^{2+}$ 応答は膜電位をそのまま反映していない可能性がある。本研究と同様に、侵害刺激を受容する ASH において、細胞体と軸索で見える  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングの結果が膜電位の変化を評価しているものではないことが示されている(Zahratka et al., 2015)。この論文内で特に細胞体ではセロトニンの存在下で膜電位と  $\text{Ca}^{2+}$ の侵害刺激に対する応答性の増減が異なることも示されており、 $\text{Ca}^{2+}$ イメージングで見られている  $\text{Ca}^{2+}$ 応答が膜電位変化でないことを示す知見も増えている。

以上から、本研究の意義としては、種々のイメージング手法を組み合わせることで、単一神経細胞の局所で行われる情報処理の重要性を示した点である。

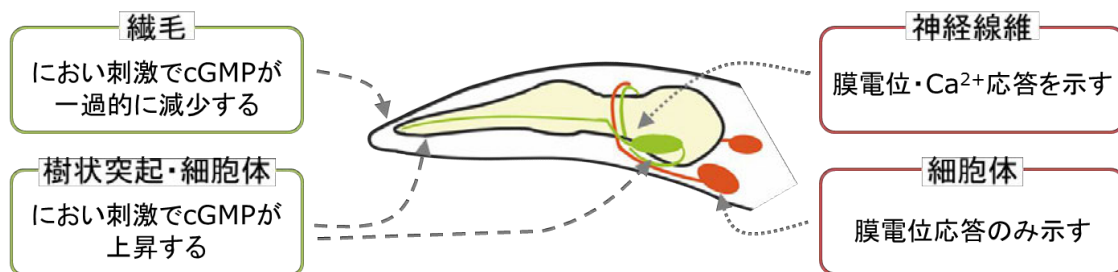


図 4.1 本研究のまとめ

本研究では AIY (赤) と AWC (緑) の単一神経細胞において、部位特異的に異なる応答を示すということを明らかにした。

## 4.2 線虫単一神経細胞の機能解明における今後の展望

これまでマウスを始め多くの生き物で単一神経細胞内の局所に注目した情報処理に関わる研究が行われてきた。本研究では、これまでこうした視点において研究がほとんどされてこなかった線虫系においても、単一神経細胞の局所で情報処理が行われることを示すことができた。すでに、多くの生き物で局所の情報処理について明らかにされており、様々な知見が存在するため、新たにこうした視点を線虫系へ持ち込むことは無意味に思われてしまうかもしれない。しかしながら、線虫系においてすでに蓄積されてきた知見や、モデル生物のユニークさから、線虫で局所的な情報処理について調べることは神経科学分野で大きく貢献できると考える (図 4.2)。

線虫は遺伝学を背景に発展してきているため、遺伝情報に関する多くの知見がある。さらに、形質転換が容易で体が透明であることから、*in vivo*での観察系として非常に有用である。こうしたメリットを生かして、遺伝学的に導入し使用することのできる様々な技術が線虫で導入されてきた。特にイメージングや光遺伝学に関しては多くの実験がなされている(Fang-Yen et al., 2015; Husson et al., 2013; Kerr, 2006)。イメージング法に関してはCa<sup>2+</sup>はもちろんのこと、膜電位(Flytzanis et al., 2014)、cGMP(Couto et al., 2013)、グルタミン酸(Marvin et al., 2013)や、細胞内シグナルに大きく関わる Ras などのイメージングを行った例(Banerjee et al., 2015; Tomida et al., 2012; Uozumi et al., 2012)が線虫ではある。一方で、光遺伝学的手法に関しては ChR2 や NpHR などの細胞を興奮・抑制するチャネル(Husson et al., 2013)だけではなく、光刺激によって cGMP 産出を行うタンパク質(Gao et al., 2015)や Ca<sup>2+</sup>を放出するタンパク質(Fukuda et al., 2014)などがすでに用いられている。これだけ様々な種類のタンパク質が用いられているのは形質転換が容易なうえ、すでに変異体を用いた研究から細胞内シグナル伝達経路が知られているためであると考えられる。また、*in vivo*での感覚神経細胞についてこうしたイメージング手法を用いることができる点も線虫特有のメリットである。線虫は透明であることから、本研究の様に感覚神経細胞での局所的な情報処理について調べることができた。線虫の感覚神経系は特定の刺激に対する役割が特化しており、特定の刺激に対する情報処理を明らかにする上でシンプルなモデルとして扱うことができる。そのため、他の生物では体の構造から調べるのが困難な感覚神経細胞末端で起こるシグナル伝達について *in vivo*で調べることができる。例えば、AWC が視細胞に近いという点から、実際の視細胞も第 3 章で明らかとなった局所的な cGMP 応答性を持っている可能性がある。

一方で、線虫単一神経細胞の機能解析を行う上でのデメリットは、線虫では電気生理学

的手法を用いることが難しい点である。また、仮に電気生理が行えたとしても、細胞を露出させる過程で元の空間配置が崩れてしまい局所での機能を解析するのは困難さを伴う。また、線虫は体がクチクラ層で覆われているため薬理刺激が困難であるという問題も抱えている。しかし、先述の様にイメージング手法と光遺伝学的手法が線虫系の研究で非常に有用なツールとして用いられており、それぞれの技術がさらに発展することで電気生理学的手法を用いなくても線虫単一神経細胞の情報処理様式の解明は進むと考えられる。Ca<sup>2+</sup>放出のコントロール(Fukuda et al., 2014)の様に光遺伝学的手法で神経伝達物質や神経調節物質をコントロールすることができれば、線虫系ならではの単一神経細胞の機能解明が可能となるだろう。

また、顕微鏡等の観察系の発展も単一神経細胞の機能解析を行う上で大きな役割を担う。線虫全体のサイズが小さいというメリットを生かし、頭部線虫神経系全体のイメージングを行う技術はすでにいくつか報告がある(Prevedel et al., 2014; Schrödel et al., 2013) (図 4.3)。こうした技術を応用すれば、神経環に位置する神経線維のイメージングができ、シナプスレベルでの情報処理様式の解明を行える可能性がある。線虫はシナプスレベルで入出力の関係があきらかになっているため、こうした技術は樹状突起上の情報統合がどの様に行われているのか明らかにする手助けとなる。また、イメージングに加えて電子顕微鏡でシナプスの投射関係を改めて調べるといったアイデアもある。すでに、マウスで方向選択性を持った網膜神経節細胞とアマクリン細胞の投射関係をイメージングと電子顕微鏡で調べ、樹状突起上のシナプス入力と方向選択性について調べた報告がある(Briggman et al., 2011) (図 4.4)。線虫系では電子顕微鏡を用いた手法が確立されていることから、イメージングとこうした技術を組み合わせることで、線虫系のメリットを最大限に生かした単一神経細胞の機能解析を行うことができるだろう。

例えば、今回用いた感覚神経細胞 AWC において、こうした技術を組み合わせることでこれまで行われて来なかった感覚神経細胞が行う情報処理について調べることができる (図 4.5 A)。第 3 章で測定した繊毛での cGMP レベルはにおい受容体のすぐ下流でシグナルをさらに下流に伝えていくセカンドメッセンジャーの役割を担う。つまり、繊毛の cGMP 応答は膜電位や Ca<sup>2+</sup>と比較して、より受容体が受け取る入力の情報を反映していると考えられる。一方で、AWC はグルタミン酸を介して次の神経細胞に情報を伝える(Chalasan et al., 2007)ことから、放出されるグルタミン酸の量を測定することができれば、単一神経細胞内でどのような入力を受け、出力を行っているのか正確に測定することが可能である。グルタミン酸を測定する蛍光タンパク質はすでに報告されており(Marvin et al., 2013)、例えば

AIY の様に AWC からグルタミン酸を受ける神経細胞にグルタミン酸感受性蛍光タンパク質 iGluSnFR を発現させれば実際に測定が可能である。

また、AIY などの介在神経細胞に注目し情報統合について調べるような研究も例として挙げられる (図 4.5 B)。AIY でのみ神経線維の  $\text{Ca}^{2+}$  が測定できるような環境で、同時に脳全体のイメージングで行われているような複数神経細胞の応答が測定できるような系を製作する。AIY へ入力を行う神経細胞はすでに知られているので、どの部位にどの神経細胞から入力を受けているのかということを知った上で神経活動をモニタリングすることができる。この様に入力の出所を明らかにすることができる点が、先述したマウス視覚系の方向選択性に関する研究と比較し、線虫系における有利な点であるといえる。こうした系では、神経活動の測定と同時に行動を観察することはできないが、いくつかの介在神経細胞が行動決定の上流に位置することは知られており (Gordus et al., 2015; Gray et al., 2005)、また AIY も神経活動が進行方向に影響を及ぼすため (Kocabas et al., 2012)、AIY の情報統合の結果を行動と結びつけることも可能かも知れない。従って、他の生物ではできない情報統合の研究を行うことができると言える。

これまで展望を含め、線虫系の部位特異的な情報処理に関わる様々な例を示してきた。しかし、こうした部位特異的な情報処理の背景で、結局のところ何が線虫単一神経細胞の情報伝達を担っているのかはわからない。例えば、におい刺激を受けた受容体のすぐ下流で cGMP は減少するが、この cGMP 変化自体が軸索まで、例えば細胞内を拡散することにより直接におい情報を伝達しているとは考えづらい。むしろ、繊毛での cGMP は最初の膜電位の変化を引き起こすきっかけであり、膜電位が軸索までの情報伝達を行っていると考えた方が、情報伝達速度を考えてももっともらしい。もしそうであるのならば、膜電位応答の副次的な応答としての部位特異的な  $\text{Ca}^{2+}$  応答があるだけなのかもしれない。つまり、膜電位を測定することができれば、線虫内での情報処理を読み解けることを意味する。しかし、一方で  $\text{Ca}^{2+}$  の変化と前進速度の変化に相関が見られるような例 (Li et al., 2014) や第 1 章で示したような首振りと神経環の  $\text{Ca}^{2+}$  応答の例 (Hendricks et al., 2012) (図 1.3A) もあり、依然として  $\text{Ca}^{2+}$  を観察すれば情報処理について明らかにできると支持する様な報告もある。

いずれにせよ、シグナル伝達系が詳しく明らかにされている線虫では、注目したい情報伝達のレベルに合わせて、手法を選択し情報処理について明らかにすることができる。以上の理由から今後線虫が単一神経細胞の情報処理様式を明らかにする上で一つの選択肢になり、神経科学分野で貢献できると考えている。

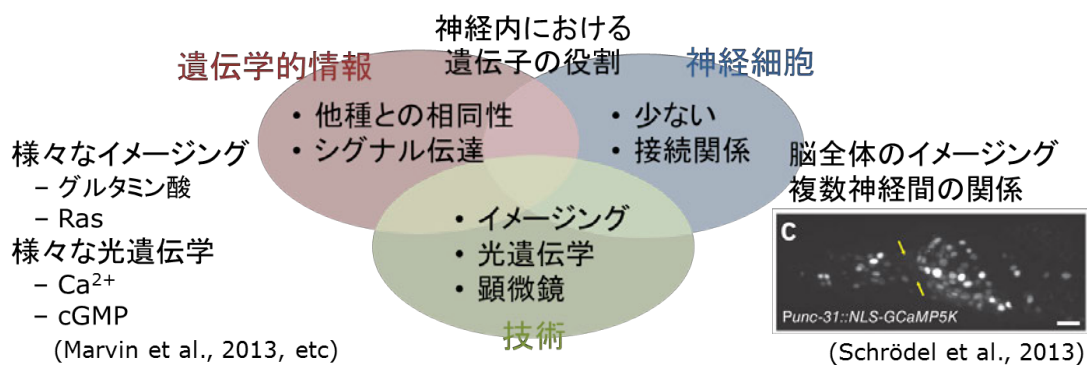


図 4.2 線虫のメリットを生かした単一神経細胞の機能解析

線虫は古くから遺伝学的情報と神経系のシンプルさから神経細胞内における遺伝子の役割が明らかにされてきた。さらに、形質転換が容易であることからイメージングや光遺伝学的手法が発展してきた。近年、遺伝学的情報を利用し、様々な分子のイメージングや光遺伝学が線虫系で用いられてきた (Marvin et al., 2013, etc)。また、神経系の特徴を生かし、脳全体のイメージングが可能となるような顕微鏡の開発も行われてきている (Schrödel et al., 2013 より)。

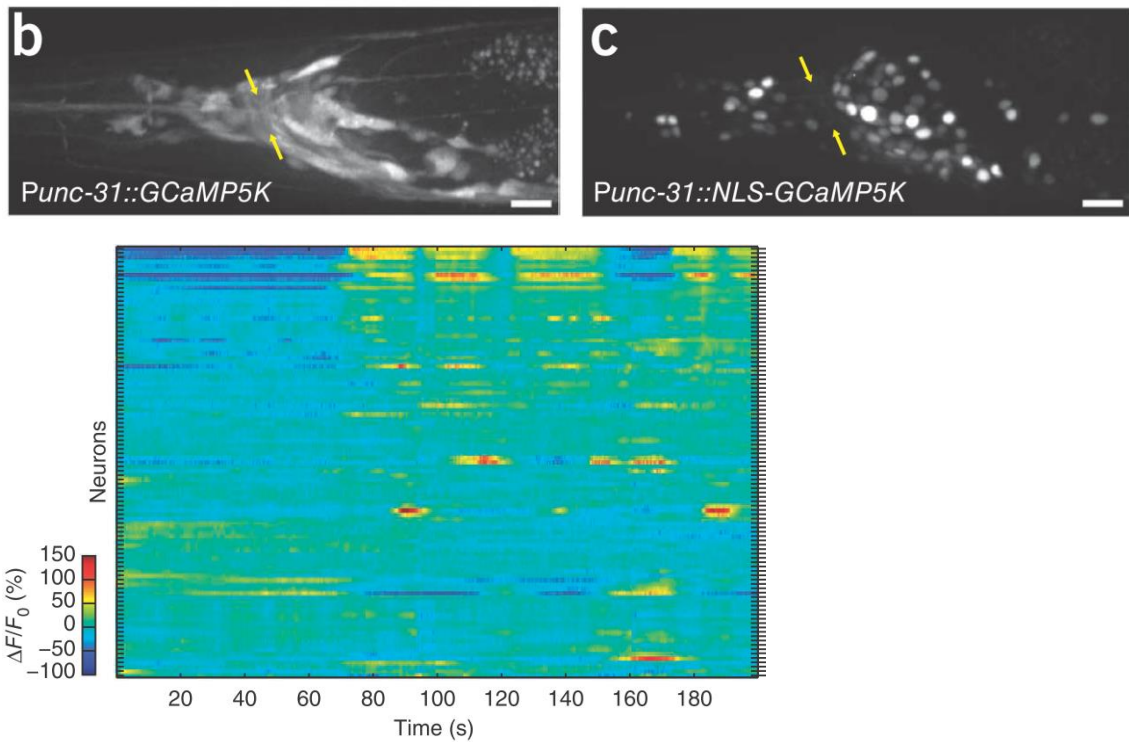


図 4.3 線虫脳全体のイメージング例

(上段) 線虫脳全体に一般的な  $\text{Ca}^{2+}$ インディケータを発現させた線虫 (左) と核に局在する  $\text{Ca}^{2+}$ インディケータを発現させた線虫 (右)。(下段) 実際に上段右の線虫を用いて  $\text{Ca}^{2+}$ 応答を取った結果。縦軸が観察された個々の神経細胞を表しており、横軸が時間を示している。(Schrödel et al., 2013 より)

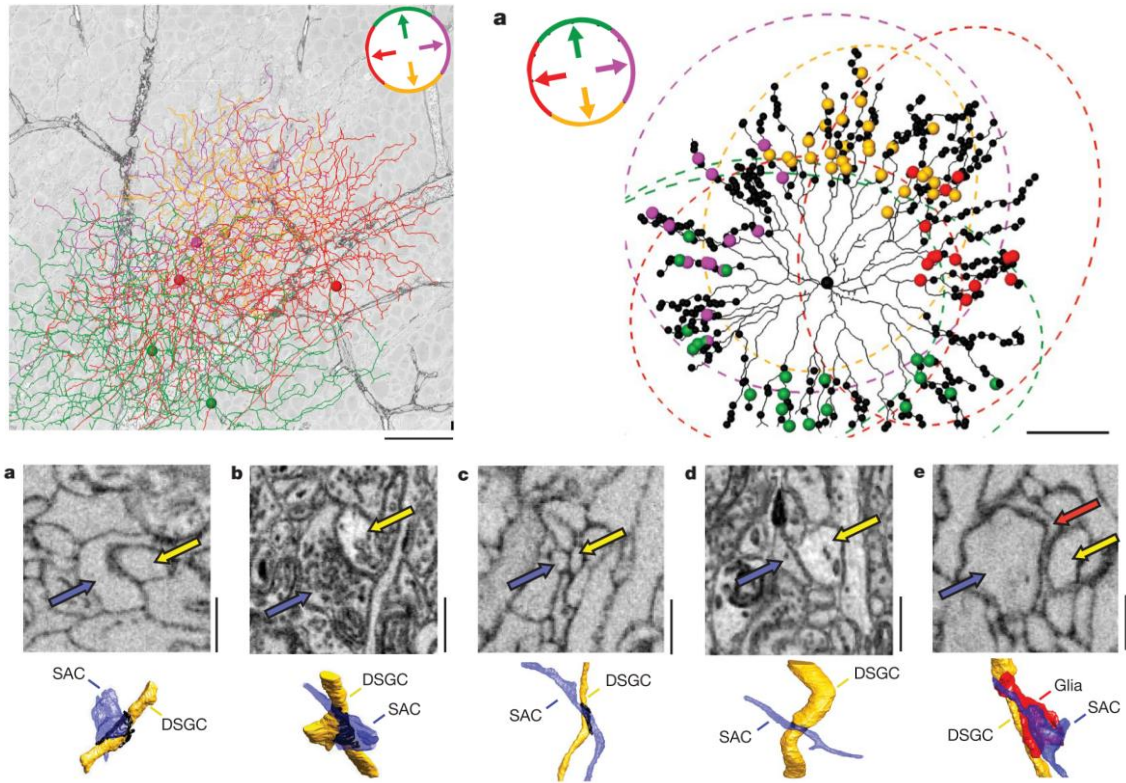


図 4.4 方向選択性網膜神経節 (DSGC) とスターバーストアマクリン細胞 (SAC) の接続関係を二光子顕微鏡と電子顕微鏡から明らかにした例

(上段)カラーで表示されているものは DSGC の細胞もしくはシナプス入力。DSGC から SAC への入力直前に  $Ca^{2+}$  イメージングによって調べられており、カラーは応答する視覚刺激の方向を示している。左図は二光子顕微鏡で個々の神経細胞がどの方向の刺激に対して応答を示すのかを示している。右図の黒で示された神経細胞は SAC であり、どの方向選択性を持つ DSGC とどの部位でシナプス接続をしているのかを示している。(下段) 実際にどのようなシナプス接続を持っているのか示した図。(Briggman et al., 2011 より)

(上段)カラーで表示されているものは DSGC の細胞もしくはシナプス入力。DSGC から SAC への入力直前に  $Ca^{2+}$  イメージングによって調べられており、カラーは応答する視覚刺激の方向を示している。左図は二光子顕微鏡で個々の神経細胞がどの方向の刺激に対して応答を示すのかを示している。右図の黒で示された神経細胞は SAC であり、どの方向選択性を持つ DSGC とどの部位でシナプス接続をしているのかを示している。(下段) 実際にどのようなシナプス接続を持っているのか示した図。(Briggman et al., 2011 より)

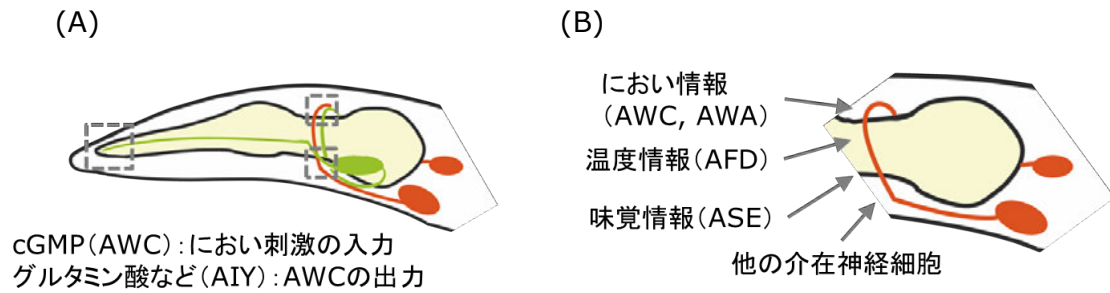


図 4.5 単一神経細胞機能解析の例

(A) AWC の入出力から単一神経細胞で行われる情報処理を明らかにする例。出力側について部位を分けて観察すれば、より詳細な単位での出力を明らかにすることができる。(B) AIY が入力を受ける神経細胞は明らかとなっているため、他の神経細胞の応答を測定しながら、神経線維上の応答を調べることができれば他の生物ではできない情報統合に関する研究を行うことができる。



## 参考文献

- Banerjee S, Versaw WK, Garcia LR (2015) Imaging Cellular Inorganic Phosphate in *Caenorhabditis elegans* Using a Genetically Encoded FRET-Based Biosensor. PLoS One 10:e0141128.
- Bargmann CI (2006) Chemosensation in *C. elegans*. WormBook:1–29.
- Briggman KL, Helmstaedter M, Denk W (2011) Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina. Nature 471:183–188.
- Chalasani SH, Chronis N, Tsunozaki M, Gray JM, Ramot D, Goodman MB, Bargmann CI (2007) Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. Nature 450:63–70.
- Clark DA, Biron D, Sengupta P, Samuel ADT (2006) The AFD sensory neurons encode multiple functions underlying thermotactic behavior in *Caenorhabditis elegans*. J Neurosci 26:7444–7451.
- Couto A, Oda S, Nikolaev VO, Soltesz Z, de Bono M (2013) In vivo genetic dissection of O<sub>2</sub>-evoked cGMP dynamics in a *Caenorhabditis elegans* gas sensor. Proc Natl Acad Sci U S A 110:E3301-10.
- de Bono M, Maricq AV (2005) Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. Annu Rev Neurosci 28:451–501.
- Fang-Yen C, Alkema MJ, Samuel ADT (2015) Illuminating neural circuits and behaviour in *Caenorhabditis elegans* with optogenetics. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 370:20140212.
- Flytzanis NC, Bedbrook CN, Chiu H, Engqvist MKM, Xiao C, Chan KY, Sternberg PW, Arnold FH, Gradinaru V (2014) Archaelhodopsin variants with enhanced voltage-sensitive fluorescence in mammalian and *Caenorhabditis elegans* neurons. Nat Commun 5:4894.
- Fukuda N, Matsuda T, Nagai T (2014) Optical control of the Ca<sup>2+</sup> concentration in a live specimen with a genetically encoded Ca<sup>2+</sup>-releasing molecular tool. ACS Chem Biol 9:1197–1203.
- Gao S, Nagpal J, Schneider MW, Kozjak-Pavlovic V, Nagel G, Gottschalk A (2015) Optogenetic manipulation of cGMP in cells and animals by the tightly light-regulated guanylyl-cyclase opsin CyclOp. Nat Commun 6:8046.
- Goodman MB, Hall DH, Avery L, Lockery SR (1998) Active currents regulate sensitivity and dynamic range in *C. elegans* neurons. Neuron 20:763–772.
- Gordus A, Pokala N, Levy S, Flavell SW, Bargmann CI (2015) Feedback from network states generates variability in a probabilistic olfactory circuit. Cell 161:215–227.
- Gray JM, Hill JJ, Bargmann CI (2005) A circuit for navigation in *Caenorhabditis*

- elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A 102:3184–3191.
- Hendricks M, Ha H, Maffey N, Zhang Y (2012) Compartmentalized calcium dynamics in a *C. elegans* interneuron encode head movement. Nature 487:99–103.
- Husson SJ, Gottschalk A, Leifer AM (2013) Optogenetic manipulation of neural activity in *C. elegans*: from synapse to circuits and behaviour. Biol Cell 105:235–250.
- Kerr RA (2006) Imaging the activity of neurons and muscles. WormBook:1–13.
- Kocabas A, Shen C-H, Guo Z V, Ramanathan S (2012) Controlling interneuron activity in *Caenorhabditis elegans* to evoke chemotactic behaviour. Nature 490:273–277.
- Li Z, Liu J, Zheng M, Xu XZS (2014) Encoding of both analog- and digital-like behavioral outputs by one *C. elegans* interneuron. Cell 159:751–765.
- Marvin JS, Borghuis BG, Tian L, Cichon J, Harnett MT, Akerboom J, Gordus A, Renninger SL, Chen T-W, Bargmann CI, Orger MB, Schreiter ER, Demb JB, Gan W-B, Hires SA, Looger LL (2013) An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission. Nat Methods 10:162–170.
- Prevedel R, Yoon Y-G, Hoffmann M, Pak N, Wetzstein G, Kato S, Schrödel T, Raskar R, Zimmer M, Boyden ES, Vaziri A (2014) Simultaneous whole-animal 3D imaging of neuronal activity using light-field microscopy. Nat Methods 11:727–730.
- Schrödel T, Prevedel R, Aumayr K, Zimmer M, Vaziri A (2013) Brain-wide 3D imaging of neuronal activity in *Caenorhabditis elegans* with sculpted light. Nat Methods 10:1013–1020.
- Tomida T, Oda S, Takekawa M, Iino Y, Saito H (2012) The temporal pattern of stimulation determines the extent and duration of MAPK activation in a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. Sci Signal 5:ra76.
- Uozumi T, Hirotsu T, Yoshida K, Yamada R, Suzuki A, Taniguchi G, Iino Y, Ishihara T (2012) Temporally-regulated quick activation and inactivation of Ras is important for olfactory behaviour. Sci Rep 2:500.
- Usuyama M, Ushida C, Shingai R (2012) A model of the intracellular response of an olfactory neuron in *Caenorhabditis elegans* to odor stimulation. PLoS One 7:e42907.
- Zahratka JA, Williams PDE, Summers PJ, Komuniecki RW, Bamber BA (2015) Serotonin differentially modulates Ca<sup>2+</sup> transients and depolarization in a *C. elegans* nociceptor. J Neurophysiol 113:1041–1050.

## 公刊論文目録および口頭発表目録

### 定期刊行誌掲載論文（主論文に関連する原著論文）

- (1) Shidara, H., Kobayashi, J., Tanamoto, R., Hotta, K., & Oka, K. (2013). Odorant-induced membrane potential depolarization of AIY interneuron in *Caenorhabditis elegans*. *Neuroscience letters*, 541, 199-203.
- (2) Shidara, H., Hotta, K., & Oka, K. Compartmentalized cGMP responses of olfactory sensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience*, in press.

### 定期刊行誌掲載論文（その他の論文）

- (1) Kobayashi, J., Shidara, H., Morisawa, Y., Kawakami, M., Tanahashi, Y., Hotta, K., & Oka, K. (2013). A method for selective ablation of neurons in *C. elegans* using the phototoxic fluorescent protein, KillerRed. *Neuroscience letters*, 548, 261-264.
- (2) Matsumoto, C. S., Shidara, H., Matsuda, K., Nakamura, T., Mito, T., Matsumoto, Y., ... & Ogawa, H. (2013). Targeted gene delivery in the cricket brain, using in vivo electroporation. *Journal of insect physiology*, 59(12), 1235-1241.
- (3) Ogawa, M., Shidara, H., Oka, K., Kurosawa, M., Nukina, N., & Furukawa, Y. (2015). Cysteine residues in Cu, Zn-superoxide dismutase are essential to toxicity in *Caenorhabditis elegans* model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 463(4), 1196-1202.

### 国際会議発表

- (1) \*Shidara, H., Ashida, K., Hotta, K., Oka, K., (2016). The locally distinctive cGMP response in an olfactory sensory neuron of *Caenorhabditis elegans*. *Neuroscience 2016* (Society for Neuroscience), San Diego, U.S.A.
- (2) \*Shidara, H., Kobayashi, J., Tanamoto, R., Hotta, K., Oka, K., (2012). Neural activity visualization of AIY interneuron in *Caenorhabditis elegans* with voltage-sensitive fluorescent protein. *Neuroscience 2012* (Society for Neuroscience), New Orleans, U.S.A.
- (3) \*Makino, M., Shidara, H., Hotta, K., Oka, K., (2013). Response to olfaction in *Caenorhabditis elegans* follows the Weber-Fechner law. *Neuroscience 2013* (Society for Neuroscience), San Diego, U.S.A.

- (4) \*Shidara, H., Makino, M., Hotta, K., Oka, K., (2013). AIY interneurons involved in the cross modality adaptation in *Caenorhabditis elegans*. Neuroscience 2013 (Society for Neuroscience), San Diego, U.S.A.
- (5) \*Makino, M., Shidara, H., Hotta, K., Oka, K., (2014). The synchronized neural activity of olfactory neuron AWC with the head movement in *Caenorhabditis elegans*. Neuroscience 2014 (Society for Neuroscience), Washington, U.S.A.
- (6) \*Ashida, K., Shidara, H., Hotta, K., Oka, K., (2015). Experimental platform for dissecting olfactory system in *C. elegans.*, Chicago, U.S.A.
- (7) \*Ashida, K., Shidara, H., Hotta, K., Oka, K., (2016). Toward the system identification of olfactory learning neurons in *C. elegans*. NIG International Symposium 2016 Japan Q-Bio week, Tokyo Symposium, Tokyo, Japan.
- (8) \*Shidara, H., Ashida, K., Hotta, K., Oka, K., (2016). The compartmentalized cGMP dynamics in a sensory neuron, AWC, of *Caenorhabditis elegans*. CeNeuro2016 (*C. elegans* Topic Meeting: Neuronal development, Synaptic function and Behavior), Nagoya, Japan.
- (9) \*Ashida, K., Shidara, H., Hotta, K., Oka, K., (2016). Early adaptation induces compartmentalized modulation of neuronal activities of sensory and interneuron in *C. elegans*. CeNeuro2016 (*C. elegans* Topic Meeting: Neuronal development, Synaptic function and Behavior), Nagoya, Japan.
- (10) \*Ashida, K., Shidara, H., Hotta, K., Oka, K., (2016). Compartmentalized modulation of sensory and interneuronal activities for odor adaptation in *C. elegans*. Neuroscience 2016 (Society for Neuroscience), San Diego, U.S.A.

## 国内学会発表

- (1) \*設樂久志、芦田慶太、堀田耕司、岡浩太郎, (2016). The compartmentalized cGMP dynamics of the olfactory sensory neuron AWC in *Caenorhabditis elegans*. (線虫 (*C. elegans*) 感覚神経細胞 AWC における部位特異的な cGMP 応答) 第 39 回日本神経科学大会 (日本神経科学学会), 神奈川
- (2) \*設樂久志、小林純也、棚元亮、堀田耕司、岡浩太郎, (2012). Membrane Potential Imaging of interneuron AIY in *Caenorhabditis elegans*. (線虫介在神経細胞 AIY の膜電位イメージング) 第 35 回 日本神経科学大会 (日本神経科学学会), 名古屋

- (3) \*設樂久志、小林純也、棚元亮、堀田耕司、岡浩太郎, (2012). Localized neural activities in AIY interneuron of *Caenorhabditis elegans*: fluorescent imaging study. (線虫 AIY 介在神経細胞での局在した神経活動: 蛍光イメージングによる研究) 第 50 回 日本生物物理学会年会 (日本生物物理学会), 名古屋
- (4) \*設樂久志、小林純也、棚元亮、堀田耕司、岡浩太郎, (2013). 膜電位イメージングが明らかにした線虫 AIY 介在神経細胞での部位特異的な神経活動 新学術領域研究 「蛍光生体イメージ」 第 3 回 Vivid Workshop, 石川
- (5) \*松本 - 佐藤千尋、設樂久志、松田光司、中村太郎、三戸太郎、松本幸久、岡浩太郎、小川宏人, (2013). Control of gene expression pattern within adult cricket brain using in vivo electroporation. (In vivo エレクトロポレーション法を用いた成虫コオロギ脳における遺伝子発現パターンの制御) 第 36 回 日本神経科学大会 (日本神経科学学会), 京都
- (6) \*設樂久志、小林純也、棚元亮、堀田耕司、岡浩太郎, (2013). Cross modality adaptation in *Caenorhabditis elegans*. (線虫における交差順応) 第 36 回 日本神経科学大会 (日本神経科学学会), 京都
- (7) \*設樂久志、小林純也、棚元亮、堀田耕司、岡浩太郎, (2013). The effects induced by different sensory modalities each other in *C. elegans*. (線虫において異なる感覚情報が相互に与える影響) 第 22 回 日本バイオイメージング学会 学術集会 (日本バイオイメージング学会), 東京
- (8) \*小川まり子、設樂久志、岡浩太郎、古川良明, (2013). A worm model describing propagation of protein aggregates in neurodegenerative diseases. (線虫モデルを利用した神経変性疾患における病態伝播のメカニズム解明) 第 51 回 日本生物物理学会年会 (日本生物物理学会), 京都
- (9) \*設樂久志、小林純也、棚元亮、堀田耕司、岡浩太郎, (2013). Sensory stimulation from a specific modality adapts a different modality in *Caenorhabditis elegans*. (線虫においてあるモダリティーが異なるモダリティーの順応を引き起こす) 第 51 回 日本生物物理学会年会 (日本生物物理学会), 京都
- (10) \*小川まり子、設樂久志、岡浩太郎、古川良明, (2014). Investigating the Role of SOD1 Cysteine Residues in Neurodegeneration using *C. elegans*. (タンパク質ジスルフィドの異常が神経変性疾患の発症に果たす役割: 線虫を用いた表現型解析) 第 52 回 日本生物物理学会年会 (日本生物物理学会), 北海道

- (11) \*芦田慶太、設樂久志、堀田耕司、岡浩太郎, (2015). Characterization of the neural system for odor information processing in *C. elegans*. (線虫嗅覚神経系の応答特性解析) 第 38 回 日本神経科学大会 (日本神経科学学会), 神戸
- (12) \*設樂久志、牧野多成、堀田耕司、岡浩太郎, (2015). Sensitivity to odorants of the behavior and neural activities in *Caenorhabditis elegans*. (線虫 (*C. elegans*) の行動と神経活動から見たにおい感度の評価) 第 38 回 日本神経科学大会 (日本神経科学学会), 神戸
- (13) \*設樂久志、牧野多成、堀田耕司、岡浩太郎, (2015). Specific behavior and neural activity of *Caenorhabditis elegans* unveil how exactly it detects difference of odor concentration. (線虫 (*C. elegans*) がかぎ分けられるにおい濃度差を行動と神経活動から明らかにする) 第 53 回 日本生物物理学会年会 (日本生物物理学会), 石川
- (14) \*設樂久志、牧野多成、堀田耕司、岡浩太郎, (2015). 線虫 (*C. elegans*) のにおい感度を行動と神経活動から評価する 第 24 回 日本バイオイメーキング学会 学術集会 (日本バイオイメーキング学会), 東京
- (15) \*芦田慶太、設樂久志、堀田耕司、岡浩太郎, (2015). 線虫における感覚神経細胞と介在神経細胞の同時イメージング 第 24 回 日本バイオイメーキング学会 学術集会 (日本バイオイメーキング学会), 東京
- (16) \*芦田慶太、設樂久志、堀田耕司、岡浩太郎, (2016). Quantification of relations between compartmentalized sensory and interneuronal activities to odor stimulus during early adaptation in *C. elegans*. (線虫の早期嗅覚順応に対する感覚・介在神経細胞間の部分特異的関係性の定量) 第 39 回 日本神経科学大会 (日本神経科学学会), 神奈川
- (17) \*設樂久志、芦田慶太、堀田耕司、岡浩太郎, (2016). Compartmentalized cGMP responses to odor in *Caenorhabditis elegans*' olfactory sensory neurons. (線虫 (*C. elegans*) 嗅覚感覚神経細胞内の領域特異的なにおいに対する cGMP 応答) 第 54 回 日本生物物理学会年会 (日本生物物理学会), 茨城
- (18) \*芦田慶太、設樂久志、堀田耕司、岡浩太郎, (2016). Compartmentalized modulations of sensory and interneurons for early adaptation in *C. elegans*. (線虫の早期嗅覚順応における感覚・介在神経細胞の部分特異的可塑性) 第 54 回 日本生物物理学会年会 (日本生物物理学会), 茨城

## その他

- (1) Shidara, H., & Oka, K. (2015). How variety of time scales in memory could *Caenorhabditis elegans*, a simple and compact neural circuit organism, form? In Sakakibara, M. & Ito, E. (Eds), *Memory Consolidation*. (pp. 1-18). Nova Science Publishers, Inc.

## 謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院理工学研究科後期博士課程在学中に、慶應義塾大学理工学部生命情報学科 岡浩太郎教授の指導の下で行いました。岡先生には、学部1年に授業でお世話になってから、9年間という長い間ご指導いただきました。ご多忙の中、私の研究に気を配っていただき、さらに研究に関することを含め様々なご助言をいただきましたこと、深く感謝しております。研究を行う上で、また研究者として何が大切であるか、日々学ばせていただきました。全てをしっかりと理解できているわけではありませんが、先生から学んだことを心に留め、一人前の研究者として認めていただけるよう、これからも精進していきたいと思えます。改めてになりますが、心より御礼申し上げます。

慶應義塾大学理工学部物理情報工学科 内山孝憲教授ならびに、同大学生命情報学科 土居信英准教授、舟橋啓准教授にはご多忙な中、学位請求論文審査会で副査を引き受けていただき、様々なご指摘とご助言をいただきました。多角的な視点からの議論を提供していただきましたこと、深く御礼申し上げます。

慶應義塾大学理工学部生命情報学科 堀田耕司専任講師には研究を進めるにあたって、多くの議論の場をいただいたとともに、多くのご助言をいただきました。また、堀田先生の未開領域への挑戦していく勢いや、真摯に研究へ向かう姿勢から多くのことを学ばせていただきました。日々、研究の些細なことからいろいろなことで相談に乗っていただき、深く感謝しております。先生から学んだ、研究に対する姿勢を大切に、日々研究に取り組んでいけるよう邁進します。

慶應義塾大学理工学部物理情報工学科 松本佳宣教授ならびに、機械工学科 三木則尚准教授にはマイクロ流体デバイス作製にあたり、研究室を使用させていただきました。本研究の成果は、デバイスなしには成し得なかったものです。ご協力いただきましたことを、深く御礼申し上げます。

理化学研究所 基幹研究所 佐甲細胞情報研究室 荒田幸信博士にはマイクロインジェクション法のご指導賜りました。当研究室のインジェクションの技術が大幅に改善され、様々な実験に挑戦できるようになったのも技術をご教授いただけたおかげです。深く御礼申し上げます。

慶應義塾大学理工学部生命情報学科 新藤豊特任助教には実験手法から研究の進め方まで多くのことを相談させていただきました。ご自身の体験から、的確なアドバイスをいただけたことは、研究を進めていく上で非常に参考になりました。また、山中龍特任助教にも、研究に関して多くのことを相談させていただきました。話している中で、自分が持つ



ていない様々な視点に気づかせていただくことができました。お二方には研究だけではなく、研究生活を過ごして行く上でも大変お世話になりましたこと、深く御礼申し上げます。

研究を進めていく上で多くの議論をさせていただいた、下井利修氏にも深く御礼申し上げます。下井氏の知識量や実験計画の綿密さには、非常に驚かされました。また、研究生活を一緒に過ごし、ご指導いただいた研究室の先輩方にも感謝申し上げます。異なる生物を扱う研究室の中で、多くの思いがけないご助言をいただくことができました。特に、線虫班の先輩である、小林純氏、大野陽平氏、二階達哉氏には御礼申し上げます。小林氏から線虫に関して最も多くのことを、大野氏と二階氏には技術面で多くのことを学ばせていただきました。先輩方なしでは今私が行っている研究成果はありません。

線虫班と一緒に研究を行ってきた、鈴木怜子氏、牧野多成氏、重川千紘氏、芦田慶太氏、服部愛氏、森遙香氏、吉水敏城氏に感謝申し上げます。また、研究室は違いますが一緒に研究を行っていた小川まり子氏にも感謝申し上げます。線虫班として一緒に研究をやっていく中で触発されることは多々あり、研究を進めていく上で非常に励まされました。特に、芦田慶太氏には同じ班として深く研究について議論できたことに感謝しております。知識量の多さなどから学ばせていただくことも多く、博士課程の後半では特に私に影響を与えてくれました。

また、線虫班の鈴木氏も含め研究室で一緒に過ごした同期の永瀬史章氏、山下正芳氏、横山貴星氏、宮澤孝彰氏にも感謝申し上げます。研究室を一緒に過ごした日々はもちろんのこと、幅広く活躍する皆様から研究室を出た後もことある毎に気にかけてもらえたことは支えになりました。

同じ後期博士課程である鈴木李夏氏にはそのストイックさから日々刺激を受けることができました。研究を進めて行く上で励みになったことに感謝申し上げます。研究を行う上でサポートしていただき、特に研究費のことなどご助言いただいた上ヶ迫いとか氏にも御礼申し上げます。そして、紙面では触れることのできなかつた研究室でお世話になった皆様に感謝申し上げます。研究室での 6 年間を楽しく過ごすことができたのは皆様のおかげです。

当研究は日本学術振興会 特別研究員奨励費「線虫行動と感覚受容感度の関係理解を目的とした単一神経細胞の部位特異的情報処理解析（課題番号：14J06037）」の課題のもと行いました。研究費や学会参加において援助いただいたことに感謝申し上げます。また、実験で使用したプラスミドの一部は文部科学省「新学術領域研究 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 総括支援活動（行動解析融合型プラットフォーム支援活動）」より供与していただきました。感謝申し上げます。

最後に、研究を行うにあたりいつも健康を気遣ってくれた家族に感謝いたします。

2017年1月