

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	山内 悠至
論文題目	Development of functional cellomics for comprehensive analysis of the relationship between neural networks and behavior in <i>Caenorhabditis elegans</i> (線虫の神経ネットワークと行動の連関を網羅的に解析するためのファンクショナルセロミクス法の開発)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>神経ネットワークを用いて、動物は環境変動に呼応して行動を出力する。しかし、動物における感覚入力から行動出力に至る情報の統合・計算プロセスのメカニズムにはいまだ不明な点が多い。</p> <p>行動と神経ネットワークの連関を理解する上で線虫<i>Caenorhabditis elegans</i>は優れたモデル生物である。線虫は、①多様な感覚受容・記憶・学習などの脳機能を有す・②302個のニューロンから成るシンプルな脳を持つ・③全ニューロンの接続パターンが解明済み・④全脳Ca²⁺イメージングが利用可能という利点を持ち、脳全体のふるまいをシングルニューロンレベルで網羅的に観察可能である。しかし、脳全体の網羅的な“観察”データが得られる線虫においても、行動と神経ネットワークの連関を解読することはいまだ極めて難しい。そのひとつの理由は、神経ネットワークに多様な人為的操作(摂動)を加え、各ニューロンが行動に与える実際の影響を網羅的に調べられる方法論が存在しないからである。</p> <p>本論文は、神経ネットワークに対して仮説フリーかつハイスループットに摂動を与えられるfunctional cellomics法を提唱し、神経ネットワークの網羅的解析法を確立したものであり、その内容は以下のように要約される。</p> <p>第1章では、神経ネットワークに対して仮説フリーかつハイスループットに摂動を与えられるfunctional cellomics法を確立している。Functional cellomics法とは、確率的Cre/lox部位特異的組換えを応用し、線虫個体の各ニューロンがオプシンで標識されるかどうかを「ランダム化」する技術である。具体的には、lox2272とloxPの2種類のlox配列を交互に配置した遺伝子カセットを設計し、loxPの間に転写因子QF2wを挿入している。この遺伝子カセットにCreタンパク質を作用させると、Creはlox2272配列間かloxP配列間のどちらか片方が切り出され、他方が残存する。Creがlox2272配列間を切り出すと、転写因子QF2wが発現し、それがオプシンを誘導する。この確率的制御はひとつひとつの細胞で独立して行われるので、オプシンがランダムに標識された線虫個体群を簡単に取得できる。この線虫個体群を用いて光照射下で一斉に行動解析することで、線虫行動と神経ネットワークの連関を網羅的に解析できる。本論文は、functional cellomics法を用いることで線虫産卵行動に関与するニューロンを迅速に同定できることを示している。</p> <p>第2章では、functional cellomics法を改善し、任意の確率でオプシンを標識できるシステムの開発している。第1章で開発された遺伝子カセットを用いた場合、オプシンの標識率は約30%と高かった。このように高い確率でオプシンが標識されると、各神経細胞の機能を識別することが困難になる。第2章では、機械学習を用いて確率的Cre/lox部位特異的組換えを改善することで、オプシン標識率の制御に成功している。具体的には、多数のlox配列変異体を構築し、各変異体のCreによる切断率をイルミナシーケンサーで定量した。次に、変異体の配列とその切断率をガウス過程回帰でモデル化し、任意のlox変異体の切断率を高い精度で予測することに成功している。この機械学習モデルで予測されたlox変異体を用いることで、自由な確率でオプシンが標識可能となることを示している。</p> <p>第3章では、線虫の単一の細胞サブタイプに対してプロテオーム解析を行うための方法論を開発している。第1章と第2章で開発したfunctional cellomics法を用いれば、表現型に影響を及ぼす神経細胞をハイスループットに同定できる。その次に必要とさ</p>			

れるのは、同定された細胞内でどのようなタンパク質が機能しているのかを調べることである。そこで、アジド化フェニルアラニンを取込みさせることができる変異型phenylalanyl-tRNA synthetaseを応用した。具体的には、線虫の特定の細胞サブタイプで機能するプロモータを活用して変異型phenylalanyl-tRNA synthetaseを発現させ、この線虫にアジド化フェニルアラニンを取込みさせることで、その細胞サブタイプで発現するタンパク質のみをアジド化している。さらに、アジド化されたペプチド・タンパク質のみを精製することで、単一細胞サブタイプのプロテオーム解析を実現している。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

神経ネットワークに摂動を与える方法論として、オプトジェネティクスが強力な手法である。しかし従来のオプトジェネティクスには、①オプシンを標識する細胞を選ぶ際に一般に仮説が必要・②スループットが低い・③1細胞分解能の摂動は難しいという欠点があり、動物個体に多様な摂動パターンを与えることは難しかった。本研究は、神経ネットワークに対して仮説フリーかつハイスループットに摂動を与えられるfunctional cellomics法を提唱し、神経ネットワークの網羅的解析法を確立したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. 仮説フリーに神経ネットワークに摂動を与えられる「細胞レベルの機能的オミックス」と呼べる方法論を開発した。Cre/lox部位特異的組換えを応用し、ひとつひとつの神経細胞がオプシンで標識されるかどうかをランダムに決定可能とすることで、特定の行動(産卵行動など)に影響を与える神経細胞の迅速な同定を実現している。このアプローチは、従来の仮説駆動型アプローチを相補するものであり、個体レベルの表現型に影響する神経細胞を仮説フリーに探索できる。
2. 当初のfunctional cellomics法には、オプシンの標識確率を自在に制御できないという欠点があった。そこで、イルミナシーケンサーと機械学習を組み合わせることで、確率的Cre/lox部位特異的組換えを改善し、標識率を自在に選択可能とした。標識率を自在に選択可能なfunctional cellomics法を用いることで、神経ネットワーク機能の一細胞レベルにおける解明につながると期待される。
3. 動物個体において、特定の細胞種に対してプロテオミクスを行うことは簡単ではない。そのため、functional cellomics法で重要な神経細胞が同定されたとしても、どのようなタンパク質が機能しているかを調べることは難しい。そこで、アジド化フェニルアラニンを特定の細胞サブタイプのみで取り込ませる技術を応用し、細胞サブタイプ分解能のプロテオミクスを実現している。このアプローチは、個体レベルの生命現象を一細胞レベル、かつ、その細胞に発現するタンパク質のレベルで理解するために重要になると期待される。

以上のように、本論文は、線虫個体の神経ネットワークの機能を網羅的にアノテーション可能とする確率的組換えに基づく方法論、および、アノテーションされた神経細胞に特徴的に発現するタンパク質を同定する細胞特異的修飾アミノ酸導入に基づく方法論を提示したものであり、動物個体レベルで創発する表現型のメカニズム理解に向けて寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和5年2月10日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降(学位授与日から3ヶ月以内)