

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19502

研究課題名（和文）発光計測技術の開発による求愛学習中のドーパミン細胞のダイナミクスと機能の解明

研究課題名（英文）Analysis of neural dynamics during courtship learning through development of bioluminescence recording system

研究代表者

風間 北斗（Kazama, Hokto）

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：90546574

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：これまで自由行動中の個体の神経活動と行動を同時に追跡する手法がなかったため、社会的行動中に行われる、能動的な感覚情報獲得の神経メカニズムはほとんど分かっていなかった。そこで本研究では、自由に行動するショウジョウバエにおいて、特定の神経細胞の活動と行動を非侵襲的にモニターする、発光バイオセンサー、光電子増倍管及びサーモグラフィーを組み合わせたシステムを開発した。そしてこれを用いて、フェロモンを介した動物間コミュニケーションの新戦略とその神経基盤の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発した発光バイオセンサーを用いたシステムは、自然環境により近い状況で動物を自由に行動させ、特定の神経細胞の活動を可視化できる利点がある。このようなアプローチにより、動物がどのようにして情報交換をするのかといったコミュニケーションの戦略や、どのようにして複数の同種を見分けるのかという個体認識のメカニズムの理解につながると期待できる。また、近年発展しているゲノム編集の技術と本システムを組み合わせることで、ハエに限らずさまざまな動物において広く社会的行動の神経基盤を解明できる可能性がひらけた。

研究成果の概要（英文）：Neural mechanisms underlying active acquisition of sensory information during social behavior have largely remained elusive due to the lack of technology that simultaneously monitors the neural activity and movement of freely behaving animals. In this study, we developed a system that non-invasively tracks the activity of specific type of neurons and movement of freely behaving fruit fly *Drosophila* by combining a bioluminescence probe, photomultiplier tubes, and thermography. Using this system, we uncovered a novel strategy and a neural mechanism that animals employ to communicate via pheromone signals.

研究分野：神経科学

キーワード：発光計測 自由行動 嗅覚受容細胞 中枢神経細胞 血液脳関門 ショウジョウバエ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、嗅覚情報処理の神経機構を研究している。これまでに、仮想空間内で固定された状態で飛行するハエの匂い応答と、嗅覚細胞の応答を計測し、両者の関係性を解析することで、匂い嗜好を定量的に解読するモデルを作成してきた。

この過程で痛感したのは、仮想空間内で行う実験では、刺激を高い時空間分解能で制御したり行動を詳細に解析したりできる一方、あくまでも実験者が課した課題における、人工的な刺激に対する行動や神経活動しか調べられないことである。従って、動物行動学的に機能の重要性が示されている、求愛や闘争あるいはそれにまつわる学習といった行動を司る神経機構を調べるためには、完全に自由に行動する動物の特定神経細胞から活動を計測するアプローチが必要となる。そこで、発光プローブの利点と、ショウジョウバエ遺伝学の強みを組み合わせることによってこの難題を解決しようという研究構想に至った。

2. 研究の目的

自然環境下で自由に行動するショウジョウバエにおいて、特定の神経細胞の活動と行動を非侵襲的にモニターするシステムを開発し、感覚情報を用いた動物間コミュニケーションとその神経基盤を理解することを目指した。その開発が成功裏に終わった暁には、更に動物間コミュニケーションの中でも求愛行動に着目し、適切な個体に求愛することを学ぶのに必要であることが示されているドーパミン細胞が、求愛学習中にどのようなダイナミクスを示すかを観察することで、その細胞が行う情報処理を調べることを計画した。

3. 研究の方法

自由に行動する動物の特定神経細胞から活動を測定するという課題を解決するために、発光プローブに基づいた神経活動計測技術を開発した。その理由は、発光プローブは励起光を必要としないため、励起用の光学系下にハエを固定することなく自由に行動させられるからである。発光プローブには、カルシウム感受性発光タンパク質 *Aequorin* に蛍光タンパク質 *tdTomato* をつなげた、*Aequorin-tdTomato* (*Aeq-tdTA*)を用いた。カルシウム濃度上昇と同時に *Aequorin* が出す青色光のエネルギーを *tdTomato* が吸収して励起状態に移り、その後 *tdTomato* が光子を出すという、生物発光共鳴エネルギー移動の仕組みを利用したプローブである。*Aeq-tdTA* は *Gal4/UAS* システムという遺伝学的手法を用いて、特定の神経細胞に発現させた。*Aeq-tdTA* が発光するために必要な基質であるセレンテラジンは、血管への注射を通して細胞に導入した。

Aeq-tdTA を発現させたハエは、アリーナ内で行動させた。発光シグナルの検出には光電子増倍管を用いた。発光シグナルは非常に微弱なことで知られるので、光の検出効率を上げるために、アリーナは二本の光電子増倍管で挟み込んだ。また、ハエの行動はサーモグラフィーを用いて観察した。ハエは変温動物であるが、低温プレートをアリーナの後方に置くことで、背景とコントラストを付けて検出することが可能である。サーモグラフィーを用いることによって、光電子増倍管のバックグラウンドノイズを上げてしまう照明光を省き、高いシグナルノイズ比で発光を検出した。発光しないオスと発光するメスを入れて求愛学習をさせられるようなサイズのアリーナを設計した。

4. 研究成果

(1) 自由に行動する動物の神経活動を計測する発光バイオセンサー技術の確立とフェロモンを介した動物間コミュニケーションの新戦略の発見

光電子増倍管とサーモグラフィーを組み合わせた、特定の神経細胞の活動と行動の同時計測システムが機能するかどうかを調べる為に、まず原理証明実験を行った。そこではオスのフェロモン *cVA* に特異的に反応する嗅覚受容細胞に *Aeq-tdTA* を発現させ、アリーナ内の二匹のオスの行動と神経活動を計測した。その結果、*Aeq-tdTA* を発現したオスが他方の発現していないオスに近づいた際には発光シグナルが検出されなかったものの、マーキング行動を通して提示された分泌物に接近した際には大きな発光シグナルが検出された。したがって、*cVA* はオスのマーキング行動によって積極的に放出され、局所的に配置されることが分かった。これは、*cVA* は主にオスの体表に分泌され、個体同士が接近したときに検知されるという従来の見解を覆す結果である。

次に、オスの分泌物がハエの行動に及ぼす影響を調べるために、円形のアリーナ内でオスのハエを自由に動き回らせ、マーキング前後の行動を追跡した。その結果、マーキング後に、分泌物周辺に頻繁に近づき、そこで多くの時間を費やすことが分かった。さらに、オスの分泌物が求愛行動中のハエに及ぼす影響を調べるために、アリーナ内にオスとメス双方のハエを入れ、オスのマーキング前後の行動を追跡した。その結果、求愛行動中にもかかわらず、オスとメス双方のハエがマーキング領域に強く惹きつけられ、多くの時間を費やすことが明らかとなった。一方、メスの分泌物はオスとメス双方の行動に影響を与えなかった。これは、オスの分泌物が

性アイデンティティを持ち、同種のアエがそれを認識・区別して行動していること示す。cVAは長年研究されてきたが、マーキング行動により特定のタイミングで積極的に放出され、社会的コミュニケーションに利用されていることが初めて明らかとなった(Mercier et al., *Current Biology*, 2018)。

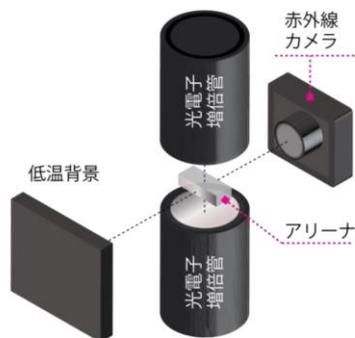


図1: 発光タンパク質を用いたアエの神経活動と行動の同時計測システム

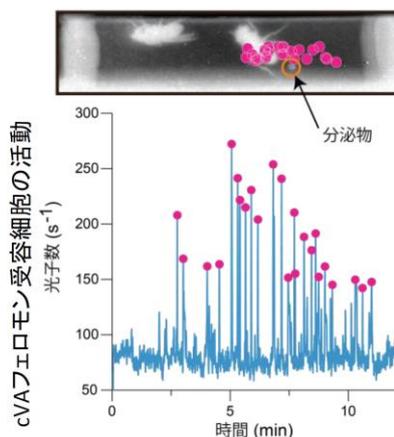


図2: cVA受容細胞の活動のダイナミクス

(2) 発光バイオセンサーAeq-tdTA を用いた中枢神経細胞からのシグナル計測

上記の通り構築した実験系を中枢神経細胞に適用することを目指した。発光プローブ Aeq-tdTA が発光するために必要な基質であるセレンテラジンは、抹消神経細胞に導入する際は血管への注射を通して行えたが、中枢神経細胞に導入するためには血液脳関門を越える必要があるため、グリア性の血液脳関門を一部取り除くプロトコルを確立した。その結果、中枢神経細胞に基質を届けることに成功したが、動物の行動状態が変化してしまう場合が数多く観察された。そこで、血液脳関門を透過しやすい基質で発光する新規のタンパク質をコードしたショウジョウバエを作成する作業を進めた。

自由行動する動物の神経活動と行動を同時計測する新規技術を確立する過程で非常に面白い生物学的現象を発見し論文発表まで行えたため、限られた残りの期間で当初目的としたドーパミン細胞から記録するまでには至らなかったが、本技術を更に改良することで目標の達成に向けて研究を続けていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Mercier D, Tsuchimoto Y, Ohta K, Kazama H	4. 巻 28
2. 論文標題 Olfactory landmark-based communication in interacting <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2624-2631
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2018.06.005	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 Fujisawa S, Kazama H	4. 巻 140
2. 論文標題 Circuits and neural dynamics underlying behavior	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2019.01.002	査読の有無 無
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 Shiozaki HM, Ohta K, Kazama H	4. 巻 106
2. 論文標題 A multi-regional network encoding heading and steering maneuvers in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 126-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2020.01.009	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 Ando T, Sekine S, Inagaki S, Misaki K, Badel L, Moriya H, Sami MM, Chihara T, Kazama H, Yonemura S, Hayashi S	4. 巻 29
2. 論文標題 Nanopore formation in the cuticle of the insect olfactory sensillum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1512-1520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2019.03.043	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 7件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hokto Kazama
2. 発表標題 Plasticity and stability of olfactory representations in the Drosophila memory center
3. 学会等名 Neuroscience2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hokto Kazama
2. 発表標題 Synthesis of unitary odor object representations in an association area
3. 学会等名 International workshop on olfaction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mercier D, Tsuchimoto Y, Ohta K, Kazama H
2. 発表標題 Bioluminescence neural-monitoring reveals olfactory landmark-based communication in interacting Drosophila
3. 学会等名 International workshop on olfaction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hokto Kazama
2. 発表標題 Neural basis of odor-taste multisensory integration in Drosophila
3. 学会等名 42nd Annual meeting of the molecular biology society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hokto Kazama
2. 発表標題 動物のナビゲーションを支える神経回路のしくみを解く 顕微鏡と仮想空間の融合がもたらすソリューション
3. 学会等名 42nd Annual meeting of the molecular biology society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hokto Kazama
2. 発表標題 Odor-taste multisensory integration in Drosophila
3. 学会等名 Naito Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hokto Kazama
2. 発表標題 記憶中枢における匂いオブジェクトの生成
3. 学会等名 Neuroscience2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hokto Kazama
2. 発表標題 ショウジョウバエの脳高次機能の限界はどこにあるのか？ 顕微鏡周りに広がる無限の可能性
3. 学会等名 52nd Annual meeting of the Japanese society of developmental biologists (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Damien Mercier、高木（槌本）佳子、太田和美、風間北斗	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 222
3. 書名 実験医学別冊 発光イメージング実験ガイド（永井健治、小澤岳昌編集）	

〔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
研究 協力者	メルシエ ダミアン (Mercier Damien) (60604840)	国立研究開発法人理化学研究所・999・24 (82401)	