

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06332

研究課題名(和文) 交尾か拒否かの性行動を選択する神経回路におけるドーパミン信号の分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular control mechanisms of dopamine signaling in the neural circuit for action selection of mating.

研究代表者

石元 広志 (Ishimoto, Hiroshi)

名古屋大学・理学研究科・特任准教授

研究者番号：80643361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：配偶行動においてメスは、オスの求愛を直ちには受入れず、まず相手を評価した後、交尾を受入れる。ショウジョウバエにおいて、この交尾前の拒否から受容への行動切換えを制御する脳の神経回路を発見し、回路を構成する神経細胞のそれぞれで、異なるドーパミン受容体が活動を制御することを発見した。本研究では、ドーパミン信号が如何にこの神経回路の挙動を制御するのかについて、回路を構成する神経細胞のドーパミン応答を生理学的に解析した。その結果、神経細胞間の接続の有無やドーパミン入力持続時間に依存して、神経応答様式が変化すること、またこの変化の時間タイミングは、メスの行動切替を説明しうることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、交尾の配偶行動を選択決定する脳機能を担う神経回路において、ドーパミンという単一の神経伝達分子を用いながら、複数の回路挙動を分岐させる神経回路の動作原理を細胞レベルでその解明に迫った、という学術的な意義がある。この神経回路は、哺乳類の大脳基底核と機能的な類似性を示す。異性に対する親愛性、仲間との絆形成といった、他者と自己の関係性を構築するための脳の基本原理を解くために、本研究で得た知見を様々な生物間で比較することが可能になった。これにより、個体間コミュニケーションの獲得と進化の謎を解くことが期待され、また、対人関係に関わる社会問題や疾患の解決と治療に新たな方法を提供しうる。

研究成果の概要(英文)：In the mating behavior, females do not immediately accept the courtship from males, but rather evaluate their mates first before accepting them for mating. We found a neural circuit that controls this behavioral switch from pre-mating rejection to acceptance in *Drosophila*, and found that different dopamine receptors control the activity in each of the neurons that make up the circuit. In this study, we physiologically analyzed the dopamine response of the neurons that make up the circuit in order to clarify how dopamine signals control the behavior of this circuit. The results suggest that the neural response patterns depend on the presence or absence of connections between neurons and the duration of dopamine input, and that these patterns may be consistent with behavioral switching in females.

研究分野：行動遺伝学、神経行動学、内分泌神経科学

キーワード：ドーパミン 配偶行動 意思決定 行動選択 フィードフォワード フィードバック

1. 研究開始当初の背景

メスの配偶行動において、交尾を受入れるか又は拒否するのか、といった意思決定が、どのような分子や脳神経回路で情報処理され最終的な行動が選択されるのか、その仕組みの多くが未だ解明されていない。脊椎動物の配偶者選択において、大脳基底核線条体が上記の行動決定に重要な役割を担うことが知られている。例えば、一夫一婦のハタネズミは線条体のドーパミン分泌量に依存して、つがい関係が成立する。この線条体のドーパミンシグナル強度の調節がメスの交尾意思の決定に重要なことは明白である。しかしながら、メスが交尾の拒否・受容を選択判断する脳神経機能を分子レベル・単一細胞レベルの解像度で詳細解析するには、マウス等の哺乳類動物モデルにおいても、脳の神経構造の複雑さが解析のボトルネックとなっている。この問題を解決するためには、単純な脳神経をもつモデル実験系が有用である。

昆虫モデル生物のショウジョウバエのメスは求愛開始直後のオスに拒否行動を示す。しかし、求愛が継続してオスの情報が蓄積するにしたがって、交尾を受容するように行動が転換する。このメスの配偶行動において、拒否・受容の行動を切替える脳神経機構について、交尾の受容行動を駆動するコマンド神経細胞群の関与が推定されているが、同種のオスを一旦拒否する行動を説明するに至っていない。そのため、メスの脳内に交尾の「拒否と受容を選択制御する」機能を持つ別の神経回路の存在が推定された。上記の経緯から私は、ショウジョウバエの配偶行動から分子遺伝学的に行動の制御に関わる神経細胞群の同定を行い、楕円体と呼ばれる神経構造体内のニューロン群が、メスの配偶行動を制御する回路(以後、交尾判断回路と記載)を形成していることを見出した。この交尾判断回路は、近年、脊椎動物の大脳基底核と構造的、機能的な類似性が提唱されている「中心複合体」を構成している(Strausfeld and Hirth, Science 2013)。また、脊椎動物の大脳基底核と同様に、ハエの交尾判断回路においてもドーパミンシグナルが配偶意思決定に重要であることを見出していた。

2. 研究の目的

ショウジョウバエの交尾判断回路は、アセチルコリン作動性神経細胞群(R4d)とGABA作動性神経細胞群(R2/R4m)で構成されており、R4dは求愛を拒否する行動を、一方でR2/R4mは、R4dに抑制性シナプスを接続して求愛を受容する行動を促進する。これら両神経細胞群は、異なるドーパミン受容体によって活性化されることを明らかにしている。拒否と受容という正反対の行動を促す異なる神経細胞群(R4dとR2/R4m)が共通の神経伝達物質であるドーパミンによって、どのように神経活動が制御され、行動選択に至るのか、その分子制御機構を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

交尾判断回路を構成する2種類の神経細胞群(R4dとR2/R4m)の活性化を制御する分子機構を担う分子実体を明らかにする。この分子実体においては、予備検討から明らかにしているグルタミン酸シグナル経路を中心に関連分子について、行動制御への関与を明らかにする。また、それら分子群による当該神経細胞群の回路接続関係を詳細に解析するとともに、機能的な神経制御様式を明らかにする。さらに、R4dとR2/R4m神経細胞群にドーパミン受容体を異所的に発現して、ドーパミン受容体に依存した当該神経細胞群の活動制御を明らかにする。これらについて下記の方法を用いて研究を進めた。

メスの配偶行動解析：野生型のオスに対する、メスの配偶行動をビデオ録画する。こ

のビデオデータから、経時的な積算交尾率、交尾潜時を自作した PC プログラム (図 1) を用いて半自動的に検出・算出した。算出結果は、再度ビデオデータを目視で確認する。

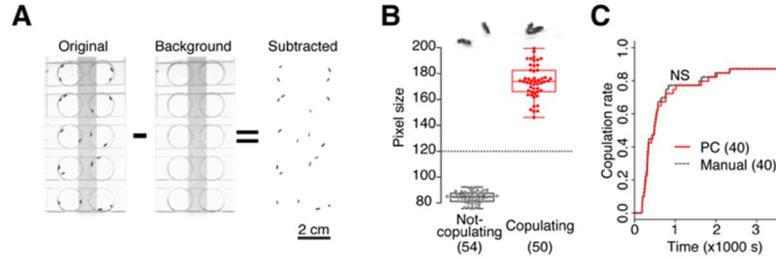


図 1 自動行動解析手法

神経細胞と神経回路の形態解析法：交尾判断回

(A)背景画像との差分でハエを検出する。(B)交尾状態を物体のピクセル数で分別する。(C)手動解析と同等の結果を得られる。野生型オスとペアにして性行動を解析する。

路を構成する個々の神経細胞の実際のシナプス接続の場所と数の推定を目的には *Syb::GRASP* (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners) 法を用いた。 *Syb::GRASP* 法は、神経細胞間の接続を可視化する分子遺伝学的手法である。二分割した GFP 分子の一方をシナプスタンパク質の *Synaptobrevin* (*Syb*) に融合している。これにより、神経細胞の接続とシナプス情報の方向性を可視化して検出できる。また、Trans-TANGO 法を用いて交尾判断回路内のシナプス情報伝達の方向性を検証した。

神経活動の Ca^{2+} イメージング解析：神経伝達物質ドーパミンに対する交尾判断回路の神経応答の様式を解析する目的で、カルシウムインディケータタンパク質 (GCaMP6f) を Gal4/UAS 法を用いて、神経特異的に発現させた。人工体液組成液中でハエの脳を取り出し、スピニングディスクコンフォーカル顕微鏡で GCaMP6f の輝度変化を観察する。脳に対して、マイクロピペットからドーパミン刺激液を噴出 (パフ) して目的の神経細胞を刺激した。GCaMP6f の輝度変化から、最大輝度値、応答潜時、応答持続時間を ImageJ を用いてデータ抽出した。

4. 研究成果

ドーパミン作動性 PPM3 神経細胞と交尾判断回路がどのように情報をやりとりしているのかを明らかにする目的で、PPM3 神経細胞の接続先および接続方向を分子形態学的に調べた。まず、順行性トランスシナプスマーカー法 (Trans-TANGO 法) を用いて PPM3 神経細胞の下流神経細胞群を網羅的に可視化したところ、楕円体神経細胞群が主たる下流の接続細胞であること

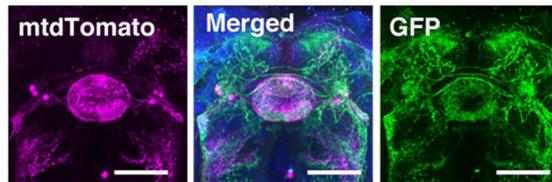


図 2 Trans-TANGO 法

着目した神経細胞を GFP で標識し、下流に接続している全ての神経細胞を mtdTomato で可視化する。PPM3 ドーパミン神経細胞の下流接続神経が楕円体であることを示している。Scale bars: 50 μ m

を明らかにした。さらに PPM3 神経細胞の入力側を GFP 標識したアセチルコリン D₇ 受容体サブユニットを発現させて可視化したところ、PPM3 神経細胞は、上方前大脳内側部 (Superior medial protocerebrum, SMP) に入力部位が密集していることが分かった。SMP は、非密集型の神経叢構造をとり、嗅覚フェロモン情報に代表される性に関する感覚情報と性行動出力を統合する領域と考えられている。従って、PPM3 神経細胞がオスの情報を楕円体当該神経回路に入力すると考えられた。また、*Syb::GFP* を用いて PPM3 神経細胞の出力シナプスを可視化したところ、Trans-TANGO で示された楕円体神経細胞と接する部位に GFP 蛍光シグナルが集中していた。これらの解析から、片側脳で 2 個の PPM3 神経細胞は、オスの性的な上昇が集約する SMP 脳領域から情報を入力し、楕円体に対して出力していることを明らかにした (図 2)。この結果は、PPM3 神経細胞の活動を操作して得られた機能的な知見と合致していた。

ハエのドーパミン神経系と楕円体神経系は、歩行運動などの活性を調節する役割も担う。そのため、これら神経系の機能を分子遺伝学的に抑制または活性化した場合、メスの運動活性(能力)に依存して交尾率が変化する可能性がある。そこで、これまでに明らかにした神経細胞群や分子群の操作による交尾率の変化が、メスの運動活性(歩行速度)と相関するのかを解析した。その結果、メスの運動活性と交尾率は相関がなかった(図3)。

交尾判断回路を構成する R2/R4m 神経細胞は、抑制性の神経伝達物質 GABA を用いて、交尾潜時の短縮と交尾率の上昇を促す。一方で、R4d 神経細胞において GABA_A 受容体を介した GABA シグナルを遮断すると、交尾拒否行動が極端に長く持続する。これにより、交尾潜時の延長と交尾率の低下が生じた。これらの神経機能の解析によって、R2/R4m から R4d への抑制性のシナプス接続が示唆され、*Syb*-GRASP 法で神経接続を可視化したところ、この接続を確認することができた(図4)。

交尾判断回路を構成する R2/R4m、R4d 神経細胞に発現する分子情報を single cell RNAseq データベース(scope.aertslab.org)から取得した結果、GABA やドーパミン受容体に加えて、グルタミン酸、NMDA 受容体、一酸化窒素合成酵素(NOS)が発現していることが分かった。次に、個々の遺伝子発現を R2/R4m もしくは R4d 神経細胞群特異的に抑制して、メスの交尾行動を解析した。その結果、R2/R4m 神経細胞由来のグルタミン酸/NMDAR シグナルが R4d 神経細胞群の NOS を活性化し、発生した NO が逆行性シナプス伝達によって R2/R4m 神経細胞群の GABA 放出が促進され、今度は R4d 神経細胞群を抑制する神経機構が強く示唆された。以上の研究成果は、事前の仮説を支持する結果であるとともに、交尾判断回路を構成する神経細胞種の活動に依存して交尾拒否と受容の判断が想定以上に柔軟に制御されている事を示唆していた(図5)。これらの成果は、論文にまとめ発表した(Ishimoto & Kamikouchi 2020 Current Biol.)。

これまでの研究成果では R2/R4m と R4d へのドーパミンシグナルの入力は一様である、ことを前提にしている。しかし、実際には、これら個々の神経細胞種において異なるドーパ

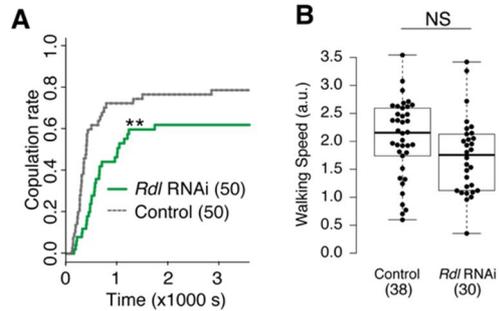


図3 交尾率と運動活性
(A)R4d 神経細胞で GABA 受容体の発現を抑制したメス(緑)は、交尾拒否が強まり交尾率が低くなる。(B)このメスバエの運動活性はやや低下している。運動活性が上昇する事が拒否行動が強まる理由ではないことが分かる。

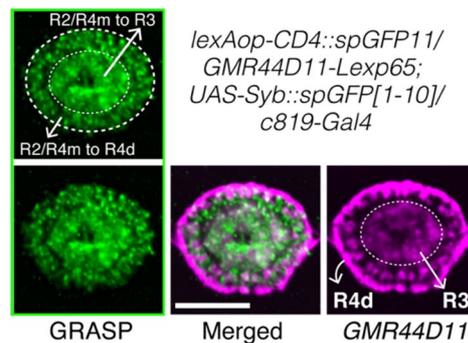


図4 *Syb::GRASP* 法
R2/R4m 神経細胞を Green、GRASP シグナルを Magenta で標識している。R4d リングに強い GRASP シグナルが検出できたことから、R2/R4m から R4d への方向へのシナプス接続が示唆された。Scale bar: 25µm

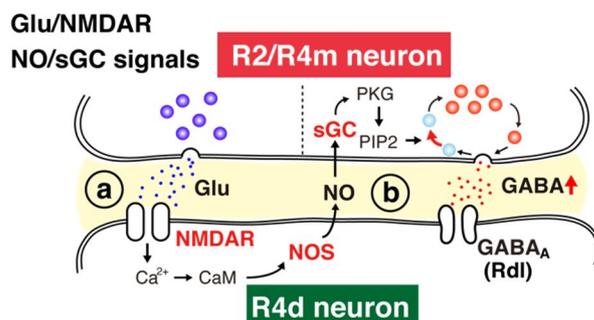


図5 交尾判断回路の逆行性シナプス伝達制御
(a)R2/R4m 神経細胞から放出されるグルタミン酸は NMDAR を介して R4d 神経細胞を活性化する。(b)R4d 神経細胞の NOS に依存して生成された NO は R2/R4m 神経細胞への逆行性シナプス伝達によって sGC の活性化を促す。これにより GABA の放出が促進されることが示唆された。

ミン受容体を介した神経活動の制御が行われている。ドーパミン受容体の違いが回路の動作様式にどのように作用するのかを明らかにする目的で、Gal4/UAS 法を用いて異所的にドーパミン受容体を発現させて、メスの配偶行動を解析した。

ショウジョウバエには4種類のドーパミン受容体(*DopR1*, *DopR2*, *D2R*, *DopEcR*)がある。遺伝子発現抑制操作から、R4dで*DopR2*がR2/R4mで*D2R*が神経活性化に必要であることを明らかにしている。そこで、メスの行動発現に必要なこれら受容体とは異なるドーパミン受容体をR4dもしくはR2/R4mで異所的に過剰発現させた場合のメスの配偶行動を解析した。その結果、R4dで*DopR1*, *D2R*, *DopEcR*を過剰発現した場合であっても、野生型と比較してメスの交尾潜時と積算交尾率に大きな変化は検出されなかった。同様にR2/R4mにおいて、*DopR1*, *DopR2*, *DopEcR*のいずれかを過剰発現させても、行動に対する影響はなかった。この結果は、本来発現している受容体の頑健性が高い可能性を示唆している。元の受容体の発現を他の受容体で置換える操作が必要である。

交尾判断回路の動作に特に重要な因子がドーパミンである。これまでの検討から、交尾判断回路へのドーパミン入力強度と持続時間が、交尾判断回路を構成する神経細胞の活動を転換させる鍵になる。この仮説を検証する目的で、交尾判断回路のドーパミンに対する応答を神経生理学的に解析した。GCaMP6fをR4d神経細胞群で発現させ、摘出脳を観察対象とした。高濃度のドーパミン(~50mM)で刺激した場合、R4d神経細胞は、即座に応答するが数秒で応答が収束した。また、脳を洗浄した後に再刺激をしても再応答は得られなくなっていた。一方で、低濃度のドーパミン(<100 μ M)で刺激をした場合、長い応答潜時(5~10分)の後に、スパイク状に輝度値の変化が開始され、その応答様式は、刺激をしている間、維持された。さらに洗浄後の再応答も観察された。低濃度のドーパミンに対する応答潜時が長いことから、ドーパミンで活性化する他の神経細胞からの入力が、R4d神経細胞の応答の原因である可能性がある。そこで、テトロドトキシンを用いて神経間のシナプス情報のやりとりを抑制した。その結果、応答潜時が短縮され、また応答輝度変化が増加した。未だ多くの検討の余地を残すものの、交尾判断回路のR4d神経細胞がドーパミンに応答すること、またこの応答が他の神経細胞のシナプス接続により抑制されていること、が推測するに足る結果である。R2/R4m神経細胞は、R4d神経細胞を抑制的に制御するため、Ca²⁺イメージング法で観察された上記の生理応答変化に関与している可能性が高い。本研究期間において、Ca²⁺イメージング装置の故障と、不完全ながら復旧した状態であったが、上記で示した興味深い成果を得ることができた。今後は、R2/R4m神経細胞も同様にその生理応答を解析し、R4d神経細胞の応答の時系列変化様式と比較する。さらに分子遺伝学的に神経活動を操作する因子を導入し、R2/R4m神経細胞(又はR4d神経細胞)の活動に依存したR4d神経細胞(又はR2/R4m神経細胞)のドーパミンに対する応答を解析する予定である。

本研究によって、メスの配偶行動において、オスの求愛を一旦拒否しつつ、その後交尾を受容に転換もしくは拒否を維持する、といった行動選択や意思決定に関わる脳の神経回路とその駆動に関与する一連の分子群を同定することができた。これら成果は、学術誌に掲載され(Ishimoto & Kamikouchi 2020 *Current Biol.*)、また、多くのメディアに取り上げられ、広く一般に研究成果を伝えることができた。さらに、同定した回路の動作機構を生理学的に解析した結果から、本研究の成果は、交尾の配偶行動を選択決定する脳機能を担う神経回路において、ドーパミンという単一の神経伝達分子を用いながら、複数の回路挙動を分岐させる神経回路の動作原理を細胞レベルでその解明に迫った、という学術的な意義がある成果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ishimoto Hiroshi, Kamikouchi Azusa	4. 巻 30
2. 論文標題 A Feedforward Circuit Regulates Action Selection of Pre-mating Courtship Behavior in Female <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 396 ~ 407.e4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2019.11.065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ishimoto Hiroshi, Sano Hiroko	4. 巻 136
2. 論文標題 Ex Vivo Calcium Imaging for Visualizing Brain Responses to Endocrine Signaling in Drosophila	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/57701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Daichi, Ishimoto Hiroshi, Li Xiaodong, Kohashi Tsunehiko, Ishikawa Yuki, Kamikouchi Azusa	4. 巻 38
2. 論文標題 GABAergic Local Interneurons Shape Female Fruit Fly Response to Mating Songs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4329 ~ 4347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.3644-17.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Li Xiaodong, Ishimoto Hiroshi, Kamikouchi Azusa	4. 巻 7
2. 論文標題 Auditory experience controls the maturation of song discrimination and sexual response in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.34348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Li Xiaodong, Ishimoto Hiroshi, Kamikouchi Azusa	4. 巻 8
2. 論文標題 Assessing Experience-dependent Tuning of Song Preference in Fruit Flies (<i>Drosophila melanogaster</i>)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.2932	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishimoto Hiroshi, Kamikouchi Azusa	4. 巻 Apr10
2. 論文標題 Molecular and neural mechanisms regulating sexual motivation of virgin female <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-021-03820-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Li Xiaodong, Kruszelnicki James, Chiba Yukina, Ishimoto Hiroshi, Ishikawa Yuki, Kamikouchi Azusa	4. 巻 2020.07.16.205443
2. 論文標題 Auditory experience prevents loss of the innate song preference as a selective cue in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.07.16.205443	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 石元広志, 上川内あづさ
2. 発表標題 A feedforward circuit controls pre-mating courtship response via a reciprocal signaling systems in female <i>Drosophila</i> .
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石元広志, 上川内あづさ
2. 発表標題 A feedforward circuit in the central complex regulates action selection of pre-mating courtship behavior in female <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石元広志, 上川内あづさ
2. 発表標題 交尾意思決定を制御するショウジョウバエのフィードフォワード神経回路
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Ishimoto and Azusa Kamikouchi
2. 発表標題 Dopaminergic control of a central circuit for the decision-make process of female mating.
3. 学会等名 第13回日本ショウジョウバエ研究会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石元広志
2. 発表標題 求愛記憶の詳細定量法
3. 学会等名 第11回分子高次機能研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Ishimoto and Azusa Kamikouchi
2. 発表標題 A feedforward circuit regulates decision-make process of mating in female Drosophila.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石元広志, 上川内あづさ
2. 発表標題 A feedforward circuit in the ellipsoid body regulates action selection of pre-mating courtship behavior in female Drosophila
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>愛の獲得には、継続的な求愛が必要 ~世界初、拒否と受容の行動切替メカニズムを解明! ~ http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20200106_sci1.pdf 朝日新聞：ハエの世界、求愛繰り返しれば効果あり メスの行動が変化 https://www.asahi.com/articles/ASMDM62XHMDMOIPE02J.html 読売新聞：オスがめげずに求愛、メスは拒否から受け入れへ...実験で明らかに https://www.yomiuri.co.jp/science/20200104-0YT1T50148/ 毎日新聞：「求愛拒否から受け入れへ」脳の仕組み解明 ハエの研究で 名大チームら https://mainichi.jp/articles/20200102/k00/00m/040/213000c 時事通信：ハエの求愛、粘りが大事 雌が拒否から受容へ 脳の仕組み解明・名古屋大 https://www.jiji.com/jc/article?k=2020010300036&g=soc</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------