高等研究院全学初年時プログラム「学問の面白さを知る」

行動から脳のはたらきを知る

＜小さな生物の研究から生命のからくりの理解へ＞

名古屋大学大学院理学研究科
生命理学専攻
分子神経生物学グループ

森　郁恵

July 14, 2009

外界は脳で感じる

刺激
⇩
感覚器官
⇩
脳
（記憶•学習）

例
視覚：光（眼、網膜）
聴覚：音（耳、内耳）
嗅覚：揮発物質（鼻、嗅粘膜）

心は脳でつくる

メニューを見る（眼）
⇩
迷う・とまどう・即決
（過去の記憶：情報処理）
⇩
オーダーする

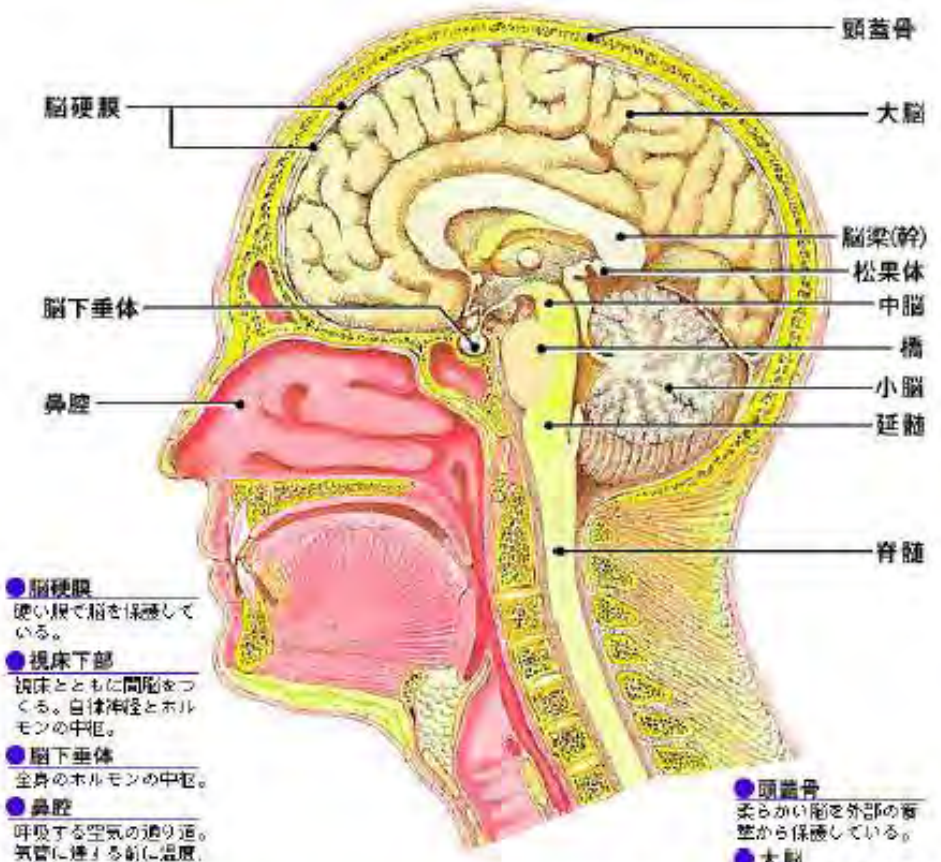
外界は脳で感じる

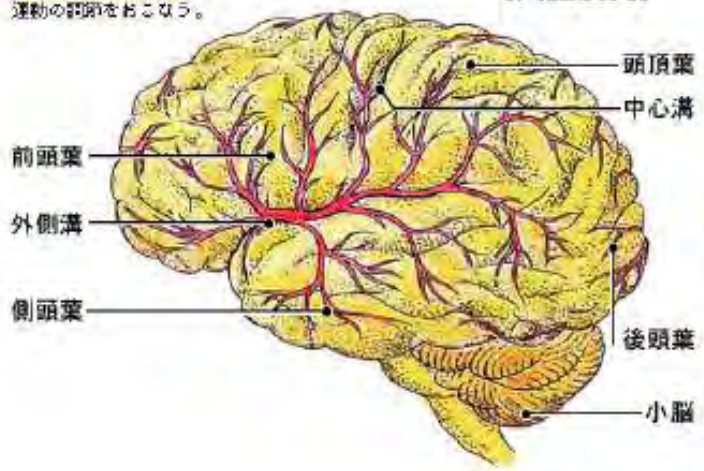
刺激
⇩
感覚器官
⇩
脳
（記憶•学習）

例
視覚：光（眼、網膜）
聴覚：音（耳、内耳）
嗅覚：揮発物質（鼻、嗅粘膜）

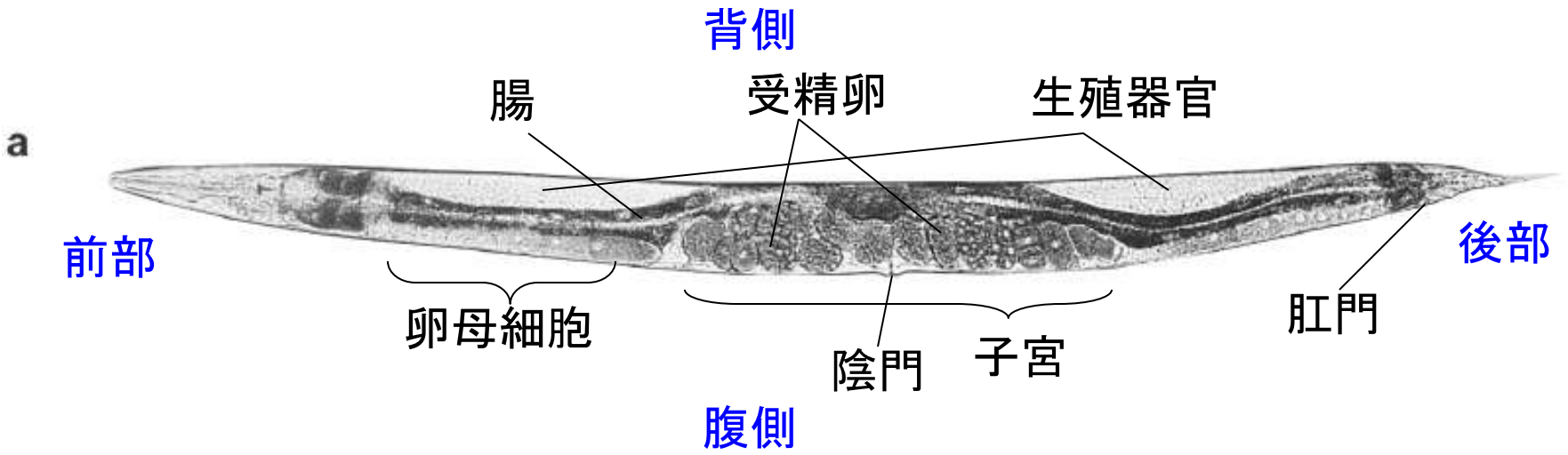
心は脳でつくる

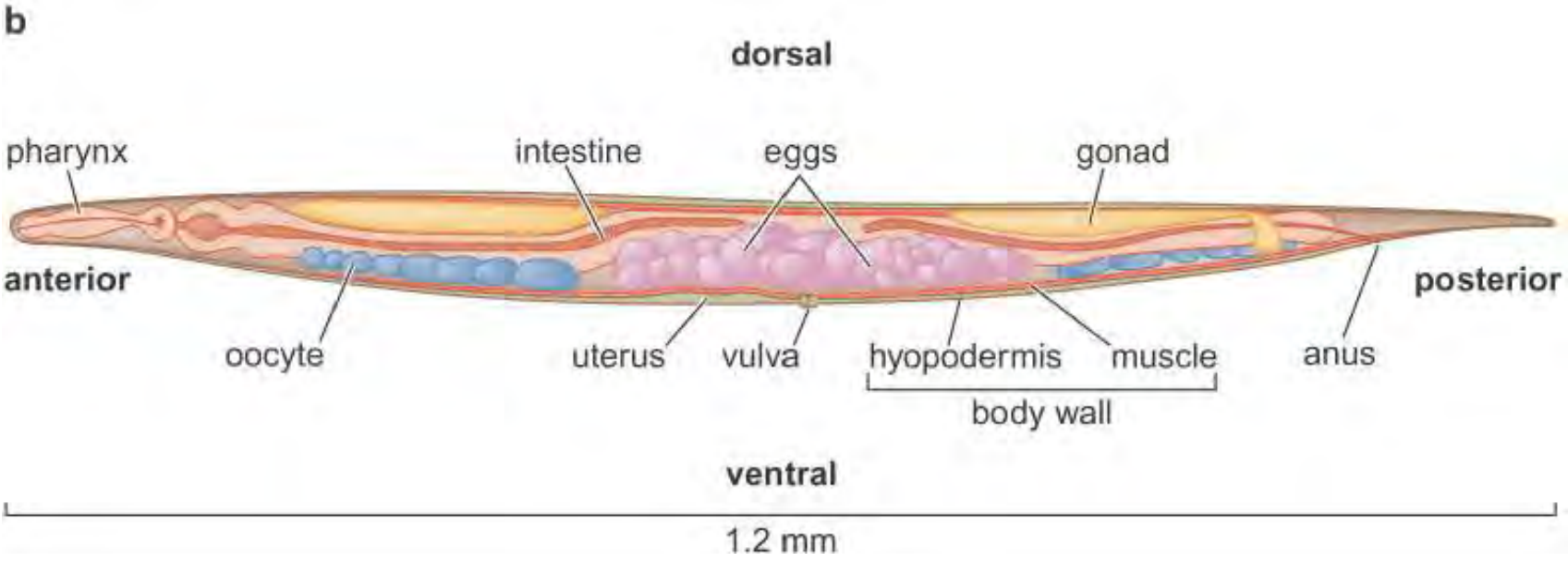
メニューを見る（眼）
⇩
迷う・とまどう・即決
（過去の記憶：情報処理）
⇩
オーダーする



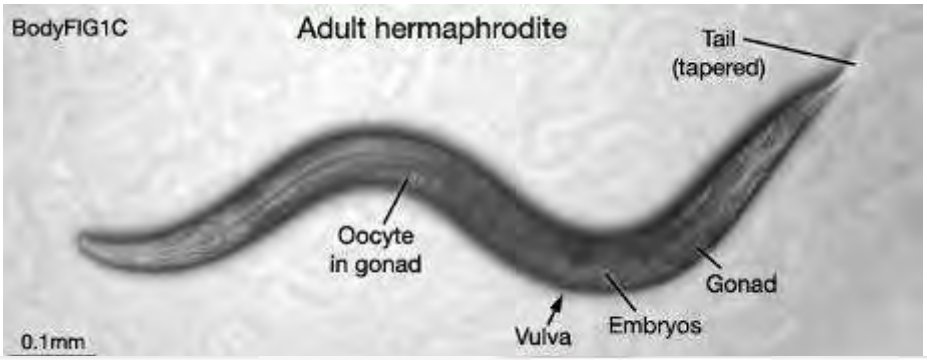


線虫*C. elegans*の体の構成





線虫*C. elegans*： 究極のモデル動物



・体長約1mmの非寄生性線虫
・透明
・～1000個の細胞
・302個の神経細胞（ニューロン）
・～18000個の遺伝子

シンプルで解析しやすい
生きたまま体内の細胞を観察できる

⟺

ヒトは100億個
ヒトは20000～30000個

ヒトと同じ遺伝子を多く持ち、
医学の発展にも役立つ

小さな生き物の研究から大きな発見

ノーベル医学生理学賞

＊２００２年受賞者：線虫研究者３人
「細胞の中には、死ぬために生まれてくるものもある」
線虫からヒトまで同じ仕組み（生き物の形作りのからくり）

＊２００６年受賞者：線虫研究者２人
「RNA干渉の発見」
線虫からヒトまで同じ仕組み（遺伝子の調節のからくり）

ノーベル化学賞

＊2008年受賞者：線虫研究者１人（下村先生と同時受賞）
「GFPの発見と生命科学への応用」
生命科学基礎研究と医学応用研究において多大なる貢献

Nobelprize.org

The Nobel Prize in Chemistry 2008

"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"

Photo: U. Montan

Photo: U. Montan

Photo: U. Montan

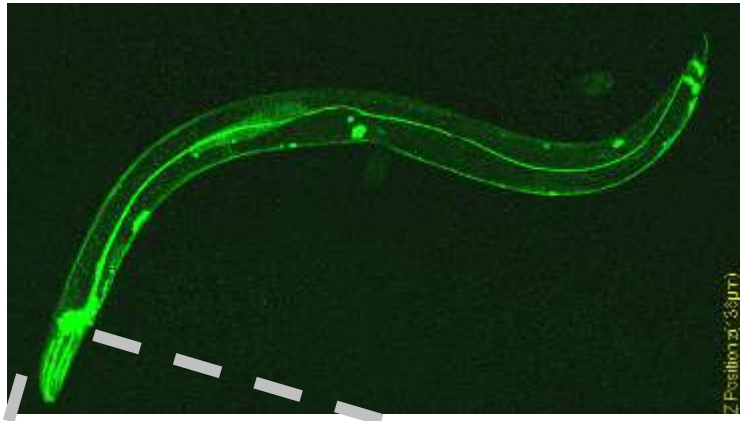
1/3 of the prize	1/3 of the prize	1/3 of the prize
USA	USA	USA
Marine Biological Laboratory (MBL) Woods Hole, MA, USA; Boston University Medical School Massachusetts, MA, USA	Columbia University New York, NY, USA	University of California San Diego, CA, USA; Howard Hughes Medical Institute
b. 1928 (in Kyoto, Japan)	b. 1947	b. 1952

Titles, data and places given above refer to the time of the award.
Photos: Copyright © The Nobel Foundation

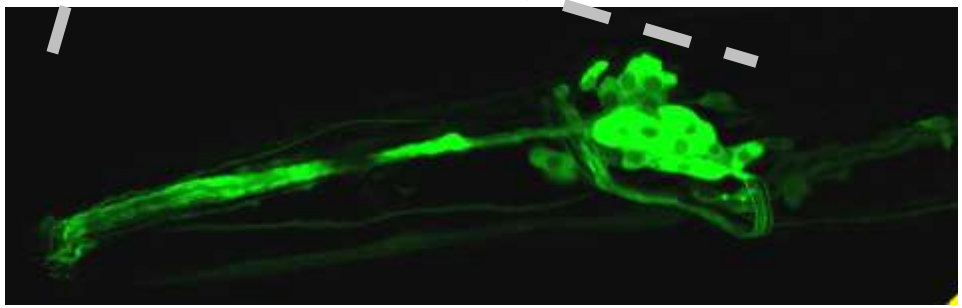
 Copyright © Nobel Web AB 2009

線虫C. elegansの神経回路と行動のConferenceにて
（2009年3月　VA, USA）

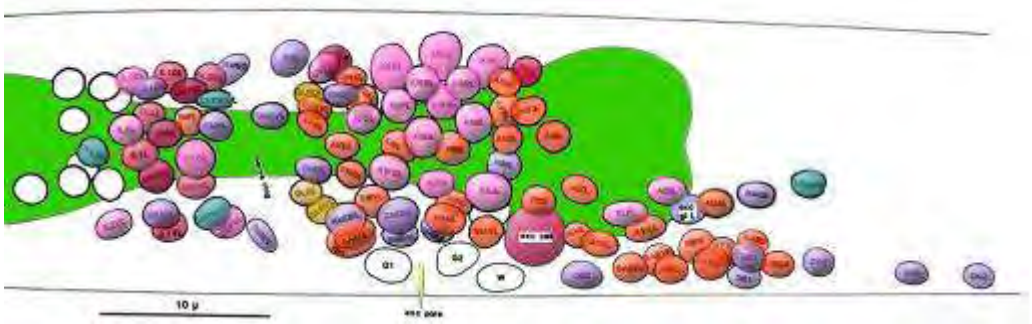
*C. elegans*の神経系



体が透明なため、生きたまま内部まで観察できる。
クラゲ蛍光タンパク（GFP）を始めとした様々な蛍光タンパクを導入



全ての神経細胞が同定されており、アイデンティティの明確な神経細胞を解析できる。



C. elegans は さまざまな刺激を受容して応答する

感覚 - 入力

温度
味
匂い
接触

行動 - 出力

反射

走性

温度走性は飼育温度に依存して変化する

温度受容の中枢は脳にある

温度情報は生命維持に必須

- 変温動物：環境温度 ⇒ 生存
- 恒温動物：体温感知 ⇒ 生命維持

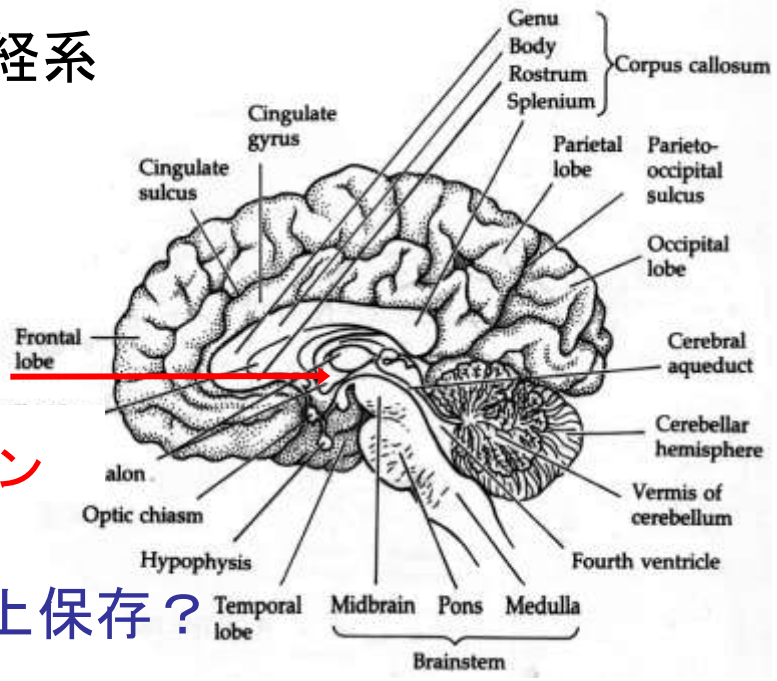
✦ 温度を感知するシステム

温度の受容：脳・神経系

例：ヒトの体温

(古い脳: 旧皮質)
視床下部

温度受容ニューロン

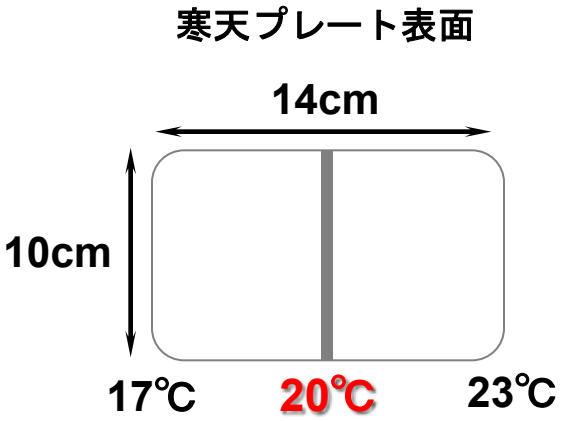


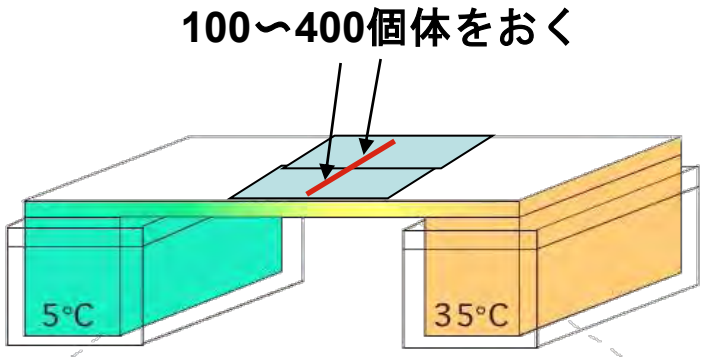
分子神経メカニズムは進化上保存？

✦ 温度受容メカニズムの解明に向け
シンプルなモデル動物：線虫*C. elegans*

集団温度走性テスト

目的　　定量的な解析　／　個体の温度走性テストと対応





特徴　　多量の個体を一度にテストするため 統計解析に優れる

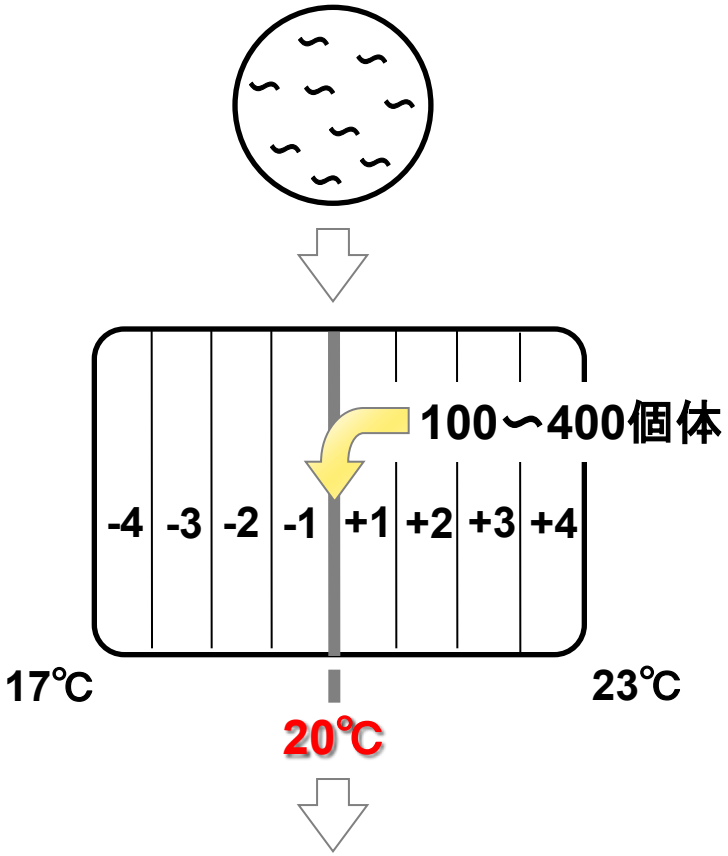
寒天プレート（2次元平面）

個体の密度が低い

個体の分布の算出方法

餌あり　一定温度

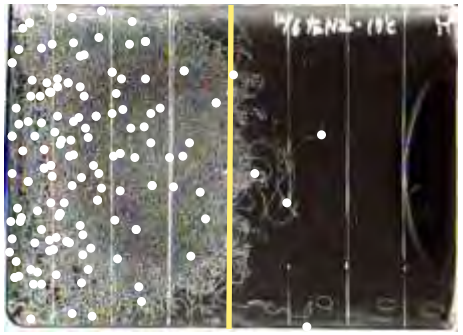
(17℃、20℃、23℃)



個体の分布を記録

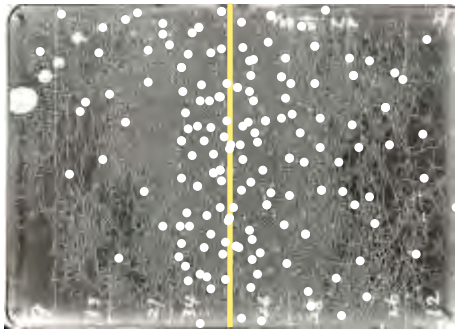
直線状温度勾配上における野生型個体の分布

17℃飼育



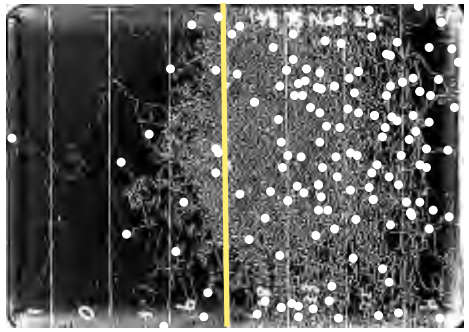
17℃ 23℃

20℃飼育



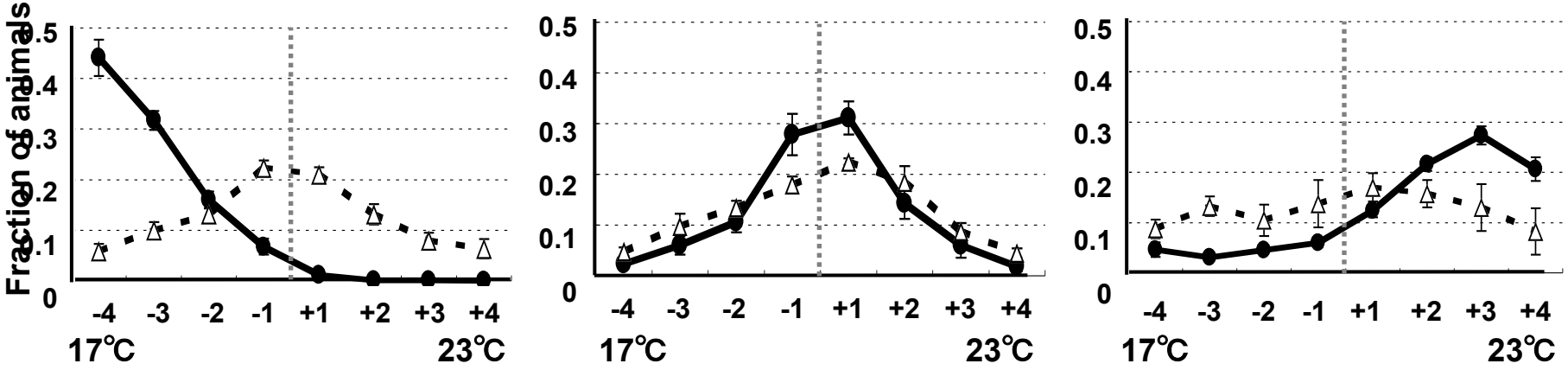
17℃ 23℃

23℃飼育



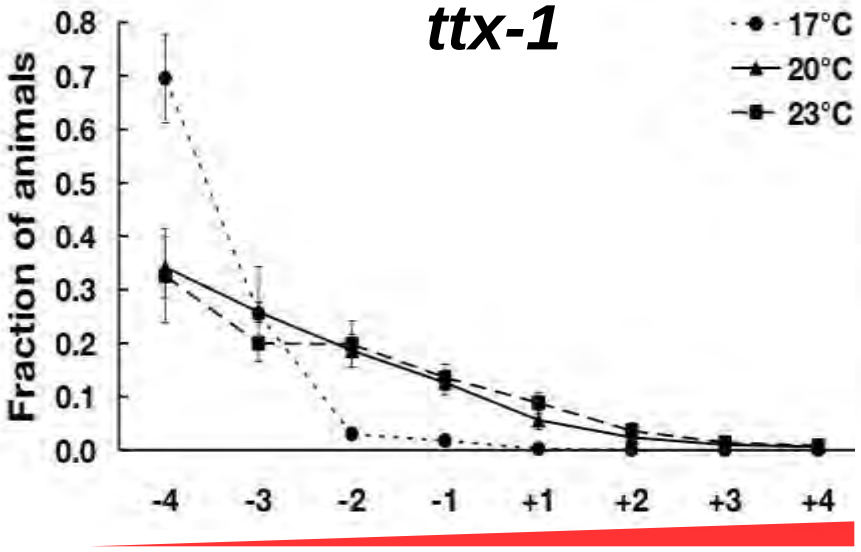
17℃ 23℃

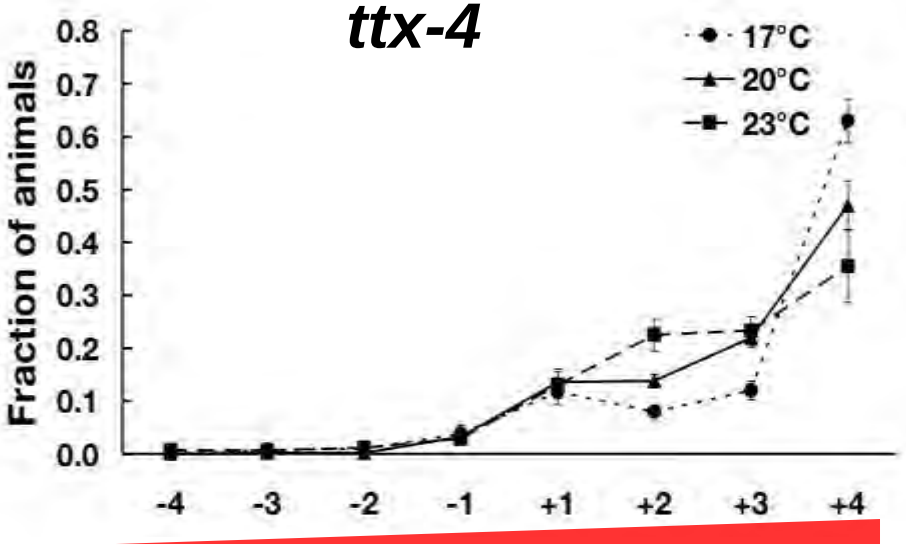
● 温度勾配上　△ 温度勾配なし

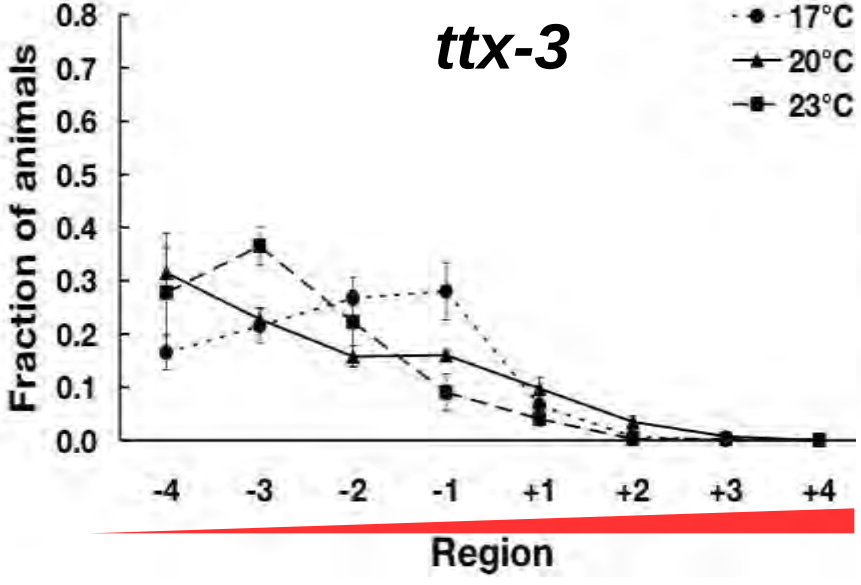


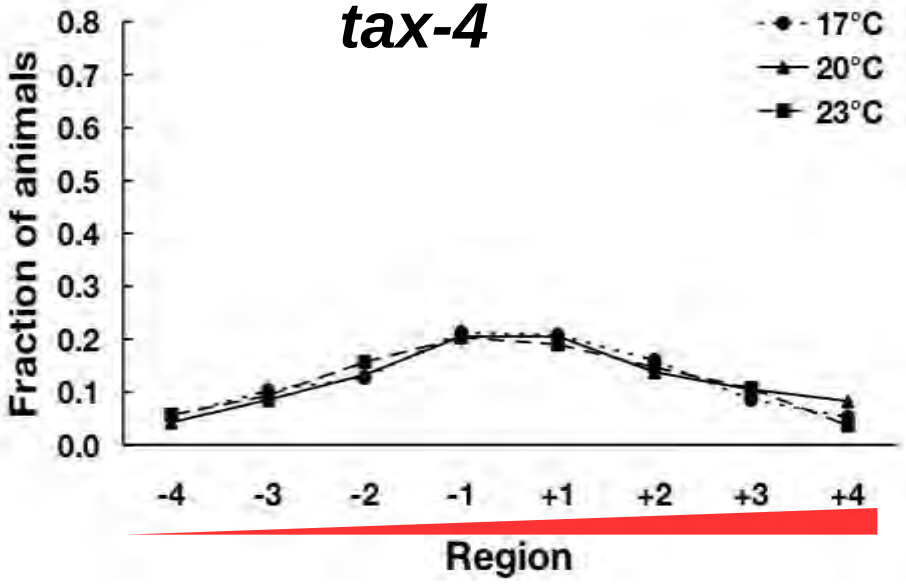
野生型個体は直線状温度勾配上で飼育温度域に分布した

温度走性異常突然変異体の温度勾配上での分布

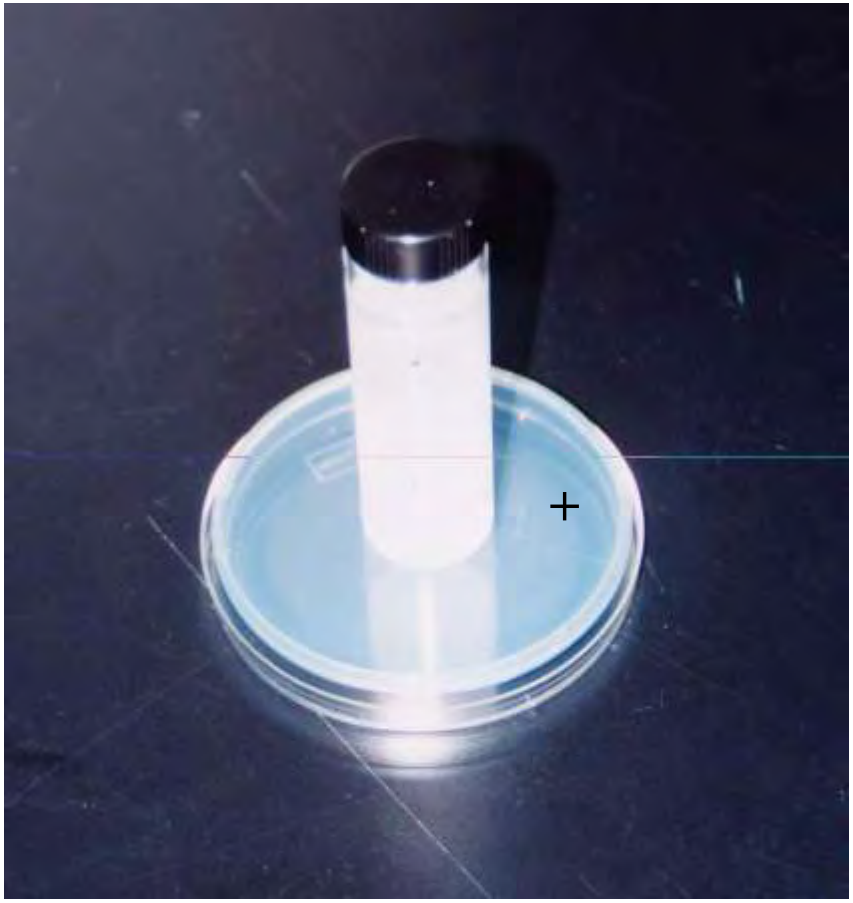




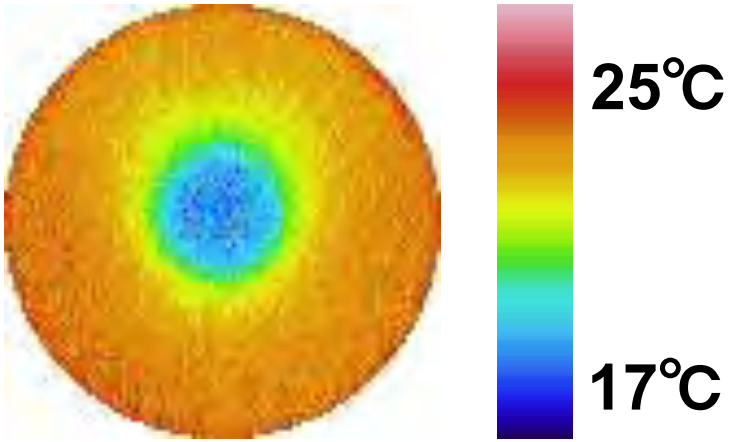




個体の温度走性テスト（放射状温度勾配）



温度走性テスト
(Hedgecock and Russell, 1975)



Thermography

Ⅰ－ 温度走性は過去の飼育温度によって変化する

餌を十分与えられて飼育された場合

15℃で飼育後

20℃で飼育後

25℃で飼育後

温度勾配上で飼育温度に移動する

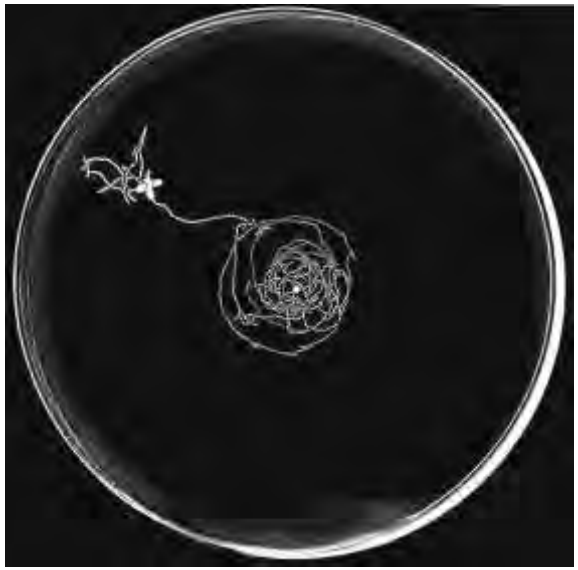
II － 温度走性は飢餓体験によって変化する

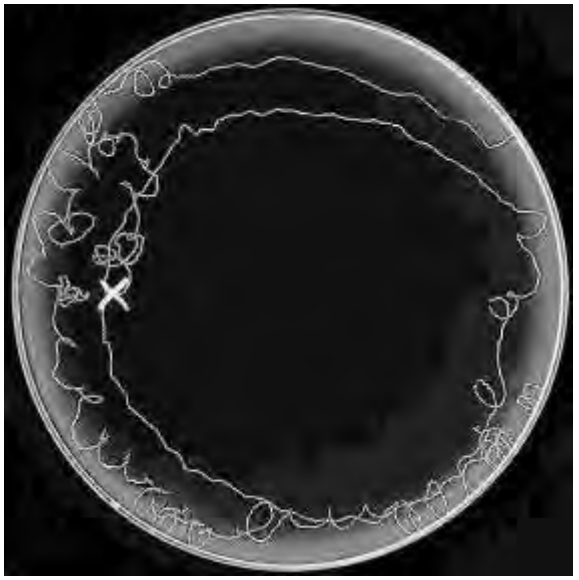
17℃飼育後

25℃飼育後

餌が十分
与えられた場合

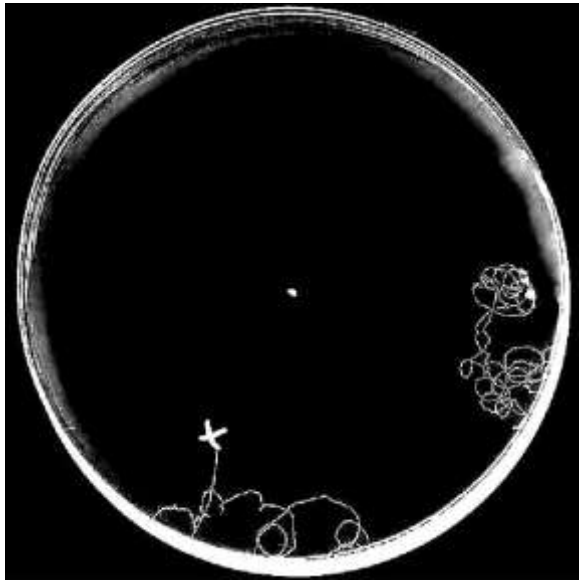
餌体験温度に移動する

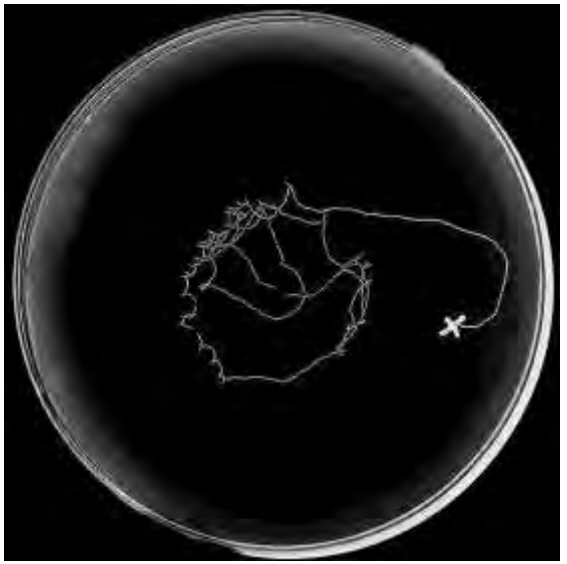




飢餓を
体験した場合

飢餓体験温度を避ける

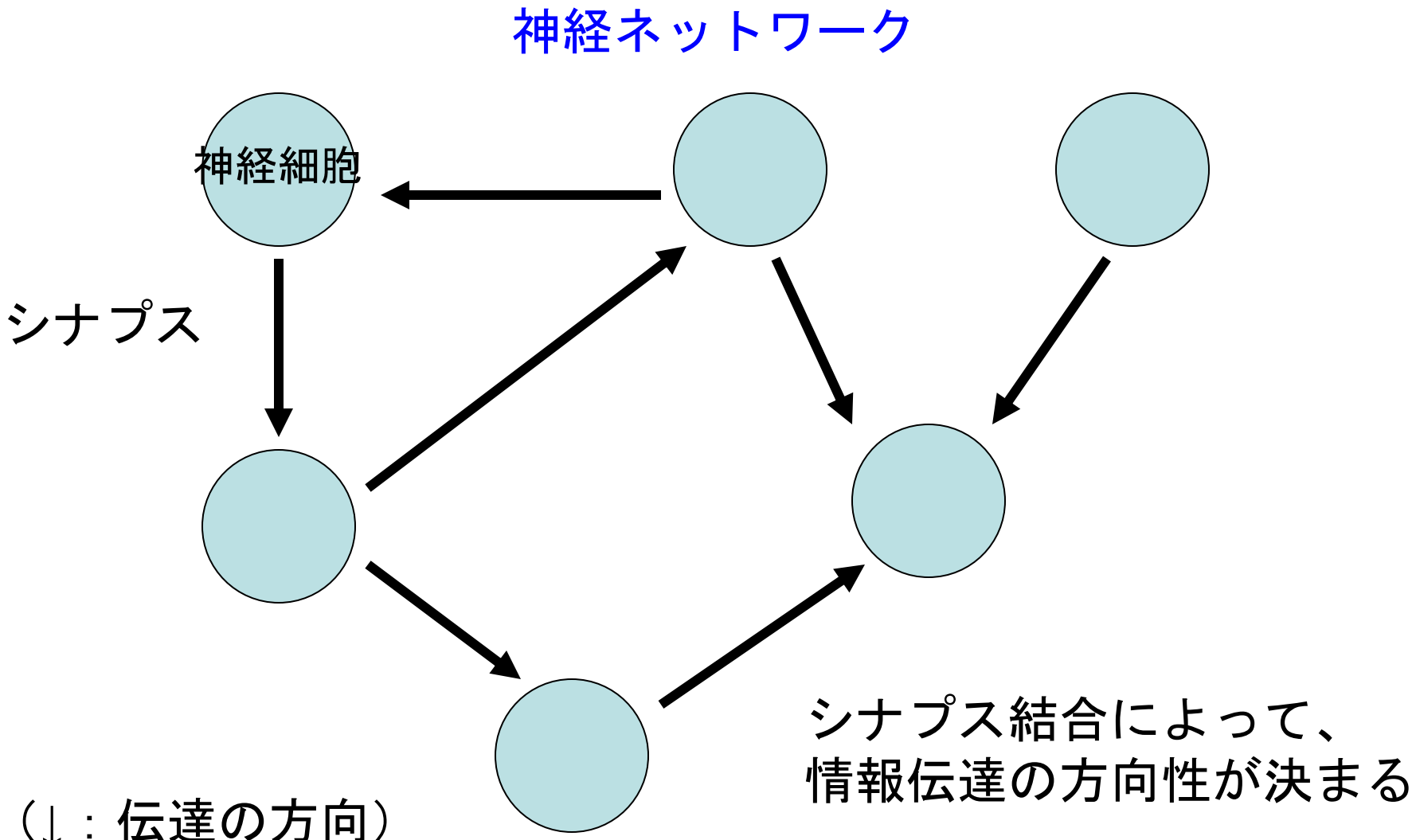




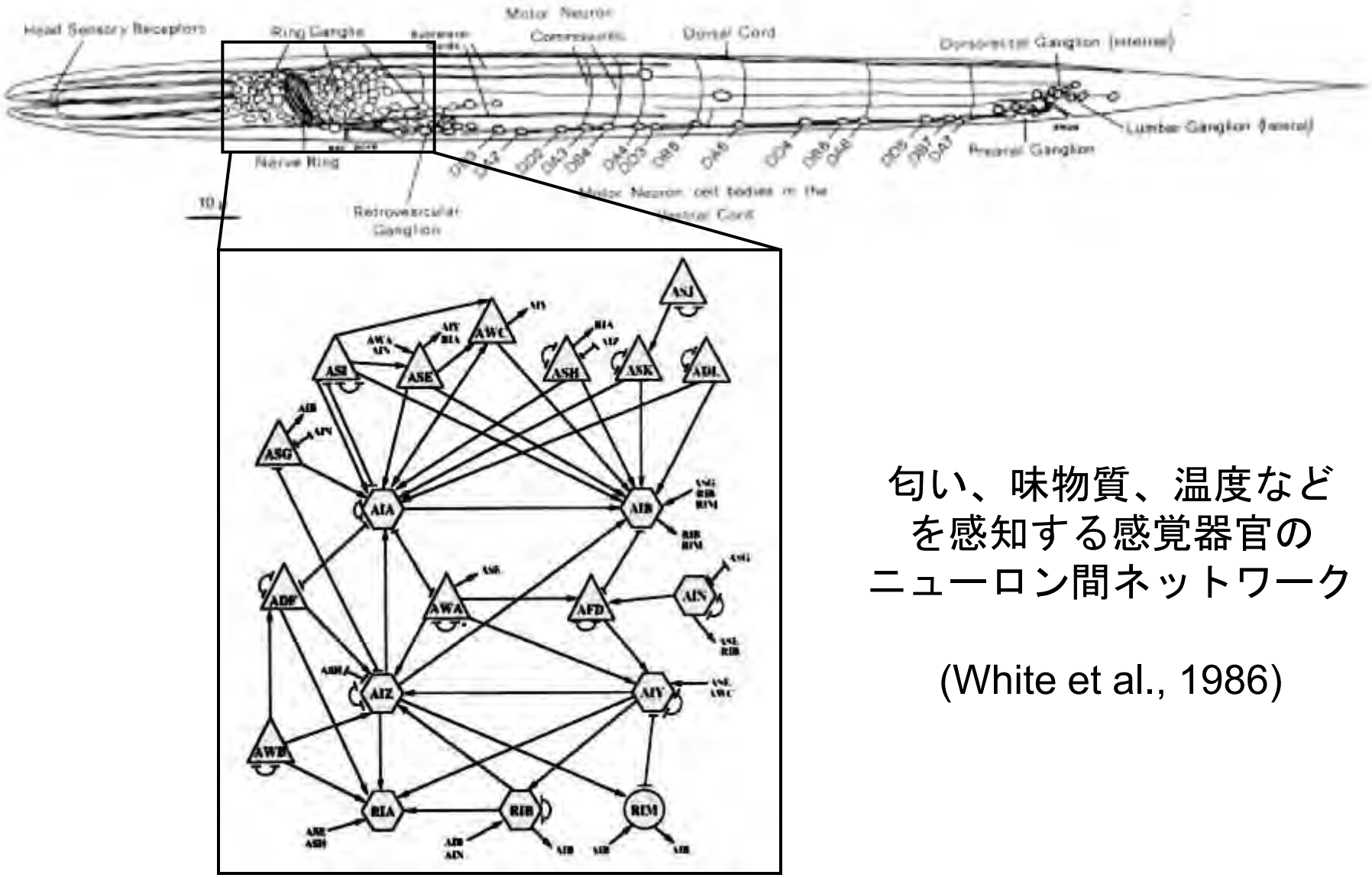
線虫の温度走性

温度受容と学習・記憶の研究
に適するシステム

神経系では神経細胞同士がシナプス結合することによって情報をやり取りをしている



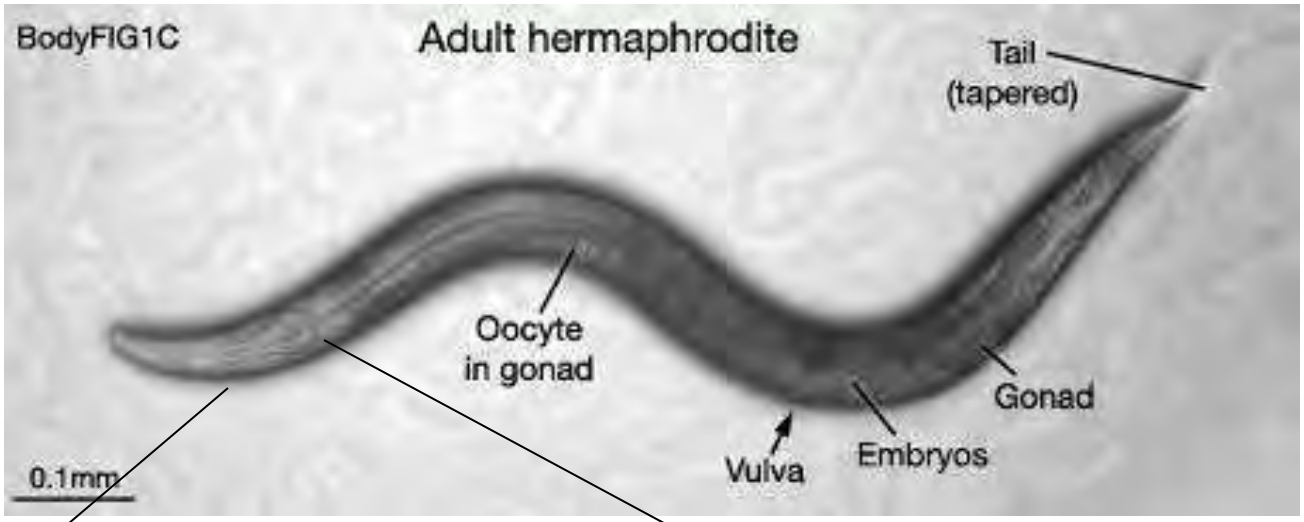
全ての神経の位置と結合が分かっている

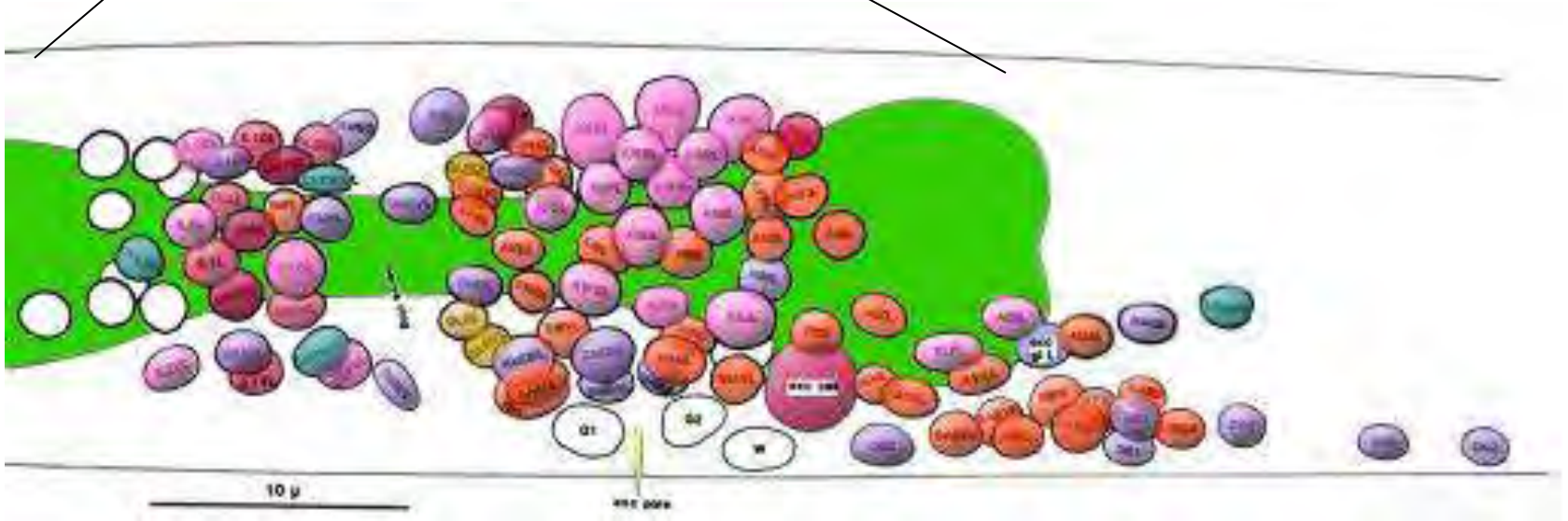


匂い、味物質、温度など
を感知する感覚器官の
ニューロン間ネットワーク

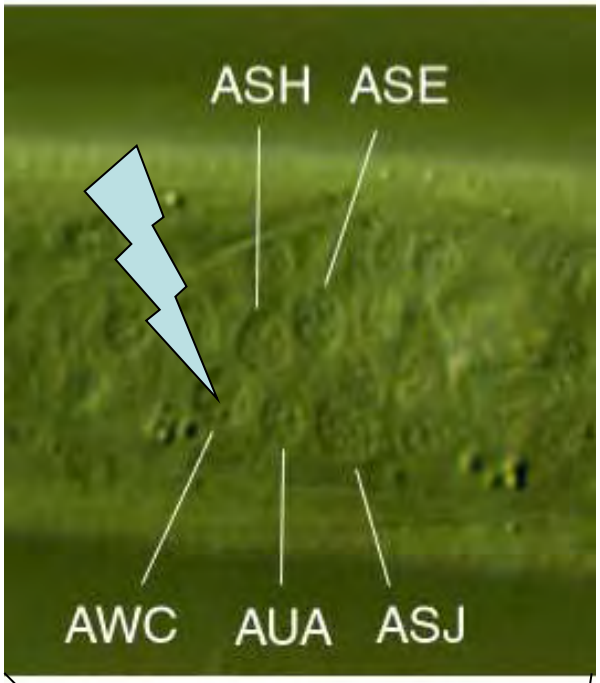
(White et al., 1986)

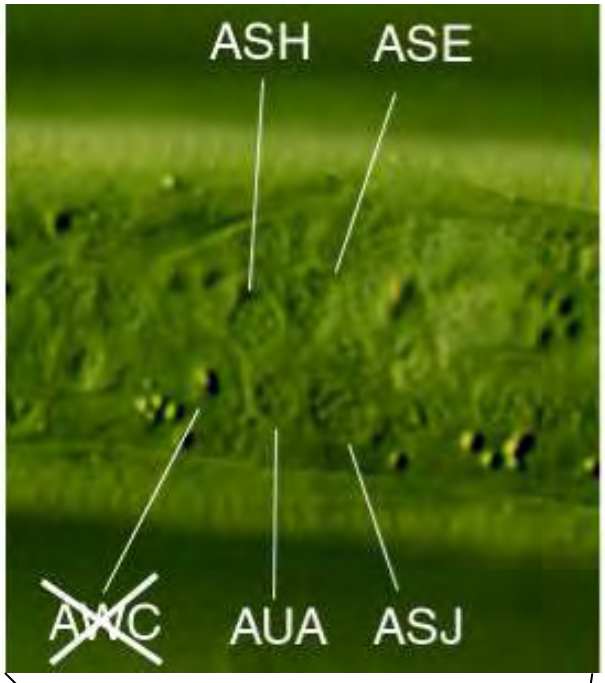
レーザー照射による細胞破壊実験





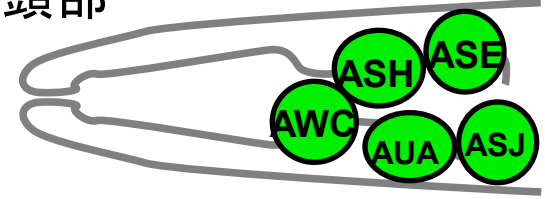
レーザー破壊後、温度走性行動に異常があるか？

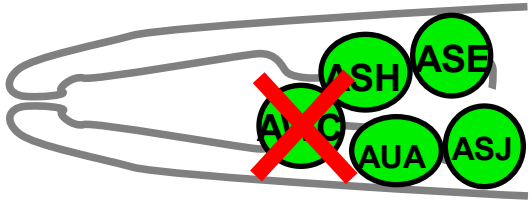




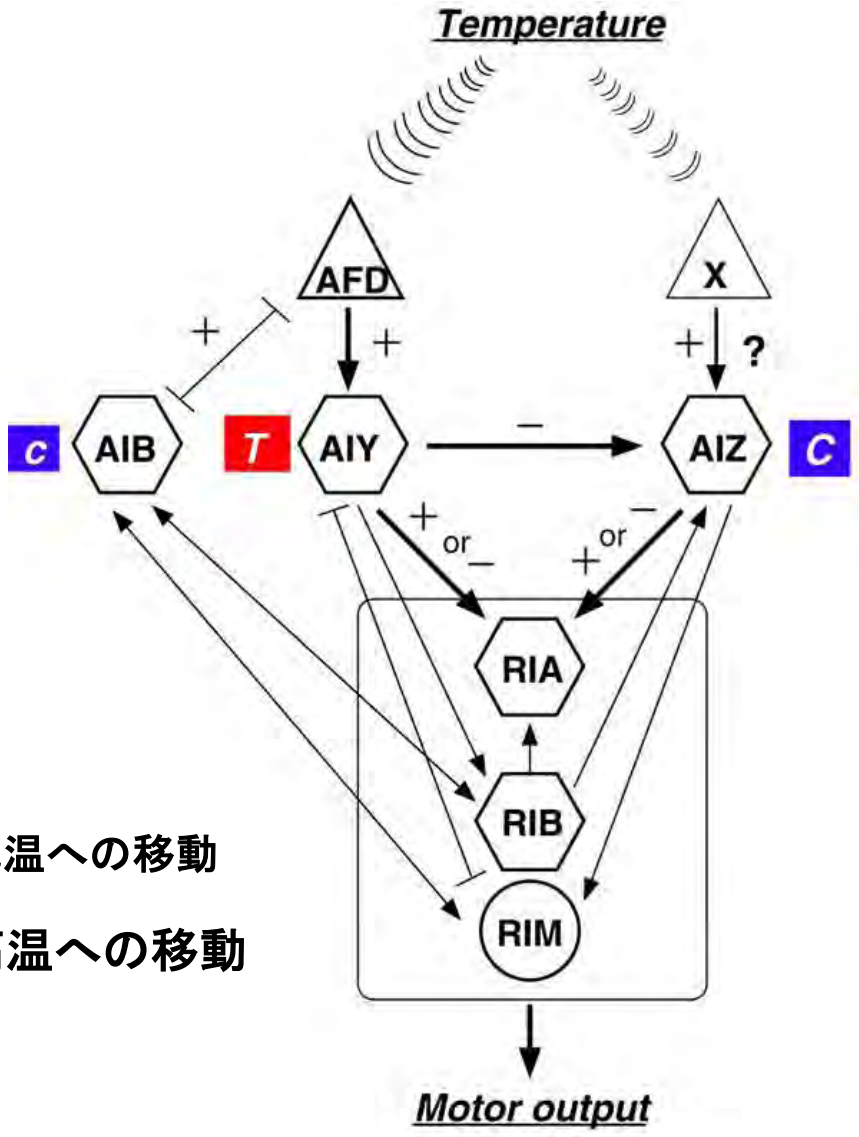
温度走性行動に
変化が見られるか
観察

頭部





レーザー照射による細胞破壊実験の結果から提唱された温度走性の神経回路モデル



C -低温への移動

T -高温への移動

[Mori and Ohshima, Nature, 1995]

環境からの刺激

温度受容

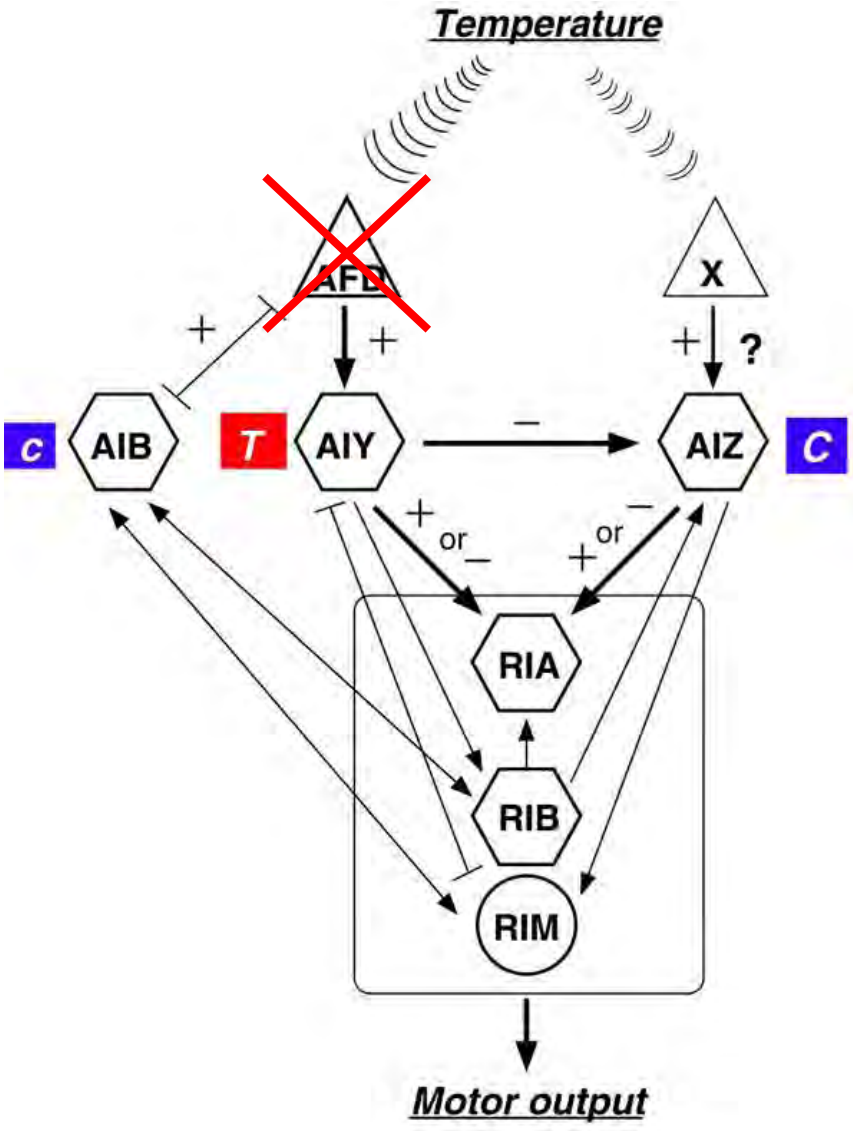
神経可塑性
（記憶と学習）

応答行動

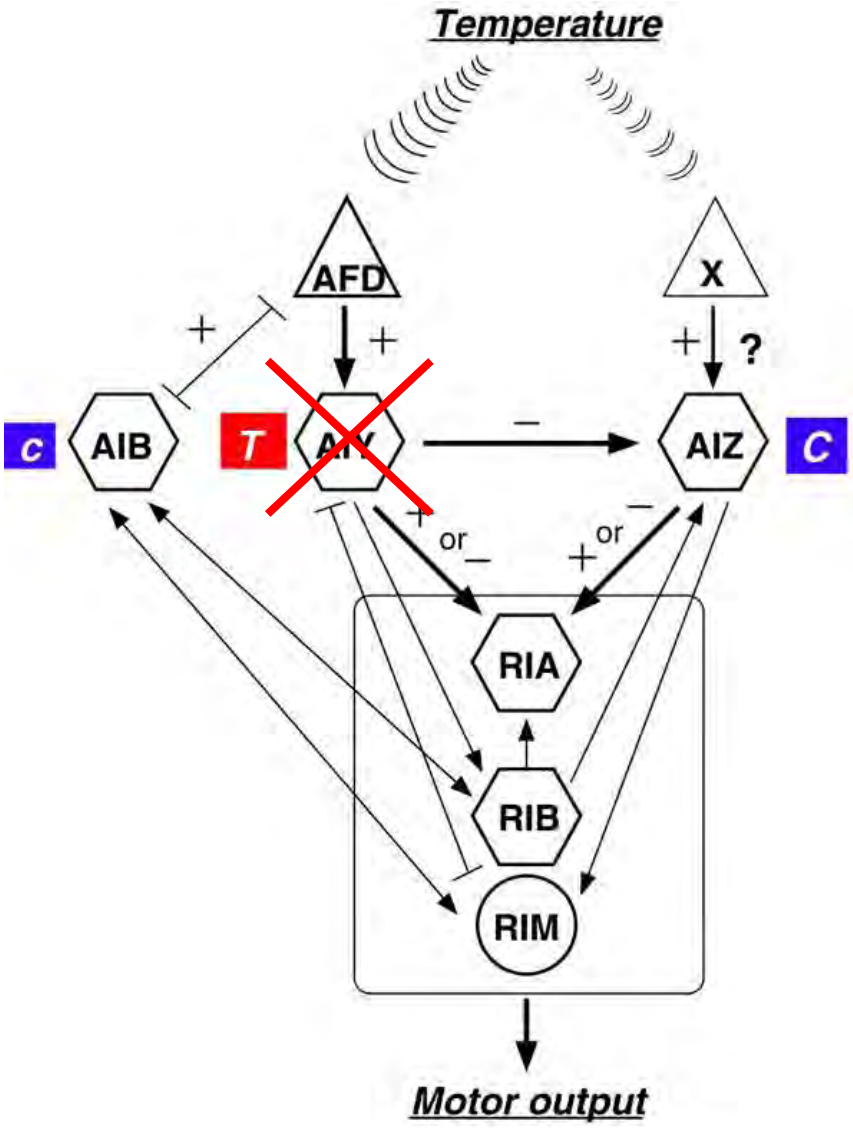
温度無走性

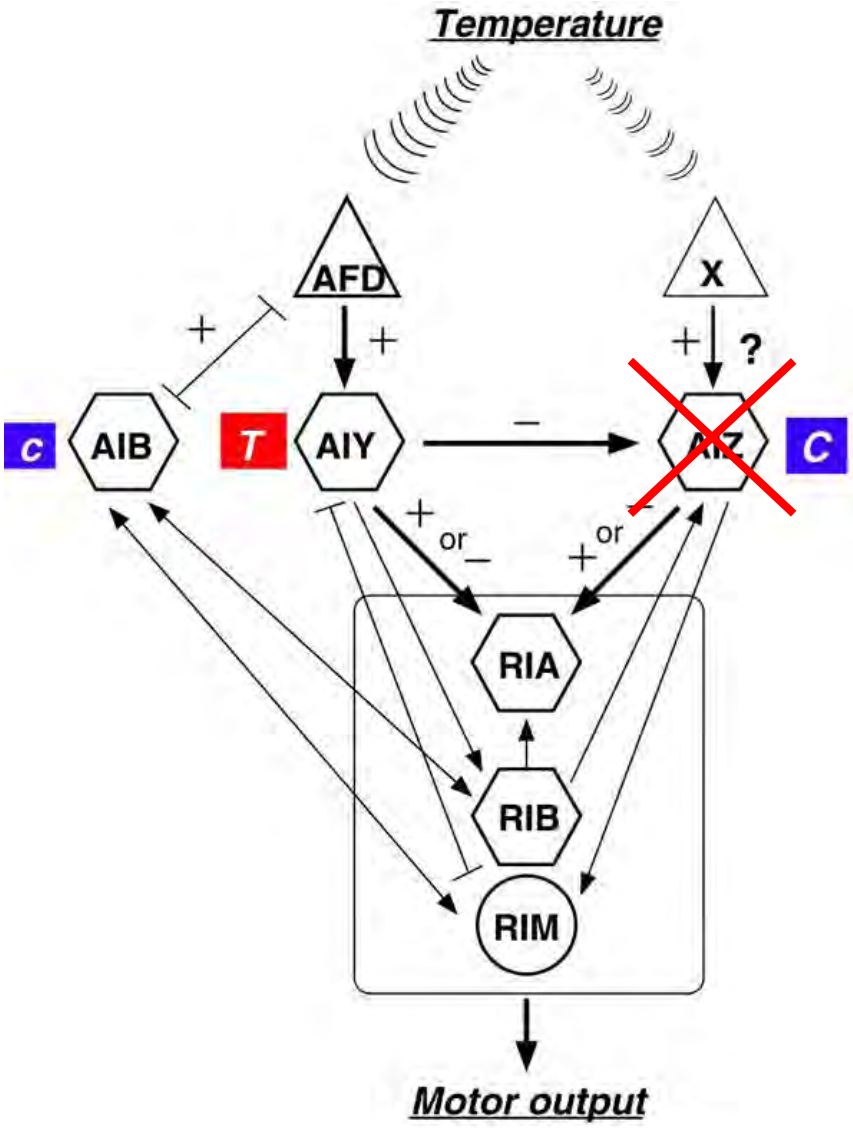
温度無走性/好冷性

好冷性



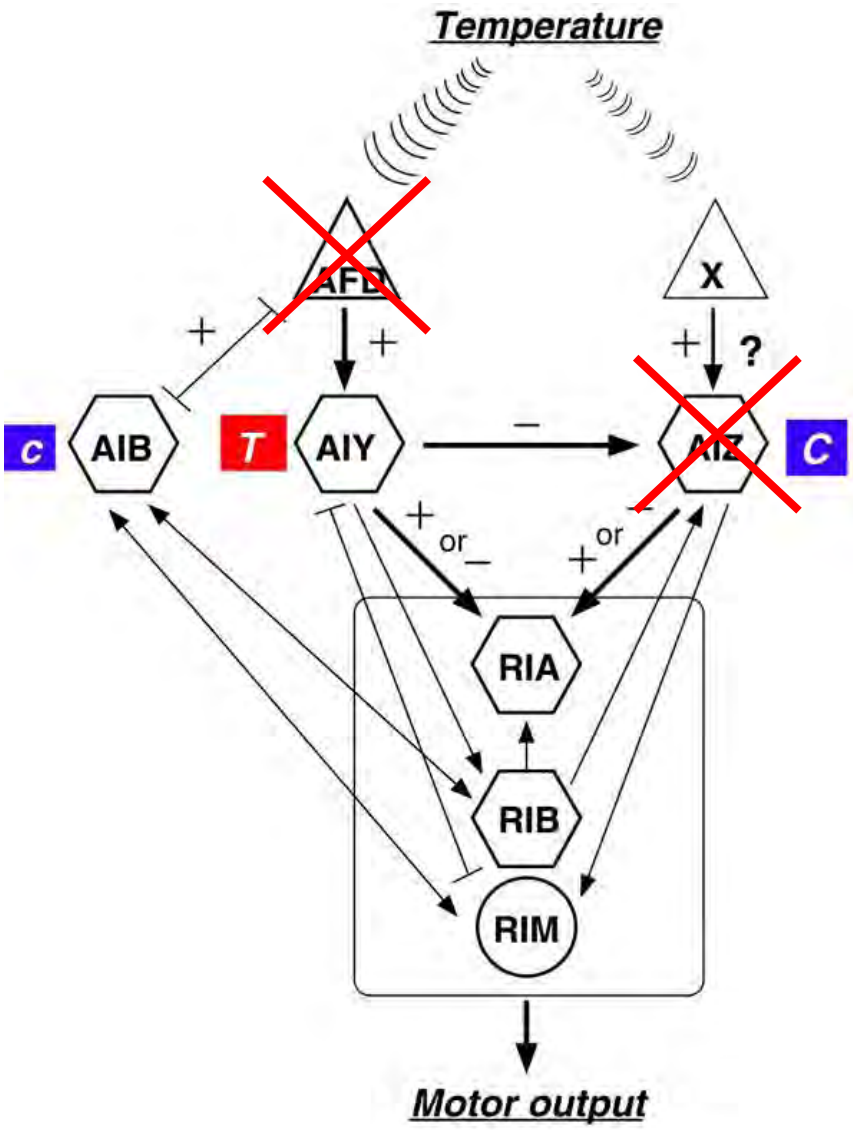
好冷性


Temperature
AFD
X
+
+
+
?
c
AIB
T
AIY
AIZ
C
−
+
or
−
+
or
−
RIA
RIB
RIM
Motor output

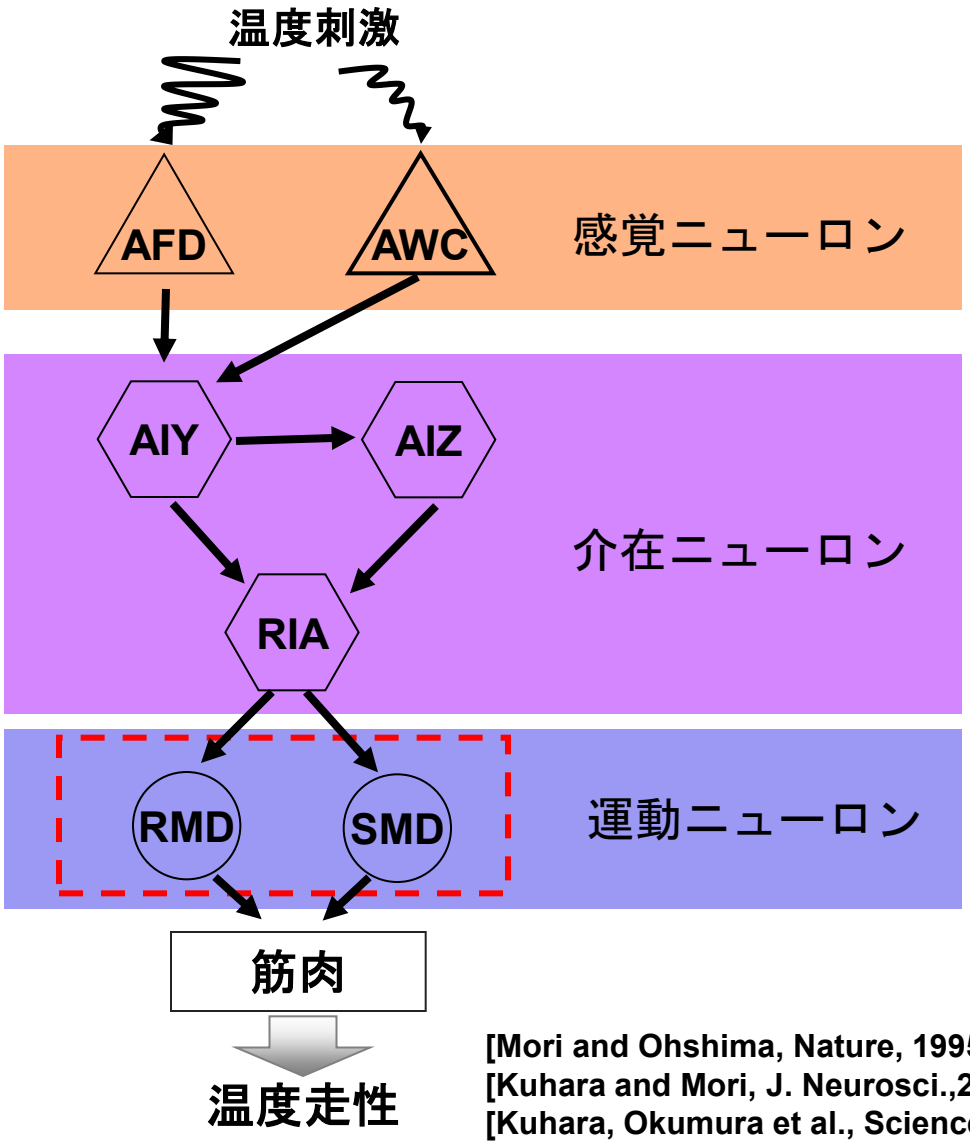

Temperature
AFD
X
+
+
+
?
c
AIB
T
AIY
–
AIZ
C
+ or –
+ or –
RIA
RIB
RIM
Motor output

好熱性

温度無走性


Temperature
AFD
X
+
+
+
?
c
AIB
T
AIY
–
AIZ
C
+ or –
+ or –
RIA
RIB
RIM
Motor output

温度走性神経回路：入力から出力まですべて明らかになっている全生物において唯一の神経細胞ネットワーク



[Mori and Ohshima, Nature, 1995]
[Kuhara and Mori, J. Neurosci.,2006]
[Kuhara, Okumura et al., Science, 2008]
[Ohnishi, Kuhara, Mori, unpublished]

外部環境の刺激
（Input：入力）

感覚受容

情報処理と統合
（記憶と学習）

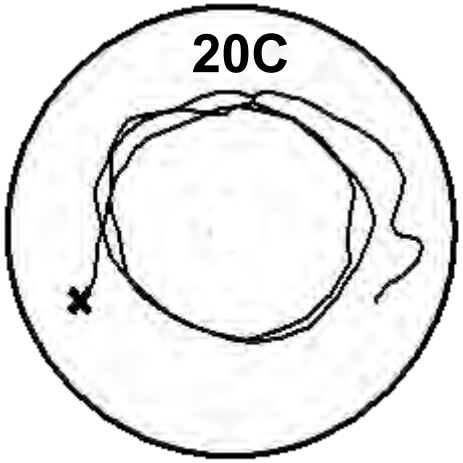
筋肉活動

行動としての応答
（Output：出力）

動物は異なる刺激をどうやって識別するのか？

温度走性のシグナル伝達経路の解析

温度走性行動が異常な突然変異体（単離・解析）

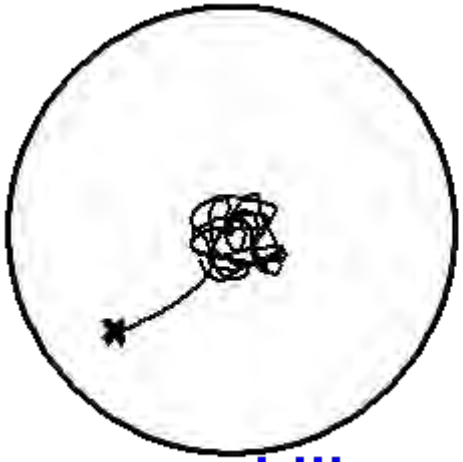


normal

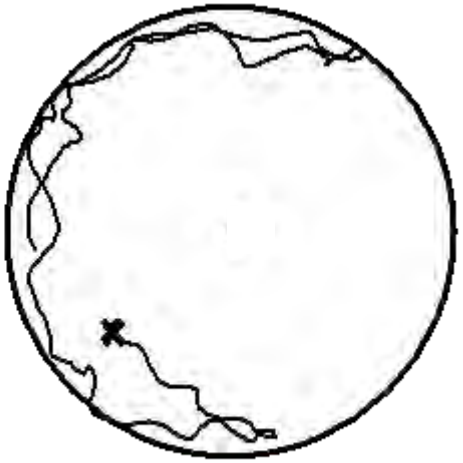
athermotactic

tax-2
tax-4
ttx-5
ttx-7

ttx-6
dgk-1
ttx-1
ttx-3
ttx-8
goa-1



cryophilic



thermophilic

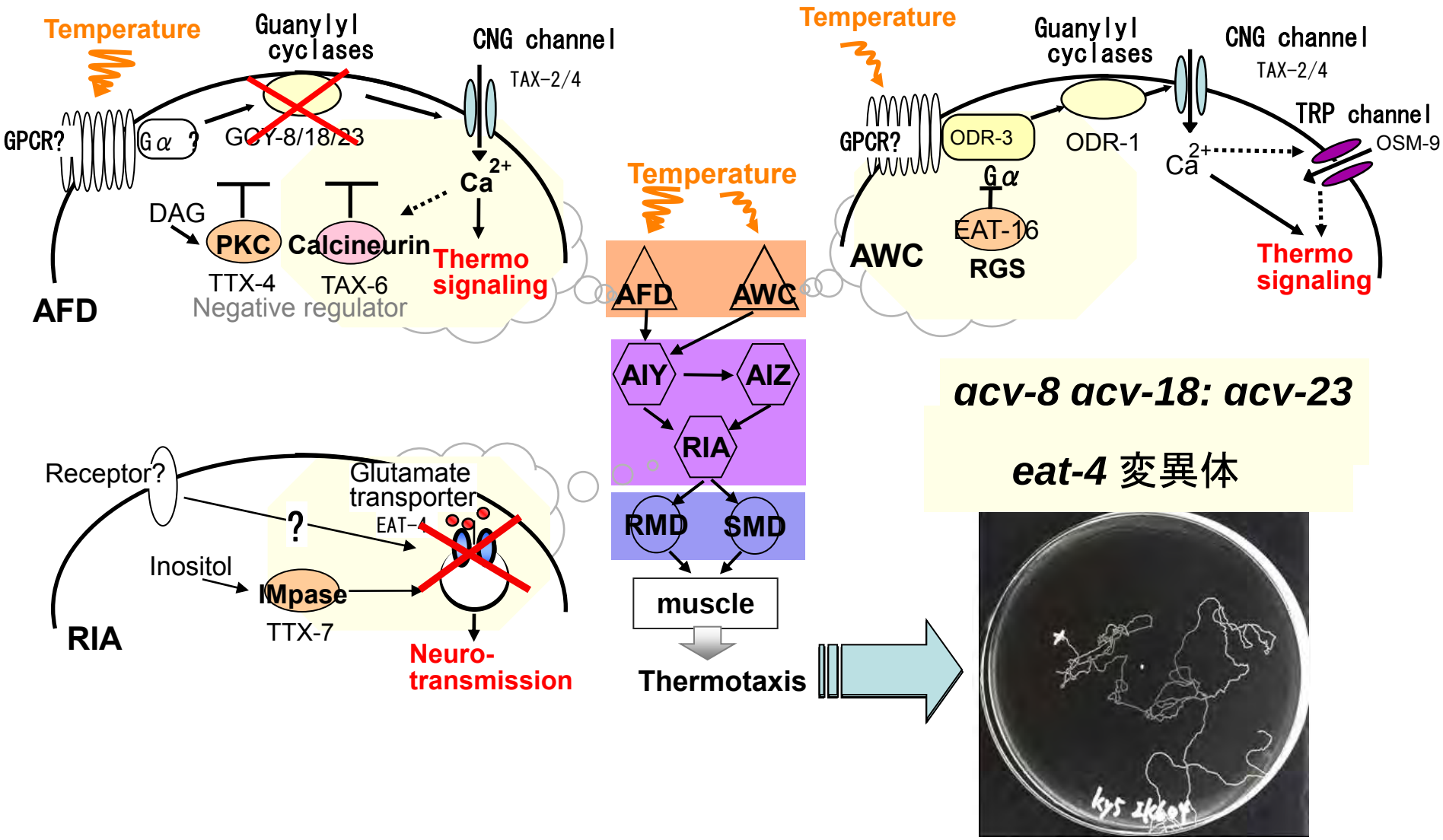
ttx-4
tax-6

*C. elegans*のデータベースの活用

ACeDB (A C. elegans Data Base)

WormBase

温度走性の分子メカニズム



動物は、なぜ、そう行動するのか？

➡ 学習・記憶のメカニズムの解析

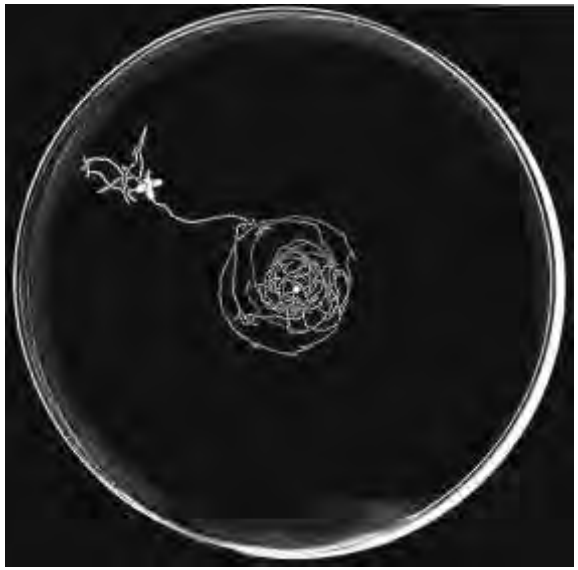
II – 温度走性は飢餓体験によって変化する

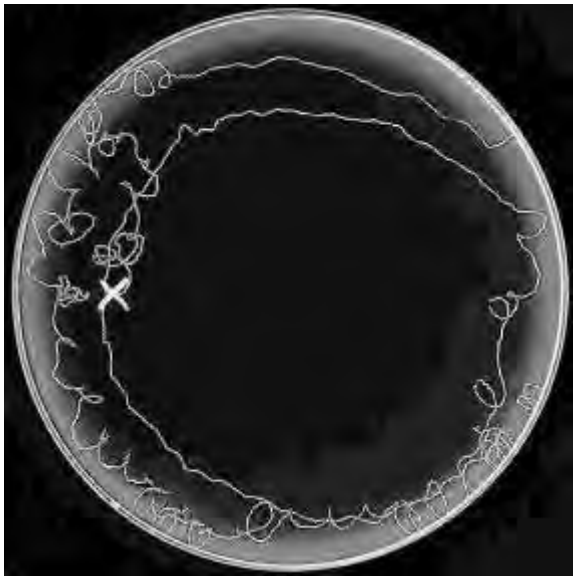
17℃飼育後

25℃飼育後

餌が十分
与えられた場合

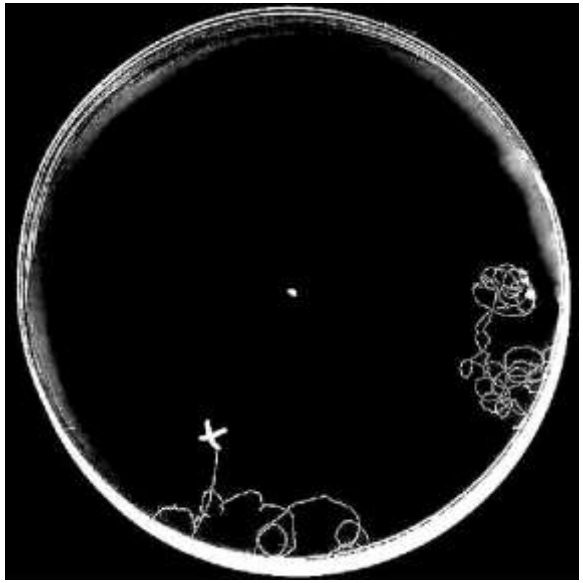
餌体験温度に移動する

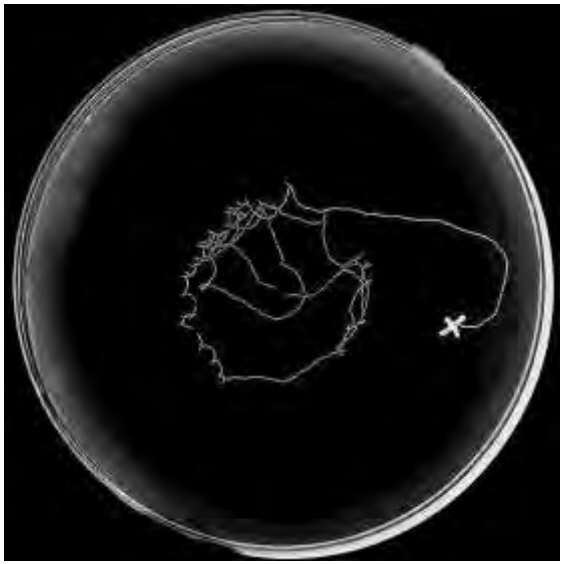




飢餓を
体験した場合

飢餓体験温度を避ける





aho-2 突然変異体は 温度と餌の連合学習が異常である

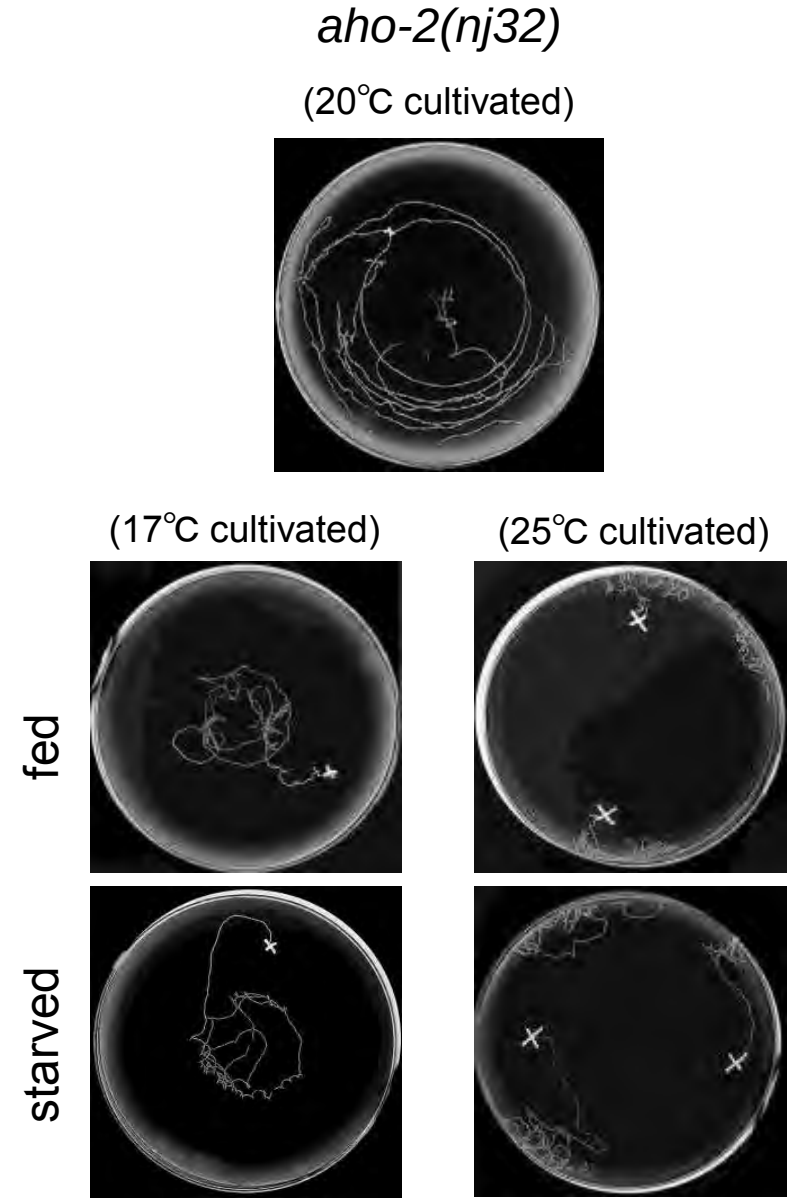
エサ経験温度へ移動する

↓

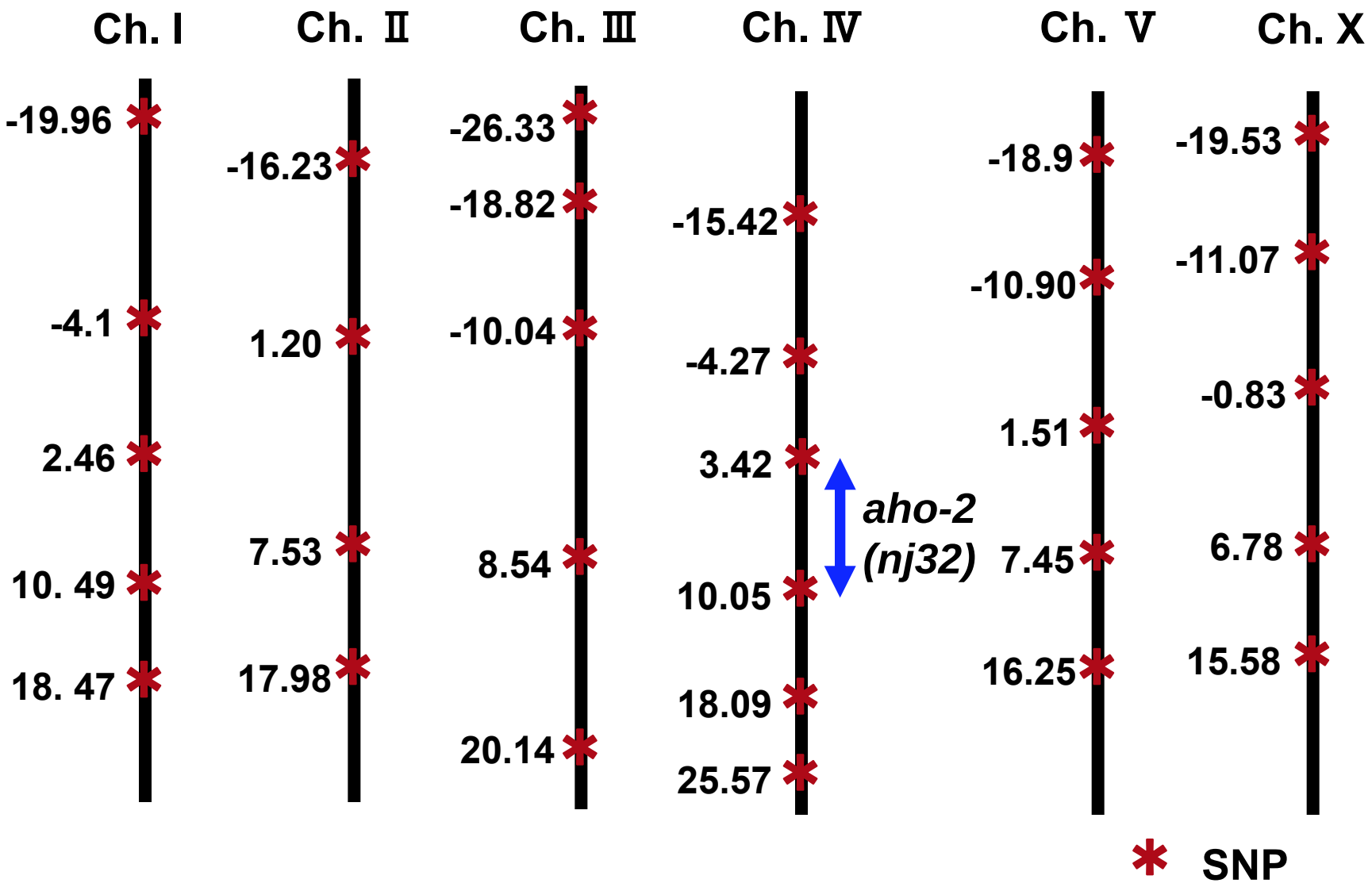
飢餓を体験したにもかかわらず、
飼育温度へ移動する

↓

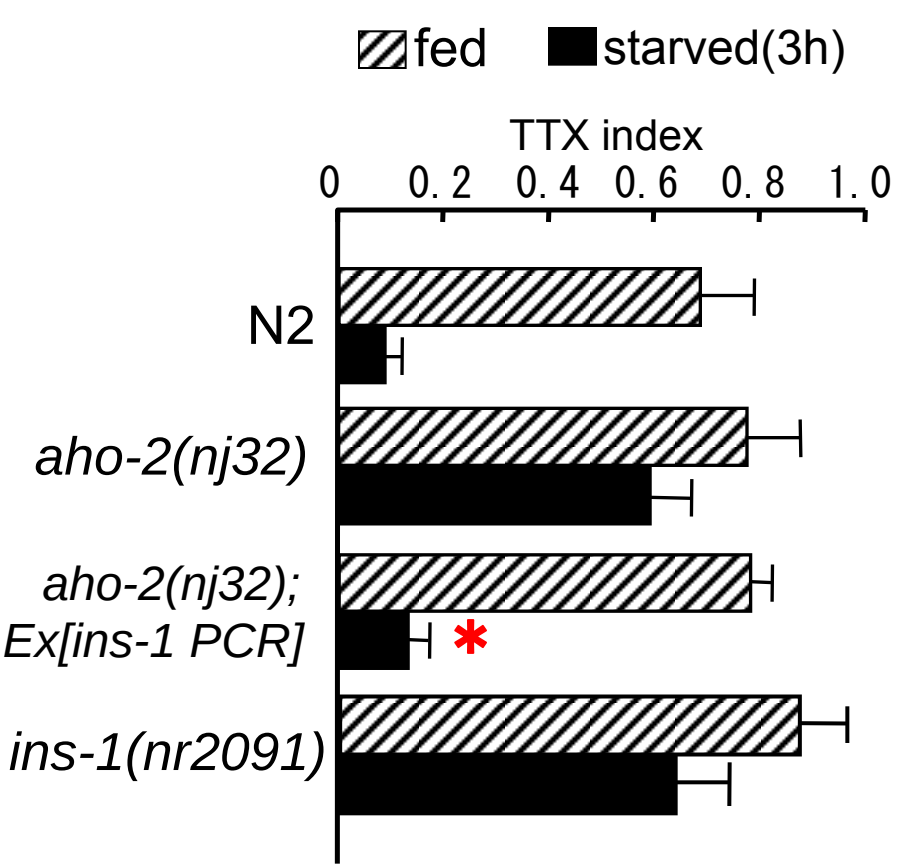
エサの認識は正常



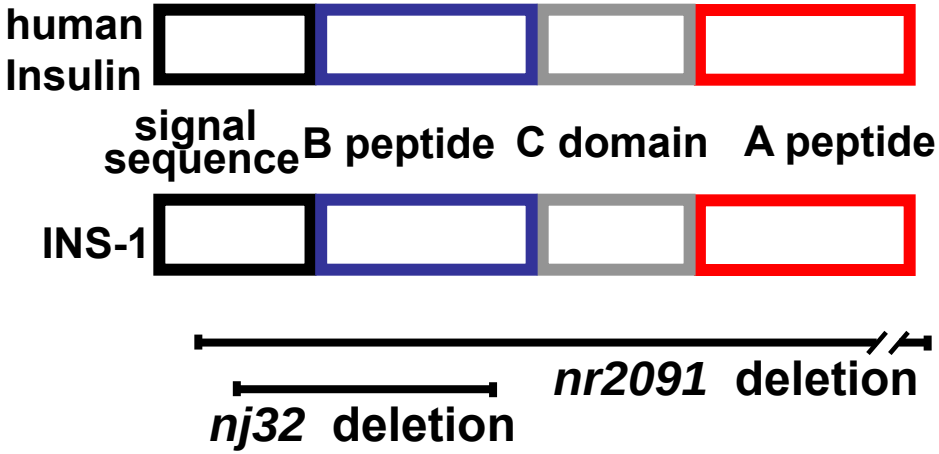
*aho-2*遺伝子は第４染色体にマップされた

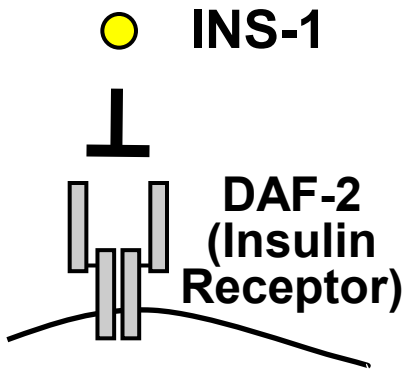


aho-2 遺伝子は ヒトのインシュリン遺伝子と相同な *ins-1* 遺伝子だった

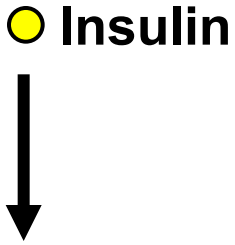


$$\text{TTX index} = \frac{\text{animals migrating to cultivated temperature(17˚C)}}{\text{total animals}}$$





(Pierce *et al.* 2001
Genes & Dev. 15, 672)



LTD

(Rat hippocampus)

(Man *et al.* 2000 Neuron. 25, 649)

動物のこころをさぐれるか？

➡ 中枢神経系（脳）の生理学

神経回路は

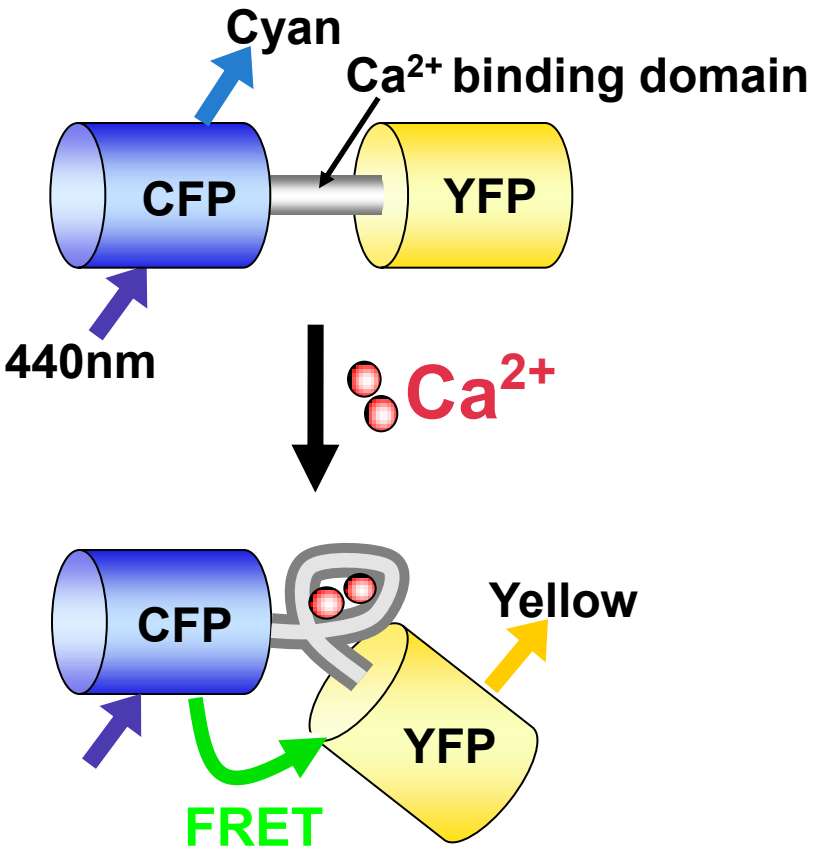
行動しているときに

どう活動しているのか?

学習・記憶の分子機構と生理学的機構

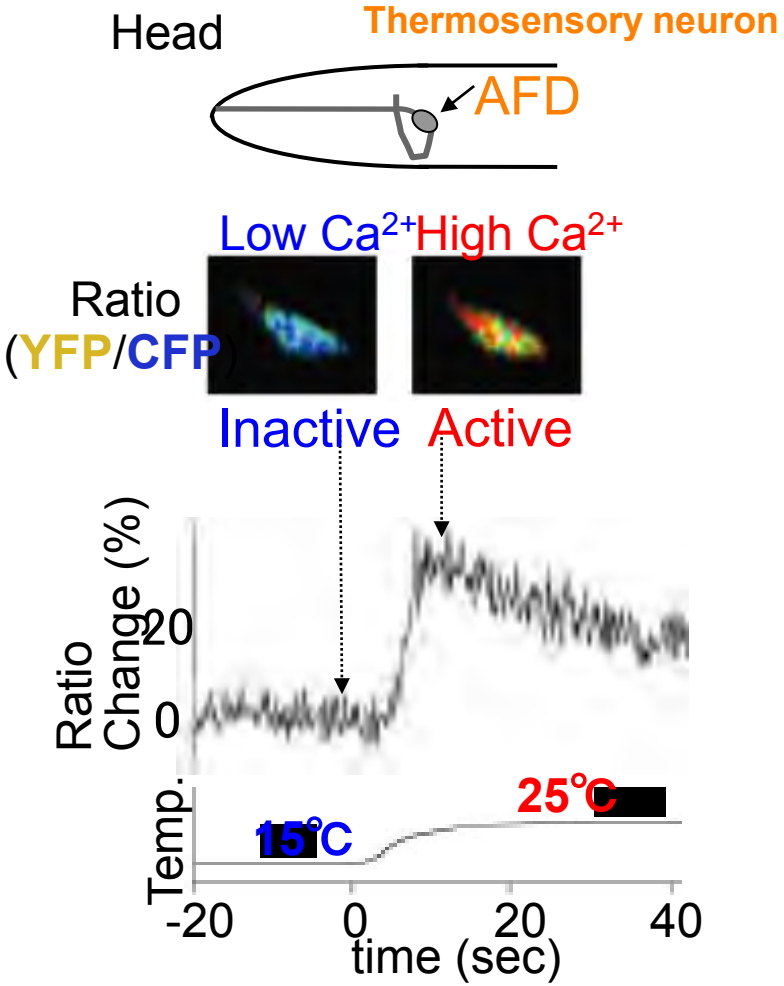
AFD 温度受容ニューロンは温度上昇に応答する

Cameleon:細胞内カルシウム濃度の指標となるインディケーター



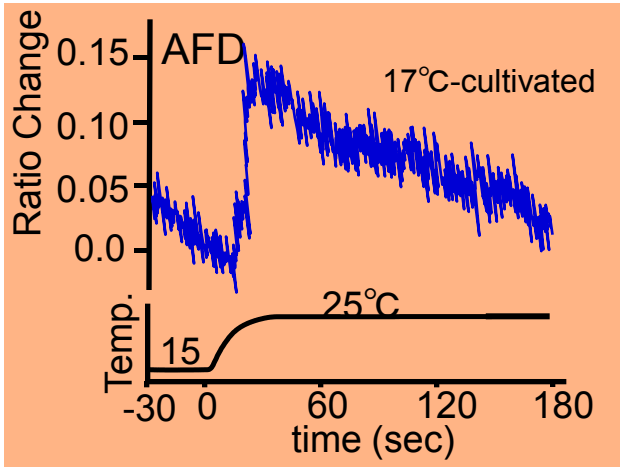
(Fluorescence Resonance Energy Transfer)

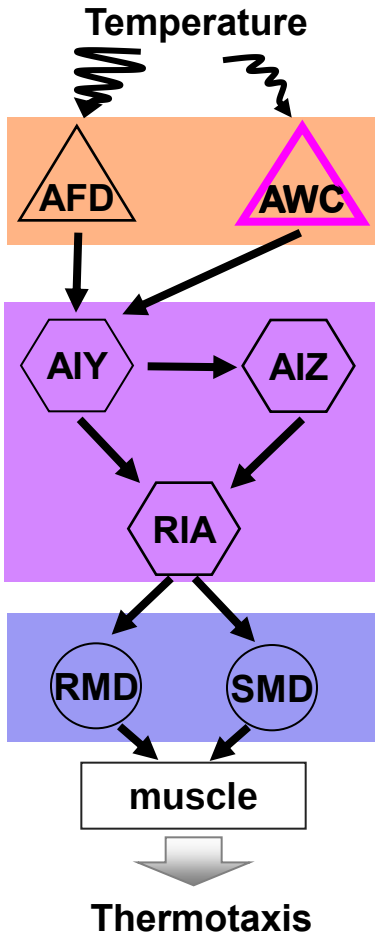
$$\text{Ratio} = \frac{\text{YFP}}{\text{CFP}}$$

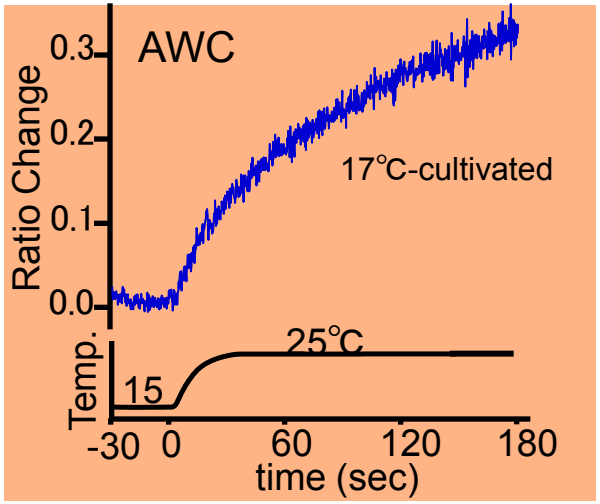


[Kimura et al., Curr. Biol. ,2004]

AWCニューロンは匂いを感知するニューロン：温度上昇に対して AFDニューロンとは異なる応答をする



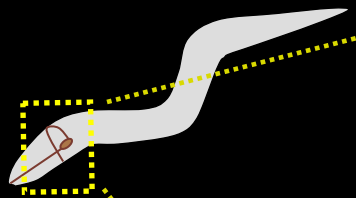




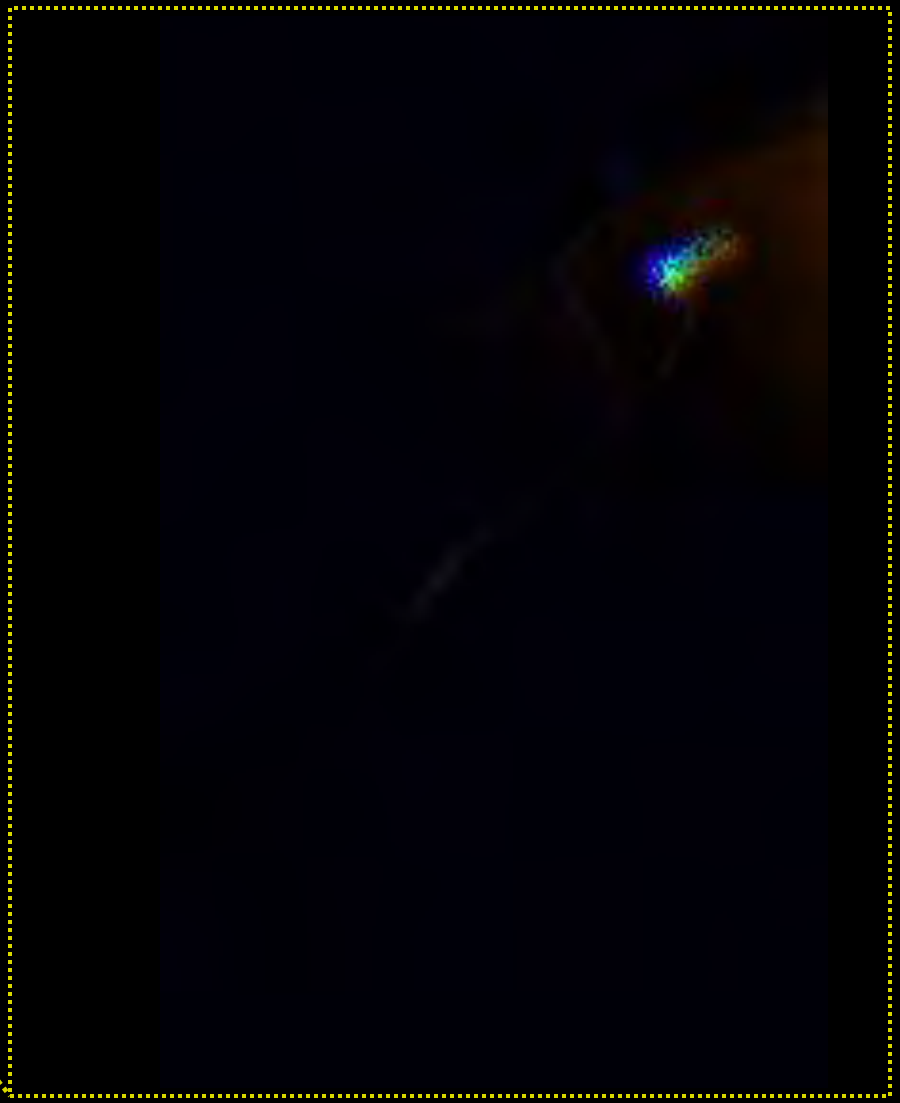
[Kimura et al., Curr. Biol. , 2004]
[Kodama et.al. ,Gene Dev. , 2006]
[Kuhara and Mori, J. Neurosci., 2006]

[Kuhara, Okumura et al., Science, 2008]

20℃-cultivated

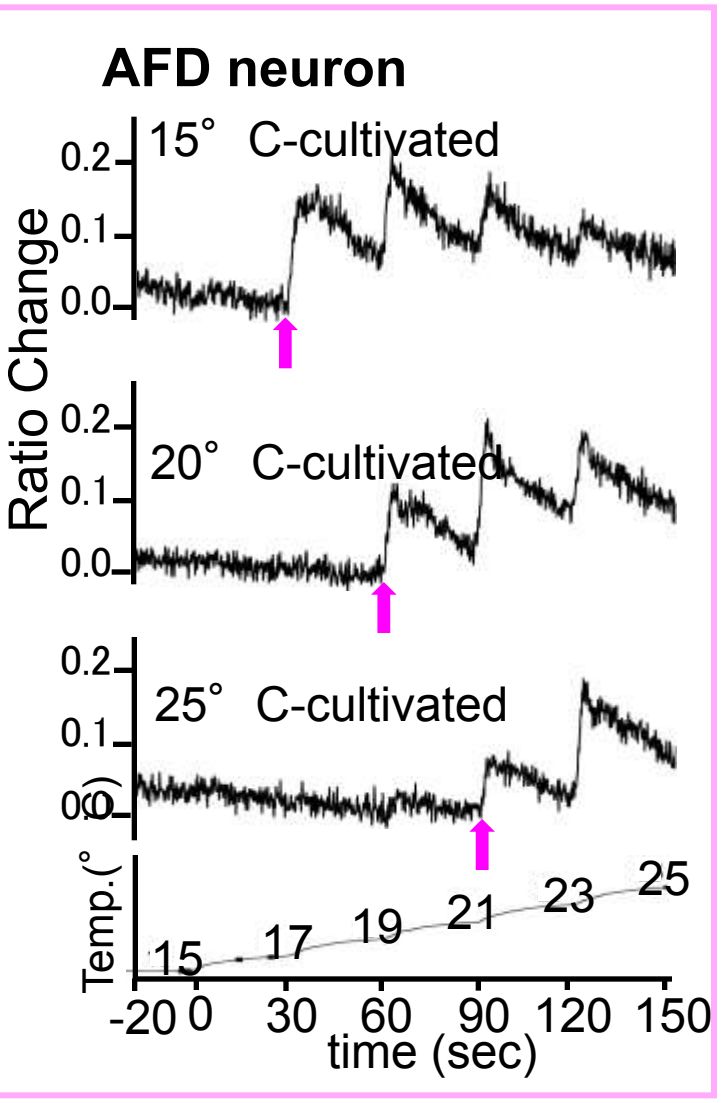


AWC olfactory neuron

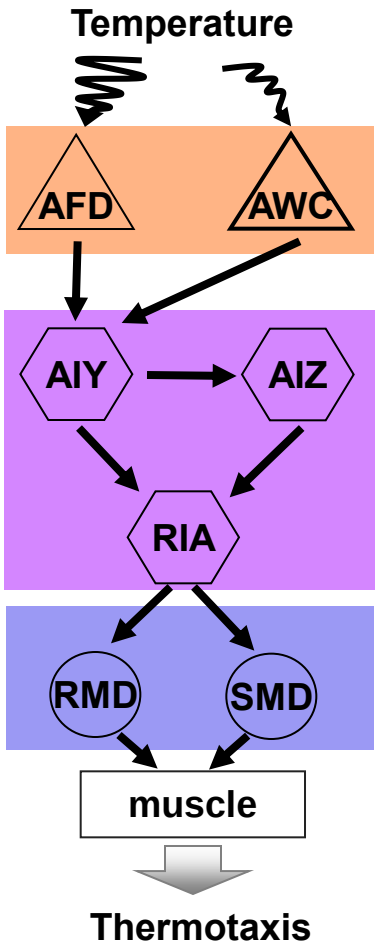


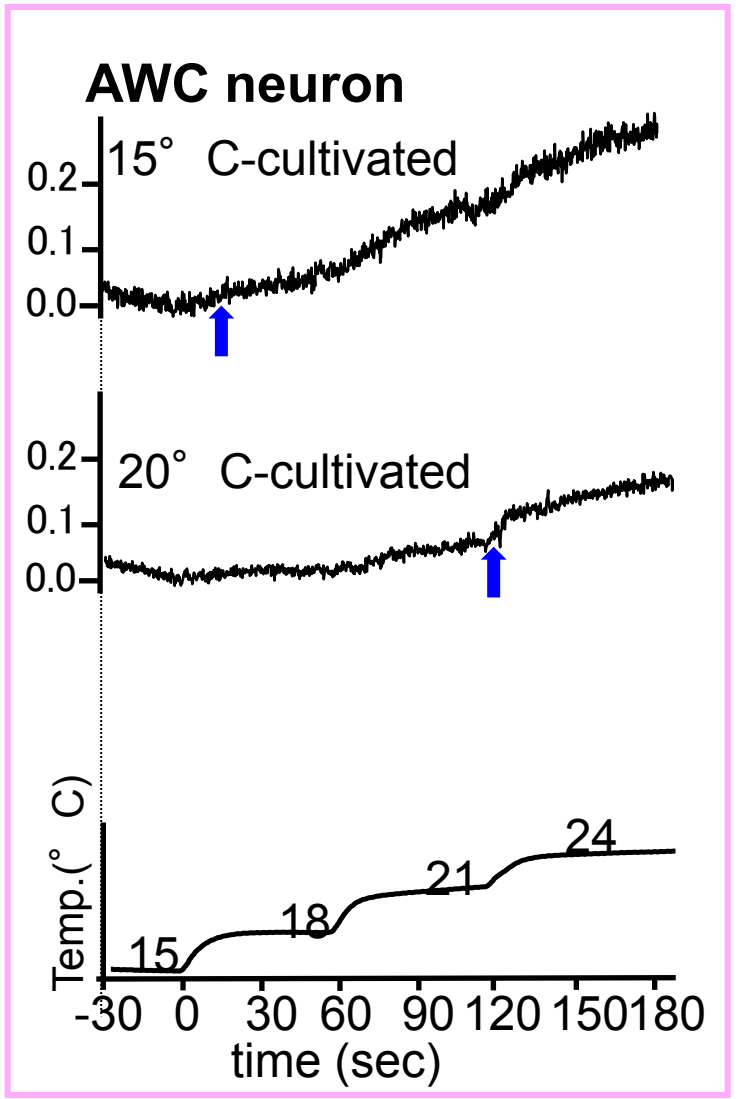
Temperature change
15℃ → 24℃
(2 min)

AFD と AWC ニューロンは 温度上昇に対して
飼育温度に依存して応答を変化させる：飼育温度を記憶する



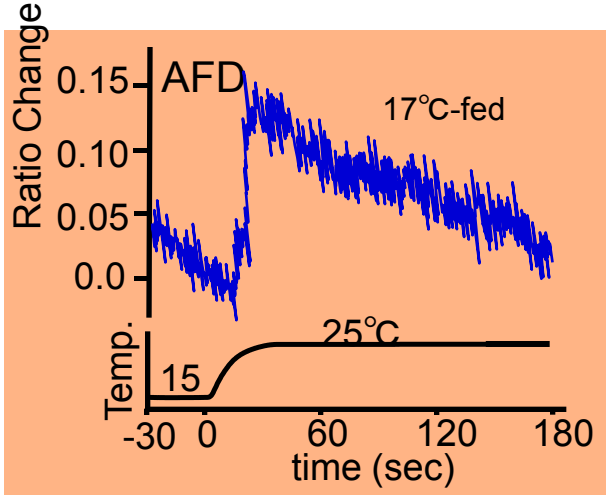
[Kimura et al., Curr. Biol. , 2004]

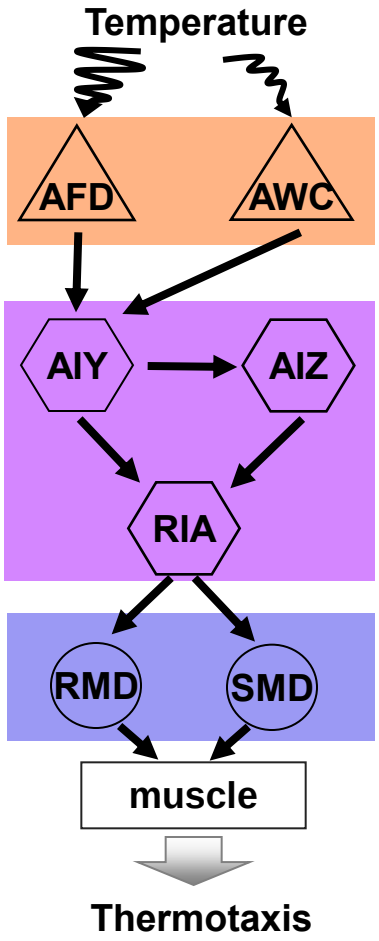


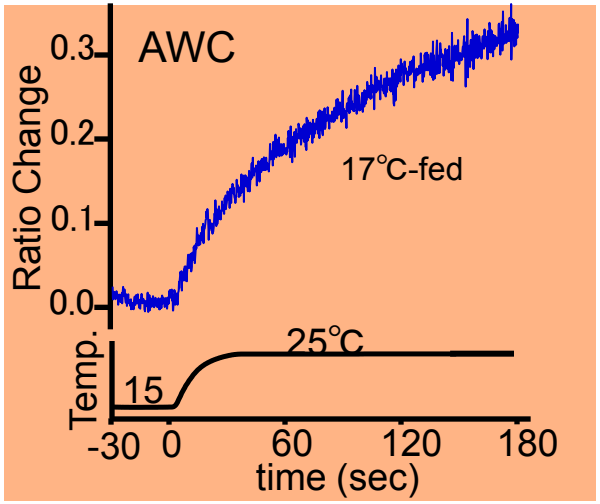


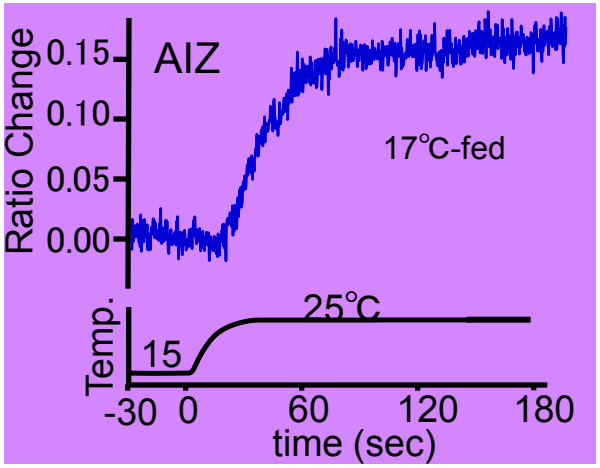
[Kuhara, Okumura et al., Science, 2008]

温度走性神経回路を構成する異なるニューロンは温度変化に対して異なる応答をする



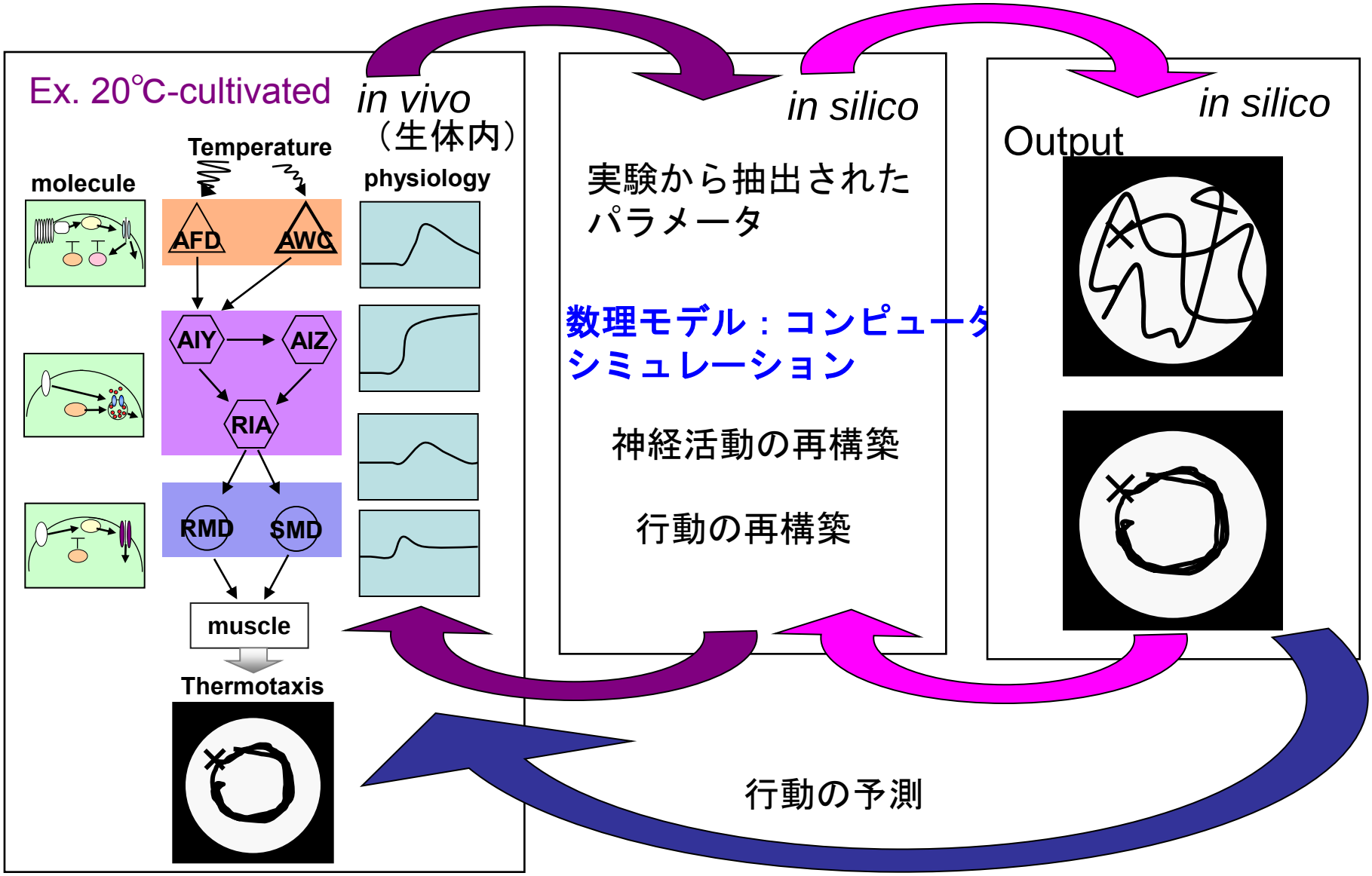




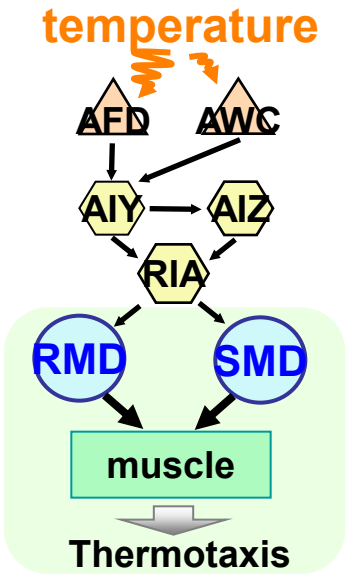


[Kimura et al., Curr. Biol. , 2004]
[Kuhara and Mori, J. Neurosci., 2006]
[Kodama et al. , Genes Dev., 2006]
[Kuhara, Okumura et al., Science, 2008]

温度走性の *in silico* 再構築：実験科学と理論科学



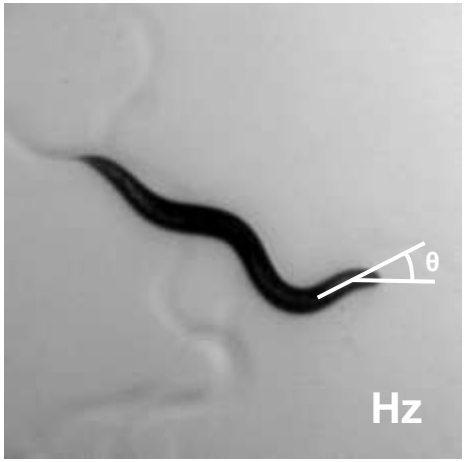
線虫運動の自動追尾システムの開発

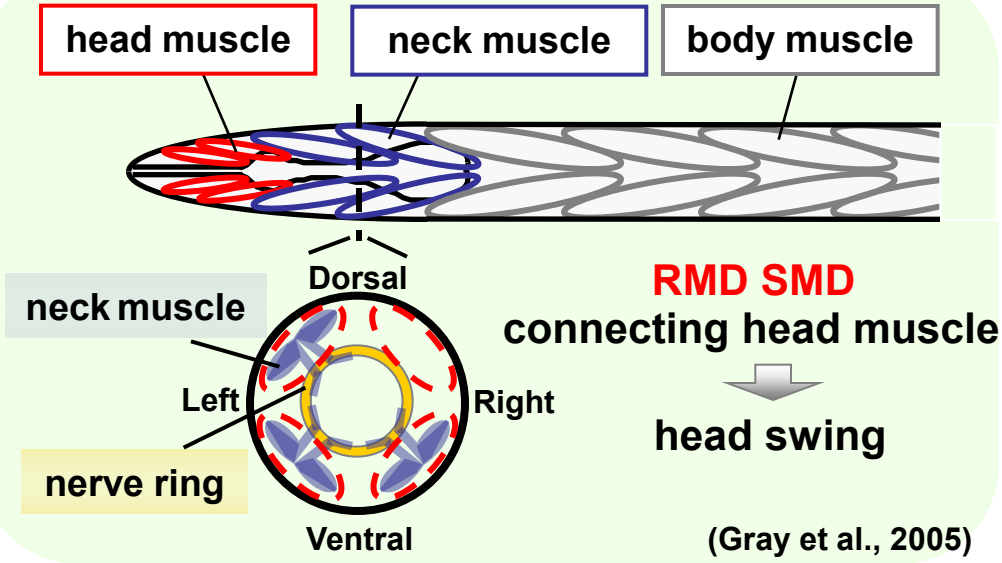


Auto-tracking system

on temperature gradient

Data analysis





RMD SMD

connecting head muscle

head swing

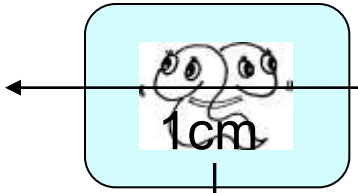
(Gray et al., 2005)

in vivo parameter for computation

線虫を自動追従する装置

線虫追従システム

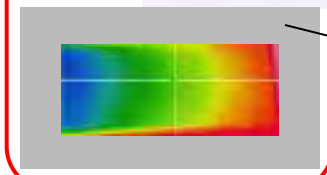
画像データ



$9mm^2$

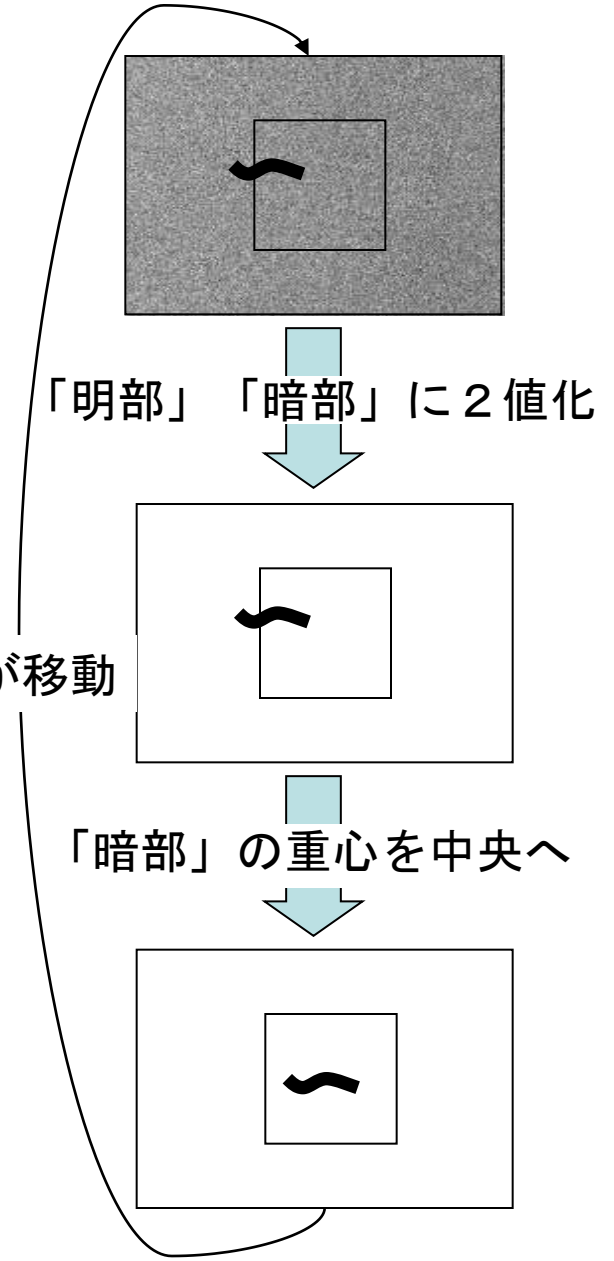
データ処理
ステージ制御
MetaMolph

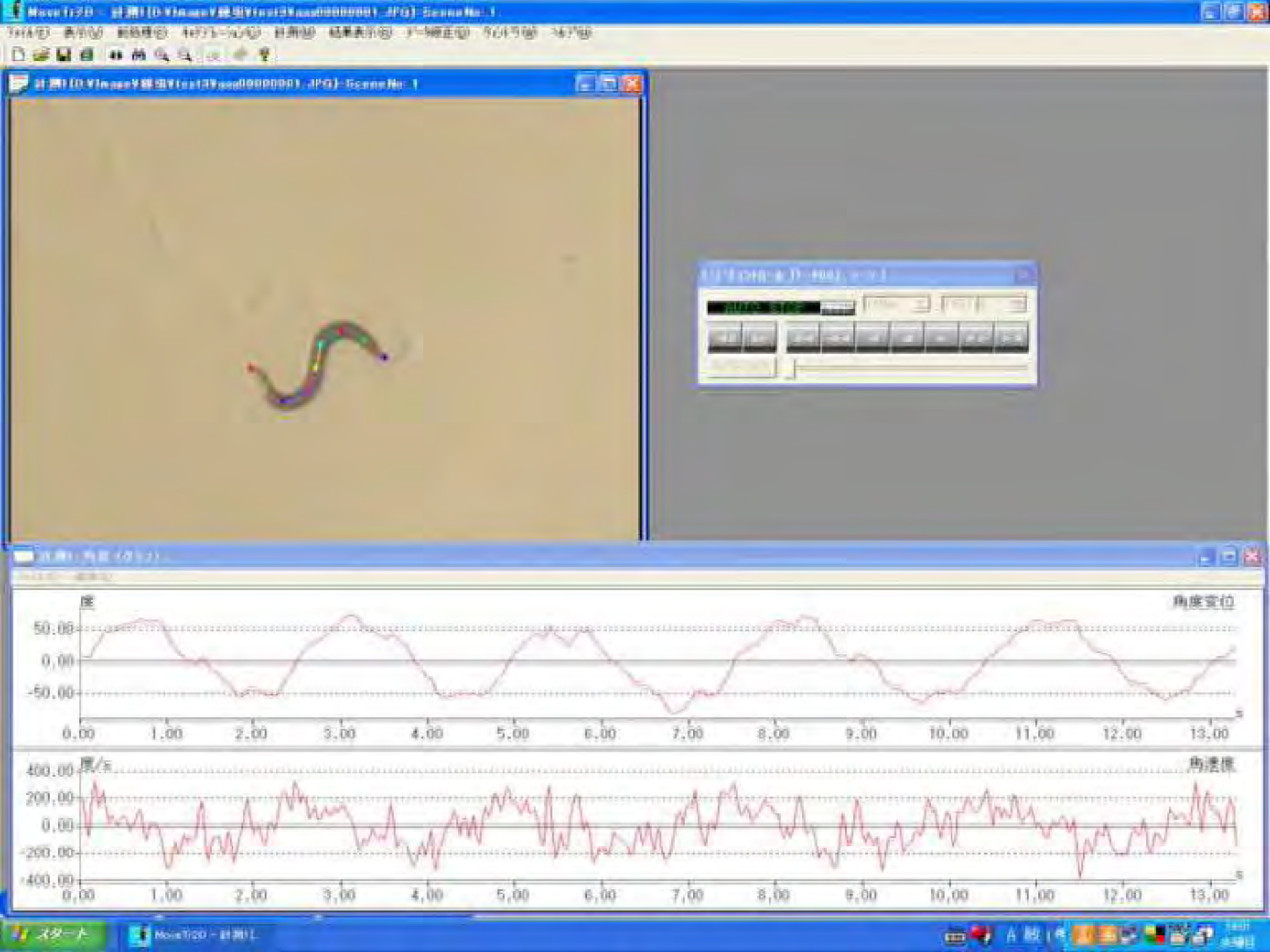
温度勾配装置

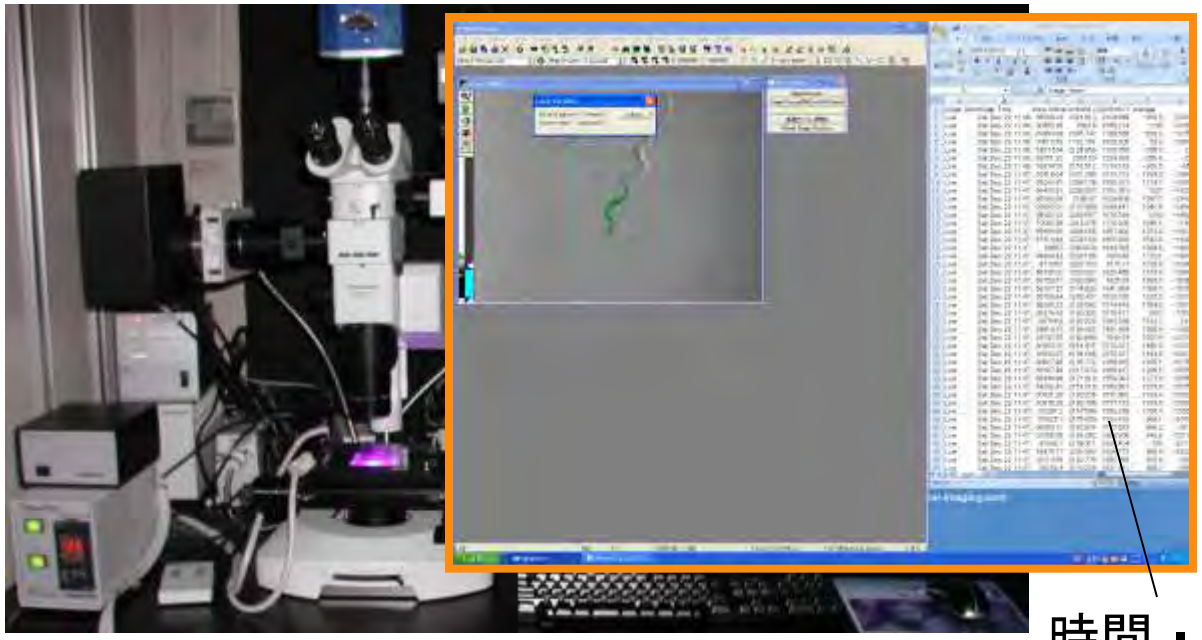


電動ステージ

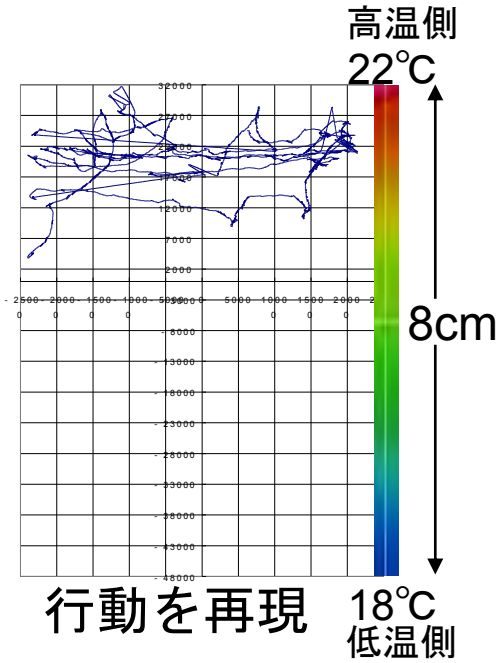
共同開発
久原 篤
大西 憲幸
オリンパス
モレキュラーデバイス
東海ヒット




度
角度変位
50.00
0.00
-50.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
s
度/s
角速度
400.00
200.00
0.00
-200.00
-400.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
s



時間・位置
情報を残す



行動を再現

温度走性を行っている線虫の運動

数理モデリング

温度走性行動の数理モデリング

線虫運動の構成要素

まず、基本的な運動モデルを適用してみる・・・

- 前進 (後退)　−持続時間に確率性 (ノイズ) あり
- 大きな方向転換 −角度に確率性 (ノイズ) あり
- 小さな方向転換 −角度に確率性 (ノイズ) あり

開発したAuto-tracking systemにより、
これら3つの基礎パラメータを演算可能

(線虫の運動は、これら基本要素の時系列からなる。)

前進 (後退) の持続時間、方向転換の角度などが、確率分布で表される特性を持ち、それが何らかのパラメータ (温度勾配など) に依存する

→ biased random walk

Collaborators

Kenichi Nakazato
(中里　研一)
Atsushi Mochizuki
(望月　敦史)
基礎生物学研究所
統合バイオセンター

運動方程式

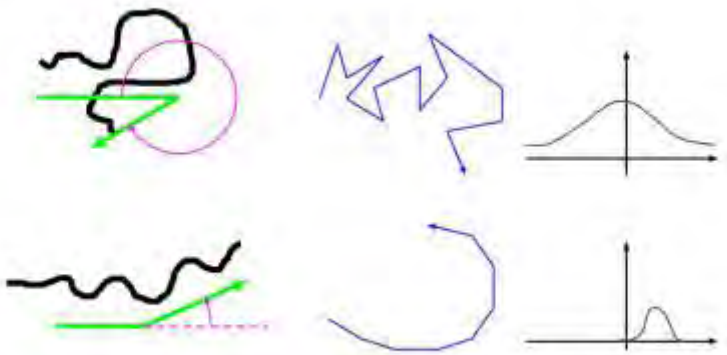
$$dx = v(\theta, ...)dt \quad (1)$$

$$d\theta = dW(t, ...) \quad (2)$$

1. 時刻 t の線虫の移動量 dx は、時刻 t の線虫の速度 $v(\theta)$ によって決まり、θ で決まる方向を向き、大きさは温度などのパラメータによって決まる。

2. 時刻 t の線虫の方向転換量 $d\theta$ は、確率的に決まるものとする。W は、方向転換の特性を反映した確率分布によって生成される。確率分布は温度場の特徴などによって決まる。

方向転換

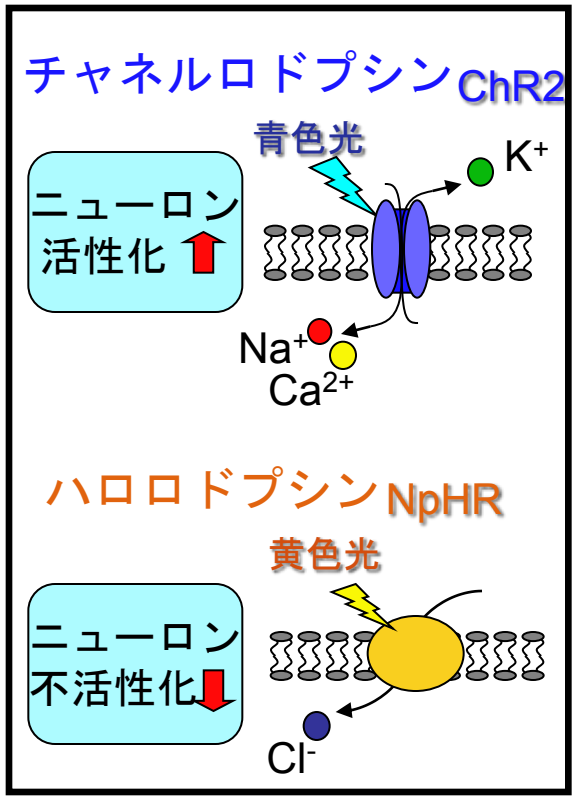


1. 方向転換は、大きなものと、小さな首ふり程度のものがあるので、それぞれ考慮する。

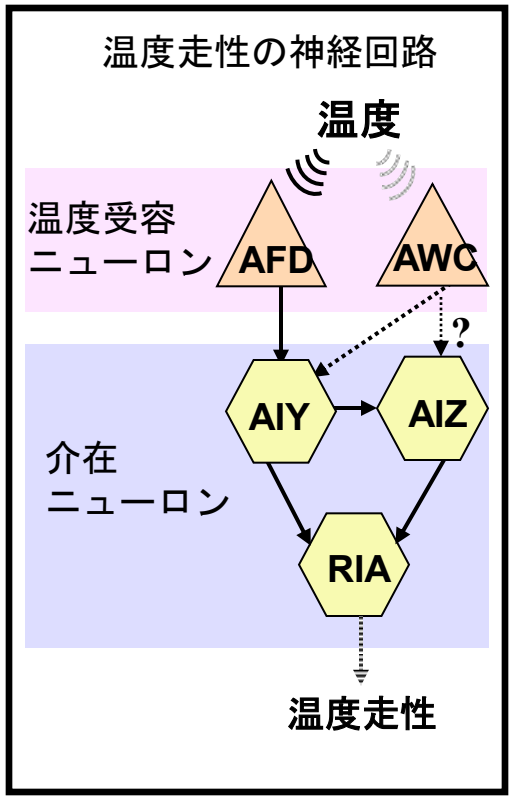
2. 大きな方向転換は、確率分布のばらつき具合を、小さな方向転換は確率分布の平均値をあたえる。

神経活動を人工的に操作する

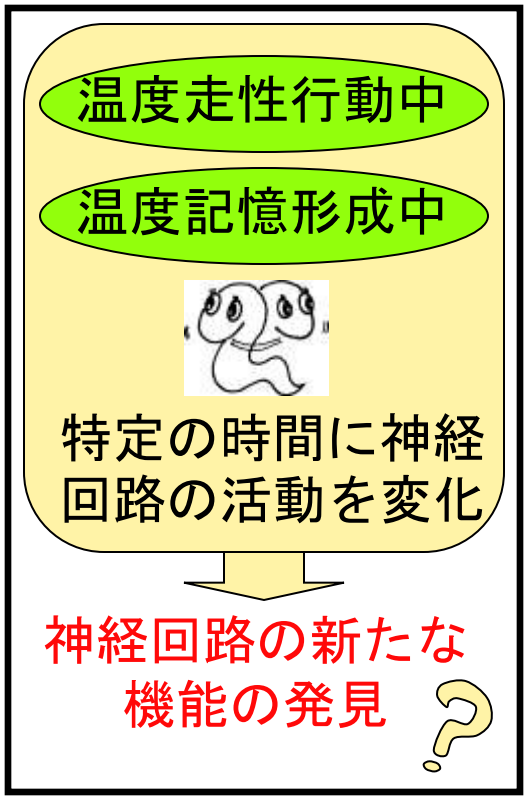
神経回路活動を意図的に操作できるタンパク



神経回路に遺伝子導入



行動中や記憶中に神経活動を人工的に操作



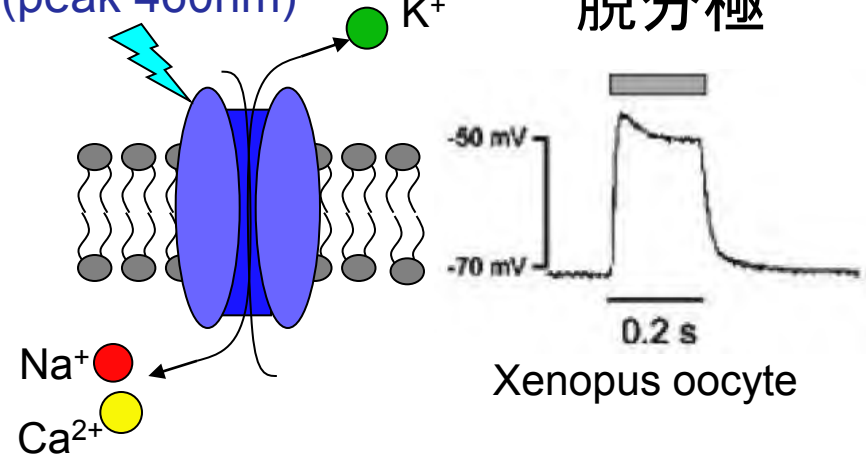
神経活動を瞬間的に操作する技術:
チャネルロドプシンとハロロドプシン

神経活動をミリ秒の単位で上昇や下降させる技術

（光感受性 陽イオンチャネル）

チャネルロドプシンChR2

青色光
(peak 460nm)



脱分極

Xenopus oocyte

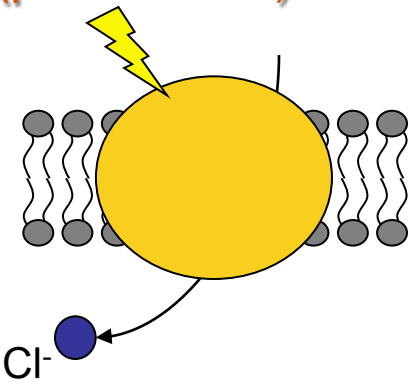
ニューロン活性化↑

(Nagel *et al*., 2003)

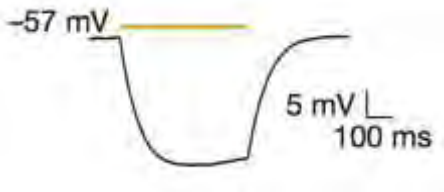
（光感受性 Cl^-イオンポンプ）

ハロロドプシンNpHR

黄色光
(peak 580nm)



過分極



Xenopus oocyte

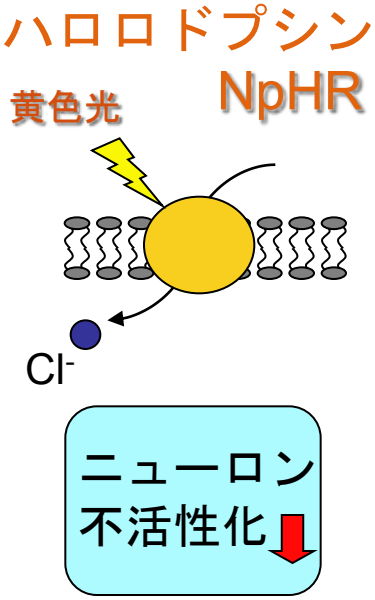
ニューロン不活性化↓

(Zhang *et al*., 2007)

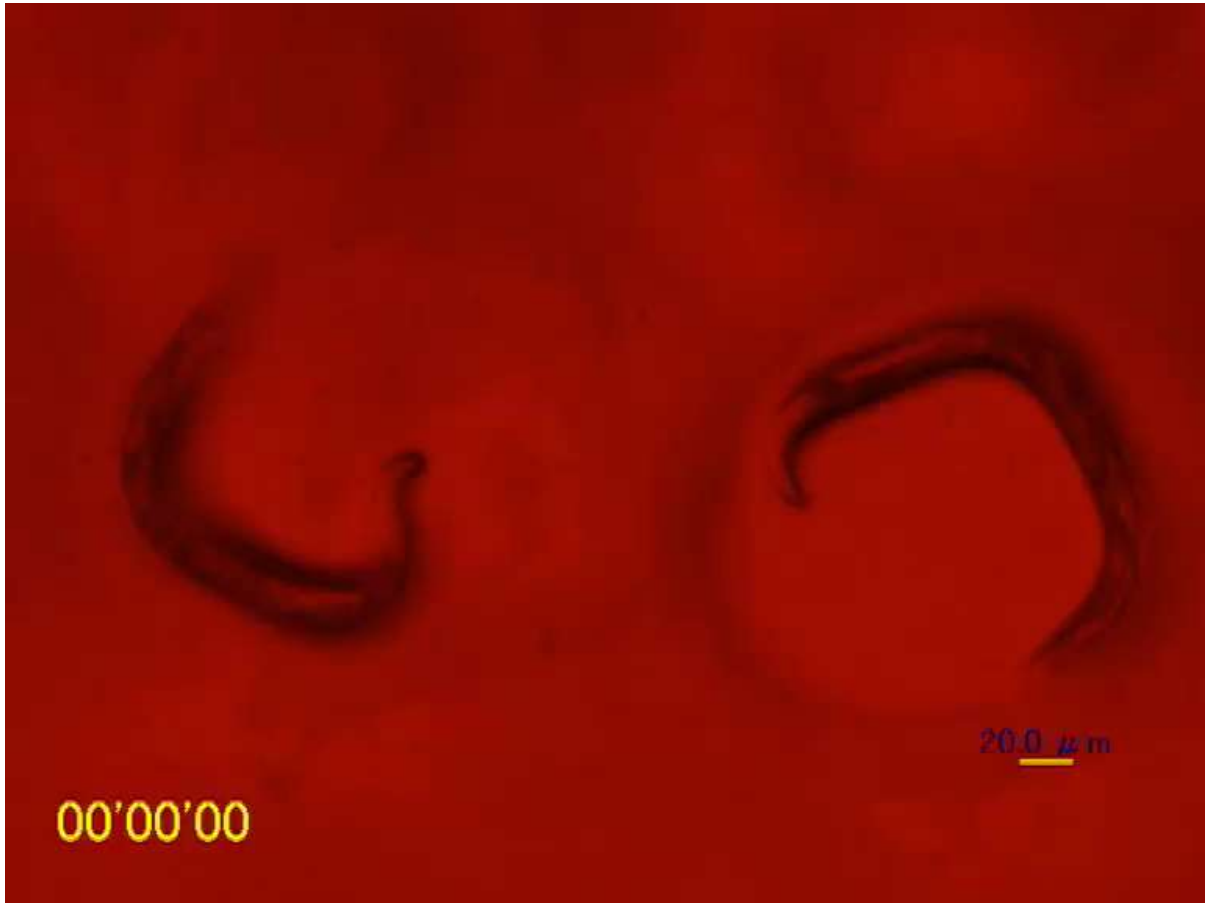
行動中や記憶中の神経回路機能の解析にもちいる

運動ニューロンでハロロドプシンを発現する系統

筋肉運動を制御する運動ニューロンでハロロドプシンを発現する系統
(Zhang *et al*., 2007)

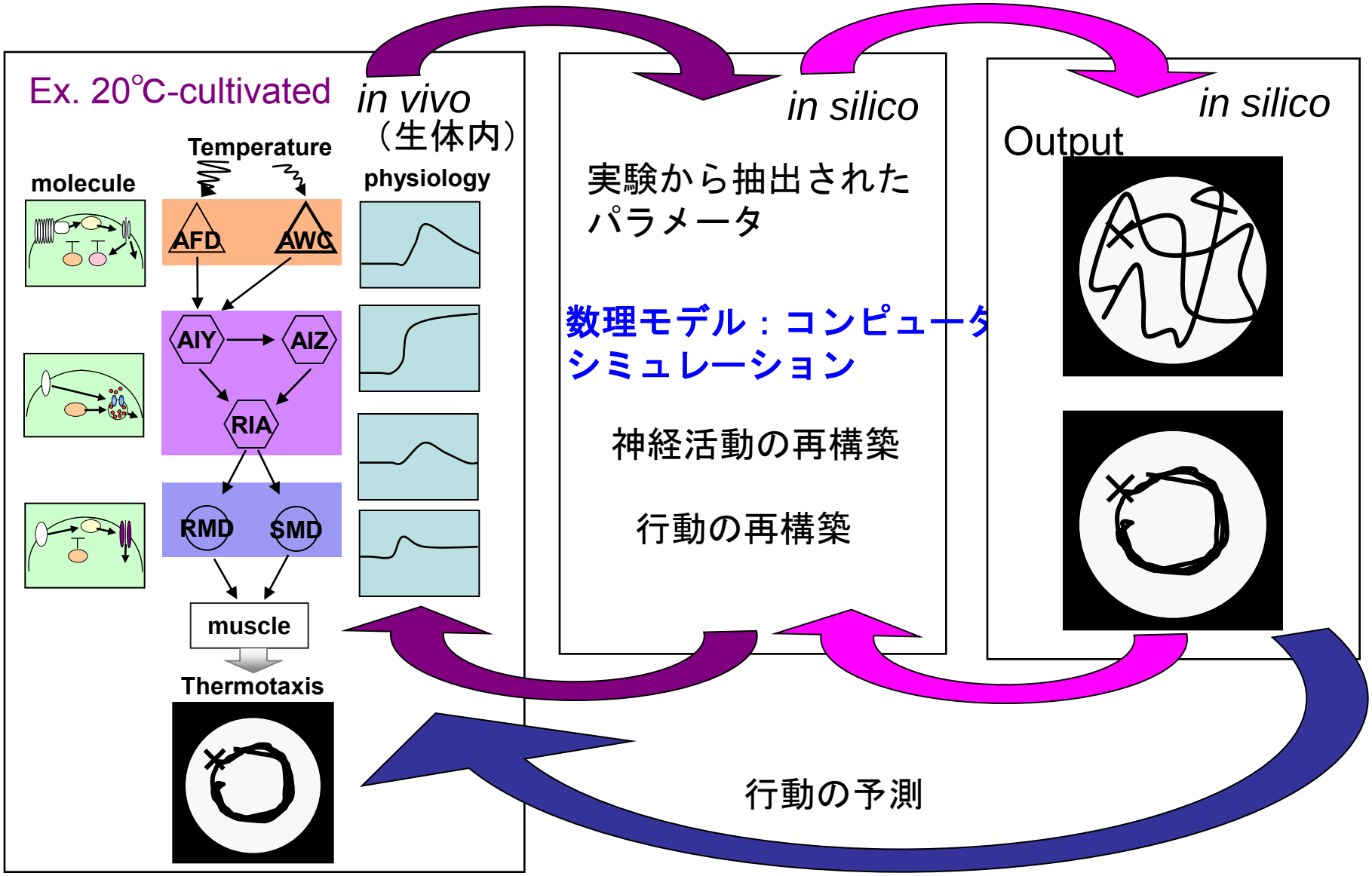


ハロロドプシン発現個体　　コントロール個体



4秒で黄色光On → 7秒で黄色光Off

温度走性の *in silico* 再構築：実験科学と理論科学



Assistant Professor（助教）
Atsushi Kuhara（久原　篤）

Postdoctral fellow（博士研究員）
Takuma Sugi（杉　拓磨）
Hiroyuki Sasakura（笹倉寛之）
Yuki Tsukada（塚田祐基）
Paola Jurado（パオラ フラド）

Research Associate（研究員）
Akiko Miyara（宮良晶子）

Graduate Student（大学院生）
Nana Nishio（西尾奈々）
Noriyuki Ohnishi（大西憲幸）
Tsubasa Kimata（木全　翼）
Ayako Okazaki（岡崎史子）
Taishi Emmei（延命大士）
Fuyuki Goto（後藤冬樹）
Tomoyasu Shimowada（下和田智康）
Yukuo Nishida（西田征央）
Kyougo Kobayashi（小林暁吾）
Tomoyuki Furuta（古田智敬）

Undergraduate Student（学部4年生）
Shingo Ikeda（池田真悟）
Fumiya Nakamura（中村文哉）
Naoya Hiramatsu（平松尚也）

Members of Mori Lab (2009)

<優れた研究を名古屋から世界へ発信>

Technical Assistant（技術補佐員）
Mami Murakami（村上由美）
Takako Sakaki（榊　貴子）