

令和 6 年 4 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21414

研究課題名（和文）はばたき飛行変速ギアの神経制御

研究課題名（英文）Neuronal control of gear for flapping flight

研究代表者

並木 重宏（Namiki, Shigehiro）

東京大学・先端科学技術研究センター・准教授

研究者番号：40567757

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：飛行の制御に関わる神経回路として、飛翔神経叢、ハルテア神経叢に神経支配をもつ細胞の探索および解剖学的な分析を行った。これまでに特定されていなかった新しい種類の神経細胞を発見した。cWIN-IAは飛翔神経叢、cWIN-IBは飛翔神経叢に加えてハルテア神経叢から入力領域を持ち、双方とも飛翔神経叢の前方に出力していた。cWIN-IIは飛翔神経叢に入力領域を持ち、飛翔神経叢の後方に出力していた。形態学的な分析から、いずれの細胞種も、飛行の操縦に重要な役割をもつ間接飛翔筋(basalar muscle)への運動ニューロンmnb1とシナプス接続し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

昆虫は巧みな飛行能力を持ち、ハチをはじめとする飛行昆虫の研究は、ドローンの研究開発に大きく貢献してきました。本研究では、モデル昆虫のショウジョウバエを対象として、飛行を制御する神経回路の構造を分析しました。昆虫の神経系では、速い情報処理を行うために軸索の直径が拡大した神経細胞が使われていることがあります。今回の研究では、拡大した軸索をもつ神経細胞を、新しく3種類特定しました。それぞれ神経節の両側を接続するものであり、両半身の高速な情報伝達を担うことが予想され、飛行の制御において重要な役割を持つと考えられます。

研究成果の概要（英文）：We have explored the neuroanatomy of cells innervating the flight and the haltere neuropils which are neural circuits involved in flight control. We found new types of neurons that were not previously identified: cWIN-IA had an input area from the flight neuropil, cWIN-IB had an input area from the flight neuropil plus the haltere neuropil, and both had output regions in the anterior part of the contralateral flight neuropil. cWIN-II had an input area in the flight neuropil and, output region in the posterior part of the contralateral flight neuropil. output to the posterior part of the flight plexus. Morphological analysis suggested that both cell types had synaptic connections with motoneuron mnb1 to the indirect flight muscles (basalar muscle 1), which play an important role in flight maneuvers.

研究分野：神経行動学

キーワード：はばたき飛行 ハルテア 飛翔神経叢 ギアボックス 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

昆虫の巧みな飛行は、効率的な送粉によって植物との多様な共生関係を実現し、生物進化において最も重要な発明の一つであるといわれる。実験動物としての利点を活かし、昆虫を用いて盛んに飛行の研究が行われてきた。ドローンなどの小型無人飛行体の開発は、そのほとんどが飛行昆虫の研究に基づいている¹。自然界で動物がもつ機能については、低コストかつシンプルに実装されていることが多く、工学的にも有用なアイデアを与える可能性がある。

2. 研究の目的

昆虫の飛行を制御する仕組みを調べるため、本研究では飛行に関連する基盤として、分子遺伝学的なツールが利用できるモデル動物のキイロショウジョウバエを対象とし、飛行筋への運動ニューロンが inputs を受ける神経系の飛行神経叢・ハルテア神経叢を構成する神経回路を明らかにすることを目的とした。また将来の神経細胞機能の検証ツールとして、飛行回路の構成ニューロンを選択的に標識する組み換え系統の作出についても検討した。

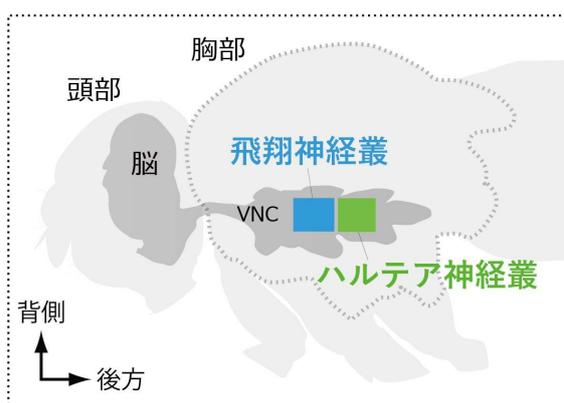


図 1. 飛行神経叢とハルテア神経叢の位置。側方から見たショウジョウバエの身体（灰色）と神経系（濃い灰色）。胸部にある腹部神経索（Ventral nerve cord, VNC）のなかで、飛行神経叢を青で、ハルテア神経叢を緑で示す。それぞれ翅とハルテア（平均棍）へと接続されている。

3. 研究の方法

解剖学 ハワードヒューズ医学研究所ジェネリアリサーチキャンパスが提供している標準的なプロトコルを用いた (<https://www.janelia.org/project-team/flylight/protocols>)。ここで簡単に説明する。3-5日齢の雌成虫の中樞神経系をS2培地（Schneider's Insect Medium, Sigma）で解剖し、パラホルムアルデヒドで固定した後、ヤギ血清ブロッキング緩衝液に移した。その後、緩衝液を0.5% Triton X-100 (PBT)を含むリン酸緩衝生理食塩水で希釈した一次抗体（マウス nc82 上清 1:30, ウサギポリクローナル抗 GFP1:1000）で置換し、4°Cで36-48時間静置した。PBTで洗浄後、次にサンプルをPBTで希釈した二次抗体（Alexa Fluor 488 ヤギ抗ウサギ, Alexa Fluor 568 ヤギ抗マウス, 1:400）とインキュベートし、4°Cで3日間静置した。その後、サンプルを洗浄し、パラホルムアルデヒドで再度固定した後、ポリ-L-リジンカバースリップにマウントし、キシレンで洗浄し、キシレンフタル酸ジブチルでスパーサー付きの標準的な顕微鏡スライドに包埋した。2日間乾燥させた後、共焦点顕微鏡（Zeiss LSM 510）を用いてサンプルを20倍および63倍で撮影した。

細胞選択的な標識系統の作出 (Split-GAL4 Intersection) 神経系の発現が異なる約9,000の GAL4 エンハンサートラップ系統の発現パターンを確認したうえで組み合わせを検討し、Split-GAL4 交差法を用いて、発現を限局した遺伝子組換え系統を作出した。この手法では、GAL4 を2つに分割した Split 系統を用意して交配する。次世代では、2つの Split 系統の発現が重複した細胞のみで GAL4 システムが有効に機能する(図2)²。GAL4 系統の細胞標識パターンのデータベースを参照し、飛行神経叢・ハルテア神経叢に神経支配を持つ細胞のみを標識し、

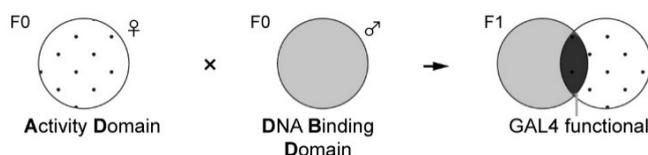


図 2. Split-GAL4 交差法の模式図。2つの親系統（AD 系統と DBD 系統）(F0) を掛け合わせ、次世代では発現が重複する細胞のみ標識される (F1)。

かつ他の発現が少ない Split 系統を探索した。

神経データの標準座標系への変換 ニューロン画像の標準座標系への変換は、先行研究を参考にした³。腹部神経索 (Ventral nerve cord, VNC) における split-GAL4 発現パターンの共焦点画像スタックを、FlyLight プロジェクトチームによって撮像されたオスの CantonS ショウジョウバエの VNC における nc82 発現パターンから得られた標準化テンプレートにアライメントした。VNC アライメントの手順は Court et al, 2020 を参考にした⁴。

4. 研究成果

まず先行研究で特定されている巨大軸索をもつハルテア介在ニューロンである Contralateral haltere interneuron を GAL4 データベースから探索し、これを用いて Split-GAL4 交差法を適用し、このニューロンを選択的に標識する組み換え系統の作出に成功した (図 3)。ひとつは細胞体と同側のハルテア神経叢に樹状突起様の分枝をもち、反対側の neck motor neuropil へと軸索を送るタイプ (contralateral haltere interneuron projecting to neck motor neuropil; n-cHIN)、もう一つは細胞体と同側のハルテア神経叢に樹状突起様の分枝を持ち、反対側の wing neuropil に軸索を送るタイプ (contralateral haltere interneuron projecting to wing neuropil; w-cHIN) で、いずれの場合もこれらの形態学的特徴は、他種を含む先行研究で報告されている contralateral haltere interneuron の形態学的特徴と一致していた^{5,6}。

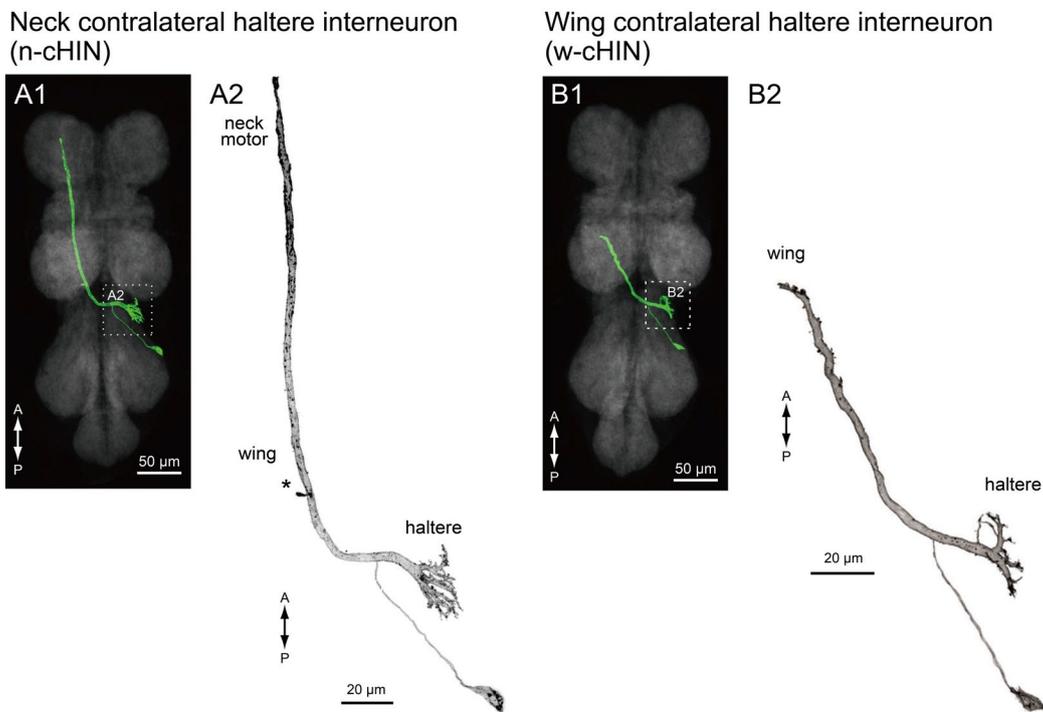


図 3. 既知の巨大介在ニューロン。A. Contralateral haltere interneuron to neck motor neuropil (n-cHIN)の神経形態 (緑) と胸部神経節の神経叢 (白) (A1) 。A2 に拡大した神経形態を示す。B. Contralateral haltere interneuron to wing neuropil (w-cHIN). B2 に拡大した神経形態を示す。

データベースを探索する過程で、巨大な軸索をもつ介在ニューロンを新たに 3 種類特定した (図 4)。一つ目は、細胞体と同側の飛行神経叢に樹状突起様の分枝をもち、反対側の飛行神経叢の前方に軸索を送るタイプで、名称を contralateral wing interneuron type-IA (cWIN-IA) とした (図 4A)。2 つ目は cWIN-IA と類似しているものの、飛行神経叢に加えて、ハルテア神経叢、神経節の中央に位置する tectulum にも樹状突起様の分枝をもち、cWIN-IA と同様、飛行神経叢の前方へ軸索を送るものであり、名称を contralateral wing interneuron type-IB (cWIN-IB) とした (図 4B)。さらに 3 つ目の細胞種として、細胞体と同側のハルテア神経叢に樹状突起様の分枝をもち、反対側の飛行神経叢の後方に軸索を送るものがあり、名称を contralateral

wing interneuron-II (cWIN-II)とした (図 4C). これらの細胞種を選択的に標識する系統の作出にも成功した.

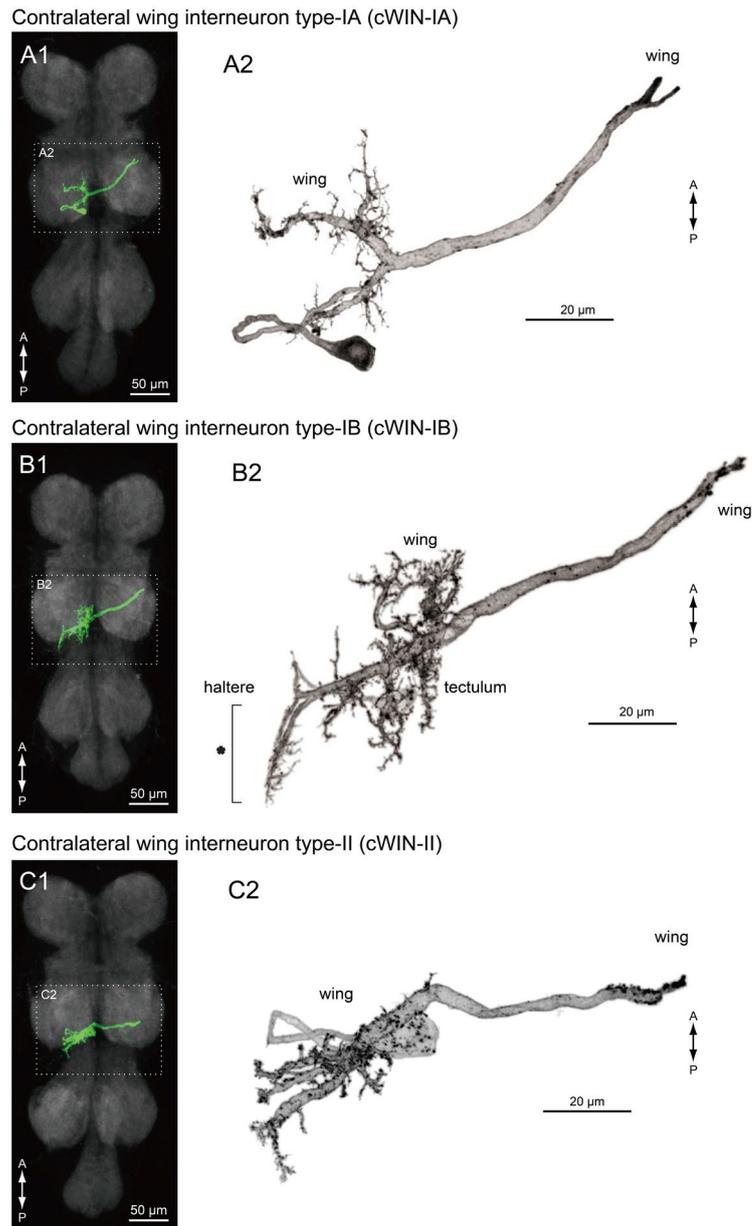


図 4. 新規に特定した巨大介在ニューロン. **A.** Contralateral wing interneuron type-IA (cWIN-IA) の神経形態 (緑) と胸部神経節の神経叢 (白) (A1) . A2 に拡大した神経形態を示す. **B.** Contralateral wing interneuron type-IB (cWIN-IB). B2 に拡大した神経形態を示す. ハルテア神経叢の神経分枝をアスタリスクで示す. **C.** Contralateral wing interneuron type-II (cWIN-II). C2 に拡大した神経形態を示す.

既知の巨大介在ニューロンは、飛行の操縦に重要な役割をもつ関節飛行筋 basalar muscle に投射する運動ニューロン mnb1 に接続していることが知られている⁶. 本研究で新規に同定した 3 つ細胞種についても mnb1 への接続関係を検証した. mnb1 の樹状突起は 3 つの分枝, 正中線をまたぐ Contralateral branch (CB), 後方に分布する Posterior branch (PB), 側方に分布する Lateral branch (LB) に分けることができる (図 5A). 標準座標系において, mnb1 と巨大介在ニューロンの神経分布を評価した (図 5B). w-cHIN の軸索様分布は mnb1 の CB に, cWIN-IA, IB については LB に, cWIN-II については PB に近接していた. 以上から, 異なる巨大介在ニューロンの情報が, 運動ニューロン mnb1 の異なる樹状突起領域に出力されることが示唆された.

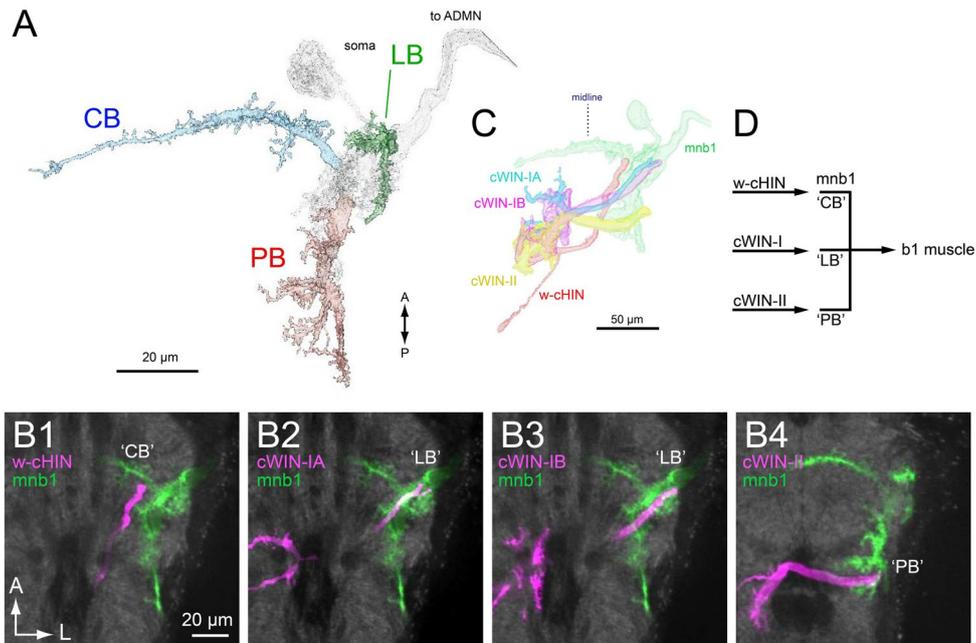


図5. 巨大介在ニューロンから運動ニューロンへの接続関係. A. *mnb1* 運動ニューロンの神経形態の3次元再構築像. 主要な3つの樹状突起をカラーで示す. Contralateral branch (CB) を青, Lateral branch (LB) を緑, Posterior branch (PB) を赤で示す. B. 標準座標系における巨大介在神経 (マゼンタ) と *mnb1* 運動ニューロン (緑). Wing contralateral haltere neuron (w-cHIN) (B1), contralateral wing interneuron IA (cWIN-IA) (B2), contralateral wing interneuron IB (cWIN-IB) (B3), contralateral wing interneuron II (cWIN-II) (B4). C. 標準座標系のデータを用いた5種神経細胞の3次元再構築像 (赤, w-cHIN; 青, cWIN-IA; マゼンタ, cWIN-IB; 黄色, cWIN-II; 緑, *mnb1*). D. 巨大介在ニューロンから *mnb1* 運動ニューロンへの接続関係の模式図. それぞれ別の樹状突起に出力している.

本研究では、昆虫の飛行を制御する回路である飛翔神経叢、ハルテア神経叢において拡大した軸索を持つ特徴的な細胞を新たに同定した。拡大した軸索を持つ神経細胞の存在は、昆虫種間でも様式が異なり、生態学的な意義を大きく反映していると考えられる。軸索拡大の顕著な例としては、双翅目昆虫の逃避行動に関わる神経細胞として、Giant fiber が知られている。無信号を伝える速度を高める手段として、脊椎動物でみられる跳躍伝導を用いる代わりに、軸索径の拡大を戦略として用いている。Giant fiber の場合は、逃避行動のための信号を迅速に伝えるための適応であると考えられている。飛行回路における巨大介在ニューロンについては、飛行の制御に関する速い情報処理の必要性を反映した適応である可能性がある。今回 Split-GAL4 を用いて作出した選択的な系統を使った巨大介在ニューロンの選択的な制御により、機能を検証することができる。

参考文献

1. Floreano, D. & Wood, R. J. Science, technology and the future of small autonomous drones. *Nature* **521**, 460–466 (2015).
2. Luan, H., Peabody, N. C., Vinson, C. R. & White, B. H. Refined spatial manipulation of neuronal function by combinatorial restriction of transgene expression. *Neuron* **52**, 425–436 (2006).
3. Namiki, S., Dickinson, M. H., Wong, A. M., Korff, W. & Card, G. M. The functional organization of descending sensory-motor pathways in *Drosophila*. *Elife* **7**, (2018).
4. Court, R. *et al.* A Systematic Nomenclature for the *Drosophila* Ventral Nerve Cord. *Neuron* **107**, 1071–1079.e2 (2020).
5. Strausfeld, N. J. & Seyan, H. S. Convergence of visual, haltere, and prosternal inputs at neck motor neurons of *Calliphora erythrocephala*. *Cell Tissue Res.* **240**, 601–615 (1985).
6. Trimarchi, J. R. & Murphey, R. K. The shaking-B2 mutation disrupts electrical synapses in a flight circuit in adult *Drosophila*. *J. Neurosci.* **17**, 4700–4710 (1997).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 9件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Dombrovski Mark, Peek Martin Y., Park Jin-Yong, Vaccari Andrea, Sumathipala Marissa, Morrow Carmen, Breads Patrick, Zhao Arthur, Kurmangaliyev Yerbol Z., Sanfilippo Piero, Rehan Aadil, Polsky Jason, Alghailani Shada, Tenshaw Emily, Namiki Shigehiro, Zipursky S. Lawrence, Card Gwyneth M.	4. 巻 613
2. 論文標題 Synaptic gradients transform object location to action	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 534 ~ 542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05562-8	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 Meissner Geoffrey W, Nern Aljoscha, Dorman Zachary, DePasquale Gina et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 A searchable image resource of Drosophila GAL4 driver expression patterns with single neuron resolution	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.80660	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 Namiki Shigehiro, Ros Ivo G., Morrow Carmen, Rowell William J., Card Gwyneth M., Korff Wyatt, Dickinson Michael H.	4. 巻 32
2. 論文標題 A population of descending neurons that regulates the flight motor of Drosophila	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1189 ~ 1196.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2022.01.008	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 Court R, Namiki S, Armstrong D, Borner J, Card G, Costa M, Dickinson MH, Duch C, Korff W, Mann R, Merritt D, Murphey R, Seeds A, Shirangi T, Simpson J, Truman J, Tuthill J, Williams D, Shepherd D	4. 巻 107
2. 論文標題 A Systematic Nomenclature for the Drosophila Ventral Nerve Cord.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 1071-1079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuron.2020.08.005	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 該当する

1. 著者名 Huoviala P, Dolan MJ, Love FM, Myers P, Frechter S, Namiki S, Pettersson L, Roberts RJV, Turnbull R, Mitrevica Z, Breads P, Schlegel P, Bates AS, Rodrigues T, Aso Y, Bock D, Rubin GM, Stensmyr M, Card G, Costa M, Jefferis GSXE	4. 巻 394403
2. 論文標題 Neural circuit basis of aversive odour processing in Drosophila from sensory input to descending output	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/394403	査読の有無 無
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 Gorko Benjamin, Siwanowicz Igor, Close Kari, Christoforou Christina, Hibbard Karen L., Kabra Mayank, Lee Allen, Park Jin-Yong, Li Si Ying, Chen Alex B., Namiki Shigehiro, Chen Chenghao, Tuthill John C., Bock Davi D., Rouault Hervé, Branson Kristin, Ihrke Gudrun, Huston Stephen J.	4. 巻 628
2. 論文標題 Motor neurons generate pose-targeted movements via proprioceptive sculpting	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 596 ~ 603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-024-07222-5	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 該当する

1. 著者名 Meissner Geoffrey W, Nern Aljoscha, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 A searchable image resource of Drosophila GAL4 driver expression patterns with single neuron resolution	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.80660	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 Cheong H. S. J., Eichler K., St?rner T., Asinof S. K., Champion A. S., Marin E. C., Oram T. B., Sumathipala M., Venkatasubramanian L., Namiki S., Siwanowicz I., Costa M., Berg S., Janelia FlyEM Project Team, Jefferis G. S. X. E., Card G. M.	4. 巻 2024
2. 論文標題 Transforming descending input into behavior: The organization of premotor circuits in the Drosophila Male Adult Nerve Cord connectome	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.96084.1	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 Ehrhardt Erica, Whitehead Samuel C, Namiki Shigehiro, Minegishi Ryo, Siwanowicz Igor, Feng Kai, Otsuna Hideo, Meissner Geoffrey W, Stern David, Truman Jim, Shepherd David, Dickinson Michael H., Ito Kei, Dickson Barry J, Cohen Itai, Card Gwyneth M, Korff Wyatt, FlyLight Project Team	4. 巻 2023
2. 論文標題 Single-cell type analysis of wing premotor circuits in the ventral nerve cord of <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.05.31.542897	査読の有無 無
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1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 並木重宏
2. 発表標題 ハエの飛行を司令する神経細胞の探索
3. 学会等名 第42回エアロ・アクアバイオメカニズム定例講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------