

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02576

研究課題名（和文）適応的な行動制御を可能とする神経回路の構築原理

研究課題名（英文）Design principles of neural circuits that regulate adaptive animal behaviors

研究代表者

能瀬 聡直（Nose, Akinao）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：30260037

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：環境中からもたらされる様々な感覚情報を適切な行動の実行につなげることは脳神経系の最も基本的な機能のひとつであるが、その背景にある神経回路の分子発生機構は未解明である。本研究では、ショウジョウバエ幼虫の司令ニューロンWaveが軸索誘導分子Wnt4/Fz2の作用により体節の位置に応じて体の前後軸に沿った軸索伸長の方向を変化させることで、異なる体部位への接触刺激を異なる行動へと結びつけることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の行動が遺伝子にどのようにして書き込まれているのかを明らかにすることは人類の基本的な問いのひとつである。本研究ではショウジョウバエをモデルとした研究により、その一端を初めて明らかにするものである。Wnt/Fzシグナルは種を越えて体の前後軸に沿った軸索誘導に関与することが知られていることから、本研究で明らかとなった分子機構はヒトも含め一般性をもつものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Linking various sensory stimuli to the execution of appropriate behaviors is a fundamental function of the nervous system, yet the underlying molecular developmental mechanisms remain unknown. Here, we showed that command-like Wave neurons match their somatosensory receptive field to appropriate motor outputs by changing their axon extension along the A-P axis in segment-specific manner via the Wnt4/Fz2 axon guidance molecules.

研究分野：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：ショウジョウバエ 行動制御 神経回路発達 軸索誘導 行動進化 Wntシグナル

1. 研究開始当初の背景

様々な外的刺激に対して生存に適した行動を選択し実行することは脳神経系の機能の根幹である。例えば、身体の一部に侵害刺激が与えられれば、刺激部位とは反対側に逃避するのは当然の反応である。また、刺激部位が異なれば、逃避行動が異なるのも極めて自然である。しかし、この一見当たり前に思える適応行動の背後にあるのは、発生過程において巧妙に配線された神経回路である。複雑な中枢回路の中で、様々な感覚入力はどのような仕組みで間違いなく合目的な行動出力へと接続されるのか。これまでの「軸索誘導分子」の研究は、個々の神経軸索が特定の方向や道筋にそって伸長し、標的細胞と結合する過程を制御する過程に着目し、その分子機構を明らかにしてきた。しかしながら、このような個々の軸索の誘導機構が最終的にどのようにして回路レベルで合理的な行動制御を実現しているのかについては明らかにされてこなかった。

2. 研究の目的

本研究ではショウジョウバエ幼虫が体の前、後への触覚刺激に応じて後退、前進という異なる行動をとる系をモデルとして研究を進めた。ショウジョウバエ幼虫の脊髄(正確には「脊髄」ではなく「腹部神経節」であるが相同な構造であるので本報告書では「脊髄」と呼ぶ)は脊椎動物と同様に分節構造をとる。各神経分節は相同の構造をもち、支配する体節内の感覚神経細胞からの入力を受け、分節内の運動神経細胞を介して同じ体節に運動出力を送る。我々はコネクトミクス解析を駆使した以前の研究により、体の前後への感覚神経細胞を異なる運動実行回路に合目的につなげるノード(結節)として働く Wave ニューロンを同定した。Wave ニューロンは脊髄内の各分節(A1-A7)に存在する相同な介在神経細胞であるが、前方の神経分節の Wave (以下、a-Wave とよぶ)が「頭部」への触覚刺激を受容し「後退運動」を司令するのに対し、後方の Wave (以下、p-Wave とよぶ)は「尾部」への刺激を受容し「前進運動」を司令する。この機能の違いを反映して、a-Wave と p-Wave は異なる軸索配線様式をとっている。すなわち a-Wave が軸索を前方へと伸張させ後退実行回路と結合するのに対し、p-Wave は軸索を後方へと伸張させ前進実行回路と結合する。以上の観察は、Wave ニューロンが、神経節によって異なるパターンで軸索突起を伸張することによって、異なる体部位への触覚刺激を異なる運動実行回路へとつなぎ、適応的な行動選択の要となっていることを強く示唆している。そこで本研究ではこの Wave ニューロンの神経節特異的な軸索伸長を制御する分子メカニズムを探ることにより、適応的な神経回路の構築原理を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Fz2 等の軸索誘導に関与する受容体の候補を Wave ニューロン特異的に機能阻害するために、RNAi コンストラクトを Gal4-UAS システムにより Wave ニューロンに発現させた。各神経節の Wave ニューロンの軸索伸長のパターンを調べるため、MultiColor FlpOut (MCFO)法(Nern et al., PNAS, 2015)を用いた。

領域特異的な Wave ニューロンの活性化は先行研究(Takagi et al., Neuron, 2017)に従い単離脳における局所光刺激により行った。Gal4-UAS システムを用いて Wave ニューロンにチャネルロドプシン(ChR2 T15C9.YFP)を、LexA システムを用いてすべての細胞に赤色カルシウムセンサー R-GECO1 を発現する幼虫から単離した脳を MAS コートスライドガラス(松浪硝子工業 S9215)に張り付けて、共焦点顕微鏡(FV1000 (Olympus))にセットした。顕微鏡には二つの光路、局所光刺激用とカルシウムイメージング用がありダイクロイックミラー(ADM405/488 (Olympus))で分離される。光刺激は 488 nm Ar レーザーで行い、範囲は直径 50 μm 、強度は 8.3 μW とした。刺激を行う間、同時に R-GECO1 によるカルシウムイメージングを行った。このイメージングは EMCCD カメラ(iXon3 (ANDOR TECHNOLOGY))で行い、励起光は Xe lamp (X-Cite exacte (EXCELITAS TECHNOLOGIES))の光を蛍光フィルターを通して照射した。刺激は 5 秒間の刺激を 3 回行い、インターバルは 20 秒とした。

幼虫の触覚刺激は Von Frey フィラメントを用いて行った。このフィラメントは、本来は人間の触覚テストなどに用いられる器具であり、フィラメント毎に与えられる刺激の強度が設定されており常に一律な強度の刺激を幼虫に与えることができる。実体顕微鏡(SZX16, Olympus)及び CCD カメラ(XCD-V60, SONY)を介して、観察と撮影をしながら、リンゴジュースを混ぜた寒天の上で運動する幼虫の頭部に近い部位を Von Frey フィラメントで刺激し、その際の幼虫の反応を見た。幼虫の応答を定量化するために後退が誘導される度合いを表す Kerman score を用いた(Kerman et al., Neuron, 1994)。幼虫が反応を止め、再び前進運動を行うようになるまで待ち、再び刺激を与えるというプロトコルを、一頭あたり 5 回繰り返した。

4. 研究成果

まず Wave ニューロンの分節特異的な軸索伸長を発生過程において制御する軸索誘導因子および受容体を同定するため Wave ニューロンにおいて様々な軸索誘導分子受容体に対する RNAi コンストラクトを発現し、その軸索走行を調べた。その結果、候補分子として Wnt の受容体 Fz2

を同定した。Fz2 の RNAi knock-down(KD)変異体では、通常前方へと軸索を伸ばす a-Wave が後方へと軸索を伸長するようになっていた。このことは Fz2 が通常 a-Wave 軸索の後方への伸長を抑制していることを示唆している。我々はさらにこの制御過程に関わる Fz2 のリガンドとして Wnt4 を同定した。すなわち Wnt4 欠失変異体では Fz2 の KD 体と同様、a-Wave が後方へと軸索を伸長するようになっていた。Wnt4 の発現を調べると脊髄内で前後軸に沿って勾配をもち、後方において高いことが分かった。受容体 Fz2 の発現も勾配を示し、逆に前方で高かった。以上の結果から、Fz2 が Wnt4 を負（反発性）のガイド分子と認識することで、a-Wave の軸索が Wnt4 の濃度が低い前方へと誘導されることが示唆された。

次に Fz2 の KD によって引き起こされる軸索誘導の変化が a-Wave の機能、すなわち行動出力にも影響を与えるかを調べるため以下の2つの実験を行った。まず、Wave ニューロンにチャンネルロドプシン2を発現させた単離脳における局所光刺激を用い、Fz KD 変異体において a-Wave が誘導する運動出力に変化があるかを調べた。その結果、正常体では a-Wave を光活性化すると後退運動に対応する神経活動が誘発されるのに対し、Fz2 KD 変異体においては、後退が誘導される頻度が有意に減少するとともに、従来は起こらない前進運動が誘発されるのが観察された(図1)。このことから、Fz 変異体において前方 Wave の軸索伸長のパターンが変化するのに伴って、このニューロンが誘発する運動出力も変化していることが示唆された。

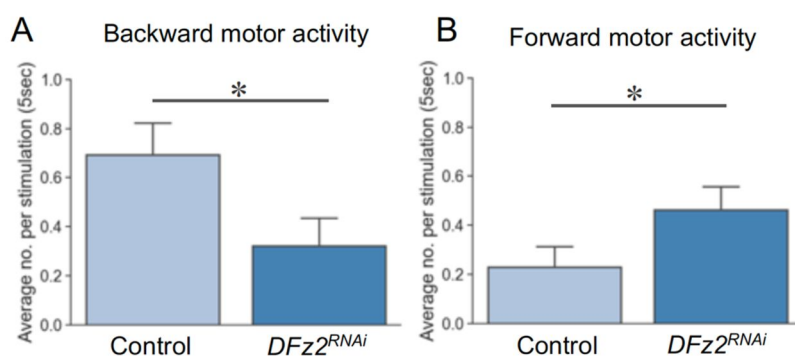


図 1. Fz2 の KD は a-Wave が誘導する運動出力を変化させる。Fz2 の KD 系統 (DFz2RNAi)では、後退運動(A)に対応する神経活動が減少するとともに前進運動(B)に対応する活動が増加していた。

次に、幼虫の正常な行動への影響を検討した。Wave ニューロンは幼虫の頭部への触覚刺激に対する後退運動の誘発に必須の役割を果たす。そこで、Fz2 KD 変異体において、この頭部刺激による後退運動の誘発にどのような影響が出るかを調べたところ、後退運動の頻度が減少するとともに、速い前進運動が誘発されるのが観察された。この結果は、Fz 欠失変異体において前方 Wave の軸索伸長のパターンが変化するのに伴って、このニューロンが誘発する行動も変化していることをさらに支持するものである(図2)。

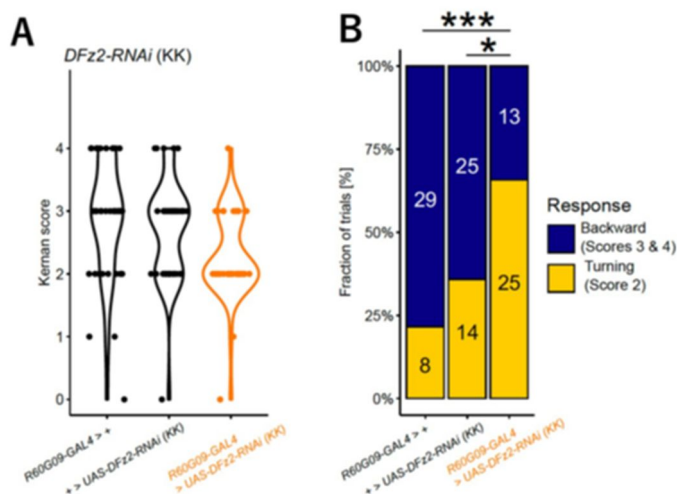


図 2. Fz2 の KD は幼虫の頭部接触刺激に対する応答を変化させる。(A)Kerman score の分布、(B) 後退と方向転換に対応する Kerman score の割合。Fz2 の KD 系統(*R60G-GAL4>UAS-DFz2-RNAi*)では対照群(*R60G-GAL4>+, +>UAS-DFz2-RNAi*)に比べて後退が減少していることがわかる。

最後に Wave の軸索誘導における Fz2 の役割をさらに検証するため、従来 Fz2 の発現が低い後方 Wave (p-Wave) において Fz2 を強制的に高発現したときに、このニューロンの軸索投射にどのような影響が出るかを調べた。その結果、軸索の後方伸長が短縮する結果が得られたとともに、一部の Wave では後方伸長の欠損も見られた。この結果は、DWnt4 が Fz2 を介して、a-Wave の軸索に対して反発的に働きかけるという上記の仮説をさらに裏付けるものである。

以上の結果から、ショウジョウバエ幼虫の司令ニューロン Wave が軸索誘導分子 Wnt4/Fz2 の作用により体節の位置に応じて体の前後軸に沿った軸索伸長の方向を変化させるで、異なる体部位への接触刺激を異なる行動へと結びつけることを示した。Wnt/Fz シグナルは種を越えて体の前後軸に沿った軸索誘導に関与することが知られていることから、本研究で明らかとなった「Wnt シグナルによる司令ニューロンの軸索誘導の制御が行動選択のパターンを決める」という行動制御の分子発生機構はヒトも含め一般性をもつものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Giachello Carlo N. G., Hunter Iain, Pettini Tom, Coulson Bramwell, Knufer Athene, Cachero Sebastian, Winding Michael, Arzan Zarin Aref, Kohsaka Hiroshi, Fan Yuen Ngan, Nose Akinao, Landgraf Matthias, Baines Richard A.	4. 巻 42
2. 論文標題 Electrophysiological Validation of Monosynaptic Connectivity between Premotor Interneurons and the aCC Motoneuron in the Drosophila Larval CNS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6724 ~ 6738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2463-21.2022	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 該当する
1. 著者名 Sun Xiyang, Liu Yingtao, Liu Chang, Mayumi Koichi, Ito Kohzo, Nose Akinao, Kohsaka Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 A neuromechanical model for Drosophila larval crawling based on physical measurements	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-022-01336-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Park Jeonghyuk, Chung Yul Ri, Nose Akinao	4. 巻 12
2. 論文標題 Comparative analysis of high- and low-level deep learning approaches in microsatellite instability prediction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16283-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Fukumasu Kazushi, Nose Akinao, Kohsaka Hiroshi	4. 巻 156
2. 論文標題 Extraction of bouton-like structures from neuropil calcium imaging data	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neural Networks	6. 最初と最後の頁 218 ~ 238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neunet.2022.09.033	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 Giachello Carlo N. G., Hunter Iain, Pettini Tom, Coulson Bramwell, Knufer Athene, Cachero Sebastian, Winding Michael, Arzan Zarin Aref, Kohsaka Hiroshi, Fan Yuen Ngan, Nose Akinao, Landgraf Matthias, Baines Richard A.	4. 巻 42
2. 論文標題 Electrophysiological Validation of Monosynaptic Connectivity between Premotor Interneurons and the aCC Motoneuron in the Drosophila Larval CNS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6724 ~ 6738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2463-21.2022	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 該当する

1. 著者名 Sun Xiyang, Liu Yingtao, Liu Chang, Mayumi Koichi, Ito Kohzo, Nose Akinao, Kohsaka Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 A neuromechanical model for Drosophila larval crawling based on physical measurements	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-022-01336-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Park Jeonghyuk, Chung Yul Ri, Nose Akinao	4. 巻 12
2. 論文標題 Comparative analysis of high- and low-level deep learning approaches in microsatellite instability prediction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16283-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukumasu Kazushi, Nose Akinao, Kohsaka Hiroshi	4. 巻 156
2. 論文標題 Extraction of bouton-like structures from neuropil calcium imaging data	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neural Networks	6. 最初と最後の頁 218 ~ 238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neunet.2022.09.033	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 Sun Xiyang, Nose Akinao, Kohsaka Hiroshi	4. 巻 18
2. 論文標題 A vacuum-actuated soft robot inspired by Drosophila larvae to study kinetics of crawling behaviour	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0283316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0283316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Liu Yingtao, Hasegawa Eri, Nose Akinao, Zwart Maarten F, Kohsaka Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Synchronous multi-segmental activity between metachronal waves controls locomotion speed in Drosophila larvae	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.83328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takagi Suguru, Takano Shiina, Hashimoto Yusaku, Morise Shu, Zeng Xiangsunze, Nose Akinao	4. 巻 -
2. 論文標題 Segment-specific axon guidance by Wnt/Fz signaling diversifies motor commands in Drosophila larvae	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.09.05.555126	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 XiangSunZe Zeng, Yuko Komanome, Hokto Kazama, Akinao Nose
2. 発表標題 Molecular and cellular mechanisms underlying the emergence of spontaneous patterned activity crucial for motor development in Drosophila
3. 学会等名 NEURO2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akinao Nose
2. 発表標題 Functional development of neural circuits that regulate animal behaviors
3. 学会等名 The Neurophysics of Locomotion (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yingtao Liu, Akinao Nose, Maarten Frans Zwart, Hiroshi Kohsaka
2. 発表標題 Synchronous multi-segmental activity controls the speed of axial locomotion by modulating the interval between peristaltic waves in <i>Drosophila</i> larvae
3. 学会等名 SfN Neuroscience meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahisa Date, Akinao Nose, Hiroshi Kohsaka
2. 発表標題 Comprehensive characterization of behavior specific neurons in fruit fly larvae with a photoconvertible calcium sensor
3. 学会等名 Adaptive Circuit Census (ACC) International Symposium 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yingtao Liu, Akinao Nose, Maarten F Zwart, Hiroshi Kohsaka
2. 発表標題 Synchronous multi-segmental activity between metachronal waves controls the crawling speed in fly larvae
3. 学会等名 第45 回日本分子生物学会年会(MBSJ2022) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 XiangSunZe Zeng, Yuko Komanome, Hokto Kazama, Akinao Nose
2. 発表標題 Molecular and cellular mechanisms underlying the emergence of spontaneous patterned activity crucial for motor development in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 NEURO2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akinao Nose
2. 発表標題 Functional development of neural circuits that regulate animal behaviors
3. 学会等名 The Neurophysics of Locomotion (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yingtao Liu, Akinao Nose, Maarten Frans Zwart, Hiroshi Kohsaka
2. 発表標題 Synchronous multi-segmental activity controls the speed of axial locomotion by modulating the interval between peristaltic waves in <i>Drosophila</i> larvae
3. 学会等名 SfN Neuroscience meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahisa Date, Akinao Nose, Hiroshi Kohsaka
2. 発表標題 Comprehensive characterization of behavior specific neurons in fruit fly larvae with a photoconvertible calcium sensor
3. 学会等名 Adaptive Circuit Census (ACC) International Symposium 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yingtao Liu, Akinao Nose, Maarten F Zwart, Hiroshi Kohsaka
2. 発表標題 Synchronous multi-segmental activity between metachronal waves controls the crawling speed in fly larvae
3. 学会等名 第45 回日本分子生物学会年会(MBSJ2022) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Date Takahisa, Liu Yingtao, Nose Akinao, Kohsaka Hiroshi
2. 発表標題 A tonically active neuron implicated in the maintenance of muscle relaxation in Drosophila larvae
3. 学会等名 Neurobiology of Drosophila 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Date Takahisa, Liu Yingtao, Yamaguchi Akihiro, Rui Wu, Paul McNulty, Marc Gershow, Maarten Zwart, Nose Akinao, Kohsaka Hiroshi
2. 発表標題 Transient suppression of tonically active neurons gates motor output in Drosophila larval crawling
3. 学会等名 Asia Pacific Drosophila Neurobiology Conference 3 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Seki Takaki, Kohsaka Hiroshi, Nose Akinao
2. 発表標題 Identification of a novel interneuron that regulates forward wave propagation in Drosophila larvae
3. 学会等名 Asia Pacific Drosophila Neurobiology Conference 3 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Zeng XiangSunZe、Komanome Yuko、Seki Takaki、Kazama Hokuto、Nose Akinao
2. 発表標題 Emergence of oscillatory motor activities in developing Drosophila embryos
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fukumasu Kazushi、Nose Akinao、Kohsaka Hiroshi
2. 発表標題 Two perpendicular stripe-wise structures in the neuropil involved in generation of Drosophila larval crawling behaviors
3. 学会等名 第46 回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Date Takahisa、Nose Akinao、Kohsaka Hiroshi
2. 発表標題 Revealing behavior-specific neuronal populations in Drosophila larvae with a photoconvertible calcium sensor
3. 学会等名 第46 回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Seki Takaki、Komanome Yuko、Zeng XiangSunZe、Kohsaka Hiroshi、Nose Akinao
2. 発表標題 Mechanisms of neural circuit reorganization that enable coordinated movement
3. 学会等名 第46 回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fukumasu Kazushi、Nose Akinao、Kohsaka Hiroshi
2. 発表標題 Spatiotemporal structure of synapse population activity in the motor circuits for crawling
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

能瀬研究室 http://bio.phys.s.u-tokyo.ac.jp/
--

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		
	英国	University of Cambridge	University of St Andrews