

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23300114

研究課題名(和文) 感覚フィードバックに依存した運動回路の機能発達

研究課題名(英文) The role of sensory feedback during the development of motor circuits in *Drosophila* larvae

研究代表者

能瀬 聡直 (Nose, Akinao)

東京大学・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) 15,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ショウジョウバエ胚・幼虫をモデルとして用い、運動回路の発達過程における感覚受容、特に運動の結果として生じる体性感覚の役割を調べることを目的とした。ショウジョウバエの感覚神経細胞は三種類に分けられるが、その中でも運動感覚受容への関与が示唆されているchordotonal neurons (chos)に着目した。このニューロンの神経伝達を時期特異的に阻害し、成長後の幼虫のぜん動運動パターンへの影響を調べた結果、胚発生の特定の時期における伝達が重要であることを示した。以上により、臨界期特異的な運動体性感覚受容が運動回路の発達において果たす役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of eliminating sensory inputs on the development of peristaltic movements of *Drosophila* embryos and larvae. We found that inhibition of chordotonal organs (chos), but not multidendritic (md) neurons, caused a lasting decrease in the speed of larval locomotion. To narrow down the sensitive period, we applied shorter inhibition at various embryonic and larval stages and found that two-hour inhibition during 16-20 h AEL, but not at earlier or later stages, was sufficient to cause the effect. These results suggest that neural activity mediated by specific sensory neurons is involved in the maturation of the sensorimotor circuits and there is a critical period for this plastic change. Consistent with a role in sensory feedback, chos were activated during larval peristalsis and acute inhibition of chos transmission in the larvae decreased the speed of locomotion.

研究分野：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経可塑性 ショウジョウバエ 運動回路 臨界期 運動感覚フィードバック 神経回路

1. 研究開始当初の背景

脳神経系は以下の2つのステップを経て形成される。まず、遺伝的なプログラムに従い、大まかな神経結合パターンのレイアウトが決定される。次に、外発的もしくは内発的な神経活動に依存して、神経結合の調整がなされ、環境に適応した機能的な回路が完成される。神経回路の成熟過程における神経活動の重要性は、主に感覚系に関する研究により明らかにされてきた。例えば、視覚系の眼優位性の生成過程において、感覚入力の影響を受け神経結合のパターンが再編されること、さらにこの再編は生後の特定の時期においてのみ起こること（臨界期の存在）等が示されている (Hensch, *Nat. Rev. Neuro.* 6, 877, 2005)。一方、運動系の発達における感覚入力、特に筋肉収縮の感覚フィードバックが、神経回路の発達に果たす役割についてはほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエ胚・幼虫をモデルとして用い、運動回路の発達過程における感覚受容、特に運動の結果として生じる体制感覚、の役割を調べることを目的とした。一般に歩行・呼吸といった規則的な運動は中枢パターン生成器 (CPG) と感覚フィードバックにより制御される。CPG は自律的にリズムカルな信号を生成し、これを、運動神経を介して筋肉に伝える。一方、感覚フィードバックは運動生成に必須ではないが、速度・リズムなど運動パターンの諸要素を調整する。ショウジョウバエ幼虫のぜん動運動においても CPG と感覚フィードバックが定型的な運動パターン生成に関わることが示唆されている。特に、感覚フィードバックを介在する候補神経細胞 chordotonal neurons (chos) および multidendritic neurons (md) が同定されており、GAL4-UAS システムによる遺伝学的操作が可能なので、運動回路の発達過程における感覚フィードバックの役割を調べるのに適した系となっている。これまでに、成長後の幼虫において md がぜん動運動の速度の制御に関与することが他の研究者らにより示されている (Jan ら, *PNAS* 104, 5199, 2007; Thomas ら, *MCN* 35, 383, 2007)。しかしながら、運動回路の発達過程において感覚受容がどのような役割をもっているのかについてはこれまで調べられていなかった。

幼虫のぜん動運動は前後体節間を一方に筋収縮の波が伝わることにより起こる。我々は以前に、ぜん動運動の速さを指標として、運動回路の発達過程を調べた。その結果、最初にぜん動運動が起こり始める胚発生後期から、孵化直後にかけての短時間 (5 時間程度) において、ぜん動運動の速度が急に早くなり、その後は3齢幼虫まで変化しないことが分かっていた。このことは、この回路が実際の運動を経験しながら成熟することを示唆している。また、胚発

生後期に運動パターンの著しい変化が見られることから、この時期が回路の可塑性の高い時期であると考えられた。そこで、温度感受性 Shibire を用いてこの胚発生後期において、chos および md の神経伝達を阻害し、成長後の幼虫の運動パターンへの影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) 時期特異的神経伝達阻害

特定の胚発生時期において、神経活動を抑制させる手段として Shibire^{ts} タンパク質を用いた。Shibire^{ts} は、神経細胞のシナプス伝達に必須のタンパク質ダイナミンの温度感受性変異体であり、非許容温度において神経伝達物質の放出を阻害する。このタンパク質を感覚神経細胞特異的に発現させ、温度を上げることで感覚神経細胞の活動を阻害した。温度上昇を様々な胚発生時期に行い、運動回路に与える長期的な効果を調べるため、産卵後 96 時間 (3 齢幼虫) のぜん動運動の速さを計測した。

(2) カルシウムイメージング

ぜん動運動における感覚神経細胞の活動ダイナミクスを調べるために、蛍光カルシウムセンサー (G-CaMP) によるカルシウムイメージングを、解剖下の幼虫に対して行った。筋肉の動き、および感覚神経細胞軸索における蛍光変化を蛍光顕微鏡 (MVX10, Olympus,) と CCD カメラ (XCD-V60, Sony) により観察した。

4. 研究成果

(1) 運動回路発達における感覚受容の役割
まず、温度感受性 Shibire を用いて、胚発生最末期 6 時間 (15-21 時間) において、chos および md の神経伝達を阻害し、成長後の幼虫の運動パターンへの影響を調べた。その結果、chos の機能を阻害したときのみ、対照個体と比べてぜん動運動が有意に遅くなることが分かった (図 1)。

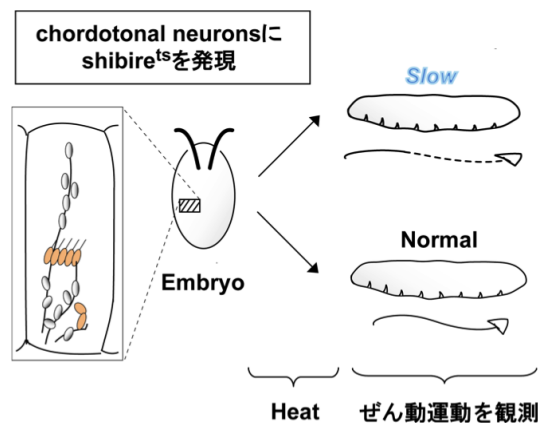


図 1 : 胚発生後期における chos の活動阻害はぜん動運動の速度に影響を与える。

次に、さらに時期を絞って同様の解析を行い、15-21時間における *chos* ニューロンの活動が重要であることを見いだした。一方、これより早い時期や遅い時期（例えば孵化後 10 時間）における阻害は効果がないことから、この現象は臨界期特異的であることが示唆された（図 2）。

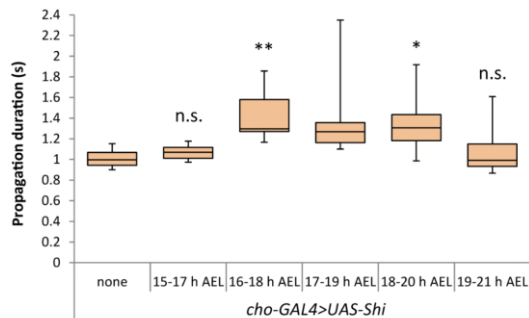


図 2 : 臨界期の存在。16-18, 17-19, 18-20 時間における *chos* の阻害がぜん動運動の速度を遅くしたのに対し、その前後の時期における阻害は影響がなかった (Fushiki et al., 2013 より引用)。

(2) 完成後の回路における *chos* の役割
運動回路発達における *chos* の役割をより良く理解するために、次に成熟後の幼虫における機能を調べた。まず、カルシウムイメージングにより、ぜん動運動中における活動様式を解析した。その結果、ぜん動運動に伴って、各体節間を前後に伝播する活動が観察された（図 3）。このことは、*chos* が筋肉の収縮により活性化され、その情報を中枢に伝えていることを強く示唆している。さらに幼虫における *chos* の機能を調べるため、温度感受性 *Shibire* を用いて、幼虫において *chos* による神経伝達を一過性に阻害したところ、ぜん動運動の速度が遅くなることを見いだした。以上の結果は、*chos* がぜん動運動時において各体節において筋肉収縮の情報を中枢にフィードバックしており、このフィードバックがぜん動運動の速度の制御に貢献することを示唆している。

以上の結果から、特定の胚発生時期における *chos* を介した感覚受容が速度を制御する運動回路の発達に関わることが明らかとなった。

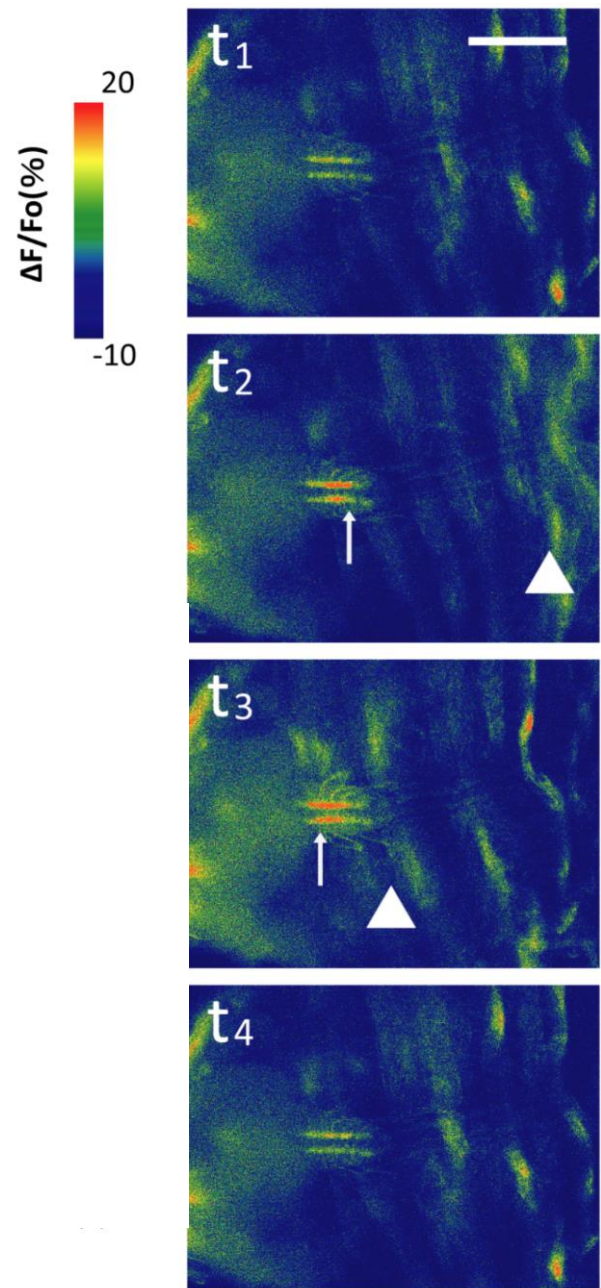


図 3 : *chos* の活動のカルシウムイメージング。筋肉の収縮(白い三角)の伝播に伴い、*chos* の活動(矢印)が中枢神経系内を後ろから前へと伝播するのが分かる (Fushiki et al., 2013 より引用)。

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 6 件)

(原著論文、すべて査読あり)

- ① Okusawa S, Kohsaka H, Nose A. Serotonin and downstream leucokinin neurons modulate larval turning behavior in *Drosophila*. *J Neurosci*. **34**,

- 2544-2558 (2014).
doi: 10.1523/JNEUROSCI.3500-13.2014.
- ② Fushiki A, Kohsaka H, Nose A. Role of sensory experience in functional development of *Drosophila* motor circuits. *PLoS One*. 2013 Apr 19;8(4), e62199 (2013).
doi: 10.1371/journal.pone.0062199.
- ③ Matsunaga T, Fushiki A, Nose A., Kohsaka H. Optogenetic Perturbation of Neural Activity with Laser Illumination in Semi-intact *Drosophila* Larvae in Motion. *J Vis Exp*. 2013 Jul 4;(77), e50513 (2013).
doi: 10.3791/50513.
- ④ Fukui A, Inaki M, Tonoë G, Hamatani H, Homma M, Morimoto T, Aburatani H & Nose A. Lola regulates glutamate receptor expression at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Biology Open* 1, 362-375 (2012).
doi: 10.1242/bio.2012448.
- ⑤ Kohsaka H, Okusawa S, Itakura Y, Fushiki A & Nose A. Development of larval motor circuits in *Drosophila*. *Develop. Growth Differ.* 54, 408-419 (2012). doi:
10.1111/j.1440-169X.2012.01347.x.
- ⑥ Nose A. Generation of neuromuscular specificity in *Drosophila*: novel mechanisms revealed by new technologies. *Front Mol Neurosci.* 5, 62 (2012).
doi: 10.3389/fnmol.2012.00062.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Nose, A.: Functional dissection of the central circuits that regulate larval locomotion. Behavioral Neurogenetics of larval *Drosophila*: Molecules, Circuits, Computation and Robotics. 2014. 3. 9-12, KKR ホテル熱海 (熱海市)
- ② Hasegawa, E. and Nose, A.: Search for cholinergic interneurons that regulate larval locomotion. Neurobiology of *Drosophila*, CSHL Meeting, 2013.10.1-5, Cold Spring Harbor, ニューヨーク (アメリカ)
- ③ Itakura, Y., Kohsaka, H., Pulver S. and Nose, A.: Identification and functional analyses of interneurons in the neural network that regulates the peristaltic locomotion of *Drosophila* larvae. Neurobiology of *Drosophila*, CSHL Meeting, 2013.10.1-5, Cold Spring Harbor, ニューヨーク (アメリカ)
- ④ Fushiki, A. Kohsaka, H., and Nose, A.: Identification and functional analysis of a class of local GABAergic

interneurons in the *Drosophila* larval motor circuit. 第 36 回日本神経科学大会, 2013.6.20-23, 稲盛財団記念館 (京都市)

- ⑤ Nose, A.: Optogenetic dissection of the neural circuits that regulate rhythmic movement in *Drosophila* larvae, Symposium on Sensory Systems & Neural Circuits, 2013.2.12, 東京大学伊藤ホール (東京)
- ⑥ Nose, A.: Optogenetic dissection of motor circuits that regulate larval peristalsis in *Drosophila*, "Behavioral Neurogenetics of *Drosophila* Larva" meeting at Janelia Farm, 2012.10.1, アシユバーン (アメリカ)
- ⑦ 能瀬聡直、高坂洋史、高木俊輔: Optogenetic dissection of motor circuits in *Drosophila* larvae、「第 35 回日本神経科学大会」シンポジウム、2012.9.18、名古屋国際会議場 (名古屋)
- ⑧ 能瀬聡直: Imaging and Manipulating Motor Circuit Activity, Developmental Neurobiology Course 2012、2012.7.27、沖縄科学技術大学院大学 (沖縄)
- ⑨ 能瀬聡直: 光生理学を用いたショウジョウバエ運動回路の機能解剖、「大脳新皮質構築」「メゾ神経回路」合同ワークショップ、2012.7.25、仙台国際センター (仙台)
- ⑩ 能瀬聡直: Optogenetic dissection of motor circuits that regulate larval locomotion in *Drosophila*、「メゾ神経回路」第 1 回公開国際シンポジウム、2012.7.7、小柴ホール (東京)

[図書] (計 1 件)

- ① 高坂洋史、能瀬聡直: ショウジョウバエを用いたオプトジェネティクス研究、「オプトジェネティクス」、エヌ・ティール・エス、141-153 (2013)。 (著書、分担執筆)

[その他]

ホームページ等

<http://bio.phys.s.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 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