

行動を制御する神経活動と神経回路網の生体内での 可視化解析

Direct visualization of neural activities and circuits controlling animal behaviors.

研究代表者 独立行政法人産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門 研究員 戸井基道
National Institutes of Advanced and Industrial Sciences and Technology,
Neuroscience Research Institute, Researcher, Motomichi Doi

和文要旨

動物がある行動を起こす時や1つの物事を記憶する時に、脳を形成する多数の神経細胞の中でどのような神経がどのようなタイミングで活性化し、その活動は次にどの神経に受け渡されて最終的な行動が産み出されているのだろうか。その逆に記憶等を産み出す最も単純な神経回路網はどのようなものであろうか。このような疑問に答えるためには脳の中を走る神経情報そのものを捕まえる、すなわち動物が行動を示す際に活性化される個々の神経細胞の活動と繋がりをモニターし、その行動を制御している神経回路網を明らかにすることが1つの方法であると思われる。そのために本研究では、発達した脳を持つ哺乳類の情報処理機構を理解する前段階として、単純な神経系ではあるが様々な本能行動から学習等の複雑な情報処理を行うことも可能なモデル生物、線虫を実験材料とし、行動を制御している神経回路網とその個々の神経の活動変化を生体内で直接可視化することを目指す。

Abstract

When animals show a variety of intrinsic behaviors, or when they learn or memorize something, what kind of neurons in the brain is activated, what the timing of their activations are, and which neurons receive the information from them? Or, what kind of neural circuit is the most simple in order to form memory and learning? To answer these questions, it may be the best way to directly catch the neural information itself in the brain. This means that we should observe the cellular activities of each neuron and their connections in the living animals. In this research, a tiny soil worm, *Caenorhabditis elegans*, is used as a model system to understand complex human brain mechanism. The *C. elegans* is quite useful for this purpose, because they have a simple nervous system but they show a variety of behaviors. The aim of this research is to visualize the neural circuits controlling intrinsic behaviors, and to measure the activities of each neuron in the living animals.

1. 研究目的

動物の生命活動や本能行動を作り出す神経情報は、多数の神経細胞がシナプスと呼

ばれる接続を介して繋がりと、神経回路網を形成することから産み出されている。特に神経系の発達した高等動物では、感覚神経

からの入力情報を脳内の複雑な神経回路網が処理し、その結果生み出される出力情報が筋肉へ伝わることで一つの行動が制御されている。これらの行動を支配している神経回路網を理解するためには、まずどのような種類の神経がどのタイミングで活性化(発火)し、次にどの神経に情報を伝え(神経伝達物質の放出)、受け取った神経群がさらに次にどの神経に情報を受け渡すのか、その情報の流れを知る必要がある。従来の解剖学的解析や電気生理学的研究から、さまざまな生命活動に関与した神経群の同定とそれらの接続様式(シナプス形成)、さらに活動パターンを基に個々の神経細胞の機能や役割などを理解することから、神経回路網の実体が少しずつ明らかになりつつある。しかしながら本質的な神経回路網を同定するためには、ある行動が引き起こされているその時に、生体中の神経細胞をモニターし、どの神経がどのタイミングで活動し、どのようなネットワークが構成されているのかを、直接観察することが最も有効な手段だと思われる。

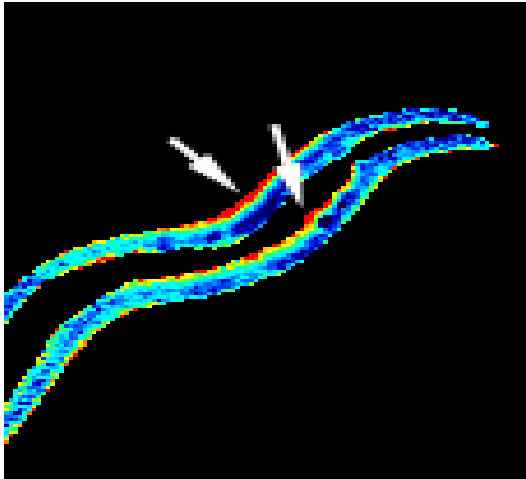
そこで本研究課題ではヒトを含めた高等動物の行動を制御する神経回路網可視化に向けた第一歩として、比較的単純な神経系を持つモデル生物線虫を用い、行動に特異的な神経回路網を形成する全神経細胞の活動変化を可視化・記録することから、神経情報処理メカニズムの実体を理解することを目的とする。具体的な手法として、線虫の神経系に活動依存的(カルシウム濃度依存的)に蛍光波長の変化する蛍光色素タンパク質を発現させ、一つの神経細胞全体からその内のシナプス部位、繋がる下流の神経、最終的にはその行動を制御する筋肉と

繋がる運動神経までを可視化させ、行動時にどのように活動が変化するかを生体中で観察する。第一段階として、2本の神経によって支配されている線虫排泄行動時における神経活動のリアルタイム観察、第二段階として化学走性を支配している神経活動の解析と神経回路網の同定を試みることから、刺激(臭い)を記憶する際に起こる神経活動、あるいは神経回路レベルの変化(神経情報の流れの変化)の生体内解析を目指したい。

2. 研究経過

(1) Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質の選定

線虫の個々の神経活動をモニターする手段として、 Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質と各神経特異的発現活性を持つプロモータを融合させた融合遺伝子を作製し、それを線虫体内に発現させて観察する事を試みた。まず幾つかの Ca^{2+} 感受性タンパク質の中から、線虫で最も効率よく発現する物を選択するために、体壁筋特異的に蛍光タンパク質を発現させて観察することを試みた。その結果、CFP/YFP FRETを用いて Ca^{2+} 測光を行うYC2.12が効率良く発現し、かつ筋収縮時における Ca^{2+} 変動をモニターすることに成功した(図1)。



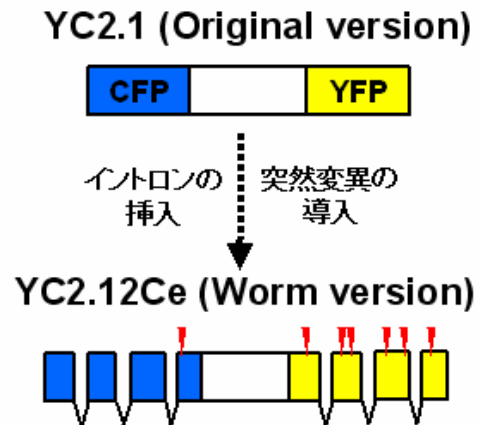
(矢印はCa²⁺濃度の高い筋収縮部位を示す)

(2) 排泄行動を制御する神経活動の観察

生体内での神経活動可視化解析の第1歩として、2本の神経 (AVL と DVB) によりその行動を制御されている排泄行動時の神経活動を記録することを試みた。まず AVL と DVB 特異的な発現活性を持つプロモータ領域を *unc-47* (GABA transporter) 遺伝子上流領域から選り出した。この領域と通常の GFP 蛍光タンパク質との融合遺伝子を用い形質転換体を作製したところ、ほぼ特異的な蛍光を確認することが出来た。次にこのプロモータ領域と YC2.12 との融合遺伝子を作製し、形質転換体の作製を試みた。多数の形質転換体を単離し、それぞれについて蛍光発現を観察したが、顕微鏡の励起光を最大にした際にわずかな蛍光を確認できる程度の発現を持つ転換体しか得られなかった。神経細胞は筋肉等の他の組織と比べて非常に微細であるため、通常より効率の良い、また蛍光強度の高い感受性タンパク質が必要であると思われた。そこで蛍光タンパク質の改良を行った。

(3) YC2.12 の改良と形質転換体の作製

オリジナルの YC2.12 は哺乳類の細胞での効率的な発現を目的として作製されているため、まず遺伝子のコドン変換が線虫に適したものに置き換えた。これにより、同時に線虫では長い cDNA 配列ではタンパク質への翻訳効率が低下することが知られるため、CFP、YFP それぞれをコードする DNA 領域内に数個のイントロンが挿入された形の YC2.12 となった。しかしながら、この場合の蛍光遺伝子領域は、蛍光強度を上げるために入れられた突然変異を従来の蛍光タンパク質のものと置き換えられているため、その蛍光強度は自体は低下する。したがってオリジナル YC2.12 の塩基配列を基に、蛍光強度を高めるための塩基置換を1カ所ずつ、合計で7カ所挿入した CeYC2.12 を作製した (図3)。



これらの各改良した YC2.12 毎に *unc-47* 遺伝子プロモータとの融合遺伝子を作製し形質転換体の単離を行った。しかしながら、最終的に全ての改良を終えた後に単離された形質転換体においても、初期の物よりも蛍光強度は確実に高くなっているものの、その蛍光強度は非常に微量であり、測光に用いるのに十分なものは単離出来なかった。

用いるプロモータ領域も数種類変更してみたが、同様に観察に適したものを得ることは出来なかった。通常の GFP であれば非常に強度の強い蛍光を発する形質転換体を得られるにも関わらず、カルシウム感受性の蛍光タンパク質を用いると、非常に少量の分子を発現した個体しか得られない事は、観察目的にしている運動神経におけるカルシウムのバッファリング（キレート）が個体の生存に非常に重要であることを示しているであろう。したがって、運動神経を用いてのイメージングを一旦中止し、感覚神経を用いた観察を試みた。

（４）化学感覚神経に CeYC2.12 を発現させた形質転換体の作製

線虫の化学感覚神経に CeYC2.12 を発現させるために、数種類の既知のプロモータとの融合遺伝子を作製し、形質転換体を作製した。その中で感覚神経と介在神経、運動神経に至るまでの複数の神経に同時に強く蛍光を発する個体を得ることに成功した。現在この形質転換体を用いて、刺激を与えた時の各神経の活動変化記録を試みている（図 3）。



3．研究成果

これまでの研究から、生体内の神経活動

をリアルタイムで記録できるシステムを構築することに成功した。構築した観察システムと蛍光プローブを用いることで、筋細胞におけるカルシウム変動を生体内で記録することは可能となった。また蛍光タンパク質の改良を重ね、神経細胞でのカルシウム変動が可能な形質転換体を得ることも出来た。さらに神経細胞間でカルシウム濃度の変動に大きな差があることを見出すことが出来た。すなわちある一部の運動神経は、カルシウム結合タンパク質の存在により細胞内のカルシウム濃度が減少することが、個体の生存に大きな影響を与えるが、感覚神経等はその影響は小さい。この発見は今後様々な神経を用いてイメージングを行う上での貴重な予備データとなりうる。

4．今度の課題と発展

現在までに、培養細胞系や単一神経でのカルシウムイメージングについては幾つかの報告があるが、シナプスを介した複数の神経細胞の活動変化をイメージングした例は存在しない。今回作製した観察系においても、2神経の活動変化の同時観察までは可能と思われるが、より複雑な神経回路網における活動変化をイメージングするためには、3次元でカルシウムの濃度変化に依存した蛍光強度の変化を取得できる観察システムが必要となる。今後より S/N 比の高い蛍光プローブの探索と測定システムの改良を重ね、複雑な神経回路網の可視化解析を目指したい。

5．発表論文リスト

なし