

## 塩濃度の嗜好を決定する味覚神経回路の動作機構の解明

國友 博文<sup>1</sup>, 朴 燦賢<sup>1</sup>, 佐藤 博文<sup>1</sup>, 小川 治夫<sup>2</sup>, 飯野 雄一<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻, <sup>2</sup> 東京大学定量生命科学研究所

**概要** 味覚の好みは環境要因の影響を受け常に変化する。これには摂食に伴う情動と味覚との連合学習が一定の役割を担う。しかし、感覚情報と神経系の内部状態が関連付けて記憶され、その記憶に基づいて摂食行動が調節されるメカニズムは良くわかっていない。味覚学習は動物が環境に適応し生存し続けるために必須な能力であり、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(塩濃度学習)。我々は感覚刺激強度の記憶、およびその記憶に基づいて探索行動が調節される機構を分子・細胞レベルで明らかにする研究に取り組んでいる。この目的のため、本研究では塩濃度学習に欠損を示す変異体を得てその原因遺伝子の機能解明に取り組んだ。

塩濃度学習に欠損を示す原因因子として、CIC 型陰イオンチャンネルをコードする *clh-1* 遺伝子のミスセンス変異を同定した。興味深いことに、遺伝子の機能が完全に喪失した *clh-1* 欠失変異体は野生型の表現型を示し、得られた学習変異体では CLH-1 チャンネルが本来とは異なるはたらきをしていることが示唆された。変異体の行動や神経活動を調べた結果、CLH-1 は細胞内塩化物イオン濃度の調節を介して味覚ニューロンの塩刺激に対する応答に寄与し、変異体では味覚神経の塩応答、延いては好ましい塩濃度に向かう探索行動を制御する神経回路の応答が弱まっていることが明らかになった。CIC チャンネルの遺伝子はヒトにも複数あり、遺伝子疾患への関与が知られている。今回の研究成果は、CIC チャンネルの機能と疾患との関係を理解することにも役立つと期待される。

### 1. 研究目的

味覚の好みは遺伝的要因に加え食習慣など環境要因の影響を受けて変化する。味覚嗜好の変化はヒトでは生涯続き、これには生理的状态など摂食に伴う情動と味覚との連合学習が一定の役割を担うと推定される。実際に、げっ歯類の味覚嫌悪学習では孤束核など味覚情報の伝達経路と扁桃体をはじめとする脳内報酬系双方の関与が示唆されている<sup>(1)</sup>。しかし、感覚情報と脳の内部状態が関連付けて記憶され、その記憶に基づいて摂食行動が調節されるメカニズムは良くわかっていない。

連合学習の仕組みを明らかにするには、感覚情報の処理、情報の統合、記憶の形成、行動の生成といった各過程に必要な神経回路を同定し、そこでいかなる生理的変

化が生じているか調べる必要がある。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、個々の細胞ではたらく分子の機能から個体の行動までの全過程を統合的に精査できる点が優れている。そこで我々は、神経系の動作機構を解明するのに適したモデル生物、線虫 *C.エレガンス* を用いて、塩濃度の嗜好が決定される仕組みを分子・細胞レベルで明らかにする研究に取り組んでいる。

線虫は塩(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 (Figure 1)。先行研究から、塩濃度学習の分子・神経機構について以下のことが明らかになっていた。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 ASER と呼ばれる 1 個の味覚神経からの塩情報の入力が必要十分である。②ASER 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<sup>(2)</sup>。

塩濃度学習に関わる遺伝子の機能解明は、飢餓条件下ではたらくインスリンシグナル伝達経路の ASER における役割等が明らかになってきた一方<sup>(3-6)</sup>、餌を得た濃度に向かう走性に関与する因子はあまりわかっていなかった。新規因子を探索するため、我々は塩走性に欠損を示す変異体を得て原因遺伝子を同定した。CIC 型クロライドチャンネルをコードする *clh-1* 遺伝子のミスセンス変異が食餌条件下の塩濃度学習に異常をもたらす結果を得ていたが、その詳細は調べられていなかった。本研究では、行動分析や神経活動のライブイメージングを用いて、塩走性における *clh-1* の役割を調べた。

## 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<sup>(7,8)</sup>。

### 2.2 行動解析

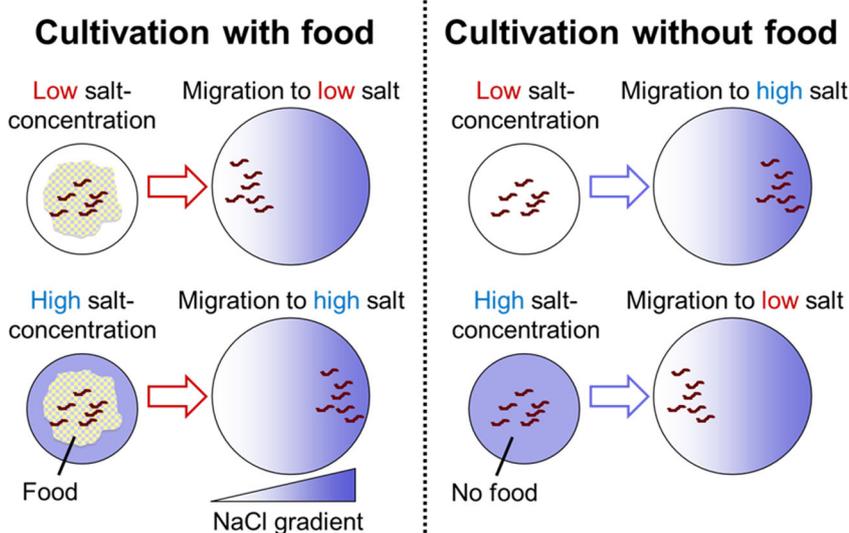
塩濃度学習の行動アッセイは既報に従った<sup>(2)</sup>。塩走性を定量化するため、走性指数 (Chemotaxis index) を算出した。走性指数 =  $\{(高塩濃度側の個体数) - (低塩濃度側の個体数)\} \div \{(全個体数) - (全く移動しなかった個体$

数)} である。走性指数が高いほど、高塩濃度へ移動した虫の割合が高かったことを示す。行動分析 (クリノキネシスおよびクリノタクシスの定量化) は既報に従った<sup>(9)</sup>。

### 2.3 神経細胞の蛍光イメージング

線虫の頭部にあるニューロンの活動を *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<sup>(10)</sup>。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。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、細胞種に特異的に発現するプロモーターを用いてそれぞれの神経に発現させた。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。AIB の神経活動と行動を同時に観察する場合には、微小流路アリーナに入れた線虫個体をトラッキングシステムで観察した。ASER の細胞内塩化物イオン濃度の観察には Superclomeleon を用いた<sup>(11)</sup>。

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、図では“0 mM”と表記) または高塩濃度 (100 mM NaCl を含む NGM 培地、図では“100 mM”と表記) でさらに一晚飼育した。塩濃度変化の刺激として、NaCl の濃度を 50 mM から 25 mM または 25 mM から 50 mM に切り替えた。



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

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

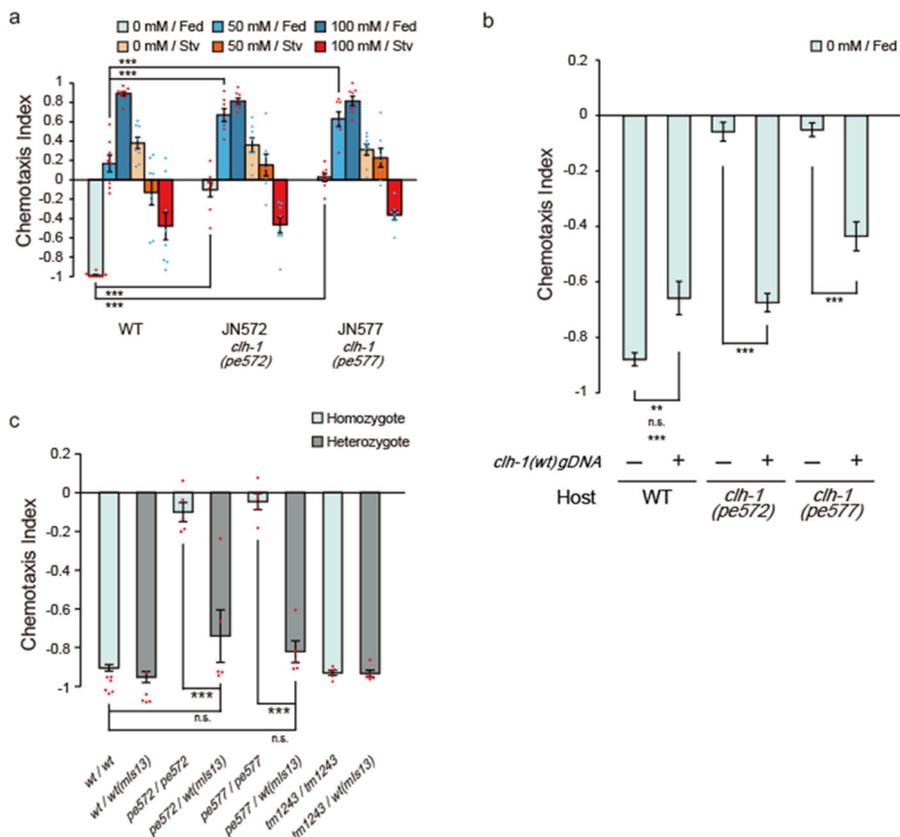
### 3. 研究結果

#### 3.1 CIC チャネルをコードする *clh-1* 遺伝子のミスセンス変異体は塩走性に欠損を示す

塩濃度学習に関与する新規因子を見出すため遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、食餌条件後の塩走性には欠損を示すが飢餓条件後の走性は正常な変異株を複数得た (Figure 2a)。SNPs を用いた変異遺伝子座のマッピングとゲノム塩基配列決定の結果、JN572 と JN577 はいずれも CIC 型陰イオンチャネルをコードする *clh-1* 遺伝子にミスセンス変異をもつことが明らかになった。JN572 は CLH-1 タンパク質に M293I のアミノ酸置換 (以降、*clh-1(pe572)* と表記する) を、JN577 は I146T のアミノ酸置換 (以降、*clh-1(pe577)* と表記する) をそれぞれ有していた。同一遺伝子の変異が独立に複数得られたことから、この遺伝子が塩走性に重要な役割を担っている可能性が高

いと思われた。ところが、*clh-1* 遺伝子の機能を完全に失うと推定される機能喪失変異体は塩走性に異常を示さず (データは示さない)、上記の 2 つの変異体では、*clh-1* 遺伝子が従来とは異なる機能をもつように変化したことが示唆された。また、変異体の塩走性を詳細に調べたところ、変異体は低い塩濃度に向かう走性が野生型に比べ弱まっていることが明らかになった (Figure 2a)。

変異体の表現型は *clh-1* のゲノム DNA 断片を発現させると回復した (Figure 2b)。一方、*clh-1* 機能喪失変異体にミスセンス変異体の *clh-1* DNA 断片を導入すると変異体の表現型を示した (データは示さない)。また、ミスセンス変異アリルと野生型アリルのヘテロ接合体は野生型と同様な表現型を示したことから (Figure 2c)、これらの変異体の表現型の原因は潜在的 *clh-1* のミスセンス変異によると結論付けた。



**Figure 2. Two missense mutations in *clh-1* give rise to food-associated salt chemotaxis disorder.**

(a) Chemotaxis of wild-type animals and two mutants obtained from screening, JN572: *clh-1(pe572)* and JN577: *clh-1(pe577)*. Dots represent individual trials. Bars and the error bars represent mean  $\pm$  s.e.m.,  $n = 8$  assays, Dunnett's test, \*\*\* $p < 0.001$ . (b) Rescue of *clh-1(pe572)* and *clh-1(pe577)* mutants by *clh-1* genomic DNA fragments. Dots represent individual trials. Bars and the error bars represent mean  $\pm$  s.e.m.,  $n \geq 4$ , Tukey's test, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , n.s. not significant. (c) Chemotaxis of *clh-1* heterozygotes. *clh-1* homozygotes were crossed with a *clh-1(wt)* reporter strain that express GFP in pharyngeal muscle (*mls13*). Resulted F1 animals were used for assay. Dots represent individual trials. Bars and the error bars represent mean  $\pm$  s.e.m.,  $n \geq 4$ , Tukey's test, \*\*\* $p < 0.001$ , n.s. not significant.

### 3.2 *clh-1* の変異は反復した塩刺激に対する ASER の応答を減弱させる

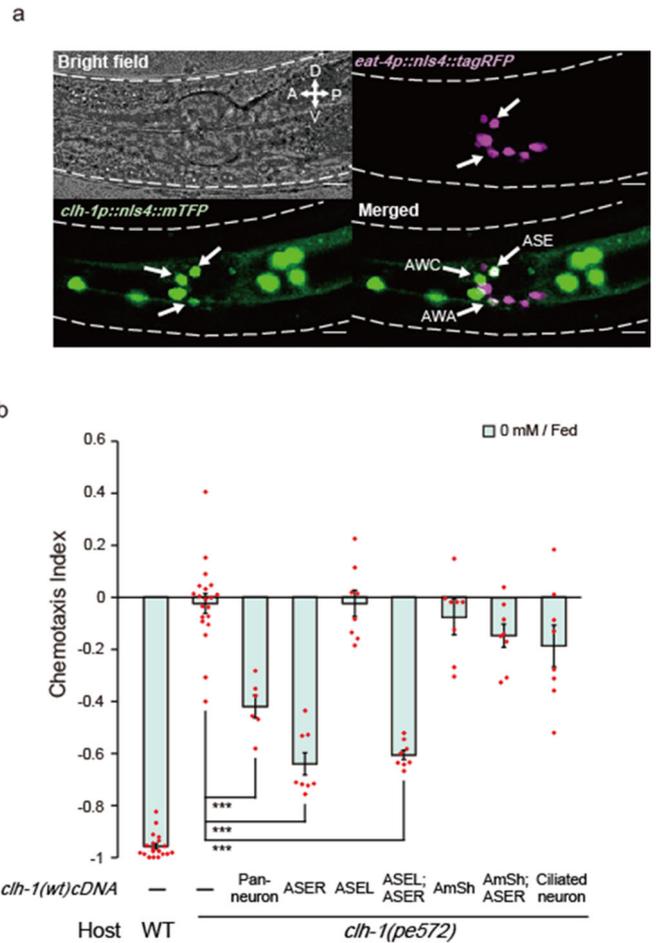
蛍光タンパク質レポーターを用いて神経系における *clh-1* 遺伝子の発現を調べたところ、ASER 味覚神経で発現することが明らかになった (Figure 3a)。組織・細胞特異的に遺伝子の機能を回復させた結果、ASER 味覚神経において正常な *clh-1* 遺伝子が機能することが塩走性に重要であった (Figure 3b)。

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。ASER は環境の塩濃度の低下によって脱分極し、この応答性は飼育塩濃度を変えても、飢餓条件下でも基本的には変化しない<sup>(2, 12)</sup>。野生型と *clh-1(pe572)* および *clh-1(pe577)* 変異体それぞれについてカルシウムイメージングを用いて ASER の塩応答を調べたところ、低塩濃度で飼育した変異体個体の ASER は繰り返し与えられる刺激への応答が弱まっていた (Figure 4a)。これは、塩濃度低下刺激後および刺激除去 (塩濃度上昇) 後の双方において細胞内カルシウム濃度の減衰が弱いことが原因と思われた (Figure 4b)。一方、高塩濃度飼育後では、*clh-1(pe572)* 変異体で常に若干応答が小さいものの、ASER の塩応答に大きな異常は見られなかった (Figure 4c, d)。

続いて、塩化物イオン濃度に応じて蛍光輝度が変化する Superclomeleon を用いて、塩応答に伴う ASER の細胞内塩化物イオン濃度の変化を調べた。その結果、ASER では脱分極に伴って細胞内の塩化物イオンの濃度が上昇し、*clh-1* ミスセンス変異体ではその上昇幅が大きくなっていることが明らかになった (Figure 4e, f)。これらの結果から、*clh-1* 遺伝子は細胞のイオン濃度の調節を介して、塩濃度の変化に対する ASER の応答性に寄与していることが示唆された。

### 3.3 *clh-1* のミスセンス変異体は低塩濃度に向かう行動機構の制御に欠損を示す

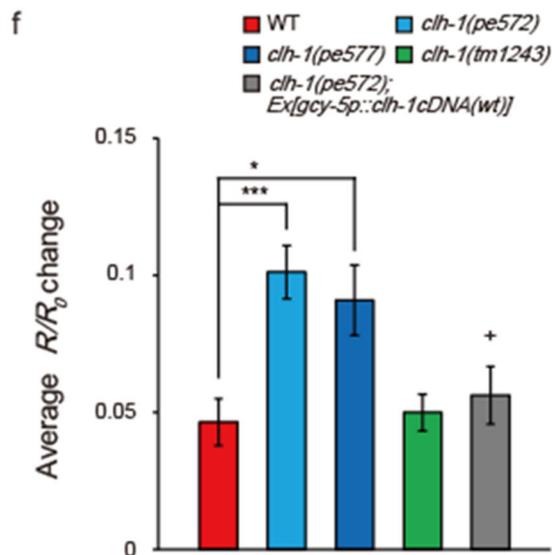
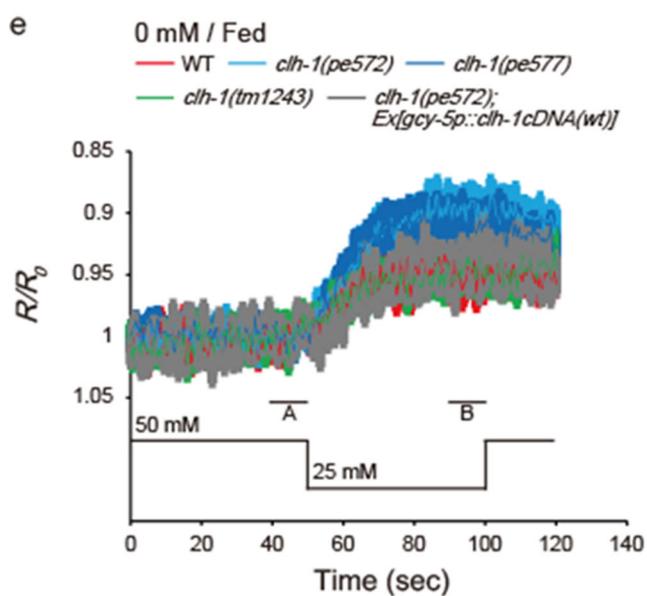
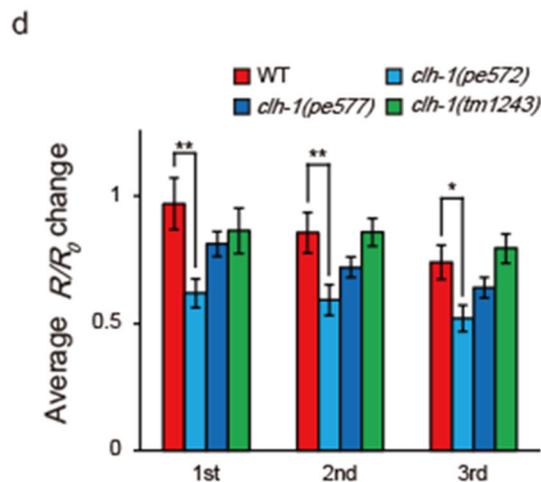
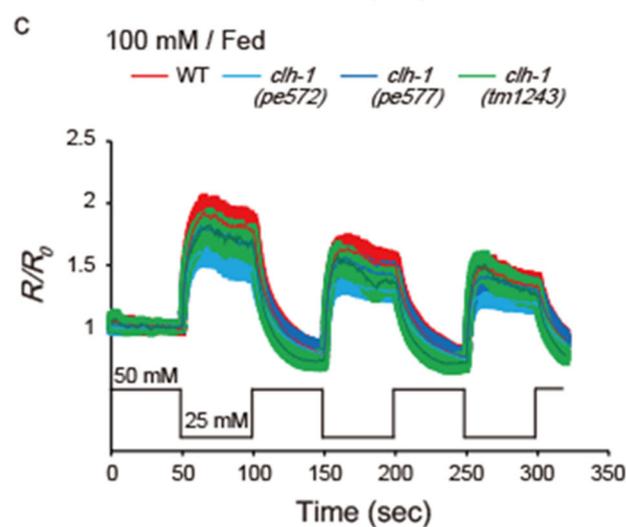
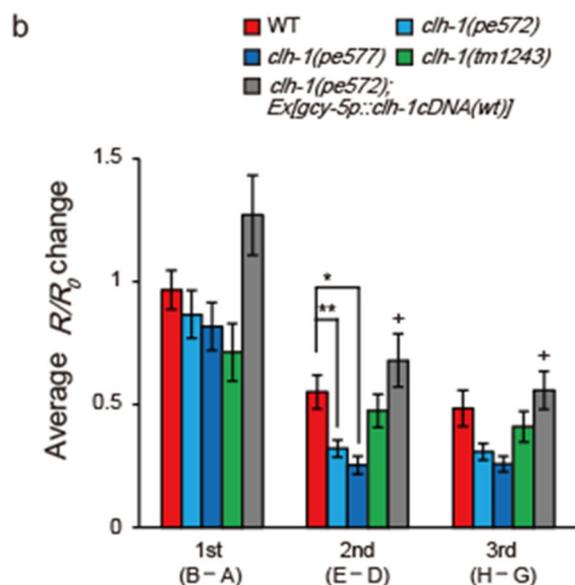
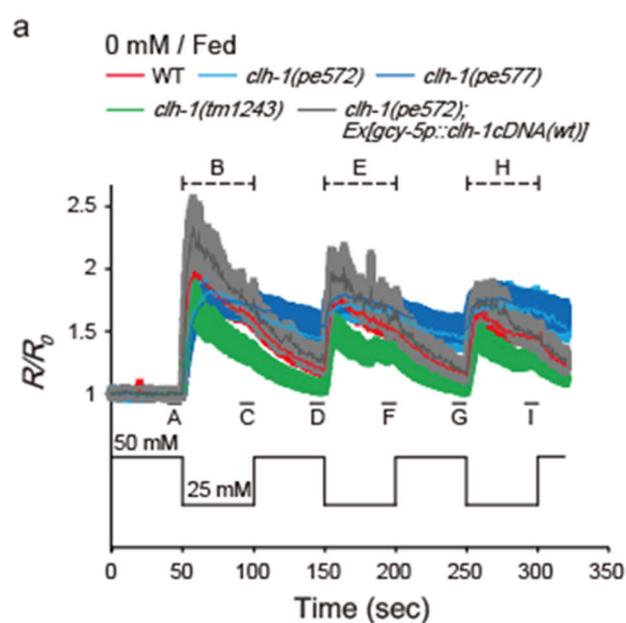
線虫の塩走性では、少なくとも 2 つの行動調節機構が用いられている。一つ目はクリノキネシスと呼ばれ、線虫の探索行動全般にはたらく主要な機構である<sup>(13)</sup>。これは、ある程度長い時間窓で塩濃度の変化を感知し好ましくない方向に進んでいると判断したとき、方向転換の頻度を上昇させて正しい方向へと向かう仕組みである。二つ目の機構はクリノタキシスと呼ばれる。塩走性を観察するプレート



**Figure 3. *clh-1* acts in the salt-sensing neuron ASER.**

(a) Expression pattern of *clh-1p::nls4::mTFP* (green, bottom left) in an adult animal. At least three pairs of sensory neurons, AWA, AWC and ASE expressed the marker. *eat-4p::nls4::tagRFP* and *DiI*, that marks glutamatergic neurons (magenta, top right) and six pairs of head sensory neurons (not shown), respectively, were used as position markers for cell identification. Scale bar = 10  $\mu$ m. (b) Rescue of *clh-1(pe572)* mutants by cell-specific expression of *clh-1(wt)* cDNA. Promoters used in this experiment are as follows; *rimb-1p* for all neurons, *gcy-5p* for ASER, *gcy-7p* for ASEL, *vap-1p* for amphid sheath cells, *dylf-1p* for ciliated neurons. Dots represent individual trials. Bars and the error bars represent mean  $\pm$  s.e.m.,  $n \geq 6$  assays, Tukey's test. \*\*\* $p < 0.001$ .

上では、線虫は頭部を背腹方向に振って前進 (または後退) する。この際、首振りに伴う塩濃度変化を感知し背側または腹側の好ましい濃度方向へ徐々にカーブする<sup>(14)</sup>。線虫はこれら 2 つの機構を組み合わせて好ましい塩濃度に向かう走性を示す。塩走性時の行動を解析した結果、



#### Figure 4. Calcium dynamics of ASER in response to repeated salt stimuli is altered in *clh-1* mutants.

(a and c) Calcium responses of ASER stimulated by NaCl concentration changes between 50 mM and 25 mM after cultivation at 0 mM NaCl (a) or 100 mM NaCl (c) in the presence of food for 6 hr. A to I indicate the time points for calculation of  $R/R_0$  changes. A, D, and G are the time points for pre-stimulus  $R/R_0$ , B, E, and H are the time points for peak  $R/R_0$  during stimulation, C, F, and I are the time points for decayed  $R/R_0$  during stimulation. The shaded region represents s.e.m.,  $n \geq 16$  animals. (b and d)  $R/R_0$  changes at each NaCl down-step stimulus (B - A, E - D, and H - G for the 1st, 2nd, and 3rd stimulus, respectively). 0 mM NaCl cultivated (b) or 100 mM cultivated (d). See Materials and methods for details. Bars and the error bars represent mean  $\pm$  s.e.m., dots represent individual trials.  $n \geq 16$  animals, Tukey's test,  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ ,  $+p < 0.05$ , compared with *clh-1(pe572)* mutant. (f) Responses of SuperClomeleon expressed in ASER after cultivation at 0 mM NaCl in the presence of food. External NaCl concentration was shifted from 50 mM to 25 mM at time 50 s. Note that the scale of the vertical axis is inverted so that increase in chloride concentration is displayed as up-shift of traces. A and B indicate the time points for calculating  $R/R_0$  changes. The shaded region represents s.e.m.,  $n \geq 17$  animals. (g)  $R/R_0$  changes upon salt decrease. Mean  $\pm$  s.e.m., dots represent individual trials.  $n \geq 17$  animals, Tukey's test,  $***p < 0.001$ ,  $*p < 0.05$ , compared with wild type.  $+p < 0.05$ , compared with *clh-1(pe572)* mutant.

*clh-1* ミスセンス変異体は、低塩濃度に向かう行動において、いずれの行動機構にも顕著な異常を示した (Figure 5a, b)。

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。このうち、AIB を活性化すると、クリノキネシス時に観察されるような方向転換を引き起こすことが知られている。AIB の神経活動と線虫の行動を同時にイメージングした結果、*clh-1* ミスセンス変異体は塩濃度上昇刺激に応じた後退行動 (Figure 5c, d) および AIB の神経活動 (Figure 5e, f) に異常を示した。

これらの結果から、ミスセンス変異による CLH-1 の機能変化が味覚神経およびその情報処理を担う神経回路の塩刺激に対する応答を阻害し、塩走性行動に異常をもたらすことが示された。

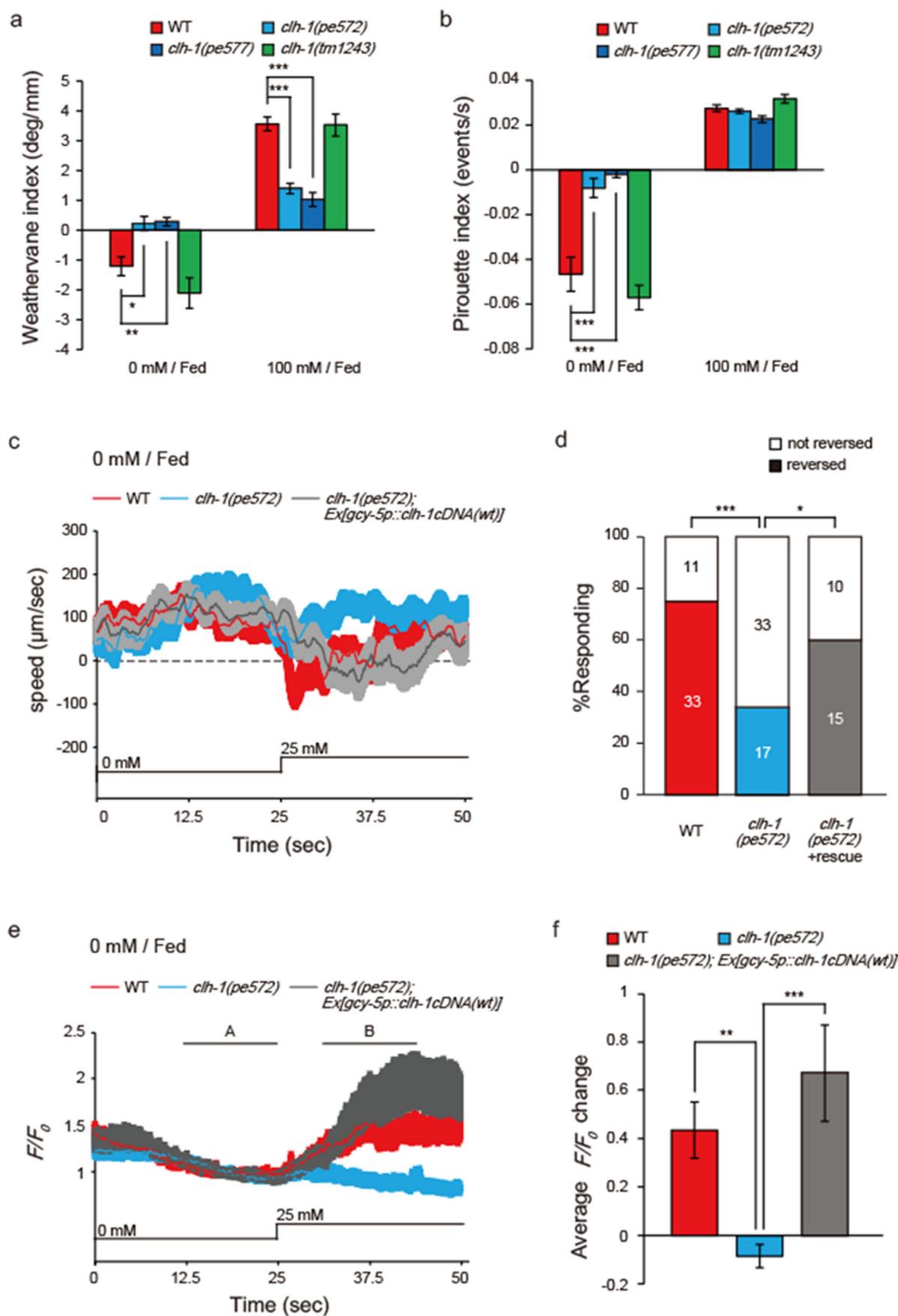
#### 4. 考察と今後の課題

本研究は線虫 *C. elegans* の塩濃度学習の実験系を用いて、CIC 型クロライドチャンネル CLH-1 が味覚神経の神経活動および塩走性行動の調節に関与することを明らかにした。

*clh-1(pe572)* および *clh-1(pe577)* 変異体は低い塩濃度に向かう行動に欠損を示した。ここでは、クリノタキシスの調節機構について考察する。クリノタキシスでは、線虫は首振りに伴ってわずかに上下する塩濃度をモニターする必要がある。*clh-1* ミスセンス変異体では、低塩濃度飼育後および高塩濃度飼育後のいずれの条件においてもクリノタキシスに異常を示した。低塩濃度飼育後に塩濃度変化の反復刺激に対する ASER の応答性が低下していたこ

とは、この表現型と良く一致する。一方で、高塩濃度飼育後には ASER の応答に大きな異常は見られなかった。この結果は、ASER の応答に CLH-1 のミスセンス変異が与える影響は飼育塩濃度の違いにより異なることを示している。これまでの研究から、今回用いた行動アッセイや神経活動の観察実験において、ASER は低塩濃度飼育後の実験条件ではどちらかといえば過分極の状態、高塩濃度飼育後は脱分極の状態にあると推定される。低塩濃度飼育後の塩濃度低下刺激よって ASER の細胞内塩化物イオン濃度が上昇し、その大きさは野生型よりミスセンス変異体で大きいことが明らかになったが、これ以外の条件における塩化物イオン濃度の変化や細胞内外のイオン環境は不明である。CLH-1 の変異による ASER の塩応答への影響を詳細に調べるにはパッチクランプ実験などが必要である。また上述の結果は、ASER の応答がクリノタキシスに依存した行動調節に与える影響は低塩濃度飼育後に大きく、高塩濃度飼育後は小さいことを示唆している。高塩濃度飼育後は ASER 以外の味覚神経の寄与や神経回路レベルの調節がはたしている可能性が考えられる<sup>(15,16)</sup>。

CIC 型クロライドチャンネルは種を越えて保存されている。ほ乳類には CIC ファミリーの遺伝子が 9 個あり、それぞれ、細胞膜または細胞小器官の膜において塩化物イオン (Cl<sup>-</sup>) や重炭酸イオン (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) などの陰イオンを通過させるチャンネルまたはトランスポーターとして機能する。これらは細胞内のイオン環境を一定に保つのに不可欠なほか、筋やニューロンなどの興奮性細胞では膜電位の調節に寄与する。



**Figure 5. Missense mutations in *clh-1* attenuate both klinotaxis and klinokinesis, as well as AIB response and reversal in response to salt increase.**

(a and b) *clh-1(pe)* mutants show defects in migration bias in salt chemotaxis. Bias of klinotaxis (a) and klinokinesis (b), represented by weathervane index and pirouette index, respectively. In both mechanisms, positive and negative values indicate migration bias toward higher and lower salt concentrations, respectively. Bars and the error bars represent mean  $\pm$  s.e.m., dots represent individual trials.  $n \geq 18$  assays, Dunnett's test, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . (c and e) Locomotion speed of animals (c) and calcium responses of AIB (e) after cultivation at 0 mM NaCl in the presence of food. In panel (e), A and B indicate the time points for calculation of  $F/F_0$  changes. NaCl concentration change from 0 mM to 25 mM at 25 s. The shaded region represents s.e.m.,  $n \geq 25$  animals. (d) Proportion of animals that showed reversal after salt stimulus. Reversal was defined as follows; backward locomotion, whose velocity less than  $-100 \mu\text{m}/\text{sec}$  was continued for more than 1 s (35 frames). The error bars represent s.e.m.,  $n \geq 25$  animals, Fisher's exact test. \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ . (f)  $F/F_0$  change upon salt stimulus (B - A, see Materials and methods for details). Bars and the error bars represent mean  $\pm$  s.e.m., dots represent individual trials.  $n \geq 25$  animals, Tukey's test, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ .

CLCNI 遺伝子にコードされている骨格筋型クロライドチャネル CIC-1 の機能低下は先天性ミオトニーを引き起こすことが知られ、CIC-1 全体にわたって疾患の原因となる変異が同定されている<sup>(17)</sup>。*clh-1(pe572)*と *clh-1(pe577)*の変異はいずれもチャネルのポアを形成する膜貫通ヘリックスの内部にあり、疾患の原因となる相同な変異は同定されていなかった。本研究の CLH-1 の機能解析から得られた結果は、ヒトの神経系における CIC タンパク質の機能や CIC タンパク質に関わる疾患の理解にも寄与し得る。

## 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. T. Inui, C. Inui-Yamamoto, Y. Yoshioka, I. Ohzawa, T. Shimura, Activation of efferents from the basolateral amygdala during the retrieval of conditioned taste aversion. *Neurobiol. Learn. Mem.* 106, 210–220 (2013).
2. H. Kunitomo, et al., Concentration memory-dependent synaptic plasticity of a taste circuit regulates salt concentration chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* 4, 2210 (2013).
3. M. Tomioka, et al., The Insulin/PI 3-Kinase Pathway Regulates Salt Chemotaxis Learning in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* 51, 613–625 (2006).
4. H. Ohno, et al., Role of synaptic phosphatidylinositol 3-kinase in a behavioral learning response in *C. elegans*. *Science* (80-. ). 345, 313–317 (2014).
5. R. Iwata, S. Oda, H. Kunitomo, Y. Iino, Roles for class IIA phosphatidylinositol transfer protein in neurotransmission and behavioral plasticity at the sensory neuron synapses of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7589–7594 (2011).
6. T. Adachi, et al., Reversal of salt preference is directed by the insulin/PI3K and G q/PKC signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 186, 1309–1319 (2010).
7. S. Brenner, The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94 (1974).
8. C. C. Mello, J. M. Kramer, D. Stinchcomb, V. Ambros, Efficient Gene-Transfer in *C-Elegans* - Extrachromosomal Maintenance and Integration of Transforming Sequences. *Embo J.* 10, 3959–3970 (1991).
9. K. Yoshida, et al., Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*. *Nat. Commun.* 3, 739 (2012).
10. J. P. Nguyen, et al., Whole-brain calcium imaging with cellular resolution in freely behaving *Caenorhabditis elegans*. *P Natl Acad Sci Usa* 113, E1074-81 (2015).
11. O. Markova, M. Mukhtarov, E. Real, Y. Jacob, P. Bregestovski, Genetically encoded chloride indicator with improved sensitivity. *J. Neurosci. Methods* 170, 67–76 (2008).
12. C. I. Bargmann, H. R. Horvitz, Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to

- multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron* 7, 729–742 (1991).
13. J. T. Pierce-Shimomura, T. M. Morse, S. R. Lockery, The fundamental role of pirouettes in *Caenorhabditis elegans* chemotaxis. *J. Neurosci.* 19, 9557–9569 (1999).
  14. Y. Iino, K. Yoshida, Parallel Use of Two Behavioral Mechanisms for Chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 29, 5370–5380 (2009).
  15. L. Wang, et al., A Gustatory Neural Circuit of *Caenorhabditis elegans* Generates Memory-Dependent Behaviors in Na + Chemotaxis. *J. Neurosci.* 37, 2097–2111 (2017).
  16. M. S. M. S. Jang, Y. Toyoshima, M. Tomioka, H. Kunitomo, Y. Iino, Multiple sensory neurons mediate starvation-dependent aversive navigation in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 18673–18683 (2019).
  17. A. Thiemann, S. Gründer, M. Pusch, T. J. Jentsch, A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356, 57–60 (1992).

## Molecular and Neural Mechanisms of Salt Chemotaxis Learning

Hirofumi Kunitomo<sup>1</sup>, Chanhyun Park<sup>1</sup>, Hirofumi Sato<sup>1</sup>, Haruo Ogawa<sup>2</sup>, Yuichi Iino<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, School of Science, The University of Tokyo

<sup>2</sup> Institute for Quantitative Biosciences, The University of Tokyo

### Summary

Taste preference is determined by environmental factors such as dietary habits as well as by genetic factors. It is proposed that an associative learning of taste experience and emotion upon eating plays an important role in formation of taste preference. However, mechanisms as to how sensory information and internal state of the brain are integrated and memorized, and how feeding behavior is regulated based on the memory are not fully understood. Taste-dependent learning is an essential ability for animals to adapt to the natural environment, therefore such ability is found even in animals with a simple nervous system. The soil nematode *Caenorhabditis elegans* migrates toward the salt concentration at which it has been fed, while avoid the concentration at which it experienced starvation. Preference for a particular salt concentration depends on either food or salt-concentration conditions. Therefore, salt chemotaxis of *C. elegans* is a form of associative learning in which food and salt concentration are memorized (salt concentration learning). Our goal is understanding of the mechanisms by which exploratory behavior is regulated based on memory at the molecular and cellular level. In this study, we elucidated the function of a ClC channel of *C. elegans* whose mutations resulted in defects in salt concentration learning.

Through genetic analyses of the mutants, we identified two independent missense mutations in the *clh-1* gene as the responsible factor for salt concentration learning. *clh-1* is one of the six ClC anion channel/transporter genes of *C. elegans*. Interestingly, loss of function of *clh-1* showed no defects in salt chemotaxis, suggesting that the mutations conferred a novel activity to the CLH-1 channel in the mutants. Functional imaging approaches revealed that CLH-1 contributes to the salt response of a gustatory neuron through regulating intracellular chloride ion concentration. Salt response of the gustatory neuron as well as the responses of the postsynaptic interneurons that regulate exploratory behavior were severely weakened in the mutants. ClC channels are conserved in humans, and some are involved in genetic diseases. Our results may contribute to understanding the roles of ClC channels in the nervous system in higher organisms.