

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 9 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25249020

研究課題名(和文) 光刺激ビジュアルサーボ顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of optogenetics visual servo microscope

研究代表者

橋本 浩一 (Hashimoto, Koichi)

東北大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：80228410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、とくに感覚応答行動系を中心にして脳機能を解明するために複数のニューロン活動を同時刺激し、状態に応じた外部刺激を与え、行動を計測するシステムを開発した。とくに、統合プラットフォームとして、動く観察対象を高速に自動追跡して特定の神経細胞をプロジェクションマッピングによって刺激するロボット顕微鏡「オーサカベン」を世界で初めて開発し、行動中の線虫の複数のドーパミン細胞の性質がそれぞれ異なることを解明した。さらに線虫の匂い応答行動に関して、情報を時間積分して「意思決定」をおこなうという、ヒトなどに共通する脳機能を持つ可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to analyze the brain function mainly by the sensory response behavior system, we simultaneously stimulated neuronal activities, developed an external stimulus according to the state, and developed a system to measure behavior. In particular, as the integration platform, we developed the world's first robot microscope "OSACaBeN" that automatically tracks moving observation objects at high speed to stimulate specific nerve cells by projection mapping, and the properties of multiple dopamine cells in nematodes during action are different from each other. Furthermore, regarding the smell response behavior of nematodes, we clarified the possibility of possessing brain functions common to humans and others, performing time-integrated information "decision making".

研究分野：機械制御

キーワード：ビジュアルサーボ プロジェクションマッピング オプトジェネティクス 神経科学

### 1. 研究開始当初の背景

脳の機能は、比較的解明されているセンサ系と運動系を除いて、そのほとんどがブラックボックスとして扱われている。分子遺伝学的に非常に優れた性質をもち、様々な研究にモデル生物として広く利用されている線虫 (*C. elegans*) においても、脳中枢系の神経モデルはブラックボックスである。

### 2. 研究の目的

本研究では、とくに感覚応答行動系を中心にして脳機能を解明するために、複数のニューロン活動を同時計測し、状態に応じた外部刺激を与え、行動を計測するシステムを開発する。

### 3. 研究の方法

脳機能や神経回路の機能解明のためには、生体反応を観察することは本質的であり、なかでも神経活動の計測と行動の計測は最重要である。センサ/中枢/モータニューロンがネットワークを形成し、その総合的出力が行動として表出するからである。提案者はロックオントラッキング顕微鏡を開発し、生物の行動と神経細胞活動の同時計測を可能とした。「非拘束で運動する生物の神経細胞を追跡しつつ蛍光画像を記録できる」ことが特長であり、観察倍率と観察フィールドのトレードオフを本質的に解決する。ステージ制御に透過光を利用するため、蛍光マーカが不要である、Z 軸の制御に回折現象を利用できる (オートフォーカス、Z トラッキング、Z スキャン)、神経活動変化による蛍光強度変化に影響されない、多波長の計測に影響を与えない、などのメリットがある。図1に開発したロボット顕微鏡「オーサカベン」のブロック図を示す。本研究では、主に *C. elegans* を対象として、下記の特徴を有する統合システムを開発するとともに、その系統的設計方法を確立する。

### 4. 研究成果

本研究の目的は、生物の神経細胞を高い時間分解能で蛍光計測し、光刺激をリアルタイム制御する統合ビジュアルサーボ顕微鏡とリアルタイムソフトウェアを開発することである。分子遺伝学とオプトジェネティクスの技術に基づいて  $Ca^{2+}$ 濃度を発光強度に変換する蛍光タンパク質と、光刺激を感受して細胞内外のイオン交換を制御するオプトジェネティクスタンパク質とを、生体細胞に導入する。このような生物を非拘束状態で高速ロックオントラッキングして、神経活動状況と行動とを同時に計測する。さらに、神経回路の状態に応じて回路の任意の要素を選択的に光照射する。これにより神経回路に意図的な外乱を付与したときの行動変化を調べることができる。脳中枢神経系の動作機序を解明するためにはこのような統合プラット

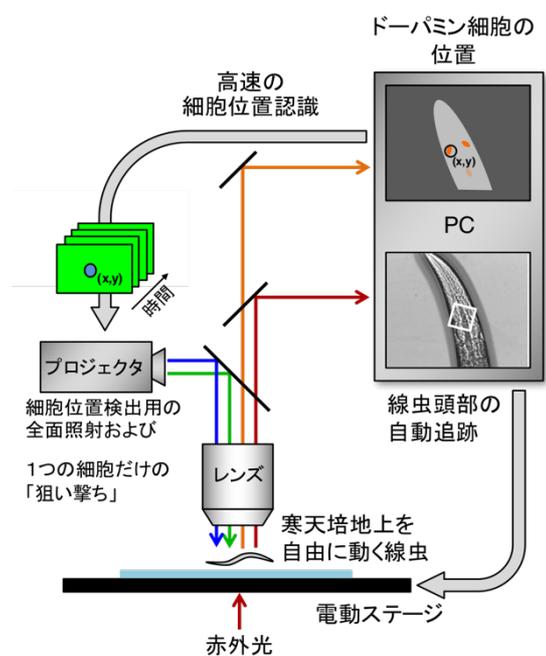


図1 ロボット顕微鏡「オーサカベン」の模式図。線虫頭部は、顕微鏡下からの赤外光で画像化される。この画像は1秒間に200回撮影され、毎回高速の画像認識が行われて、*C. elegans*頭部の同じ場所をレンズ中央に維持するように電動ステージの位置を制御しつづける。同時に、図2に示すドーパミン細胞では、位置確認のための赤色蛍光タンパク質と、光によって細胞を活性化させるタンパク質が遺伝子から読み出されている。この赤色蛍光タンパク質の位置を別のプログラムが認識し、液晶プロジェクタからその位置に対して細胞活動化のための青色光を照射する。

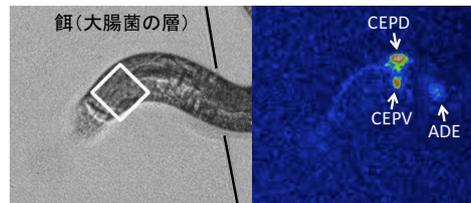
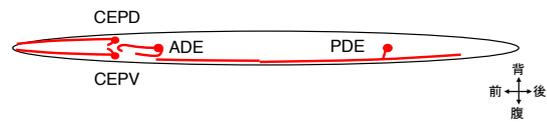


図2 線虫 *C. elegans* のドーパミン細胞の活動の様子。(図上) 全長 1mm 程度の *C. elegans* における4ヶ所のドーパミン細胞を左側から見た様子。それぞれの細胞は実際には左右1対ずつ存在するが、*C. elegans* は右か左を下にして移動するため、顕微鏡から見た時もこの図のように見える。(図下) 餌の層の中に移動した時の頭部ドーパミン細胞の活動の様子。赤いほど活動度が高く、頭部背側の CEPD 細胞が最も活動していることが分かる。

フォームの開発が必須である。

本研究では、統合プラットフォームとして、動く観察対象を高速に自動追跡して特定の神経細胞をプロジェクションマッピングによって刺激するロボット顕微鏡「オーサカベン」を世界で初めて開発し、行動中の線虫 *C. elegans* の複数のドーパミン細胞の性質がそれぞれ異なることを明らかにした (図2; Scientific Reports 2016)。この研究成果は、高等動物におけるドーパミンの働きを理解することにつながると期待できる。

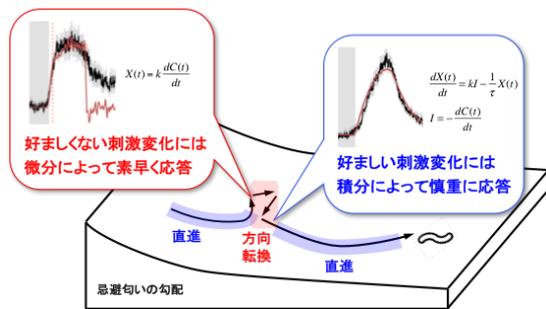


図3 匂い回避行動中の C. エレガンスの微分的・積分的な神経活動。嫌いな匂いが作る勾配を模式的に表している。嫌いな匂いの方向へ向かって移動を始めると、嫌いな匂いの濃度が上昇するという「好ましくない刺激変化」が生ずる事になる。この場合、特定の神経細胞が匂い濃度の微分によく似た神経活動を示し、C. エレガンスは連続した方向転換を素早く始める。この方向転換の際にたまたま正しい方向に進み始めると、嫌いな匂い濃度が減少するという「好ましい刺激変化」が生ずる事になる。この時、別の神経細胞が匂い濃度変化の積分によく似た神経活動を示し、この値が一定に達した時に、方向転換が抑えられ、その方向への直進に切り換わっていた。

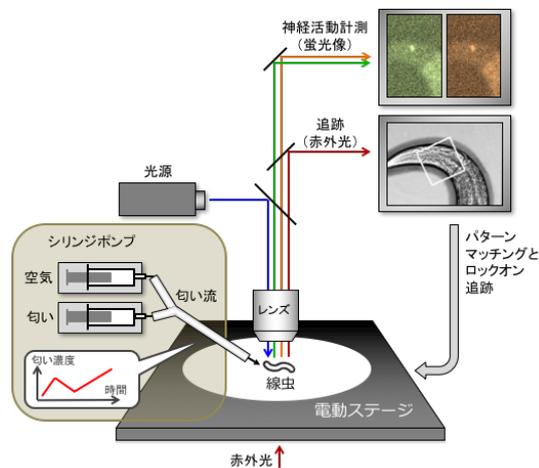


図4 ロボット顕微鏡「オーサカベン 2」の模式図。図2のロボット顕微鏡「オーサカベン」の改良版。線虫が動くアリーナ内の温度勾配を動的に制御するために、シリンジポンプのリアルタイム制御を加えた。

図3に線虫の匂い応答行動に関する神経系の模式図を示す。図4に匂い勾配を精密に制御できる「オーサカベン2」のブロック図を示す。これにより、C. エレガンスは情報を時間積分して「意思決定」を行うという、ヒトなどに共通する脳機能を持つ可能性が明らかになった。これらの成果は、2017年5月に eLife に発表される予定である。

ロボット顕微鏡「オーサカベン」は線虫以外の小型動物（ゼブラフィッシュなど）にも用いることができることから、さまざまな小型動物を用いた「脳活動と行動の関係」の解明に寄与することが期待できる。つまり、「オーサカベン」は統合プラットフォームとして今後広く利用できると考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

1. Tanimoto, Y., Yamazoe-Umemoto, A., Fujita, K., Kawazoe, Y., Miyanishi, Y., Yamazaki, S.J., FEI, X., Busch, K.E.,

Gengyo-Ando, K., Nakai, J., Iino, Y., Iwasaki, Y., Hashimoto, K., \*Kimura, K.D. Calcium dynamics regulating the timing of decision-making in *C. elegans*. **eLife**, 査読有, 2017; 6: e21629. DOI: 10.7554/eLife.21629

2. Pudith Sirigrivatanawong, Shogo Arai, Vladimiro Thoma and Koichi Hashimoto, Multiple Drosophila Tracking System with Heading Direction, **Sensors**, 査読有, Vol.17, No.1, 96, 2017. DOI: 10.3390/s17010096
3. Tanimoto, Y., Zheng, Y. G., Fei, X., Fujie, Y., Hashimoto, K., \*Kimura, K.D. *In actio* optophysiological analyses reveal functional diversification of dopaminergic neurons in the nematode *C. elegans*. **Scientific Reports**, 査読有, 6, 26297, 2016. doi: 10.1038/srep26297
4. Vladimiro Thoma, Stephan Knapek, Shogo Arai, Marion Hartl, Hiroshi Kohsaka, Pudith Sirigrivatanawong, Ayako Abe, Koichi Hashimoto and Hiromu Tanimoto, Functional dissociation in sweet taste receptor neurons between and within taste organs of *Drosophila*, **Nature Communications**, 査読有, Vol.7, 10678, 2016. doi: 10.1038/ncomms10678
5. Yamazoe-Umemoto, A., Fujita, K., Iino, Y., Iwasaki, Y., Kimura, K.D. Modulation of different behavioral components by neuropeptide and dopamine signalings in non-associative odor learning of *Caenorhabditis elegans*., **Neuroscience Research**, 査読有, 99, pp. 22-33, 2015. DOI: 10.1016/j.neures.2015.05.009
6. Yohsuke Satoh, Hirofumi Sato, Hirofumi Kunitomo, Xianfeng Fei, Koichi Hashimoto and Yuichi Iino, Regulation of experience-dependent bidirectional chemotaxis by a neural circuit switch in *Caenorhabditis elegans*., **Journal of Neuroscience**, 査読有, Vol. 34, No. 47, pp. 15631-15637, Nov. 19, 2014. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1757-14.2014
7. Kawazoe, Y., Yawo, H., Kimura, K.D. A simple optogenetic system for behavioral analysis of freely moving small animals, **Neuroscience Research**, 査読有, 75 (1), pp. 65-68, 2013. DOI: 10.1016/j.neures.2012.04.011
8. Yuki Tsukada and Koichi Hashimoto, Feedback regulation of microscopes by image processing, **Development, Growth & Differentiation**, 査読有, vol. 55, no. 4, pp. 550-562, May 2013. DOI: 10.1111/dgd.12056
9. Makoto Hiroi, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Naoki Masuda, Koichi Hashimoto, Kiichi Inoue, Andre Fiala and Tetsuya Tabata, Principal component analysis of odor coding at the level of third-order

- olfactory neurons in *Drosophila*, **Genes to Cells**, 査読有, vol.18, pp.1070-1081, 2013. DOI: 10.1111/gtc.12094
- Nishio, N., Mohri-Shiomi, A., Nishida, Y., Hiramatsu, N., Kodama-Namba, E., Kimura, K.D., Kuhara, A., Mori, I. A novel and conserved protein AHO-3 is required for thermotactic plasticity associated with feeding states in *Caenorhabditis elegans*., **Genes to Cells**, 査読有, 17 (5), pp. 365-386, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01594.x

[学会発表] (計11件)

- Shogo Arai, Pudith Sirigrivatanawong and Koichi Hashimoto, Multiple *Drosophila* tracking and posture estimation algorithm, **Informatics, Electronics & Vision (ICIEV)**, 査読有, 2015 International Conference on. pp.1-6, Fukuoka, June 15-18, 2015
- Koichi Hashimoto, Visual Servo Microscope for Optogenetic Manipulation and Neural Network Identification, **IEEE Int. Conf. on Mechatronics and Automation (ICMA)**, 招待講演, 査読無, Beijing, China, August 5, 2015 (Plenary)
- Koichi Hashimoto, Visual Servo Microscope for Estimating Brain Function, **Workshop on Advances in Robotics**, 招待講演, 査読無, Macau, December 5, 2015 (Keynote)
- Koichi Hashimoto, Visual Servo for Inspection, Parts Handling and Assembly, **IEEE Int. Conf. on Robotics and Bio-mimetics (ROBIO)**, 招待講演, 査読無, Zhuhai, China, December 9, 2015 (Plenary)
- Yuki Tsukada, Chen Min, Xianfeng Fei, Koichi Hashimoto and Ikue Mori, High-speed, high-magnification tracking system for calcium imaging of neurite during free moving, **19th International C. elegans Meeting**, 査読有, University of California, Los Angeles, U.S.A., June 29, 2013.
- Yuki Tanimoto, Kosuke Fujita, Yuya Kawazoe, Yosuke Miyanishi, Shuhei Yamazaki, Xianfeng Fei, Karl Emanuel Busch, Keiko Gengyo-Ando, Junichi Nakai, Koichi Hashimoto and Kotaro Kimura, A virtual reality running machine for worms ---a highly integrated microscope system for olfactory behavior, **19th International C. elegans Meeting**, 査読有, University of California, Los Angeles, U.S.A., June 29, 2013.
- Keiko Gengyo-Ando, Y. Kagawa-Nagamura, Masamichi Ohkura, Xianfeng Fei, Michiyo Suzuki, Koichi Hashimoto and Junichi Nakai, In vivo calcium imaging of motor circuit during spontaneous locomotion using improved G-CaMPs, **19th International C. elegans Meeting**, 査読有, University of California, Los Angeles, U.S.A., June 28, 2013.
- Akiko Yamazoe, Yuki Tanimoto, Kosuke Fujita, Yuya Kawazoe, Yosuke Miyanishi, Shuhei Yamazaki, Xianfeng Fei, Karl Emanuel Busch, Keiko Gengyo-Ando, Junichi Nakai, Yuichi Iino, Yuishi Iwasaki, Koichi Hashimoto, Kotaro Kimura, A neural mechanism for navigation along a repulsive odor gradient, **19th International C. elegans Meeting**, 査読有, University of California, Los Angeles, U.S.A., June 27, 2013.
- Pudith Sirigrivatanawong, Shogo Arai, and Koichi Hashimoto, Lake Monitoring Sensors Distribution with Low Energy Consumption, **IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics (ROBIO)**, 査読有, Shenzhen, China, December 12-14, 2013.
- Yuko Nagamura, Keiko Ando, Akane Osawa, Koichi Hashimoto, Masamichi Okura, Junichi Nakai, Real-time optogenetic control and imaging of neuromuscular activity in freely moving *Caenorhabditis elegans*., **Neuro 2013**, 査読有, P2-2-250, Kyoto, June 21, 2013.
- Koichi Hashimoto, Exploration of brain function through behavior, neural activity observation, and optogenetic manipulation, **International Symposium on OptoMechatronics Technology (ISOT)**, 招待講演, 査読無, Paris, France, October 29, 2012. (Invited)

[図書] (計1件)

- Kimura, K.D., Busch, K.E. From connectome to function: Using optogenetics to shed light on the *C. elegans* nervous system. In: Optogenetics. Appasani K. ed. Cambridge University Press, Cambridge (Book chapter; 2017), pp. 37-54
6. 研究組織
- 研究代表者  
橋本 浩一 (HASHIMOTO, KOICHI)  
東北大学大学院情報科学研究科・教授  
研究者番号:80228410
  - 研究分担者  
木村 幸太郎 (KIMURA, KOTARO)  
大阪大学大学院理学研究科・准教授  
研究者番号:20370116
  - 連携研究者  
東谷 篤志 (HIGASHITANI, ATSUSHI)  
東北大学大学院生命科学研究所・教授

研究者番号:40212162

鏡 慎吾 (KAGAMI, SHINGO)  
東北大学大学院情報科学研究科・准教授  
研究者番号:90361542

荒井 翔悟 (ARAI, SHOGO)  
東北大学大学院工学研究科・准教授  
研究者番号:80587874