

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24800014

研究課題名(和文)線虫の塩走性行動を制御する神経ネットワークのシステム生物学的解析

研究課題名(英文) Systems biology analysis of neuronal network that controls salt chemotaxis of *C. elegans*

研究代表者

豊島 有 (Toyoshima, Yu)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10632341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：線虫の塩走性行動においては、感覚神経が検出する塩濃度の時間変化から、進行方向およびそれに垂直な方向への塩濃度の勾配を区別して、質的に異なるふたつの走性機構を使い分けていると考えられる。神経活動を正確かつ定量的に測定できる実験系を確立したところ、感覚神経においては濃度勾配の方向の情報が区別されていないことが示唆された。また数理モデルの解析から、濃度勾配の情報を明確に分離できなくなると塩走性行動に異常が生じることがわかった。これらの結果から、感覚神経より下流の神経ネットワークにおいて、濃度勾配の方向の情報が分離されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The nematode *C. elegans* shows salt chemotaxis. The animals sense gradient of salt concentration through temporal responses of sensory neurons, and they use two different behavioral mechanisms for the gradient in normal and tangential directions. Our improved quantitative imaging systems revealed that the temporal responses of sensory neurons contain information of gradient in both directions. Analyzing mathematical model showed that the extraction of information of gradient in normal direction is required to the one of the two behavioral mechanisms. These results suggest that downstream neurons or neuronal network will extract the information of gradient direction.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：神経情報処理 システム生物学 ライブイメージング モデル化とシミュレーション 線虫

1. 研究開始当初の背景

神経ネットワークは外界の情報を検知して処理し、行動を引き起こすが、この情報処理のしくみは不明な点も多い。線虫 *C.エレガンス* の神経ネットワークは 302 個の神経細胞から構成されており、細胞間の全ての配線が明らかになっていることや、神経活動や行動の測定が容易であることなど、神経ネットワークの情報処理のしくみを明らかにする上で利点が多い。

線虫は平面上を蛇行走行しながら塩濃度を感じ、特定の塩濃度に誘引されるという、塩走性行動を示す。その際、進行方向およびそれに垂直な方向への塩濃度の勾配を同一神経細胞の活動の時間変化により検出しているにも関わらず、各々の方向の濃度情報を区別して質的に異なるふたつの走性機構を使い分けていることがわかってきた。神経ネットワークにより濃度勾配の空間情報が分別されていると考えられるが、その情報処理のしくみは不明であった。

2. 研究の目的

線虫の塩走性には質的に異なるふたつの走性機構が関与していることが知られている。例えば高塩濃度へ向かう線虫では、進行方向の塩濃度が減少傾向にあると感じると、急激な後退を起こす神経に情報が伝わり、高塩濃度の方向へ一気に進行方向を変える(ピルエット)。一方、進行方向に垂直な方向の濃度勾配を感じると、首振りを制御する神経に情報が伝わり、首振りの角度を変えて徐々に高塩濃度の方向へ進行方向を変える(風見鶏)。線虫の塩濃度感知機構は頭部に 1 か所しかないため、線虫は周辺の濃度勾配をそのまま感知することはできず、蛇行走行中の塩濃度の時間変化として感知すると考えられている。線虫は介在神経での情報処理により濃度勾配の方向の情報を抽出し、質的に異なるふたつの走性機構を使い分けていると考えられるが、入力的时间パターンから二種の情報を分離・抽出する情報処理のしくみは不明であった。

一方代表者はこれまで、細胞内シグナル伝達の分野において、生物学的実験と微分方程式モデルを組み合わせた解析により、シグナル分子の活性化の時間パターンに刺激の情報をコードする「時間情報コード」の概念を実証してきた。この概念を線虫の塩走性行動に適用すると、進行方向と垂直方向の塩濃度勾配の情報は感覚神経への入力的时间パターンの違いとして多重にコードされ、介在神経のネットワークなどのもつフィルタ特性の違いによって分離・抽出されると考えられる。そこで、線虫の神経細胞ネットワークが実際にこのような動作原理に従って情報を処理しているかどうか確かめることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、線虫の塩走性行動を制御する情報抽出機構の動作原理を解明することを目的として、多重情報コードの作業仮説のもとでシステム生物学的解析を行う。まず特定の周波数に応答する介在神経といった重要な構成要素を同定するために、様々な時間パターンで線虫に刺激を与えた際の神経細胞の応答データをカルシウムイメージングにより取得する(1)。このデータを利用して、実験結果をよく再現できる数理モデルを得る(2)。さらに作成したモデルやその動的特性を解析して、作業仮説で想定された周波数フィルタ特性が神経ネットワークのどの部分に存在するかを明らかにする(3)。

(1) カルシウムイメージングによる神経細胞の活動測定

特定の神経細胞のみに遺伝子発現を誘導するプロモーターを用いて、塩濃度を感じる感覚神経 ASE やその下流の介在神経に Ca^{2+} 感受性蛍光プローブを発現させた各種線虫株を作成する。これらの線虫を微小流路中に固定して灌流液の塩濃度を徐々にまたは周期的に変化させることで、進行方向や垂直方向の濃度勾配を模倣した刺激を与える。また塩濃度の勾配内で運動している線虫を高速に追跡することもできる。これらの状況下でカルシウムイメージングを行って神経活動の時系列データを取得する。

特定の神経細胞特異的に蛍光プローブを発現させることが困難な場合は、多数の神経細胞の同時計測が可能な、高速共焦点顕微鏡を用いた 4D イメージング観察技術の利用も検討する。

(2) 実験データに基づいた数理モデルの作成

単一神経細胞の神経活動や、複数の神経細胞間の関係性を微分方程式で表現した数理モデルを作成する。作成した数理モデルが、(1)で得られた神経活動のタイムコースを再現できるよう、遺伝的プログラミング法などにより微分方程式のパラメータを推定しつつ、モデルの構造を改良する。

(3) 数理モデルの解析と動的特性の検証

作成した数理モデルを解析することで、神経細胞ネットワークの動的特性を明らかにする。具体的には、代表者がシグナル伝達の解析で用いた周波数応答解析の手法などを数理モデルの時間パターンに適用し、神経細胞ネットワークのどの部分にローパスフィルタやバンドパスフィルタといった特性が現れるか、複数ある場合にはどのフィルタが最も重要かなどを明らかにする。

4. 研究成果

(1) カルシウムイメージングによる神経細胞の活動測定

H24 年度は、微小流路デバイスを用いて、

塩濃度が繰返し変化する刺激を線虫に与え、神経細胞の応答を正確に測定できる実験系を確立した。この際、以下のような問題をクリアすることで、神経細胞の活動測定の定量性・正確性を大幅に向上させることができた。

10分という比較的短時間かつ静的な撮影条件にもかかわらず、撮影中に経時的な焦点ズレが生じ、正しく測定ができないという問題が生じた。そこで、Ca²⁺感受性蛍光プローブの比較対象として別の蛍光分子を同じ細胞へ発現させて同時に撮影し、画像処理の際に同じ領域を定量して補正することで、この問題を解決した。

Ca²⁺感受性蛍光プローブの応答速度が個体間で異なるという問題があることがわかった。振動的な刺激を与えた際の応答の振幅は、対象の神経細胞系の内在的特性だけでなく、蛍光プローブの応答速度にも影響を受ける。蛍光プローブの応答速度は個体間で最大10倍程度異なっていたため、振動的な刺激を与えた際の応答の振幅を個体間で直接比較できない場合があることがわかった。そこで、蛍光プローブの応答速度を個体ごとに予め測定し、参照用データと同程度の応答速度を示した個体について、振動的な刺激を与えて応答を測定することで、この問題に対応した。

この系を用いて感覚神経の応答を測定したところ、感覚神経は塩濃度変化の周期が長いほど応答が強くなることや、蛇行の周期と一致するような振動刺激にも応答することが明らかになった。この結果は、進行方向および垂直方向の濃度勾配の情報は感覚神経の段階では区別されておらず多重化されていることを示唆していた。

線虫の神経ではCa²⁺レベルの緩やかな変化によって信号を伝えているが、H25年度に改良型の微小流路デバイスを導入したところ、感覚神経のCa²⁺レベルの下限は既存のプローブの検出下限を下回っており、緩やかなCa²⁺レベルの変化を正しく測定できていないことがわかった。そこで、親和性が改良された新規Ca²⁺感受性プローブや、近年開発が進んでいる膜電位感受性蛍光プローブの導入を進めた。

また、ある神経細胞についてはプローブの特異的な発現を誘導することが困難だと判明したので、4Dイメージング観察技術の利用を検討し、この神経細胞を測定できるよう、4Dイメージング技術により得られた画像データを解析するためのプログラムの作成を進めた(発表論文、研究室との共同研究を含む)。

(2) 実験データに基づいた数理モデルの作成

塩濃度感覚神経の数理モデルについて、先行研究を元にMatlab上の微分方程式モデルとして実装し、(1)で得られた実験データを再現できるよう、遺伝的プログラミング法を

利用してパラメータ推定を行った。その結果、既存の反応経路だけでは、実験結果に現れる一過性の応答を再現できない可能性が示唆された。別の感覚神経の数理モデルでは一過性応答が再現できたとの既報がある。そこで、一過性応答などモデルの動的特徴が、モデルのどの経路に依存しているかを解析する枠組みを実装した。この枠組みを既報のモデルに適用し、得られた経路を塩濃度感覚神経の数理モデルに追加して、一過性応答を再現できるよう改良した。

(3) 数理モデルの解析と動的特性の検証

風見鶏機構を再現する数理モデルが先行研究で示されているので、この数理モデルをCUDA環境上に実装・改変し、動的特性を解析した。遺伝的プログラミング法を用いて、風見鶏機構の性能が高いパラメータを探索した結果、神経細胞ネットワークの一部において、特定の周期の信号だけをよく通すようなバンドパスフィルタ特性を持ち、垂直方向の濃度勾配の情報だけが抽出されるようなモデルが選ばれることがわかった。またこのバンドパス特性が発揮できないよう改変したモデルでは風見鶏機構が正しく働かなくなることが明らかになった。これらの結果から、風見鶏機構にとってバンドパス特性のような情報抽出機構が必要不可欠であることが示唆された。

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)

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*, 査読有、2014 (in press)

[学会発表](計4件)

徳永旭将ら、「逐次的カーネル密度推定法を用いた神経細胞カルシウムイオン分布の定量化」、2013年度統計関連学会連合大会、大阪、日本、2013/9/8-11

広瀬修ら、「3次元動画内の非常に多数の細胞領域を自動追跡するための粒子フィルタ手法の開発」、人工知能学会全国大会2014 (JSAI2014)、愛媛、日本、2014/5/12-15

Terumasa Tokunaga, et al., "Automated detection and tracking of many cells by using 4D live-cell imaging data", 22nd Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular

Biology, Boston, USA, 2014/7/11-15

〔その他〕

ホームページ等

http://molecular-ethology.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/IINO_lab_J.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊島 有 (Toyoshima Yu)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：10632341

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし