

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14308

研究課題名(和文)線虫をモデルとした自発行動制御の神経回路メカニズムの解明

研究課題名(英文)A study of neural circuit mechanism of voluntary behavior 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)：動物は自らの意思で自発的に行動するがその脳内機構はよく分かっていない。本研究は線虫の脳活動と行動を定量的に解析するための実験基盤の開発と自発行動の神経回路を明らかにすることを目的とした。自動追尾装置と高速スキャンレーザー顕微鏡を統合したイメージングシステムICaSTを開発した。ICaSTにより自由行動下の線虫のカルシウムイメージングを行い、自発後退運動に先行、随伴する神経活動を見出した。神経活動と行動の関連を解析するため光遺伝学操作とイメージングの同時計測システムを開発した。これらのシステムは線虫だけではなく他の動物の自発行動の神経回路とシナプス機構の研究にも有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Animals exhibit voluntary behaviors, but their neural mechanisms are not well understood. In this study, we developed a new imaging system, ICaST, which combines an automatic tracking system and a fast-scanning laser confocal microscope, to image neurons of interest in freely behaving *C. elegans*. Using ICaST in conjunction with an improved G-CaMP7, we conducted Ca²⁺ imaging of a freely moving animal at high magnification while automatically tracking the target in the microscope's field of view. We identified several neurons in the head ganglia that act before or during spontaneous backward locomotion. We also developed a system for optogenetic stimulation and simultaneous imaging by concurrent use of G-CaMP and ChR2. Our new approach will provide a powerful platform for studying the neural circuit mechanisms of *C. elegans* behaviors and has potential for use in other animals.

研究分野：神経生理学

キーワード：イメージング 線虫 神経回路

1. 研究開始当初の背景

動物は自らの意思で自発的に行動するがその神経メカニズムはよく分かっていない。意欲の低下や随意運動の障害はうつやパーキンソン病などの疾患にも深く関連しているため、自発性行動の中枢機構の解明は脳科学・医学の両面で重要な課題である。これまで線虫、昆虫、甲殻類などの無脊椎動物を対象として誘発刺激に対する応答行動に関する多くの研究が行われてきたがこれらの動物も誘発刺激に依存しないさまざまな自発性行動を示すことが知られている。我々は線虫をモデルに用いて行動の開始に先行するドーパミンニューロンの神経活動を見出した。甲殻類においても自発性行動の開始に先行する脳内の準備活動が報告されている。これらの知見は無脊椎動物の意思に相当する神経機構の存在を示唆するものであり、無脊椎動物モデルが自発行動の研究対象としても有用であることを示している。

蛍光カルシウムイメージング法は時空間分解能の高い機能イメージングとして生体に広く使われている。我々は以前より蛍光カルシウムセンサーG-CaMP の開発を行うとともに線虫トラッキング顕微鏡システムの開発を行ってきた(東北大・橋本教授との共同研究)。行動中の動物の多神経活動を細胞レベルで動的に可視化し解析するシステムは重要な基盤技術であり、本研究ではトラッキング顕微鏡を用いた実験システムの開発と線虫の自発性行動の神経生理学的解析を行った。

2. 研究の目的

自由行動下の動物の神経活動をリアルタイムで可視化し、さらに神経活動と行動の因果関係を明らかにすることは行動の神経メカニズムの解明に重要である。本研究は線虫をモデルに用いて、(1)動く動物の神経活動と行動をリアルタイムに同時記録し定量的に解析するためのイメージングシステムの開発、(2)光遺伝学による神経活動の制御技術とイメージング技術を組み合わせたシステムの開発、(3)これらのシステムを用いて自発行動発現に関わる神経回路を明らかにすることを目的としている。本研究により自発行動発現の神経回路とシナプス機構の詳細な解析のための新たな実験基盤が開発され、自発行動の脳内機構の解明につながることを期待される。

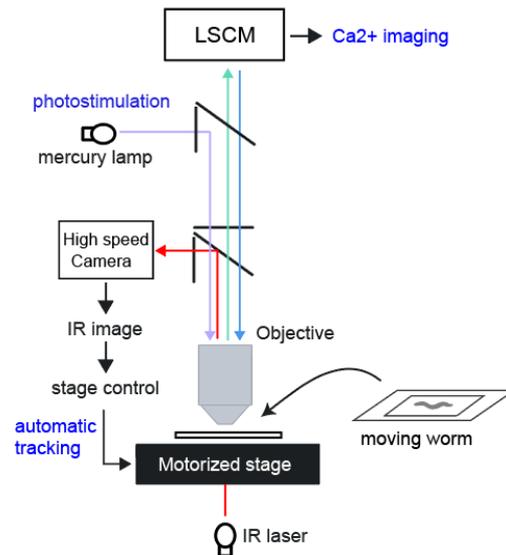


図1:開発したICaSTシステムの概略図

3. 研究の方法

(1)イメージングシステムの開発: 高速スキャンレーザー顕微鏡(ニコン A1R)に自動追尾装置を装着した。光学フィルターを内蔵した装置と近赤外(IR)光源を内蔵した装置を作成し、レーザー顕微鏡の光路に導入した。追尾対象を常に観察視野の中心に保持するため線虫のIR画像をハイスピードcMOSカメラで高速撮影(200Hz)し、パターン認識アルゴリズムでリアルタイム処理を行い精密XYZ自動ステージ装置を自動制御した。

(2)光遺伝学とイメージング: チャネルロドプシン2(ChR2)とカルシウムセンサーを共発現するトランスジェニック体を樹立しイメージングと光刺激の条件等を厳密に検討した。線虫はChR2のcofactorであるレチナール(ATR)を欠くためATR存在下で培養したものをを用いた。ATR非存在下で培養した個体を対照として用いた。

(3)線虫のイメージング解析: 線虫神経系に改良型G-CaMPを導入したトランスジェニック体を樹立した。カルシウムによって蛍光が変化しない赤色蛍光タンパク質を共発現し、センサーとの蛍光強度比を解析することにより動物の動きによる影響を抑えた。線虫をソフトアガーの上のせ、カバーガラスでマウントしイメージング実験に用いた。対物レンズは20倍あるいは40倍を用い、レーザー顕微鏡で2色の蛍光像と透過像(512x512画素)を7-30Hzで同時取得した。蛍光画像の解析はNIS-elementソフトウェア(ニコン)を

用いた。

4. 研究成果

(1) パターン認識による自動追尾と高速スキャンレーザー顕微鏡を統合したイメージングシステム ICaST (Integrated platform for Ca^{2+} imaging, Stimulation, and Tracking) を開発した。システムの概略図を図 1 に示す。ICaST を用いて自由運動中の線虫の自動追尾を行った例を示す (図 2)。新たに開発したソフトウェアを用いて自動ステージの xy 変位情報を解析し、軌跡、スピード、加速度等の行動の情報を取得した。線虫の動きはソフトアガー上にマウントした状態でスピードが遅くなるものの前進・後退運動や逃避行動が確認された。トラッキングは線虫の頭部、陰門部、尾部等の任意の領域でテストし、いずれも顕微鏡視野内に長時間 (~60 分間) 保持することができた。

次に後退運動の制御に働くことが知られている AVA 介在ニューロンのイメージングを行いシステムを評価した。G-CaMP を発現する遺伝子組み換え動物を用いて自由行動中の線虫の頭部を自動追尾しながら同時にカルシウムイメージングを試みた。高倍率で最長 30 分間のイメージングデータと行動のデータを取得することができた。イメージングの空間分解能は ~1 μm の高解像度であり、神経細胞を同定して神経活動を解析することが可能であった。AVA 神経活動と後退行動がよく対応しているのがわかる (図 3)。

(2) ChR2 と G-CaMP はそれぞれ光遺伝学、機能イメージングによく用いられるが、励起波長が近いため併用は困難である。最近我々は ChR2 と励起波長域の異なる R-CaMP を用いて神経活動の操作と同時計測を行ったが (Inoue et al, Nature methods, 2015)、さまざまな改良型が開発されている G-CaMP との併用ができればさらに応用範囲が広がると考えられる。そこで今回 ChR2 と改良型 G-CaMP の波長特性、励起光の波長および光強度等の条件を厳密に検討し、ChR2 変異体と G-CaMP7 を用いて光によるニューロンの制御と神経活動の同時計測に成功した (Gengyo-Ando et al, 2017)。

(3) 線虫は主に前進運動で餌を探索するが、時折自発的に後退運動あるいは深い屈曲 (オメガターン) 運動を行い進行方向を変えることが知られている。ICaST システムを用いて

外部からの刺激を与えない条件で前進運動から自発的な後退運動へのスイッチングに

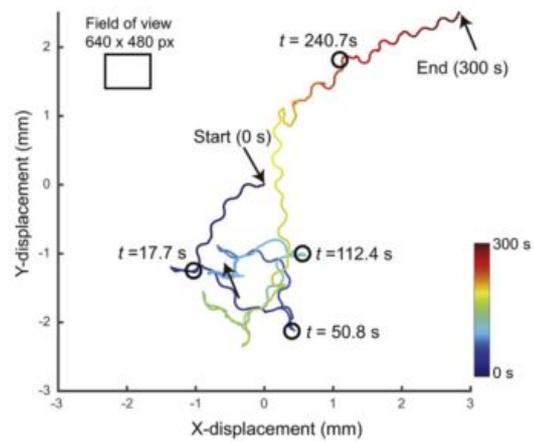
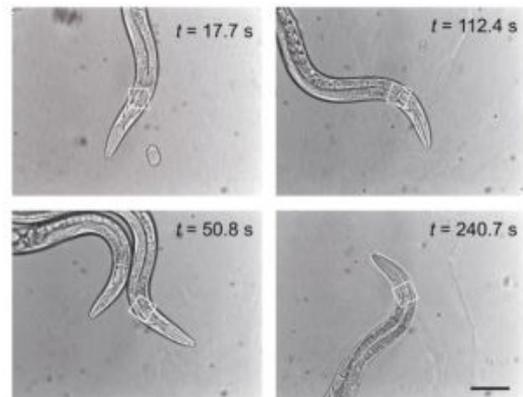


図 2 : 自由運動中の線虫の自動追尾
(上)線虫の IR 画像。頭部の任意部位() が自動追尾によって顕微鏡視野内に維持されている。(下)線虫の動いた軌跡。各時間は上の写真と対応している。左上は cMOS カメラの視野を示す (Gengyo-Ando et al, 2017 から引用)

着目して脳活動の体系的なイメージング解析を行った。アセチルコリン、GABA、モノアミン含有ニューロン等の神経系にセンサーを発現するトランスジェニック体を作成し、神経活動と行動の解析を行った。それにより、自発後退運動へのスイッチングに先行あるいは随伴するカルシウム変動を示すニューロンを見出した。さらに活動制御の神経基盤を明らかにするため各種神経伝達物質の変異体を用いて体系的なイメージング解析を行い神経活動の制御にモノアミンの作用が関与することを見出した。現在、行動と神経活動の因果関係を明らかにするため、IR-LEGO による単一ニューロンでのチャンネルロドプシンの発現制御と光遺伝学的解析を進めている。

本研究で開発したシステムは、線虫だけで

はなく他のモデル動物を用いた行動の神経生理学的研究にも有用であると考えられる。

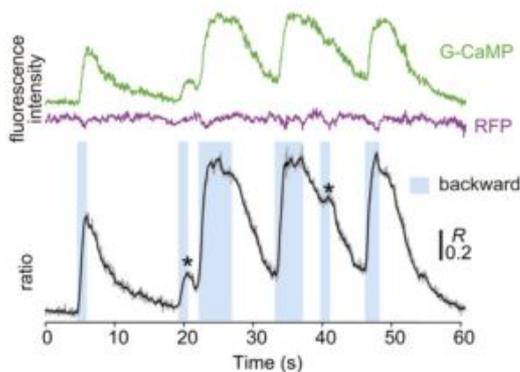


図3：自由行動中の線虫頭部ニューロンのイメージング。ICaSTシステムを用いて行動と神経活動を同時記録した。G-CaMP(緑)、赤色蛍光タンパク質 RFP(赤)、蛍光強度比 G-CaMP/RFP(黒)、青いバーは自発後退運動を示す。後退時に活動が上昇している。

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 7 件)

Gengyo-Ando K, Kagawa-Nagamura Y, Ohkura M, Fei X, Chen M, Hashimoto K, Nakai J. A new platform for long-term tracking and recording of neural activity and simultaneous optogenetic control in freely behaving *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience Methods*. 286 (2017) 56–68. doi: 10.1016/j.jneumeth.2017.05.017. 査読有

Tanimoto Y, Yamazoe-Umemoto A, Fujita K, Kawazoe Y, Miyanishi Y, Yamazaki SJ, Fei X, Busch KE, Gengyo-Ando K, Nakai J, Iino Y, Iwasaki Y, Hashimoto K, Kimura KD. Calcium dynamics regulating the timing of decision-making in *C. elegans*. *Elife*. 2017 May 23;6. pii: e21629. doi: 10.7554/eLife.21629. 査読有

Gengyo-Ando K, Kage-Nakadai E, Yoshina S, Otori M, Kagawa-Nagamura Y, Nakai J, Mitani S. Distinct roles of the two VPS33 proteins in the endolysosomal system in *Caenorhabditis elegans*.

Traffic. 2016 Nov;17 (11):1197-1213. doi: 10.1111/tra.12430. 査読有

Tanji T, Nishikori K, Haga S, Kanno Y, Kobayashi Y, Takaya M, Gengyo-Ando K, Mitani S, Shiraishi H, Ohashi-Kobayashi A. Characterization of HAF-4- and HAF-9-localizing organelles as distinct organelles in *Caenorhabditis elegans* intestinal cells. *BMC Cell Biology*. 2016 Jan 27;17:4. doi: 10.1186/s12860-015-0076-2. 査読有

Sakaguchi A, Sato M, Sato K, Gengyo-Ando K, Yorimitsu T, Nakai J, Hara T, Sato K, Sato K. REI-1 Is a Guanine Nucleotide Exchange Factor Regulating RAB-11 Localization and Function in *C. elegans* Embryos. *Developmental Cell*. 2015 Oct 26;35(2):211-21. doi:10.1016/j.devcel.2015. 査読有

Sato M, Kawano M, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Nakai J, Hayashi Y. Generation and Imaging of Transgenic Mice that Express G-CaMP7 under a Tetracycline Response Element. *PLoS One*. 2015 May 6;10(5):e0125354. doi: 10.1371/journal.pone.0125354. 査読有

安藤恵子, 中井淳一:カルシウムシグナル。 **生体の科学** 増大特集(細胞シグナル操作法) 2015年66巻5号 pp. 388-389. 査読無

[学会発表](計 12 件)

Keiko Gengyo-Ando, Yuko Kagawa-Nagamura, Masamichi Ohkura, Koichi Hashimoto, Junichi Nakai: Tyramineric regulation of motor neurons: calcium imaging and optogenetic control in freely behaving *C. elegans*. *The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan*, 2016.11.14-19. OIST (沖縄県恩納村)

Takumi Sugioka, Naoya Toyoda, Keiko Gengyo-Ando, Junichi Nakai, Shin Takagi: An optogenetic analysis of forward and backward locomotion in *C. elegans*. **2016年線虫神経生物学国際集会 (CeNeuro2016)** 2016.7.27-30. 名古屋大学 (愛知県名古屋)

市)

安藤恵子, 永村ゆう子, 大倉正道, 橋本浩一, 中井淳一: チラミンによる線虫運動ニューロン活動の制御. **第39回日本神経科学大会**, 2016.7.18-22. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

梶岡拓己, 豊田直弥, 安藤恵子, 中井淳一, 高木新: 光遺伝学的操作による線虫 *C. elegans* の前後運動の解析. **第39回日本神経科学大会**, 2016.7.18-22. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

茂木優貴, 安藤恵子, 沖篤志, 岩井陽一, 毛内拓, 平瀬肇, 大倉正道, 中井淳一: G-CaMP7 発現マウス大脳皮質脳細胞活動の細胞-領野スケール長期イメージング実験解析法. **第38回日本分子生物学会年会**, 2015.12.1-4. 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Fujii H, Kamiyo S, Takemoto-Kimura S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H: Rational design of ultrafast, high-affinity calcium indicators for monitoring neuronal activity. *Neuroscience* **2015**, 2016.10.17-21. McCormick Place (Chicago, USA)

岩瀬奏絵, 永村ゆう子, 中井淳一, 安藤恵子: 線虫 *C. elegans* を用いた難治性てんかん責任遺伝子の機能解析. **第133回日本薬理学会関東部会**, 2015.10.10. 柏の葉カンファレンスセンター (千葉県・柏市)

Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Fujii H, Kamiyo S, Takemoto-Kimura S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H: Rational design of a novel high-affinity, ultrafast, red calcium indicator R-CaMP2. **第58回日本神経化学大会**, 2015.9.11-13. 大宮ソニックシティ (埼玉県・さいたま市)

Nakai J, Ohkura M, Kagawa-Nagamura Y, Muto A, Inoue M, Bito H, Kawakami K, Gengyo-Ando K: Real-time visualization of neuronal activity in zebrafish and *C. elegans*. **第38回日本神経科学大会シンポジウム**, 2015.7.28-31. 神戸ポートアイランド

(兵庫県・神戸市)

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: Rational design of a novel high-affinity, ultrafast, red calcium indicator R-CaMP2. **第38回日本神経科学大会**, 2015.7.28-31. 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

茂木優貴, 安藤恵子, 沖篤志, 岩井陽一, 毛内拓, 平瀬肇, 大倉正道, 中井淳一: G-CaMP7 を大脳皮質に発現するマウスを用いた神経活動のマイクロマクロ解析法. **第132回日本薬理学会関東部会**, 2015.7.4. 明海大学 (千葉県・浦安市)

Tanimoto Y, Yamazoe A, Fujita K, Kawazoe Y, Miyanishi Y, Yamazaki S, Gengyo-Ando K, Nakai J, Fei X, Iwasaki Y, Hashimoto K, Kimura K: Neuronal mechanisms for *C. elegans* olfactory navigation revealed by a highly integrated microscope system. **20th International C. elegans Meeting**, 2015.6.24-28. University of California (Los Angeles, USA)

[その他]

ホームページ等

<http://subsi.saitama-u.ac.jp/index.html>

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) 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

高木 新 (TAKAGI, Shin)
名古屋大学・理学研究科・准教授
研究者番号: 90171420