

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04255

研究課題名(和文)コネクトミクスと光遺伝学による運動回路の機能解剖

研究課題名(英文)Functional dissection of motor circuits by connectomics and optogenetics

## 研究代表者

能瀬 聡直 (NOSE, Akinao)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：30260037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエ幼虫のぜん動運動は体の前後に沿って後から前へと筋肉が順番に収縮することで起こる。本研究で私達はコネクトミクスと光遺伝学を用い、この系ではたらく興奮性の前運動介在神経細胞群、CLIsを同定した。このニューロンは各神経節に存在し、ぜん動運動が起こる際に、後方から前方へと順番に活動する。CLIsはコリン作動性ニューロンのマーカーであるChATを発現し、運動神経が発火する直前に活動していた。さらに、CLIsを局所的に活性化すると対応する筋肉の収縮が誘導された。これらの結果はCLIsが幼虫の移動運動において体の前後に沿って運動神経細胞を直接活性化していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Drosophila larval peristalsis is generated by sequential contractions of body-wall muscles from the posterior to anterior segments. In this study, we used connectomics and optogenetics to identify excitatory premotor interneurons in this system, termed CLIs. These neurons were segmentally arrayed and activated sequentially from the posterior to anterior segments during peristalsis. The CLIs express ChAT, a marker for cholinergic neurons and were active just prior to motoneuronal firing in each segment. Moreover, local activation of CLIs induced contraction of muscles in the corresponding body segments. Our results suggest that the CLIs directly activate motoneurons sequentially along the segments during larval locomotion.

研究分野：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：コネクトミクス 光遺伝学 ショウジョウバエ 運動回路 カルシウムイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

能動的に移動できることは動物の最大の特徴であり、各動物種はそれぞれの生存環境に適した多様な運動形式を進化の過程で獲得している。ヒトの歩行や魚の遊泳など、多種多様な移動運動が自然界には存在するが、多数の筋肉を順序正しく収縮させ、さらにこれをリズムックに行うという点で共通している。従って、これを実現する神経回路の制御機構を明らかにすることは神経科学の大きな目標のひとつである。これまで歩行や遊泳といった移動運動をモデルに多くの研究がなされているが、神経回路がどのようにして様々な運動パターンを生み出すのかについての我々の理解は限られている。

### 2. 研究の目的

中枢回路研究のプラットフォームとしての整備が急速に進みつつあるショウジョウバエの幼虫において、オプトジェネティクスによる局所活動操作やコネクトミクス（電子顕微鏡画像3次元再構築）解析等の革新的技術を駆使することにより、定型運動の制御機構を理解することを目的とした。具体的には、運動神経細胞の上流の介在神経細胞を同定し、その機能、配線、活動ダイナミクスを解析することで、運動パターンを創出する神経回路の作動様式を探った。特にこれまで明らかにされてこなかった興奮性の前運動介在神経細胞を同定することを目指した。

### 3. 研究の方法

コネクトミクス解析はインターネットを介して連続電子顕微鏡(EM)画像の再構築が行えるCATMAIDと呼ばれるシステムを用い、それを開発した米国 Janelia Farm 研究所の Albert Cardona 博士らとの共同で行った。神経活動の操作には光遺伝学(optogenetics)を用いた。具体的には、Gal4-UAS システムを用い青色光感受性陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシン2(ChR2)を着目する細胞に発現させた。また神経活動阻害にはテタナス毒素を用いた。神経活動の測定には、Ca<sup>2+</sup>濃度依存性蛍光蛋白質 GCaM6f を利用したカルシウムイメージングを用いた。標本としては単離した脳神経系(脳および腹部神経節)を用い、自発的に起こるぜん動運動時(fictive movement)の神経活動を記録した。

### 4. 研究成果

(1) 興奮性前運動介在神経細胞 CLIs の同定と機能解析  
幼虫のぜん動運動は前後体節間を一方向に伝わる筋収縮の波である(図1)。以前の研究により私達はカルシウムイメージングを用いて、前運動介在神経細胞(運動神経細胞のシナプス前細胞)PMSI(per-positive median segmental interneurons)を同定し、このニューロンが抑制を介して運動神経細胞の発火時間を調節することでぜん動運動の速度を制御していることを見いだした(Kohsaka et al., Curr. Biol., 2014)。しかし、興奮性の前運動介在神経細胞は見つかっていなかった。そこで、本研究では、幼虫の全中枢神経系を含む電子顕微鏡画像3D空間において前運動介在神経細胞の再構築を行い、その形態と投射パターンを解析することで候補となる細胞を探した。具体的には運動神経細胞上のポストシナプス終末から逆行的に軸索をトレースし、最終的に前運動神経細胞を同定し、このなかにCLI(cholinergic lateral interneuron)と名付けた一群の介在神経細胞を同定した。CLIは各体節に存在し同じ体節(もしくは近接する体節)の運動神経細胞をシナプス支配する局所介在神経細胞であった。その機能を調べるために、まず当該細胞において特異的に発現するGal4系統をJanelia研究所のJim Truman博士との共同研究で探索し該当するものを見出した。次に、得られたGal4系統を用いて、光依存性活性化チャンネルチャンネルロドプシン2(ChR2)をCLI細胞において特異的に発現させ、光により一過的にこの神経細胞を興奮させたときの幼虫の行動への影響を調べた。その結果、筋肉の収縮が見られたことから、CLI細胞は運動神経細胞に対し興奮性の入力を与えていると示唆された。より詳細にCLIの機能を調べるために、解剖した幼虫において集光したレーザー光を各神経節に照射し筋収縮への影響を調べた。その結果、局所的な筋収縮が観察されたことからCLIは局所的に運動神経細胞を興奮させることが分かった(図2)。また、免疫組織化学法によってもCLIが興奮性のアセチルコリン作動性マーカーを発現することを確認した。次にカルシウムイメージングによる活動パターンの解析を行った。GCaMP6fをレポーターとしカルシウムイメージングを行い、ぜん動運動における活動パターンを解析した。

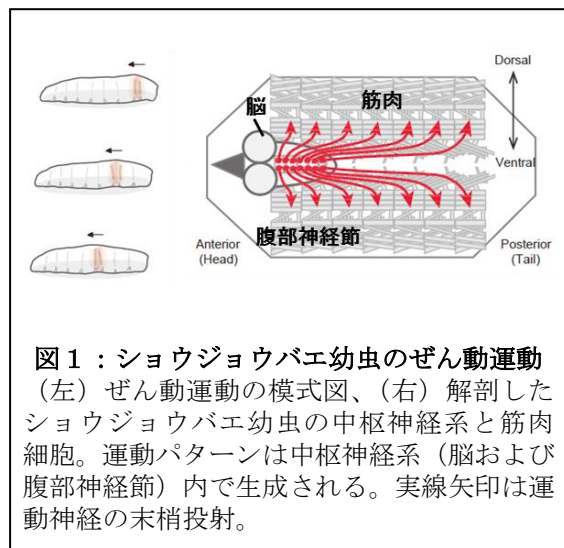
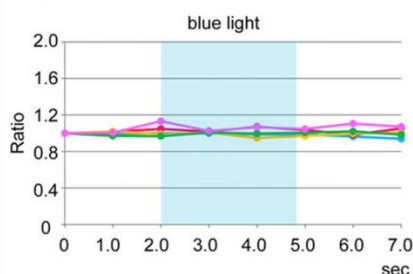
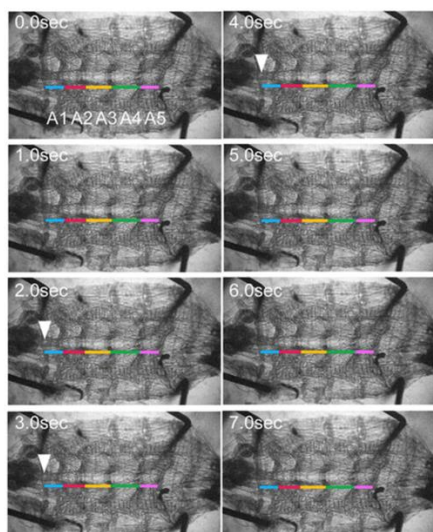


図1: ショウジョウバエ幼虫のぜん動運動 (左) ぜん動運動の模式図、(右) 解剖したショウジョウバエ幼虫の中中枢神経系と筋肉細胞。運動パターンは中枢神経系(脳および腹部神経節)内で生成される。実線矢印は運動神経の末梢投射。

細胞の発火時間を調節することでぜん動運動の速度を制御していることを見いだした(Kohsaka et al., Curr. Biol., 2014)。しかし、興奮性の前運動介在神経細胞は見つかっていなかった。そこで、本研究では、幼虫の全中枢神経系を含む電子顕微鏡画像3D空間において前運動介在神経細胞の再構築を行い、その形態と投射パターンを解析することで候補となる細胞を探した。具体的には運動神経細胞上のポストシナプス終末から逆行的に軸索をトレースし、最終的に前運動神経細胞を同定し、このなかにCLI(cholinergic lateral interneuron)と名付けた一群の介在神経細胞を同定した。CLIは各体節に存在し同じ体節(もしくは近接する体節)の運動神経細胞をシナプス支配する局所介在神経細胞であった。その機能を調べるために、まず当該細胞において特異的に発現するGal4系統をJanelia研究所のJim Truman博士との共同研究で探索し該当するものを見出した。次に、得られたGal4系統を用いて、光依存性活性化チャンネルチャンネルロドプシン2(ChR2)をCLI細胞において特異的に発現させ、光により一過的にこの神経細胞を興奮させたときの幼虫の行動への影響を調べた。その結果、筋肉の収縮が見られたことから、CLI細胞は運動神経細胞に対し興奮性の入力を与えていると示唆された。より詳細にCLIの機能を調べるために、解剖した幼虫において集光したレーザー光を各神経節に照射し筋収縮への影響を調べた。その結果、局所的な筋収縮が観察されたことからCLIは局所的に運動神経細胞を興奮させることが分かった(図2)。また、免疫組織化学法によってもCLIが興奮性のアセチルコリン作動性マーカーを発現することを確認した。次にカルシウムイメージングによる活動パターンの解析を行った。GCaMP6fをレポーターとしカルシウムイメージングを行い、ぜん動運動における活動パターンを解析した。

### control



### experimental

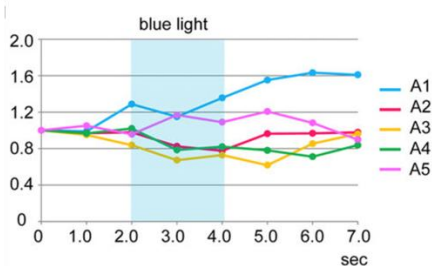
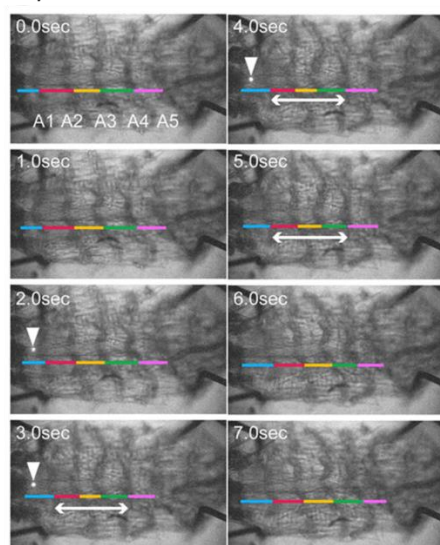


図3：CLIニューロンの機能解析

光操作で CLI ニューロンを活性化したとき (下) と対照群 (上) における筋収縮の時間経過 (写真) と各体節の長さ (色分けして示す) の定量解析 (グラフ)。

その結果、CLI の活動はぜん動運動に伴い波状の活動を示し、その活動は各神経節において運動神経細胞細胞の直前に起こることが分かった (図3)。以上の結果は CLI がぜん動運動時に各体節において運動神経細胞細胞を活性化していることを示唆するものである。

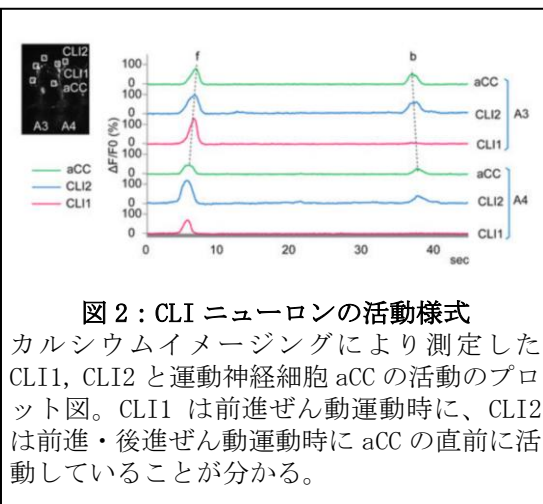


図2：CLIニューロンの活動様式

カルシウムイメージングにより測定した CLI1, CLI2 と運動神経細胞 aCC の活動のプロット図。CLI1 は前進ぜん動運動時に、CLI2 は前進・後進ぜん動運動時に aCC の直前に活動していることが分かる。

### (2) 興奮性前々運動 CDLI 介在神経細胞の同定と機能解析

CDLI(cholinergic dorso-lateral interneurons)は各体節に存在する介在神経細胞である。ぜん動運動の制御にどのように関わっているのかを探るため、カルシウムイメージングを行い、ぜん動運動における活動パターンを解析した。その結果、ぜん動運動の開始と同じタイミングで、体の中程の数体節において同時に活動が起こることが分かった。

次に CDLI がどのような下流回路を介して運動制御に関わるのかを探るため、CDLI を起点としてコネクティクス解析を行った。その結果、CDLI の主な下流ニューロンとして、体壁を縦に走る筋肉群 (transvers muscles, TMs) を支配する運動神経細胞を阻害すると考えられる GABA 作動性ニューロンを同定した。テタナス毒素を用いて CDLI ニューロンを阻害すると、ぜん動運動の頻度と速度が減少することが分かった。以上の結果を合わせると、CDLI ニューロンはぜん動運動の開始時に筋肉群 TMs を弛緩させることで、正常な運動を制御していることが示唆された。

### 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 6 件)

- ① Takagi S, Cocanougher BT, Niki S, Miyamoto D, Kohsaka H, Kazama H, Fetter RD, Truman JW, Zlatic M, Cardona A, \*Nose A. Divergent Connectivity of Homologous

- Command-like Neurons Mediates Segment-Specific Touch Responses in *Drosophila*. *Neuron* **96**(6):1373-1387 (2017) doi: 10.1016/j.neuron.2017.10.030. (査読有)
- ② \*Kohsaka H, Guertin PA, Nose A. Neural circuits underlying fly larval locomotion. *Current Pharm. Design.* **23**:1-12 (2017) doi: 10.2174/1381612822666161208120835. (査読有)
- ③ 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**: 2045-2060 (2017) doi: 10.1523/JNEUROSCI.1453-16.2017. (査読有)
- ④ Hasegawa E, Truman JW, \*Nose A. Identification of excitatory premotor interneurons which regulate local muscle contraction during *Drosophila* larval locomotion. *Sci Rep.* **2016**; **6**: 30806 (2016) doi: 10.1038/srep30806. (査読有)
- ⑤ 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* **10**, 7554/eLife.13253 (2016) doi: 10.7554/eLife.13253. (査読有)
- ⑥ 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* **3**, e0136660 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0136660. (査読有)
- [学会発表] (計 11 件)
- ① Nose A : Optophysiological and connectome analyses of the neural circuits regulating escape behaviors in *Drosophila* larvae 日本比較生理生化学会第39回福岡大会, 福岡大学 (2017)(招待講演) (国際学会)
- ② Nose A : Circuit mechanisms of action selection in *Drosophila* larvae, Systems biology of the brain “Reconstructing the connectome of the fruit fly larva” : CUSO Staromics PhD-program Workshop, University of Fribourg, Switzerland (2017) (招待講演) (国際学会)
- ③ Takagi S, Cocanougher BT, Niki S, Miyamoto D, Kohsaka H, Kazama H, Fetter RD, Truman JW, Zlatic M, Cardona A, Nose A : “Divergent connectivity of homologous command-like neurons mediates segment-specific touch responses in *Drosophila*” CSHLMMeeting “Neurobiology of *Drosophila*”, Cold Spring Harbor Laboratory, USA (2017) (国際学会)
- ④ Takagi S, Cocanougher BT, Niki S, Miyamoto D, Kohsaka H, Kazama H, Fetter RD, Truman JW, Zlatic M, Cardona A, Nose A : “Divergent connectivity of command-like neurons mediates segment-specific touch responses in *Drosophila* larvae” 第17回 東京大学生命科学シンポジウム, 本郷 (2017)
- ⑤ Kohsaka H, Zwart MF, Fushiki A, Fetter RD, Truman JW, Cardona A, Nose A : Bidirectional feedback circuits regulate propagation of motor activity in opposite directions. 第40回日本神経科学大会, 幕張 (2017)
- ⑥ Ohura S, Kohsaka H, Nose A : Identification of interneurons that regulate backward locomotion during light-avoidance behavior in *Drosophila* larvae. 第40回日本神経科学大会, 幕張 (2017)
- ⑦ Takagi S, Cocanougher BT, Niki S, Miyamoto D, Kohsaka H, Kazama H, Fetter RD, Truman JW, Zlatic M, Cardona A, Nose A : “A segment-specific sensorimotor pathway mediates touch-triggered backward escape response in *Drosophila* larvae”, 第40回日本神経科学大会, 幕張 (2017)
- ⑧ Hiramoto A, Jonaitis J, Niki S, Miyamoto D, Fetter RD, Cardona A, Pulver S, Nose A : Identification of neuronal circuitry that regulate backward escape behavior in *Drosophila* larvae 第40回日本神経科学大会, 幕張 (2017)
- ⑨ Nose A : Genomic and connectomics analysis of the motor circuits in larval *Drosophila*, NSF Workshop: Comparative Principles of Brain Architecture and Functions, Marriott Marquis San Diego Marina, USA (2016) (招待講演) (国際学会)
- ⑩ Nose A, Kohsaka H, Yoon Y, Takagi S, Hiramoto A, Ohura S, Niki S : Circuit mechanisms that regulate motor pattern in larval *Drosophila*. Behavioral Neurogenetics of *Drosophila* Larva, Janelia Farm Research Campus, USA (2016) (招待講演) (国際学会)

- ⑪ Hasegawa E, Truman JW, Nose A :  
Search for cholinergic interneurons  
that regulate larval locomotion in  
*Drosophila*. 第7回光操作研究会国際シ  
ンポジウム「神経回路と神経装飾」, 東  
京 (2015) (国際学会)

[その他]

ホームページ

能瀬・高坂研究室

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

能瀬 聡直 (NOSE Akinao)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・  
教授

研究者番号 : 30260037