

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650062

研究課題名（和文） 線虫神経ネットワーク動態を調べるための新規包括的研究手法

研究課題名（英文） Comprehensive approaches for investigating the neural network dynamics in *C. elegans*

研究代表者

岡 浩太郎 (OKA KOTARO)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：10276412

研究成果の概要（和文）：

線虫の行動と神経細胞応答との関係を明らかにするために、マイクロ流体デバイスと種々の蛍光タンパク質を併用した包括的な線虫神経ネットワーク解析のためのツールを作製し、実際にそれらのツールの有用性を調べた。その結果下記のような成果を得た。

- (1)線虫周囲の環境を厳密に制御し、また同時に線虫運動を精細に解析するためのデバイスとソフトウェアを開発した。
- (2)タンパク質型カルシウムセンサーおよび膜電位感受性センサーを線虫介在神経細胞 AIY に導入し、マクロデバイス中で匂い刺激に対する神経細胞応答を可視化することに成功した。また活性酸素種を発生する Killerred タンパク質を用いて、特定神経細胞を破壊する系を作ること成功した。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a new technique for investigating the neural circuit and neurons comprehensively with micro-fluid devices and fluorescent proteins. Our main outcomes and results are followings.

- (1)We developed specific micro-fluid devices for controlling the microenvironment around the worm precisely, and also developed a software for analyzing the behavior of the head region of the worm.
- (2)We succeeded to visualize the neural activity with fluorescent-based Ca sensor and also membrane potential sensor during odorant stimulation in the micro-fluidic devices. We also succeeded to selectively eliminate the specific neurons with Killerred, that produces reactive oxygen species (ROS) during green light illumination.

The combination of these techniques enable us to investigate the relationships between the neuronal activities and behaviors in detail and comprehensively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野：システム生物学

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：生体情報

1. 研究開始当初の背景

線虫を研究材料に用いて、「神経—行動」の相関を明らかにしようとする研究は、例えば特定神経細胞を線虫幼若期に破壊することにより行動がどのように変遷するかを調べることにより明らかにされてきた（例えば Chalfie ら 1995）。また最近では神経機能に変異を生じている種々の線虫を実験材料に用い、定量的な行動観察から行動変異に関する神経機能を包括的に明らかにする試みが報告されていきている（例えば Gray et al. 2005）。一方で我々は特定神経細胞を顕微鏡観察下で破壊除去する実験技術を開発し、それにより直接神経—行動相関を明らかにすることを進めてきた（小林他、投稿準備中）。また我々の研究室では、細胞内カルシウムを含む複数のセカンドメッセンジャーを可視化するための技術の開発も行っており、最近では心筋細胞などの大変形を行う単一細胞から複数のセカンドメッセンジャー情報を可視化する技術の開発に成功している（Niino et al. PLoS ONE, 2009）。また最近では光により神経細胞を興奮・抑制させることが可能な技術の開発が進められてきており、線虫においても筋収縮等を光でコントロールする研究が報告されている（例えば Zhang et al. 2007）。これらの先行研究の成果から、光による神経細胞機能の興奮・抑制を制御するとともに、特定神経細胞の興奮状態を包括的に研究するための準備が整いつつあるものと考え、これら光による制御・計測技術をマイクロデバイスによる定量的な刺激添加方法を併用した、神経機能を包括的に調査するための研究手法の提案に至った。

2. 研究の目的

線虫の神経回路と行動との関係について包括的に調べることを目的として、種々の蛍光タンパク質を特定の神経細胞または神経細胞群に発現させ、光により神経細胞機能を「制御・計測する」新規な実験系を提案する。このような実験系を構築するために紫外線硬化性樹脂による計測系をデザイン・作製し、その装置内に特定神経細胞に蛍光タンパク質を発現させた組み換え線虫を導入し、種々の匂い刺激を与えた状態下で特定の神経細胞機能を亢進・抑制させたときの神経回路動態を調べる。これにより Reading the mind of a worm 研究を推進するのに有効なツールの開発を進める。

3. 研究の方法

(1) 線虫の行動を高精度に計測するための新規なマイクロデバイスの開発

線虫を光刺激するだけであるのならば線虫を特定デバイス中に固定することなく、シ

ャーレ上で行動観察することが可能であるが、本提案研究のように光計測により線虫神経細胞動態を観察する場合には線虫の動きを抑制する必要がある。そのため光硬化性樹脂を利用したマイクロデバイスを作製し、線虫をその中に固定することを試みた。具体的な作成手順を図1に示す。

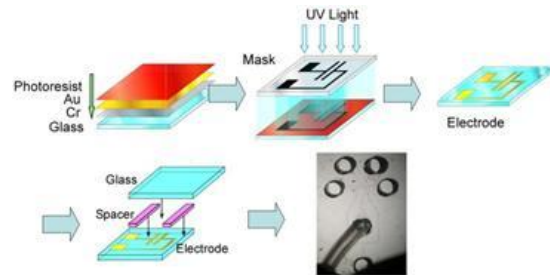


図1 マイクロデバイスの作製方法の概略

(2) 蛍光タンパク質を利用した特定神経細胞機能の改変と匂い刺激に伴う特定神経細胞応答の光学計測系の確立

特定の線虫神経細胞に種々の光制御・光計測タンパク質を導入する必要がある。このようなタンパク質の候補としては、細胞内カルシウムイオン計測タンパク質 (Cameleon, GCamp とその蛍光波長が異なる変異体)、cAMP 計測タンパク質、cGMP 計測用タンパク質、活性酸素種を光により発生するタンパク質 (KillerRed)、光感受性陽イオンチャネル (バクテリオロドプシン)、塩素イオンポンプ (ハロロドプシン) を発現させて神経興奮を誘引・抑制させる膜タンパク質等が考えられる。これらの細胞とタンパク質の掛け算の数だけプラスミドを調製し、線虫にマイクロインジェクションし、計測可能な蛍光タンパク質導入線虫の作製を試みた。

また上記 (1) で開発したデバイス中で作製した線虫を可視化または神経機能を改変させたときの神経細胞応答を計測した。

4. 研究成果

(1) 線虫の行動を高精度に計測するための新規なマイクロデバイスの開発

線虫行動を高い分解能で解析するための新規なマイクロ流体デバイスを開発することに成功した (図2)。このデバイスは線虫の腹側と背側に異なる種類の溶液 (図2中では濃淡で示してある) を層流として導入することができる。これにより異なる2種類の溶液に対する線虫の嗜好性を調べることが可能となった。このデバイスを開発するにあたり、最も難しかった点は、線虫尾部を安定してデバイス中に固定するためのデバイス幅の条件決めであった。またこのデバイスは流路を切り替えることにより、迅速に線虫周囲の環境を変えることができる。

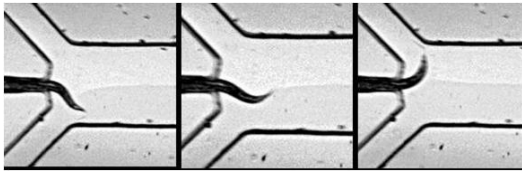


図2 マイクロ流体デバイス中に固定された線虫の動き

またこのデバイス中での線虫行動を定量評価するためのソフトウェアを開発した。具体的には、連続取得した線虫画像を二値化処理することにより、線虫輪郭線を抽出し、頭部から等間隔に10点を選んで、その点の座標を経時的に計測することが可能であるようにした(図3)。

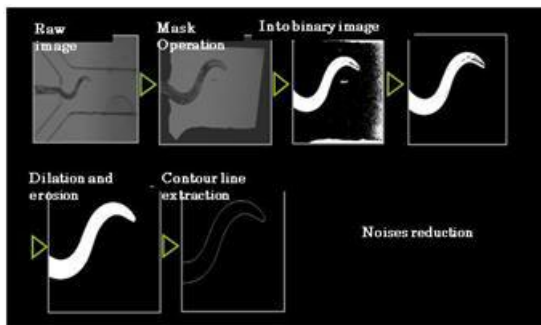


図3 マイクロデバイス中の線虫行動定量化のための画像処理手順

最終的にはこの線虫のデバイス中の動きを自動定量した(図4)。この図では、線虫頭部から連続した進行波が尾部方向に移動する様を解析した例を示す。このように、従来は困難であった線虫の微細な行動を、その周囲環境を自由に制御しながら解析することが可能な系を開発することに成功した。

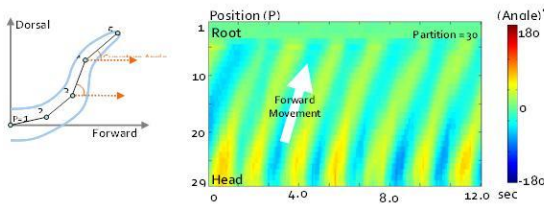


図4 線虫頭部のモデル(左)と線虫頭部の角度変化の時系列を解析した一例(右)

(2) 蛍光タンパク質を利用した特定神経細胞機能の改変と匂い刺激に伴う特定神経細胞応答の光学計測系の確立

Killerred を介在神経細胞 AIY に発現させて、緑色光を照射したところ、2 時間半程の光照射によって神経細胞を破壊できることを確認した。この実験では、GFP と Killerred を AIY に共発現させることにより、Killerred の褪色と神経軸索が崩壊して様子を観察した(図5)。

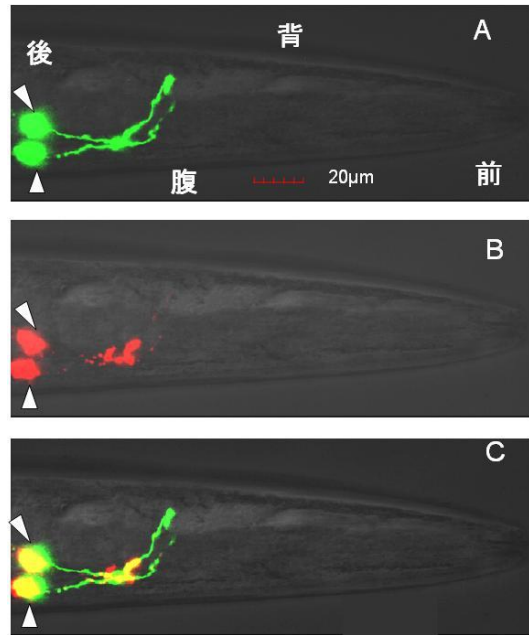


図5 緑色光照射による介在神経細胞 AIY の破壊の様子 緑は GFP, 赤は Killerred の蛍光をそれぞれ示している。2 時間半の光照射により神経線維は破壊されて消失する。A は GFP のみ、B は Killerred のみ、C は両者をマージさせたものである。

またこの AIY を破壊した線虫においては、短期感覚順応の消失を阻害することができた。このことは変異型線虫を用いた先行研究の結果とも一致しており、本手法が線虫における神経と行動との相関を調べる上で有力であることを示している。

また上記①で作製したようなマイクロデバイス中で匂い刺激に対する AIY 神経細胞の応答を、蛍光タンパク質 Cameleon を用いてイメージングすることに成功した(図6)。

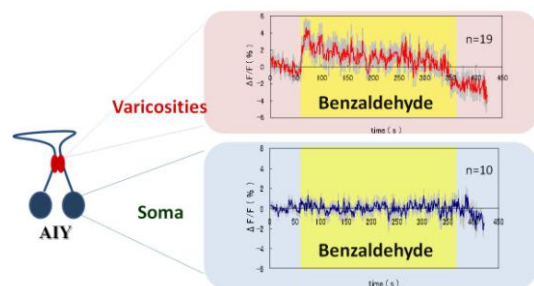


図6 Cameleon による AIY 神経細胞のカルシウムイメージングの1例 ベンズアルデヒドで匂い刺激を行うと、バリコシティ部位で振動しながら減衰するようなカルシウム応答を計測することができた。また一方で同じ刺激であっても細胞体では顕著なカルシウム応答は観察できなかった。

このカルシウム応答は興味深いことに神経線維状のバリコシティでは顕著であった

が、細胞体ではまったく見られなかった。またバリコシティでは振動しながら徐々に匂い刺激の最中に減衰するような応答が見られた。このような応答は先行研究で報告されている他の線虫神経細胞応答と大きくことなっていた。

そこで線虫神経細胞応答をより直接的に調べる方法として、AIY 神経細胞に膜電位に依存して蛍光強度を変化させる蛍光タンパク質型センサーを導入することにより調べることを試みた。蛍光タンパク質にはいまま線虫に用いられた実績のない VSFP2.42 を用いた。この蛍光タンパク質は膜電位に依存して蛍光共鳴エネルギー移動を起こす (図7を参照)。

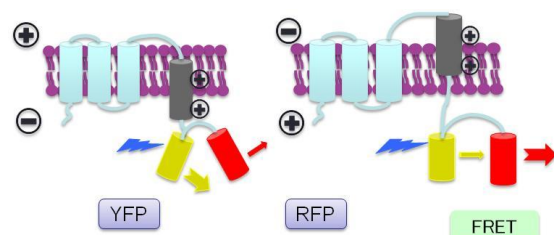


図7 VSFP2.42 による膜電位計測の原理

このセンサーを AIY 神経細胞に発現させたところ、その発現の度合いにばらつきがあった。また細胞内局在を調べたところ、本来細胞膜への局在が期待されるセンサーであるはずのものが、細胞質へ移行しているものが見られた。そこで細胞膜局在が顕著である線虫のみを選び、マイクロデバイス中でイソamilアルコールを嗅がせた際の膜電位応答を附バリコシティと細胞体で計測することを試みた (図8)。

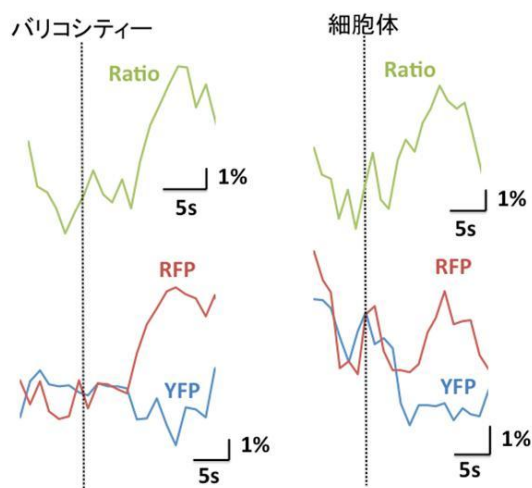


図8 イソamilアルコールで刺激した際の AIY 介在神経細胞における膜電位の変動ノイズはあるものの、バリコシティと細胞体の双方で RFP 由来の蛍光強度の増大と YFP 蛍光の減少が刺激に対応して観察された。この

ことは VSFP2.42 で適切に膜電位計測ができたことを示している。

以上の結果から、線虫神経細胞において初めて膜電位の蛍光イメージングに我々は成功したものと考えている。またカルシウムイメージングの結果と比較して興味深いのは、バリコシティだけでなく、細胞体でも膜電位変化は観察できた点である。このことは、細胞体の体積が大きいために、細胞体での相対的なカルシウム濃度上昇は小さく、神経細胞が興奮していてもその応答を計測することは Cameleon を用いたカルシウムイメージングでは難しいという可能性を示している。そのため今後はより感度の高いカルシウムセンサーで調べる必要があるものと思われる。

以上要するに本研究では、線虫周囲の微小領域環境を適切に制御するためのマイクロデバイス技術の開発に成功した。このデバイス中で特定神経細胞の機能破壊およびカルシウム応答または膜電位応答が計測可能であること示すことに成功した。これらの技術はモデル生物線虫において、神経と行動との相関を調べるための強力なツールとなるものと期待される。

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)

[学会発表] (計4件)

- ① T. NIKAI, J. KOBAYASHI, Y. OHNO, K. HOTTA, K. OKA, "Artificial odor adaptation of awc bypassing gpcr using 8-br-camp for c.elegans", Society for Neuroscience 41th annual meeting, 2011.11.13, Washington, USA.
- ② 二階達哉, 小林純也, 大野陽平, 堀田耕司, 岡浩太郎, "8-br-cGMP を用いた GPCR バイパスによる線虫 AWC 嗅覚神経の慣れ", 第34回日本神経科学大会, 2011.9.17, パシフィコ横浜 (神奈川) .
- ③ J. KOBAYASHI, K. OKUDA, K. HOTTA, K. OKA, "In vivo calcium imaging of AIY interneuron related to early adaptation in C. elegans", Society for Neuroscience 40h annual meeting, 2010.11.7, San Diego, USA.
- ④ 小林純也, 森澤勇馬, 川上真季, 棚橋裕太, 堀田耕司, 岡浩太郎, 蛍光タンパク質 KillerRed を用いた線虫神経細胞の新規選択的破壊法の確立, 第19回日本バイオイメージング学会学術集会, 2010.9.9, 慶應義塾大学 (神奈川)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 浩太郎 (OKA KOTARO)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：10276412

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし