

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19421

研究課題名（和文）新奇行動獲得の神経基盤

研究課題名（英文）Neuronal basis underlying evolution of novel behavior

研究代表者

松尾 隆嗣（Matsuo, Takashi）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：70301223

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：動物の多様な行動の進化を実現する至近的メカニズムはなんだろうか？このような問題に取り組むためには、非モデル生物でも高度な遺伝学的ツールを使えるようにすることが必要である。本研究ではキイロショウジョウバエに近縁でありながらも他に例を見ない特徴的な求愛行動を進化させたテナガショウジョウバエを対象に、キイロショウジョウバエと同じ遺伝子導入システムを確立することで、キイロショウジョウバエで用いられている改変遺伝子ベクターがそのままテナガショウジョウバエでも使えるようにした。このシステムを用いてカルシウムイメージング用の遺伝子導入システムを作成した。さらに、深層学習を用いた自動行動解析システムを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、モデル生物の近縁種を用いて実験的に生物進化を研究する手法が広く用いられつつある。一方で、新しい研究材料にはモデル生物で使える様々な技術が存在していないことが多く、研究障壁となっている。本研究の成果は新しい研究材料を開発することでこのような障壁を取り除き、非モデル生物を用いた研究をさらに推し進めることになると期待される。また、本研究で開発した深層学習を用いた自動行動解析システムはどのような動物のどんな行動にも対応することができるので、研究分野のみならず動物園やその他の場所で動物の行動を管理する目的に広く用いることができる。

研究成果の概要（英文）：What is the proximate mechanism underlying the evolution of novel behaviors?

To answer this question, advanced genetic tools need to be available in non-model animals that evolved to have characteristic behaviors. In this study, the attP/attB system for gene transformation has established in *Drosophila prolongata*, a fruitfly that has evolved a unique courtship behavior. Using this system, transgenic *D. prolongata* strains for calcium imaging of neural activity were generated. In addition, an automated behavior analysis system using deep learning networks was developed for the real time behavior analysis.

研究分野：昆虫行動学

キーワード：Drosophila prolongata

1. 研究開始当初の背景

動物の多様な行動の進化を実現する至近的メカニズムはなんであるか？系統的に近縁な種群でも、ある種だけが質的に全く新しい行動を獲得していることがある。しかし、どのような神経系の変化が新奇な行動の獲得に寄与しているのかはほとんど分かっていなかった。

生物の多様性進化の至近的メカニズムについては近年多くのことが明らかになってきている。特に形態の進化については分子レベルで解明されている例も多数あり、“既存の発生メカニズムの流用”といった共通原理も見いだされるに至っている。その一方、行動の進化についての我々の知識は限られている。これまでにない新しい行動の獲得は適応度を大きく変化させ、他種との関係にも影響を与えるため生態学上重要な問題であるが、どのような神経系の変化が新奇行動の進化を実現するのかについてはほとんど分かっていなかった。

キイロショウジョウバエは行動の神経基盤についての研究で近年好んで用いられるモデル生物である。その利点は高度に洗練された遺伝学的な解析ツールにあり、脳内の任意の神経細胞群の活動状態を自在に検出する技術(カルシウムイメージング)および特定の行動が行われたかどうかをコンピューターによりリアルタイムで検出する技術(自動行動解析)を用いて、求愛行動をはじめ様々な行動を制御する神経回路が次々に同定されている。しかしながら、種間で新奇な行動が進化するメカニズムは、モデル種だけを使っていたのでは答えることができないチャレンジな問題である。

我々はこれまで、テナガショウジョウバエのユニークな形態と行動に関する研究を行ってきた。テナガショウジョウバエはキイロショウジョウバエに比較的近縁であるが、形態的には大きく異なり、顕著な性的二型を示す(図1)。特にオスの前脚は着色・肥大しているのが特徴となっている。求愛



図1 テナガショウジョウバエ *Drosophila prolongata* のメス(左)とオス(右)

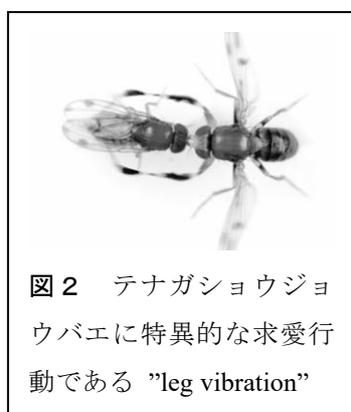


図2 テナガショウジョウバエに特異的な求愛行動である“leg vibration”

行動も独特であり、肥大した前脚

を用いてメスの腹部を激しく連打する“leg vibration”と呼ぶ動作を伴う(図2)。このようなオスの形態と行動は近縁種を含め他のショウジョウバエでは全く見られないため、テナガショウジョウバエの系譜で特異的に進化したと考えられる(Setoguchi et al. 2014 J. Ethol.)。Leg vibrationにはメスの交尾受容性を高める効果があるが、一方でその音を聴きつけたライバルオスの介入を招くため、テナガショウジョウバエは社会的条件(他のオスが存在するか否か)により求愛の方法(leg vibrationを用いるか否か)を切り替えていることが分かった(Setoguchi et al. 2015 Proc. R. Soc. B)。

このように leg vibration は生態学的に大きな意味を持つ行動であるが、どのようにして獲得されたのかは全くの謎である。進化の過程で突然全く新しい行動が出現する謎を解くことは、行動進化のメカニズムの理解を格段に進歩させることになるが、そのためには従来の比較行動学的方法論を超える技術的なブレークスルーが必要である。他方モデル生物の神経行動学では、特定の神経細胞の活動状態をリアルタイムで観察する技術(カルシウムイメージング)と行動をリアルタイムでコンピューター解析する技術(自動行動解析)が革命的な変化をもたらしている。これにより、各種の行動を実現する神経回路が同定されているが、高度な遺伝子組み換え技術を必要とするため非モデル生物での適用例は無かった。また、キイロショウジョウバエで用いられている自動行動解析システムはキイロショウジョウバエの行動に特化したシステム設計とパラメーター設定となっており、他の種の異なる行動に適用するためには大きな困難が存在していた。

2. 研究の目的

本研究では、1. キイロショウジョウバエで用いられている遺伝学的ツールを非モデル生物であるテナガショウジョウバエでも使えるようにすること、および2. 深層学習を用いた柔軟な自

動行動解析手法を開発すること、の2つを目的とする。これにより、テナガシヨウジヨウバエの行動進化に関わる神経回路を明らかにするための基盤を形成する。

3. 研究の方法

3-1. attP/attB 遺伝子導入システムの確立

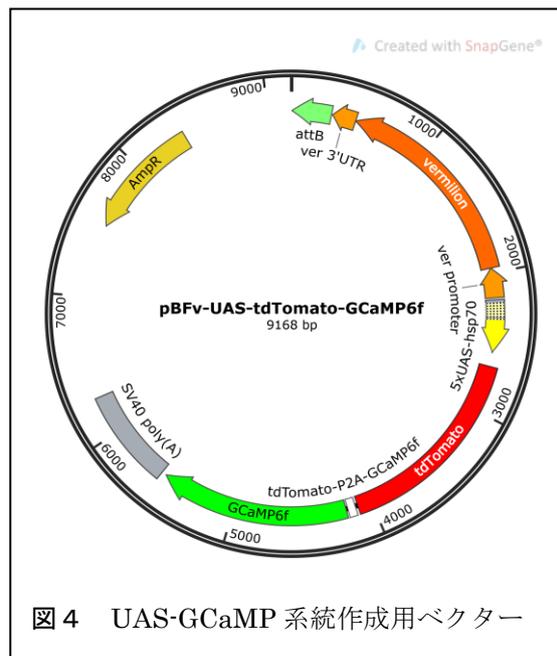
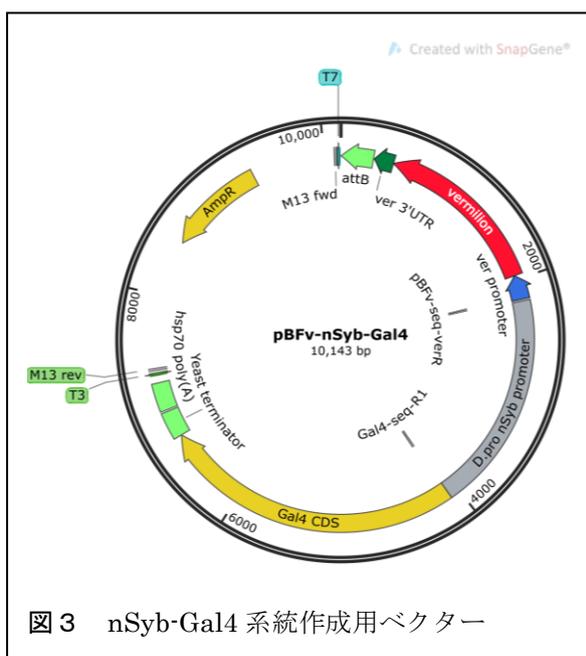
ゲノム編集技術により非モデル生物においても高度な遺伝子操作が可能になったとは言え、現状ではまだ制限が多くモデル生物と同等の操作を行うことは現実的ではない。一方キイロシヨウジヨウバエにおける遺伝子導入は現在ファージ由来の配列特異的組換え酵素 (Φ C31 インテグラーゼ) を利用した遺伝子導入法を用いることが標準となっている。 Φ C31 インテグラーゼは attP 配列と attB 配列の間で DNA 鎖を組み変えるので、あらかじめゲノム中に attP 配列を導入しておくこと、attB 配列を持つベクターを組み込むことができる。ゲノム編集による遺伝子導入よりも効率がよく安定性があり、大きくて複雑なコンストラクトも導入できる利点がある。キイロシヨウジヨウバエではこのシステムを用いて多数の高機能な遺伝学的解析ツールが作られている。したがってテナガシヨウジヨウバエにおいても attP/attB システムを使えるようになれば、キイロシヨウジヨウバエ用に開発された遺伝学的ツールをそのままテナガシヨウジヨウバエに導入し、解析に用いることができる。

そこで、attP 配列を載せた piggyBac ベクターを用いて、テナガシヨウジヨウバエ attP 系統群を作成した。このベクターにはマーカーとして 3xP3-DsRed も載っており、複眼における赤色蛍光によって遺伝子導入個体を識別することができる。

3-2. Gal4/UAS システムを用いたカルシウムイメージング用システムの作成

キイロシヨウジヨウバエでは Gal4/UAS を用いたバイナリー遺伝子発現システムが多用される。この方法は発現様式を規定する Gal4 システムと発現させる遺伝子を持った UAS システムの2つを作成しなくてはならないため一見遠回りに思えるが、汎用性と拡張性に富むためキイロシヨウジヨウバエにおいて遺伝学的手法が高度化できた主要因の一つとなっている。ゲノム編集を用いた遺伝子導入では成功率が低いためこのような2倍の手間がかかる方法は採用できないが、形質転換効率の高い attP/attB システムなら比較的容易に実現することができる。

Gal4 システムとして、パンニューラルに遺伝子発現を誘導する nSyb 遺伝子のプロモーターを用いた nSyb-Gal4 を、UAS システムとしてカルシウムイメージング用の UAS-GCaMP を作成することとした (図3, 4)。なお、UAS-GCaMP には発現マーカーとして赤色蛍光タンパク質 tdTomato も搭載されており、P2A 配列により翻訳後切断を受けて GCaMP と分離される仕組みである。



3-3. 深層学習を用いた自動行動解析システムの確立

キイロショウジョウバエで伝統的に用いられている自動行動解析システムは、1. 前景抽出を用いた物体検出による個体位置のトラッキング および 2. 機械学習を用いた行動分類 の2ステップからなる。この手法は実験装置の構造や照明条件に制限が多かったり、行動の数学的な定義の最適化に手間がかかったりという問題があり、他の種や新しい行動に対応できるように拡張することが容易ではない。

そこで本研究では深層学習の技法を用いることにより 1 ステップでトラッキングと行動の検出をおこなえるシステムを設計した (図5)。この手法はその原理上、複雑な実験装置や不均一な照明条件でも安定した検出を行うことができ、異なる種や新しい行動に定義を拡張することも比較的容易である。

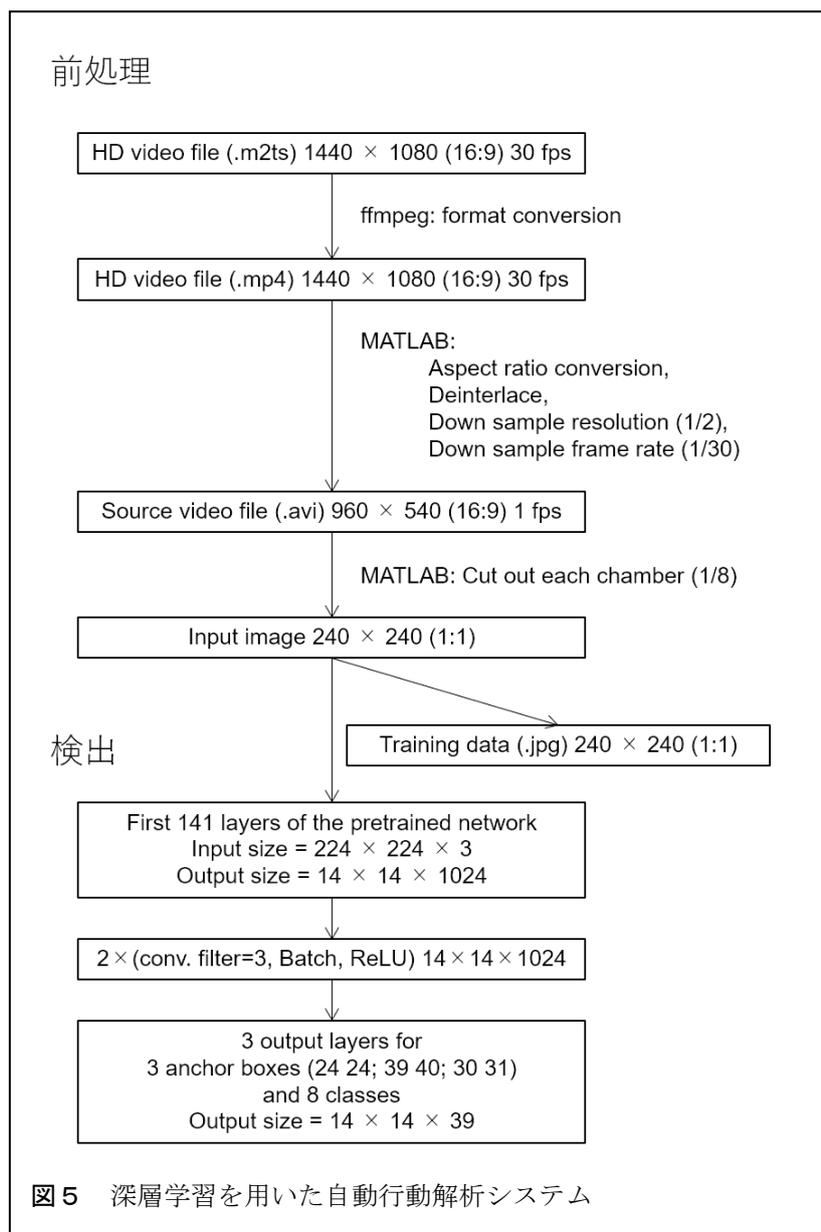


図5 深層学習を用いた自動行動解析システム

4. 研究成果

4-1. attP 系統の作成

約 400 系統のスクリーニングを行い、ゲノム上の異なる位置に attP 配列を挿入した 40 系統を確立した。これらのすべてについて attP/attB システムによる遺伝子導入効率を計測した。また、ゲノム上の挿入位置を塩基配列レベルで特定した。

4-2. カルシウムイメージング用系統の作成

nSyb-Gal4 系統と UAS-GCaMP 系統を作成した。これらの掛け合わせにより、目的通り神経系で GCaMP が発現していることを確認した。

4-3. 深層学習を用いた自動行動解析システムの作成

これまでのシステムでは解析することができなかった内部にエサ台が存在する底面が平坦でない容器を用いて、テナガショウジョウバエの闘争行動と求愛行動を同時に解析できるシステムが完成した (図 6)。テナガショウジョウバエに固有の求愛行動である leg vibration にも対応しており、現在のところ 1 秒以内の精度で各種行動を検出することができる。

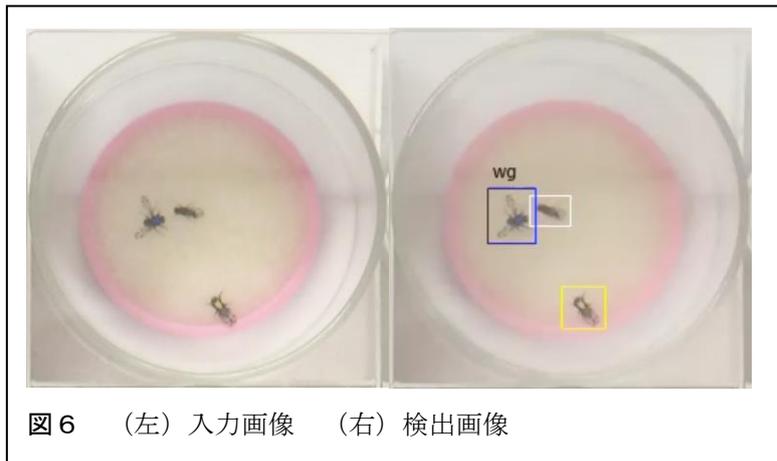


図 6 (左) 入力画像 (右) 検出画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuyoshi Minekawa, Takahisa Miyatake, Yukio Ishikawa, Takashi Matsuo	4. 巻 140
2. 論文標題 The adaptive role of a species-specific courtship behaviour in coping with remating suppression of mated females	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Animal Behaviour	6. 最初と最後の頁 29-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anbehav.2018.04.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ayumi Kudo, Takeshi Awasaki, Yukio Ishikawa, Takashi Matsuo	4. 巻 92
2. 論文標題 piggyBac- and phiC31 integrase-mediated transgenesis in <i>Drosophila prolongata</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 277-285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.17-00024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kazuyoshi Minekawa, Kai Amino, Takashi Matsuo	4. 巻 74
2. 論文標題 A courtship behavior that makes monandrous females polyandrous	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Evolution	6. 最初と最後の頁 2483-2493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/evo.14098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuki Ando, Toshiki Yoshimizu, Takashi Matsuo	4. 巻 166
2. 論文標題 Food availability reverses the effect of hunger state on copulation rate in <i>Drosophila prolongata</i> females	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Behaviour	6. 最初と最後の頁 51-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anbehav.2020.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kai Amino, Takashi Matsuo	4. 巻 37
2. 論文標題 Intra- versus inter-sexual selection on Sexually dimorphic traits in <i>Drosophila prolongata</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 210-216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs200010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 香月雅子、松尾隆嗣
2. 発表標題 深層学習を用いた昆虫の闘争行動の自動検出
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 網野海、松尾隆嗣
2. 発表標題 深層学習を用いたテナガシヨウジョウバエにおけるなわばり行動の解析
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊嶋直樹、網野海、松尾隆嗣
2. 発表標題 テナガシヨウジョウバエにおける闘争・交尾行動間の相互作用
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 香月雅子、松尾隆嗣
2. 発表標題 深層学習を用いた昆虫行動の自動アノテーション
3. 学会等名 日本動物行動学会第38回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Matsuo
2. 発表標題 Drosophila prolongata as a model species of sexual selection studies
3. 学会等名 NSI Workshop "Neural Mechanisms underlying Behavior" (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶺川一喜、網野海、松尾隆嗣
2. 発表標題 新奇求愛行動獲得による配偶システムの進化
3. 学会等名 第22回日本進化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉水敏城、松尾隆嗣
2. 発表標題 テナガシヨウジヨウバエを用いたタカ・ハトゲームの再現
3. 学会等名 第39回日本動物行動学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 嶺川一喜
2. 発表標題 一つの求愛行動が単婚性のメスを多婚性に変化させる
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スイス	スイス連邦工科大学ローザンヌ校		