

博士論文（要約）

キイロショウジョウバエ脳における

感覚中枢の機能的解析

(Functional analysis of sensory centers in the

Drosophila melanogaster brain)

矢野朋子

目次

本博士論文中、第0章 (p.9-p.11 一部)、第5-6章 (p.66-p.92、図26-図46、表1-7)、第7章 (p.94-p.95 一部) は生物学系学術雑誌に掲載予定であるため削除してあります。

0. 要旨	p.5
1. 序論	
1-1. キイロショウジョウバエを用いた脳神経回路の網羅的解析の意義	p.12
1-2. キイロショウジョウバエ脳の研究	p.13
1-3. キイロショウジョウバエの体性感覚を受容する感覚器官	p.15
1-4. キイロショウジョウバエ体性感覚受容器の胸腹部神経節への投射パターン	p.18
1-5. キイロショウジョウバエの視覚	p.19
1-6. GAL4-UAS システムとカルシウムイメージング法による機能的解析	p.20
1-7. 2 光子レーザー顕微鏡を用いたカルシウムイメージング	p.22
2. 材料と方法	
2-1. かけ合わせと飼育	p.24
2-2. カルシウムイメージング用固定方法	p.25
2-3. カルシウムイメージング	p.26
2-4. 機械刺激装置	p.27
2-5. 空気流刺激装置	p.28
2-6. トラックボール装置	p.30
2-7. 機械刺激・空気流刺激・顕微鏡撮影の制御	p.30
2-8. 光刺激装置	p.31

2-9. 各種解析方法	p.31
2-10. 統計解析	p.37
2-11. 脳標本の染色	p.37

Part.1 : 体性感覚中枢の構造的機能的解析

3. 結果 1

3-1. 胸腹部神経節から脳へ投射する神経をラベルする GAL4 系統のうち カルシウムイメージングに適した系統の選別	p.40
3-2. 翅・平均棍の感覚器官から脳へ直接投射する神経群の解析	p.43
3-3. 脚の感覚器官から脳へ直接投射する神経群の解析	p.45
3-4. 末梢感覚器官からの入力を受け脳へ投射する介在神経群の機能的解析	p.46
3-5. Lco1N1 における自由行動下での片側各脚 1 本だけ残したときの反応部位	p.49
3-6. 正面からの強い風に対して踏ん張ったときの Lco1N1 の反応	p.50
3-7.末梢での GCaMP の発現	p.52

4. 考察 1

4-1. 体性感覚神経は末梢の感覚器官から直接脳へ投射する経路と 介在神経を経由する経路の 2 つがある	p.53
4-2. 翅、平均棍由来の神経群 Wcs1N、Hcs1N は動きを検出し脳の 異なる領域に情報を伝えている	p.59
4-3. 脚由来の 1 次神経群 Lco1N1、Lco1N2、2 次神経 Lco2N1、Lco2N2、 Les2N1、Les2N2 は脚の動きに対してそれぞれ異なる反応を示す	p.62

Part.2 : 低次視覚中枢と高次視覚中枢を結ぶ視覚投射経路 (VPNs) の波長特異性の

解析

5. 結果 2

5-1. 光刺激装置の開発 p.67

5-2. 光刺激実験に使用するハエ系統で標識される神経の投射形態 p.68

5-3. 視覚の 1 次中枢と高次中枢を結ぶ各種 VPNs の波長特異的な神経応答の解析
p.71

6. 考察 2

6-1. 視覚投射神経の視葉での受容野とその働き p.86

6-2. 異なる光刺激に対して強い反応を示した経路 p.88

6-3. 異なる光刺激に対して弱い反応を示した経路 p.91

6-4. 異なる光刺激に対して反応を示さなかった経路 p.92

7. まとめ p.93

8. 謝辞 p.96

9. 引用文献 p.97

10. 図・表

0. 要旨

地球上の全ての生物は環境の変化を検知する仕組みを有しており、それにより外敵から身を守ったり、餌を見つけたりすることができる。我々ヒトを含めた哺乳動物では、視覚、聴覚、味覚、嗅覚、体性感覚がそれにあたる。これらの五感体表にある特定の感覚器官で刺激が受容され、感覚神経により中枢である脳に情報が伝えられることにより生じる。そして受容された感覚情報ごとに適切な行動を選択し、出力している。すなわち、動物の行動を理解するためには、外界からの刺激がどのように受容され、脳中枢で処理され、行動として出力されるのかという一連の経路を明らかにすることが必要である。しかし、複雑な脳をもつ動物になるほど、その経路の全貌を明らかにすることは困難である。そこで、よりシンプルな脳をもつ動物を用いて動物行動に関与する神経回路を明らかにし、全ての動物に共通する原理を見つけることが動物行動の理解において重要なステップとなる。

キイロショウジョウバエは昆虫の中でも脳研究が進んでおり、低次感覚中枢の神経回路の詳細が明らかとなっている。また多種多様な研究手法も開発されているため神経回路の全貌を解明するのに適している。本研究では、視覚、聴覚、味覚、嗅覚に比べて研究が遅れておりまだ詳細が分かっていない体性感覚中枢について、その構造と機能を明らかにする。また、キイロショウジョウバエは波長特異的な行動が知られているがそれを司る視覚中枢の神経回路は解明されていない。本研究では体性感覚中枢を明らかにするために立ち上げた実験系を応用して、異なる波長に対する視覚の低次中枢と高次中枢を結ぶ高次視覚投射経路の神経活動の波長特異性も解析し、ショウジョウバエの脳の感覚中枢の機能的解明を進めた。

キイロショウジョウバエの体性感覚に関しては、その感覚器官が体表に散在していること、刺激の種類が触覚、圧覚、温度覚、痛覚など複数種あることなどから、他の感覚と比べて脳

における中枢の解析があまり進んでいなかった。そこで本研究では、解剖学的な解析により、ハエの胴体部から脳へ投射する神経の形態、投射経路に関しての詳細を調べ、それら新たに見つかった神経について胴体部からのどのような体性感覚情報がどのような経路で、脳のどの領域に投射するのかを GAL4-UAS システムを用いたカルシウムイメージング法により解明する。研究手順としては、既知の経路から、カルシウムイメージングに使用可能な特異性が高く、発現の強い系統を選び、胴体部に複数種の刺激を与えた場合や、自由に行動している場合での神経活動をカルシウムイメージング法により記録した。

キイロショウジョウバエの体表には、機械感覚毛、鐘状感覚子と呼ばれる感覚器官があり、それぞれ接触や圧覚を受容している。また体表のすぐ下には弦音器官や樹状に広がった神経が広がっており、それぞれ振動や温度、痛みなどを受容している。これまでの解剖学的な解析から、それら体表の体性感覚受容器から脳への神経投射経路には 2 種類あることが分かった。一つは末梢から直接脳へ投射する経路、もう一つは胸部神経節で介在神経を介して脳へ投射する経路である。カルシウムイメージングはこの二種類の経路について行った。

直接の経路には、翅、平均棍、脚からのものがあり、腹からのものは確認されていない。翅、平均棍の経路は、それぞれの末梢から胸部神経節に入った神経群が頸部で一つになり、脳に入って分岐して 4 つの領域に投射する。投射領域は GNG と呼ばれる領域の腹側後部に 2 束 (Hcs1N-m, 1) と、同じ GNG ではあるが聴覚の 1 次中枢である AMMC と呼ばれる領域のすぐ後に 2 束 (Wcs1N-m, 1) である。この 4 つの神経束をラベルする系統において、まず刺激を与えやすい翅の基部に 4 パターンの機械刺激を与えた (圧迫と、1Hz、50Hz、300Hz の振動)。その結果、圧迫、振動数に関係なく機械刺激により翅が動いた場合に Wcs1N が応答した。平均棍も同様に、平均棍が動いた場合に Hcs1N が応答した。このことから、翅からの神経束は AMMC 後の GNG へ、平均棍からの神経束は腹側後部の GNG へ投射し、それぞ

れ翅、平均棍の動きを検知していることが明らかとなった。当研究室先行研究によりこれらの神経は体表の歪みを検知する鐘状感覚子に由来することが分かっており、機械刺激への応答はこの感覚子の特性によく合致している。さらに Wcs1N、Hcs1N が翅、平均棍の動きを検知することから、飛翔時の神経応答を調べたところ、静的な機械刺激時に比べ劇的に反応が強くなった。飛翔の実験では、機械刺激時には応答が確認できなかった Wcs1N-1 の反応も確認できた。このことから、脳に投射する Wcs1N、Hcs1N がそれぞれ翅、平均棍の動きの激しさや角度を検知し、その動きをモニターしていることが分かった。

次に脚から直接脳へ投射する神経群は、弦音器官に由来するもので、脳の AVLPL と呼ばれる領域に投射している。この経路では、ほとんど同じ経路を通るが終末部位が少し異なる 2 つの神経群が見つかった (Lco1N1、Lco1N2)。2 つの神経群がどのような刺激に対して反応するのかを調べるために、それぞれをラベルする異なる 2 系統のハエを用いて、自由行動下におけるそれぞれの神経応答を比較した。ハエの行動をボール上での歩行 (walk) と脚の静止 (stop ball)、空中で脚が何にも触れずにばたつかせている状態 (move air)、空中で脚を自分の体や固定装置に接触させながら動かしている状態 (contact air)、空中での脚の静止 (stop air)、脚を折りたたんだ飛翔 (flight) の 6 つに分類し、それぞれの行動時の神経応答について比較した。その結果、ボール上では Lco1N1、2 ともに stop ball より walk の方が強く反応していた。空中においても、stop air に比べ、move air や contact air の方が神経が反応していた。Lco1N1 と Lco1N2 の大きな違いは、stop ball の反応である。Lco1N1 では、stop ball が全ての行動の中で最も反応が小さいが、Lco1N2 では stop ball よりも stop air や flight の方が反応が小さい。以上の結果から、Lco1N1、Lco1N2 の両方とも脚の動きを検知していると考えられる。また、Lco1N2 は、ボール上で静止している時にも弦音器官から関節が曲がることにより生じる張力を受容していることが考えられる。

Lco1N1 においては、さらにハエの正面から強い風を与え、踏ん張らせたときの応答を調べた。ハエの正面から強い風を与える実験では、歩行状態から踏ん張り状態に移行した場合と、静止状態から踏ん張り状態に移行した場合で神経応答を比較した。その結果、歩行状態から踏ん張り状態への移行では神経応答に差が無く、静止状態から踏ん張り状態への移行では踏ん張り状態に入ると神経応答が強くなることが確認された。このことから、Lco1N1 は脚の動き時だけでなく、脚の筋肉の収縮時にも反応すると考えられる。

さらに、前脚、中脚、後脚からの情報が脳のどこに伝えられるかを調べるため、体の片側の脚を1本だけ残して他を切除したハエをボール上で歩行させ、静止時と歩行時の Lco1N1 の神経応答を比較した。その結果、前脚のみ、中脚のみ残した場合は、脳の AVLP 領域で歩行時に神経応答が確認されたが、後脚の場合には AVLP 領域には応答が見られなかった。そこで、投射経路の途中である GNG の部分において神経応答を調べたところ、歩行時と静止で神経応答に差が見られた。このことから、前脚、中脚からの情報は AVLP まで伝えられるが、後脚からの情報は GNG に送られることが明らかとなった。このことは、解剖学的な神経投射の差とも合致している。

次に介在神経の経路では、当研究室の先行研究により同定された脚の弦音器官からの情報を伝える Lco2N1、2 と脚の機械感覚毛からの情報を伝える Les2N1、2 の4経路を解析した。

弦音器官の介在神経 Lco2N1、2 は脳内で異なる経路を通るが、投射標的は Lco1N と同様に AVLP である。それぞれの神経群をラベルする系統を用いて、自由行動下の5つの行動(上記の飛翔以外)での神経応答を比較した。その結果、Lco2N1 では、ボール上での反応は walk に強かった。しかし、空中では stop air と move air の応答に差が無く、両者ともにボール上の stop ball より反応が小さい。その代わりに、contact air、特に脚をすり合わせるグルーミング時に有意に強く神経が反応した。Lco2N2 は Lco2N1 と同様にボール上では stop ball より

walkの方が応答が強く、空中でも stop air より move airの方が応答が強かった。また脚の静止時を比較すると、ボール上より空中の方が応答が小さかった。このことから、Lco2N1、2は、どちらも脚の動きを検出し、Lco2N1はさらに接地情報が入力されたときのみ反応することが分かった。

機械感覚毛の介在神経 Les2N1、2は両者とも GNGの少し異なる領域にまず投射し、その後 Les2N1は SLPと呼ばれる脳の上部に、また Les2N2は PVLPと呼ばれる脳の側方の中間の高さにある領域に投射する。イメージングは、脳の比較的上部にあって観察がしやすい SLPと PVLPにおいて行った。Les2N1においては、Lco2Nの実験と同様に解析した5種類の行動パターンでの神経応答の間に有意な差は認められなかったが、Les2N2では Lco2N2と類似した結果が得られ、脚が動くことによって何かに触れると、神経が強く反応することが分かった。さらに統計検定の結果、Les2N2では接地感覚があるボール上での静止時に比べ、接地感覚がない空中での静止時やばたつき時の方が応答が強くなるという、Lco2N1とは逆の性質が示された。

1. 序論

1-1. キイロショウジョウバエを用いた脳神経回路の網羅的解析の意義

昆虫は地球上の動物種の約 85%を占めており、多種多様な生態を示している。個々の昆虫種が有する特異的な形態、体色、習性などは、彼らが環境に適応し、生存率を高めるために得た重要な特性であり、昆虫の示す行動ではそれら外的・内的特性が最大限利用されている。

昆虫はその種数と同様に多様な行動を示す。それら全ての行動は、共通して環境中、あるいは自らが発する何らかの刺激が引き金となって引き起こされている。すなわち昆虫は、体に及ぼされる変化を検知する能力を持ち、その変化に対して適切な行動をとる仕組みを備えているのである。その能力は昆虫だけでなく、全ての生物が持ち合わせており、共通の原理があると考えられる。特に動物では、発達した神経系を利用して行動を制御している。動物の行動を理解するためには、どのような刺激が、どのような器官で受容され、どのような神経経路をたどって行動という出力につながるのかという一連の情報の流れを形態的、機能的に明らかにする必要がある。昆虫は脊椎動物に比べて比較的単純な神経系ではあるが、その行動には他の動物と共通する部分も多くあり、神経回路の普遍性の探求を行うには適している。また、昆虫特有の行動や感覚情報処理の仕組みを明らかにすることで、農業や工業などの産業的な発展にも寄与することができると考えられる。

昆虫は脊椎動物と同様に、五感と呼ばれる視覚、聴覚、嗅覚、味覚、体性感覚（触覚、圧覚、温痛覚）を有している。特にモデル生物であるキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) では、脳における神経回路の網羅的な研究がなされており、視覚 (Clandinin and Zipursky, 2002、Otsuna and Ito, 2006)、聴覚 (Kamikouchi, *et al.*, 2006)、嗅覚 (Tanaka, *et al.*, 2004)、味覚 (Wang, *et al.*, 2004) に関しては、脳における 1 次中枢からより高次の

中枢においても詳細な形態や働きが明らかにされている。行動の観点からも、歩行 (Akitake *et al.*, 2015, Wosnitza *et al.*, 2013)、飛翔 (Vogel, 1966, Shrman and Dickinson, 2004, Dickinson, 1999, Dickinson, 2005)、グルーミング (Corfas and Dudai, 1989)、配偶行動 (Kohatsu *et al.*, 2011, Pan, *et al.*, 2012)、逃避行動 (Dewell and Gabbiani, 2012, Titlow *et al.*, 2015, Xu *et al.*, 2006)、摂食行動 (Edgecomb *et al.*, 1994, Melcher and Pankratz, 2005)、闘争行動 (Kravitz and Huber, 2003, Nilsen *et al.*, 2004)、集団行動 (Ramdya *et al.*, 2015) など数多くの研究がなされている。これら行動の中には鍵刺激により解発される本能行動もあるが、匂いや熱、電気ショック、甘み報酬刺激などによる連合学習記憶など、高次の情報処理を必要とする行動の報告もある (Liu *et al.*, 2006, Wolf and Heisenberg, 1991)。また多くの行動は、個体を受容する複数の感覚情報が統合されて引き起こされる複雑なものであり、例えば、単純に見える歩行においても、脚が接地しているかどうか、接地しているのはどの脚か、接地していない脚はどの程度地面から離れているか、脚の関節はどの程度曲がっているかなどの脚からの情報に加え、どの方向に移動するのかという制御には視覚情報や嗅覚情報、聴覚情報などを利用している。このことから行動を制御する神経回路を明らかにするためには、1 種類の刺激の受容経路を調べるだけでは不十分で、全ての感覚においてその情報処理経路を明らかとすることが必要であり、既に多くの神経が同定されているキイロショウジョウバエは最適の実験動物のひとつであると言える。

1-2. キイロショウジョウバエ脳の研究

昆虫の神経系はヒトと同様に中枢と末梢の区別がある集中神経系に分類され、頭部に脳、胸部に胸部神経節、腹部に腹部神経節と呼ばれる中枢がある。感覚の統合や記憶や学習などの高次の情報処理は頭部の脳において行われ、簡単な反射などは胸腹部の神経節で行われて

いると考えられている。キイロショウジョウバエの脳には約 10 万個の神経細胞があるが、そのうち視覚情報を処理する視葉を除いた脳本体の細胞数は片半球あたり約 2 万個と少ない。ヒトの脳の神経細胞数が約 1000 億個であるから 5000 分の 1 の数である。神経細胞数が少ないにも関わらず、基本的な感覚は脊椎動物と同じで、多様な行動を示すこともキイロショウジョウバエが神経回路網を明らかにするのに適している理由の一つである。また、前項でも述べたが、昆虫の中でもキイロショウジョウバエ脳の研究は進んでおり、脳の詳細な領域分けや領域間のネットワーク解析なども行われ、脳の全貌が明らかになりつつある (Ito et al., 2013, Ito et al., 2014, Yu et al., 2013)。

キイロショウジョウバエ脳における視覚や聴覚、嗅覚、味覚に関しては、それぞれが光の強弱や分子の検出といった特定の目的に特化して分化してきた、特定の感覚器官によって担われていること、またそれらの感覚器官が頭部に集中していてそこからの神経が脳に直結していることなどから、解析が比較的容易であり、これまで多くの研究がなされてきた。これに対し、体性感覚は触覚、圧覚、痛覚、温度覚などと呼ばれている多様な感覚の総称である。昆虫でも触ると逃げる、脚を触ると動かす (Vandervorst and Ghysen, 1980)、熱刺激を与えると逃げる (Xu et al., 2006) といった行動を示すことから、体性感覚の存在は確認されている。また、体性感覚を受容しているであろう、体表に散在している機械感覚毛などの感覚器官に色素を注入して中枢への軸索投射を調べるバックフィル染色などを利用して、脚や翅といった特定の部位のみに関してではあるが詳細な神経の形態や体表の感覚器と中枢との位置関係などが明らかにされている (Gysen, 1980)。しかし、それら多くの研究は胸部神経節に関するものがほとんどで、脳における詳細な研究は数少ない。そこで本研究では、まずキイロショウジョウバエ脳で唯一詳細な形態が分かっていない体性感覚 1 次中枢を形態学的に明らかにするとともに、神経活動に伴って変化する細胞内カルシウム濃度を蛍光を使って計

測するカルシウムイメージング法によって、脳の体性感覚1次中枢に投射する神経を機能的に明らかにする。

本研究では体性感覚中枢の解明に加えて、体性感覚中枢の解析のために立ち上げた実験系を応用して、ハエの複眼に異なる波長の光刺激を加えることが可能となった。そこでこれまで詳細が明らかとなっていなかった視覚の高次中枢においてその働きをカルシウムイメージング法により明らかにする。視覚の研究はこれまでに多くの研究が進められており、視葉の構造、各視細胞の応答特性や、視葉内での投射経路、また、動きや色の検出に関わる神経の特定など、低次中枢での解析が多くある (Menne and Spatz, 1997、Rister *et al.*, 2007、浜中、泰山,2015)。また、低次中枢と高次中枢を結ぶ視覚投射神経の経路、形態も調べられており、行動実験によってそれら連絡経路の機能に波長特異的な性質があることも明らかにされている (Otsuna and Ito, 2006, Otsuna *et al.*, 2014)。ただ、行動実験だけでは、複数の神経からなる神経群の詳細な応答特性を明らかにすることは困難である。しかし、本研究で新たに開発したイメージング実験系を応用すれば、各視覚投射神経において網羅的に波長特異的な応答を明らかにすることが可能である。そこで本研究では多様な視覚投射神経路が異なる波長によってどのような反応の違いを示すのかを調べ、脳における色覚の情報を司る領域を同定する。

1-3. キイロシヨウジョウバエの体性感覚を受容する感覚器官

キイロシヨウジョウバエは、機械感覚毛、鐘状感覚子、弦音器官等のさまざまな感覚器を用いて、外部環境からの接触や圧迫、振動、自己の動きにより生じる刺激を感じとっている (石井, 1982)。機械感覚毛は体表全体に散在しており、太さ、長さ、生え方、分布の違いから、接触の程度や部位などを検出できる仕組みになっている。例えば、コオロギの腹部末端

にある尾葉と呼ばれる器官では、環境中の空気の流れを検出しているが、その速度や加速度は長さの異なる感覚毛により感じ分け、毛の倒れる向きで空気流の方向を検出している（矢野, 2012）。また、頭部の触角において空気の流れや振動を検出しており、その仕組みはコロギとは異なり触角基部の関節の屈曲度合いの検出によるものである（Yorozu, *et al.*, 2009）。いずれの検出法にせよ、昆虫な微妙な刺激の違いを検出することで、天敵からの攻撃なのか、ただ風が吹いただけなのかなど、自身がどのような状況に身をおいているのかを認識することができる仕組みになっている。

本研究では脳における体性感覚中枢を調べるにあたり、まず体性感覚を受容する各種感覚器を概説する。機械感覚毛は、中空のある程度の長さを有する毛状構造で、体表部とは柔らかい膜を介してつながっており、毛状部が動くことにより生じる膜の歪みを検出する器官であり、過去の研究から、胸部背面、翅、平均棍、脚、腹にある機械感覚毛の分布は詳細に明らかにされている。まず胸部背側には 13 対の太く長い剛毛が、左右対称に胸部を囲む形で生えており、さらに背面全体には 200 本程度の小さな短い剛毛が、列をなして生えている（Ghyssen, 1980）（図 1A、E）。また、翅においては前縁に機械受容感覚毛と化学物質受容感覚毛が密集して並んでおり、翅脈にも剛毛が生えている（図 1B・C）。また、後翅が退化して形成されている平均棍の表面も、本数は少ないが機械受容感覚毛が存在する（『衛生昆虫の微細構造』, <http://bsikagaku.jp/insect.html>）（図 1D）。脚は基節、転節、腿節、脛節、跗節の 5 つの節からできており、基部側にいくほどその分布は少なくなるが、表面は多数の感覚毛で覆われている（図 1E）。脚の末端には機械感覚毛だけでなく味覚受容感覚毛があり、特に前脚でその数が多いと言われている。また、関節部分には短い剛毛が密生した板状感覚毛があり、関節を曲げることにより生じる毛の動きから、関節の動く方向などを感じ取っていると考えられる（石井, 1982）。腹部も背側、腹側の両方が細かい毛で覆われ、短めの剛毛が規

則的に分布している。

鐘状感覚子は、ドーム状をした感覚器で体表のクチクラの歪みを検出する器官であり、翅、平均棍、脚の関節部に特異的に分布していることが分かっている。翅では基部側での分布が多いが、翅の翅脈にもある。また平均棍はこん棒状の形をしているが、その柄の部分に整列して存在している。これまでの研究により、鐘状感覚子は 6 種類あり、翅と平均棍でその分布が異なることも明らかにされている (Cole and Palka, 1982)。鐘状感覚子の研究は、ゴキブリやナナフシなどでも活発に行われており、脚にある鐘状感覚子の詳細な形態や (Moran, *et al.*, 1971)、脚の屈曲角度を正確に検出していることも明らかにされている (Hofmann and Bassler, 1982)。

弦音器官は体表の下に存在し、細長い形態をしている。弦音器官の両端は体表クチクラ下に弦を張るように付着し、その張力の変化を検出する器官である。脚の関節部、特に腿節と脛節、脛節と跗節の関節部にあることが分かっており、特に腿節と勁節間の間ではその数が多い。またバッタの脚の研究などから、その中でも分布部位の違いによりいくつかのグループに分けられている (Usherwood, *et al.*, 1968)。また、翅、平均棍、腹部にもその存在が確認されている (Jarman, 2002)。弦音器官は体表直下でなく体内にあり、弦状の器官が振動したり、伸長したりすることで反応するため、地面の振動や、体の屈曲を検出するために利用されていると考えられている。これら鐘状感覚子、弦音器官、機械感覚毛の間隔検知の仕組みを模式図を図 1F に示す。

最後に、多樹状突起 Multidendritic (MD) 神経と呼ばれる神経群があり、それらが、有害な熱刺激や突き刺すような刺激を検出することが明らかにされている。幼虫での研究が多いが、成虫においても腹部に MD 神経群が分布していることが示されている (Tracey, Jr *et al.*, 2003)。

本研究では、これら胴体部の感覚受容細胞がどのような経路で、どのような刺激を脳に伝えているのかを明らかにすることを目的としている。

1-4. キイロシヨウジョウバエ体性感覚受容器の胸腹部神経節への投射パターン

キイロシヨウジョウバエの体表の各感覚器官に付随する神経の、中枢への投射形態に関しては、古くから現在に至るまで多くの研究がなされている。体表の機械感覚毛に関しては、胸部の背面、翅、脚、腹部などに多数あるが、それらの神経は脳まで投射しておらず、胸腹部神経節で終末することが既に明らかにされている (Ghysen, 1980, Inestrosa, *et al.*, 1987, Murphey *et al.*, 1989, Palka and Ghysen, 1982)。翅、平均棍の鐘状感覚子に付随する神経は、胸部神経節と脳の両方へ投射していることが過去の研究から明らかにされている。その投射経路は翅、平均棍の両方において共通して複雑で、1 つの神経が胸部神経節で枝分かれし、様々なパターンを形成している。そのうちのいくつかの経路が集まって脳へ直接投射していると考えられる。また、翅の翅脈状にある鐘状感覚子に付随する神経は脳まで投射していないことも明らかにされている (Palka and Ghysen, 1982)。脚の鐘状感覚子に関しては、胸部神経節で終末し、脳まで投射している神経群は確認されていない。また、脚にある弦音器官に付随する神経群は、翅、平均棍の鐘状感覚子の神経群と同様に、胸部神経節で終末する経路と、脳まで投射する経路があり、1 つの神経が枝分かれして複数の経路を形成していることが当研究室の博士研究員坪内により明らかにされた。翅、平均棍、腹部の弦音器官に付随する神経群に関しては、脳まで投射している神経群は確認されていない。また、MD 神経に関しても、直接脳へ投射している経路は確認されていない。これらの既知の情報と本実験のカルシウムイメージングの結果をもとに、体性感覚 1 次中枢の構造的、機能的地図を作成する。

1-5. キイロシヨウジヨウバエの視覚

キイロシヨウジヨウバエの視覚に関しては、受容器官である目の構造から、脳にある高次中枢までの神経経路が詳細に明らかにされている。キイロシヨウジヨウバエの目は複眼であり、片側約 750 個の個眼と呼ばれる構造が集まってできている。各個眼に 1 つのレンズが備わっており、その下に 8 つの視細胞、R1-R8 があり感桿分体と呼ばれる光受容構造を形成している。この感桿分体に光受容タンパク質であるロドプシンが高密度で局在しており、300nm から 600nm までの波長の光を受容している。複眼で受容された光は視細胞を經由して、視葉と呼ばれる視覚の 1 次中枢に伝えられる。視葉はさらに 4 つの部分に分けられ、外側から視葉板、視髄、視小葉、視小葉板と呼ばれている。視葉の各部分で、動きや色、形、明暗などの視覚の特徴が抽出されている。また視細胞 R1-R8 それぞれの働き、視葉への投射パターンも明らかにされている。R1-R6 は紫外光、可視光の両方に敏感であり、主に動きの検出に重要であることが分かっており、それら R1-R6 で受容された視覚情報は視葉板に入力され、どのような経路を通るのかも明らかにされている。また、それらの出力シナプスが、複数の入力シナプスに接続していること、その 2 次神経の中の動きに反応する経路も同定されている。一方、R7-R8 は色の検出に関与していることが分かっており、ロドプシンもそれぞれ 2 種類もっていることが分かっている。R7 は Rh3 と Rh4 をもち、特に紫外領域に敏感である。また R8 は Rh5 と Rh8 をもち、緑色から青色の波長の光に敏感であることが明らかにされている。さらに R7-R8 で受容された視覚情報は、直接視髄まで伝えられることも分かっている。

(Menne and Spatz, 1997、Rister *et al.*, 2007、浜中、泰山,2015)。さらに、視覚の 1 次中枢である視葉から、脳へ情報を連絡している 2 次神経経路が、Otsuna と Ito (2006) により明らかにされており、行動実験によりいくつかの経路で波長特異的な行動異常が確認されている。本研究では、それら視覚の 2 次経路に関して波長特異的な応答が見られるかどうかを

カルシウムイメージング法により検証する。

1-6. GAL4-UAS システムとカルシウムイメージング法による機能的解析

キイロショウジョウバエはモデル生物の中でも遺伝的解析手法が数多く開発されており、GAL4-UAS システムはその一つである。GAL4-UAS システムでは、遺伝子組み換えにより酵母由来の転写調節因子 GAL4 タンパク遺伝子をゲノム中にもつハエの系統（GAL4 発現誘導系統）と GAL4 タンパク質が特異的に結合する UAS プロモーター配列とその下流に任意の遺伝子をゲノム中にもつハエの系統（レポーター系統）を掛け合わせることで、GAL4 タンパクが発現している特定の細胞にのみ UAS 配列以下にコードされた遺伝子を発現させる手法である（Rorth, 1996）（図 2）。また、キイロショウジョウバエでは全ゲノム配列が明らかになっており、機能の分かっている遺伝子が発現する細胞を狙って、GAL4 遺伝子を発現させることも可能である。レポーターとして使用される遺伝子には、 β ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein: GFP）などの形態を可視化するためのもの、破傷風毒素（Tetanus toxin: TNT）などの毒素により神経の働きを阻害するもの、温度作動性チャネルタンパクや光作動性チャネルタンパクなどの人為的に神経の働きを活性化させるものなど、実験の用途によって様々な遺伝子が開発されている。本研究では、刺激に対する神経の応答を調べるにあたり GAL4/UAS システムを用いてカルシウムイメージング法を行う。カルシウムイメージングは、神経が反応すると細胞内のカルシウム濃度が上昇することを利用し、神経の応答を可視化する方法である。神経活動の記録方法には、電気生理学的なアプローチもあり、嗅覚や視覚の感覚中枢の解析ではカルシウムイメージングと並んで活用されている（Liu and Wilson, 2013）。しかし、脳の中でも外部からアクセスしやすい位置にある嗅覚や視覚の中枢と比べて、本研究で解析する体性感覚中枢は、脳の下部にあると

考えられるため、電極を刺すのが困難であるためカルシウムイメージング法を採用した。また、カルシウムイメージング法では、一度に多数の細胞の活動も記録できるため、単一細胞レベルから領域レベルまで、解析の幅が広がる。カルシウムイメージング用に解発されたインジケータタンパクは数多くあり、Cameleon (Miyawaki *et al.*, 1997) や GCaMP (Nakai *et al.*, 2001、Chen *et al.*, 2013)、RCaMP (Akerboom, *et al.*, 2013) などがある。これらのインジケータタンパクは、カルシウムイオンと結合することにより機能する仕組みになっている。例えば、Cameleon は CFP と YFP の 2 色の蛍光物質の間にカルモジュリンが挟まれた構造で、カルモジュリンにカルシウムイオンが結合していない状態で紫色光を照射して励起すると、YFP は励起されず CFP の蛍光のみが検出されるが、カルモジュリンにカルシウムイオンが結合すると、CFP と YFP の両者が近接するようになり、励起光により CFP が吸収したエネルギーが YFP に移動し、光っていなかった YFP が蛍光を出すという蛍光エネルギー移動 (FRET) 現象を利用したものである (三輪編、2007)。GCaMP は緑色蛍光タンパク GFP の構造を改変し、カルモジュリンと M13 と呼ばれるペプチドを GFP タンパクの中間に融合させたものである。カルシウムイオンがない状態では GFP タンパクの構造が大きく歪んでいるために蛍光を発しないが、カルモジュリンにカルシウムイオンが結合すると構造が変化し、蛍光強度が変化する仕組みになっている (Chen *et al.*, 2013)。GCaMP が改良されたものに、GCaMP6s (slow)、GCaMP6m (medium)、GCaMP6f (fast) の 3 種類があり、カルシウムイオンがカルモジュリンに結合して引き起こされる、GCaMP の構造変化の速さ (キネティクス) の違いから、slow、medium、fast と種類分けされ、実験用途に合わせて選択することができるようになっている。さらに GCaMP6 は、従来の GCaMP よりも反応前と反応後の蛍光量の変化が大きく捉えやすいようになっている (Chen *et al.*, 2013)。また、GCaMP は Cameleon と比較して、カルシウムイオンへの感受性が高く、反応も速い

ことが分かっている (Tian *et al.*, 2009)。RCaMP (Akerboom *et al.*, 2013、Dana *et al.*, 2016) は赤色蛍光蛋白 RFP を GCaMP と同様に改変したもので、カルシウムイオンの上昇によりその蛍光強度を変化させる。RCaMP にも RCaMP1a、1b、1c、1e、1f、1h の複数が開発されており、キイロショウジョウバエの GAL4-UAS システムでは現在 UAS-RCaMP1a、1b、1f が使用できるようになっている。

本研究において、体性感覚の 1 次中枢の解析に関しては、胸部神経節から脳へ投射する神経をラベルする GAL4 発現誘導系統から、イメージング法において使いやすいような、特異性が高く、発現が強い系統をまず選び、それらの系統で GCaMP を発現させて、胴体や脚から受容される体性感覚により、それらの神経が反応するか、またその情報は脳のどの領域に伝えられるのかを調べる。また、視覚の高次中枢における波長特異性の解析に関しては、すでに明らかになっている視覚の低次中枢から高次中枢に伸びる多数の投射神経経路を標識する GAL4 発現誘導系統において、GCaMP を発現させ、それぞれの神経経路がどのような波長に反応するのかを調べる。

1-7. 2 光子レーザー顕微鏡を用いたカルシウムイメージング

本研究では、ハエが歩行や飛翔行動を行えるように自然な姿勢を保持したまま、イメージングを行う。そのためには脳を上側から観察するが、胸腹部神経節から脳に投射する体性感覚神経は主にその下部に終末する。そこで脳の上側から下側を観察するために、最大で脳組織の約 200 μm の深さにある神経を観察しなければならない場合も生じる。このような深部では組織内の散乱によって光量が減衰するため、普通の蛍光観察法では解析が難しい。2 光子レーザーは 1 光子レーザーの約 2 倍の波長を用い、2 つの光子が同時に蛍光物質に当たることにより、蛍光物質が励起状態になり、蛍光を放出させる。2 光子励起光では波長が長

く、散乱が生じにくいために、標本のより深い部分まで光が届くこと、また、焦点面で光子の密度が高くなるようになっており、焦点面以外では蛍光物質が励起されないため、焦点面以外の蛍光物質も励起する 1 光子レーザーと比較して、ラジカル発生などによる細胞へのダメージが少ない。さらに、矢野修士論文（2014）において、焦点面以外の面でも蛍光物質を励起する 1 光子レーザーと比較して、2 光子レーザー使用時の方が背景のノイズが少なく、1 光子レーザーでぼやけて見えた神経繊維もはっきりと観察することができることが明らかにされている。また、本研究では視覚の波長特異性を調べる実験も行う。1 光子レーザーでは励起光自体の波長が視細胞の受容可能波長域と重なるため、励起光によって視覚系が刺激されてしまって特定の波長への反応を調べるできない。その点、2 光子レーザーは赤外光であり、キイロショウジョウバエが感じるできない波長領域なので、複眼に照射する特定の波長の光に対する応答だけを観察することができる。

2. 材料と方法

2-1. かけ合わせと飼育

遺伝子組み換えされたキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いた。レポーター系統の雌とドライバー系統の雄をかけ合わせて生まれた次世代の中から雌のみを実験に使用した。使用した GAL4 発現誘導系統は、体性感覚神経では MZ815-GAL4、iav-GAL4、GMR30G08-Gal4、GMR20E05-GAL4、NP1619-GAL4、NP3375-GAL4、GMR85A11-GAL4、視覚投射神経では NP302、NP681、NP3337、NP6250、NP6645、NP7226、NP7302、NP7476。また、レポーター系統は w⁺;UAS-GCaMP6s、w⁺;UAS-GCaMP6s;UAS-GCaMP6s、w⁺;UAS-DsRed(F3A2)/SM1;20XUAS-GCaMP6s/TM6B,Sb,Tb、UAS-CD8::mCherry である。DsRed、CD8::mCherry はカルシウムイメージング中に生じる脳の動きを観察、補正するために用いた。UAS-DsRed(F3A2) (Verkhusha *et al.*, 2001)、UAS-CD8::mCherry (Ting *et al.* 2014)、20XUAS-GCaMP6s (Kim *et al.*, 2013、Chen *et al.*, 2013)。ハエは標準のコーンミール培地で飼育し、飼育室の温度は 25 度、明 : 暗 = 12h : 12h に保った。実験には雌を使用し、羽化後 4 日~7 日以内の個体を使用した。雌を使用したのは体が雄よりも大きく実験に使用しやすいからである。実験に使用したハエの日齢の条件は、雌のハエが産卵できるようになる時期が羽化後 3~4 日ということが分かっており、その日齢を成虫としての機能が備わった状態と考え設定した。また、加齢にともなう行動の変化を調べた研究により、歩行による移動や重力走性、光刺激による逃避行動が 7 日を過ぎると低下することが明らかにされており (Simon *et al.*, 2005、Martinez *et al.*, 2006)、8 日以降のハエは使用しないこととした。

2-2. カルシウムイメージング用固定方法

アクリル製パーツとステンレス製パーツを組み合わせて作成した固定用プレート（図 3C）に UV 接着剤（Three bond、光硬化型瞬間接着剤）でハエの頭部、胸部を固定し、ステンレス製パーツの穴（縦 0.56mm、横 0.42mm）から頭部のクチクラを注射針（テルモ注射針、25G×5/8” 0.50×16mm）とピンセットで取り除き脳を露出させた（図 3D）。解剖中は、脳が乾かないようにリンガー液（NaCl 140mM、KCl 2mM、CaCl₂ 1.5mM、MgCl₂ 4.5mM、HEPES-NaOH 5mM、pH7.1、Yoshihara, 2012）中で行った。また、イメージング中の脳の動きを抑えるため、口吻も接着剤で固定した。この固定方法の開発には Kohatsu and Yamamoto (2015) を参考にした。

< 固定手順 >

1. 氷で麻酔したハエ（図 3A）を固定台（真鍮製台の上部と側面に磁石を貼り、カミソリが固定できる）と側面の磁石に貼り付けた片刃カミソリ（日新 EM 株式会社、片刃トリミング用カミソリ（カーボンスチール）LF14K）との間にできた隙間に図 3B のように挟んだ。挟む際は、翅を固定台の端に引っ掻け、腹部と脚を固定台と側面の片刃カミソリで挟むようにした。片刃カミソリは刃の部分をヤスリで削り、刃が上になるように用いた。このとき、頸部を片刃カミソリにもうけた溝に合うようにセットした。さらに翅を刃を落とした両刃カミソリ（縦:20mm、横:43mm：使用したのは半分のみ）で上から抑えて、動かないようにした。ハエを固定台にセットしたら、両眼の上部と胸部の最も盛り上がっている部分に UV 接着剤をつけ、固定用プレート（図 3C-左、中央）と接着させた（図 3C-右）。固定用プレートをのせるときは、ステンレス製パーツにあけた穴と頭部を合わせるようにのせ、UV 照射器（ユークス株式会社、モスキュア・ミニ 365 LED 紫外線照射器）で接着させた。このとき、観察したい神経の位置、形態に合わせて頭部の傾きを変えた。

2. 固定台側面の腹部と脚を抑えている片刃カミソリを少し奥に開きながら下ろし外した。次に、翅を抑えている両刃カミソリを上を浮かし、その間にハエが固定された固定用アクリル製プレートを前に押し出し、ハエとアクリル製プレートを固定台から取り外した。
3. ステンレス製プレートの解剖穴部分に少しリンガー液をのせ、ピンセットと注射針を用いて頭部クチクラを取り除いた (図 3D)。この時、脳の上を覆っている気管も取り除いた。解剖後はリンガー液を交換してステンレス製プレートの上をリンガー液で満たした。
4. 図 3E に固定された状態の模式図と実際の写真を示す。

2-3. カルシウムイメージング

カルシウムイメージングには 2 光子レーザー顕微鏡 (オリンパス株式会社、FV1000-MPE BX61WI)、共焦点レーザー顕微鏡 FV1000 用多光子レーザーシステム (オリンパス株式会社、Mai Tai Deep See) を使用した。使用した対物レンズはツァイスの 40 倍の水浸レンズ (型番 : W Plan-Apochromat 40x/1.0、開口数 N.A.1.0) とオリンパスの 10 倍の乾燥レンズ (型番 : UplanFL N 10x/0.30、開口数 N.A.0.30)。また、コンデンサー部分を取り除き、代わりにトラックボール台 (シグマ光機) を置き、ハエがトラックボール上に接地したとき、余計な負担がかからない自然な姿勢でイメージングできるようにした (図 4A-C)。トラックボールに使用したボールは直径 5mm の PP 製と真鍮製である。PP 製ボールは軽くハエが動かしやすいが、トラックボール大を下げたハエを空中に保持して飛翔状態にする際に、ハエがトラックボールを抱え込んでしまったり、脚がボールに引っかかり、大きく脳が動いてしまったりする場合があった。そのような場合には、重くハエがボールを抱え込むことが出来ず、また表面がなめらかで脚が引っかかることがない、真鍮製ボールを使用した。

使用した 2 光子レーザーの波長は 940nm。スキャン速度は 156ms/F-186ms/F (毎秒 5.4-6.4

フレーム)。カルシウムイメージング中のハエの様子は歯科用実体顕微鏡 (Leica, M320) (図 4A) に内蔵されたビデオカメラで記録した。翅への機械刺激実験では、マニピュレーター (ナリシゲ、MWS-1) にホルダー (シグマ光機、特注) にセットしたピエゾアクチュエーターを取り付け、歯科用実体顕微鏡で観察しながらあらかじめ刺激を加えたい体表部位のすぐ上にタングステン線 ($\phi 0.1\text{mm}$) の先を保持して、任意波形発生装置から出力した刺激を与えている間の神経の応答をカルシウムイメージングした (図 5D-E)。人為的に翅、平均棍を動かす実験では、マニピュレーターを手動で動かし、翅が一番大きく動いた状態で保持し、再び元の位置に戻し、その間の神経の応答をカルシウムイメージングした。翅の刺激を行う際は、実験中に脚などがあたって翅が動かないように、翅の真中から先端部分を除去し、平均棍も除去した。平均棍の刺激を行う際は翅の実験と同様に、翅の真中から先端部分を除去し、さらに翅の付け根を UV 接着剤で固定した。

脚の体性感覚神経の解析では、ハエをトラックボール上で自由に行動させ、そのときの神経の応答をカルシウムイメージングにより計測し比較した。計測中にハエの示した行動をビデオで撮影し、ボール上での歩行と静止、空中での脚のばたつき (脚が体や固定装置などに触れない状態) と、接触 (脚が体や固定装置などに触れた状態)、静止、飛翔に分類した。飛翔は、トラックボールを下げ、ハエの前下方から空気刺激を与えることにより誘発した。下からの空気流刺激は脚で踏むポンプを利用し、ハエの正面に内径 5mm のパイプを設置した。

2-4. 機械刺激装置

<実験器具・材料>

任意波形／ファンクション・ジェネレータ (Tektronix、AFG2021 型)、ピエゾコントローラ ((株) メステック MESS-TEK.Co.,Ltd、M-26118-S)、ピエゾアクチュエーター ((株) メ

ステック MESS-TEK.Co.,Ltd、MU-100ADS12 移動範囲：オープンループ時 $100\mu\text{m}$ (分解能: 0.5nm)、クローズドループ時 $80\mu\text{m}$ (分解能: 2nm)、ピンバイス (電動ドリル用ピンバイス片頭式、対応サイズ: 直径 $0.1\sim 2.0\text{mm}$)、タングステン線 (イーエムジャパン株式会社、直径 $0.1\text{mm}\times 10\text{m}$)。

<設置方法・設定>

機械刺激は、任意波形／ファンクション・ジェネレータ (図 5A) から、予めプログラムで作成した任意の波形の電圧をピエゾコントローラ (図 5B) に出力し、ピエゾアクチュエーター (図 5C) を伸縮させることにより複数種の刺激を制御する。伸縮の程度は、電圧値を変えることにより調節でき、本研究では -5V から 5V の範囲で電圧を変化させた。ファンクション・ジェネレータとピエゾコントローラは BNC ケーブルで接続した。ピエゾアクチュエーターの先には直径 0.1mm のタングステン線を固定し、その先をハエの体表に押し当てて刺激を行う。実験に使用する波形はファンクション・ジェネレータ付属のパソコン用ソフトで作成し、タングステン線が一定時間 (7 秒間) 伸びたままになる定常的な圧迫に加え、伸長時に 1Hz 、 50Hz 、 300Hz の振動を付加するモードを作成した (図 5D)。触覚を司る神経には刺激が加わっている間中反応するものと、刺激に対して慣れを示すものがあり、圧迫、 1Hz はその特性を調べるために使用する。 50Hz と 300Hz は、触角で検知される振動のうち神経応答の差が最も大きくなるという報告をもとに設定した (上川内博士より)。

2-5. 空気流刺激装置

<実験器具・材料>

エアポンプ (安永エアポンプ株式会社、YP-20 A 型、空気量: $6\text{l}/\text{min}$ 、常用圧力: 0.01MPa 、風量: $20\text{L}/\text{min}$)、流量計 (KOFLOC、RK1200M)、風速計 (KANOMAX、クリモマスター

風速計 Model65 シリーズ、プローブ：6551-21) 電磁弁 (高砂電機工業株式会社、MTV-3-NM6-32 12VDC、PCTFE、NRV-4E1, 12VDC, PTFE)、リレー (パナソニック、PhotoMOS リレーパワー1a)、抵抗 (510 オーム、4 個)、電圧変換可能 AC アダプター、タイゴンチューブ (SAINT-GOBAIN、内径 4mm、外径 6mm)、PTFE チューブ (東京硝子機械株式会社、TGK-2×3 mm 10m)、継手、真鍮パイプ (Gallery SAKATSU、外径 0.4mm、内径 0.2mm)、注射針 (テルモ注射針、21G×1 1/2" 0.80×38mm)、二口洗浄瓶 (脱脂綿、活性炭素、蒸留水を別々に入れて空気洗浄用のため使用する)、脱脂綿 (西尾衛生材料株式会社、NS 特別裁断綿)、活性炭素顆粒状 (和光純薬工業株式会社)、蒸留水、T 字同型チューブコネクター (ARAM、TPX. E-1)、I 型異径チューブコネクター (株式会社アイシス、ミニフィッティング (F) I 型異径)。

<設置方法・設定>

エアーポンプ (図 6A)、流量計 (流量調節装置) (図 6B)、電磁弁 (図 6C)、刺激部 (図 6D) の順で装置を接続した。エアーポンプと流量計間は内径 4mm のタイゴンチューブ、オリフィス径が小さい電磁弁に関しては、流量計と電磁弁間、電磁弁と刺激部間は内径 2mm の PTFE チューブを、またオリフィス径が大きい電磁弁に関しては、流量計と電磁弁間、電磁弁と刺激部間は内径 4mm のタイゴンチューブを使用した。エアーポンプからはトラックボール (後述) 用の流量計にも空気を流すので、T 字チューブコネクターで 2 経路に分岐した。刺激部は I 型異径チューブコネクター、注射針、真鍮製パイプを接着剤で接着して作成した。

2-6. トラックボール装置

<実験器具・材料>

トラックボール台（シグマ光機、特注）、ポリプロピレン製球（アズワン株式会社、PP 球 3 / 16 インチ）、流量計（KOFLOC、RK1200M）、タイゴンチューブ（SAINT-GOBAIN、内径 4mm、外径 6mm）、PTFE チューブ（東京硝子機械株式会社、TGK-2×3 mm 10m）、流量計用継手（SMCFITTINGS、KQ2H06 - 02AS）。

<設置方法・設定>

エアーポンプ（図 6A）、流量計（図 6B）、トラックボール台（図 4B）の順で装置を接続した。エアーポンプと流量計間は空気流刺激と同様、内径 4mm のタイゴンチューブで接続し、流量計とトラックボール台間は PTFE チューブで接続した。必要な流量は微量で、PP 球が浮いていることを目で確認し決定した。

2-7. 機械刺激・空気流刺激・顕微鏡撮影の制御

<実験器具・材料>

パルス発生装置（A.M.P.I プログラマブル・スティミュレーター Master8）、BNC ケーブル、各刺激装置の外部トリガー入力部、2 光子レーザー顕微鏡。

<設置方法・設定>

機械刺激、空気流刺激、を与えるタイミング、刺激時間、顕微鏡撮影の開始・終了をパルス発生装置（図 7A）により制御した。パルス発生装置はパソコンから制御して、プログラムした一定のタイミングで Master8 から BNC ケーブルで接続したファンクション・ジェネレータ（機械刺激装置用）とリレー（空気流刺激装置用）を制御した（図 6E）。各種刺激の制御の流れを模式図に示す（図 7）。

2-8. 光刺激装置

<実験器具・材料>

モノクロメーター（朝日分光株式会社、CMS-100）、キセノン光源（朝日分光株式会社、MAX-303）、石英ライトガイド（結束径：直径 5mm、朝日分光株式会社）パワーメーター（Newport、1918-R）、スティックタイプ UV/Si ディテクタ（Newport、918D-ST-UV）

<設置方法・設定>

光刺激は、パソコンにより制御できるようになっており、モノクロメーター（分光器）とパソコンを USB ケーブルで接続している。また、パワーメーターを用いて、どの波長でも同じ強さの刺激を与えることができるように、自動でパワー校正ができる。パワーメーターは分光器とパソコンに接続されており、パソコン上から任意の波長の出力を校正することができる。（図 8A-B）。まず実験前に分光器から各波長の光を出力し、パワーメーターで光量を測定する。測定値が一定になるように分光器の絞りを制御し、その絞り値をパソコンソフトで記憶する。実験時は、この校正値に従って波長ごとに絞りを制御し、光量を一定に保つ。本研究で使用したキセノン光源は 350nm-800nm の範囲で連続した波長をもつ。光量を計測するディテクタの計測部は 10mm 四方である。図 8C に本実験で使用した光刺激の各波長を示した。また、図 8D は本研究で使用したキセノン光源を使用したときの、各波長における分光放射照度 (mW/cm^2) の相対値を示したグラフである（朝日分光カタログより引用）。

2-9. 各種解析方法

<翅への機械刺激時のカルシウムイメージング>

使用したハエの遺伝子型は、翅や平均棍の基部にある鐘状感覚子を標識する（後述）MZ815 > GCaMP6s である。機械刺激装置を用いて、翅の根元に、圧迫、振動（1Hz、50Hz、300Hz）

を与え、神経応答を比較した (図 5E)。刺激開始 2 秒前から 1 秒間の平均を求めベース値 F とし、それに対する各フレームにおける蛍光の変化量の割合を計算し $\Delta F/F$ (%) とした。箱ヒゲ図には刺激開始 3 秒前から 2 秒間と刺激開始 3 秒後から 2 秒間の $\Delta F/F$ を使用した。統計解析では刺激前と刺激中、異なる刺激間同士で差があるかないかを検証した。機械刺激により動いた翅の角度の算定は画像解析ソフト *fi*ji により行い、刺激前の翅の付け根と、翅外側の縁を結んだ線を基準とし、そこからどのくらい動いたかを計測した。

<翅、平均棍を人為的に動かした時のカルシウムイメージング>

使用したハエの遺伝子型は、MZ815 > DsRed(F3A2), GCaMP6s である。歯科用実体顕微鏡で録画した動画から翅、平均棍が動き始めた時間、動きがピークを迎えた時間、元の位置に戻り始めた時間を記録し、イメージングのデータと対応する部分を解析した。解析する部分に関して、翅または平均棍が動き始める 2 秒前から 1 秒間の GCaMP6s 輝度値の平均を求めベース値 F とし、それに対する各フレームにおける蛍光の変化量の割合を計算し $\Delta F/F$ (%) とした。さらに神経の位置を確認するために発現させた赤色蛍光タンパク DsRed のデータから、刺激前で最もピントが合っている 1 秒間の輝度値の平均を求め、その値と各フレームの DsRed 輝度値の変化量を GCaMP6s の変化量から引くことでハエの拍動や食道の動きにより生じた脳の動きを補正した。箱ヒゲ図には刺激開始 3 秒前から 2 秒間と刺激開始 3 秒後から 2 秒間の $\Delta F/F$ を使用した。統計解析では刺激前と刺激中で差があるかないかを検証した。

<翅、平均棍に関する飛行時のカルシウムイメージング>

使用したハエの遺伝子型は、MZ815 > GCaMP6s である。歯科用実体顕微鏡で録画した動画から翅が開き始めた時点を飛行行動の開始点とし、閉じ始めた時点を飛行行動の終了点と

し、イメージングのデータと対応する部分を解析した。この実験では DsRed を発現させていないため脳の動きの補正は行っていない。飛翔開始 2 秒前から 1 秒間の平均を求めベース値 F とし、それに対する蛍光の変化量の割合を計算し $\Delta F/F$ (%) とした。箱ヒゲ図には飛翔開始 3 秒前から 2 秒間と刺激開始 3 秒後から 2 秒間の $\Delta F/F$ を使用した。ただし、平均棍由来の神経群では 1 サンプルにおいてイメージング中の脳標本のズレにより 1 秒分のデータになっていないものが含まれている。統計解析では飛翔前と飛翔中で差があるかないかを検証した。

<脚に関する自由行動下のカルシウムイメージング>

使用したハエの遺伝子型は、脚の弦音器官の感覚神経や、弦音器官、外部感覚毛の神経と接続する 2 次介在神経を標識する（後述）、 $iav > DsRed(F3A2), GCaMP6s, R30G08 > DsRed(F3A2), GCaMP6s, NP1619 > DsRed(F3A2), GCaMP6s, R20E05 > DsRed(F3A2), GCaMP6s, NP3375 > CD8::mCherry, GCaMP6s, R85A11 > DsRed(F3A2), GCaMP6s$ である。自由行動はボール上での歩行、静止、空中でのばたつき、接触、静止、飛翔の 7 種類に分けた。ボール上での歩行は、全ての脚を継続して動かしている状態を歩行とし、脚がボールから離れていない状態で動いたもの、極端に脚を動かす速度が遅いものは除外した。ボール上での静止は、一本でも脚が接地していればボール上での静止とした。接触は空中で動かした脚の種類や本数に関係なく脚をすり合わせたり、翅をグルーミングしたり、固定用プレートに脚があたったりした場合を接触とした。ただし、グルーミング様の行動に関しては、その行動中に他の脚がばたついた場合は除外した。飛翔は翅・平均棍の実験と同様に定義した。実験中の行動は歯科用顕微鏡の動画を解析しイメージングデータと対応させた。ボール上で静止しているときの 1 秒間の平均をベース値 F とし、それに対する各フレームにおける

GCaMP6s の変化量の割合を計算した $\Delta F/F$ (%) の場合で各行動間の神経応答を比較した。ここで GCaMP6s の変化量からは、翅への機械刺激の実験と同様にして算出した DsRed、または CD8::mCherry の輝度値の変化量を GCaMP6s の変化量から引き、ハエの拍動や食道の動きにより生じた脳の動きを補正したものを各行動の比較に使用した。ボール上での静止が同じ試行中に複数ある場合は、最も長いものを採用し、次の行動に変わる 2 秒前から 1 秒間の平均をベースとして計算した。箱ヒゲ図には行動が変わる直前から 2 秒間の $\Delta F/F$ を使用した。これは行動が変わる直前のデータが、最も安定していたからである。統計解析では、各行動間に差があるかないかを Kruskal-Wallis の検定でまず検証し、差があった場合にはそれぞれの行動の間の差をウィルコクソンの順位和検定で検証した。

<片側各脚 1 本だけ残したときのカルシウムイメージング>

使用したハエの遺伝子型は弦音器官神経を標識する $iav > DsRed(F3A2)$, GCaMP6s である。実験開始直前に体の片側の脚 1 本のみを残して残りの 2 本を切除し（反対側は全ての脚を残す）、ボール上で自由に行動させ、カルシウムイメージングを行った。脚を動かした場合を歩行、動きを止めた場合を静止とした。ボール上で静止しているときの 1 秒間の平均をベース値 F とし、それに対する各フレームにおける蛍光の変化量の割合を計算し $\Delta F/F$ (%) とした。また GCaMP6s の変化量からは、翅への機械刺激の実験と同様にして算出した DsRed の輝度値の変化量を GCaMP6s の変化量から引き、ハエの拍動や食道の動きにより生じた脳の動きを補正した。ボール上での静止が同じ試行中に複数ある場合は、最も長いものを採用し、次の行動に変わる 2 秒前から 1 秒間の平均をベースとして計算した。箱ヒゲ図には行動が変わる直前から 2 秒間分の $\Delta F/F$ を使用した。これは前項と同様に、行動が変わる直前のデータが、最も安定していたからである。統計解析では歩行時と静止時で蛍光量に差がある

かないかを検証した。

<ハエ正面から強風を与え踏ん張らせたときのカルシウムイメージング>

使用したハエの遺伝子型は $iav > DsRed(F3A2), GCaMP6s$ である。この実験では、ハエが正面から強い風を受けると風に抵抗して踏ん張るという習性を利用した実験である (Yorozu *et al.*, 2009)。空気流刺激装置を用いて、ハエの正面から約 2cm 程度離れた場所から 3.0L/分の流量の空気流刺激を内径 5mm のパイプを用いて与えた (図 6D)。この実験では、流量を確保するためオリフィス径が大きい方の電磁弁を使用した。流量は、ハエをイメージング固定プレートに固定し顕微鏡にセットした状態で、3.5L/分から徐々に弱くし、最も効率よく踏ん張り行動がみられた 3.0L/分に決定した。この実験では、撮影の開始と終了、空気流刺激の開始、刺激の持続時間はパルス発生装置により制御した。解析はボール上で歩いている状態から踏ん張る状態になった場合と、静止している状態から踏ん張る状態になった場合の 2 つの場合において、前後の行動間に神経応答の差があるかないかを検証した。バックグラウンドの全データの平均を求めベース値 $F_{background}$ とし、それに対する各フレームにおける蛍光の変化量の割合を計算し $\Delta F / F_{background}$ (%) とした。GCaMP6s の輝度値は、「GCaMP6s の輝度値 \times (1 - DsRed の $\Delta F / F \times 100)$ 」の式によりハエの拍動や食道の動きにより生じた脳の動きを補正したものを使用した。DsRed の $\Delta F / F$ (%) は、翅への機械刺激の実験と同様に算出した。箱ヒゲ図には行動が変わる直前から 2 秒間の $\Delta F / F_{background}$ を使用した。

<ハエに異なる波長の光刺激を照射したときのカルシウムイメージング>

使用したハエの遺伝子型は、視葉の視覚低次中枢から脳本体の高次視覚中枢に投射する神経経路を標識する $NP302 > DsRed(F3A2), GCaMP6s, NP681 > GCaMP6s, NP6250$

>GCaMP6s, GCaMP6s, NP6645 > DsRed(F3A2), GCaMP6s, NP7226 > GCaMP6s, NP7302 > DsRed(F3A2), GCaMP6s, NP7476 > GCaMP6s である。DsRed は GCaMP だけでは神経の位置の特定が困難な場合に用いた。また、w⁺;UAS-GCaMP6s と、w⁺;UAS-GCaMP6s;UAS-GCaMP6s のどちらを使用するかは、より明るく観察できることを基準に決定した。この実験では、ハエに 350nm の紫外光から 680nm の赤色光までの異なる波長の光を 30nm ごとに照射し、そのときの神経の応答を調べた (図 8C)。しかし、GCaMP をレポーターとして用いた実験では、その蛍光と重なる緑領域の波長の光刺激を与えると、その光も顕微鏡の蛍光検出器のフィルターを通過してしまうため画像が全体的に白飛びしてしまう。そこで、GCaMP6s の蛍光域と重なる 500nm-530nm の波長は実験から除外した。この実験では 1 回の試行中に 350-680nm の 10 種類の刺激を 1 秒間、15 秒間隔で照射し、神経の応答を記録した。また、視細胞の疲弊や馴化による影響を防ぐため、各試行の間には 10 分のインターバルをおき、また 350nm-680nm の向きで刺激を行った次は、680nm-350nm の向きで刺激を行い、馴化の影響を防いだ。解析は、刺激を与える直前から 10 秒間の平均をベース値 F とし、それに対する各フレームにおける蛍光の変化量の割合を計算し $\Delta F / F$ (%) とした。

<末梢における GCaMP の発現確認のための撮影>

使用したハエの遺伝子型は、MZ815>GCaMP6s、iav-GAL4>GCAMP6s。翅、平均棍の基部の撮影には MZ815>GCaMP6s、脚の撮影には iav-GAL4>GCAMP6s を用いた。翅基部、平均棍基部の撮影はそれぞれの器官を胴体部から切り離さずに実体顕微鏡 (Leica, M165 FC) にデジタルカメラ (Olympus PEN Light, E-PL5) を取り付けて撮影した。脚の撮影には切除し易かった中脚を用いた。脚の切除は注射針 (テルモ注射針 25G×5/8” 0.50×16mm)

とピンセットを用いた。切除した脚は、ビニールテープで加工したスライドガラスにマウントし、リンガー液を適量加え、カバーガラスをかけて共焦点顕微鏡（オリンパス株式会社、FV1000）で撮影した。撮影に使用した対物レンズはオリンパスの 10 倍の乾燥対物レンズ（型番：UPlanSApo 10x/0.40、開口数 N.A.0.40）。ビニールテープで加工したスライドガラスとは、スライドガラスにビニールテープを貼り、脳や脚などの観察したい器官に合わせてビニールテープにカッターでビニールテープ部分を切り取ったものである。脳標本の撮影にもこの加工したスライドガラスを用いた。

2-10. 統計解析

統計解析は R で行った。3 群以上の比較には Kruskal-Wallis の検定 (`kruskal.test`)、2 群間の比較にはウィルコクソンの順位和検定 (`wilcox.exact`) を行った。統計解析の全ての結果を表 1-7 に示す。今回取得したデータは神経末端部、軸索部のものであり、撮影中の標本の角度により同じ神経でも値がに大きな差が出るものもあり、正規分布に従うとは言えないため、ノンパラメトリックな検定方法を採用した。

2-11. 脳標本の染色

羽化後 4 日～10 日以内の雌のハエを解剖、抗体染色し、標本を作成した。作成した標本は共焦点顕微鏡（オリンパス株式会社、FV1000）で撮影した。使用した対物レンズはオリンパス 30 倍シリコンレンズ（型番：UPlanSApo 30x/1.05、開口数 N.A.1.05）。

ハエの解剖は PBS 溶液内で行い、PEM (0.1M PIPSE、2mM EGTA、1mM MgSO₄、pH 6.95) で解剖した脳は 4%に希釈したホルムアルデヒドで 4℃、2 時間固定した。固定が終わったら、PBT 溶液 (PBS、0.5% Triton X-100) で 15 分、3 回洗った。洗った後、PBT で希釈した 10%

の normal goat serum (ブロッキングバッファー) で、4°C、2 時間ブロッキングした。ブロッキング後は、ブロッキング溶液で希釈した 1 次抗体液に変え 2 晩インキュベートした。インキュベート後、PBT 溶液で 15 分、3 回洗い、ブロッキング溶液で希釈した 2 次抗体液に変え 1 晩インキュベートした。インキュベート後、PBT 溶液で、15 分 3 回、PBS 溶液で 15 分 1 回洗った後、PBS で希釈した 50%グリセロールに変え 2 時間 4°Cでインキュベートした。最後に水で希釈した 80%グリセロールに変え、1 晩インキュベートした。

使用した 1 次抗体は rabbit anti-GFP 抗体 (Molecular Probe、#A11122, 1/1000 倍)、mouse nc82(Hybridoma bank, 1/100 倍)、2 次抗体は Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG (Molecular Probes, #A-11077, 1/250 倍)、Alexa Fluor 647-conjugated anti-mouse IgG (Molecular Probes, #A-21236, 1/250 倍)である。

Part. 1

体性感覚中枢の構造的機能的解析

3. 結果 1

3-1. 胸腹部神経節から脳へ投射する神経をラベルする GAL4 系統のうちカルシウムイメージングに適した系統の選別

体性感覚を受容する感覚器官は胸部以下の胴体部にあるため、脳での体性感覚中枢を調べるためには、胸腹部神経節から脳へ投射している神経を解析しなければならない。GAL4-UAS システムを用いた解剖学的な解析により、約 14,000 系統ある GAL4 系統のうち 37 系統が胸腹部から脳へ情報を伝えている神経を特異的にラベルすることが私が所属する研究室の解剖学的な研究から明らかとなっている。本研究では、それら 37 系統のうちカルシウムイメージングに適した系統をまず選別した。今回スクリーニングした GAL4 系統の中には、GAL4 遺伝子がハエのゲノム中にランダムに挿入された系統も多くあり、その発現は系統によってさまざまであった。例えば、ある系統では脳の多数の細胞で GAL4 が同時に発現してしまっているため、今回の研究で調べたい神経をはっきりと区別することができない。また逆に、胸腹部神経節から脳へ投射する神経において GAL4 の発現が極端に少ないと、神経応答を検出することができない。そこで、観察したい神経をはっきりと標識され、その他の神経があまり標識されない系統を選んだ。

37 系統のうち 31 系統は末梢の感覚器官から直接脳へ投射している感覚神経を標識しており、その中から 3 系統を選んだ (図 9)。この 3 系統で末梢から直接脳へ投射する神経群をほぼ全てカバーしていることが当研究室の先行研究により明らかにされている (坪内、2016、未発表データ)。残り 6 系統は胸腹部神経節で感覚神経から情報を受け取って脳に投射する介在神経を標識しており、このうち 4 系統を選んだ (図 10)。

末梢から直接脳へ投射する感覚神経群をラベルする 3 系統は、MZ815 (図 9A)、*iav*-GAL4 (図 9B)、GMR30G08 (図 9C) である。*iav*-GAL4 は *inactive* 遺伝子が発現している細胞

にのみ GAL4 が発現する系統である。末梢の感覚神経には、機械刺激（圧迫、振動）や熱刺激を受容するチャネルタンパク質が発現しており、Transient Receptor Potential channel (TRP チャンネル) と呼ばれている。trp 遺伝子はキイロショウジョウバエで発見された遺伝子で、陽イオンチャネルを形成する。また、脊椎動物で保存されていることも明らかとなっている (Fowler and Montell, 2012)。TRP チャンネルは複数種あり、キイロショウジョウバエには、TRPC、TRPA、TRPN、TRPV の 4 つのサブファミリーがある。主に温度感覚を担う TRP チャンネルは TRPA サブファミリーに、機械感覚を担う TRP チャンネルは、TRPN、TRPV サブファミリーに属することが明らかにされている。Inactive は TRPV サブファミリーに属するチャネルタンパクであり、接触刺激やロコモーションによる刺激、音刺激、重力刺激に反応することが分かっている (Fowler and Montell, 2012)。

末梢から直接脳へ投射する体性感覚神経は、翅と平均棍の基部にある鐘状感覚子 (campaniform sensilla, cs) と脚の関節部にある弦音器官 (chordotonal organ, co) に由来するものだけであることが分かっており、MZ815 系統は翅、平均棍の鐘状感覚子の神経群をラベルし、iav-GAL4 は脚の弦音器官のほとんどの神経群を、また GMR30G08 は iav-GAL4 とは異なる脚の弦音器官の神経群をラベルする。それぞれの系統において脳での投射を調べると、異なる経路を通過して脳の異なる領域に終末することが分かった。

翅、平均棍の鐘状感覚子由来の神経群は胸部神経節の背側から入射し、一つの束となり頸部の背側を通過して脳の後方から入り、前側方へ向かって 4 つの束に分かれる。脳に入射してからは GNG (gnathal ganglia) と呼ばれる脳下部領域の後方から 1 束ずつ、少しずつ前方に移動しながら、AMMC (antennal mechanosensory and motor center) と呼ばれる領域の少し後の領域まで投射していた。これら 4 つの束をそれぞれ脳の後方から順に、Hcs1N-m、Hcs1N-l、Wcs1N-m、Wcs1N-l と名付けた (図 11A-C)。(H は平均棍 Haltere、W は翅 Wing、

N は neuron、m は正中側 medial、l は側方 lateral を示す。平均棍と翅からの投射特異性については次節で報告する。

次に脚の弦音器官から脳へ直接投射する神経群は、前脚、中脚、後脚それぞれから胸部神経節の腹側に軸索が入射し、それらが 1 つの束となり頸部腹側から脳へ投射する。脳へ入った神経群に枝分かれば見られず、GNG を外側前上方に向かって斜めに横切り、GNG を出ると脳の側方の縁に沿って AVLP (anterior ventrolateral protocerebrum) と呼ばれる領域の腹側に終末する。この経路を通る神経群には 2 つあり、1 つは束になったまま AVLP で終末するが (iav-GAL4)、もう 1 方は終末部分が二股になっている (GMR30G08)。また、GMR30G08 の方が AVLP よりも上方まで伸びている。前者を Lco1N1、後者を Lco1N2 と名付けた (図 16A-C、図 17A-C)。

次に胸部神経節で介在神経を介して脳へ情報を伝える経路であるが、それら介在神経経路が胸部神経節において、末梢のどのような感覚器官から入力を受け、脳のどの領域に情報を伝えているのかということは解剖学的な研究により明らかにされている (坪内、2016、未発表データ)。介在神経の経路の解析には、NP1619 (図 10A)、GMR20E05 (図 10B)、NP3375 (図 10C)、GMR85A11 (図 10D) の 4 つを選んだ。そのうち NP1619、GMR20E05、は脚の弦音器官からの入力を受ける介在神経で、それぞれ Lco2N1、Lco2N2 と順に名前をつけた (図 18A-C、図 19A-C、L は leg の略)。残りの NP3375、GMR85A11 は脚の外部感覚毛 (external sensilla, es) から入力を受ける介在神経で、それぞれ Les2N1、Les2N2 と順に名前をつけた (図 20A-C、図 21A-C)。

2 次介在神経である Lco2N1、Lco2N2 は 1 次感覚神経である Lco1N1、Lco1N2 と同じ、腹側 AVLP に投射する。ただし、その終末の形態はどちらもカップ状に枝を広げており、Lco1N1、Lco1N2 の束状の形態とは異なり、より広い領域に情報を伝える構造をしていた。

Lco2N1 と Lco2N2 の違いは、AVLP までの経路である。Lco2N1 は Lco1N1、Lco1N2 と同様に、GNG を斜めに横切り、脳の縁を通過して、腹側 AVLP に投射していた。それと比較して、Lco2N2 は頸部腹側の中心よりから脳へ入り、GNG の正中側を抜け、脳後部に軸索を曲げた後、再び脳前部の腹側 AVLP に終末していた (図 18A-C、図 19A-C)。

次に、Les2N1、Les2N2 は脳の腹側から背側にかけて長い軸索を伸ばしており、その経路はほぼ同じであった。どちらの神経束も GNG、PVLP (posterior ventrolateral protocerebrum)、腹側 SLP (superior lateral protocerebrum) に枝を広げているが、Les2N1 は PVLP よりも SLP に多くの枝を広げ、Les2N2 は SLP よりも PVLP で枝を多く広げていた (図 20A-C、図 21A-C)。

3-2. 翅・平均棍の感覚器官から脳へ直接投射する神経群の解析

翅、平均棍の感覚器官から直接脳へ投射する神経群 Wcs1N、Hcs1N の解析には MZ815 系を使用し、4 つの束が末梢のどの部位に由来するのか、また刺激の違いによる反応の差があるかどうかを明らかにする実験を行った (図 11)。まず最も刺激が与えやすい翅の基部に機械刺激 (圧迫、1Hz、50Hz、300Hz) を与え (図 11D)、そのときの神経応答を調べた。刺激の順番はどの個体、どの試行でも同一とした。その結果、全ての種類の機械刺激に対して、Wcs1N1-1 において神経の興奮が見られた (図 11D-F)。また、振動の周波数の周波数が高くなるにつれて、神経の応答が下がっていた (図 11G)。しかし、4 匹、5 試行 (1 個体のみ 2 データ取得) のデータのうち 1 試行において、圧迫、50Hz では反応しているのに 1Hz、300Hz ではほとんど反応していないというデータが含まれていた (図 12A-B)。そこで、歯科用実体顕微鏡で記録したイメージング中の動画を解析したところ、圧迫では機械刺激により翅が 92.04° 、50Hz では 32.49° 動いていたが、1Hz、300Hz では翅は動いていなかった

(図 12B-C)。このことから、5 試行全てのイメージング中の翅の動きを確認し、角度を計測して、そのときの神経の応答の強さを比較した。その結果を図 13A-D に示した。図 13A-B から、翅の位置がもとの場所より少なくとも 5 度以上動いた場合に、有意に強い神経の興奮が見られた。それぞれの場合において刺激前と刺激中で神経応答に有意差があるかどうかを調べた結果、翅の動きが 5 度より小さい場合には差は認められず、5 度より大きい場合に差があることが認められた (図 13C)。さらに、翅の位置の変化には垂直方向と、水平方向の 2 種類があったため、その 2 種類間でも比較を行った。その結果、垂直方向の変化と水平方向の変化間に差が認められた (図 13D)。以上から、観察された神経応答は、翅の基部に加えた圧迫刺激の周波数の違いよりも、それによって翅が一定以上動いたかどうかによって生じていると思われる。

Wcs1N1-l が翅の動きにより反応することから、次に圧迫刺激、振動刺激ではなく、人為的に翅の位置を垂直方向に変位させることにより、Wcs1N-l、Hcs1N-m の反応を調べた (図 14)。その結果、翅の位置を変化させると、Wcs1N-l は反応が見られ、刺激前と刺激中で有意差が認められたが、Hcs1N-m、Hcs1N-l は反応が見られなかった (図 14C)。同様に、平均棍の位置も人為的に変位させた場合も調べた。その結果、Hcs1N-m、Hcs1N-l は平均棍が変位すると神経の反応が見られ、刺激前と刺激中で有意差が認められたが、Wcs1N-l、Wcs1N-m は反応が見られなかった (図 14D)。

さらに翅、平均棍は飛行のときに大きく動くので、飛行時においても、これら 4 つの神経群に関して神経応答を調べた (図 15)。その結果、Wcs1N-m、Wcs1N-l、Hcs1N-m、Hcs1N-l、全ての神経群において飛行前と比較して飛行時に神経が応答していた (図 15A-D)。Wcs1N-l、Hcs1N-l、m に関して飛行前と飛行中で神経応答を比較したところ有意差が認められた (図 15B)。またその反応は非常に強く、人為的に翅、平均棍の位置を変えた場合と比

べて 2~3 倍も強かった。人為的に翅や平均棍を動かした場合には、これらは定常位置から最大 90 度までゆっくり移動するだけなのに対し、飛翔時には定常位置からプラス 90 度、マイナス 90 度の範囲で急激な移動が生じる。反応の強さの違いは、この違いを反映している可能性がある。

3-3. 脚の感覚器官から脳へ直接投射する神経群の解析

<自由行動下での神経応答の比較>

脚の弦音器官から脳へ直接投射する神経の解析には、*iav-GAL4* 系統と *GMR30G08* 系統の 2 系統を使用した。この実験では、ハエがボール上を歩いているとき (*walk*)、止まっているとき (*stop ball*)、空中で脚をばたつかせているとき (*move air*)、空中で何かに脚が触れているとき (*contact air*)、空中で止まっているとき (*stop air*)、飛翔時 (*flight*) の 6 つの行動間で神経応答に差があるかないかを調べた。

まず *Lco1N1* をラベルする *iav-GAL4* 系統で、*AVLP* の下部に投射している部分をカルシウムイメージングした (図 16A-G)。6 つの行動間の神経応答を *Kruskal-Wallis* 検定により比較したところ、差が認められた ($p < 0.05$) ので、*stop ball* と各行動間で神経応答に差があるかないかをウィルコクソンの順位和検定により調べた。まずボール上では、*stop ball* 時よりも、*walk* 時に神経が強く反応することが明らかとなった ($p < 0.05$)。次に空中では *move air* 時には特に強い反応が見られ、*contact air*、*stop air*、*flight* の順で反応が弱くなった ($p < 0.05$)。また、*stop air* と *move air*、*contact air*、*flight* 間の神経応答を比較したところ、*move air* と *contact air* は *stop air* よりも神経が反応していたが ($p < 0.05$)、*flight* とは差が見られなかった。

次に *Lco1N2* をラベルする *GMR30G08* 系統で、*AVLP* 下部に投射している部分をカルシ

ウムイメージングした（図 17A-G）。Lco1N1 と同様に 6 つの行動間の神経応答を Kruskal-Wallis 検定により比較したところ、差が認められた ($p<0.05$)。次に stop ball と各行動間で神経応答に差があるかないかをウィルコクソンの順位和検定により調べた。その結果、stop ball と比較して walk、move air、contact air は神経応答が強かったことが認められ、stop air、flight は有意に反応が小さいことが認められた ($p<0.05$)。さらに stop air と move air、contact air、flight 時の神経応答を比較したところ、move air と contact air は有意に反応が強くなっており、flight 時は逆に反応が小さくなっていた ($p<0.05$)。

以上の結果をまとめると Lco1N1、Lco1N2 はどちらも、stop ball 時に比べて、脚が動いている状態 (walk ball、contact air、move air) のときに神経が興奮すると言える。しかし、Lco1N1 が stop ball 時に最も神経応答が小さかったことと比較して、Lco1N2 では stop air、flight air 時に最も神経応答が小さかったことから、Lco1N2 は脚が地面についている状態では、神経が興奮していると考えられる。

3-4. 末梢感覚器官からの入力を受け脳へ投射する介在神経群の機能的解析

<脚の弦音器官から脳へ投射する Lco2N1 の自由行動下における神経応答>

Lco2N1 の自由行動下の神経応答の違いは NP1619 系統を用い、AVLP 下部に投射している、カップ状の領域についてカルシウムイメージングを行った。解析した行動は、walk、stop ball、move、contact air、stop air の 5 種類で、それぞれの行動間で神経応答に差があるかないかを比較した（図 18）。

カルシウムイメージングの結果、walk ball、contact air 時に神経の強い反応が見られた ($p<0.05$)。stop ball、move air、stop air 時は神経の反応が弱く、特に move air と stop air が目立って弱かった（図 18E-F）。それら 5 つの行動間の神経応答について Kruskal-Wallis

検定により比較したところ、差が認められた。この結果を受けて、まず stop ball と各行動間の神経応答をウィルコクソンの順位和検定により比較した。その結果、ボール上では walk ball 時に、空中では contact air 時に有意に反応が強くなっていることが認められた ($p < 0.05$)。また、move air、stop air 時は stop ball 時よりも神経の反応が有意に弱いことが認められた ($p < 0.05$)。さらに、stop air 時と move air 時の反応を比較したところ、差は認められなかった。

ボール上では walk ball 時に神経の興奮が見られたこと、空中では contact air 時に神経の興奮が見られたことから、Lco2N1 は脚が動いているだけでは反応せず、何かに触れている状態で足を動かすと反応すると考えられる。

<脚の弦音器官から脳へ投射する Lco2N2 の自由行動下における神経応答>

Lco2N2 の自由行動下の神経応答の違いには GMR20E05 系統を用い、AVLP 下部に投射している領域についてカルシウムイメージングを行った。こちらの系統では、Lco2N1 と違って、カップ状の形態の全体像をイメージング画像から捉えることができず、その一部分について解析を行った。解析した行動は、walk、stop ball、move、contact air、stop air の 5 種類で、それぞれの行動間で神経応答に差があるかないかを比較した (図 19A-G)。

カルシウムイメージングの結果、walk ball 時は他の行動時と比較して神経が反応している結果が得られたが、その他の行動間はどれも同じような神経応答を示した (図 19E-F)。それら 5 つの行動間において神経応答に差があるかどうかを Kruskal-Wallis 検定により比較したところ、差が認められた ($p < 0.05$)。この結果を受けて、まず stop ball と各行動間の神経応答をウィルコクソンの順位和検定により比較した。その結果、ボール上では walk ball と stop ball では walk ball 時の方が有意に神経が反応していることが認められた ($p < 0.05$)。そ

れと比較して、空中の全ての行動は stop ball 時よりも神経が反応していなかった ($p < 0.05$)。

次に、stop air に対して move air、contact air 時の神経応答を比較したところ、move air 時は stop air 時よりも神経が反応していることが認められたが、contact air 時とは差が認められなかった ($p < 0.05$)。以上の結果をまとめると、Lco2N2 は空中では足の動きに関係なく、ボール上の行動よりも神経の応答が弱かった。このことから、Lco2N2 は脚が地面についているかどうかを検出していると考えられる。また、空中での行動を比較した結果、move air 時に反応が強くなっていたことから、空中では脚が動いているかどうかを検出していると考えられる。

<脚の外部感覚器から脳へ投射する Les2N1 の自由行動下における神経応答>

Les2N1 の自由行動下における神経応答の解析には NP3375 系統を使用し、SLP 領域に投射する神経についてカルシウムイメージングを行った (図 20A-C)。その他の領域に投射する神経は、実験装置の性能の限界により観察することができなかった。解析した行動は、walk、stop ball、move air、contact air、stop air の 5 種類で、それぞれの行動間で神経応答に差があるかないかを比較した (図 20D-G)。

カルシウムイメージングの結果、どの行動においても神経に目立った差は観察できなかった。Kruskal-Wallis 検定も行ったが、5 つの行動における神経応答には有意な差は認められなかった ($p < 0.05$)。以上の結果をまとめると、Les2N1 の SLP 領域に投射している部分では、足の接地情報や動き情報は伝えられていないことが考えられる。

<脚の外部感覚器から脳へ投射する Les2N2 の自由行動下における神経応答>

Les2N2 の自由行動下における神経応答の解析には GMR85A11 系統を使用し、SLP 領域

と PVLP 領域の境目あたりに投射する神経についてカルシウムイメージングを行った (図 21A-C)。その他の領域に投射する神経は、Les2N1 と同様に、実験装置の性能の限界により観察することができなかった。解析した行動は、walk、stop ball、move air、contact air、stop air の 5 種類で、それぞれの行動間で神経応答に差があるかないかを比較した (図 21D-G)。

カルシウムイメージングの結果、walk、contact air 時に神経が強く応答していた。また、Lco1N や Lco2N と違い、その反応には一過的な性質があった (図 21G)。Kruskal-Wallis 検定により、5 つの行動間の神経応答に差があるかないかを比較したところ、有意に差があることが認められた ($p < 0.05$)。この結果を受けて、まず、stop ball とその他の行動間で神経応答に差があるかどうかをウィルコクソンの順位和検定により比較したところ、全ての行動時における神経応答が stop ball 時に比べて有意に強いことが認められた ($p < 0.05$)。さらに、stop air 時と contact air、move air 時の神経応答間に差があるかどうか調べたところ、stop air 時と move air 時では神経応答に差は認められなかったが、contact air 時は神経が有意に反応していることが認められた ($p < 0.05$)。以上の結果をまとめると、Les2N2 はボール上では脚が動いているときに反応すること、空中では脚が動くだけでは強く反応せず、何かに触れた場合に強く反応すると考えられる。この結果は Lco2N1 と類似した結果である。また、空中での反応全てが stop ball じよりも反応が強かったことから、Les2N2 は接地情報を検出していると考えられる。

3-5. Lco1N1 における自由行動下での片側各脚 1 本だけ残したときの反応部位

Lco1N1 は同側の前脚、中脚、後脚からの全ての神経が 1 つになっていることが本研究室の先行研究により明らかにされている (坪内、2016、未発表データ)。全ての脚の動きに関してカルシウムイメージングした結果、AVLP に投射している部分においては、脚が動いてい

るときに神経が強く反応することが分かった (図 16)。しかし、動いている脚の本数によって反応に差があるようであった。そこで、前脚、中脚、後脚からの情報が全て脳の AVLP 領域まで伝えられているのかどうかを検証することにした。実験は片側のみ各脚 1 本だけを残した状態にし、ボールの上を歩いた場合 (walk ball) と止まった場合 (stop ball) で神経応答に差があるかないかを調べることにより、末梢からの情報が伝達されているかどうかを検証した (図 22A-D)。

まず AVLP 下部に投射する部位のイメージングを行った。その結果、前脚、中脚のみをそれぞれ残した場合、stop ball 時と比較して walk ball 時に神経が反応していることが認められたが、後脚のみを残した場合には、反応に差が認められなかった (図 22B-D) ($p < 0.05$)。そこで、経路の途中である GNG の部分において同様の実験を行い、神経応答を比較したところ、stop ball 時よりも walk ball 時の方が神経が反応していることが認められた (図 22B-D) ($p < 0.05$)。以上の結果から、ひとつの神経束の中でも前脚と中脚は束の先の AVLP 下部まで脚の動きの情報が伝達されているが、後脚の動きの情報は束の付け根側の GNG までしか伝達されておらず、脚によって異なる脳領域に情報が伝えられることが分かった。

3-6. 正面からの強い風に対して踏ん張ったときの Lco1N1 の反応

動物の行動は必ずしも目に見える動きをとまなうものばかりではなく、外からは何も力が加わっていないように見える場合でも体の内部では動きが見られる場合がある。それが、筋肉の動きである。人は台風のような強い風に対してその場に踏ん張って吹き飛ばされないようにする。弦音器官は体内にある感覚器官であり、関節部における付け根側と先側の節の間の張力を計測している。踏ん張っているときには脚に力が入っていることを脳へ伝える必要があるが、その役割を弦音器官が担っており、筋肉の収縮弛緩により反応すると考えた。バ

ツタやゴキブリの研究においては脚の弦音器官が脚の筋肉に接続していることが明らかにされている (Burns, 1974, Young, 1970)。キイロショウジョウバエは正面から強い風を受けると、吹き飛ばされないようにその場に踏ん張るという習性が知られており (Yorozu *et al.*, 2009)、踏ん張っている時には、脚の筋肉が収縮していると考えられる。この習性を利用して、ハエが強風に対して踏ん張っているときに、Lco1N1 がどのような反応を示すかを調べることにより、脚内部の筋肉の収縮の情報を検知しているかどうかを確かめた。この実験では、AVLP に投射している部位をイメージングした (図 23A)。これは、AVLP 領域には前脚と中脚の両方からの神経が集まっているため神経の数が多く、また AVLP が GNG に比べて脳の上部に位置するため、イメージングを行いやすいからである。空気流刺激装置から 3.0L/min の強さの風をハエの正面から与え、踏ん張る行動が見られたデータにおいて解析を行い、walk ball (歩行) から踏ん張っている状態になった場合と stop ball (静止) から踏ん張っている状態になった場合の 2 通りの場合について神経応答の差を調べた。

walk ball から踏ん張っている状態になった場合では、神経応答に変化は見られず、検定の結果も有意差は認められなかった (図 23B-左、C) ($p < 0.05$)。これは、walk 時と踏ん張り時でどちらも神経が反応していたことを示している。この結果と比べて、stop ball から踏ん張っている状態になった場合、stop ball 時に比べて、踏ん張り時の方が神経が反応していた (図 23B-右、C) ($p < 0.05$)。以上の結果をまとめると、脚が動いているとき、すなわち脚の筋肉が活発に収縮、弛緩を繰り返している状態、筋肉が収縮する踏ん張り時に神経が強く応答し、筋肉の収縮が少ない stop ball 時には神経の応答が弱いことから、Lco1N1 は筋肉の収縮、弛緩の検出を行っていると考えられる。

3-7. 末梢での GCaMP の発現

UAS-GCaMP6s を発現させたときの MZ815 や iav-GAL4 の脳や胸腹部神経節における神経の形態は確認した。さらに末梢においてどのような発現が見られるかを確認するため、MZ815>GCAMP6s の個体の翅基部、平均棍基部、iav-GAL4>GCAMP6s の個体の中脚における蛍光を調べた (図 24A-C)。MZ815>GCaMP6s の翅、平均棍は Leica の実体顕微鏡で観察したところ強い蛍光をそれぞれの鐘状感覚子がある部分に確認できた (図 24A-B)。また、iav-GAL4>GCAMP6s の中脚における GCaMP の発現は、脚のクチクラが厚く実体顕微鏡下では観察が困難であったため、共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果、転節と腿節の関節部と脛節と跗節の関節部に蛍光が確認され、弦音器官において GCaMP が発現していることを確認できた (図 24C)。

4. 考察 1

4-1. 体性感覚神経は末梢の感覚器官から直接脳へ投射する経路と介在神経を經由する経路の2つがある

<末梢から脳へ直接投射する経路とその由来する感覚器>

これまでの解剖学的な研究から、胴体部に散在する機械感覚毛や鐘状感覚器で受容された刺激の情報が、胸腹部神経節にどのように伝えられているのか、その経路が詳細に調べられている。Ghysen (1980) は、バックフィル染色法を用いて、胸部背側の剛毛、翅の鐘状感覚器や機械感覚毛、平均棍の鐘状感覚器に付随する神経の胸部神経節における投射パターンを単一細胞レベルで明らかにしている。また、その形態形成が遺伝的にどのように制御されているかも調べている (Palka and Ghysen, 1982、Grillenzoni, *et al.*, 1998)。本研究のスクリーニングにより得られた MZ815 という系統では、胸部神経節から脳に直接投射している神経群がラベルされており、まずその神経が末梢のどの感覚器官に由来するのかをこれらの既知の研究結果から明らかにした。Ghysen (1980) の報告から、胸部背側の機械感覚毛に付随する神経は胸部神経節で、前後に軸索を伸ばし分岐を形成しており、直接脳まで投射する神経は確認されていない。翅の鐘状感覚器に付随する神経は、胸部神経節で枝分かれし、広範囲に軸索を伸ばすものがあり、さらにその枝分かれした軸索が脳まで投射しているものが明らかにされている。さらに翅の基部にある鐘状感覚器に由来する神経のみが、脳まで投射することも明らかにされている。また、翅の縁にある機械感覚毛に付随する神経は、束になって胸部神経節の一部の領域に終末することが分かっている。平均棍の鐘状感覚器に付随する神経は、翅の鐘状感覚器に付随する神経と同様に、胸部神経節で枝分かれし、広範囲に軸索を伸ばすものがあり、さらにその枝分かれした軸索が脳まで投射しているものが明らかにされ

ている。これらの情報から、MZ815 でラベルされている神経のうち、脳まで投射している神経は翅と平均棍の鐘状感覚器由来であるといえる。また、昆虫の胸部は 3 つの節からできおり、胸部神経節も 3 つの部分に分けられている。翅は胸部第 2 節、平均棍は胸部第 3 節から出ており、翅からの神経と平均棍からの神経は、胸部神経節に入射する場所の違いから区別することができる。実際に、MZ815>GCaMP6s のハエを用いて翅基部、平均棍を撮影した結果、蛍光も確認された (図 24A-B)。

次に、脚の感覚器官に由来する神経群についてであるが、こちらも胸部神経節における詳細な経路が明らかにされている。Murphey 等 (1989) によって、脚の機械感覚毛付随する神経の投射経路が単一細胞レベルで明らかにされている。前脚、中脚、後脚はそれぞれ胸部第 1 節、第 2 節、第 3 節から出ており、それぞれの脚に由来する神経は胸部神経節の 3 つの体節のそれぞれから入射する。それぞれの脚の機械感覚毛に由来する神経は胸部神経節内を前後軸方向にまたがず、各体節内で終末する。一部の神経では正中線をまたいで対側に投射するものが確認されている。また、それら神経の胸部神経節内での投射形態は丸く弧を描くものが多い。脚には、機械感覚毛の他に鐘状感覚器、伸長受容器、弦音器官がある。鐘状感覚器については、Merritt と Murphey (1992) により、明らかにされており、機械感覚毛と同様に胸部神経節にて終末する。その形態は各神経節内で広範囲に神経を分岐させた形態になっている。また、Shepherd と Smith (1996) により伸長受容器に由来する神経が胸部神経節の各体節内において、束状に終末することが明らかにされている。弦音器官の多くは TRPV チャネルが発現していることが分かっており、TRPV チャネルをコードする遺伝子 *Inactive (Iav)* を用いた発現誘導系統である *iav-GAL4* の発現パターンから弦音器官に由来する神経の胸部神経節における投射が分かる。これらの情報を照らし合わせて、*iav-GAL4*、R30G08 の胸部神経節での投射形態を確認したところ、機械感覚毛由来の神経、鐘状感覚器

由来の神経、伸長受容器由来の神経の形態的特徴、と合致しないため、*iav-GAL4*、*R30G08* でラベルされる神経のうち、脳へ直接投射する神経は弦音器官由来であると言える。また *iav-GAL4* においては、*iav-GAL4>GCaMP6s* を用いて、脚の関節部を撮影し、弦音器官が発現していることも確認した (図 24C)。以上の解剖学的な考察から、末梢から脳へ直接投射する神経群は、翅、平均棍、脚に由来し、翅、平均棍では鐘状感覚器に由来する神経であること、脚では弦音器官に由来する神経であることが明らかとなった。

機械感覚毛由来の神経で脳へ直接投射する経路がないことに関する理由として、機械感覚毛からの情報が脳における高速な感覚統合を必要とした行動にあまり関係しないためではないかと考えた。例えば、翅や平均棍は飛翔に関係しているが、飛翔中は目からの視覚情報、触覚からの空気流情報、重力方向などから、飛翔速度や方向を制御している。その制御時には必ず、高速で振動する翅や平均棍からの感覚情報のフィードバックも必要であるため、介在神経を介して脳へ伝えるよりも、直接伝える神経の重要性が高いと考えられる。脳に直接投射している神経数が多いことから、その必要性が分かる。脚からの情報も、強い風に対して踏ん張る行動時は (Yorozu, *et al.*, 2009)、触角からの空気流情報と脚の感覚器官からの情報が行動制御に必要である。胴体部の機械感覚毛に関する行動としては、近年、個体間の接触における集団行動 (Ramdya, *et al.*, 2015) も報告されているが、よく見られるのは脚で胴体や翅をこすって汚れを落とすグルーミング行動である。聴覚、味覚など複数の感覚情報を統合する必要がある配偶行動時には、雄が雌をタッチする、逆に雌が雄にタッチされるといった現象が見られるが、その場合、ある範囲における複数の機械感覚毛からの感覚情報を統合して、刺激が加えられた部位、強さなどから、脳へ伝える必要のある場合にのみ介在神経が反応する仕組みになっているのではないかと考えられる。

<末梢から脳へ直接投射する経路の脳での投射領域>

翅の鐘状感覚器に由来する神経群の経路 $Wcs1N\cdot m$ 、 $Wcs1N\cdot l$ は脳下部の GNG に投射し、AMMC と呼ばれる触角からの情報を受け取る 1 次中枢のすぐ後側に終末する (図 11A-C)。特に、AMMC の中でも E と呼ばれる領域に近く、この領域が触角からの情報の中でも振動 (音) ではなく、傾き (重力・風検知) を受容していることから (Kamikouchi *et al.*, 2006)、飛翔に関わっている翅からの情報を触角からの情報と感覚統合するにあたり、非常に適した領域である。

次に平均棍の鐘状感覚器に由来する神経群の経路 $Hcs1N\cdot m$ 、 $Hcs1N\cdot l$ は $Wcs1N\cdot m$ 、 l よりも脳の後方で腹側の GNG に投射する (図 11A-C)。 $Hcs1N\cdot l$ の一部は AMMC の E の領域の端付近まで末端を伸ばしており、 $Wcs1N\cdot m$ 、 l と同様に飛翔時の感覚情報の統合に適した領域であると考えられる。一方、 $Hcs1N\cdot m$ とほとんどの $Hcs1N\cdot l$ は GNG 内で終末している。GNG の前側には味覚の 1 次中枢があることが明らかにされているが (Miyazaki and Ito, 2010)、その他の領域に関しては詳細が分かっていない。本研究により、 $Hcs1N\cdot m$ 、 l が投射する場所である GNG の後方腹側の領域が、飛翔制御に関係している可能性を示すことができた。今後この GNG 領域に投射する他の神経の詳しい解析が期待される。

最後に脚の弦音器官に由来する神経群の経路 $Lco1N1$ と $Lco1N2$ は、AVLP と呼ばれる領域の腹側に終末する。 $Lco1N1$ と $Lco1N2$ の違いは、 $Lco1N1$ ではすべての神経が 1 つの束になって投射しているのに対して、 $Lco1N2$ は終末部が二股になっているところである。これら 2 つの経路の末梢レベルでの解剖学的な解析から、 $Lco1N1$ と 2 で発現している弦音器官のサブセットが異なることが博士研究員の坪内により報告されている。このことから、末梢レベルでの異なる種類の弦音器官の神経が、脳において異なる形態で投射していることが明らかとなった。また、翅と平均棍の鐘状感覚子の大多数が脳まで投射する $Wcs1N$ 、 $Hcs1N$

と比べて、脚の弦音器官では脳まで投射する神経がごく一部であり、それらの投射領域も脳の一部に限定されていることから、弦音器官の大部分の情報は胸部神経節で処理され、最低限必要な情報のみが脳へ送られていると考えられる。脚からの感覚入力の大部分は歩行に必要な情報であり、その歩行は、頭を取り除いた状態でも行われることから、多くの情報処理が胸部神経節で行われていると考えられる。

<胸腹部神経節で介在神経を介して脳へ伝える経路>

介在神経の経路に関しては、当研究室の坪内研究員による解剖学的な解析から、その詳細が明らかにされている。末梢から直接脳へ投射する経路の項でも述べたが、機械感覚毛に由来する神経は全て胸腹部神経節において終末している。また、弦音器官に由来する神経には直接脳へ投射するものもあるが、その多くは胸部神経節で終末している。その他にも、脚の伸長感覚器や腹の多樹状突起（MD）神経などが胸腹部神経節には投射している。そのうち、本研究で使用した NP1619、GMR20E05 でラベルされる脳へ投射する介在神経 Lco2N1、Lco2N2 は、胸部神経節において弦音器官由来の神経と接続しており、その脳における投射領域は Lco1N と同様に AVLP の腹側である。Lco1N と異なる点は、その末端が Lco2N1、2 の両方ともカップ状になっており、腹側 AVLP の一部分ではなく、全体的に枝を広げている点である。これは、直接ではないにしても、脚の弦音器官からの情報が脳において、より幅広い感覚統合を必要とする何らかの行動に大きく関与していることを示唆している。また、Lco2N1、Lco2N2 間での違いは AVLP までに通る経路である。感覚神経の投射パターンから、異なる場所の感覚器官から受容された情報は、脳の異なる領域に投射する傾向が強い。例えば、Wcs1N や Hcs1N は同じ鐘状感覚器由来の多数の神経が集まったものだが、異なる 2 つの領域に終末している。一方 Lco2N1、2 は、同じように脚から由来し、経路は異なるが脳

の同じ領域に投射している。しかし経路が異なることから、伝達する情報の質が異なるのではないかと考えられる（この点は後で議論する）。

次に、NP3375、GMR85A11 でラベルされる脳へ投射する介在神経 Les2N1、Les2N2 は、胸部神経節において脚の機械感覚毛由来の神経と接続しており、その脳における投射領域は GNG、PVLP、SLP である（図 20A-C、図 21A-C）。PVLP は視覚情報 (Otsuna *et al.*, 2014)、聴覚情報 (Lai *et al.*, 2012) が伝えられる高次中枢であること、SLP には嗅覚情報が伝えられる高次中枢であることが報告されている (Yu *et al.*, 2013)。Les2N とこれまで見てきた神経群の異なる点は、Les2N は脳の背側から腹側にかけて広範囲に情報を伝えていること、またその神経細胞数が他の経路に比べて少ないということである。広範囲に投射していることから、機械感覚毛からの情報がさまざまな高次情報処理に関与していると考えられる。また、脳に投射している神経細胞数が、他の感覚器官の経路に比べて少ないことから、これらの神経は多数の機械感覚毛からの情報をまとめており、体表の個別の部分の位置情報を脳に伝えるものではないと考えられる。

本研究では明らかにすることはできなかったが、腹部の多樹状突起神経から入力を受けて、脳へ伝える介在神経の経路が必ずあるはずである。過去の研究により、視覚刺激として、あるパターンを表示すると同時に腹部に熱刺激を与えることを繰り返すと、そのパターンと熱刺激を記憶し、刺激を与えなくてもそのパターンを見ると方向転換をしようとする行動が明らかにされている (Wolf and Heisenberg, 1991)。このことから、脳にある記憶中枢に、腹部に与えられた熱刺激の情報が伝えられていることは明らかである。多樹状突起神経の中には熱刺激を受容するものがあることが知られている (Hwang, R.Y. *et al.*, 2007)。腹部の多樹状突起神経と接続する介在神経を明らかにすることは、キイロショウジョウバエ脳における構造的、機能的な体性感覚地図を明らかにすることや、熱刺激が学習に結びつく過程を理解

するために必要不可欠であり、今後の課題の1つである。

4-2. 翅、平均棍の鐘状感覚子由来の神経群 Wcs1N、Hcs1N は動きを検出し脳の異なる領域に情報を伝えている

翅、平均棍から直接脳へ投射している神経群 Wcs1N、Hcs1N は、前項の解析結果より、鐘状感覚子由来であることが明らかとなった。そのことから、体表のクチクラの歪みにより神経が応答することが予想され、飛行時の翅、平均棍の動きを検出する働きがあると考えられる。

翅の基部に圧迫、1Hz、50Hz、300Hz の機械刺激を与えたときの Wcs1N-l の反応を調べた実験 (図 13)、翅、平均棍を人為的に動かしたときの Wcs1n-l、Hcs1N-m、Hcs1N-l の反応を調べた実験 (図 14)、飛行時の Wcs1n-l、Hcs1N-m、Hcs1N-l の反応を調べた実験 (図 15) の結果から、翅、平均棍が動くことにより、それぞれの神経群が反応することが明らかとなった。このことは、Wcs1N、Hcs1N が鐘状感覚子由来であることと一致する結果である。さらに、翅の基部に圧迫、1Hz、50Hz、300Hz の機械刺激を与えた実験では、翅の動きが垂直方向と水平方向では、垂直方向に動いた場合により強く反応していた。これは、飛行の際に翅の上下方向の運動が激しく、飛行時には水平方向へ翅を広げた情報よりも、垂直方向に翅がどの程度動いたかの情報の方が多く必要であると考えられる。異なる振動数の機械刺激を与えた実験では、1Hz から 300Hz に向って神経応答が弱くなる結果が得られた (図 11G)。ただし、これは鐘状感覚子神経の周波数応答性を反映したものではない可能性もある。ピエゾの動作限界から、振動数が高くなるにつれて、ピエゾの変位量 (μm) が小さくなるため (矢野、2014)、翅の動きも小さくなった可能性も考えられるためである。また、翅、平均棍を人為的に最大変位の位置まで動かした実験では、より神経の応答が強くなった。さらに

この実験から、翅や平均棍がその位置を変えている間は神経が反応し続けており、馴化が起らない神経であることが明らかとなった。最後に飛行時の結果であるが、飛行時は機械刺激や人為的な変位を与えた場合と比べて、顕著に強く神経が反応していた。これは飛行時には翅や平均棍は 200Hz の早さで非常に大きな振幅で振動しており、この激しい動きが翅や平均棍の基部のクチクラに及ぼす影響も非常に大きいためであると考えられる。これらのことから、飛行時は翅の動きの大きさ、頻度などの情報を Wcs1N、Hcs1N で検出していると考えられる。さらに、この結果をふまえて、翅、平均棍を一定の角度に保ち、異なる周波数の振動を与えたときの神経応答を比較することで、振動数による応答特性の違いについても今後解析可能となるだろう。

ここまで Wcs1N と Hcs1N が翅や平均棍の動きにより反応し、その動きが大きいほど反応が強いことも明らかにすることができ、末梢の感覚器官である鐘状感覚子の特徴と合致していることを証明することができた。次に、飛行時の Wcs1N の反応と Hcs1N の反応を比較すると、Hcs1N の方がより反応が強かった (図 15B)。この要因として、Hcs1N から脳へ投射している神経の数が多いのではないかということ、脳での投射領域の神経の密度が Hcs1N の方が高いためではないかと考えた。鐘状感覚子の数は翅よりも平均棍の方が多いたことが明らかにされている (Cole and Palka, 1982)。脳での投射を比べると、Wcs1N の方が終末部に広がりが見られた (図 11A-B)。もう一つの考えられる要因としては、鐘状感覚子の種類が異なることが考えられる。鐘状感覚子の詳細な形態、分布は Cole と Palka (1982) により明らかにされている。鐘状感覚子は 6 種類あり、円形か楕円形か、ドーム上の出っ張りの高さが高いか低い、ソケットがあるかないかで Type1 から Type6 まで分類されている。Type1 は円形で、出っ張りの高さが高く、ソケットがある形態、Type2 は円形で、出っ張りの高さが高く、ソケットがない形態、Type3 は円形で、出っ張りの高さが低く、ソケットがある形

態、Type4 は円形で、出っ張りの高さが低く、ソケットがない形態、Type5 は楕円形で、出っ張りの高さが低く、ソケットがある形態、Type6 は楕円形で、出っ張りの高さが低く、ソケットがない形態をそれぞれしている。さらに、分布している部位によってドームの直径も異なることが明らかにされており、 $2.5\sim 9.0\mu\text{m}$ である。翅の背側には約 63 個の鐘状感覚子が、腹側には 14~15 個の鐘状感覚子があることが分かっており、そのうち、翅の基部にある鐘状感覚子は背側のみで、21 個である。それらは Type1 (1 個) と Type5 (20 個) で形態は円形と楕円形だがどちらもソケットがある構造、直径は $5.0\text{-}6.0\mu\text{m}$ で大きめである。平均棍の背側と腹側には約 50 個ずつの鐘状感覚子があり、Type5 のみで、直径は $2.5\mu\text{m}\text{-}4.0\mu\text{m}$ で翅の基部と比べると大きさが約半分である。以上の形態学的な知見から、Wcs1N と Hcs1N では後者の方が由来する鐘状感覚子の数が 4 倍多く、しかも分布する範囲が狭いことから、神経終末の密度に大きな差があり、そのために神経応答に差がでた可能性が高いことが示唆される。また、Wcs1N には平均棍で発現していない Type1 由来の神経も含まれているが、1 つだけであり、神経の反応に顕著な違いをもたらすことができるとは考えにくい。そのため、飛行時の Wcs1N と Hcs1N の反応の大きさの違いは神経の数によるものではないかと考えられる。しかし、鐘状感覚子の神経は胸部神経節において多数終末することが分かっており、これらの全てが脳まで投射するかはまだ確定していない。そのため、末梢での神経細胞数の違いが脳での神経の数の違いにそのまま適応されるかどうかは今後検証する必要がある。検証する方法としては、胸部神経節で終末する神経群のみをラベルする系統を翅と平均棍それぞれについて用意し、これらの系統が末梢でラベルする鐘状感覚子細胞の数を数え、全ての細胞数から引けば、脳へ投射している神経の数を調べることが可能である。しかし、そのような神経をラベルする系統がなかったため、今回の研究ではこれを検証することはできなかった。

また、Wcs1N、Hcs1Nは脳においてそれぞれ2つの束に分かれるが、本研究で使用了系統では、それぞれの束の構造的・機能的な違いを明らかにすることはできなかった。それぞれの束が、末梢での発現部位の違いにより分けられているのか、それとも刺激の入力の違いにより分けられているのかについては、末梢の鐘状感覚子の分布のグループごとにGAL4を発現する系統を用いて、解剖学的、機能的な解析をする必要がある。翅の場合は、Type1とType5の神経があるため、Type1のみをラベルできる系統、Type5のみをラベルできる系統を解析する必要がある。しかし、そのような神経をラベルする系統がなかったため、検証することはできなかった。

4-3. 脚由来の1次神経群 Lco1N1、Lco1N2、2次神経 Lco2N1、Lco2N2、Les2N1、Les2N2は、脚の動きに対してそれぞれ異なる反応を示す

脚からの神経投射については、まず、脚の弦音器官に由来する神経群、Lco1N1、Lco1N2、Lco2N1、Lco2N2の応答特性を比較する。弦音器官は、バッタやゴキブリなどの研究から、脚における分布が詳細に明らかにされている(Field and Matheson, 1998)。弦音器官は基節、転節部には存在せず、腿節、勁節、腑節に分布している。また、腿節部に分布している弦音器官が関節部の動きを主に受容していると考えられており、勁節、腑節部に分布している弦音器官は主に振動を受容することが明らかにされている(Field and Matheson, 1998)。トラックボール上での歩行運動(walk ball)では測定した全ての経路において神経の反応が強いことが確認された。このときは脚に振動刺激はほとんど加わっていないと考えられるので、これら4つの神経は少なくとも腿節にある弦音器官からの入力を脳へ伝える神経を含んでいると考えられる。次にトラックボール上の静止時(stop ball)の反応では、Lco1N1、Lco2N1では神経の反応が小さかったが、Lco1N2、Lco2N2では神経の反応は強かった。静止時には

関節の動きは起きないが、ボールに接していることによって体の重量を受け止める応力が脚関節にかかっている。Lco1N1 と Lco1N2 はどちらも末梢から直接脳へ投射する神経群であるが、この応力を伝えるかどうかが異なるといえる。同様に Lco2N1、Lco2N2 はどちらも弦音器官から入力を受ける 2 次神経であるが、応力を伝えるかどうかが異なる。これは、これらの介在神経が入力を受けている 1 次神経が異なる可能性がある。次に空中で脚が動きながら何かに触れている状態 (contact air) のときの神経応答であるが、Lco2N2 を除いて全ての神経群で神経が強く反応していた。walk ball 時では Lco2N2 も強い反応が見られたことから、脚が動いていて、何かに触れた場合に強く反応することが考えられたが、結果は異なっていた。walk ball 時は関節部にハエの体重がかかっているが、contact air 時には空中であり、関節部に自重がかかっていない。そのため、Lco2N2 は強く反応しなかったのではないかと考えられる。このことから、Lco2N2 は接地感覚の検出に重要な役割を担っている可能性がある。次に空中で脚を自由に動かしている状態 (move air) の神経応答を比較する。Lco1N1、Lco1N2 は強く反応したが、Lco2N1、Lco2N2 は神経の反応が弱かった。Lco2N1 は walk ball 時、contact air 時の両方で神経が強く反応していたため、脚が動いている move air 時にも反応することが予想されたが、結果は違った。これは、Lco2N1 が単に脚が動いているという刺激だけでは強く反応せず、さらに、脚が何かに触れているという情報がなければ反応しないことを示唆している。また、Lco2N2 は contact air 時に比べて、さらに神経の反応が小さかった。このことから、contact air 時は walk ball、stop ball 時と比べて自重の影響は小さいが、何かに脚が触れることにより関節部に応力がかかっていたことを示唆している。次に空中での脚の静止状態 (stop ball) の神経応答を比較すると、Lco1N1 では神経の反応が強かったが、その他の経路では反応が小さかった。また、固定した状態で翅を羽ばたかせる飛翔 (flight) 時は Lco1N1 と Lco1N2 の 2 経路で神経の反応を解析したが、こちらも Lco1N1

でのみ神経の反応が確認された。stop air 時、flight 時はボール上で静止する場合よりも関節部が大きく曲がっていることが多い。このことから、Lco1N1 は関節部の屈曲状態も検出しているのではないかと考えられる。

以上の結果をまとめると、Lco1N1 は脚の動いたとき、関節部の強く屈曲したときに反応すること、Lco1N2 は脚の動いたとき、接地しているときに反応すること、Lco2N1 は接地している状態または、何かに脚が触れている状態で脚が動いた場合に反応すること、Lco 2 N2 は接地した状態で脚が動いた場合に反応することがわかり、どの経路も AVLP 領域の腹側に終末するが、全て異なる脚からの入力情報を伝えていることを明らかにすることができた。

次に脚の機械感覚毛に由来する介在神経群 Les2N1、Les2N2 の応答特性を比較する。Les2N1 は、walk ball、stop ball、contact air、stop air の 5 つの行動全てにおいて、今回抽出した時間帯では神経の反応に変化が見られなかった。しかし、行動に同期はしていないが、神経自体の活動は見られた。このことから、Les2N1 の SLP 領域では行動に同期した脚の接地感覚や動きなどの情報は伝えられないと考えられる。Les2N1 は 2 次神経であることと、神経が脳の SLP 領域に盗撮するまでに長い距離があることから、途中の経路で他の神経からの修飾を受けている可能性も考えられる。また、Les2N1 は GNG、PVLP 領域にも終末していることから、こちらの領域に接地情報や動きの情報を伝えている可能性もある。しかし、Les2N1 の神経は細く、脳上部にある SLP 領域でのカルシウムイメージングが顕微鏡の性能上限界であったため、脳下部での応答を調べることはできなかった。また、坪内研究員による胸部神経節の解剖学的な解析から、Les2N1 の胸部神経節での投射パターンから味覚感覚を受容する脚の神経の投射パターンによく似ていることが示唆されている。このことから、Les2N1 が味覚の情報を検知している可能性がある。次に Les2N2 の神経応答であるが、walk ball 時、contact air 時に強い反応がみられ、move air 時、stop air 時にも神経が反応し

ていた。また、その反応が一過的であったことと、**stop ball** 時にのみ神経の反応が小さかったことから、**Les2N2** は脚が接地している状態で、静止しているときは神経は反応しないが、脚が動くと神経が反応すると考えられる。これは機械感覚毛が一過的な反応に敏感であることと合致している。また、このことは **contact air** 時に反応が強かったことから支持することができる。しかし、この考えでいくと、脚が他のものに触れていない **move air** 時、**stop air** 時は神経反応が小さくなるはずであるが、実際は違っていた。**walk ball** 時、**contact air** 時と比較すると小さいものの、反応は見られた。**move air** 時で弱いながらも反応が見られた理由としては、脚をばたつかせることにより生じた空気流により脚の機械感覚毛が反応してしまった可能性が考えられる。**stop air** 時に機械感覚毛が動いてしまう原因としては、この実験の際はトラックボールを下げてハエを空中に浮かせた状態にしているが、下にあるトラックボールの隙間から、トラックボールを浮かせるために流している空気流が漏れて脚にあたっていた可能性が考えられる。**Les2N2** は PVLP 領域でのカルシウムイメージングによって異なる感覚情報を伝えていることが明らかにすることができたが、**Les2N1** と同様にラベルされる神経の数が非常に少なく蛍光が弱かったため、顕微鏡の性能の限界により、脳の下部にある PVLP の腹側投射部、GNG の投射部については解析できなかった。

7. まとめ

本研究により、まずこれまで詳細が明らかとなっていなかったキイロショウジョウバエ脳における体性感覚中枢の構造と機能を明らかにすることができた。体性感覚中枢への経路には、末梢から直接脳へ投射する経路と、介在神経を介する経路の 2 種類があり、それらが異なる感覚情報を伝えていることが分かったことは、ハエが脳において体性感覚情報を体の部位ごとに情報処理しているだけでなく、刺激の種類ごとに分けて情報処理していることを示唆している。これまでの研究では胸部神経節においての機能的解析は行われてきたが、脳に投射する神経の生理学的な応答を調べ、由来する神経ごとに脳における投射部位を明らかにして体系的な体性感覚地図を作成したのは本研究が初めてであり、異なる感覚情報を統合して行なわれているであろう複雑な行動の神経回路の解明に貢献できたと言える。また、直接の経路と介在神経の経路は翅、平均棍、脚と言った器官ごとに主に利用されている経路が異なっていたことから、行動とその行動を引き起こす感覚情報、行動により生じる感覚情報の伝え方には密接な関係があり、神経節ごとに情報処理を行なう昆虫において、より高次の情報処理がなされていると考えられる脳に、どのような感覚情報が、どのような経路で伝えられるかを明らかにできたことは、昆虫脳の理解につなげることができたと言える。今回調べた経路はそれぞれ、視覚や聴覚の 2 次中枢に近い部分に神経終末を形成しており、視覚や聴覚の高次神経と情報が統合されていると考えられ、飛翔や配偶行動といった行動に関する感覚情報の統合、行動決定などの処理が脳で管理されている可能性が高いことを示唆している。

図 25 には各経路の脳における投射形態と、投射領域を示した模式図と、それぞれの反応特性をまとめた表を示した。今後は本研究のスクリーニングではまだ見つけることができなかった、脚や翅のその他の体性感覚細胞に由来する介在神経や、腹部神経節から脳へ投射する神

経群をラベルする系統を探索し、歩行以外の刺激における脚の感覚神経の応答や、腹への熱刺激や接触刺激による神経応答を調べ、キイロシヨウジョウバエ脳における機能的体性感覚中枢マップを完成させる必要がある。また、今回明らかとなった神経群についても体の部位ごとの比較はできたが、同じ部位の中にある異なるサブタイプの神経の神経応答の違いは確認できていない。これを検証するためには、ある部位にある感覚神経の全部でなく一部のサブタイプのみをラベルするような、より特異的な発現誘導系統を探す必要がある。

8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々からご支援を頂戴いたしました。厚く御礼申し上げます。

まず審査を担当して下さいました東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻准教授程久美子先生、同専攻教授森下真一先生、東京大学大学院理学系研究科生物学専攻教授久保健雄先生、名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻教授上川内あづさ先生には、お忙しい中お時間を作って頂き私の博士研究に対してご教示下さいました。とても勉強になりました。深く感謝申し上げます。そして、東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻准教授伊藤啓先生には、指導教員として5年間たくさんのご指導をいただきました。ありがとうございました。

また、本研究で確立した実験系の立ち上げには、名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻教授上川内あづさ先生と同研究室の山田大智さん、東北大学大学院生命科学研究科生命機能科学専攻教授山元大輔先生と同研究室の古波津創博士、東京大学先端科学技術センター生命知能システム分野教授神崎亮平先生と同研究室の並木重宏博士、国立研究開発法人情報通信研究機構（旧米国マサチューセッツ大学メディカルスクール神経生物学科）の吉原基二郎先生に、実験装置や標本作成技術など、多くのことを教えていただきました。ありがとうございました。

伊藤啓研究室の坪内朝子博士、横山健博士には、研究遂行、論文作成にあたり、多くのご援助を頂きました。心より御礼申し上げます。また伊藤正芳博士には、実験方法や研究遂行計画に関して的確なアドバイスをたくさん頂きました。大変感謝しております。また、技術職員の首藤里美さん、山下杏子さん、高本良子さん、石田陽子さん、廣瀬遥果さんにはハエの世話、脳標本の作製、撮影などでお世話になりました。秘書の杜田沙織さん、鈴木まり子さんには事務手続きや書類作成等手伝って頂きました。ありがとうございました。

最後になりましたが、日本学術振興会より日本学術振興会特別研究員（DC2）として1年間研究費のご支援を頂戴いたしました。感謝申し上げます。

9. 引用文献

- Akerboom, J., Calderon, N. C., Tian, L., Wabnig, S., Prigge, M., Tolo, J., Gordus, A., Orger, M. B., Severi, K. E., Macklin, J. J., Patel, R., Pulver, S. R., Wardill, T. J., Ficher, E., Schuler, C., Chen, T. -W., Sarkisyan, K. S., Marvin, J. S., Bargmann, C. B., Kim, D. S., Kugler, S., Lagnado, L., Hegemann, P., Gottschalk, A., Schreiter, E.R. and Looger, L. L. (2013). Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Vol 6, 2, 1-29.
- Akitake, B., Ren, Q., Boiko, N., Ni, J., Sokabe, T., Stockand, D. J., Eaton, A. B. and Montell, C. (2014). Coordination and fine motor control depend on *Drosophila* TRP γ . *NATURE COMMUNICATIONS*. 6:7288, DOI: 10.1038.
- Burns, M.D. (1974). Structure and physiology of the locust femoral chordotonal organ. *Journal of Insect Physiology*. Vol 20, Issue 7, 1319-1339.
- Chen, T.W. *et al.* Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295-300 (2013).
- Clandinin, T.R. and Zipursky, S. L. (2002). Making Connections in the Fly Visual System. *Neuron*, Vol. 35, 827-841.
- Cole, E. S. and Palka, J. (1982). The pattern of campaniform sensilla on the wing and haltere of *Drosophila melanogaster* and several of its homeotic mutants. *Development* 71, 41-61.
- Corfas, G. and Dudai, Y. (1989). Habituation and Dishabituation of a Cleaning Reflex in Normal and Mutant *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 9(1): 56-62. *J. Embryol. exp. Morph.* Vol 71. 41-61.
- Dana, H., Mohar, B., Sun, Y., Narayan, S., Gordus, A., Hassemann, J. P., Tsegaye, G., Holt, G. T., Hu, A., Walpita, D., Patel, R., Macklin, J. J., Bargmann, C., Ahrens, M. B., Schreiter, E. R., Jayaraman, V., Looger, L. L., Svoboda, K. and Kim, D. S. (2016). Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity. *eLife*. 5: e12727.
- Dewell, R.B. and Gabbiani, F. (2012). Escape Behavior: Linking Neural Computation to Action. *Current Biology* Vol.22, No5, 152-153.
- Dickinson, M.H. (1999). Haltere-mediated equilibrium reflexes of the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Philosophical Transactions of the Royal Society. Lond. B*. 354,

- Dickinson, M.H. (2005). The Initiation and Control of Rapid Flight Maneuvers in Fruit Flies. *Integrative and Comparative Biology*. 45:274–281.
- Edgecomb, R. S. Harth, C. E. and Scheneiderman, A. M. (1994). REGULATION OF FEEDING BEHAVIOR IN ADULT *DROSOPHILA MELANOGASTER* VARIES WITH FEEDING REGIME AND NUTRITIONAL STATE. *Journal of Experimental Biology*. 197, 215-235.
- Field, L. and Matheson, T. (1998). Chordotonal Organs of Insects. *Advances in Insect Physiology* 27. 1-230.
- Fowler M.A. and Montell, C. (2012). *Drosophila* TRP channels and animal behavior. *Life Sciences* 19, 394-403.
- Ghysen, A. (1980). The Projection of Sensory Neurons in the Central Nervous System of *Drosophila*: Choice of the Appropriate Pathway. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 78, 521-541.
- Grillenzoni1, N., Helden, J., Dambly-Chaudière, C. and Ghysen, A. (1998). The iroquois complex controls the somatotopy of *Drosophila notum* mechanosensory projections. *Development*. 125, 3563-3569.
- Hwang, R.Y., et al. (2007). Nociceptive neurons protect *Drosophila* larvae from parasitoid wasps. *Current Biology*. 17(24). 2105-2116.
- Hofmann, T. and Bassler, U. (1982). Anatomy and physiology of trochanteral campaniform sensilla in the stick insect, *Cuniculina impigra*. *Physiological Entomology*. 7. 413-426.
- Inestrosa, N. C., Sunkel, C. and Arriagada, J. (1987). The sensory projections of *Drosophila* mutants which show abnormal wing formation or flying behavior. *Brain Research*. 416, 248-256.
- Ito, K., Shinomiya, K., Ito, M., Armstrong, D. J., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homberg, U., Jenett, A., Keshishian, H., Restifo, L. L., Roessler, W., Simpson, J. H., Strausfeld, N. J., Strauss, R. and Vosshall, L. B., Insect Brain Name Working Group. (2014). A Systematic Nomenclature for the Insect Brain. *Neuron* 81, 755-765.
- Ito, M., Masuda, N., Shinomiya, K., Endo, K., and Ito, K. (2013). Systematic Analysis of Neural Projections Reveals Clonal Composition of the *Drosophila* Brain. *Current Biology*, Volume 23, Issue 8, 644-655.

- Jarman, A. P. (2002). Studies of mechanosensation using the fly. *Human Molecular Genetics*. Vol 11. No. 10. 1215-1218.
- Kamikouchi, A., Shimada, T. and Ito, K. (2006). Comprehensive Classification of the Auditory Sensory Projections in the Brain of the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* 499: 317-356.
- Kim, D. and Howard Hughes Medical Institute, Janelia Research Campus (2013.)
- Kao, J., Wu, G. Y., Peng, H., Myers, G. and Lee, T. *Current Biology*, Volume 23, Issue 8, 633-643.
- Kohatsu, S. and Yamamoto, D. (2015). Visually induced initiation of *Drosophila* innate courtship-like following pursuit is mediated by central excitatory state. *Nature Communications* 6, Article number 6457.
- Kravits, E. A. and Huber, R. (2003). Aggression in invertebrates. *Current Opinion in Neurobiology*, 13: 736-743.
- Laia, J. S. -Y., Lo, S. -J., Dickson, B. J. and Chiang, A. -S. (2012). Auditory circuit in the *Drosophila* brain. *PNAS*. Vol 109, No. 7, 2607-2612.
- Lee T. (2009). New genetic tools for cell lineage analysis in *Drosophila*. *Nature Methods* 6, 566-568.
- Liu, G., Seiler, H., Wen, A., Zars, T., Ito, K., Wolf, R., Heisenberg, M. and Liu, L. (2006). Distinct memory traces for two visual features in the *Drosophila* brain. *Nature* Vol 439, 551-556.
- Liu, W.W. and Wilson, R.I. (2013). Transient and Specific Inactivation of *Drosophila* Neurons In Vivo Using a Native Ligand-Gated Ion Channel. *Current Biology* 23, 1202-1208.
- Martinez, V. G., Javadi, C. S., Ngo, E., Ngo, L. Lagow, R. D. and Zhang, B. (2007). Age-Related Changes in Climbing Behavior and Neural Circuit Physiology in *Drosophila*. *Developmental Neurobiology*. DOI 10.1002. 778-791.
- Melcher, C. and Pankratz, M.J. (2005). Candidate Gustatory Interneurons Modulating Feeding Behavior in the *Drosophila* Brain. *PLOS biology*. Vol 3. Issue 9. 1618-1629.
- Menne, D. and Spatz, H. -C. (1977). Colour Vision in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology*. 114, 301-312.
- Merritt, D. J. and Murphey, R. K. (1992). Projections of Leg Proprioceptors Within the CNS of the Fly *Phormia* in Relation to the Generalized Insect Ganglion. *The Journal of Comparative Neurology*. 322, 16-34.

- Miyawaki, A. *et al.* Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *NATURE* 388, 882-887 (1997).
- Miyazaki, T. and Ito, K. (2010). Neural Architecture of the Primary Gustatory Center of *Drosophila melanogaster* Visualized With GAL4 and LexA Enhancer-Trap Systems. *The Journal of Comparative Neurology*. 518, 4147-4181.
- Moran, D. T., Chapman, K. M. and Ellis, R. A. (1971). THE FINE STRUCTURE OF COCKROACH CAMPANIFORM SENSILLA. *The Journal of Cell Biology*. Vol 48, 155-173.
- Murphey, R. K., Possidente, D. R., Vandervorst, P. and Ghysen, A. (1989). Compartments and the Topography of Leg Afferent Projections in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*. 9(9), 3208-3217.
- Nakai, J. *et al.* (2001). A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *NATURE BIOTECHNOLOGY* 19, 137-141 .
- Nilsen, S. P., Chan, Y., Huber, R., and Kravitz, E. A. (2004). Gender-selective patterns of aggressive behavior in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* vol.101, no.33, 12342-12347.
- Otsuna, H. and Ito, K. (2006). Systematic analysis of the visual projection neurons of *Drosophila melanogaster*. I. Lobula-Specific Pathways. *The Journal of Comparative Neurology* 497 (6): 928-958.
- Otsuna, H., Shinomiya, K. and Ito, K. (2014). Parallel neural pathways in higher visual centers of the *Drosophila* brain that mediate wavelength-specific behavior. *Front Neural Circuits*, Volume 8, Article 8, 1-12.
- Palka, J. and Ghysen, A. (1982). Segments, compartments and axon paths in *Drosophila*. *Trends in Neurosciences*. Vol 5, 382-386.
- Pan, Y., Meissner, G. W. and Baker, B. S. (2012). Joint control of *Drosophila* male courtship behavior by motion cues and activation of male-specific P1 neurons. *PNAS* DOI: 10.1073, 1-6.
- Ramdya, P., Lichocki, P., Cruchet, S., Frisch, L., Tse, W., Floreano, D. and Benton, R (2015). *NATURE*. VOL 519, 233-236.
- Rister, J., Pauls, D., Schenell, B., Ting, C.-Y., Lee, C. -Y., Sinakevitch, I., Morante, J., Strausfeld, N. J., Ito, K. and Heisenberg, M. (2007). *Neuron*. 56, 155-170.
- Rorth, P. (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12418-12422.
- Scott, E., Raabe, T., Luo, L. (2002). Structure of the vertical and horizontal system

- neurons of the lobula plate in *Drosophila*. The Journal of Comparative Neurology Vol. 454. 470-481.
- Shepherd, D. and Smith, S. A. (1996). Central projections of persistent larval sensory neurons prefigure adult sensory pathways in the CNS of *Drosophila*. Development. 122, 2375-2384.
- Sherman, A. and Dickinson, D. H. (2004). Summation of visual and mechanosensory feedback in *Drosophila* flight control. The Journal of Experimental Biology 207, 133-142
- Simon, A. F., Liang, D. T. and Krantz, D. E. (2005). Differential decline in behavioral performance of *Drosophila melanogaster* with age. Mechanisms of Ageing and Development. 127, 647-651.
- Tanaka, K. N. Awasaki, T., Shimada, T. and Ito, K. (2004). Integration of Chemosensory Pathways in the *Drosophila* Second-Order Olfactory Centers.
- Ting, C.Y. et al.(2014), Photoreceptor-derived activin promotes dendritic termination and restricts the receptive fields of first-order interneurons in *Drosophila*. Neuron 81, 830-846
- Titlow, J. S., Johnson, B. R. and Pulver, S.R. (2015). Light Activated Escape Circuits: A Behavior and Neurophysiology Lab Module using *Drosophila* Optogenetics. The Journal of Undergraduate Neuroscience Education. 13(3), A166-A173.
- Tracey, W.D. Jr., Wilson, R. L., Laurent, G. and Benzer, S. (2003). *painless*, a *Drosophila* Gene Essential for Nociception. *Cell* 113, 261-273
- Usher, P. N. R., Runion, H. I. and Campbell, J. I. (1968). STRUCTURE AND PHYSIOLOGY OF A CHORDOTONAL ORGAN IN THE LOCUST LEG. Journal of Experimental Biology. 48, 305-323.
- Vandervorst, P. and Ghysen, A. (1980). Genetic control of sensory connections in *Drosophila*. *Nature* **286**, 65-67.
- Verkhusha, V. V., Otsuna, H., Awasaki, T., Oda, H., Tsukita, S. and Ito, K. (2001) An enhanced mutant of red fluorescent protein DsRed for double labeling and developmental timer of neural fiber bundle formation. J Biol Chem 276, 29621-29624.
- Vogel, S. (1966). FLIGHT IN *DROSOPHILA*. Journal of Experimental Biology. 44, 567-578.
- Wan, Y., Otsuna, H., Chien, C. -B. and Hansen, C. (2012). FluoRender: An Application of

- 2D Image Space Methods for 3D and 4D Conforcal Microscopy Data Visualization in Neurobiology Research. NIH Public Access Author Manuscript, IEEE Pac Vis Symp. Author manuscript. 201-208.
- Wang, Z., Singhvi, A., Kong, P. and Scott, K. (2004). Taste Representations in the *Drosophila* Brain. *Cell*, Vol. 117, 981-991.
- Wolf, R. and Heisenberg, M. (1991). Basic organization of operant behavior as revealed in *Drosophila* flight orientation. *Journal of Comparative Physiology A*. 169: 699-705.
- Wosnitza, A., Bockemuüh, T., Duübbert, M., Scholz, H. and Buüsches, A. (2013). Inter-leg coordination in the control of walking speed in *Drosophila*. *The Journal of Experimental Biology* 216, 480-491.
- Xu, S., Cang, C. L., Liu, X. F., Peng, Y. Q., Ye, Y. A., Zhao, Z. Q. and Guo, A.K. (2006). Thermal nociception in adult *Drosophila*: behavioral characterization and the role of the *painless* gene. *Genes, Brain and Behavior* 5, 602-6 .
- Young, D. (1970). The structure and function of a connective chordotonal organ in the cockroach leg. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B* 256: 401-426.
- Yorozu, S., Wong, A., Fischer, B. J., Dankert, H., Kernan, M. J., Kamikouchi, A., Ito, K. and Anderson, D. J. (2009). Distinct sensory representations of wind and near-field sound in the *Drosophila* brain. *Nature* 458, 201-205.
- Yoshihara, M. (2012). Simultaneous Recording of Calcium Signals from Identified Neurons and Feeding Behavior of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Visualized Experiments*. 62, 1-6 .
- Yu, H., Awasaki, T., Schroeder, M., David, Long Fuhui, Yang Jacob S., He Yisheng, Ding Peng, Kao, J, Wu, G. Y., Peng, H., Myers, G. and Lee, T. (2013). Clonal development and organization of the adult *Drosophila* central brain. *Current Biology*. 23 (8), 633-643.
- 石井象二郎（著）（1982）『昆虫生理学』 培風館
- 大綱英生（著）（2006）『ショウジョウバエを用いた、低次視覚中枢と高次視覚中枢を結ぶ視覚投射経路の解析』
- 浜中良隆、泰山浩司（著）（2015）『キイロショウジョウバエ第一次視覚中枢・視葉板の超微細構造』 顕微鏡 Vol.50. No. 2.
- 三輪佳宏（編）（2007）『実験がうまくいく 蛍光・発行試薬の選び方と使い方』 羊土社 119-124
- 矢野朋子（著）（2012）『片側尾葉切除コオロギの行動補償における刺激空気流のタイミン

グと強さの関係』平成 23 年度 愛媛大学理学部生物学科 卒業論文
矢野朋子（著）（2014）『キイロショウジョウバエにおける体性感覚中枢の構造と機能の
解析』平成 25 年度 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 情報生命科学専攻 修
士論文
『衛生昆虫の微細構造』、BSI 生物科学研究所 <http://bsikagaku.jp/insect.html>

10. 図・表

図 1

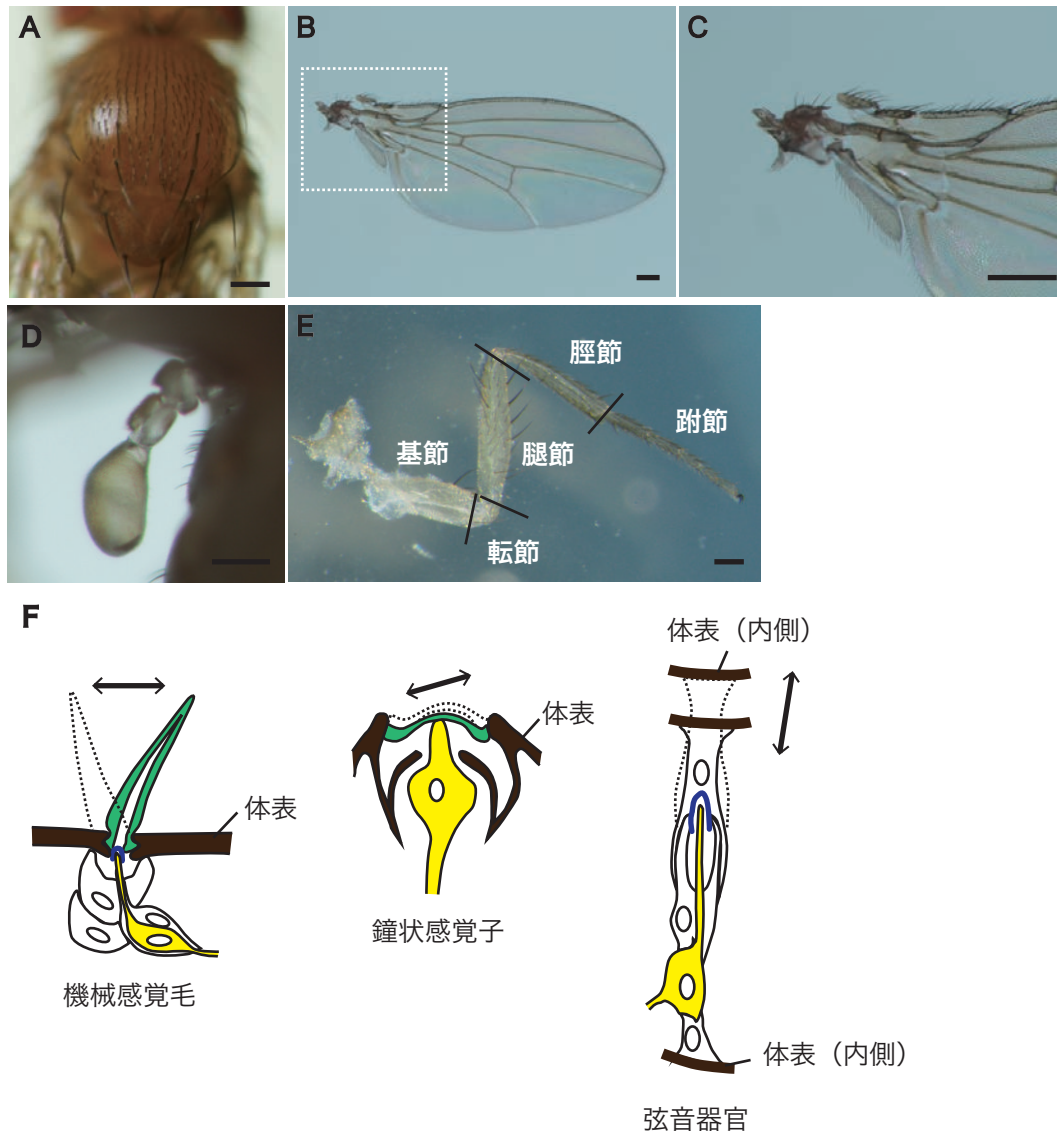


図 1 : キイロショウジョウバエ体性感覚器官

A-E : キイロショウジョウバエの胸部、翅、平均棍、脚の写真。スケールバーは $100\mu\text{m}$ 。
A : 胸部背面の機械感覚毛。B : 翅の全体写真。C : B の白点線部の拡大図。D : 平均棍。
E : 脚。各節の名称を示す。基部に近い方から基節、転節、腿節、脛節、跗節。F : 機械感覚毛鐘状感覚子、弦音器官の構造の模式図。黄色い細胞がそれぞれの感覚神経。機械感覚毛は、鐘状感覚子に毛の部分が付け加わったか形態をしており、毛が動くことにより接着している神経が反応する。鐘状感覚子は体表が歪むことにより、体表クチクラ部に接着している神経が引っ張られ、神経が反応する。弦音器官は、神経が細長い弦状の細胞と接着しており、その細胞が体表クチクラ下に接着し、関節が曲がったりすることにより生じる張力の変化や、弦状の細胞が振動することによって神経が反応する。

図 2

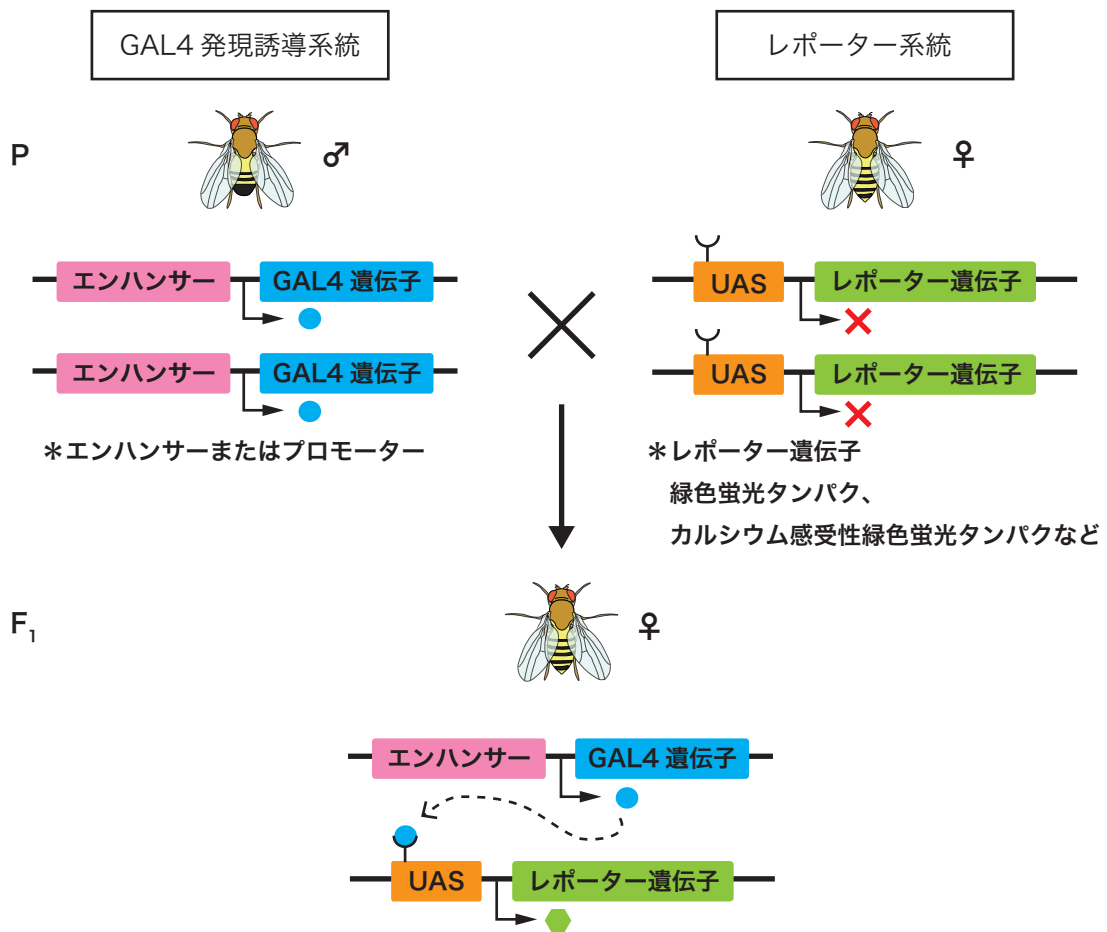


図 2 : GAL4-UAS システム

GAL4-UAS システムの仕組みを表す。P (親世代) は、酵母の転写調節因子である GAL4 遺伝子を組み込んだハエ (左: GAL4 発現誘導系統) と、GAL4 の標的配列である UAS 配列とその下流にレポーター遺伝子を組み込んだハエ (右: レポーター系統) をかけ合わせることで、次世代 (F1) において、GAL4 が発現している細胞でのみレポーター遺伝子を発現させることができる。GAL4 遺伝子の発現は、GAL4 遺伝子をランダムにハエのゲノム上に挿入した場合、その挿入された領域を支配するエンハンサーの活性に依存する。特定のタンパク質の遺伝子が分かっている場合、それらの遺伝子の転写を調節するプロモーター領域の下流に GAL4 遺伝子を挿入することにより、調べたいタンパク質が発現している細胞を狙って GAL4 を発現させることも可能である。また、レポーター遺伝子には、緑色蛍光タンパク (GFP)、カルシウム感受性蛍光タンパク (GCaMP) などの他に、神経活動を阻害する物質や、逆に活性化する物質なども発現させることが可能である。

図 3

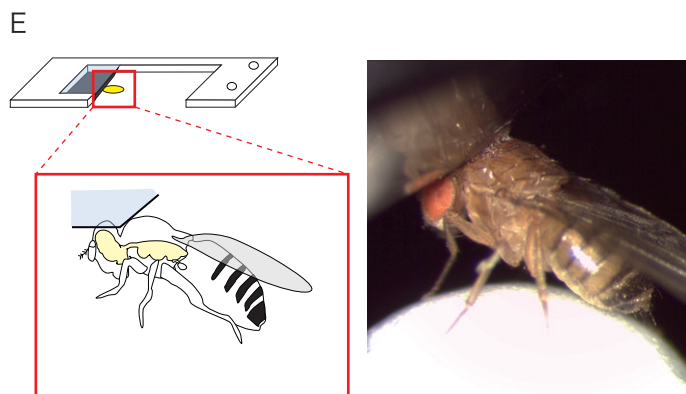
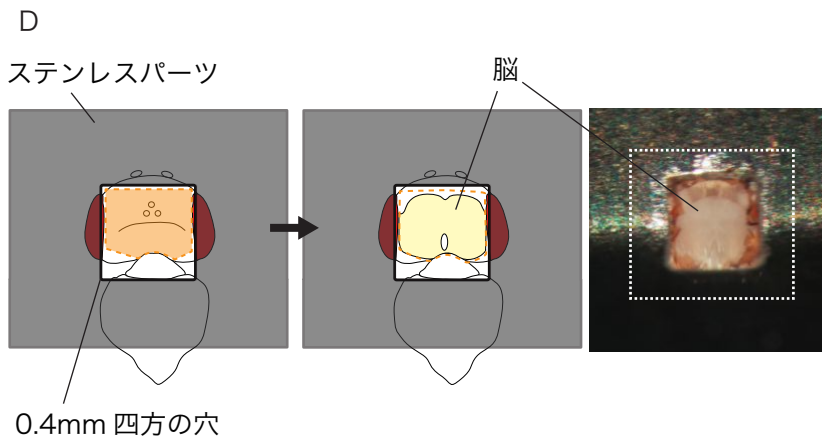
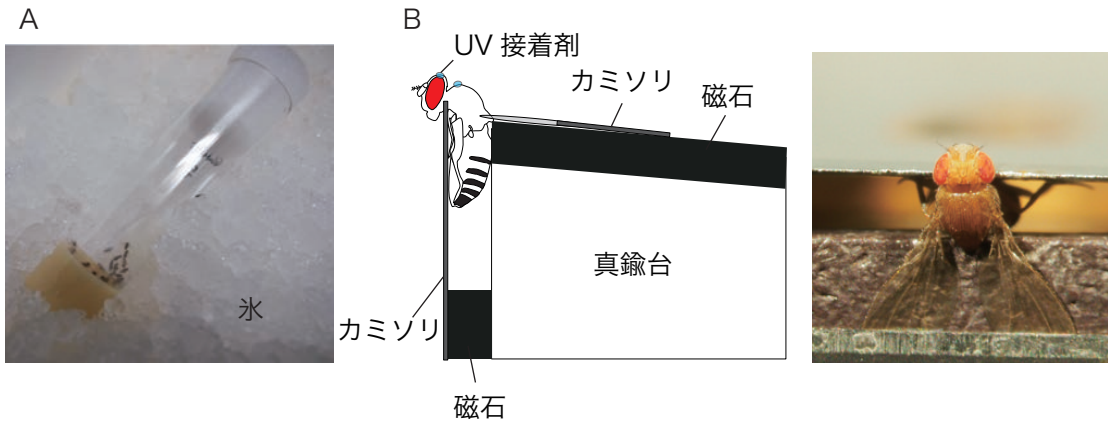


図 3：カルシウムイメージング用標本固定方法

A：飼育バイアルにいれたまま、氷で麻酔する。B：真鍮製の台とカミソリを板磁石で接着させ、その間にできた隙間にハエを入れたときの、横方向からの様子を表した図（左）と、真上からの様子を撮影した写真（右）。ハエ胸部の最も盛り上がっている部位、複眼上部に UV 接着剤を塗布し、固定用プレートと接着させる。C：固定用プレートの模式図（左）と、実際の写真（中）、ハエ頭部に固定している様子（右）。D：固定用プレートに空けた 0.4mm 四方の穴から見えるハエ頭部の模式図と解剖範囲（左、中）、実際に解剖した後の写真（右）。E：固定用プレートへの固定が完了した状態を表した模式図（左）と、実際の様子（右）。

図 4

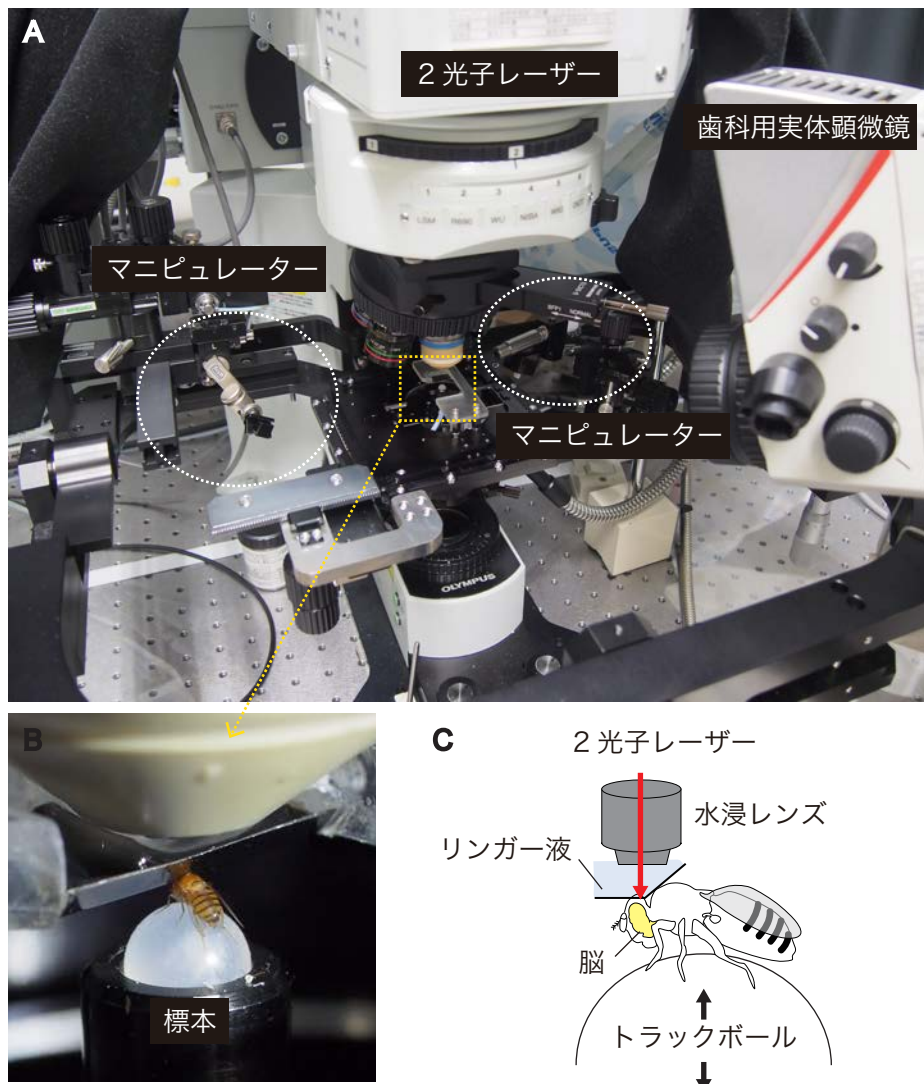


図 4：実験セットアップ

A-B：標本周りの実験セットアップ。顕微鏡は2光子レーザー顕微鏡を使用し、コンデンサーの代わりにトラックボール装置 (B) を設置している。刺激は左右に設置したマニピュレーターに刺激部を設置し、実験を行う。実験中のハエの行動は、ライカの歯科用実体顕微鏡を用いて、記録した。B、C：トラックボール状の標本の様子の模式図と、実際の様子を示した。トラックボール装置は下から空気が出るようになっている。

図 5

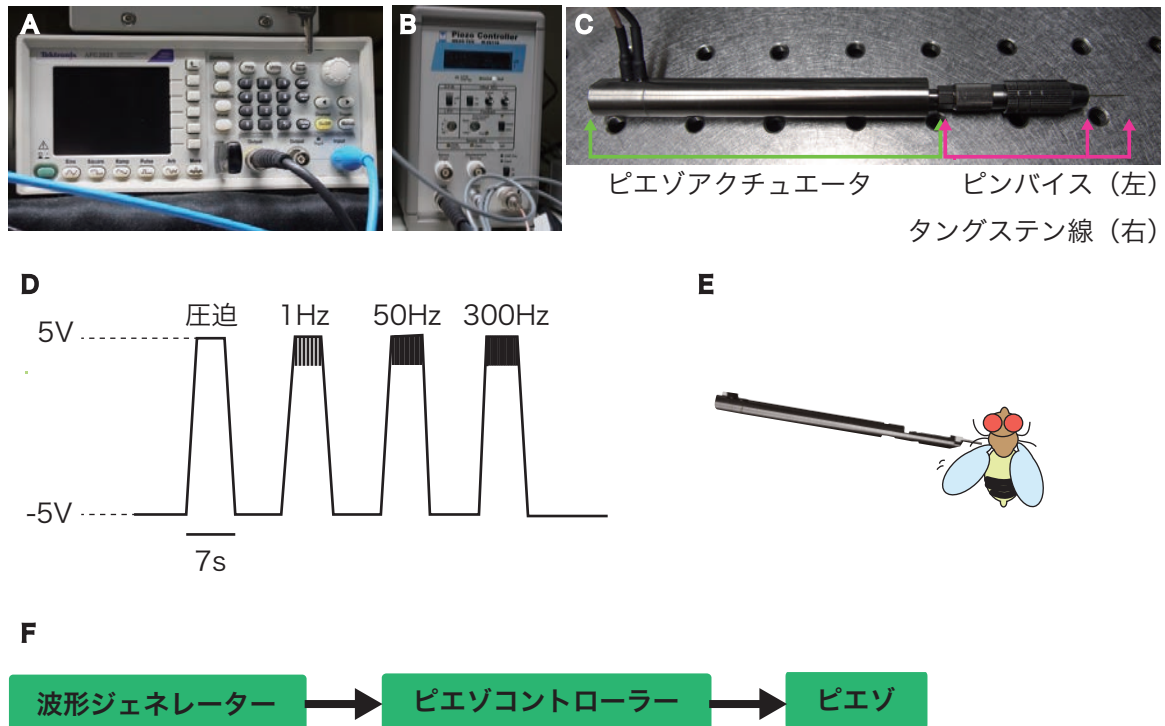


図 5：機械刺激装置セットアップ

A：任意波形発生装置。任意の波形を出力することができる。内蔵された波形と専用ソフトを用いて独自に作成した波形の両方を出力することができる。B： Piezoコントローラー。任意波形発生装置から入力された波形の電圧変化を Piezo に出力し、Piezo の伸縮を制御する。C： Piezo アクチュエーターと、ピンバイス、刺激部からなる。Piezo アクチュエーターは、Piezo コントローラーからの電圧変化を実際の Piezo の伸縮として出力する。ピンバイス部には直径の異なる刺激素材を設置することができるようになっている。刺激部には今回はタングステン針を使用した。マニピュレーター設置部。D：今回使用した機械刺激の波形。E：ハエへの刺激を模式的に表した図。F：刺激制御の流れ。

図 6

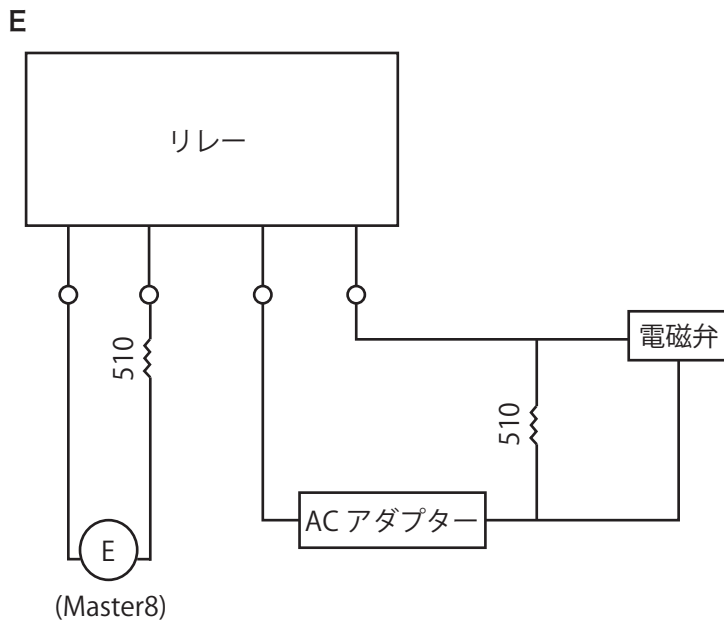
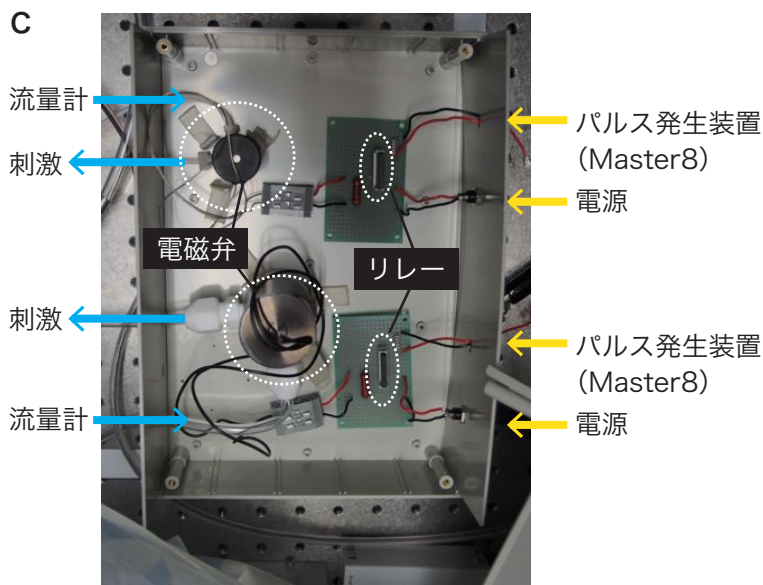
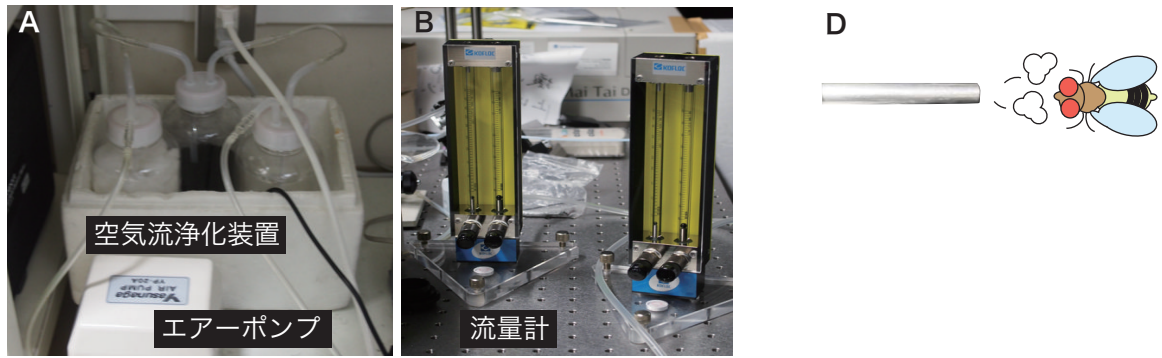


図 6：空気流刺激装置セットアップ

A：エアーポンプと空気流浄化装置。エアーポンプからの空気流は、脱脂綿、顆粒状活性炭、蒸留水（空気流浄化装置）を通過して流量計へつながる。B：流量計。流量計は刺激用とトラックボール用の2つ用意した。同じエアーポンプからの空気流を直前で2又に分けている。C：空気流刺激 ON/OFF 制御装置。電磁弁、リレーからできている。電磁弁には空気流が入る穴、弁がある穴、常に空いている穴の3つがある。流量計からの空気流は電磁弁に入り、パルス発生装置から信号がきた時のみ電磁弁の弁が開き、刺激が与えられる。信号がないときは常に空いている穴から空気流が放出される。電磁弁は、オリフィス径の小さいもの（奥）と、大きいもの（手前）の2種類を用意し、実験の内容によって変更することができる。リレーはパルス発生装置と電源に接続している。D：ハエへの刺激を模式的に表した図。E：リレー回路。F：刺激制御の流れ。

図 7

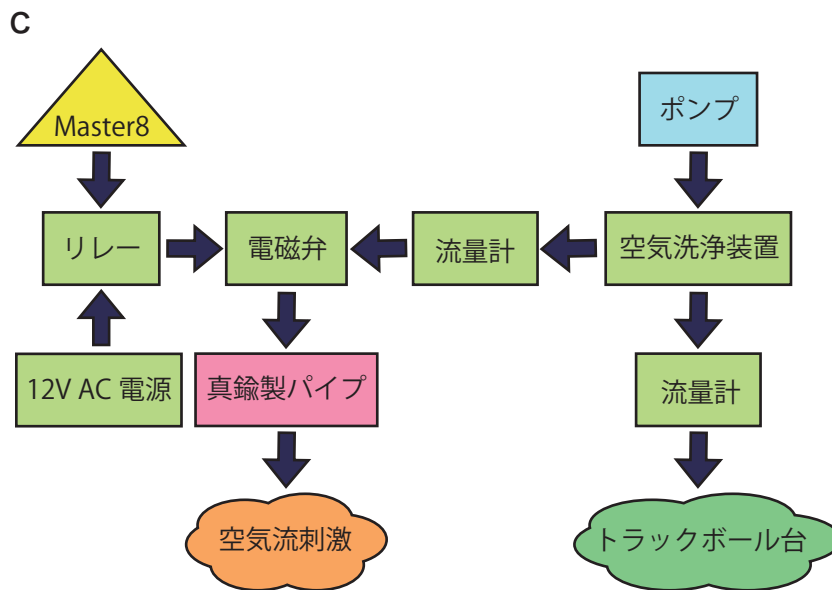
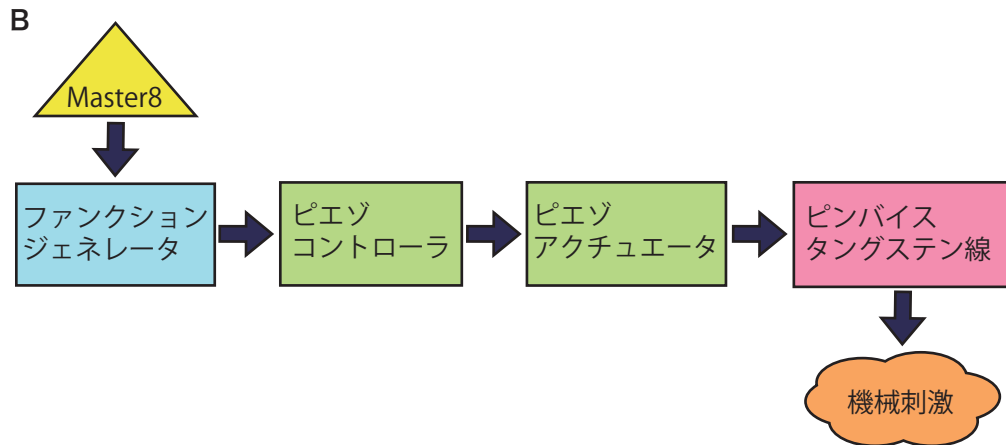


図 7：刺激の一括制御

A：パルス発生装置。B：機械刺激 ON/OFF の自動制御の流れ。C：空気流刺激 ON/OFF の自動制御の流れ

図 8

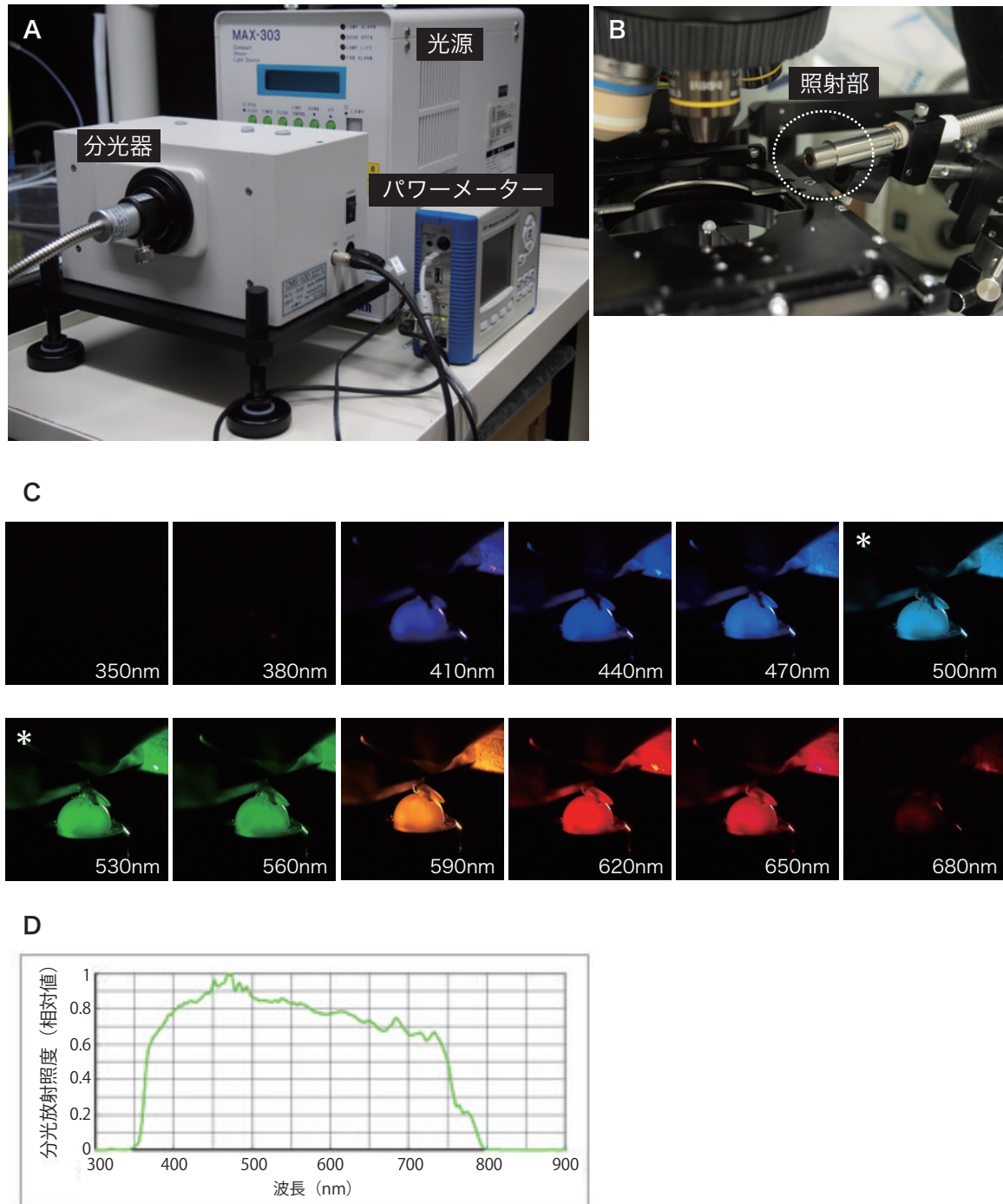


図 8：光刺激装置セットアップ

A：光刺激装置。キセノン光源、分光器、パワーメーターで構成されている。パワーメーターは分光器に接続し、パソコンも分光器に接続されている。パソコン上からパワー校正、刺激の ON/OFF 制御ができる。B：光刺激照射部。C：350nm から 680nm まで 30nm ごとの光刺激 ($20\mu\text{W}/\text{cm}^2$)。*は本研究では使用しない波長。D：キセノン光源の分光相対照度を波長ごとに示したグラフ。

図 9

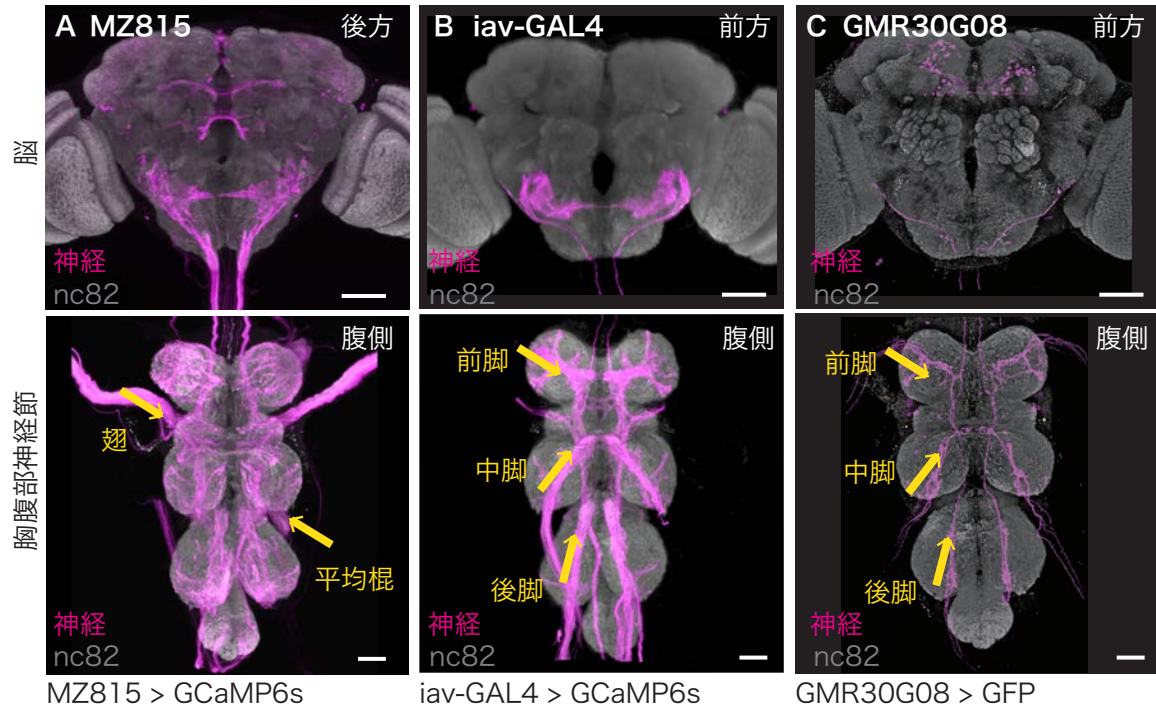


図 9：末梢から脳へ直接投射する経路をラベルする系統

A-C：末梢から脳へ直接投射する経路をラベルする系統。それぞれ上段に脳、下段に胸腹部神経節での神経の投射パターン（マゼンダ）を示す。nc82 は入力シナプス部をラベルし、脳の輪郭、領域を確認するために用いる。スケールバーは $50\mu\text{m}$ 。脳の写真は前方または後方のどちらか神経が見やすい方向からのものを示した。A：翅、平均棍の鐘状感覚器から直接脳へ投射する神経経路がラベルされる。胸腹部神経節において翅、平均棍の神経は背側から入射する。また、画像編集ソフト fluorender を用いて、実験では観察しない神経は消している。B-C：脚の弦音器官から直接脳へ投射する神経経路がラベルされる。胸腹部神経節において各脚からの神経は腹側から入射する。C の共焦点画像データは坪内博士より頂いたものである（図 17-A も同様）。

図 10

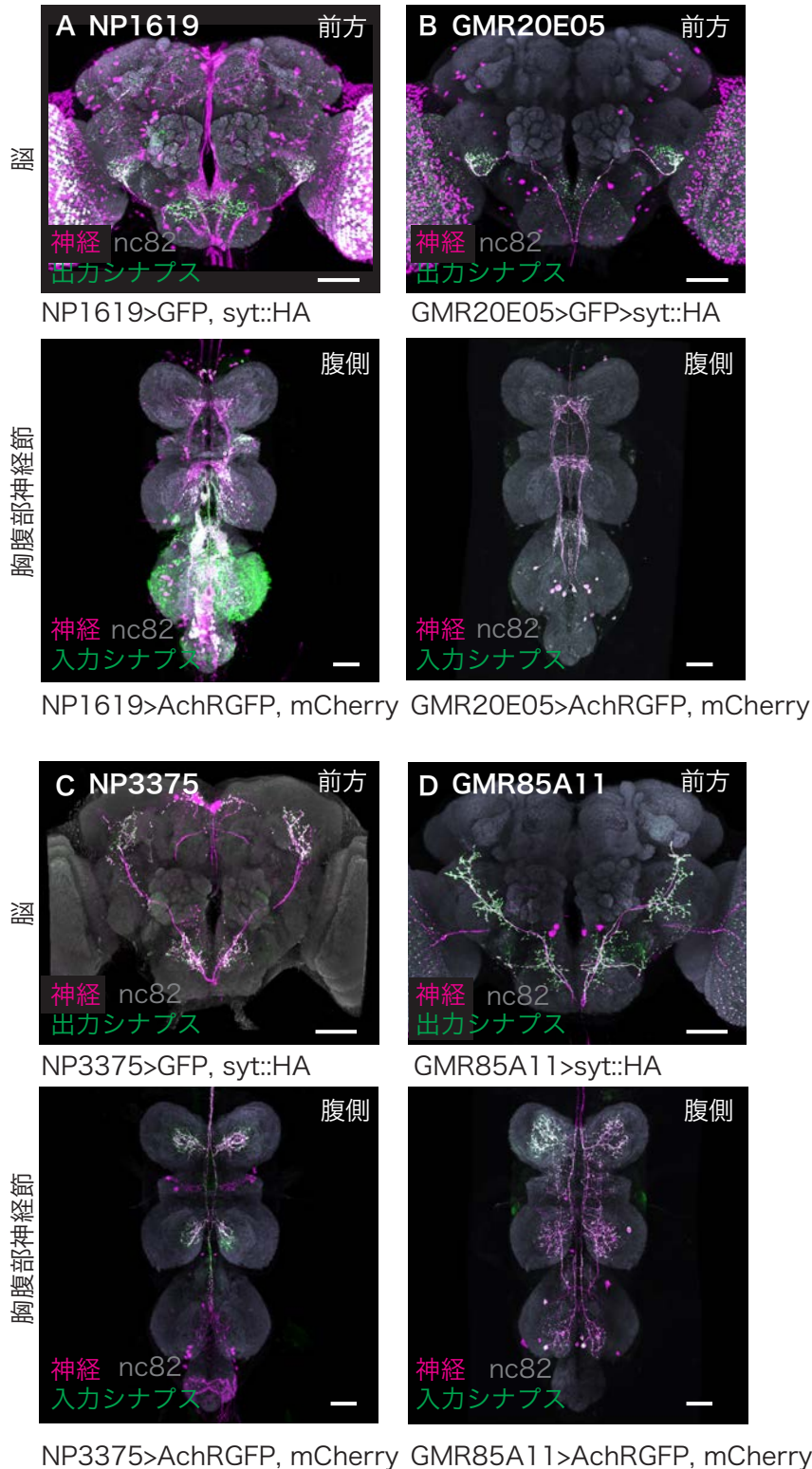


図 10：末梢から介在神経を介して脳へ投射する経路をラベルする系統

A-B：脚の弦音器官からの情報を脳へ伝えている経路をラベルする系統。C-D：脚の機械感覚毛からの情報を脳へ伝えている経路をラベルする系統。それぞれ上段に脳、下段に胸腹部神経節を示す。脳では神経の形態（マゼンダ）と、その出力シナプスの分布（緑）を、胸腹部神経節では、神経の形態と入力シナプスの分布（緑）を示している。スケールバーは $50\mu\text{m}$ 。共焦点画像データは坪内博士より頂いたものである（図 18-A、図 19-A、図 20-A、図 21-A も同様）。

図 11

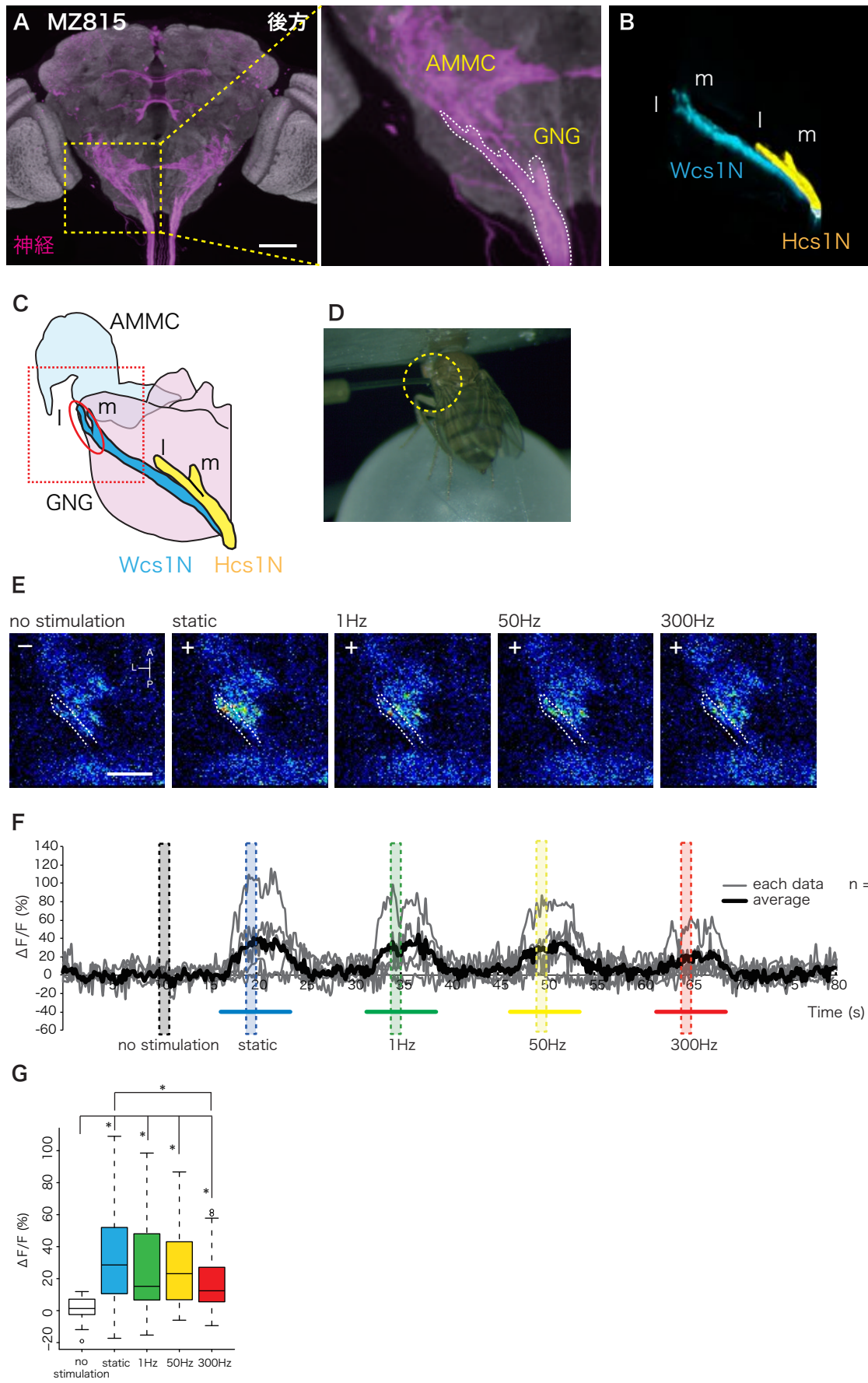


図 11：翅への機械刺激の結果

A-B：MZ815>GCaMP6s がラベルする翅、平均棍由来の神経の形態と投射領域。A：(右) 脳全体での発現パターン。(左) A の黄色点線枠部の拡大図。白点線で囲まれている神経が、翅、平均棍由来の神経群。スケールバーは $50\mu\text{m}$ 。B：水色の神経群が翅由来の神経群 Wcs1N、黄色の神経群が平均棍由来の神経 Hcs1N。それぞれ二股に分かれ、内側の束が m (medial)、外側の束が l (lateral)。C：Wcs1N、Hcs1N の投射の模式図とその投射領域。赤点線枠はイメージング領域を示す。赤色実線枠は解析した神経を示す。D：刺激部位の写真。E：カルシウムイメージングの画像。擬似カラーは輝度値を反映している。白点線部は解析する神経の全体を示している。カルシウムイメージング画像左上の +/- は神経応答の強さを示している。スケールバーは $20\mu\text{m}$ 。F：機械刺激に対するカルシウムイメージングの結果。点線枠は蛍光変化量の比較に用いたデータ範囲を示す。横実線は各刺激を与えたタイミングと時間を示す。グレーの実線は各データ、黒の実線はその平均を示す。n=5。G：F の点線枠内の蛍光変化量を比較した結果。no stimulation と各刺激間の蛍光変化量の比較をウィルコクソンの順位和検定で、static-300Hz 間の蛍光変化量の変化をクルスカル・ウォリス検定で比較した (*p<0.05)。

図 12

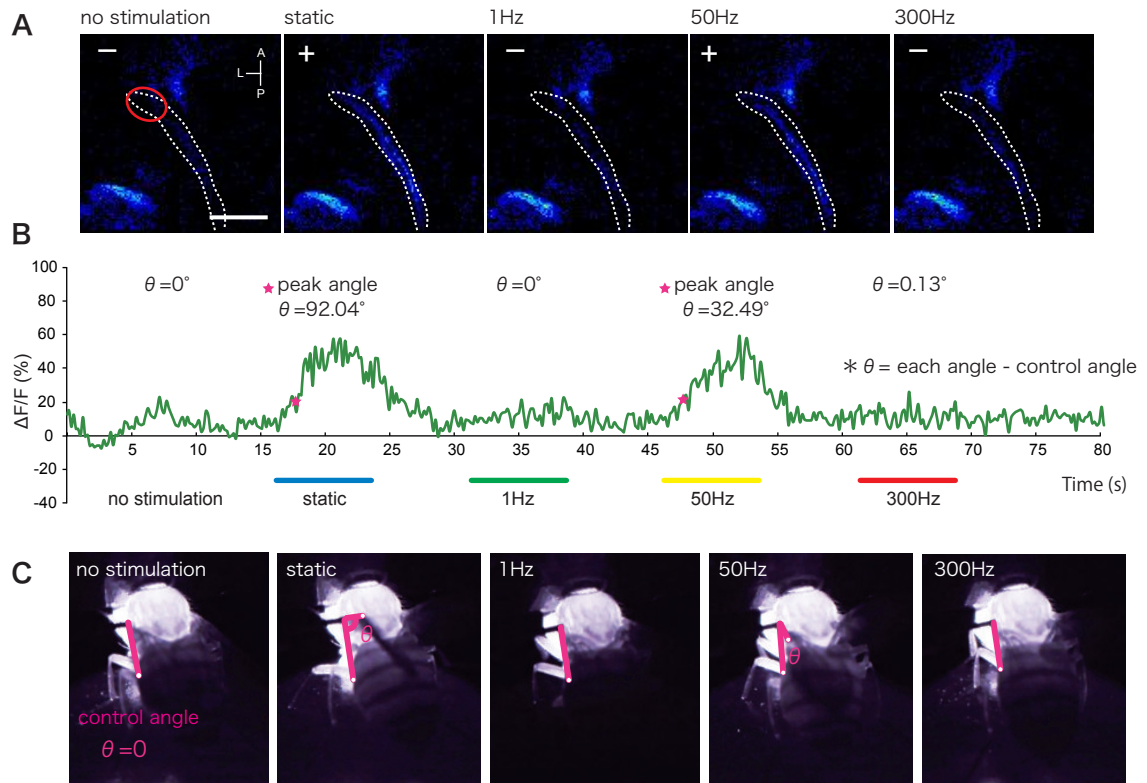


図 12：翅の動きの神経への関与

A-B：翅への機械刺激に対する神経応答の 1 データ。A：カルシウムイメージングの画像。擬似カラーは輝度値を反映している。白点線部は解析する神経の全体像を示す。赤色実線枠は実際に解析した部位を示す。カルシウムイメージング画像左上の +/- は神経応答の強さを示している。スケールバーは $20\mu\text{m}$ 。B：神経の蛍光変化量のグラフ。実線横棒は各刺激のタイミング、長さを示す。各刺激中の最も翅が動いた瞬間の翅の角度 θ を示す。グラフ上の星マーク（マゼンダ）は翅の角度がピークを迎えた時間を示している。 θ は no stimulation 時の翅の外側の縁が作る線に対して、なす角とした。C：各刺激時の翅の動きがピーク迎えたときの写真。また、そのときの翅の角度（B の角度に対応）を示した。

13

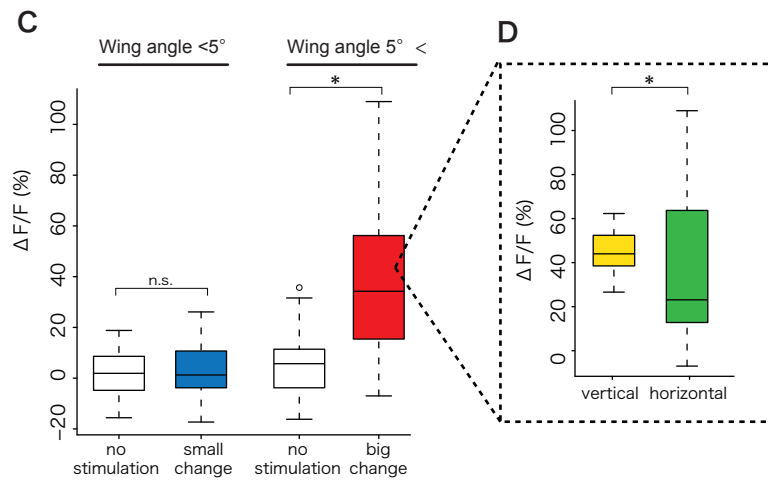
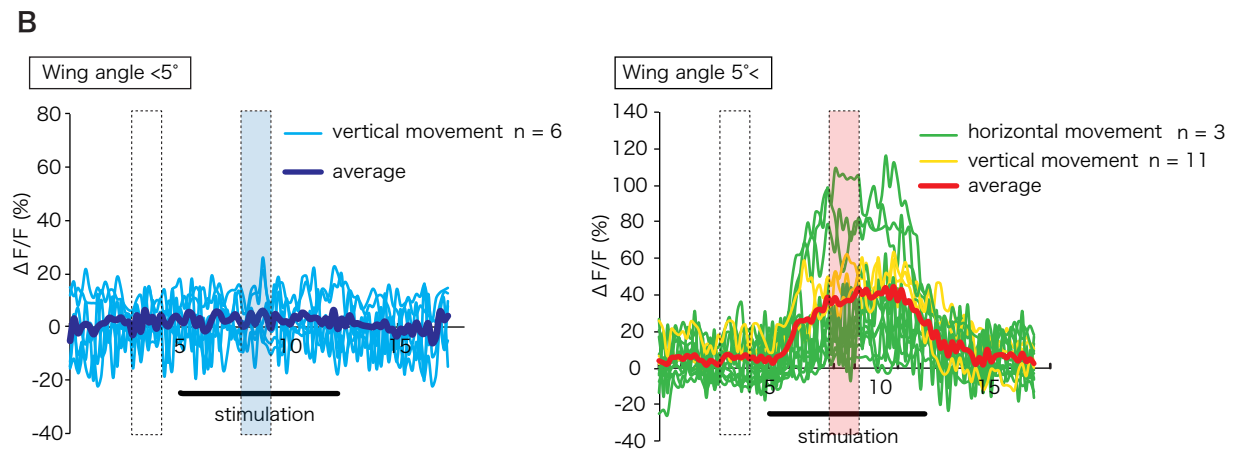
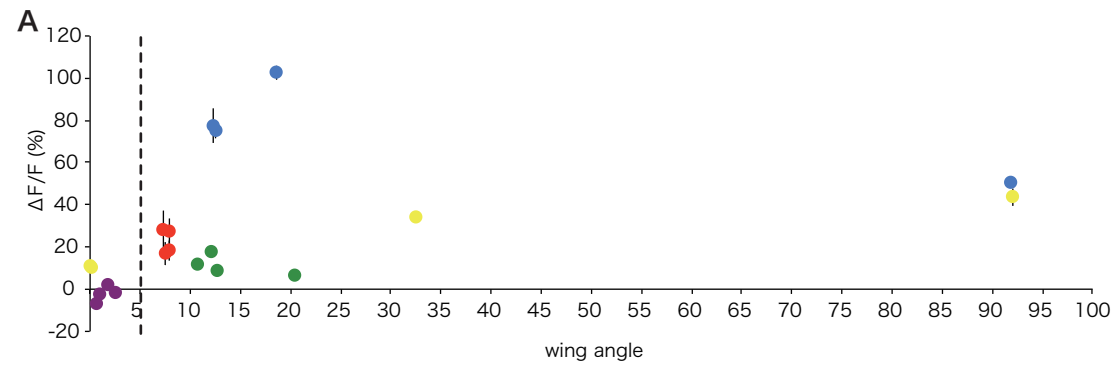


図 13：翅の動きに対する神経の応答

A：機械刺激による翅の動きの角度（横軸）と蛍光変化量（縦軸）の相関を調べたグラフ。各丸い点は 1 つのデータを示す。また、同じ色は同一個体のデータである。5°の位置に縦方向の点線を表示した。B：翅の角度が 5°より小さい場合（左）、大きい場合（右）の刺激前と刺激中の蛍光変化量のグラフ。左のグラフの水色の線は各データ、紺色はその平均（ $n=6$ ）を示す。右側のグラフの緑色の線（水平方向への動き）、黄色の線（垂直方向への動き）は各データ、赤色はその平均を示す（ $n=14$ ）。黒色の横棒が刺激のタイミングと長さを示す。それぞれの点線枠は刺激前と刺激中の蛍光変化量の比較に使用したデータを示す。C：翅の角度が 5°より小さい場合、大きい場合それぞれの刺激前、刺激中の蛍光変化量の比較の結果。ウィルコクソンの順位和検定により比較した（* $p<0.05$ ）。D：翅の角度が 5°より大きい場合のデータにおいて、垂直方向への動きと水平方向への動き間での蛍光変化量の比較を行った結果。ウィルコクソンの順位和検定により比較した（* $p<0.05$ ）。

図 14

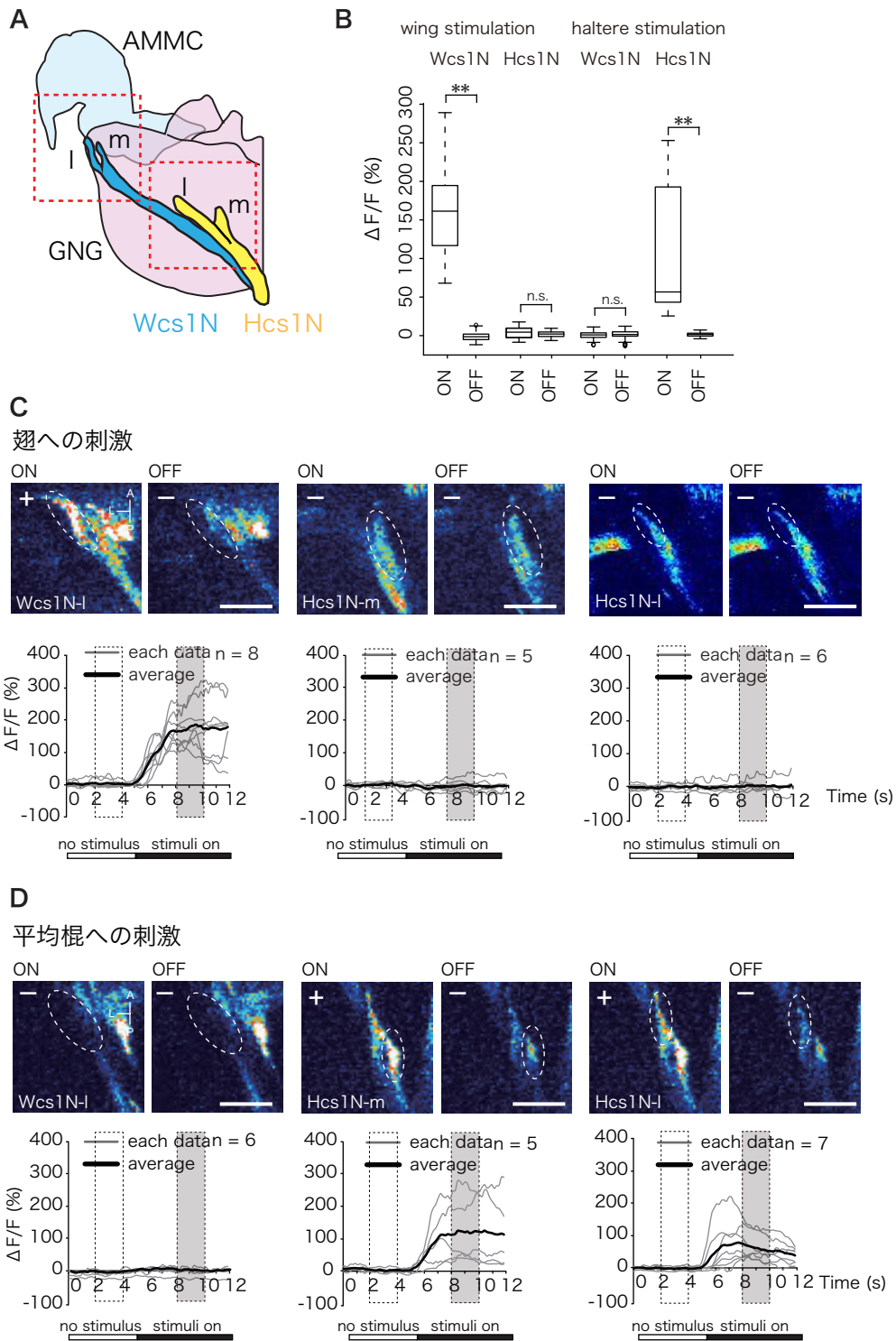


図 14：翅、平均棍を人為的に動かしたときの神経応答

A：Wcs1N、Hcs1N の神経投射パターンとその投射領域の模式図。赤色点線枠はカルシウムイメージングした部位を示す。B：Wcs1N、Hcs1N の刺激前、刺激中の蛍光変化量を比較した結果。ウィルコクソンの順位和検定で比較した (* $p < 0.05$)。C：(上段) 翅へ刺激を与える前、刺激中のカルシウムイメージングの画像と、蛍光変化量のグラフを示す。擬似カラーは輝度値を反映している。カルシウムイメージング画像左上の +/- は神経応答の強さを示している。また、白点線部は神経の解析する神経の全体を示している。スケールバーは $20\mu\text{m}$ 。(下段) 蛍光変化量のグラフでは、グレーの実線が各データ、黒の実線がその平均。刺激前、刺激中の蛍光変化量の比較には、点線枠内のデータを使用した。グラフ下に示す細長い白い箱、黒い箱はそれぞれ刺激前、刺激中を示す。D：(上段) 平均棍へ刺激を与える前、刺激中のカルシウムイメージングの画像と、蛍光変化量のグラフを示す。擬似カラーは輝度値を反映している。カルシウムイメージング画像左上の +/- は神経応答の強さを示している。また、白点線部は神経の解析する神経の部位を示している。蛍光変化量のグラフでは、グレーの実線が各データ、黒の実線がその平均をそれぞれ示す。スケールバーは $20\mu\text{m}$ 。(下段) 刺激前、刺激中の蛍光変化量の比較には、点線枠内のデータを使用した。グラフ下に示す細長い白い箱、黒い箱はそれぞれ刺激前、刺激中を示す。

図 15

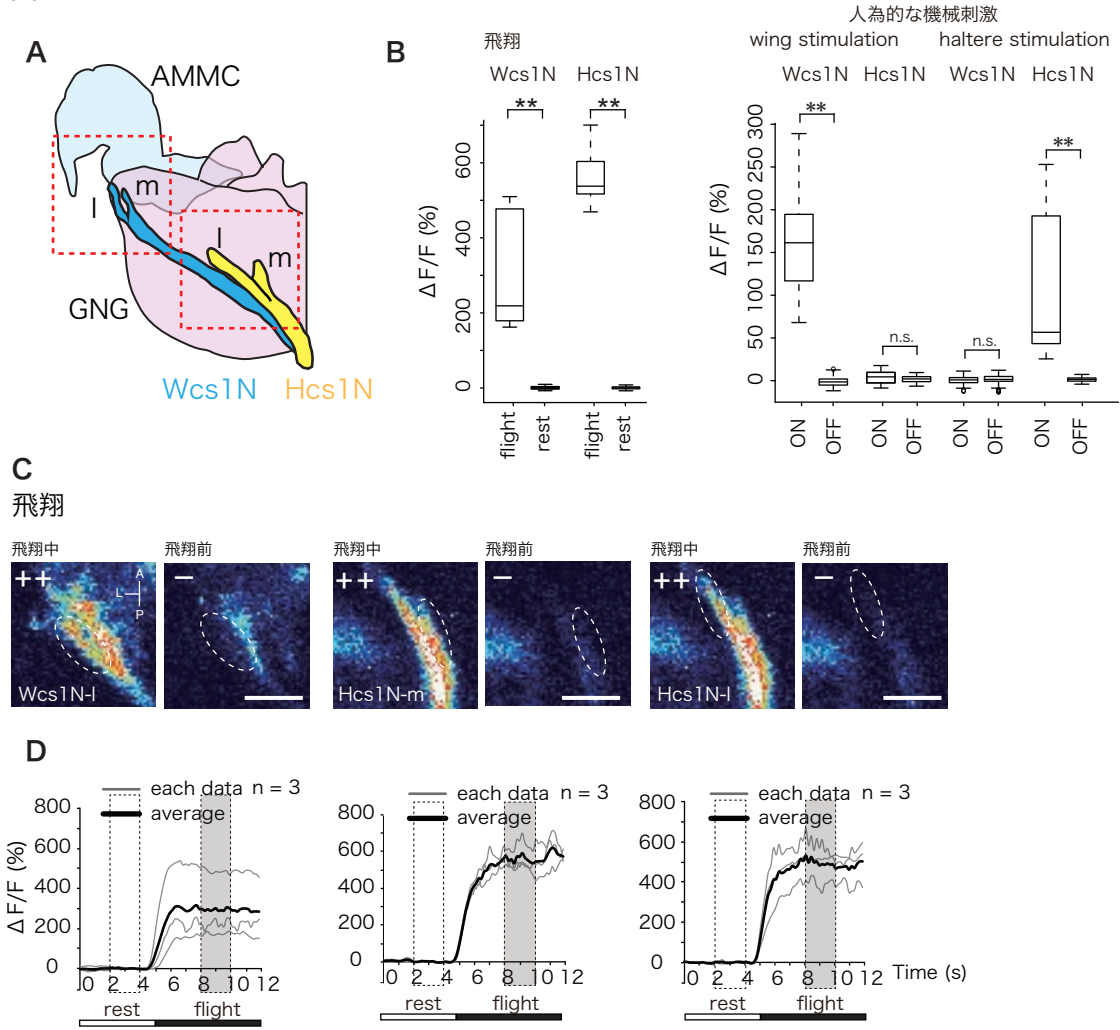


図 15：飛行時の神経応答

A：Wcs1N、Hcs1N の神経投射パターンとその投射領域の模式図。赤色点線枠はカルシウムイメージングした部位を示す。B：Wcs1N、Hcs1N の飛行前、飛行中の蛍光変化量を比較した結果（左）。ウィルコクソンの順位和検定で比較した（* $p < 0.05$ ）。人為的な機械刺激により翅を動かした場合の神経応答の結果（図 14 B）。C：（上段）飛行前、飛行中のカルシウムイメージングの画像と、蛍光変化量のグラフを示す。擬似カラーは輝度値を反映している。白点線部は神経の解析する神経全体を示している。カルシウムイメージング画像左上の +/- は神経応答の強さを示している。スケールバーは $20\mu\text{m}$ 。（下段）蛍光変化量のグラフでは、グレーの実線が各データ、黒の実線がその平均をそれぞれ示す。刺激前、刺激中の蛍光変化量の比較には、点線枠内のデータを使用した。グラフ下に示す白い箱、黒い箱はそれぞれ刺激前、刺激中を示す。

図 16

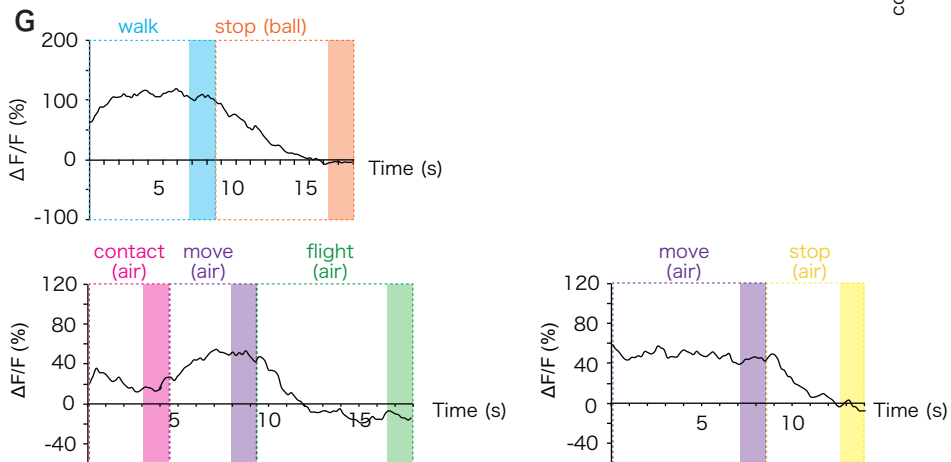
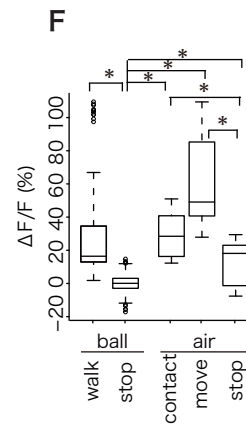
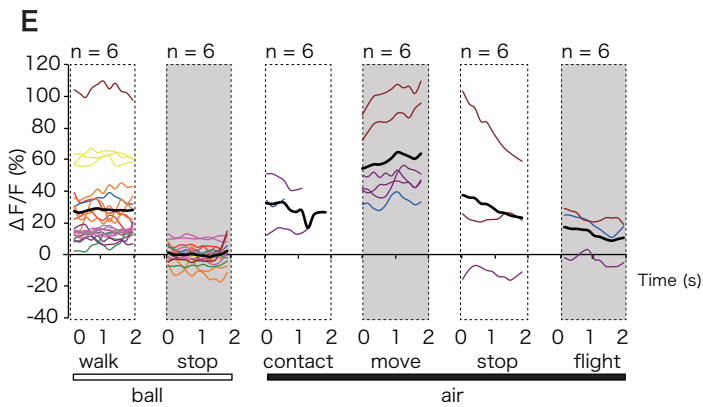
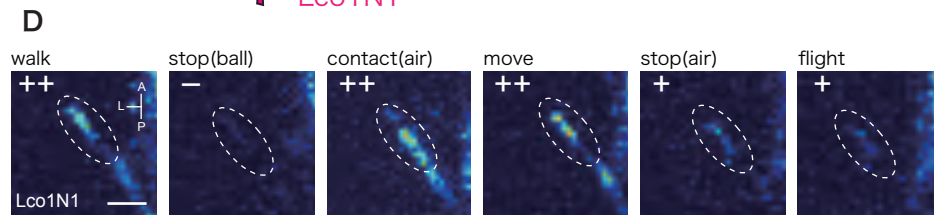
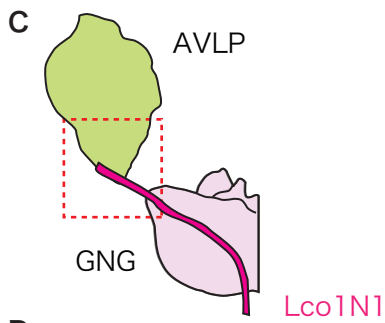
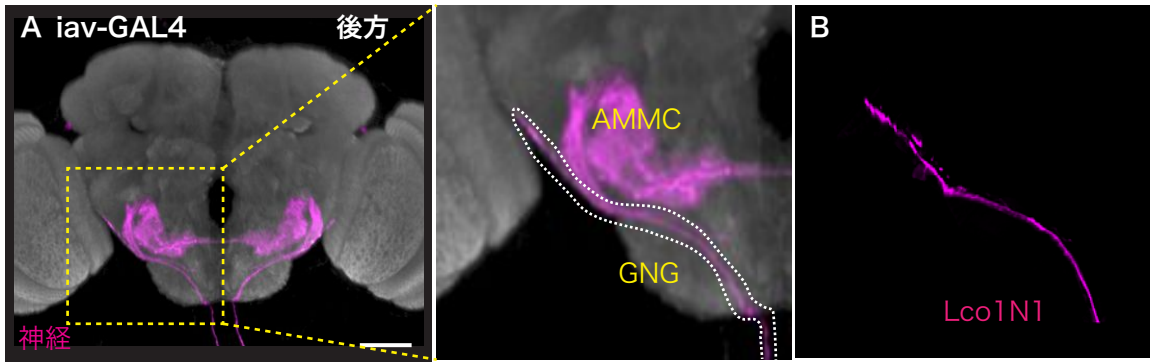


図 16 : Lco1N1 の神経応答

A-C : iav-GAL4>GCaMP6s がラベルする脚由来の神経の形態と投射領域。A : (左) 脳全体での発現パターン。黄色点線枠部が目的神経の投射領域。(右) 黄色点線枠部の拡大図。白点線で囲まれている神経が脚由来の神経群。スケールバーは $50\mu\text{m}$ 。B : マゼンダ色の神経群が脚由来の神経群 Lco1N1。C : Lco1N1 の投射の模式図とその投射領域。赤点線枠はイメージング領域を示す。D : 自由行動下のカルシウムイメージングの画像。擬似カラーは輝度値を反映している。白点線部は神経の解析する神経全体を示している。カルシウムイメージング画像左上の +/- は神経応答の強さを示している。スケールバーは $20\mu\text{m}$ 。E : 各行動時 2 秒間の蛍光変化量のグラフ。異なる色の実線は各データ、黒の実線はその平均を示す。同一個体のデータは同じ色で示している。点線枠は蛍光変化量の比較に用いたデータ範囲を示す。グラフ下の白い箱は ball 上の行動、黒い箱は空中での行動を分けている。F : E の点線枠内の蛍光変化量を比較した結果。全行動間の蛍光変化量の変化をクルスカル・ウォリス検定で、ball 上での stop と各刺激間の蛍光変化量の比較をウィルコクソンの順位和検定で比較した (* $p<0.05$)。G : 各行動時の蛍光変化量の生データ。点線枠内のデータを比較に用い、それらのデータはある行動から次の行動に変わる直前の 2 秒間 (色がついている部分) を使用した。

図 17

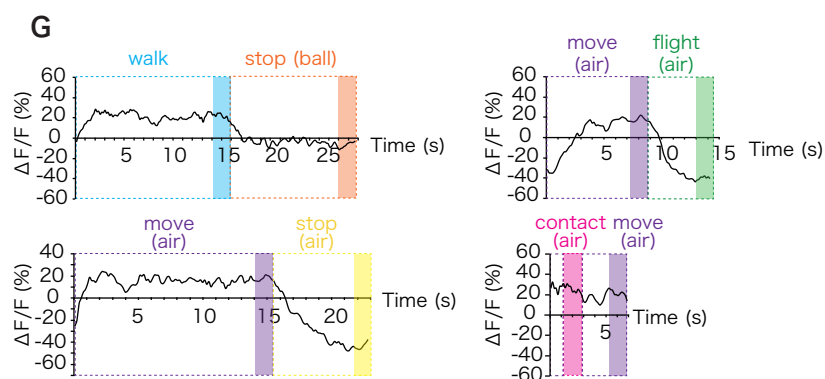
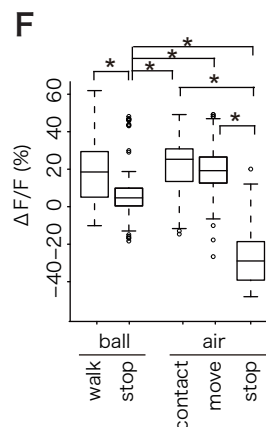
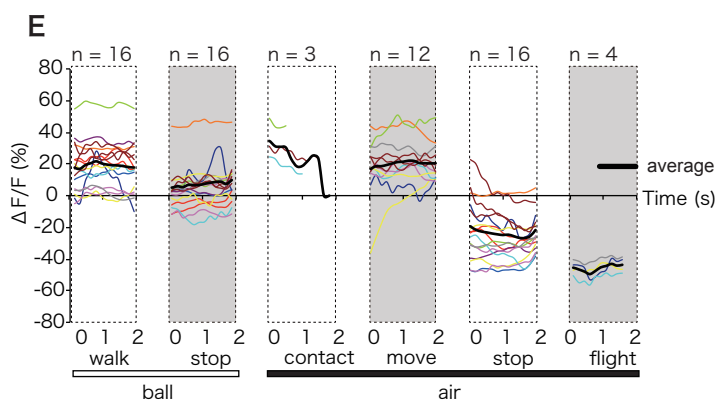
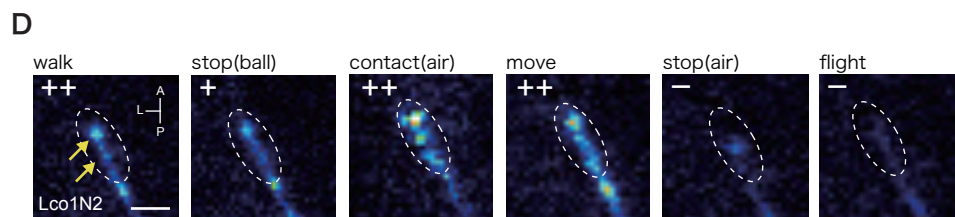
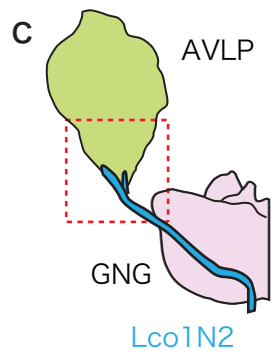
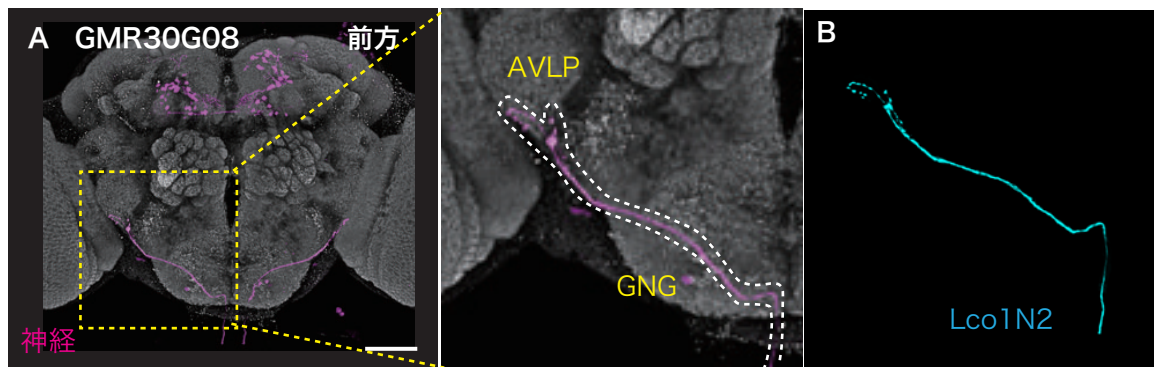


図 17 : Lco1N2 の神経応答

A-C : GMR30G08 >GFP がラベルする脚由来の神経の形態と投射領域。A : (左) 脳全体での発現パターン。黄色点線枠部が目的神経の投射領域。(右) 黄色点線枠部の拡大図。白点線で囲まれている神経が脚由来の神経群。スケールバーは $50\mu\text{m}$ 。B : 青色の神経群が脚由来の神経群 Lco1N2。C : Lco1N2 の投射の模式図とその投射領域。赤点線枠はイメージング領域を示す。D : 自由行動下のカルシウムイメージングの画像。擬似カラーは輝度値を反映している。白点線部は神経の解析する神経全体を示している。カルシウムイメージング画像左上の +/- は神経応答の強さを示している。スケールバーは $20\mu\text{m}$ 。E : 各行動時 2 秒間の蛍光変化量のグラフ。異なる色の実線は各データ、黒の実線はその平均を示す。同一個体のデータは同じ色で示している。点線枠は蛍光変化量の比較に用いたデータ範囲を示す。グラフ下の白い箱は ball 上の行動、黒い箱は空中での行動を分けている。F : E の点線枠内の蛍光変化量を比較した結果。全行動間の蛍光変化量の変化をクルスカル・ウォリス検定で、ball 上での stop と各刺激間の蛍光変化量の比較をウィルコクソンの順位和検定で比較した (* $p < 0.05$)。G : 各行動時の蛍光変化量の生データ。点線枠内のデータを比較に用い、それらのデータはある行動から次の行動に変わる直前の 2 秒間 (色がついている部分) を使用した。

図 18

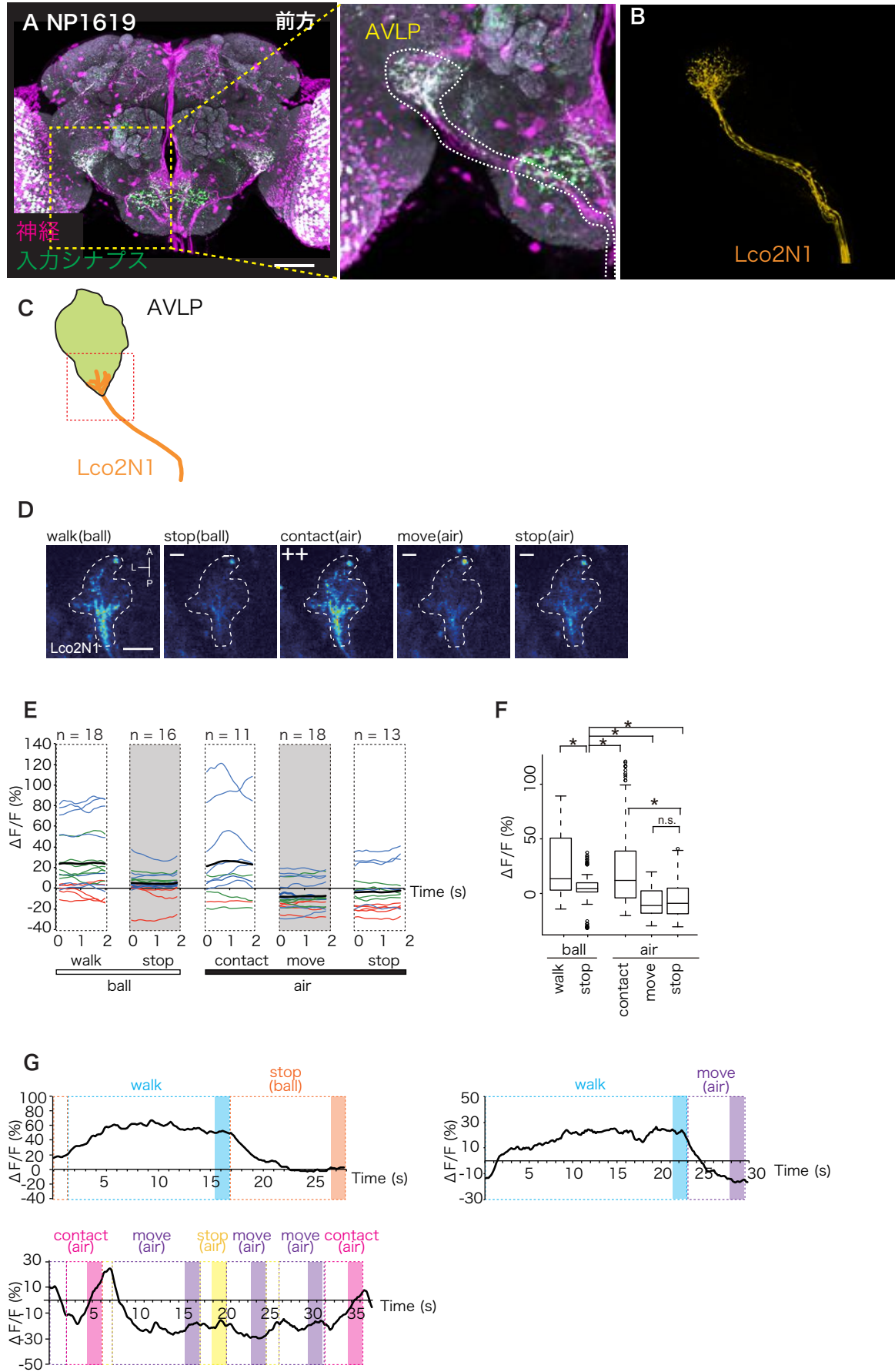


図 18 : Lco2N1 の神経応答

A-C : NP1619 >GFP, sytHA がラベルする脚の弦音器官からの入力を受ける介在神経群の形態と投射領域。A : (左) 脳全体での発現パターン。黄色点線枠部が目的神経の投射領域。(右) 黄色点線枠部の拡大図。白点線で囲まれている神経が脚の弦音器官から入力を受ける介在神経群。スケールバーは $50\mu\text{m}$ 。B : オレンジ色の神経群が脚の弦音器官からの入力を受ける介在神経群 Lco2N1。C : Lco2N1 の投射の模式図とその投射領域。赤点線枠はイメージング領域を示す。D : 自由行動下のカルシウムイメージングの画像。擬似カラーは輝度値を反映している。白点線部は神経の解析する神経全体を示している。カルシウムイメージング画像左上の +/- は神経応答の強さを示している。スケールバーは $20\mu\text{m}$ 。E : 各行動時 2 秒間の蛍光変化量のグラフ。異なる色の実線は各データ、黒の実線はその平均を示す。同一個体のデータは同じ色で示している。点線枠は蛍光変化量の比較に用いたデータ範囲を示す。グラフ下の白い箱は ball 上の行動、黒い箱は空中での行動を分けている。F : E の点線枠内の蛍光変化量を比較した結果。全行動間の蛍光変化量の変化をクルスカル・ウォリス検定で、ball 上での stop と各刺激間の蛍光変化量の比較をウィルコクソンの順位和検定で比較した (* $p < 0.05$)。G : 各行動時の蛍光変化量の生データ。点線枠内のデータを比較に用い、それらのデータはある行動から次の行動に変わる直前の 2 秒間 (色がついている部分) を使用した。

図 19

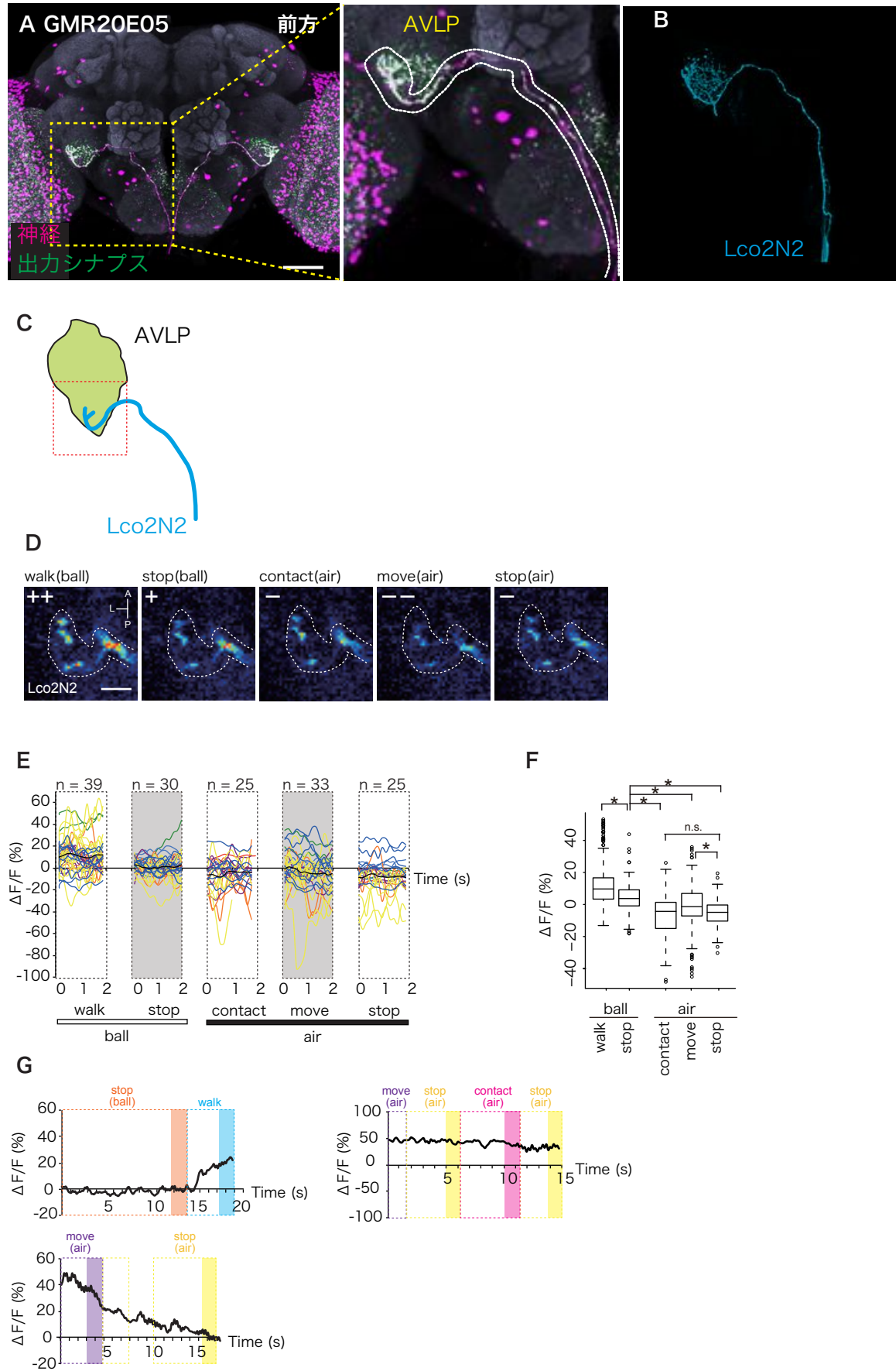


図 19 : Lco2N2 の神経応答

A-C : GMR20E05 >GFP, sytHA がラベルする脚の弦音器官からの入力を受ける介在神経群の形態と投射領域。A : (左) 脳全体での発現パターン。黄色点線枠部が目的神経の投射領域。(右) 黄色点線枠部の拡大図。白点線で囲まれている神経が脚の弦音器官から入力を受ける介在神経群。スケールバーは $50\mu\text{m}$ 。B : 水色の神経群が脚の弦音器官からの入力を受ける介在神経群 Lco2N2。C : Lco2N2 の投射の模式図とその投射領域。赤点線枠はイメージング領域を示す。D : 自由行動下のカルシウムイメージングの画像。擬似カラーは輝度値を反映している。白点線部は神経の解析する神経全体を示している。カルシウムイメージング画像左上の +/- は神経応答の強さを示している。スケールバーは $10\mu\text{m}$ 。E : 各行動時 2 秒間の蛍光変化量のグラフ。異なる色の実線は各データ、黒の実線はその平均を示す。同一個体のデータは同じ色で示している。点線枠は蛍光変化量の比較に用いたデータ範囲を示す。グラフ下の白い箱は ball 上の行動、黒い箱は空中での行動を分けている。F : E の点線枠内の蛍光変化量を比較した結果。全行動間の蛍光変化量の変化をクルスカル・ウォリス検定で、ball 上での stop と各刺激間の蛍光変化量の比較をウィルコクソンの順位和検定で比較した (* $p < 0.05$)。G : 各行動時の蛍光変化量の生データ。点線枠内のデータを比較に用い、それらのデータはある行動から次の行動に変わる直前の 2 秒間 (色がついている部分) を使用した。

図 20

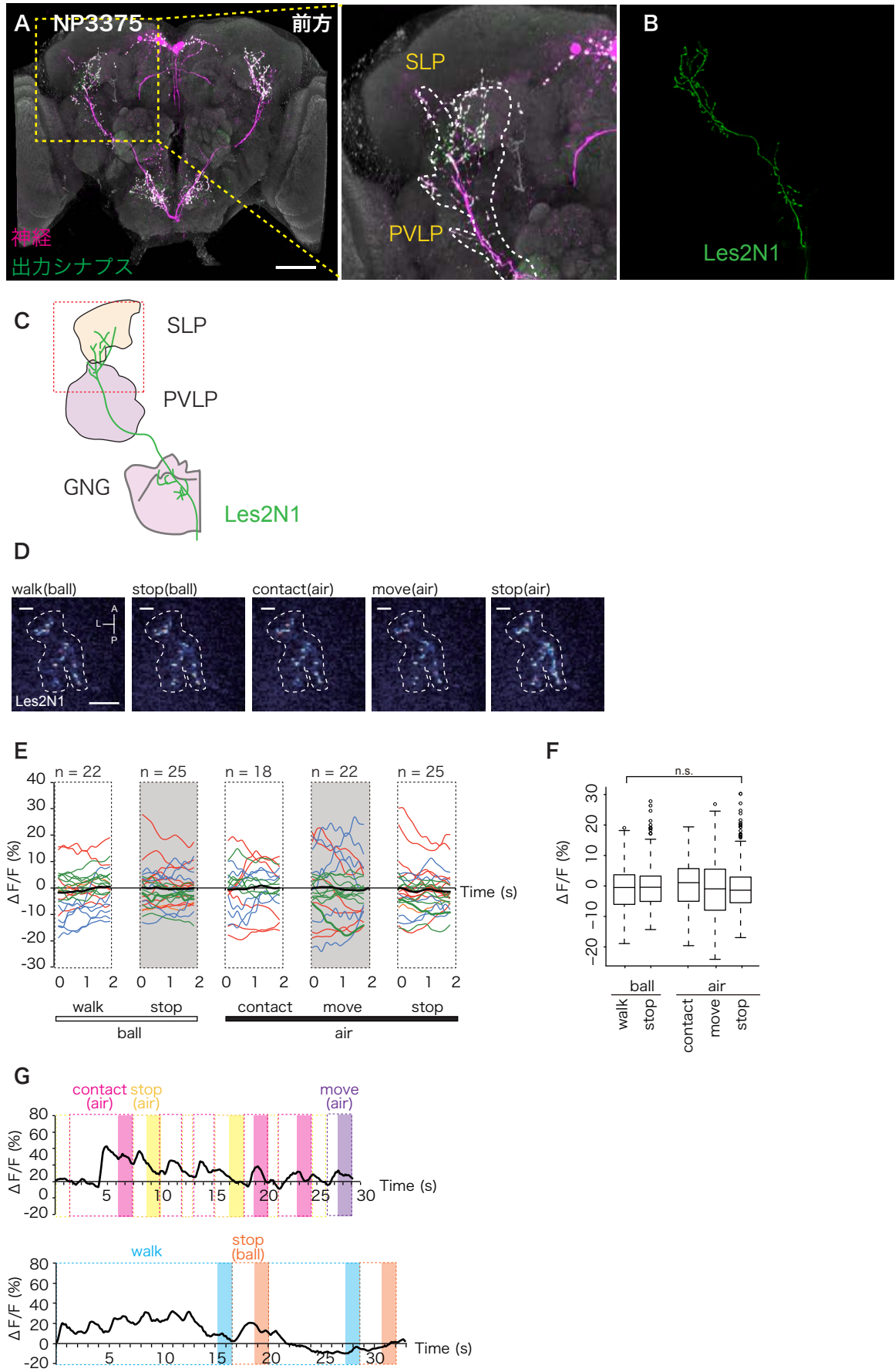


図 20 : Les2N1 の神経応答

A-C : NP3375 >GFP, sytHA がラベルする脚の機械感覚毛からの入力を受ける介在神経群の形態と投射領域。A : (左) 脳全体での発現パターン。黄色点線枠部が目的神経の投射領域。(右) 黄色点線枠部の拡大図。白点線で囲まれている神経が脚の機械感覚毛から入力を受ける介在神経群。スケールバーは $50\mu\text{m}$ 。B : 黄緑色の神経群が脚の機械感覚毛からの入力を受ける介在神経群 Les2N2。C : Les2N2 の投射の模式図とその投射領域。赤点線枠はイメージング領域を示す。D : 自由行動下のカルシウムイメージングの画像。擬似カラーは輝度値を反映している。白点線部は神経の解析する神経全体を示している。カルシウムイメージング画像左上の +/- は神経応答の強さを示している。スケールバーは $10\mu\text{m}$ 。E : 各行動時 2 秒間の蛍光変化量のグラフ。異なる色の実線は各データ、黒の実線はその平均を示す。同一個体のデータは同じ色で示している。点線枠は蛍光変化量の比較に用いたデータ範囲を示す。グラフ下の白い箱は ball 上の行動、黒い箱は空中での行動を分けている。F : E の点線枠内の蛍光変化量を比較した結果。全行動間の蛍光変化量の変化をクルスカル・ウォリス検定で比較した (* $p < 0.05$)。G : 各行動時の蛍光変化量の生データ。点線枠内のデータを比較に用い、それらのデータはある行動から次の行動に変わる直前の 2 秒間 (色がついている部分) を使用した。

図 21

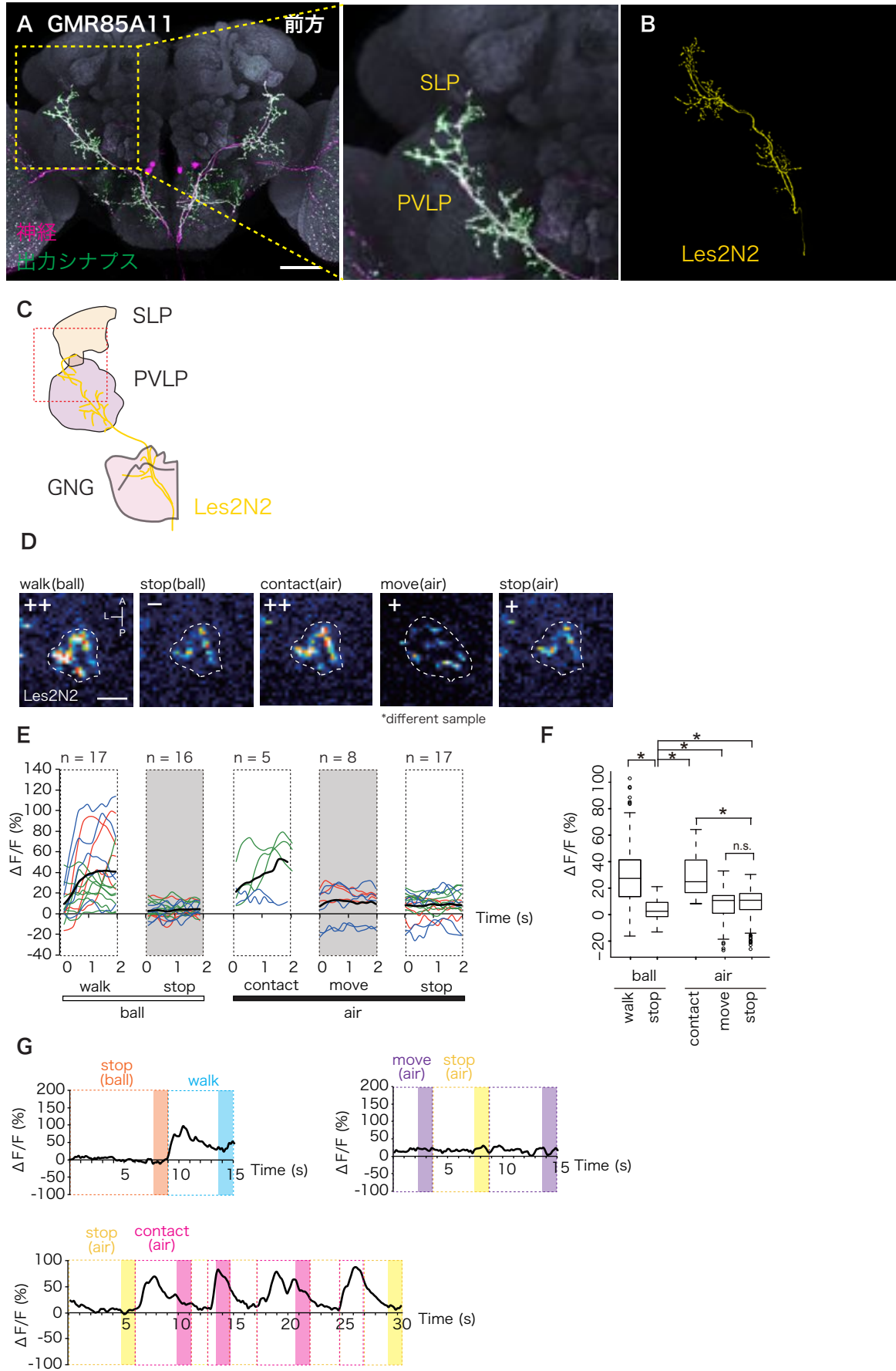


図 21 : Les2N2 の神経応答

A-C : GMR85A11 >GFP, sytHA がラベルする脚の機械感覚毛からの入力を受ける介在神経群の形態と投射領域。A : (左) 脳全体での発現パターン。黄色点線枠部が目的神経の投射領域。(右) 黄色点線枠部の拡大図。白点線で囲まれている神経が脚の機械感覚毛から入力を受ける介在神経群。スケールバーは $50\mu\text{m}$ 。B : 黄色の神経群が脚の機械感覚毛からの入力を受ける介在神経群 Les2N2。C : Les2N2 の投射の模式図とその投射領域。赤点線枠はイメージング領域を示す。D : 自由行動下のカルシウムイメージングの画像。擬似カラーは輝度値を反映している。白点線部は神経の解析する神経全体を示している。カルシウムイメージング画像左上の +/- は神経応答の強さを示している。スケールバーは $10\mu\text{m}$ 。E : 各行動時 2 秒間の蛍光変化量のグラフ。異なる色の実線は各データ、黒の実線はその平均を示す。同一個体のデータは同じ色で示している。点線枠は蛍光変化量の比較に用いたデータ範囲を示す。グラフ下の白い箱は ball 上の行動、黒い箱は空中での行動を分けている。F : E の点線枠内の蛍光変化量を比較した結果。全行動間の蛍光変化量の変化をクルスカル・ウォリス検定で、ball 上での stop と各刺激間の蛍光変化量の比較をウィルコクソンの順位和検定で比較した (* $p < 0.05$)。G : 各行動時の蛍光変化量の生データ。点線枠内のデータを比較に用い、それらのデータはある行動から次の行動に変わる直前の 2 秒間 (色がついている部分) を使用した。

図 22

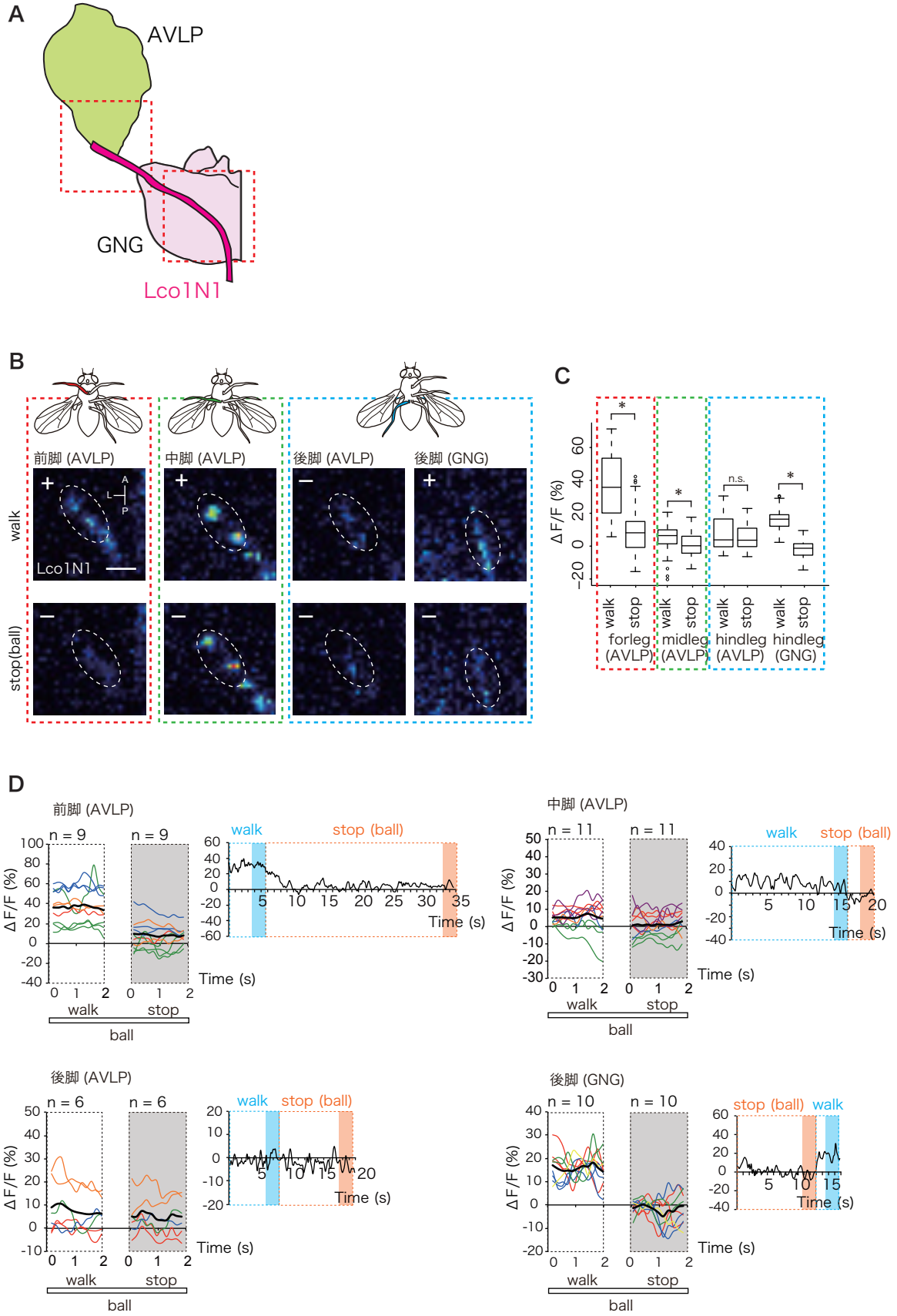


図22：Lco1N1 神経群における各脚の投射経路

A：Lco1N1 の投射の模式図とその投射領域。赤点線枠はイメージング領域を示す。B：片側各脚1本のみ残した場合のカルシウムイメージングの画像。擬似カラーは輝度値を反映している。白点線部は神経の解析する神経全体を示している。カルシウムイメージング画像左上の+/-は神経応答の強さを示している。スケールバーは20 μ m。C：walk時、stop ball時の蛍光変化量を比較した結果。walkとstop ball比較はウィルコクソンの順位和検定で比較した(* $p < 0.05$)。D：各脚のwalk、stop ball時の2秒間の蛍光変化量のグラフ(左)と、蛍光変化量の生データ(右)を示す。(左)グラフの異なる色の実線は各データ、黒の実線はその平均を示す。点線枠は蛍光変化量の比較に用いたデータ範囲を示す。グラフ下の白い箱はball上でのwalkまたはstop ballのタイミングを示す。(右)グラフの点線枠内のデータを比較に用い、それらのデータはある行動から次の行動に変わる直前の2秒間(色がついている部分)を使用した。

図 23

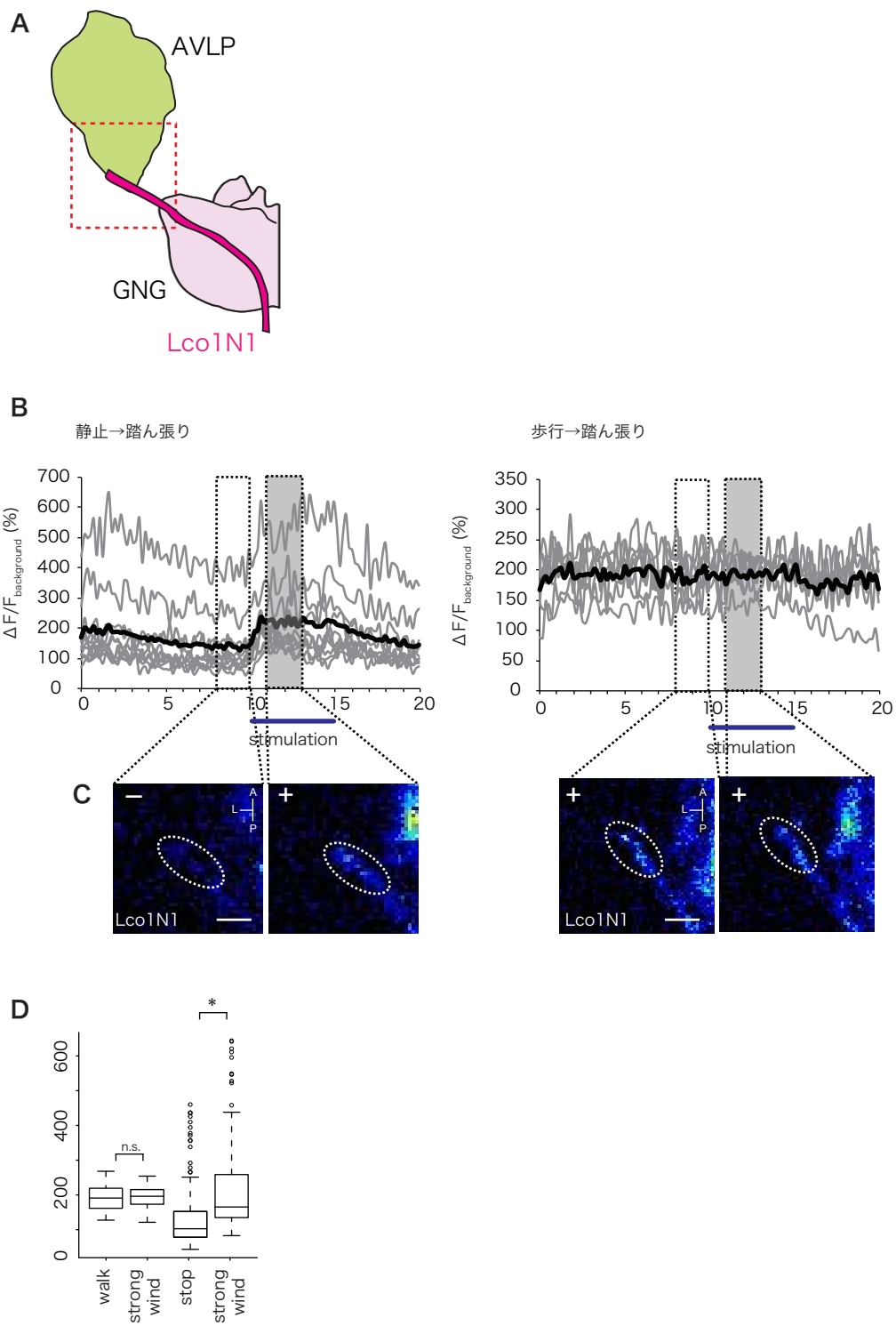


図 23 : Lco1N1 神経群における強い風に対する踏ん張り時の反応

A : Lco1N1 の投射の模式図とその投射領域。赤点線枠はイメージング領域を示す。B : 静止から踏ん張った場合（左）と歩行から踏ん張った場合（右）の蛍光変化量のグラフ。グレーの実線が各データ、黒い実線がその平均。点線枠は蛍光変化量の比較に用いたデータ範囲を示す。グラフ下の紺色の実線は空気流刺激を与えたタイミングとその長さを示す。C : カルシウムイメージングの画像。擬似カラーは輝度値を反映している。白点線部は神経の解析する神経全体を示している。カルシウムイメージング画像左上の+/-は神経応答の強さを示している。スケールバーは $20\mu\text{m}$ 。D : 静止から踏ん張った場合、歩行から踏ん張った場合それぞれの、刺激前、刺激中の蛍光変化量を比較した結果。ウィルコクソンの順位和検定で比較した (* $p<0.05$)。

図 24

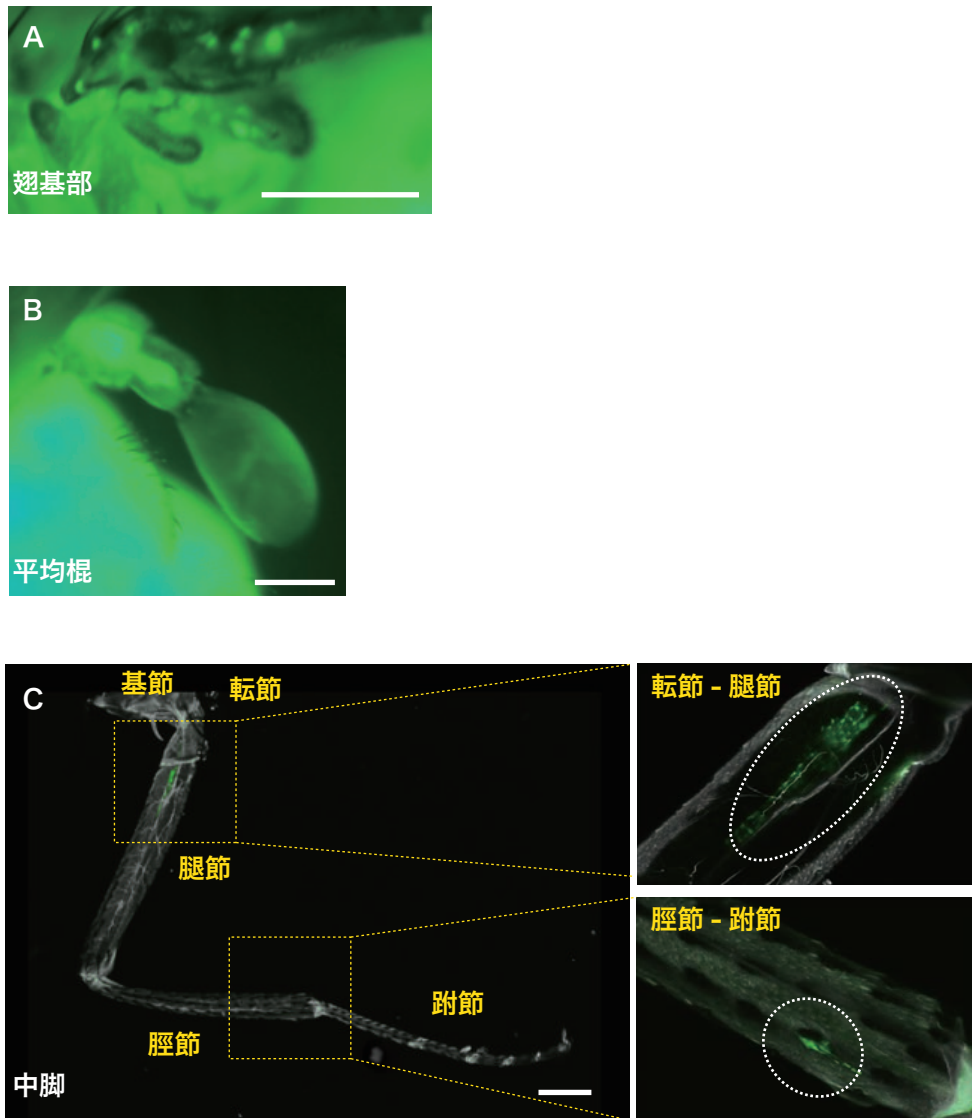
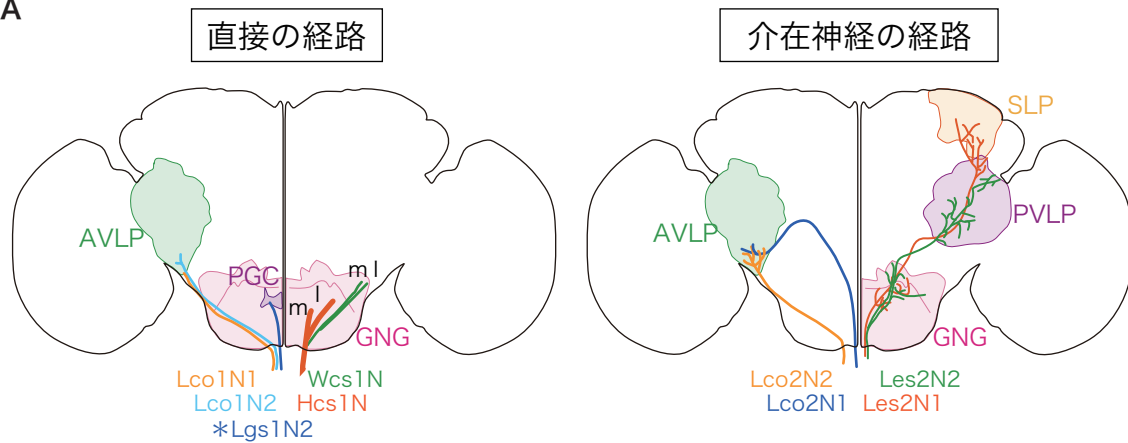


図 24 : 末梢での GCaMP の発現

A : 翅基部での GCaMP の発現。B : 平均根基部での GCaMP の発現。C : 脚での GCaMP の発現。転節と腿節の関節部の拡大写真 (右上) と脛節と跗節の関節部の拡大写真 (右下)。スケールバーは $100\mu\text{m}$ 。

図 25

A



B

	movements
Wcs1N	+
Hcs1N	+

	walk(ball)	stop(ball)	contact(air)	move(air)	stop(air)	flight(air)
Lco1N1	++	-	++	++	+	+
Lco1N2	++	+	++	++	-	-
Lco2N1	+	-	+	-	-	-
Lco2N2	++	+	-	--	-	
Les2N1	-	-	-	-	-	
Les2N2	++	-	++	+	+	

図 25：体性感覚を担う神経群のまとめ

A：(左) 翅、平均棍の鐘状感覚子、脚の弦音器官から直接脳へ投射する神経群の脳での投射経路、投射領域を示した模式図。(右) 胸部神経節で脚の弦音器官から入力を受ける介在神経、機械感覚毛から入力を受ける介在神経の脳での投射経路、投射領域を示した模式図。B：A で示した神経群が、それぞれどのような刺激に対して反応するかをまとめた表。+は神経の反応が強いことを、-は神経の反応が弱いことを示す。符号の数が神経応答の強弱を表している。