

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 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770068

研究課題名（和文）フェロモン情報の脳内統合処理機構の研究

研究課題名（英文）The pheromone-processing machinery in the Drosophila brain

研究代表者 田中 暢明（TANAKA NOBUAKI）

京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニット・研究員

研究者番号：20517924

研究成果の概要（和文）：ショウジョウバエを用いて、フェロモン刺激を受容する嗅細胞と、その情報を受け取る投射神経のフェロモン応答をカルシウム・イメージング法で比較した結果、両者の応答様式は、極めて類似していることが明らかになった。また、その刺激閾値は、雌においては、交尾後に増大することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）： Real time calcium imaging works revealed that the response patterns to pheromone of the projection neurons were very similar with those of olfactory sensory neurons innervating the same glomerulus in the fly primary olfactory center. We found that the sensory threshold to pheromone was subject to plastic change according to mating experiences.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	3100000	930000	4030000
2011 年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
年度			
総計	3600000	1080000	4680000

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：神経生物・嗅覚系

1. 研究開始当初の背景

昆虫においては、フェロモン刺激が求愛や交尾行動を誘発することが知られているが、いまだ脳内のフェロモン情報処理機構や、フェロモン情報と他の感覚刺激の統合処理過程は解明されていない。

2. 研究の目的

ショウジョウバエの遺伝学的手法に、イメージング技術や行動学的手法を組み合わせ、フェロモン情報が昆虫の脳内で処理される過程を調べ、性行動を誘発する神経基盤を解明する。また、フェロモン情報処理が求愛の成

否や交尾経験に応じて、可塑的变化を受けるのか明らかにする。

3. 研究の方法

フェロモンに対する嗅細胞・嗅覚系介在神経の神経応答を調べるために、嗅覚系神経に特異的に神経活性のレポーター遺伝子であるGCaMPを発現させ、蛍光顕微鏡下でフェロモン刺激時の蛍光強度の変化を測定する。また、その変化を、交尾前後の雌で比較する。なお、嗅覚系介在神経に特異的にGCaMP遺伝子を発現するためには、GAL4 エンハンサートラップ法を用いる。

4. 研究成果

本研究では、まず雄フェロモンの *cis*-vaccenyl acetate (cVA) に応答することが知られている嗅細胞 (Or67d 嗅細胞) と Or67d 嗅細胞からの出力を受ける投射神経のそれぞれに、カルシウム蛍光指示タンパク質である GCaMP 遺伝子を発現させ、cVA 刺激時における応答をリアル・タイム・イメージング法で可視化した。その結果、嗅細胞と投射神経の cVA に対する応答様式に差は検出できなかった。このことから、cVA による刺激入力、嗅覚系 1 次中枢内では、局所介在神経の処理をそれほど受けないことが示唆された。

さらに、交尾前後で、cVA に対する応答の違いがあるか調べる目的で、Or67d 嗅細胞に GCaMP を発現させた未交尾雌と既交尾雌で cVA に対する応答を比較した。0%から 10%まで、異なる濃度の cVA 由来の匂いで刺激したところ、未交尾雌も既交尾雌も、濃度の上昇に伴い、GCaMP の発する蛍光強度が増大した (Fig. 1)。

それぞれの濃度で、匂い刺激前の平均明度と、匂い刺激中の最も蛍光強度が強かった時の明度を比較すると (Fig. 2)、未交尾雌で

は、0.1% cVA の刺激で、匂い刺激時に有意に明度が増加し、0.5%から 10%に濃度を上げていく度に、刺激による明度の変化が大きくなった (Fig. 2A)。それに対して、野生型の雄と交尾した雌は、0% (つまり、cVA の溶媒としてもちいた paraffin oil) で刺激すると、刺激中に明度が有意に減少し、0.1、0.5% cVA に対しては明度に変化はなく、1%以上で有意に明度が増加することがわかった。未交尾雌の cVA に対する刺激閾値が 0.1%以下であるのに対して、既交尾雌は、1%であったことから、雌は交尾経験によって、cVA 刺激に対する感受性が低下することが明らかになった (Fig. 2B)。なお、実際の雄の匂いを雌にかがせると、0.1% cVA 応答と 1% cVA 応答の間の蛍光強度の変化が観察されることから、今回の可塑的变化は、実際に雌が自然にフェロモンを感知している状況で起こっていることが示された。

この変化が、交尾中に雄から雌に移入されて、雌の行動を変化させる sex peptide に由来するのかどうか調べる目的で、同様の実験を、sex peptide を持たない変異体雄と交尾させた雌を用いて行った。その結果、sex peptide を持たない変異体雄と交尾させた雌では paraffin oil に対する明度に刺激前と刺激中で違いはなかったものの、刺激閾値自体は、野生型の雄と交尾した雌と同様であった (Fig. 2C)。この結果から、交尾前後における cVA に対する刺激閾値の変化は、sex peptide によらないことが明らかになり、交尾したことによる機械刺激、受精したことによるホルモンバランスの変化、または sex peptide 以外で雄から移入される物質などが、刺激閾値の変化を引き起こしている可能性が示唆される。

交尾後、雌は雄の求愛を一過的に受け入れなくなるが、既交尾雌の雄に対する関心の変

化が、雄フェロモンに対する刺激閾値の増大に由来するものかどうか、今後行動実験を用いて検証する必要がある。

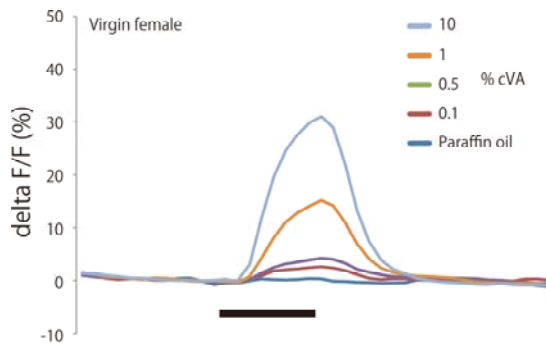


Fig 1A. 未交尾雌の cVA 応答

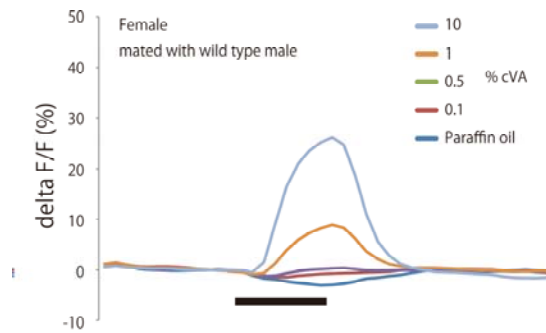


Fig 1B. 野生型雄と交尾した雌の cVA 応答

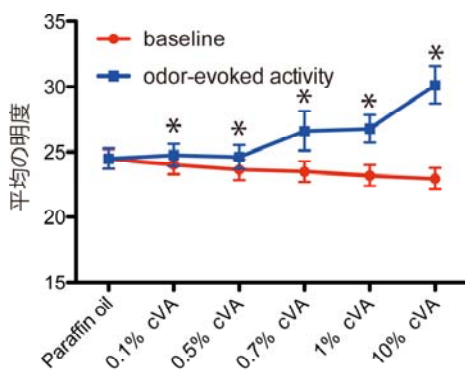


Fig 2A. 未交尾雌

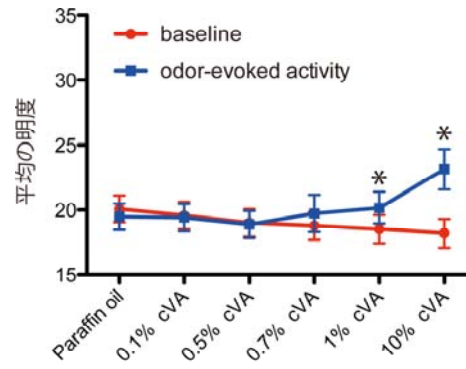


Fig 2B. 野生型雄と交尾した雌

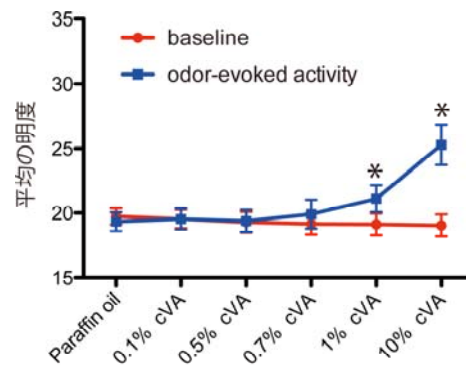


Fig 2C. SP 遺伝子の変異体雄と交尾した雌

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 2 件)

Tanaka NK, Endo K, Ito K. 2012. The organization of antennal lobe-associated neurons in the adult *Drosophila melanogaster* brain. *J Comp Neurol* 査読有り

DOI: 10.1002/cne.23142

Tanaka NK, Dye L, Stopfer M. 2011. Dual-labeling method for electron microscopy to characterize synaptic co-nnectivity using genetically encoded fluorescent reporters in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience Methods* 194:312-315. 査読有り

DOI コード無し

[学会発表] (計 8 件)

Tanaka N, Ito K, Stopfer M. 2011. 10.5

Olfactory Neuronal Circuit in a *Drosophila* Brain. 日本味と匂学会、石川県立音楽堂 (石川県)

Tanaka N, Ejima A. 2011.9.20 Multiple antennal lobe-protocerebral tracts in *Drosophila*. European Symposium on Insect Taste and Olfaction, Repinskaya Hotel (St. Petersburg, Russia)

Tanaka N, Stopfer M. 2011.5.24 Dual-labeling Method for Electron Microscopy to Characterize Synaptic Connectivity Using Genetically Encoded Fluorescent Reporters in *Drosophila*. Asia Pacific *Drosophila* Research Conference, Chientan Youth Activity Center (Taipei)

田中暢明、江島亜樹 2010.11.4 Olfactory neuronal circuit for reproductive behaviors in *Drosophila*. 北米神経科学学会大会、San Diego Convention Center (米国)

田中暢明、江島亜樹 2010.9.24 ショウジョウバエの生殖行動を生み出す神経機構とその可塑性。日本動物学会、東京大学駒場キャンパス (東京都)

田中暢明、伊藤啓、Mark Stopfer. 2010.9.9 Olfactory neuronal circuit in *Drosophila*. 味と匂学会、北九州国際会議場 (福岡県)

Tanaka N. 2010.8.23. Olfactory neuronal circuit in *Drosophila*. 第3回 APRU アジア太平洋 Brain& Mind リサーチシンポジウム、ソウル大学 (韓国)

田中暢明、Mark Stopfer. 2010.7.29. Odor-evoked neural oscillations in *Drosophila* are mediated by widely branching interneurons. 包括脳ワークショップ、さっぽろ芸文館 (北海道)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 田中 暢明 (TANAKA NOBUAKI)

京大大学生命科学系キャリアパス形成ユニット・研究員

研究者番号： 20517924