

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570009

研究課題名(和文)線虫脳における自発活動の動作基盤の遺伝学的解析

研究課題名(英文)Genetic analysis of mechanisms for spontaneous activities in the *C. elegans* central nervous system

研究代表者

寺本 孝行(Teramoto, Takayuki)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90571836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳の自発活動は情報処理に関与していると考えられているが、その働きはよくわかっていない。本研究では線虫 *C. elegans* の中枢神経系をモデルとして、4Dイメージングシステムを用いて全中枢神経の計測を行うことで自発活動の解析を行った。その結果、複数ニューロンが同期して周期的活動を示し、逆位相の周期性を持つグループが存在することがわかった。周波数成分の解析より、線虫の前進と後退の切り替えの周期に近い成分が含まれることが示され、行動を制御するパターンジェネレーターの一つとして機能していると思われた。さらにギャップジャンクションの変異体では、活動の頻度が低いことから電気シナプスの関与が推測された。

研究成果の概要(英文)：The central nervous system generates spontaneous activities, which are thought to contribute to information processing; however, its function is not fully understood. In this study, to reveal its nature, we performed whole-brain imaging of *C. elegans* at cellular resolution by using 4D imaging system that we have designed and developed. Analysis of temporal changes in ratio of the individual neurons revealed a synchronized rhythmic activity in multiple neurons under non-stimulus condition. By frequency analysis indicated a major component is close to rhythm of switching forward-backward locomotion, implying that the rhythm component may function as a pacemakers or pattern generators for the locomotion. On the other hand, a gap-junction coding gene *inx-7* mutation reduced spontaneous activity, implying gap-junctions may be involved in the pacemaker.

研究分野：神経科学

キーワード：カルシウムイメージング 神経 線虫

1. 研究開始当初の背景

脳は外部から刺激が無い状態でも、活発に自発活動していることが古くから知られている。近年、脳スライスを使った研究から、複数のニューロンが同期した自発活動の存在が報告され、認知や学習などの高次な情報処理に重要な役割を果たしている可能性が示されている (R.Cossart ら, Nature 2003; Y.Ikegaya ら, Science 2004)。同期自発活動には、ギャップジャンクション (GJ) による電氣的結合 (電氣シナプス) が必要であり、これまでもロックアウト動物を用いた行動学的研究や電氣生理学的研究から、同期自発活動における GJ の重要性について多くの知見が得られている (E. Dere ら, Neurosci&Biobehav.Review 2011)。しかしながら、ニューロン間の電氣的接続が、同期自発活動の動作にどのような役割を果たしているのかは、必ずしも明らかにされていない。また、動物が生きたままで、個々のニューロンのレベルで自発活動を計測するのは技術的に困難であるため、情報の入出力 (刺激入力と行動出力) と同期自発活動の関連性については、ほとんど研究例が無い。

2. 研究の目的

本研究は、線虫脳における同期自発活動をモデルとし、線虫の実験材料としてのアドバンテージと、最新イメージング技術を組み合わせることで、同期自発活動の動作基盤を明らかにし、情報の入出力と同期自発活動の関連性を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

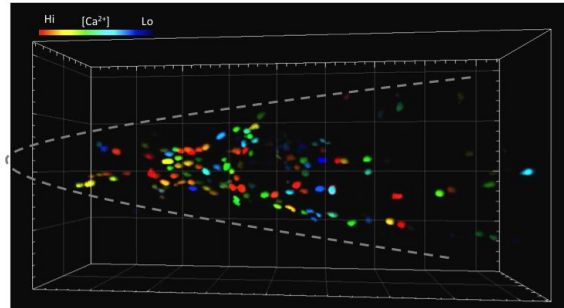
線虫の全中枢神経の活動を 4D Ca^{2+} イメージングにより詳細に解析する。また、遺伝学的手法により GJ 分子である *inx* の機能損失型変異株を用いて、自発活動を 4D Ca^{2+} イメージングによって計測・解析を行う。また、同一イメージング技術を使って、自発活動を計測しながら、感覚刺激を線虫に加えて、その影響を調べ、また、線虫の前進後退を制御する指令運動ニューロンの活動と同期自発活動と入出力信号との関連性を解析する。

4. 研究成果

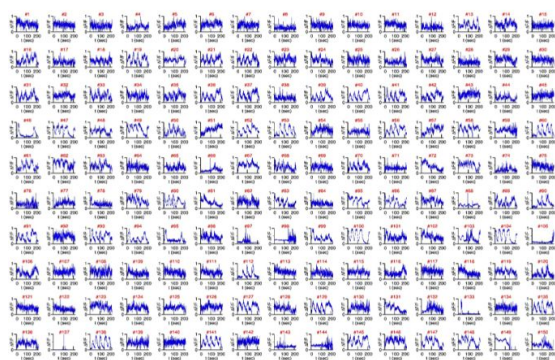
1) 自発活動を個々のニューロンレベルで可視化・計測するイメージング手法の確立

線虫頭部の全ニューロンの核にレシオメトリック Ca^{2+} インジケータ YC と mCherry を発現させた線虫株を作成し、4D イメージングシステムに各波長の蛍光画像を同時に撮像するシステムを新たに設置することで、 Ca^{2+} 計測と mCherry を使った細胞位置の詳細な特定と追跡が可能になった。また、これにより線虫に麻酔をすること無く、中枢神経系を構成する 150 個以上のニューロンの Ca^{2+} イメージングを実現することができ、これまでに比べてニューロンの自発活動を詳細に捉えることに成功した。(右上図とグラフ)

線虫の中枢神経系の 4D Ca^{2+} イメージング



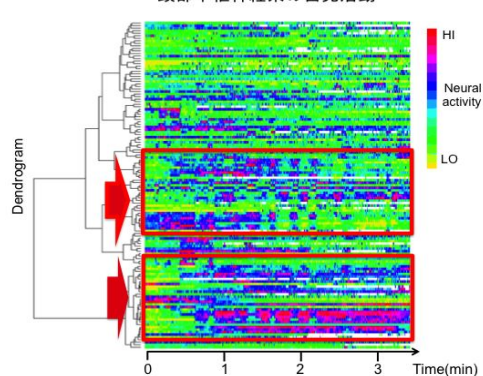
150個の頭部ニューロンの同時計測



2) 自発活動の解析

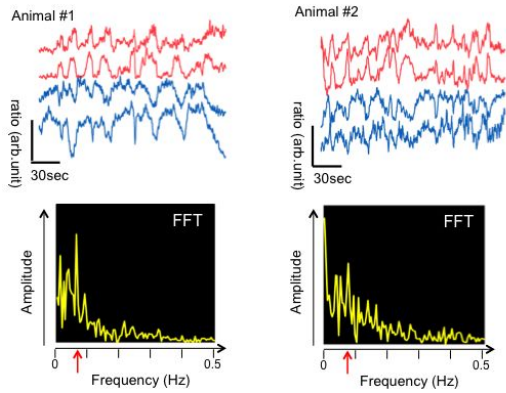
4D Ca^{2+} イメージングを用いて、多数のニューロンの活動を無刺激条件下で計測することによって、複数のニューロンが同期して周期的に活動していることが明らかとなった。また、逆位相の周期を示すニューロンのグループが存在することが明らかになった。このことは、興奮性と抑制性のニューロンが相互に活動していることが考えられた。(下図)

頭部中枢神経系の自発活動



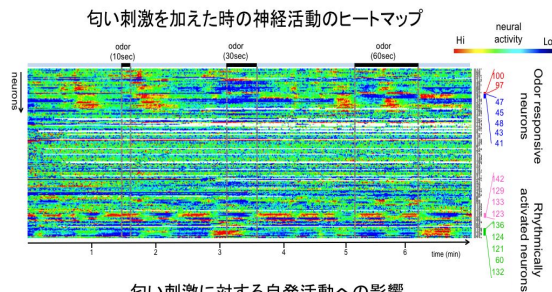
2) 同期的かつ周期的リズム

周期の成分を高速フーリエ変換により解析したところ、主な周期成分の一つは、線虫の前進-後退の切り替えの周期に近い成分であった。また、実際にイメージング中の線虫頭部の前後の動きと相関性が見られたことから、この周期成分は、線虫の前進と後退のリズムのパターン生成に参与していると考えられた。(次項左上トレース)

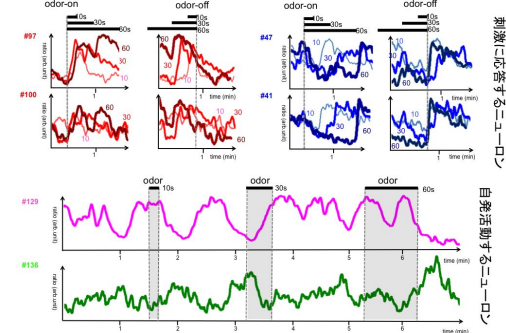


3) 自発活動に対する刺激の影響

自発活動を行っている線虫に対して匂い物質（イソアミルアルコール）を使って感覚刺激を行い、自発活動に対する感覚刺激の影響について 4D イメージングを用いて調べた。その結果、匂い感覚刺激に対して複数のニューロンが応答しているにもかかわらず、自発活動しているニューロンの周期や活動に大きな変化見られなかった。このことは、自発活動が匂いによる刺激に対して堅牢性を持ったリズムであることを示すものと思われる。

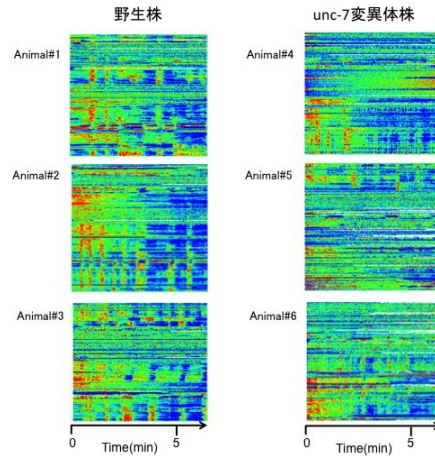


匂い刺激に対する自発活動への影響



4) *inx-7*変異体における自発活動

ギャップジャンクションの関与を調べるために、中枢神経系で発現している *inx-7* の機能喪失型変異体を用いて、無刺激条件下で 4D イメージングを行ったところ、野生型株の自発活動に比べ、同期した発火の頻度が低い傾向があることが明らかになった。また、野生株線虫のそれと異なり、明確な逆位相の周期を観察することはできなかった。このことは、線虫中枢神経における自発活動は、複数ニューロンの電気シナプスを介した信号伝達に関与していると考えられた。



以上の結果より、線虫の中枢神経系には、同期した周期的活動（自発活動）があり、ギャップジャンクションが関与していることが示唆された。主要な周期成分の一つは線虫の前後運動と相関していることから、ステレオタイプな運動パターンを生み出すパターンジェネレーターとして機能していると思われる。

本研究の期間内では、これらニューロンを同定することができなかったが、引き続き同定の手法の確立を進め、本研究で得られた知見と併せることで、神経回路図上に神経活動パターンをマッピングすることが可能と思われる。これによって、自発活動と感覚情報の関係や、中枢神経系における感覚情報の流れ、情報処理の神経メカニズムについても新たな知見が得られることが期待できる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Terumasa Tokunaga, Osamu Hirose, Shotaro Kawaguchi, Yu Toyoshima, Takayuki Teramoto, Hisaki Ikebata, Sayuri Kuge, Takeshi Ishihara, Yuichi Iino, Ryo Yoshida
Automated detection and tracking of many cells by using 4D live-cell imaging data
Bioinformatics 5;30(12):i43-i51 (2014)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Takayuki Teramoto, Yuta Yamamoto, and Takeshi Ishihara
4-D Ca^{2+} imaging of the multiple neurons that regulate the sensory integration underlying behavioral choice
C. elegans Neuroscience Meeting
2012年6月14日
ハイデルベルグ ドイツ

2. Takayuki Teramoto, Yuta Yamamoto, and Takeshi Ishihara

4-D Ca^{2+} imaging technique reveals multi-neural activities in a local circuit regulating *C. elegans* behavioral choice.
第 35 回日本分子生物学会年会 ワークショップ

2012 年 12 月 14 日

福岡交際会議場・マリンメッセ

3. Takayuki Teramoto, Yuta Yamamoto, and Takeshi Ishihara

4-D Ca^{2+} imaging of the multiple neurons in a local circuit regulating behavioral choice

19th International *C. elegans* Meeting

2013 年 6 月 28 日

ロサンゼルス アメリカ合衆国 University of California, Los Angeles

4. 寺本 孝行、石原 健

C. elegans の中枢神経系まるごとのカルシウムイメージングに向けて
包括的脳科学研究推進支援ネットワーク
平成 25 年度 夏のワークショップ

2013 年 9 月 1 日

名古屋国際会議場

5. Takayuki Teramoto and Takeshi Ishihara,
In vivo 4-D Ca^{2+} imaging of multi-neuronal activities in a local circuit for *C. elegans* decision-making

新学術領域研究 第 7 回領域会議

2014 年 6 月 7 日 九州工業大学

6. Takayuki Teramoto, Yu Toyoshima, Terumasa Tokunaga, Ryo Yoshida, Yuichi Iino and Takeshi Ishihara

4-D imaging of neuronal activities in the whole central nervous system visualizes correlative patterns between multiple neurons.

C. elegans Neuro 2014

2014 年 7 月 7 日 University of Wisconsin, Madison, WI, USA

7. 寺本孝行、徳永旭将、広瀬修、豊島有、飯野雄一、吉田亮、石原健

線虫 *C. elegans* の全中枢神経の Ca^{2+} イメージングによる刺激に対する応答と無刺激時における神経活動の計測

JST/CREST 第 3 回領域会議

2015 年 10 月 30 日

沖縄科学技術大学院大学

8. 寺本孝行、徳永旭将、広瀬修、豊島有、飯野雄一、吉田亮、石原健

線虫 *C. elegans* の全中枢神経の Ca^{2+} イメージ

ングによる刺激に対する応答と無刺激時における神経活動の計測

第 37 回日本分子生物学会年会

2015 年 11 月 26 日

横浜市 パシフィコ横浜

9. Takayuki Teramoto and Takeshi Ishihara

4-D imaging of neuronal activities in a local circuit for *C. elegans* behavioral choice

包括型脳科学研究推進支援ネットワーク
2014 年度シンポジウム

2014 年 12 月 11 日

東京医科歯科大学

10. 寺本孝行、吉田亮

線虫中枢神経系のもろごと計測および定量解析にむけた取り組み

定量生物の会 第 7 回年会

2015 年 1 月 12 日 九州大学筑紫キャンパス

11. Takayuki Teramoto, Terumasa Tokunaga, Osamu Hirose, Yu Toyoshima, Yuichi Iino, Ryo Yoshida, and Takeshi Ishihara

Whole-brain imaging of *C. elegans* reveals multi-neuronal dynamics under non-stimulus condition.

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting
Wiring the Brain

2015 年 3 月 26 日 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~bunsiide/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

寺本 孝行 (TERAMOTO, Takayuki)

九州大学・理学研究院生物・准教授

研究者番号 90571836

(2) 連携研究者

石原 健 (ISHIHARA, Takeshi)

九州大学・理学研究院生物・教授

研究者番号：10249948