

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500380

研究課題名(和文) キイロショウジョウバエの求愛行動の基盤となる機能的神経回路網の同定

研究課題名(英文) Identification of functional neural networks underlying courtship behavior in *Drosophila melanogaster*.

研究代表者

鳥羽 岳太 (Toba, Gakuta)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：40599669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、キイロショウジョウバエの求愛行動の基盤となる神経回路網を同定する目的で、中枢神経系内のシナプス接続を可視化する新規GRASPシステムの開発を行った。GRASPの2種類の分割GFPにそれぞれ別の細胞マーカーを付加し、それぞれの分割GFP発現神経細胞を可視化できるようにした。部位特異的組換え酵素の働きによって、別々の神経細胞に分割GFPを発現させるシステムを完成させた。現在、このシステムを用い、求愛行動の基盤となる神経回路網の同定に向け研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a novel GRASP system that visualizes synaptic connections in the central nervous system in order to identify neural networks underlying courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. Distinct cell markers were added to the two parts of the split GFP (spGFP) in the GRASP, so that the shape of neurons that express spGFPs can be visualized. We developed a novel expression system for GRASP in which the two spGFPs are expressed in different neurons by the action of a site-specific recombinase. We are currently trying to identify the neural networks underlying courtship behavior using the novel GRASP system.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経回路 行動 キイロショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

脳の高次機能の神経基盤、分子基盤の解明は脳神経科学の主要な課題であるが、その多くは未知のままである。高度な生理学的解析や操作が可能なモデル動物内に、解析の容易な系として、高次機能を内包する神経回路網を同定することにより、脳の高次機能実現の背後にある情報処理メカニズムに迫れる可能性がある。そのようなモデル動物の一つ、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の雄の求愛行動は、定型的な生得行動でありながら、求愛対象の認識、行動を起こすか否かの意思決定^[1]、経験に基づく行動の可塑的修飾^[2]といった脳の高次機能を必要とする要素を含んでいる。

キイロショウジョウバエの雄の求愛行動は、神経系の性決定遺伝子である *fruitless* (*fru*) の雄特異的産物が発現する神経細胞 (Fru+細胞) によって主に制御されていることが知られている^[3]。したがって求愛行動の基盤となる神経回路網は、Fru+細胞とそれらに接続する神経細胞によって形作られていると考えられる。Fru+細胞は末梢神経系、中枢神経系合わせて約 1,000 あり、その解剖学的位置と形態については詳細な研究が進められている。しかし、Fru+細胞相互、あるいは他の神経細胞との機能的接続の解明については、適当な解析手段が存在しなかったこともあり、未だ手つかずの段階であった。

2. 研究の目的

Fru+細胞を中心とする神経細胞接続を解析することによって、求愛行動の基盤となる神経回路網を明らかにできる可能性があることは以前から認識されていたが、神経細胞が密集した中枢神経系内においてシナプス接続を効率よく検出する手段がこれまで存在していなかった。近年、二つに分割された緑色蛍光タンパク質 (split GFP, spGFP) の再構成による蛍光を指標としてシナプス接続を可視化する遺伝学的ツール (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners, GRASP)^[4]と、従来の GAL4-UAS システム^[5]とは独立に単一細胞に任意の遺伝子を発現させることができるツール^[6]が開発され、これらを組み合わせることによって Fru+細胞相互、あるいは他の神経細胞とのシナプス接続を可視化できる可能性に気がつき、本研究の着想に至った。

本研究では、GRASP を用いて Fru+細胞と、それらに接続する神経細胞のシナプス接続の網羅的マップを作成し、求愛行動の基盤となる神経回路網を解剖学的に同定する。同定された神経回路のうち興味深い回路については、関与する神経細胞の個別的活性化/不活性化、あるいは神経活動イメージングによっ

て、求愛行動における生理学的機能の同定を行う。以上により、感覚情報の入力から情報処理を経て行動の出力に至る機能的神経回路網を解剖学的、生理学的に明らかにするとともに、脳の高次機能研究の場としての新たな系の確立を目指す。

3. 研究の方法

GRASP では、2 つに分割した GFP の断片 (spGFP1-10 と spGFP11) を、どちらも細胞膜結合タンパク質との融合タンパク質として、それぞれ異なった神経細胞に発現させる。生産された分割 GFP は、どちらの断片も細胞膜結合タンパク質によって細胞膜に繋ぎ止められた状態で細胞外に存在する。異なった断片を発現する神経細胞同士がシナプスを形成している場合、シナプスにおいて両者の細胞膜が十分に近接し、細胞膜上の分割 GFP 断片同士が組み合わさって機能的 GFP が再構成され、励起光によって蛍光を発する^[4] (図 1)。

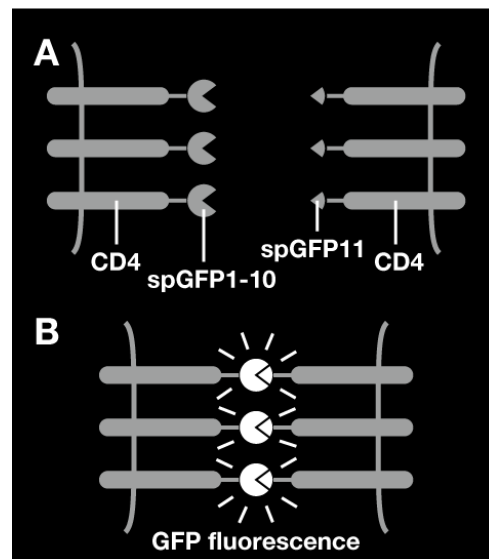


図 1. GRASP の原理。分割 GFP の断片を細胞膜結合タンパク質と融合させて、別々の神経細胞に発現させる (A)。シナプスにおいて GFP の再構成が起こり、蛍光を発する (B)。

GRASP の分割 GFP のそれぞれを特定の神経細胞群に発現させるため、本研究開始当初は、GAL4-UAS システム^[5]と Q システム^[6]を用いる計画であった。しかし、その後、単一トランスジーン内の構造変化によってどちらか一方の分割 GFP が発現されるメカニズムを着想し、分割 GFP の相互排他的発現を実現するためには後者の方が優れていると考えられたため、そちらの方法を採用した。組換えにより分割 GFP を発現する GRASP トランスジーンと、組換えを誘導する部位特異的組換え酵素発現トランスジーンを構築、導入し、求愛

行動の基盤となる神経回路網の同定を目指した。

4. 研究成果

新規 GRASP システムを構築するにあたり、細胞マーカーを付加した改良型 GRASP 遺伝子を作製した。この改良により、それぞれの神経細胞の形態を免疫染色により可視化することが可能となる。改良型 GRASP 遺伝子を GAL4-UAS システム^[5]と LexA-LexAop システム^[7]でキロショウジョウバエの嗅覚系神経細胞に発現させ、細胞マーカーと GFP に対する免疫染色を行ったところ、spGFP11 を発現する嗅覚受容神経細胞、spGFP1-10 を発現する二次投射神経細胞、両者の間のシナプス接続による GRASP シグナルの三者を同時に可視化することができた(図2)。

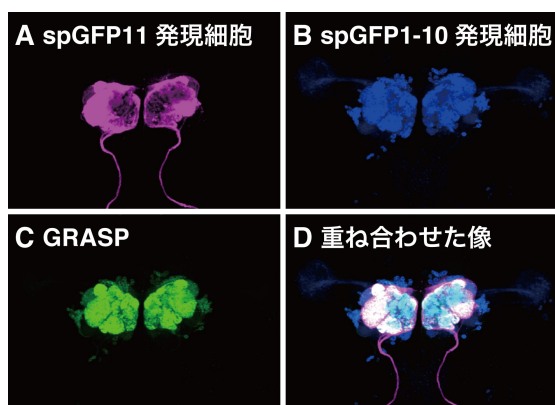


図2. 細胞マーカーを付加した改良型 GRASP。(A) spGFP11 を発現する嗅覚受容神経細胞の形態。(B) spGFP1-10 を発現する二次投射神経細胞の形態。(C) GRASP により可視化された触角葉での両者のシナプス接続。(D) 重ね合わせた画像。

次に、部位特異的組換え酵素の働きによって、別々の神経細胞に GRASP の 2 種類の spGFP を発現させるトランスジーンを設計、構築した。使用する組換え酵素と構造の違う 2 タイプの GRASP トランスジーン、Rec-GRASP1 と Rec-GRASP2 を作製した。これらの GRASP トランスジーンを持ったトランスジェニックショウジョウバエを作製し、部位特異的組換え酵素発現トランスジーンと組み合わせ、設計通りに動作するかどうかの試験を行った。

Rec-GRASP1 については、組換え酵素の発現は確認できたものの、それに反応して起こるはずの spGFP の発現が確認できず、現在、その原因の究明と対策を進めているところである。Rec-GRASP2 では、設計通り部位特異的組換え酵素の発現に反応して 2 種類の spGFP が発現し、神経細胞間のシナプス接続が GFP 蛍光でラベルされることが確認された(図3)。ただし、組換え酵素の発現レベルが高いと、両 spGFP が共発現してしまう場合も観察された。

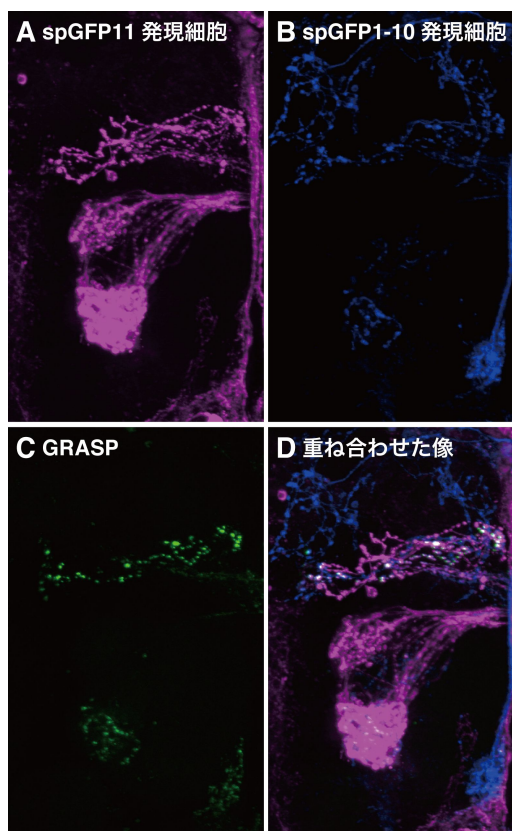


図3. 新規発現システムによる GRASP。(A) spGFP11 を発現する神経細胞の形態。(B) spGFP1-10 を発現する神経細胞の形態。(C) GRASP により可視化されたシナプス接続。(D) 重ね合わせた画像。

本研究により開発された新規 GRASP システムは、汎用性の高いものであり、新規技術を今後研究コミュニティに提供できる点において、本研究成果の意義は大きいと考えられる。本研究を発展させる形で、現在、機能的神経回路網の同定に向けて引き続き研究を進めている。

引用文献

- [1] Dickson (2008) Science 322:904-909.
- [2] Griffith & Ejima (2009) Learn Mem 16:743-750.
- [3] Yamamoto (2008) J Neurogenet 15:1-24.
- [4] Feinberg et al (2008) Neuron 57:353-363.
- [5] Brand & Perrimon (1993) Development 118:401-415.
- [6] Potter et al (2010) Cell 141:536-548.
- [7] Lai & Lee (2006) Nat Neurosci 9: 703-709.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

- (1) 渡邊可奈子、鳥羽岳太、小金澤雅之、山元大輔

Gr39a, a highly diversified gustatory receptor in *Drosophila*, has a role in sexual behavior.
Behavior Genetics、査読有、41 巻、2011 年、746-753
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10519-011-9461-6>

〔学会発表〕(計 9 件)

(1) 田中良弥、鳥羽岳太、山元大輔
Drosophila 属非モデル種における CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集
日本蚕糸学会第 84 回大会
2014 年 3 月 10-11 日、日本大学生物資源科学部本館、藤沢市

(2) 鳥羽岳太、山元大輔
細胞マーカーと組換え発現系を導入したショウジョウバエの改良型 GRASP
第 36 回日本分子生物学会年会
2013 年 12 月 3-6 日、神戸ポートアイランド、神戸市

(3) 鳥羽岳太、山元大輔
Improved GRASP with cell markers and recombination-based expression systems
コールドスプリングハーバー研究所ショウジョウバエ神経生物学集會
2013 年 10 月 1-5 日、コールドスプリングハーバー研究所、コールドスプリングハーバー、米国

(4) 佐藤耕世、鳥羽岳太、伊藤弘樹、小金澤雅之、山元大輔
Sex-specific functions of *longitudinals lacking*
コールドスプリングハーバー研究所ショウジョウバエ神経生物学集會
2013 年 10 月 1-5 日、コールドスプリングハーバー研究所、コールドスプリングハーバー、米国

(5) Yilmazer, Yasemin、鳥羽岳太、山元大輔
Characterization of *platonica*, a *Drosophila* mutant defective in copulation
第 2 回アジア太平洋ショウジョウバエ研究会議
2013 年 5 月 13-16 日、ソウル大学校、ソウル、韓国

(6) Biyik, Yasemin、鳥羽岳太、山元大輔
Molecular identification of the responsible gene for the *Drosophila* behavioral mutant *platonica*
第 35 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 11-14 日、福岡国際会議場、福岡市

(7) 佐藤耕世、鳥羽岳太、伊藤弘樹、小金澤

雅之、山元大輔
longitudinals lacking cooperates with *fruitless* in generating sexual differences in neuronal structures and behavior
「Everything you ever wanted to know about sex」ワークショップ
2012 年 3 月 10 日、シェラトンシカゴホテル & タワーズ、シカゴ、米国

(8) 佐藤耕世、鳥羽岳太、伊藤弘樹、小金澤雅之、山元大輔
longitudinals lacking cooperates with *fruitless* in generating sexual differences in neuronal structures and behavior
第 53 回ショウジョウバエ研究会議
2012 年 3 月 7-11 日、シェラトンシカゴホテル & タワーズ、シカゴ、米国

(9) 鳥羽岳太、山元大輔
ショウジョウバエ神経系性決定因子 *Fruitless* のリン酸化、多量体化、及び発現
第 34 回日本神経科学大会
2011 年 9 月 14-17 日、パシフィコ横浜、横浜市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
鳥羽 岳太 (TOBA, GAKUTA)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号: 40599669

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
山元 大輔 (YAMAMOTO, DAISUKE)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号: 50318812