

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850218

研究課題名(和文) 神経活動依存的な遺伝子発現を利用した昆虫の性フェロモン神経回路の可視化と機能解析

研究課題名(英文) Visualization and functional analysis of sex pheromone neural circuit of insects using an activity-dependent gene expression

研究代表者

木矢 剛智 (Taketoshi, Kiya)

金沢大学・自然システム学系・准教授

研究者番号：90532309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：感覚情報に応じた適切な行動の選択は生物の生存において極めて重要な役割を果たす。本研究では、シンプルな脳構造であるにも関わらず、回路・分子のロジックに於いては他の動物と共通の原理を保有する昆虫の脳に着目し、感覚情報入力と行動出力の対応関係が明確な性フェロモン伝達神経回路の可視化と機能解析を目的とした。本研究では、本研究者が発見した神経活動依存的な発現増加を示す遺伝子Hr38に着目し、カイコガとショウジョウバエの2種の昆虫を用いて、活動依存的な神経回路可視化法及び機能解析法を構築した。本手法を用いることで、既知の回路に加え新規な神経回路が性フェロモン情報処理に関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：How do animals select their behavior in response to certain sensory inputs? Appropriate response to sensory information is critical for animal survival. In the present study, I focused on the brain of insects which has low complexity, but has similar circuit property and molecular basis as the brain of other animals including vertebrates. In many insects, sex pheromone induces stereotypic courtship behavior with clear relationship between receptor and behavior. Here, I established a novel neural circuit tracing method utilizing an activity-dependent gene expression. Recently, I identified a novel immediate early gene Hr38, whose expression increases in response to neural activity. In the present study, I used the promoter activity of Hr38 to express GFP in order to visualize neurons activated by sex pheromone or courtship behavior. In addition to previously known neural circuits, I identified novel circuits involved in courtship behavior.

研究分野：昆虫科学

キーワード：初期応答遺伝子 神経活動 フェロモン 昆虫 カイコ ショウジョウバエ 脳 Hr38

1. 研究開始当初の背景

動物は外界からの情報を正確に受容・認識し、適切な行動により反応する。しかしながら、感覚情報が行動出力を生み出す神経機構には不明な点が多く残されている。特に脳の高次中枢は、感覚情報の統合や運動指令の判断において最も重要であると考えられるにも関わらず、有効なアプローチがないためその動作原理は未解明のままである。

感覚情報が行動を生み出す神経機構の解明には、特定の感覚刺激に対する定型行動に着目し、その神経回路及び機能を包括的に明らかにすることが有効である。昆虫の性フェロモンは、特異的な嗅覚受容体の活性化が、性行動といった定型行動を誘発する点で入出力関係が明確であり、感覚入力と行動の関係を調べる目的に適している。また昆虫の脳は、脊椎動物の脳に比べ極めて少数の神経細胞で構成されており、神経回路の包括的な解析が可能である。本研究者はこれらの研究上の利点と、遺伝学的手法を用いた神経機能の解析や比較が可能であるといった観点から、カイコガとショウジョウバエの2種の昆虫を用いて研究を行ってきた。

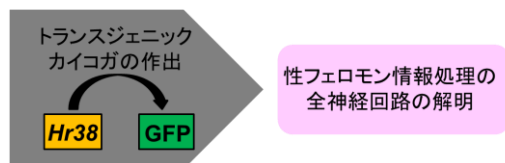
最近、本研究者は新規な神経活動のマーカー遺伝子として *Hr38* を同定し、これらの昆虫の脳で性フェロモンに反応する細胞の分布を包括的に明らかにした (*Current Biology*, 2013)。この論文では、嗅覚中枢や運動中枢のみならず、脳の高次中枢として知られる領域の細胞群が性フェロモンの刺激に応じて活動することを明らかにし、脳高次中枢における感覚情報処理機構の解明には本研究者のアプローチが極めて有効であることを示してきた。

2. 研究の目的

遺伝子組換え昆虫を利用した神経回路の可視化



特定の神経細胞で *Hr38* が発現することを見出したが、*Hr38* を発現する細胞が構成する神経回路は不明



本研究では上述の研究結果を更に発展することを主眼に、*Hr38* によってラベルされた細胞が構成する神経回路の形態や機能を明らかにすることを大きな目標とした。具体的には、*Hr38* の転写活性を利用した遺伝子組換えカイコガやショウジョウバエの作成に取り組み、性フェロモンに反応した神経細胞・回路の特異的な可視化・操作を行い、その機能解明を目的とした (上図参照)。

3. 研究の方法

本研究では、本研究者が独自に構築してきた遺伝学的手法により、カイコガ・ショウジョウバエの脳において性フェロモンに応答する神経回路を可視化し、さらに人為的に活動を操作することで、どのような神経回路や動作原理によって、感覚情報に依存した行動発現の制御がなされているのかということを目明らかにすることを目指した。具体的には以下の点について取り組んだ。

(1) 遺伝子組換え (Tg) カイコガを用いた性フェロモン情報を処理する神経回路の同定

Hr38 の発現依存的に GAL4 を発現する Tg カイコガを作成し、最も GFP の発現が強い系統の選別を現在行った。神経回路の可視化に最適な系統を用いて、性フェロモンに反応した神経回路を GFP により可視化した。

(2) 性フェロモンに反応した神経細胞の機能的意義の解明

本研究者はこれまでに、温度依存的に開口するイオンチャネル (dTrpA1) ・シナプス伝達を阻害する (shibire) や破傷風毒素軽鎖 (TeTxLC) ・Ca インジケーター (GCaMP5G) を GAL4 依存的に発現できるカイコガの作出に成功していた。そこでこれらの系統を利用することで、①で可視化した神経回路の人為的な活性化・シナプス伝達阻害・活動のリアルタイム計測を行った。これにより神経回路が性行動の制御に果たす機能を明らかにすることを試みた。

(3) ショウジョウバエの脳において性フェロモン情報を処理する神経回路の同定と解析

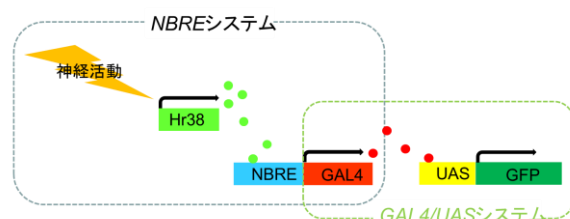
高度な遺伝学的手法を駆使することのできるショウジョウバエを用い、カイコガと同様のアプローチで性フェロモンに反応する神経回路の同定と解析を行った。具体的には、*Hr38* 転写開始点に GAL4 をノックインした系統を利用し *Hr38* を発現する細胞の可視化・機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子組換え (Tg) カイコガを用いた性フェロモン情報を処理する神経回路の同定

新規な神経回路可視化法“NBREシステム”の構築

・*Hr38* は転写活性化因子
・NBRE (9塩基) に結合 → 活動依存的に神経細胞を可視化できるのでは？



カイコガの脳において、神経活動の起こった細胞を可視化するための新規な遺伝学的手法“NBREシステム”を考案・構築した(前頁図参照)。その原理は以下の通りである。

神経活動依存的に発現する遺伝子 *Hr38* は転写因子 HR38 をコードしており、HR38 は NBRE という 9 塩基の配列に結合し、下流の遺伝子の転写を誘導する性質を持つ。この活性を利用し、NBRE 配列の下流に任意の遺伝子(本研究では GAL4)を配置することで、神経活動依存的にその遺伝子を発現させることが出来るというものである。これまでに *Hr38* の神経活動依存的発現制御を行うプロモーターを探索したが、少なくとも *Hr38* の周辺ゲノム領域 20kb においては、神経活動依存的な遺伝子発現制御領域は見つからなかった。この結果は神経活動による *Hr38* の転写制御は、遠位のエンハンサーによって制御されていることを示唆している。カイコガにおいてプロモーターを詳細に探索することは労力的に困難であることから、本“NBREシステム”を用いることで、本研究の目的達成を試みた。

まずプロモーターに用いる NBRE 配列の繰り返し回数を調べた。具体的には 5x, 15x, 25x, 35x のいずれかの回数で NBRE 配列をタンデムに並べ、その下流に GAL4Δ (細胞毒性の少ない GAL4 バリエーション)を配置したコンストラクトを作成し、各コンストラクトにつき 3 系統ずつ、計 12 系統の遺伝子組換えカイコガ系統を作出した。これらの系統をすべて UAS-mCD8GFP (膜移行型シグナル付 GFP) 系統と掛け合わせ、性フェロモン刺激の後に抗 GFP 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果 15x 系統の 1 系統のみで性フェロモン刺激依存的な GFP の発現が認められた。

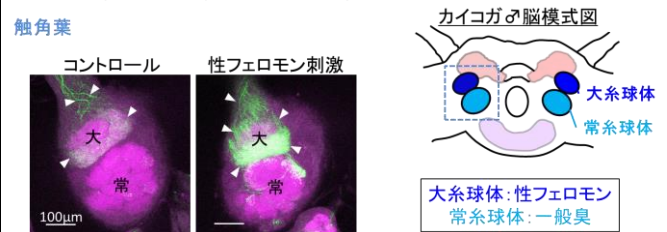
本実験で得られた系統の GFP の発現強度は非常に低く、神経回路の包括的可視化には不向きであったため、次に GFP の発現強度を増加させる条件の検討を行った。

まず UAS-mCD8GFP を 20xUAS-IVS-Syn21-myr::GFP-p10T 系統に変えて同様の実験を行った。ここでの改善点では、UAS の繰り返し数を 5x→20x として転写活性を増加させたこと、人工的なスプライシング配列 IVS や翻訳エンハンサー Syn21 配列や p10T 配列をベクターに付加して翻訳効率の増加を試みた。その結果、やはり 15x 系統の 1 系統のみで性フェロモン刺激依存的な GFP の発現が認められたが、GFP の発現強度の増加はわずかであった。

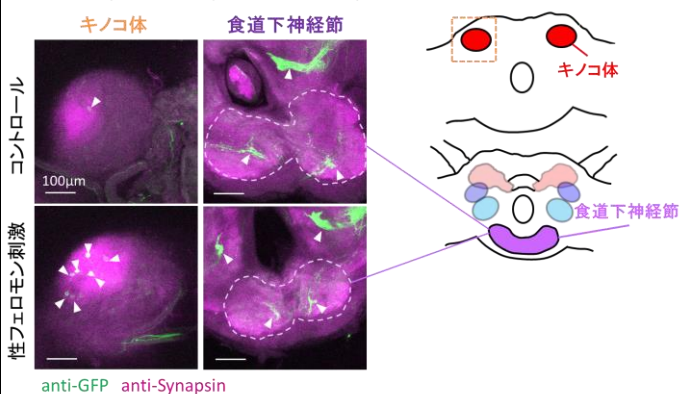
そこで次に NBRE-GAL4Δ 系統の改変を行った。まず、転写活性が高いことが知られていた GAL4::VP16 と GAL4::p65 に GAL4Δ を置き換えた系統を作出した。しかし、GAL4::VP16 と GAL4::p65 は共に高い細胞毒性を持つようで、作出した系統を維持することが出来ず、系統が絶えてしまい GAL4 の転写活性増加による GFP 強度の増加を検討することは出来なかった。

そこで更に別のアプローチとして、GAL4Δ に Syn21・p10T 等の配列を付与し、GAL4Δ 自身の発現量を増加させることで、GFP 発現量の増加を試みることにした。15xNBRE・25xNBRE それぞれの下流に Syn21-GAL4Δ-p10T を配置したコンストラクトを作成し、各コンストラクトにつき 3 系統ずつ系統の作出を行い、20xUAS-IVS-Syn21-myr::GFP-p10T 系統と掛け合わせ、GFP の発現を検討した。その結果、神経回路の可視化に十分な強度の GFP の発現を達成することが出来た。これらの中でも特に、15xNBRE の Line3 が最も GFP の発現強度が良いことを確認した(下図参照)。これにより、本研究の最大目標であった活動依存的な神経回路の可視化法の確立に成功したと考えている。現在、結果の総まとめを行い、論文投稿の準備に取り掛かっているとところである。

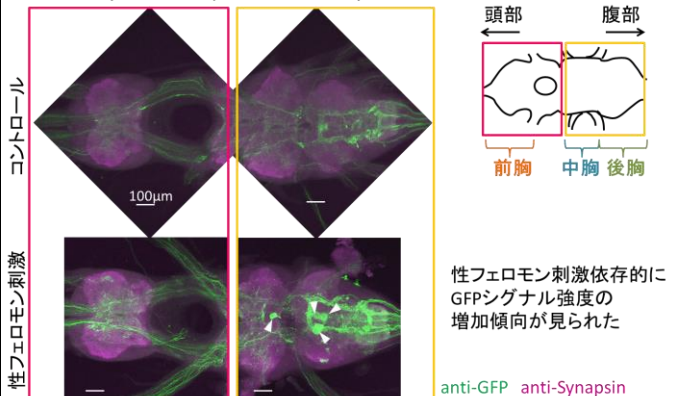
15xNBRE-Syn21-GAL4Δ-p10T Line3/UAS-myr::GFP



15xNBRE-Syn21-GAL4Δ-p10T Line3/UAS-myr::GFP



15xNBRE-Syn21-GAL4Δ-p10T Line1/UAS-myr::GFP

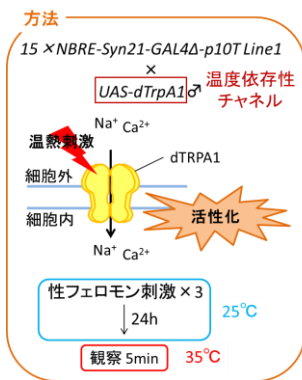


(2) 性フェロモンに応答した神経細胞の機能的意義の解明

上記のシステムを完成したことから、神経

活動依存的に GFP 以外の機能操作タンパク質を発現させることも出来るようになった。そこでまず、本システムを利用し、活動の起こった神経回路に温度依存的に開口するイオンチャネル dTrpA1 を発現するカイコガを作出した。性フェロモン刺激によって dTrpA1 を発現させ、温熱刺激による神経回路の再活性化を試みた。5 例中 2 例のみであったが、温熱刺激による性行動の再活性化を行うことが出来た（下図参照）。本結果により、NBRE システムを用いることで神経回路を可視化出来るのみならず、機能操作を行うことが可能であることが示された。只、上述の通り、再活性化率が低いことから更なる技術面での改良が必要であると考えている。

本実験で用いた UAS-dTrpA1 システムは通常のベクターを用いて作成したシステムであり、翻訳エンハンサーの付加などを行っていないシステムである。dTrpA1 タンパク質発現増強のために、20xUAS-IVS-Syn21-dTrpA1-P2A-myr::GFP-p10T システム（タンパク質発現強化型ベクターにポリシストロニックなタンパク質発現配列 P2A で dTrpA1 と myr::GFP を連結して導入）を作製した。しかし、dTrpA1 が全く機能しないこと、さらには myr::GFP が赤色蛍光タンパク質になってしまう等の不具合が起こり、本実験の改善には至らなかった。今後、別のアプローチにより機能操作タンパク質を強く発現させることで、上記の問題の解決を図りたい。



結果

コントロール			性フェロモン刺激				
1	2	3	1	2	3	4	5
x	x	x	x	○	x	x	○

温熱刺激依存的に交尾行動が誘発
→性フェロモンに反応した神経回路の再活性化に成功(2/5)

NBREシステムは神経回路の可視化だけでなく、神経活動の操作も可能

次に同様のアプローチにより Ca インジケータ (GCaMP5G) を発現するカイコガを作出し、Ca イメージングによる神経活動のリアルタイム計測を試みた。しかし、GCaMP の発現量が低く、神経活動を計測することは出来なかった。これは免疫染色で検出できるレベルと Ca イメージングが可能となるレベルでは、タンパク質の発現絶対量が大きく違うことが原因であると考えられる。今後、更に発現強度を増加させたり、計測システムを高感度化したりする必要があると考えられる。

更にシナプス伝達を阻害する破傷風毒素軽鎖 (TeTxLC) を神経活動依存的に発現することを試みた。しかし、27 年度の秋以降、研究室でカイコガの病気 (膿病) が大発生してしまい、実験を行うことが出来なかった。現

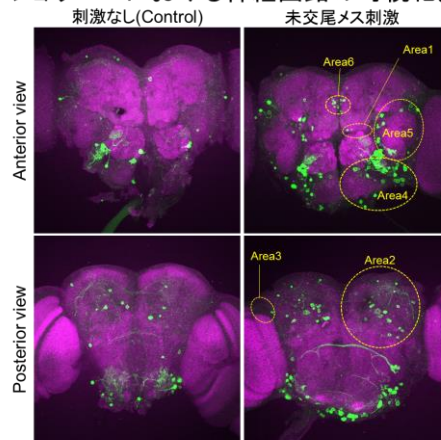
在 (28 年 4 月) では病気を駆除することが出来ているので、今後、本実験を再度行いたい。

(3) ショウジョウバエの脳において性フェロモン情報を処理する神経回路の同定と解析

Hr38 転写開始点に GAL4 をノックインした系統の作出に成功していたので、本システムを用いて *Hr38* を発現する細胞の可視化・機能解析を行った。

まず、本手法を用いてオスのショウジョウバエにメスのショウジョウバエを提示した際にどのような神経回路が活動するかを可視化した。その結果、下図のように様々な脳領域においてメス刺激依存的な GFP 陽性細胞の発現が認められた。

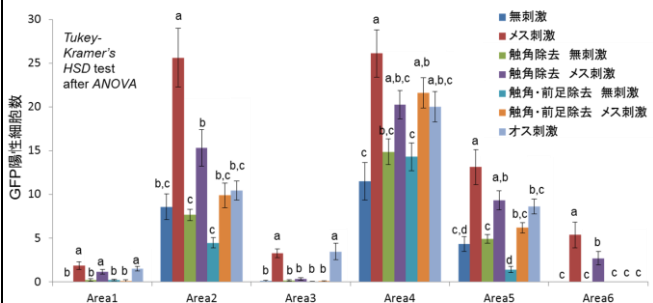
ショウジョウバエにおける神経回路の可視化法の確立



メスで刺激した際に反応した神経細胞の可視化に成功した

また、この結果を定量的に解析するために各脳領域における GFP 陽性細胞の数を数えた。この際、触角を除去した個体や、触角と先端部を除去した個体を作成し、感覚情報入力をなくした場合にどのような変化が起こるかを調べた。その結果、いずれの領域においても、メス刺激依存的な GFP 陽性細胞数の増加は、感覚情報入力の遮断によって減弱・消失することを確認した（下図）。その中でも特に Area6 と本研究者が定義した領域は、メスで刺激した際にのみ GFP 陽性細胞が認められること（オスで刺激した場合には GFP 陽性細胞が一切認められなかった）、その反応は感覚入力量依存的であることを見出した。

感覚入力依存的なGFP陽性細胞の定量的解析

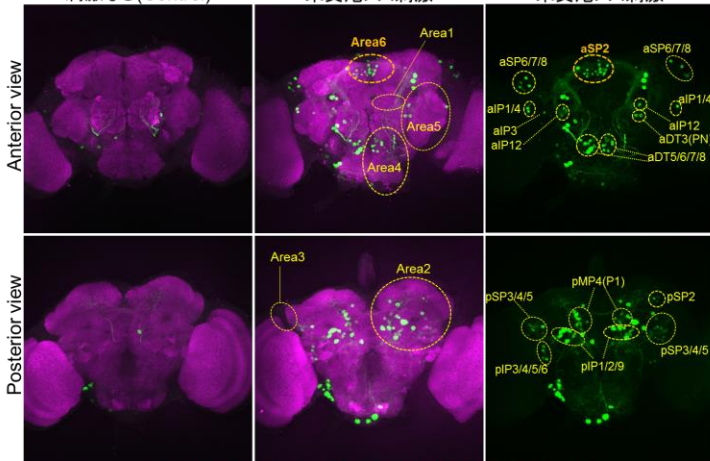


Area6神経は化学感覚入力依存的かつメス刺激特異的な反応

⇒Area6神経の構成する神経回路の同定

そこで次に Area6 の細胞の性質を調べることとした。いくつかの予備実験の結果、Area6 の細胞群は性決定遺伝子 *fruitless* 陽性であることが分かった。そこでショウジョウバエの遺伝学的手法により、*fruitless* 陽性神経回路のみで、活動依存的な神経回路の可視化を行ってみた。その結果、Area6 の細胞は *asp2* という細胞群であることを見出した (下図)。

fruitless神経回路に局限した活動依存的な細胞ラベル
刺激なし(Control) 未交尾メス刺激 未交尾メス刺激



Area6神経は、**aSP2**神経細胞群であった

次にこの *asp2* 神経回路の機能的な重要性を明らかにすることを目的に、*asp2* 特異的にシナプス伝達を阻害する破傷風毒素軽鎖 (TeTxLC) を発現する系統を作出した。この系統では性行動の開始に異常はないが、性行動の活性が低くなり、交尾を完遂することに障害があることを見出した。

そこで更に *asp2* 特異的に温度依存的に開口するイオンチャネル *dTrpA1* を発現する系統を作出した。この系統を用いて、*asp2* の神経活動を亢進させた場合の性行動を調べたが、特に性行動や交尾活性を促進するような表現型は見られなかった。

以上の結果より、活動依存的な神経回路可視化法をショウジョウバエで確立し、これを用いて交尾行動時に活動する新規な神経回路として *asp2* 神経回路を見出した。さらにこの *asp2* 神経回路は交尾行動に重要な役割を担う神経回路であることを明らかにした。先行研究によって明らかにされている *fruitless* 神経回路の構造から、*asp2* 神経回路には触角・前足先端からの性フェロモン入力および視覚からの入力があることが分かっている。また、*asp2* 神経回路は性行動指令を発する P1 神経回路の上流に位置することも明らかとなっている。これらのことを総合すると、*asp2* は様々な感覚情報を統合し、P1 神経回路に入力することで、P1 神経回路の活動に影響を与え、交尾行動の活性制御に関わっているものと推察される。今後、この仮説の検討を行ってゆきたい。

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 3 件)

(1) 木矢剛智

神経活動依存的に発現する遺伝子 *Hr38* を利用した昆虫の生得的行動時の神経活動の検出. 生化学 みにれびゅう 2015 第 87 巻 第 2 号 pp.221-224 <https://seikagaku.jbsoc.or.jp/10.14952/SEIKAGAKU.2015.870221/> [総説] 査読なし

(2) Taketoshi Kiya, Koudai Morishita, Keiro Uchino, Masafumi Iwami, and Hideki Sezutsu Establishment of tools for neurogenetic analysis of sexual behavior in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 2014 Nov 14;9(11):e113156. doi: 10.1371/journal.pone.0113156. 査読有

(3) Seika Takayanagi-Kiya, Kayo Misawa-Hojo, Taketoshi Kiya, Takekazu Kunieda, Takeo Kubo Splicing Variants of NOL4 Differentially Regulate the Transcription Activity of Mlr1 and Mlr2 in Cultured Cells. *Zoological Science*, 2014 Nov;31(11):735-40. doi: 10.2108/zs14004 査読有

[学会発表] (計 1 2 件)

(1) 木矢剛智

昆虫の生得的行動の神経基盤：活動依存的な神経回路可視化法の開発によるアプローチ. 平成 27 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会. 2015 年 9 月 26 日 北海道大学 (札幌 北海道) [招待講演]

(2) 木矢剛智

昆虫の生得的行動の神経基盤：活動依存的な神経回路可視化法の開発によるアプローチ. 日本動物学会北海道支部第 562 回支部講演会. 2015 年 9 月 25 日 北海道大学 (札幌 北海道) [招待講演]

(3) 木矢剛智

昆虫の生得的行動の神経基盤：活動依存的な神経回路可視化法の開発によるアプローチ. 平成 26 年度 日本動物学会 中部支部大会. 2014 年 11 月 22 日 金沢大学臨海実験所(能登 石川) [招待講演]

(4) Taketoshi Kiya

Visualization of neural activity of forager honeybee brain by IEGs. International Union for the Study of Social Insects International Congress. 2014 年 7 月 14 日. Cairns Convention Centre (Queensland, Australia) [招待講演]

5) Taketoshi Kiya, Masafumi Iwami

Detection of neurons that respond to female in the brain of male *Drosophila*, using a neural activity marker gene, *Hr38* JDRC11. 2014 年 6 月 6 日. 金沢歌劇座 (金沢 石川)

〔図書〕(計 2件)

木矢剛智

研究者が教える動物実験 第2巻：神経・筋
26章 遺伝子発現の差：何が違いを生むの
か？(P115-P118)

27章 遺伝子はどこで機能しているのか？
(P119-P123)

日本比較生理生化学会編

2015年

〔その他〕

ホームページ等

<http://kiya.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木矢 剛智 (KIYA TAKETOSHI)

金沢大学・理工研究域・自然システム学
系・准教授

研究者番号：90532309