

令和元年6月21日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02516

研究課題名(和文) 介在神経回路における情報変換原理の解明

研究課題名(英文) information processing mechanisms in an inter-neuronal circuit

研究代表者

森 郁恵 (Mori, Ikue)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：90219999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,200,000円

研究成果の概要(和文)：動物が生存のため効果的に行なっている行動モードの切り替えと維持の制御メカニズムに関して、介在神経細胞に注目し、網羅的な解析を行った。行動と神経活動の時系列計測、またそれらに対する数理解析により、これまで分かっていなかった探索や移動行動における行動要素の構成が明らかとなり、それに関わる機能的な神経回路も明らかとなった。また行動モード依存的な神経活動の状態を明らかにし、神経活動への摂動方法を確立することで機能的な神経回路地図を同定し、その解析方法も確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

探索行動のような、単一の動作にとどまらず一連の行動系列として機能を持つ行動を実現する神経回路メカニズムの理解は、重要であるにも関わらずあまり理解が進んでいなかった。また介在神経細胞の行動に対する関与も感覚神経細胞や運動神経細胞に比べて不明であった。本研究で介在神経細胞に注目し、機能的な神経回路としてどのように行動モードを制御しているかを明らかにすることで、柔軟な環境への対応を実現する神経回路メカニズムの一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We focused on an inter-neuronal circuit that regulates behavioral mode of animals. Comprehensive analysis including time courses of behavior and neural activity showed elements of behavior to explore and navigate animals on thermal environments. Mathematical analysis clarifies quantitative data so that we could identify functional neural circuits for the behavioral regulation. We also established quantitative perturbation methods for neural activity analysis and successfully determined some states of the target neural circuit.

研究分野：神経科学

キーワード：神経回路 意思決定 行動選択 情報処理 C.elegans

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

線虫の神経系は302個の「名前がつけられ区別可能で個体差がほぼない」神経細胞から成り、それらの接続地図(コネクトーム)の作成は1980年代に完了している(White et al., *Phil. Trans. Royal Soc. B*, 1986)。さらに2000年代に劇的な向上をみせている神経活動の革新的計測・制御技術を活用することで、「動物は、環境入力を脳神経回路で情報処理した結果、どのような意思決定を行い、最終的な行動を選択するか」という問題に対して解答できる状態にきている。実際、計算論神経科学の研究者が、従来まで情報数理論に留まっていた神経回路・行動戦略モデルを線虫に適用し、実験的に検証する試みも始まった。

このような例として線虫やゼブラフィッシュなどの小規模な神経回路では、多数の神経細胞の活動を同時に計測し、それらの神経活動と行動出力を結びつけるための「全脳イメージング」が進められている(Ahrens et al., *Nature Methods* 2013, Kato et al., *Cell*, 2015)。多数の神経細胞の細胞体から得られた大量の計測データを主成分分析することで、神経活動の特性を大局的に分類した結果、主に運動回路を構成する神経細胞群の動態が明らかとなってきた。しかしながら、環境入力に応じて実行される情報処理や意思決定に重要な役割を果たす介在神経細胞の活動は、しばしば細胞体では検出されず、神経突起でのみ検出され、しかも、確率的で再現性がないことが明らかになってきた。従って、これらの介在神経細胞の活動を捉えるには、全脳イメージング的アプローチでは限界があることも分かってきた。実際に、申請者は、感覚神経細胞から情報を受け取る介在神経細胞を解析することで、同一細胞内であっても異なる部位で異なる反応特性を示すこと(神経活動の局所性)、また、反応特性の規則が不明瞭で確率的挙動(ゆらぎ)を示すこと(神経活動の不確実性)を見出した。

申請者は、行動を生成する細胞・神経回路メカニズムを解明する行動パラダイムとして、線虫が飼育温度を記憶し、生存に適切な温度を探索して、その温度域に停留する「記憶温度探索搾取行動」に、いち早く着目した。この行動を生み出す神経回路を同定することに世界で初めて成功し(Mori and Ohshima, *Nature* 1995)、分子遺伝学解析や、神経活動のカルシウムイメージング、オプトジェネティクス、個体運動の自動追尾システムを開発・活用することで、回路情報処理機構の解析を進めている(Kuhara, Mori et al., *Science*, 2008; Kuhara, Mori et al., *Nature Commun*, 2011; Aoki and Mori, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2015; Yoshida, Nakano, Mori et al., *Genes Brain and Behavior*, in press 2015)。

本研究を提案するにあたって、この回路内の複数の神経細胞は、細胞突起の局所領域で確率的な活動を示す観察が得られたことが基盤となっている。単調に増加する温度入力に対して、AFD 温度感覚神経細胞は、個体間で再現性の高い決定論的な応答特性を示すが、AFD とシナプス結合している下流の AIY 介在神経細胞は、個体間で再現性の低い確率的な応答を示した(Kobayashi, Nakano, Mori et al., *Cell Reports*, 2016; Tsukada, Mori et al., *J. Neurosci.*, 2016)。ところが、AIY の応答が、ノイズ的溫度入力に対しては、その確率的挙動を低減させて、より決定論的になると同時に、温度受容に加え温度記憶も行う AFD の活動と、高い同期性を示すようになることを突き止めた。すなわち、介在神経細胞 AIY が、AFD で受容・記憶される温度情報を、さらに下流回路へ通過させるか、させないかを定める「情報のゲーティング」をしており、さらに、この AIY によるゲーティングは、行動選択モードの切り替えに必須であることを示唆する結果を得た。AIY が、AFD の記憶情報を下流の運動回路に伝えると、記憶情報が運動回路の内的ゆらぎより優先されて、記憶依存的な搾取行動モードが選択される。一方、AIY が、AFD の情報を下流回路に伝達しないと、運動回路の内的ゆらぎが優先され、飼育温度域を求めて探し回る探索行動モードが選択されるのである。一連の研究成果は、生物が実行する行動戦略の根本原理に迫るた

めの、極めて重要な示唆を与えられ、神経回路が介在神経細胞の確率的挙動を積極的に制御することで情報のゲーティングを行い、行動モードの選択、切り替え、維持といった行動状態を制御する、すなわち、意思決定を実現している可能性を示唆する。また、これらの結果は、行動戦略メカニズムを解明するためには、行動状態が遷移するありさまや、それに伴う神経活動状態の遷移を、動的なシステムの遷移として捉える必要性も強く示唆した。従って、本研究で神経突起の局所性と不規則で確率的な神経活動を加味した上で、行動と神経活動それぞれを、「状態空間」の概念を使って数理物理的に表現することで、行動状態と神経活動状態を動的に捉え、両者の状態を並列比較することで、それらの因果律を明らかにすることが期待される。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、行動モードの切り替えと維持の制御メカニズムを、介在神経細胞の活動の「局所性」および「不確実性(ゆらぎ)」を加味して明らかにすることを目的とする。動的システムの解析に適する数理物理的手法により、行動状態および神経活動状態それぞれの動的な遷移を捉えて、行動モードの切り替えと神経回路動態の相関を明らかにし、モデル生物としての線虫の利点である、突然変異体やトランスジェニック系統を用いた分子遺伝学的手法やオプトジェネティクスなどを最大限活用することにより、数理物理的解析の結果を実験的に検証する。これにより神経活動と行動の因果律を明らかにして、神経回路動作原理の分子・細胞・回路基盤を解明することを目指す。具体的には線虫の記憶温度探索搾取行動を、「行動状態が動的に遷移するシステム」として捉え、神経活動状態の遷移と行動状態の遷移が、どのような因果関係にあるのか、脳神経系に内包される不確実性(ゆらぎ)が行動モードの選択・切り替え・維持にどのような役割を果たすのかを定量的な実験から明らかにすることを目指す。行動と神経活動の同時計測により、神経回路動態と行動モードの選択・切り替え・維持の遷移とを並列に比較することで、神経回路動態によって行動が制御される「意思決定実現」メカニズムを解明する。行動と神経活動の因果律を確率過程でモデル化し、光遺伝学・分子遺伝学的な神経活動の摂動実験によって、実験的に検証する。

## 3. 研究の方法

### 行動のハイスループットな定量的計測と解析

線虫は飼育温度を記憶し、温度勾配上に置かれると、飼育温度を探索し(探索行動モード)、その温度域付近に到達する頃になると、等温線上に沿って前進行動を続けながら、その温度域に留まろうとする(Isothermal tracking、温度記憶依存的な搾取行動モード)。この記憶温度探索搾取行動を実行中の線虫個体の運動を、時系列に沿って追尾することで、この行動を成立させるための前進、後退、様々な方向転換(ターン)などの運動要素の動的な遷移を解析する。そのため高解像度の動画を長時間計測し、数百個体の行動の時系列を定量的に評価できるシステムである Multi Worm Tracker (Swierczek *et. al.*, *Nature Methods*, 2011)を用いる。高解像度カメラを使うことによって、スループット性を向上させた Multi Worm Tracker システムを用いて、記憶温度探索搾取行動中の異なる運動要素(たとえば、前進、後退、シャローターンと呼ばれる浅い角度での前進方向の変更、オメガターンと呼ばれる U ターン型の方向転換など)の切り替えやそれらの組み合わせを検出し、それらの遷移過程を観測する。また、記憶温度探索搾取行動に重要な遺伝子群の機能欠損突然変異体や、細胞特異的な Caspase の発現により各神経細胞に細胞死を誘導した系統について同様の行動解析を行い、分子や神経細胞が運動要素の切り替えや遷移に果たす役割を明らかにすることで、行動戦略の分子・細胞・回路基盤に迫る。

さらに線虫行動を動的システムと捉え、運動状態を「状態空間」と呼ばれる空間で記述することで、行動特性を数理物理的に解析する。状態空間では、空間上のある一点がシステムのある一つの状態に対応する。線虫行動の解析では、体の形状・姿勢、および移動速度が「運動状態」となる。高次元で記述される状態を、主成分分析などの数理的手法を適用することで、我々が見ることのできる次元数まで逡減させ解析する。このような数理的解析から、線虫の行動を「探索行動モード」や「記憶依存的な搾取行動モード」などに分類することで、動的な遷移ダイナミクスやそのネットワーク構造に関わる遺伝子・分子の実態に迫る。

#### 神経活動の定量計測と数理解析

記憶温度探索搾取行動の神経回路を形成する神経細胞のうち、温度受容神経細胞 AFD と、AFD から直接入力を受ける介在神経細胞である AIY に焦点を絞り、固定下の野生型個体および各神経細胞の機能が異常となる突然変異体に対して、カルシウムイメージングを用いて詳細に計測する。得られた計測データは行動解析と同様に数理物理学的手法により解析する。神経活動の計測にあたっては、コネクトームを活用し、シナプス接続箇所を考慮して、神経突起の局所領域から神経活動の計測を行う。これまでに少なくとも AIY の神経突起において、神経活動の局所性と確率的挙動を見出しているため(Kobayashi, Nakano, [Mori et al., Cell Reports 2016](#))、計測された AFD および AIY 神経細胞における神経突起局所領域のカルシウム輝度値を軸とする「神経状態空間」を構成する。これにより、軌道が準安定的に滞在するアトラクターを「記憶温度探索搾取行動を規定する回路の活動状態」と定義し、その出現頻度およびその遷移のダイナミクスを抽出する。さらに神経細胞ごとの特有の応答特性を精密に調べるために、固定下の個体に対して、単調な温度上昇や下降、ステップ型、凹凸型の温度変化や、ゆらぎを含んだランダムな温度変化(ガウシアンホワイトノイズ)など、様々なパターンの温度入力に対する神経活動を計測する。様々な温度入力パターンに対する応答を系統的に調べることで、応答特性が変化する規則の全貌を明らかにする。

#### 神経活動への摂動

神経活動の遷移と行動モードの選択・切り替え・維持の遷移との因果律について検証するために ChR2、NpHR、Arch など、オプトジェネティクスを用いて各神経細胞の活動を操作する。さらに高速・高分解能の線虫自動追尾システムを用いて、記憶温度探索搾取行動中の行動と、確率的挙動を含む神経活動の同時計測を行い、数理物理学的手法によって表現される行動状態空間と神経状態空間を並列に比較することで、行動モードの選択・切り替え・維持の遷移ダイナミクスと、神経回路動態の遷移の因果関係を明らかにする。また AFD と AIY 神経細胞の結合の関係性により神経活動の関係がどのように変化するかをシナプスレベルで明らかにするために、フェムトセカンドレーザーを用いて、神経突起局所領域のみを切除し、複数あるいは単一のシナプス接続を欠失させたときの、AFD および AIY の神経活動を計測する。フェムトセカンドレーザーは熱を与える領域を極微小に限定し、切除実験においてもナノジュールレベルの熱量に抑え、細胞体への影響を抑えることができる。この技術により神経突起の一部のみをレーザーで切除し、なおかつ生きたままの神経細胞 AFD と AIY の活動関係性を解析する。

#### 4. 研究成果

Multi Worm Tracker を用いた詳細な時系列行動解析を実施することで、これまで分からなかった探索行動や移動における行動要素の構成が明らかとなった。神経科学における定量的な行動解析の重要性が非常に高くなったことから、特に神経活動と組み合わせた定量的な行動解析は動物種を問わず活発に研究が進められており、相互に情報交換が行われている。本研究成果も神

経科学全体に影響を与える神経基盤を提供するものとなった。さらにこの Multi Worm Tracker を用いた記憶温度探索中の行動解析を基盤として、細胞特異的に Caspase を発現させ、神経回路における特定の神経細胞の役割を解析する摂動実験を大規模に行うことで、これまで想定されていた神経回路の機能的地図を塗り替える新たな知見を得た。これまで提唱されている機能的な神経回路地図を刷新することで、新たな問題提起と研究の方向性を示唆する成果となった。また本研究で着目している探索搾取行動について、特徴となる等温線上を継続して探索する行動 (isothermal tracking) の解析方法を開発し、それを用いてどの神経細胞が探索搾取行動に関わるかを解析することで、探索搾取行動の制御に寄与の高い神経細胞を同定した。特に運動神経細胞のすぐ上流に位置する RIA 神経細胞が寄与することをつきとめ、運動制御と感覚情報の統合に関わる情報処理のメカニズムの一端が明らかとなった。

飽食経験のある個体と、飢餓経験のある個体で、AFD と AIY の相互作用がどのように異なるかを調べるため、AFD と AIY にそれぞれカルシウムプローブ RCaMP2 と GCaMP3 を発現させたシステムを用いてカルシウム動態の時系列が明らかとなった。マイクロビーズで体を固定した線虫に対して温度変化刺激を与えながら、AFD と AIY から同時にカルシウムシグナルを取得し、20度で飽食を経験した個体に対して、15度付近から23度まで振動しながら上昇する温度刺激を与えると、AFD のカルシウムシグナルは17度付近で上昇し始め、温度振動にフェイズロックする振動を示した。AIY は AFD の応答開始温度付近 (17度付近) では AFD の振動に同期する応答を示したが、より高温では AFD と逆に同期していた。一方、20度で飢餓を経験した個体に対して17度付近の温度振動刺激を与えると、AFD は飽食個体と同様の応答特性を示したが、AIY は AFD の応答開始温度付近で AFD に対して逆に同期することがわかった。これらの計測データをもとに、相互相関関数によるタイムラグ相関解析、およびヒルベルト変換を用いたシグナル間位相差の検出により、AFD の応答開始温度付近 (17度付近) における AFD と AIY の動的相互作用が、飢餓経験によって変容していることが分かった。この結果は、これまでに得られた行動実験の結果を説明しうるものであり、数理的な解析からその特徴が明らかとなった。

オプシンやフェムトセカンドレーザーを用いた神経回路への摂動により、シナプスレベルの解像度で神経細胞へ介入することに成功した。青色光により活性酸素を生成する miniSOG を用いて、対象としている AFD-AIY 神経細胞間のシナプスにおける小胞の機能を阻害することに成功した。またフェムトセカンドレーザーを用いた神経線維の切断も、隣の神経繊維を傷つけることなく切除することに成功し、その影響をカルシウムイメージングにより計測することができた。これらの神経回路への摂動実験により、行動と神経活動の定量計測や数理解析から得られる仮説を検証する方法論が確立された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) An SWA., Choi ES., Hwang W., Son HG., Yang JS., Seo K., Nam HJ., Nguyen NTH., Kim EJE., Suh BK., Kim Y., Nakano S., Ryu Y., Man Ha C., Mori I., Park SK., Yoo JY., Kim S., Lee SV., "KIN-4/MAST kinase promotes PTEN-mediated longevity of *Caenorhabditis elegans* via binding through a PDZ domain" *Aging Cell*. e12906. DOI: 10.1111/accel.12906 査読有.2019

(2) Aoki I., Tateyama M., Shimomura T., Ihara K., Kubo Y., Nakano S., Mori I., "SLO potassium channels antagonize premature decision making in *C. elegans*" *Communications Biology*(1). DOI: 10.1038/s42003-018-0124-5 査読有.2018

(3) Yamaguchi S., Naoki H., Ikeda M., Tsukada Y., Nakano S., Mori I., Ishii S., "Identification of animal behavioral strategies by inverse reinforcement learning" PLOS Computational Biology(14). e1006122. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006122 査読有.2018

(4) TSUKADA Y., MORI I., "Thermosensory Neuronal Encoding of Spatial Temperature Gradient in *C. elegans* Thermotaxis" Seibutsu Butsuri(58):031-033. DOI: 10.2142/biophys.58.031 査読有.2018

(5) Sasakura H., Moribe H., Nakano M., Ikemoto K., Takeuchi K., Mori I., "Lifespan extension by peroxidase and dual oxidase-mediated ROS signaling through pyrroloquinoline quinone in *C. elegans*" Journal of Cell Science(130):2631-2643. DOI: 10.1242/jcs.202119 査読有.2017

(6) Taniguchi A., Kimura Y., Mori I., Nonaka S., Higashijima S., "Axially-confined in vivo single-cell labeling by primed conversion using blue and red lasers with conventional confocal microscopes" Development, Growth & Differentiation(59):741-748. DOI: 10.1111/dgd.12412 査読有.2017

[学会発表](計 40 件)

(1) 森 郁恵, "線虫の行動と脳神経回路の包括的解析から、記憶、学習、意思決定のメカニズムを探る"日本線虫学会大会公開シンポジウム「新」線虫研究~加速する多様化と応用への期待~(招待講演), 2018

(2) 森 郁恵, "線虫行動と神経回路の包括的解析から記憶、学習、意思決定のメカニズムを探る"第34回日本生理心理学大会(招待講演), 2016

(3) Ikue Mori, "Unveiling principle of neural circuits underlying learning, memory, and decision-making." Science Lecture at Department of Life Science, Peking University(招待講演), 2016

[図書](計 2 件)

(1) Aoki I., Nakano S., Mori I., "Molecular Mechanisms of learning in *C. elegans*" In: Learning and Memory: A Comprehensive Reference 2nd Edition (Ed:Byrne)" Elsevier:415-434 2017

[その他]

ホームページ等 <http://elegans.bio.nagoya-u.ac.jp/~lab/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 中野俊詩

ローマ字氏名: NAKANO Shunji

研究協力者氏名: 塚田祐基

ローマ字氏名: TSUKADA Yuki