

研究終了報告書

「線虫全神経の1細胞遺伝子発現解析と活動計測」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：豊島 有

1. 研究のねらい

神経回路の働きは動物の行動から人間の思考まで多くの生命現象にかかわるため、その動作原理の解明は神経科学の究極の目標の一つである。線虫 *C.elegans* の神経系は 302 個とごく少数の神経細胞から構成され、細胞系譜や神経細胞間の接続も明らかにされている。また味や匂い、温度などの様々な刺激を受け取り、過去の状態を記憶・学習しつつ、化学走性を始めとする多様な生命現象を制御している。こうした行動時の神経活動のダイナミクスを網羅的に観測し、神経細胞間の相互作用を明らかにすることによって、神経回路がどのように外界の環境や記憶といった情報を処理して動的な生命現象を生み出すかを理解することができる。

代表者らはこれまで、線虫頭部にある全中枢神経の活動を同時に観測するための技術開発を進めてきた。その結果、線虫の中枢神経の大半は無刺激状態でも自発的に活動しており、これらが様々な位相で同期していること、また線虫の動きとの相関が強いことなどが明らかになってきた。よって神経系での情報処理のしくみを理解するためには、行動中の線虫の全神経活動を観察することが重要であると考えられた。

そこで本研究では、**(1)線虫を自動追尾する電動ステージを 4D イメージング用顕微鏡に組み込むことで、行動中の線虫の全神経活動を観察すること**を目指した。線虫の移動に伴って姿勢が変わると、画像中の神経細胞も大きく移動するため、細胞の追跡手法も別途開発する必要がある。

また、得られた神経活動を神経回路にマッピングし、回路レベルの解析を行うためには、画像中の細胞が既知の 302 個の神経細胞のいずれであるかを同定(アノテーション)する必要がある。代表者が開発したアノテーション手法は遺伝子発現パターンの情報に依存しているが、これらの情報は不完全であった。そこで、**(2)1 細胞遺伝子発現解析技術を活用して、個々の細胞の遺伝子発現情報を取得し、アノテーションの基盤情報を強化すること**を目指した。とくに近年急速に開発が進んでいる DNA バーコーディング技術により細胞系譜を再構成したり、空間トランスクリプトーム技術により遺伝子発現パターンを取得する。

さらに、**(3)改良した顕微鏡システムとアノテーション手法を組み合わせ、行動中の線虫の全神経活動を観察し、神経回路にマッピングして回路レベルの解析を行うこと**を目指した。

2. 研究成果

(1)概要

項目 1 では、行動中の線虫を自動的に追尾するための電動ステージをスピニングディスク型倒立共焦点顕微鏡に設置した。さらに正立側に自作光学系を追加して正倒立顕微鏡とした。これらの改良によって、自由行動中の線虫の全身像を取得しつつ、頭部を自動追尾して、全脳イメージングを行うことに成功した。また、自由行動中の線虫の姿勢変化をキャンセルするため、線虫の中心線を取得する新規アルゴリズム(Kuze et al, in preparation)や、中心線に基づい

た画像のアライメント手法を開発し、画像中の細胞を自動追跡する既存手法を改良した。これらを組み合わせて、自由行動中の線虫の頭部神経細胞の神経活動を汎神経的に抽出することに成功した。

項目 2 ではまず、線虫の頭部にある約 180 個の神経細胞を同定する手法を開発した (Toyoshima Y., et al., 2020)。この細胞同定手法が根拠とする遺伝子発現パターン情報は整備が不十分であった。そこで 1 細胞レベルで遺伝子発現情報を取得し、空間情報や細胞系譜情報などの他の情報と統合することで、成虫期の線虫における遺伝子発現パターンの情報を整備することを目指した。空間情報については膨張顕微鏡法や seqFISH 法の導入を検討し、この中で用いる HCR 法によって、線虫の成虫における *eat-4* 遺伝子の発現を観察することに成功した。細胞系譜情報については、DNA バーコーディング法の適用を目指して、塩基編集酵素である Target-ACEMax を線虫へ導入し、roller 変異を誘導することに成功した。生殖腺や初期胚における発現を向上させる改良を導入し、塩基編集の効率を確認するための蛍光レポーターを作成した。

項目 3 では、保定された線虫の全脳の神経活動データに対し、時間遅れ埋め込みと独立成分分析を組み合わせた新規手法およびその拡張法を適用して、複数個体に共通する神経活動モチーフとその出現頻度時系列を抽出することに成功した。個体間で共通した神経活動や、個体差の大きな神経活動を検出できた (Toyoshima et al, in preparation)。さらにこの手法を、自由行動中の線虫の全脳神経活動と行動のデータ(ただし細胞は未同定)に対して適用し、線虫の前進や後退、首振りといった要素行動と強く相関する神経活動を取得することができた。また本領域の露崎研究員と共同で、保定された線虫の全脳神経活動データにテンソル分解を適用して、機能的な神経モジュールを抽出するための新規クラスタリング技術を開発し、論文にまとめた (Tsuyuzaki et al, in preparation)。

(2) 詳細

項目 1 「行動中の線虫の全神経活動の観察系の確立」

項目 1 についてはまず、行動中の線虫を自動的に追尾する電動ステージを購入し、スピニングディスク型倒立共焦点顕微鏡に設置した。自動追尾のため赤外明視野像を同時に取得する構成とした。しかし低倍率の対物レンズを用いた場合は線虫を追尾しながら蛍光を撮影できたが、全脳の機能的イメージングには解像度が不足していた。一方、高倍率の対物レンズを用いた場合は、解像度は十分なものの、視野の不足などが原因で自動追尾が難しかった。また行動を解析するための線虫の全身像の取得も難しかった。

こうした問題を解決するため、中間変倍光学系や斜行光学系などいくつかの改良案を自作して検討を重ね、正立側に自作光学系を追加して正倒立顕微鏡とする解決策を見出した。倒立側は高倍率の対物レンズを用いて神経活動観察のための高い解像度を得つつ、正立側は低倍率の対物レンズを用いることで広い視野を得て、線虫の全身像を取得することができるようになった。倒立側の共焦点顕微鏡によって励起された蛍光像を正立側でも撮影して追尾に用いることで、自動追尾の追従性を向上させた。また光学系の途中にパターン照明装置を設置し、任意の時間パターン・空間パターンで光遺伝学的な刺激を与えることも可能とした。さらに新規ゲル基材を採用することで行動を阻害しない観察系を確立した。これらの手法を組み

合わせて、自由行動中の線虫の全身像を取得しつつ、頭部を自動追尾して、全脳イメージングを行うことに成功した。

自由行動中の線虫は様々な姿勢をとるため、撮影した動画中の神経細胞の位置が大きく変化してしまい追跡が難しい。線虫の姿勢は正中線(中心線)の曲がり方として表現できる。全身像から中心線を取得し、曲がった中心線をまっすぐに伸ばして揃えるように画像を歪めるアライメント処理によって、細胞位置の変化を抑制できる。しかしターン行動中の線虫は頭部と尾部が接触した姿勢をとり、既存の細線化手法では正確な中心線を取得することが難しかった。そこで、非ターン行動時の画像に基づいて、中心線から画像を生成するモデルを作成し、ターン行動時の画像に対して、生成モデルの画像と一致するような中心線を推定する大域的最適化アルゴリズムを構築した(Kuze et al, in preparation)。また、神経細胞の位置が大きく変化しても正確に追跡できるよう、既存の木構造追跡法を拡張した。これらの手法を組み合わせ、自由行動中の線虫の頭部神経細胞の神経活動を汎神経的に抽出することに成功した。

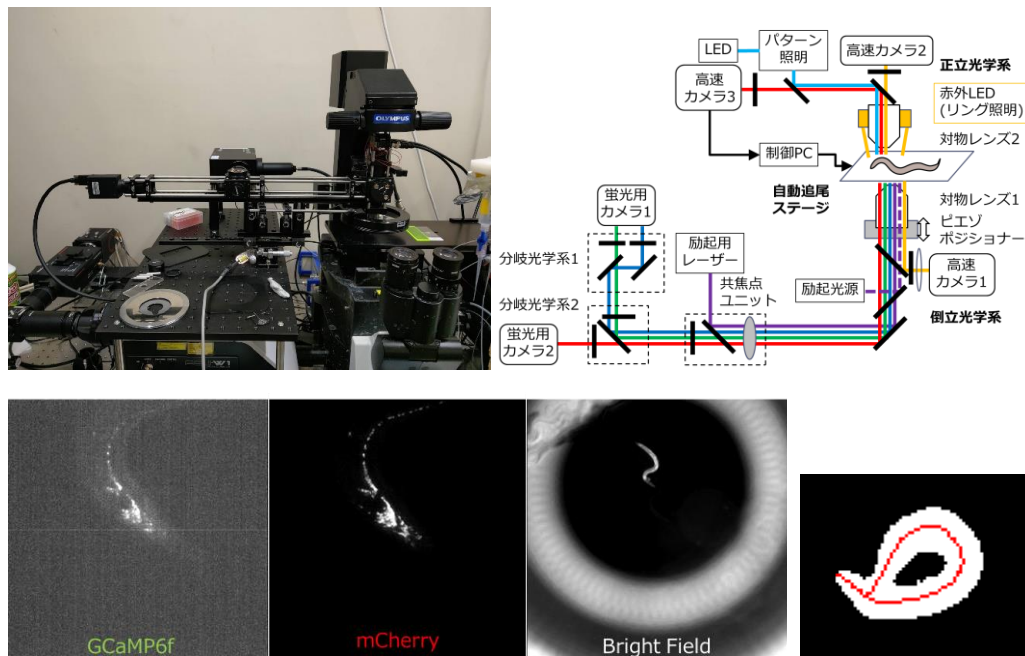


図 1: (上左) 構築した正立側光学系。(上右) 正倒立光学系の概要図。(左下) 撮影した自由行動中の線虫の頭部蛍光像と全身像。(右下) ターン行動中の線虫の正確な中心線の自動取得結果。

項目 2 「1 細胞遺伝子発現解析」

項目 2 についてはまず、線虫の頭部にある約 180 個の神経細胞を同定する手法を開発し、本研究期間中に論文を BMC Biology 誌に発表した(Toyoshima Y., et al., 2020)。この手法では、個々の細胞に特異的に発現する遺伝子のプロモーターによって蛍光タンパク質の発現を誘導して、細胞の位置と遺伝子発現のデータベースを作成した。また複数の細胞特異的プロモーターを組み合わせた株を作出して、個々の神経細胞を塗り分け、全体のうち約 8 割の細胞を識別・同定することができるようになった。またこの方法を 4D イメージングと組み合わせ、全脳の神経活動を神経回路にマッピングすることもできた。

細胞特異的プロモーターによる同定手法は、その遺伝子の発現パターンが一定であることを前提としているが、実際にはある程度のばらつきがあり、細胞同定の妨げとなっている。例えば小胞性グルタミン酸輸送体をコードする *eat-4* 遺伝子は、頭部前方神経節の片側において9細胞で発現すると報告されているが、実際には個体によって7細胞から10細胞までのばらつきがみられた。また孵化直後のL1幼虫では細胞配置のばらつきが少なく、相対位置のみで細胞が同定できるとされており、遺伝子の発現パターンはL1幼虫で同定したとして報告されることが多かった。しかし観察者の目視判断に大きく依存しており、過去に報告された発現パターンが後に誤りだと判明した例もある。さらに、例えばホメオボックス遺伝子である *lin-11* は幼虫と成虫で発現パターンが異なることが示唆されている。このように、神経活動の観察実験に用いられる成虫期において、遺伝子発現パターンの情報は不十分であった。そこで本項目では、1細胞レベルで遺伝子発現情報を取得し、空間情報や細胞系譜情報などの他の情報と統合することで、成虫期の線虫における遺伝子発現パターンの情報を整備することを目指した。

線虫の初期発生における細胞系譜は個体差がほとんどないことが知られている。近年では塩基編集技術を活用したDNAバーコーディング法によってゲノム上に細胞系譜情報を書き込み、後で読み出して細胞系譜を再構成する技術が研究されている。こうした技術を線虫に導入し、細胞系譜を成虫期に読み出すことができれば、細胞同定にとって有用な情報となる。そこで塩基編集酵素のひとつである Target-AID およびその派生である Target-ACEMax を線虫へ導入した。線虫向けにコドン等を改変した Target-AID/ACEMax を、テトラサイクリン依存性遺伝子発現調節システム Tet/Q と組み合わせ、ゲノムに導入した線虫株を作出した。Target-ACEMax を時期特異的に発現させることで、*rol-6 (e187)*の原因変異を特異的に誘導し、roller変異体を作成することに成功した。しかしこれらの変異は子孫に遺伝しなかったことから、この株では生殖腺内や初期胚において塩基編集酵素の発現が誘導できていないと考えられた。そこで線虫の生殖腺で外来遺伝子の発現を誘導できるとされる PATC 配列を Target-AID/ACEMax に導入し、生殖腺内や初期胚での発現効率の改善を図った。また roller 等の全身的な表現型に頼らずに塩基編集の結果を確認できるよう、塩基編集によって開始コドンが修復され蛍光を発するようになる塩基編集レポーターを作成した。現在はこれらを線虫ゲノムに組み込んで、塩基編集効率を計測しつつ、細胞系譜を記録するための sgRNA の設計を進めている。

一方、近年では空間トランスクリプトーム技術の開発が急速に進んでいる。なかでも蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)法は、3次元位置情報を保持しながら遺伝子発現情報を取得できるうえ、神経活動を測定した個体に適用できる可能性もあり、細胞同定に役立つと期待される。ただし組織内部で転写産物(あるいは由来する信号)を増幅する必要があり、空間的な制約から、検出できる遺伝子の種類や量に限界がある。膨張顕微鏡法と組み合わせたり、プロービングを繰り返すことで、検出できる遺伝子の種類と数を増やすことができると考えられた。そこでまず膨張顕微鏡法を線虫向けに改良した ExCel 法の導入を試みたが、膨張処理時のサンプルの安定性が低く、導入を断念した。次にプロービングを繰り返す手法として seqFISH法の導入を進めた。seqFISH法では、HCR法によるプロービングを繰り返すことで、数百種類程度の mRNA を1分子レベルで検出することができる。実際に HCR 法により、線虫の成虫において *eat-4* 遺伝子の発現を確認することができた。しかし、プローブを剥がす処理を

安定して行うためにはサンプルをゲルに埋め込む必要があるため、条件検討を進めている。

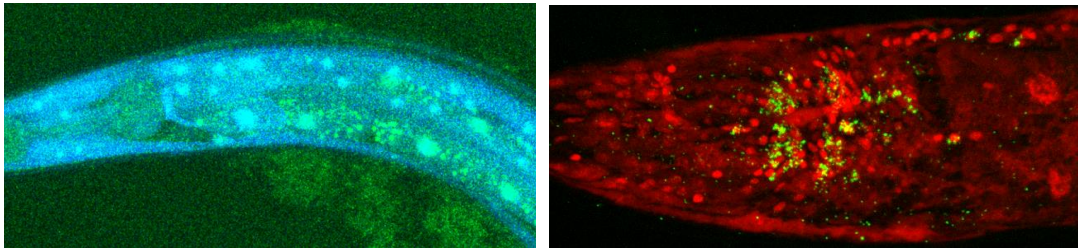


図 2: (左)Target-AID の発現誘導(青)によって塩基編集レポーターの蛍光(緑)が誘導された。(右) HCR 法による *eat-4* mRNA(緑)の検出例。赤色は細胞核を示す。

項目 3 「行動中の線虫の全神経活動の回路レベルでの解析」

自由行動中の線虫の神経活動の取得に時間がかかることが予想されたため、過去に取得済みの、微小流路内に保定された線虫の全脳の神経活動データを用いて、回路レベルでの解析手法を先に確立することを目指した。これらの線虫の神経活動データに対して、時間遅れ埋め込みと独立成分分析を組み合わせた新規手法を適用し、複数個体に共通する神経活動モチーフとその出現頻度時系列を抽出することに成功した。ただし細胞同定手法の制約上、頭部全神経のうち 2 割程度の未同定細胞が生じる。また未同定細胞は個体ごとに異なる。独立成分分析はこうした欠損値を許容できないため、全 24 個体、177 細胞から、欠損値を含まないよう、10 個体、94 細胞に限定して解析する必要がある。そこで、独立成分分析によって得られた行列を拡張し、行列分解法を適用することで、欠損値を推定・補完する手法も開発した。全 24 個体の欠損値を含むデータに対して本手法を適用し、欠損値を補いながら神経活動モチーフとその出現頻度時系列を得ることに成功した。出現頻度時系列の解析から、個体間で共通した神経活動と、個体差の大きな神経活動をそれぞれ検出することができた (Toyoshima et al, in preparation)。

さらにこの手法を、項目 1 で新たに得られた、自由行動中の線虫の全脳神経活動と行動のデータ(ただし細胞は未同定)に対して適用した。その結果、線虫の前進や後退、首振りといった要素行動と強く相関する神経活動を取得することができた。

また本領域の露崎研究員と共同で、保定された線虫の全脳神経活動データから、機能的な神経モジュールを抽出するための新規クラスタリング技術を開発し、論文にまとめた(Tsuyuzaki et al, in preparation)。

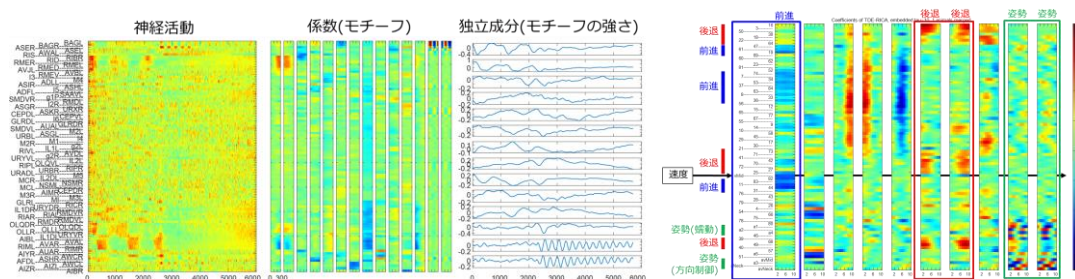


図 3: (左)保定した線虫の全脳神経活動から神経活動モチーフとその出現頻度時系列を得た。(右)自由行動中の線虫の全神経活動と行動データから、前進や後退、首振り等の要素行

動と強く関連した神経活動モチーフを抽出した。

3. 今後の展開

本研究により、自由行動中の線虫の全脳機能的イメージングのための技術的基盤を構築できた。今後は、行動をつかさどる神経活動がどのように生み出されるのかという生物学的な問いに積極的に取り組みたい。また、本研究を通じて、線虫の神経活動でも個体差があることが明らかになってきた。その由来を知るために、今後 2 年程度を目処として、神経活動を計測した個体において空間トランスクリプトームを取得するための技術開発を進めたい。また本研究で確立した線虫の塩基編集技術や神経活動解析技術等はそれぞれ、新規変異体の作出による遺伝子機能解析や、哺乳類脳の大規模神経活動の解析など、様々な活用が期待できる。

4. 自己評価

- 顕微鏡の構築や、塩基編集技術の導入など、問題の解決に時間がかかってしまい、採択当初の研究計画を達成できない部分が生じた。とくに経験の浅い分野での研究計画の見通しに甘いところがあった。
- 本さがけ研究の成果が認められ、研究期間中に准教授へ昇任し、研究室を立ち上げて独立することができた。本研究の支援によって、研究の基盤を確立することができた。
- 本研究を通じて、領域内外で複数の共同研究を開始することができた。とくに、自由行動中の線虫の全脳イメージング技術を活用した新たな共同研究が、JST CREST バイオ DX 領域への応募・採択に至り、今後の研究の発展が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:2件

1. Llian Mabardi, Hirofumi Sato, Yu Toyoshima, Yuichi Iino, Hirofumi Kunitomo, “Different modes of stimuli delivery elicit changes in glutamate driven, experience-dependent interneuron response in *C. elegans*”, *Neuroscience Research* (2022), in press;

自由行動中の線虫が感じる環境変化は、実験で頻用されるステップ状の刺激パターンよりも、徐々に変化するような刺激パターンに近いと考えられる。本研究では塩走性行動中に線虫が感じると想定される、徐々に変化する刺激を与えた際に、感覚神経や介在神経がどのように応答するか調べた。

2. Keita Mori, Naohiro Yamauchi, Haoyu Wang, Ken Sato, Yu Toyoshima, Yuichi Iino, “Probabilistic generative modeling and reinforcement learning extract the intrinsic features of animal behavior”, *Neural Networks*, (2022), 145, 107-120.

線虫の行動の定量的な表現を確率的な生成モデルで学習することで、実際の行動の特徴をうまく再現できることを示した。また光遺伝学的な刺激によって線虫を特定の仮想的な目標地点へ誘導するというタスクにおいて、どのような行動状態のときに光刺激を与えるのがよいかという戦略を強化学習によって獲得したところ、実際の線虫とよく似た行動戦略が得ら

れた。この光刺激戦略の有効性を、実際に閉ループ光刺激実験を行って実証した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のものも含む)

(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)

1. Yu Toyoshima, Hirofumi Sato, Daiki Nagata, Manami Kanamori, Moon Sun Jang, Koyo Kuze, Suzu Oe, Takayuki Teramoto, Yuishi Iwasaki, Ryo Yoshida, Takeshi Ishihara and Yuichi Iino, “Deducing ensemble dynamics and information flow from the whole-brain imaging data”, in preparation
2. Koki Tsuyuzaki, Kentaro Yamamoto, Yu Toyoshima, Hirofumi Sato, Manami Kanamori, Takayuki Teramoto, Takeshi Ishihara, Yuichi Iino and Itoshi Nikaido “WormTensor: a clustering method for time-series whole-brain activity data of *C. elegans*”, in preparation
3. Kuze Koyo, Yu Toyoshima, Yuichi Iino, “WormTracer: a time-lapse pose estimation method for complex postures of *C. elegans*”, in preparation