

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640004

研究課題名(和文)線虫の自発的行動発現に関わる神経回路活動の可視化と解析

研究課題名(英文)Imaging analysis of neural circuit involved in voluntary behaviors in *C. elegans*

## 研究代表者

安藤 恵子 (GENGYO-ANDO, Keiko)

埼玉大学・理工学研究科・特任教授

研究者番号：40221741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：動物は外部からの感覚刺激がなくても自発的に行動するが、随意行動制御の神経機構はよくわかっていない。我々は、シンプルな脳を持つ線虫に着目し、自発行動発現の神経回路と分子メカニズムを明らかにすることを目指している。本研究では、行動に伴う神経活動を動的に可視化するため、最近新たに開発した緑色蛍光カルシウムセンサーを線虫に応用し、自発行動中の神経活動を体系的に可視化・解析する実験系を構築した。また、高感度・高速応答性の赤色蛍光センサーを新たに開発し、行動中の線虫で2色のセンサーを利用した細胞活動の同時計測や光操作技術との併用に成功した。これらの光技術は、脳科学・生命科学分野に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Most Animals can initiate and regulate voluntary behaviors in the absence of external stimuli, but the mechanism underlying decision-making is largely unknown. To elucidate the molecular and neural mechanism of these behaviors, we focused on *C. elegans*, which have a simple brain consisting of only 302 neurons and transparent body. Using our recently developed G-CaMP6-8, green genetically encoded calcium indicators (GECIs), we developed a system that allowed systematic imaging and analysis of the neural activity during spontaneous locomotion. We further designed R-CaMP2, a high-affinity, fast, red GECI, and successfully achieved dual-color imaging and optical stimulation in combination with green GECIs and channelrhodopsin 2 in freely moving *C. elegans*.

研究分野：分子生物学

キーワード：イメージング G-CaMP 線虫

## 1. 研究開始当初の背景

多くの動物は外部からの刺激がなくても自発的に行動を発現し制御するが、そのメカニズムはほとんどわかっていない。最近、ザリガニの自発的な歩行において、行動開始に先行する準備神経活動が発見され (Kagaya, Takahata: *Science*, 2011)、無脊椎動物の意思に相当する脳内活動の存在が示唆されている。しかしながら、無脊椎動物の比較的単純な脳でさえ、自発行動の神経メカニズムの詳細はよくわかっていない。これまで、我々の研究グループは、GFP を用いた蛍光  $Ca^{2+}$  センサー-G-CaMP を開発し (Nakai ら 2001; Ohkura ら 2012)、 $Ca^{2+}$  イメージングにより神経活動を測定し脳機能を解明する研究を行っている。研究代表者は、シンプルな脳を持ち全神経回路の接続パターンが明らかになっている線虫 *C. elegans* に着目し、自発行動発現の神経回路機構の解明を目指している。線虫は体が透明で、生体神経活動の光学的測定に適している。自発行動発現の脳機能を明らかにするためには、行動に伴う神経活動を動的に可視化する必要がある。しかし、行動中の動物の神経活動を、顕微鏡下で高倍率で可視化することは今まで困難であった。研究代表者らは、高速レーザーキャン顕微鏡に自動追尾装置を統合したシステム (東北大・橋本浩一教授との共同研究) を開発し、今まで困難であった自発行動中の神経回路活動を単一ニューロンレベルで高精度に長期可視化することに成功している。したがって、このシステムを用いることにより、線虫自発行動における神経回路活動の体系的な解析が可能であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、最近新たに開発した高性能 G-CaMP を線虫 *C. elegans* に応用し、自発行動中の神経活動を体系的に可視化・解析するための実験系を構築することを目的とする。また、G-CaMP との同時計測を可能にする、長波長の赤色蛍光センサーを新たに開発する。これにより、近接した複数のニューロンの多色イメージングや光駆動性機能分子を用いた光操作技術との併用が可能となり、自発行動解析の基盤技術が確立すると期待される。

## 3. 研究の方法

カルシウムセンサーを発現する遺伝子改変動物の作成：インジェクション法で改良型プローブを発現する遺伝子改変動物を作成した。紫外線照射で染色体内にトランスジーンを挿入し安定なトランスジェニック系統を確立した。

自由行動中の線虫のイメージング解析：線虫は固形培地上で主に前進しながら餌の探索行動をするが、時々自発的に後退運動を行

う。餌や匂いなどの明確な外部感覚刺激を与えない条件下で線虫を自由行動させた。上記方法で作成した遺伝子改変動物を用いて、自動追尾イメージングシステムで行動をモニターしながら 15frame/s で蛍光像と透過像を取得した。motion artifact を抑えるために、同じ細胞にカルシウムプローブと異なる波長の蛍光マーカーを発現させ、ratio  $Ca^{2+}$  imaging を行った。NIS elements AR (ニコン画像解析用ソフトウェア) で画像を取得し、光学測定データを定量的に解析した。

行動解析：線虫の行動は CCD カメラで経時的に撮影し、行動解析ソフト (WriggleTracker) で定量的解析を行なった。

## 4. 研究成果

研究実施計画に基づき、改良型 G-CaMP をさまざまな神経系特異的なプロモータ制御下に組み込み、アセチルコリン、GABA、グルタミン酸、モノアミンなどを含有する神経細胞での活動を解析するための遺伝子改変動物を作成した。自動追尾顕微鏡システムの操作性をさらに高めるため、レーザー顕微鏡の下部光学系を新たに改良した。それにより、自由行動中の線虫を広い視野で効率よく見つけながら、イメージング画像を取得することが可能になった。さらにプログラムに改良を加え、これまで以上に長時間の安定した自動追尾に成功している。上記システムを用いて、本研究で樹立した遺伝子改変動物の自由行動中の神経活動を高解像度で可視化する

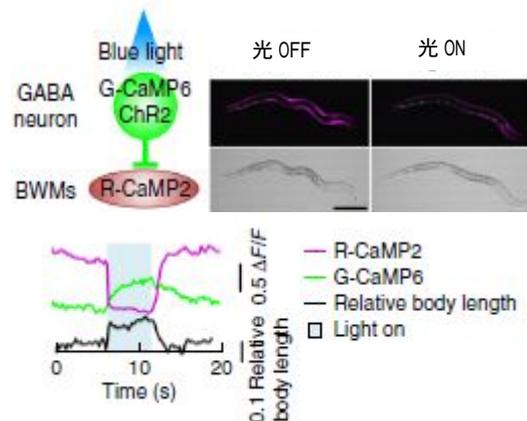


図1 線虫の筋神経系における in vivo イメージングと光操作

上段左：線虫 GABA ニューロンと体壁筋 (BWM) の模式図。上段右：カルシウムセンサーとチャンネルロドプシンを発現する線虫。光操作により G-CaMP (緑) の蛍光強度が上がり (GABA ニューロンの活性化)、R-CaMP2 (マゼンタ) の蛍光強度が下がる (BWM の弛緩)。下段：行動とイメージングの定量的解析  
Inoue ら *Nature Methods*, 2015 から改変

ことに成功し、自発的に前進モードから後退モードに行動が変化する際の、ダイナミックな神経活動変化を明らかにした。

近接した複数のニューロンの神経活動を同時にイメージングするためには、波長域の異なるカルシウムセンサーが必要である。こ

れまで、緑色センサーの開発は飛躍的に進んできたが、高性能な赤色センサーの開発は比較的遅れている。そこで、高性能な赤色蛍光プローブの開発と生体神経活動可視化への応用を試みた。R-CaMP1.07をベースに超高感度・超高速の赤色カルシウムプローブ R-CaMP2 を開発した(東大・尾藤晴彦教授らとの共同研究: Inoue ら *Nat Methods* 2015)。このプローブを生体に応用し、異なる細胞活動の同時計測と、チャンネルロドプシンとの併用が可能かどうかを検証した。GABA 作動性抑制性運動ニューロンに G-CaMP およびチャンネルロドプシンを組み込み、さらに投射先の筋細胞に R-CaMP2 を組み込んだ線虫株を

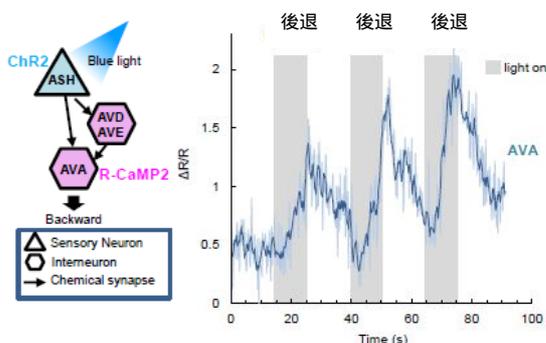


図 2 赤色蛍光センサーを用いた後退コマンドインターニューロンの ratio imaging と光操作  
左: 線虫神経回路の模式図。コマンドインターニューロン(AVA/AVD/AVE)に R-CaMP2、それらに投射する上位感覚ニューロン ASH にチャンネルロドプシンを発現させた。右: AVA のイメージング解析。光操作(グレーのバー)により AVA が活性化し、その結果、後退運動(グレーの線)が誘発された。Inoue ら *Nature Methods*, 2015 から改変

樹立し、光刺激に伴う GABA ニューロンの活動上昇と筋での活動低下の 2 色同時計測および筋弛緩による行動停止の同時記録に成功した(図 1)。また、上位ニューロンを光操作し、後退運動を誘発した際の後退コマンドニューロン活動の同時計測にも成功した(図 2)。

考察: 本研究で、線虫の自発行動に伴う神経回路活動を体系的に解析するための実験系が構築された。今後、神経活動の可視化とともに、神経活動の活性化や抑制による行動の影響を調べ、神経活動と自発行動との因果関係を明らかにすることも重要であると考えられる。本研究で開発したシステムおよびセンサーは、生体での神経活動と行動との関連を詳細に解析することを可能にするものであり、脳科学・生命科学分野で役立つものと期待される。

## 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 4 件)

Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2. Inoue M, Takeuchi A, Horigane S,

Ohkura M, Gengyo-Ando K, Fujii H, Kamiyo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H. *Nat Methods*. 2015 Jan; 12(1):64-70. doi: 10.1038/nmeth.3185.

Akiyoshi S, Nomura KH, Dejima K, Murata D, Matsuda A, Kanaki N, Takaki T, Mihara H, Nagaishi T, Furukawa S, Gengyo-Ando K, Yoshina S, Mitani S, Togayachi A, Suzuki Y, Shikanai T, Narimatsu H, Nomura K. *Glycobiology*. 2015 Jan;25(1):8-20. doi: 10.1093/glycob/cwu080. 査読有

Nakamura F, Kumeta K, Hida T, Isono T, Nakayama Y, Kuramata-Matsuoka E, Yamashita N, Uchida Y, Ogura K, Gengyo-Ando K, Mitani S, Ogino T, and Goshima Y. Amino and carboxyl terminal domains of Filamin-A interact with CRMP1 to mediate Sema3A-signaling. *Nat Commun*. 2014 Oct 31;5:5325. doi: 10.1038/ncomms6325 査読有

Sasaki A, Nakae I, Nagasawa M, Hashimoto K, Abe F, Saito K, Fukuyama M, Gengyo-Ando K, Mitani S, Katada T, Kontani K. Arl8/ARL-8 functions in apoptotic cell removal by mediating phagolysosome formation in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*. 2013 May;24(10):1584-92. doi: 10.1091/mbc.E12-08-0628. 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

井上昌俊、竹内敦也、堀金慎一郎、大倉正道、安藤恵子、藤井哉、上條諭志、竹本 木村さやか、狩野方伸、中井淳一、喜多村和郎、尾藤晴彦「Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2」第 88 回日本薬理学会年会、2015.3.18-20、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

藤泰一、高橋尚也、安藤恵子、大倉正道、中井淳一、西垣功「個体(線虫)レベルでの超多並列刺激応答モニターシステム」第 37 回日本生物学会年会 2014.11.25-27. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

坂口愛沙、佐藤美由紀、安藤恵子、佐藤克哉、中井淳一、佐藤健「低分子量 GTPase RAB-11 の新規結合因子 REI-1/REI-2 は受精後の RAB-11 再局在化を制御する」第 37 回日本生物学会年会 2014.11.25-27. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

川島・横浜市)

安藤恵子「メンブレントラフィックにおける Sec1/Munc18 ファミリーの機能と疾患」第 87 回日本生化学会、2014.10.15-18. 京都国際会議場(京都府・京都市)招待講演

中井淳一、大倉正道、安藤恵子「蛍光カルシウムプローブ G-CaMP による in vivo カルシウムイメージング」第 58 回日本薬学会関東支部大会、2014.10.4、昭和大学(東京都・品川区)

Keiko Gengyo-Ando, Yuko Kagawa-Nagamura, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai:  $Ca^{2+}$  imaging in *C. elegans*. OIST technical seminar, 2014.6.26-27. 沖縄科学技術大学院大学 OIST(沖縄県・国頭郡)招待講演

安藤恵子「in vivo カルシウムイメージングと光操作による神経回路の機能解析」分子生物学コロキウム、2013.12.7. ホテルグランヴィア岡山(岡山県・岡山市)招待講演

大澤明香音、安藤恵子、永村ゆう子、大倉正道、中井淳一「難治性てんかんの責任遺伝子 Munc18-1 変異の機能解析」第 36 回日本分子生物学会年会、2013.12.3-6、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

坂口愛沙、佐藤美由紀、安藤恵子、佐藤克哉、中井淳一、佐藤健「受精における表層顆粒分泌の制御因子 RAB-11 に結合する新規因子の解析」第 36 回日本分子生物学会年会、2013.12.3-6、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Yuko Kagawa-Nagamura, Keiko Gengyo-Ando, Masamichi Ohkura, Xianfeng Fei, Kouichi Hashimoto, Junichi Nakai: Development of a high-resolution  $Ca^{2+}$  imaging and optogenetic control system in freely moving *C. elegans*. BSI RETREAT 2013. 2013.11.21-22. 軽井沢プリンスホテル(長野県・北佐久郡)

永村ゆう子、安藤恵子、大澤明香音、橋本浩一、大倉正道、中井淳一「自由運動中の線虫の光刺激とカルシウムイメージングを可能とするシステムの開発」Neuro 2013.2013.6.20-23、国立京都国際会館(京都府・京都市)

安藤恵子、永村ゆう子、大倉正道、Xianfeng Fei、橋本浩一、中井淳一「自

由運動中の線虫の高解像度カルシウムイメージングシステムの開発」第 46 回日本発生物学会大会 2013.5.28-31、くにびきメッセ(島根県・松江市)

安藤恵子「光技術による線虫出力系回路の機能解析と運動機構の解明」井川洋二先生追悼シンポジウム、2013.5.11-12、理研・森脇和郎ホール(茨城県・筑波市)

Keiko Gengyo-Ando, Yuko Kagawa-Nagamura, Masamichi Ohkura, Xianfeng Fei, Michiyo Suzuki, Kouichi Hashimoto, Junichi Nakai. In vivo calcium imaging of motor circuit during spontaneous locomotion using improved G-CaMPs. The 19<sup>th</sup> international *C. elegans* meeting 2013, June 26-30, Los Angeles (USA)

Akiko Yamazoe, Yuki Tanimoto, Kosuke Fujita, Yuya Kawazoe, Yosuke Miyaniishi, Shuhei Yamazaki, Xianfeng Fei, Karl Emanuel Busch, Keiko Gengyo-Ando, Junichi Nakai, Yuichi Iino, Yuishi Iwasaki, Koichi Hashimoto, Kotaro Kimura: A neuronal mechanism for navigation along a repulsive odor gradient. The 19<sup>th</sup> international *C. elegans* meeting 2013 June 26-30, Los Angeles (USA)

Hyeon-Cheol Lee, Takuya Kubo, Nozomu Kono, Eriko Kage-Nakadai, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Takao Inoue, Hiroyuki Arai: Depletion of *mboa-7*, an enzyme that incorporates polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol (PI), impairs PI 3-phosphate signaling. The 19<sup>th</sup> international *C. elegans* meeting 2013, June 26-30, Los Angeles (USA)

Yuki Tanimoto, Kosuke Fujita, Yuya Kawazoe, Yosuke Miyaniishi, Shuhei Yamazaki, Xianfeng Fei, Karl Emanuel Busch, Keiko Gengyo-Ando, Junichi Nakai, Koichi Hashimoto, Kotaro Kimura. A virtual reality running machine for worms-a highly integrated microscope system for olfactory behavior. The 19<sup>th</sup> international *C. elegans* meeting 2013, June 26-30, Los Angeles (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
埼玉大学脳末梢科学研究センター  
<http://subs1.saitama-u.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

安藤恵子 (GENGYO-ANDO, Keiko)  
埼玉大学・理工学研究科・特任教授  
研究者番号：40221741

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

中井淳一 (NAKAI, Junichi)  
埼玉大学・理工学研究科・教授  
研究者番号：80237198

大倉正道 (OHKURA, Masamichi)  
埼玉大学・理工学研究科・准教授  
研究者番号：70369172

橋本浩一 (HASHIMOTO, Kouichi)  
東北大学・情報科学研究科・教授  
研究者番号：80228410