

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300120

研究課題名(和文) 動体認識の神経回路とその動作機構

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of motion detection circuits

研究代表者

佐藤 純 (Sato, Makoto)

金沢大学・新学術創成研究機構・教授

研究者番号：30345235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)： 動体認識は多くの動物において見られる基本的な視覚情報処理であるが、その動作機構は不明な点が多く神経科学における重要な課題となっている。本研究ではショウジョウバエ視覚系を用いて動体認識回路の同定およびその機能解析を行った。

まずハエに対して様々な視覚刺激を与え、ハエの応答を赤外線センサーによって測定するインセクトアリーナを構築した。この装置を用いてハエ視覚中枢内で動体認識に関与すると予測される神経細胞Mi1, Lawf1およびLawf2神経細胞の機能を解析した。その結果、Mi1が動体認識において中心的な役割を果たすこと、またこの過程でLawf1とLawf2が協調的に働く事を見出した。

研究成果の概要(英文)： Visual information processing in motion detection is an important topic of neuroscience. However, the details of motion detection circuits remain elusive. In this study, we used the fly visual center as a model to elucidate the structure and function of motion detection circuits. As a first step, I constructed an insect arena, in which various visual stimuli can be presented to a fly and its response can be quantified using an infrared sensor. Using this system, I examined the roles of potential motion detection neurons such as Mi1, Lawf1 and Lawf2. As a result, I found that Mi1 plays a central role in motion detection and that Lawf1 and Lawf2 act co-operatively.

研究分野：神経科学

キーワード：動体認識 視覚情報処理 ショウジョウバエ 視覚中枢

1. 研究開始当初の背景

動体認識は多くの動物において見られる基本的な視覚情報処理であるが、その実体および動作機構は不明な点が多く、神経科学における重要な課題となっている。動体認識回路の動作機構は進化的に保存されており、ショウジョウバエは優れたモデル系だと考えられているが、ハエを用いた動体認識の研究はほとんど進んでいなかった。我々はこれまでハエ視覚系の発生機構について研究してきたが、この過程で特定の神経細胞の機能を人工的に操作する道が開かれた。これら独自のツールを利用することで、動体認識回路の動作機構を明らかにすることができると考えられた。

2. 研究の目的

ショウジョウバエの視覚中枢において動体認識に関与すると考えられる神経細胞を同定し、その機能を明らかにすることによって進化的に保存された動体認識回路の動作機構を明らかにする。

3. 研究の方法

a. インセクトアリーナの構築 :

コンピューター制御の LED によってハエに様々な視覚刺激を提示し、ハエの応答を測定するインセクトアリーナを構築する。また、同じシステムを用いてカルシウムイメージングを行う。

b. 神経細胞種特異的に神経活動を操作するためのハエ系統作出 :

動体認識に関与すると予測される神経細胞特異的に遺伝子発現を誘導するトランスジェニック系統を作成する。

c. 神経活動阻害時の動体認識の異常の解析 :

インセクトアリーナと上記の系統を用いて、特定の細胞の神経活動を抑制した時のハエの応答を解析する。

d. 透明化超解像撮影法による神経形態の観察 :

光学顕微鏡によって神経細胞の立体的な微細構造可視化する手法を開発し、動体認識に関与する神経細胞の形態を観察する。

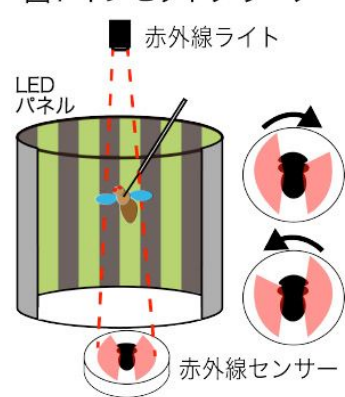
4. 研究成果

a. インセクトアリーナの構築 :

コンピューター制御の LED を円筒状に配置し、その中心にハエを宙吊りにすることにより、様々な視覚刺激を提示できるインセクトアリーナを構築した。この際のハエの応答を測定する方法として、当初はハエの飛翔する向きをビデオカメラで撮影し、撮影後に画像解析することで定量データを取得する方針で研究を進めていた。しかし、この方法では動画解析に時間がかかり、またハエの応答に合わせてリアルタイムに画像を変化させる

ことができなかった。

図1 インセクトアリーナ



そこで、研究期間の途中でハエの応答をビデオ撮影する代わりに、ハエの翅を赤外線センサーで照らし、その影を赤外線センサーで検出する方法に

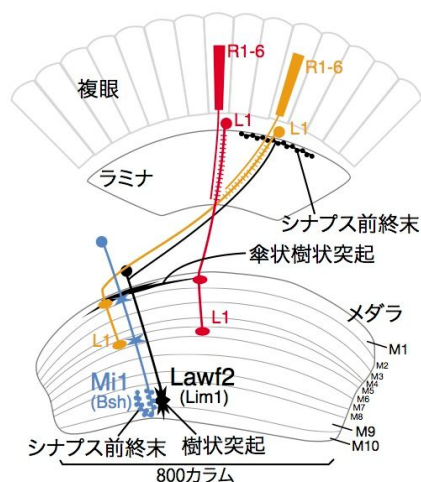
切り換えた(図1)。これにより、視覚刺激に対するハエの応答をリアルタイムに正確に解析することができるようになった。

また、アリーナ中に様々な形状、コントラストのストライプを表示し、これを様々な速度で動かすプログラムを作成した。これにより、動体認識の情報処理における様々な異常をインセクトアリーナを用いて解析することができるようになった。

b. 神経細胞種特異的に神経活動を操作するためのハエ系統作出 :

ハエの視覚系は複眼と脳の視覚中枢から成る。視覚中枢はさらにラミナ、メダラ、ロビュラから成るが、メダラが最も大きく、多くの神経細胞を含んでおり、動体認識においてもメダラが最も重要な役割を果たすと考えられている(図2)。

図2 ハエの視覚系



我々はこれまでメダラの発生機構について研究してきたが、その過程で動体認識に関与すると推測される神経細胞が特異的に発現している遺伝子を明らかにしてきた。例えば Mi1 は Bsh、Lawf2 は Lim1 を発現する。他にもこれらの神経細胞において発現する様々な遺伝子を同定している。近年ではショウジョウバエゲノム上の様々な DNA 断片制御下で Gal4 を発現させる Gal4 ドライバー系統のライブラリーが公共のストックセンター

から入手可能になっている。従って、遺伝子  
の名前から、目的とする神経細胞において発  
現する DNA 断片を同定することができる。こ  
れらの DNA 断片を用いて Gal4, LexA, FLPase  
もしくは神経活動を抑制するような遺伝子  
を発現させることにより、目的の神経細胞特  
異的に神経活動を操作することができる。

我々は動体認識に関与すると推測される  
Mi1, Lawf1 および Lawf2 の機能を解析するた  
め、これら神経細胞特異的に神経活動を操作  
するための様々なトランスジェニック系統  
を作成した。例えば Bsh は Mi1 特異的に発現  
するが、実際には Mi1 以外の様々な神経細胞  
においても発現する。そこで、Mi1 において  
発現する別の遺伝子 Hth に着目し、bsh-Gal4  
と hth-FLP を作成した。FLP は酵母由来の DNA  
組換え酵素で、標的の FRT 配列間の組み換え  
を誘導する。bsh-Gal4 と hth-FLP の両方が発  
現する細胞においてのみ内向整流性カリウ  
ムチャンネル(Kir)を発現させる系統として、  
UAS-FRT-stop-FRT-Kir を作成した。これらの  
系統を組み合わせることで、Mi1 特異的に神  
経活動を抑制することができる。同様な手法  
によって Lawf1 および Lawf2 特異的に神経活  
動を抑制する系統を作成した。

#### c. 神経活動阻害時の動体認識の異常の解析：

上記のインセクトアリーナと動体認識の  
異常を解析するプログラム、また Mi1, Lawf1,  
Lawf2 の神経機能を特異的に阻害するトラン  
スジェニック系統を組み合わせることによ  
り、これら神経細胞の働きを明らかにした。

Mi1 の機能を阻害した場合、動体認識が著  
しく阻害されることが分かった。しかし、動  
体認識が完全に無くなるわけではなく、ある  
程度の応答が残ったことから Mi1 の機能不全  
を保證するような別の神経回路の存在が予  
想される。例えば Mi1 は光刺激の増強(ON シ  
グナル)に応答する L1 神経の入力を受けてい  
る(図 2)。OFF シグナルに応答する L2 神経を  
介した神経回路が Mi1 を介した経路と同じよ  
うな働きをしているのかも知れない。

Lawf1 の機能はこれまで知られておらず、  
Lawf2 の機能も非常にマイナーであると考え  
られていたが、Lawf1 と Lawf2 の投射パター  
ンは非常に似ており、どちらもメダラ内の広  
範な領域から入力を受け、ラミナに逆行性の  
出力を持つ。Lawf1 と Lawf2 が協調的に働い  
ている可能性を検証するため、上記の手法を  
用いて Lawf1 および Lawf2 の神経活動を特異  
的に阻害した。この時、これまで知られて  
いたよりも明確な動体認識の異常が見られ  
たことから、Lawf1 と Lawf2 が協調的に働い  
ていると考えられる。しかし、両者がどのよ  
うにして協調的に働いているかを明らかに  
するためには今後の解析が待たれる。

#### d. 透明化超解像撮影法による神経形態の観 察：

これまで視覚中枢内の神経細胞の形態は  
共焦点顕微鏡によって撮影していたが、光の  
回折現象のため、光学顕微鏡の解像度には限  
界があり、シナプスなどの微細構造をハッキリ  
と観察することは困難だった。また、脳は  
かなりの厚みを持っており、脳の深部におい  
てはさらに解像度が低下するという問題が  
あった。我々は理研 CDB 今井研との共同研究  
により、組織を透明化し脳の深部を超解像で  
撮影する新しい手法 SeeDB2 を開発し、これ  
を用いて動体認識に関わる神経細胞の形態  
を観察した。

その結果、Mi1 神経細胞の軸索終末が特徴  
的な分岐構造を持つことを見出した(図 2)。  
これまで Mi1 の軸索終末は釣り針のようなフ  
ック状の構造を取っているとされていたが、  
そのフックの先端が 2~4 本に分岐して  
いたのである。この分岐構造が方向特異的な  
動体認識において重要な役割を果たしてい  
るかもしれない。

#### 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 8 件)全て査読有

1) Suzuki, T., Hasegawa, E., Nakai, Y., Kaido, M.,  
Takayama, R. and Sato, M. Formation of  
neuronal circuits by interactions between  
neuronal populations derived from different  
origins in the *Drosophila* visual center. **Cell  
Reports** 15, 499-509 (2016).

2) Ke, M. T., Nakai, Y., Fujimoto, S., Takayama,  
R., Yoshida, S., Kitajima, T. S., Sato, M. and Imai,  
T. Super-resolution mapping of neuronal circuitry  
using an index optimized clearing agent. **Cell  
Reports** 14, 2718-2732 (2016).

3) Suzuki, T., Takayama, R. and Sato, M.  
eyeless/Pax6 Controls the Production of Glial  
Cells in the Visual Center of *Drosophila*  
melanogaster. **Developmental Biology** 409,  
343-353 (2016).

4) Suzuki, T. and Sato, M. Neurogenesis and  
neuronal circuit formation in the *Drosophila*  
visual center. **Development Growth and  
Differentiation** 56, 491-498 (2014).

5) Sato, M., Suzuki, T. and Nakai, Y. Waves of  
differentiation in the fly visual system.  
**Developmental Biology** 380, 1-11 (2013).

6) Suzuki, T., Kaido, M., Takayama, R. and Sato,  
M. A temporal mechanism that produces neuronal  
diversity in the *Drosophila* visual center.  
**Developmental Biology** 380, 12-24 (2013).

7) Hasegawa, E., Kaido, M., Takayama, R. and Sato, M. Brain-specific-homeobox is required for the specification of neuronal types in the *Drosophila* optic lobe. **Developmental Biology** 377, 90-99 (2013).

8) Fujita, N., Nagata, Y., Nishiuchi, T., Sato, M., Iwami, M., Kiya, T. Visualization of neural activity in insect brains using a conserved immediate early gene, hr38. **Current Biology** 23, 2063 (2013).

〔学会発表〕(計 10 件)

1) Suzuki, T., Hasegawa, E., Nakai, Y., Kaido, M., Takayama, R. and Sato, M. Formation of neuronal circuits by interactions between neuronal populations derived from different origins in the *Drosophila* visual center. 24th European *Drosophila* Research Conference, Heidelberg, Germany (2015.9)

2) Nakai, Y. and Sato, M. Functional analysis of potential motion detection neurons in the *Drosophila* visual center. Neuroscience 2015, 神戸 (2015. 7).

3) Sato, M., Miura, T. and Nagayama, M. Mathematical modeling and genetic analysis of the wave of differentiation in the *Drosophila* visual center. Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference3, Beijing, China (2015.5)

4) 中井康弘、長谷川恵理、海道雅子、高山理恵、佐藤 純 ショウジョウバエ視覚中枢神経の動体認識における機能解析 第 37 回日本分子生物学会年会 横浜 (2014.11)

5) 中井康弘、長谷川恵理、海道雅子、高山理恵、佐藤 純 Identification and functional analysis of the neuronal circuits for motion detection in the *Drosophila* visual center. 第 11 回日本ショウジョウバエ研究会 金沢 (2014.6)

6) 中井康弘、長谷川恵理、海道雅子、高山理恵、佐藤 純 ショウジョウバエ視覚中枢における動体認識回路の同定とその機能解析 第 36 回日本分子生物学会年会 神戸 (2013.12)

7) Suzuki T., Kaido M, Takayama R, Sato M. A temporal mechanism that produces neuronal diversity in the *Drosophila* visual center. Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference2, Seoul, Korea (2013.5)

8) Nakai, Y., Hasegawa, E., Kaido, M., Takayama, R. and Sato, M. Identification and functional

analysis of the putative neuronal circuit for motion detection in the medulla. 第 10 回日本ショウジョウバエ研究会, 東京 (2012. 10).

9) Nakai, Y., Hasegawa, E., Kaido, M., Takayama, R. and Sato, M. Identification and functional analysis of the putative neuronal circuit for motion detection in the medulla. 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡 (2012. 12).

10) Sato, M. A birth-order dependent mechanism that produces neuronal diversity in the *Drosophila* visual center. Gordon Research Conference, Visual System Development, Colby-Sawyer College, USA (2012.8).

〔図書〕(計 0 件)

〔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://fsosato.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 純 (Makoto Sato)  
金沢大学・新学術創成研究機構・教授  
研究者番号：30345235

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

長谷川 恵理 (Eri Hasegawa)  
金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・博士研究員  
研究者番号：50469607

鈴木 匠 (Takumi Suzuki)  
金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン  
研究センター・博士研究員  
研究者番号：30623764

中井 康弘 (Yasuhiro Nakai)  
金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン  
研究センター・博士研究員  
研究者番号：00648537

今村 幸祐 (Kosuke Imamura)  
金沢大学・理工研究域電子情報学系・准教授  
研究者番号：00324096