

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780048

研究課題名(和文) 生体イメージングを用いた触角と触角葉における性フェロモン情報提示機構の解明

研究課題名(英文) in vivo live imaging for sex pheromone information presentation neural mechanism in Drosophila olfaction

研究代表者

井下 強 (Inoshita, Tsuyoshi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20601206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエは、嗅覚情報をもとに求愛相手を識別しているが、識別に使用される嗅細胞や嗅物質の全容は、未だ明らかにされていない。本研究では、嗅細胞の応答を記録する生体イメージング法を確立し、求愛相手識別を担う嗅覚応答の網羅的地図の作成を行った。その結果、成熟度や交尾経験の異なるバエの体表抽出物に対する嗅覚応答に差を見出した。こうした結果から、求愛相手の識別における神経基盤では、バエの匂いとエサの匂いの情報統合が行われていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Olfactory information plays key roles in Drosophila courtship behavior, but the whole picture of pheromonal compounds and their neural basis of olfaction are not clarified. This study established in vivo live imaging system to record olfactory responses and visualized responding pattern to cuticular extracts that include pheromonal chemicals. Cuticular extracts excited broad-characteristic patterns those are reflected their sex, maturity and courtship conditions in olfactory glomeruli. Further specific olfactory receptor expressing neurons discriminated sex by using olfactory information of fly extracts with food odors. These results suggest that neural basis of olfaction for courtship mate discrimination utilize olfactory information of pheromones and foods in Drosophila.

研究分野：神経科学

キーワード：ショウジョウバエ 性フェロモン 嗅覚 生体イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

動物は外界からの多様な情報を感覚細胞や感覚神経で受容し、中枢神経系において神経細胞間の情報伝達により統合・抽出し、行動制御に利用する。嗅覚情報は、ほとんど全ての動物が利用し、エサの探索や仲間・繁殖相手や天敵の探索・識別に利用される。近年のマウスやショウジョウバエの研究では、単一の嗅細胞が複数の匂い物質の受容を担い、匂い識別は、複数種類の嗅細胞の応答パターンの違いにより識別されていることが示唆されている。しかし、外界に存在する多様な化学物質から、特定の情報を抽出する機構は未解明である。

ショウジョウバエは、全ゲノムが読まれ、多くの分子遺伝学的手法が確立されており、任意の遺伝子の発現制御が可能である。また、多数の突然変異系統や遺伝子組み換え系統も確立されており、モデル動物として広く利用されている。ショウジョウバエは、一連の特徴的な求愛行動を取り、その制御に関わる神経機構の解明も進められている。ショウジョウバエの求愛行動では、求愛相手の探索や識別、求愛行動の進行の過程で嗅覚情報が利用され、種特異的な匂い物質である性フェロモンの存在も報告されている。ショウジョウバエの嗅覚受容細胞（嗅細胞）は、触角や小顎髭に存在する嗅覚感覚子と呼ばれる毛状の器官の基部に存在する。嗅細胞は、軸索を脳の触角葉に投射しており、触角葉には、43個の系球体と呼ばれる構造が存在する。これら系球体は、特定の1種類の嗅覚受容体に対応している。しかし、こうした嗅覚受容体は、複数種類の匂い物質に反応するため、匂い情報は、反応する系球体の組み合わせとして提示される。ハエの性フェロモンは、体表のクチクラに含まれると考えられ、その組成は、成熟度や性別、交尾経験に応じて変化し、その違いをもとに求愛相手の識別が行われていると考えられている。嗅覚で受容されるオ

スの性フェロモンとして cis-Vaccenyl Acetate (cVA) が同定され、受容細胞と対応する系球体が同定されているが（引用論文）、メスの性フェロモンは未発見であることから、他の性フェロモンの存在が示唆されており、性フェロモン受容機構の全容は未解明である。ハエの求愛行動は、エサのある場所に集まった複数のハエの中から、嗅覚情報をもとに適切な求愛相手を探索して行われる。このことから、エサや他のハエなどの雑多な匂い情報から、特定の匂い情報を抽出する機構が働き、求愛相手の識別が行われていると推察される。このため、ハエの求愛相手識別機構の理解は、情報統合・抽出機構の解明にも役立つと考えられる。そこで、生体イメージングによる嗅覚応答の可視化技術と任意の神経の活動を制御し、可視化する手法の樹立が求められた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の2点である。

(1) 嗅覚応答を可視化する生体イメージング法の樹立とそれを利用したショウジョウバエ触角葉における求愛相手の嗅覚情報地図の作成：ショウジョウバエは、求愛相手の嗅覚情報から交尾可能かどうかを識別していると考えられている。しかし、交尾可能性に関わる、性別や成熟度、交尾経験の違いから生じる匂い情報の違いがどのように提示されているかは、明らかになっていない。そこで、嗅覚応答を記録するための生体イメージングシステムを構築し、性別や成熟度、交尾経験の違うハエ匂いに対する嗅覚応答を記録し、求愛相手の状態に応じた嗅覚地図を作成する。

(2) 神経活動を任意に制御するシステムの構築とそれを利用した求愛相手識別に関する嗅覚情報処理を担う神経機構の解明：エサや他のハエの匂いから適切な求愛相手の匂い情報を抽出する神経機構を解明するた

め、細胞間の相互作用を制御（抑制/亢進）するシステムを構築する。特定の嗅細胞の活性を制御し、他の糸球体の応答に与える影響を解析し、細胞間の相互作用を担う介在神経や神経伝達物質の同定を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 嗅細胞のハエ体表抽出物に対する応答地図の作成：感覚神経の活動に応じて、神経細胞内のカルシウム濃度上昇が起きる。そこで、分子遺伝学的手法を用いて、カルシウム濃度に応じて蛍光強度変化が起きる蛍光タンパク質 G-CaMP (引用論文) を嗅細胞で発現させ、触角への匂い刺激時の触角葉糸球体における蛍光強度変化を観察し、匂いに対する応答パターンを計測した。刺激に用いた匂い物質は、性別や成熟度、交尾経験の異なるハエの体表から抽出し、機械制御により触角に匂い刺激を与えた。表皮の一部を切開し、生きた状態のハエの脳を顕微鏡下で観察し、蛍光強度の変化を記録した。

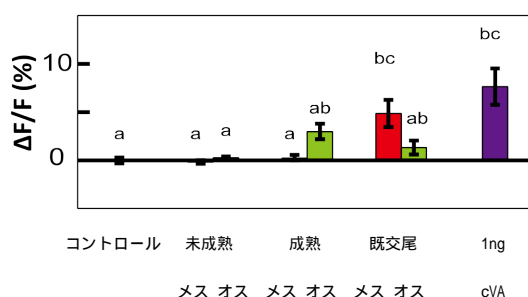
(2) 神経活動の制御とシナプス分泌の計測を可能とするシステムの樹立：シナプス分泌を検出するため、シナプス小胞の膜タンパク質に pH 感受性の蛍光タンパク質を接続した VMAT-pHluorin (引用論文) を神経細胞で発現させることで、蛍光強度上昇によりシナプス分泌の可視化が可能である。そこで、任意の神経細胞で VMAT-pHluorin を発現させ生きた脳を観察し、神経活動に起因する蛍光強度変化を計測する実験設備を構築する。さらに、神経活動を任意に制御するため、高温条件下で形態異常を起こす TrpA1 チャネルを神経細胞で発現させ、VMAT-pHluorin の蛍光を観察した状態で、温度刺激による神経活動を誘導する実験設備を構築する。

### 4. 研究成果

(1) まず、申請者は、神経応答に応じた蛍光強度測定システムの構築を行った。特定の

嗅覚受容体を発現する嗅細胞や広範な嗅細胞でカルシウム感受性蛍光タンパク質 G-CaMP を発現させ、顕微鏡下で表皮の一部を切除した触角葉を観察し、匂い刺激を行うことで生体における糸球体の応答を蛍光強度の変化として観察するシステムを樹立した。このシステムを用い、オスの性フェロモン cVA やハエの体表抽出物に対する応答を記録した。既にオスの性フェロモンとして同定されている cVA に応答する糸球体の応答を記録したところ、未成熟のハエや未交尾のメスの匂いに対しては応答が見られなかったが、成熟したオスや交尾後のメスの匂いに強い応答が記録できた。オスは、他の成熟したオスや交尾後のメスには求愛行動を示さないため、この糸球体が、求愛行動抑制的な情報の受容に働くことが明らかになった (下図)。

オスの性フェロモン応答性糸球体



オスの DA1 糸球体は、交尾受容性の低いハエ (成熟オスや既交尾メス) の匂いに応答する。

次に、広範な嗅細胞の応答記録は、これまでエサの匂いの受容に関わると考えられてきた糸球体の多くが、ハエの体表抽出物に応答することを示した。一部の糸球体 (VA6, DA3) は、オスの体表抽出物に対する応答に比べ、メスの体表抽出物に対する応答強度がより強く、性別の識別に関わると考えられる。また、蛍光強度が刺激前より低下する糸球体が存在し、自発的な神経発火が抑制されていると考えられる。これは、応答した他の糸球体から抑制的な情報伝達が行われているこ

とを示唆する。

また、IR8a 受容体を発現している嗅細胞は、エサの匂いとハエの匂いを組み合わせた時に強く応答することが示され、エサの匂いとハエの匂いの情報が統合され、求愛相手の識別に利用されていることを示していた。

以上の結果から、ハエの求愛相手識別には複数の系球体の応答が関わる可能性が示唆された。また、系球体の応答の段階で、既に情報修飾が行われていることが示された。

(2) これまでの結果から、ハエの匂いに応答する系球体地図が作成でき、系球体間での情報修飾を確認できた。そこで、情報修飾機構解明のための神経応答制御・計測システムの構築を行った。脳の DA 神経細胞で VMAT-pHluorin を発現させ、生きた脳を顕微鏡下で観察した。シナプス分泌に異常を生じさせることで、蛍光強度の低下が検出できることを、神経変性疾患の原因遺伝子 Parkin の変異体を用いて確認した。正常な Parkin を発現させた状態では、自発的な神経活動に依存した蛍光強度に変化は見られなかったが、Parkin の変異体を発現させることにより、神経機能の異常が誘導され、VMAT-pHluorin の蛍光強度の低下が見られた。このことから、構築したシステムが、シナプス小胞分泌可視化を可能とすることが確認できた。さらに、TrpA1 チャネルを共発現させ、高温刺激を与えることで VMAT-pHluorin シグナルの強度上昇を確認した。この手法の利用により、特定の嗅細胞のシナプス分泌を誘導した状態での触角葉の応答パターンを計測することで、接続された系球体の特定が期待できる。

本研究の成果をまとめると、嗅覚応答の生体イメージング法の樹立により、ハエの求愛受容性の違いの識別を担うと考えられる複数の系球体を特定した。系球体間で情報統合・抽出が行われていることを示唆する知見を得た。系球体間の情報統合・抽出機構解明のために、神経活動の制御とシナプス分

泌イメージングのためのシステムを樹立した。現在、新たに樹立したシステムを利用し、系球体間の接続図を作成すべく、実験を進めており、ショウジョウバエの求愛相手識別に関わる情報修飾機構の解明を目指している。

本研究成果は、ショウジョウバエの求愛行動における嗅覚情報識別機構の理解に貢献するだけでなく、ショウジョウバエ嗅覚系の情報統合・抽出機構のモデルとしての有用性も示している。さらに、本研究で構築した神経活動制御システムとシナプス分泌計測システムは、ショウジョウバエをモデルとした他の神経機能関連遺伝子の機能解析にも応用可能であり、他分野への貢献も期待できる。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

Kahori Shiba-Fukushima, Taku Arano, Gen Matsumoto, Tsuyoshi Inoshita, Shigeharu Yoshida, Yasushi Ishihama, Kwon-Yul Ryu, Nobuyuki Nukina, Nobutaka Hattori, Yuzuru Imai: **Phosphorylation of Mitochondrial Polyubiquitin by PINK1 Promotes Parkin Mitochondrial Tethering**. PLoS Genetics. 10: e1004861, 2014 : 査読あり

DOI: 10.1371/journal.pgen.1004861.

Kahori Shiba-Fukushima, Tsuyoshi Inoshita, Nobutaka Hattori, Yuzuru Imai: **PINK1-Mediated Phosphorylation of Parkin Boosts Parkin Activity in *Drosophila***. PLoS Genetics. 10: e1004391, 2014 : 査読あり

DOI: 10.1371/journal.pgen.1004391

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

井下 強、柴 佳保里、梅崎 勇次郎、今居 譲、服部 信孝: **ドーパミン分泌の生体内ライブイメージング (Parkin and Vps35 play roles in synapse vesicle**

release). 第 55 回日本神経学会学術大会,  
2014 (福岡県・福岡市)

Tsuyoshi Inoshita, Yujiro Umezaki, Yuka  
Hosaka, Nobutaka Hattori, Yuzuru Imai:

**Parkinson's disease-associated protein  
Vps35 regulates neuronal activities,  
which are modulated by**

**Parkinson's-disease associated protein  
kinase LRRK2.** 第 3 7 回日本神経科学  
大会, 2014 (神奈川県・横浜市)

井下 強、穂坂 有加、梅崎 勇次郎、  
服部 信孝、今居 譲: **パーキンソン病  
原因遺伝子産物 Vps35 と LRRK2 は、小  
胞輸送と神経分泌を制御する。** 第 3 7 回  
日本分子生物学会年会, 2014 (神奈川  
県・横浜市)

Tsuyoshi Inoshita, Aki Ejima: *in vivo* live  
imaging of pheromonal olfactory  
responses to various statuses of flies in  
*Drosophila*. Neurofly meeting. 2012 (中  
国・蘇州)

[図書](計 1 件)

Tsuyoshi Inoshita, Yuzuru Imai: **Ubiquitin  
ligase-assisted selective autophagy of  
mitochondria: Determining its biological  
significance using *Drosophila* models.**

In: Autophagy: Cancer, Other Pathologies,  
Inflammation, Immunity, and Infection: in  
press. (Edited by Arif M Hayat, Elsevier,  
Amsterdam) : 書籍

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

井下 強 (INOSHITA, Tsuyoshi)

順天堂大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 20601206

### (2)研究協力者

今居 譲 (IMAI, Yuzuru)

順天堂大学・医学研究科・先任准教授

研究者番号 : 30321730

江島 亜樹 (EJIMA, Aki)

東京大学・農業生命科学研究科・特任講師

研究者番号 : 00548571