

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02476

研究課題名(和文) ショウジョウバエにおける求愛定位行動解発の神経回路メカニズム

研究課題名(英文) An analysis of neuronal circuitry mechanism that release courtship following in *Drosophila*

研究代表者

古波津 創 (Kohatsu, Soh)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所神戸フロンティア研究センター・研究マネージャー

研究者番号：40571930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの雄は雌に求愛する際、主に視覚に頼りながら雌個体を追跡する。この求愛定位行動における視覚の重要性は行動レベルでよく調べられているが、その基盤となる視覚情報を運動出力に変換する神経回路の実体は不明であった。本研究は光遺伝学を活用した行動スクリーニングとトレッドミルを用いた歩行活動の定量解析、そして行動中の個体における *in vivo* カルシウムイメージングを用いて、求愛中の雄が示す、視覚に依存した歩行ターンの制御を担う新規介在ニューロン群を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ショウジョウバエ雄の求愛行動は複数の要素的な動作の組み合わせによって構成されており、交尾達成のためにはそれらの要素的動作を協調的に発現させることが不可欠である。本研究では雄の求愛行動を形作る要素的動作の中でもとりわけ基礎的な、「雌の追跡」に関わるニューロン群を見出した。これは今後、求愛行動に関わる行動選択と運動制御の神経回路機構を探る上での起点となるものであり、ここに本研究の学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In *Drosophila*, a male primarily relies on vision to chase and follow his potential mate. The role of vision in courtship following is well studied at the behavior level, yet its underlying neural circuit mechanism is unclear. In this study, by means of behavior screening that takes advantage of optogenetics, treadmill-based quantitative locomotion recording and *in vivo* calcium imaging, we identified a novel visual interneuron subset that mediates vision-dependent locomotion turn during courtship following. Our result contributes to understanding of the releasing mechanism of courtship behavior and visual target following in the fly brain.

研究分野：Neuroethology

キーワード：Drosophila courtship vision calcium imaging visual behavior

## 1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエの雄が示す求愛行動は典型的な本能行動であり、総体としては極めて高い定型性を示す。しかし同時に求愛行動は複数の要素的な動作(行動要素)が組み合わさって構成された複合的行動でもあり、雄が雌に対する追跡・定位行動や、片翅を伸展・振動させて求愛歌を発生するシンギングなどの動作を動的に切り替えることによって進行する。交尾の達成には、雄が雌と相互作用しながら求愛行動を構成する行動要素を適切に組み合わせることで実行することが決定的に重要であるが、その行動選択の基盤となる神経機構の十分な理解は得られていない。行動選択の神経機構は神経行動学における普遍的なテーマであり、その説明原理として、個別の行動要素の実行を担う神経回路部位間の協調的あるいは競合的な神経接続や、各神経回路部位の活動を調停する、トップダウン制御機構などが提唱されてきた。しかしながら、往々にしてこうした行動の調節機構は実験的な取り扱いが困難であり、実験データに基づく検討は十分になされていない。

モデル生物のキイロショウジョウバエは、最も豊富な分子遺伝学ツールが利用可能な生物であり、ニューロンの標識と活動操作および活動計測を単一ニューロン解像度行うことが可能である。これに加えて、近年になり、行動および神経活動の計測技術が飛躍的な進歩を遂げた。トレッドミル実験系(図1)の活用により、拘束条件下にある個体を用いて求愛行動をはじめとする行動を惹起して解析するアプローチが一般化し、またこれを *in vivo* 機能イメージングと組み合わせることにより、行動と神経活動を同時計測し、その相関を調べることが可能になった。こうした背景の下、従来は技術的な制約のために探求が困難であった、行動選択機構の神経回路基盤を実験的に探る道が拓けつつあった。

キイロショウジョウバエにおいては、転写因子をコードする *fruitless (fru)* 遺伝子が神経系と行動の性分化に中核的な役割を果たす。*fru* 発現ニューロンは成虫の脳に約 2000 個存在し、その中でも P1 と名付けられた約 20 個のニューロンからなる雄特異的なニューロン群は求愛行動の発現制御において特権的な機能を担う。研究代表者らは、温度感受性 *trp* チャンネル(*dTrpA1*)を利用して P1 ニューロン群を人為的に活性化すると、雄はターゲットとなる雌がいない状態でも求愛を開始し、また求愛行動を強く惹起する不揮発性の雌フェロモン刺激下において P1 ニューロン群が顕著な  $Ca^{2+}$  応答を示すことを見出し、P1 ニューロン群が雄の求愛行動を開始させる中枢をなすことを示した。

前述の通り、P1 ニューロン群の強制活性化により求愛行動が開始する。トレッドミル実験系においた雄に対して PC ディスプレイ上に表示した人工視覚刺激を呈示して左右に反復移動させると、雄はその動きに追従する弱い歩行運動を示すが、その定位活動の活性は P1 ニューロン群の強制活性化によって劇的に上昇する。同様の定位活動の活発化は実際の雌を刺激として用いた場合においても観察される。すなわち、雄の眼前に雌の腹部を呈示し、左右に反復移動させるだけでは活発な定位行動は生じないが、まず雌の腹部で雄の前肢に触れ、その直後に左右に反復移動させると極めて活発な定位行動が生じる。こうした行動レベルの知見からは、P1 ニューロン群が視運動制御回路に出力を送ってゲインコントロールをかけることによって定位行動発現の閾値を制御することが想定できる。雌に対する定位は一連の求愛行動の最初に発現する行動要素であり、その発現制御機構の解明は、求愛行動解発の中枢機構を理解する上での最重要課題の一つでありながら、P1 ニューロン群による制御を受けると想定される視運動制御回路が同定されていないために手付かずのままであった。

この視運動制御回路を構成するニューロン群の最も有力な候補は初期視覚中枢である視葉からの出力を中大脳に伝える視覚系投射ニューロン小集団の一つである LC10 ニューロン群である。LC10 ニューロン群の一部は *fru* を発現していることから、求愛行動への関与が強く示唆されるものの、これを直接的に示す実験的証拠はなかった。また、LC10 ニューロン群の下流にあるか否かを問わず、求愛に関連する視覚情報を受けて歩行運動を制御する、より下流の神経回路の実体は全く不明であった。

## 2. 研究の目的

求愛開始の中枢として P1 ニューロン群が同定されて以降、求愛行動の制御機構を具体的な神経回路の特性に則して理解するための試みは活発化した。しかしそこでの研究の多くは P1 ニューロン群自体の活動制御機構の理解を志向するものであり、P1 ニューロン群の活動が一連の求愛行動を解発する神経機構は、ほぼ扱われていなかった。前述のとおり、P1 ニューロン群は視覚に依存した定位行動の閾値制御に関与することが想定できるが、その検証には視覚情報に基づ

いて求愛定位行動のための歩行調節を行う、具体的な神経回路部位の同定が必須である。そこで本研究では求愛定位行動の実行を担う視運動制御回路で中心的な役割を果たす新規ニューロン群を探索・同定し、その機能を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は、まず定位行動に関連した動作の実行に関わるニューロン群をニューロンの活動操作技術を用いた行動スクリーニングによって探索・同定し、それに続く行動学的・生理学的解析によって同定したニューロン群の機能解析を行った。ニューロン群の探索には光遺伝学を活用した行動スクリーニングを、行動解析にはトレッドミルシステムを用いた歩行活動の定量記録、生理学的解析には *in vivo* Ca<sup>2+</sup>イメージングをそれぞれ用いた。

#### (1) 定位行動関連ニューロン群の探索

求愛定位行動の制御に関わる新規ニューロン群を探索するため、ニューロン活動の人為的活性化を利用した行動スクリーニングを行った。ニューロンの強制活性化には光遺伝学的手法を用いた。*CsChrimson* 遺伝子は赤色光応答性のイオンチャンネルをコードしており、これをニューロンに異所発現させることでニューロンに光応答性を付与できる。そこで GAL4/UAS システムを用いて *CsChrimson* を少数の神経細胞に導入した個体を観察チャンパーに放ち、チャンパー全体に赤色光を照射した。これにより個体を生かしたままの状態にて特定ニューロン群を特異的に強制活性化した。その際の様子を撮影したビデオ記録を手動で解析することにより、強制活性化されたニューロン群の機能を推定した。なお行動スクリーニングの実施にあたっては、作業効率向上のため、最大で4個体に同時に赤色光を照射して行動を記録できる実験装置を作成して使用した。

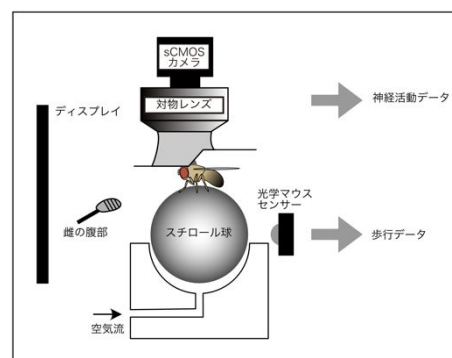


図1 トレッドミルシステム

#### (2) 行動解析

視覚刺激に対する求愛定位行動の定量解析にはトレッドミルシステムを用いた(図1)。この系において実験個体は空気流で浮上させた発泡スチロール球の上に固定される。スチロール球は空気流で浮上しているため、実験個体はその上を自由に歩行できる。この歩行に伴って生じたボールの回転をモニターすることにより実験個体の歩行活動を定量した。このシステム上に置いた雄に対して、求愛開始のトリガーとなる雌の前肢へのメスの接触と追跡対象となる視覚刺激を与え、これにより生じる歩行活動を記録・解析した。視覚刺激は八工の眼前に設置したコンピュータディスプレイ上に表示することにより呈示した。

#### (3) 神経活動計測

本研究における神経活動計測には、トレッドミル上を歩行する個体を用いた *in vivo* Ca<sup>2+</sup>イメージング技術を用いた(図1)。雄の頭部のクチクラを一部除去して脳を観察可能な状態にした後、顕微鏡下に設置したトレッドミルシステムに配置し、脳の蛍光画像と歩行活動を同時に記録した。Ca<sup>2+</sup>センサー-GCaMP7b を Gal4/UAS システムを用いて標的ニューロン群に発現させ、背面照射型 sCMOS カメラを用いて 10 fps のサンプリングレートで蛍光像を取得した。視覚刺激を呈示する際は、暗背景上を左右に反復移動する複数もしくは単一の青色の正方形(視野角 25° x 25°)を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 求愛行動の実行に関連した視覚系介在ニューロン群の同定

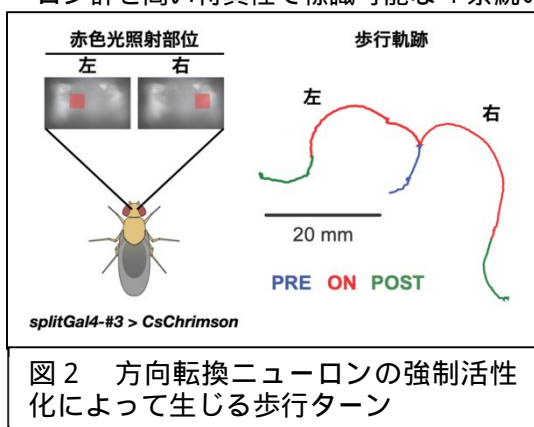
ショウジョウバエにおいて、温度遺伝学・光遺伝学的手法を用いた神経細胞の網羅的機能探索は行う際は、発現特異性の異なる多数のドライバーシステムを用いて *CsChrimson* や *dTrpA1* 等の効果遺伝子の発現を誘導するのが一般的である。この方法は特定の細胞群の活動を再現性よく操作する上では有効である一方、発現パターン(ニューロンの強制活性化パターン)が常に左右対称になるという制約がある。求愛定位行動には左右方向へのターンなどの左右非対称な動作が

含まれるため、これに関連したニューロン群を捕捉するためには、左右非対称なパターンで神経活動を惹起するのが望ましい。そこで本研究ではモザイク解析のアプローチを採用した。

モザイクパッチの誘導には、マイルドな熱ショックで *flippase* 遺伝子を発現させ、UAS 配列と *CsChrimson* のコーディング配列との間に挿入された停止コドンを含むカセット配列を除去する方法を用いた。これにより、*Gal4* ドライバーの標的細胞群の一部にのみ *CsChrimson* の発現を誘導した。*fru* 遺伝子のゲノム断片を制御配列として含み、かつ視覚情報の処理に関連した脳領域に密な標識を示す *Gal4* ドライバー系統を用いてモザイク解析を行った結果、求愛行動に含まれる運動パターンの惹起に関わる、複数の介在ニューロン群を見出した。観察された運動パターンには、左右方向の歩行ターン、前進、歩行の停止、そして交尾試行直前に観察される特徴的な「横歩き」が含まれた。強制活性化により左右方向の歩行ターンが惹起される介在ニューロン群を「方向転換ニューロン」と名付け、以後はこのニューロン群を対象を絞って解析を進めた。

## (2) split-Gal4 系統の確立

方向転換ニューロン群を特異的な発現を示す split-Gal4 系統を確立した。split-Gal4 は、転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメイン (DBD) と活性化ドメイン (AD) を異なるプロモーターの制御下で発現させ、両者が共発現する細胞集団でのみ GAL4 が再構成されるシステムである。color depth MIP mask search を活用したニューロン形態/ドライバー系統のデータベース検索によって方向転換ニューロンに特徴的な神経突起が標識される DBD/AD 系統を選別し、最終的に方向転換ニューロン群を高い特異性で標識可能な 4 系統の split-Gal4 系統を確立した。この split-Gal4 系統を用いて細胞体・樹状突起部やシナプス前終末を特異的に標識可能な各種マーカーを発現させて使用した解剖学的解析により、方向転換ニューロン群は視結節 (optic tubercle) に主要な入力部位を持ち、複数の前運動中枢に出力部位を持つことが判明した。本研究の開始後に求愛行動への関与が実証された視覚系投射ニューロン群である LC10 ニューロン群 (Ribeiro et al., 2018) は視結節に終末しており、方向転換ニューロン群は LC10 ニューロン群からの入力を受けることが推測された。



## (3) 方向転換ニューロン群の機能解析

方向転換ニューロン群が歩行制御に果たす役割の詳細を探るため、同ニューロン群の強制活性化によって生じる行動形質を検討した。split-Gal4 系統を用いて方向転換ニューロン群に *CsChrimson* を導入した雄を開頭した後にトレッドミルシステムに配置し、顕微鏡の光路を介して赤色光を照射した。左右の脳半球にそれぞれ分布する方向転換ニューロンを選択的に強制活性化するため、赤色光はパターン照射装置を使用して視結節領域に局所的に照射した。歩行活動の定量データに基づき、方向転換ニューロン群の強制活性化により生じる行動形質を検討したところ、赤色光照射を行った脳半球と同側に進行方向を変える歩行ターンが生じることがわかった (図 2)。赤色光照射が長時間 (~3 秒) にわたった場合でも、生じる歩行ターンの角速度は一定で時間変動を示さなかったことから、同ニューロン群が下降性ニューロン群に直接出力を送ることが推測された。また、同じ方法で LC10 ニューロン群を強制活性化すると、方向転換ニューロン群を活性化した場合と同様に、赤色光を照射した脳半球側に向き直る歩行ターンが生じたことから、方向転換ニューロン群が LC10 ニューロン群と同一の神経経路を構成することが示唆された。さらに、各種の照射条件における結果を検討した結果、左右脳半球の方向転換ニューロン群を同時に強制活性化した場合には、左右方向のターンではなく、前進する速度の上昇が生じることを見出した。このことから、同ニューロン群が一方向へのターンの制御に関与するだけでなく、左右の視覚系への入力を統合し、歩行活動を制御する過程にも関与することが推測された。

## (4) 方向転換ニューロンに生じる活動のイメージング解析

*in vivo*  $Ca^{2+}$  イメージングにより、歩行活動中に方向転換ニューロン群に生じる神経活動を検討した。先に樹立した split-Gal4 系統でカルシウムセンサー GCaMP7b を方向転換ニューロンに導入し、視結節部における応答を計測すると同時に、歩行活動を記録した。トレッドミルシステム上に雄を配置し、その前肢に雌の体でタッチした直後に追跡対象となる人工視覚刺激を呈示すると、その動きに追従する左右方向の歩行ターンが散発的に生じる。その際の方向転換ニューロンの活動を検討した結果、同ニューロン群が歩行ターンと同期した顕著な  $Ca^{2+}$  応答を示すことが明らかになった。この  $Ca^{2+}$  応答は提示された視覚刺激に対して雄が歩行ターンを示さなかつ

た試行ではほぼ生じなかったことから、視覚刺激に対する感覚応答ではなく、雄が示した歩行ターンに対応するものと考えられた(図3)。さらに、計測を行った脳領域と歩行ターンの方向との対応を調べると、計測した方向転換ニューロンが位置する脳半球と同じ側に向かって雄がターンした際に限って顕著な応答が生じていた。一方、LC10 ニューロン群の活動を計測すると、方向転換ニューロン群と同様に、顕著な  $Ca^{2+}$  応答は同側に向かう歩行ターン時に生じていた。これらの左右性に関する結果は先の強制活性化実験の結果とよく符合しており、また、同ニューロン群が LC10 ニューロン群の下流に位置するとの解釈とも対応する。以上の結果から、方向転換ニューロン群は LC10 ニューロン群からの入力を受けて活動し、それにより同側への歩行ターンを惹起する機能を担うことが示唆された。

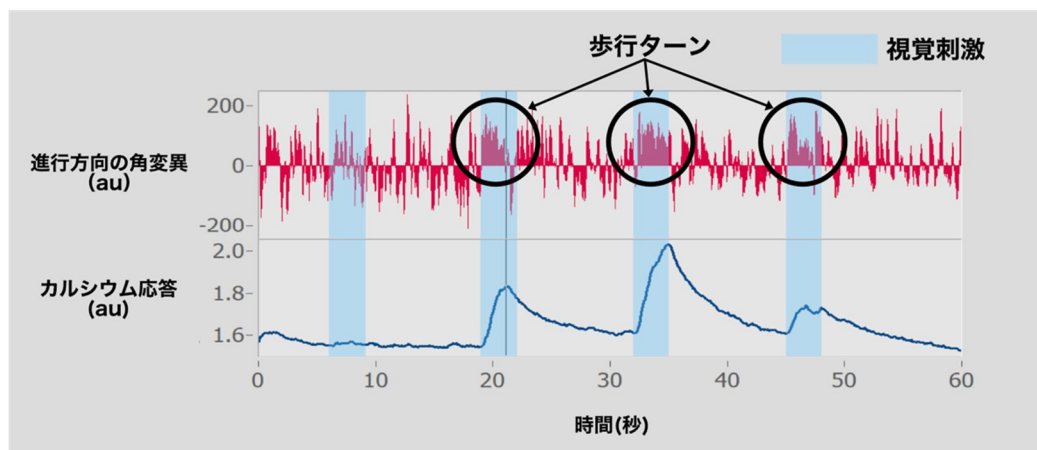


図3 歩行ターンと同期して方向転換ニューロンに生じる  $Ca^{2+}$  応答

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kohatsu Soh, Tanabe Noriko, Yamamoto Daisuke, Isono Kunio	4. 巻 15
2. 論文標題 Which Sugar to Take and How Much to Take? Two Distinct Decisions Mediated by Separate Sensory Channels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2022.895395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kohatsu, S., Yamamoto, D.
2. 発表標題 A visual interneuron subclass that mediates vision-dependent courtship pursuit in male.
3. 学会等名 15th Japan Drosophila Research Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原佑介、田中良弥、古波津創、佐藤耕世、山元大輔
2. 発表標題 Drosophila subobscuraの脳内インスリン産生ニューロンは吻運動を制御して種特異的な求愛行動を生み出す。
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Soh Kohatsu and Daisuke Yamamoto
2. 発表標題 Behavioral analysis of vision dependent action choice in courting male Drosophila
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of The Japanese Society for Comparative Physiology and BioChemistry
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kohatsu S. and Yamamoto D.
2. 発表標題 Exploration of visual circuit that mediate male courtship in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第41回東京大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka R., Higuchi T., Kohatsu S., Sato K., Awasaki T. and Yamamoto D.
2. 発表標題 The neural mechanism underlying species-specific courtship behavior in <i>Drosophila subobscura</i>
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第41回東京大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Soh Kohatsu and Daisuke Yamamoto
2. 発表標題 Identification of visual interneurons that mediate courtship following in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Conferences: Latest Advances in Development & Function of Neuronal Circuits (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Soh Kohatsu and Daisuke Yamamoto
2. 発表標題 Identification of interneuron subsets that mediate vision-dependent courtship following in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第40回神戸大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古波津創、山元大輔
2. 発表標題 光操作技術と画像解析を活用したショウジョウバエ求愛行動の定量解析
3. 学会等名 定量生物学の会 第九回年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kohatsu, S., Yamamoto, D.	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 14
3. 書名 Optical Recording of Brain Neuron Activities from a Male Drosophila Behaving on a Treadmill. In: Yamamoto, D. (eds) Behavioral Neurogenetics. Neuromethods, vol 181. Humana, New York, NY. <a href="https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2321-3_11">https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2321-3_11</a>	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>情報通信研究機構未来ICT研究所 神経網ICT研究室 行動神経生物学プロジェクト  <a href="https://www2.nict.go.jp/neuro/evoneuro/index.html">https://www2.nict.go.jp/neuro/evoneuro/index.html</a>          情報通信研究機構・未来ICT研究所・行動神経生物学プロジェクト  <a href="http://www2.nict.go.jp/frontier/evoneuro/index.html">http://www2.nict.go.jp/frontier/evoneuro/index.html</a></p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------