

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22115002

研究課題名(和文)時空間パターンを生み出すメゾ回路の作動原理の解明

研究課題名(英文)Understanding the operating principles of the meso-circuitry that generates spatio-temporal patterns

研究代表者

能瀬 聡直 (NOSE, AKINAO)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：30260037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 119,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経活動の時空間パターンが生成される仕組みを明らかにすることは脳科学における最重要課題のひとつである。本研究では、ショウジョウバエ幼虫の中枢神経回路をモデル系としてこの問題に取り組み以下の成果をあげた。1) 運動回路の摂動応答測定により、運動神経細胞の局所的な活動が電気シナプスを介して運動頻度の制御に關与することを示した。2) カルシウムイメージング、光遺伝学、シナプス間隙GFP再構成法、コネクトミクスなどを用いた解析により、幼虫の運動の速度や方向転換を制御する介在神経細胞の機能を示した。3) 4Dカルシウムイメージングのデータから細胞集団の活動を自動取得し、統計解析する手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：How spatio-temporal patterns of neural activity are generated by the central circuits is a fundamental question in neuroscience. In this study, we used larval *Drosophila* as a model and obtained the following results. 1) We showed that local activity of motor neurons regulates, via gap junctions, the frequency of larval locomotion. 2) We identified interneurons that regulate the speed of locomotion and turning behavior. 3) We developed statistical methods that allow automated acquisition of the activity of a neural population from 4D calcium imaging data.

研究分野：神経科学

キーワード：メゾ神経回路 オプトジェネティクス ショウジョウバエ 運動回路 カルシウムイメージング 電気シナプス 統計解析 コネクトミクス

1. 研究開始当初の背景

脳神経系のあらゆる機能は、神経回路内を神経活動が特定の道筋に沿って伝わることで生成される。したがって、神経活動の時空間パターンが生成される仕組みを明らかにすることは脳科学における最重要課題のひとつである。脳神経系は、多くの場合、細胞群が局所的に配置した「基本単位」が並立することにより構築されており、その機能は基本単位間の情報のやりとりにより生じる。したがって、このような基本単位間を、神経活動が特定のパターンで伝播する仕組みを理解することは、神経回路の作動原理の理解に大きく貢献すると期待される。本研究では、ショウジョウバエ幼虫のぜん動運動を制御する中枢神経回路をモデル系として、この問題に取り組んだ。

ショウジョウバエ幼虫のぜん動運動は前後体節間を一方に伝わる筋収縮の波である。これを制御する中枢神経回路は、各体節の運動神経細胞を一定の時間間隔で発火することで協調的な運動出力を生む。ぜん動運動が体節間を伝わる速さは通常約0.6秒/体節で一定だが、状況によって変化し得ることから、この回路は定型的でありながらも柔軟なものと考えられる。図1に示すように、昆虫においては、各体節の神経構造は相同なので、この回路は、「基本単位」となる各体節の回路が連絡して、より大きな回路を構築している系と捉えることができる。したがって、メゾ回路内で協調的な神経活動の時空間パターンが生み出される過程を解析するのに良い実験系となると考えられた。

2. 研究の目的

ショウジョウバエ幼虫の中枢神経回路が、どのような仕組みにより、体節間を一定のスピードで伝わる協調的な運動出力を生むのかを明らかにすることを目的とした。具体的には、以下の3つの項目である。

1) 光操作と神経活動検出の同時適用による運動回路の摂動応答測定

体節間を神経活動が伝播する時に、特定の細胞群に摂動を加えた時の回路応答を測定することにより、回路の機能特性を探ることができると考えられる。そこで、光感受性チャネルによる神経活動の活性化・不活化と神経活動の測定を組み合わせた実験系の構築を進めた。

2) 運動回路の構成細胞の同定と機能解析

ショウジョウバエ幼虫において運動制御に関わる介在神経細胞の実体は、本研究開始時

には全く未知であった。したがってこれら介在神経細胞を同定し、その機能を明らかにすることが、回路を理解するために非常に重要であった。そこで、Ca²⁺イメージング、光遺伝学、シナプス間隙 GFP 再構成法、コネクトーム(連続電子顕微鏡画像からの再構築)などを用いた機能解剖解析を進めることを目的とした。

3) 集団神経活動の統計解析

神経回路が織りなす伝播現象を記述する数理モデルを構築するためには、多数の神経細胞の活動を効率よく取得し、統計解析することがまず要求される。そこで、4D イメージングのデータから細胞集団の活動を自動取得し、統計解析する手法を開発した。

3. 研究の方法

神経活動の操作には光遺伝学(optogenetics)および温度遺伝学(thermogenetics)を用いた。具体的には、活動抑制をするために黄色光感受性陰イオンポンプであるハロロドプシン3(NpHR)、温度感受性 Shibire タンパク質(Sh[its])を、活動亢進をするために青色光感受性陽イオンチャネルであるチャネルロドプシン2(ChR2)、温度依存陽イオンチャネルTRPA1を用いた。神経活動の測定には、Ca²⁺濃度依存性蛍光蛋白質 GCaMP、RCaMP を利用したカルシウムイメージングを用いた。また、運動神経細胞の活動測定には、電気生理学による末梢神経根からの細胞外記録も用いた。

神経活動の操作と測定を同時に行うために、光遺伝学とカルシウムイメージングを組み合わせた。このため、光刺激用の共焦点顕微鏡(FV1000,Olympus)の鏡筒に、カルシウムイメージング用の EMCCD カメラ(iXon3, ANDORTECHNOLOGY, Japan)を取り付けた装置を用いた。照射系には、光遺伝学のための励起光とカルシウムイメージングのための励起光の2つの光路を用意した。波長の重なりを避けるため、活動抑制には NpHR と GCaMP を、活動亢進には ChR2 と RCaMP を組み合わせて用いた。

4. 研究成果

幼虫のぜん動運動は前後体節間を伝わる筋収縮の波である。この運動は各神経節(A1~A07)の運動神経細胞(MN)が一定の時間間隔で逐次的に発火することで生み出される。この時空間パターン制御の仕組みを探るため光遺伝学、カルシウムイメージング、数理統計解析等を組み合わせた多角的な研究

を進め以下の成果を得た。

(1) 光操作によるメゾ回路の時空間制御

まず、ハロロドプシン(NpHR)による神経活動抑制の系をショウジョウバエで構築し、この実験系を用いて、上記中枢回路の作動原理を探った。NpHRは光照射により活性化するプロトンポンプで、これを特定の神経細胞に発現することで、その活動を操作(抑制)することが可能となる。我々はまずショウジョウバエにおいてGal4-UAS発現系によりNpHRを発現することを可能にするトランスジェニック系統を作成した。この系統を用いて運動神経細胞に特異的にNpHRを発現した幼虫に光照射を行うと、幼虫の体全体が弛緩することから、マウスや線虫など同様に、NpHRが昆虫においても機能することが確認された。次に、運動神経細胞の活動の一過的な抑制がぜん動運動に与える効果を調べた。すなわち局所的筋収縮が尾端から頭端に向けて伝播している途中で、次に収縮する運動神経細胞の活動を一過性に抑制した際にぜん動運動にどのような影響がでるかを調べた。具体的には以下の2つの可能性を検討した。運動出力がなくても介在神経細胞を介して回路内を神経活動が伝播するならば、運動神経細胞の活動とは関係なく、中枢内を活動が伝播すると予想される(モデル1)。一方、運動出力がないと次の体節へ活動が引き継がれない場合は、伝播は光によって一時的に停止すると考えられる(モデル2)。実験を行ったところ、光照射により筋収縮の伝播は一時的に停止した。このことからモデル2が支持された。さらに興味深いことに、光照射を終了すると、ぜん動運動は停止した体節から再開した。以上の結果から、運動神経細胞の活動が隣接する体節への活動伝播に必要であることを示唆すると同時に、回路内に伝播の状態を記憶する機構が存在することが明らかとなった(Inada et al., 2011)。

さらに詳細に、運動神経細胞の活動が波の伝播を制御する仕組みを理解するため、中枢内活動伝播ダイナミクスを可視化しながら、運動神経細胞の活動を局所的に操作することを試みた。このため、GCaMP、RCaMPを用いたCa²⁺イメージング法と、NpHRによる光活動抑制、ChR2による光活動亢進とを組み合わせた実験系を構築し、光操作の回路ダイナミクスへの影響を詳細に調べることが可能とした。また、上述の研究では数秒程度の活動阻害の効果をみたが、本研究ではより長い時間(数10秒)での影響を見た。Caイメージングにより運動神経細胞の伝播

波を尾側から頭側への連続的な蛍光強度上昇すなわち運動波としてとらえながら、一過的かつ局所的な光刺激を神経根に与えることで特定の体節の運動神経細胞の活動を操作し、その際起こる運動波への影響を測定した。その結果、特定の体節の運動神経細胞の活動操作が回路全体の活動頻度に大きな影響を与えることが明らかとなった。すなわち、中央付近の神経節(A4, A5, A6)の運動神経細胞の活動を抑制すると運動波の頻度が著しく減少するのが観察された(図1)。このような影響は、頭側(A1, A2, A3)あるいは尾側(A7)の活動抑制では見られなかった。一方、尾側の(A6, A7)神経分節内の運動神経細胞の活動亢進によって運動波の頻度が上昇した。以上の結果は運動神経細胞の局所的な活動が運動回路全体の活性化の頻度制御に貢献することを示唆している。さらに背景にある機構を探るため、電気シナプスの変異体において、同様の活動亢進・抑制の実験を行った。その結果、変異体においては、運動波の頻度への影響が大きく減少することが分かった。以上より①運動神経細胞の局所的な活動は、運動回路によって生成される活動パターンに影響を与えること、②その効果には神経分節間で差があること、③運動波の頻度調節に電気シナプスが関与していること、が明らかとなった(Matsunaga et al., 2013, 及び投稿中)。

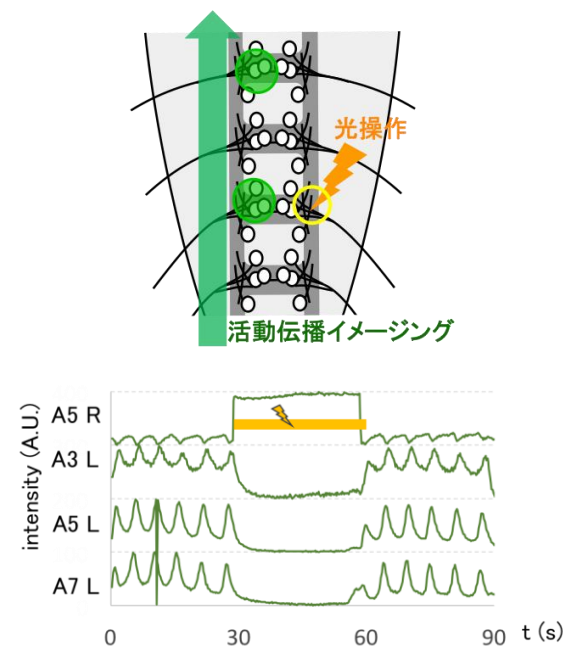


図1：運動神経細胞の活動局所抑制による運動波頻度の減少

(2) 運動制御介在神経細胞の同定と機能解析

幼虫のぜん動運動は通常の条件下では、一定の周期・速度で起こることから厳密な制御を受けていると考えられる。この制御に関わるような介在神経細胞を探索するため、カルシウムイメージングを用いて、運動出力に関連した活動パターンを示し、従って運動の制御に関与する可能性のある介在神経群をいくつか同定した。さらに、その機能を光遺伝学等により解析することで、運動伝播の速度の制御に関わる介在神経細胞 PMSIs (per-positive segmental interneurons) を同定することに成功した(Kohsaka et al., Current Biology 2014)。

PMSIs は、各体節において約 15 個のクラスターとして存在し、ぜん動運動と同時に前後体節間を伝わる波状の活動パターンを示した。単一細胞モザイク法、シナプス間隙 GFP 再構築法等の解剖学的解析により、PMSIs は、各体節内で局所的に軸索を伸張し、運動神経細胞に直接結合する介在神経であることが示唆された。チャンネルロドプシンを用いて行動中の幼虫においてこの細胞群を活性化すると、体壁全体の筋肉弛緩が誘導され、ぜん動運動が完全に停止した。局所的な光照射により特定の体節の PMSIs を活性化すると、それに対応した体節の筋肉の弛緩が誘導された。以上の結果および PMSIs がグルタミン酸（運動神経細胞の活動を阻害することが知られている）を合成することから、PMSIs は各体節において運動神経細胞に直接結合し、その活動を抑制していると考えられた。

逆に、ハロロドプシンや Shi [ts]を用いて、一時的にこの細胞の活動を抑制すると、ぜん動運動の速度が半分近くに減少した。このことは、幼虫が適切な運動速度で動くためには、PMSIs の活動が必要であることを示している。さらに、動物のスピードの変化として現れたこの表現系が、回路内部のどのような変化によるものかを細胞レベルで調べるため、運動神経の活動を電気生理学的に測定した。その結果、PMSIs が活動できないと、個々の体節の運動神経、および筋肉細胞が活動する時間幅が長くなっていることが分かった(図2)。個々の体節が活動している時間が長いと、身体の軸に沿って個々の体節の筋収縮が順々に伝わっていくのに時間がかかるため、結果として運動速度が遅くなったと考えられた。これは、PMSIs が運動神経の出力を短く制限することで、運動速度を制御してい

ることを示唆している。ショウジョウバエ幼虫が示す、身体の後から前にかけて順に筋収縮する運動パターンは、魚などの脊椎動物にも見られる。興味深いことに、今回ショウジョウバエ幼虫で見出された PMSIs と非常に性質の似ている神経細胞が、魚類、両生類、哺乳類の運動回路にも見出されており、本研究で明らかとなった運動速度の制御機構は、種を超えて働くものと考えられる。

PMSIs 以外にも、各体節に存在し、前進ぜん動運動の際に後ろから前の体節へと順次活動する局所前運動ニューロンとして、GVLIs(Itakura et al, 2015)、W 細胞(Hasegawa et al., 投稿準備中)を同定した。興味深いことに、これら細胞の活動のタイミングには一定のずれが見られた。すなわち、W 細胞は運動神経細胞の活動に対し、約 1 体節分早く活動するのに対し、PMSI, GVLIs 細胞はそれぞれ約 0.5、2 体節分遅れて活動が見られた。この活動のタイミングは、W 細胞が運動神経細胞に対し興奮性、PMSI と GVLIs 細胞が抑制性であるという知見とも合致し、このような位相の異なる入力により、運動神経細胞の活動のパターンが形作られると予想された。また、幼虫の方向転換時の運動制御に関わる神経細胞群を同定し、その回路構造を明らかにした(Okusawa et al., 2014)。

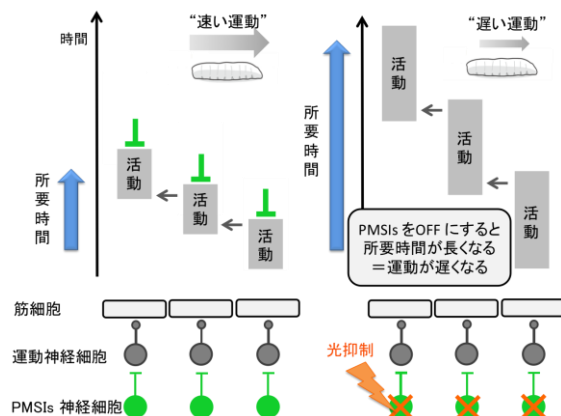


図 2 : PMSI 神経細胞による運動速度の制御機構

(3) 神経集団活動の統計解析

ショウジョウバエ幼虫では前・後ろ方向のぜん動運動と、方向転換などが見られる。それらと類似した活動は単離した中枢神経系内でも観測される。そこで単離脳におけるカルシウムイメージングデータから、それぞれの運動を特徴づける集団神経活動を抽出する

ことを試みた。3次元空間に分布している神経細胞からのカルシウムシグナルを測定するため、スピニングディスク共焦点顕微鏡の焦点面を、圧電素子を用いて上下させ高速撮影を行った。この方法で取得したデータには数百個の神経細胞の活動が含まれており、それらの活動を読み取るには、まずすべての細胞の位置を特定する必要がある。原理的には人が目視でできる作業であるが、細胞の数が多くなるに連れて困難になってくる。また、再現性やバイアスのなどの問題があることから、細胞の位置を計算機で特定することを試みた。サンプルにはカルシウムレポーター以外に核局在性の蛍光蛋白質を発現させ、その蛍光データを用いて細胞の位置を検出するようにした。具体的には lowpass filter をかけたのち、watershed 手法に類似した計算を行った。さらに、細胞の半径をパラメーターとして指定することで、細胞を自動検出することに成功した。

運動神経細胞のカルシウムイメージングから上記手法により得られた約500個の細胞の活動データを統計解析した。主成分分析 (PCA) で次元縮約をした状態空間のなかで、K-means clustering を行うことで、集団活動をいくつかの状態に分離し、前・後ぜん動運動や方向転換の運動に対応づけることに成功した。また、fourier transform により主要成分の比較を行うことにより、すべての細胞の位相を定義することができた。またパターンの速度が異なっている活動間でも多数の細胞は位相が保たれていることも確認できた。以上のように運動神経細胞集団の活動遍歴の巨視的振る舞いを統計手法により捉えることに成功した (Yoon et al., 投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Fushiki, A., Zwart M.F., Kohsaka, H., Fetter, R.D., Cardona, A. & Nose, A. A circuit mechanism for the propagation of waves of muscle contraction in *Drosophila*. *eLife* **10**, 7554/eLife.13253 (2016). (査読あり)
2. Itakura, Y., Kohsaka, H., Ohyama, T., Zlatic, M., Pulver, S.R. & Nose, A. Identification of Inhibitory Premotor Interneurons Activated at a Late Phase in a Motor Cycle during *Drosophila* Larval Locomotion. *PLoS One* **3**, e0136660 (2015). (査読あり)
3. Kohsaka, H., Takasu, E., Morimoto, T. & Nose, A. A Group of Segmental Premotor Interneurons Regulates the Speed of Axial Locomotion in *Drosophila* Larvae, *Curr. Biol.* **24**, 2643-2651 (2014). (査読あり)
4. Okusawa, S., Kohsaka, H. & Nose, A. Serotonin and downstream leucokinin neurons modulate larval turning behavior in *Drosophila*. *J Neurosci.* **34**, 2544-2558 (2014). (査読あり)
5. 能瀬聡直. ショウジョウバエ幼虫を用いて定型運動の制御機構を探る. *細胞工学* **33**, 249-254 (2014). (査読なし)
6. Fushiki, A., Kohsaka, H. & Nose, A. Role of sensory experience in functional development of *Drosophila* motor circuits. *PLoS One*. 2013 Apr 19;**8**(4), e62199 (2013). (査読あり)
7. Matsunaga, T., Fushiki, A. Nose, A. & Kohsaka, H. Optogenetic Perturbation of Neural Activity with Laser Illumination in Semi-intact *Drosophila* Larvae in Motion. *J Vis Exp*. 2013 Jul 4;**(77)**, e50513 (2013). (査読あり)
8. 能瀬聡直, 文部科学省科学研究費・新学術領域研究「メゾスコピック神経回路から探る脳の情報処理基盤」がめざすもの *生体の科学* **64**(1), 80-87 (2013). (査読なし)
9. Fukui, A., Inaki, M., Tonoe, G., Hamatani, H., Homma, M., Morimoto, T., Aburatani, H. & Nose, A. Lola regulates glutamate receptor expression at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Biology Open* **1**, 362-375 (2012). (査読あり)
10. Nose, A. Generation of neuromuscular specificity in *Drosophila*: novel mechanisms revealed by new technologies. *Front Mol Neurosci.* **5**, 62 (2012). (査読なし)
11. Kohsaka, H., Okusawa, S., Itakura, Y., Fushiki, A. & Nose, A. Development of larval motor circuits in *Drosophila*. *Develop. Growth Differ.* **54**, 408-419 (2012). (査読なし)
12. Inada, K., Kohsaka, H., Takasu, E., Matsunaga, T. & Nose, A. Optical dissection of neural circuits responsible for *Drosophila* larval locomotion with halorhodopsin. *PLoS One* **6**, e29019 (2011). (査読あり)
13. Shakiryanova, D., Morimoto, T., Zhou, C., Chouhan, A.K., Sigrist, S.J., Nose, A., Macleod, G.T., Deitcher, D.L. & Levitan, E.S. Differential Control of Presynaptic CaMKII Activation and Translocation to Active Zones. *J Neurosci.* **31**, 9093-9100 (2011). (査読あり)

14. Inaki, M, Shinza-Kameda, M, Ismat, A., Frasch, M & Nose, A. *Drosophila* Tey represses transcription of a repulsive cue Toll and generates neuromuscular target specificity. *Development* **137**, 2139-2146 (2010). (査読あり)
 15. Morimoto, T., Nobechei, M., Komatsu, A., Miyakawa, H. & Nose, A. Subunit-specific and homeostatic regulation of glutamate receptor localization by CaMKII in *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuroscience* **165**, 1284–1292 (2010). (査読あり)
- [学会発表] (計 12 件)
1. 能瀬聡直 : 時空間パターンを生み出すメゾ回路の作動原理の解明, 新学術領域研究「メゾ神経回路」領域成果報告会、2014.12.11, ホテル東京ガーデンパレス (東京都文京区)
 2. Nose, A. Functional dissection of the central circuits that regulate *Drosophila* larval locomotion, ESF-EMBO Flies, worms and robots: combining perspectives on minibrains and behaviours, 2014.11.11, Sant Feliu, Spain (招待講演)
 3. 能瀬聡直 : 運動制御の基本原理を探る : モデル動物の神経回路の作動からロボティクスへ、第8回 Motor Control 研究会、2014.8.8、筑波大学大学会館 (茨城県つくば市) (招待講演)
 4. Nose, A. : Functional dissection of the central circuits that regulate larval locomotion, Behavioral Neurogenetics of larval *Drosophila*: Molecules, Circuits, Computation & Robotics, 2014.3.10, KKR ホテル熱海 (静岡県熱海市) (招待講演)
 5. Nose, A. : Optogenetic dissection of the neural circuits that regulate rhythmic movement in *Drosophila* larvae, The University of Tokyo - Korea University The 2nd Joint Workshop on Bio-Soft Matter, 2013.3.1, Seoul, Korea (招待講演)
 6. Nose, A. : Optogenetic dissection of the neural circuits that regulate rhythmic movement in *Drosophila* larvae, Symposium on Sensory Systems & Neural Circuits, 2013.2.12, 伊藤国際学術研究センター (東京都文京区) (招待講演)
 7. Nose, A. : Optogenetic dissection of motor circuits that regulate larval peristalsis in *Drosophila*, "Behavioral Neurogenetics of *Drosophila* Larva" meeting at Janelia Farm, 2012.10.1, 米国(バージニア州) (招待講演)
 8. 能瀬聡直, 高坂洋史 & 高木俊輔. Optogenetic dissection of motor circuits in *Drosophila* larvae. 「第35回日本神経科学大会」シンポジウム, 2012.9.18, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市中区) (招待講演)
 9. 能瀬聡直 : 光生理学を用いたショウジョウバエ運動回路の機能解剖、「大脳新皮質構築」「メゾ神経回路」合同ワークショップ、2012.7.25、仙台国際センター (宮城県仙台市) (招待講演)
 10. 能瀬聡直 : Optogenetic dissection of motor circuits that regulate larval locomotion in *Drosophila*, 「メゾ神経回路」第1回公開国際シンポジウム、2012.7.7、小柴ホール (東京都文京区) (招待講演)
 11. Kohsaka, H. & Nose, A. Optogenetic dissection of central circuits underlying larval locomotion in *Drosophila*. 第34回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) (招待講演)
 12. Nose, A. : Optogenetic dissection of the neural circuits that regulate larval locomotion in *Drosophila*. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Symposium, 2011.5.18-21, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市) (招待講演)
- [図書] (計 1 件)
1. 高坂洋史, 能瀬聡直 ショウジョウバエを用いたオプトジェネティクス研究、in オプトジェネティクス、エヌ・ティー・エス、141-153 (2013). (著書、分担執筆、査読なし)
- [その他]
ホームページ
<http://bio.phys.s.u-tokyo.ac.jp>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
能瀬 聡直 (NOSE AKINAO)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号 : 30260037
 - (2) 研究分担者
森本 高子 (TAKAKO MORIMOTO)
東京薬科大学・生命科学部・准教授
研究者番号 : 10311648
 - (3) 連携研究者
高坂 洋史 (HIROSHI KOHSAKA)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教
研究者番号 : 20431900