

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16191

研究課題名（和文）ヒルの鋭敏化学習におけるニューロン集団活動ダイナミクス生成の神経生理学的解明

研究課題名（英文）Neurophysiological mechanisms underlying population dynamics of sensitization learning in the leech nervous system

研究代表者

富菜 雄介（Tomina, Yusuke）

北海道大学・電子科学研究所・特任助教

研究者番号：70835959

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、「多数のニューロンによる活動が学習にどのように寄与するのか」という視点に立ち、その解析に有利なヒルの神経節を材料として、その神経ネットワークの動作原理の解明を目的とした。機械刺激に対する鋭敏化学習を対象に、独自開発した網羅的な膜電位イメージング法（神経活動を蛍光シグナルとして捉える方法）を適用することで、モノアミン含有ニューロンの他、多数の細胞との相関が明らかとなった。また、多種類の機械感覚系の共通の出力先となるニューロン群を同様の手法で探索し、その統合過程について示唆的な結果を得た。さらに、シナプスの生理学・解剖学的情報を統一的に理解するための機能的コネクトームデータを取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒル神経節に網羅的な膜電位イメージングという新規に開発したアプローチを実行することで、少数ニューロン系においても、学習成立時に特定の細胞集団が特定のパターンで活動するという知見を得た。これは、多数のニューロン集団の活動ダイナミクスそのものが学習に重要な役割を果たすという視点を支持する。また、行動時の神経活動とシナプス接続の情報を同一の全体神経節から得るという革新的アプローチにより、線虫やショウジョウバエといったモデル動物でも成し得なかった機能的コネクトームデータを取得した。本成果は、シナプスから神経回路、脳から行動という異なる階層レベルを統合的に理解するうえで極めて重要な知見を提供する。

研究成果の概要（英文）：In this study, based on the viewpoint of "how activity by a large number of neurons contributes to learning," we aimed to elucidate the operating principles of the neural network using leech ganglion. By applying our newly developed comprehensive membrane potential imaging method to sensitization learning to mechanical stimuli, we were able to clarify the correlation between monoamine-containing neurons and a large number of cells. In addition, we developed an original method for correcting artifacts caused by small movements during imaging, and applied this method to obtain good image processing results. A related study of the functional connectome of the leech ganglion was published in the renowned international journal eLife.

研究分野：神経行動学

キーワード：膜電位イメージング 鋭敏化 機械感覚 コネクトーム 神経生理学 環形動物 ニューロン モノアミン

### 1. 研究開始当初の背景

鋭敏化や条件づけといった学習行動は、神経系を発達させた動物において幅広く共有される適応的行動である。学習過程における神経基盤の従来の中心テーマは、シナプス可塑性(シナプス接続の特性が変化する性質)の分子機構であった(Kandel et al., 2014)。一方で、多数のニューロン集団の活動ダイナミクスそのものが学習に重要な役割を果たすことが近年の実験・理論的研究により主張されてきた(Chaudhuri & Fiete, 2016)。こうした知見は「学習におけるニューロン集団活動ダイナミクスの役割」という見地に基づいた研究の急迫の必要性を示している。本研究の学術的問いは、中枢神経系においてネットワークを構成する多数のニューロン集団の活動ダイナミクスが学習行動においてどのように形成されるかというものである。

### 2. 研究の目的

本研究では、「学習行動に関与する神経集団活動のダイナミクス」という視点に基づき、神経回路網レベルでの解析において類似希な有利性をもつヒルを用いて、短期記憶性の鋭敏化学習(弱い刺激に対して弱い応答をしていたものが、強い刺激を与えた後、弱い刺激を与えると強い応答を示すという非連合学習)において観察される体節神経節内のニューロン集団ダイナミクスの発現機構の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) ヒル神経節において、圧感覚ニューロンへの電気刺激(テスト刺激)により局所湾曲反射を誘導し、その刺激の前後で侵害感覚ニューロンを刺激する(鋭敏化刺激)ことで、鋭敏化を誘導した。テスト刺激と鋭敏化刺激の前後で多数のニューロン活動の変化をモニターするために、独自開発した両側顕微鏡による網羅的な膜電位イメージング法を適用した(Tomina & Wagenaar, 2017)。両側顕微鏡は、正立顕微鏡と倒立顕微鏡を組み合わせたものであり、ヒル体節神経節の腹-背側表面にそれぞれ分布する2層の細胞体層に同時に焦点を合わせることが可能である。膜電位感受性色素 VoltageFluor を体節神経節にバスアプリケーションすることで、250-300個のニューロンから同時に神経活動計測が可能である。この手法により、鋭敏化刺激により賦活されるニューロンを網羅的な膜電位同時イメージング法により探索した。

(2) 鋭敏化シグナルの入力経路を推定するため、接触刺激、圧感覚刺激、侵害刺激のそれぞれについて、共通に賦活されるニューロン群を網羅的な膜電位イメージング法により探索した。単離したヒル神経節標本において、刺激提示は各タイプの機械感覚ニューロンを細胞内電極法により電気刺激した。0.5Hzの周波数で刺激提示を行い、この周波数で同期するニューロンをコヒーレンス解析により探索した。また、画像処理を行う過程で、モーションアーティファクト補正アルゴリズムの改良を行い、役立てた。

(3) 網羅的な膜電位イメージング(蛍光顕微鏡画像)と解剖学的コネクトーム(電子顕微鏡画像)を組み合わせることで、機能的コネクトームのデータセットを作成した。これにより、機械感覚入力最終的に収束する運動ニューロンのひとつDE3(Dorsal Excitator 3)について、神経突起におけるシナプス接続の空間分布と、膜電位イメージングによる神経生理学的な情報を統合した。手順としては、網羅的な膜電位イメージングを終えた標本をマイクロCTで撮像したのち、連続ブロック表面SEM法により、神経節全体から電子顕微鏡切片画像を得た。電子顕微鏡は切片1枚の厚さは50nmで合計9602枚、1ピクセルあたり5.5x5.5nmの解像度で撮影を行うことで、シナプスの同定まで可能となった。

### 4. 研究成果

(1) 各試行でテスト刺激を提示し(試行間インターバル3分間)各ニューロンの膜電位シグナル強度をプロットすると、毎回の鋭敏化刺激の直後において、多くのニューロンで短期的な応答上昇が認められた(図1)。電気生理学的にモニターした運動ニューロンの活動も同じタイミングで鋭敏化の応答を示しており、ニューロン集団の応答変化との相関性が認められた。応答変化を示したニューロンを可視化すると、モノアミン系ニューロン(Retzius cell, Leydig cell)の他、多くの介在ニューロンと運動ニューロンが活動上昇を示すことが明らかとなった(図2)。(未発表)

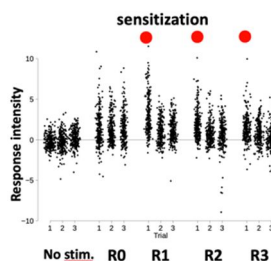


図1: 鋭敏化による短期的なニューロン集団の活動上昇(赤丸: 鋭敏化試行).

(2) 単離神経節標本を用いているが、神経節を取り囲む神経鞘には収縮性細胞があり、感覚ニューロンの刺激時にこれも刺激されて微小な振動が生じる。このイメージング時に生じたモーションアーティファクトを補正する方法を再検討し、画像処理のクオリティを向上させる結果を得た(未発表)。そして、接触感覚系、圧感覚系、侵害感覚系のそれぞれについて、網羅的膜電位応答のデータを取得し、これにコヒーレンス解析を適用し、応答マップを作成した(図3)。応答した同定ニューロンを感覚ニューロン、介在ニューロン、運動ニューロンのタイプ別に分類した。すると、3種類の機械感覚ニューロンからの入力、介在ニューロンの段階に比べて運動ニューロンのレベルで特に収斂の度合いが高いことが明らかとなった(図4)。つまり、介在ニューロンのレベルでは、機械感覚の種類に応じた独自経路の割合が高いが、最終的には多くの運動ニューロンに情報が集約される(未発表)。

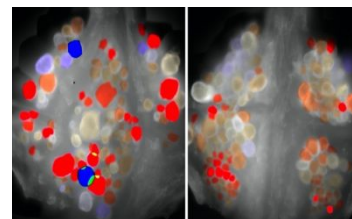


図2: 鋭敏化による短期的なニューロン集団の活動上昇。(赤:脱分極応答変化, 青:過分極応答変化)

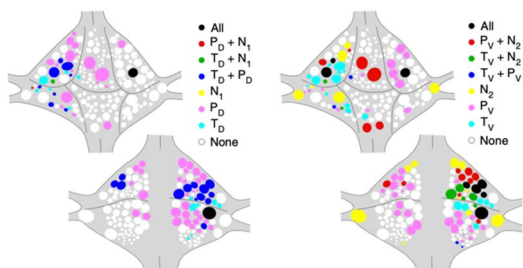


図3: 接触感覚(T), 圧感覚(P), 侵害感覚(N)の各種感覚経路の収束を示すニューロン応答マップ。

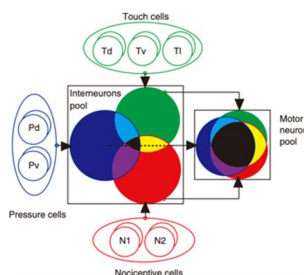


図4: 各種機械感覚系の共通入力経路. 介在ニューロンの段階に比べて、運動ニューロンの段階において重複度合いが高い。

(3) 圧感覚刺激による局所湾曲反射、遊泳、這行の各仮想行動の誘導中に網羅的膜電位イメージングを行い、その同一標本に対して連続 SEM 画像を取得し、DE3 運動ニューロンの全体像をフルトレースした(図5)。この神経突起に接続するシナプスを同定し、神経週末を逆的にトレースすることでどのニューロンが接続しているか同定した(図6)。DE3の神経突起上におけるシナプス集団の空間的なクラスターに着目して、解剖学・生理学的な特徴づけを行った。シナプスの空間情報と結びつける生理学的な情報としては、ニューロン同士の同期性の指標となるコヒーレンスを使用した。クラスター解析の結果、局所湾曲反射は試行間のばらつきが大きいため行動特異的なクラスターは見出せなかったが、遊泳と這行については試行間のばらつきが少なく、統計的に有意なクラスターを見いだせた。その結果、同じコネクトーム内でも、同期的な活動をするシナプスのクラスターは2つの行動でその空間的広がりが異なっていた。遊泳においては、這行よりも神経突起に沿ってより広い範囲に同期が広がっていた。(Ashaber, Tomina, Kassraian et al. 2021 eLife で公表済み)

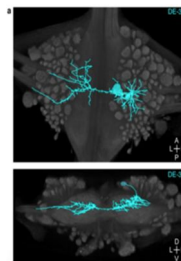


図5: 電子顕微鏡切片画像から再構築したDE3運動ニューロンの全体像。



図6: DE3にシナプス接続するニューロン集団。

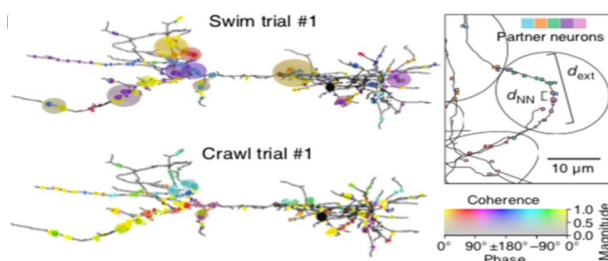


図7: 泳ぐ試行(上)と這行(下)の同期したシナプスに関連するクラスター。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ashaber Maria*, Tomina Yusuke*, Kassraian Pegah*, Bushong Eric A, Kristan William B, Ellisman Mark H, Wagenaar Daniel A	4. 巻 10
2. 論文標題 Anatomy and activity patterns in a multifunctional motor neuron and its surrounding circuits	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e61881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.61881	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Mria Ashaber, Yusuke Tomina, Pegah Kassraian-Fard, Eric A. Bushong, William B. Kristan Jr, Mark H. Ellisman, Daniel A. Wagenaar	4. 巻 2020.03.09
2. 論文標題 Combined membrane potential imaging and connectome of behavioral circuits in an annelid worm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.03.09.984013	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 富菜雄介、アシャパー・マリア、カスライアン・ペガ、ブッシュン・エリック、クリスタン・ビル、エリズマン・マーク、ワゲナー・ダニエル
2. 発表標題 新規の機能的コネクトーム法を用いたヒル中枢神経系における多様な行動を担う前運動ニューロン群のシナプス接続の解析
3. 学会等名 日本動物学会2020オンライン大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富菜雄介、アシャパー・マリア、カスライアン・ペガ、ブッシュン・エリック、クリスタン・ビル、エリズマン・マーク、ワゲナー・ダニエル
2. 発表標題 ヒル中枢神経系の多様な行動を担う運動ニューロンと前運動ニューロン群を対象とした機能的コネクトーム法による神経生理-解剖学的解析
3. 学会等名 日本動物学会北海道支部大会2021オンライン大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富菜雄介, 岡浩太郎, Daniel A. Wagenaar
2. 発表標題 多様な機械感覚刺激において動員されるヒル神経節のニューロン群: 網羅的イメージング法による機能的マッピング
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maria Ashaber, 富菜雄介, Eric A. Bushong, Pegah Kassraian-Fard, Tom Deerinck, Mark Ellisman, Daniel A. Wagenaar
2. 発表標題 Combined membrane potential imaging and connectome of behavioral circuits in the medicinal leech
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第41回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富菜雄介, 岡浩太郎, Daniel A. Wagenaar
2. 発表標題 網羅的膜電位イメージング法を用いた接触・圧・侵害感覚の生成 において動員されるヒル神経節ニューロン集団の機能的マッピング
3. 学会等名 第72回日本動物学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomina, Y., Oka, K., and Wagenaar, D. A.
2. 発表標題 Whole ganglion mapping for various types of mechanosensation in the leech nervous system using voltage-sensitive dye imaging
3. 学会等名 49rd annual meeting of the Society for Neuroscience. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ashaber, M., Tomina, Y., Bushong, E.A., Fard, P.K., Kim, K.Y. Deerinck, T., Elisman, M.H., and Wagenaar, D.A.
2. 発表標題 Form and function: Connectivity and activity maps of behavioral circuits in the medicinal leech.
3. 学会等名 49rd annual meeting of the Society for Neuroscience. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富菜雄介
2. 発表標題 網羅的膜電位イメージング- シリアルブロックSEM融合法による 神経回路網の生理-解剖学的研究
3. 学会等名 北海道大学電子科学研究所第4回オンライン研究交流会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富菜雄介
2. 発表標題 膜電位イメージング-コネクトーム融合法によるヒルの多機能性神経回路の生理・解剖学的解析
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会(オンライン米子開催)サテライトシンポジウム「K1 非モデル生物を材料とした神経行動学のイマとミライ」 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富菜雄介, Ashaber Maria, Kassraian Pegah, Bushong A Eric, Kristan B William, Elisman H Mark, Wagenaar A Daniel
2. 発表標題 機能的コネクトーム法によるヒルの多機能性運動神経回路の解析
3. 学会等名 第7回北海道大学・部局横断シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富菜雄介
2. 発表標題 網羅的膜電位イメージングによる環形動物の多機能性神経回路に関する生理学的研究
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第43回大会(第30回吉田奨励賞受賞者講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富菜雄介
2. 発表標題 Lessons from the Medicinal Leech: Correlated Voltage Imaging and Electron Microscopy for Functional Connectome
3. 学会等名 日本発生物学会第55回大会 (Workshop 2: Lessons from Non-Model organisms: For developmental biologists who only use model organisms) (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap <a href="https://researchmap.jp/lobster/presentations/edit">https://researchmap.jp/lobster/presentations/edit</a> Wagenaar lab <a href="http://www.danielwagenaar.net/">http://www.danielwagenaar.net/</a>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------