

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560459

研究課題名(和文) 高速トラッキング顕微鏡を用いた神経微小領域の活動計測

研究課題名(英文) monitoring activity of neuronal micro domain using high speed tracking system

研究代表者

塚田 祐基 (Tsukada, Yuki)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：80580000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：顕微鏡観察下で自由に行動する微小生物を自動追尾するトラッキングシステムを開発し、温度勾配上を自由に行動する線虫を高倍率の対物レンズ下で追尾することに成功した。特定の神経細胞に蛍光カルシウムプローブを発現させ、このシステムで測定することで、自由行動下での非侵襲神経活動計測を実現した。さらにこのトラッキングシステムから得られる動画データを解析するため、画像解析プログラムを開発した。これら開発したツールを用い神経活動計測と温度勾配を探索しているときの行動要素を比較することで、介在神経細胞の活動が探索行動にどのように関わっているかを定量した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a tracking system that automatically tracks microorganisms navigating freely on a small dish. The system succeeded in tracking nematodes acting freely on the temperature gradient under a high magnification objective lens. Fluorescence calcium probes were expressed in specific neurons and neural activity was measured with this system in noninvasive manner under a freely behaving condition. To analyze the time-lapse imaging data obtained from this tracking system, an image analysis program was developed. Using these tools, we analyzed behavioral factors and neural activities related to thermotaxis behavior. Our research helps to understand how activity of interneurons contributes to regulate behavior during exploratory navigation.

研究分野：神経科学

キーワード：顕微鏡制御 C. elegans カルシウムイメージング 画像処理

### 1. 研究開始当初の背景

蛍光タンパク質を利用したカルシウムイメージング技術は、神経細胞の活動や、発生における分子シグナルなどを非侵襲的に計測する手段として、様々な研究の枠組みにおいて利用されている。しかしながら、これまで主に観察されている現象は固定した試料、もしくは顕微鏡視野範囲内に動きが限定される試料におけるものであり、動いている対象、特に個体レベルの大きなものが自由に動く状態でのライブイメージングは難しかった。神経系のような、個体が動いている状態での機能解明が重要である対象において、動いている個体での機能的イメージング技術は重要である。研究代表者は、これまで線虫 *C. elegans* が自由に動く状態で感覚神経細胞を蛍光カルシウムイメージングする技術確立した(Tsukada and Mori, *Springer* 2013)。さらに高速トラッキングシステムを利用することで神経突起など局所領域での蛍光イメージングにも成功した。モデル生物である線虫は神経細胞が全て同定されており、電子顕微鏡レベルで神経接続も全て明らかにされているため、神経回路機能の解明を目指したイメージング技術を効果的に適用する観察対象として、理想的な系である(White *et al. Phil. Trans. Royal Soc. B* 1986)。行動と神経活動を調べるためのモデルとして、温度走性行動と呼ばれる、温度に対する記憶を含んだ行動は理想的な実験系を提供し、すでにその神経回路も同定されている(Mori and Ohshima, *Nature* 1995)。このシンプルな実験系に高速トラッキングシステムを利用することで、行動中の介在神経細胞の活動計測が可能となり、感覚神経からの入力が集約されることが分かっている介在神経細胞の機能解明に迫ることが期待できる。

### 2. 研究の目的

介在神経細胞は神経回路の情報処理において重要な役割を担っていると考えられており、線虫において AIY と呼ばれる介在神経細胞は探索行動において重要であることが示唆されている(Kocabas *et al. Nature* 2012)。AIY は自然な状況では神経突起の細い部分でのみ顕著なカルシウムシグナルが見られるため、細胞体でカルシウムシグナルが測定できる感覚神経や運動神経と違い、これまで有効な計測方法がなく、行動中にどのような活動をしているかは明らかにされていなかった。この問題に対し、申請者がこれまで開発してきた高速トラッキング技術を利用して、AIY 神経細胞の神経突起を捕捉し神経活動を計測することで、自由に行動している状況で介在神経細胞がどのような情報処理を行なっているか明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

これまでに開発した高速トラッキングシステムをカルシウムイメージングに応用し、行動中個体の神経細胞微小領域でのカルシウムシグナルを計測する。環境からの刺激としては温度勾配を用い、温度勾配上を自由行動する線虫に対し、行動と神経活動を同時に観測する。その際に、感度が高く、レシオメトリックなカルシウムプローブである GEM-GECO を AIY 介在神経細胞だけに発現させた線虫を用い、動きによるアーチファクトを回避する。蛍光画像の解析には専用の解析プログラムを作成し、顕微鏡視野内を動き回る神経細胞の輝度値変化をコンピューターで検出する。さらに専用の照明系を導入することでオプトジェネティクスを用いた神経活動制御をトラッキングと同時にを行い、行動の変化と局所領域の活動変化の相関を調べる。

### 4. 研究成果

[主な成果] 顕微鏡観察下で自由に行動する微小生物を自動追尾するトラッキングシステムを開発し、温度勾配上を自由に行動する線虫を高倍率の対物レンズ下で追尾することに成功した。特定の神経細胞に蛍光カルシウムプローブを発現させ、このシステムで測定することで、自由行動下での非侵襲神経活動計測を実現した。さらにこのトラッキングシステムから得られる動画データを解析するため、画像解析プログラムを開発した。これら開発したツールを用い神経活動計測と温度勾配を探索しているときの行動要素を比較することで、介在神経細胞の活動が探索行動にどのように関わっているかを定量した。

[国内外における位置づけとインパクト] 行動中の個体から神経活動を計測する研究は国内外でここ数年活発に進められており、様々な方法が提案される中、本研究で提案する高倍率の計測は他のシステムでは実現されておらず、非常に高い技術力を示すことができた。また具体的な応用先である介在神経細胞の活動意義についても神経科学として重要な現象をつかみつつある。神経科学として未解決問題である神経活動による行動制御の原理解明に対して、新規の方法を開発したことで解決の糸口を提供し、これまで計測できなかった対象についてのデータを解析することで神経科学研究の分野として重要な知見が得られている。

[今後の展望] 本研究では汎用性の高い神経活動計測の方法を開発したことで、自由行動している多細胞生物の行動制御機構を詳細に調べることができる実験系を提供する。これらの方法を用いることで神経回路における情報処理の様式をこれまでないレベルで詳細に調べることが可能になり、またダイナミックな機能についても迫ることができるようになると期待される。開発したツール

を効果的に利用することでさらに神経科学としての重要な発見に貢献することが期待される。

[具体的な成果] 自由行動している線虫の神経細胞微小領域からカルシウムシグナルを計測するため、これまでに開発した高速トラッキングシステムを使い、遺伝的にコードされた蛍光カルシウムプローブである **GEM-GECO** を AIY 介在神経細胞に発現させた線虫から蛍光画像を取得する実験系を確立した。さらにその画像を解析するためのプログラムを開発し、視野内を動く神経細胞から神経突起部分を抽出することで、その蛍光輝度値の時系列を抽出した。このプログラムは蛍光画像から細胞体の中心を基準にして、特定の距離に応じて神経突起領域を特定し、神経突起に沿った蛍光輝度値を抽出するもので、時系列画像を処理することで神経突起上の蛍光輝度値変化を解析することができる。この解析プログラムは本研究でも重要な位置を占め、プログラムが作成できたことにより、自由行動中の微小領域からの時系列シグナルを抽出できるようになり、行動実験で重要となる蛍光輝度値の変化を詳細に計測することが可能となった。時系列画像から任意の場所を手動で抽出することは非常に労力が必要であったが、プログラムにより自動抽出することで時間、労力、客観性が大幅に改善された。

またトラッキングシステムの画像取得におけるオートフォーカスのプログラムを改善することで、安定した蛍光輝度値の計測ができるようになった。神経突起は生体内で 3 次元的に複雑な形状をしているため、オートフォーカスや顕微鏡制御プログラムの改善は実験のスループットや精度、客観性を高めるために重要であり、これらの成果により、今後複合的な実験を行うための基盤が整った。

これら開発したシステムを利用することで行動中の細胞局所的な神経活動の計測を実施した。遺伝的にコードされた蛍光カルシウムプローブである GEM-GECO を用いた高速トラッキングを実施し、行動中の AIY 介在神経細胞の活動計測と、そのときの行動変化を解析した。計測を実施する過程で、GEM-GECO の励起に必要な短波長の光が行動に影響する可能性も確認されたため、GEM-GECO に加えて、新しく開発された、遺伝的にコードされたカルシウムプローブである YCX を導入し、AIY 神経細胞でのみ YCX タンパクを発現するシステムの作成を行い、その系統を使ったカルシウムイメージングも実施した。

YCX は以前からある *cameleon* と同様に蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用したプローブであるが、*cameleon* よりもシグナルノイズ強度比が高く、GEM-GECO と比べて長波長の励起光を用いるため、生体への毒性が少ない。また、GEM-GECO と同じくレシオメトリックな

測定系であるため、計測対象の動きによるアーチファクトやシグナルの減衰が少ない。これを用いて、自然な状態で行動と神経活動の計測を行い、AIY 介在神経細胞の活動がどのように行動に関わっているか、検証を進めた。さらに高速に ON/OFF 制御が可能な Lumencore 照明について、プログラムによって制御する環境を整え、様々な強度、時間幅で光刺激を与えることを可能にした。

また発展的な実験として、温度勾配上を自由に行動する線虫を高倍率の対物レンズ下で追尾し、AFD 神経細胞と AIY 神経細胞に対する同時カルシウムイメージングも実現した。AFD 神経細胞と AIY 神経細胞は非常に近接しており、軸索と樹上突起が神経環と呼ばれる構造上で接続しているが、AFD 神経細胞に核局在シグナルを含んだカルシウムプローブを発現させることで AFD、AIY それぞれの蛍光シグナルが干渉しない状況を作り、それぞれの蛍光シグナルを同時に計測することに成功した。核における AFD のカルシウムシグナルは細胞体とほぼ同じタイミングでシグナルが変化することを確かめ、自由行動下での計測も実現した。さらにこのトラッキングシステムから得られる動画データを解析するため、画像解析プログラムの開発も行った。自由行動下では画像内での神経細胞の位置、形状が変化するため、まず輝度値に従って自動的に神経細胞領域を抽出し、さらに抽出した領域における神経突起の特徴点を抽出するプログラムを開発した。この抽出した神経突起中の特徴点は時間ごとに変形する神経突起の位置合わせに使い、自由行動中に変化する神経突起であっても対応する位置関係を保つ補正を行った。最終的に、神経細胞体を中心とする極座標空間に蛍光シグナルを投射し、抽出した特徴点を基準に位置合わせを行うことで、自由に行動する線虫に対しての時系列解析を可能にした。

感覚神経細胞と介在神経細胞の情報処理についての実験を進めるため、AFD 神経細胞にヒスタミン依存性 C1 チャンネル HisC11 を発現させた系統を作成し、神経活動を制御することによって AFD 神経細胞と AIY 神経細胞間における情報伝達の様式を定量した。さらに AIY の神経活動計測と、温度勾配を探索しているときの行動要素を比較することで、介在神経細胞の活動が探索行動にどのように関わっているかを定量した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Yuki Tsukada, Masataka Yamao, Honda Naoki, Tomoyasu Shimowada, Noriyuki Ohnishi, XAtsushi Kuhara, Shin Ishii, and Ikue Mori “Reconstruction of spatial thermal gradient encoded in thermosensory neuron AFD in *Caenorhabditis elegans*” *Journal of neuroscience* 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

1. Linghuan Xu, Yuki Tsukada, Muneki Ikeda, Shunji Nakano, Ikue Mori “Identification of RIA interneuron-mediated behavioral components essential for thermotaxis” CeNeuro2016 C. elegans Topic Meeting: NEURONAL DEVELOPMENT, SYNAPTIC FUNCTION & BEHAVIOR 27-30 July 2016 Toyota auditorium Nagoya, Aichi

2. Amame Kano, Amame Kano, Yuki Tsukada, Ikue Mori “Integration of thermal and chemical information in C. elegans” CeNeuro2016 C. elegans Topic Meeting: NEURONAL DEVELOPMENT, SYNAPTIC FUNCTION & BEHAVIOR 27-30 July 2016 Toyota auditorium Nagoya, Aichi

3. Hironori J. Matsuyama, Yuki Tsukada, Satomi Tsukamoto, Masataka Yamao, Honda Naoki, Shin Ishii, and Ikue Mori “Switching among exploitation and exploration behavioral modes in the nematode C. elegans” CeNeuro2016 C. elegans Topic Meeting: NEURONAL DEVELOPMENT, SYNAPTIC FUNCTION & BEHAVIOR 27-30 July 2016 Toyota auditorium Nagoya, Aichi

4. Yuki Tsukada, Ikue Mori “Toward functional connectomics at synaptic level” CeNeuro2016 C. elegans Topic Meeting: NEURONAL DEVELOPMENT, SYNAPTIC FUNCTION & BEHAVIOR 27-30 July 2016 Toyota auditorium Nagoya, Aichi

5. 塚田 祐基 “動画像からの行動解析－線虫を例に－” 昆虫デザイン研究会 家畜化過程の理解とポスト家畜化 2016年07月07日 (招待講演) 岡崎コンファレンスセンター 愛知県岡崎市

6. Yuki Tsukada “Quantification and reconstruction of thermosensory neuronal processing in C. elegans” NIG International Symposium 2016 Force, Information and Dynamics: X factors shaping living systems Jan 10 2016 (招待講演) 東京大学生産技術研究所 東京都渋谷区

7. Yuki TSUKADA, Naoki Honda, Masataka Yamao, Shin Ishii, Ikue MORI “Neural encoding of thermotaxis behavior in C. elegans” 神経科学会 Neuro2015 神戸国

8. Yuki TSUKADA, Xianfeng FEI, Chen MIN, Koichi HASHIMOTO, Ikue MORI “High-speed, high-magnification tracking system for monitoring interneuronal activity of freely moving C. elegans” 神経科学会 Neuro2014 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市 11<sup>th</sup> Sep 2014

9. 塚田 祐基 “画像解析と顕微鏡制御を駆使した動く対象へのイメージングとオプトジェネティクス” (招待講演) 第六回光塾 2014年9月6日 未来ICT研究所(兵庫県)

[図書] (計 2 件)

1. 三浦 耕太, 塚田 祐基, (編著) 学研メディカル秀潤社「ImageJではじめる生物画像解析」 2016年 296ページ

2. Tsukada, Y., Mori, I. Springer “Optogenetics in Caenorhabditis elegans” in Optogenetics-Light Sensing Proteins and Their Applications 2015 213-226

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://elegans.bio.nagoya-u.ac.jp/~tsukada/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚田 祐基 (TSUKADA, Yuki)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 80580000

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

森 郁恵 (MORI, Ikue)

中野 俊詩 (NAKANO, Shunji)

橋本 浩一 (HASHIMOTO, Koichi)