

研究報告書

「脳の内的環境を制御する神経伝達機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 田中 暢明

1. 研究のねらい

動物の脳は、個体の気分や体調などに応じて、たとえ同じ刺激入力が入っても、異なる感覚、行動や情動を引き起こす。そうした個体の気分などには、モノアミンやペプチド、ホルモンなどの神経伝達調節物質の出力の関与が示されている。ショウジョウバエの遺伝学的手法を駆使して、こうした伝達物質の感覚情報処理における役割を明らかにし、曖昧に「気分」とくられてきた脳の内的環境がどのように生み出されているのかを調べることを目標にして研究を行っている。

2. 研究成果

(1) 概要

動物は、個体のコンディションに応じて、それに適した行動をとることができる。たとえば、空腹条件下のショウジョウバエが、餌を充分にあたえられていた個体よりも、より早く餌場に到達したり、また、ショウジョウバエの雌が、産卵活動をしている期間は、雄の求愛を受け入れないことが知られている。こうした、コンディションに応じた行動の可塑的変化の表出には、モノアミンやペプチド、ホルモンの関与が報告されてきた。しかしながら、様々なモノアミンやペプチドなどが協調的に働いて、感覚入力に対して応答するかしないかを決定する機構、言い替えると、応答の閾値の制御機構に関してはまだわかっていないことが多い。ショウジョウバエの嗅覚系をモデルにして、その神経機構を探るべく、まず、様々な嗅覚系の神経細胞に遺伝子発現を誘導できる GAL4 エンハンサートラップシステムを同定した(論文 2)。そして、色素注入実験や、GAL4 系統を用いて、嗅覚系神経回路の解剖学的研究を行い(論文 2,3)、さらに同定した神経間にシナプス連絡があるか電子顕微鏡で観察する技術を確立した(論文 1)。その上で、本研究では、コンディションごとの匂い応答の閾値の変化について、2 点に着目して研究を行った。研究テーマ A としては、交尾前後の雌のフェロモン応答の閾値の変化、研究テーマ B としては、刺激応答閾値に関して、生理実験とカップリングできる行動実験系の確立を行った。

(2) 詳細

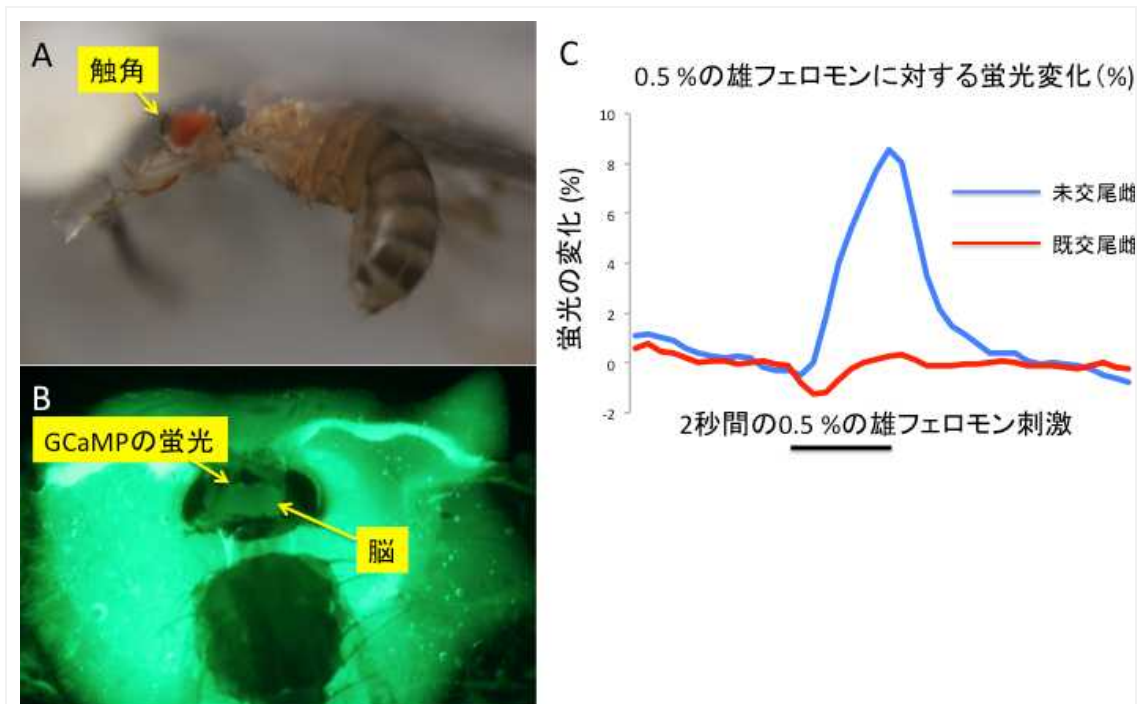
(1) 研究テーマ A 「交尾前後の雌のフェロモン応答の閾値の変化」

ショウジョウバエの雌は交尾後、産卵活動を開始して、雄の求愛を受け入れなくなる。交尾後のこうした行動変化は、雄が交尾中に精子とともに雌に移入するsex peptideと呼ばれるペプチドが感覚神経に作用することによって誘発されることが報告されている。

では、交尾後の雌が雄からの求愛を拒否している時、昆虫の求愛に極めて重要な役割を果たす雄フェロモン (*cis*-vaccenyl acetate) に対する神経応答はどうなっているのだろうか？それを調べるために、未交尾雌と、交尾してから24時間後の既交尾雌とで、雄フェロモンに対する神経応答を比較した。方法としては、雄フェロモンを検出するOr67d嗅覚受容体を発現する嗅細胞に、カルシウム蛍光指示タンパク質のGCaMP遺伝子を特異的に発現させ、低濃度から高濃度のフェロモンで触角を刺激した際のシナプス終末における蛍光変化を定量した (図A, B)。まず、未交尾雌では、雄臭と0.1% cVAに対しては同程度の蛍光量変化が観察され、cVAの濃度を上げるとその応答が濃度に応じて大きくなった。一方、既交尾雌は、0.5% cVAですら応答が観察できず、未交尾雌と比較して雄フェロモンに対する刺激応答の閾値が大きくなることが明らかになった (図C)。

一方、交尾後の雌は産卵活動に入るわけなのだが、産卵する餌場の匂いに対する感受性に、未交尾雌と既交尾雌とで違いはあるのだろうか？先述の実験と同様に、Ir64a 嗅覚受容体を発現する Ir64a 嗅細胞で、食べ物に含まれる phenylacetaldehyde に対する応答を記録すると、未交尾雌と既交尾雌で、刺激応答の閾値に違いは検出できなかった。

このようなフェロモン応答の閾値の変化は何に誘発されるのだろうか？交尾後の行動変化を誘発するsex peptideが感覚応答まで変化させうるか調べる目的で、sex peptideを持たない突然変異体の雄と交尾した雌の雄フェロモンに対する応答の閾値を調べた。その結果は、野生型の雄と交尾した雌のフェロモン応答の閾値と同じであった。つまり、交尾後の雌の雄フェロモンに対する神経応答の変化はsex peptideに依存しないことが明らかになった。



(2) 研究テーマ B「刺激応答閾値に関して、生理実験とカップリングできる行動実験系の確立」

これまで、異なる濃度の匂いに対する神経応答を生理実験で記録してきた。匂いの濃度依存的な神経活動と行動との相関を調べるためには、生理実験で用いた匂い刺激に限りなく近い条件で、行動実験を行う必要がある。そこで、ショウジョウバエでは学習・記憶のテストにつかう T maze の器械を少し改変して、ショウジョウバエが様々な濃度の匂いに対して、その匂いを選択して向かうかテストできるようにした。これまでの生得的な匂いの選択の研究では、慢性的に匂いを嗅げるような条件で行った実験が主で、比較的短い時間で選択させるような実験はほとんどなかった。様々な匂いを試した結果、グレープジュースで濃度依存的な選択的行動が最も効果的に観察された。また、その選択的行動は、ショウジョウバエの空腹条件に依存し、空腹にすればより低濃度の匂いに誘引される結果となった。

3. 今後の展開

研究テーマ A に関しては、交尾後の匂い応答の閾値の変化が sex peptide に依存しなかったことから、どういった因子が変化を誘導しているのか検討する必要がある。交尾後、雌は卵を大量に作りはじめることから、卵の増産に関与するホルモンに着目して、交尾後体内で量に変化するホルモンを探索し、そのホルモンによって匂い応答の変化が生じるかテストする。

研究テーマ B に関しては、テーマ A とカップリングできるようにするには、まだ微調整が必要ではあるが、この系を用いることで、コンディションに応じた匂い選択機構を生理学的・行動学的に明らかにすることができるようになった。特に様々な空腹条件下における匂いの選択と、同じ条件下での匂いに対する神経応答を比較し、相関のあるものを探することで、コンディションに応じて匂いを選択する機構、さらには、匂いを選択して匂い源

にむかわせる脳内機構について末梢から高次の嗅覚野に連絡する神経の応答を調べていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究の最終的な目標は、脳が気分や体調に応じて感覚情報処理を変化させる機構を明らかにすることである。これまでに、コンディションによる匂い応答の閾値の変化を生理学的・行動学的手法で明らかにし、その解析を行うための GAL4 エンハンサートラップシステムの同定を終えたという点で、一定の成果をあげ、また、今後研究を発展させる基盤を整えることができたと言える。しかしながら、まだまだ道半ばである。今後はこれまでに同定してきた GAL4 エンハンサートラップシステムをもちいて、様々な神経細胞、特に、モノアミンやホルモン、ペプチドなどを持つ神経の神経活動パターンを記録し、その出力が周辺の神経細胞の匂い応答にどのように作用しうるのか、また、そうした伝達物質を持つ神経細胞間が相互作用して、脳全体のバランスを制御し、感覚情報処理を変化させる機構を調べていく必要がある。

(2) 研究総括評価

動物行動の基本パターンは対応する神経回路により定式化されているものの、個体の置かれた状況により行動表出を適切に修飾する神経回路が介在し、モノアミン、ペプチドホルモンなどの神経伝達/修飾物質が後者に関わると考えられるが、そのような機能的回路の実体と機能様式は未だ不明な部分が多い。本研究では遺伝学的な実験操作が容易かつ豊富なショウジョウバエを用い、嗅覚応答行動、具体的には性フェロモン応答・産卵行動や求餌行動などに着目し、行動表出修飾の有力なメカニズムとなる応答閾値調節に関して神経回路の観点からアプローチしたものである。交尾に伴い雌バエに移入する特定のペプチドホルモンが、雄フェロモンを感知する特定の嗅覚神経細胞のカルシウム応答の閾値を引き上げること、他方でこのペプチドは雌の産卵環境への嗅覚的誘因物質フェニルアセトアルデヒドに対する応答閾値は変化させないことを見出したことは興味深い成果である。また個体行動レベルでの解析を進めるための実験装置の開発を進めており、空腹と選択行動について予備的成果が得られている。今後得意とする蛍光顕微鏡による神経線維連絡解析と併せて特定行動を調節修飾する回路のメカニズムの解明が進むことが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Tanaka NK, Dye L, Stopfer M. (2011) Dual-labeling method for electron microscopy to characterize synaptic connectivity using genetically encoded fluorescent reporters in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience Methods* 194:312-315.
2. Tanaka NK, Endo K, Ito K. (2012) The organization of antennal lobe-associated neurons in the adult *Drosophila melanogaster* brain. *J Comp Neurol* 520:4067-4130.

3. Tanaka NK, Suzuki E, Dye L, Ejima A, Stopfer M. (2012) Dye-fills reveal additional olfactory tracts in the protocerebrum of wild-type *Drosophila*. *J Comp Neurol* 520:4131-4140.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Tanaka N, Ejima A. (2010) Olfactory neuronal circuit for reproductive behaviors in *Drosophila*. Annual meeting for society for neuroscience. San Diego, CA, USA. (ポスター発表)

Tanaka N, Stopfer M. (2011) Dual-labeling Method for Electron Microscopy to Characterize Synaptic Connectivity Using Genetically Encoded Fluorescent Reporters in *Drosophila*. 1st Asia Pacific *Drosophila* Research Conference, Taipei, Taiwan. (ポスター発表)

Tanaka N, Ejima A. (2011) Multiple antennal lobe-protocerebral tracts in *Drosophila*. European Symposium on Insect Olfaction and Taste, Saint Petersburg, Russia. (ポスター発表)

Tanaka N, Ito K, Stopfer M. (2011) Olfactory Neuronal Circuit in a *Drosophila* Brain. 日本味と匂学会 (招待講演)

Tanaka N, Ejima A. (2013) Pheromone processing pathways in *Drosophila*. Asia Pacific *Drosophila* Research Conference, Seoul, Korea. (口頭発表)

八木亮輔、田中暢明. (2013) Convergence of multimodal sensory input to the mushroom body calyx in *Drosophila*. 日本動物学会大会 (口頭発表)

Tanaka N. (2014) The olfactory system in *Drosophila*. International Workshop on Animal Instinctive and Intelligent Behaviors, Sapporo, Japan. (口頭発表)