

令和 5 年 7 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06335

研究課題名(和文) ショウジョウバエの糖探索行動を制御する神経回路の行動遺伝学解析

研究課題名(英文) Neuronal circuit for sugar searching behavior in Drosophila

研究代表者

谷村 禎一 (Teiichi, Tanimura)

名古屋大学・理学研究科・招へい教員

研究者番号：20142010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の位置情報認識行動の神経機構を理解するために、ショウジョウバエの糖探索行動を制御する神経回路の同定を目標とした。Gal4/UAS法を用いて、脳内の特定のニューロン群の神経興奮を光学遺伝的に遮断させ、糖探索行動への影響を調べた。神経活動を不活性化できるUAS-NpHR(Halorhodopsin)を用いた。糖があった原点の場所から一定の距離を離れて停止している時点で光刺激を与えて、その後、原点に戻ることができるかを種々のGal4系統を用いて検討した。その結果、原点への復帰ができなくなる系統を選び出すことにより、脳内の中心体の神経経路が探索行動に関わっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ショウジョウバエの糖探索行動において、八エが自己の位置座標を脳内の神経回路によって認識し行動を制御していることを私たちの研究が明らかにしてきた。それが脳内のどのような神経回路によっていることかを知るために本研究を行い、中心体の関与を解明した。これはこれまで他の昆虫のナビゲーションの研究からも示されてきたことである。ショウジョウバエでは、神経回路網が解明されているので、今後の研究によって、その細胞レベルでのメカニズムの解明ができると期待される。このような昆虫のナビゲーション機構の解明はロボティクスに応用できる知見になりうる。

研究成果の概要(英文)：To understand the neural mechanisms of insect navigation behavior, I aimed to identify the neural circuits controlling sugar-seeking behavior in Drosophila. Employing the Gal4/UAS method, I optogenetically blocked the neural excitability of a specific group of neurons in the brain and examined their effects on sugar-seeking behavior. I used UAS-NpHR (Halorhodopsin), which can inactivate neural activity. I used various Gal4 strains to examine whether they could return to the origin after optical stimulation at the point where they stopped a certain distance away from the origin location where the sugar was located. The results suggest that neural pathways in the central complex of the brain are involved in exploratory behavior.

研究分野：行動生理学

キーワード：ショウジョウバエ 摂食行動 味覚受容 探索行動 位置情報

研究成果報告書

2018 年～2022 年

基盤研究(C) (一般)

ショウジョウバエの糖探索行動を制御する神経回路の 行動遺伝学解析

名古屋大学 理学研究科 招聘教員 谷村禎一

新型コロナウイルス (COVID-19) に関連する繰越申請

延長 2021.3.19

延長 2022.3.15

交付を受けた助成金 4,290,000 円

直接経費 3,300,000 円

間接経費 990,000 円

【研究の背景】

生得的行動は動物の特定のキー刺激によって引き起こされる (Tinbergen, 1951)。行動反応は、キーとなる刺激の質や強さだけでなく、動物の内部状態によっても誘発される。生得的な行動反応の根底にある神経細胞と分子ネットワークの同定は、神経生物学の重要な研究課題である。昆虫の採餌行動は、最も洗練された行動のひとつである。昆虫の採餌行動は、効率よく餌を見つけるために行われ、大規模探索と局所探索の 2 つの段階に分けることができる。位置情報に基づいたナビゲーション行動については、サバクアリが経路積分によって巣穴に戻る行動について、Wehner らの優れた研究がある。Wehner らが行ったサバクアリ *Cataglyphis fortis* の巣穴への帰巣行動は興味深い。巣からジグザクに歩いていても直線で巣穴に戻ることができることから、砂漠アリは経路積分を行っていることがわかっている。ミツバチの蜜がある花までの飛行行動も経路積分によっていると考えられる。さらにミツバチはダンスによって他個体に花の位置情報を伝達することができる。渡り鳥、長距離移動するチョウが磁気、太陽コンパスを用いていることが知られている。しかし、位置情報認識のニューロン機構に関する研究は少ない。空腹は大規模な餌源の探索を誘発し、餌の摂取はより多くの餌を得るための局所的な探索を誘発する (Bell, 1990; Dethier, 1957)。ミツバチは食物を摂取した後、採餌場所を伝達することができ、アリは経路統合のメカニズムを使って巣に戻ることができる (von Frisch, 1967; Müller and Wehner, 1988)。Dethier は以前、お腹を空かせたクロバエ *Phormia regina* が糖に誘起された局所探索行動を行うことを証明し

(Dethier, 1957)、この行動がハチのダンス・コミュニケーションの原型である可能性を示唆した。ハエの糖探索行動とミツバチのダンスは、餌の摂取後に開始され、定型的な巡回行動を含む点で類似しており、餌源の質と個体の内部状態によって調節される (Dethier, 1957; von Frisch, 1967)。しかし、その仮説を支持する明確な証拠はない (Brockmann et al.)。

ショウジョウバエは少量の糖滴を摂取すると局所的な糖探索行動を行う (Bell et al., 1985)。我々は、探索行動の引き金となる感覚入力経路の同定を目指している。ショウジョウバエでは、複数の味覚器官が脚部、口器 (口唇と口蓋掌)、内咽頭に存在する (Stocker, 1994; Singh, 1997)。それぞれの味覚器官は、摂食行動を制御する上で特定の役割を持っていると考えられている。ハエは足根味蕾で糖の存在を感知する。そして、糖の濃度が十分に高ければ、口吻を伸ばす。そして仮気管間乳頭味覚が刺激され、シバリアポンプの働きによって溶液を飲み始める。吸い込まれた溶液は最終的に咽頭味覚ニューロンによってモニターされ、摂取を継続するかどうか決定される (LeDue et al.)。最後に、溶液は食道から挑心嚢に通過し、ハエが空腹であれば、溶液は作物に通過する。そこで、探索行動がどの感覚ステップで開始され、制御されるのか、またどのような刺激が行動を誘発するのかを調べた。まず、糖液のどのような化学的性質が行動を誘発するのかを検証した。

昆虫の本能的な定型行動は鍵刺激によってトリガーされる。しかし、ある行動がトリガーされるかは体内の状態に依存し、またどれだけの強さで行動が発現させるかも制御されている。本研究の糖探索行動は、空腹時において糖受容刺激によってトリガーされるが、探索中に自己の位置情報を計測しつつその情報に基づいて一定時間、局所的な動きをするという点でユニークな行動である。申請者は、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の糖探索行動の神経機構を研究が、このような経路積分の解明に繋がると考えた。関与すると考えられる脳の領域は中心複合体 (Central Complex (CX)) である。central complex は節足動物で共通に見られる脳の中心部にある構造で、前大脳橋 (protocerebral bridge)、扇状体 (fan-shaped body)、楕円体 (ellipsoid body) 小結節 (noduli) (扇状体と楕円体という用語は双翅類において用いられている) からなる。詳細な神経の接続様式はショウジョウバエにおいて解析中であり明らかになっていない。中心複合体には様々な感覚情報が入力されており、ショウジョウバエ、ゴキブリ、バッタなどにおけるこれまでの研究によって、運動制御、交尾行動、視覚位置情報による学習、飛行中の空間移動などに関わることが明らかにされてきた。これまでの研究を元にとると、糖探索行動における一時的な位置情報の記憶、運動制御に関わるニューロンは、中心複合体にあると考えられる。キノコ体は、記憶学習に関わっていること知られており詳細な研究が行われているが、中心複合体はほとんど未知の場所である。遺伝学的なツールを用いて単一ニューロンレベルでの解析が可能になった今、中心複合体における糖探索行動のニューロン機構を研究することができる。

【本研究の課題】

昆虫の位置情報認識の神経機構の解明を最終目標とし、ショウジョウバエの糖探索行動を制御する神経回路を同定する。空腹のキイロショウジョウバエは、少量の糖溶液を摂取してなお空腹であると、糖溶液があった場所の周囲を歩行探索しつつ、糖溶液があった場所に戻ってくる連続した探索行動を1分間ほど行う (Murata et al., 2017)。この行動はハエが満腹時には起こらず、さらなる糖溶液を求めて起こる

定型的行動である。行動の重要な要素はハエが平面上の自分の位置と糖溶液があった位置を認識できることである。私たちは、この行動の鍵刺激となる感覚情報は咽頭の味細胞への糖味覚入力であることを明らかにした(Murata et al., 2017)。これまでの研究で感覚情報を統合して運動を制御していると考えられている脳内の中心複合体(central complex)内のニューロンを遺伝的手法を用いて解析し、糖探索行動のコマンドニューロン回路とその回路と連絡している位置情報認識に関わる神経回路を同定し、Ca²⁺イメージングによって実際の神経活動を確認する。

【実験手法】

探索行動はハエの空腹度に依存するが、ハエの遺伝的背景による系統差によって絶食耐性が異なる。そこで、各系統の生存曲線を調べて、同じ絶食度となる絶食時間を決めて実験を行う。できるだけ自然状態で実験を行うために、ハエが微量の糖溶液を見つけるまで待つ。アリーナは直径 160 mm のシャーレを用いているが、視覚によるランドマークが無いように周囲の視野を均一にしている。上部の web カメラで撮影した画像を、フリーソフトウェア Ctrax で解析してハエの座標位置を得て行動軌跡を解析する。これまで、行動の解析では、総移動距離、中心からの距離、中心部に戻る頻度、速度などの様々なパラメータを用いた解析を行う。

糖溶液があった場所を、微量に残った糖、ハエ自身が残した匂いが用いられている可能性は、糖溶液をシートの上に置き、ハエが糖溶液を摂取した後にシートを除去しても糖溶液があった場所に戻ることができることから除外できる。また暗黒でも同様な探索行動を行うので視覚情報を利用しているのでもない。歩行中にランドマークとなる手狩りはないと思われる。自身の足跡が見えてそれをたよりに歩くこともあるがその寄与は大きくない。時間経過で興味深いのは、探索行動で動いている行動は連続しておらず、途中、ランダムな頻度でとどまり、清掃行動を行っている。すなわち、清掃行動時も前の位置情報を保持しており、数秒後に行動を切り替えることができるのである。座標情報は短期記憶されていなければならない。

【研究計画と成果】

これまでの数種の昆虫も用いた研究によって、脳内の中心複合体が昆虫の運動を制御するセンターであると考えられている(Turner-Evans & Jayaraman, 2016)。中心複合体のどの神経群がどのように関わっているかを解明するために、ショウジョウバエにおいて Gal4/UAS 法を駆使する。Gal4/UAS 法は、限定された神経細胞で任意の外来遺伝子を発現させることができる。この方法を用いて、脳内の特定のニューロン群を光学的あるいは熱的刺激により神経興奮させて、糖探索行動への影響を調べる。protocerebral bridge, ellipsoid body と fan-shaped body の一部に発現がある多数の Gal4 系統が確立されている。Gal4 が発現している特定のニューロン群を遺伝的に人為的に抑制あるいは興奮させる。UAS-Shi[ts]:30-35°Cほどの高温におくことによってシナプス伝達が可逆的に阻害できる、UAS-TrpA1 : 同様に高温におくことにより、ニューロンを強制的に発火させる、UAS-channel rhodopsin(ChR) : 改良型の ReaChR を用いることで、赤外の光刺激で頭部深部のニューロンを発火させることができる。中心複合体の3つのどの構造が関わっているのを明らかにし、次年度はより詳細に単一ニューロンレベルの解析を目指した。

味覚情報は、フ節、唇弁の感覚子で受容されるが、それらからの味覚刺激では糖探索行動は誘発されない。左図に示したように、外部の味細胞が機械感覚細胞に変化した *poxn* 突然変異体においても糖探索行動が起こることから、咽頭の味細胞への糖刺激が鍵刺激となることがわかった。糖溶液を吸引して咽頭で甘味を感じてから探索行動が始まる。咽頭の味細胞の食道下神経節における投射場所は、唇弁、フ節の味細胞の投射場所とは異なる。咽頭の味細胞の投射場所から中心複合体に投射している2次神経を追えば、コマンドセンターに至る経路が同定できる可能もある。ショウジョウバエでは、電顕の連続切片を用いた全脳ニューロンの接続図コネクトロームの作成が Janelia Research Campus で進行中であり (Meinertzhagen, J. Neurogenet. 30:62-68, 2016)、数年後には中心複合体の Connectome が得られると期待される。ごく最近、3つの異なる走行経路の味覚2次神経が新しい手法を用いて明らかになった (Talay et al., Neuron 96,1, 2017)。そのひとつは中心複合体に終末しており糖探索行動に関わっている可能性がある。

Gal4/UAS 法を用いて、脳内の特定のニューロン群を光学的あるいは熱的刺激により神経興奮させて、糖探索行動への影響を調べる実験計画書に書いたアプローチを検討した。まず、光刺激がハエの糖探索行動に影響がないことを確認した。次に、UAS-channel rhodopsin(ChR) を用いて光刺激により特定のニューロンを活性化した。その結果、活性化によって探索行動が阻害された場合に、それが別の行動プログラムが駆動されたことで引き起こされる可能性を除外できないことが問題になった。そこで、神経活動の不活性化による方法を用い戦略に修正した。Halorhodopsin (NpHR)は光刺激により作動する chloride pump で神経活動を不活性化できる。UAS-NpHR を用いることを選択した。次に糖探索行動のどの時点で光刺激を与えるかを検討し、糖があった原点の場所から一定の距離を離れて停止している時点で光刺激を与えて、その後、原点に戻ることができるかを異なる種々の Gal4 系統を用いて検討した。その結果、原点への復帰ができなくなる系統を選び出すことができたが詳細な神経回路の同定までには至らなかった。

ハエの中心複合体神経の活動を Ca^{2+} イメージング手法でモニターするためには、固定したハエをボールの上を歩かせる treadmill 方式での実験を行ったが、神経活動のモニターまでには至らなかった。これらの実験はインドの NCBS で行う計画であったが、新型コロナ感染拡大による渡航制限が障害となり実現できなかった。

発表論文

- Shakeel, M., Kaushik, S., Tanimura, T., Brockmann, A. & Kain, P. Tracking sugar-elicited local searching behaviour in *Drosophila*. JoV, under review
- Rihani, K., Fraichard, S., Chauvel, I., Poirier, P., Delompré, T., Neiers, F., Tanimura, T., Ferveur, J-F. & Briand, L. A conserved odorant binding protein is required for essential amino acid detection in *Drosophila*. Communications Biology volume 2, 425 (2019)
- Kudow, N., Kamikouchi, A. & Tanimura, T. Softness sensing and learning in *Drosophila* larvae. J. Exp. Biol. (2019)
- Brockmann A., Basu P., Shakeel M., Murata S., Murashima N, Boyapati R.K., Prabhu N.G., Herman J.J. & Tanimura T. Sugar intake elicits intelligent searching behavior in flies and honey bees. Front. Behav. Neurosci. (2018) | <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00280>
- Damrau, C., Toshima, N., Tanimura, T., Brembs, B. & Colomb, J. Octopamine and tyramine contribute separately to the counter-regulatory response to sugar deficit in *Drosophila*. Front. Syst. Neurosci. (2018) <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00100>
- Murata, S., Brockmann, A. & Tanimura, T. Pharyngeal stimulation with sugar triggers local searching behavior in *Drosophila*. J. Exp. Biol. 220, 3231-3237 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Rihani, K., Fraichard, S., Chauvel, I. et al.	4. 巻 2
2. 論文標題 A conserved odorant binding protein is required for essential amino acid detection in <i>Drosophila</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 425-435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0673-2	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 該当する

1. 著者名 Kudow N, Kamikouchi A. & Tanimura T.	4. 巻 222
2. 論文標題 Softness sensing and learning in <i>Drosophila</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Biology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jeb.196329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Damrau, C., Toshima, N., Tanimura, T., Brembs, B. & Colomb, J.	4. 巻 -
2. 論文標題 Octopamine and tyramine contribute separately to the counter-regulatory response to sugar deficit in <i>Drosophila</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Systems 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/fnsys.2017.00100	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------