

研究報告書

「1 細胞レベルで脳高次機能とニューラルネットワークの関係を網羅的に明らかにするリバースオプトジェネティクス」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研究者: 青木 航

1. 研究のねらい

脳が行動を生み出すメカニズムは、生命科学における最大の謎のひとつである。脳は、感覚ニューロン・介在ニューロン・運動ニューロンが相互に接続しあつた複雑なネットワーク構造を形成している。感覚ニューロンにインプットされた情報は、介在ニューロンで計算され、行動という形でアウトプットされるが、その計算プロセスはよくわかっていない。そこで本研究では、仮説フリー・ハイスループット・シングルセル分解能で、ニューロンの機能を網羅的にアノテーションする新規方法論—機能的セロミクス—を確立し、高次機能とニューラルネットワークの関係の解明を試みた。

機能的セロミクスを実装するために、確率的遺伝子発現制御システムであるブレインボウを応用した。ブレインボウとは、Cre/lox 組み換えシステムを利用することで、遺伝子の発現を確率的に制御するものである。我々は、この手法を応用することで、それぞれのニューロンがオプシンで標識されるかどうかを 1 細胞ごとに確率的に決定されるシステムを考案した。オプシン標識がランダム化された動物個体ライブラリが得られれば、光照射下で行動実験を行うことで、ノンスタンダードな行動を示す個体が単離できると期待される。さらに、その個体においてどのニューロンがオプシンを発現していたかを同定すれば、各ニューロンの機能を推定できる。このアプローチは、ノンスタンダードな行動を示す動物個体を先に単離し、それに関与するニューロンを後から同定するため仮説フリーである。また、1 度の実験で多数の標識パターンを検証できるため、スループットが高い。さらに、オプシンで標識されるかどうかは 1 細胞ごとに独立して決定されるため、1 細胞分解能である。

本研究により、「この高次機能に重要なニューロンを 1 細胞レベルで網羅的に同定したい」といった要求に確実に応えられる技術基盤を確立し、次世代ニューラルネットワーク解析法におけるデファクトスタンダードを目指す。将来的には、神経ネットワークの構造情報、機能的セロミクスによる網羅的アノテーション、さらに機械学習を組み合わせることで、個体レベルの神経ネットワーク動作モデルの構築が可能になると期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

線虫 *Caenorhabditis elegans* は最もシンプルな神経ネットワークを持つモデル生物である。その神経系の構造は既に解明され、302 個のニューロンと約 7000 個のニューロン間結合を持つことがわかっているが、その機能はいまだよくわかっていない。

そこで我々は、各ニューロンが行動に与える機能を網羅的にアノテーションするための新規方法論—機能的セロミクス—を提唱してきた(図 1)。我々は、Cre/lox システムとオプトジェネテ

イクスを応用し、ひとつひとつのニューロンに対して光作動性チャネルであるオプシンを制御された確率で標識できる技術を開発した。この技術を用いて、ランダムなパターンでオプシンが発現した線虫ライブラリを構築し、そのライブラリに対して光照射下で行動実験を行い、特徴的な行動を見せた線虫を単離する。さらに、どのニューロンがオプシンで制御されていたかを後から同定することで、ニューロンの機能を1細胞レベルで仮説フリーにアノテーションすることができる。

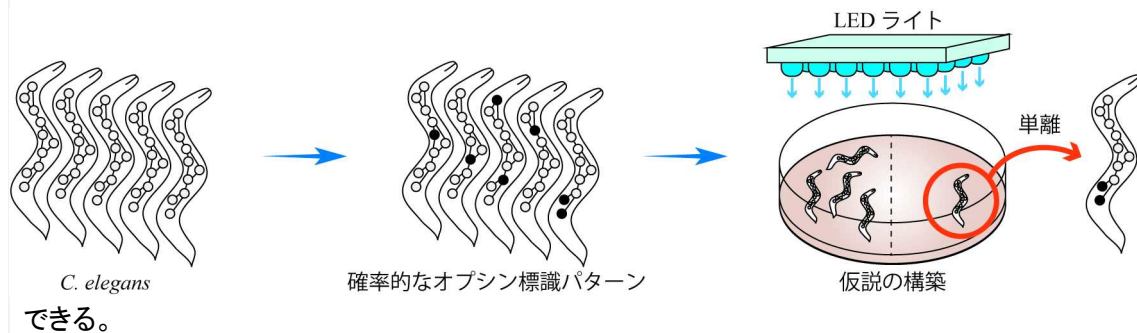


図1:新規方法論「機能的セロミクス」。オプシンを発現するかどうか1細胞ごとに確率的に決定される。オプシン発現パターンがランダム化された線虫ライブラリに対して光照射下で行動を観察することで、行動とニューロンの関係を網羅的に調べることができる。

我々は、機能的セロミクスを線虫に実装し、確率的なオプシン標識を実現した (Sci. Rep., 2018)。また、多数の Cre/lox 変異配列を創出し、自由にオプシン標識率を制御できることを示した (unpublished)。さらに、この方法論を線虫の産卵行動に適用し、ひとつの HSN ニューロンの活性化が産卵行動の十分条件であることを示した (Sci. Rep., 2018)。機能的セロミクスをさまざまな行動系に適用することで、脳の普遍的計算原理を理解できるようになると期待される。

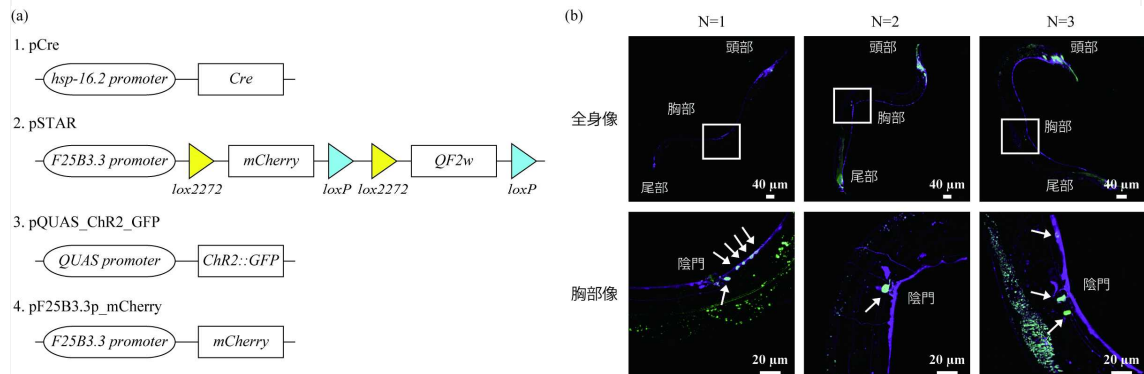
(2) 詳細

研究テーマ A「機能的セロミクスの提唱と線虫 *C. elegans* への実装」

機能的セロミクスを線虫に実装するために、4つのプラスミドを設計した(図2a)。pCre プラスミドは、ヒートショックに応じて Cre リコンビナーゼを発現する。pSTAR プラスミドは、ブレインボウ技術に基づく確率的標識を実現するための核となる要素である。具体的には、全ニューロンで働くプロモーター (*F25B3.3p*) の下流に、2種類の lox 配列 (*loxP* 配列と *lox2272* 配列) を交互に配置し、その間に蛍光タンパク質 *mCherry* と転写因子 *QF2^m* を配置した。*loxP* 配列と *lox2272* 配列は機能的に直交しており、どちらか片方のみが Cre によって認識されて組み換えられる。pQUAS_ChR2_GFP は、転写因子 *QF2^m* に依存してオプシン (チャネルロドプシン 2, ChR2) と GFP の融合タンパク質 (ChR2-GFP) を発現させる。さらに、Cre が働いた後も *mCherry* の標識を継続させるために、p*F25B3.3p_mCherry* を構築した。

これらのプラスミドを線虫に導入すると、初期状態では全ニューロンで *mCherry* が発現するが、Cre によって *lox2272* 間の配列が組み換えられた場合のみに、転写因子 *QF2^m* が発現しはじめる。*QF2^m* が誘導されると、ChR2-GFP が発現し、そのニューロンを光依存的に活性化できるようになる。蛍光タンパク質 GFP が ChR2 と融合しているため、どのニューロンでオプシンが

発現しているかは、蛍光顕微鏡で簡単に同定可能である。実際に、線虫 *C. elegans* の形質転換体を樹立し、ヒートショックを与え、ChR2-GFP が制御された確率で標識されているかどうか



を確認した。独立した3つの個体を観察したところ、ChR2-GFPは各個体において異なるパターンで発現していることがわかった(図 2b)。

図 2: オプシンの確率的標識の実証. (a) 機能的セロミクスを線虫に実装するために、4つのプラスミドを構築した。pCre は、ヒートショックにより Cre を誘導する。pSTAR は mCherry を全ニューロンで発現するが、*lox2272* 間で組み換えが起きた場合に限り転写因子 QF2^w を発現する。pQUAS_ChR2_GFP は、転写因子 QF2^w に依存してチャネルロドプシン 2 と GFP の融合タンパク質 ChR2-GFP を発現させる。pF25B3.3p_mCherry は、組み換え後も全ニューロンを mCherry で標識する蛍光マーカーである。(b) 4つのプラスミドを導入した *C. elegans* にヒートショックを与え、12時間後に蛍光を観察した。その結果、ChR2-GFP を発現するニューロンはランダム化されていた。矢印で示された白い細胞が、ChR2-GFP で標識された細胞である。

研究テーマ B「機能的セロミクスの線虫産卵行動への適用」

機能的セロミクスの概念実証を目指して、我々は線虫の産卵行動に着目した。線虫の産卵行動は、2つの Hermaphrodite-Specific Neurons (HSNs, HSNR および HSNL) を中心とした比較的シンプルなサブネットワークによって制御されていることが知られている。もし機能的セロミクスを用いて HSNs のリアノテーションを迅速に行うことができれば、機能的セロミクスの概念を実証できると考えた。まず、ChR2-GFP が確率的にラベルされた線虫ライブラリを構築した。次に、その線虫ライブラリに光を照射し、動画で行動を撮影した(図 3ab)。多数の線虫個体を解析したところ、65%の線虫が光依存的な産卵行動を示すことがわかった(図 3c)。ネガティブコントロールとして、オプシンの補因子である all-*trans*-retinal (ATR) を含まない条件で同様の実験を行ったところ、産卵行動は認められなかった。

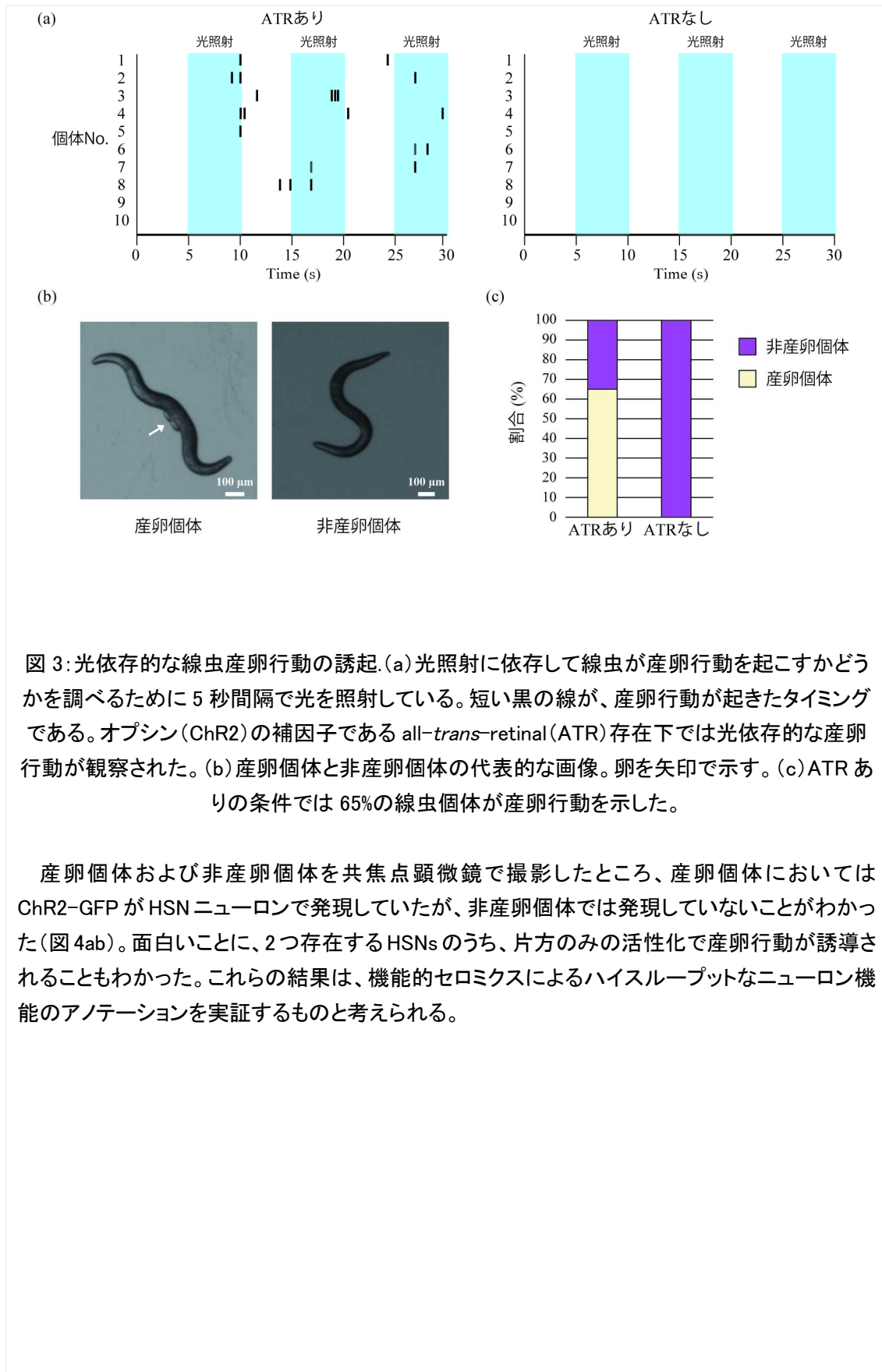


図 3: 光依存的な線虫産卵行動の誘起。(a) 光照射に依存して線虫が産卵行動を起こすかどうかを調べるために 5 秒間隔で光を照射している。短い黒の線が、産卵行動が起きたタイミングである。オプシン (ChR2) の補因子である all-*trans*-retinal (ATR) 存在下では光依存的な産卵行動が観察された。(b) 産卵個体と非産卵個体の代表的な画像。卵を矢印で示す。(c) ATR ありの条件では 65% の線虫個体が産卵行動を示した。

産卵個体および非産卵個体を共焦点顕微鏡で撮影したところ、産卵個体においては ChR2-GFP が HSN ニューロンで発現していたが、非産卵個体では発現していないことがわかった(図 4ab)。面白いことに、2 つ存在する HSNs のうち、片方のみの活性化で産卵行動が誘導されることもわかった。これらの結果は、機能的セロミクスによるハイスループットなニューロン機能のアノテーションを実証するものと考えられる。

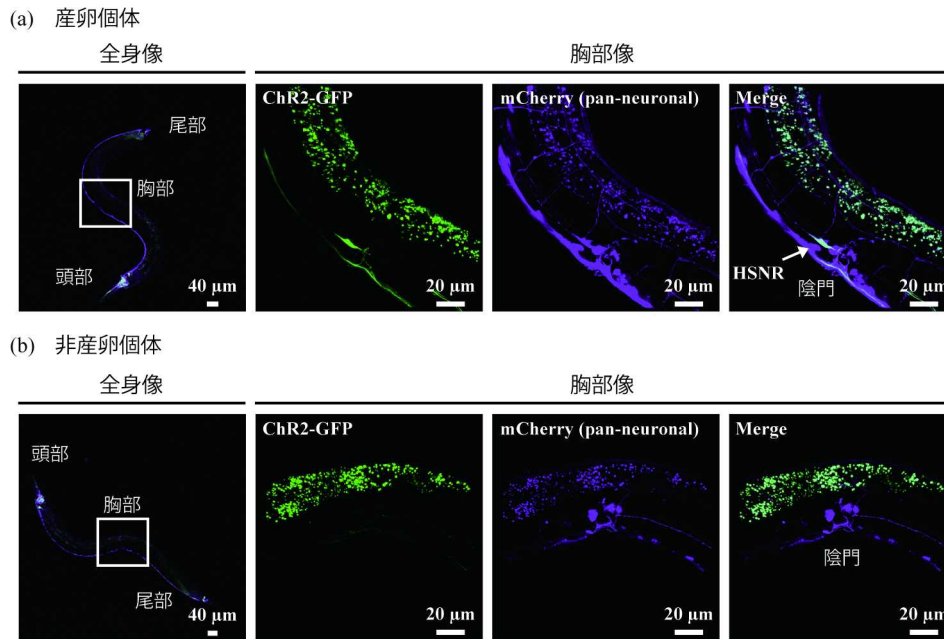


図 4: 共焦点顕微鏡による産卵ニューロンのアノテーション。(a) 産卵個体を共焦点顕微鏡で観察したところ、HSN ニューロンにオプシンが発現していた。ChR2-GFP を発現しているニューロンを矢印で示す。(b) 非産卵個体を共焦点顕微鏡で観察したところ、HSN に ChR2-GFP は発現していなかった。

3. 今後の展開

我々は世界で初めて、仮説フリー・ハイスループット・シングルセル分解能でニューロンの機能を網羅的にアノテーションする新規方法論—機能的セロミクス—のコンセプトを提唱し、その概念を実証した。この方法にはさまざまな強みが存在する。第一に、特別な機器を必要としないため、導入コストが低い。第二に、一匹の遺伝子組み換え体から無数の標識パターンを生み出せるため、仮説フリーかつハイスループットである。第三に、オプシンが発現するかは1細胞ごとに望みの確率で決定されるため、1細胞分解能である。線虫においては、左右対称のニューロン対をプロモーターで区別することは比較的難しいが、機能的セロミクスではそのようなニューロン間でも特異的標識が可能になる。第四に、オプシンに限らずさまざまなエフェクターを利用できるため、拡張性が高い。ニューロンの活性化・抑制・除去・遺伝子発現制御など、さまざまな介入が可能になるだろう。機能的セロミクスは、従来の仮説主導型オプトジェネティクスと相補的な役割を果たすことで神経系の動作原理解明に寄与すると考えられる。将来的には、構造的セロミクスの情報、機能的セロミクスによる網羅的アノテーション、さらに機械学習を組み合わせることで、個体レベルの神経ネットワーク動作モデルの構築が可能になると期待される。

4. 自己評価

● 研究目的の達成状況

本研究の主要研究項目であった、①機能的セロミクスの実証、②自由自在なオプシン標識効率の制御、③多様なニューロン活性制御ツールの確立、④線虫行動に関する網羅的ネットワーク解析において、当初目的を達成した。①機能的セロミクスの実証においては、線虫をモデルとして、オプシンの確率的標識を実現した。②自由自在なオプシン標識効率の制御においては、網羅的な *lox* 変異体ライブラリを創出し、*S. cerevisiae* を用いて切断効率を網羅的に評価した。さらに、得られた *lox* 変異体を用いることで、自由自在なオプシン標識効率の制御が可能であることを示した。③多様なニューロン活性制御ツールの確立においては、線虫においてさまざまなオプシンやアポトーシス誘導タンパク質など、多様なツールを実装した。④線虫行動に関する網羅的ネットワーク解析においては、線虫産卵行動をモデルとして、2つ存在する HSNs のうち、片方のみの活性化で産卵行動が誘導されることを証明した。また、当初計画が順調に進んだため、1細胞特異的にプロテオーム解析を行うための BONCAT system の実装にも挑戦し、その結果未知 GPCR の同定にも成功している。これらの成果から、当初目標を上回る成果を得られたと考えられる。

● 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本研究は、京都大学 大学院農学研究科 応用生命科学専攻 生体高分子化学分野(植田充美研究室)で実施した。研究代表者である青木が研究プランの策定を行い、大学院生4人とともに研究を推進した。また、明治大学の新屋良治講師、中部大学の長谷川浩一准教授と共同研究を推進し、Scientific Reports に論文を発表するとともに、多数の学会で発表を行った。

研究費の執行に関して、微分干渉顕微鏡や実体顕微鏡など、線虫研究を効率的に推進するための設備を整え、また、遺伝子実験やタンパク質実験、線虫行動実験を行うための消耗品を購入した。さらに、研究内容に関する発表および議論を行うための旅費として使用し、そこから有意義な共同研究に至った。

● 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

本研究において、世界で初めて、仮説フリー・ハイスループット・シングルセル分解能でニューロンの機能を網羅的にアノテーションする新規方法論—機能的セロミクス—のコンセプトを提唱し、その概念を実証した。機能的セロミクスは、従来の仮説主導型オプトジェネティクスと相補的な役割を果たすことで神経系の動作原理解明に寄与すると考えられる。将来的には、構造的セロミクスの情報、機能的セロミクスによる網羅的アノテーション、さらに機械学習を組み合わせることで、個体レベルの神経ネットワーク動作モデルの構築が可能になると期待される。また、自閉症などヒトのさまざまな疾患が、ニューラルネットワークの接続パターンもしくは計算プロセスの変化により生じていることが示唆されつつあり、本研究によるニューラルコンピューティングの基本原理の理解は、それらの疾患がなぜ生じるのかを理解し、創薬に繋げる上で貴重な知見になると期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. **Aoki W**, Matsukura H, Yamauchi Y, Yokoyama H, Hasegawa K, Shinya R, Ueda M. Cellomics approach for high-throughput functional annotation of *Caenorhabditis elegans* neural network. *Sci Rep.*, 2018, 8(1), 10380

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

プレスリリース

1. 神経ネットワークの機能を解明する光遺伝学的操作法を開発 –脳動作原理の解明を目指したバイオテクノロジーの展開–. 京都大学プレスリリース.
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2018/180710_1.html

著作物

1. 脳機能の解明を目指した個体レベルの data-driven science の実装. AI 導入によるバイオテクノロジーの発展, シーエムシー出版, 2018.

学会発表

1. Aoki W. Cellomics approach for high-throughput functional annotation of *Caenorhabditis elegans* neural network. Max Planck Florida Institute–JST(PRESTO) Joint Workshop on Neuroscience and Single Cell Research, 2018.
2. Aoki W. Cellomics approach for high-throughput functional annotation of *Caenorhabditis elegans* neural network. 12th International workshop on approaches to single cell analysis, 2019.
3. Yamauchi Y, Matsukura H, Aoki W, Ueda M. Analysis of neural networks of *Caenorhabditis elegans* by functional cellomics. ASBMB, 2019.