

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650115

研究課題名(和文)雌コオロギの配偶者選択行動を司る脳機能の解明

研究課題名(英文)Understanding neuronal mechanisms underlying female preference and sexual selection in cricket

研究代表者

青沼 仁志 (Aonuma, Hitoshi)

北海道大学・電子科学研究所・准教授

研究者番号：20333643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の雌による配偶者選択の神経基盤を調べるため、神経系の修飾機能を任意に操作することを可能にする新奇遺伝子導入法(in vivo RMCE法)の開発に取り組んだ。コオロギの雌は雄の誘因歌や求愛歌を聞いて配偶行動を誘発する。この行動の誘発には脳内生体アミンのはたらきが重要である。そこでまずin vivo RMCE法の確立に欠かせない遺伝子導入コオロギ(attP系統)を作成した。次に、3xP3-EYFP 遺伝子を3xP3-mCherry 遺伝子に置きかえる技術の確立を目指し引き続き取り組んでいる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is understanding the neuronal mechanisms underlying adaptive behavior, and we focused on mating behavior that is one of the common behaviors of animals. In crickets, males sound calling song and courtship song to attract a female. The female can decide to mate or not to mate with the male sounding. In order to understand the neuronal mechanism of mating selection, we have investigated the roles of biogenic amines, in particular dopamine (DA). Behavioral and pharmacological experiments demonstrated that metabolism of DA in the brain increased when female respond to the calling song. We then asked which neurons release or receive DA in the brain? In order to identify these neurons, we challenged to develop novel method to create transgenic crickets (in vivo RMCE). As a first step, we succeeded in creating transgenic crickets carrying attP sequence. Using them, we have challenged to create transgenic crickets using phiC31 integrase.

研究分野：動物生理・行動

キーワード：昆虫 適応行動 遺伝子導入 配偶行動 神経修飾 生体アミン in vivo RMCE法 piggyBack transposon

1. 研究開始当初の背景

適応的な行動の発現には、脳内の生体アミン類が神経修飾物質としてはたらき調節している、また、その生理学的な機能は脊椎動物と無脊椎動物で類似している。昆虫では、脳内の生体アミンであるドーパミン(DA)は配偶行動や嫌悪学習などにかかわる重要な神経修飾物質である。予備実験から、クロコオロギの雌は、雄が発音する誘因歌を受容すると脳内 DA の代謝量が有為に増加することが分かっていた。しかし、雄の求愛に対して、雌の脳で生理状態が変化する神経細胞の同定、配偶行動が動機づけられ配偶者選択が起こる脳の神経生理メカニズムについては未解決である。その背景には、生体アミンの標的細胞がリガンドを受容した時に、細胞の生理状態がどう変化し脳機能が調節され、行動として表出するのかが理解されていない点がある。そこで、脳内生体アミンの神経修飾機構を任意に機能操作することで配偶者選択の神経基盤を明らかにする道筋をつける必要が出てきた。

2. 研究の目的

昆虫の雌による配偶者選択の神経基盤を明らかにし、適応的な行動スイッチングの神経生理機構を理解するために、コオロギの脳内アミンの修飾機能を任意に操作し、配偶者選択の神経メカニズムを調査するための新奇な遺伝子導入法 (*in vivo* RMCE 法) を確立することを目指す。雌コオロギは、雄の誘因歌とそれに続く求愛歌で配偶行動が誘発される。雄の発音によって雌の脳の生理状態が変容し、その際、生体アミンにより行動閾値が修飾されることが重要だと考えている。そこで、キメリック GPCR 型人工アミン受容体を用いて脳内生体アミンの神経修飾機構を任意に機能操作し、配偶者選択にかかわる脳の神経基盤を明らかにすることを最終目的とする。そこで、本研究では、コオロギ脳内の DA 標的細胞にキメリック GPCR 型アミン受容体を発現させ、アミンの標的細胞の生理機能を任意に操作する。

キメリック GPCR とは、複数の GPCR の機能ドメインをシャッフルした人工 GPCR タンパク質で、リガンド特異性や受容体下流シグナル伝達系を人工的に改変し操作することができる。本研究では、昆虫の脳内で特定の細胞にキメリック GPCR 型アミン受容体を発現させる技術を開発し、配偶行動にかかわる脳内生体アミンについて標的細胞の生理状態を人為的に操作する。これにより、配偶行動の動機付けにかかわる脳の働きを調べる。その手段として以下の方法を確立する。

in vivo RMCE 法による遺伝子導入技術

の確立。キメリック GPCR 型アミン受容体を脳内のアミン標的細胞で発現する遺伝子導入システムを短期間で樹立する系を確立する。

キメリック GPCR 型アミン受容体を発現させた細胞を任意のタイミングで機能操作する技術の確立。配偶行動の発現にかかわる DA の働きを明らかにする。

3. 研究の方法

雌コオロギの配偶行動の動機付けの神経メカニズムを解明するため、まず、脳で発現する DA 受容体のうち、どのサブタイプが配偶行動の動機付けと配偶者選択にかかわるのかを解明する。次に、新奇な遺伝子導入技術である *in vivo* RMCE 法を開発する。行動発現にかかわる受容体の特定には、薬理学実験と RNAi 法による受容体遺伝子ノックダウン系を併用する。交尾行動に關与するアミン受容体を発現する標的細胞を同定し、その細胞でキメリック GPCR 型アミン受容体を発現する遺伝子導入システムを作製する。この遺伝子導入システムを使い、配偶行動にかかわる DA 標的細胞においてリガンドを受容した際の細胞の応答を人為的に任意タイミングでミミック・キャンセルし、脳の生理機能の変化と表出する行動の関係を調べる。

4. 研究成果

雌コオロギによる配偶者の選択行動から、行動の適応的な切り替えの神経生理機構を理解することを最終目標として研究に取り組んできた。雄の誘因歌と求愛歌は雌の配偶行動を誘発する。コオロギの配偶行動の誘発には、脳内アミンのはたらきが重要と考え、その修飾機能を任意に操作し配偶者選択の神経基盤を調べるために新奇遺伝子導入法の開発に取り組んだ。

平成 26 年度

配列特異的組替え酵素(ϕ C31 integrase)を用いた遺伝子導入コオロギ作成法の確立を進めた。*piggyBac* transposon をもちいて作成した組替え標的部位 (*attP1-3xP3-EYFP-attP2*) を累代飼育・選抜し、繁殖力に優れたシステムを 8 系統選抜 (*attP* 系統) した。*attP* 系統は複眼で黄緑色蛍光タンパク質 EYFP を発現するため、複眼ができる胚発生後期から成虫期に至るまでの期間に蛍光顕微鏡下で容易に識別可能である。次に、作成した *attP* 系統に対し、受精卵内で ϕ C31 integrase による配列特異的組み替えが起こるかを検討した。組換え対象遺伝子発現カセット *attB1-3xP3-mCherry-attB2* を含むプラスミド DNA と共に野生型

ϕ C31 integrase mRNA を受精卵内に顕微量注入し, *3xP3-EYFP* 遺伝子が *3xP3-mCherry* 遺伝子に置き変わるかを検討した. この遺伝子置換によって *attP* 系統の複眼における緑色蛍光が消失し, 代わりに赤色蛍光が観察されるはずであった. この実験系による組替えの効率評価実験を複数回遂行したが, 組替えに成功したコオロギを得ることができなかった.

受精卵内における ϕ C31 integrase タンパク質の安定した発現を図るため, ϕ C31 integrase 遺伝子を改変し (cricket codon-optimized ϕ C31 integrase) 同様の実験を行ったが, 組替えに成功したコオロギを得ることができなかった.

平成 27 年度

組換えが起こらなかった原因として, 受精卵内で組替えに十分な量の ϕ C31 integrase タンパク質を合成させることができなかったことが考えられた. そこで, 野生型 ϕ C31 integrase codon-optimized ϕ C31 integrase の mRNA ではなく, ϕ C31 integrase 遺伝子を含むプラスミド DNA より ϕ C31 integrase mRNA を受精卵内で転写させる実験系を立ち上げた. ϕ C31 integrase 遺伝子はハウスキープ遺伝子である β -*actin* 遺伝子の転写調節領域を用いて発現させた. さらに強い組替え活性を持つ変異型 ϕ C31 integrase を用いることで組替え効率を向上させることにも取り組んだ. *attB1-3xP3-mCherry-attB2* を含むプラスミド DNA と共に β -*actin*- ϕ C31 integrase 遺伝子を含むプラスミド DNA を受精卵内に顕微量注入したが, この実験系においても組替えに成功したコオロギを得ることができなかった.

これらの結果から, コオロギの生殖細胞中で恒常的に ϕ C31 integrase 遺伝子を発現する遺伝子導入コオロギを用いた遺伝子組換え系の構築が必須であると考え, *piggyBac* transposon をもちいてコオロギゲノム上に β -*actin*- ϕ C31 integrase 遺伝子を挿入した遺伝子組み換え系統の作成に取り組んでいる.

一方, 昆虫の脳内ドーパミンのはたらきが深くかわる行動として, サバクトビバッタの集団化, 寄生アリの女王の攻撃性などを新たに確認することができた. これらの成果は昆虫の配偶行動におけるドーパミンのはたらきを考察するうえで重要な知見となる.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Ohkawara K. and [Aonuma H.](#) (2016) Changes in the levels of biogenic amines associated with aggressive behavior of queen in the social parasite ant *Vollenhovia*

nipponica. *Insectes Sociaux*.

doi:10.1007/s00040-016-0461-7.

Newland P.L., al Ghamdi M., Sharkh S., [Aonuma H.](#) and Jackson C.W. (2015)

Exposure to static electric fields leads to changes in biogenic amine levels in the brains of *Drosophila*. *Proc. Roy. Soc. B.*, doi: 10.1098/rspb.2015.1198.

Alessi A.M., O'Connor V., [Aonuma H.](#) and Newland P.L. (2014) Dopaminergic modulation of phase reversal in desert locusts. *Front. Behav. Neurosci.*, 8:371, doi: 10.3389/fnbeh.2014.00371.

Kawabata K., [Aonuma H.](#), Takahashi S., Hosoda K. and Xue J. (2014) Image-based pose estimation for analyzing cricket-robot interaction behavior. *J. Signal Process.*, 118(3): 135-141.

[Watanabe T.](#) and [Aonuma H.](#) (2014)

Tissue-specific promoter usage and diverse splicing variants of the found in neurons; an ancestral Hu/ELAV-like RNA binding protein gene of insects, in a direct developing-insect *Gryllus bimaculatus*. *Insect Mol. Biol.*, 23(1): 26-41.

[学会発表] (計 10 件)

Kimura F., [Aonuma H.](#), Sato T. and Sakura M. (2015) Change in biogenic amine levels in the narrow-winged mantis *Tenodera angustipennis* caused by the parasitic horsehair worm *Chordodes sp.*, 第40回日本比較内分泌学会・第37回日本比較生理生化学会 合同大会, 広島市JMSアステールプラザ

[渡邊 崇之](#), [宇賀神 篤](#), [青沼 仁志](#) (2015) 原始的な不完全昆虫脳で発現する最初期遺伝子の探索, 日本動物学会 第86回大会, 新潟コンベンションセンター 朱鷺メッセ

[Watanabe T.](#), Atsushi U. and [Aonuma H.](#) (2015) Neurogeneities in the field cricket *Gryllus bimaculatus* – a novel experimental approach to understand neural/molecular bases of instinctive behaviors of basal insects”, 13th ISIN Symposium on the Neurobiology of Invertebrates, Tihany, Hungary.

[Watanabe T.](#) and [Aonuma H.](#) (2015) Sex-determination genes in the cricket brain - identification, expression and molecular evolution, 13th ISIN Symposium on the Neurobiology of Invertebrates, Tihany, Hungary.

[渡邊 崇之](#), [青沼 仁志](#) (2015) 不完全変態昆虫脳で発現する性決定因子の解析, 日本進化学会第17回東京大会, 中央大学 後楽園キャンパス

Watanabe T., Ugajin A. and Aonuma H.
(2014) Identification of neuronal immediate
early gene expressed in the cricket nervous
system, 15th RIES-Hokudai International
Symposium, CHÂTERAISE Gateaux
Kingdom SAPPORO

Watanabe T. and Aonuma H. (2014)
Establishing cricket neurogenetics: recent
advances and further perspectives”,
International Workshop - Neuronal
principles of learning and memory and its
perspectives for designing autonomic
distributed systems, Hawaii Tokai
International College, Honolulu, Hawaii,
USA

Watanabe T. and Aonuma H. (2014)
Development of tools for neurogenetics in
the field cricket *Gryllus bimaculatus*, 11th
International Congress of Neuroethology
and The 36th Annual Meeting of The
Japanese Society for Comparative
Physiology and Biochemistry, Sapporo
Convention Center, Sapporo.

Watanabe T. and Aonuma H. (2014)
Development of tools for neurogenetics in
the field cricket *Gryllus bimaculatus*,
Hokkaido Neuroethology Workshop 2014,
Hokkaido Univ., Sapporo.

Aonuma H. (2014) Systematic
understanding adaptive behavior —modeling
of group size dependent aggression—”,
ICN2014 satellite programs/Hokkaido
Neuroethology Workshops 2014, Hokkaido
Univ., Sapporo.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青沼 仁志 (AONUMA HITOSHI)
北海道大学・電子科学研究所・准教授
研究者番号：20333643

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

渡邊 崇之 (WATANABA TAKAYUKI)
北海道大学・電子科学研究所・学術研究員
研究者番号：70547851