別紙４

報告番号	※　甲　第　　号

主　論　文　の　要　旨

論文題目　**Dissection of the mechanism underlying individuality of a memory-driven behavior in the nematode *Caenorhabditis elegans* (線虫 *C. elegans* の記憶行動における個体間差異を制御するメカニズムの解析)**

氏　　名　小林　暁吾

論　文　内　容　の　要　旨

記憶・学習といった高次の能力を獲得した生物は、過去の経験をもとに、起こりうる出来事を予測し、生存や繁殖の確率を高める。本研究では、線虫 *C. elegans* の温度走性行動をモデル系として、記憶・学習のメカニズムの解明を試みた。温度走性行動とは、一定の温度で、餌の存在する条件下で飼育された個体が、餌のない温度勾配上で、過去に体験した飼育温度へ移動する行動である。この行動をつかさどる神経回路が同定されており、その回路の最も上流に位置するのが、温度受容細胞である AFD ニューロンである。興味深いことに、AFD ニューロンは飼育温度を細胞単独で記憶している可能性があることが示唆されていたが、既存の実験系では、AFD ニューロンと神経接続する細胞や神経内分泌因子の関与を完全には排除することができず、細胞単独での記憶形成を検証することは不可能であった。

そこで本研究では、AFD ニューロンの初代培養系を確立し、AFD ニューロンを他の細胞から完全に隔離した条件下で、温度記憶が形成されるか検証を行った。具体的には、まず、神経活動の指標である細胞内カルシウムイオン濃度の変化に応じて蛍光強度が変化する GCaMP3 分子が AFD ニューロン特異的に発現する線虫系統を樹立し、その系統の個体群から胚細胞を単離して AFD ニューロンの初代培養系を確立した。次に、初代培養 AFD ニューロンが、培養温度を記憶するかを、カルシウムイメージングで検証したところ、培養温度依存的な温度応答が観察されたことから、AFD ニューロンにおける記憶形成は、他の細胞との相互作用を必要としないことが示された。

AFD ニューロンによる飼育温度依存的な温度応答には、サンプルごとのばらつきが観察された。23℃飼育の野生株の AFD ニューロンは、14℃から 24℃への温度上昇刺激に対し、あるサンプルは 19℃付近で、また別のサンプルでは 22℃付近において細胞内カルシウムイオン濃度上昇が観察された。この AFD ニューロンの温度応答のばらつきは、試行間差異（trial-to-trial variability）と、個体間差異（animal-to-animal variability）のどちらに起因するのか、同一の AFD ニューロンを 6 回連続して応答温度を計測したところ、試行間差異はおよそ 0.4 ºC であったのに対し、個体間差異はおよそ 1.4ºC であった。この結果から、AFD ニューロンは細胞単独で温度を記憶するが、その記憶に基づいた温度応答には、ある一定レベルの個体間差異が存在することが示された。

この AFD ニューロンの温度応答の個体間差異は、*cmk-1* 遺伝子の機能が欠損することで異常に増大した。*cmk-1* 遺伝子は生物種を超えて広く保存されたカルシウム-カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ CaMKI/IV の線虫ホモログ CMK-1 をコードする。23℃飼育の *cmk-1* 変異体の AFD ニューロンの温度応答は、試行間差異はおよそ 0.5 ºC であったのに対し、個体間差異はおよそ 3.9 ºC であり、16.0 ºC から 21.0 ºC という広い温度域で温度応答が観察された。この異常は、野生型 *cmk-1* cDNA を AFD ニューロン特異的に発現させることで回復したことから、CMK-1 は、AFD ニューロンで細胞自律的に機能し、温度応答の個体間差異を負に制御していることが示された。

次に、線虫の全タンパク質に対して、ヒトの CaMKI タンパク質を用いたリン酸化プロテオミクス解析を実施し、ヒト CaMKI のリン酸化標的分子の候補として 38 の線虫タンパク質を同定した。これらのタンパク質のうち、Raf が欠損した *lin-45* 変異体では、*cmk-1* 変異体とは反対に、AFD ニューロンの温度応答のばらつきの減少が観察された。Raf は、線虫からヒトまで保存された Raf-MEK-ERK-MED23 という分子経路を形成していることが知られている。そこで、これらをコードする遺伝子の変異体についても温度応答の解析を実施したところ、*lin-45* 変異体と同様に、MEK、ERK、MED23 いずれの欠損によっても AFD 温度応答のばらつきの減少が観察された。これらの結果から、CMK-1 は Raf をリン酸化すること、Raf 経路は AFD 温度応答の個体間差異を正に制御していることが示された。

cmk-1 遺伝子の機能欠損は温度走性行動にも異常を引き起こし、野生株が温度勾配上において飼育温度付近に分布するのに対し、*cmk-1* 変異体は、より広い温度域に分布した。この異常は、野生型 *cmk-1* cDNA を AFD ニューロン特異的に発現させることで回復する一方で、キナーゼ活性を持たない不活型 *cmk-1* cDNA では温度走性行動異常の回復が観察されなかった。このことから、AFD ニューロンにおける CMK-1 のキナーゼ活性が温度走性行動の成立に必須であることが示された。さらに、*cmk-1* 変異体では、AFD ニューロンだけでなく、AFD ニューロンと後シナプス接続する AIY 介在ニューロンにおいても、飼育温度に依存した温度応答のばらつきに増大が観察された。この AIY ニューロンの異常も、野生型 *cmk-1* cDNA を AFD ニューロン特異的に発現させることで回復した。これらの結果から、CMK-1 は AFD ニューロンにおいて Raf 経路と相互作用して AFD 温度応答の個体間差異を制御することで、下流の神経回路動態および、温度走性行動における個体間差異も制御することが示された。