

東京大学大学院新領域創成科学研究科

複雑理工学専攻

2020 年度

修士論文

ショウジョウバエ幼虫の行動選択を制御する
コマンドニューロン軸索形態と機能の相関に関する研究

2020 年 2 月 19 日提出

指導教員 能瀬 聡直 教授

森瀬 周

1.要旨

外界からの刺激に対して適切な行動を取れるよう行動戦略を適応させることは動物の生存にとって極めて重要である。そのような反応を実装する神経回路には、外界からの刺激を受容する感覚ニューロンからの入力を分別し、適切な行動を取るよう然るべき出力を運動ニューロンに送る機能が備わっている。しかし、そのような回路がどのようにして個体発生や進化の過程で形作られるのかに関する理解は限られている。本研究では、遺伝学的技術が豊富なショウジョウバエの幼虫をモデル動物として活用し、この問題に取り組んだ。ショウジョウバエ幼虫は、頭部を触られると後退し、尾部を触られると前進するというような反応を一般に示す。また、その体は、頭側から尾側にかけて胸部に T1、T2、T3 体節、腹部に A1、A2、..., A8/9 体節を持つ繰り返し構造を持つ。更に、中枢神経系には脊椎動物における脊髄にあたる腹部神経節（VNC）という領域が存在し、体節に対応した神経分節が存在している。

一般に神経回路は正確で複雑なニューロン同士の配線により形成されており、この配線を形作る軸索誘導やシナプス形成のメカニズムについて多くの研究がなされている。しかし、軸索誘導によって形成されたネットワークの形状と機能の相関は未だ明らかになっていない。また、進化の過程で適応的な行動を実現するような特定の神経配線が形成される過程についても理解されていないことが多い。一方、外界刺激を特定の反応に結びつける回路において、少数のコマンドニューロンと呼ばれる介在ニューロンが中心的な役割を担っていることも多くの動物種で明らかになっている。コマンドニューロンの神経配線の変化は行動の変化に直結する可能性が高いので、その神経配線の仕組みを探ることで、軸索誘導等の神経配線の発生メカニズムを回路の機能に結びつけることができると考えられる。そこで、本研究では、ショウジョウバエ幼虫において前進・後退運動の選択を制御するコマンドニューロンに着目し、その配線機構と機能との相関を探った。

ショウジョウバエ幼虫において、触覚刺激に対する反応を司るコマンドニューロンである Wave ニューロンは VNC の各節に 1 対ずつ存在し、節ごとにその軸索の形状が異なる。また、尾部に近いものを刺激すると前進を、頭部に近いものを刺激すると後退を惹起するというように、体節特異的な機能を持つこのように Wave ニューロンは体節特異的な軸索配線を介して異なる行動誘導を司ると考えられることから、回路の配線と機能を結びつけるのに特に適していると考えられた。そこで当研究室の先行研究において、Wave ニューロンの軸索誘導に関わる分子の探索が行われ、*Drosophila* Wnt4(DWnt4)と、その受容体 *Drosophila* Frizzled 2,4 (DFz2, 4) が同定された。このうち、DFz2, 4 の欠失が及ぼす軸索の形状への影響については個々の細胞レベルで評価されていたが、DWnt4 の欠失が及ぼす影響については部分的にしか調べられていなかったため、この 2 つの受容体がそれぞれどのようなリガンドと結合することで機能を果たしているのかが不明であった。そこで、DWnt4 の欠失を導入した幼虫の中枢神経系を用いて、一細胞形態解析を行い、受容体と同

様の表現型を確認した。このことから、DFz2, 4 は DWnt4 を介して Wave ニューロンの軸索誘導を行うことが示された。

また、Wave ニューロンの配線の変化がその行動制御における機能にどのような影響を及ぼすのかを調べるため、頭部への触覚刺激に対して幼虫が後退運動をする過程に着目した研究を行った。このため Wave ニューロンを特異的に胚発生の時期から DFz2 の機能を欠失させた幼虫と正常の幼虫において、頭部を Von Frey フィラメントで刺激し、したがって頭側の Wave ニューロンを活性化した際の反応を評価・定量し行動戦略が変わっているか調べた。その結果、DFz2 の欠失によって、反応の頻度自体は変化しない一方で、後退運動が減少し方向転換が増加するという行動戦略の変化が確認された。以上の結果は、コマンドニューロンの軸索配線の変化が行動制御という神経回路の機能の変化に直接つながることを示唆するものである。

今後は、Wave ニューロン全体ではなく、一部のみを無傷の状態で活性化できるような遺伝的ツール等を用いてより高い精度で軸索誘導異常が行動へ及ぼす影響について調べ、神経回路の機能と行動の相関についての理解を深め、ひいては進化における行動戦略の適応的な変化の過程についての知見を得たい。

2. イントロダクション

2.1. 運動と神経系

この節ではニューロンの構造や、軸索誘導のメカニズムについて概説する。

2.1.1. ニューロンについて

動物の運動は全て脳神経系によって制御されている。脳神経系を構成するニューロンは下流のニューロンや筋肉に情報を送信する軸索、上流のニューロンから情報を受信する樹状突起、遺伝情報を保持する核などが存在する細胞体から成る細胞である（図 1）。ニューロン同士が複雑かつ正確に連結することでネットワークを形成し、多種多様で精密な運動制御を実現している。

ニューロンは更に、感覚ニューロン、運動ニューロン、介在ニューロンの 3 種類に分類できる。感覚ニューロンは外界からの刺激の受信、運動ニューロンは筋肉への出力、介在ニューロンは感覚ニューロンからの情報の統合や運動ニューロンへの情報送信をそれぞれ担っている。種類に依らず、ニューロンは非活動時には細胞膜に存在するイオン交換ポンプの働きにより、膜電位は静止電位と呼ばれる電位を保っている。しかし、外界からの刺激や上流のニューロンからの信号を受け取ると脱分極が起こり、膜電位が上昇する。この際、電位が閾値以上まで上昇することで、電位依存性 Na^+ チャネル、 K^+ チャネルの開閉によって一過性の電位上昇が起こり、活動電位が生じる（図 2）。これが、ニューロンが活性化した状態であり、この興奮がシナプスによって他のニューロンに伝播することで情報の伝達が行われる。

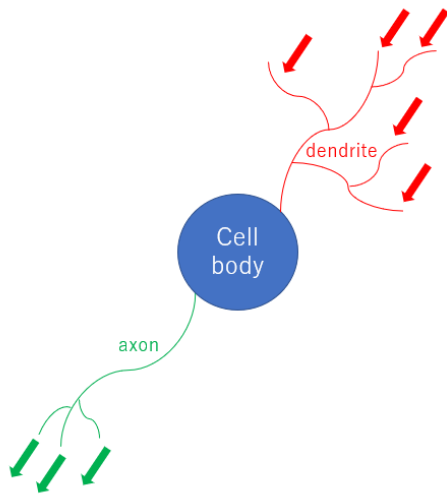


図 1.ニューロンの模式図

ニューロンの形態を表した模式図。赤色部分が樹状突起 (dendrite)、青色部分が細胞体 (cell body)、緑色部分が軸索 (axon) を表す。樹状突起で他の細胞から情報を受け取り、細胞体を通じて軸索からまた他の細胞へ情報を伝達する。

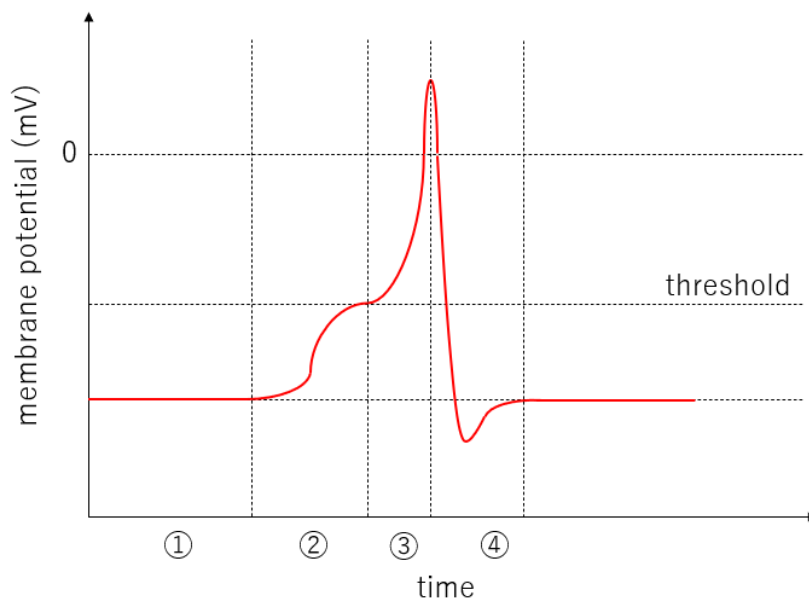


図 2.膜電位の推移の模式図

ニューロンが活動していない時は静止膜電位を保っている (①)。しかし、十分な強度の入力が入り、膜電位が閾値以上まで上がる (②) と、一斉に電位依存性 Na^+ チャンネルが開いて細胞内に Na^+ が流入することで膜電位が急激に上昇する (③)。そして、 K^+ チャンネルが開き、 Na^+ チャンネルが閉じると、細胞内に多く存在していた K^+ が細胞外へと流出して膜電位は速やかに低下して一時的に静止膜電位より低下してから静止膜電位に戻る (④)。

2.1.2. 軸索誘導メカニズムについて

神経回路が機能するためには、各ニューロンと、その標的ニューロンとが特異的かつ正確な配線を形成することが不可欠である。この配線は動物の発生過程において、ニューロンが適切なパートナーに向けて正しく軸索を伸長することで形成される。最近の研究により、この過程は以下のような分子メカニズムにより制御されることが明らかになっている。すなわち、その先端にある成長円錐と呼ばれる構造が移動して軸索を牽引することで実現される。成長円錐の移動方向は自律的に決定されるわけではなく、成長円錐が牽引している細胞周辺に存在する軸索ガイダンス因子が、ガイダンス因子を検知するための受容体分子を通じて誘引的あるいは忌避的に成長円錐に働きかけることで、成長円錐の移動方向が決定される（図3）。

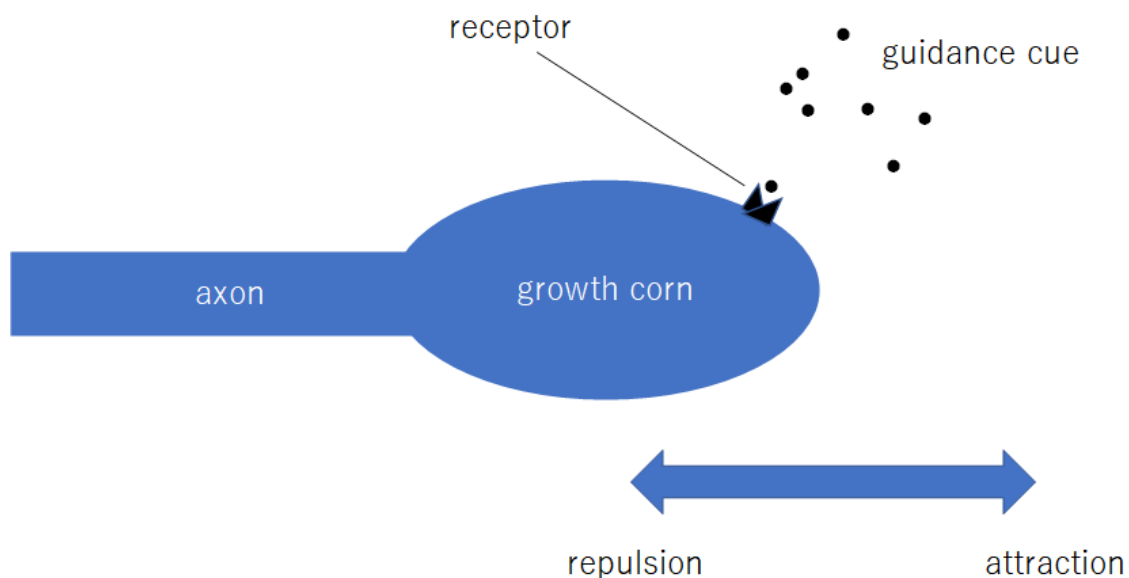


図3：軸索誘導の模式図

軸索の先端の成長円錐という構造物が、軸索誘導因子を受容体で検知し、それによって伸長方向を定める。

2.2. コマンドニューロン説

動物は、外界からの刺激を適切に分別して様々な反応を示す。例えば、ザリガニは頭部を触られると、後方に跳ね、尾部を触られると上方に跳ねるというように同じ触覚刺激であっても、その部位に応じて違った反応を示す（Takagi and Nose, 2019）。動物種によって刺激と反応の組み合わせは様々であるが、外界刺激を適切に識別して反応するという情報処理の過程は動物に普遍的なものである。この過程を担う回路において、コマンドニューロンと

呼ばれる特定の介在ニューロンが、回路の上流で識別された入力を行動という出力に変換する上で特に重要な役割を果たしているということが様々な動物種における先行研究によって示されている (Bouvier et al., 2015; Kupfermann and Weiss, 1978; Wiersma and Ikeda, 1964)。

2.3. モデル動物としてのショウジョウバエ

2.3.1. ショウジョウバエの歴史

遺伝学者である Thomas Hunt Morgan の研究がショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) のモデル動物としての始まりである。Morgan はライフサイクルが早く、変異体を比較的容易に作成できる特長に着目してショウジョウバエをモデル動物として用い、遺伝子の染色体理論を証明して 1933 年にノーベル生理学・医学賞を受賞した。その後も、ショウジョウバエは強力なモデル動物として使われ続け、その結果として多くの遺伝子操作のツールが蓄積している。特に本研究の対象である神経科学においては、神経細胞への多様な遺伝子操作が行いやすいことがショウジョウバエの大きな利点となっている。また、脳神経系の構造や行動が比較的単純で画一的であることも運動系の研究のモデル動物として優れた特徴である。

ショウジョウバエ幼虫は、頭側から尾側にかけて胸部に T1, T2, T3 体節、腹部に A1, A2, ..., A8/9 体節を持つような体構造を持つ。更に、中枢神経系には脊椎動物における脊髄にあたる腹部神経節 (VNC) という領域が存在し、体節に対応した神経分節が存在し、各分節に対応する体節の筋肉を制御する (図 4)。

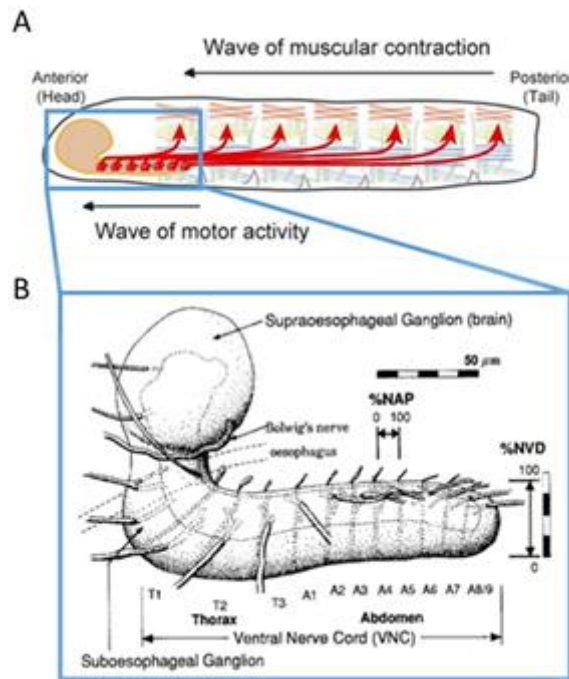


図 4. ショウジョウバエ幼虫の体および神経系の構造 (A. cited from Kohsaka et al., 2012, B. cited from Ito et al., 1995)

中枢神経は脳、Subesophageal zone、腹部神経節（VNC）から構成される。VNC は節構造をとっており対応する体節を制御する。

2.3.2. ショウジョウバエを用いた運動系の研究の概説

これまでに当研究室および他の研究室で行われていたショウジョウバエ幼虫を用いた運動系の研究を、そこで用いられている手法を含めて解説する。当研究室では、ショウジョウバエ幼虫の神経系において、運動ニューロンの上流に位置して特定の運動を惹起するような機能を持ち、したがって運動を制御する上で重要な役割を果たすと考えられるニューロンを同定し、その回路構造を明らかにし、さらに運動制御における役割を調べることで、運動制御のシステムを細胞レベルではなく回路レベルで理解することを目指している。

そのための一つのアプローチとして、遺伝子発現システムを介して特定のニューロンにのみ光作動性の陽イオンチャネルを発現させ、幼虫に光を照射してそのニューロンを活性化させ、その際に見られた行動様式の変化を評価することで、ニューロンの機能を推定するという研究を行っている。そのなかで、後退運動等の特定の運動を惹起するコマンドニューロンである Wave ニューロンが発見された。

また、注目したニューロンを、蛍光タンパク質を利用して抗体染色することでその配線の形態や位置、更には連結しているパートナーのニューロンを同定することも行っている。蛍

光タンパク質は、神経突起や細胞体の可視化の他にも、幼虫の神経系を露出した状態で神経活動の可視化を行うこともできる。

このように遺伝子操作を通じて、ニューロンの機能や形態、ネットワーク内での位置づけを評価することで、運動を制御する神経回路の理解を深めることが可能となっている。

2.4.本研究で用いられた手法について

2.3.2.節で触れられた手法のうち、本研究で用いられたものについて詳細に説明する。

2.4.1. 遺伝子発現システムについて

ショウジョウバエの研究に用いられる遺伝子発現システムの代表的なものとして、*GAL4/UAS*システムが挙げられる (Brand & Perrimon., 1993)。

酵母由来の転写因子である *GAL4* は *UAS*(Upstream Activation Sequence)という DNA 配列と結合することで、*UAS* 下流遺伝子の発現を誘導することができる。したがって、理論上は着目する細胞群を標的とする *GAL4* 系統と、希望する遺伝子的操作を実現する *UAS* 系統を用意し交配することで、次世代の個体において特定の細胞に特定の遺伝子操作を行うことができる (図 5)。

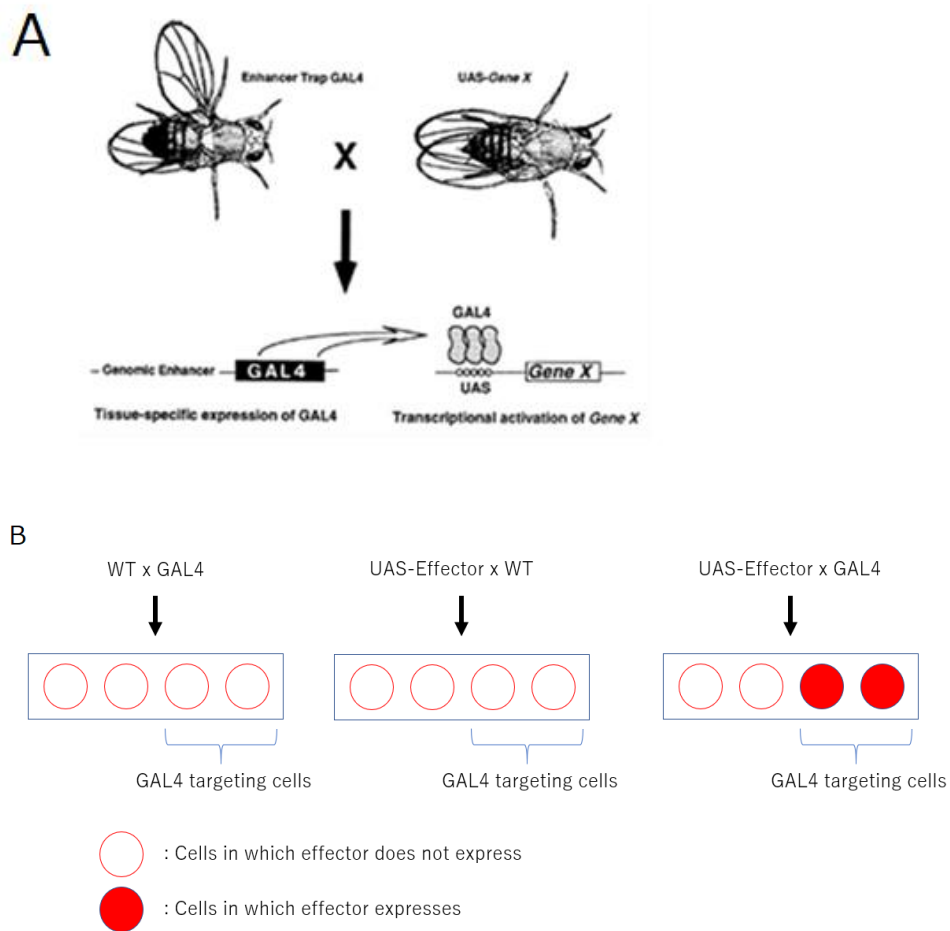


図 5. *GAL4/UAS* システムの概略図

(A), (B) *GAL4/UAS* システムの模式図。特定の細胞群に *GAL4* を発現させた *GAL4* システムと任意の遺伝子を *UAS* 下流に配列した *UAS* システムを掛け合わせることで次世代において *GAL4* 標的ニューロン群に任意の遺伝子を発現することが可能。*UAS* の下流の遺伝子は *GAL4* 存在下においてのみ転写翻訳が行われるため、分解能の高い遺伝子操作が可能となる。(A. cited from Brand and Perrimon, 1993)

2.4.2. 蛍光タンパク質について

蛍光タンパク質とは、励起光を吸収して蛍光を発するタンパク質のことである。神経科学において、蛍光タンパク質は、ニューロンの形態、位置の把握から、その活動の強度、頻度の観測まで様々な用途で用いられている。現在、蛍光タンパク質はその蛍光の波長の長短などに違いがある様々なバリエーションが存在するが、元々はオワンクラゲから分離精製された緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein, GFP）（Shimomura et al., 1962）が始まりである。GFP の発見後、遺伝子配列の決定や実用化が進み、改良及び発展に伴い、現在では広く研究で活用されている。

2.4.3. Optogenetics について

神経細胞の活動の計測や人為的な活性化の従来手段としては、電気生理学的手法があった。電気生理学的手法は、被験体の神経系を露出させた上で標的のニューロンに電極を刺して操作を行う手法である。この手法は、操作によって引き起こされる反応とニューロンの膜電位との直接的な対応を示すことができるというメリットがあるが、一方で、ニューロンに直接電極を刺すことに伴う神経系の損傷や、標的のニューロンに正しく電極を刺すことの困難さなど、デメリットも存在した。そういったデメリットを解消し自由度が高く、分解能の良い操作を実現するために開発されたのが Optogenetics である。この手法は、光感受性イオンチャネルを用いることで、特定の波長の光の照射によって神経系への物理的な損傷を伴わずに神経活動を亢進及び抑制することができる手法である（Yizhar et al., 2011）。

また、この手法をショウジョウバエ幼虫で用いる利点として、上記のものに加えて、幼虫の表皮及び組織は光を透過するため、幼虫の体に一切の物理的損傷を与えずに神経活動を操作することができ、神経活動の操作が運動に与える影響を直接観察できることが挙げられる。これを *GAL4/UAS* システムと組み合わせることで、光を神経系全体に照射しながら特定の細胞群だけを操作することも可能となる。本研究では、神経活動の亢進のための光作動性陽イオンチャネルとして CsChrimson を用いた。

CsChrimson は藻類である *Chlamydomonas subdivisa* から見つかった光感受性陽イオンチャネルである（Klapoetke et al., 2014）。CsChrimson は、All-trans-Retinal (ATR) の存在下で波長 600nm 付近の光に反応する（図 6）。*GAL4/UAS* システムと組み合わせることで特定の細胞群においてのみ CsChrimson を発現させることができる。CsChrimson を発現させた個体に 600nm 付近の光を照射することで CsChrimson を開口させることができ、それによって細胞膜内に陽イオンが流入し脱分極が起こることで CsChrimson を発現させた神経細胞の活動を亢進できる。

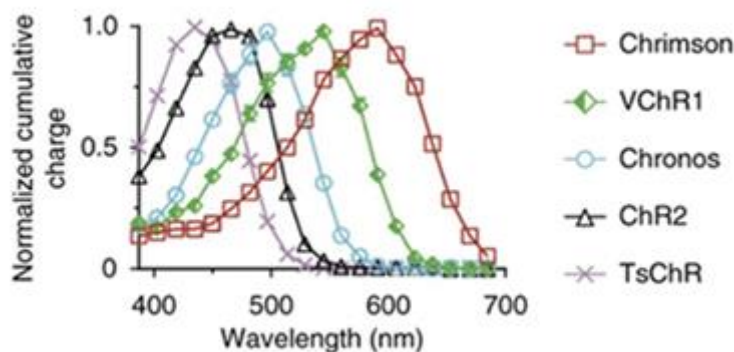


図 6.CsChrimson を含む光作動性イオンチャネルの光の波長と反応の強度の相関(Cited from Klapoetke et al., 2014)

CsChrimson は 600nm 付近の光に対して反応のピークがあることが見て取れる。イオンチャネル毎に反応する波長が異なるので、組み合わせることで柔軟な実験を行うことが可能である。

2.4.4. モザイク解析

GAL4/UAS システムは、理論上は望む細胞を標的とする *GAL4* 系統が用意できれば任意の細胞のみを操作の適用の対象とすることができる。一方で、望む細胞を標的に含む *GAL4* 系統が存在しても、そのみを含む系統が存在しないという問題がしばしば発生する。そういった場合に、標的ニューロンを減らすことができるモザイク解析が利用できる。モザイク解析では、確率的に一部の標的細胞においてのみ染色体組換え誘導因子である flippase の働きによって *UAS* の下流の停止配列が切除されて下流遺伝子が発現するようになる (図 7)。このため *GAL4/UAS* システムと、ヒートショックプロモーターの制御下におくことで熱を与えることで確率的に酵母由来の flippase (FLP) を発現する遺伝子コンストラクト、flippase の標的配列である FRT 配列の間に停止配列をもつ遺伝子コンストラクトを組み合わせる。本研究では、主としてニューロンの単一細胞形態解析を実行する際にモザイク解析を活用した。

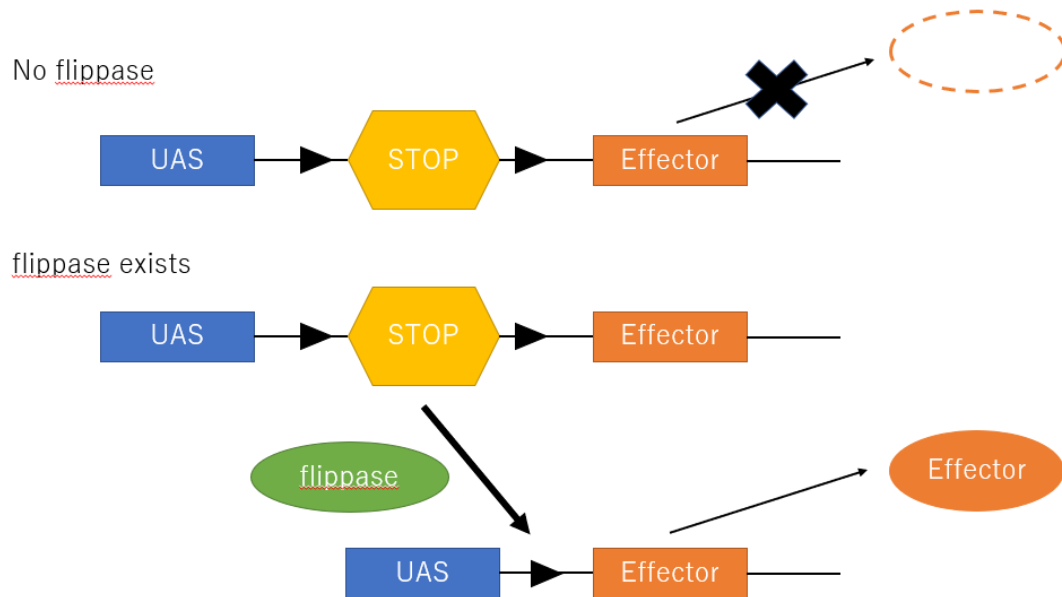


図 7.モザイク解析の原理の模式図

flippase が存在しなければ、*UAS* 配列の直下の転写停止配列によって転写が止まってしまうが、flippase が存在すれば、その働きによって、停止配列が切除され、*UAS* 配列の下流が転写されるようになる。熱刺激によって確率的に flippase が発現するようなメカニズムと組み合わせることで個体ごとに *GAL4* 標的細胞内で確率的に *UAS* の下流の遺伝子が発現するようになる。

2.5.Wave ニューロン

先行研究によって、ショウジョウバエ幼虫の触覚刺激に対する反応を司るコマンドニューロンとして Wave ニューロンが同定された (Takagi et al., 2017)。この節で機能的・形態的特徴などを含め先行研究で Wave ニューロンに関して明らかになったことについて説明する。

2.5.1.Wave ニューロンの機能と形態的特徴

Wave ニューロンはショウジョウバエ幼虫の腹部神経節の各節毎に 1 対ずつ存在し、前方に位置する細胞は後退運動を、後方に位置する細胞は前進運動を惹起するというように位置依存的に異なる機能を持つだけでなく、節ごとに異なる軸索・樹状突起の形状を持つニューロンである (図 8)。

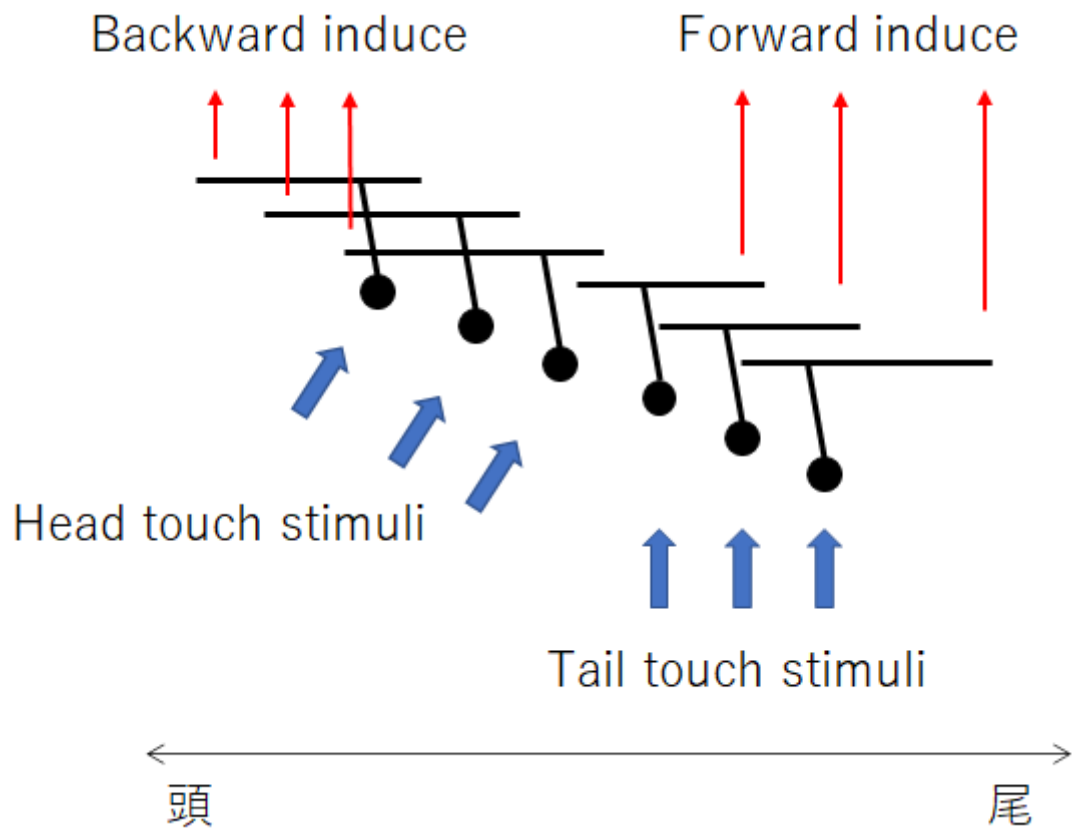


図 8. Wave ニューロンの配線の模式図

傾向として、前方の節にある Wave ニューロンは前方へ神経突起を伸ばし、後方の節にある Wave ニューロンは逆に後方へ神経突起を伸ばしている。

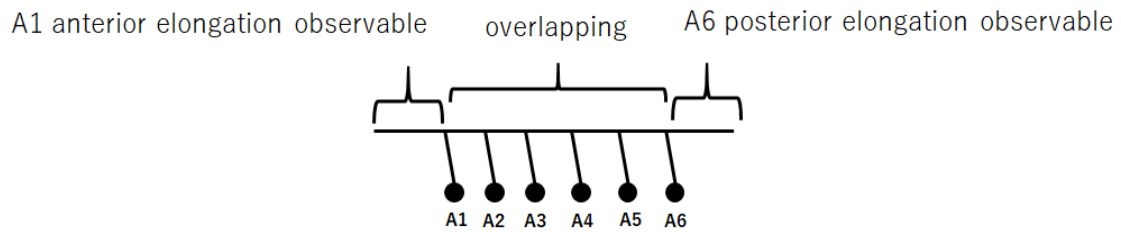
2.5.2. Wave ニューロンの行動選択回路における位置づけ

Wave ニューロンの上流には体表への触覚刺激を受容する MD III/IV クラスニューロンという感覚ニューロンが存在する。先行研究では A1 節にある Wave ニューロンの下流回路に存在するニューロンについて調べられているが、回転運動を惹起する介在ニューロンや、触覚刺激によって誘導される後退運動に関与する介在ニューロンが存在し、さらにそれらの下流に運動ニューロンが存在することが明らかになっている (Takagi et al., 2017)。

2.5.3.Wave ニューロンの軸索誘導メカニズム

Wave ニューロンの軸索誘導に関わる分子についても先行研究によって調べられている (Takagi et al. 2017)。これまでに、RNAi 法を介した遺伝子転写阻害 (ノックダウン) などを通じて、Wave ニューロンの軸索誘導に関わる受容体として、*Drosophila* Frizzled 2, 4 (DFz2, 4) が同定されている。特に DFz2 のノックダウン変異体においては、本来、前方に軸索を伸ばす前側の Wave ニューロンが後方へも軸索を伸長していた。また、これら受容体に結合し軸索を誘導するリガンド分子の候補として Wnt タンパク質ファミリーに属す *Drosophila* Wnt4 (DWnt4) が同定されている (図 9)。

(A)



(B)

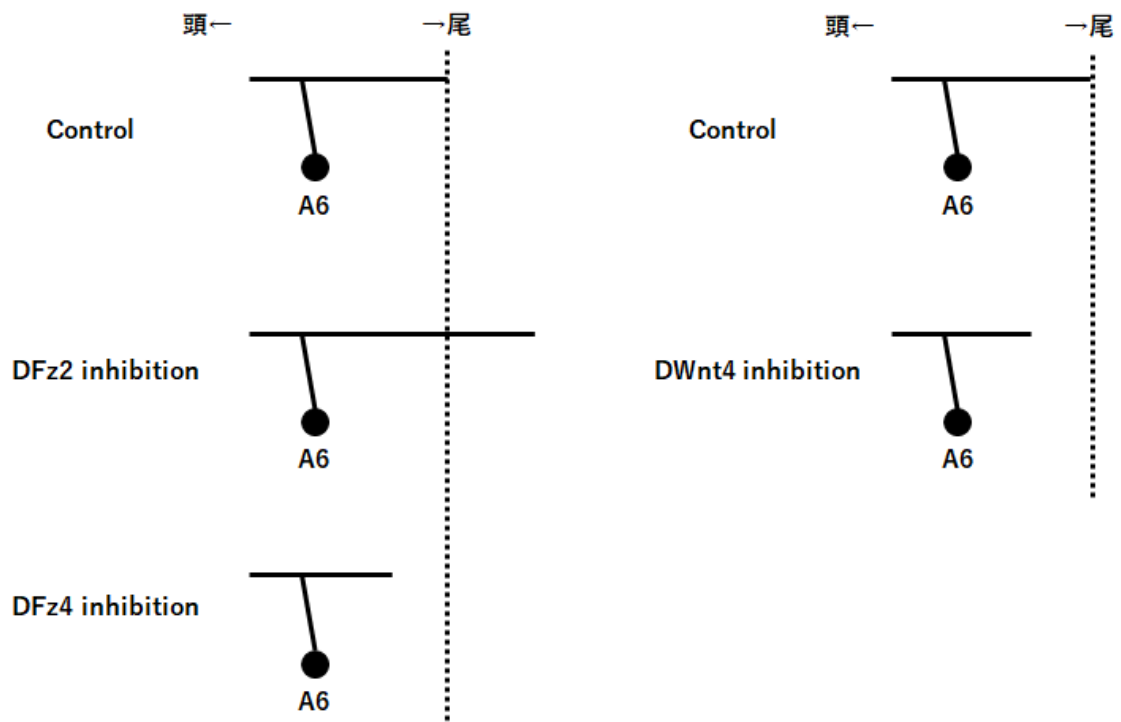


図 9.Wave ニューロンの軸索誘導因子同定のためのスクリーニング結果

いずれの図でも細胞体は黒丸で、軸索は水平に伸びた黒線で表現されている。

(A) 軸索の配線とその重複の模式図。A6 後方への投射は重複がなく、伸長の長短の比較する部位として適している。

(B) A6 後方へ投射された軸索の長さの模式図。野生型（左右上段）と比較して、DFz2 の欠失を導入した個体（左中段）ではより長く、DFz4 の欠失を導入した個体（左下段）では短くなっている。また、DWnt4 の欠失を導入した個体（右下段）の A6 後方への軸索投射を野生型（左右上段）と比較すると、DFz4 の欠失を導入した個体（左下段）と同様に投射が短くなっている。

神経突起の伸長の前後軸方向における極性が実現されるためには、誘導因子が前後軸方向において不均一に分布する必要がある (Kirszenblat et al., 2011; Lyukusyutova et al. 2003)。この仮説に一致して、胚発生期において、DWnt4 は尾側により多く存在するように分布していた (Takagi et al., unpublished) (図 10)。以上の観察から、尾部に偏って分布する DWnt4 が、DFz2 を発現する Wave 軸索に対して忌避的に作用すると考えられた。(Takagi et al., unpublished) (図 11,12)。更に、Wnt タンパク質ファミリーの受容体である Frizzled/Ryk は哺乳類や線形動物においても軸索の前後軸方向への誘導に寄与することが知られており (Hiliard and Bargman, 2006; Kirszenblat et al., 2011; Lyukusyutova et al., 2003)、種を越えて保存された分子機構により Wave ニューロンの軸索誘導が制御されていることが示唆された。

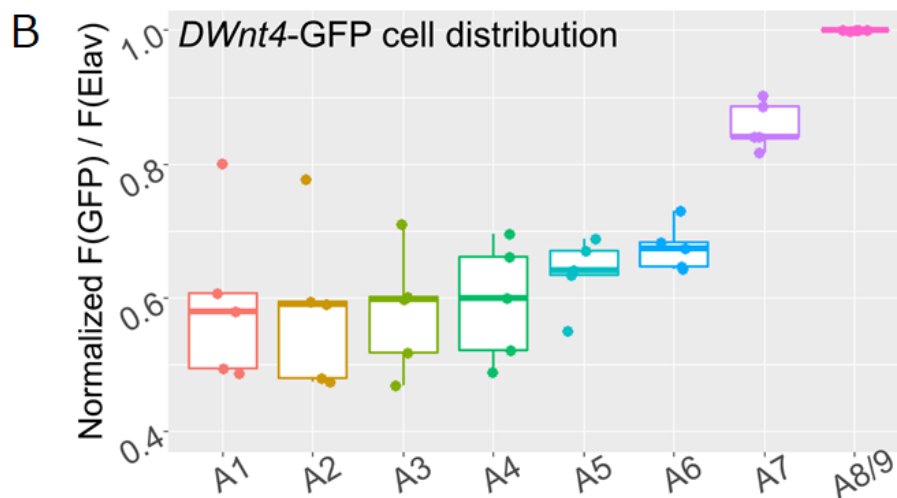
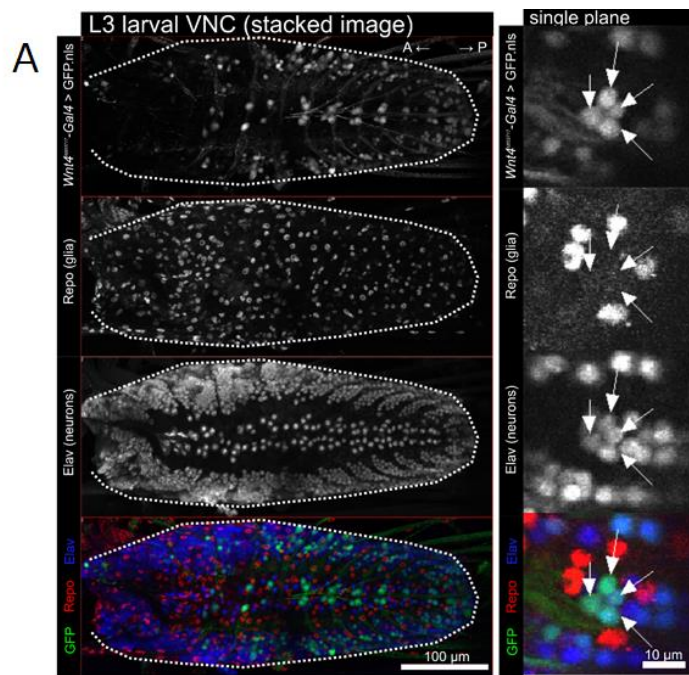


図 10.DWnt4 の胚発生期における分布の図 (Cited from Takagi et al., unpublished)

(A) 最上段が、DWnt4 を染色した図、2 段目がグリア細胞（神経系を構成するニューロン以外の細胞）を染色した図、3 段目がニューロンの細胞体を染色した図、最下段が上の 3 つの画像を複合した図である。細胞体に重なって Wnt4 が分布していることが見て取れる。

(B) DWnt4 を蛍光染色した際の蛍光強度とニューロンの細胞体を蛍光染色した際の蛍光強度の比を体節ごとに計算したもの。後部に Wnt4 が偏在していることが見て取れる。

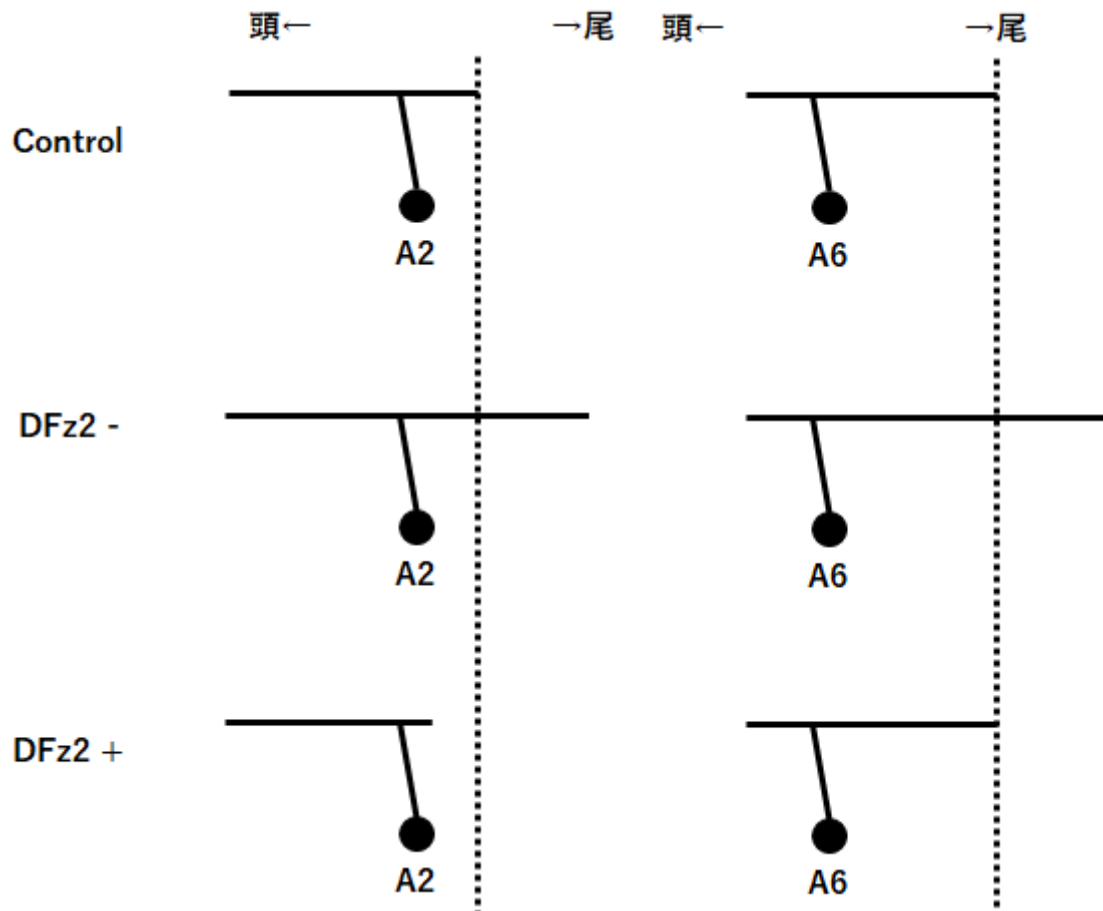
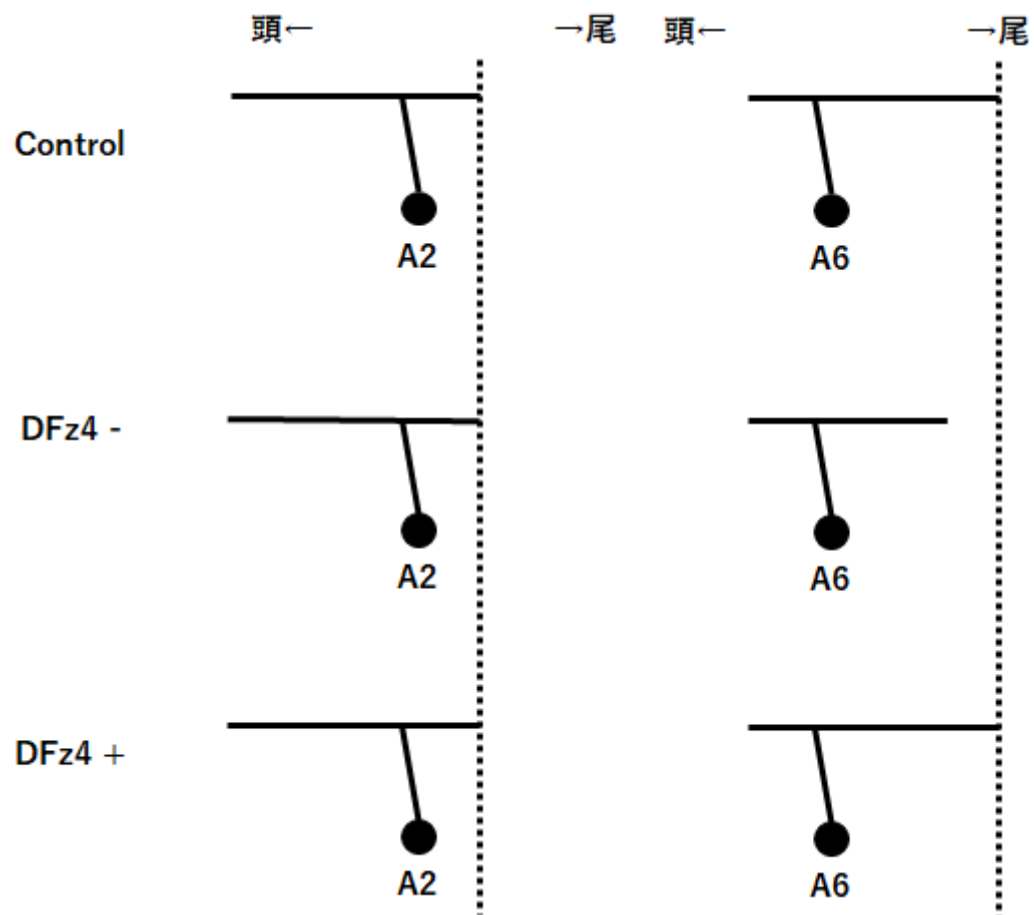


図 11.DFz2 のノックダウン及び過剰発現が軸索の伸長に及ぼす影響の模式図
細胞体が黒丸で、軸索が水平に伸びた黒線で示されている。上段が野生型、中段が DFz2 に欠失を導入した個体、下段が DFz2 の過剰発現を導入した個体を表す。
軸索の伸長の度合いに有意差があった部分のみを長く或いは短く表現している。統計検定は Welch の t test を Bonferroni の補正をかけて行った。

(A)



(B)

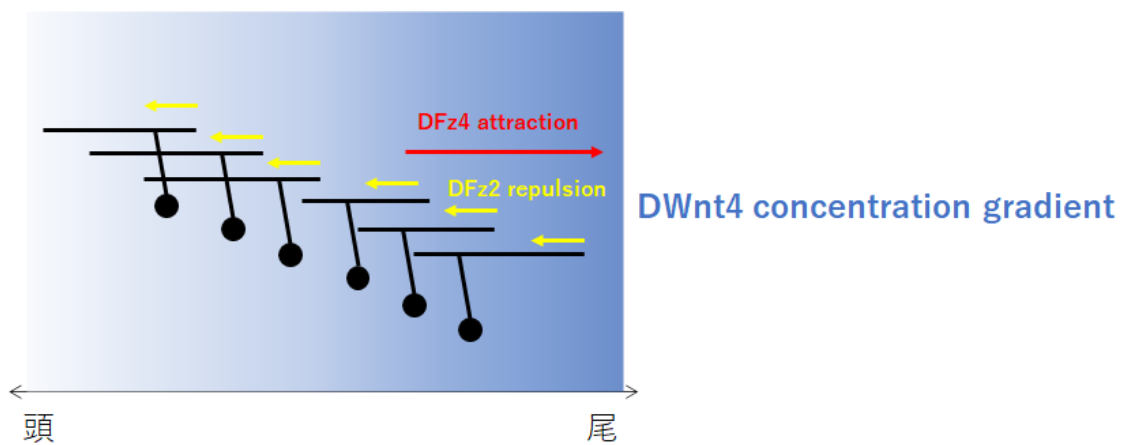


図 12.DFz4 のノックダウン及び過剰発現が軸索の伸長に及ぼす影響の模式図

(A)細胞体が黒丸で、軸索が水平に伸びた黒線で示されている。上段が野生型、中段が DFz4 に欠失を導入した個体、下段が DFz4 の過剰発現を導入した個体を表す。

軸索の伸長の度合いに有意差があった部分のみを長く或いは短く表現している。統計検定は Welch の t test を Bonferroni の補正をかけて行った。

(B)先行研究によって推定された DWnt4 及び DFz2, 4 を介した軸索誘導メカニズムの模式図。尾部に偏在する DWnt4 に対して、DFz2 が全体として忌避的に作用し、DFz4 が尾部においてのみ誘引的に作用することで軸索を誘導している。

2.5.4. Wave ニューロンの機能と形態の関係

DFz2 をノックダウンした個体においては、本来前方に軸索を伸ばし後退回路を誘導する前方の Wave ニューロンが、不適切に後方に軸索を伸ばしていた。この軸索伸長パターンは前進運動を誘発する後方の Wave ニューロンと類似している。この軸索伸長の変化によって、前方の Wave ニューロンが誘導する行動が後退から前進へと変化することはないだろうか。もしこれを示すことができれば、軸索伸長制御と回路の機能の関係を証明できる。このような動機に基づき、先行研究において、変異体において Optogenetics を用いて Wave ニューロンを活性化する実験が行われた。その結果、野生型と比較して統計的に有意に幼虫の前進運動が早くなっていることが明らかになった (Takagi et al., unpublished) (図 13)。速い前進運動は、尾部に触覚刺激を受けた際の反応、つまり後方に位置する Wave ニューロンが惹起された際の反応に対応するので、この結果は上記の仮説を支持するものである。しかし、この実験では書く体節に存在する Wave ニューロン全てを活性化しているので、前方の Wave ニューロンの軸索誘導の変化が行動誘導様式の変化の直接の原因となっているかに関しては曖昧さが残っていた。

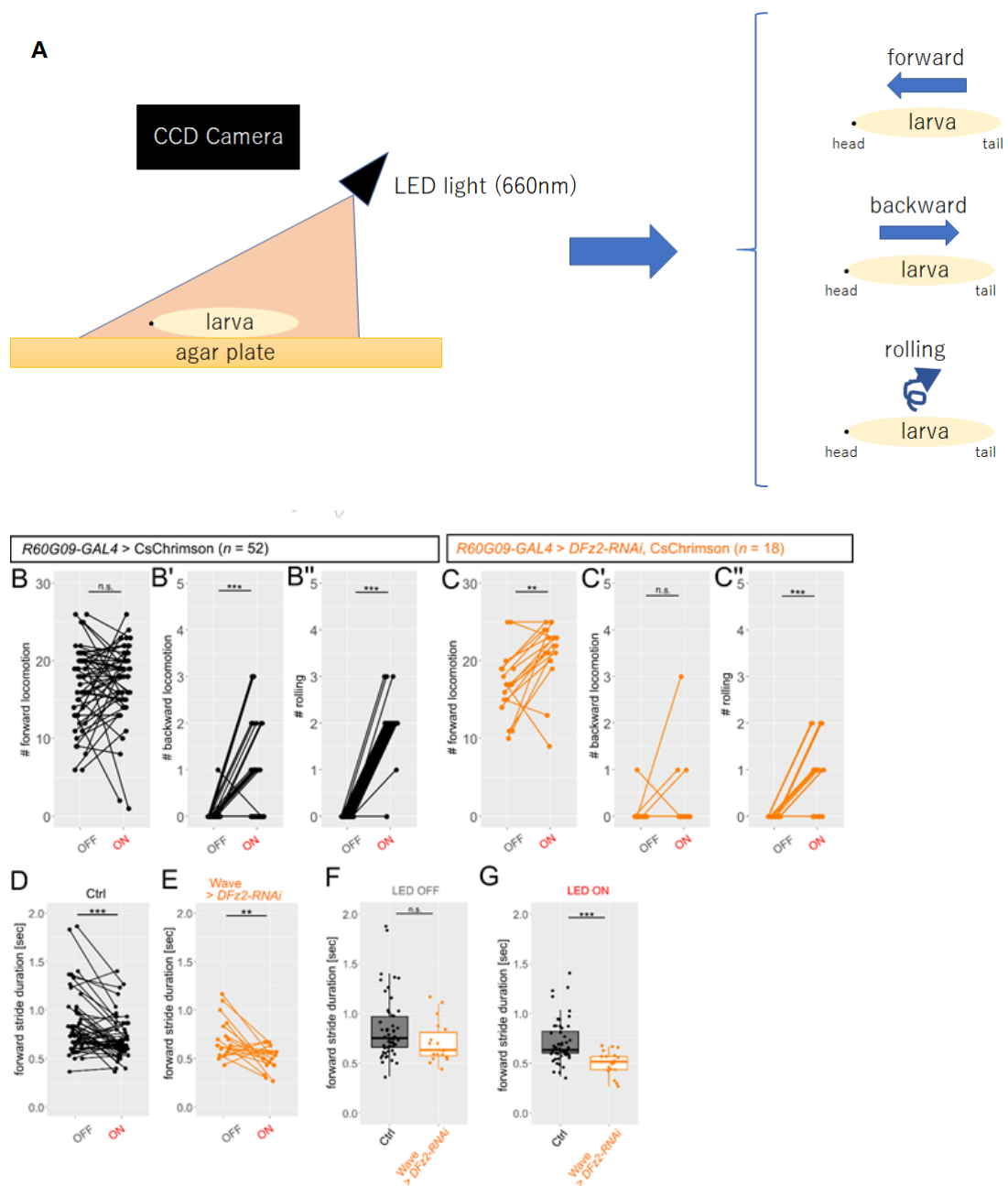


図 13.無傷状態での Wave ニューロンの活性化実験 ((B) - (G) cited from Takagi et al., unpublished)

(A) 実験の概略図。幼虫の表皮は薄いため、生きている状態でも照射された赤色光は充分透過して、光作動性イオンチャネルを作動させることができる。赤色光を一定時間照射した時の行動の回数などを定量した。

(B) - (B'') DFz2 のノックダウンを導入していない対照群における、赤色光の照射の有無による前進 (B)・後退 (B')・回転 (B'') の各行動の回数を比較したものである。統計検定として、Wilcoxon の符号順位検定を用いた。

(C) - (C'') DFz2 のノックダウンを導入した実験群における、赤色光の照射の有無による前進 (C)・後退 (C')・回転 (C'') の各行動の回数を比較したものである。統計検定として、Wilcoxon の符合順位検定を用いた。

(D) 対照群における前進運動 1 回あたりにかかる時間を赤色光の照射の有無で比較した。統計検定として、Wilcoxon の符合順位検定を用いた。

(E) 実験群における前進運動 1 回あたりにかかる時間を赤色光の照射の有無で比較した。統計検定として、Wilcoxon の符合順位検定を用いた。

(F) 赤色光の照射がない状態での前進運動 1 回あたりにかかる時間を対照群と実験群とで比較した。統計検定として、Wilcoxon の符合順位検定を用いた。

(G) 赤色光の照射がある状態での前進運動 1 回あたりにかかる時間を対照群と実験群とで比較した。統計検定として、Wilcoxon の符合順位検定を用いた。

2.6.本研究の目的

外界からの刺激に対して適切に反応し行動することは動物の生存にとって極めて重要なことである。本研究で用いたショウジョウバエ幼虫でも、頭部を触られれば後退し、尾部を触られれば前進するというように、触覚刺激に対して部位特異的に反応を示すことが観察される。

ショウジョウバエに限らず、動物一般において、外界からの刺激と行動を結びつける回路において、ニューロン同士の複雑で正確な連結が重要であることが分かっている。また、ニューロン同士の軸索誘導やシナプス形成のメカニズムについても、寄与する分子の同定も含め、理解が進んでいる。一方で、そのような神経配線によって形成された回路の形態と機能の相関については未だ理解されていないことが多い。また、進化の過程において回路が適応的に変化する際に、回路全体が協調的に変化するのか、それとも回路の重要な部位が局所的に変化するのかについても理解されていないことが多い。

本研究で着目している介在ニューロンである Wave ニューロンは、ショウジョウバエ幼虫においてその触覚刺激に対する部位特異的な反応を司るコマンドニューロンであることが知られている (Takagi et al., 2017)。また、Wave ニューロンの胚発生期における軸索誘導メカニズムについても先行研究で調べられており、軸索誘導因子 DWnt4 及びその受容体である DFz2, 4 の関与が明らかになっている (図 12K)。特に受容体である DFz2, 4 については、そのノックダウン変異体において、単一細胞レベルでの形態解析が行われ、Wave ニューロンの軸索制御における機能の詳細が明らかとなっている。しかし、DWnt4 の変異体については、Wave ニューロン全体としての形態の異常は明らかになっているものの、個々のニューロンレベルでの表現型は調べられていなかったため DWnt4 の作動機構及び DFz2, 4 との関係については不明であった (図 9F, G)。そこで、本研究では、まず、モザイク解析を用いて DWnt4 の変異体における単一 Wave ニューロンの形態を詳細に解析し、先行研究によって明らかになった DFz2, 4 のノックダウンによる軸索誘導異常と比較することで、DWnt4 の機能を探った。

一方、上記のように、Wave ニューロンの形態変化が行動様式の変化を伴うかについても先行研究において追求された。特に、DFz2 のノックダウンにおいて前方の Wave ニューロンの軸索配線が変化するのに伴い、誘導行動が本来の後退から前進へと変化した可能性が示唆されたが、頭側の Wave ニューロンのみを特異的に活性化させた実験ではなかったので曖昧な点が残っていた。そこで、本研究では幼虫の頭部を Von Frey フィラメントで突いて触覚刺激を与えることで頭側の Wave ニューロンを特異的に活性化する実験を行い、DFz2 のノックダウンによって頭側の Wave ニューロンの機能がどう変質しているかを確認した。

以上のように先行研究を補完することで、Wave ニューロンの軸索形態の変化と機能の変質の関係を確かめ、そこから、神経回路の適応が全体的な形態の変化を伴うのかそれとも局

所的な変化によって起こるのかといった神経回路の進化的な側面についても理解を深めることを本研究の最終的な目標とした。

3. 手法

3.1. 幼虫の解剖について

本研究では、DWnt4 の変異体導入によってどのように Wave ニューロンの形態が変化するかを蛍光染色によって観察する際に、その中枢神経を撮影のために露出させ、染色などの作業を行うために幼虫の解剖を行った。

幼虫の解剖は、顕微鏡を用いて幼虫を視界に捉えながら、ピンセット及びハサミを用いて行った。シリコンプレート上にまず幼虫を置き、背腹軸がプレートに対して垂直になり、かつ、体が真っ直ぐな状態になるように頭端と尾端を針で止め、TES バッファーで浸す。その後、背側の中心線に沿ってハサミを尾側から入れ、開いて、体内を露出させた後に、中枢神経を傷つけないようにしながら内臓を除去し、最後に体表を更に 2 本の針で固定して解剖が完了する (図 14)。

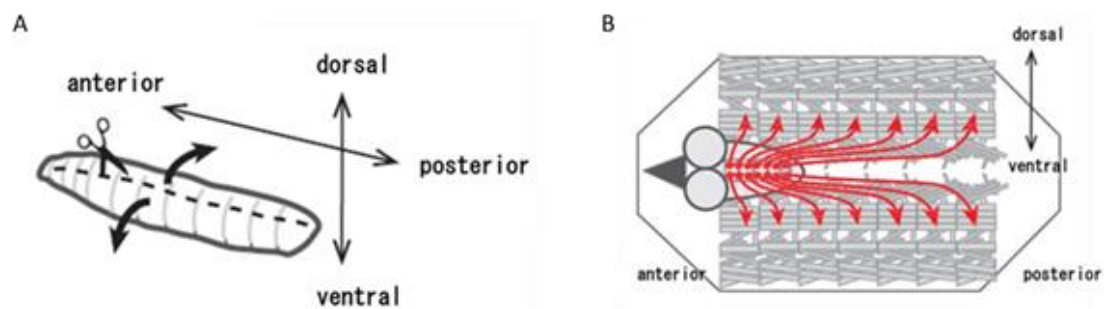


図 14. ショウジョウバエ幼虫の解剖の手法と完成図(Cited from Kohsaka et al., 2012)

(A) ショウジョウバエ幼虫に対するハサミの入れ方の模式図。

(B) 解剖の完成状態を表した模式図。

3.2.モザイク解析による Wave ニューロンの一細胞形態解析

本研究では、個別の Wave ニューロンを標的とする *GAL4* 系統が存在しないことから、本研究ではモザイク解析を行うことで、個別の Wave ニューロンの DWnt4 の変異体導入による形態変化を観察した。

モザイク解析を行うためには、ショウジョウバエ幼虫の発生の任意の時期に、弱い熱刺激を与える必要がある。本研究では、主として 1~2 齢の時期に幼虫に 37.5~38.7°C の熱刺激を 1 時間インキュベータ内で放置することで与えた。

その後、3 齢に達した時点で幼虫の解剖を 3.1 節で触れた手法によって行い、次に、ニューロンの形態解析のための抗体染色を行った。ニューロンの形態を確認するために、Wave ニューロンに蛍光タンパク質を発現させているが、蛍光タンパク質の本来の蛍光は、詳細な形態を確認するのに十分な強度を持たないため、蛍光タンパク質に抗体を付着させて蛍光強度を上げる手法を用いた。

具体的には、まず、幼虫を解剖した後、30 分間 4%ホルムアルデヒド液（ホルマリン原液+PBS）に浸し、細胞組織を固定する。リン酸緩衝生理食塩水（以下 PBS）と Triton-X を含んだ PBS（以下 PBT）でよく洗浄した後に、30 分間 PBT で 5%に薄めた羊由来の血清（NGS）を用いてブロッキングを行う。そして一次抗体（Af2020-1rabbit(anti-GFP)）と 5%に薄めた NGS の溶液に一晩浸す。翌日 PBT でよく洗浄した後、二次抗体（Alexa488 Goat (anti-rabbit IgG 抗体)）と 5%に薄めた NGS の溶液に一晩浸す。最後にもう一度 PBT, PBS で洗浄した後に、共焦点レーザー顕微鏡（FV1000,Olympus）で撮影を行った。

3.3.行動実験

幼虫の触覚刺激に対する反応を見るために、Von Frey フィラメントを用いて幼虫に触覚刺激を与えた。このフィラメントは、本来は人間の触覚テストなどに用いられる器具であり、フィラメント毎に与えられる刺激の強度が設定されており常に一律な強度の刺激を幼虫に与えることができる。

本研究では、実体顕微鏡（SZX16,Olympus）及び CCD カメラ（XCD-V60,SONY）を介して、観察と撮影をしながら、リンゴジュースを混ぜた寒天の上で運動する幼虫の頭部に近い部位を Von Frey フィラメントで刺激し、その際の幼虫の反応を見た（図 14）。幼虫が反応を止め、再び前進運動を行うようになるまで待ち、再び刺激を与えるというプロトコルを、一頭あたり 5 回刺激を与えるまで繰り返した。

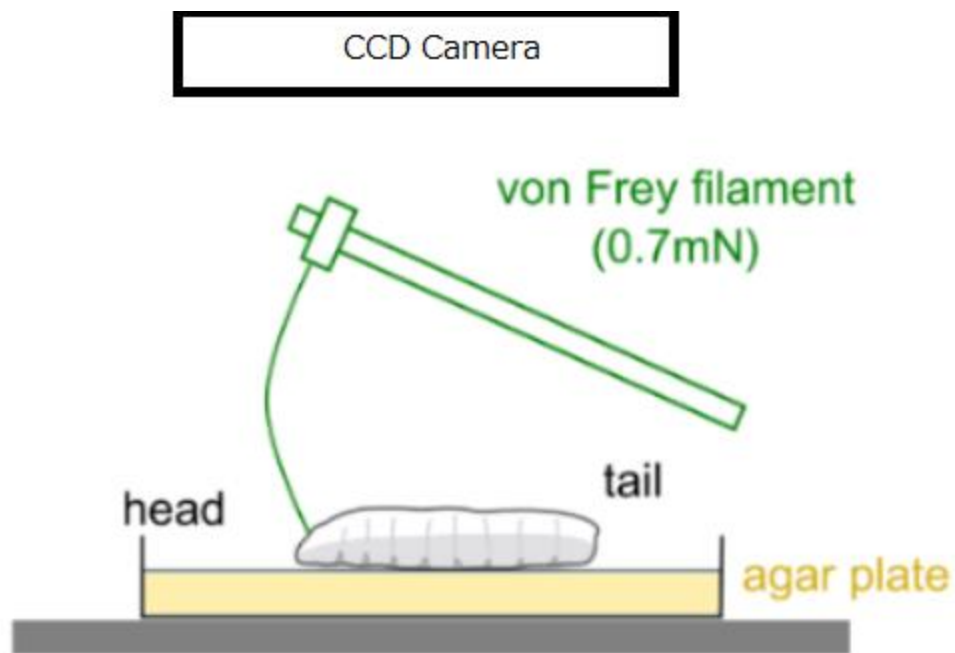


図 15.幼虫の触覚刺激に対する反応を見る行動実験の模式図

寒天上で自由に行動する幼虫の頭部を Von Frey フィラメントで突き、その後の反応を観察し分類・定量した。

3.4.Optogenetics のよる神経活動亢進を用いた行動実験

本研究では、CsChrimson を用いてショウジョウバエ幼虫の神経活動亢進し、その際の幼虫の運動を観察した。この際、リンゴジュースを混ぜ込んだ寒天の上で自由に動く幼虫に、LED ライトを用いて強度 12.5mW の波長 660nm の赤色光を照射した（図 15）。実験は全て 25°C に保たれた室内で行われた。本研究では、確率的な CsChrimson の発現を確かめるための用途でしか用いなかった手法であるため、光の照射時間は厳密に定めなかった。

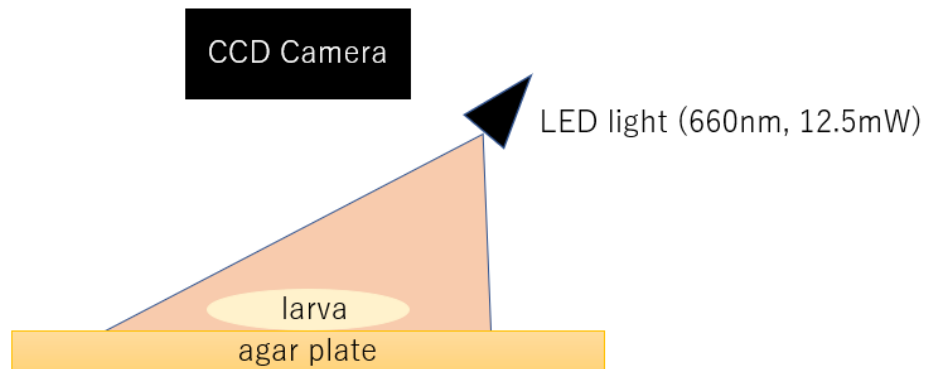


図 16.Optogenetics を用いた行動実験の模式図

寒天上を自由に動く幼虫に赤色光を照射してその行動を分類した。

3.5.統計解析

実験群と対照実験群の差が有意であることを示すために統計学における検定を用いた。本研究では主として、幼虫の行動実験において、Fisher の正確確率検定を用いて比較する 2 群に差があるかを検定した。対照群が 2 群存在した関係で多重比較の補正をかける必要性があったが、その時は、Hochberg の方法を用いて補正した。また、Wave ニューロンの形態解析において、Wnt4 の変異体導入が形態に影響を及ぼすことを統計的に示すために、同様に Fisher の正確確率検定を用いた。

また、実験結果を記す P 値は以下のように定義した。

$P^* < 0.05$ $P^{**} < 0.01$ $P^{***} < 0.001$ n.s. = 有意差なし

3.6.本研究で用いたショウジョウバエの系統

yw

野生型の系統。実験群と比較するための対照群の個体をかけ合わせで作成するために用いた。(Bloomington Drosophila Stock Center, #6598)

20XUAS>dsFRT>CsChrimson::mVenus,pBPhsFlp2::Pest

任意の GAL4 系統と交配させ、次世代において、発生の時期に弱い熱ショックを与えることで GAL4 標的ニューロン群に確率的に CsChrimson::mVenus を発現させることができる。熱ショックを与える時間の調節によって発現の頻度は操作できる。(Gift from Drs. Stefan Pulver, Karen Hibbard and the Gerald Rubin lab members)

UAS-fz2-RNAi

RNAi 法を介して任意の GAL4 の標的細胞において DFz2 の遺伝子の発現を阻害することができる。以下の 3 つの系統を本研究では利用した。

UAS-fz2-RNAi (Bloomington Drosophila Stock Center, #27568)

UAS-fz2-RNAi (Vienna Drosophila Stock Center, #44390)

UAS-fz2-RNAi (Vienna Drosophila Stock Center, #108998)

R60G09-GAL4

A2-A6 の Wave ニューロンを胚発生期から標的とする GAL4 系統。Fz2 のノックダウンを通じて Wave ニューロンの形態を変化させる際に用いた。(Bloomington Drosophila Stock Center, #46441)

R77H11-GAL4

R60G09 と異なり、胚発生期から Wave ニューロンを標的とするわけではないが、より強く発現を誘導する *GAL4* 系統で A1-A6 の Wave ニューロンを標的とする。

Wnt4 のノックアウトによる Wave ニューロンの形態解析の際に

20XUAS>dsFRT>CsChrimson::mVenus,pBPhsFlp2::Pest と組み合わせて用いた。

(Bloomington Drosophila Stock Center, #39983)

Wnt4[C1], Wnt4[EMS23]

いずれも Wnt4 の欠失導入のために用いた変異体。より強い変異を導入した状態で Wnt4 を介した軸索誘導メカニズムを評価するため両方の変異を持つ幼虫で形態解析を行った。

C1 (Bloomington Drosophila Stock Center, #6651)

EMS23 (Kyoto Stock Center, #108-974)

以上の系統は熱ショックを与えるために 37.5~38.7°C に維持されたインキュベータ内に入れた時以外はいずれも温度 25°C で保たれた部屋で飼育した。

4.実験結果

4.1.DWnt4 変異体における単一 Wave ニューロン形態解析

Wave ニューロンの軸索誘導において、先行研究で確認されている DFz2, 4 のノックダウンの影響が DWnt4 を介した軸索誘導メカニズムが影響を受けた結果であるかどうか確認したいと考えた。先行研究では DFz2, 4 のノックダウン及び過剰発現によって軸索伸長がどのように変わるかということは個々の細胞レベルで調べられていたが、DWnt4 の変異体を導入した際の Wave ニューロンの軸索の伸長の様子については全体を染色するだけに留まっており個々の細胞レベルでその変化を把握することは困難であった（図 17）。また、個々の Wave ニューロンを標的とする GAL4 系統も存在しない。そのため、本研究では、モザイク解析の手法を用いて、特に全体の染色で様子が把握できなかった前方の Wave ニューロンについて、個々の細胞レベルで、DWnt4 の変異が軸索伸長に与える影響について調べた。

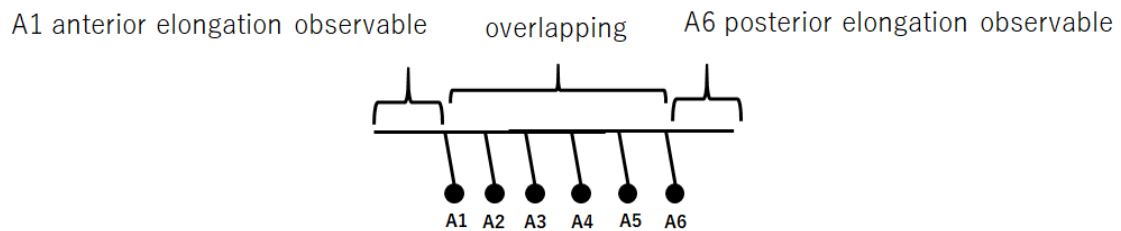
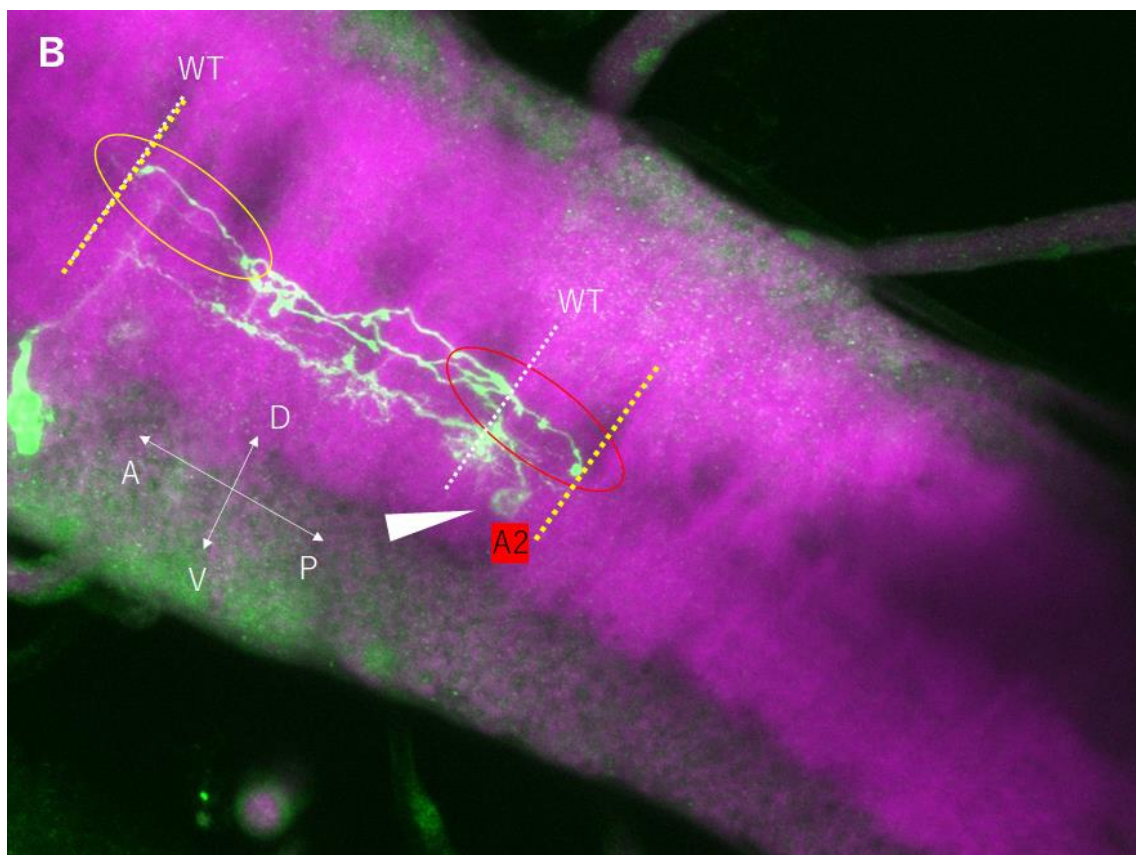
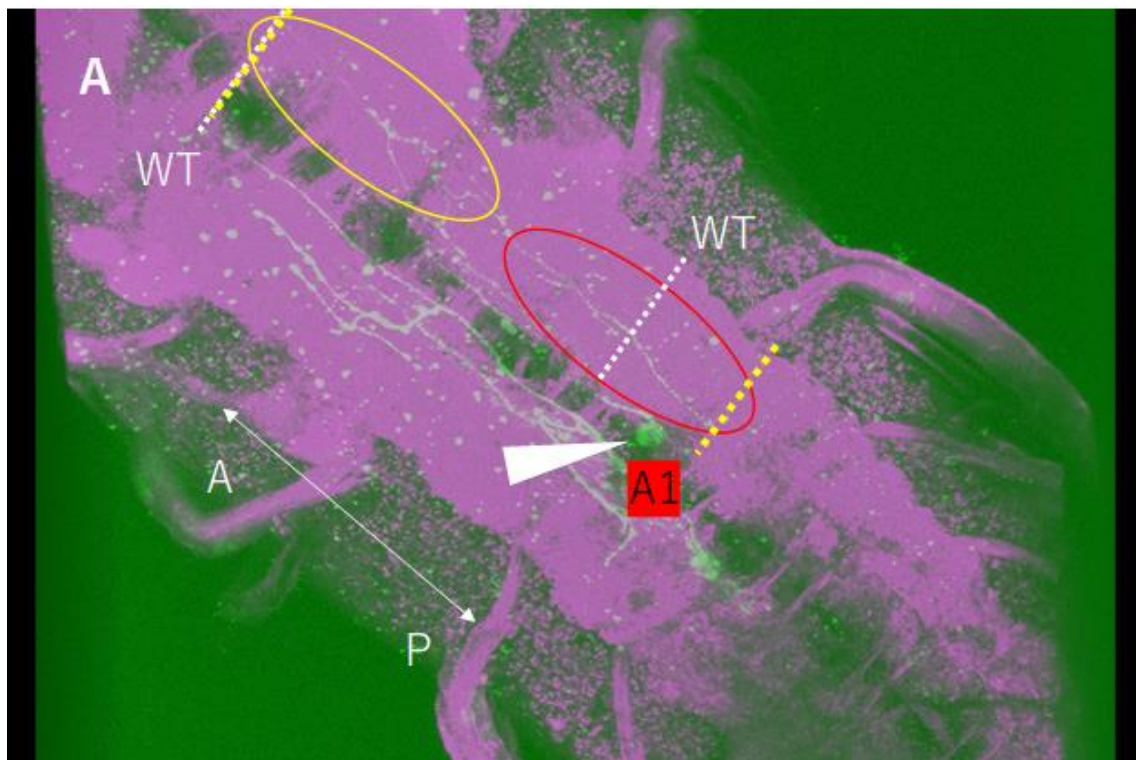
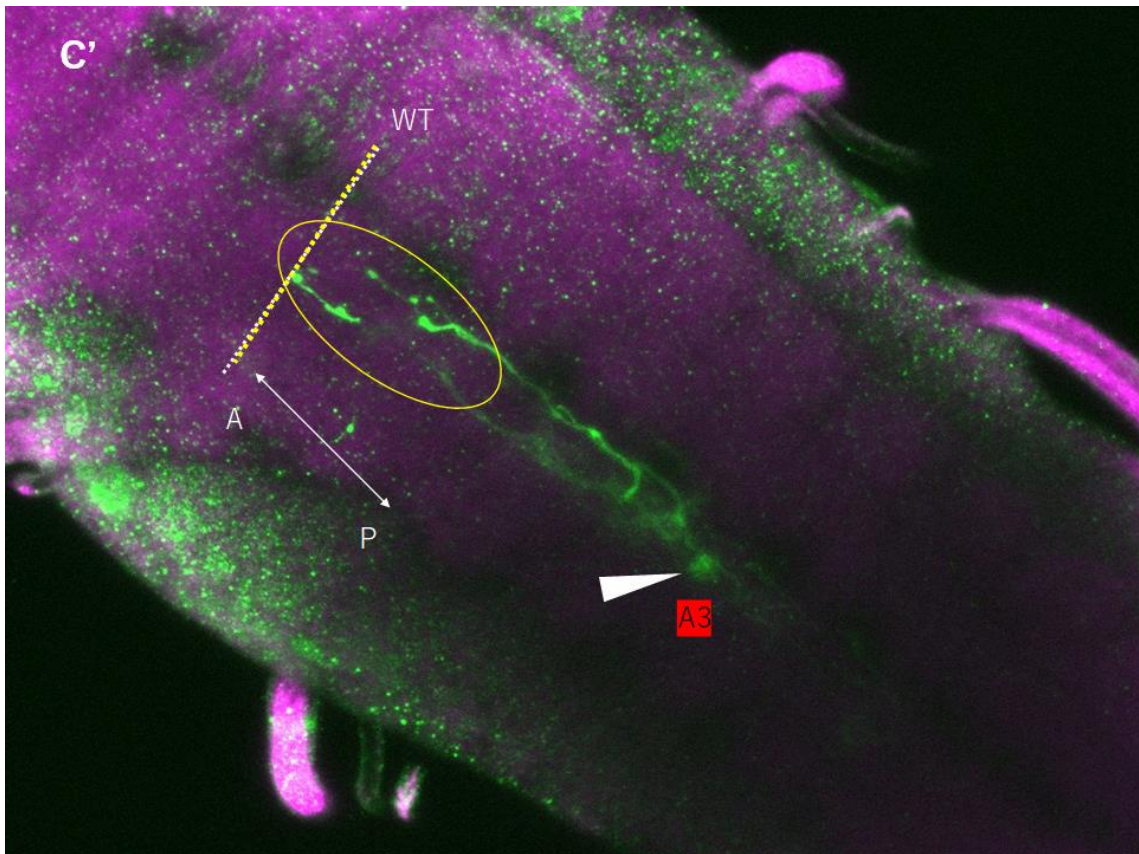
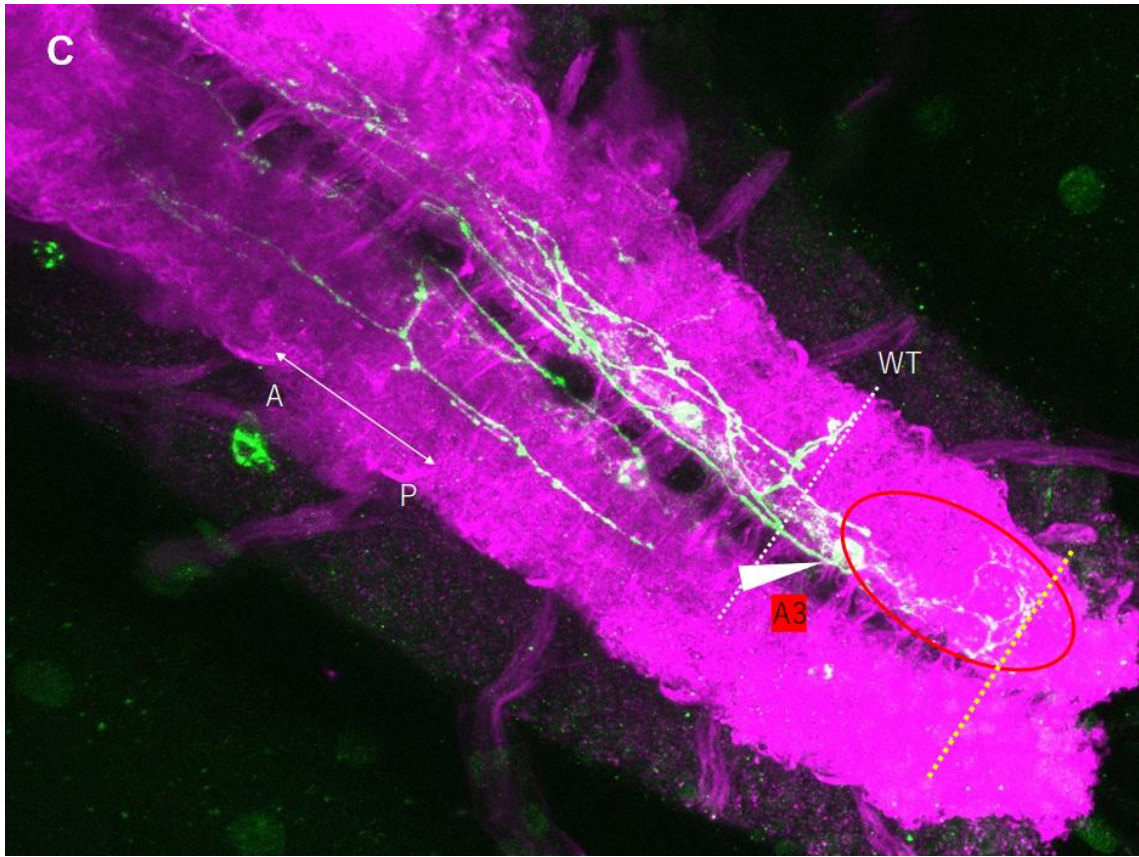


図 17：軸索の配置の模式図

図のように、A1 尾側～A6 頭側の軸索の伸長は重なり合っており個別にその長さを観測することができない。





D.

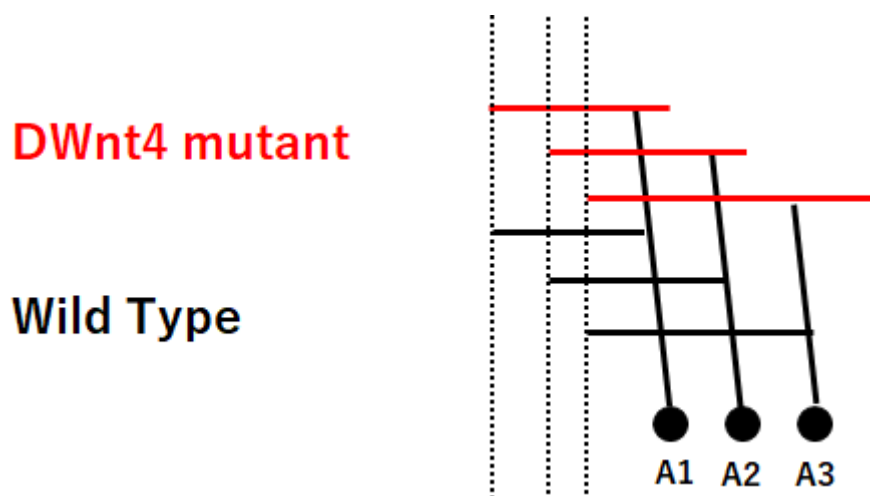


図 18.DWnt4 mutant の Wave ニューロンの形態解析

いずれも白色矢印が細胞体を、赤円が後方へ投射された軸索の先端部を、黄円が前方へ投射された軸索の先端部を示す。AP がそれぞれ頭尾軸、DV が背腹軸を示す。

また、白点線が WT で見られる軸索の伸長範囲を、黄点線が DWnt4 の変異体を導入された個体で見られる軸索の伸長範囲を示している。

(A) A1 の Wave ニューロンを捉えた染色図。尾側へ投射された軸索が A1 まで達している一方で、頭側へ投射された軸索は T1 までで止まっている。

(B) A2 の Wave ニューロンを捉えた染色図。尾側へ投射された軸索は A2 後部まで達している一方で、頭側へ投射された軸索は T1 までで止まっている。

(C) , (C') A3 の Wave ニューロンを捉えた染色図。尾側へ投射された軸索が A4 まで達している (C) 一方で、頭側へ投射された軸索は T3 までで止まっている。

(D) 結果の模式図。上段の DWnt4 の変異体の軸索が、前方への伸長が下段の野生型のものとは変わらない一方で、後方への伸長が、野生型よりも長くなっていることを示している。

その結果、A1-A3 節に位置する Wave ニューロンの尾部側への投射について、野生型と比較して A1 は野生型が T3 までしか伸びていないものが A1 まで、A2 は野生型が A1 までしか伸びていないものが A2 まで、A3 は野生型が A2 までしか伸びていないものが A4 まで有意に軸索が伸びていることが示された (図 16A-C) (Fisher の正確確率検定でいずれも $p = 0.0143$, $n=4$)。

一方で、頭側への投射は、野生型と比較して長くも短くもなかった。(図 18A,B,C') (A1-A3 それぞれ $n=7,5,4$)

以上の結果は、DFz2 のノックダウンの結果の傾向と符合する (図 11B,G, 図 12B,G)。このことから、頭側の体節において、DFz2 のノックダウンで見られた軸索誘導異常は、DWnt4 を介した軸索誘導メカニズムが正常に機能しなかった結果であると推定できる。

4.2.モザイク解析の手法を用いた前方 Wave ニューロンの活性化の試み

先行研究では、DFz2 のノックダウン変異体において、Wave ニューロン全体を活性化させた時に速い前進運動の惹起が為されたことから間接的に Wave ニューロンの機能が変化していることが推定された (図 13) が、Wave ニューロンの形態の変化と行動の変化の直接的な因果関係は未だ示せていない。そこで、モザイク解析の手法を用い、確率的に頭側のみで CsChrimson を発現させた個体を作り出して行動実験を行えば良いと考えた。当然、解剖しなければ発現の様子が分からないので、発現の有無、多寡を問わず先に行動実験を行い、その後解剖及び染色によって発現を確かめるというプロトコルでまずどれくらい“当たり”の個体を作り出せるのかを確認したいと考えた。

先行研究では、Wave ニューロンを胚発生期から標的する GAL4 系統と、モザイク解析のための UAS 系統をかけ合わせた際に、十分な発現の強度が得られず、optogenetics を介して Wave ニューロンを活性化するための赤色光を照射しても、野生型と異なる運動は前進・後退どちらについても見られなかった。

しかし、先行研究では遺伝子がどちらも 1 コピーしかなかったのが失敗の原因であると考え、UAS を 2 コピー持つ系統を用いて実験することを考えた (図 19)。

また、確率的な発現を促すための熱刺激を与える時間の長短によって、発現の多寡が変わるが、この加熱時間の適切な長さを見出した上で、“当たり”がどれくらい出るのか評価することにした。

そこで、まず 90 分ほど加熱した個体群で実験した所、発現が非常に多く、また、複数の Wave ニューロンを活性化した時に見られるような回転運動を示した (図 20)。狙い通り行動の表現型を示し、また、前進のみならず回転運動を示したことから頭側の Wave ニューロンを活性化するのに十分な強度であると判断したため、加熱時間を 65 分程度に短くした上でもう一度実験をした。加熱時間の短縮によって、まず目標である発現数の絞り込みは達成でき、全体で 2~3 個の細胞でしか CsChrimson が発現していないような個体を得られるようになった。しかしながら、計 70 個体ほどで実験をするも、後退運動を示した個体は 1 個体しかなく、その個体も頭側単独で発現させていなかった (図 21)。

この前段階の実験でも CsChrimson の発現が尾部に偏っているように見えたことから、用いている系統が、尾部に偏って発現するような特性があるだろうことが推定される。また、DFz2 の欠失を導入して行動実験を行う際には、どのように行動が変化するか分からないため、今回のように行動を見て解剖する個体を決めるという実験のコストの削減が行えず、行動実験を行った全ての個体で解剖しなければならない。従って、頭部の Wave ニューロンのみで CsChrimson を発現させた個体を安定して供給し、行動実験を行ってその結果を統計的に分析するのは難しいと考え、この方策は断念した。

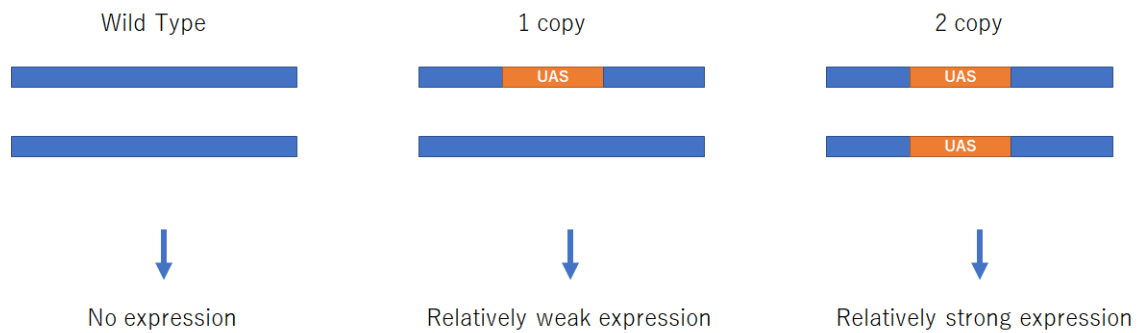
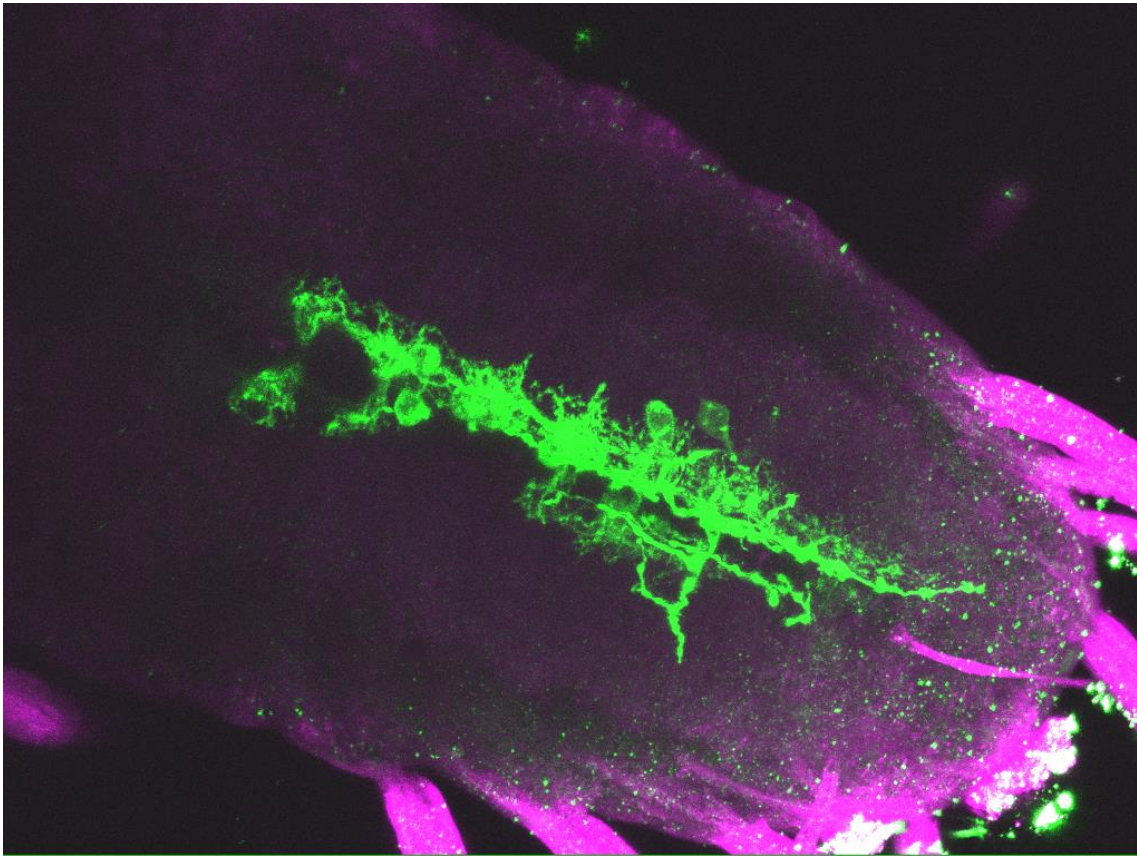


図 19：発現の模式図

ショウジョウバエに限らず一般に動物の染色体はそれぞれ同じものが対になっていて、対のうち片方にだけ UAS 配列があるよりも両方に UAS 配列が存在したほうがより多く遺伝子の転写が行われ、UAS の下流に CsChrimson の遺伝子があるなら、より多く CsChrimson が発現するようになる。

A.



B.

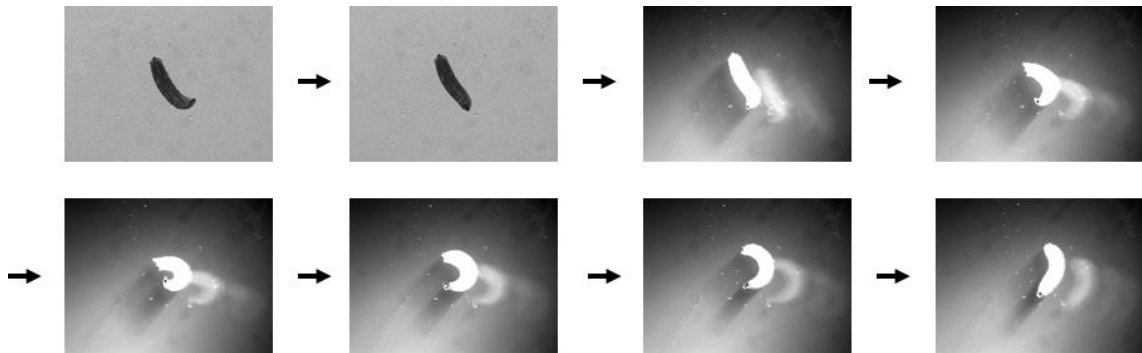


図 20：90 分熱刺激を与えた際の染色図と Wave ニューロンを活性化させた時の行動

(A) CsChrimson が発現した Wave ニューロンのみを抗体染色した図。複数の体節にまたがって CsChrimson が発現していることが分かる。

(B) (A)の幼虫が生きている時に optogenetics を介して CsChrimson が発現している Wave ニューロンを活性化した際の反応。光の照射（3 枚目から）によって幼虫が体をくの字に曲げて回転運動をしている。

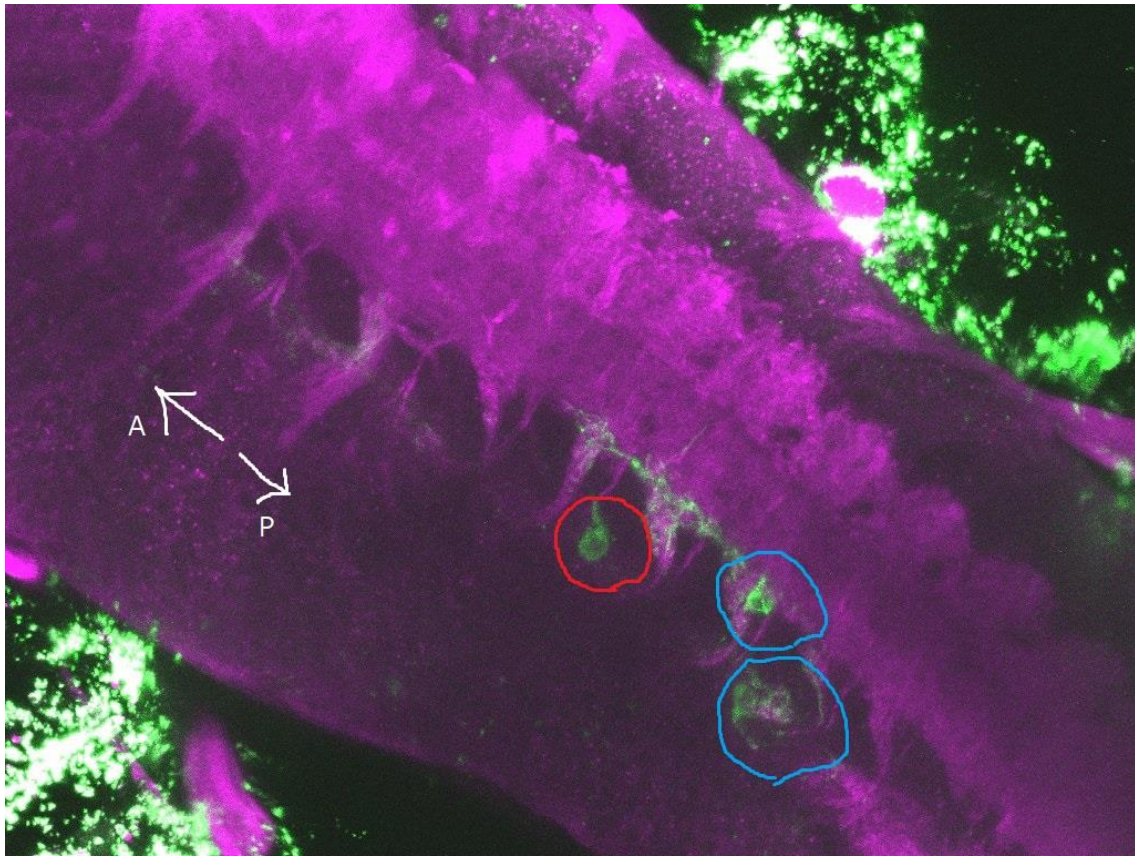


図 21.唯一後退運動を見せた個体の染色図

赤円で示したように、A2 に発現が見られた一方で、青円で示したように A4,A5 にも発現していた。

4.3.DFz2 をノックダウンした状態での行動実験

行動中の個体で特定のニューロンを活性化することができる optogenetics という手法を用いて行われた先行研究においては、DFz2 のノックダウン変異体で後退運動が減少し、また、対照群と比べてより速い前進運動が惹起されるようになることが確認された (Takagi et al., unpublished) (図 13G)。速い前進運動というのは、本来頭側ではなく尾側に位置する Wave ニューロンが惹起する行動であり、DFz2 のノックダウンにおいて Wave ニューロンが尾側へと異常に軸索を伸長すること (図 11B,G) と併せて考えれば、頭側 Wave ニューロンの機能が、軸索投射の変化に伴い尾側の Wave ニューロンに近いものに変質したという仮説が立つ。

しかしながら、先行研究では、Wave ニューロン全体を活性化しており、頭側の細胞の軸索投射の変化の影響のみを調べた訳ではなかった。上記のように頭側の Wave ニューロンのみを標的とする GAL4 系統は存在しないので、optogenetics を用いて頭側の Wave ニュ

ーロンのみを活性化することはできない。しかし頭側の Wave ニューロンが体の頭側に受けた触覚刺激を受容する感覚ニューロンから入力を受けることから、optogenetics ではなく直接触覚刺激を幼虫の頭部に与えることで前方の Wave ニューロンを活性化することができると考えた。そこで、野生型と DFz2 のノックダウン変異体において頭部刺激を行い、軸索誘導異常が Wave ニューロンの機能に与える影響を評価することを考えた。上述の仮説に基づけば、頭部に触覚刺激を与えられた際の反応は、野生型に比べて後退運動が減少し、速い前進運動や方向転換のような逃避行動が増加するのではないかと予想した。

本実験では、幼虫に一律な触覚刺激を与えるために Von Frey フィラメントという、本来人間の触覚テストなどで用いられるような器具を用いて幼虫に刺激を与えた際の一連の反応を撮影・解析した（図 15, 22）。

解析のため、平面上で自由に運動するショウジョウバエ幼虫の頭部を Von Frey フィラメントで突いた際の反応を観察し、これを 2 種の対照群及び DFz2 のノックダウンを導入した実験群とで比較した。今回、2 種類の対照群と比較したのは、UAS-RNAi の系統が本来意図されたものの以外の作用を及ぼす可能性を否定するためである。また、そういった影響を排除するために、RNAi 系統も複数種類用いた。

また、ショウジョウバエ幼虫の刺激への反応を評価する際の尺度として、ショウジョウバエ幼虫にまつ毛で刺激を与えた際の反応を評価する尺度として先行研究で用いられた Kernan score (Kernan, Cowan and Zuker, 1994) (表 1) を用いた。

表 1. Kernan score と反応の対応表

Score	反応
0	無反応
1	刺激を受容後、行動を停止
2	刺激を受容後、方向転換
3	刺激を受容後、1 回だけ後退
4	刺激を受容後、複数回後退

まず、行動実験を行う前に、新しく使う RNAi 系統が従来のものと同様の軸索形態の変化を引き起こすかを確かめた（図 23）。

行動実験にて比較した結果、対照群では、score 3 の反応を最も多く示したのに対して、実験群では score 2 の反応を最も多く示した（図 24A-D）。また、score 2 以下と 3 以上で 2 群に分けて、群同士で Fisher の正確確率検定にかけた結果、DFz2 のノックダウンによって、頭部付近への触覚刺激に対して後退運動を示す頻度が有意に減少することが明らかになった（図 24E）。その一方で、反応自体は損なわれていないことも示されたので、DFz2 のノックダウンが単に運動機能を損なった結果後退運動が減少したというよりも、むしろ行動戦略の変容を促したことが示唆された。

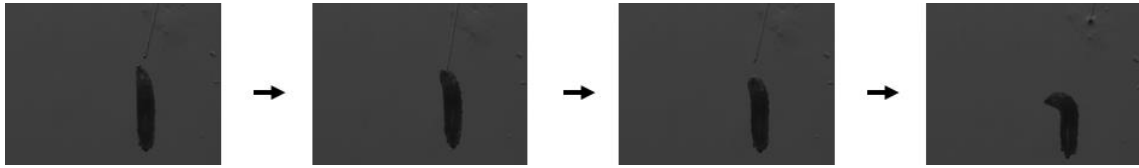


図 22 : Von Frey フィラメントを用いた幼虫への刺激とその後の反応の例
 画像では幼虫がフィラメントで頭部を突かれた(2枚目)あとに方向転換している(4枚目)ことが見て取れる。

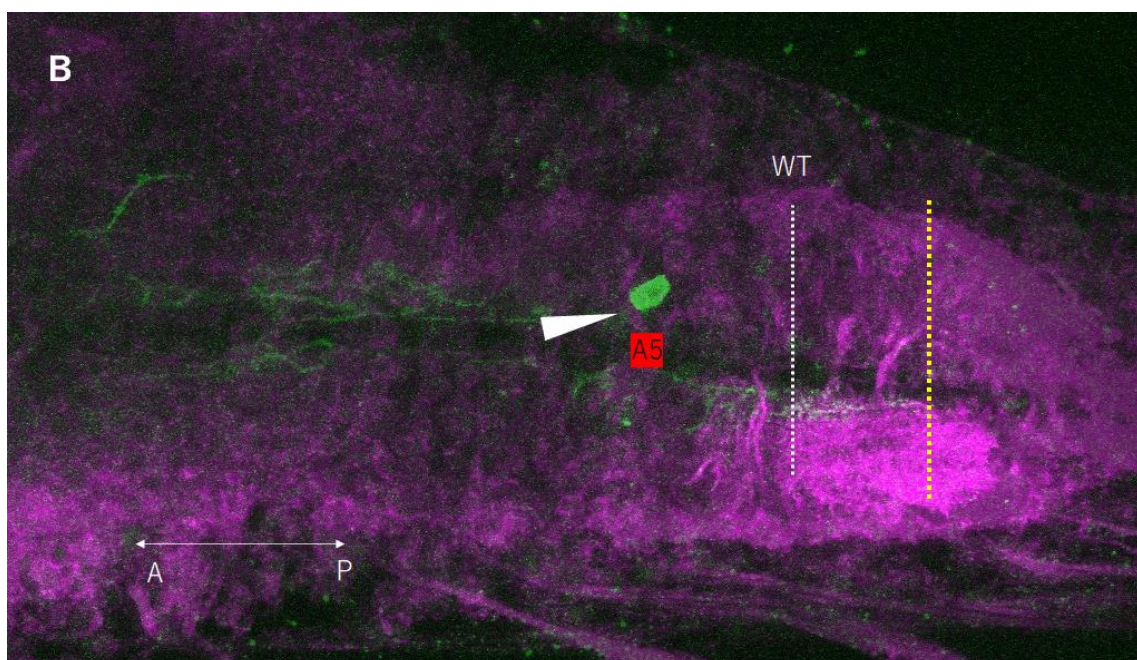
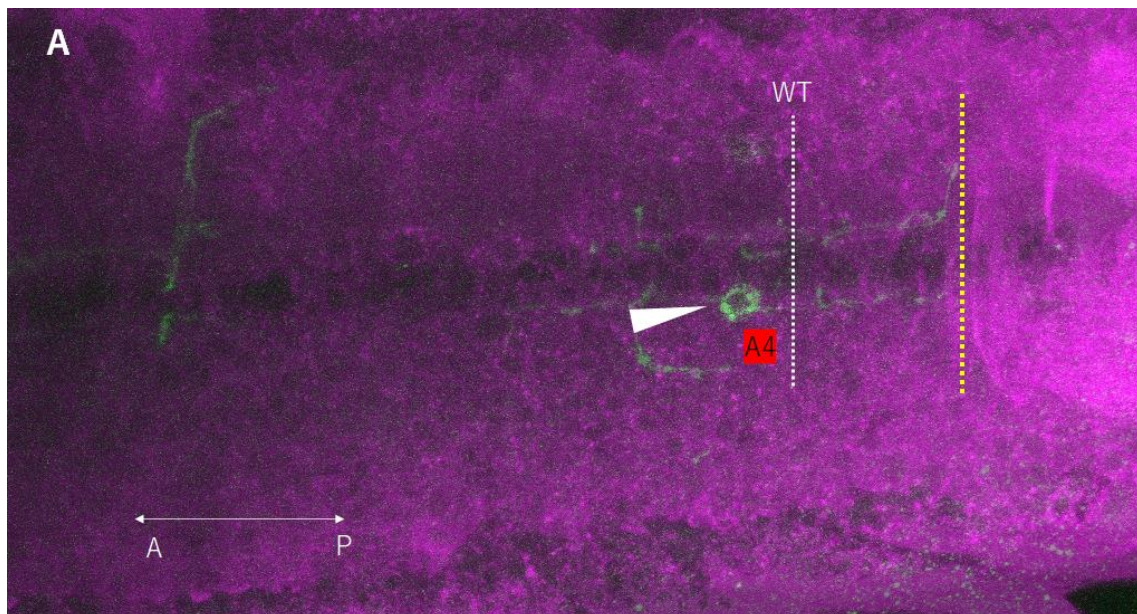
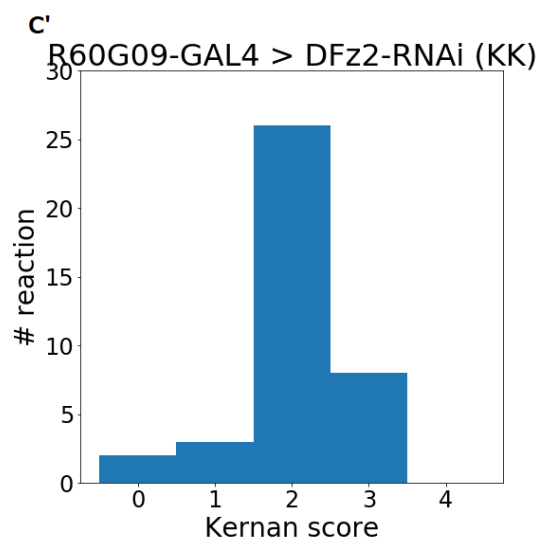
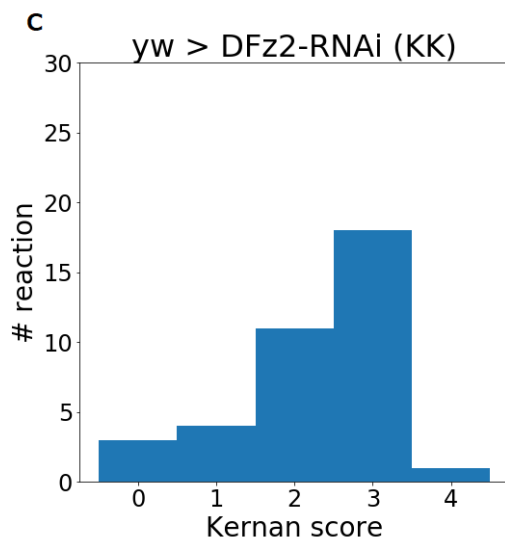
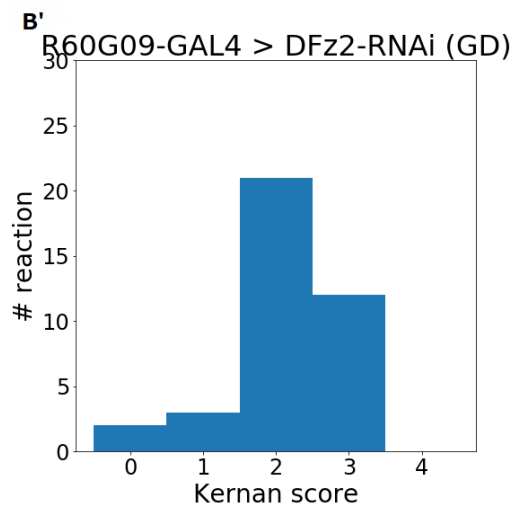
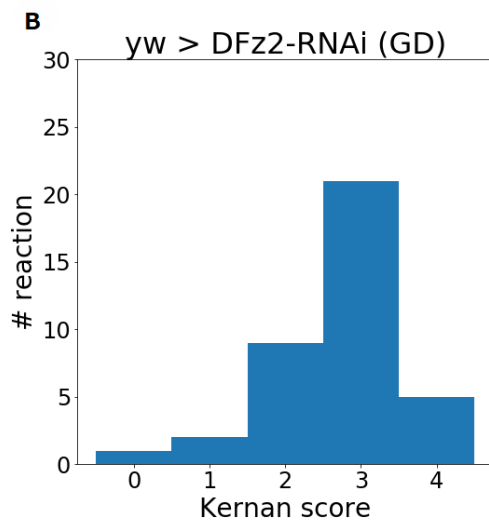
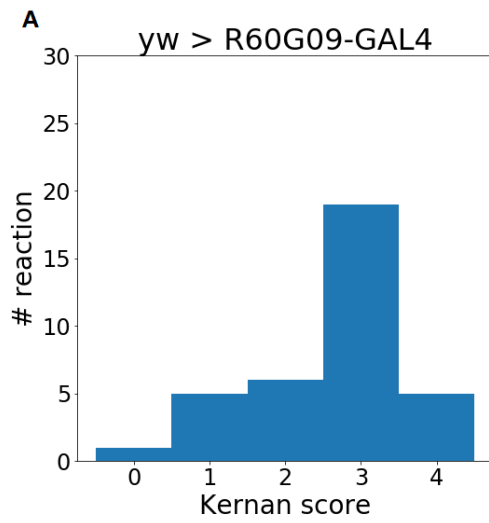


図 23：新しい RNAi 系統による DFz2 ノックダウンを導入した個体の染色図

白矢印が細胞体、赤背景の字が位置する体節を示す。

(A) GD 系統の RNAi を用いてノックダウンを導入した個体の染色図。A4Wave ニューロンの後方への軸索投射は、野生型は A4 まで伸びる（白点線）が、この個体は A6 付近（黄点線）まで伸びているのが分かる。

(B) KK 系統の RNAi を用いてノックダウンを導入した個体の染色図。A5Wave ニューロンの後方への軸索投射は、野生型は A6 まで伸びる（白点線）が、この個体は A7 付近（黄点線）まで伸びているのが分かる。



D

	DFz2 - RNAi			
	GD		KK	
	backward	reaction	backward	reaction
DrC vs Exp	0.0098***	1	0.0003***	1
DrC vs EfC	1	1	0.2363	0.6145
EfC vs Exp	0.0078***	1	0.0158**	0.6705

図 24. 各系統の組み合わせのショウジョウバエの触覚刺激に対する反応のヒストグラムと統計検定の結果

(A) - (C') 横軸が Kernan score の 0~4 に対応し、縦軸がそのスコアに分類された反応を示した回数となる。

(A) 野生型と、Wave ニューロンを標的とする GAL4 系統をかけ合わせた対照群の個体で行った実験の結果を示す。

(B) 野生型と今回新たに取り寄せた DFz2-RNAi 系統をかけ合わせた対照群の個体で行った実験の結果を示す。

(B') Wave ニューロンを標的とする GAL4 系統と今回新たに取り寄せた DFz2-RNAi 系統をかけ合わせた実験群の個体で行った実験の結果を示す。

(C) 野生型と今回新たに取り寄せた DFz2-RNAi 系統をかけ合わせた対照群の個体で行った実験の結果を示す。(C) ,(C')で用いた RNAi 系統とは異なる系統を用いた。

(C') Wave ニューロンを標的とする GAL4 系統と今回新たに取り寄せた DFz2-RNAi 系統をかけ合わせた実験群の個体で行った実験の結果を示す。(C) ,(C')で用いた RNAi 系統とは異なる系統を用いた。

(D) Wave ニューロンを標的とする GAL4 系統と野生型をかけ合わせた対照群を DrC, DFz2-RNAi 系統と野生型をかけ合わせた対照群を EfC と表記している。また、実験群を Exp と表記している。backward の列が、後退反応を示した数と方向転換・停止・無反応を示した数の 2 群についての Fisher の正確確率検定で算出した p 値、reaction が無反応を示した回数とそれ以外の反応を示した回数の 2 群について Fisher の正確確率検定で算出した p 値のであり、それぞれ多重比較の補正済の値。3.5 節の流儀に従ってアスタリスクを数字に振った。

5. 考察

5.1. Wave ニューロンの軸索誘導メカニズムについて

先行研究で、VNC 尾部側において DWnt4 の変異体が Wave ニューロンの軸索伸長に及ぼす影響は DFz4 のノックダウンと同様であることが示されていた (Takagi et al., 2017) (図 9F,G, 12G) が、個々の細胞レベル、特に頭部側において軸索伸長が DWnt4 の変異体導入によってどのように影響を受けるのかについては分かっていなかった。

本研究で、VNC 頭部においても、DFz2 のノックダウンと同様の軸索伸長を示すことが明らかになり (図 25)、結果として、DWnt4/DFz2,4 を介した軸索誘導メカニズムにおいて、DWnt4/DFz2,4 と異なる機能を果たす主要な誘導因子・受容体は存在しないということが推定された。

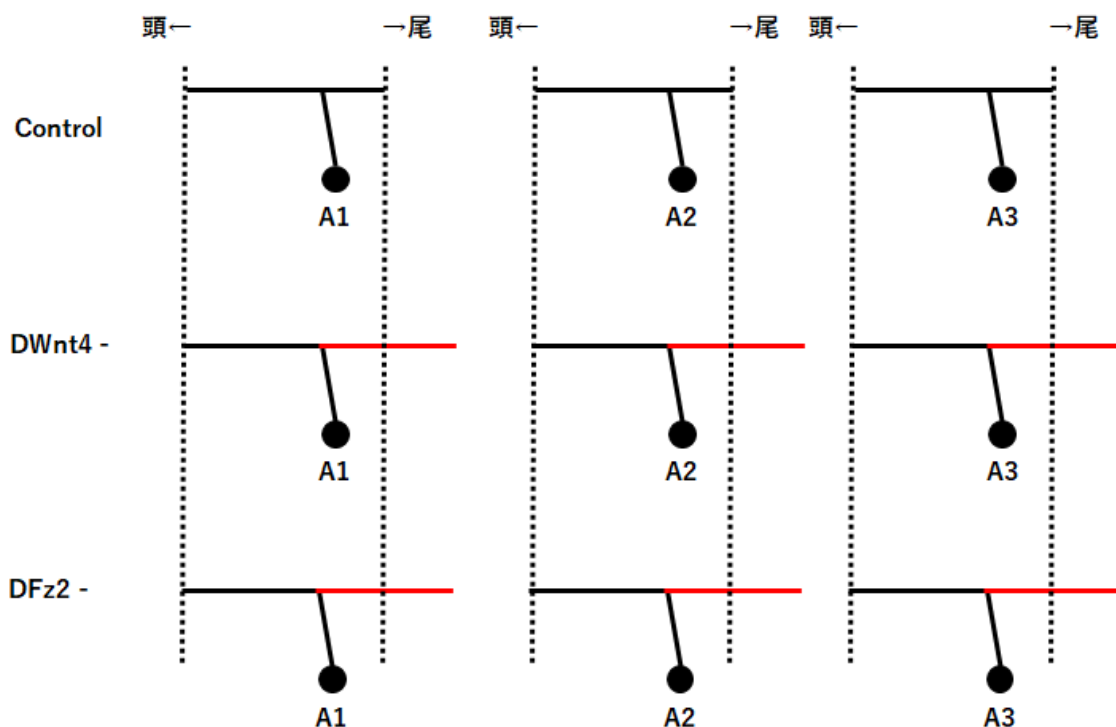


図 25. 4.1 節の実験の結果の模式図

細胞体が黒丸で、軸索が水平に伸びた線で示されている。遺伝子操作によって伸長の長さが変わった軸索の部位のみ赤色にしてある。上段が野生型、中段が DWnt4 に欠失を導入した個体、下段が DFz2 に欠失を導入した個体の軸索伸長の模式図である。

Wave ニューロンのような、VNC の節毎に存在し、それぞれが固有の配線・機能を持つニューロンはショウジョウバエに固有のものではない。ショウジョウバエ幼虫の VNC が節

ごとに対応する体節の運動を制御するように、部位ごとにそれぞれ別の機能を持つような、いわばモジュールが集まって構成される脳神経系の構造としては、動物の脊髄、後脳、大脳新皮質などが挙げられる。また、Wave ニューロンで軸索誘導因子として機能していた Wnt もショウジョウバエ幼虫に留まらず、線虫及び哺乳類でも同じように軸索誘導に関わっていることが先行研究によって明らかになっている (Hiliard and Bargman, 2006; Kirszenblat et al., 2011; Lyukusyutova et al., 2003)。以上のことから、本研究で掘り下げた、Wave ニューロンの軸索誘導メカニズムと類似のメカニズムが、より高次の動物の脳神経系においても、軸索配線をモジュール毎に制御することによってモジュールの機能的な特異性を実現することに寄与しているのではないかと推察される。

5.2.DFz2 ノックダウンが行動戦略に及ぼす影響について

先行研究で、DFz2 の遺伝子転写阻害を導入した個体は、Wave ニューロン全体の活性化によって野生型よりも速い前進運動が惹起されるようになることが示されている (Takagi et al., unpublished) (図)。速い前進運動は本来、尾部の Wave ニューロンが惹起する運動であり、尾側への軸索投射が野生型よりも長く伸びたことで頭側の Wave ニューロンの機能が、尾側のものに近い機能に変質した可能性が示唆された。一方で、頭側の Wave ニューロンを活性化した際に野生型と比較して行動がどのように変化するのかということについては分かっていなかった。

ショウジョウバエ幼虫の頭部への触覚刺激に対する応答は、DFz2 の遺伝子転写阻害によって有意に後退運動が減少し、方向転換が増加したことが示された (図 26)。また、反応そのものが鈍くなるなど、反応そのものが損なわれたという運動機能の低下を示唆する兆候は確認されたわけではなく、単純に反応そのものが変容していることも示された。このことから、行動選択回路における軸索投射の局所的な変化が行動戦略を変容させ得るということが推定された。

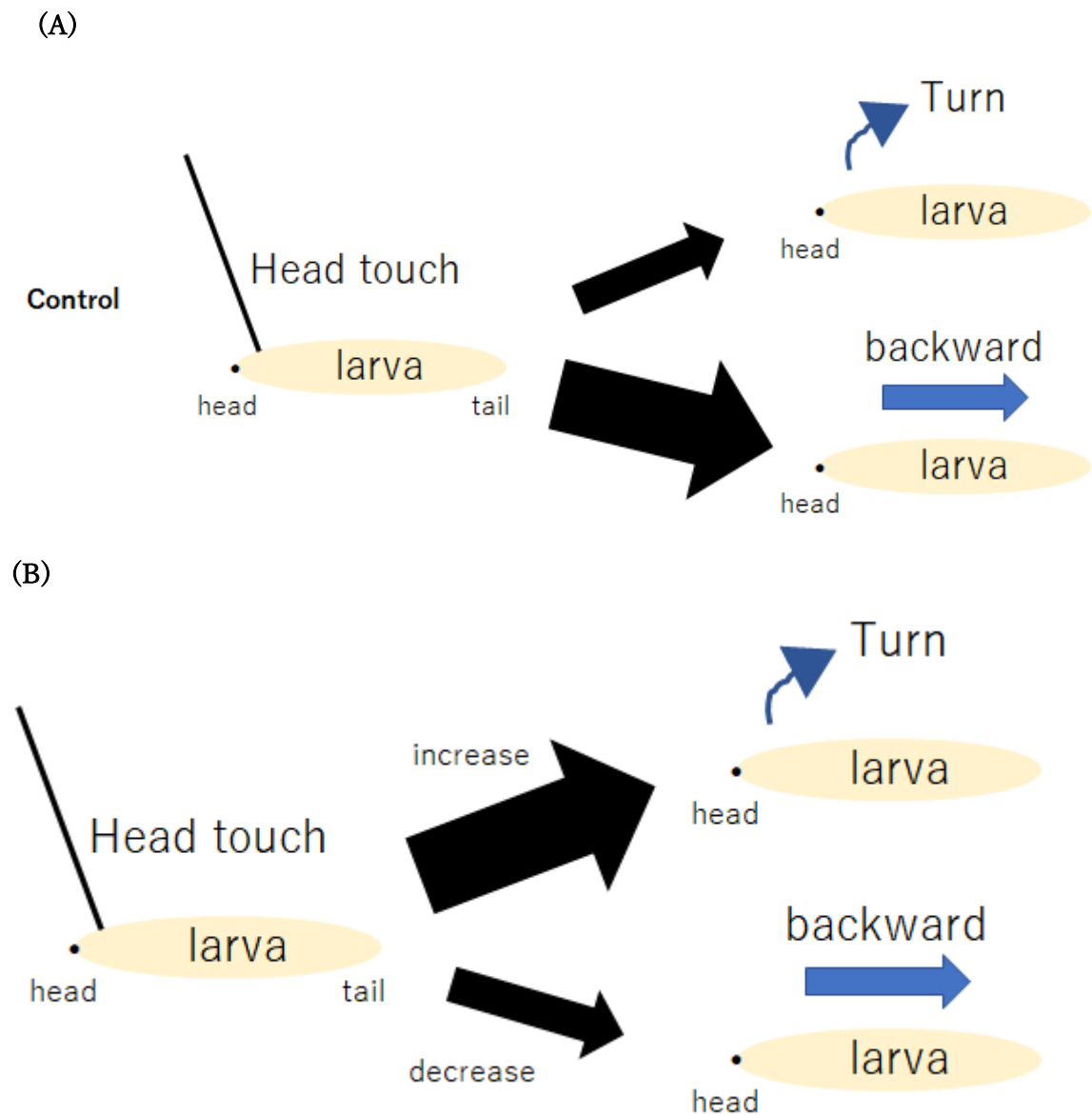


図 26. 4.3 節の実験の結果の模式図

(A) 野生型の頭部への触覚刺激への反応の模式図。主として後退運動を示す。

(B) DFz2 欠失導入個体の頭部への触覚刺激への反応の模式図。野生型と異なり、後退運動が減少し、方向転換が増加した。

本研究では、軸索誘導の変化が行動様式の変化に繋がることを示唆されたが、一方で、どのように行動様式の変化が実現されたのかはよく分かっていない。先行研究で明らかになった、DFz2 のノックダウン個体における Wave ニューロンの活性化が速い前進運動を誘発する現象は、おそらく本来尾部側の Wave ニューロンの下流に位置する前進回路に、頭部側の Wave ニューロンが軸索を接続するようになったためと推察されるものの、DFz2 のノッ

クダウンによる頭部側の Wave ニューロンの後方への軸索伸長によって、本当に前進回路に軸索が接続されるようになったかは未だ確かめられていない。神経回路の局所的な変化が神経回路の配線にどのように影響を及ぼすかについて理解し、ひいては、神経回路の形態の変化が機能に影響を与える理屈について理解することは、動物の神経回路の進化の過程を理解する上で極めて重要であると考ええる。

また、本研究では、行動様式の異なる異種間の軸索形態などは比較せず、単一種で軸索誘導因子のノックダウンを通じて起こした軸索誘導の変化が、行動様式の変化を引き起こし得ることを示しただけであった。だが、自然界においても軸索誘導因子をコードする遺伝子領域に起きた変異は、その動物の行動様式を変化させ、ひいては進化のきっかけとなり得るのではないだろうか。具体的には、まず、軸索誘導メカニズムに関わる因子をコードする遺伝子の変異などがあり、それによって軸索の伸長が変化し、その結果として行動が変化するという過程を辿って行動様式の変化が起こり、種分化などをやがては引き起こすという流れで進化が起こると推測される。

上記の可能性を検討するためには例えば、現存する近縁種同士の遺伝子配列の違いがある箇所を調査し、そのような軸索誘導因子をコードする領域があるか、また、どのような回路でそれらの因子が機能するのと言ったことも併せて調べれば良い。神経回路の進化の過程を理解することは、未だ分かっていないことが多い神経回路の形態と機能の相関について理解できるという点で重要であるが、それに加えて、種分化に伴い行動様式が変化する例は枚挙に暇がなく、こういった行動様式の変化を神経回路の観点から評価できるのは、進化学の観点からも非常に有意義であるだろう。

5.3.今後の展望

本研究では、DWnt4/DFz2, 4 による軸索誘導メカニズムにおいて、同様の機能を担う他の因子が存在する可能性は否定できないものの、DWnt4/DFz2, 4 のそれぞれが互いに主要なパートナーとして軸索誘導に寄与していることが示された。

Wave ニューロンは頭側にあるものが主として軸索を頭側に投射し、尾側にあるものが逆に尾側に投射するというような体節特異的な軸索投射パターンを持つが、今回詳細に調べた DWnt4/DFz2, 4 による軸索誘導メカニズムは主として尾側への軸索投射を制御する因子 (図 11,12) であり、全く別の誘導メカニズムが同時に機能することで軸索の頭側への投射を制御している可能性も否定できない。Wave ニューロンを通じた回路の形態と機能の相関についての研究に限っても、軸索誘導メカニズムの全貌を明らかにすることはより多様なアプローチを可能にするものであるため、全く別の誘導メカニズムについて探索することは有益であると考ええる。

また、本研究では、触覚刺激に対する反応について、DFz2 のノックダウンによって後退運動が減少し、方向転換が増加するという形で変化することが示された。しかしながら、直

接 Wave ニューロンの機能が軸索伸長の変化によって変容したということは示せなかった。4.2 節で示したように本研究ではうまくいかなかったが、Wave ニューロン全体ではなく、特定の Wave ニューロン、特に頭側の Wave ニューロンを行動中の幼虫で活性化できるような手法を模索、実行してロックダウンの有無で行動を比較するなどして、軸索伸長と機能の相関についてより詳細に評価することが、今回示唆した行動戦略の変容についてより具体的に調べる上で必要であると考え。しかし、一番簡単な、頭側の Wave ニューロンを胚発生期において標的とする *GAL4* 系統を用いるという手法は、そういった系統が現状見つかっておらず困難であるため、そういった系統の探索と並行して既存の *GAL4* 系統において確率的に発現させる手法などをまず活用していく必要がある。

本研究では、触覚刺激に対する応答を司る回路におけるコマンドニューロンである Wave ニューロンの軸索誘導を変化させることで、応答そのものを変容させられることを示した。これは、今まであまり調べられてこなかった回路の適応的な変化に関して、それが局所的な回路の変化によってもたらされる可能性を示唆するものである。今後、Wave ニューロンを通じた更なる行動戦略の解析によって、ショウジョウバエだけに留まらない普遍的な回路の適応的な変化のメカニズムの解明が進むことが期待される。

6.参考文献

Bouvier, J., Caggiano, V., Leiras, R., Caldeira, V., Bellardita, C., Balueva, K., Fuchs, A., and Kiehn, O. Descending Command Neurons in the Brainstem that Halt Locomotion. *Cell* 163, 1191–1203. (2015)

Brand, A. H. Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118 401 415 (1993)

Hilliard, M.A., and Bargmann, C.I. Wnt signals and Frizzled activity orient anterior-posterior axon outgrowth in *C. elegans*. *Dev. Cell* 10, 379–390. (2006)

Ito, K., Urban, J. Technau, G.M. Distribution, classification, and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. *Roux's Arch Dev Biol* 204 284 307 (1995)

Kirszenblat, L., Pattabiraman, D., and Hilliard, M.A. LIN-44/Wnt Directs Dendrite Outgrowth through LIN-17/Frizzled in *C. elegans* Neurons. *PLoS Biol.* 9, e1001157. (2011)

Klapoetke, N. et al. Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat Methods* 11 338 346 (2014)

Kohsaka, H. et al . Development of larval motor circuits in *Drosophila* . *Develop. Growth Differ* 54 , 408 419 (2012)

Kupfermann, I., and Weiss, K.R. The command neuron concept. *Behav. Brain Sci.* 1, 3. (1978)

Lyuksyutova, A.I., Lu, C.-C., Milanesio, N., King, L.A., Guo, N., Wang, Y., Nathans, J., Tessier-Lavigne, M., and Zou, Y. Anterior-Posterior Guidance of Commissural Axons by Wnt-Frizzled Signaling. *Science* (80-.). 302, 1984–1988. (2003)

Nose, A., Takagi, S. Circuit architecture for somatotopic action selection in invertebrates. *Neuroscience Research* 140 37 42 (2019)

Shimomura, O., Johnson, F. H., Saiga, Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea* . *J. Cellular and*

Comparative Physiol 59 , 223–239 (1962)

Takagi, S. et al. Divergent Connectivity of Homologous Command-like Neurons Mediates Segment-Specific Touch Responses in *Drosophila*. *Neuron* 96 1373–1387 (2017)

Yizhar, O. et al. Optogenetics in Neural Systems. *Neuron* 71 , 9–34 (2011)

Wiersma, C.A.G., and Ikeda, K. Interneurons commanding swimmeret movements in the crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Comp. Biochem. Physiol.* 12, 509–525. (1964)

7.謝辞

本研究を行うにあたって、研究内容に留まらず研究生活等を含め包括的に粘り強く指導していただいた能瀬聡直教授に深く感謝いたします。また、研究について指導や助言を頂いた高坂洋史講師に深く感謝します。また、コロナ禍の中でも研究環境の維持に尽力してくださった柴原香澄氏に深く感謝します。そして、細々とした実験手法についての指導から、研究内容についてまで、きめ細かく指導していただいた高木優氏に深く感謝します。最後に、研究内容や生活に様々な意見を頂き、支えてくださった宮本道人氏、平本篤紀氏、劉英濤氏、曾祥孫澤氏、孫喜洋氏、福益一司氏、張旭氏、川崎賢人氏、真中美穂氏、李子源氏に深く感謝します。皆様、ありがとうございました。