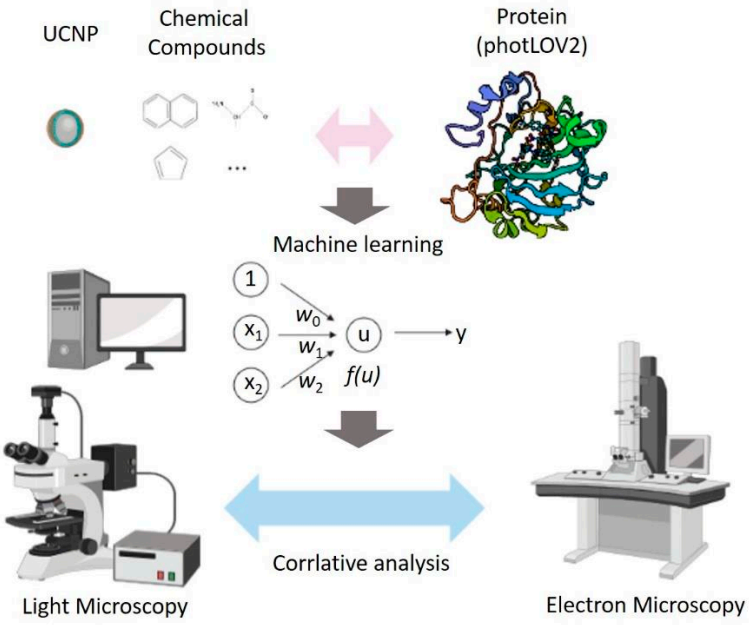
76　機械学習的アプローチによる神経回路の機能解析	岩﨑　広英

【目的】近年、神経回路の網羅的解析（コネクトーム解析）のプロジェクトが全世界的に展開されている。特に FIB-SEM や SBF-SEM、ATUM などの走査型電子顕微鏡を用いた諸技術の急速な進歩に伴い、脳組織の三次元再構築に対する障壁が低減しつつあり、コネクトーム研究の加速化に貢献している。一方、三次元再構築された脳の電子顕微鏡像から特定の神経細胞を抽出する、いわゆるセグメンテーションの自動化については、機械学習的アプローチをはじめとする様々なアルゴリズムが開発されているものの、現時点で決定的な手法は確立されていない。また、蛍光タンパク質等で神経細胞を標識することで得られる特定の神経細胞の脳内における分布や投射先などの広域情報をシナプスレベルでの超微細形態情報と対応づけることはセグメンテーションをはじめとするコネクトーム解析において有用であるが、光学顕微鏡像と電子顕微鏡像とを対応付けるための光-電子相関顕微鏡法（CLEM）について決定的な手法が確立されていない。その理由の一つとして電子顕微鏡用試料作製過程におけるオスミウム酸固定や脱水過程により、大半の蛍光タンパク質が消光することが挙げられる。そこで本研究では機械学習的手法を用いて CLEM に利用可能な蛍光プローブの開発を目指した。

【方法】電子顕微鏡用試料作製過程におけるオスミウム酸固定と脱水過程に耐えうる蛍光標識法として、低分子蛍光化合物に着目し、とくに電子顕微鏡用樹脂の有する自家蛍光を回避するため、アップコンバージョンナノパーティクル（UCNP）に着目した。また、蛍光タンパク質の中では植物における光屈性を誘導する光受容タンパク質フォトトロピンに着目した。フォトトロピンの LOV2 ドメイン（photLOV2）にはフラビンモノヌクレオチド（FMN）が結合し、蛍光を発する。FMN の蛍光がオスミウム酸固定や脱水処理に影響されないことに着目し、photLOV2 に結合しうる低分子化合物を機械学習的アプローチにより探索した。また、photLOV2 の FMN との結合に関わるアミノ酸に突然変異を導入し、安定な蛍光を発する分子の探索を試みた。

【結果】電子顕微鏡用試料作製処理におけるオスミウム酸固定や脱水処理を行っても蛍光が消光しない photLOV2 変異体を作製することに成功した。また、機械学習によるドッキング解析から、photLOV2 と結合することが予想される低分子性化合物の候補分子を複数見出すことができた。

機械学習的アプローチによる CLEM プローブ開発



76. 機械学習的アプローチによる神経回路の機能解析

岩﨑　広英

群馬大学 大学院医学系研究科 機能形態学分野

Key words：コネクトーム，光学顕微鏡，電子顕微鏡，光 - 電子相関顕微鏡法

緒　言

脳は膨大な数の神経細胞が互いにシナプスを介して神経回路を形成しネットワークとして機能することにより、記憶、情動など様々な高次機能を司る。従ってこれらの神経細胞がどのように配線されているのかを網羅的に解明することは脳の高次機能を素子レベルで理解する上で重要な手がかりをもたらすものと思われる。このような神経細胞の網羅的な結合様式はコネクトーム（connect＋-ome＝connectome）と呼ばれており、コネクトーム研究は現在、世界各国において精力的に推進されている［1］。コネクトームに関する理解が深まれば、神経回路の動作原理やシナプスの多様性［2］に関する理解が深まるだけでなく、自閉症［3］などの発達障害や精神疾患などの病因・病態の解明につながる。

コネクトームをシナプスレベルで解明するためには、電子顕微鏡による観察が必要となる。従来は固定・樹脂包埋した脳を厚さ 50～70 nm 程度に薄切し、得られた連続切片を透過型電子顕微鏡（Transmission Electron Microscopy：TEM）で画像取得して三次元再構築するのが一般的であった。しかし取りこぼしなく超薄連続切片を回収するには高い技術と長時間にわたる作業を要する上、取得した画像のコンピュータ上でのアラインメント処理にも多くの労力を必要とする。しかし近年、走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscopy：SEM）の解像度の向上に伴い、FIB（Focused Ion Beam）-SEM や SBF（Serial Block Face）-SEM を利用した生体組織の三次元再構築像取得が普及した。FIB-SEM や SBF-SEM では試料ブロックを連続超薄切片化する代わりに集束イオンビームまたはダイヤモンドナイフを用いてブロックの表面を切削し、新たに表出した面を SEM でスキャンすることで画像取得する。一旦、試料を顕微鏡にセットすれば、自動的に機械が切削・画像取得を繰り返すことから、試料ブロックを超薄連続切片化して回収する労力と時間を大幅に削減できるだけでなく、ブロック表面から画像取得するため得られる画像の方向が安定しており、切片から画像取得する場合と比較してコンピュータ上での画像の大幅なアラインメント処理を必要としない、などの利点がある。このように FIB-SEM や SBF-SEM をはじめとする電子顕微鏡技術の近年の飛躍的進歩に伴い、生体組織の電子顕微鏡による三次元再構築像の取得が比較的容易となり、コネクトーム解析が加速度的に進歩しつつある。実際、コネクトームが最初に解明されたのは線虫（*C.elegans*）であるが、従来の TEM を用いた超薄連続切片の解析であり完成までに 20 年もの月日を要した［4］。これに対し、現在ではショウジョウバエ［5］をはじめとして、比較的少数の神経細胞から構成される動物種において全コネクトーム解析が短期間のうちに完成しており、マウスにおいても SBF-SEM を利用した網膜のコネクトーム解析が報告されている［6］。一方、TEM で観察する超薄連続切片はグリッド上に保持されていることから何度も観察・画像取得することが可能であるのに対し、FIB-SEM や SBF-SEM を用いた観察は破壊的な観察手法であるため、同じ試料は一度しか観察できないという欠点がある。ATUM（Automatic Tape-collecting Ultra-Microtome）法はプラスチックテープ上にベルトコンベアの要領で自動回収した超薄連続切片を SEM で観察する手法であり、切片回収を自動化すると共に同じ試料を何度でも観察できるという点で上記の問題を解決することが可能であるが、コンピュータ上での画像の大幅なアラインメントを必要とする。このように、コネクトーム解析のための電子顕微鏡技術はそれぞれ長所と短所を有することから、各技術の長所・短所をよく理解した上で用いることが肝要となる。さらに、脳組織の三次元再構築像の中から特定の神経細胞を抽出する、いわゆるセグメンテーションにおいて、モノクロ表示された電子顕微鏡像の中から特定の細胞を同定・抽出するにあたり現時点では人間の手による作業が最も正確であるが、コネクトーム解析においてはセグメンテーションをいかにして自動化するかが重要な課

題であり、この点において機械学習的アプローチに対する期待が高まっている。

コネクトーム解明のためには電子顕微鏡による微細構造解析だけでなく、光学顕微鏡の併用が重要である。光学顕微鏡は広い領域をカバーすることができるだけでなく、生きたままの細胞・組織を観察することが可能であり、マルチカラーの画像を取得することができるという長所を有し、電子顕微鏡と互いに補完的である。このような光学顕微鏡と電子顕微鏡を併用したイメージング技術は光-電子相関顕微鏡法（Correlative Light- and Electron- Microscopy : CLEM）と呼ばれ、近年盛んに技術開発が推進されている。

CLEM における最大の課題のひとつは、光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いてそれぞれ撮影した画像を照合し対応付けるための技術開発である。特に蛍光タンパク質で標識された細胞に対する CLEM では、現在用いられている蛍光タンパク質のほぼ全てが電子顕微鏡用試料作製処理により消光することから、蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像との対応付けが困難である。この問題を回避するために、これまでに様々な手法が開発されてきた。例えば、番号が付された培養皿に細胞を培養することで蛍光標識された細胞をラベルして電子顕微鏡像との位置合わせに用いる方法［7］や、光学顕微鏡での観察後に生体組織をレーザーで照射し、焼灼痕を付すことで、焼灼痕と標的細胞との位置関係を手がかりとして電子顕微鏡像との位置合わせを行う［8］といった手法である。しかしこれらの手法は間接的であると同時に、複雑なステップを経て試料作製する必要があり、多くの労力と時間を必要とする。そこで本研究課題では、機械学習的アプローチを取り入れることで電子顕微鏡用試料作製処理を経ても消光しない蛍光分子の開発を目指した。

方法と結果

1. 低分子化合物を用いた細胞標識と機械学習的アプローチの導入

本研究では、機械学習的アプローチを導入することで、電子顕微鏡用試料作製処理を施しても消光しない蛍光分子の開発を目指した。電子顕微鏡用試料作製は主に 1. オスミウム酸による固定、2. 有機溶媒への置換による脱水、3. Epon などの疎水性樹脂への包埋の各ステップから成るが、例えば Green Fluorescent Protein（GFP）などの生物研究に良く利用される蛍光タンパク質は 1 または 2 のステップにおいて消光するものが多い。そこで当初の計画では蛍光を発する低分子化合物群に着目し、その際、電子顕微鏡観察に用いられる Epon 樹脂そのものが高い自家蛍光を示すことに留意し、標識分子が発する蛍光と epon 樹脂が発する自家蛍光とを分離しやすい化合物を利用することにした。とくに本研究では通常の蛍光分子と異なる光学特性を有する Upconversion nanoparticle（UCNP）に着目した。通常の蛍光分子では、蛍光に比べて励起光の波長は短いのに対し、UCNP は複雑な励起機構を経ることにより、励起光よりも波長の短い蛍光を誘起することが可能であり、Epon 樹脂の自家蛍光を無視することが可能となる（図 1A、B）。また UCNP の粒子は TEM での観察において図 1C に示すように特徴的な形態を有することから、UCNP を含む細胞を容易に同定することができ、光学顕微鏡像と照合することが可能である［9］。そこで UCNP としてランタニドナノ粒子（LNP）を中心に 1. 細胞への導入効率、2. 電子顕微鏡処理による蛍光量の減少率、3. Epon 樹脂の自家蛍光の影響、の 3 点に着目して広汎なスクリーニングを実施し、それぞれの性質について UCNP 各分子の構造との関連について機械学習的手法によりその傾向を分析し、CLEM に適した UCNP を探索することを計画した。また、これと並行して細胞内に取り込まれた UCNP を検出し、細胞をセグメンテーションするための機械学習アルゴリズムの開発を目指した。そのため、まず LNP の蛍光の検出のための光学系を構築した。しかし使用を予定していた UCNP の多くは入手先が海外であり、本年度は新型コロナウイルスの感染拡大に伴い流通がストップした。このため当初予定していた低分子化合物による CLEM 実験の年度内での実施が困難となったことから次項で述べる蛍光タンパク質を用いた CLEM に重点を置いた。

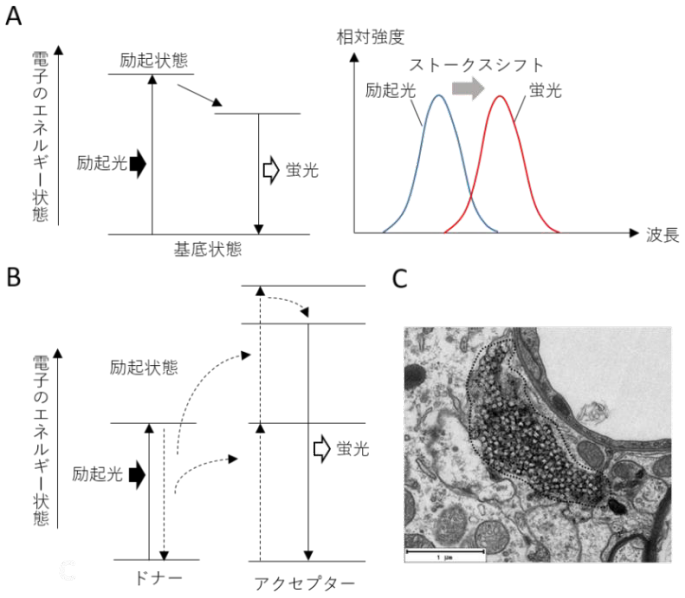


図 1. CLEM プローブとしての UCNP

A) 通常の蛍光分子の蛍光発生の原理および励起光と蛍光の波長の関係について。

B) UCNP における蛍光発生の原理について。

C) 透過型電子顕微鏡で観察した UCNP（スケールバー＝1μm）。点線で囲んだ部分に UCNP 粒子が集積している。

2. 機械学習的アプローチによる蛍光タンパク質と結合分子の探索

従来の細胞生物学において用いられてきた GFP をはじめとする蛍光タンパク質プローブの多くは、タンパク質自身が発光団を形成するものが大半であった。このため、オスミウム酸による固定や脱水による構造変化に伴い消光することが予想される。そこで本研究では異なる原理に基づいて蛍光を発するタンパク質に注目した。

フォトトロピンは植物において光屈性を誘導する光受容体タンパク質であり、N 末端側には光感知に関わる LOV（Light、Oxygen、Voltage）ドメインを２つ（LOV1、LOV2）有する（図 2A）[10]。フォトトロピンの発色団は LOV ドメインに結合しているフラビンモノヌクレオチド（FMN）であることから、固定・脱水しても FMN の蛍光は変化しないのではないかとの仮説を立てた。さらにシロイヌナズナのフォトトロピンの LOV2 ドメイン（photLOV2）は、その構造と性質についてこれまでに詳細な研究がなされており、X 線結晶構造解析により詳細な分子構造が解明され、FMN との結合に必須なアミノ酸についても多くの知見が蓄積されている。そこでこれらの知見をもとに機械学習的アプローチにより photLOV2 と結合しうる化合物を広範にスクリーニングした。photLOV2 の立体構造は Protein Database （PDB）から情報を得て使用した（図 2B）。スクリーニングに際しては、オープンソースの化合物情報ライブラリとして RDkit、機械学習のライブラリとして scikit-learn を用いた。Morgan Fingerprint により特徴抽出し、学習アルゴリズムとしてパーセプトロンを用い、結合候補分子予測を行った。これと並行して Autodock vina を用いて候補分子のドッキングを行い、affinity を算出した。両者の予測により、photLOV2 と結合する可能性の高い分子をスクリーニングした。これらの解析を経ることで、photLOV2 と結合し得る候補分子を多数見出すことができた（図 2C）。

これと並行して photLOV2 と FMN の位置関係から結合に必須のアミノ酸を予測し、これらのアミノ酸配列を置換した突然変異体を作製した。得られた突然変異導入分子を哺乳類培養細胞（HEK293T）に遺伝子導入すると、蛍光を確認することができた（図 2D）。FMN は細胞培養液に大量に含まれており、細胞質にも取り込まれることから photLOV2 を発現させることで蛍光を呈したと考えられる。さらに蛍光が確認された photLOV2 変異体について、細胞を 2% PFA と 2%グルタールアルデヒド混合溶液で固定した後に 1% OsO_4＋1.5%フェロシアン化カリウム（in 0.1 M カコジル酸緩衝液、pH＝7.4）で 1 時間固定し、さらに 1% OsO_4（in 0.1 M カコジル酸緩衝液、pH=7.4）で 1 時間

固定した。続いて 50%から 70%、80%、90%、95%、99.5%、無水エタノールに順次置換し、脱水した。その後、酸化プロピレンに置換し、Epon または Durcupan 樹脂と酸化プロピレンとを 1：1 で混合した液に置換し、最終的に Epon または Durcupan に完全に置換し、60℃で 2 晩インキュベートして重合させた。それぞれのステップにおいて細胞の蛍光を確認し、落射型蛍光顕微鏡を用いて撮像した。上記の一連のスクリーニングにより、酸化オスミウム処理（図 2E）および脱水処理（図 2F）を行っても蛍光が消光しない photLOV2 遺伝子改変タンパク質を見出すことに成功した。

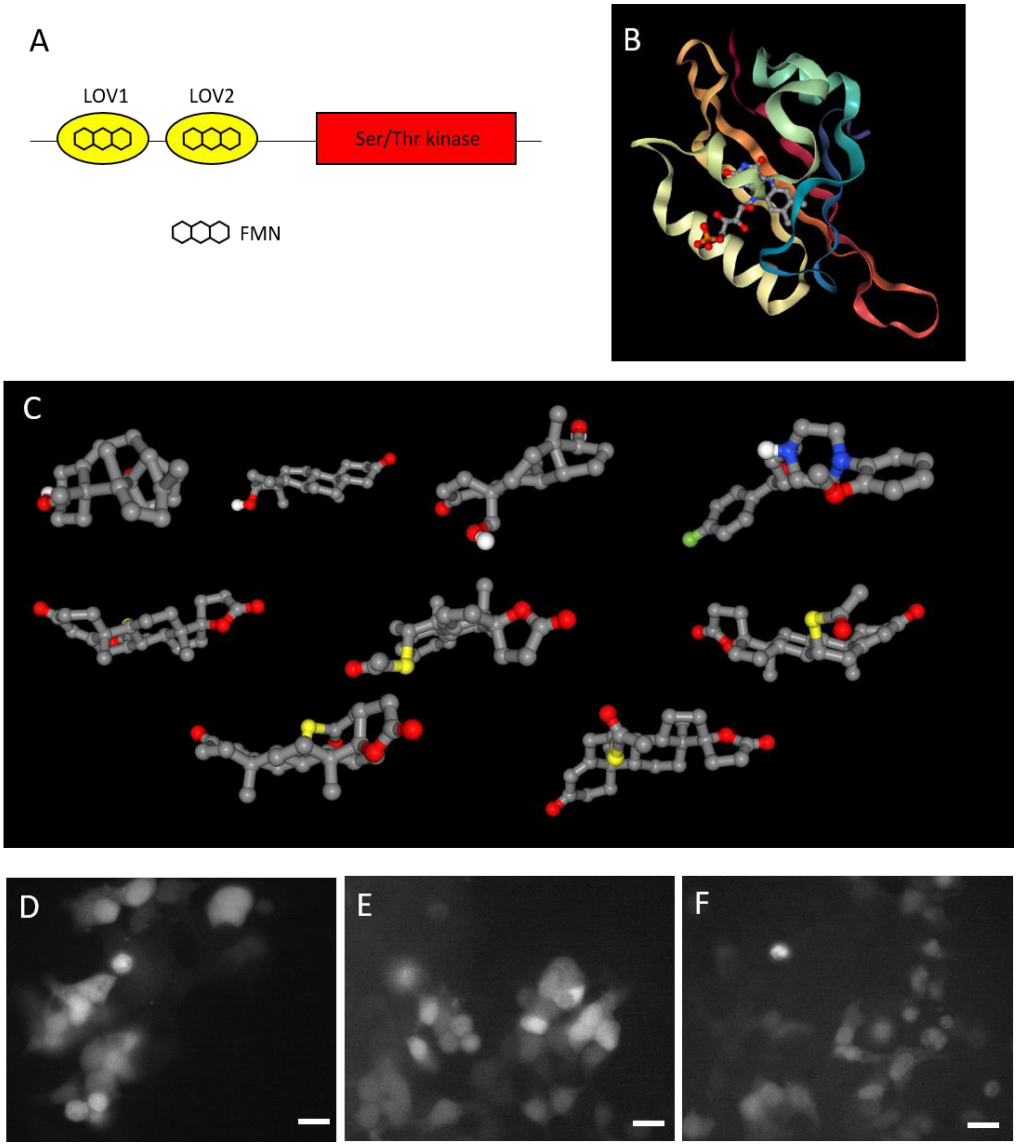


図 2. CLEM プローブとしての photLOV2

A） シロイヌナズナ phototropin の分子構造とフラビンモノヌクレオチド（FMN）結合部位。

B） photLOV2 と FMN の結合状態における分子構造。

C） 機械学習により photLOV2 と高い結合活性が予測される分子群（抜粋）。

D） photLOV2 変異体を導入した HEK293 細胞。

E） OsO_4 で処理後の photLOV2 変異体発現細胞。

F） OsO_4 および脱水処理後の photLOV2 変異体発現細胞。

スケールバー：20 μm（D～F）。

考　察

本研究により、植物の光受容体タンパク質フォトトロピンの LOV2 ドメインを元に改変した分子 photLOV2 変異体が CLEM において有効な分子プローブとなり得ることが示された。LOV ドメインを有する分子はフォトトロピン以外にも Zeitlupe（ZTL）、FKF1、LKP2 などがシロイヌナズナゲノム中に存在し、いずれも FMN と結合する。従って、これらの分子についても同様のアプローチにより探索を行うことで、より CLEM に適したプローブの開発につながる可能性がある。

本研究では FMN そのものを用いて photLOV2 変異体のスクリーニングを行うと同時に、photLOV2 との結合が想定される分子についても機械学習を用いた結合予測により複数種同定することができた。これらの候補分子を順次合成し、培養液中に添加することで、FMN に比べて強く、また波長の長い蛍光を発する化合物をスクリーニングすることが可能となる。FMN の示す蛍光は波長が短く、細胞自体が示す自家蛍光と近い。これは FMN そのものが細胞の自家蛍光の一因となっている可能性が高い。また励起光として青色光を用いる必要があるため、細胞へのダメージも比較的高い。そこで、FMN より長波長側にシフトした photLOV2 結合分子が利用できれば、蛍光の検出が容易になる。本研究において見出された photLOV2 結合候補分子のうち長波長側に蛍光を示す化合物を重点的に解析し、photLOV2 変異体と合わせて利用することで、蛍光プローブとしての有用性が高まることが期待される。

本研究の目的である神経回路のコネクトーム解析に photLOV2 変異体を利用するにあたっては、photLOV2 を効率的に神経細胞に導入する手法の開発が今後の課題となる。photLOV2 の分子量は約 10 kD と比較的小さく、GFP の半分以下であることから、ウイルスベクターを用いた場合でも充分にパッケージングされるサイズである。従って、今後はアデノ随伴ウイルス（Adeno-associated virus：AAV）などのウイルスベクターを用いた神経細胞への遺伝子導入について検討する予定である。特に AAV はその serotype により細胞種特異的な遺伝子導入が可能であることから、脳内の特定の神経細胞に特異的に photLOV2 変異体を導入し、CLEM に供することで、特定の細胞種と特異的に回路を構築する神経細胞の同定と、神経回路の全貌の解明を目指す。

共同研究者

本研究の共同研究者は、群馬大学大学院医学研究科機能形態学分野の村上徹、多鹿友喜、一ノ瀬聡太郎の諸氏である。

文　献

1） Swanson LW, Lichtman JW. From Cajal to Connectome and Beyond. Annu. Rev. Neurosci. 2016 Jul 8; 39: 197-216.　PMID: 27442070 DOI: 10.1146/annurev-neuro-071714-033954

2） Parajuli LK, Urakubo H, Takahashi-Nakazato A, Ogelman R, Iwasaki H, Koike M, Kwon HB, Ishii S, Oh WC, Fukazawa Y, Okabe S. Geometry and the Organizational Principles of Spine Synapses along a Dendrite. eNeuro 2020 Oct 27; PMID: 33109633 DOI: 10.1523/ENEURO.0248-20.2020

3） Mizuno S, Hirota JN, Ishii C, Iwasaki H, Sano Y, Furuichi T. Comprehensive Profiling of Gene Expression in the Cerebral Cortex and Striatum of BTBRTF/ArtRbrc Mice Compared to C57BL/6J Mice. Front.Cell Neurosci. 2020 Dec 10; PMID: 33362469 DOI: 10.3389/fncel.2020.595607. eCollection 2020

4） White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 1986 Nov 12; B 314, 1–340. PMID: 22462104 DOI:10.1098/rstb.1986.0056

5) Scheffer LK, Xu CS, Januszewski M, Lu Z, Takemura SY, Hayworth KJ, Huang GB, Shinomiya K, Maitlin-Shepard J, Berg S, Clements J, Hubbard PM, Katz WT, Umayam L, Zhao T, Ackerman D, Blakely T, Bogovic J, Dolafi T, Kainmueller D, Kawase T, Khairy KA, Leavitt L, Li PH, Lindsey L, Neubarth N, Olbris DJ, Otsuna H, Trautman ET, Ito M, Bates AS, Goldammer J, Wolff T, Svirskas R, Schlegel P, Neace E, Knecht CJ, Alvarado CX, Bailey DA, Ballinger S, Borycz JA, Canino BS, Cheatham N, Cook M, Dreher M, Duclos O, Eubanks B, Fairbanks K, Finley S, Forknall N, Francis A, Hopkins GP, Joyce EM, Kim S, Kirk NA, Kovalyak J, Lauchie SA, Lohff A, Maldonado C, Manley EA, McLin S, Mooney C, Ndama M, Ogundeyi O, Okeoma N, Ordish C, Padilla N, Patrick CM, Paterson T, Phillips EE, Phillips EM, Rampally N, Ribeiro C, Robertson MK, Rymer JT, Ryan SM, Sammons M, Scott AK, Scott AL, Shinomiya A, Smith C, Smith K, Smith NL, Sobeski MA, Suleiman A, Swift J, Takemura S, Talebi I, Tarnogorska D, Tenshaw E, Tokhi T, Walsh JJ, Yang T, Horne JA, Li F, Parekh R, Rivlin PK, Jayaraman V, Costa M, Jefferis GS, Ito K, Saalfeld S, George R, Meinertzhagen IA, Rubin GM, Hess HF, Jain V, Plaza SM. A connectome and analysis of the adult Drosophila central brain. Elife. 2020 Sep 7;9:e57443. PMID: 32880371 DOI 10.7554/eLife.57443

6) Helmstaedter M, Briggman KL, Turaga SC, Jain V, Seung HS, Denk W. Connectomic reconstruction of the inner plexiform layer in the mouse retina. Nature. 2013 Aug 8; 500(7461):168-74. PMID: 23925239 DOI: 10.1038/nature12346

7) Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. A method of correlative light and electron microscopy for yeast cells. Micron. 2014 Jun;61:53-61. PMID: 24792447 DOI: 10.1016/j.micron.2014.02.007

8) Takahashi-Nakazato A, Parajuli LK, Iwasaki H, Tanaka S, Okabe S. Ultrastructural Observation of Glutamatergic Synapses by Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy (FIB/SEM). Methods Mol Biol. 2019; 1941:17-27. PMID: 30707424 DOI: 10.1007/978-1-4939-9077-1_2

9) Chen S, Weitemier AZ, Zeng X, He L, Wang X, Tao Y, Huang AJY, Hashimotodani Y, Kano M, Iwasaki H, Parajuli LK, Okabe S, Teh DBL, All AH, Tsutsui-Kimura I, Tanaka KF, Liu X, McHugh TJ. Near-infrared deep brain stimulation via upconversion nanoparticle-mediated optogenetics. Science. 2018 Feb 9;359(6376):679-684. PMID: 29439241 DOI: 10.1126/science.aaq1144

10) Crosson S, Moffat K. Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 13;98(6):2995-3000. PMID: 11248020 DOI: 10.1073/pnas.051520298. PMID: 11248020