

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15205

研究課題名（和文）光機能性有機小分子による神経活動制御を活用した神経回路機能の解析

研究課題名（英文）Functional analysis of neural circuits using photofunctional organic small molecules for neural activity control

研究代表者

高橋 光規（Takahashi, Hironori）

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：30788922

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、線虫 *C. elegans* を用いて神経回路による行動制御メカニズムの解明を目的とした。ハイスループット神経活動測定法、全脳観察顕微鏡の開発を行い、浸透圧刺激からの回避行動を制御する神経回路機能にアプローチした。刺激を受容する感覚神経から下流の介在神経への情報伝達が、局所の神経回路活動により制御されること、個体の全脳活動により局所回路活動が決定され、刺激に対する行動応答が多様化することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、感覚情報の入力から動物の行動出力に至る情報伝達がフィードフォワードなものではなく、自発的脳活動と外部からの刺激情報が統合されて複雑に制御されていることを示し、神経科学に新しい知見を加えた。また、高解像度のライトフィールド顕微鏡の開発により、全脳活動取得のコストを減少させ、全脳活動を活用した研究への参入障壁を低下させることができる。これにより、全脳活動を調節する薬剤のスクリーニングや、神経疾患の全脳解析などへ発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the neural mechanism of behaviour control using the nematode *C. elegans*. We approached the circuit function of avoidance behaviour from osmotic stimuli by developing a high-throughput neural activity monitoring system and a microscope for whole-brain imaging. We elucidated that neuronal transmission from sensory neurons to downstream interneurons is regulated by local neural circuit activity, which is determined by global brain activity, resulting in diverse behavioural responses.

研究分野：神経生理学

キーワード：感覚情報処理 神経回路解析 Ca²⁺イメージング 線虫 全脳活動測定 ライトフィールド顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経活動と行動を結びつけ、神経回路がどのように行動を制御しているのかを理解することは、神経科学分野の重要な課題の1つである。線虫 *C. elegans* は、体が 1 mm と小さく、行動観察や蛍光イメージングが容易に行えることから、神経科学研究のモデル生物として広く用いられている。線虫は、前進運動により周囲を探索し、有害物質に遭遇すると後退運動・方向転換を行って回避する。これら一連の回避行動は、主に感覚神経 ASH、介在神経 AIB、RIM、AVA の 4 つの神経細胞により制御されると考えられている。しかし、介在神経細胞間の情報伝達については、様々な矛盾があり、結局この神経回路がどのように回避行動を制御しているかは明確に理解できていない。

このような神経回路機能の解析のため、蛍光 Ca^{2+} センサー-GCaMP を利用した光学的な神経活動の記録や、光によって開口するイオンチャネルを用いて神経活動を制御する光遺伝学などの手法が開発されてきた。線虫の神経回路がどのように回避行動を制御しているかを明らかにするためには、自由に動き回る線虫で神経活動・行動を同時に記録し、かつ、神経活動を制御する手法が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が開発した 580 nm という長波長光で使用可能なケージド化合物 KFL-cap を用いて、光による神経活動の制御・神経活動の光学記録・行動の記録の 3 つすべてを同時に行う手法の開発を目指す。また、この手法を用いて、線虫の回避行動と神経活動がどのように対応しているか明らかにすることで、神経回路による行動制御のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

研究開始当初の計画では、次の 3 つの研究方法を設定した。

(1) 実験系の確立：線虫を顕微鏡視野に留めるためマイクロ流体装置を活用し、神経細胞に発現した Ca^{2+} センサー-GCaMP の蛍光観察を行う。KFL-cap で神経細胞を活性化し、神経活動と行動を同時記録する。

(2) 神経活動と回避行動の対応付け：感覚神経 ASH を KFL-cap で活性化しながら介在神経 RIM の活動を記録し、RIM の活動と回避行動の対応関係を取得する。

(3) 神経回路の情報伝達経路の決定：介在神経 AIB、RIM、AVA の情報伝達において、前者の細胞を KFL-cap で活性化し、後者の活動を GCaMP で観察することで、情報伝達が興奮性が抑制性を決定する。

しかし、(1) 実験系の確立段階で、広視野を高輝度で観察できるマクロ蛍光顕微鏡を開発し、ASH、AIB の情報伝達を調べたところ、従来想定されていたフィードフォワードな神経情報伝達とは異なる神経回路の動作機構が示唆された。そこで、下記のように研究方法を修正した。

(1) ハイスループット神経活動測定システムの確立：マクロ蛍光顕微鏡により広視野・高輝度の蛍光観察を行い、複数個体から神経活動をハイスループットに取得する。

(2) 神経伝達の障害による情報伝達様式の解明：介在神経 AIB に接続する神経細胞からの神経伝達を破傷風毒素 TeTx で障害し、感覚神経刺激時の AIB 応答変化を取得する。

(3) 全脳活動取得による神経回路動作機構の解明：高解像度ライトフィールド顕微鏡の開発により、全脳神経活動を取得し、情報伝達機構を解明する。

4. 研究成果

(1) ハイスループット神経活動測定システムの確立

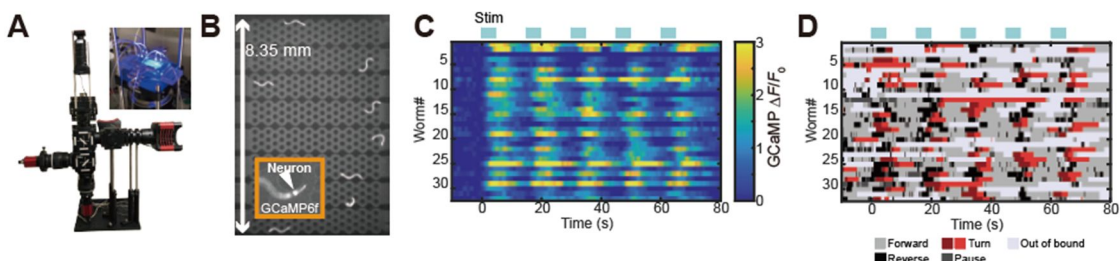


図1 (A) 開発したマクロ蛍光顕微鏡。(B) マイクロ流体装置中の線虫の蛍光像。(C) 感覚神経 ASH の浸透圧刺激に対する応答。(D) 浸透圧刺激に対する行動応答。

広視野を高輝度で観察するため、大口径レンズを 2 つ組み合わせたタンデムレンズ方式のマクロ蛍光顕微鏡を開発した(図 1A)。動き回る線虫を顕微鏡視野に留めるため、内部で線虫が自由に動くことができ、液性の感覚刺激を与えることができるマイクロ流体装置を作製した(図 1B)。感覚神経 ASH に Ca^{2+} センサー-GCaMP6f を発現した線虫株を作製し、この顕微鏡システムを用いて浸透圧刺激を与え、ASH の活動と線虫行動を動画撮影した。取得した動画は、数値解析言

語 MATLAB で作製したカスタムスクリプトによって解析し、神経細胞位置の追跡と、線虫の姿勢・移動方向・移動速度の抽出による行動分類を行った。刺激に対する ASH の活性化 (図 1C) と刺激に対する行動応答 (図 1D) を、複数個体からハイスループットに取得する観察システムの確立に成功した。

(2) 神経伝達の障害による情報伝達様式の解明

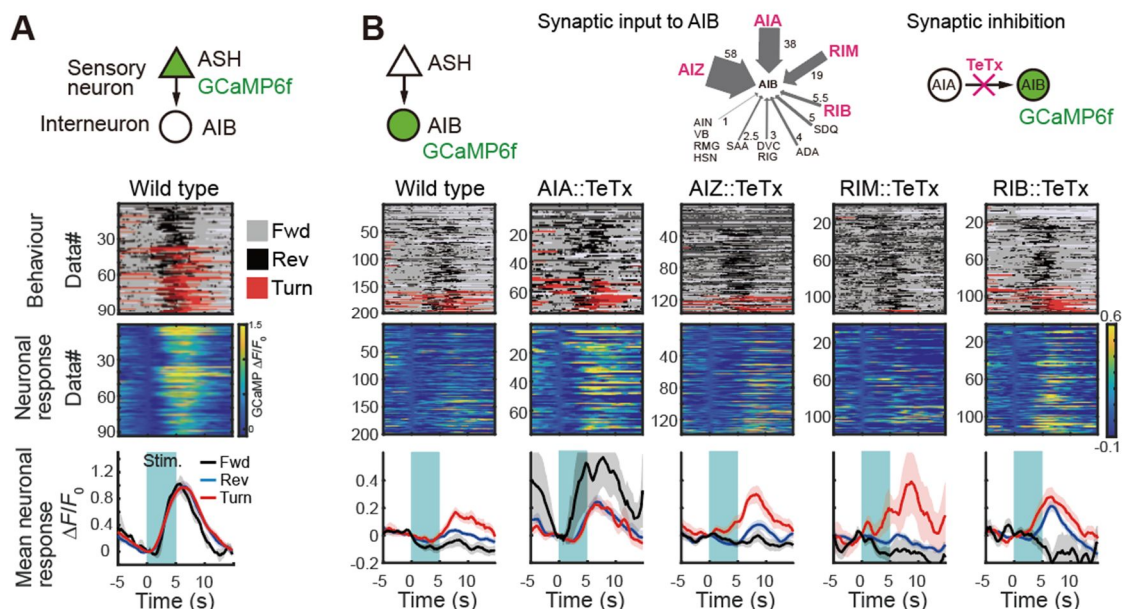


図 2 (A) 上段：浸透圧刺激への行動応答，中段：感覚神経 ASH の応答，下段：行動応答により分類した神経応答の平均値。(B) 介在神経 AIB の活動と行動応答を同時に記録。介在神経 AIZ, AIA, RIM, RIB のそれぞれに、シナプス伝達を阻害する TeTx を発現させた線虫株で AIB 応答を取得。

ハイスループット神経活動測定システムを用いて、浸透圧刺激に対する感覚神経 ASH の応答を取得し、行動応答ごとに分類した。線虫は、浸透圧刺激に対し、前進、もしくは、後退・方向転換の回避行動を行う。ASH の応答は、行動応答の種類によらず一定であることが明らかになった (図 2A)。一方、ASH の下流にある介在神経 AIB について、刺激への応答を取得すると、方向転換、後退、前進の順に AIB 応答は小さく、ばらつくことが明らかになった (図 2B)。これは、ASH からの入力があるのに、すぐ下流の AIB の応答はばらつくということであり、従来のフィードフォワードな神経伝達では説明ができない。そこで、線虫のコネクトームデータベースを活用して、AIB へのシナプス接続が多い上位 4 つの細胞 AIZ, AIA, RIM, RIB に着目した。これらの細胞に、シナプス伝達を阻害する TeTx を発現させ、刺激への AIB の応答を取得した (図 2B)。

これらのデータを分析するため、まず、AIB の神経応答について、刺激開始から応答開始までの遅延時間、神経応答の上昇時間、下降時間を算出した (図 3A)。AIA からのシナプス伝達を阻害すると、AIB の応答は、遅延が小さくなり、活動上昇の時間が延長した (図 3B, C)。一方、RIM からのシナプス伝達を阻害すると、AIB 活動の下降時間が延長した (図 3D)。RIB からのシナプス伝達を阻害すると、活動の上昇時間および下降時間の両方が延長した。AIZ からのシナプス伝達を阻害した場合は、シナプス接続の多さにもかかわらず、AIB 応答に変化は見られなかった (図 3B-D)。これらを総合すると、AIA と RIB は、AIB 応答を抑制する働きがあり、RIM は AIB 応答を活性化する働きがあることが明らかになった。

さらに、AIB の応答がどの程度ばらつくかを可視化するため、AIB の神経応答データについて相関値を計算した (図 3E)。AIB 応答のばらつきが小さいと相関値は 1 に近づき、ばらつきが大きいと相関値は 0 に近づく。AIA, RIM, RIB それぞれを阻害すると、野生型と比較して AIB の応答はばらつきが少なくなった。ゆえに、これらの介在神経からのシナプス伝達により、AIB の応答はばらつきが大きくなる仕組みがあることが明らかになった。

行動応答の割合について、AIA を抑制すると AIB が活性化しやすくなり方向転換の割合は増加した (図 3F)。一方、RIM を抑制すると、AIB は活性化しにくくなり、方向転換の割合が減少した (図 3F)。以上から、AIB に接続する神経細胞の活動状態のフィードバックを受けて、ASH-AIB の伝達効率が制御されるという従来のフィードフォワードな伝達概念を一新する結果が得られた。

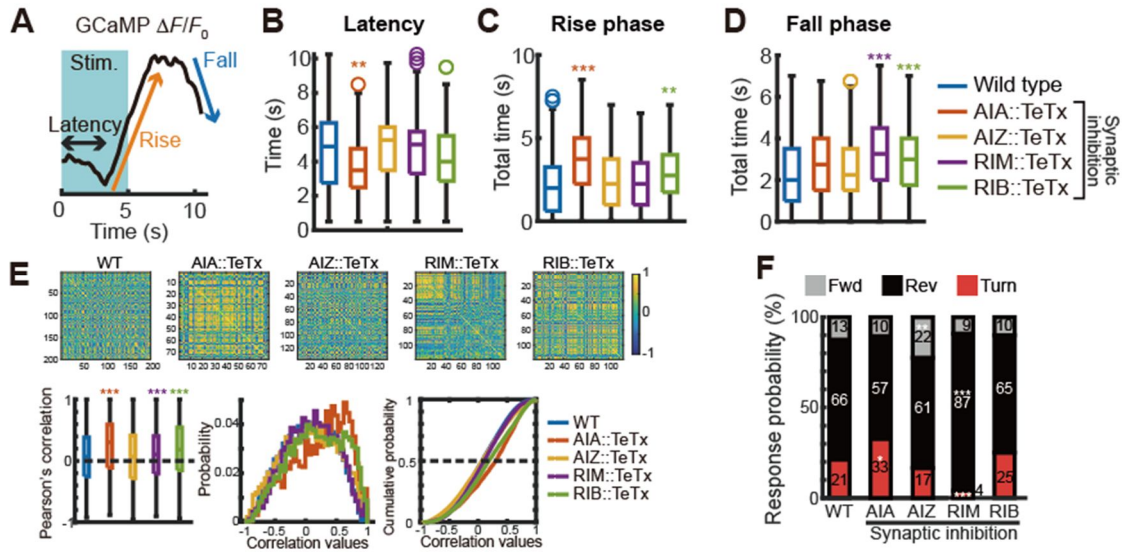


図3 (A) 神経活動の分析法。(B-D) 図2の介在神経 AIB の応答を分析。(E) AIB 応答の相関値を計算。(F) 行動応答割合の比較。

(3) 全脳活動取得による神経回路動作機構の解明

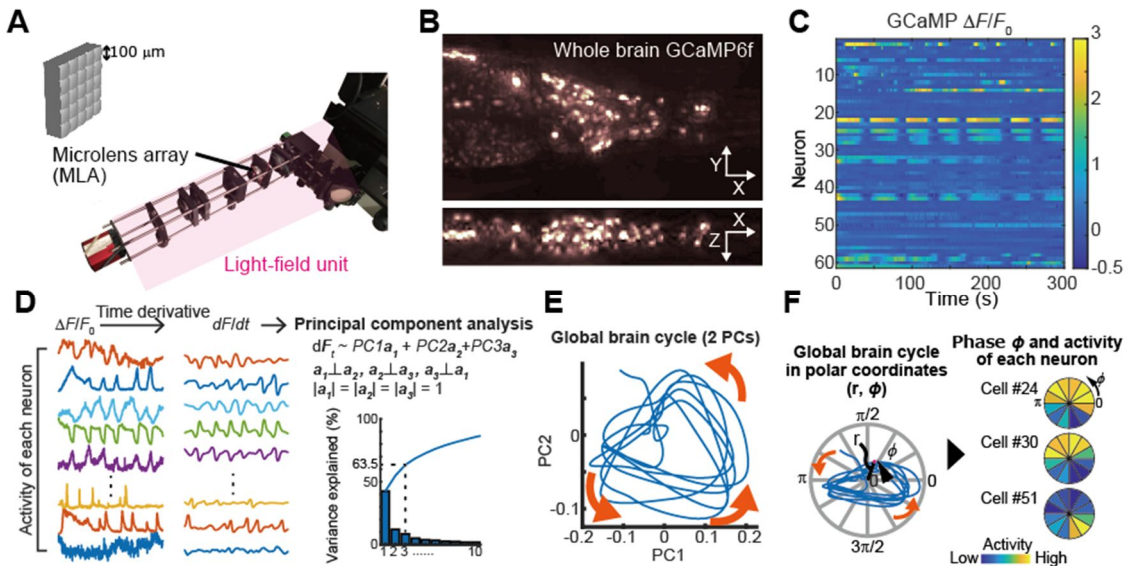


図4 (A) ライトフィールド顕微鏡の光学系。(B) 取得した線虫の全脳画像。(C) 全脳画像から取得した神経活動をカラーマップ表示。(D) 全脳神経活動を時間微分し、主成分分析によって次元削減。(E) 主成分分析で3つのパラメータに次元削減し、最初の2つの主成分の時間変化をプロット。全脳活動は、低次元空間で周回性の軌道を描く。(F) 各神経細胞の活動を、全脳周回軌道の位相に対してプロット。細胞毎に活性化する位相が異なる。

刺激に対する AIB の応答は、AIB に接続する神経回路の活動状態に依存して制御されることが示唆された。しかし、個体全体の神経活動は、複数の回路が相互作用する複雑なシステムであり、特定の回路だけに着目しても神経活動による行動制御の全体像を知ることはできないと思われる。そのため、線虫全脳を観察し、すべての神経細胞の活動を取得して行動制御の機構を明らかにする必要がある。そこで、微小レンズが並列された光学素子・マイクロレンズアレイを顕微鏡光路に挿入することで、カメラに入射する光の角度情報を取得できるライトフィールド顕微鏡を独自に組み立てた(図4A)。ライトフィールド顕微鏡では、観察試料から発する光の角度情報を用いることで試料の3次元復元が可能である。本研究では、ガルバノミラーによる微小な画像変位を行い、サンプリング数を増やすことで高解像度な3次元復元を実現した。これにより、従来のライトフィールド顕微鏡と比較して、線虫全脳撮影の解像度が向上し、1細胞を見分けられるようになった(図4B)。

この高解像度ライトフィールド顕微鏡を用いて、GCaMP6f を全神経細胞に発現した線虫株を観察し、自発的な全脳活動を記録した。各神経細胞を追跡し、神経活動の時間変化を取得した(図

4C). この神経活動データは、約 60 個の細胞からなる高次元時系列データであり、次元削減を行うことで全脳活動の特徴抽出を試みた。取得した神経活動を時間微分し、主成分分析によってパラメータを 3 つに削減した (図 4D)。このうち、最初の 2 つの主成分について、その時間変化をプロットすると、全脳活動は周回性の軌道を描いた (図 4E)。これは、全脳活動が一定の規則に従って周期変化することを意味する。さらに、この周回軌道が円上にあるとみなして、原点からの距離と角度によって表すと、全脳活動の状態をこの角度を位相として表すことができる。各神経細胞の活動を、この全脳活動の位相に対してプロットすると、細胞毎に活動が高い位相を可視化することができた (図 4F)。

これらの結果から、各神経細胞は、全脳活動の特定の位相に同期しながら、自発的に活動を変化させていることが明らかになった。すなわち、(2) で特定した AIB を制御する AIA, RIM, RIB についても、全脳活動の位相と同期した活動変化があり、刺激入力タイミングに応じて AIB の活動が決定され、行動が出力されるという制御機構が示唆された。これは、従来の感覚神経から運動神経までフィードフォワードに情報が伝達されるという神経伝達様式とは異なり、個体内部の神経活動状態と外部刺激が統合して神経応答が決まるという新しい行動制御機構である。

従来、線虫全脳観察は、スピニングディスク共焦点顕微鏡や 2 光子顕微鏡といった高額な機器が必要であった。本研究で開発した高解像度ライトフィールド顕微鏡は、それらの顕微鏡の 20 分の 1 程度の費用で全脳観察を可能にする。これにより、研究コストを大幅に減少させ、全脳観察研究への参入を容易にすることで神経科学分野の発展に寄与する。

今後の展望として、取得した全脳観察データにおいて、各神経細胞の同定を行い、AIA, AIB, RIM, RIB の局所神経回路の活動と、全脳活動が具体的にどのような制御関係で結ばれるのかを明らかにしていく。また、光遺伝学を活用し、全脳活動に介入する技術開発を進め、神経回路による行動制御機構をより詳細に明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 高橋光規、小田賢幸 |
| 2. 発表標題 浸透圧刺激に対する応答多様化機構の解明 |
| 3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2023 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 高橋光規 |
| 2. 発表標題 神経活動イメージングのための顕微鏡開発 |
| 3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2023 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 高橋光規、小田賢幸 |
| 2. 発表標題 神経活動イメージング法の開発による感覚処理機構の解明 |
| 3. 学会等名 第32回日本バイオイメーjing学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高橋光規、小田賢幸 |
| 2. 発表標題 高時空間分解能4Dイメージングによる線虫全脳活動の取得 |
| 3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 高橋光規, 小田賢幸 |
| 2. 発表標題 高時空間分解能4Dイメージングによる線虫全脳活動計測 |
| 3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高橋光規 |
| 2. 発表標題 High-throughput system for simultaneous monitoring of neural activity and behaviour |
| 3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2022 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高橋光規 |
| 2. 発表標題 ハイスループットイメージングによる行動多様化機構の解明 |
| 3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高橋光規 |
| 2. 発表標題 Neural and behavioral control by a yellow-light-activatable caged compound |
| 3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2021 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| 産業財産権の名称 切片作成装置および支持部材 | 発明者 高橋光規, 山崎佳夫, 北條雅史 | 権利者 株式会社シンテック, 国立大学法人山梨大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2022-084649 | 出願年 2022年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|