

令和元年6月27日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19452

研究課題名(和文)リバースオプトジェネティクスの実証と、線虫の「動き」モデリングへの展開

研究課題名(英文) Development of reverse optogenetics and its application for analysis of a neural network related to *C. elegans* locomotion

研究代表者

青木 航 (Wataru, Aoki)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：10722184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：線虫 *C. elegans* は302個のニューロンからなる神経ネットワークを持つが、その機能はいまだよくわかっていない。我々は、各ニューロンが行動に与える機能を網羅的にアノテーションするための新規方法論「機能的セロミクス」を開発した。この方法論を線虫の産卵行動に適用し、産卵行動に強く影響するニューロンの解析に成功した。さらに、線虫の行動を自動でトラッキングしモデル化する動画撮影システムを構築し、線虫のロコモーションモチーフに影響するニューラルネットワークの解析を進めている。機能的セロミクスをさまざまな行動系に適用することで、普遍的な脳の計算メカニズムを理解できるようになる期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の独創性は、従来の発想を逆転させ、仮説を必要としない網羅的解析法を神経ネットワーク研究に導入することに集約される。本申請は、仮説フリー・ハイスループット・1細胞分解能の方法論を細胞ネットワークレベルの研究に新しく導入するものである。本方法論により、動物の行動を高精度に予測できる神経ネットワークモデルの構築に成功すれば、神経系の普遍的動作原理を理解する上で大きなマイルストーンとなる。

研究成果の概要(英文)： *C. elegans* has a simple neural network composed of 302 neurons, and its computation mechanisms have not been well understood. We developed a novel methodology, functional cellomics, for hypothesis-free functional annotation of single neurons on *C. elegans* behavior. We applied functional cellomics to egg-laying behavior of *C. elegans*, and succeeded in high-throughput re-annotation of neurons which are important for the egg-laying behavior. Furthermore, we have constructed an automatic worm tracking system, and are analyzing neurons which affect *C. elegans* locomotion. In the future, functional cellomics will support our understanding on universal computation mechanisms of brains.

研究分野：神経科学

キーワード：optogenetics reverse optogenetics functional cellomics *C. elegans* neural network

1. 研究開始当初の背景

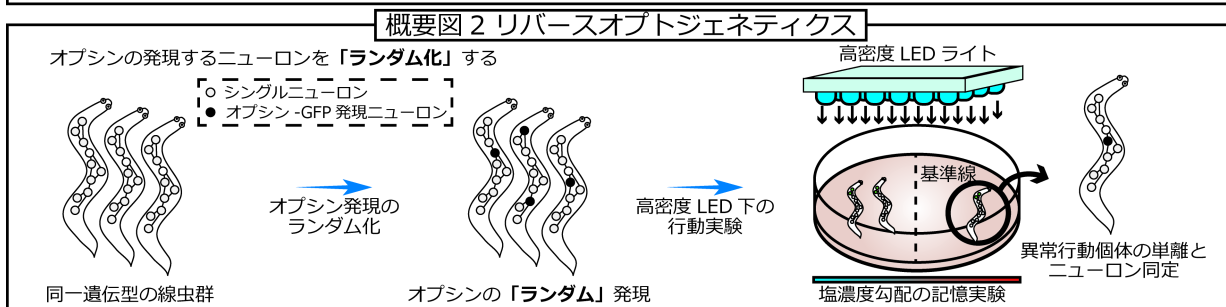
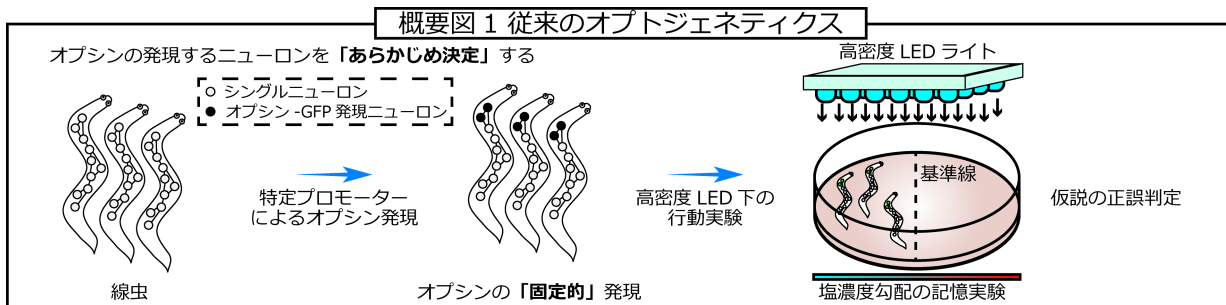
動物の高次機能（学習や記憶）は、脳に存在するニューラルネットワークにより生み出される。しかし、高次機能とニューラルネットワークの関係は、最もシンプルな神経ネットワークを持つモデル生物である線虫 *C. elegans* においてもまだよくわかっていない。

高次機能とニューラルネットワークの関係を調べるには、特定のニューロンの活性を人為的に ON/OFF できる技術が必要である。ニューロンの活性を人為的に操作できれば、その操作が高次機能へ及ぼす影響を見ることで、高次機能とニューラルネットワークの関係を調べられる。Karl Deisseroth が開発した『オプトジェネティクス』は、ニューロンにオプシン（光受容体）を発現させ、光を照射することで、ニューロンの活性を自在に ON/OFF する技術である。オプトジェネティクスの開発は、高次機能とニューラルネットワークの関係を精密に解析できる方法論を提供し、脳神経研究が急速に進展するきっかけとなった。しかし、オプトジェネティクスには以下の 3 つの欠点が存在する。そのため、高次機能とニューラルネットワークの関係を網羅的に、また、1 細胞レベルで精密に調べることは難しい。

オプトジェネティクスは仮説を必要とする。既に存在する仮説の検証・発展には強力な手法であるが、完全に新しい発見は生まれにくい。なぜなら、実際の実験において、オプシンの発現を制御するプロモーターを選択する必要があり、そのためには、「ある脳の高次機能がどのニューロン群と関係があるか」という仮説が事前に必要とされるからである。スループットが低い。仮説に合わせて異なる遺伝子組換え動物を作製する必要がある。

1 細胞レベルの解析が難しい。1 細胞特異的プロモーターはほぼ存在しない。また、活動中の動物のシングルニューロンに光を収束させることも難しい。

そこで申請者は、仮説フリー・ハイスループット・1 細胞分解能の特徴を持つ新しい方法論『リバースオプトジェネティクス』を提唱してきている。リバースオプトジェネティクスとは、神経ネットワークを構成する全ニューロンのうち、オプシンが発現するニューロンを 1 細胞レベルで「ランダム化」する技術である。従来のオプトジェネティクスでは、オプシンが発現するニューロンを事前に選択し、その行動への影響を検証する（概要図 1）。リバースオプトジェネティクスでは、オプシンが発現するニューロンを 1 細胞レベルでランダム化し、行動に影響を与えるニューロンを「後から」同定する（概要図 2）。



2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が提案する方法論『リバースオプトジェネティクス』の開発を推進すること、および、その応用として線虫 *C. elegans* の口コモーション（運動）を制御する神経ネットワークの動作原理の理解を深めることである。

3. 研究の方法と成果

我々は線虫 *C. elegans* をモデルとし、事前に仮説を必要としないオプトジェネティクスの開発を試みた。本研究では、確率的遺伝子発現制御システムであるブレインボウ技術を応用し、それぞれのニューロンがオプシンで標識されるかどうかを 1 細胞ごとに確率的に決定される「機能的セロミクス」システムを考案した。ランダムにオプシンで標識された線虫ライブラリが得られれば、光照射下で行動実験を行うことで、非標準的な行動を示す個体が単離できる。さらに、その個体におけるオプシン発現ニューロンを同定すれば、各ニューロンの機能を推定できる。

4. 研究成果

機能的セロミクスを実装するために、4つのプラスミドを設計した(図2a)。pCreは、ヒートショックでCreリコンビナーゼを発現する。pSTARは、ブレインボウ技術で確率的標識を実現するための核となる要素であり、全ニューロンで働くプロモーター(F25B3.3p)の下流に、2種類のlox配列(loxPとlox2272)を交互に配置し、その間に蛍光タンパク質mCherryと転写因子QF2wを配置した。loxPとlox2272は機能的に直交しており、どちらか片方のみが確率的にCreによって組み換えられる。pQUAS_ChR2_GFPは、転写因子QF2wによりオプシン(チャネルロドプシン2、ChR2)とGFPの融合タンパク質(ChR2-GFP)を発現させる。さらに、Creが働いた後もmCherryの標識を続けるために、pF25B3.3p_mCherryを構築した。

これらのプラスミドを線虫に導入すると、最初は全ニューロンでmCherryが発現し、Creがlox2272間の配列を組み換えた場合のみに、転写因子QF2wが発現する。QF2wがChR2-GFPを誘導し、そのニューロンを光依存的に活性化できるようになる。蛍光タンパク質GFPがChR2と融合しているので、オプシン標識ニューロンは蛍光顕微鏡で簡単に同定可能である。実際に、*C. elegans*の形質転換体にヒートショックを与え、ChR2-GFPが確率的に標識されているかどうかを確認したところ、ChR2-GFPは各個体において異なるパターンで発現していることがわか

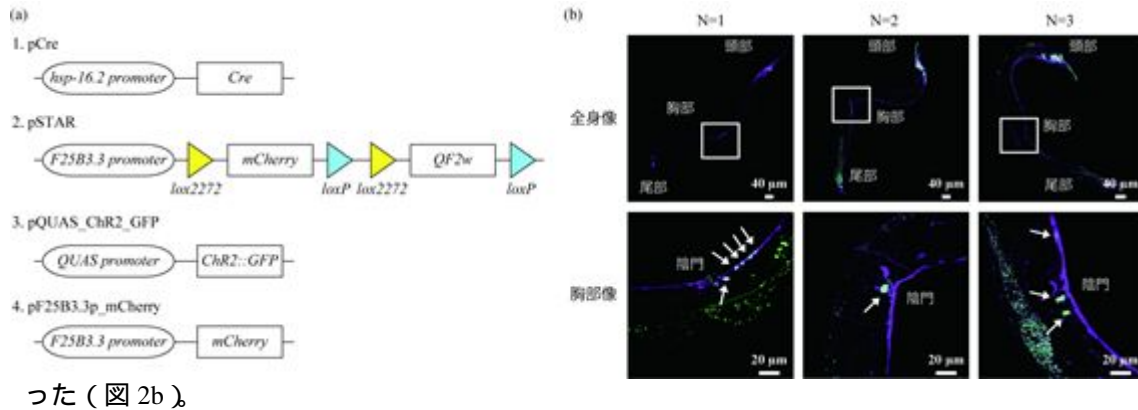
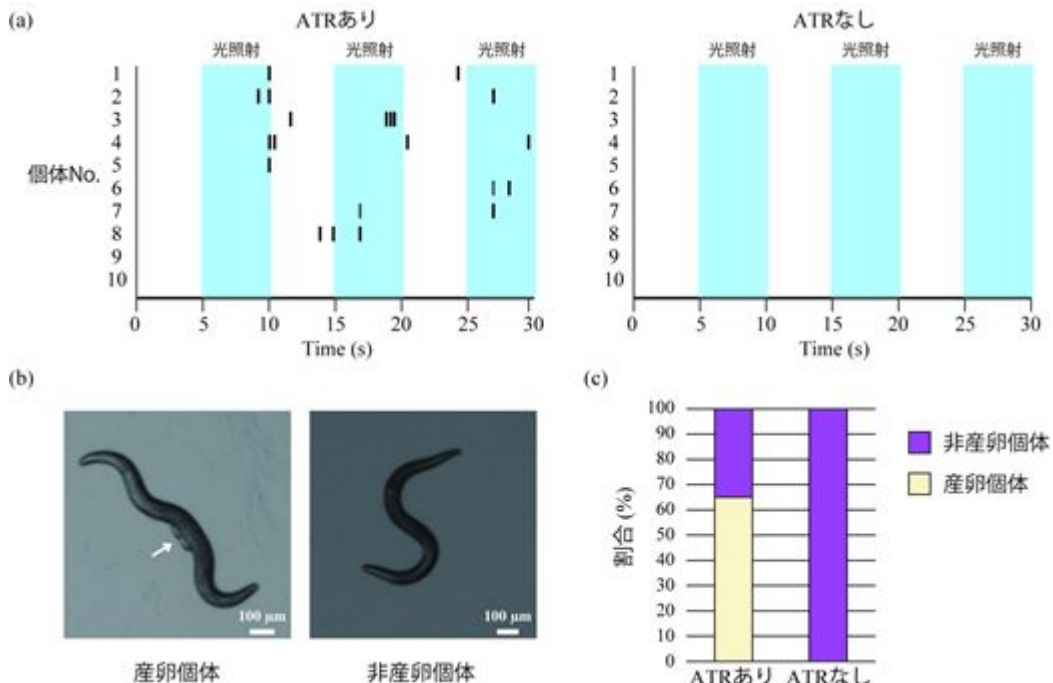


図2: オプシンの確率的標識

(a) 機能的セロミクスを線虫に実装するための遺伝子回路。(b) ChR2-GFPの確率的標識。矢印で示された白い細胞がChR2-GFP標識細胞。

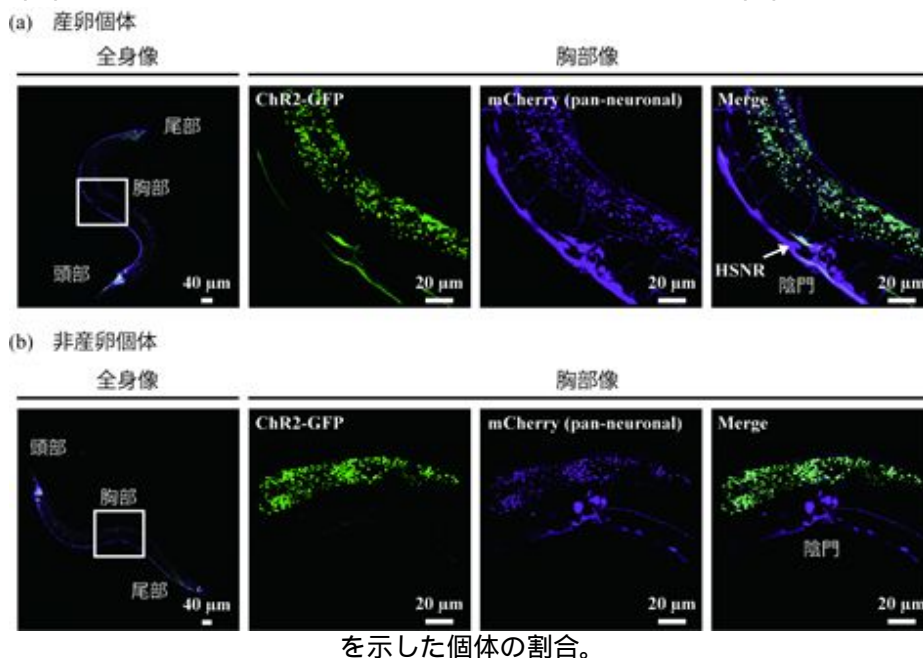
機能的セロミクスの実証を目指して、線虫の産卵行動に着目した。線虫の産卵行動は、2つのHermaphrodite-Specific Neurons(HSNRおよびHSNL)を中心としたシンプルなサブネットワークによって制御されている。機能的セロミクスを用いてHSNsのリアノーションを迅速に行えれば、機能的セロミクスの概念を実証できると考えた。まず、ChR2-GFPが確率的にラベルされた線虫ライブラリを構築し、光照射下で産卵行動を観察した(図3ab)。多数の線虫個体を解析したところ、65%の線虫が光依存的産卵行動を示した(図3c)。ネガティブコントロールとして、オプシンの補因子であるall-trans-retinal(ATR)を含まない条件で実験を行ったところ、産卵行動は認められなかった。産卵個体および非産卵個体を共焦点顕微鏡で撮影したとこ



る、産卵個体においては ChR2-GFP が HSN ニューロンで発現していた (図 4ab) 面白いことに、2 つ存在する HSNs のうち、片方のみの活性化で産卵行動が誘導されることもわかった。

図 3：光依存的な線虫産卵行動

(a) 5 秒間隔で光を照射した場合の、線虫産卵行動パターン。黒の線が産卵行動が起きたタイミング。(b) 産卵個体と非産卵個体の代表的画像。卵を矢印で示す。(c) 光依存的に産卵行動



を示した個体の割合。

図 4：共焦点顕微鏡による発現解析

(a) 産卵個体の共焦点画像。(b) 非産卵個体の共焦点画像。

機能的セロミクスを線虫口コモーションの解析に応用するために、Schafer 研究室のサポートのもと、線虫の口コモーションを自動でトラッキングし、行動をモデル化するシステムを当研究室において立ち上げた。このシステムでは、多数の線虫を同時に観察しつつ、それぞれの口コモーションをモチーフに分解して理解を深めることができる。さらに、光による介入実験を同時に実施することで、線虫口コモーションと神経ネットワークの解析を進めつつある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Aoki Wataru, Matsukura Hidenori, Yamauchi Yuji, Yokoyama Haruki, Hasegawa Koichi, Shinya Ryoji, Ueda Mitsuyoshi, Cellomics approach for high-throughput functional annotation of *Caenorhabditis elegans* neural network, *Scientific Reports*, 8, 2018

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Wataru AOKI, Haruki YOKOYAMA, Hidenori MATSUKURA, Mitsuyoshi UEDA, High-throughput Functional Annotation of the *Caenorhabditis elegans* Neural Network, ASBMB, 2017
2. 松倉 秀典, 横山 治樹, 青木 航, 植田 充美, ニューラルネットワークを網羅的かつハイスループットに解析する新規方法論, 生物工学会, 2017
3. 青木 航, 山内 悠至, 松倉 秀典, 万 沢夫, 橋本 崇志, 油屋 駿介, 植田 充美, 神経ネットワークの網羅的解析に向けた“functional cellomics”の開発, 分子生物学会, 2017
4. 青木 航, 神経ネットワーク機能の網羅的解析を目指したバイアスフリーオプトジェネティクスの開発, 細胞凝集研究会, 2018
5. 山内 悠至, 松倉 秀典, 青木 航, 植田 充美, ファンクショナルセロミクスによる神経ネットワークのハイスループットアノテーション, 生物工学会, 2018
6. Wataru Aoki, Cellomics approach for high-throughput functional annotation of *Caenorhabditis elegans* neural network, Max Planck Florida Institute-JST(PRESTO) Joint Workshop on Neuroscience and Single Cell Research, 2018
7. 松倉 秀典, 山内 悠至, 横山 治樹, 青木 航, 植田 充美, 機能的セロミクスを用いた線虫行動の解析, 分子生物学会, 2018
8. 山内悠至, 松倉秀典, 横山治樹, 青木 航, 植田充美, 線虫神経ネットワークのハイスループットアノテーション法の開発, 分子生物学会, 2018
9. 青木 航, 仮説フリーサイエンスの拡張による生命理解の高速化, 第 3 回生物機能開発研

研究所講演会, 2018

10. Wataru Aoki, Cellomics approach for high-throughput functional annotation of *Caenorhabditis elegans* neural network, 12th International workshop on approaches to single cell analysis, 2018

〔図書〕(計 2 件)

1. 青木 航, シーエムシー出版, AI 導入によるバイオテクノロジーの発展, 2018
2. 青木 航, シーエムシー出版, バイオイノベーションに向けて~バイオテクノロジーの新技术からの新しい視点~, 2019

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

5. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。