

環境ノイズ下での細胞および細胞下レベルでの
シグナル入出力関係の解明

2019 年度

芦田 慶太

学位論文 博士（理学）

環境ノイズ下での細胞および細胞下レベルでの
シグナル入出力関係の解明

2019 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

芦田 慶太

目次

第 1 章 緒言.....	1
1.1 生体内の入出力関係.....	1
1.2 環境ノイズ下における入出力関係.....	4
1.3 本研究の目的.....	8
参考文献.....	9
第 2 章 情報幾何学による大腸菌走化性モデルにおける順応の定量.....	14
2.1 背景.....	14
2.2 方法.....	17
2.2.1 大腸菌の化学走性モデル.....	17
2.2.2 数値計算.....	17
2.3 結果.....	19
2.3.1 大腸菌の走化性モデルにおける情報幾何学.....	19
2.3.2 様々な刺激に対する順応の効率.....	20
2.4 考察.....	25
参考文献.....	27
第 3 章 環境ノイズ下における線虫介在神経細胞 AIY の入出力関係.....	30
3.1 背景.....	30
3.2 方法.....	32
3.2.1 線虫株と飼育条件.....	32
3.2.2 インジェクション用プラスミド DNA.....	32
3.2.3 共焦点イメージング.....	32
3.2.4 Ca^{2+} 、グルタミン酸および膜電位イメージング.....	33
3.2.5 画像解析.....	33
3.2.6 データ解析および統計的仮説検定.....	34
3.2.7 Ca^{2+} 応答およびグルタミン酸入力減少データの抽出.....	35

3.2.8 ランダム選択データ	35
3.3 結果.....	36
3.3.1 AIY における膜電位変化と Ca^{2+} 応答	36
3.3.2 AIY における匂い刺激に対するグルタミン酸入力と Ca^{2+} 応答	36
3.3.3 AIY におけるグルタミン酸入力減少と Ca^{2+} 上昇.....	37
3.3.4 GLC-3 受容体と Ca^{2+} 応答.....	38
3.3.5 グルタミン酸合成欠損変異体における Ca^{2+} 応答	38
3.4 考察.....	50
参考文献	53
第 4 章 結言.....	58
4.1 本研究のまとめと意義	58
4.2 今後の展望	61
参考文献	64

公刊論文目録および口頭発表目録

謝辞

第 1 章 緒言

1.1 生体内の入出力関係

生体システムは外部から情報を受け取り、それを処理する。それは、個体レベルから分子レベルまでのどの段階においてもみられる (Rieke et al., 1997; Dayan and Abbott, 2005; Alberts et al., 2012; Bialek, 2012; Kandel et al., 2012)。すなわち、生命の理解には、各レベルにおける情報処理システムでどのような処理がおこなわれているのか、を理解する必要がある。そのために、入力と出力を観測することで個々のシステムを理解するのはよく用いられている手法である (図 1.1)。

特定の入力に対して、出力を観測する例としては、細胞内の分子メカニズムにおいて、様々な薬理刺激に対する応答をシグナル伝達を担うタンパク質のリン酸化として捉え、ウェスタンブロットによって定量されてきた (Towbin et al., 1979; Alberts et al., 2012)。神経細胞においては細胞膜電流や電圧を任意に変えて刺激を与えたときの膜電位や電流変化を取得することで、その電気化学的な特性がパッチクランプ法などの様々な電気生理学的手法によって調べられている (Neher and Sakmann, 1976; Hamill et al., 1981; Kandel et al., 2012)。最近では、様々な細胞シグナルを計測することが可能な蛍光プローブの開発によって、in vivo においても、特定刺激に対する細胞シグナル伝達の時空間的応答を取得できるようになった (Grynkiewicz et al., 1985; Miyawaki et al., 1997; Dean and Palmer, 2014; Arrowsmith et al., 2015; Miyawaki and Niino, 2015; Lin and Schnitzer, 2016)。

また、出力の計測だけではなく、入力に関しても時空間的な制御が可能となってきた。例えば、マイクロ流体デバイスを用いることで刺激を時間・空間的に厳密に制御することができる (Chronis et al., 2007; Liu and Lu, 2016; Hiraiwa et al., 2018, 2019)。さらには光遺伝学的手法により、神経細胞の興奮や抑制、セカンドメッセンジャーの局所濃度変動などの刺激を時空間的に制御できるようになってきた (Nagel et al., 2003; Boyden et al., 2005; Kim et al., 2017)。これらの刺激技術と光シート型顕微鏡 (Huisken et al., 2004; Power and Huisken, 2017) や二光子顕微鏡 (Denk et al., 1990; Helmchen and Denk, 2005) などの顕微鏡技術の進歩によって、組織・個体レベルの広い範囲での現象を一細胞とそれ以下の解像度で高速に取得できるようになった。このようにして、特定の入力に対する出力を取得することで、個体レベルから分子レベルまで、様々な階層を跨いだシステムの理解が進んでいる。一例として、マウスの音と連合させた恐怖条件付け学習においては、聴覚野から扁桃体への特定のシナプス結合が強まることで、恐怖行動が引き起こされることが明らかになった (Abdou et al., 2018)。これは、一神経細胞レベル、神経回

路レベル、個体レベルを跨いで入出力関係の解明をした研究の一例である。

入力制御や出力の取得だけでなく、それらを理解するための解析手法も様々に開発されている。応答強度の比較や相互相関解析も有用な手法 (Kobayashi et al., 2013; Suzuki et al., 2015, 2018) であるが、制御理論におけるシステム同定法を援用することで、神経細胞の応答特性が明らかにされてきている (Marmarelis and Naka, 1972; Dayan and Abbott, 2005; Nagel and Doupe, 2006; Kato et al., 2014)。個体レベルにおいても、線虫やハエの幼虫において光遺伝学によって感覚神経細胞の応答を制御することで、制御理論的なアプローチにより、感覚神経細胞応答と行動の関係性も明らかにされている (Gepner et al., 2015; Tsukada et al., 2016)。また、取得されたデータから数理モデルを構築することで、システムを理解するシステムバイオロジーも有用な手法であり (Kitano, 2002)、マイコプラズマにおいては、すでに全細胞シミュレーションがおこなわれている (Karr et al., 2012)。このように、様々な手法によって、生命における入出力関係が現在までに明らかにされてきた。また、今後もそれらの手法の開発は進むだろう。

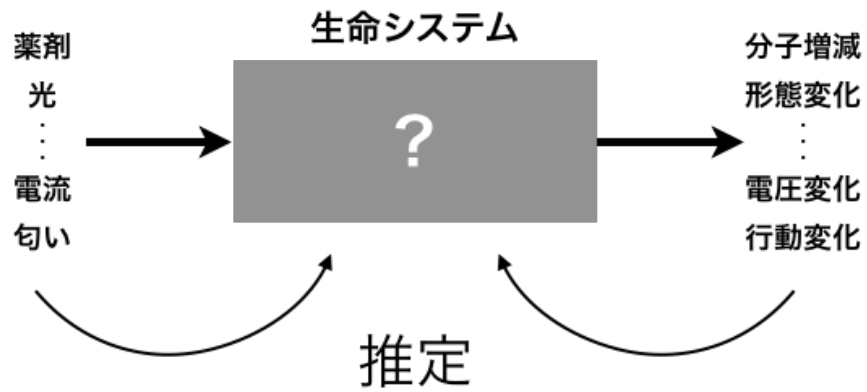


図 1.1 システム同定的生命システムの理解

実験者が設定した入力に対して、出力を測定することで、その間に存在する生命システムがどのような性質をもっているのかを探る。

1.2 環境ノイズ下における入出力関係

これまで述べてきたように、生物において様々な入出力関係が制御、測定、解析手法の向上によって現在までに明らかにされてきた。一方で、これらのアプローチは入力および出力の平均的な関係性のみに着目しており、入力の揺らぎや確率的な振る舞いが出力にどのような影響を与えるのかに関してはほとんど議論されていない。むしろ、平均化をすることで、あえてこれらの影響を打ち消すようなアプローチが取られてきていた。しかし、例えば、量子力学においては、物理量の測定値は確率的な振る舞いを示す (Born, 1926; Heisenberg, 1927; Sakurai and Napolitano, 2017) ことが、その量子力学の本質的な性質として理解されている。古典力学においても、Brown 運動に代表されるように、微視的な揺らぎにより、巨視的な拡散現象が駆動されることも明らかにされており、平均的な挙動よりも、その物理量の確率分布のほうが重要な意味をもつ (Einstein, 1905; Sekimoto, 2010)。

生物においても、こうした揺らぎによる影響は決して無視できないものと認識されてきている (Faisal et al., 2008; Eldar and Elowitz, 2010; Tsimring, 2014)。例えば、同一培養条件の培養細胞においても細胞毎の不均一性が存在し、それは遺伝子発現などの内在的な要因と、リガンドなどの外因的な要因があることがわかっている (Elowitz et al., 2002; Eldar and Elowitz, 2010; Tsimring, 2014)。このような不均一性は薬剤耐性の一因であるため、医療分野においても重要な問題である (Hinohara and Polyak, 2019)。また、揺らぎは雑音としてシグナル伝達などを阻害するだけではなく、逆に感度を高めることもあり、これは確率共鳴として知られている (Wiesenfeld and Moss, 1995; Gammaitoni et al., 1998; Anderson et al., 2000) (図 1.2)。このようなノイズ下での情報伝達を理解するための手段としては情報理論 (Cover and Thomas, 2006) が適用されてきた。情報理論はもともと通信分野において、ノイズの多い通信路において情報を転送するために開発された (Shannon, 1948) が、これを生物におけるシグナル伝達に適用される研究がある (Rieke et al., 1997; Bialek, 2012; Uda et al., 2013; Uda and Kuroda, 2016)。これらの研究では、神経成長因子 NGF に対するシグナル伝達が定量化され、シグナル阻害に対してその情報伝達が頑健であることが示された (Uda et al., 2013; Uda and Kuroda, 2016)。また、情報理論において定義されたエントロピーが、熱力学でのエントロピーとの対応が理論的にも実験的にも示されている (Jarzynski, 1997; Sagawa and Ueda, 2010; Sekimoto, 2010; Toyabe et al., 2010; Seifert, 2012; Ito and Sagawa, 2013; Parrondo et al., 2015)。このような揺らぎを無視できない系での熱力学は揺らぐ系の熱力学 (stochastic thermodynamics) とよばれており、近年、大腸菌の走化性モデルにこの理論を用いること

で、そのシグナル伝達が熱力学的に効率的であることがわかった (Ito and Sagawa, 2015)。こうした知見から、生命におけるノイズを考慮した入出力関係の重要性は明らかである (図 1.3)。

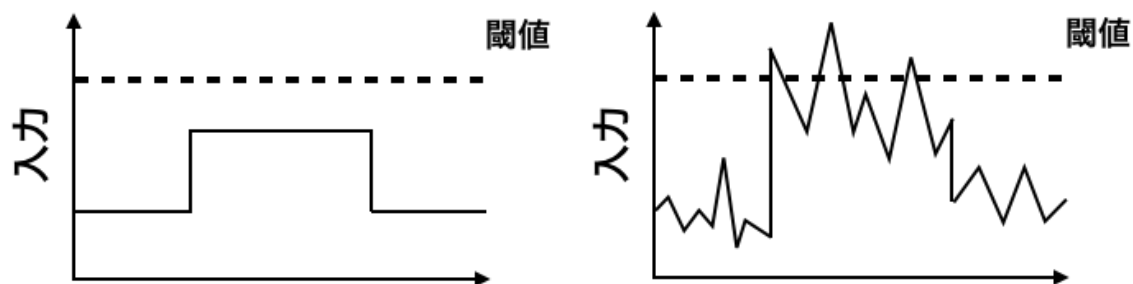
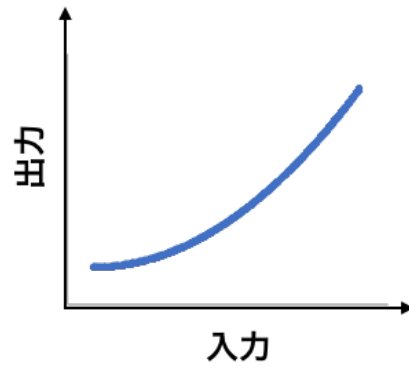


図 1.2 確率共鳴の例

ノイズが無いと信号は閾値を超えることはない（左）が、ノイズによって入力が閾値を超えることがおこる（右）。これは、ノイズより、逆に感度が上昇していることを意味し、このような現象を確率共鳴とよぶ。

決定論的



確率論的

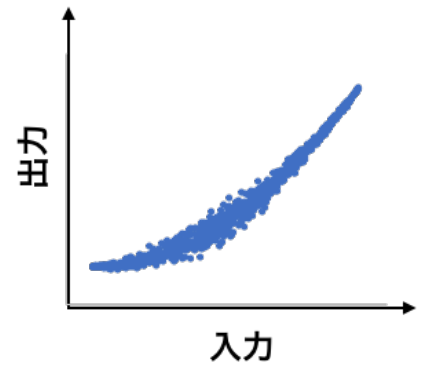


図 1.3 従来の考え方と本研究で取り組む考え方

従来は平均化によって決定論的な関係を考えている（左）が、本来はノイズによって、入力、出力ともに確率的なもので、その応答には幅がある（右）。

1.3 本研究の目的

以上で述べたように、生命においてノイズを考慮した入出力関係を明らかにすることが重要であるという認識は生物学の分野でも浸透しているものの、一方で、未だに生物において、ノイズを含む入力に対して、どのように応答するのかについての理解は理論、実験の両面において不十分である。この不十分な理解を克服するためには、前述した大腸菌走化性モデルのような細胞下レベルでのシグナル伝達メカニズムがよくわかっている系について、生物学者にも理解可能な揺らぎに関する新規な評価軸を定めるとともに、生物学者によく知られているモデル生物系について、その入出力関係を明らかにするような実験系を開発することは重要であると考えた。そこで、本研究においては新しい入出力関係の定量化手法を提案し、理論と実験の橋渡しを試みる。第 2 章においては、理論面から、生命において非常によく見られるフィードバック系を例にあげ、ノイズの影響を定量するために定式化をおこなう。大腸菌走化性の数理モデルを用い、揺らぐ系の熱力学および情報幾何学を導入することで熱力学的な順応効率を定量する。さらに、その効率が入力ノイズによってどのように変化するかをみる。第 3 章においては、実験面からのアプローチを試みる。第 2 章で明らかにしたような入出力関係におけるノイズの影響を調べるためには、入出力の同時時系列データが必要である。しかしながら、生体内のフィードバック系に用いられる分子は基本的に変化が小さく、また現状、その測定技術も十分ではない (Miyawaki and Niino, 2015; Lin and Schnitzer, 2016)。よって、現状の測定技術においては、第 2 章で定式化した理論をそのまま適用するのは難しい。そのため、より測定が容易な系を対象とすることで、同時イメージングによって、ノイズ下での入出力関係を明らかにすることを試みた。線虫の介在神経細胞 AIY をモデルとし、その入力である神経伝達物質および、出力である Ca^{2+} 応答および膜電位変化を自然ノイズ下で測定することで、自然に揺らいでいる神経伝達物質入力によって、散発的な神経活動がおこることを明らかにする。

第 4 章においては、以上より得られた結果について議論し、今後の展望を述べる。

参考文献

- Abdou K, Shehata M, Choko K, Nishizono H, Matsuo M, Muramatsu S-I, Inokuchi K (2018) Synapse-specific representation of the identity of overlapping memory engrams. *Science* 360:1227–1231 Available at: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aat3810>.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2012) *Molecular biology of the cell*, 6th ed. Garland Science.
- Anderson J, Lampl I, Gillespie D, Ferster D (2000) The contribution of noise to contrast invariance of orientation tuning in cat visual cortex. *Science* 290:1968–1972 Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.290.5498.1968>.
- Arrowsmith CH et al. (2015) The promise and peril of chemical probes. *Nat Chem Biol* 11:536–541 Available at: <http://www.nature.com/articles/nchembio.1867>.
- Bialek W (2012) *Biophysics: searching for principles*. Princeton University Press.
- Born M (1926) Zur quantenmechanik der stoßvorgänge. *Zeitschrift für Phys* 37:863–867 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF01397477>.
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8:1263–1268 Available at: <http://www.nature.com/articles/nn1525>.
- Chronis N, Zimmer M, Bargmann CI (2007) Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Methods* 4:727–731 Available at: <http://www.nature.com/articles/nmeth1075>.
- Cover TM, Thomas JA (2006) *Elements of information theory*. Hoboken: Wiley-Interscience.
- Dayan P, Abbott L (2005) *Theoretical neuroscience: computational and mathematical modeling of neural systems*. MIT press.
- Dean KM, Palmer AE (2014) Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging. *Nat Chem Biol* 10:512–523 Available at: <http://www.nature.com/articles/nchembio.1556>.
- Denk W, Strickler J, Webb W (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248:73–76 Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2321027>.
- Einstein A (1905) Über die von der molekularkinetischen theorie der wärme geforderte bewegung von in ruhenden flüssigkeiten suspendierten teilchen. *Ann Phys* 322:549–560 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/andp.200590005>.
- Eldar A, Elowitz MB (2010) Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature* 467:167–173 Available at: <http://www.nature.com/articles/nature09326>.
- Elowitz M, Levine A, Siggia E, Swain P (2002) Stochastic gene expression in a single cell.

- Science 297:1183–1186 Available at:
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1070919>.
- Faisal AA, Selen LPJ, Wolpert DM (2008) Noise in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 9:292–303 Available at: <http://www.nature.com/articles/nrn2258>.
- Gammaitoni L, Hänggi P, Jung P, Marchesoni F (1998) Stochastic resonance. *Rev Mod Phys* 70:223–287 Available at: <https://link.aps.org/doi/10.1103/RevModPhys.70.223>.
- Gepner R, Mihovilovic Skanata M, Bernat NM, Kaplow M, Gershow M (2015) Computations underlying *Drosophila* photo-taxis, odor-taxis, and multi-sensory integration. *Elife* 4 Available at: <https://elifesciences.org/articles/06229>.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450 Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3838314>.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:85–100 Available at:
<http://link.springer.com/10.1007/BF00656997>.
- Heisenberg W (1927) Über den anschaulichen inhalt der quantentheoretischen kinematik und mechanik. *Zeitschrift für Phys* 43:172–198 Available at:
<http://link.springer.com/10.1007/BF01397280>.
- Helmchen F, Denk W (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2:932–940 Available at: <http://www.nature.com/articles/nmeth818>.
- Hinohara K, Polyak K (2019) Intratumoral heterogeneity: more than just mutations. *Trends Cell Biol* 29:569–579 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892419300467>.
- Hiraiwa T, Nakai Y, Yamada TG, Tanimoto R, Kimura H, Matsumoto Y, Miki N, Hiroi N, Funahashi A (2018) Quantitative analysis of sensitivity to a Wnt3a gradient in determination of the pole-to-pole axis of mitotic cells by using a microfluidic device. *FEBS Open Bio* 8:1920–1935 Available at:
<http://doi.wiley.com/10.1002/2211-5463.12525>.
- Hiraiwa T, Yamada TG, Miki N, Funahashi A, Hiroi N (2019) Activation of cell migration via morphological changes in focal adhesions depends on shear stress in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *J R Soc Interface* 16:20180934 Available at:
<http://www.royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsif.2018.0934>.
- Huisken J, Swoger J, Del Bene F, Wittbrodt J, Stelzer EHK (2004) Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* 305:1007–1009 Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1100035>.

- Ito S, Sagawa T (2013) Information thermodynamics on causal networks. *Phys Rev Lett* 111:180603 Available at: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.111.180603>.
- Ito S, Sagawa T (2015) Maxwell's demon in biochemical signal transduction with feedback loop. *Nat Commun* 6:7498 Available at: <http://www.nature.com/articles/ncomms8498>.
- Jarzynski C (1997) Nonequilibrium equality for free energy differences. *Phys Rev Lett* 78:2690–2693 Available at: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.78.2690>.
- Kandel RE, Schwartz HJ, Jessell MT, Siegelbaum AS, Hudspeth AJ (2012) *Principles of neural science*, 5th ed. New York: McGraw-Hill Professional.
- Karr JR, Sanghvi JC, Macklin DN, Gutschow M V., Jacobs JM, Bolival B, Assad-Garcia N, Glass JI, Covert MW (2012) A whole-cell computational model predicts phenotype from genotype. *Cell* 150:389–401 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867412007763>.
- Kato S, Xu Y, Cho CE, Abbott LF, Bargmann CI (2014) Temporal responses of *C. elegans* chemosensory neurons are preserved in behavioral dynamics. *Neuron* 81:616–628 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089662731301088X>.
- Kim CK, Adhikari A, Deisseroth K (2017) Integration of optogenetics with complementary methodologies in systems neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 18:222–235 Available at: <http://www.nature.com/articles/nrn.2017.15>.
- Kitano H (2002) Systems biology: a brief overview. *Science* 295:1662–1664 Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1069492>.
- Kobayashi T, Nagase F, Hotta K, Oka K (2013) Crosstalk between second messengers predicts the motility of the growth cone. *Sci Rep* 3:3118 Available at: <http://www.nature.com/articles/srep03118>.
- Lin MZ, Schnitzer MJ (2016) Genetically encoded indicators of neuronal activity. *Nat Neurosci* 19:1142–1153 Available at: <http://www.nature.com/articles/nn.4359>.
- Liu Y, Lu H (2016) Microfluidics in systems biology — hype or truly useful? *Curr Opin Biotechnol* 39:215–220 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166916301288>.
- Marmarelis PZ, Naka K-I (1972) White-noise analysis of a neuron chain: an application of the wiener theory. *Science* 175:1276–1278 Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.175.4027.1276>.
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388:882–887 Available at: <http://www.nature.com/articles/42264>.
- Miyawaki A, Niino Y (2015) Molecular spies for bioimaging—fluorescent protein-based probes. *Mol Cell* 58:632–643 Available at:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276515001677>.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13940–13945 Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1936192100>.
- Nagel KI, Doupe AJ (2006) Temporal processing and adaptation in the songbird auditory forebrain. *Neuron* 51:845–859 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627306006775>.
- Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799–802 Available at: <http://www.nature.com/articles/260799a0>.
- Parrondo JMR, Horowitz JM, Sagawa T (2015) Thermodynamics of information. *Nat Phys* 11:131–139 Available at: <http://www.nature.com/articles/nphys3230>.
- Power RM, Huiskens J (2017) A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging. *Nat Methods* 14:360–373 Available at: <http://www.nature.com/articles/nmeth.4224>.
- Rieke F, Warland D, De Ruyter Van Steveninck R, Bialek W (1997) *Spikes: exploring the neural code*. MIT press.
- Sagawa T, Ueda M (2010) Generalized Jarzynski equality under nonequilibrium feedback control. *Phys Rev Lett* 104:090602 Available at: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.104.090602>.
- Sakurai JJ, Napolitano J (2017) *Modern quantum mechanics*, 2nd ed. Cambridge University Press.
- Seifert U (2012) Stochastic thermodynamics, fluctuation theorems and molecular machines. *Rep Prog Phys* 75:126001 Available at: <http://stacks.iop.org/0034-4885/75/i=12/a=126001?key=crossref.a937f55c8fce3473876363a3edb3c282>.
- Sekimoto K (2010) *Stochastic energetics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-05411-2>.
- Shannon CE (1948) A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J* 27:379–423 Available at: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=6773024>.
- Suzuki R, Hotta K, Oka K (2015) Spatiotemporal quantification of subcellular ATP levels in a single HeLa cell during changes in morphology. *Sci Rep* 5:16874 Available at: <http://www.nature.com/articles/srep16874>.
- Suzuki R, Hotta K, Oka K (2018) Transitional correlation between inner-membrane potential and ATP levels of neuronal mitochondria. *Sci Rep* 8:2993 Available at:

- <http://www.nature.com/articles/s41598-018-21109-2>.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350–4354 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388439>.
- Toyabe S, Sagawa T, Ueda M, Muneyuki E, Sano M (2010) Experimental demonstration of information-to-energy conversion and validation of the generalized Jarzynski equality. *Nat Phys* 6:988–992 Available at: <http://www.nature.com/articles/nphys1821>.
- Tsimring LS (2014) Noise in biology. *Rep Prog Phys* 77:026601 Available at: <http://stacks.iop.org/0034-4885/77/i=2/a=026601?key=crossref.5e3de98e26f7afe3ffa4ce108836d8e4>.
- Tsukada Y, Yamao M, Naoki H, Shimowada T, Ohnishi N, Kuhara A, Ishii S, Mori I (2016) Reconstruction of spatial thermal gradient encoded in thermosensory neuron AFD in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 36:2571–2581 Available at: <http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.2837-15.2016>.
- Uda S, Kuroda S (2016) Analysis of cellular signal transduction from an information theoretic approach. *Semin Cell Dev Biol* 51:24–31 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952115300240>.
- Uda S, Saito TH, Kudo T, Kokaji T, Tsuchiya T, Kubota H, Komori Y, Ozaki Y, Kuroda S (2013) Robustness and compensation of information transmission of signaling pathways. *Science* 341:558–561 Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1234511>.
- Wiesenfeld K, Moss F (1995) Stochastic resonance and the benefits of noise: from ice ages to crayfish and SQUIDS. *Nature* 373:33–36 Available at: <http://www.nature.com/articles/373033a0>.

第 2 章 情報幾何学による大腸菌走化性モデルにおける順応の定量

2.1 背景

ノイズのある環境において生体システムは外部情報を処理する必要がある。感覚順応は其中でも様々な強度の外部刺激に対して応答性を調節するための重要な機能の一つである。多くの生物で、負のフィードバックによって、順応がなされている (Nakatani et al., 1991; Menini, 1999; Hohmann, 2002; Hazelbauer et al., 2008; Tu et al., 2008; Lan et al., 2012; Shidara et al., 2017)。ノイズ下における情報処理を定量的に理解するために、揺らぐ系の熱力学 (stochastic thermodynamics) によるアプローチが提唱されている (Sartori and Tu, 2011; Lan et al., 2012; Sartori et al., 2014; Ito and Sagawa, 2015; Ito, 2018)。揺らぐ系の熱力学とは、Brown 運動に代表されるような、ノイズによる影響が無視できないような系における熱力学である (Jarzynski, 1997; Crooks, 2007; Sekimoto, 2010; Seifert, 2012; Parrondo et al., 2015)。着目している系の確率分布の遷移から、エントロピーなどの熱力学的量を計算でき、また、情報理論におけるエントロピーとの対応関係が知られている (Sagawa and Ueda, 2008, 2010; Ito and Sagawa, 2013; Parrondo et al., 2015)。特に、感覚順応のモデルとして、大腸菌 (*Escherichia coli*) の走化性モデルは良く調べられており (Hazelbauer et al., 2008; Micali and Endres, 2016; Bi and Sourjik, 2018)、熱力学的なコストとの関係が明らかにされ (Lan et al., 2012; Sartori et al., 2014; Ito and Sagawa, 2015)、感覚順応の過程が熱力学的に効率的であることがわかってきた。大腸菌の化学物質感覚受容において、外界のリガンドは MCP (methyl-accepting chemotaxis protein) 受容体によって受容され、CheA キナーゼの自己リン酸化を抑制する。CheA のリン酸化は CheY の活性を介して大腸菌の前進を抑制する。一方、CheA のリン酸化は CheB をリン酸化し、CheB は MCP を脱メチル化によって活性化する。よって、MCP による CheA の活性減少は CheB の活性減少を引き起こし、MCP の脱メチル化が抑制されることで、MCP の活性が減少する。このような負のフィードバックによって、外界のリガンドに対する順応が起こる (図 2.1A)。揺らぐ系の熱力学においては、CheA キナーゼ活性を着目系とすると、MCP のメチル化がそれに対して過去のシグナルに関する情報を記録するメモリであるとみなせる。先行研究において、順応におけるエネルギーと順応速度、そして順応の正確性の関係性が数理モデルを用いて明らかにされている (Lan et al., 2012)。この研究では、正確性は刺激前のキナーゼのレベルと順応後のキナーゼのレベルの差として表現され、また、順応速度はモデルにおける時定数によってのみ決定されていた。そして、熱力学的なコストはこれらのパラメータによって定式化されている。順応速度は同じモデルであっ

ても刺激などにより変化するはずであるが、これまでの議論では、時定数以外に順応速度とコストについて考えることは行われていない。近年、揺らぐ系の熱力学に対して、情報幾何学を導入し、マスター方程式を用いて、化学反応における反応速度と熱力学的コストが明らかになった (Ito, 2018)。また、一般的な Langevin 方程式においても情報幾何学的なアプローチが導入されている (Ito and Dechant, 2018)。これらのアプローチではその時々において順応の効率について議論することができる。本研究では、情報幾何学と揺らぐ系の熱力学を大腸菌化学走性順応モデル (図 2.1) に適用し、順応速度と熱力学的なコストを数理モデルと数値計算によって調べた。その結果、順応の効率は外界のリガンド強度に対しては頑健性を示したが、外界のリガンドに含まれるノイズ強度を強くするとその効率は低下した。一方で、ノイズ強度に対して単調減少するわけではなく、ノイズによって、効率が上昇する非自明な現象がみられた。

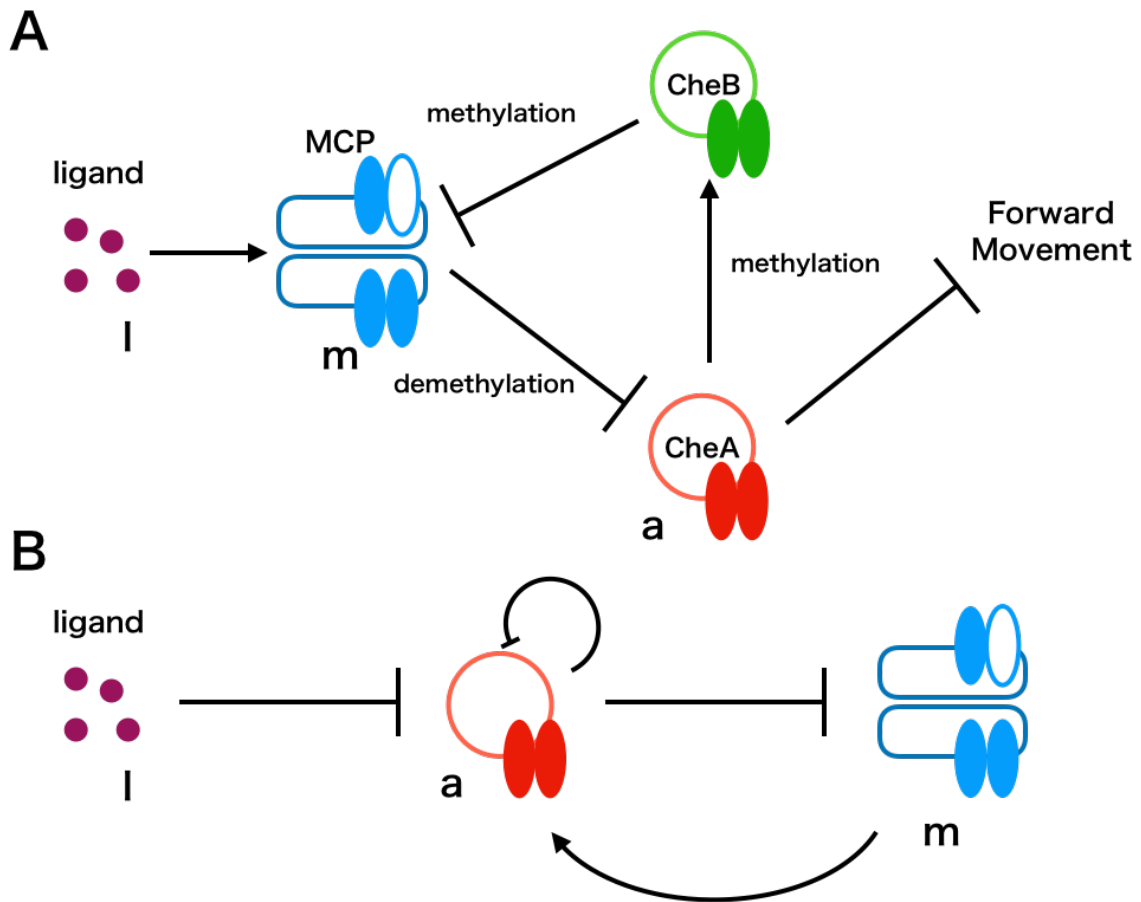


図 2.1 大腸菌走化性モデルの模式図

(A) 外部リガンド刺激は MCP 受容体に結合し、CheA キナーゼの自己リン酸化を抑制する。CheA のリン酸化は大腸菌の前進行動を抑制するため、CheA の抑制によって、前進行動が促進する。CheA キナーゼは CheB をリン酸化し、CheB は MCP を脱メチル化する。よって、CheA の抑制により、CheB も抑制されることで、MCP のメチル化が促進される。MCP のメチル化によって、MCP が抑制され、順応がおこる。(B) 粗視化モデル。(A)のモデルよりも変数が減っているが、順応に関する基本的な挙動は再現できる。

2.2 方法

2.2.1 大腸菌の化学走性モデル

大腸菌の化学走性の数理モデルには、先行研究において定式化されている粗視化した連立線形 Langevin 方程式 (Tu et al., 2008; Sartori and Tu, 2011; Ito and Sagawa, 2015) を用いた (図 2.1B)。具体的には

$$\begin{aligned}\frac{da(t)}{dt} &= -\frac{1}{\tau_a} [a(t) - \overline{a(t)}] + \xi_a(t) \\ &= -\frac{1}{\tau_a} [a(t) - \alpha m(t) + \beta l(t)] + \xi_a(t)\end{aligned}\quad (2.1)$$

$$\frac{dm(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau_m} a(t) + \xi_m(t) \quad (2.2)$$

であらわされ、 $a(t)$ がキナーゼの活性、 $m(t)$ が受容体のメチル化レベル、 $l(t)$ が外界のリガンド強度、 $\overline{a(t)}$ が順応後の定常状態時の $a(t)$ の活性レベルをあらわす。 $\xi_a(t)$ および $\xi_m(t)$ は独立白色 Gauss ノイズをあらわし、強度はそれぞれ $2T_a$ と $2T_m$ である。このモデルは粗視化線形モデルではあるが、実験との対応関係がすでに確認されている (Tu et al., 2008)。また、定数は先行研究で決定された値を用いており、それぞれ $\tau_a = 0.02$ 、 $\tau_m = 0.2$ 、 $\alpha = 2.7$ 、 $T_a = T_m = 0.005$ である (Tu et al., 2008; Tostevin and ten Wolde, 2009; Lan et al., 2012; Ito and Sagawa, 2015)。また、これらの粗視化モデルでは、各パラメータは無次元量である。

2.2.2 数値計算

前節で導入したモデルを用いて、次節において導入する微小距離の 2 乗 ds^2 、熱力学的コスト変化 \mathcal{C} および統計的長さ \mathcal{L} は Python (version 3.6.1) の numpy ライブラリ (version 1.12.1) を用いて数値計算した。これらの計算には $a(t)$ および $m(t)$ の確率分布 $P(a, m)$ が必要となる。初期分布が Gauss 分布の場合、線形 Langevin 方程式ではその後も Gauss 分布に従うため、平均値と共分散のみから確率分布を求めることができ (Van Kampen, 2007)、それは次のような Fokker-Planck 方程式に従う。

$$\begin{aligned}\frac{\partial P(a, m)}{\partial t} &= \frac{1}{\tau_a} P(a, m) + \frac{1}{\tau_a} [a(t) - \alpha m(t) + \beta l(t)] \frac{\partial P(a, m)}{\partial a(t)} \\ &\quad + \frac{1}{\tau_m} a(t) \frac{\partial P(a, m)}{\partial m(t)} + T_a \frac{\partial^2 P(a, m)}{\partial a(t)^2} + T_m \frac{\partial^2 P(a, m)}{\partial m(t)^2}\end{aligned}\quad (2.3)$$

平均と共分散の微小時間における変化は、線形 Langevin 方程式でかつ、Gauss ノイズの場合には次のように定式化できる (Van Kampen, 2007)。

$$\Delta\mu = \left(- \begin{pmatrix} \frac{1}{\tau_a} & -\frac{\alpha}{\tau_a} \\ \frac{1}{\tau_m} & 0 \end{pmatrix} \mu + \mu \right) \Delta t \quad (2.4)$$

$$\Delta\Sigma = \left(- \begin{pmatrix} \frac{1}{\tau_a} & -\frac{\alpha}{\tau_a} \\ \frac{1}{\tau_m} & 0 \end{pmatrix} \Sigma - \Sigma \begin{pmatrix} \frac{1}{\tau_a} & -\frac{\alpha}{\tau_a} \\ \frac{1}{\tau_m} & 0 \end{pmatrix}^T + 2 \begin{pmatrix} T_a & 0 \\ 0 & T_m \end{pmatrix} \right) \Delta t + o(\Delta t^2) \quad (2.5)$$

ここで、 T は行列の転置、 Σ は $a(t)$ と $m(t)$ の共分散行列、 μ は $a(t)$ と $m(t)$ の平均をあらわす。これらを用いてオイラー法 ($\Delta t = 0.0001$) によって数値計算した。また、初期分布はリガンド強度 $l(t) = 0$ の場合の平衡状態を用いた。 ds^2 は Fisher 情報量 $G(\theta)$ および Kullback-Leibler 情報量 D_{KL} から計算できるが、それらは Gauss 分布の場合は平均と共分散から次のように計算できる (Nielsen and Garcia, 2009; Amari, 2016)。

$$G(\theta) = \Delta\mu^T \Sigma^{-1} \Delta\mu + \frac{1}{2} \text{tr}[\Sigma^{-1} \Delta\Sigma \Sigma^{-1} d\Sigma] \quad (2.6)$$

$$\begin{aligned} D_{KL}(P(a, m; \theta) || P(a, m; \theta + \Delta\theta)) \\ = \log \frac{|\Sigma + \Delta\Sigma|}{|\Sigma|} + \text{tr}((\Sigma + \Delta\Sigma)^{-1} \Sigma) + \Delta\mu^T (\Sigma + \Delta\Sigma)^{-1} \Delta\mu - \text{dim}(P(a, m)) \end{aligned} \quad (2.7)$$

ここで、 tr はトレース、 $\text{dim}(\cdot)$ はベクトルの次元をあらわす。すべての計算において、刺激強度は $l(t) = 0$ ($t < 0$) で、[図 2.3](#) では $T_a = 0.005$ に固定し、[図 2.4](#) では T_a を時刻 0 で変化させた。

2.3 結果

2.3.1 大腸菌の走化性モデルにおける情報幾何学

大腸菌走化性の順応は非常によく調べられており、外界のリガンドが受容体によって感受されるとキナーゼのリン酸化を抑制する (Hazelbauer et al., 2008; Micali and Endres, 2016; Bi and Sourjik, 2018) (図 2.1)。先行研究において、この順応は線形 Langevin 方程式によって表現されている (Tu et al., 2008; Sartori and Tu, 2011; Ito and Sagawa, 2015)。このモデルは粗視化モデルであり、熱力学的な解析ができるほど簡素なモデルではあるが、実験結果をよく反映している。 $a(t)$ は CheA キナーゼの活性化レベルをあらわし、 $m(t)$ は MCP 受容体のメチル化レベルを表現している。上記のように、外界のリガンドによって、キナーゼが一過的に抑制され、受容体がそれに続いてメチル化される (図 2.2A)。これらの活性レベルはノイズによって変動する確率変数であるため、確率分布によってあらわすことができる。 $a(t)$ および $m(t)$ は初期分布が Gauss 分布の場合に Gauss 分布に従って時間変動する。このようなモデルに対して、情報幾何学を適用する。情報幾何学により、2つの確率分布間の微小距離を測定することができる (Amari, 2016)。特に、Gauss 分布に代表される指数分布族 $p(x; \theta)$ と $p(x; \theta + d\theta)$ の微小距離 ds は

$$ds = 2D_{KL}(p(x; \theta) || p(x; \theta + d\theta)) \quad (2.8)$$

$$= \sum g_{i,j} d\theta_i d\theta_j \quad (2.9)$$

であらわされる。ここで θ は分布を表すパラメータであり、 $G(\theta) = (g_{i,j})$ である。先に述べたように、 $a(t)$ および $m(t)$ の初期分布を Gauss 分布であると仮定することで、これらから確率分布間の微小距離を計算することができる。

先行研究 (Ito, 2018; Ito and Dechant, 2018) と同様に、微小距離の2乗 ds^2 を考えると

$$\frac{ds^2}{dt^2} = \left(\frac{ds}{dt}\right)^2 = \left(\frac{\sqrt{ds}}{dt}\right)^2 \quad (2.10)$$

$$= \left(\frac{1}{2\sqrt{ds^2}} \frac{ds^2}{dt}\right)^2 \quad (2.11)$$

となる。また、ここで、 $ds^2/dt^2 = \Sigma g_{i,j} d\theta_i/dt d\theta_j/dt$ である。次に、先行研究 (Wootters, 1981; Ito, 2018) と同様に、時刻 0 から τ までの統計的長さ \mathcal{L} を次のように導入する。

$$\mathcal{L} = \int ds = \int_0^\tau \frac{ds}{dt} dt \quad (2.12)$$

また、熱力学的コスト \mathcal{C} は

$$c = \int_0^\tau \left(\frac{ds}{dt} \right)^2 dt \quad (2.13)$$

で定義する。先行研究において、この量が着目している系におけるエントロピー変化と関係し、熱力学的コストをあらわしていることが示されている (Ito and Dechant, 2018)。Cauchy-Schwarz の不等式 (Crooks, 2007) から、先行研究 (Ito, 2018; Ito and Dechant, 2018) と類似した順応の速度と熱力学的コストの間に次の関係がいえる。

$$\int_0^\tau dt \int_0^\tau \left(\frac{ds}{dt} \right)^2 dt \geq \left(\int_0^\tau \frac{ds}{dt} dt \right)^2 \quad (2.14)$$

$$\tau \geq \frac{\mathcal{L}^2}{c} \quad (2.15)$$

等式は ds^2/dt^2 が時間に依存しない場合に成り立つ。この不等式は $a(t)$ と $m(t)$ の推移に対して制限を与える。 $a(t)$ と $m(t)$ の推移とは、順応を意味するため、これは順応速度に対して制限を与えていることとなる。つまり、短い時間で順応をするためには、より多くの熱力学的コストを支払う必要があることを意味する。また、順応の効率 η を

$$\eta = \frac{\mathcal{L}^2}{\tau c} \quad (2.16)$$

であらわせる。これは、 $\eta = 1$ のとき、最も効率的に推移していることを意味する。

2.3.2 様々な刺激に対する順応の効率

前節において導入した種々のパラメータを数値計算によって解くことで、入力によって順応速度の効率がどのように変化するかを検証した (図 2.2)。数値計算の結果、 $ds^2/dt^2 \geq 0$ は満たされていた (図 2.2B)。これは、実数の自乗は非負であることからいえる。さらに、順応の速度と熱力学的コストの関係は推移時間によって、抑えられていた (図 2.2D)。これらの結果は、先に示した関係が数値計算においても成り立っていることを示している。また、順応においては3つの段階がみられた (図 2.2E)。リガンドに応答している 0–0.02 まで、順応開始の 0.02–0.1、そして順応後半の 0.1–である。最初の段階では効率 η がほぼ 1 近い状態で推移している。次に、順応が開始されると効率が低下し、順応が完了し、定常状態に近づくとほぼ 0 となる。

次に、リガンドの刺激強度を変えたところ、熱力学的コスト c および統計的長さ \mathcal{L} は変化したがる、効率 η は変化しなかった (図 2.3)。最後に、リガンド刺激のノイズ強度を変化させた (図 2.4)。直感的にはノイズが小さければ効率は高くなるが、数値計算の結果もそれを反映している。しかしながら、最初の段階では効率 η は $T_a = 0.005$ のときより

も $T_a = 0.05$ のほうが高かったが、次の段階ではそれは逆転し、 $T_a = 0.0005$ ではさらに効率は悪化した。この結果は順応において最適なノイズレベルがあることを示唆している。これらの結果は、順応速度の効率を初めて示し、それが刺激強度には頑健であるが、ノイズ強度によって大きく変動することを明らかにした。

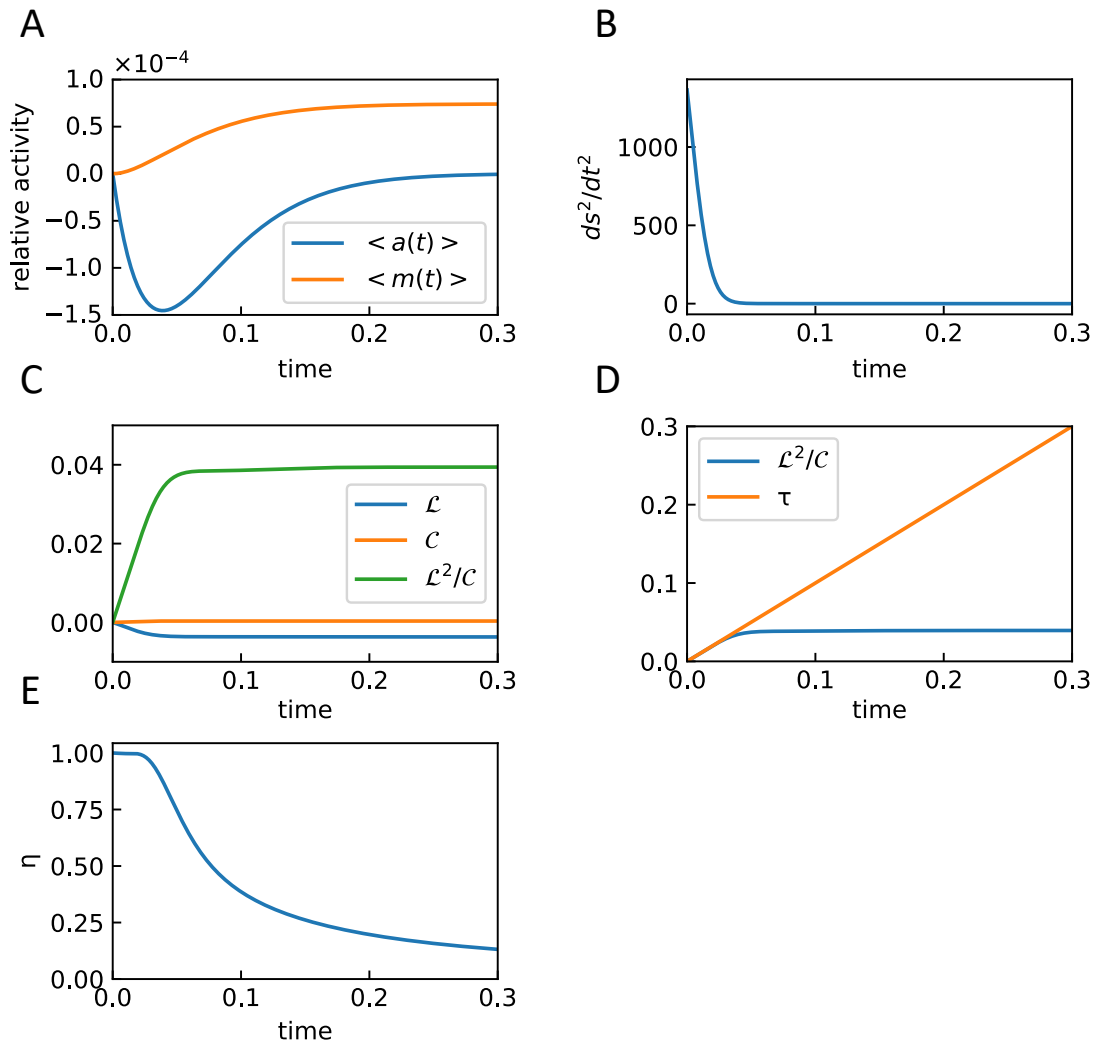


図 2.2 数値計算による大腸菌走化性モデルおよび熱力学的パラメータの時間発展
 (A) キナーゼ活性 $a(t)$ および受容体メチル化レベル $m(t)$ の平均値。キナーゼ活性が一過的に減少した後、もとのレベルまで戻っており、順応している。 ds^2/dt^2 (B) および、熱力学的コスト c 、統計的長さ \mathcal{L} および \mathcal{L}^2/c (C) の時間変化。(D) \mathcal{L}^2/c と経過時間 τ の関係。経過時間 τ が \mathcal{L}^2/c の上界となっている。(E) 順応速度の効率 η 。

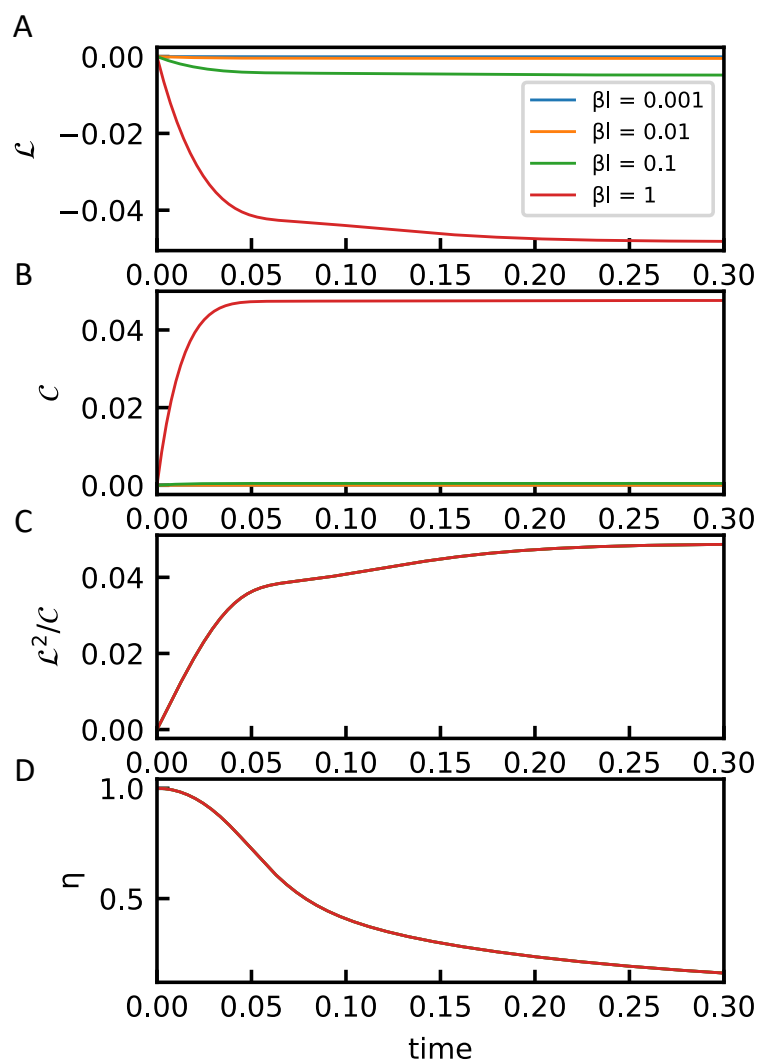


図 2.3 様々なリガンド刺激強度に対する熱力学的パラメータ
 統計的長さ \mathcal{L} (A)、熱力学的コスト c (B)、 \mathcal{L}^2/c (C)、順応速度の効率 η (D) の
 時間変化。

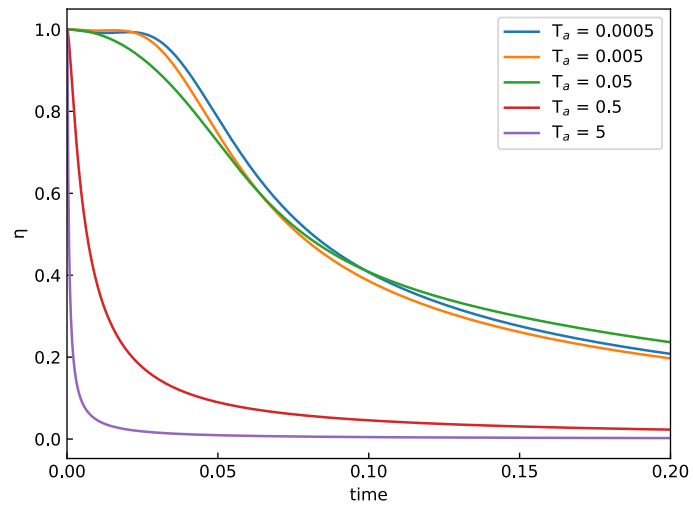


図 2.4 様々なリガンドのノイズ強度に対する順応速度の効率 η の時間変化

2.4 考察

揺らぐ系の熱力学と情報幾何学を大腸菌走化性モデルに導入することで、順応速度と熱力学的コストの関係を明らかにした。初期分布が Gauss 分布であることと、Langevin 方程式が線形であることを仮定したが、それでも十分に応用範囲は広い。先行研究ではマスター方程式においてのみ調べられていた (Ito, 2018)。しかし、本研究で用いた Langevin 方程式は、酵母における浸透圧感知や嗅覚神経細胞、光感受性細胞など、広い生命現象に適用されている (Nakatani et al., 1991; Menini, 1999; Hohmann, 2002; Hazelbauer et al., 2008; Lan et al., 2012; Shidara et al., 2017)。よって、本研究における定式化は幅広い生命現象に適用することができるだろう。

本研究において大腸菌化学走性モデルに対して揺らぐ系の熱力学と情報幾何学を導入した。このモデルは揺らぐ系の熱力学を用いて、よく調べられている (Sartori and Tu, 2011; Lan et al., 2012; Sartori et al., 2014; Ito and Sagawa, 2015) が、順応速度に関しては不明な点が多い。刺激強度や回数によって順応速度が変化することが実験的に知られている (Chalasanani et al., 2007; Shidara et al., 2017) ため、速度も順応を理解する上で重要なパラメータといえる。今までに、順応の速度について、モデルの時定数を用いて熱力学的コストについて議論がなされている (Lan et al., 2012)。しかし、本研究における定式化は図 2.2 や図 2.4 にみられるような、時々刻々の変化について議論ができるため、先行研究よりも踏み込んだ議論ができるようになった。

順応の効率はノイズ強度に応じて単調減少するような簡単な関係にはなっていない (図 2.4)。信号感知において、ノイズによってその感度が向上する、確率共鳴という現象が知られている (Wiesenfeld and Moss, 1995; Gammaitoni et al., 1998; Anderson et al., 2000; McDonnell and Abbott, 2009)。直接的に関係する報告はないが、確率共鳴は周波数特異的なものや複数の閾値が存在するものなど、多くの種類が報告されている (Stocks, 2000; McDonnell and Abbott, 2009; Tutu, 2011) ため、本研究においてみられた現象は確率共鳴の一種であるかもしれない。

本研究では様々な刺激強度およびノイズ強度に対して順応速度の効率を調べ、刺激強度に対しては頑健であるが、ノイズ強度に対しては大きく変化することを示した。線虫の嗅覚受容において、セカンドメッセンジャーである cGMP は広い範囲の刺激強度に対して頑健な順応速度を示すことが知られている (Shidara et al., 2017) ことから、本研究の結果と合致する結果が実際の生体においてもみられている。順応速度については時定数について議論されることはあるが、実験によって、より詳細な解析をすることは難しい (Lan

et al., 2012)。特に、順応速度の効率を実験的に調べることは困難だろう。しかし、光感受性蛍光タンパク質を使うことで、刺激強度やノイズ強度を調整することができるようになってきた (Gepner et al., 2015; Gorur-Shandilya et al., 2017; Chen et al., 2018)。そこで、それらの結果と本研究の解析と組み合わせることで、順応についてより詳細に調べることができるだろう。

参考文献

- Amari S (2016) Information geometry and its applications. Springer.
- Anderson J, Lampl I, Gillespie D, Ferster D (2000) The contribution of noise to contrast invariance of orientation tuning in cat visual cortex. *Science* 290:1968–1972 Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.290.5498.1968>.
- Bi S, Sourjik V (2018) Stimulus sensing and signal processing in bacterial chemotaxis. *Curr Opin Microbiol* 45:22–29 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527417302540>.
- Chalasanani SH, Chronis N, Tsunozaki M, Gray JM, Ramot D, Goodman MB, Bargmann CI (2007) Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 450:63–70 Available at: <http://www.nature.com/articles/nature06292>.
- Chen I-W, Papagiakoumou E, Emiliani V (2018) Towards circuit optogenetics. *Curr Opin Neurobiol* 50:179–189 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438817302477>.
- Crooks GE (2007) Measuring thermodynamic length. *Phys Rev Lett* 99:100602 Available at: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.99.100602>.
- Gammaitoni L, Hänggi P, Jung P, Marchesoni F (1998) Stochastic resonance. *Rev Mod Phys* 70:223–287 Available at: <https://link.aps.org/doi/10.1103/RevModPhys.70.223>.
- Gepner R, Mihovilovic Skanata M, Bernat NM, Kaplow M, Gershow M (2015) Computations underlying *Drosophila* photo-taxis, odor-taxis, and multi-sensory integration. *Elife* 4 Available at: <https://elifesciences.org/articles/06229>.
- Gorur-Shandilya S, Demir M, Long J, Clark DA, Emonet T (2017) Olfactory receptor neurons use gain control and complementary kinetics to encode intermittent odorant stimuli. *Elife* 6 Available at: <https://elifesciences.org/articles/27670>.
- Hazelbauer GL, Falke JJ, Parkinson JS (2008) Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem Sci* 33:9–19 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000407002903>.
- Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300–372 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040128>.
- Ito S (2018) Stochastic thermodynamic interpretation of information geometry. *Phys Rev Lett* 121:030605 Available at: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.121.030605>.
- Ito S, Dechant A (2018) Stochastic time-evolution, information geometry and the Cramér-Rao bound. arXiv Available at: <http://arxiv.org/abs/1810.06832>.
- Ito S, Sagawa T (2013) Information thermodynamics on causal networks. *Phys Rev Lett* 111:180603 Available at: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.111.180603>.

- Ito S, Sagawa T (2015) Maxwell's demon in biochemical signal transduction with feedback loop. *Nat Commun* 6:7498 Available at: <http://www.nature.com/articles/ncomms8498>.
- Jarzynski C (1997) Nonequilibrium equality for free energy differences. *Phys Rev Lett* 78:2690–2693 Available at: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.78.2690>.
- Lan G, Sartori P, Neumann S, Sourjik V, Tu Y (2012) The energy–speed–accuracy trade-off in sensory adaptation. *Nat Phys* 8:422–428 Available at: <http://www.nature.com/articles/nphys2276>.
- McDonnell MD, Abbott D (2009) What is stochastic resonance? Definitions, misconceptions, debates, and its relevance to biology. *PLoS Comput Biol* 5:e1000348 Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1000348>.
- Menini A (1999) Calcium signalling and regulation in olfactory neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9:419–426 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438899800634>.
- Micali G, Endres RG (2016) Bacterial chemotaxis: information processing, thermodynamics, and behavior. *Curr Opin Microbiol* 30:8–15 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527415001721>.
- Nakatani K, Tamura T, Yau KW (1991) Light adaptation in retinal rods of the rabbit and two other nonprimate mammals. *J Gen Physiol* 97:413–435 Available at: <http://www.jgp.org/cgi/doi/10.1085/jgp.97.3.413>.
- Nielsen F, Garcia V (2009) Statistical exponential families: a digest with flash cards. Available at: <http://arxiv.org/abs/0911.4863>.
- Parrondo JMR, Horowitz JM, Sagawa T (2015) Thermodynamics of information. *Nat Phys* 11:131–139 Available at: <http://www.nature.com/articles/nphys3230>.
- Sagawa T, Ueda M (2008) Second law of thermodynamics with discrete quantum feedback control. *Phys Rev Lett* 100:080403 Available at: <http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.3131311>.
- Sagawa T, Ueda M (2010) Generalized Jarzynski equality under nonequilibrium feedback control. *Phys Rev Lett* 104:090602 Available at: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.104.090602>.
- Sartori P, Granger L, Lee CF, Horowitz JM (2014) Thermodynamic costs of information processing in sensory adaptation. *PLoS Comput Biol* 10:e1003974 Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1003974>.
- Sartori P, Tu Y (2011) Noise filtering strategies in adaptive biochemical signaling networks. *J Stat Phys* 142:1206–1217 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10955-011-0169-z>.
- Seifert U (2012) Stochastic thermodynamics, fluctuation theorems and molecular machines.

- Rep Prog Phys 75:126001 Available at:
<http://stacks.iop.org/0034-4885/75/i=12/a=126001?key=crossref.a937f55c8fce3473876363a3edb3c282>.
- Sekimoto K (2010) Stochastic energetics. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-05411-2>.
- Shidara H, Hotta K, Oka K (2017) Compartmentalized cGMP responses of olfactory sensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. J Neurosci 37:3753–3763 Available at:
<http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.2628-16.2017>.
- Stocks NG (2000) Suprathreshold stochastic resonance in multilevel threshold systems. Phys Rev Lett 84:2310–2313 Available at:
<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.84.2310>.
- Tostevin F, ten Wolde PR (2009) Mutual information between input and output trajectories of biochemical networks. Phys Rev Lett 102:218101 Available at:
<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.102.218101>.
- Tu Y, Shimizu TS, Berg HC (2008) Modeling the chemotactic response of *Escherichia coli* to time-varying stimuli. Proc Natl Acad Sci USA 105:14855–14860 Available at:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0807569105>.
- Tutu H (2011) Frequency adaptation in controlled stochastic resonance utilizing delayed feedback method: Two-pole approximation for response function. Phys Rev E 83:061106 Available at: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.83.061106>.
- Van Kampen NG (2007) Stochastic processes in physics and chemistry, 3rd ed. North Holland.
- Wiesenfeld K, Moss F (1995) Stochastic resonance and the benefits of noise: from ice ages to crayfish and SQUIDS. Nature 373:33–36 Available at:
<http://www.nature.com/articles/373033a0>.
- Wootters WK (1981) Statistical distance and Hilbert space. Phys Rev D 23:357–362 Available at: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevD.23.357>.

第3章 環境ノイズ下における線虫介在神経細胞 AIY の入出力関係

3.1 背景

環境ノイズ下において、感覚入力から行動までの情報処理を理解することは神経科学の重要な課題である。感覚入力に対するノイズについては、今までに刺激に含まれるノイズの強度を変え、その時の応答を測定することで、理解されてきた (Faisal et al., 2008; Nienborg and Cumming, 2009; Renart and Machens, 2014)。しかしながら、未だに1神経細胞レベルではわかっていない点が多い。例えば、1神経細胞レベルの研究では、特定の刺激に対する Ca^{2+} 応答や膜電位の変化についてはよく調べられている (Augustine et al., 2003; Frick et al., 2004; Losonczy et al., 2008; Destexhe, 2011; Cichon and Gan, 2015; Ogawa and Oka, 2015; Stuart and Spruston, 2015) が、無刺激状態において、神経伝達物質入力がどのように神経活動に影響を与えているのかはよくわかっていない。特に、生体内においては神経回路の複雑さから研究が難しい (Ogawa and Oka, 2015; Prešern et al., 2015; Stuart and Spruston, 2015)。

線虫 *Caenorhabditis elegans* は神経細胞数が302個と非常に少なく、その解剖学的な接続も明らかになっており (White et al., 1986)、またその透明さから蛍光イメージングとの相性が良い (Kerr and Schafer, 2006) ため、無刺激状態における神経伝達物質入力と神経活動の関係を調べるのに適している。特に、介在神経細胞の一つである、AIY は嗅覚、味覚、温度などの様々な情報を感覚神経細胞から受け取り (Clark et al., 2006; Chalasani et al., 2007; Kuhara et al., 2011; Satoh et al., 2014)、その情報を処理し、行動を制御していることが知られている (Kocabas et al., 2012; Li et al., 2014; Satoh et al., 2014) ため、研究対象として適している。この神経細胞は一对の介在神経細胞で、咽頭後部の腹部側に細胞体を持ち、咽頭を巻くように神経環に神経線維を伸ばし、背側で2つの神経細胞がギャップ結合を形成する (White et al., 1986) (図 3.1A)。また、感覚神経細胞は感覚入力に対して決定論的な応答を示す (Clark et al., 2006; Chalasani et al., 2007; Kato et al., 2014; Tsukada et al., 2016) のに対し、AIY は外部刺激がなくても散発的な Ca^{2+} 応答を示す (Clark et al., 2006; Chalasani et al., 2007)。グルタミン酸受容体欠損変異体を用いた実験および感覚神経細胞の破壊実験によって、外部刺激に対する AIY の Ca^{2+} 応答がみられなくなる (Clark et al., 2006; Chalasani et al., 2007)。このことから、無刺激状態においてみられる AIY の散発的な Ca^{2+} 応答も外界のノイズによる感覚入力を統合した結果、発生するのではないかと推察される。

本研究では、複数の同時蛍光イメージング法を組み合わせることで、in vivo 系に

おける無刺激状態での AIY の入出力関係を明らかにした。まず、AIY の Ca^{2+} 応答を AIY の出力とみなしてよいかを確認するために、膜電位と Ca^{2+} の同時イメージングによって、それらが同時に起こり、 Ca^{2+} 応答を AIY の出力とみなしてよいことを確かめた。次に、匂いであるイソアミルアルコール (IAA) を、感覚入力を変化させる刺激として用い、匂い存在下、非存在下において神経伝達物質である、グルタミン酸入力と Ca^{2+} 応答を同時に測定した。その結果、匂いの有無にかかわらず、 Ca^{2+} 応答はグルタミン酸入力が増加しているときにおこり、また、逆にグルタミン酸入力が増加しているときに Ca^{2+} 応答は上昇した。さらに、グルタミン酸受容体およびグルタミン酸合成経路欠損変異体を用いて同様の測定をすることで、グルタミン酸の現象が Ca^{2+} 応答を引き起こしていることを明らかにした。この結果は、無刺激状態の *in vivo* 系において入出力関係を解明したはじめての例である。グルタミン酸入力は感覚神経細胞から出力されており、また、AIY の Ca^{2+} 応答は行動と相関すること (Li et al., 2014) から、これらの結果は、自然状態における行動を説明する一端になる。

3.2 方法

3.2.1 線虫株と飼育条件

線虫は大腸菌 *Escherichia coli* OP 50 株が塗布された NGM (nematode growth medium) アガー上で 20°C で飼育した (Brenner, 1974)。すべての実験には雌雄同体を用いた。また、遺伝子改変株は野生株 N2 および RB594 *glc-3(ok321)* V 変異体、MT6308 *eat-4(ky5)* III 変異体に対してプラスミド DNA をマイクロインジェクションによって作製した。オリジナルの株については *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) から取得した。実験に使用した遺伝子改変株は次のとおりである: *okaEx5[pttx-3::iGluSnFR, 50 ng/μL + pttx-3::R-GECO1, 50 ng/μL]*, *okaEx6[pttx-3::ArcLight, 50 ng/μL + pttx-3::R-GECO1, 50 ng/μL]*, *okaEx10[pttx-3::GCaMP6, 50 ng/μL + pttx-3::dimer2, 50 ng/μL]*, *okaEx15; glc-3(ok321) X [pttx-3::iGluSnFR, 50 ng/μL + pttx-3::R-GECO1, 40 ng/μL + punc-122::dsRed, 15 ng/μL]*, *okaEx16; eat-4(ky5) X [pttx-3::iGluSnFR, 50 ng/μL + pttx-3::R-GECO1, 40 ng/μL + punc-122::dsRed 15 ng/μL]*。

3.2.2 インジェクション用プラスミド DNA

タンパク質型膜電位センサー ArcLight を発現させるために、*C. elegans* Codon Adapter (Redemann et al., 2011) を用いて、線虫用にコドン最適化をおこない、全合成した (Integrated DNA Technologies Genes)。コドン最適化した ArcLight は Gateway ディスティネーションベクター (Thermo Fisher Scientific) に組み込んだ。その他の発現タンパク質用の Gateway ディスティネーションベクターと神経特異的発現のためのプロモーター用 Gateway エントリーベクター (Thermo Fisher Scientific) は包括型脳科学研究推進支援ネットワークより取得した。Gateway ディスティネーションベクターと Gateway エントリーベクターを用いて、Gateway LR 反応によってインジェクション用プラスミド DNA を作製した。

3.2.3 共焦点イメージング

神経細胞の構造を確認するための共焦点画像 (図 3.1A、3.2A) は倒立型顕微鏡 (IX81, Olympus) にとりつけた共焦点レーザー顕微鏡システム (FluoView FV1000, Olympus) および 40 倍油浸レンズ (UPLFLN 40XO, Olympus) を用いて撮影した。線虫は 20 mM のアジ化ナトリウム溶液に浸した後、1%の低融点アガロースゲル (UltraPure, Invitrogen) で固定した。ArcLight および iGluSnFR については 488 nm で励起、500–545

nm を検出し、R-GECO については 559 nm で励起、570–670 nm を検出した。

3.2.4 Ca²⁺、グルタミン酸および膜電位イメージング

Ca²⁺感受性赤色蛍光タンパク質 R-GECO1 (Zhao et al., 2011)、Ca²⁺感受性緑色タンパク質 G-CaMP6 (Ohkura et al., 2012) および dimer 2 (Campbell et al., 2002) (リファレンス用 RFP)、グルタミン酸感受性緑色蛍光タンパク質 iGluSnFR (Marvin et al., 2013)、膜電位感受性緑色蛍光タンパク質 ArcLight (Jin et al., 2012) の線虫神経細胞からの応答をマイクロ流体デバイス (Chronis et al., 2007) を用いて測定した。このマイクロ流体デバイスは、線虫を固定した上で匂い刺激の有無を任意のタイミングで切り替えられるものである。線虫への刺激には S-basal バッファーと S-basal バッファーで希釈した IAA 溶液 (9.2 × 10⁻⁴ mol/L) を用いた。Ca²⁺とグルタミン酸の同時イメージングでは線虫を 60 秒間 S-basal バッファー、その後 60 秒間 IAA 溶液、次に再び 60 秒間 S-basal バッファーで刺激した (図 3.3B)。Ca²⁺と膜電位の同時イメージングでは、S-basal バッファーから IAA 溶液に切り替えたタイミングで 70 秒間測定した。匂い無刺激条件においては、切り替えずに 70 秒間測定した。蛍光褪色の影響を避けるために後半の 60 秒間のみを解析に用いた。Ca²⁺とグルタミン酸イメージングでは取得および露光間隔は 100 ms、Ca²⁺と膜電位イメージングでは 20 ms で撮影をした。撮影には倒立型顕微鏡 (IX71, Olympus) を介して、LED 光源 (SOLA, Lumencor) および 3CCD カメラ (C7800-20, Hamamatsu Photonics) を用いた。画像の取得には AQUACOSMOS (Hamamatsu Photonics) を用い、20 倍レンズ (UCPLFLN 20X, Olympus) を、1.6 倍ズームレンズを介して行なった。また、BrightLine GFP/DSRED-A (Semrock) キューブを使用した。ArcLight の蛍光は脱分極時に減少し、R-GECO の蛍光は Ca²⁺上昇時に増加するため、図 3.1B、3.1C の膜電位変化は R-GECO からの蛍光漏れ込みの影響はない。また、図 3.1B の ArcLight の結果の上昇傾向は蛍光褪色による影響であり、 $-\Delta F/F_0$ で表記していることに起因する。また、動きによる影響をなくすために、アセチルコリン受容体のアゴニストである levamisole (2 mM) を用いた。levamisole は AIY の Ca²⁺ 応答の頻度には影響を与えないことは事前に確認した (図 3.7)。

3.2.5 画像解析

画像解析には先行研究において作成された MATLAB (MathWorks) で書かれた半自動化したプログラムを用いた (Shidara et al., 2017)。関心領域は蛍光強度と細胞の形態的特徴から手動で決定した (図 3.1A、3.2A)。先行研究より、AIY は細胞体では Ca²⁺ 応答がはっきり

りと確認されないことがわかっている (Clark et al., 2006; Chalasani et al., 2007) ため、Ca²⁺およびグルタミン酸入力において、AIY の神経突起からデータを取得した。すべての蛍光強度データは最初の 2 秒間の平均を用いて $\Delta F/F$ を計算し、規格化した。

3.2.6 データ解析および統計的仮説検定

対応のある t-test および Welch の t-test には Excel 2011 の TTEST 関数、Pearson 相関係数には Python 3 (version 3.7.0) の SciPy ライブラリ (version 1.1.0) の stats.pearsonr 関数、Fisher の正確確率検定には R (version 3.4.3) の fisher.test 関数、Wilcoxon の符号順位検定および Wilcoxon の順位和検定にはそれぞれ R (version 3.4.3) の coin パッケージの wilcoxsign_test 関数 (exact オプション)、coin パッケージの wilcox_test 関数 (exact オプション) をそれぞれ用いた。正規分布が仮定できるものについてはパラメトリックな検定法を、そうでないものについてはノンパラメトリックな検定法を用いた。

図 3.1C の Ca²⁺応答および膜電位変化は後述のように Ca²⁺応答を抽出することで作成した。図 3.1D、3.1E の膜電位応答の大きさは図 3.1C の -0.5 秒から +0.5 秒の最大値から -1 秒から -2 秒の平均値を引いた値である。Ca²⁺応答は +0.5 秒から +1.5 秒の最大値から -1 秒から 0 秒の平均値を引いた値である。

図 3.2C (左) は匂い添加直後 20 秒間の平均値、図 3.2C (右) は匂い除去直後 20 秒間の平均値である。

図 3.3–3.6 において匂い刺激条件を前期 (early odor) および後期 (later odor) に分けた。前期は匂い添加後 10 秒間で、後期は添加後 10 秒から 60 秒である (図 3.3B)。匂い添加直後、グルタミン酸量が減少し、10 秒程度で定常になる (図 3.2.B) ため、このように区分した。

また、図 3.3、3.5、3.6 では Ca²⁺応答の有無によって場合分けした。後述の方法で得られた Ca²⁺応答に含まれていない区間を Ca²⁺応答が無い区間とした。図 3.3C ではすべてのグルタミン酸データを時刻 0 で値が 0 になるように平行移動した。Ca²⁺応答前 (図 3.3D、pre) は図 3.3C の -3 秒から -2 秒の平均値、Ca²⁺応答中 (図 3.3D、onset) は -0.5 秒から +0.5 秒の平均値である。図 3.3E、3.3F のグルタミン酸減少量は図 3.3D の Ca²⁺応答前の値から応答中の値を引いた値である。図 3.3E の Ca²⁺増加量は図 3.3C の 2 秒から 3 秒の平均値から -1 秒から 0 秒の平均値を引いた値である。

図 3.4A のグルタミン酸減少時の Ca²⁺応答は下記のように取得した。すべての Ca²⁺応答は時刻 0 で 0 になるように移動した。図 3.4B の応答前 (pre) と応答中 (onset) は図

3.3D と同様に計算した。図 3.4C、3.4D のランダム選択データは下記のように取得した。

図 3.4D の Ca^{2+} 上昇量は図 3.4B の応答中の値から応答前の値を引くことで算出した。

図 3.5B のグルタミン酸入力 of 平均値は図 3.2C と同様に計算した。図 3.5C–3.5E は図 3.3C、3.3D および図 3.3F と同様に計算した。

図 3.6B のグルタミン酸入力 of 平均値は図 3.2C と同様に計算した。匂いに対する Ca^{2+} 応答率 (図 3.6C) は匂い添加後 10 秒間での応答の有無から算出した。図 3.6D の Ca^{2+} 応答頻度は匂い添加後 10 秒から 60 秒の間の Ca^{2+} 応答数を数えることで計算した。図 3.5C–3.5E は図 3.3C、3.3D および図 3.3F と同様に計算した。

3.2.7 Ca^{2+} 応答およびグルタミン酸入力減少データの抽出

Ca^{2+} 応答を抽出するために、 Ca^{2+} データの最初から 5 秒後の点から前後それぞれ 5 秒間の平均値を計算した。5 秒後の平均値が 5 秒後の平均値+5 秒前の標準偏差の 3 倍より大きかった場合、目視で確認後、 Ca^{2+} 応答開始点であるとした。グルタミン酸減少を抽出するために、同様にして、5 秒間の平均値を計算し、その差が閾値 (0.025、図 3.3F より決定) よりも大きかった場合、その点をグルタミン酸減少点とした。 Ca^{2+} 応答およびグルタミン酸減少について、前後 5 秒間を、重複を許さずに抽出した。 Ca^{2+} 応答について抽出されなかった点を Ca^{2+} 応答してない点とした。

図 3.7 については、levamisole の有無によってシグナルノイズ比が異なるため、 Ca^{2+} 応答数は目視で測定した。図 3.7B では 70 秒から 120 秒、図 3.7C では 60 秒から 70 秒の Ca^{2+} 応答数を計測した。

3.2.8 ランダム選択データ

図 3.4C、3.4D で用いたランダム選択データは Python の NumPy ライブラリ (version 1.15.2) の random.randint 関数を用いて選択点から前後 5 秒を抽出した。シードは計算時の時刻を用いて初期化した。

3.3 結果

3.3.1 AIYにおける膜電位変化と Ca^{2+} 応答

本研究では、環境ノイズ下での入出力関係の定量において、線虫の AIY 介在神経細胞に着目した。AIY は様々な感覚神経細胞からグルタミン酸入力を受け取っており、また、散発的な Ca^{2+} 応答 (Ca^{2+} spike) を示すことが知られている。(Clark et al., 2006; Chalasani et al., 2007)。線虫神経細胞には、膜電位依存性 Na^+ チャンネルがないことから、 Ca^{2+} が膜電位変化の主原因であると考えられている (Goodman et al., 1998; Faumont et al., 2006, 2011; Mellem et al., 2008; Gao and Zhen, 2011; Shidara et al., 2013)。近年、感覚神経細胞において、スパイク様膜電位変化には電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが必要であることが示された (Liu et al., 2018; Shindou et al., 2019) ことから、これは支持される。AIY は行動を制御することが知られており (Li et al., 2014)、それが膜電位変化によるものであると推察されている。しかしながら、AIY における Ca^{2+} 応答と膜電位変化の関係は未だに不明な点が多い (Liu et al., 2009, 2018; Shidara et al., 2013)。そこで、膜電位感受性緑色蛍光タンパク質である ArcLight (Jin et al., 2012) および Ca^{2+} 感受性赤色蛍光タンパク質 R-GECO (Zhao et al., 2011) を用いて同時蛍光イメージングをおこなった (図 3.1A)。先行研究において予想された (Faumont et al., 2012) ように、 Ca^{2+} 応答と類似したスパイク様膜電位変化が観察され (図 3.1B)、そのタイミングは Ca^{2+} 応答とほぼ同時だった。また、先行研究と同様に (Shidara et al., 2013)、 Ca^{2+} 応答が観察されづらい細胞体においても応答を確認することができた。

膜電位変化と Ca^{2+} 応答の関係を詳細に調べるために、個々の応答を取得した (図 3.1C)。その結果、やはり膜電位変化は Ca^{2+} 応答とほぼ同時におこっており (図 3.1C)、それらの応答強度は匂い添加によって変化しなかった (図 3.1D)。また、膜電位変化の大きさと Ca^{2+} 応答の大きさについても相関はみられなかった (図 3.1E)。これらの結果より、以後の解析では、 Ca^{2+} 応答は AIY の出力とみなす。

3.3.2 AIY における匂い刺激に対するグルタミン酸入力と Ca^{2+} 応答

AIY 介在神経細胞は種々の感覚神経細胞から、グルタミン酸を受け取っており、それらを統合して Ca^{2+} 応答を示していると考えられている (Clark et al., 2006; Chalasani et al., 2007)。グルタミン酸は味覚、嗅覚、温度感覚神経細胞から受け取っており (White et al., 1986; Clark et al., 2006; Chalasani et al., 2007; Satoh et al., 2014)、AIY は明確な外部刺激なしに散発的な Ca^{2+} 応答を示す。このことから、局所の温度、味覚物質濃度、匂い

物質濃度の変化などの環境ノイズを AIY に対するグルタミン酸入力が変わっていると考えられる。AIY は抑制性のグルタミン酸入力をグルタミン酸作動性 Cl⁻チャンネル GLC-3 を介して受け取り GLC-3 (Horoszok et al., 2001; Clark et al., 2006; Serrano-Saiz et al., 2013)、匂い刺激により感覚神経細胞がグルタミン酸放出を減少させることで AIY は Ca²⁺ 応答を示す (Chalasani et al., 2007; Ventimiglia and Bargmann, 2017)。GLC-3 チャンネル欠損変異体やグルタミン酸合成経路欠損変異体において、匂いに対する AIY の Ca²⁺ 応答はみられなくなる (Chalasani et al., 2007)。このことから、AIY の散発的な Ca²⁺ 応答は環境ノイズによって誘導されるグルタミン酸入力の変化によって生じていると考えられる。そこで、AIY に対するグルタミン酸入力と Ca²⁺ 応答をグルタミン酸感受性緑色蛍光タンパク質 iGluSnFR (Marvin et al., 2013) と Ca²⁺ 感受性赤色蛍光タンパク質 R-GECO (Zhao et al., 2011) を AIY に発現させることで、同時に測定した (図 3.2)。

先行研究により、匂い (イソアミルアルコール、IAA) 刺激によりグルタミン酸入力が増加することが示唆されている (Chalasani et al., 2007) ため、IAA を外部環境を変化させるために用いた。グルタミン酸入力は、決定論的に匂い添加により減少し、匂い除去により一過的に増加した (図 3.2B)。この応答は感覚神経細胞の応答と対応している (Chalasani et al., 2007; Shidara et al., 2017)。一方、Ca²⁺ 応答は、先行研究の報告どおり (Chalasani et al., 2007)、匂いの有無にかかわらず観察された。また、匂い添加により、その直後、Ca²⁺ 応答が誘導された (図 3.6C、N2)。これは、匂い添加によるグルタミン酸の減少が Ca²⁺ 応答を誘導していることを示唆している。

3.3.3 AIY におけるグルタミン酸入力減少と Ca²⁺ 上昇

匂い刺激に対するグルタミン酸入力と Ca²⁺ 応答を観察すると、グルタミン酸入力が減少したときに Ca²⁺ 応答が起こっているようにみえた (図 3.3A)。より詳細に調べるために、匂い無し (no odor)、匂い刺激前期 (early odor)、匂い刺激後期 (later odor) の 3 条件に分類し (図 3.3B)、それぞれの条件において Ca²⁺ 応答開始前後のグルタミン酸応答を取得した (図 3.3C)。その結果、どの条件においても Ca²⁺ 応答開始前と比べ、開始時にはグルタミン酸入力は減少していた (図 3.3D)。しかし、グルタミン酸入力減少量と Ca²⁺ 応答の大きさには相関はなかった (図 3.3E)。また、Ca²⁺ 応答の有無で比較した場合、匂いの有無にかかわらず Ca²⁺ 応答存在下ではグルタミン酸入力が有意に減少していた (図 3.3F)。これらの結果は、グルタミン酸入力の減少によって Ca²⁺ 応答が引き起こされることを示唆している。

グルタミン酸入力の減少が本当に Ca²⁺ 上昇を引き起こすのかどうかを確認するた

めに、グルタミン酸入力減少前後の Ca^{2+} 応答を取得した (図 3.4)。その結果、匂いの有無に関わらず、グルタミン酸減少時に有意に Ca^{2+} は上昇した (図 3.4B)。さらに、ランダム選択データと比較した場合、その上昇は有意に大きかった (図 3.4C、3.4D)。これらの結果から、グルタミン酸減少に Ca^{2+} 応答が上昇していることが示された。

3.3.4 GLC-3 受容体と Ca^{2+} 応答

これまでに、グルタミン酸減少時に Ca^{2+} が上昇し、またその逆も成り立つことを示した。先行研究より、グルタミン酸作動性 Cl^- チャンネルが感覚刺激に対する Ca^{2+} に重要であることがわかっている (Horoszok et al., 2001; Chalasani et al., 2007; Ohnishi et al., 2011; Aoki et al., 2017)。そこで、GLC-3 欠損変異体を用いて同様の実験をおこなった (図 3.5)。その結果、グルタミン酸入力は野生型 (N2) と同様の匂い応答を示した (図 3.5A、3.5B) が、 Ca^{2+} 応答は減少する傾向がみられた (図 3.6C、*glc-3*)。一方、 Ca^{2+} 応答頻度については匂いの有無に関わらず減少した (図 3.6D、*glc-3*)。次に、 Ca^{2+} 応答前後のグルタミン酸入力を取得した結果 (図 3.5C)、匂い存在下では減少傾向がみられなかったが、匂いがない条件では有意に減少した (図 3.5D)。AIY は代謝型グルタミン酸受容体である MGL-1 も発現している (Kang and Avery, 2009; Jeong and Paik, 2017) ため、この受容体が Ca^{2+} 応答に何らかの役割を持っている可能性がある。これらの結果は、GLC-3 受容体を介したグルタミン酸入力の減少が Ca^{2+} 応答に重要であることを示している。

3.3.5 グルタミン酸合成欠損変異体における Ca^{2+} 応答

次に、グルタミン酸合成欠損変異体である *eat-4* 株を用いて実験をおこなった (図 3.6)。EAT-4 は小胞型グルタミン酸トランスポーターの一種で、この欠損株はグルタミン酸による神経伝達が欠損する (Lee et al., 1999; Chalasani et al., 2007)。EAT-4 欠損変異体では、グルタミン酸入力の匂い応答はみられなくなった (図 3.6A、3.6B)。さらに、野生型と比較して、匂い添加による Ca^{2+} 応答はみられなくなり (図 3.6A)、匂いの有無に関わらず散発的な Ca^{2+} 応答もほとんどなかった (図 3.6B)。次に、 Ca^{2+} 応答開始前後のグルタミン酸入力を取得した結果 (図 3.6E)、グルタミン酸入力の減少はみられなかった (図 3.6F)。グルタミン酸入力の減少についても、 Ca^{2+} の有無に関わらず、差はなかった (図 3.6G)。これらの結果から、AIY の Ca^{2+} 応答がグルタミン酸入力の揺らぎによる減少によって、引き起こされることが明らかになった。

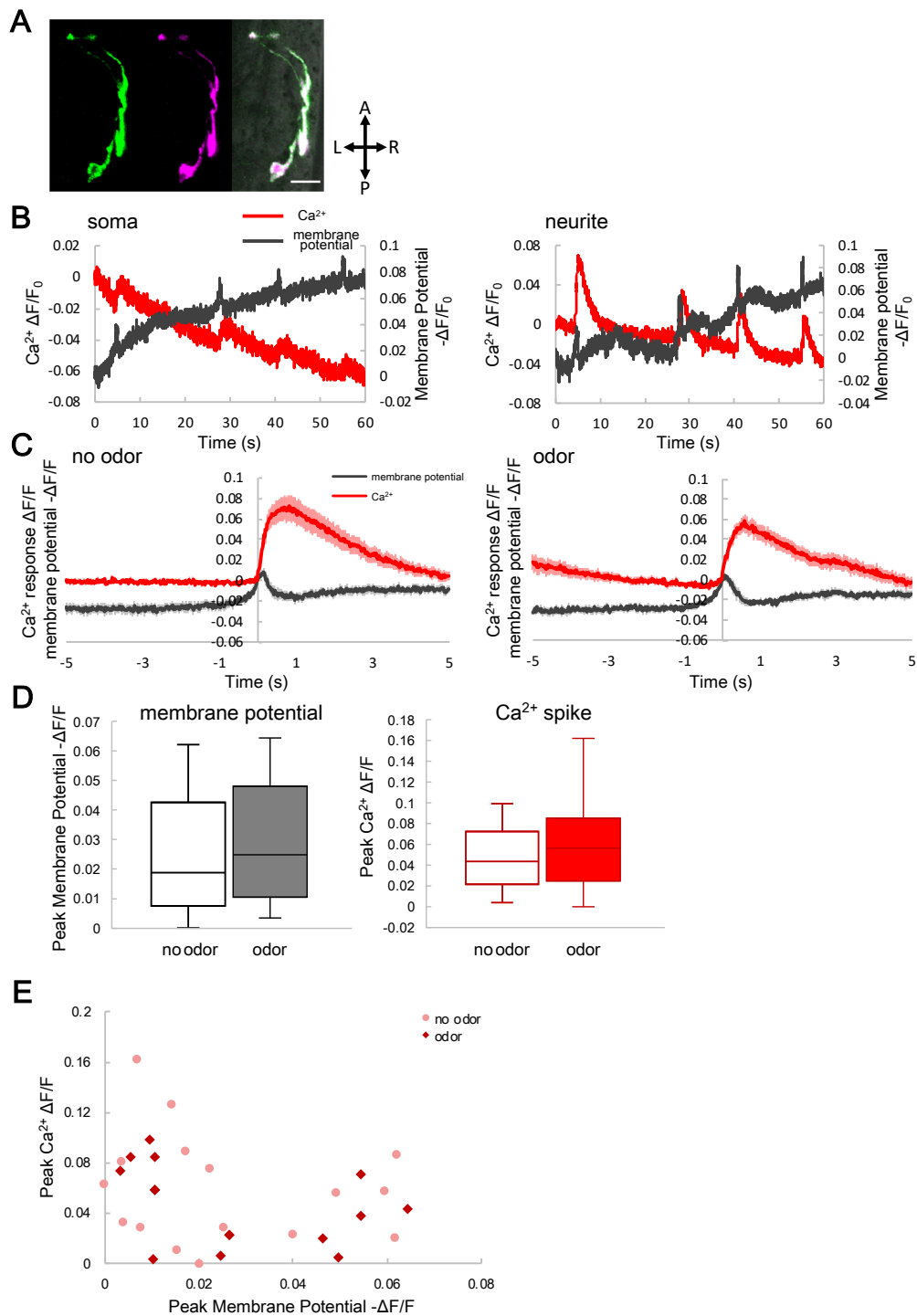


図 3.1 AIY における膜電位と Ca^{2+} の同時イメージング

(A) AIY に発現させた膜電位センサー ArcLight (緑、左) および Ca^{2+} センサー R-GECO (マゼンタ、中) の共焦点顕微鏡による蛍光画像およびその重ね合わせ画像 (右)。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。A: 前方、P: 後方、L: 左側、R: 右側。(B) 代表的な

細胞体 (左、soma) および神経突起 (右、neurite) における Ca^{2+} 応答 (赤) と膜電位変化 (黒)。(C) 無刺激下 (左) および匂い刺激下 (右) における平均した Ca^{2+} 応答 (赤) および 膜電位応答 (黒)。影は標準誤差をあらわす (無刺激: $N = 20$, $n = 16$ 、匂い刺激: $N = 10$, $n = 15$)。(D) 無刺激下 (色なし) および 匂い刺激下 (色付き) における膜電位応答の大きさ (黒) と Ca^{2+} 応答の大きさ (赤)。統計量は以下のとおりである。膜電位、 $p = 0.38$ 、 Ca^{2+} 、 $p = 0.85$ (対応のある t-test、無刺激: $N = 20$, $n = 16$ 、匂い刺激: $N = 10$, $n = 15$)。(E) Ca^{2+} 応答と膜電位応答の大きさの相関。ピンク丸が無刺激、赤四角が匂い刺激下での応答を示す。統計量は以下の通りである。無刺激: Pearson 相関係数 = -0.19 、 $p = 0.48$ 、匂い刺激: Pearson 相関係数 = -0.40 、 $p = 0.14$ (無刺激: $N = 20$, $n = 16$ 、匂い刺激: $N = 10$, $n = 15$)。

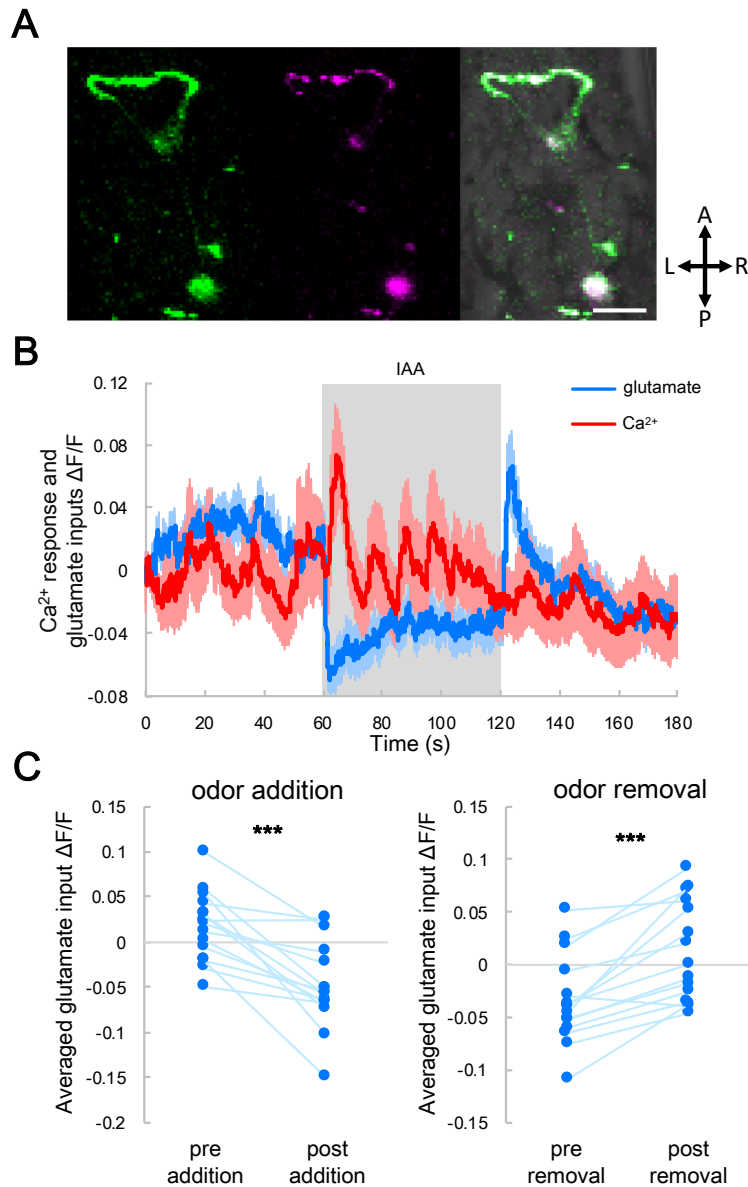


図 3.2 AIY におけるグルタミン酸入力と Ca^{2+} の同時イメージング

(A) AIY に発現させたグルタミン酸センサー iGluSnFR (緑、左) および Ca^{2+} センサー R-GECO (マゼンタ、中) の共焦点顕微鏡による蛍光画像およびその重ね合わせ画像 (右)。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。A: 前方、P: 後方、L: 左側、R: 右側。(B) 平均した匂いに対するグルタミン酸入力 (青) および Ca^{2+} 応答 (赤)。影は標準誤差をあらわす。(C) 平均した匂い添加前後 (pre-addition および post-addition) のグルタミン酸応答 (左) および、匂い除去前後 (pre-removal および post-removal) のグルタミン酸応答 (右)。統計量は以下に示すとおりである。左: $p = 0.00010$ 、右、 $p = 0.000086$ (対応のある t-test、 $N = 15$ 、*** $p < 0.001$)。

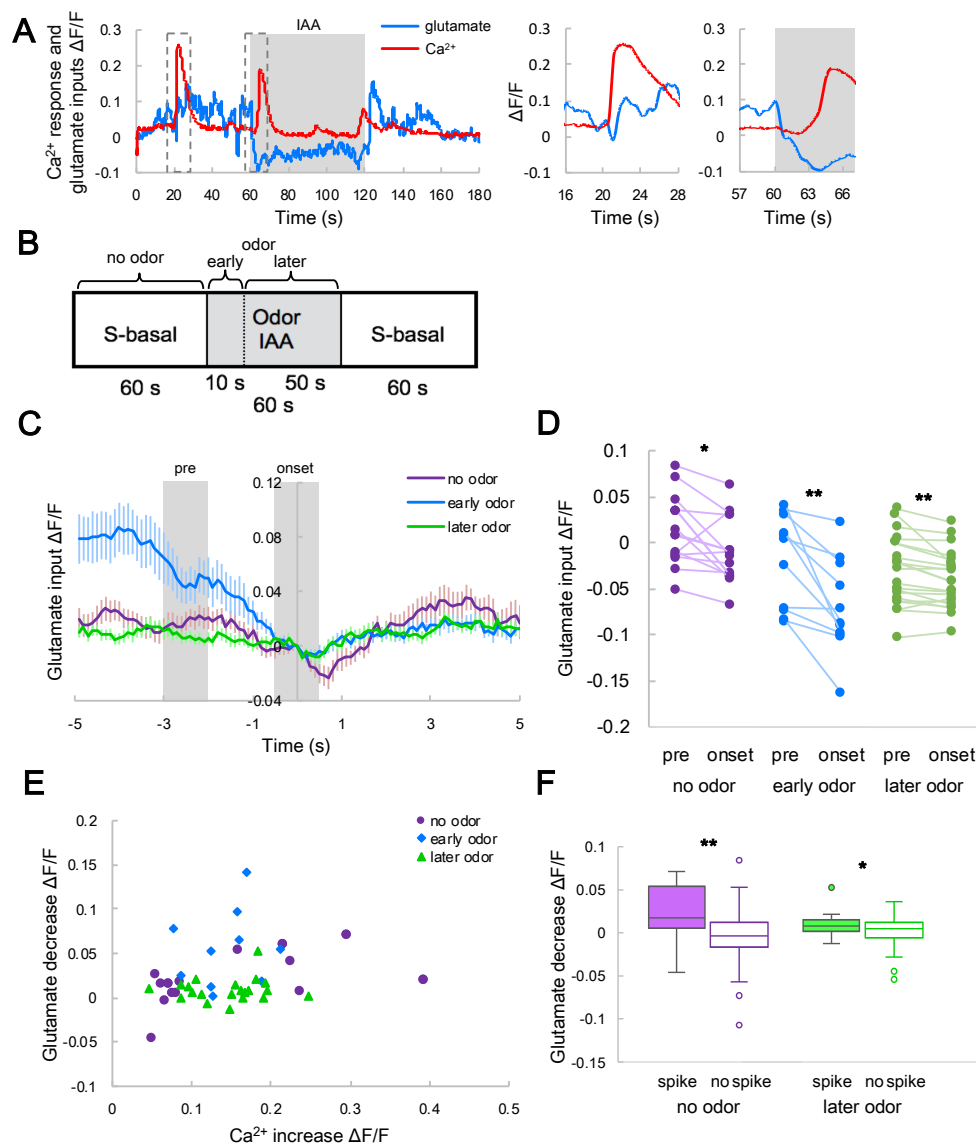


図 3.3 Ca^{2+} 応答時のグルタミン酸入力

(A) 代表的なグルタミン酸入力 (青) および Ca^{2+} 応答 (赤)。右は点線部分の拡大図である。影は匂い (IAA) 刺激をあらわす。(B) 応答の分類。無刺激 (no odor)、匂い前期 (early odor) および 匂い後期 (later odor) に分類した。(C) Ca^{2+} 応答時の平均したグルタミン酸入力。紫、青および緑線はそれぞれ無刺激、匂い前期、匂い後期でのグルタミン酸入力をあらわす。エラーバーは標準誤差をあらわす (N = 15、無刺激: n = 15、匂い前期: n = 11、匂い後期: n = 21)。(D) Ca^{2+} 応答前と応答中のグルタミン酸入力。応答前 (pre) は C 中の -3 秒から -2 秒の平均値をあらわし、応答中 (onset) は -0.5 秒から +0.5 秒の平均値をあらわす。統計量は以下のとおりである。無刺激: p = 0.010、匂い前期: p = 0.0024、匂い後期: p = 0.0037 (対応のある t-test、N = 15、無刺激: n = 15、匂い前期: n = 11、匂い後期: n = 21、*p < 0.05, **p < 0.01)。

(E) グルタミン酸入力減少量と Ca^{2+} 増加量の相関。紫丸、青四角および緑三角はそれぞれ無刺激、匂い前期、匂い後期の応答を示す。統計量は以下のとおりである。無刺激: Pearson 相関係数 = 0.58、 $p = 0.022$ 、匂い前期: Pearson 相関係数 = 0.080、 $p = 0.81$ 、匂い後期: Pearson 相関係数 = 0.069、 $p = 0.77$ ($N = 15$ 、無刺激: $n = 15$ 、匂い前期: $n = 11$ 、匂い後期: $n = 21$)。 (F) Ca^{2+} 応答がある場合 (色付き) とない場合 (色なし) のグルタミン酸入力の減少。統計量は次のとおりである。無刺激: $p = 0.0062$ 、匂い後期: $p = 0.037$ (Welch の t-test、 $N = 15$ 、無刺激・ Ca^{2+} 応答あり: $n = 15$ 、無刺激・ Ca^{2+} 応答なし: $n = 89$ 、匂い後期・ Ca^{2+} 応答あり: $n = 21$ 、匂い後期・ Ca^{2+} 応答あり: $n = 69$ 、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

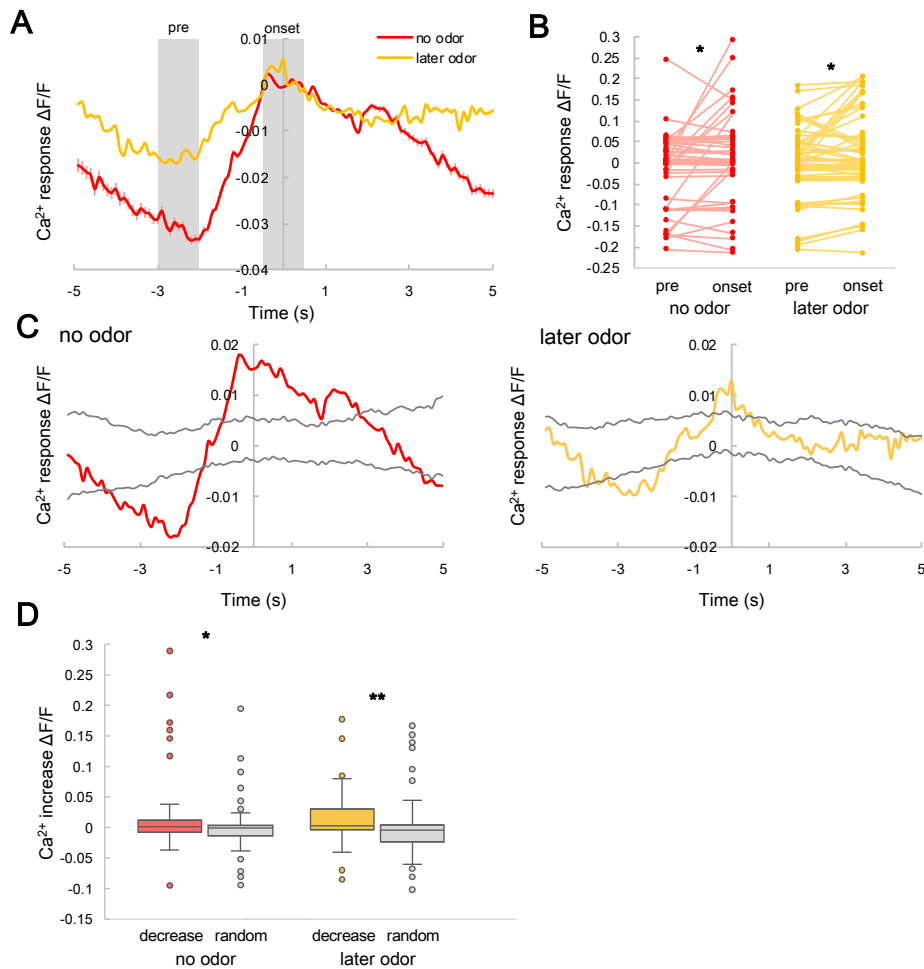


図 3.4 グルタミン酸入力減少時の Ca^{2+} 応答

(A) グルタミン酸入力減少時の Ca^{2+} 応答。赤およびオレンジ線はそれぞれ無刺激および匂い後期における応答をあらわす。エラーバーは標準誤差をあらわす (N = 15、無刺激: n = 43、匂い後期: n = 61)。(B) グルタミン酸入力減少前 (pre、A の-3 秒から-2 秒の平均値) と応答中 (onset、A の-0.5 秒から+0.5 秒の平均値) の Ca^{2+} 応答。統計量は次のとおりである。無刺激: p = 0.014、匂い後期: p = 0.014 (対応のある t-test、N = 15、無刺激: n = 43、匂い後期: n = 61、*p < 0.05)。(C) 無刺激下 (左) および匂い刺激下 (右) におけるグルタミン酸減少時の Ca^{2+} 応答。灰線はランダム選択データ ± 標準偏差をあらわす。(D) グルタミン酸減少時 (色付き) およびランダム選択データ (色なし) の Ca^{2+} 増加。統計量は以下のとおりである。無刺激: p = 0.045、匂い後期: p = 0.0015 (Wilcoxon の順位和検定、N = 15、無刺激・減少時: n = 43、無刺激・ランダム: n = 100、匂い後期・ Ca^{2+} 応答あり: n = 61、匂い後期・ Ca^{2+} 応答あり: n = 100、*p < 0.05、**p < 0.01)。

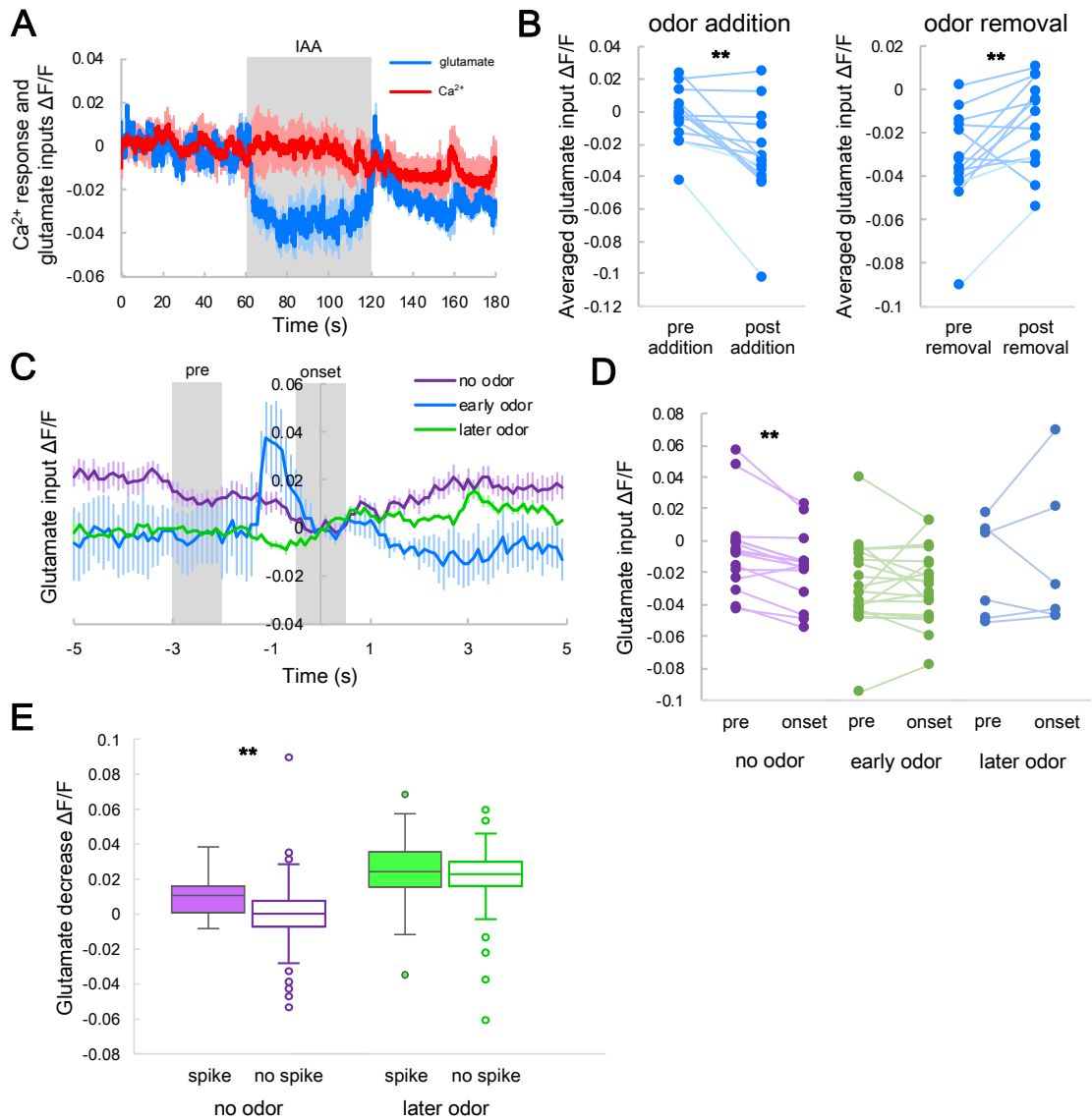


図 3.5 GLC-3 受容体欠損変異体における Ca²⁺応答時のグルタミン酸入力

(A) 平均した匂いに対するグルタミン酸入力 (青) および Ca²⁺応答 (赤)。影は標準誤差をあらわす (N = 12)。(B) 平均した匂い添加前後 (pre-addition および post-addition) のグルタミン酸応答 (左) および、匂い除去前後 (pre-removal および post-removal) のグルタミン酸応答 (右)。統計量は以下に示すとおりである。左: p = 0.0030、右、p = 0.0018 (対応のある t-test、N = 12、***p < 0.01)。(C) Ca²⁺応答時の平均したグルタミン酸入力。紫、青および緑線はそれぞれ無刺激、匂い前期、匂い後期でのグルタミン酸入力をあらわす。エラーバーは標準誤差をあらわす (N = 12、無刺激: n = 15、匂い前期: n = 6、匂い後期: n = 20)。(D) Ca²⁺応答前と応答中のグルタミン酸入力。応答前 (pre) は C 中の-3 秒から-2 秒の平均値をあらわし、

応答中 (onset) は-0.5 秒から+0.5 秒の平均値をあらわす。統計量は以下のとおりである。無刺激: $p = 0.0012$ 、匂い前期: $p = 0.65$ 、匂い後期: $p = 0.89$ (対応のある t-test、 $N = 12$ 、無刺激: $n = 15$ 、匂い前期: $n = 6$ 、匂い後期: $n = 20$ 、** $p < 0.01$)。 (E) Ca^{2+} 応答がある場合 (色付き) とない場合 (色なし) のグルタミン酸入力 of 減少。統計量は次のとおりである。無刺激: $p = 0.0027$ 、匂い後期: $p = 0.58$ (Welch の t-test、 $N = 12$ 、無刺激・ Ca^{2+} 応答あり: $n = 15$ 、無刺激・ Ca^{2+} 応答なし: $n = 114$ 、匂い後期・ Ca^{2+} 応答あり: $n = 20$ 、匂い後期・ Ca^{2+} 応答あり: $n = 82$ 、** $p < 0.01$)。

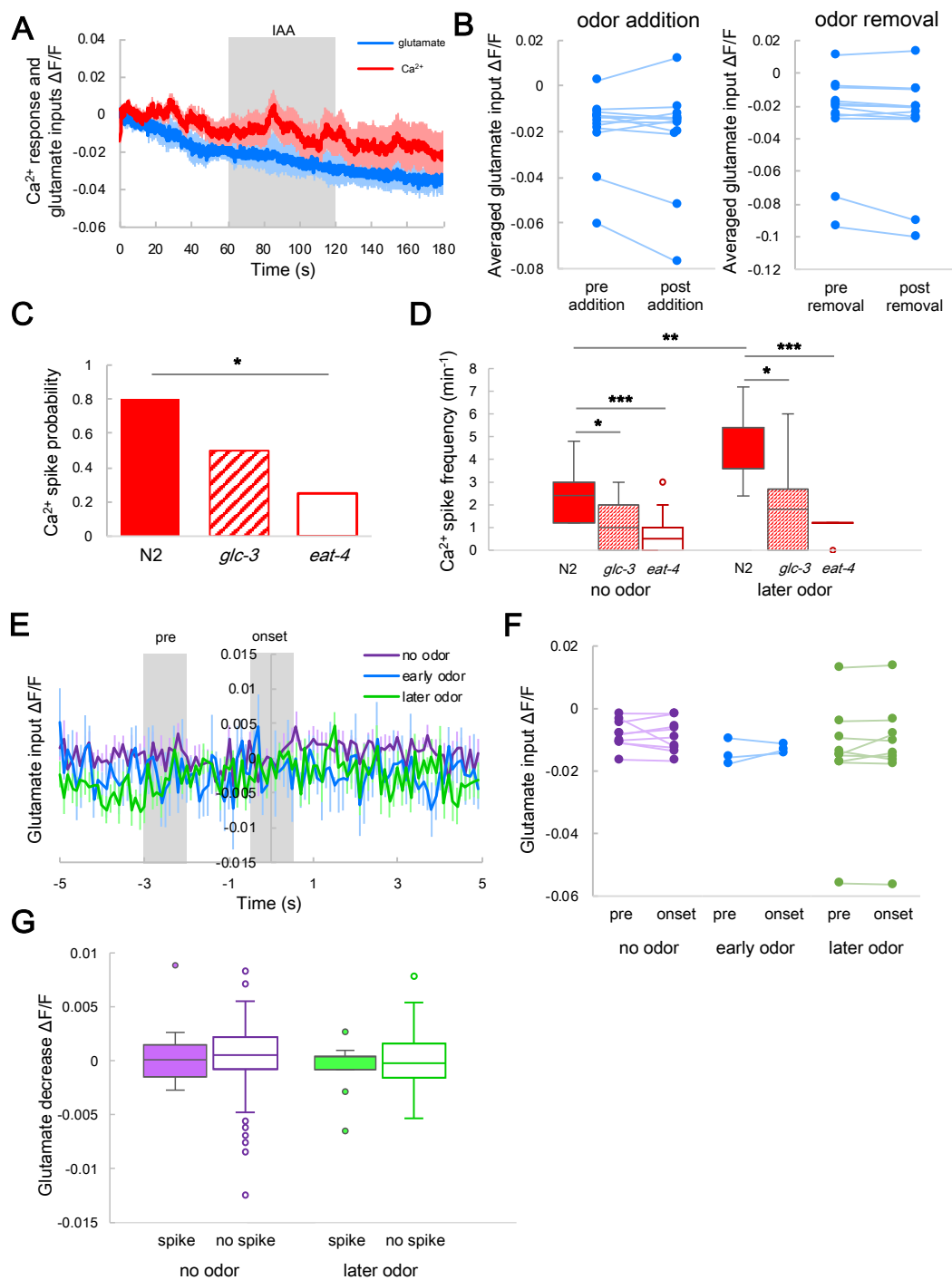


図 3.6 EAT-4 欠損変異体における Ca^{2+} 応答時のグルタミン酸入力

(A) 平均した匂いに対するグルタミン酸入力 (青) および Ca^{2+} 応答 (赤)。影は標準誤差をあらわす (N = 12)。(B) 平均した匂い添加前後 (pre-addition および post-addition) のグルタミン酸応答 (左) および、匂い除去前後 (pre-removal および post-removal) のグルタミン酸応答 (右)。統計量は以下に示すとおりである。左:

$p = 0.41$ 、右、 $p = 0.055$ (対応のある t-test、 $N = 12$)。 (C) 匂い添加時の Ca^{2+} 応答率。統計量は次のとおりである。N2 と *glc-3* の比較: $p = 0.13$ 、N2 と *eat-4* の比較: $p = 0.014$ (Fisher の正確確率検定、Holm 補正、N2: $N = 15$ 、*glc-3* $N = 12$ 、*eat-4* $N = 12$ 、* $p < 0.05$)。 (D) 無刺激下および匂い刺激下における Ca^{2+} 応答頻度。N2 での無刺激下と匂い刺激下の比較: $p = 0.0045$ 、*glc-3* での無刺激下と匂い刺激下の比較: $p = 0.34$ 、*eat-4* での無刺激下と匂い刺激下の比較: $p = 0.34$ 、無刺激下での N2 と *glc-3* の比較: $p = 0.024$ 、無刺激下での N2 と *eat-4* の比較: $p = 0.00044$ 、匂い刺激下での N2 と *glc-3* の比較: $p = 0.014$ 、匂い刺激下での N2 と *eat-4* の比較: $p = 0.000015$ (Wilcoxon の符号順位検定および Wilcoxon の順位和検定、Holm 補正、N2: $N = 15$ 、*glc-3* $N = 12$ 、*eat-4* $N = 12$ 、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$)。 (E) Ca^{2+} 応答時の平均したグルタミン酸入力。紫、青および緑線はそれぞれ無刺激、匂い前期、匂い後期でのグルタミン酸入力をあらわす。エラーバーは標準誤差をあらわす ($N = 12$ 、無刺激: $n = 9$ 、匂い前期: $n = 3$ 、匂い後期: $n = 9$)。 (F) Ca^{2+} 応答前と応答中のグルタミン酸入力。応答前 (pre) は C 中の -3 秒から -2 秒の平均値をあらわし、応答中 (onset) は -0.5 秒から +0.5 秒の平均値をあらわす。統計量は以下のとおりである。無刺激: $p = 0.60$ 、匂い前期: $p = 0.53$ 、匂い後期: $p = 0.50$ (対応のある t-test、 $N = 12$ 、無刺激: $n = 9$ 、匂い前期: $n = 3$ 、匂い後期: $n = 9$)。 (G) Ca^{2+} 応答がある場合 (色付き) とない場合 (色なし) のグルタミン酸入力の減少。統計量は次のとおりである。無刺激: $p = 0.88$ 、匂い後期: $p = 0.48$ (Welch の t-test、 $N = 12$ 、無刺激・ Ca^{2+} 応答あり: $n = 9$ 、無刺激・ Ca^{2+} 応答なし: $n = 108$ 、匂い後期・ Ca^{2+} 応答あり: $n = 9$ 、匂い後期・ Ca^{2+} 応答なし: $n = 100$)。

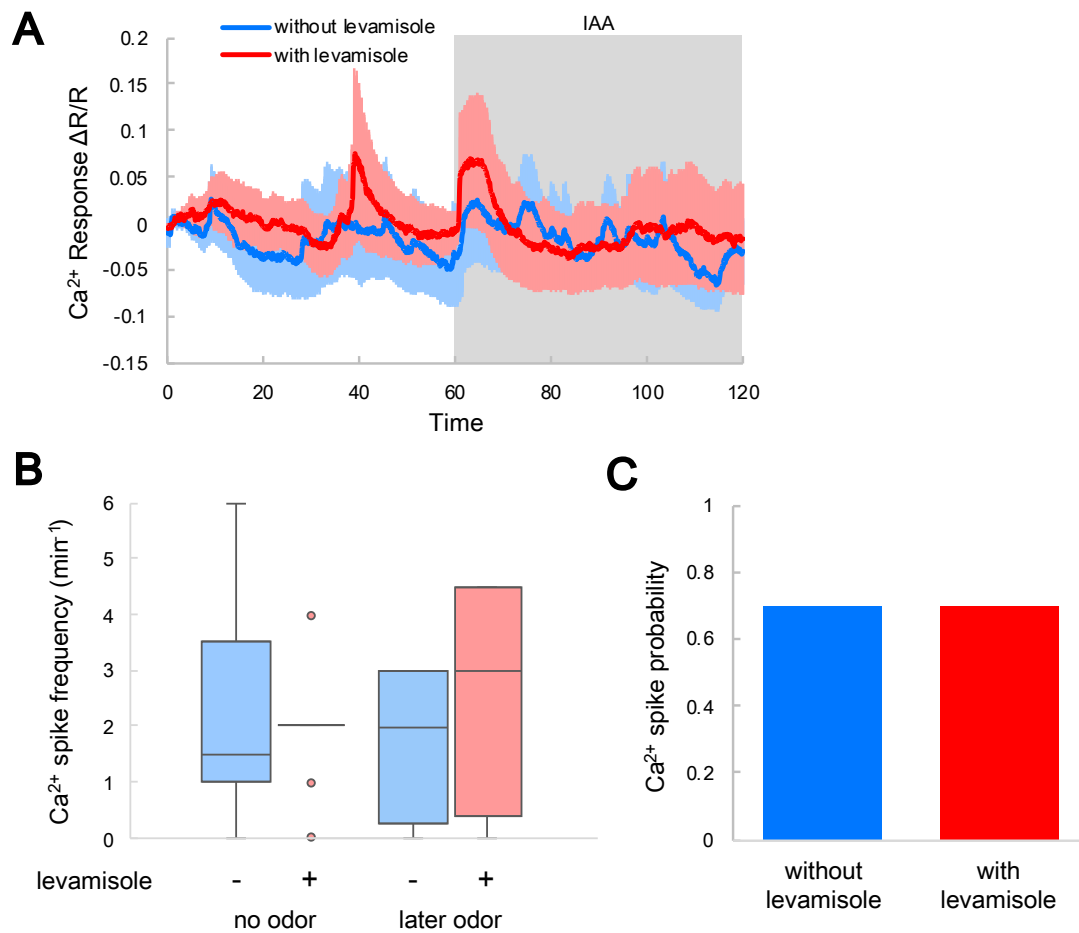


図 3.7 Ca²⁺応答に対する levamisole の影響

(A) levamisoleの無添加 (青) および添加個体 (赤) の匂いに対する AIY の Ca²⁺応答。灰の影は IAA 刺激を、線の周りの影は標準誤差をあらわす (ともに N = 10)。(B) 無刺激下および匂い刺激下における Ca²⁺応答頻度。無刺激下: $p = 0.75$ 、匂い刺激下: $p = 0.80$ (Wilcoxon の順位和検定、Holm 補正、ともに N = 10)。(C) 匂い添加時の Ca²⁺応答率。 $p = 1.0$ (Fisher の正確確率検定、ともに N = 10)。

3.4 考察

本研究では、2つの同時イメージング法および変異体を用いた実験によって、環境ノイズ下におけるAIYのCa²⁺と膜電位、Ca²⁺とグルタミン酸入力の間関係を明らかにした。それにより、Ca²⁺応答と膜電位応答がほぼ同時にみられることがわかった。また、AIYの散発的なCa²⁺応答はグルタミン酸応答の揺らぎによって引き起こされることが明らかになった。このことはin vivo系の環境ノイズ下において入出力関係を明らかにしたはじめての報告である。

AIYは感覚神経細胞から放出されるグルタミン酸入力を受け取り(White et al., 1986; Chalasani et al., 2007; Serrano-Saiz et al., 2013)、またそのCa²⁺応答は速度や方向転換行動と相関する(Li et al., 2014)。これより、本研究の結果は感覚入力の揺らぎが行動の揺らぎを生む可能性を示唆している。無刺激下において感覚入力と行動を同時に測定することは、シグナルノイズ比が低く、困難である(Faumont et al., 2012)。本研究の結果はこのような関係性を理解する上で重要である。

先行研究において、ノイズを人工的に付加することで、ノイズと認知機能との関係性がみられてきた(Nienborg and Cumming, 2009; Renart and Machens, 2014)。この手法は認知機能を理解する上では強力な手法ではあるが、無刺激下における生物行動やその生理を明らかにするには向かない。本研究では、無刺激下でのAIYの入出力関係を詳細に調べた。このような手法は無刺激下での行動の多様性や、複雑な神経回路における自発発火を理解する上で重要である。

神経伝達物質入力とCa²⁺応答の間関係を明らかにした。先行研究では、ケージド化合物やシナプス前細胞を刺激することでこれらの関係を明らかにしようと試みられてきた(Callaway and Katz, 1993; Branco and Häusser, 2010; Kramer et al., 2013)。しかしながら、これらの刺激は人工的で、かつ、実際の神経伝達物質入力を定量することはできない。本研究では、無刺激時において、無刺激状態において生理的にみられる条件において、神経伝達物質入力とCa²⁺応答を測定することに成功した。このような同時イメージングによる手法は今後ますます有用になると考えられる。

本研究では*eat-4*や*glc-3*といった変異体を用いたが、それらにおいてもCa²⁺応答を完全になくすことはできなかった。AIYは神経ペプチドなど、他の神経伝達物質を受け取っており、それらはCa²⁺応答を引き起こし得る(Kuhara et al., 2011; Rabinowitch et al., 2016; Aoki et al., 2017)。グルタミン酸入力の減少がAIYのCa²⁺応答を引き起こすことを明らかにしたが、他の神経伝達物質によって、その応答性が修飾される可能性は十分に有

り得る。また、本研究はグルタミン酸入力を変化させるために匂い刺激を用いたが、その他の刺激によって変化させた場合、先に述べたような神経ペプチドなどによって、応答性が変化する可能性が考えられる。実際、匂いにものみ応答することが知られている AWC 神経細胞が高濃度の NaCl 刺激によって神経ペプチドを介して Ca^{2+} 応答を引き起こされる (Leinwand and Chalasani, 2013)。よって、複数の感覚入力による修飾も応答性を変化させる可能性がある。

また、*glc-3* や *eat-4* 変異体において、 Ca^{2+} 応答頻度が減少した。GLC-3 はグルタミン酸作動性 Cl^{-} チャネルである (Horoszok et al., 2001) から、これらの変異体においては、AIY の膜電位は脱分極すると考えられる。しかし、変異体においても Ca^{2+} 応答の形にはあまり変化がなかった (図 3.8)。このことは、AIY 神経細胞が Ca^{2+} 応答を作り出す機能を保持していることを示唆しており、平衡電位が保たれていることを意味している。なぜなら、線虫の Ca^{2+} 応答には脱分極が必要だからである (Liu et al., 2018; Shindou et al., 2019)。よって、グルタミン酸入力がない変異体においては Ca^{2+} 応答を示すための閾値電位を超えることができないため、応答は減少したものと考えられる。

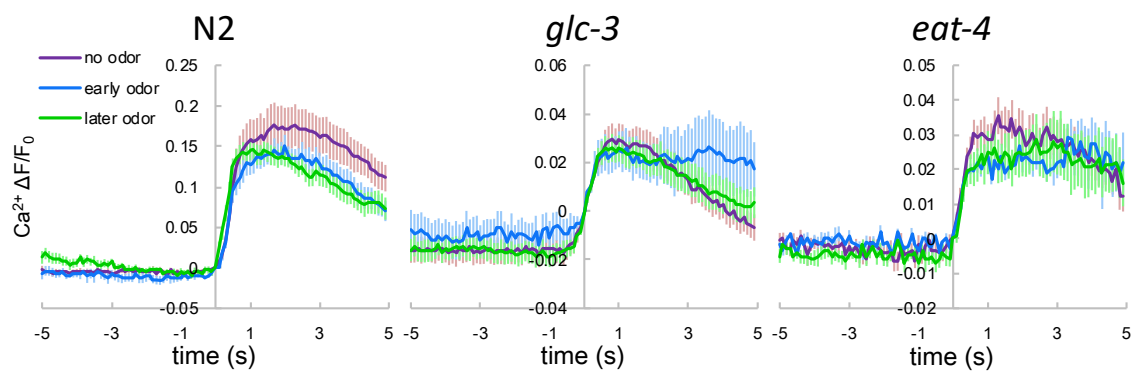


図 3.8 Ca^{2+} 応答の平均

紫、青および緑線はそれぞれ無刺激、匂い前期、匂い後期での Ca^{2+} 応答をあらわす。

エラーバーは標準誤差をあらわす (N2: N = 15、無刺激: n = 15、匂い前期: n = 11、匂い後期、n = 20、*glc-3* N = 12、無刺激: n = 15、匂い前期: n = 6、匂い後期、n = 20、*eat-4* N = 12 無刺激: n = 9、匂い前期: n = 3、匂い後期、n = 9)。

参考文献

- Aoki I, Nakano S, Mori I (2017) Molecular mechanisms of learning in *Caenorhabditis elegans*. In: Learning and memory: a comprehensive reference, Second Edi., pp 415–434. Elsevier. Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128093245210961>.
- Augustine GJ, Santamaria F, Tanaka K (2003) Local calcium signaling in neurons. *Neuron* 40:331–346 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627303006391>.
- Branco T, Häusser M (2010) The single dendritic branch as a fundamental functional unit in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 20:494–502 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438810001170>.
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71–94 Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4366476>.
- Callaway EM, Katz LC (1993) Photostimulation using caged glutamate reveals functional circuitry in living brain slices. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7661–7665 Available at:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.90.16.7661>.
- Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7877–7882 Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.082243699>.
- Chalasani SH, Chronis N, Tsunozaki M, Gray JM, Ramot D, Goodman MB, Bargmann CI (2007) Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 450:63–70 Available at: <http://www.nature.com/articles/nature06292>.
- Chronis N, Zimmer M, Bargmann CI (2007) Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Methods* 4:727–731 Available at: <http://www.nature.com/articles/nmeth1075>.
- Cichon J, Gan W-B (2015) Branch-specific dendritic Ca²⁺ spikes cause persistent synaptic plasticity. *Nature* 520:180–185 Available at:
<http://www.nature.com/articles/nature14251>.
- Clark DA, Biron D, Sengupta P, Samuel ADT (2006) The AFD sensory neurons encode multiple functions underlying thermotactic behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 26:7444–7451 Available at:
<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1137-06.2006>.
- Destexhe A (2011) Intracellular and computational evidence for a dominant role of internal network activity in cortical computations. *Curr Opin Neurobiol* 21:717–725 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438811001012>.
- Faisal AA, Selen LPJ, Wolpert DM (2008) Noise in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*

- 9:292–303 Available at: <http://www.nature.com/articles/nrn2258>.
- Faumont S, Boulin T, Hobert O, Lockery SR (2006) Developmental regulation of whole cell capacitance and membrane current in identified interneurons in *C. elegans*. *J Neurophysiol* 95:3665–3673 Available at: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.00052.2006>.
- Faumont S, Lindsay T, Lockery S (2012) Neuronal microcircuits for decision making in *C. elegans*. *Curr Opin Neurobiol* 22:580–591 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438812000840>.
- Faumont S, Rondeau G, Thiele TR, Lawton KJ, McCormick KE, Sottile M, Griesbeck O, Heckscher ES, Roberts WM, Doe CQ, Lockery SR (2011) An image-free opto-mechanical system for creating virtual environments and imaging neuronal activity in freely moving *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 6:e24666 Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0024666>.
- Frick A, Magee J, Johnston D (2004) LTP is accompanied by an enhanced local excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nat Neurosci* 7:126–135 Available at: <http://www.nature.com/articles/nn1178>.
- Gao S, Zhen M (2011) Action potentials drive body wall muscle contractions in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2557–2562 Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1012346108>.
- Goodman MB, Hall DH, Avery L, Lockery SR (1998) Active currents regulate sensitivity and dynamic range in *C. elegans* neurons. *Neuron* 20:763–772 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627300810144>.
- Horoszok L, Raymond V, Sattelle DB, Wolstenholme AJ (2001) GLC-3: a novel fipronil and BIDN-sensitive, but picrotoxinin-insensitive, L-glutamate-gated chloride channel subunit from *Caenorhabditis elegans*. *Br J Pharmacol* 132:1247–1254 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.bjp.0703937>.
- Jeong H, Paik Y-K (2017) MGL-1 on AIY neurons translates starvation to reproductive plasticity via neuropeptide signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 430:80–89 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160617304906>.
- Jin L, Han Z, Platasa J, Woollorton JRA, Cohen LB, Pieribone VA (2012) Single action potentials and subthreshold electrical events imaged in neurons with a fluorescent protein voltage probe. *Neuron* 75:779–785 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627312007040>.
- Kang C, Avery L (2009) Systemic regulation of starvation response in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 23:12–17 Available at: <http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.1723409>.

- Kato S, Xu Y, Cho CE, Abbott LF, Bargmann CI (2014) Temporal responses of *C. elegans* chemosensory neurons are preserved in behavioral dynamics. *Neuron* 81:616–628 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089662731301088X>.
- Kerr RA, Schafer WR (2006) Intracellular Ca²⁺ imaging in *C. elegans*. *Methods Mol Biol* 351:253–264 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988439>.
- Kocabas A, Shen C-H, Guo Z V., Ramanathan S (2012) Controlling interneuron activity in *Caenorhabditis elegans* to evoke chemotactic behaviour. *Nature* 490:273–277 Available at: <http://www.nature.com/articles/nature11431>.
- Kramer RH, Mourot A, Adesnik H (2013) Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins. *Nat Neurosci* 16:816–823 Available at: <http://www.nature.com/articles/nn.3424>.
- Kuhara A, Ohnishi N, Shimowada T, Mori I (2011) Neural coding in a single sensory neuron controlling opposite seeking behaviours in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* 2:355 Available at: <http://www.nature.com/articles/ncomms1352>.
- Lee RY, Sawin ER, Chalfie M, Horvitz HR, Avery L (1999) EAT-4, a homolog of a mammalian sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 19:159–167 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9870947>.
- Leinwand SG, Chalasani SH (2013) Neuropeptide signaling remodels chemosensory circuit composition in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Neurosci* 16:1461–1467 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3511>.
- Li Z, Liu J, Zheng M, Xu XZS (2014) Encoding of both analog- and digital-like behavioral outputs by one *C. elegans* interneuron. *Cell* 159:751–765 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414012446>.
- Liu Q, Hollopeter G, Jorgensen EM (2009) Graded synaptic transmission at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:10823–10828 Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0903570106>.
- Liu Q, Kidd PB, Dobosiewicz M, Bargmann CI (2018) *C. elegans* AWA olfactory neurons fire calcium-mediated all-or-none action potentials. *Cell* 175:57–70.e17 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867418310341>.
- Losonczy A, Makara JK, Magee JC (2008) Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *Nature* 452:436–441 Available at: <http://www.nature.com/articles/nature06725>.
- Marvin JS, Borghuis BG, Tian L, Cichon J, Harnett MT, Akerboom J, Gordus A, Renninger SL, Chen T-W, Bargmann CI, Orger MB, Schreiter ER, Demb JB, Gan W-B, Hires SA, Looger LL (2013) An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate

- neurotransmission. *Nat Methods* 10:162–170 Available at:
<http://www.nature.com/articles/nmeth.2333>.
- Mellem JE, Brockie PJ, Madsen DM, Maricq A V. (2008) Action potentials contribute to neuronal signaling in *C. elegans*. *Nat Neurosci* 11:865–867 Available at:
<http://www.nature.com/articles/nn.2131>.
- Nienborg H, Cumming BG (2009) Decision-related activity in sensory neurons reflects more than a neuron's causal effect. *Nature* 459:89–92 Available at:
<http://www.nature.com/articles/nature07821>.
- Ogawa H, Oka K (2015) Direction-specific adaptation in neuronal and behavioral responses of an insect mechanosensory system. *J Neurosci* 35:11644–11655 Available at:
<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1378-15.2015>.
- Ohkura M, Sasaki T, Sadakari J, Gengyo-Ando K, Kagawa-Nagamura Y, Kobayashi C, Ikegaya Y, Nakai J (2012) Genetically encoded green fluorescent Ca²⁺ indicators with improved detectability for neuronal Ca²⁺ Signals. *PLoS One* 7:e51286 Available at:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0051286>.
- Ohnishi N, Kuhara A, Nakamura F, Okochi Y, Mori I (2011) Bidirectional regulation of thermotaxis by glutamate transmissions in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 30:1376–1388 Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2011.13>.
- Prešern J, Triplehorn JD, Schul J (2015) Dynamic dendritic compartmentalization underlies stimulus-specific adaptation in an insect neuron. *J Neurophysiol* 113:3787–3797 Available at: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.00945.2014>.
- Rabinowitch I, Laurent P, Zhao B, Walker D, Beets I, Schoofs L, Bai J, Schafer WR, Treinin M (2016) Neuropeptide-driven cross-modal plasticity following sensory loss in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* 14:e1002348 Available at:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1002348>.
- Redemann S, Schloissnig S, Ernst S, Pozniakowsky A, Ayloo S, Hyman AA, Bringmann H (2011) Codon adaptation-based control of protein expression in *C. elegans*. *Nat Methods* 8:250–252 Available at: <http://www.nature.com/articles/nmeth.1565>.
- Renart A, Machens CK (2014) Variability in neural activity and behavior. *Curr Opin Neurobiol* 25:211–220 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438814000488>.
- Sato Y, Sato H, Kunitomo H, Fei X, Hashimoto K, Iino Y (2014) Regulation of experience-dependent bidirectional chemotaxis by a neural circuit switch in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 34:15631–15637 Available at:
<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1757-14.2014>.
- Serrano-Saiz E, Poole RJ, Felton T, Zhang F, De La Cruz ED, Hobert O (2013) Modular

- control of glutamatergic neuronal identity in *C. elegans* by distinct homeodomain proteins. *Cell* 155:659–673 Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867413012269>.
- Shidara H, Hotta K, Oka K (2017) Compartmentalized cGMP responses of olfactory sensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 37:3753–3763 Available at:
<http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.2628-16.2017>.
- Shidara H, Kobayashi J, Tanamoto R, Hotta K, Oka K (2013) Odorant-induced membrane potential depolarization of AIY interneuron in *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Lett* 541:199–203 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394013001262>.
- Shindou T, Ochi-Shindou M, Murayama T, Saita E, Momohara Y, Wickens JR, Maruyama IN (2019) Active propagation of dendritic electrical signals in *C. elegans*. *Sci Rep* 9:3430 Available at: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-40158-9>.
- Stuart GJ, Spruston N (2015) Dendritic integration: 60 years of progress. *Nat Neurosci* 18:1713–1721 Available at: <http://www.nature.com/articles/nn.4157>.
- Tsukada Y, Yamao M, Naoki H, Shimowada T, Ohnishi N, Kuhara A, Ishii S, Mori I (2016) Reconstruction of spatial thermal gradient encoded in thermosensory neuron AFD in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 36:2571–2581 Available at:
<http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.2837-15.2016>.
- Ventimiglia D, Bargmann CI (2017) Diverse modes of synaptic signaling, regulation, and plasticity distinguish two classes of *C. elegans* glutamatergic neurons. *Elife* 6 Available at: <https://elifesciences.org/articles/31234>.
- White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S (1986) The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 314:1–340 Available at: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.1986.0056>.
- Zhao Y, Araki S, Wu J, Teramoto T, Chang Y-F, Nakano M, Abdelfattah AS, Fujiwara M, Ishihara T, Nagai T, Campbell RE (2011) An expanded palette of genetically encoded Ca²⁺ Indicators. *Science* 333:1888–1891 Available at:
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1208592>.

第4章 結言

4.1 本研究のまとめと意義

生命において、ノイズを考慮した入出力関係を明らかにすることは重要な課題である。これまで、入出力関係はその平均的な振舞いに着目されてきた。一方で、未だノイズを含む入力に対する応答の理解は理論、実験の両面において不十分であった。そこで、第2章においては、理論面から、大腸菌走化性の数理モデルに対して、揺らぐ系の熱力学と情報幾何学を用いることで熱力学的な順応効率の定量化に成功したことを報告した。さらに、その効率が入力のノイズの大きさに対して単調減少することなく、複雑な振舞いをするを明らかにした (図 4.1、左)。第3章においては、実験面から、線虫の介在神経細胞 AIY に対して、その入力である神経伝達物質および、出力である Ca^{2+} 応答および膜電位変化を環境からの自然なノイズの下で測定することに成功したことを報告した。これによって、神経伝達物質入力の揺らぎによる減少によって、散発的な神経活動がおこることを明らかにした (図 4.1、右)。

第2章、第3章において、理論、実験の両面からノイズ下における入出力関係を明らかにした。第2章の結果は、情報幾何学と揺らぐ系の熱力学の導入により、順応の効率を生物学者にもわかりやすい形で定量化することに成功した。しかし、これは数理モデルから導き出された結果であり、実際生体内で順応効率にノイズが影響を与えているかは不明である。一方で、第3章において示したように、入出力の時系列データを同時イメージング法によって、ノイズも含めて測定することができれば、第2章の結果を実験的に証明することができるだろう。このように、本研究におけるアプローチは、ノイズの影響を知るための今後の研究指針を示している。

また、本研究において、ノイズは生命システムを理解する上で無視できないものであると示した。大腸菌モデルにおいては、ノイズによって走化性の効率が向上する場合がみられた。これより、外界の化学物質に含まれるノイズさえも効率的な化学走性に利用していることを示唆した。これは、ノイズによってその刺激に対する感度が向上する確率共鳴現象の一種であるかもしれない (Wiesenfeld and Moss, 1995; Gammaitoni et al., 1998; Anderson et al., 2000; McDonnell and Abbott, 2009; Tutu, 2011)。また、線虫においては、感覚入力のシステム内表現であるグルタミン酸入力が、介在神経細胞 AIY の散発的な Ca^{2+} 応答を引き起こすことを明らかにした。AIY の Ca^{2+} 応答は線虫の速度や方向転換行動と相関することが知られている (Li et al., 2014)。これより、感覚入力の揺らぎが自然状態での多様な行動を生む可能性を示唆し、効率的な餌探索行動とも関係する可能性があ

る (Yoshimizu et al., 2018; Ashida et al., 2019)。このように、揺らぎやノイズに着目することで、今まで平均化によって無視されていた現象についての理解を深めることが可能となった。これまでの研究は平均化によってノイズを取り除くことで、その対象システムについての理解を深めてきた。こうした方法論はもちろん重要であるが、それによって、見落としている部分が少なくないことを本研究において示すことができた。

以上から、本研究の意義はノイズ研究において理論、実験両面を結びつけるための方向性を示した点である。

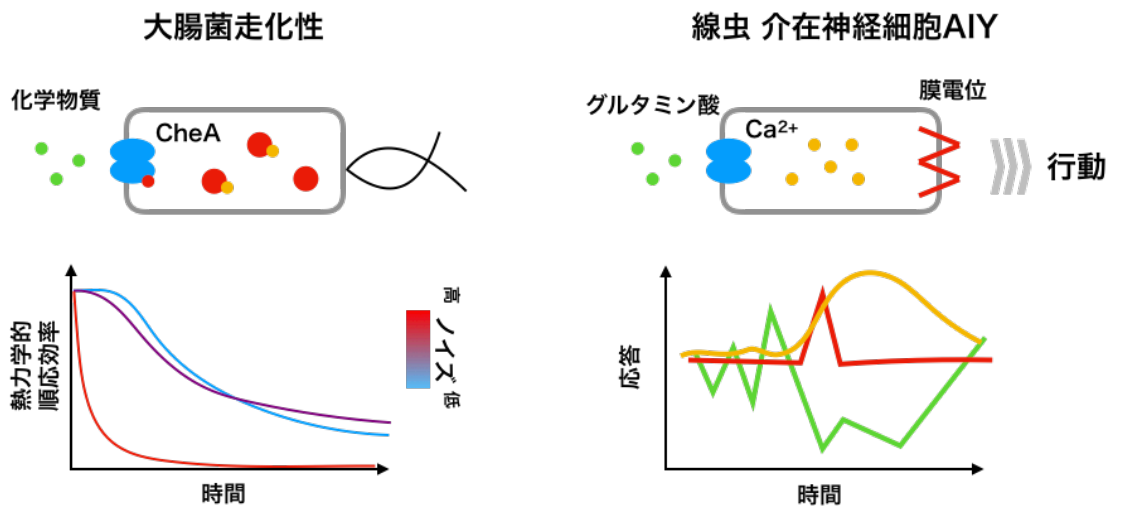


図 4.1 本研究の要約

大腸菌の走化性モデルを用い、ノイズに対して、順応効率が単調減少しないことを示した (左)。また、線虫の介在神経細胞 AIY において、グルタミン酸入力の変動による減少が Ca^{2+} 応答を引き起こし、そのときに膜電位変化がおこることを示した (右)。

4.2 今後の展望

これまでの研究の多くは、測定系などによらないで元来システムに含まれているはずのノイズをも取り除くことで、その対象システムについて解析を進めてきた。しかし、本研究ではこのような生命現象が元来もつ揺らぎやノイズに着目することで、今まで取り除かれていて見ることができなかつた現象について理論、実験の両面からアプローチした。それにより、ノイズが与える影響の重要性を示すことができた。一方で本研究の限界はこの理論と実験を実際に突き合わせることでできていない点である。これは理論の検証に必要な実験技術の限界にあるものと考えられる。しかし、近年の測定、制御技術の向上により、これらを結びつけることが近い将来可能になるだろう (図 4.2)。

出力測定に関しては、光遺伝学や蛍光プローブの開発により、より幅広い対象において、その関係性が同定されるだろう (Arrowsmith et al., 2015; Miyawaki and Niino, 2015; Lin and Schnitzer, 2016; Kim et al., 2017)。測定対象としては、Ca²⁺や cGMP などの主要なセカンドメッセンジャーに加え (Mochizuki et al., 2001; Nagai et al., 2004; Russwurm et al., 2007; Niino et al., 2009; Miyawaki and Niino, 2015)、本研究において用いたグルタミン酸センサーの他に γ -アミノ酪酸 (GABA)、アセチルコリン、ドーパミン、ノルアドレナリンなど多数の神経伝達物質が測定できるようになってきた (Marvin et al., 2013, 2018, 2019; Jing et al., 2018; Patriarchi et al., 2018; Sun et al., 2018; Feng et al., 2019)。また、蛍光イメージングでは同時イメージングのためには励起及び蛍光波長の重複を避けなければならないが、細胞内シグナル分子を測定するために良く用いられる蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した蛍光タンパク質型センサーの場合、シアンと黄色の蛍光の組み合わせが多い。しかし、近年ではオレンジと赤の組み合わせについても報告されている (Shaner et al., 2005; Bajar et al., 2016)。また、FRET 型センサーのように、2色の蛍光を用いるのではなく、1つの蛍光タンパク質で測定することも可能になっており、またその色もよく用いられる緑色、青、黄色の他にも赤や赤外蛍光タンパク質によっても作製されたセンサーも開発されている (Zhao et al., 2011; Dana et al., 2016; Wu et al., 2018; Inoue et al., 2019; Qian et al., 2019)。これらの測定技術の向上によって、多数の細胞内シグナルの同時イメージングをすることで、本研究で見たような理論、実験の両面を結びつける研究が可能になるだろう。

また、出力測定技術も向上している。光シート型顕微鏡 (Huisken et al., 2004; Power and Huisken, 2017) や二光子顕微鏡 (Denk et al., 1990; Helmchen and Denk, 2005) などにより、より広い範囲を高解像度かつ長時間、高シグナルノイズ比で撮影でき

るようになった。ノイズの影響を知るためには、シグナル自体がもつノイズが測定に起因するノイズに埋もれないことが重要であるから、このような測定技術の向上もノイズに関する研究の理解に大きく貢献するだろう。

一方で、入力を制御し、ノイズの影響を見るアプローチもあるだろう。例えば、光遺伝学的手法がある。これは、光感受性タンパク質を用いることで、生体に対して非侵襲かつ高速に変調を引き起こすものであり、例えば、膜電位変化や Ca^{2+} 濃度変化を引き起こすものが良く用いられている (Nagel et al., 2003; Boyden et al., 2005; Kim et al., 2017)。また、それ以外にも、近年は遺伝子発現の制御も可能になってきた (Lee et al., 2017; Yamada et al., 2018)。また、キメラ G タンパク質共役受容体 (GPCR) 用いることにより特定化合物に対して、特定の GPCR のシグナル伝達を引き起こすことができる (Guettier et al., 2009; Vardy et al., 2015; Roth, 2016)。このような手法によって、入力を制御することで、入力に任意のノイズを含ませたときの出力を測定できる。このようなアプローチもノイズの影響を理解する上で重要であろう。

理論については、本研究において揺らぐ系の熱力学と情報幾何学を用いることで大腸菌走化性の順応効率を明らかにした。揺らぐ系の熱力学と情報幾何学との関わりについては、研究がはじまったばかりである。よって、今後ますます理解が進んでいくだろう。また、揺らぐ系の熱力学においては、解析のしやすさから、モデルは線形で記述されることが多い (Seifert, 2012; Parrondo et al., 2015)。一方で、生体内には非線形な応答はありふれている (Strogatz, 2015)。このような問題に対しては、移流拡散方程式で用いられる数値計算によるアプローチを Fokker-Planck 方程式に適用するのが有用であろう。よって、生命における理解には、揺らぐ系の熱力学、情報幾何学、流体力学、計算機科学といった様々な分野からのアプローチが必要となってくるだろう。

以上で述べたように、両面にはまだ溝が存在している現状であるが、本研究において、理論、実験の両面からノイズによる影響について調べることで、その溝を埋めることに貢献できたと考えている。また、現状ではその橋渡しに何が不足しているのか、についても明らかにできたと考えている。よって、理論、実験の両面からのアプローチはノイズによる影響を理解に貢献することができるだろう。

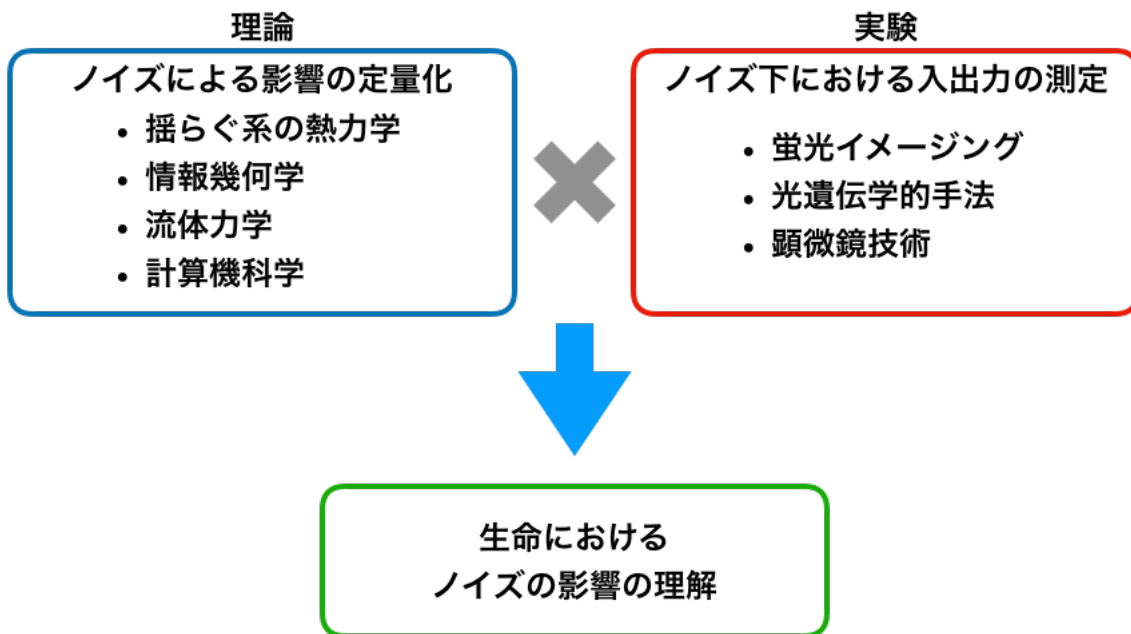


図 4.2 今後の展望

参考文献

- Anderson J, Lampl I, Gillespie D, Ferster D (2000) The contribution of noise to contrast invariance of orientation tuning in cat visual cortex. *Science* 290:1968–1972 Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.290.5498.1968>.
- Arrowsmith CH et al. (2015) The promise and peril of chemical probes. *Nat Chem Biol* 11:536–541 Available at: <http://www.nature.com/articles/nchembio.1867>.
- Ashida K, Kato T, Hotta K, Oka K (2019) Multiple tracking and machine learning reveal dopamine modulation for area-restricted foraging behaviors via velocity change in *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Lett* 706:68–74 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394019303301>.
- Bajar B, Wang E, Zhang S, Lin M, Chu J (2016) A guide to fluorescent protein FRET pairs. *Sensors* 16:1488 Available at: <http://www.mdpi.com/1424-8220/16/9/1488>.
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8:1263–1268 Available at: <http://www.nature.com/articles/nn1525>.
- Dana H, Mohar B, Sun Y, Narayan S, Gordus A, Hasseman JP, Tsegaye G, Holt GT, Hu A, Walpita D, Patel R, Macklin JJ, Bargmann CI, Ahrens MB, Schreiter ER, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS (2016) Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity. *Elife* 5 Available at: <https://elifesciences.org/articles/12727>.
- Denk W, Strickler J, Webb W (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248:73–76 Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2321027>.
- Feng J, Zhang C, Lischinsky JE, Jing M, Zhou J, Wang H, Zhang Y, Dong A, Wu Z, Wu H, Chen W, Zhang P, Zou J, Hires SA, Zhu JJ, Cui G, Lin D, Du J, Li Y (2019) A genetically encoded fluorescent sensor for rapid and specific *in vivo* detection of norepinephrine. *Neuron* 102:745-761.e8 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627319301722>.
- Gammaitoni L, Hänggi P, Jung P, Marchesoni F (1998) Stochastic resonance. *Rev Mod Phys* 70:223–287 Available at: <https://link.aps.org/doi/10.1103/RevModPhys.70.223>.
- Guettier J-M, Gautam D, Scarselli M, de Azua IR, Li JH, Rosemond E, Ma X, Gonzalez FJ, Armbruster BN, Lu H, Roth BL, Wess J (2009) A chemical-genetic approach to study G protein regulation of β cell function in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19197–19202 Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.0906593106>.
- Helmchen F, Denk W (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2:932–940 Available at: <http://www.nature.com/articles/nmeth818>.
- Huisken J, Swoger J, Del Bene F, Wittbrodt J, Stelzer EHK (2004) Optical sectioning deep

- inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* 305:1007–1009 Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1100035>.
- Inoue M et al. (2019) Rational engineering of XCaMPs, a multicolor GECI suite for *in vivo* imaging of complex brain circuit dynamics. *Cell* 177:1346–1360.e24 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867419303939>.
- Jing M et al. (2018) A genetically encoded fluorescent acetylcholine indicator for *in vitro* and *in vivo* studies. *Nat Biotechnol* 36:726–737 Available at: <http://www.nature.com/articles/nbt.4184>.
- Kim CK, Adhikari A, Deisseroth K (2017) Integration of optogenetics with complementary methodologies in systems neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 18:222–235 Available at: <http://www.nature.com/articles/nrn.2017.15>.
- Lee D, Hyun JH, Jung K, Hannan P, Kwon H-B (2017) A calcium- and light-gated switch to induce gene expression in activated neurons. *Nat Biotechnol* 35:858–863 Available at: <http://www.nature.com/articles/nbt.3902>.
- Li Z, Liu J, Zheng M, Xu XZS (2014) Encoding of both analog- and digital-like behavioral outputs by one *C. elegans* interneuron. *Cell* 159:751–765 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414012446>.
- Lin MZ, Schnitzer MJ (2016) Genetically encoded indicators of neuronal activity. *Nat Neurosci* 19:1142–1153 Available at: <http://www.nature.com/articles/nn.4359>.
- Marvin JS et al. (2018) Stability, affinity, and chromatic variants of the glutamate sensor iGluSnFR. *Nat Methods* 15:936–939 Available at: <http://www.nature.com/articles/s41592-018-0171-3>.
- Marvin JS, Borghuis BG, Tian L, Cichon J, Harnett MT, Akerboom J, Gordus A, Renninger SL, Chen T-W, Bargmann CI, Orger MB, Schreier ER, Demb JB, Gan W-B, Hires SA, Looger LL (2013) An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission. *Nat Methods* 10:162–170 Available at: <http://www.nature.com/articles/nmeth.2333>.
- Marvin JS, Shimoda Y, Magloire V, Leite M, Kawashima T, Jensen TP, Kolb I, Knott EL, Novak O, Podgorski K, Leidenheimer NJ, Rusakov DA, Ahrens MB, Kullmann DM, Looger LL (2019) A genetically encoded fluorescent sensor for in vivo imaging of GABA. *Nat Methods* 16:763–770 Available at: <http://www.nature.com/articles/s41592-019-0471-2>.
- McDonnell MD, Abbott D (2009) What is stochastic resonance? Definitions, misconceptions, debates, and its relevance to biology. *PLoS Comput Biol* 5:e1000348 Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1000348>.
- Miyawaki A, Niino Y (2015) Molecular spies for bioimaging—fluorescent protein-based

- probes. *Mol Cell* 58:632–643 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276515001677>.
- Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A, Matsuda M (2001) Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411:1065–1068 Available at: <http://www.nature.com/articles/35082594>.
- Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10554–10559 Available at:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0400417101>.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13940–13945 Available at:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1936192100>.
- Niino Y, Hotta K, Oka K (2009) Simultaneous live cell imaging using dual FRET sensors with a single excitation light Koch K-W, ed. *PLoS One* 4:e6036 Available at:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0006036>.
- Parrondo JMR, Horowitz JM, Sagawa T (2015) Thermodynamics of information. *Nat Phys* 11:131–139 Available at: <http://www.nature.com/articles/nphys3230>.
- Patriarchi T, Cho JR, Merten K, Howe MW, Marley A, Xiong W-H, Folk RW, Broussard GJ, Liang R, Jang MJ, Zhong H, Dombeck D, von Zastrow M, Nimmerjahn A, Gradinaru V, Williams JT, Tian L (2018) Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science* 360:eaat4422 Available at:
<http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aat4422>.
- Power RM, Huiskens J (2017) A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging. *Nat Methods* 14:360–373 Available at:
<http://www.nature.com/articles/nmeth.4224>.
- Qian Y, Piatkevich KD, Mc Larney B, Abdelfattah AS, Mehta S, Murdock MH, Gottschalk S, Molina RS, Zhang W, Chen Y, Wu J, Drobizhev M, Hughes TE, Zhang J, Schreier ER, Shoham S, Razansky D, Boyden ES, Campbell RE (2019) A genetically encoded near-infrared fluorescent calcium ion indicator. *Nat Methods* 16:171–174 Available at:
<http://www.nature.com/articles/s41592-018-0294-6>.
- Roth BL (2016) DREADDs for neuroscientists. *Neuron* 89:683–694 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627316000659>.
- Russwurm M, Mullershausen F, Friebe A, Jäger R, Russwurm C, Koesling D (2007) Design of fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based cGMP indicators: a systematic approach. *Biochem J* 407:69–77 Available at:

- <http://www.biochemj.org/cgi/doi/10.1042/BJ20070348>.
- Seifert U (2012) Stochastic thermodynamics, fluctuation theorems and molecular machines. *Rep Prog Phys* 75:126001 Available at:
<http://stacks.iop.org/0034-4885/75/i=12/a=126001?key=crossref.a937f55c8fce3473876363a3edb3c282>.
- Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2:905–909 Available at: <http://www.nature.com/articles/nmeth819>.
- Strogatz HS (2015) *Nonlinear dynamics and chaos*, 2nd ed. CRC Press.
- Sun F et al. (2018) A genetically encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. *Cell* 174:481-496.e19 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867418308456>.
- Tutu H (2011) Frequency adaptation in controlled stochastic resonance utilizing delayed feedback method: Two-pole approximation for response function. *Phys Rev E* 83:061106 Available at: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.83.061106>.
- Vardy E et al. (2015) A new DREADD facilitates the multiplexed chemogenetic interrogation of behavior. *Neuron* 86:936–946 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627315002895>.
- Wiesenfeld K, Moss F (1995) Stochastic resonance and the benefits of noise: from ice ages to crayfish and SQUIDS. *Nature* 373:33–36 Available at:
<http://www.nature.com/articles/373033a0>.
- Wu J, Abdelfattah AS, Zhou H, Ruangkittisakul A, Qian Y, Ballanyi K, Campbell RE (2018) Genetically encoded glutamate indicators with altered color and topology. *ACS Chem Biol* 13:1832–1837 Available at: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchembio.7b01085>.
- Yamada M, Suzuki Y, Nagasaki SC, Okuno H, Imayoshi I (2018) Light control of the Tet gene expression system in mammalian cells. *Cell Rep* 25:487-500.e6 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124718314566>.
- Yoshimizu T, Shidara H, Ashida K, Hotta K, Oka K (2018) Effect of interactions among individuals on the chemotaxis behaviours of *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol* 221:jeb182790 Available at: <http://jeb.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jeb.182790>.
- Zhao Y, Araki S, Wu J, Teramoto T, Chang Y-F, Nakano M, Abdelfattah AS, Fujiwara M, Ishihara T, Nagai T, Campbell RE (2011) An expanded palette of genetically encoded Ca²⁺ Indicators. *Science* 333:1888–1891 Available at:
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1208592>.

公刊論文目録および口頭発表目録

定期刊行誌掲載論文（主論文に関連する原著論文）

- (1) Ashida K, Oka K (2019) Stochastic thermodynamic limit on *E. coli* adaptation by information geometric approach. *Biochem Biophys Res Commun.* 508:690–694.
- (2) Ashida K, Hotta K, Oka K (2019) The input–output relationship of AIY interneurons in *Caenorhabditis elegans* in noisy environment. *iScience*. in press.

定期刊行誌掲載論文（その他の論文）

- (1) Yoshimizu T, Shidara H, Ashida K, Hotta K, Oka K (2018) Effect of interactions among individuals on the chemotaxis behaviours of *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol.* 221:jeb182790.
- (2) Ashida K, Kato T, Hotta K, Oka K (2019) Multiple tracking and machine learning reveal dopamine modulation for area-restricted foraging behaviors via velocity change in *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Lett.* 706:68–74.

国際会議発表

- (1) Ashida K, Shidara S, Hotta K, Oka K (2015) Experimental platform for dissecting olfactory system in *C. elegans*. *Neuroscience 2015, Chicago, U. S. A.*
- (2) Ashida K, Shidara S, Hotta K, Oka K (2016) Toward the system identification of olfactory learning neurons in *C. elegans*. *NIG international symposium 2016, Tokyo, Japan.*
- (3) Ashida K, Shidara S, Hotta K, Oka K (2016) Early adaption induces compartmentalized modulation of neuronal activities of sensory and interneuron in *C. elegans*. *Neuronal Development, Synaptic Function & Behavior C. elegans Topic Meeting 2016, Nagoya, Japan.*
- (4) Shidara H, Ashida K, Hotta K, Oka K (2016) The compartmentalized cGMP dynamics in a sensory neuron, AWC, of *Caenorhabditis elegans*. *Neuronal Development, Synaptic Function & Behavior C. elegans Topic Meeting 2016, Nagoya, Japan.*
- (5) Shidara H, Ashida K, Hotta K, Oka K (2016) The locally distinctive cGMP response in an olfactory sensory neuron of *Caenorhabditis elegans*. *Neuroscience 2016, San Diego, U. S. A.*

- (6) Ashida K, Shidara S, Hotta K, Oka K (2016) Compartmentalized modulation of sensory and interneuronal activities for odor adaptation in *C. elegans*. Neuroscience 2016, San Diego, U. S. A.
- (7) Mori H, Shidara H, Ashida K, Hotta K, Oka K (2017) The role of neural activities in AIY interneurons for controlling behavior of *Caenorhabditis elegans*. Neuroscience 2017, Washington D. C., U. S. A.
- (8) Ashida K, Shidara S, Hotta K, Oka K (2017) Compartmentalized modulations of sensory and interneuronal relations on early adaptation in *C. elegans*. Neuroscience 2017, Washington D. C., U. S. A.
- (9) Ashida K, Hotta K, Oka K (2018) The relationship between input and output under natural noise of an interneuron in *Caenorhabditis elegans*. 11th FENS Forum of Neuroscience, Berlin, Germany.
- (10) Ashida K, Hotta K, Oka K (2018) Quantification of the input-output relationship in an interneuron of *Caenorhabditis elegans*. Neuroscience 2018, San Diego, U. S. A.
- (11) Mori H, Shidara H, Ashida K, Hotta K, Oka K (2018) Serotonin modulates neural activity of RID interneuron and the behavior in *Caenorhabditis elegans*. Neuroscience 2018, San Diego, U. S. A.

国内学会発表

- (1) 芦田慶太, 設樂久志, 堀田耕司, 岡浩太郎 (2015) 線虫における感覚神経細胞と介在神経細胞の同時イメージング, 第 24 回 日本バイオイメージング学会学術集会, 東京.
- (2) 芦田慶太, 設樂久志, 堀田耕司, 岡浩太郎 (2015) 線虫嗅覚神経系の応答特性解析, 第 38 回 日本神経科学大会, 兵庫.
- (3) 設樂久志, 芦田慶太, 堀田耕司, 岡浩太郎 (2016) 線虫 (*C. elegans*) 嗅覚感覚神経細胞内の領域特異的なにおいに対する cGMP 応答, 第 54 回 日本生物物理学会年会, 茨城.
- (4) 芦田慶太, 設樂久志, 堀田耕司, 岡浩太郎 (2016) 線虫の早期嗅覚順応における感覚・介在神経細胞の部分特異的可塑性, 第 54 回 日本生物物理学会年会, 茨城.
- (5) 芦田慶太, 設樂久志, 堀田耕司, 岡浩太郎 (2016) 線虫の早期嗅覚順応に対する感覚・介在神経細胞間の部分特異的関係性の定量, 第 39 回 日本神経科学大会, 神奈川.
- (6) 設樂久志, 芦田慶太, 堀田耕司, 岡浩太郎 (2016) 線虫 (*C. elegans*) 嗅覚感覚神経細胞 AWC における部位特異的な cGMP 応答, 第 39 回 日本神経科学大会, 神奈川.
- (7) 芦田慶太, 設樂久志, 堀田耕司, 岡浩太郎 (2017) 線虫早期順応による感覚神経入力お

よび介在神経応答の領域特異的調整, 第 40 回 日本神経科学大会, 千葉.

- (8) 森遥香, 設楽久誌, 芦田慶太, 堀田耕司, 岡浩太郎 (2017) 線虫介在神経細胞 AIY の神経活動と行動との関係, 第 40 回 日本神経科学大会, 千葉.
- (9) 森遥香, 設楽久誌, 芦田慶太, 堀田耕司, 岡浩太郎 (2017) 線虫における介在神経細胞 AIY のカルシウム応答と行動の関係, 第 1 回 慶應ライフサイエンスシンポジウム, 神奈川.
- (10) 芦田慶太, 設楽久志, 堀田耕司, 岡浩太郎 (2017) 早期順応による線虫介在神経細胞入力と応答の領域特異的調整, 第 1 回 慶應ライフサイエンスシンポジウム, 神奈川.
- (11) 芦田慶太, 堀田耕司, 岡浩太郎 (2018) 線虫介在神経細胞における入出力関係の定量, 第 41 回 日本神経科学大会, 兵庫.
- (12) 森遥香, 芦田慶太, 設楽久誌, 堀田耕司, 岡浩太郎 (2018) 線虫介在神経細胞 RID 活動と行動のセロトニン処理による変化, 第 41 回 日本神経科学大会, 兵庫.
- (13) 芦田慶太, 堀田耕司, 岡浩太郎 (2018) 線虫神経細胞における入出力関係の解明, 定量生物学の会 第 9 回年会, 大阪.
- (14) 芦田慶太, 設楽久志, 堀田耕司, 岡浩太郎 (2019) 線虫早期順応での感覚および介在神経細胞間関係のイメージングによる解明, 第 42 回 日本神経科学大会, 新潟.

謝辞

本研究は、私が慶應義塾大学大学院理工学研究科後期博士課程在学中に、慶應義塾大学理工学部生命情報学科 岡浩太郎教授の指導の下でおこないました。学部から博士課程まで、多忙の中、非常に丁寧な御指導を頂いたこと、深く感謝致します。教えて頂いたことは、これからも私が研究を進めていく上で、いつまでも私の指針となっていくと思います。改めて、心より御礼申し上げます。

慶應義塾大学理工学部物理情報工学科 内山孝憲教授ならびに、同大学生命情報学科 土居信英教授、舟橋啓准教授にはご多忙中、学位請求論文審査会で副査を引き受けて頂き、御指摘と御助言を頂きました。非常に親身になって、議論して頂いたことに、深く御礼申し上げます。

慶應義塾大学理工学部生命情報学科 堀田耕司准教授には研究を進めるにあたって、多くの議論や御助言を頂きました。研究者として対等に議論に応じて下さったことは私の財産です。先生から学んだ研究に対する姿勢を大切に、日々研究に取り組んでまいります。

慶應義塾大学理工学部物理情報工学科 松本佳宣教授ならびに、同大学機械工学科 三木則尚教授にはマイクロ流体デバイス作製にあたり、研究室を使用させて頂きました。本研究の成果は、先生方の御協力なしには成し得ませんでした。御協力に深く御礼を申し上げます。

慶應義塾大学理工学部生命情報学科 新藤豊特任助教には実験手法から研究の進め方、新規手法に関してなど、非常に多くのことを相談させて頂きました。親身になって相談にのって頂き、また、的確なアドバイスを頂いたことは、研究を進めていく上で非常に参考になりました。また、山陽小野田市立山口東京理科大学 山中龍助教にも、研究に関して多くのことを相談させて頂きました。先生が研究室に在籍中の間に、議論をして頂いた多くのことは、研究を進める上で、非常に参考にさせて頂きました。お二方には研究だけでなく、研究生活を過ごして行く上でも大変お世話になりましたことを深く御礼を申し上げます。

線虫班と一緒に研究をおこなってきた、設楽久志博士、牧野多成氏、服部愛氏、森遙香氏、吉水敏城氏、岸海斗氏、清水慶氏、夏目佳枝氏に感謝を申し上げます。線虫班として一緒に研究を進めたことは、自身の研究を進めていく上で非常に励みになりました。特に、設楽久志博士には、私が線虫班として所属してから、実験手法や研究の進め方などを一から丁寧に指導頂きました。また、貴重な時間を割いて、深く研究について議論で

きたことは感謝しております。北海道大学理学研究院の博士研究員となられてからも、学会などでお会いする度に議論して頂き、感謝してもしきれません。

また、研究室で一緒に過ごした同期の大高雅貴氏、椎名海舟氏、田端里絵子氏、中山友里氏にも感謝申し上げます。研究室を一緒に過ごした日々はもちろんのこと、卒業後もことある毎に気にかけてもらえたことは支えになりました。

博士課程の間、吉田育英会のドクター21 プログラムにおいて、援助頂いたことに感謝申し上げます。金銭面だけでなく、手厚いサポートを頂けたことは私が余裕を持って研究を進める上で、欠かせないものでした。また、本研究は慶應義塾大学博士課程学生研究支援プログラムおよび KLL 後期博士課程研究助成金に支援頂きました。研究費や学会参加において御援助を頂いたことに感謝を申し上げます。

また、実験で使用したプラスミドの一部は文部科学省「新学術領域研究 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 総括支援活動（行動解析融合型プラットフォーム支援活動）」より供与していただきました。感謝を申し上げます。

最後に、研究をおこなうにあたり、いつも健康に気遣ってくれた家族に感謝致します。

令和元年 8 月

芦田 慶太