

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号: 11301

研究種目: 若手研究(B)

研究期間: 2009~2011

課題番号: 21770074

研究課題名(和文) 時計ニューロンは行動発現ON/OFFのタイムキーパーとなるか?

研究課題名(英文) Do clock neurons work as a timekeeper for emergence of behavior?

研究代表者

小金澤 雅之 (KOGANEZAWA MASAYUKI)

東北大学・大学院生命科学研究所・准教授

研究者番号: 10302085

研究成果の概要(和文): 動物の活動はサーカディアンリズムと呼ばれる 24 時間の周期性を示す。このリズムは時計遺伝子群とそれらの遺伝子を発現する時計ニューロンによって制御されている。では 24 時間よりも短い時間スケールの行動制御に時計遺伝子・時計ニューロンは機能しているであろうか? 本研究は、遺伝学的技術の洗練されたショウジョウバエを用いた行動解析を行い、時計遺伝子が歩行活動や求愛行動など短い時間スケールの行動発現のパターンに影響を与えることを示した。

研究成果の概要(英文): Activity of animals shows 24 hr rhythmicity called the circadian rhythm. This rhythm is controlled by the function of "clock neurons" and "clock genes" expressed in these neurons. The question is that the clock genes and the clock neurons also regulate an emergence of behavior in shorter time scale. By using *Drosophila*, I shown in this study that the clock genes affect on the emergence of behavior in shorter time scale, such as the locomotion activity or the courtship behavior.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野: 生物学

科研費の分科・細目: 基礎生物学、動物生理行動

キーワード: ショウジョウバエ・時計遺伝子・求愛行動

## 1. 研究開始当初の背景

地球上に生息する様々な生物の活動は 24 時間周期のサーカディアンリズムを持つ。ショウジョウバエでは *period (per)*などの時計遺伝子群発現のフィードバックループが分子基盤となり、時計遺伝子を発現する少数の時計ニューロンによってサーカディアンリズムの制御がなされていることが明らかとされている。これらの時計遺伝子・時計ニューロンは 24 時間よりも短い時間スケールの行動制御にも機能しているであろうか?

ショウジョウバエの雄が求愛行動時に雌に対して発する求愛歌には周期的揺らぎ(1 分程度の周期)があり、サーカディアンリズムに異常のある時計遺伝子突然変異体ではその周期にも異常がある事が報告されている。さらにサーカディアンリズムを示す個体と周期性を失った個体では、単純な活動パターンにも差違がある。これらの報告や観察は、時計遺伝子・時計ニューロンは単にサーカディアンリズムの周期を制御しているだけではなく、より短時間の行動発現にも影響を

与えていることを示唆する。このことを明らかとするためには、従来扱われてきた24時間周期のような長時間スケールの現象に注目するのではなく、より短い時間スケールでの行動発現に焦点を絞った解析を行うべきであると考えた。

## 2. 研究の目的

様々な遺伝学的手法を適用できるショウジョウバエを用いて、突然変異体や神経機能を操作した個体の行動解析することにより、時計遺伝子・時計ニューロンが24時間周期を持つサーカディアンリズムのみならず、さらに短い時間スケールにおける行動発現のON/OFFに関しても重要な役割を果たしているか否かを検証することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料

実験にはキョロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)を用いた。野生型としてCS系統を使用し、時計遺伝子の突然変異系統として、*per<sup>01</sup>*(無周期型)、*per<sup>L</sup>*(長周期型)、*per<sup>S</sup>*(短周期型)を用いた。時計ニューロンを特異的に操作するためのGal4ドライバー系統として*pdf-Gal4*を用いた。時計ニューロンの興奮性やシナプス伝達を一過的に操作するために*UAS-dTrpA1*系統と*UAS-shf<sup>S</sup>*系統を利用した。*pdf-Gal4*と*UAS-dTrpA1*もしくは*UAS-shf<sup>S</sup>*を持つ個体を用いて、時計ニューロン特異的に且つ一過的に神経活動の上昇もしくはシナプス伝達の阻害を行った。羽化後3から7日目の個体を用い、通常温度25°Cで行動実験を行った。

### (2) 歩行活動の解析

直径1 cm・高さ3 mmの円形チェンバーにショウジョウバエを1個体入れ、その歩行活動をビデオカメラにて撮影した。コンピュータに取り込んだ動画データからハエの移動軌跡をトラッキングソフトウェア(ライブラリー社: Move-tr/2D、DigiMo社:リアルタイム2D-PTV)にて抽出し、移動距離・移動速度・加速度などの基本的行動量を算出した。

### (3) 求愛行動の解析

直径1.8 cm・高さ3 mmの円形チェンバーに雄個体とターゲットとなる処女雌を入れ、視覚の手がかりをなくすために赤色光下で求愛行動を観察した。1時間の観察時間中に交尾をしたペアの割合および交尾に至るまでの時間を各突然変異体で比較した。

### (4) 求愛歌の測定

床にマイクを設置した直径8 mm・高さ3 mmの円形チェンバーに雄個体とターゲットとなる雌を入れ、雄の発する求愛歌を記録した。歌はアン

プ(Warner社:DP-304)にて増幅した後、デジタル化(ADI社:PowerLab 8/30)を介してコンピュータに取り込み解析を行った。なお、雌側の効果を極力一定にするため、雌は実験直前に断頭して不動化した個体を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 時計遺伝子突然変異体の歩行活動

ビデオトラッカーをベースとした行動解析システムにより野生型個体と時計遺伝子突然変異体の歩行活動の比較を行った。時計遺伝子変異の中でサーカディアンリズムに最も大きな行動変化が観察されるのは無周期性の突然変異体であることから、まず*per<sup>01</sup>*を用いた解析を行った。野生型では歩行/停止の時系列パターンは複雑なダイナミクスを持つが、その統計的な性質は個体ごとに大きな差は観察されなかった。一方、*per<sup>01</sup>*突然変異体はより不規則なバースト状の歩行/停止パターンを示し、さらに野生型に比べて歩行停止時間が長い個体と短い個体が混在する傾向があった。この結果は*per<sup>01</sup>*突然変異ではサーカディアンリズムの同調が出来ないため、個体ごとに主観的時刻が異なることに関係している可能性がある。

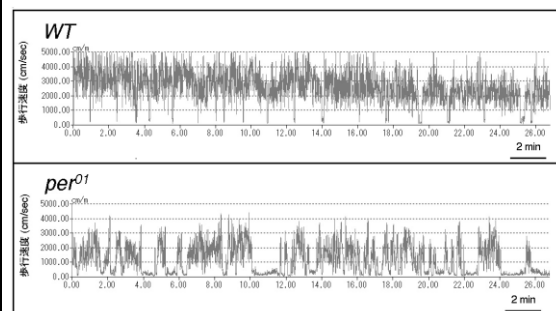


図1 野生型(WT)個体と無周期型変異体(*per<sup>01</sup>*)の歩行活動例。横軸は観測時間を表し、縦軸は歩行速度を表している。*per<sup>01</sup>*ではより不規則な歩行活動を示している。

さらに長周期型*per<sup>L</sup>*と短周期型*per<sup>S</sup>*の両突然変異体を用いて同様の歩行活動解析を行った。*per<sup>L</sup>*突然変異体は歩行活性が高く歩行持続時間が長くなる傾向が見られた。また歩行をやめてから次の歩行を開始するまでの停止持続時間は短かった。一方、*per<sup>S</sup>*突然変異体は歩行活性が低く歩行持続時間が短い傾向があり、長時間歩行活動を停止する個体が多かった。この結果は歩行活動という短い時間スケールでの活動の長短とサーカディアンリズム周期の長短との間に対応関係があることを示している。以上の結果は短い時間スケールの行動発現においても時計遺伝子群が機能している可能性を示唆するものである。

## (2) 時計ニューロンの活動修飾の歩行活動への効果

サーカディアンリズムの制御に関わる時計ニューロンの興奮性やシナプス伝達を一過的に操作するためのツールとして、温度依存的にニューロンの電氣的興奮性を上昇させることのできる dTrpA1 と温度依存的にシナプス伝達を阻害できる shi<sup>ts</sup> を利用した。時計ニューロン特異的に上記 2 つのタンパク質を発現させるための Gal4 ドライバーとして *pdf-Gal4* 系統を用いた。*pdf-Gal4* と *UAS-dTrpA1* もしくは *UAS-shi<sup>ts</sup>* を持つ個体を用いることにより、時計ニューロン特異的に且つ一過的に神経活動の上昇もしくはシナプス伝達の阻害を行った条件で歩行活動を解析した。dTrpA1 を用いた時計ニューロンの強制活性化実験では、dTrpA1 チャンネルが開口していない 22°C をコントロールとし、実験チャンバーを 30°C にすることによりニューロンの活性化を行った。shi<sup>ts</sup> を用いた時計ニューロンのシナプス伝達阻害実験では、19°C をコントロールとし、実験チャンバーを 31°C にすることによりシナプス伝達の阻害を行った。

どちらの場合も時計ニューロンの活動には人為的な影響を及ぼさない低温条件では歩行活性が低く、時計ニューロンの電氣的興奮性の上昇やシナプス伝達阻害を引き起こすような高温条件では歩行活性が高かった。しかしながら、野生型個体であっても温度を上げることにより歩行活動の活性は上昇することから、これらの効果は時計ニューロンの活動修飾によるものというよりは、環境条件の変化に起因するものである可能性が高い。どちらの修飾でも高温条件は 30°C 前後であるので、時計ニューロンの強制的活性化状態(dTrpA1)と時計ニューロンのシナプス伝達阻害条件(shi<sup>ts</sup>)で歩行活動パターンを解析したが、大きな違いは見出されなかった。これらの結果から、時計ニューロンの活動性そのものが短い時間スケールでの行動発現を直接制御しているのではないことが示唆された。

## (3) 時計遺伝子突然変異体の求愛行動

歩行活動は個体ごとの変動が大きく、時計遺伝子・時計ニューロンの機能との関係を探るには、短い時間スケールで観測できるより定型的で安定した行動に着目する必要がある。そこで極めて安定な生得的行動である求愛行動に焦点を絞って実験を行うこととした。*per* 突然変異体では雄の求愛歌リズムの周期に異常があることが報告されている。時計遺伝子機能が短時間の行動発現に一般的に寄与しているならば、雄の求愛歌の生成のリズムだけではなく、求愛歌の受容に関わる雌側のリズムにも影響を与え、同じリズムの個体に対する求愛受入のほうがより安定している可能性が考えられる。そこで *per<sup>L</sup>* と *per<sup>S</sup>* 突然変異体を用いて同一遺伝子型のペアもしくは異なる遺伝子型のペアの求愛行動を観察し、それぞれのペアでの交尾の有無と交尾ま

でかかる時間の比較を行った。1 時間の観察時間中における交尾成功率は *per<sup>L</sup>*、*per<sup>S</sup>* ともに同一遺伝子型の雄が求愛したか否かにかかわらず大きな差はなかった。しかしながら交尾までにかかる時間については、同一遺伝子型のペアの方が異なる遺伝子型のペアに比べてやや短い傾向があった。この傾向は *per<sup>L</sup>* の雌に関して顕著で統計的に有意な差であることが確認された。この結果は雄の求愛歌生成のみならず雌の求愛歌の嗜好性に関しても時計遺伝子が関与していることを示唆している。

交尾行動は 2 個体の相互作用で成立するため、交尾までにかかる時間であっても変動が大きく依然として安定な行動指標とは言い難かった。そこで、雄の求愛行動のみに注目して行動解析をすることとした。雄の求愛行動で最もはっきりした要素行動は種特異的な音響パターンをもつ求愛歌生成である。*per<sup>L</sup>* 突然変異体では雄の求愛歌リズムの周期が長くなり、*per<sup>S</sup>* 突然変異体では逆に周期が短くなることが報告されている。しかし求愛歌記録システムを用いて各々の *per* 突然変異体が生成する求愛歌のパターンを解析したが、*per* 変異体での求愛歌リズムの明確な異常は検出できなかった。報告されている求愛歌リズムは不明瞭であることが知られ、さらに *per* 変異体での周期異常も再現できないという報告もなされていることから、求愛歌リズムの変動の他にさらに安定した現象を扱うことが求愛行動発現と時計遺伝子機能の関連を探る上で重要であると考えた。雄の求愛行動パターンを解析するためには、雌側の効果を極力一定にする必要があるため、断頭した雌個体に対する雄の行動を求愛歌記録システムを用いて解析した。興味深いことに、断頭雌を認識した直後の雄の行動は極めて定型的な時間パターンを持っていることが明らかとなった。すなわち 2~3 秒の求愛行動を示した後、5~8 秒の静止状態を経て再び次の求愛行動を開始しこれを数分間繰り返すという規則的行動である。この行動は極めて安定で、個体間の差も小さいものであるため、時計遺伝子変異体の短い時間スケールでの行動異常を解析する上で大変優れているものであった。各々の求愛エポックの長さおよび各求愛エポック間の静止時間を *per<sup>L</sup>* 変異体と *per<sup>S</sup>* 変異体で比較したところ、*per<sup>L</sup>* は *per<sup>S</sup>* に比べて、一回の求愛持続時間が長く、各求愛エポック間の静止時間は短いことが明らかとなった(図 2)。このことは単独個体の歩行活動解析で見出された、*per<sup>L</sup>* 変異体では歩行持続時間が長くなり停止持続時間が短くなり、*per<sup>S</sup>* 変異体では歩行持続時間が短くなり停止持続時間が長くなるという現象と類似している。

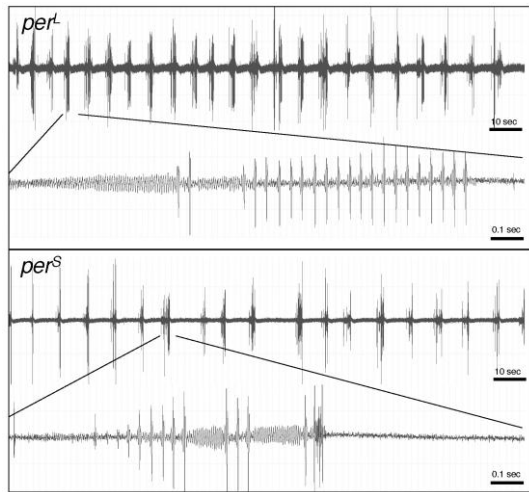


図 2 長周期型変異体( $per^L$ )と短周期型変異体( $per^S$ )の求愛歌。横軸は観測時間、縦軸は記録された音を示している。上段のトレースは約 2 分間の記録を示し、下段のトレースは一つの求愛エピソードを拡大したものである。

#### (4) まとめ

本研究では突然変異体や神経機能を操作した個体の行動解析により、時計遺伝子・時計ニューロンが短い時間スケールにおける行動発現にも関わっていることを検証した。歩行活動の解析では、時計遺伝子変異が歩行活動パターンに影響を与えていることを示した。特に  $per^L$  変異体では歩行持続時間が長くなり停止持続時間が短くなるのに対して  $per^S$  変異体では歩行持続時間が短くなり停止持続時間が長くなるという傾向は、サーカディアンリズム周期の長短とも対応するものである。一方、時計ニューロンの活動修飾では歩行活動パターンに大きな影響は見られなかった。より安定な行動指標として求愛行動に注目して解析を行ったところ、静止した雌に対する雄の求愛パターンは特定の条件では極めて規則的であることを今回見出した。この安定した行動パターンを利用して時計遺伝子変異の効果調べたところ、 $per^L$  変異体は  $per^S$  変異体と比べて、一回の求愛持続時間が長く、各求愛エピソード間の静止時間は短いことが明らかとなった。歩行活動と求愛行動発現において時計遺伝子変異がサーカディアンリズム周期の長短と対応する形で影響を与えたことは、時計遺伝子の機能はサーカディアンリズムのような長時間スケールの行動制御だけでなく、短時間スケールでの行動発現にも関わっていることを強く示唆する。時計ニューロンの機能修飾では大きな行動変化は観察できなかったことから、時計遺伝子が関わる短い時間スケールの行動制御を司るニューロン群は時計ニューロンとは別なものであると考えられる。今後、時計遺伝子機能が短い時間スケールの行動発現をどのように制御しているのかをニューロンレベルで解明していくことが必要であると考えられる。

#### 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 9 件)

- 古波津創、小金澤雅之、山元大輔  
同定介在ニューロン P1 の強制活性化による雄の性行動の解発と P1 のフェロモン応答性。  
*Aroma Research*, 46, 139 -139(2011)  
査読無し
- Kohatsu, S., Koganezawa, M. and Yamamoto, D.  
Female contact activates male-specific interneurons that trigger stereotypic courtship behavior in a *Drosophila* male.  
*Neuron* 69, 498-508 (2011) 査読あり
- Koganezawa, M., Haba, D., Matsuo, T. and Yamamoto, D.  
The shaping of male courtship posture by lateralized gustatory inputs to male-specific interneurons.  
*Curr. Biol.* 20, 1-8 (2010) 査読あり
- Koganezawa, M., Hara, H., Hayakawa, Y., and Shimada, I.  
Memory effects on scale-free dynamics in foraging *Drosophila*.  
*J. Theor. Biol.* 260, 353-358 (2009) 査読あり

[学会発表] (計 29 件)

- 小金澤雅之、山元大輔  
ショウジョウバエ求愛行動を解発する *fruitless* 発現神経回路  
日本動物学会第 82 回大会  
2011 年 9/21-9/23, 旭川
- Koganezawa, M. and Yamamoto, D.  
Male courtship behavior triggered by the artificial activation of *doublesex*-expressing neurons.  
2011 年 9/14-9/17, 横浜
- Shimada, I. and Koganezawa, M.  
Animal behavior as a complex adaptive system.  
8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry  
2011 年 6/1~6/5, 名古屋

4. Koganezawa, M.  
The neural circuitry contributing to male courtship behavior of *Drosophila*.  
8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry  
2011年 6/1~6/5, 名古屋
5. Koganezawa, M. and Yamamoto, D.  
Male courtship behavior triggered by the artificial activation of *fruitless*-expressing neurons.  
第33回日本神経科学大会  
2010年 9/2-9/4, 神戸
6. Koganezawa, M.  
Functional dissection of the neural circuitry triggering courtship behavior of *Drosophila*.  
第87回日本生理学会大会  
2010年 5/21, 盛岡
7. Koganezawa, M. and Yamamoto, D.  
Pheromonal signal shapes courtship song of *Drosophila*.  
The 7th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception  
2009年 11/3-11/4, 福岡
8. Koganezawa, M. and Yamamoto, D.  
Functional dissection of the neural circuitry controlling male courtship by the manipulation of single neuron activities.  
Janelia Farm Conference: Improving the Toolkit for *Drosophila* Neurogenetics  
2009年 10/4-10/7, Washington (USA)
9. Koganezawa, M. and Yamamoto, D.  
Sexually dimorphic *fruitless*-expressing interneurons shape male courtship posture in *Drosophila*.  
The 32nd Annual Meeting the Japan Neuroscience Society  
2009年 9/16-9/18, 名古屋
10. 小金澤雅之、山元大輔  
フェロモン受容体 Gr32a 発現ニューロンはショウジョウバエの求愛行動の制御に關与する  
日本味と匂学会第43回大会  
2009年 9/2-9/4, 旭川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小金澤 雅之 (KOGANEZAWA MASAYUKI)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授  
研究者番号：10302085

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：