

論文審査の結果の要旨

氏名 尹 永扨

本研究では、ショウジョウバエ幼虫において light-sheet 顕微鏡と calcium imaging 手法を組み合わせた whole-brain functional imaging を行い、異なる運動パターン下で起こる神経回路の活動パターンを解析した。作成したプログラムは、何千個の神経細胞が含まれる中枢神経系の calcium imaging 動画から細胞の場所および活動パターンを抽出し解析することを可能にした。

ショウジョウバエ幼虫の運動に関わる神経回路については未だ不明である。ショウジョウバエ幼虫の運動パターンそして運動神経細胞と筋肉の配線についてはいくつかの研究がなされ、運動の際運動神経細胞の活動の時空間パターンについては大まかにわかっている。また、幼虫の中枢神経系の運動に関わる回路に対しては小さい機能単位での研究がいくつかなされている。しかし、それらの機能単位は回路の他の部分との相互作用が大きく、独立した回路として取り扱うことは困難である。したがって、回路の動作原理を探るために最後にはそれらの相互作用を考慮しなければいけない。

そこで本研究は、light-sheet を用いてショウジョウバエ幼虫の全神経回路の活動測定および解析を試みた。まず、全神経細胞に calcium indicator である GCaMP6f タンパク質を発現するような遺伝子配列を持つ 1 れい幼虫を用意した。3 れい幼虫に比べ小さい体積を持つことからより深い領域が撮影できる。そして、筋肉から伝わる動きを排除するため中枢神経系を取り出し測定を行った。

従来の小規模の calcium imaging 動画の解析に比べ、本研究で撮影するような大規模の calcium imaging の動画を扱うにはコンピューターを用いた前処理を行うことが必要不可欠である。ショウジョウバエ幼虫の中枢神経系に含まれる神経細胞の数はおよそ 1 万個存在し、手作業で前処理を行うことはほぼ不可能である。よって、撮影したすべての神経細胞からの蛍光強度を抽出するためにいくつかの前処理のプログラムを作成した。

Calcium imaging 動画の中に含まれる試料が時間とともにずれていくことがわかり、まずそのズレを補正するプログラムを作成した。従来の単純な補正の方法では撮影した動画を補正することができなかった。大きな理由として 1) 神経活動による蛍光強度の散発的な変化、2) calcium indicator の退色、が考えられた。問題 1 を解決するために、画像を小さく分けて各部分に対してレジストレーションを行い、求めたすべてのオフセットの分布から一番頻度の高い値を選択することにより散発的なエラーを除くことにした。画像の比較の際には normalized cross-correlation を用いることにより問題 2 を回避することができた。実データに対して補正を行った結果、十分な精度で各時刻での試料の位置が求めることができた。

次に、calcium imaging 動画からすべての神経細胞の活動の時系列を求めるため、細胞の位置を特定できるプログラムを作成した。この手順のために試料は核局在性の mCherry 赤色タンパク質を発現するようにしてある。赤色波長から撮影しているイメージに laplacian of gaussian フィルターをかけることにより、細胞の中心を求めることができた。

細胞の位置情報から細胞に含まれる領域の voxel の値を平均することにより細胞の活動を得ることができる。しかし、求めたシグナルは細胞の活動だけでなく退色などの影響によっても変化していた。このシグナルから活動情報のみを綺麗に抽出するために規格化を行うプログラムを作成した。原理は各時刻に対しローカル領域をもうけ、それらの最小値をバックグラウンドとみなした。シグナルをそのバックグラウンドの時系列で割ってから適切にシフトさせることにより退色などの影響を大きく軽減することができた。

観測している回路の状態を決めるため、まず先行研究から得られている知見をもとにいくつかの回路状態を定義し、それらの中の遷移モデルを立てた。そのモデルを実データに実装するために hidden Markov model を採用した。実データを使った Baum-Welch algorithm 学習の結果、大まかな初期のパラメータから実データを反映した状態間の遷移確率が求まった。そのパラメータを使い Viterbi algorithm を施し実データの各時刻での回路の状態を求めることができた。

求まった回路の状態の情報を用いて、すべての細胞に対し活動パターンを定量した。前進運動および後進運動の状態との相関を評価することにより、各細胞の状態依存性を定量することができた。前進特異性の細胞と後進特異性の細胞は両方存在し、それらの場所を調べた結果脳だけでなく VNC (ventral nerve cord)にも多数存在することがわかった。

VNC に含まれる状態特異性の細胞群はその状態の時に活動する運動神経細胞群と類似する時空間パターンを示した。これらの細胞群は中枢神経系が異なる活動パターンを出力するための重要な役割を担っていると考えられる。また、前進運動状態の開始とともに活動する神経細胞のうち、脳に近い領域に含まれている細胞群を見つけることができた。これらの細胞群は場所と活動のタイミングを両方考慮すれば、パターン生成に直接関与しているのではなく状態の開始に関わっていると推測することができるため、運動を引く起こす役割を担う細胞の候補として考えることができる。

以上のように、本研究ではショウジョウバエ幼虫の whole-brain functional imaging のデータから活動の取得するための前処理を開発し、hidden Markov model を実装し回路の統計的な解析を行った。運動状態依存的な細胞群の同定についての研究はごく限られていることから、今回の見つかった細胞群の情報は、それら細胞の存在および場所の情報を提供する。また、この手法で得られた細胞の活動マップは、異なる活動に関わる回路の同定に大きな貢献をなすと期待される。そして、まだ報告されていない前進運動を誘発する候補となる細胞群を見つけることができた。

この論文は、中江博士、谷口博士、高坂博士、野中博士、石井博士、能瀬博士と共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を行ったもので、提出者の寄与が十分であると認められる。したがって審査員一同は同提出者に博士（理学）の学位を授与できると判断する。