

令和元年5月26日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05053

研究課題名(和文) 昆虫脳高次中枢における性フェロモン情報統合処理機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of integration mechanisms of sex pheromone information in the higher center of insect brains

研究代表者

木矢 剛智 (Kiya, Taketoshi)

金沢大学・生命理工学系・准教授

研究者番号：90532309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：外界からの感覚情報に対し適切な行動によって反応することは、動物の生存や種の維持に重要である。昆虫の性フェロモンは、入力(感覚情報)と出力(性行動)が明確に対応している。本研究では、ショウジョウバエやカイコガの脳を対象に、神経活動依存的な神経回路の機能操作法を新規に確立し、性フェロモンや性行動の情報が脳で処理される経路の解明を目指した。これら昆虫のオスにおいて、性行動に伴って活動した神経回路を特異的にラベルし、さらにその神経回路を光遺伝学的手法によって再活性化する手法を確立した。さらにショウジョウバエでは新規に同定した神経回路が性行動のモチベーション制御に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫は多様な生得的行動(本能行動)を示しますが、これらの行動がどのような神経回路の働きによって生み出されているのか不明な点が多く残されています。本研究では、モデル昆虫であるショウジョウバエやカイコガを用い、神経活動依存的に発現する遺伝子を利用し、神経回路を可視化・操作する技術を確立しました。本技術を用いて、昆虫の交尾行動時に活動が起きた神経細胞を可視化したり、光照射によって行動を制御することに成功しました。これらの知見は将来、さまざまな昆虫の生得的行動の神経基盤の解明および行動の制御に活用されることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Responding appropriately to environmental information is essential for the survival and prosperity of animals. Sex pheromone-processing neural pathways of insects is a great model to investigate the relationship between input (sensory information) and corresponding output (sexual behavior). In the present study, I aimed to establish methods to manipulate the activity of neural circuits in an activity-dependent manner using vinegar flies and silkmths, to elucidate neural pathways of sex pheromone information. I succeeded in labeling and re-activating neural circuits that had been activated by sexual behavior in vinegar flies. In silkmths, I established strains that can express highly sensitive channel rhodopsin, enabling manipulation of moth behavior by optogenetics.

研究分野：昆虫分子神経科学

キーワード：ショウジョウバエ カイコ Hr38 神経活動 交尾行動 fruitless doublesex 初期応答遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物は外界からの情報を正確に受容・認識し、適切な行動により反応する。しかしながら、感覚情報に応じて適切な行動発現が制御される神経機構については不明な点が多く残されている。特に脳の高次領域は、感覚情報の統合や運動指令の判断において最も重要な役割を担うと考えられるにも関わらず、真に有効なアプローチがないため、その動作原理は未解明のままである。本研究者は昆虫の性フェロモンによって制御される定型的な性行動に着目し、その神経回路及び機能を包括的に明らかにすることを大きな目的として研究を行ってきた。昆虫の性フェロモンは、特異的な嗅覚受容体の活性化が、性行動といった定型行動を誘発する点で入出力関係が明確であり、感覚入力と行動の関係を調べる目的に適している。また昆虫の脳は、脊椎動物の脳に比べ極めて少数の神経細胞で構成されており、神経回路の包括的な解析が可能である。これらの利点に着目し、性フェロモンによって性行動が誘発された際に、脳のどのような神経回路が活動しているのか、といったことを、活動依存的な神経回路の可視化や操作によって解き明かすことを目指した。研究開始当初には、昆虫において保存された神経活動マーカー遺伝子として *Hr38* を同定し、昆虫の脳で性フェロモンに反応する細胞の包括的マップの作製に成功した論文を出版していた (*Current Biology*, 2013)。しかしながら単に *Hr38* の発現を検出するだけでは、行動時に活動のあった細胞を同定することはできないものの、これらの細胞が構成する神経回路の形態や機能は明らかにすることはできなかった。そこで本研究者は、*Hr38* の転写活性を利用して、活動のあった神経細胞を GFP によって可視化したり、チャンネルロドプシンによって活動を操作したりすることができる手法の確立に、カイコガ及びショウジョウバエを用いて取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が構築に取り組んでいた新規な手法を確立し、カイコガ・ショウジョウバエの脳高次領域において、感覚情報を統合・処理する神経回路を可視化し、さらに人為的に神経活動を操作することで、どのような神経機構によって、感覚情報に依存した行動発現の制御がなされているのかということ明らかにすることを目的とした。具体的には遺伝子組換え昆虫を用い、性フェロモンや性行動に伴って活動の起きた神経回路を GFP によってラベル・可視化し、光遺伝学的手法によって可視化した神経を再活性化することで、行動と神経回路の関連性を解き明かすことを目指した。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエを用いた研究

ショウジョウバエにおいては、*Hr38* の転写開始点に酵母の転写因子 GAL4 が挿入された系統を作出していたので、これを膜移行シグナル付きの GFP を発現する系統(UAS-mCD8GFP) と掛け合わせ、神経活動依存的な神経回路ラベリング法の確立に取り組んだ。この際、単に GAL4/UAS システムで GFP を発現させると、発生時や性行動時以外での神経活動に伴うと考えられる GFP 発現が多数認められ、高バックグラウンドとなってしまい、特異的な神経回路のラベリングができなかった。そのため GAL4 のリプレッサーである GAL80 の温度感受性変異体 (GAL80^{ts}) を用いることで、性行動時に活動のあった細胞のみを GFP でラベル出来る手法を構築した。様々な条件を検討した結果、最終的に行動に伴って活動のあった神経回路を特異的にラベル出来る系統と手法を構築した。また、本手法によって GFP の代わりにチャンネルロドプシンの一種である CsChrimson を発現させることで、行動時に活動のあった神経回路を、後で人為的に再活性化できる系統と手法を確立した。さらに本解析によってこれまで機能の知られていなかった aSP2 と呼ばれる神経細胞群が、メスの性行動時に非常によく活動していることを見出した。そこで aSP2 の神経活動を人為的に操作する実験を行い、aSP2 が性行動において担う役割の解析を行った。

(2) カイコガを用いた研究

カイコガにおいては、研究開始時点で効率的なノックイン技術が開発されていなかった。そのため *Hr38* が転写活性化因子であることを利用した活動依存的な神経回路可視化法を構築した。この際、様々な種類の GAL4 システムを作出し、最も感度良く神経活動を検出できる系統を選抜した。また活動依存的な神経回路の可視化及び機能操作のために必要な UAS システム群 (UAS-myc::GFP, UAS-TeTxLC, UAS-GCaMP, UAS-Channelrhodopsin) を作出した。さらにショウジョウバエのケースと同様に性行動時に活動のあった神経回路のみを特異的に可視化できるようにユビキタスプロモーター下で GAL80^{ts} を発現する系統の作出に取り組んだ。

近年のゲノム編集技術の進展に伴い、カイコにおいても任意の遺伝子座への遺伝子ノックインが可能であるとの報告がなされるようになってきたので、CRISPR/Cas9 を用いた GAL4 遺伝子のノックイン法の確立にも取り組んだ。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエを用いた研究

Hr38 のプロモーター制御下に GFP を発現するオスのショウジョウバエを用い、メスに反応して活動の起きた神経回路を可視化した。性的に成熟したオスのショウジョウバエは、

処女メスに出会うと即座に定型的な交尾行動を示し最終的には交尾する。この一連の行動を誘導したオスのショウジョウバエの脳における GFP の発現を免疫染色によって可視化した。全ての神経細胞で GFP が活動依存的に発現する条件では、脳全体で多数の細胞が GFP を発現して詳細な神経回路の同定は困難であった。そこでショウジョウバエの遺伝学的手法によって、中枢神経系の性決定遺伝子である *fruitless* や *dsx* 発現細胞のみで神経活動依存的な GFP 発現が生じる系統を作出し、メスで刺激した際に活動の起こった神経回路を可視化した (図 1 上段)。その結果、*fruitless* や *dsx* 発現細胞は交尾行動依存的に活動すること、*fruitless* や *dsx* 陽性細胞の中でも一部の細胞が交尾行動で活動すること、性特異的な神経回路が良く反応していることを見出した。また、この解析の過程において、*fruitless* 陽性神経回路の中でも既知の神経回路に加え、aSP2 と名付けられた神経細胞群が性行動時に良く活動する神経回路であることを見出した。

次に GFP ではなく光応答性チャネルであるチャンネルロドプシンが *fruitless* や *dsx* 発現細胞で活動依存的に発現する系統を作出した。この系統を用い、前述と同様の方法によってオスのバエを刺激し、その後赤色光を照射することによって性行動を誘発することが出来るか検討した (図 1 下段)。その結果、メスで刺激したオスでは腹部を曲げる行動 (交尾行動) が光刺激依存的に認められた。一方、対照実験として行った刺激無しの個体やオスで刺激した個体では同様の反応は認められなかった。この結果は、活動依存的にラベルされた神経回路が確かに行動に伴って活動の起きた細胞であることを証明するものである。これらの結果は、行動制御のような複雑な神経機構に関する cell assembly を解析することができる手法をショウジョウバエにおいて世界で初めて確立したことを示している。モデル昆虫であるショウジョウバエにおいて本技術が確立されたことは、本分野において非常に重要なマイルストーンになると考えられる。

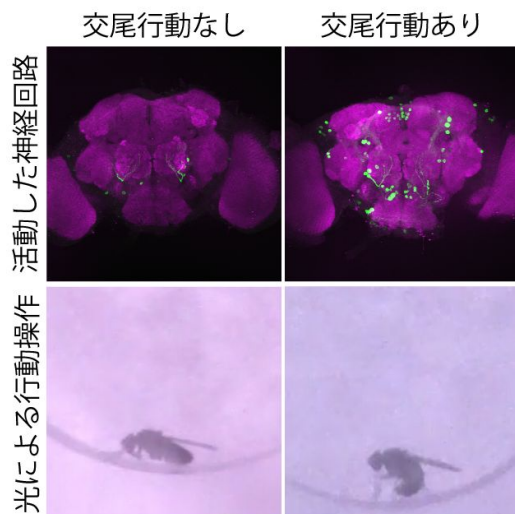


図 1 .(上段) *fruitless* 発現細胞にのみ限局して神経活動依存的に GFP が発現するようにした系統のオスのショウジョウバエの脳の免疫染色結果 (緑: GFP、紫: 脳の形態)。交尾行動を示したもので特異的に GFP 陽性細胞が認められた。(下段) *fruitless* 発現細胞にのみ限局して神経活動依存的に CsChrimson が発現するようにした系統のオスショウジョウバエに光照射をした結果。交尾行動を示した個体特異的に、光による腹曲げ行動が認められた。

aSP2 神経回路の機能解析

上記において性行動時に活動が高まることを見出した神経細胞群 aSP2 について機能解析を行った。まず aSP2 細胞選択的に Kir2.1 を発現させ、aSP2 細胞の神経活動を抑制した個体を作成し、オスの性行動を解析した。このようなオスは交尾行動を開始することはできるものの、交尾を完遂することはできなかった。さらに詳細にオスの交尾行動を解析したところ、aSP2 細胞の神経活動が抑制された個体は、交尾を頻繁に中断してしまうこと、すなわち交尾行動のモチベーションが下がってしまっていることを見出した。一方、温度センサーチャネル dTrpA1 を aSP2 細胞選択的に発現し、人為的に aSP2 細胞の神経活動を高めた個体では、交尾行動のモチベーションが上昇する結果は認められなかった。以上のことやその結果及び解剖学的な所見から、aSP2 細胞は様々な感覚情報を統合し、交尾行動のモチベーション制御に重要な役割を担っていると考えられた。

(2) カイコガを用いた研究

活動依存的な神経回路の可視化及び機能操作のために必要な UAS 系統群 (UAS-myr::GFP, UAS-TeTxLC, UAS-GCaMP, UAS-Channelrhodopsin) を作出した。これらの系統の作出では、遺伝子組換え系統作出ベクターに mRNA の発現量・安定性を高める配列やタンパク質翻訳効率を上昇させるエンハンサー配列を付与し、目的タンパク質の発現量増加による神経回路の高効率な可視化や操作が可能となるように工夫した。新規に作成した UAS-myr::GFP を既存の UAS-mCD8GFP 系統と比較したところ、蛍光強度で 100 倍程度発現強度が格段に上昇しており、狙い通りに高感度な神経回路のラベリングが可能であることを確認した。また同様のベクターバックボーンを用いて、神経伝達を阻害すること

のできる系統 (UAS-TeTxLC) や神経活動依存的な細胞内 Ca^{2+} イオン動態を可視化することのできる系統 (UAS-GCaMP) を作出し、遺伝学的解析における有用性を検討し、その結果を論文として出版した。また光遺伝学的に神経活動を操作することのできる系統 (UAS-Channelrhodopsin) も作出し、カイコガ脳における有用性検討結果の解析を鋭意進めているところである。

様々な条件を検討したうえで選抜した神経活動応答性の GAL4 系統カイコを用い、で作出した UAS-myr::GFP 系統と掛け合わせの上、性フェロモンによって刺激したオスのカイコガの脳で活動の起こった神経回路を GFP によって可視化した。性フェロモン (ボンビコール) 刺激依存的に嗅覚情報処理中枢である触角葉や・脳高次領域であるキノコ体で刺激依存的な GFP の発現が認められた。一方、運動中枢の食道下神経節では刺激依存的な GFP の発現は認められなかった。しかしながら、多少の GFP 発現の偏りは見られるものの、活動依存的な神経回路の可視化には成功したものと考えられた。

次に上記の手法を用い温度チャネル dTrpA1 や破傷風毒素軽鎖 (TeTxLC) を性フェロモン刺激依存的に発現させ、神経活動依存的な行動操作を試みたが、発現強度不足や毒性による発生致死により行動操作を再現性良く十分に行うことはできなかった。またカルシウムセンサータンパク質 GCaMP6f を用いた活動のイメージングも試みたが、性フェロモン刺激以外の GCaMP タンパク質の発現 (発生時や羽化時の神経活動によるものと考えられる) によりバックグラウンドが高くうまく行かなかった。そこで、これらの問題を解決すべく、新たにチャンネルロドプシンを用いた神経活動制御及び GAL80^{ts} を利用した時期特異的遺伝子発現による解決を試みることにした。現時点では赤色光で神経活動を操作することのできる UAS-CsChrimson がカイコガで有用であることを確認している。また、GAL80^{ts} に関しては系統の樹立を進めているところである。今後これらの系統を駆使することで、活動依存的な神経回路の人為的活動操作や神経活動イメージングを可能にしてゆきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Seika Takayanagi-Kiya, [Taketoshi Kiya](#)

Activity-dependent visualization and control of neural circuits for courtship behavior in the fly *Drosophila melanogaster* 査読有

Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019 Mar 19;116(12):5715-5720.

doi:10.1073/pnas.1814628116. Epub 2019 Mar 5.

Koudai Morishita, Masafumi Iwami, [Taketoshi Kiya](#)

Mapping of courtship behavior-induced neural activity in the thoracic ganglia of silkworm *Bombyx mori* by an immediate early gene, *Hr38* 査読有

Zoological Science, 2018 Jun;35(3):276-280.

doi: 10.2108/zs170196.

Chiho Hara, Koudai Morishita, Seika Takayanagi-Kiya, Akihisa Mikami, Keiro Uchino, Takeshi Sakurai, Ryohei Kanzaki, Hideki Sezutsu, Masafumi Iwami, [Taketoshi Kiya](#)

Refinement of ectopic protein expression through the GAL4/UAS system in *Bombyx mori*: application to behavioral and developmental studies 査読有

Scientific Reports, 2017 Sep 18;7(1):11795.

doi: 10.1038/s41598-017-12102-2.

Syusaku Taguchi, Masafumi Iwami, [Taketoshi Kiya](#)

Identification and characterization of novel genes expressed preferentially in the corpora allata or corpora cardiaca during the juvenile hormone synthetic period in the silkworm, *Bombyx mori*

査読有

Zoological Science, 2017 Oct;34(5):398-405.

doi: 10.2108/zs170069.

Seika Takayanagi-Kiya, [Taketoshi Kiya](#), Takekazu Kunieda, Takeo Kubo

Mblk-1 Transcription Factor Family: Its Roles in Various Animals and Regulation by NOL4 Splice Variants in Mammals 査読有

Int. J. Mol. Sci., 2017 Feb; 18(2): 246.

doi: 10.3390/ijms18020246.

[学会発表] (計 15 件)

木矢 星歌、[木矢 剛智](#) 神経活動依存的に発現する遺伝子 *Hr38* を用いたショウジョウバエ

脳において性行動時に活動した神経回路の可視化と操作 日本分子生物学会 2018年

木矢 剛智 昆虫の生得的行動の神経基盤：活動依存的な神経回路可視化法の開発によるアプローチ 第11回北陸合同バイオシンポジウム 2018年

木矢 星歌、塩谷 捺美、西内 巧、岩見 雅史、木矢 剛智 新規な神経活動マーカー遺伝子 *stripe* を利用したショウジョウバエの神経回路の可視化と操作による社会的文脈依存的行動の神経基盤の解析 ConBio2017 2017年

坂本 沙紀、箕口 昌杜、大村 知世、岩見 雅史、木矢 剛智 神経活動依存的に発現する遺伝子 *Hr38* は CREB の下流で長期記憶の形成を促進する ConBio2017 2017年

八代 百合子、三木 文佳、佐藤 優希、岩見 雅史、木矢 剛智 神経活動依存的な遺伝子発現を簡単に定量化できる手法の構築と新規な因子の網羅的スクリーニング ConBio2017 2017年

木矢 星歌、坂本 沙紀、岩見 雅史、木矢 剛智 神経活動依存的に発現する遺伝子 *Hr38* を用いたショウジョウバエ脳において性行動時に活動した神経回路の可視化と操作 日本動物学会 2017年

木矢 剛智 昆虫の生得的行動を制御する神経機構 第3回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会 2017年

木矢 剛智、岩見 雅史 神経活動依存的に発現する遺伝子 *Hr38* を用いたショウジョウバエ脳において性行動時に活動した神経回路の可視化と操作 日本分子生物学会 2016年

Taketoshi Kiya Visualization and manipulation of neural circuit of insect brain using conserved immediate early genes ICZ&ZSJ meeting 2016 2016年

Seika Takayanagi-Kiya, Masafumi Iwami, Taketoshi Kiya Visualization and manipulation of neural circuit activated by courtship behavior in the brain of *Drosophila melanogaster*, using a neural activity marker gene, *Hr38* ICZ&ZSJ meeting 2016 2016年

Youko Ito, Masafumi Iwami, Taketoshi Kiya Neural activity-dependent regulation of insect development by PTTH neurons ICZ&ZSJ meeting 2016 2016年

Masami Nakata, Masafumi Iwami, Taketoshi Kiya Characterization of the sexually dimorphic expression of doublesex in the brain of silkworm, *Bombyx mori* ICZ&ZSJ meeting 2016 2016年

Natsumi Shioya, Takumi Nishiuchi, Masafumi Iwami, Taketoshi Kiya Identification of stripe, the insect homolog of *egr-1*, as a novel immediate early gene in the brain of vinegar fly, *Drosophila melanogaster* ICZ&ZSJ meeting 2016 2016年

木矢 剛智、岩見 雅史 神経活動依存的に発現する遺伝子 *Hr38* を用いたショウジョウバエ脳において性行動時に活動した神経回路の可視化と操作 日本神経科学学会 2016年

Taketoshi Kiya, Masafumi Iwami Visualization and manipulation of neural circuit activated by courtship behavior in the brain of *Drosophila melanogaster*, using a neural activity marker gene, *Hr38* JDRC12 2016年

〔その他〕

ホームページ等

<http://kiya.w3.kanazawa-u.ac.jp/>