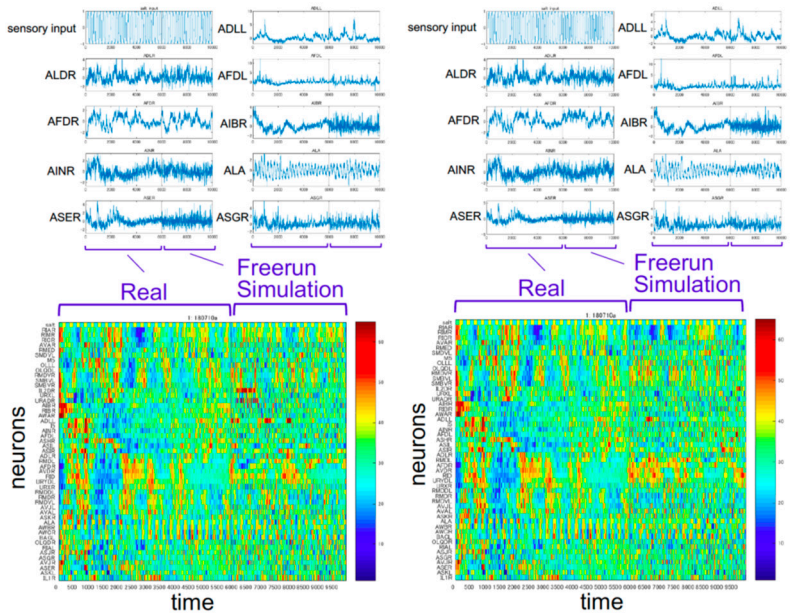
73　遺伝子・シナプスレベルでの行動の個体差の生成機構	飯野　雄一

【目的】あらゆる生物は個体差を持っている。個体差の原因としては、「遺伝的な差異」、「環境の差異」、「発生過程における確率的な要因」などが考えられる。個体差について特に興味深いのは、脳神経系の個体差である。本研究では、遺伝的な差異が排除できる線虫 *C. elegans* を用いて神経系の個体差と行動の個体差がどう生じるかを明らかにすることを試みた。本報告ではそのうち神経系の個体差の定量化とモデリングによる個体差の原因の検討について報告する。

【方法】線虫カルシウムプローブ Yellow Cameleon 2.60 を全神経に発現する線虫を微小流路チップに保定し、塩濃度変化の感覚刺激を与えつつ、対物レンズを高速に上下動させながら共焦点画像を取得する「4D イメージング」の装置により時系列立体画像を取得し、コンピュータビジョンにより定量化した。得られたデータから、カーネル法の一種、gKDR 法を発展させた gKDR-GMM 法を用いてシナプスのモデル化を行い、それらのモデルを用いて神経系全体の活動のシミュレーションを行った。

【結果】すべての個体について、塩の感覚刺激の周期で活動する一群の神経がみられた一方、感覚刺激とは異なるタイミングで同期して活動状態が変化する（自発的活動とみなされる）神経群が見られた。最も大きな同期集団は自発的活動を示すグループで、反転した活動を示す神経群もみられる。これら正逆のグループのサイズが個体により異なることが認められた。このような神経活動が生じる機構を探るため、線虫の神経回路の情報をもとに、各神経細胞の活動がそれにシナプス入力する神経の活動に影響されて決まる関係を上記で考案した方法により数理モデル化した。このモデルによりシミュレーションを行ったところ、図のように、実際の神経活動と同様の同期性、偶発性をもった神経活動が再現された。このモデルにおけるシナプス連絡強度を調べたところ、単一の神経が多数の神経に影響を与えて同期活動を作っている形跡はなく、弱い多数の相互作用をもとにした自己組織化により同期活動が生成されていることがわかった。個体差についても、単一の大きな差異ではなくシナプス連絡の軽微な差異が積み重なって神経系全体の活動の差異を生じていることが推定された。

頭部全神経の活動測定データに基づく神経ネットワークのシミュレータを作成し個体差の要因を探った



73. 遺伝子・シナプスレベルでの行動の個体差の生成機構

飯野　雄一

東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻

Key words：線虫 *C. elegans*，gKDR 法，神経回路モデル，シナプス，シミュレーション

緒　言

あらゆる生物は個体差を持っている。個体差の原因としては、「遺伝的な差異」、「環境の差異」、「発生過程における確率的な要因」などが考えられる。個体差について特に興味深いのは脳神経系の個体差である。多細胞のネットワークからなる神経系で個体差がどう生じ、それが行動や思考などの情報処理にどう影響するかは生物学の大きな問題である。

本研究では上記のうち、「遺伝的な差異」の影響を排除して、神経系の個体差と行動の個体差がどう生じるかを明らかにする。用いるモデル生物、線虫 *C. elegans* では 959 個の体細胞すべての細胞系譜が明らかにされており、この中には 302 個の神経細胞が含まれる。本研究において特に重要なのはその生殖様式である。研究に用いた雌雄同体は自家受精で増殖するため、遺伝的な背景が親と子孫集団の間で完全に同一である。従って、個体差の要因として遺伝的要因を考慮する必要がない。

我々はこの線虫を用いて、4D イメージングの手法により、頭部の全神経細胞の活動を同時に測定する系を構築した（石原ら、岩崎ら、吉田らとの共同研究、JST-CREST の支援による）。これにより測定した神経系の活動パターンには、予想外に個体間の差異が非常に大きかった。しかしながら、線虫においてはどの個体も同じ行動（例えば化学誘引物質への化学走性）ができるように見える。

そこで、本研究では行動の個体差を定量化するとともにその原因を探るための研究を行った。

方　法

1. 蛍光画像の取得と定量化

頭部全神経のイメージングには 4D イメージングシステムを用いた。このシステムは共同研究者の九州大学、石原健教授の研究室に構築されたもので、本装置の構築過程より共同研究を行っている。測定はチップに保定した線虫に定期的な塩濃度変化の感覚刺激を与えながら行い、対物レンズをピエゾ素子により高速に上下に移動しつつ蛍光画像を取得する。1 秒間に約 5 立体が撮影できる。コンピュータビジョンにて同定された各神経の範囲について YFP の蛍光と CFP の蛍光の比（細胞内カルシウムレベルに対応）を神経活動の指標として用いた［1，2］。顕微鏡の画像の関係（レンズから遠い側は見えにくいなど）ですべての神経が捉えられていない場合もある。また、名前付けが出来ない神経もあり、これは個体ごとに異なることに留意頂きたい。

2. 神経活動のシミュレーション

各ターゲット神経について、神経回路情報から、二段階以内で接続しているプレシナプスの神経の活動に時間遅れ埋め込みを施す。具体的には現在からさかのぼり 20 タイムステップ（約 4 秒）おきに 5 段階の過去データを用いた。つまり、シナプス二段階以内の神経の数×5 の次元数にてターゲット神経の 5 ステップ後（1 秒後）の活動を予測するモデルを作成する。なお、説明変数にはターゲット神経自身の活性も含む。これにカーネル法による次元削減手法である gKDR（gradient Kernel Dimension Reduction）［3］および変数選択手法 CISE［4］を用いた。これで 3 次元に減らした説明変数と目的変数の同時確率分布を 5 成分の混合正規分布モデルで確率モデルとしてモデル化した（gKDR-GMM モデル）。

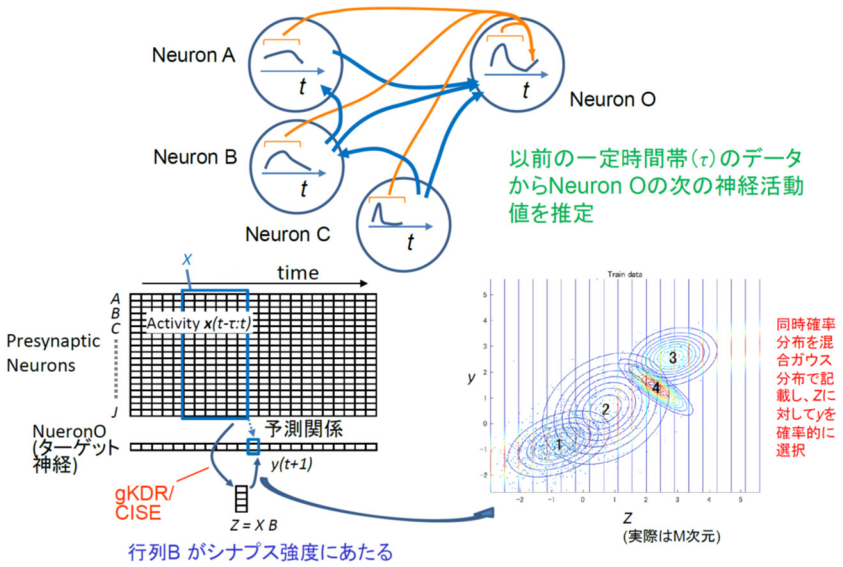


図 1. 実データに基づく神経活動のシミュレーション

モデリングの流れの模式図。

結　果

本研究では行動の個体差の定量化も行ったが、紙面の関係で神経活動の個体差の解析に絞って記載する。

1. 神経活動の個体差

4D イメージングにより得られたデータについて、まず個体によりどのように異なるかを解析した。すべての個体について、塩の感覚刺激の周期で活動する一群の神経がみられた一方、感覚刺激とは異なるタイミングで同期して活動状態が変化する（自発的活動とみなされる）神経群が見られた［5］。最も明確にみられる差異として、これらの集団の大きさに個体差が見られた。これを定量的に評価するために、各個体において、測定された全神経の活動を主成分分析にかけ、第一主成分の主成分スコアと各神経の活動の相関係数を計算し、これを大きい順に並べて表示した結果が図 2 である。

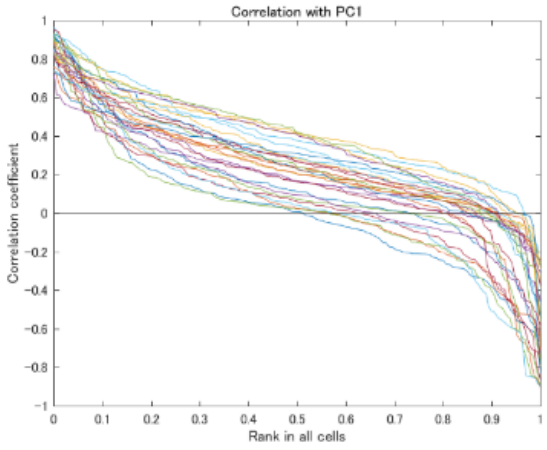


図 2. 各神経の活動の第一主成分との相関関係

第一主成分スコアと各神経の相関係数を降順に並べた結果。横軸は測定された全神経のうちの順位率。各色の線は各個体（全 28 個体）を示す。

第一主成分（最も主要な神経活動パターンの代表値と見なされる）と正の相関を持つ神経と負の相関を持つ神経との割合が個体によって大きく異なることが見てとれる。実際の活動の時間経過の例を図 3 の上段に示す。最も大きな同期集団は上述のような自発的活動を示すグループで、反転した活動を示す神経群もみられる。これら正逆のグループのサイズが異なることは、図 3 下段において、相関関係を持つ神経ペアが青色で示されるのでその形が異なることからも理解できる。

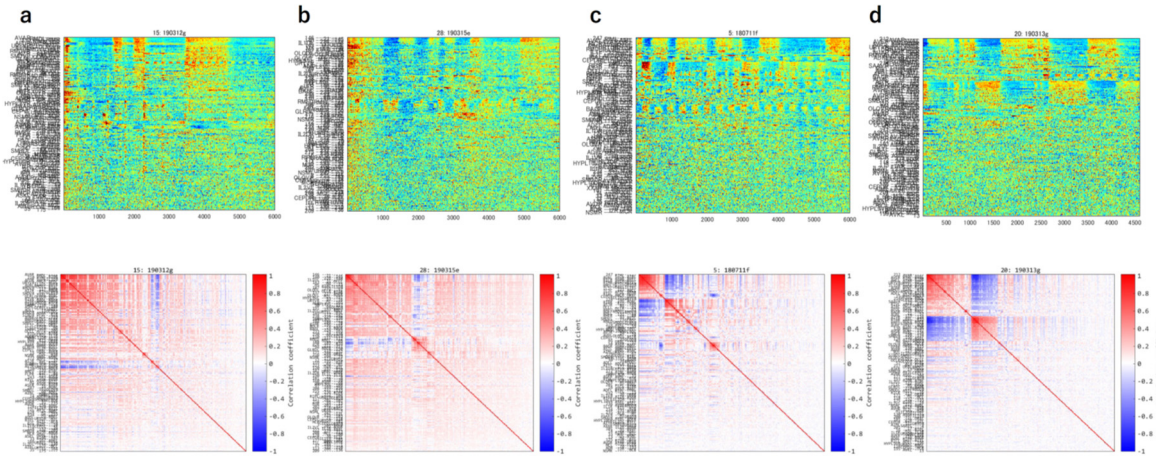


図 3. 相関関係が異なる個体の例

上段）神経活動のヒートマップ。各行が各神経、横軸が時間（測定のタイムポイント＝約0.2秒単位）。寒色から暖色になるほど高いカルシウムレベルを示す（高い神経活性を反映）。各個体について階層的クラスタリングを行い、似た活動の神経が近くの行に来るように並べ替えてある。名前のついていない神経もすべて含む。

下段）神経間の相関係数を総当たりで計算し、マトリクスで表現したもの。赤色が正の相関、青色が負の相関。神経の順は上段と同じ。

a、b）は図1で線が上側に来ていた個体（第一主成分と正の相関を持つ神経が多い）の2例。

c、d）は図1で下側に来ていた個体（第一主成分と負の相関を持つ神経が比較的多い）の2例。

次に、神経を同定した情報を加えて解析を行った。すなわち、神経の名前付けの情報を用い、個別の関係をより明示的に表現するために、名前をもとに神経の順序を揃えて表示した相関マトリクスを図 4 に示す。特定の神経対に注目した場合に、個体によって相関が正負と異なる場合があること、同期する相手が個体により少しずつ異なることがわかる。特定の神経対の例における活動の時間経過を図 5 に表示した。個体により正の相関関係（同じ動き）の場合と負の相関関係の場合（逆の関係）がみられる。

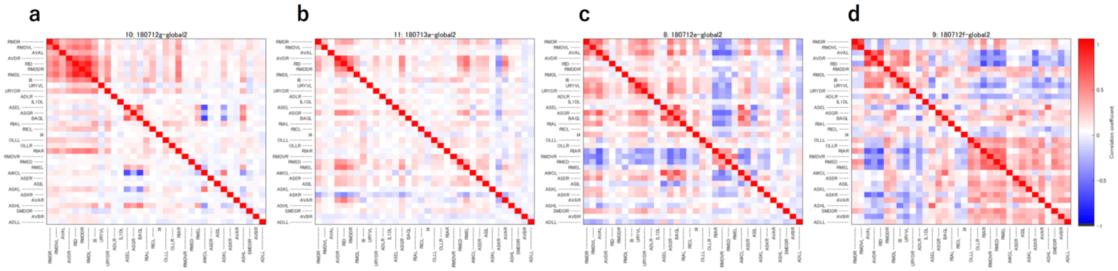


図 4. 神経細胞間の相関関係の個体ごとの違い

図 3 下段の相関マトリクスと同様だが、この図では名前付けのされた神経のみを用い、同じ順に神経細胞が並べられている。28 個体中 10 個体以上で名前付けのされた神経だけを表示している。全個体を通しての神経活動の相関係数をもとに階層的クラスタリングで神経細胞を並べる順を決めた。

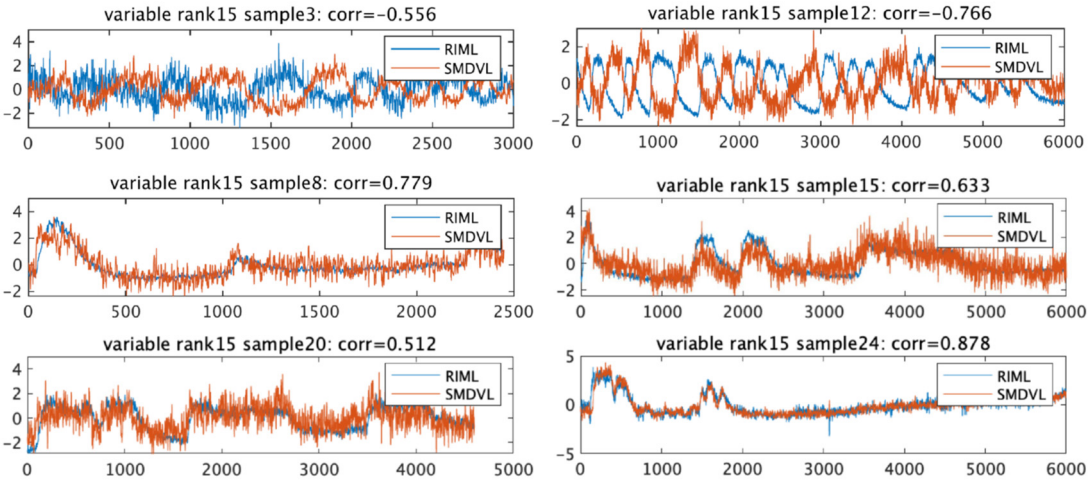


図 5. 個体ごとに相関関係が異なる神経対の例
RID神経とSMDVL神経の関係が正の相関である個体と負の相関である個体とが存在する。このような神経対は多数存在する。

2. 神経活動を再現するシミュレーションモデルの構築

では、そのような神経活動の見かけ上の差異はどういう要因により作りだされているのだろうか。神経活動を形作る主要な要因はいうまでもなく神経細胞間のシナプス結合とギャップ結合である。線虫では電子顕微鏡を用いた構造解析により個々の神経細胞間の結合がすべて分かっている。しかし、電子顕微鏡でわかる形態からだけではそれぞれのシナプスが興奮性か抑制性かが分からず、シナプス強度もわからない。

そこで、データ駆動型アプローチによりシナプス強度を推定することを行った。まず、それぞれの神経（ターゲット神経）の活動を、それに入力する神経の活動から予測するモデルを作成した。この際、プレシナプスの神経として、順方向のシナプスまたはギャップ結合の二段階以内でターゲット神経と結合している神経を用いた。二段階とした理由は、前述の理由でデータの欠損があるため一段階ではターゲット神経の予測に十分な情報がない場合があると考えられたためである。

「方法」に述べた手法を開発し、シナプス伝達モデルを作成した。各神経をターゲットとしたモデルが得られると、次にこれを順に用いることで、次の瞬間の全神経の神経活動値の予測ができる。これを繰り返すことにより、シミュレーションにより神経回路の動きを生成することができる。このように得られたシミュレーション神経活動は、実データと同様の集団が同期して活動していた。確率モデルであるので、繰り返しシミュレーションを行うと毎回結果が異なり、同期集団の活動パターンが異なる。しかし同期関係はかなり保たれている（図 6）。

つまり、個々のシナプスを表現した本モデルにより、実際のネットワーク全体の神経の活動が再現できたと考えられる。このモデルを調べることにより、個体毎に異なる同期が見られる原因が推定できる。

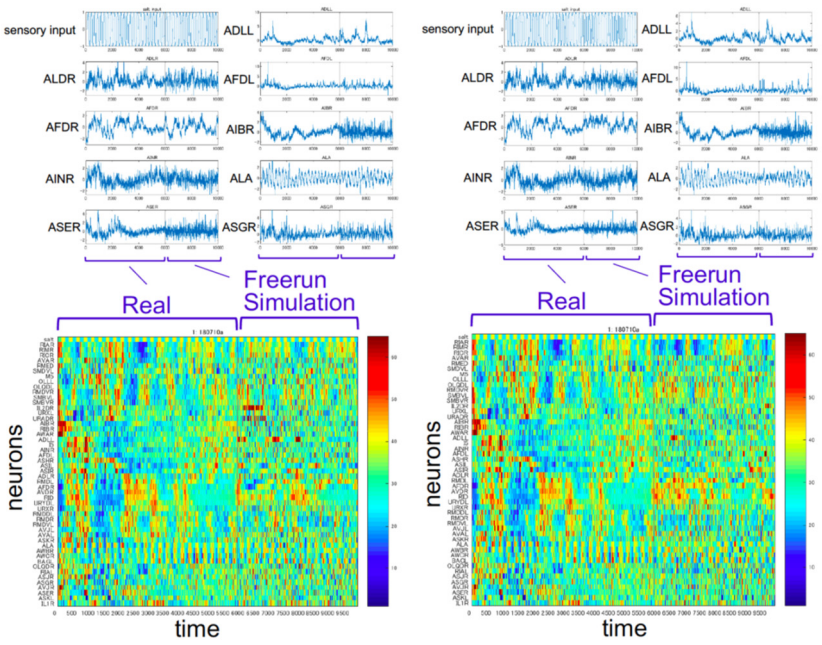


図 6. シナプス伝達モデルによる神経活動シミュレーション
同じデータ（“Real”）をもとにしてシミュレーション（“Freerun Simulation”）を2度行った結果（左右の図）。上段にいくつかの神経のみ抜き出して表示した。

3. 神経活動の個体差の要因の推定

では、モデルにおいて同期活動がどのように生じているのだろうか。概念的には図 7 の二つの可能性が考えられる。a）は特定の神経が多数の神経に影響を与え、そのため入力を受けた神経群が同期的に活動するという可能性。b）は多数の弱いシナプス連絡があるために自己組織化により同期活動が生じる可能性である。上記の gKDR-GMM モデルにおけるシナプス強度、すなわち各ターゲット神経がどの神経からどの程度の影響を受けているかを調べた結果が図 8 である。見えにくいが、多くのボックスが濃い青色となっており、つまり各ターゲット神経について、多数のプレシナプス神経から弱い寄与がみられる。一個の神経から多数の神経に強いシナプス連絡がある形態（暖色セルが横一列に並ぶはず）は見当たらない。従って、起こっている現象は図 7 の概念図の b）に近いと思われる。

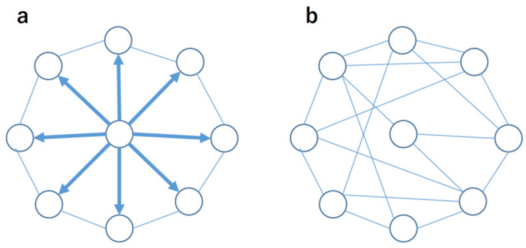


図 7. 同期活動の生成機構として考えられる代表的なモデル
○が各神経を表し、線や矢印がシナプス連絡を示す（化学シナプスとギャップ結合は区別していない）。
a） ハブ神経が存在し、その神経から多数の神経に同様なシナプス入力があるために同期が起こる。
b） 多数の神経の間にネットワーク状の伝達があり、その中から自己組織化により同期活動が生じる。

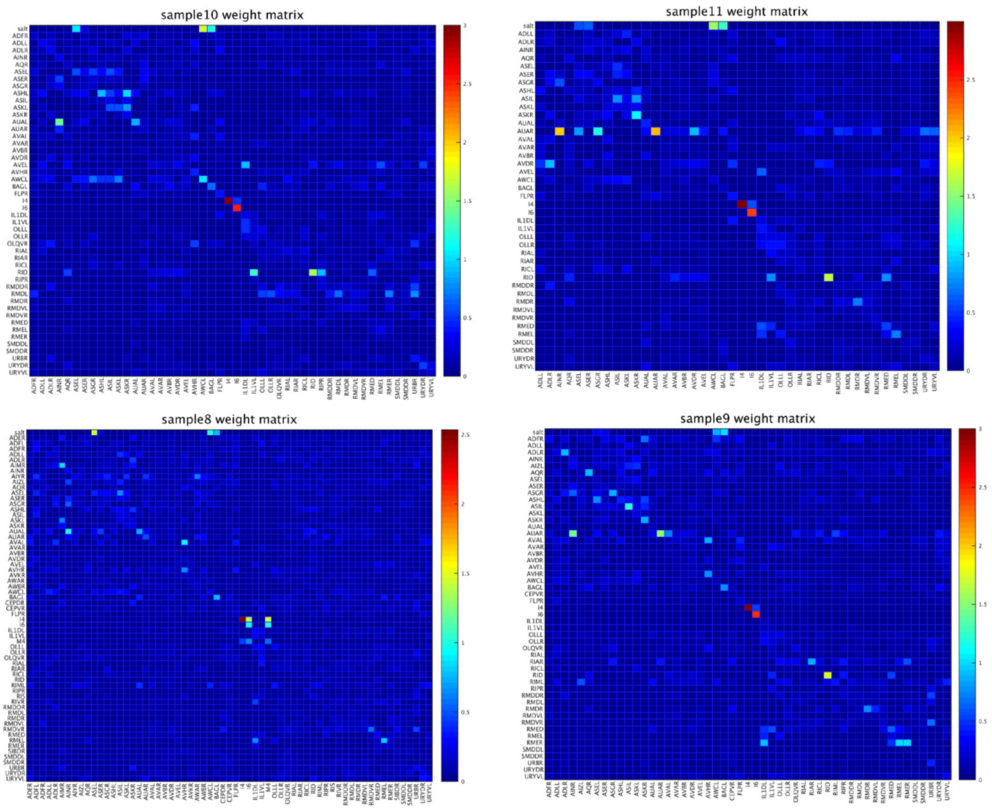


図 8. ポストシナプスの神経の活動に対する各プレシナプス神経の寄与
シミュレーションモデルに用いたgKDRにより得られた次元削減行列Bの各神経に対する成分を示す。暖色になるほどターゲットの神経の活動への寄与が高い。列がターゲット神経、行がプレシナプス神経である。対角線は自身の過去の活動からの影響により次の活動が決まるという構造を示す。対角線以外は他の神経からの影響である。ただし、最上行は外からの感覚入力として与えた塩の刺激からの影響をシナプス結合と同等に扱っている。

考　察

本報告では神経活動の個体差に注目して記載した。神経活動のレベルでみられる最も顕著な個体差は自発的同期活動において正逆の活動を示す集団の大きさと、動員される神経の差異であった。各個体において、各神経間のシナプス伝達をモデル化することで、このような同期活動を再現することに成功した。モデルの構造を調べてみると、各神経が多数の弱いシナプス入力により活動を決定されており、そのような相互作用の中から自己組織化により同期活動が形成されていることが伺われた。個体ごとの差が特定の少数のシナプスに起因する可能性は低いと考えられる。

今回の全神経イメージングにおいては、個々の個体を約 20 分間顕微鏡下で測定しており、技術的困難から一個体を繰り返し測定することは行っていない。サンプル間の差を便宜的に「個体差」と呼んだが、同じ個体が時期によって異なる活動パターンをみせる可能性も考えられる。単一のネットワークモデルが異なるパターンを生じ得るのかは、今後検討すべき課題である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院理学系研究科飯野研究室の豊島有、佐藤博文、ジャンムンソン、金森真奈美、九州大学大学院理学研究院分子遺伝学研究室の石原健、寺本孝行、大江紗、村上悠子、久下小百合、統計数理研究所データ科学系の吉田亮、ウステファン、茨城大学工学部の岩崎唯史、金沢大学理工研究域の広瀬修、九州工業大学情報工学研究院の徳永旭将である。

文　献

1) Toyoshima Y, Tokunaga T, Hirose O, Kanamori M, Teramoto T, Jang MS, Kuge S, Ishihara T, Yoshida R, Iino Y. Accurate Automatic Detection of Densely Distributed Cell Nuclei in 3D Space. PLoS Comput Biol. 2016 Jun 6;12(6):e1004970. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004970

2) Toyoshima Y, Wu S, Kanamori M, Sato H, Jang MS, Oe S, Murakami Y, Teramoto T, Park C, Iwasaki Y, Ishihara T, Yoshida R, Iino Y. Neuron ID dataset facilitates neuronal annotation for whole-brain activity imaging of C. elegans. BMC Biol. 2020 Mar 19;18(1):30. PMID: 32188430 doi: 10.1186/s12915-020-0745-2.

3) Fukumizu K, Leng C. Gradient-Based Kernel Dimension Reduction for Regression. Journal of the American Statistical Association 2014 March; 109(505): 359-370. DOI: 10.1080/01621459.2013.838167

4) Chen X, Changliang Zou, R. Dennis Cook. Coordinate-independent sparse sufficient dimension reduction and variable selection. Ann. Statist. 2010 December; 38(6): 3696-3723. DOI: 10.1214/10-AOS826

5) Kato S, Kaplan HS, Schrödel T, Skora S, Lindsay TH, Yemini E, Lockery S, Zimmer M. Global brain dynamics embed the motor command sequence of Caenorhabditis elegans. Cell. 2015 Oct 22;163(3):656-69. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.034.