

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650167

研究課題名(和文) 線虫中枢神経系の全ニューロンの神経活動を同時にイメージングする方法の確立

研究課題名(英文) Establishing a new method to analyze neuronal activities of all individual neurons of *C. elegans* CNS.

研究代表者

石原 健 (Ishihara, Takeshi)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10249948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系での情報処理を可視化するために、線虫の頭部中枢神経系の全てのニューロンの個別の活動を、生きたまま同時に、イメージングによって測定する手法を確立することを目的とした。顕微鏡システムの改良やカルシウムプローブの最適化、細胞のトラッキングシステムを含む解析手法の改良などを組み合わせることによって、数十個の神経細胞の活動を個別に測定することができるようになり、同期する活動などを観察することに成功した。

研究成果の概要(英文)：To visualize the informational processing in CNS, we planned to devise a method that enable us to analyze the activities of all individual neurons in living *C. elegans*. To do this, we improved a microscopy system, optimized Ca²⁺ probe and image processing including tracking neurons by pattern matching. By using this system, we succeeded in evaluating more than 20 individual neurons and in observing a synchronous activity.

研究分野：行動遺伝学

キーワード：神経科学 イメージング 線虫 情報処理

1. 研究開始当初の背景

動物は、外部からの様々な情報を、中枢神経系で適切に処理することによって、環境に適応することができる。中枢神経系における情報処理のメカニズムは、これまで様々な方法で解析され、分子レベルから、神経回路、行動レベルまで非常に大きな成果を挙げてきている。一方で、「中枢神経系が全体としてどのように協調して情報処理を行っているか?」については、不明な点も多い。この問題に解答するための一つとして、ニューロンレベルの解析を、中枢神経系全体に拡張し、全てのニューロン活動を同時に測定することが重要であると考えた。その上で、得られた活動の計測結果と神経回路構造とに基づき、時間軸も含んだニューロン間の相互関係を明らかにすることによって、中枢神経系における情報処理機構の全体像に近づけるのではないかと考えた。

私達は、線虫 *C. elegans* を用いて、分子遺伝学やイメージングによって情報処理の分子・神経回路メカニズムを解析してきている。本研究を開始するまでに、ニポウ式共焦点ユニット、2台の EMCCD カメラ、対物レンズの高速ピエゾ移動を組合せた 4D ライブイメージングシステムを構築した。このシステムでは、3次元に配置された十数個のニューロンの活動を、1立体(10断面で1立体像)当たり 2~3コマ/秒測定できる。立体的に配置された十数個の神経細胞を同時にイメージングすることによって、細胞内の Ca^{2+} 濃度変化を測定することに成功していた。

2. 研究の目的

本研究においては、この 4D ライブイメージングシステムを改良することによって、線虫の頭部にある全中枢神経細胞の活動を同時測定することができるのではないかと考えた。活動を同時に測定する点に最も特徴があり、これは、脳にある全ての神経の活動を個別に同時測定することに相当する。申請時にはこのような研究の報告はなかった。本研究提案が成功すれば、中枢神経系の全ての神経細胞の活動を個々にかつ同時に観察できることから、これまでの少数のニューロンのイメージング解析とは質・量とも異なるデータが得られる。

そこで、本研究では、その基礎として下記のような課題の解決を目指すこととした。

(1) 4D イメージングシステムを、高速に測定できるように改良する。

(2) 全中枢神経系のカルシウムイメージングを行うために、カルシウムプローブの最適化を行う。

(3) イメージングシステムで得られた画像に基づいて、細胞の神経活動を測定するための解析手法を確立する。

これらの方法を組み合わせることによって、線虫 *C. elegans* の中枢神経系の全ての神経

細胞の活動を個々にかつ同時に観察できる

3. 研究の方法

(1) 4D イメージングシステムの最適化

本研究においては、高速に顕微鏡画像を撮像するために、顕微鏡での撮像条件や光学系について検討を行った。また、測定する線虫を保持する微小流路についても最適化を進めた。

(2) カルシウムプローブの最適化

測定に用いるカルシウムイオン濃度に依存して蛍光が変化するタンパク質プローブの発現や Ca^{2+} との親和性などについて検討を行った。

(3) 解析手法の最適化

高速に撮像することによって、時間あたりの画像が増加する。これを効率よく解析する手法について検討を進めた。

(4) 多数の神経細胞の活動の測定

線虫の全中枢神経細胞の約 1/3 程度の神経細胞でカルシウムプローブを発現させ、20 個以上の神経細胞の活動の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 4D イメージングシステムの最適化

4D イメージングシステムにおいて、撮影速度を決めている要因の一つは、撮像に用いているカメラの解像度である。CCD カメラにおいては、解像度を下げることによって、高速にデータを取得することができる。そこで、カルシウムプローブを撮像するカメラに 2x2 のビニングをして xy 方向の解像度を 1/2 に下げることによって、撮像間隔を短くした。しかし、それに伴い対物レンズのピエゾ素子による移動速度が速くなったため、対物レンズの共振が発生し、正確に対物レンズを高速に移動させるできないことがわかった。そこで、この共振を防ぐために、対物レンズを支えるレボルバーに重量可変型のおもりを設置することによって、任意の速さの撮像に対応できるように、顕微鏡に改良を施した。これにより、毎秒 90 フレーム、4-5 立体/秒のカルシウムプローブの蛍光画像の取得が可能になった。

カルシウムプローブタンパク質を高速に撮像することが可能になった一方で、解像度を犠牲にしているために、細胞の同定・トラッキングなどの解析の精度がおちることが予想された。そこで、細胞のマーカーとなる別の波長の蛍光タンパク質を同時に発現させ、イメージングを行うこととした。そのために、3波長を同時に取得できるように光学系を変更した。このとき、細胞のマーカーとなる蛍光タンパク質としては、赤色の蛍光を示す mCherry を用いることによって、カルシウムプローブの蛍光とは干渉しないようにした。また、長波長の蛍光を感度良く測定できる cMOS カメラを導入することによって、高速に高解像度の mCherry 蛍光画像を、カルシウムプローブの蛍光画像と同期して

取得することができた。

カルシウムプローブの蛍光画像と細胞マーカーの蛍光画像とは、異なるカメラで撮像しているため、それぞれの画像を一致させる必要がある。そこで、格子(グリッド)画像を二つのカメラで同時に撮像し、それらを一致させるアフィン行列を求めて、実際の蛍光イメージング画像をアフィン変換することによって、両者の画像を一致させることができるようになった。

神経活動を測定するときには、線虫をPDMS(ポリジメチルシロキサン)でできた微小流路にいれて、様々な刺激を与えながら測定する。しかし、線虫の体の大きさによっては、微小流路がやや太いために、測定中に大きく動いてしまい、正確な測定ができない。そこで、太さが異なる微小流路を作成することによって、線虫の大きさに合わせて測定できるようにした。とくに、変異体では大きさがやや小さい個体が多いことから、細い微小流路が有効であることがわかった。

(2) カルシウムプローブの最適化

神経の活動を測定するためのカルシウムプローブとしては、FRET(フェルスター共鳴エネルギー移動)型のカルシウムプローブである Yellow Cameleon を用いている。このプローブは、YFP と CFP との間の FRET の効率がカルシウムイオン濃度によって変化する。本研究で用いている 4D イメージングシステムでは、撮像毎に得られる断面が異なる可能性があることから、蛍光の絶対的な光量の変化を測定するのでは測定誤差が大きくなる可能性があるのに対し、YFP と CFP の二つの蛍光タンパク質の輝度値を求めた上で、その割合を計算することによって、神経活動を測定することができる点が優れていると考えている。

この Yellow Cameleon を、細胞核において発現させることによって、細胞が密集している領域においても、神経活動を測定することができると考えた。そのため、Yellow Cameleon の N 末端に核移行シグナルを導入した。また、これまでの研究から、核で発現させた場合には、神経突起と比べて Ca^{2+} イオン濃度変化が小さい細胞があることが推定されていたことから、細胞質や神経突起において用いるカルシウムプローブより Ca^{2+} に対する親和性が高い YC2.60 を用いた。

二波長の蛍光輝度の比を測定するために新たなカルシウムプローブの開発も行った。これまでに神経活動の測定に用いられているプローブとしては、Yellow Cameleon の他に、 Ca^{2+} 濃度が高いときに蛍光が強くなる GCaMP や RCaMP がある。もし Ca^{2+} 濃度が低いときに蛍光が強くなるインバースタイプのプローブがあれば、極めて効率よく Ca^{2+} 濃度変化を測定することができるだけでなく、蛍光強度比で測定できるために、測定する断面のずれなどによる影響を少なくすることが

できる。そこで、インバースタイプのカルシウムプローブである、インバースペリカムをもとに、GCaMP とは Ca^{2+} に対する応答が異なる性質を持ったプローブを作成した。このプローブを、線虫に導入することによって、これまでのセンサーとは異なり、抑制性の神経活動を鋭敏に測定できることがわかった。

(3) 画像解析システムの確立

4D イメージングシステムで撮像した画像について、神経細胞のトラッキング(追跡)などを行う画像処理を構築する必要がある。本研究では、パターンマッチングによる細胞のトラッキングを開発し MATLAB を用いて以下のように実装した。

立体画像を投射したプロジェクション画像を作成し、輝度値を求めたい細胞を特定する。

各細胞について、1 タイムポイント前の画像とのパターンマッチングを行うことによって、細胞のトラッキングを行う。このとき、測定したい神経細胞の周囲(各方向に各 3-4 倍)の画像(周囲のニューロン数個を含む)を元にしたパターンマッチングを行った後に、その内部でその細胞のパターンマッチングを行うことによって、精度良く細胞を追跡することが可能になった。これは、個々の神経細胞の形態や画像は類似しているが、周囲数個の神経細胞との配置は、個々の神経細胞によって異なっているためであると考えている。

各細胞領域について、YFP 輝度値、CFP 輝度値の合計の比を求めた。このとき、大津の 2 値化を使って背景値を求め、輝度値の計算に反映させた。

この手法により、20 個程度の神経細胞の活動を同時に測定できることがわかった。しかし、線虫の中枢神経系の約 170 個の神経細胞の活動を測定するためには、精度良く神経細胞を分離する必要があると考えている。

(4) 線虫の多数の神経細胞のイメージング

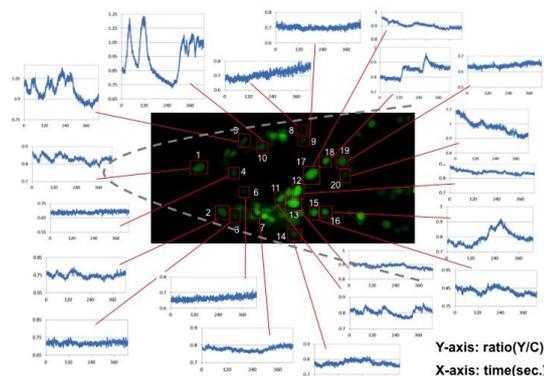


図1 頭部の多数の神経細胞の活動

4D イメージングシステムにより、刺激をしていない線虫において、多数の神経細胞の活動を測定した。多くの神経細胞で自発的な活動を

が観察できている。

本研究では、上記(1)~(3)の結果に基づいて、実際に多数の神経細胞の活動の測定を行った。pkc-1 プロモーターを用いてプローブを発現させ、測定した結果の一例を図1に示す。これにより、無刺激の線虫においても、多くの神経細胞が活動していることから、線虫においても自発活動が観察できることが明らかになった。

現在、線虫のほぼ全ての神経細胞カルシウムプローブを発現させ、高速に画像を取得することに成功している。しかし、全神経細胞の活動を測定するためには、新たな解析手法の開発が必要である。そこで、現在共同研究によって、解析手法の開発を進めていくことを目指している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4件)

1) Tokunaga, T., Hirose, O., Kawaguchi, S., Toyoshima, Y., Teramoto, T., Ikebata, H., Kuge, S., Ishihara, T., Iino, Y., Yoshida, R. Automated detection and tracking of many cells by using 4D live-cell imaging data. *Bioinformatics*. 査読有.

30.2014.i43-51.doi10.1093/bioinformatics/btu271

2) 飯野 雄一、寺本 孝行、石原 健 神経系丸ごと観測による神経回路の解析、生体の科学、査読無、65巻、2014、416-417

3) Inoue, A., Sawatari, E., Hisamoto, N., Kitazono, T., Teramoto, T., Fujiwara, M., Matsumoto, K., Ishihara, T. Forgetting in *C. elegans* is accelerated by neuronal communication via the TIR-1/JNK-1 pathway. *Cell Reports*. 査読有. 3(3). 2013. 808-819. doi:10.1016/j.celrep.

4) Uozumi, T., Hirotsu, T., Yoshida, K., Yamada, R., Suzuki, A., Taniguchi, G., Iino, Y., Ishihara, T. Temporally-regulated quick activation and inactivation of Ras is important for olfactory behaviour. *Scientific Reports*. 査読有. 2.2012.500.doi10.1038/srep00500

[学会発表](計 10件)

Ishihara, T., Inoue, A., Sawatari, E., Kitazono, T., Fujiwara, M., Teramoto, T. Active forgetting of the olfactory memory in *C. elegans*. (招待講演)

NEUROBIOLOGY: DIVERSE SPECIES & CONSERVED PRINCIPLES. 2014年9月15-19日. 中国蘇州

寺本 孝行、吉田 亮、線虫中枢神経系のまるごと計測および定量解析にむけた取り組み、定量生物の会第7回年会、2015年1月11-12日、福岡

久下 小百合、寺本 孝行、石原 健、線虫、*C. elegans* の単一神経細胞におけるカルシウムダイナミクス、第37回日本分子生物

学会年会、2014年11月25-27日、横浜

Kuge, S., Teramoto, T., Ishihara, T.

Tracking of Ca²⁺ dynamics in a whole single neuron. 2014 *C. elegans* Topic Meeting: Neuronal Development, Synaptic Function & Behavior. 2014年7月7-10日. Madison, USA

寺本 孝行、石原 健(招待講演)
C. elegans の中枢神経系まるごとのカルシウムイメージングに向けて、包括的脳科学研究推進支援ネットワーク平成25年度夏のワークショップ、2013年8月27日-9月1日、名古屋

Teramoto, T., Yamamoto, Y., Ishihara, T. 4-D Ca²⁺ imaging of the multiple neurons in a local circuit regulating behavioral choice. 19th International *C. elegans* Meeting. 2013年6月26-30日. Los Angeles USA

Kuge, S., Teramoto, T., Ishihara, T. Ca²⁺ dynamics of a whole single neuron. 19th International *C. elegans* Meeting. 2013年6月26-30日. Los Angeles USA

寺本 孝行、山本 悠太、石原 健、4-D Ca²⁺ イメージングによる線虫 *C. elegans* の行動選択を制御する複数ニューロンの活動の可視化と計測(招待講演)、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11-14日、福岡

石原 健、寺本 孝行、線虫 *C. elegans* における3次元構成画像の解析に基づく多数の神経活動の同時測定、バイオイメージング・インフォマティクス ワークショップ2012、2012年11月1日-2日、神戸

Teramoto, T., Yamamoto, Y., Ishihara, T. 4-D Ca²⁺ imaging of the multiple neurons that regulate the sensory integration underlying behavioral choice. EMBO Conference Series *C. elegans* Neurobiology. 2012年6月14-17日. Heidelberg, Germany

[その他]

ホームページ等

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~bunsiide/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 健 (ISHIHARA Takeshi)
九州大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号: 10249948

(2) 連携研究者

寺本 孝行 (TERAMOTO Takayuki)
九州大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号: 90571836

久下 小百合 (KUGE Sayuri)
九州大学・大学院理学研究院・学術研究員
研究者番号: 50260104