

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700395

研究課題名(和文) 運動出力の時空間パターンを生み出す神経回路基盤の解明

研究課題名(英文) Research of neural network basis for generating spatiotemporal activity patterns of animal locomotion

研究代表者

高坂 洋史 (Kohsaka, Hiroshi)

東京大学・新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：20431900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：動物が適切な速さで動くというのは、一見あたりまえのように思われるが、神経回路がどのようにそれを実現しているのかは、ほとんど明らかになっていない。本研究では、神経回路の詳細な解析が可能であるショウジョウバエ幼虫の運動回路をモデルとして、運動の速さを制御する神経回路機構の解明を進めた。その結果、per-IN という一群の神経細胞が運動速度の制御に必要であり、この神経細胞群は、運動神経の活動時間幅を短くすることで、適切な移動速度を生み出していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Each animal moves in a certain speed. Though this observation seems obvious, it is still almost unclear how neural circuits generate speed of animal locomotion. In this study, using a motor circuit of *Drosophila* larvae as a model system, which is amenable to detailed analyses of neuronal networks, we examined the mechanisms of speed control of the larval locomotion. We found that a subset of interneurons, we named per-IN, regulate speed of locomotion by shortening the duration of motor neuronal activities.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン シナプス 神経回路 遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

動物の体のいたるところに筋肉がある。個々の筋肉がランダムに収縮してしまうと、機能的な動きが生まれ出せない。複数の筋肉が互いに協調して収縮することで、動物は意味のある動きができる。それでは、脳神経回路はどのようにして動物の精妙な動きを生成・制御しているのであろうか。神経回路を構成する介在神経細胞を同定し、運動出力の時空間パターンを生み出す機構を明らかにすることは、神経科学における重要な課題のひとつである。

これまでに、様々な動物種において運動(遊泳、歩行、飛翔など)の制御に関わる細胞の同定が進められてきた。これらの運動は周期的な動きからなり、それを反映して中枢神経回路内に周期的な活動をする介在神経細胞が同定されている。これらの研究は主に電気生理学的手法に基づいており、神経細胞の電気活動を詳細に解析できる一方、一度に測定できる細胞の数は限られているため、個々の細胞の神経活動の時間パターンについては詳しく調べられるが、回路内全体を飛び交う神経活動の時空間パターンについての理解は限られている。また、電気生理学的測定のために動物をある程度解剖し電極が細胞に直接接触できる状態にしなければならないため、同定した細胞が行動中の個体でどのような役割を果たしているかは明らかにできない。

神経細胞の集団がシステムとして時空間パターンを生み出す機構を明らかにするために、本研究では、ショウジョウバエ幼虫のぜん動運動を制御する中枢神経回路をモデルとし、特にこれまでに我々が同定した介在神経細胞 per-IN に注目し、神経活動の可視化や操作などの手法を用いて、運動制御を担う回路基盤を解析する。ショウジョウバエの遺伝学的手法を駆使することに加え、多様な運動パターンのうち「筋収縮が身体を伝播する速さ」という時空間パターンのうち最もシンプルだが定量解析に耐えうるパラメータに着目することで、運動制御の回路機構の理解を目指す。

## 2. 研究の目的

動物の動き(遊泳・歩行・飛翔など)は、神経回路が適切な時空間活動パターンを生成することで実現する。中枢神経回路内の介在神経細胞のネットワークがいかにして適切な活動パターンを生み出すかという問題は、神経科学上の基本的な課題の1つである。本研究では、ショウジョウバエ幼虫のぜん動運動をモデルとして、遺伝学的手法を駆使して神経回路が時空間活動パターンを生み出すしくみの解明を目指す。特に既に同定した時空間活動パターンを制御する抑制性介在神経細胞について、その神経活動と運動出力との関係、及び上流の神経細胞の探索を通して、回路内を活動が伝わる速さがどのように制御されているかを明らかにし、神経回路内

での情報伝播の細胞・分子的基盤の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

主に2つのテーマ(1)と(2)について研究を進めた。(1) per-IN の一過的抑制による運動制御機構の解明、においては、per-IN の神経活動を操作したときの運動神経細胞の活動変化を詳細に解析することによって、抑制性制御がどのようにして、伝播速度の維持を担っているのかを明らかにする。このテーマでは、神経活動の操作(光感受性タンパク質、および温度感受性タンパク質)と測定(カルシウムイメージング、および電気生理学的測定)を組み合わせて行なう。(2) per-IN の回路内上流神経細胞の同定、においては、遺伝学的手法を用いて、per-IN の活動を制御している神経細胞の同定、及びその制御を担う分子機構の解明によって、抑制性制御が運動回路の中でどのように調節されているのかを明らかにする。このテーマでは、2重発現システム(Gal4-UAS システムおよび IexA システム)、GRASP 法を用い、RNA 干渉システムを用いて行なう。

## 4. 研究成果

(1) per-IN と運動神経細胞との活動の関係性を調べた。これまでに、per-IN の神経活動を抑制すると、ショウジョウバエ幼虫のぜん動運動が遅くなることを見出している。そこで、per-IN と運動神経細胞との機能的関係を調べるために、2種のカルシウム感受性タンパク質を用いて、per-IN と運動神経細胞の活動を同時に測定した。per-IN には赤色カルシウム感受性タンパク質 R-GECO1 を発現させ、運動神経細胞には、緑色カルシウム感受性タンパク質 GCaMP5 を発現させ、これらの2色のプローブの経時的蛍光変化を撮影した。すると、per-IN はそれがシナプス結合している運動神経細胞の活動よりも遅れて活動した。per-IN は運動神経細胞に対して抑制的に作用することが示唆されていることから、per-IN は、運動神経細胞が活動する時間的長さを短く調節していると考えられる。そこで、per-IN の活動が運動出力に与える影響を調べるために、筋収縮の経時測定、及び、運動神経の電位変化測定を行なった。まず、筋肉細胞に蛍光タンパク質 GFP を発現するシステムを用いて、per-IN の活動を温度感受性ダイナミン変異体 shibire を用いて阻害することで、ぜん動運動を行なっている際の筋収縮のダイナミクスがどのように変化するかを調べた。per-IN の活動を阻害しても、体節の長さ、最大収縮時の長さは変わらなかった。しかし、収縮している時間が長くなっていた。このことは、per-IN の活動が運動神経細胞の活動を短くしているとする予想に合致する。さらにこの仮説を直接示すために、運動神経の活動を細胞外電位記録によって測定し、per-IN を光感受性塩化物イオンポン

プハロドプシンによって活動阻害することで、運動神経の活動がどのような影響を受けるかを調べた。すると、per-INを抑制することで、運動神経のバースト活動の長さが長くなった。これらの結果は、per-INが運動神経細胞の活動長さを短くして運動速度を調節していることを示唆し、運動速度を調節する機構の一端が明らかになった。

(2) per-INがどのような神経支配を受けているかを調べるために、上流の介在神経細胞の探索を行なった。上流の探索には、GRASP法を用いた。GRASP法は、GFPの2つの互いに相補的な非蛍光性断片を2つの異なる神経細胞集団にそれぞれ発現させ、もしこの2つの神経細胞集団がシナプスを形成するほど近傍にあると、非蛍光性断片が細胞外で相補し、蛍光タンパク質となって蛍光を発するので、蛍光測光によってこれを検出するという方法である。per-INで遺伝子発現を誘導するper-lexAシステムを作成し、様々なGal4システムと組み合わせて用いることで、per-INとシナプスを形成する介在神経細胞の候補を探索したところ、下行性の神経線維を持つ介在神経細胞の同定に成功した。per-INとのシナプス結合が示唆されたので、この介在神経細胞が運動速度の制御に関わる可能性がある。そこで、この介在神経細胞の活動を整流性カリウムチャンネルを用いて抑制したところ、ぜん動運動速度が遅くなった。このことから、この新規介在神経細胞がper-INを介して運動制御を担っている可能性が示唆される。今後、このような介在神経細胞の同定を網羅的に進めることにより、神経回路内における活動伝播速度がどのように生み出されているのかが明らかにできると期待できる。

## 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4件)

Okusawa,S., Kohsaka,H. and Nose,A. Serotonin and downstream leucokinin neurons modulate larval turning behavior in Drosophila. Journal of neuroscience. 査読あり。34(7) (2014) 2544-2558. DOI:10.1523/JNEUROSCI.3500-13.2014.

Matsunaga,T., Fushiki,A., Nose,A. and Kohsaka,H. Optogenetic perturbation of neural activity with laser illumination in semi-intact Drosophila larvae in motion. J. Vis. Exp. 査読あり。77 (2013) DOI:10.3791/50513

Fushiki,A. Kohsaka,H. and Nose,A. Role of sensory experience in functional development of Drosophila motor circuits. PLoS One. 査読あり。8 (2013) 1-10 DOI:10.1371/journal.pone.0062199

Kohsaka,H. Okusawa,S., Itakura,Y. Fushiki,A. and Nose,A. Development of

larval motor circuits in Drosophila. Development, Growth and Differentiation. 査読あり。54 (2012) 408-419. DOI:10.1111/j.1440-169X.2012.01347.x [学会発表](計12件)

Kohsaka,H., Takasu,E. and Nose,A. Normal locomotion speed requires pre-motor inhibitory interneurons in Drosophila larva. 第91回日本生理学会(招待講演)、2014年3月16-18日、鹿児島大学郡元キャンパス

Kohsaka,H., Takasu,E. and Nose,A. Mapping neural connections with PMSIs a group of premotor inhibitory interneurons. Behavioral neurogenetics of larval Drosophila. 2014年3月9-12日、KKR Atami

Kohsaka,H. and Nose,A. 可視光線と遺伝学で神経回路のはたらきを調べる。日本遺伝学会 第85回大会(招待講演) 2013年9月19-21日、慶応義塾大学日吉キャンパス

高坂洋史. ショウジョウバエ幼虫の運動制御。第7回 Motor Control 研究会(招待講演) 2013年9月5-7日、東京大学農学部・弥生講堂

Kohsaka,H. and Nose,A. Segmental control of motor output by pre-motor inhibitory interneurons for generating innate speed of larval locomotion in Drosophila. 第36回日本神経科学大会、2013年6月20-23日、国立京都国際会館

Kohsaka,H. and Nose,A. Innate speed of larval locomotion is generated by segmental pre-motor inhibitory interneurons. 2<sup>nd</sup> Asi-Pasific Drosophila research conference (APDRC), 2013年5月13-16日、Seoul National University Seoul, Korea

高坂洋史、能瀬聡直. 時空間パターンを生み出すメゾ回路の作動原理の解明。新学術領域研究「メゾスコピック神経回路から探る脳の情報処理基盤」領域会議、2012年11月7,8日、KKRホテル熱海

Teranishi,K., Kohsaka,H. and Nose,A. RNAi-based screening for transcription factors in interneurons for speed control of larval locomotion. Japanese Drosophila Research Conference 2012, 2012年10月13-15日、東京慈恵会医科大学

Kohsaka,H. Takasu,E. and Nose,A. Genetic search for interneurons that interact with PMSIs, a group of larval premotor inhibitory interneurons. Janelia Farm Conference: Behavioral Neurogenetics of Drosophila larva. 2012年9月30日-10月3日、HHMI/Janelia Farm Research Campus, Ashburn, USA

Kohsaka,H., Takagi,S. and Nose,A. Speed control of larval peristalsis by segmentally-arrayed local inhibitory interneurons. NEUROFLY 2012 14<sup>th</sup> European

Drosophila neurobiology conference. 2012  
年9月3-7日、パドゥア、イタリア

Kohsaka, H., Takagi, S. and Nose, A.  
Speed control of larval locomotion by  
segmentally-arrayed local inhibitory  
interneurons. 包括脳ネットワーク 夏の  
ワークショップ、2012年7月24-27日、仙台  
国際センター

高坂洋史、無脊椎動物のCPG、生理学研  
究所研究会：第6回 Motor Control 研究会  
(招待講演) 2012年6月21-23日、自然科  
学研究機構 岡崎コンファレンスセンター

〔図書〕(計 1 件)

高坂洋史、能瀬聡直、エヌ・ティー・エス、  
「オプトジェネティクス」ショウジョウバエ  
を用いたオプトジェネティクス研究、2013年、  
141-153 ページ

〔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://bio.phys.s.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高坂 洋史 (KOHSAKA, Hiroshi)  
東京大学大学院 新領域創成科学研究  
科・助教  
研究者番号：20431900

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：