

性フェロモン神経回路の活動依存的な可視化と操作による機能解明

Activity-dependent visualization and analysis of sex pheromone neural circuits

(日本動物学会推薦)

代表研究者 金沢大学 木矢 剛智 Kanazawa University Taketoshi KIYA

How do animals select their behavior in response to certain sensory inputs? Appropriate responses to sensory information are critical for survival. In the present study, we focused on the brain of insects which has low complexity, but has similar circuit property and molecular basis as the brain of higher animals. In many insects, sex pheromone induces stereotypic courtship behavior with clear relationship between receptor activation and behavioral outcome. Here, we established a novel neural circuit tracing method utilizing an activity-dependent gene expression. Recently, we identified a novel immediate early gene *Hr38*, whose expression increases in response to neural activity. In the present study, using the promoter activity of *Hr38*, we generated a genetic system to drive expression of GFP upon neural activity to visualize the neural circuit activated by sex pheromone or courtship behavior. With this novel method, we revealed that neurons in the higher brain center, as well as olfactory neurons, are active in response to pheromone stimulation in silkworms. In the vinegar fly, we identified novel neural circuits involved in courtship behavior, in addition to previously known neural circuits. These results indicate that our neural circuit tracing method is highly useful for functional analysis of insect neural circuits.

研究目的

動物は外界からの情報を正確に受容・認識し、適切な行動により反応する。しかしながら、感覚情報が行動出力を生み出す神経機構には不明な点が多く残されている。特に脳の高次中枢は、感覚情報の統合や運動指令の判断において最も重要であると考えられるにも関わらず、有効なアプローチがないためその動作原理は未解明のままである。

感覚情報が行動を生み出す神経機構の解明には、特定の感覚刺激に対する定型行動に着目し、その神経回路及び機能を包括的に明らかにすることが有効である。昆虫の性フェロモンは、特異的な嗅覚受容体の活性化が、性行動といった定型行動を誘発する点で入出力関係が明確であり、感覚入力と行動の関係を調べる目的に適している。また昆虫の脳は、脊椎動物の脳に比べ極めて少数の神経細胞で構成されており、神経回路の包括的な解析が可能である。本研究者はこれらの研究上の利点と、遺伝学的手法を

用いた神経機能の解析や比較が可能であるといった観点から、カイコガとショウジョウバエの2種の昆虫を用いて研究を行ってきた。

最近、本研究者は新規な神経活動のマーカー遺伝子として *Hr38* を同定し、これらの昆虫の脳で性フェロモンに反応する細胞の分布を包括的に明らかにした(参考文献1)。本論文では、嗅覚中枢や運動中枢のみならず、脳の高次中枢として知られる領域の細胞群が性フェロモンの刺激に応じて活動することを明らかにし、脳高次中枢における感覚情報処理機構の解明には本研究者のアプローチが極めて有効であることを示してきた。

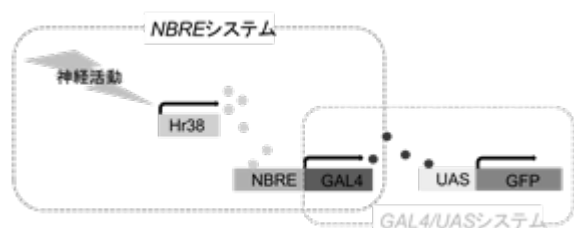
本研究では上述の研究結果を更に発展することを主眼に、*Hr38* によってラベルされた細胞が構成する神経回路の形態や機能を明らかにすることを大きな目標とした。具体的には、*Hr38* の転写活性を利用した遺伝子組換えカイコガやショウジョウバエの作成に取り組み、性フェロモンに反応した神経細胞・回

路の特異的な可視化・操作を行い、その機能解明を目的とした。

研究経過

(1) 遺伝子組換え (Tg) カイコガを用いた性フェロモン情報を処理する神経回路の同定

カイコガの脳において、神経活動の起こった細胞を可視化するための新規な遺伝学的手法“NBRE システム”を考案・構築した。その原理は以下の通りである。



神経活動依存的に発現する遺伝子 *Hr38* は転写因子 *HR38* をコードしており、*HR38* は *NBRE* という 9 塩基の配列に結合し、下流の遺伝子の転写を誘導する性質を持つ。この活性を利用し、*NBRE* 配列の下流に任意の遺伝子 (本研究では *GAL4*) を配置することで、神経活動依存的にその遺伝子を発現させることが出来るというものである。これまでに *Hr38* の神経活動依存的発現制御を行うプロモーターを探索したが、少なくとも *Hr38* の周辺ゲノム領域 20kb においては、神経活動依存的な遺伝子発現制御領域は見つからなかった。この結果は神経活動による *Hr38* の転写制御は、遠位のエンハンサーによって制御されていることを示唆している。カイコガにおいてプロモーターを詳細に探索することは労力的に困難であることから、本“NBRE システム”を用いることで、本研究の目的達成を試みた。

まずプロモーターに用いる *NBRE* 配列の適切な繰り返し回数を調べた。具体的には 5x, 15x, 25x, 35x のいずれかの回数で *NBRE* 配列をタンデムに並べ、その下流に *GAL4Δ* (細胞毒性の少ない *GAL4* バリエント) を配置したコンストラクトを作成し、各コンストラクトにつき 3 系統ずつ、計 12 系統の遺伝子組換えカイコガ系統を作出した。これらの系統をすべて *UAS-mCD8GFP* (膜移行型シグナル付 *GFP*) 系統と掛け合わせ、性フェロモン刺激の後に抗 *GFP* 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果 15x 系統の 1 系統のみで性フェロモン刺激依存的な *GFP* の発現が認められた。

本実験で得られた系統の *GFP* の発現強度は非常に

低く、神経回路の包括的な可視化には不向きであったため、次に *GFP* の発現強度を増加させる条件の検討を行った。

まず *UAS-mCD8GFP* を *20xUAS-IVS-Syn21-myr::GFP-p10T* 系統に変えて同様の実験を行った。ここでの改善点では、*UAS* の繰り返し数を 5x→20x として転写活性を増加させたこと、人工的なスプライシング配列 *IVS* や翻訳エンハンサー *Syn21* 配列や *p10T* 配列をベクターに付加して翻訳効率の増加を試みたことである。その結果、やはり 15x 系統の 1 系統のみで性フェロモン刺激依存的な *GFP* の発現が認められたが、*GFP* の発現強度の増加はわずかであった。

そこで次に *NBRE-GAL4Δ* 系統の改変を行った。まず、転写活性が高いことが知られていた *GAL4::VP16* と *GAL4::p65* に *GAL4Δ* を置き換えた系統を作出した。しかし、*GAL4::VP16* と *GAL4::p65* は共に高い細胞毒性を持つようで、作出した系統を維持することが出来ず、系統が絶えてしまい *GAL4* の転写活性増加による *GFP* 強度の増加を検討することは出来なかった。

そこで更に別のアプローチとして、*GAL4Δ* に *Syn21・p10T* 等の配列を付与し、*GAL4Δ* 自身の発現量を増加させることで、*GFP* 発現量の増加を試みることにした。15x*NBRE*・25x*NBRE* それぞれの下流に *Syn21-GAL4Δ-p10T* を配置したコンストラクトを作成し、各コンストラクトにつき 3 系統ずつ系統の作出を行い、20x*UAS-IVS-Syn21-myr::GFP-p10T* 系統と掛け合わせ、*GFP* の発現を検討した。その結果、神経回路の可視化に十分な強度の *GFP* の発現を達成することが出来た。これらの中でも特に、15x*NBRE* の Line3 が最も *GFP* の発現強度が良いことを確認した。

本系統における *GFP* の発現を詳細に調べたところ、嗅覚情報の一次中枢である触角葉の性フェロモンに応答することが知られている領域や脳高次領域において、性フェロモン刺激依存的に *GFP* シグナル見られるようになることが観察された。この結果は、以前に行った *Hr38* の *in situ hybridization* の結果とも一致しており、性フェロモンに応答した神経回路を可視化することに成功したと判断した。

(2) 性フェロモンに応答した神経細胞の機能的意義の解明

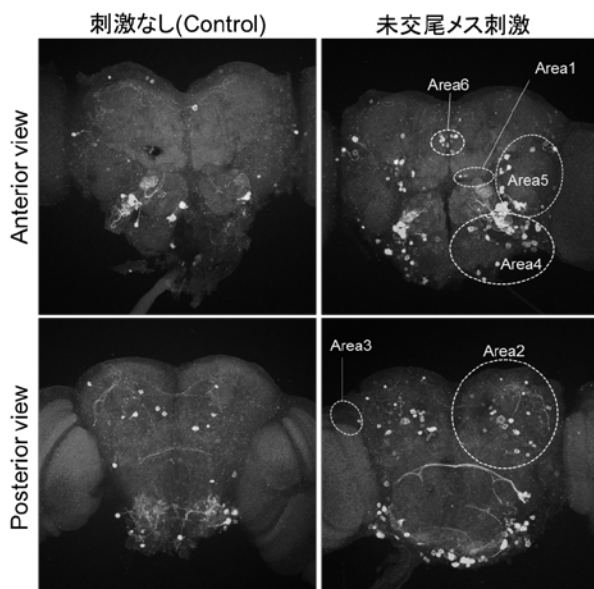
上記のシステムを完成したことから、神経活動依存的に *GFP* 以外の機能操作タンパク質を発現させ

ることも出来るようになった。そこでまず、本システムを利用し、活動の起こった神経回路に温度依存的に開口するイオンチャネル *dTrpA1* を発現するカイコガを作出した。性フェロモン刺激によって *dTrpA1* を発現させたカイコガを用い、温熱刺激による神経回路の再活性化を試みた。現時点では5個体中2個体みの成功率であるが、温熱刺激による性行動の再活性化を行うことが出来た。本結果により、*NBRE* システムを用いることで神経回路を可視化出来るのみならず、機能操作を行うことが可能であることが示された。只、上述の通り、再活性化率が低いことから更なる技術面での改良が必要であると考えられる。

(3) ショウジョウバエの脳において性フェロモン情報を処理する神経回路の同定と解析

本研究の開始時点でショウジョウバエでは、*Hr38* 転写開始点に *GAL4* をノックインした系統の作出に成功していた。本研究では、この系統を用いて *Hr38* を発現する細胞の可視化・機能解析を行った。

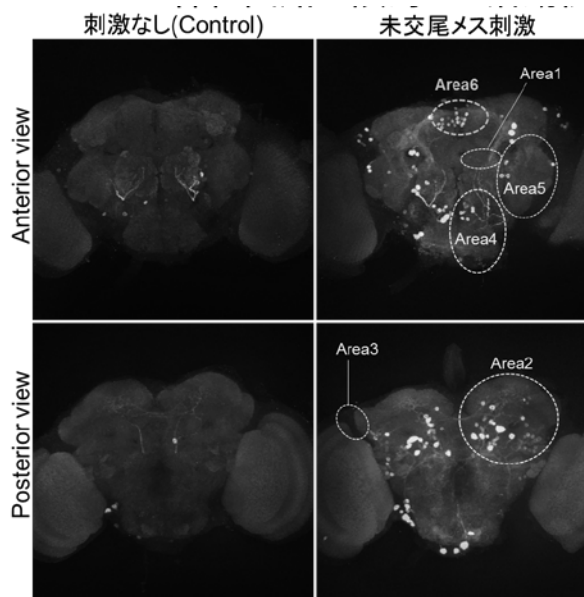
まず、本システムを用いてオスのショウジョウバエにメスのショウジョウバエを提示した際にどのような神経回路が活動するかを可視化した。その結果、下図のように様々な脳領域においてメス刺激依存的な GFP 陽性細胞の発現が認められた。



また、この結果を定量的に解析するために各脳領域における GFP 陽性細胞の数を数えた。この際、触角を除去した個体や、触角と前足先端部を除去した個体を作成し、感覚情報入力をなくした場合にどのような変化が起こるか調べた。その結果、いずれの

領域においても、メス刺激依存的な GFP 陽性細胞数の増加は、感覚情報入力遮断によって減弱・消失することを確認した。その中でも特に Area6 と本研究者が定義した領域は、メスで刺激した際にのみ GFP 陽性細胞が認められること（オスで刺激した場合には GFP 陽性細胞が一切認められなかった）、その反応は感覚入力量依存的であることを見出した。

そこで次に Area6 の細胞の性質を調べることにした。様々な転写因子との二重染色によるスクリーニングの結果、Area6 の細胞群は性決定遺伝子 *fruitless* 陽性であることが分かった。そこでショウジョウバエの遺伝学的手法により、*fruitless* 陽性神経回路のみで、活動依存的な神経回路の可視化を行った(下図)。その結果、Area6 の細胞は *asp2* という細胞群であることを見出した。



次にこの *asp2* 神経回路の機能的な重要性を明らかにすることを目的に、*asp2* 特異的にシナプス伝達を阻害する破傷風毒素軽鎖 (*TeTxLC*) を発現する系統を作出した。この系統では性行動の開始に異常はないが、性行動の活性が低く、交尾を完遂することに障害があることを見出した。

そこで更に *asp2* 特異的に温度依存的に開口するイオンチャネル *dTrpA1* を発現する系統を作出した。この系統を用いて、*asp2* の神経活動を亢進させた場合の性行動を調べたが、特に性行動や交尾活性を促進するような表現型は見られなかった。

考察

本研究では、神経活動依存的に発現量増加する初期応答遺伝子 *Hr38* を遺伝学的に利用することで、

活動依存的に神経回路を可視化・操作する手法を、カイコガ及びショウジョウバエの2種の昆虫で確立した。*Hr38* は線虫からヒトに至る幅広い生物種で高度に保存された遺伝子であり、ゲノム配列の決定された全て昆虫種に存在することが確認されている。よって本研究は、カイコガとショウジョウバエに留まらず、幅広い昆虫種や他の動物門の生物においても、*Hr38* の転写活性やプロモーター活性を利用することで活動依存的に神経回路を可視化・操作することが出来る可能性を示すものである。今後、昆虫科学以外の研究分野においても重要なツールとなることが期待される。

(1) カイコガにおける結果の考察

カイコガの脳において活動依存的な神経回路の可視化を行った事により、嗅覚情報の入力部のみならず、脳高次領域において性フェロモン刺激依存的にGFPでラベルされる細胞を可視化することが出来た。多くの感覚情報は高次領域へ伝達されるに従い、情報処理経路が発散・複雑化する為、それを追跡することは徐々に困難になってゆく。そのような観点において、脳高次領域において感覚刺激に応答する回路を可視化できたことは、今後、感覚情報が行動を制御する機構を明らかにしてゆく上で極めて重要な意義を持つと考えられる。

本研究の期間中に、他のグループより、高次脳領域において性フェロモンに反応する神経(SMP神経)の報告がなされた(参考文献2)。我々が可視化した細胞の中にもSMP神経と推定されるものも含まれていた。このようなことから、新規神経回路の同定という観点では新規性が下がってしまったが、本手法の有用性が再度確認されたと考えられる。

本手法の強みは可視化のみならず神経活動を人為的に操作することが出来る点にある。今後、可視化した神経回路の人為的機能操作を行うことで、未だ報告のなされていない神経回路やその機能を明らかにしてゆきたい。

(2) ショウジョウバエにおける結果の考察

ショウジョウバエの脳においても、活動依存的な神経回路可視化法を確立し、交尾行動時に活動する神経回路を明らかにすることに成功した。さらに既知の神経回路に加え、新規な神経回路としてasp2神

経回路を見出した。また、このasp2神経回路は交尾行動に重要な役割を担う神経回路であることを明らかにしつつある。先行研究によって明らかにされているfruitless神経回路の構造から、asp2神経回路には触角・前足先端からの性フェロモン入力および視覚からの入力があることが分かっている。また、asp2神経回路は性行動指令を発するP1神経回路の上流に位置することも明らかとなっている。これらのことを総合すると、asp2は様々な感覚情報を統合し、P1神経回路に入力することで、P1神経回路の活動に影響を与え、交尾行動の活性制御に関わっているものと推察される。今後、この仮説の検討を行ってゆきたい。

参考文献

1. Fujita N, Nagata Y, Nishiuchi T, Sato M, Iwami M, Kiya T. Visualization of neural activity in insect brains using a conserved immediate early gene, *Hr38*. *Curr Biol*. 2013 Oct 21;23(20):2063-70.
2. Namiki S, Iwabuchi S, Pansopha Kono P, Kanzaki R. Information flow through neural circuits for pheromone orientation. *Nat Commun*. 2014 Dec 23;5:5919.

研究の発表

口頭発表

1. 木矢剛智 昆虫の生得的行動の神経基盤：活動依存的な神経回路可視化法の開発によるアプローチ. 平成27年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会. [招待講演]
2. 木矢剛智 昆虫の生得的行動の神経基盤：活動依存的な神経回路可視化法の開発によるアプローチ. 日本動物学会北海道支部第562回支部講演会. [招待講演]

誌上発表

1. 木矢剛智 神経活動依存的に発現する遺伝子*Hr38*を利用した昆虫の生得的行動時の神経活動の検出. 生化学 みにれびゅう 2015 第87巻 第2号 pp.221-224 [総説]
2. Kiya T, Morishita K, Uchino K, Iwami M, Sezutsu H. Establishment of tools for neurogenetic analysis of sexual behavior in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS One*. 2014 Nov 14;9(11):e113156.