

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650159

研究課題名(和文) 新規なマイクロデバイスを用いた線虫神経回路可塑性の定量的理解

研究課題名(英文) Quantitative understanding for neural plasticity of *C. elegans* with newly developed micro-fluidic device

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：線虫の神経-行動相関を明らかにするため、新規なマイクロ流体デバイスと蛍光イメージング法を併用して調べる研究を行った。線虫頭部に層流を作り、温度または匂い物質などの濃度刺激を厳密に制御するマイクロ流体デバイスをデザインし、その時間的・空間的制御について検証を行った。またこのデバイス中の線虫行動を定量解析するためのソフトウェアを開発した。このデバイスを用いて、線虫頭部に高低2種類の匂い濃度刺激を加えたところ、線虫頭部が高濃度領域に長く滞在することを半自動的に定量することができた。またこの時、介在神経細胞AIYの神経活動に依存したカルシウム濃度上昇は頭部の屈曲行動と強く相関することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Caenorhabditis elegans is known as one of model animals, and it has been used for understanding the relationship between neural functions and behaviors. The worm senses odors and shows taxis toward the source of favorite odor by detecting its concentration gradient. However, little is known how exactly worms can discriminate the concentration of odor and change their head turning behavior in regard to the response of olfactory neurons. For demonstrating the role of single neurons in specific behaviors, we investigated the neural activity from a single neuron by Ca and membrane potential imaging, and also quantitative behaviors by developing new types of micro-fluidic devices. We succeeded to visualize the Ca oscillation synchronized with the head movement during odor stimulation in AIY interneuron.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：線虫 神経回路 特定神経細胞破壊 細胞膜電位計測 細胞カルシウム計測 マイクロ流体デバイス

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」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 et al. 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きている(例えば Gray et al. 2005)。このような研究をさらに展開するためには、「個別神経細胞の機能と特定の行動」の対応付けをさらに進める必要がある。最近では自由行動中の線虫特定神経細胞の機能を細胞内カルシウムイメージングで調べる研究が進められてきている(例えば Faumont et al. 2011) 一方で、外部環境を厳密にコントロールした環境下で生物行動を詳細に観察する必要性もある。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)。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。また、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、心筋細胞などの大変形を行う単一細胞や神経成長円錐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. 2009, 2010, Kobayashi et al. 2013)。本研究ではこれらの先行研究の動向と申請者の従来研究を考え、厳密に制御された環境における線虫行動を厳密に調べ、特定神経細胞機能と対応づけを可能とするような新規なマイクロデバイスを開発し、それにより神経回路可塑性を明らかにすることを目指すこととした。

2. 研究の目的

特定神経細胞がどのような機能を担っているのかを明らかにすることは、システム神経科学の大きな目標の一つである。線虫は神経細胞数が 302 個と数が少ないため、個々の神経細胞を破壊することにより、ネットワーク機能が調べられてきた。最近になって従来の破壊実験の結果と整合性が取れない結果が行動中の線虫の運動制御系神経細胞からの神経活動をカルシウムイメージングで調べることにより明らかになってきた(例えば Faumont et al. 2011)。同様なことは感覚神経細胞についても考えることができ、本提案のように「厳密に線虫周囲環境を制御でき、かつ神経回路機能を計測・修飾可能なマイクロデバイス」は、神経の包括的かシステム的な理解に対して定量的な情報を提供することが可能となる。このような研究アプローチから、最終的には「線虫の心を読む研究」を加速的に進め

る(図1)。

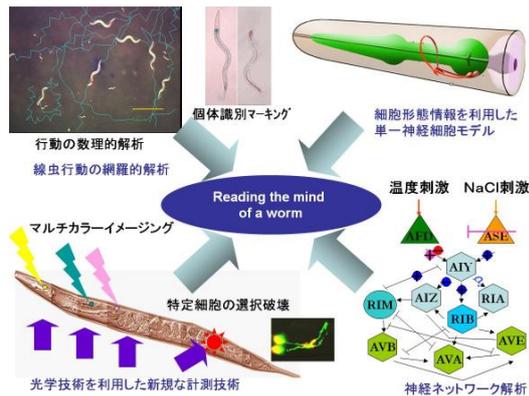


図1 「線虫の心を読む研究」の戦略

3. 研究の方法

特定神経細胞の機能と行動との関係を厳密に調べるためのマイクロデバイスを開発する。このデバイスは①線虫行動を数十μm精度で計測することができ、②自動的に行動パラメータを抽出し、③特定神経細胞からの神経活動計測または特定神経細胞機能の破壊、を行うことができる。またこのデバイスを用いることにより、化学走性、温度走性(餌のあった生育環境温度を記憶し、その温度を好んで移動する特性)について、マイクロデバイス中に温度の異なる2種類の溶液を導入して層流をつくることにより調べる。また同時にこの行動に関係している介在神経細胞について神経活動計測を行う。さらにこの神経細胞をその場破壊した際に、化学走性、温度走性行動がどのように修飾されるかを、行動パラメータを取得することにより行動の可塑性を評価することを試みた。

4. 研究成果

(1) 線虫行動を精密に計測するためのマクロデバイスの製作

特定の実験に特化したマイクロデバイスを、光硬化性樹脂等を利用して作製する。基本的に作製方法は Bargmann が用いた方法(Choronis et al. 2007)を参考とした。

上記のような手法を用いて、線虫の腹側と背側に異なる種類の溶液を流すことが可能な新規なデバイスの開発に成功した(図2)。

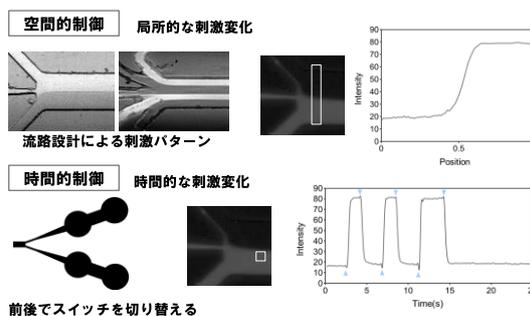


図2 線虫周囲環境を厳密に制御可能なデバイスと空間・時間応答の確認例

刺激入力制御には、空間的制御と時間的

制御が必要である。前者に関しては、図2に示したような流路設計により、線虫頭部近傍に二層または四層の刺激パターン（温度または匂い濃度など）を作れることを確認した。また実際に濃度勾配ができていないかを、蛍光物質を含んだ溶液を流し、その強度を計測することにより確認した。また後者の時間的制御は、ひとつの流路の前後2つの溶液口を設け、それをスイッチで切り替えることにより実現し、この切り替えに伴う応答を同様に確認した。

次にこのデバイス中で線虫運動を厳密に計測するための画像処理アルゴリズムとその実装を行った。線虫画像から図3のような手続きで線虫運動を幾つかの代表点の座標として経時的に計測できるようにした。

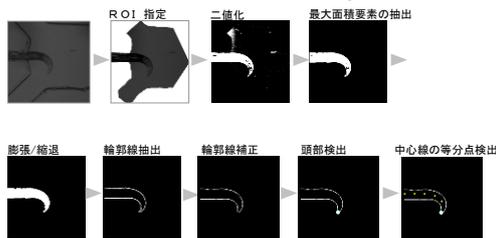
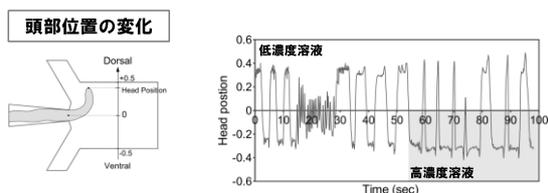


図3 線虫行動を精密計測するための画像処理手順

このデバイスと画像解析手法を用いて、異なる NaCl 濃度の溶液を線虫頭部に流した際の線虫首振り応答を調べた。その結果、高濃度溶液に頭部が滞在する時間が有意に増加することを明らかにした（図4）。頭部存在位置だけでなく、線虫頭部の曲率変化などを利用して、線虫行動を神経活動と比較可能な程度



まで厳密に計測することに成功した。

図4 異なる濃度の NaCl 溶液を線虫頭部に灌流した時の首振り行動の変化

(2) 特定神経細胞破壊技術の開発と特定神経細胞からの神経活動の計測

線虫行動を神経活動との関係を明らかにするためには、神経活動を経時的に調べる必要がある。そのために特定神経細胞を破壊するための技術の開発を行い、特定神経細胞のその場破壊が可能であることを示した（雑誌論文①）。

また種々の感覚情報の統合が行われている介在神経細胞として我々が注目してきた AIY 神経細胞において、細胞膜電位イメージングに成功した（雑誌論文②）。カルシウムイメージングの結果と比較したところ、従来 AIY 神経細胞の細胞体では神経興奮に伴うカルシウ

ム濃度増大は見られないことが報告されていたが、膜電位の脱分極をイメージングすることができた。また多くの感覚情報が統合されていると考えられているニューライトにおいては、カルシウム応答も膜電位脱分極も共に観察することができた。このことは AIY 神経細胞の局所神経機能と情報統合を理解する上で新規な知見を提供したものと考えている。

次に線虫首振りと AIY 神経細胞の神経活動との関係を明らかにするために、(1)で述べた手法を用いて、首振り運動と AIY 神経細胞カルシウム応答との関係を調べた（図5）。

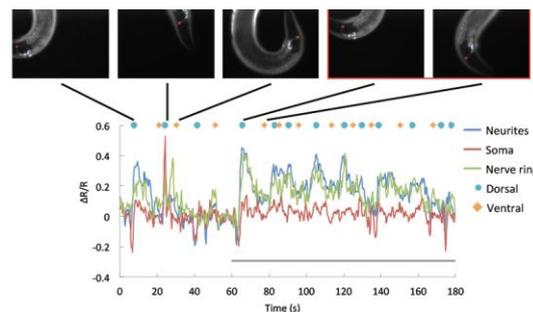
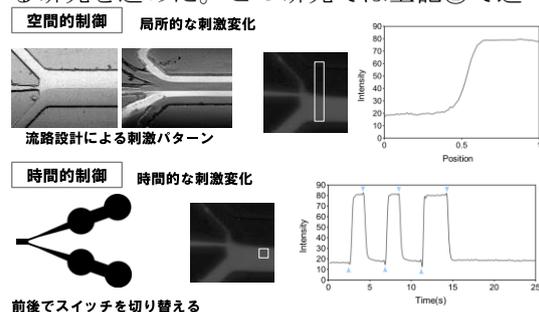


図5 匂い刺激前後での線虫首振り運動と介在神経細胞 AIY の局所部位（細胞体、ニューライト、神経環部）でのカルシウム応答との関係

図5において上部にはカルシウムイメージング中の線虫頭部の運動を示しており、下のグラフは介在神経細胞 AIY の局所カルシウム応答を神経環 (nerve ring)、細胞体 (soma)、ニューライト (neurite) について示している。またグラフ上の点は線虫が腹側 (ventral) と背側 (dorsal) にそれぞれ屈曲したタイミングを示す。この図から、細胞体では殆どカルシウム応答は見いだされないことを確認した。また匂い刺激 (図中のグレーのバー) 後には、ニューライトのカルシウム応答と首振りとは強く相関していることを明らかにした。従来この AIY 神経細胞が首振りと関係しているという知見がなかったことから、運動情報と感覚情報がこの介在神経細胞において統合されている可能性を示す興味深い知見であると思われる。

さらにマイクロデバイスとカルシウムイメージング法を併用する研究として、線虫においてウェーバー則が成り立つかを明らかにする研究を進めた。この研究では上記①で述べ



前後でスイッチを切り替える

たマイクロデバイスを利用して、線虫がどの程度の塩濃度差を検出可能であるのかを調べた。その結果線虫は行動からは概ね10%の濃度差を検出可能であることを示すことができた。一方、カルシウム応答の感度はそれよりも2桁程度高いことがわかった。このことは、感覚神経細胞から行動までの一連の情報処理を考える上で重要な知見であると思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kobayashi J, Shidara H, Morisawa Y, Kawakami M, Tanahashi Y, Hotta K, Oka K, “A method for selective ablation of neurons in *C. elegans* using the phototoxic fluorescent protein, KillerRed”, *Neurosci Lett.*, 548, 261-264, 2013.
doi: 10.1016/j.neulet.2013.05.053. (査読有)
- ② Shidara H, Kobayashi J, Tanamoto R, Hotta K, Oka K, “Odorant-induced membrane potential depolarization of AIY interneuron in *Caenorhabditis elegans*”, *Neurosci Lett*, 541, 199-203, 2013.
doi:10.1016/j.neulet.2013.02.016. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Shidara H, Kobayashi J, Tanamoto R, Hotta K, Oka K, “AIY interneurons involved in the cross modality adaptation in *Caenorhabditis elegans*”, *Neuroscience 2013*, San Diego (USA), Nov 11, 2013.
- ② Makino M, Shidara H, Hotta K, Oka K, “Response to olfaction in *Caenorhabditis elegans* follows the Weber-Fechner law”, *Neuroscience 2013*, San Diego (USA), Nov 11, 2013.
- ③ Shidara H, Kobayashi J, Tanamoto R, Hotta K, Oka K, “Sensory stimulation from a specific modality adapts a different modality in *Caenorhabditis elegans*”, 第51回日本生物物理学会年会, 国立京都国際会館(京都), 2013.10.30.
- ④ 設楽 久志, 小林 純也, 棚元 亮, 堀田 耕司, 岡 浩太郎, 「線虫において異なる感覚情報が相互に与える影響」, 第22回日本バイオイメーキング学会学術集会, 東京大学薬学部講堂(東京), 2013.9.16.
- ⑤ 設楽 久志, 小林 純也, 棚元 亮, 堀田 耕司, 岡 浩太郎, 「線虫における交差順応」, 第36回日本神経科学大会, 国立京都国際会館(京都), 2013.6.21.
- ⑥ Shidara H, Kobayashi J, Tanamoto R, Hotta K, Oka K, “Neural activity

visualization of AIY interneuron in *Caenorhabditis elegans* with voltage-sensitive fluorescent protein” *Society for Neuroscience 2012*, New Orleans (USA), Oct 14, 2012.

- ⑦ 設楽 久志, 小林 純也, 棚元 亮, 堀田 耕司, 岡 浩太郎, 線虫 AIY 介在神経細胞での局在した神経活動: 蛍光イメージングによる研究, 第50回日本生物物理学会, 名古屋大学東山キャンパス(名古屋), 2012.9.24.
- ⑧ 設楽 久志, 小林 純也, 棚元 亮, 堀田 耕司, 岡 浩太郎, 線虫介在神経細胞 AIY の膜電位イメージング, 第35回日本神経科学大会, 名古屋国際会議場(名古屋), 2012.9.20.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 浩太郎 (OKA, Kotaro)
研究者番号: 10276412