

114. 活動依存的な神経可視化による昆虫脳高次機能の解析

木矢 剛智

金沢大学 理工研究域 自然システム学系 生物学コース 発生生物学研究室

Key words : 初期応答遺伝子, 性行動, フェロモン, 神経活動, 神経回路

緒言

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、感覚情報が行動を生み出す神経機構には不明な点が多く残されてきた。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。我々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。

近年、我々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てきた¹⁾。本研究では、*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を作出し、活動の起こった神経細胞を選択的に可視化・活動制御する手法の確立に取り組むことにした。またこれにより、昆虫脳高次領域において、感覚情報がどのような神経回路において処理・統合されることで、行動の発現が制御されているのかということの解明に取り組んだ。

方法および結果

1. 遺伝子組換え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(図1A)。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。

プロモーターに用いる *NBRE* 配列の繰り返し回数や翻訳エンハンサー配列の付与などの条件を検討し、神経活動の可視化に最適なシステムを作出した。このシステムを用いて神経回路の可視化を行ったところ、嗅覚情報の一次中枢である触角葉の性フェロモンに反応することが知られている領域(触角葉大糸球体: 図1B) や脳高次領域(キノコ体: 図1C上図) において、性フェロモン刺激依存的な GFP シグナルが認められた。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、性フェロモンに反応する神経回路を可視化することに成功したと判断された。その一方で、運動中枢領域(食道下神経節: 図1C下図) では性フェロモン刺激依存的な GFP シグナルは認められなかったことから、*NBRE* システムが正常に作動しない脳領域もあること、すなわち本手法の脳領域特異性があるという問題点も明らかとなった。

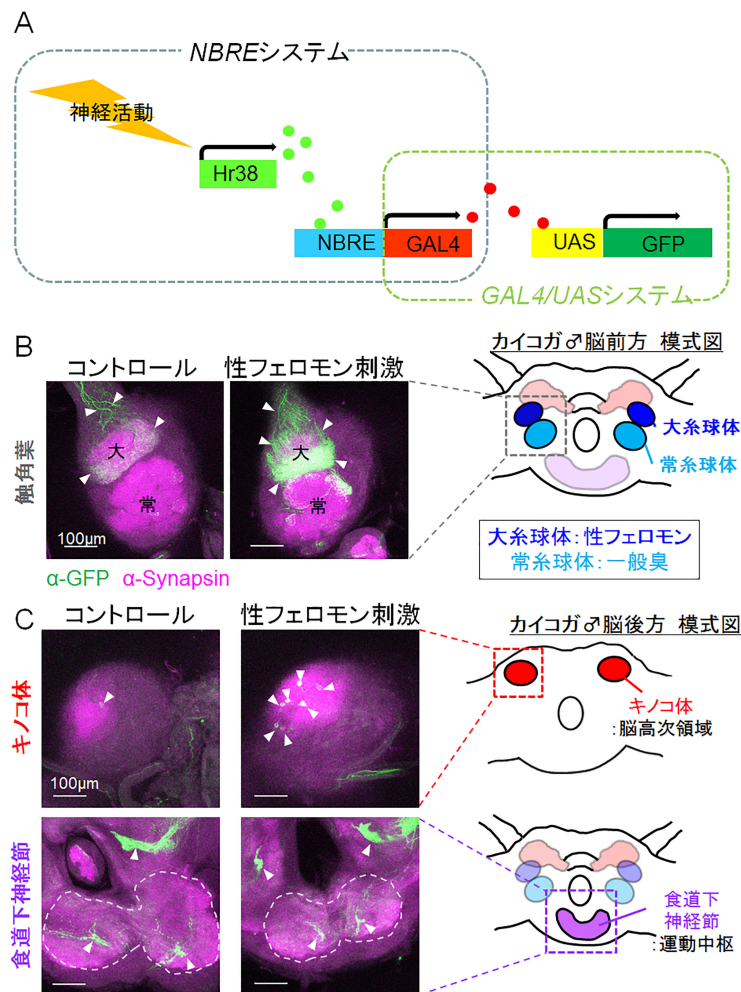


図1. *NBRE*システムの概要と *NBRE*システムによるカイコガ神経回路の活動依存的可視化
 (A) 新規に構築した活動依存的な神経回路可視化法 *NBRE*システムの原理。
 (B) 触角葉における免疫染色の結果。性フェロモン刺激依存的に、性フェロモン応答領域である大糸球体（「大」と表記）に強い GFP シグナルが認められた。
 (C) 脳高次中枢（キノコ体：上段）と運動中枢（食道下神経節：下段）における免疫染色の結果。性フェロモン刺激依存的な GFP 陽性細胞の増加がキノコ体においては認められた。一方、食道下神経節では刺激依存的なシグナル変化は認められなかった。

2. 性フェロモンに応答した神経回路の機能的意義の解明

上記のシステムを利用し、神経活動依存的に機能操作タンパク質を発現させ、性フェロモンに応答した神経回路の機能的意義の解明に取り組んだ。GFPの代わりに、温度依存的に開口するイオンチャネル *dTrpA1* やシナプス伝達を阻害する破傷風毒素軽鎖 *TeTxLC* を発現するカイコガを作成した。これらのカイコガを用いて、神経活動の人為的な活性化や阻害による行動への影響を調べたが、残念ながら活動依存的に行動を操作することはできなかった。この原因としては機能操作タンパク質の発現量が低いことや *NBRE*システムの脳領域特異性があることが影響しているものと考えられる。今後、活動依存的な遺伝子発現系の最適化などを図って、解決してゆく必要があるものと考えている。

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* をノックインしたシステムの作出に成功していた。本研究では、このシステムを用いて *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、図2 A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。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製し、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を調べた。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事であることを見出した。

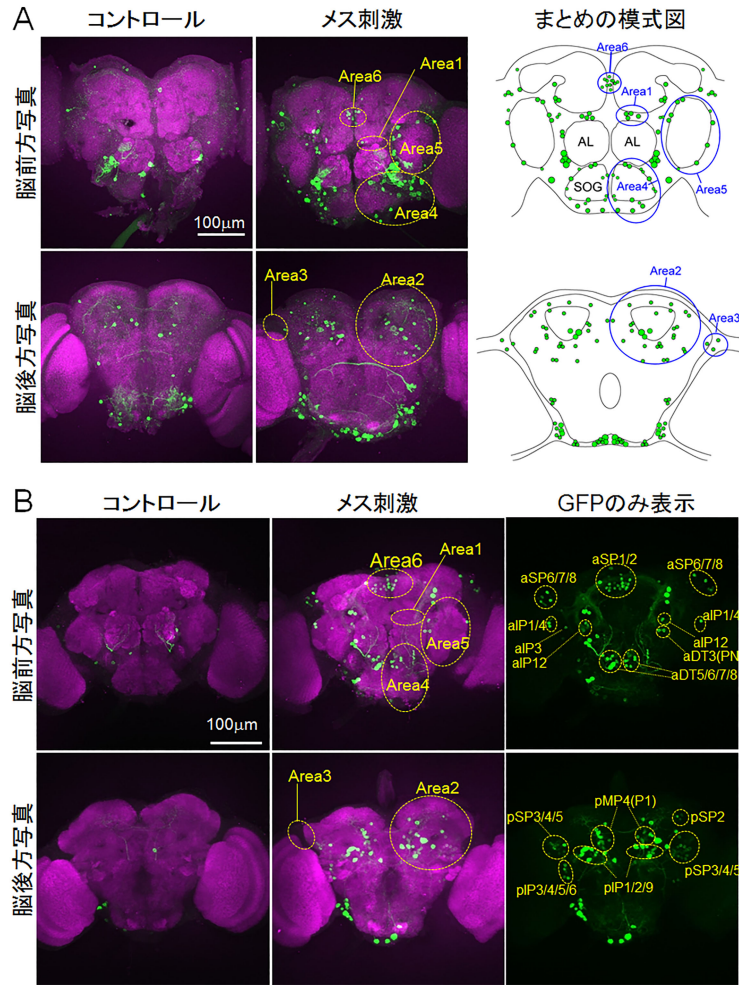


図2. オスのショウジョウバエ脳における、メスにตอบสนองして活動した神経細胞の GFP による可視化

(A) メス刺激によって活動の起こった神経細胞の GFP による可視化の結果。

単独飼育による刺激無しのコントロール個体（オス）の脳（左側）とメスと交尾したオスの脳（真ん中）における GFP の発現パターンを免疫染色によって可視化した。脳を前方から見た写真を上段、後方から見た写真を下段に示してある。（右側）メス刺激依存的に GFP 陽性細胞が見られたパターンの模式図。

(B) 脳の性決定遺伝子 *fruitless* 発現神経回路に局限して、活動依存的な神経回路可視化を行った結果。

コントロールではほとんど GFP 陽性細胞は見られない（左）。一方、メスで刺激された場合には、多くの細胞が GFP を発現するようになった（中）。メス刺激のサンプルの GFP のみを表示（右）すると、細胞体のみならず神経回路網も可視化されていることが分かる。

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 (図 2 B)。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 もしくは恒常的開口型カリウムチャンネル Kir2.1 を発現する系統を作出した。これら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なり、交尾を完遂することに障害があることを見出した。更に aSP2 特異的に温度依存的に開口するイオンチャンネル 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。これらの結果は、aSP2 神経回路は交尾行動の遂行に必要なではあるが十分な神経回路ではないということを示している。

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。また本手法を用いて、新規な機能を持った神経回路 (aSP2 神経回路) を同定・機能解析することが出来た。*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。

本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

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. doi: 10.1016/j.cub.2013.08.051. Epub 2013 Oct 10. PMID: 24120640