

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18582

研究課題名(和文) ショウジョウバエ求愛行動をモデルとした視覚認知と行動選択の神経機構の研究

研究課題名(英文) Identification of interneurons that mediate vision-dependent courtship regulation in male *Drosophila*

研究代表者

古波津 創 (Kohatsu, Soh)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：40571930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではショウジョウバエ雄の求愛行動制御に関わる2つの視覚系介在ニューロン群を見出した。これらのニューロン群を強制活性化すると、雌に対する定位行動の一部である「歩行ターン」が惹起された。歩行ターンを惹起可能な視覚刺激の呈示下でこれらのニューロン群はCa²⁺応答を示し、その応答強度は雄の歩行ターンに伴って顕著に増大した。GRASP解析からは、これらのニューロン群がoptic tubercleにおいてシナプス接続を有することが示唆された。これらのニューロン群が視覚誘導性の求愛行動要素の発現制御に関わる神経経路の一部を構成することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that two subsets of interneurons that express a sex determination gene *fruitless* are involved in vision-dependent courtship regulation in male *Drosophila*. Optogenetically activating either of these neurons, Lv1 + Ld neurons or AL5a neurons, induced locomotion turn, which is the part female chasing that a male show during courtship. In vivo Ca²⁺ imaging demonstrated that these neurons show Ca²⁺ rise during presentation of visual stimulus that can induce locomotion turn. GRASP analysis suggested that these two subsets of interneurons have synaptic contact in a brain region optic tubercle. Collectively, these neurons are suggested to consist visual circuits that mediate behavior regulation during courtship.

研究分野：神経行動学

キーワード：ショウジョウバエ 視覚行動 求愛行動

1. 研究開始当初の背景

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の雄が示す求愛行動は、複数の要素的行動からなる、複合的な行動である。雄は求愛行動を開始すると、下に述べる要素的行動を切り替えながら雌を誘い、最終的に交尾を達成する。

雄の求愛行動は次の5つの行動要素からなる。雌を追跡し、体軸を雌に向ける「定位行動」、前肢で雌の腹部に触れる「タッピング」、片翅を伸展・振動させて求愛歌を発する「シンギング」、口器で雌の交尾器を舐める「リッキング」、腹部を屈曲させて交尾を試みる「交尾試行」である。

この一連の過程は求愛行動のトリガーニューロンである P1 ニューロン群の活動により活性化される。P1 ニューロン群は雄特異的介在ニューロンであり、前肢の化学感覚器が不揮発性の性フェロモンで刺激されることにより活動する。前肢の化学感覚器から P1 ニューロン群に至る上向性神経経路の詳細は明らかになっている一方、P1 ニューロン群下流の神経回路についての知見は乏しい。このため、P1 ニューロン群の活動によって一連の求愛行動が活性化される神経機構は不明である。行動観察からは、個々の求愛行動要素が高い視覚依存性を示すことがわかっている。このことから、視覚入力から運動出力に至る神経回路の挙動に P1 ニューロン群が修飾的に作用し、これにより視覚誘導性の求愛行動要素の発現が活性化されるというシナリオが考えられる。しかしながら、現状では個々の求愛行動要素の実行に関わる視覚系神経経路の実体はわかっていない。これを明らかにすることにより、P1 ニューロン群による求愛行動発現制御の神経回路メカニズムを理解する道が開けると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では視覚誘導性の求愛行動に関わるニューロン群を解剖学的・機能的に同定することを通し、求愛行動要素発現の神経基盤を理解することを目的とした。具体的には、(1)拘束個体を用いた行動解析により求愛行動の視覚性制御様式を明らかにし、(2)光遺伝学を利用した神経細胞の強制活性化により、視覚依存的な求愛行動要素の発現に関わるニューロン群を同定した。さらに、(3)in vivo 機能イメージングにより、(2)で見出したニューロン群の応答特性解析を行った。

3. 研究の方法

行動実験 本研究での行動実験には、トレッドミルに拘束した雄を用いた求愛行動解析法と神経細胞の光遺伝学的強制活性化とを組み合わせ用いた(図1, Kohatsu *et al.*, 2015)。分子遺伝学的手法により特定の神経細胞集団に改変型チャネルロドプシン(CsChrimson::Venus)を導入した雄の頭部に

赤色光を照射して神経細胞を強制活性化し、これが雄の歩行活動その他の行動に与える影響を定量した。視覚刺激を行う際はコンピュータディスプレイ上に表示した視覚パターンを刺激として用いた。視覚パターンの生成にはオープンソースの視覚刺激作成用ライブラリを使用した(Psychopy; Peirce, 2007)。

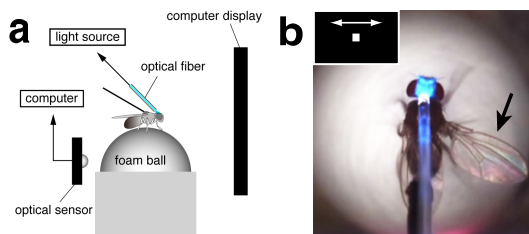


図1. トレッドミルと光遺伝学を活用した視覚行動解析。(a)実験系の概略図。空気流で浮上させた樹脂球上に実験個体を拘束し、光ファイバーを通じた光照射、コンピュータディスプレイを用いた視覚刺激を行う。(b)拘束条件下で人為的に惹起された求愛行動。矢印は片翅伸展・振動を示す。左上の挿入図は呈示した視覚刺激の模式図。改変型 channelrhodopsin 活性化のための青色光が頭部に照射されているのが見える。

機能イメージング実験 in vivo 機能イメージング実験では開頭した雄をトレッドミル上に配置し、視覚刺激呈示中または定位行動中に神経細胞集団が示す Ca^{2+} 応答を Ca^{2+} センサー-GCaMP6s を用いて光学的に計測した。これと同時に行動をビデオ記録し、神経活動と行動出力との対応関係を解析した。

4. 研究成果

(1) 求愛行動の視覚性制御様式の解析

これまでに研究代表者は、P1 ニューロン群を光遺伝学的手法で強制活性化した状態の雄に、水平方向に移動する明暗格子パターン ($\lambda = 60^\circ$ 、時間周波数: 8 Hz) を視覚刺激として呈示することで、パターンの動きに追従する歩行ターンおよび片翅伸展・振動を惹起できることを見出した。本研究ではこの実験アプローチを拡張して様々な視覚刺激パターンに対する雄の行動反応を解析した結果、雄の正面に表示した明暗格子パターンを下方向に移動させると、リッキングおよび交尾試行が引き起こされることを見出した。これによりタッピングを除いた全ての求愛行動要素を2つの人為的操作、すなわち求愛行動中枢の強制活性化と視覚刺激呈示のみで引き起こすことが可能になった。なお、以下では簡単のため、横方向、縦方向に移動する上記の格子パターンをそれぞれ横刺激、縦刺激と記す。

次に、野生型の雄を用いてこれらの視覚刺激に対する行動反応を検討した。まず、雌フェロモン刺激で求愛行動を活性化した雄に横刺激を呈示すると、光遺伝学を用いた場合と同様、定位行動(左右方向の歩行ターン)とシンギングが生じることが確認された。一方、縦刺激を呈示した場合は明瞭な行動反応は観察されなかった。次に、横・縦の刺激を組

み合わせ、雌フェロモン刺激直後にまず横刺激を18秒間呈示して活発な歩行ターンと片翅伸展・振動を引き起こし、その直後に縦刺激を5秒間呈示したところ、明瞭なリッキングと交尾試行が観察された。横刺激と縦刺激の間にインターバルを挿入し、その長さを変化させると、縦刺激に対する反応強度はインターバルの延長に伴って減じ、インターバルが5秒以上になると完全に消失した。また、横刺激の呈示中に活発な行動反応が見られなかった試行では、それに引き続く縦刺激の呈示中にも明瞭な行動は生じなかった。他方、横・縦刺激を呈示する順番を入れ替えた場合には、いずれの行動反応も生じなかった。これらから、視覚誘導性の求愛行動要素の制御には、①雌フェロモン刺激-P1ニューロン群の活性化に依存した、横刺激に対する行動反応性の上昇と、②横刺激に対する行動出力からのフィードバックに依存した、縦刺激に対する行動反応性の上昇、この2つの過程が含まれることが示唆された。横刺激により生じる行動要素(定位行動、シンギング)と縦刺激により生じる行動要素(リッキング、交尾試行)はそれぞれ求愛行動シークエンスの前半と後半において、より高頻度で観察される。上記②の過程が①に依存することが、求愛行動要素の発現順序を決定している要因の1つであることが推測された。

(2) 求愛行動制御に関わる視覚系介在ニューロン群の探索

次に、光遺伝学を利用した行動解析により、求愛行動の制御に関わる視覚系介在ニューロン群を探索した。ここでは実験がより容易な横刺激に対する行動反応に焦点を絞って解析を行った。

解剖学的解析から、性決定遺伝子 *fruitless(fru)* を発現するニューロン群には視葉と中脳をつなぐ視覚系投射ニューロン群が複数含まれることが示されている。そこでまず、これらのニューロン群に発現すると期待される *Gal4* ドライバー系統を発現パターンデータベースの検索により選別した(Janelia research campus FlyLight *Gal4* collection, <http://flweb.janelia.org/>; Vienna VT-*Gal4* library, <http://stockcenter.vdrc.at/control/main>)。これらのドライバー系統を用いて *UAS-CsChrimson::Venus* を発現させた雄の頭部へ赤色光を照射し、生じた行動を解析したところ、VT043656-*Gal4*、R22D06-*Gal4* の2系統でラベルされる神経細胞群を強制活性化すると、視覚刺激を呈示していない場合でも左右方向への歩行ターンが惹起されることがわかった。

いずれの系統を用いた場合でも、赤色光を雄の頭部の左右半球いずれかのみ照射すると、光照射を行った側に向き直ろうとする歩行ターンが観察された(図2)。一方、頭部へ左右対称に赤色光を照射した場合には再

現性のある行動反応は見られなかった。このことから、これらのドライバー系統でラベルされるニューロン群の中に、その活性化によって同側へのターンを惹起可能なものが含まれ、これらのニューロン群を左右同時に活性化すると、出力が拮抗するために明確な行動出力が観察されないものと考えられた。

これらのドライバー系統はいずれも視葉の lobulla と中脳の optic tubercle とをつなぐ、LC10 と命名されたグループに分類される視覚系投射ニューロン群に発現を示していた。そこで LC10 ニューロン群特異的に発現する *split-Gal4* 系統を用いて同じ実験を行ったところ、R22D06-*Gal4* または VT043656-*Gal4* を用いた場合と同様の結果が得られた。このことから、LC10 ニューロン群の活性化によって歩行ターンが惹起可能なることがわかった。

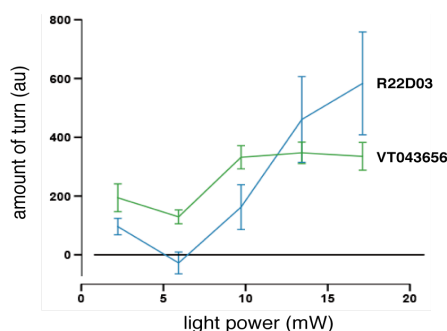


図2. 視覚系介在ニューロン群の光遺伝学的強制活性化により惹起された歩行ターンの赤色光強度依存性。

LC10 ニューロン群は optic tubercle に密な神経突起を有する。そこで LC10 ニューロン群の下流で機能するニューロン群を探索するため、この脳領域に分枝を有する、LC10 以外のニューロン集団をラベルするドライバー系統をデータベース検索により選別し、LC10 の場合と同様の行動解析を行った。その結果、R22D03-*Gal4* 系統によりラベルされる神経細胞の強制活性化により、明瞭な歩行ターンが生じることがわかった(図2)。LC10 ニューロン群を強制活性化した場合と R22D03-*Gal4* 陽性のニューロン群を強制活性化した場合とで赤色光強度-歩行ターン活性曲線を比較すると、R22D03-*Gal4* の場合の方がより急峻な傾きを持ち、歩行ターン活性の最大値がより大きい傾向が認められた(図2)。また、R22D03-*Gal4* の場合には歩行ターンに加えて、シンギングや、交尾の直前に雄が示す特徴的な歩行パターン(横歩き; crab walking)など、LC10 ニューロン群を活性化した際にはみられない行動要素も惹起されることがわかった。

optic tubercle に分枝を持つ R22D03-*Gal4* 陽性のニューロン群は、その神経突起が正中線付近でV字型の鋭角的な屈曲を示す。このユニークな形態的特徴は *fru* 発現ニューロン群である AL5a ニューロン群と共通する。そこで以下ではこのニューロン群を便宜的に

「AL5a 様ニューロン群」と呼ぶ。

次に LC10 ニューロン群と AL5a 様ニューロン群が神経接続を有するか否かを GRASP 法により検討した。GRASP 法では、解析対象となる複数の神経細胞にそれぞれ異なる split-GFP コンポーネントを発現させる。これらの細胞の細胞膜が十分に近接している場合、細胞膜の間隙越しに split-GFP の再構成が起こって蛍光シグナルが生じる。このことを利用してシナプス形成の有無を検討できる。

VT043656-*Gal4* を用いて *UAS-spGFP1-10* を、R22D03-*lexA* を用いて *lexAop-spGFP11* を発現させた雄では、optic tubercle に蛍光シグナルが観察された。なお R22D03-*lexA* は R22D03-*Gal4* に用いたのと同じ制御配列を *lexA* 配列上流に繋いだドライバーコンストラクトで、R22D03-*Gal4* とほぼ同じ発現パターンを示す。一方、いずれかの spGFP のみを発現させた個体では optic tubercle にシグナルは検出されなかった。このことから、双方の spGFP コンポーネントを発現させた際に観察された蛍光シグナルは GRASP シグナルであり、LC10 ニューロン群、AL5a 様ニューロン群が optic tubercle においてシナプス接続を有することが示唆された。

木村らは成虫の脳に約 2000 個ある *fru* 発現ニューロンを形態的特徴に基づいて 40 のサブクラスに分類しており (Kimura *et al.*, 2008)、その中の Lv1+Ld ニューロン群と AL5a ニューロン群が本研究で扱った LC10 ニューロン群と AL5a 様ニューロン群とそれぞれ対応すると考えられる。実際、抗 FRU 抗体を用いた免疫染色では LC10 ニューロン群、AL5a 様ニューロン群のいずれにも FRU タンパク質の発現が認められた。しかしながら脳半球あたりの細胞数で比較すると、LC10 ニューロン群が 159 ± 1.47 ($n = 4$) なのに対し Lv1+Ld ニューロン群が 45 であるなど、特徴に相違もある。既知の *fru* 発現ニューロン群と LC10 ニューロン群、AL5a 様ニューロン群の対応関係の詳細は、インターセクション法などを用いた解剖学的解析により、今後明らかにする必要がある。

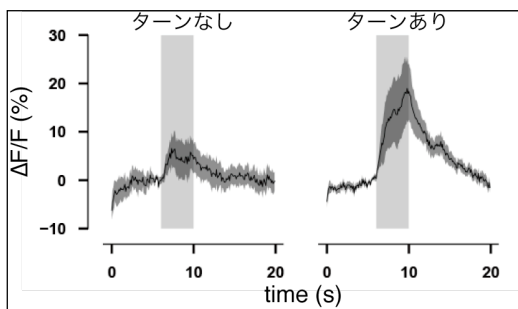


図 3. 歩行ターンに伴って生じる optic tubercle における視覚応答の増強。VT043656-*Gal4* を用いて *UAS-GCaMP6s* を発現させた雄における、視覚刺激 ($\lambda = 30^\circ$, 8 Hz, 横刺激) 呈示下での記録。背景の着色は刺激を呈示した時間窓を示す。

(3) 求愛行動制御に関わる視覚系介在ニューロン群の応答特性

求愛行動の制御に関わる視覚刺激の呈示下における LC10 ニューロン群、R22D03-*Gal4* 陽性ニューロン群の活動を *in vivo* 機能イメージングにより検討した。

まず、VT043656-*Gal4* を用いて *UAS-GCaMP6s* を発現させた雄を用いた記録を行った。VT043656-*Gal4* がラベルするニューロン群のうち、記録を行った optic tubercle に分枝を有するのは LC10 ニューロン群のみであるため、ここで得られたシグナルは LC10 ニューロン群のみに由来すると解釈できる。

始めに、optic tubercle の蛍光像を蛍光顕微鏡でモニターしつつ、横方向に移動する格子パターンを呈示すると Ca^{2+} レベルの上昇が生じた。格子パターンの移動方向を左・右・上・下と変えて応答強度を比較すると、定位行動の惹起効果が最も高い移動方向、すなわち格子パターンが正中線から、記録を行った optic tubercle と同側に向かって水平移動する際に、最も顕著な応答がみられた。

次に、イメージング中に求愛行動を惹起し、視覚応答と行動反応との関係を調べた。実験ではまず雄の前肢に雌の腹部で触れ、その後から横方向に移動する格子パターンを 3 秒間、一定のインターバルを挟みつつ反復呈示した。視覚刺激呈示のインターバルは 1 秒とした。インターバルを挟んで視覚刺激を反復刺激すると、雄の定位行動活性を閾値付近に維持することができる。このため雄は同一の視覚刺激を反復呈示されているにも関わらず、ある時は歩行ターンを示し、ある時は示さない。このことを利用して、一連の視覚刺激呈示下における Ca^{2+} 応答と行動反応を同時記録し、歩行ターンが生じた場合と生じなかった場合とで Ca^{2+} 応答を比較した。その結果、雄が歩行ターンを示した試行では Ca^{2+} 応答が顕著に増強されることがわかった (図 3)。

続いて optic tubercle における R22D03-*Gal4* 陽性ニューロン群の Ca^{2+} 応答を検討した。ここでも LC10 ニューロン群から記録を行った際と同様、視覚刺激のみ、雌フェロモン刺激と視覚刺激の対呈示、の 2 つの条件で実験を行った。視覚刺激を単独呈示した実験からは、LC10 ニューロン群と同様の方向選択性を示す結果が得られたが、その一方で応答の強度は LC10 ニューロン群に比して全体に小さかった。雌フェロモン刺激と視覚刺激との対呈示条件では、LC10 ニューロン群の場合と同様、歩行ターンが生じることにより Ca^{2+} 応答が増強されることが明らかになった。ただし R22D03-*Gal4* で標識されるニューロン群には、AL5a 様ニューロン群以外にも optic tubercle に分枝を持つニューロン群が少数ながら含まれる。optic tubercle におけるそれらのニューロン群の分枝の密度は AL5a 様ニューロン群よりもはるかに低いものの、得られた記録にはそれらのニューロンの寄与が含まれる可能性は否定出来ない。今

後、AL5a 様ニューロン群特異的に *UAS-GCaMP6s* を発現させた条件下で同様の結果がられるかどうか、検証する必要がある。

VT043656-*Gal4*, R22D03-*Gal4* いずれを用いた場合においても、*in vivo* イメージング下では行動実験で観察されたリッキングと交尾試行は惹起できなかった。そのため、現時点ではこれらの行動反応と optic tubercle における視覚応答との対応関係を調べることができていない。これは、これらの行動の閾値が相対的に高いこと、*in vivo* イメージング下では開頭の負荷により活発な求愛行動の活性化が困難なことが理由として考えられる。実験個体への負荷がより低いプレパレーション作製法の開発や、刺激の呈示方法の改善などが今後の技術的課題として挙げられる。

(4) まとめ

本研究により、視覚誘導性の求愛行動要素発現に関わる2つの候補ニューロン集団が同定された。歩行ターンに伴ってこれらのニューロン群に生じる視覚応答増強の機能的意味とその神経回路メカニズムの解明が直近の課題と考えられる。多くの行動データを考慮すれば、P1ニューロン群がこの過程に関与する蓋然性は高い。本研究で扱った視覚系介在ニューロン群の機能とP1ニューロン群との関わりを調べることにより、高次の行動制御ニューロンが要素的行動の発現を制御するメカニズムを具体的な神経回路の動作に基づいて理解するための足がかりが得られると期待できる。

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 3件)

① Tanaka, R., Higuchi, T., Kohatsu, S., Sato, K. and Yamamoto, D. Optogenetic activation of the *fruitless*-labeled circuitry in *Drosophila subobscura* males induces mating motor acts. *J. Neurosci.*, 2017, (3), pp. 11662-11674, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1943-17.2017, 査読あり

② Higuchi, T., Kohatsu, S. and Yamamoto, D. Quantitative analysis of visually induced courtship elements in *Drosophila subobscura*. *J. Neurogenet.*, 2017, pp. 1-9, doi: 10.1080/01677063.2017.1290613, 査読あり

③ Yamamoto, D. and Kohatsu, S. What does the *fruitless* gene tell us about nature vs. nurture in the sex life of *Drosophila*? *Fly*, 2016 vol. 2, pp. 1-9, doi: 10.1080/19336934.2016.1263778, 査読あり

[学会発表] (計 3件)

① Tanaka, R., Higuchi, T., Kohatsu, S., Sato, K. and Yamamoto, D. Anatomical dissection and optogenetic activation of the *fruitless*-labeled circuitry in genome-edited *Drosophila subobscura*. Cold spring harbor laboratory meeting: Neurobiology of *Drosophila*, October 3-7, 2017 (New York, USA)

② Tanaka, R., Higuchi, T., Kohatsu, S., Sato, K. and Yamamoto, D. Visualization and optogenetic activation of the *fruitless*-labeled circuitry in genome-edited *Drosophila subobscura*. EMBO|EMBL Symposia: Neural circuits in the past, present and future, May 14-17, 2017, (Heidelberg, Germany)

③ Kohatsu, S. Vision-dependent courtship regulation and its neural basis in *Drosophila*. Invited seminar at Molecular neuroethology laboratory, Gwangju Institute of Science and Technology, May 4, 2016, (Gwangju, Korea)

[その他]

ホームページ: 国立研究開発法人情報通信研究機構未来 ICT 研究所フロンティア創造総合研究室行動神経生物学プロジェクト
<http://www2.nict.go.jp/frontier/evoneuro/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古波津 創 (KOHATSU, Soh)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号: 40571930