

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07147

研究課題名(和文)種特異的な聴覚情報の脳内表現と性行動発現の脳神経機構の解明

研究課題名(英文)Central regulation of the decision make process for mating behavior in *Drosophila*

研究代表者

石元 広志 (Ishimoto, Hiroshi)

名古屋大学・理学研究科・特任講師

研究者番号：80643361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000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に応じて交尾拒否か受容かの判断をする。本研究は、これまで不明であったメスの交尾判断を担う脳神経回路(交尾判断回路)を新規に同定した。この交尾判断回路を分子遺伝学的に詳細解析して神経接続様式、神経伝達物質、受容体分子を明らかにし、神経回路を構成する2種類の神経細胞群が交尾行動の拒否と受容を制御することを機能的に明らかにした。さらに交尾判断回路は入力シグナルに対して遅延出力を生み出すフィードフォワード構造を示していた。この事は、メスの性的モチベーションの高まりにオスの求愛アプローチが一定時間必要である実際の観察事実によく合致していた。

研究成果の概要(英文)： Females make a decision whether to accept or reject the copulation during a series of courtship ritual. This mutual courtship process is widely appeared in many animal species, however, little is known about the neuronal and molecular mechanisms of higher-order functions underlying this female behavioral switch during courtship ritual. Here, I explored the neuronal nature of the female decision make for the proper copulation in *Drosophila melanogaster*. Then I found that a feedforward circuit motif was composed of the DA targeting neurons that were divided into at least two structural and functional classes, one positively modulates courtship rejection and the other class, composed by GABAergic neurons, negatively modulates courtship rejection. Each neural class required different types of dopamine receptors. These findings may possibly provide perspectives on how behavioral switches controlled at the neural circuit level.

研究分野：神経行動遺伝学

キーワード：ドーパミン 性行動 意思決定 価値判断 モチベーション ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

私たちの脳は、どのようにして音響信号から特徴を抽出するのか。また、そこから意味情報をどのように読み解くのか。音情報処理の神経機構は、神経科学において解明すべき大きな問題である。近年発達が著しい fMRI などによる経時的な脳活性化部位の画像化や、多重微小電極を用いた脳の局所神経集団の活動測定は有効な知見を提供するが、単一細胞レベルの分解能で、神経回路の生理機能を解析するには、単純な神経系をもち、分子遺伝学的技術で特定の機能を持つ神経を比較的容易に同定できるモデル生物ショウジョウバエが有効である。多くの生物種と同様にショウジョウバエのオスは、メスへの求愛時に、パターン化された羽音（求愛歌）を奏する (Greenspan & Ferveur, 2000)。メスは求愛歌を聴いて同種を判別し、交尾受容を決定するのである (求愛歌応答行動, Markow, 1987)。例えば、実験的に翅を切除して求愛歌の発生を抑制したオスや、聴覚を失ったメスは、交尾成功率が著しく低下する。また、求愛歌を構成するパルス歌 (pulse song) の周期 (inter pulse interval; IPI) が、種の識別に重要な要素として知られている (Tauber & Eberl, 2003)。ショウジョウバエのメスが示す求愛歌応答行動は、種特異的な求愛歌パターンを識別して行動を制御する脳機能を基盤にしているのである。申請者はこれまで、種に固有な音識別の神経機構を理解する目的で、メスの求愛歌応答行動である配偶 (交尾の受容・拒否) 行動に着目して研究してきた。ショウジョウバエでは、任意の遺伝子発現を特定の神経で時期特異的に誘導することができる (TARGET システム)。これを利用し、まず、求愛歌情報の処理から行動発現に至る過程に関わる神経細胞を体系的にスクリーニングした。神経伝達物質産生、記憶、概日リズムなどの機能を担う神経や代表的神経構造をそれぞれ標識する Gal4 系統 (約 40 種類) を用いて、各ニューロンの活動を成虫時期特異的に抑制したメスの配偶行動を解析した。ここでは、メスが交尾を受容するタイミングを指標にして行動スクリーニングした。求愛行動を録画した画像から交尾した時間を自動解析するプログラムを独自に開発して、高効率な解析を可能にした。行動スクリーニングの結果、交尾率が著しく低下する、または著しく早く交尾を受容する 6 種類の Gal4 系統を同定した。そのうち 1 種類が、ドーパミン神経細胞群を標識する系統であった。ドーパミン神経細胞群は行動の意思決定に関与することが知られている。よって、メスの脳において、求愛歌の情報処理過程で、種特異性を弁別し、行動を決定する回路の構成要素としてドーパミン神経細胞が含まれると推測された。そして、

約 282 個ある脳のドーパミン神経細胞をサブクラスごとに標識する新たな Gal4 系統群を解析して、26 個の細胞群にその機能単位を絞り込むことに成功した。これら、スクリーニングで得られた Gal4 系統群で標識される神経細胞の求愛歌に対する応答特性を解明する目的で、聴覚刺激を与えつつ脳内部の神経細胞応答をリアルタイムに測定する Ca^{2+} イメージング実験を行った結果、種特異的な求愛歌に対してメスのみで応答し、オスでは応答を示さない神経細胞を同定した。

2. 研究の目的

これまでの研究成果を元にして、更なる解析を進め、メスの配偶行動における求愛情報処理を担う神経回路とその機能を単一神経細胞レベルで同定する。また、スクリーニングで同定した他の Gal4 系統の中には、脳の前背側部の少数の神経を標識するものもあった。このことは、脳の前背側部キノコ体近傍の神経群がメスの性受容度の決定に重要であるとすると、脳神経細胞の雌雄モザイク解析の知見と合致していた (Tompkins & Hall, 1983)。スクリーニングで得られた、これらメスの配偶行動の制御に関わる神経細胞群の神経回路構造と機能を明らかにする。

3. 研究の方法

すでに同定していた 6 種類の Gal4 発現誘導系統で標識される神経細胞群は、その全てがメスの求愛歌応答行動の制御に関与するとは限らない。熱ショックフリップアウト法を用いて上記 6 種類の Gal4 系統で標識される神経を減じると同時に、内向き整流性 K^{+} チャンネル (Kir2.1) を発現して神経活動抑制を行う。予備研究と同様の求愛歌応答行動アッセイを用いて、求愛歌を識別してメスの配偶行動を決定する責任神経群を同定する。このアッセイにより、明確な行動の表現型を表す個体 (~100 個体を目処) に共通して標識される神経を同定する。行動アッセイ後、該当神経細胞を GFP 染色して精密な投射パターンを明らかにする。個々の神経細胞の脳染色画像を標準脳画像にフィットさせるプログラム (CMTK, Rohlfing & Maurer, 2003) を用いて全ての該当神経細胞を同一の脳画像上にマッピングすることで、神経回路の概要を明らかにする。フリップアウトはランダムに生じるため多数の個体を調べる必要がある。そこで、既に予備研究で確立している画像解析技術を用いた高効率な行動スクリーニングに対応する。

脳画像データが公開されている 13017 種類の Gal4 系統 (Janelia farm Fly light, VDRC brain base 由来) を基に、予備研究で同定し

た神経細胞群と連絡する、または同定した神経細胞群と一次聴覚神経の脳投射領域を繋ぐ神経を画像スクリーニングする。スクリーニングで得られた Gal4 発現誘導系統は、GFP を発現させて実際の神経標識パターンを確認する。既に、連絡神経細胞の同定解析で得られた 20 系統については、連絡候補神経の機能を調べる必要がある。そこで、予備研究と同様の TARGET システムを用いた神経活動抑制を行い、雌の配偶行動に異常を示す Gal4 系統を同定する。また、脳の領域間を繋ぐような神経細胞、例えば視覚中枢と聴覚中枢を繋ぐような神経細胞の場合、情報の伝達方向は神経細胞の機能を推定する上で重要である。そこで、該当神経のシナプス接続の入出力部位を明らかにし、神経情報伝達の方法を同定する。シナプトプレビン(Syb)はシナプス前膜に局在する。そこで、Syb に GFP を融合したタンパク質を該当神経細胞に発現させて、シナプス出力部位を同定する。また、アセチルコリン受容体(AChR.D 7)はシナプス後膜に局在する。同様に AChR.D 7 を該当神経細胞に発現させ、シナプス入力部位を同定する。また、GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP)法を用いて当該神経細胞同士の接続から神経回路構造を明らかにする。

該当神経細胞(群)の機能充分性を明らかにする目的で、目的の神経細胞(群)を人為的に興奮させてメスの配偶行動を調べる。予備研究で得られた神経細胞を抑制した場合の結果と比較し、該当神経細胞の機能を推定する。神経細胞を活性化する方法として、光や熱で開口するチャネルロドプシンや dTRPA1 チャネルを用いる。該当神経細胞に発現させて光/熱刺激を与えて神経細胞を興奮させる。熱刺激(30℃)にはペルチエ素子で正確に温度管理されたヒートプレートを用いる。

4. 研究成果

本研究で、ショウジョウバエのメスが示す、求愛の拒否と受容の行動選択を制御する交尾判断回路を同定した。この神経回路は交尾拒否行動を促進する神経細胞(A)群と、反対に受容行動を促進する神経細胞(B)群で構成されていた。さらに、これら神経細胞群のシナプス接続部位とシナプス前後関係、神経情報の流れる方向、神経伝達物質(神経細胞(A)群がアセチルコリン作動性、神経細胞(B)群が GABA 作動性)、ドーパミン受容体の構成(神経細胞(A)群が Dop1R2、神経細胞(B)群が D2R 受容体)、神経細胞(A)群で機能する GABA 受容体(Rdl)を同定することができた。交尾判断回路の神経細胞群を個別に分子遺伝学的操作をした結果、神経細胞(A)群と神経細胞(B)群の活性化過程の制御が、交尾の拒否か

受容かを制御する神経機構の中核であることを突き止めた。

本研究でドーパミンによって駆動される少なくとも2種類の神経細胞グループで構成される神経回路がメスの交尾判断を制御する事を明らかにした。交尾判断回路は、少数のドーパミン神経細胞群を起点にして駆動されて、入力シグナルに対して遅延出力を生み出すフィードフォワード構造を示していた。この事は、メスの性的モチベーションを高めるためにオスの求愛が一定時間必要である実際の観察事実によく合致していた。脊椎動物では、オスの性的接触でメスの側坐核ドーパミンが増加し、配偶者の受け入れ行動を決定する。この分子機構は未解明であるが、本研究により、昆虫の単純脳神経系で側坐核と類似した性行動選択機能を持つ神経回路を世界に先駆けて同定できた。さらにドーパミンシグナルが回路動作を制御する鍵分子であることから、「性行動判断」に関係する分子や神経回路機構が種を越えて保存されている可能性が示唆された。本研究で、性行動判断の単純脳モデル実験系の提供が可能になったことで、今後行動判断や価値判断に關与する動物脳一般に共通する神経制御の一般原理抽出や、多様性の理解が進展すると期待される。

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)

- (1) Yamada D, Ishimoto H, Li X, Kohashi T, Ishikawa Y, Kamikouchi A. GABAergic local interneurons shape female fruit fly response to mating songs. *The Journal of Neuroscience* 24 April 2018, 3644-17
- (2) Li X, Ishimoto H, Kamikouchi A. Auditory experience controls the maturation of song discrimination and sexual response in *Drosophila*. *eLife*. 2018 Mar 20;7. pii: e34348. doi: 10.7554/eLife.34348.
- (3) Hindle SJ, Munji RN, Dolgih E, Gaskins G, Orng S, Ishimoto H, Soung A, DeSalvo M, Kitamoto T, Keiser MJ, Jacobson MP, Daneman R, Bainton RJ. Evolutionarily Conserved Roles for Blood-Brain Barrier Xenobiotic Transporters in Endogenous Steroid Partitioning and Behavior. *Cell Rep*. 2017 Oct 31;21(5):1304-1316. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.026.
- (4) Sano H, Nakamura A, Texada JM, Truman JT, Ishimoto H, Kamikouchi A, Nibu Y, Kume K, Ida T, Kojima M. The nutrient-responsive hormone

CCHamide-2 controls growth by regulating insulin-like peptides in the brain of *Drosophila melanogaster*. PLoS Genet. 11(5): e1005209. 2015

〔学会発表〕(計 12 件)

- (1) 石元広志, 交尾の「拒否と受容」意思決定を制御するメスの脳神経機構, 平成 30 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(日本蚕糸学会第 88 回大会), 2018.03.18, 名古屋大学
- (2) 石元広志, 近藤佳子, 上川内あづさ, Accept or Reject? Central Control of the Mating Decision Make in *Drosophila* Females., The 88th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, 2017.09.21, 富山県民会館
- (3) 石元広志, 小原真帆, 上川内あづさ, Neuropeptide F negatively regulates stability of courtship-associated memory in *Drosophila*, The 3rd International Insect Hormone (21st Ecdysone) Workshop, 2017.07.09, 栃木県那須ホテルエビナール那須
- (4) 石元広志, Central modulation of the mating decision make in *Drosophila* females, The 4th Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference, 2017.05.11, 大阪大学
- (5) 石元広志, 牧野佑亮, 上川内あづさ, Neuropeptide F caused a hunger-driven early memory loss in *Drosophila* courtship associating memory, 国際研究集会 Towards elucidation of memory engram, 2016.12.05, 生理学研究所
- (6) 山田大智, 小橋常彦, 石川由希, 石元広志, 上川内あづさ Response properties of local interneurons in the fly auditory system, 12th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2016.09.10, 立教大学 池袋キャンパス
- (7) 吉田森, 石元広志, 石川由希, 上川内あづさ, Integration of auditory and visual signals in *Drosophila melanogaster*, 12th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2016.09.10, 立教大学
- (8) Xiaodong Li, 石元広志, 上川内あづさ, Integration of auditory and visual signals in *Drosophila melanogaster*, 12th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2016.09.10, 立教大学
- (9) 石元広志, 牧野祐介, 上川内あづさ Hunger-state modulates stability of courtship memory via peptide hormone NPF, 12th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2016.09.10, 立教大学
- (10) 山田大智, 石元広志, 上川内あづさ, ショウジョウバエにおける二次聴覚神経細胞の応答特性, 第 39 回日本神経科学大会, 2016.07.22, パシフィコ横浜
- (11) Xiaodong Li, 石元広志, 上川内あづさ Auditory plasticity induced by long-term sound exposure in *Drosophila*, 第 39 回日本神経科学大会, 2016.07.22, パシフィコ横浜
- (12) 石元広志, 近藤佳子, 上川内あづさ A subset of dopaminergic neuron modulates courtship decision-making in *Drosophila*., 第 39 回日本神経科学大会, 2016.07.22, パシフィコ横浜

〔その他〕

報道

EurekAlert!

https://www.eurekalert.org/pub_releases/2018-03/nu-ef1032018.php

Asia Research News

https://www.researchsea.com/html/article.php/aid/11548/cid/1/research/science/nagoya_university/even_flies_like_a_familiar_song_how_auditory_learning_shapes_fly_behavior.html

Science Daily

<https://www.sciencedaily.com/releases/2018/03/180320100850.htm>

Neuroscience News

<http://neurosciencenews.com/flies-music-8674/>

Phys.org

<https://phys.org/news/2018-03-flies-familiar-song-how-auditory-behavior.html>

Bioengineer.org

<https://bioengineer.org/even-flies-like-a-familiar-song/>

BrightSurf

<https://www.brightsurf.com/news/article/032018452349/even-flies-like-a-familiar-song.html>

AlphaGalileo

<https://www.alphagalileo.org/ViewItem.aspx?ItemId=184705&CultureCode=en>

Science Newsline

<http://www.sciencenewsline.com/news/2018032103590045.html>

ホームページ等
名古屋大学栄養神経科学講座
<https://nsi.bio.nagoya-u.ac.jp/jp/groups/nn>
名古屋大学脳回路構造学グループ
http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~NC_home/index2.htm

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石元 広志 (ISHIMOTO HIROSHI)
名古屋大学・理学研究科・特任講師
研究者番号：80643361

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

上川内 あづさ (KAMIKOUCHI AZUSA)
名古屋大学・理学研究科・教授
研究者番号：00525264

(4)研究協力者

山田 大智 (YAMADA DAICHI)
名古屋大学・理学研究科・大学院生