

塩濃度記憶の分子・神経機構の解明

國友 博文, 飯野 雄一, 佐藤 博文

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

概要 刻々と変化する環境に適応し生存競争を勝ち抜くために学習は必須であり, その能力は比較的単純な神経系をもつ動物にも備わっている。記憶に基づいて学習行動が生じる仕組みを明らかにするには, 感覚, 記憶, 運動などの各要素がそれぞれ神経回路のどこで, どのように情報処理されているか特定することが必要である。

土壤線虫 *C.エレガンス* は, 塩化ナトリウムの濃度勾配上に置かれると餌を経験した塩濃度に向かい, 飢餓を経験した濃度を避けるように移動する。餌と塩濃度いずれの条件が変わっても異なる行動を生じることから, 線虫の塩走性は餌と塩濃度を関連付けて記憶する連合学習と考えられる。線虫が餌を経験した塩濃度に向かう行動には, たった1つの感覚神経, ASER からの入力が必要十分である。ASER は塩濃度の低下によって興奮する。ASER からの塩情報がどのように経験依存的な塩走性行動を生じるか明らかにするため, 本研究では ASER から入力を受ける介在神経の役割について調べた。その結果, 3種類の一次介在神経のうち, AIY は低塩濃度への走性, AIA は高塩濃度への走性に必須な役割をもつことが明らかになった。また AIB は他の神経と並行して, 高塩, 低塩両方向への走性に寄与することが明らかになった。

学習に関わる新奇遺伝子を探索するため, 塩走性に欠損を示す変異体を単離し原因遺伝子を同定した。その結果, CLC 型クロライドチャンネルをコードする *clh-1* 遺伝子とジアシルグリセロールキナーゼをコードする *dgk-1* の塩走性への関与が明らかになった。CLC チャンネルは種を越えて広く保存されており, CLH-1 と相同性の高い哺乳類の CIC-2 は, 膜電位を過分極させ神経細胞の興奮を抑制することが示されている。組織特異的機能回復実験から, *clh-1* と *dgk-1* はいずれも ASER で機能することが示唆された。

1. 研究の目的と背景

環境の変化に適応し生存競争を勝ち抜くために学習は必須であり, その能力は比較的単純な神経系をもつ動物にも備わっている。土壤線虫 *C.エレガンス* は, 塩 (塩化ナトリウム) の濃度勾配上に置かれると餌を経験した塩濃度に向かい, 飢餓を経験した塩濃度を避けるように移動する (塩濃度学習, Fig. 1)^(1, 2)。餌と塩濃度のいずれの条件を変えても走性が変化することから, 塩濃度学習は餌を無条件刺激, 塩濃度を条件刺激とする連合学習と考えられる。我々は, 線虫の塩濃度学習をモデルとして味覚記憶の分子メカニズムを解明し, 行動可塑性を生じる神経機構を明らかにすることを目指している。

線虫の塩濃度学習において, 個体の移動方向は経験塩濃度の高低と餌の有無の二つの条件の違いそれぞれ

に応じて逆転している。これまでの研究から, 餌を経験した塩濃度に向かう走性には個体の頭部にある味覚神経 ASER からの塩情報の入力が必要十分であり, ASER と一次介在神経の間のシナプス伝達の可塑性が行動を変化させる原因の一つであることがわかっている⁽¹⁾。ASER は K^+ , Na^+ , Cl^- , Br^- , I^- などの濃度低下により細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する⁽³⁻⁵⁾。ASER は常に塩濃度の低下により脱分極し, その極性は経験塩濃度を変えても, 飢餓条件下でも変化しない。但し ASER の塩応答は経験塩濃度が高いほど大きくなる傾向があり, その応答性を調節する仕組みが記憶の一部を担っていると考えられる⁽¹⁾。

ASER は 3 種類の一次介在神経, AIA, AIB, AIY にシナプス接続している⁽⁶⁾。このうち, AIB への情報伝達は飼育塩濃度に依存して大きく変化する。飼育塩濃度が高か

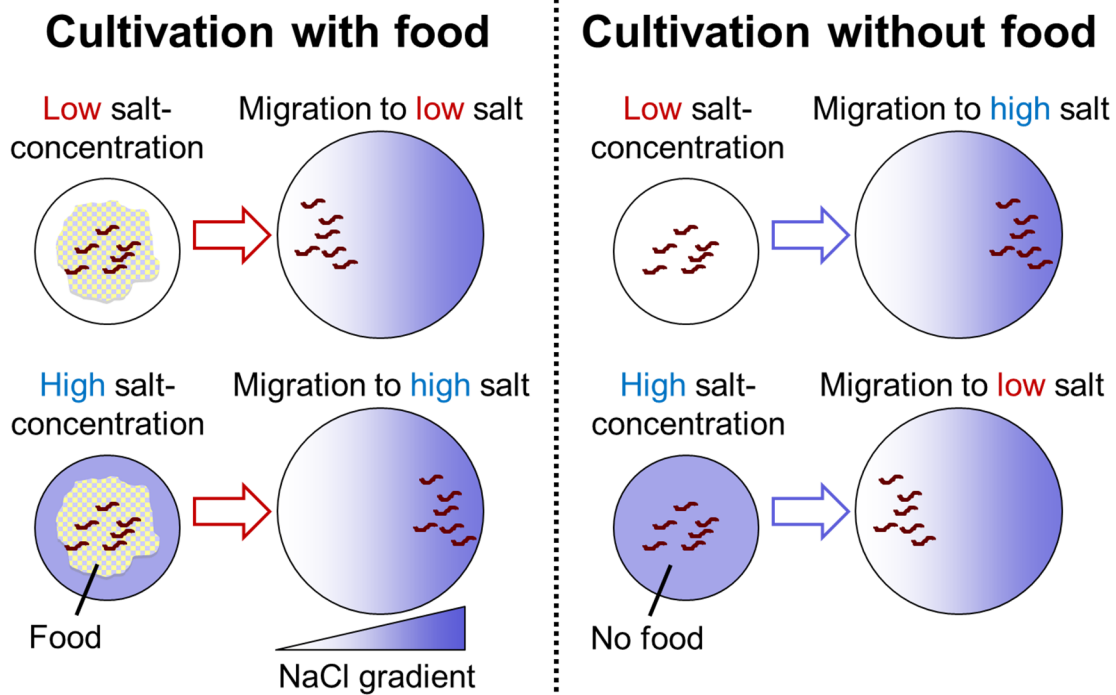


Figure 1. Salt chemotaxis learning of *C. elegans*

Wild-type *C. elegans* animals are attracted to the concentration at which they have been fed (left), whereas they avoid it if they have been starved (right).

った場合、AIB は塩濃度が低下すると ASER に連動して脱分極するが、飼育塩濃度が低かった場合には AIB は応答しない。AIB の応答と線虫の行動には強い相関が見られることから、ASER から AIB へのシナプス伝達の可塑性が飼育塩濃度に依存した行動の逆転を制御している可能性が示唆された。ところが、AIB を破壊した個体は塩濃度学習に部分的な欠損しか示さず、他の介在神経も寄与することが明らかになった⁽¹⁾。

飢餓条件による行動の逆転には、味覚神経におけるインスリンシグナル伝達経路のはたらきが必要なことが既にわかっている^(7, 8)。インスリン様ペプチドをコードする *ins-1*、インスリン受容体の *daf-2*、または PI3-K の *age-1* などの変異体は、餌を経験した塩濃度への走性には全く異常を示さない。ところが、これらの変異体に飢餓を経験させ塩走性を観察すると、餌を与えたときと同様に経験塩濃度に向かう行動を示す^(4, 7)。このことから、これらの遺伝子は飢餓の情報に依存して行動を逆転させる機構に関与していることが示唆される。一方で、塩濃度の高低により行動が調

節される分子機構の理解はあまり進んでいない。

このような状況を踏まえ、本研究では、経験塩濃度に依存した走性行動の逆転を生み出す神経回路の動作機構を明らかにするため、ASER から入力を受ける一次介在神経の細胞破壊実験によりそれらの役割を明らかにした。また分子機構を調べるため塩濃度走性変異体をスクリーニングし、原因遺伝子として CLC 型クロライドチャンネルをコードする *clh-1* を同定した。

2. 研究方法

2.1 線虫株、線虫の培養と遺伝学

線虫の培養および変異原処理、交配、形質転換、トランスジーンゲノム染色体への挿入など分子遺伝学の実験手法は、一般的な方法に従った^(9, 10)。線虫の餌には、大腸菌株 NA22 株を使用した。本研究で用いた線虫株を Table 1 に示した。

介在神経破壊株の作製に用いたコンストラクトは、細胞特異的プロモーターにマウスの *caspase 1* 遺伝子を連結し

Table 1. *C. elegans* strains used in this study

| Strain | Genotype |
|------------|--|
| Bristol N2 | Wild type |
| JN578 | <i>peIs578[npr-9p::caspl npr-9p::venus unc-122p::mCherry]</i> . |
| JN579 | <i>peIs579[txx-3p::caspl ttx-3p::venus lin-44p::gfp]</i> . |
| JN580 | <i>peIs580[ins-1(short)p::caspl ins-1(short)p::venus unc-122p::gfp]</i> . |
| JN604 | <i>peIs578[npr-9p::caspl npr-9p::venus unc-122p::mCherry]; peIs579[txx-3p::caspl ttx-3p::venus lin-44p::gfp]</i> . |
| JN605 | <i>peIs578[npr-9p::caspl npr-9p::venus unc-122p::mCherry]; peIs580[ins-1(short)p::caspl ins-1(short)::gfp unc-122p::gfp]</i> . |
| JN1693 | <i>peIs579[txx-3p::mcasp1 ttx-3p::venus lin-44p::gfp] peIs580[ins-1(short)p::mcasp1 ins-1(short)::venus unc-122p::gfp]</i> . |
| JN572 | <i>clh-1(pe572) II</i> . |
| JN2201 | <i>dgk-1(pe2201) X</i> . |

作製した⁽¹¹⁾。用いたプロモーターは、AIA:*ins-1(s)*プロモーター⁽⁸⁾、AIB:*npr-9*プロモーター⁽¹²⁾、AIY:*txx-3*プロモーター⁽¹³⁾である。

2. 2 行動アッセイ

塩濃度学習の行動アッセイは既報に従った⁽¹⁾。塩走性を定量化するため、塩走性指数(Chemotaxis index)を算出した。塩走性指数 = {(高塩濃度側の個体数) - (低塩濃度側の個体数)} ÷ {(全個体数) - (全く移動しなかった個体数)}である。塩走性指数が大きいほど、高塩濃度側へ移動した虫の割合が高かったことを示す。行動分析(クリノキネシスの定量化)は既報に従った⁽¹¹⁾。

2. 3 塩濃度学習変異体のスクリーニング

餌を経験した塩濃度に向かう走性に欠損を示す変異体を得るため、変異原処理した線虫の孫(F2)世代 12,000 ゲノム相当を複数のグループに分け塩濃度学習アッセイを行った。餌あり・0 mM NaCl で飼育した後の塩走性に異常を示す線虫を回収した。その個体の子孫を用いて同様に行動アッセイを行い、変異体の割合を高めた。これを 6 回繰り返し、最後は1つのグループから 1 匹のみを選び互いに独立な変異体の候補を 17 株得た。そこから運動性や塩濃度の感知に異常がある変異体を除き、6 株の塩走性変異体を得た。

2. 4 変異表現型の原因遺伝子の同定

塩走性変異体を野生株 N2 でバッククロスした後、N2 と

別の野生株 CB4856 の間の SNP を利用したマッピングを行った⁽¹⁴⁾。最終的な原因変異の同定は、塩走性表現型の機能相補実験と塩基配列解析により決定した。

3. 結果と考察

3. 1 ASE の一次介在神経, AIA, AIB, AIY の遺伝学的破壊株の作製

AIA (JN580), AIB (JN578), または AIY (JN579) 特異的にマウスの *caspase 1* 遺伝子を発現させた線虫株を作製した。蛍光レポータータンパク質の発現を指標として細胞の有無を観察したところ、いずれも 96%以上の高い効率で細胞破壊が見られた(Fig. 2A-C)。レーザーを照射して細胞を破壊した個体の行動解析から、AIA と AIY は自発運動中の方向転換を抑制し、逆に AIB は方向転換を促進することが報告されている^(15, 16)。今回作製した細胞破壊株の方向転換頻度を測定したところ、AIA または AIY の破壊株では野生型に比べて有意に方向転換頻度が高く、逆に AIB 破壊株では方向転換頻度が低かった(Fig. 2D)。これらの結果は既報と一致し、各細胞が正しく破壊されていることが示唆された。

3. 2 AIY は低塩濃度, AIA は高塩濃度への走性に必要である

一次介在神経破壊株の塩走性を観察したところ、AIY 破壊株は低塩濃度への走性、AIA 破壊株は高塩濃度へ

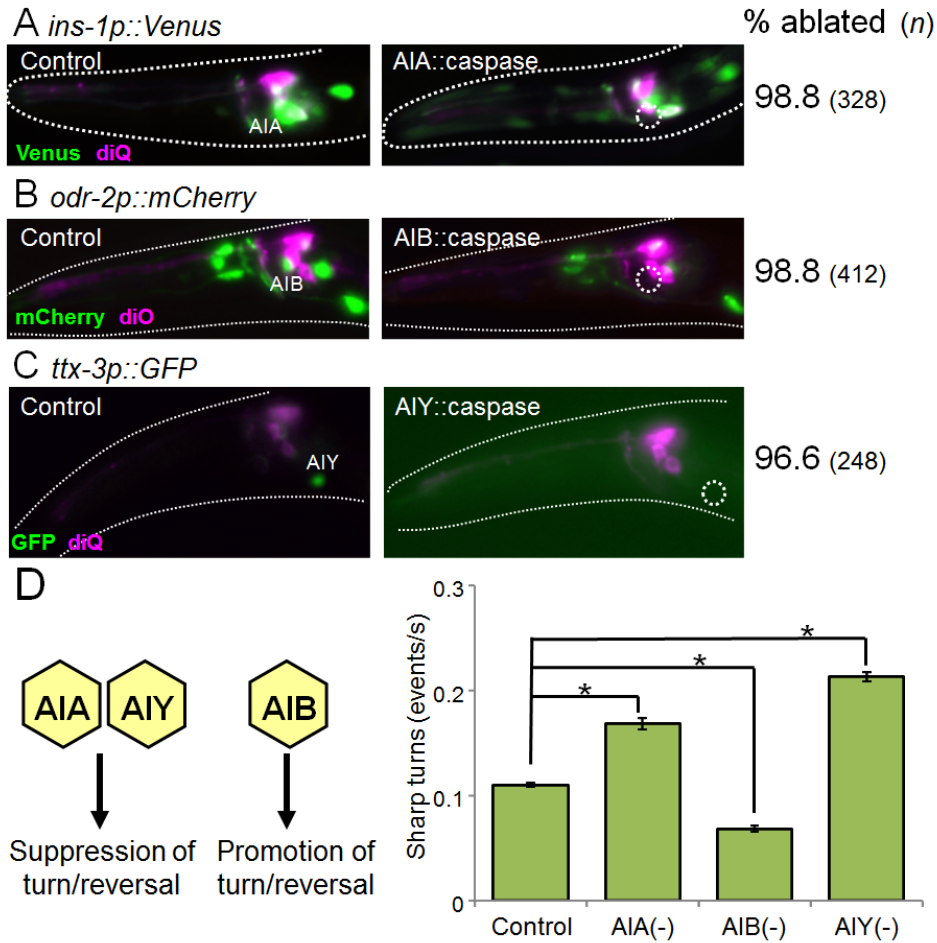


Figure 2. Creation of interneuron-ablated animals

A-C, Images of the head region of fluorescent protein-expressed animals. Wild-type background (left panels) and cell-ablated animals (right panels). *ins-1p::venus* (green) overlaid with lipophilic dye diQ that stains 5 pairs of sensory neurons (magenta) (**A**), *odr-2p::mcherry* (green) overlaid with diO (magenta) (**B**), *ttx-3p::gfp* (green) overlaid with diQ (magenta) (**C**). **D**, Frequency of sharp turns of the interneuron-ablated animals. *; $p < 0.05$.

の走性に欠損を示した (**Fig. 3A**)。いずれの株でも飼育塩濃度に依存した塩走性の傾向は残っており、介在神経はそれぞれが単独で特定の移動運動を担っているのではないことが明らかになった。LIM ホメオドメイン転写因子をコードする *ttx-3* 遺伝子は AIY の細胞運命決定に必須である⁽¹⁷⁾。*ttx-3* 変異体は AIY 破壊株と同様、低塩濃度への走性に欠損を示した (**Fig. 3A**)。

線虫の塩走性では、移動運動中の方向転換頻度が変化するクリノキネシス (klinokinesis, または biased random walk) と呼ばれる進路決定機構がおもに用いられている⁽¹⁸⁾。すなわち、線虫は目的の塩濃度に向かう際、移動に伴う塩濃度の変化を感知して間違った方向に進んでいる

と方向転換頻度を上昇させ、正しい方向に向かっているときには方向転換頻度を低下させる。AIA 破壊株と AIY 破壊株について行動を分析したところ、AIY 破壊株は低塩濃度飼育後の塩濃度低下に対する方向転換頻度の抑制に欠損を示した (**Fig. 3B**)。これに加えて、高塩濃度飼育後の塩濃度低下に対する方向転換頻度の上昇にも欠損が見られた (データは示さない)。一方 AIA 破壊株では、高塩濃度飼育後の塩濃度低下に対する方向転換頻度の上昇に欠損が見られ (**Fig. 3C**)、これ以外の条件で異常は見られなかった (データは示さない)。これらの結果は、AIY や AIA が塩濃度低下時のクリノキネシスの調節に必要なことを示す。一方、AIA または AIY を破壊した株の塩

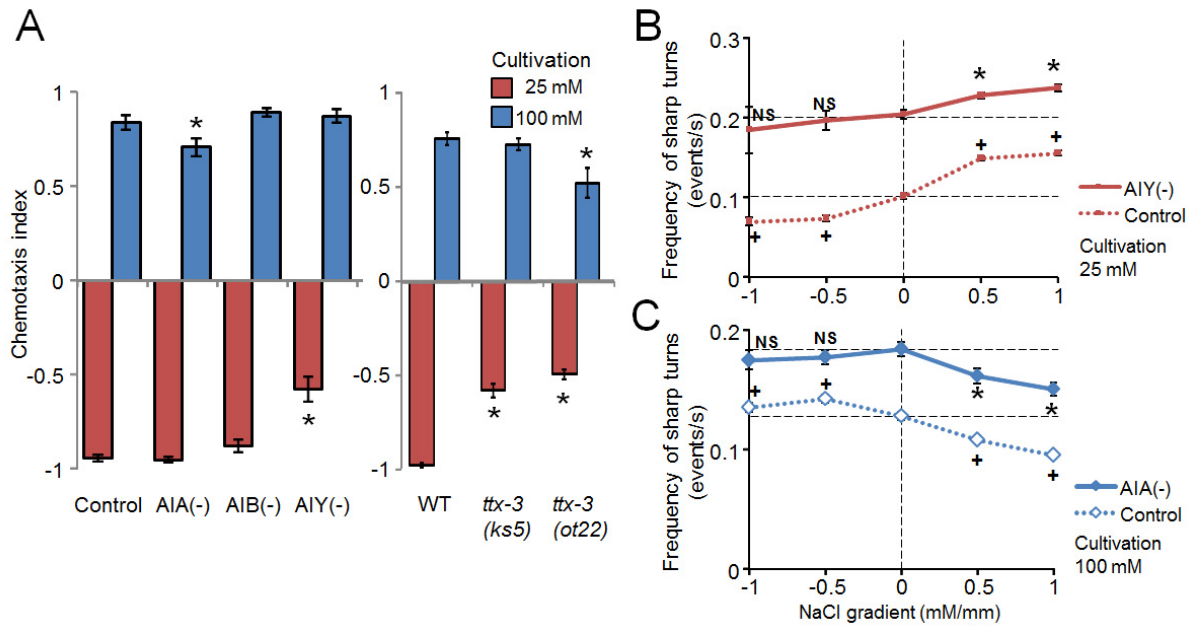


Figure 3. AIIY is required for chemotaxis to low salt, whereas AIA is required for chemotaxis to high salt
A, Salt chemotaxis of the individual cell class-ablated animals (left) and *ttx-3* mutants that have defects in AIIY functions (right). *; difference from wild-type, $p < 0.05$. **B** and **C**, Frequency of sharp turns of AIIY-ablated animals cultivated with 25 mM NaCl (**B**). Results of AIA-ablated animals cultivated with 100 mM NaCl (**C**). +; difference from no salt gradient in wild type, *; difference from no salt gradient in the same ablated animals, $p < 0.05$, NS; not significant.

走性の欠損は特定の塩濃度を経験した後に限定されていたことから、塩情報は並列して互いに補完する複数の介在神経回路に伝達され走性行動を生じているか、各介在神経が特定の条件のみで行動を制御している可能性が示唆された。

クリノキネシスに欠損を示すのに塩走性の表現型が観察されない理由には、(1)高塩濃度側と低塩濃度側のどちらに向かうかという塩走性の極性は、それぞれの方向に進んでいるときの方向転換頻度の差分により決定される。そのため、塩濃度低下に対する応答が異常でも塩濃度の上昇に対する応答が正常であれば極性は保たれる、(2)クリノキネシス以外の進路決定機構がクリノキネシスの異常を補完している⁽¹⁹⁾、などが考えられる。前者の可能性について調べるため、塩濃度の低下に対する方向転換頻度と塩濃度の上昇に対する方向転換頻度の差(クリノキネシス指数)を計算した(**Fig. 4**)。高塩濃度飼育後のAIIY破壊株のクリノキネシス指数は、同条件の野生型と差はなかった。この結果は、AIIY破壊株が高塩濃度への走性に異常を示さないことと一致する。AIIYは塩濃度低下時のクリノキ

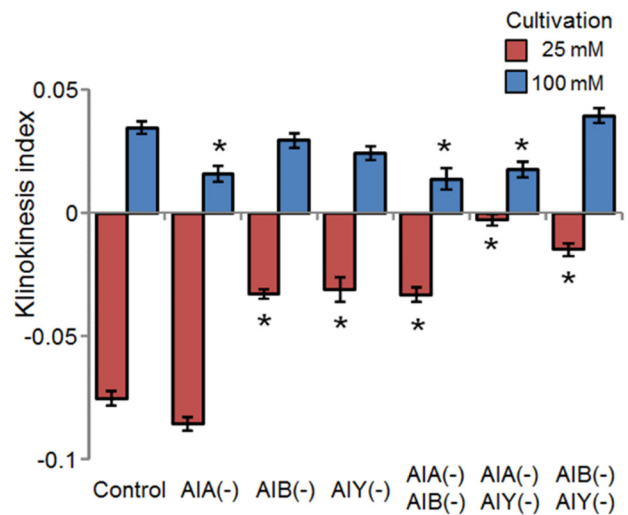


Figure 4. Defective klinokinesis in the interneuron-ablated animals
 Klinokinesis index was defined as the difference of frequency sharp turns between negative NaCl gradient and positive NaCl gradient. *; difference from wild type, $p < 0.05$.

ネシスの調節に必要であるが塩濃度上昇時の調節には関与しないため、破壊株は高い塩濃度に向かう能力を保持しており高塩濃度への塩走性には欠損を示さなかったと考えられる。

3.3 一次介在神経は塩情報を分散処理する

ASE からの塩情報が並行する神経回路で処理されている場合、それらを同時に破壊すると、別個に破壊したときよりも顕著な塩走性欠損が生じると考えられる。この可能性を調べるため、複数の一次介在神経を同時に破壊した線虫株の塩走性行動を観察した (Fig. 5A)。その結果、AIA 神経の破壊による高塩濃度への走性の欠損は AIB または AIY を同時に破壊することにより増強された。また、AIY 破壊株の低塩濃度への走性の欠損は AIA または AIB を同時に破壊することにより増強された。特に、AIA と AIY を同時に破壊した個体は、高塩濃度、低塩濃度どちらの走性も著しく弱まった。これらの結果は、高塩濃度経験後に高塩濃度に向かう走性には AIA、低塩濃度経験後に低塩濃度に向かう走性には AIY が大きな役割を果たすが、いずれの神経も逆方向への走性にも寄与していることを示す (Fig. 5B)。また AIB 単独の破壊は顕著な表現型を示さなかったが、AIA または AIY と同時に破壊すると塩走性異常の表現型が強まった (Fig. 5A)。AIB は AIA や

AIY と並行して塩情報を処理し、高塩濃度および低塩濃度への走性を強めるようにはたらいっている可能性が考えられる (Fig. 5B)。ASE からシナプス入力を受ける AWC 嗅覚神経が介在神経としてはたらき、急激な塩濃度変化に対する行動を調節することが報告されている⁽²⁰⁾。多重破壊株では ASE からの塩情報が他の感覚神経を介して処理され走性を生じている可能性がある。

二重破壊株についてクリノキネシス指数を計算した (Fig. 4)。二重破壊株の指数の傾向は塩走性の表現型と良く一致し、クリノキネシスが塩走性の極性を決める主要な進路決定機構であることが示唆された。興味深いことに、塩走性の表現型に欠損を示さない AIB 破壊株は、低塩濃度飼育後のクリノキネシス指数が野生型に比べて有意に大きかった。

3.4 CLC 型クロライドチャンネルをコードする *clh-1* の変異は餌を経験した塩濃度への走性に欠損を示す

塩濃度学習の分子機構を調べるため変異体をスクリーニングし、原因変異を同定した。特に塩濃度の高低に応じた行動の調節に関与する遺伝子を見出すため、餌を経験した塩濃度に向かう走性に欠損を示し、かつ飢餓による行動の逆転には異常を示さない変異体に注目した (Fig. 6A)。これらのうち JN572 と JN577 は CLC 型クロライドチャ

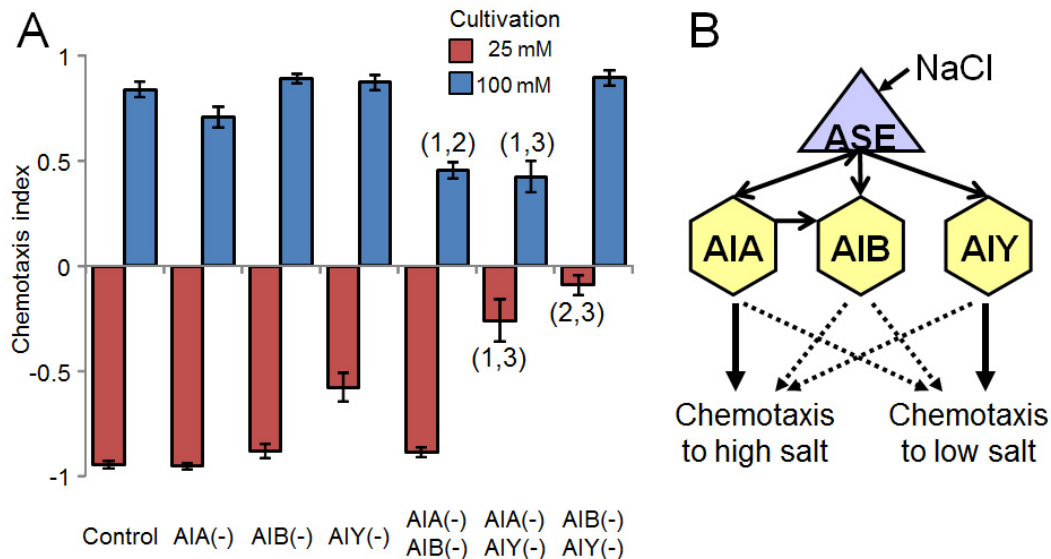


Figure 5. Salt information is transmitted through parallel interneuron circuits

A, Chemotaxis of doubly interneuron-ablated animals. Numbers in parentheses indicate significant difference from AIA-ablated animals (1), AIB-ablated animals (2) and AIY-ablated animals (3), $p < 0.05$. **B**, Hypothetical roles of the interneurons in salt chemotaxis.

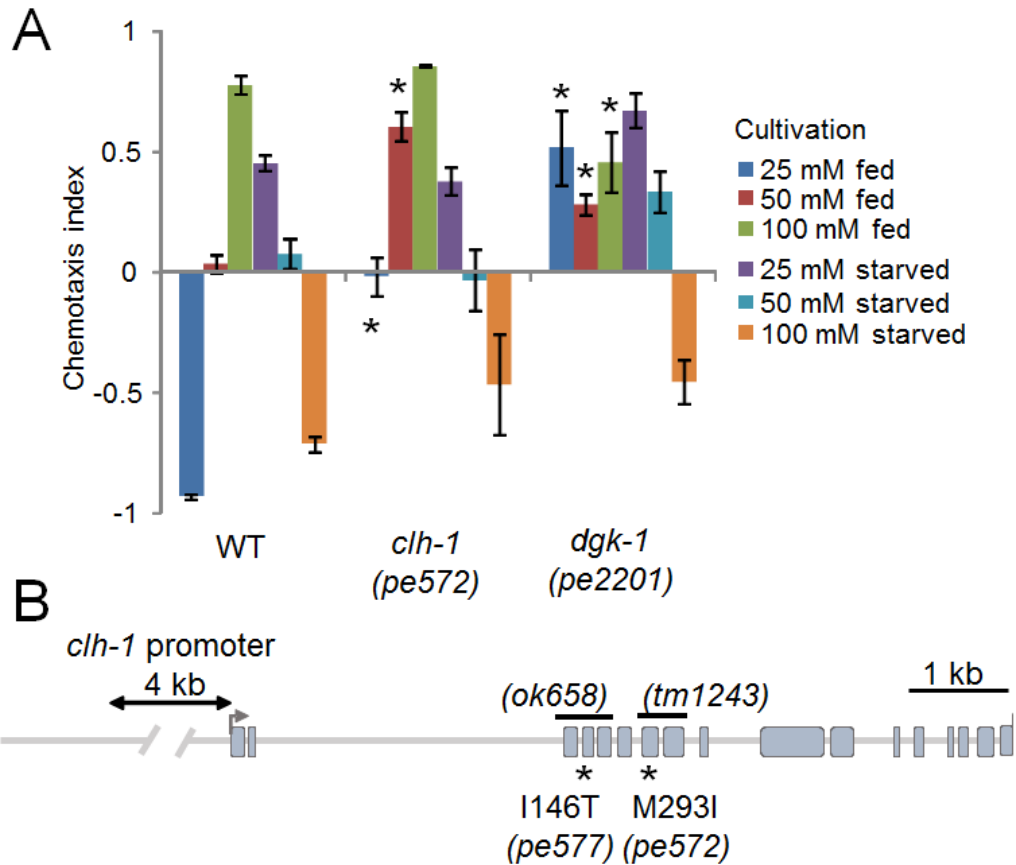


Figure 6. *clh-1* and *dgk-1* are required for salt chemotaxis learning

A, Salt chemotaxis of JN572 *clh-1(pe572)* and JN2201 *dgk-1(pe2201)*. *, difference from wild type, *, $p < 0.05$. **B**, Molecular details of the *clh-1* mutations.

ネルをコードする *clh-1* 遺伝子のミスセンス変異が原因であり、前者は第 7 エキソンに M293I 変異(*clh-1(pe572)*)、後者は第 4 エキソンに I146T 変異(*clh-1(pe577)*)をもっていた(**Fig. 6B**)。興味深いことに、*clh-1* の機能が完全に失われると予想される欠失変異体の *clh-1(tm1243)* や *clh-1(ok658)* は塩走性に欠損を示さなかった(データは示さない)。また *clh-1(pe572)* と *clh-1(pe577)* と野生型 *clh-1* のヘテロ接合体も欠損を示さなかった(データは示さない)。これらの結果は、*pe572* と *pe577* は *clh-1* の野生型アリルに対して劣性であるが、機能喪失変異ではないことを示す。*clh-1* の機能細胞を特定するため、変異体の特定の組織・細胞で野生型の *clh-1* 遺伝子を発現させる機能回復実験を行った。その結果、神経系全体または ASER 神経で野生型の *clh-1* を発現させると塩走性の欠損が回復した(データは示さない)。これらの結果から、*clh-1(pe572)* と *clh-1(pe577)* の変異は ASER で機能する CLH-1 の活性を

変化させ塩走性に欠損を示すことが示唆される。

JN2201 の塩走性欠損の原因は、ジアシルグリセロールキナーゼをコードする *dgk-1* のナンセンス変異 Q580stop であった(**Fig. 6A**)。 *dgk-1* についても機能細胞を同定したところ、ASER 神経で部分的な機能回復が見られた(データは示さない)。

4. 展望

本研究により、線虫の塩走性において味覚神経からの塩濃度変化の情報は AIA, AIB, AIY の各介在神経に並行して伝達され、それらのいずれもが高塩濃度および低塩濃度への走性に寄与することが示された。AIA または AIY を破壊した個体は、飼育時の塩濃度と行動中の塩濃度変化が特定の組み合わせになった場合にのみ塩走性行動に欠損を示した。このメカニズムとしては、ASE と AIB の関係と同様に⁽¹⁾、シナプス伝達の可塑性によって特定

の条件でのみ介在神経に情報が伝達されている可能性が考えられる。これを明らかにするには、各介在神経の塩応答を調べ、シナプスの性質を明らかにする必要がある。最近になって、自由行動中の線虫の神経活動を記録する顕微鏡システムが共同研究者によって整備された。そのシステムを用いて ASER と AIB の塩応答を改めて観察したところ、経験塩濃度が低かった場合、AIB は塩濃度の上昇によって脱分極するようになることが明らかになった(佐藤ら, 未発表)。この結果は、ASER から AIB の神経伝達の符号が塩濃度条件によって逆転していることを示す。また、変異体を用いた観察から、ASER から AIB へはグルタミン酸が伝達物質として使われており⁽²¹⁾、AIB 神経の AMPA 型受容体 GLR-1 が必要なことが明らかになっている(佐藤ら, 未発表)。AIA と AIY に対しても同様な解析を進め、味覚神経から介在神経への塩情報の伝達機構を明らかにしたい。

CLC ファミリーの遺伝子バクテリアからヒトまで広く保存されている。ヒトでは 4 種類のチャネルと 5 種類の輸送体がクローニングされており、神経を含むほぼすべての組織でいずれかのサブタイプが発現する。いくつかの CLC 遺伝子の機能不全は疾患の原因となることが示唆されている^(22, 23)。CLC チャネルは細胞のクロライドイオンホメオスタシスに関与し、その機能異常は神経や筋の興奮性に影響することが知られている⁽²⁴⁾。CLC チャネルはホモ二量体またはヘテロ二量体を形成する。個々のサブユニットはチャネルとして独立に機能するが、結合相手によって性質が変わることが知られている。線虫のゲノム上には *clh-1* から *clh-6* の 6 個の CLC 遺伝子があり、それぞれ神経や表皮、筋肉などの組織で発現する⁽²⁵⁾。CLH-3 は、産卵行動を調節する⁽²⁶⁾。CLH-1 は表皮、グリア、および神経で発現することが分かっており、電位依存性クロライドチャネルであることが報告されている。また最近、CLH-1 がグリア細胞で重炭酸イオンのトランスポーターとしてはたらき細胞内の pH を調節することが示されている⁽²⁷⁾。本研究により、塩走性においては、CLH-1 は味覚神経 ASER で機能することが明らかになった。ASER における CLH-1 の機能と学習変異体で同定された *clh-1* の点変異がタンパク質の構造と機能に与える影響を調べることで、神経応答と行動の可塑性における CLC チャネルの役割を明らかにしたい。

5. 謝辞

本研究は公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団の研究助成を受けて実施されました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

6. 文献

1. Kunitomo H, et al. (2013) Concentration memory-dependent synaptic plasticity of a taste circuit regulates salt concentration chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* 4:2210.
2. Luo L, et al. (2014) Dynamic encoding of perception, memory, and movement in a *C. elegans* chemotaxis circuit. *Neuron* 82(5):1115–1128.
3. Ortiz CO, et al. (2009) Lateralized Gustatory Behavior of *C. elegans* Is Controlled by Specific Receptor-Type Guanylyl Cyclases. *Curr Biol* 19(12):996–1004.
4. Ortiz CO, et al. (2006) Searching for neuronal left/right asymmetry: genomewide analysis of nematode receptor-type guanylyl cyclases. *Genetics* 173(1):131–149.
5. Suzuki H, et al. (2008) Functional asymmetry in *Caenorhabditis elegans* taste neurons and its computational role in chemotaxis. *Nature* 454(7200):114–117.
6. 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(1165):1–340.
7. Ohno H, et al. (2014) Role of synaptic phosphatidylinositol 3-kinase in a behavioral learning response in *C. elegans*. *Science* 345(6194):313–317.
8. Tomioka M, et al. (2006) The Insulin/PI 3-Kinase Pathway Regulates Salt Chemotaxis Learning in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* 51(5):613–625.
9. Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1):71–94.
10. 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(12):3959–3970.

11. Yoshida K, et al. (2012) Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*. *Nat Commun* 3:739.
12. Bendena WG, et al. (2008) A *Caenorhabditis elegans* allatostatin/galanin-like receptor NPR-9 inhibits local search behavior in response to feeding cues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(4):1339–1342.
13. Altun-Gultekin Z, et al. (2001) A regulatory cascade of three homeobox genes, *ceh-10*, *ttx-3* and *ceh-23*, controls cell fate specification of a defined interneuron class in *C. elegans*. *Development* 128(11):1951–1969.
14. Wicks SR, Yeh RT, Gish WR, Waterston RH, Plasterk RH (2001) Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat Genet* 28:160–164.
15. Gray JM, Hill JJ, Bargmann CI (2005) A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(9):3184–3191.
16. Wakabayashi T, Kitagawa I, Shingai R (2004) Neurons regulating the duration of forward locomotion in *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Res* 50(1):103–111.
17. Hobert O, et al. (1997) Regulation of interneuron function in the *C. elegans* thermoregulatory pathway by the *ttx-3* LIM homeobox gene. *Neuron* 19(2):345–357.
18. Pierce-Shimomura JT, Morse TM, Lockery SR (1999) The fundamental role of pirouettes in *Caenorhabditis elegans* chemotaxis. *J Neurosci* 19(21):9557–9569.
19. Iino Y, Yoshida K (2009) Parallel Use of Two Behavioral Mechanisms for Chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 29(17):5370–5380.
20. Chalasani SH, et al. (2010) Neuropeptide feedback modifies odor-evoked dynamics in *Caenorhabditis elegans* olfactory neurons. *Nat Neurosci* 13(5):615–621.
21. Serrano-Saiz E, et al. (2013) Modular control of glutamatergic neuronal identity in *C. elegans* by distinct homeodomain proteins. *Cell* 155(3):659–673.
22. Stölting G, Fischer M, Fahlke C (2014) CLC channel function and dysfunction in health and disease. *Front Physiol* 5:378.
23. Jentsch TJ (2008) CLC Chloride Channels and Transporters: From Genes to Protein Structure, Pathology and Physiology doi: 10.1080/10409230701829110.
24. Jentsch TJ (2015) Discovery of CLC transport proteins: cloning, structure, function and pathophysiology. *J Physiol (Lond)*.
25. Schriever AM, Friedrich T, Pusch M, Jentsch TJ (1999) CLC chloride channels in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 274(48):34238–34244.
26. Branicky R, Miyazaki H, Strange K, Schafer WR (2014) The voltage-gated anion channels encoded by *clh-3* regulate egg laying in *C. elegans* by modulating motor neuron excitability. *J Neurosci* 34(3):764–775.
27. Grant J, Matthewman C, Bianchi L (2015) A Novel Mechanism of pH Buffering in *C. elegans* Glia: Bicarbonate Transport via the Voltage-Gated CLC Cl-Channel CLH-1. *J Neurosci* 35(50):16377–16397.

Molecular and Neural Mechanisms of Memory-Dependent Salt Chemotaxis in *C. elegans*

Hirofumi Kunitomo, Hirofumi Sato, Yuichi Iino

Department of Biological Sciences, School of Science, The University of Tokyo

Summary

Mapping the neuronal components of perception, memory, and motor control is critical in understanding how memory-dependent behavior is encoded by the nervous system. Salt chemotaxis of *Caenorhabditis elegans* is a memory-dependent navigation behavior: animals are attracted to the salt concentration at which they have been fed, whereas they avoid it if they have been starved (salt concentration chemotaxis).

Input from a single sensory neuron, ASER, is required and sufficient for salt concentration chemotaxis under well fed conditions, and ASER is activated by salt concentration decrease irrespective of cultivation salt concentrations. To understand how sensory inputs are translated into behavior, we examined the roles of postsynaptic neurons of ASER by ablating them individually or in combination. ASER densely synapses on three pairs of interneurons, AIA, AIB and AIY. Loss of AIY resulted in impaired chemotaxis to low salt but not to high salt. On the other hand, AIA-ablated animals showed a weak but significant defect in chemotaxis to high salt. Ablating both AIY and AIA disrupted chemotaxis to both directions. Quantitative analyses of locomotion revealed that these chemotaxis defects were concomitant with altered properties of klinokinesis strategy. Ablation of AIB interneurons did not cause discernible effect on salt concentration chemotaxis, although these neurons were involved in the regulation of ASER-evoked reorientation. These results indicate that although both AIY and AIA are involved in the regulation of turning frequency upon salt concentration decreases, they differently mediate transmission of sensory information after cultivation at distinct salt concentrations.

To identify genes involved in salt concentration chemotaxis, we screened mutants that show deficits in salt concentration chemotaxis. A CLC-type chloride channel *clh-1* appeared to function in ASER to migrate toward food-associated salt concentrations.