

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770065

研究課題名(和文) ショウジョウバエにおける求愛行動発現機序の行動学的・生理学的研究

研究課題名(英文) A behavioral and physiological study of the central regulatory mechanism that governs male courtship behavior in *Drosophila*

研究代表者

古波津 創 (Kohatsu, Soh)

東北大学・生命科学研究科・研究支援者

研究者番号：40571930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は本能行動のモデルとしてキイロショウジョウバエの求愛行動を取り上げ、その神経メカニズムの解析を行った。光遺伝学と呼ばれる手法を用いて様々な中枢神経細胞群を人工的に活性化し、それにより生じる行動を調べた結果、pC1とpC2Iと呼ばれる2つの中枢神経細胞群の活動により求愛行動が引き起こされることを見出した。また、求愛行動中の雄の脳における神経活動のリアルタイム計測に初めて成功し、上記2つの神経細胞群が実際の求愛行動に伴って活動する事を見出した。以上から、pC1とpC2Iの両ニューロン群が求愛行動の中枢性制御と遂行に中心的な役割を果たすことが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored the neural substrate that governs the male courtship behavior in *Drosophila*. Using an optogenetic neural activation technique applied to brain neurons in a male freely behaving on a treadmill, we identified two subsets of interneurons, pC1 and pC2I neurons, which express a sex determination gene *doublesex* (*dsx*), are responsible for the activation of male courtship behavior. *in vivo* functional imaging revealed that these two subsets of interneurons show transient calcium rises that are temporally associated with courtship acts, providing the first demonstration of neural correlates of courtship behavior in *Drosophila*. Taken together, it is suggested that the activation of pC1 and pC2I neurons has a pivotal role in central regulatory mechanism of male courtship behavior.

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 本能行動 求愛行動 カルシウムイメージング 光遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

動物の本能行動は複数の要素行動が特定の目的の下に配列されたものであり、そのメカニズムの理解には個々の要素行動を解発する刺激の同定、および個々の要素行動の発現制御を司る神経回路の同定が不可欠である。研究代表者らは雄のキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) をモデルにの求愛行動の中核制御機構を研究しており、研究開始時点で、この種の雄の求愛行動が前肢の感覚器に対する雌フェロモン刺激を契機として開始することを見出していた。一方、2つの性決定遺伝子 *fruitless(fru)* と *doublesex(dsx)* を共発現する雄特異的介在ニューロン群である P1 ニューロンを温度感受性イオンチャネル *dTrpA1* を用いて強制活性化すると、雌のいない雄単独の状況下でも雄は求愛を開始することがわかってきた。また前肢への雌フェロモン刺激下で P1 ニューロンに一過性のカルシウム応答が生じることが *in vivo* 機能イメージングにより示されていた。これらは P1 ニューロンが雌フェロモン刺激を受けて雄の求愛行動を開始する神経回路の中核をなすことを強く示唆し、P1 ニューロンをその一部に含む神経回路の挙動と求愛行動発現との関係の解明が喫緊の課題であった。

## 2. 研究の目的

本研究はキイロショウジョウバエの求愛行動をモデルに、本能行動発現機構の神経基盤を単一神経細胞集団レベルで明らかにすることを目的とした。歩行シミュレータを用いた行動解析と *in vivo* 機能イメージングを実験手法の基軸に据え、(1) 光遺伝学と人工的な視覚刺激を利用した新たな求愛行動解析手法の開発、(2) 求愛中の雄が雌に定位する際に用いられる視覚的特徴の探索、(3) 求愛行動の惹起に関わる介在ニューロン群の同定、(4) 求愛行動と関連した活動を示す介在ニューロン群の同定および生理学的

解析を行った。これらを通し、感覚入力と特定介在ニューロンの活動との相互作用から本能行動が形作られる機構の一端を明らかにする事を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 歩行シミュレータを用いた行動解析

行動解析は直径約 5 mm のスチロール球を利用した小型トレッドミル上に固定した個体を用いて行った(図 1 a)。スチロール球は微弱な空気流で浮上しており、ハエの肢の動きに伴って回転する。このため実験個体はこの上を「歩行」することが可能で、拘束された状態にありながら求愛行動を惹起することが出来る。実験個体の歩行活動はスチロール球の回転を光学センサで計測する事で記録し、翅の動きなどの行動は上方、側方に配置した2つのカメラでビデオ記録した。

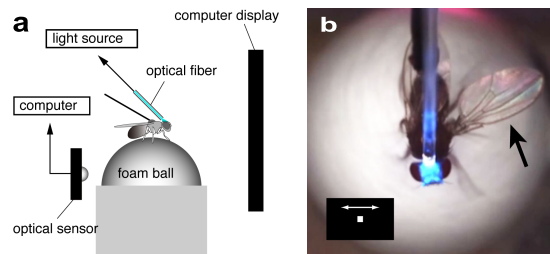


図 1. 光遺伝学を用いた中枢神経の強制活性化。(a) 実験装置の模式図。(b) *dsx* 発現ニューロンの強制活性化により引き起こされた雄の求愛行動。雄の求愛行動に特徴的な片翅の伸展が見られる(矢印)。

### (2) *in vivo* 機能イメージング

頭部のクチクラを一部除去して脳を露出させ、顕微鏡で蛍光画像を記録できる状態にした雄をトレッドミル上に配置し、求愛行動を惹起して *dsx* 発現ニューロンのカルシウム応答を光学的に記録した(図 3)。イメージング中の行動は、歩行トラッキングとビデオ撮影により記録した。カルシウムセンサーには GCaMP3.0 を用いた。

## 4. 研究成果

(1) 仮想現実を利用した求愛行動解析法の開発

光遺伝学を用いた神経細胞の強制活性化法を歩行シミュレータ上の個体に適用し、行動を妨げることなく中枢神経活動を操作する実験手法を開発した。光感受性イオンチャネル channelrhodopsin wide receiver (ChRWR) を Gal4/UAS システムで発現させ、ChRWR 活性化のための光刺激は青色光源に接続した光ファイバーの一端を個体の頭部上方に配置し、クチクラ越しに行った。これにより ChRWR を導入した特定の神経細胞群の活動を非侵襲かつ高い時間分解能で惹起する事が可能になった (図 1 a)。

さらに、オープンソースの視覚心理実験用刺激作成ライブラリ "vision egg" を用いて、歩行シミュレータ上の雄にコンピュータディスプレイ上の視覚刺激を呈示する環境を整えた。

これらを利用し、*dsx* 発現ニューロンを強制活性化した上でディスプレイ上を左右に反復移動するスポットを呈示すると、雄はスポットの動きに追従する歩行活動を示し(定位行動)、片翅を伸展 / 振動させた(求愛歌の発生、図 1 b)。また、一部の個体においては口吻の伸展(リッキング)、腹部の屈曲(交尾試行)も含めた、ほぼ全ての求愛行動の要素が惹起された。求愛行動中枢の強制活性化とディスプレイ上の視覚パターンという人工的な刺激のみで求愛行動が惹起できるようになったことで、特定の介在ニューロン群の活動と視覚行動との対応関係を厳密に探ることが可能になった。

## (2) 定位行動の視覚手がかりの探索

前項目の実験において *dsx* 発現ニューロンの強制活性化と視覚刺激のどちらか一方のみを与えた条件では定位行動は生じなかった。このことから *dsx* 発現ニューロンの活性化により視覚刺激に対する雄の行動応答性が動的に変化し、定位行動が発現したと考えられる。

そこで次に *dsx* 発現ニューロン群を強制活性化した雄に様々な視覚パターンを呈示し、生じた定位行動の活性を比較することで定位行動の際に用いられる視覚的特徴を探索した。その結果、視野中を水平方向に高速で移動する明暗の格子パターン (時間周波数: 8 Hz) が極めて活発な定位行動を惹起し、水平移動する単一のスポットを呈示した場合の約 2 倍もの定位行動活性を引き起こす事がわかった。この顕著な定位行動は *dsx* 発現ニューロンの強制活性化によらず、雌個体の性フェロモン刺激で求愛行動を引き起こした野性型個体においても観察された。このことから、格子パターンにより生じる顕著な定位行動が、光遺伝学の利用に起因する人為現象ではない事が確かめられた。

## (3) 求愛行動惹起に関わる介在ニューロン群の同定

雄の脳に分布する *dsx* 発現ニューロンはその細胞体の位置、分枝パターンの違いから 10 のサブクラスタに分類される。このうちのどれが定位行動の惹起に関わるのかをモザイク解析によって調べた。まず、MARCM 法を用いて *dsx* 発現ニューロンの一部だけに ChRWR を発現する体細胞モザイクを作成し、光刺激下で格子パターンに対する行動応答を記録

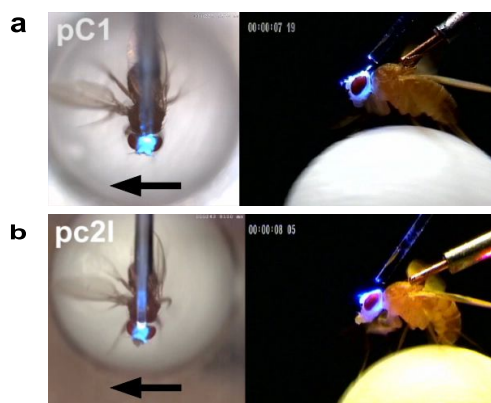


図 2 .単一ニューロンクラスタの強制活性化により惹起された求愛行動。pC1 ニューロン(a)、pc2l ニューロン(b)の強制活性化と視覚刺激により引き起こされた行動。各図左の矢印は視覚刺激の移動方向を示す。

した。その後、脳を摘出して ChRWR を発現した神経細胞群を免疫組織化学的に同定した。73 個体のモザイク個体を解析した結果、P1 ニューロンをその一部に含む「pC1 ニューロン」および「pC21 ニューロン」の2つの *dsx* 発現ニューロン群が定位行動と片翅伸展行動の発現と正の相関を示した。また、いずれのニューロン群も単一クラスタクロンに ChRWR が発現した個体で求愛行動が惹起された(図2)。これらの事から pC1 ニューロンと pC21 ニューロンが求愛行動の惹起に関わると結論した。これらのニューロン群は共に定位・片翅伸展の生起に関わる一方で、その強制活性化により生じる行動には違いも見られた。即ち、pC1 ニューロンの活性化では定位と片翅伸展のみが惹起されたのに対し、pC21 ニューロンの活性化では、さらに口吻の伸展(リッキング)および腹部の屈曲(交尾試行)が引き起こされた。定位・片翅伸展は定位から交尾に至る一続きの求愛行動の前半を構成する行動であり、リッキング・交尾試行は、より雄の興奮が高まった後半に生じる行動である。共に求愛行動の活性化に関わりつつも pC1、pC21 両ニューロンが機能的に分化しており、一連の求愛行動の中で異なる役割を果たす事が示唆された。

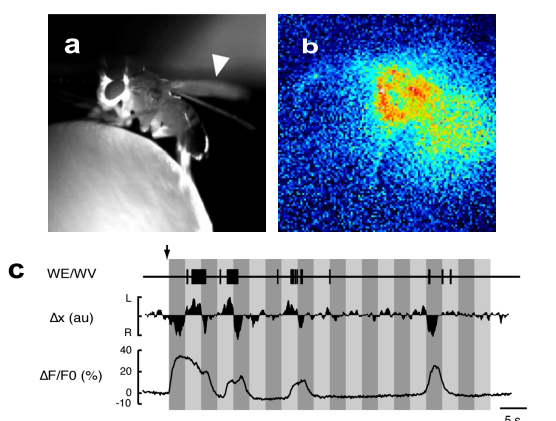


図3 . 求愛行動中の雄における機能イメージング。(a)中枢神経活動の光学計測下で生じた求愛行動(片翅伸展、矢尻)。(b) *dsx* 発現ニューロン群に生じたカルシウム応答の疑似カラー表示。(c) *dsx*-発現ニューロンのカルシウム応答と行動の記録例。WE/WV: 片翅伸展、 $\Delta x$ : 歩行ターン、 $\Delta F/F_0$ : カルシウム応答

#### (4) 求愛行動と相関する中枢神経活動の *in vivo* 計測

求愛行動中における *dsx* ニューロン群の活動動態を明らかにするため、*in vivo* 機能イメージングを行った。雌で前肢に触れた後に視覚刺激を呈示すると、脳の蛍光イメージング下で、雄は定位行動および片翅の伸展を示し、それに伴って脳の lateral protocerebrum (lpr) 領域に明瞭なカルシウム応答が生じた(図3)。なお、ショウジョウバエは行動の文脈によらず、1Hz 程度の遅い視覚フローに追従して歩行する反射行動(optomotor response)を示すことが知られる。*dsx* 発現ニューロンのカルシウム応答は optomotor response 時には生じなかった。このことから lpr で記録された *dsx* 発現ニューロンのカルシウム応答は、単なる視覚フローに追従する歩行によって生じたのではなく、求愛行動という特定の行動の活性を反映したものであると考えられた。

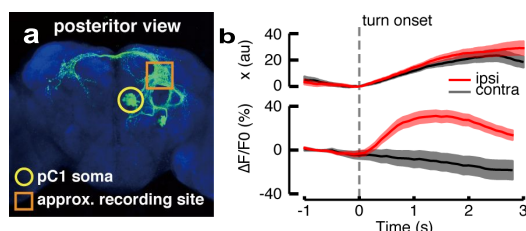


図4 . 求愛中の定位行動と同期した pC1 ニューロン群のカルシウム応答。(a)記録を得た pC1 モザイククロンの例。(b)同時記録された歩行活動と pC1 ニューロン群におけるカルシウム応答。上: 歩行軌跡。下: pC1 ニューロン群のカルシウム応答。

lpr は複数の *dsx* 発現ニューロンが分枝しているため、ここで得られた応答がどの *dsx* 発現ニューロンの活動に由来するのかわからない。そこでより少数の *dsx* 発現ニューロンに GCaMP3.0 を発現するモザイク個体を MARCM 法を用いて作出し、求愛行動中の神経活動記録を行った。記録後の個体から脳を摘出し、GCaMP3.0 を発現したモザイククロンを免疫組織化学的に同定した。その結果、前述のカルシウム応答が pC1、pC21 の両ニュー

ロン群に由来する事がわかった。さらにカルシウム応答と歩行活動との対応を調べると、これらのニューロンは、脳内におけるその細胞体の位置と同側に向かって雄が歩行の向きを変える際にカルシウム応答を示すことがわかった(図4b)。このことから pC1、pC2I ニューロン群は単に求愛行動活性の制御に関わるだけでなく、左右どちらに向けて求愛するかという運動の制御過程にも関与する事が示唆された。

#### (5) まとめ

本研究では、新たに開発した行動解析法と中枢神経活動の *in vivo* 光学計測により、求愛時における視覚誘導性の定位行動の惹起および制御に pC1 と pC2I の2つの *dsx* 発現ニューロン群が関わる事を明らかにした。ショウジョウバエにおいて、求愛行動の発現と対応する中枢神経活動についての報告はこれまでに無く、本能行動の神経メカニズムの解明に大きく貢献する成果であると言える。これらの神経細胞群の活動が視覚刺激に対する定位行動の ON/OFF を如何にして切り替えるのか、その機構の解明が今後の主要な課題の一つと言える。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 4件)

古波津創、山元大輔、歩行シミュレータを利用した昆虫行動の定量解析、定量生物学の会 第六回年会、2013年11月22日-24日、大阪

Kohatsu S, Yamamoto D、Dynamic activities of interneurons that trigger male courtship revealed by *in vivo* calcium imaging in *Drosophila*, Cell Symposia: Genes, Circuits, and Behavior、

2013年7月2日-4日、カナダ、トロント

古波津創、小金澤雅之、山元大輔、新規の行動解析法と神経活動イメージングによるショウジョウバエ求愛行動発現機構の解析、文部科学省化学研究費補助金新学術領域研究 神経系の動作原理を明らかにするためのシステム分枝行動学 班会議、2012年7月24-26日、宮城

Kohatsu S、Yamamoto D、Male-specific interneurons responsive to courtship-triggering stimuli revealed by *in vivo* calcium imaging in *Drosophila*. , The 34th Annual Meeting of The Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry, 2012年7月6日-8日、神奈川

〔図書〕(計 2件)

Yamamoto D, Kohatsu S, Koganezawa M、Springer、「Insect Pheromone Behavior: Fruit Fly、In Pheromone Signaling, Ed. K Touhara」, 2013、261-272ページ

Kohatsu S、Koganezawa M、Yamamoto D、Springer、「*in vivo* optical recording of brain interneuron activities from a *Drosophila* male on a treadmill, In Genetically encoded functional indicators, Ed. Martin, J.-R.」, 2012、103-112ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古波津 創 (KOHATSU, SOH)  
東北大学・大学院生命科学研究科・  
研究支援者

研究者番号：40571930

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし