

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分
平成29年3月14日現在

ショウジョウバエ行動制御神経回路のコネクトミクス解析

Connectomics Analysis of the Neural Networks
that Regulate the Behavior of *Drosophila*

課題番号：26221002

伊藤 啓 (ITO KEI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授



研究の概要

連合中枢からの情報が行動制御中枢に伝えられる過程は、罰や報酬と連合した学習に対応した適切な行動を動物が実現するために極めて重要であるにもかかわらず、まだほとんど解明されていない。脳構造が比較的単純で、特定の神経での特異的な遺伝子発現誘導が容易なショウジョウバエ脳を用いて、これら未解析の脳領域の神経経路を体系的に同定し、機能的解析を行う。

研究分野：神経科学一般

キーワード：神経情報処理、コネクトミクス、モデル生物、イメージング、ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

罰や報酬と連合した学習の出力は、忌避や接近などの行動を惹き起こす。しかし連合中枢からの情報がどのように行動制御中枢に伝えられて、これらの行動に結びつくかは、ほとんど解析されていない。連合中枢と行動制御中枢を結ぶ情報伝達経路がきちんと解明されていないことが、この問題の理解を困難にする大きな課題になっている。

2. 研究の目的

キイロショウジョウバエはごく小さな脳しか持たないにもかかわらず、下等哺乳類に匹敵する多彩な行動レパートリーと連合学習機能を持つ。また、特定の神経を可視化し、機能を操作するための高度な分子生物学的手法が揃っている。さらに、連合中枢と行動制御中枢が脳の狭い範囲に隣接しているという構造的特徴も持つ。これらの利点を活かし、多彩な神経ラベル法によって神経を体系的に同定して両中枢間の情報ネットワークを網羅的に明らかにし、それらの神経が行動制御の際に示す反応や機能を解明する。

3. 研究の方法

酵母由来の GAL4 や大腸菌由来の LexA 転写調節因子をゲノムの1ヶ所に組み込んだ細胞種特異的発現系や、2つの発現パターンを組み合わせて共発現する細胞のみで、極めて高い特異性で他の遺伝子の発現を誘導できる split GAL4 発現誘導系をスクリーニングして、これまで解析が進んでいなかった連合中枢と行動制御中枢を結ぶ脳領域群にある神経を標識するようなシステムを網羅的に同定

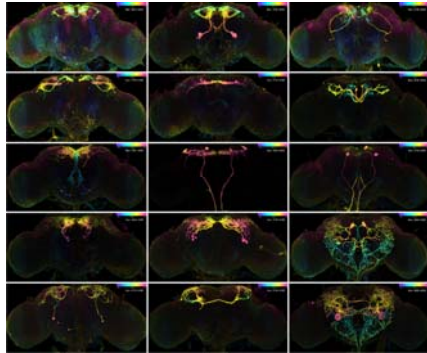
する。さらに、同定された神経でカルシウム濃度感受性蛍光タンパクを発現させた神経特異的イメージングや、光依存的なチャンネルタンパクを発現させたオプトジェネティクスを用いて、機能的解析を行う。

4. これまでの成果

本研究で対象とする脳領域の神経構造に関する研究知見は、これまでゼロに近い。そこでまず、細胞系譜特異的な神経構造であるクローナルユニットや、既存の発現誘導系統群の発現パターンの解析によって、すでに解析が進んでいて本研究の対象外であるキノコ体・中心複合体・視葉（一次視覚中枢）以外の脳部位に、どのような神経が存在するかを調べた。3,400の発現誘導系統を解析して10,534種類の神経を見だし、投射パターンが相似の神経を分類整理した結果、これらの脳部位に合計964種類の神経を同定した。

既存の発現誘導系統は、少ないものでも数種類、多いものでは数十種類の神経を同時に標識してしまう場合が多い。より特異的な高い遺伝子発現誘導を実現するため、酵母由来の転写調節因子 GAL4 タンパク質の DNA 結合部位 (DBD; DND Binding Domain) と転写活性化部位 (AD; Activation Domain) を、それぞれ異なる遺伝子の上流転写制御部位に融合させた2種類の形質転換システムを組み合わせて、両者の発現が共存する細胞でのみ機能的 GAL4 タンパク質が形成されて特異的な発現を誘導できる、次世代の発現誘導システム split GAL4 系統のスクリーニングを行った。同システムを大規模に作成している唯一の

研究機関である米国ハーワードヒューズ医学財団ジェネリア研究所の協力を得て、これまでに11,000通りの組み合わせ



SMP 領域に投射を持つ神経群の例

の掛け合わせスクリーニングを実施し、314種類の神経について細胞特異的な split GAL4 系統を樹立した。

こうして同定された多数の神経の投射構造解析によって、詳しい解析がこれまで行われていなかった約 20 の脳領域のうちの半数について、特異的な神経投射パターンによる内部の詳細な境界構造や、周囲の脳領域との特異的な結合パターンを解析している。

また、以前から開発を続けていた、超高解像度のレーザー顕微鏡画像から画像処理によってシナプスの位置を自動抽出して数と分布を計測する技術を完成させ、これまで到底不可能だった多数のシナプスの定量計測を実現した。これによって、羽化 30 日後の老化したハエや、カリウムチャネルを強制発現させて特定の神経の活動電位変化を阻害したハエでは、神経の投射パターンには明確な変化が見られないにも関わらず、羽化直後の若いハエに比べて当該神経のプレシナプスの総数が約 20%減少することを発見した。

また、ハエの行動制御中枢には視覚二次中枢から多くの神経経路が入力しているが、視覚一次中枢から二次中枢への投射神経の特定の一部を阻害すると、波長特異的な光への接近行動阻害が生じることが分かっている。ハエの可視波長領域全体にわたって特定波長の光を同一光量で照射できる新開発の高精度分光光源装置を用いた実験系を構築し、細胞内カルシウム濃度に依存して蛍光強度が変化する GCaMP タンパク質を特定の細胞で発現させて神経応答を計測した結果、阻害実験の結果に対応する特定の経路で波長特異的な応答が見られることを発見した。

さらに、赤色光の刺激で神経活動を誘起できる赤方偏移チャネルロドプシンをこれまでに同定した多様な神経で特異的に発現させ、当該神経特異的な光誘導神経刺激による行動変化のビデオ解析を実施している。これまでに 90 種類の神経を解析して、そのうち 13 種類で光誘導刺激によって歩行が停止したり旋回したりするものを発見した。これらの神経は、動物の接近行動と忌避行動の切り換えに関係している可能性がある。

5. 今後の計画

従来未知であった脳領域の研究を行うには、誰かがその領域の構造に関する基礎的知見を提供し、詳しい解析を行うための研究ツールを提供しないとならない。これまでほとんど解析されていなかった多数の脳領域において、数百種の神経を新たに同定してそれらの神経の構造と機能に関する基礎的知見を提供し、さらにそれらの神経の特異的機能操作を可能にする大量の発現誘導系統を研究コミュニティに供給する本研究は、この点で大きな波及効果を持ち、海外の関心も高い。

今後の研究期間では、まだ特異的発現誘導系統が樹立できていない神経についてスクリーニングを続け、合計で 400 種以上の特異的発現誘導系統の樹立を目指す。これらの系統で標識された神経は、シナプス分布を解析して当該神経経路を通る情報の流れを明らかにすると共に、同一種類の細胞が複数標識されている系統では、個々の細胞を染め分けて単一細胞レベルでの投射構造の微細な違いを解析する。さらに、こうして同定されたすべての新規神経と、既知のすべての神経について、相互の投射標的の相関関係を三次元的に網羅的に解析し、可能な神経接続のパターンと、そこから想定される情報の流れを解析する。

ショウジョウバエ脳のコネクトミクス研究では、線虫以外では初となる全脳電子顕微鏡連続切片画像データが平成 28 年に完成し、世界各国の研究者の共同プロジェクトで網羅的神経トレース作業が始まろうとしている。効率的で正確な電顕画像トレースには、神経の全体構造に関する光学顕微鏡レベルの知識が欠かせない。そこで、電顕コネクトミクス研究者に逐次情報を提供して画像トレース作業をサポートすると同時に、光顕レベルと電顕レベルのコネクトミクス研究のシームレスな統合を実現する。

同定した神経の機能を理解するために、残りの神経種についてもオプトジェネティクス実験を継続し、接近や忌避に関連した行動変化を惹き起こす神経を探索する。これらの神経の投射パターンと当該神経刺激時の行動変化の対応を調べ、イメージングによって行動時の神経活動パターンを解析することによって、行動を制御する神経が脳内にどのように分布し、それぞれがどのように行動制御に関わるかを解析する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

ホームページ等

<http://jfly.iam.u-tokyo.ac.jp/lab/>

itokei@iam.u-tokyo.ac.jp