

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370031

研究課題名(和文) マルチスケール分析を用いた脳内環境変化による本能行動修飾の神経機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of neural mechanisms underlying modification of instinct behavior by internal brain state changes by multi-scale analysis of the silkworm brain

研究代表者

神崎 亮平 (Kanzaki, Ryohei)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：40221907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳内環境が行動を修飾する神経機構の理解のために、カイコガのフェロモン情報処理系を対象に、神経修飾物質セロトニンに関する解析を行った。セロトニン合成酵素遺伝子のプロモータを利用し、フェロモン情報処理の前運動中枢である側副葉に分枝するセロトニン分泌細胞を標識した遺伝子組換え系統を得た。本システムを利用した、光遺伝学的手法によるセロトニン作用機構の解析の要素技術として、生体を局所的に光刺激が可能なシステムを構築した。並行して、新たなフェロモン情報処理機構として、触角葉において、フェロモンの絶対濃度情報が、過去に受けた匂いに対する相対濃度情報に変換され高次へ出力されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To understand neural mechanisms underlying how internal brain state modulates animal behaviors, we focused on serotonergic modulation in pheromone processing system of the silkworm *Bombyx mori*. We generated transgenic silkworm lines that were designed to express a transgene under the upstream sequence of a tryptophan hydroxylase gene that encodes an enzyme involved in serotonin biosynthesis. One of the lines labeled serotonergic neurons innervating the lateral accessory lobe, a premotor center for pheromone-source searching behavior. For functional analysis of these neurons by optogenetic approaches, we established a light emission system to locally stimulate biological tissues. We also found a previously unrecognized transformation of pheromone concentration information that indicates the antennal lobe encodes odorant concentration changes rather than absolute concentration in pulse trains of pheromone stimuli.

研究分野：神経行動学

キーワード：神経行動 昆虫 脳 行動修飾

## 1. 研究開始当初の背景

これまで脳内環境による行動の修飾機構の解析は複数の昆虫種を用いて国内外で盛んに行われて、神経修飾物質の脳内変動と行動修飾との間に相関があることが報告されている<sup>(1-3)</sup>。しかし、これらの研究の多くは脳の一部の領域への作用に限定され、神経修飾物質と行動との相関は示されてはいるものの、行動の修飾にいたる神経回路の特性の変化までをシステムティックに記述した例はほとんどない。その要因として対象とする行動発現を生成する基本回路の理解自体が十分ではないことがあげられる。

このような状況下で、代表者らはオスカイコガの匂い源定位行動を生成する脳内情報処理系を対象として、感覚入力から行動出力にいたる全基本回路を明らかにしてきた。そして、この行動発現の感度(行動閾値)が概日リズムやフェロモン受容の経験(慣れ)によって変動すること、そして、さまざまな神経修飾物質の中でも生体アミンの1つであるセロトニンの脳内濃度が行動閾値と顕著に相関することを見出した<sup>(4)</sup>。また神経回路レベルでは、セロトニン投与により嗅覚系一次中枢である触角葉の構成神経群の活動が増強されることを明らかにした<sup>(5)</sup>。これらの結果から、オスカイコガでは、何らかの作用により生じたセロトニンの脳内濃度の変動が基本回路の特性を変化させることで、行動閾値がダイナミックに調節されるとの仮説に至った。また、セロトニン分泌細胞は脳内の異なる機能領域に広く出力をもつため、基本回路においても異なる行動修飾作用を持つことが推測される。神経回路の特性は個々の神経細胞の興奮性に基いて変化するため、セロトニンによるこれらの行動修飾作用の神経機構を明らかにするためには、神経細胞・神経回路・行動といった異なる階層間での分析・統合が必要である。代表者らは、これまでの研究過程で、神経細胞、神経回路、さらには行動レベルのデータをデータベース化して、それらを統合してモデル化し、評価・検証する技術を開発した<sup>(6)</sup>。これらのマルチスケールの分析技術や統合技術を活用することで、神経修飾物質による基本回路の修飾機構の解明が可能となり、動物が脳内環境によってダイナミックかつ柔軟に行動を制御する脳内情報処理のシステムティックな理解が初めて実現されるものと考えた。

(1) Kloppenburg P, Mercer AR, *Annu Rev Entomol*, **53**:179-190 (2008). (2) Farooqui T, *Neurochem Res*, **32**: 1511-1529 (2007). (3) Blenau W, Thamm M, *Arthropod Struct Dev*, **40**: 381-394 (2011). (4) Gatellier L et al. *J Exp Biol*, **207**: 2487-2496 (2004). (5) Hill E et al. *J Exp Biol*, **206**: 345-352 (2003). (6) Kanzaki R et al. *Advanced Robotics* **22**: 1605-1628 (2008). (7) Fujiwara T et al. *Neuroreport*: **20**: 1061-1065 (2009). (8) Kanzaki R et al. *Chem Senses* **28**:113-130(2003). (9) Yamagata T et al. *Zool Sci* **25**: 509-516 (2008). (10) Sakurai T et al. *PLoS Genet* **7**: e1002175 (2011).

## 2. 研究の目的

本研究では、カイコガのフェロモン情報処理系の基本回路の構成神経を対象に、セロトニンが単一神経細胞そして神経回路の特性に与える作用を明らかにし、神経回路の特性の変化と行動修飾との関係をシステムティックに記述することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子組換えカイコガの作出と解析

遺伝子組換え系統は転移因子 piggyBac を利用した方法により作出した。セロトニン合成酵素であるトリプトファン水酸化酵素遺伝子のカイコホモログ (BmTRH) の開始コドンの上流配列(約 3.7 kb)の下流に GAL4 遺伝子をつないだ遺伝子組換え用ベクターを構築した。構築したベクターを piggyBac のトランスポゼースを発現するヘルパーDNA とカイコ卵に共インジェクションし、次世代で組換え体を選抜し、GAL4 系統を得た。作出した組換え体を UAS-GFP 系統のカイコガと交配し、得られた次世代のオス個体の脳における GFP 発現パターンを、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織学的手法により解析した。脳をリンガー液中で摘出後、抗 GFP 抗体で標識を行い、GFP 抗体を Alexa488 標識二次抗体で、検出した。標識後の脳をエタノール上昇系列で脱水してからサリチル酸メチル中で組織の透明化を行った。蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡(励起光 488nm, 505-550nm バンドパスフィルター)により取得した。

### (2) 局所的な光刺激システムの開発

光遺伝学的手法による脳内の特定のセロトニン分泌細胞の活動制御に向けて、脳内を局所的に光刺激できるシステムの開発を行った。光源には channelrhodopsin-2 (ChR2) の励起ピーク波長近傍の 473nm のレーザーを用い、2 軸ガルバノミラーによりレーザー光の光軸の制御を行った。さらに、開発したシステムの制御プログラムを作成し、刺激部位の選択、刺激までの遅れ時間、刺激間隔、刺激時間、刺激回数などのパラメーターを設定できる環境を構築した。

### (3) 触角葉濃度情報変換機構の解析

触角葉における濃度情報のダイナミックな調節機構の解析のために、自然環境下でオスのカイコガが受容する濃度レンジ(10-1000 ng)のフェロモンを連続したパルス刺激で与えた。嗅覚受容細胞の応答計測はフェロモン受容細胞でカルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP2 を発現する系統を用い (BmOR1-GAL4/UAS-GCaMP2)、カルシウムイメージング法により実施し、投射神経の計測はルースパッチ法により実施した。

## 4. 研究成果

①セロトニン分泌細胞ラベリングシステムの作出と解析

脳内のセロトニン分泌細胞の入出力領域のマップの構築を目的として、BmTRHの上流配列をプロモーターとして GAL4 を発現する遺伝子組換えカイコガ(BmTRH-GAL4)を2系統作出した。UAS-GFP との交配で得られた BmTRH-GAL4/UAS-GFP 系統の脳における GFP 標識細胞とセロトニン免疫陽性細胞の分布と比較したところ、これらの系統の脳ではセロトニン免疫陽性細胞の一部で GFP を発現することが示唆された。

GFP 標識細胞の解析から、系統間で標識パターンに差異が見出され(図1)、1系統においては、フェロモン情報処理の前運動中枢である側副葉の付近に分枝する両側性のセロトニン分泌細胞で GFP の発現が検出された(図2)。そこでこの系統を用いて標識細胞の詳細な解析を試みたが、GFP の発現量が十分でなく詳細な構造の同定にはいたらなかった。結果として、本研究期間内に遺伝子組換え体を利用した入出力マッピングにはいたらなかったものの、これらの系統は、キイロショウジョウバエ以外の昆虫種で、遺伝子組換えにより脳内の生体アミン分泌細胞で外来遺伝子の発現に成功した初めての例であり、今後セロトニンの作用機構を分析するための重要なツールとして利用が期待される。

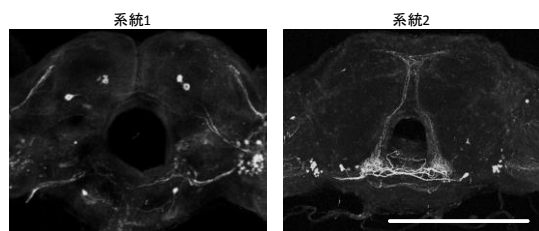


図1 BmTRH-GAL4/UAS-GFP の GFP 発現パターン

オス成虫脳の抗 GFP 抗体染色後の共焦点顕微鏡図。系統間で GFP 発現パターンが異なっていた。スケールバー：500  $\mu\text{m}$

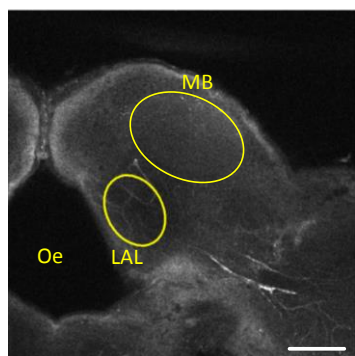


図2 BmTRH-GAL4(系統1)/UAS-GFP の側副葉への分枝。図1中の系統1の側副葉付近の拡大図。そ LAL: 側副葉、MB: キノコ体、Oe: 食道。スケールバー：100  $\mu\text{m}$

## ②光刺激システムの開発

本研究では、①で作出した BmTRH-GAL4 系統を利用して、セロトニン分泌細胞で青色光

感受性イオンチャネルである channelrhodopsin-2 (ChR2) を発現する遺伝子組換え系統を作出し、光により特定のセロトニン分泌細胞の活動を制御する実験系の構築を計画した。この目的のために局所的に光刺激を制御できるシステムを開発した。システムの性能評価は、すでに ChR2 の機能が確認されているフェロモン受容細胞で ChR2 を発現する系統 (BmOR1-GAL4/UAS-ChR2) を利用して実施した。レーザーのサンプルへの照射強度が半分になる位置を外周とした場合に、光のスポット径は約 300  $\mu\text{m}$  となった(図3)。なおスポット径はガルバノミラーとサンプル間に適切な焦点距離のレンズを挿入することで、調節が可能である。本システムの構築により、特定の領域の神経細胞の活動を光遺伝学的手法により制御できる刺激系が確立された。

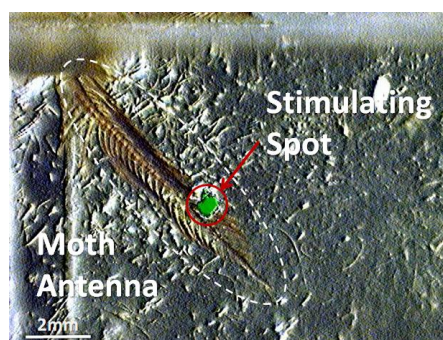


図3 カイコガ触角への局所光刺激の例。緑色で示した領域が光刺激のスポットにあたる。スケールバー：2 mm

## ③触角葉におけるフェロモン濃度情報処理機構

本研究を遂行する過程で、フェロモン情報処理の主要領域である触角葉におけるフェロモン濃度情報コーディングに関する新たなメカニズムを発見した。触角の嗅受容細胞で受容されたフェロモン情報は嗅覚系一次中枢である触角葉へ処理され、投射神経により高次中枢へ出力される。自然条件下で受容する濃度レンジのフェロモンを、濃度が一定の連続したパルス刺激として触角に提示し、そのときの嗅覚受容細胞と投射神経の活動を別々に計測した。その結果、最初のフェロモン刺激に対しては受容細胞、投射神経ともに刺激の絶対濃度に対して濃度依存的な応答を示した(図4A)。嗅覚受容細胞においては、その後の連続したパルス刺激に対しては、刺激の絶対濃度に依存的な応答が観察された。一方で、投射神経では、いずれの濃度の刺激に対しても複数回のパルス刺激後に同程度の応答強度に収束することが明らかになった(図4A)。興味深いことに、応答強度が収束した状態で、刺激濃度を変化させると、濃度を高くしたときには投射神経の活動が増加し、低くしたときには減少することが示された(図4BC)。これらの結果は、触角で受容したフェロモンの絶対濃度の情報が触角

葉の神経回路において、過去に受けた匂いに対する相対濃度情報に変換されて高次へ出力されることを示唆している。さらに薬理的解析から、このようなフェロモン濃度情報の相対化には触角葉内部で分枝する局所介在神経から放出される抑制性神経伝達物質である GABA の作用が重要であることを明らかにした。

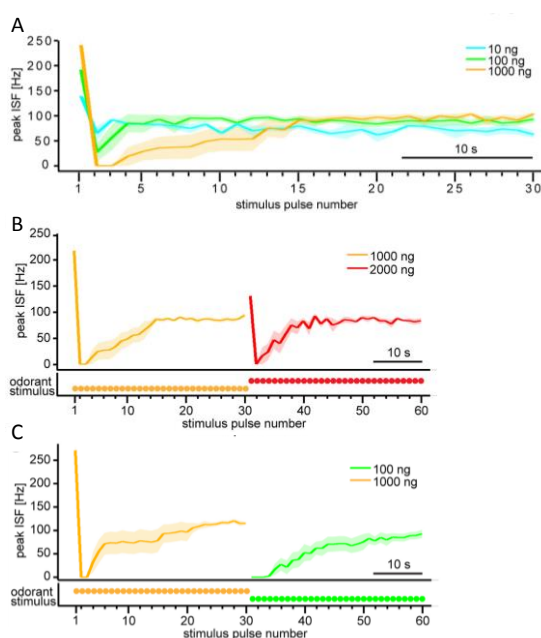


図 4 触角葉神経回路におけるフェロモン濃度情報の相対化

(A) 異なる濃度の連続パルス刺激に対する投射神経の最大瞬間発火頻度 (ISF)。最初の刺激に対する応答は濃度依存的であるが、最終的に応答は一定となるのがわかる。応答が一定化した状態で刺激濃度を高(B)、もしくは低く(C)変化させると、応答はそれぞれ増加、減少した。

## 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 12 件)

- ① Sakurai T, Mitsuno H, Mikami A, Uchino K, Tabuchi M, Zhang F, Sezutsu H, Kanzaki R, Targeted disruption of a single sex pheromone receptor gene completely abolishes *in vivo* pheromone response in the silkworm, *Sci Rep*, **5**, 11001 (2015) (doi: 10.1038/srep11001) 査読有
- ② Namiki S, Iwabuchi S, Pansopha Kono P, Kanzaki R, Information flow through neural circuits for pheromone orientation in the moth, *Nat Comm*, **5**, 5919 (2014) (doi: 10.1038/ncomms6919) 査読有
- ③ Pansopha P, Ando N, Kanzaki R, Dynamic

use of optic flow in pheromone tracking behavior by male silkworm, *Bombyx mori*, *J Exp Biol*, **217**, 1811-1820 (2014) (doi: 10.1242/jeb.090266) 査読有

- ④ Fujiwara T, Kazawa T, Sakurai T, Fukushima R, Uchino K, Yamagata T, Namiki S, Haupt SS, Kanzaki R, Odorant concentration differentiator for intermittent olfactory signals, *J Neurosci*, **34**, 16581-16593 (2014) (doi: 10.1523/JNEUROSCI.2319-14.2014) 査読有
- ⑤ 櫻井 健志, 神崎 亮平, カイコガの高選択的・高感度な性フェロモン認識の分子・神経基盤, *蚕糸・昆虫バイオテック*, **83**, 115-127 (2014) (doi.org/10.11416/konchubiotec.83.2\_115) 査読有
- ⑥ 神崎 亮平, 昆虫の脳を理解し, 脳を作る, *化学工学*, **78**, 387-390 (2014) 査読有
- ⑦ 櫻井 健志, 田淵 理史, 神崎 亮平, カイコガにおける性フェロモンの特異的認識機構, *日本味と匂学会誌*, **20**, 41-47 (2013) 査読無
- ⑧ Sakurai T, Namiki S, Kanzaki R, Molecular and neural mechanisms of sex pheromone reception and processing in the silkworm *Bombyx mori*, *Front Physiol*, **5**, article 125 (2014) (doi: 10.2289/fphys.2014.00125) 査読有
- ⑨ Fujiwara T, Kazawa T, Haupt SS, Kanzaki R, Postsynaptic odorant concentration dependent inhibition controls temporal properties of spike responses of projection neurons in the moth antennal lobe, *PLoS One*, **9**, e89132 (2014)
- ⑩ Kanzaki R, Minegishi R, Namiki S, Ando N, Insect-machine hybrid system for understanding and evaluating the sensory-motor control by sex pheromone in *Bombyx mori*, *J Comp Physiol A*, **199**, 1037-1052 (2013) (DOI 10.1007/s00359-013-0832-8) 査読有
- ⑪ Tabuchi M, Sakurai T, Mitsuno H, Namiki S, Minegishi R, Shiotsuki T, Uchino K, Sezutsu H, Tamura T, Haupt SS, Nakatani K, Kanzaki R, Pheromone responsiveness threshold depends on temporal integration by antennal lobe projection neurons, *Proc Natl Acad Sci*, **110**, 15455-15460, 110 (2013) (doi: 10.1073/pnas.1313707110) 査読有
- ⑫ Hamada S, Tabuchi M, Toyota T, Sakurai T, Hosoi T, Nomoto T, Nakatani K, Fujinami M, Kanzaki R, Giant vesicle functionally expressing membrane receptors for insect pheromone, *Chem*



[学会発表] (計 16 件)

- ① Ryohei Kanzaki, Neural basis of odor-source localization in the silkworm: from genes, neural networks, and behavior to robots, Annual Talks 2015-Biology Across Scales, 2015 年 1 月 5 日~1 月 8 日, Bangalore, India (招待講演)
- ② 神崎 亮平, 昆虫科学が拓く生物エレクトロニクス, 日経エレクトロニクスセミナー, 2014 年 10 月 30 日, パシフィコ横浜, 横浜 (招待講演)
- ③ Ryohei Kanzaki, Analysis and synthesis of odor-source localization in insects: From genes, neural networks, and behavior to robots, 11th International Congress of Neuroethology / 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry, 2014 年 7 月 28 日~8 月 1 日, 札幌コンベンションセンター, 札幌 (招待講演)
- ④ Poonsup Pansopha, Visual processing pathways and their roles in modulation of pheromone-triggered behavior in the male silkworm, *Bombyx mori*, 11th International Congress of Neuroethology / 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry, 2014 年 7 月 28 日~8 月 1 日, 札幌コンベンションセンター, 札幌
- ⑤ 神崎 亮平, 昆虫科学から迫る次代のバイオミメティクス, 科学工学技術委員会, 2014 年 6 月 8 日, 東京都中小企業振興公社, 東京 (招待講演)
- ⑥ 神崎 亮平, 昆虫の嗅覚機構を再現した匂いセンサ・匂い源探索ロボット, 第 42 回センサ&アクチュエータ技術シンポジウム, 2014 年 5 月 21 日, 化学会館, 東京 (招待講演)
- ⑦ 神崎 亮平, 昆虫力を観る・知る・利用するー遺伝子・ニューロン・脳からロボットへー, 宇都宮大学 VBL 講演会, 2013 年 11 月 12 日, 宇都宮大学, 栃木 (招待講演)
- ⑧ Ryohei Kanzaki, Insect-machine hybrid system -New directions in bionic engineering, The 4th International Conference on Bionic Engineering, 2013 年 8 月 13 日~8 月 16 日, Nanjing, China (招待講演)
- ⑨ Ryohei Kanzaki, Insect-machine hybrid system for understanding and evaluating the sensory-motor control, 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine

and Biology Society, 2013 年 7 月 3 日~7 月 7 日, Osaka International Conference Center, Osaka, Japan (招待講演)

- ⑩ 神崎 亮平, 昆虫とロボットで探る脳科学, 平成 25 年度複雑系生命システム研究センター研究会, 2013 年 5 月 18 日, 東京大学駒場 I キャンパス, 東京 (招待講演)
- ⑪ 神崎 亮平, 次代の技術を担う「昆虫力」~昆虫科学が迫る昆虫の感覚・脳・行動のしくみ~, 第 104 回発明教室 未来技術セミナー (石川県発明協会), 2013 年 4 月 19 日, 石川県地場産業振興センター, 石川 (招待講演)
- ⑫ 神崎 亮平, 次代の技術を担う「昆虫力」~昆虫科学が迫る昆虫の感覚・脳・行動のしくみ~, 平成 25 年度 JEITA「電子部品部会」講演会, 2013 年 4 月 18 日, 大手センタービル, 東京 (招待講演)
- ⑬ 神崎 亮平, 次代の技術を担う「昆虫力」~昆虫科学が迫る昆虫の感覚・脳・行動のしくみとその応用~, 日本蚕糸学会第 83 回大会公開シンポジウム特別講演, 2013 年 3 月 18 日, つくば農林ホール, 茨城県 (招待講演)
- ⑭ 神崎 亮平, 次代の技術を担う「昆虫力」~昆虫の感覚・脳・行動のしくみ~, JEITA 技術委員会講演会, 2013 年 1 月 25 日, 大手センタービル, 東京 (招待講演)
- ⑮ 神崎 亮平, 昆虫パワーの科学ー昆虫からみた脳科学・ロボット・教育の未来ー, 第 29 回浜松コンファレンス, 2012 年 11 月 3 日, アクティシティ浜松中ホール, 静岡 (招待講演)
- ⑯ Ryohei Kanzaki, Analysis and synthesis of odor source localization in the silkworm, International Symposium Olfactoin in insects under debate, July 20th, Würzburg, Germany (招待講演)

[図書] (計 1 件)

神崎 亮平, 岩波書店, サイボーグ昆虫, フェロモンを追う, 108 (2014)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.brain.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神崎 亮平 (KANZAKI, Ryohei)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号: 40221907

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

加沢 知毅 (KAZAWA, Tomoki)

東京大学・先端科学技術研究センター・特  
任研究員

研究者番号：00507824

櫻井 健志 (SAKURAI, Takeshi)

東京大学・先端科学技術研究センター・特  
任講師

研究者番号：20506761