

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14813

研究課題名(和文) 昆虫脳高次中枢における感覚情報統合と行動決定の神経回路機構解明

研究課題名(英文) Mechanisms of multimodal sensory integration and decision making in *Drosophila* higher brain centers

研究代表者

木矢 星歌 (Takayanagi-Kiya, Seika)

金沢大学・生命理工学系・研究協力員

研究者番号：40793196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動物は環境から種々の感覚情報を受け取り、適切な行動を選択する。本研究ではショウジョウバエをモデルとして、脳で複数の感覚入力を受ける神経群aSP2(雄の性行動時に活動する神経として本研究者が報告)に着目し、感覚情報の統合と行動決定を行う神経機構の一端を明らかにすることを目指した。aSP2神経の活動を抑制したショウジョウバエの雄では求愛が断続的になったことから、aSP2神経は求愛持続の決断や性行動のモチベーション維持に関わることを見出した。また、雌との接触によって雄の脳内でaSP2神経の活動が変動する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

ショウジョウバエの脳高次中枢に存在するaSP2神経は雄で構成細胞数が多く、発達した雌雄差のある神経回路であることは知られていたが、その性行動における機能は不明であった。本研究はaSP2神経が雌由来の感覚情報に応答し、雄の性行動モチベーション維持に関わることを初めて示した。これは昆虫の脳における行動決定機構の一端を明らかにするものである。昆虫における感覚情報統合と、性行動制御の詳細がさらに解明されれば、将来的には昆虫の産業的利用の拡大や新たな害虫防除法の開発に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Animals continuously make decisions based on sensory information they receive from the environment. In the current study, I aimed to investigate the neural basis of this decision-making process by using sexual behavior of the fruit fly *Drosophila melanogaster* as a model. Here I focused on a cluster of neurons termed aSP2 (which we previously reported as a cluster activated when males exhibit courtship), located in the higher order brain region of males, which receives multimodal sensory information. aSP2-silenced males were not able to sustain courtship towards a female, suggesting that aSP2 is involved in the decision-making process of whether or not to continue courting, and/or the regulation of courtship vigor. In addition, I found that the activity level of aSP2 neurons changes when a male touches a female by his front leg.

研究分野：神経分子生物学

キーワード：神経科学 性行動 初期応答遺伝子 即初期遺伝子

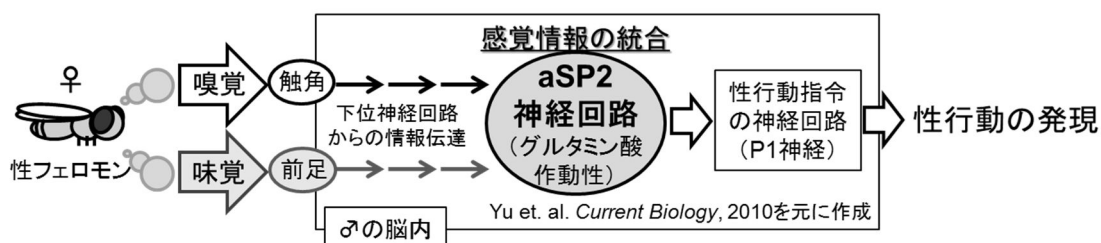
### 1. 研究開始当初の背景

動物は種々の感覚入力から環境中の情報を判断し、自らの行動を決定する。しかし動物が環境から受け取る種々の感覚情報を統合し、適切な行動を選択する神経機構については不明な点が多く残されている。昆虫の性フェロモンは、特異的な性フェロモン受容体の活性化が、性行動という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。本研究者はこれらの研究上の利点と、遺伝学的手法を用いた神経機能の解析が可能であるといった観点から、ショウジョウバエの性行動を対象として、感覚情報が行動を制御する機構の解析を行ってきた。

ショウジョウバエのオスは、メスに出会うと定型的な求愛行動を示し、メスに受け入れられると交尾を完遂することが出来る。この際、オスは視覚・嗅覚・味覚といった様々な感覚情報を総動員して、相手が同種の異性であることを詳細に確認しながら行動する。他種のメスや、既に他のオスと交尾済みのメスなど、ふさわしくない相手に対する求愛行動は時間とエネルギーの浪費につながるため、オスはこれを避けるための神経機構を備えている。すなわちショウジョウバエの求愛行動においては、常に多種感覚情報を手掛かりに、求愛行動を継続するかどうかといった行動の決断が行われている。

本研究者はこれまで、所属研究室で同定されていた保存された初期応答遺伝子 *Hr38* (*Current Biology*, 2013) や *stripe* (投稿準備中) に着目し、行動時に活動の起こった神経細胞特異的に GFP を発現させて、神経回路を可視化する手法を確立してきた。本手法を用い求愛行動がどのような感覚情報の統合機構によって制御されているのかを調べたところ、嗅覚と味覚の 2 種類の性フェロモン情報が aSP2 という *fruitless* (ショウジョウバエ脳の性決定因子) 陽性細胞の構成する神経細胞群で統合されていることを見出した。さらに興味深いことに、aSP2 細胞の神経活動を抑制すると、オスは求愛行動を継続して行うことができなくなり、交尾完遂率が激減することを見出した。*fruitless* 発現神経細胞が構成する神経回路を詳細に調べた先行研究から、嗅覚・味覚を介した性フェロモン情報は aSP2 神経細胞が構成する神経回路に入力すること、さらに aSP2 神経細胞は性行動を指令するコマンド神経 (P1 神経) に入力経路をもつことが知られていた(下図)。

性フェロモン情報を伝達する *fruitless* 神経回路の模式図



よって、aSP2 神経回路は複数種類の感覚情報を統合し、性行動発現の司令塔に伝達する回路を構成していると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、感覚統合神経回路 (aSP2) に着目し、様々な感覚情報が統合され、行動決断が下される神経機構を明らかにすることにある。オスのショウジョウバエは複数種類の感覚情報を元に、相手が同種のメスであることを確認しながら求愛行動を継続することから、aSP2 神経回路は感覚情報に依存した行動の発現制御において中心的な役割を持つと考えられる。そこで本研究では、aSP2 神経回路において複数の感覚情報が統合される機構と、その情報が P1 神経に伝達される機構についての解析を行うことにより、動物の脳において共通に認められる、様々な感覚情報を手掛かりに行動を決定する神経機構の一端を明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) aSP2 神経活動抑制が雄の求愛行動に与える影響の詳細な解析

本研究者は初期応答遺伝子 *Hr38* の発現活性を利用した神経ラベル法を用いて、雄の脳内で性行動中に aSP2 神経が活動することを発見している。本研究ではまず、内向き整流制カリウムチャンネル (Kir2.1) を発現させることによって雄の aSP2 神経活動を抑制した際に、求愛行動がどのように変化するかを詳細に解析した。

#### (2) aSP2 神経が雄の性行動によって活動することの確認

*Hr38* とは異なる初期応答遺伝子 *stripe* の発現活性を利用して、雄の性行動中に活動する神経細胞の GFP ラベルを行い、aSP2 神経の活動が確認できるかを調べた。

#### (3) aSP2 の神経活動をリアルタイムで検出するカルシウムイメージング系の構築

これまでの本研究者の研究では、即初期遺伝子を利用した神経活動の検出を行っていたため、aSP2 神経が雌からの感覚情報にリアルタイムでどう応答するかは不明であった。そこで、カルシウムインジケータタンパク質 GCaMP6f を発現するショウジョウバエを用いて、半拘束状態の雄の脳内神経活動をリアルタイムに検出できるカルシウムイメージング系を構築した。

#### (4)雌由来の感覚情報に対する aSP2 神経の生理応答の解析

aSP2 神経細胞に GCaMP6f を発現させたショウジョウバエの雄を、顕微鏡下で半拘束状態にし、前脚に雌を接触させた際の aSP2 神経の活動を解析した。

#### (5)aSP2 神経からのグルタミン酸伝達が雄の求愛行動へ与える影響の解析

先行研究から、aSP2 神経はグルタミン酸作動性神経であることが報告されている。そこで、aSP2 神経からのグルタミン酸伝達が雄の求愛モチベーションを促進するかを調べるため、aSP2 神経特異的に vGluT のノックダウンを行い、雄の性行動への影響を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1)aSP2 神経の活動は雄の求愛モチベーション維持に必要である

aSP2 神経の活動を特異的に抑制した雄の雌に対する求愛・交尾行動を解析した結果、aSP2 抑制雄は求愛行動を何度も開始するものの、すぐに中断してしまうことが分かった(図 1)。一方、雌と接触してから求愛行動の開始までにかかる時間には、対照群との差が認められなかった。これらの結果は、aSP2 神経の活動が、求愛相手の感知や求愛開始の判断には影響しないが、求愛を持続するモチベーションの維持に関わることを示唆している。

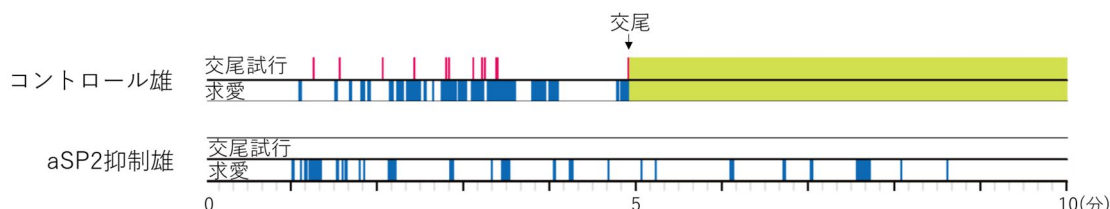


図1 雄の求愛行動解析結果の一例。雌と自由に接触させた10分間のうち求愛(青)と交尾(赤)が観察された時間を示している。aSP2抑制雄ではコントロールに比べ求愛行動の持続時間が短く、交尾に至った雄の割合が低かった。

この結果は、本研究者が以前から取り組んでいた活動依存的な神経活動ラベル法開発についての研究結果と合わせて、*PNAS* 誌に筆頭著者として発表した(Takayanagi-Kiya and Kiya, 2019)。

#### (2)aSP2 神経活動の *stripe* を利用した神経活動ラベル法による検出

雄が雌に対し求愛行動を行った際の神経活動を、*stripe* の発現活性を利用した神経活動ラベル法により GFP で可視化したところ、aSP2 神経において顕著な GFP 発現が認められた(図 2)。この結果は aSP2 神経が性行動によって活動することを裏付けるものである。また、他の *fruitless* 陽性細胞でも性行動依存的に GFP 発現の上昇が観察され、これは *Hr38* の発現活性を利用した神経活動ラベル法の解析結果と類似していた。この結果は、これら 2 手法が共に神経活動検出において有用であることを示している。

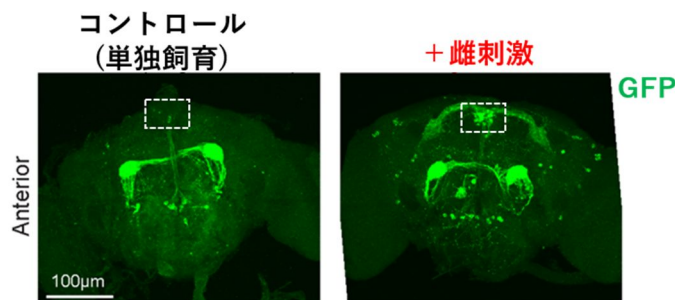


図2 *stripe* 依存的な神経活動ラベル法によって、雄の性行動時の神経活動を GFP で可視化した。24時間雌と共に飼育した雄(右)は aSP2 神経(点線部)における GFP 発現が見られたのに対し、単独飼育したコントロール雄(左)では aSP2 神経における活動依存的な GFP 発現は殆ど見られなかった。

上記の結果と、*stripe* を利用した神経活動ラベル法については 2019 年に日本分子生物学会において発表した。また、現在これらの内容をまとめた論文の投稿準備中である。

#### (3)雌との接触により雄の aSP2 神経活動が変動する

研究室内に Ca イメージングを実施するための設備を新たに導入し、半拘束状態の雄に対し雌を提示した際の神経活動をリアルタイムで計測するためのセットアップを整えた。これを利用し、aSP2 神経に GCaMP6f を発現する雄を半拘束状態にし、前脚に雌を接触させたところ、神経細胞内のカルシウム変動が観察された。この結果は、雌由来の感覚情報によって雄の aSP2 神経活動が変化することを示唆している。今後さらに詳細な解析を行うことで、雌からのどのような感覚入力が aSP2 神経の活動に影響するのかを調べる予定である。

#### (4)aSP2 神経における vGluT ノックダウンは雄の求愛行動に影響しない

aSP2 神経において vGluT をノックダウンした雄のショウジョウバエでは、雌に対する求愛行

動の開始と交尾達成のタイミングにコントロールとの差が認められなかった。このことから、aSP2 神経からのグルタミン酸伝達は求愛行動に影響しない可能性がある。この場合、グルタミン酸以外の神経伝達物質が求愛モチベーションに関与する可能性が考えられる。今後は、複数の RNAi 系統を用いり、別の神経伝達物質の伝達を阻害した際の行動への影響を調べたりすることにより、aSP2 神経がどのように求愛モチベーションを制御しているかの詳細を明らかにしたい。

#### 引用文献

- Takayanagi-Kiya S, Kiya T. Activity-dependent visualization and control of neural circuits for courtship behavior in the fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019; 116(12):5715-5720.
- Yu JY, Kanai MI, Demir E, Jefferis GS, Dickson BJ. Cellular organization of the neural circuit that drives *Drosophila* courtship behavior. *Curr Biol*. 2010. 20(18):1602-14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Seika Takayanagi-Kiya and Taketoshi Kiya	4. 巻 116
2. 論文標題 Activity-dependent visualization and control of neural circuits for courtship behavior in the fly <i>Drosophila melanogaster</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 5715-5720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1814628116	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高柳-木矢 星歌、塩谷 捺美、西内 巧、岩見 雅史、木矢 剛智
2. 発表標題 即初期遺伝子stripeを利用した神経回路の可視化と操作による、ショウジョウバエ雄の求愛行動に関わる神経基盤の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昆虫の生得的行動を生み出す神経回路の新しい解析技術を確立！ <a href="https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/65392">https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/65392</a>
--

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
---------	---------