

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2018

課題番号：26830006

研究課題名(和文)空間情報の処理を担う神経ネットワークの動作原理の解明

研究課題名(英文) Analysis of dynamics of neural network that processes spatial information on chemotaxis of *C. elegans*

研究代表者

豊島 有 (Toyoshima, Yu)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：10632341

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)：線虫は特定の塩濃度の領域へ向かう際、進行方向および垂直方向の塩濃度勾配に対して、異なる行動戦略を用いている。神経回路上では塩濃度勾配の方向の情報が時間的に多重にコードされており、こうした空間情報を分離・抽出する神経回路機構を明らかにすることを目指した。神経活動を正確に測定するため最新のCa²⁺プローブを導入した。塩刺激を受容する感覚神経及び一次介在神経は、垂直方向の信号と同程度の早い周期に対して応答できることが確認できた。より多数の神経を同時に観察できるよう、4Dイメージング観察技術の整備を進めた。また線虫の走性行動について、測定した神経活動に基づいた数理モデル化に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

<1. カルシウムイメージングによる神経細胞の活性測定>によって、線虫の神経活動を正確に測定するための枠組みを確立することができた。また全脳の神経活動を測定する技術を開発して、自発活動の影響を明らかにすることができた。観察された神経活動を個体間で比較したり、神経回路の視点で解釈するための技術の開発も進んでいる。また<2. 実験データに基づいた数理モデルの作成>によって、実験データに基づいた数理モデル化の枠組みを確立することができた。とくに神経活動を正確にモデル化することで、環境 神経回路 行動という多階層システムの包括的な解析が可能になった。

研究成果の概要(英文)：In salt chemotaxis of the nematode *C. elegans*, they choose behavioral strategies according to the direction of gradient of salt concentration. Information of the direction will be encoded in the temporal patterns of neural activity, and we try to find how the neural circuit decodes it. By using latest Calcium indicators, we confirmed that sensory neurons and 1st-layer interneurons show accurate response to fast stimuli that corresponds to the gradient vertical to the locomotion direction. We also developed several techniques required for whole-brain activity imaging. Additionally, we developed mathematical models of chemotaxis based on the measured neural activities.

研究分野：システム生物学

キーワード：システム生物学 モデル化とシミュレーション ライブイメージング 神経情報処理 線虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経ネットワークは外界の情報を検知して処理し、行動を引き起こすが、この情報処理のしくみは不明な点も多い。線虫 *C.エレガンス* の神経ネットワークは 302 個の神経細胞から構成されており、細胞間の全ての配線が明らかになっていることや、神経活動や行動の測定が容易であることなど、神経ネットワークの情報処理のしくみを明らかにする上で利点が多い。線虫は平面上を蛇行走行しながら塩濃度を感知し、特定の塩濃度に誘引されるという走性行動を示す。高塩濃度へ向かう線虫では、進行方向の塩濃度が減少傾向にあると感じると、急激な後退を起こす神経に情報が伝わり、高塩濃度の方向へ一気に進行方向を変える(ピルエット)(Pierce-Simomura,1999)。一方、進行方向と垂直の方向の濃度勾配を感じると、首振りを制御する神経に情報が伝わり、首振りの角度を変えて徐々に高塩濃度の方向へ進行方向を変える(風見鶏)(Iino,2009)。線虫の塩濃度感知機構は頭部に 1 か所しかないため、線虫は周辺の濃度勾配をそのまま感知することはできず、蛇行走行中の塩濃度の時間変化として感知すると考えられている。つまり進行方向および垂直方向の塩濃度の情報は感覚神経への入力段階で時間パターンとして多重にコードされている。線虫は介在神経での情報処理によりこれらの情報を抽出し、質的に異なるふたつの走性機構を使い分けしていると考えられるが、入力のパターンから二種の情報を分離・抽出する情報処理のしくみは不明である。

2. 研究の目的

線虫は特定の塩濃度の領域へ向かう性質があり、進行方向および垂直方向の塩濃度勾配に対してそれぞれピルエット機構と風見鶏機構という異なる行動戦略を用いている。その際神経ネットワークにおいては塩濃度勾配の方向の情報が時間的に多重にコードされていると考えられる。本研究では、多重にコードされた空間情報を分離・抽出する機構を同定し、その動作原理の解明を目指している。

3. 研究の方法

本研究では、線虫の塩走性行動を制御する情報抽出機構の動作原理を解明することを目的として、多重情報コードの作業仮説のもとでシステム生物学的解析を行う。まず特定の周波数にตอบสนองする介在神経(バンドパスフィルタ)といった重要な構成要素を同定するために、<1.カルシウムイメージングによる神経細胞の活性測定>により、様々な時間パターンで刺激を与えた際の神経細胞の応答データを取得する。このデータを利用して<2.実験データに基づいた数理モデルの作成>を行い、実験結果をよく再現できる数理モデルを得る。作成したモデルを解析して、作業仮説で想定された周波数フィルタ特性が神経ネットワークのどの部分に存在するかを明らかにすることを試みる。

4. 研究成果

<1. カルシウムイメージングによる神経細胞の活性測定>

線虫の神経では Ca^{2+} レベルの緩やかな変化によって信号を伝えているが、感覚神経の平時の Ca^{2+} レベルは既存の Ca^{2+} プロープの検出下限を下回っており、線虫の行動時に生じる小さな神経活動を正しく検出できない可能性があった。親和性が向上した最新の Ca^{2+} プロープ(GCaMP6s)を用いると小さな神経活動を十分な S/N 比で検出できたが、応答速度が非常に遅いため、測定した神経活動は不正確になってしまった。その後、親和性・応答速度の両面で改良が進んだ新しい構造の Ca^{2+} プロープ(RCaMP2)が発表された。実際に線虫に導入したところ、GCaMP6s と比較して、同程度の親和性を維持しつつも応答速度が約 2 倍速くなったことが確認できた。ただし RCaMP2 は細胞によって発現量が大きく異なり、十分量の発現が誘導可能な細胞に限られていた。一方、膜電位感受性蛍光プロープは小さな神経活動についても正確に測定できると考えられるので、3 種類の膜電位プロープを感覚神経に発現させたが、いずれも十分な蛍光輝度が得られなかった。

GCaMP6s および GCaMP6f 等を発現させた線虫を用いて、繰り返し刺激を与えながら特定の神経の活動を観察して、塩濃度刺激の情報が神経回路中のどの細胞までどのような態様で届くか調べた。風見鶏行動に深く関わると考えられる神経細胞のうち、塩刺激を受容する感覚神経及び一次・二次介在神経については、首振りの周期と同程度の早い周期に対して応答できることが確認できた。今後は、より広いクラスの神経に対して同様の実験を行うことで、周期的な変化に強く応答する神経を同定できる可能性がある。

ある神経細胞についてはプロープの特異的な発現を誘導することが困難だと判明したので、4D イメージング観察技術によりこうした神経を測定できるよう、4D イメージングデータに適した画像解析プログラムを作成し、論文として発表した(論文 6 など)。とくに、別々のカメラ等で同時に撮影した多色蛍光の動画を、カメラの出力のまま変換せずにまとめて扱う中間形式を開発し、4D イメージングの画像解析におけるデータ容量を 1/3 程度まで削減することにも成功した。

このプログラムを用いて、22 個の感覚神経に Ca^{2+} インジケータを発現させた線虫の 4D イメージングデータを解析したところ、塩濃度変化にตอบสนองする感覚神経が少なくとも 9 種類にの

ばることが明らかになった。新たに応答が確認された神経が塩走性行動にどのように関わっているかは不明だが、何らかの情報処理を行っている可能性もあり、今後のさらなる研究が必要である。またこのプログラムを用いて、全神経に Ca²⁺インジケータを発現させた線虫の 4D イメージングデータを解析したところ、線虫頭部の中枢神経群は線虫の動きと同期した自発的活動を示すことがわかった。この自発的活動は外部刺激による神経活動を覆い隠すほど強く、また広範囲に渡っていた。外部刺激に依存した神経活動を抽出するためには、多数の個体を観察して比較し、自発的活動を除外する必要があるため、個体間の比較に必要な、細胞の対応付け(同定)のための技術開発と線虫株の作成を進めた。

神経細胞の同定のためには細胞核が標準的な位置に存在する必要があるが、4D イメージングの際に線虫を保定する微小流路内では、線虫が押しつぶされて核の配置が歪んでしまい、神経細胞の同定が困難になることがわかった。線虫をうまく保定しつつも核の配置が歪まないように、微小流路の形状を様々に調整した結果、最大 150 個(8 割)程度の神経細胞を同定できるようになり、神経活動を個体間で比較できるようになった。

哺乳類の神経活動の解析においては、複数のスパイク列から意味のある信号を取り出すために、PCA や NMF、ICA 等の粗視化手法が汎用される。150 細胞程度が同定された 2 個体のデータについて、上記の粗視化手法を適用した結果、刺激依存的な神経活動を抽出するためには ICA が適切であることや、刺激依存的な神経活動は感覚神経の周辺に限局していることがわかった。また取得した神経活動の時系列データについて、自発的な活動がどこまで予測可能か確かめた。予測には人工ニューラルネットワークの一種である Convolutional Neural Network 法か、Cross Embedding 法などで利用される k 近傍法と変数選択法を組み合わせた方法かのいずれかを用いた。2000 フレームのデータのうち最後の 200 フレームを予測用として除き、前半 900 フレームを学習用、後半 900 フレームを検証用として、それぞれ 10 時点先を予測させた。いずれの方法も、塩刺激に応答するような神経の活動は比較的容易に予測できたが、それ以外の自発的な活動については予測が困難であった。また k 近傍法については、ICA 法などでは見落とされやすい、相対的に小さな変化であっても、時系列予測に役立つ特徴を抽出できることがわかった。こうした解析手法を組み合わせ、自発活動を除外し、刺激依存的な活動だけを取り出す手法を開発している。

<2. 実験データに基づいた数理モデルの作成>

外部刺激と感覚神経の活動の関係を数理モデル化の手法を検討した。匂い刺激や温度刺激とその受容神経の活動の関係については、実データに基づいた数理モデル化の手法が最近報告されたので、これらを基礎として様々な拡張を検討した。様々な濃度の酸素刺激を受容神経に与えた際の応答について解析したところ、従来の数理モデルに非線形性フィルタを追加することで数理モデルの性能が向上することがわかった。また塩濃度刺激とその受容神経の応答の関係について、通常用いるステップ状の刺激よりも、ランダムな刺激を与えて応答を測定したほうが、予測性能が高いモデルを作成できることがわかった。これらの方法によって、塩を受容する神経の応答を様々な濃度範囲で予測できる数理モデルを作成することに成功した。

英国 MRC の小田および de Bono との共同研究として、線虫の酸素走性行動の数理モデル化に取り組んだ。酸素感覚受容に関わる神経活動を測定し、刺激と応答の関係を再現する数理モデルを作成することに成功した。この感覚神経モデルの下流に、ピルエット機構を生み出す行動モデルを追加したところ、線虫の酸素走性行動の特徴を再現することができた。環境の感知から神経活動と行動を再現できる包括的な数理モデルの開発によって、環境の情報が神経系でどのように表現され、どのように行動出力へ結びつくかを定量的に明らかにすることができた。これらの成果をまとめた論文は PNAS 誌に掲載された(論文 3 など)。

また作成した酸素走性のモデルを援用して、塩濃度変化に伴う DAG レベルの変化をもとに、塩走性行動の数理モデルを作成した。この数理モデルは現時点ではピルエット機構による塩走性しか再現できないが、風見鶏行動の数理モデルと適切に結合させることで、両者の機構を同時に表現できる数理モデルの基盤とすることができる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. Osamu Hirose, Shotaro Kawaguchi, Terumasa Tokunaga, Yu Toyoshima, Takayuki Teramoto, Sayuri Kuge, Takeshi Ishihara, Yuichi Iino, Ryo Yoshida, [SPF-CellTracker: Tracking multiple cells with strongly-correlated moves using a spatial particle filter], IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics, Volume 5963, Page 1, 査読あり, Year 2017. DOI: 10.1109/TCBB.2017.2782255.
2. 豊島 有, [線虫の 4D イメージング画像処理], 生体の科学, Volume 68, Page 474-5, 査読なし, Year 2017. DOI: 10.11477/mf.2425200701.
3. Shigekazu Oda, Yu Toyoshima, Mario de Bono, [Modulation of sensory information processing by a neuroglobin in *C. elegans*], PNAS, Volume 114, Page E4658-E4665, 査

- 読あり, Year 2017. DOI: 10.1073/pnas.1614596114.
4. 豊島 有, [神経応答のモデリング ~ Ca²⁺イメージングを用いて], 実験医学増刊号, Volume 35, Page 875-8, 査読なし, Year 2017.
 5. 豊島 有、飯野 雄一, [密集した多数の神経細胞の活動を同時に測定する自動画像解析技術の開発], 生物物理, Volume 57, Page 20-23, 査読なし, Year 2017. DOI: 10.2142/biophys.57.020.
 6. Yu Toyoshima, Terumasa Tokunaga, Osamu Hirose, Manami Kanamori, Takayuki Teramoto, Moon-Sun Jang, Sayuri Kuge, Takeshi Ishihara, Ryo Yoshida, Yuichi Iino, [Accurate Automatic Detection of Densely Distributed Cell Nuclei in 3D Space.], PLOS Computational Biology, Volume 12, Page e1004970, 査読あり, Year 2016. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004970.
 7. Terumasa Tokunaga, Osamu Hirose, Shotaro Kawaguchi, Yu Toyoshima, Takayuki Teramoto, Hisaki Ikebata, Sayuri Kuge, Takeshi Ishihara, Yuichi Iino, Ryo Yoshida, [Automated detection and tracking of many cells by using 4D live-cell imaging data], Bioinformatics, Volume 30, Page i43-i51, 査読あり, Year 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu271.

[学会発表](計 101 件)

1. Yu Toyoshima, [Bio-image informatics for whole brain activity imaging and analysis of neural activity of *C. elegans*], 第 57 回日本生物物理学会年会, Year 2019.
2. Yu Toyoshima, [Exploring the information processing of neural network through whole-brain activity-imaging of *C. elegans*], 第 42 回日本神経科学大会, Year 2019.
3. 豊島 有, [線虫全脳の機能的イメージングと動態解析], レーザー顕微鏡研究会, Year 2019.
4. Yu Toyoshima, [Algorithms and software to extract neurons and neural activity from recordings], 22nd International Worm Meeting, Year 2019.
5. Yuichi Iino, [Observation and Analyses of the Dynamics of the Whole Head Nervous System in *C. elegans*], 日本神経回路学会 第 28 回全国大会 (JNNS2018), Year 2018.
6. Yu Toyoshima, [Bio-image informatics for whole-brain activity imaging of *C. elegans*], 線虫研究の未来を創る会, Year 2018.
7. 飯野 雄一, [線虫の頭部全神経のイメージングによる神経回路の動態解析], 日本動物学会 第 89 回札幌大会, Year 2018.
8. Yu Toyoshima, [Simultaneous measurement of whole-brain activity and behavior toward comprehensive understanding of salt chemotaxis of *C. elegans*], International Symposium on Systems Science of Bio-Navigation 2018, Year 2018.
9. 佐藤 研, [線虫全脳イメージングのための高速三次元蛍光顕微鏡の開発], 第 41 回日本神経科学大会, Year 2018.
10. Yu Toyoshima, [Bio-image informatics for whole-brain activity imaging of *C. elegans*], CeNeuro2018, Year 2018.
11. Yu Toyoshima, [Bio-image informatics for whole brain activity imaging], 新学術領域「レゾナンスバイオ」若手の会 Joint Young Researchers' Meeting at Academia Sinica, Year 2017.
12. 小田 茂和, [神経グロビンによる知覚変化の情報処理機構], 第 55 回日本生物物理学会大会, Year 2017.
13. 飯野雄一, [線虫の全中枢神経イメージングによる神経活動と感覚運動情報との関連解析], 第 40 回日本神経科学大会, Year 2017.
14. Keita Mori, [Labeling of active neural circuits by the calcium probe CaMPARI], 21st International Worm Meeting, Year 2017.
15. Stephen Wu, [Whole neural network analysis of *C. elegans* using an automated image processing pipeline], 4th International Workshop on Quantitative Biology, Year 2017.
16. 佐藤研, [線虫 *Caenorhabditis elegans* の高速 3D 全脳イメージング], 第 39 回日本分子生物学会年会, Year 2016.
17. Stephen Wu, [Whole Brain Imaging of *Caenorhabditis Elegans* × Machine Learning], 第 5 回生命医薬情報学連合大会 (IIBMP2016), Year 2016.
18. 豊島 有, [全脳イメージングの自動解析に向けた要素技術について], 第 5 回生命医薬情報学連合大会 (IIBMP2016), Year 2016.
19. Shigekazu Oda, [Neural information processing by neuroglobin in *Caenorhabditis elegans*], The 17th International Conference on Systems Biology, Year 2016.
20. Yu Toyoshima, [Accurate automatic detection of densely distributed cell nuclei in 3D space.], CeNeuro2016, Year 2016.
21. Keita Mori, [Labeling of active neural circuit by the calcium probe CaMPARI], 第 39 回日本神経科学大会, Year 2016.
22. 豊島 有, [全脳イメージングの自動解析に向けた要素技術について], バイオイメージングフォーメティクスワークショップ 2016, Year 2016.

23. Shigekazu Oda, [Neural coding modulation by Neuroglobin alters the behavior of *C. elegans*], European Worm Meeting 2016, Year 2016.
24. Shigekazu Oda, [Neural coding modulation by Neuroglobin alters the behavior of *C. elegans*], 10th European Biophysics Congress 2015, Year 2015.
25. 豊島 有, [3次元的に密集した細胞核の高精度な自動認識手法], バイオイメージングフォーマティクスワークショップ 2015, Year 2015.
26. 豊島 有, [3次元的に密集した細胞核の高精度な自動認識手法], 定量生物学の会 第7回年会, Year 2015.
27. 豊島 有, [密集した細胞核の高精度な自動認識手法], 第37回分子生物学会, Year 2014.
28. Shigekazu Oda, [Neuroglobin Functions as a Frequency Coding Modulator in Sensory Neurons of *C. elegans*], PLM9 (<http://10times.com/plm-9>), Year 2014.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://molecular-ethology.bs.s.u-tokyo.ac.jp/labHP/J/JTop.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。