

博士論文（要約）

Doctoral Dissertation (Censored)

ショウジョウバエ幼虫において行動選択を担う

投射ニューロンの同定と機能解析

(Identification and functional analyses of the projection neurons  
regulating action selection in *Drosophila* larvae)

令和元年7月 博士（理学）申請

A Dissertation Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy

July 2019

東京大学大学院 理学系研究科 物理学専攻

Department of Physics, Graduate School of Science,

The University of Tokyo

宮本 道人

Dohjin Miyamoto



# Abstract

感じ、考え、動く。動物がこれらの行動を起こせるのは、脳神経系内の回路の働きに依る。外界の刺激がどのように中枢神経系に伝わり、どのように行動選択が行われ、どのように運動につながるのかを明らかにすることは、神経科学の重要なテーマのひとつである。

中枢神経系には、異なる神経領域を接続する投射ニューロンと、同じ領域内に軸索を伸ばすローカルニューロンの二種類がある。異なる領域に投射するニューロンは、情報の統合や他の領域への伝達に関わる重要なニューロンである可能性が高いと考えられる。本研究では、分節化された脳神経系のなかでどのようにして特定の運動が選択され実行されるのかを、ショウジョウバエ幼虫の投射ニューロンに着目して、細胞レベルで探ることを目的とした。

ショウジョウバエ幼虫においては、特定の細胞で遺伝子発現を誘導することを可能とする Gal4 系統がリソース化されており、その発現パターンを可視化した画像も公開されている。本研究ではこの可視化画像から、投射ニューロンが含まれると考えられる候補系統を目視で 40 系統選択し、リソースから取り寄せた。

これらに対し、光遺伝学を用いた非侵襲行動実験を行い、特定の行動を誘発するニューロンを含む系統を探した。その結果、Gal4 発現細胞の活動亢進により後退あるいは前進運動の頻度が上がる系統を複数発見した。これら Gal4 系統の多くは少数ではあるが複数種のニューロンを含んでいたため、候補ニューロンを絞り込むため、さらにレーザー光による単離中枢神経系への局所神経活動亢進、Gal80 を用いた一部の領域での Gal4 機能阻害、クローン解析などを行い、2 系統 (ショウジョウバエ系統名：5 年以内に雑誌等で刊行予定のため

非公開) において、後退トリガーニューロンを同定した。ショウジョウバエ系統名：5 年以

内に雑誌等で刊行予定のため非公開

τニューロン、ショウジョウバエ系統名：5 年以内に雑誌等で刊行予定のため非公開

標的ニューロンに含まれる後退トリガーニューロンを ψ、μニューロンと名付け、詳細な解析を行った。

τニューロンを含むショウジョウバエ系統名：5 年以内に雑誌等で刊行予定のため非公開

標的ニューロンの活動抑制を行うと、機械刺激・青色光による後退ぜん動運動が減少した。したがって、τニューロンは後退運動の誘発に必要かつ十分なトリガーニューロンであることが示唆された。また頭部への触覚刺激を中枢に伝える胸部 T3 神経節の神経束に電流を流

し刺激すると、 $\tau$ ニューロンが活性化されることが、 $\text{Ca}^{2+}$ イメージングによって観察された。このことから、 $\tau$ ニューロンが後退ぜん動運動を起こすような感覚刺激に応じて活動することが確かめられた。 $\tau$ ニューロンは、コリン作動性であり、胸部 T1-T2 神経分節の DM 神経束近傍から入力を受けて脳内の VMC 領域に出力していた。DM 神経束近傍には、頭部への機械刺激から後退をトリガーする Wave ニューロンの軸索が存在することが知られていたため、Wave ニューロンと  $\tau$ ニューロンを同時に可視化した結果、重なっているのが観察され、したがって直接神経結合をしている可能性が示唆された。これらの実験から、 $\tau$ ニューロンは視覚、触覚両方の刺激の下流で後退運動の制御に関わっていること、特に触覚の刺激に対しては Wave ニューロンを介して機能していることが示唆された。

一方、 $\psi$ 、 $\mu$  ニューロンを含む シヨウジョウバエ系統名：5 年以内に雑誌等で刊行予定のため非公開

標的ニューロンの活動抑制を行うと、青色光による後退・屈曲ぜん動運動が減少した。したがって、 $\psi$ 、 $\mu$  ニューロンの両方または片方が後退運動の誘発に十分なだけでなく必要であることが示唆された。 $\mu$  ニューロンは、左右の脳の VLP 領域に樹状突起と軸索の双方を持つほか、左右の胸部 T1 神経分節にも軸索を伸ばしていた。一方  $\psi$  ニューロンは腹部神経節の尾端に存在する GABA 作動性ニューロンであり、腹部 A2-A8 神経分節にまたがり CI 神経束付近を前後に走る一对の神経突起にポストシナプス・プレシナプスを持ち、脳内の VLP 領域に軸索を伸ばしていた。VLP 領域付近には、青色光に対する逃避行動に関与する後退トリガー候補ニューロン Bi-Cluster の神経突起が存在する。これらの実験から、 $\mu$ ニューロン、 $\psi$ ニューロンは視覚刺激の下流で後退制御に関わっていることが示唆された。

また、 $\tau$ ニューロンを含む シヨウジョウバエ系統名：5 年以内に雑誌等で刊行予定のため非公開

非公開 標的ニューロン、 $\psi$ 、 $\mu$  ニューロンを含む シヨウジョウバエ系統名：5 年以内に雑誌

等で刊行予定のため非公開 標的ニューロンの活動抑制を行うと、後退ぜん動運動が減少す

るとともに、前進ぜん動運動が増加した。このことから、 $\tau$ 、 $\mu$ 、 $\psi$  ニューロンは、頭部への機械刺激や青色光刺激を受けた際に前進ぜん動運動の回路を抑制する役割も持っており、これらのニューロンを抑制すると前進ぜん動運動が生じるという可能性が考えられた。

本研究では、頭部への機械刺激と青色光による刺激がそれぞれどのように中枢神経系内を伝わり、後退ぜん動運動をトリガーするかの一端を明らかにした。今後、このような複数の投射ニューロンの同定を通し、行動選択過程における脳の複数領域を繋いだ制御の仕組みが明らかになると期待される。

Feel, think and move. These actions in the animal kingdom are thought to be produced by neurocircuitry in the nervous system. Understanding how sensory stimuli are transmitted to the central nervous system, how action selections are made, and how the movement is actuated is a major goal in neuroscience.

There are two types of neurons found in the central nervous system: projection neurons and local neurons. Projection neurons project to distant region(s) whereas local neurons locate within a certain region. Accordingly, projection neurons are likely to play an essential role in integration of multiple sets of information and information transfer to other regions. In this study, I systematically investigated and identified three types of projection neurons that trigger action selection in *Drosophila* larvae.

*Drosophila* larva is a classical model organism with strong genetic tools, including the Gal4-UAS system, which enables induction of gene expression in specific cells. A large collection of Gal4 lines has been generated by the FlyLight project and has been deposited as an open source to a stock center with images of the Gal4 expression. I screened through the large collection and identified 40 candidate lines that might contain projection neurons.

To examine if activating neurons targeted by the candidate Gal4 lines could induce specific motor pattern(s), I carried out noninvasive behavioral experiments by using optogenetics and identified several lines that target neurons whose activation resulted in increased backward or forward locomotion. Because many of these Gal4 strains contain multiple types of neurons, I then performed 1. Spatially localized photoactivation within the isolated central nervous system, 2. Partial suppression of Gal4 expression by the Gal80 technique, and 3. mosaic analysis, to identify the neurons that trigger the behaviors. As a result, I identified three types of neurons which trigger larval backward locomotion when activated by optogenetics and named them as  $\tau$  (targeted by ショウジョウバエ系統名：5年

以内に雑誌等で刊行予定のため非公開),  $\mu$  and  $\psi$  neurons (ショウジョウバエ系統名：5年以

内に雑誌等で刊行予定のため非公開), respectively.

Silencing ショウジョウバエ系統名：5年以内に雑誌等で刊行予定のため非公開 targeted neurons (including the  $\tau$  neuron) reduced the frequency of backward locomotion induced by tactile or blue light stimuli, suggesting that  $\tau$  neurons are not only sufficient by also necessary for the induction of backward locomotion upon the sensory stimuli. Next I used calcium imaging to record the activity of  $\tau$  neurons while applying electrical currents to stimulate the sensory nerve root in the thoracic neuromere T3, which conveys tactile stimulation in the head to the central nervous system.  $\tau$  neurons were activated immediately after the electrical stimulation, suggesting that  $\tau$  neurons are activated by

the tactile stimuli in the head. The  $\tau$  neuron is cholinergic and receives inputs near the Fasciclin2-positive DM fascicle in the thoracic T1-T2 neuromeres and projects to the VMC region in the brain. Interestingly, Wave neurons, which were previously shown to be involved in the regulation of backward locomotion induced by tactile stimuli, also project towards the DM bundle. Indeed, simultaneous visualization of Wave and  $\tau$  neurons revealed an overlapping region of their neurites. These results suggest that  $\tau$  neurons receive information from visual and tactile afferents and regulate backward locomotion.

Silencing ショウジョウバエ系統名：5年以内に雑誌等で刊行予定のため非公開-targeted neurons including  $\mu$  and  $\psi$  neurons decreased light-evoked backward locomotion and bending behavior, suggesting that both or one of  $\mu$  and  $\psi$  neurons are not only sufficient but also required for light-evoked backward locomotion. Anatomically, the dendrites and axons of  $\mu$  neurons arborize in the VLP region of both hemispheres, and an axonal projection also extends bilaterally to the T1 neuromere of the ventral nerve cord.  $\Psi$  neurons are GABAergic. They extend a bilaterally pair of neurites anteriorly across the abdominal 2-8 neuromere along the CI fascicle and an axon that project all the way to the VLP brain region. The previously identified Bi-Cluster neuron, which is another candidate backward triggering neuron in response to blue light, is also known to extend their neurites to the VLP region. These results suggest that  $\mu$  and  $\Psi$  neurons are involved in the regulation of backward locomotion in response to visual stimuli.

Intriguingly, inhibition of ショウジョウバエ系統名：5年以内に雑誌等で刊行予定のため非公開 and ショウジョウバエ系統名：5年以内に雑誌等で刊行予定のため非公開 targeted neurons also increased forward locomotion. This suggests that  $\tau$ ,  $\mu$ , and  $\psi$  neurons might play a role in suppressing forward peristaltic circuits when tactile or blue light stimuli are presented.

Taken together, this study identified three candidate projection neurons that function as trigger neurons for backward locomotion by linking the perception of blue light and/or tactile stimuli in the head to the execution of the escape behavior. Accordingly, this study provides the fundamentals for the future studies on the functional role of projection neurons on information integration and action selection.

# 目次

1	研究背景および研究目的.....	11
1-1	動物の定型的行動の生成と投射ニューロン .....	11
1-1-1	中枢パターン発生器 .....	11
1-1-2	行動トリガーニューロン .....	11
1-1-3	投射ニューロン .....	12
1-2	ショウジョウバエ幼虫の行動と中枢神経系 .....	12
1-2-1	ショウジョウバエ幼虫の行動の種類 .....	12
1-2-2	幼虫の節構造 .....	13
1-2-3	幼虫の脳 .....	14
1-3	ショウジョウバエ幼虫の運動トリガーニューロン .....	14
1-3-1	幼虫の様々な運動制御 .....	14
1-3-2	幼虫の後退行動に関わる感覚ニューロン .....	15
1-3-3	幼虫の後退トリガーニューロン .....	15
1-4	本研究の目的 .....	16
2	研究手法 .....	18
2-1	遺伝学的ツール .....	18
2-1-1	ニューロンのターゲティング .....	18
2-1-2	ニューロンの可視化 .....	19
2-1-3	ニューロンの活動操作 .....	19
2-1-4	ニューロンの活動測定 .....	20
2-1-5	クローン解析 .....	20
2-2	神経細胞の可視化 .....	21
2-2-1	免疫染色法 .....	21
2-2-2	蛍光観察 .....	21

2-2-3	用いた抗体 .....	22
2-3	行動実験.....	22
2-3-1	行動実験全般のセットアップ.....	22
2-3-2	光遺伝学での非侵襲行動実験.....	23
2-3-3	頭部へのピンによる刺激 .....	23
2-4	単離中枢神経系への Ca <sup>2+</sup> イメージングおよび局所神経活動亢進.....	23
2-4-1	Ca <sup>2+</sup> イメージング .....	24
2-4-2	ガラス電極を用いた神経刺激と Ca <sup>2+</sup> イメージングの同時適用.....	24
2-4-3	光遺伝学を用いた局所神経活動亢進と Ca <sup>2+</sup> イメージングの同時適用.....	24
2-5	用いたショウジョウバエ系統 .....	25
2-6	統計解析 .....	26
2-7	用いたソフトウェア .....	26
3	研究結果	

第 3, 4, 5 章については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

#### 4 考察

第 3, 4, 5 章については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

#### 5 結論

第 3, 4, 5 章については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

謝辞

図

引用文献

## 図のリスト

- Fig.1-1 ショウジョウバエ三齢幼虫の体節・腹部神経節
- Fig.1-2 ショウジョウバエ幼虫の腹部神経節と脳の相対座標
- Fig.1-3 幼虫の脳・投射ニューロンと行動選択
- Fig.2-1 遺伝子発現システム：Gal4-UAS システム
- Fig.2-2 光による神経活動亢進と神経活動測定
- Fig.2-3 トリガーニューロン候補を絞り込む手法

第 3, 4, 5 章については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

# 1 研究背景および研究目的

## 1-1 動物の定型的行動の生成と投射ニューロン

### 1-1-1 中枢パターン発生器

動物の定型的な運動パターンは、中枢神経系内のニューロン群が織りなす律動的な活動によって創り出されると考えられている。我々は日常的に行っている「歩く」という行為において、「この筋肉の次にこの筋肉を収縮させよう」などと考えることなく、「歩こう」とただ考えることだけで一連の歩行パターンが実現できる。このことから、特定の時空間パターンで運動ニューロンを活動させる神経回路が、動物に先天的に備わっていることが予想できる。しかし、この回路が「感覚入力なしにリズムを生成する」ものであるのか、あるいは「感覚フィードバックによる反射の連鎖だけでリズムを生成する」ものであるのかは、長らく議論の対象であった (Delcomyn, 1998)。

この論争が決着を見たのは、以下の実験によってである。即ち、背中を固定したバッタに飛翔行動を行わせている状態で、翅の運動を感知する感覚器官と中枢神経系とを結ぶ神経経路を除去しても、電気生理学的に測定された飛翔関与ニューロンの発火パターンに変化がなかったのである (Wilson, 1961)。この実験により中枢神経系にあると示された、定型的な運動パターンを生成する律動的な神経回路は、その後中枢パターン発生器 (Central Pattern Generator: CPG) と呼ばれるようになった (Delcomyn, 1998)。

現在では動物の定型的な運動パターンは一般的に、この中枢パターン発生器から作り出されると考えられており (Mulloney and Smarandache, 2010)、本研究で扱うショウジョウバエ幼虫においても、前進ぜん動運動および後退ぜん動運動の伝播波が感覚入力非存在下で生成することが知られている (Suster and Bate, 2002)。

### 1-1-2 行動トリガーニューロン

では、この中枢パターン発生器を駆動させるスイッチのようなニューロンはあるのだろうか。定型的な運動パターンが特定の刺激によって生じることは昔から知られていた (Tinbergen, 1951) が、中枢パターン発生器を駆動させるニューロンについての研究は、ザリガニの遊泳肢の運動を制御する実験 (Wiersma and Ikeda, 1964) から始まった。この研究では、ザリガニの一部の介在ニューロンの活動電位が遊泳肢による逃避運動を引き起こすことが明らかにされており、一部の介在ニューロンだけで運動の開始・持続時間・強さが制御できることから、その概念はコマンドニューロン仮説と名付けられた (Delcomyn, 1998)。

その後ほかの動物でも中枢パターン発生器を駆動させるニューロン群の存在が明らかとなった (Grillner, 1975) が、コマンドニューロンを「一連の運動を完全に生成するのに、そ

の活動が必要十分なニューロン」と定義すると、これに完全にあてはまるものはほとんどない。現在では、運動を引き起こす経路が複数ある場合や、複数のニューロン群の協調によって運動が実現する場合など、様々な例が知られている (Kupfermann and Weiss, 1978; Delcomyn, 1998)。そこで本研究では便宜的に、「一連の運動を完全に生成するのに、その活動が必要十分なニューロン群」をコマンドシステムと呼び、「一連の運動を完全に生成するのに、その活動が十分なニューロン群」をトリガーニューロンと呼ぶこととする。

### 1-1-3 投射ニューロン

投射ニューロン (Projection neuron) は、その細胞体が存在する領域と異なる領域に軸索を伸ばし、長距離の投射を行っているニューロンのことを指す (Amaral, Ch17, 2000)。特に腹部神経節／脊髄から脳に情報を伝えるニューロンを上行性 (Ascending)、脳から腹部神経節／脊髄に情報を伝えるニューロンを下行性 (Descending) と呼ぶ。また、本研究では、右脳と左脳を繋ぐようなニューロンについても投射ニューロンに含め研究対象とした。

上行性ニューロンの例を挙げると、例えばヒトでは、Anterolateral system という、痛みや温度の情報を肌から脳へ伝達する Somatosensation の神経束が知られている (Gardner et al., 2000)。これは、脊髄の中に投射した感覚ニューロンから入力を受け、それを視床に伝える役割を持つ。下行性ニューロンの例を挙げると、例えばヒトでは、Corticospinal tract という、皮質から脊髄の運動ニューロンを直接コントロールしている神経束の存在が知られている (Amaral, Ch18, 2000)。

なお、投射ニューロンと対になる概念として、同じ領域内に軸索を伸ばしているニューロンを「ローカルニューロン」あるいは「介在ニューロン」と呼ぶが、介在ニューロンという言葉には注意が必要である。感覚ニューロンと運動ニューロン以外のニューロンを介在ニューロンと指す場合も多く、特に本論文では介在ニューロンという言葉はこちらの意味でのみ用いている。

投射ニューロンは異なる脳領域をつなぐため、複数のモダリティの統合や離れた体部位の協調などの高次の制御に関与する可能性がある。ショウジョウバエ成虫においては、近年下行性ニューロンの投射パターンを網羅的に調べた研究が行われ、片側の脳だけで下行性ニューロンは約 350 存在すると推定されている (Namiki et al., 2018)。

## 1-2 ショウジョウバエ幼虫の行動と中枢神経系

### 1-2-1 ショウジョウバエ幼虫の行動の種類

ショウジョウバエの三齢幼虫は通常、腐った果物等のなかで穴を掘りながら食餌しているが、実験に際し寒天プレート等の平面上に置くと、移動運動を開始する。この運動のなかで

最も頻度の高い運動が、前進ぜん動運動 (Forward locomotion) である。その他の運動として、頭部に軽い機械刺激や青色光刺激が与えられたときに起こる後退ぜん動運動 (Backward locomotion)、青色光刺激が与えられたときや方向転換の際に起こる屈曲運動 (Bending)、自発的もしくは刺激に応じて起こる頭部の方向転換 (Head casting) や起立 (Green et al., 1983; Gomez-Marin et al., 2012; Okusawa et al., 2014)、熱や強い痛みを伴う機械刺激が与えられたときに起こる横方向への回転 (Rolling) (Hwang et al., 2007)、頭部へ空気を当てたときなどに起こる収縮 (Hunch) などが知られている (能瀬、2014)。

本研究ではこのうち特に前進ぜん動運動と後退ぜん動運動を主な解析対象とする。その理由のひとつはこの二種のぜん動運動における筋肉の収縮パターンが周期性を持つために、定量的な解析が行い易いことである。前進ぜん動運動は、各体節の筋肉が順に収縮することにより実現される。一方、後退ぜん動運動は、前進ぜん動運動と逆の方向に筋肉が順に収縮することで実現される。

本研究で用いるショウジョウバエ幼虫における体軸の方向に関する解剖用語を整理しておく。体の前後方向は、頭側 (Anterior-side)、尾側 (Posterior-side) と呼び、この軸を頭尾軸 (AP 軸) と呼ぶ。上下方向は、背側 (Dorsal-side)、腹側 (Ventral-side) と呼び、この軸を背腹軸 (DV 軸) と呼ぶ。左右方向は、左側 (Left-side)、右側 (Right-side) と呼び、この軸を左右軸 (LR 軸) と呼ぶ。単離された中枢神経系においてもこれらの体軸表現を同様に用いる。

## 1-2-2 幼虫の節構造

幼虫の中枢神経系は脳、節構造をとる腹部神経節 (Ventral Nerve Cord: VNC、脊椎動物の脊髄にあたる) およびその間に存在する食道下神経節 (Subesophageal Ganglion: SEZ) から構成される (Fig.1-1 A)。運動ニューロンは VNC 内の各神経分節に存在し、対応する各体節の筋肉に投射している (Hoang et al., 2001)。幼虫の体節には頭側から尾側にかけて T1-T3、A1-A8 と名前が順についており (Fig.1-1 B)、それぞれに対応する神経分節も同様に T1-T3、A1-A8 と呼ばれる (Fig.1-1 C)。なお、T は胸部 (Thoracic)、A は腹部 (Abdominal) を指す。3 齢幼虫では、ひとつの半神経分節にニューロンが約 300 個存在し (Truman and Bate, 1988)、そのうち約 35 個が運動ニューロン、残りが介在ニューロンである。各神経分節の運動ニューロンが順に、分節間を伝播波 (Propagating wave) 状に活動することで、ぜん動運動が実現する (Fox et al., 2006; Kohsaka et al., 2012)。前進/後退ぜん動運動は解剖し中枢神経系 (Central Nervous System: CNS) を露出した状態でも生成し、さらに、CNS のみを単離した状態でもぜん動運動に対応する神経活動 (Fictive locomotion) が起こる。このため、神経活動を後述の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングにより測定しながら運動を観察することが可能である (Kohsaka et al., 2012)。

幼虫の VNC 内でのニューロンの位置を三次元的に把握するために、細胞接着分子

Fasciclin2 (Fas2) の発現に基づく相対座標がよく用いられる (Landgraf et al., 2003; Santos et al., 2007)。Fas2 陽性軸索束は各神経節において左右方向に走るもの (Commissure) を含むため、Fig.1-2 A のように T1-T3、A1-A8 それぞれの神経節間の境界の参照として使える。また異なる位置で頭尾方向に走る 5 本の軸索束、DM (DorsoMedial)、DL (DorsoLateral)、CI (CentroIntermedial)、VM (VentroMedial)、VL (VentroLateral) も含み、これらは Fig.1-2 A, A' のように VNC 内の左右・背腹の相対位置の参照として用いることができる。

### 1-2-3 幼虫の脳

ショウジョウバエ幼虫の脳は、Hartenstein によっていくつかの領域に分類されている (Hartenstein et al., 2015)。これら領域は Neuroglial の発現と、脳構造の透過画像とを照らし合わせることで、可視化される (Fig.1-2 B)。各脳領域を把握するためには、まず大まかに脳内を頭側、尾側、その中間に分けて考え、さらに細かい領域を同定する。本研究では主に中間に位置する Ventro-Medial Cerebrum (VMC) 領域および Ventrolateral Protocerebrum (VLP) 領域に着目する。VMC は SEZ のすぐ背側、脳梁の最も腹側付近にあり、かつキノコ体の腹側に位置することから同定される。また VLP は VMC よりも側方にあり、Optic layer より内側にあることから同定される。

## 1-3 ショウジョウバエ幼虫の運動トリガーニューロン

### 1-3-1 幼虫の様々な運動制御

ヒトを含む脊椎動物ではリズム的な運動パターンは脊髄の介在ニューロンからなる CPG で生成され、運動ニューロンに伝わると考えられている。感覚ニューロンからの入力はその運動パターンを調整する役割を果たす。また、運動パターンの生成開始の引き金となるのは、脳からの入力であったり、感覚ニューロンからの入力であったりすると考えられている。

同様にショウジョウバエ幼虫においても、外界からの刺激が頭部や体表から入ると、それが脳や VNC へ伝わり、行動選択に繋がる。この時、脊髄に対応する VNC のみで行動選択が行われる経路と、脳での行動選択が VNC に伝わる経路があることが知られている (Ohyama et al., 2015) (Fig.1-3 A)。

このとき、外界からの刺激が体表から脳に伝わる経路では上行性ニューロンが、脳での行動選択が VNC に伝わる経路では下行性ニューロンが、それぞれ活動することになる (Fig.1-3 A, B)。

ショウジョウバエ幼虫の運動に関わるトリガーニューロンの研究として、回転、頭部の方向転換を誘発する感覚ニューロンをそれぞれ同定した研究 (Hwang et al., 2007; Ohyama et al., 2013) や、ショウジョウバエ幼虫の方向転換とぜん動運動の切り替えが VNC 内で行われる

ことを示した研究 (Berni et al., 2012)、また、収縮運動と屈曲運動の切り替え機構を示した研究 (Jovanic et al., 2016) などがある。

また、ショウジョウバエ幼虫の方向転換を制御するニューロン (Okusawa et al., 2014) や、ぜん動運動速度を制御するニューロン (Kohsaka et al., 2014) が同定されている。

特に後退行動については次の 1-3-2 および 1-3-3 で記述する。

### 1-3-2 幼虫の後退行動に関わる感覚ニューロン

ショウジョウバエ幼虫の後退運動は、頭部への触覚刺激、青色光や侵害的な化学物質への曝露により高頻度で誘導される。また、特に強い刺激がない場合でも、低い頻度であるが自発的に起こる。このことから、様々な感覚刺激を統合し、さらに確率的な要素を加え、後進の行動選択がなされると考えられる。本研究では特に、頭部への触覚刺激および青色光により誘導される後退運動に着目する。触覚刺激は感覚ニューロン、MD (Multidendritic) Class III および MD Class IV によって検知される。MD Class III は gentle-touch を感知し (Kernan et al., 1994; Tsubouchi et al., 2012; Yan et al., 2013)、MD Class IV は機械刺激を感知する (Hwang et al., 2007; Kim et al., 2012; Tracey et al., 2003) ことが知られている。一方、青色光は、Bolwig Organ という頭部の光受容器のほか、体表の MD Class IV 感覚ニューロンでも感知されることが知られている。Bolwig Organ は、青色光を感知するロドプシン 5 (Rh5) を発現する 4 つの光受容細胞と、緑色光を感知するロドプシン 6 (Rh6) を発現する 8 つの光受容細胞から構成される器官であるが、光逃避行動に関係するのは Rh5 型であることが示唆されている (Sprecher et al., 2007; Sprecher and Desplan, 2008)。Rh5 は、脳の Larval Optic Neuropil (LON) という領域に投射し、アセチルコリンで情報を伝達していることが知られている (Keene et al., 2011; Keene and Sprecher, 2012)。

### 1-3-3 幼虫の後退トリガーニューロン

1-3-2 で記述した感覚ニューロンの下流において働く後退トリガーニューロンとして、MDN、Wave (頭部分節側のニューロンのみ)、Seta、Leta などがこれまでに報告されている。以下、それぞれについて詳述する。

Mooncrawler Descending Neuron (MDN) は、脳に存在し、左右の脳に対照的な神経突起を伸ばすとともに、VNC の A3 分節まで下行性の軸索を伸ばすニューロンである (Carreira-Rosario et al., 2018)。下流に後退時に特異的に活動する興奮性の前運動ニューロン A18b や前進を抑制する働きをする pair1 ニューロンがあることがわかっており、これらニューロンを介して後進運動回路を活性化するとともに前進運動回路を抑制すると提唱されている。MDN は幼虫が蛹期を経て成虫になるまで持続し、成虫の後退ぜん動運動に関わるコマンドニューロン (Bidaye et al., 2014) となることも知られている。

Wave ニューロンは、VNC の各神経分節に 2 個ずつ存在するニューロンであり、頭部分節側と尾部分節側で異なる行動を誘発する (Takagi et al., 2017)。頭部側分節 (A1-A4) の Wave ニューロンが活性化すると後退ぜん動運動を誘発し、尾部側分節 (A5-A8) の Wave ニューロンが活性化すると前進ぜん動運動を誘発する。頭部側分節 A1 の Wave ニューロンについてコネクトミクスによる網羅的回路構造解析がなされており、上流・下流の細胞が決定された。その結果、1. Wave ニューロンは樹状突起を SEZ および T1-T3 神経分節の VM 神経束付近に伸ばし、そこで頭部への触覚刺激を検知する感覚ニューロン、MD Class III、MD class IV から直接入力を受けること、2. 軸索を T1-T3 分節の DM 束付近に伸ばし後退運動の実行に関わる神経細胞群に出力することが明らかとなっている。Wave ニューロンの活動は頭部への触覚刺激による後退運動の誘導に関与するが、視覚刺激によって誘導される後退運動には必要ではない。これらの観察から、Wave は頭部への触覚刺激を後退運動へつなげるノードとして機能すると提案されている。

Seta と Leta は、その活性化が後進運動を誘導するニューロンとして同定され、青色光により誘導される後退行動に関与することが示唆されているが、この上流・下流回路についてはわかっていない (Park et al., 2018)。

また未発表であるが、所属研究室の先行研究において、青色光による後退運動の誘導に関わる Bi-Cluster ニューロンが同定されている (大浦ら、未発表)。上記の Wave ニューロンの場合と逆に、Bi-Cluster ニューロンは青色光による後退運動の誘導に関与するが、頭部への触覚刺激により誘導される後退運動には必要ではない。このような観察から、頭部への触覚刺激と青色光の下流にそれぞれ別個の後退トリガー回路が存在することが示唆されている。

#### 1-4 本研究の目的

感じ、考え、動く。動物がこれらの行動を起こせるのは、中枢神経・末梢神経から構成される神経系の働きに依る。感覚ニューロンからどのように入力が伝わり、どのように行動選択が行われ、どのように運動につながるのかを明らかにすることは、神経科学の重要なテーマのひとつである。これまでに、線虫における単純な行動の選択からサルにおける複雑な行動選択プロセスに至る様々なレベルで多くの研究がなされてきた (Takagi and Nose, 2019; Krakauer and Ghez, 2000)。一般に中枢神経系には膨大な数のニューロンが存在し、そのなかで一つ一つのニューロンを特定し扱うことは困難である。そのため、複数の感覚入力が感覚器から脳にどのように入力し、どのように脳内で統合され、どのように行動が選択され、どのように運動につながるのかを一つ一つの神経細胞のレベルで解析するような研究は、線虫やヒルなどの非常に小規模な神経系をもつ動物に限られていた (Faumont et al., 2012)。

ショウジョウバエ幼虫は、ニューロン数約 300 である線虫と比較して、比較的複雑な神経系を持つ。また、脊椎動物と同様に体節構造を持ち、定型的な運動の種類が複数存在する。三齢幼虫のニューロン数は約 12000 であり (Li et al., 2014)、脊椎動物と比較すると少ない

とはいえ多数の細胞を含むため、従来、ショウジョウバエ幼虫の中枢神経系において、介在ニューロンが構成する回路構造を系統的に解析するのは不可能であった。しかし最近、コネクティクス解析のプラットフォームがショウジョウバエ幼虫において開発され、中枢回路の構造解析が次々に明らかにされつつある (Saalfeld et al., 2009)。また、少数のニューロンを標的とする Gal4 系統が系統的に作成され、UAS 系統と交配させることで、特定の細胞で特定の遺伝子が発現させることが可能となっている (Pfeiffer et al., 2010)。

そこで本研究では、分節化された脳神経系のなかでどのようにして特定の運動が選択され実行されるのかを、ショウジョウバエ幼虫を用いて細胞レベルで探ることを目的とした。特に、異なる脳領域をつなぐことで、複数のモダリティの統合や離れた体部位の協調などの高次の制御に関与する可能性がある投射ニューロンに着目して研究を行った。

## 2 研究手法

### 2-1 遺伝学的ツール

#### 2-1-1 ニューロンのターゲティング

##### Gal4-UAS システム

ショウジョウバエにおいては、遺伝子発現システムが発達しており、特定のニューロンを狙って任意の遺伝子を発現することが可能である (Venken et al., 2011)。なかでも Gal4-UAS システム (Brand and Perrimon, 1993) は、ショウジョウバエ神経研究に最も用いられている遺伝子発現システムである。Gal4 は酵母に由来する転写因子であり、UAS (Upstream Activation Sequence) という DNA 配列に結合することで下流遺伝子の発現を誘導する。ショウジョウバエでは、P 因子トランスポゾン (Rubin and Spradling, 1982) や  $\phi$ C31 インテグレース (Groth et al., 2004) を用いたトランスジェニック技術を利用して、特定の細胞に Gal4 タンパク質を発現させる「Gal4 系統」および、発現誘導させたい遺伝子を UAS 配列の下流に配置させた「UAS 系統」を製作することが可能である。この二系統を交配させると、次の世代の個体において、特定の細胞で特定の遺伝子が発現する (Fig.2-1)。

ショウジョウバエでは、多数の遺伝子の近傍ゲノム配列の制御下に Gal4 を発現する系統 (数千以上) が作製されているため、公開されている系統を入手し、様々なレポーター遺伝子を下流に配置した UAS 系統と組み合わせることで、中枢神経系の多くの細胞の活動を特異的に操作・測定できる。

米国のハーワード・ヒューズ医学研究所では、様々な発現パターンを示す Gal4 系統が作成され (Pfeiffer et al., 2010)、三齢幼虫でも発現パターンの画像がライブラリ化されている (Li et al., 2014)。

##### LexA システム

本研究では、同一個体内で二種の細胞群にそれぞれ異なるレポーターや神経活動操作プロモーターを発現させて実験を行った。このために Gal4-UAS システムと同時に用いたのが、Gal4-UAS と独立の遺伝子発現システム、LexA システム (Lai and Lee, 2006) である。

大腸菌 LexA タンパク質に転写活性をもつ分子を結合させると、この融合タンパク質は LexA オペレーター配列 (LexAop) に結合してその下流の遺伝子発現を誘導できるようになる。このシステムによって、特定の細胞に LexA タンパク質を発現させる「LexA 系統」および、発現誘導させたい遺伝子を LexAop 配列の下流に配置させた「LexAop 系統」を製作すれば、二系統を交配させた次世代において、細胞特異的な遺伝子発現が誘導できる。

このシステムは Gal4-UAS システムと独立に遺伝子発現を誘導できるため、同一個体内に Gal4、UAS、LexA、LexAop それぞれの遺伝子を導入することで、Gal4 発現細胞に UAS 下

流の遺伝子を発現させ、LexA 発現細胞に LexAop 下流の遺伝子を発現させる、ということが可能になる。

### **Gal80**

Gal80 は、その発現細胞において Gal4 の機能を抑制する遺伝学的ツールである。これにより、Gal4 の発現特異性を増すことができる。例えば tsh-Gal80 では、tsh 発現制御領域依存的に Gal80 が脳と尾端において発現し Gal4 を抑制するので、Gal4 依存的発現誘導を主に VNC に限定させることができる (Clyne and Miesenböck, 2008)。

## 2-1-2 ニューロンの可視化

### **蛍光タンパク質**

蛍光タンパク質とは、励起光を受けると蛍光を発するタンパク質である。本研究ではこれを用いてニューロンの形態、位置を調べた。蛍光タンパク質の存在は、オワンクラゲから緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein: GFP) を分離精製した研究 (Shimomura et al., 1962) によって明らかになり、線虫の細胞への GFP 導入・発現 (Chalfie et al., 1994) が行われたのを皮切りに、様々な動物種で細胞の標識として広く利用されるようになった。さらにその後 GFP の遺伝子配列を一部改変することで、様々な異なる蛍光波長を持つようにした蛍光タンパク質が作られた (Miyawaki et al., 1997)。本研究では GFP のほか mCherry、mVenus、黄色蛍光タンパク質 (Yellow Fluorescent Protein: YFP) を用いている。

### **シナプトタグミン**

シナプトタグミンはシナプス小胞上に存在する膜タンパク質である。特定の細胞において蛍光タンパク質と融合したシナプトタグミンを発現し、可視化することで軸索の位置を推定することができる (Nicolai et al., 2010)。

### **DenMark (Dendritic Marker)**

DenMark は樹状突起に選択的に存在する ICAM5 / Telencephalin と赤色蛍光タンパク質 mCherry の融合タンパク質である。DenMark を特定の細胞に発現させ、可視化することで樹状突起の位置を推定することができる (Nicolai et al., 2010)。

## 2-1-3 ニューロンの活動操作

### **光遺伝学による神経活動亢進**

光遺伝学とは、特定の波長の光を感受すると神経活動を亢進または抑制するタンパク質を特定のニューロン群に遺伝子発現させ、神経活動を光操作する手法である (Yizhar et al.,

2011)。本研究ではニューロンの活動を亢進するために、緑藻類クラミドモナスの眼点由来の光感受性陽イオンチャンネル CsChrimson を、上述した Gal4-UAS システムを用いて特定のニューロン群に発現させた。CsChrimson は All-Trans-Retinal (ATR) の存在下で光感受性のチャンネルを形成し、633nm 付近の光を照射されると構造を変化させ陽イオンを選択的に通し、ニューロンに脱分極を引き起こす (Klapoetke et al., 2014) (Fig.2-2 A)。ショウジョウバエにおいては、光感受性タンパク質が用いられる以前から、温度感受性タンパク質を用いた神経活動制御 (Parisky et al., 2008) が行われてきたが、光照射は温度変化よりも時空間分解能が高い点の特徴である。CsChrimson のほか、後述する局所神経刺激の手法では、青色光をピークに広い励起光波長をもつ Channelrhodopsin-2 (ChR2) を用いた (Nagel et al., 2003; Kato et al., 2012; Berndt et al., 2011)。ChR2 も CsChrimson 同様、ATR 存在下でのみ光感受性チャンネルを形成し、488nm 付近の光で構造変化し、ニューロンに脱分極を引き起こす。

### 光遺伝学による神経活動抑制

ニューロンの活動を抑制するために、光感受性陰イオン透過型チャンネルロドプシンである GtACR1 および GtACR2 を用いた。GtACR2 は青色光照射で、GtACR1 は緑色光照射で、それぞれ開口し神経活動を抑制する (Carreira-Rosario et al., 2018)。GtACR1 および GtACR2 も、ATR 存在下でのみ光感受性チャンネルを形成する。

## 2-1-4 ニューロンの活動測定

### Ca<sup>2+</sup>イメージング

Ca<sup>2+</sup>イメージングは Ca<sup>2+</sup>が結合すると蛍光量に変化するレポーターを特定のニューロン群に遺伝子発現させ、神経活動時に細胞内に流入する Ca<sup>2+</sup>の濃度変化を測定することで、神経活動を可視化する手法である。ショウジョウバエ幼虫においては、上述の Gal4-UAS システムや LexA システムを用いて特定のニューロン群にカルシウム感受性蛍光タンパク質を発現させることにより、発現細胞群の同時活動測定が可能となる。Ca<sup>2+</sup>イメージングは電気生理学的測定に比べると時間解像度は落ちるものの、多数の細胞の活動を同時に測定できることに大きなアドバンテージが存在する。

蛍光 Ca<sup>2+</sup>センサーは緑色の蛍光ピーク波長を持つ蛍光 Ca<sup>2+</sup>センサー GCaMP (Nakai et al., 2001; Chen T-W et al., 2013) のほか、赤色の蛍光ピーク波長を持つ蛍光 Ca<sup>2+</sup>センサー RCaMP (Akerboom et al., 2012) および RGECO (Red fluorescent genetically-encoded Ca<sup>2+</sup> indicators for optical imaging) (Zhao et al., 2011; Kohsaka et al., 2014) を用いた。これらのタンパク質は、GFP にカルモジュリンを挟み込んだ構造をしており、Ca<sup>2+</sup>結合下でカルモジュリンが形態変化することで蛍光タンパク質の構造が変化して蛍光が上昇し、その後 Ca<sup>2+</sup>が乖離すると蛍光が低下するため、経時的に神経活動を可視化できる (Fig.2-2 B)。

## 2-1-5 クローン解析

### MCFO (MultiColor FlpOut)

一部の神経細胞のみで確率的に、独立したエピトープタグ V5、HA、FLAG を結合したスパゲティモンスターGFP (smGFP) を発現させ、個々の細胞を別の色で染色する手法。組換え酵素である flippase (FLP) と、その標的配列 (flippase recognition target : FRT) を用いて、体細胞組換えを誘導して、クローンを作る (Nern et al., 2015)。

### FlpOut を用いた光遺伝学

組換え酵素である flippase (FLP) と、その標的配列 (flippase recognition target : FRT) を用い、Heatshock promoter の制御下で FLP が誘導される手法 (Fig.2-3 A)。これにより、熱を与えたときにのみ *UAS-FRT-STOP-FRT-CsChrimson* の STOP コドンが外れ、確率的に CsChrimson を発現した細胞ができる。本研究では、37.5-39.0°C のインキュベータに 0.5h-1h の条件下で heatshock を与えた。

## 2-2 神経細胞の可視化

### 2-2-1 免疫染色法

三齢幼虫をシリコンプレート上に虫ピン ( $\phi$  0.10mm, Stainless steel, Austerlitz Insect Pins) で固定し、Phosphate Buffered Saline (PBS) 溶液中で背側正中線に沿って切れ目を入れて体壁を両側に展開し虫ピンで固定し、体壁がよく見えるよう内臓をピンセットで取り払った。4%ホルムアルデヒドを含む PBS 溶液を用いて 20-30 分固定を行った後に PBS 溶液で 30 分洗浄、5%ヤギ血清を含む PBT 溶液 (0.2% Triton X-100 in PBS) で 30 分ブロッキング、その後一次抗体と 5%ヤギ血清 PBT 溶液に溶液を置換して 4°C で一晩静置した。これを PBT で 30 分洗浄、二次抗体と 5%ヤギ血清 PBT 溶液で置換して 4°C で一晩静置した。PBT で洗浄した後 PBS に置換し、蛍光観察を行った。

### 2-2-2 蛍光観察

2-2-1 のように準備した標本から中枢神経系を単離した。単離の手順としては、幼虫の中枢神経系から体壁に伸びている神経束を切断し、mouthhook 等の周辺組織から中枢神経系をピンセットで外し、PBS 溶液を滴下した MAS コート付きスライドガラス (S9215, Matsunami Glass) の上に貼り付けて固定した。水分をキムワイブ (日本製紙クレシア) で吸い取った後に、標本を透明化することができる試薬 Vecta Shield (Vector Laboratories) で置換、カバーガラス (18×18mm, Thickness 0.13-0.17mm, Matsunami Glass) をかけた。そこに超純水

(MILLIPOREの純水装置 milliQ により作成)を滴下して倍率60倍の水浸レンズ(LUMPlanFI, NA0.90, Olympus)、倍率100倍の水浸レンズ(LUMPlanFI, NA1.00, Olympus)を用いるか、あるいは乾式40倍レンズ(UPlanSAPO, NA0.90 or NA0.95, Olympus)を用いるかして、共焦点顕微鏡(FV1000, Olympus)においてレーザー光でスキャンした。画像のスキャンにはFV1000 付属の画像スキャンソフトウェア(Olympus FLUOVIEW Ver.4.2)を用いた。Alexa488 は Ar レーザー(波長 488nm)で、Cy3、Alexa555 はヘリウムネオンレーザー(波長 543nm)でそれぞれ励起した。

### 2-2-3 用いた抗体

用いた抗体を以下に記す。

#### 一次抗体

rabbit anti-GFP (Af2020, Frontier Institute; 1:1000)  
mouse anti-GFP (G6539, Sigma; 1:1000)  
guinea pig anti-GFP (Af1180, Frontier Institute; 1:1000)  
rabbit anti-dsRED (632496, TaKaRa; 1:500)  
rabbit anti-HA (C29F4, Cell Signaling Technology; 1:1000)  
mouse anti-V5 (R960-25, Invitrogen; 1:500)  
rat anti-FLAG (NBP1-06712, NOVUS; 1:150)  
mouse anti-Fas2 (1D4, Hybridoma Bank (University of Iowa); 1:10)  
mouse anti-neuroglian (BP104, DSHB; 1:50)  
rabbit anti-GABA (A2052, Sigma; 1:500)  
rabbit anti-vGluT (Gift from Hermann Aberle; 1:1000)  
mouse anti-ChAT (4B1, Hybridoma Bank (University of Iowa); 1:50)

#### 二次抗体

goat Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG (A-11034, Invitrogen Molecular Probes; 1:300)  
goat Alexa Fluor Cy3-conjugated anti-rabbit IgG (A-10520, Invitrogen Molecular Probes; 1:300)  
goat Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (A-11001, Invitrogen Molecular Probes; 1:300)  
goat Alexa Fluor 555-conjugated anti-mouse IgG (A-21424, Invitrogen Molecular Probes; 1:300)  
goat Alexa Fluor Cy5-conjugated anti-mouse IgG (A-10524, Invitrogen Molecular Probes; 1:300)  
goat Alexa Fluor 633-conjugated anti-rat IgG (A-21094, Invitrogen Molecular Probes; 1:200)  
goat Alexa Fluor 488-conjugated anti-guinea pig IgG (A-11073, Invitrogen Molecular Probes; 1:300)

## 2-3 行動実験

### 2-3-1 行動実験全般のセットアップ

一般的なコーンミール培地で飼育した雄と雌を同じバイアルに入れ交配させ、室温  $25\pm 1^\circ\text{C}$  の条件下で育て、2 齢幼虫をイーストペースト（乾燥酵母を同量の超純水に溶解させたもの）を塗ったリンゴジュース入り寒天プレートの上に移しアルミホイル等で遮光し、2 日間  $25^\circ\text{C}$  のインキュベータで育て、育った 3 齢幼虫を実験に用いた。イーストは ATR2mM を含むものと、全く含まないものをそれぞれ用いた。

幼虫はピンセットでピックアップし、実験に用いる前に超純水で軽く洗い、室温  $25\pm 1^\circ\text{C}$  の条件下で、ほぼ平面であるリンゴジュース入り寒天プレートの上に移し、その上を這わせて実験を行った。撮影は実体顕微鏡（SZX16, Olympus）と CCD カメラ（XCD-V60, SONY）によって行った。

### 2-3-2 光遺伝学での非侵襲行動実験

2-3-1 のようにセットアップした幼虫に対し、光照射を行い、その際の行動の変化を撮影した。実験は照度  $0.1\mu\text{W}/\text{mm}^2$  以下の暗幕内部で行い、CsChrimson を発現した個体に対しては赤色光、GtACR1 を発現した個体に対しては緑色光、GtACR2 を発現した個体に対しては青色光を照射した。赤色光照射には LED 光源（ $\sim 0.25\text{mW}/\text{mm}^2$ , 660nm, Thorlabs）、青色光照射には水銀ランプ光源（U-HGLGPS, Olympus）および蛍光フィルター（ $\sim 0.85\text{mW}/\text{mm}^2$ , 460-495nm）、緑色光照射には水銀ランプ光源および蛍光フィルター（ $\sim 0.70\text{mW}/\text{mm}^2$ , 530-550nm）を用いた。光照射の際には手動でフィルターを開閉した。

光照射は、幼虫を寒天プレート上に静置してから 15 秒以上経過し、前進ぜん動運動を安定して行う状態になったことを確認した後に、30 秒間行った。この光照射 30 秒の間の幼虫の前進ぜん動運動回数、後退ぜん動運動回数、屈曲運動回数を定量した。なお、光照射の前後での寒天プレートの温度変化は  $\pm 0.5^\circ\text{C}$  以下で、幼虫の行動に影響が出るほど大きい温度変化はないことを確認している。また、幼虫が寒天プレートに潜ったり、全く動かなかったり、プレートの端まで辿り着いてしまったりした場合、その個体は定量対象から除外した。

### 2-3-3 頭部へのピンによる刺激

幼虫は自発的に後退ぜん動運動を行うことはあまりない。そこで本研究では、強制的に後退ぜん動運動を生じさせるひとつの手法として、先の尖った虫ピン（ $\phi 0.10\text{mm}$ , Stainless steel, Austerlitz Insect Pins）で幼虫の頭部を突くことを行った。幼虫は頭部を突かれると、後方に逃げるために後退ぜん動運動を行う。

2-3-1 のようにセットアップした幼虫に対し、自由行動を 15 秒以上させた後、頭部を虫ピンで突いた。虫ピンで突いた 3 秒以内に後退運動が起こったら後退とカウント、そうでなければ後退なしとカウントした。

## 2-4 単離中枢神経系への $\text{Ca}^{2+}$ イメージングおよび局所神経活動亢進

### 2-4-1 $\text{Ca}^{2+}$ イメージング

三齢幼虫をシリコンプレート上に虫ピンで固定し、TES Buffer (TES 5 mM, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, MgCl 4 mM, CaCl 2 mM, sucrose 36 mM, pH = 7.15) 中で背側正中線に沿って切れ目を入れて体壁を両側に展開し虫ピンで固定し、中枢神経系を単離した。単離の手順としては、幼虫の中枢神経系から体壁に伸びている神経束を切断し、mouthhook 等の周辺組織から中枢神経系をピンセットで外し、TES Buffer を滴下した MAS コート付きスライドガラスの上に貼り付けて固定した。撮影には共焦点顕微鏡 (FV1000, Olympus もしくは Axioskop 2 FS, Zeiss) を用いた。

時空間的に精密な神経活動測定を行うため、CCD カメラと比較してより高コントラストな画像を得られる EMCCD カメラ (iXon3, Andor Technology) を用いた。Xe ランプ光 (X-Cite, Opto Science) あるいはレーザー光 (CSU-LS2WP, Zeiss) を中枢神経系全体に照射し、その励起によって GCaMP (または RGECO) が発する蛍光を EMCCD カメラで検出した。蛍光の見え方には個体ごとに微小な差があるので、光照射強度は適宜調節した。撮影は暗室内で行い、10fps で 800 フレーム以上取得した。

画像処理には EMCCD カメラ Andor iXon 付属の画像解析ソフトウェア (Andor iQ 1.10.3) を用いた。解析では各ニューロンに ROI を囲い、蛍光強度変化をグラフ化した。また、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングの際、活動を見たいニューロンを含む Gal4 系統と同時に、一部の運動ニューロンを可視化する *eve[RRa-F]-Gal4* (Fujioka et al., 2003) を用いた。これにより、運動ニューロンとの活動の相関を観察した。レンズには 10 倍水浸レンズ (Achromplan, NA0.25, Zeiss)、20 倍水浸レンズ (XLUMPLFLN, NA1.0, Olympus) を用いた。

### 2-4-2 ガラス電極を用いた神経刺激と $\text{Ca}^{2+}$ イメージングの同時適用

2-4-1 同様のセットアップのもと、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行いながら、ガラス電極を用いて、一部の感覚ニューロンの活動亢進を行った。幼虫の中枢神経系と体壁を繋いでいる末梢神経に対し、直径 5-8  $\mu\text{m}$  のガラスピペットを挿し、electronic stimulator (SEN-3301, Nihon Kohden) で生成したパルス電流 (Square pulses, interval: 10 ms, duration: 5 ms) を、プラチナ電極を通

して 10 秒間流した。

### 2-4-3 光遺伝学を用いた局所神経活動亢進と $\text{Ca}^{2+}$ イメージングの同時適用

2-4-1 同様のセットアップのもと、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行いながら、Channelrhodopsin-2 (ChR2) を発現させた幼虫に対し、レーザー光を用いて一部の感覚ニューロンの活動亢進を行った。局所的な光刺激を与えるため、スキャンした画像上で照射パターンを自由に編集できる共焦点顕微鏡 (FV1000, Olympus) を用いた。実験系のセットアップは (Fig.2-3 B) に示した。解剖したサンプルを倍率 20 倍の水浸レンズ (XLUMPLFLN, NA1.0, Olympus) で拡大し、VNC の全体が見えるよう配置した後、Ar レーザーを光源とした 515nm のレーザー光でスキャンして、ChR2::YFP 発現細胞の位置を確かめた。画像のスキャンには FV1000 付属の画像スキャンソフトウェア (Olympus FLUOVIEW Ver.4.2) を用いた。

次にスキャンした画像上で、光刺激を行いたい領域に点状の ROI (Region Of Interest) を作成し、Time Controller に光刺激する領域・照射光強度・照射タイミングを登録し、3 分間に 4-6 回の光照射を行った。光照射には 488 nm に輝線スペクトルを持つ Ar レーザーを光源とした青色光を用いた。この青色光は直径 600 $\mu\text{m}$  のピンホールを通して直径を絞られた後、光学倍率 3 倍のエリア照明ユニットにて直径 200 $\mu\text{m}$  の平行光になり、倍率 20 倍の対物レンズを用いることで直径 10 $\mu\text{m}$  (理論値) の平行光として標本面に照射される。

## 2-5 用いたショウジョウバエ系統

用いたショウジョウバエ系統を以下に記す。

ショウジョウバエ系統名：5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開
-----------------------------------

## 2-6 統計解析

統計解析には R-project (<https://www.r-project.org/>) を用いた。Mann–Whitney  $U$  test には、R-project のパッケージ"exactRankTests"を利用した。統計的有意差は以下のアスタリスクによって示した：\*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ; n.s., not significant。実験個体数は Fig.3-4 および Fig.3-10 を除き、すべて  $n$  で示した。

## 2-7 用いたソフトウェア

データ処理および作図には R-project、Igor Pro (WaveMetrics)、Excel (Microsoft)、PowerPoint (Microsoft) を用いた。論文作成には Word (Microsoft) を用いた。

### 3 研究結果

第 3, 4, 5 章については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

### 4 考察

第 3, 4, 5 章については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

### 5 結論

第 3, 4, 5 章については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

# 謝辞

本研究は森瀬周氏、能瀬聡直教授との共同研究です。森瀬周氏には主に 3-1 に記述した実験をサポートして頂きました。能瀬聡直教授にはあらゆる面で深甚なるご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。

また、本研究を行うにあたり、抗体を分与してくださった Hermann Aberle 博士、ショウジョウバエ系統を分与してくださった Miki Fujioka 博士、Tzumin Lee 博士、Julie Simpson 博士、Bassem Hassan 博士、Chris Doe 博士、Stefan Pulver 博士、Karen Hibbard 博士、および Gerald Rubin 研究室のメンバーに感謝申し上げます。

そして、本論文を審査頂き、貴重なご助言を下された酒井邦嘉教授、古澤力教授、岡田真人教授、新井宗仁教授、多羽田哲也教授に感謝申し上げます。

本研究を行うにあたって、現在能瀬研究室にいらっしゃる皆さま、また過去に能瀬研究室に在籍していらっしゃった皆さまから、沢山のご助言・ご協力・ご指導を頂きました。まず、未発表データを共有して下さった大浦将弥氏に感謝申し上げます。本研究全般に渡ってご助言・ご協力・ご指導を頂いた高坂洋史博士、高木優博士、平本篤紀氏、曾祥孫澤氏に感謝申し上げます。局所神経活動亢進の実験系の立ち上げをはじめ、研究室に入った時から様々な面でご指導下さった松永光幸博士に感謝申し上げます。脳領域の同定に関してご助言を頂いた伏木彬博士、青色光逃避に関する先行研究を行っていた奥沢暁子博士、朴正赫氏、研究環境の維持の面で大変お世話になった柴原香澄氏に感謝申し上げます。様々な実験についてご指導下さった高須悦子博士、二木佐和子氏、長谷川恵理博士、板倉由季博士に感謝申し上げます。

そのほか、研究活動を支えて下さった能瀬研究室の皆さま全員——劉英涛氏、孫喜洋氏、福益一司氏、稲葉晨介氏、張旭氏、川崎賢人氏、真中美穂氏、戸松一貴氏、仲林宏斗氏、高鳥達也氏、松尾悠司氏、川崎達平博士、尹永沢博士、草野真希氏、圓尾仁志氏、李康秀氏、高木俊輔氏、直井紀枝氏、坂巻裕美氏、丸田祥樹氏、坂佳祐氏、森竜太氏、櫻井寛人氏——に感謝申し上げます。

皆さま本当に有難うございました。

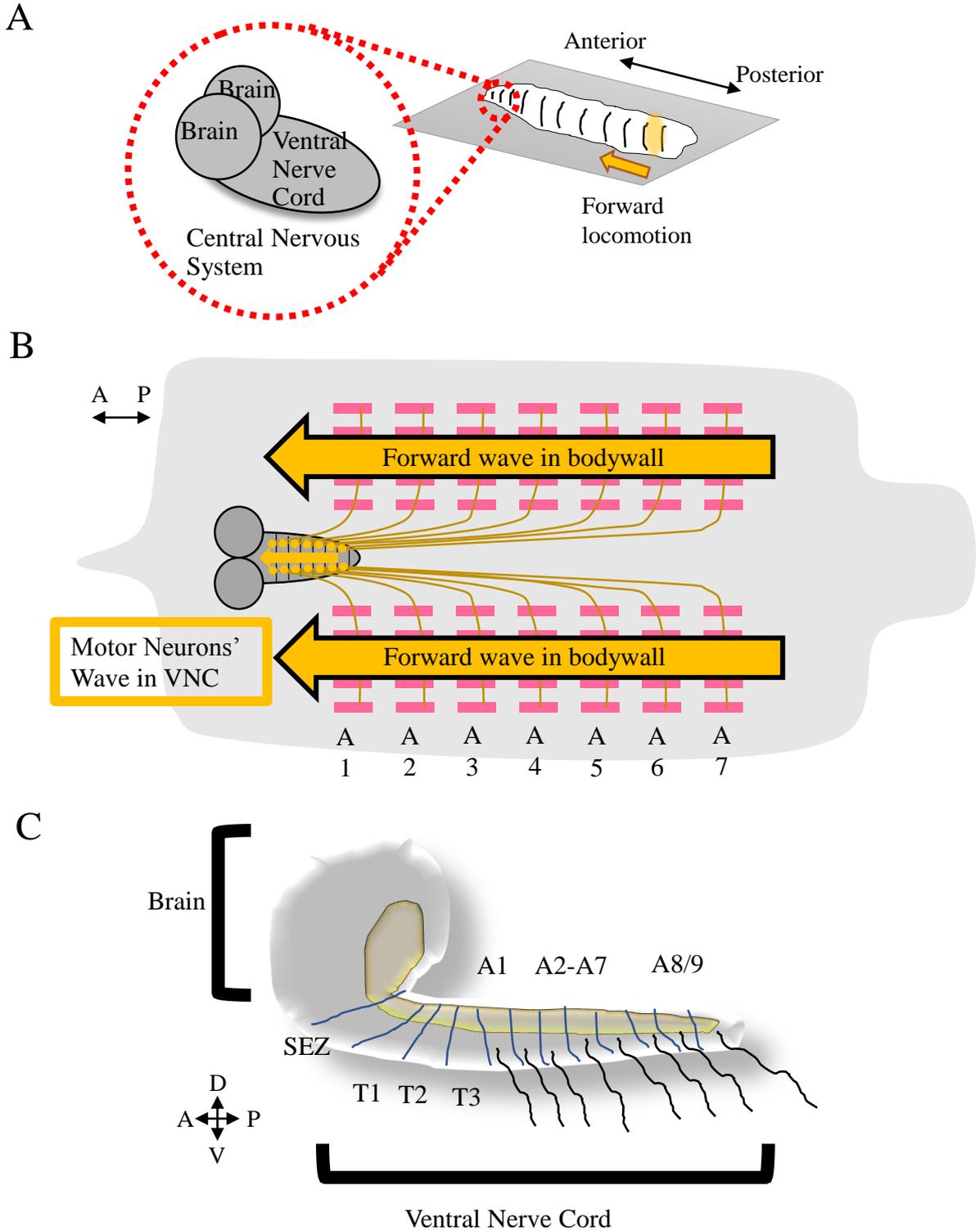
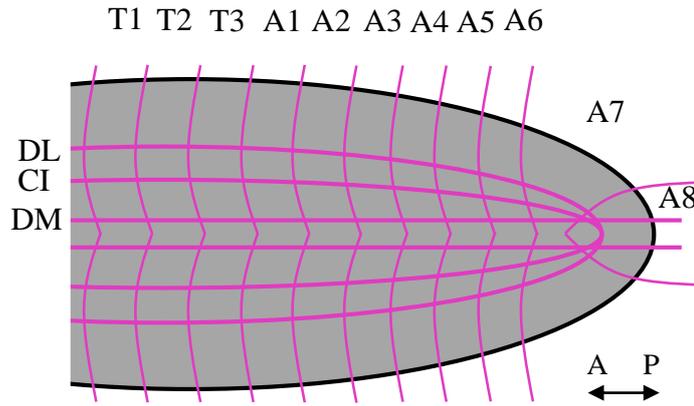
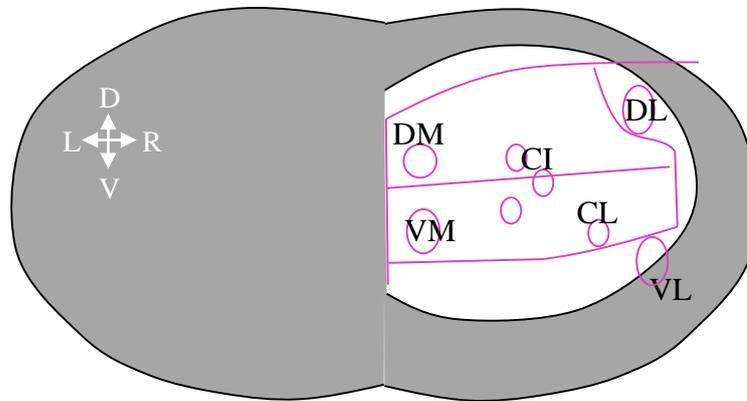


Fig.1-1 ショウジョウバエ三齢幼虫の体節・腹部神経節。(A) ショウジョウバエ幼虫の模式図。体節ごとの筋収縮が順に隣の体節に伝わることで、前進もしくは後退ぜん動運動が起こる。中枢神経系は脳と腹部神経節 (VNC) から構成される。(B) 運動ニューロンの活動と筋収縮の対応。幼虫のぜん動運動は、運動ニューロン群の連続的な活動によって生成される。黄色の点は運動ニューロンを表す。ピンクの四角形は筋肉の模式図である。(C) ショウジョウバエ三齢幼虫の中枢神経系の概略図。VNCには頭側から尾側にかけて、T1-T3、A1-A7、A8/9と呼ばれる神経分節が存在する。脳とVNCの間には食道下神経節 (SEZ: Subesophageal Ganglion) と呼ばれる器官がある。

A



A'



B

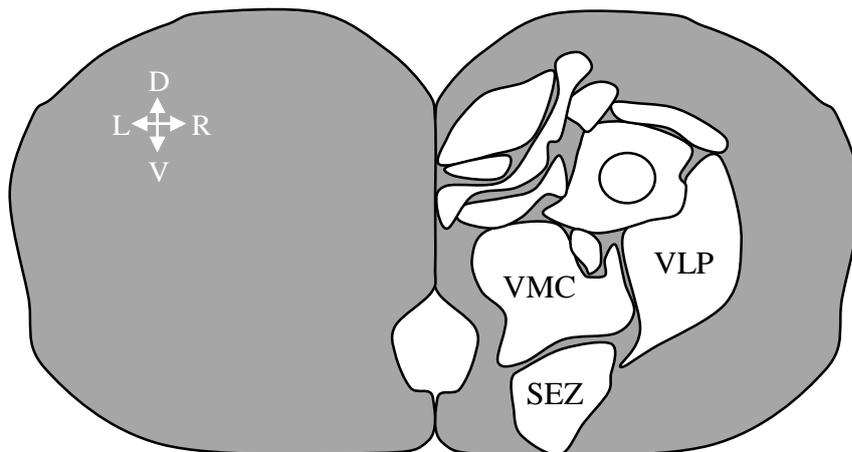
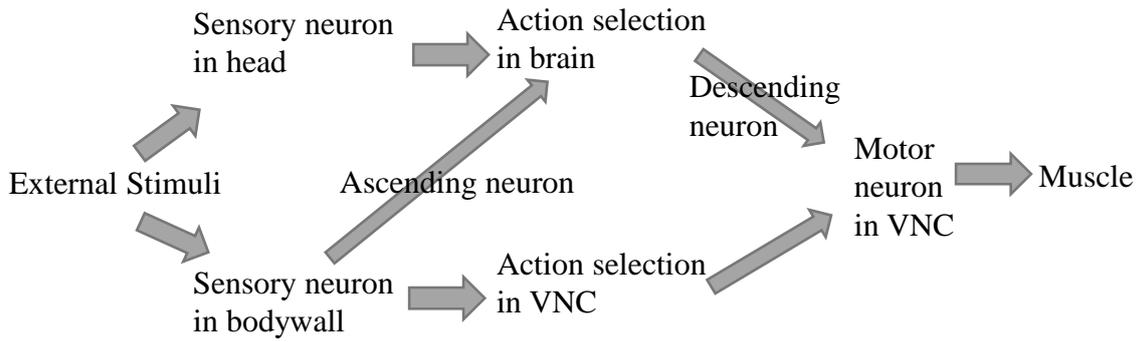


Fig.1-2 ショウジョウバエ幼虫の腹部神経節と脳の相対座標。(A,A') ショウジョウバエ幼虫の腹部神経節 (VNC) における Fas2 座標。抗 Fas2 抗体陽性軸索束 (マゼンタ) は相対座標として参照として用いることができる。Santos et al., 2007 を参考に作成。(A) 背側から見た図。(A') 尾端側から見た A5 神経分節付近の図。(B) ショウジョウバエ幼虫の脳の各領域。Hartenstein et al., 2015 を参考に作成。

A



B

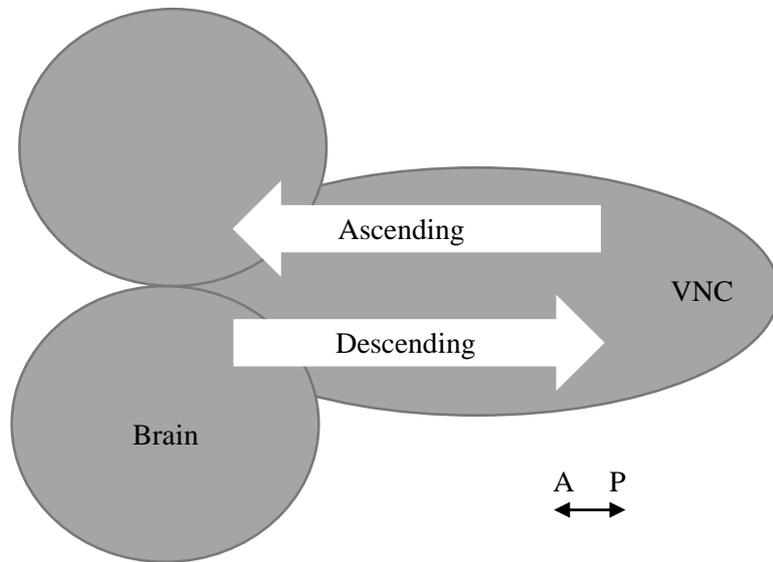


Fig.1-3 幼虫の脳・投射ニューロンと行動選択。(A) 外界からの刺激により行動選択が行われ、筋肉に出力されるまでに取り得る経路。(B) 投射ニューロン。VNCから脳に情報を伝えるニューロンを上行性 (ascending)、脳からVNCに情報を伝えるニューロンを下行性 (descending) と呼ぶ。

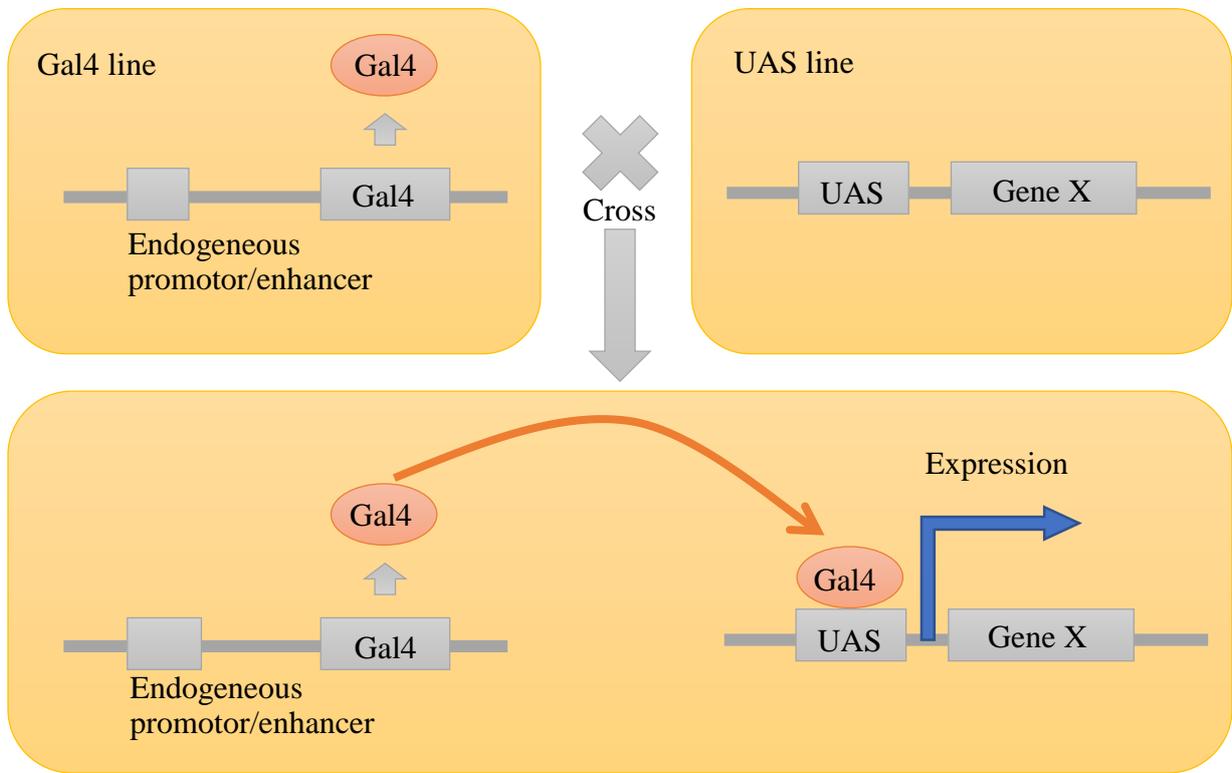
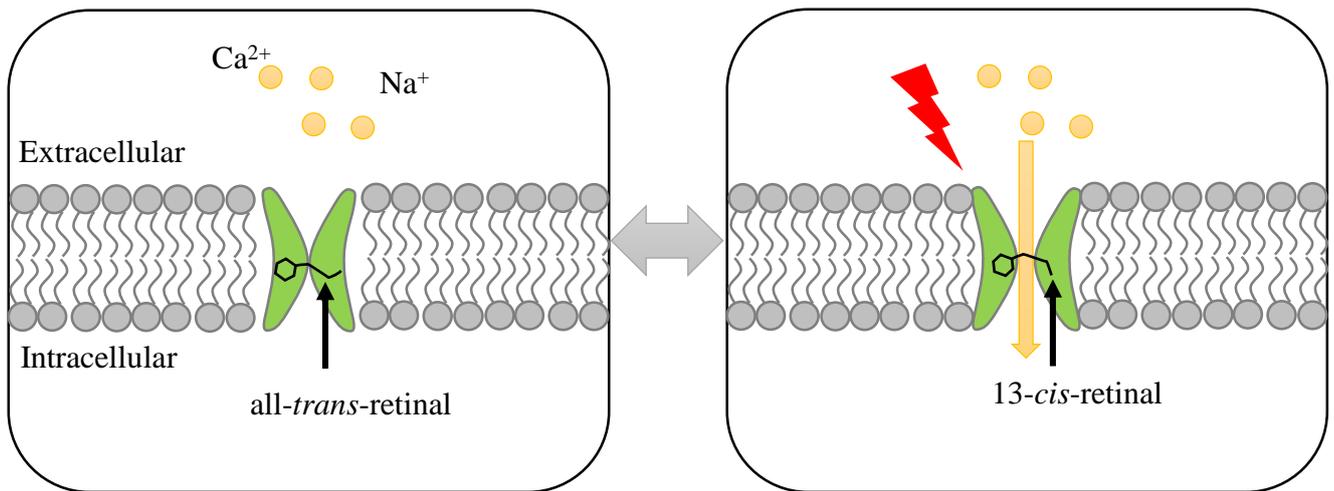


Fig.2-1 遺伝子発現システム：Gal4-UASシステム。Gal4は酵母に由来する転写因子であり、UASというDNA配列に結合することで下流遺伝子の発現を誘導する。

A



B

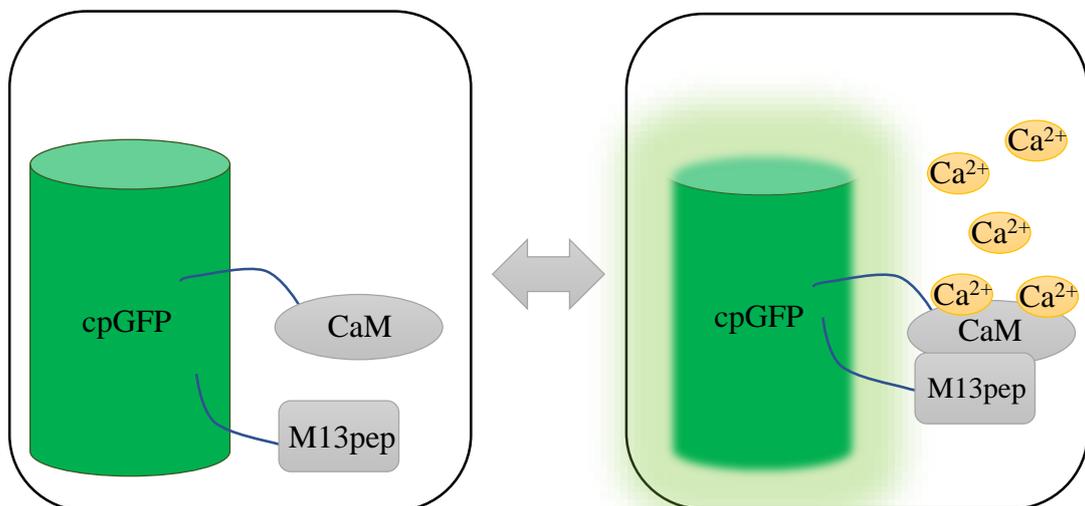
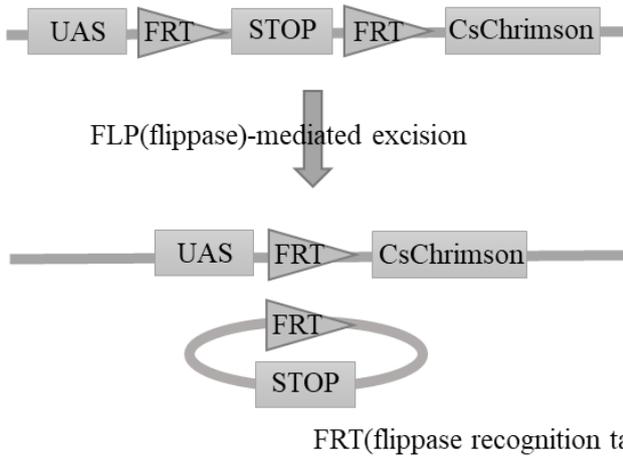


Fig.2-2 光による神経活動亢進と神経活動測定。(A) 光による神経活動亢進。CsChimsonはAll-Trans-Retinal (ATR) の存在下で光感受性のチャンネルを形成し、480nm付近の光を照射されると構造を変化させ陽イオンを選択的に通し、ニューロンに脱分極を引き起こす。(B) 光による神経活動測定。GCaMPは蛍光タンパク質cpGFPにカルモジュリン (CaM: Calmodulin) を挟み込んだ構造をしており、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合下でカルモジュリンが形態変化することで蛍光タンパク質の構造が変化して蛍光が上昇し、 $\text{Ca}^{2+}$ が乖離すると蛍光が低下するため、経時的に神経活動を可視化できる (cpGFP: circularly permuted GFP, CaM: Calmodulin, M13pep: a CaM-binding peptide)。

A



- Animal #1: Neuron A expression
- Animal #2: No expression
- Animal #3: Neuron B expression
- Animal #4: No expression
- Animal #5: Neuron A, B expression
- Animal #6: No expression
- Animal #7: Neuron C expression

...etc

B

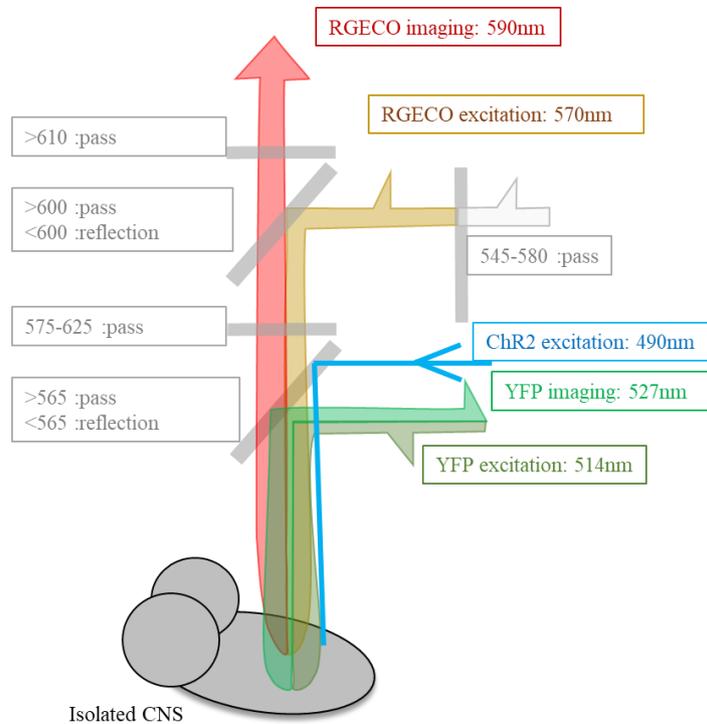


Fig.2-3 トリガーニューロン候補を絞り込む手法。(A) FlpOutを用いた光遺伝学。組換え酵素FLPとその標的配列FRTを用いて、Heatshock promoterの制御下でFLPを誘導することで、熱で確率的にCsChrimson発現細胞を作る。これによって、CsChrimsonが発現するニューロンを個体ごとにランダムにすることが可能になり、特定のニューロンのみを活動亢進することができる。(B) 神経活動亢進と神経活動測定を同時に行う実験系。まず、514nm付近の光によりYFPを励起し、527nm付近の蛍光の画像を得ることで、Gal4発現ニューロンの位置を確認する。次にターゲットのニューロンを確認し、光照射位置を領域した後、中枢神経系全体のRGECOを570nm付近の光により励起させ、lexA発現ニューロンの活動をイメージングする。この状態のまま、決定した領域に490nm付近の光を照射すれば、その領域のChR2が励起され、領域内に存在するGal4発現ニューロンの活動が亢進される。なお、灰色はフィルター、あるいはハーフミラーを表し、灰色の四角内には透過光と反射光がどのように分けられているかの目安を記した。

第3, 4, 5章については、5年以内に  
雑誌等で刊行予定のため、非公開

## 引用文献

Adams MD et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.

Akerboom J et al. (2012). Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *The Journal of Neuroscience* 32, 13819-13840.

Amaral DG. (2000). The Anatomical Organization of the Central Nervous System. from Kandel ER, Schwartz JH and Jessell TM. (2000). *Principles of Neural Science*, 4th. ed., McGraw-Hill Health Professions Division, Ch17, 317-336.

Amaral DG. (2000). The Functional Organization of Perception and Movement. from Kandel ER, Schwartz JH and Jessell TM. (2000). *Principles of Neural Science*, 4th. ed., McGraw-Hill Health Professions Division, Ch18, 337-348.

Berni J, Pulver S, Griffith L and Bate M. (2012). Autonomous Circuitry for Substrate Exploration in Freely Moving *Drosophila* Larvae. *Current Biology* 22, 1861–1870.

Berndt A et al. (2011). High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7595–7600.

Bidaye SS, Machacek C, Wu Y and Dickson BJ. (2014). Neuronal Control of *Drosophila* Walking Direction. *Science* 344, 97-101.

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

Carreira-Rosario A et al. (2018). MDN brain descending neurons coordinately activate backward and inhibit forward locomotion. *elife* 7, e38554.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW and Prasher DC. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.

Chen T-W et al. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295–300.

Clyne JD and Miesenböck G. (2008). Sex-Specific Control and Tuning of the Pattern Generator for Courtship Song in *Drosophila*. *Cell* 133, 354–363.

Delcomyn F. (1998). *Foundations of Neurobiology*, 1st. ed., W. H. Freeman, New York.

Faumont S, Lindsay TH and Lockery SR. (2012). Neuronal microcircuits for decision making in *C. elegans*. *Current Opinion in Neurobiology* 22, 580-591.

Friesen WO and Kristan WB Jr. (2007). Leech locomotion: Swimming, crawling, and decisions. *Current Opinion in Neurobiology* 17, 704-711.

Fox LE, Soll DR and Wu CF. (2006). Coordination and modulation of locomotion pattern generators in *Drosophila* larvae: effects of altered biogenic amine levels by the tyramine beta hydroxylase mutation. *The Journal of Neuroscience* 26, 1486-1498.

Fujioka M et al. (2003). Even-skipped, acting as a repressor, regulates axonal projections in *Drosophila*. *Development* 130, 5385–5400.

Fushiki A et al. (2016). A circuit mechanism for the propagation of waves of muscle contraction in *Drosophila*. *elife* 5, e13253.

Gardner EP, Martin JH and Jessel TM. (2000). The Bodily Senses. from Kandel ER, Schwartz JH and Jessell TM. (2000). *Principles of Neural Science*, 4th. ed., McGraw-Hill Health Professions Division, Ch22, 430-450.

Gomez-Marin A, Stephens GJ and Louis M. (2011). Active sampling and decision making in *Drosophila* chemotaxis. *Nature Communications* 2, 441.

Green CH, Burnet B and Connolly KJ. (1983). Organization and patterns of inter- and intraspecific variation in the behaviour of *Drosophila* larvae. *Animal Behaviour* 31, 282–291.

Grillner S. (1975). Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction. *Physiological Reviews* 55, 247-304.

Groth AC, Fish M, Nusse R and Calos MP. (2004). Construction of transgenic *Drosophila* by using

the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics* 166, 1775-1782.

Hartenstein V et al. (2015). Lineage-associated tracts defining the anatomy of the *Drosophila* first instar larval brain. *Developmental Biology*. 406, 14–39.

Hoang B and Chiba A. (2001). Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Developmental Biology* 229, 55-70.

Hwang RY et al. (2007). Nociceptive neurons protect *Drosophila* larvae from parasitoid wasps. *Current Biology* 17, 2105–2116.

Inoue M et al. (2015). Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2. *Nature Methods* 12, 64-70.

Jovanic T et al. (2016). Competitive Disinhibition Mediates Behavioral Choice and Sequences in *Drosophila*. *Cell* 167, 858-870.

Kato HE et al. (2012). Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature* 482, 369-374.

Keene AC et al. (2011). Distinct visual pathways mediate *Drosophila* larval light avoidance and circadian clock entrainment. *Journal of Neuroscience* 31, 6527–6534.

Keene AC and Sprecher SG. (2012). Seeing the light: photobehavior in fruit fly larvae. *Trends in Neurosciences* 35, 104–110.

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

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

Kohsaka H, Takasu E, Morimoto T and Nose A. (2014). A Group of Segmental Premotor Interneurons Regulates the Speed of Axial Locomotion in *Drosophila* Larvae. *Current Biology* 24, 2643-2651.

Krakauer J and Ghez C. (2000). Voluntary Movement. from Kandel ER, Schwartz JH and Jessell TM.

(2000). *Principles of Neural Science*, 4th. ed., McGraw-Hill Health Professions Division, Ch38, 756-781.

Kupfermann I and Weiss KR. (1978). The command neuron concept. *Behavioral and Brain Sciences* 1, 3–39.

Lai SL and Lee T. (2006). Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nature Neuroscience*. 9, 703–709.

Landgraf M et al. (2003) Charting the *Drosophila* neuropile: a strategy for the standardised characterisation of genetically amenable neurites. *Developmental Biology* 260, 207-225.

Li HH et al. (2014). A GAL4 Driver Resource for Developmental and Behavioral Studies on the Larval CNS of *Drosophila*. *Cell Reports* 8, 897-908.

Mulloney B and Smarandache C. (2010). Fifty Years of CPGs: Two Neuroethological Papers that Shaped the Course of Neuroscience. *Front Behav. Neurosci.* 4, 45.

Nagel G et al. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13940-13945.

Nakai J, Ohkura M and Imoto K. (2001). A high signal-to-noise Ca<sup>2+</sup> probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. 19, 137–141.

Namiki S et al. (2018). The functional organization of descending sensory-motor pathways in *Drosophila*. *eLife* 7, e34272.

Nern A, Pfeiffer BD, and Rubin GM. (2015). Optimized tools for multicolor stochastic labeling reveal diverse stereotyped cell arrangements in the fly visual system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E2967–E2976.

Nicolaï LJJ et al. (2010). Genetically encoded dendritic marker sheds light on neuronal connectivity in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20553–20558.

Ohyama T et al. (2013). High-throughput analysis of stimulus-evoked behaviors in *Drosophila* larva reveals multiple modality-specific escape strategies. *PLoS ONE* 8, e71706.

Ohyama T et al. (2015). A multilevel multimodal circuit enhances action selection in *Drosophila*. *Nature* 520, 633–639.

Okusawa S, Kohsaka H and Nose A. (2014). Serotonin and downstream leucokinin neurons modulate larval turning behavior in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*. 34, 2544-2558.

Parisky KM et al. (2008). PDF cells are a GABA-responsive wake-promoting component of the *Drosophila* sleep circuit. *Neuron* 60, 672-682.

Park J et al. (2018). Data-driven analysis of motor activity implicates 5-HT2A neurons in backward locomotion of larval *Drosophila*. *Scientific Reports* 8, 10307.

Pfeiffer BD et al. (2010) Refinement of Tools for Targeted Gene Expression in *Drosophila*. *GENETICS* 186, 735-755.

Rubin GM and Spradling AC. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, 218, 348-353.

Saalfeld S, Cardona A, Hartenstein V and Tomančák P. (2009). CATMAID: Collaborative Annotation Toolkit for Massive Amounts of Image Data. *Bioinformatics* 25, 1984–1986.

Santos JG. (2007) Neuroarchitecture of Peptidergic Systems in the Larval Ventral Ganglion of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 2, e695.

Shimomura O, Johnson FH and Saiga Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, 223–239.

Sprecher SG and Desplan C. (2008). Switch of rhodopsin expression in terminally differentiated *Drosophila* sensory neurons. *Nature* 454, 533–537.

Sprecher SG, Pichaud F and Desplan C. (2007). Adult and larval photoreceptors use different mechanisms to specify the same Rhodopsin fates. *Genes & Development* 21, 2182–2195.

Suster ML and Bate M. (2002). Embryonic assembly of a central pattern generator without sensory

input. *Nature* 416, 174-178.

Takagi S et al. (2017). Divergent connectivity of homologous command-like neurons mediates segment-specific touch responses in *Drosophila*. *Neuron* 96, 1373–1387.

Takagi S and Nose A. (2018). Circuit architecture for somatotopic action selection in invertebrates. *Neuroscience Research* 140, 37-42.

Tinbergen N. (1951). *The Study of Instinct*, Oxford Univ. Press, New York.

Tracey WD, Wilson RI, Laurent G and Benzer S. (2003). *painless*, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell* 113, 261–273.

Truman JW and Bate M. (1988) Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 125, 145-157.

Tsubouchi A, Caldwell JC and Tracey WD. (2012). Dendritic filopodia, ripped pocket, NOMPC, and NMDARs contribute to the sense of touch in *Drosophila* larvae. *Current Biology*. 22, 2124–2134.

Miyawaki A et al. (1997). Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882-887.

Venken HJ, Simpson JH and Bellen HJ. (2011). Genetic manipulation of genes and cells in the nervous system of the fruit fly. *Neuron* 72, 202-230.

Lai SL and Lee T. (2006). Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nature Neuroscience* 9, 703-709.

Wilson DM. (1961). The central nervous control of flight in a locust. *Journal of Experimental Biology* 38, 471-490.

Wiersma CAG and Ikeda K. (1964) Interneuron commanding swimmeret movements in the crayfish, *Procambarus clarki* (girard). *Comp. Biochem. Physiol* 12, 509-525.

Yizhar O et al. (2011). Optogenetics in neural systems. *Neuron* 71, 9-34.

Zhao Y et al. (2011). An expanded palette of genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators. *Science* 333, 1888–1891.