

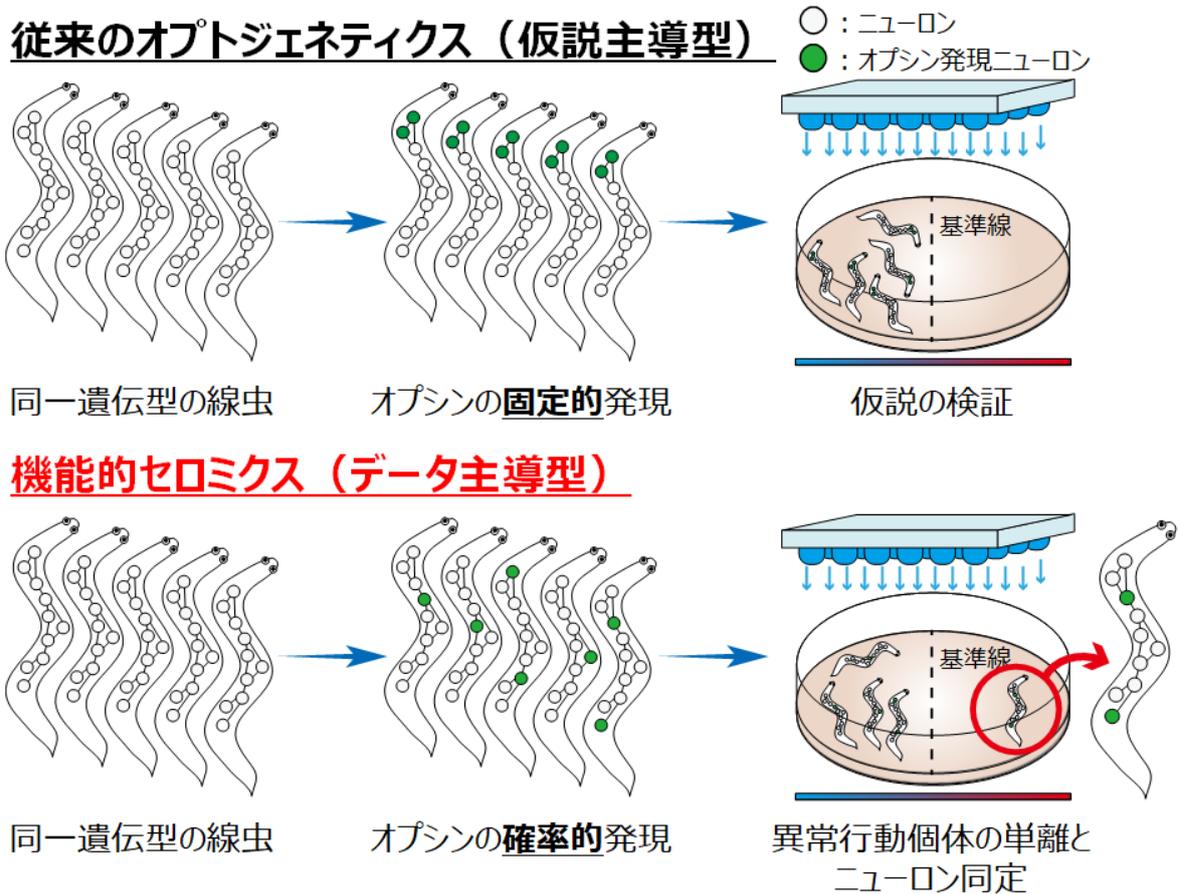
# 神経ネットワークの機能を解明する光遺伝学的操作法を開発

## —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—

### 概要

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻の植田充美 教授、青木航 助教（JST さきがけ研究員兼任）、松倉秀典 修士課程学生、山内悠至 修士課程学生ならびに横山治樹 修士課程学生（研究当時、現：A.T. Kearney 社）は、明治大学および中部大学との共同研究により、神経ネットワークの機能を高速に解明するための新しい光遺伝学的操作法「機能的セロミクス」の開発に成功しました。さらに、この方法を線虫 *Caenorhabditis elegans* の神経ネットワークに適用し、線虫の産卵行動に影響する神経を迅速に同定することに成功しました。複雑な神経ネットワークがどのように感覚情報を統合して出力するのかという、神経ネットワーク計算モデルを構築する上で、非常に重要な知見を提供する成果です。

本研究は、2018年7月10日に英国の学術誌「Scientific Reports」のオンライン版に公開されました。



### 1. 背景

神経科学におけるひとつの目的は、脳が感覚情報を統合して適切な行動を出力するプロセスを理解することです。しかしながら、神経ネットワークは非常に複雑であり、その計算プロセスを理解することは簡単ではありません。例えば、線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) は302個のニューロン（神経細胞）から成るシンプルな神経ネットワークを持ち、ニューロンの全結合パターンも既に解明されています（図1）。しかし、

このようにシンプルな *C. elegans* においてさえ、神経ネットワークと行動の関係はまだまだよくわかっていません。

脳の機能を理解するためには、脳の特定の部位がどのような機能を持っているのかという生理学のおよび行動学的データを網羅的に蓄積することが必要です (図 2)。しかしながら、そのようなデータを生み出すことのできる方法論は無く、神経科学における技術的ボトルネックとなっています。そこで本研究では、「機能的セロミクス」(functional cell-omics)、すなわち、複雑な神経ネットワークにおいて、ある任意のニューロンが、ある特定の行動に対してどのような機能を持っているかを網羅的に探索することのできる新しい方法論を構築しようと考えました。

## 2. 研究手法・成果

この「機能的セロミクス」が必要とする特性は、①ハイスループット (高速かつ大量に評価すること)・②仮説フリー・③1 細胞分解能・④簡便に任意のニューロンの活性を自由に制御可能なことです。本研究では、このような方法論を実現するために、オプトジェネティクス (光遺伝学) と Brainbow テクノロジーに注目しました。

オプトジェネティクスとは、光作動性チャネルであるオプシンをニューロンに発現させることで、ニューロンの活性を光照射によって自由に制御可能とする技術です。この技術の適用により、ニューロンの活性化・抑制・破壊といったさまざまな介入実験を優れた時空間分解能で実現可能となりました。しかし、従来のオプトジェネティクスでは、どのニューロンにオプシンを発現させるかをあらかじめ考え、適切なプロモーターを選択する必要があります。そのためこのアプローチは、既に存在する仮説を精密に検証するには効果的でしたが、まったく新しい発見を生むことは困難でした。

そこで本研究は、従来のオプトジェネティクスの発想を転換し、仮説がなくても (仮説フリー) 神経ネットワークを操作できる方法論を構築しようと考えました (図 3)。すなわち、ひとつひとつのニューロンにおいてオプシンが発現するかどうかを確率的に決定するシステムを開発し、さまざまなパターンでオプシンが標識された線虫ライブラリを取得します。この確率的ラベリングを実現するために、Cre-lox システムを基盤とする Brainbow テクノロジーを採用しました。Brainbow テクノロジーによりオプシンでランダムに標識された線虫ライブラリが得られれば、そのライブラリに対して光照射下で行動実験を行うことで、今まで知られていなかったような神経ネットワークと行動の連携をハイスループットに発見できます。このアプローチは、まず異常な行動を示す個体を発見し、後からどのニューロンが影響していたのかを同定できるため、「仮説フリー」といえます。

次に、機能的セロミクスを実装するために、Brainbow テクノロジーに基づいて遺伝子組み換え線虫を作りました。この線虫では、熱刺激を加えることで組換えタンパク質 Cre が誘導されます。さらに、Cre がゲノム構造を変化させることで、オプシンが発現するかどうか確率的に決定されます。このオプシンには、蛍光タンパク質である GFP が融合されているため、オプシンで制御されていたニューロンを行動実験後に簡単に同定することができます。実際に遺伝子組み換え線虫を樹立して一過性の熱刺激を与えたところ、それぞれの個体において、異なるパターンでオプシンが発現していることがわかりました (図 4)。

さらに、この線虫を用いて、線虫の産卵行動に対して影響を与えるニューロンの超高速同定を試みました。線虫の産卵行動は比較的シンプルな神経ネットワークによって制御されており、ふたつの Hermaphrodite-Specific Neuron (HSN) が中心的な役割を担っていることが知られています。オプシンを確率的に標識した線虫ライブラリを構築し、このライブラリに対して光を照射しながら動画を撮影しました。多数の個体の動画

を撮影したところ、光依存的に産卵した個体は 65%、産卵しなかった個体は 35%の割合でした。オプシンが機能していない線虫では、産卵行動は観察されませんでした。次に、産卵個体と非産卵個体を単離し、確かに HSN にオプシンの発現が認められることを共焦点顕微鏡によって確認しました (図 5)。これらの結果は、本研究で提唱した機能的セロミクスにより、ある行動に対して影響するニューロンを超高速に同定可能であることを示しています。

### 3. 波及効果、今後の予定

本研究では「機能的セロミクス」を用いることで、ある行動に対して影響し得るニューロンを高速かつ網羅的に同定することに成功しました。この結果は、ハイスループット・仮説フリー・1細胞分解能かつ簡便な神経ネットワークの機能解明を実現するものです。将来的には、「記述的セロミクス (脳の構造の網羅的データ)」と「機能的セロミクス (脳の機能の網羅的データ)」を蓄積し、それらを AI など機械学習によって統合することで、複雑な神経ネットワークがどのように感覚情報を統合して出力するのかという神経ネットワーク計算モデルを構築する上で、非常に重要な知見を提供できると考えられます。

### 4. 研究プロジェクトについて

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻、明治大学、中部大学との共同研究です。本研究は、科学技術振興機構さきがけ (番号: JPMJPR16F1) および日本学術振興会・科学研究費 (科研費番号: 17K19452) のサポートのもと推進されました。

#### <用語解説>

**Cre-lox システム**：遺伝子を組み換えるための方法論のひとつ。遺伝子組み換えタンパク質である Cre が lox 配列を認識することで、任意の遺伝子配列をゲノムに挿入・除去することができる。

**Brainbow テクノロジー**：Cre-lox システムを応用し、遺伝子の発現を確率的に制御できるようにしたもの。

#### <論文タイトルと著者>

タイトル：Cellomics approach for high-throughput functional annotation of *Caenorhabditis elegans* neural network

著者：Wataru Aoki, Hidenori Matsukura, Yuji Yamauchi, Haruki Yokoyama, Koichi Hasegawa, Ryoji Shinya, Mitsuyoshi Ueda

掲載誌：Scientific Reports DOI: 10.1038/s41598-018-28653-x

#### <お問い合わせ先>

青木航 (あおき・わたる)

京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 応用生化学講座 生体高分子化学分野 助教

TEL: 075-753-6495 FAX: 075-753-6112

E-mail: aoki.wataru.6a@kyoto-u.ac.jp

<参考図>

図1：線虫の「心」はどのように機能するのか？

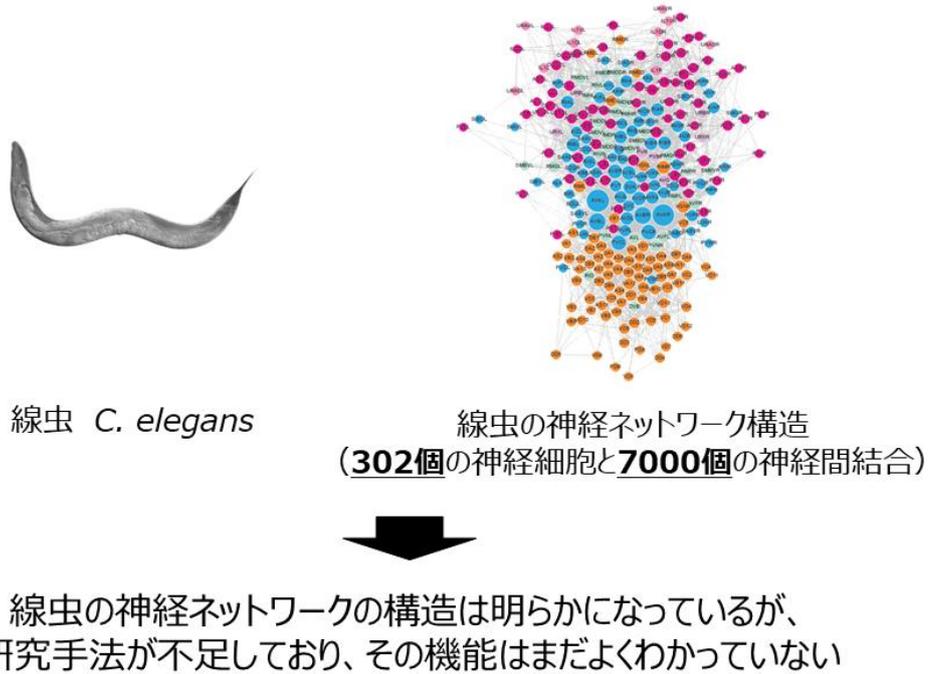
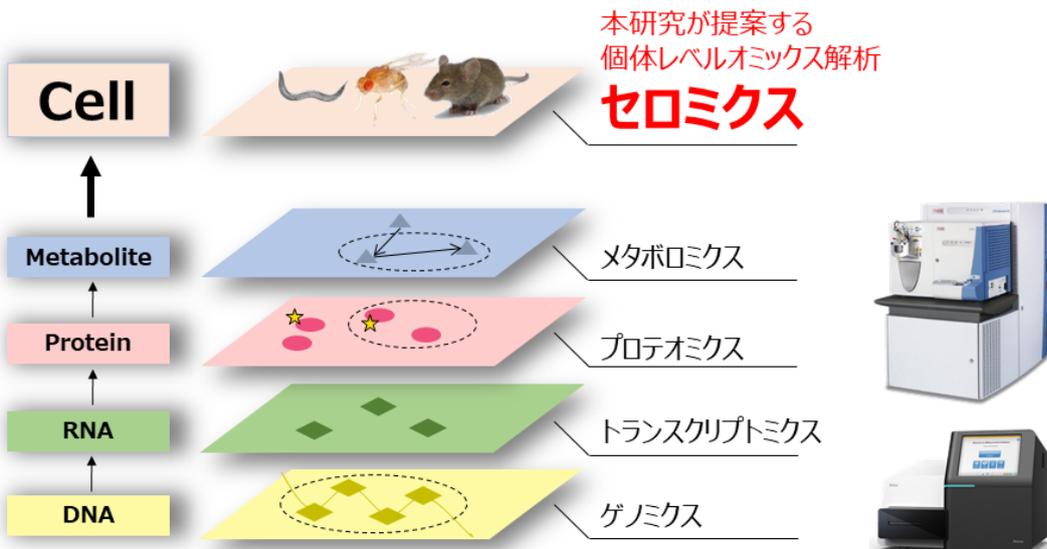


図2：個体レベルのオミックス解析が必要とされていた



※オミックス解析：すべての構成要素を同時に計測し、  
ビッグデータをもとに価値のある情報を抽出する方法

図3：従来法と本提案手法の比較

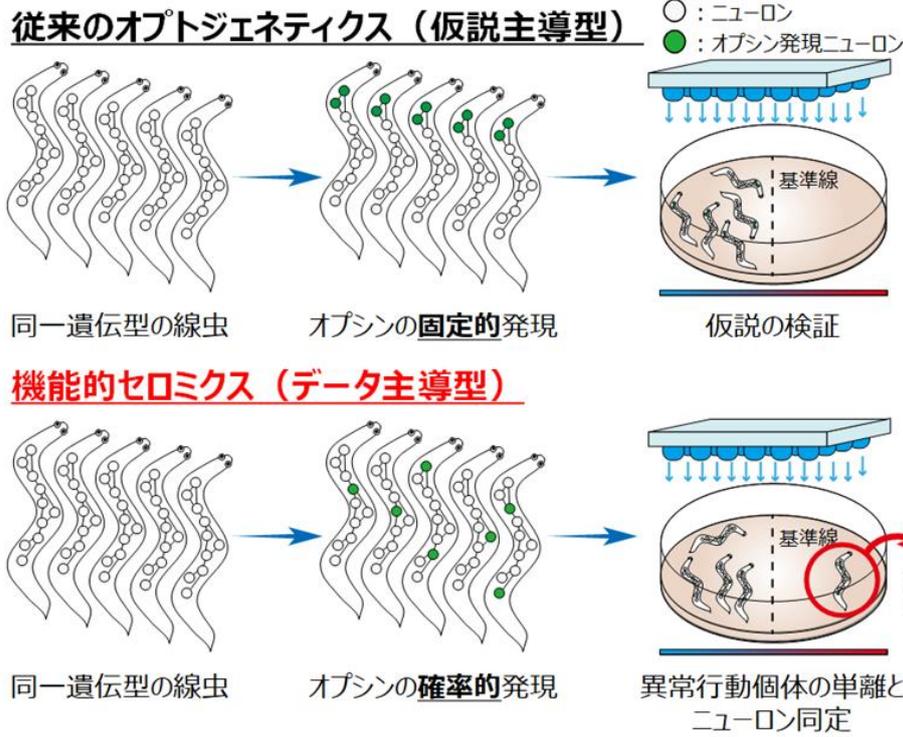


図4：機能的セロミクスによるオプシンの確率的標識

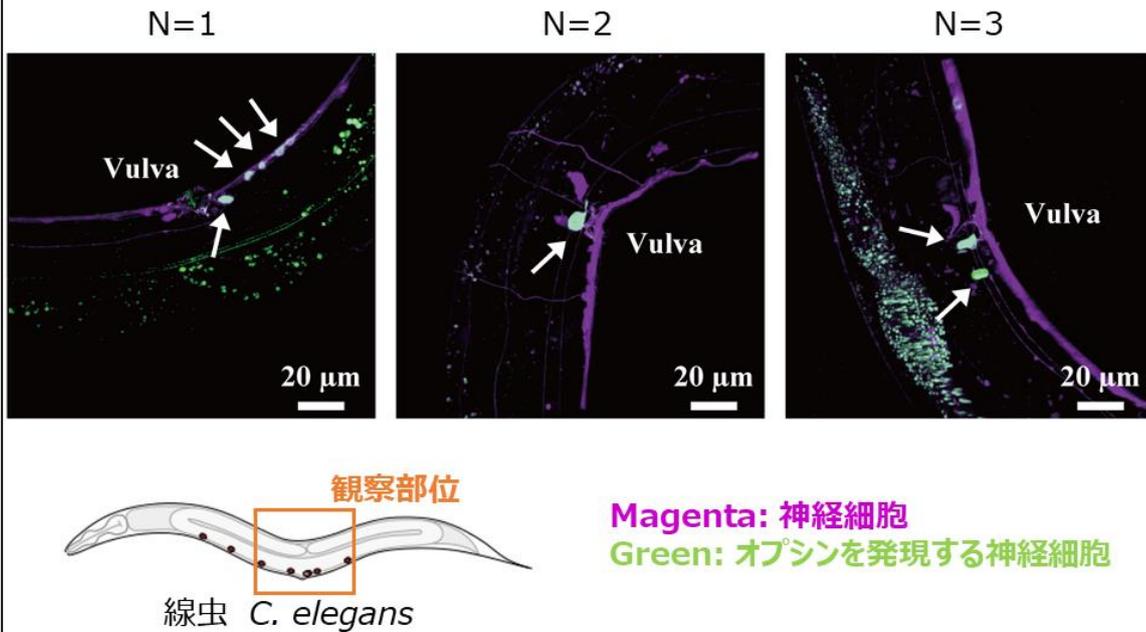
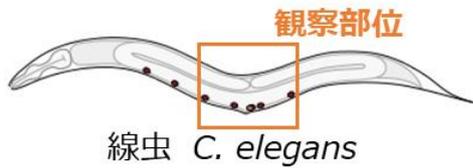
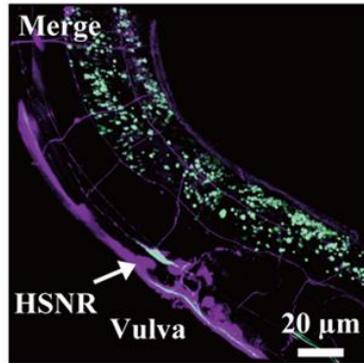
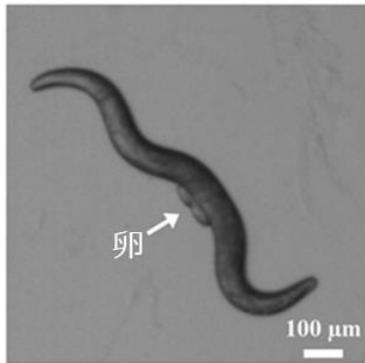


図5:産卵行動に影響する神経細胞の超高速アノテーション

光に依存して産卵する線虫では、HSNニューロンが活性化されている



Magenta: 神経細胞  
Green: オプシンを発現する神経細胞