

令和 元年 6 月 24 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年

受付番号 687

氏 名

藤原輝史

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: Champalimaud Centre for the Unknown (国名: ポルトガル)2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。歩行における自己運動推定の神経基盤3. 派遣期間: 平成 29 年 6 月 1 日 ~ 令和 元年 5 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

Champalimaud Centre for the Unknown, Champalimaud Neuroscience Programme5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

歩行中の正確な自己運動の推定は、変わり続ける環境の中で正確で安定した歩行能力を維持するために重要である。つまり、機能的な歩行は単にフィードフォワードで達成されるものではなく、外来の変化に対し常に能動的に補正することで達成される。自己運動の安定的で正確な推定は自己運動により生じるオプティックフロー(規則的なパターンを持った視覚の流れ)や機械感覚器、随伴発射(運動関連性の信号)といった複数感覚フィードバックの統合により達成される。更に、この信号処理は生物の歩行中における、時々刻々と変化する行動状態により柔軟でなければならない。それは、フィードバック情報が歩行状態に依存し動的に変化するためである。しかしながら、神経系がどのように動的に複数感覚情報を統合し、機能的な歩行を維持しているかはどの生物種でもよく分かっていない。過去の研究で、私は球状トレッドミル上を歩行するショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の脳においてホールセルパッチクランプ法(細胞内電気生理計測法)を適用し、前進(前から後)方向のオプティックフローに選択的感受性のある HS 細胞から活動を記録し、HS 細胞が自己歩行回転に対し、歩行回転方向選択的に応答することを発見した(Fig. 1A, D, E, Fujiwara et al., 2017)。HS 細胞は歩行回転信号と自己回転により生じるオプティックフローに対する信号を加算的に統合していた(Fig. 1A)。つまり、HS 細胞は複数の自己運動推定信号を統合している。本研究ではまず、別のハエの種で発見されていた後退(後から前)方向のオプティックフローに選択的感受性のある H2 細胞を、その形態特性を活用し細胞標識法を適用することでショウジョウバエにおいて同定した(Fig. 1B)。同定した H2 細胞は、予測されたように、後退方向のオプティックフローに対して活性化された(Fig. 1C)。同様に歩行中のハエの H2 細胞からホールセルパッチクランプ法を用いて活動を記録した(Fig. 1D)。H2 細胞は HS 細胞とは逆方向の歩行回転方向選択的な歩行回転信号を持つことで、HS 細胞と同様に歩行回転信号と自己回転により生じるオプティックフローに対する信号を加算的に統合していた(Fig. 1E)。また、HS 細胞と同様に、この H2 細胞上の回転歩行信号は回転方向速度に比例し増加した。次に、遺伝学操作を活用し、H2 細胞に ATP 受容チャネルを発現させ、微小電極を用いて H2 細胞の軸索に局所的に ATP を注入することで脳片側の H2 細胞を活性化させたところ、過去に HS 細胞の活性化で見られたように(Fujiwara et al., 2017)、ハエは軸索投射側と同側に回転した(Fig. 1F)。これ

らの発見から私たちは、この HS, H2 細胞視覚神経回路が、以下のように、ハエの歩行直進性の維持に貢献しているという説を提唱した (Fig. 1G)。直進しているハエの歩行軌跡は、外来の揺らぎ (例えば歩行する地面表面の凹凸) や内来の揺らぎ (例えば左右の身体の微妙な非対称性) により、時々刻々と回転方向に逸れる。例えば、ハエの歩行軌跡が左に逸れた場合、右側 HS 細胞と左側 H2 細胞が、加算的に統合された歩行回転信号と自己回転により生じるオプティックフローに対する信号により活性化され、定量的に右側への回転を促すことで、左側への逸脱を補正する。生物が歩行中に直進軌跡を保つことは、環境中の感覚情報の正確な抽出や、探索行動においてより広範囲の領域を網羅するために有効である。これらの結果は米国 Janelia Farm で行われた国際学会で発表した。

更に、ハエが前進している際 (この場合 HS 細胞、H2 細胞は並進方向のオプティックフローによりそれぞれ活性、抑制される)、HS 細胞、H2 細胞は前進歩行速度に感受性を持つ歩行関連性信号を受容していることが分かった (Fig. 1H, I)。HS 細胞は前進歩行により活性され、逆に H2 細胞は抑制された。この調節信号は秒以下単位で細胞の活動を調節していた。この信号は、ハエが速い速度で前進している際に、自己運動により生じる前進方向オプティックフローに対し活性される HS 細胞の役割を高めていると考えられる。つまり、特にハエが速い速度で前進している際に、特に HS 細胞が歩行軌跡の回転方向への逸脱の補正に寄与していると考えられる。これを裏付けるために、ハエがトレッドミル上で前進している際に片側 HS 細胞を一時的に抑制する実験を試みた。まず、オプトジェネティクスを用いて、HS 細胞に抑制性光感受性チャネル GtACR を発現させ、対物レンズを通して光照射することで片側の HS 細胞抑制を試みた (Fig. 2A)。クローズドループ系を構築し、ハエが一定の期間前進している際に光照射を行った。予測されたように、ハエの歩行軌跡は照射側と反対側に逸れた (Fig. 2B, C)。コントロール群 (HS 細胞に GtACR を発現していないハエ) は、実験群に比べて歩行軌跡の逸脱は定量的に少なかったものの、実験群と同側に逸脱した。これは、光照射により生じる熱刺激による副作用と考えられる。

このオプトジェネティクスを用いた副作用を避けるために、別の方法として、ヒスタミン受容チャネル *ort* を HS 細胞に発現させ、HS 細胞の軸索に局所的にそして一時的にヒスタミンを注入することで片側の HS 細胞を一時的に抑制させた (Fig. 2D, E)。前述の実験と同様に、クローズドループ系でハエが一定の期間前進している際にヒスタミン注入を行った。予測されたように、ヒスタミン注入に際し、ハエの歩行軌跡は注入側と反対側に逸れた (Fig. 2F)。また、逸脱の度合いは、ハエの前進速度が速い場合に上昇した (Fig. 2G)。

結論として、本研究では、まず、H2 細胞が HS 細胞と同様に歩行回転信号を受容し、また、歩行回転信号と自己回転により生じるオプティックフローに対する信号を加算的に統合していることが分かった。片側 H2 細胞の活性はハエの同側回転を生じたことから、H2 細胞は HS 細胞と同様に、ハエが前進している際に歩行軌跡の逸脱に対し能動的に補正を行っていると考えられる。更に、HS 細胞と H2 細胞は前進歩行に対し反対の調節を受けていることが分かった。この方向性はハエの前進歩行により生じるオプティックフローに対するこれらの細胞の視覚応答の方向性と一致し、歩行信号が視覚フィードバック信号と回転方向、並進方向双方において動的に加算され、加算信号が下降神経回路に有効的に活用されていることを示唆する。また、このことから、ハエが速い速度で前進している際には、HS 細胞が主に歩行軌跡の逸脱の補正を行っていると考えられる。このことは HS 細胞を一時的に抑制する実験で裏付けられた。これらの結果ら、本研究は、複数感覚信号を統合し、歩行状態 (前進歩行速度) に依存して、細かな時間スケールで歩行を動的に調節する神経基盤を解明した。

これらの結果を博士課程学生が行った行動実験結果と合わせて論文にまとめ、国際誌及びバイオアーカイブに投稿した。

参考文献

Terufumi Fujiwara, Tomás L. Cruz, James P. Bohnslav, & M. Eugenia Chiappe. A faithful internal representation of walking movements in the *Drosophila* visual system. *Nature neuroscience*, 20, 72-81, 2017

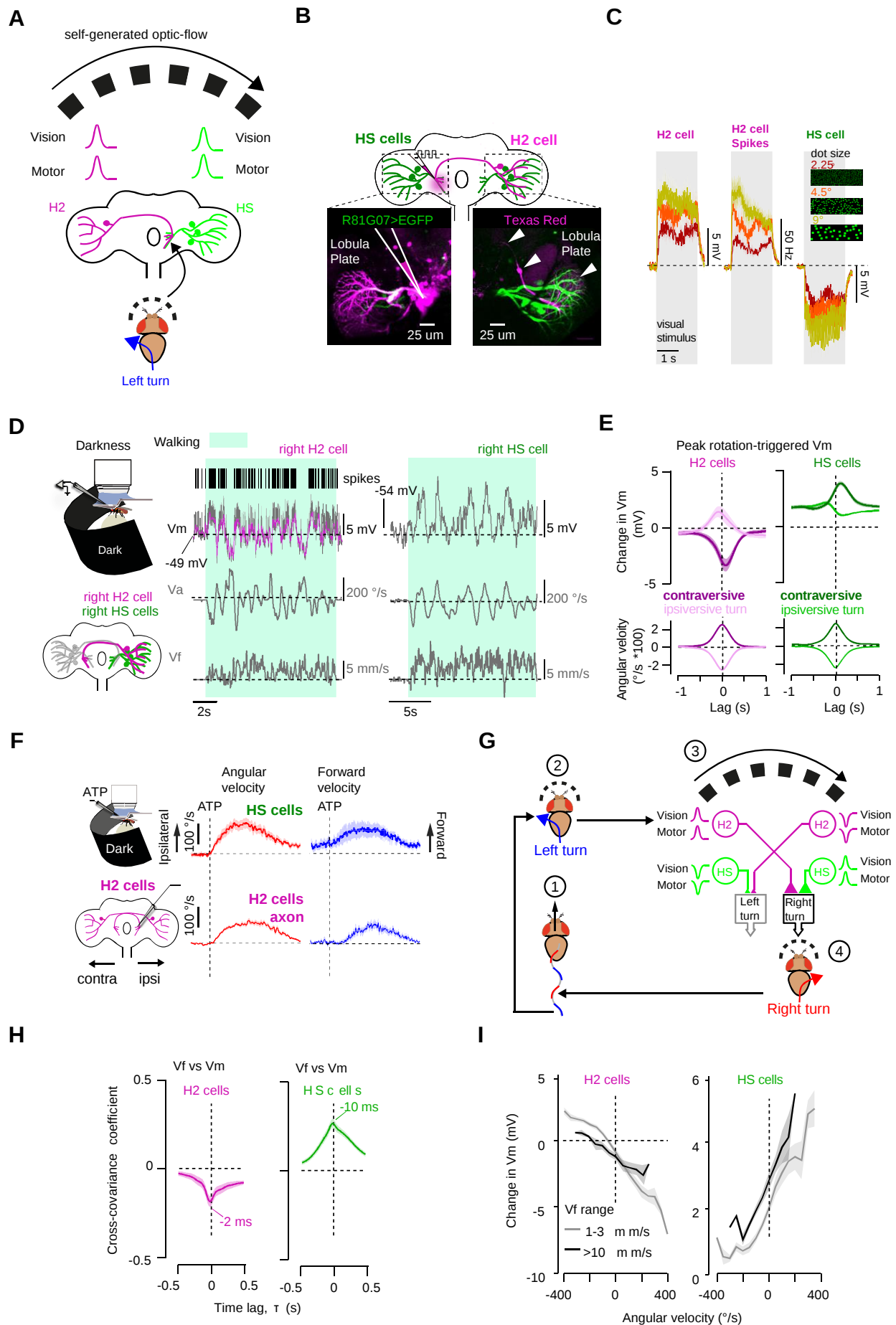


Figure 1. A. Schematic diagram of visual and walking signals on HS- and H2-cells. Both HS- and H2-cells integrate visual and motor-related signals congruently. **B.** Top, schematic of Texas Red electroporation at the axons of HS cell (green), to identify a putative H2 cell (magenta). Bottom, a two-photon image stack projection after electroporation at the left-side axon terminals (left image) shows a single, putative H2 cell with contralateral soma and dendritic projections in the right lobula plate (right image, magenta cell, arrowheads; green cells: GFP expressing left-side HS cells). **C.** Direction selective responses (regressive – progressive motion) of spiking H2 cells (N= 9 cells, left: subthreshold activity; middle: firing rate; mean ±

SEM, solid line and shaded, respectively), and of non-spiking HS cells (right, N=7 cells) to random dot stimuli of different sizes. Gray shades indicate the stimulation period. **D.** Top: schematic of the experimental setup (left), and of H2 and HS cells (right). Middle and bottom: Example segments of recordings in darkness of the cell's membrane potential (Vm), and a fly's angular (Va) and forward (Vf) velocities for a right-side H2 cell (middle), and for a right-side HS cell (bottom). The green shade indicates walking. For H2, the subthreshold Vm, and the spikes are indicated in magenta and with ticks, respectively. **E.** Vm triggered at the peak of ipsiversive or contraversive fly rotations (bottom traces) for H2 (left, magenta, n=16 cells) and for HS cells (right, green, n=25 cells). **F.** Unilateral application of ATP and its effect on the angular (Va) and forward (Vf) velocities of a walking fly. Top: ATP application at the axon terminals of HS cells (n=18); bottom: at the axon terminals of H2 cells (n=14). **G.** A proposal function of optic-flow processing circuit. When a walking path of a fly (①) is deviated toward left (②), the concerted neural dynamics (③) promotes the fly turn toward right in a quantitative manner (④), thereby compensating the angular deviation. **H.** Cross-covariance analysis between the fly's forward velocity and the Vm of H2 (left, magenta, n=16 cells) or HS cells (right, green, n=25 cells) in recordings performed in darkness. **I.** Change in Vm (relative to quiescence) as a function of the fly's angular velocity during low (1-3 mm/s, light gray), or high (>10 mm/s, dark gray) forward speed for H2 (left, n= 9 cells) or HS cells (right, n= 9 cells). Data are presented as the mean $\pm$ SEM.

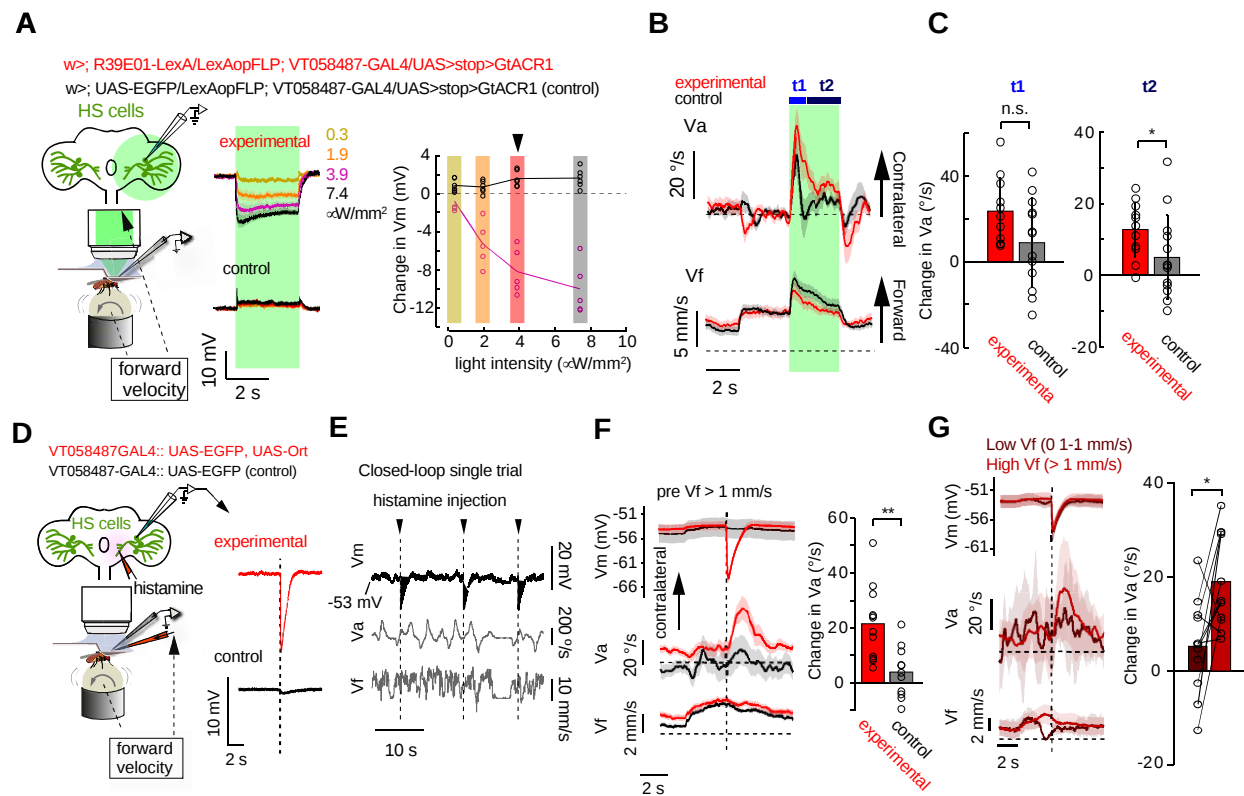


Figure 2. **A.** Experimental paradigm: a 530-nm light was projected onto one side of the brain, conditioned to the forward velocity of a walking fly. Middle: change in Vm in HS cells (mean $\pm$ SEM, 10 trials per fly) to different light intensities in experimental (top, n = 5 cells) or control (bottom, n = 4 cells) flies. Right: change in Vm before and after light stimulation (mean value) as a function of light intensity, in experimental (red) or control (black) flies. The arrowhead indicates the intensity used for closed-loop experiments. **B.** Conditional silencing experiment. Mean angular (Va) or forward (Vf) velocity traces (mean $\pm$ SEM, experimental flies: red, n = 11 cells; control flies: black, n = 13 flies) triggered at the onset of illumination. **C.** Change in angular velocity upon light illumination for experimental (red) or control (black) flies. The first second (t1, left) or the following 2 seconds (t2, right) from the stimulus onset were used for the quantification (*: p < 0.05, Wilcoxon rank-sum test). **D.** (Left) Experimental paradigm. (Right) The membrane potential (Vm) of HS cells (mean $\pm$ SEM, 10 averaged trials per fly) upon local application of histamine in experimental (red, top, N = 12 flies) or control flies not expressing *ort* artificially (black, bottom, N = 10 flies). **E.** Example segment of simultaneously recorded Vm, Va and Vf. The arrowheads and dashed lines indicate conditional histamine injections. **F.** (Left) The mean $\pm$ SEM of the Vm (n = 7 for experimental flies, n = 6 for control flies), Va and Vf in experimental (red, N=12 flies) or control flies (black, N=10 flies) upon conditional histamine injections. Note that Vm is reported for a subset of flies in which the whole-cell condition lasted until the end of the experiment. (Right) Change in Va before and after histamine injection in experimental (red) or control flies (black). **: p = 0.002, Wilcoxon rank-sum test. **G.** Similar to (F) with the analysis divided into low (dark red) or high (light red) Vf for experimental flies (n=11 flies). *: p = 0.02, Wilcoxon signed-rank test.