

研究報告書

「ショウジョウバエ脳において聴覚情報処理を行う神経基盤の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 4 月～平成 26 年 9 月

研究者: 上川内 あづさ

1. 研究のねらい

ブレインマシンインタフェースを実用化するには、脳が今、どういう情報をどのように処理してどういった結論を出しているのかを、なるべく高い解像度で外部から知る必要がある。例えば音認識においては、脳のどの領域が、どのように反応した時に、脳が音をどのように知覚しているかを読み解かなければならない。これにより、脳活動を外部から観測することで、脳が音をどのように理解しているのかを検出できるような解読装置の設計も可能になる。このような研究を進めるための優れたモデル系として、本研究はショウジョウバエの聴覚系に着目した。

多くの動物で、「音」は外界環境を知るための重要な感覚刺激である。聴覚系は、音情報を処理するシステムであり、物理的には単なる空気振動である「音」から、種に固有の意味を抽出する情報処理装置として捉えられる。この情報処理の様式を、システムを構成する素子である神経細胞群やそれらが連なった神経回路の活動様式として読み取ることを可能にするための基盤を整備することを、本研究のねらいとした。

動物の脳の内部にある聴覚神経回路は、雑多な空気振動の中から、有用な振動成分だけを選別してパターン抽出などの情報処理を行い、特定の意味を抽出している。よって、「脳が音をどう知覚しているか」を解読するためにはまず、音受容器から脳の高次処理領域に至る聴覚神経回路の全貌を単一細胞レベルで同定し、それぞれの神経回路で行われる情報処理を解明して情報の符号化様式の全体像を理解する必要がある。

ショウジョウバエは、脳の神経細胞数が片半球数万個と少なく、特定の細胞の機能だけを操作する分子遺伝学的手法が整備されている。また、羽音を使って同種間でコミュニケーションを行う。オスは、求愛時に、「求愛歌」と呼ばれる、種に固有の音パターンを持つ羽音を奏でてメスにアピールするのである。これらの特徴から、ショウジョウバエは、音情報処理システムを構成する聴覚神経回路の精密な構造機能相関地図を作成する為の理想的なモデル生物である。

本研究者はこれまで、このような実験上の利点を持つショウジョウバエに着目して、低次聴覚神経が形成する全神経回路の研究を進めてきた。これを発展させて、本研究では、低次から高次に至る聴覚神経の同定解析を行うことで、聴覚情報の符号化と情報処理様式を解明し、ショウジョウバエを用いた脳情報解読制御技術の実用化に向けた基盤を整備した。

2. 研究成果

(1) 概要

キイロショウジョウバエのオスが示す、求愛歌音刺激に依存した特徴的な行動(聴覚行動)は、脳内で実行される音情報処理の結果を反映した出力を評価するための優れた指標と

して使われてきた。実際、キイロショウジョウバエが示す聴覚行動を評価することで、聴覚システムの内部構造を推定することができる。しかしその解析は煩雑であり、大規模解析を阻む主要因であった。そこでまず私は、画像解析の手法を利用して自動的に定量するソフトウェアの開発を行った(Yoon et al, 2013)。ハエの身体を楕円近似し、長軸先端部の円形物を頭部として認識するようなアルゴリズムを作成し、複数個体間における相互作用を2個体間の身体と頭部との距離として判別できるようにした。これにより、体系的に作成したショウジョウバエ変異体の示す聴覚行動を効率的に解析できるようになった。これを用いて、キイロショウジョウバエ、ならびにその近縁種であるオナジショウジョウバエの聴覚行動を定量的に解析した。その結果、それぞれの種は固有の時間パターンを持つパルス音に対して特徴的な応答を示すことがわかった。

次に、高次聴覚神経回路の構造を解明するための第一段階として、ショウジョウバエの触角基部にある「耳」に内在する機能未知の感覚神経細胞サブグループの応答性の解明に取り組んだ。これまでに発見されている5種類のサブグループのうち、「細胞群 D」と呼ばれる神経細胞集団が、どのような刺激に応答するのかを、カルシウムイメージング法を用いて解析した。その結果、これらの感覚神経細胞は、音刺激によって引き起こされる受容器の振動に強く応答し、特に 200Hz 程度の中域周波数の振動に選択性を持つことがわかった。この応答性は、これまでに私が解明してきた、他の4種類のサブグループの応答性とは異なる特徴的な性質であり、ショウジョウバエの脳はこれら5種類のサブグループの応答様式の組み合わせとして、触角受容器の動き方を計算できることが示された(Matsuo, Yamada et al, 2014)。これは、ショウジョウバエが外界の環境を知覚する初期段階として、音刺激を含めた空気の振動や流れを、脳内部の5次元空間上に表現できる、ということの意味する。本発見により、これら細胞群の応答を解析することでショウジョウバエが感じているそれらの刺激の種類を解読できるようになった。

(2) 詳細

研究テーマ A 「聴覚行動解析の自動化ツールの開発と応用」

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) をはじめとしたショウジョウバエの多くの種類で、オスは「求愛歌」と呼ばれる羽音を使ってメスに求愛することが知られる。この求愛歌を構成する音は種に固有の周波数や時間パターンを持ち、特にパルス音の時間間隔が性的隔離の一端を担うと考えられている。これまでの研究から、同種の求愛歌を模したパルス音をオスの集団に聞かせると、互いに追いかけて合せて隊列を形成することがわかっている。この隊列形成は、特定の音に反応した定型的な応答行動であり、それぞれのショウジョウバエ内部で実行された音の知覚および評価を反映した行動出力として捉えることができる。よって、入力と行動出力との相関関係、ならびにシステム内部に摂動を与えた場合の影響を詳細解析することで、システムの内部構造を推定できると予想される。

そこで本研究ではまず、キイロショウジョウバエが示す聴覚行動を自動で解析するツールの作成に取り組んだ。従来使われている方法は、動画を目視で観察し、隊列に参加しているショウジョウバエ個体の数を手で数える、というものであった。これは動画一つを解析するのに4時間かかる、といった非常に煩雑な方法であり、大規模解析には不向きであった。本研究では、隊列を形成する個体の数を画像認識手法により自動解析するアルゴリズム「ChaiN」

を作成した。このアルゴリズムは主に、(1)動画をフレームに分割し、各画像におけるショウジョウバエの位置と頭の向きを画像解析により決定、(2)各個体の頭部を中心とした「隊列範囲」を定義し、他個体の身体がその範囲に含まれるかを決定、(3)各フレームの隊列参加個体数を csv ファイルに出力、という3段階の過程から構成される。Chain を用いて聴覚行動を解析した結果、目視での解析とほぼ同じ結果が得られ、その有効性が確認された。

次に、パルス音刺激から聴覚行動出力までの情報処理の特性を調べるため、キイロショウジョウバエ、及びオナジショウジョウバエ (*Drosophila simulans*) を用いた聴覚行動解析を行った。これらは近縁種であり、それぞれ求愛歌に含まれるパルス音の平均パルス間隔が 35 ミリ秒、55 ミリ秒であることが知られている。これらを含む様々な時間パターンで作成した人工パルス音を刺激として用いてオスの隊列行動を計測し、Chain ソフトウェアで定量解析した。その結果、キイロショウジョウバエは種に固有の時間パターンを含む音に選択的に応答行動を示したのに対して、オナジショウジョウバエの選択性は低く、多様なパルス音に応答することがわかった。キイロショウジョウバエの聴覚系には、特定のパルス間隔の音刺激を選別するバンドパスフィルターが内蔵されていると考えられる。なお、Chain ソフトウェアは以下のサイトからダウンロード可能である (<http://jfly.iam.u-tokyo.ac.jp/chain/>)。

研究テーマ B 「新たな聴覚細胞群の同定と特性解析」

ショウジョウバエは、触角にある感覚器で音を受け取ることが知られている。この触角感覚器はショウジョウバエの「耳」とも呼ばれ、音の他にも、重力や風の情報を受け取ることがわかっている。触角感覚器の内部には5種類の感覚神経細胞群が存在し、細胞群 A, B は音を、細胞群 C, E は重力と風の刺激に選択的に応答し、情報を脳に伝えることがわかっている (Kamikouchi et al, 2009; Yorozu et al, 2009)。しかし残る細胞群 D については、細胞数が少なく解析が困難、という理由により、その応答特性は不明なままであった。

そこで私は、ショウジョウバエにおいて高次聴覚神経回路の構造を解明するための第一段階として、ショウジョウバエの触角基部にある「耳」に内在する、この機能未知の細胞群 D の応答性の解明に取り組んだ。細胞群 D を選択的に標識するショウジョウバエシステムを利用して、カルシウム濃度に応じて蛍光強度が変化する GCaMP3 (Tian et al, 2009) を細胞群 D に発現させ、脳内部に投射する軸索部分から応答性を計測する、という実験系を独自に構築した。刺激については、触角感覚器を自在に動かすため、静電気をを用いた触角駆動法 (Albert et al, 2007) を応用した。その結果、細胞群 D は音刺激を模した触角受容器の振動に対しては強く応答するが、重力や風の刺激を模した触角受容器の持続的な位置変化へはあまり応答しないことがわかった。次に振動応答性を詳細に解析したところ、ショウジョウバエの求愛歌や羽音の主成分である 100 Hz から 200 Hz あたりの振動に応答性のピークを持つことがわかった。同様に振動応答細胞である細胞群 A, B はそれぞれ、100 Hz 未満の振動、100 Hz 以上の振動に強く応答することがわかっている。また、持続的な位置変化に応答する細胞群 C, E はそれぞれ前方への変位、後方への変位の受容を担う。よって、細胞群 D は、他の4種類の細胞群の応答性とは異なる特徴的な応答性を持ち、ショウジョウバエの脳はこれら5種類の細胞群の応答様式の組み合わせとして、触角受容器の動き方を計算できることが示された (Matsuo, Yamada et al, 2014)。このことは、ショウジョウバエが外界の環境を知覚する初期段階として、音刺激を含めた空気の振動や流れを、脳内部の5次元空間上に表現できる、という

ことを意味している。本研究の成果により、これらの細胞群の応答を解析することで、音の高さや重力や風の向きなど、ショウジョウバエが感じているこれら刺激の種類を解読できるようになった。

3. 今後の展開

本研究の成果により、ショウジョウバエがどのような周波数域の音を受容しているのかが、脳内部の神経活動を測定することにより解読可能になった。また、聴覚行動解析の結果から、ショウジョウバエの脳内では、特定のパルス間隔の音刺激を選別するバンドパスフィルターが内蔵されていることが推測された。そこで今後は、ショウジョウバエが受容した音のパラメータ、特にショウジョウバエにとって重要な意味を持つパルス間隔をどのように知覚して評価しているのか、その神経回路基盤の解明を進める。これまでに同定した高次聴覚神経細胞群が形成する神経回路が、その基盤を担うと予想される。よって、それら細胞群の応答特性や神経回路機能の解明を進めることで脳が音を評価する情報処理機構を理解し、外部からの応答性測定により解読できるようにする。

4. 評価

(1) 自己評価 (研究者)

本研究では、音の情報が、神経細胞群やそれらが構成する神経回路の活動様式としてどのように脳内表現されているのかを解明することを目指した。そのための第一段階として、研究テーマ A では、音の受容器から脳に至る神経経路を形成する一次神経細胞として機能する感覚細胞のうち、性質が不明であった細胞群 D の応答特性を解明した。その結果、細胞群 D はこれまでに解析されている他の細胞群 A, B, C, E と異なり、ショウジョウバエの求愛歌や羽音の主成分である 100 Hz から 200 Hz あたりの振動に応答性のピークを持つことを発見した。これにより、これまでに本研究者が発見している、他の4種類の細胞群の応答特性と合わせて、ショウジョウバエは、音刺激を含めた空気の振動や流れ、といった外界からの刺激を脳内部の5次元空間上に神経活動地図として表現できる、ということを示すことができた。またこの発見により、全聴感覚細胞の応答特性が明らかになった。これを足がかりとして、各細胞群の下流の神経回路の解析も順調に進んでおり、音情報処理の動作原理の理解につながる結果だと評価している。また、研究テーマ B では、音情報処理システムの内部構造を推定するために行動実験を利用する、という発想の元、聴覚行動を解析する自動化ツール作成を検討した。その結果、これまで膨大な時間がかかっていた手動解析と同精度の結果を自動算出できるソフトウェア Chain の作成に成功し、公開した。ショウジョウバエを用いた聴覚システムの神経行動学的研究は今後ますます発展する分野であり、多くの研究者がこのソフトウェアを利用することが期待できる。このソフトウェアを利用した体系的な聴覚行動解析の結果、ショウジョウバエの脳内では、特定のパルス間隔の音刺激を選別するバンドパスフィルターが内蔵されていることが推測できた。求愛歌の種特異的な認識に重要だと予想されるこのような特性を持つフィルターが、どのような神経回路として実装されているのかの解明は、音コミュニケーションの成立原理を理解するためには欠かせない。本研究により得られた成果は、今後の研究を進めるための重要な足がかりになると期待できる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

研究進捗状況は良好であり、研究目標は達成された。BMIを用いた身体システムを実用化するためには脳活動の解読装置の適切な設計が必須であるが、その理解のためには人や霊長類での複雑なシステムでの解析とともに、昆虫など、複雑な行動を比較的少数の神経細胞で行うスモールシステムの研究も有用な情報を与える。本研究では、スモールシステムの利点を生かした研究として、ショウジョウバエの脳情報解読を解明する目的で、聴覚情報処理システムを構成する神経回路の網羅的解析を進めた。ショウジョウバエは、同種間でのコミュニケーションに羽音を使うことが知られており、脳の神経細胞数が片半球で数万個と少なく、特定の細胞の機能だけを操作する分子遺伝学的手法が整備されており、音情報処理システムを構成する聴覚神経回路の精密な構造機能相関地図を作成する為の理想的なモデル生物である。分子遺伝学を駆使した神経解剖学的解析およびその機能を解明するカルシウムイメージングの結果、脳内部での聴覚神経細胞群の投射様式と応答特性の体系的な解明に成功した。特に、これまで機能不明であった細胞群 D が、これまでに解析されている他の細胞群 A, B, C, E と異なり、ショウジョウバエの求愛歌や羽音の主成分である 100 Hz から 200 Hz あたりの振動に応答性のピークを持つことを発見した。5 つの細胞群の全貌が明らかになったことにより、外界の空気の振動や流れが、ハエ脳内部の5群の細胞応答様式に対応して、5次元空間の神経活動地図上に表現されることを示した。さらに聴覚行動を画像解析により自動定量するアルゴリズムを開発し、大量のデータ処理を可能とし、これを用いて 2 種のショウジョウバエの機能解析を行い、特有の時間パターンを持つパルス音に対して種固有の特徴的な応答を示すことを見出した。さらに、高次聴覚神経回路の機能構造を解明するため、触角基部にある「耳」に内在する感覚神経細胞サブグループの応答性を、カルシウムイメージング法を用いて解析した。この結果からショウジョウバエの脳内では、特定のパルス間隔の音刺激を選別するバンドパスフィルターが内蔵されると考えられる。この機能は求愛歌の種特異的な認識に重要であり、その神経回路構成の解明は、音コミュニケーションの成立原理を理解するためには欠かせない。以上の結果は、形態学的マッピングに機能面の拡充を行い、音受容器から脳の高次処理領域に至る聴覚神経回路の全貌を単一細胞レベルで同定し、これらの構成する神経回路での情報符号化様式の全体像を理解することに歩を進めたものと考えられる。

本研究成果により、平成 24 年度日本神経科学学会奨励賞を受賞し、新学術領域「記憶ダイナミズム」の計画班員に採択されている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Matsuo E, Yamada D, Ishikawa Y, Asai T, Ishimoto H, Kamikouchi A. Identification of novel vibration- and deflection-sensitive neuronal subgroups in Johnston's organ of the fruit fly. **Frontiers in Physiology**. 2014. 5:179. doi: 10.3389/fphys.2014.0017.
2. Yoon J, Matsuo E, Yamada D, Mizuno H, Morimoto T, Miyakawa H, Kinoshita S, Ishimoto H, Kamikouchi A. Selectivity and plasticity in a sound-evoked male-male interaction in *Drosophila*. **PLoS ONE**. 2013. 8(9): e74289, 2013

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 総説

- 1) 上川内あづさ 「ショウジョウバエの音響交信を支える神経基盤 — 求愛歌を受容する聴覚系のしくみ —」. **生物科学**, 2013. 65, **95-101**.
- 2) Kamikouchi A. Auditory neuroscience in fruit flies. **Neuroscience Research**. 2013. 76:113-118.
- 3) Matsuo E, Kamikouchi A. Neuronal encoding of sound, gravity, and wind in the fruit fly. **J Comp Physiol A**. 2013. 199:253-262.
- 4) 松尾恵倫子, 上川内あづさ 「ショウジョウバエの「耳」を起点とする機械感覚情報処理システム」 **細胞工学** 2013. 32:454-460.
- 5) 上川内あづさ 「分子遺伝学で探るショウジョウバエの聴覚と重力感覚の神経回路」 **生化学** 2011. 83:399-402.
- 6) 上川内あづさ, 伊藤啓 「聴覚神経系のシステムニューロバイオロジー: 遺伝子発現誘導系を駆使した新たな研究戦略 Systems neurobiology for auditory systems: a new strategy using a gene-expression induction system」 **実験医学** 2011. 29:538-543.

2. 著書

- 1) 松尾恵倫子, 石元広志, 上川内あづさ 「音への応答行動を測る 求愛歌は効果あり? ショウジョウバエの聴覚テスト: オスの求愛行動を利用した実験」「重力への応答行動を測る ショウジョウバエは上に逃げる? ショウジョウバエを使った反重力走性の測定: 上方向に移動する割合を決定する」 In: **研究者が教える動物実験** (日本比較生理生化学会編) In press.
- 2) 上川内あづさ 「2章: 無脊椎動物の研究対象 - その1 - 線虫」「3章: 無脊椎動物の研究対象 - その2 - ショウジョウバエ」 In: **新・生命科学シリーズ 動物行動の分子生物学**(久保健雄 編) 裳華房, 2014.
- 3) Kamikouchi A, Fiala A. Monitoring neural activity with genetically-encoded Ca²⁺ indicators. In: **Methods in Neuroethological Research** (Eds: Ogawa H, Oka K.) Springer Japan, 2013.

3. 国際会議招待講演

- 1) Kamikouchi A. Anatomical and Functional Organization of the *Drosophila* Auditory System. International Symposium on Organization and Function of the Nervous System. Tokyo, Nov 27. 2012.
- 2) Kamikouchi A. The auditory system of fruit flies. 4th International Symposium on Photonic Bioimaging. Sapporo, Sep. 17. 2012
- 3) Kamikouchi A. Neuroanatomy of the *Drosophila* auditory system. Janelia Farm Workshop: The Neurobiology and Evolution of Insect Acoustic Communication, Janelia Farm, USA. May 14th-16th. 2012.
- 4) Kamikouchi A, Seki H, Mizuno H, Miyakawa H, Ito K, Morimoto T. The auditory map in the fly brain. Gender Equality Committee symposium: Trends in Neuroscience (S2-J-1-2) **Neuroscience2011**, Yokohama, Sep 14. 2011.
- 5) Kamikouchi A, Seki H, Mizuno H, Miyakawa H, Ito K, Morimoto T. The gravity- and sound-sensing systems in the fruit fly. Comparative mechanobiology from monad to human S32-3. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, Nagoya, Jun 3. 2011.

4. 受賞
2012年 平成24年度日本神経科学学会奨励賞