

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02968

研究課題名（和文）昆虫脳高次中枢における情報統合と行動決断の神経機構

研究課題名（英文）Neural mechanisms of information integration and decision-making in the higher center of insect brains

研究代表者

木矢 剛智（KIYA, TAKETOSHI）

金沢大学・生命理工学系・准教授

研究者番号：90532309

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：動物が外界からの情報を正確に受容・認識し、適切な行動により反応する仕組みを調べた。具体的には、昆虫の脳の高次中枢に着目し、性フェロモンの情報が脳で統合される仕組みについて、カイコガとショウジョウバエを用いて解析した。脳の性決定に関わる遺伝子であるdoublesexとfruitlessに着目した。ショウジョウバエではaSP2という神経細胞群に着目して、神経活動の解析や性行動における機能を調べた。カイコガでは、遺伝子の発現解析・ノックアウト・ノックインシステムを用いた解析を行った。また、カイコガの脳の性を決定する遺伝子の候補を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫が環境からの情報に適切に反応する神経メカニズムの一端を明らかにした。また、カイコガの脳の性を決定する新たな遺伝子の候補を発見することが出来た。本研究は、昆虫の脳がどのような機構で作動するかといった基本概念や、昆虫の脳の性決定がどのように進化してきたのかといった疑問の一端を解き明かす、学術的に意義のあるものである。また、地球上で最も繁栄している生物である昆虫を模倣することで、環境に適応した新規技術の開発に繋がる可能性があり、SDGsの達成という観点において社会的意義のある研究である。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanisms by which animals accurately receive and recognize information from the environment and respond by appropriate behavior. We investigated the higher centers of the insect brain and analyzed the mechanism by which sex pheromone information is integrated in the brain using silkmoths and vinegar flies, focusing on doublesex and fruitless, genes involved in sex determination in the brain. In Drosophila, we focused on the aSP2 neuron cluster and investigated its neural activity and function in sexual behavior. In the silkmoths, we analyzed gene expression, knockout and knockin lines. We also found candidate genes that determine the sex of the silkmoth brain.

研究分野：昆虫科学

キーワード：カイコ ショウジョウバエ 昆虫 性決定 脳 doublesex fruitless Hr38

1. 研究開始当初の背景

動物は外界からの情報を正確に受容・認識し、適切な行動により反応する。しかしながら、感覚情報に応じて、適切な行動の発現が制御される神経機構については不明な点が多く残されている。特に脳の高次領域は、感覚情報の統合や運動指令の判断において最も重要な役割を担うと考えられるにも関わらず、複雑な哺乳類の脳では解析が困難で、その動作原理は未解明のままである。

感覚情報が行動を制御する神経機構の解明には、特定の感覚刺激に対する定型行動に着目し、その神経回路及び機能を包括的に明らかにすることが有効である。昆虫の性フェロモンは、特異的な嗅覚受容体の活性化が、定型的な性行動を誘発する点で入出力関係が明確であり、感覚入力と行動の関係を調べる目的に適している。また昆虫の脳は、脊椎動物の脳に比べ極めて少数の神経細胞で構成されており、神経回路の包括的な解析が可能である。研究代表者はこれらの研究上の利点と、遺伝学的手法を用いた神経機能の解析や神経回路の進化的な比較が可能であるといった観点から、カイコガとショウジョウバエの2種の昆虫を用いて研究を行ってきた。

以前に研究代表者のグループでは、昆虫種間で高度に保存された神経活動のマーカー遺伝子 *Hr38* を同定し、これらの昆虫の脳で性フェロモンに反応する細胞の分布を明らかにしてきた (*Current Biology*, 2013)。この研究により、嗅覚中枢や運動中枢のみならず、脳の高次中枢として知られる領域の細胞群が性フェロモンの刺激に応じて活動していることが明らかとなった。また、研究代表者らは、神経活動依存的な *Hr38* の転写活性を利用した遺伝子組換えカイコガやショウジョウバエを作出し、性フェロモン刺激時や性行動時に活動のあった神経回路だけを特異的に GFP で可視化できる新規な手法を確立した。この技術により、性行動時のオスのショウジョウバエの脳では性決定遺伝子である *fruitless* 及び *doublesex* を発現する神経回路が選択的に活動するという先行研究と同様の結果に加え、味覚と嗅覚の性フェロモン情報が統合される高次脳領域 (aSP2 細胞群) を新規に見出した (*PNAS*, 2019)。またオスのカイコガの脳においても性フェロモンに反応する神経回路を可視化したところ、高次脳領域でラベルされる神経回路の周辺に、*doublesex* を発現するオス特異的な細胞群が存在することを見出してきた。

2. 研究の目的

本研究は、昆虫の脳高次中枢における行動決断の神経機構とその神経回路の進化の解明を目的とした。さらにカイコガ脳には性行動の神経回路を規定する新規な分子機構が存在すると予想されたので、この分子経路および関与する新規な遺伝子の同定も目的とした。本研究により、動物の脳に共通に認められる、様々な感覚情報を手掛かりに行動を決断する神経機構とその進化的基盤について、その一端を解明することを目指した。

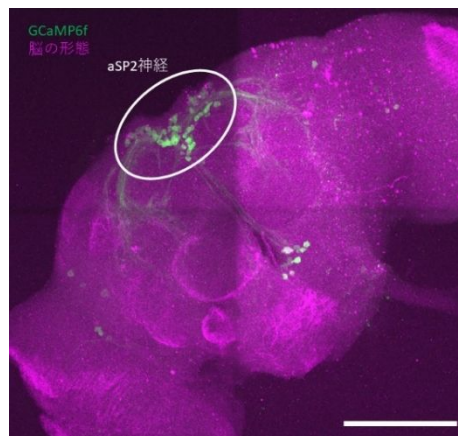
3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエの脳において、嗅覚と味覚の性フェロモン情報が統合され、行動決断に至る神経回路の詳細な機能解析

Ca²⁺イメージングによる aSP2 神経回路の活動動態の解析

研究代表者らが以前に性行動モチベーションの制御に重要であることを見出した aSP2 神経回路においてどのように情報の統合が行われているのかといったことを、Ca²⁺イメージングによって明らかにするため、aSP2 神経選択的に GCaMP6f (Ca インジケータータンパク質) 及び tdTomato を発現させたショウジョウバエを作出した (右図)。また Ca²⁺イメージングのための顕微鏡やカメラをセットアップした。

また、将来的に様々な解析をすることを念頭に、split-GAL4 を用いた外来遺伝子発現系の構築に取り組んだ。そのために *fruitless* の P1 プロモーターに GAL4 DNA-binding domain を CRISPR/Cas9 でノックインした系統を作出した。



② aSP2 神経が性行動指令の神経回路の活動を制御する機構の解析

aSP2 神経において、どのような神経伝達が性行動モチベーションを制御しているのかという点を明らかにする目的で、aSP2 神経で様々な神経伝達物質の合成酵素をノックダウンした系統

を作出し、性行動に与える影響を調べた。

(2) カイコガ脳高次領域の神経回路の進化的保存性の解析と新規分子機構の解明

doublesex を発現する神経回路の解析

カイコガにおいては、脳の性決定遺伝子候補として *doublesex* と *fruitless* を想定し、発現解析や機能解析を進めた。*doublesex* については、脳における発現および機能解析を、主に組織学的な観点から行った。また、*doublesex* 発現神経回路を遺伝学的に操作することを目的に TAL-PITCh 法によって、*doublesex* 遺伝子座に GAL4 をノックインした系統を作出した。UAS-*myr::GFP* 系統や UAS-GCaMP6f 系統と掛け合わせ、GAL4/UAS システムにより解析を進めた。

fruitless ノックアウト系統の表現型解析

ショウジョウバエにおいて性フェロモン情報処理や性行動に重要な神経回路を規定する遺伝子である *fruitless* のホモログ遺伝子を CRISPR/ Cas9 によってノックアウトしたカイコガを作出していたので、性フェロモンへの応答や交尾行動といった行動の表現型を解析した。また、ショウジョウバエにおいて *fruitless* は多様なスプライシングバリエーションがあり、脳特異的かつ性特異的に発現するバリエーションが重要であることが知られている。同様のことがカイコガでも認められるかどうかについて、RNA-Seq 解析によって、カイコガの脳における *fruitless* 遺伝子のスプライシングバリエーションの解析を行った。

カイコガ脳において性決定に関わる新規な分子機構の解析

doublesex や *fruitless* の解析より、脳の性決定は体細胞をは異なった経路を介する可能性を見出したので、新規な遺伝子のスクリーニングを行った。様々な発生段階の脳を用いて、雌雄間で発現に差のある遺伝子を RNA-Seq 解析した。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエの脳において、嗅覚と味覚の性フェロモン情報が統合され、行動決断に至る神経回路の詳細な機能解析

Ca²⁺イメージングによる aSP2 神経回路の活動動態の解析

aSP2 神経回路特異的に GCaMP6f 及び tdTomato を発現するショウジョウバエ系統を作出した。このショウジョウバエの脳を、顕微鏡下において半自由行動状態でイメージングできるシステムを構築した。具体的には、頭部の一部のクチクラに穴を開けて顕微鏡で脳の蛍光シグナルを観察できる状態にし、体は虫ピンに接着剤で固定しつつも足は自由に動かせる状態にする方法を確立した。

まず、この *in vivo* preparation において、神経活動を適切に捉えられていることを確認するためのポジティブコントロール実験を行った。具体的には、ハエの行動をモニターしながら、脳へカリウム溶液を加え、神経活動を誘発させた際の蛍光シグナルの変化を計測した。その結果、おおよそ 300% 程度の蛍光変化率を検出することができた。

次に、オスのショウジョウバエの前足に、メスの身体を接触させて性フェロモン刺激した際の aSP2 神経の応答を観察した。非常に弱いながら（蛍光変化率 10% 程度）刺激に対する応答が認められた。しかし十分な回数の再現を得られておらず、今後の検証が必要である。上記のカリウム刺激実験と違い、刺激に対する応答が弱いようで、preparation の状態が万全でないと十分なシグナルが得られないようであった。今後、*in vivo* preparation の作成手順の最適化を図って、当初の仮説の検討に取り組む必要がある。

② aSP2 神経が性行動指令の神経回路の活動を制御する機構の解析

まず、aSP2 神経はグルタミン酸作動性であることが知られていたため、グルタミン酸合成酵素である VGluT をノックダウンした個体を作出し、性行動モチベーションの変化を調べた。しかし、当初の予想に反して性行動の開始や維持には全く変化が認められなかった。系統間での RNAi の効率の違いも考慮に入れ 3 種類の系統を作出して調べたが、すべてにおいて明確な表現型は認められなかった。

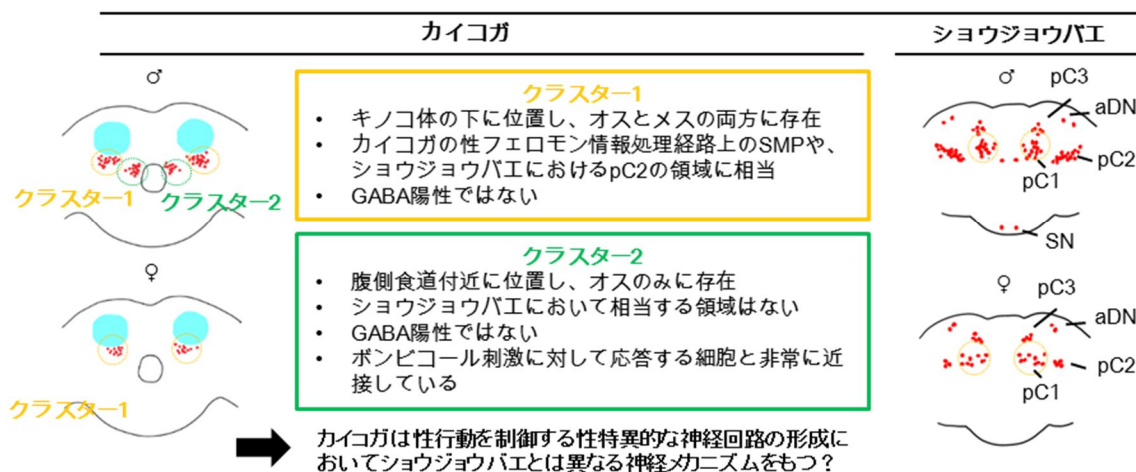
そのため、当初の仮説を見直し、グルタミン酸以外の他の神経伝達物質の関与を検討することにした。アセチルコリンおよび GABA の合成酵素である ChAT や Gad1 をノックダウンした個体を作成して実験を行ったが、やはり性行動モチベーションに明確な変化は認められなかった。詳細は省くが、RNAi を行うために用いたドライバー系統が、十分に aSP2 神経をカバーできていなかった可能性が考えられたので、必要な系統の作出に取り組んだ。今後、新たなドライバー系統を用いて実験を行うことで、上記の仮説の再検討を行うべく予定である。

(2) カイコガ脳高次領域の神経回路の進化的保存性の解析と新規分子機構の解明

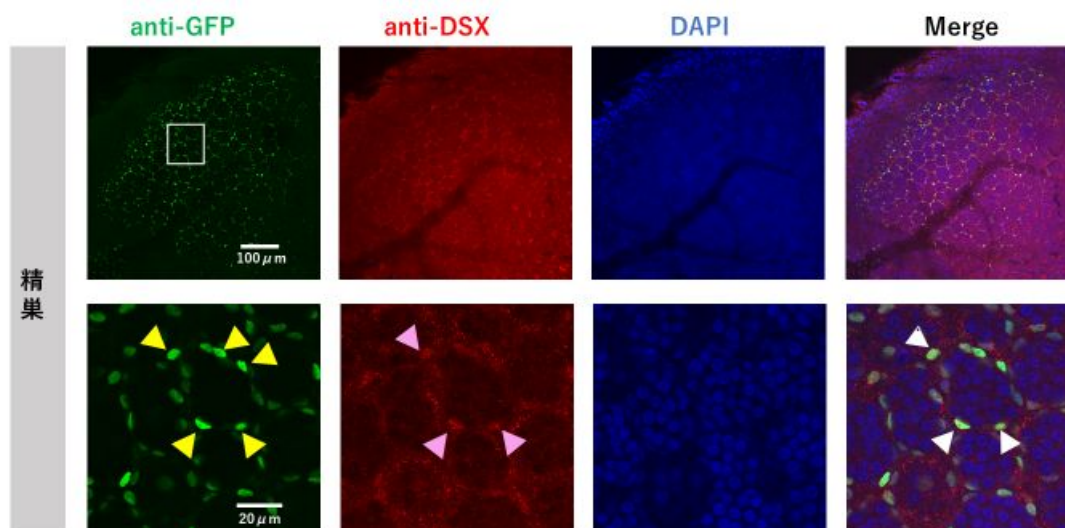
doublesex を発現する神経回路の解析

まず、*doublesex* を発現する神経には雌雄で異なるクラスターがあり、細胞数も雌雄や発生段階で異なることを明らかにし、論文として出版した(下図まとめ参照)。脳における発現パターンは、ショウジョウバエと比較すると、脳背側部に複数のクラスターを形成し、雌雄差を持って存在する点では一緒であったが、クラスターの位置や数、性行動への応答性においては大きく異なっていた。この結果は、性行動を制御する高次脳領域の神経回路の一部は進化的に保存されており、*doublesex* がこれを規定しているが、昆虫間で全く同じではないことを強く示唆している。

DSX の発現



そこで次に、*doublesex* 発現神経回路を遺伝学的に操作することを目的に、TAL-PITCh 法によって *doublesex* 遺伝子座に GAL4 をノックインした系統を作成した。*doublesex* 遺伝子の 1st メチオニンの前に GAL4 をノックインした系統を作成したが、何故か脳では正常に GAL4/UAS システムが作動せず、*doublesex* 発現細胞に GFP 等の外来遺伝子を発現させることが出来なかった。しかし、この系統は、脳以外の組織では *doublesex* 発現細胞を GFP によって可視化することが可能であった。特に、*doublesex* が最もよく発現する組織である生殖腺では GFP が非常に良く発現していた。例えば、精巣において UAS-GFP.nls (核移行シグナル付 GFP) で *doublesex* 発現細胞を可視化すると、下図のように生殖細胞を取り巻くシスト細胞を可視化することが出来た。



今後、この利点を生かして生殖腺における *doublesex* 発現細胞の機能解析を進める予定である。

fruitless ノックアウト系統の表現型解析

ショウジョウバエにおいて性フェロモン情報処理や性行動に重要な神経回路を規定する遺伝子である *fruitless* のホモログ遺伝子を CRISPR/ Cas9 によってノックアウトしたカイコガ系統を樹立した。*fruitless* ノックアウトのオス蛾は性フェロモンに反応することはできるものの、十分な交尾行動を遂行できず子孫を残せないことを見出した。また、RNA-Seq 解析によって *fruitless* 遺伝子のスプライシングバリエーションの解析を行ったところ、脳特異的な転写産物があり、これが雌雄で異なったスプライシングを示すことを見出した。更に *fruitless* 遺伝子はメスの脳において多く発現しており、脳の全域に発現していることを *in situ* hybridization によって明らかにした。

カイコガ脳において性決定に関わる新規な分子機構の解析

カイコガ脳においてショウジョウバエとは異なった性決定機構があると考えられたので、新規な遺伝子のスクリーニングを RNA-Seq により行った。その結果、発現量に差のある遺伝子を複数同定したが、いずれも性行動や脳機能に関与しなそうなものばかりであった。そのため、発現量ではなくスプライシングパターンに着目してデータを再解析したところ、雌雄間でスプライシングが異なる遺伝子を複数同定した。培養細胞 (BmN4) を用いて、これらの遺伝子が雌雄差のシグナルの下流にあるかを調べた。オス化因子である *Masc* を過剰発現させると、いずれもスプライシングのパターンがメス型からオス型へと変化することが確認された。よって、これらの遺伝子はオス化シグナルの下流でスプライシングが変化する新規な遺伝子であることが分かった。

今後、これらの遺伝子のノックアウトや過剰発現などによってカイコガの性行動がどのような影響を受けるのかといったことや、脳のどこで発現しているのか、またこれらの遺伝子の発現細胞は性行動時に活動するのかといったことを調べることで、性行動における役割を明らかにすることが出来ると期待される。

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 0件）

1. 著者名 Nakata M, Kikuchi Y, Iwami M, Takayanagi-Kiya S, Kiya T.	4. 巻 129
2. 論文標題 Identification and characterization of sexually dimorphic neurons that express the sex-determining gene doublesex in the brain of silkworm <i>Bombyx mori</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Insect Biochem Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 103518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibmb.2021.103518.	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 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 國生 龍平・木矢 剛智
2. 発表標題 CRISPR-Cas13d によるカイコ内在性遺伝子のノックダウン
3. 学会等名 令和4年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野 真純・叶田 貴之・岩見 雅史・木矢 星歌・木矢 剛智
2. 発表標題 フリップアウト法によるカイコガ脳における単一細胞ラベル法の確立
3. 学会等名 令和4年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木矢 剛智
2. 発表標題 Splitシステムを利用した活動依存的神経回路ラベル法の高度化
3. 学会等名 第92回日本動物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木矢 剛智
2. 発表標題 Splitシステムを利用した活動依存的神経回路ラベル法の高度化
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國生 龍平・木矢 剛智
2. 発表標題 CRISPR-Cas13d によるカイコ内在性遺伝子のノックダウン
3. 学会等名 令和4年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野 真純・叶田 貴之・岩見 雅史・木矢 星歌・木矢 剛智
2. 発表標題 フリップアウト法によるカイコガ脳における単一細胞ラベル法の確立
3. 学会等名 令和4年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木矢 剛智
2. 発表標題 Splitシステムを利用した活動依存的神経回路ラベル法の高度化
3. 学会等名 第92回日本動物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木矢 剛智
2. 発表標題 Splitシステムを利用した活動依存的神経回路ラベル法の高度化
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野 真純, 中田 匡美, 岩見 雅史, 木矢 星歌, 木矢 剛智
2. 発表標題 カイコガにおけるfruitlessホモログ遺伝子の発現および機能解析
3. 学会等名 令和3年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木矢 剛智
2. 発表標題 メスのショウジョウバエの脳で性行動時に活動した神経回路の初期応答遺伝子を利用した可視化
3. 学会等名 第91回日本動物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木矢 剛智
2. 発表標題 メスのショウジョウバエの脳で性行動時に活動した神経回路の初期応答遺伝子を利用した可視化
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野 真純, 中田 匡美, 岩見 雅史, 木矢 星歌, 木矢 剛智
2. 発表標題 カイコガにおけるfruitlessホモログ遺伝子の発現および機能解析
3. 学会等名 令和2年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木矢 星歌, 塩谷 捺美, 西内 巧, 岩見 雅史, 木矢 剛智
2. 発表標題 新規な神経活動マーカー遺伝子stripeを利用した ショウジョウバエの神経回路の可視化と操作 による社会的文脈依存的行動の神経基盤の解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 裕果, 原 千穂, 菊地 佑介, 岩見 雅史, 木矢 剛智
2. 発表標題 カイコガの性フェロモンに応 答する神経回路の活動依 存的な可視化及び操作
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野 真純, 中田 匡美, 岩見 雅史, 木矢 星歌, 木矢 剛智
2. 発表標題 カイコガにおけるfruitless ホモログ遺伝子の発現及び 機能解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木矢 星歌, 坂本 沙紀, 岩見 雅史, 木矢 剛智
2. 発表標題 神経活動依存的に発現する遺伝子Hr38はfruitless神経回路において長期求愛記憶の形成を促進する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seika Takayanagi-Kiya, Natsumi Shioya, Takumi Nishiuchi, Masafumi Iwami, Taketoshi Kiya
2. 発表標題 Analysis of neural mechanisms of Drosophila male courtship behavior by activity-dependent visualization and manipulation of neural circuits using an immediate early gene stripe
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://kiya.w3.kanazawa-u.ac.jp/

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