

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430004

研究課題名(和文)環境に適応した運動出力を生み出す神経回路機構の解明

研究課題名(英文)A study on neural circuits generating adaptive motor outputs

研究代表者

高坂 洋史 (KOHSAKA, HIROSHI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：20431900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：動物の運動速度制御は、動物が環境に適応して行動するために重要である。本研究では、ショウジョウバエ幼虫の運動をモデル系として、運動速度を制御する介在神経細胞を同定し、速度が生み出される回路機構を明らかにした。PMSIsと名付けた細胞により、運動する速さの機構が明らかになった。prePMSI1とprePMSI2という介在神経細胞の同定により、運動の方向性がどのように神経回路に実装されているのかが明らかになった。これらの知見は運動出力を生み出す神経回路機構の一端を明らかにするものとなった。

研究成果の概要(英文)：Axial motion, which is generated by propagation of muscular contractions along the length of the body, is commonly seen in animal movements (e.g., swimming, crawling and multi-leg walking). Axial motion is regulated by neural circuits that include local circuits within each neuromere as well as intersegmental connections between them. Intersegmental connections are believed to be particularly important for the generation of coherent movements along the body axis. However, circuit mechanisms underlying intersegmental coordination are poorly understood. We use *Drosophila* larval crawling as a model to study axial locomotion. The behavior is generated by propagation of local muscle contractions from the posterior to anterior segments. We identified a class of local interneurons, termed period-positive median segmental interneurons (PMSIs) and pre-PMSI1,2 as key factors for larval locomotion.

研究分野：神経科学

キーワード：神経回路 運動制御 オプトジェネティクス コネクトミクス ゲノミクス 介在神経細胞

1. 研究開始当初の背景

神経系は、動物の体の内外の情報に基づいて適切な行動を生み出す。体の内外の情報は、感覚神経細胞による受容によって神経回路内に入力される。一方、運動出力は運動神経細胞が適切な時空間パターンで筋収縮を引き起こすことで生成される。この神経回路の始まりと終わりに相当する、感覚情報と運動出力との関係は、脊髄反射や前庭動眼反射などの反射回路では詳しく研究されているが、介在神経細胞群が時空間パターンを生成するような、より複雑な神経回路においては、いまだ不明な点が多かった。

2. 研究の目的

動物の運動速度は、動物の行動の中で重要なパラメータの1つである。本研究では、ショウジョウバエ幼虫の運動をモデル系として、運動速度を制御する介在神経細胞を同定し、速度が生み出される回路機構を解明する。また、個体が環境に応じて適応的に速度を変化させる神経回路基盤の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、速度制御に関わる介在神経細胞の同定・機能解析により、速度コード地図の作成を進める。またその結果に基づき、動物の適応的行動を担う回路機構の解明を目指す。

平成26年度は、少数の介在神経細胞で発現するGal4系統のスクリーニングを行なう。また、異なる栄養条件、及び温度条件における行動を解析することによって、ショウジョウバエ幼虫の適応的行動について定量的規則を明らかにする。

平成27年度以降は、前年度見出したGal4系統の中から速度制御に関わる系統の探索を行なう。また、介在神経細胞間の構造的・機能的関係を解明する。さらに、これらの神経細胞群が適応的行動にどのように関与するのかを解析し、運動速度制御の神経回路機構のモデル化を目指す。

発現パターンに基づくGal4系統のスクリーニング

これまでにPMSI介在神経細胞を同定し、この神経細胞が、ショウジョウバエ幼虫のぜん動運動の速度制御に関与していることを明らかにした。本研究では、速度制御に関わる介在神経細胞の網羅的な同定を進めるために、欧米の研究所で作成された15,000を超すGal4系統群に対して、PMSIを解析した手法を適用する。まず、候補となるGal4系統の中から比較的少数の介在神経細胞で発現している系統を選択する。Janelia farm研究所のGal4系統では、3齢幼虫の中枢神経系でのGal4発現パターンデータが公開されているのでその情報を活用する。特に、前後軸方向に神経線維を伸張させているものや、各単一神経節に神経突起を局在させているものに注目する。一方、VDRC研究所のGal4

系統では3齢幼虫での発現データは解析されていない。しかし、個々のGal4系統作成で用いられているゲノム断片DNA配列が全て公開されている。そこで、そのゲノム断片の近傍遺伝子の発現情報や、類似のゲノム領域を用いたJanelia farm研究所のGal4系統の発現パターン情報を基に、少数の神経細胞で発現することが期待できる系統を探索する。例えば、細胞接着分子は、少数細胞での発現と特異的接着能によって、精密な神経接続の分子基盤であると考えられている。ショウジョウバエゲノム上には、約200個のカドヘリン、免疫グロブリン、ロイシンリッチリピートの細胞接着分子ファミリーがあり、これらの遺伝子の近傍ゲノム断片を用いて約1000のGal4系統がVDRCで作成されている。これらのGal4系統は、細胞接着分子の発現と同様に少数の神経細胞での発現が期待できる。候補Gal4系統の発現パターンを抗体染色によって調べることによって、少数の介在神経細胞群で発現するGal4系統を探索する。

適応的速度制御の行動解析

速度制御を担う神経回路は、実際の動物の行動においてどのように駆動されるのか？ショウジョウバエ幼虫のぜん動運動は定型的で、その速さはほぼ均一であるが、環境に応じて変化する。幼虫期は、さかんな摂食行動によって大きくなる時期であるため、栄養状態が幼虫の行動に大きな影響を与える。絶食下におくと、ぜん動運動が速くなることが知られている(Koon et al., 2011)。一方、温度要因も速度に影響を与え、低温下ではぜん動運動は遅くなる。これらの現象に注目し、栄養条件や温度条件に応じて、幼虫のぜん動運動速度がどのように適応的に変化するかを詳細に測定し、定量的規則を構築する

4. 研究成果

1. 運動速度制御を担う新規介在神経細胞の同定。

これまでに、運動速度制御を担う介在神経細胞として、PMSIを同定した。PMSIの神経活動を阻害すると運動速度が低下することから、PMSIの上流の介在神経細胞が運動速度制御を担っている可能性が高い。そこで、PMSIの上流の神経細胞の同定を進めた。Janelia Farm研究所のAlbert Cardona博士との共同研究で、ショウジョウバエ幼虫の神経系の連続切片電子顕微鏡像の3次元再構築データを用いて、PMSIとの間にシナプスを形成している神経細胞の探索を行なった。その結果、数十の候補介在神経細胞を同定した。続いて、同研究所のJames Truman博士との共同研究により、候補介在神経細胞でのみ特異的に発現するGal4系統の探索を進めたところ、このうち、30の候補介在神経細胞について、そのような特異的Gal4系統が、作成済みもしくは、作成可能であることが分かった。一方、細胞接着分子をコードする遺伝子の発現制

御システムを利用して作成された Gal4 系統を探索したところ、少数の神経細胞で発現する系統が複数得られた。以上の2つのスクリーニングにより、運動回路を構成する候補神経細胞を特異的にマークする Gal4 系統の同定に成功した。

2. 適応的運動速度制御の回路機構の解明
幼虫の運動パターンを精密に定量化するために、幼虫の各体節に局限して発現する Gal4 系統を見出し、GFP を発現させ自由行動中の個体の蛍光を経時的に測定することにより、幼虫個体の運動のみならず、各体節の運動ダイナミクスを抽出する系を構築した。その結果、運動パターンを表現するいくつかのパラメータについて、画像解析に基づく半自動的定量化に成功した。

3. 運動制御に関わる介在神経細胞の探索
コネクトミクス解析により、PMS1 介在神経細胞の上流の神経細胞の候補リストを作成した。これらの神経細胞について遺伝学的手法によって構造・機能解析を進めた。その結果、PMS1 の上流の細胞として、pre-PMS11 と pre-PMS12 を見出した。これらの細胞は各半体節に1つずつ存在しており、興奮性の伝達物質と考えられるアセチルコリン陽性であった。pre-PMS11 は、1つ後方の体節の PMS1 に投射し pre-PMS12 は、1つ前方の体節の PMS1 とシナプス結合をしていた。Ca imaging 法によってこれらの細胞の活動を調べたところ、非常に興味深いことに、pre-PMS11 は、前方伝播特異的に活動し、逆に pre-PMS12 は、後方伝播特異的に活動を示した。これらの結果は、運動回路制御において、活動が伝播する方向とは反対方向に局所的にフィードバックを送っているという新しい機構を示唆するものである。

4. 適応的速度制御の回路解析
蛍光マーカを用いて、ショウジョウバエ幼虫のぜん動運動を半自動で高解像度で定量する方法を確立した。この手法を用いて環境温度を変化させた際、運動ダイナミクスがどのように変わるのかを解析した。ショウジョウバエ幼虫は、高温では高速で移動し、低温では低速で移動する。この適応的速度変化のダイナミクスを定量化した。すると、興味深いことに、速度が変化するにも関わらず、体節収縮の速さと体節弛緩の速さの比が一定に保たれていることが明らかになった。さらに、体節間の収縮タイミングを定量したところ、速度の変化に関わらず、異なる体節間での収縮のタイミングが保たれていることが分かった。この二つの恒量の発見は、運動ダイナミクスをモデル化する上で非常に強い制限を与え、運動制御機構の解明に大きく寄与するものと考えられる。

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 6 件)

Kohsaka, H., Guertin, P.A., Nose, A.: Neural circuits underlying fly larval locomotion. *Current Pharm. Design.* 23:1-12 (2017)

Matsunaga, T., Kohsaka, H., Nose, A.: Gap junction-mediated signaling from motor neurons regulates motor generation in the central circuits of larval *Drosophila*. *J. Neurosci.* 37(8): 2045-2060 (2017)

Thoma V, Knappek S, Arai S, Hartl M, Kohsaka H, Sirigrivatanawong P, Abe A, Hashimoto K, Tanimoto H. Functional dissociation in sweet taste receptor neurons between and within taste organs of *Drosophila*. *Nature Communications* (2016) 7:10678

Fushiki A, Zwart MF, Kohsaka H, Fetter RD, Cardona A, Nose A.: A circuit mechanism for the propagation of waves of muscle contraction in *Drosophila*. *eLife* (2016) 5. pii: e13253

Itakura Y, Kohsaka H, Ohyama T, Zlatic M, Pulver SR, Nose A.: Identification of Inhibitory Premotor Interneurons Activated at a Late Phase in a Motor Cycle during *Drosophila* Larval Locomotion. *PLoS One* (2015) 10(9): e136660

Kohsaka, H., Takasu, E., Morimoto, T. and Nose, A.: A group of segmental premotor interneurons regulates the speed of axial locomotion in *Drosophila* larvae. *Current Biology*, Volume 24, Issue 22, p2632-2642, (2014).

[学会発表](計 24 件)

Kohsaka, H., Zwart, M. F., Fushiki, A., Fetter, R. D., Cardona, A., Truman, J. W. and Nose, A.: Local feedback on axial propagation in *Drosophila* larval locomotor circuits. *Behavioral neurogenetics of Drosophila larva*. HHMI Janelia research campus, 2016.10.23-26, U.S.A.

Nose, A., Kohsaka, H., Yoon, Y., Takagi, S., Hiramoto, A., Ohura, S. and Niki, S.: Circuit mechanisms that regulate motor pattern in larval *Drosophila*. *Behavioral Neurogenetics of Drosophila Larva*, 2016.10.25 Janelia Farm Research Campus, USA.

Suguru Takagi, Sawako Niki, Dohjin

Miyamoto, Hiroshi Kohsaka, Hokto Kazama, Richard D. Fetter, Albert Cardona, Akinao Nose.: Neural circuits that mediate backward escape responses to mechanical noxious stimuli in *Drosophila* larvae. Behavioral Neurogenetics of *Drosophila* Larva, 2016.10.23-26, HHMI Janelia Research Campus (USA)

Suguru Takagi, Sawako Niki, Dohjin Miyamoto, Hiroshi Kohsaka, Richard D. Fetter, Albert Cardona, Akinao Nose.: Dissecting neural circuits regulating behavioural switching in *Drosophila* larvae by connectomic and functional analyses. Cooperation in Physics Workshop: LMU-UT, 2016.2.29-3.1, 東京大学 (東京・本郷)

Youngtaek Yoon, Ken Nakae, Hiroshi Kohsaka, Shin Ishii, Akinao Nose.: Statistical analysis of the activity of whole central neurons in a standard nerve cord of *Drosophila* larvae. Cooperation in Physics Workshop: LMU-UT, 2016.2.29-3.1, 東京大学 (東京・本郷)

Hiroshi Kohsaka, Maarten F. Zwart, Richard Fetter, Albert Cardona, James W. Truman, Akinao Nose.: Local feedback is important for the regulation of intersegmental activity propagation during *Drosophila* larval locomotion. Cold Spring Harbor laboratory, Meetings-Neurobiology of *Drosophila*, 2015.9.29-10.3, Cold Spring Harbor Lab, U.S.A.

Teruyuki Matsunaga, Hiroshi Kohsaka, Akinao Nose.: Local Motoneuronal activity regulates the frequency of ctive larval locomotion in a segment-specific manner. Cold Spring Harbor laboratory, Meetings-Neurobiology of *Drosophila*, 2015.9.29-10.3, Cold Spring Harbor Lab, U.S.A.

Kohsaka, H., Takasu, E. and Nose, A.: Speed of axial locomotion is regulated by local inhibitory interneurons in *Drosophila* larvae., NeuroFly2014, 2014.10.5-9, Crete, Greece

Thoma, V., Knapek, S., Arai, S., Hartl, M., Kohsaka, H. and Tanimoto, H.: Functional dissociation in sugar receptor neurons between and within taste organs of *Drosophila*., NeuroFly2014, 2014.10.5-9, Crete, Greece

Kohsaka, H., Takasu, E. and Nose, A.: Speed of axial locomotion is regulated by local inhibitory interneurons in *Drosophila* larvae., ICN2014, 2014.7.28-8.1, Sapporo Convention Center (Hokkaido, Sapporo).
他 14 件

〔図書〕(計 1 件)

Kohsaka, H. and Nose, A. Optogenetics in *Drosophila*. (a book chapter in "Optogenetics"), Springer Verlag (2015)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

<http://bio.phys.s.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
高坂 洋史 (KOHSAKA, Hiroshi)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教
研究者番号 : 20431900

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者 ()