

塩濃度学習の分子・神経機構の解明

國友 博文, 佐藤 博文, 飯野 雄一

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

概要 学習は動物が環境に適応し生存競争を勝ち抜くために必要な能力であり, 比較的単純な神経系をもつ動物にも備わっている。土壌線虫 *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塩濃度を避けるように移動する。餌と塩濃度いずれの条件を変更しても行動が変化することから, 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つの味覚神経, ASERからの入力が必要十分である。ASERは飼育時の環境によらず塩濃度の低下により脱分極することがわかっている。それでは, 線虫はこの味覚神経の応答のみでいかに塩濃度勾配を上ったり下ったりできるのだろうか。ASERは3対の介在神経, AIA, AIB, および AIY に出力している。これまでに ASER から AIB への神経伝達の可塑性が行動の変化に関わることが示唆されているが, その機構は十分には明らかになっていなかった。

ASER および AIB の神経活動と個体の行動との関係を調べるため, 自由に行動している線虫に塩濃度変化の刺激を与え, 行動と神経活動を同時に計測した。餌を経験した塩濃度から遠ざかるような濃度変化刺激を与えると, 線虫の方向転換頻度が上昇した。このとき ASER の活動は感覚入力と, AIB の活動は行動出力とそれぞれ相関し, 両者間の接続は高塩濃度飼育後に興奮性, 低塩濃度飼育後には抑制性であることが明らかになった。この結果は, ASER から AIB へのシナプス伝達の可塑性が経験に依存した行動の変化を引き起こしていることを強く示唆する。変異体の観察および細胞特異的な機能回復実験から, ASER と AIB のシナプス伝達はグルタミン酸によって担われており, ASER における小胞性グルタミン酸トランスポーターEAT-4, および AIB における AMPA 型グルタミン酸受容体 GLR-1 のはたらきが興奮性, 抑制性どちらの伝達にも寄与することが示唆された。

1. 研究の目的と背景

動物にとって学習は生存や生殖の可能性を高めるために不可欠な能力である。学習が成立すると, 同じ感覚刺激が与えられた場合でも従来とは異なる応答行動が観察されるようになる。このとき神経回路内には経験に依存して新たな情報伝達経路が形成され, 複数の情報が関連付けられる結果, 入出力の関係が変わると考えられる。学習の仕組みを理解するには, これらの出来事が神経回路のどこで, どのような分子機構により生じているか調べるのが有効である。シンプルな神経回路をもち分子遺伝学の手法が整備されたモデル生物は, 個々の神経細胞ではたらく分子の機能から行動までの過程をすべて精査でき

る利点がある。

多くの生物にとって味覚は餌を探索する手がかりであり, また食物の好き嫌いに見られるように, 味覚は学習の手がかりとしても重要である⁽¹⁾。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得ていた塩濃度に向かい, 飢餓を経験した塩濃度を避ける。餌と塩濃度いずれの条件を変えても行動が変化することから, 線虫の塩走性は塩濃度と餌の有無を関連付けて記憶し行動を制御する連合学習(塩濃度学習)と考えられる(**Fig. 1**)⁽²⁾。塩濃度学習において, 個体の移動方向は直前に経験した塩濃度の高低と餌の有無の二つの条件の違いで逆転している。我々は, 線虫個体が過去に経験した塩濃度の違

いが神経回路にもたらす生理的な変化を分子・神経細胞レベルで同定しその仕組みを明らかにすることによって、味覚が記憶される機構、味覚と餌の情報が統合され新規の行動が生じる機構を理解することを目指している。

塩濃度学習で見られる塩走性の分子・神経機構については、すでに以下のことがわかっている。①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1個の味覚神経 ASER から塩情報の入力が必要十分である。② 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ひとつである。③味覚神経におけるジアシルグリセロール(DAG)シグナル伝達経路の活性が高いと線虫は高い塩濃度に向かい、その活性が低いと低い塩濃度に向かって移動する^(2,3)。

ASER は線虫の主要な味覚神経であり、 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- など無機イオンの感知に必要である。これらの環境中の濃度が低下すると ASER の細胞内カルシウムイオン濃度が上昇(脱分極)する^(4,6)。ASER は塩濃度の低下により脱分極し、この極性は飼育塩濃度を変えても、飢餓条件下でも変化しない⁽⁷⁾。また 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⁽⁸⁾。このうち、ASER から 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。

高い塩濃度で飼育された場合 ASER と AIB は連動し、塩濃度が低下すると AIB が脱分極する。一方低い塩濃度で飼育された場合には、塩濃度が低下しても AIB は応答しない⁽²⁾。

線虫はクリノキネシスと呼ばれる行動戦略を用いて塩走性することが知られている。これは、塩濃度の変化を感知して好ましくない方向に進んでいると判断したとき、方向転換の頻度を上昇させて正しい方向へ向かう行動制御の仕組みである。AIB を活性化すると方向転換が促進され(Fig. 3A)、これは飼育塩濃度には依存しない^(9, 10)。この性質と ASER-AIB 間のシナプス伝達の飼育塩濃度依存性から、高塩濃度で飼育された線虫が高い塩濃度に向かう行動をうまく説明できる。すなわち、個体の移動に伴って塩濃度が低下すると ASER が脱分極し、それが興奮性の伝達を介して AIB を脱分極させ、方向転換が促され結果として高い塩濃度に向かう仕組みである。

一方、線虫が低い塩濃度に向かう行動を生じる神経機構は不明であった。上述のように、餌を経験した塩濃度に向かう行動では、塩濃度の情報は ASER から入力すれば十分である。ASER は環境の塩濃度が上昇すると過分極するため(「結果」3.1節を参照)、個体が塩濃度勾配を下

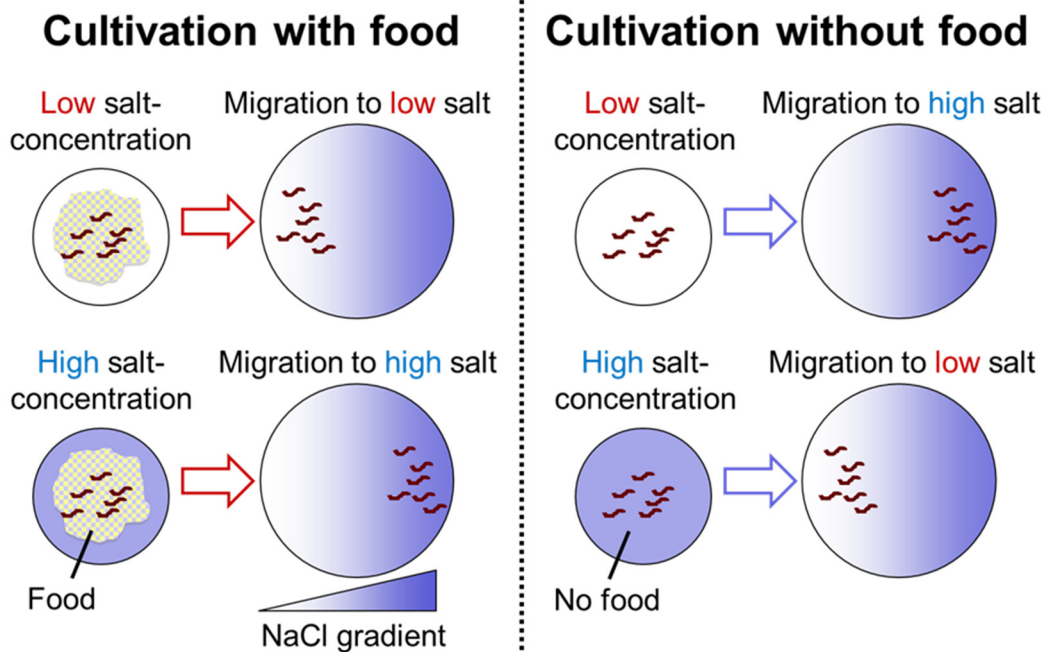


Figure 1. Salt concentration learning of *C. elegans*

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)

るためには、ASER が過分極すると方向転換が促進される仕組みが必要となる。この機構を明らかにするため、本研究では自由行動中の線虫に塩刺激を与え ASER と AIB の応答、および行動との関係を調べた。また ASER から AIB へのシナプス伝達に関わる分子機構を検討した。その結果、ASER から AIB への神経伝達は飼育塩濃度の高低に依存して伝達の極性が反転し、興奮性と抑制性どちらの伝達にも ASER のグルタミン酸放出と AIB の AMPA 型グルタミン酸受容体が関与することが明らかになった。

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、形質転換など分子遺伝学の実験手法は、一般的な方法に従った^(11, 12)。本研究で用いた線虫株を **Table 1** に示した。

2.2 神経細胞のカルシウムイメージングと行動の同時計測

味覚神経 ASER と ASER からシナプス入力を受ける介在神経 AIB は、いずれも線虫の頭部にある。これらの活動を *in vivo* で観察するため、遺伝子コード型カルシウムインジケータの GCaMP6s を用いた。GCaMP6s は細胞内カルシウムイオン濃度が上昇すると蛍光輝度が増す⁽¹³⁾。焦点ずれ等による蛍光輝度の振れを補償するため対照の蛍光タンパク質として mCherry を同時に発現させ、GCaMP6s と mCherry の蛍光強度比 (R) を算出した。これらの蛍光タンパク質は、細胞特異的に発現する遺伝子のプロモーターを用いて各神経に発現させた。ASER における発現には *gcy-5* プロモーター、AIB には *npr-9* プロモ

ーターを用いた。蛍光画像を 2 フレーム毎秒で取得し、細胞体の蛍光強度の平均値を算出した。時系列データは塩刺激を与える前の蛍光強度比 (R0) で標準化した。

カルシウムインジケータを用いた線虫の神経活動の観察には、一般に、線虫個体を微小流路に挟んで運動を制限する方法が用いられる⁽¹⁴⁾。これは観察する細胞の位置や焦点のずれを抑制するためであるが、神経活動と個体の運動との関係を調べたい場合には適当ではない。近年、自由に行動している線虫に任意の環境刺激を与えることができる微小流路アリーナが考案され、神経活動の観察に用いられた⁽¹⁵⁾。本研究でもこの微小流路アリーナを用いて線虫に塩濃度変化の刺激を与え、神経活動と行動を同時に計測した。顕微鏡システムの概要を **Fig. 2** に示す。観察したい神経細胞を顕微鏡視野の中心に保持するためトラッキングシステムを用いた⁽¹⁶⁾。トラッキングシステムは赤外光によって線虫頭部の動きをモニターし、その移動をキャンセルするようにステージを動かして観察対象を視野の中心に保持する。記録されたステージの移動度から線虫の移動速度を算出した。

線虫を 50 mM の NaCl を含む通常の NGM 培地で成虫まで飼育した後、低塩濃度 (NaCl を添加しない NGM 培地, **Fig. 3** から **Fig. 5** では "0 mM NaCl" と表記) または高塩濃度 (100 mM NaCl を含む NGM 培地, **Fig. 3** から **Fig. 5** では "100 mM NaCl" と表記) でさらに一晩飼育し、微小流路アリーナに挿入した。微小流路アリーナ中の線虫個体に塩刺激を付与する方法は既報に従い、NaCl の濃度を 25 mM から 50 mM、または 50 mM から 25 mM に切り替えた⁽²⁾。

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

Strain	Genotype
Bristol N2	Wild type
	<i>Ex[gcy-5p::gcamp6s gcy-5p::mcherry]</i> .
	<i>Ex[npr-9p::gcamp6s npr-9p::mcherry]</i> .
	<i>eat-4(ky5) III; Ex[npr-9p::gcamp6s npr-9p::mcherry]</i> .
	<i>eat-4(ky5) III; Ex[npr-9p::gcamp6s npr-9p::mcherry]; Ex[gcy-5p::eat-4(+)]</i> .
	<i>glr-1(ky176) III; Ex[npr-9p::gcamp6s npr-9p::mcherry]</i> .
	<i>glr-1(ky176) III; Ex[npr-9p::gcamp6s npr-9p::mcherry]; Ex[npr-9p::glr-1(+)]</i> .

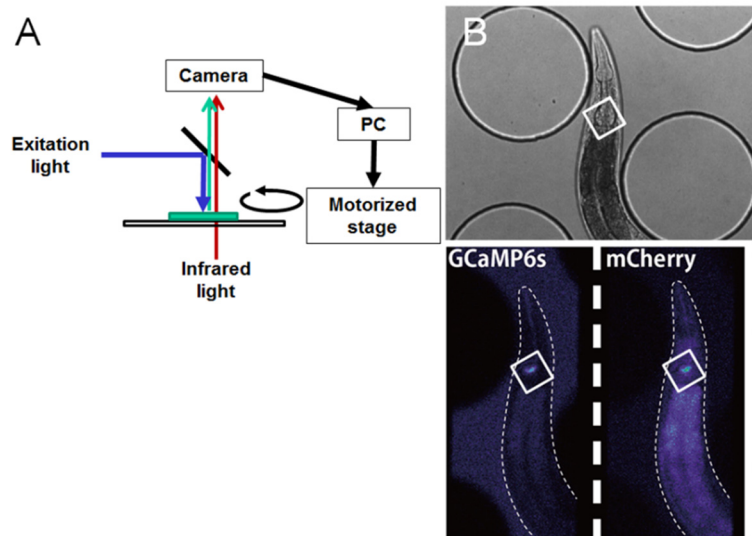


Figure 2. Calcium imaging of a head neuron in free-moving animal

A, Schema of the tracking and imaging microscope setup. The PC-regulated motorized stage keeps a targeted structure to the center of the field. **B**, Example of microscope images. Top: bright field, bottom left: fluorescence image of a neuron that express GCaMP6s, bottom right: fluorescence image of mCherry of the same neuron. Rectangles indicate the position of target

3. 結果

3. 1 ASER 味覚神経の塩刺激に対する応答特性は飼育条件に依存しない

微小流路アリーナを用いて自由に行動している線虫個体の神経活動を観察するにあたり、はじめに ASER の塩応答を観察した。カルシウムインジケータを ASER に発現させた線虫個体を低塩濃度 (0 mM NaCl) または高塩濃度 (100 mM NaCl) で飼育した後、50 mM NaCl から 25 mM NaCl の塩濃度低下刺激、または 25 mM NaCl から 50 mM NaCl の塩濃度上昇刺激を与えた。

ASER の細胞内カルシウムイオン濃度は塩濃度低下刺激により上昇し、この応答性は飼育塩濃度に依存しなかった (**Fig. 3B**)。この結果は、個体の運動を制限して観察した従来の結果と一致した。一方、塩濃度上昇刺激を与えた場合にはカルシウムイオン濃度が低下、すなわち ASER が過分極する傾向が見られた (**Fig. 3C**)。これらの結果から、ASER の応答は塩刺激の入力と相関しており、その応答の特性は運動の有無および飼育塩濃度の高低には依存しないことが明らかになった。

3. 2 ASER から AIB への神経伝達の極性は飼育塩濃度に依存して反転する

塩刺激に対する個体の応答行動と AIB の神経活動と

の関係を明らかにするため、自由行動している線虫に塩刺激を与え個体の移動の速さと AIB のカルシウム応答を同時に観察した。

塩濃度低下刺激を与えた場合、高塩濃度で飼育した個体は前進方向の速度が一時的に低下した。これは塩刺激により一時的に方向転換が促進されていることを示す。一方、低塩濃度で飼育した個体ではその応答は見られなかった (**Fig. 3B**)。塩濃度上昇刺激を与えた場合、低塩濃度飼育個体でのみ速度の低下が観察された (**Fig. 3C**)。これらの結果は、微小流路アリーナ中でも飼育塩濃度に依存した方向転換頻度の調節が観察されることを示し、線虫は飼育塩濃度から遠ざかる塩濃度変化を感じると方向転換頻度を上昇させ飼育塩濃度に向かうことを示唆している。

AIB はこのとき、方向転換頻度が上昇する条件で活性化した。すなわち、高塩濃度飼育後の塩濃度低下刺激、および低塩濃度飼育後の塩濃度上昇刺激により AIB の細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、他の条件では応答は見られなかった (**Fig. 3B, C**)。

これらの結果は、AIB の脱分極が方向転換を促進するという知見と矛盾せず、AIB の応答は行動出力と相関することを示唆する。しかし、方向転換頻度の上昇が AIB の活

性化によって引き起こされたかどうかはわからない。今回観察されたAIBのカルシウム動態は高塩濃度飼育後の塩濃度低下刺激と低塩濃度飼育後の塩濃度上昇刺激とで異なり、前者は塩刺激に素早く応答して細胞内カルシウム濃度が一過的に上昇し、後者は塩刺激に緩やかに応答し細胞内カルシウム濃度の高い状態が暫く維持される傾向が見られた。

3.3 AIBの塩応答にはASERのグルタミン酸神経伝達が必要である

ASERとAIBは化学シナプスで直接接続している。またASERは神経伝達物質としてグルタミン酸と複数の神経ペプチドを放出することが知られている^(8, 17)。ASERとAIBの間のシナプス伝達の可塑性の機構を探るため、はじめにグルタミン酸神経伝達の関与を調べた。小胞性グルタミン

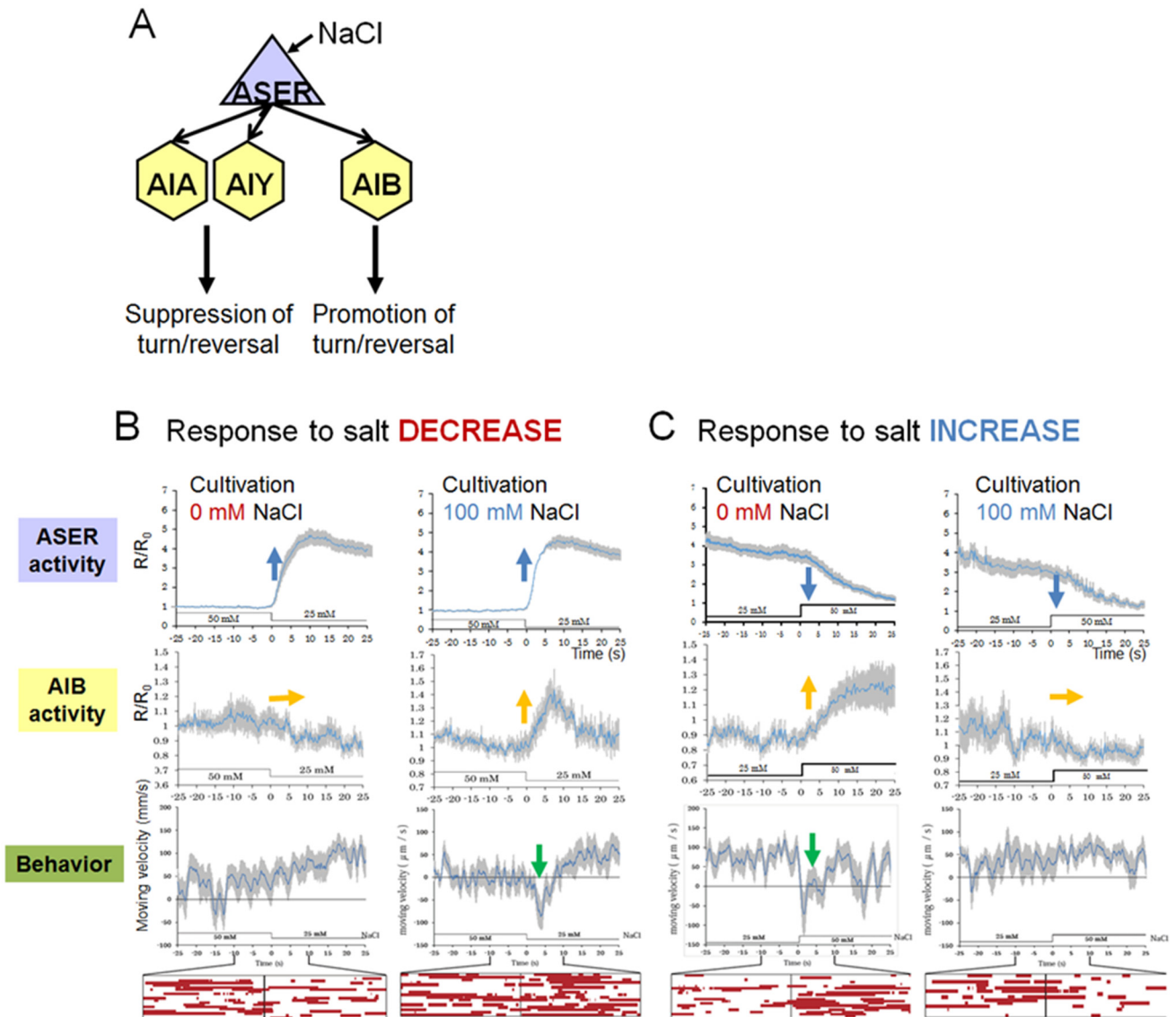


Figure 3. The sign of synaptic transmission between ASER and AIB reverses according to previous salt experience
A, A diagram of synaptic connectivity of the salt sensing neuron ASER and the postsynaptic first-layer interneurons. **B** and **C**, Salt responses of ASER (top row), AIB (second top), moving velocity of animals along with timing of reversals (bottom row). Animals were judged as reversed if the value of forward velocity came to less than zero, which was indicated in red color. Response to salt decrease (**B**) and increase (**C**). Animals were cultivated under low salt condition (left columns) or high salt condition (right columns)

酸トランスポーターをコードする *eat-4* の変異体を用いて塩刺激に対する AIB の応答および行動を観察した。

野生型の AIB が塩刺激に応答し方向転換が促進される条件, すなわち, 低塩濃度飼育後の塩濃度上昇刺激および高塩濃度飼育後の塩濃度低下刺激のいずれの条件においても, *eat-4* バックグラウンドの個体では AIB の塩応答, 方向転換の促進ともに完全に消失していた。次に, ASER からのグルタミン酸小胞放出が関与するか調べるため, *eat-4* 変異体の ASER 神経のみに野生型の *eat-4* 遺伝子を発現し機能を回復させた。その結果, 高塩濃度飼育後の塩濃度低下刺激に対しては, AIB の塩応答, 行動ともに野生型と同程度に回復した。低塩濃度飼育後の塩濃度上昇刺激に対しては, AIB の塩応答は野生型と同程度に回復したが, 方向転換頻度の制御は部分的にしか回復しなかった (Fig. 4)。

以上の結果は, AIB の塩応答は ASER からのグルタミン酸小胞放出に依存していることを示す。また方向転換頻度の制御に対する *eat-4* の寄与については, 高塩濃度飼育後は ASER で EAT-4 が機能すれば十分であるが, 低塩濃度飼育後では ASER 以外の細胞における EAT-4 の

はたらきも必要ことが明らかになった。

3. 4 AIB の塩応答には AMPA 型受容体 GLR-1 の機能が必要である

AIB 神経は AMPA 型グルタミン酸受容体の GLR-1 を発現し, それは匂いの感覚受容において嗅覚神経 AWC からのグルタミン酸神経伝達に必要なことが知られている⁽¹⁸⁾。塩応答における GLR-1 の役割を調べるため, *glr-1* の変異体を用いて塩刺激に対する AIB の応答および行動を観察した。

低塩濃度飼育後の塩濃度上昇刺激および高塩濃度飼育後の塩濃度低下刺激のいずれの条件においても, *glr-1* バックグラウンドの個体では AIB の塩応答, 方向転換の促進ともに観察されなかった。次にこれらの応答に AIB 神経における GLR-1 の機能が関与するか調べるため, *glr-1* 変異体の AIB のみで野生型の *glr-1* を発現し機能を回復させた。その結果, 高塩濃度飼育後の塩濃度低下刺激に対しては AIB の塩応答, 行動ともに野生型と同程度に回復した。低塩濃度飼育後の塩濃度上昇刺激に対しては, AIB の塩応答も方向転換頻度の制御も部分的にしか回復しなかった (Fig. 5)。

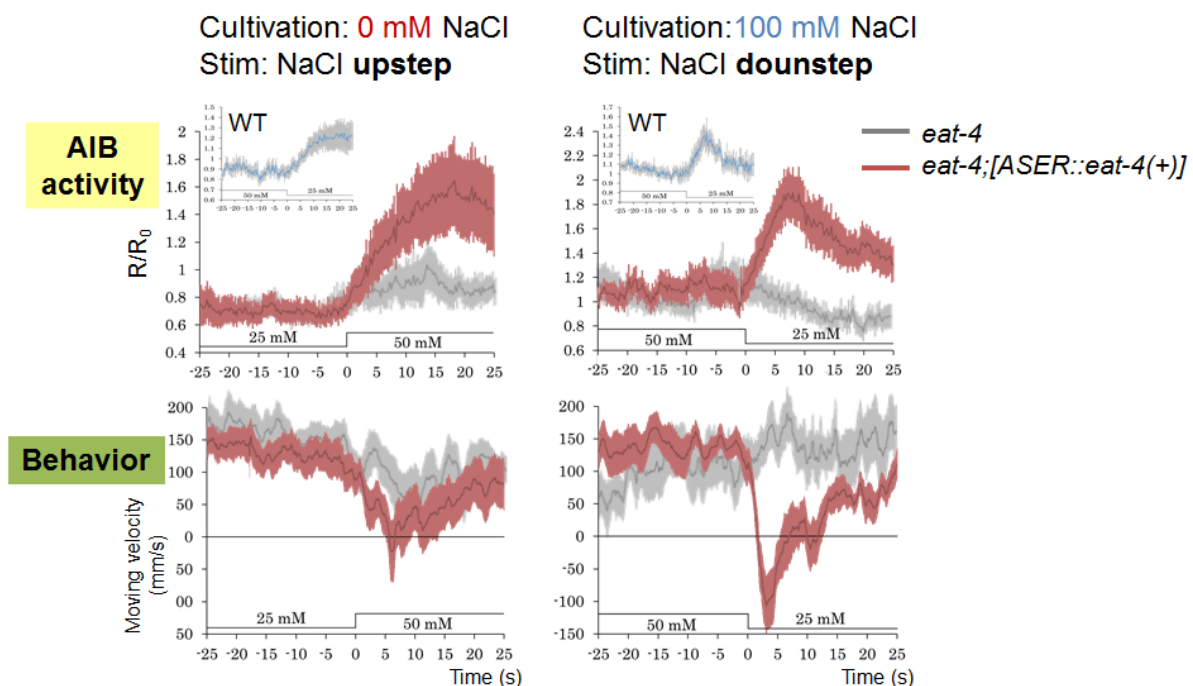


Figure 4. *eat-4* is required for synaptic transmission between ASER and AIB and acts in ASER

Salt responses of AIB (top) and moving velocity of animals (bottom). Results of *eat-4* mutants (gray lines) and *eat-4* mutants whose ASER neuron solely expresses wild-type *eat-4* gene by a cell-specific promoter (red lines). Salt up-step was delivered to animals cultivated under low salt condition (left), or salt down-step to animals cultivated at high salt (right)

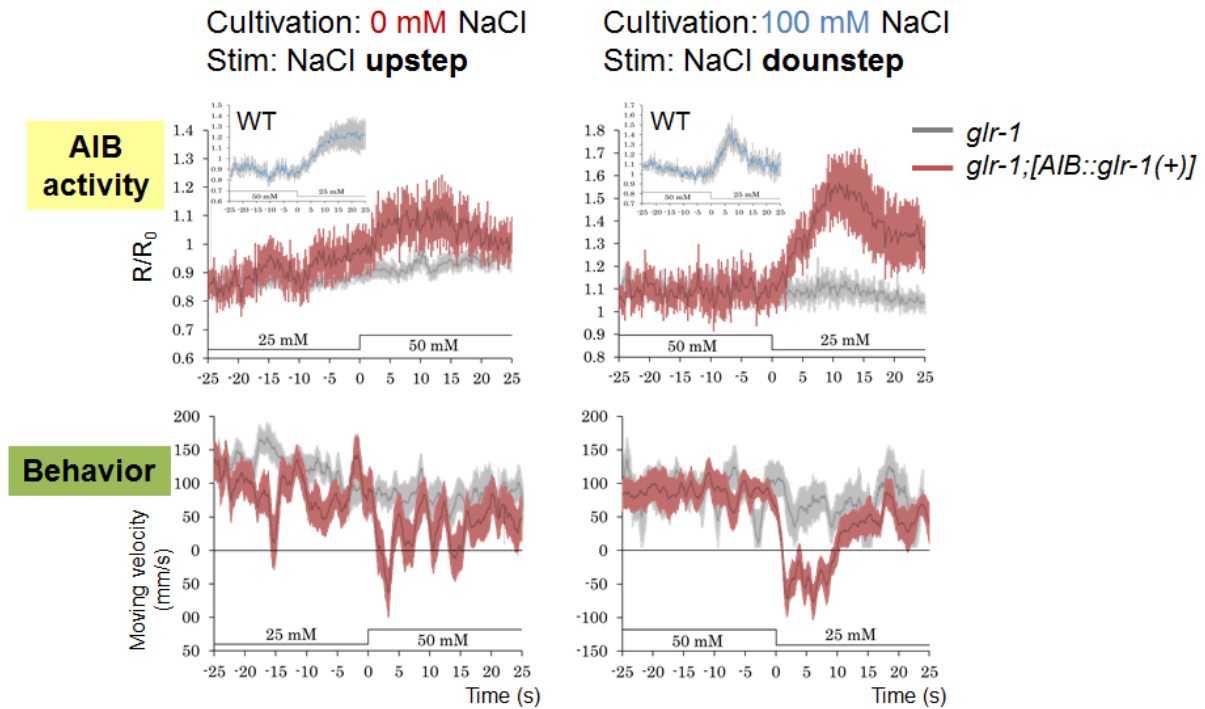


Figure 5. *glr-1* acts in AIB to regulate synaptic transmission between ASER and AIB and acts in AIB

Salt responses of AIB (top) and moving velocity of animals (bottom). Results of *glr-1* mutants (gray lines) and *glr-1* mutants whose AIB neurons express wild-type *glr-1* by a cell-specific promoter (red lines). Salt up-step was delivered to animals cultivated under low salt condition (left), or salt down-step to animals cultivated at high salt (right)

以上の結果は、AIB の塩応答と方向転換頻度の制御には AIB におけるグルタミン酸受容体 GLR-1 のはたらきが必要なことを示す。高塩濃度飼育後の塩濃度低下刺激に対する応答は AIB において GLR-1 が機能すれば十分であるが、低塩濃度飼育後の塩濃度上昇刺激に対する応答には他の細胞における GLR-1 の機能も必要である。

4. 考察と課題

本研究では自由に行動している線虫個体に塩刺激を与え味覚回路の神経活動と行動を同時に観察した。その結果、線虫が飼育塩濃度へ向かう走性には ASER と AIB の間の塩情報伝達の可塑性が重要な役割を担うことが従来に増して支持された。高塩濃度飼育後は塩濃度の低下によって方向転換が促進される。このとき ASER と AIB はともに脱分極しており、両者の接続は興奮性の接続である。一方、低塩濃度飼育後は塩濃度の上昇によって方向転換が促進される。このとき ASER は過分極し AIB は脱分極している。従って、両者の間は抑制性の接続と言える。

ASER と AIB の間の伝達の符号が逆転することによって方向転換が促進される塩濃度変化の上下が低塩濃度飼育後と高塩濃度飼育後で逆になり、塩濃度勾配上での移動方向が変わると推測される。学習によって好き嫌いが逆転する行動はホニュウ類の味覚嫌悪学習でも観察される⁽¹⁾。しかし、学習の前後で接続の符号が逆転する神経伝達を細胞レベルで観察できる系は限られている。ASER と AIB の間の情報伝達機構の解明は、好き嫌いの行動がシナプスレベル、神経細胞レベルでどのように生じるか明らかにする良いモデルである。

AIB の活動は行動出力と関連していることが明らかになった。個体を微小流路に固定した従来の観察方法では、低塩濃度飼育後の塩濃度上昇に対する AIB のカルシウム応答は観察されなかった。この原因のひとつとして、運動制限により AIB の神経応答が抑制されていた可能性が考えられる。3.2 節で述べたように、低塩濃度飼育後の塩濃度上昇刺激に対して AIB は緩やかに応答し細胞内カルシウム濃度の高い状態が維持されるように見え、これは

高塩濃度飼育後の塩濃度低下刺激に対する速く一過的な応答とは対照的である。低塩濃度飼育後は ASER に入力した塩刺激が他の神経を介して方向転換を促進し、AIB のカルシウム応答を引き起こしている可能性が考えられる。ASER は AIA 神経を介しても AIB に接続している。塩刺激に対する AIB の応答や方向転換運動を AIA 除去個体で調べることで、塩走性における AIA の役割を明らかにできる。

低塩濃度飼育後に見られる ASER から AIB への抑制性の伝達はどのように起きるのだろうか。 *glr-1* 変異体の AIB のみで GLR-1 を機能回復させると ASER-AIB 間の抑制性の伝達が部分的に回復したことから、両者間に抑制性の伝達を担う介在神経(仮に X とよぶ)が存在し、それが低塩濃度飼育後にのみはたらく可能性が考えられる (Fig.

6)。また同時に、GLR-1 を発現するほかの神経によっても ASER から AIB へ抑制性の伝達が担われていることが示唆される。一方、*eat-4* 変異体の ASER のみで EAT-4 を機能回復させた場合には ASER-AIB 間の抑制性伝達が野生型と同程度に回復した。この仕組みとしては、たとえば、抑制性のグルタミン酸受容体が低塩濃度飼育後に AIB で機能する可能性が考えられる。線虫ではグルタミン酸作動性のクロライドチャンネルが抑制性の伝達を担う例が知られている。また、*eat-4* 以外の小胞性グルタミン酸トランスポーターのホモログとして、*vglu-2* と *vglu-3* が知られている⁽¹⁹⁾。これらの遺伝子の変異体を用いて AIB の塩応答を調べることで、抑制性のグルタミン酸神経伝達に関わる分子を同定できる。上述のように、介在神経 X は AIA の可能性が考えられる。

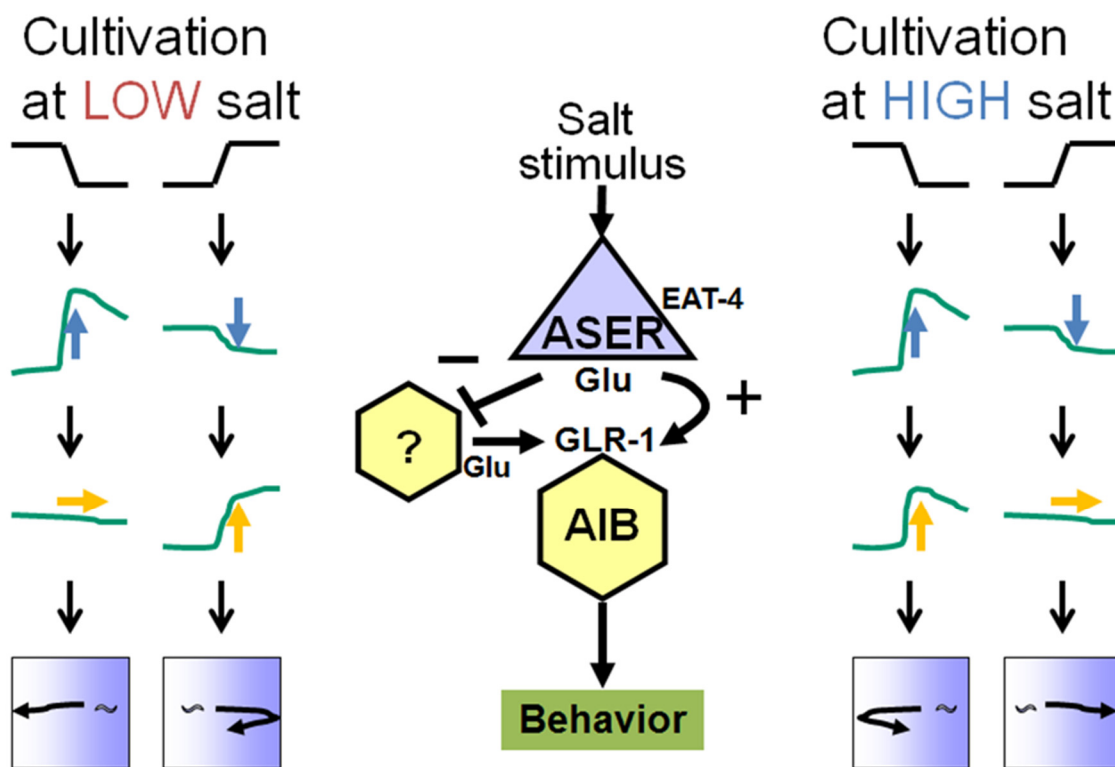


Figure 6. *clh-1* and *dgk-1* are required for salt chemotaxis learning

Summary of neural responses and animals behavior to salt stimuli. Synaptic transmission from ASER to AIB is excitatory after cultivation at high salt, whereas it is inhibitory after cultivation at low salt. An interneuron might mediate inhibitory transmission under cultivation at low salt. Molecular components for glutamatergic neurotransmission are shown (see text for detail)

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. Garcia R (2002) Postextinction of conditioned fear: between two CS-related memories. *Learn Mem* 9:361–3.
2. 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.
3. Adachi T et al. (2010) Reversal of salt preference is directed by the insulin/PI3K and Gq/PKC signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 186:1309–19.
4. Suzuki H et al. (2008) Functional asymmetry in *Caenorhabditis elegans* taste neurons and its computational role in chemotaxis. *Nature* 454:114–7.
5. Bargmann CI, Avery L (1995) Laser killing of cells in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Cell Biol* 48:225–50.
6. Ortiz CO et al. (2009) Lateralized gustatory behavior of *C. elegans* is controlled by specific receptor-type guanylyl cyclases. *Curr Biol* 19:996–1004.
7. 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* 106:301–8.
8. 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.
9. Pierce-Shimomura JT, Morse TM, Lockery SR (1999) The fundamental role of pirouettes in *Caenorhabditis elegans* chemotaxis. *J Neurosci* 19:9557–69.
10. Gray JM, Hill JJ, Bargmann CI (2005) A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3184–91.
11. Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71–94.
12. Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V (1991) Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* 10:3959–70.
13. Chen T-W et al. (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499:295–300.
14. Chronis N, Zimmer M, Bargmann CI (2007) Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Methods* 4:727–31.
15. Albrecht DR, Bargmann CI (2011) High-content behavioral analysis of *Caenorhabditis elegans* in precise spatiotemporal chemical environments. *Nat Methods* 8:599–605.
16. Satoh Y et al. (2014) Regulation of experience-dependent bidirectional chemotaxis by a neural circuit switch in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 34:15631–7.
17. Serrano-Saiz E et al. (2013) Modular control of glutamatergic neuronal identity in *C. elegans* by distinct homeodomain proteins. *Cell* 155:659–73.
18. Chalasani SH et al. (2007) Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 450:63–70.
19. Hobert O (2013) The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*:1–106.

Molecular and Neural Mechanisms of Salt Chemotaxis Learning

Hirofumi Kunitomo, Hirofumi Sato, Yuichi Iino

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

Summary

Learning ability is essential for animals to better adapt and survive in variable environment, and such ability is documented even in animals with simple neural circuit. Salt chemotaxis of the soil nematode *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 chemotaxis learning).

Input from a single taste neuron, ASER, is required and sufficient for salt chemotaxis under well-fed conditions, and this neuron is activated by salt concentration decrease irrespective of cultivation salt concentrations. Such responsivity of ASER raise a fundamental question as to how animals generate bidirectional migration behavior on salt gradient according to salt experiences. It is suggested that salt experience modulate synapse strength between ASER and a pair of primary interneurons AIB, and this synaptic plasticity is responsible for behavioral change. However, the molecular and cellular mechanisms of ASER-AIB synaptic plasticity remains largely elusive.

To elucidate the relationship of neuronal responses of ASER and AIB as well as behavioral responses of animals to salt stimuli, we observed salt responses of the neurons in free-moving animals. ASER was depolarized by salt down-steps irrespective of cultivation conditions, whereas AIB was activated either by salt decrease after high salt cultivation or by salt increase after low salt cultivation. Increase in turning frequency correlated with AIB activation. These results demonstrate that the sign of synaptic transmission between ASER and AIB is reversed according to salt experience: it is excitatory after high salt cultivation, whereas inhibitory after low salt cultivation. Mutant analyses revealed that both excitatory and inhibitory transmissions are glutamatergic in which EAT-4 (VGLUT) acts in ASER and GLR-1 (AMPA receptor) acts in AIB.