

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19479

研究課題名（和文）膨張試料顕微鏡法と全脳カルシウムイメージングの統合による神経回路動態の包括的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analyses of neural circuit dynamics by integration of expansion microscopy and whole-brain calcium imaging

研究代表者

能瀬 聡直（Nose, Akinao）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：30260037

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）：本研究では光学顕微鏡で比較的簡便に組織の微細構造を解析できる膨張試料顕微鏡法を用いて、神経細胞の「活動」に関する情報と「構造」に関する情報を統合することを目的とした。このため、幼虫中枢神経系に膨張試料顕微鏡法を適用し、100 nm程度の分解能を達成し、全神経細胞を染色したサンプルから単一の軸索・シナプスの構造を撮影することを可能とした。さらに、光変換カルシウムセンサーCaMPAR12と組み合わせることで、神経系の微細構造と活動強度を関連づけることが可能となった。以上の研究により、膨張試料顕微鏡法を用いて構造と神経活動を関連づける基盤を構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経回路を細胞レベルで解析することは、特に遺伝学的手法の開発が進んだモデル動物では重要な研究戦略であるが、神経細胞の数に比して良い遺伝子マーカーの数が少ないため、遺伝学的ラベリングができない細胞が生じ、それらはどうしても解析から漏れてしまう。本研究で開発した膨張試料顕微鏡法を用いた手法は、遺伝子マーカーの有無によらず神経細胞を効率良く同定することを可能とすることで、神経活動パターン解析の自由度を大きく高めるであろう。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to integrate information regarding the “activity” and “structure” of neurons by using expansion microscopy which enables visualization of fine structures of neuronal tissues at the light level. We applied expansion microscopy to the central nervous system of *Drosophila* larvae, realized ~400nm resolution, and succeeded in visualizing the structures of individual axons and synapses in pan-neuronally stained samples. Furthermore, by combining with the photo-convertible calcium sensor CaMPAR12, we succeeded in linking data of neural activity to those of neuronal fine structures. Taken together, we used expansion microscopy to establish an experimental system which integrates information regarding the “activity” and “structure” of neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：ショウジョウバエ 膨張顕微鏡 カルシウムイメージング コネクトーム 神経回路

1. 研究開始当初の背景

神経回路上で、どのように情報が伝播して脳機能を生み出すのかは、神経科学における根本問題である。この問題に挑むためには、「脳全体の神経回路がどのように配線されているのかを決定」するとともに、「脳全体の神経活動を細胞レベルの解像度で記録」し、得られた結果を統合して解釈することが重要である。前者について、電子顕微鏡画像の3次元再構築技術の進展により、従来線虫においてのみ可能であったコネクトミクス解析が、ショウジョウバエやゼブラフィッシュなどのより複雑な脳神経系において実現しつつある。一方、後者についても Ca^{2+} イメージングを用い、線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュにおいて全脳レベルの神経活動記録が報告されている。しかし、神経系全体の活動データとコネクトームの回路情報を統合して解釈することはいまだ実現されていない。その要因として、光学顕微鏡レベルで行われる全脳 Ca^{2+} イメージングにおいては神経突起などの微細構造を捉えることができないため、その形態特徴に基づきコネクトームデータ内の細胞と照らし合わせることに難しいことがある。通常、コネクトミクス解析と活動イメージングは別の個体において行われており、細胞体の位置などに個体差があるため、形態特徴に関する情報なしでは両者における細胞のマッチングは困難である。この問題を解決するひとつの手段として、イメージングで用いた試料において、複数の遺伝子マーカを用いて細胞を同定する試みが線虫でなされているが、区別できる細胞種の数に限られている。もうひとつの手段として、 Ca^{2+} イメージングを用いて活動を測定した標本そのものをコネクトミクス解析に用いるということが考えられ、線虫、ショウジョウバエ幼虫などで試みられつつある。しかし、電子顕微鏡撮像のため連続した超薄切片を作成し、さらにそこから神経構造を再構築するには莫大な労力がかかるという問題が残る。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では光学顕微鏡で比較的簡便に組織の微細構造を解析できる膨張試料顕微鏡法を用いて、カルシウムイメージングから得られる「活動」に関する情報とコネクトミクスから得られる「構造」に関する情報を統合し、システム全体の作動機構を明らかにすることを目的とした。このため、コネクトミクス解析とカルシウムイメージング両方の技術が発達しているショウジョウバエ幼虫をモデルとした研究を行った。

3. 研究の方法

近年開発された膨張試料顕微鏡法(Chen, Boyden et al., Science, 2015)は、膨潤性のある格子を生体試料内に形成し、その格子にタンパク質や蛍光分子を架橋させ、その後等方的に膨潤させることにより、組織全体を拡大させる。その結果、通常の光学顕微鏡でも生物試料内の構造を回折限界以下の高い空間分解能で撮影することができる。本研究では、この手法をショウジョウバエ幼虫の脳神経系に適用し個々の神経突起を追跡した。まず、すべての神経細胞において緑色蛍光タンパク質(GFP)を細胞膜に局在させて発現させることで神経突起を一様に可視化した。この系統の幼虫の中樞神経系を免疫染色して膨張試料顕微鏡法を適用することで、複雑な神経組織内において従来は区別できない個々の神経軸索を同定した。さらに、神経突起を隣接する光学切片において追跡することで、軸索の配線を再構築した。

神経伝達物質の情報については、全神経細胞突起の染色に加えてショウジョウバエの主要な神経伝達物質であるアセチルコリン、グルタミン酸、GABA の免疫染色を行い、試料を膨張させて高解像度画像を撮影した。

神経活動情報を解析に統合するために、光変換カルシウムセンサーの CaMPAR12(Moeyaert et al., Nature Commun, 2018)を用いた。CaMPAR12 は、神経活動に伴うカルシウムイオン濃度上昇と紫外線照射によって、蛍光波長が緑色から赤色へと不可逆的に変化する。CaMPAR12 を全神経細胞に発現させた幼虫の自由行動時に紫外線を照射することで、光照射中に活動していた神経細胞・シナプスの形態と分布を赤色蛍光として読み取ることに成功した。さらに、赤色に色変換した CaMPAR12 特異的な抗体で免疫染色を行った上で膨張試料顕微鏡法を適用することで、活動強度の高い神経細胞の構造を高解像度で撮影した。

4. 研究成果

まず幼虫中枢神経系に膨張試料顕微鏡法を適用するために、免疫染色などの実験条件を探索した。その結果、約4倍の組織膨張によって100 nm程度の分解能が得られ、全神経細胞を染色したサンプルから単一の軸索・シナプスの構造を安定して撮影することが可能となった(図1)。さらに、少数の神経細胞群と全神経細胞の二重染色を行うことで、特定の細胞種が形成する軸索の束を複数種類同定した。これにより、コネクトミクス解析との統合に必要なサンプル間の構造比較のための参照点が得られた。

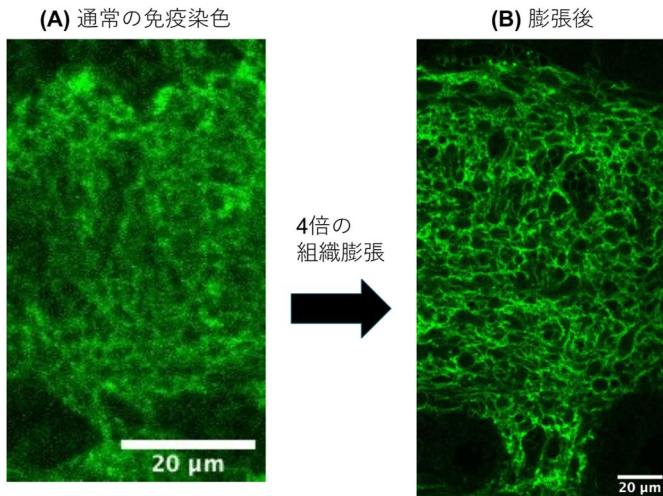


図 1. 膨張試料顕微鏡法により画像の解像度が向上した。ショウジョウバエ幼虫の全神経細胞に細胞膜局在型の GFP を発現させ、中枢神経系の免疫染色画像を取得した。(A) 通常の免疫染色画像。(B) 膨張試料顕微鏡法を適用した画像。約 4 倍の組織膨張により解像度が向上し、個々の神経突起の構造を鮮明に撮影することができた。

次に幼虫の中枢神経系の神経伝達物質の分布を、膨張試料顕微鏡法を用いて高解像度で可視化した。膨張後の高解像度画像では神経伝達物質陽性のシナプス前終末一つ一つを分別することができた(図 2)。各シナプスの符号を知ることが可能になり、固定サンプルの解剖学的な特徴から神経系の情報処理様式を考察することが可能になった。

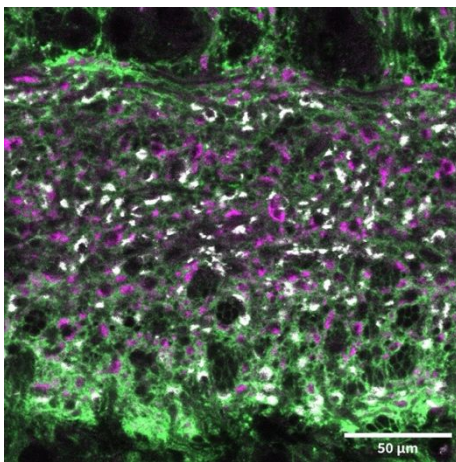


図 2. 全神経細胞膜と神経伝達物質の免疫染色画像。免疫染色後に膨張試料顕微鏡法を適用して、共焦点顕微鏡で画像を取得した。

緑: 神経細胞膜

マゼンタ: Acetylcholine transferase(ChAT)

白: vesicular GABA transporter

各伝達物質陽性のシナプス前終末が個別に確認できる。

最後に光変換カルシウムセンサーCaMPARI2 と膨張試料顕微鏡法を組み合わせることで、幼虫の前進運動・および後退運動時に活動していた神経細胞の微細構造を可視化した。強く活動した神経細胞内で色変換した CaMPARI2 に対して抗体染色を行い、さらに膨張試料顕微鏡法を適用することで色変換が起きた神経突起の構造を詳細に観察することができた(図 3)。この手法により、神経細胞の微細構造と活動強度を関連づけることが可能となった。

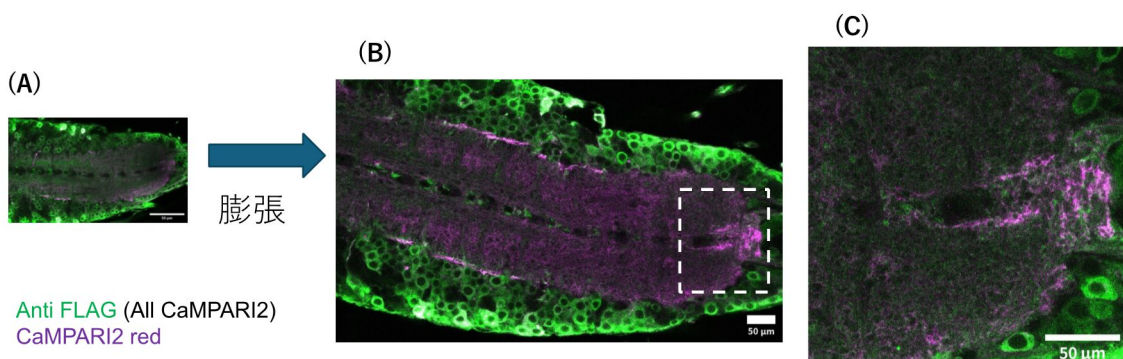


図 3. CaMPARI2 の免疫染色と膨張試料顕微鏡法の統合。緑: FLAG 抗体で染色した全ての CaMPARI2。マゼンタ: 色変換した CaMPARI2 の染色。(A) 通常の免疫染色画像。(B) 膨張試料顕微鏡法適用後の画像。(C) 画像(B)の破線部分の拡大画像。画像(C)のように、高い神経活動を示す軸索の微細構造が確認できる。

以上の研究により、膨張試料顕微鏡法を用いた神経系の微細構造解析の技術を確立し、構造と神経活動を関連づける基盤を構築することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Giachello Carlo N. G., Hunter Iain, Pettini Tom, Coulson Bramwell, Knufer Athene, Cachero Sebastian, Winding Michael, Arzan Zarin Aref, Kohsaka Hiroshi, Fan Yuen Ngan, Nose Akinao, Landgraf Matthias, Baines Richard A.	4. 巻 42
2. 論文標題 Electrophysiological Validation of Monosynaptic Connectivity between Premotor Interneurons and the aCC Motoneuron in the Drosophila Larval CNS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6724 ~ 6738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2463-21.2022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sun Xiyang, Liu Yingtao, Liu Chang, Mayumi Koichi, Ito Kohzo, Nose Akinao, Kohsaka Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 A neuromechanical model for Drosophila larval crawling based on physical measurements	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-022-01336-w	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 -

1. 著者名 Park Jeonghyuk, Chung Yul Ri, Nose Akinao	4. 巻 12
2. 論文標題 Comparative analysis of high- and low-level deep learning approaches in microsatellite instability prediction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16283-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukumasu Kazushi, Nose Akinao, Kohsaka Hiroshi	4. 巻 156
2. 論文標題 Extraction of bouton-like structures from neuropil calcium imaging data	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neural Networks	6. 最初と最後の頁 218 ~ 238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neunet.2022.09.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sun Xiyang, Nose Akinao, Kohsaka Hiroshi	4. 巻 18
2. 論文標題 A vacuum-actuated soft robot inspired by Drosophila larvae to study kinetics of crawling behaviour	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0283316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0283316	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 -

1. 著者名 Liu Yingtao, Hasegawa Eri, Nose Akinao, Zwart Maarten F, Kohsaka Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Synchronous multi-segmental activity between metachronal waves controls locomotion speed in Drosophila larvae	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.83328	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 Takagi Suguru, Takano Shiina, Hashimoto Yusaku, Morise Shu, Zeng Xiangsunze, Nose Akinao	4. 巻 -
2. 論文標題 Segment-specific axon guidance by Wnt/Fz signaling diversifies motor commands in Drosophila larvae	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.09.05.555126	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 XiangSunZe Zeng, Yuko Komanome, Hokto Kazama, Akinao Nose
2. 発表標題 Molecular and cellular mechanisms underlying the emergence of spontaneous patterned activity crucial for motor development in Drosophila
3. 学会等名 NEURO2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akinao Nose
2. 発表標題 Functional development of neural circuits that regulate animal behaviors
3. 学会等名 The Neurophysics of Locomotion (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yingtao Liu, Akinao Nose, Maarten Frans Zwart, Hiroshi Kohsaka
2. 発表標題 Synchronous multi-segmental activity controls the speed of axial locomotion by modulating the interval between peristaltic waves in <i>Drosophila</i> larvae
3. 学会等名 SfN Neuroscience meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahisa Date, Akinao Nose, Hiroshi Kohsaka
2. 発表標題 Comprehensive characterization of behavior specific neurons in fruit fly larvae with a photoconvertible calcium sensor
3. 学会等名 Adaptive Circuit Census (ACC) International Symposium 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yingtao Liu, Akinao Nose, Maarten F Zwart, Hiroshi Kohsaka
2. 発表標題 Synchronous multi-segmental activity between metachronal waves controls the crawling speed in fly larvae
3. 学会等名 第45 回日本分子生物学会年会(MBSJ2022) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Date Takahisa、Liu Yingtao、Nose Akinao、Kohsaka Hiroshi
2. 発表標題 A tonically active neuron implicated in the maintenance of muscle relaxation in Drosophila larvae
3. 学会等名 Neurobiology of Drosophila 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Date Takahisa、Liu Yingtao、Yamaguchi Akihiro、Rui Wu、Paul McNulty、Marc Gershow、Maarten Zwart、Nose Akinao、Kohsaka Hiroshi
2. 発表標題 Transient suppression of tonically active neurons gates motor output in Drosophila larval crawling
3. 学会等名 Asia Pacific Drosophila Neurobiology Conference 3 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Seki Takaki、Kohsaka Hiroshi、Nose Akinao
2. 発表標題 Identification of a novel interneuron that regulates forward wave propagation in Drosophila larvae
3. 学会等名 Asia Pacific Drosophila Neurobiology Conference 3 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Zeng XiangSunZe、Komanome Yuko、Seki Takaki、Kazama Hokuto、Nose Akinao
2. 発表標題 Emergence of oscillatory motor activities in developing Drosophila embryos
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fukumasu Kazushi、Nose Akinao、Kohsaka Hiroshi
2. 発表標題 Two perpendicular stripe-wise structures in the neuropil involved in generation of Drosophila larval crawling behaviors
3. 学会等名 第46 回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Date Takahisa、Nose Akinao、Kohsaka Hiroshi
2. 発表標題 Revealing behavior-specific neuronal populations in Drosophila larvae with a photoconvertible calcium sensor
3. 学会等名 第46 回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Seki Takaki、Komanome Yuko、Zeng XiangSunZe、Kohsaka Hiroshi、Nose Akinao
2. 発表標題 Mechanisms of neural circuit reorganization that enable coordinated movement
3. 学会等名 第46 回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fukumasu Kazushi、Nose Akinao、Kohsaka Hiroshi
2. 発表標題 Spatiotemporal structure of synapse population activity in the motor circuits for crawling
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

能瀬研究室
<http://bio.phys.s.u-tokyo.ac.jp/>

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			
英国	University of Cambridge	University of St Andrews		