

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870154

研究課題名(和文) 個体の外的環境に対する体性感覚神経の感覚受容メカニズムと情報伝達経路の解明

研究課題名(英文) Anatomical and behavioral analysis of adult somatosensory neurons in Drosophila

研究代表者

坪内 朝子 (Tsubouchi, Asako)

東京大学・分子細胞生物学研究所・研究員

研究者番号：40713566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000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をひとつの高次生体システムととらえ、体性感覚受容に関わる神経細胞を同定し、物理的刺激が全身にある様々な種類の体性感覚受容器を介して、それら多様な情報がどのような経路で中枢神経に伝達され、脳内で統合処理されているのかを解剖学的解析及び行動解析により明らかにした。具体的には、脳と腹部神経節内における1次及び2次体性感覚マップを完成し、腹部神経節内では、その構造(層構造)がほ乳類と相関性が高いことを明らかにした。また脳内では、1次と2次それぞれの体性感覚神経細胞の投射先が非常に近い領域に集まっていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Somatosensation is crucial for the survival of all animals. Animals have various types of somatosensory neurons along the entire body surface. However, their precise distribution, morphology, axonal projections and contributing neural networks in the central nervous system still remain largely unknown.

We first analyzed the axonal projection patterns of somatosensory neurons in both the brain and the thoraco-abdominal ganglion (TAG) using an array of Gal4/UAS expression driver strains that label characteristic subsets of somatosensory cells. To analyze the functional neural circuitry for somatosensation in natural circumstances, we observed the characteristic walking behavior against wind. We found that some types of somatosensory neurons only contribute to the behavioral responses. We have established both primary and secondary somatosensory projection map of the entire body in the Drosophila central nervous system by doing anatomical and behavioral analysis.

研究分野：神経科学

キーワード：体性感覚 神経回路網 ショウジョウバエ 行動実験

1. 研究開始当初の背景

生物は生体の外部からの様々な情報を感知し、その情報を正確に処理することで常に変化する外界環境に反応している。多くの生物は、五感(視覚、聴覚、嗅覚、味覚、体性感覚)を各感覚に特異的な末梢神経で感知し、その情報を中枢神経に伝えている。視覚、聴覚、嗅覚、味覚は、それぞれ体の特異的な器官に同じような形の感覚受容細胞が多数並んだアレイで刺激を感知しているのに対し、体性感覚は、体全体に分布するさまざまな形態の感覚器官から受け取る情報を統合して感知している。

この体性感覚受容は生命機能に必須であり、破綻が生じると重篤な疾患や損傷を引き起こす。例えば、痛覚感受に異常が生じれば、通常は痛みを伴わない微細な刺激に対しても痛みを感じるアロディニアを引き起こし、温度感受に異常が生じれば、個体は体温を調節できなくなって生命の危険にさらされる。また、物を触った時に受ける様々な感覚情報を統合して、その物を特定したり、強い刺激と弱い刺激を同時に受けた時、痛みを伴う強い刺激に対して優先的に忌避行動を取ったりできるのは、異なる種類の感覚細胞からの情報を正確に脳内で処理しているからだと考えられている。

しかしながら、体性感覚を感知する末梢神経が形態学的かつ機能的に多様であるという点や、体性感覚器官が個体全体に分散していて脳までの経路が複雑だという解剖学的理由から、その機能解析や神経回路解明は、他の感覚と比べ遅れている。

2. 研究の目的

哺乳類と同レベルの五感認識を持つキイロショウジョウバエを、ひとつの高次生体システムととらえ、体性感覚受容に関わる神経細胞を同定し、外的刺激に対する活動と生体の動的な変化過程を最新のイメージング技術を用いて追跡することで、物理的刺激や温度変化がどのように感知され、それら多様な情報がどのような経路で中枢神経系に伝達されるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

[1] 成虫体性感覚神経細胞の同定と形態学的観察

個体表面に埋め込まれた体性感覚受容細胞の微細な構造や細胞間の立体的な位置を明らかにすることは、外部刺激の受容機構を理解する上で重要である。そこで申請者はまず、GFP などの蛍光マーカータンパク質を神経細胞で発現させ、共焦点顕微鏡を用いてホールマウントの状態を観察し、生体内で感覚受容細胞を1細胞レベルで形態学的に分類する。

多種多様の細胞が隣接している生体内

では、詳細な細胞形態分類をおこなう上で、1細胞レベルで個別の細胞を識別できる技術が必要である。ショウジョウバエでは遺伝子発現パターンに応じて神経細胞を特異的にラベルすることができる発現誘導系統(GAL4 系統と LexA 系統)が 4,000 以上ある(Hayashi S et al., *Genesis*, 34(1-2):58-61, 2002; Miyazaki T and Ito K, *Journal of Comparative Neurology*, 518(20): 4147-81, 2010)。これら 4,000 以上の系統と幼虫の末梢神経での発現が確認されている系統の中から、胸腹部の体表や脚、翅にある体性感覚細胞を個別にラベルできる系統をスクリーニングする。

具体的には、これら発現誘導系統を用いて膜結合型蛍光タンパク質を発現させることで、個別の遺伝子発現パターンを有する体性感覚受容細胞の位置や微細な細胞形態を、高感度高解像度の共焦点顕微鏡を用いて個体内で観察する。また GAL4 系統と LexA 系統と組み合わせることで、体性感覚細胞とその周りの細胞や介在神経など、同時に二種類の細胞群を可視化する。さらには、体全体にある全く違う形の感覚器官から受け取る情報が中枢神経のどの領域に投射しているのかを明らかにする。体性感覚細胞の軸索末端の観察には脳と腹部神経節を取り出し染色を行う。

[2] 成虫体性感覚神経細胞の機能解析

形態パターンから分類した細胞がそれぞれどのような体性感覚を受容するかを、成虫の行動実験により明らかにする。成虫は自然界において、様々な刺激それぞれに対して特徴的な行動を取る。その行動の中で、風に対する歩行に注目した。成虫は、地面に止まっている状態で強い風を受けると歩行を停止して踏ん張ることが報告されている(Yorozu et al., *Nature*, 458(7235): 201-205, 2009)。この行動は、ショウジョウバエを用いて実験室内で定量的に観察可能であり、神経活動を遺伝的に操作した時に見られる行動を、ビデオ録画し MATLAB などのソフトウェアを用いて定量的に解析する。

4. 研究成果

[1] 成虫体性感覚神経細胞の同定と形態学的観察

ショウジョウバエ発現誘導系統を用いたスクリーニングを行った結果、各部位(脚、翅、平均棍、腹部)にある各種の体性感覚神経細胞を特異的にラベルすることが出来る系統を同定した。図1に一例を記載した。

[2] 成虫体性感覚神経細胞の軸索末端の観察

同定した各種体性感覚神経細胞を特異的にラベルすることが出来る系統を用いて、それら神経細胞の中枢神経への軸索投射パター

ンを、脳と腹部神経節を取り出し染色を行い観察した。その結果、脚にあるほとんどの体性感覚神経細胞は、腹部神経節で終末しているのに対し、翅や平均棍にある体性感覚神経細胞は、腹部神経節を通り、脳まで直接軸索を伸長させていることが分かった。

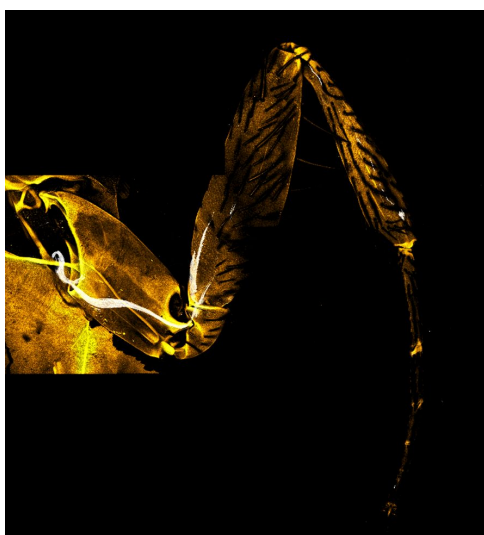
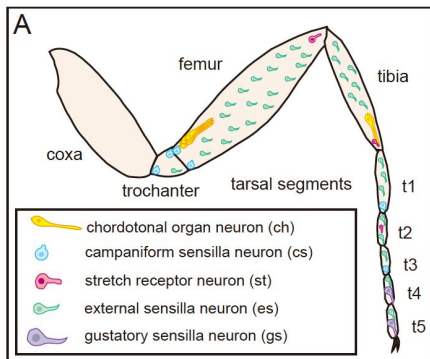


図1(上)脚の体性感覚神経細胞のイラスト。関節内部にある弦音神経(ch)、表皮クチクラに埋め込まれたドーム状の鐘状感覚子(cs)、ストレッチレセプター(st)、感覚毛細胞の付け根にある外部感覚神経(es)、味覚受容神経(gs)。(下)弦音神経(ch)を特異的にラベルすることができる発現誘導系統。写真で白く見えているものが弦音神経細胞群。

さらに詳しく観察すると、脚の体性感覚神経細胞の神経終末は、腹部神経節で層構造を形成していることが分かった。また、翅と平均棍にある体性感覚神経細胞は、その機能ごとに脳の特定の領域に直接投射していることが分かった。

[3] 2次体性感覚神経細胞の解剖学的同定
ショウジョウバエ発現誘導系統を用い、1次体性感覚神経細胞のプレシナプス領域に樹状突起を伸長させる2次神経細胞を解剖学的観察により同定した。具体的には、1次神経細胞にプレシナプス末端特異的に局在するシナプトタグミン分子を発現させ、もう一方で、2次神経細胞にポストシナプス特異的に局在するアセチルコリン受容体を発現させ、両者の共局在を共焦点顕微鏡で観察した。

[4] 成虫体性感覚神経細胞の機能解析
形態パターンから分類した細胞がそれぞれどのような体性感覚を受容するか、同定した2次神経細胞と機能的な結合が見られるかどうか、さらには異なる機能の体性感覚神経細胞が脳内のどこで情報統合を統合しているかについて明らかにした。
成虫は、地面に止まっている状態で強い風を受けると歩行を停止して踏ん張ることが報告されている (Yorozu et al., *Nature*, 458(7235): 201-205, 2009)。この先行研究に基づき、成虫は脚から得られる接地情報と、触覚から得られる風の情報を脳内で統合していることが考えられる。そこで、はじめに、脚の各体性感覚神経細胞の機能を阻害した時、どのような行動を示すのかを観察した。神経細胞の機能阻害には、細胞の電位変化を阻害するKirチャンネルタンパク質 (Baines RA et al., *The Journal of Neuroscience*, 21(5), 1523-31, 2001; Paradis S et al., *Neuron*, 30(3), 737-49, 2001) を発現させた。実験方法の模式図を図2に示す。歩行の様子をビデオ録画し、得られた動画を解析ソフト (Ctrax: The Caltech Multiple Walking Fly Tracker) を用いてトラッキングし、MatLabソフトウェアを用いて各成虫の歩行速度を算出した。

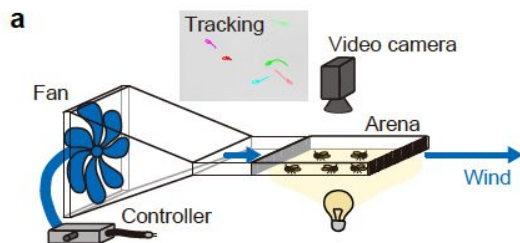


図2 行動実験の模式図 成虫を入れたチャンバの横から風を当て、歩行の様子をビデオ録画する。

その結果、感覚毛細胞の付け根にある外部感覚神経(es)の機能を阻害した場合、風刺激の有無に関わらず、歩行速度が著しく低下した。また、関節内部にある弦音神経細胞(ch)やストレッチレセプター(st)の機能を阻害した場合、風に対する正常な行動(風刺激を与えられると歩行を停止する)を取る事ができなかった。一方、鐘状感覚子や味覚受容神経細胞の機能を阻害しても、風刺激に対する行動に異常は見られなかった。さらには、弦音神経細胞(ch)の2次神経細胞の機能を阻害すると、1次神経細胞同様に、行動に異常が見られたことから、弦音神経細胞(ch)の1次神経細胞と同定した2次神経細胞は機能的に結合していることが言えた。

本研究によって、これまで明らかになっていなかった、中枢神経内のショウジョウバエの体性感覚マップを完成させることができた。その結果から、ショウジョウバエは、ほ乳類

と同等に、腹部神経節で体性感覚神経ごとに軸索の投射先が分かれており、層構造を形成していることが分かった。また、解剖学的解析と行動解析により、脳内での1次および2次神経中枢を見つけることができた。

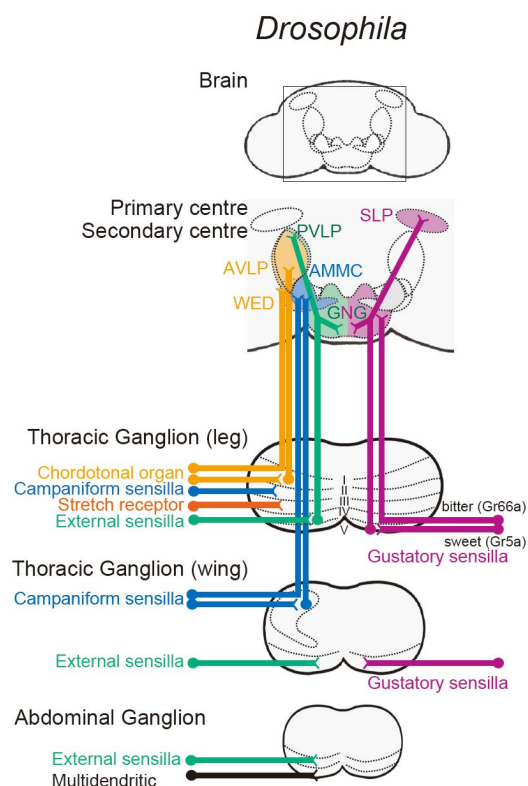


図3 ショウジョウバエの体性感覚マップ
腹部神経節(Thoracic Ganglion)では、各体性感覚神経細胞の軸索は層構造を形成している。また、脳内でも、体性感覚神経細胞ごとに、1次および2次神経細胞の投射先が分かれている。

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 1件)

(1) Mauthner SE, Hwang RY, Lewis AH, Xiao Q, Tsubouchi A, Wang Y, Honjo K, Skene JH, Grandl J, Tracey WD Jr.

Balboa binds to pickpocket in vivo and is required for mechanical nociception in *Drosophila* larvae.

Current Biology 査読有

2014 Dec 15; 24(24): 2920-2925

[http://www.cell.com/current-biology/references/S0960-9822\(14\)01347-5](http://www.cell.com/current-biology/references/S0960-9822(14)01347-5)

[学会発表](計 6件)

(1) Asako Tsubouchi, Takeshi K. Yokoyama, Tomoko Yano, Kei Ito

Somatosensory Projection Map of the Entire Body in the *Drosophila* Central Nervous

System

Cold Spring Harbor Meeting, 2015
Neurobiology of *Drosophila*

2015年09月29日~2015年10月03日

Cold Spring Harbor Laboratory (米国 ニューヨーク市)

(2) Asako Tsubouchi, Takeshi K. Yokoyama, Tomoko Yano, Kei Ito

Anatomical and Behavioral Analysis of Adult Somatosensory Neurons in *Drosophila*
第38回 日本神経科学学会

2015年07月28日~2015年07月31日

神戸国際会議場、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

(3) Asako Tsubouchi, Takeshi K. Yokoyama, Tomoko Yano, Kei Ito

Anatomical Analysis of Adult Somatosensory Neurons in *Drosophila*
3rd Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference (APDRC)

2015年05月11日~2015年05月14日

Beijing conference center (中国 北京市)

(4) Asako Tsubouchi, Takeshi K. Yokoyama, Tomoko Yano, Kei Ito

Topographic Projection Map of Adult Somatosensory Neurons in *Drosophila*
第37回 日本神経科学学会

2014年09月11日~2014年09月13日

パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(5) Asako Tsubouchi, Jessica L. Robertson, W. Daniel Tracey, Takeshi K. Yokoyama, Kei Ito

Anatomical and Behavioral Analysis of Mechanosensory Neurons in *Drosophila*

2014 International Congress of Neuroethology / Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry

2014年07月28日~2014年08月01日

札幌コンベンションセンター(北海道 札幌市)

(6) Asako Tsubouchi, Jason C Caldwell, Jessica L. Robertson, W. Daniel Tracey, Takeshi K. Yokoyama, Kei Ito

Anatomical and Behavioral Analysis of Mechanosensory Neurons in *Drosophila*

第11回 日本ショウジョウバエ研究会

2014年06月04日~2014年06月06日

金沢歌劇座(石川県 金沢市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://jfly.iam.u-tokyo.ac.jp/lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪内 朝子 (Asako, Tsubouchi)

東京大学 分子細胞生物学研究所 特任
研究員 (2016年3月まで)

東京大学 総合文化研究科 教養学部
次世代イメージング画像解析学講座 特
任助教 (2016年4月より)

研究者番号: 40713566

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし