

線虫の神経細胞を蛍光観察するための顕微鏡システム

A Microscope System for Fluorescence Observation of a Neuron in *C. elegans*

○丸三徳, 橋本浩一

○Mitsunori Maru, Koichi Hashimoto

東北大学

Tohoku University

キーワード: 視覚フィードバック (Visual feedback), 線虫 (*C. elegans*), 顕微鏡 (Microscope)

連絡先: 〒 980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-01 東北大学 情報科学研究科 橋本・荒井 / 鏡研究室,
TEL 022-795-4007, FAX 022-795-7019,

E-mail: maru@ic.is.tohoku.ac.jp, koichi@ic.is.tohoku.ac.jp

1. 緒言

本研究の目的は、動物の「神経活動」とそのアウトプットとして起こる「行動変化」とを関連付けて観察・解析することにある。動物は、それらを取り囲む環境から多様な刺激を受容し、脳・神経系で刺激情報を処理して行動を決定する¹⁾。例えば、ヒトを含む動物は自分の好きな食べ物の匂いを嗅ぐと、匂いのする方向に自分の望む食べ物が存在すると期待して移動する。匂いという刺激を受け取ると、その情報は過去の経験や記憶に基づいて脳の中で処理され、そのアウトプットとして行動の変化を起こす。もし体に疾患を抱えていれば、刺激の受容や脳内における情報処理に問題が生じ、行動も通常とは異なるものに変化する。このように動物の「神経活動」と「行動変化」は密接な関連がある。そして両者を結びつける情報処理の機構を明らかにすることは、学習・記憶などといった神経機能のメカニズムを解明することにつながる非常に

重要な課題である。神経における情報処理の機構を網羅的に理解できれば、脳・神経系の疾患の早期発見や予防などの医療応用も可能である。神経機能のメカニズムを解明するためには、動物の「神経活動」とその結果として起こる「行動変化」とを結びつけて統合的に解析することが必要である。しかし、約 1000 億個存在すると言われるヒトの神経細胞が互いに複雑に影響しあって生み出す神経の機能を、ヒトの神経活動を解析することによって明らかにすることは非常に困難である。

そこで本研究では観察対象として線虫 *C. elegans* を用いた。線虫はヒトやマウスなどの哺乳動物と比べて簡単な神経回路を持っており、302 個の神経細胞すべての結合様式も明らかになっている^{2, 3, 4)}。体が透明で観察がしやすく、生活環が 3 日程度と短いため飼育も容易である線虫は神経科学で広く研究対象として用いられている。さらに神経活動の状態変化に大きく関わる Ca^{2+} 濃度の変化⁵⁾ と相関のある蛍光タン

パク質を神経細胞内に発現させることが容易であり、蛍光観察を用いて神経細胞の活動状態を可視化することができる⁶⁾。したがって線虫は「神経活動」と「行動変化」を同時に評価することに適した生物であるといえる (Fig. 1)^{7, 8, 9)}。線虫の体長は約 1 [mm]、神経細胞は 10 [μm] 程度と非常に小さいため、顕微鏡下で観察することが望ましい。

しかし、汎用の顕微鏡下で線虫の神経活動と行動を観察する際にも問題が生じる。それは、線虫の観察倍率と顕微鏡視野サイズがトレードオフの関係にあり、運動する線虫が顕微鏡の視野外に出てしまい観察が中断してしまうという問題である。そのため従来は、行動を観察する場合には神経活動の評価を犠牲にして観察倍率を下げる、神経活動を観察する場合には線虫の体を機械的または化学的に固定して行動を制限する、といった方法が取られてきた。これでは動物の「神経活動」と「行動変化」を同時に観察・解析することができないため、両者を同時に観察できる計測装置が必要である。

そこで本研究では、顕微鏡に取り付けたカメラで取得した画像を用いて線虫の運動をキャンセルする方向に顕微鏡のステージをリアルタイムで制御することで、線虫の運動をトラッキングする顕微鏡システムを開発した。開発した顕微鏡システムを用いた実験では、線虫の明視野像に現れる模様をテンプレートマッチングにより認識・追跡し、追跡領域が画像中心に近づくように顕微鏡のステージを制御した。そして同時に線虫の感覚神経細胞に発現している蛍光タンパク質 CFP (Cyan Fluorescent Protein) と YFP (Yellow Fluorescent Protein) の蛍光画像を記録した。開発した顕微鏡システムにより、線虫の「神経活動」と「行動変化」を同時に記録することに成功した。

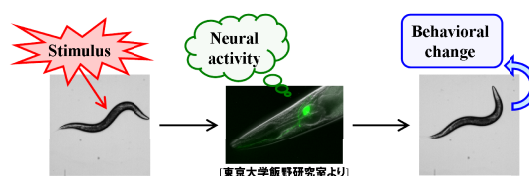


Fig. 1 線虫の神経活動と行動変化の概念図。線虫は刺激を受容した後、神経回路で刺激情報と過去の記憶とを統合的に処理し、そのアウトプットとして運動を変化させる。

2. 顕微鏡システム

2.1 システムの構成要素

以下では本研究で提案する顕微鏡システムの構成要素について詳説する (Fig. 2)。正立顕微鏡 (BX51, オリンパス) に付属のステージを取り外し、電動ステージ (ストローク: X 軸 ± 80 [mm]・ Y 軸 ± 30 [mm]・ Z 軸 ± 4 [mm], 繰り返し位置決め精度: XY 軸 ± 2.5 [μm]・ Z 軸 ± 1 [μm], 最大速度: 10 [mm/s], ヒーハイスト精工) を設置した。線虫の明視野像を取得するための高速度 CCD カメラを正立顕微鏡の上部に取り付けた。明視野像を得るための透過光と神経活動を記録するための蛍光を完全に分離するため、バンドパスフィルタを顕微鏡内に取り付けた。透過光として利用したのは中心波長 710 [nm], 半値幅 80 [nm] の光である。線虫の神経細胞内に発現させた蛍光タンパク質 Yellow Cameleon を構成する CFP (Cyan Fluorescent Protein) および YFP (Yellow Fluorescent Protein) の蛍光観察を行うための励起光源としてキセノンランプを設置した。励起光源から励起光のみを選択的に透過する CFP 用, YFP 用それぞれの励起フィルタ顕微鏡内に取り付けた。同様に、短波長は反射し長波長は透過するダイクロイックミラーを CFP 用, YFP 用それぞれ顕微鏡内に取り付けた。Fig. 3 (a) に 2 波長分岐光学装置の概略図を, (b) に写真を示す。顕微鏡を通過した蛍光は 2 波長分岐光学装置内のダイクロイックミラーにより CFP, YFP の 2 つに分割された後、蛍光のみを透過する吸収フィルタを通し

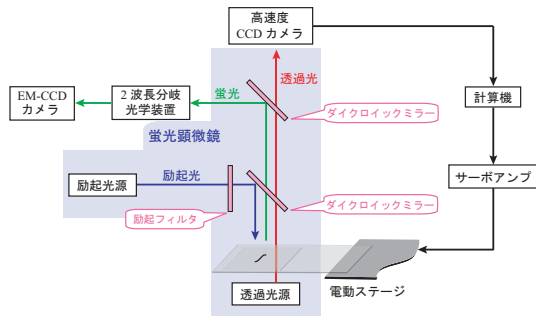
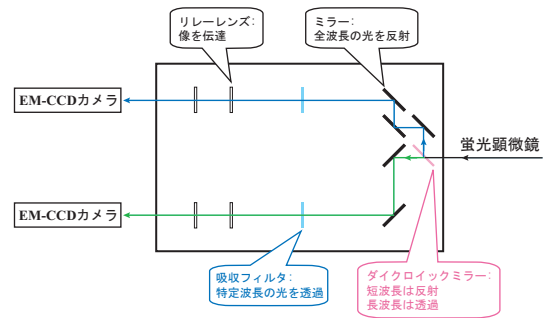


Fig. 2 線虫の神経細胞を蛍光観察するための顕微鏡システムの概要. 電動ステージに載せた線虫に透過光および励起光を当てる. 透過光は高速度 CCD カメラで撮影しトラッキングに用いる. 蛍光像は EM-CCD カメラで撮影して記録する.

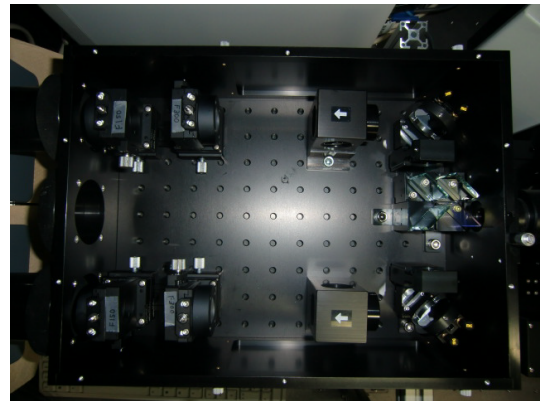
て線虫神経細胞の蛍光像を撮像するための EM-CCD カメラに入射する. EM-CCD カメラは一般的な冷却 CCD カメラと比較して高感度, 高フレームレートという特徴を持っている. 計算機の OS は Linux, CPU は Intel(R) Xeon(R) X5460 3.16 [GHz], RAM は 4 [GB] である. プログラムの実装には C 言語を用いた. また画像処理ライブラリとして OpenCV を使用した.

2.2 画像処理とステージ制御

電動ステージに載せたシャーレ上の線虫に透過光を当て, 明視野像を高速度 CCD カメラで撮像した. 取得した明視野像は記録および画像処理を行うため計算機に転送した. 計算機では画像内の線虫の頭部をテンプレートマッチング処理によりトラッキングした. 線虫の頭部は 2次元平面内で X, Y 方向の並進および θ 方向の回転の 3 自由度で運動をすると仮定して各パラメータを推定した. 各パラメータの推定では, テンプレート画像とトラッキング中の画像の各画素の二乗誤差を最小化する非線形問題を, 高速な収束計算手法である ESM (Efficient Second-order Minimization) 法を適用して計算した¹⁰⁾. 画像間の誤差を計算する際には, テンプレート画像とトラッキング中の画像の両方にガウシアンフィルタを適用した後で各画素の輝度値を比



(a)



(b)

Fig. 3 2 波長分岐光学装置の概略図 (a) と写真 (b). 蛍光顕微鏡を通過してきた光はダイクロイックミラーにより分割され, それぞれ全波長の光を反射するミラーを介して吸収フィルタへと導かれる. その後 2 波長の蛍光は 2 枚ずつのリレーレンズを介して EM-CCD カメラへ向かう.

較した (Fig. 5). ガウシアンフィルタを適用することで, 線虫の体の変形やうねりによるパターンの変化に対してロバストにトラッキングできると考えられる. その後, トラッキング中の画像の中心座標と視野中心座標の偏差を X, Y 方向それぞれについて求めた. この偏差と電動ステージのエンコーダ出力を用いて, 線虫の頭部の動きをキャンセルする方向にステージをリアルタイムで PD 制御した. また線虫の頭部の移動軌跡を再構成するため, 電動ステージの変位情報を計算機に記録した. 明視野像でのトラッキング開始とほぼ同時にシャーレ上の線虫に励起光を当て始め, EM-CCD カメラを用いて蛍光像の取得を行った. 行動を解析するための明

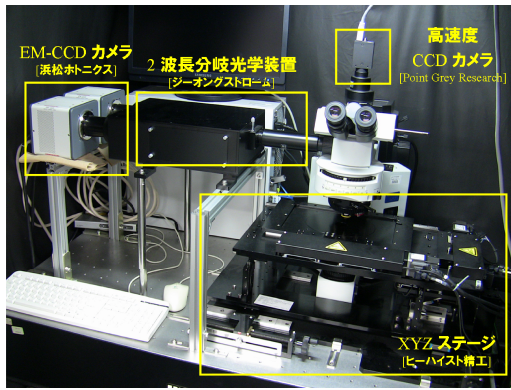


Fig. 4 顕微鏡システムの概観写真. 正立顕微鏡上部に取り付けられた高速 CCD カメラで取得した明視野像の画像処理結果を用いて電動ステージを制御する. 2 波長分岐光学装置を通してそれぞれの波長の蛍光画像を 2 台の EM-CCD カメラで撮影・記録する.

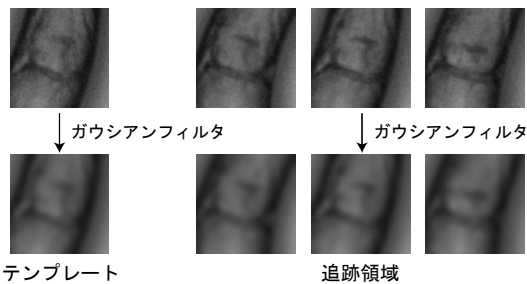


Fig. 5 テンプレートおよび追跡領域画像例. 上段はガウシアンフィルタ適用前で下段はガウシアンフィルタ適用後の画像例である.

視野像取得との同期を取るため, EM-CCD カメラは, 計算機から一定のタイミングで送信されるトリガを受け取ったときに露光を開始するように設定した.

3. 評価実験

3.1 実験手順

本研究では, 観察対象として神経細胞 ASER に蛍光タンパク質が発現している線虫株を使用した. ASER は NaCl 等の塩類を受容する神経細胞であり, 線虫の化学走性に大きく関与していることが明らかになっている^{11, 12}). ASER

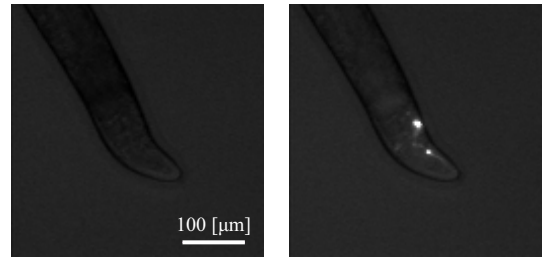


Fig. 6 神経細胞 ASER の顕微鏡画像. 左側は励起光を当てる前で右側が励起光を当てた後の蛍光画像. 右側の画像中の白く光る領域が ASER である.

の中に発現しているのは Yellow Cameleon という蛍光タンパク質である¹³). Yellow Cameleon は主に CFP と YFP で構成され, FRET イメージングを行うことによって細胞内 Ca^{2+} 濃度の計測が可能である¹⁴). Fig. 6 は本研究で使用した線虫株の顕微鏡画像である. 線虫の頭部に見える緑色の光が ASER 内の Yellow Cameleon が発した蛍光である. この線虫株は東京大学の飯野雄一教授から譲っていただいた. 実験に用いる線虫株は $15^{\circ}C$ のインキュベータ内で飼育した. 線虫はシャーレの中の厚さ約 $5 [mm]$ の寒天上に載せた. 顕微鏡の対物レンズの倍率は 20 倍とした.

明視野像を用いて線虫の頭部に現れるパターンをテンプレートマッチング処理によりトラッキングした. テンプレート画像とトラッキング中の画像をぼかすために用いるガウシアンフィルタのカーネルサイズは 7×7 画素, ガウシアンフィルタの標準偏差は 5 画素とした. 電動ステージの制御周期は $1 [ms]$ で一定にした. 高速 CCD カメラの最大フレームレートは $200 [fps]$ であるため, 制御信号は $5 [ms]$ ごとに更新した. 明視野像を取得するための高速 CCD カメラの解像度は 640×480 画素とし, 線虫の頭部を囲むテンプレート画像の大きさは 80×80 画素とした. さらに, トラッキングと同時にシャーレ上の線虫に励起光を当て, 神経細胞 ASER 内の Yellow Cameleon の蛍光像を取得

した. EM-CCD カメラの解像度は最大で 1000×1000 画素であるが, 8×8 画素の輝度値を足し合わせるビニング処理をして 125×125 画素とした. 露光時間は 33 [ms], フレームレートは 25 [fps] とした.

3.2 結果と議論

顕微鏡システムを用いて線虫頭部に現れるパターンのトラッキングおよび神経細胞の蛍光観察を行った. 運動する線虫の頭部を視野の外に見失うことなくトラッキングすることができた (Fig. 7 (a)). 画像内の白色の枠が本実験で設定したトラッキング領域である. 線虫が左右に体をくねらせながら変形してもロバストにトラッキングできているといえる. また明視野像でのトラッキングと同時に線虫の神経細胞の蛍光像を記録した (Fig. 7 (b)). 明視野像の取得と蛍光像の取得は時間同期が取れているため, 行動と神経活動の対応付けが取れることになる.

電動ステージの X, Y 方向の変位情報から線虫の頭部の移動軌跡を再構成した (Fig. 8). 線虫が頭部を左右に振りながら前進していることがわかる. 線虫の頭部が移動した範囲は約 7.0 [mm] \times 3.0 [mm] であった. 高速度 CCD カメラの実視野サイズは約 0.24 [mm] \times 0.18 [mm] であった. 高速度 CCD カメラ実視野サイズに比べて線虫の頭部が移動した範囲の方が非常に広いことがわかる. トラッキングをしなければ, すぐに線虫の頭部を視野の外に見失っていたことが示唆される. 運動する線虫を観察し続ける上で提案システムは非常に有用であるといえる.

透過光と蛍光の波長を適切に分離する光学系を設計したことで, 明視野観察と蛍光観察を同時に実現できた. 提案システムを用いれば, 線虫の明視野像でトラッキングしながら神経の活動状態を蛍光像として記録した後で, 細胞内 Ca^{2+} 濃度を定量化することができると考えられる. 特に線虫の温度走性^{15, 16)} や化学走性^{17, 18)} に着目して, 各種刺激による線虫の個体行動と細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を観測し, 神経の活動状

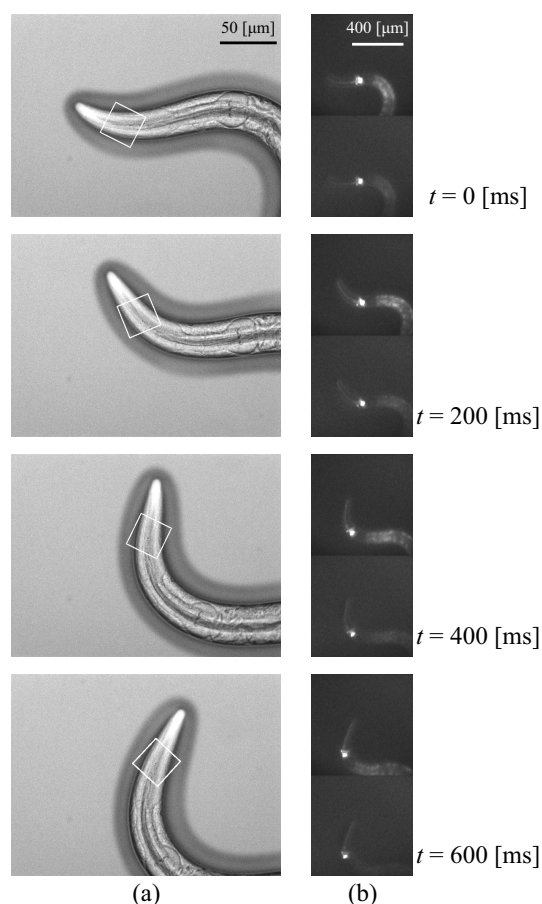


Fig. 7 線虫の頭部に現れるパターンをテンプレートマッチングによりトラッキングした結果 (a) と, 線虫のトラッキングと同時に神経細胞 ASER の蛍光観察を行った結果 (b). 各フレームには上下に異なる 2 種類の波長の蛍光像が重なって写っており, 上側が CFP, 下側が YFP の蛍光像に対応する.

態を評価できるシステムへと発展させたい. これにより線虫の様々な刺激に対する行動の変化と神経細胞の活動状態を関連付け, 分子レベルで解析することができ, さらには神経回路の情報伝達原理の解明に貢献できると考えている.

4. 結言

本研究では, 線虫の明視野像に現れるパターンを用いて体の特定部位をトラッキングし, 同時に神経細胞の蛍光像を取得できる顕微鏡システムを開発した. 明視野像に現れるパターンを用いたトラッキングでは, 選択した領域をテンプレート画像としたテンプレートマッチング処

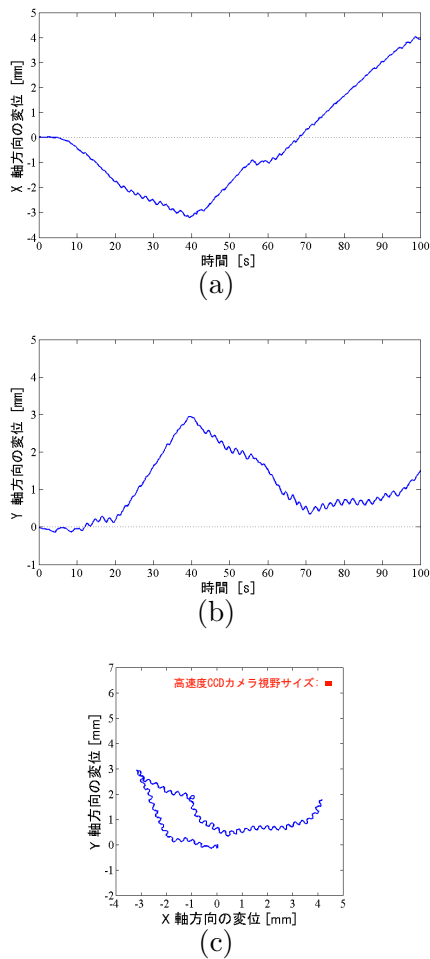


Fig. 8 トラッキング時間と電動ステージの変位情報から再構成した線虫追跡領域の X 軸方向 (a), Y 軸方向 (b) の変位との関係. 電動ステージの変位情報から再構成した線虫追跡領域の運動軌跡 (c). 赤色の四角形は明視野画像用の高速度 CCD カメラの対物レンズ 20 倍における視野サイズ (約 0.24 [mm] × 0.18 [mm]) を示している.

理によって推定し, 特定部位が画像中心に近づくように顕微鏡の電動ステージをリアルタイム制御した. 蛍光像の取得には EM-CCD カメラを用いて, 線虫の神経細胞 ASER に導入した蛍光タンパク質 Yellow Cameleon の蛍光観察を行った. 提案システムを用いた実験では, 運動する線虫の神経細胞が存在する部位を 20 倍の対物レンズ下でトラッキングし, 同時に蛍光像を記録することに成功した. 本研究で開発した顕微鏡システムにより, 「神経活動」と「行動変化」を同時に記録することができた. 今後, 提案システムを用いて線虫のトラッキングおよび

神経細胞内 Ca^{2+} 濃度の定量的解析を行い, 従来の神経科学研究では成し得なかった「神経活動」と「行動変化」を統合的に解析することが可能になると確信する.

本研究では, トラッキングを XY 方向に限定していたため, 線虫の運動により焦点がずれて画像がぼけることがあった. Z 方向にも電動ステージを自動制御し, オートフォーカス可能な顕微鏡システムへと発展させることが課題である.

5. 謝辞

実験で使用した線虫株を譲ってください, またその取り扱いについて貴重な助言を下された東京大学の飯野雄一教授に深く感謝する. 本研究は独立行政法人 科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業 さきがけおよび SORST (「協調と制御」研究領域) からの助成を受けたものである. また本研究は科研費基盤研究 (A) (課題番号: 21246040) および新学術領域研究 (課題番号: 21115502) の助成を受けたものである.

参考文献

- 1) 石原, “線虫 *C. elegans* における感覚情報の統合と学習に関わる分子メカニズム,” 生物物理, vol. 43, no. 6, pp. 287–290, 2003.
- 2) J. E. Sulston and H. R. Horvitz, “Post-embryonic Cell Lineages of the Nematode *Caenorhabditis elegans*,” *Developmental Biology*, vol. 56, no. 1, pp. 110–156, 1977.
- 3) J. Kimble and D. Hirsh, “The Postembryonic Cell Lineages of the Hermaphrodite and Male Gonads in *Caenorhabditis elegans*,” *Developmental Biology*, vol. 70, no. 2, pp. 396–417, 1979.
- 4) J. E. Sulston, E. Schierenberg, J. G. White, and J. N. Thomson, “The Embryonic Cell

- Lineage of the Nematode *Caenorhabditis elegans*,” *Developmental Biology*, vol. 100, no. 1, pp. 64–119, 1983.
- 5) B. Katz, “The Release of Neural Transmitter Substances,” *Liverpool University Press*, 1969.
 - 6) 稲澤, 津田, 小島, “顕微鏡フル活用術イラストレイテッド 基礎から応用まで,” 秀潤社, 2000.
 - 7) J. H. Baek, P. Cosman, Z. Feng, J. Silver, and W. R. Schafer, “Using Machine Vision to Analyze and Classify *Caenorhabditis elegans* Behavioral Phenotypes Quantitatively,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 118, no. 1, pp. 9–21, 2002.
 - 8) W. R. Schafer, “Deciphering the Neural and Molecular Mechanisms of *C. elegans* Behavior,” *Current Biology*, vol. 15, no. 17, pp. R723–R729, 2005.
 - 9) N. Chronis, M. Zimmer, and C. I. Bargmann, “Microfluidics for *in vivo* Imaging of Neuronal and Behavioral Activity in *Caenorhabditis elegans*,” *Nature Methods*, vol. 4, no. 9, pp. 727–731, 2007.
 - 10) S. Benhimane and E. Malis, “Homography-Based 2D Visual Tracking and Servoing,” *International Journal of Robotic Research*, vol. 26, no. 7, pp. 661–676, 2007.
 - 11) C. I. Bargmann and H. R. Horvitz, “Chemosensory Neurons with Overlapping Functions Direct Chemotaxis to Multiple Chemicals in *C. elegans*,” *Neuron*, vol. 7, no. 5, pp. 729–742, 1991.
 - 12) J. T. Pierce-Shimomura, S. Faumont, M. R. Gaston, B. J. Pearson, and S. R. Lockery, “The Homeobox Gene *lim-6* Is Required for Distinct Chemosensory Representations in *C. elegans*,” *Nature*, vol. 410, no. 6829, pp. 694–698, 2001.
 - 13) A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien, “Fluorescent Indicators for Ca^{2+} Based on Green Fluorescent Proteins and Calmodulin,” *Nature*, vol. 388, no. 6645, pp. 882–887, 1997.
 - 14) A. K. Kenworthy, “Imaging Protein-Protein Interactions Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy,” *Methods*, vol. 24, no. 3, pp. 289–296, 2001.
 - 15) K. Kimura, A. Miyawaki, K. Matsumoto, and I. Mori, “The *C. elegans* Thermosensory Neuron AFD Responds to Warming,” *Current Biology*, vol. 14, no. 14, pp. 1291–1295, 2004.
 - 16) D. A. Clark, C. V. Gabel, H. Gabel, and A. D. T. Samuel, “Temporal Activity Patterns in Thermosensory Neurons of Freely Moving *Caenorhabditis elegans* Encode Spatial Thermal Gradients,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 27, no. 23, pp. 6083–6090, 2007.
 - 17) C. I. Bargmann, E. Hartwig, and H. R. Horvitz, “Odorant-Selective Genes and Neurons Mediate Olfaction in *C. elegans*,” *Cell*, vol. 74, no. 3, pp. 515–527, 1993.
 - 18) S. Saeki, M. Yamamoto, and Y. Iino, “Plasticity of Chemotaxis Revealed by Paired Presentation of a Chemoattractant and Starvation in the Nematode *Caenorhabditis elegans*,” *Journal of Experimental Biology*, vol. 204, pp. 1757–1764, 2001.