

論文の内容の要旨

Studies on a role for prior activity in olfactory behavior of *Drosophila* larvae

(ショウジョウバエ幼虫の嗅覚行動における神経活動履歴の役割に関する研究)

歌代 奈和

生物は外部刺激に応じて行動することができる。この時、神経細胞は刺激に応じて活動する。しかし実際には、特定の行動を引き起こす外部刺激を受容する以前から、神経細胞は活動している。この刺激に先立つ神経活動の履歴を **prior activity** と呼ぶ。このような **prior activity** は様々な脳領域で観察され、刺激に対する神経応答を変化させる可能性があることが示唆されてきた。しかし、**prior activity** の遺伝学的な制御が難しいことから、**prior activity** が生物の行動において果たす役割は解明されていなかった。本研究では、**prior activity** が生物の行動に与える影響を明らかにするため、ショウジョウバエ幼虫の嗅神経細胞に着目した。この嗅神経細胞の神経活動と行動との関係は詳細に調べられており、神経活動の変化と行動の変化とを対応付けられる。この利点を生かし、嗅神経細胞の **prior activity** が変化した時に、幼虫の刺激に対する行動がどのように変化するか検討した。その結果、嗅神経細胞の **prior activity** が減少した変異体幼虫において、刺激に対する行動が変化した。このような幼虫の嗅神経細胞は刺激に対する神経応答もまた変化していた。さらに、**prior activity** のどのような特徴が生物の行動を変化させることができるのか検討するため、**prior activity** を遺伝学的に制御するためのツールの開発を試みた。以上の結果から、本研究は **prior activity** が生物の感覚情報処理と行動に対して与え得る影響を明らかにした。

序論

神経細胞は特定の行動を引き起こすような外部刺激を受容する以前から活動している。この刺激に先立つ神経活動の履歴である **prior activity** は、感覚神経細胞に加えて、大脳皮質や海馬の神経細胞においても観察されている (Arieli et al., 1995; Luczak et al., 2013; Romano et al., 2015)。例えば嗅覚系において、神経細胞は環境中に存在する匂い物質に常に晒されている。また、そのような環境中の刺激がない状況においても、神経細胞は自発的に活動している。これまでに、これら **prior activity** の状態によって、刺激に対する神経応答が変化する可能性が示唆されてきた (Azouz et al., 1999)。しかし、**prior activity** の制御が難しいために、**prior activity** の感覚情報処理における役割や、その結果として行動に与える影響は十分に評価できていなかった。

私はショウジョウバエ幼虫の匂いを受容する一次神経細胞である嗅神経細胞は、**prior activity** と生物の行動との関係を調べるのに適したモデルとなり得ると考えた。嗅神経細胞はにおいの情報を伝達する一次感覚神経細胞である。各嗅神経細胞は嗅覚受容体 (OR) とその共受容体 **Orco** を発現している。これらの受容体は複合体チャネルを形成し、嗅神経細胞のにおいに対する応答性や神経生理的な性質を決める (Hallem et al., 2004)。嗅神経細胞を1細胞レベルで活性化すると、典型的な誘引行動または忌避行動が誘導される (Bellmann et al., 2010; Fishilevich et al., 2005; Semmelhack et al., 2009)。そのため、この系を利用すれば、**prior activity** を変化させた時の影響を、典型的な行動の変化として検出できると考えた。また重要なことに、ショウジョウバエ成虫の嗅覚受容体が樹状突起に局在しない **Orco** 変異体において、嗅神経細胞の自発発火が減少すると報告されている (Larsson et al., 2004)。そのため、本研究では、まず、**Orco** の変異体を利用して、**prior activity** の影響を評価することができる新たなモデル系を作ることを目指した。

結果

1. 嗅神経細胞の **prior activity** に寄与する分子の同定

嗅神経細胞の **prior activity** を制御し行動への影響を検討するため、嗅神経細胞の **prior activity** に寄与する分子の同定を試みた。各嗅神経細胞は細胞特異的な **prior activity** の頻度を示す。そのため、各嗅神経細胞特異的な分子が **prior activity** に寄与すると考え、嗅覚

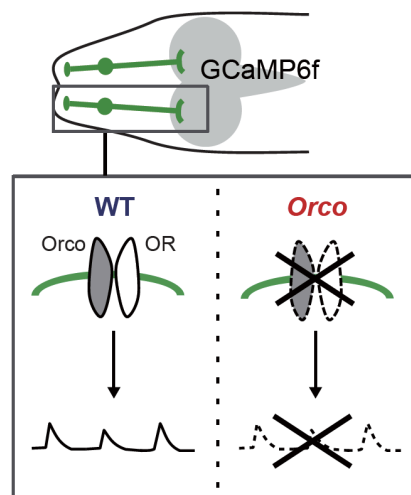


Fig. 1 嗅神経細胞の **prior activity**
幼虫の頭部の模式図。嗅神経細胞はカルシウムインジゲータ **GCaMP6f** を発現している (緑)。嗅神経細胞において **Orco** と **OR** は陽イオンチャネルを形成する。野生型 (WT) の嗅神経細胞では、**ORNs** の **prior activity** が観察される。一方、**Orco** 変異体の嗅神経細胞では、**prior activity** が観察されない。

受容体複合体に着目した。嗅神経細胞の *prior activity* を観察するため、*ex vivo* カルシウムイメージング法を確立した。その結果、嗅覚受容体複合体が形成されない *Orco* 変異体において、嗅神経細胞の *prior activity* の頻度が低下することを確認した(Fig1BC)。さらに、*Orco* 変異体の嗅神経細胞において、*Orco* の発現を1細胞レベルで回復すると、嗅神経細胞の *prior activity* の頻度が回復した(Fig1C)。以上の結果から嗅神経細胞の *prior activity* には各細胞が発現する嗅覚受容体複合体が重要であることを明らかにした。

2. *Orco* 変異体の刺激に対する行動の解析

Orco 変異体において、嗅神経細胞の *prior activity* が減少する。そのため、*Orco* 変異体の行動と野生型の行動とを比較すれば、嗅神経細胞の *prior activity* の行動への寄与を検討できると考えた。そこで、*Orco* 変異体の刺激に対する行動を観察するため、嗅神経細胞を光遺伝学的に活性化させた。光遺伝学的に嗅神経細胞を刺激すると、野生型の幼虫は刺激光が当たる領域に誘引された(Fig. 2A)。それに対し、*Orco* 変異体は、刺激光に対する誘引行動が減弱した(Fig2B 下)。

さらに、これらの行動の変化は刺激光が当たる領域と当たらない領域の境界における行動の変化によってもたらされること示した。以上の結果から、嗅神経細胞の *prior activity* が減弱した *Orco* 変異体において嗅神経細胞の刺激によって誘起される行動が変化することを発見した (Fig. 2A)。

3. *Orco* 変異体における刺激に対する神経応答の解析

嗅神経細胞の *prior activity* が減弱した変異体において、嗅神経細胞の刺激に対する応答がどのように変化するか検討するため、嗅神経細胞の刺激に対する応答を観察した。持続的な刺激に対して、WT の ORN の応答は揺らぎながらも、一定のレベルを保っていた(Fig. 2B 右)。一方、*Orco* 変異体の嗅神経細胞は刺激開始直後には野生型よりも強く刺激に応答するが、その後、徐々に応答が減弱した(Fig. 2B 左)。さらに、*Orco* 変異体では、嗅神経細胞とシナプス結合する細胞においても刺激に対する応答が変化していた。これらの結果か

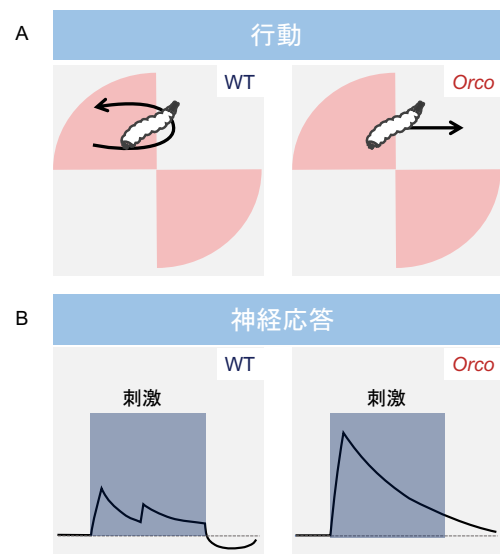


Fig. 2 *Orco* 変異体における刺激に対する行動と神経応答の変化

(A) 光活性化チャネルを嗅神経細胞に発現させた幼虫の行動。野生型幼虫 (WT) は境界領域において、刺激光の当たる領域へとターンする傾向があるが、*Orco* 変異体幼虫は、ターンせず、刺激光の当たらない領域へと出て行く傾向がある。

(B) 光活性化チャネルを発現させた野生型 (WT) と *Orco* 変異体の嗅神経細胞の刺激光に対する応答の典型例。縦軸はカルシウム変化率の強度、横軸は時間を表す。光刺激は黒い影で、ベースラインの活動レベルを破線で表す。

ら、*Orco* 変異体では刺激に対する応答が神経回路レベルで変化していることを見出した。

4. Prior activity の新規制御ツールの開発

Prior activity を増加させた時、刺激に対する行動がどのように変化するか検討するため、prior activity の制御ツールの開発を試みた。嗅覚受容体複合体は嗅神経細胞の prior activity に寄与するため、他の細胞の prior activity もまた、変化させることができるのではないかと考えた。そこで、嗅覚受容体複合体の融合タンパク質を作成し、嗅覚系の 2 次神経細胞である投射神経細胞に発現させた。その結果、嗅覚受容体複合体融合タンパク質を発現させた投射神経細胞において prior activity の頻度が増加することがわかった。この結果から、嗅覚受容体複合体融合タンパク質は prior activity の頻度を変化させるツールとして応用できる可能性を示唆した。

考察

本研究において、嗅神経細胞の prior activity は嗅覚受容体複合体に依存することが明らかになった。また、嗅覚受容体複合体を形成できず、prior activity が減弱している嗅神経細胞を持つ *Orco* 変異体の幼虫は刺激に対する行動が変化することを示した。また、刺激に対する嗅神経細胞の応答は野生型よりも、むしろ *Orco* 変異体の方が強く、応答パターンも変化していた。さらに、*Orco* 変異体における刺激に対する応答の変化は嗅神経細胞とシナプス結合する細胞においても観察された。以上の結果から、本研究は prior activity は刺激に対する神経応答を修飾し、最終的な行動を変化させる可能性を示唆した。これらの結果に加えて、嗅覚受容体複合体融合タンパク質には嗅神経細胞以外の細胞においても prior activity を制御するツールとして応用できる可能性があることを示した。嗅覚受容体複合体について、嗅覚受容体複合体は特異的な頻度の自発発火をもたらす可能性やチャネルのイオン選択性変化させるような *Orco* の変異が示唆されている。そのため、異なる組み合わせの融合タンパク質の作製や、既知の *Orco* 変異導入を試みることによって、様々な頻度やパターンに prior activity を変化させるツールを開発できる可能性がある。将来的に、このようなツールを完成させることができれば、prior activity のどのような特徴が生物の行動に重要なのか検証できるだろう。