

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06264

研究課題名（和文）環境依存的に逃避行動を調節する神経生理メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of neurophysiological mechanisms that regulate escape behavior in an environment-dependent manner

研究代表者

碓井 理夫（Usui, Tadao）

京都大学・生命科学研究科・講師

研究者番号：10324708

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）：Beroタンパク質がABLKニューロンの自発的かつ持続的な神経活動（カルシウム振動）の形成に必須であることを見出すとともに、このCa<sup>2+</sup>振動がABLKニューロンの侵害覚応答に拮抗的に作用することを発見した。これは、侵害覚入力以外の感覚入力が侵害覚入力と統合されていることを強く示唆するものであった。この成果は、国際学術誌*eLife*に論文発表した（Li et al., 2023）。ABLKニューロンに発現する神経ペプチド受容体がBeroと機能的に相互作用することを発見した。さらに、さまざまな環境ストレスに応じてABLKニューロンの神経活動が変動することを発見しており、現在も検証をすすめている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で得られた成果は、動物の生存戦略の「かなめ」である捕食者からの回避行動について、これまで知られていなかった神経調節メカニズムを明らかにしたことである。従来は、捕食回避行動は定型的であり、調節される余地はあまりないと考えられてきた。しかし、本研究により、自然に存在する遺伝的な因子（bero遺伝子の多型）により捕食回避行動の迅速性が多様化していることが明らかになった。これに加えて、調節神経回路の動態が、さまざまな環境要因によっても変動することがわかってきた。回避行動は痛覚により起動されるため、本研究課題の成果は、ヒトの疼痛緩和療法を改善するための有用な情報を与えると期待できる。

研究成果の概要（英文）： We found that the Bero protein is essential for the formation of spontaneous and sustained neural activity (Ca<sup>2+</sup> oscillations) of ABLK neurons, and that these Ca<sup>2+</sup> oscillations antagonize the nociceptive response of ABLK neurons. This strongly suggested that sensory inputs other than nociceptive inputs were integrated with nociceptive inputs. In a paper published in the international journal *eLife* (Li et al., 2023), we found that neuropeptide receptors expressed in ABLK neurons functionally interact with Bero protein. We also found that the neuronal activity of ABLK neurons fluctuates in response to various environmental stresses, which is still being verified.

研究分野：神経行動学

キーワード：捕食回避行動 感覚ゲーティング 疼痛緩和療法 カルシウムイメージング ショウジョウバエ 神経ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

動物が、捕食者の襲撃などの危機的状況を臨機応変に回避する行動(捕食回避行動)は、個体の生存に直結するきわめて重要な本能行動である。申請者はショウジョウバエ幼虫をモデル系にして、一次痛覚ニューロンの発火パターンが個体の捕食回避行動を制御する生理メカニズムの解明に取り組んできた(Terada et al., 2016; Onodera et al., 2017)。その研究の過程で、遺伝的背景の異なる複数の野生型系統の示す捕食回避行動が、非常に異なる応答特性を示すことに気付いた。とくに、刺激付与時から捕食回避行動を開始するまでの潜時が、1~10秒にもおよび幅にわたる多様性を示した。

そこで研究代表者は、「逃避行動を調節する遺伝的・環境依存的な調節機構は何か？」に興味を持ち、これを解明するための研究を進めてきた。いったん遺伝的な調節機構を明らかにできれば、それを起点にして環境依存的な行動調節機構にも迫れるのではないかと期待し、以下の一連の解析を行った。まずゲノム配列が既知の野生型 38 系統 (*Drosophila* Genetic Reference Panel, DGRP; Mackay et al., 2012) について、各系統の捕食回避行動の迅速性を計測した。続いて、逃避行動の迅速性と統計的に有意に相関する一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) をゲノムワイドに探索し、責任 SNP を特定し、それを含む遺伝子として複数責任遺伝子候補群を同定した。続いて、個々の候補遺伝子を全ニューロンでノックダウンし、捕食回避行動の迅速性を評価した。その結果、機能未知の GPI アンカー型タンパク質をコードする *CG9336/belly roll(bero)* 遺伝子の機能阻害により捕食回避行動が促進されることを発見した。これは、通常条件下では *bero* 遺伝子が捕食回避行動を抑制していることを示す。Bero タンパク質の類縁タンパク質である Sleepless タンパク質の先行研究から、Bero タンパク質は何らかの受容体タンパク質やイオンチャンネルタンパク質の活性調節因子であると推定された。

## 2. 研究の目的

はじめに、「動物が、捕食回避行動パターンを、環境条件に即して巧妙に調節する遺伝的・環境依存的な調節メカニズムは何か？そして、その調節メカニズムの中で *bero* 遺伝子ならびにその遺伝子産物が、どのような機序で捕食回避行動を抑制しているのか？」を本研究課題の学術的な「問い」と設定した。そして、本研究の目的は、「*bero* 発現ニューロンに注目してショウジョウバエ幼虫の逃避行動を調節する遺伝的・環境依存的な調節メカニズムをささえる神経回路基盤と Bero タンパク質による未知のチャンネル制御機構を探索し理解すること」であった。

Bero タンパク質には脊椎動物ホモログ (*Lynx1* を含む *Ly6* タンパク質群) が多数存在している。したがって、ショウジョウバエをモデルに研究することで得られる成果は、ヒトを含む脊椎動物の神経回路が同様の行動調節を支配する神経メカニズムを理解することにも繋がる可能性が高い。こうした理解が深まれば、疼痛緩和治療の新しい方法論の創出に発展する可能性もあり、ヒトの生活の質向上に資する可能性があるかと期待された。

## 3. 研究の方法

本研究計画では、3年間の研究計画で、以下の3つの研究課題 [A]~[C]に取り組んだ。

研究計画[A] ABLK ニューロンによる栄養依存的な逃避行動の調節機構の解析

【2021~22 上年度】

研究代表者はこれまでに、*bero* 遺伝子がショウジョウバエ幼虫中枢神経系にある7対のニューロンである腹部ロイコキニン産生ニューロン (ABLK ニューロン) の自発的な持続神経活動を昂進することを示した。この観察は、ABLK ニューロンの神経活動が捕食回避行動を抑制的に調節することを示唆していた。そこで、ABLK ニューロンの神経活動を内向き整流性 K<sup>+</sup>チャンネルの強制発現によって慢性的に抑制することで、捕食回避行動が亢進するかのうかを検証するとともに、光遺伝学ツールである光活性化型塩化物イオンチャンネル GtACR による一過性の神経活動抑制により、捕食回避行動が抑制されるかどうかを検証した。並行して、さまざまな環境ストレス下で神経活動が変動するかどうか、Ca<sup>2+</sup>イメージングにより調査した。

研究計画[B] GPB5 ニューロンによる環境温度依存的な逃避行動の調節機構の解析

【2021 下~22 年度】

研究代表者はこれまでの予備的な実験から、*bero* 遺伝子がショウジョウバエ幼虫 GPB5 ニューロンの一過的 Ca<sup>2+</sup>レベル低下を抑制することを示した。この観察は、GPB5 ニューロンの神経活動が低下することが逃避行動を促進することを示唆する。そこで、GPB5 ニューロンの神経活動

を低閾値型 Na<sup>+</sup>チャネルの強制発現により慢性的に昂進させることで、捕食回避行動が抑制されるかどうか検証した。これと並行して、過去の自身の研究で豊富な実績をもつ、赤外線レーザーの局所照射による単一細胞加温系を利用して (Terada et al., 2016; Onodera et al., 2017) GPB5 ニューロンがもつ内受容細胞としての温度応答特性を検証することを目指す。

#### 研究計画[C] Bero タンパク質の標的分子の同定と神経活動調節機構の理解

【2021 下～23 年度】

Bero タンパク質の生理活性は未知である。Bero タンパク質が GPI アンカー型タンパク質であることから、何らかの膜タンパク質 (受容体タンパク質やイオンチャネルタンパク質など) と協調的に機能することで、神経活動を調節していると考えられた。そこで、各ニューロンにおいて、Bero タンパク質の標的となる膜タンパク質を網羅的に探索して同定することを目指す。具体的には、神経活動の興奮や抑制に関与する既知の受容体タンパク質やイオンチャネルタンパク質に注目し、すでに公開されているシングルセル RNA シーケンス解析データを利用した探索をすすめること目指した。

## 4 . 研究成果

研究計画[A]については、Bero タンパク質が ABLK ニューロンの自発的かつ持続的な神経活動 (カルシウム振動) の形成に必須であることを見出すとともに、このカルシウム振動が ABLK ニューロンの侵害覚応答に抑制的に作用すること (細胞内自己活動抑制現象) を発見した。これは、侵害覚入力とは異なる何らかの感覚入力、侵害覚入力と情報統合されていることを強く示唆するものであった。この研究成果は、国際学術誌 *eLife* に査読付き論文として発表した (Li et al., 2023)。

研究計画[B]については、GPB5 ニューロンでは Bero タンパク質により、神経活動レベルが上昇すること (侵害覚入力による負の応答の下り幅が縮小すること) を強く示唆する解析結果を得ている。カルシウム活動を観察するだけでは応答の絶対値を知ることは困難なため、神経活動のベースラインが変動しているかどうかは不明のままである。そこで、現在、ホールセルパッチクランプ法などの電気生理学的手法を組み合わせた解析を試行中である。

研究計画[C]については、ショウジョウバエ幼虫の中枢神経系を対象にしたシングルセル RNA シーケンス解析の公開データを再解析することにより、ABLK ニューロンに発現する様々な膜タンパク質を同定している。その内、ある神経ペプチド受容体タンパク質が Bero と物理化学的および機能的に相互作用することを発見している。このタンパク質をコードする遺伝子をノックダウンすると、*bero* ノックダウンと同様に ABLK ニューロンの自発的かつ持続的な神経活動が有意に減弱する。このことから、この膜タンパク質が、Bero タンパク質のパートナー分子である可能性が高いと考えている。現在、これを *in vitro* 再構成系を用いて検証するための準備を進めているところである。

これに加えて、さまざまな環境ストレスに応じて ABLK ニューロンの神経活動が変動することを発見しており、検証をすすめている。現在、原著論文発表に向けて準備中である。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yasutetsu Kanaoka, Koun Onodera, Kaori Watanabe, Yusaku Hayashi, Tadao Usui, Tadashi Uemura, Yukako Hattori	4. 巻 12
2. 論文標題 Inter-organ Wingless/Ror/Akt signaling regulates nutrient-dependent hyperarborization of somatosensory neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.79461	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 -

1. 著者名 Shuangyu Luo, Kanji Furuya, Kimiya Matsuda, Yuma Tsukasa, Tadao Usui, Tadashi Uemura	4. 巻 28
2. 論文標題 E-cadherin-dependent coordinated epithelial rotation on a two-dimensional discoidal pattern	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13001	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 -

1. 著者名 Li Kai, Tsukasa Yuma, Kurio Misato, Maeta Kaho, Tsumadori Akimitsu, Baba Shumpei, Nishimura Risa, Murakami Akira, Onodera Koun, Morimoto Takako, Uemura Tadashi, Usui Tadao	4. 巻 12
2. 論文標題 Belly roll, a GPI-anchored Ly6 protein, regulates Drosophila melanogaster escape behaviors by modulating the excitability of nociceptive peptidergic interneurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.83856	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7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yuma Tsukasa, Misato Kurio, Kaho Maeta, Kai Li, Tadashi Uemura and Tadao Usui
2. 発表標題 Hemolymph osmolality gates nociceptive transmission via atypical GPCR signaling
3. 学会等名 Asia Pacific Drosophila Neurobiology Conference 3（国際学会）
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Yuma Tsukasa, Misato Kurio, Kaho Maeta, Kai Li, Tadashi Uemura and Tadao Usui
2. 発表標題 Fluid osmolality gates nociceptive escape behaviors in Drosophila larvae
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Yuma Tsukasa, Misato Kurio, Kaho Maeta, Kai Li, Tadashi Uemura and Tadao Usui
2. 発表標題 Hemolymph osmolality gates nociceptive transmission via atypical GPCR signaling
3. 学会等名 The 20th Biostudies Student Symposium
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Yuma Tsukasa, Kai Li, Misato Kurio, Kaho Maeta, Akimitsu Tsumadori, Shumpei Baba, Risa Nishimura, Koun Onodera, Takako Morimoto, Tadashi Uemura, Tadao Usui
2. 発表標題 The novel Ly6/ -Neurotoxin family protein, Belly roll, regulates the nociceptive transmission in response to the fluid osmolality
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 (NEURO2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Yuma Tsukasa, Kai Li, Misato Kurio, Kaho Maeta, Akimitsu Tsumadori, Shumpei Baba, Risa Nishimura, Koun Onodera, Takako Morimoto, Tadashi Uemura, Tadao Usui
2. 発表標題 The internal state-dependent modulation of the nociceptive transmission
3. 学会等名 第15回日本ショウジョウバエ研究集会 (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Tadao Usui
2. 発表標題 Elucidation of the internal state-dependent modulation of the nociceptive escape behavior
3. 学会等名 Neurogenetics of the Drosophila larva (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Tadao Usui
2. 発表標題 Elucidation of the internal state-dependent modulation of the nociceptive escape behavior
3. 学会等名 International Symposium on Development and Plasticity of Neural System (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>逃避行動が遺伝要因や環境要因により調節されるメカニズムの理解  <a href="https://www.cellpattern.lif.kyoto-u.ac.jp/research/research-usui/">https://www.cellpattern.lif.kyoto-u.ac.jp/research/research-usui/</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
---------	---------