

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18839

研究課題名（和文）局部機能抑制と神経-筋モデル解析からひもとく線虫の筋運動生成メカニズム

研究課題名（英文）Study on mechanisms of motor control in *C. elegans* using region-specific irradiation and neuromuscular model analysis

研究代表者

鈴木 芳代（Suzuki, Michiyo）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・主幹研究員（定常）

研究者番号：10507437

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：モデル生物の線虫（*C. elegans*）の運動制御機構を探るため、中枢神経系（CNS）を狙って炭素イオンビームを照射した結果、CNSとその周辺の筋細胞への炭素イオン照射直後には、線量依存的かつ照射面積依存的な全身運動の一時的な低下が観られることなどが示唆された。また、CNS照射後も全身運動を担う体壁筋が頭部から尾部まで順に収縮・弛緩を繰り返す、筋活動の「波」の伝搬が観られたことから、線虫の全身運動のリズム生成を担っているのは、CNSではなく全身の筋細胞ネットワークである可能性が強まった。また、線虫の実構造に基づく神経-筋モデルを用いたシミュレーション（仮想実験系）による細胞機能推定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線虫は、細胞を構成する分子とその機能に関する知見が蓄積されているが、生体機能には未解明な部分が多く従来手法だけでは解明が難しい。独自の局部機能抑制法による実験と数理モデルによる仮想実験とを組み合わせたアプローチで細胞機能を探った本研究の試みは挑戦的かつ画期的である。

本研究は、これまでにない画期的な細胞機能抑制法の確立、及び動物の実構造を考慮した数理モデルによる仮想実験系の確立とにより生命科学研究に技術的な進歩をもたらした。また、動物の動作原理を探るとい生物学の問題を工学的アプローチで解決し、得られた知見を動物の仕組みに学ぶ機械の設計や制御に活かす取り組みは、社会システムの発展に貢献する。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we developed a novel method for targeted central nervous system irradiation of *Caenorhabditis elegans*, and showed the first evidence for the involvement of the CNS in control in adult animals. The motility decreased in a dose-dependent manner immediately after CNS-targeted irradiation, suggesting that the motor control of *C. elegans* is not independent of the CNS. In addition, to investigate the behaviors of neurons in the CNS we conducted computer simulation using a neuromuscular model of *C. elegans*. A series of results in our study are partly consistent with previous experimental or theoretical studies, which suggested the involvement of neurons consisting CNS in locomotion.

研究分野：マイクロビーム生物学

キーワード：マイクロビーム *C. elegans* マイクロチップ 中枢神経系照射 運動リズム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、動物に学ぶ革新的な知能機械の開発を目指し、生命現象の動作原理をシンプルな系で理解するための魅力的な対象であるモデル生物の線虫 (*C. elegans*) に着目して、特に筋運動のメカニズムを調べてきた。線虫は 959 個の細胞で刺激応答や筋運動制御のほか、学習・記憶も実現しており、多細胞生物で唯一、全細胞の配置や細胞間接続が完全に分かっている。その筋運動に関する最大の課題は、調和の取れたリズムカルな筋運動がいかんして実現されているのか、とりわけ、リズム生成器の実体を個々の細胞機能の解明を通して突き止めることである。個々の細胞や組織の機能を調べる手法として、突然変異体や細胞機能阻害剤を用いる手法があるが、任意の細胞や細胞群の機能だけを選択的に抑制することは難しい。また、レーザーで細胞を破壊するレーザーアブレーションでは、任意の細胞を狙い撃ちできるが、細胞機能が永久的に抑制されることやレーザーによる細胞ダメージが応答に反映されるという問題がある。

研究代表者らは、この問題を打開するための新しい実験的アプローチとして、重イオンをマイクロビーム化して特定の細胞群を狙って照射し、組織を破壊せずにその機能だけを一時的に抑制することに世界に先駆けて成功した。これを用いれば、「ある細胞の機能を抑制した場合の応答の正解」を調べられるはずだが、実験時間が限られる加速器を利用した本手法で全細胞の機能を網羅的に調べるのは、現実的ではない。

2. 研究の目的

研究代表者らは、実験を補う手法として、数理モデルを用いた仮想実験による細胞機能推定を着想し、線虫の細胞一つひとつと対応付けできる神経筋モデルを完成させて、コンピュータ上で仮想的に任意の細胞機能を不全にしてその機能を調べることを試みてきた。もし、重イオンマイクロビーム局部機能抑制で得られたデータをこのモデルの出力教師信号として用いてその内部パラメータを最適化できれば、実測データのない細胞の機能も仮想実験で精度良く推定できる可能性がある。このことは、細胞機能解明研究の速度とデータ精度の飛躍的な向上に直結する。

本研究では、重イオンマイクロビーム局部機能抑制法と線虫の数理モデルによる仮想実験という二つの独自技術を組み合わせ、細胞機能を精度良く推定する仮想実験系を確立することを目的とする。これにより線虫の筋運動生成メカニズムを解明することを最終目標とする。

3. 研究の方法

本研究では、マイクロビーム局部照射実験で得られたデータをもとに、線虫の神経-筋モデルの内部パラメータを最適化し、実生物実験に代わる推定精度の高い仮想実験系を確立する。

(1) イオンマイクロビーム局部照射実験

筋運動を担う体壁筋細胞の収縮・弛緩に伴って増減するカルシウムをイメージングプローブで蛍光標識することで、筋の収縮・弛緩の度合いを可視化した遺伝子組換え線虫を用いて、局部照射後の筋運動の動態を調べる。実験には、量研高崎研の重イオンマイクロビーム細胞局部照射装置を用い、感覚受容及び情報処理を担う頭部の中枢神経系 (CNS) と筋運動を担う頭から尾までの腹側及び背側体壁筋を照射する。局部照射線虫の蛍光動画像を画像解析し、筋運動時の各部位の座標を取得する。また、各部位の蛍光強度を抽出し、特定の筋細胞の機能抑制が筋運動全体にどのような影響を及ぼすのかを解析する。

(2) 仮想実験による細胞機能の推定

(1)の実験で得られたデータをもとに、線虫モデルの内部パラメータを最適化する。その後、実測データのない細胞の機能を抑制する仮想実験を行い、筋運動に現れた変化をデータ化する。一連の仮想実験の結果から、筋運動の生成・制御に関与する細胞候補を絞り込み、筋運動生成メカニズムを解明する。

4. 研究成果

(1) イオンマイクロビーム局部照射実験

線虫の特定部位を狙ってイオンビームを照射するためには動きを抑制する必要があるが、麻酔を用いることができない。そこで、PDMS製のシートに線虫の幅と同程度の幅及び深さの直線状のマイクロチャンネル (溝) を複数形成したマイクロチップを開発し、線虫をチャンネルに封入保定する手法を確立した (Suzuki, et al., J. Vis. Exp., 2019)。次に、全身運動を担う体壁筋細胞の収縮・弛緩に伴って増減するカルシウムイオンをイメージングプローブで蛍光標識した遺伝子組換え線虫をこの手法で保定して筋細胞活動を蛍光撮像し、画像解析により各部位の蛍光強度から活動レベルを導出する手法を考案した。

頭に位置する神経環 (中枢神経系 (CNS) に相当) へのイオンマイクロビーム照射によって筋活動がどのように変化するかを観察することを目的に、体壁筋細胞の収縮・弛緩に伴って増

減するカルシウムイオンを蛍光標識した遺伝子組換え線虫への局部照射を行った。実験では、量研高崎研のイオンマイクロビーム細胞局部照射装置を用い、線虫の頭に位置する神経環の直径約 20 μm ないし約 60 μm の範囲を狙って炭素イオンビームを照射した。独自開発した PDMS マイクロチップ「Worm Sheet」を用い、照射中のみ線虫を直線状のマイクロチャンネルに封入することで生理活性を損なわず照射中の動きのみ抑制した。CNS 照射前後の線虫を動画撮像して画像解析し、体の各部位の蛍光強度をもとに CNS 照射が全身運動にどのような影響を及ぼすのかを解析した。実験の結果、CNS とその周辺の筋細胞への炭素イオン照射直後には、線量依存性かつ照射面積依存性な全身運動の一時的な低下が観られること、及びこの運動低下は中枢神経系への照射影響を反映していることなどが示唆された。また、中枢神経系照射後も、全身運動を担う体壁筋が頭部から尾部まで順に収縮・弛緩を繰り返す、筋活動のいわば「波」の伝搬が観られたことから、線虫の全身運動のリズム生成を担っているのは、中枢神経系ではなく全身の筋細胞ネットワークである可能性が強まった。これら一連の実験結果を学術論文にまとめて国際誌に発表する (Suzuki, et al., *Biology*, 2020) とともに、プレス発表を行った。

さらに、詳細に CNS の細胞への照射影響を調べるために、数個の細胞だけを狙って超精密なマイクロビームを照射する技術を開発し、学術論文にまとめて国際誌に発表した (Funayama, et al., *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B.*, 2020)。

(2) 仮想実験による細胞機能の推定

本研究では、線虫の運動神経と筋細胞の実接続構造に基づいて構築した、実在の細胞一つひとつと対応付けのできる神経筋モデルを用いて、コンピュータ上で細胞機能を推定することを試みた。

C. elegans は、69 個の運動ニューロンと 95 個の筋肉細胞しかないにもかかわらず、さまざまな運動パターンを生み出すことができる。最近の研究では、化学的シナプス結合の強さがボルツマン型の分布に従うことが示唆されているため、同じタイプのニューロン間の結合に係るパラメーターに同じ値を割り当てている従来の線虫神経回路モデルの構成は非現実的であることが分かってきた。そこで、本研究では、接続強度の現実的な分布を持つ運動ニューロンと筋細胞間のネットワークが前進と後退の両方の動きの振動 (リズム信号) を生成できるかどうかを調べた。具体的には、コマンドニューロン、クラス A, B, D, AS の運動ニューロン、及び化学的シナプス結合と電気的ギャップ結合の両方を考慮した筋細胞で構成されるコネクトームベースのニューラルネットワークモデル (神経回路モデル) を作成し、これを用いた情報伝達シミュレーションを試みた。まず、コマンドニューロン入力と筋細胞の活動レベルに関する教師データを用いて、時間逆伝搬法と呼ばれる教師あり学習方法によって細胞間結合の各パラメータを学習的に調整した。調整済みのパラメータを用いたシミュレーションの結果、運動ニューロンの神経回路は、前進運動と後退運動に対応する異なる位相パターンの振動 (リズム) を生成でき、コマンドニューロンの活動に応じて任意の時間ごとに切り替え可能であることが確認された。さらに、学習的に調整された化学的シナプス結合と電気的ギャップ結合の接続強度あるいは情報伝達量に相当する重み係数が実際の動物の場合と同様にボルツマン型の分布に従うことを確認した。これら一連の結果を学術論文にまとめて発表した (Sakamoto, et al., *Sci. Rep.*, 2021)。

さらに、線虫の体のダイナミクスモデルに基づく環境摩擦の推定方法を考案し、線虫の体と環境との間に生じる摩擦が全身運動の生成・制御にどのように作用するのかを解析した。その結果、線虫の全身運動時の筋活動レベルが環境摩擦に応じて変化することなどを見出し、学術論文にまとめて発表した。なお、研究協力者の山下浩生氏が『線虫研究の未来を創る会 2019』にて本研究の成果の一部を発表し、優秀ポスター発表賞を受賞した。

以上のように、本研究では、細胞を破壊することなくその機能を一時的に抑制し、機能を調べることができるマイクロビーム局部機能抑制法による実験と、実構造を考慮した数理モデルを用いた仮想実験とにより、線虫の運動リズム生成メカニズムの解明を目指した。線虫の実構造に基づくモデルを構築し、実験データをもとにモデルのパラメータを最適化する本研究のアプローチは、動物行動の表面的な模倣に止まりがちな従来のバイオミメティクスの限界を打破するものと期待できる。すなわち、個々の細胞機能とその組み合わせによる身体全体の機能創出の関係性を明らかにする試みは、生物の内部状態まで考慮した新たなバイオミメティクスが実現につながる。研究代表者らは、本研究の延長線上に構造に依存して生まれる機能や賢さを知能機械の設計や制御に活かすことを見据えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kazuma Sakamoto, Zu Soh, Michiyo Suzuki, Yuichi Iino, Toshio Tsuji	4. 巻 in press
2. 論文標題 Forward and backward locomotion patterns in <i>C. elegans</i> generated by a connectome-based model simulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Michiyo, Soh Zu, Yamashita Hiroki, Tsuji Toshio, Funayama Tomoo	4. 巻 9
2. 論文標題 Targeted Central Nervous System Irradiation of <i>Caenorhabditis elegans</i> Induces a Limited Effect on Motility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 289 ~ 289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology9090289	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tomoo Funayama, Tetsuya Sakashita, Michiyo Suzuki, Yuichiro Yokota, Nobumasa Miyawaki, Hirotsugu Kashiwagi, Takahiro Satoh, Satoshi Kurashima	4. 巻 465
2. 論文標題 An irradiation device for biological targets using focused microbeams of cyclotron-accelerated heavy ion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms	6. 最初と最後の頁 101 ~ 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nimb.2019.12.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Michiyo Suzuki, Tetsuya Sakashita, Tomoo Funayama	4. 巻 145
2. 論文標題 Immobilization of Live <i>Caenorhabditis elegans</i> Individuals Using an Ultra-thin Polydimethylsiloxane Microfluidic Chip with Water Retention	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e59008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/59008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Zu Soh, Kazuma Sakamoto, Michiyo Suzuki, Yuichi Iino, Toshio Tsuji	4. 巻 8
2. 論文標題 A computational model of internal representations of chemical gradients in environments for chemotaxis of <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35157-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 鈴木 芳代, 平塚 哉	4. 巻 145
2. 論文標題 微小生物を生きのまま長時間観察できる保水性マイクロチップの開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 放射線と産業	6. 最初と最後の頁 16-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Kazuma Sakamoto, Hiroki Yamashita, Zu Soh, Michiyo Suzuki, Toshio Tsuji
2. 発表標題 Multiple Regression Analysis to Reveal Relationships between Muscle Activities and Body Bends in a Transgenic <i>Caenorhabditis elegans</i>
3. 学会等名 The 26th International Symposium on Artificial Life and Robotics (AROB 26th 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 芳代, 舟山 知夫
2. 発表標題 線虫の中枢神経に対する炭素イオン照射の影響
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 芳代, 舟山 知夫
2. 発表標題 Dose-dependent effects of targeted irradiation to the central nervous system in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 芳代, 坂下 哲哉, 舟山 知夫
2. 発表標題 狭小空間での実験と長時間観察のための試料収容デバイスの開発と条件検討
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 線虫体壁筋のカルシウムイメージングと運動姿勢の比較と検討
2. 発表標題 山下 浩生, 曾 智, 鈴木 芳代, 辻 敏夫
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michiyo Suzuki, Tetsuya Sakashita, Tomoo Funayama
2. 発表標題 Immobilization method of live <i>Caenorhabditis elegans</i> individuals using an ultra-thin wettable-PDMS microfluidic chip
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michiyo Suzuki
2. 発表標題 A case report: Invention and commercialization of useful technologies based on industry-academia-government collaboration - In the case of a PDMS microfluidic chip (Worm Sheet)-
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zu Soh, Kazuma Sakamoto, Michiyo Suzuki, Yuichi Iino, Toshio Tsuji
2. 発表標題 Computer simulation of connectome-based neural network model of Caenorhabditis elegans to generate muscle activity patterns for locomotion
3. 学会等名 The 22nd International C. elegans Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michiyo Suzuki, Tetsuya Sakashita, Tomoo Funayama
2. 発表標題 Development of the immobilization method of live Caenorhabditis elegans individuals using an ultra-thin polydimethylsiloxane microfluidic chip with water retention
3. 学会等名 The 22nd International C. elegans Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zu Soh, Kazuma Sakamoto, Michiyo Suzuki, Yuichi Iino, Toshio Tsuji
2. 発表標題 Computer simulation of connectome-based neural network model of Caenorhabditis elegans to generate muscle activity patterns for locomotion
3. 学会等名 22nd International C. elegans Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michiyo Suzuki, Tetsuya Sakashita, Tomoo Funayama
2. 発表標題 Development of the immobilization method of live <i>Caenorhabditis elegans</i> individuals using an ultra-thin polydimethylsiloxane microfluidic chip with water retention
3. 学会等名 22nd International C. elegans Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 芳代, 坂下 哲哉, 服部 佑哉, 横田 裕一郎, 小林 泰彦, 舟山 知夫
2. 発表標題 線虫の動きを抑えてマイクロビームで狙い撃つ技術の開発 中枢神経への照射影響の解析
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 芳代, 坂下 哲哉, 舟山 知夫
2. 発表標題 線虫の運動機能に対する放射線の影響 ~線質と照射領域による比較~
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 芳代, 舟山 知夫
2. 発表標題 線虫に対する重イオンマイクロビーム中枢神経照射の影響
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 芳代
2. 発表標題 線虫収容保定用マイクロチップ「Worm Sheet」の使い方
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 生物試料用マイクロチップ、カバー、生物試料封入キットおよび方法	発明者 鈴木 芳代, 坂下 哲哉, 舟山 知夫, 平塚 哉	権利者 量子科学技術研究開発機構, Biocosm株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-521272	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 BIOLOGICAL SAMPLE MICROCHIP, COVER, BIOLOGICAL SAMPLE SEALING KIT AND METHOD	発明者 鈴木 芳代, 坂下 哲哉, 舟山 知夫, 平塚 哉	権利者 量子科学技術研究開発機構, Biocosm株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、WO/2019/225633	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 生物試料用マイクロチップ、カバー、生物試料封入キットおよび方法	発明者 平塚 哉, 鈴木 芳代, 坂下 哲哉, 舟山 知夫	権利者 Biocosm株式会社, 量子科学技術研究開発機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-045480	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計4件

産業財産権の名称 微小生物収容容器	発明者 鈴木 芳代	権利者 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構
産業財産権の種類、番号 意匠、意匠登録第1643833号(D1643833)	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 微小生物収容容器	発明者 鈴木 芳代	権利者 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構
産業財産権の種類、番号 意匠、意匠登録第1643832号(D1643832)	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 微小生物収容容器	発明者 鈴木 芳代	権利者 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構
産業財産権の種類、番号 意匠、意匠登録第1643831号(D1643831)	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 微小生物収容容器	発明者 鈴木 芳代	権利者 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構
産業財産権の種類、番号 意匠、意匠登録第1643830号(D1643830)	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

プレス発表(2020.12.07)
 量子科学技術研究開発機構 プレスリリース 生命の不思議を“ピンポイント照射”で明らかに
<https://www.qst.go.jp/site/press/46413.html>
 広島大学 【研究成果】 生命の不思議を“ピンポイント照射”で明らかに
<https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/61821>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	曾 智 (Soh Zu) (80724351)	広島大学・先進理工系科学研究科(工)・助教 (15401)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	坂本 一馬 (Sakamoto Kazuma)		
研究協力者	山下 浩生 (Yamashita Hiroki)		
連携研究者	辻 敏夫 (Tsuji Toshio) (90179995)	広島大学・先進理工系科学研究科(工)・教授 (15401)	
連携研究者	舟山 知夫 (Funayama Tomoo) (40354956)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・上席研究員(定常) (82502)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------