

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：63801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07417

研究課題名(和文) 意志決定機構の解明に向けた、キイロショウジョウバエ味覚二次神経の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analyses of gustatory second-order neurons of *Drosophila melanogaster* with the goal of elucidation of the decision-making mechanism

研究代表者

宮崎 隆明 (Miyazaki, Takaaki)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・博士研究員

研究者番号：00777807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：甘味を感じる神経細胞から脳内で情報を受け取っている味覚二次神経細胞の中には、摂食行動を支配する神経細胞や、連合学習の際に報酬情報を伝えている神経細胞と直接つながっているものがあることを見出した。私が以前の研究で標識していた味覚二次神経細胞14種類のうち、1種類は摂食系につながっていた。また、この14種類のうち、4種類のみが報酬情報を伝える神経細胞に接続していた。味覚行動実験において、他の細胞には影響を与えずに二次神経細胞のみを遺伝学的に操作できるような手法を確立した。

ハエの口に与えた味刺激の濃度と、脳内の味覚神経細胞の反応を同時に計測する実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Sugar stimuli detected by the gustatory system serve as reward cues for associative learning as well as triggers for immediate feeding behaviors. Gustatory sensory neurons (GSNs) send information about sugar from the mouth to a specific subregion of the brain. A specific subpopulation of brain neurons mediate the reward signal required for associative learning, while another subset of neurons command the feeding behavior. In the previous study, we achieved genetic identification of 15 types of gustatory second-order neurons (G2Ns), which functionally contact onto sugar-responsive GSNs. In this research, we found that one/four type(s) of G2Ns directly connect to the feeding/reward system, respectively.

We established a genetic tool to manipulate G2Ns without a side-effect on other neurons in gustatory behavioral experiments.

We established an experimental system in which we can record concentration of taste stimulation near the fly's mouth and responses of gustatory neurons in the brain.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 味覚 学習と行動 キイロショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

動物は、感覚器官によって身の回りの状況を認識し、その情報を脳神経系で処理することで、状況に合った意思決定を行う。この過程はどのようなものだろうか？ある感覚刺激に対して観察される行動は学習によって変化しうる。味覚系は主に、食べる／食べないという行動を惹き起こすのに対し、視・嗅覚系はさまざまな行動を惹き起こしうる。そのため、前記の行動修飾の度合いは味覚系において他の感覚系よりも小さい。従って味覚系では、動物実験を通じてある感覚刺激に対して起きる行動を決定する機構に迫りやすい。本研究では、豊富な分子遺伝学的手法が利用可能で、哺乳類よりも単純な神経系を持ちながら様々な味刺激に対して状況に応じ適切に対応できるキイロショウジョウバエ（以下、ハエ）をモデルとして用いて、この問題を解き明かすことを目指した。

ハエでは、遺伝学的手法によりある一部の細胞のみを標識することができる。ハエで利用可能なたくさんの遺伝子組み換え系統の中には、系統ごとに異なった一部の細胞のみでいろいろな外来遺伝子を発現させることができるものがある。同じ系統を用いれば、別の個体でも同じ種類の細胞で外来遺伝子が発現するので、このことをもって「ある系統がその種類の細胞を標識した」という。これを利用して、例えば、緑色蛍光蛋白質（GFP）を発現させればその細胞のみを可視化して存在部位や形態を観察することができるし、細胞の機能を変化させるような蛋白質を発現させればその細胞のみで機能変化を特異的に惹き起こすことができる。

ハエでは、味を感じる神経細胞と、味刺激によって起こる摂食行動や報酬学習の際に働く神経細胞が既に遺伝学的に標識されていたが、それらの間を結ぶ神経回路がどのようなものであるかは分かっていなかった。ハエは主に口で味を感じるが、ここには味覚感覚神経細胞がある。この細胞は軸索と呼ばれる突起を脳まで伸ばし、味の情報を伝えている。ハエが砂糖などの好きな味を感じると、この感覚刺激に応じた意思決定の結果として、ものを食べようとしたり、そのとき感じていた匂いに以後惹き寄せられるように学習したりする。摂食行動を支配する神経細胞や、好きな味の報酬情報を記憶の中へ送る神経細胞はハエの脳の中で特定されていたが、これらの細胞は味を感じる細胞の突起末端とは接続していない。すなわち、何らかの未知の神経回路がこれらの間をつないでいる。

私は以前の研究で、ハエの脳の中で砂糖の味を感じる神経細胞の突起末端から情報を受け取る二次神経細胞を 15 種類、遺伝学的に標識していた。これらの細胞の中に、上記の未知の神経回路を担うものがあるのではないかと考え、研究を行った。

## 2. 研究の目的

(1) 私が遺伝学的に同定した、甘味情報を受け取る味覚二次神経細胞が、摂食行動を支配する神経細胞や報酬情報を匂い記憶中枢へ伝える神経細胞と接続しているか否かを明らかにする。

(2) 味覚二次神経細胞のみで遺伝子発現を惹き起こすことができるような遺伝学的手法を確立する。私が以前の研究で味覚二次神経細胞の同定に用いた系統は、その細胞のみを標識するのではなく、余分な細胞も標識していた。このとき、外来遺伝子は着目した細胞だけでなく余分な細胞でも発現する。神経細胞の形態を観察したり、(1)のように接続を調べたりするときには、余分な細胞は別の場所にあるので問題にならない。しかし、細胞の働きを変化させてそれが個体レベルの行動にどう影響するかを調べるときには、着目した細胞の変化が影響したのか余分な細胞の変化が影響したのかが区別できなくなってしまう。そこで、味覚二次神経細胞では遺伝子発現を惹き起こすがそれ以外の細胞ではそうしない方法が必要となる。

(3) (1)で味覚系と摂食系・報酬系をつないでいることが分かった神経細胞が味刺激に対してどのように反応するかを生きたハエを用いて調べるため、ハエに与えた味の濃度と神経細胞の反応の強さを同時に測定する方法を確立する。

## 3. 研究の方法

(1) ハエで利用できる遺伝学的手法により、2種類の神経細胞の間の接続を検出できる。2種類の神経細胞を、それぞれ、標識するような2つの系統を用いて、片方の種類の神経細胞では細胞表面にGFPの一部の断片を、もう片方の種類の神経細胞の表面ではGFPの残りの断片を発現させる。このとき、これら2種類の神経細胞が接続しているときには、GFPの相補的断片同士がくっつき、蛍光を発するようになる。逆に接合がないときには、2種類の断片は別々のままで蛍光は生じない。

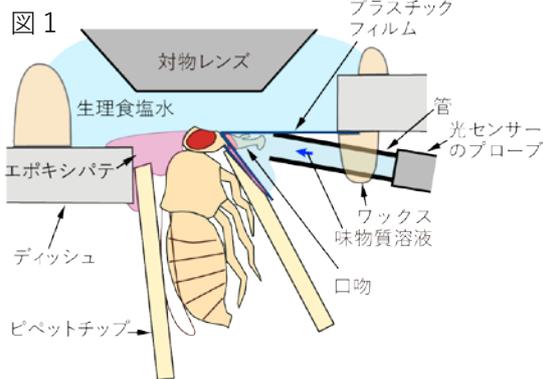
この方法(GRASP法)を利用して、私がこれまでに遺伝学的に同定した味覚二次神経細胞のそれぞれと摂食行動を支配する神経細胞とが接続しているかどうか、および、各種類の味覚二次神経細胞と報酬情報を伝える神経細胞が接続しているかどうかを調べる。

(2) 着目した味覚二次神経細胞を標識する2つの系統を組み合わせる。ハエでは、2系統のどちらによっても標識されるときだけ、遺伝子を発現させる手法がある。2つの系統がどちらも着目した細胞を標識するが、余分に標識される細胞には共通部分がないときには、この方法で着目した細胞のみで遺伝子発現を起こせる。そこで、着目した味覚二次神経細胞を標識する他の系統を、多数の系統の

中から探し出す。こうして得られた候補系統の中から2つを選んだ組み合わせのそれぞれについて、着目した細胞のみで遺伝子発現が起こるようになっているか否かを確認する。

(3) 神経活動に応じて蛍光強度が変化する蛋白質を着目した神経細胞で発現させ、その活動を蛍光強度の変化を通じて顕微鏡下で観察する。蛍光蛋白質の発現のために、(1)で得られた神経細胞を標識する系統を用いる。このように遺伝子操作したハエを生きのままディッシュに固定し、頭部の皮膚に穴を開けて内部の脳が見えるようにする。このハエの口に味刺激を加え、そのときの蛍光の変化を、時系列を追って顕微鏡で観察する。この方法は、私が以前の研究で確立させたものである(図1)。

味刺激を加えるための水溶液には色をつけておき、光センサーで色の濃さを計測する。これで、口に接する味物質の濃度をリアルタイムで測定しながら、神経活動を記録する系を構築した。従来の研究では、味刺激を与える際にハエの口に味溶液の滴を付けていた。この場合、同時に機械的な刺激も加わってしまい、滴を離しても口に少量の溶液が付いたままになって刺激の終了時点でばらつきが生じる。そこで、常にハエの口に液体が流れるようにし、その液体を水→味溶液→水と切り替えるようにした。ハエの口は小さいので、それに見合った流量は液体の粘性に比べて小さく、液体の種類を切り替えるのに時間が掛かる。そこで、切り替え途中の味物質の濃度の経時変化を神経細胞の反応と同時に記録することにした。



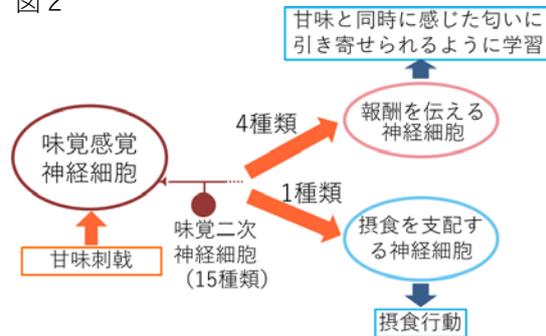
#### 4. 研究成果

(1) 摂食行動を支配するコマンドニューロンが脳の中でどこに神経突起を伸ばすかは既に知られていた。私が以前の研究で同定していた15種類の味覚二次神経細胞のうち1種類は、神経突起をこの場所に伸ばしていた。このことは、この二次神経細胞が摂食系の細胞とつながっていることを示唆していた。そこで、これらの細胞間の接続の有無を、GRASP法によって調べた。すると、確かに蛍光が観察されたのでつながっていることが分かった。

次に、15種類の二次神経細胞のそれぞれに

ついて、匂い記憶の中枢に報酬情報を伝えている神経細胞と接続しているかどうかを、同様の方法で調べたところ、うち4種類が報酬情報を伝える神経細胞につながっていることが判明した(図2)。

図2



上記の結果により、味を感じてから、それによって起きる意思決定の結果を反映して働く神経細胞まで、感覚情報が流れる経路を明らかにできた。これらの神経細胞は遺伝学的に標識されているので、外来遺伝子を発現させることにより、神経活動を抑制・活性化したり可視化したりすることがこの細胞のみできるようになった。これを利用して、味を感じてから意思決定が起こるまでに神経回路でどのような情報処理が行われているかを調べることができるようになった。

(2) 方法(2)によって特定の味覚2次神経のみを操作できる系統を得た。私が以前の研究で得た系統のうち、1系統は脳内の味覚2次神経細胞を標識するだけでなく、同時に脳内の別の部位に存在する神経細胞と、胸腹部神経節内にある神経細胞をも標識していた。これと同じ味覚2次神経細胞を標識すると考えられる候補系統を約5000系統の中から探索した。これで得られたもの同士、または得られたものと既存の系統を組み合わせ、味覚2次神経細胞が標識されるが他の細胞が標識されないようになっているかどうかを調べた。すると、試した32通りの組み合わせのうち3通りについてそのようになっていた。

これにより、味覚2次神経細胞の活動は操作しながらも他の細胞には影響を与えないことようにできる。すなわち、今後、味覚2次神経細胞の個体レベルの働きを、行動実験を通じて調べることができるようになった。

(3) 味刺激の濃度とそれに対する反応を動計測する実験系を製作し、脳内の神経細胞の活動を記録できることを確認した。口で味を感じる神経細胞が脳まで伸ばしている神経突起の末端が、砂糖水に反応することを観察できた。今後、これと同じ方法により味覚2次神経細胞の活動も計測できると期待される。また、神経活動と同時に味物質の濃度の経時変化も記録できた。この結果では、複数回の刺激の際の経時変化は同じようになっており、従来の味溶液の滴

を付ける方法に比べて刺戟のばらつきを小さくできることが確かめられた。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 9 件)

- ①宮崎 隆明、林子暘、李 奇宏、マーク ストッファー、伊藤 啓、鈴木 えみ子、Anatomical screening and live imaging of gustatory 2nd-order neurons that link sugar detection and feeding/reward systems, Keystone Symposia Conference “State of the Brain: Genetic Dissection of Brain Circuits and Behavior in Health and Disease”, 2020, キーストーン (米国コロラド州)、2018 年 1 月 16 日
- ②宮崎 隆明、Gustatory second-order neurons that have direct synaptic connections to the feeding/reward systems、次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム、回路-11 (B21)、一橋講堂 (東京都)、2017 年 12 月 21 日
- ③宮崎 隆明、林子暘、李 奇宏、マーク ストッファー、伊藤 啓、鈴木 えみ子、キイロショウジョウバエにおいて味覚二次神経は摂食/報酬系に直接シナプス接続する、日本味と匂学会第 51 回大会、P-035、神戸国際会議場 (神戸市)、2017 年 9 月 26 日 ※「味覚部門」優秀発表賞受賞
- ④宮崎 隆明、林子暘、李 奇宏、マーク ストッファー、伊藤 啓、鈴木 えみ子、Filling the missing links between sugar sensation and the motor/reward systems: Genetic identification of gustatory second-order neurons in *Drosophila*、第 40 回日本神経科学大会、3O-09m1-4、幕張メッセ (千葉市)、2017 年 7 月 22 日
- ⑤宮崎 隆明、林子暘、李 奇宏、マーク ストッファー、伊藤 啓、鈴木 えみ子、キイロショウジョウバエを用いた、味覚系と摂食/報酬系をつなぐ 神経回路の同定、第 2 回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会、3-3、自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市)、2017 年 6 月 10 日
- ⑥宮崎 隆明、Gustatory second-order neurons that convey sugar taste information to the feeding/reward systems in *Drosophila*、第 343 回 大阪大学神経科学懇話会、大阪大学吹田キャンパス (大阪府吹田市)、2017 年 5 月 11 日

⑦宮崎 隆明、林子暘、李 奇宏、マーク ストッファー、伊藤 啓、鈴木 えみ子、Neural circuits of genetically-identified gustatory second-order neurons、4th Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference、P157、大阪大学吹田キャンパス (大阪府吹田市)、2017 年 5 月 10 日

⑧宮崎 隆明、林子暘、李 奇宏、マーク ストッファー、伊藤 啓、鈴木 えみ子、Gustatory second-order neurons that convey sugar taste information to the feeding/reward systems in *Drosophila*、第 16 回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」、ISP01、九州大学病院キャンパス (福岡市)、2016 年 12 月 3 日

⑨宮崎 隆明、林子暘、鈴木 えみ子、李 奇宏、マーク ストッファー、伊藤 啓、Neuronal screening to fill the missing links between the sugar sensation and the motor/reward systems、第 12 回日本ショウジョウバエ研究会、S2-1、立教大学池袋キャンパス (東京都)、2016 年 9 月 9 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[https://researchmap.jp/t\\_m/](https://researchmap.jp/t_m/)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮崎 隆明 (MIYAZAKI, Takaaki)  
国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・博士研究員  
研究者番号: 00777807

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

鈴木 えみ子 (SUZUKI, Emiko)  
国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・准教授  
研究者番号: 20173891  
伊藤 啓 (ITO, Kei)  
Howard Hughes Medical Institute Janelia Research Campus・Senior Fellow  
研究者番号: 00311192