

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780047

研究課題名(和文) 新規な神経活動依存的遺伝子を用いた昆虫の性フェロモン神経回路の可視化と機能解析

研究課題名(英文) Visualization and analysis of sex pheromone neural circuits in insects using a novel immediate early gene.

研究代表者

木矢 剛智 (Kiya, Taketoshi)

金沢大学・自然システム学系・特任助教

研究者番号：90532309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：外界からの情報を正確に感知し、適切に応答することは、動物の生存・子孫維持に極めて重要である。本研究者は比較的シンプルな構造からなる昆虫の嗅覚系に着目し、性フェロモン受容が行動を制御する仕組みの解明に取り組んできた。本研究ではカイコガの脳より神経活動依存的に発現量が増加する新規な遺伝子としてHr38を同定し、これがカイコガ・ショウジョウバエの脳において神経活動のマーカーとして利用できることを見出し、異性の匂いに応答する細胞の包括的同定に成功した。さらに遺伝子組換え昆虫を用いて神経活動の起こった神経細胞特異的にGFPなどのレポーター遺伝子を発現する昆虫の作成を試みた。

研究成果の概要(英文)：Many insects exhibit stereotypic instinctive behavior, but the underlying neural mechanisms are not well understood due to difficulties in detecting brain activity in freely-moving animals. Immediate early genes (IEGs) whose expression is transiently and rapidly upregulated upon neural activity are powerful tools for detecting behavior-related neural activity. In the present study, I identified Hr38 as a novel IEG that is transiently expressed in the male silkworm, *Bombyx mori*, by female odor stimulation. Using Hr38 expression as an indicator of neural activity, I mapped comprehensive activity patterns of the silkworm brain in response to female sex pheromones. I found that Hr38 can also be used as a neural activity marker in the fly, *Drosophila melanogaster*. Using Hr38, I constructed a neural activity map of the fly brain in response to female stimulation. In addition, I established transgenic insects whose active neurons can be visualized with GFP, using Hr38 expression as tools.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：カイコ ショウジョウバエ Hr38 フェロモン 神経活動 昆虫 脳 初期応答遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物は外界からの情報を正確に受容・認識し、適切な行動により反応する。しかしながら、感覚情報が行動出力を生み出す神経機構には不明な点が多く残されている。特に脳の高次中枢は、感覚情報の統合や運動指令の判断において最も重要であると考えられるにも関わらず、有効なアプローチがないためその動作原理は未解明のままであった。

(2) 感覚入力が行動を生み出す神経機構の解明には、特定の感覚刺激に対する定型行動に着目し、その神経回路及び機能を包括的に明らかにすることが有効である。昆虫の性フェロモンは、特異的な嗅覚受容体の活性化が、性行動といった定型行動を誘発する点で入出力関係が明確であり、感覚入力と行動の関係を調べる目的に適している。また昆虫の脳は、脊椎動物の脳に比べ極めて少数の神経細胞で構成されており、神経回路の包括的な解析が可能である。これらの研究上の利点と、遺伝学的手法を用いた神経機能の解析や比較が可能であるといった観点から、本研究者はカイコガとショウジョウバエの2種の昆虫を用いて研究を行ってきた。

(3) 性フェロモン情報を処理する神経回路の包括的解析には、神経活動依存的に発現量が増加する初期応答遺伝子を利用した神経細胞の可視化が有効であると本研究者は考え、カイコガの脳を用いたマイクロアレイ解析を行い、新規な初期応答遺伝子(神経活動依存的に発現する遺伝子)として *Hr38* (Hormone receptor 38) を同定した。また *Hr38* はカイコのみならずショウジョウバエの脳においても神経活動依存的に発現することを確認していた。

2. 研究の目的

本研究は、本研究者が発見した新規な初期応答遺伝子 *Hr38* が神経活動のマーカーとして幅広い昆虫種で使用可能であるかを検討し、これまで未知であった性フェロモンに反応する神経細胞を包括的に同定することを目的とした。また、*Hr38* の神経活動依存的発現という性質を利用し、神経活動の起こった細胞を特異的に GFP でラベルしたり、dTrpA1 チャンルのような神経機能が操作できるタンパク質を発現したりすることで、性フェロモン情報を処理する神経回路の詳細な同定と機能解析を目指した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組換え (Tg) カイコガを用いた性フェロモン情報を処理する神経回路の同定

Hr38 のプロモーターの制御下に GAL4 を発現する Tg カイコガを作成する。GAL4/UAS システム (図1) を利用することで、神経活動の起こった神経細胞だけに GFP を発現させる

ことが可能である。これを用いることで性フェロモン刺激に反応して *Hr38* を発現する神経細胞の投射パターンを可視化することが可能である。これにより、性フェロモン情報を処理する神経回路を、入力から出力に至るまで同定する。

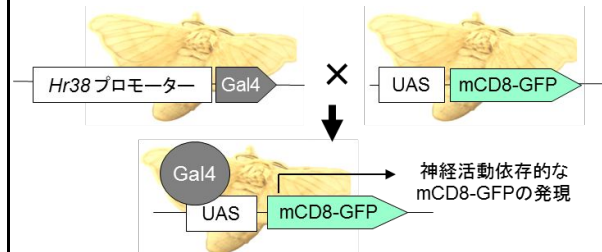


図1. GAL4/UAS システムを利用した活動依存的な神経回路の可視化

またカイコガの脳において性フェロモン依存的に *Hr38* を発現する神経細胞の位置を、連続切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションにより詳細に明らかにする。

両者の発現パターンを比較することで、Tg カイコガの脳において発現する GFP が *Hr38* の発現を正確に反映するものであるかを検討する。

(2) 性フェロモンに反応する神経細胞の機能的意義の解明

本研究者は、これまでに温度依存的に開口するイオンチャネルである *dTrpA1* を異所的に発現することの出来る Tg カイコガを確立してきた(論文投稿準備中)。この Tg カイコガを用いることで、*dTrpA1* を発現する細胞を 35 に温めることで神経活動を誘発することが可能である。*Hr38* のプロモーターの制御下に *dTrpA1* を発現する Tg カイコガを作製し、脳を局所的に温めて刺激することで、(1) で同定する神経回路の機能を明らかにする。

Shibire^{ts} や破傷風毒素軽鎖 (TeTxLC) のような神経伝達阻害を行うことの出来るタンパク質を異所的に発現することの出来る Tg カイコガを作成する。このようなシステムを利用することで、性フェロモンに反応した神経細胞や回路の機能的必要性を明らかにする。

3. ショウジョウバエの脳において性フェロモン情報を処理する神経回路の同定と解析

高度な遺伝学的手法を駆使することのショウジョウバエを用い、カイコガと同様のアプローチで性フェロモン情報処理を行う神経回路の同定と解析を行う。

まず *in situ* ハイブリダイゼーションによって、オスのショウジョウバエの脳において性フェロモン依存的に *Hr38* を発現する神経細胞の位置を詳細に明らかにする。

またこれらの細胞の活動が、本当にメスからの匂い刺激に対する反応であるかという

ことを、触角の除去・前足先端部（接触フェロモン検知器）除去・*Orco* 変異体（匂い感知が出来ない変異体）・*Or47b* 変異体（メス性フェロモン受容体の変異体）を用いて検討する。

Hr38 の発現パターンを正確に反映する GAL4 系統を作出し、神経活動依存的に GFP が発現するショウジョウバエ系統を作成する。この系統を用いて、メスの匂いに反応する神経細胞の形態や回路を明らかにする。

また との比較を行うことで、GAL4/UAS システムを介した発現検出の妥当性を検討する。

4. 研究成果

(1) 遺伝子組換え (Tg) カイコガを用いた性フェロモン情報を処理する神経回路の同定

Tg カイコガ作出のための機器類のセットアップを行い、*Hr38* の神経活動依存的な転写制御を行うゲノム領域の同定を試みた。まず RACE 法によって *Hr38* 転写開始点を決定した。

次に転写開始点から上流 2.6kb もしくは 5kb のゲノム断片に GAL4 を繋いだコンストラクトを導入したカイコガを作成したが、神経活動依存的な GAL4 発現は認められなかった。

そこでさらに広いゲノム領域が神経活動依存的な転写制御に関わる可能性を考え、第 1 イントロンを含む 18kb のゲノム領域（転写開始点上流 5kb 及び第 1 エクソンと第 1 イントロン 13kb を含むゲノム領域）を GAL4 の前に配置したコンストラクトを導入したカイコガを作成した。しかし残念ながら、この Tg 系統においても神経活動依存的な GAL4 の発現は認められなかった。

これらの結果から、遠位のゲノム領域からの制御が *Hr38* の神経活動依存的な転写制御に重要である可能性が考えられた。後述するようにショウジョウバエにおいても同様の結果が得られており、*Hr38* の発現制御が遠位のエンハンサーによってなされる機構は、他の昆虫においても保存されている可能性が高いと考えられた。

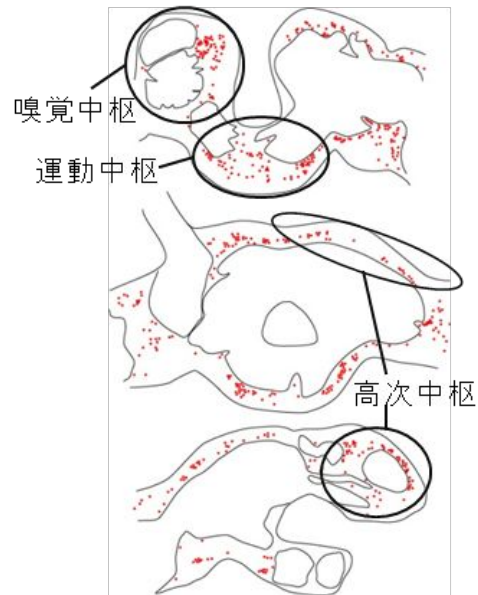
そこで別のアプローチとして、HR38 が転写活性化因子であることを利用し、HR38 の結合配列 (NBRE 配列) を利用した神経活動の検出法の構築を行った。神経活動依存的な HR38 の発現の検出に最適な NBRE 配列条件を検討するために、NBRE 配列をタンデムに繋いだものを GAL4 のプロモーターに配置し検討を行った。NBRE 繰り返し数が 5x, 15x, 25x, 35x の 4 パターンを検討したところ、15x が神経活動の検出に最適であり、実際に性フェロモン刺激依存的に GFP が脳で発現することを免疫染色法によって確認することが出来た。

包括的な神経回路の可視化には、感度・発現強度が未だ不十分であるため、現在、転写活性のより強い GAL4 (GAL4-VP16, GAL4-p65) を用いた系統を作出し、さらに有用な神経活

動依存的な神経回路の可視化法の確立にトライしている。

オスのカイコガの脳において性フェロモンに反応して *Hr38* が発現する細胞の分布を詳細に明らかにした (図 2)。これは昆虫の脳で異性の匂いに反応する細胞を包括的に同定した初めての例である。この結果は *Current Biology* 誌に出版した。

図2 カイコガの脳で性フェロモンに反応した細胞の分布



(2) 性フェロモンに反応する神経細胞の機能的意義の解明

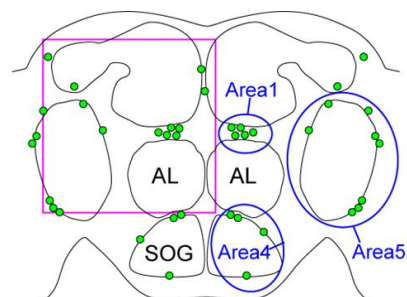
前述のように神経活動依存的に GAL4 が発現する系統の作製に予想以上の時間がかかってしまったため、性フェロモンに反応する神経細胞の活動操作を行うまでには至らなかった。

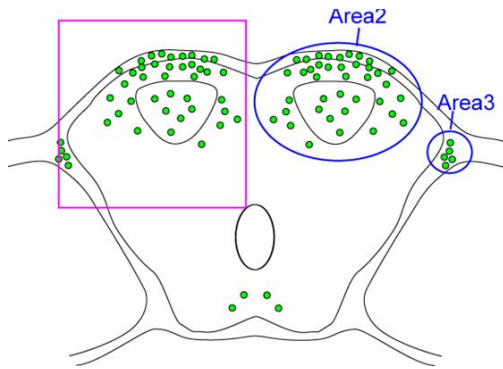
しかしこれまでに、dTrpA1 チャネルを触角の性フェロモン受容細胞に発現した個体では、温度熱刺激により性行動を制御できることや、TeTxLC を発現させることで性行動を阻害できることを確認しており、今後、神経回路の機能解析を行う下地を整えることは出来た。

3. ショウジョウバエの脳において性フェロモン情報を処理する神経回路の同定と解析

図 3 のように、メスの匂いに反応して活動する神経細胞の分布を明らかにした。

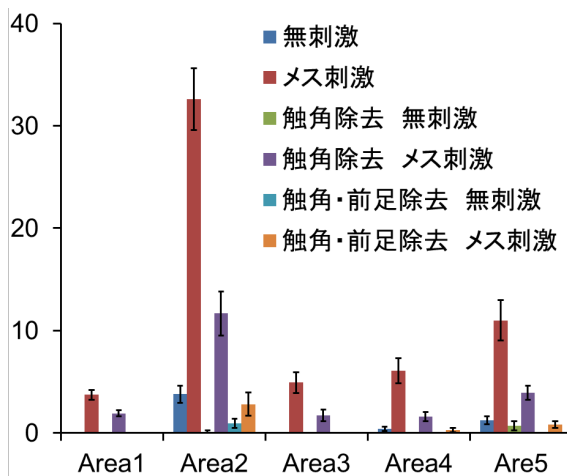
図3 オスのショウジョウバエ脳においてメスに反応した細胞の分布





これに加え、触角の除去・前足先端部除去・*Orco* 変異体・*Or47b* 変異体による解析を行った。その結果、触角の除去によって、メスに反応する細胞の数が半減し、触角と前足先端の除去を同時に行うと、ほぼ全ての反応細胞が消失することが観察された(図4)。この結果は、メスの検出が触角及び前足先端において行われており、触角を介した感覚情報の貢献度はおおよそ半分強であることを示している。

図4 . 各脳領域(図3にArea1~5と表示)において *Hr38* を発現する細胞数



また、*Orco* 変異体・*Or47b* 変異体においては、メス刺激に反応して *Hr38* を発現する細胞の数が野生型に比べて減少していること、さらに前足先端部を除去すると、*Hr38* 陽性細胞数はさらに減少するものの完全にはなくなることを見出した。

この結果は、嗅覚入力および性フェロモン受容体 (*Or47b*) を介した感覚入力メスの検知に重要であるが、嗅覚以外の感覚情報(前足先端部を介した接触フェロモンの検知)も大きく貢献することを示している。また触角と前足先端部の同時除去と異なり、メスに反応する *Hr38* 陽性細胞が残存することから、*Orco* 非依存の嗅覚情報 (iGluR タイプの受容体などを介すると予想される) もメスの検知に貢献していることが考えられた。

これらの結果も前述のカイコガで得られた結果と合わせて *Current Biology* 誌に出版

した。

Hr38 の神経活動依存的な転写制御を行うゲノム領域を同定する目的で、*Hr38* 周辺の30kb に渡るゲノム領域をスクリーニングしたが、神経活動依存的な発現制御を行っていると考えられるゲノム領域は同定できなかった。これはカイコガと同様に、遠位のエンハンサーによって、転写制御がなされているためではないかと考えられる。

そこで次に、カイコガと同様に NBRE を利用した神経活動依存的な *Hr38* の発現検出法の確立に取り組んだ。プロモーターに用いる NBRE の繰り返し回数を 5x, 10x, 15x, 25x, 30x, 35x とした 6 パターンを試し、10x が最も感度良く *Hr38* の発現をモニター出来ることを見出した。現在、NBRE システムを利用した神経回路の可視化法の構築を進めている。

また、*Hr38* の発現を正確にモニターできるショウジョウバエ系統の作出に取り組んだ。一つ目のアプローチとして *Hr38* 周辺に LacZ や GAL4 が挿入されているエンハンサーシステムのスクリーニングを行った。その結果、神経活動依存的に LacZ が発現する系統を同定することに成功した。ショウジョウバエの遺伝学的手法によって、この LacZ を GAL4 に変換した系統を作成し、神経活動依存的に GAL4 が発現するショウジョウバエ系統を作出することが出来た。現在、この系統を用いて、神経活動の起こった細胞を GFP で特異的に染色できる手法を確立しつつある。

二つ目のアプローチとして、*Hr38* を GAL4 に置き換えるノックイン系統の作出にも取り組んだ。これまでにターゲティングコンストラクトを作成し、系統の作出に取り組んできたが、正確にノックインの出来た系統を得ることは成功していない。上記のアプローチによって神経活動をモニターできる GAL4 系統が作出出来ているので、このアプローチによる系統作出は行わずとも良いと考えている。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

(1) Nozomi Fujita, Yuka Nagata, Takumi Nishiuchi, Makoto Sato, Masafumi Iwami, Taketoshi Kiya

Visualization of neural activity in insect brains using a conserved immediate early gene, *Hr38* *Current Biology*, 2013, 23(20):2063-70. 査読有 doi: 10.1016/j.cub.2013.08.051.

(2) Taketoshi Kiya, Atsushi Ugajin, Takekazu Kunieda and Takeo Kubo Identification of *kakusei*, a nuclear non-coding RNA, as an immediate early gene

from the honeybee, and its application for neuroethological study **International Journal of Molecular Sciences**, 2012, 13, 15496-15509. 査読有 doi: 10.3390/ijms131215496.

(3) Anuradha Roy, Sakiko Shimizu, **Taketoshi Kiya**, Kazuei Mita, and Masafumi Iwami

Identification of 20-hydroxyecdysone-inducible genes from larval brain of the silkworm, *Bombyx mori*, and their expression analysis

Zoological Science, 2012 May; 29(5):333-9. 査読有 doi: 10.2108/zsj.29.333.

(4) Atsushi Ugajin, **Taketoshi Kiya**, Takekazu Kunieda, Masato Ono, Tadaharu Yoshida, Takeo Kubo

Detection of Neural Activity in the Brains of Japanese Honeybee Workers during the Formation of a 'Hot Defensive Bee Ball' **PLoS ONE**, 2012; 7(3):e32902. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0032902.

〔学会発表〕(計 16 件)

(1) **木矢 剛智**、佐藤 優希、岩見 雅史
神経活動依存的に発現する遺伝子 *Hr38* を用いたショウジョウバエ脳においてメスに反応する神経細胞の検出. 第 36 回日本分子生物学会. 2013 年 12 月 3 日 ~ 2013 年 12 月 6 日. 神戸ポートアイランド.

(2) 山端 宏葵、金子 わかな、鎌田 千尋、岩見 雅史、**木矢 剛智**
ミツバチの脳においてエクジステロイド・シグナルは長期記憶の形成を促進する. 第 36 回日本分子生物学会. 2013 年 12 月 3 日 ~ 2013 年 12 月 6 日. 神戸ポートアイランド.

(3) 原 千穂、森下 広大、田口 周作、内野 恵郎、櫻井 健志、神崎 亮平、岩見 雅史、瀬筒 秀樹、**木矢 剛智**
新規な初期応答遺伝子 *Hr38* の活動依存的発現を利用した、カイコガの脳において性フェロモンに反応する神経回路の可視化法と機能解析法の開発. 第 36 回日本分子生物学会. 2013 年 12 月 3 日 ~ 2013 年 12 月 6 日. 神戸ポートアイランド.

(4) **木矢 剛智**、佐藤 優希、岩見 雅史
初期応答遺伝子 *Hr38* を用いたショウジョウバエ脳においてメスに反応する神経回路の同定. 第 84 回日本動物学会 2013 年 09 月 26 日 ~ 2013 年 09 月 29 日. 岡山大学津島キャンパス.

(5) 田口 周作、内野 恵郎、瀬筒 秀樹、岩見 雅史、**木矢 剛智**
遺伝子組み換えカイコガを用いた幼若ホル

モン生合成制御機構の解析. 第 84 回日本動物学会 2013 年 09 月 26 日 ~ 2013 年 09 月 29 日. 岡山大学津島キャンパス.

(6) 山端 宏葵、岩見 雅史、**木矢 剛智**
ミツバチの脳においてエクダイソン・シグナルは長期記憶の形成を促進する. 第 84 回日本動物学会 2013 年 09 月 26 日 ~ 2013 年 09 月 29 日. 岡山大学津島キャンパス.

(7) **Taketoshi Kiya**
Identification of *Hr38* as a conserved neural activity-induced gene in insect brains: its application as a marker for neural activity and implication for neural activity-dependent modification of ecdysone signaling in the brain. International Insect Hormone (19th Ecdysone) Workshop 2013. July 22-26, University of Minnesota Minneapolis, Minnesota, USA.

(8) **木矢 剛智**、佐藤 優希、岩見 雅史
新規な初期応答遺伝子 *Hr38* を用いたショウジョウバエ脳においてメスに反応する神経細胞の検出. Neuro2013. 2013 年 06 月 20 日 ~ 2013 年 06 月 23 日. 国立京都国際会館.

(9) 藤田 望、高島 美保、山端 宏葵、西内 巧、佐藤 純、岩見 雅史、**木矢 剛智**
昆虫で広く保存された新規な初期応答遺伝子 *Hr38* を用いた活動依存的な神経回路の可視化. 第 35 回日本分子生物学会. 2012 年 12 月 11 日 ~ 2012 年 12 月 14 日. 福岡国際会議場.

(10) Nozomi Fujita, Miho Takashima, Hiroki Yamahana, Takumi Nishiuchi, Makoto Sato, Masafumi Iwami, **Taketoshi Kiya**
Neural activity visualization in insect brains by a conserved immediate early gene, *Hr38*. JDRC10. 2012 年 10 月 13 日 ~ 2012 年 10 月 15 日. 東京慈恵医科大学.

(11) Yuki Sato, Masafumi Iwami, **Taketoshi Kiya**
Development of activity-dependent neural tracing methods in the brain of fruit fly, *Drosophila melanogaster*. JDRC10. 2012 年 10 月 13 日 ~ 2012 年 10 月 15 日. 東京慈恵医科大学.

(12) Tomoyo Ohmura, Shouma Sato, Masafumi Iwami, Takaomi Sakai, **Taketoshi Kiya**
Functional analysis of a novel immediate early gene, *Hr38*, in the long-term courtship memory in *Drosophila*. JDRC10. 2012 年 10 月 13 日 ~ 2012 年 10 月 15 日. 東京慈恵医科大学.

(13)木矢 剛智、藤田 望、高島 美保、山端 宏葵、西内 巧、佐藤 純、岩見 雅史
新規な神経活動依存的遺伝子 M8 は昆虫で広く保存された有用な神経活動マーカーである。第 35 回日本神経科学大会。2012 年 09 月 18 日～2012 年 09 月 21 日。名古屋国際会議場。

(14)木矢 剛智、櫻井 健志、内野 恵郎、神崎 亮平、岩見 雅史、瀬筒 秀樹
熱遺伝学的手法によるカイコガの神経活動および行動の操作。第 83 回日本動物学会 2012 年 09 月 13 日～2012 年 09 月 15 日。大阪大学。

(15)山端 宏葵、高島 美保、岩見 雅史、木矢 剛智
新規な初期応答遺伝子 M8 を用いたミツバチの脳でフェロモンに反応する神経細胞の検出。第 83 回日本動物学会。2012 年 09 月 13 日～2012 年 09 月 15 日。大阪大学。

(16)森下 広大、岩見 雅史、木矢 剛智
カイコガの性行動時の運動パターンを生成する神経基盤の解明。第 83 回日本動物学会 2012 年 09 月 13 日～2012 年 09 月 15 日。大阪大学。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kiya.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木矢 剛智 (KIYA TAKETOSHI)

金沢大学・理工研究域・自然システム学系・特任助教

研究者番号：90532309

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし