

味覚嗜好の調節に関与する、イオン感知神経の塩応答と細胞外塩化物イオン濃度の制御機構の解明

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 味覚の嗜好の決定には、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。味覚学習は餌を探索し選別するために必要なため、簡単な神経系をもつ生物にもその能力が備わっている。土壌線虫の *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。餌または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、過去に経験した餌の有無と塩濃度を関連付けた記憶に基づく連合学習と考えられる(塩濃度学習)。我々は塩濃度学習の機構を調べ、感覚刺激強度の記憶や連合学習における情報の統合、適応行動の分子・神経機構を解明することを目指している。

本研究では、学習による探索行動の制御に寄与するシナプス可塑性の分子機構を調べるため、シナプス伝達変異体を用いて神経活動と行動の同時観察を行った。その結果、味覚神経から後シナプス介在神経への塩情報の伝達は飼育された塩濃度の高低によって興奮性と抑制性の双方の性質を示すこと、また味覚神経から分泌されるグルタミン酸および介在神経で機能する興奮性と抑制性の受容体が経験に依存したシナプス伝達の調節を担うことが明らかになった。抑制性のグルタミン酸受容体は他の生物種にも保存されている。本研究の成果は、他種におけるシナプス可塑性や学習の機構の理解に役立つと期待される。

1. 研究目的

味覚の嗜好は食習慣などの環境要因によって変化する。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、および扁桃体をはじめとする脳内報酬系の関与が示唆されている¹⁾。味覚学習は効率よく餌を探索し選別するために必要なため、シンプルな神経系をもつ生物にもその能力が備わっている。土壌線虫の *C.エレガンス* は、塩化ナトリウム(これ以降、塩と記す)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。餌または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、過去に経験した餌の有無と塩濃度を関連付けた記憶に基づく連合学習と考えられる(塩濃度学習, **Figure 1**)²⁾。我々は塩濃度学習の機構を調べ、感覚

刺激強度の記憶や連合学習における情報の統合、適応行動の分子・神経機構を解明することを目指している。

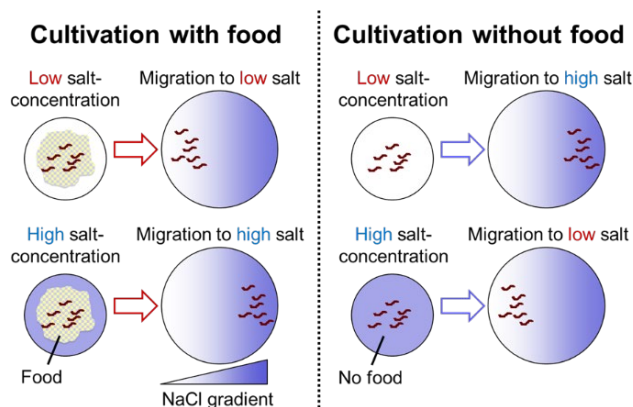


Figure 1. Salt concentration learning of *C. elegans*.

Wild-type *Caenorhabditis 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).

線虫の走化性では、方向転換頻度の調節によって探索行動が制御される。塩濃度学習では、低い塩濃度で飼育された線虫は、塩濃度の勾配を上るときに方向転換の頻度を上昇させ勾配を下るときに方向転換を抑制することにより低塩濃度側へ移動する。高い塩濃度で飼育された線虫では、塩濃度の変化と方向転換頻度の関係が逆になる。またこれまでの研究から、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 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。飼育塩濃度に関わらず、ASER 神経の活動は環境の塩濃度が低下すると活性化し、塩濃度が上昇すると抑制される。②ASER 神経と一次介在神経 AIB 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。AIB 神経が活性化すると方向転換が促進される²⁻⁴⁾。

上述した ASER 神経の塩応答および AIB 神経の性質は、探索行動の制御とシナプス可塑性の関係に下記の疑問を生じる。低い塩濃度で飼育された線虫は、塩濃度が上昇し ASER 神経が抑制されるときに AIB 神経が活動して方向転換が促進される。逆に、高い塩濃度で飼育された線虫では、塩濃度が低下し ASER 神経が活性化されるときに AIB 神経が活動する。個体の行動と神経活動を同時に記録する実験から、実際に、ASER 神経から AIB 神経へのシナプス伝達は、飼育条件に依存して抑制性と興奮性の相反する性質を示すことが明らかになっていた (Figure 2)。シナプス伝達は強弱が変化することはあっても、その符号が逆転するケースは少ない。ASER・AIB 神経間のシナプス可塑性はどのような仕組みで調節されているのだろうか。本研究では、シナプスの符号が変化する分子機構を調べるため、野生型およびシナプス伝達変異体を用いて行動と神経活動の同時記録を行った。その結果、ASER 神経から AIB 神経への塩情報の伝達は、ASER 神経から分泌されるグルタミン酸と、AIB 神経で機能する AMPA 型受容体およびグルタミン酸依存性塩化物イオンチャンネル (GluCl) によって担われることが明らかになった。

2. 研究方法

2.1 線虫の培養と遺伝学

線虫の培養や形質転換など、分子遺伝学の実験手法は一般的な方法に従った^{5,6)}。

2.2 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⁷⁾。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 神経における発現には *gcy-5* プロモーター、AIB 神経には *npr-9* プロモーターを用いた。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て神経活動と行動を同時に計測した^{8,9)}。

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) または高塩濃度 (50 mM または 100 mM NaCl を含む NGM 培地) でさらに一晩飼育した。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。

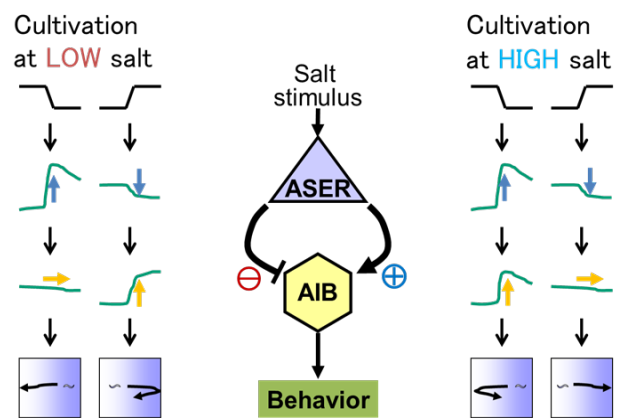


Figure 2. Synaptic transmission from ASER salt sensing neuron to AIB interneuron reverses depending on previous cultivation salt concentrations.

In the animals that had been cultivated at low concentrations of NaCl in the presence of food (left), synaptic connection from ASER to AIB shows an inhibitory transmission property. On the other hand, in the animals cultivated at high concentrations of salt (right), the connection shows excitatory transmissions.

3. 結果

3. 1 ASER 神経から AIB 神経への神経伝達の可塑性は ASER からのグルタミン酸放出に依存する

ASER 神経は神経伝達物質としてグルタミン酸を放出する¹⁰。ASER・AIB 神経間のグルタミン酸神経伝達が塩濃度学習における行動の制御に関与する可能性を検討するため、変異体を用いて行動と神経活動の同時記録を行った。*eat-4* 遺伝子は、線虫の神経で機能する小胞性グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)をコードする唯一の遺伝子である^{10, 11}。野生型では、低塩濃度飼育後に塩濃度上昇刺激 (Figure 3A, inset), または高塩濃度飼育後に塩濃度低下刺激 (Figure 3B, inset) を与えると AIB 神経の細胞内カルシウム濃度が上昇(脱分極)する。これらの応答は *eat-4* 変異体では顕著に弱かった。また, ASER 神経のみに正常な *eat-4* 遺伝子を発現させることにより AIB 神経の塩応答が回復した (Figure 3A および B, 上)。AIB 神経の脱分極は方向転換頻度の上昇を引き起こす³。*eat-4* 変異体では、方向転換の引き金となる移動速度の低下と後退運動が顕著に弱かった。この表現型は ASER 神経における *eat-4* 遺伝子の発現により回復した (Figure 3A および B, 下)。これらの結果は、飼育塩濃度に依存した ASER・AIB 間神経伝達の可塑性は ASER からのグルタミン酸放出に依存することを示す。

3. 2 ASER 神経から AIB 神経への神経伝達の可塑性は AIB 神経における AMPA 型グルタミン酸受容体 GLR-1 の機能に依存する

次に、AIB 神経におけるグルタミン酸受容体について検討した。AIB 神経には AMPA 型受容体の GLR-1 が発現し、嗅覚情報の伝達等で機能している^{12, 13}。*glr-1* 変異体では飼育塩濃度に依存した AIB 神経の塩応答が顕著に弱く、変異体の AIB 神経のみに野生型の *glr-1* 遺伝子を発現させることにより応答が回復した (Figure 4A および B, 上)。また *glr-1* 変異体では塩刺激に伴う方向転換の促進も顕著に弱まり、この表現型は AIB 神経における *glr-1* 遺伝子の発現により回復した。但し、低塩濃度飼育後の塩濃度上昇刺激に対する応答(抑制性の伝達)では、回復は部分的だった (Figure 4A)。以上の結果は、飼育塩濃度に依存した ASER・AIB 神経間の興奮性伝達、および抑制性伝達の少なくとも一部は、AIB 神経における GLR-1 受容体に依存することを示す。

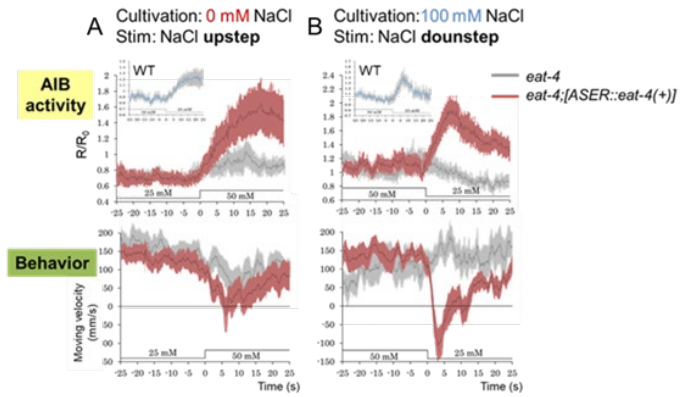


Figure 3. EAT-4 acts in ASER for the experience-dependent synaptic transmission between ASER and AIB.

Calcium responses of AIB (upper panels) and moving velocity of animals (lower panels) upon the stimulus of salt-concentration up-step after cultivation at 0 mM NaCl (A) or the stimulus of salt-concentration down-step after cultivation at 100 mM NaCl (B). Wild type (upper panel, inset), *eat-4(ky5)* mutants (gray) and *eat-4(ky5)* mutants whose ASER was solely rescued (dark red). Shaded region around the lines represents S.E.M. n = 15-26.

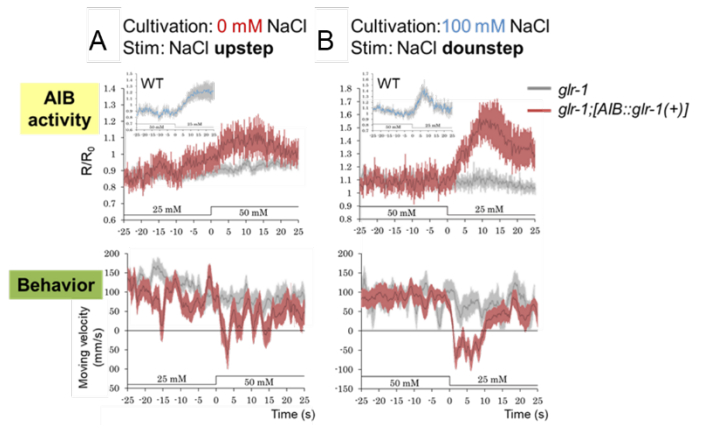


Figure 4. GLR-1 acts in AIB for the experience-dependent synaptic transmission between ASER and AIB.

Calcium responses of AIB (upper panels) and moving velocity of animals (lower panels) upon the stimulus of salt-concentration up-step after cultivation at 0 mM NaCl (A) or the stimulus of salt-concentration down-step after cultivation at 100 mM NaCl (B). Wild type (upper panel, inset), *glr-1(ky176)* mutants (gray) and *glr-1(ky176)* mutants whose AIB was rescued (dark red). Shaded region around the lines represents S.E.M. n = 17-24.

3. 3 ASER 神経から AIB 神経への抑制性の神経伝達にはグルタミン酸依存性塩化物イオンチャネル AVR-14 が関与する

これまでの結果から、ASER・AIB 神経間のシナプス伝達の飼育塩濃度に依存した調節は、ASER 神経からのグルタミン酸放出と AIB 神経における AMPA 型受容体によ

って担われていることが明らかになった。低塩濃度飼育後に観察される抑制性伝達は両者のみでは不十分で、AIB神経ではたらく抑制性受容体の関与が示唆された。AIB神経で抑制性のグルタミン酸受容体が機能していれば、塩濃度上昇刺激により ASER 神経が過分極してグルタミン酸の放出量が減少すると AIB 神経は脱抑制される。線虫はグルタミン酸依存性塩化物イオンチャンネル (GluCl) などの抑制性のグルタミン酸受容体を持ち、AIB 神経において GluCl のサブユニットの一つである AVR-14 が機能することが知られている^{14,15}。avr-14 変異体では、低塩濃度飼育後の塩濃度上昇刺激に対する応答が減弱していた (Figure 5A)。この表現型は、変異体の AIB 神経で正常な avr-14 遺伝子を発現することにより回復した (Figure 5C)。一方、高塩濃度飼育後の塩濃度低下刺激への応答は野生型と同様に観察された (Figure 5B, D)。以上の結果は、ASER・AIB 間の抑制性の伝達に AVR-14 が寄与していることを示す。

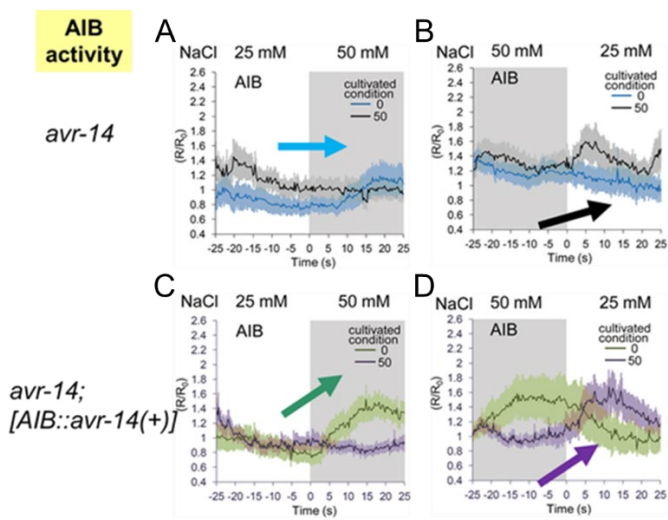


Figure 5. AVR-14, an inhibitory glutamate receptor that acts in AIB, is involved in the inhibitory synaptic transmission between ASER and AIB after cultivation at low concentrations of salt.

Calcium responses of AIB of the *avr-14(adl302)* mutants (A and B) and *avr-14(adl302)* mutants whose AIB was rescued (C and D). Salt-concentration up-step (A and C) or down-step (B and D) after cultivation at 0 mM or 50 mM of NaCl. Shaded region around the lines represents S.E.M. n = 19–22.

4. 考察と今後の課題

本研究では、線虫 *C. elegans* の塩濃度学習に関与するシナプス可塑性の分子機構として、味覚神経からのグルタミン酸放出と、後シナプス介在神経における興奮性 (AMPA 受容体, GLR-1) および抑制性 (GluCl, AVR-14) の受容体のはたらきが必要なことを明らかにした。GLR-1 は興奮性、抑制性両方の伝達に寄与し、AVR-14 は抑制性伝達に寄与していた。ほ乳類のほとんどのニューロンが悉無律に従って刺激に応答するのは異なり、線虫の神経伝達は段階的な性質を示す (graded synapse) ことが知られている^{16,17}。すなわち、シナプス前細胞に入力が無いときも常に放出される伝達物質によってシナプス後細胞に信号が送られ、シナプス前細胞の膜電位に応じて伝達物質の放出量が増減しシナプス後細胞の応答が連続的に調節される。GLR-1 が興奮性、抑制性両方の伝達に必要なのは、飼育条件によらず AIB 神経の段階的応答に必須な役割を担っているためと考えられる。一方、抑制性受容体である AVR-14 の効果は、低塩濃度飼育後に顕著に現れる。最近になって、低塩濃度飼育後にのみ AVR-14 が活性化する仕組みが明らかになった。AVR-14 が反応するグルタミン酸の濃度は GLR-1 の反応領域の低濃度側と重なり、ASER 神経からのグルタミン酸放出レベルは低塩濃度飼育後に低く、高塩濃度飼育後にはそれより高いことを示す結果が得られた。これらの結果は、低塩濃度飼育後には ASER 神経の活動が GLR-1 と AVR-14 の両者を介して AIB に伝達され、GLR-1 に比べて AVR-14 の寄与が大きい場合には抑制性伝達となることを示唆している。一方、高塩濃度飼育後にはグルタミン酸レベルが高いため GLR-1 が主として働き、興奮性伝達となる (Hiroki et al., in press)。この仮説は飼育塩濃度に依存してシナプスの極性が反転する仕組みをうまく説明できる。受容体の発現レベルやシナプスへの局在の変化が関与する可能性も残っている。

学習や記憶の神経基盤となるシナプス可塑性のメカニズムは、シナプスの数や大きさの変化、受容体の種類、数や分布の変化など様々なものが既に知られている。多くの場合、シナプス可塑性によって伝達効率が上下することはあっても興奮性と抑制性が切り替わる例は稀である。本研究は線虫を用いて、性質の異なる受容体が協働することによりシナプスの符合が反転する新たな機構を明らかにした。このシナプス可塑性は、個体が過去に経験した塩濃

度と餌の情報を統合する連合学習において、移動方向を反転させる行動の制御に関与する。GluCl は無脊椎動物に広く保存されている。同様なシナプス可塑性の調節機構は他種においても用いられていると推定される。

今回の研究から、餌を経験した塩濃度に依存した行動制御の神経機構が明らかになった。線虫の塩濃度走性は、餌の有無によっても移動方向が制御される。これにはグルタミン酸作動性のシナプス伝達に加えて、神経ペプチドの関与が明らかになっている。我々は ASER 神経におけるインスリンシグナルが重要な役割を担うことを既に明らかにしているが¹⁸⁻²¹⁾、他の複数の神経ペプチドが関与することを見出している。これらの役割を明らかにすることにより、塩濃度学習を制御する神経機構の全容に迫れると考えている。

我々は 2020 年度ソルト・サイエンス研究財団研究助成 2043「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」を受けて線虫の味覚学習に必要な遺伝子の機能解明に取り組み、CIC 型塩化物イオンチャネル CLH-1 の変異が ASER 神経の塩応答、ひいては塩走性行動に異常をもたらすことを明らかにした²²⁾。この成果を発展させるため、2021 年度は以下の 3 項目に取り組んだ。①味覚神経シナプスにおける陰イオン濃度の調節機構の解明、②味覚神経から介在神経へのシナプス伝達可塑性の制御機構の解明、③無脊椎動物における無機イオンの受容機構の解明。項目①については、AIB 神経において低塩濃度飼育後にのみ GluCl がはたらく機構の一つとして引き続き検討している。すなわち、上述した受容体のグルタミン酸感受性の違いに加えて、飼育塩濃度の低下(または ASER 神経の活性化)に伴ってシナプス近傍の塩化物イオン濃度が上昇し GluCl が機能する条件が整う可能性がある。最近になって、CLH-1 がグリア細胞外の塩化物イオン濃度を調節し ASH 感覚神経の接触刺激応答に寄与することが示唆された²³⁾。塩走性においても類似した機構がはたらき得る。項目③は塩受容体分子のヘテロ発現系の確立を進めるとともに、重金属イオンの受容体をスクリーニングする実験系の構築に着手した。これらの 2 項目についてはまとまった結果が得られなかったため、本報告書には記載していない。

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. 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. B. J. Piggott, J. Liu, Z. Feng, S. A. Wescott, X. Z. S. S. Xu, The neural circuits and synaptic mechanisms underlying motor initiation in *C. elegans*. *Cell* 147, 922–933 (2011).
4. L. Wang, et al., A gustatory neural circuit of *Caenorhabditis elegans* generates memory-dependent behaviors in Na⁺ chemotaxis. *J. Neurosci.* 37, 2097–2111 (2017).
5. S. Brenner, The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94 (1974).
6. 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).
7. J. P. Nguyen, et al., Whole-brain calcium imaging with cellular resolution in freely behaving *Caenorhabditis elegans*. *P Natl Acad Sci Usa* 113, 33 (2015).
8. D. R. Albrecht, C. I. Bargmann, High-content behavioral analysis of *Caenorhabditis elegans* in precise spatiotemporal chemical environments. *Nat. Methods* 8, 599–605 (2011).
9. H. Sato, H. Kunitomo, X. Fei, K. Hashimoto, Y. Iino, Simultaneous recording of behavioral and neural responses of free-moving nematodes *C. elegans*. *STAR Protoc.* 2 (2021).
10. E. Serrano-Saiz, et al., Modular control of glutamatergic neuronal identity in *C. elegans* by distinct homeodomain proteins. *Cell* 155, 659–673 (2013).

11. R. Y. N. Lee, E. R. Sawin, M. Chalfie, H. R. Horvitz, L. Avery, EAT-4, a homolog of a mammalian sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 19, 159–167 (1999).
12. P. J. Brockie, D. M. Madsen, Y. Zheng, J. Mellem, A. V. Maricq, Differential expression of glutamate receptor subunits in the nervous system of *Caenorhabditis elegans* and their regulation by the homeodomain protein {UNC-42.}. *J. Neurosci.* 21, 1510–1522 (2001).
13. S. H. Chalasani, et al., Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 450, 63–70 (2007).
14. D. F. Cully, et al., Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371, 707–711 (1994).
15. P. J. Summers, et al., Multiple Sensory Inputs Are Extensively Integrated to Modulate Nociception in *C. elegans*. *J. Neurosci.* 35, 10331–10342 (2015).
16. M. B. Goodman, D. H. Hall, L. Avery, S. R. Lockery, Active currents regulate sensitivity and dynamic range in *C. elegans* neurons. *Neuron* 20, 763–772 (1998).
17. Q. Liu, G. Hollopeter, E. M. Jorgensen, Graded synaptic transmission at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10823–10828 (2009).
18. M. Tomioka, et al., The Insulin/PI 3-Kinase Pathway Regulates Salt Chemotaxis Learning in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* 51, 613–625 (2006).
19. 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).
20. H. Ohno, et al., Role of synaptic phosphatidylinositol 3-kinase in a behavioral learning response in *C. elegans*. *Science* (80-.). 345, 313–317 (2014).
21. T. Nagashima, Y. Iino, M. Tomioka, DAF-16/FOXO promotes taste avoidance learning independently of axonal insulin-like signaling. *PLoS Genet.* 15, 1–24 (2019).
22. C. Park, et al., Roles of the CLC chloride channel CLH-1 in food-associated salt chemotaxis behavior of *C. elegans*. *Elife* 10, 1–27 (2021).
23. J. Fernandez-Abascal, et al., A glial Cl⁻ channel mediates nose touch responses in *C. elegans*. *Neuron* 110, 470–485.e7 (2022).

The Regulatory Mechanisms of Ion Response and Extracellular Ionic Milieu of a Salt-Sensing Neuron that Dictate Taste Preference.

Hirofumi Kunitomo, Hirofumi Sato, Yuichi Iino

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

Summary

Taste preference is determined by dietary habits. However, neural substrate that underlies formation of taste preference, such as synaptic regulation that directs different behavioral preference of food, is not fully understood. Since taste learning is necessary for animals to effectively search for food, such ability is equipped in the animals with a simple nervous system. The soil nematode *Caenorhabditis elegans* migrates toward the salt concentration at which it has been fed, while avoids the concentration at which it experienced starvation.

To understand the molecular mechanisms that regulate synaptic plasticity contributing to the bi-directional, experience-dependent salt chemotaxis behavior, we performed simultaneous monitoring of neural activity and locomotion of animals while delivering salt stimulus using synaptic transmission mutants. We here demonstrate that the synapse between a gustatory neuron to a postsynaptic interneuron shows both excitatory and inhibitory transmission properties depending on previously experienced salt concentrations. This bidirectional neural response is mediated by glutamate released from the gustatory neuron. Glutamate acts through an AMPA-type excitatory glutamate receptor and an inhibitory glutamate-dependent chloride channel, both acting in the interneuron. These findings suggest that experience-dependent synaptic plasticity is generated by altering the excitatory and inhibitory postsynaptic signals from a sensory neuron to interneurons.