神経系の動作原理を明らかにするためのシステム分子行動学

Systems molecular ethology to understand the operating principle of the nervous system

平成 20 年度～平成 24 年度
科学研究費助成事業（科学研究費補助金）
新学術領域研究（研究領域提案型）
研究成果報告書

領域略称名「分子行動学」
領域番号（ 3004 ）

平成 25 年 7月

領域代表者
東京大学大学院理学系研究科
教授・飯野雄一

目　次

1　はしがき ····· 1

2　領域全体の概要 ····· 5
2.1　研究組織 ····· 7
2.2　交付決定額 ····· 10
2.3　研究発表 ····· 10
2.3.1 雑誌論文
2.3.2 学会発表
2.3.3 図書
2.4　研究成果による産業財産権の出願・取得状況 ····· 58
2.5　報道記事 ····· 59
2.6　研究成果の概要 ····· 66
2.6.1 研究領域の設定目的
2.6.2 主な成果
2.6.2.1 神経回路の構築の機構
2.6.2.2 感覚情報処理の機構
2.6.2.3 学習・記憶の機構
2.6.2.4 運動制御の機構
2.6.2.5 動物行動の統合・制御の機構
2.6.2.6 個体間相互作用に関わる行動制御
2.6.2.7 イメージング技術の開発
2.6.2.8 神経回路操作技術の開発
2.6.2.9 光学プローブの開発、改良
2.6.2.10 数理、モデリング
2.6.2.11 応用
2.6.3 まとめ
2.7　総括班の活動 ····· 76
2.7.1 班会議、ワークショップ
2.7.2 支援活動
2.7.3 アウトリーチ
2.7.4 若手派遣
2.8　総括班評価者による評価 ····· 82

3　個別研究成果報告
3.1　計画研究
化学走性行動と連合学習の分子神経機構の解明
東京大学大学院理学系研究科　飯野 雄一 ····· 85
神経回路における感覚情報処理の制御機構の解明
九州大学大学院理学研究院　石原 健 ····· 89
複数感覚入力に対する行動選択の神経回路
岩手大学工学部　新貝 鉚蔵 ····· 93
ショウジョウバエの記憶形成回路の構造および機能発現の分子基盤
東京大学分子細胞生物学研究所　多羽田 哲也 ····· 97
学習記憶とその障害の遺伝子経路解明と動態解析
公益財団法人東京都医学総合研究所　齊藤 実 ····· 100
ゼブラフィッシュを用いた、脊椎動物脊髄運動系神経回路の動作原理の解明
自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター　東島 眞一 ····· 104
モデル小動物イメージングのための新しい遺伝子コード型プローブの開発
東京大学大学院総合文化研究科　佐藤 守俊 ····· 108
移動運動と学習記憶の確率モデルによる数理解析
東京大学大学院情報理工学系研究科　増田 直紀 ····· 112
生物行動のシステム工学的解釈とバイオミメティック・センサ・システムの提案
広島大学大学院工学研究院　辻 敏夫 ····· 116

3.2　公募研究

ソングバードを用いた時空間制御を与える遺伝子発現系の開発と行動実験への応用
北海道大学大学院理学研究院　和多 和宏 …… 120
ショウジョウバエ求愛行動をモデルとした行動進化の神経基盤の解明
東北大学大学院生命科学研究科　小金澤 雅之 …… 122
神経活動評価のための顕微鏡オートフォーカスと蛍光画像解析
東北大学・情報科学研究科　橋本 浩一 …… 126
ショウジョウバエをモデルとする報酬記憶の分子行動学
筑波大学生命環境科学研究科　古久保 - 徳永 克男 …… 128
ゼブラフィッシュの覚醒・睡眠の分子機構に関する研究
埼玉大学 脳科学融合研究センター　中井 淳一 …… 130
線虫の出力系回路における神経活動の可視化と解析
埼玉大学研究機構脳科学融合研究センター　安藤 恵子 …… 134
C.elegans における CREB 依存的なアセチルコリンシグナル制御の解析
東京大学大学院総合文化研究科　周防 諭 …… 137
ミツバチの視覚情報処理を支える脳のモジュール構造の分子的構築の解析
東京大学大学院理学系研究科　久保 健雄 …… 140
感覚神経 MAPK 制御のリアルタイムな可視化による線虫の環境応答行動の研究
東京大学医科学研究所　冨田 太一郎 …… 143
ショウジョウバエの脳から胸腹部神経節へ投射する行動制御神経のシステム解析
東京大学・分子細胞生物学研究所　伊藤 啓 …… 146
線虫の神経回路の光操作から探る感覚と記憶に関わる神経の暗号
甲南大学理工学部　久原 篤 …… 149
霊長類における神経路選択的な機能分子制御技術の開発
京都大学霊長類研究所　井上 謙一 …… 152
記憶情報の読み出し制御を担う神経回路の同定と解析
京都大学 白眉センター　松尾 直毅 …… 155
ショウジョウバエ求愛行動を環境適応的に制御する嗅覚系神経分子機構
京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニット　江島 亜樹 …… 157
線虫 C.elegans の匂い応答行動を制御する神経ネットワークの統合的機能解析
大阪大学大学院理学研究科　木村 幸太郎 …… 159
細胞膜電位の時空間制御と同時計測
大阪大学大学院医学系研究科　筒井 秀和 …… 161
生得的および経験的な食嗜好の形成・個体行動・神経・分子の視点から
神戸大学大学院理学系研究科　尾崎 まみこ …… 163
ショウジョウバエの摂食行動における意志決定の行動遺伝学的解析
九州大学大学院理学研究院　谷村 禎一 …… 164
ゼブラフィッシュ摘出脳脊髄標本を利用した眼球運動とロコモーションの統合機構の解明
熊本大学教育学部　齋藤 和也 …… 166
行動・イメージング解析による長期記憶プロセスの分子・細胞基盤の解明
首都大学東京理工学研究科　坂井 貴臣 …… 169
摂食行動を創出する新規分子と神経回路の解明
自治医科大学医学部　矢田 俊彦 …… 172
記憶想起の分子制御基盤解明と記憶想起障害を示すモデルマウス開発の試み
東京農業大学・応用生物科学部　喜田 聡 …… 174
聴覚情報処理を担う機能モジュールの体系的な同定と解析
名古屋大学大学院理学研究科　上川内 あづさ …… 177
嫌悪刺激回避行動の学習機構
関西医科大学・医学部　中村 加枝 …… 181
野生型および変異マウスにおけるバレル回路形成素過程の解析
国立遺伝学研究所 形質遺伝研究部門　岩里 琢治 …… 183
ロコモーション発達過程におけるグリシン作動性シナプスの形成
国立遺伝学研究所新分野創造センター　平田 普三 …… 187

後脳を介した感覚運動制御系の構築メカニズムの解明
国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系　浅川 和秀 ····· 190
遺伝子改変マウスの神経活動を覚醒下で記録し、大脳基底核の運動制御機構を解明する
生理学研究所・統合生理研究系　知見 聡美 ····· 193
先天的な「冷たい恐怖」と後天的な「温かい恐怖」を制御する神経メカニズムの解明
(公財)大阪バイオサイエンス研究所・神経機能学部門　小早川 高 ····· 196
ゼブラフィッシュ嗅覚行動を司る神経回路メカニズムの分子遺伝学的解明
理化学研究所 脳科学総合研究センター　吉原 良浩 ····· 200
ゼブラフィッシュの手綱核による恐怖行動制御
理化学研究所・発生遺伝子制御研究チーム　岡本 仁 ····· 204
レム睡眠における大脳賦活化の意義とメカニズム
理化学研究所脳科学総合研究センター　林 悠 ····· 206
シナプス接続とシナプス小胞放出の可視化による機能的神経回路網の解明
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門　戸井 基道 ··· 208
モデル生物の行動を制御する未知の神経ペプチド探索と機能解析
久留米大学分子生命科学研究所遺伝情報研究部門　児島 将康 ····· 211

1　はしがき

1　はしがき

本報告書は、平成 20 年度‐24 年度に実施された文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「神経系の動作原理を明らかにするためのシステム分子行動学」(略称:分子行動学)の研究成果をまとめたものである。神経系は生命体が進化の過程で作り上げてきた高度に分化発達した情報処理系であり、分子生物学、細胞生物学、生理学、生物物理学などさまざまな研究分野の基本的な課題が凝集された魅力的な研究対象である。そのような難しい研究対象であるが、簡単な生物あるいは単純化された実験系を用いて基本的な原理を抽出するアプローチは、他の生命現象と同様多くの利点を持ち、そのような研究からすでに多くの知見が得られている。しかしながら、研究体制としてはこれまでまとまったものがなく、領域のより集約的な推進が求められていた。そこで、本領域はそのようなアプローチを進める研究を中心に組織し、いわゆるモデル生物、モデル系を用いた精緻な研究を大きく推進することを目指した。さらには、このようなモデル系に期待される使命のひとつとも言える、イメージング技術や数理解析、工学的アプローチなど、新たな境界領域を積極的に開拓し取り込むことを目指した。本領域は計画研究 9 件（平成 20 年度～）および公募研究 22 件（平成 21 年度～)、23 件（平成 23 年度～）よりなり、総括班にはイメージング支援班と数理支援班を設け、領域全体にわたるメンバーの協力により個々の研究を支援し効率化する体制を作るとともに、ワークショップ等を開催して情報交換の機会を作ることに努めた。これらの研究環境の構築により、領域内では極めて活発な議論と共同研究が生まれ、分子イメージングや行動のトラッキング測定、行動の数理解析などについて異なる分野の技術協力が新たな研究の潮流を生み出し、多くの研究成果に結びついたと考えている。

本研究領域の活発な推進にご尽力頂いた班員および総括班員、有形無形のご助力とご評価を頂いた関係分野の諸先生方に、この場を借りて深い感謝の意を表させて頂きたい。

平成 25 年 7 月　領域代表　飯野雄一

2　領域全体の概要

2.1 研究組織（総括班、計画研究、公募研究）

総括班

役 割	氏 名	所 属
領域代表 領域総括・領域事務	飯野　雄一	東京大学大学院理学系研究科・教授
支援班長 イメージング支援	石原　健	九州大学大学院理学研究院・教授
研究連絡担当 数理支援	新貝　鉚蔵	岩手大学工学部・教授
広報担当	多羽田　哲也	東京大学分子細胞生物学研究所・教授
領域推進方法の策定	齊藤　実	公益財団法人東京都医学総合研究所・参事研究員
領域推進方法の策定	東島　眞一	自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター・准教授
イメージング支援	佐藤　守俊	東京大学大学院総合文化研究科・准教授
数理支援	増田　直紀	東京大学大学院情報理工学研究科・准教授
領域推進方法の策定	辻　敏夫	広島大学大学院工学研究院・教授
イメージング支援	永井　健治	大阪大学産業科学研究所・教授
評価委員	森　憲作	東京大学大学院医学系研究科・教授
評価委員	合原　一幸	東京大学生産技術研究所・教授
評価委員	森　郁恵	名古屋大学大学院理学研究科・教授
評価委員	宮脇　敦史	理化学研究所脳科学総合研究センター・チームリーダー
評価委員	桂　勲	国立遺伝学研究所・所長

計画研究

研究代表者	所属	研究課題名
飯野　雄一	東京大学大学院理学系研究科	化学走性行動と連合学習の分子神経機構の解明
石原　健	九州大学大学院理学研究院	神経回路における感覚情報処理の制御機構の解明
新貝　鉚蔵	岩手大学工学部	複数感覚入力に対する行動選択の神経回路
多羽田　哲也	東京大学分子細胞生物学研究所	ショウジョウバエの記憶形成回路の構造および機能発現の分子基盤
齊藤　実	公益財団法人東京都医学総合研究所	学習記憶とその障害の遺伝子経路解明と動態解析
東島　眞一	自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター	ゼブラフィッシュを用いた、脊椎動物脊髄運動系神経回路の動作原理の解明
佐藤　守俊	東京大学大学院総合文化研究科	モデル小動物イメージングのための新しい遺伝子コード型プローブの開発
増田　直紀	東京大学大学院情報理工学系研究科	移動運動と学習記憶の確率モデルによる数理解析
辻　敏夫	広島大学大学院工学研究院	生物行動のシステム工学的解釈とバイオミメティック・センサ・システムの提案

公募研究
平成 21 年度～22 年度

研究代表者	所 属	課題名
和多 和宏	北海道大学大学院理学研究院	ソングバードを用いた時空間制御を与える遺伝子発現系の開発と行動実験への応用
橋本 浩一	東北大学・情報科学研究科	運動する生物のロバスト追跡と蛍光画像解析
古久保 － 徳永 克男	筑波大学生命環境科学研究科	ショウジョウバエをモデルとする報酬記憶の分子行動学
中井 淳一	埼玉大学脳科学融合研究センター	ゼブラフィッシュの覚醒・睡眠の分子機構に関する研究
小早川 高	(公財)大阪バイオサイエンス研究所 神経機能学部門	哺乳類の匂いに対する多様な情動を制御する神経回路の解明
久保 健雄	東京大学大学院理学系研究科	ミツバチの視覚情報処理を支える脳のモジュール構造の分子的構築の解析
冨田 太一郎	東京大学医科学研究所	MAPKリン酸化シグナルのイメージングによる線虫の環境応答行動の研究
伊藤 啓	東京大学・分子細胞生物学研究所	ショウジョウバエの脳から胸腹部神経節へ投射する行動制御神経のシステム解析
木村 幸太郎	大阪大学大学院理学研究科	線虫*C. elegans*行動制御・解析システムの開発
筒井 秀和	大阪大学大学院医学系研究科	膜電位の高精細in vivoマッピングに向けた基盤技術開発
尾崎 まみこ	神戸大学大学院理学系研究科	生得的および経験的な食嗜好の形成・個体行動・神経・分子の視点から
谷村 禎一	九州大学大学院理学研究院	ショウジョウバエのアミノ酸味覚受容と摂食行動可塑性の行動分子遺伝学
齋藤 和也	熊本大学教育学部	ゼブラフィッシュ摘出脳脊髄標本を利用した眼球運動とロコモーションの統合機構の解明
坂井 貴臣	首都大学東京理工学研究科	ショウジョウバエの長期記憶にかかわる脳内経路と動作原理の解明
上川内あづさ	東京薬科大学・生命科学部	ショウジョウバエの聴覚行動を制御する神経回路基盤の解明
松尾 直毅	京都大学 白眉センター	記憶の形成と想起に関与する神経回路の可視化と解析
中村 加枝	関西医科大学・医学部	快と不快による行動決定の学習機構
児島将康(*2)	久留米大学	モデル生物の行動を制御する未知の神経ペプチド探索と機能解析
岩里 琢治(*1)	国立遺伝学研究所 形質遺伝研究部門	野生型および変異マウスにおけるバレル回路形成素過程の解析
吉原 良浩	理化学研究所 脳科学総合研究センター	「好き・嫌い・記憶」を制御するゼブラフィッシュ嗅覚神経系のシステム分子行動学
岡本 仁	理化学研究所 発生遺伝子制御研究チーム	ゼブラフィッシュの手綱核による恐怖行動制御
戸井 基道	独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門	シナプス接続とシナプス小胞放出の可視化による機能的神経回路網の解明

(*1) 平成 22 年 6 月 22 日付けで辞退
(*2) 平成 22 年 8 月 30 日付けで辞退

公募研究
平成 23 年度～24 年度

研究代表者	所 属	課題名
和多 和宏	北海道大学大学院理学研究院	ソングバードを用いた時空間制御を与える遺伝子発現系の開発と行動実験への応用
小金澤 雅之	東北大学大学院生命科学研究科	ショウジョウバエ求愛行動をモデルとした行動進化の神経基盤の解明
橋本 浩一	東北大学・情報科学研究科	神経活動評価のための顕微鏡オートフォーカスと蛍光画像解析
安藤 恵子	埼玉大学研究機構脳科学融合研究センター	線虫の出力系回路における神経活動の可視化と解析
周防 諭	東京大学大学院総合文化研究科	*C. elegans*におけるCREB依存的なアセチルコリンシグナル制御の解析
冨田 太一郎	東京大学医科学研究所	感覚神経MAPK制御のリアルタイムな可視化による線虫の環境応答行動の研究
久原 篤	甲南大学理工学部	線虫の神経回路の光操作から探る感覚と記憶に関わる神経の暗号
井上 謙一	京都大学霊長類研究所	霊長類における神経路選択的な機能分子制御技術の開発
松尾 直毅	京都大学 白眉センター	記憶情報の読み出し制御を担う神経回路の同定と解析
江島 亜樹	京都大学 生命科学系キャリアパス形成ユニット	ショウジョウバエ求愛行動を環境適応的に制御する嗅覚系神経分子機構
木村 幸太郎	大阪大学大学院理学研究科	線虫*C. elegans*の匂い応答行動を制御する神経ネットワークの統合的機能解析
筒井 秀和	大阪大学大学院医学系研究科	細胞膜電位の時空間制御と同時計測
谷村 禎一	九州大学大学院理学研究院	ショウジョウバエの摂食行動における意志決定の行動遺伝学的解析
坂井 貴臣	首都大学東京理工学研究科	行動・イメージング解析による長期記憶プロセスの分子・細胞基盤の解明
矢田 俊彦	自治医科大学医学部	摂食行動を創出する新規分子と神経回路の解明
喜田 聡(*3)	東京農業大学・応用生物科学部	記憶想起の分子制御基盤解明と記憶想起障害を示すモデルマウス開発の試み
上川内あづさ	名古屋大学大学院理学研究科	聴覚情報処理を担う機能モジュールの体系的な同定と解析
中村 加枝	関西医科大学・医学部	嫌悪刺激回避行動の学習機構
平田 普三	国立遺伝学研究所新分野創造センター	ロコモーション発達過程におけるグリシン作動性シナプスの形成
浅川 和秀	国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系	後脳を介した感覚運動制御系の構築メカニズムの解明
知見 聡美	生理学研究所・統合生理研究系	遺伝子改変マウスの神経活動を覚醒下で記録し、大脳基底核の運動制御機構を解明する
小早川 高	(公財)大阪バイオサイエンス研究所 神経機能学部門	先天的な「冷たい恐怖」と後天的な「温かい恐怖」を制御する神経メカニズムの解明
吉原 良浩	理化学研究所 脳科学総合研究センター	ゼブラフィッシュ嗅覚行動を司る神経回路メカニズムの分子遺伝学的解明
林 悠	理化学研究所 脳科学総合研究センター	レム睡眠における大脳賦活化の意義とメカニズム

(*3) 平成 24 年 6 月 28 日付けで辞退

2.2 交付決定額(配分額)

（千円）

		平成 20 年度	平成 21 年度	平成 22 年度	平成 23 年度	平成 24 年度	合計
総括班	直接経費	67,600	11,500	20,000	15,500	11,500	126,100
	間接経費	20,280	3,450	6,000	4,650	3,450	37,830
計画研究	直接経費	174,400	116,600	119,300	128,100	108,000	646,400
	間接経費	52,320	34,980	35,790	38,430	32,400	193,920
公募研究	直接経費	-	80,000	79,400	80,000	78,900	318,300
	間接経費	-	24,000	23,820	24,000	23,670	95,490

2.3 研究発表

2.3.1 雑誌論文

＜計画研究＞

飯野雄一

1) Ikeda, D.D., Duan, Y., Matsuki, M., Kunitomo, H., Hutter, H., Hedgecock, E.M., and Iino, Y. (2008). CASY-1, an ortholog of calsyntenins/alcadeins, is essential for learning in *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 5260-5265. 査読有査読有

2) Kano, T., Brockie, P.J., Sassa, T., Fujimoto, H., Kawahara, Y., Iino, Y., Mellem, J.E., Madsen, D.M., Hosono, R., and Maricq, A.V. (2008). Memory in *Caenorhabditis elegans* Is Mediated by NMDA-Type Ionotropic Glutamate Receptors. Curr Biol *18*, 1010-1015. 査読有査読有

3) Hayashi, Y., Hirotsu, T., Iwata, R., Kage-Nakadai, E., Kunitomo, H., Ishihara, T., Iino, Y., and Kubo, T. (2009). A trophic role for Wnt-Ror kinase signaling during developmental pruning in *Caenorhabditis elegans*. Nat Neurosci *12*, 981-987. 査読有査読有

4) Iino, Y., and Yoshida, K. (2009). Parallel use of two behavioral mechanisms for chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. J Neurosci *29*, 5370-5380. 査読有

5) Ortiz, C.O., Faumont, S., Takayama, J., Ahmed, H.K., Goldsmith, A.D., Pocock, R., McCormick, K.E., Kunimoto, H., Iino, Y., Lockery, S.*, et al.* (2009). Lateralized gustatory behavior of *C. elegans* is controlled by specific receptor-type guanylyl cyclases. Curr Biol *19*, 996-1004. 査読有

6) Yamada, K., Hirotsu, T., Matsuki, M., Kunitomo, H., and Iino, Y. (2009). GPC-1, a G Protein γ-Subunit, Regulates Olfactory Adaptation in *Caenorhabditis elegans*. Genetics *181*, 1347-1357. 査読有

7) Adachi, T., Kunitomo, H., Tomioka, M., Ohno, H., Okochi, Y., Mori, I., and Iino, Y. (2010). Reversal of Salt Preference Is Directed by the Insulin/PI3K and Gq/PKC Signaling in *Caenorhabditis elegans*. Genetics *186*, 1309-1319. 査読有

8) Kimura, Y., Kurabe, N., Ikegami, K., Tsutsumi, K., Konishi, Y., Kaplan, O.I., Kunitomo, H., Iino, Y., Blacque, O.E., and Setou, M. (2010). Identification of tubulin deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and mammalian cytosolic carboxypeptidases (CCPs). J Biol Chem *285*, 22936-22941. 査読有

9) Lin, C.H., Tomioka, M., Pereira, S., Sellings, L., Iino, Y., and van der Kooy, D. (2010). Insulin signaling plays a dual role in *Caenorhabditis elegans* memory acquisition and memory retrieval. J Neurosci *30*, 8001-8011. 査読有

10) Ohkubo, J., Yoshida, K., Iino, Y., and Masuda, N. (2010). Long-tail behavior in locomotion of *Caenorhabditis elegans*. J Theor Biol *267*, 213-222. 査読有

11) Takayama, J., Faumont, S., Kunitomo, H., Lockery, S.R., and Iino, Y. (2010). Single-cell transcriptional analysis of taste sensory neuron pair in *Caenorhabditis elegans*. Nucleic Acids Res *38*, 131-142. 査読有

12) Yamada, K., Hirotsu, T., Matsuki, M., Butcher, R.A., Tomioka, M., Ishihara, T., Clardy, J., Kunitomo, H., and Iino, Y. (2010). Olfactory plasticity is regulated by pheromonal signaling in *Caenorhabditis elegans*. Science *329*, 1647-1650. 査読有

13) Aoki, R., Yagami, T., Sasakura, H., Ogura, K.I., Kajihara, Y., Ibi, M., Miyamae, T., Nakamura, F., Asakura, T., Kanai, Y.*, et al.* (2011). A Seven-Transmembrane Receptor That Mediates Avoidance Response to Dihydrocaffeic Acid, a Water-Soluble Repellent in *Caenorhabditis elegans*. J Neurosci *31*, 16603-16610. 査読有

14) Iwata, R., Oda, S., Kunitomo, H., and Iino, Y. (2011). Roles for class IIA phosphatidylinositol transfer protein in neurotransmission and behavioral plasticity at the sensory neuron synapses of *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 7589-7594. 査読有

15) Oda, S., Tomioka, M., and Iino, Y. (2011). Neuronal plasticity regulated by the insulin-like signaling pathway underlies

salt chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. J Neurophysiol *106*, 301-308. 査読有
16) Shinkai, Y., Yamamoto, Y., Fujiwara, M., Tabata, T., Murayama, T., Hirotsu, T., Ikeda, D.D., Tsunozaki, M., Iino, Y., Bargmann, C.I., *et al.* (2011). Behavioral Choice between Conflicting Alternatives Is Regulated by a Receptor Guanylyl Cyclase, GCY-28, and a Receptor Tyrosine Kinase, SCD-2, in AIA Interneurons of *Caenorhabditis elegans*. J Neurosci *31*, 3007-3015. 査読有
17) Tomida, T., Oda, S., Takekawa, M., Iino, Y., and Saito, H. (2012). The temporal pattern of stimulation determines the extent and duration of MAPK activation in a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. Sci Signal *5*, ra76. 査読有
18) Uozumi, T., Hirotsu, T., Yoshida, K., Yamada, R., Suzuki, A., Taniguchi, G., Iino, Y., and Ishihara, T. (2012). Temporally-regulated quick activation and inactivation of Ras is important for olfactory behaviour. Sci Rep *2*, 500. 査読有
19) Yamada, K., Tsuchiya, J., and Iino, Y. (2012). Mutations in the *pqe-1* gene enhance transgene expression in *Caenorhabditis elegans*. G3 (Bethesda) *2*, 741-751. 査読有
20) Yoshida, K., Hirotsu, T., Tagawa, T., Oda, S., Wakabayashi, T., Iino, Y., and Ishihara, T. (2012). Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*. Nat Commun *3*, 739. 査読有

石原健
1) Oishi, A., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Mohri-Shiomi, A., Kimura,K.D., Ishihara, T., Katsura, I. (2009) FLR-2, the glycoprotein hormone alpha subunit, is involved in the neural control of intestinal functions in *Caenorhabditis elegans*. Genes to Cells. *14,*1141-1154doi:10.1111/j.1365-2443.2009.01341.x.査読有
2) Hayashi, Y., Hirotsu, T., Iwata, R., Kage-Nakadai, E., Kunitomo, H., Ishihara, T., Iino, Y. and Kubo, T. (2009) A trophic role for Wnt-Ror kinase signaling during developmental pruning in *Caenorhabditis elegans*. Nature Neuroscience. *12*, 981-987. doi: 10.1038/nn.2347.査読有
3) Hirotsu, T., Hayashi, Y., Iwata, R., Kunitomo, H., Kage-Nakadai, E., Kubo, T., Ishihara, T. and Iino, Y. (2009) Behavioural assay for olfactory plasticity in*C. elegans*. Nature Protocols. *139*.査読無
4) Yamada, K., Hirotsu, T., Matsuki, M., Butcher R.A., Tomioka, M., Ishihara, T., Clardy J., Kunitomo, H., Iino, Y. (2010) Olfactory plasticity is regulated by pheromonal signaling in *Caenorhabditis elegans*. Science, *329*. 1647-1650. doi 10.1126/science.1192020. 査読有
5) Fujiwara, M., Teramoto, T., Ishihara, T., Ohshima Y. and McIntire, S. L.(2010) A novel zf-MYND protein, CHB-3, mediates guanylyl cyclase localization to sensory cilia and controls body size of *C. elegans*. PLoS Genetics. *6*, e1001211. doi:10.1371/journal.pgen.1001211 査読有
6) Shinkai, Y., Yamamoto,Y., Fujiwara, M., Tabata, T. , Murayama T., Hirotsu, T. , Ikeda, D., Tsunozaki, M., Iino, Y., Bargmann, C., Katsura, I., and Ishihara, T. (2011) Behavioral choice between conflicting alternatives is regulated by a receptor guanylyl cyclase GCY-28 and a receptor tyrosine kinase SCD-2 in AIA interneurons of *C. elegans*. J. Neuroscience. *31*(8), 3007-3015. doi 10.1523/JNEUROSCI.4691-10.2011.査読有
7) Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang,YF., Nakano, M., Abdelfattah AS., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T. CampbellRE.(2011) An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. Science*333(6051)*,1888-1891. doi10.1126/science.1208592査読有.
8) Yoshida, K., Hirotsu, T., Tagawa, T., Oda, S., Wakabayashi, T., Iino, Y., Ishihara, T.(2012) Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*.Nature Communications. *3*:739. doi: 10.1038/ncomms1750. 査読有
9) Uozumi, T., Hirotsu, T., Yoshida, K., Yamada, R., Suzuki, A., Taniguchi, G., Iino, Y., Ishihara, T.(2011)Temporally-regulated quick activation and inactivation of Ras is important for olfactory behaviour.Scientific Reports.*2*:500. doi 10.1038/srep00500. 査読有
10) Sasaki, O., Yoshizumi, T., Kuboyama, M., Ishihara, T., Suzuki, E., Kawabata, S., Koshiba, T.(2013) A structural perspective of the MAVS-regulatory mechanism on the mitochondrial outer membrane using bioluminescence resonance energy transfer. Biochimica et Biophysica Acta. *1833(5)*. 1017-1027. doi 10.1016/j.bbamcr.査読有
11) Inoue, A., Sawatari, E., Hisamoto, N., Kitazono, T., Teramoto, T., Fujiwara, M., Matsumoto, K., Ishihara, T.(2013) Forgetting in *C. elegans* is accelerageted by neuronal communication via the TIR-1/JNK-1 pathway. Cell Reports. *3 (3)* . 808-819. doi:10.1016/j.celrep.査読有

新貝鉚蔵
1) Wakabayashi T., Kimura, Y., Ohba, Y., Adachi, R., Satoh, Y., and Shingai, R. (2009). *In vivo* calcium imaging of OFF-responding ASK neurons in *C. elegans*. BBA Gen. Subj. *1790*, 765-769.査読有
2) Kuramochi, M., Iwasaki, Y. (2010). Quantitative modeling of neuronal dynamics in *C. elegans.* Lecture Notes in Computer Science (Springer-Verlag). *6443*, 17–24.査読有
3) Yoshida, K., Hirotsu, T., Tagawa, T., Oda, S., Wakabayashi, T., Iino, Y., Ishihara, T. (2012). Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*. Nature Comms. 査読有
5) Usuyama, M., Ushida, C., Shingai, R. (2012). A model of the intracellular response of an olfactory neuron in *Caenorhabditis elegans* to odorstimulation PLoS ONE *7*(8): e42907. 査読有
6) Shingai R., Furudate M., Hoshi K., Iwasaki Y. (2013). Evaluation of head movement periodicity and irregularity during locomotion of *Caenorhabditis elegans*. Front. Behav. Neurosci. *7*:20. doi:10.3389/fnbeh.2013.00020. 査読有

多羽田哲也

1) Sugie, A., Umetsu, D., Yasugi, T., Fischbach, K.-F., and Tabata, T. (2010). Recognition of pre- and postsynaptic neurons via nephrin/NEPH1 homologs is a basis for the formation of the Drosophila retinotopic map. Development, *137*, 3303-3313. 査読有

2) Yasugi, T., Sugie, A., Umetsu, D., and Tabata, T. (2010). Coordinated sequential action of EGFR and Notch signaling pathways regulates proneural wave progression in the Drosophila optic lobe. Development, *137*, 3193-3203. 査読有

3) Murakami, S., Dan, C., Zagaeski, B., Maeyama, Y., Kunes, S., and Tabata, T. (2010). Optimizing Drosophila Olfactory Learning with a Semi-automated Training Device. Journal of Neuroscience Methods, *188*, 195-204. 査読有

4) Shimizu, K., Sato, M., and Tabata, T. (2011). The Wnt5/Planar cell polarity pathway regulates axonal developmentof the Drosophila mushroom body neuron. J. Neuroscience, *31*, 4944-4954. 査読有

5) Kawamori, H., Tai, M., Sato, M., Yasugi, T., and Tabata, T. (2011). The Fat/Hippo pathway regulates the progress of neural differentiation signaling in the Drosophila optic lobe. Dev. Growth Diff. *35*, 653-667. 査読有

6) Hasegawa*, E., Kitada*, Y., Kaido, M., Takayama, R., Awasaki, T., Tabata, T., and Sato, M. (2011). Concentric zones, cell migration and neuronal circuits in the Drosophila visual center. Development, *138*, 983-993. * equal contribution. 査読有

齊藤実

1) Horiuchi, J., Yamazaki, D., Naganos, S., Aigaki, T., and Saitoe, M. (2008). PKA inhibits a consolidated form of memory in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*105*, 20976-20981. 査読有

2) Matsuno, M., Horiuchi, J., Tully, T., and Saitoe, M. (2009). The Drosophila CAM Klingon is required for long-term memory formation and is regulated by Notch. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*106*, 310-315. 査読有

3) Yamazaki, D., Horiuchi, J., and Saitoe, M. (2010). Genetic dissection of age-related memory impairment in Drosophila. Hirosaki Med. J. *61*, S26-S33. 査読有

4) Tamura, T., Horiuchi, D., Chen, Y.C, Sone, M., Miyashita, T., Saitoe, M., Yoshimura, N., Chiang, A.S., and Okazawa, H. (2010). Drosophila PQBP1 regulates learning acquisition at projection neurons in aversive olfactory conditioning. J. Neurosci,*30*, 14091-14101. 査読有

5) Yamazaki, D., Horiuchi, J., Miyashita, T., and Saitoe, M. (2010). Acute inhibition of PKA activity at old ages ameliorates age-related memory impairment in Drosophila. J. Neurosci. *30*, 15573-15577. 査読有

6) Tamura T, Horiuchi D, Chen, Y.C, Sone M, Miyashita T, Saitoe M, Yoshimura N, Chiang A.S, Okazawa H. (2010). *Drosophila* PQBP1 regulates learning acquisition at projection neurons in aversive olfactory conditioning. J Neurosci.*30*, 14091-14101. 査読有

7)上野耕平、齊藤実 (2010). 記憶学習の精緻な理解に向けてのモデル動物：ハエ 生体の科学 *61*, 17-23. 査読無

8)松野元美、齊藤実（2010）学習・記憶と分子マーカー 月刊臨床医学 *12*, 1375-1379. 査読無

9)平野恭敬、齊藤実 (2010). 脳の老化：加齢性記憶障害とその分子機構 メディカルバイオ *7*, 24-29. 査読無

10) Hirano, Y., Kuriyama, Y., Miyashita, T., Horiuchi, J., and Saitoe, M. (2012). Reactive oxygen species are not involved in the onset of age-related memory impairment in Drosophila. Genes, Brain and Behavior *11*, 79-86. 査読有

11) Naganos, S., Horiuchi, J., and Saitoe, M. (2012). Mutations in the Drosophila insulin receptor substrate, CHICO, impair olfactory associative learning. Neurosci. Res. *73*, 49-55. 査読有

12) Miyashita, T., Oda, Y., Horiuchi, J., Yin, J.C., Morimoto, T., and Saitoe M. (2012). Mg^{2+} block of Drosophila NMDA receptors is required for long-term memory formation and CREB-dependent gene expression. Neuron *74*, 887-898. 査読有

13) Kamimura K, Ueno K, Nakagawa J, Hamada R, Saitoe M, Maeda N (2013). Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction. J Cell Biol. *200*, 219-233. 査読有

14) Ueno, K, Naganos, S., Hirano, Y., Horiuchi, J., and Saitoe M. (2013). Long-term enhancement of synaptic transmission between antennal lobe and mushroom body in cultured Drosophila brain. J. Physiol. *591*, 287-302. 査読有

15）Hirano, Y., Masuda, T., Naganos, S., Matsuno, M., Ueno, K., Miyashita, T., Horiuchi, J., and Saitoe M. (2013). Fasting Launches CRTC to Facilitate Long-term Memory Formation in Drosophila. Science *339*, 443-446. 査読有

16）平野恭敬、齊藤実 (2013). 記憶改善に向けた新たな進展：軽度の空腹状態は長期記憶形成を促進する 細胞工学 *32*, 452-453. 査読無

東島眞一

1) Kimura, Y., Satou, C., and Higashijima, S. (2008). V2a and V2b neurons are generated by the final divisions of pair-producing progenitors in the zebrafish spinal cord.Development *135*, 3001-3005.査読有

2) Vitorino, M., Jusf, P.R., Maurus, D., Kimura, Y.,Higashijima, S., and Harris, W.A. (2009). Vsx2 in the zebrafish retina: restricted lineages through depression. Neural Development *4*, 14.査読有

3) Miyasaka, N., Morimoto, K., Tsubokawa, T., Higashijima, S., Okamoto, H., and Yoshihara, Y. (2009). From the Olfactory Bulb to Higher Brain Centers: Genetic Visualization of Secondary Olfactory Pathways in Zebrafish. J. Neuroscience *29*, 4756-4767.査読有

4) Bae, Y., Kani, S., Shimizu, T., Tanabe, K., Nojima, H., Kimura, Y., Higashijima, S., and Hibi, M. (2009). Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. Developmental Biology *300*, 406-426.査読有

5) Satou, C., Kimura, Y., Kohashi, T., Horikawa, K., Takeda, H., Oda, Y., and Higashijima, S. (2009). Functional role of a specialized class of spinal commissural inhibitory neurons during fast escapes in zebrafish. J. Neuroscience *29*, 6780-6793. 査読有

6) Sugiyama, M., Sakaue-Sawano, A., Iimura, T., Fukami, K., Kitaguchi, T., Kawakami, K., Okamoto, H., Higashijima, S., and Miyawaki, A. (2009). Illuminating Cell-Cycle Progression in the Developing Zebrafish Embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) *106*, 20812-20817.査読有

7) Wada, H., Ghysen, A., Satou, C., Higashijima, S, Kawakami, K., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (2010). Dermal morphogenesis controls lateral line patterning during postembryonic development of teleost fish. Developmental Biology *340*, 583-594.査読有

8) Kani, S., Bae, Y-K, Shimizu T, Tanabe, K., Satou, C., Parsons, M., Scott, E., Baier, H., Higashijima, S., and Hibi, M. (2010).Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum.Developmental Biology *343*, 1-17.査読有

9) Tsutsui, H., Higashijima, S., Miyawaki, A., and Okamura, Y. (2010). Visualizing voltage dynamics in zebrafish heart. J. Physiology *588*, 2017-2021.査読有

10) Nakamura, S., Kobayashi, K., Nishimura, T., Higashijima, S., and Tanaka, M. (2010). Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka. Science *328*, 1561-1563. 査読有

11) Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, T., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., Sassa, T., Amo, R., Shiraki, T., Kawakami, K., Hosoya, T., Higashijima, S., and Okamoto, H. (2010). The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. Nature Neuroscience *13*, 1354-1356.査読有

12) Kinkhabwara, A., Riley, M., Koyama, M., Monen, J., Satou, C., Kimura, Y., Higashijima, S., and Fetcho, J.R. (2011). A structural and functional ground plan for neurons in the hindbrain of zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) *108*, 1164-1169. 査読有

13) Koyama, M., Kinkhabwala, A., Satou, C., Higashijima, S., and Fetcho, J.R. (2011). Mapping a sensory-motor network onto a structural and functional ground plan in the hindbrain. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) *108*, 1170-1175.査読有

14) Wibowo, I., Pinto-Teixeir, F, Satou, C., Higashijima, S., and Lopez-Schier, H. (2011). Compartmentalized Notch signaling sustains epithelialmirror symmetry. Development *138*, 1143-1152.査読有

15) Muto, A., Ohkura, M., Kotani, T., Higashijima, S., Nakai, J., and Kawakami, K. (2011). Genetic visualization with an improved GCaMP reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) *108*, 5425-5430.査読有

16) Asakawa, K., Higashijima, S., and Kawakami, K. (2012). An mnr2b/hlxb9lb enhancer trap line that labels spinal and abducens motor neurons in zebrafish.Developmental Dynamics *241*, 327-332.査読有

17) Satou, C., Kimura, Y., and Higashijima, S.(2012). Generation of multiple classes of V0 neurons in zebrafish spinal cord: progenitor heterogeneity and temporal control of neuronal diversity. J. Neuroscience *32*, 1771-1783.査読有

18) Behra, M., Gallardo, V.E., Bradsher, J., Torrado, A., Elkahloun, A., Idol, J., Sheehy, J., Zonies, S., Xu, L., Shaw, K.M., Satou, C., Higashijima, S., Weinstein, B., and Burgess, S.M. (2012). Transcriptional signature of accessory cells in the lateral line, using the Tnk1bp1:EGFP transgenic zebrafish line. BMC Dev. Biol.*12*, 6.査読有

19) Eklöf-Ljunggren, E., Haupt, S., Ausborn, J., Dehnisch, I., Uhlén, P., Higashijima, S., and El Manira, A. (2012). Origin of excitation underlying locomotion in the spinal circuit of zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) *109*, 5511-5516. 査読有

20) Jusuf, P.R., Albadri, S., Paolini, A., Currie, P., Argenton, F., Higashijima, S., Harris, W.A., and Poggi, L. (2012).Biasing amacrine subtypes in the Atoh7 lineage through expression of Barhl2. J. Neuroscience *32*, 13929-13944.査読有

21) Shimozono, S., Iimura T., Kitaguchi T., Higashijima, S., and Miyawaki A. (2013). Visualization of an endogenous retinoic acid gradient across embryonic development. Nature *496*, 363-366.査読有

22) Kimura, Y., Satou, C., Fujioka, S., Shoji, W., Umeda, K., Ishizuka, T., Yawo, H., and Higashijima, S. (2013). Hindbrain V2a neurons in the excitation of spinal locomotor circuits during zebrafish swimming. Current Biology (印刷中).査読有

23) Aoki, T., Kinoshita, M., Aoki, R., Agetsuma, M., Aizawa, H., Yamazaki, M., Takahoko, M., Amo, R., Arata, A., Higashijima, S., Tsuboi, T., and Okamoto, H. (2013). Imaging of Neural Ensemble for Retrieval of a Learned Behavioral Program. Neuron (印刷中).査読有

24) Reimer, M.M., Norris, A., Ohnmacht, J., Patani, R., Zhong, Z., Dias, T.B., Kuscha, V., Scott, A.L., Chen, Y., Rozov, S., Frazer, S.L., Wyatt, C., Higashijima, S., Patton, E.E., Panula, P., Chandran, S., Becker, T., and Becker, C.G. (2013). Dopamine from the brain promotes spinal motor neuron generation during development and adult regeneration. Developmental Cell (印刷中).査読有

25) Hirabayashi, R., Hozumi, S., Higashijima, S., and Kikuchi, Y. (2013). Ddx46 Is Required for Multi-lineagedifferentiation ofhematopoieticstem cells in zebrafish. Stem Cells and Development(印刷中).査読有

佐藤守俊

1) Kim, S.B., Sato, M., and Tao, H. (2008). Circularly permutated bioluminescent probes for illuminating ligand-activated protein dynamics. Bioconjugate Chem., *19*, 2480–2486.査読有

2) Kim, S.B., Sato, M., and Tao, H. (2009). A split Gaussia luciferase-based bioluminescence template for tracing protein dynamics in living cells. Anal. Chem., *81*, 67–74.査読有

3) Kim, S.B., Sato, M., and Tao, H. (2009). Genetically encoded bioluminescent indicators for stress hormones" Anal. Chem., *81*, 3760–3768.査読有

4) Kim, S.B., Sato, M., and Tao, H. (2009). Molecular tension-indexed bioluminescent probes for determining protein—protein interactions. Bioconjugate Chem., *20*, 2324–2330.査読有

5) Suzuki, H., and Sato, M. (2010). Genetically encoded fluorescent indicators to visualize protein phosphorylation by c-Jun NH_2-Terminal Kinase (JNK) in living cells. Supramol. Chem., *22*, 434–439.査読有

6) Jang, K., Sato, K., Tanaka, Y., Yan, X., Sato, M., Nakajima, T., Mawatari, K., Konno, T., Ishihara K., and Kitamori, T. (2010). An efficient surface modification using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine to control cell attachment via photochemical reaction in a microchannel. Lab Chip, *10*, 1937–1945.査読有

7) Kano, F., Arai, T., Matsuto, M., Hayashi, H., Sato, M., and Murata, M. (2011). Hydrogen peroxide depletesphosphatidylinosidol-3-phosphate from endosomes in a p38 MAPK-dependentmanner and perturbs endocytosis. Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res., *1813*, 784–801.査読有

8) Oya, M., Suzuki, H., Watanabe, Y., Sato, M., and Tsuboi, T. (2011). Amino acid taste receptor regulates insulin secretion in pancreatic β-cell line MIN6 cells. Genes Cells, *16*, 608–616.査読有

9) Kim, S.B., Suzuki, H., Sato, M., and Tao, H. (2011). Superluminescent variants of marine luciferases for bioassays. Anal. Chem., *83*, 8732–8740.査読有

10) Lin, Y.C., Nihongaki, Y., Lin, T. Y., Razavi, S., Sato, M., and Inoue, T. Rapidly reversible manipulation of molecular activities using dual chemical dimerizers. Angew. Chem. Int. Ed., 発表予定，査読有

増田直紀

1) Ohkubo, J. (2008). The stochastic pump current and the non-adiabatic geometrical phase. Journal of Statistical Mechanics P02011. 査読有

2) Masuda, N., Kawamura, Y., and Kori, H. (2009). Impact of hierarchical modular structure on ranking of individual nodes in directed networks. New Journal of Physics *11*, 113002. 査読有

3) Masuda, N., Kawamura, Y., and Kori, H. (2009). Analysis of relative influence of nodes in directed networks. Physical Review E *80*, 046114 (2009). 査読有

4) Ohkubo, J. (2009). Posterior probability and fluctuation theorem in stochastic processes. Journal of the Physical Society of Japan *78*, 123001. 査読有

5) Masuda, N., Kawamura, Y., and Kori, H. (2010). Collective fluctuations in networks of noisy components. New Journal of Physics *12*, 093007. 査読有

6) Iwagami, A., and Masuda, N. (2010). Upstream reciprocity in heterogeneous networks. Journal of Theoretical Biology *265*, 297-305. 査読有

7) Watanabe, T., and Masuda, N. (2010). Enhancing the spectral gap of networks by node removal. Physical Review E *82*, 046102. 査読有

8) Masuda, N., and Kori, H. (2010). Dynamics-based centrality for general directed networks. Physical Review E *82*, 056107. 査読有

9) Ohkubo, J., Yoshida, K., Iino, Y., and Masuda, N. (2010). Long-tail behavior in locomotion of *Caenorhabditis elegans*. Journal of Theoretical Biology *267*, 213-222. 査読有

10) Ohkubo, J., and Eggel, T. (2010). Direct numerical method for counting statistics in stochastic processes. Journal of Statistical Mechanics P06013. 査読有

11) Masuda, N. (2011). Clustering in large networks does not promote upstream reciprocity. PLoS ONE *6*, e25190. 査読有

12) Ohkubo, J. (2011). Nonparametric model reconstruction for stochastic differential equation from discretely observed time-series data. Physical Review E *84*, 077802. 査読有

13) Ohkubo, J. (2011). Approximation scheme based on effective interactions for stochastic gene regulation. Physical Review E *83*, 041915. 査読有

14) Takaguchi, T., Sato, N., Yano, K., and Masuda, N. (2012). Importance of individual events in temporal networks. New Journal of Physics *14*, 093003. 査読有

15) Ueno, T., Masuda, N., Kume, S., and Kume, K. (2012). Dopamine modulates the rest period length without perturbation of its power law distribution in Drosophila melanogaster. PLoS ONE *7*, e32007. 査読有

16) Kori, H., Kawamura, Y., and Masuda, N. (2012). Structure of cell networks critically determines oscillation regularity. Journal of Theoretical Biology *297*, 61-72. 査読有

17) Ohkubo J. (2012). Counting statistics for genetic switches based on effective-interaction approximation. Journal of Chemical Physics 137, 125102. 査読有

18) Ohkubo, J. (2012). One-parameter extension of the Doi-Peliti formalism and its relation with orthogonal polynomials. Physical Review E *86*, 042102. 査読有

19) Nakamura, M., and Masuda, N. (2012). Groupwise information sharing promotes ingroup favoritism in indirect

reciprocity. BMC Evolutionary Biology *12*, 213. 査読有
20) Watanabe, T., Hirose, S., Wada, H., Imai, Y., Machida, T., Shirouzu, I., Konishi, S., Miyashita, Y., and Masuda, N. (2013). A pairwise maximum entropy model accurately describes resting-state human brain networks. Nature Communications *4*, 1370. 査読有
21) Ito, M., Masuda, N., Shinomiya, K., Endo, K., and Ito, K. (2013). Systematic analysis of neural projections in the Drosophila brain as a composition of clonally associated units. Current Biology *23*, 644-655. 査読有

辻敏夫
1) Suzuki, M., Sakashita, T., Yanase, S., Kikuchi, M., Ohba, H., Higashitani, A., Hamada, N., Funayama, T., Fukamoto, K., Tsuji, T., and Kobayashi, Y. (2009). Effects of ionizing radiation on locomotory behavior and mechanosensation in *Caenorhabditis elegans*. J. Radiat. Res., *50*, 119-125. 査読有
2) 辻　敏夫, 鈴木　芳代, 曽　智, 寺脇　充, 滝口　昇, 大竹　久夫 (2010). 生物行動のシステム論的解釈と工学応用－線虫、ラット、メダカを手掛かりとしてー. ソフトウェアバイオロジー, 9, 3-12. 査読無
3) Tsuji, T., Suzuki, M., Takiguchi, N., and Ohtake, H. (2010). Biomimetic control based on a model of chemotaxis in *Escherichia coli*. Artif. Life, *16*, 155-177. 査読有
4) Terawaki, M., Hirano, A., Soh Z., and Tsuji, T. (2010). Unconstrained and noninvasive measurement of bioelectric signals from small fish. Artif. Life Robotics, *14*, 342-347. 査読有
5) Soh, Z., Tsuji, T., Takiguchi, N., and Ohtake, H. (2010). Neuro-based olfactory model for artificial organoleptic tests. Artif. Life Robotics, *14*, 474-479. 査読有
6) 滝口　昇 (2010). 生物由来制御アルゴリズムの工学的応用に関する研究. 生物工学会誌, *88*, 108-113. 査読有
7) 坂下　哲哉, 鈴木　芳代, 大内　則幸, 伴　信彦 (2010). 日本におけるシステム放射線生物学（SRB）の胎動. 放射線生物研究, *45*, 367-383. 査読無
8) Soh, Z., Tsuji, T., Takiguchi, N., and Ohtake, H. (2011). An artificial neural network approach for glomerular activity pattern prediction using the graph kernel method and the Gaussian mixture functions. Chem. Sens. *36*, 413-424. 査読有
9) 寺脇　充, 曽　智, 平野　旭, 辻　敏夫 (2011). 小型魚類の生体電気信号を利用したバイオアッセイシステムの提案. 計測自動制御学会論文集, *47*, 119-125. 査読有
10) 坂下　哲哉, 鈴木　芳代 (2011). 線虫 *C. elegans* における運動と学習を指標とした放射線影響解析, 放射線生物研究, 46, 30-46. 査読無
11) 滝口　昇 (2011). 嗅覚識別と選択的注意, 生物工学会誌, 89, 732-738. 査読無
12) 坂下　哲哉, 鈴木　芳代 (2011). 講座「イオンビームを用いたバイオ・医療への応用研究の現状と将来展望」第 10 回モデルとしての線虫に観る放射線の生物への影響と研究の展開, 放射線と産業, 131, 37-41. 査読無
13) Hattori, Y., Suzuki, M., Soh, Z., Kobayashi, Y., and Tsuji, T. (2012). Theoretical and evolutionary parameter tuning of neural oscillators with a double-chain structure for generating rhythmic signals. Neural. Comp. *24*, 635-675. 査読有
14) Hattori, Y., Suzuki, M., Soh, Z., Kobayashi, Y., and Tsuji, T. (2012). Modeling of the pharyngeal muscle in *Caenorhabditis elegans* based on FitzHugh-Nagumo equations. Artif. Life Robotics, *17*, 173-179. 査読有
15) 来山　茂央, 曽　智, 平野　旭, 辻　敏夫, 滝口　昇, 大竹　久夫 (2012). 呼吸波計測に基づく小型魚類遊泳行動の非接触・非拘束計測. 計測自動制御学会論文集, *48*, 151-158. 査読有
16) Soh, Z., Kitayama, S., Hirano, A., and Tsuji, T. (2013). A bioassay system based on behavioral analysis and bioelectric ventilatory signals of a small fish. IEEE Trans. Instrum. Meas. *62*.（発表予定）査読有
17) 曽　智, 宮本　健太郎, 平野　旭, 栗田　雄一, 辻　敏夫 (2013). 小型魚類の水質汚染監視用バイオアッセイシステムの開発. 電気学会論文誌 C（電子・情報・システム部門誌）, *133*.（発表予定）査読有

＜公募研究＞

和多和宏
1) Liu, W.C., Wada, K., and Nottebohm, F. (2009). Variable food begging calls are harbingers of vocal learning. PloS one *4*, e5929. 査読有
2) Kubikova, L., Wada, K., and Jarvis, E.D. (2010). Dopamine receptors in a songbird brain. The Journal of comparative neurology *518*, 741-769. 査読有
3) Horita, H., Wada, K., Rivas, M.V., Hara, E., and Jarvis, E.D. (2010). The dusp1 immediate early gene is regulated by natural stimuli predominantly in sensory input neurons. The Journal of comparative neurology *518*, 2873-2901. 査読有
4) Horita, H., Kobayashi, M., Liu, W.C., Oka, K., Jarvis, E.D., and Wada, K. (2012). Specialized Motor-Driven dusp1 Expression in the Song Systems of Multiple Lineages of Vocal Learning Birds. PloS one *7*, e42173. 査読有
5) Chen, C.C., Wada, K., and Jarvis, E.D. (2012). Radioactive in situ hybridization for detecting diverse gene expression patterns in tissue. Journal of visualized experiments：JoVE. *62*, e3764 査読有
6) Wada, K., Hayase, S.,Imai, R., Mori, C., Kobayashi, M., Liu, W-C., Takahasi, M.,and Okanoya, K. (2013).
Differential androgen receptor expression and DNA methylation state in striatum song nucleus Area X between wild and domesticated songbird strains. European Journal of Neuroscience 「発表予定」査読有

小金澤雅之

1) 古波津創、小金澤雅之、山元大輔 (2011).「同定介在ニューロン P1 の強制活性化による雄の性行動の解発と P1 のフェロモン応答性」Aroma Research, *46*, 139.　査読無

2) Watanabe, K., Toba, G., Koganezawa, M., and Yamamoto D. (2011).Gr39a, a highly diversified gustatory receptor in Drosophila, has a role in sexual behavior. Behav Genet *41*, 746-753. 査読有

3) Goto, J., Mikawa, Y., Koganezawa, M., Ito, H., and Yamamoto, D. (2011).Sexually dimorphic shaping of interneuron dendrites involves the Hunchback transcription factor.J. Neurosci. *31*, 5454-5459. 査読有

4) Takayanagi, S., Toba, G., Koganezawa, M., Lukacsovich, T., and Yamamoto, D. (2012).An untranslated RNA sequence encoded in the putative regulatory region of fruitless, a major courtship regulator gene of Drosophila. Intern. J. Biol. *4*, 20-26. 査読有

5) Ito, H., Sato, K., Koganezawa, M., Ote, M., Matsumoto, K., Hama, C., and Yamamoto, D. (2012). Fruitless recruits two antagonistic chromatin factors to establish single-neuron sexual dimorphism. Cell *149*, 1327-1338. 査読有

6) Sakurai, A., Koganezawa, M., Yasunaga, K., Emoto, K., and Yamamoto, D. (2013).Select interneuron clusters determine female sexual receptivity in Drosophila.Nature Communications *4*, Article number:1825. 査読有

橋本浩一

1) Fei, X., Igarashi, Y., Shinkai, M., Ishikawa, M., and Hashimoto, K. (2009) A Parallel Computation of the Region-Based Level Set Method for Boundary Detection with Moving Objects, Journal of Robotics and Mechatronics, 21, 698-708.　査読有

2) Arai, S., Iwatani Y., and Hashimoto, K. (2011). Fast Sensor Scheduling for Spatially Distributed Sensors. IEEE Transactions on Automatic Control, 56(8), 1900-1905.　査読有

3) 小原健, 五十嵐康伸, 橋本浩一. (2011). 細胞の個体差に適応する高速オートフォーカス顕微鏡. 計測自動制御学会論文集. 47(1), 31-39.　査読有

4) Arai, S., Iwatani, Y., and Hashimoto, K. (2011) A condition for better estimation using asynchronous sampling than synchronous sampling. SICE Journal of Control, Measurement, and System Integration, 4(3), 249-253.　査読有

5) Iwatani, Y., Arai, S., and Hashimoto, K. (2011) Stability of switched stochastic systems in discrete-time. SICE Journal of Control, Measurement, and System Integration, 3(5), 368-371.　査読有

6) Fei, X., Teramoto, T., Ishihara, T. and Hashimoto, K. (2012). Estimating Deformation of Neurons in Fluorescent Images, Interdisciplinary Information Sciences, 18(2), 113-122. 査読有

古久保-徳永克男

1) Furukubo-Tokunaga, K. (2009). Modeling schizophrenia in flies. Prog Brain Res *179*, 107-115. 査読有

2) Furukubo-Tokunaga, K., Adachi, Y., Kurusu, M., and Walldorf, U. (2009). Brain patterning defects caused by mutations of the twin of eyeless gene in *Drosophila melanogaster*. Fly (Austin) *3*, 263-269. 査読有

3) Honjo, K., and Furukubo-Tokunaga, K. (2009). Distinctive neuronal networks and biochemical pathways for appetitive and aversive memory in *Drosophila* larvae. J Neurosci *29*, 852-862.査読有

4) Wairkar, Y.P., Toda, H., Mochizuki, H., Furukubo-Tokunaga, K., Tomoda, T., and Diantonio, A. (2009). Unc-51 controls active zone density and protein composition by downregulating ERK signaling. J Neurosci *29*, 517-528. 査読有

5) Kurusu, M., Maruyama, Y., Adachi, Y., Okabe, M., Suzuki, E., and Furukubo-Tokunaga, K. (2009). A conserved nuclear receptor, Tailless, is required for efficient proliferation and prolonged maintenance of mushroom body progenitors in the *Drosophila* brain. Dev Biol *326*, 224-236. 査読有

6) Ando, M., Totani, Y., Walldorf, U., and Furukubo-Tokunaga, K. (2011). TALE-class homeodomain transcription factors, homothorax and extradenticle, control dendritic and axonal targeting of olfactory projection neurons in the *Drosophila* brain. Dev Biol *358*, 122-136. 査読有

7) Mochizuki, H., Toda, H., Ando, M., Kurusu, M., Tomoda, T., and Furukubo-Tokunaga, K. (2011). Unc-51/ATG1 controls axonal and dendritic development via kinesin-mediated vesicle transport in the *Drosophila* brain. PLoS ONE *6*, e19632. 査読有

中井淳一

1) Hoogland, T.M., Kuhn, B., Göbel, W., Huang, W., Nakai, J., Helmchen, F., Flint, H., and　Wang, S. S.-H. (2009) Radially expanding transglial calcium waves in the intact cerebellum. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA *106*, 3496-3501. 査読有

2) Sudo, Y., Matsuo, K., Tetsuo, T., Tsutsumi, S., Ohkura, M., Nakai, J., and Uezono, Y. (2010) Derived (mutated)-types of TRPV6 channels elicit greater Ca^{2+} influx into the cells than ancestral-types of TRPV6: Evidence from Xenopus oocytes and mammalian cell expression system. J. Pharmacol. Sci. *114*, 281-291. 査読有

3) Shindo, A., Hara, Y., Yamamoto, T.S., Ohkura, M., Nakai, J., and Ueno, N. (2010) Tissue-tissue interaction-triggered calcium elevation is required for cell polarization during Xenopus gastrulation. PLoS One *5*, e8897. 査読有

4) 大倉正道、中井淳一(2010) 新しい蛍光 Ca^{2+}センサーG-CaMP を用いた生体 Ca^{2+}画像化. 生体の科学 *61*, 86-92. 査読無

5) Muto, A., Ohkura, M., Kotani, T., Higashijima, S.-I., Nakai, J., and Kawakami, K. (2011) Genetic visualization with an improved GCaMP calcium indicator reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA *108*, 5425-5430. 査読有

6) 中井淳一 (2011) 分子画像法：蛍光プローブを用いた小脳の分子イメージング.生体の科学「特集　小脳研究の課題」*62*,

281-286. 査読無
7) Ohkura, M., Sasaki, T., Sadakari, J., Gengyo-Ando, K., Kagawa-Nagamura, K., Kobayashi, C., Ikegaya, Y., and Nakai, J. (2012) Genetically Encoded Green Fluorescent Ca^{2+} Indicators with Improved Detectability for Neuronal Ca^{2+} Signals. PLoS One. *7*, e51286 査読有
8) Tanaka, K.F., Matsui, K., Sasaki, T., Sano, H., Sugio, S., Fan, K., Hen, R., Nakai, J., Yanagawa, Y., Hasuwa, H., Okabe, M., Deisseroth, K., Ikenaka, K., and Yamanaka, A.(2012) Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. Cell Rep *2*, 397-406.査読有
9) Yoshiba, S., Shiratori, H., Kuo, I.Y., Kawasumi, A., Shinohara, K., Nonaka, S., Asai, Y., Sasaki, G., Belo, J.A., Sasaki, H., Nakai, J., Dworniczak, B., Ehrlich, B.E., Pennekamp, P., and Hamada, H.(2012) Cilia at the Node of Mouse Embryos Sense Fluid Flow for Left-Right Determination via Pkd2. Science *338*, 226-231.査読有
10) Kawabata, I., Kashiwagi, Y., Obashi, K., Ohkura, M., Nakai, J., Wynshaw-Boris, A., Yanagawa, Y., and Okabe, S. (2012) LIS1-dependent retrograde translocation of excitatory synapses in developing interneuron dendrites. Nat. Commun. *3*, 722. 査読有
11) Ohkura, M., Sasaki, T., Kobayashi, C., Ikegaya, Y.,and Nakai, J. (2012) An improved genetically encoded red fluorescent Ca^{2+} indicator for detecting optically evoked action potentials. PLoS One 7,e39933.査読有
12) Iguchi, M., Kato, M., Nakai, J., Takeda, T., Matsumoto-Ida, M., Kita, T., Kimura, T., and Akao, M. (2012) Direct monitoring of mitochondrial calcium levels in cultured cardiac myocytes using a novel fluorescent indicator protein, GCaMP2-mt. Int. J. Cardiol. *158*, 225-234. 査読有
13) 中井淳一、永村ゆう子、大倉正道、清宮はるな、藤田孝、松永祐、長谷川登志夫、安藤恵子 (2012) 香りの評価法の検討—バイオアッセイを用いた香り評価の試み. Aroma Res. *13*, 126-131. 査読有
14) Ohkura, M., and Nakai, J.: R-CaMP1.07, a new genetically encoded red fluorescent Ca^{2+} indicator suitable for optogenetics. Open Optogenetics 発表予定.査読無
15) 大倉正道、中井淳一 (2013) 遺伝子コード型赤色蛍光カルシウムプローブ R-CaMP1.07. 日本薬理学雑誌 *141*, 175. 査読無
16) 大倉正道、貞苅純子、中井淳一 (2012) タンパク質でできた高性能な蛍光カルシウムセンサー.ケミカルエンジニヤリング *57*, 38-43. 査読無
17) Muto, A.*, Ohkura, M.*, Abe, G., Nakai, J., and Kawakami, K.(* equal contribution) (2013) Real-time visualization of neuronal activity during perception. Current Biology *23*, 1-5. 査読有
18) Tanaka, M., Shih, P.-Y., Gomi, H., Yoshida, T., and Nakai, J., Ando, R., Furuichi, T., Mikoshiba, K., Semyanov, A., and Itohara, S. (2013) Astrocytic Ca^{2+} signals are required for the functional integrity of tripartite synapses. Molecular Brain *6*, 6.査読有

安藤恵子
1) Nomura, K.H., Murata, D., Hayashi, Y., Dejima, K., Mizuguchi, S., Kage-Nakadai, E., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Hirabayashi, Y., Ito, M., et al. (2011). Ceramide glucosyltransferase of the nematode *Caenorhabditis elegans* is involved in oocyte formation and in early embryonic cell division. Glycobiology *21*, 834-848. 査読有
2) Nakai, J., Gengyo-Ando, K., Usami, A., Ohkura, M., Ikegaya, Y., and Matsuki, N. (2011). In vivo calcium imaging of *C. elegans* body wall muscles with genetically encoded calcium probe G-CaMP. J Pharmacol Sci *115*, 111p-111p. 査読無
3) Kage-Nakadai, E., Kobuna, H., Funatsu, O., Otori, M., Gengyo-Ando, K., Yoshina, S., Hori, S., and Mitani, S. (2012). Single/low-copy integration of transgenes in *Caenorhabditis elegans*using an ultraviolet trimethylpsoralen method. BMC Biotechnol *12*. 1-9. 査読有
4) Murata, D., Nomura, K.H., Dejima, K., Mizuguchi, S., Kawasaki, N., Matsuishi-Nakajima, Y., Ito, S., Gengyo-Ando, K., Kage-Nakadai, E., Mitani, S., et al. (2012). GPI-anchor synthesis is indispensable for the germline development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Mol Biol Cell *23*, 982-995. 査読有
5) Yoshina, S., Sakaki, K., Yonezumi-Hayashi, A., Gengyo-Ando, K., Inoue, H., Iino, Y., and Mitani, S. (2012). Identification of a novel ADAMTS9/GON-1 function for protein transport from the ER to the Golgi. Mol Biol Cell *23*, 1728-1741. 査読有
6) Matsunaga, Y., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Iwasaki, T., and Kawano, T. (2012). Physiological function, expression pattern, and transcriptional regulation of a *Caenorhabditis elegans* insulin-like peptide, INS-18. Biochem Bioph Res Commun *423*, 478-483. 査読有
7) Lee, H.C., Kubo, T., Kono, N., Kage-Nakadai, E., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Inoue, T., and Arai, H. (2012). Depletion of mboa-7, an enzyme that incorporates polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol (PI), impairs PI 3-phosphate signaling in *Caenorhabditis elegans.* Genes Cells *17*, 748-757. 査読有
8) Tada, M., Gengyo-Ando, K., Kobayashi, T., Fukuyama, M., Mitani, S., Kontani, K., and Katada, T. (2012). Neuronally expressed Ras-family GTPase Di-Ras modulates synaptic activity in *Caenorhabditis elegans*. Genes Cells *17*, 778-789. 査読有
9) Matsunaga, Y., Nakajima, K., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Iwasaki, T., and Kawano, T. (2012). A *Caenorhabditis elegans*Insulin-Like Peptide, INS-17: Its Physiological Function and Expression Pattern. Biosci Biotech Bioch *76*, 2168-2172. 査読有
10) Barstead, R., Moulder, G., Cobb, B., Frazee, S., Henthorn, D., Holmes, J., Jerebie, D., Landsdale, M., Osborn, J., Pritchett, C., Robertson, J., Rummage, J., Stokes, E., Vishwanathan, M., Mitani, S., Gengyo-Ando, K., et al. (2012). Large-Scale Screening for Targeted Knockouts in the *Caenorhabditis elegans* Genome. G3-Genes Genom Genet *2*, 1415-1425. 査読有
11) Ohkura, M., Sasaki, T., Sadakari, J., Gengyo-Ando, K., Kagawa-Nagamura, Y., Kobayashi, C., Ikegaya, Y., and Nakai, J.

(2012). Genetically Encoded Green Fluorescent Ca^{2+} Indicators with Improved Detectability for Neuronal Ca^{2+} Signals. PLos One *7*. e51286. 1-10. 査読有
12) Usami, A., Gengyo-Ando, K., Nagamura, Y., Yoshida, Y., Matsuki, N., Ikegaya, Y., and Nakai, J. (2011). Dynamic neuromuscular regulation in freely crawling *C. elegans*: High-resolution and large-scale *in vivo* Ca^{2+} imaging. Neurosci Res *71*, E242-E242. 査読無
13) 中井淳一, 永村ゆう子, 大倉正道, 清宮はるな, 藤田孝, 松永祐, 長谷川登志夫, 安藤恵子: 香りの評価法の検討:バイオアッセイを用いた香り評価の試み. *アロマリサーチ 13*, 126-131,2012. 査読無
14) 安藤恵子, 大倉正道, 中井淳一, 線虫の 3D タイムラプス Ca^{2+}イメージング. 文部科学省科学研究費補助金　新学術領域 神経系の動作原理を明らかにするためのシステム分子行動学領域ニュース, *3*, 17-18, 2012. 査読無
15) Sasaki, A., Nakae, I., Nagasawa, M., Hashimoto, K., Abe, F., Saito, K., Fukuyama, M., Gengyo-Ando K., Mitani, S., Katada, T., Kontani, K. (2013) Arl8/ARL-8 functions in apoptotic cell removal by mediating phagolysosome formation in *C. elegans*. Mol Biol Cell. 発表予定

久保健雄
1) Hayashi, Y., Hirotsu, T., Iwata, R., Kage-Nakadai, E., Kunitomo, H., Ishihara, T., Iino Y. and Kubo, T. (2009). A trophic role for Wnt-Ror kinase signaling during developmental pruning in *Caenorhabditis elegans*. Nat. Neurosci.*12*, 981-987.□ 査読有
2) Tadano, H., Yamazaki, Y., Takeuchi, H. and Kubo, T. (2009). Differential expression associated with age-dependent division of labor and neural subtype-specific expression of a novel non-coding RNA, Nb-1, in the honeybee (Apis mellifera L.) worker brain. Insect Mol. Biol.*18*, 715-726.□ 査読有
3) Fujiyuki, T., Matsuzaka, E., Nakaoka, T., Takeuchi, H., Wakamoto, A., Ohka, S., Sekimizu, K., Nomoto, A. and Kubo, T. (2009). Distribution of Kakugo virus and its effects on the gene expression profile in the brain of the worker honeybee Apis mellifera L. J. Virol.*83*, 11560-11568. 査読有
4) Kiya, T. and Kubo, T. (2010). Analysis of GABAergic and non-GABAergic neuron activity in the optic lobes of the forager and re-orienting worker honeybee (Apis mellifera L.). PLoS ONE *5*(1), e8833. 査読有
5) Hori, S., Kaneko K., Saito, T., Takeuchi, H. and Kubo, T. (2010). Expression of two microRNAs, ame-mir-276 and -1000, in the adult honeybee (Apis mellifera) brain. Apidologie*42*, 89-102. 査読有
6) Watanabe, T., Takeuchi, H. and Kubo, T. (2010). Structural diversity and evolution of the N-terminal isoform-specific region of ecdysone receptor-A and -B1 isoforms in insects. BMC Evol. Biol.*10*, 40. 査読有
7) Kaneko, K., Hori, S., Morimoto, M. M., Nakaoka, T., Paul, R. K., Fujiyuki, T., Shirai, K., Wakamoto, K., Tsuboko, S., Takeuchi, H. and Kubo, T. (2010). *In situ* hybridization analysis of the expression of futsch, tau, and MESK2 homologues in the brain of the European honeybee (Apis mellifera L.). PLoS ONE *5*, e9213.□ 査読有
8) Yamazaki, Y., Kiuchi, M., Takeuchi, H. and Kubo, T. (2011). Ecdysteroid biosynthesis in workers of the European honeybee (Apis mellifera L.). Insect Biochem. Mol. Biol.*41*, 283-293. 査読有
9) Kiya, T. and Kubo, T. (2011). Dance type and flight parameters are associated with different mushroom body neural activities in worker honeybee brains. PLoS ONE*6*, e19301.□ 査読有
10) Ugajin, A., Kiya, T., Kunieda, T., Ono, M., Yoshida, T. and Kubo, T. (2012). Detection of neural activity in the brains of Japanese honeybee workers during the formation of a "hot defensive bee ball" PLoS ONE *7*, e32902. 査読有
11) Kiya, T., Ugajin, A., Kunieda, T. and Kubo, T. (2012). Identification of kakusei, a nuclear non-coding RNA, as an immediate early gene from the honeybee, and its application for neuroethological study *Intl. J. Mol. Sci.*13(12), 15496-15509. 査読無
12) Uno, Y., Fujiyuki, T., Morioka, M and Kubo, T. (2012). Mushroom body-preferential expression of proteins/genes involved in endoplasmic reticulum Ca^{2+}-transport in the worker honeybee (Apis mellifera L.) brain. Insect Mol. Biol.査読有、発表予定

冨田太一郎
1) Tomida, T., Takekawa, M., O'Grady, P., and Saito, H. (2009). Stimulus-Specific Distinctions in Spatial and Temporal Dynamics of Stress-Activated Protein Kinase Kinase Kinases Revealed by a Fluorescence Resonance Energy Transfer Biosensor. Mol. Cell. Biol. *22*, 6117-6127. 査読有
2) Tomida, T., Oda, S., Takekawa, M., Iino, Y., and Saito, H. (2012). The Temporal Pattern of Stimulation Determines the Extent and Duration of MAPK Activation in a *Caenorhabditis elegans* Sensory Neuron. Sci. Signal. *5*, ra76. 査読有

伊藤啓
1) Ito, K. (2010). Organizational considerations for the steady development of digital brain atlases. Front Syst Neurosci, 4: 26
2) Inagaki, H. K., Kamikouchi, A., and Ito, K. (2010). Protocol for quantifying sound-sensing ability of *Drosophilamelanogaster*. Nat Protoc 5, 26-30.
3) Inagaki, H. K., Kamikouchi, A., and Ito, K. (2010). Methods for quantifying simple gravity sensing in *Drosophilamelanogaster*. Nat Protoc 5, 20-25.
4) Larkin, A., Karak, S., Priya, R., Das, A., Ayyub, C., Ito, K., Rodrigues, V., and Ramaswami, M. (2010). Central synaptic mechanisms underlie short-term olfactory habituation in *Drosophila* larvae. Learn Mem 17, 645-653.
5) Miyazaki, T., and Ito, K. (2010). Neural architecture of the primary gustatory center of

*Drosophilamelanogaster*visualized with GAL4 and LexA enhancer-trap systems. J Comp Neurol 518, 4147-4181.
6) Masuda-Nakagawa, L. M., Awasaki, T., Ito, K., and O'Kane, C. J. (2010). Targeting expression to projection neurons that innervate specific mushroom body calyx and antennal lobe glomeruli in larval *Drosophila*. Gene Expr Patterns 10, 328-337.
7) Aso, Y., Siwanowicz, I., Bracker, L., Ito, K., Kitamoto, T., and Tanimoto, H. (2010). Specific dopaminergic neurons for the formation of labile aversive memory. Curr Biol 20, 1445-1451.
8) Schnell, B., Joesch, M., Forstner, F., Raghu, S. V., Otsuna, H., Ito, K., Borst, A., and Reiff, D. F. (2011). Processing of horizontal optic flow in three visual interneurons of the *Drosophila* brain. J Neurophysiol. *103*, 1646-1657
9) Shinomiya, K., Matsuda, K., Oishi, T., Otsuna, H., and Ito, K. (2011). Flybrain neuron database: a comprehensive database system of the *Drosophila* brain neurons. J Comp Neurol 519, 807-833.
10) Ito, M., Masuda, N., Shinomiya, K., Endo, K., and Ito, K. (2013). Systematic analysis of neural projections reveals clonal composition of the Drosophila brain. Curr. Biol. *23*, 644–655.
11) Flood, T., Iguchi, S., Gorczyca, M., White, B., Ito, K., and Yoshihara, M. (2013). A single pair of interneurons commands the *Drosophila* feeding motor program. Nature, in press.

久原篤
1) Kuhara, A., Ohnishi N., Shimowada T., Mori, I. (2011). "Neural coding in a single sensory neuron controlling opposite seeking behaviors in *Caenorhabditis elegans*" Nature commun., *2 (355)*, doi: 10.1038/ncomms1352, 1-12.査読有
2) Ohnishi N., Kuhara, A., Nakamura, F., Okochi, Y., Mori, I. (2011). "Bidirectional regulation of thermotaxis by glutamate transmissions in *Caenorhabditis elegans*"EMBO Journal, *30*, 1376-1388.査読有
3) Miyara, A., Ohta, A., Okochi, Y., Tsukada, Y., Kuhara, A., Mori, I. (2011). "Novel and conserved protein TTX-8/Macoilin is required for diverse neuronal functions in *C. elegans*"PLoS Genetics, *7(5)*: e1001384,1-14.査読有
4) Kimata T., Tanizawa Y., Can Y., Ikeda S., Kuhara, A., Mori I. (2012). "Phosphatidylinositol signaling regulated by myo-inositol monophosphatase is essential for synaptic polarity in *Caenorhabditis elegans*" Genetics, *191, 2*, 509-521.査読有
5) Nishio, N., Mohri-Shiomi, A., Nishida, Y., Hiramatsu, N., Kodama, E., Kimura, K., Kuhara, A., Mori, I. (2011). "A Novel and Conserved Protein AHO-3 Is Required for Thermotactic Plasticity Associated with Feeding States in *Caenorhabditis elegans*"Genes to Cells . *17(5)*:365-386.査読有
6)大西憲幸、久原篤. (2012). "線虫 *Caenorhabditis elegans*の温度応答を制御する神経情報処理メカニズム"比較生理生化学,*29 3*, p112-120.査読有
7)久原篤. (2012). "線虫の温度応答の分子生理メカニズム" □生物物理, *52 4*, p200-202.査読有
8)久原篤. (2012). "神経活動の光操作とイメージングによる神経伝達の暗号解読" □Genes & Genetic Systems, *86 5*, Suppl. p4. 査読有

井上謙一
1) Kato, S., Kuramochi, M., Takasumi, K., Kobayashi, K., Inoue, K., Takahara, D., Hitoshi, S., Ikenaka, K., Shimada, T., Takada, M., Kobayashi, K. (2011). Neuron-specific gene transfer through retrograde transport of lentiviral vector pseudotyped with a novel type of fusion envelope glycoprotein. Hum. Gene. Ther. *22*, 1511-1523. 査読有
2) Hiraoka, M., Inoue, K., Ninomiya, T., Takada, M. (2012). Ischaemia in the Zinn–Haller circle and glaucomatous optic neuropathy in macaque monkeys. Br. J. Ophthalmol. *96*, 597-603. 査読有
3) Ninomiya, T., Sawamura, H., Inoue, K., Takada, M. (2012). Segregated pathways carrying frontally-derived top-down signals to visual areas MT and V4 in macaques. J. Neurosci. *32*, 6851-6858. 査読有
4) Inoue, K., Koketsu, D., Kato, S., Kobayashi, K., Nambu, A., Takada, M. (2012). Immunotoxin-Mediated Tract Targeting in the Primate Brain: Selective Elimination of the Cortico-Subthalamic "Hyperdirect" Pathway. PLoS ONE. 7, e39149. 査読有
5) Takahara, D., Inoue, K., Hirata, Y., Miyachi, S., Nambu, A., Takada, M., Hoshi, E. (2012). Multisynaptic projections from the ventrolateral prefrontal cortex to the dorsal premotor cortex in macaques - anatomical substrate for conditional visuomotor behavior. Eur. J. Neurosci. *36*, 3365-75. 査読有
6) Hirata, Y., Miyachi, S., Inoue, K., Ninomiya, T., Takahara, D., Hoshi, E., Takada, M. Dorsal Area 46 Is a Major Target of Disynaptic Projections From the Medial Temporal Lobe. Cereb. Cortex. (in press) 査読有

松尾直毅
1) Matsuo, N., Yamasaki, N., Ohira, K., Takao, K., Toyama, K., Eguchi, M., Yamaguchi, S., and Miyakawa, T. (2009). Neural activity changes underlying the working memory deficit in alpha-CaMKII heterozygous knockout mice. Front. Behav. Neurosci. 3:20. 査読有
2) Tanda, K., Nishi, A., Matsuo, N., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Sugimoto, T., Toyama, K., Takao, K., and Miyakawa, T. (2009). Abnormal social behavior, hyperactivity, impaired remote spatial memory, and increased D1-mediated dopaminergic signaling in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. Mol. Brain 2(1):19. 査読有
3) Matsuo, N., Tanda, K., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Toyama, K., Takao, K., Takeshima, H., and Miyakawa, T. (2009). Comprehensive behavioral phenotyping of ryanodine receptor type3 (RyR3) knockout mice: Decreased social contact duration in two social interaction tests. Front. Behav. Neurosci. 3:3. 査読有
4) 松尾直毅 (2009). 長期記憶の分子基盤. 生化学 81, 610-614. 査読無
5) Matsuo, N., Takao, K., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Tanda, K., and Miyakawa, T. (2010). Behavioral profiles of three

C57BL/6 substrains. Front. Behav. Neurosci. 4:29.　査読有
6) 松尾直毅 (2011). 記憶の獲得と想起：記憶痕跡の解明に向けたアプローチ. 細胞工学 30, 470-474.　査読無
7) Takahashi, N., Kitamura, K., Matsuo, N., Mayford, M., Kano, M., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2012). Locally synchronized synaptic inputs. Science 335, 353-356.　査読有
8) 松尾直毅 (2013). 記憶痕跡の可視化と操作. 生体の科学 64, 36-40.　査読無

江島亜樹
1) Slawson, J.B., Kuklin, E.A., Ejima, A., Mukherjee, K., Ostrovsky, L., Griffith, L.C. (2011). Central regulation of locomotor behavior of Drosophila melanogaster depends on a CASK isoform containing CaMK-like and L27 domains. Genetics *187*, 171-184.査読有
2) Trott AR, Donelson NC, Griffith LC, Ejima, A. (2012) Song Choice is Modulated by Female Movement in Drosophila Males. PLoS ONE 7(9): e46025. doi:10.1371/journal.pone.0046025 査読有
3) Tanaka NK, Suzuki E, Dye L, Ejima, A, and Stopfer M. (2012) Dye-Fills Reveal Additional Olfactory Tracts in the Protocerebrum of Wild-Type *Drosophila*. Journal of Comparative Neurology. *520*, 4131-4140.査読有

木村幸太郎
1) Oishi, A., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Mohri-Shiomi, A., Kimura, K.D., Ishihara, T., and Katsura, I. (2009). FLR-2, the glycoprotein hormone alpha subunit, is involved in the neural control of intestinal functions in *Caenorhabditis elegans*. Genes Cells *14*, 1141–1154. 査読有
2) Kimura, K.D., Fujita, K., and Katsura, I. (2010). Enhancement of odor avoidance regulated by dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*. J. Neurosci. *30*, 16365–16375. 査読有
3) Kobayashi, Y., Kimura, K.D., and Katsura, I. (2011). Ultradian rhythm in the intestine of *Caenorhabditis elegans* is controlled by the C-terminal region of the FLR-1 ion channel and the hydrophobic domain of the FLR-4 protein kinase. Genes Cells *16*, 565–575. 査読有
4) Nishio, N., Mohri-Shiomi, A., Nishida, Y., Hiramatsu, N., Kodama-Namba, E., Kimura, K.D., Kuhara, A., and Mori, I. (2012). A novel and conserved protein AHO-3 is required for thermotactic plasticity associated with feeding states in *Caenorhabditis elegans*. Genes Cells *17*, 365–386. 査読有
5) Kawazoe, Y., Yawo, H., and Kimura, K.D. (2013). A simple optogenetic system for behavioral analysis of freely moving small animals. Neurosci. Res. *75*, 65–68. 査読有

筒井秀和
1) Tsutsui, H., Shimizu, H., Mizuno, H., Nukina, N., Furuta, T., and Miyawaki, A. (2009). The E1 mechanism in photo-induced beta-elimination reactions for green-to-red conversion of fluorescent proteins. Chem Biol *16*, 1140-1147.　査読有
2) Shimozono, S., Tsutsui, H., and Miyawaki, A. (2009). Diffusion of large molecules into assembling nuclei revealed using an optical highlighting technique. Biophys J *97*, 1288-1294.　査読有
3) Tsutsui, H., Higashijima, S., Miyawaki, A., and Okamura, Y. (2010). Visualizing voltage dynamics in zebrafish heart. J Physiol *588*, 2017-2021.　査読有
4) Tian, Q., Oberhofer, M., Ruppenthal, S., Scholz, A., Buschmann, V., Tsutsui, H., Miyawaki, A., Zeug, A., Lipp, P., and Kaestner, L. (2011). Optical action potential screening on adult ventricular myocytes as an alternative QT-screen. Cell Physiol Biochem *27*, 281-290.　査読有

尾崎まみこ
1) Takashi A Inoue, Kiyoshi Asaoka, Kazuaki Seta, Daisuke Imaeda, Mamiko Ozaki (2009) Sugar receptor response of the food-canal taste sensilla in a nectar-feeding swallowtail butterfly, Papilio xuthus. Naturwissenschaften *96*, 355-363. 査読有
2) Qin Quyang ; Hiroyasu Sato, Yoshihiro Murata, Atsushi Nakamura, Mamiko Ozaki, Tadashi Nakamura (2009) Contribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate transduction cascade to the detection of "bitter" compounds in the blowflies. Comp. Biochem. Physiol. *135*, 309-316. 査読有
3) Hojo Masaru, Ayako Wada-Katsumata, Toshiharu Akino, Susumu Yamaguchi, Mamiko Ozaki, Ryohei Yamaoka (2009) Chemical disguise as particular caste of host ants in the inquiline parasite Niphanda fusca (Lepidoptera: Lycaenidae). Proc.Roy.Soc.B. *276*, 551-558. 査読有
4) Mamiko Ozaki, Tadashi Nakamura (2009) Chemosensory regulation of feeding in the blowfly: several studies after 'the Hungry Fly'. SEB experimental biology series. *63*:77-101. 査読無
5) Ayako Wada-Katsumata, Mamiko Ozaki, Fumio Yokohari, Michiko Nishikawa, Ritsuo Nishida (2009) Behavioral and electrophysiological studies on the sexually biased synergism between oligosaccharides and phospholipids in gustatory perception of nuptial secretion by the German cockroach. J. Insect Physiol. *55*, 742-750. 査読有
6) Kazuyo Fujikawa, Aya Takahashi, Azusa Nishimura, Masanobu Itoh, Toshiyuki Takano-Shimizu, Mamiko Ozaki (2009) Characteristics of genes up-regulated and down-regulated after 24 h starvation in the head of Drosophila. Gene *446*, 11-17. 査読有
7) Yuko Ishida, Mamiko Ozaki (2011) A putative octopamine/tyramine receptor mediating appetite in a hungry fly. Naturwissenschaften *98*:635-638. 査読有
8) Yuko Ishida, Mamiko Ozaki (2011) Aversive odorant causing appetite decrease downregulates tyrosine decarboxylase

gene expression in the olfactory receptor neuron of the blowfly, Phormia regina. Naturwissenschaften *99*:71-75. 査読有
9) Ida T, Takahashi T, Tominaga H, Sato T, Kume K, Ozaki M, Hiraguchi T, Maeda T, Shiotani H, Terajima S, Sano H, Mori K, Yoshida M, Miyazato M, Kato J, Murakami N, Kangawa K, Kojima M. (2011) Identification of the novel bioactive peptides dRYamide-1 and dRYamide-2, ligands for a neuropeptide Y-like receptor in Drosophila. Biochem. Biophys. Res. Commun. *410*, 872-877. 査読有
10) Aya Takahashi, Nao Fujiwara-Tsujii, Ryohei Yamaoka, Masanobu Itoh, Mamiko Ozaki, Toshiyuki Takano-Shimizu (2012) Cuticular Hydrocarbon Content that Affects Male Mate Preference of Drosophila melanogaster from West Africa. Int. J. Evo Biol. *2012*, Article ID 278903. 査読有
11) Azusa Nishimura, Yuko Ishida, Aya Takahashi, Haruka Okamoto, Marina Sakabe, Masanobu Itoh, Toshiyuki Takano-Shimizu, Mamiko Ozaki (2012) Starvation-induced elevation of taste responsiveness and expression of a sugar taste receptor gene in Drosophila melanogaster. J. Neurogen *26*, 206-215. 査読有
12) Kidokoro-Kobayashi M, Iwakura M, Fujiwara-Tsujii N, Fujiwara S, Sakura M, Sakamoto H, Higashi S, Hefetz A, Ozaki M. (2012) Chemical discrimination and aggressiveness via cuticular hydrocarbons in a supercolony-forming ant, Formica yessensis. PLOS ONE. *7*:e46840.
13) Ida T, Takahashi T, Tominaga H, Sato T, Sano H, Kume K, Ozaki M, Hiraguchi T, Shiotani H, Terajima S, Nakamura Y, Mori K, Yoshida M, Kato J, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Kojima M. (2012) Isolation of the bioactive peptides CCHamide-1 and CCHamide-2 from Drosophila and their putative role in appetite regulation as ligands for G protein-coupled receptors. Front Endocrinol. *3*:Article ID 177. 査読有

谷村禎一
1) Hiroi, M., Tanimura, T., and Marion-Poll, F. (2008). Hedonic taste in Drosophila as revealed by ectopic expression of olfactory receptors in taste neurons. PLoS ONE*3*: e2610. 査読有
2) Matsumoto, A., Ohta, Y., Itoh, T.Q., Sanada-Moriyama, S., Matsuyama, T., Fuchikawa, T., Tanimura, T., and Miyatake, T. (2008). Period gene of Bactrocera cucurbitae (Diptera: Tephritidae) among strains with different mating times and sterile insect technique. Ann. Ent. Soc. America *101*, 1121-1130.査読有
3) Ryuda, M., Tsuzuki, S., Tanimura, T., Tojo, S., and Hayakawa Y. (2008). A gene involved in the food preferences of larval Drosophila melanogaster. J. Insect Physiol. *54*, 1440-1445. 査読有
4) Fuchikawa, T., Sanada, S., Nishio, R., Matsumoto, A., Matsuyama, T., Yamagishi, M., Tomioka, K., Tanimura, T., and Miyatake T. (2009). The clock gene cryptochrome of Bactrocera cucurbitae (Diptera: Tephritidae) in strains with different mating times. Heredity *104*, 387-392. 査読有
5) Fujita, M., and Tanimura, T. (2011). Drosophila evaluates and learns the nutritional value of sugars. Curr. Biol. *21*, 751-755. 査読有
6) Itoh, T.Q., Tanimura, T., and Matsumoto, A. (2011). bHLH-ORANGE family genes regulate the expression of E-box clock genes in Drosophila. Appl. Entomol. Zool. *46*, 391-397. 査読有
7) Itoh, T.Q., Tanimura, T., and Matsumoto, A. (2011). A membrane-bound transporter controls the circadian transcription of clock genes in Drosophila. Genes to Cells *16*, 1159–1167. 査読有
8) Ryuda, M. Tsuzuki, S., Matsumoto, H., Oda, O., Tanimura, T., and Hayakawa Y. (2011). Identification of a novel gene, Anorexia, regulating feeding activity via insulin signaling in Drosophila melanogaster. J. Biol. Chem. *286*, 38417-38426.査読有
9) Ozaki K, Ryuda M, Yamada A, Utoguchi A, Ishimoto H, Calas D, Marion-Poll F, Tanimura, T., and Yoshikawa H. (2011). A gustatory receptor involved in host-plant recognition for oviposition of the butterfly, Papilio xuthus. Nature Commun. *2*, 542. 査読有
10) Toshima, N., and Tanimura, T.(2012). Taste preference for amino acids is dependent on internal nutritional state in Drosophila melanogaster. J. Exp. Biol. *215*, 2827-32. 査読有
11) Matsuda, T., Kanki, T., Tanimura, T., Kang, D., and Matsuura, E.T. (2013). Effects of overexpression of mitochondrial transcription factor A on lifespan and oxidative stress response in Drosophila melanogaster.*Biochem. Biophys. Res. Commun.430, 717-721.* 査読有
12) Ryuda, M., Calas-List, D., Yamada, Y., Marion-Poll, F., Yoshikawa, H., Tanimura, T., and Ozaki, K, (2013). Gustatory sensing mechanism coding for multiple oviposition stimulants in the swallowtail butterfly, Papilio xuthus. J. Neurosci. *33*, 1405-1412. 査読有
13) Gruber, F., Knapek, S., Fujita, M., Matsuo,K., Shinzato, N., Bräcker, L., Siwanowicz, I., Tanimura, T., and Tanimoto, H. (2013). Suppression of conditioned odor approach by feeding is independent of taste and nutritional value in Drosophila. Curr. Biol. *23*, 507-514. 査読有
14) Itoh, Q.T., Matsumoto, A., and Tanimura, T.(2013). C-terminal binding protein (CtBP) activates the expression of E-box clock genes with CLOCK/CYCLE in Drosophila. PLoS ONE *8*, e63113.査読有

齋藤和也
1) Saitoh, K., Inagaki, S., Nishimura, M., Kawaguchi, H., Song, W. J. (2010). Spontaneous activity resembling tone-evoked activity in the primary auditory cortex of guinea pigs. Neurosci. Res. *68*, 107-113. 査読有
2) Sawatari, H., Tanaka, Y., Takemoto, M., Nishimura, M., Hasegawa, K., Saitoh, K., and Song, W-J. (2011), Identification and characterization of an insular auditory field in mice. European Journal of Neuroscience *34*, 1944-1952.査読有

坂井貴臣

1) Ishimoto, H., Sakai, T., and Kitamoto, T. (2009). Ecdysone signaling regulates courtship long-term memory formation in adult Drosophila melanogaster. PNAS *106*: 6376-6381. 査読有

2) Sakai, T., Kasuya, J. Kitamoto, T. and Aigaki, T. (2009). The Drosophila TRPA channel, Painless, regulates sexual receptivity in virgin females. Genes, Brain and Behavior *8*: 546-557. 査読有

3) Sakai, T. and Aigaki, T. (2010). Overexpression of a repressor isoform of CrebB-17A lengthens courtship break in the fruit fly Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophilidae). Applied Entomology and Zoology *45*: 533-539. 査読有

4) Sakai, T. and Aigaki, T. (2010). The Drosophila calcineurin regulator, Sarah, is involved in male courtship. NeuroReport *21*: 985-988. 査読有

5) 坂井貴臣 (2011). ショウジョウバエメスの性行動の神経遺伝学的研究. 比較生理生化学 *28*: 225-230. 査読有

6) Sakai, T., Inami,S., Sato, S., Kitamoto, T. (2012). Fan-shaped body neurons are involved in period-dependent regulation of long-term courtship memory in Drosophila. Learning & Memory *19*: 571-574. 査読有

7) Sakai, T., Sato, S., Ishimoto, H., *Kitamoto, T. (2013). Significance of the centrally expressed TRP channel Painless in Drosophila courtship memory. Learning & Memory *20*: 34-40. 査読有

矢田俊彦

1) Nakata, M., Manaka, K ., Yamamoto, S., Mori M., Yada, T. (2011) . Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca2+ influx through L-type channels in mouse islet □-cells. Endocr J *58*, *305*–313. 査読有

2) Kohno, D., Sone, H., Tanaka, S., Kurita, H., Gantulga, D., Yada, T. (2011) . AMP-activated protein kinase activates neuropeptide Y neurons in the hypothalamic arcuate nucleus to increase food intake in rats. Neuroscience Letters *499,* 194–198. 査読有

3) Maejima, Y., Kohno, D., Iwasaki, Y., Yada, T. (2011) . Insulin suppresses ghrelin-induced calcium signaling in neuropeptide Y neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. Aging (Albany NY) *3*, 1092–1097. 査読有

4) Maejima, Y ., Iwasaki, Y., Yamahara, Y., Kodaira, M., Sedbazar, U., Yada, T. (2011) . Peripheral oxytocin treatment ameliorates obesity by reducing food intake and visceral fat mass. Aging (Albany NY) *3*, 1169–1177. 査読有

5) Gantulga, D., Maejima, Y., Nakata, M., Yada, T. (2012) . Glucose and insulin induce Ca2+ signaling in nesfatin-1 neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. Biochem Biophys Res Commun *420*, 811–815. 査読有

6) Damdindorj, B., Dezaki, K., Kurashina, T., Sone, H., Rita, R., Kakei, M., Yada, T. (2012) . Exogenous and endogenous ghrelin counteracts GLP-1 action to stimulate cAMP signaling and insulin secretion in islet □-cells. FEBS Lett *586*, 2555–2562. 査読有

7) Iwasaki, Y., Kakei, M., Nakabayashi, H., Ayush, EA., Hirano-Kodaira, M., Maejima, Y., Yada, T. (2013) . Pancreatic polypeptide and peptide YY3-36 induce Ca2+ signaling in nodose ganglion neurons. Neuropeptides *47*, 19–23. 査読有

8) Aoki, H., Nakata, M., Dezaki, K., Lu, M., Gantulga , D., Yamamoto, K., Shimada, K., Kario, K., Yada, T. (2013) . Ghrelin counteracts salt-induced hypertension via promoting diuresis and renal nitric oxide production in Dahl rats. Endocr J .[Epub ahead of print] 査読有

9) Yang, Y., Shimomura, K., Sakuma, K., Maejima, Y., Iwasaki Y., Galvanovskis, J., Dezaki, K., Nakata, M., Yada, T. (2013) . Bupropion can close KATP channel and induce insulin secretion. J Pediatr Endocrinol Metab. *25*, 1–4. 査読有

10) Mori, M., Yamada, M., Okada, S., Hashimoto, K., Satoh, T., Shimizu, H., Yada, T. (2013) . Discovery of nesfatin-1 and overview of biological actions and new developments. Curr Pharm Des . [Epub ahead of print] 査読有

11) Nakata, M., Yada, T. (2013) . Role of NUBC2/Nesfatin-1 In glucose control: diverse functions in islets, adipocytes and brain. Curr Pharm Des. [Epub ahead of print] 査読有

12) Sedbazar, U., Maejima, Y., Nakata, M., Mori, M., Yada, T. (2013) . Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 rises in synchrony with feeding suppression during early light phase in rats. Biochem Biophys Res Commun. *10*, 434–438. 査読有

喜田聡

1) Suzuki, A., Fukushima, H., Takuya Mukawa, T., Toyoda, H., Wu, L-J., Zhao, M-G., Hui Xu, H., Shang, Y., Endoh, K., Iwamoto, Mamiya, N., Okano, E., Hasegawa, H., Mercaldo, V., Yue Zhang, Y., Maeda, R., Ohta, M., Josselyn, S.A., Zhuo, M., and Kida, S. (2011) Up-regulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. J. Neurosci. *31*, 8786-8802. 査読有

2) Kitamura, T., Okubo-Suzuki, R., Takashima, N., Murayama, A., Hino, T., Nishizono H., Kida, S. and Inokuchi, K. (2012) Hippocampal function is not required for the precision of remote place memory. *Mol Brain*, *5*, 5. 査読有

3) Nomoto, M., Takeda, Y., Uchida, S., Mitsuda, K., Enomoto, H., Saito, K., Choi, T., Watabe, A.M., Kobayashi, S., Masushige, S., Manabe, T. and Kida, S. (2012) Dysfunction of the RAR/RXR signaling pathway in the forebrain impairs hippocampal memory and synaptic plasticity. Mol. Brain. *5*, 8. 査読有

4) Wang, H., Morishita, Y., Miura, D., Naranjo, J.R., Kida, S. and Zhuo, M. (2012) Roles of CREB in the regulation of FMRP by group I metabotropic glutamate receptors in cingulate cortex. Mol Brain. *5*: 27. 査読有

5) Descalzi, G., Fukushima, H., Suzuki, A., Kida, S. and Zhuo, M. (2012) Genetic enhancement of neuropathic and inflammatory pain by forebrain upregulation of CREB-mediated transcription.Mol. Pain. 8: 90. 査読有

6) Kida, S. (2012) A functional role for CREB as a positive regulator of memory formation and LTP. Experimental Neurobiology. *21*, 136-140. 査読有

上川内あづさ

1)上川内あづさ、稲垣秀彦、萬涼子、伊藤啓(2009).「解剖学・生理学・行動学の統合的解析モデルとしてのショウジョウバエを利用した音・重力・風情報の脳内処理機構の解明　Application of Drosophila as an integrative neural model to understand how sound, gravity, and wind information are processed in the brain」.蛋白質核酸酵素　共立出版 *54*, 1817-1826.　査読無

2)上川内あづさ、稲垣秀彦、伊藤啓(2009).「ショウジョウバエにおける音、重力、風検知の神経基盤　The neural mechanism underlying sound, gravity and wind senses in Drosophila」. 実験医学羊土社　*27*, 2105-2108.　査読無

3)上川内あづさ、伊藤啓(2010).「ショウジョウバエの音と重力の受容システムの解明　Analysis of the Drosophila gravity- and sound-sensing systems」. 生物物理 *50*, 282-285.　査読無

4) Inagaki HK, Kamikouchi A, Ito K. (2010). Methods for quantifying simple gravity sensing in Drosophila melanogaster. Nat Protocols *5*, 20-25.　査読有

5) Inagaki HK, Kamikouchi A, Ito K. (2010). Protocol for quantifying sound-sensing ability of Drosophila melanogaster. Nat Protocols *5*, 26-30.　査読有

6) Kamikouchi A, Wiek R, Effertz T, Göpfert MC, Fiala A. (2010).　Transcuticular optical imaging of stimulus-evoked neural activities in the Drosophila PNS. Nat Protocols *5*, 1229-1235.　査読有

7) Kamikouchi A, Albert JT, Göpfert MC.(2010). Mechanical feedback amplification in Drosophila hearing is independent of synaptic transmission.Eur J Neurosci *31*, 697-703.　査読有

8)上川内あづさ (2011).「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 *83*, 399-402.　査読有

9)上川内あづさ、伊藤啓(2011).「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 *29*, 538-543. 2011.　査読無

10) Matsuo E, Kamikouchi A. (2013). Neuronal encoding of sound, gravity, and wind in the fruit fly. J Comp Physiol A. *199*, 253-262. 査読有

11)松尾恵倫子、上川内あづさ(2013).「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　*32*, 454-460.　査読無

12) Kamikouchi A. (2013).Auditory neuroscience in fruit flies. Neurosci. Res. 「発表予定」*In press*,　査読有

中村加枝

1) Bromberg-Martin, E.S., Hikosaka, O., Nakamura, K. (2010). Coding of task reward value in the dorsal raphe nucleus.J Neurosci.*30*(18):6262-6272 査読有

2) Yoshizawa, K., Nakao, K., Habiro, M., Hayashi, K., Kuwata, M., Uehara, N., Takashi, Y., Nakamura, K., Tsubura, A.(2010). Cerebromalacia with epilepsy and cortical blindness in a laboratory Japanese macaque *(Macacafuscata)*.Toxicologic Pathology*38*(7):1058-1063 査読有

3) Cools,R.,Nakamura, K., Daw, N.D.　(2011). Serotonin and dopamine: Unifying affective, activational, and decision functions. Neuropsychopharmacology*36*,98-113 査読有

4) Okada, K., Nakamura, K., and Kobayashi, Y. (2011) .A neural correlate of predicted and actual reward value information in monkey pedunculopontine tegmental and dorsal raphe nucleus during saccade tasks.　Neural Plasticity*2011* 1-21 査読有

5) Nakamura, K., Santos, G., Matsuzaki, R., and Nakahara, H. (2012) .Differential reward coding in the subdivisions of the primate caudate during an oculomotor task.　J Neurosci.*32* (45):1518-1512 査読有

岩里琢治

1) Iwasato,T. (2009).　中枢神経回路の活動依存的精緻化. 生物の科学遺伝. 63, 79 - 85. 査読無

2) Takeuchi, S., Yamaki, N., Iwasato, T., Negishi, M., Katoh, H. (2009). Beta2-chimaerin binds to EphA receptors and regulates cell migration. FEBS Lett. 583, 1237-1242. 査読有

3) Singer, P., Yee, B.K., Feldon, J., Iwasato, T., Itohara, S., Grampp, T., Prenosil, G., Benke, D., Mohler, H., Boison, D. (2009). Altered mnemonic functions and resistance to NMETHYL-d-Aspartate receptor antagonism by forebrain conditional knockout of glycine transporter 1. Neuroscience. 161, 635-654. 査読有

4) Tanabe, Y., Hirano, A., Iwasato,T., Itohara, S., Araki, K., Yamaguchi, T., Aizawa, Y., Takahashi, H., Kakita, A., Nawa, H. (2010). Molecular characterization and gene disruption of a novel zincfinger protein, HIT-4, expressed in rodent brain. J.Neurochem. 112, 1035-1044. 査読有

5) Dhande, OS,. Bhatt, S,. Anishchenko, A,. Elstrott, J,. Iwasato, T,. Swindell, EC,. Xu, HP,. Jamrich, M,. Itohara, S,. Feller,MB,. Crair,MC,. (2012). Role of adenylate cyclase 1 in retinofugal map development. J Comp Neurol. 520, 1562-1583. 査読有

6) Yamashita, H., Chen, S., Komagata, S., Hishida, R., Iwasato, T., Itohara, S., Yagi, T., Endo, N., Shibata, M., Shibuki K. (2012). Restoration of contralateral representation in the mouse somatosensory cortex after crossing nerve transfer. PLoS One. 7, e35676. 査読有

平田普三

1) Hirata, H., Takahashi, M., Yamada, K., and Ogino, K. (2011). The biological role of the glycinergic synapse in early zebrafish motility. Neurosci. Res. *71*, 1-11.査読有

2) Ogino, K., Ramsden, S. L., Keib, N., Schwarz, G., Harvey, R. J., and Hirata, H. (2011). Duplicated gephyrin genes showing distinct tissue distribution and alternative splicing patterns mediate Moco biosynthesis, glycine receptor clustering and escape behavior in zebrafish. J. Biol. Chem. *286*, 806-817. 査読有
3) Naganawa, Y., and Hirata, H. (2011). Developmental transition of touch response from slow muscle-mediated coilings to fast muscle-mediated burst swimming in zebrafish. Dev. Biol. 355, 194-204.査読有
4) Low, S. E., Amburgey, K., Horstick, E., Linsley, J., Sprague, S. M., Cui, W. W., Zhou, W., Hirata, H., Saint-Amant, L., and Kuwada, J. Y. (2011). TRPM7 is required within zebrafish sensory neurons for the activation of touch-evoked escape behaviors. J. Neurosci. *31*, 11633-11644. 査読有
5) Hirata, H., Wen, H., Kawakami, Y., Naganawa, Y., Ogino, K., Yamada, K., Saint-Amant, L., Low, S. E., Cui, W. W., Zhou, W., Sprague, S. M., Asakawa, K., Muto, A., Kawakami, K., andKuwada, J. Y. (2012). Connexin39.9 is necessary for coordinated activation of slow-twitch muscle and normal behavior in zebrafish. J. Biol. Chem. *287*, 1080-1089. 査読有
6) Yamanaka, I., Miki, M., Asakawa, K., Kawakami, K., Oda, Y., and Hirata, H. (2013). Glycinergic transmission and postsynaptic activation of CaMKII are required for glycine receptor clustering in vivo. Genes Cells *18*, 211-224.査読有
7) Hirata, H., Nanda, I., van Riesen, A., McMichael, G., Hu, H., Hambrock, M., Papon, M.-A., Fischer, U., Marouillat, S., Ding, C., Alirol, S., Bienek, M., Preisler-Adams, S., Grimme, A., Seelow, D., Webster, R., Haan, E., MacLennan, A., Stenzel, W., Yap, T. Y., Gardner, A., Nguyen, L. S., Shaw, M., Lebrun, N., Haas, S. A., Kress, W., Haaf, T., Schellenberger, E., Chelly, J., Viot, G., Shaffer, L. G., Rosenfeld, J. A., Kramer, N., Falk, R., El-Khechen, D., Escobar, L. F., Hennekam, R., Wieacker, P., Hübner, C., Ropers, H.-H., Gecz, J., Schuelke, M., Laumonnier, F., and Kalscheuer, V. M. (2013). Mutations of ZC4H2 are associated with arthrogryposis multiplex congenita and intellectual disability and through impairment of central and peripheral synaptic plasticity. Am. J. Hum. Genet. *92*, 681-695. 査読有
8) Horstick, E. J., Linsley, J. W., Dowling, J. J., Hauser, M. A., McDonald, K. K., Ashley-Koch, A., Saint-Amant, L., Satish, A., Cui, W. W., Zhou, W., Sprague, S. M., Franzini-Armstrong, C., Hirata, H., and Kuwada, J. Y. (2013). Stac3 is a novel component for excitation-contraction coupling and mutated in Native American myopathy. Nat. Commun. In press.査読有

浅川和秀
1) Kishimoto, N., Alfaro-Cervello, C., Shimizu, K., Asakawa, K., Urasaki, A., Nonaka, S., Kawakami, K., Garcia-Verdugo, J.M., and Sawamoto, K. (2011). Migration of neuronal precursors from the telencephalic ventricular zone into the olfactory bulb in adult zebrafish. J Comp Neurol *519*, 3549-3565. 査読有
2) Pujol-Marti, J., Zecca, A., Baudoin, J.P., Faucherre, A., Asakawa, K., Kawakami, K., and Lopez-Schier, H. (2012). Neuronal birth order identifies a dimorphic sensorineural map. J Neurosci *32*, 2976-2987. 査読有
3) Hirata, H., Wen, H., Kawakami, Y., Naganawa, Y., Ogino, K., Yamada, K., Saint-Amant, L., Low, S.E., Cui, W.W., Zhou, W., Asakawa, K. et al. (2012). Connexin 39.9 protein is necessary for coordinated activation of slow-twitch muscle and normal behavior in zebrafish. J Biol Chem *287*, 1080-1089. 査読有
4) Asakawa, K., Higashijima, S., and Kawakami, K. (2012). An mnr2b/hlxb9lb enhancer trap line that labels spinal and abducens motor neurons in zebrafish. Dev Dyn *241*, 327-332. 査読有
5) Yamanaka, I., Miki, M., Asakawa, K., Kawakami, K., Oda, Y., and Hirata, H. (2013). Glycinergic transmission and postsynaptic activation of CaMKII are required for glycine receptor clustering in vivo. Genes Cells *18*, 211-224. 査読有
6) Kishimoto, N., Asakawa, K., Madelaine, R., Blader, P., Kawakami, K., and Sawamoto, K. (2013). Interhemispheric asymmetry of olfactory input-dependent neuronal specification in the adult brain. Nat Neurosci 発表予定、査読有
7)Asakawa, K., Abe, G., and Kawakami K. (2013). Cellular dissection of the spinal cord motor column by BAC transgenesis and gene trapping in zebrafish. Front Neural Circuits 発表予定、査読有

知見聡美
1) Nambu, A., Chiken, S., Shashidharan, P., Nishibayashi, H., Ogura, M., Kakishita, K., Tanaka, S., Tachibana, Y., Kita H, and Itakura, T. (2011) Reduced pallidal output causes dystonia. Front. Syst. Neurosci. *5*, 89: 1-6. 査読有
2) Chiken, S., and Nambu A (2013) High-frequency pallidal stimulation disrupts information flow through the pallidum by GABAergic inhibition. J. Neurosci. *33*: 2268-2280. 査読有
3) Sano, H., Chiken, S., Hikida, T., Kobayashi, K., and Nambu, A. (2013) Signals through the striatopallidal indirect pathway stop movements by phasic excitation in the substantia nigra. J. Neurosci. *33*: 7583-7594. 査読有

小早川高
1) Imai, T., Yamazaki, T., Kobayakawa, R., Kobayakawa, K., Abe, T., Suzuki, M., Sakano, H. (2009). Pre-target axon sorting establishes the neural map topography. Science (Article) *325*, 585-590. 査読有
2) Matsumoto, H., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Tashiro, T., Mori, K., Sakano, H., and Mori, K. (2010). Spatial arrangement of glomerular molecular-feature clusters in the odorant-receptor-class domains of the mouse olfactory bulb. J. Neurophysiol. *103*, 3490-3500. 査読有
3) Yokoyama, T K., Mochimaru, D., Murata, K., Manabe, H., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Sakano, H., Mori, K., and Yamaguchi, M. (2011). Elimination of adult-born neurons in the olfactory bulb is promoted during the postprandial period. Neuron. *71(5)*, 883-897. 査読有
4) Igarashi, K M., Iseki, N., An, M., Yamaguchi, Y., Nagayama, S., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Tanifuji, M., Sakano, H., Chen, W R., and Mori, K. (2012). Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different

targets in the olfactory cortex. J. Neuroscience. *32(23)*, 7970-7985. 査読有

吉原良浩

1) Koide, T., Miyasaka, N., Morimoto, K., Asakawa, K., Urasaki, A., Kawakami, K., and Yoshihara, Y. (2009). Olfactory neural circuitry for attraction to amino acids revealed by transposon-mediated gene trap approach in zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *106*, 9884-9889.査読有

2) Miyasaka, N., Morimoto, K., Tsubokawa, T., Higashijima, S., Okamoto, H., and Yoshihara, Y. (2009). From the olfactory bulb to higher brain centers: genetic visualization of secondary olfactory pathways in zebrafish. J. Neurosci. *29*, 4756-4767. 査読有

3) Yoshihara, Y., De Roo, M., and Muller, D. (2009). Dendritic spine formation and stabilization. Curr. Opin. Neurobiol. *19*, 146-153.査読有

4) Takeuchi, H., Inokuchi, K., Aoki, M., Suto, F., Tsuboi, A., Matsuda, I., Suzuki, M., Aiba, A., Serizawa, S., Yoshihara, Y., Fujisawa, H., and Sakano, H. (2010). Sequential arrival and graded secretion of Sema3F by olfactory neuron axons specify map topography at the bulb. Cell *141*, 1056-1067.査読有

5) Haga, S., Hattori, T., Sato, T., Sato, K., Matsuda, S., Kobayakawa, R., Sakano, H., Yoshihara, Y., Kikusui, T., and Touhara, K. (2010). A male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual behaviour via a select vomeronasal receptor. Nature *466*, 118-122.査読有

6) Mitsui, S., Igarashi, K. M., Mori, K., and Yoshihara, Y. (2011). Genetic visualization of the secondary olfactory pathway in Tbx21 transgenic mice. Neural Syst Circuits *1*, 5.査読有

7) Matsumoto, I., Ohmoto, M., Narukawa, M., Yoshihara, Y., and Abe, K. (2011). Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. Nat. Neurosci. *14*, 685-687.査読有

8) Langhauser, M., Ustinova, J., Rivera-Milla, E., Ivannikov, D., Seidl, C., Slomka, C., Finne, J., Yoshihara, Y., Bastmeyer, M., and Bentrop, J. (2012). Ncam1a and Ncam1b – two carriers of polysialic acid with different functions in the developing zebrafish nervous system. Glycobiology *22*, 196-209.査読有

9) Yoshihara, S., Takahashi, H., Nishimura, N., Naritsuka, H., Shirao, T., Hirai, H., Yoshihara, Y., Mori, K., Stern, P., and Tsuboi, A. (2012). 5T4 glycoprotein regulates the sensory input-dependent development of a specific subtype of newborn interneuron's in the mouse olfactory bulb. J. Neurosci. *32*, 2217-2226. 査読有

10) Mizuguchi, R., Naritsuka, H., Mori, K., Mao, C.A., Klein, W.H., and Yoshihara, Y. (2012). Tbr2 deficiency in mitral and tufted cells disrupts excitatory-inhibitory balance of neural circuitry in the mouse olfactory bulb. J. Neurosci. *32*, 8831-8844. 査読有

11) Mori, Y., Matsui, T., Furutani, Y., Yoshihara, Y., and Fukuda, M. (2012). Small GTPase Rab17 regulates the dendritic morphogenesis and postsynaptic development of hippocampal neurons. J. Biol. Chem. *287*, 8963-8973.査読有

12) Furutani, Y., Kawasaki, M., Matsuno, H., Mitsui, S., Mori, K., and Yoshihara, Y. (2012). Vitronectin induces phosphorylation of ezrin/radixin/moesin actin-binding proteins through binding to its novel neuronal receptor telencephalin. J. Biol. Chem. *287*, 39041-39049.査読有

13) Walling, S.G., Brown, R.A.M., Miyasaka, N., Yoshihara, Y., and Harley, C.W. (2012). Selective wheat germ agglutinin (WGA) uptake in the hippocampus from the locus coeruleus of dopamine-b-hydroxylase-WGA transgenic mice. Front. Behav. Neurosci. *6*, 23.査読有

14) Tachikawa, K.S., Yoshihara, Y., and Kuroda, K.O. (2013). Behavioral transition from attack to parenting in male mice: a crucial role of the vomeronasal system. J. Neurosci. *33*, 5120-5126.査読有

15) Braubach, O.R., Miyasaka, N., Koide, T., Yoshihara, Y., Croll, R.P., and Fine, A. Experience-dependent versus experience-independent postembryonic development of distinct groups of zebrafish olfactory glomeruli. J. Neurosci. *33*, 6905-6915.査読有

16) Miyasaka, N., Wanner, A.A., Li, J., Mack-Bucher, J., Genoud, C., Yoshihara, Y., and Friedrich, R.W. (2013). Functional development of the olfactory system in zebrafish. Mech. Dev. (in press).査読有

岡本仁

1) Amo, R., Aizawa, H., Takahoko, M., Kobayashi, M., Takahoko, R., Aoki, T., and Okamoto, H. (2010) Identification of the zebrafish ventral habenula as a homologue of the mammalian lateral habenula. J Neurosci. *30*, 1566-1574.

2) Agetsuma M, Aizawa H, Aoki T, Nakayama R, Takahoko M, Goto M, Sassa T, Amo R, Shiraki T, Kawakami K, Hosoya T, Higashijima S, and Okamoto, H. (2010) The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. Nat Neurosci. *13*, 1354-1356.

3) Aizawa H, Amo R, and Okamoto, H. (2011) Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. Front Neurosci. 5:138. doi: 10.3389/fnins.2011.00138. Epub 2011 Dec 21.

4) Okamoto, H., Agetsuma M., and Aizawa H. (2012) Genetic dissection of the zebrafish habenula, a possible switching board for selection of behavioral strategy to cope with fear and anxiety. Devl. Neurobiol. *72,* 386-394.

5) Aizawa H., Kobayashi M., Tanaka S., Fukai T., and Okamoto, H. (2012) Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. J Comp Neurol. 520, 4051-4066.

6) Aizawa H., Yanagihara S., Kobayashi M., Niisato K., Takekawa T., Harukuni R., McHugh T.J., Fukai T., Isomura Y., and Okamoto H. (2013)The synchronous activity of lateral habenular neurons is essential for regulating hippocampal theta oscillation. J. Neurosci. in press

7) Aoki T., Kinoshita M., AokiR., Agetsuma M.,Aizawa H., Yamazaki M., Takahoko M., Amo R., Arata A., Higashijima S., Tsuboi T., and Okamoto, H. (2013) Imaging of Neural Ensemble for the Retrieval of a Learned Behavioral Program. Neuron, in press.

林悠
1) Hayashi, Y., Hirotsu, T., Iwata, R., Kage-Nakadai, E., Kunitomo, H., Ishihara, T., Iino, Y., and Kubo, T. (2009). A trophic role for Wnt-Ror kinase signaling during developmental pruning in *Caenorhabditis elegans*. Nat. Neurosci. *12*, 981–7. 査読有

戸井基道
1) Yamashita, M., Iwasaki, K., and Doi, M. (2009). The non-neuronal syntaxin SYN-1 regulates defecation behavior and neural activity in *C. elegans* through interaction with the Munc13-like protein AEX-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. *16*, 404-408. 査読有
2) Doi, M., Minematsu, H., Kubota, Y., Nishiwaki, K., and Doi, M. VPS9-domain protein RIN-1 is a novel effector for Rac that regulates neuronal cell migration and axon pathfinding in *C. elegans*. Development. 査読有

児島将康
1) Ida, T., Takahashi, T., Tominaga, H., Sato, T., Kume, K., Ozaki, M., Hiraguchi, T., Maeda, T., Shiotani, H., Terajima, S., Sano, H., Mori, K., Yoshida, M., Miyazato, M., Kato, J., Murakami, N., Kangawa, K., Kojima, M. (2011). Identification of the novel bioactive peptides dRYamide-1 and dRYamide-2, ligands for a neuropeptide Y-like receptor in Drosophila. Biochem Biophys Res Commun, *410*.872-877.査読有
2)Ida, T., Takahashi, T., Tominaga, H., Sato, T., Kume, K., Kumiko, Yoshizawa-Kumagaye., Hideki, Nishio., Kato, J., Murakami, N., Miyazato, M., Kangawa, K., Kojima, M. (2011). Identification of the endogenous cysteine-rich peptide trissin, ligand for an orphan G-proteincoupled receptor in Drosophila. Biochem Biophys Res Commun, *414*, 44-48.査読有
3)Ida, T., Takahashi, T., Tominaga, H., Sato, T., Sano, H., Kume, K., Ozaki, M., Hiraguchi, T., Shiotani, H., Terajima, S., Nakamura, Y., Mori, K., Yoshida, M., Kato, J., Murakami, N., Miyazato, M., Kangawa, K., Kojima, M. (2013). Isolation of the bioactive peptides CCHamide-1 and CCHamide-2 from *Drosophila* and their putative role in appetite regulation as ligands for G-protein-coupled receptors. Frontiers in Eendocrinol. 発表予定　査読有

2.3.2 学会発表

＜計画研究＞

飯野雄一
1) Ryo Iwata, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino「Isolation of mutants defective in salt chemotaxis learning in *C. elegans*」3rd East Asia *C. elegans* Meeting 2008、2008 年 4 月 19 日、上海
2) 岩田遼、國友博文、飯野雄一「線虫 *C. elegans* における化学走性学習を制御する新規分子の探索」第 31 回日本神経科学大会、2008 年 7 月 10 日、東京
3) Shigekazu Oda, Yugo Matsuura, Koji Hotta and Kotaro Oka「Benzaldehyde adaptation is interfered by high temperature in *C. elegans*.」3rd East Asia *C. elegans* Meeting 2008、2008 年 4 月 20 日、中国（上海）
4) Masahiro Tomioka and Yuichi Iino「The mechanism of INS-1 secretion in the regulation of salt chemotaxis learning」Neuronal Development, Synaptic Function ＆ Behavior *C. elegans* Topic Meeting #2、2008 年 7 月 1 日、University of Wisconsin-Madison
5) Takeshi Adachi, Masahiro Tomioka, Hirofumi Kunitomo, Yoshifumi Okochi, Ikue Mori, Yuichi Iino.「Analysis of genes interacting with the insulin-like signaling pathway, which regulates salt chemotaxis learning in *C. elegans*」第 31 回日本神経科学大会、2008 年 7 月 10 日、東京
6) Yuichi Iino, Kazushi Yoshida and Takanobu Tagawa「Behavioral Strategy for Salt Chemotaxis and Underlying Neurons」Neuronal Development, Synaptic Function ＆ Behavior *C. elegans* Topic Meeting #2、2008 年 7 月 1 日、マディソン
7) Jun Takayama, Serge Faumont, Hirofumi Kunitomo, Shawn Lockery, Yuichi Iino「Identification of genes expressed left/right asymmetrically in ASE neurons of *C. elegans*」Neuronal development, synaptic function & behavior *C. elegans* topic meeting #2、2008 年 7 月 1 日、Madison
8) Jun Takayama, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino「Gene expression profiling of single chemosensory neurons of the nematode *Caenorhabditis elegans*」第 31 回日本神経科学大会、2008 年 7 月 10 日、東京
9) 富岡征大、飯野雄一「線虫 *C. elegans* におけるインスリン/PI3 キナーゼシグナル伝達経路による化学走性学習の制御」第 31 回　日本神経科学大会、2008 年 7 月 11 日、東京国際フォーラム（東京）
10) 山田康嗣、広津崇亮、松木正尋、國友博文、飯野雄一「線虫 *C. elegans* の嗅覚順応はネプリライシン NEP-2 により制御される」第 80 回日本遺伝学会大会、2008 年 9 月 3 日、名古屋
11) 吉田和史、広津崇亮、飯野雄一、石原健「線虫 *C. elegans* における匂いの濃度に依存した行動変化を制御する神経回路の解明」第 80 回　日本遺伝学会大会、2008 年 9 月 3 日、名古屋

12) 吉田和史、飯野雄一「線虫の塩に対する化学走性を制御する機構に関与する神経回路の解析」第 31 回　日本分子生物学会年会、2008 年 12 月 11 日、神戸
13) 國友博文、飯野雄一「C.エレガンスの塩化ナトリウムに対する走性行動の餌と塩による調節」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会　合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸
14) 大野速雄, 池田大祐, 國友博文, 飯野雄一「カルシンテニン/アルカデインの線虫ホモログ CASY-1 の学習における機能の解析」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 12 日、神戸
15) 飯野雄一、富岡征大、安達健、吉田和史、田川嵩展「線虫 *C. elegans* の化学走性とその可塑性の分子神経機構」日本遺伝学会第 80 回大会、2008 年 9 月 4 日、名古屋
16) Kazushi Yoshida and Yuichi Iino「Analysis of the neural circuit for the regulation of two behavioral strategies for salt chemotaxis」17th International *C. elegans* Meeting、2009 年 6 月 24 日、ロサンゼルス
17) Ryo Iwata, Hirofumi Kunitomo,Yuichi Iino「Role of the phopholipase C□ homolog PLC-1 in the regulation of salt chemotaxis learning in *C. elegans*」17th International *C. elegans* Meeting、2009 年 6 月 25 日、ロサンゼルス
18) Hirofumi Kunitomo and Yuichi Iino「A combination of salt and food conditions in the habitat affects preference for salt in *C. elegans*.」17th International *C. elegans* Meeting、2009 年 6 月 27 日、ロサンゼルス
19) Shigekazu Oda, Masahiro Tomioka and Yuichi Iino「Analysis of neuronal plasticity in salt chemotaxis learning of *C. elegans* by Ca^{2+} imaging.」17th International *C. elegans* Meeting、2009 年 6 月 26 日、Los Angeles
20) Hayao Ohno, Daisuke D. Ikeda, Hirofumi Kunitomo and Yuichi Iino「Functional analysis of CASY-1, an ortholog of Calsyntenins/Alcadeins, which is essential for multiple forms of learning. 」17th International *C. elegans* Meeting、2009 年 6 月 25 日、ロサンゼルス
21) K. Yamada, T. Hirotsu, M. Matsuki, H. Kunitomo, Y. Iino「Olfactory adaptation is regulated by a peptide signal in *C. elegans*」17th International *C. elegans* Meeting、2009 年 6 月 27 日、ロサンゼルス
22) 國友博文、大野速雄、飯野雄一「C.エレガンスの塩走性行動の制御機構の解明」第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜
23) 吉田和史、飯野雄一「線虫 *C. elegans* の塩走性における 2 つの機構を制御する神経回路と分子」第 32 回　日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日、横浜
24) 大野速雄、國友博文、飯野雄一「線虫 *C. elegans* の塩走性学習とその分子基盤」第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜
25) 富岡征大、飯野雄一「Dopamine-dependent secretion of INS-1, an insulin-like peptide, regulates salt chemotaxis learning in *C. elegans*」第 32 回　日本神経科学大会、2009 年 9 月 16 日、名古屋国際会議場（名古屋）
26) 富岡征大、飯野雄一「線虫 *C. elegans* の塩走性学習におけるインスリン様ペプチド INS-1 の分泌の役割」第 32 回　日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、パシフィコ横浜（横浜）
27) S. ODA, M. TOMIOKA, Y. IINO「Analysis of neuronal plasticity in salt chemotaxis learning of *C. elegans* by Ca^{2+} imaging.」NEUROSCIENCE 2009 SfN's 39th annual meeting、2009 年 11 月 19 日、Chicago
28) 岩田遼、國友博文、飯野雄一「*C. elegans* phopholipase Cε homolog PLC-1 regulates sensory set-point and learning 」第 32 回　日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜（横浜）
29) 安達健，富岡征大，國友博文，大河内善史，森郁恵，飯野雄一「線虫 *C. elegans* の味覚神経 ASER による塩走性学習の制御とその分子メカニズム」第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 13 日、横浜
30) 小野寺馨、國友博文、飯野雄一「Strength of salt chemotaxis learning intensity and retention of sensory signaling of memory in *Caenorhabditis elegans*」第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜市
31) Yuichi Iino「Molecular and cellular mechanisms of salt chemotaxis learning in *C. elegans*」Janelia Farm Conference "Neural Circuits and Behavior in *C. elegans* II: Towards the Ultimate Model"、2009 年 3 月 10 日、Ashburn
32) Ryo Iwata, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino.「Synaptic regulation of DAG and phosphoinositides by M01F1.7, the conserved phosphatidylinositol transfer protein」4th East Asia *C. elegans* Meeting、2010 年 7 月 12 日、東京
33) Hayao Ohno, Hirofumi Kunitomo, Takeshi Adachi and Yuichi Iino「*C. elegans* has a memory for NaCl concentrations」4th East Asia *C. elegans* Meeting、2010 年 7 月 13 日、東京
34) Kazushi Yoshida, Takaaki Hirotsu, Takanobu Tagawa, Shigekazu Oda, Yuichi Iino and Takeshi Ishihara「Neural and behavioral mechanisms of response to an odorant depending on its concentration 」4th East Asia *C. elegans* Meeting、2010 年 7 月 13 日、東京
35) Kazushi Yoshida, Takaaki Hirotsu, Takanobu Tagawa, Shigekazu Oda, Yuichi Iino and Takeshi Ishihara「Neural and behavioral mechanisms of response to an odorant depending on its concentration 」Neuronal Development, Synaptic Function ＆ Behavior *C. elegans* Topic Meeting 2010、2010 年 6 月 29 日、Madison
36) Shigekazu Oda, Masahiro Tomioka and Yuichi Iino「Dynamics of neural circuit underlying salt chemotaxis learning in *C. elegans*」Neuronal Development, Synaptic Function ＆ Behavior *C. elegans* Topic Meeting 2010、2010 年 6 月 29 日、Madison
37) 富岡征大、小田茂和、飯野雄一「The role of INS-1, an insulin-like peptide, in salt chemotaxis learning」Neuronal Development, Synaptic Function ＆ Behavior *C. elegans* Topic Meeting 2010、2010 年 6 月 29 日、Madison
38) 富岡征大、安達健、小田茂和、飯野雄一「線虫 *C. elegans* の学習を制御するインスリン様シグナル伝達経路の役割」第 81 回　日本動物学会大会、2010 年 9 月 24 日、東京大学（東京都）
39) Koji Yamada, Ryo Iwata, Takaaki Hirotsu, Masahiro Matsuki, Rebecca A. Bucher, Masahiro Tomioka, Takeshi Ishihara, Jon Clardy, Hirofumi Kunitomo and Yuichi Iino「Ascaroside phromones regulate olfactory plasticity through the

SNET-1 peptide」Neuronal Development, Synaptic Function ＆ Behavior *C. elegans* Topic Meeting 2010、2010 年 6 月 29 日、Madison
40) Koji Yamada, Ryo Iwata, Takaaki Hirotsu, Masahiro Matsuki, Rebecca A Butcher, Masahiro Tomioka, Takeshi Ishihara, Jon Clardy, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino「Pheromonal interactions modulate behavioral plasticity in *C. elegans*」4th East Asia *C. elegans* Meeting、2010 年 7 月 14 日、東京
41) Koji Yamada, Jun-ichi Tsuchiya, Yuichi Iino.「Repression of transgene expression by the Q/P-rich nuclear protein PQE-1.」18th international *C. elegans* meeting、2011 年 6 月 24 日、ロサンゼルス
42) Hayao Ohno, Masahiro Tomioka, Shinya Kato, Yasuki Naito, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino「Axonal transport of a new DAF-2 isoform governs associative learning.」18th International *C. elegans* Meeting、2011 年 6 月 24 日、ロサンゼルス
43) Yuki Sakurai, Hirofumi Kunitomo, and Yuichi Iino.「Genetic analysis of food-associated salt concentration memory.」18th international *C. elegans* meeting、2011 年 6 月 23 日、ロサンゼルス
44) M. TOMIOKA and Y. IINO「The role of insulin/PI 3-kinase pathway in food-dependent plasticity of salt chemotaxis in *C. elegans*」Neuroscience 2011, SfN's 41st annual meeting、2011 年 11 月 16 日、Washington, DC
45) Hirofumi Sato, Hirofumi Kunitomo, Shigekazu Oda, Yuichi Iino「Experience-dependent modulation of the neuronal response in the gustatory circuit」18th international *C. elegans* meeting、2011 年 6 月 25 日、ロサンゼルス
46) Hirofumi Kunitomo, Ryo Iwata, Hirofumi Sato, Hayao Ohno, Yuichi Iino.「Experience-dependent modulation of salt preference in *C. elegans*.」18th International *C. elegans* Meeting、2011 年 6 月 23 日、米国ロサンゼルス
47) 國友博文、佐藤博文、安達健、岩田遼、大野速雄、飯野雄一「C. エレガンスの味覚記憶と行動可塑性の分子神経機構」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 17 日、横浜
48) Hirofumi Kunitomo, Ryo Iwata, Hirofumi Sato, Hayao Ohno, and Yuichi Iino「Roles of diacylglycerol signaling in discrimination of stimulus intensity in a *Caenorhabditis elegans* taste receptor neuron.」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜
49) Hayao Ohno, Masahiro Tomioka, Shinya Kato, Yasuki Naito, Hirofumi Kunitomo and Yuichi Iino「Axonal transport of a novel isoform of the Insulin/IGF receptor governs associative learning in *Caenorhabditis elegans*」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、横浜
50) Yuichi Iino「Sensing Salt: Plasticity in Sensory Systems and Behavioral Response」18th International *C. elegans* Meeting、2011 年 6 月 24 日、ロサンゼルス
51) Kazushi Yoshida, Takaaki Hirotsu, Takanobu Tagawa, Shigekazu Oda, Yuichi Iino, and Takeshi Ishihara「Olfactory preference switch depending on odor concentration is mediated by combinatorial change of acting sensory neurons」18th international *C. elegans* meeting、2011 年 6 月 24 日、Los Angeles
52) Kazushi Yoshida, Takaaki Hirotsu, Takanobu Tagawa, Shigekazu Oda, Yuichi Iino, and Takeshi Ishihara「Coordinated change of acting sensory neurons is important for olfactory preference change depending upon odor concentration」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、横浜
53) 櫻井裕樹、國友博文、飯野雄一「C. エレガンスの塩濃度走性の遺伝学的解析」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜（横浜）
54) 土屋純一、山田康嗣、飯野雄一 「Elucidation of the molecular mechanism of olfactory plasticity regulated by interactions between individuals」第 34 回分子生物学会、2011 年 12 月 13 日、横浜
55) 佐藤博文、國友博文、小田茂和、飯野雄一「線虫 *C. elegans* の塩濃度記憶に依存した神経応答の解析」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜
56) 小田茂和、富岡征大、飯野雄一「Dynamics of neural activities underlying salt chemotaxis learning in *C. elegans*」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜
57) 田村成宏、富岡征大、國友博文、飯野雄一「プロテインキナーゼ C による線虫の塩濃度学習の制御機構の解析」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜
58) 佐藤陽介、丸三徳、橋本浩一、飯野雄一「線虫 *C. elegans* における姿勢依存的光刺激システムの開発」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜
59) Naoko Sakai, Masahiro Tomioka, Takeshi Adachi, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino「Analyses of molecular mechanisms of information ntegration in food-dependent salt chemotaxis learning in *C. elegans*」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜
60) 酒井奈緒子、富岡征大、安達健、國友博文、飯野雄一「線虫の塩走性学習に関わるインスリン/PI3 キナーゼ経路の新規分子の探索」第 11 回東京大学生命科学シンポジウム、2011 年 6 月 4 日、本郷
61) Hayao Ohno, Masahiro Tomioka, Shinya Kato, Yasuki Naito, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino「Axonal transport of a novel DAF-2 isoform regulates associative learning」EMBO Conference Series *C. elegans* Neurobiology、2012 年 6 月 15 日、ハイデルベルク
62) Hayao Ohno, Masahiro Tomioka, Shinya Kato, Yasuki Naito, Hirofumi Kunitomo and Yuichi Iino「Axonal transport of a novel isoform of the Insulin/IGF receptor regulates gustatory plasticity in *Caenorhabditis elegans*」XVI International Symposium on Olfaction and Taste、2012 年 6 月 24 日、ストックホルム
63) Kunitomo Hirofumi, Sato Hirofumi, Satoh Yohsuke, Iino Yuichi「Neural coding of the homeostatic salt chemotaxis based on salt-concentration memory in *C. elegans*」第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋

64) Hirofumi Kunitomo, Hirofumi Sato, Ryo Iwata, Takeshi Adachi, Hayao Ohno and Yuichi Iino「Roles of diacylglycerol signaling in migration toward preferred salt concentration in *C. elegans*」International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)、2012 年 6 月 25 日、Stockholm
65) Kazushi Yoshida, Takaaki Hirotsu, Takanobu Tagawa, Shigekazu Oda, Tokumitsu Wakabayashi, Yuichi Iino, and Takeshi Ishihara「Neuronal mechanisms underlying olfactory preference change depending upon odor concentration」XVI International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)、2012 年 6 月 25 日、Stockholm
66) 吉田和史、飯野雄一「線虫の塩への化学走性を調節する神経回路の同定」日本味と匂学会第 46 回大会、2012 年 10 月 4 日、大阪
67) Yohsuke Satoh, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino「Optogenetic analysis of the mechanism for sensing chemical gradients」5th East Asia Worm Meeting、2012 年 6 月 28 日、台北
68) Yohsuke Satoh, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino「Optogenetic analysis of the mechanism for sensing chemical gradient in *C. elegans*」第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡
69) Masahiro Tomioka, Hayao Ohno, Shinya Kato, Yasuki Naito, Hirofumi Kunitomo and Yuichi Iino「The role of a splicing isoform of insulin receptor in starvation-induced behavioral plasticity in *C. elegans*」第 35 回　日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋国際会議場（名古屋市）
70) Masahiro Tomioka, Yasuki Naito, Shinya Kato, Hayao Ohno, Yuichi Iino「A Molecular Machinery that Determines Alternative Splicing Patterns of Insulin Receptor in *C. elegans* Chemosensory Neurons.」RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II、2012 年 6 月 11 日、RIKEN CDB（神戸）
71) Yuichi Iino, Hirofumi Kunitomo, Masahiro Tomioka, Hayao Ohno, Hirofumi Sato, Ryo Iwata, Shigekazu Oda, Yohsuke Sato and Takeshi Adachi「Molecular and neuronal mechanisms for experience-dependent gustatory behavior in *Caenorhabditis elegans*.」XVI International Symposium on Olfaction and Taste、2012 年 6 月 24 日、ストックホルム
72) Yuichi Iino, Hirofumi Kunitomo, Masahiro Tomioka, Hayao Ohno, Hirofumi Sato, Ryo Iwata, Shigekazu Oda, Yohsuke Sato and Takeshi Adachi「Molecular and neuronal mechanisms for experience-dependent gustatory behavior in *Caenorhabditis elegans*.」XVI International Symposium on Olfaction and Taste、2012 年 6 月 24 日、ストックホルム

石原健
1) 井上明俊、石原健、線虫 *C. elegans* を用いた記憶を忘れるメカニズムの遺伝的解析、第３１回日本分子生物学会年会･第８１回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 9 日-12 日、神戸
2) 畑茉容、横田慎一、石原健、線虫 *C. elegans* での Ca2+イメージングによる感覚情報統合の可視化、第３１回日本分子生物学会年会･第８１回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 9 日-12 日、神戸
3)前田恭介・広津崇亮・石原健線虫 *C. elegans* の神経回路を介した嗅覚順応機構の分子遺伝学的解析、第３１回日本分子生物学会年会･第８１回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 9 日-12 日、神戸
4)海江田兼次、石原健線虫 *C. elegans* におけるブタノンエンハンスメントに関わる記憶の消去の解析、第３１回日本分子生物学会年会･第８１回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 9 日-12 日、神戸
5)Shinkai,Y., and Ishihara, T. Molecular analysis of the integration of two sensory signals in *C. elegans.* 17th International *C. elegans* Meeting,　2009 年 6 月 24-28 日 Los Angeles U.S.A.
6)Kiriyama, K., Hirotsu, T., Kamizaki, T., Sato, N. and Ishihara,T. Systematic identification of specific receptors for odorants in *C. elegans*.17th International *C. elegans* Meeting, 2009 年 6 月 24-28 日 Los Angeles U.S.A.
7)Fujiwara, M., Sato, N., Maruyama, S., Akamine, T. and Ishihara, T.
Chemotactic control by a germline signal in *C. elegans*17th International *C. elegans* Meeting 2009 年 6 月 24-28 日 Los Angeles U.S.A.
8)Hirotsu, T., Yamada, R., Suzuki, A. and Ishihara, T. Live imaging of Ras activity in olfactory neurons in *C. elegans*.17th International *C. elegans* Meeting, 2009 年 6 月 24-28 日 Los Angeles U.S.A.
9)広津崇亮、山田龍司、鈴木暁也、石原健、線虫の嗅覚神経における Ras の活性のライブイメージング、第３２回日本神経科学大会、2009 年 9 月 16 日-18 日、名古屋
10)井上明俊、石原健、線虫における記憶を忘れるメカニズムの遺伝学的解析、第３２回日本神経科学大会　2009 年 9 月 16 日-18 日、名古屋
11)桐山恵介、広津崇亮、紙崎智子、佐藤則子、石原健
線虫における嗅覚受容体遺伝子の解析、第３２回日本神経科学大会、2009 年 9 月 16 日-18 日、名古屋
12)Hirotsu T., Yamada R., Suzuki A., Uozumi T., Ishihara T. Live imaging of Ras activity in olfactory neurons in *C. elegans*.International Symposium on Cellular Signaling.2009 年 11 月 19 日、筑波
13)寺本孝行、Eric Lambie, 岩崎幸一、TRPM channels govern both absorption and excretion of magnesium in *C. elegans*. 第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 9 日-12 日、横浜
14)井上明俊、石原健,線虫を用いた記憶を忘れるメカニズムの遺伝学的解析、第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 9 日-12 日、横浜
15)海江田兼次、石原健、線虫 *C. elegans* におけるブタノンエンハンスメントに関わる記憶の消去の解析、第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 9 日-12 日、横浜
16)出水田一生、藤原学、石原健 Search for the new regulators of the RNAi pathway in *C. elegans*.第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 9 日-12 日、横浜

17)魚住隆行、広津崇亮、山田龍司、鈴木暁也、石原健、線虫の嗅覚系における Ras の活性化のライブイメージング、第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 9 日-12 日、横浜
18)Shinkai,Y. and Ishihara, T.MOLECULAR ANALYSES OF THE INTEGRATION OF TWO SENSORY　SIGNALS IN *C. ELEGANS*. 2010　Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Neuronal Circuit,2010 年 03 月 10 日,Cold Spring Harbor United States of America
19) 石原健、線虫の神経回路における感覚情報の統合と記憶の忘却のメカニズム、日本分子生物学会第 10 回春季シンポジウム、2010 年 6 月 7－9 日、松島
20) Inoue, A. and Ishihara, T. The P38/JNK MAP kinase pathway regulates forgetting in *Caenorhabditis elegans*.NEURONAL DEVELOPMENT,SYNAPTIC FUNCTION & BEHAVIOR *C. elegans* Topic Meeting　2010 年 6 月 26 日- 7 月 2 日 Madison,USA
21) Uozumi T., Hirotsu T., Teramoto T., Yamada R., Suzuki A., Ishihara T.Live imaging of Ras activity in the olfactory system in *C. elegans*.NEURONAL DEVELOPMENT,SYNAPTIC FUNCTION & BEHAVIOR *C. elegans* Topic Meeting 2010 年 6 月 26 日- 7 月 2 日 Madison,USA
22) Takayuki Teramoto, Laura A. Sternick, Eriko Kage-Nakadai, Shirine Sajjadi, Jakub Siembida, Shohei Mitani, Kouichi Iwasaki, Eric J. Lambie. Combinatorial regulation of three TRPM channels governs magnesium homeostasis.4th East Asia *C. elegans* Meeting 2010 年 7 月 11 日-12 日東京
23) Inoue, A. and Ishihara, T.P38/JNK MAP kinase pathways regulate forgetting in *Caenorhabditis elegans* Neuro 2010. 2010 年 9 月 1 日-4 日、神戸
24) 新海陽一、山本悠太、石原　健線虫 *C. elegans* を用いた感覚情報の統合のメカニズムの解析 Neuro 2010. 2010 年 9 月 1 日-4 日、神戸
25) Ishihara, T.Molecular and neural mechanisms of behavioral choice in *C. elegans*.Systems Molecular Ethology and Beyond. 2011 年 11 月 10 日東京大学
26) 寺本孝行、石原健 Four-dimensional in vivo Ca2+ imaging of the *C. elegans* neural network 第 16 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム 2010 年 12 月 1 日、東京
27) 藤原学、佐藤則子、石原健線虫の匂いの好みを変化させる性腺シグナルの働きと作用機構 BMB2010・第 33 回日本分子生物学会 2010 年 12 月 7 日-12 月 10 日、神戸
28) 広津崇亮、桐山恵介、紙崎智子、佐藤則子、石原健線虫 *C. elegans* における嗅覚受容体の網羅的解析、BMB2010・第 33 回日本分子生物学会 2010 年 12 月 7 日-12 月 10 日、神戸
29) 猿渡悦子、海江田兼次、石原健線虫 *C. elegans* におけるブタノンエンハンスメントにかかわる記憶の消去の解析、BMB2010・第 33 回日本分子生物学会 2010 年 12 月 7 日-12 月 10 日、神戸
30) 井上明俊、石原　健線虫 *C. elegans* において記憶の忘却は p38/JNK MAP キナーゼ経路により制御される、BMB2010・第 33 回日本分子生物学会 2010 年 12 月 7 日-12 月 10 日、神戸
31) 魚住隆行、広津崇亮、寺本孝行、山田龍司、鈴木暁也、石原健線虫 *C. elegans* の嗅覚神経における Ras の活性化のライブイメージング、BMB2010・第 33 回日本分子生物学会 2010 年 12 月 7 日-12 月 10 日、神戸
32) 山本悠太、石原　健線虫 *C. elegans* における感覚情報の統合の分子メカニズムの解析,BMB2010・第 33 回日本分子生物学会 2010 年 12 月 7 日-12 月 10 日、神戸
33) Ishihara, T.Molecular and neural mechanisms for behavioral choice between two　conflicting alternatives in *C. elegans*. The 3rd International Conference on Cognitive Neurodynamics 2011 年 6 月 12 日 Hilton Niseko Village,Hokkaido, Japan
34) Akitoshi Inoue, Takeshi Ishihara The P38/JNK MAP kinase pathway regulates forgetting in *Caenorhabditis elegans*.18th International *C. elegans* Meeting Los Angeles U.S.A. 2011 年 6 月 22-26 日
35) Fujiwara Mnabi, Takeshi Ishihara Chemotaxis behavior is regulated by germline in *C. elegans* 18th International *C. elegans* Meeting Los Angeles U.S.A. 2011 年 6 月 22-26 日
36) Swatari Etsuko Changes in responsivity of olfactory neurons to odor during olfactory adaptation and recovery in *Caenorhabditis elegans*. １８ｔｈ International *C. elegans* Meeting Los Angeles U.S.A. 2011 年 6 月 22-26 日
37) 広津崇亮、魚住隆行、吉田和史、寺本孝行、山田龍司、鈴木暁也、飯野雄一、石原健 In vivo imaging of Ras activity in olfactory neurons suggests its transient activation is important for olfactory behavior 第 63 回日本細胞生物学会大会　2011 年 6 月 28 日、北海道大学
38) 石原健、新海陽一、山本悠太、寺本孝行、線虫 *C. elegans* の行動選択に関わる感覚情報の統合を制御するメカニズム、日本神経科学大会　シンポジウム「化学感覚の情報処理の分子神経機構」S4-G-1-3 2011 年 9 月 17 日、横浜
39) 寺本孝行、石原健、*C. elegans* 神経ネットワークの４次元Ｃａ２＋イメージング、第 34 回日本神経科学大会　2011 年 9 月 15 日、横浜
40) 吉田和史、広津崇亮、田川崇展、小田茂和、飯野雄一、石原健、匂いの濃度に依存した感じ方の変化は活性化する感覚ニューロンの組み合わせが変化することにより制御される、第 34 回日本神経科学大会　2011 年 9 月 15 日、横浜
41) 山本悠太、新海陽一、寺本孝行、石原健、線虫 *C. elegans* における感覚情報の統合の分子メカニズムの解析、第 34 回日本神経科学大会　2011 年 9 月 15 日、横浜
42) 魚住隆行、広津崇亮、吉田和史、寺本孝行、山田龍司、鈴木暁也、飯野雄一、
石原健、In vivo イメージングによって明らかにされた素早い Ras の活性化の嗅覚行動への重要性第 34 回日本神経科学大会 2011 年 9 月 16 日、横浜
43) 寺本孝行、石原健　4D *in vivo* Ca^{2+} imaging of the *C. elegans* neural network. 第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日、横浜

44) 谷口群、桐山恵介、紙崎智子、佐藤則子、石原健、広津崇亮
Systematic identification of olfactory receptors for odorants in *C. elegans*.第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日、横浜
45) 山本悠太、新海陽一、猿渡悦子、寺本孝行、石原健、線虫 *C. elegans* における感覚情報の統合の分子メカニズムの解析、第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日、横浜
46) 有井照剛、藤原学、石原健、線虫 *C. elegans* における cGMP 依存性タンパク質キナーゼ EGL-4 による特定の匂いへの走性制御機構の解析、第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日、横浜
47) 魚住隆行、広津崇亮、吉田和史、山田龍司、鈴木暁也、飯野雄一、石原健、In vivo イメージングによって明らかにする素早い Ras の活性変化の嗅覚行動への重要性第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 15 日、横浜
48) Fujiwara M., Sato N, Maruyama S, Ishihara T. Chemotaxis behavior is regulated by germline in *C. elegans*. EMBO Conference Series *C. elegans* Neurobiology 2012 年 6 月 16 日 EMBL Heidelberg, Germany
49) Teramoto T, Yamamoto Y, and Ishihara T. 4-D Ca2+ imaging of the multiple neurons that regulate the sensory integration underlying behavioral choice. 2012 年 6 月 14 日 EMBL Heidelberg, Germany
50) Sawatari E, Kaieda K, Teramoto T, Ishihara T. snt-3 regulates memory erasing for butanone enhancement in *Caenorhabditis elegans*. 2012 年 6 月 16 日 EMBL Heidelberg, Germany
51) Inoue A, Sawatari E, Teramoto T, Ishihara T. Forgetting in *C. elegans* is accelerated by neuronal communication via the p38 MAPK pathway. 2012 年 6 月 15 日 EMBL Heidelberg, Germany
52) 北園智弘、井上明俊、猿渡悦子、石原健、線虫 *C. elegans* を用いた忘却シグナルの探索、文部科学省新学術領域研究「包括型脳科学研究推進支援ネットワーク」夏のワークショップ、2012 年 7 月 26 日、仙台
53) 石原健、線虫の行動選択を制御する神経回路とその活動の可視化、文部科学省新学術領域研「システム分子行動学」班会議、2012 年 7 月 26 日、仙台
54) 藤原学、佐藤則子、石原健、生殖細胞が制御する線虫の感覚行動、日本遺伝学会第 84 回大会、2012 年 9 月 24 日、九州大学
55) 北園智弘、井上明俊、石原健、線虫 *C. elegans* を用いた忘却シグナルの探索、日本遺伝学会第 84 回大会、2012 年 9 月 24 日、九州大学
56) 石原健、寺本孝行、線虫 *C. elegans* における３次元構成画像の解析に基づく多数の神経活動の同時測定、バイオイメージ・インフォマティクスワークショップ 2012、2012 年 11 月 1 日、神戸
57) 石原健、線虫 *C. elegans* の神経回路における忘却の制御機構、記憶回路研究会、2012 年 11 月 21 日、岡崎
58) 石原健、Acceleration of forgetting by neuronal communication in *C. elegans*. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ORGANIZATION AND FUNCTION OF THE NERVOUS SYSTEM. 2012 年 11 月 27 日、東京大学
59) 藤原学、佐藤則子、石原健、線虫の成長に伴う行動変化に関わるミトコンドリアの働き、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡
60) 寺本孝行、山本悠太、石原健、4-D Ca2+イメージングによる線虫 *C. elegans* の行動選択を制御する複数ニューロンの活動の可視化と計測、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡
61) 猿渡悦子、海江田兼次、寺本孝行、石原健、シナプトタグミン類似タンパク質 SNT-3 は線虫 *C. elegans* においてブタノンエンハンスメントの記憶の消去を制御する、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡
62) 井上明俊、猿渡悦子、寺本孝行、石原健、線虫 *C. elegans* において記憶の忘却は ASK/JNK 経路を介した神経間シグナル分泌により促進される、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡
63) 北園智弘、井上明俊、石原健、線虫 *C. elegans* を用いた忘却シグナルの探索、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡

新貝鉚蔵
1) Adachi, R., Osada, H., Shingai, R. "Temperature memory and chemosensation are preferential in different phases during simultaneous presentation assay in *C. elegans*". Neuroscience 2008, 2008 年 11 月 16 日 Washington DC, USA
2)安達良太、長田洋、新貝鉚蔵「線虫 *C. elegans* における飼育温度と誘引性化学物質の統合処理」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸ポートアイランド
3) 宇壽山　衛、若林篤光、佐々木和彦、新貝鉚蔵「匂い刺激に対する線虫 AWC ニューロン内カルシウムイオン濃度変動モデル」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸ポートアイランド
4) 若林篤光、木村由紀裕、安達良太、佐藤洋一、新貝鉚蔵「線虫 *C. elegans* の ASK 感覚神経細胞のカルシウムイメージング」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸ポートアイランド
5) 祝田尚之、岩崎唯史、新貝鉚蔵　「*C. elegans* の温度走性・化学走性に関与するニューラルネットワークのシナプス極性予測」電子情報通信学会ニューロコンピューティング研究会 2009 年 3 月 13 日、玉川大学
6) Wakabayashi,T., Togashi, T., Shingai, R. "Behavioral decision-making during acidic pH avoidance in *C. elegans*". 17th International *C. elegans* Meeting, 536B, 2009/6/24-28, UCLA, CA, USA.
7) 新貝鉚蔵 .「複数入力に対する行動選択」　日本生物物理学会東北支部会シンポジウム（招待講演）2009 年 9 月 11 日、東北大学
8) 祝田尚之、岩崎唯史、若林篤光、新貝鉚蔵　「C.エレガンスの部分神経回路のシミュレーション」　BPES 2009 第24回生体・生理工学シンポジウム（主催　計測自動制御学会）（依頼講演）、2009年9月24日　26日、東北大学
9)宇壽山　衛、佐藤　淳、五味壮平、新貝鉚蔵「C.エレガンス嗅覚受容ニューロンの細胞内Ca^{2+}応答モデル」第19回日本数理生物学会年会、2009年9月9日　11日、東京大学駒場キャンパス

10)宇壽山　衛、佐々木和彦、五味壮平、新貝鉚蔵　「*C. elegans* 嗅覚ニューロンの匂い信号伝達経路モデル」　第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 9 日　12 日、パシフィコ横浜
11)高橋尚敬、赤坂岳人、山月亮、祝田尚之、岩崎唯史、新貝鉚蔵 A neural network model of *C. elegans*(2009)第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 9 日　12 日、パシフィコ横浜
12)田中英俊、若林篤光、新貝鉚蔵「*C. elegans* のブタノンに対する化学走性の塩化アンモニウムによる促進」第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 9 日　12 日、パシフィコ横浜
13) Shingai, R. "Simultaneous presentation of two attractants modifies taxis behavior in *C. elegans*". 第87回日本生理学会大会、2010年5月19日　5月21日、盛岡
14) Shingai, R., Takahashi, H., Iwasaki, Y., Sakata, K., Wakabayashi, T., Ogurusu, T. "Computer simulation for neural network of *C. elegans*". 4th East Asia *C. elegans* Meeting, 2010年7月11日　14日、代々木、東京
15)Shingai, R., Takahashi, H., Iwasaki, Y., Wakabayashi, T., Ogurusu, T. "Neural network model of *C. elegans*". 日本神経科学会大会Neuro 2010、*2010*年9月2日　4日、神戸コンベンションセンター
16) Kuramochi, M., Iwasaki, Y. "Quantitative modeling of neuronal dynamics in *C. elegans*". 17th International Conference on Neural Information Processing (ICONIP 2010), 2010年11月22日, Sydney (Australia).
17) Kuramochi, M., Sakata, K., Shingai,R., Iwasaki, Y. Dynamical model variables, calcium imaging and design of *C. elegans* neuron. The 7th Asian Biophysical Association Symposium,招待講演、2011年1月30日, New Delhi (India).
18)Iwasaki, Y., Kuramochi, M., Sakata, K., Oda, S.,Iino, Y., and Shingai, R. "Neuronal modeling toward quantitative understanding of nervous system of *C. elegans*" 18th International *C. elegans*Meeitng, 545C, 2011 年 6 月 22 日 – 26 日,UCLA, CA, USA.
19)岩崎唯史, 坂田和実, 小田茂和, 飯野雄一, 新貝鉚蔵 "Quantitative neural model of *C. elegans* and its application to a neural circuit for chemotaxis". 第 49 回日本生物物理学会, Oral Session 3F0948、2010 年 9 月 16 日　18 日、兵庫県立大学.
20) Shingai, R., Takahashi, H., Iwasaki, Y., Ogurusu, T.「C. エレガンスのモデル神経回路における周期的興奮(Periodic excitation in a model neural network of *C. elegans*)」　第34回日本神経科学大会Oral Session O3-H-1-1、2011年9月14日　17日、パシフィコ横浜
21) 坂田和実, 山田雅史, 岩崎唯史, 秋田宙樹, 若林篤光, 新貝鉚蔵, 小栗栖太郎「非対称性を取り入れた線虫感覚神経系のコンピュータシミュレーション」　第 34 回日本神経科学大会 P4-u06、2011 年 9 月 14 日　17 日、パシフィコ横浜
22) 一條宏, 若林篤光, 大場祐介, 高橋亮介, 小栗栖太郎, 新貝鉚蔵 (2011)「線虫*C. elegans*嗅覚受容ニューロンは味覚刺激により活性化する」　第34回日本神経科学大会P4-K17、2011年9月14日　17日、パシフィコ横浜
23) Shingai, R., Takahashi, H., Iwasaki, Y. "Neural circuit model for head swing and forward/backward movement of *C. elegans*". Neuroscience 2011, 623.12, 11 月 12 日　16 日, Washington DC, USA
24) Usuyama, M., Shingai, R., Ichinose, M. "Intracellular response model of an olfactory neuron in *C. elegans*". Neuroscience 2011, 624.03, 11 月 12 日　16 日, Washington DC, USA
25) 高橋亮介, 一條宏, 大場祐介, 若林篤光, 小栗栖太郎, 新貝鉚蔵 (2011) 線虫における塩感覚ニューロン ASE の機能欠損変異体の匂い感受性. 第 34 回日本分子生物学会　1P-0925、2011 年 12 月 13 日　16 日、パシフィコ横浜
26) 岩崎唯史　「線虫のニューロンと蛍光 Ca2+インジケータに関する動的モデル」　新学術領域「システム分子行動学」数理シンポジウム、2012 年 5 月 11 日-12 日、東京大学
27) Yamazoe, A., Iwasaki, Y., Miyanishi, Y., Kawazoe, Y., Kimura, K. "A novel behavioral strategy at run initiation for efficient odor avoidance" EMBO Conference Series: *C. elegans* Neurobiology, 2012年6月14日-17日, Heidelberg, Germany
28) Wakabayashi, T., Sakata, K., Shingai, R. "Navigational decision-making during acidc pH avoidance in *C. elegans*" EMBO Conference Series: *C. elegans* Neurobiology, 2012 年 6 月 14 日-17 日, Heidelberg, Germany
29) Iwasaki,Y., Ichijo, H., Shingai, R., Yamazoe, A., Kimura, K. "Computational evaluation of odor gradient in chemotaxis assay" 5th East Asia *C. elegans* Meeting, 2012 年 6 月 27 日-30 日, Taipei, Taiwan
30) Iwasaki, Y., Sakata, K., lino, Y., Shingai, R. "Integrated modeling of neuronal dynamics and observed fluorescence intensity in *C. elegans*". 包括脳ネットワーク夏のワークショップ 2012、*2012*年7月24日-27日、仙台国際センター
31) Usuyama, M., Shingai, R. "Intracellular response model of *C. elegans* olfactory neuron"包括脳ネットワーク夏のワークショップ2012、*2012*年7月24日-27日、仙台国際センター
32) 若林篤光、中野裕太、渡辺美和、冨田浩史　「線虫は、幼生の生育や成虫の運動に対して毒性を持つレア・アース元素を化学感覚器で検出し、忌避行動を示す」　第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日　14 日、福岡

多羽田哲也

1) Tabata, Yasugi, Sugie, Umetsu, and Fischbach. "Cellular and molecular mechanisms underlying neural circuit formation in Drosophila visual system development". Neural development, 42nd Annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2009 年 5 月 28 日-31 日, Niigata.
2) 阿部"Sickie, a Neuron Navigator homolog, is required for axonal elongation of Drosophila mushroom body". 第 9 回日本ショウジョバエ研究会（JDRC9)、2009 年 7 月 6 日—8 日、静岡
3) Murakami, Sekiguchi, Shimizu, Maeyama, and Tabata "Identification of mushroom body-associated neurons that regulate the formation of Drosophila olfactory aversive memory". 第 32 回神経科学大会、2009 年 9 月 16 日-18 日、名古屋

4) 阿部“Sickie, a Neuron Navigator homolog, is required for axonal elongation of Drosophila mushroom body”. 第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 16 日—18 日、名古屋
5) Tabata “Spatio-temporal regulation of DER and Notch signaling pathways organizes the proneural wave progression in medulla neuroblast development”. Neurobiology of Drosophila, 2009 年 9 月 29 日-10 月 3 日, Cold Spring Harbor Laboratory, USA
6) 村上 “Mushroom body-associated neurons that regulates the formation of Drosophila olfactory aversive memory”. 第 2 回分子高次機能研究会シンポジウム、2009 年 11 月 3 日-5 日、福島
7) 村上、関口、前山、多羽田「ショウジョウバエ嗅覚忌避記憶形成過程に働くキノコ体接続神経細胞の特定」新学術領域班会議「神経系の動作原理を明らかにするためのシステム分子行動学」、2009 年 11 月 18 日-20 日、静岡
8) 村上、関口、前山、多羽田「ショウジョウバエ嗅覚忌避記憶形成過程に働くキノコ体接続神経細胞の特定」第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日-12 日、横浜
9) 新田、清水、大坪、多羽田“RNA interference screening for genes involved in the development of Drosophila mushroom body”. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 12 日、横浜
10) Tabata “Cellular and molecular mechanisms underlying neural formation in Drosophila visual system development”. International Symposium on Drosophila Bio-Resource:- Pioneering life science research with Drosophila Genetic Resources -, 2010 年 3 月 17 日-18 日, Kyoto
11) Murakami*, Sekiguchi*, Ichinose, Maeyama, and Tabata *These authors contributed equally to this work “Identification of a mushroom body output neuron required during the consolidation phase for odor memory”. International Symposium on Drosophila Bio-Resource:- Pioneering life science research with Drosophila Genetic Resources -, 2010 年 3 月 17 日-18 日, Kyoto
12) 阿部“Sickie, a NEURON NAVIGATOR homolog, is required for the axonal development of Drosophila mushroom body neurons”. ショウジョウバエ遺伝資源センター設立 10 周年記念行事　国際バイオリソースシンポジウム「ショウジョウバエ」、2010 年 3 月 17 日—18 日、京都
13) 阿部“Sickie, a NEURON NAVIGATOR homolog, is required for the axonal development of Drosophila mushroom body neurons”. 第 43 回発生生物学会、2010 年 6 月 20 日—23 日、京都
14) 阿部“Sickie, a NEURON NAVIGATOR homolog, is required for the axonal development of Drosophila mushroom body neurons”. 発生生物学会　夏季シンポジウム 2010、2010 年 8 月 25 日—27 日、東京
15) Tabata, Murakami “Mechanisms underlying Drosophila memory formation”. 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日−10 日、神戸
16) Murakami, Minami, Maeyama, Suzuki, and Tabata “Transcriptome analysis of olfactory aversive memory in Drosophila mushroom body”. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日-10 日、神戸
17)阿部 “Sickie, a NEURON NAVIGATOR homolog, is required for the axonal development of Drosophila mushroom body neurons”. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日-10 日、神戸
18) Tabata “Molecular and Cellular basis of the Drosophila memory formation”. Todai Forum:Systems Biology & Genome Medicine, 2011 年 10 月 21 日, Ecole Normale Superieure de Lyon, France
19) Hiroi, Cameron, and Scott “The molecular basis of water taste in Drosophila”. the 9th International Symposium on Olfaction and Taste, 2011 年 11 月 4 日-6 日、福岡
20) Yamazaki, Hiroi, Ichinose, and Tabata “Long-term memory formation-dependent changes of CREB reporter signals in Drosophila”. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜
21) Hiroi, Yamazaki, Murakami, and Tabata Learning-induced neural plasticity in Drosophila at a single cell level. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜
22) 村上 “Identification of novel genes in olfactory memory formation by RNA-seq analysis”. 第 5 回分子高次機能研究会、2012 年 8 月 27 日-29 日、滋賀
23) Yamazaki, Hiroi, Ichinose, and Tabata “Memory traces in Drosophila revealed by CREB-dependent reporter gene expression”. 第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 21 日、名古屋
24) 新田、清水、大坪、西、程、多羽田「ショウジョウバエ嗅覚記憶中枢に於いて DIP2 は軸索枝の投射を制御する」第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 21 日、名古屋
25)新田、清水、大坪、西、程、多羽田 “Disco-interacting protein 2 (DIP2)regulates guidance of axon branches in the mushroom body”. 第 10 回日本ショウジョウバエ研究会（JDRC10）、2012 年 10 月 13 日、東京
26)阿部 “Sickie regulates axonal growth of Drosophila Mushroom Body neurons via Slingshot-Cofilin pathway”. 第 10 回日本ショウジョウバエ研究会（JDRC10）、2012 年 10 月 13 日-15 日、東京
27) 多羽田「個体内記憶回路の同定とその機能解析による学習記憶制御基盤の統合的理解」生理学研究所、2012 年 11 月 20 日-21 日、愛知
28) 廣井、前山、多羽田 “Cellular-resolution imaging of olfactory memory in the Drosophila Mushroom body and its efferent neurons”. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡
29) 新田、清水、大坪、西、程、多羽田“Disco-interacting protein 2 (DIP2) regulates guidance of sister axons in the Drosophila mushroom body”.第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡

30）上岡、山崎、市之瀬、大坪、廣井、多羽田「ショウジョウバエにおける長期記憶形成依存的な CREB レポーター発現から見る記憶の痕跡」第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡
31）新田、清水、大坪、西、程、多羽田"Disco-interacting protein 2 (DIP2) regulates guidance of sister axons in the *Drosophila* mushroom body". Symposium on "Sensory Systems & Neural Circuits", 2013 年 2 月 11 日、東京
32）阿部 "Sickie regulates axonal growth of Drosophila Mushroom Body neurons via Slingshot-Cofilin pathway". Symposium on "Sensory Systems and Neural Circuits", 2013 年 2 月 11 日-12 日、東京
33) Ueoka, Hiroi, Ohkura, Nakai, and Tabata "Comprehensive Odor mapping in the Mushroom Body neurons in Drosophila melanogaster". Symposium on "Sensory Systems and Neural Circuits" , 2013 年 2 月 11 日-12 日、東京
34) Tabata "Drosophila olfactory coding and memory". Symposium on "Sensory Systems and Neural Circuits", 2013 年 2 月 12 日, Tokyo
35) Tabata "Visualizing Drosophila olfactory memory". Institute of Cellular and Organismic Biology Academia Sinica, 2013 年 3 月 25 日, Taiwan, R.O.C.
36）上岡、廣井、大倉、中井、多羽田「ショウジョウバエ嗅覚記憶中枢における匂い応答のマッピング」第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 27 日、東京

齊藤実
1）Miyashita T, Horiuchi J, Saitoe M. Functional significance of Mg^{2+} block in associative learning and memory. in *Learning and Memory: A Synthesis of Flies and Honeybees* Janelia Farm HHMI Conference、2008 年 11 月 12 日、Janelia Farm Research Campus, VA, USA
2）山崎大介、齊藤実　ショウジョウバエの加齢性記憶障害に関連する新規因子の同定と解析　第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会　2008 年 12 月 11 日、神戸
3）長野慎太郎、齊藤実　chico, a Drosophila insulin receptor substrate homolog, is required for olfactory learning. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸
4）吉野木綿子、齊藤実　（2008） Identification of a Drosophila mutant that shows accelerated memory loss upon aging. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸
5）堀内純二郎、山崎大介、長野慎太郎、相垣敏郎、齊藤実　Improving memory in Drosophila by decreasing PKA activity. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸
6）栗山祐二、宮下知之、堀内純二郎、上野耕平、齊藤実　酸化ストレスの記憶に与える影響　第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸
7）齊藤実　cAMP/PKA signaling pathway that regulates age-related memory impairment in Drosophila.　第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会　シンポジウム「老化と代謝」2008 年 12 月 9 日、神戸
8）Yamazaki D, Saitoe M. Pyruvate Carboxylase, a downstream candidate for cAMP/PKA signaling pathway that regulates age-related memory impairment in *Drosophila*. 11th Meeting of Hirosaki International Forum of Medical Science 、2009 年 3 月 27 日、弘前
9）Yamazaki D, Saitoe M. *Ram*, a mutation of the *Drosophila* pyruvate carboxylase ortholog, suppresses age-related memory impairment. 第 9 回日本ショウジョウバエ研究会ワークショップ、2009 年 7 月 8 日、掛川市
10）上野耕平、齊藤実　培養ショウジョウバエ脳における神経応答の高速スキャニングコンフォーカル顕微鏡による可視化　第 32 回日本神経科学大会、名古屋 2009 年 9 月 18 日
11）松野元美、堀内純二郎、Tim Tully、齊藤実　ショウジョウバエ細胞接着因子 Klingon は Notch 依存的な長期記憶形成に必要である。第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 17 日、名古屋
12）宮下知之、齊藤実　(2009)　なぜ長期記憶形成に間が必要か？第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 16 日、名古屋
13）Nagano S, Saitoe M. *chico*, a Drosophila insulin receptor substrate homolog is required for olfactory learning. in Neurobiology of Drosophila.、2009 年 10 月 1 日、Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA
14）齊藤実　cAMP/PKA シグナリングによる脳の老化機構　第 31 回日本基礎老化学会シンポジウム「老化に伴う生体ネットワーク変化の解明に向けた新たなトレンド」、2009 年 10 月 31 日、東京
15）Matsuno M, Horiuchi J, Tully T, Saitoe M. (2009) The Drosophila CAM Klingon is required for memory consolidation via neuron-glia interaction.　第 32 回日本分子生物学会年会シンポジウム「神経回路を基盤とするシステム分子行動学」、2009 年 12 月 9 日、横浜
16) 齊藤実　加齢に伴う記憶力低下の分子機序　年齢軸生体恒常性研究会シンポジウム　年齢・健康・疾患－生命の統合的理解にむけて、　2010 年 3 月 5 日、つくば
17）上野耕平、齊藤実　一過性ドパミン処理はキノコ体ニューロンの反応性を増強させる。第 33 回日本神経科学学会、2010 年 9 月 4 日、神戸
18）長野慎太郎、上野耕平、齊藤実　ショウジョウバエの chico 遺伝子の変異はキノコ体の神経の可塑性を阻害する。第 33 回日本神経科学学会、2010 年 9 月 2 日、神戸
19）田村拓也、堀内大輔、Yi-Chung Chen、曽根雅紀、宮下知之、齊藤実、吉村奈津恵、Ann-Shyn Chiang、岡澤均　感覚二次ニューロン依存的な記憶に関わる新規分子、dQBP1。第 33 回日本神経科学学会、2010 年 9 月 2 日、神戸
20）Ueno K, Naganos S, Saitoe M. Associative neural plasticity in the mushroom body of Drosophila. in System molecular ethology and beyond 、2010 年 11 月 10 日、東京
21）宮下知之、齊藤実　なぜ長期記憶形成には間が必要か？第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7 日、神戸

22）松野元美、齊藤実　ショウジョウバエ細胞接着因子 Klingon を介した神経・グリア相互作用は長期記憶形成に必要なグリアでの転写を調節する。第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7 日、神戸
23）平野恭敬、齊藤実　行動を司る長期記憶の保持にはエピジェネティックな制御が関与する。第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 9 日、神戸
24）上野耕平、齊藤実　遺伝子と行動を繋ぐ脳機能の蛍光イメージング解析。「行動は遺伝子でどこまで規定されるか」第 33 回日本分子生物学会年会ワークショップ、2010 年 12 月 8 日、神戸
25）Saitoe M. Regulation of Drosophila age-related memory impairment by glial cells. in *Learning and Memory: A Synthesis of Flies and Honeybees* Janelia Farm HHMI Conference、2011 年 5 月 16 日、Janelia Farm Research Campus, VA, USA
26）平野恭敬、齊藤実　長期記憶の保持には持続的な遺伝子発現制御が必須である　第 34 回日本神経科学学会、2011 年 9 月 17 日、横浜
27）松野元美、齊藤実　Neuron-glia interaction via Drosophila CAM Klingon modulates Repo-mediated glial gene expression required for long-term memory formation. 第 34 回日本神経科学学会、2011 年 9 月 15 日、横浜
28）上野耕平、長野慎太郎、齊藤実　Correlated activation of dopamine receptor is an essential for associative synaptic plasticity relevant to olfactory aversive memory.　第 34 回日本神経科学学会、2011 年 9 月 15 日、横浜
29）Hirano Y, Saitoe M. Maintenance of long-term memory requires persistent regulation of gene expression. in *Neurobiology of Drosophila*、2011 年 10 月 4 日、Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA
30）Ueno K, Naganos S, Saitoe M. Learning-related synaptic plasticity in the *Drosophila* mushroom bodies require correlated activation of NMDA, acetylcholine and dopamine D1 receptors. in *Neurobiology of Drosophila*、2011 年 10 月 6 日、Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA
31）平野恭敬、齊藤実　Maintenance of long-term memory requires persistent regulation of gene expression　第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜
32）上野耕平、齊藤実　in vivo imaging analysis of neural plasticity in mushroom body neurons.　「Visualization and optic control of neural circuit underlying behavior」第 34 回日本分子生物学会年会ワークショップ、2011 年 12 月 13 日、横浜
33）齊藤実　ショウジョウバエを用いて何が記憶を作るのかを知り、記憶が出来るところを見る　バイオカンファレンス 2011、2011 年 11 月 11 日、東京
34）齊藤実、平野恭敬　食事制限による非特異的な長期記憶促進効果とその分子機構　包括脳ワークショップ公開班会議、2012 年 7 月 26 日、仙台
35）Hirano Y, Naganos S, Matsuno M, Ueno K, Miyashita T, Horiuchi J, Saitoe M. Food deprivation facilitates long-term memory formation through activation of the CREB co-activator, CRTC in Drosophila. in *Neurofly*、2012 年 9 月 5 日、Padua, Italy
36）神村圭亮、上野耕平、中川　淳、齊藤実、前田信明　ショウジョウバエの神経筋接合部の形成においてパールカンは Wnt の双方向性シグナルを調節する　日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋
37）上野耕平、亀谷富由樹、長谷川成人、齊藤実　神経可塑性に伴うリン酸化プロファイルの網羅的解析　日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋
38）長野慎太郎、上野耕平、齊藤実　ショウジョウバエの匂い連合学習で形成される 2 種類の記憶成分　日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋
39）宮下知之、齊藤実　活性型 CREB と抑制型 CREB の比を調節するメカニズム　日本神経科学大会、2012 年 9 月 18 日、名古屋
40）平野恭敬、齊藤実、長野慎太郎、松野元美、上野耕平、宮下知之、堀内純二郎　ショウジョウバエにおいて飢餓は、CREB/CRTC 経路の活性化により長期記憶形成を促進する　日本神経科学大会、2012 年 9 月 18 日、名古屋
41）松野元美、齊藤実　長期記憶形成に必要な神経－グリア相互作用　日本神経科学大会シンポジウム「個々の神経細胞の働きを俯瞰して見る脳機能」、2012 年 9 月 19 日、名古屋
42）Ueno K, Saitoe M. Long-term enhancement in the mushroom body in cultured Drosophila brain: Cellular substrate for olfactory learning. *International symposium on organization and function of the nervous system*、2012 年 11 月 27 日、東京
43）宮下知之、齊藤実　The rest interval dependent MAPK activation forms and sustains c-fos and CREB transcriptional cycling required for long-term memory. 第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ「遺伝子発現とタンパク質分解によって産み出される記憶制御のダイナミクス」、2012 年 12 月 11 日、福岡

東島眞一

1) Higashijima, S.“Development and function of spinal locomotor circuits in zebrafish“ 3rd Viktor Hmburger Symposium on Motor System Development、2009 年 10 月、シカゴ（アメリカ）
2) 東島、佐藤、木村“Development and function of spinal locomotor circuits in zebrafish“第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月、名古屋
3) 東島、「ゼブラフィッシュを用いた in vivo イメージング」第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月、横浜.
4) Higashijima, S. “Development and function of V2 neuron in zebrafish spinal cord“ 2nd Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology, 2010 年 5 月、パリ（フランス）
5) 東島、木村、佐藤“Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in zebrafish“　第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月、横浜

6) 東島、木村、佐藤"Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in zebrafish"第 34 回日本分子生物学会、2011 年 12 月、横浜.
7) Higashijima, S."Development of V2 and V0 neurons in zebrafish spinal cord" 19th biennial meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN-2012), 2012 年 1 月、ムンバイ（インド）
8) 東島、木村、佐藤 "Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in zebrafish" 第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月、名古屋

佐藤守俊
1) 佐藤守俊，細胞内で生起する分子過程の可視化計測法，日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008「バイオイメージングのためのバイオマテリアル」，2008 年 11 月 18 日，東京
2) 佐藤守俊，細胞内のシグナル伝達を可視化する分子プローブ，日本分析化学会第 58 年会化学センサー懇談会，2009 年 9 月 24 日，北海道
3) 佐藤守俊，分子イメージング細胞の中の分子を見るナノテクノロジー，東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻談話会「応用化学の新しい潮流」，2009 年 10 月 3 日，東京
4) 佐藤守俊，細胞内のシグナル伝達を可視化する分子プローブ，日本薬学会第 130 年会シンポジウム「薬学における生命志向型化学（分子設計を基盤とした生命現象解明）」，2010 年 3 月 29 日，岡山
5) 佐藤守俊，"分子イメージング"細胞内の分子を見るナノテクノロジー，第 24 回学際融合ビジュアライゼーションシンポジウム，2011 年 1 月 11 日，東京
6) 佐藤守俊，細胞内シグナル伝達を可視化する分子プローブ，日本化学会第 24 回関東支部大会，2011 年 8 月 31 日，東京
7) 佐藤守俊，細胞内シグナル伝達を可視化する分子プローブ，第 24 回植物脂質シンポジウム，2011 年 9 月 19 日，東京
8) 佐藤守俊，細胞内の分子を見るナノテクノロジー，第 60 回高分子討論会，2011 年 9 月 29 日，岡山
9) 佐藤守俊，生体分子を可視化する技術・操作する技術，光操作研究会，2011 年 9 月 30 日，愛知
10) 佐藤守俊，細胞内シグナル伝達を可視化する技術・操作する技術，日本膜学会第 34 年会，2012 年 5 月 9 日，東京
11) 佐藤守俊，生体分子を可視化する技術・操作する技術，京都大学化学研究所生体分子情報研究領域セミナー，2012 年 6 月 21 日，京都
12) Moritoshi Sato，Methods to visualize molecular processes in living cells，JASIS，2012 年 9 月 7 日，千葉
13) 佐藤守俊，細胞内の分子過程を探索する遺伝子コード型の分子プローブ，日本化学会第 61 年会，2012 年 9 月 19 日，金沢
14) 佐藤守俊，生命現象を見る技術・操作する技術，フロンティアシンポジウム，2012 年 11 月 16 日，東京

増田直紀
1) H. Kori, Y. Kawamura, N. Masuda. Theory of collective enhancement of temporal precision in oscillator networks. Biosignal 2010, July 14-16 (2010), Berlin, Germany.
2) N. Masuda, Y. Kawamura, H. Kori. Collective phase diffusion in networks of noisy oscillators. SIAM Conference on Applications of Dynamical Systems. Workshop: Linking Neuronal Network Architecture and Collective Dynamics. May 22-26 (2011), Snowbird, Utah, USA.
3) T. Watanabe, N. Masuda. Sequential node removal to increase the spectral gap of networks. NetSci 2011. June 8-10 (2011), Budapest, Hungary.
4) H. Kori, Y. Kawamura, N. Masuda. Design principle of precise neural clocks. The 3rd International Conference on Cognitive Neurodynamics (ICCN2011). June 9-13 (2011), Hilton Niseko Village, Hokkaido, Japan.
5) H. Kori, Y. Kawamura, N. Masuda. Network structure dependence of oscillation regularity in coupled noisy oscillators. Engineering of Chemical Complexity. July 4-8 (2011), Berlin, Germany.
6) N. Masuda. Dependence of oscillation regularity on structure of networks. Anomalous Statistics, Generalized Entropies and Information Geometry. March 6-10 (2012), Nara, Japan.
7) T. Takaguchi, N. Sato, K. Yano, N. Masuda. Detecting important interaction events in temporal networks. NetSci 2012. June 20-22 (2012), Evanston, Illinois, USA.
8) T. Takaguchi, N. Sato, K. Yano, N. Masuda. A centrality measure for interaction events in temporal networks. European Conference on Complex Systems (ECCS'12). September 3-7 (2012), Brussel, Belgium.
9) H. Kori, Y. Kawamura, N. Masuda. Dependence of oscillation regularity on network structure in coupled noisy oscillators. European Conference on Complexf Systems (ECCS'12). September 3-7 (2012), Brussel, Belgium.
10) N. Masuda. Quantifying importance of interaction events in temporal networks. Toward Mathematical Foundations of Complex Network Theory. September 14-16 (2012), Kyoto, Japan.
11) H. Kori, Y. Kawamura, N. Masuda. Network structure dependence of collective enhancement of temporal precision in coupled noisy oscillators. The First Annual Winter q-bio Meeting. February 18-21 (2013), Waikiki, Hawaii.

辻敏夫
1) Suzuki, M., Sakashita, T., Hattori, Y., Yanase, S., Kikuchi, M., Funayama, T., Yokota, Y., Tsuji, T., and Kobayashi, Y., The video-based quantitative evaluation of IR-induced effects on locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans*, 17th

International *C. elegans* Meeting, 24-28 Jun. 2009, Los Angeles U.S.A.
2) 滝口、志風、加藤、大竹「マウスのにおい識別学習と脳内活動部位の変容」化学工学会第 41 回秋季大会、2009 年 9 月 16～18 日、東広島
3) 滝口「生物由来制御アルゴリズムの工学的応用に関する研究」第 61 回日本生物工学会大会、2009 年 9 月 23～25 日、名古屋
4) 滝口、松村、加藤「マウスのにおい嗜好性検定手法の開発」第 61 回日本生物工学会大会、2009 年 9 月 23～25 日、名古屋
5) Takiguchi, N., Shikaze, M., Yasuda, Y., Ohtake, H., Study on the selective attention formation for the odor discrimination in mice, The 8th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC '09), 24-28 Nov. 2009, Kobe Japan
6) Takiguchi, N., Modeling of chemosensory information processing and its application, KSBB International Symposium 2009, 15-16 Apr. 2010, Kyungwon Korea
7) Suzuki, M., Sakashita, T., Hattori, Y., Tsuji, T., and Kobayashi, Y., Effects of ionizing radiation on pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans*, 4th East Asia *C. elegans* Meeting, 11-14 Jul. 2010, Tokyo Japan
8) 滝口、山村、加藤、曽、辻、大竹「マウスのにおい識別における選択的注意機構とその応用」化学工学会第 42 回秋季大会、2010 年 9 月 6～8 日、京都
9) 滝口、曽、辻「マウスにおい識別モデルを用いた微生物培養の特徴抽出」化学工学会第 43 回秋季大会、2010 年 9 月 6～8 日、京都
10) Suzuki, M., Sakashita, T., Tsuji, T., and Kobayashi, Y., Computational inferences on alteration of neurotransmission in chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*, The 20th International Conference on Artificial Neural Networks (ICANN 2010), 15-18 Sep. 2010. Thessaloniki, Greece
11) Hattori, Y., Suzuki, M., Soh, Z., Kobayashi, Y., and Tsuji, T., A novel tuning method for neural oscillators with a ladder-like structure based on oscillation analysis, The 20th International Conference on Artificial Neural Networks (ICANN 2010), 15-18 Sep. 2010. Thessaloniki, Greece
12) 滝口、「嗅覚識別における選択的注意の影響」第 7 回物質科学専攻フォーラム、2010 年 10 月 8 日、金沢
13) 滝口、山村、加藤、「マウスのにおい嗜好性検定手法の開発」第 62 回日本生物工学会大会、2010 年 10 月 27～29 日、宮崎
14) Suzuki, M., Sakashita, T., Hattori, Y., Tsuji, T., and Kobayashi, Y., Effects of ionizing radiation on pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans*, 18th International *C. elegans* Meeting, 22-26 Jun 2011, Los Angeles U.S.A.
15) 曽、斉藤、辻、栗田、滝口、大竹「ラット嗅球の神経活動パターンとヒトのニオイ感覚の比較」日本味と匂学会第 45 回大会、2010 年 10 月 5－7 日、金沢
16) 斉藤、曽、栗田、滝口、大竹、辻「ニオイ分子のグラフ構造を利用したラット嗅覚神経活動予測モデルの提案」日本味と匂学会第 45 回大会、2010 年 10 月 5－7 日、金沢
17) Soh, Z., Tsuji, T., Takiguchi, N., and Ohtake, H., On-Center/Off-Surround neural network model for olfactory attention, 3rd Intenational Joint Conference on Computational Intelligence, 24-26 Oct. 2011, Paris France
18) 宮本、来山、曽、平野、栗田、辻、滝口、大竹「小型魚類の水質汚染監視用バイオアッセイシステムの開発」第 12 回公益社団法人　計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会、2011 年 12 月 23～25 日、京都
19) Hattori, Y., Suzuki, M., Soh, Z., Kobayashi, Y., and Tsuji, T., An electrophysiological model of the pharyngeal muscle in *Caenorhabditis elegans*, The 17th International Symposium on Artificial Life and Robotics, 19-21 Jan. 2012, Oita Japan
20) Hattori, Y., Suzuki, M., Soh, Z., Kobayashi, Y., and Tsuji, T., Simulation of cell activities in pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans*, EMBO Conference Series: *C. elegans*Neurobiology, 14-17 Jun. 2012, Heidelberg, Germany
21) Soh, Z., Tsuji, T., Suzuki, M., Hattori, Y., Takiguchi, N., and Ohtake, H., A body dynamics simulation platform for *Caenorhabditis elegans*, EMBO Conference Series: *C. elegans* Neurobiology, 14-17 Jun. 2012, Heidelberg, Germany
22) Suzuki, M., Sakashita, T., Kobayashi, Y., and Tsuji, T., Computational inferences on neurotransmission in chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*, EMBO Conference Series: *C. elegans* Neurobiology, 14-17 Jun. 2012, Heidelberg, Germany
23) Soh, Z., Saito, M., Tsuji, T., Takiguchi, N., and Ohtake, H., A comparison between human perceptions of odor similarity and the gloemrular activity patterns in rats, XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 23-27 Jun. 2012, Stockholm Sweden
24) Hattori, Y., Suzuki, M., Kobayashi, Y., and Tsuji, T., Neuronal signal simulation of the pharyngeal pumping motion in *Caenorhabditis elegans*, 4th International Conference on Foundations of Systems Biology in Engineering, 21-25 Oct. 2012, Tsuruoka Japan
25) Suzuki, M., Sakashita, T., Tsuji, T., and Kobayashi, Y., Computational study of neurotransmission in chemotaxis of *Caenorhabditis elegans*, 4th International Conference on Foundations of Systems Biology in Engineering, 21-25 Oct. 2012, Tsuruoka Japan
26) Suzuki, M., Sakashita, T., Tsuji, T., Hattori, Y., and Kobayashi, Y., Quantitative analysis of ionizing radiation-induced effects on locomotion in *Caenorhabditis elegans*, 19th International *C. elegans* Meeting, 26-30 Jun. 2013, Los Angeles, U.S.A (accepted)
27) Hattori, Y., Suzuki, M., Tsuji, T., and Kobayashi, Y., Cell-level modeling and simulation of the pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans*, 19th International *C. elegans* Meeting, 26-30 Jun. 2013, Los Angeles, U.S.A (accepted)
28) Soh, Z. Masaoka, M., Suzuki, M., Hattori, Y., Tsuji, T., A method of estimating environmental friction based on a body dynamics model of *Caenorhabditis elegans*, 19th International *C. elegans* Meeting, 26-30 Jun. 2013, Los Angeles, U.S.A (accepted)

＜公募研究＞

和多和宏

1) 森、和多「Auditory deprivation affects gene expression in vocal related pathway in songbird」日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜

2) 今井、和多「Multiple regulation of Egr family expression for vocal learning in songbird」　日本分子生物学会年会　2009 年 12 月 11 日、横浜

3)堀田、Jarvis ED、岡、和多「Immediate Early Gene dusp1 is Regulated by Natural Behavior in the Primary Sensory Areas and Vocal Areas of Birds」　日本分子生物学会年会　2009 年 12 月 11 日、横浜

4)堀田、小林、Jarvis ED、岡、和多「Specialized motor-driven dusp1 expression in song nuclei of vocal learning birds」　日本神経科学会年会　2010 年 9 月 3 日、神戸

5) 森、和多「Deafening before critical period for vocal learning affects gene expression pattern in song nuclei of songbird」 Society for Neuroscience 年会　2010 年 11 月 16 日、アメリカ　サンディエゴ

6)小林、今井、森、Liu　W-C、和多　「Epigenetic gene expression dynamics induced by singing regulate the critical period of vocal learning」日本エピジェネティクス研究会年会　2011 年 5 月 19 日熊本

7) 森、和多「聴覚入力阻害による囀りパターン固定化への影響」Animal 2011：日本動物心理学会・日本動物行動学会・応用動物行動学会・日本家畜管理学会合同大会　2011 年 9 月 8 日　東京

8)森、和多「Deafening before critical period of vocal learning causes delayed stabilization of vocal patterns」日本神経科学会年会　2011 年 9 月 16 日横浜

9)今井、和多「Learned heterospecific song patterns were limitedly produced at juvenile stage but finally restricted by species-specific manners in songbird」日本神経科学会年会　2011 年 9 月 16 日横浜

10)和多「発声学習臨界期における多段階発現制御機構とエピジェネティクス動態」日本動物学会年会　2011 年 9 月 21 日　旭川

11) 大串、和多「囀り学習臨界期中の囀り頻度は囀り日内発達に影響を与える」日本動物学会年会　2011 年 9 月 22 日　旭川

12) 和多「神経行動科学から考える「生まれと育ち」」ASCON2011 年 11 月 3 日上諏訪

13) 小林、今井、森、大串、堀田、Liu　W-C、和多「Epigenetic gene expression dynamics induced by singing regulate a critical period of vocal learning」Society for Neuroscience 年会　2011 年 11 月 14 日、アメリカ　ワシントン DC

14)和多「鳴禽類ソングバードにおけるウイルス発現系を用いた神経科学研究」包括脳ネットワーク　夏のワークショップ 2012 年 7 月 26 日仙台

15) 森、和多「An inherited genetic program for acquisition of species-specific vocal pattern in songbird」 10th **International Congress of Neuroethology**　2012 年 8 月 8 日　アメリカ　ワシントン D

16)和多、早瀬、今井、森、小林、Liu　W-C、高橋、岡ノ谷　「Variation in gene expression and DNA methylation state in wild and domesticated songbird strains」Society for Neuroscience 年会　2012 年 10 月 14 日、アメリカ　ニューオリンズ

17)早瀬、大串、小林、和多　「Continual vocal behavior influences induction of motor-driven genes in songbird vocal areas」Society for Neuroscience 年会　2012 年 10 月 14 日、アメリカ　ニューオリンズ

18) 和多　「Songbird as an Animal Models for Vocal Communication Disorder with a View from Nature via Nurture」基礎生物科学研究所重点共同利用研究シンポジューム 2013 年 1 月 24 日　岡崎

小金澤雅之

1) Koganezawa, M., The neural circuitry contributing to male courtship behavior of Drosophila, ICCPB2011、2011 年 6 月 1 日、名古屋

2) 小金澤雅之・山元大輔「ショウジョウバエ求愛歌のパターンを決める司令ニューロン」平成 23 年度日本動物学会東北支部大会、2011 年 7 月 30 日、弘前

3) 小金澤雅之・山元大輔「ショウジョウバエ求愛行動を解発する fruitless 発現神経回路」日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 22 日、旭川

4) Koganezawa, M. and Yamamoto, D., Male courtship behavior triggered by the artificial activation of doublesex-expressing neurons.第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 15 日、横浜

5) Koganezawa, M. and Yamamoto, D., Functional dissection of fru/dsx-expressing neural circuitry generating Drosophila courtship behavior. JCCPB2012(第 34 回日本比較生理生化学会年会)、2012 年 7 月 6 日−7 日、葉山

6) 小金澤雅之・山元大輔「ショウジョウバエ種特異的求愛行動パターンを生み出す fru 発現神経回路」平成 24 年度日本動物学会東北支部大会、2012 年 7 月 21 日、山形

7) 小金澤雅之・山元大輔「ショウジョウバエ求愛歌生成を制御する fruitless/doublesex 発現神経回路」日本動物学会第 83 回大会、2012 年 9 月 15 日、大阪

8) Koganezawa, M. and Yamamoto, D., Functional dissection of neural circuitry generating Drosophila courtship song by intersectional approach. 第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋

9) 小金澤雅之「ショウジョウバエの求愛行動を司る fruitless 発現神経回路」日本遺伝学会第 84 回大会・ワークショップ「モデル動物の特徴を生かした行動遺伝学の新たな展開」、2012 年 9 月 24 日、福岡

橋本浩一

1）Fei, X. and Hashimoto, K. (2010). An Object-Tracking Algorithm Based on Particle Filtering with Region-Based Level Set Method. IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems,2908-2913.　査読有

2）Maru, M., Igarashi, Y., Arai, S., and Hashimoto, K. (2010). Fluorescent microscope system to track a particular region. 2010 IEEE/SICE International Symposium on System Integration (SII). 347-352.　査読有

3）Obara, T., Igarashi, Y., and Hashimoto, K. (2011). Fast and adaptive auto-focusing algorithm for microscopic cell observation. IEEE Int. Conf. Intelligent Robots and Systems, 7-12.　査読有

4）Maru, M., Chen, M., and Hashimoto, K. (2011) Visual Servo Microscope for Locking on Single Neuron of a Worm. 2011 IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics (IEEE-ROBIO 2011), Thailand, Dec 7-11, 2011.　査読有

5）Zang, C., Hashimoto, K., and Moon, J.J. (2011), A visual tracking strategy using Computer Graphics and Edge, 2011 IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics (IEEE-ROBIO 2011), Thailand, Dec 7-11, 2011.　査読有

6）Zang, C., and Hashimoto, K. (2011). Camera Localization by CAD Model Matching, 2011 IEEE/SICE International Symposium on System Integration (SII 2011), Kyoto, Japan, Dec. 20-22.　査読有

7) Satoh, Y., Maru, M., Hashimoto, K., Iino, Y. (2011). Construction of a system for movement-dependent optical stimulation in *C. elegans*.　The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 査読有

8）Tsukada, Y., Chen, M., Yokoyama, G., Hashimoto, K., Mori, I. (2012) High-speed tracking system for neurite fluorescence imaging during freely moving *C. elegans*. EMBL Conference *C. elegans* Neurobiology, Heidelberg, Germany, June 14-17. 査読有

9）Tanimoto, Y., Yamazoe, A., Hashimoto, K., Kimura, K. (2012) A virtual reality running machine for worms – a highly integrated system for olfactory behavior. EMBL Conference *C. elegans* Neurobiology, Heidelberg, Germany, June 14-17. 査読有

10）Yokoyama, G., Tsukada, Y., Chen, M., Hashimoto, K., Mori, I. (2012) Neurite fluorescence imaging of freely moving individual *C. elegans* animals with high-speed tracking and autofocus system. 5th East Asia *C. elegans*, Taipei, Taiwan, June 27-30.　査読有

11）Tanimoto, Y., Yamazoe, A., Hashimoto, K., Kimura, K. (2012) A virtual reality running machine for worms – a highly integrated system for olfactory behavior. 5th East Asia *C. elegans*, Taipei, Taiwan, June 27-30.

12）Hashimoto, K., and Fei, X. (2012). Exploration of Brain Function through Behavior, Neural Activity Observation, and Optogenetic Manipulation. Invited Talk, International Symposium Optomechatronic Technologies (ISOT), October 29-31. 査読有　招待講演

古久保—徳永克男

1) Mochizuki, H., Toda, H., Tomoda, T., and Furukubo-Tokunaga, K. (2009). Unc-51/Atg1 Kinase Regulates Kinesin-1 Dependent Axonal Transport and Polarized Axonal Targeting of Diverse Neural Molecules in *Drosophila*.　Cold Spring Harbor Meeting "Neurobiology of *Drosophila*", Cold Spring Harbor, New York, U. S. A.

2) Ando, T., Kondoh, K., Honjo, K., Mochizuki, H., Ando, M., Horigane, S., Takayama, K., Maruyama, Y., Shimoda, M., Kamiya, A., Ishida, N., Tomoda, T., Saitoe, M., Sawa, A., and　Furukubo-Tokunaga, K. (2009). Modeling Schizophrenia in Flies: Direct Expression of a Schizophrenia Susceptibility Gene, *DISC1,* Impairs Arousal and Associative Learning in *Drosophila.*　Cold Spring Harbor Meeting "Neurobiology of *Drosophila*", Cold Spring Harbor, New York, U. S. A.

3) Ando, M., Takayama, K., Ando, T., Honjo, K., Mochizuki, H., Kamiya, A., Sawa, A., and Furukubo-Tokunaga, K. (2010). Expression of DISC1 impairs associative learning and axonal development in *Drosophila.* Society for Neuroscience 40th Annual Meeting, San Diego, U. S. A.

4) Takayama, K., Tanaka, D., Ando, M., Ando, T., Honjo, K., Shimoda, M., Kamiya, A., Ishida, N., Saitoe, M., Sawa, A., and Furukubo-Tokunaga, K. (2011). Direct Expression of a Schizophrenia Susceptibility Gene, DISC1, Impairs Sleep Homeostasis, Associative Learning and Axonal Branching in *Drosophila*. Asia Pacific *Drosophila* Research Conference, Taipei, Taiwan.

5) Kurita, K., Tanaka, D., Pandey, H., Takayama, K., Ando, T., Ando, M., Honjo, K., Mochizuki,H.,Sawa,A., and Furukubo-Tokunaga, K. (2012). Modeling Schizophrenia in Flies: Direct Expression of *DISC1,* Alters Sleep Homeostasis and Impairs Associative Learning in *Drosophila.* XIV European *Drosophila* Neurobiology Conference, Padova, Italy.

6) Honda, T., and Furukubo-Tokunaga, K. (2012). Optogenetic and Thermogenetic Activation of Memory Circuit in *Drosophila* Larvae.　5th Japan China Korea Graduate Student Forum, Tsukuba, Japan.

7) Kurita, K., Tanaka, D., Honda, T., Pandey, H., Arai, Y., Ikejiri, K., and Furukubo-Tokunaga, K. (2012). Direct Expression of a Schizophrenia Susceptibility Gene, DISC1, Suppresses Neural development in *Drosophila*.5th Japan China Korea Graduate Student Forum, Tsukuba, Japan.

中井淳一

1）中井淳一、「フェロモン受容のメカニズム.」第 6 回 GPCR 研究会、基調講演、2009 年 5 月 8-9 日、東京

2) Ohkura, M., Kitahara, T., Norota, I., Nakai, J., Kubota, I., and Ishii, K.An improved genetically-encoded fluorescent Ca^{2+} probe that less affects calcineurin signaling. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences、2009 年 7 月 27 日-8 月 1 日、京都

3）Nakai, J.,　Hoogland, T.,　Kuhn, B.,　Gobel, W., Huang, W., Helmchen, F., Flint, J., and Wang, S. Bergmann グリア細胞におけるカルシウム波の in vivo 計測 in vivo Ca^{2+} waves in Bergmann glial cells. 第 24 回生体生理工学シンポジウム、2009 年 9 月 24-26 日、仙台

4) Usami, A., Ohkura, M., Matsuki, N., Ikegaya, Y., and Nakai, J. Detecting single action potentials with the improved genetically encoded Ca^{2+} probe G-CaMP. American neuroscience meeting 2009、2009 年 10 月 17-20 日、シカゴ
5) Both, M., Brankack, J., von Kameke, A., Reichinnek, S., Sprengel, R., Nakai, J., Draguhn, A., and Hasan, M.T. Genetically-encoded Ca^{2+} sensors for population imaging of neuronal activity dynamics in the rodent hippocampus. American neuroscience meeting 2009、2009 年 10 月 17-20 日、シカゴ
6) Tanaka, M., Nakai, J., Lebedinskiy, A., Gomi, H., Mikoshiba, K., Semyanov, A., and Itohara, S. Reduced astrocytic IP3-mediated calcium signaling results in behavioral abnormality in mice. American neuroscience meeting 2009、2009 年 10 月 17-20 日、シカゴ
7) Castell, X., Astori, S., Meyer, S., Borgloh, Z.A., Yang, Y., Pilpel, Y., Kügler, S., Sprengel, R., Nakai, J., Euler, T., and Hasan, M.T. Performance of genetically-encoded Ca^{2+} sensors of neural activity, inverse pericam, GCaMP2, GCaMP2.2 and camgaroo-2, in mammalian neurons both in vitro and in vivo. American neuroscience meeting 2009、2009 年 10 月 17-20 日、シカゴ
8) Tanaka, M., Nakai, J., Lebedinskiy, A., Gomi, H., Mikoshiba, K., Semyanov, A., and Itohara, S. Reduced astrocytic IP_3-mediated calcium signaling results in behavioral abnormality in mice. Neuro2009、2009 年 9 月 16-18 日、名古屋
9) 宇佐美篤、大倉正道、松木則夫、池谷裕二、中井淳一、改良型蛍光カルシウムセンサタンパク質 G-CaMP4. Neuro2009、2009 年 9 月 16-18 日、名古屋
10) Muto, A., Nakai, J., and Kawakami, K. Visualization of functional neural circuits using the GAL4-UAS system in zebrafish. Neuro2009、2009 年 9 月 16-18 日、名古屋
11)Nakai, J., Hoogland, T., Kuhn, B., Gobel, W., Huang, W., Helmchen, F., Flint, J., and Wang, S.小脳グリア細胞間のカルシウム波の in vivo 解析. 日本薬理学会年会、2010 年 3 月 16-18 日、大阪
12)中井淳一、「小脳バーグマングリア細胞間を伝わるカルシウム波.」 第 7 回 GPCR 研究会 基調講演 2010 年 5 月 7-8 日、東京
13) 中井淳一、「G-CaMP による in vivo calcium imaging.」平成 22 年生理研研究所研究会、神経活動の光操作（行動制御への応用）、 2010 年 9 月 9-10 日、岡崎
14) 宇佐美篤、安藤恵子、大倉正道、池谷裕二、中井淳一、松木則夫、新規蛍光 Ca^{2+}センサーG-CaMP4 を用いた生体 Ca^{2+}の画像化、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2010、2010 年 9 月 11 日、京都
15) Nakai, J.「In vivo Imaging with Genetically-encoded Ca^{2+} Sensors. New Horizons In Calcium Signaling.」、2010 年 10 月 10-13 日、北京
16) 中井淳一: G-CaMP を用いた in vivo カルシウムイメージング, イメージングワークショップ、2011 年 1 月 20 日、さいたま
17) 中井淳一、安藤恵子、宇佐美篤、大倉正道、池谷裕二、松木則夫、G-CaMP を用いた線虫体壁筋の in vivo カルシウムイメージング、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 22-24 日、横浜
18) 宇佐美篤、安藤恵子、大倉正道、池谷裕二、中井淳一、松木則夫：蛍光 Ca^{2+}センサータンパク質 G-CaMP4 による神経活動の可視化第 11 回東京大学生命科学シンポジウム、2011 年 6 月 4 日、東京
19) Gengyo-Ando, K., Usami, A., Kagawa-Nagamura, Y., Yoshida, Y., Matsuki, N., Ikegaya, Y., and Nakai, J.: High-resolution *in vivo* Ca^{2+} imaging of neuromuscular system in *Caenorhabditis elegans*. 18th International *C. elegans* Meeting, 2011 年 6 月 22－26 日、ロサンゼルス
20) 宇佐美篤、安藤恵子、池谷裕二、中井淳一、松木則夫: in vivo Ca^{2+} imaging を用いた線虫運動出力系の調節機構の解明, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011、2011 年 8 月 31 日、東京
21) Kawakami, K., Abe, G., Asakawa, K.,Fukuda, R., Lal, P., Muto, A., and Nakai, J.: Genetic dissection of the brain function by transposon-mediated gene and enhancer trapping, Symposium Vertebrate brain functions elucidated in zebrash and medaka, Neuro2011、2011 年 9 月 15 日、横浜
22) Miyanishi, Y., Nakai, J., and Kimura, K.: Functional imaging of neuronal activity for odor avoidance of the nematode *C. elegans*, Neuro2011、2011 年 9 月 15 日、横浜
23) Muto, A., Nakai, J., and Kawakami, K.: Calcium imaging of the zebrash visual system with the GCaMP, Neuro2011、2011 年 9 月 16 日、横浜
24) Usami, A., Gengyo-Ando, K., Nagamura, Y., Yoshida, Y., Matsuki, N., Ikegaya, Y., and Nakai, J.: Dynamic neuromuscular regulation in freely crawling *C. elegans*: high-resolution and large-scale in vivo Ca^{2+} imaging, Neuro2011、2011 年 9 月 16 日、横浜
25) Sato, M., Kawamo, M., Islam, T., Yamaguchi, Y., Ohkura, M., Nakai, J., and Hayashi, Y.: In vivo two-photon imaging of neuronal circuit activity using transgenic mice that express fluorescent calcium sensor proteins in the brain, Neuro2011、2011 年 9 月 16 日、横浜
26) Koide, T., Ohkura, M., Nakai, J., and Yoshihara, Y.: In vivo imaging of neural activities along the olfactory circuitry in transgenic zebrash, Neuro2011、2011 年 9 月 17 日、横浜
27) 中井淳一: G-CaMP によるカルシウムイメージングと線虫神経細胞の光操作, 平成２３年度生理研研究会神経活動の光操作（行動制御への応用）、2011 年 9 月 29 日、岡崎
28) Muto, A., Nakai, J., Kawakami, K.: Functional brain imaging with improved GCaMPs in zebrafish, Neuroscience2011、2011 年 11 月 13 日、ワシントン DC
29) Gengyo-Ando, K., Usami, A., Kagawa-Nagamura, Y., Yoshida, Y., Matsuki, N., Ikegaya, Y., Nakai, J.: Functional analysis of neuromuscular circuit using high-resolution in vivo Ca^{2+} imaging in *C. elegans*, Workshop Visualization and optic control of neural circuit underlying behavior 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

30) Nakai, J.: Ca^{2+} imaging with genetically encoded Ca^{2+} indicator G-CaMP, Workshop　Neuronal ensemble revealed by calcium imaging　第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜
31) 中井淳一:　GFP を用いたカルシウムセンサー(G-CaMP) による Ca^{2+}イメージング, 第 34 回日本分子生物学会年会　ニコンユーザー会、2011 年 12 月 15 日、横浜
32) 大倉正道、武藤彩、小谷友也、東島眞一、川上浩一、中井淳一：カルシウムプローブ蛋白質によるゼブラフィッシュ脊髄運動神経の時空間活動の可視化、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、京都
33) 宇佐美篤、安藤恵子、大倉正道、中井淳一、松木則夫「改良型 G-CaMP を用いた線虫運動出力の神経調節機構の解明」日本薬学会第 132 年会、2012 月 3 月 28 日、札幌、学生優秀発表賞受賞
34) Ohkura, M., Sasaki, T., Ikegaya, Y. and Nakai, J.: Probing activities of single neurons with an improved genetically encoded Ca^{2+} indicator. 8th FENS Forum of Neuroscience, 2012 年 7 月 14-18 日、スペインバルセロナ
35) Gengyo-Ando, K., Usami, A., Kagawa-Nagamura, Y., Ohkura, M., Ikegaya, Y., Matsuki, N., Nakai, J.「Dynamic neuromuscular regulation in freely crawling *C. elegans*: multicellular Ca^{2+} imaging using G-CaMPs.」第 35 回神経科学学会年会, 2012 年 9 月 18-21 日、名古屋
36) 丸岡久人、中川直、佐伯麻衣、松本直実、大倉正道、中井淳一、細谷俊彦、「深層における特定のニューロナルサブタイプからの in vivo カルシウムイメージング.」第 35 回神経科学学会年会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋
37) 佐藤正晃、イスラムタンビル、竹川高志、山川宏、河野真子、山口陽子、深井朋樹、大倉正道、中井淳一、林康紀、「二光子カルシウムイメージングのためのマウス仮想ナビゲーションシステム.」第 35 回神経科学学会年会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋
38) Ohkura, M., Nakai, J.「Development and application of G-CaMP-type genetically encoded Ca^{2+} indicators.」 2012 Fall Janelia Conference "Fluorescent Proteins and Biological Sensors　." November 1-4, 2012. Ashburn USA
39) Kagawa-Nagamura, Y., Gengyo-Ando, K., Ohkura, M., Nakai, J.「Molecular physiological study of the neuromuscular circuit for locomotion behabior in *Caenorhabditis elegans*」RIKEN BSI RETREAT 2012, 2012 年 11 月 12 日、軽井沢
40) 安藤恵子、宇佐美篤、永村ゆう子、大倉正道、池谷裕二、松木則夫、中井淳一「改良型 G-CaMP を用いた自由運動中の線虫神経筋活動の Ca^{2+}イメージング」35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡
41) Ohkura, M. and Nakai, J.: Development and neuronal application of G-CaMP-type genetically encoded Ca^{2+} indicators with high-sensitivity and high-responsivity. 高等研プロジェクト「ゲノム工学とイメージングサイエンスに基づく生命システム研究の新展開」研究会、2013 年 2 月 22-23 日、奈良
42) 大倉正道、佐々木拓哉、小林千晃、池谷裕二、中井淳一、「改良型赤色蛍光カルシウムプローブ蛋白質 R-CaMP1.07 を用いた channelrhodopsin-2 の光刺激による神経発火の可視化.」第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21-23 日、福岡
43) 貞苅純子、大倉正道、佐々木拓哉、安藤恵子、永村ゆう子、小林千晃、池谷裕二、中井淳一、「高感度かつ高速応答性の G-CaMP 型改良カルシウムプローブ蛋白質を用いた細胞単位およびシナプス単位での神経活動の可視化.」第 86 回日本薬理学会年会、 2013 年 3 月 21-23 日、福岡
44) 真仁田聡、鈴木崇之、小田川摩耶、松原智恵、大倉正道、佐藤正晃、中井淳一、林康紀、M.E. Larkum、村山正宜、「 In vivo マウス脳における皮質間の相互連絡.」第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 27-29 日、横浜

安藤恵子

1) 宇佐美篤, 安藤恵子, 大倉正道, 池谷裕二, 中井淳一, 松木則夫「蛍光Ca^{2+}センサータンパク質G-CaMP4による神経活動の可視化」第11回東京大学生命科学シンポジウム, 2011年6月4日, 東京, ポスター発表賞受賞
2) Gengyo-Ando,K., Usami, A., Kagawa-Nagamura, Y., Yoshida, Y., Matsuki, N., Ikegaya, Y. and Nakai, J.「High-resolution *in vivo* Ca^{2+} imaging of neuromuscular system in *Caenorhabditis elegans*」18th International *C. elegans* Meeting, 2011 年 6 月 24 日, ロサンゼルス
3) 宇佐美篤, 安藤恵子, 池谷裕二, 中井淳一, 松木則夫「*in vivo* Ca^{2+} imagingを用いた線虫運動出力系の調節機構の解明」次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2011, 2011年8月31日, 東京
4) 宇佐美篤, 安藤恵子, 大倉正道, 松木則夫, 池谷裕二, 中井淳一「自由運動下での線虫神経筋活動のカルシウムイメージング」第34回日本神経科学大会, 2011年9月14日, 横浜
5) Gengyo-Ando, K., Usami, A., Kagawa-Nagamura, Y., Yoshida, Y., Matsuki, N., Ikegaya, Y., Nakai, J. 「Functional analysis of neuromuscular circuit using high-resolution *in vivo* Ca^{2+} imaging in *C. elegans*」第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日, 横浜, 招待講演
6) 安藤恵子「モデル動物線虫を利用したゲノム創薬」埼玉バイオ III 研究交流会, 2012 年 3 月 21 日, 埼玉, 招待講演
7) 宇佐美篤, 安藤恵子, 大倉正道, 中井淳一, 松木則夫「改良型 G-CaMP を用いた線虫運動出力の神経調節機構の解明」日本薬学会第 132 年会, 2012 月 3 月 28 日, 札幌, 学生優秀発表賞受賞
8) Gengyo-Ando, K., Usami, A., Kagawa-Nagamura, Y., Ohkura, M., Ikegaya, Y., Matsuki, N. and Nakai, J. 「Dynamic neuromuscular regulation in freely crawling *C. elegans*: multicellular Ca^{2+} imaging using G-CaMPs」第 35 回神経科学学会年会, 2012 年 9 月 19 日, 名古屋, 招待講演
9) 安藤恵子, 宇佐美篤, 永村ゆう子, 大倉正道, 池谷裕二, 松木則夫, 中井淳一「改良型G-CaMPを用いた自由運動中の線虫神経筋活動のCa^{2+}イメージング」35回日本分子生物学会年会, 2012年12月14日, 福岡
10) Kagawa-Nagamura, Y., Gengyo-Ando, K., Ohkura, M., Nakai, J.「Molecular physiological study of the neuromuscular circuit for locomotion behabior in *Caenorhabditis elegans*」RIKEN BSI RETREAT 2012, 2012年11月12日, 軽井沢
11) 安藤恵子「疾患モデル動物の開発と応用」埼玉バイオ最終成果発表会, 2013年03月18日, 埼玉
12) 安藤恵子「光技術による線虫出力系回路の機能解析と運動機構の解明」井川洋二先生追悼シンポジウム, 2013年5月11日, 筑

波

周防論

1) 周防論、石浦章一「Dopamine and octopamine regulate acetylcholine signaling in *C. elegans*」日本分子生物学会年会、2011年12月14日、横浜
2) 大網栄太郎、周防論、石浦章一「Dopamine regulates the body length through two dopamine receptors in *C. elegans*」日本分子生物学会年会、2011年12月14日、横浜
3) 吉田碧、周防論、石浦章一「*C. elegans* における2種のGq共役型オクトパミン受容体を必要とする飢餓依存的なシグナル伝達の解析」日本分子生物学会年会、2011年12月14日、横浜
4) 周防論、石浦章一「Bioamine-regulation of acetylcholine signaling in *C. elegans*」East Asia *C. elegans* Meeting、2012年6月28日、台北、台湾
5) 大網栄太郎、周防論、石浦章一「Dopamine regulates the body length in *C. elegans*」East Asia *C. elegans* Meeting、2012年6月27日、台北、台湾
6) 吉田碧、周防論、石浦章一「Analysis of starvation-mediated signaling that requires two Gq-coupled octopamine receptors in *C. elegans*」East Asia *C. elegans* Meeting、2012年6月27日、台北、台湾
7) 大網栄太郎、周防論、石浦章一「ドーパミンとオクトパミンによる線虫 *C. elegans* の体のサイズ制御」日本分子生物学会年会、2012年12月12日、福岡

久保健雄

1) Tadano, Yamazaki, Takeuchi and Kubo. "Analysis of a novel non-coding RNA, *Nb-1*, whose expression changes in the honeybee brain in a division of labor-dependent manner" 日本動物学会第80回大会、2009年9月、静岡
2) Tadano, Yamazaki, Takeuchi, Kubo. "Division of labor-, developmental stage-, sex-, and neural cell type-selective expression of a non-coding RNA, *Nb-1*, in the honeybee (*Apis mellifera* L.) brain" 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月、横浜
3) 金子、森本、堀、中岡、竹内、久保 "Analysis of the brain substructures using region-preferential genes of the honeybee" 第32回日本分子生物学会、2009年12月、横浜
4) Kaneko, Morimoto, Hori, Nakaoka, Takeuchi and Kubo, T. "Recent progress in the 'molecular dissection' of the honeybee brain" 第32回日本分子生物学会、2009年12月、横浜
5) Tadano, Yamazaki, Takeuchi and Kubo. "Differential expression associated with age-dependent division of labor and neural subtype-specific expression of a novel non-coding RNA, *Nb-1*, in the honeybee (*Apis mellifera* L.) worker brain" Neuroscience 2009. November, 2009, Chicago, USA
6) 多田野、山崎、竹内、久保 "ミツバチ働き蜂の蛹脳における非翻訳性 RNA Nb-1 の増殖細胞選択的な発現" 日本動物学会第81回大会、2010年9月、東京大学駒場キャンパス
7) 多田野、山崎、竹内、久保 "ミツバチ働き蜂の蛹脳における非翻訳性 RNA Nb-1 の増殖細胞選択的な発現" 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月、神戸国際会議場
8) 宇賀神、木矢、國枝、小野、吉田、久保 "初期応答遺伝子を用いたニホンミツバチ (*Apis cerana japonica*) 脳における神経興奮検出系の確立" 包括脳ネットワーク夏のワークショップ、2010年7月、札幌
9) 宇賀神、木矢、國枝、小野、吉田、久保 "初期応答遺伝子を用いたニホンミツバチ (*Apis cerana japonica*) 脳における神経興奮検出系の確立" 日本動物学会 第81回大会、2010年9月、東京大学駒場キャンパ
10) 宇賀神、木矢、國枝、小野、吉田、久保 "Analysis of neural activity in the brain of Japanese honeybee attacking against giant hornet by forming a 'hot defensive ball" 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月、神戸国際会議場
11) 宇賀神、木矢、國枝、小野、吉田、久保 "熱殺蜂球形成時のニホンミツバチ働き蜂の脳の神経興奮は高温情報処理を反映する"日本動物学会第82回大会、平成23年9月、旭川大雪アリーナ
12) 塩田、木内、竹内、久保"Ecdysteroid biosynthesis in adult workers of the European honeybee *Apismellifera* L."日本動物学会 第82回大会、平成23年9月、旭川大雪アリーナ
13) 宇賀神、木矢、國枝、小野、吉田、久保"熱殺蜂球形成時のニホンミツバチ働き蜂の脳の神経興奮は高温情報処理を反映する"昆虫ワークショップ2011東北、2011年10月、蔵王温泉
14) 久保 "ミツバチの社会性行動を生み出す脳と遺伝子の仕組み" 第2回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会、平成23年11月、岐阜
15) Tadano, Takeuchi and Kubo. "Expression analysis of a long non-coding RNA, Nb-1 during oogenesis and embryogenesis and suppression of the gene expression using RNAi in the European honeybee."第34回日本分子生物学会年会、平成23年12月、パシフィコ横浜
16) Ugajin, Kiya, Ono, Yoshida and Kubo. "Neural activity in the brains of the Japanese worker honeybees involved in a hot defensive bee ball reflects thermal stimuli processing" 第34回日本分子生物学会年会、平成23年12月、パシフィコ横浜
17) 塩田、木内、竹内、久保 "Ecdysteroid biosynthesis in adult workers of the European honeybee *Apismellifera* L."第34回日本分子生物学会年会、平成23年12月、パシフィコ横浜
18) 宇賀神、木矢、國枝、小野、吉田、久保 "熱殺蜂球形成時のニホンミツバチ働き蜂の脳の神経興奮は高温情報処理を反映する" 第56回日本応用動物昆虫学会大会、平成23年3月、奈良
19) 久保 "ミツバチの社会性行動を生み出す脳と遺伝子の仕組み" 第34回ミツバチ科学研究会（招待講演）、平成23年3月、玉川学園

20) Ugajin, Kunieda, Ono, Yoshida, Kubo. “Neural activity in the brains of the Japanese honeybees involved in a hot defensive bee reflects thermal stimuli processing.” 10th International Congress of Neuroethology, 2012 Aug, MD, USA
21) 宇賀神、國枝、小野、吉田、久保 “熱殺蜂球形成時のニホンミツバチ脳内の神経興奮は高温情報処理を反映する” 日本昆虫学会第 72 回大会、平成 24 年 9 月、東京都町田市
22) 宇賀神、國枝、小野、吉田、久保 “初期応答遺伝子を利用したニホンミツバチとセイヨウミツバチにおける高温暴露時のキノコ体神経活動の解析” 第 57 回日本応用動物昆虫学会大会、2013 年 3 月、神奈川県藤沢市

冨田太一郎
1) Taichiro Tomida, Haruo Saito 「Spatio-temporal dynamics of stress-activated MAP3K activity revealed by a novel FRET biosensor」米国生物物理学会 54 回大会、2010 年 2 月、サンフランシスコ、米国
2) 冨田太一郎、斎藤春雄「Real-time imaging of stress induced JNK activity in living cells」日本分子生物学会、2010 年 12 月、神戸
3) 冨田太一郎、斎藤春雄「MAP3K 活性化のリアルタイムイメージングによるストレス応答シグナル動態の解明」日本薬理学会年会、2011 年 3 月
4) 冨田太一郎 「線虫の環境応答行動における情報伝達の可視化」第 82 回日本動物学会シンポジウム、旭川、2011 年 9 月
5) 冨田太一郎、斎藤春雄「in vivo MAPK リン酸化シグナルの可視化による線虫の感覚応答解析」日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、横浜
6) 冨田太一郎、斎藤春雄「MAP キナーゼ活性化の in vivo イメージングとシステムエンジニアリング的アプローチによる線虫感覚神経 MAPK 制御機構の解析」日本分子生物学会年会、2012 年 12 月、福岡

伊藤啓
1)宮崎隆明、伊藤啓「Systematic mapping of the primary gustatory center in the Drosophila brain」、11th European Symposium for Insect Taste and Olfaction、2009.09.19～24、イタリア・ヴィッラシミーウス
2)宮崎隆明、伊藤啓「Systematic analysis of gustatory receptor neurons of Drosophila melanogaster using two enhancer-trap systems」、第 32 回日本神経科学大会、2009.9.16～18、名古屋・名古屋国際会議場
3)四宮和範、松田圭司、大石高生、伊藤啓「Flybrain Neuron Database, a comprehensive online database of the Drosophila brain neurons」、第 32 回日本神経科学大会、2009.9.16～18、名古屋・名古屋国際会議場
4)伊藤啓「ショウジョウバエの遺伝子発現誘導系を駆使した脳オミックス」、第 82 回日本生化学会大会、2009.09.21-24、神戸・神戸ポートアイランド
5)宮崎隆明、伊藤啓「Systematic analysis of the projection map of the primary gustatory center using two enhancer-trap systems in Drosophila melanogaster」、第 48 回日本生物物理学会年会、2010.09.20～22、仙台・東北大学川内キャンパス
6)宮崎隆明、伊藤啓「Neural Structure of the Drosophila primary gustatory center revealed with GAL4 and LexA enhancer-trap systems」、Functional Neurobiology in Minibrains: From Flies to Robots and Back Again、2010.10.17～22、スペイン・サン・フェリウ・デ・ギホルス
7)四宮和範、伊藤啓「Comprehensive map and nomenclature system of the brain of Drosophila」、Functional Neurobiology in Minibrains: From Flies to Robots and Back Again、2010.10.17～22、スペイン・サン・フェリウ・デ・ギホルス

久原篤
1) 久原篤 「光技術と分子遺伝学から探るシナプス伝達の暗号」生理研研究会 シナプス可塑性の分子基盤、2011 年 6 月 16-17 日、岡崎
2) 久原篤 「線虫の温度感知にかかわる神経回路の光操作」神経組織の成長・再生・移植研究会第 26 回学術集会 2011 年 6.25、東京
3) 久原篤、大西憲幸、下和田智康、森郁恵 「線虫の神経回路の光操作から探る感覚と記憶に関わる神経の暗号」包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ 2011 年 8 月 21-23 日、神戸
4) 久原篤、大西憲幸、下和田智康、森郁恵 「Neural coding in neural circuit controlling seeking sensory-behavior」第 49 回日本生物物理学会年会 シンポジウム 2011 年 9 月 16 日、姫路
5) 久原篤、大西憲幸、下和田智康、森郁恵 「感覚行動をつかさどる神経回路の情報処理の暗号」第 49 回日本生物物理学会年会 一般講演 2011 年 9 月 18 日、姫路
6) 久原篤、大西憲幸、下和田智康、森郁恵 「神経活動の光操作とイメージングによる神経伝達の暗号解読」遺伝学会年会 2011 年 9 月 20-22 日、京都
7) 久原篤 「暑がり屋さんの脳・寒がり屋さんの脳～温度感知と脳の仕組み～」動物学会 近畿支部講演会「動物学が開く医療への扉」2011 年 11 月 5-6 日、神戸
8) Atsushi Kuhara, Noriyuki Ohnishi, Tomoyasu Shimowada, and Ikue Mori 「Excitatory and inhibitory neurotransmission in a single sensory neuron direct opposite temperature-seeking behaviors」 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13-16 日、横浜
9) 久原篤「行動に関わる神経回路の生理暗号をさぐる」第 4 回甲南大学生物学シンポジウム 2012 年 1 月 13 日、神戸
10) 久原篤「温度情報処理の神経回路システムの分子生理的解析」包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ 2012 年 7 月 26 日、仙台
11) 久原篤「線虫の温度感覚と記憶を制御する神経回路の分子生理機構」第 83 回日本動物学会年会 2012 年 9 月 13-15 日、大阪

12) 宇治澤知代、太田茜、桑原直人、久原篤「線虫の温度応答適応に関わる感覚神経系を介した情報伝達」第 83 回日本動物学会年会 2012 年 9 月 13-15 日、大阪
13) 久原篤「動物の温度応答の分子遺伝学」日本遺伝学会 2012 年 9 月 25 日、福岡
14) 宇治澤知代、桑原直人、太田茜、久原篤「Molecular and neural systems of cold resistance of *C. elegans*」分子生物学会 2012 年 12 月 11-14 日、福岡

井上謙一
1) Inoue, K., Kato, S., Kobayashi, K., Takada, M. Development in pathway-selective gene delivery and neuronal ablation with enhanced retrograde transfer of a modified lentiviral vector in primate brain. The 8th IBRO World Congress Of Neuroscience. 2011/7. Florence, Italy.
2) 木村活生、井上謙一、奥田泰弘、加藤成樹、黒田呈子、藤原真紀、小林和人、高田昌彦「霊長類における改変型逆行性感染型レンチウィルスベクター使用による黒質ドーパミンニューロンへの選択的遺伝子発現」第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋

松尾直毅
1) 松尾直毅「Genetic Visualization of Memory in Mice」第 32 回日本神経科学大会　シンポジウム、2009 年 9 月 18 日、名古屋
2) 松尾直毅「記憶と学習の遺伝子研究」日本睡眠学会　第 15 回　睡眠科学研究講座、2010 年 7 月 3 日、名古屋
3) 松尾直毅「Genetic Manipulation of Memory Circuits in Mice」第 33 回日本分子生物学会年会　シンポジウム、2010 年 12 月 8 日、神戸
4) 松尾直毅「記憶痕跡の探究」. 自然科学研究機構シンポジウム、2011 年 2 月 23 日、岡崎
5) 松尾直毅「遺伝子改変マウスを用いた記憶痕跡の探究」第 82 回日本動物学会シンポジウム、2011 年 9 月 21 日、旭川
6) 松尾直毅「記憶痕跡の探究」生理学研究所　研究会、2012 年 11 月 21 日、岡崎
7) 松尾直毅「Genetic Manipulation of Memory Circuits in Mice」第 33 回日本分子生物学会年会　ワークショップ、2012 年 12 月 8 日、神戸

江島亜樹
1) 江島亜樹「Song choice according to female movement in Drosophila males」14th Annual Genes, Brain and Behavior Meeting、2012 年 05 月 15 日~2012 年 05 月 19 日、米国 Boulder, Colorado
2) 江島亜樹「Olfaction tells distance to a target female and modulates courtship song choice in Drosophila males」Invertebrate neurobiology 2012、2012 年 06 月 18 日~2012 年 06 月 22 日、中国蘇州
3) 江島亜樹「Song Choice is Modulated by Female Movement in Drosophila Males」Neurofly2012、2012 年 09 月 03 日~2012 年 09 月 07 日、イタリア Padua
4) 江島亜樹「Experience-dependent plasticity in olfactory pheromone responses in Drosophila」日本神経科学大会、2012 年 09 月 18 日~2012 年 09 月 21 日、名古屋名古屋国際会議場
5) 江島亜樹「メスまでの距離に応じてオスの求愛戦略を可塑的に制御する嗅覚フェロモン」第 10 回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」、2012 年 11 月 02 日~2012 年 11 月 04 日、福岡九州大学

木村幸太郎
1) Kimura K.、「Enhancement of odor avoidance regulated by dopamine signaling in the nematode *C. elegans*.」 The 7th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. (Nov. 3, 2009) Fukuoka, Japan.
2) 木村幸太郎：「Enhancement of odor avoidance regulated by dopamine signaling in the nematode *C. elegans*」第 87 回日本生理学会大会・シンポジウム一比較的単純なモデル動物を用いた運動・行動研究、2010 年 5 月、盛岡市
3) Yamazoe A, Kimura K.「The Worms Responds to the Gradient Direction of the Repulsive Odor 2-nonanone」 *C. elegans* Meeting "Neuronal Development, Synaptic Function & Behavior" 2010. 6. The University of Wisconsin, WI, USA
4) Kimura K, Fujita K. 「Identifying the site of dopamine action for regulating the enhancement of 2-nonanone avoidance」 *C. elegans* Meeting "Neuronal Development, Synaptic Function & Behavior" 2010. 6. The University of Wisconsin, WI, USA
5) Miyanishi Y,Kimura K. 「Functional imaging of neurons for 2-nonanone avoidance」 4th East Asia *C. elegans* Meeting 2010. 7. 国立オリンピック記念青少年総合センター
6) Yamazoe A, Kimura K. 「The worms respond to the gradient direction of the repulsive odor 2-nonanone」 4th East Asia *C. elegans* Meeting 2010. 7. 国立オリンピック記念青少年総合センター
7) Fujita K, Kimura K. 「Identifying the Site of Dopamine Action for Regulating the Enhancement of 2-nonanone Avoidance」 4th East Asia *C. elegans* Meeting 2010. 7. 国立オリンピック記念青少年総合センター
8) Fujita K, Kimura K. 「Identifying the site of dopamine action for regulating experience-dependent odor avoidance in the nematode *C. elegans*」平成 22 年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ 2010. 8. ホテル札幌芸文館
9) Yamazoe A, Kimura K. 「The nematode *C. elegans*responds to the gradient direction of a repulsive odor 2-nonanone」第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 2010. 9. 神戸コンベンションセンター

10) Fujita K, Kimura K.「Identifying the site of dopamine action for regulating experience-dependent odor avoidance in the nematode *C. elegans*」第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 2010. 9. 神戸コンベンションセンター
11) Fujita K, Kimura K. 「Identification of the site of dopamine action for regulating experience-dependent odor avoidance in the nematode *C. elegans*」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010. 12. 神戸コンベンションセンター
12) Kimura K.:「An integrative and quantitative analysis of dopamine-dependent odor avoidance behavior of the nematode *C. elegans*」 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (Jun. 2, 2011) Nagoya, Japan.
13) Fujita K, Kimura K.「Dopamine signaling for regulating experience-dependent odor avoidance」18th International *C. elegans* Meeting 2011. 6. University of California Los Angels, CA, USA
14) Yamazoe A, Iwasaki Y, Kimura K. 「Worms maintain their response to the repulsive odor 2-nonanone during avoidance behavior」 International *C. elegans* Meeting 2011. 6. The University of California Los Angels, CA, USA
15) Yuya Kawazoe, Hiromu Yawo, Kotaro Kimura. 「A multi-worm optogenetic system」 The 18th International *C. elegans* Meeting 2011.6.24 University of California, Los Angeles, CA, USA
16) 藤田幸輔、藤江由香子、木村幸太郎「線虫 *C. elegans* の匂い忌避行動において学習を制御するドーパミンシグナルの解析」平成 23 年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ 2011. 8. 神戸国際会議場
17) 山添萌子、岩崎唯史、木村幸太郎 匂い刺激を適切な応答行動に変換するための神経機能」 平成 23 年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ 2011. 8. 神戸コンベンションセンター
18) Yuya Kawazoe, Hiromu Yawo, Alexander Gottschalk, Kotaro Kimura 「新たな *C. elegans* 光遺伝学的解析システムの開発 A new optogenetic system for behavioral analysis of *C. elegans*」 2011 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ 神戸国際会議場 2011.8.22-23
19) Kimura K.:「Repulsive odor learning regulated by dopamine signaling in worms」Comprehensive Brain Science Network. Symposium — Reward and aversive information processing and monoamine signalings (Aug. 22, 2011) Kobe, Japan.
20) Yamazoe A, Iwasaki Y, Kimura K. 「*C. elegans* maintain their response to the repulsive odor 2-nonanone during avoidance behavior」第 34 回日本神経科学大会 2011. 9. パシフィコ横浜
21) 川添 有哉、八尾 寛、Alexander Gottschalk、木村 幸太郎 「高輝度 LED を用いた線虫 *C. elegans* に対するシンプルな光遺伝学実験系の確立 A multi-worm optogenetic system for the nematode *C. elegans*」 第 34 回日本神経科学大会 2011.9.16 パシフィコ横浜
22) Fujita K, Fujie Y, Kimura K.「Dopamine signaling in a pair of interneurons regulates aversive olfactory learning in the nematode *C. elegans*」第 34 回日本分子生物学会年会 2011. 12. パシフィコ横浜
23) Yamazoe A, Iwasaki Y, Miyanishi Y, Kawazoe Y,Kimura K. 「A novel behavioral strategy at run initiation for efficient odor avoidance」 EMBO Conference Series *C. elegans* Neurobiology. 2012 年 6 月、EMBL Advanced Training Centre, Heidelberg, Germany
24) Yamazoe A, Fujita Y, Kimura K. 「Stimulus-dependent expression of odor learning regulated by peptide signaling」 EMBO Conference Series *C. elegans* Neurobiology. 2012 年 6 月、EMBL Advanced Training Centre, Heidelberg, Germany
25) Fujita K, Fujie Y, Kimura K. 「Dopamine regulates odor learning via neurotransmitter signalings」 EMBO Conference Series *C. elegans* Neurobiology. 2012 年 6 月、EMBL Advanced Training Centre, Heidelberg, Germany
26) Tanimoto Y, Yamazoe A, Hashimoto K, Kimura K. 「A virtual reality running machine for worms–a highly integrated tracking system for olfactory behavior」 5th East Asia *C. elegans*Meeting. 2012 年 6 月、Chientan Youth Activity Center, Taipei, Taiwan
27) Fujita K, Fujie Y, Yamazoe A, Kimura K. 「Dopamine regulates odor learning via neurotransmitter signalings in the nematode *C. elegans*」平成 24 年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ 2012 年 7 月、仙台
28) Kawazoe Y, Yawo H, Gottschalk A, Kimura K. 「Optogenetic analysis of neural circuit for odor avoidance behavior in *C. elegans*」平成 24 年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ 2012 年 7 月、仙台
29) Fujita K, Fujie Y, Kimura K. 「Dopamine regulates odor learning via neurotransmitter signalings in the nematode *C. elegans*」第 35 回日本神経科学大会 2012 年 9 月、名古屋
30) Kawazoe Y, Yawo H, Gottschalk A, Kimura K. 「Optogenetic analysis of neural circuit for odor avoidance behavior in *C. elegans*」第 35 回日本神経科学大会 2012 年 9 月、名古屋

筒井秀和

1) Tsutsui, H., FRET Probing of Membrane Voltage. Janellia Farm Voltage Imaging Workshop, Nov 7; 2009, Janellia Farm Research Campus, USA
2) Tsutsui, H., S. Karasawa, A. Miyawaki, Y. Okamura, Membrane potential measurements with engineered FRET sensor, *The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences*, Aug 1, 2009, Kyoto, Japan.
3) Tsutsui, H., S. Karasawa, A. Miyawaki, Y. Okamura, Membrane potential measurements with engineered FRET sensor, 53rd Biophysical Meeting, Mar 4, 2009, Boston USA
4)筒井「Sensing membrane voltage with voltage sensitive phosphates and new coral fluorescence proteins」日本神経科学会、2009 年 9 月 17 日、名古屋
5)筒井「FRET-sensing of membrane voltage」日本生化学会、2009 年 10 月 21 日、神戸
6) Tsutsui, H., FRET sensing of transmembrane voltage. *Gordon Research Conference on Bioelectrochemistry,* July 6, 2012,

Lucca, Italy.
7)筒井「Voltage sensing phosphatase as molecular tools」日本神経科学会、2012 年 9 月 20 日、名古屋
8)筒井、岡村「Rapid evaluations of optical voltage reporters using filed-induced transmembrane potential responses」日本生理学会、2013 年 3 月 29 日、東京

尾崎まみこ
1) Toru Maeda, Tetsutaro Hiraguchi, Mamiko Ozaki (2011) Integulation of olfactory and gustatory signs of food in Phormia regina: Odor of 1-octen-3-ol via maxillary palps enhances feeding behavior promoted by labellar sensillar stimulation by sugar.12th European Symposium for Insect Taste and Olfaction, 2011/09, St.Petersburg, Russia.
2) Toru Maeda, Satoshi Tamotsu, Mamiko Ozaki (2012) Putative region for connection between the olfactory and the gustatory neurons for feeding behavior facilitation in the blowfly, *Phormia regina* 16th International Symposium of taste and Olfaction, 2012/6/23-27, Stockholm,Sweden

谷村禎一
1) 谷村禎一、利嶋奈緒子「　ショウジョウバエにおける内的栄養素要求度に依存した摂食行動の行動遺伝学的解析」日本味と匂学会年会シンポジウム、2012 年 10 月 3 日、大阪
2) Naoko Toshima and Teiichi Tanimura, Feeding response to amino acids and its modulation by internal nutritional state in Drosophila. Neurofly (European Fly Neurobiology Meeting), 2012 年 9 月 6 日、Padova, Italy
3) 谷村禎一、利嶋奈緒子「栄養価評価によるショウジョウバエの摂食行動制御の神経機構」日本生理学会大会シンポジウム、2013 年 3 月 27 日、東京
4) Teiichi Tanimura, Nutritional homeostasis and gustatory sensation of amino acids in Drosophila melanogaster. Mechanisms of Insect Nutritional Homeostasis, 2013 年 5 月 3 日、Bonn, Germany
5) Naoko Toshima and Teiichi Tanimura, Feeding response to amino acids and its modulation by internal nutritional requirement in Drosophila. Mechanisms of Insect Nutritional Homeostasis, 2013 年 5 月 3 日、Bonn, Germany

齋藤和也
1) Saitoh, K., Nishimura, M., Song, W.-J., Frequency- and level- dependent detectable change of auditory response pattern in the cortex. 第36回国際生理学会、2009年7月31日　京都
2) Saitoh, K., Nishimura, M., Song, W.-J., Mutual information between acoustic stimuli and optical signals in the primary auditory cortex. 第32回日本神経科学会、2009年9月18日　名古屋
3) Ocana, F.M., Saitoh, K., Rodriguez,F., Robertson, B. and GRILLNER, S.,Is there a “motor pallium” in the lamprey?　8th World Congress of Neuroscience, International Brain Research Organization (IBRO), Frorence-Italy, July16, 2011.

坂井貴臣
1) 坂井、宇井、相垣「ショウジョウバエの LIM ホメオボックス遺伝子 apterous は長期記憶に必要である」日本神経科学大会、2009 年 9 月 17 日、名古屋
2) 坂井「Functional analysis of Drosophila homologs of schizophrenia-associated genes」日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日、横浜
3) 佐藤、坂井「ショウジョウバエ PainTRP チャネル依存的な長期記憶に関わる脳神経細胞の同定」包括型脳ネットワーク夏のワークショップ、2010 年 7 月 27 日、札幌
4) 宇井、坂井「ショウジョウバエの LIM ホメオボックス遺伝子 apterous は短期記憶に必要か？」日本神経科学大会、2010 年 9 月 4 日、神戸
5) 佐藤、坂井「脳特定領域における painless 遺伝子の発現はショウジョウバエの長期記憶に関与する」日本神経科学大会、2010 年 9 月 4 日、神戸
6) 坂井「ショウジョウバエメスの性行動の神経遺伝学的解析」日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸
7) 坂井「The painless TRP channel is required for aversive courtship memory in Drosophila」包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ、2011 年 8 月 24 日、仙台
8) 小林, 坂井「脳特定領域における painless 遺伝子の発現はショウジョウバエメスの性行動に関与する」日本神経科学大会、2011 年 9 月 15 日、横浜
9) 佐藤、坂井「成虫脳の mushroom bodies および pars intercerebralis における painless 遺伝子の発現はショウジョウバエの長期記憶に関与する」日本神経科学大会、2011 年 9 月 15 日、横浜
10) 佐藤、坂井「The role of central nervous system-expressed Painless TRP channels in Drosophila long-term courtship memory」日本比較生理生化学会、2012 年 7 月 7 日、葉山
11) 大橋、坂井「ショウジョウバエ成虫の侵害熱刺激反応における Painless TRP チャネルの役割」日本神経科学大会、2012 年 9 月 18 日、名古屋
12) 井並、坂井「ショウジョウバエキノコ体における LIM ホメオボックス遺伝子 apterous の発現は長期記憶に必要である」日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋
13) 佐藤、坂井「ショウジョウバエ求愛長期記憶における中枢神経系の Painless TRP チャネルの役割」日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋
14) 佐藤、坂井「ショウジョウバエ成虫脳で発現する Painless TRP チャネルの求愛長期記憶における役割」日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡

矢田俊彦

1)前島、Udval、中田、森、矢田「視床下部室傍核 Nesfatin-1- Oxytocin による摂食調節と病態的意義」第 32 回日本肥満学会、2011 年 9 月 23 日　24 日、淡路

2)前島、Sedbazar、矢田「オキシトシンの摂食制御経路に弓状核 POMC ニューロンが関与する」第 32 回日本肥満学会、2011 年 9 月 23 日　24 日、淡路

3)Sedbazar、前島、中田、矢田「OLETF ラットの過食・肥満は孤束核 POMC と室傍核オキシトシンの低下による」第 32 回日本肥満学会、2011 年 9 月 23 日　24 日、淡路

4)Gantulga、前島、中田、矢田「視床下部室傍核 nesfatin-1 ニューロンのレプチン、CCK による活性化」第 32 回日本肥満学会、2011 年 9 月 23 日　24 日、淡路

5)中田、森、矢田「Nesfatin-1 による膵□細胞インスリン分泌調節機構の多様性」第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012 年 4 月 19 日　21 日、名古屋

6)前島、岩﨑、Sedbazar、矢田「オキシトシンの生理的摂食調節作用と末梢投与による抗肥満効果」第 33 回日本肥満学会、2012 年 10 月 11 日　12 日、京都

7)Gantulga, Maejima, Nakata, Yada「Nesfatin-1 Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Are Regulated by Meal-Evoked Factors.」The Endocrine Society's 94th Annual Meeting & Expo, June 23-26, 2012 ,Houston, USA

8)Maejima, Iwasaki, Arai, Sedbazar, Gantulga, Yada T「Peripheral Oxytocin Treatment Reduces Food Intake and Ameliorates Obesity, Fatty Liver and Glucose Intolerance in Diet-Induced Obese Mice. 」 The Endocrine Society's 94th Annual Meeting & Expo, June 23-26, 2012 ,Houston, USA

喜田聡

1)喜田聡、福島穂高、張悦「想起後の記憶制御のダイナミズム」第 34 回日本神経科学大会シンポジウム、2011 年 9 月 17 日、横浜

2)福島穂高、張悦、喜田聡「想起後の受動回避記憶強化誘導時の脳領野間相互作用機構の解析」第 34 回日本神経科学大会、 2011 年 9 月 17 日、横浜

3)長谷川俊介、太田美穂、齋藤香織、中村あずみ、細田浩司、喜田聡「前脳領域 BMAL1 は記憶想起をサーカディアン制御する」第 34 回日本神経科学大会、 2011 年 9 月 17 日、横浜

4)張　悦、福島穂高、喜田聡「免疫染色法を用いた受動的回避記憶の固定化に関与する脳領域の同定及び役割の解析」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、横浜

5)石川理絵、金亮、奥川哲央、難波隆志、高坂新一、内野茂夫、喜田聡「NMDA 型グルタミン酸受容体阻害剤メマンチン投与による成体海馬神経新生促進は海馬依存性学習記憶形成を向上させる」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、横浜

6)野本真順、武田陽平、金亮、光田幸司、喜田聡「海馬レチノイン酸受容体は記憶形成を正に制御する」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、横浜

7)谷水俊之、門間和音、張悦、福島穂高、喜田聡「社会的認知記憶固定化に関与する脳領域の同定」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 17 日、横浜

8)芹田龍郎、福島穂高、喜田聡「学習能力に対する転写因子 CREB の役割」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、横浜

9)齋藤香織、野本真順、内田周作、喜田聡「情動行動制御に対するレチノイン酸情報伝達系の役割の解析」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、横浜

10)光田幸司、野本真順、武田陽平、喜田聡「レチノイン酸情報伝達系不活化による PSD-95 と AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR1 サブユニットの発現抑制」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、横浜

11)大石諭、永田幹、喜田聡「海馬依存性学習・記憶形成に対するビタミン B 1 の役割の解析」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、横浜

12)福島穂高、張悦、喜田聡「タンパク質合成と分解を介した想起後の受動回避記憶の強化」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

13)長谷川俊介、太田美穂、中村あずみ、齋藤香織、細田浩司、喜田聡「前脳領域 BMAL1 は記憶想起をサーカディアン制御する」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

14)張　悦、福島穂高、喜田聡「CREB と Erk のリン酸化を指標とした恐怖記憶再固定化及び消去制御に関わるニューロン集団の同定」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

15)石川理絵、金亮、奥川哲央、難波隆志、高坂新一、内野茂夫、喜田聡「NMDA 型グルタミン酸受容体阻害剤メマンチン投与後の成体海馬神経新生促進による海馬依存性記憶の向上」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

16)野本真順、武田陽平、光田幸司、喜田聡「記憶形成に対する海馬レチノイド情報伝達経路の役割の解析」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

17)稲葉洋芳、張悦、金亮、間宮則、喜田聡「海馬における恐怖記憶再固定化と消去時の分子動態の解析」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

18)芹田龍郎、福島穂高、喜田聡「転写因子 CREB 活性化による海馬依存性学習の向上」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

19)齋藤香織、野本真順、内田周作、喜田聡「レチノイン酸情報伝達系の機能阻害は情動行動の異常を引き起こす」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

20)光田幸司、野本真順、武田陽平、喜田聡「レチノイン酸情報伝達系による PSD-95 と AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR1

サブユニットの発現制御」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜
21)福島穂高、張悦、喜田聡「プロテオソーム依存的タンパク質分解と新規遺伝子発現を介した想起後の受動回避記憶強化」第 56 回日本農芸化学会大会、2012 年 3 月 23 日、京都
22)長谷川俊介、太田美穂、中村あずみ、齋藤香織、細田浩司、喜田聡「前脳領域サーカディアン転写リズムによる時間帯依存的な記憶想起制御」第 56 回日本農芸化学会大会、2012 年 3 月 23 日、京都
23)張　悦、福島穂高、喜田　聡「CREB と Erk の活性化を指標とした恐怖記憶強化及び消去を制御するニューロン集団の同定」第 56 回日本農芸化学会大会、2012 年 3 月 23 日、京都
24)石川理絵、金亮、難波隆志、高坂新一、内野茂夫、喜田聡「メマンチン投与による成体海馬神経新生促進と海馬依存的学習・記憶形成能力の向上」第 56 回日本農芸化学会、2012 年 3 月 23 日、京都
25)稲葉洋芳、張悦、金亮、間宮則、喜田聡「恐怖記憶再固定化と消去誘導時の海馬と扁桃体における細胞内情報伝達機構の解析」第 56 回日本農芸化学会大会、2012 年 3 月 23 日、京都
26)芹田龍郎、福島穂高、喜田聡「CREB 情報伝達系活性化が学習能力に与える影響の解析」第 56 回日本農芸化学会、2012 年 3 月 23 日、京都
27)齋藤香織、野本真順、内田周作、喜田聡「情動行動制御に対するレチノイン酸情報伝達系の役割の解析」第 56 回日本農芸化学会大会、2012 年 3 月 23 日、京都
28)喜田聡「恐怖記憶制御のダイナミクス」第１５３回日本獣医学会学術集会シンポジウム、2012 年 3 月 27 日、大宮
29)喜田聡「Dynamic regulation of fear memory after retrieval.」Bio-X 2012 International Symposium on Molecular Cognition and Translational Research on Neuropsychiatric Disorders. Shanghai, China, Apr 29th, 2012
30)喜田聡「Dynamic regulation of memory after retrieval.」1st frontier international symposium for neurons and disease. Xian, China, Mar, 2012

上川内あづさ
1)Kamikouchi A, Hikita K, Seki H, Uchida A, Ito K, Miyakawa H, Morimoto T.Systematic screening of higher-order auditory neurons in the fruitfly brain.CSH meeting “NEUROBIOLOGY OF *DROSOPHILA*”, 2009 年 10 月 1 日、Cold Spring Harbor, USA
2)上川内あづさ　「ショウジョウバエの二次聴覚神経が形成する回路構造の解析」　新学術領域研究　神経系の動作原理を明らかにするためのシステム分子行動学、2009 年 11 月、静岡
3)Kamikouchi A, Ito K, Miyakawa H, Morimoto T. The neural pathway for hearing and gravity-sensing in Drosophila. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日（招待）1S15-4、横浜
4)Kamikouchi A, Hikita K, Seki H, Uchida A, Sato R, Ito K, Miyakawa H, Morimoto T. Systematic identification of higher-order auditory neurons in a fruitfly brain.国際バイオリソースシンポジウム「ショウジョウバエ」、2010 年 3 月 17 日、京都
5)上川内あづさ、稲垣秀彦、Göpfert MC、宮川博義、森本高子、伊藤啓　ショウジョウバエにおける音，重力，風検知の神経基盤、第 115 回日本解剖学会総会、2010 年 3 月 28 日（招待）1S6-AM1、盛岡
6)Seki H, Uchida A, Ito K, Miyakawa H, Morimoto T, Kamikouchi A. Identification of neurons that project to the secondary auditory center in the *Drosophila* brain. 第 33 回日本神経科学大会、2010 年 9 月 2 日、神戸
7)Kamikouchi A, Hikita K, Mizuno H, Sato R, Miyakawa H, Ito K, Morimoto T.　Anatomy and function of the secondary auditory neurons AMMC-B1 in the fruit fly brain.第 33 回日本神経科学大会、2010 年 9 月 2 日、神戸
8)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.　2011 年 6 月 3 日（招待）、名古屋
9)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).　第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 14 日（招待）、横浜
10)Seki H, Ishiguro Y, Miyakawa H, Morimoto T, Kamikouchi A.Anatomy of the secondary auditory neurons in the *Drosophila* brain. 第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 14 日、横浜
11)上川内あづさ　脳の中の聴覚神経回路を探る　日本分子生物学会　第 12 回春期シンポジウム、2012 年 4 月 25 日（招待）、山梨
12)松尾恵倫子、関治由、森本高子、宮川博義、伊藤啓、上川内あづさ　「ショウジョウバエにおける二次聴覚神経回路の解明」日本分子生物学会第 12 回春季シンポジウム「トランスレーショナル分子生物学～新世代への知の継承～」、2012 年 4 月 25 日～26 日、山梨
13)Kamikouchi A.　Neuroanatomy of the Drosophila auditory system. Janelia Farm Workshop: The Neurobiology and Evolution of Insect Acoustic Communication, May 14th-16th. 2012（招待）、Janelia Farm, USA.
14)Matsuo E, Seki H, Asai T, Morimoto T, Miyakawa H, Ito K, Kamikouchi A.　Systematic analysis on the second auditory circuit in the fly brain. 日本比較生理生化学会第 34 回大会、2012 年 7 月 6 日～8 日、葉山
15)Kamikouchi A. How do fruitflies hear? 日本比較生理生化学会第 34 回大会、2012 年 7 月 8 日（招待）、葉山
16)松尾恵倫子、関治由、浅井智紀、森本高子、宮川博義、伊藤啓、上川内あづさ　「ショウジョウバエ聴覚系における高次神経回路の解析」日本動物学会第 83 回大会、2012 年 9 月 12 日、大阪
17)上川内あづさ　ショウジョウバエ聴覚系の神経回路地図 Auditory neural circuits in the fruit-fly brain.　日本動物学会第 83 回大会、2012 年 9 月 13 日（招待）、大阪
18)Kamikouchi A. The auditory system of fruit flies.4th International Symposium on Photonic Bioimaging. Sep. 17th. 2012（招待）、Sapporo

19)Kamikouchi A. Auditory neural circuits in the fly brain. シンポジウム「個々の神経細胞の働きを俯瞰して見る脳機能」 第35回日本神経科学大会、2012年9月19日（オーガナイザー）、名古屋
20)Matsuo E, Seki H, Asai T, Morimoto T, Miyakawa H, Ito K, Kamikouchi A. Comprehensive analysis on the secondary auditory circuit in the fly brain. 第35回日本神経科学大会、2012年9月21日、名古屋
21)Jeonghyeon Y, Matsuo E, Mizuno H, Morimoto T, Miyakawa H, Kamikouchi A. Neural mechanism that modulates the sound-evoked behavior of fruit flies. The 10th Japanese Drosophila Research Conference (JDRC10)、2012年10月13～15日、東京
22)Yamada D, Matsuo E, Kamikouchi A. Elucidation of the response characteristics of subgroup-D neurons in the fly ear. The 10th Japanese Drosophila Research Conference (JDRC10)、2012年10月13～15日、東京
23)Matsuo E, Seki H, Asai T, Morimoto T, Miyakawa H, Ito K, Kamikouchi A. The auditory map in the fly brain. The 10th Japanese Drosophila Research Conference (JDRC10)、2012年10月13～15日、東京
24)Asai T, Matsuo E, Seki H, Morimoto T, Miyakawa H, Ito K, Kamikouchi A. Characterization of the secondary auditory neurons in the fly brain. The 10th Japanese Drosophila Research Conference (JDRC10)、2012年10月13～15日、東京
25)Kamikouchi A. The fruit-fly brain as a tool to explore how the auditory system works. 第9回日独先端科学シンポジウム(JGFoS2012)、2012年10月26日～28日、ポツダム、ドイツ
26)Kamikouchi A. Anatomical and Functional Organization of the *Drosophila* Auditory System. *International Symposium* on Organization and Function of the Nervous System. Nov. 27. 2012（招待）、Tokyo
27)上川内あづさ　ショウジョウバエの音受容センサーと聴覚神経回路地図　2012年度研究会　「細胞センサーの分子機構・相互関連・ネットワーク研究会」　生理学研究所、2012年11月29日、岡崎

中村加枝
1) Nakao, K., Matsuzaki, R., Noritake, A., Okada, O., Kobayashi, Y., Nakamura, K. ,Positive and negative value coding in the primate dorsal raphe nucleus. Society for neuroscience meeting (Oct. 20,2009.) Chicago
2) Nakao, K., Matsuzaki, R., Okada, O., Kobayashi, Y., Nakamura, K. , Reward coding by the primate dorsal raphe neurons is context dependent. 日本神経科学会(Sep. 16, 2009)　名古屋
3) Matsuzaki, R., Nakao, K., Nakamura, K. , Reward-dependent modulation of neuronal activity in the primate ventral striatum. The 32nd annual meeting, the Japan Neuroscience Society (Sep. 16, 2009) Nagoya
4) Nakamura, K. ,ドパミンとセロトニンによる報酬獲得行動の制御のメカニズム , 第27回頭頸部自律神経研究会　(Aug. 29, 2009）大阪
5) Hayashi, K., Nakao, K., Okada, O., Kobayashi, Y., Nakamura, K. , Neural processing of appetitive and aversive stimuli in the primate dorsal raphe nucleus. Society for neuroscience meeting (Nov. 15, 2010) San Diego
6) Noritake, A., Nakamura, K. , Positive and negative reward value coding in the primate lateral hypothalamus.Society for neuroscience meeting(Nov. 15, 2010) San Diego
7) Hayashi, K., Nakao, K., Okada, O., Kobayashi, Y., Nakamura, K. , Neuronal coding of rewarding and aversive stimuli in the primate dorsal raphe nucleus. The 33rd annual meeting, the Japan Neuroscience Society(Sep. 4, 2010) Kobe
8) Noritake, A., Nakamura, K. , Reward-coding by the primate lateral hypothalamus neurons is spatially distinct. The 33rd annual meeting, the Japan Neuroscience Society(Sep. 4, 2010) Kobe
9) Nakamura, K. , 報酬獲得行動におけるセロトニンの役割. つくばブレインサイエンスセミナー（July 13, 2010）筑波
10) Nakamura, K. , Value coding by the primate dorsal raphe nucleus. 包括脳シンポジウム（札幌　August,　2010）
11) Nakamura, K.,Ryuichi M., , Role of basal ganglia for reward-dependent modulation of action. 日本神経科学会（Sep. 4, 2010）神戸
12) Nakamura, K., , New perspectives on value-based decision making. 日本神経科学会（シンポジウム）（Sep. 4, 2010）神戸
13) Hayashi K, Nakao K, Matsuzaki, R, Okada K-I, Kobayashi, Y, Nakamura, K. , Neuronal activity in the primate dorsal raphe nucleus encodes positive and negative value. Society for neuroscience meeting (Nov. 13, 2011) Washington
14) Noritake, A., Nakamura, K.　Comparison of neuronal signals for reward value in appetitive and aversive contexts in the primate lateral hypothalamus. Society for neuroscience meeting (Nov. 13, 2011) Washington
15) Hayashi, K., Noritake, A.,Nakamura, K.Cognitive control of response inhibition in the primate. The 34th annual meeting, the Japan Neuroscience Society (Sep. 14-17, 2011)横浜
16) Noritake, A., Nakamura, K.Neuronal modulation n appetitive and aversive contexts in the primate lateral hypothalamus. The 34th annual meeting, the Japan Neuroscience Society (Sep. 14-17, 2011)横浜
17) Guitart-Masip, M., Crockett, M., Nakamura, K., Cools, R."Appetitive and aversive coding in the primate dorsal raphe nucleus" in the symposium "Serotonin, motivation and action in learning anddecision-making" 11th International Conference on Cognitive Neuroscience, Palma, Mallorca,Spain
18) Nakamura, K.　Differential reward coding in the dorsolateral and ventromedial part of the primate caudate. Society for neuroscience meeting (Oct. 15, 2012) New Orleans
19) Noritake, A., Nakamura, K.　Coding of reward uncertainty in the primate lateral hypothalamic neurons. Society for neuroscience meeting (Oct. 15, 2012) New Orleans
20) Noritake, A., Nakamura, K. Uncertainty coding in the primate lateral hypothalamus area. The 35th annual meeting, the Japan Neuroscience Society (Sep. 18, 2012)名古屋
21) Hayashi, K., Noritake, A.,Nakamura, K. Action control and value coding in the primate dorsal raphe nucleus. The 35th annual meeting, the Japan Neuroscience Society (Sep. 19, 2012)名古屋

岩里琢治

1) Iwasato, T., Yamamoto, N.「シナプス回路形成と維持-ショウジョウバエから哺乳類まで」第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 16 日、名古屋（招待講演）

2) Iwasato, T.「マウス体性感覚系にみる神経回路の生後発達機構」頭部形成研究会、2009 年 11 月 16 日、修善寺（招待講演）

3) Iwasato, T.「Circuit refinement during postnatal development of the mouse somatosensory cortex.」BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会　合同大会、2010 年 12 月 7 日、神戸　（招待講演）

4) Mizuno, H., Saito, Y. M., Itohara, S., Iwasato, T.「Single cell labeling method reveals the precise developmental process of barrel neuron dendrites in somatosensory cortex of neonatal mice」 Society for Neuroscience 2011、2011 年 11 月 12 日－11 月 16 日、Washington, DC

5) Iwasato, T.「幼仔脳における神経回路の発達：マウス体性感覚野（バレル野）での研究」日本分子生物学会　第 12 回春季シンポジウム、2012 年 4 月 25 日－4 月 26 日、山梨県笛吹市（招待講演）

6) Mizuno, H., Luo, W., Saito, Y. M., Itohara, S., Iwasato, T.「Direct analyses of NMDA receptor-mediated refinement of barrel neuron dendrites in neonatal mouse somatosensory cortex」Society for Neuroscience 2012、2012 年 10 月 13 日－10 月 17 日、New Orleans

7) Iwasato, T.「マウス体性感覚野バレル発達の in vivo イメージング」認識と形成研究会 2012、2012 年 12 月 1 日－12 月 2 日、宇都宮（招待講演）

8) Iwasato, T.「Towards in vivo imaging of barrel formation in neonatal mouse cortex 」遺伝研研究会　Circuit construction in the mammalian cerebral cortex：Genetic and imaging approaches、2012 年 12 月 15 日－12 月 16 日、三島（招待講演）

9) Iwasato, T.「In vivo imaging of dendritic refinement of barrel cells in the neonatal mouse cortex」国際高等研究所研究プロジェクト「ゲノム工学とイメージングサイエンスに基づく生命システム研究の新展開」研究会、2013 年 2 月 22 日－2 月 23 日、京都（招待講演）

平田普三

1) 平田「ゼブラフィッシュにおけるグリシン作動性シナプスの形成」第 44 回日本発生生物学会年会、2011 年 5 月 19 日、沖縄

2) 平田「Developmental transition of motor behavior from slow muscle-mediated coiling to fast muscle-mediated burst swimming in zebrafish」The 7th European Zebrafish Meeting、2011 年 7 月 6 日、エジンバラ（英国）

3) 長縄、荻野、平田「ゼブラフィッシュの運動発達過程における筋の使い分け」平成 23 年度日本動物学会中部支部大会、2011 年 7 月 31 日、福井

4) 長縄、荻野、平田「Developmental transition of touch response from slow muscle-mediated coilings to fast muscle-mediated burst swimming in zebrafish」第 17 回小型魚類研究会、2011 年 9 月 9 日、三島

5) 平田「ゼブラフィッシュにおけるグリシン作動性シナプスの活動依存的形成」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 15 日、横浜

6) 荻野、平田「逃避行動とグリシン作動性シナプスの形成」第 82 回日本動物学会大会、2011 年 9 月 21 日、旭川

7) 平田「奨励賞受賞講演：運動システムの発達における神経系と筋の分化・形成」第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21 日、京都

8) 長縄、平田「ゼブラフィッシュの運動発達おける泳動能獲得過程の解析」第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、京都

9) 平田「運動・行動の分子遺伝学」三重大学 COE-A シンポジウム「魚類をモデルとした生物多様性と次世代型ポストゲノム教育研究拠点」、2011 年 12 月 6 日、津

10) 平田「Slow-twitch and fast-twitch muscle defects in zebrafish」Cold Spring Harbor Asia Conference. The 5th Annual Zebrafish Disease Models Meeting. Fishing for Answers: Zebrafish Models of Human Development and Disease、2012 年 4 月 19 日、蘇州（中国）

11) 平田、ウェン、川上、長縄、荻野、山田、セントアマン、ロウ、チョー、スプレイグ、浅川、武藤、川上、クワダ「Electrical coupling in muscle enables compensation of sporadic neural outputs to coordinate robust and efficient behavior during motor development」第 45 回日本発生生物学会会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会、2012 年 5 月 30 日、神戸

12) 平田、ウェン、川上、長縄、荻野、山田、セントアマン、ロウ、チョー、スプレイグ、浅川、武藤、川上、クワダ「コネキシンの研究」包括脳夏のワークショップ、2012 年 7 月 26 日、仙台

13) 平田、ウェン、川上、長縄、荻野、山田、セントアマン、ロウ、チョー、スプレイグ、浅川、武藤、川上、クワダ「細胞カップリングによる運動出力の補正」第 83 回日本動物学会大会、2012 年 9 月 13 日、大阪

14) 平田、荻野、山田、ハーヴェイ「Defective escape behavior in DEAH-box RNA helicase Dhx37 mutant zebrafish improved by restoring glycine receptor expression」The 5th Strategic Conference of Zebrafish Investigators、2013 年 1 月 21 日、アシロマ（米国）

15) 平田「Formation and function of glycinergic synapse in zebrafish」International Institute for Advanced Studies Research Project "Novel developments on the study of life and biological systems based on genome engineering and imaging science" The First Symposium、2013 年 2 月 23 日、木津川

浅川和秀

1) Asakawa, K., Abe, G., Kawakami, K. Genetic dissection of the hindbrain by the Gal4-UAS system in zebrafish. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists 2011 年 5 月 19 日

2) Asakawa, K., Abe, G., Kawakami K. Genetic Dissection of the Hindbrain by the Gal4-UAS System. 7th European

Zebrafish Meeting 2011 年 7 月 6 日
3) 浅川和秀, 阿部玄武, 川上浩一ゼブラフィッシュを用いた後脳運動制御機能の遺伝学的解剖第３４回日本神経科学大会 2011 年 9 月 17 日
4) Asakawa, K., Abe, G., Kawakami, K. Genetic dissection of the hindbrain by the Gal4-UAS system in zebrafish. Society for Neuroscience 2011 2011 年 11 月 14 日

知見聡美
1) Chiken S, Ohta C, Sato A, Sasaoka T, Katsuki M, Kurokawa M, Nambu A "Dopamine D1 receptor modulates neurotransmission through the basal ganglia" 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2011 年 6 月 2 日、名古屋
2) 知見聡美、一瀬千穂、一瀬宏、近藤一直、南部篤「ドーパ反応性ジストニアモデルマウスにおける大脳基底核ニューロンの活動」第 34 回日本神経科学学会、2011 年 9 月 15 日、横浜
3) Chiken S, Nambu A "High-frequency pallidal stimulation disrupts information flow through the pallidum by GABAergic inhibition" Frontiers in Primate Neuroscience Researches, 2012 年 2 月 23 日、東京
4) 知見聡美、南部篤「淡蒼球内節－脳深部刺激療法の作用機序の解析」第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 31 日、長野
5) 知見聡美、南部篤"High-frequency pallidal stimulation disrupts information flow through the basal ganglia by GABAergic inhibition"日本比較生理生化学会第 34 回大会、2012 年 7 月 6－7 日、葉山
6) Chiken S, Ohta C, Sato A, Sasaoka T, Kurokawa M, Nambu A "Dopamine D1 and D2 receptors differently modulate information processing through the basal ganglia" Neuroscience 2012, SfN's 42nd annual meeting, 2012 年 10 月 15 日、New Orleans
7) Nambu A, Chiken S "High-frequency pallidal stimulation disrupts information flow the pallidum by GABAergic inhibition" Neuroscience 2012, SfN's 42nd annual meeting, 2012 年 10 月 15 日、New Orleans
8) Sano H, Chiken S, Kobayashi K, Nambu A "Striatopallidal neurons attenuate motor activity through the phasic response pattern in the basal ganglia" Neuroscience 2012, SfN's 42nd annual meeting, 2012 年 10 月 15 日、New Orleans
9) Chiken S, Nambu A "High-frequency pallidal stimulation blocks local neuronal activity and information flow through the basal ganglia" GCOE 第 4 回国際シンポジウム、2012 年 11 月 16 日、名古屋
10) Chiken S, Ohta C, Sato A,Sasaoka T, Kurokawa M, Nambu A "Functional role of dopamine D1 and D2 receptors in information processing through the basal ganglia"11th Triennial meeting of International Basal Ganglia Society、2013 年 3 月 6 日、Israel
11) Nambu A, Chiken S "High-frequency pallidal stimulation disrupts information flow the pallidum by GABAergic inhibition" 11th Triennial meeting of International Basal Ganglia Society、2013 年 3 月 6 日、Israel

小早川高
1) 小早川高「嗅覚入力による快・不快情動生成と他感覚入力への影響」平成 21 年度生理学研究所研究会、2009 年 10 月 1 日、岡崎
2) 小早川高、小早川令子「Neural mechanisms to control odor evoked emotions and behaviors.」日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日、横浜
3) 小早川高「Innate versus learned odor processing in the mouse olfactory bulb.」日本神経科学学会、2010 年 9 月 13 日、神戸
4) 小早川高「Neuronal mechanisms controlling innate and learned behaviors in the mouse olfactory system.」生理学研究所シナプス研究会、2010 年 12 月 3 日、岡崎
5) 小早川高「Odor-evoked innate and learned fear responses are controlled by distinct neuronal mechanisms.」包括脳ネットワーク夏のワークショップシンポジウム、2011 年 8 月 22 日、神戸
6) 小早川高、伊早坂智子、小早川令子「Neuronal mechanisms controlling innate and learned fear responses.」日本神経科学大会、2011 年 9 月 17 日、横浜
7) 小早川高「先天的と後天的な恐怖によって誘発される不動行動は異なる神経回路によって制御される」第 5 回パーキンソン病・運動障害疾患コングレス、2011 年 10 月 7 日、東京
8) 小早川高「匂いに対する恐怖反応のメタボロミクス解析」第 31 回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2011 年 11 月 10 日、鶴岡
9) 小早川高「嗅覚神経回路による情動と行動の制御」第 42 回城南神経懇話会、2012 年 6 月 14 日、東京
10) 小早川高「Odor-evoked innate and learned fear responses are mediated by distinct neuronal mechanisms.」生理学研究所国際研究集会、2012 年 9 月 13－15 日、岡崎
11) 小早川高「匂いによる社会コミュニケーション行動の制御」日本味と匂学会第 46 回大会、2012 年 10 月 5 日、大阪
12) 小早川高「Odor-evoked innate and learned fear responses are mediated by distinct neuronal mechanism.」新学術領域研究３領域合同国際シンポジウム、2012 年 11 月 27－28 日、東京
13) 小早川高、伊早坂智子、小早川令子「匂いに対する恐怖のメタボロミクス」日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡
14) 小早川高「匂いに対する多様な情動を先天的と後天的に規定する神経メカニズム」第 9 回宮崎サイエンスキャンプ、2013 年 2 月 15 日、宮崎

吉原良浩

1) 吉原、後藤(金子)「標的糸球体への嗅細胞軸索集束を制御する細胞認識分子 BIG-2」第 31 回日本神経科学大会 (Neuroscience 2008)、2008 年 7 月 9 日-11 日、東京

2) 三津井、吉原「二次嗅覚神経細胞特異的に遺伝子発現を誘導するエンハンサー領域の同定」第 31 回日本神経科学大会（Neuroscience 2008)、2008 年 7 月 9 日-11 日、東京

3) Yoshihara, Kaneko-Goto "BIG-2 mediates olfactory axon convergence to target glomeruli"International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT XV), 2008.7.21-26, San Francisco, USA

4) Mitsui, Yoshihara "Identification of mitral/tufted cell-specific transcriptional enhancer upstream of mouse *Tbx21* gene"International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT XV), 2008.7.21-26, San Francisco, USA

5) Miyasaka, Morimoto, Tsubokawa, Higashijima, Okamoto, Yoshihara "Visualizing mitral cell axon projection in transgenic zebrafish"International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT XV), 2008.7.21-26 San Francisco, USA

6) Koide, Miyasaka, Morimoto, Kawakami, Yoshihara "Genetic dissection of zebrafish olfactory circuitry mediating attractive response to amino acids" International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT XV), 2008.7.21-26 San Francisco, USA

7) 宮坂、森本、坪川、東島、岡本、吉原「ゼブラフィッシュ二次嗅覚神経系の可視化と軸索投射パターンの解析」日本味と匂学会第 42 回大会、2008 年 9 月 17 日-19 日、富山

8) 小出、宮坂、森本、川上、吉原「アミノ酸への誘引行動を介在するゼブラフィッシュ嗅覚神経回路の遺伝学的解析」日本味と匂学会第 42 回大会、2008 年 9 月 17 日-19 日、富山

9) Yoshihara "Genetic dissection of olfactory neural circuits in zebrafish" 18th European Chemoreception Research Organization Congress, ECRO-2008 2008.9.3-7, Portoroz, Slovenia

10) Koide, Yoshihara "Genetic dissection of zebrafish olfactory circuitry mediating attractive response to amino acids" 6th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2008), 2008.12.6-7, Fukuoka, Japan

11) 吉原「嗅覚神経系の機能構築原理：嗅上皮から嗅球へ，さらには高次嗅覚中枢へ」日本生物物理学会第 46 回年会、2008 年 12 月 3 日-5 日、福岡

12) 吉原、宮坂、小出、増田「ゼブラフィッシュ嗅覚行動の神経回路遺伝学」日本味と匂学会第 43 回大会、2009 年 9 月 2 日-4 日、旭川

13) 増田、小出、宮坂、吉原「ゼブラフィッシュ嗅覚忌避行動の自動的定量解析法の確立」日本味と匂学会第 43 回大会、2009 年 9 月 2 日-4 日、旭川

14) 宮坂、冨澤、佐藤、吉原「嗅球の発達における嗅神経投射の役割：片側嗅神経欠損ゼブラフィッシュ変異体を用いた解析」日本味と匂学会第 43 回大会、2009 年 9 月 2 日-4 日、旭川

15) 小出、宮坂、川上、吉原「アミノ酸への誘引行動を介在するゼブラフィッシュ嗅覚神経回路の遺伝学的解析」第 15 回小型魚類研究会、2009 年 9 月 12 日-13 日、名古屋

16) 宮坂、森本、坪川、東島、岡本、吉原「嗅球から高次中枢へ：ゼブラフィッシュ二次嗅覚経路の遺伝子工学的可視化」第 32 回日本神経科学大会、 2009 年 9 月 16 日-18 日、名古屋

17) 小出、宮坂、川上、吉原「アミノ酸への誘引行動を司るゼブラフィッシュ嗅覚神経回路の遺伝学的解析」第 32 回日本神経科学大会、 2009 年 9 月 16 日-18 日、名古屋

18) Mitsui, Yoshihara "Identification of mitral/tufted cell-specific transcriptional enhancer upstream of mouse *Tbx21* gene"7th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2009), 2009.11.3-4, Fukuoka, Japan

19) 吉原 "Systems molecular neuroethology of zebrafish olfaction" 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日-12 日、横浜

20) Yoshihara "Neural circuit genetics of zebrafish olfaction" Formal Seminar at Neuroscience Graduate Program, UCSF, 2009.9.17, San Francisco, USA

21) Yoshihara "Neural circuit genetics of zebrafish olfactory system2"Janelia Farm Conferences: Form and Function of the Olfactory System, 2010.5.23-26, Ashburn, USA

22) Miyasaka, Koide, Okamoto, Yoshihara "Genetic tracing of axonal projections from the olfactory bulb to higher brain centers in zebrafish" Janelia Farm Conferences: Form and Function of the Olfactory System, 2010.5.23-26, Ashburn, USA

23) 増田、小出、宮坂、吉原「ゼブラフィッシュ嗅覚忌避行動を司る神経回路メカニズムの解析」第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 2 日-4 日、神戸

24) 脇阪、宮坂、吉原「警報フェロモンに応答するゼブラフィッシュ嗅細胞の同定」第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 2 日-4 日、神戸

25) 水口、吉原「マウス嗅球僧帽・房飾細胞の分化における Tbr2 の機能」第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 2 日-4 日、神戸

26) 宮坂、吉原「遺伝子工学的単一ニューロン標識によるゼブラフィッシュ二次嗅覚経路の解析」第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 2 日-4 日、神戸

27) 後藤(金子)、佐藤、堅田、吉原、西依、木村、東原、吉原「嗅細胞特異的新規膜蛋白質#123 の発見と機能解析」第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 2 日-4 日、神戸

28) Mizuguchi, Yoshihara "Tbr2 is required for proper differentiation of mitral/tufted cells in the mouse olfactory bulb"40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2010), 2010.11.13-17, San Diego, USA

29）Mizuguchi, Yoshihara “Roles of T-box transcription factors in mitral/tufted cells” 8th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2010), 2010.11.6-7, Fukuoka, Japan
30）Yoshihara “Neural circuit genetics of zebrafish olfactory system”10th China-India-Japan-Korea Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (NBNI 2010), 2010.10.11-12, Kunming, China
31）Yoshihara “Molecular genetic dissection of olfactory circuits in zebrafish” International Symposium on Systems Molecular Ethology and Beyond, 2010.11.10, Tokyo, Japan
32）吉原「ゼブラフィッシュが好きな匂いと嫌いな匂い：嗅覚社会行動の神経回路基盤」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 14 日-17 日、横浜
33）宮坂、吉原「嗅球から高次中枢へと至るゼブラフィッシュ嗅覚経路の包括的遺伝学的解析」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 14 日-17 日、横浜
34）三津井、五十嵐、森、吉原「Tbx21 遺伝子エンハンサーを用いたマウス二次嗅覚経路の可視化と神経活動イメージング」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 14 日-17 日、横浜
35）水口、吉原「マウス嗅球の神経回路形成における Tbr2 の役割」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 14 日-17 日、横浜
36）矢吹、小出、宮坂、脇阪、渡邉、吉原「ゼブラフィッシュにおける性行動発現の嗅覚メカニズム-プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ によって活性化される神経回路素子の同定-」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 14 日-17 日、横浜
37）小出、大倉、中井、吉原「嗅覚神経回路選択的遺伝子発現エンハンサーOCE と蛍光カルシウムセンサーGCaMP を用いたゼブラフィッシュ嗅覚ニューロン活動の in vivo イメージング」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 14 日-17 日、横浜
38）宮坂、吉原「嗅球から高次中枢へ: ゼブラフィッシュ嗅覚系の機能構築」日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 21 日-23 日、旭川
39）脇阪、増田、小出、宮坂、吉原「ゼブラフィッシュ嗅覚忌避行動を司る神経回路メカニズムの解明」日本味と匂学会第 45 回大会、2011 年 10 月 5 日-7 日、金沢
40）Kinameri, Kaneko-Goto, Sato, Katada, Touhara, Yoshihara “A novel membrane protein #123 with specific expression and crucial function in olfactory sensory neurons” 9th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perceptioin (YR Umami Forum 2011), 2011.11.5-6, Fukuoka, Japan,
41）吉原「ゼブラフィッシュの嗅覚行動を司る神経回路メカニズム,,千里ライフサイエンス振興財団セミナー『匂い・香り・フェロモン』」、2011 年 11 月 4 日、豊中
42）Yoshihara “Neural circuit mechanisms for olfactory behaviors in zebrafish” International Symposium Formation and Function of Brain Networks: From Genes to Behavior, 2012.1.11-12, Nagoya, Japan
43）Kaneko-Goto, Sato, Katada, Kinameri, Yoshihara, Nishiyori, Kimura, Fujita, Touhara, Reed, Yoshihara “Goofy: a novel Golgi membrane protein with specific expression and crucial function in the olfactory sensory neurons” XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012.6.23-27, Stockholm, Sweden
44）Wakisaka, Miyasaka, Yoshihara “Odor map in the zebrafish olfactory bulb-1: phosphorylated Erk immunohistochemistry” XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012.6.23-27, Stockholm, Sweden
45）Tachikawa, Shindo, Yoshihara, Kuroda “Neural circuit mechanism underlying behavioral transition from attack to parenting toward pups in male mice” XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012.6.23-27, Stockholm, Sweden
46）Miyasaka, Wakisaka, Masuda, Arganda-Carreras, Seung, Yoshihara “From the olfactory bulb to higher brain centers: a comprehensive axon projection map revealed by genetic single-neuron labeling in zebrafish” XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012.6.23-27, Stockholm, Sweden
47）Yoshihara “Olfactory circuits in zebrafish” XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012.6.23-27, Stockholm, Sweden
48）Masuda, Wakisaka, Koide, Miyasaka, Yoshihara “Olfactory neural circuitry mediating Schreckstoff-evoked alarm response in zebrafish” XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012.6.23-27, Stockholm, Sweden
49）Koide, Ohkura, Nakai, Yoshihara “Odor map in the zebrafish olfactory bulb-2: GCaMP Ca^{2+} imaging” XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012.6.23-27, Stockholm, Sweden
50）Yabuki, Koide, Miyasaka, Wakisaka, Masuda, Watanabe, Yoshihara “Olfactory neural circuitry mediating prostaglandin F2α-evoked sexual behavior in male zebrafish” XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012.6.23-27, Stockholm, Sweden
51）Mitsui, Koide, Yoshihara “Olfactory circuit enhancer (OCE) in mouse Tbx21 gene directs efficient transgene expression along the olfactory neural pathways in mice and zebrafish” XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012.6.23-27, Stockholm, Sweden
52）吉原「ゼブラフィッシュにおける嗅覚行動発現の神経機構」嗅覚情報処理の神経基盤 −匂い分子から嗅覚神経回路、行動・情動まで−、2012 年 9 月 15 日、東京
53）矢吹、小出、宮坂、脇阪、増田、渡邉、吉原 “Olfactory neural circuitry mediating prostaglandin F2α-evoked sexual behavior in male zebrafish”嗅覚情報処理の神経基盤 −匂い分子から嗅覚神経回路、行動・情動まで−、2012 年 9 月 15 日、東京
54）小出、大倉、中井、吉原“Odor map in the zebrafish olfactory bulb: GCaMP Ca^{2+} imaging” 嗅覚情報処理の神経基盤 −匂い分子から嗅覚神経回路、行動・情動まで−、 2012 年 9 月 15 日、東京
55）水口、成塚、森、Chai-An、William、吉原“Tbr2 is required for establishing proper excitatory-inhibitory balance of neural circuitry in the mouse olfactory bulb” 嗅覚情報処理の神経基盤 −匂い分子から嗅覚神経回路、行動・情動まで−、2012 年 9

月 15 日、東京
56) 刀川、吉原、黒田“Behavioral Transition from attack to parenting in male mice: a crucial role of the vomeronasal system, Behavioral Transition from attack to parenting in male mice: a crucial role of the vomeronasal system” 嗅覚情報処理の神経基盤 −匂い分子から嗅覚神経回路、行動・情動まで−、2012 年 9 月 15 日、東京
57) 吉原「ゼブラフィッシュの嗅覚行動を司る神経回路素子の同定」第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18 日-21 日、名古屋
58) 宮坂、脇阪、増田、Arganda-Carreras、Seung、吉原「嗅球から高次中枢へ：ゼブラフィッシュ二次嗅覚系の包括的軸索投射マップ」第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18 日-21 日、名古屋
59) 増田、脇阪、小出、宮坂、吉原“Olfactory neural circuitry mediating Schreckstoff-evoked alarm response in zebrafish” 第 18 回小型魚類研究会、2012 年 9 月 22 日-23 日、京都
60) 小出、大倉、中井、吉原“Functional odor map in the zebrafish olfactory bulb” 第 18 回小型魚類研究会、2012 年 9 月 22 日-23 日、京都
61) 後藤(金子)、佐藤、堅田、木滑、吉原、西依、木村、藤田、東原、Reed、吉原“Goofy: a novel olfactory-specific Golgi protein required for proper function of the olfactory sensory neurons”日本味と匂学会第 46 回大会、2012 年 10 月 3 日-5 日、吹田
62) Yabuki, Koide, Miyasaka, Wakisaka, Masuda, Watanabe, Yoshihara “Receptor and neural circuitry activated by sex pheromone PGF2α in zebrafish” The 10th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2012), 2012.11.3-4, Fukuoka, Japan
63) Yoshihara “Olfactory circuits and behaviors in zebrafish” Cold Spring Harbor Conferences Asia: Neural Circuit Basis of Behavior and its Disorders, 2012.11.5-9, Suzhou, China
64) Yoshihara "Olfactory receptors, neural circuits, and behaviors in zebrafish” Sensory Systems & Neural Circuits, 2013.2.11-12, Tokyo, Japan
65) 吉原「ゼブラフィッシュ嗅覚行動の神経回路基盤」第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 27 日-29 日、東京

岡本仁
1) Okamoto H.「Functional analysis of the habenula in controlof fear", 4th Asia-Oceania zebrafish meeting」2009 年 9 月 1 日, Jeju island, Korea
2) Okamoto H.「Roles of Mosaic eyes/Crumbs complex incoordination of proliferation with the apico-basal polarity of the neuroepithelial cells」Construction and Reconstruction of the Brain, 2009 年 10 月 9 日, Awaji, Japan
3)岡本「手綱核：行動と記憶のスイッチボードを求めて」千里ライフサイエンスセミナー「次世代の脳研究」、2009 年 11 月 6 日、豊中
4) Okamoto H.「Zebra_sh as a model system for study of fear」 IBRO-APRC Neuroscience associate school: Hormones, Brain and Behaviour, 2009 年 11 月 30 日, Bandar Sunway, Malaysia
5) Okamoto H.「Zebra_sh as a model animal to study neural circuits against fear」INCF Topical Workshop on Roles of neuroinformatics in the process of building, evaluating and using genetic animal models for brain diseases, 2009 年 12 月 13 日, Stockholm, Sweden
6)岡本「ゼブラフィッシュ研究から見たヒトの心の成り立ち」大阪バイオサイエンス研究所 Monthly Lecture 2010 年 1 月 8 日、吹田
7) Okamoto H.「Functional analysis of the habenula in control of fear」 14th IBRO-APRC associate school of neuroscience Synaptic plasticity：From basics to clinical applications, 2010 年 1 月 27 日, Bangkok, Thailand
8) Okamoto H.「Functional analysis of the habenula in control of fear」 11th Australian and New Zealand zebrafish workshop, 2010 年 2 月 4 日, Sydney, Australia
9)岡本「A fish's-eye view of human emotion」人間知性研究センター第 5 回シンポジウム:ヒト以外の知性について話そう、2010 年 3 月 9 日、東京
10)岡本「ゼブラフィッシュからわかる、ヒト脳の発生と機能」日本動物学会関東支部第 61 回大会シンポジウム「モデル動物を使った脳科学の新展開」、2010 年 3 月 20 日、さいたま
11) Okamoto H.「Zebrafish as a model system for study of fear」2nd International MRC symposium on Signals, Neurons and Behavior, 2010 年 4 月 7 日, Gwangju, Korea
12) Okamoto H.「The habenula regulates experience-dependent choice of fear responses in zebrafish」 Development of pattern in the nervous system, 2010年5月13日, Minerve, France
13) Okamoto H.「Zebrafish as a model animal to study fear」 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2010年6月23日, 京都
14) Okamoto H.「Circuit formation」Developmental Neurobiology Course, 2010年7月19日, 沖縄
15)岡本「ゼブラフィッシュ研究から見たヒトの心の成り立ち」第29回分子病理学研究会、2010年7月31日、つくば
16)岡本「ゼブラフィッシュの生細胞イメージング」第35回組織細胞化学講習会、2010年8月5日、甲府
17)岡本「魚の研究から明らかになったヒトの脳の成り立ちと働き」Neuro2010サテライトシンポジウム「脳科学におけるヒト研究と動物研究のクロスオーバー」、2010年9月1日、神戸
18)岡本「Habenula as the multimodal switching board for controlling behaviors」第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会（Neuro2010)、2010年9月2日、神戸

19) Okamoto H.「Zebrafish as a model system for study of fear」 EU COST Action BM0804 workshop: Zebrafish as a neurophysiological and neurobehavioural model, 2010年9月9日, London, UK
20)岡本「ゼブラフィッシュ研究から見たヒトの心の成り立ち：Fish-eye's view on human mind」平成22年度生理学研究所情動研究会「感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻」、2010年9月30日、岡崎
21) Okamoto H.「Habenula as the multimodal switching board for controlling behaviors」 Emotions: From neurochemistry and brain evolution to human behaviour, 2010年10月16日, Genval, Belgium
22) 岡本「ゼブラフィッシュの研究からわかる，ヒトの脳の成り立ちと働き」名古屋大学グローバルCOEプログラム「機能分子医学への神経疾患・腫瘍の融合拠点」ニューロサイエンスコース、2010年11月5日、名古屋
23) Okamoto H.「Habenula as the multimodal switching board for controlling behaviors」International symposium on brain aging and dementia: basic and translational aspects, 2010年11月28日, Vanarasi, India
24) Okamoto H.「Zebrafish as a model system for study of fear」 5th Congress of Federation of Asian-Oceanian Neuroscience Societies (FAONS) and 28th Annual Meeting of Indian Academy of Neurosciences (IAN), 2010年11月29日, Lucknow, India
25) Okamoto H.「Cross-species approach for the study of the neural circuits controlling emotion」Imaging structure and function in the zebrafish brain, 2010年12月14日, Lisboa, Portugal
26) Okamoto H.「Cross-species approach for the study of the neural circuits controlling emotion」 Educational workshop for students in the medical and dental scientist training program, 2011年1月24日, Naju, Korea
27) Okamoto H.「Cross-species approach for the study of the neural circuits controlling emotion」 The 4th strategic conference of zebrafish investigators, 2011年1月31日, Pacific Grove, USA
28) Okamoto H.「Dual roles of Notch in regulation of apically restricted mitosis and apicobasal polarity of neuroepithlial cells」 SFB 488 Symposium 2011: `12 years of nervous excitation', 2011年2月26日, Heidelberg、Germany
29) Okamoto H.「Habenula as the multimodal switching board for controlling behaviours」 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry （ICCPB2011）, 2011年6月3日, 名古屋
30) Okamoto H.「Mechanisms underlying the emergence of vertebrate behavior」Developmental Neurobiology Course 2011, 2011年7月27日, 恩納村
31) Okamoto H.「Study of neural circuits for fear-motivated behavior in zebrafish」 ISDN2012, 2012年1月12日, Mumbai, India
32) Okamoto H.「The roles of the habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive behavior」Central neuroplasticity in sensory-emotional Link, 2012年9月15日, 岡崎
33) Okamoto H.「The roles of habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive behaviour」 XXX annual conference of Indian Academy of Neurosciences(IAN) and international symposium on translational neurosciences: Unraveling mysteries of brain in health and disease. 2012年10月29日, Amritsar, India
34) Okamoto H.「The roles of the habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive behavior. Jenelia workshop on zebrafish genetics, transgenesis, and systems biology, 2012年11月2日, Ashburn, USA
35) Okamoto H.「The roles of the habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive behavior」Cold Spring Harbor Conferences Asia: Neural Circuit Basis of Behavior and its Disorders, 2012年11月8日, Suzhou, China
36) Okamoto H.「The roles of the habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive behavior」 The neurobiology of emotion, 2012年11月14日, Stresa, Italy
37) Okamoto H.「The roles of the habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive behavior」 NEUREX workshop "If only descartes had known about the habenula", 2012年11月20日, Strasbourg, France
38) Okamoto H.「The roles of the habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive behavior」Imaging structure and function in the zebrafish brain, 2012年12月7日,London, UK
39) Okamoto H.「The habenulo-interpeducular pathway as the switchboard in the experience dependent choice of fear responses」 5th strategic conference of zebrafish investigators, 2013年1月22日, Pacific Grove, USA
40)岡本「The roles of the habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive behavior」国際高等研究所研究プロジェクト「ゲノム工学とイメージングサイエンスに基づく生命システム研究の新展開」2012年度第1回研究会、2013年2月22日、京都
41)Okamoto H.「Habenula as a gate switch of emotion」Francis Crick Symposium on Neurosciece: The Changing Brain, Cold Spring Harbor Asia, Suzhou, China, 2013 May6-10

林悠
1) 安田光佑、林悠、田中三佳、糸原重美「Genetic analysis of thalamic non-specific nuclei in sleep and higher order brain functions」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、横浜
2) 林悠、酒井一弥、安田光佑、安藤れい子、糸原重美「レム睡眠中枢ニューロンの遺伝学的解析」日本睡眠学会第３７回学術集会・シンポジウム「越境する睡眠科学」、2012 年 06 月 28 日、横浜
3) 林悠、酒井一弥、安田光佑、安藤れい子、糸原重美「レム睡眠中枢回路とその発生学的起源に関する遺伝学的解析」、包括脳ネットワーク夏のワークショップ、2012 年 07 月 27 日、仙台
4) 林悠「レム睡眠中枢回路とその発生学的起源に関する遺伝学的解析」脳・肝インターフェースメディシン研究センター「Symposium on Behavioral Molecular Neuroscience 2013」、2013 年 03 月 26 日、東京
5) 林悠「The molecular and evolutionary bases of sleep and sleep states in mammals and *C. elegans*」The 1st Annual

WPI-IIIS Symposium ～Solving the mystery of sleep～、2013 年 03 月 27、つくば
6) 林悠、酒井一弥、安田光佑、Julia Nguyen、安藤れい子、糸原重美「レム睡眠中枢回路とその発生学的起源に関する遺伝学的解析」第 90 回日本生理学会大会・シンポジウム「睡眠・覚醒の包括的な理解を目指した若手研究者による新しいアプローチ」、2013 年 03 月 29、東京

戸井基道
1) 戸井、峯松、久保田、西脇、宮本「*Caenorhabditis elegans* Ras-interacting protein 1 homologue RIN-1 is a novel effector protein of CED-10/Rac that regulates neuronal cell and axon growth cone migration.」17th International *C. elegans* Meeting、2009 年 6 月 26 日、Los Angeles
2) 戸井、峯松、久保田、西脇、宮本「*Caenorhabditis elegans* Ras-interacting protein 1 homologue RIN-1 is a novel effector protein of CED-10/Rac that regulates neuronal cell and axon growth cone migration.」第 32 回日本神経科学学会年会、2009 年 9 月 16 日、名古屋
3) 戸井、峯松、久保田、西脇、宮本「Ras-interacting protein 1 homologue RIN-1 is a novel effector protein of CED-10/Rac that regulates neuronal cell and axon growth cone migration.」4th East Asia *C. elegans* Meeting、2010 年 7 月 12 日、東京
4) 戸井、峯松、久保田、西脇、宮本「Ras-interacting protein 1 homologue RIN-1 is a novel effector protein of CED-10/Rac that regulates neuronal cell and axon growth cone migration」第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸
5) 戸井、峯松、久保田、西脇、宮本「新規の Rac エフェクターRIN-1 による線虫生体内の神経細胞の移動と軸索伸長制御」第 84 回日本生化学会、 2011 年 9 月 24 日、京都
6) 戸井、峯松、久保田、西脇、宮本「VPS9 ドメインを有する RIN-1 タンパク質は線虫の細胞移動や軸索伸長を制御する新規の Rac エフェクターである」第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、京都

児島将康
1) 井田、粂、佐藤、児島「モデル生物を利用した新規生理活性ペプチドの探索」日本獣医学会、2010 年 9 月 16 日、帯広
2) 井田、佐藤、児島「モデル生物を利用した新規生理活性ペプチドの探索」日本獣医学会、2011 年 9 月 20 日、大阪
3) 井田、富永、岩元、粂、佐藤、佐野、平口、尾崎、宮里、寒川、児島「ショウジョウバエ新規生理活性ペプチドの発見と応用」日本比較内分泌学会、2012 年 11 月 30 日、福井

2.3.3 図書

増田直紀
1) 増田直紀、今野紀雄「複雑ネットワーク」近代科学社、2006 年、全 277 頁

辻敏夫
1) Suzuki, M., Sakashita, T., Tsuji, T., and Kobayashi, Y. (2010). Computational Inferences on Alteration of Neurotransmission in Chemotaxis Learning in *Caenorhabditis elegans*, In: Diamantaras, K., Duch, W., and Iliadis, L.S. (Eds.), Artificial Neural Networks -ICANN 2010, Lecture Notes in Computer Science, 6352, 291-300.
2) Hattori, Y., Suzuki, M., Soh, Z., Kobayashi, Y., and Tsuji, T. (2010). A Novel Tuning Method for Neural Oscillators with a Ladder-like Structure based on Oscillation Analysis, In: Diamantaras, K., Duch, W., and Iliadis, L.S. (Eds.), Artificial Neural Networks -ICANN 2010, Lecture Notes in Computer Science, 6352, 401-410.

和多和宏
1)小出剛・山元大輔編著「行動遺伝学入門：動物とヒトの“こころ”の科学」裳華房、2011 年、全 217 頁
2) 中村桂子編「生命誌年刊号 vol.69-72「遊ぶ」」新曜社、2012 年、全 275 頁

小金澤雅之
1) Kohatsu, S., Koganezawa, M., Yamamoto, D. (2012) in vivo optical recording of brain interneuron activities from a Drosophila male on a treadmill. In: Genetically Encoded Functional Indicators, J.-R. Martin Ed., Humana Press Springer: New York, 103-112.

古久保-徳永克男
1) Furukubo-Tokunaga, K., Ludlow, Z. N., and Hirth, F. (2012). Memory circuits in *Drosophila*. in "*The Memory Mechanisms in Health and Disease*", World Scientific, London, U. K., 444 Pages.

久保健雄
1) Kubo, T. Neuroanatomical dissection of the honeybee brain based on temporal and regional gene expression patterns. In: Honeybee neurobiology and Behavior. A Tribute to Randolf Menzel (eds. Galizia CG, Eisenhardt D and Giulfa M). Springer. (2012). 16 pages.

久原篤
1) 久原篤□「線虫の行動をEYEで感じる」□Someone　リバネス出版、2012年、全31頁

尾崎まみこ
1) 石田裕幸，尾崎まみこ他「動物の多様な生き方第 2 巻」共立出版、2009 年、全 262 頁
2) 尾崎まみこ他「次世代バイオミメティクスの最前線」シーエムシー出版、2011 年、全 232 頁
3) 尾崎まみこ他「社会性昆虫の進化生物学」海游舎、2011 年、全 477 頁
4) 尾崎まみこ他「研究者が教える動物飼育　第 2 巻」共立出版、2012 年、全 224 頁

谷村禎一
1) 谷村禎一「化学受容の科学」東原和成編、化学同人、(2012) 分担執筆

齋藤和也
1) Song, W.-J., Nishimura, M., Saitoh, K.(2012). Auditory cortex in guinea pigs: subfield organization and functional domains. In "Auditory Cortex: Anatomy, Functions and Disorders", Chapter4, ed: Mounya Elhilali, Nova Science Publishers, Inc.,73-82.

矢田俊彦
1) 前島裕子、Sedbazar Udval、岩崎有作、高野英介、矢田俊彦「日本薬理学雑誌」、金芳堂日本薬理学会誌出版部、2011 年、全 4 頁 162-165
2)前島裕子、矢田俊彦「実験医学」、羊土社、2011 年､全 2 頁 1240-1241
3)前島裕子、Udval Sedbazar、矢田俊彦「Clinical Neuroscience」､中外医学社、2012 年、全 2 頁 181-183
4) 矢田俊彦 :「からだと病気のしくみ図鑑」監修、法研、2012 年、全 55 頁　107-161

上川内あづさ
1) Kamikouchi A, Fiala A. Monitoring neural activity with genetically-encoded Ca^{2+} indicators. In: Methods in Neuroethological Research (Eds: Ogawa H, Oka K.) Springer Japan, 2013

岩里琢治
1) 岩里琢治「行動遺伝学入門　動物とヒトの“こころ”の科学」裳華房、2011 年、全 14 頁
2) 岩里琢治、糸原重美「＜series モデル動物利用マニュアル＞　疾患モデルの作製と利用－脳・神経疾患」LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER 、2011 年、全 12 頁
3) 岩里琢治「＜series モデル動物利用マニュアル＞　疾患モデルの作製と利用－脳・神経疾患」LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER、2011 年、全 11 頁

平田普三
1) 平田普三「グリシン受容体の構造と機能」臨床神経科学 2012 年（Vol. 30）12 月号、p1352-1354
2) 平田普三「脊椎動物の運動システムの発達」生化学 2013 年（Vol. 85）4 月号、p235-243

小早川高
1) 小早川高、小早川令子「マウスの匂いに対する先天的な情動や行動を制御する神経回路の発見」Aroma Research 10、2009 年、全 6 頁
2) 小早川高、小早川令子「哺乳類の匂いに対する情動を先天的に制御する神経回路の発見」医学のあゆみ 232、2009 年、全 7 頁
3) 小早川高、小早川令子「嗅覚の分子機構」Clinical Neuroscience 28、2010 年、全 3 頁
4) 小早川高、小早川令子「匂いに対する先天的な恐怖反応を制御する嗅覚神経回路の発見」生化学みにれびゅう 83、2011 年、全 5 頁
5) 小早川高、小早川令子「嗅覚系による情動や行動の制御メカニズム」Annual Review 神経 2011、2011 年、全 6 頁
5) 小早川高「匂いと感覚を結ぶメカニズム」香料 256、2012 年、全 9 頁

吉原良浩
1) Yoshihara, Y. Molecular genetic dissection of the zebrafish olfactory system. In “Chemosensory Systems in Mammals, Fishes, and Insects” (edited by W. Meyerhof and S. Korsching). Springer (2009). pp. 97-120, 全 261 頁
2) 吉原良浩、入来篤史、加藤忠史「脳科学の教科書」岩波ジュニア新書、2011 年、全 225 頁

岡本仁
1)岡本仁、遺伝子と経験が作る神経回路。現代生物科学入門，第４巻，神経生物学（浅島誠編）、岩波書店、2009、総ページ数１９８ページ（うち担当分６７ページ）

児島将康
1) 井田隆徳、児島将康、加藤丈司「ペプチド医薬の最前線」シーエムシー出版、2012 年、全 5 頁

2.4 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

産業財産権の名称、発明者、権利者、産業財産権の種類、出願番号、出願年月日

佐藤守俊
1)超高輝度で安定な人工生物発光酵素、金　誠培, 佐藤守俊, 田尾博明、産業技術総合研究所東京大学、特許、特願 2009-101025、2009 年 4 月 16 日出願
2)一分子型プローブ及びその利用、金　誠培, 佐藤守俊, 田尾博明、産業技術総合研究所, 東京大学、特許、特願 2009-200413、2009 年 8 月 31 日出願
3)タンパク質の翻訳後修飾の検出・定量用プローブ、佐藤守俊, 高橋浩治、東京大学、特許、特願 2009-2470982009 年 10 月 27 日出願

辻敏夫
1)水質検査システムおよび魚類監視システム、辻敏夫、曽智、栗田雄一、宮本健太郎、特願 2013-051916、2013 年 3 月 14 日出願

中井淳一
1) （特許申請）特定部位のアミノ酸を置換した緑色蛍光蛋白質またはそのホモログを用いたカルシウムセンサー蛋白. 発明者: 中井淳一、大倉正道、出願人：埼玉大学、特願 2009-289789、出願日 H21.12.21.
2) （特許申請）特定部位のアミノ酸を置換した緑色蛍光蛋白質またはそのホモログを用いたカルシウムセンサー蛋白質. 発明者：大倉正道、中井淳一、出願人：埼玉大学、特願 2010-232788、出願日　H22
3) （特許申請）赤色蛍光蛋白質を用いたカルシウムセンサー蛋白質. 発明者：大倉正道、中井淳一、出願人：埼玉大学、特願 2012-137434、出願日　H24.6.19.
4) （特許申請）非線形光学顕微鏡. 発明者：中井淳一(埼玉大学)、大出孝博(株式会社フォブ)、出願人：埼玉大学、株式会社フォブ、特願 2012-197366、出願日　H24.9.7.

矢田俊彦
1)「食欲調整剤、治療薬、健康食品、動物用飼料、及び食欲調整方法」、矢田俊彦(届出・代表)、栗田英治、シューカイ、自治医科大学(権利者)、特許、特願 2011-177985、平成 23 年 8 月 16 日出願
2)「肥満・メタボリックシンドローム治療薬、及びその動物の治療方法」、矢田俊彦(届出・代表)、前島裕子、岩﨑有作、自治医科大学(権利者)、特許、特願 2011-271652、平成 23 年 12 月 12 日出願

小早川高
1) 「動物用忌避剤」小早川高、小早川令子、公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所・脳科学香料株式会社、特許（PCT 出願）、2011 年 2 月 8 日出願、出願番号：PCT/JP2011/052652
2) 「恐怖又は不安の計測システム」小早川高、小早川令子、公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所、特許、2012 年 11 月 22 日出願、出願番号：特願 2012-256514
3)「情動の計測方法」小早川高、小早川令子、曽我朋義、公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所、特許、2013 年 4 月 26 日出願、出願番号：特願 2013-094653

児島将康
1) ショウジョウバエ由来生理活性ペプチド、井田隆徳、児島将康、粂和彦、特願：2010-045816、2009 年 3 月 2 日
2) ショウジョウバエ由来生理活性ペプチドｄＲＹａｍｉｄｅ、井田隆徳、児島将康、特願 2012-70356、2012 年 3 月 26 日

2.5 報道記事

飯野雄一
「フェロモンでにおいの好み変化」毎日新聞 2010.10.5
「線虫のエサのにおい　フェロモンで好み変化」日経産業新聞 2010.10.7
「フェロモンは効く　種の存続へ　行動制御」読売新聞夕刊 2010.10.14

石原健
「におい好き嫌い濃度で変化　異なる感覚神経反応」西日本新聞平成 24 年 3 月 14 日
「匂いの濃度で好き嫌い変化」日経産業新聞 2012.3.27
「記憶を忘れさせる細胞」H25.3.22　西日本新聞　朝刊
「忘却の仕組み解明へ　におい忘れる細胞　線虫で特定」H25.3.22　毎日新聞　朝刊
「記憶忘却促す神経細胞」H25.3.22　日本経済新聞　夕刊
H25.3.22　共同通信
H25.3.22　東京新聞
「記憶忘却促す細胞発見」H25.3.25　産経新聞　朝刊
「積極的に記憶の消去促す神経細胞と制御機構発見」H25.4.12　科学新聞
H25.4.25　北海道新聞　朝刊

齊藤実
物忘れ仕組み解明期待　読売新聞(多摩版) 2009.2.18
Tabone CJ, Ramaswami M.　Neuron 74, 767-769 (2012)にて同号に発表した論文の特集を組まれる Is NMDA Receptor-Coincidence Detection Required for Learning and Memory?
「マグネシウムブロックによる記憶調節」NHK おはよう日本他　研究紹介(2012. 6. 7)
「マグネシウムにより記憶を調節」東京新聞　(2012. 6. 7)
「おなかが空くと記憶力アップ　都医学総研、ハエで確認」他。日本経済新聞、時事通信、読売新聞(夕刊)、毎日新聞　(2013. 1.25)
「空腹時記憶向上」科学新聞　(2013. 2. 8)
「記憶力は“空腹状態で向上”」NHK おはよう日本　(2013. 2.1)
Learning and memory: Austerity measures for memory: Research Highlight in *Nature Rev Neurosci* 14, 159 (2013).

東島眞一
「外敵から攻撃、脳が混乱でも　魚の逃避、脊髄が指令」日本経済新聞 2009 年 5 月 27 日夕刊
「脳の命令　脊髄が“交通整理”」中日新聞 2009 年 5 月 28 日朝刊
「脳が迷っても脊髄が命令」毎日新聞 2009 年 5 月 27 日夕刊
「コロ細胞、逃避行動に関与」日刊工業新聞 2009 年 5 月 28 日
「危険！脳迷っても脊髄判断」読売新聞 2009 年 5 月 28 日朝刊
「逃避行動　コロ細胞関与」科学新聞 7 月 3 日
「魚の尾っぽ振る神経細胞群　脊髄の付け根　動きを制御」朝日新聞 2013 年 4 月 26 日
「後脳の神経群　体動かす　司令塔細胞　魚で特定」中日新聞 2013 年 4 月 26 日
「魚の泳ぎ　後脳の神経細胞群が制御」東海愛知新聞 2013 年 4 月 26 日
「後脳の神経細胞群　動き制御」読売新聞 2013 年 5 月 1 日
「魚の尾びれ　光で操作　泳ぎの司令塔細胞を特定」日経産業新聞 2013 年 5 月 1 日
「魚の脳に泳ぎの「司令塔」」毎日新聞 2013 年 4 月 30 日

中井淳一
日経産業新聞: Muto, A., Ohkura, M. et al, Current Biology 23, 1-5, 2013 の論文に関する記事が掲載された。内容：脳活動生きたまま観察.報道年月日：H25.2.13
Muto, A., Ohkura, M. et al, Current Biology 23, 1-5, 2013 の論文が国内外のインターネットサイト（以下）に大きく取り上げられた。
「What's Your Fish Thinking?」サイエンスマガジン 2013 年 1 月 31 日
「Scientists Watch a Fish Think」サイエンティフィックアメリカン 2013 年 1 月 31 日
「Fish Watches Food. Scientists Watch Fish's Thoughts」ナショナルジオグラフィック 2013 年 1 月 31 日
「Fish Neurons Fire in Real-Time as It Stalks Prey」ワイアード 2013 年 2 月 1 日
「Fluorescent protein lets us read a fish's thoughts」ニューサイエンティスト 2013 年 1 月 31 日
「Seeing a fish's thoughts」ネイキッドサイエンティスト 2013 年 1 月 31 日
「For the first time, scientists film a fish thought in action」ロサンゼルスタイムズ 2013 年 2 月 1 日
「遺伝研、脳に映る視覚世界をリアルタイムで観察することに成功」マイナビニュー2013 年 2 月 1 日
「魚の脳に写される視覚世界を可視化することに成功」カラパイア 2013 年 2 月 3 日

「世界初！脳の電気的な動きをリアルタイムで可視化」GIZMOND2013 年 2 月 14 日
「日本の科学者が魚の思考を可視化することに世界で初めて成功!!考えを読み取ることが可能になる可能性も!?」コモンポスト 2013 年 2 月 3 日
「世界初！脳の電気的な動きをリアルタイムで可視化」アメーバニュース 2013 年 2 月 14 日
大倉正道:　蛍光分子センサーの開発と神経回路研究への応用. 日本経団連埼玉埼経協ニュース 371, 18-18, (2012).

久保健雄
「Hornet-killing honeybees' brain activity measured」BBC　16 March 2012
「Hot Bee Balls" Cook Enemy Hornets—But How Do Bees Endure the Heat?」National Geographic Daily News,Published March 16, 2012
「Japan bees cook enemy in 'hot defensive bee ball'」Reuters，Mar 29, 2012
「天敵襲撃→脳が興奮状態に　ミツバチの遺伝子特定」北陸中日夕刊 2012.03.15
「ニホンミツバチ　攻撃時に脳神経興奮」北國夕刊
「天敵襲撃で脳が興奮　ミツバチの陰電子特定」2012 年 3 月 16 日
「敵蒸し殺すニホンミツバチ　脳のキノコ体温度制御か」北國 2012.3.16
「天敵「蒸し殺す」謎に迫る=脳のキノコ体で温度制御か」時事通信 2012 年 3 月 15 日
「脳のキノコ体、温度制御か　敵を蒸し殺すニホンミツバチ」富山新聞 2012 年 3 月 16 日

冨田太一郎
「Testing the Signal」SCIENCE（EDITORS'CHOICE），19 OCTOBER 2012

久原篤
「名大ら、神経ネットワークにおける情報伝達の新しい概念を発見」Yahoo ニュース 2011 年 6 月 18 日
「名大ら、神経ネットワークにおける情報伝達の新しい概念を発見」マイナビジャーナル 2011 年 6 月 18 日
「「興奮」と「抑制」の相反する情報　神経細胞が同時伝達　精神疾患治療に光」神戸新聞 2012 年 3 月 19 日

木村幸太郎
「線虫のにおい学習　ドーパミンが必要」日刊工業新聞 2010 年 12 月 2 日
「線虫に学習能力　ドーパミンが昨日･･･嫌な臭い実験で判明」2010 年 12 月 1 日
「線虫　嫌な臭い覚えます　ドーパミンが作用･･･逃げろ」2010 年 12 月 1 日

矢田俊彦
平成 23 年 12 月 26 日論文発表プレスリリース
「母乳出させるホルモンに肥満防止作用」日本経済新聞【電子版】2011 年 12 月 21 日
「母乳出させるホルモン　肥満を防ぐ作用」日本経済新聞 2011 年 12 月 21 日夕刊
「脳内ホルモンで体重減少　体に注射で効果　メタボ治療に活用期待」読売新聞 2011 年 12 月 25 日朝刊
「満腹感 2 物質が働き　肥満・糖尿病治療へ期待」2012 年 5 月 2 日
「満腹感仕組み解明へ前進」日本経済新聞 2012 年 3 月 25 日

喜田聡
「記憶力抜群のマウス　東京農大で誕生」読売新聞 2011 年 6 月 26 日朝刊

小早川高
「においで情動との関連探る」読売新聞 2010 年 3 月 1 日
「においチュー目　ネコなどの天敵「先天的恐怖」応用　ネズミ新撃退剤」産経新聞 2011 年 8 月 4 日
「背すじも凍る「恐怖の香り」鼻と脳の連携プレー」Asahi Shinbun GLOBE　2013 年 4 月 21 日

吉原良浩
日経ネット「左右非対称な神経回路の存在を嗅覚系で発見」2009 年 4 月 15 日
日刊工業新聞「嗅覚回路は左右非対称 - 理研 GFP で神経可視化」2009 年 4 月 16 日
科学新聞「左右非対称な神経回路理研チーム嗅覚系で発見 – ゼブラフィッシュの神経回路 GFP 使って可視化」2009 年 4 月 24 日
日経ネット「好きな匂いを察知して誘引行動を引き起こす神経回路を同定」2009 年 6 月 2 日
日本経済新聞夕刊「美味伝える神経回路特定 – 理研の研究チーム魚使い実験で」2009 年 6 月 2 日
日刊工業新聞「動物のにおいに基づく行動 – 理研、神経の仕組み解明」2009 年 6 月 3 日
産経新聞「匂いから脳の働きを解き明かす」2009 年 6 月 16 日
日経バイオテク「ゼブラフィッシュがアミノ酸に誘引される際に働く嗅覚神経回路を同定」2009 年 6 月 22 日
朝日新聞「見えない世界に潜む美 – 雲の形成・におい感知する分子…」2009 年 8 月 4 日
朝日新聞「土曜ナントカ学 – ほのかな香りを「聞く」」2009 年 10 月 24 日
日刊工業新聞「味を感じる細胞が生まれる仕組み解明」2011 年 5 月 16 日

日本経済新聞「甘味や苦味を感知 － 「味細胞」の仕組み解明」2011 年 5 月 16 日
毎日新聞「甘味・苦味・うま味たんぱく質発見 － 味覚障害治療へ弾み」2011 年 5 月 16 日
化学工業日報「神経回路形成に重要分子 － 匂い伝える脳中枢系で確認」2012 年 6 月 28 日
日刊工業新聞「組織分化の重要因子 － 嗅覚機能担う」2012 年 6 月 29 日
埼玉新聞「母と一緒なら子育て － 父マウスの神経回路変化」2013 年 3 月 21 日

林悠
「脳神経の切断を防ぐ遺伝子発見」大阪読売新聞 2009 年 6 月 29 日
「神経切断防ぐ遺伝子、アルツハイマー防げる？」読売新聞 2009 年 6 月 29 日
「脳神経：制御を解明　アルツハイマー理解に道」毎日新聞 2009 年 6 月 29 日
「脳の配線ミスを生前の発達期に修正する新たなメカニズム発見」科学新聞 2009 年 7 月 10 日
「必要な脳神経守るしくみ」朝日新聞 2009 年 6 月
「脳神経制御を解明　アルツハイマー理解に道」朝日新聞 2009 年 6 月

H22.10.7
日経産業新聞
12面

線虫のエサのにおい

フェロモンで好み変化

東大、集中防ぐ仕組み解明

東京大学の飯野雄一教授と山田忠嗣特任助教らは、土の中に住む線虫にエサの取り合いを避ける性質が備わっていることを発見した。互いのフェロモンに反応して好きなにおいの種類を変える。おいしそうなにおいがするエサが一個しかない場合、多数の線虫が群がるうちにそれぞれのにおいの好みが変わり、別のエサを探して散らばるという。成果は米科学誌サイエンスに掲載された。

飯野教授らは、数十匹の線虫を平らな容器で飼育し、線虫が好むエサを近くに置いた。通常、線虫はエサのにおいがする方向にさろした線虫では、「SNET－1」というたんぱく質の合成量が減っていた。また「NEP－2」というたんぱく質分解酵素が活発に働き、SNET－1を分解していることも分かった。

SNET－1は線虫のにおいの好みの制御にかかわっており、SNET－1が少なくなるとにおいの好みが変化すると考えられるという。飯野教授は「フェロモンの働きでにおいの好みが一時的に変化し、エサへの集中などを防いでいる」と説明している。ほかの動物の行動の仕組みを解明するのにも役立つ成果という。

線虫は常にフェロモンを分泌しており、近くにいる仲間の数を知るのに役立っていることがこれまでに分かっていた。

日経産業新聞 2010.10.7

匂いの濃度で好き嫌い変化

九大 神経の仕組み解明

九州大学の広津崇亮助教らは、匂いの濃度によって好き嫌いが変わる仕組みを解明した。線虫を使った実験で、匂い物質が低濃度だと反応する感覚神経と、高濃度だと反応する感覚神経が、別々に存在することが分かった。人間で類似する感覚神経が見つかれば、匂いの好みを客観的に評価でき、食品や香料の開発に生かせるとみている。

線虫は低濃度のイソアミルアルコールを好む。「AWC」と名付けられた感覚神経で匂い物質を受容し、匂いの発生源に引き寄せられる。イソアミルアルコールを高濃度にすると線虫が嫌がった。「ASH」など3種類の感覚神経が忌避行動を起こしていることを突き止めた。

イソアミルアルコールを高濃度にした時に、低濃度の時に反応するAWCが機能していないことも分かった。このため、同じ匂い物質であっても濃度によって働く感覚神経が違うことが分かった。

人間でも匂いの濃度によって好き嫌いが起こる。広津助教らは線虫での成果をもとに、人ではどのような仕組みで起きているか今後調べる。

日経産業新聞 2012.3.27

記憶忘却促す神経細胞

九大など線虫の実験で発見

日経 3/21 9 (14) ②

九州大と名古屋大の研究グループは、線虫を使った実験で記憶を忘却させる働きのある神経細胞を発見したと発表した。この神経細胞から、記憶を保持する働きのある神経細胞へ忘却を促す物質が送られていることが分かった。研究内容は21日付の米科学誌セル・リポーツ（電子版）に掲載された。

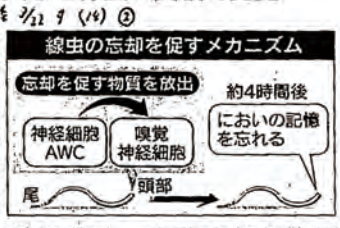
研究グループは今後、哺乳類など複雑な神経構造を持つ生物で同様の神経細胞がないか調べる。

線虫は特定のにおいに反応し、においを発する物質に一度引き寄せられた後、しばらくは同じにおいに反応しなくなる。その後、記憶が薄れると再びにおいに反応するようになる性質がある。

研究グループは、時間がたっても記憶が薄れず、再びにおいに反応しない個体「突然変異体」を選別。詳しく調べたところ、「AWC」と呼ばれる特定の神経細胞が機能しなくなっていたことが分かった。

さらに正常に反応する線虫のAWCを調べると、においの記憶忘却を促すシグナルとして働く物質が、においの記憶を保持する神経細胞に送られていることも分かった。

研究グループの石原健九大教授は「この研究をもとに、ヒトなど高等生物で忘却が起こる仕組みが解明されることを期待している」と話した。



「におい」忘れさせる物質放出

日本経済新聞2013. 3. 25

科学新聞 4/12（金） 2面

積極的に記憶の消去促す神経細胞と制御機構発見

九大と名大 共同

九州大学大学院理学研究院の石原健教授、同システム生命科学府の井上明俊院生らは、名古屋大学大学院理学研究科の松本邦弘教授、久本直毅准教授らと共同で、遺伝学的手法とイメージング技術とを組み合わせて記憶の忘却について解析、神経細胞が忘却促進シグナルを放出することによって、記憶を積極的に忘れさせる仕組みが存在することを明らかにした。高等動物における忘却制御機構を解明する基盤として重要な成果とみられる。

動物は、様々な情報を記憶することができ、獲得された記憶は適切な時間だけ保持され、その後忘れられることが必要である。というのは、例えば、餌のある場所を記憶したとしても、餌がなくなる頃には忘れていた方が生存の可能性が高まるはずだからである。

これまで、記憶の獲得や保持に関する多様な制御機構が分子・神経回路レベルで明らかにされてきているが、その一方で、記憶を忘れるメカニズムについてはほとんどわかっておらず、積極的な制御機構があるのかどうかさえ議論の分かれるところであった。

研究グループは今回、単純な神経系を持つ線虫C.エレガンスをモデルに、記憶を忘れにくい（記憶を忘れるメカニズムが壊れている）突然変異体を単離し、遺伝学的手法とイメージング技術を組み合わせて解析することにより、記憶の忘却を制御する分子・神経回路メカニズムの解明に取り組んだ。

ほとんどの動物は、強い匂いにさらされると、その匂いに対して応答しにくくなる。こうした行動の変化は、非常に単純な学習の一種であると考えられている。線虫では、このような匂いの記憶は約4時間保持される。

同グループは、この匂いの記憶が24時間以上継続する、記憶を忘れにくい変異体を同定することに成功、その解析によって、記憶を忘れさせるための神経細胞が存在することを突き止めた。さらに、その神経細胞が、忘却促進シグナルを放出することで他の神経細胞に保持されている記憶を積極的に忘れさせていることも明らかにした。

この変異体では、忘却を促進する神経細胞内で働くTTR-1/JNK-1シグナル回路が壊れているために、忘却シグナルが放出されず、記憶を忘れにくくなっていた。

また、神経活動をカルシウムイメージングで測定することにより、記憶を保持している神経細胞の同定にも成功。匂いを感じる神経細胞では、強い匂いにさらすと匂い物質に対する応答がなくなり、4時間前の上で飼育すると応答が回復することがわかった。このことは、匂いを感じる神経細胞に記憶が保持されていることを示唆している。それに対し、記憶を忘れにくい変異体では、この応答が4時間後でも回復しないことが明らかになった。これらの結果から、忘却促進シグナルは、記憶を保持している神経細胞の応答の回復を促進していると考えられる。

科学新聞2013. 4. 12

6/9 東京新聞

マグネシウムが記憶維持に役割

都研究所などが解明

脳の神経細胞内の遺伝子を活性化し、記憶を長期間維持するのにマグネシウムイオンが重要な役割を果たしていることが、東京都医学総合研究所と首都大学東京、東京慈恵会医科大学の共同研究で分かった。老化による記憶力低下やアルツハイマー病の発症メカニズムの一部が解明されると期待される。七日発行の米科学誌「ニューロン」に掲載された。

脳の神経細胞は別の神経細胞との接続部からカルシウムイオンを取り入れ、記憶を長期間維持するために遺伝子を活性化する。マグネシウムイオンは接続部の通り道をふさぐ役割を果たしているが、興奮時に外れ、カルシウムイオンを通すことが分かっていた。

遺伝子操作でマグネシウムイオンによる阻害が起きないショウジョウバエを作って調べたところ、正常に学習（短期の記憶）は行われたが、細胞内に過剰なカルシウムイオンが入ったことで遺伝子の活性化を抑制するタンパク質が増えた。マグネシウムイオンによる阻害は、余分なカルシウムイオンの流入を防ぎ、抑制型タンパク質の増加を抑える働きをしていると分かった。

同研究所の宮下知之研究員は「マグネシウムイオンは記憶の維持を邪魔する物質の増加を防いでいるようだ。アルツハイマー病はマグネシウムイオンの不足が原因の可能性がある」と話している。

東京新聞2012. 6. 9

科学技術総合

空腹時 記憶力向上

東京都医学研 仕組みを解明

記憶障害改善の可能性も

ショウジョウバエで実験

2013年2月8日 科学新聞

科学新聞2013. 2. 8

中日新聞 2009年5月28日(木) 朝・[illegible]面

脳の命令 脊髄が"交通整理"

魚で実験 哺乳類にも可能性

自然科研などチーム解明

[illegible]

GFPで神経細胞を目立たせたゼブラフィッシュの稚魚＝生理学研究所提供

中日新聞2009. 5. 28

読売新聞　2013年5月1日　26面

後脳の神経細胞群 動き制御

岡崎・生理学研 「歩行障害解明つながれば」

魚で実験

魚が尾を振って泳ぎ出す動きは、脊髄の付け根にある後脳の神経細胞群が司令塔の役割を果たしていることを、自然科学研究機構・生理学研究所（岡崎市）の東島眞一准教授（神経科学）らの研究グループが発見した。研究成果は4月25日付の米国の生物学専門誌の電子版に掲載された。

実験では、ゼブラフィッシュの稚魚を使い、後脳の神経細胞群「V2a」に遺伝子操作で、青色の光を感じると活発に動くたんぱく質と、緑色の光を感じると動きを抑えるたんぱく質の2種類を、それぞれ別の稚魚に組み込んだ。

活発に動くたんぱく質の稚魚は、青色の光をあてると尾を振って動き出した一方、動きを抑えるたんぱく質の稚魚は緑色の光をあてると泳ぐのをやめたという。

実験の結果、後脳にある神経細胞群「V2a」が光に反応して、脊髄の神経回路を刺激し、魚が泳ぎだしたり、止まったりする動きをコントロールしていたことがわかった。

東島准教授は、「同じ脊椎動物の哺乳類にも、同じ神経細胞群があると考えられており、歩行などの動きを制御する神経回路の一つが明らかになった。脊髄損傷などによる歩行障害を解明する研究につながれば」と話していた。

ゼブラフィッシュを使って脳機能を研究する小田洋一・名古屋大学大学院教授（生命理学）は「リズム運動を制御する神経回路の実態が分かったことは非常に大きな進歩」と話している。

読売新聞2013. 5. 1

魚の尾びれ 光で操作

泳ぎの司令塔細胞を特定

生理研

自然科学研究機構生理学研究所は、魚の尾びれの動きを光で操作する実験に成功した。泳ぐときに司令塔の役割を果たす神経細胞の集まりを脳の中で特定した。この場所に、光の刺激によって神経細胞の働きを活発にさせるたんぱく質の遺伝子を組み込んだ。静かにしていた魚に光を当てると、尾を動かして泳ぎだしたという。

この神経細胞は人間でいえばえん髄に相当する部分の中にあった。同様の組織は人にもあるため、歩行のリズムやバランスを保つしくみの解明に役立つという。成果は米専門誌カレント・バイオロジー（電子版）に掲載された。

研究グループはゼブラフィッシュを使い、脊髄の付け根にある後脳のV2aと呼ばれる場所に注目した。

実験では、たんぱく質の遺伝子を幼魚のV2aにある神経細胞に入れた。ほとんど動いていない幼魚に光をあてると、20ミリ秒程度ですぐに尾を左右に振って泳ぎ始めた。

逆に神経細胞の活動を抑えるたんぱく質を同じ神経細胞に入れたところ、光を当てて100ミリ秒後にぴたっと尾の動きが止まった。

V2aは、人を含む脊椎動物の多くがもっている。人の歩く動作にもかかわっていると考えられるという。

日経産業新聞
2013年5月1日
6面

日経産業新聞2013. 5. 1

Muto A & Ohkura M et al, Current Biology 23, 1-5, 2013 新聞記事
日経産業新聞 2013 年 2 月 13 日

脳活動、生きたまま観察

国立遺伝研、熱帯魚使い新手法

国立遺伝学研究所の武藤彩助教、川上浩一教授らは、熱帯魚のゼブラフィッシュで、泳いでいるときの脳の活動をリアルタイムで観察する技術を開発した。エサとなる微生物が視界を横切った時に目で追っているさまが脳の神経活動から分かった。生きたまま観察できる新手法は、生物の行動を理解するのに役立つ。米科学誌カレント・バイオロジーに掲載された。

脳の神経細胞は、活動に合わせてカルシウム濃度が変わる。研究チームの埼玉大学の中井淳一教授はカルシウムのわずかな変化に反応して光る人工たんぱく質を開発、ゼブラフィッシュの稚魚の脳に組み込んだ。内部の光が透けて見えるので、神経の活動で起きるごく微小な変化もリアルタイムで検出できる。

エサ追う視線 神経細胞が順に反応

実験ではゼブラフィッシュの遺伝子を操作し、稚魚の脳の中脳視蓋と呼ぶ部分に人工たんぱく質を作った。目の前でエサのゾウリムシを泳がせると、ゾウリムシを追う行動が脳内で処理されているように、神経細胞が順番に活動していた。

目で見た外の世界を脳が理解する仕組みを「視覚地図」と呼ぶ。人にも共通して存在する。新手法は認知など脳活動の研究に役立つという。

日経産業新聞2013. 2. 13

2012年(平成24年)3月19日 月曜日 くらし 18

「興奮」と「抑制」の相反する情報

神経細胞が同時伝達

精神疾患治療に光

甲南大など解明

先体の神経細胞間で情報を伝える場合、逆の側の細胞は「興奮」「抑制」という相反する情報を同時に伝達していることを、甲南大（神戸市東灘区）や名古屋大などの研究グループが線虫を使って解明した。成果は、うつ病など、神経細胞間の伝達に問題がある精神疾患の治療に役立つ可能性があるという。英科学誌「ネイチャー・コミュニケーションズ」電子版に掲載された。（会井信彦）

神経細胞間は従来、興奮という2種類の神経細胞により抑制のどちらか一方の情報だけを伝達しているとされていた。

線虫は体長1ミリ程度で土の中の細菌などを食べる線形動物で、遺伝子の種類と数はヒトと類似。研究グループは、神経細胞が302個あるとされる線虫の中の細菌などを食べる線形動物で、遺伝子の種類と数はヒトと類似。研究グループは、神経細胞が302個あるとされる線虫の中の2種類の情報を同時に伝達し、量が多い方の情報によって受ける側の細胞の活動が変化する、とみている。

甲南大理工学部の久原篤講師（生体調節学）は「今後、神経細胞による複数の情報伝達の仕組みが詳細に解明されれば、それらの情報を調節することで効果的な薬剤の開発につながる可能性もある」と話す。

研究成果について説明する久原篤講師＝神戸市東灘区住吉本町

神戸新聞2012. 3. 19

線虫 嫌な臭い覚えます

ドーパミンが作用…逃げろ

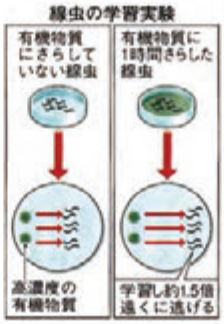
体長約1ミリとごく小さな線虫が一度嫌いな臭いを感知すると、再びこの臭いにさらされた際に、より遠くへ逃げるように学習することを大阪大（大阪府豊中市）や国立遺伝学研究所（静岡県三島市）のチームが明らかにした。一日付の米科学誌「ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス」に掲載された。

学習には、脳内で働く神経伝達物質「ドーパミン」が重要な働きをしていた。大阪大の木村幸太郎特任准教授は「神経細胞が三百二個しかない遺伝子の解析も容易な線虫を使えば、学習などの複雑な神経機能を簡単に調べられ、向精神病薬の作用機構の解明や新薬開発に役立つ」としている。

チームは、線虫が嫌がる臭いのする有機物質を使って実験。低濃度の有機物質に事前に一時間さらして学習させた線虫を、再び高濃度の有機物質の近くに置くと、学習していない線虫に比べ約一・五倍遠くへ逃げた。

遺伝子の突然変異でドーパミンの機能が失われている線虫では、正常な線虫でも、ドーパミンの働きを抑える薬を与えると学習しないことが分かった。

線虫の学習実験



体長約1ミリの線虫（大阪大の木村幸太郎特任准教授提供）

東京新聞2010. 12. 1

読売新聞（地域：33頁）2011年（平成23年）12月25日（日曜日）朝刊

脳内ホルモンで体重減少

自治医大の研究 米誌掲載

体に注射で効果 メタボ治療に活用期待

脳内で分泌されるホルモンを体内に投与すると、食欲低下と脂肪燃焼を促し、体重が減少するなどの効果があることを、自治医大（栃木県下野市薬師寺）のグループが研究で明らかにした。米学術誌「エイジング」（電子版）に午前、掲載された。肥満などの治療に役立つと期待される。

ホルモン「オキシントシン」は、脳の視床下部で作られ、脳下垂体から分泌される。特に女性は分娩の際に多く分泌されることがわかっている。また、近年の研究で、人間の視床下部の組織にも存在することも明らかになっている。

研究を行ったのは、同大生理学講座の矢田俊彦教授と同助教。動物からクローン化したオキシントシンを投与した結果、体内で脂肪燃焼が促され、体重が減少することが分かった。

矢田教授らは、オキシントシンが視床下部にはたらきかけることを解明。見返り体に投与したオキシントシンの脂肪燃焼などへの効果を検証した。

研究では、雌のクローンのエサを通常与えて体重を増やした肥満状態の雌マウスに対し、体内で自然分泌されるものと同じ量のオキシントシンを皮下に注射した。すると、エサを通常の量に戻すと、体重が減少し、肥満状態から体重が減った。一方で、運動量に変化はなく、脂肪が燃焼されて肥満状態がなくなっていることが確認された。

また、肥満状態のマウスの体重は、オキシントシンを注射しなかったものは、注射後2週間で約1・8倍に増加したが、オキシントシンを注射したものは約1・5倍に減少した。その結果、投与の約1・8倍量を分泌するホルモンを体内に常に送り込む——ことの効果と判断された。

メタボリック・シンドロームは、内臓脂肪蓄積のほか、高血圧、高血糖、高中性脂肪血症のいずれか二つ以上を併せ持った状態を指す。

オキシントシンの効果でマウスに生じた変化

今回の研究は、オキシントシンが肥満防止・高血糖と脂肪をなくす、記憶力の改善に役立つ可能性があることがわかったという。矢田教授は「今後は、肥満症と高血糖症などの動物モデルを使って、効果が確かめられれば、メタボ治療の対象となる」と話している。

読売新聞2011. 12. 25

記憶力抜群のマウス

＊ 東京農大で誕生

特定の遺伝子を強化して記憶力抜群の「スマート（賢い）マウス」を作ることに、東京農業大学の喜田聡教授（分子神経科学）らが成功した。認知症の治療薬開発などに役立つと期待される。15日付の米神経科学会誌に発表した。

記憶には、数時間程度の短期記憶と、長ければ一生続く長期記憶がある。短期記憶は脳の神経回路が変化して長期記憶に変換される。この変換には「CREB」という遺伝子が必要で、この遺伝子の働きを抑えると、長期記憶に障害が出ることを喜田さんらは発見していた。

今回は遺伝子組み換え技術を使って、脳でCREBがよく働くマウスを作製した。このマウスは、1日前に会ったマウスを認識するのにかかる時間が通常のマウスの半分近くに短縮したほか、通常だと1か月程度で忘れてしまう場所も記憶しているなど、記憶力が大幅にアップしていた。CREBが神経の成長を促す物質を増やし、短期記憶も向上していた。

喜田さんは「学習能力を高めたマウスはこれまでに作られていたが、記憶力を高めたマウスは初めて。CREBを標的にして薬を開発すれば、認知症や記憶障害の治療に役立つ可能性がある」と話している。

記憶力を高めたスマートマウス

読売新聞2011. 6. 26

6-4 The Charm of Scents

背すじも凍る「恐怖の香り」

AsahiGLOBE2013. 4. 21

日刊工業新聞
2009年(平成21年)4月16日 木曜日 23☆

〝嗅覚回路〟は左右非対称

理研 GFPで神経可視化

理化学研究所の吉原吉浩チームリーダーらは、熱帯魚の脳内の嗅覚系神経回路が左右非対称であることを発見した。熱帯魚は神経科学分野でモデル生物であるゼブラフィッシュを使用。緑色蛍光たんぱく質（GFP）で神経回路を可視化した。においに関与する脳内の細胞だけにGFPを発現させた例は初めてという。利き脚などの左右非対称な現象の解明が期待される。

嗅覚は獲物を探したり、外敵から逃げるなど生存に必須な感覚器官。においの分子は鼻の奥にある嗅細胞が受け取り、その後、嗅球と呼ばれる脳の入り口ににおいの情報を伝える。

嗅球内のにおい情報を受け取る細胞に緑色蛍光たんぱく質（GFP）を発現させ観察した。

嗅球から手綱核と呼ばれる感情に関与する脳の一部分に神経回路が直接つながり、さらに一つある嗅球から右の手綱核にのみつながることがわかった。嗅球と手綱核は脳内に左右対称に存在する。

動物が外敵から身を守るために決まって同じ方向に反転するなどの左右非対称な行動や嗅覚と感情のつながりを解明することが期待される。

今回の成果は、米科学誌「ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス」の電子版15日号に掲載される。

脳科学総合研究センター

シナプス分子機構研究チーム

発生遺伝子制御研究チーム

日刊工業新聞2009. 4. 16

日本経済新聞（夕刊）
2009年（平成21年）6月2日（火曜日）

美味伝える神経回路特定

魚使い実験で

好きな食べ物など特定のにおいを脳に伝える神経回路を、理化学研究所のチームが魚を使った実験で特定した。においは動物にとって餌を得たり、仲間と外敵を識別したりするのに重要な情報。においの伝達と行動とのかかわりを知る手掛かりになるという。成果は米科学アカデミー紀要に発表した。

理研の研究チーム

研究チームは熱帯魚の一種ゼブラフィッシュに、光るたんぱく質の遺伝子を導入、特定のにおいに反応する神経回路が目に見えるようにした。この魚で、においを受け取る嗅（きゅう）細胞と神経とのつながりを調べた。

魚が好むアミノ酸を与えながら、特定の場所の神経を遮断して情報が伝わらないようにし、魚の行動を観察。嗅球と呼ぶ部分の外側の神経を切った魚では、アミノ酸を与えても魚は反応しなかったという。研究チームは、魚がおいしいと感じるにおいを脳まで伝える神経回路があるとみている。

脳科学総合研究センター　シナプス分子機構研究チーム

日本経済新聞2009. 6. 2

埼玉新聞 2013年03月21日 朝刊 18面

母と一緒なら子育て

父マウスの神経回路変化

理研発表

マウスの子育て実験

交尾の経験のない雄 | 母マウスと過ごした父

子を見ると攻撃 | 子育てする

鼻の奥の神経細胞を切除

自分の子でも攻撃 | 自分の子でもてってに育てなくなる

父マウスが子育てするのは、乳腺が女性として行動するようになる神経のメカニズム解明につながる成果だ」としている。

母マウスの妊娠中から同居した父マウスは、自分の子以外の子マウスでも体をなめるなどの子育てをする。一方、交尾の経験がない独身の雄は、子マウスを見ると直ちに攻撃。子を排除して雌を自分のものにしようとする行動とみられる。

チームは、独身の雄とメスを交尾させた二匹にして神経回路を調べた。独身の雄は、鼻の奥の下側にあり、子が出すフェロモンを受け取る神経細胞が機能。そこから脳の攻撃行動に関与する部位に回路がつながり活性化していた。

父マウスは、この神経細胞が働かず、フェロモンの情報が伝わらなかった。独身の雄もこの神経細胞を切除すると、子を攻撃しなくなるばかりか、自分の子でなくても育てるようになった。

チームは、父マウスは交尾や妊娠中の同居などを経験することで、ホルモン量が変化し、神経回路に変化が表れ、自らの子を殺さないよう攻撃行動が抑えられるとみている。

脳科学総合研究センター

シナプス分子機構研究チーム　親和性社会行動研究ユニット

埼玉新聞2013. 3. 21

2.6 研究成果の概要

2.6.1 研究領域の設定目的

動物の行動は生命の示す最も高次かつ重要な機能のひとつであり、行動を構成する基本的素過程の分子レベルからの解明は人間の精神活動を理解する上でも重要な知的基盤を与える。しかし行動を分子から理解しようとする際、両者の間には依然として大きな階層の隔たりがあり、現状では理解が不十分である。これを乗越えるには行動の鍵となる神経細胞－シナプス－神経回路を同定し、まさにその場で、重要な分子の働きを解析することが必要である。本研究領域ではこのアプローチを可能にするモデル生物を主たる研究材料とし、個体行動とそれを裏打ちする神経回路の働きを分子の観点からできるだけ完全に理解することを目指した。このために、行動遺伝学、神経行動学、分子可視化技術、数理科学、工学などの諸分野を融合して新学問領域を形成し新技術を投入することにより、学習・記憶や感覚情報処理、行動選択、交互運動など、種を越えて保存された行動素過程の動作原理を理解することを目的とした。

本領域では神経系の基本的な機能である感覚受容、感覚情報処理、運動制御、行動選択、学習（記憶の形成）、記憶の維持、情報統合などの機構を、それらに関わる神経回路と分子の動態のレベルから解明することを目指した。比較的神経系の構造の単純な生物から、より複雑高度な生物まで、個々の研究課題に適した生物を用いた各研究を統合して包括的な概念を得ることを最終目標とした。以下、学問上のいくつかの課題項目に分けて本研究領域の研究成果を概説する。より詳しくは、各研究課題についての成果報告を参照のこと。

本研究領域の 5 年間の研究成果として、英文論文数は合計 339 報（共同研究による重複含）である。特に、主立った雑誌については、Nature (IF 36.3 : 東島、吉原/小早川、伊藤)、Cell (IF 32.4 : 小金澤、吉原)、Science (IF 31.2 : 飯野/石原、石原、齊藤、東島、中井、松尾、小早川)、Nature Neuroscience (IF 15.5 : 飯野/石原/久保、東島/岡本、浅川、吉原)、Neuron (IF 14.7 : 齊藤、東島/岡本)、Developmental Cell (IF 14.0 : 東島)、Nature Protocols (IF 9.9 : 飯野/石原、上川内/伊藤 2 報、上川内)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (IF 9.7 : 飯野 2 報、齊藤 2 報、東島 4 報、東島/中井、中井、吉原、坂井)、Current Biology (IF 9.6 : 飯野 2 、東島、伊藤、増田/伊藤、中井、谷村 2 報)、Science Signaling (IF 7.5 : 富田/飯野)、Nature Communications (IF 7.4 : 飯野/石原/新貝、増田、小金澤、中井、久原、谷村)、Journal of Neuroscience (IF 7.1 : 飯野 2 報、飯野/石原、多羽田、齊藤 3 報、東島/岡本/吉原、東島 3 報、小金澤、古久保 2 報、井上、木村、谷村、喜田、中村 2 報、平田、浅川、知見 2 報、小早川、吉原 4 報、岡本 2 報)、Development (IF 6.6 : 多羽田 3 報、東島 2 報、戸井)、Cell Reports (IF 未定 : 石原、中井)が上げられる。

2.6.2 主な成果

2.6.2.1 神経回路の構築の機構

さまざまな神経機能を分子・回路のレベルから理解するためには、まず回路の構造とその形成機

構を明らかにする必要がある。神経回路の機能と、それを形成するメカニズムの両者を理解することを目的に研究を進めた。

ショウジョウバエの脳の記憶中枢であるキノコ体は、軸索束からできた３つの軸を基本とする特徴的な形態を持ち、この構造が記憶の形成や想起に重要であることが知られている。多羽田らはキノコ体構造が形成される機構について研究を進め、Wnt5/PCP 制御経路と Rac/Sickie/Slinghsot 経路が軸索投射を制御することを見いだした(Shimizu et al. J. Neurosci. 2011)。また、久保らは、ミツバチのキノコ体の大型ケニオン細胞に特異的に発現する遺伝子群を同定し、その中のひとつ、Mblk-1 について、線虫を用いて機能解析を行った。その結果、線虫の Mblk-1 である MBR-1 が幼虫初期に余分に形成される神経突起の剪定に働くことを見いだした(Hayashi et al. Nature Neurosci. 2009)。一方、岩里は、マウスの皮質体性感覚野のバレル構造の形成機構について研究を行った。これはマウスのヒゲの一本一本に対応する筒状構造で、ヒゲからの感覚入力に依存した回路形成が起こるモデル系である。新生仔マウスの樹状突起動態の観察系を構築して観察を行うことにより、バレル細胞の樹状突起が NMDA 受容体依存に出生後徐々にバレル方向への方向性を獲得することがわかった。

シナプス形成については、戸井らが線虫の特定細胞間のシナプス形成に関わる遺伝子を変異体スクリーニングにより同定した。この遺伝子は細胞外マトリックスの構成蛋白質をコードするものと思われ、シナプス特異性の形成機構の一端が明らかとなった。一方、平田らはゼブラフィッシュのグリシン伝達性シナプスに注目し、受容体の凝集機構を研究した。この結果、シナプス伝達の重要性に加え、受容体のサブユニット構成が正しい凝集に重要であることを明らかにした。さらに、RNA ヘリカーゼによる、受容体サブユニットのスプライシング制御の関与が示唆された。

2.6.2.2 感覚情報処理の機構

動物が外界の情報を感知することは神経系の情報処理の第一ステップであり、この段階で情報がどう伝えられ、どう加工されるかは神経系の動作原理を理解する上で重要な課題である。この感覚情報処理機構については、本研究期間内にさまざまな進展が得られた。

石原らは、二つの相反する化学刺激が与えられた際に、どちらを優先して応答するかという感覚相互作用についての研究を行った。その結果、二つの感覚神経から入力を受ける介在神経が行動選択のバイアスを決める働きをしていることがわかり、そこで働く受容体型グアニル酸シクラーゼがその働きに重要であることがわかった(Shinkai et al. J. Neurosci. 2011)。一方、久原は線虫の温度走性を引き起こす温度受容神経のシグナル伝達を光活性化イオンチャネルとカルシウムイメージングを組み合わせて調べ、温度受容神経から、プラスマイナス両方向のシナプス伝達が起こっているであろうことを見つけた。さらに、このうち一方はグルタミン酸によるシナプス伝達であろうことを明らかにした(Kuhara et al. Nature Commun. 2011)。

上川内はショウジョウバエの音受容の神経経路の系統的な解析を行った。エンハンサートラップの大規模スクリーニングにより、二次聴覚神経を標識して単一細胞で回路構造を明らかにし、神経回路地図を作成した。同じく吉原は、ゼブラフィッシュの嗅覚神経経路の解析を行った。免疫染色と GAL4 ライン、G-CaMP によるカルシウムイメージングにより嗅球の匂い特異性のほぼ全貌を明らかにした。さらに、嗅球からの二次嗅覚神経回路についても、特異的エンハンサーの使用と遺伝学的単一神経標識法により、多数の経路を包括的に明らかにした。これをもとに、アミノ酸に対する誘引行動の神経機構を特定神経経路の遺伝学的操作により明らかにした(Koide et al. PNAS

2009)。

尾崎はクロキンバエを用い、匂いが食欲を増進または減退させる機構、すなわち味覚と嗅覚の相互作用についての研究を行い、食欲を増進/減退させる匂いの神経投射を調べたところ、軸索分枝が味覚中枢である食道下神経節に投射し、そこで味受容神経と相互作用することを示唆する結果を得た。

その他、感覚情報処理は、学習・記憶や情動など、動物行動全般に関わる入力経路としての性質を持つことから、以下の各項目に記載する研究においてもさまざまな知見が得られている。

2.6.2.3 学習・記憶の機構

学習・記憶の機構については、本研究領域の主要な課題の一つと位置づけ、さまざまなモデル系での研究を行う研究者を結集させた。領域内での相互作用による研究の発展もめざましいものがあったと総括できる。以下、主要な成果について概観する。

線虫では、飯野らにより、塩の感覚受容と飢餓を連合することにより塩の忌避を引き起こす学習の機構が調べられた。これに必要な因子として哺乳類カルシンテニンのホモログが見つかり(Ikeda et al. PNAS 2008)、さらに、この膜蛋白質がインスリン受容体の軸索輸送を介して学習を制御することが明らかとなった。一方、線虫が塩の濃度を記憶することが発見され、その記憶が感覚神経に蓄えられているらしいことが明らかになった。感覚神経から介在神経のシナプス伝達の変化が学習記憶に依存した行動変化を引き起こしているらしいことも見いだされた(Oda et al. J. Neurophysiol. 2011)。石原らは、記憶の忘却の機構の研究を行った。嗅覚学習の忘却が早い変異体を分離して調べたところ、嗅覚神経で働く JNK-1 MAP キナーゼ経路の働きが忘却を早める機能を持つことがわかった。ただし、このシグナルは他の嗅覚神経の応答変化に依存した嗅覚学習を制御している。つまり、細胞間で働く忘却促進シグナルの存在が発見された(Inoue et al. Cell Reports 2013)。

ショウジョウバエでも、齊藤実らによりインスリンシグナルの学習への影響が調べられた。インスリン経路の IRS/Chico の変異体では、記憶の獲得に障害が見られた。これは脳、特にキノコ体の発育が悪いせいであることが、レスキュー実験により確認された(Naganos et al. Neurosci. Res. 2012)。哺乳類では NMDA 受容体のイオンチャネル活性の Mg^{2+}によるブロック（Mg^{2+}ブロック）がシナプス可塑性に重要とされているが、その意義は不明であった。ショウジョウバエでも NMDA 受容体は連合学習に必要だが、齊藤らが Mg^{2+}ブロックのかからない変異体受容体を作成したところ、連合学習はできるが長期記憶が形成されないことが見いだされた。さらに、Mg^{2+}ブロックがないと CREB 転写因子の阻害因子が誘導され、CREB の活性化による長期記憶形成に支障を生じることが明らかになった。NMDA 受容体の性質としてよく知られる Mg^{2+}ブロックの意義を明らかにした重要な研究となった(Miyashita et al. Neuron 2012)。

さらに、本研究領域では、齊藤らによりショウジョウバエの脳を単離して培養し、学習と同等の変化を起こさせる実験系が開発された。この状態で匂い刺激と電気刺激を与えることにより、2 時間にわたって持続するシナプス変化が観察された。この系において、ニコチン酸アセチルコリン受容体、NMDA 受容体、ドーパミン受容体が同時に活性化されることがシナプス伝達の長期亢進に必要であることが見いだされた(Ueno et al. J. Physiol. 2013)。一方、古久保-徳永らは生きたままのショウジョウバエで、学習を起こさせる刺激を人為的に与える実験系の構築を行った。すなわち、トランスジェニックショウジョウバエを作製し、青色光で開く光活性化チャネル ChR2 を用いて匂

い刺激を光刺激で置換、温度依存性 TRP チャネル dTrpA1 を用いて報酬刺激を温度刺激で置換した。この系で、光と温度の組み合わせ学習により光走性を生じさせることに成功した。

谷村らは、ショウジョウバエが栄養価を認識して学習する現象を探求した。特定のアミノ酸に対する欠乏状態を作り出すと、ハエはそのアミノ酸に対する感度を上昇させ、好んで摂取するようになった。さらに、この行動のために、アミノ酸は体内のセンサーで感知されていることがわかった(Toshima and Tanimura, J. Exp. Biol. 2012)。一方、齊藤らは、空腹時と満腹時とで嗅覚学習の能力が異なることに気付いた。すなわち、満腹時には繰り返し学習が必要なところ、空腹時には一回の学習で長期記憶が形成されることが見いだされた。さらに、この差が満腹時には転写因子 CREB と CBP が共に働くが、空腹時には CREB に対して CRTC が働くためであることが解明された(Hirano et al. Science 2013)。

マウスでは、松尾らにより、異なった二つの時期に活動した神経を染め分ける技術が整備され、音と電気ショックとの連合で形成される嫌悪学習の際に、記憶形成時と記憶想起時それぞれで活動した神経の比較がなされた。さらに、学習時に活動した神経を、後に人為的に活性化する実験系が構築され、人為的活性化により恐怖記憶が想起されることが認められた。これにより、特定のコンテキストで活動した一群の神経細胞が記憶の実体を担うというセル・アセンブリー仮説が支持される結果となった。一方、喜田らは記憶プロセスに対するサーカディアンリズム（概日周期）の役割を検討した。主要な時計遺伝子のひとつ、BMAL1 のドミナントネガティブ型を前脳特異的に発現するマウスを作成し、調べた結果、特定の時間帯の想起にだけ障害が起こることが明らかになった。

以上、学習記憶の機構についてはそれぞれの生物の実験系を生かした、受容体チャネルから生体リズムまでさまざまなレベルでの新規知見が得られた。いずれの研究でも共通しているのは、生物が外界から受け取ったいくつかの情報を組み合わせ、それを神経系の中に保持する機構が何かという疑問である。これについていくつかの解答が得られたので、今後より一般化した法則としての理解が進むものと思われる。

2.6.2.4 運動制御の機構

神経系の情報処理の主要な出力形態は運動である。動物の見せる運動にはさまざまな早さ、さまざまな法則性のものがあるが、動物が危険を回避したり食糧を確保したりするため必要十分な行動を起こすように、神経系がどのような制御を行っているかが本研究領域の一つの課題であった。

飯野らは線虫の化学走性の機構について運動パターンという観点から解析を行った。その結果、クリノキネシスとクリノタクシスの２つの行動パターンの併用により化学物質の濃度勾配を登る行動が引き起こされることがわかった(Iino and Yoshida, J. Neurosci. 2009)。線虫は、薄い濃度において誘引される誘引性匂い物質に対して、同じ匂いが濃くなるとそれを忌避する性質を持っている。飯野らと石原らは共同で、この際にどのように忌避行動が起こるかを調べた。面白いことに、クリノキネシス機構は逆転していたが、クリノタクシス機構は誘引方向に働いていた。つまり、線虫は相矛盾する行動をしつつ、忌避を起こす行動パターンが勝るために濃い匂いから遠ざかっていた(Yoshida et al. Nature Commun. 2012)。木村らは、薄い濃度でも忌避行動を引き起こす忌避性匂い物質に対する線虫の行動を調べた。その結果、上記の２つとは異なる第３の行動機構が見いだされた。この機構は非常に効率がよく、線虫は匂いから遠ざかる方向を選んで直進するという行動戦略をとっていた。みつかった３つの行動制御機構については、各研究グループにより、それを産み出す神経回路の研究が進められた。

ゼブラフィッシュはミリ秒単位での非常に速い逃避行動を見せる。東島らは、音・振動刺激に対してゼブラフィッシュ幼魚がどちら側に体を曲げて逃げるかの決定の機構に注目した。この反応を主に司るのは左右一対のマウスナー細胞であるが、これらの両者が発火してしまった際に、その一方を下流で阻害することにより正しく一方向に体を曲げることを保証する神経、CoLo 神経を発見した(Satou et al. J. Neurosci. 2009)。一方、浅川らは、ゼブラフィッシュ胚を用いて機械刺激に対する逃避行動の際に体を曲げる角度を制御する機構について、定量的刺激・観測系を作製して調べた。GAL4 トラップスクリーニングを行った結果、後脳の一部の細胞（mafb 細胞）の機能を阻害すると屈曲角度が増大することを見いだした。mafb 細胞群には上記マウスナー細胞が含まれるので、この関与について調べたところ、マウスナー細胞は屈曲が起こるかどうかを決定するのに対し、その他の mafb 細胞が屈曲の角度を制御することが分かった。

齊藤和也らは、よりゆっくりの遊泳行動に着目し、メダカを用いて視覚刺激に応答して遊泳方向を変える神経機構を調べることを目指した。メダカを一部固定して視覚パターンを提示し、行動と脳の活動を測定する系を構築し、この系を用いてイメージングを行った結果、視覚パターンに応じた視蓋の活動パターンを定量化することができた。

以上、線虫と小型魚類に集中して行った一連の研究の成果により、精緻な行動制御の機構の一端が解明された。

2.6.2.5 動物行動の統合・制御の機構

本項では、情動や食欲などを含め、動物の感覚から運動までを統合・制御する神経回路の機構について行ったいくつかの研究を要約する。

岡本らは、哺乳類では海馬と扁桃体からの入力を受け情動的価値の表現に関わると推定されている脳部位、手綱核の機能をゼブラフィッシュで調べた。背側手綱核の一部を阻害したところ、恐怖学習成立後の恐怖反応が異常に亢進していることを観察した。この脳部位が恐怖学習の成立や消去と密接に関わると考えられる(Agetsuma et al. Nature Neurosci. 2010)。

小早川は、マウスの恐怖反応を引き起こす匂い物質の作用を調べた。その結果、先天的な恐怖反応を引き起こす「恐怖臭」を与えると、これまでに見られていなかった、体表および体内温度の低下、心拍数の半減など、強い生体応答が起こることが発見された。この匂いに応答する嗅球背側ドメインから入力を受け、これらの生体応答を引き起こす脳内の候補領域を網羅的に同定した。

哺乳類の運動制御においては、大脳基底核線条体のドーパミン D1 受容体と D2 受容体へのドーパミン入力が枢軸的な制御を行っている。知見らは、遺伝子改変マウスを用いた実験を行い、D1 受容体が直接路ニューロンに対し興奮性に作用、D2 受容体は間接路ニューロンに対し抑制性に作用し、D1 受容体を阻害すると自発運動が著しく低下することを明らかにした。一方、線虫においても、周防らによりこれとよく似た制御系が解析された。SIA と呼ばれる神経での CREB 転写因子の活性は、他神経からのドーパミンの作用により抑制され、オクトパミンにより促進される。一方、SIA では CREB 転写因子は運動を引き起こすアセチルコリンの放出を負に制御することが明らかとなった。

中村らは、サルの学習課題遂行中に線条体の神経応答を調べた。この結果、報酬の大小、報酬を得られる場所、期待の強さなどをコードする別々の神経を見いだし、報酬の情報処理が並列に行われていることが示唆された(Nakamura et al. J. Neurosci. 2012)。

矢田らは哺乳類の摂食の制御機構について調べた。視床下部室傍核に発現するネスファチンは摂

食を抑制する機能があることが示され、一方ネスファチンニューロンはグルコースやインスリン、CCK、レプチンにより直接活性化されることがわかった。さらに、ネスファチン mRNA 量は日周リズムに従って変動し摂食と逆相関を示すことがわかった。肥満モデルラットでは明期でのネスファチンの発現上昇が阻害されていることが見いだされ、日周リズム制御の障害が過食や肥満と結びつく可能性が示唆された(Gantulga et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012; Sedbazar et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2013)。

最後に、林らは睡眠の制御機構について研究を行った。睡眠制御に関わると推定されていた橋網様体の各細胞種を遺伝学的にラベルする系を確立し、トランスジェニックマウスを作製して神経活動を制御したところ、網様体の一群の神経を人為的に活性化させることによりレム睡眠様の状態を起こすことができ、別の一群の神経を活性化させることにより覚醒状態を作り出して睡眠を阻害することに成功した。

2.6.2.6 個体間相互作用に関わる行動制御

本研究領域の研究を進めていく過程でクローズアップされてきたテーマが個体間相互作用であった。まず、個体間の相互作用でよく知られている関係として、求愛行動など雌雄間でのコミュニケーションが上げられる。江島らは、ショウジョウバエのオスは、フェロモンの受容によってメスまでの距離またはメスの活動性を推定し、相手メスの性的受容性に応じて求愛歌パターンを変化させることを見いだした。さらに、このように求愛歌のパターンを変化させることが交尾の成功率を上げるのに有効であることが示された(Trott et al. PLoS ONE 2012)。坂井らは、オスのショウジョウバエが求愛に失敗すると、それ以降求愛行動を行わなくなるという求愛条件付けの機構について研究を進めた。求愛条件付けに必要な神経として新に Fan-shaped neuron およびインスリン分泌細胞を同定し、必須因子として時計蛋白質 Per や TRP チャネル Painless を同定した(Sakai et al. Learning and Memory 2012; Sakai et al. Learning and Memory 2013)。

小金澤らはショウジョウバエの求愛行動の種間の違いに注目した。標準種 *D. melanogaster* とは異なる求愛行動を示す *D. subobscura* から、神経系の雌雄差形成に重要な Fruitless 遺伝子のプロモーター領域を取得し、このプロモーターが働く *D. melanogaster* の神経細胞を活性化したところ、*D. subobscura* に特徴的な求愛行動が誘起された。この結果から、*D. melanogaster* の神経系が本来 *D. subobscura* の性行動を作り出しうるように構築されているという驚くべき事実が明らかとなり、種特異的な性的二形成の形成機構についての洞察が得られた。

吉原らは、ゼブラフィッシュのオスを誘引する性フェロモンの実体としてプロスタグランディン F2 原（PGF2α）が働いていることをみつけた。PGF2α はよく知られたホルモンであるが、これが体外において性フェロモンとしても働くという発見である。さらに、その受容体を同定し、フェロモン受容のシグナルを伝える嗅球糸球を同定した。

雌雄間以外の個体間相互作用も動物の行動や形態を様々に変化させる。久保らは個体間相互作用の最たる例として、ミツバチの社会性行動に注目し、働き蜂の分業に伴って脳で発現減少する遺伝子を探索した。その結果、非翻訳 RNA、Nb-1 を同定した。Nb-1 は幼若ホルモンの分泌を行うオクトパミン陽性神経で発現していた。幼弱ホルモンの低下が働き蜂の分業を促す可能性が提示されており、Nb-1 が幼若ホルモンの分泌を抑制する可能性が考えられた(Tadano et al. Insect Mol. Biol. 2009)。また、ニホンミツバチは大型のオオミツバチが巣への侵入を試みると、集団で取り囲み高熱を発して相手を殺傷する熱殺蜂球を形成する。このときに、キノコ体の傘の外の位置に存在

するケニヨン細胞が興奮すること、これらの細胞は熱により活性化されることを明らかにした(Kiya et al. PLoS ONE 2012)。

飯野らは、線虫の嗅覚学習における学習能が個体間相互作用により変化することを見いだした。この相互作用は雌雄同体同士の間で働くフェロモンによって仲介されており、個体が密に存在するときには嗅覚学習を促進するように働く。さらに、この作用を仲介する体内ペプチドも発見した(Yamada et al. Science 2011)。

このように、個体間コミュニケーションは今や新規知見が続々と得られ、注目を集める研究領域となっており、本新学術領域はこの分野を牽引する役割を果たしてきたと言えよう。

2.6.2.7 イメージング技術の開発

本領域では神経系の動作機構を研究するための技術開発にも力を入れた。石原らは、領域内共用設備として、ニポウ式共焦点顕微鏡と対物レンズ高速移動を同期する 4D イメージングシステムの構築整備を行った。この装置により、FRET 型プローブを用いて線虫など 3 次元的に配置された複数の神経細胞の活動を同時に取得できるようになった。橋本らは、回転、変形しつつ移動する画像についてビジュアルサーボ理論を適用し、電動ステージを用いて、移動する生物を顕微鏡下で捉えつつ高速にトラッキングするシステムを開発した。この技術は共同研究として線虫を用いる何名かの班員の研究に取り入れられた。特に、安藤らは、高速共焦点レーザー顕微鏡にトラッキングシステムを組み入れ、自由運動中の線虫の筋肉や神経の活動をカルシウムイメージングにより記録することに成功した。

上川内らは、ショウジョウバエの触覚音受容器を自在に動かしながら脳の神経活動を測定する方法を開発した。帯電させたショウジョウバエを顕微鏡下に固定し、触覚先端部近傍に設置した電極に電圧信号を付加して触覚先端部を静電気により駆動し、脳に Cameleon を発現させてカルシウムイメージングを行うことによりこれを達成した(Kamikouchi et al. Nature Protocols 2010)。齊藤実らはショウジョウバエの脳を単離して培養し、電気刺激を与えながらカルシウムイメージングを行う系を構築した。多羽田らは、ショウジョウバエのキノコ体細胞に G-CaMP を発現させ、開頭して二光子顕微鏡にとりつけ、4 次元イメージングを行ってキノコ体の約 2000 個の細胞体全体を捉えることに成功した。また、軸索束の断面を観察することによっても多数の神経の活動を同時に経時的に測定することができた。このデータを画像解析と数理処理することにより、神経集団の活動の特性を抽出した。

東島は、特定の細胞種に光活性化チャネル、チャネルロドプシンやアーキロドプシンを発現するゼブラフィッシュの幼魚を寒天マウントし、脳内の一部の領域だけの細胞に光照射を行う装置を開発した。同時にハイスピードカメラで撮影することにより、光操作により生じる行動変化を観察することができた(Satou et al. Current Biology 2012)。

以上を含め、多くの班員の工夫や技術投入により、本研究領域では新たな手法が多数開発され、班員間の情報交換や協力を通して、最先端の成果を生み出す基盤となった。

2.6.2.8 神経回路操作技術の開発

平行して、遺伝学的に神経回路の操作を行う技術の開発も進められた。伊藤らは、エンハンサートラップによりショウジョウバエの一部の神経をラベルし、その形態、特に接続関係を網羅的に解

析する手法を開発した。これを用いて脳の配線図を系統的に作成し、ショウジョウバエの脳機能の研究の強力な基盤を作成した。同じ材料を用いて、特定の神経細胞群を遺伝学的に操作することも可能となった。

前述のように、松尾らはマウスにおいて、一定の時期に活動した神経細胞だけをラベルする手法を開発した。この手法により、一定時期に活動した神経細胞を他の時期に操作することが可能となった。

モデル生物以外の動物においても開発の努力がなされた。和田らは、ソングバードの脳で時期特異的かつ細胞タイプ特異的発現を実現させるための試行を繰り返し、アデノ随伴ウイルスを用いることにより発声学習・歌形成に関わる特定脳領域への安定した発現を達成した。さらに、ソングバードのトランスジェニック個体の作出にも成功した。井上らは、逆行性感染性レンチウイルスとアデノ随伴ウイルスのベクターを作成し、サルの特定の神経路の神経だけで外来遺伝子の発現を起こす系を開発した。特定の神経路の神経伝達遮断を起こすことや、shRNA による遺伝子抑制を行うこともできるようになった。

このような多種の動物において遺伝子操作系の開発が進み、技術の整備が進展したことは、今後高次脳機能の解明に大きく貢献することと思われる。

2.6.2.9 光学プローブの開発、改良

本領域では光学プローブによる in vivo の神経活動や分子動態の観測を一つの大きな目標とした。このような手法の発達により従来不可能であった研究が可能となりつつあったからである。実際、プローブ開発に優れた班員により多くの開発、改良がなされた。

中井らは、蛍光カルシウムプローブ G-CaMP の開発の実績があり、これは本領域でも多用された神経活動をモニタするレポーターとなったが、さらに特性の改良を行った。開発されたプローブのうち、G-CaMP6, 7, 8 では、カルシウムの有無により最大 40 倍に迫る蛍光強度比が得られた（Ohkura et al. PLoS ONE 2012a）。石原らは、赤色のカルシウムレポーターR-GECO の開発に関わった（Zhao et al. Science 2011）。さらに中井らはこれを改良し、蛍光比 30 倍に迫る R-CaMP1.07 を開発した（Ohkura et al. PLoS ONE 2012b）。これにより、チャネルロドプシンを用いて青色光刺激により神経を活性化しながら R-GECO や R-CaMP1.07 を用いて赤色光により神経活動をモニターすることが可能となった。

筒井らは、神経活動の際の膜電位をモニターする FRET 型蛍光プローブである Mermaid の開発実績があるが、本領域では、電位センサードメインの構造変化に関する研究を行い、これをもとに Mermaid をさらに改良し、高速・高感度の Mermaid2 を開発した。

佐藤らは、生体シグナル分子のレポーターの開発を進めた。JNK の活性をモニターするプローブ(Suzuki and Sato, Supramol. Chem. 2010)、H_2O_2の量をモニターするプローブ、cGMP のプローブを開発した。特に、cGMP プローブは cGMP の濃度変化の履歴を残すという有用な性質を持つプローブとなった。さらに、PI3K など生体分子の光操作技術の開発も進めた。富田らは、MAP キナーゼ経路の Ras, MAP3K, ERK のプローブを開発し、実際に線虫の感覚神経内で MAP キナーゼ活性のモニターに用いた。この結果、MAP キナーゼの活性化は、感覚入力の時間パターンに大きく依存することがみつかった。すなわち、中程度の頻度で入る刺激に対して、継続的な MAP キナーゼの活性化が最も大きかった。この特性を説明する数理モデルを提出した(Tomida et al. Science Signaling 2012)。

2.6.2.10 数理、モデリング

数理、モデリングについては、特に支援班を設け、この分野の専門家により他の班員の研究のサポートを行う体制を取ると共に、数理、モデリングに特化した研究も進めた。

線虫は全神経回路の接続関係が既知という大きな特徴を持っている。新貝らは、まず感覚神経内での化学受容と神経興奮をモデル化した。これにより、カルシウムイメージングで観察される匂い受容に対する神経応答が再現された(Usuyama et al. PLoS ONE 2012)。次に、線虫の頭部神経回路のモデリングを行った。匂い刺激に対する各神経の膜電位の変化を同時に記載し、前進、後退の応答を再現するモデルを作成することに成功した。

増田らはネットワークの性質についての理論的な研究を行った。神経ネットワーク上の各神経（ネットワークの頂点）の重要性を決める指標として中心性を導入し、この値を近似的に求める手法を開発し、感覚神経、介在神経、運動神経という上流から下流への方向性と、それぞれの中での重要性の値を抽出することができた(Masuda et al. New J. Phys. 2009; Masuda et al. Phys. Rev. E 2009; Masuda and Kori, Phys. Rev. E 2010)。また、線虫の移動運動の特性を実データから抽出することを行った(Ohkubo et al. J. Theor. Biol. 2010)。一方、哺乳類の脳機能の研究のために、最大エントロピー法を用いて fMRI データから脳のネットワークを推定する手法を開発した(Watanabe et al. Nature Communications 2013)。

2.6.2.11 応用

脳神経系の機能に関する研究の進展をもとに、これをヒントとして応用を目指す研究を辻らが進めた。まず、線虫の神経-筋モデルを作成し、化学走性行動のシミュレーションを行った。体の硬さを表すバネ要素、ダンパー要素と筋肉による力を発生する要素をもとに身体動力学モデルを用いた。化学走性は前述の実動物の研究から得られたクリノキネシス、クリノタクシスの機構をモデル化した。これにより計算機上で実際の行動を再現するモデルを作成した。さらに、このモデルと運動機構をもとに、線虫型多モジュール連結ロボットを作製した。

また、小型魚類の出す微弱電流を検出する機構を開発し、これを基盤とし、呼吸波信号を使って水質をモニターする生物センサーシステムを開発した(Soh et al. IEEE Trans. Instr. Meas. 2013)。関連して、電極センサーを用いて魚の位置を検出するシステムも作製した(Terawaki et al. Artificial Life and Robotics 2010)。さらに、匂い物質による嗅球の活動のデータをもとに、化学物質の構造から嗅球活動を推定するシステムを構築し、これにより匂い識別能の予測と人工官能試験の系を構築した(Soh et al. Artificial Life and Robotics 2010)。

このように、本領域での基礎研究の成果を、応用につなげる展望をも視野に入れられたことは特筆に値する。

2.6.3 まとめ

以上、簡単に本領域の研究成果を概観したが、感覚受容から学習記憶、運動制御、個体間コミュニケーション、ひいては食欲や睡眠まで、広範な神経系の営みについての理解が進んだことが見て取れるであろう。神経系は神経細胞という基本単位がつなぎ合わせて作られているブロック模型のようなものである。素子の形や機能に多くの種類がなかったとしても、作り出される作品には無限の可能性がある。本領域の研究においても、複雑な神経系の振る舞いをどこまで素子の振る舞いの組み立てとして説明できるかがテーマであり、解析の方法論を多くの班員が共有し、共に開発を進めて来たことが本領域の大きな特徴であった。そして、その結果、素子からシステムの動作を作り出す動作原理に関して多くの貴重な示唆が得られた。本領域の成果を基盤として、参加した班員のみならず、波及効果を受けた神経科学全体が今後さらに日進月歩の速さで神経系の理解を進めていくことは間違いがない。

2.7 総括班の活動

新学術領域研究においては、各研究課題間の連携を強化し、研究成果を発信するために総括班は重要な働きを果たす。各班員、特に若手研究者が主体的に進める研究を支援し、班員間の研究協力や情報交換を促進し、領域全体の研究の発展を円滑に推進し、広く成果を公表するとともにフィードバックを受けてさらなる研究の発展に結びつけることを念頭に、本領域の総括班の活動を推進した。

2.7.1 班会議、ワークショップ、研究会の開催

【平成 20 年度】

第 1 回総括班会議
日時：2008 年 12 月 11 日
場所：神戸市ポートアイランド　レストランサンマリノ

【平成 21 年度】

第 1 回班会議およびワークショップ、第 2 回総括班会議
日時：2009 年 11 月 18 日-20 日
場所：静岡県掛川市ヤマハ リゾートつま恋
招待講演者：Dr. Sam Kunes (Harvard University)、Dr. Mario de Bono (MRC)

【平成 22 年度】

ポスター発表および領域会議
（包括脳ネットワーク夏のワークショップへの参加）
日時：2010 年 7 月 27 日～30 日
場所：ホテルさっぽろ芸文館（旧北海道厚生年金会館）

第 1 回イメージングワークショップ
日時：2010 年 8 月 18 日
場所：九州大学国際ホール
講演者：村山孝(沖縄科学技術研究基盤整備機構)、能瀬聡直（東京大学）、広津崇亮（九州大学）、寺本孝行（九州大学）

第 2 回班会議および国際シンポジウム、第 3 回総括班会議
・班会議
日時：2010 年 11 月 8 日（月）～11 月 9 日（火）
場所：ホテルアジュール竹芝
・国際シンポジウム「Systems Molecular Ethology and Beyond」（公開）
日時：平成 22 年 11 月 10 日(水)
場所：東京大学理学部 1 号館小柴ホール(本郷キャンパス)
招待講演者：Cori Bargmann (Rockefeller University), Yi Zhong (Cold Spring Harbor Laboratory /

Tsinghua University, China), Thomas Preat (CNRS, France), 内田直滋(Harvard University, Center for Brain Science)、河西春郎(Universuty of Tokyo, Graduate School of Medicine, Japan)各氏

【平成 23 年度】

第 3 回班会議およびワークショップ、第 4 回総括班会議
・班会議
日時：2011 年 8 月 20 日（土）～8 月 21 日（日）
場所：チサンホテル新大阪

・ワークショップ「報酬系・罰系とモノアミンシグナル伝達」
（包括脳ネットワーク夏のワークショップの一環）
日時：平成 23 年 8 月 22 日（月）
場所：神戸国際会議場
招待講演者：Tim Tully (DART Neuro Science LLC.)、池本聡（National Institutes of Health、NIH）

光操作研究会（共催）
日時：2011 年 9 月 29～30 日
場所： 生理学研究所
生理学研究会「神経活動の光操作(行動制御への応用)」

第 2 回イメージングワークショップ
日時：2012 年 1 月 20 日（金）13：00～17：30、1 月 21 日（土）9：30～12：00
場所：イメージングワークショップ講演(20 日)埼玉大学総合研究棟 1 階シアター教室
イメージングデモンストレーション(21 日)埼玉大学教育機構棟 5 階 脳科学融合研究センター内ラウンジ（オープンラボ 2B、7）
招待講演者：池谷裕二(東京大学)、佐々木拓哉（生理学研究所)、武藤彩(遺伝学研究所)、川上浩一(遺伝学研究所)（うち、佐々木拓哉氏、武藤彩氏は本領域による支援）

第 3 回イメージングワークショップ
「４Ｄイメージングシステムに関する講習会」
日時：2012 年 3 月 8 日（木）～3 月 9 日（金）
場所：九州大学箱崎キャンパス

【平成 24 年度】

新学術領域「システム分子行動学」数理シンポジウム
日時：2012 年 5 月 11 日（金）～12 日（土）
場所：東京大学 工学部 6 号館 3 階セミナー室Ａ，Ｄ
招待講演者：黒田真也(東大)、小林徹也(東大) 、伊藤啓・伊藤正芳(東大)、塚田祐基(名大)、中里研一(理研)、青沼仁志(北大)、鈴木芳代(原子力研究開発機構)、中林潤(横浜市立大学)、曽智(広島大)

第 4 回班会議、第 5 回総括班会議
日時：2012 年 7 月 24 日（火）～7 月 26 日（木）
場所：メルパルク SENDAI（24 日~25 日）、仙台国際センター（26 日）

※26 日は包括脳ネットワーク夏のワークショップでの公開班会議

光操作研究会（共催）
日時：2012 年 9 月 27～28 日
場所：岡崎コンファレンスセンター
第 4 回光操作研究会(動作原理の理解と行動制御への応用)

国際シンポジウム
【新学術 3 領域合同国際シンポジウム】
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ORGANIZATION AND FUNCTION OF THE NERVOUS SYSTEM
日時：2012 年 11 月 27 日（火）～ 28 日（水）
場所：東京大学理学部 1 号館 小柴ホール
文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究
「神経細胞の多様性と大脳新皮質の構築」代表 山森哲雄(基礎生物学研究所 教授)
「メゾスコピック神経回路から探る脳の情報処理基盤」代表 能瀬聡直(東京大学 教授)
「神経系の動作原理を明らかにするためのシステム分子行動学」代表 飯野雄一(東京大学 教授)
招待講演者：Scott Waddell (University of Oxford)、Shawn Xu (University of Michigan)、澁木克栄（新潟大学）、濡木理（東京大学）、後藤由季子（東京大学）、Frederick J. Livesey (The Wellcome Trust/Cancer Research UK Gurdon Institute)、Alessandra Pierani (Institut Jacques Monod)、Kenneth J. Campbell (Cincinnati Children's Hospital Medical Center)、三品 昌美（立命館大学）（うち、Scott Waddell 氏および Shawn Xu 氏は本領域の支援による。）

2.7.2 支援活動

新たな研究分野にあって最新の手法を用いるためには、共通に利用できる技術について領域として開発を行い、個々の研究の支援とすることが研究分野の発展に大きな力となる。このため、本領域では「イメージング支援」「数理支援」の二つの支援班を設けた。また、領域内の研究交流を促進するための財政的な支援として「交流推進旅費」、「ミニワークショップ支援」を行った。

【イメージング支援】
行動を制御する神経回路の機能をシステムの振る舞いとして明らかにするためには、神経活動をリアルタイムでかつ非侵襲的に測定するイメージングの技術が有用である。そのため、以下の活動を行った。
(1)ワークショップなどでイメージング技術を積極的に取り上げ、班員が最新のイメージングに取り組める体制整備を構築した。
(2)線虫やゼブラフィッシュなどにおいて多数の神経の活性を 4 D イメージングにより同時に測定するため、九州大学に高速共焦点顕微鏡システムを導入し、4D イメージングを実施するために必要な技術を整備した。この領域内共用設備を共同研究ベースで活用し、各班員が自らの研究に利用できるようにした。
(3)イメージングに用いる光学プローブの開発、改良を行った。
前項 2.7.1 記載の「第 1 回イメージングワークショップ」「第 3 回イメージングワークショップ」はイメージング支援班の主催で開催し、領域として共催した「光操作研究会」にも支援班員が参加した。

【数理支援】
本領域の研究では、分子から行動までの様々な対象からのシグナルが計測される。これらの情報を数理的に処理することは現象の理解に重要である。このような解析に十分な技術や経験を持たない班員を対象とし、計測に伴う情報処理や数理的問題について支援を行った。主な内容は以下の通りである。
(1)イメージング支援班とイメージング画像の解析方法について協議。
(2)公募班員に匂い物質の拡散のシミュレーションに関する支援。
(3)計画班員に行動機構に関する数理解析の支援。
(4)計画班員に学習の形成機構に関する数理モデリングの実施。
(5)計画班員にカルシウムイメージング結果の数理解析に関する支援。
(6)計画班員に記憶形成に伴う脳神経活動の解析の支援。
などを行ったほか、班会議の機会やメールによる相談に対し、随時アドバイスを行った。

【交流推進旅費】
本支援は、中間評価におけるコメントを受けて、平成 22 年度より開始した。班員間の研究交流を促進することを目的として、研究代表者、分担者その他研究室メンバーが領域内の他の班員の研究室を訪問する際に、申し出により総括班から交流推進旅費として旅費を支援した。平成 22 年度 4 件、平成 23 年度 7 件、平成 24 年度 5 件の支援を実施した。

【ミニワークショップ支援】
本支援も中間評価コメントを受けて開始した。領域内の情報交換を活発にするため、領域内で特色のある技術や研究テーマについて、全班員からのボトムアップの提案を受け、自由参加型のミニワークショップを開催する計画に対して財政的な支援を行うものとした。
2.7.1 に記載の「第２回イメージングワークショップ」（2012 年）「光操作研究会」（2011 年、2012 年）はこの支援によるものである。

2.7.3 アウトリーチ

一般大衆、特に将来の科学を担う若い生徒に研究の醍醐味を知らせることは、科学に対する理解の醸成と次世代の研究者の育成のために重要である。そこで、本領域でも、中等教育の場に出向き、あるいは一般向けのイベントを開催して本領域の研究成果を分かりやすく伝える活動を以下のように実施した。

【平成 21 年度】
1) 2009 年 6 月 4 日(木)盛岡市立高等学校への出張授業（実施代表者：岩手大学工学部　新貝鉚蔵）
講義:「線虫 C.エレガンスはモデル生物です—特に神経の働きと行動について—」
実習:生徒をグループに分けて、線虫の化学走性(誘因行動または忌避行動)、および接触刺 激に対する忌避行動の実験(いずれも野生種と変異種を比較); 実験のまとめ
2) 2009 年 7 月 23 日(木)岩手県立遠野高等学校への出張授業(実施代表者:岩手大学工学部　新貝鉚蔵)
講義:「線虫 C.エレガンスはモデル生物です—特に神経の働きと行動について—」
実習:生徒をグループに分けて、線虫の化学走性(誘因行動または忌避行動)、および接触刺 激に対する忌避行動の実験(いずれも野生種と変異種を比較); 実験のまとめ

3)2009 年 7 月 21 日法政大学女子高等学校向けの実習授業（実施代表者：東京大学大学院理学系研究科 飯野雄一）
実習内容: 「線虫 C.エレガンスの観察:遺伝子の変異と表現型」1.実体顕微鏡を用いた線虫の観察 2.微分干渉顕微鏡を用いた線虫の器官の観察 3.化学走性行動の観察(化学走性アッセイ)

【平成 22 年度】
1) 2010 年 9 月 11 日青森県立三本木高校への出張授業（実施代表者：岩手大学工学部　新貝鉚蔵）
講義:「線虫 C.エレガンスの行動を制御する神経系と遺伝子」
実習:線虫の行動に関する実習
2)2010 年 9 月 16 日岩手県立水沢高校への出張授業（実施代表者：岩手大学工学部　若林篤光）
実習:食塩に対する走化性に関する学習

【平成 23 年度】
１)平成 23 年 8 月 6 日~8 月 7 日　日本科学未来館における一般市民向け研究紹介イベント（実施代表者：東京大学大学院理学系研究科 飯野雄一、参加研究室代表者：多羽田哲也、東島眞一、平田普三）

【平成 24 年度】
1)平成 24 年 7 月 30 日~8 月 3 日　東京都医学総合研究所における夏のセミナーの基礎・技術コース「ショウジョウバエを用いた学習記憶の研究」（実施代表者：東京都医学総合研究所 齊藤実）
2)平成 24 年 11 月 19 日宮城県仙台第一高等学校への出張授業（実施代表者：岩手大学工学部　新貝鉚蔵）

2.7.4 若手派遣

若手研究者の国際交流を促進し、研究分野の発展に寄与することを目的として、「若手研究者海外派遣プログラム」
として派遣旅費を支援した。

【平成 21 年度】
1）岩手大学・若林篤光、2009 年 6 月 24 日～30 日、17th International C. elegans meeting、米国カリフォルニア大学ロサンゼルス校
2）九州大学・藤原学、2009 年 6 月 24 日～29 日、17th International C. elegans meeting、米国カリフォルニア大学ロサンゼルス校
3）国立遺伝学研究所・水野秀信 、2009 年 10 月 15 日～23 日、第 39 回北米神経科学学会（Society for Neuroscience annual meeting 2009）アメリカ合衆国イリノイ州シカゴ市マコーミックプレイス
4）東京大学・宮崎隆明 2009 年 12 月 2 日～6 日、アメリカ合衆国国立衛生研究所 マーク・ストッファー研究室 アメリカ合衆国メリーランド州ベセスダ
5）東京大学・冨田太一郎、2010 年 2 月 20~24 日、第 54 回米国生物物理学会(Biophysical Society 54th annual meeting）アメリカ合衆国カリフォルニア州サンフランシスコモスコーンセンター
6）東京大学・宮崎隆明、2010 年 3 月 10 日～18 日、3rd Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Neuronal Circuits（アメリカ合衆国ニューヨーク州コールドスプリングハーバー）
ロックフェラー大学 Vosshall 研究室（アメリカ合衆国ニューヨーク州マンハッタン）
ジョンズ・ホプキンス大学医学部 Montell 研究室（アメリカ合衆国メリーランド州ボルチモア）

【平成 22 年度】
1）日本原子力研究開発機構・鈴木芳代、2010 年 9 月 13 日~9 月 21 日、第 20 回人工ニューラルネットワーク国際会議(20th International Conference on Artificial Neural Networks: ICANN2010)、ギリシャ共和国テッサロニキ県(Thessaloniki)
2)北海道大学･森千紘､5 月 27 日～6 月 17 日､Rockefeller 大学 Nottebohm 研究室 & Center for Field Research in Ethology and Ecology (アメリカ合衆国ニューヨーク州ニューヨーク市)
3）茨城大学大学院・倉持昌弘、2010 年 11 月 22 日～11 月 26 日、第 17 回神経情報処理に関する国際会議（17th International Conference on Neural Information Processing: ICONIP 2010)、オーストラリア・シドニー市　シドニー工科大学
4）理化学研究所・揚妻正和、2011 年 1 月 8 日～14 日、コロンビア大学 Rafael Yuste 博士研究室、アメリカ合衆国ニューヨーク州ニューヨーク市

【平成 23 年度】
1）大阪大学大学院・川添有哉、2011 年 6 月 21 日～28 日、18th International C. elegans Meeting アメリカ・カリフォルニア大学ロサンゼルス校（UCLA)
2）首都大学東京大学院・佐藤翔馬、2011 年 9 月 1 日～11 日、アイオワ大学（University of Iowa）北本年弘博士研究室
3）京都大学・橘真一郎、2011 年 10 月 3 日～9 日、14th Neurobiology of Drosophila meeting アメリカ合衆国ニューヨーク州、コールド・スプリング・ハーバー研究所
4）北海道大学大学院・小林雅比古、2011 年 11 月 1 日～18 日、第 41 回北米神経科学会研究会(41th annual meeting of the Society for Neuroscience; SfN2011)In Washington, DC at the Walter E. Washington convention Center
5）九州大学大学院・新里　直、2012 年 1 月 31 日～2 月 4 日、Sungkyunkwan University(成均館大学校) Jae-Young Kwon 研究室・KAIST(韓国科学技術院) Walton Jones 研究室・KAIST(韓国科学技術院) Mini-Symposium on Drosophila Sensory Biology ・GIST(光州科学技術院) Young-Joon Kim 研究室

【平成 24 年度】
1）北海道大学生命科学院・早瀬 晋、2012 年 10 月 11 日~ 19 日、第 42 回北米神経科学研究会(42nd annual meeting of the Society for Neuroscience:SfN2012)、In New Orleans, at the Ernest N. Morial Convention Center
2）広島大学大学院・服部佑哉、2012 年 6 月 13 日~6 月 19 日、EMBO Conference Series: C. elegans Neurobiology 、The European Molecular Biology Laboratory Advanced Training Centre (ドイツ連邦共和国ハイデルベルク)
3）大阪大学大学院・谷本悠生 、2012 年 6 月 27 日~ 7 月 1 日、5th East Asia Worm Meeting、Chien Tang Youth Activity Center, Taipei
4）京都大学生命科学系・井下強、2012 年 9 月 2 日~ 12 日、Neurofly meeting 2012、フランス国立農業研究所、イタリア・パドヴァ・Centro Congressi Padova、フランス・ヴェルサイユ・国立農業研究所 Frederic Marion-Poll 研究室

2.8 総括班評価者による評価

平成 22 年の中間評価に際し、総括班評価委員のうちお二人より評価意見を頂いた。下記にそのまま転記する。これらのご意見に従い、領域運営の後半においては追加の企画ワークショップ２件と新学術領域研究３領域合同国際シンポジウムを開催し、共通原理の導出について議論し研究分野の融合をはかるとともに、ミニワークショップ支援、研究交流推進旅費支援の追加措置を行い班員間の研究連絡を密にする試みを行った。

新学術領域研究「神経系の動作原理を明らかにするためのシステム分子行動学」

総括班評価者：　森　憲作　（東京大学、大学院医学系研究科）

本研究領域の目的は、「外界からの感覚情報や学習経験に基づいて適切な行動を引き起こす神経系の機能を、分子－シナプス－神経細胞－神経回路－個体行動　などの様々なレベルから統合的に理解する」ことにあり、人間の精神活動を理解する上で極めて重要な研究課題である。本領域では、各レベルでのアプローチを可能にする線虫から霊長類に至るまでの様々なモデル動物を研究材料にする研究者が、お互いに連携して研究を進めており、神経科学、行動遺伝学、神経行動学、分子可視化技術、数理科学、工学などの諸分野を融合し、「行動を構成する基本的素過程」の理解を目指す新しい学問領域の創成を試みている。発足以来まだ短い研究期間にもかかわらず、線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィシュ、マウス等をモデル動物とした研究が、すでに大きく進展しており、このままこれらの研究が進めば神経科学を飛躍的に発展させる成果に結びつくと期待される。異なる分野の研究者間の共同研究や技術協力も、多数活発におこなわれており、本研究領域の研究推進に大きく寄与している。工学や数理モデルグループと実験グループとの共同研究はまだ少なめだが、本研究領域が発展するにつれより活発になると思われる。以上のように、本研究領域は全体として順調に進展しており、各グループがこのまま本研究に専念することができれば我が国の脳神経系研究の飛躍的発展に大きく貢献すると思われる。

総括班評価者：　桂　勲　（国立遺伝学研究所名誉教授）

昨年の 11 月 18 日(水)ー20 日(金)に開催された本領域の班会議およびワークショップに参加し、今回の中間評価ヒアリング用に領域代表者が作成した資料、およびこの資料作成のために全班員から送られた報告書を読みました。これらを総合して考え、以下のような意見を持ちました。

（1）班員の多くは、高いレベルの研究を行い成果を上げている。また、その研究内容は、本新学術領域研究の趣旨に沿ったものである。今後もこのレベル以上の研究を継続して欲しい。この新学術領域研究によるさまざまな支援を利用して、今後、全員が立派な成果を出すことを期待する。

（2）数理科学や工学の専門家やプローブを開発する研究者とモデル生物の研究者との共同研究、および異なるモデル生物の研究者間の情報交換が研究の推進に役立っている。班員からさらなる研究交流の促進を望む声があるので、何らかの手段を考えられてはいかがだろうか。

（3）本新学術領域研究で、4D イメージング装置は重要な役割を果たすと考えられる。納入後に欠陥が見つかったが、その対応もでき、画像解析ソフトの整備も進んでいる。本年８月のワークショップが成果を上げ、近い将来に何人かの班員が画期的なデータを出すことを期待する。

（4）数理支援班は、データ解析に関して何人かの班員の役に立つことができた。公募班員への呼びかけは適切である。シミュレーションが役に立つためには、現在の現象の説明にとどまらず新しい発見の引き金となることを目標にすべきだろう。

（5）海外渡航援助と班会議での発表の他に、若手育成のアイディアはないだろうか。

（6）評価委員全員をうまく利用する方法を考えられてはいかがだろうか。

（7）現段階では、変異・遺伝子操作・細胞破壊・神経信号操作などで分子–神経細胞–シナプス–神経回路–個体というレベルを通しての因果関係をつかみ、行動をリアルタイムで定量的に解析し解釈することが重要であり、それを遂行することでさまざまな発見が期待できる。しかし、最終目標とする「行動の基本原理の解明」には、それに加えて別の何かが必要ではないだろうか。

3　個別研究成果報告

計画研究：平成 20 年度-平成 24 年度

化学走性行動と連合学習の分子神経機構の解明

研究代表者：飯野　雄一

東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻

＜研究の目的と進め方＞

動物の行動が遺伝子産物の機能変化に依存してどう変化するかを理解するためには、神経系の動作の基本原理の根底からの理解が必要である。哺乳類を中心に、既知分子については多くの知見が蓄積されたが、新規の機能分子、特に学習などの制御機構に関わる未知の分子を発見することは容易ではない。我々はこれまでに、線虫C.エレガンスの遺伝学を用い、化学走性の学習に関わるいくつかの分子経路の同定に成功している。この基盤のもと、本研究では神経科学における重要問題のうち、以下の４点に焦点を絞った問題認識と目標を設定し、これを達成する。

１）連合学習の機構、特に、学習の成立機構、学習に依存した行動のスイッチ機構、記憶の持続時間を決定する機構、学習能力を制限する機構の解明

２）走性行動の機構、特に単一の感覚入力から複数の情報を抽出する機構の解明

３）個体間の行動の差異の分子的基盤と自発的神経活動の意義の解明

４）多様な走性行動に関わる全神経回路の動作機構の解明

＜研究計画＞

以下の各項目に沿って研究を進めることとした。

1) マルチワームトラッカーの開発

研究の準備として、プレート上の線虫の行動を高解像度カメラで連続的に撮影し、定量化する装置を開発する。

2) 学習の成立維持機構

塩および匂いに対する化学走性においては、これらの化学物質と餌の有無の組み合わせによって学習が起こり、化学走性行動が変化する。本研究はこれらの学習をモデル系として用い、行動変化の機構を次の分子経路を手がかりとして明らかにする。

①インスリン/PI3-キナーゼ経路

②CASY-1

以上2つはいずれも塩の学習および匂いの学習の双方に必要な分子（経路）として同定していたので、これらがいかに働いて学習のどの局面を司っているかを明らかにする。

③Go/Gq経路

GoとGqのαサブユニットおよびγサブユニットの変異体が化学走性や学習について特徴的な異常を示すので、それぞれの機能解析とこれらの分子による行動制御機構を明らかにする。

④ニューロペプチド、モノアミンのシグナル

これらは神経回路の調節の役割を担うことが多い。我々の研究で学習に関わることが明らかになった分子について機能解析を進める。

⑤新規変異体

学習にさまざまな異常を来たす新たな変異体を分離し、原因遺伝子を決定することにより新たな制御機構を発見する。

3) 走性行動の機構

化学走性の際に、線虫が化学感覚を受容し、それをどう処理し、いかなる行動を起こすことにより走性が達成されるかを明らかにする。

4) 個体間の行動の差異の分子的基盤と自発的神経活動の意義

遺伝的バックグラウンドが全く同一の線虫間で行動に差異が生じる原因を、神経細胞レベルで解析し、さらには関与する分子をみつける。

5) 多様な走性行動に関わる全神経回路の動作機構の解明

神経回路がさまざまな情報をどう処理するか、回路の動作機構を解明する。

＜得られた研究成果＞

A) 走性行動の機構について

まず研究項目 1)、3)について本項で記載する。

化学走性とは、生物が近くにある化学物質を感知し、その物質に誘引されてその方向に進んでいく行動、あるいは逆にその物質を忌避して遠ざかる行動である。線虫はさまざまな塩や匂い物質などに対して化学走性を示す。本研究開始にあたり、平成 20 年～21 年には、まず化学走性行動がどのような行動素過程により達成されているかを検討した。電動ステージにより一匹の線虫の動きを追跡するシングルワームトラッカーを用いて行動を定量的に解析した結果、以前に報告されていたピルエット機構に加え、風見鶏機構と名づけた機構が存在することがみつかった（図１a)。シミュレーションにより、この両者の機構が同時に働いたときに、最も化学走性の効率がよくなることがわかり（図１b)、これらの結果を論文として報告した（Iino and Yoshida, Journal of Neuroscience, 2009)。

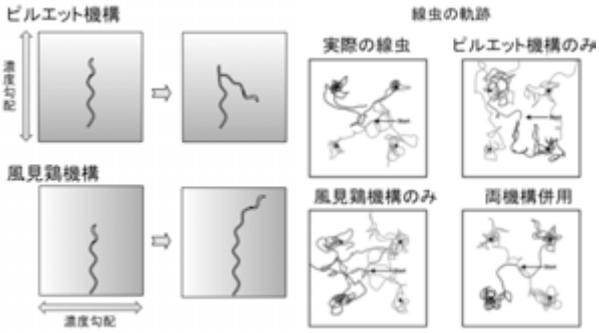


図１　(a)（左）塩走性の２つの機構　ピルエット機構：進行に伴って塩濃度が低下すると急激に方向転換を行う。風見鶏機構：進行方向に対し垂直方向に塩濃度の勾配があると、塩濃度の高い方にゆっくりカーブして進む。　(b)（右）塩をスポットした点（格子点）への化学走性行動。実際の線虫と、風見鶏機構、ピルエット機構の一方だけ、または双方が働いていると仮定した線虫の行動のコンピュータシミュレーション。

さらに、平成 21 年から 22 年にかけて、本領域計画研究班員の大久保、増田との共同研究で、寒天平板上の線虫の行動をより詳細に数理的に解析した結果、線虫のランダムウォークの際の曲率の分布が、通常仮定される正規分布ではなくロングテール分布に従うことがわかった。このことは、カーブして進む際に線虫が出す力の変動が力の大きさと比例することを示唆し、一般的に生物の行動をモデル化する際の重要な示唆を与えるものとなった（Ohkubo et al. J. Theor. Biol., 2010)。

一方、平成 20 年～24 年に、計画研究の石原らと共同で、匂いへの化学走性が匂いの濃度によって大きく変わることに注目して研究を進めた。すなわち、低濃度では誘引行動を引き起こす匂い物質は、いずれも高濃度で与えると忌避行動を引き起こした。人間においても、低濃度では好感を与える匂いであっても高濃度では不快な匂いとなる現象がしばしば見られる。今回着目した線虫の匂い応答はこの現象と類似している。

濃い匂いに対して線虫が忌避行動を行う際の行動機構について、本研究課題でセットアップしたマルチワームトラッカーを用いて解析した。これは多数の線虫の行動を同時に連続的に撮影し、この画像から個々の線虫の行動を定量化するものである。この解析により、濃い匂いから忌避行動を行う際には、線虫は匂いの濃度が上昇した際に方向転換を行う、つまり誘引時とは逆転したピルエット行動を示すことがわかった。面白いことに、風見鶏機構は誘引方向に働いており、忌避方向に働くピルエット機構と拮抗する形で行動を制御することがわかった。薄い匂いと濃い匂いへの誘引/忌避行動に関わる感覚神経を決定し、カルシウムイメージングによりそれらの神経の応答を調べた結果、薄い匂いは AWC 神経が受容する一方、濃い匂いには AWC 神経は応答せず、他の神経、ASH,AWB, ADL が濃い匂いに対して応答して忌避行動を引き起こすことがわかった（Yoshida et al. Nature Communications, 2012)。

B) 学習の機構について

次に研究項目 2)について記載する。

(1) 飢餓による学習

通常の培養条件で飼育した線虫は、NaCl などの塩に対して正の化学走性を示す。しかし、研究代表者らは、塩の存在下で線虫に飢餓を経験させると塩を忌避するようになることを本研究の開始以前にみつけ、この行動変化（塩走性学習とよぶ）にインスリン/PI3 キナーゼ経路の機能が重要であることを見いだしていた。インスリン受容体 DAF-2 および下流因子 AGE-1（PI3 キナーゼ)は、塩を受容する ASER 感覚神経で働くこともわかっていた。

この学習に欠損を持つ変異体を分離してその解析を進め、哺乳類のカルシンテニンのホモログをコードする *casy-1* 遺伝子に変異が起こっていることがみつかった。哺乳類カルシンテニンは脳で多く発現する膜貫通蛋白質である。さらなる解析の結果、線虫 *casy-1* も神経系で主に発現すること、*casy-1* 変異体が温度学習や匂い学習にも欠損を持ち、塩走性学習については ASER 感覚神経だけで正常型 *casy-1* を発現させると変異体の学習欠損を回復できることがわかった。これらの結果をまとめ、平成 20 年に論文に発表した（Ikeda et al, PNAS, 2008)。

平成 21 年以降、CASY-1 の機能を探る研究を続けた。*casy-1* 変異の抑圧変異体を分離したところ、PI3 キナーゼの逆反応を司る *daf-18*/PTEN の変異体が複数分離された。このことは CASY-1 とインスリン/PI3 キナーゼ経路の間に密接な関係があることを示唆した。

一方、インスリン受容体 DAF-2 についても研究を進めていたが、DAF-2 にはこれまで知られていなかったスプライシングアイソフォームが存在することがみつかった。このアイソフォーム

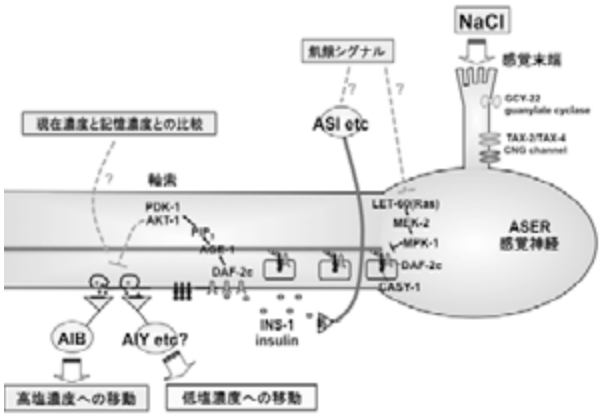


図２　ASER感覚神経におけるインスリン受容体DAF-2cの局在制御。DAF-2c は CASY-1 をアダプターとして軸索輸送され、シナプス領域に運ばれる。これは MAPK 経路により調節される。インスリン受容体の下流ではシナプス伝達が制御されることにより塩への行動が変化されると想定される。

(DAF-2c)は、特異的に ASER 神経の軸索部位に濃縮されて局在することがわかった。そこで、*casy-1* 変異体で DAF-2c 受容体の局在を調べたところ、軸索局在が見られないことがわかった。CASY-1 が DAF-2c の軸索輸送に関わることが示唆されたため、さらに分子的な解析を進めた結果、CASY-1 はキネシン１による DAF-2c の輸送の仲立ちをする積荷アダプターとして機能していることが明らかになった（図２、Ohno ら、投稿中)。

DAF-2 を中心とするインスリン経路については、共同研究により嗅覚学習における機能も調べた。*daf-2* 変異体は嗅覚学習もできず、嗅覚学習においては嗅覚神経で DAF-2 受容体が働くことが明らかになった。温度感受性 *daf-2* 変異体を用いた温度シフト実験より、*daf-2* は学習の成立時だけでなく、記憶の維持の間にも必要であることがわかった（Lin et al., Journal of Neuroscience, 2010)。

一連の研究結果から、インスリン経路は飢餓のシグナルを伝えている可能性がもっとも高い。上記の ASER 神経における DAF-2c の局在制御は、局在変化（軸索への蓄積）が記憶の分子実体の 1 つとして働き、軸索に局在したインスリン受容体にインスリンからのシグナルが作用することで、継続的に PI3K シグナルが入って忌避行動を起こさせるというモデルと矛盾しない（図２)。

インスリン/PI3 キナーゼ経路の活性が上昇した *daf-18* 変異体は、飢餓を経験させなくとも塩を忌避する。つまり、最初から塩走性学習後の状態のような行動となる。そこで、*daf-18* を抑圧する変異体を分離したところ、*egl-30* と *gcy-22* の変異体が分離された。*egl-30* は Gq α サブユニットをコードする遺伝子であり、分離された変異は活性化型変異であった。一方、*gcy-22* は受容体型グアニル酸シクラーゼをコードし、ASER 感覚神経の感覚受容に必須である。これらの解析の結果、飢餓学習により恐らく ASER の働きが変化することに加え、学習後の塩忌避行動には ASER のみならず、他の感覚神経の活動が必要であることが示唆された（Adachi et al. Genetics 2009)。

(2) 塩濃度の学習

一方、塩の認識に関しては本研究期間中に新たな展開が得られた。従来、線虫は生得的に塩（NaCl）を好むものと考えられてきた。しかし、塩濃度が非常に低い状態で飼育された線虫は、塩への走性を示さないことをみつけた。そこで塩濃度をより系統的にコントロールし、広い濃度勾配をもつテストプレート上で実験を行うと、線虫は以前に餌と共に飼育されていた塩濃度を好み、その塩濃度に向かうことがわかった。つまり、飼育時の塩濃度を学

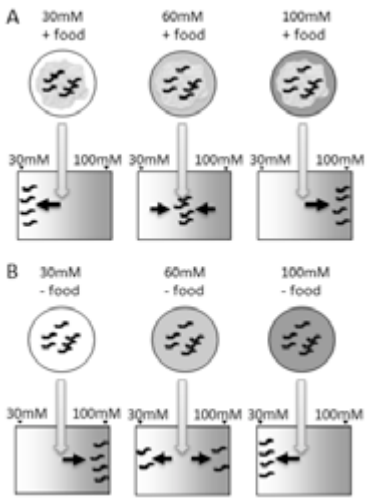


図３　塩濃度記憶による線虫の行動可塑性。塩濃度勾配上におかれると、餌と共に飼われていた線虫は飼われていた塩濃度に向かう。一方餌なしで飼われていた線虫はその塩濃度を避けるように移動する。

習記憶し、テスト時にはその記憶と現在の塩濃度を比較してどちらの方向に向かうかを決定していることが推定された。この塩濃度記憶は数時間持続することもわかった。さらに面白いことに、餌がない状況で一定の塩濃度で保持された線虫は、逆にその塩濃度を避けるように行動することがわかった（図３）。前項(1)で観察していた塩走性学習は、常に経験塩濃度より低い塩濃度領域での走性を観察していたために、塩の存在下での飢餓の後に塩濃度の低い方向に向かう行動しか観察されなかったものと理解できる。

以降、研究期間の終了まで、この学習の分子神経機構の解析を進めた。まず、どの感覚神経が関わるかを調べたところ、ASER 感覚神経が必要十分であることがわかった。次に ASER 神経の感覚受容をカルシウムプローブ GCaMP を用いて測定した。ASER 神経は塩濃度の低下に応答するが、応答の大きさは、それまで培養されていた際の塩濃度が高いほど大きいことがわかった。ASER 感覚神経は主に３つの介在神経、AIA, AIB, AIY にシナプス出力を送っている。これら３神経についても塩濃度変化に対する応答を測定したところ、特に AIB について面白い変化が見られた。AIB

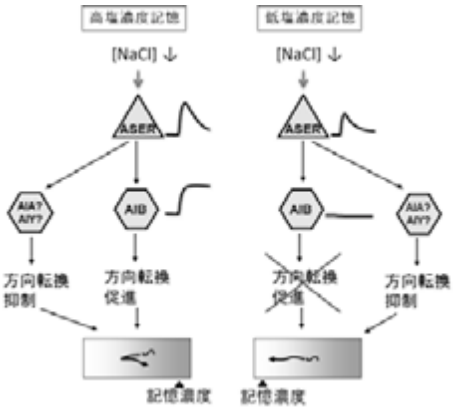


図４　高い塩濃度を記憶している線虫では塩濃度変化に対して ASER も AIB も応答する。しかし低い塩濃度を記憶している線虫は ASER は小さく応答し、AIB は応答しない。AIB は方向転換を引き起こすので、この違いがピルエット行動の違いを生み出し高塩濃度に向かう行動が起こるかどうかに反映する。

は ASER と同様に塩濃度の低下に応答するが、この応答は飼育された塩濃度が刺激に用いる塩濃度より高いときに起こり、より低い塩濃度で飼育された線虫においては AIB の応答が見られないことがわかった（図４）。

上述の Gq 経路について再度調べたところ、Gq/DAG/PKC 経路が活性化されると線虫は無条件に高い塩濃度に向かうことがわかった。また、これらの分子は ASER 神経で働くこともわかった。逆に、この経路を ASER 神経特異的に不活化すると、線虫は低い塩濃度に向かう。このことから、ASER 神経における Gq 経路の活性が線虫が向かう塩濃度を強く制御することがわかる。さらに、AIB 神経の応答は ASER 神経での Gq 経路の活性に依存して変わった。Gq/DAG/PKC 経路は他の神経で知られているように、ASER 神経のシナプス出力を制御することにより、塩走性行動を制御していると推定される。

行動機構についても調べた。ピルエット機構と風見鶏機構の関与を調べたところ、このいずれの機構も現在の塩濃度と記憶塩濃度の大小に応じて逆転することがわかった。

以上の結果より、塩濃度の記憶は ASER 感覚神経の中に形成され、ASER 神経からその下流の介在神経へのシナプス伝達が変化することによって記憶に依存した行動を変化させるものと結論される。以上の結果をまとめて投稿中である。

では飢餓学習の後には神経活動はどうなるのであろうか。ASER と AIB について、飢餓下で塩に曝した後に応答を測定したところ、やはり AIB の応答がなくなることがわかった。従って、飢餓後の塩忌避行動も同様の ASER シナプスの変化に依存している可能性が示唆される（Oda et al. Journal of Neurophysiology, 2011）。ただし、前述のように、飢餓後の行動は、ASER 以外の感覚神経も関与した複雑な行動であることが推定される。

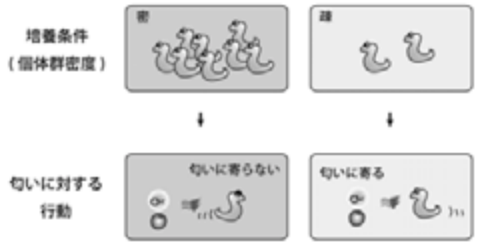
(3) 嗅覚学習

匂いに対する行動の可塑性についても研究を進めた。前述のように、線虫はさまざまな匂い物質に対し、低濃度では誘引行動を示す。ところが、餌の非存在下で同じ匂いに一定時間曝されると、匂いへの走性を失い、場合によっては忌避行動に転じる。これを嗅覚学習（または嗅覚順応、嗅覚可塑性）と呼ぶ。研究開始以前より嗅覚学習の変異体を多数分離しており、本研究期間内に原因遺伝子の同定と機能解析を進めた。

その中のひとつ、*gpc-1* は G 蛋白質のγサブユニットをコードすることがわかった。線虫のゲノムには *gpc-1* と *gpc-2* の２つのγサブユニット遺伝子があるが、*gpc-1* は特定の感覚神経にだけ発現し、感覚神経の可塑性を制御していると推定された。*gpc-1* 欠損変異体では嗅覚可塑性が失われるのに対し、*gpc-1* をβサブユニット *gpb-1* とともに嗅覚神経に高発現させると匂いへの走性が低下した（Yamada et al. Genetics 2009）。

嗅覚学習の研究の過程で、嗅覚学習の程度が、飼育時の線虫の個体数（個体群密度）によって変わることをみつけた。より詳しい解析の結果、この現象にはフェロモンが関わっていることが明らかになった。線虫のフェロモンはアスカロシドと呼ばれる五炭糖の誘導体であることが分かっている。フェロモンは線虫が構成的に分泌しているが、フェロモンを分泌できない変異体を用いた実験や合成フェロモン添加実験などから、個体群密度が高いときにはこのフェロモンが個体相互間で働いて嗅覚学習を促進することがわかった。

この制御の分子機構については、嗅覚学習欠損変異体のひとつからヒントが得られた。この変異体の原因遺伝子、*nep-2* は哺乳類のネプリライシンファミリーのホモログをコードする。ネプリライシンは GPI により細胞表面にアンカーされ、細胞外で働くペプチダーゼである。*nep-2* の抑圧変異体を分離したところ、



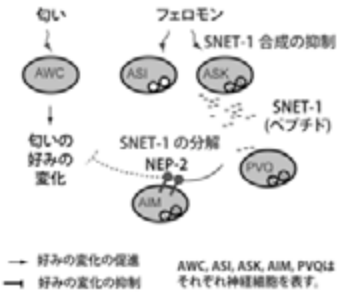


図５　個体間相互作用による嗅覚学習の制御　（上）個体群密度が高いと嗅覚学習が強く起こり匂いに寄らなくなる。（下）フェロモンによる嗅覚学習の制御のモデル。ASI 感覚神経と ASK 感覚神経での SNET-1 ペプチドの発現がフェロモンにより負に制御される。SNET-1 は嗅覚学習を負に制御する一方、NEP-2 による分解によって調節される。

SNET-1 というペプチドをコードする遺伝子の変異体が得られた。遺伝学的な関係から、SNET-1 は NEP-2 が切断するペプチドであると推定された。さらに、*snet-1* は感覚神経 ASI を含むいくつかの感覚神経で発現し、ASI での *snet-1* の発現はフェロモンにより抑えられることがわかった(図５)。

以上より、フェロモン受容のシグナルは体内ペプチド SNET-1 により行動制御に結びつけられることが分かった。線虫は個体群密度の高低によって微妙に行動を制御し、集団としての種の生存に有利なように行動していることが推定された（Yamada et al. Science 2011)。

C) 走性行動に関わる神経回路について

A)で述べたように、2 つの機構の協調により塩や匂いへの化学走性が達成される。この神経回路を明らかにするために、レーザーで個々の神経を破壊する実験を行った。この結果、感覚神経 ASER の重要性に加え、介在神経 AIZ が必須であることがわかった（Iino and Yoshida, Journal of Neuroscience, 2009)。引き続き平成 23～24 年度に他の神経についてもレーザー破壊実験を行い、首振り行動を制御する SMB 神経が風見鶏行動とピルエット行動の両者に必要であることがわかった (Yoshida ら未発表)。

AIB 神経については、レーザー破壊や遺伝学的細胞破壊により、ピルエット行動が低下するが、風見鶏行動や化学走性の効率には有意な影響を与えないことがわかった (Iino and Yoshida 2009, Kunitomo ら投稿中)。

本領域公募班員の橋本らと共同で、線虫を追尾しながら光照射を行う装置を平成 22 年度に作成した。この装置は、線虫の姿勢を自動認識し、リアルタイムに判断を行って特定のタイミングでのみ光照射を行うことができる。この装置を用い、チャネルロドプシンを ASER または ASEL 神経に発現させた線虫に光照射を行ってその神経を活性化させる実験を行った。これによって、風見鶏行動を再現させることができた（Satoh ら未発表)。

線虫が飼育されていた塩濃度を記憶し、行動を変化させる行動には、上記のように ASER、AIB、AIZ、SMB 神経が関わることがわかったが、この行動制御に関わる神経回路の全貌は未だ明らかではない。そこで、より多くの神経の活動を観測するために、本領域の支援班で設置された共用設備である 4D イメージングシステムを用いて多数の神経の同時測定を行った。この結果については引き続き解析中である。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)はこれまでに誰も気がついていなかった走性機構を発見したもので、他の生物を含めても、2 つの機構を併用して走性行動を行うことが明確に示された唯一の例となった。研究対象としても面白いので、世界的に高い評価を受け、その機構を理論的、実験的に調べる研究も最近いくつか発表されている（McCormick et al., PLOS One 6(10), e25710, 2011; Kocabas et al. Nature 490, 273, 2012)。

一方、B)(2)についてはハーバード大学のグループが同様の発見をしていることがわかっており、相互に調整をしつつ論文投稿を行っている状態である。線虫が化学物質の濃度を記憶できること、記憶濃度と実際に感じている濃度の比較を行い行動を正負に変化させること、さらに、餌の状態との連合により行動が逆転することなど多次元の行動制御があることが明らかになり、今後の研究の枠組みを変える報告になると予想される。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画の4)（行動の個体差、自発行動）については、計画当初に、個体ごとに、かつリアルタイムに神経活動と行動の両者を同時観察する必要があると判断し、これを達成するための装置の開発から着手した。本研究公募班員の橋本らと共同で進めることとし、彼らとホークビジョン社が開発した高速トラッキングのハードウェア、ソフトウェアを導入し設置した。このセットアップを平成21年～22年度にかけて行い、その後、この装置を研究成果C)の研究(前述)に転用し、そのためのセットアップを行った。次に、トラッキングに伴う焦点面の変動の問題を軽減するために、マイクロフルイディクスを用いたPDMS素子を用いることにした。これを稼働させるために予想外の時間がかかり、平成24年までかけてようやく稼働の目途が立ったため、現在実験を行っているところである。

研究計画2)④のモノアミンシグナルについては、領域の中間評価の際に種間比較のためにドーパミンなどのモノアミンの役割を検討してはどうかとの指摘があり研究計画に追加した。セロトニンの添加により塩走性学習が低下することは以前に観察していたが、ドーパミン、セロトニンなど一連のモノアミンの合成系や受容体の変異体では顕著な異常を生じなかった。唯一、オクトパミンの変異体で異常が認められており、現在も引き続き研究を進めている。

＜今後の課題、展望＞

本研究は主に線虫の化学走性行動に焦点を絞って神経回路の動作原理を解明する研究を進めたが、本研究の結果により、線虫の行動および学習と行動可塑性について、分子から神経回路、行動まで包括的な理解が進んだ。ただし、神経回路の理解は感覚神経を中心とした神経群の一部について達成されたのみで、未だ同定されていない重要な神経があることも明らかである。また、運動制御回路の理解もまだこれからである。本研究領域の共同利用設備として4Dイメージングシステムが設置され、ハードウェア、ソフトウェア両面で技術開発が行われて神経系の全体を時系列で観測できるようになった。我々の系においてもこの装置を利用し、解析を開始したところである。今後、本研究を基盤にして神経系全体の測定を行うことにより、神経回路による記憶保持と発現、行動制御の機構がより包括的に明らかにされると期待できる。

計画研究：２００８年度-２０１２年度

神経回路における感覚情報処理の制御機構の解明

研究代表者：石原　健

九州大学大学院理学研究院生物科学部門

＜研究の目的と進め方＞

動物は、外界からの様々な情報を中枢神経系で処理し、環境に適切に応答している。このような情報処理は、多数の神経細胞で構成された神経回路の構造に依存しているが、環境や経験によって常に変化している。このためには、中枢神経系において柔軟に制御される必要がある。我々は、単純な神経回路を持つ線虫 *C. elegans* の行動を指標にして、高次神経機能の元になる情報処理の素過程を、分子レベルと神経回路レベルとを結びつけて明らかにすることを目指した。

線虫 *C. elegans* は、302 個からなる単純な神経回路の構造が明らかになっているだけでなく、体が透明でイメージングによる神経活動の測定が可能である。さらに、行動の測定が容易で、分子遺伝学的解析により行動を制御する分子メカニズムの解析も可能である。

本研究においては、主に以下の研究を進めることによって、情報処理を制御するメカニズムを明らかにすることを目指した。

A)行動選択に関わる感覚情報の統合の制御

二つの情報から一つの出力という最も単純な情報処理の一つについて、行動選択の測定系を用いて、分子遺伝学的解析を進める。これにより、情報処理の制御を担う分子・神経回路を明らかにする。

B) 記憶の忘却の制御機構

感覚情報を学習することによって記憶が形成される。この記憶は、固定化され長期記憶となる場合もあるが、多くは時間とともに忘れられる。これまで、学習に関わるメカニズムは様々な系で解析されてきたが、忘却の制御に関わるメカニズムはほとんど明らかになっていなかった。そこで、線虫の行動可塑性を用いた遺伝学的解析により、忘却を制御する分子・回路メカニズムを明らかにすることを目指した。

C) 線虫における多数のニューロン活動の同時計測

これまで、カルシウム感受性蛍光タンパク質を用いたカルシウムイメージングにより線虫の神経活動を測定することが行われていたが、顕微鏡で同時に観察できるのは同一平面上にある神経細胞だけである。そのため、線虫の中枢神経系のように、３次元的に配置されていると、複数の神経細胞を同時に観察することができなかった。そこで、3 次元に配置された中枢神経系全体を高速に観察するシステムを構築し、複数の神経細胞の同時観察を目指した。

D) 神経機能と体内環境との相互作用

動物は、様々な感覚応答を、そのときの体内の環境条件などに依存して変えている。その反対に、感覚応答に依存して体の大きさなどの体内環境を制御していると考えられる。しかし、感覚応答と体内環境の相互作用について、その分子機構も含めて不明な点が多い。そこで、感覚入力に依存して体の大きさを決定するメカニズムと、成長過程に依存して感覚応答が変化するメカニズムについて、分子遺伝学的解析により感覚応答と体内環境とを結ぶメカニズムを明らかにすることを目指した。

＜研究計画＞

A) 行動選択に関わる感覚情報の統合の制御機構

本研究では、二つの異なる感覚刺激に対する応答の選択のメカニズムを解析した。線虫は、匂い物質ジアセチルに対して誘引応答を示し、銅イオンに対して忌避応答を示す。そこで、銅イオンを越えないとジアセチルに近づけない行動測定系を用いて、2 つの感覚刺激を比較し、銅イオンに対する応答をジアセチルに対する応答より優先する変異体をとして、分泌タンパク質 HEN-1、その受容体と考えられる受容体チロシンキナーゼ SCD-2、受容体型グアニル酸シクラーゼ GCY-28 を分子遺伝学的に同定してきた。本研究においては、これらのタンパク質が、どの神経細胞でどのように行動選択を制御しているのかを、主に分子遺伝学的手法を用いて明らかすることを目指した。

B) 記憶の忘却の制御機構

線虫では、ほとんどの行動可塑性は数時間以内に失われる。本研究では、強い匂い刺激に曝した結果起こる嗅覚順応をモデルとして研究を進めた。ジアセチルに対する嗅覚順応の記憶は約４時間で失われる。これまでに、嗅覚順応が４時間以上保持される変異体を同定していた。そこで、この変異体の原因遺伝子の同定及びその機能解析を通じて、嗅覚順応の忘却制御機構を分子レベル・神経回路レベルで明らかにすることを計画した。

線虫は、ブタノンに対して弱い誘引性の応答を示すが、餌の存在下にブタノンで条件付けするとブタノンに対する応答が強くなるブタノンエンハンスメントと呼ばれる行動可塑性を示す。このブタノンエンハンスメントが起きた線虫を、餌の上で飼育すると、ブタノンを忌避するようになる。このようなブタノンに対する応答の変化は、ブタノンエンハンスメントの記憶の書き換えに伴うの記憶の消去（extinction）の一種と考えられる。そこで、ブタノンエンハンスメント後の記憶の消去が起こらない変異体の単離と解析により、記憶の消去に関わる分子メカニズムを明らかにすることを計画した。

C) 線虫における多数のニューロン活動の同時計測

線虫の中枢神経系は、高倍の対物レンズを用いて観察した際に、一つの視野に収まる。従って、画像取得と同期した対物レンズの高速移動とニポウディスク式共焦点装置を組み合わせ、多数の焦点面の画像を撮影することにより、3次元に配置された神経活動の全体像を観察することができるシステムを確立することを計画した。

このシステムを用いて、PDMSで作成した微小流路に、複数の神経細胞においてカルシウム感受性タンパク質を発現させた線虫を導入することによって動きを止め、その神経活動を同時に測定することとした。

D) 神経機能と体内環境との相互作用

線虫においては、感覚入力が失われると体が小さくなることが知られている。この小ささを抑圧する変異体として *chb-3* を同定した。この CHB-3 は、zf-MYND モチーフを持つ高等生物まで保存

されたタンパク質であった。そこで、本研究においては、CHB-3タンパク質の機能解析を行うことによって、感覚入力が体内環境を制御するメカニズムを明らかにすることを計画した。

動物は、生殖腺の発達の状況に行動を変化させることが多い。線虫においても生殖細胞を除去すると、特定の匂い物質ジアセチルに対する応答のみが影響を受けることがわかった。このことは、生殖細胞から、神経細胞の機能を制御するシグナルがでている可能性があることを示している。本研究においては、生殖細胞による感覚応答の制御メカニズムを明らかにするために、 温度感受性 *glp-1* 変異体(制限温度でのみ生殖細胞がない)を用いたスクリーニングによって、匂い物質ジアセチルに対する応答が生殖細胞の影響を受けない変異体を単離し、その原因遺伝子の解析を進めることによって、生殖細胞に依存した応答変化のメカニズムを明らかにすることを計画した。

E) “注意”を制御するメカニズム

行動解析の結果から、線虫が走性行動を示しているときには、他の感覚刺激に対する応答が抑制されていることが推定される。これは、予めある感覚刺激に応答していると、それ以外の感覚シグナルを神経回路上で遮断する機構があることを示していると考えている。そこで、走性中に他の刺激に応答してしまう変異体の単離解析によって、“注意”の分子メカニズムを明らかにする。

＜得られた研究成果＞

A) 行動選択に関わる感覚情報の統合の制御機構

2つの感覚刺激の情報を統合に異常を示す変異体として、誘引性匂い物質ジアセチルに対する応答に比べ忌避物質銅イオンに対する応答を優先する変異体 *gcy-28* を同定していた。この原因遺伝子は、受容体型グアニル酸シクラーゼをコードしている。この遺伝子には、オルタナティブスプライシングにより、4つのアイソフォームが知られていたが、このうち d サブタイプが AIA 介在ニューロンでのみ発現していること、d サブタイプ特異的な変異体が行動選択に異常を示すこと、d サブタイプを AIA ニューロンで発現させることによって全てのサブタイプを失った gcy-28 変異体の行動選択の表現型を回復できることなどから、AIA 介在ニューロンで GCY-28.d が機能することによって、感覚情報の統合が制御されていることが推定された。さらに、GCY-28 の下流で、cGMP 依存性カチオンチャネルが働いていることも明らかにした。一方、我々が以前に同定した HEN-1 の受容体と推定される受容体チロシンキナーゼ SCD-2 も AIA 介在ニューロンで特異的に発現させることによって、行動選択の表現型を回復することから、AIA 介在ニューロンで機能していることが推定された。そこで、SCD-2 と GCY-28 が同じ経路で働いてくるかを、二重変異体を作成して調べたところ、独立して働いていることが明らかになった。AIA ニューロンは、ジアセチルを受容する AWA ニューロンギャップジャンクションで、銅イオンを受容する ASH ニューロンからシナプス結合でつながっている。これらのことから、AIA ニューロンで二つの感覚情報の統合が起きていると推定された。

次に、分子遺伝学的手法を用いて、AIA 介在ニューロンをなくした線虫や、AIA を不活性化した線虫を作成し、行動表現型を解析した。これらの線虫は、ジアセチルへの応答よりも銅イオンからの忌避応答を優先していた。

野生型では、AIA ニューロンが GCY-28 や SCD-2 に依存して、AIB ニューロンを抑制することによって、銅イオンからの行動を抑制している。一方、*gcy-28・scd-2* 変異体や、AIA ニューロンを不活性化した場合には、AIB ニューロンの抑制機構が働かないために、銅イオンからの忌避反応が抑制されると考えられる（図１）。 本研究成果は、高等動物における意思決定（Decision Making）の制御に関わる神経・分子メカニズムを研究する上での基盤として重要であると考えている。

これらの結果は、国際学会などで発表したほか、学術論文として発表した（Shinkai et al. Journal of Neuroscience 2011）。

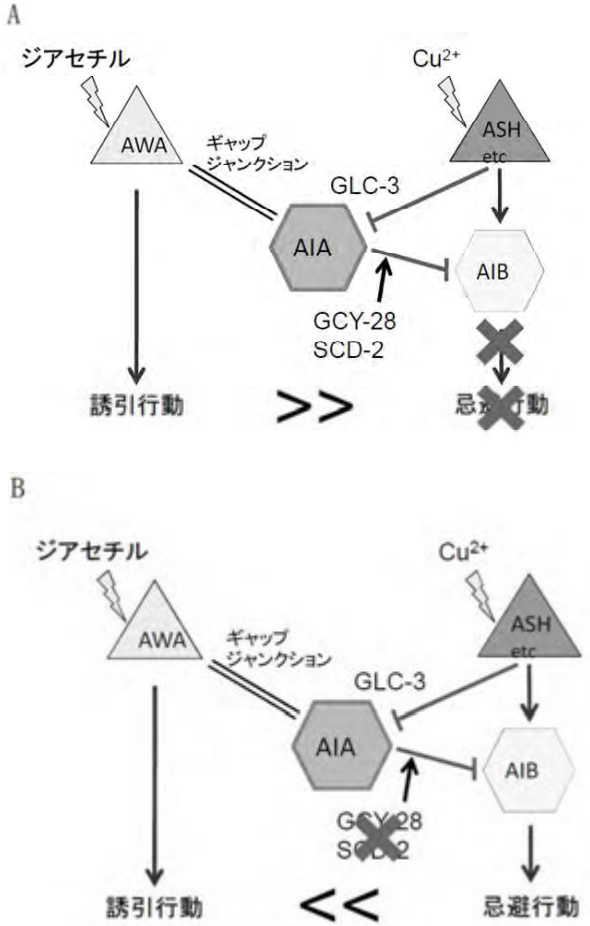


図１　行動選択を制御する神経回路モデル

B) 記憶の忘却の制御機構

AWA ニューロンで受容される匂い物質ジアセチルに対する嗅覚順応の記憶を忘れにくい変異体として同定した *qj56* 変異体(図２)の原因遺伝子を決定したところ、*tir-1* というアダプタータンパク質をコードする遺伝子であることがわかった。この TIR-1 のオルソログ SARM は、哺乳類の脳でも発現していることが知られているがその機能は明らかになっていない。線虫においては、TIR-1 は、p38MAPKKK である NSY-1 の上流で働き、自然免疫や神

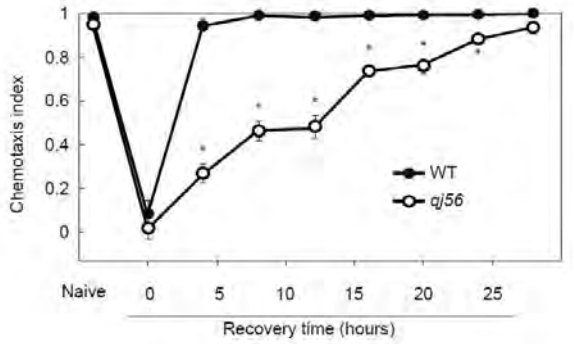


図２　嗅覚順応の記憶を忘れにくい変異体の表現型

経分化の制御に関わっていることが知られていた。そこで、このシグナル経路が記憶の忘却を制御しているかを解析した。分子遺伝学的なエピスタシス解析の結果、NSY-1, SEK-1, JNK-1 がこの順に働いて、忘却を制御していることがわかった。そこで、このシグナル経路が働くニューロンを、神経細胞特異的な表現型回復実験によって調べたところ、AWC ニューロンで働いていることが明らかになった。

次に、ジアセチルを受容する AWA ニューロンにおける、ジアセチル刺激に対する神経応答をカルシウムイメージングによって測定した。野生型および *tir-1* 変異体において、AWA ニューロンにおいて、Ca^{2+}感受性蛍光タンパク質を発現させ、ジアセチル刺激に対する応答を、嗅覚順応前、直後、４時間飼育後に測定した。嗅覚順応の条件付け前は、ジアセチル刺激により細胞内カルシウム濃度が上昇したが、条件付け後にはそのような応答が観察されなかった。その後、４時間餌の上で飼育すると、野生型では、ジアセチルに対する応答は回復したが、*tir-1* 変異体では応答は回復しなかった。このような感覚応答の表現型は、TIR-1/JNK-1 を AWC ニューロンにおいて発現させることによって回復した。これらのことから、嗅覚順応とその回復は、AWA ニューロンの感覚応答によって説明できること、AWC ニューロンにおける TIR-1/JNK-1 経路が、主に AWA ニューロンの神経応答の変化を制御することによって、調節されていることを示している。

そこで、AWC ニューロンで働く TIR-1/JNK-1 経路が、どのようにして AWA ニューロンにおける神経応答の回復を制御しているのかを明らかにするために、AWC ニューロンを不活性化した線虫を作成して忘却を調べたところ、記憶を忘れにくくなっていた。さらに、AWC ニューロンからの分泌を抑制した場合にも記憶を忘れにくくなるのに対し、分泌を促進すると *tir-1* 変異体の忘れにくくなる表現型が回復した。これらのことは、AWC から記憶の忘却を促進するシグナルが分泌されることによって、忘却が制御されていることを示している(図３)。

次に、記憶の忘却が環境によって制御されているかを調べた。嗅覚順応の条件付け後に、餌がない条件で記憶を忘れさせると、AWC 神経がない線虫では記憶を忘れにくいが、TIR-1/JNK-1 経路の変異体では記憶を忘れることがわかった。このことは、餌がない条件では、TIR-1/JNK-1 経路に依存しないで忘却促進シグナルが分泌されていること、餌があると忘却促進シグナルの分泌が抑制されること、TIR-1/JNK-1 経路がこの抑制を抑制することによって、結果的に忘却促進シグナルの分泌を促していることが示唆された。

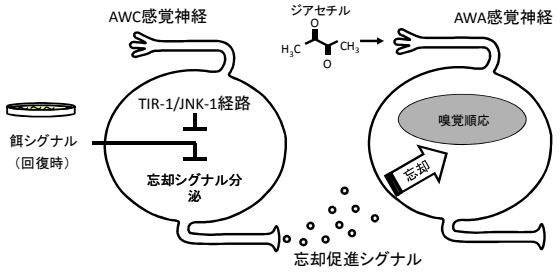


図３　忘却制御のメカニズム

これらの結果は、忘却には能動的な制御メカニズムが存在していること、それが神経間コミュニケーションによって担われていることを示している。本研究の成果は、高等動物で忘却を制御するメカニズムを解析する基盤として重要であると考えている。

これらの結果をまとめ、国際学会などで発表したほか、学術論文として発表した（Inoue et al. Cell Reports 2013)。

ブタノンエンハンスメントの記憶が保持される変異体として同定した *qj74* について原因遺伝子を同定したところ、*snt-3* 遺伝子であることがわかった。SNT-3 は、シナプトタグミンと類似した分子ではあるが、膜貫通領域がないなど通常のシナプトタグミンとは異なるドメイン構造をとっているタンパク質である。この遺伝子の GFP 融合遺伝子を作成したところ、ほとんど神経細胞で発現していた。そこで、神経細胞特異的な表現型回復実験を行ったところ、ブタノンを受容する AWC ニューロンにおいて SNT-3 が働いていることが推測された。

次に、忘却過程おける AWC ニューロンの感覚応答をカルシウムイメージングによって解析した。ブタノンを主に受容している AWC^{ON} ニューロンにおいて、ブタノンエンハンスメントの条件付け後にはブタノンに対する応答が強くなっており、その変化は餌の上で飼育しても変わらなかった(図４)。このことは、ブタノンエンハンスメントの条件付け後に飼育した時に忌避するようになるという行動の変化は、感覚応答に寄るものではないことを示唆している。

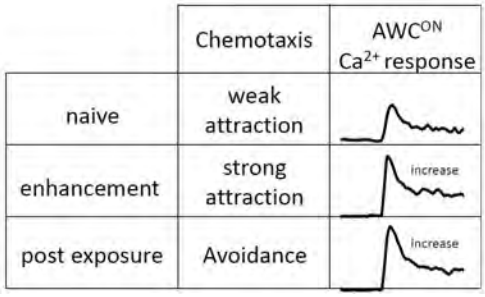


図４　ブタノンエンハンスメントにより起こる感覚ニューロンの応答の変化

これらの結果は、ブタノンエンハンスメント後のブタノンに対する行動の変化は、記憶の書き換えに伴う消去によく似た現象であることを示唆している。これまで、忘却と同様に記憶の消去に関するメカニズムにも不明の点が多く、この解析により、記憶の消去の分子基盤が明らかになることと考えている。

本研究の成果は、国際学会などで発表している。

C) 線虫における多数のニューロン活動の同時計測

３ 次元的に配置された複数の神経細胞の活動を、カルシウムイメージングによって同時に測定するために、ニポウ式共焦点顕微鏡と対物レンズ高速移動を同期するシステムを構築した。

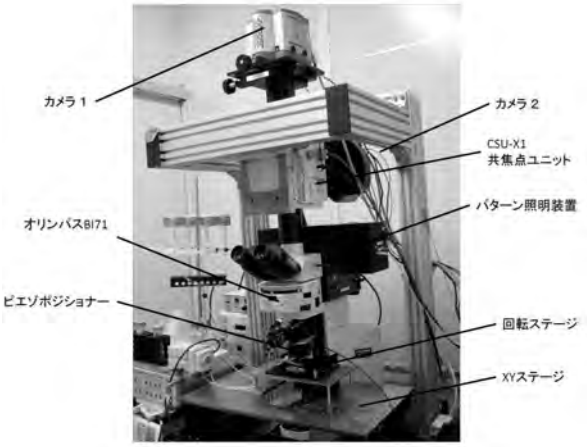


図４　４Dイメージングシステムの外観

カルシウムイメージングのためには、FRET 型プローブを用いることから、2 波長同時に画像を取得することが必要である。そのため、２台のカメラをμm 単位で位置あわせする装置を作成し、位置ずれがない 2 波長の画像を同時に取得できるようにした。このシステムを用いることで、毎秒約 40 枚の画像を取得し、その画像から約３立体を構築することができる。

このシステムを用いて、PDMS で作成した微小流路中の線虫の中枢神経系の神経活動を、カルシウム感受性蛍光タンパク質を用いて、測定した。この撮影画像から神経活動を解析するために、この撮影中に線虫が移動することを補正するための神経細胞のトラッキングや立体画像での FRET 解析を行うためのプログラムを作成した。これにより、３次元的に配置された複数の神経細胞の活動を同時に測定することができるようになった。

このシステムを用いて、行動選択を担う情報の統合に関わる神経回路について、複数ニューロンの同時観察をおこなった。その結果、AWA ニューロンと AIA ニューロンとは、ジアセチル刺激によって同時に活性化すること、AIA ニューロンと AIB ニューロンとは、鏡像のように、片方が活性化しているときには、もう一方が抑制されているという応答を示した。これらの結果は、図１のモデルの神経回路の働きをよく説明していると考えられた。

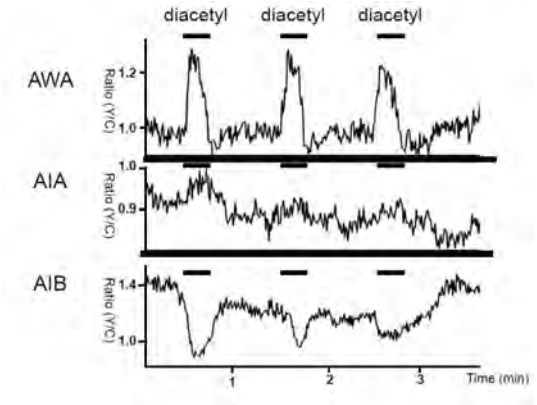


図５　行動選択を制御する神経回路の同時イメージング

次に、多数のニューロンの活動の同時イメージングを行った。pkc-1 プロモーターを用いて数十個のニューロンに Ca2+感受性蛍光タンパク質を発現させた線虫を、このシステムで観察した。多数の神経細胞の同時イメージングを行うことができた。このシステムを利用することにより中枢神経系全体の情報処理を可視化できるのではないかと期待している。

本研究の成果は、国際学会などにおいて発表した。

D) 神経機能と体内環境との相互作用

感覚繊毛が失われた変異体における体の小ささを抑圧する変異体として受容体型グアニル酸シクラーゼ GCY-12 の変異体を同定した。GCY-12 と GFP の融合タンパク質を線虫の感覚ニューロンに発現させたところ、野生型においては感覚繊毛に局在していたが、*chb-3* 変異体においては感覚繊毛への局在が失われていた。そこで、GCY-12::GFP 融合タンパク質を用いて、樹状突起での輸送をタイムラプス観察により測定した。その結果、*chb-3* 変異体では、GCY-12::GFP タンパク質の輸送が、速度・頻度とも低下していることがわかった。この表現型は、野生型 CHB-3 の同じ細胞での発現で回復することから、細胞自律的であることが示唆された。これらのことから、zf-MYND を持つ CHB-3 が、感覚応答に必要なシグナル経路のタンパク質の樹状突起内で内輸送の制御をしていると考えられる。

本研究の成果は、国際学会で発表したほか、学術論文(Fujiwara et al., Pros Genetics, 2010)として発表した。

動物において、成長につれて同一の感覚刺激に対する応答が変化することがある。本研究においては、線虫が幼虫から成虫になる過程でジアセチルに対する応答性が高くなることも見いだした。生殖腺の成熟がそれを担っていることを示唆している。そこで、生殖腺がないときでも、ジアセチルに対する応答行動が変化する変異体をスクリーニングし単離した。この変異体を、全ゲノムシークエンスにより解析し、原因遺伝子候補を絞り込んだ。さらに、RNAi による網羅的スクリーニングにより、ミトコンドリアにおける ATP 合成が関係していることが明らかになった。今後、これらの変異体の分子遺伝学的解析によって、成長に伴う体内環境の変化に依存した感覚応答のメカニズムが明らかになることと考えている。

本研究の成果は、国際学会などで発表している。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果 A の行動選択を制御する感覚応答のメカニズムについては、意思決定を担う微小神経回路を決定した研究として、先駆的な研究であると詳しく紹介されている(Faumont et al. Current Opinion of Neurobiolgy, 2012)など、今後の行動選択や意思決定を担うメカニズムを解析する上での基盤として重要であると考えられる。

研究成果 B の記憶の忘却の制御機構に関しては、能動的な忘却制御メカニズムがあることを示しただけでなく、外部環境によって忘却が制御される仕組みの存在も示唆する成果である。これまで、記憶の形成や維持に関わる制御機構が中心に解析されてきたが、今後の忘却も含めた記憶の全体像の解析の中で重要な基盤となる研究成果であると考えている。

研究成果 C の線虫における多数のニューロン活動の同時計測については、これまで例を見ないシステムを構築した。今後、このシステムを用いて、線虫の中枢神経系全体の同時イメージングを行うことが可能になると考えている。この中枢神経系全体の同時イメージングは海外でも注目を浴びている分野で有り、今後競争が激化すると考えている。

研究計画 D の神経機能と体内環境との相互作用については、樹状突起におけるシグナル分子輸送の新しい制御システムを見つけたものである。耐性幼虫の形成に関わる変異体で同じ分子を独立して見つけたグループ(Jensen et al. Pros Genetics 2010)がいることもあわせ、今後哺乳類での機能解析などに発展することが期待される。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画 E の“注意”を制御するメカニズムについては、様々な感覚刺激を用いたり、行動測定のパラダイムを工夫したりしたが、再現的な結果が得られる測定系が開発できなかったため、変異体のスクリーニングをすることができなかった。そのため、研究を中止した。

＜今後の課題、展望＞

本研究の成果は、単純な情報処理である感覚情報の統合や、単純な行動可塑性の忘却などをモデルとして、感覚情報処理の基盤となるメカニズムを分子レベル・神経回路レベルで明らかにしたものである。本研究を通じて明らかになった、忘却促進シグナルの実体の解明などにより、詳細なメカニズムが明らかになる。さらに、中枢神経系全体のイメージングシステムが確立したことにより、情報処理の全体像の可視化に結びつけていきたい。

複数感覚入力に対する行動選択の神経回路

研究代表者：新貝　鉚蔵[1)]　研究分担者：岩崎　唯史[2)]　研究分担者：若林　篤光[1)]

1)岩手大学工学部　2) 茨城大学工学部

＜研究の目的と進め方＞

計測と数理的解析・モデル化により、C.エレガンスに２種類の誘引性感覚刺激（温度と化学物質の組合せに重点を置く）を同時に与えた場合の行動選択の神経系制御機構に関する次の研究を行う。

１）行動選択の神経メカニズムを、一匹毎の線虫の詳細な行動解析と細胞内 Ca^{2+}濃度変化計測により解明する。特に誘引性温度が化学走性に与える影響の神経機構を解明する。

２)特定のニューロンに異常を持つ変異体及び行動選択に関する変異体の表現型を解析する

３）走性データの統計解析と数理モデルの作成・解析により行動レベルで制御機構を解明する。

４）少数ニューロンからなる回路モデルの作成・解析により、行動選択の制御機構を解明する。

５）全ニューロンを考慮した回路モデルの作成・解析により神経系全体からの考察を行う。

＜研究計画＞

１）行動選択の神経メカニズムを解明する目的で、一匹毎の線虫の詳細な行動解析を行う。その為に本研究課題で開発する行動解析ソフトウエアを活用する。野生種について、温度と塩の感覚を同時に刺激した場合、および匂いと塩の感覚を同時刺激した場合を解析する。また、酸忌避行動の解析により、後退とターンのどちらを線虫が採るかの行動選択に関する研究を行う。2 種類の外部刺激に対する細胞内 Ca^{2+}濃度変化を測定する目的で、感覚ニューロン及び介在ニューロンにカルシウム濃度依存性蛍光蛋白質 G-CaMP2 を発現する線虫系統を複数系統作製する。蛍光画像解析システムを用いて、感覚刺激に対する感覚ニューロンまたは介在ニューロンの細胞内 Ca^{2+}濃度変化を測定する。細胞内カルシウムイオン濃度変化を計測し、2 入力の神経系内での相互作用を解明する。

２)これまでに作成した細胞破壊系統および既存の変異種を用いて、温度と塩の感覚を同時に刺激した場合、および匂いと塩の感覚を同時刺激した場合について、行動解析を行い、行動選択における夫々のニューロンの役割と行動選択の神経機序を調べる。

３）　走性データの統計分析を行い、モデル化を行う。初めに誘因物質の濃度勾配が無い条件下での行動を解析する。次に、2 誘因刺激に対する選択行動を解析する。走性データの統計分析を行うためのコンピュータプログラムを整備する。処理結果を元に行動のモデル化を進め、実験と比較することによりモデルの仮説の正否を確認する。

４)単一感覚ニューロンの細胞内カルシウム濃度変化モデルを作成する。その結果を組込み、且つ報告されている感覚刺激応答を実現する小規模な神経回路モデルを作成する。統計物理学的手法により部分神経回路に対する有効理論を展開する。

５)種々の感覚刺激に反応する大規模回路モデルの構築とその解析により、線虫神経系全体からの考察を行う。実験事実に矛盾し無い感覚刺激に対する応答を実現する。特に、細胞内カルシウム濃度変化計測データをモデルに取入れる。また、誘引・忌避刺激に対して前進・後退及び首振り運動を行う頭部神経回路モデルを作成する。多刺激に対する行動選択の神経系制御モデルを目指す。全ニューロンから成る神経回路構築の作業を進め、全神回路モデルの完成を目指す。さらに、全シナプス結合の位置情報を付加した神経結合データベースのデータ書式を決定し、データベース構築を進め、より高精度のモデル作成の基盤を作る。

＜得られた研究成果＞

A）平成２０年度にから２４年度まで研究計画の項目１）および２）について次の研究を進めた。移動運動・化学走性・温度走性の行動データの統計解析によって行動選択の神経メカニズムを解明する目的で、一匹毎の線虫の行動を詳細に解析するための解析ソフトウエアを充実させた。即ち、前進・後退・停止状態をコンピュータソフトウエアでの自動認識を高い精度で可能にした。虫の動きの向きなどの特徴量の抽出、運動方向転換（ピルエット）の自動認識をほぼ完成させた。2 つの誘因刺激に対する行動選択の研究の基礎として、一様な誘因物質存在下で他の誘引物質への走性行動を調べた。虫の動きの速さ・方向転換などの行動解析を行い、且つ細胞内カルシウムイオン濃度変化を計測した。その結果、塩と誘引性匂いの 2 つの感覚情報が神経系内で相互作用することを見出した。細胞破壊系統および既存の変異種を用いた行動を含めて、これらをまとめて学術論文として投稿中である。

酸に対する忌避行動において、後退とターンのどちらを線虫が採るかの行動選択に関しても 1 匹の線虫の行動データを解析した。コンピュータシミュレーションの結果は行動実験結果を良く説明した。これらの研究結果を国際会議で発表し（Wakabayashi, Sakata Shingai, EMBO Conference Series: C. elegans Neurobiology, 2012 Heidelberg, Germany)、変異種の解析を含めて学術論文として投稿した。さらに、共同研究者若林は、感覚刺激研究の一環としてレア・アースイオンの生物個体に与える影響を検討し、すべてのレア・アースが線虫に対し毒性を有すること、すべてのレア・アースを線虫が化学感覚器を介して認識することを明らかにした。レア・アースへのストレス応答経路が重金属に対するそれと共通であること、レア・アースの認識に関与する感覚神経経路が重金属に対するものと異なることを明らかにした（第 35 回日本分子生物学会で発表, 2012）。

B)平成２０年度にから２４年度まで研究計画の項目３）について次の研究を進めた。線虫の移動運動は体全体の波状の運動によりなされるが、頭は複雑な動きをする。これまで頭の動きを解析した報告はほとんどなかった。そこで、頭の動きの新規評価法を提案した。コンピュータソフトウエアを開発して、寒

天プレート上を自由に動く線虫について頭の軌跡が、①頭の軌跡の区間平均により得られる線、②頭から体長の 5%尾側寄りの点の軌跡、③体の中点の軌跡の夫々を横切る交点を求めて、交点間の頭部軌跡の長さのヒストグラムを作成すると、夫々次の事が判明した。①では、ほとんどの種で、発達段階が若い成虫以後、加齢と共に頭部運動の不規則性が増大し、それは神経伝達物質 GABA を欠損した変異体（*unc-25*）で顕著である。しかし、セロトニン欠損種（*tph-1*）では若い成虫でも老化した虫と同様に不規則性は大きい（図１）。②では、変異種に依存して、例えば AMPA 型グルタミン酸受容体に欠陥のある変異種と NMDA 型グルタミン受容体に欠陥のある変異種の間では、頭先端の振り幅が異なる。③では、頭の運動が体中心の動きに成虫３日目から強く同期する種が多い（図２）。これらの結果を学術論文として発表した（Shingai et al., Front. Behav. Neurosci., 2013）。

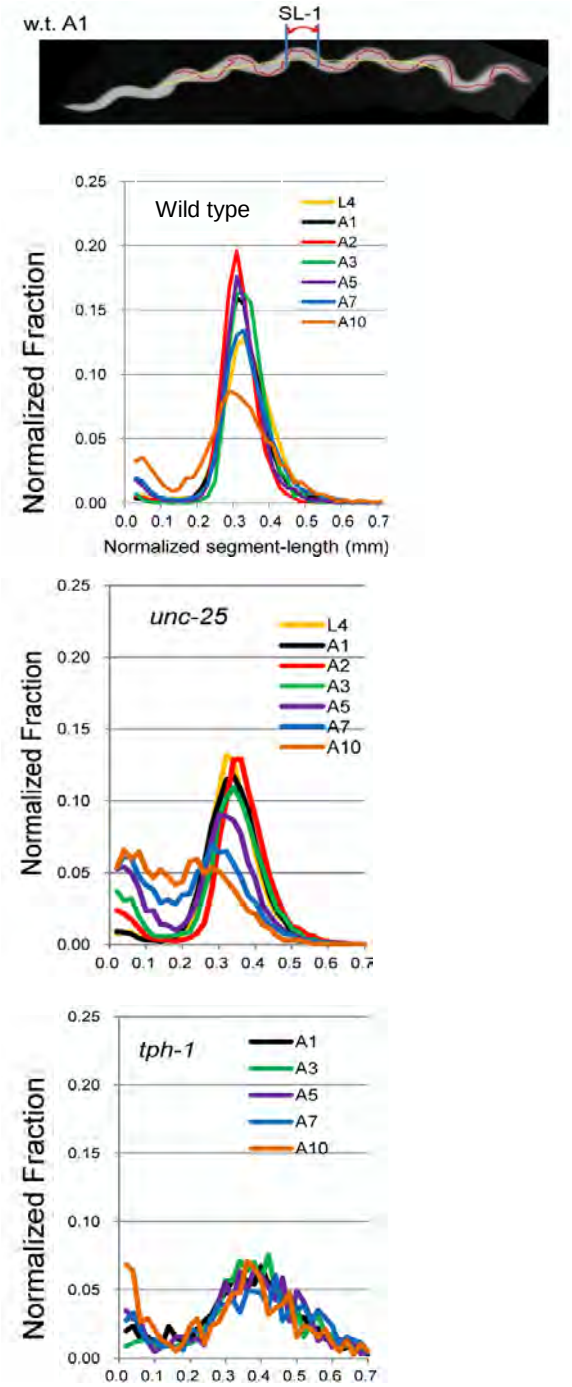


図１　上図：前進する線虫の画像を重ね合わせた。頭の軌跡が、頭の軌跡の区間平均により得られる線を横切る交点を求めた。交点間の頭部軌跡の長さ（SL-1）を算出した。 中および下図：ヒストグラム（横軸は線虫の体長で規格化した SL-1）を線虫の齢（age）毎に描いた。GABA 欠損種（unc-25）では頭の不規則な小さな振り（横軸 <0.2 成分）が加齢と共に大きく増える。

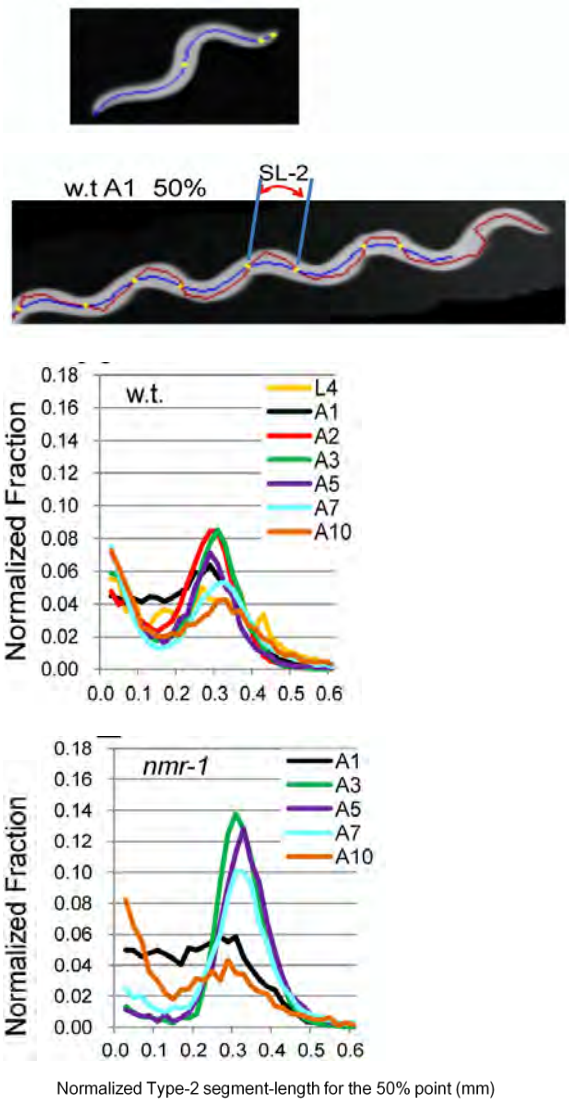
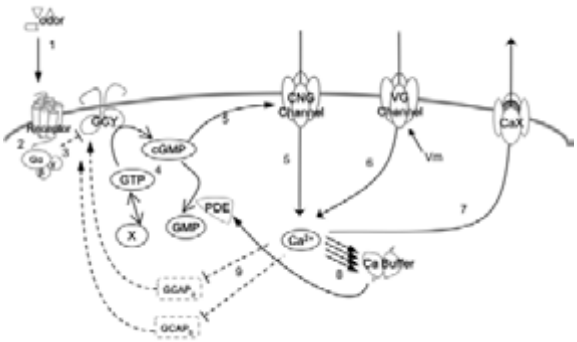


図２　上図：頭の軌跡が、体の中点の軌跡を横切る交点を求めて、交点間の頭部軌跡の長さ（50% SL-2）を算出する。下図：野生種（w.t.）と NMDA 型グルタミン酸受容体に欠陥のある変異体（*nmr-1*）の 50% SL-2 のヒストグラム。成虫１日目（A1）と３日目（A3）の間で、ヒストグラムの形に大きな違いがある。大きなピークは、頭先端の動きの周期と体の中点の動きの周期が同様であることを示す。

線虫の走性行動において、誘因性又は忌避性物質の濃度勾配や温度勾配は、行動を決める重要な要因である。これらの勾配を物理化学的な計算式から求めることは、勾配が行動に与える影響を解釈するために必要な情報である。そこで実験で使用されている物質の濃度勾配を算出して、その結果を国際会議で発表した（Iwasaki et al.. 5th East Asia C. elegans Meeting, 2012,

Taipei, Taiwan)。また、研究分担者岩崎は、阪大の木村らに協力して 2-ノナノンの濃度勾配の計算式を考案してこの忌避物質に対する線虫の走性行動に適用し、学術論文を投稿中である。

C) 平成２０年度にから２４年度まで研究計画の項目４）について研究を進め、次の成果を得た。線虫の神経細胞の細胞内情報処理経路のモデルは、脊椎動物に比較して非常に少ない。それは線虫に関して公表された実験事実が限られているからである。嗅覚感覚神経細胞 AWC は、匂刺激に対する細胞内情報処理経路に関する分子生物学的または生理学的情報が、線虫の中では比較的多く文献に有る細胞である。そこで、線虫の細胞内情報処理のモデル化の対象に AWC ニューロンを選んだ。匂い刺激に対する細胞内カルシウム濃度変化の実験結果はすでに報告されている。モデルでは情報伝達物質の濃度変化や物質間の相互作用を微分方程式で記述した。その結果、実験事実を再現する細胞内情報処理モデルを作ることに成功した（図３）。これらの結果を学術論文に発表した（Usuyama, Ushida and Shingai, PLoS ONE, 2012)。



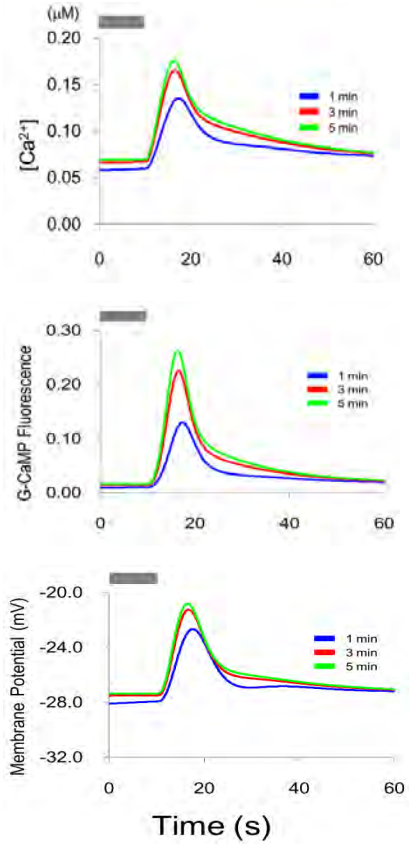


図３　匂刺激に対する AWC 神経細胞の細胞内情報処理経路の応答モデル。　上図：モデルの模式図。T 字は抑制を、矢印は促進を表す。匂刺激が与えられて図左上の受容体（Receptor）に匂物質が結合すると、GCY が抑制される。匂刺激が終わって匂物質が受容体から離れると、GCY が活性化してサイクリック GMP が産生されて CNG イオンチャネルを活性化してカルシウムイオンが流入する。カルシウムイオン濃度が上昇すると、それを抑える回路（点線で示す）が働き減少に転じる。下図：匂刺激終了後の反応。上から順に、カルシウムイオン濃度の変化、蛍光プローブ G-CaMP の蛍光強度変化、膜電位の変化。匂刺激を１，３，５分間と長くするに従い、刺激終了後の反応は大きくなり、実験結果を再現している。

線虫のASE感覚神経細胞のカルシウムイメージングデータ(東大・飯野研究室)をもとに、膜電位、カルシウムバッファ濃度、カルシウムイオン濃度、蛍光プローブ濃度を連立させた神経細胞モデルを構築した。蛍光プローブとカルシウムイオンの親和性およびキネティクスを考慮しており、蛍光プローブG-CaMPだけでなくYellow Cameleonも扱うことができる。各種イオンチャネルの膜電位依存性だけでなく、細胞内カルシウムイオン濃度の膜電位依存性も定量的に推定することが可能となった。これらの結果を国際会議と本領域主催の「システム分子行動学」数理シンポジウムで発表した（Kuramochi & Iwasaki, 17th International Conference on Neural Information Processing, 2010; Kuramochi., Sakata, Shingai, Iwasaki、The 7th Asian Biophysical Association Symposium, 2010; 岩崎, 「システム分子行動学」数理シンポジウム, 2012, 東大)。また、その結果を塩への走性行動に関する感覚神経細胞とその下流の介在神経細胞からなる小規模な神経回路モデル（図４）に応用して、国際会議で発表した（Iwasaki, Kuramochi, Sakata, Oda, Iino, Shingai, 18th International *C. elegans* Meeintg, 2011, USA)。

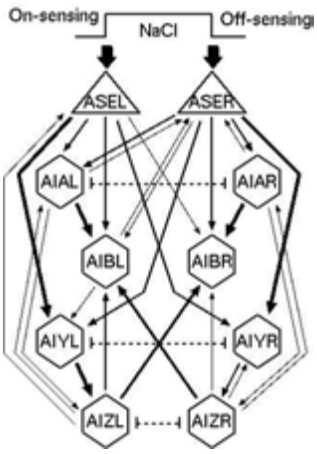


図４　塩への走性行動に関する小規模神経回路。　細胞間の矢印は化学シナプス結合を、点線はギャップ結合を表す。刺激物質である塩の濃度を上下すると、夫々ASEL、ASER が主に反応する。

D) 平成２０年度にから２４年度まで研究計画の項目５）について研究を進め次の成果を得た。線虫頭部の神経回路を対象として、同じクラスに属する左右一対の神経細胞を1個の神経細胞で置換えた簡略化した回路について、塩への化学走性、匂い物質への誘因走性、忌避走性、高温度の刺激に対する忌避走性に対して

、移動運動の前進／後退を決めるコマンドニューロンが適切に反応し、且つ首振りが行われるようにシナプス結合の興奮／抑制を設定することができた（図５）。これらの結果を国際会議で発表した(Shingai, Takahashi, Iwasaki, Neuroscience2011, 2011, Washington DC)。しかし、新しい実験事実が報告されたので(Hendricks et al.2012年7月)、それを取り入れたモデルに改良しつつある。また、302個全てのニューロンから成る神経回路の結線をプログラム上で繋いで、この全神経回路の動作を調べる基盤を作った。

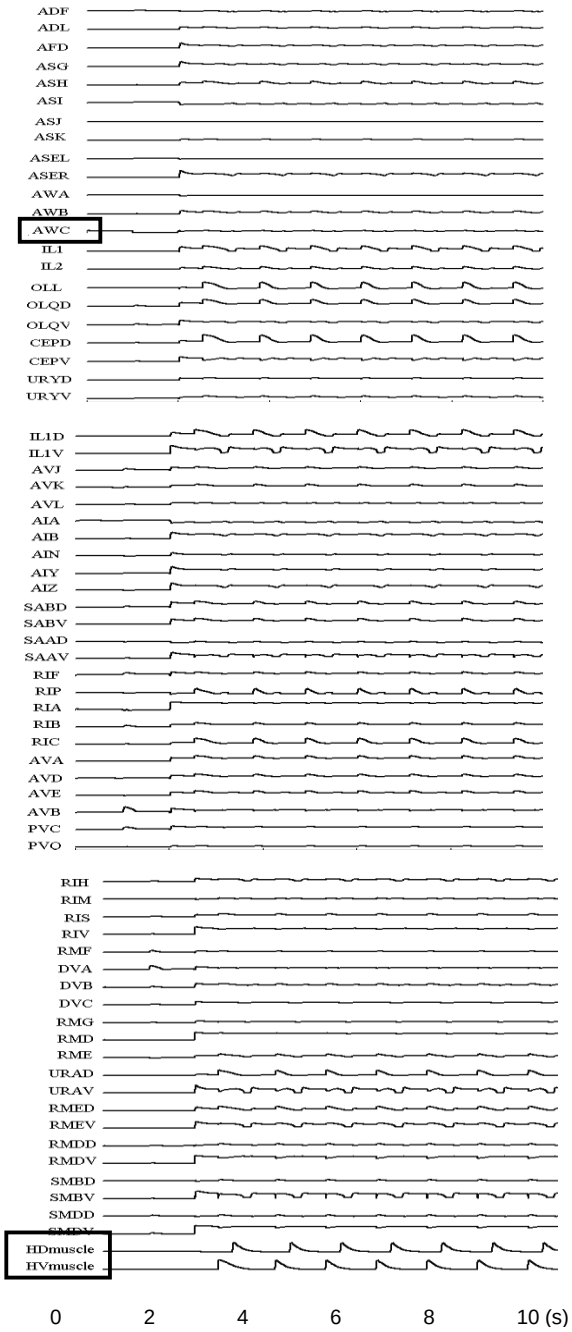


図５　頭部神経回路の膜電位応答。AWC 嗅覚ニューロン（上図左の四角）に 1－2 秒間負のパルスを入力。入力終了後に回路全体が反応して線虫の頭の背側と腹側の筋肉（下図の四角）を交互に興奮させる。左の英字は神経細胞名または筋肉を示している。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)は、匂物質への走性行動が塩感覚により修飾されているという新事実を示すことができた。また、酸に対する忌避行動の解析と行動メカニズムの推定は、他に無い内容である。

B)については、頭の動きの複雑さを解析した最初の報告であり、提案した方法は線虫の行動を研究する上で広く使用され且つ発展すると予想している。

C)については、線虫神経細胞内の情報伝達物質(カルシウムイオンを含む)が関与する情報伝達経路を数式で表現することはこれまでほとんど手つかずであった。それを実現した事に意義がある。また、小規模回路のの精密なモデルは我々以外に世界的にほとんど見られないが、各神経細胞の役割が高等生物よりも大きい線虫では意味がある。

D)については、線虫の神経回路モデルはいくつか国外で発表されているが方法が異なっている。神経細胞の結合をすべて組合せてモデル化する事は、国内外ともに我々以外ではほとんど発表されていない。しかし欧米でも進行中であるので、今後夫々の特徴を生かして独自におよび連携して神経回路全体のモデルが作られていくと予想している。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画１）の中で、温度と誘引物質との間の行動選択の研究については、解析ソフトウエアの製作が予想以上に遅れた為にデータ解析が十分できず、期間中に完成しなかった。その解析を本領域研究終了後も継続している。この為、期間中に解析が可能であった塩と匂いの感覚情報の相互作用の研究および酸に対する忌避行動の行動選択の研究に力を注いだ。

研究計画５)のコンピュータ上に神経細胞を結合させて線虫神経系の大規模回路を作りシミュレーションを行う研究は、完成していない。主な理由は、神経細胞レベルの生理学的実験事実が少ないために神経細胞間の結合に関する自由度が莫大であるためである。そこで、急いで回路のパラメータを決めるのではなく、新たな実験事実を順次モデルに取り入れていくことに、方針を改めた。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果、行動選択の神経メカニズムには種々の機構があることが見えてきた。今後さらなる進展が期待される。

行動解析ソフトウエアの開発により行動解析の研究基盤が充実した。今後、神経活動の記録と行動解析を結合させて、行動時の線虫の動きを引き起こす神経系の研究がさらに進むことが期待される。

神経活動に関連する分子の働きを数式で表現して実験事実と照合する研究は始まったばかりで、近い将来に実を結ぶと期待される。

移動運動や走性行動に関する細胞レベルの実験事実が増えており、本研究で目指した大規模回路モデルの完成は現実的になってきており、今後も研究を進める必要がある。

計画研究：2008 年度-2012 年度

ショウジョウバエの記憶形成回路の構造および機能発現の分子基盤

研究代表者：多羽田哲也

東京大学分子細胞生物学研究所

＜研究の目的と進め方＞

脳機能を支える神経回路パターンは長い進化の過程で脳機能による淘汰のフィードバックを受けており、神経回路の発生メカニズムは、脳の機能発現を最適化するようにデザインされている。神経回路の機能と、それを形成するメカニズムの両者を有機的に理解することが必要であると考える。本研究は、ショウジョウバエの匂い記憶中枢である Mushroom body（MB）をモデルとして、神経経回路形成と匂い記憶形成機構の統合的な理解をはかる。ショウジョウバエの匂い記憶形成において中心的な役割を担っている mushroom body（MB）の形成機構と、そこにおける記憶形成の分子メカニズムを明らかにする。ショウジョウバエの嗅覚系では匂い分子は触覚の olfactory receptor neuron（ORN）に受容され、projection neuron（PN）を経て、Mushroom body（MB）の Kenyon 細胞（KCs）を興奮させる。KCs は約 2000 個あり、個別の匂いに応答する数十から１００程度の KCs の組み合わせにより匂い情報をコードし、忌避／報酬刺激との同時検出器として働き、記憶形成の中心にある。これは哺乳類の嗅上皮、嗅球と連絡する嗅覚系回路と相同であり、3 次神経である MB は lateral horn と合わせて、哺乳類の梨状皮質、扁桃体さらには海馬等に相当すると考えられる（図１）。

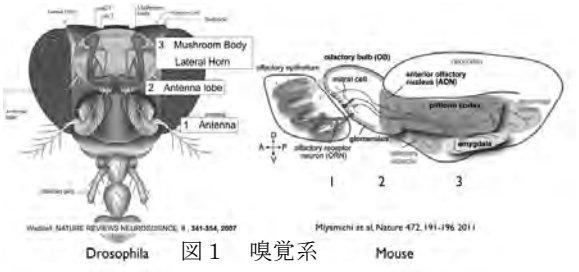


図１　嗅覚系

以下の３プロジェクトを推進する。

（１）長期記憶形成に伴い発現する遺伝子の同定

匂いと電気ショックを連合させた忌避記憶学習において記憶の前後で MB から RNA を抽出し、記憶形成により転写される遺伝子を同定し、その機能を明らかにする。

（２）MB 形成に機能する遺伝子群の同定

MB の形態形成に機能する様々な転写因子、細胞認識に関わる因子などを選別し、その遺伝子に対応するヘアピンループ RNA を MB に発現させ、表現型を観察し、MB 形成に機能する遺伝子を明らかにし、形成メカニズムを理解する。

（３）イメージングによる神経機能の解析

記憶に伴う遺伝子機能を解析するために CREB の発現、Ca レベルなどを指標に記憶形成に機能する MB の神経細胞を同定し、記憶形成メカニズムを明らかにする。

＜研究計画＞

1)　長期記憶形成に伴い発現する遺伝子の同定

長期記憶形成後の脳から経時的にMBを取り出しRNAを抽出した後、cDNAを合成し、リニアに増幅する。それを大規模シークエンシングすることにより、MBで発現し、長期記憶形成に伴って発現が上昇する遺伝子を同定する。その遺伝子の機能解析を行い、記憶形成機構の理解をはかる。

2) MB 形成に機能する遺伝子群の同定

遺伝研の上田龍研究室および IMP の Barry Dickson 研究室で作成された hrRNA ライブラリーを MB に発現させその表現型から MB の軸索投射の特異性を規定する機構を探る。このとき、様々な転写因子、細胞認識に関わる因子などを選別し、その遺伝子に対応する hrRNA を MB に発現させる。また MB に発現する sickie と Wnt5 の機能解析を行なう。

3) イメージングによる神経機能の解析

３次神経であるMBおよびその下流の４次神経（図２）を中心にCa等のイメージングにより、匂い情報のコーディング及び記憶痕跡の詳細な解析を行い、記憶による細胞応答の変化様式を明らかにする。さらにこれらの細胞で機能する信号伝達系を同定し、記憶形成の分子機構を解明する。またCREリポーターにより同定されるMBおよびそれ以外の神経細胞（CRE細胞とする）の機能を人為的に操作し、長期記憶形成に働くCRE細胞の機能を明らかにし、cell assembly仮説を検証する。

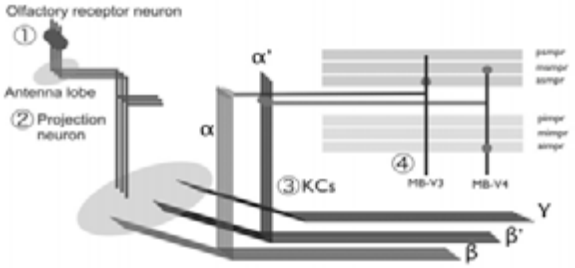


図 2 ショウジョウバエの嗅覚神経回路

＜得られた研究成果＞

A)　半自動学習装置の開発

ショウジョウバエの匂い罰学習を効率良く行なうために Harvard 大の Sam Kunes 研究室と共同で半自動学習装置の開発を行なった。本装置では匂い物質を気流にのせてハエ個体に提示する際の電磁弁の開閉と電気ショックのタイミングを Labview で自由に制御することができる。これにより電気ショックのパルスと匂い提示のパルスを同期することによって効率良く学習させることを見出し、以下に発表した。

Murakami, S., Dan, C., Zagaeski, B., Maeyama, Y., Kunes, S. and Tabata, T. Optimizing Drosophila Olfactory Learning with a Semi-automated Training Device. Journal of Neuroscience Methods. 188, 195-204, 2010.

B)　MB で発現する遺伝子の記憶形成における機能解析

脳から切り出した３個の MB から RNA を抽出し、大規模塩基配列決定法によりトランスクリプトーム解析を行なう方法を確立した。それにより ras-related GTPase と相同性のある蛋白質と phosphodiesterase に相同性のある蛋白質をコードしている２つの遺伝子が MB で発現し、長期記憶によりそのレベルが上昇することが明らかとなった。これらの遺伝子の変異を解析したところ、記憶形成能の低下が見られた。さらに両者に遺伝的相互作用があることがわかった（論文未投稿）。

C） MB を形成する PCP メカニズム

平面内細胞極性（Planar Cell Polarity: PCP）を制御する因子群は個別に神経発生に機能していることは知られていたが、PCP 経路として機能することは報告されていなかった。様々な PCP 遺伝子の変異がキノコ体の軸索形成に必要であり、それらの間に遺伝学的相互作用がみられることから PCP 経路がキノコ体軸索形成に必要であることを提唱した。さらに、キノコ体の軸索形成への Wnt の関与を検討するために、Wnt 遺伝子の変異体を解析し、Wnt5 変異体においてキノコ体の形成異常を見いだした。Wnt5 と PCP 制御因子の間に遺伝学的相互作用が見られたことから、Wnt5 を PCP 経路のリガンドであると提唱した。Wnt5 はキノコ体の樹状突起で形成されるカリックスに局在する。カリックスにおいて Wnt5 の発現を回復することで Wnt5 変異体の表現型がレスキューされたことから、カリックスに局在する Wnt5 がキノコ体の軸索形成に重要であることが示された。また、Wnt5 変異体のクローン解析やキノコ体特異的な RNAi の誘導による Wnt5 のノックダウン実験により、カリックスに局在する Wnt5 の少なくとも一部はキノコ体から分泌されるものであることを示した。軸索のガイダンスや分岐には軸索誘導因子の微小な濃度差を読み取る事が必要である。その微小なシグナルの差を PCP 経路により増幅し安定したシグナルとする機構を提唱した（図３）。

Shimizu, K., Sato, M. and Tabata, T. The Wnt5/Planar cell polarity pathway regulates axonal development of the *Drosophila* mushroom body neuron. J. Neuroscience, 31, 4944-4954, 2011.

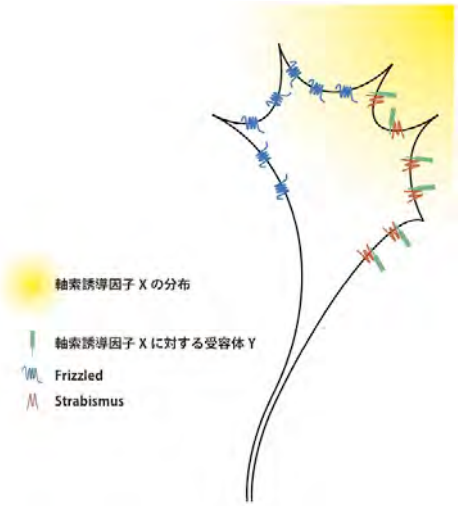


図３ 軸索投射における PCP シグナルの役割

D） MB で発現する Sickie の機能解析

MBで発現するSickieは、神経軸索伸長に必須であるアクチン結合性のCHドメインを持ち、F-actinに富む新生神経の軸索で顕著に検出される。細胞骨格再編成のスイッチであるRac、アクチン脱重合実行因子Cofilin、Cofilinの活性化因子Slingshotと、Sickieが遺伝学的に相互作用する結果を得たため、変異体においてF-actinの性状を解析した。MARCM法によりコントロールと変異体の神経を同一個体内に誘導することで、組織染色のシグナルの定量的解析が可能となった。*sickie*、*slingshot*変異体、*LIMK*強制発現変異体のキノコ体神経軸索束では、F-actinの総シグナル強度が各々の比較対象の神経軸索束よりも有意に高いことが明らかになった。また、LIMK強制発現変異体の軸索伸長異常はSickie^{WT}、Rac1^{Y40C}またはSlingshot^{WT}の強制発現により抑制されたが、*sickie-RNAi*の誘導によりこれらの抑制効果は阻害され、異常なF-actinも同時に観察された。以上の結果より、SickieはRac/Slingshot/Cofilin経路を仲介することでF-actinの再編成を正に制御し、軸索伸長を担うことが明らかなった（図４）。投稿準備中

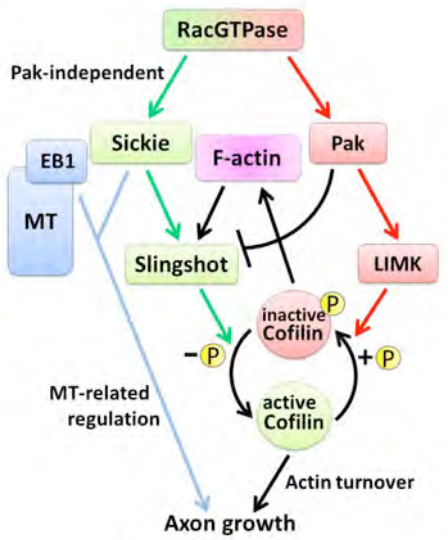


図４ 軸索投射における Sickie の役割

E）軸索投射制御機構における Dip2 の役割

キノコ体形成異常スクリーニングで得た Dip2 遺伝子の解析を行なった。Dip2 変異では軸索走行に異常が観察される。データベース上では核内因子に分類されているが、抗体染色により膜近傍に局在していることが示唆されたので、局在を支配しているドメインの同定を試みた。また、マイクロアレイ法を用いて、Dip2 変異において発現が変化する遺伝子を同定し、それらの遺伝子との相互作用を遺伝学的に解析する準備を行なった。さらに、Dip2 と結合する因子の生化学的な探索も行ない、機能解析を進めている。

F）KCs における匂いコーディングの解析

KCs にCa リポーターGCaMP を発現させたショウジョウバエを開頭して２光子顕微鏡下におき、匂い刺激および必要に応じて電気ショックの罰刺激を与えイメージングを行った。このとき様々な発現ドライバーおよび GCaMP 分子を用い、最適な組み合わせを探った。

KCs の細胞体を４次元イメージングで観察すると、２０００個の全ての KCs の応答を記録することができる（図５①）。また、背側から観察することによってα/βおよびα'/β'に属する KCs（全 KCs の３分の２）の軸索束の横断面を観察する事ができる（図５②）。さらに深部を観察することでγを含む全ての KCs の神経軸索束の縦断面を観察する事が可能である（図５③）。KCs の細胞体の配置は個体毎に異なっている。また軸索束の配置はサブタイプごとにまとまっているもののその中での配置は個体によって一定ではない。それ故に、一連の解析は同一個体を用いる必要がある。そのさいに絶えず同一焦点面の画像を比較できるよ

う、複数の焦点面の画像を比較した。
これらの各神経細胞の GCaMP シグナルの変化量を定量化し、

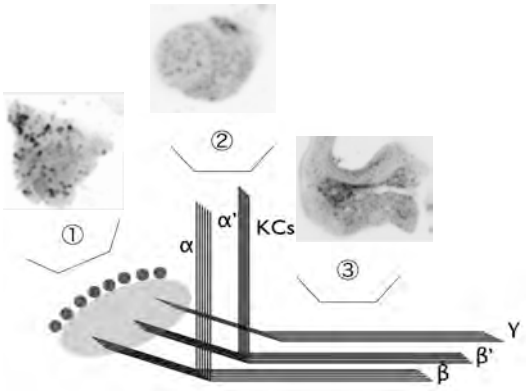


図５KCs のイメージング

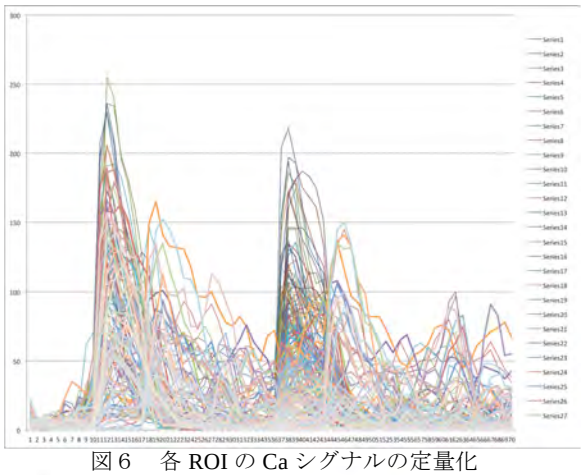


図６　各 ROI の Ca シグナルの定量化

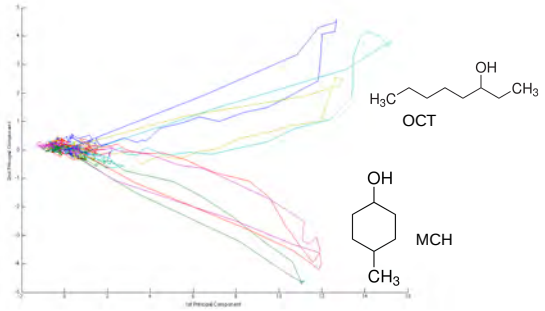


図７　異なる匂い物質に対する応答の PCA 分析

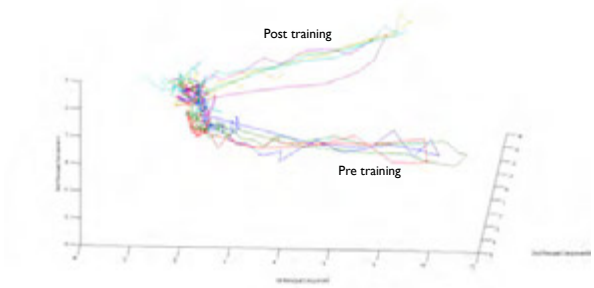


図８　PCA による記憶痕跡の分析

標準化した（図６）後に多変量解析法を用いて解析する。これにより匂いコーディングや記憶痕跡を解析することを試みている。図７は匂い学習記憶に頻用される２種の異なった匂い分子（Oct と MCH）を交互に同じ個体に数回提示した時の、それぞれの応答を主成分分析した解析例である。２種の匂いに対する応答がこの解析法で容易に分離されていることがわかる。

顕微鏡下で匂いと電気ショックの連合学習を行い同様の主成分分析を行うと学習前後で異なる応答パターン（記憶痕跡）を示すことを見いだした（図８）。

G）MB の output 神経のイメージング

MB から入力を受ける４次神経である MB-V3 あるいは MB-V4（図２④）のイメージングを行った。これらの神経も匂いの提示によって応答する。記憶形成後に特異的な応答レベルの低下が観察された。

H）CREB に応答する神経細胞を同定し制御する手法の開発

長期記憶形成には転写因子 CREB の活性が必要である。人口的な CREB 結合配列を持つリポーター遺伝子を持つトランスジェニック・ショウジョウバエを作成し、CREB に応答する神経細胞を脳全体で同定し、その細胞に様々な遺伝子を発現させる系を確立した。長期記憶形成に伴って、このリポーターのシグナルが上昇することを観察し、またこの細胞の出力を抑えると記憶形成能が低下することを見出した。

＜国内外での成果の位置づけ＞

ショウジョウバエの嗅覚系回路を哺乳類と比べると MB の KCs は高々２０００個の神経細胞で構成されているとはいえ、扁桃体や海馬に相当し、匂いと罰／報酬の連合学習の形成を司る。本研究では、ほぼ全ての KCs の細胞応答を同時にイメージングすることができ、扁桃体や海馬の全神経を同時にイメージングすることに匹敵する。一部の神経細胞の活動からモデルを作って回路全体の動作を推測のではなく、機能単位に含まれるほぼ全ての神経の活動をモニタし、その結果を用いて回路の動作を解析する手法を開発した。この系により、匂いのコーディングと記憶形成によるその修飾を、推定モデルではなく、全神経の実データによって解析する本研究は新たな研究領域を開拓するものである。

記憶形成に伴い発現が制御を受ける遺伝子を同定し、その機能解析も進んでいる。未だ報告のない新たなシグナル系の発見につながる可能性がある。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

Caイメージングではごくわずか画像の位置、焦点面がずれることによってデータ画像の比較ができなくなるために、安定した画像を得ることが必須であり、ソフトウエアの改良を行っている。CREBレポーターの発現を成虫に限局し、神経発生への影響を排除することは高度な分子遺伝学的な手法が必要で系統の確立に時間がかかる。顕微鏡の画像取得速度が遅く必要な時間分解能が得られないので、高速の装置の導入が不可欠である。

＜今後の課題、展望＞

Caイメージングで得られた記憶痕跡から個々の細胞における生物学的意味を抽出する手法の開発が急務である。これとCREリポーターの結果を総合して、記憶形成に機能する細胞を同定し、記憶形成に機能する遺伝子群の解析を細胞レベルでマップすることにより記憶の獲得、固定、想起の機構を細胞単位で理解することを目指したい。最終的にはMB特有の神経軸索の投射メカニズムが、進化的に記憶を生み出すにいたった理を明らかにしたい。

計画研究：2008 年度-2012 年度

学習記憶とその障害の遺伝子経路解明と動態解析

研究代表者：齊藤　実　研究分担者：宮下知之

公益財団法人東京都医学総合研究所運動・感覚システム研究分野学習記憶プロジェクト

＜研究の目的と進め方＞

我々を含む国内外の研究から、学習記憶に関わる遺伝子、いわゆる記憶関連遺伝子の同定が進んでいる。しかしこれら遺伝子の学習記憶における機能を十分に理解しているとは言いがたく、いつ、いかなるところで働くのか？また各種認知機能障害との関わりについても不明な点が多い。本研究において我々はショウジョウバエのモデル動物としての特長（高度な遺伝学的手法、光透過性の高い脳、記憶過程の行動遺伝学的分離）を利用することで上記の課題にアプローチしていく。

具体的には１）PKA, NMDA 受容体など、動物種を超えて学習記憶に関与する分子の機能をより詳細に調べることで、新たな記憶パラダイムの創出につなげ、２）加齢性記憶障害に焦点を当ててその分子神経機構を明らかにする。さらに３）学習記憶過程における神経・分子動態をリアルタイムに調べる、新規のショウジョウバエ学習記憶解析系として、“取り出した培養脳神経系”に顕微鏡下で学習記憶を成立させる「in vitro 学習系」の開発に挑戦する。

ショウジョウバエは線虫同様、哺乳類モデルと比べて学習記憶などの行動遺伝学的解析に優れたモデル動物である。近年顕微鏡下で固定したハエからの in vivo でのイメージングが行われるようになったが、より詳細な神経連絡や回路動態を知るには哺乳類モデルで発達しているような in vitro での解析系の開発が不可欠である。幸いなことにショウジョウバエの脳は光透過性が高く、神経回路での分子動態を可視化して解析することは理論的には可能である。本研究では佐藤グループと共同で分子可視化プローブを開発し、in vitro 学習系に利用する。また得られた実験データをもとに増田グループと共同で分子動態の数値化を行い、感覚情報から記憶情報への変換の数理モデルを構築する。

＜研究計画＞（年度ごとに分けても結構です）

1)記憶関連遺伝子の機能解析

NMDA受容体、PKAは学習記憶への関与がよく知られているが、いくつかの未解決な重要課題がある。例えばMg2+ブロックはNMDA受容体が持つ、他のイオン透過型受容体には無い特徴であるが、未だに学習記憶における役割は明らかになっていない。またPKAは記憶形成に必須であるにも関わらず、その機能が亢進すると却って記憶障害を起こす。そこでこれらをコードする遺伝子を初め、各記憶関連遺伝子に変異を入れた遺伝子改変体を作成し、詳細な行動遺伝学的解析に加えて、適宜電気生理学的解析、生化学的解析を組み合わせて、記憶関連遺伝子の新たな役割を明らかにする。また嫌悪性の長期記憶の形成には通常、間隔を空けた繰り返し学習が必要だが、間を空ける生理学的意義は依然として不明である。そこで間でおこる変化を捉えて、これを人為的に操作することで、間が長期記憶形成で果たす役割を明らかにする。

2) 加齢性記憶障害の分子・神経機構の解明

我々は加齢性記憶障害の抑制変異体DC0/+（DC0はPKA触媒サブユニットPKA-C1をコードする遺伝子）の解析から、cAMP/PKAシグナリング活性が老齢期では加齢性記憶障害（中期記憶障害）の原因となっていることを明らかにした。我々はDC0/+変異体を用いたプロテオミクス解析から、cAMP/PKAシグナリングの下流タンパクの候補として、ミトコンドリアタンパクPyruvate Carboxylase (PC)とホモローグを持つタンパクを同定した。このタンパクの変異体解析を行い、加齢性記憶障害の発現に関わる分子・神経機構を明らかにする。

3) in vitro学習系の開発

通常の匂い条件付けでは、条件刺激の匂い(CS+)と無条件刺激の電気ショック(US)を同時に与え、CS+とUSの連合学習を成立させるが、この条件付けによりキノコ体という記憶中枢で匂いに対するCa2+応答が上昇する記憶痕跡が形成される。また多くの学習記憶関連遺伝子がキノコ体に発現することなどから、匂い情報とショック情報はキノコ体で連合されると考えられている。匂い情報は触角葉(AL)を経てキノコ体に投射する一方、ショック情報は腹側神経節(VNC)を上行して脳に入る。そこで取り出した脳に、匂いの代わりにAL刺激を、電気ショックの代わりにVNC刺激をすることで、キノコ体に記憶痕跡が現れるか？キノコ体にCa2+プローブを発現したトランスジェニックフライを作成し検証すると共に、記憶痕跡の形成機構を電気生理学・薬理学的に調べる。

＜得られた研究成果＞

A) PKA による記憶統合抑制機構の発見

平成 20 年度に、研究計画の項目 1)について PKA を対象とした研究を進めた。PKA は学習記憶に必須のリン酸化酵素であり、その欠失体では記憶の獲得・保持不全が起こる。その一方で、加齢性記憶障害は PKA 活性を下げると抑制できることなどから、単に PKA は記憶形成にポジティブに働くだけで無いことが予想されていた。そこで PKA の活性が抑制された変異体を使い、記憶行動の詳細な解析を行った。その結果、PKA 活性が約半分に低下した変異体では記憶保持が亢進することが分った（図１）。

ショウジョウバエでは獲得された記憶は最終的にタンパク合成依存性の長期記憶か、非依存性の麻酔耐性記憶へと固定化される。そこで上記の PKA 変異体にタンパク合成阻害剤を用いて、どちらへの固定化が促進されるのか調べたところ、麻酔耐性記憶への固定化が促進されることが分った。これらの結果をまとめて学会、学術論文で発表した(Horiuchi et al, PNAS, 2008)

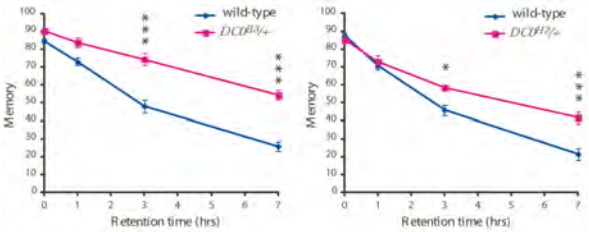


図１学習後の記憶スコアは PKA の変異体 DC0/+の方が野生型と比べて高いスコアを 7 時間以上維持している。

B）長期記憶形成に関わる細胞接着因子 Klg の同定

記憶変異体の検索から我々は長期記憶に障害を持つ変異体を単離した。そこで研究計画１）に従って、平成 20-21 年度に単離された変異体の解析を行った。その結果、単離された変異体は細胞接着因子 Klingon (Klg)として同定された遺伝子の変異体であることが分った。そこで詳細な行動解析を行った結果、klg 変異体では長期記憶過程が特異的に障害されること、Klg の発現量は長期記憶形成に伴い上昇することなどが分った。また Klg の発現レベルが受容体型転写因子 Notch により調節されていることも分った。より詳しく調べたところ、長期記憶学習によりプレセニリン依存性に Notch の細胞内ドメインが遊離して転写を開始すること、これにより Klg の発現量が上昇し長期記憶の形成に寄与するといったシグナル経路が明らかとなり、こうした結果をまとめて学会、学術論文に発表した（Matsuno et al, PNAS 2009).

C）PKA 活性の急性低下による加齢性記憶障害の改善。

研究計画２）に従って、平成 21-22 年度に実施した。我々は加齢性記憶障害が PKA 変異体で顕著に抑制されることを既に見出しいたが、こうした加齢性記憶障害が可逆的か不可逆的か明確で無かった。そこで任意の時期に PKA の活性を低下させられるトランスジェニックフライを作成し、二つの可能性について検証した。その結果、加齢性記憶障害となったものでも PKA 活性を低下させると記憶力が顕著に改善されることを見出し、学会、学術論文に発表した (Yamazaki et al, J Neurosci 2010)。

D）酸化ストレス依存性に起こる加齢性記憶障害

研究計画２）に従って、平成 20-23 年度に実施した。酸化ストレスを生む活性酸素はエネルギー代謝の副産物であり、最も主要な老化のリスクファクターとして知られている。加齢性記憶障害は脳老化の典型的な表現型である。そこで酸化ストレスと加齢性記憶障害との関わりを明らかにするため、酸化ストレスの負荷を薬理学的、遺伝学的に与えて加齢性記憶障害を調べた。その結果意外なことに、ショウジョウバエで観られる加齢性記憶障害の発現契機は、酸化ストレスに依らないことが示唆された。そこでこの結果をまとめて学会、学術論文に発表した（Hirano et al, Genes, Brain and Behavior 2012）。

E)　インスリンシグナルの変異による学習障害

研究計画１）と２）に従って、平成 20-23 年度に実施した。インスリンシグナルは寿命の制御に深く関わることが知られているシグナル経路である。即ちインスリンシグナルが低下した変異体では老化が抑制され、寿命が長い。そこでインスリンシグナルと加齢性記憶障害との関わりを調べるため、インスリン受容体基質 Chico の抑制変異体を用いて記憶行動を調べたところ、この変異体では、若いときから記憶情報の獲得に障害が観られた。また chico 変異体では脳の発育が悪く、サイズが小さくなっているが、記憶中枢のキノコ体で chico 遺伝子を発現させるとキノコ体のサイズのみ大きくなり、且つ顕著な記憶改善も観られた。これらの結果から、内因性のインスリンシグナルによるキノコ体神経の成長が認知機能の発達に必須であることが示唆された。これらの成果をまとめて学会、学術論文に発表した（Naganos et al, Neurosci Res 2012)。

F)　NMDA 受容体の Mg ブロックによる長期記憶制御

研究計画１）に従って、平成 20-24 年度に実施した。NMDA 受容体を介した Ca2+透過は、Mg2+ブロックがあるため、シナプス後細胞の脱分極と同期しない定常状態では抑制されている（図２)。しかしこうした整流機構の生理的意義は不明であった。そこで Mg2+ブロックが欠失した NMDA 受容体のトランスジェニックフライを作成し、電気生理学、行動学的解析を行った。その結果 Mg2+ブロックは従来考えられていた連合学習のスイッチとして働くのでは無く、長期記憶形成のゲート機構として働くことが分った。さらに Mg2+ブロックによる定常状態での Ca2+透過抑制は、定常状態における転写因子 CREB の抑制型イソフォームの発現を抑制するために機能しており（図２)、この抑制が無くなると長期記憶学習で活性型 CREB が機能できなくなることを明らかにし、学会、学術論文に発表した（Miyashita et al, Neuron 2012)。

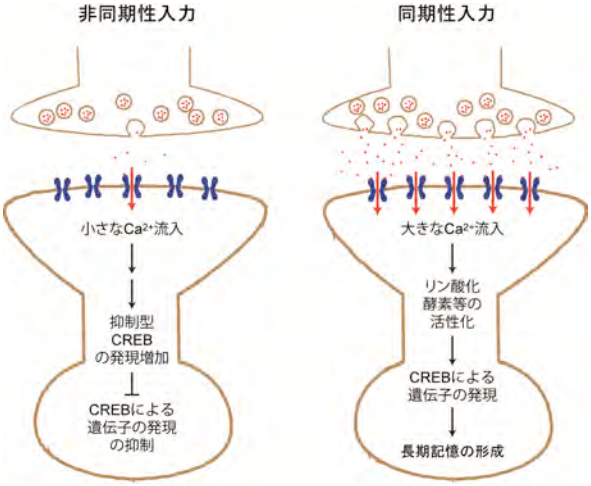


図２　Mg ブロックによる定常状態での Ca 流入（非同期性入力）の抑制と CREB による遺伝子発現

G)　単離培養脳での記憶痕跡の形成

研究計画３）に従って、平成 20-24 年度に実施した。薬理学的解析により、触角葉からの匂い情報はニコチン性アセチルコリン受容体を介してキノコ体に入力する一方、ショック情報は従来考えられていたドーパミンで無く、NMDA 受容体を介して入力することが示唆された。また触角葉と、腹側神経節から脳への入力経路である上行神経路を同時刺激すると、触角葉とキノコ体間のシナプス伝達が 2 時間以上にわたり亢進すること、このシナプス伝達の長期亢進が匂い記憶と極めてよく似た生理学的特徴を持つことを明らかにした。

一方ドーパミン受容体はショック情報を伝達する役割でないことが示唆されたが、匂い記憶同様、長期亢進の成立に必要であり、ニコチン性アセチルコリン受容体、NMDA 受容体、ドーパミン受容体の 3 つが、同期して活性化されることで、長期亢進が起こることが分った。こうした生理学、薬理学的相同性から、キノコ体における長期亢進は匂い記憶の細胞モデルとなることを提唱し、学会、学術論文に発表した（Ueno et al, J Physiol 2013)。

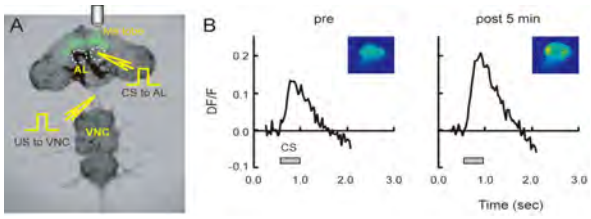


図３　in vitro 学習系による触角葉－キノコ体間シナプス伝達の長期亢進。触角葉（AL）刺激に対するキノコ体（MB）の Ca2+応答をみた。同期刺激後は前より Ca2+応答が亢進している。

H)　空腹による長期記憶の形成亢進

研究計画１）に従って平成 22-24 年度に実施した。ショウジョウバエでは、匂いとショックの組み合わせによる嫌悪性長期記憶の形成には、間隔を空けた繰り返し学習が必要な一方、匂いと砂糖など報酬を組み合わせた報酬性長期記憶の形成は一回の学習で充分である。我々はこうした違いが生まれる理由が、報酬性学習前の空腹状態にあること、即ち、空腹状態であれば嫌悪性の長期記憶も 1 回の学習で形成されることを見出した。さらに非空腹状態での繰り返し学習による長期記憶形成と、空腹状態での一回学習による長期記憶では、関与する神経回路と長期記憶関連遺伝子の転写機構が異なることを明らかにし、これらを学会、学術論文に発表した（Hirano et al, Science 2013)。

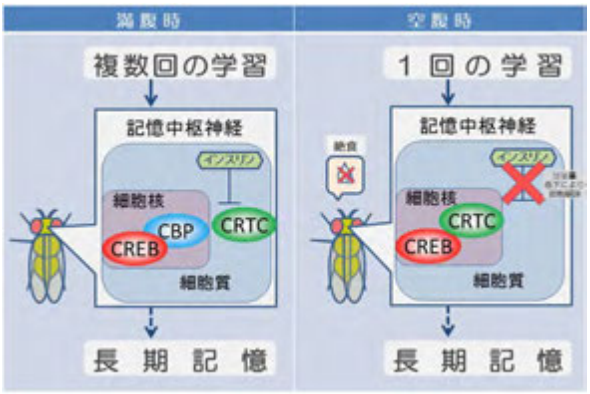


図４　空腹による長期記憶の形成亢進。満腹時は CBP/CREB 複合体による長期記憶関連遺伝子の発現が起こるのに対して、空腹時は CRTC/CREB 複合体による遺伝子発現が起こり、一回の学習で長期記憶となる。

I)　加齢に伴う PC 活性の上昇による加齢性記憶障害の発現

計画研究２）に従って平成 20-24 年度に実施した。プロテオミクス解析により同定されたタンパクがショウジョウバエの PC ホモローグ dPC であることを生化学的に明らかにし、この加齢に伴う発現レベルの上昇が、PKA 活性と相まって加齢性記憶障害を引き起こすこと、この dPC 依存性の加齢性記憶障害が先に成果 D)で示唆された酸化ストレス非依存性の脳老化シグナルであることを明らかにし学会で発表すると共に、学術論文を投稿した。

J)　間隔により ERK 依存性に形成される c-fos/CREB サイクル

計画研究１）に従って平成 20－24 年度に実施した。間で起こる生化学的現象を検索した結果、MAPK の活性化が学習期間中でなく、間で起こることが分った。さらに MAPK 依存性に c-fos と CREB 間で転写サイクルが形成されることを明らかとし、学会で発表した。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果 A)は C)と共に、PKA の持つ拮抗的多面性を行動生理学的に初めて明らかにした成果である。また A)の結果は記憶の消失が能動的な遺伝子経路活性によるといった概念の端緒となるものであり、この後 Zhong らは Rac 経路による記憶の消失制御機構を提唱し、石原らにより線虫で忘却シグナルの同定が進んだ。

研究成果 B)は細胞接着因子による長期記憶の制御機構を初めて明らかにした報告である。また長期記憶形成に伴う Klg の発現を上流で制御するプレセニリンはアルツハイマー病との関連が示唆されている細胞膜プロテアーゼであり、Klg とアルツハイマー病との関連も予想させる。

研究成果 C)は加齢性記憶障害が不可逆的な現象でなく、可逆的なものであることを明らかにした点で意義が大きい。PKA そのものは、先に示した機能の多面性から、これにより加齢性記憶障害を制御することは困難であるが、脳部位特異的な抑制方法や、下流因子の中から、創薬の標的分子が見出される可能性がある。

研究成果 D)、I)から、これまで加齢性記憶障害の主要な原因と考えられていた酸化ストレスが、少なくともショウジョウバエでは主たる原因となっていないことが初めて示された。さらに酸化ストレス非依存性の脳老化シグナルとして dPC が同定された。ショウジョウバエを用いた脳老化の分子神経機構解明は Davis や Mery らからの報告もあり、今後、ショウジョウバエによる脳老化の分子神経機構解明が大きく発展することが予想される。

研究成果 E)で、インスリンシグナルの変異と精神遅滞とに関連性があることがヒトで報告されていたが、インスリンシグナルの冗長性から実験的な証明は未だ成されていなかった。ショウジョウバエではインスリンシグナル受容体基質が一種しかないことを利用することで、インスリンシグナルによるキノコ体の成長が記憶獲得に必要な神経回路形成に必須の役割を果たすことが示され、インスリンシグナルの変異と精神遅滞との因果関係が証明された点で意義のある成果となった。

研究成果 F)により、初めて NMDA 受容体の Mg2+ブロックが連合学習のスイッチとしてではなく、長期記憶形成のゲート機構として働くといった生理学的意義が明らかになった。NMDA 受容体の Mg2+ブロックは 50 年近く前に発見されていたが、その生理的意義は明らかになっていなかった。非同期入力と同期入力が NMDA 受容体により判別できることから、連合学習のスイッチと考えられてきたが、証明はされていなかった。この概念を変えた点において生理学・行動学的に大きなインパクトを与えた。

研究成果 G)により、ショウジョウバエで初めて in vitro での記憶研究を行う環境が整った。ショウジョウバエの脳はコンパクトなため、一視野で脳全体を俯瞰してのイメージングが可能である。また脳全体の回路結合を保ったまま、特定の回路機能を調べることができる生理学的解析系は哺乳類モデルにもなく、今後この解析系から多くの成果が期待される。

研究成果 H)から、記憶機構が加齢のみならず、空腹と言った生理状況に応じても変化することが明らかになった。一方、Preat らは過度の飢餓状態では寧ろ長期記憶形成を阻害することを報告している。今後このような生理状況に応じた記憶機構の変化を対象とした研究が発展することが予想される。

研究成果 J)　から MAPK の活性が学習期間中でなく、間で上昇することが初めて分った。しかし同様の発見を米国の Zhong らもしており、長期記憶に必要な間の長さが膜結合型フォスファターゼ SHP2 により制御されているとの報告が出された。一方我々は間の生理的意義として、c-fos/CREB 間で転写サイクルが MAPK により、間に依存して形成されることを示し、現在論文の投稿準備中である。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画１）で間隔により ERK 依存性に c-fos/CREB サイクルが形成されることを初めて明らかにしたが、論文として発表するまでには至らず、Zhong らに先を越されて仕舞った。いくつかの理由があるが、一つには c-fos と CREB の転写サイクルが、細胞自律的に起こるかを検証するために行った c-fos と CREB の発現局在の解析に思いの外手間取ってしまったことが上げられる。その一方で空腹による長期記憶亢進などは予想以上に成果のとりまとめが早く進み、世界に先駆けて成果を発表することができた。また in vitro イメージング解析系も順調に開発が進み、現在ドーパミン神経の連合学習における動作機序について広範な解析が進んでいる状況である。

一方、増田と共同で進めている MAPK 活性動態を指標とした長期記憶学習の間隔が果たす生理学的意義の数理モデルは上記の実験の遅滞から途中で止まってしまったが、実験結果が得られ次第再開する予定である。

＜今後の課題、展望＞

本研究からいくつかの重要な概念の創出が成された。それは例えば、Mg2+ブロックが学習記憶で果たす役割に対する考え方の変換であり、固定化されていると思われている記憶機構が生理状況に対応して変わるという考え方の変換である。

こうした中で研究成果のB)に関連して、我々は現在Klgが神経-グリアの間隙に発現し神経-グリア相互作用を担うことを見出している。さらに長期記憶形成には神経だけでなく、グリア細胞での新規遺伝子発現が必要なことが分かり、この遺伝子発現がKlgにより調節されていることを示すデータが得られつつある。これは従来の転写依存性に起こる神経回路の可塑性を土台とした記憶モデルから、神経－グリア回路も含めた可塑的変化を土台とした記憶モデルへの変換を示す成果となる可能性がある。

本研究において我々はショウジョウバエで初めてとなる、in vitroでの記憶解析系を開発した。哺乳類モデルで精力的に進められているLTPの発現機構の解析でin vitroの実験系が果たした役割を鑑みれば、我々のin vitro解析系が今後果たす役割の重要性も想像に難くない。また佐藤らが開発したMAPKやNOに対する機能分子プローブはin vitro学習系に応用するための系統を現在作成中であり、今後の解析が楽しみな状況である。。

計画研究：平成２０年度-平成２４年度

ゼブラフィッシュを用いた、脊椎動物脊髄運動系神経回路の動作原理の解明

研究代表者：東島　眞一

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター

＜研究の目的と進め方＞

脊椎動物のほとんどの行動は、脊髄内介在神経細胞群が作る神経活動が最終的に運動ニューロンの活動を駆動することによって生じる。しかしながら、その脊髄運動系神経回路の詳細は、特に哺乳動物においてはほとんど分かっていない。研究対象として、より単純な脊椎動物を取り上げることにより、神経回路を実際に明らかにする可能性が生まれる。ゼブラフィッシュ幼魚は比較的単純な中枢神経系をもち、また、体が透明であるためにトランスジェニックの手法を用いて蛍光タンパク質を発現させることにより神経細胞の種類の同定をより精密なレベルで行うことができる。我々はこれまでに、トランスジェニックフィッシュを用い、脊髄内に存在する様々なクラスの神経細胞をラベルすることに成功してきた。本研究では、この方向をより押し進め、ゼブラフィッシュ幼魚を用い、特定のクラスの神経細胞を生きたままラベルできる利点をフルに活かして、脊椎動物脊髄運動系神経回路の動作原理解明に向けて取り組んでいく。分子生物学、解剖学、イメージング、電気生理学、光遺伝学等の広範な手法を総動員して、脊椎動物脊髄運動系神経回路の動作原理理解に向けて研究を進めていく。

＜研究計画＞

1)脊髄運動系神経回路の解剖学的解析

脊髄において少数の細胞群で発現する転写因子が数多く見いだされてきている。これら転写因子の発現は、神経細胞の個性と密接にリンクしていると考えられている。これら転写因子に関して、蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックフィッシュを作製して、脊髄運動系神経回路の解剖学的解析を進める。共焦点顕微鏡による観察を主として研究を進める。

2) 逃避運動に関与する脊髄神経回路の機能解析

幼魚の逃避運動を駆動する脊髄内神経回路を詳しく解析する。動物が危険な敵や刺激からすばやく逃げる運動は,生存にどうしても必要で,最大の効率で実現されることが求められる。それぞれの動物は、可能な限り俊敏に遠ざかるために、最適化された神経回路を獲得したと考えられる。この逃避運動を司る神経回路を調べることで、神経回路の動作原理に迫ることを目指す。

3) 脊髄内V0ニューロンの詳細な解析

脊椎動物脊髄発生において、転写因子 Dbx1 を発現する領域(以下、p0 ドメイン）からは、主に交叉型介在ニューロンが生じることが示されている（以下、V0 ニューロン)。交叉型介在ニューロンは左右の協調運動について重要な役割を果たすことが期待されるが、V0 ニューロンの詳しい役割は明らかにされていない。V0 ニューロンの役割を調べるために、その発生様式から機能解析までの詳しい解析を進める。

4) Chx10 発現神経細胞（V2a ニューロン）の機能解析

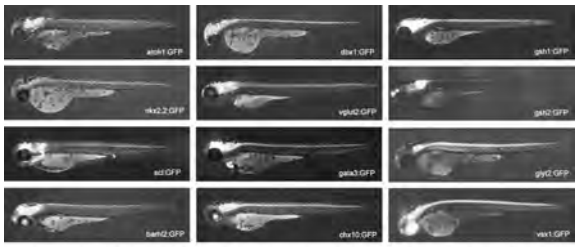
脊髄、および後脳において、転写因子 Chx10 を発現する神経細胞（以下、V2a ニューロン）は、同側投射性の興奮性ニューロンであり、遊泳運動に重要な役割を果たしていることが示唆されている。この V2a ニューロンについて、光遺伝学、電気生理学を用いて、遊泳運動に果たす役割を詳細に解析する。

＜得られた研究成果＞

A) 脊髄運動系神経回路の解剖学的解析

研究期間全般（平成 20-24 年度）を通じて、研究計画 1)について研究を進めた。すなわち発生期の脊髄において、少数の神経細胞、ないし神経前駆細胞で発現する数多くの転写因子を取りあげ、それら陽性細胞で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックフィッシュを作製した。得られたトランスジェニックフィッシュを用いて、脊髄神経回路の体系的な解析を進めた。また、神経伝達物質特性（グルタミン酸、グリシン、GABA）に密接にリンクする遺伝子（それぞれ、vglut2, glyt2, gad）に関してトランスジェニックフィッシュを作製し、上記の転写因子陽性細胞の伝達物質特性を体系的に解析した。得られた結果は、現在学術論文としてまとめている。

また、作製した多くのトランスジェニックフィッシュは、脊髄神経細胞の研究だけでなく、中枢、末梢神経系のさまざまな部位の研究に非常に有用なツールとなる。このため、我々は世界の数多くの研究者にラインを供与して、後脳、眼、嗅覚器官、末梢感覚器官の発生に関して共同研究を行った。そして、得られた成果を数多くの学術雑誌に発表した。



本研究で作製したさまざまなトランスジェニックフィッシュ

B) 逃避運動に関与する脊髄神経回路の機能解析

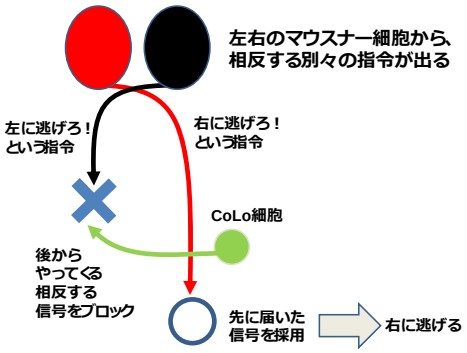
平成 20 年度から 21 年度までに、研究計画 2)に基づき、逃避運動に関する神経回路の詳しい解析を進めた。ゼブラフィッシュを含めた硬骨魚類の後脳にはマウスナー細胞と呼ばれる、一対の大きな細胞が存在する。マウスナー細胞は、その軸索を反体側の脊髄にまで伸ばし、脊髄の中で運動ニューロンなどとシナプスを作っている。マウスナー細胞が発火すると、魚の逃避運動が引き起こされる。逃避運動と同時に、脊髄の反対側にはすばやい抑制がかかることが示されていた。しかし、この素早い抑制が行動レベルでどのような役割を果たすかは明らかとなっていなかった。

我々は東京大学武田洋幸研究室と共同研究を行い、脊髄においてある種の介在神経（以下、CoLo とよぶ；CoLo は、Commissural

local の略；軸索が比較的短いためこのように名付けた）が GFP で標識されているエンハンサートラップラインを見いだした。CoLo ニューロンの詳しい解析を行ったところ、これらはマウスナー細胞から電気シナプスの入力を受けてすぐさま発火する交差型抑制性ニューロンであることが分かった。すなわち、CoLo ニューロンは、逃避運動の際に反対側にすばやい抑制を送る神経細胞であったわけである。

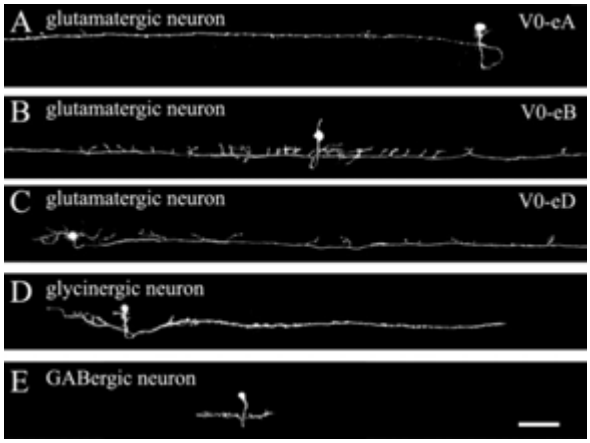
CoLo ニューロンの行動レベルでの機能を調べるため、レーザー照射により CoLo ニューロンを除去し、その幼魚の逃避運動を調べた。音・振動刺激により逃避運動を引き起こすと、コントロール幼魚は左右どちらかへスムーズに逃避運動を行うが、CoLo を除去した幼魚は、しばしば硬直してどちらにも動けない、という表現型を示した。CoLo を除去するのと同時に、左右のマウスナー細胞のどちらか一方をレーザー除去しておくと、このような表現型はいっさい見られなかった。したがって、硬直の表現型が起きるときは、左右のマウスナー細胞の両方が発火していることを強く示唆している。すなわち今回の研究により、（1）幼魚が逃避運動を行う際には、左右のマウスナー細胞の両方が発火することが起こりうること、（2）マウスナー細胞の両方が発火してしまっても、CoLo 細胞が担う素早い抑制のおかげで、魚は左右のどちらかへ逃避運動を行うことが可能である、の２点が示された。すなわち、逃避運動の際には、脳内の情報処理のみならず、脊髄レベルでの下降性コマンドの取捨選択が非常に重要な役割を果たしていることを示すことに成功した。この結果は、J. Neuroscience に論文発表を行った（Satou et al., 2009）。

CoLo ニューロンがあれば、どちらか一方に逃げだすことができるが、CoLo ニューロンを機能不全にした場合には、左、右、両方の指令がやってくるため、動くことができなくなった。



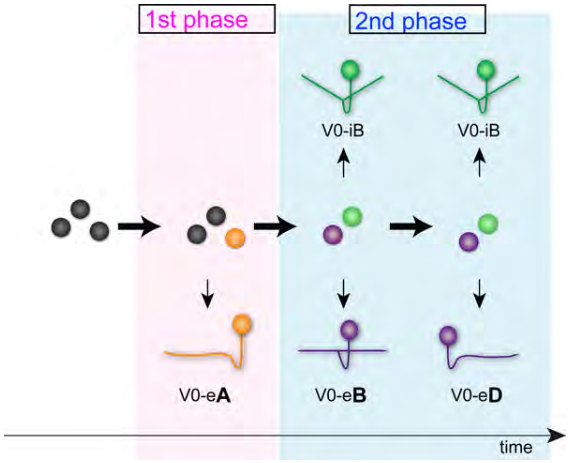
C）脊髄内V0ニューロンの詳細な解析

平成 21 年度から 22 年度までに、研究計画 3)に基づき、脊髄内 V0 ニューロンの詳細な解析を行った。まず、p0 ドメインから誕生する神経細胞を、トランスジェニックフィッシュを用いて蛍光たんぱく質で可視化し、ドメイン内のサブタイプの全貌を明らかにした。その結果、３種類のグルタミン酸作動性の興奮性細胞と２種類の抑制性細胞（グリシン作動性とＧＡＢＡ作動性の神経細胞）が誕生することを明らかにした。



多様な V0 ニューロンの形態学的解析

次に、その多様性がどのような法則に基づいて作り出されるのかを明らかにするために、ひとつの神経前駆体細胞が生み出す神経細胞の全貌を明らかにするために、長期タイムラプスイメージングを行い、興奮性細胞と抑制性細胞は異なる前駆体細胞から誕生することを明らかにした。さらに、3 種類の興奮性細胞のうち、1 種類は特別な前駆体細胞から分裂を伴わず、他の細胞の分化するタイミングに先駆けて分化し、残りの 2 種類の興奮性細胞は同じ前駆体細胞が時間とともに異なる２種類の興奮性細胞を生み出すことを明らかにした。このように、p0 ドメイン内の神経細胞の多様性は、複数のメカニズムが複雑にからみあって多様性を作り出されていることが明らかとなった。この V0 ニューロンの発生機構に関する研究は、J. Neuroscience に論文発表を行った。（Satou et al., 2012）。



多様な V0 ニューロン発生の模式図

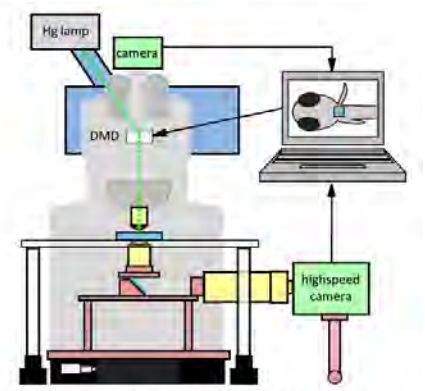
我々は、以前、p2 ドメインから誕生する V2a（興奮性細胞）と V2b（抑制性細胞）が、神経前駆体細胞の非対称分裂により作られ

ることを明らかにしている（Kimura et al., 2008, Development）。一方で、本研究では、p0 ドメインから誕生する興奮性細胞と抑制性細胞は異なる神経前駆体細胞から誕生することが明らかになり、ドメイン内の多様性がドメインごとに異なるメカニズムで生み出されることが明らかとなった。今後は、p0, p2 以外のドメインについても、多様性が作り出されるメカニズムを明らかにしていくことで、複雑な脊髄神経回路網を構築する細胞の多様性が生み出される全貌が明らかにされるものと考えられる。

D) Chx10 発現神経細胞（V2a ニューロン）の機能解析

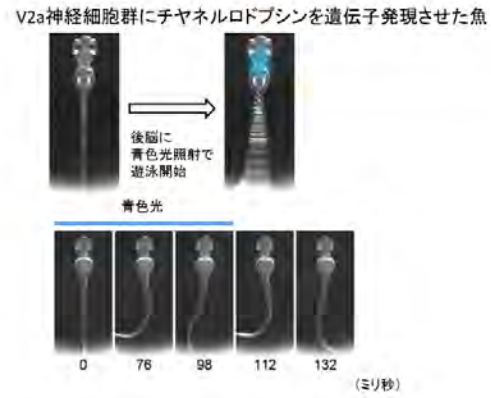
平成 22 年度から 24 年度までに、研究計画 D)に基づき、Chx10 発現神経細胞（V2a ニューロン）の機能解析を行った。我々は以前に、脊髄 V2a ニューロンが、すべて同側下行性神経細胞であり、またグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞であることを明らかにしている。また、運動ニューロンとの２細胞同時記録を行うことにより、それらが遊泳運動中にリズミックに発火し、運動ニューロンに直接シナプス結合していることを示している。すなわち、脊髄 V2a ニューロンは、遊泳運動において、運動ニューロンの活動を cycle-by-cycle にリズミックに制御する神経細胞であることを報告している（Kimura et. al., J. Neuroscience, 2006）。

本研究では、脊髄から一続きに存在している後脳 V2a ニューロンに着目して研究を進めた。我々はまず、「後脳 V2a ニューロンは脊髄遊泳系運動神経回路全般をドライブする神経細胞群である」との仮説を立て、この仮説を、光遺伝学を用いて検証することを試みた。この目的のため、光刺激を行うことと同時に幼魚の運動をモニターする下図の顕微鏡システムを組み上げた。

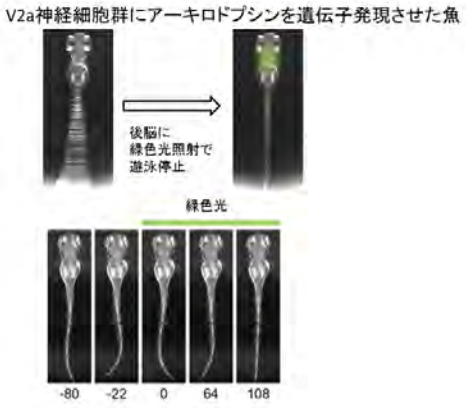


ハイスピードカメラで運動状況をモニターしながら、
狙った場所へ光刺激を行い、神経活動に摂動を加える。
幼魚は胸びれの部分以外は寒天へマウントする。

このシステムを用い、後脳 V2a 群でチャネルロドプシンを発現する幼魚に光刺激を行ったところ、100%に近い頻度で幼魚は遊泳運動を開始した。



次に、後脳 V2a 群でアーキロドプシンを発現する幼魚に光刺激を行ったところ、100%に近い頻度で幼魚は遊泳運動を停止した。



これらの実験結果により、後脳 V2a ニューロン群は、脊髄遊泳系運動神経回路をドライブするのに必要十分な役割を果たすことを明らかにした。

また、後脳 V2a ニューロンに対して電気生理学的解析を行い、仮想遊泳運動中の発火パターンを調べた。その結果、遊泳リズムと強く相関した発火パターンを示す細胞群と、遊泳リズムと発火パターンの相関が非常に低い細胞群の双方が存在することが明らかになった。従来、V2a ニューロンと形態的に相同な網様体脊髄路ニューロンの発火パターンが遊泳リズムと相関するかについては様々な見方があった。本研究では、後脳 V2a ニューロンには多様性があり、トニックなものとリズミックなもの両方があることを示した。

この後脳 V2a ニューロンの機能解析に関する研究は、Current Biology に論文発表を行った。（Satou et al., 2012）。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)は、今後の脊髄神経発生、神経回路形成、神経回路機能解析のもっとも基礎となる研究である。今後の脊髄神経回路の研究に大きく役に立っていくものと期待される。また、作製されたトランスジェニックゼブラフィッシュ群は、脊髄神経回路の研究のみならず、中枢神経系の他の領域の研究においても重要なツールとして大きな役割を果たしていくであろう。

研究成果の B)は、逃避運動における特定のクラスの脊髄神経回路の役割を非常に明瞭に示した研究である。CoLo ニューロンは、脊椎動物の脊髄神経細胞の中で、おそらく役割がもっとも明瞭な形で明らかになったものであり、研究のインパクトは大きい。

研究成果の C)は、脊髄神経細胞の、ドメイン内からの神経細胞多様性形成に、発生時期に依存した機構があることをライブイメージングにより明らかにした。発生時期に依存したドメイン内からの神経細胞の多様性形成機構は、最近マウスにおいても報告されており、脊椎動物全般に見られる共通の機構であることが明らかとなった。

研究成果の D)は、後脳 V2a ニューロンが、脊髄運動系神経回路の活性の制御に不可欠な役割を果たしていることを示したものである。後脳 V2a ニューロンは哺乳類においても存在しているが、その役割はまったく明らかにされていない。本研究において示された、ゼブラフィッシュ後脳における V2a ニューロンの役割は、哺乳類にもそのまま演繹できる可能性が非常に高い。すなわち、哺乳類においても後脳 V2a ニューロンは、歩行運動を司る脊髄運動系神経回路に興奮を送る上で不可欠の役割を果たしてい

ることが強く示唆される。この点において、本研究成果は、ゼブラフィッシュのみならず、脊椎動物運動系神経回路の構成の全般を理解する上での重要な知見を与えるものである。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究期間を通じて、研究室メンバーの努力により研究はおおむね順調に進行した。当初、脊髄のみを研究対象としていたが、光遺伝学の系が順調に動いたため、後脳にまで研究対象を広げることができた。一方、Chx10以外の転写因子陽性細胞に関する研究は、深いとろろまではまだ到達できておらす今後の課題である。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果により、光遺伝学により、特定のクラスの神経細胞の活動を制御し、その行動に与える影響を調べる系が確立された。本研究ではChx10陽性細胞に関して詳しい解析を行ったが、他にも多くのトランスジェニックフィッシュが作製済みであり、今後、この技術を用いて研究が進展していくことが期待される。また、本研究では、逃避運動、遊泳運動ともに、体幹の運動のみを対象としてきたが、まだ手をつけられていない重要な研究対象として、胸びれの運動があげられる。胸びれの左右交互の運動は、陸上脊椎動物の四肢のリズム運動のプロトタイプといえるものであり、この動きを司る神経回路の詳細を明らかにしていくことが、今後の課題の１つとしてあげられる。

公募研究：2008 年度-2012 年度

モデル小動物イメージングのための新しい遺伝子コード型プローブの開発

研究代表者：佐藤　守俊 [1)]

1）東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻

＜研究の目的と進め方＞

細胞の中の生体分子の挙動を可視化する分子イメージング研究においては,興味ある生体分子もしくは生体イオンを捕まえて光を発生する，いわゆるプローブ（probe）と呼ばれる機能性分子の開発が必須である．我々は現在までに，生体脂質や生体小分子,タンパク質リン酸化など生命機能と疾患の理解に重要な細胞内の分子過程を可視化する蛍光プローブを数多く開発し,それらが生きた細胞内の分子イメージングにおいて強力なツールとなることを実証してきた．さらに，開発した蛍光プローブを駆使して,既存の研究手法では知り得なかった生きた細胞内の分子過程の時空間動態を次々と明らかにしてきた．

本領域研究で対象とするモデル小動物においても,様々な分子過程のイメージングが強く求められている.我々は特に蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）に基づく二波長測光型の蛍光プローブを数多く設計・開発し，上述のように細胞内の分子過程のイメージングを実現してきた．本研究では，新しいFRET型蛍光プローブを開発すると共に,これとは異なったタイプの蛍光プローブの開発にも挑戦した.特定の一種類のイオンもしくは生体分子のイメージングに加えて，複数種のイオン・分子過程の同時イメージングに関するニーズが,特にモデル小動物の行動遺伝学研究において急増しているが，これを実現するためには，遺伝子コード型でありかつ単色の蛍光プローブが必要である．しかし，実際に現在モデル小動物での *in vivo* イメージングに用いられている遺伝子コード型単色蛍光プローブは Ca^{2+}蛍光プローブのみに留まっている.動物行動システムの理解において鍵となる様々な分子過程の単色蛍光プローブの開発が,モデル小動物に基づく分子行動学研究に強く求められる技術課題の一つであると考え,環状核酸の単色蛍光プローブを開発することを目標に研究を行った．

本研究で挑戦する二つ目の課題は,マウスなどの透明でないモデル動物の生体深部におけるイメージングを実現する遺伝子コード型プローブの開発である．生物発光タンパク質（ルシフェラーゼ）は，自家蛍光など，蛍光タンパク質が抱える問題に無縁であるため,生体での理想的なレポーターとして注目されるようになって久しい.ルシフェラーゼを活用してカルシウムイオンやタンパク質間相互作用等のイメージングを目指す生物発光プローブも報告されようになってきた．しかし，蛍光タンパク質や蛍光プローブに比べると,ルシフェラーゼや生物発光プローブの利用は依然として限定的である.その原因はいくつか考えられるが,やはり既存のルシフェラーゼの輝度が非常に低いことが第一に挙げられるであろう.この輝度に関する問題が生物発光イメージングの発展のボトルネックになっていることは否めない.日進月歩の勢いの蛍光タンパク質の改良研究に比べると，ルシフェラーゼのそれは散発的であり，蛍光タンパク質に大きく遅れを取っていると言わざるを得ないからである．我々は輝度など，ルシフェラーゼが抱えるいくつかの問題については改良の余地が大きいと考えている.本研究ではルシフェラーゼにアミノ酸変異を導入し,極めて輝度の高い変異体を開発することに目標に研究を行った．

システム分子行動学研究に資する三つ目の技術課題は,モデル小動物の特定細胞において,特定のタンパク質の機能を自由自在に光操作する技術の開発であると我々は考えている.種々のケージド化合物の成功や,神経伝達を光制御するチャンネルロドプシンのインパクトなどを考えると,様々な酵素等のタンパク質の光操作技術の開発は,モデル小動物のシステム分子行動学研究はもとより，細胞・組織レベルでの基礎研究やマウスなどモデル哺乳類動物での研究においても極めて強力なツールを提供すると確信する．本研究では特に，様々なタンパク質の機能の光操作を実現する極めて一般性の高い技術（光スイッチタンパク質）を開発し,これを用いて,脂質リン酸化酵素,タンパク質リン酸化酵素,低分子量GTP結合タンパク質，三量体Gタンパク質等の生体分子を光照射で自由自在に操作する遺伝子コード型分子プローブを創製した．

＜研究計画＞

1) 細胞内の分子過程を可視化する新しい蛍光プローブの開発．

本研究では,特に細胞のストレス応答の理解に重要なタンパク質リン酸化酵素（JNK）の活性化を可視化するFRET型蛍光プローブ,細胞遊走等の様々な細胞機能の理解に重要な活性酸素種の一つである過酸化水素を可視化するFRET型蛍光プローブ,及び脳神経機能の理解に重要な環状核酸の一つである環状グアノシン一リン酸（cGMP）を可視化する単色蛍光プローブを開発する．特に，cGMPの単色蛍光プローブについては，ホスホジエステラーゼ（PDE5）のcGMPの分子認識に関わるドメインを，緑色蛍光タンパク質（GFP）の144番目のアミノ酸と145番目のアミノ酸の間に挿入して，当該環状核酸の単色蛍光プローブを開発する．

2) 高輝度生物発光タンパク質（ルシフェラーゼ）の開発．

ルシフェラーゼと言えばホタルやウミシイタケ由来のルシフェラーゼが有名である.ホタルやウミシイタケ以外にも様々な生物がルシフェラーゼを有することが知られている.中でもガウシアと呼ばれる体長10ミリ程度の小さな海洋性甲殻類が有するルシフェラーゼは,ホタルルシフェラーゼの数百倍という,市販のルシフェラーゼの中では最も高い輝度を有している.ガウシアルシフェラーゼはセレンテラジン（基質）を酸化する酵素である.この酵素反応で生成した励起分子が緩和する過程で生物発光が発生する．我々は，上述の酵素反応が起こる活性中心近傍に集中的にアミノ酸変異を導入し,発光強度を指標として変異体をスクリーニングすることにより,高輝度変異体を開発する．

3) 生体分子の光操作を実現する技術の分子プローブの開発．

細胞内で生起する分子過程の光操作を実現する分子プローブの設計のためには，光刺激で結合・解離をコントロールできる光スイッチタンパク質の開発が必須である.我々はこの目的のために,光受容に関わる様々な生物が有する光受容体タンパク質の特性を探索することから研究を開始する．必要に応じて,この光受容体にアミノ酸変異を加えてその機能を大幅に向上させ,高性能かつ一般性の高い光スイッチタンパク質を開発す

る．この光スイッチタンパク質を部品として用いて，様々な生体分子をそれぞれ光操作するための遺伝子コード型分子プローブを設計し，そのキャラクタリゼーションを行う．

＜得られた研究成果＞

A) タンパク質リン酸化を可視化する FRET 型蛍光プローブ

細胞のストレス応答を制御するセリン・スレオニンキナーゼ（JNK）の活性を可視化する蛍光プローブ“JuCKY（ジャッキー）”を遺伝子工学的手法を用いて開発した．JuCKY は蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を原理とする蛍光プローブである．JuCKY が ERK や p38 など，基質選択性が非常に酷似している関連のセリン・スレオニンキナーゼには全く蛍光応答をしめさず, JNK の活性化に対してのみシャープな蛍光応答を与えることを示した．このように高いキナーゼ選択性を有する JuCKY に核局在化配列（nuclear localization sequence）を連結するとプローブが核内局在化し，核内における JNK の動態を可視化できることを示した．一方，核外輸送シグナル配列（nuclear export signal sequence）を連結した JuCKY は細胞質に局在し，これを用いて細胞質における JNK の活性を可視化できることを示した．（平成 20 年度～22 年度）（*Supramol. Chem.* 2010）

B) 過酸化水素を可視化する FRET 型蛍光プローブの開発

過酸化水素（H_2O_2）は様々な細胞機能の調節に関与していることが近年次々と明らかにされ, 新しい細胞内シグナル伝達物質としても注目されつつある. H_2O_2 が細胞中でどのように機能しているのか，その細胞内動態を明らかにすることは，H_2O_2 による生命機能の制御と活性酸素種に起因する数々の疾患を理解する上で鍵となる重要な課題である．本研究では，生理的低濃度の H_2O_2 を高感度かつ特異的，可逆的に可視化する新しい遺伝子コード型蛍光プローブを設計・開発した．プローブの選択性を *in vitro* で検討したところ, NO, $ONOO^-$, OCl^-，O_2^-等の活性酸素種には応答せず，H_2O_2 特異的に蛍光シグナルを与えることを示した．また，0.5 μM から 100 μM までの H_2O_2 を定量的に検出する極めて感度の良い蛍光プローブであることを示した．この蛍光プローブが応答可逆性を有する蛍光プローブであることも示した．我々は細胞が運動を始める際の初期過程において H_2O_2 が極めて重要な役割を果たしていることを薬理学的手法で明らかにしていたが，細胞のどこで H_2O_2 が生成しているのかは全く不明であった．この問題を明らかにするために，上述の蛍光プローブを遺伝子工学的手法で細胞膜に局在化させた．この局在型の蛍光プローブを用いて血管内皮細胞を観察したところ, H_2O_2 は細胞膜上で一様に生成するのではなく，膜状仮足（ラメリポディア）と呼ばれる特定の膜構造内に限局して生成し，細胞運動を制御していることが明らかになった．（平成 21 年度～24 年度）（*Submitted*）

C) 環状核酸を可視化する単色蛍光メモリープローブの開発

環状グアノシン一リン酸（cGMP）は，線虫のような神経細胞を 302 個しか持たない下等生物から，ヒトのような 140 億個以上の神経細胞を有する高等生物において，記憶形成や学習行動をはじめとする様々な神経機能を制御する因子として知られている．cGMP の動態を可視化するために FRET 型の蛍光プローブが開発されているが，これは，細胞内 cGMP の濃度変化に忠実に応答して蛍光シグナルが増減するため，興味ある生物個体を顕微鏡下に束縛・固定した上で，蛍光シグナルをモニターし続けなくてはならない．本研究で開発した蛍光プローブは, 細胞内の cGMP 濃度の上昇に応答して蛍光強度が増加する点は既存の蛍光プローブと共通しているが, その後細胞内の cGMP 濃度が低下してもその蛍光強度は減少しないという性質を持つ点が大きく異なる．

我々はまず, GFP とホスホジエステラーゼ(PDE5)の cGMP 認識に関わるドメインを用いてプローブを開発し，これが過去におこった環状核酸の濃度上昇を記憶するメモリーとしての機能を有することを明らかにした（図１）．さらに，当

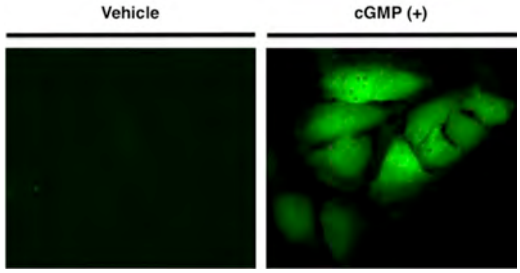


図１　環状核酸（cGMP）の単色メモリープローブ．細胞内 cGMP が生成していない時には無蛍光であるが(左図)，細胞内に cGMP が生成すると強い蛍光を発するようになる(右図). 一旦蛍光を発するようになると, cGMP 濃度が減少に転じても，蛍光強度はそのまま維持される．このように本プローブは記憶型（メモリー型の）の性質を有している．

該プローブにアミノ酸変異を導入し，その輝度を大幅に向上させた．当該蛍光プローブを導入したトランスジェニック線虫を作製し，当該プローブが線虫の神経細胞における環状核酸の生成をイメージングできることを示した．さらに，メモリーとしての機能を有する当該プローブは，固定・保存処理を施した線虫の標本において，少なくとも数週間以上にわたって，線虫の神経細胞で生起した環状核酸の生成に関する情報を保持することを示した．

本プローブは，興味ある生物個体を，束縛なく自由に行動できる環境下で記憶・学習させた後に，どの神経細胞で cGMP 濃度上昇が起きていたのかを精査することができる．さらに，本プローブは，これまでは観測できなかったほどの微弱なシグナルでも，蓄積させることによって検出できるため，cGMP の高感度 *in vivo* イメージングを可能にする．（平成 21 年度～24 年度）（*Manuscript in preparation*）

D) 高輝度生物発光プローブの開発

我々は，ガウシアルシフェラーゼの活性中心近傍に集中的にアミノ酸変異を導入し，発光強度を指標として変異体をスクリーニングすることにより，高輝度変異体を単離した．ちなみに，ガウシアルシフェラーゼは極めて結晶化が困難なタンパク質であり，その構造は明らかになっていない．我々も当該ルシフェラーゼの生物発光特性を合理的に改変するために結晶化を試みているが成功には至っていない．従って，様々な手法でガウシアルシフェラーゼの活性中心を推定し，その近傍のアミノ酸を狙って変異を導入した．このように取得した変異体のうち最も明るいものは，オリジナルのルシフェラーゼに比べて約 10 倍程度高輝度化していた（図２，上図）．ちなみに高輝度化の主要な原因は酵素反応のターンオーバー速度の大幅な向上であることも明らかになった．生体深部でのイメージングにおいて高輝度変異体の有効性を評価するために，悪性黒色腫由来の細胞に高輝度変異体を発現させ，この細胞をマウスの尾静脈に注射して肺への転移を観察した（図２，下図）．高輝度変異体では肺全体に悪性黒色腫細胞が転移している様子が観察できた．一方，オリジナルのガウシアルシフェラーゼを用いて同様のイメージングを行ったところ，転移細胞の密度が高い部位のみから生物発

光シグナルが観察され，高輝度変異体のようにより少数の細胞の挙動を可視化することは困難であった（図２，上図）．

我々が開発したルシフェラーゼの高輝度変異体は，線虫やショウジョウバエ，ゼブラフィッシュ等の透明性の高いモデル小動物はもちろんのこと，特にマウス等の透明でない生体サンプルでのイメージングにおいて極めて強力なツールを提供する．その応用範囲としては，生体での少数の癌細胞や幹細胞等の挙動を高感度に追跡する細胞トラッキング，遺伝子発現を高感度に可視化するレポーター，カルシウムイオンやタンパク質間相互作用等の高感度イメージングを実現する生物発光プローブ等が考えられる．また，生物発光タンパク質や生物発光プローブが励起光を必要としないことを考えると，チャネルロドプシンやハロロドプシンを用いるオプトジェネティクス技術との相性が非常に良いと考えられる．（平成 20 年度～23 年度）（*Anal. Chem.* 2011）

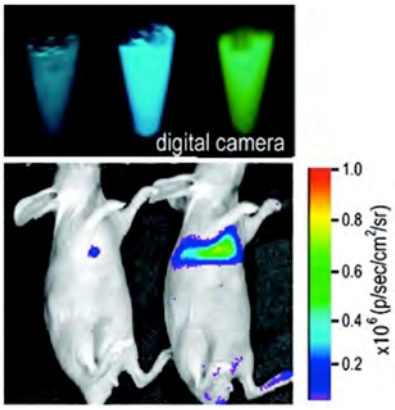


図２　生物発光タンパク質（ルシフェラーゼ）の高輝度化・長波長化．（上図）オリジナルのルシフェラーゼ（左），高輝度変異体（中央），長波長化変異体（右）．（下図）ルシフェラーゼを用いてガン細胞の肺への転移をイメージング．オリジナルのルシフェラーゼ（左）と高輝度変異体（右）．

E) 生体分子の光操作技術の開発

我々はライフサイエンス分野における光技術の将来は必ずしも可視化計測のみに限定されるものでなく，タンパク質の機能や細胞機能を自由自在に“コントロール”するための技術として，光を利用したいと考えている．例えば，細胞膜上の各種受容体や細胞内シグナル伝達を担う様々なタンパク質（酵素）の活性をそれぞれ光で自由自在にコントロールできるようになれば，当該タンパク質が果たす役割を，薬理学的手法や RNA 干渉等の既存の研究手法では得ることができない高い時間・空間分解能で，明らかにできるのではなかろうか．遺伝子発現に関連した転写，エピジェネティクス等の染色体上で生起する分子過程を光でコントロールできようになれば，それぞれの遺伝子の機能を解明する技術として極めて有用なのではなかろうか．さらには，生体の中で細胞遊走，細胞死，細胞分化，細胞増殖，分泌等の細胞機能を自由自在に光でコントロールできるようになれば，当該細胞機能の理解とその応用において極めて有効なのではなかろうか．このような光操作技術の開発は，細胞機能の構成的な理解と制御を目指す新しい生命科学の開拓に繋がるであろう．

我々は上述のような光操作技術を実現する目的で，植物等が有する様々な光受容体（photoreceptor）をスクリーニングし，当該タンパク質が光照射に応答して示す機能の探索研究を遂行した．特に，光照射依存的に相互作用を生起する光受容体を解析する実験系を構築し，これを用いて，様々な光受容体をスクリーニングすることにより，非常に興味深い光受容体を見つけ出すことに成功した．その一つは，光照射依存的に可逆的に多量体（up to 10^6 molecules）を形成する光受容体である．この光受容体をタグとして用いれば，任意のタンパク質やドメインの離合集散を光で自由自在に時空間制御できると考えられる．もう一つ，光照射依存的に二量体を形成する光受容体も見出すことが出来た．我々は，特に光刺激依存的に二量体を形成する光受容体に着目し，これにアミノ酸変異を加えてその機能を大幅に向上させた．具体的には，二量体の相互作用面にアミノ酸変異を導入することにより，親和性を向上させたり，補因子結合部位にアミノ酸変異を加えることにより二量体化のキネティクスを大幅に向上させることができた．

このように天然の光受容体にアミノ酸変異を加えることにより開発した光スイッチタンパク質を用いて，細胞遊走やアポトーシス，糖代謝等の細胞機能を制御する生体脂質（ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸）の産生酵素（ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ; PI3K）を光で活性化させ当該脂質を細胞膜の狙った場所に瞬時に出現させる分子プローブを開発した．この分子プローブは，極めて静的な状態にある細胞膜に局所的に大量の当該脂質を産生させ，そこにラメリポディアやメングレンラッフリングを自由自在に生起させることが出来ると共に，細胞を光で自由自在に移動させる，つまり細胞ナビゲーションも可能にすることも示した（図３）．この脂質産生酵素のみならず，低分子量 GTP 結合タンパク質やタンパク質リン酸化酵素の光操作にも当該光スイッチタンパク質を利用できることを示した．（平成 21 年度～24 年度）（*Submitted*）

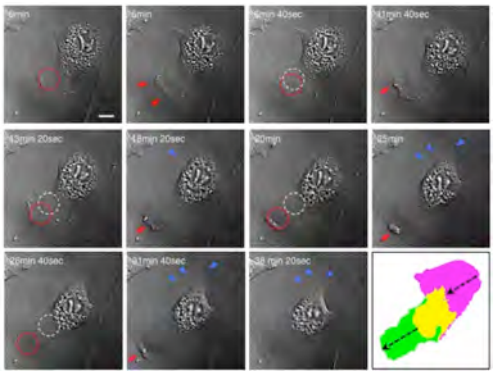


図３　生体脂質（ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸）の産生を光操作する分子プローブ．光を照射したところ（赤丸印）に当該脂質が産生し，それと共に細胞膜にラメリポディアが形成される．引かし照射の場所を右下に移動させることにより，細胞をその方向に移動させる，つまり細胞の光ナビゲーションが実現できた．

＜国内外での成果の位置づけ＞

蛍光プローブに関する代表的な研究成果 A，B はいずれも当該生体分子の可視化をはじめて実現するものであり，今後，これらを用いた成果が上がってくることが多いに期待される．

蛍光プローブの代表的成果 C は，既存の蛍光プローブとは全く異なるコンセプトの蛍光プローブを開発したという点で非常に新規性が高いと考えられる．本研究で示した環状核酸（cGMP）のみならず，本研究のプローブの分子設計を参考にして，様々な生体分子もしくは生体イオンに対して，同様の蛍光メモリーが今後開発されれば，特に複雑な神経回路の解

明が急務となっている神経科学の分野において極めて重要なツールを提供することになると予想される．

研究成果 D で開発した生物発光プローブは，発表の時点で世界で最も輝度の高いルシフェラーゼとして大いに注目を浴びた．その後，国内外のその他の研究グループからも，極めて輝度が高いルシフェラーゼが発表されるようになり，今後の競争の激化が予想される研究開発分野である．

研究成果 E について，天然の光受容体をそのまま用いて，生体分子の活性を光で操作できるようにする技術がいくつか発表されるようになっているが，本研究のように，天然の光受容体に大幅な改変を加えてその機能を大幅に向上させて，極めて有用かつ一般性の高い光スイッチを開発する研究は他に例を見ない．当該光操作分野において新しい流れ作るきっかけになるものと期待される．

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究成果Eで開発した光操作技術を線虫等のモデル小動物で利用するところまで本研究で遂行したかったが，研究期間の終了までには間に合わず，培養細胞での検討までに留まった点が残念である．この点は，今後，是非挑戦していきたい．他はおおむね順調に進めることが出来たと考えている．

＜今後の課題、展望＞

本研究では，生命現象の可視化のための新しい分子プローブを開発すると共に，光を用いて生命現象を操作する革新ツール（光スイッチタンパク質）の開発にも挑戦し，これを開発することができた．特にこの光スイッチタンパク質に関しては，本研究で試みた細胞内分子過程のみならず，様々な生体分子の光操作に応用して，さらに多くの研究者の役に立てるツールを開発していきたいと考えている．また，細胞の光操作に留まらず，モデル動物の生体内で生起する分子過程の光操作にも挑戦していきたいと考えている．

計画研究：平成 20 年度 - 平成 24 年度

移動運動と学習記憶の確率モデルによる数理解析

研究代表者：増田　直紀[1)]　研究分担者：大久保　潤[2)]

1）東京大学大学院情報理工学系研究科数理情報学専攻　2）京都大学情報学研究科システム科学専攻

＜研究の目的と進め方＞

A）線虫の移動行動は複雑である。具体的には、緩やかにカーブしながら進むことと、時折急激な方向転換を行うことを織り交ぜながら、例えば餌の濃度が高い位置へ向かって行く。後者の「急激な方向転換」については、その統計的性質などがよく調べられている。一方、前者の「緩やかにカーブしながら進む」ことについては、計画研究班の飯野らが発見した好きな化学物質の濃度が高い側に徐々に曲がっていく風見鶏機構の存在を除いては、よくわかっていなかった。一方で、他の生物については、移動行動をレヴィ・ウォークや相関を持つランダム・ウォークなどの数理モデルを用いて解析することが古くから行われていて、走性や採餌行動の理解のために用いられている。そこで、本研究では、飯野班の実験から得られた、線虫の移行動のデータを、ランダム・ウォークおよび統計力学の解析手法を用いて解析した。

B）線虫のニューラル・ネットワークは、302個の神経細胞から成る。線虫の刺激などへの応答とニューラル・ネットワークの機能の関係については、多くの研究が行われているものの、全体のネットワークのうちの少数の神経細胞からなるネットワークに焦点をあてて、関係性を論じることが通常である。そのようなアプローチと補完的なものとして、線虫のニューラル・ネットワークのダイアグラム全体から、個々のニューロンの重要性などを論じるというネットワーク科学的なアプローチが考えられる。特に、科学シナプスを方向つきの枝、ギャップ・ジャンクションを方向なしの枝とするグラフに対して、枝の向きに沿って上位と下位が定義され、大域的にも上位から下位へと階層が定まることが一般的である。そこで、本研究では、そのような方向性のあるネットワークに対してノードの重要性指標を提案し、線虫のニューラル・ネットワークの構造解析を行った。

C）ニューラル・ネットワークや細胞ネットワークにおいて、各素子には、内在的あるいは外部から与えられたノイズがあり、それによって動的秩序状態もゆらいでいると考えられる。例えば心拍や概日リズムは、それぞれ、ペースメーカ細胞と時計細胞の同期によって生成されている。また、電気魚の一種は、仲間の認識や採餌のために数百ヘルツの振動的な電気信号を発し、その振動の周期は非常に精確であることが知られている。

単一細胞の活動にはゆらぎがあるが、もしこのゆらぎが同期ダイナミクスに残れば、正確な周期性は損なわれる。また、神経細胞集団による情報処理・伝達でもゆらぎは障害となると考えられる。一方、ある程度のゆらぎを集団挙動に残すことは、例えば、確率共鳴と呼ばれる現象のためには有利であるかもしれない。ノイズを受ける素子のネットワークの、集団挙動におけるゆらぎの研究は生物分野でも活発になされてきたが、これを取り扱う一般的な理論枠組みが存在しなかった。そこで、本研究では、ネットワーク結合系に対して、各素子のゆらぎの大きさと集団挙動のゆらぎの大きさを関係づける理論を構築した。

D)ヒトの全脳的な空間スケールの脳ネットワークを考える。ネットワークのリンクは、領野間の結びつきがあることを表す。このような脳ネットワークの構造から情報を引き出す試みは、2000 年頃から盛んになっている。このとき、2 領野間の結合の有無やその強さを決定する方法は簡単ではない。解剖に基づいて結合を決定することはしばしばある。 1 つの研究グループが全ての結合の有無を解剖学的に決定することはできないので、そのような研究はメタ研究として行われてきた。ただし、メタ研究をもってしても、全ての結合の有無が調べられたわけではなかった。

より簡便で広く用いられている手法は、機能的結合の利用である。全脳レベルの活動は、fMRI などの脳画像計測として行われることが普通である。この研究領域で、機能的結合とは（Bold signal の 0.01-0.1 Hz 内という低周波領域の）活動相関のことを表す（電気生理で提唱されている機能的結合とは同じ定義ではない）。すなわち、ある 2 領野（ROI = region of interest）での活動の時間相関が強ければ、その 2 点はシナプスや解剖学的結合とまでは言わないが機能的に結びついていると見なす。現在の脳画像解析には、電気生理やカルシウムイメージングのような時間解像度はないので、信号の流れのような因果関係をミリ秒単位で特定することは難しい。したがって、因果関係でなく相関関係で見ることは許容されることが多い。 しかし、それでもなお、機能的結合には難点がある。それは、機能的結合による解析が ROI 対を個別に取り扱っていることに起因する。活動の相関を測る作業を、ROI 対を取り替えて行い、その総体として脳ネットワークを定義している。これは、脳ネットワークの総体的な活動を把握するために適切な手法であるかどうかわからない。また、相関係数の性質上、ROI A と B が直接結合して相関していて、B と C もそうであれば、A と C は直接結合していなくてもある程度相関してしまう、という擬相関の問題がある。 そこで、我々は、機能的結合を用いずに脳ネットワークを直接推定する方法を開発した。

E）ニューラル・ネットワークを例とする生物のネットワークの上には動的に信号が流れていて、結合（シナプス）は常に使われているとは限らない。与えられた刺激やタスクに応じて、ネットワークの中で活発な部分と不活発な部分があると考えることは自然である。一方、ネットワークという理論的視点では、伝統的に結合は常に同じ強さで存在していることを暗黙に仮定した上で理論やデータ解析手法の体系を構築する場合が多かった。

近年、生物や非生物のデータがこの観点から見直され、結合は一時的にだけ存在して使われる、という理論体系が発展しつつあり、総称してテンポラル・ネットワークと呼ばれる。テンポラル・ネットワークの研究は全体としてまだ歴史が浅いため、様々な解析手法を提案し、異なる種類のデータセットに対して適用してその性能等を調べることが有益であるのが現状である。そこで、本研究では、テンポラル・ネットワークの解析手法をいくつか提案し、人工的に生成したデータや入手可能な実デー

タに対して適用した。

＜研究計画＞

A) 線虫の移動行動のデータ解析と数理モデリング

- 飯野班のデータの解析
- ランダム・ウォークによる数理モデリング
- ランダム・ウォークの理論的解析

B) 有向ネットワークの中心性指標

- ラプラシアンを用いた中心性指標の提案
- 提案指標とランダム・ウォーク、同期、DeGroot モデルとの関係性の導出
- モジュール構造を持つネットワークに対する近似手法の構築
- 線虫のニューラル・ネットワークへの応用

C) ネットワーク内の振動の精確性

- 結合振動子系を用いた、振動の精確性問題の定式化
- 同期解周辺におけるダイナミクスの線形化
- 振動の精確性指標とネットワーク構造を結ぶ公式の導出
- 具体的なネットワークに対する、提案理論の応用

D) 最大エントロピー法による脳ネットワークの推定

- 静止状態における fMRI 信号の計測
- 最大エントロピー原理の実データへの適用
- 脳ネットワークの推定
- 他の手法との性能比較

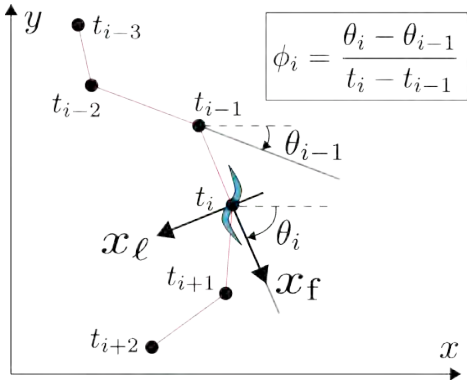
E) テンポラル・ネットワークの解析

- イベントの予測可能性の定式化
- イベントの重要性指標の定式化
- 人工データおよび実データへの提案手法の応用

＜得られた研究成果＞

A) 平成 20 年度から 21 年度までに、研究計画の項目 A)について研究を進めた。具体的には、線虫が緩やかにカーブしながら進む部分に注力して実験データの解析を行った。特に、線虫が曲がる速さ（図 1）の統計を調べた。その結果、単位時間で曲がる大きさの分布は、べき分布であることがわかった。多くのときは曲がる度合いが小さくて直線的に進み、大きめに曲がるときが時折、しかし、それなりの頻繁で起こる、ということである。曲がる大きさは正規分布に従わない。べき分布は、「急激な方向転換」を線虫の軌道から除去した残りのデータについても見られることも明らかになった。

図 1: 線虫の行うランダム・ウォークの概念



このようなべき分布は、線虫が古典的なランダム・ウォークを行うと仮定すると説明できない。我々は、べき則を伴う線虫の移動行動を、乗算的なノイズを受けるランダム・ウォークによって数理モデル化した。生成された軌道は、実際の線虫の軌道と類似していた。この数理モデルでは、移動するために生成される力が、力の大きさに比例した大きさのノイズを伴う。実際の線虫にもこのような比例関係が存在する可能性が示唆された。

これらの結果をまとめ、学術論文として発表した（Ohkubo, Yoshida, Iino and Masuda, Journal of Theoretical Biology, 2010）。

B) 平成 20 年度から 22 年度までに、研究計画の項目 B)について研究を進めた。具体的には、各頂点の重要性を定める指標（中心性）を 2 種類定義し、線虫のニューラル・ネットワークに適用した。その結果、感覚ニューロンが上流にあり、インターニューロンが中位にあり、運動ニューロンが下流にあるという傾向があることを定量化することができた。また、例えば、感覚ニューロンの中でも、ネットワークにおける位置という意味での重要性は、ニューロンごとにかなり異なることがわかった。開発に用いては、ラプラシアン行列を用いた。ラプラシアンに導かれるダイナミクスは、ネットワーク上の同期現象、拡散現象などを表し、提案指標は、そのようなダイナミクスにおける頂点(ニューロン)の重要性を与えると解釈することができる。

次に、行列・木定理を用いて、ネットワークが階層（モジュール）構造を持つ場合の、中心性の値の近似手法を開発した（図 2)。この手法は、頂点数が多いネットワークに対して有効である。また、線虫のように頂点数が多くないネットワークに対しても、頂点の重要性をそれが属するグループの重要性と、その頂点のグループ内での重要性の積で近似できるという解釈を与える。

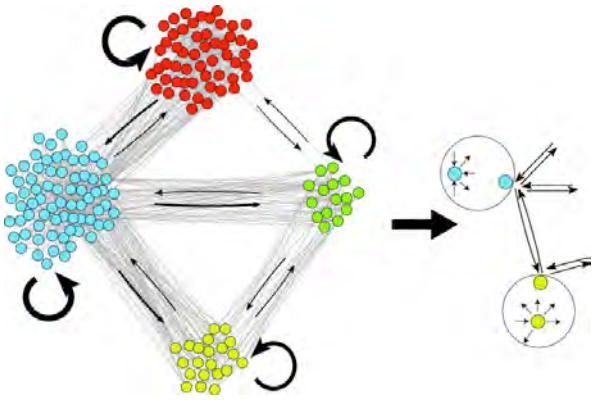


図 2: モジュール構造を持つネットワーク。この例は、線虫のニューラル・ネットワークの一部である。

これらの結果をまとめ、学術論文として発表した（Masuda, Kawamura and Kori, New Journal of Physics, 2009; Masuda, Kawamura and Kori, Physical Review E, 2009; Masuda and Kori, Physical Review E, 2010）。

C) 平成 20 年度から 22 年度までに、研究計画の項目 C)について研究を進めた。まず、素子が同期していることは仮定し、その上でどのような場合に振動の周期のゆらぎが小さい(振動が精確である）か（図 3）を、結合振動子モデルを用いて解析した。具体的には、均一な動的素子、かつ、無向ネットワークでは、集団ゆ

らぎは中心極限定理と一致することが明らかになった。すなわち、ゆらぎの標準偏差は素子数の逆数の平方根に比例することがわかった。したがって、この場合は、素子がネットワーク化することによってノイズの逓減が実現できる。一方、一般のネットワークでは中心極限定理よりも弱い素子数への依存性を伴って、ネットワークのノイズは減少する。特に、有向スケールフリー・ネットワークでは、標準偏差が素子数の逆数の平方根以外のべきに比例するという特徴的な依存性を持つ。また、無向ネットワークでも、格子結合振動子系でターゲットパターンやスパイラルパターンが現れる場合は、ある程度の素子数以上でゆらぎが減少しなくなることを明らかにした。

これらの結果をまとめ、学術論文として発表した（Masuda, Kawamura and Kori, New Journal of Physics, 2010; Kori, Kawamura and Masuda, Journal of Theoretical Biology, 2012)。

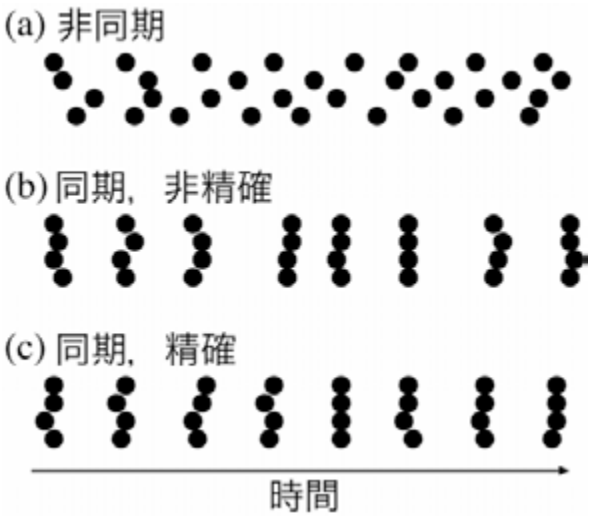


図 3: 振動の精確性の概念

D) 平成 22 年度から 24 年度までに、研究計画の項目 D)について研究を進めた。具体的には、最大エントロピー法と呼ばれる手法を fMRI 信号に用いて、脳ネットワークを推定した。最大エントロピー法は統計物理学でイジング・モデルと呼ばれ、統計学や情報幾何学では対数線形モデルと呼ばれるモデルである。各時刻での計測データ（スナップショット）について、ある閾値で切って各 ROI の状態を活動または非活動のどちらかに 2 値化することは、本手法の特徴の 1 つである。ROI が N 個あれば、各スナップショットは 2 の N 乗個ある可能な状態のうちの 1 つとなる。スナップショットが 2 の N 乗個のそれぞれの状態をとる確率は、実験データとモデルでなるべく近くなるように、統計的手法でモデルのパラメータ値を決定した。

データは、被験者が特に何もしていないとき、2 種類の全脳レベルのネットワークに属する脳領域から得られる fMRI 信号（default mode network と frontoparietal network。 特に前者は、被験者が何もしていない時に活性化されている脳ネットワークとされている）を用いた。最大エントロピー法により推定されたモデルは、データをよく説明することがわかった。さらに、解剖学的結合をもとにしたネットワークと、本手法により推定されたネットワークを照合したところ、その当てはまり度合いは、機能的結合や他の手法から推定されたネットワーク構造よりも高かった。したがって、最大エントロピー法は、擬相関やペアを個別に推定してしまうこと、といった機能的結合の弱点を克服しつつ、実データを説明する力も持つことが期待される。

これらの結果をまとめ、学術論文として発表した（Watanabe et al., Nature Communications, 2013)。

E) 平成 22 年度から 24 年度までに、研究計画の項目 E)について研究を進めた。具体的には、素子から素子への信号伝達を時間的に離散的なイベントと見なし、イベント系列の予測可能性を定量化する手法を開発した。個々の素子にとってのイベント系列を、伝達の相手素子をイベントの時刻順に並べた系列であると定義する。次に、個々の素子のイベント系列の予測可能性を、直前のイベントの相手がどの素子であったかを知ることにより次のイベントの相手がどの素子であるかについて得られる情報量として定義する。この予測可能性はイベント系列の相互情報量を用いて定量化する。入手可能であるデータに対して本手法を適用した結果、イベント系列はある程度予測可能であることが判った。この予測可能性の主な原因はイベント時間間隔のバースト性であった。すなわち、一度イベントが起こった素子対は短い時間間隔の間に再びイベントを起こしやすい、という傾向がかなりの程度予測可能性に寄与していた。しかしながら、そのバースト性の影響を除いてもなおイベント系列には有意な予測可能性が見られた。

次に、テンポラル・ネットワークにおける個々のイベントの重要度の指標を提案する。重要性は、静的なネットワークにおいては個々の素子や結合の中心性と呼ばれ、基準や応用に応じて中心性の定義が色々存在する。本研究では、イベントに含まれる２素子に、他の素子についてより最近の情報をもたらすようなイベントを重要であると見なし、イベントの重要度を定義した。すなわち、直近性の意味で情報を多く運ぶと思われるイベントほど重要である、という定義である。提案された重要度指標を人工データや実データに適用し、重要度指標の性質を調べた。特に、実データから多数の重要度の低いイベントを取り除いても、全体としてのネットワークの連結性は保たれることが判った。すなわち、テンポラル・ネットワークの結合は少数の重要なイベントによって保つことが可能である、という意味での頑健性が示唆される。また、実データをランダム化したデータに対して同様のイベント除去テストを行うことにより、頑健性の主因がペアごとのイベント発生時間間隔のバースト性であることがわかった。

これらの結果をまとめ、学術論文として発表した（Takaguchi et al., Physical Review X, 2011; Takaguchi et al., New Journal of Physics, 2012)。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)は、経済物理学などの分野で使われていた手法を新しく線虫のデータに適用した報告である。線虫のみならず、様々な生物の走性や採餌行動の理解に寄与するものと期待される。

研究成果の B) については、ページランクなどの類似指標が存在するため、生物学よりも枠を広げて考えれば競争の激しい分野である。その中で、ラプラシアンという枠組みに基づいて中心性指標の一連の開発が行えた。ラプラシアンに基づくネットワーク構造解析の手法は、その後も発展が著しい。

研究成果の C) は、問題の重要性は理論と実験の両面から長らく認識されてきたが、決定的な理論的理解がなかった課題であった。本報告はこの問題に理論的な答を与えるものであり、今後も、理論と実験の両面からの本研究テーマの発展が見込まれる。

研究成果の D)については、最大エントロピー法は長らく知られていたものの、神経科学では、おそらく先行研究がそうであったために神経スパイクの離散的なデータに適用することが主な応用であった。本研究では、fMRI 信号というアナログのデータ

に本手法を適用して成功をおさめた最初の研究事例である。今後は、脳ネットワークの構造推定の手法についての議論がより活発になると予想される。また、類似の手法を線虫などのより小さい生物へと適用することが今後盛んになると予想される。

研究成果の E) については、本研究を含め、世界中で様々なテンポラル・ネットワークの解析手法が提案されている昨今である。しかし、その大半は本研究も含め、社会データや感染症伝搬などの社会現象に応用することを主な応用としている。しかしながら、テンポラル・ネットワークのデータは、脳・神経系を含め、生物界にも普遍的に見られる。今後は、本研究で得られたものを含むテンポラル・ネットワークの解析手法が生物データに応用されていくことが予想される。

研究成果 A) ～ E) に共通して、上記の見解は国際的標準に基づくものである。国内においては、類似研究はあまり見られず、本研究が各研究成果について国内をリードするものであると考えられる。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画の D) について、研究の過程で、最大エントロピー法には、fMRI の基準に照らすとかなり多いデータが必要である、という難点があることがわかった。本研究では素子数が 11 または 12 のネットワークを推定するために、6人の被験者のデータをプールする必要があり、また1人の被験者から計測した時間もかなり長かった。また、データが十分にあったとしても、数理的な理由で、パラメータの決定作業にはかなりの計算時間がかかった。

＜今後の課題、展望＞

研究課題 D) について、スケーラビリティを克服すべく解析手法の改良は、ここ3年程度でもかなり発展している。今後はそれらの手法を取り込んだデータ解析を行うことが望まれる。また、本領域が主要ターゲットとしていたモデル動物(特に線虫)では、ニューロン間の信号伝達の因果関係が見える時間解像度での多点同時計測が、可能になりつつある。その点、fMRI が対象とするヒト脳と異なる。したがって、因果関係を考慮しない元の最大エントロピー法ではなく、因果関係を考慮した最大エントロピー法や、同目的の他の数理的手法を適用することが望ましいかもしれない。最大エントロピー法について言えば、そのような方向にも解析技術は発展しつつあり、これらの手法を線虫などの多点同時計測データに適用することは本研究テーマの展望の一つとして挙げられよう。

計画研究：20 年度-24 年度

生物行動のシステム工学的解釈とバイオミメティック・センサ・システムの提案

研究代表者：辻　敏夫[1)]　研究分担者：田中　良幸[1)]、滝口　昇[2)]、鈴木　芳代[3)]

1）広島大学大学院工学研究院電気電子システム数理部門　2）金沢大学・理工研究域・自然システム学系

3）独立行政法人日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門

＜研究の目的と進め方＞

近年、環境中に存在する化学物質が生物に与える影響を定量評価するためのセンサ・システムの必要性が指摘されており、その研究開発が盛んに行われている。しかし、極めて広範囲にわたる化学物質をカバーすることと化学物質の微妙な違いを識別することの2つを同時に満足するようなセンサ・システムを工学的に構築するのは容易ではなく、生物の嗅覚系に匹敵するような人工システムはまだ実現されていない。また、工学的な分析法のみに基づくアプローチでは、化学物質が生物に及ぼす生理的・心理的影響を予測することまでは難しく、従来の工学的アプローチに代わる新しい方法論が必要とされている。

これまで研究代表者らは「生体システムに学ぶ」、「生体システムを利用する」という立場で、機械システムの設計や制御に有用な技術の研究開発を進めてきたが、センサ・システムの研究開発においても、生体システムに学び、生体システムを利用するというアプローチが有効であると考えられる。生物の環境応答（例えば、化学走性行動）を考えると、分子と行動の間に横たわるブラックボックスの動作メカニズムを明らかにすることは、①外的・内的刺激の受容、② 刺激情報の統合処理、③ 行動の決定と運動制御という3つの機能を担う生体情報処理メカニズムをシステム工学的に解釈することと等価であり、その3つの機能を工学的に再構築することにより生物の感覚系に匹敵する人工センサ・システムを実現できる可能性がある。

本研究では、感覚入力に対する応答を行動出力（運動）によって評価することが比較的容易な線虫、げっ歯類（マウス、ラット）及び小型魚類（ゼブラフィッシュ、メダカ）を主な対象として、１．環境刺激に対する生物行動モデルの構築とシミュレーション、及び２．生物の情報処理メカニズムに基づくバイオミメティック・センサ・システムの開発（要素技術の創出）を達成目標とした。

＜研究計画＞

達成目標１．及び２．に関する以下の５項目を重点項目とした。

1．環境刺激に対する生物行動モデルの構築とシミュレーション

1）線虫の刺激応答実験と神経-筋モデルとにより刺激応答の神経情報処理メカニズムを探る

2）マウスの嗅神経系モデルと行動実験とにより匂い識別に有効な選択的注意のメカニズムを探る

２．生物の情報処理メカニズムに基づくバイオミメティック・センサ・システムの開発（要素技術の創出）

3）線虫の刺激応答メカニズムを応用して移動ロボットの環境適応制御を実現する

4）マウスの匂い識別アルゴリズムを実装した匂いセンサシステム（人工官能検査装置）を開発する

5）小型魚類を「生きたセンサ」として用いたバイオアッセイ（水質検査装置）システムを開発する

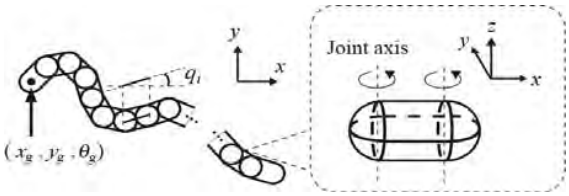


図 1　線虫の身体動力学モデル

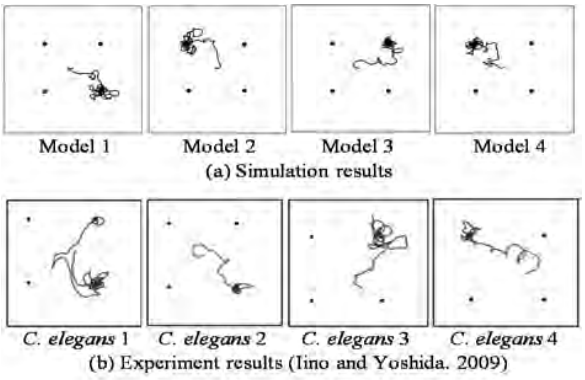


図 2　線虫の化学走性シミュレーションの結果（運動軌跡）

＜得られた研究成果＞

項目 1）について、主に A)～C）の成果を得た。

A）線虫の神経-筋モデルを用いた化学走性シミュレーション

線虫の刺激応答における感覚入力と行動出力（運動）の関係を解析するために、線虫の全身運動を担う体壁筋造に基づく身体モデルを構築した。まず、2 次元平面上で回転する関節で連結された 12 セグメントの剛体リンクで線虫の身体を近似し、ニュートン・オイラーの運動方程式に基づいて記述した（図１）。12 のリンクは実際の 12 の筋セグメントに対応しており、身体（筋）の硬さ・柔らかさを表すバネ要素、ダンパー要素及び力発生要素で構成される。この身体動力学モデルを用いたシミュレーションにより、研究計画班の飯野が提唱する「風見鶏機構」と「ピルエット機構」の２つの戦略からなる線虫の化学走性メカニズム[Iino & Yoshida, 2009]を計算科学の側面から検証した。線虫の身体動力学モデルを感覚入力に基づいて制御するために、感覚入力から行動指令を生成する神経回路モデルを構築し、身体動力学モデルを含めた 3 つのサブシステムからなる線虫シミュレータプラットフォームを完成させた。神経回路モデルは NaCl に応答する ASEL 及び ASER ニューロンとそれらに接続する介在及び運動ニューロンで構成した。飯野らの文献[Iino & Yoshida, 2009]に基づいて NaCl の濃度分布とその経時変化を記述し、開発したモデルを用いてシミュレーションを行った結果、実生物の運動軌跡（図 2a）と類似した運動軌跡（図 2b）が得られた。このとき、NaCl への誘引の強さを表す Chemotaxis Index（C. I.）を実生物と比較し

た結果、ほぼ同等の値が得られることを確認した（実生物 0.57, モデル 0.59)。また、風見鶏機構のみを神経回路モデルに組み込んだ場合には C. I.が著しく低下したことから、風見鶏機構が NaCl の探索に不可欠であることが計算科学の面からも裏付けられた。これらの成果を国際学会で発表した（Soh *et al.*, EMBO Conference Series: *C. elegans* Neurobiology, 2012)。

B) 線虫の運動を変化させる放射線の神経作用メカニズムの解析

線虫の環境刺激に対する応答のうち、化学物質応答に比べて未知な部分が多い放射線刺激に対する応答に着目し、運動を指標として調べた。線虫は、餌の存在下においては餌への接触に起因するドーパミンを介した情報伝達により全身運動が強く抑制されており、放射線に曝してもその影響は現れなかった。ところが、ドーパミンの情報伝達に異常があり、餌による全身運動の低下反応が弱くなった突然変異体に 0-500 Gy の ^{60}Co ガンマ線を照射したところ、餌による全身運動の低下に加えて照射線量依存的な全身運動の低下が相加的に観察された。このことから、放射線刺激による全身運動の低下の主因は、ドーパミンを介した情報伝達とは異なる情報伝達であることが推測された。さらに、過酸化水素に曝露した線虫の全身運動は、放射線を照射した線虫の全身運動と類似していたことから、放射線による全身運動の低下は、放射線により産生された活性酸素種などを介した情報伝達により誘導されている可能性が示唆された。この結果をまとめ、学術論文及び総説論文として発表した（Suzuki *et al.*, Journal of Radiation Research, 2009; 坂下& 鈴木,放射線生物研究,2011)。さらに、餌の咀嚼及び嚥下を担う咽頭筋のポンピング運動における放射線応答についても調べたところ、全身運動同様に放射線の照射線量依存的に低下すること、低下した運動は 2 時間以内に回復することが明らかとなった。この成果を国際学会で発表した（Suzuki *et al.*, 18th International *C. elegans* Meeting, 2011)。

C) 線虫の運動リズム生成・制御メカニズムの解析

研究成果 B) で見出した放射線刺激による線虫の運動の一時的な変化に着目し、その素過程である運動生成・制御の基本的メカニズムを明らかにするためのシミュレーション解析系の構築に着手した。線虫の全身運動の制御を担う運動ニューロンの神経回路を生物のリズム発生器（CPG）の数理モデルである神経振動子としてモデル化した。神経振動子には、ニューロンの応答特性や細胞間情報伝達量を表す多くのパラメータが含まれており、運動リズムをシミュレートするためには、これらの値を適切に調整する必要があった。本研究では、パラメータ自動調整法を独自に開発して適用し、線虫の前進運動から観測したリズム信号をシミュレートすることに成功した。また、モデルに含まれる一部のシナプスを仮想的に除去し、応答の変化を調べるシミュレーションにより、運動リズム生成・制御への個々のシナプスの関与を推定する細胞・シナプス機能推定法を考案した。この成果をまとめ、学術論文として発表した（Hattori *et al.*, Neural Computation, 2012)。一方、咽頭筋のポンピング運動については、筋細胞が運動リズムの生成を行い、ニューロンがそのリズムを制御している。そこで、筋細胞ネットワークの運動リズム生成メカニズムを探るために、咽頭の 20 個の筋細胞モデルからなる咽頭筋細胞ネットワークモデルを構築した。シミュレーションにより、提案モデルは、実験的手法による計測が困難な運動時の個々の細胞の膜電位をシミュレートできるだけでなく、膜電位の総和である咽頭筋電位の実測値をよく再現することを確認した。本成果をまとめ、学術論文として発表した（Hattori *et al.*, Artificial Life and Robotics, 2012)。さらに、細胞・シナプス機能推定法を応用して個々の咽頭筋細胞の運動リズム生成への関与を推定し、重要な筋細胞を 2 種類にまで絞り込むことに成功し、国際会議で発表した（Hattori *et al.*, 19th International *C. elegans* Meeting)。

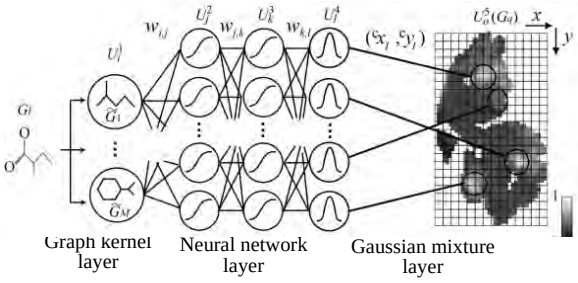


図 3　糸球体層の神経活動パターン推定モデル

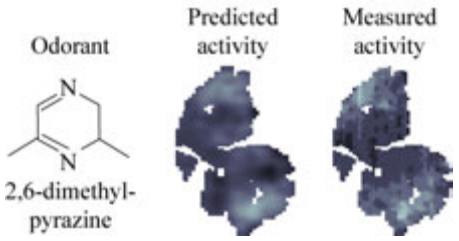


図 4　ラット嗅球の糸球体層の神経活動パターンの推定結果

次に項目 2) については、主に D)及び E) の成果を得た。

D) マウスの嗅神経系モデルによる匂い識別シミュレーション

マウスの匂い感覚特性を明らかにするために、Y-maze を用いた匂い識別行動実験を行った。まず、3 種類の分子から構成される匂い A を報酬（水）と条件づけした後、匂い A の構成要素から 1 種類もしくは 2 種類除いて構成した別の匂いと匂い A を識別させる実験を行った。その結果、匂い A と識別できない匂い構成が存在することを見出した。これは、マウスが匂いを構成する分子のうちの一部に選択的注意（アテンション）して匂い識別を行っていることを示している。この結果をまとめ、総説論文として発表した(滝口ら, 生物工学会誌, 2010)。この選択的なアテンション機能を工学的にモデル化するため、嗅覚系の解剖学的な構造（マクロレベル）に基づき、嗅覚系を構成する嗅球と梨状葉の 2 つの部位の嗅神経回路モデルを構築した。提案モデルへの入力は実測された嗅球の糸球体層に誘起される神経活動パターン(http://gara.bio.uci.edu/)で、嗅球内のニューロンモデルの間に働く競合作用と梨状葉を構成するニューロンモデルからの抑制性フィードバックによって、入力された神経活動パターンのうちの一部を抽出することができる。マウスの匂い識別実験を模擬したシミュレーションを行った結果、モデルを用いて推定したマウスの匂い識別率と実生物の匂い識別率との相関は r = 0.74 であった。この結果は、神経活動パターンから匂いの類似度をある程度推定し得ることを意味している。これらの成果をまとめ、学術論文として発表した（Soh *et al.*, Artificial Life and Robotics, 2010)。

E) 嗅球糸球体層の神経活動パターン推定モデルの構築

研究成果 D)は嗅球表面の糸球体層に誘起される神経活動パターンから匂い感覚を推定できる可能性を示唆しているが、神経活動パターンが明らかにされている匂い分子は数十万種類も存在する分子のうちごく一部に過ぎない。そこで、神経活動が未知な匂い分子についても感覚推定を可能にするため、匂い分子の構造からラット嗅球の糸球体層に誘起される神経活動パターンを推定するニューラルネットワークモデルを構築した。受容細胞と匂い分子の結合強度については、グラフカーネル法[Kashima *et al.*, 2003]を応用して求め、糸球体層の神経活動パターンは混合正規分布を用いて近似した（図 3)。また、既知の神経活動と匂い分子のセットからモデルのパラメータを調整するためのアル

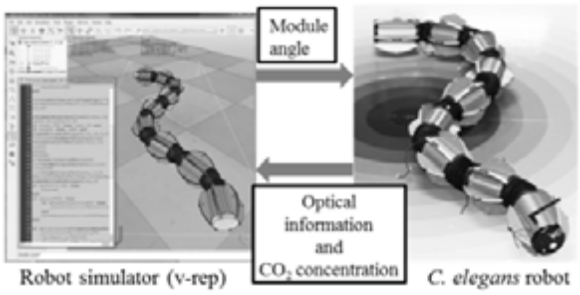


図 5　線虫型多モジュール連結ロボット制御システム

ゴリズムを提案した。構築したモデルを用いて、363 種類の分子に対する神経活動パターンを推定した結果、実測の神経活動パターンと平均 r = 0.67 の相関が認められた（図 4 は推定結果の一例）。この成果をまとめ、学術論文として発表した（Soh *et al.*, Chemical Senses, 2011）。

項目 3）については、主に F)の成果を得た。

F）線虫型多モジュール連結ロボットの環境適応制御系の構築

線虫の化学走性アルゴリズムに基づくロボット制御の前段階として、単細胞性物である大腸菌の化学走性のアルゴリズムを記述したモデルを構築し、誘引物質への集積行動や有害物質からの忌避行動といった環境適応的な応答をコンピュータ上で再現した。このモデルを小型汎用移動ロボットの運動制御アルゴリズムとして利用し、大腸菌の化学走性アルゴリズムで移動ロボットを環境適応的に制御することに成功した。この成果をまとめ、学術論文として発表した（Tsuji *et al.*, Artificial Life, 2010）。次に、線虫型多モジュール連結ロボット（Hibot 社製）を製作した。線虫の筋細胞は頭部から尾部方向に概ね 12 のセグメントに分けられ、sin 波状にくねりながら前進、後退及び方向転換を行う。本研究では、実際の線虫の神経による筋運動制御メカニズムを取り入れることを念頭に、sin 波状の運動を実現可能な最小限（9 個）のモジュールを連結したロボットとした。線虫型ロボットの各モジュールの屈曲角度は、ロボットシミュレータ v-rep（Coppelia Robotics 社製）からワイヤレス LAN 経由で送信できるようにしたほか、光情報を取得するためのワイヤレスカメラを第 1 及び第 9 モジュールに、CO_2 の濃度情報を取得するための CO_2 センサを第 1 モジュールに搭載した。ロボットシミュレータに研究成果 A)の化学走性モデルを組み込み、カメラにより取得した光強度を NaCl の濃度に対応させて刺激に応じたロボットの運動生成・制御を行う環境が整い（図 5）、現在、検証実験を重ねている段階である。構築した線虫型多モジュール連結ロボット制御システムは、研究代表者の大学の公開行事において公開（デモストレーション）した。

項目 4）については、主に G)の成果を得た。

G）匂い識別アルゴリズムに基づく人工官能検査法の開発

ラットの行動実験では、糸球体層の神経活動パターン同士の類似度と匂い感覚の類似度の間に相関関係が存在することが示唆されている。そこで、神経活動パターンから人間の匂い感覚の推定を試みた。まず、神経活動パターンに関する指標として、①神経活動パターン間の全体的な類似度を表す相関係数、②2 つの活動パターンが共通して活性化されている部位が占める割合を表すオーバーラップ率、③活動分布の複雑さの違いを表すヒストグラム差を定義し、3 種類の指標間のユークリッド距離を匂いの間の類似度と定義した。そして、15 種類の匂いを用いて人間に対する官能検査を実施することで人間が感じる匂いの類似度を定量化し、ラットの糸球体層の活動パターンの類似度と比較した。その結果、活動パターン間の類似度と人間が感じる匂いの類似度の間には中程度(0.6～0.7)の相関が認められることが明らかとなった。さらに、leave-one-out 法に基づき、1 種類の匂いを除いて官能検査に用いた全種類の匂いを学習データとして ニューラルネットワークモデルに学習させ、未学習の 1 種類の匂いについて、基準とする匂いと比較して人間が似ていると感じるか否かを推定した。その結果、64～78%の推定精度が得られた。これらの成果を国際学会で発表した（Soh *et al.*, International Symposium on Olfaction and Taste, 2012）。さらに、研究成果 D)、E)及び G)を統合し、ガスクロマトグラフィー（Alpha MOS 社製）を用いて分離した匂いの分子情報から匂い感覚を自動的に推定するシステムを試作中である。

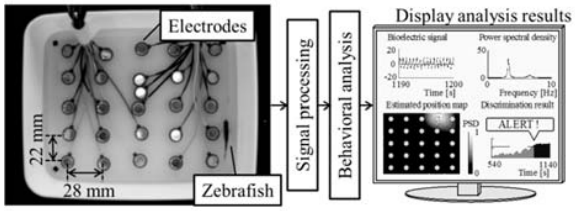


図 6　水質監視用バイオアッセイシステム

最後に項目 5）について、主に H)～J）の成果を得た。

H）小型魚類の微弱生体電気信号の非拘束／非侵襲計測法の開発

工場排水による水道水源の汚染事故は産業界において重大な問題の一つとなっている。従来から生物を「生きたセンサ」として利用し水質汚染を監視するバイオアッセイが提案されてきたが、そのほとんどは魚の行動を監視するものであった。本研究では魚の呼吸情報も重要であると考え、魚の鰓の開閉によって発生する呼吸波と呼ばれる微弱な生体電気信号に着目した。呼吸波を計測するために、H 150 mm x W 100 mm x D 50 mm の水槽底面に L = 25 個の Ag/AgCl 電極を配置し（図 6 左）、脳波計測システムを用いて計測された信号を 5 万倍増幅した後、魚の呼吸頻度である 1-10 [Hz]のバンドパスフィルタを用いて濾波するシステムを構築した。そして、メダカ、もしくは、ゼブラフィッシュを水槽内で遊泳させて呼吸波計測を行い、25 個の電極から計測された信号のうちもっともパワーが大きい信号に対して周波数解析を行った結果、非拘束／非侵襲で魚の呼吸リズムに対応する呼吸波のピーク周波数を得ることに成功した。この成果をまとめ、学術論文として発表した（Terawaki *et al.*, Artificial Life and Robotics, 2010; 寺脇ら, 計測自動制御学会論文集, 2011）。

I）小型魚類の呼吸波信号を利用した遊泳行動情報推定法の開発

魚の異常行動の検出に関しては、カメラシステムと画像処理技術を用いた手法が従来から多く提案されているが、時間帯や気象条件等による光量の変化の影響を受けず、試験魚に余分な光刺激を与える必要がない革新的な手法の開発が望まれていた。そこで、魚が遊泳する水槽の底面に配した電極を用いて計測した呼吸波信号を利用して遊泳行動情報を推定するカメラレスの検知法を新たに考案した。まず、魚と電極との距離が小さいほど計測される信号のパワーが大きいことを利用し、成果 H)で構築した呼吸波計測システムを用いて、呼吸波信号が含まれる周波数帯における信号のパワーが最大となる座標を魚の位置として推定した。提案法の推定位置を時間微分して遊泳速度を計算し、動画像解析で推定した速度と比較した結果、両者の間には強い相関(r=0.90)があり、動画像を用いた手法の代替法として十分な精度を有することが確認された。この成果をまとめ、学術論文として発表した（来山ら, 計測自動制御学会論文集, 2010）。

J）小型魚類を用いた水質監視用バイオアッセイシステムの開発

研究成果 H)及び I）の技術を組み合わせ、小型魚類を生きたセンサとして用いたバイオアッセイシステムを完成させた（図 6）。マハラノビス距離を用いて魚の呼吸波信号のピーク周波数と遊泳速度を一つの汚染判別指標として統合し、この指標が一定の閾

値を超えたときに警報を発する判定法を確立した。水質汚染を想定して、断続的にエタノールを計測水槽に混入する実験を行った結果、水中のエタノール濃度が約 0.5%に達した後約 10 分以内に汚染を検出できた。提案システムは、試験魚に余分な光刺激を与えないという新たな利点を備えながら、カメラシステムを用いた従来のバイオアッセイシステムと同程度の精度で水質汚染が検知できる次世代水質検査用バイオアッセイシステムである。この成果をまとめ、学術論文として発表した（Soh *et al.*, IEEE Transaction on Instrumentation and Measurement, 2013)。また、当該システムに係る技術について、特許出願中である(日本国特許出願 2013-051916)。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究項目 1)：研究成果 A)の線虫シミュレータプラットフォームは、NaCl 濃度の変化によって生じるピルエット機構と風見鶏機構の運動を忠実に再現可能であり、身体動力学モデル［Niebur & Erdös, 1991； Boyle *et al.*, 2008］のみ、もしくは、神経回路モデル[例えば、Eduardo *et al.*, 2010]のみでは成し得なかった環境刺激、神経回路及び運動の間に生じている相互作用を解析することができる。そのため、刺激受容から運動生成までの一連のメカニズムを解析する枠組みが与えられると期待される。

研究項目 2)：匂い分子に対する選択的注意（アテンション）は、1989 年に報告[Liang *et al.*, 1989]されて以来、受動的な匂いの識別限界によって引き起こされるものと考えられてきた。本研究では、マウスの匂い識別実験により、アテンション対象の分子を変更することが、報酬を得る機会を最大化するための戦略であることを初めて見出した（研究成果 D))。また、計算論的に嗅覚系の機能を説明した研究成果 D)と E)のモデルは、近年提案されているバイオミメティックな匂いセンシング法[Gutierrez-Osuna *et al.*, 2003]の一翼を担える可能性がある。

研究項目 3)：研究成果 F)では、線虫の身体構造を模擬したロボットに、線虫の化学走性モデルを行動制御アルゴリズムとして実装した。この線虫型ロボット制御システムは、ハードウェア、ソフトウェアの両面から線虫の環境適応制御を模擬したバイオミメティック・ロボットシステムであり、動きを模擬することを主目的とする従来の線虫ロボット[Jordan et al., 2010]とはコンセプトを異にする。少数のセンサで効率的な環境探索行動を行う線虫に学ぶ全く新しい機械制御技術の創出という観点からも、今後重点的に取り組むべき課題である。

研究項目 4)：研究成果 G)では、匂いが誘起するラット嗅球の糸球体層の神経活動と人間の感覚との間に一定の関係性があることを初めて見出した。また、糸球体層の神経活動を用いた匂いの類似度推定は、1668 種の分子特性を用いる従来手法[Haddad *et al.* 2008]と比較しても遜色ないため、今後、新たな匂い評価法としての発展が期待できる。

研究項目 5)：研究成果 J)のバイオアッセイシステムは、魚の生体電気信号と遊泳行動の双方を監視することで水質異常を迅速に検出する画期的なシステムである。提案システムを特徴付ける魚の微弱生体電気信号を用いた遊泳行動の推定技術は、光を必要としない、また、光の影響を受けない生物の行動解析など、生物実験にも応用できる可能性がある。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

本研究では、線虫をはじめとする生物のモデル化、匂い識別技術の開発や線虫型ロボット制御システムの構築など、個々の課題を達成した後、線虫型ロボットにマウスの嗅覚情報処理システム等を実装したバイオミメティック・センサ・システムの構築を目指した。しかしながら、研究成果 G)で述べたようにワイヤレスカメラにより取得した光刺激を入力とする制御系の構築には成功したものの、CO_2センサなどを利用して取得した環境の化学物質情報に基づく運動制御の実現には至らなかった。これは、研究開始当初には想定していなかった各技術の新たなニーズや可能性が研究の進捗に伴って顕在化し、当初計画の範囲を超えて優先的かつ重点的に進めるべき課題が多数生じたこと、及び光刺激の方に工学的な実用性がより強く認められたことによる。今後、化学走性に対する工学的なニーズをより明確にした上で、数年以内に当初計画よりもさらに充実した化学走性機能を有するシステムを実現する計画である。

本領域には、神経生物学をはじめとする生物学分野の班員に加え、我々のような工学分野の班員が参画していた。主に項目１)～4)に関する生物行動のモデル化とシミュレーションに関する研究においては、生物学分野の班員と工学分野の班員の生物現象を見る視点の違いに気付かされることが多かった。生物学分野の班員との議論を通じて、我々のモデル化のアイディアに生物学的に考えにくい仮定が含まれていることや詳細に扱いたい要素が生物学分野の班員と工学分野の班員とで異なっていることなどに気付き、軌道修正を要するいくつもの難題に直面した。これらのことは、当初からある程度予想していたことではあったが、生物学分野の班員の忌憚のない指摘やニーズに沿い、生物学的にも価値がある生物モデルを構築することは、時に困難なことでもあった。しかしながら、異分野間の連携によってこれまでにない研究の視点が加わり、生物学と工学を融合した新しい研究の芽がいくつも芽生えたことは大きな収穫であった。

＜今後の課題、展望＞

研究項目１)は、本研究課題の中でも特に、生物学分野の班員との連携が進んだ。当初計画の線虫モデルの構築及びシミュレーションを班員と連携しながら進める中で、我々の工学的なモデル化とシミュレーションの手法を応用できる生物学分野の課題が数多くあることに気付いた。研究成果A)の線虫の身体モデルに関する研究は、線虫の刺激応答時の神経活動を推定する生物実験の補助ツールの開発という新たな研究に結び付き、イメージング技術を専門とする班員らの協力を得ながら技術開発を進めている。また、線虫シミュレータプラットフォームは神経回路モデルの動作を簡易に行動レベルで評価し得るため、化学走性だけでなく、その他のメカニズムに関する仮説検証のツールとして利用可能と考えられる。さらに、研究成果B)における実験では、線虫の新規の環境刺激応答を見出し、未知な現象のメカニズムを解明する独自のシミュレーション解析手法の提案という新たな研究につながり成果を得ることができた。今後は、本研究で構築したこれらのシミュレーション解析技術を広く実用に供するものとするために、生物学分野のニーズに合ったよりユーザーフレンドリーなツールとなるよう細部の改良を重ねていく。

項目2) 及び4)の匂いの感覚推定技術に関しては、急速に解明されつつある嗅覚系の動作メカニズムに関する情報を取り入れつつ、人工官能検査装置（研究成果G)）の適用範囲を広げるための技術開発を進めるとともに、本研究で構築した神経活動推定法（研究成果D)）を基に匂い感覚を評価する新しい医療・安全衛生機器の研究開発を手掛けていく予定である。

項目5) の呼吸波信号の非拘束／非侵襲計測法（研究成果H)）やこれを応用したカメラレスの行動解析システム（研究成果I)、J)）は、ゼブラフィッシュの行動解析などの生物学分野の実験にも導入できる可能性がある。今後、小型魚類の実験解析を専門とする班員と連携しながら、実験解析用システムの構築に取り組んでいく。また、研究成果J) の小型魚類を用いた水質検査装置は技術的に実用化できるレベルに達しており、新たな水質監視手法として浄水場や工場への普及を視野に入れて、汎用化に関する研究開発を進めていく。

公募研究：2009 年度-2012 年度

ソングバードを用いた時空間制御を与える遺伝子発現系の開発と行動実験への応用

研究代表者：和多 和宏 [1)]

1）北海道大学大学院理学研究院生物科学部門

＜研究の目的と進め方＞

本研究は、時期特異的・細胞タイプ特異的なウイルス発現系の確立を通して、音声発声学習の学習臨界期制御機構について実験的検証を進めていくことを目的とした。

このために、鳴禽類ソングバードを音声発声学習研究の動物モデルとして利用した研究を進めてきた。ソングバードの発声学習・生成行動は、特異的な神経回路 Song system(ソングシステム)がすでに同定されている点において脊椎動物の中でユニークな神経回路といえる。さらにこの Song system は、発声運動制御系と発声学習制御系の 2 つの神経回路に分別することができ、動物の行動発現(発声学習・生成)を「運動と学習」の 2 つの回路機能に分解して検証することができる。また Song system は神経核群によって構成されているため、ターゲットとする脳部位に限定した局所的発現制御ができ、行動をその構成エレメントに分け、その行動が生み出される「場」を念頭においた研究に適している。

これまでに「声を出す」という自発的行動が、音声発声学習において脳内分子レベルで重要な意味をもつと考え、ソングバードの発声行動により発現誘導される 40 にも上る遺伝子群の網羅的な同定してきた。さらにこれらの遺伝子群において、[発声行動依存性]＋[神経回路特異性]＋[学習臨界期間限定性]を兼ね備えた多段階発現制御を受ける遺伝子が存在することを明らかにし、脳内において発達段階・環境に即した多段階(時空間)制御を受けた発現制御こそが出力行動の質を与える神経生物学的基盤の一因ではないかと考えるに至った。

本研究はこれらの研究結果をもとにさらに発展させ、ソングバードを音声発声学習研究の動物モデルとして利用し、特に時期特異的・細胞種特異的なウイルス発現系の確立を通して、多段階発現制御を受ける遺伝子群の脳内機能の実験的検証を目指した。

＜研究計画＞

本研究では具体的には以下の 4 点に関して研究を進めた。

A) 「発現時期特異性」と「細胞タイプ特異性」を兼ね備えたウイルス発現系の確立とその応用利用

B) 効率的なトランスジェニック・ソングバード作製を目指した試行実験

C) 発声学習臨界期間制御におけるエピジェネティクス関連遺伝子群の神経分子機能及び発現制御機能の解析

D) 音声学習臨界期間及び、ソングバード全種で適用できる音声時系列解析方法(Syllable Similarity Matrix法)の開発

＜得られた研究成果＞

A) 「発現時期特異性」と「細胞タイプ特異性」を兼ね備えたウイルス発現系の確立とその応用利用

2009 年度から 2012 年度までに、研究計画の項目 A) について研究を進めた。このためにまず、3 種のウイルスタイプ(レンチウイルス[第 2・3 世代]・アデノウイルス・アデノ随伴ウイルス[8・9 型]と 5 種類のプロモーターを使い、ソングバード脳内神経系細胞に効率的かつ高発現を実現する組み合わせを検証した。その結果、アデノ随伴ウイルス（セロタイプ 9 型）と CAGS プロモーターの組み合わせで、ソングバード脳内ソングシステムを構成する神経核群のなかで最も発現誘導が難しいとされる神経核 RA においても非常に強く安定した発現誘導が可能であることが明らかになった。[図 1]

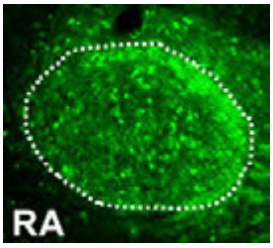


図1: アデノ随伴ウイルス(AAV)のソングバード脳内での遺伝子発現
Juvenile, Adult共に神経核RAでの3ヵ月以上の持続的な発現誘導が可能である。神経核RAでAAV9の感染・発現誘導が見られる細胞群は約70%以上で神経細胞である。

また、一度のインジェクションによって誘導可能な遺伝子発現継続時間は 3 カ月以上継続し、ソングバードの音声発声学習臨界期間を十分にカバーできるものであることを確認した。さらに、神経核 RA 内では中脳および延髄に軸索を伸ばす神経核 RA 内の投射神経細胞に選択的に感染することも明らかになった。2012 年 10 月より、後述の研究計画の項目 C)の結果を受けて、エピジェネティクス関連遺伝子群の神経核 RA の強発現及び RNAi 実験をスタート開始した。現在、実験個体数を増やすと共に、行動解析を進めている。

B) 効率的なトランスジェニック・ソングバード作製を目指した試行実験

2011 年度から 2012 年度まで、米国ロックフェラー大学 Wan-chun Liu博士との共同研究として進めた。レンチウイルスを受精卵内の始原生殖細胞に感染されることで、鳴禽類ソングバードにおいてもトランスジェニック動物を作出することが可能である。しかし、未だ汎用的な技術にまでは至っていない。このため、今回、効率的なトランスジェニック・ソングバード作製を目指し、インジェクション条件（ガラス針径、投与量・タイミング等）、卵径・殻厚の異なるソングバード種（zebra finch, java sparrow, canary）等の検証を行った。その結果、canary卵を用いることで比較的安定したトランスジェニック・ソングバードが作出できることが分かった[**図2**]。現在、ハンチントン舞踏病関連遺伝子を発現するトランスジェニック個体の作出に成功し、異常行動が表出されることまで確認できている。

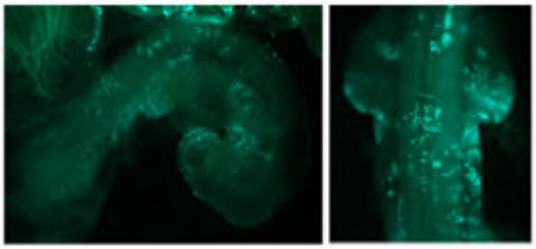


図2: レンチウイルスを利用したトランスジェニック・ソングバード作製例

C) 発声学習臨界期間制御におけるエピジェネティクス関連遺伝子群の神経分子機能及び発現制御機能の解析

2009 年度から 2012 年度までに、研究計画の項目 C) について研究を進めた。これまでに神経可塑性制御に関わる神経活動依存的に発現誘導される多くの遺伝子群が zebra finch の学習臨界期中と後でその発現誘導率が異なることが明らかになった。これらの遺伝子群のなかにエピジェネティクス関連遺伝子群が含まれていることに着目した**[図 3]**。

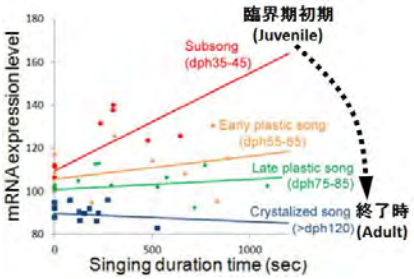


図 3: 発声行動によって発現誘導されるヒストンバリアント H3.3B
神経核 RA において学習臨界期 (subsong ~plastic son 時)のみ発現誘導される。

学習臨界期中のソングシステムを構成する神経核における神経活動依存的遺伝子群のエピジェネティクス状態（特に DNA メチル化状態）と種特異的な学習臨界期間における発現制御に関して検証を進めた。その結果、神経核 RA において、上記エピジェネティクス関連遺伝子群が発現されることと発声パターン可塑性が強く相関することを見出した。現在、研究計画の項目 A)の結果を受け、エピジェネティクス関連遺伝子群の脳内発現改変による発声学習及びその学習臨界期間形成における影響の検証を進めている。

D) 音声学習臨界期間及び、ソングバード全種で適用できる音声時系列解析方法(Syllable Similarity Matrix法)の開発

2011 年度から 2012 年度までの間、研究を進めた。近年のソングバードを用いた神経行動学的研究は、zebra finch（キンカチョウ）又は Bengalese finch（ジュウシマツ）を用いたものがほとんどである。これらの種は発声に用いる音素の分別が容易なためである。しかし、多くのソングバードの種では、その種ごとに発声パターンが学習戦略・学習臨界期間制御等で非常に興味深い行動形質をとることが知られているが、音素の分別が難しいためにほとんど研究に用いられていない。同じ理由で、学習臨界期中で発声パターンがまだ固定化していない時期における音声行動解析も十分に進んでいるとは言い難い現状である。これを踏まえ、音素間の音響類似度とその音素時系列配列情報を取り入れた新規音声時系列解析方法を開発した。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)によるアデノ随伴ウイルスに関する知見は、ソングバードを動物モデルとして用いた今後の神経行動学的研究には必須の研究手法となると考えている。またこのウイルス系による脳内遺伝子改変技術は、zebra finch のみならず多くのソングバード種に利用応用できると推測される。

研究成果の B)トランスジェニック・ソングバード作製は、国内外の研究室も含め、非常に限られた研究室でのみで成功しているが、その作製効率もまだ十分とは言えない。今回の研究成果も含めて、欧米の研究室と共にトランスジェニック・ソングバード作製条件の情報の共有化が進みつつある。

研究成果の C)による、「能動的な神経活動によって脳内で発現誘導されるエピジェネティクス関連遺伝子群が発声学習の学習臨界期制御を行う」とする概念は、発達心理・行動学といった諸分野で非常に関心をもたれはじめており、今後の脳内遺伝子改変技術による実験的検証が待たれる。

研究成果のD)による新規音声時系列解析方法の開発に関して、2011年北米神経科学会、2012年の国際神経行動学会での発表後、国内外の研究者に大きな反響を、当該研究分野における新たな音声解析手法として大きく期待され始めている。実際、論文発表前にも関わらず複数の研究室との共同研究が始まりつつある。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画のA)の「細胞タイプ特異性」をもつウイルスの作製については、当初rabies virus glycoprotein (Fu-B/ Fu-C)をもつレンチウイルスによって投射神経特異的なウイルス発現系の利用を予定していた。これは哺乳類（マウス）脳で良好な結果が報告されており、ソングバード脳内の神経核間の投射性をうまく利用できると考えたためである。しかし、班員の京都大学 霊長類研の井上謙一博士の協力のもと、霊長類で逆行性感染を確認された同じウイルス液をソングバード脳内にインジェクションしても感染が確認することができなかった。アデノ随伴ウイルスでもセロタイプが違うと哺乳類と鳥類での感染効率が大きく変わることを今回の研究でも確認しており、今後ウイルス発現系においては、プロモーター開発も含めて、動物種ごとのさらなる最適化が必要であると考えている。最終的には本研究では、AAV-9とCAGSプロモーターの組み合わせで神経核RAにおいて投射神経に特異的な発現制御が可能なことを偶然見出すことができ、当初の計画に沿った研究を進めることができた。

研究計画のB)に関しては、現時点で大きな問題になっていることではないが、鳥類、特にトランスジェニック鳥の国際郵送の難しさ・煩雑さが今後大きな問題になってくると考えられる。ソングバードを含め鳥類の精子・卵子の冷凍技術の開発もトランスジェニック技術の広範化には欠かすことができない技術と考えられるが、哺乳類に対してまだ十分な研究が進んでいない。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果により、アデノ随伴ウイルス発現系を用いて、ソングバード脳内における異所的発現制御を施行する技術が確立し、ソングバードを動物モデルとして用いた音声発声学習・臨界期制御の神経分子学的研究をさらに進める基盤を構築できた。また、音声発声学習臨界期中の音声パターンを解析する新規音声時系列解析方法も確立できたことは当初の期待以上の結果であると考えている。現在、この解析方法によって種特異的な発声パターンがいかに獲得されるのか、種特異的拘束性を考慮にいれた学習可塑性研究に発展しつつある。この研究においても、上記のウイルス発現系による遺伝子改変技術は重要な研究手法の一つになると考えている。

公募研究：2011 年度-2012 年度

ショウジョウバエ求愛行動をモデルとした行動進化の神経基盤の解明

研究代表者：小金澤　雅之

東北大学大学院生命科学研究科生命機能科学専攻

＜研究の目的と進め方＞

雄ショウジョウバエの示す求愛行動は複数の要素からなる生得的行動である。行動遺伝学的研究から、正常な求愛行動には転写因子をコードする *fruitless*(*fru*)遺伝子の働きが鍵となっていることが明らかとされてきた。さらに分子細胞生物学的研究により、雄特異的な Fru タンパク質発現は制御下にある遺伝子群の発現調節により性差を持つ神経回路を構築することが明らかとなりつつある（Kimura et al., 2005, Ito et al., 2012)。このことは *fru* 発現神経回路が求愛行動の発現に深く関与することを示唆している。2010 年に *fru* 発現ニューロンについて形態学的マッピングが報告されたが(Cachero et al., 2010; Yu et al., 2010)、現在それらのニューロンの求愛行動における機能解析が大きな課題となっている。本研究では、*fru* 発現神経回路に温度感受性陽イオンチャンネルを異所発現し強制的活性化を行う技術と遺伝学的モザイク技術を組み合わせることにより、どの *fru* 発現ニューロンが求愛行動制御に関与しているのかを同定することを第一の目的とした。

生得的行動である求愛行動のパターンは種によって異なることが多い。ショウジョウバエも種によってそれぞれ特異的な求愛行動パターンを示すことが行動学的に調べられてきた。しかしながら、それがどのような神経回路の違いによってもたらされるかについてはほとんど分かっていない。*fru* 遺伝子が神経系の雄化因子として働いていると考えると、行動パターンの差違は *fru* 発現神経回路の構築の違いを原因として生み出されている可能性がある。本研究では、他種のショウジョウバエの *fru* 遺伝子発現制御配列に *Gal4* 遺伝子を連結したトランスジーンをキイロショウジョウバエ（*D. melanogaster*）に導入し、他種の *fru* 発現神経回路に相当するニューロン群の機能解析を行うことにより、種特異的行動を生み出す神経回路の同定と、その分子遺伝学的基盤を明らかとすることを目的とした。

＜研究方法＞

1. *D. melanogaster* 求愛行動を制御する神経回路の機能解析

まず *fru* 発現ニューロンの強制活性化によって誘起される行動パターンと雌に対して行われる正常な求愛行動とを比較し、特に求愛歌生成に注目して解析を行った。*fru* 発現神経回路への外来遺伝子の異所的発現には既存の *fru-Gal4* 系統を用い、ニューロンの強制的活性化には温度感受性 TRP チャンネル（dTrpA1; Hamada et al., 2008）を利用した *UAS-dTrpA1* 系統を用いた。ごく少数の *fru* 発現ニューロンのみに dTrpA1 を異所発現したモザイク個体の作成には、MARCM 法(Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker）を利用した。高温条件下でこれら少数のニューロンを強制活性化した際の行動解析によって、求愛行動発現に関わるニューロン群の同定を行った(機能的モザイク解析)。なお、*fru* とは別の性決定遺伝子である *doublesex*(*dsx*)を発現するニューロンの機能解析も同時に行った。ショウジョウバエの体細胞の性は転写因子をコードする *fru* と *dsx* に依存している。従来、Fru タンパク質は神経系の雄化因子とされ、Dsx タンパク質は神経系以外の細胞の性決定因子であると考えられてきたが、少数のニューロンにも *dsx* が発現し、さらにその一部は *fru* を共発現することが明らかとなってきた。このことは *fru* 発現神経回路のみならず *dsx* 発現神経回路も求愛行動の実現に重要であることを示唆している。最近開発された intersectional 技術（Yu et al., 2010）を利用し、*fru/dsx* 発現ニューロン群の大局的な機能分類も行った。

2. 他種ショウジョウバエの *fru* 発現神経回路の機能解析

*D. melanogaster*とは大きく異なる求愛行動パターンを示す他種ショウジョウバエとして *D. subobscura*を用いた。求愛行動の種特異性を生み出す神経回路を解析する際に、分子遺伝学的手法の適用できない *melanogaster* 以外の種では詳細な神経回路の解析を行うことは基本的に困難である。そこで Fru タンパク質が神経系の雄化因子であることを利用して、*subobscura* の *fru* 遺伝子上流の発現制御配列に *Gal4* 遺伝子を連結した人工遺伝子(= *sub fru-Gal4* と呼称）を *melanogaster* に導入したトランスジェニックハエを作出し、*subobscura* の *fru* 発現神経回路に相当する回路を *melanogaster* 脳内で標識および操作することを試みた。まず *sub fru-Gal4* にドライブされたレポーター発現パターンと抗 Fru 抗体による *melanogaster* の内在性 Fru タンパク質の発現パターンの比較を行った。次に、*sub fru-Gal4* 発現細胞に dTrpA1 チャンネルを異所発現し高温条件下で強制活性化した際に誘導される行動パターンと *subobscura* で観察される求愛行動とを比較し、*subobscura* 様の行動が誘起できるか否かを検討した。さらに *melanogaster* と同様の機能的モザイク解析を行うことにより、種特異的行動を誘起可能なニューロン群を探索した。

＜得られた研究成果＞

1. *D. melanogaster* 求愛行動を制御する神経回路の機能解析

fru もしくは *dsx* 発現ニューロンに dTrpA1 を異所発現し高温条件下でこれらのニューロンの興奮性を強制的に上げたところ、雌がいない条件であっても求愛行動が誘起できることが明らかとなった。誘起された行動パターンには、前肢を使ったタッピング、片翅の展開と求愛歌生成、吻部を伸ばすリッキング、腹部を曲げる交尾試行などが含まれることから、*fru/dsx* 発現ニューロンの強制活性化は求愛行動を構成する全てのステップを解発できることがわかった。さらに求愛歌生成に焦点を絞った実験を行うために温度コントロール下で求愛歌を記録するシステムを構築し、*fru/dsx* 発現ニューロンの強制的活性化により誘起される求愛歌パターンを解析した。キイロショウジョウバエの求愛歌は、振幅の小さい約 160 Hz の正弦波形を示す sine song と、約 34 msec の間隔で発生する振幅の大きいパルス列からなる pulse song から構成される。*fru* 発現ニューロンを強制

的に興奮させることにより生成された音を解析した結果、雌に対する通常の求愛の際に生成される求愛歌とほぼ同等の sine song と pulse song を含む求愛歌が生成されることが明らかとなった。*dsx* 発現ニューロンは *fru* 発現ニューロンの 1/10 ほどの数しか存在していないが、これらのニューロンを強制活性化した際にも *fru* 発現ニューロンの場合と同様に正常な求愛歌が生成されることがわかった。

dsx 発現ニューロンの一部は *fru* を発現している。*dsx* 発現ニューロンを機能的に分類するために、最近開発された intersectional 技術を利用し、*dsx* と *fru* を共発現するニューロン群あるいは *dsx* のみを発現するニューロン群を選択的に操作する実験を行った。① *fru* 遺伝子座に flippase (FLP)遺伝子をノックインした fru^{FLP} と UAS と dTrpA1 遺伝子配列の間に FLP のターゲットとなる FRT 配列で stop 配列を挟み込んだ *UAS>stop>dTrpA1* の両方ををもつ個体では、*fru* 発現ニューロンに FLP が発現するため、FRT 配列に挟まれた stop 配列が *fru* 発現細胞特異的に除かれる。その結果、*dsx-Gal4*、fru^{FLP} および *UAS>stop>dTrpA1* の 3 つのトランスジーンを同時に持つ個体では、*dsx* と *fru* を共発現するニューロン群のみを高温条件下で強制的に活性化することができる。② Gal4-UAS システムと LexA-lexAop システムという 2 つの binary システムを組み合わせることによって、*dsx-Gal4*, *UAS-dTrpA1*, fru^{LexA} (LexA 遺伝子を *fru* 遺伝子座にノックインしたもの)，*lexAop-Gal80*、の４つのトランスジーンを同時に持つ個体では、*dsx* 陽性且つ *fru* 陰性なニューロン群のみを強制活性化出来る。①もしくは②の条件で得られた個体が高温条件下で生成する求愛歌の音響パターンを解析した結果、両条件とも正常な音響パターンを持つ求愛歌は生成されないことが分かった。*dsx* 発現ニューロン全体を強制活性化した際には正常な求愛歌が生成されたことをふまえると、*dsx* 発現ニューロンのうち *fru* を発現するニューロン群としないニューロン群の双方が協調的に働くことにより正常な求愛歌が生成されることが示唆された。

MARCM 法を用いた解剖学的解析により、脳内の *fru* 発現ニューロンは約 50 のニューロン群に分類できることが分かっている(Kimura et al., 2008)。同様の解析により、*dsx* 発現ニューロンは 8 つに分類できることが分かった。これらのニューロン群のうちどれが求愛行動を解発する能力があるかを明らかにするため、MARCM 法を用いて、*dTrpA1* 発現を少数の *fru* もしくは *dsx* 発現ニューロン群に限定し、それらを強制的に興奮させる実験を行った。MARCM 法では体細胞染色体組換えを確率的に一部の細胞でのみ引き起こすため、組換えが起こった細胞を由来とする細胞群にのみ *dTrpA1* の発現を限定することができる。まず、多数のモザイク個体を作成し、高温条件下で誘起される行動を記録した。次に、各個体から脳を摘出し *dTrpA1* と同時に発現させた GFP をレポーターとして、行動実験時に強制的に興奮していたニューロン群を同定した。ラベルされていたニューロン群のセットを、求愛行動を示したモザイク個体と示さなかったモザイク個体の間で比較することで、求愛行動を解発する能力のあるニューロン群を同定した。*fru* 発現ニューロンの強制活性化で片翅展開を示したモザイク個体では、P1, P2b, P4b, AL1 および AL5a と名付けられたニューロン群が有意に多くラベルされることが明らかとなった。また前脚を使ったタッピング様行動を示した個体では P1, P2b および aSP1 と名付けられたニューロン群が有意に多く観察された。片翅展開とタッピング様行動の両方が誘起されたのは P1 もしくは P2b を強制的に活性化したときであることから、これら 2 つの *fru* 発現ニューロン群が求愛行動の解発に極めて重要であることが明らかとなった。P1 は片側約 20 個のニューロンから構成され、神経突起を両側の外側原大脳に伸ばしている。一方、P2b は片側約 15 個のニューロンから構成され、外側原大脳に入力部位と想定される神経突起を展開し、頸部縦連合を下行し胸腹部神経節に終末を形成している。これらの形態的特徴から、P1 が求愛行動の引き金を引く司令信号を生成し、P2b はその司令信号を胸部神経節内の運動パターン生成回路に伝える下行性の司令線維であることが示唆された。一方、*dsx* 発現ニューロンの強制活性化では、脳内の pC1 と pC2l と名付けられたニューロン群、および胸部神経節内の TN1 と prA と名付けられたニューロン群、それぞれが求愛行動の誘起と有意な相関があった。図 1 に *dsx* を発現する pC2l ニューロン群の形態を示すとともに、pC2l を強制活性化した際に誘起される片翅展開の写真を示す。興味深いことに pC1 の一部のニューロンは *fru* 発現 P1 ニューロンに相当し、pC2l の一部は *fru* 発現 P4b ニューロンに相当していた。さらに胸部神経節内の TN1 と prA についても多くのニューロンが *fru* を共発現していた。以上の結果から *fru* と *dsx* を共発現するニューロン群が求愛行動を解発する際にコアとなる神経回路であることが強く示唆された。

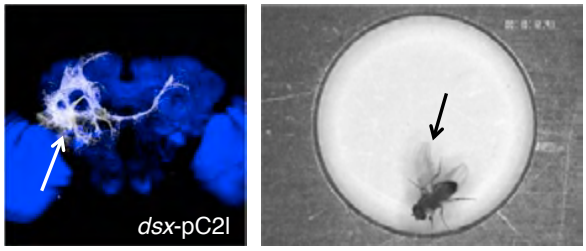


図 1：*dsx* を発現する pC2l ニューロン群（左図）と pC2l ニューロン群の強制活性化によって誘導された片翅展開（右図）

2. 他種ショウジョウバエの *fru* 発現神経回路の機能解析

本研究で対象とした *D. subobscura* はゲノム DNA の配列決定がなされていないため、近縁種のゲノムデータを参考にして *subobscura* の *fru* 遺伝子座を推定し、転写開始点より最大 31 kb 上流の推定転写制御配列を long PCR にて増幅した。得られた *subobscura* の *fru* 発現制御配列に *Gal4* 遺伝子を連結した人工遺伝子（*sub fru-Gal4*）を *D. melanogaster* に導入したトランスジェニックハエを作出した。*sub fru-Gal4* 発現パターンと *melanogaster* の内在性 Fru タンパク質の発現を抗 Fru 抗体を用いて比較したところ、一部の *sub fur-Gal4* 発現細胞は *melanogaster* 本来の Fru タンパク質を発現しているものの、多くは Fru 陰性であることが明らかとなった。さらに *sub fru-Gal4* 発現ニューロンのシナプス伝達を阻害する目的で温度感受性 *shibire* 遺伝子(shi^{ts}) を異所発現させた個体の求愛行動を観察したところ、シナプス伝達を阻害する高温条件でも雌に対する求愛行動には大きな影響を与えないことが明らかとなった。このことは Fru 陽性の *sub fru-Gal4* 発現細胞が少ないこととも符合し、大多数の *sub fru-Gal4* 発現ニューロンは *melanogaster* 本来の求愛行動には参画していないことを示唆している。

D. subobscura で特徴的な求愛行動パターンとして、① 離れた場所から雌に対して大きく吻を突き出す（*melanogaster* では雌の生殖器をなめる際に吻伸展を行う)、② 両翅を高速で開閉する（*melanogaster* では片翅展開し振動させることにより求愛歌を生成する)、③ 中脚を同期して回転させ雌に提示する（*melanogaster* では該当する行動は観察されない）等が挙げられる。*sub fru-Gal4* 発現ニューロンに dTrpA1 を異所発現し高温条件下で強制的に興奮させたところ、*subobscura* で特徴的な求愛行動パターンに類似した行動が誘起されることが明らかとなった。すなわち① 極めて強い吻伸展、② 両翅の高速開閉、および③ 中脚を前に突き出す行動、である（図 2）

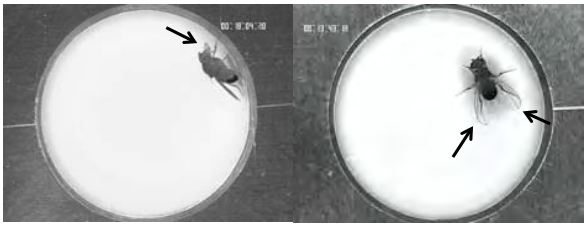


図 2：*sub fru-Gal4* 発現ニューロンの強制活性化により誘導された *D. subobscura* 求愛行動様の行動パターン。左図は強力な吻伸展を示し、右図は両翅の高速開閉を示している。

melanogaster の *fru* 発現ニューロンの強制活性化では片翅展開に伴う求愛歌生成に代表される *melanogaster* 特異的な行動パターンが誘起されるが、これら *subobscura* 様の行動は生じないことから、*sub fru-Gal4* 発現ニューロンの強制活性化によって誘起される行動は *melanogaster* の Fru タンパク質発現ニューロンとは異なったニューロン群が関与していることを示唆している。このことは Fru タンパク質陽性の *sub fru-Gal4* 発現細胞が少ないこととも対応していると考えられる。さらに、*melanogaster* を用いたトランスジェニックハエであるにもかかわらず *subobscura* 様の求愛行動パターンが誘起できたことは、*melanogaster* の神経系に存在する一部のニューロン（ここでは *sub fru-Gal4* 発現ニューロン）は他種の求愛行動パターンを潜在的に生み出す能力があることを示唆している。

さらに *melanogaster* の場合と同様に *sub fru-Gal4* を用いて機能的モザイク解析を行い、*subobscura* 様の求愛行動パターンを誘起するニューロン群の同定を試みた。その結果、両翅の高速開閉を誘起する候補ニューロンとして、脳内の下行性ニューロン群 1 種と胸部神経節に存在する 2 種のニューロン群を見出した（図 3）。興味深いことに、これらのニューロン群は *D. melanogaster* の求愛行動に関わる *fru* 発現ニューロン群と形態的に似たものであり、同じ neuroblast 由来のニューロン群であることが示唆された。脳内の下行性ニューロンは *melanogaster* の求愛行動解発に重要である P2b ニューロン群に形態的に似ており、胸部神経節で同定されたニューロン群は Philipsborn et al., 2012で報告された *fru*-vPr6 と *fru*-dPr1 ニューロン群に類似していた。このことは、*subobscura* 様の求愛行動パターンの人為的誘起においても *melanogaster* 本来の求愛行動で機能しているニューロン群と類似の神経回路が利用されていることを示唆している。その一方、抗 Fru 抗体により *melanogaster* の内在性 Fru タンパク質の存在を検出したところ、候補ニューロン群は Fru 陽性と陰性のニューロンにより構成されていることが明らかとなった。このことは、候補ニューロン群のなかでも Fru 陰性の *sub fru-Gal4* 発現ニューロンが *subobscura* 様の行動パターンを規定する際に重要であることを示唆している。

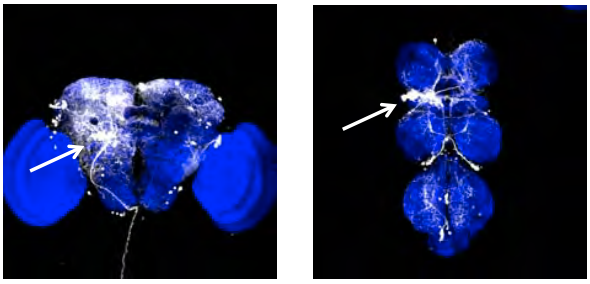


図 3：強制活性化により *D. subobscura* 様の求愛行動パターンを誘起したニューロン群。左図は P2b ニューロンに形態的に類似し、右図は vPr6 に形態的にそれぞれ類似している。

以上の結果を踏まえて、「新奇性」をもつように見える種特異的求愛行動パターンがどのように生み出されてくる進化的シナリオを考えてみたい（図４）。*D. melanogaster*脳内には約 100 の neuroblast が存在しており、その各々が形態的に類似したニューロン群を生み出している。脳内では約 50 種類の *fru* 発現ニューロン群が存在することから、約半数の neuroblast が Fru タンパク質を発現しているニューロン群を生み出していると考えられる。しかしながら、P1, P2b, vPr6 等の求愛行動の実現に最も重要なニューロン群は限られていることから、求愛行動解発のためのコアとなるようなニューロン群を生み出す neuroblast は比較的少数であると考えられる。一方で、それらの neuroblast 由来のニューロンを考えた場合、Fru タンパク質はその中の一部のニューロンにしか発現していない。Fru タンパク質により雄化されて実際の種特異的な求愛行動パターンを生み出すニューロン群は、求愛行動解発のためのコアとなる neuroblast クローンの一部であることを示唆している。同じ neuroblast に由来する残りのニューロンは、潜在的には様々な求愛行動様の行動パターンを生み出しうるが、Fru タンパク質の発現がないため実際の行動時には大きな役割を持っていないと推定される。種分化の過程で *fru* 発現制御配列の変化が生ずると、求愛行動解発のためのコアとなる neuroblast クローンの中で、異なる一群のニューロンに Fru タンパク質が発現し性的二型を持つ別な回路網が構築されると考えられる。このとき構築された Fru 発現ニューロン群が新たな種での求愛行動パターンを特徴付けることになる。このシナリオでは「新奇な」求愛行動パターンが生まれることは、求愛行動解発のためのコアとなる neuroblast の中で Fru タンパク質の発現ニューロンのセットが変化することにより、潜在的には生成し得た行動パターンが顕在化する事によって説明される。

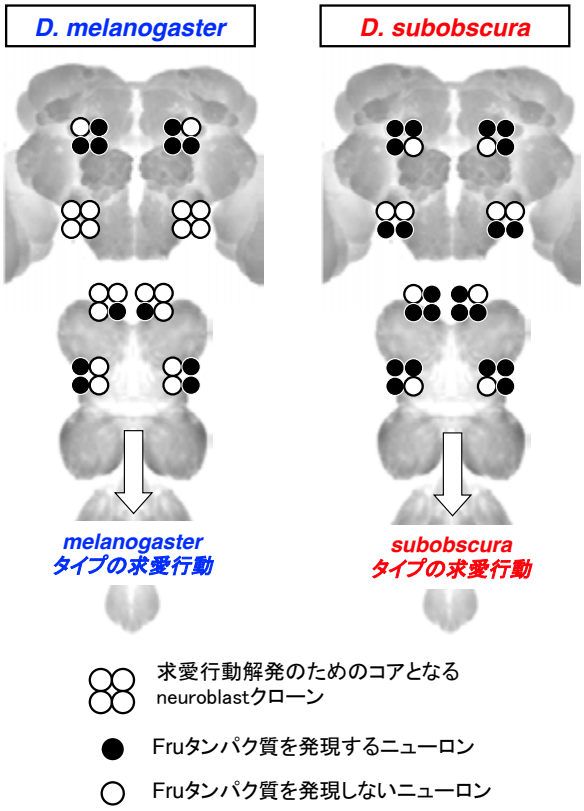


図 4：種特異的求愛行動パターンを生み出すための進化的シナリオ。求愛行動解発のためのコアとなる neuroblast クローンのなかで Fru タンパク質を発現するニューロンのセットが変化することにより、行動出力の違いが生み出される。

＜国内外での成果の位置づけ＞

ニューロンの機能阻害実験では全体の回路網に比べて操作するニューロンが少ない場合、効果が観察されにくい難点があったが、強制活性化を用いることによって少数のニューロン群を操作しただけでも大きな効果が得られることは、行動レベルと神経回路レベルの機能相関を探る上で画期的な方法として大きなトレンドとなりつつある。複雑な行動であってもそれが充分に適用可能であることを示した本研究の成果は、この流れの中でも先駆的である。「1. *D. melanogaster* 求愛行動を制御する神経回路の機能解析」に関しては、求愛行動を解発するニューロン群を同定するとともに、Ca^{2+}イメージングを用いた生理学的解析も合わせて報告し、高く評価されている。同時期にB. Dicksonらのグループが別手法を用いて求愛行動制御に関わる *fru* 発現ニューロン群の同定を報告しているが、生理学的解析まで踏み込んでいる点で、当研究グループの成果は先行している。最近、*dsx* 発現ニューロンの強制活性化による求愛行動の誘起について B. Baker らのグループから２報の学術論文が報告された (Pan et al., 2011; Pan et al., 2012)。これらの報告は、本研究成果と一部オーバーラップしているが、求愛歌生成に的を絞って複数の *fru/dsx* 発現ニューロン群の役割を示すことが出来た点で先行出来ていると考えている。*dsx* 発現ニューロンの解析で得られた成果を学術論文として発表予定である。「2. 他種ショウジョウバエの *fru* 発現神経回路の機能解析」に関しては、類似の研究は一切報告されておらず極めて独自性が高いと考えている。最近、TALEN 法などの新しい遺伝子ノックアウト技術が広範な種の生物に適用可能であることが報告され、様々な研究対象で表現型の進化を実験的に扱う機運が盛り上がってきている。その中でも行動に着目した研究は極めて少ないことから、行動パターンの進化に関する研究の進展の足がかりとして本研究の成果が活用できると考えている。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究開始時には、強制活性化法を利用した *fru* 発現ニューロンの生理学的実験も計画していた。dTrpA1 を用いた強制活性化実験では標本の温度を変化させる必要がある。しかしながらこの温度変化により摘出脳標本が移動してしまうことが判明し、Ca^{2+}イメージ実験の大きな支障となった。稼働中のCa^{2+}イメージングシステムの一部流用しただけでは計画した生理学的実験が困難であることから、これら実験に関しては断念した。「2. 他種ショウジョウバエの *fru* 発現神経回路の機能解析」に関しては、計画では *D. subobuscura* も含めて３種のショウジョウバエを対象とする予定であった。しかし、*sub fru-Gal4* 発現ニューロンの数が予想以上に多かった事に加えて、*melanogaster* 本来の *fru* 発現ニューロンのように形態的な分類がすでになされてマップが完備されている状況と異なり、*sub fru-Gal4* 発現ニューロンの解析では分類のされていないニューロン群を対象としなければならないため、機能的モザイク解析が膨大な時間がかかることが判明した。そのため、本研究では求愛行動パターンが *melanogaster* と大きく異なる *D. subobscura* １種のみで研究を進めた。

＜今後の課題、展望＞

本研究では、求愛行動という複雑な生得的行動の解発に関わるニューロン群を同定することにより、古典的な動物行動学で想定された生得的解発機構の実体を細胞レベルで明らかにすることが出来たと言える。一方で、同定されたニューロン群がどのような情報を担って求愛という複雑な行動を作り上げているのかは不明である。*fru/dsx*発現ニューロン群の中で、どのように感覚情報が処理・統合され、その結果として求愛行動発現の司令が作り出され、さらには特徴的な運動パターンを生み出すのかを「神経回路レベル」で明らかにしていくためには、今後これらのニューロンの解剖学的接続関係を明らかにするとともに、神経活動を生理学的に解析することが重要となると思われる。現在、進化発生学的視点で生物の表現型の進化を研究する流れが大きくなってきている。本研究では、種特異的行動パターンの進化に関する仮説を提示することが出来たが、これは進化発生学的にも関心が持たれる考え方であると思われる。今後、さらなる実験データの蓄積により仮説の検証を行うともに、行動進化を考える上でのより一般的なフレームワークとして有効かどうかを検討していきたい。

公募研究：2009 年度-2012 年度

神経活動評価のための顕微鏡オートフォーカスと蛍光画像解析

研究代表者：橋本　浩一 [1)]

1）東北大学大学院情報科学研究科

＜研究の目的と進め方＞

本研究の目的は、生物が持つ「神経系の活動状態」とそのアウトプットとしての「行動」を高い時間・空間分解能で計測する装置を開発することである。生物の行動を理解するためには、それを作り出している複雑な神経系情報処理過程を解明することが必要不可欠である。しかし、近年の行動遺伝学の進展にもかかわらず多段階の情報処理過程はいまだにほとんど明らかにされていない。その最も大きな原因は、観察倍率と視野サイズがトレードオフの関係にあり、運動する生物を高い空間分解能で長時間観察することができないことにある。

とくに、モデル生物として盛んに研究されている線虫（C.エレガンス）やゼブラフィッシュの神経部位を明視野像と蛍光像を用いてリアルタイム追跡し、同時に神経細胞の蛍光画像を定量計測できる顕微鏡の実現を目指す。

＜研究計画＞

1）ロバストトラッキング：対象の重なりや変形に対してロバストなトラッキングアルゴリズムを開発する。ビジュアルサーボ理論を適用することにより、画像処理のロバスト化を行う。図1に線虫をトラッキングしている際の連続写真を示す。

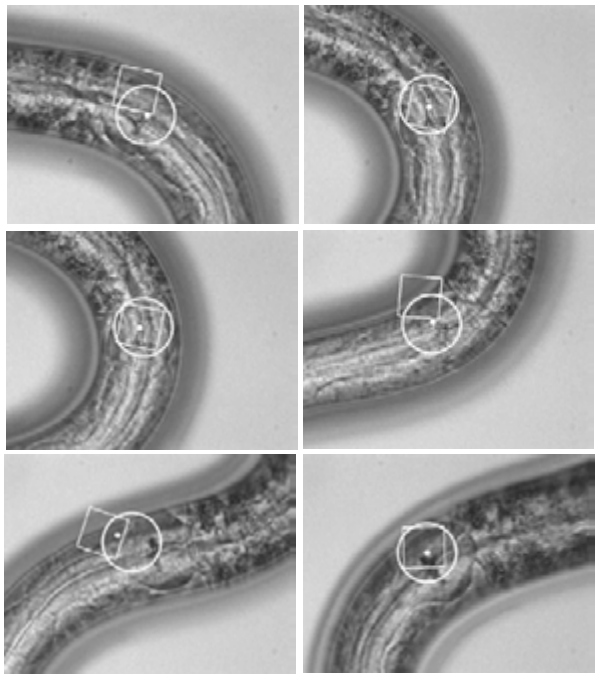


図１　パターンマッチングとフーリエ変換を用いて、変形と模様変化にロバストなアルゴリズムを実現し、トラッキング装置と連動させて線虫の動きを追跡している

2）動的ROI制御:パターンマッチングにより高い倍率で運動追跡が可能となったが、蛍光画像解析（神経細胞の活動度をCa++センサーの強度変化で定量化するが、その解析を自動化すること）のためには十分な精度で細胞位置を追跡できていない。つまり、蛍光画像では視野内にCa++センサーの像は入っているが、画面中心に固定されているわけではない。したがって、これを自動化する画像処理アルゴリズムを開発する。

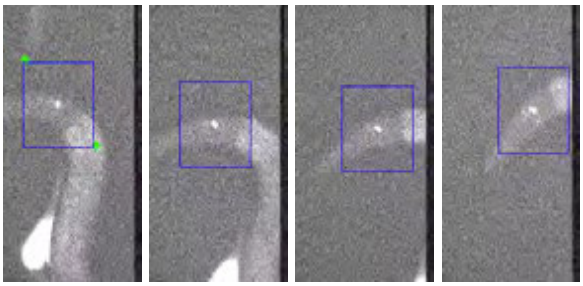


図２　運動する線虫のカルシウムセンサ部位を自動抽出し、明度変化を解析するソフトウェアを開発した。

3）焦点ぼけ推定：線虫が光軸方向に運動するとき、神経細胞像がデフォーカスする。明視野画像に生じる回折現象の特徴を利用してワンショットでオンラインフォーカス追跡を実現する。

4）刺激・神経活動・行動の統合的解析：上記の手法を統合し、刺激に対する応答を解析する。具体的には、温度変化や匂いなどの感覚刺激を与え、神経細胞の活動状態を評価する。また、ステージの移動軌跡と明視野画像列から、線虫の位置・移動速度・首不理解数などの定量的な行動データを評価し、行動と神経活動状態を統合的に解析する。

5）ゼブラフィッシュのトラッキング装置開発：線虫に比べてゼブラフィッシュは運動が高速で、急激な方向転換も発生する。さらに、ステージを動かすと水が動き行動に影響を与えるので、新しいタイプのトラッキング装置を開発する必要がある。カメラまたは対物レンズを高速で移動しつつ画像取得する方法を考案し、試作・評価する。

6）光刺激装置との統合：運動を追跡しながら光刺激を行うことは、神経回路の動作機序の解明のために重要である。動く対象の特定の神経細胞を刺激するための画像処理・ハードウェアを開発し、トラッキング顕微鏡と統合する。

＜得られた研究成果＞

A）トラッキング顕微鏡：平成21年度から23年度までに、研究計画の項目1)について研究を進め、対物レンズ40倍での高解像度トラッキングの結果を得た。開発したトラッキング装置を図3に示す（Fei, Igarashi, Shinkai, Ishikawa, Hashimoto, 2011, 小原、五十嵐、橋本, 2011, Maru, Igarashi, Arai, 2010, Obara, Igarashi, Hashimoto, 2010, Maru, Chen, Hashimoto, 2011）。本領域では、この装置と画像処理アルゴリズム（図1）を用いたいくつかの共同研究（飯野教授（東大）、中井教授・安藤准教授

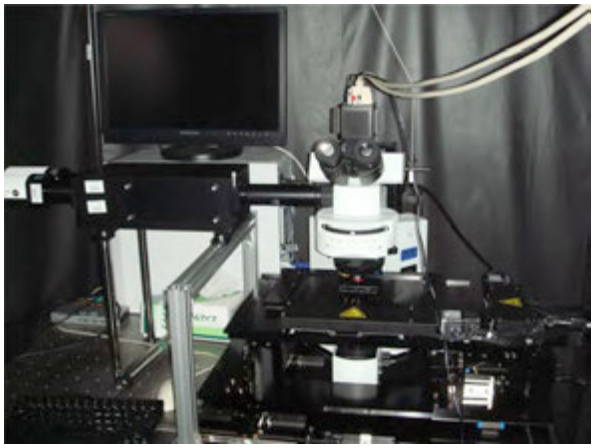


図 3　トラッキング顕微鏡。上部ポートに高速カメラを、サイドポートに高感度カメラを設置する。高速カメラの画像を PC で処理し、ステージにリアルタイムフィードバックする。これにより観察対象の動作をキャンセルすることができる。

（埼玉大）、木村准教授（阪大））が実施され、また、共同研究者からのフィードバックにより装置・アルゴリズムが改良され、共同研究成果として学会発表に至っている（Satoh, Maru, Hashimoto, Iino 2011, Tanimoto, Yamazoe, Hashimoto, Kimura, 2012a, Tanimoto, Yamazoe, Hashimoto, Kimura 2012b)。また、本領域メンバーではないが、森教授・塚田助教（名大）ともトラッキング顕微鏡を利用した共同研究を行い、学会発表を行っている（Tsukada, Chen, Yokoyama, Hashimoto, Mori, 2012, Yokoyama, Tsukada, Chen, Hashimoto, Mori, 2012)。

B) 蛍光画像解析ソフトウェア：オンライントラッキングだけでなく、蛍光画像ビデオをオフラインで解析するソフトウェアを開発した。3次元の細胞アライメントに関して石原教授・寺本助教（九大）と共著で論文を発表した（Fei, Teramoto, Ishihara, Hashimoto, 2012)。2次元の神経活動解析ソフトウェアを用いた木村准教授（阪大）との共同研究は発表準備中である。

C) トラッキングソフトウェアの高速化：トラッキング性能を向上するためには、フィードバック制御ループの高速化が必須である。そのためには、画像処理アルゴリズムの高速化を行った。具体的には、GPU（Graphic Processing Unit）を用いた高度並列化を行い、さらにCPUと同時並行処理するアルゴリズムを開発した。これにより、パターンマッチング処理がCPUだけ利用の場合と比較しての10倍程度の高速化を達成した（Zang, Hashimoto, Moon, 2011, Zang, Hashimoto, 2011)。

D) 光刺激装置とトラッキング顕微鏡との統合：研究計画の項目 6)について研究を進め、線虫の光刺激装置を開発した。これを用いた線虫の行動制御のデモは国際的に注目をされ、国際学会において招待講演を行った（Hashimoto, Fei, 2012)。

E) ゼブラフィッシュのトラッキング装置開発：本領域の班会議での発表しかしていないが、ゼブラフィッシュのトラッキング装置を開発した。図 4 に開発した装置の写真を示す。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)は世界でも例のない報告となり、国際的に注目されている。海外からの装置の問い合わせも多く、当該分野の新たな流れを作りつつあると予想される。

一方、B)、D)については発表したばかりであるので、外部からの評価は確定的ではないが、共同研究者からは利便性が格段に高まったと好評である。

C)はロボティクスへの応用が広がっており、実用性が高い。

図 4　ゼブラフィッシュトラッキング装置。XYZ ステージで高速カメラをホールドし、高速カメラの画像を PC で処理してステージを制御する。

2013 年に本成果の応用を特許出願する予定である。

E)は A)と同様に世界初の技術であり、発表と同時に多くの引き合いが来るものと確信している。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画の 4) については予備実験を進めた結果、研究代表者のラボでは定量的な評価が困難であることがわかり、飯野、木村、中井、森らのラボでの実験結果を論文発表することになった。装置開発、ソフトウェア開発においては順調に進んでいる。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果により、行動と神経活動を同時に解析する技術が確立し、分子行動学の新たな局面を展開する基盤となった。また、多くの共同研究に発展し、今後、大きな成果が期待される。

公募研究：21 年度-22 年度

ショウジョウバエをモデルとする報酬記憶の分子行動学

研究代表者：古久保 - 徳永　克男

1）筑波大学生命環境科学研究科・生物科学専攻

＜研究の目的＞

人を含む動物の行動がどのような神経回路により支配されているかという問いは、現在の神経科学の中心的問題の一つである。システムとしては、それぞれの遺伝子はそれらを発現する神経回路を介して脳機能を制御するのであり、行動を制御する神経回路の機能的同定は遺伝子機能と脳機能の包括的理解に必須の課題である。学習・記憶研究における様々なモデル動物の中でも、ショウジョウバエはその遺伝子基盤の理解に多くの知見を提供してきた。我々は、学習・記憶を制御する神経基盤の解明のために､成虫よりはるかに単純な脳を持つ幼虫に着目し、幼虫を使用した新しい嗅覚連合学習パラダイムを確立し、その特性を明らかにしてきた(Honjo & Furukubo-Tokunaga, ***J. Neurosci.*** 2005, 2009)。これにより、ショ糖報酬学習では２時間にわたり維持される **CREB** 依存性中期記憶（MTM）が生成されることを明らかにしてきた。また、１）罰と報酬のいずれの記憶も幼虫キノコ体又はその上流構造に保持されること、２）幼虫の報酬記憶と罰記憶の形成にはオクトパミン神経とドーパミン神経の出力がそれぞれ必須であること、３）これらの生理活性アミン神経が触角葉とキノコ体へ異なる配線様式をもつ事明らかにし、発生遺伝学的に決定された神経回路の違いが記憶の安定度の違いを生み出す神経基盤である事を提唱してきた（**図 1**） (Honjo & Furukubo- Tokunaga, ***J. Neurosci.*** 2009)。本研究では、学習・記憶を制御する神経回路のより詳細な解析を目的に、幼虫を使用した学習・記憶パラダイムにおいて、光感受性および温度感受性イオンチャンネルを利用した神経操作による再構築系の確立を試みた。

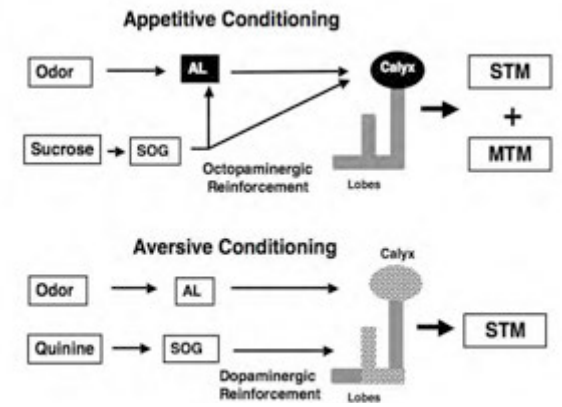


図 1. 幼虫脳の嗅覚学習回路。ショ糖報酬情報は触角葉とキノコ体の双方の樹状突起を直接活性化し、中期記憶を誘導するが、罰情報と嗅覚経路との交差は間接的であり、短期記憶のみ誘導される。

＜研究成果＞

近年の神経遺伝学的手法の発展により、特定のニューロンの活動を生きた動物に於いて光や熱により特異的に操作することが可能となりつつある。光遺伝学では、青色光に反応するイオンチャネル(ChR2)を、熱遺伝学では、温度依存的なイオンチャネル(dTrpA1)を特定のニューロンで発現させることで、可逆的に標的ニューロンを興奮させることができる。本研究では、両技術を駆使し、ショ糖報酬刺激を介在するオクトパミン神経細胞で温度感受性チャネル TrpA1 を発現するとともに、光感受性イオンチャネル ChR2 を特定の嗅受容神経で発現するショウジョウバエ遺伝子導入系統をまず作成した。

匂い刺激を青色光に置換するために、特定の嗅受容神経で発現する４種の嗅受容体遺伝子（Or82a, Or42b, Or47a,Or24a）と全ての嗅受容神経で発現する嗅受容体遺伝子（Or83b）を採用し、これらの遺伝子の発現プロモーター調節下でChR2を発現させた系統（Or-ChR2）を作成した。一方、餌刺激を温度刺激に置換するべく、オクトパミン神経で特異的に発現するTDC2遺伝子のプロモーター調節下で温度依存性チャネルdTrpA1を発現する系統（TDC2-dTrpA1）を構築した。これらの系統を使用して、遺伝学的交配により、TDC2-dTrpA1と Or-ChR2の両者をもつショウジョウバエ系統を作成した。さらに、すべての系統について、標準系統である*white* (CS10)に対して少なくとも５回の戻し交配を行い、遺伝的背景を揃えた。実験には3齢前半の幼虫を使用し、青色光に対する反応係数（ $RI = (N_{blue} - N_{red}) / (N_{blue} + N_{red})$ ）をもとに条件付けによる幼虫行動の変化を解析した。

TDC2-dTrpA1 と Or-ChR2 の両方をもつショウジョウバエ系統において青色光と熱の同時刺激を行った後に、青色光と赤色光を照射する LED テストプレートを使用して、青色光に対する走光性の変化を観察した。その結果、青色光と熱の同時刺激により青色光に対する幼虫の走化性が顕著に増加する事が明らかとなった（図２）。一方、遺伝学的背景が同一であるもののいずれの導入遺伝子も持たない系統や、TDC2-dTrpA1 と Or-ChR2 のいずれか一方のみを持つ系統に於いては青色光と熱の同時刺激による走光性の変化は誘起されなかった。

さらに、TDC2-dTrpA1 と Or-ChR2 の両方をもつショウジョウバエ系統を用いて、青色光と熱の両者、またいずれか一方のみによる条件付けを行った後に、青色光と赤色光を照射する LED テストプレートを使用して、青色光に対する走光性の変化を観察した。その結果、青色光または熱の一方のみによる刺激では走化性の変化を誘導できない事を確認し田。この結果は、条件付けによる幼虫の行動変化が、青色光と熱の同時刺激によってのみ誘起される事を明らかにした（図３）。

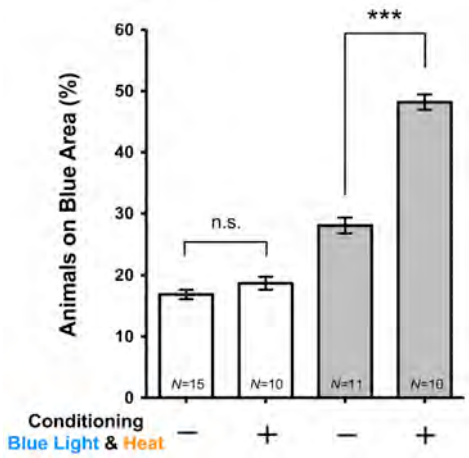


図２． 青色光と熱による条件付けと走化性の変化。
白：コントロール w(CS10)幼虫。灰色：TDC2-dTrpA1；Or-ChR2 幼虫。

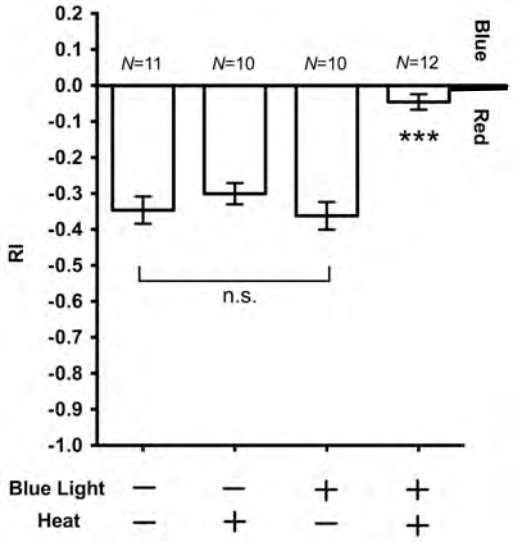


図３． TDC2-dTrpA1; Or-ChR2系統に於ける青色光と熱による条件付けと走化性の変化。

$$RI = (N_{blue} - N_{red})/(N_{blue} + N_{red})$$

＜国内外での成果の位置づけ＞

これまでの我々の研究を含む国内外の研究により幼虫の報酬学習には、オクトパミン神経を介した報酬経路と、匂い情報を媒介する嗅覚経路が脳において統合される事が示唆されてきた。本研究は、嗅覚受容神経とオクトパミン神経の特異的活性化が連合学習の成立に充分である事を直接に示すものである。さらに、匂い物質を使用した嗅覚刺激では、複数の嗅受容神経と対応する複数の糸球体が同時に活性化されるが、我々の結果は、特定の嗅受容神経による単一の糸球体の活性化により嗅覚連合学習が成立可能である事を初めて明らかにしたものであり、嗅覚連合学習を支える最小の回路ユニットを提示するものといえる。

また、本手法は、これまでの連合学習のパラダイムに対して、技術的にも著しく簡便であり、高い再現性を示す事が明らかとなった。従来のショ糖と匂い物質による手法では、学習の成立に３０分間にわたる条件付けが必要であったが、本研究で開発した光と熱による条件付けではわずか１分間の条件付けにより連合学習が成立する。本実験系は、行動レベルでの変化の観察に加えて、顕微鏡下の培養条件に於いても、青色光と熱による特異的神経回路の操作に道を開くものである。さらに、構築した遺伝子導入系統は、それぞれの遺伝子発現プロモーターを使用した直接的発現系を採用しており、GAL4-UAS 系を始めとする様々ショウジョウバエに於ける遺伝子発現操作とイメージング技術と組み合わせる事により詳細な解析が可能である。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

遺伝子導入系統の行動操作はほぼ期待どおりの結果を得る事ができた。しかしながら、導入系統の遺伝学的背景の統一を含むショウジョウバエ系統の構築と、光と熱刺激の基礎的パラメーターの検討に時間を要し、G-CaMPを使用した培養系に於ける神経回路のイメージングやレーザーによる神経細胞破壊実験等の課題が残された。

＜今後の課題、展望＞

本研究により、光と熱を用いた特異的神経回路の人為的な活性化によりショウジョウバエ幼虫において嗅覚連合学習を効率よく誘導する技術が確立し、報酬記憶を制御する神経回路の研究をさらに進める基礎を得た。また、本研究は、単離された神経系を用いた培養条件での連合学習の解析に新たな方策を提供する。ショウジョウバエ幼虫の脳を構成する細胞数は限られており、本研究成果を基礎として、学習・記憶を制御する神経回路を単一の神経細胞レベルで解明できるものと期待される。

公募研究：2009 年度-2010 年度

ゼブラフィッシュの覚醒・睡眠の分子機構に関する研究

研究代表者：中井　淳一

埼玉大学　脳科学融合研究センター

＜研究の目的と進め方＞

多くの動物が睡眠することが知られているが、その分子メカニズムはまだ良くわかっていない。哺乳類と鳥類については脳波（EEG）が測定されており、睡眠状態では EEG が徐波化することが知られており、また、レム睡眠、ノンレム睡眠の区別がある。ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュでは行動観察から活動が低下し、刺激に対する覚醒閾値が上昇することが知られており、これは睡眠状態と考えられている。本研究は、ゼブラフィッシュにおいて客観的・定量的睡眠・覚醒の評価法を確立し、睡眠と覚醒の分子機構を明らかにすることを目的いる。

＜研究計画＞

1）蛍光カルシウムセンサーG-CaMPのゼブラフィッシュへの導入

GAL-4 UAS発現系を用いて蛍光カルシウムセンサーG-CaMPをゼブラフィッシュに導入する。遺伝子導入には導入効率の良いtol2を用いる。

2）ゼブラフィッシュの神経活動のイメージング

エンハンサートラップラインの魚と掛け合わせてG-CaMPを神経細胞特異的に発現させる。稚魚を用いて寒天に包埋し、レーザー顕微鏡またはCCDカメラを用いてタイムラプスイメージングを行う。

3）睡眠・覚醒の可視化。

レーザー顕微鏡によるイメージングを行い、蛍光変化量から睡眠・覚醒状態の定量的解析を行うとともに、遺伝子操作したゼブラフィッシュを用いて、まずはヒポクレチンの経路について検討を行う。

＜得られた研究成果＞

A）蛍光カルシウムセンサーG-CaMP6～8 の開発とゼブラフィッシュへの導入

我々は新たに高感度高性能な緑色蛍光カルシウムセンサーG-CaMP6～8 の開発に成功した（図１）。開発した G-CaMP6 にアクチンを融合させた G-CaMP-actin を作成し、マウスの海馬 CA3 神経細胞に発現させたところ、歯状回からの投射線維の閾値上および閾値下の刺激に対応したシナプスのカルシウム動態を可視化する事に成功した（図２）。また線虫の神経細胞に発現させたところ行動中の線虫の神経細胞の活動を既存のセンサー以上の性能で可視化することができた（図３）。これらの結果をまとめ、学術論文として発表した（Ohkura, M. ら PLoS One　2012A）。

図１　新たに開発した高性能蛍光カルシウムセンサー G-CaMP6-8 の模式図.。（Ohkura, M. ら PLoS One　2012A）

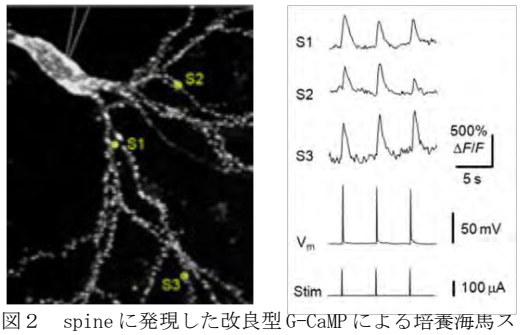


図２　spine に発現した改良型 G-CaMP による培養海馬スライス CA3 細胞の spine Ca^{2+}の測定例。プレの神経線維を電気刺激(Stim)し、ポストの細胞から電位(Vm)と蛍光を記録した。刺激に反応して spine(S1～S3)で蛍光変化が捉えられている。(Ohkura, M. ら PLoS One 2012A)

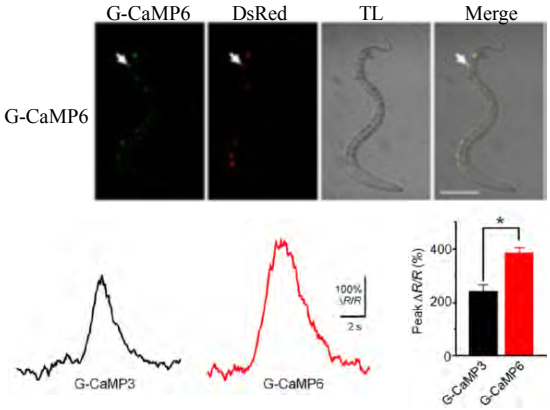


図３　線虫の DA ニューロンに G-CaMP6 を発現させた。G-CaMP6 は既存の G-CaMP3 と比較し、より大きなシグナルが観察された。(Ohkura, M. ら PLoS One　2012A)

新たに開発した G-CaMP7a を tol2 を用いてゼブラフィッシュに導入した（遺伝研川上浩一博士、武藤彩博士との共同研究）。GAL4-UAS 発現系を用いているのでエンハンサートラップラインの魚と掛け合わせる事により G-CaMP の発現部位をコントロールすることが可能である。

B）赤色蛍光カルシウムプローブ R-CaMP の開発

赤色蛍光カルシウムプローブ R-CaMP1.07 を開発し、海馬神経細胞において光活性化型チャネルであるチャネルロドプシンと併用してカルシウムイメージングを容易に行う事ができることを示した（図４―６）。この成果をまとめ、学術論文として発表した（Ohkura, M. ら PLoS One　2012B）。光刺激とカルシウムイメージングを同時併用する技術に関して、チャネルロドプシンと G-CaMP を同時に発現する線虫において光刺激とともにレーザー顕微鏡による G-CaMP の蛍光カルシウムイメージングを同時に行う事が可能な実験・測定系を開発した。

図４　R-CaMP の構造の模式図。(Ohkura, M. ら PLoS One 2012B)

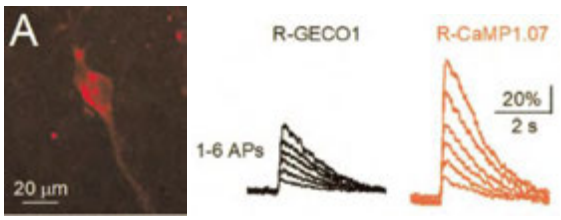
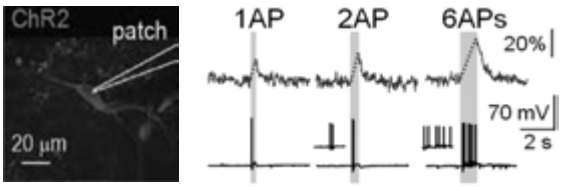


図５　R-CaMP1.07 によるマウス海馬 CA3 細胞の Ca^{2+}活動測定例。1-6 発の活動電位に対する R-CaMP1.07 の蛍光応答（右）。(Ohkura, M. ら PLoS One 2012B)



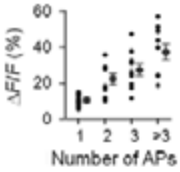


図６　R-CaMP1.07によるマウス海馬 CA3 細胞の Ca^{2+}活動測定例。Channelrhodopsin-2 の光刺激で誘発させた 1-6 発の活動電位に対する R-CaMP1.07 の蛍光応答（右上）。R-CaMP1.07 の活動電位の応答性(下)。(Ohkura, M. ら PLoS One 2012B)

C) ゼブラフィッシュの神経活動のイメージングの可視化

UAS:GCaMP7a の魚と gSA2AzGFF49A transgenic line の魚を掛け合わせる事により、視蓋、手綱核、松果体等に G-CaMP7a を発現する個体を得た（図７）(遺伝研川上浩一博士、武藤彩博士との共同研究)。実際に、稚魚を蛍光実体顕微鏡で観察したところ、肉眼でもゼブラフィッシュの脳や脊髄の蛍光の変化を観察できるほどであった。また、稚魚を 2%寒天に包埋固定した状態では細胞１つ１つの活動も十分追えるほど高解像度の測定を簡単に行えた（図８－１０)。

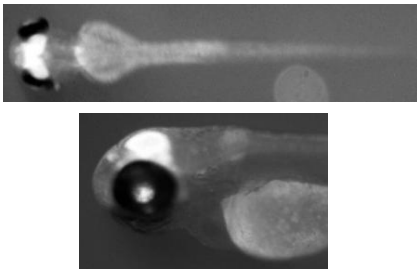


図７　G-CaMP7a を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ（gSA2AzGFF49A；UAS:GCaMP7a）の蛍光画像（上：背面、下：側面)。

視蓋：　視蓋の神経細胞では自発活動が見られるとともに、外界からの刺激に反応した活動が記録された（図８－１０)。また、神経活動は光の ON および OFF 時に生じることが in vivo において明らかになった（図１１)。

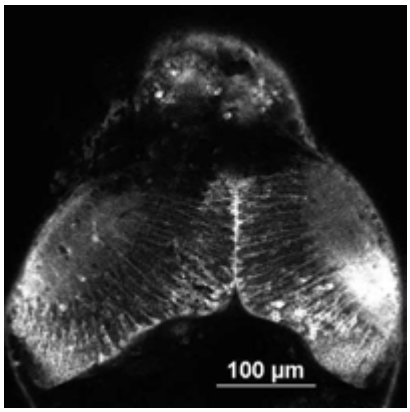


図８　G-CaMP7a を発現するゼブラフィッシュ稚魚（4pfd）の頭部のレーザー顕微鏡による蛍光画像。右の視蓋で蛍光増加が見られる。

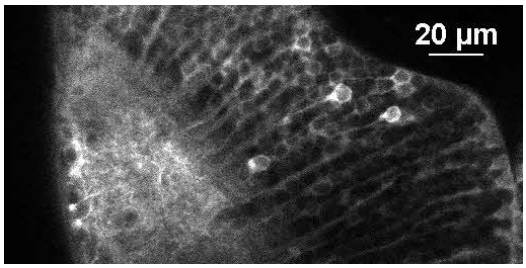


図９　レーザー顕微鏡（ニコン A1RMP）による視蓋部の蛍光タイムラプス撮影（40 x 対物レンズ使用)。ある一時点の画像。左下のニューロピルおよび細胞体（右上）の活動が捉えられている。

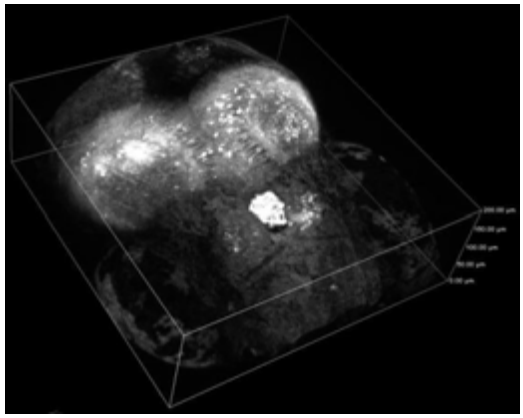


図１０　高速レーザー顕微鏡による３D 再構成画像(右手前が頭側)。松果体（中央）の蛍光が強い。

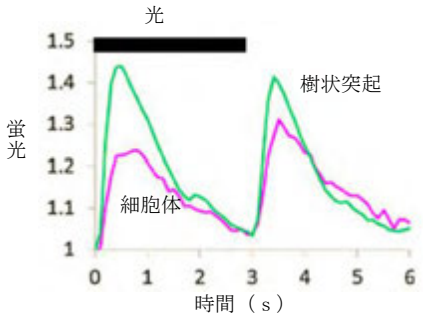


図１１　光の ON および OFF 時に大きな蛍光変化が生じる。(Muto, A. and Ohkura, M. et al Curr. Biol. 2013)

さらに、視蓋には網膜の位置と対応するマップが存在し、in vivo でそのマップを確認することができた。その結果、右目の情報は左の視蓋に、左目の情報は右視蓋に送られ情報処理されていた。また、網膜の背側の像は反対側の視蓋の腹側、網膜の腹側の像は反対側の視蓋の背側、網膜の鼻側の像は反対側の視蓋の前方、網膜の耳側の像は反対側の視蓋の後方に投射されていることが in vivo でも確認された（図１２―１３）。この成果をまとめ、学術論文として発表した（Muto, A., Ohkura, M. ら Curr. Biol. 2013）。

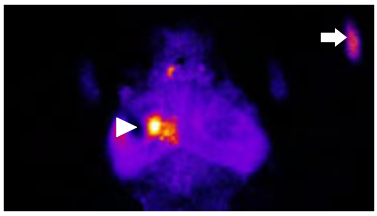


図１２　G-CaMP7a を発現させたゼブラフィッシュの CCD カメラによるカルシウムイメージング。魚に餌を見せた時の視蓋の反応を撮影した。右上の矢印は餌。中央は視蓋。餌に対応して左の視蓋に蛍光変化(矢頭)が見られる。(Muto, A. and Ohkura, M. et al Curr. Biol. 2013)

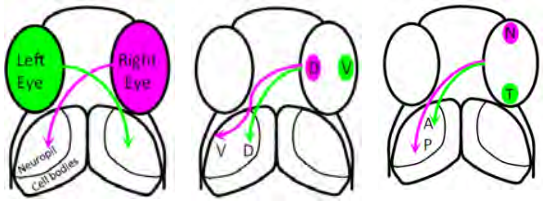


図１３　網膜から視蓋への投射をまとめた説明図(D:背側、V:腹側、N:鼻側、T:耳側、A:前方、P:後方)(Muto, A. and Ohkura, M. et al Curr. Biol. 2013)

松果体：　松果体は幼弱な時期には光感受性を持つと言われている。また、松果体はメラトニンを産生し概日リズムを制御する事が知られている。睡眠との関連性があるため松果体のカルシウムイメージングを行った。松果体は幼弱な稚魚では強い G-CaMP の蛍光が見られる（図１０，１４）。また神経活動も認められる。蛍光強度が強いのは、部位特異的に G-CaMP の発現量が多くなっていることも可能性としては考えられるが、松果体で稚魚の時期の細胞内カルシウム濃度が高い可能性が示唆される。

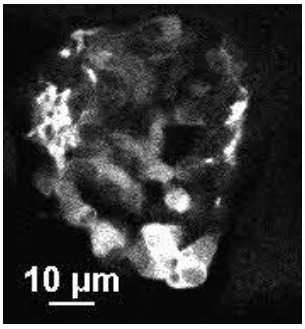


図１４　松果体のカルシウムイメージング。明るい蛍光が見られるが、自発活動は乏しい。

手綱核：　手綱核は魚から哺乳類まで保存された器官で、哺乳類の研究では手綱核は海馬のθ波との関連や、恐怖行動、レム睡眠とも関係する事が最近の研究で知られている。そこで手綱核についてカルシウムイメージングを行ったところ、手綱核では活発な自発活動が見られた。特に外側部で活動は活発で、各細胞は独自の発火パターンを持っているようで、同期発火はほとんど見られない（図１５－１６）。ゼブラフィッシュでは手綱核は背側手綱核と腹側手綱核手綱核にわかれ、マウスの内側手綱核と外側手綱核に対応している（Amo and Aizawa et al., J. Neurosci, 2010）。背側手綱核は、更に外側と内側の亜核に分かれている事が知られている。また、手綱核には左右差がある事が知られている（Aizawa et al., Current Biology, 2005; Devel. Cell, 2007）。左背側手綱核は外側亜核が内側亜核より大きく、右背側手綱核ではその反対となっている。左外側部の活動は活発で、左背側の活動は外側亜核に対応した活動であると考えている。外側亜核は中脳脚間核の背側半分に、内側亜核は中脳脚間核の腹側半分に選択的に投射している。さらに背側脚間核は中心灰白質に投射しており、中心灰白質は脅威や性的衝動に基づく本能的行動の中枢と考えられている。

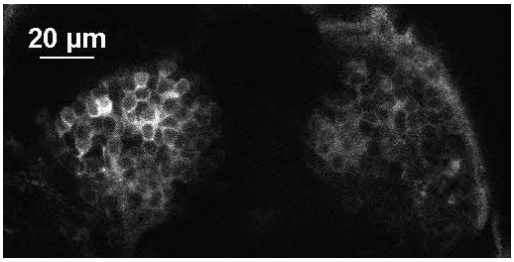


図１５　手綱核のカルシウムイメージング。活発な自発活動が見られる。

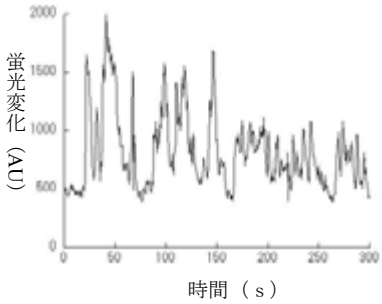


図１６　左手綱核の外側部の一神経細胞の活動。活発な自発活動が見られる。十分大きな蛍光変化量が得られている。

D) モデル生物の顕微鏡下自動追尾装置の開発

本研究グループの班員である東北大学の橋本浩一博士と共同研究を行う事ができ、顕微鏡下でモデル生物の線虫やゼブラフィッシュを追尾するための自動追尾装置を開発した（図１７）。現在はさらにレーザー顕微鏡と組み合わせた測定システムへと進化している。

図１７　開発したモデル動物の顕微鏡下自動追尾装置（東北大学橋本浩一博士との共同研究）

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果のA)B)は研究者への提供を開始しており、すでにin vivo イメージングの強力なツールとなっている。C)は論文発表後国内外の新聞やインターネットサイトで取り上げられ、高く評価されている。また、D)で開発した装置は線虫等モデル生物の追尾用に開発されたが、世界的に見て線虫の追尾装置は画像の二値化を行うものがほとんどで本装置の様に画像のパターンを認識して目標を追尾するシステムはこれまで世界でも例がない。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

ゼブラフィッシュの蛍光カルシウムイメージングまではおおむね順調に進んだが、当初の目的の睡眠・覚醒のイメージングと分子レベルの研究はいくつかの解決すべき困難がありまだ達成できていない。

つまり、高感度のカルシウムセンサーが開発されたことにともない、ゼブラフィッシュの神経細胞の活動を可視化することが非常に簡単に行えるようになったが、ゼブラフィッシュを用いた睡眠研究には以下の様な困難がある。１つ目は睡眠・覚醒状態の判定である。２つ目に長時間観察をいかに行うかという点ある。３つ目に自然な睡眠導入をいかに行わせるかという点で困難が生じた。第1の点について、そもそもゼブラフィッシュにおいては脳波測定も確立していない。当初行動学的に睡眠中は運動量が減るということを指標に考えていたが、イメージングを行いながら運動量を測定する方法には工夫が必要である。心拍数やその他のバイタルサインとともに運動量を計測し、ゼブラフィッシュにおいて睡眠状態の指標を確立してからイメージングと対比して検討を加えていくことが早道と考えられた。第２の点について、記憶スペースを大量に必要とするイメージングをむやみに長時間行う事は現実的ではない。覚醒・睡眠状態を定期的にモニターできる方法をまず確立する必要がある。定期的にモニターしていれば、そのインフォメーションをもとにイメージングを開始する事が可能である。第３の点も非侵襲的で定期的なモニターリングが可能であれば、可能性が見えてくるが、さらに可能であればフリーで泳いでいる状態でイメージングを行う事ができるようになることが理想である。そのためには顕微鏡下で生物を自動追尾する装置等の開発が重要となってくる。

＜今後の課題、展望＞

本研究の成果により、ゼブラフィッシュの脳神経細胞を可視化し解析する技術が確立し、睡眠の研究をさらに進める一定の基盤ができた。しかし、本研究より明らかになった事として、ゼブラフィッシュを用いた睡眠研究においてはこれからまだ確立しなければならない技術的要素が存在する。こうした困難は上述したような点を検討してすることにより乗り越えられると考えられる。

本研究において開発した改良型G-CaMPをもちいたゼブラフィッシュの脳機能イメージングは非常に強力で、多くの新しいことがゼブラフィッシュにおいて明らかにされる事が予想される。そのためにゼブラフィッシュの行動学、生理学な測定技術を確立し、イメージングと組み合わせることが重要である。それにより、より高い次元の研究が可能になり、ブレイクスルーを成し遂げられるように思っている。

我々は現在他の補助を受けながら光刺激技術の技術開発も手掛けている。今後、イメージング技術に光刺激技術を融合させて、研究をさらに発展させていく予定である。

線虫の出力系回路における神経活動の可視化と解析

研究代表者：安藤　恵子

埼玉大学研究機構脳科学融合研究センター

＜研究の目的と進め方＞

歩行・蛇行などのロコモーションは、リズミカルなパターン運動から構成され、ヒトから無脊椎動物まで広く認められる基本的運動である。さまざまな動物モデルを対象とした研究によって、CPG（Central Pattern Generator）回路が周期的なリズムを誘発し、上位中枢からの入力と感覚性フィードバックの作用により環境に適応したパターン運動が生成されることが知られている。しかし、脊椎動物の神経系は極めて複雑で運動を生成する神経回路の同定は困難なことが多く、その働きも不明な点が多い。

線虫はわずか 302 個のニューロンから成るシンプルな神経系を有し、神経系の全神経回路網が解剖学的に記載されている唯一のモデル動物である。線虫は固形培地上でリズミカルな蛇行運動によって移動し、誘因物質に対する正の走化性行動や、侵害刺激に対する逃避行動などのさまざまな行動パターンを示す。今まで、神経回路の特定のニューロンの破壊実験や行動異常の遺伝学的解析によって、運動制御に関わるニューロンや神経機能分子の同定が行なわれてきた。しかし、運動のメカニズムを包括的に理解するためには、多ニューロン活動の可視化による神経回路の機能解析が不可欠である。

我々の研究グループは、蛋白質性蛍光カルシウムセンサー（G-CaMP）を開発し(Nakai et al, Nat Biotechnol, 2001)、モデル動物に応用して神経回路の機能解析を行っている。本研究では、新たに開発した高性能の G-CaMP を線虫の運動系回路に応用し、運動中の個体における神経回路活動の定量的評価システムを確立するとともに、そのシステムを用いて出力系回路(運動ニューロン-筋）のイメージング解析を行い、運動制御機構を明らかにすることを目的とした。

＜研究計画＞

1）自由運動下での神経筋回路活動の定量的評価法の開発。コンピュータ制御の生物自動追跡用ビジュアルサーボステージと高速共焦点レーザー顕微鏡システムを統合し、行動を追尾しながら高解像度のイメージング蛍光画像を取得するシステムを構築する（班員の東北大学橋本浩一教授との共同研究)。

2)蛇行運動における体壁筋活動の機能解析。蛇行運動はリズミカルな筋の収縮と弛緩により行われる。改良型G-CaMPを用いて、運動中の体壁筋のイメージング解析を行い、前進および後退運動に伴うカルシウム動態を明らかにする。

3)蛇行運動における運動ニューロン回路活動の機能解析と運動の制御機構の解明。体壁筋の活動はコリン作動性およびGABA作動性運動ニューロンにより拮抗的に支配されている。本研究では、GABA 作働性運動ニューロンに着目し、運動中の回路活動を明らかにするとともに、オプトジェネティクス解析とGABA変異体のイメージング解析により、GABA 作働性運動ニューロンによる出力系回路の制御機構を明らかにする。

＜得られた研究成果＞

A)モデル動物のレーザー顕微鏡下自動追尾イメージングシステムの開発

本研究グループの班員である東北大学の橋本浩一教授と共同研究を行うことができた。所属研究室の中井淳一教授（平成21-22 年に本研究グループの班員）と橋本教授で共同開発されたシステムをさらに進化させて、ビジュアルサーボステージをレーザー顕微鏡と組み合わせた測定システムを開発した（図 1)。開発内容は以下の通りである。①新たにビジュアルサーボステージを開発した（HV-STU03 型、ホークビジョン株式会社から販売開始している）②①をニコン高速共焦点レーザー顕微鏡 A1RMP に組み込んだ。③赤外線照明により動物の顕微鏡画像を CCD カメラで撮像し（200 枚/秒)、重心位置を計算する方法、および体の一部のパターン認識により位置を計算する方法を用いて画像を処理し、トラッキングを行った。

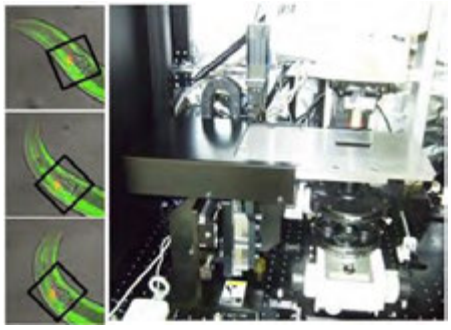


図１：モデル動物のレーザー顕微鏡下自動追尾イメージングシステム（東北大学橋本浩一教授との共同研究)。頭部の咽頭部分をパターン認識（黒い四角）し、自動追尾しながら 2 色の蛍光画像(G-CaMP と DsRed)および透過像をビデオレートで撮像している。

新たに開発した測定システムを用いることで、自由運動中の線虫を追尾しながら高倍率・高解像度のニューロンのレシオイメージング蛍光画像（改良型 G-CaMP と赤色蛍光タンパク質）と透過像をビデオレートで連続撮影することが可能となった。この成果について学会、シンポジウム等で発表を行った。

B）蛍光カルシウムセンサーG-CaMP6～8 の開発と線虫への導入

我々は高感度高性能な緑色蛍光カルシウムセンサーG-CaMP6～8 の開発に成功した。G-CaMP6 を線虫の後退運動で活性化するアセチルコリン作動性運動ニューロンに発現させたところ、従来のG-CaMP3と比較して後退運動時に約2倍の蛍光強度変化を示し、*in vivo* でも性能の向上が認められた（図 2)。

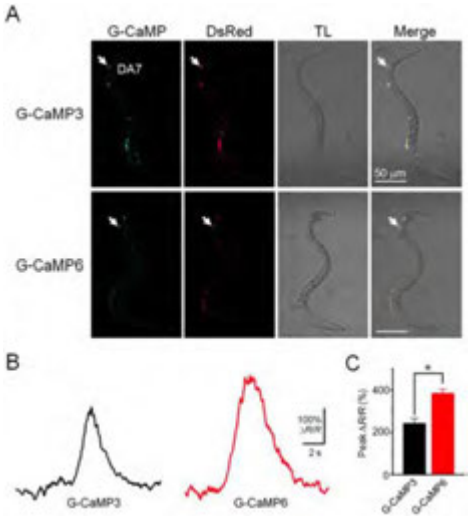


図 2：G-CaMP3 および新たに開発した G-CaMP6 を線虫コリン作動性運動ニューロンに導入し、後退運動時の蛍光強度変化を比較した。G-CaMP6 でイメージングの性能が向上している。（Ohkura M, Sasaki T, Sadakari J, Gengyo-Ando K, Kagawa-Nagamura Y, Kobayashi C, Ikegaya Y, & Nakai J *PLoS One 7*, e51286, 2012）

C) 蛇行運動における線虫体壁筋活動の可視化と解析

線虫は固形培地上に側面をつけて、背腹を交互に屈曲させて蛇行運動を行うが、そのリズミカルな運動は体全体を覆っている体壁筋の収縮と弛緩によって行われる。体壁筋は、4 列の strip から構成され、それぞれの strip は 23-24 個の筋細胞が長軸方向に並んだ構造をしている。運動時にこれらの筋細胞がどのように活動するのかを明らかにするために、ミオシン重鎖遺伝子のプロモーターを用いて、筋細胞特異的に G-CaMP を発現するトランスジェニック系統（Pmyo-3::G-CaMP 株、および Pmyo-3::G-CaMP; Pmyo-3::DsRed 共発現株）を作成した。これらの株を用いて、蛇行運動中の体壁筋のイメージング解析を行ったところ、体の屈曲する側で蛍光強度が高くなることが確認され、蛍光強度の変化が筋細胞内のカルシウム濃度の変化を反映していると考えられた。

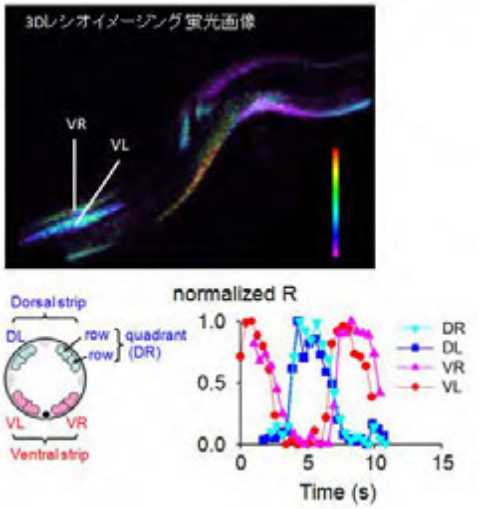


図 3：体壁筋のタイムラプス 3D レシオイメージング
運動中の個体の体壁筋 G-CaMP 蛍光と DsRed 蛍光の蛍光強度比を疑似カラーで示した 3D 蛍光画像（上）。線虫の横断面の模式図（下左）。蛍光強度比の時系列変化（下右）。DL&DR および VL&VR はそれぞれ同期して活動し、互いに逆位相であることが示された。

次に、Z 軸方向に高速で蛍光画像を撮像しタイムラプス 3D イメージング解析を行い、体の左側と右側の strip が運動時に同期して活動すること、および背側と腹側の筋肉が逆位相のレシプロカルな活動をすることを明らかにした（図 3）。

次いで、体全体の体壁筋活動を解析し、前進・後退運動における体壁筋のカルシウム動態を明らかにした（図 4）。カルシウムシグナルは、前進時には前方から後方に向かって筋細胞間を伝播し、後退時には後方から前方に向かって筋細胞間を伝播していた。この長軸方向に沿ったカルシウムシグナルの伝播を、便宜的にカルシウム波と呼ぶ。体壁筋は複数の筋細胞が長軸方向に繋がった構造をしているが、筋細胞間のギャップジャンクションは存在しないため、カルシウム波は筋細胞に投射する運動ニューロンのコーディネートされた入力を受けて形成されていると考えられる。また、運動方向がスイッチングする際には、カルシウム波の進行している部位と同一の部位からカルシウム波の進行方向が

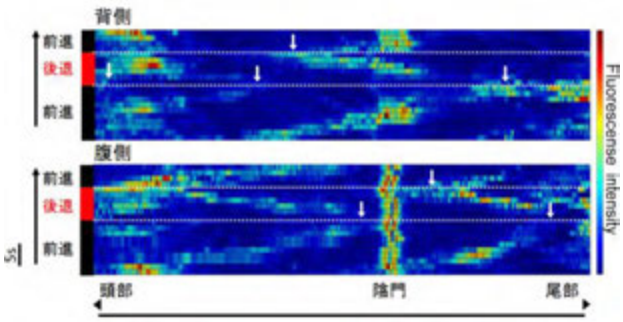


図 4：前進・後退運動における体壁筋のカルシウム動態
背側および腹側体壁筋の蛍光強度の時系列変化。前進時にはカルシウム波が head→tail に伝播し、後退時には tail→head に伝播している。矢印は伝播方向が切り替わった箇所を示す。

逆転して伝播していた（図 4）。この結果は、カルシウム波のスイッチングに際して、前進運動と後退運動を担う運動ニューロンの間で、直接的あるいは間接的な情報連絡が存在することを示唆している。

D)蛇行運動における運動ニューロン回路活動の可視化と解析

体壁筋の活動はアセチルコリン作動性運動ニューロンと GABA 作動性運動ニューロンの働きにより制御されている。本研究では、GABA 作動性運動ニューロンに着目して解析を進めた。GABA 運動ニューロンに開発した高性能 G-CaMP および DsRed を共発現するトランスジェニック系統を作成し、蛇行運動時のイメージング解析を行った。(A)で開発した自動追尾イメージングシステムを用いて、自由運動下で GABA 運動ニューロンの活動を解析した。motion artifact を抑えるために、蛍光強度比（$F_{G\text{-}CaMP}/F_{DsRed}$）を計測した。GABA 作動性運動ニューロンの活動は後退時に上昇し、特に頭部に近い部分のニューロンで活動性の上昇が顕著に認められた。

さらに、神経筋回路における GABA の機能を明らかにするために、GABA 生合成酵素（GAD：glutamic acid decarboxylase）遺伝子変異体における体壁筋のカルシウム動態を調べた。GAD 変異体では、後退時において顕著な運動異常を示すことが知られているが、背側と腹側の体壁筋で過剰なカルシウム上昇が同期して生じていた。この結果は、後退時に GABA ニューロンの活動性が上

昇する結果とともに、GABA の作用が後退時における背腹の体壁筋のレシプロカルな活動の調節に重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

E)光刺激とカルシウムイメージングを同時併用する技術の開発

運動ニューロンと体壁筋との連関を明らかにするため、光活性化型チャネルであるチャネルロドプシンと G-CaMP を発現する線虫において、光刺激とともにレーザー顕微鏡による G-CaMP の蛍光カルシウムイメージングを同時に行う事が可能な光学測定系を開発した（図 5）。この技術を用いて、運動ニューロンの光刺激により活性化される体壁筋細胞を同定する系の開発を進めている。この成果については、第 36 回神経科学学会大会(2013.6.20～23）で発表予定である。

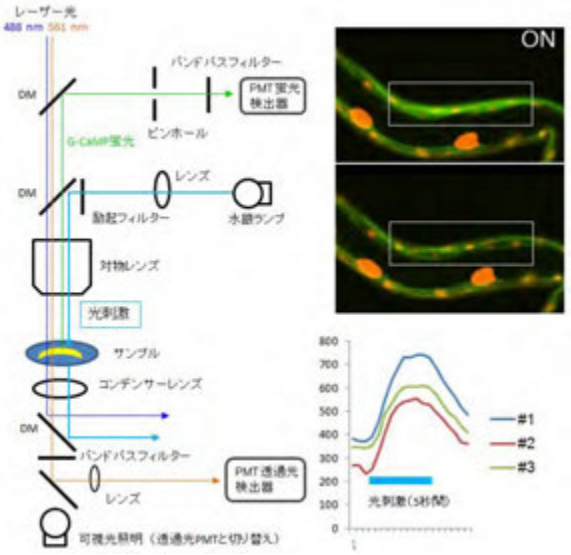


図 5：オプトジェネティクスとカルシウムイメージングを同時併用する光学測定系の開発。
高速レーザー顕微鏡（Nikon/A1RMP）の光学系を改変し、チャネルロドプシンによる光操作と G-CaMP によるイメージング解析を同時併用することが可能となった。光路図（左）、アセチルコリン作動性運動ニューロンを光刺激し、活性化される体壁筋（右上、四角部分の３つの筋細胞）の活動をイメージング解析した（右下）。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A）で開発した装置は㈱ホークビジョンより販売され、他の研究者にも利用されている。線虫の追尾装置はこれまでにもいくつかの研究室から開発されているが、レーザー顕微鏡と組み合わせて自動追尾するシステムはこれまでに例がない。このシステムを利用することで、高解像度・高倍率の多色蛍光画像（4 色まで可能）と透過像を同時に取得できるため、より詳細なイメージング解析を行うことが可能である。B)の改良型 G-CaMP は研究者への提供を開始しており、すでに in vivo イメージングの強力なツールとなっている。C)D)に関しては、部分的に拘束した状態で体壁筋のイメージングを行った例はあるが（Pierce-Shimomura et al., 2008）、自由運動下での線虫体壁筋および GABA 運動ニューロンの詳細なイメージング解析の報告はなく、運動制御における GABA の役割についてこれらの成果を論文発表する予定である。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画に基づき、自動追尾イメージングシステムの開発と出力系回路のイメージング解析を行い、当初の目標達成までおおむね順調に進んだと思われるが、以下の点について困難があり、今後さらなる技術開発や実験条件の検討が必要であると思われた。

①自動追尾システムについて：

開発当初は自動追尾が不安定な場合も多く、強制終了する場合も多かったが、ソフトの改良により、高倍率でも順調に追尾することができるようになった。しかし、動物の動きに伴ってしばしばZ軸がずれることがあり、フォーカスを手動で微調整しながら追尾する必要があった。今後はオートフォーカス機能を搭載することにより、さらに使いやすいシステムになると考えている。

②in vivoでのG-CaMP発現について：

今回、GABA運動ニューロンにいくつかのバージョンのG-CaMPを発現させたが、すべての細胞にG-CaMPを均一に発現させるのはなかなか難しかった。トランスジーンを染色体に挿入した株においても、G-CaMPの蛍光が非常に暗い細胞があり、解析が困難な場合があった。発現パターンの不均一性が細胞内のカルシウム濃度を反映しているのか、G-CaMPの性質（basal蛍光強度、G-CaMPの不安定性など）なのかについては現在のところ不明であり、さらに検討が必要である。

③イメージング解析について：

GABAニューロンには、複数の細胞が重なる部分があり、高倍率にしても区別が困難で単一ニューロンレベルでのイメージング解析が不可能な場合があった。

＜今後の課題、展望＞

本研究の成果により、運動中の線虫の神経筋回路活動を可視化・解析する技術が確立し、今後の運動研究を進めるための分子生理学的な基盤ができたと考えている。しかし、自動追尾システムやイメージングの測定技術に関しては、上述したような点を検討し、改良を加えていく必要がある。将来的には、自由運動下で高速に3D蛍光画像を取得する光学測定システムを開発することにより、ニューロンの細胞体だけではなく神経突起の活動も立体的・動的に解析することが可能になり、運動研究のさらなる発展が期待される。また、複数の神経回路のダイナミックな活動を捉えるために、G-CaMPとは異なる波長特性の蛍光カルシウムセンサーの開発も重要な課題である。最近、我々のグループでは赤色蛍光カルシウムセンサー、R-CaMPを開発し(Ohkura et al., 2012)、線虫に応用して複数の細胞での同時イメージング解析を行いつつある。今後はこれらのセンサーを併用しながら、下位の出力系（運動ニューロン―筋）の解析とともに、より上位の介在ニューロンの解析を行い、運動系回路の機能動態を明らかにしていきたい。また、本研究で開発したオプトジェネティクスとカルシウムイメージングを同時併用する光学測定系を用いて、神経系と効果器である筋肉との連関についてさらに解析を進めていきたいと考えている。

公募研究：2011 年度-2012 年度

*C. elegans*におけるCREB依存的なアセチルコリンシグナル制御の解析

研究代表者：周防　諭

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

＜研究の目的と進め方＞

動物は環境の変化に応答してその行動や代謝を変化させるが、そのような外界からの刺激に対する応答においては神経系が重要な役割を果たしている。CREBは刺激依存的に遺伝子発現を誘導する転写因子で、外部からの刺激と遺伝子発現をつなぐことができ、神経細胞の長期的変化を引き起こすのに重要であることが知られている。アミン神経伝達物質はCREBを制御することが知られており、このような制御は学習や薬物依存において重要な役割を果たすと考えられている。

線虫*C. elegans*は、神経系が非常に単純であり、遺伝子破壊・遺伝子導入が比較的容易に行えるので、神経機能を分子レベル、神経回路レベルで解析するのに非常に有用である。このような利点を生かし、近年我々は*C. elegans*において餌依存的に制御される神経回路を明らかにした。この回路においては、アミン神経伝達物質であるドーパミンとオクトパミンにより、SIAと呼ばれるニューロンでCREBの活性化が制御されている。餌がないときにはRICニューロンから放出されたオクトパミンがSIAニューロンの受容体を介してCREBの活性化を誘導する。それに対して、餌があるときにはドーパミンが放出され、RICニューロンとSIAニューロンにあるドーパミン受容体を介して、オクトパミンの放出と受容体の下流のシグナルの両方を抑制することでCREBの活性化が抑制されている（図1）。しかし、このニューロンでのCREBの活性化の生理的な役割はわかっていなかった。本研究ではこのCREBの下流で働く分子・神経回路を明らかにすることを目的とした。

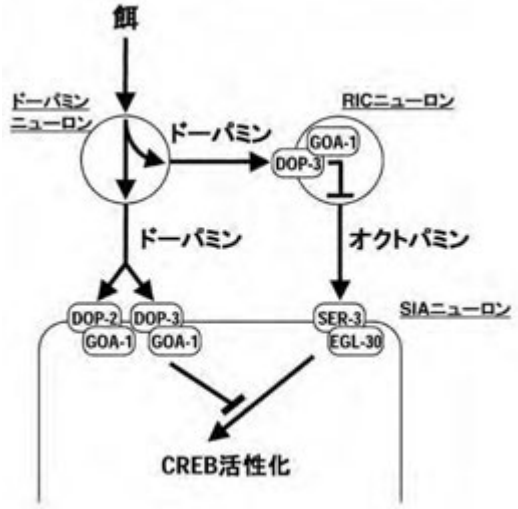


図1. 餌依存的なアミンシグナルによるCREBの制御

餌存在下に放出されるドーパミンは、ドーパミン受容体DOP-2、DOP-3およびGタンパク質GOA-1により、オクトパミンシグナルを抑制する。餌非存在下では、オクトパミン受容体SER-3はGq EGL-30を介してCREBの活性化を引き起こす。

SIAニューロンはアセチルコリンを産生することが知られているので、アミンシグナルによってアセチルコリンシグナルに変化がみられるかを測定することにした。アセチルコリンシグナルの強さは、アルジカルブという化合物に対する耐性の強さを調べることによって求めることができる。アルジカルブはアセチルコリンを分解するコリンエステラーゼの阻害剤で、*C. elegans*をアルジカルブ存在下で飼育すると過剰なアセチルコリンシグナルにより時間経過とともに麻痺が引き起こされる。*C. elegans*株間で、麻痺に要する時間を比較することでアセチルコリンシグナルの相対的な強度を調べることができる。本研究では、アルジカルブ感受性を指標とすることで、アミン神経伝達物質によるアセチルコリンシグナルの変化を測定し、アミンによりアセチルコリンシグナル制御のメカニズムとCREBの関与を明らかにする。

＜研究計画＞

1）CREB活性化によるアセチルコリンシグナルの制御

ドーパミン合成に異常の見られる変異体（*cat-2*）やドーパミン受容体の変異体についてアルジカルブ感受性を測定することでアセチルコリンシグナルに変化がみられるか調べる。もし、ここで見られたアセチルコリンシグナルの変化が上記の神経回路によるものであれば、この変化はオクトパミンシグナルとCREBに依存するはずである。オクトパミン合成酵素の変異体（*tbh-1*）やCREB変異体（*crh-1*）と*cat-2*の２重変異体についても測定を行うことで、これらの因子がドーパミンの下流で働いているか調べる。

2）CREBが作用する細胞の特定

CREBの活性化を検出することのできるレポーター*cre::gfp*を用いてこれまでに行った解析によって、ドーパミンによってCREBが制御されているのはSIAニューロンでのみであって、他の神経細胞では、少なくともこのレポーターではCREBの活性化は検出されないということが明らかとなっている。従って、ドーパミンによるアセチルコリン放出の制御においてCREBはSIAニューロンで働いていると予想される。このことを実験的に検証するために、*cat-2;crh-1*二重変異体においてSIAニューロン特異的に*crh-1*遺伝子を発現させ、*cat-2*の表現型が回復するかを調べる。

さらに、このCREBによるアセチルコリンシグナルの制御は、SIAニューロンからのアセチルコリン放出を制御している可能性のほかに、SIAで働くCREBが間接的に他のアセチルコリン産生ニューロンからのアセチルコリン放出を制御している可能性がある。もし、SIAからのアセチルコリン放出を制御しているのであれば、SIAでのアセチルコリン産生を抑制した時に、ドーパミンによるCREB制御の効果がみられなくなるはずである。SIAニューロン特異的にRNAiによってアセチルコリン合成に必要な*cha-1*遺伝子を抑制することで、SIAでアセチルコリンが産生されない株を作製し、実際にSIAニューロンのアセチルコリンがアルジカルブ耐性に関っているかを検証する。

3) SIAニューロンが全身のアセチルコリンシグナルを制御するメカニズムの解析

SIAニューロンは全体のコリンニューロンの内の数パーセントであることを考慮すると、SIAが他のコリンニューロンからのアセチルコリン放出を促すようなシグナルの増幅のメカニズムが存在する可能性がある。*C. elegans*の多数のアセチルコリン受容体のうち、ACR-2は筋肉ではなく多くのコリンニューロン（特にBody wall muscleを制御する運動ニューロン）で発現しており、アセチルコリン放出を亢進することが報告されている。SIAのCREBからのアセチルコリンシグナルの制御に*acr-2*遺伝子が関与しているかを、*cat-2;acr-2*二重変異体をアッセイすることで検証する。もしCREBが*acr-2*を介してアセチルコリン放出を制御しているのであれば、*cat-2*と*acr-2*はお互いを増進させないはずであるから、*cat-2;acr-2*はそれぞれ単独の変異体のよりも高いアルジカルブ耐性を示さないはずである。また、野生型や*cat-2*、*acr-2*について、運動ニューロンからの小胞放出の解析を行うことで、SIAニューロンからのシグナルが他のコリンニューロンでの神経伝達物質に影響を及ぼすのかを、より直接的な方法で検証する。

＜得られた研究成果＞

A) アミンシグナル依存的な CREB 活性化によりアセチルコリンシグナルが制御される。

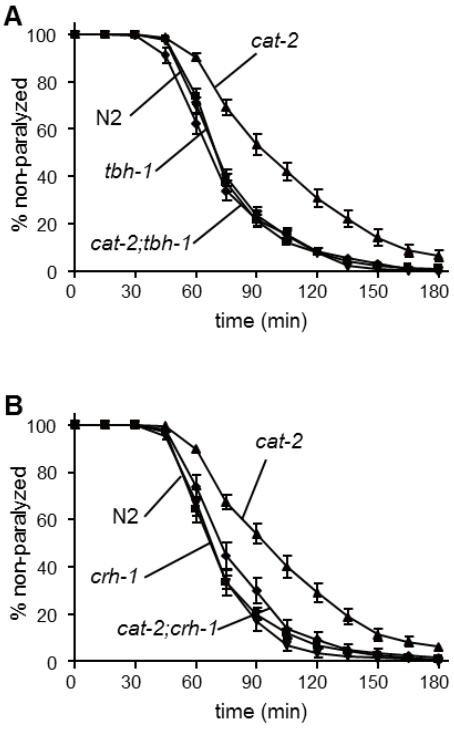


図２．ドーパミン欠損株 *cat-2* のアルジカルブ耐性

線虫 *C. elegans* を 1 mM のアルジカルブを含むプレート上で飼育すると、時間経過とともに動いている個体の割合が減少していく。ドーパミン欠損株 *cat-2* は野生型 N2 よりもアルジカルブ耐性が高く、麻痺するまでより長時間を要した。また、オクトパミン欠損株 *tbh-1* と CREB 変異体 *crh-1* はそれ単独では、野生型と同等のアルジカルブ感受性を持っていた。*cat-2;tbh-1* と *cat-2;crh-1* の二重変異体も野生型と同様のアルジカルブ感受性を示し、*tbh-1* と *crh-1* が *cat-2* の効果を抑制することが明らかとなった。

平成 23 年度に、研究計画の項目 1)について研究を進め、ドーパミンがアセチルコリンシグナルを正に制御していることを明らかにした。さらに、この効果は *tbh-1* や *crh-1* により抑制されたので、オクトパミンと CREB がドーパミンの下流で働いていることが明らかになった（図 2）。また、これらの変異体について、筋肉のアセチルコリンアゴニストに対する感受性に変化が見られないことを明らかにし、ドーパミンはアセチルコリンに対する感受性ではなく、アセチルコリンの放出を制御していることを明らかにした。この結果を学会で発表した（周防諭、石浦章一、日本分子生物学会年会、2011 年）。

B) CREB は SIA ニューロンで働き、このニューロンからのアセチルコリン放出を制御する。

平成 24 年度に、研究計画の項目 2)について研究を進めた。まず、*crh-1* を SIA ニューロンのみで発現させることで、CREB が SIA ニューロンで働くことを明らかにした(図 3)。さらに、SIA ニューロンのみでアセチルコリン合成を RNAi により抑制することで、ドーパミンにより変化するのは SIA からのアセチルコリンの放出であることを明らかにした(図 4)。以上の結果から、SIA ニューロンにおける CREB の活性化によりこのニューロンからのアセチルコリン放出が制御されることを明らかにした。この結果を学会で発表した（周防諭、石浦章一、East Asia *C. elegans* Meeting、2012）。

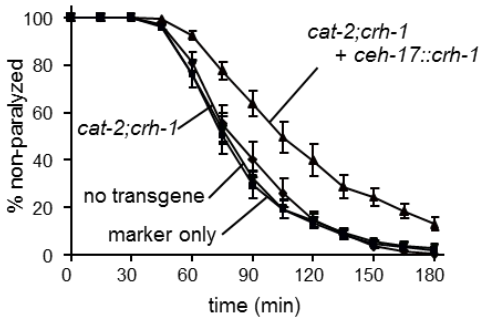


図３．CREB ホモログ *crh-1* は SIA ニューロンで働く

ceh-17 プロモーターは SIA ニューロンでの遺伝子発現を誘導する。*crh-1* 遺伝子を *ceh-17* プロモーター下で発現させるために融合遺伝子 *ceh-17::crh-1* を作成し、*cat-2;crh-1* 二重変異体に導入した。図 2 の通り、*cat-2;crh-1* 二重変異体では、*cat-2* で見られていたアルジカルブ耐性が *crh-1* の効果により抑制されているが、この形質転換体では、アルジカルブ耐性の抑制が見られず、*cat-2* 程度までアルジカルブ耐性が上昇していた。これに対して、導入遺伝子を持たないコントロールやマーカー遺伝子のみのコントロールではこのような変化は見られなかった。以上の結果から、*crh-1* は SIA ニューロンが働くことが明らかとなった。

C) ドーパミンによるアセチルコリンシグナルの制御には、アセチルコリン受容体 ACR-2 と GAR-2 が関与する。

平成 24 年度に、研究計画の項目 3)について研究を進め、*cat-2;acr-2* 二重変異体について解析を行った結果、*cat-2* と *acr-2* はお互いを増進させなかったことから、ドーパミンによるアセチルコリンシグナル制御に ACR-2 が関与していることが明らかとなった。さらに、コリンニューロンで働く別のアセチルコリン受容体 GAR-2 についても同様の解析を行い、GAR-2 の関与

も示唆する結果が得られた。以上の結果から、SIA ニューロンから放出されたアセチルコリンが、他のアセチルコリンニューロンを介して筋肉を制御している可能性が示唆された。

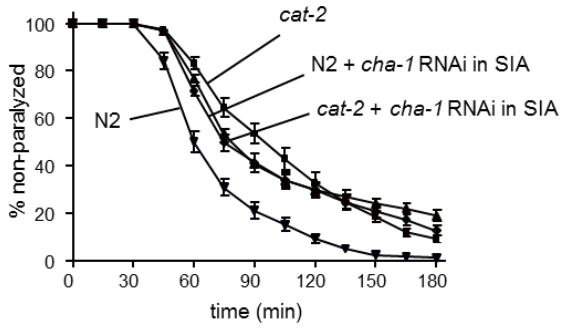


図４．SIA ニューロンでの *cha-1* 遺伝子の RNAi

cha-1 遺伝子はアセチルコリンの合成に必要な遺伝子である。*ceh-17* プロモーターを用いて、SIA ニューロンのみで *cha-1* 遺伝子の RNAi を行い、SIA ニューロンでアセチルコロンが合成できなくしてやると、野生型のバックグラウンドではアルジカルブ耐性が上昇した。同じ RNAi を *cat-2* バックグラウンドで行ってもアルジカルブ耐性に変化は見られず、*cat-2* の効果は SIA ニューロンのアセチルコリンに依存することがわかった。

D) ドーパミン、オクトパミン、CREB による体のサイズの制御

CREB はアセチルコリンシグナルの制御以外の作用を持つ可能性があり、CREB 依存的な神経制御のより深い理解のためには、そのような作用を明らかにし解析することが重要であると考えた。そこで、ドーパミン欠損株で見られる表現型の中で CREB に依存するものを探索した結果、ドーパミンはオクトパミンと CREB を介して体のサイズの制御を行っていることが明らかとなった。さらに、既に体のサイズの制御を行うことが報告されている TGF β シグナル経路との関係を調べたところ、ドーパミンは TGF β 経路とは独立に働くが、TGF β 経路の下流で表皮内で働く LON-1 という因子とは同じ経路で働くことが明らかとなった。また、ドーパミンの体のサイズに対する作用は筋肉の正常な機能に依存することを見出し、ドーパミン依存的な CREB の働きによりこれまで知られていなかったメカニズムで体の大きさを制御することを明らかにした。この成果を学会で発表した（大網栄太郎、周防諭、石浦章一、日本分子生物学会年会、2011 年および 2012 年、大網栄太郎、周防諭、石浦章一、East Asia *C. elegans* Meeting、2012）。

＜国内外での成果の位置づけ＞

本研究の成果により、アミン神経伝達物質依存的な CREB 活性化により、その細胞からの神経伝達物質の放出が調節されることを明らかにした。アミン神経伝達物質による CREB の活性化は様々な重要な生理機能を持つことが報告されているが、その細胞内での作用は未知な部分が多かったが、今回の研究によりその一端が明らかになった。さらに、CREB による神経伝達物質放出の調節が、遺伝学的手法に長けたモデル生物である *C. elegans* において明らかになったことから、今後は遺伝学的手法により研究の更なる発展が期待される。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画の2）については形質転換体の解析を行ったが、形質転換体の作成に用いたマーカー遺伝子が、それ単独で表現型に影響を与えたので、当初測定がうまくできなかった。別のマーカー遺伝子をいくつか用いることでこの問題は回避できたが、予定より時間を費やしてしまったため、計画していた運動ニューロンからの神経伝達物質のより直接的な解析を行うことができなかった。この解析は今後行っていく予定である。

＜今後の課題、展望＞

本研究では、アミン依存的なCREBの活性化により神経伝達物質の放出が制御されることを見出したが、その結果、本研究で用いた薬理学的手法によりCREBによる神経伝達物質放出の制御を測定できることが明らかとなった。CREBがどのようなメカニズムで放出の制御を行っているかは、不明な点が多く、今後の研究によりその解明が期待される。

公募研究：2009 年度-2010 年度

ミツバチの視覚情報処理を支える脳のモジュール構造の分子的構築の解析

研究代表者：久保　健雄[1)]

1）東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

＜研究の目的と進め方＞

セイヨウミツバチ（*Apis mellifera* L.）は高度な個体間分業を示す社会性昆虫である。高い視覚情報処理能力をもち、働き蜂は巣から餌場までの距離と方向に関す情報を「ダンスコミュニケーション（尻振りダンス、8 字ダンス）」により仲間に伝達する。近年の研究から、働き蜂は、採餌飛行中に複眼で受容した「視覚流動量」に基づいて飛行距離を算定し、仲間に伝えていることが分かった。しかしながら、ミツバチの視覚情報処理の基盤となる分子的・神経的基盤は明らかではない。私たちは最近、ミツバチの脳の「分子的解剖（＝領野・行動選択的な遺伝子の発現マップの作成）」を行う過程で、脳の高次中枢（キノコ体）において、今まで未知であった脳領域に特異的に発現する新規な遺伝子を発見した。さらに、視覚中枢（視葉）において、神経細胞のサブタイプに選択的に発現する遺伝子を発見した。本研究課題では、これらの新しく発見された、或いは既知・未知のミツバチの脳の「モジュール構造」が視覚情報処理に果たす機能を解析するため、当該遺伝子を発現する神経回路を可視化すると共に、その機能を調べる。

また脳のモジュール構造の成因を分子レベルで解析することを目的とした。さらにミツバチ脳の「分子的解剖」で同定されてきた脳領野選択的に発現する遺伝子や、行動依存に脳での発現が変化する遺伝子の機能解析を進めることで、ミツバチの社会性行動の基盤となる脳の分子的構築の包括的理解を目指した。

＜研究計画＞

1）平成 21 年度は以下の項目を実施する。

A）働き蜂の分業に伴って脳で発現減少する新規非翻訳性 RNA Nb-1 の同定と解析

B）大型ケニヨン細胞選択的転写因子 Mblk-1 の線虫 *C. elegans* ホモログ MBR の機能解析

2）平成22年度は以下の項目を実施する。

A）ミツバチ脳で視葉選択的に発現する遺伝子の同定と解析

B）採餌飛行時の視葉の GABA 作動性（抑制性）神経活動の解析

3）平成23年度は以下の項目を実施した。

A）ミツバチ働き蜂の脳におけるエクダイソン合成の解析

B）初期応答遺伝子 *kakusei* を用いた視覚流動の受容が脳の神経活動に及ぼす影響の解析

4）平成 24 年度は以下の項目を実施した。

A）「熱殺蜂球」を形成中のニホンミツバチの脳の神経興奮の解析

B）プロテオミクスによる小胞体カルシウム輸送に働くタンパク質/遺伝子の大型ケニヨン細胞選択的発現の解析

5）平成 25 年度は以下の項目を実施中である。

A）新規遺伝子 *mKast* の選択的発現で特徴づけられる「中間型ケニヨン細胞」の解析

＜得られた研究成果＞

A）働き蜂の分業に伴って脳で発現減少する新規非翻訳性 RNA Nb-1 の同定と解析

ミツバチが示す興味深い社会性行動の 1 つに働き蜂の分業がある。働き蜂の寿命は大体 1 ヶ月であるが、最初の 2 週間程は、巣の中でローヤルゼリーを分泌し幼虫に与える育児行動を行い、次の 2 週間は巣外で花蜜や花粉を集める採餌行動を行う。高度な視覚情報処理を必要とするのは採餌蜂であるが、この分業自体はどのように脳で制御されるのだろう。我々が行ってきたミツバチ脳の「分子的解剖」では、ミツバチの仕事の変化に伴って脳での発現量が異なる遺伝子も幾つか同定されてきた。Nb-1 はその内の 1 つで、働き蜂の分業に伴って脳での発現量は減少する。

今期の解析の結果、Nb-1 はタンパク質をコードしない、新規な非翻訳性 RNA をコードしており、脳のオクトパミン（神経伝達物質）陽性細胞で強く発現することが分かった。働き蜂の分業は、幼若ホルモン（JH）の血中濃度の低下がペースメーカーとなり、制御される可能性が提示されているが、オクトパミン陽性細胞はこの JH 分泌に関わる。これらの知見から、Nb-1 が育児蜂脳ではオクトパミン陽性細胞からの JH 分泌を抑制しており、この抑制が解除されると働き蜂の分業が促進される可能性が考えられた。これらの成果をまとめ、学術論文として発表した（Tadano et al., Insect Mol. Biol.2009）

B）大型ケニヨン細胞選択的転写因子 Mblk-1 の線虫 *C. elegans* ホモログ MBR の機能解析

ミツバチ脳の高次中枢であるキノコ体（mushroom body）は 2 つの上向きの傘（カップ型）構造をもつ左右一対の構造体である。キノコ体はケニヨン細胞とよばれる介在神経から構成され、その細胞体は傘の内側に存在する。ミツバチのケニヨン細胞は、細胞体が大きく、傘の内側の両側に存在する「大型ケニヨン細胞」と細胞体が小さく、傘内側の中央部に存在する「小型ケニヨン細胞」から構成されている。我々はこれまでミツバチ脳の「分子的解剖」を進め、大型と小型ケニヨン細胞のそれぞれに選択的に発現する遺伝子を同定してきた。Mblk-1 はキノコ体の大型ケニヨン細胞選択的に発現する新規な塩基配列特異的転写因子であり、そのショウジョウバエホモログ E93 はエクダイソン制御系下流因子で変態期に幼虫組織の崩壊に働く。我々は以前に線虫の発育過程でも「過剰な神経突起の剪定」が生じることを見いだし、MBR-1 がこの過程に関わることを示した。今期は Wnt-Ror kinase 経路が MBR-1 による剪定を抑制し、このバランスが神経突起の運命：剪定の有無を決めることを見出した。これらの成果をまとめ、学術論文として発表した（Hayashi et al., Nat. Neurosci.2009）

C）プロテオミクスを用いた、小胞体カルシウム輸送に働くタンパク質/遺伝子の大型ケニヨン細胞選択的発現の発見

我々は以前にプロテオミクスを用いて JH 分解酵素（JH diol kinase）の遺伝子がミツバチ脳でキノコ体選択的に発現することを報告している。今回さらにキノコ体選択的に発現するタンパク質を検索し、小胞体内で Ca^{2+}を貯蔵する働きをもつレティキュロ

カルビンを同定した。レティキュロカルビン遺伝子はミツバチ脳ではキノコ体の大型ケニヨン細胞選択的に発現した。一方、小胞体膜に存在し、細胞内 Ca^{2+}濃度を感知して小胞内からの Ca^{2+}遊離に働くリアノジン受容体遺伝子もキノコ体の大型ケニヨン細胞選択的に発現した。一方、小胞体のカルシウム輸送以外の機能を担う遺伝子はキノコ体選択的には発現していなかった。これらの知見は我々がこれまで提唱してきた、ミツバチ脳のキノコ体ではカルシウム情報伝達系の機能が亢進しているとの仮説をさらに支持するものである。キノコ体では小胞体全体の機能が亢進している訳ではなく（例えば小胞体の密度が高いなど）、カルシウム情報伝達系に関わる遺伝子産物のみが高濃度で存在するという、興味深い結果であった。これらの成果をまとめ、学術論文として発表した（Uno et al. Insect Mol. Biol. 2012）。

D) ミツバチ働き蜂の脳におけるエクダイソン合成の発見

ミツバチの脳では、Mblk-1 だけでなくエクダイソン受容体を始めとする多くのエクダイソン制御系遺伝子がキノコ体選択的に発現することから、働き蜂脳でエクダイソン情報伝達系が機能することが示唆されている。しかしながら通常、幼虫のエクダイソン合成器官である前胸腺は変態期に崩壊する。また成虫雌では卵巣でエクダイソンが合成されるが、働き蜂は不妊であるため、卵巣は退縮している。では働き蜂の体のどこで、エクダイソンは合成されるのだろうか。エクダイソン合成酵素の遺伝子発現解析から、ミツバチの働き蜂ではエクダイソン合成の初期段階は卵巣で進行するが、後期段階は脳で進行することが示された。また、器官培養により脳からエクダイソンが分泌されることが示され、働き蜂では脳でエクダイソンが「ニューロステロイド」として合成され、直接、脳のエクダイソン情報伝達系を制御する可能性が示唆された。これらの成果をまとめ、学術論文として発表した（Yamazaki et al., Insect Biochem. Mol. Biol.2011）

E) ミツバチ脳で視葉選択的に発現する遺伝子の同定と解析

ミツバチの複眼で受容された視覚情報は視葉を経由し、キノコ体（高次中枢）へと入力される。しかしながら採餌飛行時に受容した「視覚流動」など、一部の一次視覚情報は、視覚中枢である視葉で何らかの処理を受ける可能性がある。こうした視葉レベルでの視覚情報処理の分子・神経的基盤を探るため、視葉で、それ以外の脳部域に比べて強く発現する遺伝子をマイクロアレイで検索し、3つの遺伝子を得た。その内の1つで、微小管関連タンパク質をコードする *Futsch* と *tau* は視葉の単極細胞（視覚対象のコントラストを検出する）に選択的に発現していた。また Ras 情報伝達系に関わると推察される新規タンパク質をコードする *MESK2* は、視葉の腹側領域の水平なゾーンに発現していた。前者は単極細胞に特有な軸索構造形成、後者は地上の視覚対象（視覚流動等）の検出に働く可能性がある。これらの成果をまとめ学術論文として発表した（Kaneko et al., PLoS ONE 2010）

F) 新規遺伝子 *mKast* の発現で特徴づけられる「中間型ケニヨン細胞」の発見

上記の視葉選択的に発現する3つ目の遺伝子の解析は、キノコ体の新規内部構造を明らかにした。この遺伝子は視葉に散在する多くの神経細胞で発現したが、キノコ体内部では既知遺伝子とは全く異なる発現パターンを示した：大型と小型のケニヨン細胞の境界域に両者に挟まれて発現したのである。既知のキノコ体選択的遺伝子の発現領域との比較から、*mKast*（*middle-type Kenyon cell-preferential arrestin-related protein*）と命名したこの遺伝子が発現する領域は、大型や小型のケニヨン細胞と相補的な遺伝子発現プロフィルをもち、細胞体の大きさも丁度中間であったことから、我々はこれを「中間型ケニヨン細胞」と命名した。*mKast* と、我々が以前にミツバチから新規に同定した初期応答遺伝子 *kakusei* の二重 *in situ* hybridization により、採餌蜂では小型ケニヨン細胞と中間型ケニヨン細胞の一部が興奮することが判明した。このことから、中間型ケニヨン細胞は採餌飛行時の視覚情報処理に関わる可能性を示唆した。また、同じ遺伝子発現プロフィルをもつ神経細胞同士が集合することでキノコ体が構成されるという、新規な「モジュール構造」を発見した。これらの成果をまとめ、現在学術論文として投稿中である（Kaneko et al. submitted）

G) 初期応答遺伝子 *kakusei* を用いた視覚流動の受容が脳の神経活動に及ぼす影響の解析

我々は以前に、新規初期応答遺伝子 *kakusei* を用いた解析から、採餌飛行した働き蜂の脳では、主にキノコ体の小型ケニヨン細胞（現在では上記のように、小型ケニヨン細胞に加えて中間型ケニヨン細胞の一部）の神経活動が亢進していることを示した。一方、飛行距離は飛行中に受容した視覚流動量に基づいて計測される。では飛行距離の長さや、飛行中に受容した視覚流動量はキノコ体の神経活動にどのように影響するだろうか。まず、近距離の餌場に通い、「円ダンス」を踊る働き蜂の脳では、遠い餌場に通い、「尻振りダンス」を踊る働き蜂よりキノコ体が強く興奮していた。またキノコ体の *kakusei* の発現量（神経興奮の程度）は単位時間当たりの飛行頻度が高いと増え、*kakusei* 発現細胞の数（興奮している神経細胞の数）は視覚流動が上がると増えたことから、採餌飛行の頻度と受容する視覚経験は異なるキノコ体の神経活動に反映されると考えられた。これらの成果をまとめ、現在学術論文として発表した（Kiya et al. PLoS ONE 2011）

H) 採餌飛行時の視葉の GABA 作動性（抑制性）神経活動の解析

以前の *kakusei* を用いた採餌蜂脳の神経活動の解析では、主にキノコ体の神経興奮が亢進していたが、一方で視葉でもある程度の神経興奮が認められた。そこで視葉で興奮していた神経細胞が興奮性か抑制性か調べる目的で、GABA 合成酵素遺伝子との二重 *in situ* hybridization 法を行った。その結果、採餌飛行や定位飛行をした働き蜂の視葉では GABA 作動（抑制）性と非作動性の両方の神経細胞が興奮しており、この両者が視覚情報処理に働くことが示唆された。また、視葉では採餌飛行時に特に抑制性神経細胞の活動が高く、採餌飛行時の情報処理に関わると推定された。これらの成果をまとめ、学術論文として発表した（Kiya et al. PLoS ONE 2010）

I) 「熱殺蜂球」を形成しているニホンミツバチの脳の神経興奮の解析

ニホンミツバチは天敵であるオオスズメバチが巣に侵入すると、集団で取り囲み、46℃まで発熱しスズメバチを「熱殺」する。これはヨーロッパ原産のセイヨウミツバチは示さないことから、オオスズメバチと棲息域が重なるニホンミツバチが固有に獲得した行動様式と考えられる。我々は、このユニークな行動を産み出す脳の仕組みを調べるため、初期応答遺伝子 *kakusei* を用いて、熱殺蜂球を形成中の働き蜂の脳の活動部位を調べた。その結果、キノコ体の傘の外側に細胞体が存在するケニヨン細胞（クラス II ケニヨン細胞）が興奮していることが分かった。また、このキノコ体選択的神経興奮は、単に虫籠に入れた働き蜂を蜂球内と同じ高温に曝しただけでも再現できたことから、高温を感知して興奮していることが判明した。この神経活動はあるいは蜂球内の温度を一定に保つために、発熱を停止する「サーモスタット」の役割をもつのかも知れない。これらの成果をまとめ、学術論文として発表した（Kiya et al. PLoS ONE 2012）

＜国内外での成果の位置づけ＞

ミツバチで脳領野選択的に発現する遺伝子の同定と、その結果に基づくミツバチの脳領野の機能の推定と新しい脳領野の同定（ミツバチ脳の「分子的解剖」）に関しては我々の研究グループが世界でも先導的役割を果たしてきた。2013 年度に出版され、各国の研究者が、ミツバチの行動学と神経生物学に関するレビューを寄稿し、ミツバチ神経生理学を先導されてきたベルリン自由大学の Randol Menzel 教授に献本された教科書：Honeybee neurobiology and Behavior. A Tribute to Randolf Menzel (eds. Galizia CG, Eisenhardt D and Giulfa M). Springer. では、久保が、この研究課題に関する一章を執筆している。特に F)の、新規遺伝子 *mKast* の発現で特徴づけられる「中間型ケニヨン細胞」の発見は、単にこれまで解剖学的に認知されてきた脳領野に選択的に発現する遺伝子を同定するばかりでなく、これまで解剖学的には区別されてこなかったキノコ体の新規内部構造を発見した点で意義深い。

また *kakusei* と *mKast* の二重 *in situ* hybridization 法により、採餌飛行蜂の脳では小型ケニヨン細胞に加えて、中間型ケニヨン細胞の一部も興奮することが示されたことは、ミツバチのダンスコミュニケーション能力を支える視覚情報処理の神経的基盤を解明する上で大きな進歩であると考えている。*mKast* は現時点では中間型ケニヨン細胞選択的な唯一の遺伝子であり、今後、研究発展のための有用なツールとなると期待される。

視葉腹側の水平なゾーンに存在する視葉神経細胞に選択的に発現する *MESK2* も、その視葉での発現部位から、地上の視覚情報（視覚流動など）の受容に関連する可能性が考えられ、興味深い。この遺伝子も、視覚中枢である視葉での情報処理を解明する上で有用なツールとなる可能性がある。

国外ではイリノイ大学の Robinson 教授のグループがミツバチゲノム計画を先導し、マイクロアレイ法によるミツバチ脳で部域選択的に発現する遺伝子や、ミツバチ種間で発現が異なる遺伝子、行動依存に発現変動する遺伝子の解析などで業績を挙げているが両グループがもたらした知見には余り重複が無く、我々のグループが提唱するミツバチ脳の分子・神経的基盤に関する仮説・概念は国際的に見ても独創性が高いものと考えている。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

mKastやMESK2に対する抗体を用いた蛍光抗体法による中間型ケニヨン細胞や、視葉腹側の水平なゾーンに存在する神経細胞の投射の解析（可視化）とその機能解析は現在実施中である（現在、抗体を作成済み）。＜予想された困難＞としては、次項で述べる事由が挙げられる。ただミツバチの高度な視覚情報処理や行動発現の謎を解く上では、この方面からの研究が有効とのアプリオリな研究戦略は無かったため、多面的研究を実施し、どの方面からの研究が本当に有効かの見極めに時間がかかった。

＜今後の課題、展望＞

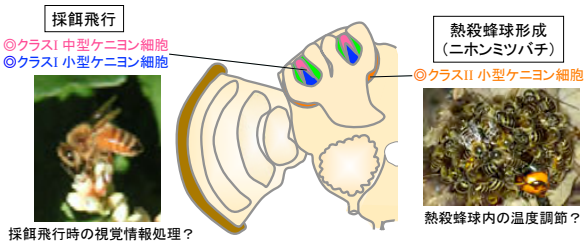
本研究課題により、今後研究対象とすべき、ミツバチの高度な視覚情報処理を支える脳のモジュール構造（キノコ体内部構造）と、その分子的構築（ケニヨン細胞サブタイプ選択的な遺伝子）の実体が設定された。今後は様々な遺伝子導入技術を検討・確立し、推定されたモジュール構造や分子的構築が実際に、ミツバチの高度な視覚情報処理や行動発現にどのように関わるかの検証が重要な課題であると考えている。

まとめ

（1） ミツバチ脳（キノコ体・視葉）の各領野固有な遺伝子発現プロフィルの発見。

◎クラスI 大型ケニヨン細胞：カルシウム情報伝達系・神経可塑性に関わる遺伝子。
◎クラスI 中型ケニヨン細胞：*mKast*（新規遺伝子）。
◎クラスI 小型ケニヨン細胞：エクダイソン受容体と核内受容体 HR38 の遺伝子。

（2） 初期応答遺伝子を利用した脳の活動部位の同定。



公募研究：平成 21 年度-24 年度

感覚神経 MAPK 制御のリアルタイムな可視化による線虫の環境応答行動の研究

研究代表者：冨田　太一郎

東京大学医科学研究所　基礎医科学部門　分子細胞情報分野

＜研究の目的と進め方＞

動物は環境変化の情報をうまく処理し、個体あるいは細胞のレベルで適切な応答を誘導することにより、生存を維持することができる。申請者は酵母から哺乳類に至るまで真核生物種に高度に保存されている代表的な環境応答シグナルであるMAPキナーゼ(MAPK)経路に着目し、特に従来法では理解することが難しい生きた動物体内のMAPK分子活性化の動態を可視化することにより、環境の刺激の情報がどのように処理されて、環境応答を制御するのかの解明を目的とした。

これまでの研究ではMAPK経路に存在する分子の活性化を「可視化」して解析する手法の開発に取り組み、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理を応用した蛍光タンパク質性プローブによって、培養哺乳類細胞の中で生じるMAPK活性の実時間イメージング実験に成功した。

そこで、本研究ではこれを発展させ、環境応答行動の代表的な研究動物モデルの線虫を用いて、生きた動物体内で生じるMAPKシグナルの動態を可視化によって解明することに挑戦した。特に、動物を取り巻く環境変化の情報が実際に生きた動物体内で伝達されていく様子をイメージングによって解明することを目指した。

本研究では、先鋭的な光化学の手法と最新の微小流体制御法とを組み合わせたシステム解析の手法を構築し、従来ほとんど不可能であった生きた動物個体のわずか1細胞内の分子制御システムの解析を実現させることを狙った。MAPKは神経細胞では記憶や学習の鍵となる分子であり、また、MAPK分子の異常はがんや異常免疫を含む様々な疾患の原因となるが細胞内動態の制御メカニズムについてはほとんど理解が進んでいない。そこで、環境応答行動を示す代表的なモデル動物の線虫を用いて動物体内の環境応答MAPKシグナルの情報処理メカニズムの解明を目指した。

＜研究計画＞

＜平成２１年度＞

(1)環境応答による MAP キナーゼ活性の可視化実験系を構築する。

a) ストレス応答 MAP3K 活性の可視化プローブの最適化。

b) MAPK 活性の可視化プローブの開発および最適化。

c) 線虫での *in vivo* 観察実験系の構築。

＜平成２２年度＞

(2)人為的な環境刺激に線虫が応答する際の *in vivo* での MAPK シグナルを検出し、刺激の種類と MAPK 活性化動態との対応を明らかにする。

d) 線虫の各組織へのプローブの導入と、環境刺激依存的な MAPK 活性化動態の可視化実験の実施。

e) 刺激の種類あるいは時間変化の情報と MAPK 動態との対応を解明。

＜平成２３年度＞

(3)生きた線虫個体に塩刺激を与えて、塩応答を担うASER感覚神経におけるERK経路MAPK (MPK-1) 活性化のイメージングを行う。関連するRas、カルシウムシグナルについても可視化を試みる。特に、塩刺激の強さや頻度などの刺激パターンを変化させた際の各分子の応答について評価する。

f) ASER神経でMAPK可視化プローブを発現する線虫実験系の作製。

g) 線虫Ras-LET60活性可視化プローブの新規開発。

h) Rasおよびカルシウムシグナル可視化プローブを発現する線虫実験系の構築。

＜平成２４年度＞

(4)線虫の細胞内シグナルに関して数理モデルを構築する。

i) 実測によって得られる MAPK 動態の特性がモデル上で再現されるためには上流分子のどのような性質が重要であるかを計算機上のシミュレーション解析により探索する。

j) カルシウムシグナルなど上流分子のイメージング実験により、上記 i)の計算機上のシミュレーション予測を検証する。

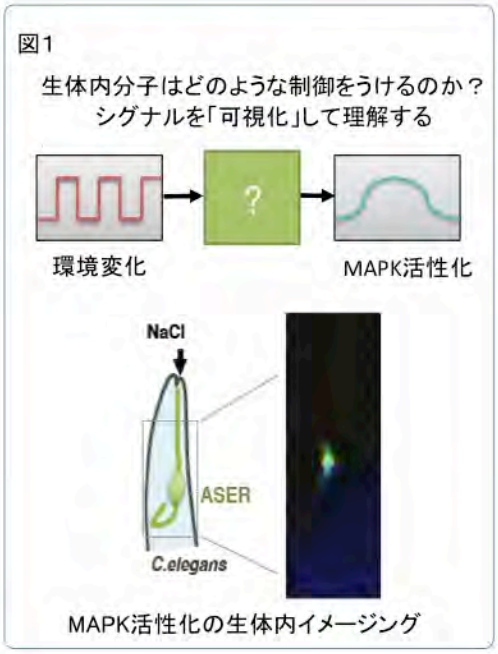
＜得られた研究成果＞

A)新規可視化プローブの開発およびプローブの FRET 効率改良法の発見。

平成 21 年度から 22 年度までに、また 23 年度において、研究計画の項目(1)および(3)について研究を進め、特に線虫の ERK 経路 MAPK と Ras の活性を可視化する FRET プローブを新規に開発することに成功した。また、先行研究で得ていた MAP3K 分子を可視化するプローブの改良を行ったところ、非常に高感度のプローブを得ることができた。特に、キナーゼ活性を可視化する FRET プローブに YPet-SECFP ペアを用いると従来の YFP-CFP ペアに比べて高感度のプローブが得られることを見いだした。この結果の一部を、学術論文に発表した (Tomida et. al., Molecular and Cellular Biology, 2009)。また、米国生物物理学会において発表した (Tomida and Saito, 54th annual meeting of biophysical society,2010)。

B)線虫 ERK-MAPK 分子のイメージングの達成

平成 21 年度から 22 年度までに、研究計画の項目(1)および(2)、について研究を進め、生きた線虫の体内の ERK 経路 MAPK 活性を可視化することに初めて成功した。それまでに、線虫の感覚神経では MAPK が環境応答の学習行動に重要な役割を果たすことが報告されていたが生きた動物における MAPK 活性化動態の詳細は明らかになっていなかった。今回の研究によって、線虫体内の MAPK 動態を実時間に観察できるようになり、環境変化の情報が体内で情報処理される様子を解析することが可能になった。

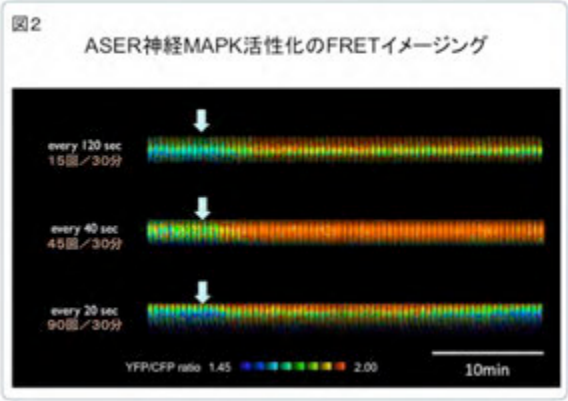


C)線虫 ASER 神経における MAPK 制御機構のイメージング解析

生体内 MAPK の実時間観察が可能になったため（上記 B)、平成 23 年度から 24 年度、研究計画(3)において、このイメージング手法を用いてヒトの味覚に相当する線虫感覚神経 ASER の塩応答のメカニズムを解析した。ASER 感覚神経を介した塩応答は線虫の行動を制御することが明らかにされており、動物行動の基本原理を研究する非常に良いモデルである。従来個体レベルの変化と遺伝子との対応は主に遺伝学的な手法によって解析が進められていたが、分子活性の時間変化などの情報はほとんど不明であった。

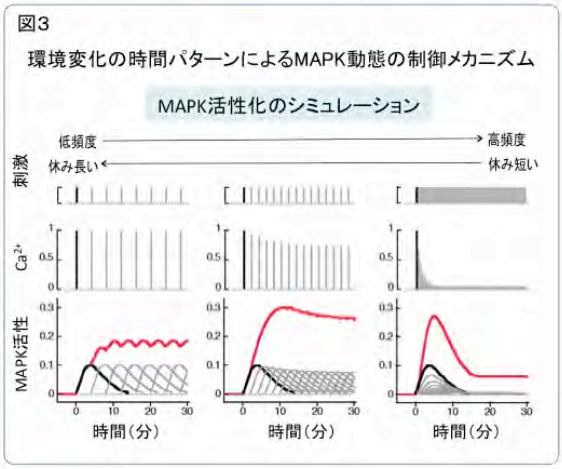
本研究では、微小流体チップ内に線虫を封入して、動物個体に曝す塩濃度を厳密に制御しながら、同時に線虫体内の MAPK 活性をイメージングによって解析する実験系を構築した。環境刺激を入力と見立て、また、MAPK を出力と見なすことにより、どのようなシステムによって MAPK 制御が生じているかを解析することを試みた（図１）。この系を用いて線虫 ASER 神経の解析を行った結果、環境変化に曝された線虫の ASER 神経内で MAPK は時間と共に活性化したが、驚いたことに、与える環境刺激の頻度や持続時間が多くても MAPK 活性が高い状態は必ずしも持続しないという結果を得た（図２）。従って、環境変化の情報は単にそのまま細胞内に伝わって MAPK 活性化を生じているのではなく、伝達される過程で何らかの情報処理を受けることによって環境変化に応じた適切な MAPK 活性を誘導している可能性が示唆された。

次に、この複雑な MAPK 制御がどのような分子メカニズムによってなされているのかを追跡した。ASER 感覚神経にカルシウムシグナルインジケータの G-CaMP2 を発現させた線虫を用いてカルシウムイメージングを行うと、環境変化の刺激と非常によく一致して細胞内カルシウム濃度上昇が惹起されたが、このとき、特定の刺激パターンによってカルシウムシグナルの抑制が生じる現象を発見した。MAPK の抑制とカルシウムシグナルの抑制が生じる条件は非常によく一致しており、実際、遺伝学的にカルシウム濃度上昇を抑制すると塩刺激による MAPK 活性化を生じないことも確認した。



D) 線虫 ASER 細胞 MAPK 制御のシミュレーションおよびモデル化の達成

計算機上のシミュレーションによって、カルシウムシグナルの抑制現象を再現したところ、MAPK の挙動とほぼ一致するのはカルシウムシグナルの時間積分値であることを突き止めた。このカルシウム抑制のモデルを用いてイメージング実験で行った様々な刺激を計算機上でシミュレートしたところ、計算機上の MAPK 動態と実際に観察された MAPK 動態はほぼ一致していた。上記 C の遺伝学的データと併せると、カルシウムシグナルが MAPK 上流で環境刺激のフィルターとして機能しており、適切な頻度の刺激のみが MAPK 活性化を引き起こしており、刺激が少ない場合や多すぎる場合にはカルシウムシグナルが抑制されているために下流の MAPK 活性が持続しないというメカニズムが明らかになった。また、数理解析の結果、恒常的に繰り返し刺激が入力される場合であっても、刺激の時間パターンが変化するだけで、MAPK 活性が弱く持続する場合と強い活性が長時間持続する場合、さらに、短時間の強い活性化の 3 通りが生じることが明らかになった（図３）。



以上 B)ーD)の結果は学術論文に発表した（Tomida et. al., Science Signaling, 2012)。また、その一部を日本動物学会シンポジウムにおいて発表した(冨田太一郎,日本動物学会旭川大会,2011)。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)については、世界中で新規の蛍光プローブが半ば競争的に開発されているが、実際に生きた動物に適用できる高感度のプローブの作成は難しく成功例はまだ多くない。本研究で効率よく高感度のプローブを作成する方法を見つけ、またさらに、実際に線虫体内の MAPK 動態を可視化に成功した点は、当該分野の新たな研究の流れを作っている。実際にモデル小動物の体内のシグナル可視化を行いたいという研究者からのプローブ譲渡希望や問い合わせが研究発表後に相次いでおり、国内外の研究者が生体イメージングを用いたシグナル解析に着手するきっかけの一つになっていると思われる。

研究成果の B)について、高感度のプローブを用いても生きた動物をイメージングすることは難しく、さらに、動物体内で狙った組織や細胞にだけ刺激を加えたり、動きのある臓器などから蛍光を観察することは困難を極める。本研究では、体が透明な線虫とマイクロ流路チップを用いてこの問題を克服できることが示せた。線虫の分子レベルの研究にはこれまで主に遺伝学的、あるいは生化学的に解析がすすめられてきたが、本研究によって FRET を用いた生体シグナル解析の有効性が示された。

研究成果の C)について、生体を多数の分子から成るシステムとして捉えて細胞内情報処理のしくみを調べるシステムバイオロジーが国内外の多くの研究者によって盛んに行われるようになってきている。本研究においては、生きた動物の単一細胞にイメージングの手法を用いつつ、さらに、システム工学的なアプローチを行うことによりシステムレベルの情報処理のしくみを明らかにした。このようなシステム解析はこれまで酵母などの培養単一細胞レベルでしか成功例がなかったが、比較的高等な動物においても同様のアプローチが有効であることを示した点で意義がある。

研究成果 D)について、カルシウムと MAPK 分子との関連については遺伝学的解析から示されてきていたが、分子の時間的動態の情報処理のしくみを扱うことは難しかった。本研究ではこの問題点を計算機シミュレーションとイメージング実験とを組み合わせて用いることで克服した。具体的には、カルシウムイメージングのデータだけを用いて MAPK 分子の動態を計算機上で予測し、実際にその予想を MAPK イメージングで検証することに成功し、しかもカルシウムシグナルと MAPK との間に比較的単純な積分回路が存在することまでシミュレーションで予測できた。単に現象を記述するだけの数理モデルではなく、数理モデルを使って現象を予測し、それをイメージングで証明できた点が大きな成果である。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画の(3)について、線虫RasホモログのLET60活性を可視化するプローブを新規に作成することに成功し、培養細胞レベルでは非常に高感度の性能を示していたが、これを線虫に発現させて刺激しても、ほとんどシグナルを生じなかった。実際に生体内でRasがほとんど活性化しない可能性とプローブの発現に問題がある可能性の二つが考えられたが、プローブやRas活性化因子については動物への遺伝子導入の確率が低いために、これを検証することができなかった。RasやMAPK関連因子は多くの場合動物の発生自体に影響するために、培養細胞レベルでは容易な遺伝子導入であっても、個体に導入する場合には予想外の手間と時間を要した。その他の実験に関してはおおむね期待通りに進展した。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果により、生体内MAPK分子を解析する技術が確立し、環境応答行動を担う神経細胞内の情報処理過程の理解をさらに進める基盤となった。また比較的高等な真核生物の線虫においてイメージングを用いたシステム解析を達成することができたが、これは今後マウスなどより高等な動物にも応用可能である。たとえば、既存の疾患モデル動物を用いて、分子のシステムレベル、あるいは分子シグナルの時間動態という観点から異常なシグナルを検出することにもつながるため、生物学的な環境応答のしくみの理解に加えて、医学的な疾患原因の解明や治療法の開発にも非常に有効であると考えられる。

また、本研究により線虫の塩応答の課程で複雑なMAPK動態制御が行われていることが明らかになったが、これにより線虫MAPKの活性化の動態が記憶や学習にどのように関わるのかという新たな疑問が生じた。今後、動物体内の単一細胞内のMAPK活性を任意に制御することが技術的に可能になれば、記憶形成過程にMAPK分子の動的な時間情報が持つ意義が明らかになるものと考えられる。現在までに様々な分子活性操作手法が徐々に実現されてきているため、本研究をさらに発展させて新規の分子操作手法と組み合わせることができれば、動物が行動をつくりだす課程において、個体レベルの挙動と分子レベルの挙動とを直接結びつけて理解できるようになると期待される。

公募研究： 2009 年度-2010 年度

ショウジョウバエの脳から胸腹部神経節へ投射する行動制御神経のシステム解析

研究代表者：伊藤 啓

東京大学分子細胞生物学研究所

＜研究の目的と進め方＞

脳の動作原理を理解するためには、感覚器官から運動器官に至る情報の流れと各部の神経回路を解明し、情報処理のそれぞれのステップに必要な神経回路の構造の全体像とその動作原理を、システムレベルで理解することが欠かせない。本研究では、ヒトなどの高等生物に比べ脳の細胞数が数万個と少ないわりに複雑な脳機能を持ち、高度な分子遺伝学的研究技術を活用できるキイロショウジョウバエを利用して、感覚神経系や学習記憶系に比べるとこれまで研究が立ち遅れていた、脳から胴体の胸腹部神経節へ行動制御に関する情報を伝える下行出力神経に着目し、その神経回路の構造と機能とを体系的に解析する。

まず、(1) 従来と異なる強力な細胞ラベル法として作成を進めている LexA エンハンサートラップ系統について、個々の系統が脳でラベルする神経細胞の画像データベースを作成して公開する。同時に (2) これまで多少は構造が分かっていた各種感覚中枢と比べ、未だほとんど知見がない出力中枢（行動制御神経の樹状突起が広がっている脳領域）について、基礎的な解剖学的解析を行い、(3) LexA エンハンサートラップ系統を用いてランドマークとなる構造を同定するとともに、GAL4 エンハンサートラップ系統を用いてこれらの出力中枢から胸腹部神経節に投射する行動制御神経の体系的な同定を行う。さらに (4) 特に LAL 領域から投射する歩行制御に関与すると思われる神経と、AMMC 領域から投射する重力応答制御に関与すると思われる神経について、GAL4 系統で同定した個々の出力神経で毒素遺伝子や光励起チャンネル遺伝子を特異的に発現させ、その機能を特異的に遮断したり励起した際にこれらの行動の制御に生じる影響を解析し、各神経の機能分担を明らかにする。最後に (5) 表現型の解析が難しい歩行方向制御について、バイオインフォマティクスの手法を用いて同定した神経回路の構造から予想される回路動作を数式モデル化してロボットに組み込み、その動作と実際のショウジョウバエの動作を比較し、情報処理モデルの妥当性と各神経が果たす機能を検証する。

＜研究計画＞

1) LexA エンハンサートラップ系統の発現パターンデータベースの作成

過去 15 年以上の間、ショウジョウバエを用いた研究では酵母の転写調節因子 GAL4 遺伝子をゲノムの様々な場所に挿入し、挿入部位に応じて異なる細胞群で発現するようにした GAL4 エンハンサートラップ系統が、非常に重要な役割を果たしてきた。GAL4 の標的配列である UAS の下流にクラゲ蛍光タンパク GFP のような細胞を可視化するための遺伝子や、破傷風毒素のような神経の機能を遮断するための遺伝子を組み込んで GAL4 特異的に発現させることによって、脳や体の様々な細胞を特異的にラベルしたり、その機能を改変したりすることができた。

しかし本研究で扱う行動制御神経が広がる脳の領域は、多くの一次感覚中枢やキノコ体などと異なり、明瞭な区画構造が存在しない。従ってこれらの領域の神経の投射を解明するには、GAL4 系統と何らかの他の細胞ラベル法を組み合わせ、2 種の神経を染め分けて解析する必要がある。しかし、GAL4 以外に神経を特異的にラベルできる手段はわずかな種類の抗体しか存在せず、この目的にはほとんど利用できなかった。

そこで本研究では、GAL4 に替わる新たなエンハンサートラップ法を用いて、脳の神経を二重にラベルする。LexA エンハンサートラップ法は、GAL4 のかわりに大腸菌由来の転写調節因子 LexA の遺伝子をゲノム内でジャンプさせる。LexA の標的配列である lexAop の下流に GFP などをつなげた遺伝子を持つ系統と掛け合わせることによって、LexA に依存して GFP が細胞特異的に発現する。GAL4 と LexA は異なる遺伝子の発現を互いに独立に誘導するので、2 種類の細胞の染め分けが可能になる。この技術は、様々な種類の神経を組みあわせてラベルし、相互の位置関係を詳しく調べることができるため、本研究に限らず非常に多くの研究者に有用な研究リソースとなる。我々はこのシステムを用いて世界で初めての大規模な系統作成を行い、現在までに約 320 系統を作成した。しかし、どの系統でどのような細胞に LexA が発現しているかを一覧するデータベースがないと、これらの系統を有効に使うことはできない。そこで本研究ではまず最初に、作成した全系統について共焦点顕微鏡を用いた連続断層撮影を行う。

2) 行動制御神経の樹状突起が広がる出力中枢の構造の解明

脳から胸腹部神経節に伸びる出力神経は、脳の下部の領域に集中的に存在している。しかしこの領域は従来ほとんど解析が進んでいない。そこで LexA 系統を利用して、これらの脳領域の中でランドマークになる構造を同定する。さらにこれを指標に 4,000 の GAL4 系統を利用して、特に中心複合体から情報を受けて歩行方向制御を司ると推測されている LAL と、触角の重力検知細胞群の情報を受ける AMMC 内のゾーン C, E から胸腹部神経節に伸びる行動制御神経群を、重点的に同定する。

3) 行動制御神経の特異的機能遮断、励起による機能の解析

LAL と AMMC 内のゾーン C, E で同定された神経に関して、行動実験による機能解析を行う。温度感受性の GAL4 抑制因子 GAL80ts と破傷風毒素 TNT 遺伝子を GAL4 系統と組み合わせ、行動実験直前の 24 時間だけハエを 30℃で飼育することにより、GAL4 抑制因子を一時的に阻害して、GAL4 発現細胞特異的に毒素遺伝子を発現させられる。また、光感受性のチャンネルロドプシンを GAL4 依存的に発現させることによって、光を当てると特定の神経の興奮を特異的に惹き起こすことができる。こうして特定の神経の機能を遮断・励起した個体について、行動実験を行う。

4) 小型ロボットの動作とハエの動作の比較による、神経情報処理モデルの検証

本研究で特に LAL からの下行神経に着目する理由は、この領域が中心複合体から情報を受けて、歩行の方向制御に関わっていると推測されるためである。中心複合体は歩行や飛行の方向制御に重要な役割を果たす脳領域だが、そこからは多くの神経が、中心複合体の前側方に位置する LAL に投射を伸ばしている。古典的な銀染色によって、LAL には胸腹部神経節に伸びる様々な下行神経が存在することが分かっている。また、特にガを用いた研究によって、匂い源を探索するジグザグ歩行行動において LAL の神経

が重要な役割を果たすと推理されている。しかし歩行の方向制御は表現型を単純な指数として定量化しにくいため、通常の方法では行動異常の解釈が難しい。そこでインフォマティクスの手法を用いた解析を行う。我々は、LAL 領域の神経回路構造をもとに、この回路から予測される出力を微分方程式の形で表し、小型ロボットを制御する実験系の構築を進めている。この系では神経回路の各要素に対応する微分方程式の項を変更することで、ロボットの挙動が変わる。本研究で解明されたショウジョウバエ LAL 出力神経の構造に基づいて計算式を調整し、特定の神経を阻害したハエの歩行とその神経に相当する方程式の項を改変したロボットの走行をビデオで比較することにより、情報処理モデルの妥当性を検証して神経制御の態様を解析する。

＜得られた研究成果＞

A) LexA エンハンサートラップ系統の発現パターンデータベースの作成

平成 21 年度から 22 年度までに、研究計画の項目 1)について研究を進め、大腸菌由来の発現制御因子 LexA::VP16 を用いたエンハンサートラップ系統の発現パターンを体系的に撮影した。LexA による発現誘導の強度は GAL4 より若干弱いため、高解像度、高感度で発現パターンを記録する方法を種々検討し、細胞質拡散性と膜移行性の 2 種類の GFP を発現させて、蛍光抗体によるラベルを行うことにより、太い神経線維と細い樹状分枝末端をどちらも明瞭に撮影する方法を確立した。

こうして得られた画像データを用いて行動制御神経が集積する領域付近に投射を持つ神経をラベルする系統を探索した結果、特に有用な系統として、行動制御神経ではないが味覚感覚神経の大部分をラベルする系統を見いだした。(味覚一次中枢は、行動制御神経の領域のすぐ下部に位置する。) この系統は味覚中枢の構造解明に非常に有用であることが分かったため、各種の味覚感覚神経とラベルする GAL4 エンハンサートラップ系統と組み合わせた味覚中枢の詳細な投射マップ解明に利用することにした。感覚中枢の中でも味覚一次中枢の構造はこれまでほとんど分かっておらず、行動制御神経の領域と同様に明瞭な構造を持たないために、神経の投射先の精密な同定が難しかった。今回得られた LexA 系統を用いて味覚感覚神経の大部分をラベルし、別にスクリーニングした GAL4 系統を用いて味覚感覚神経のごく一部をラベルして、両者の位置関係を比較することにより、甘み、苦み、水、炭酸水、口吻の接触感覚など味覚の各要素の感覚神経の投射先を詳細にマップすることができた。これによって得られた初の体系的な味覚マップを、学術論文として発表した (Miyazaki and Ito, J Comp Neurol, 2010)。

得られた系統の神経発現パターンを広く一般に公開するには論文でなくデータベースによる発表が必要になる。そこで画像データベースを構築した。このデータベースは、ショウジョウバエ脳の既知のすべての神経に関する情報を収録した神経データベースと、各種の抗体やエンハンサートラップ系統による脳画像データを収録した抗体・系統データベースからなる。画像に関しては、ユーザーがインタラクティブに画像を操作して投射パターンの解析を行えるような神経可視化ツールを開発して搭載し、活用の便宜を図った。データベースは Flybrain Neuron Database (http://ndb.flybrain.org) として公開し、学術論文として発表した (Ito, Front Syst Neurosci, 2010, Shinomiya, Matsuda, Oishi, Otsuna, and Ito, J Comp Neurol, 2011)。

B) 行動制御神経の樹状突起が広がる出力中枢の構造の解明

LexAおよびGAL4系統の発現データベースから、出力中枢に広がる神経をラベルする系統を探索し、投射パターンを比較した。この部位の神経のみを特異的にラベルする系統は予想外に少なく、それだけでは出力中枢の構造を体系的に明らかにすることは難しかった。そこで特定の神経の投射を特異的にラベルする別の方法として、個々の神経幹細胞から産生されるクローン子孫細胞集団をラベルする方法を併用した。熱ショックプロモーターの下流に組み替え誘導因子のタンパクの遺伝子をつないだコンストラクトを利用して、発生期の個体に弱いヒートショックを与えて、脳内で分裂する神経幹細胞の一部に染色体組み替えを誘導して GAL4を発現させ、成虫の脳で投射パターンを解析した。その結果、脳から胸腹部神経節に伸びる神経を体系的にラベルすることができた。興味深いことに、脳に100個程度ある神経幹細胞から作られる子孫集団のうち、胸腹部神経節に伸びる神経は3つのクローンのみに観察された。これは、行動制御神経が特定の神経幹細胞のみによって作られていることを意味しており、神経機能と細胞系譜に興味深い相関が見いだされた。この成果は、他のクローン細胞群の知見とあわせて学術論文として発表した (Ito, Masuda, Shinomiya, Endo, and Ito, Curr Biol, 2013)。

C) 行動制御神経の特異的機能遮断、励起による機能の解析

当初の計画で想定していた AMMC と LAL から伸びる行動制御神経を高い特異性でラベルする系統がなかなか得られなかったことと、光を用いて神経活動を励起させるチャンネルロドプシンが、励起に用いる短波長の光が成虫表皮のクチクラ色素にさえぎられて脳深部にまで届きにくいという、2 つの課題が生じた。そこでアプローチを変え、(1) AMMC と LAL に限らず、脳の下部にある行動制御神経をラベルしそうな系統を広く選んで行動実験に供する。(2) 光のかわりに、脳の深部にも容易に届く熱によって励起される、開発されたばかりの冷温感受性の TrpM8, 恒温感受性の TrpA1 チャンネルを用いた系で、神経活動を誘起する。という方法に切り替えた。米国 Yoshihara 研究室と協同で系を構築し、1000 系統近い GAL4 系統で Trp チャンネルを発現させて行動観察チャンバーの温度を下降または上昇させ、撮影したビデオ映像を解析して、温度変化によって特定の行動が誘導されるものをスクリーニングした。麻痺、痙攣、翅の伸長、ジャンプ、求愛行動などさまざまな行動が誘導されたが、中でも特徴的なものとして、摂食行動が特異的に誘導されるものが見いだされた。その後の詳しい解析で、この系統でラベルされる神経のうち左右 1 対の神経のみによって、口吻の伸展、口唇の展開、食道のポンプ運動によるエサの吸引、口唇の収納、口吻の格納という摂食行動の全シーケンスが特異的に惹き起こされ、この神経を阻害すると摂食行動が全く起こらなくなることが分かった。この成果を学術論文として発表した (Flood, Iguchi, Gorczyca, White, Ito, and Yoshihara, Nature、2013)。

D) 小型ロボットの動作とハエの動作の比較による、神経情報処理モデルの検証

これまで解析してきたショウジョウバエやカイコガの歩行制御神経が集中する LAL 領域の神経回路の構造から予測される制御様式を微分方程式化し、あわせてその式をプログラムして自動制御で動くロボットを作成した。LAL は嗅覚情報をトリガーにしてジグザグ状の行動を誘起し、それによって昆虫を匂い源に導く行動を制御している。匂いは空中を紐状の分子プルームとして拡散するが、この動きを再現性よく制御するのは難しいため、本来の生物が利用する匂い情報のかわりに、匂いの拡散パターンを模した明暗画像の動画をプロジェクターによってロボットの上から投射した。ロボットは匂いセンサーの代わりに光の明暗を受光素子で検知し、匂い源に向かって動く行動をシミュレートする。これによって、実際の生物の動きに近いジグザグ状に匂い源に近づく行動を再現できた。しかし実際の生物の行動と詳細に比較す

ると、一部の行動パラメーターが厳密には合致しないため、引き続き微分方程式の改良とパラメーターの調整を続けている。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)は、世界でも公開例がない LexA 発現誘導系統の体系的なデータベースとなり、行動制御神経だけでなくさまざまな神経の構造を解析するためのランドマークとして、すでに幅広く利用され、貴重なリソースとなっている。また、本研究で開発した Flybrain Neuron Database は脳の構造と神経投射の情報を提供するデータベースとして、世界的に利用されている。

B)は、行動制御神経が特定の細胞系譜によって作られているという従来想定されていなかった知見が得られ、脳の回路構造を発生学的に理解する上で新たな視点を提供できた。

C)は、光を用いたオプトジェネティクスが脳深部の神経の励起に有効でないという欠点を克服した、温度変化を用いるサーモジェネティクスの手法を確立し、行動スクリーニングによって特定の行動制御神経を同定しうることを示すことができた。

D)は、実際の神経回路の構造から予測したアルゴリズムでロボットを動かす系を開発し、従来行われているコンピューター内の仮想シミュレーションを一歩超えた、より現実的な行動シミュレーションによるバイオロボット制御機構の開発に向けての道筋を示すことができた。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究成果の B)は、脳から胸腹部神経節に伸びる行動制御中枢の神経のみをラベルするLexAやGAL4の発現誘導系統が予想外に少数しか得られなかったために、当初計画したような網羅的に特定の神経を可視化する実験を、十分に展開することができなかった。ただし染色体組み替えを利用した細胞系譜依存的な細胞ラベル法を併用することによって、当初の目標は達成できた。研究成果の C)は、摂食行動という生体にとって非常に重要な行動の全シーケンスをオン／オフする左右1対の行動制御神経を同定するという予期以上の成果に発展させることができたが、この神経は脳から胸腹部神経節に伸びるものではなく脳内の介在神経であったため、「脳から胸腹部神経節に伸びる行動制御神経を探る」という意味では、当初計画とは若干異なるものになった。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果により、行動制御神経中枢の位置や構造についての体系的知見を得ることができた。しかし、さらに詳細な構造や機能を解析するには、LexAやGAL4の発現誘導系統に染色体組み替え誘導系を組み合わせて、より少数の神経をラベルすることが必要になる。特異性を高めたGAL4発現誘導系統の開発も進んでいるので、これらも利用してさらに詳細な解析を今後も継続する。

線虫の神経回路の光操作から探る感覚と記憶に関わる神経の暗号

研究代表者：久原　篤 [1)]

1）甲南大学理工学部

＜研究の目的と進め方＞

はじめに

動物は環境情報を神経系で受容処理することによって適切に行動することができる。このような神経情報処理を解析するためのシンプルな実験動物として、線虫 *C. エレガンス*が使われている。*C. エレガンス*は多様な行動を示すことが知られており、そのひとつとして温度に対する行動である温度走性が挙げられる。温度走性とは、一定の温度下で飼育された線虫が、温度勾配に置かれた際に過去の飼育温度へ移動する行動である(図 1a)。これまでに、温度走性を制御するシンプルな神経回路と、温度受容と記憶学習に関わる多数の遺伝子同定されてきている。しかし、神経回路情報処理の新概念の創出には、従来の分子遺伝学だけでなく、最新の技術を取り入れた解析が必須であると考えられている。そこで、本研究では、従来の分子遺伝学と最新の光技術を組み合わせ、神経情報処理に関わる暗号の解読をめざした。具体的にもちいる最新の光技術としては、神経活動を自由にリモートコントロールできる光駆動生チャネルやポンプと、神経活動を定量か可能なカメレオンやマーメードといった genetically encodable な分子をもちいる。

これまでに分かっている温度受容と記憶学習の神経回路と分子メカニズム

神経情報処理を解析するための実験動物として、線虫 *C. エレガンス*をもちいる利点として、電子顕微鏡解析から 302 個のニューロンの接続によって構成される全神経回路網が解明されている点があげられる。線虫の神経系はシンプルであるが、その行動様式は多用かつ複雑である。そのひとつとして、温度に対する行動である温度走性があげられる(図 1)。温度走性とは、一定の温度下で飼育された線虫が、温度勾配に置かれた際に過去の飼育温度へ移動する行動である(図 1a)。これまでに、この温度走性を制御するシンプルな神経回路と(図 1b)、温度受容と記憶学習に関わる多数の遺伝子同定されてきた。最近では、温度受容ニューロンにおいて、温度情報が従来の TRP 型のチャネルではなく、三量体 G タンパク質で伝達されるケースが明らかになった。また、温度と餌の関連付け学習が、わずか 3 つの介在ニューロンで制御され、カルシウム依存性酵素や分泌性の神経ホルモンであるインスリンが学習に必須であることが明らかとなった。このように、分子遺伝学などを使い、感覚と記憶学習の分子機構がひも解かれてきたが、神経回路情報処理の新概念の創出には、最新の技術を取り入れた別の角度からの解析が必須であった。

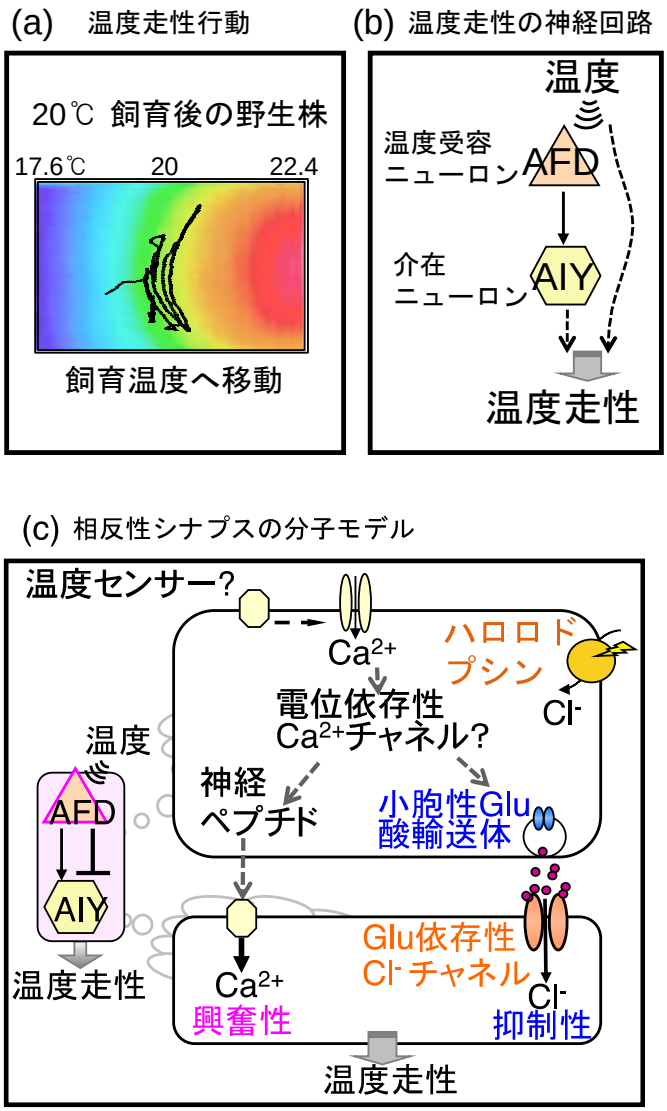


図 1

温度走性行動とその神経回路とシナプス伝達の情報処理機構

(a)線虫は温度勾配上で過去の飼育温度に移動する.たとえば、20℃で飼育された野生株は、温度勾配上で、飼育温度である20℃へ移動する。

(b)温度走性に関わる神経回路。温度は頭部に存在する温度受容ニューロン AFD で受容され、その情報は、AFD の下流の介在ニューロンである AIY で処理され、行動が制御される。

(c)相反性シナプス伝達の分子機構モデル.興奮性と抑制性のシナプス伝達にはそれぞれの神経伝達に関わる神経伝達物質が関与する。興奮性の伝達には神経ペプチドが関わることが他のグループの解析から分かってきた。

＜研究計画＞

1)　行動中の温度走性に関わる神経回路の光操作

温度勾配上で行動する線虫を自動追尾する光学装置をつかい、行動中の温度走性関連ニューロンの活動をハロロドプシンやチャネルロドプシンで活性化する。また、その状態の神経活動の変化をカルシウムイメージングや膜電位イメージングをもちいて定量化する。定量化した神経活動と行動パターンをもとに、神経伝達に関わる新しい暗号の創出をめざす。解析に用いる神経回路は温度情報伝達に関わる温度受容ニューロンとその下流の介在ニューロンである。

2)　相反する神経伝達に関わる分子

光応答性チャネルをもちいた解析から、興奮性と抑制性の神経伝達が同時に制御されている可能性が得られたため、それらの神経伝達に関わる分子機構を、遺伝学的解析から明らかとする。具体的には、シナプス伝達に関わる分子機構を変異体の解析などから同定解析する。

＜得られた研究成果＞

A)　光応答性チャネルをつかった神経の暗号の解読

平成23年度から24年度までに、研究計画の項目1)について研究を進め、以下の結果を得た。

神経活動をリモートコントロールできる光技術として、特定の波長光で開口するチャネル分子が脚光を浴びている。そのひとつである、古細菌由来の光受容タンパク質であるハロロドプシン(HR)は、黄緑光を吸収すると、細胞外から細胞内へ Cl-を輸送ことが知られている。神経細胞 は Cl-が流入すると過分極となり神経活動が低下する。本研究では、温度走性を制御する神経回路の特定の神経細胞に HR を発現させ、光照射によって神経活動を低下させることで、新たな神経機能の発見を目指した。

はじめに、行動中の線虫にピンポイントで励起光を照射する装置を開発した。具体的には、顕微鏡ステージ上の温度勾配装置の位置を自動で動かし、顕微鏡の光路から高速パルスで励起光を照射する装置をオリンパス社と共同で作製した。この開発には、設計から完成まで約 3 年を要した。開発した装置をつかい、温度行動中の線虫の温度受容ニューロンの活動を光操作した。具体的には、温度受容ニューロン AFD に HR を発現させ、温度行動中に HR の励起光を照射し、神経活動を操作した。その結果、AFD で HR を活性化した個体は、飼育温度よりも高温へ移動する好熱性異常を示した。この異常を見た時に非常に驚いた。その理由は、AFD の機能欠損変異体は、好冷性もしくは無走性の行動異常を示すことが報告されていたためであった。

AFD の活動低下が好熱性と好冷性という逆の行動異常を引き起こした原因を解析するために、AFD とその下流の介在ニューロン AIY の神経活動を細胞内 Ca^{2+}や膜電位のインディケーター遺伝子をつかい測定した(図2)。その結果、AFD で HR を活性化させた個体では、AFD の温度変化に対する細胞内 Ca^{2+}濃度の変化率が、野生株に対して約30%低下していた。その時の介在ニューロン AIY の活動を測定すると、AIY の活動はむしろ野生株より約30%上昇していた(図2中央)。一方、AFD の膜電位変化が欠損している変異体では、AFD および AIY の温度変化に対する応答が強く低下していた(図2右)。これらの解析から、AFD の活動低下率に応じて、介在ニューロンの活動逆転がおきる可能性が考えられた。また、HR を使わずに、野生株に様々な温度変化パターンを与えた実験においても、同様の神経活動の逆転が観察された。

これらの結果をまとめ、学術論文として発表した(Kuhara et al., Nature commun, 2011)。

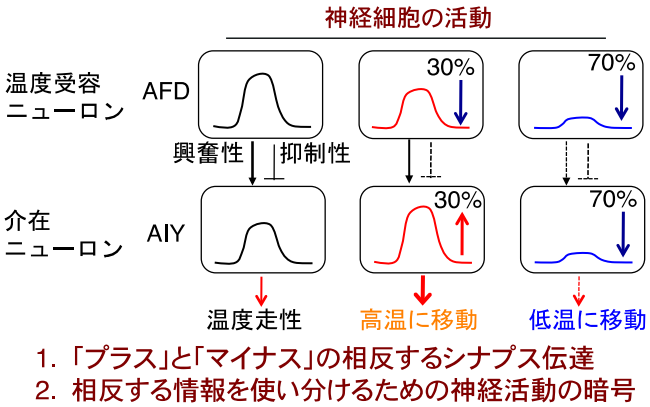


図2
神経回路の情報処理モデル.AFD から AIY には、興奮性と抑制性の神経伝達が行なわれる(左). AFD の活動が約30%低下すると、抑制性の神経伝達が相対的に低下し、AIY の活動が約30%上昇(中央). AFD の活動が約70%低下すると、興奮性と抑制性の両方の神経伝達が低下し、AIY の活動が約 70%低下(右). これは考え得るもっともシンプルなモデルであり、より複雑な制御機構の存在も考えられる。

B)　相反する神経伝達に関わる分子

平成23年度から24年度までに、研究計画の項目2)について研究を進め、以下の結果を得た。

AFD と AIY の神経回路における神経情報伝達の分子機

構に関しては、大西憲幸氏が分子遺伝学的解析をおこなった。その結果、AFD から AIY に、興奮性と抑制性の相反する２つの神経伝達が行なわれていることが明らかとなった(図 2 左)。さらに、抑制性神経伝達に小胞性グルタミン酸輸送体(VGLUT)が関与し(図 1c)、その変異体は AFD の異常により好熱性の表現型を示すことが明らかとなった。この VGLUT の変異体の AFD において HR を活性化させたところ、AIY の神経活動に影響を与えなかった。この結果に対する考察は多数考えられるが、ひとつの可能性として、HR により低下する部分の神経電位が、電位依存性チャネルなどを介して、抑制性のシナプス伝達の放出に関与している可能性が挙げられる。以上結果などから、野生株の AFD で HR を活性化させると、AFD 内における抑制性の神経伝達が結果として抑えられ、相対的に興奮性の神経伝達が強くなることで、AIY の活性を上昇させているというモデルが考えられた(図 2 中央)。以上の結果などから、温度受容ニューロンから介在ニューロンへの興奮性と抑制性の神経伝達を使い分けるための生理的暗号がみつかってきた(図 2)。これらの結果をまとめ、学術論文として発表した (Ohnishi et al., EMBO Journal, 2011)。

＜国内外での成果の位置づけ＞

脳神経系の情報処理には、ニューロン同士を接続するシナプスが重要であり、シナプス伝達には興奮性と抑制性の 2 種類がある。これまで、単一のニューロンは、それと接続する単一のニューロンに対して、主に興奮性か抑制性のどちらかの神経伝達しか行なわないと考えられていた。本研究の線虫における解析から、これら 2 つの相反する神経伝達が同時に行われるケースが見つかってきた。さらに、興奮性か抑制性の切り替えスイッチとなるニューロン内のカルシウム濃度変化のパターンが、最新の光技術を駆使することで明らかとなってきた。これらのことから、本研究成果は世界でも例のない報告となり、当該分野の新たな流れを作るきっかけになるものと予想される。その一方で、同様の光応答性チャネルを用いた研究結果が世界的にも多くのグループにより報告されていることから、今後は、さらなる競争の激化が予想される。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

介在ニューロンの神経活動の光操作を試みたが、複数のパターンの励起を行っても温度走性行動の変化を引きおこすことができなかったため、ニューロンの生理的性質上での問題がある可能性が考えられた。光応答性チャネルの種類を変更することによりこれを回避することを試みたが有効な方法とならなかったため、継続を断念した。他はおおむね順調に進んだ。

＜今後の課題、展望＞

今回、光駆動性チャネルの利点である、意図した「場所」と「時間」で神経活動を制御するだけでなく、「意図した強さ」という点も生かし、回路の細かな暗号をみつけた。本結果が、今後の神経回路の暗号解読のきっかけになれば幸いであると同時に、この情報処理機構が、他の動物の神経情報処理においても存在しているかが今後の課題である。

霊長類における神経路選択的な機能分子制御技術の開発

研究代表者：井上　謙一[1)]

1）京都大学霊長類研究所

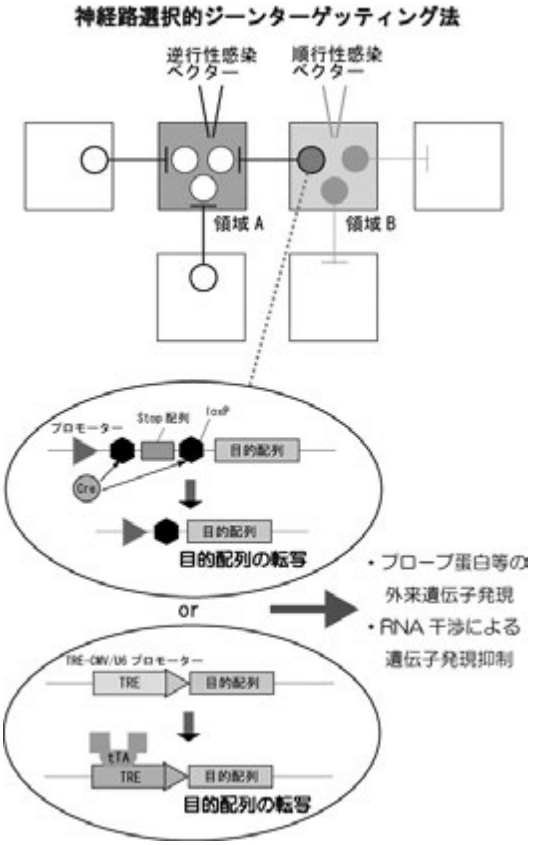
＜研究の目的と進め方＞

本研究は、逆行性感染型ウイルスベクターと順行性感染型ウイルスベクターを利用して、特定の神経回路を構成するニューロン集団に選択的に遺伝子の発現ないしは発現抑制を引き起こす手法を開発し、これを霊長類に応用することで、霊長類において分子行動学を実現するための基盤技術を確立することを第一の目的とする。また、上記手法において、特定ニューロン集団における神経活動シグナルの抑制を実現し、これをサル大脳基底核神経回路に適用することで、回路上の特定神経細胞における情報処理が行動発現に及ぼす影響を調べる手法を確立することを第二の目的とする。具体的には、右下図に示されるように、軸索末端から感染する逆行性感染型ベクターをターゲットニューロンの線維終末が分布する領域（A）に注入し、細胞体から感染する順行性感染型ベクターをターゲットニューロンの細胞体が分布する領域（B）に注入することで、Cre-loxP部位特異的組み替え反応あるいはテトラサイクリン誘導性転写制御システムにより、両方のベクターに感染したニューロン（領域Bに存在し領域Aに投射を送るニューロン）に選択的に遺伝子発現、あるいは、RNA干渉による遺伝子発現抑制が実現されるベクターシステムを構築し、霊長類を用いて運動の実行・学習に関わる大脳基底核神経回路に適用する。

１９８０年代に遺伝子改変動物の作製技術や遺伝子変異体の解析技術の開発が進み、特定の遺伝子を人為的に変異・欠失させたモデル動物を用いた脳研究が急速に進展した。このような研究手法は、遺伝子改変モデルにおける表現型を行動学的、電気生理学的、あるいは組織学的に解析することにより、当該遺伝子の機能異常や欠損がさまざまな脳の働きに与える影響を解明できるという点できわめて強力であり、実際に多数の遺伝子が脳機能（神経活動制御）に関与することがこれまで明らかにされてきた。また、近年では細胞活動を制御する機能プローブ蛋白質を用いた遺伝子導入アプローチが開発され、特定の細胞の活動が脳機能に与える影響をより直接的に検証することが可能となってきた。特に、線虫やゼブラフィッシュ、ショウジョウバエなどの比較的単純な神経系を持つ無脊椎モデル動物においては、既知神経回路上の特定ニューロンにおける遺伝子改変が実現され、遺伝子と神経回路そして行動を結びつける試みが成果を挙げつつある。一方、脊椎モデル動物であるマウスを用いた研究においても、プロモーターによる発現制御とウイルスベクターを組み合わせたアプローチにより、特定の細胞群における遺伝子改変が盛んになってきている。

他方、我が国における高次脳機能研究は近年、ニホンザルを用いて多大な成果を挙げてきた。ニホンザルは侵襲的な実験に使用される動物の中で最もヒトに近縁であり、高度な認知課題を学習・遂行する能力に優れており、感覚・運動・認知等の様々な脳機能やそれらを支える神経回路に関する解剖学的、生理学的知見がかなり集積されている。しかしながらサルにおける遺伝子改変技術は未だ実用段階にあるとはいえず、無脊椎モデル動物やマウスなどで集積された知見をよりヒトに近いサルに直接応用することは困難である。

このような背景のもと、本研究では、感染特異性を持つウイルスベクターを用いた遺伝子導入技術によって、特定の神経回路を構成するニューロン集団における機能分子の発現を選択的に制御する技術をニホンザルの個体レベルで実現し、単純な神経系を持つモデル動物で得られた知見を霊長類で検証するための基盤技術を確立する。本研究の基本的戦略は、研究代表者らが独自に開発した、霊長類において効率的に機能する逆行性感染型レンチウイルスベクター（Inoue and Kato et. al., 2007）と順行性感染型アデノ随伴ウイルスベクターとの多重感染による遺伝子発現制御であり、多重感染細胞に選択的に遺伝子発現制御を起こすため、これら２種類の感染方向を持つウイルスベクターとCre-loxP部位特異的組み替え反応、あるいはテトラサイクリン誘導性転写制御システムを組み合わせる。これにより、特定の投射系を構成するニューロン集団における遺伝子制御が実現される。より具体的には、テタヌスニューロトキシンなどの機能プローブの発現による神経活動の抑制と、NMDA受容体（NR1サブユニット）のRNA干渉法による神経可塑性の抑制を神経回路選択的に行う手法を開発する。本研究では、これらのシステムをニホンザル大脳基底核神経回路に適用し、同技術を霊長類において確立するとともに、大脳皮質―大脳基底核ループ回路が運動の実行・学習において果たす役割の解析を進める。



＜研究計画＞（年度ごとに分けても結構です）

1）霊長類における神経路選択的遺伝子発現法の実現

研究代表者らが近年開発に成功した逆行性感染型レンチウイルスベクター(狂犬病ウイルスのエンベロープ蛋白質を利用した改変レンチウイルスベクター；逆行性LVベクター）にCreリコンビナーゼ遺伝子を組み込んだベクターと、順行性感染型ベクターとしてアデノ随伴ウイルスベクター（AAVベクター）にloxPコンポーネント(目的遺伝子の直前にloxPでストップカセットを挟んだ配列を挿入したもの）を組み込んだベクターを構築する。培養細胞およびラットを用いて、二種のベクターの多重感染により目的遺伝子（マーカー蛋白質を用いる）の選択的発現が誘導されることを確認する。次いで、逆行性LVベクターをサル線条体に、ＡＡＶベクターを線条体に投射を送る黒質に注入し、ベクターの多重感染により黒質ドーパミン細胞にマーカー蛋白質の選択的発現が起こることを確認することで、神経路選択的な遺伝子操作手法をサルで確立する。

2）霊長類における神経路選択的な神経活動抑制法の実現

逆行性LVベクターにテトラサイクリン応答配列(TRE)および目的遺伝子、AAVベクターにテトラサイクリン応答因子(tTA/rtTA)を組み込んだベクターを構築する。上記１のベクターシステムにおいて、目的遺伝子をハロロドプシン・テタヌスニューロトキシン等の神経活動抑制プローブとして発現系を構築し、培養細胞およびラットを用いてシステム検証実験を行う。次いで、逆行性LVベクターをサル線条体に、ＡＡＶベクターを線条体に投射を送る黒質に注入することにより、ドキシサイクリンの投与依存的に黒質ドーパミン神経細胞に選択的に神経活動抑制プローブを発現させる。餌取りタスクを用いた行動学的解析、薬理学的解析、組織化学的解析等により、ドキシサイクリンの投与依存的に黒質ドーパミン神経細胞から線条体への神経シグナルが抑制されていることを確認する。併せて、黒質ドーパミン細胞から線条体への神経シグナルの抑制が運動の実行および学習に与える役割の解析を行う。

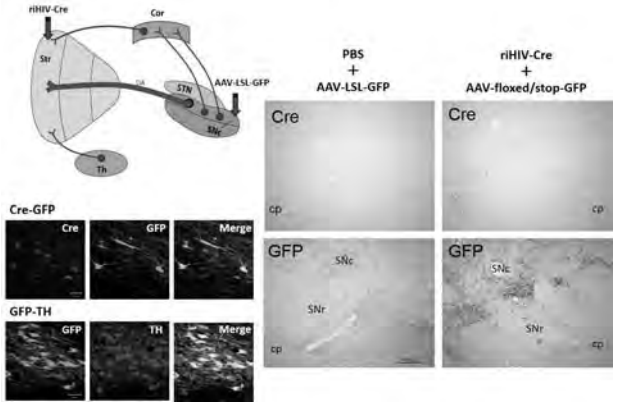
3）霊長類における神経可塑性関連遺伝子の発現抑制系の開発

上記１の研究で構築する神経路選択的な遺伝子発現ベクターシステムにおいて、shRNAを用いたRNA干渉系を構築するため、広範な神経細胞で発現を示し、神経可塑性に関与するNMDA受容体(NR1）を標的遺伝子として、霊長類におけるRNA干渉実験を行う。この目的の為に、既にクローニング済みであるニホンザルNR1(GRIN1)遺伝子の配列から、スプライシングバリアント共通領域をターゲットとして複数のshRNA生成配列をデザインする。この配列をプラスミドベクターおよびAAVベクターに搭載し、ニホンザルNR1遺伝子を強制発現させた培養細胞系、およびサルを用いたin vivo実験（線条体への注入）において発現抑制効果を検討し、最適配列を決定する。この配列と、逆行性感染型レンチウイルス(LV)ベクター、およびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを利用して、神経路選択的なNR1発現抑制を実現するベクターシステムを構築する。このためにCre-loxP部位特異的組み替え反応、あるいはテトラサイクリン発現制御システムを利用する。まずニホンザルNR1遺伝子を強制発現された培養細胞において多重感染による遺伝子抑制効果を確認する。次いで、逆行性LVベクターをサル淡蒼球に、AAVベクターを淡蒼球に投射を送る線条体に注入することにより、線条体中型有棘細胞においてNR1発現が抑制され、その結果として神経可塑性が減弱することを、主にNR1およびNR1下流シグナル分子の組織学的・分子生物学的解析により確認する。

＜得られた研究成果＞

1）霊長類における神経路選択的遺伝子発現法の実現

平成 23 年度は、研究代表者らが近年開発に成功した逆行性感染型レンチウイルス(LV)ベクターとアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターとの二重感染と、Cre リコンビナーゼによる部位特異的組換え反応を利用して、特定の神経路を構成するニューロンでのみ外来遺伝子の発現が起こるような遺伝子操作手法を、サルの黒質線条対投射系において確立した。本手法は、ターゲットニューロンの線維終末が分布する領域に Cre リコンビナーゼを発現する逆行性ベクターを、細胞体が分布する領域に loxP コンポーネントを持つ順行性ベクターをそれぞれ注入し、片方のベクターのみに感染した細胞では目的遺伝子が転写されず、両方のベクターに重感染したニューロンでのみ部位特異的組み替え反応が起こり、目的遺伝子を転写するというシステムにより、神経路選択的な遺伝子発現制御を実現するものであり、まずシステムを構成するウイルスベクターの作成を行った。システムの検証実験として、Cre リコンビナーゼを発現する逆行性 LV ベクターベクターを片側の線条体に、GFP 遺伝子を含む loxP コンポーネントを挿入した AAV ベクターを両側の黒質に注入し、黒質のニューロンのうち、線条対に投射を送るドーパミンニューロンのみにマーカーである GFP の遺伝子発現が誘導されるかを検証した（下図左上)。本実験では、Cre を発現する逆行性 LV ベクターを片側性に、loxP コンポーネントを持つ AAV ベクターを両側性に注入した。その結果、両方のベクターを注入した場合にのみ、ドーパミンニューロン選択的な GFP 遺伝子発現が誘導されることが確認された(下図右)。逆行性ベクターの注入部位である線条体では、Cre リコンビナーゼの発現は見られたが、GFP の発現は認められなかった。一方、黒質においては、GFP を発現するニューロンはすべて逆行性に Cre リコンビナーゼを発現しており、またドーパミンニューロンのマーカーであるチロシン水酸化酵素陽性であることが確認され、特定の神経路に選択的に遺伝子を発現させるシステムが有効に機能していることが示された（下図左下)。

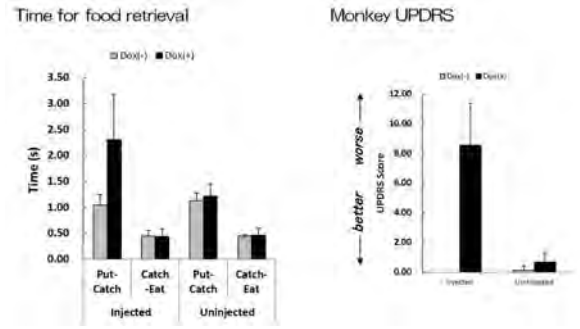


2）霊長類における神経路選択的な神経活動抑制法の実現

平成 23 年度から 24 年度までに、逆行性感染型レンチウイルス(LV)ベクターとアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターとの二重感染と、テトラサイクリン誘導性発現制御システムを利用して、特定の神経路を構成するニューロンでのみ神経伝達阻害が起こるような遺伝子操作手法を、サルの黒質線条対投射系において確立した。本手法は、テトラサイクリン発現調節系の各コンポーネントを逆行性感染型レンチウイルスベクターと AAV ベクターにそれぞれ組み込むことにより、順行性・順行性ベクターの両方が感染した特定投射系を持つニューロンでのみ TRE プロモーターにテトラサイクリンリバースアクチベーターが作用し、ドキシサイクリン投与によって目的遺伝子の発現を引き起すことが出来るものであり、まずシステムを構成するウイルスベクターの作成を

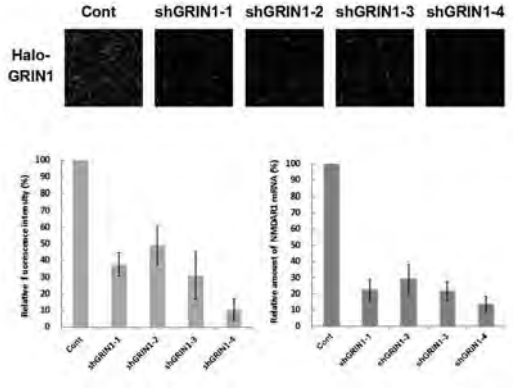
行った。本研究では特定の神経路における伝達遮断を行うことを狙い、TRE プロモーターの下流にテタヌストキシン軽鎖を組み込んだ逆行性 LV ベクター、およびテトラサイクリン応答因子を導入した AAV ベクターを作製した。まず培養細胞を用いた検証実験により、両方のベクターに感染し、且つドキシサイクリンを投与された場合にのみテタヌストキシン軽鎖の発現が生じ、伝達物質の開口放出に必要な VAMP２蛋白質が切断されることを確認した。

この結果を受け、MRI ナビゲーションシステムを用いて両側の線条体にレンチウイルスベクターを、その１－２週間後には両側の黒質にＡＡＶベクターを注入した。AAV の注入から約一ヶ月後にドキシサイクリンの経口投与を開始し、自発運動や採餌タスクへの影響を調べた。その結果、ドキシサイクリンの投与により、前傾姿勢とバランス障害が顕著に確認され、また採餌タスクにおいて巧緻運動障害が認められた。このような症状はドキシサイクリンの投与を辞めると消失し、再度投与を行うと再び発現した。採餌タスクにおける採餌時間を解析した結果、ドキシサイクリン投与に伴い有意に採餌に時間がかかるようになり、またこの効果は可逆性があることが認められた（下図左）。この結果はパーキンソン病の主症状の一つである Bradykinesia ではなく、巧緻運動障害によるものと考えられた。一方、自発運動量を解した結果、ドキシサイクリン投与により顕著な自発運動量低下（約４割）が見られ、この効果は可逆性があることが認められた。また、パーキンソン病の指標であるＵＰＤＲＳをサル用に改変した症状スコアによっても、投与による症状悪化が２種類のベクターを投与したサルで認められた（下図右）。一方、片方のベクターしか投与していないコントロールサルでは、このようなドキシサイクリン投与に伴う運動症状は認められなかった。上記のような運動障害は緩慢に進行するものであり、またドキシサイクリン投与期間中には機能回復は観察されなかった。これらの結果は、ドーパミン投射系と大脳基底核神経回路の可塑性との関係を検討する上で有用な知見および技術になると考えられる。



3) 霊長類における神経可塑性関連遺伝子の発現抑制系の開発

平成 23 年度から 24 年度までに、逆行性感染型レンチウイルス(LV)ベクターとアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターとの二重感染と、Cre リコンビナーゼによる部位特異的組換え反応を利用して、特定の神経路を構成するニューロンでのみ目的遺伝子の発現が抑制される遺伝子導入手法の開発を行った。具体的には、広範な神経細胞で発現を示し、神経可塑性に関与する NMDA 受容体(NR1)を標的遺伝子とした shRNA による RNA 干渉実験系の構築に取り組んだ。まずニホンザル NR1(GRIN1)遺伝子の配列から、スプライシングバリアント共通領域をターゲットとして複数の shRNA 生成配列をデザインし、プラスミドベクターおよび AAV ベクターに搭載し、培養細胞系において発現抑制効果を検討し、最適配列を決定した。ついで、上記配列をもとに「目的配列（センス）＋loxP 配列を含むループ配列＋目的配列（アンチセンス）＋ターミネーター配列」のように設計した shRNA 生成用 loxP コンポーネント配列を構築し、U6 プロモーター下流に上記のような RNA 干渉用の配列を組み込んだベクターを構築した。神経系培養細胞において多重感染による NR1 遺伝子発現量の変化を解析し、そのデータを元にベクター改良を行った結果、ベクターの多重感染により効率的かつ選択的に発現抑制を誘導できるウイルスベクターシステムの確立に成功した（下図）。今後同ベクターシステムの霊長類神経系における検証実験を、黒質線条体投射系をターゲットとして行う予定である。



＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果 1),2),3)はいずれも現在世界でも例のない成果であり、今後早急に報告したい。特定の神経路における遺伝子改変技術を霊長類で確立するという本研究の成果は、特定神経回路上での特定ニューロン集団における特定分子の動態が行動に及ぼす影響を霊長類で解析するための基盤技術を提供することにより、行動素過程の分子レベルへの理解に霊長類脳研究の立場から貢献できると考えられる。また、このようなウイルスベクターを用いた霊長類脳研究手法は、神経回路上で分子機能を解析することを目的とする本領域において形成される神経システムの基本的概念が、より高等な動物に適用できることを証明する優れたアプローチとなると考えられる。さらに、例えば膜電位プローブなどの光学的プローブと組み合わせるなどの応用により、正確かつ詳細な高次脳機能の神経メカニズムの解析への展開が期待できるほか、ヒトに近いサルでの神経疾患モデルの確立やその治療法の開発といった応用も期待できる。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画1),2)に関してはて当初見込んだ通りの成果を得ており、研究が順調に進展したと考えられる。研究計画の3）については培養細胞のレベルで成果を得たが、まだ霊長類神経系での検証を終えていない。これは検討実験の結果システムに可逆性を加えた方が良いと判断されたため、ベクターシステムの改良を行ったことに起因する。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果により、特定神経路を構成するニューロン集団の分子操作の影響を行動学的・あるいは生理学的に解析する技術が確立し、高次脳機能を実現する神経処理機構の解明を進める基盤となったと考えられる。今後、開発に成功した神経路選択的な神経活動抑制法や、神経路選択的な神経可塑性関連遺伝子の発現抑制法を用いて、霊長類の大脳基底核情報処理機構の解析に向け研究を推進していく。

公募研究：平成２１年度-２４年度

記憶情報の読み出し制御を担う神経回路の同定と解析

研究代表者：松尾　直毅

京都大学　白眉センター

＜研究の目的と進め方＞

動物は外界環境から多様かつ膨大な量の感覚情報を入力し、それらを脳内で記憶として保存し、必要に応じて読み出す作業を行い、最終的に“行動”という形で出力する。これらの機能は動物が状況に応じて適切な行動を起こす上で必須な役割を果たしていると考えられるが、哺乳類の脳内では千億個のニューロンが複雑精緻な神経回路網を形成しており、どれ（どの組み合わせ）が任意の記憶に関与しているか従来の方法では同定することは極めて困難であるため、これら記憶情報の読み出し(想起)を担う神経回路やその仕組みはほとんど明らかになっていない。

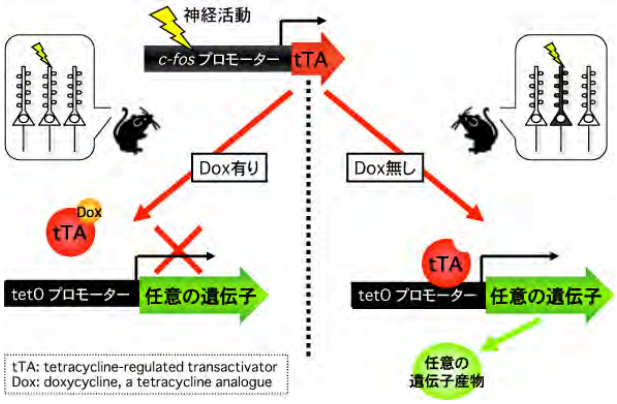
そこで本研究ではモデル動物であるマウスと神経活動依存的に発現が誘導される最初期遺伝子群（IEGs）の発現を利用して、記憶の形成と想起に関与する機能的神経細胞集団を可視化同定し、脳内の記憶情報処理の流れと各領域での役割を明らかにすることを試みた。

さらに、任意の時期に任意の行動刺激により活動した神経細胞集団に選択的に任意の遺伝子操作を可逆的に行うことが可能な遺伝子改変マウスを作製し、記憶の獲得時に活動した神経細胞集団の活動を選択的に操作することにより、その記憶との因果関係を個体レベルで直接検証することを試みた。

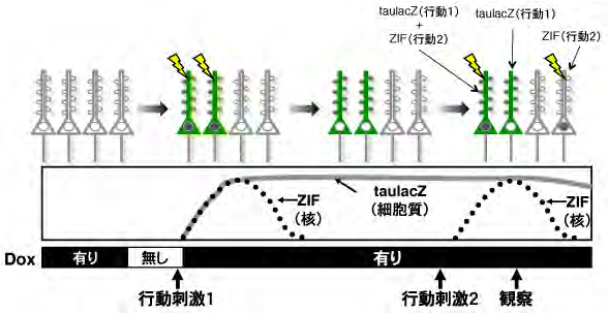
これらの研究を通して、哺乳類の脳内での記憶情報の読み出し制御に関わる神経回路の可視化・同定と動作原理の理解に迫ることを目的とした。

＜研究計画＞

1)　研究代表者らは以前、時間的に離れた２点での動物の行動の際に活動したそれぞれの神経細胞集団を同一個体の脳内において同時に可視化を行うことが可能なトランスジェニックマウスのシステムの構築に成功している（Science 2007, Science 2008）。このシステムは、神経活動依存的に発現が誘導されることが知られているImmediate-Early Genes（IEGs)のひとつ*c-fos*遺伝子のプロモーターの制御下でtTA（tetracycline-regulated transactivator)を発現するマウスと、tetOプロモーターの下流で任意の遺伝子を発現するマウスの２種類を掛け合わせることにより得られる。tTAの転写活性はドキシサイクリン(Dox)の有無



により制御されるので、tetOプロモーター下流遺伝子の発現を時間的・空間的に限定することが出来る（図)。ここでは、tetOプロモーターの下流でtau-lacZを長期的に発現するマウスと掛け合わせることにより、恐怖条件付け記憶の“形成”の際に活動した神経細胞集団を選択的に長期標識し、別のIEGマーカー(ZIF)を用いて記憶の“想起”の際に活動した神経細胞集団を選択的に標識することにより、記憶の獲得時と、記憶の読み出し時に活動した神経細胞集団をそれぞれ同一脳切片上で免疫組織化学染色による同時可視化を行い、オーバーラップして活動する集団の割合を計測する計画を立てた。

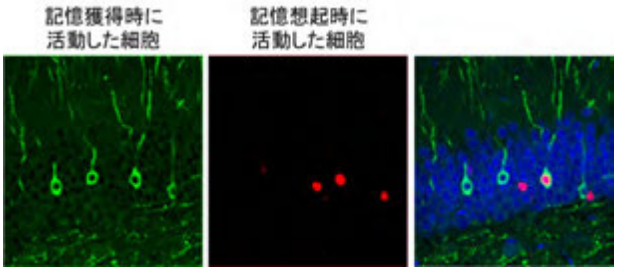


2)　αカルシウム／カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII（αCaMKII）は前脳に豊富に発現しており、シナプス可塑性や認知機能に不可欠な役割を果たしていると考えられている。αCaMKIIノックアウトマウスのヘテロ変異体（αCaMKII +/-）は、重篤な作業記憶の欠陥を含む行動異常を示すことが知られており、作業記憶の欠陥は統合失調症やその他の精神疾患の中間表現型と考えられている。本研究では、作業記憶の想起時に活動する脳部位、および変異マウスにおける作業記憶欠陥の脳内責任部位を同定するために、８方向放射状迷路を用いた作業記憶課題後のc-FosやArcなどの最初期遺伝子群の脳内での発現を調べる計画を立てた。

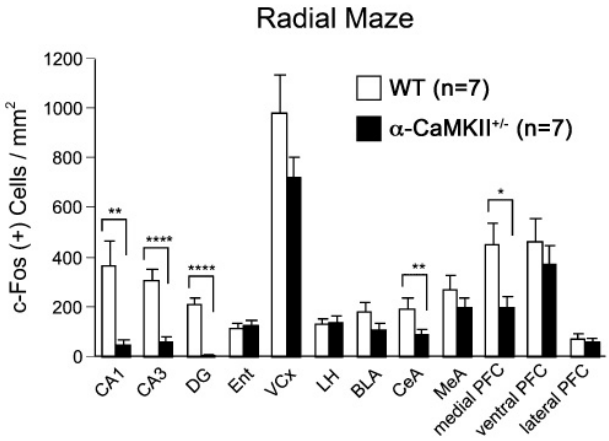
3)　上記の研究計画1)2)のような研究は記憶との相関を示す細胞集団の可視化同定という重要な研究ではあるが、これらの細胞集団が本当に記憶の構成要素であることの因果関係を示す研究が必要である。そこで、学習時に活動した神経細胞集団を人為的に再活動することにより、記憶が人為的に想起されるかどうかを調べる計画を立てた。そのために、tetOプロモーターの制御下でDREADD（Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug)を発現するマウスを利用した。DREADDはGタンパク質共役型受容体の変異体で、このうちGq型のもの（hM3Dq）は特異的な合成リガンド（CNO）が結合した時のみ、細胞に脱分極を起こすことが示されている。

＜得られた研究成果＞

A)　平成 21 年度から 23 年度までに、研究計画の項目 1)について研究を進め、初年度に確立した実験条件で、文脈依存的な恐怖条件付け記憶の形成と想起の際に活動する神経細胞集団をそれぞれ同一個体の脳内で可視化することにより、どちらの過程でも活動する集団の解剖学的同定を行った。具体的には、研究代表者らが開発した cfos-tTA と tetO-taulacZ のダブルトランスジェニックマウスを用いて文脈依存的恐怖条件付けを行い、この学習刺激により活動した神経細胞集団を tau-lacZ で標識した。２日間の Dox 入りの餌での飼育後、同じマウスを再び同じ装置に３分間戻すことにより、文脈依存的恐怖記憶を想起させた。この２回目の行動刺激により活動した神経細胞集団を、ZIF の内在性発現により標識した。脳切片を作製し、ZIF と lacZ に対する抗体を用いて２重免疫染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて背側海馬 CA1 領域の観察、記録を行い、tau-lacZ + ZIF 陽性細胞（記憶の形成と想起で共に活動）、tau-lacZ 陽性細胞（記憶形成時にのみ活動）、ZIF 陽性細胞（記憶想起時にのみ活動）、免疫染色陰性細胞（活動無し）の４種類の細胞の割合を数えた。その結果、文脈依存的恐怖条件付け学習を行った後にその記憶を想起させたグループでは tau-lacZ + ZIF 陽性細胞の割合が偶然生じる割合よりも有意に高いことが明らかとなった。この結果は、文脈依存的恐怖条件付け記憶を想起する際には、形成時に活動したのと同一の背側海馬 CA1 錐体細胞が再び活動することを示唆している。



B)　平成 21 年度から 22 年度までに、研究計画の項目 2)について研究を進めた。αCaMKII ノックアウトマウスのヘテロ変異マウスにおける作業記憶欠陥の脳内基質を同定するために、８方向放射状迷路を用いた作業記憶課題後の c-Fos や Arc などの最初期遺伝子群の脳内での発現を調べた。変異マウスでは、c-Fos の発現は歯状回ではほとんど完全に消失しており、海馬 CA1 と CA3、扁桃体中心核、内側前頭皮質においても顕著に減少していた。しかしながら、嗅内皮質や視覚野では差が認められなかった。arc プロモーターの制御下で dVenus を発現するトランスジェニックマウスを用いた免疫組織学的解析により、作業記憶課題後に誘導される arc 遺伝子の発現は、野生型マウスの歯状回において成熟した神経細胞にのみ認められた。これらの結果は作業記憶課題中の空間記憶プロセスに関わる神経回路の重要な手がかりとなると同時に、αCaMKII が歯状回神経細胞の成熟とその神経回路への統合に関与していることを示唆する。この結果は、Front. Behav. Neurosci. (2009)において公表した。



C)　平成 23 年度から 24 年度までに、研究計画の項目 3)について研究を進めた。学習時に活動した神経細胞集団の活動を人為的に再活動するために、tetO プロモーターの制御下で DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug) を発現するマウスを利用した。cfos-tTA x tetO-hM3Dq ダブルトランスジェニックマウスの作製を行い、このマウスを用いて Dox 非存在条件下において恐怖条件付け学習課題を行うことにより学習課題時に活動した神経細胞集団に hM3Dq の発現による標識を行った。翌日に CNO による人為的再活動を行い、本来ならば記憶が想起されない状況において恐怖記憶が人為的に想起されることを明らかにした。この結果を、生理研 研究会および第３３回日本分子生物学会年会ワークショップにおいて発表した。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)の結果は、似た内容の複数の論文が国外の研究グループより公表されたことからも、世界的にも注目度の高い研究であったことが示唆される。

研究成果の C)の結果は、半世紀以上もの間証明されていない心理学者 Donald Hebb により提唱された cell assembly 仮説を直接的に強く支持する結果であり、細胞・ネットワークレベルでの記憶情報の痕跡・実体を理解するための大きな手がかりとなる、極めて意義の高いものである。しかしながら、同様の方法を用いた同様の結果が MIT の利根川らのグループにより Nature 誌に報告された(Liu et al., Nature 484, 381-5, 2012)。このことは本研究が当該分野の新たな流れを作る画期的なものであることを示している。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画の1) については予備実験を進めた結果、関連した論文が国外の複数の研究室より公表されたため、現在、このシステムを活用した新たな実験系における研究を進めている。

研究計画の3) についても予備実験を進めた結果、研究代表者らが作製したマウスを利用したほぼ同様の内容の論文が米国の研究室より2012年に公表されたため、現在、このシステムを活用した新たな実験系における研究を進めている。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果により、記憶という目に見えない曖昧な現象の物質的基盤を神経科学的に解析する技術が確立し、記憶の本質の研究をさらに進める基盤となった。また、本研究を行う過程で、記憶はいったん獲得されれば永久不変のものではなく、流動的な側面が重要な役割を果たすことが明らかになりつつあり、今後の研究によりこれらに関する諸問題が解明されることが期待される。

公募研究：平成 23 年度-平成 24 年度

ショウジョウバエ求愛行動を環境適応的に制御する嗅覚系神経分子機構

研究代表者：江島亜樹 [1)]

1）京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニット

＜研究の目的と進め方＞

私たちは自身を取り巻く複雑な環境からどのように必要な情報を得、応じた行動判断を行っているのか？ 有性生殖を行う多くの動物にとって配偶者選択は重要な問題であり、オスは、メスに気に入られるために、あらゆる感覚を駆使して情報収集を行い、アプローチを調整している。

モデル動物のひとつであるショウジョウバエでは、その豊富な遺伝ツールを用いた研究により、オスが嗅覚を使って相手のフェロモンを識別し、求愛を開始するかどうかの行動決定を行う事が分かってきたが(江島2009)、求愛開始後のパフォーマンスの「質」がどのように維持・制御されているのかという点についてはほとんど注目されていなかった。

ショウジョウバエオスは、同種のメスに出会うと、歩き回るメスを追いかけながら、羽をふるわせて求愛歌を奏でる。メスは、この歌を気に入れば徐々に歩くスピードを落とし、オスの求愛を受け入れ交尾に至るが、歌がヘタだったり、パターンの異なる別種のものだった場合は、メスは求愛されても交尾を受け入れない。また、歌うためのオスの羽を切り取ると、交尾成功率は著しく低下するが、この時、録音した求愛歌をスピーカーからながすと、メスは羽を切られたオスとも交尾をするようになる（図1、Bennet-Clark et al. 1967, Schilcher 1976, Kyriacou & Hall 1984, Crossley 1995)。

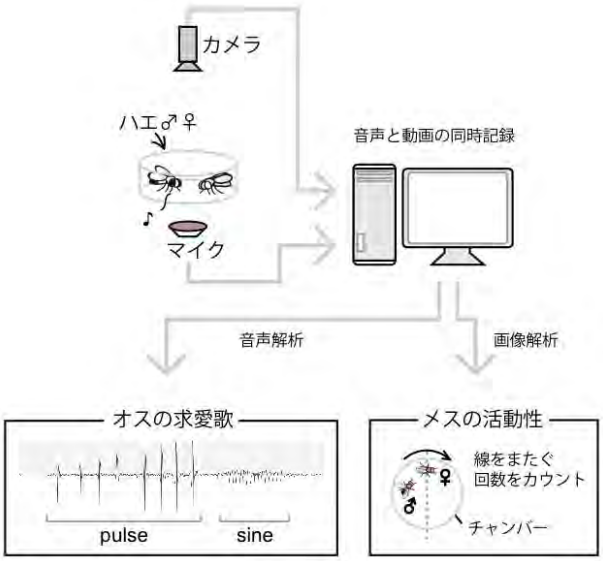
＜研究計画＞

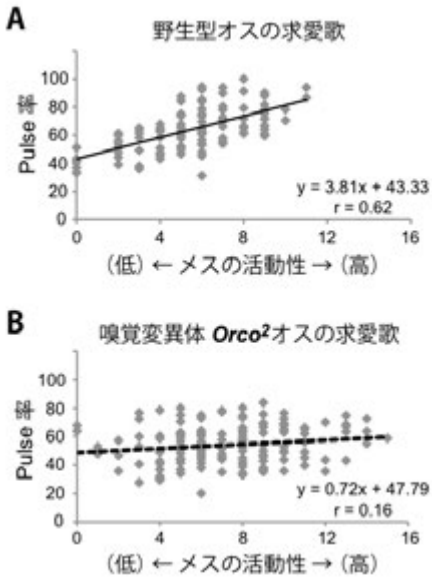
1）オスの求愛歌プロファイルとメスの活動性の同時記録アッセイを行い、オスがいつ、どのようにパルス・ソングとサイン・ソングを奏でているのか調べる。

2）歌の開始時間を0として前後3秒間における二個体間の距離を計測し、パルス・ソングとサイン・ソングのそれぞれの歌開始の時の距離の変化を解析する。

3）感覚変異体オスを用い、求愛歌プロファイル制御に必要な感覚刺激を同定する。

4）求愛歌プロファイルに異常のある変異体オスの交尾成功率を測定し、歌プロファイル制御がメスの配偶者選択に寄与しているのか確認する。

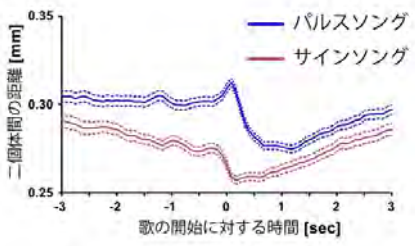




＜得られた研究成果＞

A）求愛歌プロファイルは、全体の歌のうちのパルスソングの割合（Pulse 率）として表し、メスの活動性は、チャンバーの中心線をまたいだ回数として 30 秒ごとのデータをプロットしたところ（図 3A)、メスの活動性が高い時には主にパルス・ソングを、低い時にはサイン・ソングが多く歌われる事が分かった。

それぞれの歌の開始時間を0として前後3秒間における二個体間の距離を計測したところ（図 4)、パルス・ソング（青線）は距離が離れる時に歌われ、サイン・ソング（赤線）は距離が小さくなる時に歌われていた。つまり、オスは「性的受容性が低く逃げて行くメス」には音の大きいパルス・ソング、「性的受容性



が高まり活動性を低下させた近くのメス」にはささやきサイン・ソングという柔軟な歌い分けをしている事が初めて明らかになった。

B) オスはどのようにメスの動きを知るのか？野生型オスは、暗闇条件下でも図 3A のような活動性に応じた歌い分けができる事から、視覚は必須でない事が示唆される。次に、嗅覚の関与を調べるために、嗅覚変異体 Orco2 のオスを野生型メスとペアリングし、求愛プロファイルと活動性の同時記録を行ったところ、嗅覚変異体オスはメスの活動状態に関わらずいつも同じパターンの歌を奏でる事を明らかにした(図 3B)。

また、求愛意欲を測定する別のアッセイにより、この嗅覚変異体 Orco2 のオスは、フェロモンを正しく識別できない事が確認された。以上の事から、オスは、フェロモンによってメスまでの距離もしくはメスの活動性を推定し、相手メスの性的受容性に応じて求愛パターンを変化させている事が示唆された。

C) 次に、このメスの反応に応じたオスの歌プロファイル制御が、メスの交尾受容の決定に影響を及ぼすのかどうか、これらのオスを野生型メスとペアリングした時の交尾成功率を測定した。嗅覚変異体 Orco2 のオスは野生型オスに較べて交尾成功までの時間が長く、30 分間の観察時間内の交尾成功数も有為に少なくなった。羽を切除した”歌えない”野生型オスと変異体オスの場合は、両者の交尾成功率の差が見られなくなる事から、メスの選択性は歌の質の違いを反映していると考えられる。つまり、メスの性的受容性に応じて求愛歌プロファイルを変化させるというオスの柔軟な求愛アプローチが、メスを「その気」にさせる役割を果たしていると考えられる。

以上の結果をまとめ、学術論文として発表した(Trott et al. 2012 PLoS ONE)

＜国内外での成果の位置づけ＞

学術論文として発表した成果は世界でも例のない報告となり、当該分野の新たな流れを作るきっかけになるものと予想される。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

メスの匂いがどのような匂い受容体で受理されオスの求愛プロファイル制御に関与するのかを明らかにする必要がある。現在までのところ、確定的なメスフェロモン特異的匂い受容体は同定されておらず、包括的かつ網羅的解析が必要である。その上で、嗅覚神経の活動がどのように求愛歌サブタイプを変化させているのか解剖学的および生理学的解析が待たれる。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果により、オスの求愛歌のサブタイプの意義が初めて明らかとなった。メスの匂いがどのように受容され距離の推定に利用されているのか明らかにするため、受容体神経の同定、神経活性のリアルタイムイメージングなどを行うことで、これが解明されることが期待される。

公募研究：H21 年度-H24 年度

線虫 *C. elegans*の匂い応答行動を制御する神経ネットワークの統合的解析

研究代表者：木村　幸太郎 [1)]

1）大阪大学大学院理学研究科

＜研究の目的と進め方＞

動物が生存・繁殖を行うためには、エサ・敵・異性などに関するさまざまな感覚刺激を受容し、それら刺激からの情報を適切に処理して応答行動を実行する必要がある。このような感覚応答行動を行うために、脳・神経系では感覚ニューロンから運動ニューロンに至る多階層の神経ネットワークを介した情報処理が行われている。すなわち、感覚応答行動を制御する神経ネットワーク活動の解明は、全ての動物に共通する脳・神経系の動作原理の解明にもつながり得る。しかし、高等動物においてはその脳・神経系が極めて複雑であるために、個々のニューロン間における活動の伝達がどのように個体レベルの行動の制御に反映されるのかを理解する事は困難である。

線虫 *C. elegans* は、全てのニューロンの接続様式が全て明らかになっている事・さまざまな遺伝学的解析手法が整っている事・体が透明であるために光学的手法による細胞活動の測定（カルシウムイメージングなど）や細胞活動の制御（光遺伝学的解析）に適している事、平面上を比較的低速に移動するために行動パターンの解析が容易であるなどの理由から、感覚応答行動を制御する神経ネットワーク活動の新たな原理を解明するモデルとして非常に適している。

我々は、*C. elegans* の新たな感覚応答行動を制御する神経ネットワーク活動を明らかにするために、*C. elegans* の感覚応答行動を探索した。その結果、*C. elegans* を嫌いな匂い 2-ノナノンで事前に刺激すると、2-ノナノンに対する忌避行動が増強されるという興味深い神経機能を発見した（図１）。さらに、この機能がわずか左右一対の介在ニューロン RIC へのドーパミンの作用によって制御される事などを明らかにした（Kimura KD, Fujita K, Katsura I. J. Neurosci., 2010）。

本研究ではこの興味深い2-ノナノン忌避行動を制御するニューロン活動を明らかにすることを目指した。具体的には、(1) *C. elegans*行動の高精度測定と行動パターンの定量的解析、(2) 行動時の2-ノナノン濃度変化の測定、(3) 行動時の*C. elegans* ニューロンの活動を人為的に制御できる光遺伝学実験系の開発、(4) 自由に行動する*C. elegans*を任意の匂い刺激で刺激しながらニューロン活動を測定し、操作できる統合型顕微鏡の開発、(5) 得られた結論を検証するためのコンピュータモデルの作成、を行った。その結果、わずかな匂い濃度の変化に応答する感覚受容経路に行動が制御される事により、「進行方向の選択」が行われていると考えられる事が明らかになった。

＜研究計画＞

1) *C. elegans*行動の高精度測定と行動パターンの定量的解析

直径9cmの寒天培地上の*C. elegans*の忌避行動を高解像度カメラで毎秒毎に撮影し、その行動パターンを明らかにすることを目指した。

2) 行動時の2-ノナノン濃度変化の測定

行動アッセイ条件下の気相中の2-ノナノン濃度を測定し、*C. elegans*の行動パターンと匂い濃度の相関を明らかにすることを目指した。

3) 行動時の*C. elegans*ニューロンの活動を人為的に制御できる光遺伝学実験系の開発

近年注目されている「光遺伝学的手法」によって特定のニューロンの活動を人為的に制御し、ニューロン活動パターンと個体行動との関連を明らかにすることを目指した。

4) 自由に行動する*C. elegans*を任意の匂い刺激で刺激しながらニューロン活動を測定し、操作できる統合型顕微鏡の開発

橋本浩一教授（東北大学）との共同研究により、新たな統合型顕微鏡を開発し、「バーチャル」な匂い勾配上での *C. elegans* 行動およびその際の神経活動を測定する事を目指した。

5) 得られた結論を検証するためのコンピュータモデルの作成

以上の研究から得られた結果に基づいて、2-ノナノン忌避行動時における情報処理モデルを作成し、妥当性を検討した。

＜得られた研究成果＞

1) *C. elegans*行動の高精度測定と行動パターンの定量的解析（平成21～23年度）

従来から行っていた *C. elegans* の行動パターンの定量的解析をさらに研究を進めた結果、以下が明らかになった。

① *C. elegans* の 2-ノナノン忌避行動は、頻繁に方向転換を行う

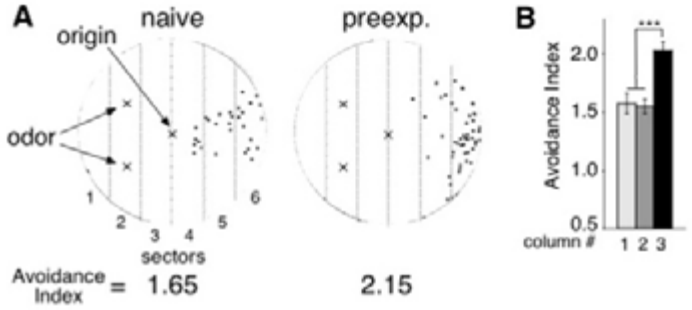


図１：*C. elegans* のノナノン忌避行動の増強。A, 12 分のアッセイ後の *C. elegans* の位置。Avoidance index は、中心線からの *C. elegans* の距離の平均。B, 事前刺激の条件による avoidance index。左から naive（事前刺激なし）、mock（事前刺激と同じ操作だがノナノン無し）、preexp.（ノナノン事前刺激有り）。Kimura et al., J. Neurosci., 2010 より改変。

pirouette と、直進する run という２つの状態に分けられる。

② 通常の *C. elegans* の化学走性行動においては、pirouette 直後は化学刺激勾配に関わらずランダムな方向に進行するが、2-ノナノン忌避においては正しい方向（この場合は匂い刺激から遠ざかる方向）に進行することが多かった。

これらの結果は、2-ノナノン忌避は従来知られていた *C. elegans* の行動パターンとは異なり、何らかのメカニズムにより「正しい方向」を判断している事が示唆された。

2) 行動時の2-ノナノン濃度変化の測定（平成22～23年度；本新学術領域研究計画班員・岩崎唯史博士（茨城大）との共同研究）

上記(1)の「正しい方向の判断」と匂い刺激との関連を理解するために、匂い勾配の計測を試みた。9cm プレートのような比較的微小な空間において匂い勾配を計測する事は困難であると考えられていたが、我々は精度高く匂いの空間勾配を計測する事に成功した。これにより、2-ノナノン忌避行動中の行動の状態は匂い濃度の変化に相関している事が明らかになった。この頃、マイクロ流体装置内に拘束された *C. elegans* を、2-ノナノン飽和水溶液によって刺激すると、特定の感覚ニューロンが濃度低下時に活性化（OFF 応答）する事が、他グループから報告された(Ha et al., Neuron, 2010)。これらの事から、*C. elegans* が 2-ノナノン勾配を下る方向に進み始めるとこの感覚ニューロンが活性化され、run が引き起こされる可能性が示唆された。

3) 行動時の *C. elegans* ニューロンの活動を人為的に制御できる光遺伝学実験系の開発（平成 21～23 年度）

簡便に光遺伝学的手法により特定ニューロンを活性化するための装置を開発した(Kawazoe et al., Neurosci. Res., 2013)。この装置を用いて特定の感覚ニューロンの活動を制御することにより、*C. elegans* の行動パターンを予想通りに制御できることを示した。

4) 自由に行動する *C. elegans* を任意の匂い刺激で刺激しながらニューロン活動を測定し、操作できる統合型顕微鏡の開発（平成 23～24 年度；本新学術領域研究公募班員・橋本浩一博士（東北大）との共同研究）

C. elegans において、「匂い刺激」「神経ネットワーク活動」「応答行動」の３つの階層の関連を、高度に定量的に理解するために、自由に行動する *C. elegans* を任意の匂い刺激で刺激しながらニューロン活動を測定し、操作できる統合型顕微鏡の開発を行った（図２）。この統合型顕微鏡によって 2-ノナノン忌避行動を解析した所、以下が明らかになった。

① わずかな匂い濃度の変化により、*C. elegans* の行動パターンの変化が誘導されること。

② この濃度変化に応じて、複数の感覚ニューロンが活性化される事。

③ これらの感覚ニューロンの活動を光遺伝学的手法によって制御すると、2-ノナノンに対する応答行動が変化すること。

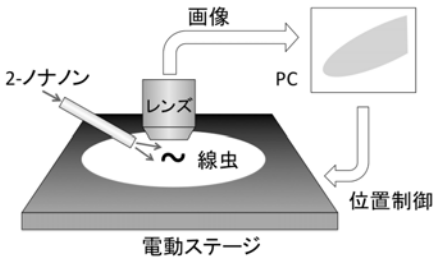


図２：統合型顕微鏡の概略図

5) 得られた結論を検証するためのコンピュータモデルの作成（平成 24 年度；本新学術領域研究計画班員・飯野雄一博士（東京大）との共同研究）

以上の結果から、*C. elegans* の行動に伴って感ずる 2-ノナノン濃度がわずかに変化すると、方向転換頻度が変化し、これによって「正しい方向への進行」が引き起こされるというモデルが考えられた。コンピュータシミュレーションにより、上記のモデルによって「正しい方向への進行」が説明される事が示された。

なお、上記の研究成果の多くは、１つの論文として現在投稿中である。

＜国内外での成果の位置づけ＞

今回見出した *C. elegans* の行動パターンは全く予想外の結果であった。２０世紀前半から、「微生物や小型小動物の刺激に対する応答行動は主に、化学物質の時間変化に応答してランダムな方向転換を行うことで非効率的に目的地に向かう（klinokinesis）か、サインカーブ状またはらせん状の周期的な動きを刺激の変化に連動させる事で徐々に進行方向を修正する(klinotaxis)か、のいずれかである」と考えられてきた。また、同様に小型のモデル動物であるショウジョウバエの幼虫では「作業記憶」を用いて同程度の確からしさで方向を選択していると考えられている。しかし、本研究対象では全く新たな情報処理により高度な感覚応答行動を実現できる事が明らかになった。

さらに、研究成果(4)で確立した統合型顕微鏡は世界でも例のない報告となり、匂い勾配の測定方法と合わせて、シンプルな神経回路を持つ *C. elegans* の感覚応答研究に新たな流れを作るきっかけになるものと予想される。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究当初は、感覚ニューロンから下流の介在ニューロンに至る「ネットワーク」の解析を行う予定であったが、感覚ニューロンの解析にとどまってしまった。しかし一方で、統合型顕微鏡を開発できた事により、この分野の研究をリードできるようになったことは非常に大きな収穫である。また、感覚ニューロンの活動だけでも、*C. elegans* の2-ノナノン忌避行動を十分説明することができた。

＜今後の課題、展望＞

本研究の成果として、神経ネットワーク活動を解析するモデル動物 *C. elegans* の匂い応答行動を全く新たなレベルから定量的かつ統合的に解析するための技術が確立できた。これにより、神経ネットワークというシステムの挙動、また記憶・学習による神経ネットワーク活動の変化の研究を独自の角度から協力に押し進める基盤となった。

細胞膜電位の時空間制御と同時計測

研究代表者：筒井秀和

1）大阪大学大学院医学系研究科

＜研究の目的と進め方＞

神経回路網を行き交う電気信号を時空間計測（可視化）する事を目指している。これまで、ホヤゲノムから発見された電位センサー蛋白質や、独自に開発したFRET（蛍光共鳴エネルギー移動）レポーターを巧みに組み合わせ、従来にない優れた性能を持つ膜電位プローブを開発し、培養哺乳類神経細胞における単一発火の検出などに成功してきた。活動している神経回路において適用し、その動作原理に迫ろうとするには、今後さらなる技術的革新が必須である。本研究においては、膜電位の可視化技術に関して、以下に示すような、主に4つの方向において進展させることを目指した。

＜研究計画＞

１）　ゼブラフィッシュ心臓の膜電位動態の非侵襲可視化。in vivoでの膜電位計測、特に動きのある標本に対する計測技法の確立を行うために、過去に開発した膜電位プローブMermaidを用いて、ゼブラフィッシュ心臓の膜電位動態を無麻酔・非拘束で非侵襲的に計測する事に取り組む。ゼブラフィッシュは、遺伝子操作技術が確立されている事、幼魚では細胞や組織の観察が生きたまま可能な事、発生が速く進む事、飼育コストが比較的安い事、等々のモデル脊椎動物としての利点を持ち、それらは心臓研究においても発揮されてきた。また、近年は、損傷後に再生がおきる事や、個体を用いた大規模スクリーニングへの適合性などのユニークな点にも注目されてきている。このように、計測技法の確立という以外の点でも大きな意義を持つと期待された。

2）　電場誘起電位に基づくプローブ評価法の開発。神経系に適応するにためには、より優れた特性を備えた膜電位プローブの開発が望まれる。膜電位プローブを論理設計のみで開発することは難しく、僅かな変異や設計の変更はしばしば予期せぬ効果を持つ。したがって膜電位プローブの特性を向上させるには、多数の候補プローブの特性を効率よく、迅速に評価する必要がある。電気生理学的測定は正確な計測が可能であるが多数のサンプルには適していない。そこで細胞外電場に対する誘起膜電位（field-induced potential）の空間分布を利用した効率的な評価法を確立する事に取り組んだ。

3）　電位センサードメインの状態遷移機構。電位センサードメインが膜電位変化に応じて、どのような構造変化を引き起こすのか、全貌は明らかとなっていない。その理解は、膜電位の時空間計測へも活かせる可能性がある。従来、膜電位変化はS4の下流のエフェクターを制御すると考えられてきたが、本研究ではS1の上流へも作用する可能性を検証した。

4）　膜電位プローブの高速・高感度化、など。上記で取り組むプローブ評価法や電位センサードメインの状態遷移などに関する知見を最大限活用し、膜電位プローブの高速・高感度化に取り組む。波長特性を長波長側にシフトさせたプローブ分子の創出などにも取り組み、オプトジェネティクス技術との併用を可能にする事までを本研究の最終目標とした。

＜得られた研究成果＞

1）　ゼブラフィッシュ心臓の膜電位動態の非侵襲可視化。心筋細胞で特異的に膜電位プローブ Mermaid を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作成した（図 1,2）。標本には受精後 70-80 時間後の胚を用いた。ガラスボトムディッシュ上に寒天で小さな凹みをつくり、その中で泳がせ、腹側から観察した。この時期の胚の泳ぎは間欠的であるため、無麻酔、非拘束という極めて生理的な状態で心臓の膜電位動態を見る事が出来た。計測には CCD カメラを２台用い、対物レンズ後にビームスピリッタを置き、独立した決像レンズを用いる事で、ドナー、アクセプターの１次像を同時に～40 フレーム/秒で取得した。相互相関を元に位置ズレを修正する処理ルーチンも開発した。4～5Hz で起きる収縮サイクルにおいて、最初の脱分極は心房と血管の境界部付近で起こり、それが心室へと伝播していくようなレシオ画像の時系列が見えた（図 3）。モーションアーティファクトなど、偽陽性信号有無を調べるために、 電位センサードメインの第一セグメントにアミノ酸置換（D129R）を含み、電位依存性が消失している変異体を発現したトランスジェニックゼブラフィッシュも同様に作成した。心収縮を観察すると、今度はほとんどレシオ変化がみられず、cmlc2::Mermaid のレシオ変化の大部分は膜電位を反映したものであるとわかった（図 4）。

アステミゾールという、第二世代のヒスタミンＨ１受容体拮抗薬がある。QT 延長などの副作用を持つことが明らかとなり市場撤退した薬物で、ゼブラフィッシュに投与した場合も心臓の機能障害を引き起こす事が知られている（但し、薬理作用も同一かについてはまだ解明されていない）。アステミゾール投与が膜電位動態に与える影響を調べた。投与前は前述同様、心房-血管の接合部から心室に膜興奮の正常な伝播が観察された。アステミゾール投与後、心室の収縮が欠如している状態においては、驚くべき事に、最初の電気的興奮が、心房、心室の境界付近で発生し、心房方向に逆伝播しているような結果が得られた。投与前の正常な収縮サイクルでは、心房-心室境界部、及び、心室での蛍光レシオのピーク時間は、心房でのピーク時間に比べて、それぞれ、57 ± 6.2 ミリ秒、及び、85 ± 6.2 ミリ秒　“遅れて”いた。これに対し、アステミゾール投与後の、心室収縮が阻害されている心臓では、52 ± 4.9 ミリ秒、及び　95　± 4.3 ミリ秒“進んで”いた（n=5, 平均値 ± 標準誤差）。このように、mermaid を用いた膜電位イメージング技術を用いて、ゼブラフィッシュの心臓の薬剤誘発性心機能障害における異常な興奮伝播のモードが明らかとなった。前述のように、ゼブラフィッシュの心臓は、心臓機能に関わり、哺乳類のものと相同性の高い重要な分子を多く発現しながら、低コスト、高い透明性、遺伝子操作性、マイクロウェルに収まる“小ささ”、などを兼ね備えた優れた材料である。また、損傷後の再生が起きる事は特有の現象で、興味深い。拍動している心臓の電気発動を“見える”ようにすることで、心臓の生理、発生、薬理学の発展につながることが期待された。この研究は理化学研究所、生理学研究所と共同で行い、結果は、Journal of Physiology 誌に発表した。

図1

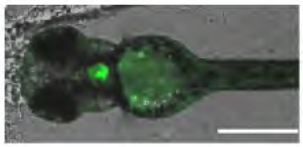


図2

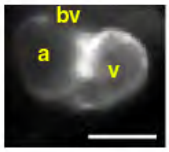


図3

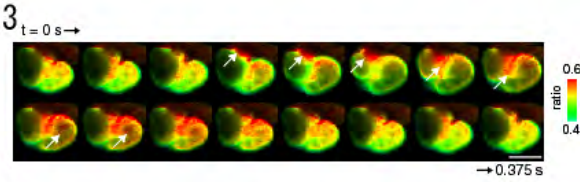
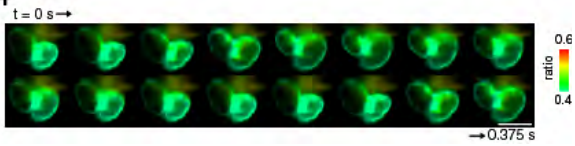


図4



（図１)作成したトランスジェニックゼブラフィッシュの FRET ドナー蛍光像。（図２)心臓の蛍光像 a; atrial v; ventricle; bv; blood vessel。（図３) 心臓における蛍光レシオ画像。拍動１周期について示してある。赤い領域は脱分極している事を示す。（図４)D129R 変異体の場合における蛍光レシオ画像。Bar = 0.5mm (図１), 0.1mm（図 2-4）

2)　電場誘起電位に基づくプローブ評価法の開発。細胞外に電場をかけることで誘起される電場誘起電位（“field-induced potential”）の空間分布を利用することで、電気生理学的な計測を行うことなく、候補プローブの定量的な特性を効率的に調べる手法を確立した。N2a 細胞（マウス神経芽腫由来細胞株）を用い、電場印加に対する光学信号の電極との角度依存性を解析する処理ルーチン等も開発した。実際のプローブ分子が「感じる」のは、field-induced potential 静止膜電位が加わったものであるが、細胞ごとの静止膜電位のばらつきが問題となった。安定的に内向き整流性カリウムチャネルを発現する細胞株を作ることで、この問題を解決した。単一の電場パルス で、電位依存性や細大応答などが、約 10 mV 程度の誤差範囲のもと、効率的に解析できるようになった。この方法を用いる事で、例えば、電位センサードメイン上において、膜電位プローブの電位依存性に影響を与えるアミノ酸変異などが発見された。結果は、Gordon Research Conference などで発表し、現在、論文投稿中である。

3)　電位センサードメインの状態遷移機構。従来、電位センサードメインが、その構造変化を伝える主要な部位は S4 の下流と考えられていたが、FRET レポーターを S1 の N 末側に付加したコンストラクトの光学信号を上記の電場を印加する手法を用いて解析したところ、予想に反して、FRET 効率の変化が検出された。同様の結果はツメガエル卵母細胞の発現系での膜電位固定実験も得られた。同様の現象はテトラメチルローダミンの環境依存性に基づく計測法によっても観察され、一般的に観察される現象であることを示していた。これらの結果は、電位センサードメインの状態遷移による構造的摂動は S1 の上流にも及びうる事を初めて実験的に示すものであり、電位依存性チャネルの動作原理を考える上でも重要な知見となり得る。また、膜電位プローブの設計に活用できる可能性もある。結果は、学会などで発表し、現在、論文投稿中。

4)）　膜電位プローブの高速・高感度化、など。上記の、電位センサードメインの構造遷移に関する新しい知見を元に、S1 の上流、S4 の下流にそれぞれ FRET ドナー・アクセプターを配置し、リンカー長などを最適化することで、高速・高感度型の膜電位プローブ、Mermaid2 を得た。哺乳類細胞での性能は、過去に開発した Mermaid に比べて、信号変化量で１．８倍、応答速度で７．７倍向上していた。時間平均加算することなく、150 Hz までのスパイク列において個々のスパイクを分解する事、海馬神経細胞における単一スパイクや閾値下の膜電位現象を捉える事、そしてマウス大脳皮質における聴覚刺激に対する応答を時間平均加算することなく可視化する事などに成功した。結果は、学会などで発表し、現在、論文投稿中。

＜国内外での成果の位置づけ＞

ゼブラフィッシュ心臓の膜電位動態の可視化は、蛋白質性の膜電位プローブを動物に遺伝的に組み込み、in vivo で興奮性組織の電気信号を計測した初めての成功例となった。また、電場誘起電位を利用した光学信号の高効率アッセイ系、電位センサードメインの状態遷移機構に関する新しい知見の発見は共に、内外を通して類の見ない、ユニークな成果である、さらに、これらの成果は、膜電位プローブの高速・高感度化へと繋がった（Mermaid2 の開発)。電位センサードメインと蛍光レポーターを組み合わせた電位プローブが内外から複数発表されるようになってきたが、その中でも Mermaid2 は唯一、大きな応答性と速い時定数を兼ね備える。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

上述のように、プローブの高速評価表、電位センサードメインの状態遷移機構、といった基礎的な事項に多くの時間を割いた事で、本研究課題の最終目標である、オプトジェネティクス技術との併用までは達成できなかった。しかしながら、その基盤は整いつつある。今後、十分に進めていく事が出来ると考えている。

＜今後の課題、展望＞

これまで多くの動物種から、電位依存性フォスファターゼに由来する電位センサードメインの単離を行ってきた。確立した光学信号の高効率アッセイ系を利用して、その特性の種多様性について明らかにする。結果を元に、最適な電位センサーを用いる事により、現在の Mermaid2 を、さらに高速・高感度化できると考えている。マウス大脳皮質もしくは小脳における自発的、刺激誘発性の電気活動等を高解像度で解析することなども目指す。また、電位センサードメインの状態遷移機構の詳細を解明する事は、膜電位の時空間計測技術の開発に繋がる可能性があるばかりでなく、イオンチャネルなど電位センサードメイン蛋白質の機能発現を分子レベルで理解する上でも重要である。これまでに S4 のみならず、S1 においても構造変化の可能性がある事を発見してきたが、独自に開発する分光法を用いることで、膜貫通セグメントの回転運動など、状態遷移機構のより詳細に迫る事も目指す。これまで電位センサードメインの状態遷移の光学検出というアプローチで膜電位の可視化法の研究を行ってきた。この方向性は今後も追及してゆくが、それ以外に、まったく新しい検出原理の探求を続けることも常に視野に入れておきたい。

公募研究：2009 年度-2010 年度

生得的および経験的な食嗜好の形成・個体行動・神経・分子の視点から

研究代表者：尾崎まみこ [1)]

1) 神戸大学大学院理学系研究科生物学専攻

＜研究の目的と進め方＞

動物は環境からの多様な入力を感覚器で受容し、神経回路で適切な情報処理を行い、最適な行動を出力することによって生存する。特に、採餌行動や摂食行動を出力するさいには、吟味すべき食物源の化学成分に起因する味と匂いの情報処理が重要となる。

実験モデル昆虫、キイロショウジョウバエを中心に味覚と嗅覚の感覚受容システム、および、その後の情報処理に関わる神経系が次々と明らかになってきているが、これら異なる化学感覚モダリティーの情報統合に関する研究は遅れているのが現状である。

我々はこれまでに、訪花・吸蜜昆虫であるクロキンバエ（Phormia regina）を使って、約50種類の花香存在下でのショ糖水溶液に対する摂食閾値濃度の変化を測定し、食欲を様々に左右する匂いを部類分けする同時に、花香に含まれ、かつ、典型的な食欲変動の原因となる匂いの化学成分を特定した。

そこで、本研究では、食欲を増進させる1-octen-3-ol臭や、食欲を減退させるD-limonene臭を受け取る嗅覚受容神経に端を発する嗅覚情報処理の神経回路と、味覚受容神経に端を発する味覚神経回路において、味覚と嗅覚のモダリティーの異なる化学情報処理のために、神経経路どうしがどのように関わる可能性があるかを調べることを目的に研究を進めることとした。

＜研究計画＞（年度ごとに分けても結構です）

1) 食欲を増進させる匂いと減退させる匂いの、入力嗅覚器官の決定、および、食欲を変動させる味覚・嗅覚情報統合の偏則性についての研究、考察を、行動実験を中心に行う。
2) 食欲を上昇させる匂いと減退させる匂いの、入力嗅覚器官ら、嗅覚受容神経の順行性染色をおこない、摂食行動の初動運動である吻伸展反射を誘発する味覚神経からも順行性染色をおこなって、両者が互いに近傍で投射する領域において、相互作用がおきていることを、形態学的に明らかにする。
3) 食欲を上昇させる匂いや減退させる匂いの刺激を共存させたときに、味覚感覚神経から吻伸展反射が起きる神経経路の活動に予想される増強が起きることを、電気生理学的あるいはイメージングの技術によって証明する。

＜得られた研究成果＞

A) 平成 21 年度から 22 年度までに、研究計画の項目 1)について研究を進め、クロキンバエの食欲を増進させる匂いとして、D-limonene、減退させる匂いとして 1-octen-3-ol を特定して、それぞれの匂いが、触角とマキシラリパルプから入力した時に初めて、対応する食欲変動を起こすことができ、その逆は成り立たないことを証明し、国際学会で発表した(Maeda et al., European Symposium of Insect Taste and Olfaction, 2011)。

B) 研究計画の項目 2)については、特に、食欲を増進する匂いの入力器官として新たに特定したマキシラリパルプに注目して、マキシラリパルプス由来の嗅覚受容神経から蛍光色素を導入し順行性染色を施行した結果、マキシラしパルプの嗅覚受容神経が、唇弁神経経路を触角葉へ乗降する神経束から分岐して食道下神経節へと投射していることが分かった。触角葉は、以前より昆虫の嗅覚一次中枢とて知られ、食道下神経節は味覚の一次中枢として知られていた。食欲増進の匂い情報が入力するマキシラリパルプス由来の嗅覚受容神経が、味覚一次センター-である食道下神経節に投射していることがわかったので、さらに、味受容神経からも蛍光色素を導入して 2 重染色を施し、互いの神経が相互作用する可能性を提示した（図１）

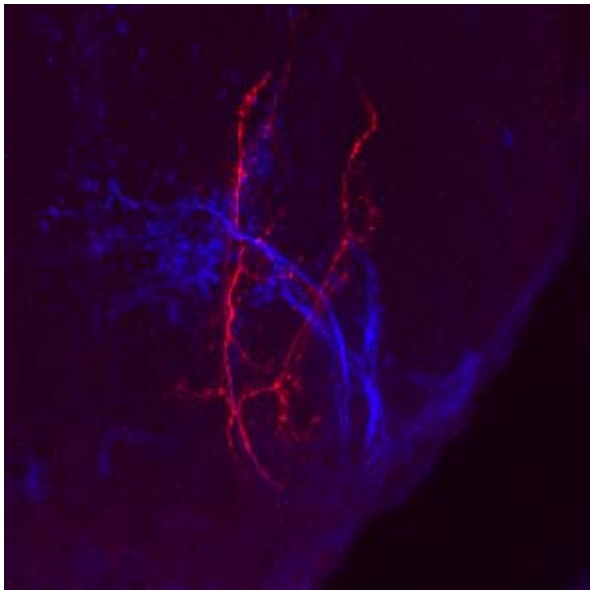


図１　マキシラリパルプスからの嗅覚受容神経順行性染色（青色）と味覚感覚子からの順行性染色（赤色）、両神経は、味覚一次中枢として知られる食道下神経節において、互いに極めて近傍で走行し、所々で、相互作用をしている可能性が示唆された。

この成果は、国際会議で発表した（Maeda et al., International Symposium of Olfaction and Taste, 2012)。

＜国内外での成果の位置づけ＞

この研究成果は世界でも例のない報告となり、味覚・嗅覚情報統合の研究の新たな流れを作るきっかけになるものと予想される。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画の3) については、時間が足りなかったため、2年間の研究助成期間内には手を付けることができなかった。

＜今後の課題、展望＞

研究計画3) を完遂することが急務である。

公募研究：平成 21 年度-平成 24 年度

ショウジョウバエの摂食行動における意思決定の行動遺伝学的解析

研究代表者：谷村　禎一

九州大学大学院・理学研究院・生物科学部門

＜研究の目的と進め方＞

生物の行動は、遺伝的にプログラムされた本能的行動の側面と、学習や環境に応じて適応的に変化できる可塑的な側面から成り立っている。本研究はショウジョウバエの「摂食行動における意志決定(decision making)」として後者の観点から取り上げる。摂食行動において糖とタンパク質をどのようなバランスで摂取するかはすべての動物にとって重要な意志決定事項である。糖はエネルギー代謝に必要であるが過剰な摂取は生体にとって好ましくない。アミノ酸は生体のタンパク質の新生のために、特にメスでは、生殖（卵形成）にとって必須である。近年の研究によってショウジョウバエは、食行動と体内環境の恒常性の諸問題を研究するのに適した実験材料であると認められるようになってきた。本研究ではまず、糖の栄養価をショウジョウバエが学習できることを明らかにした。甘いが栄養価がない糖を摂食しても意味がないように、味覚情報に依存して摂食を行うのは必ずしも生体にとって好ましくないことがある。そこで、糖の栄養価学習実験を行った。

行動実験により、ショウジョウバエは数種のアミノ酸溶液を識別して摂食し、さらにアミノ酸欠乏状態に置かれたハエはアミノ酸の摂食量が増加することがわかった。本研究では、アミノ酸を受容する味細胞と受容体分子を同定し、摂食量の可塑的な変化がどのような神経・分子メカニズムによっているのかを解明するために、アミノ酸に対する嗜好性が内的な栄養状態でどのように変化するのかを解析した。これらの研究は行動を支える神経系機能の適応的な可塑性というユニークな視点を提示するものである。

＜研究計画＞

1）糖の栄養価学習

動物が食物の栄養価をどのように判断して食べているのかはまだよくわかっていない。人間は栄養学の知識なしで、自分にとって必要な栄養素を選んで食べることができない。食行動には味覚による判断が重要だが、甘いものがすべて栄養になるわけではない。ハエは跗節の糖刺激によって吻伸展反射が生じて摂食行動が開始される。しかし、摂取した糖の栄養価が体内で判断され、摂食を続けるかをコントロールしている可能性を検討した。

2）アミノ酸に対する味覚感度の可塑的変化

行動実験からショウジョウバエがアミノ酸を識別して摂取していることがわかっているが、どの味細胞がそれを担っているかは不明である。唇弁および跗節の味覚感覚子はアミノ酸に応答しないことがわかっている。刺激効果があるアミノ酸は数個しかないが、複数のアミノ酸を組み合わせ溶液が効果あることが最近わかったので、この側面からも電気生理学的解析を進める。また味覚受容体である Gr 遺伝子ファミリーの中でアミノ酸受容体として機能しているものがあるかを検討する。現在、候補 Gr 遺伝子を強制発現させてアミノ酸応答の変化を調べる。

交尾後の摂食行動の変化は SP(sex peptide)の作用による。SP は交尾によって雄から雌に移行し、交尾拒否、摂食量の増大などの行動変化をもたらす。メスにおけるアミノ酸の嗜好性が交尾によってどのように変化するのかを解明する。

＜得られた研究成果＞

A)　糖の栄養価学習

体内における栄養価評価システムの存在を証明するために、ショウジョウバエが D-ソルビトールの栄養価を匂いと関連づけて学習できるかを調べた。学習の成立には、15 分ほどの間隔をおいた繰り返しの試行が必要であることがわかっている。一方で、ハエは摂食して満腹になると学習が抑制されることが知られている。その抑制は、最近われわれが報告したように少量の糖の摂取によっても引き起こされるので、学習の試行の際には低濃度の糖を用いて摂食時間を短くする必要があった（図 1）。D-ソルビトール寒天溶液に匂い A、水寒天溶液に匂い B をつけて、10 分間食べさせてから 1 時間絶食させるという試行を 4 回繰り返した。匂いと糖-水との組み合わせを替えて実験を二通り行った。その後、2 種類の匂いのどちらを選ぶかを T メイズテストで調べたところハエは D-ソルビトールと組み合わせた匂いの方をより多く選んだ。この結果はショウジョウバエが栄養価を学習できることを示している。以上の結果は、国内外の学会で発表し、論文として公表した(Fujita and Tanimura, 2011)。ショウジョウバエの摂食行動は単に味細胞からの情報によって支配されているのではなく、味細胞の情報がなくても栄養価がある物質を摂取できる能力があることを示している。

では体内の栄養素のモニターはどのような仕組みによるのだろうか。最近、Miyamoto らは、味覚受容体遺伝子(Gr)のひとつである Gr43a が前大脳のニューロンで発現しており、体液中のフラクトース濃度に応答することを報告した。したがって、D-ソルビトールは体内でフラクトースに変換され Gr43a によって受容されている可能性がある。

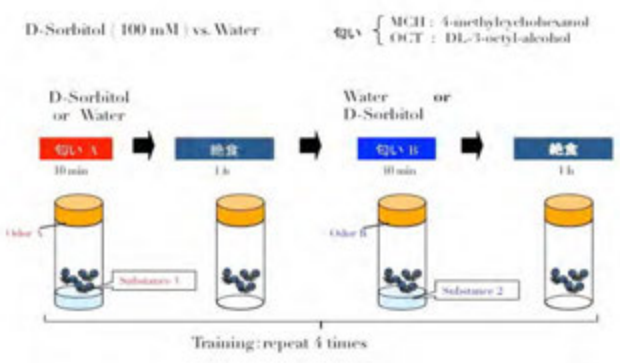


図 1　栄養価学習の手順

B)　アミノ酸に対する味覚感度の可塑的変化

アミノ酸欠乏にあるハエは、その状態を「把握」して、アミノ酸を選択して食べる能力があるのだろうか。このことを知るために、羽化 12 時間以内のハエを集め、通常培地(aa[+])と糖だけの培地(aa[-])で 6 日間飼育して、アミノ酸に対する嗜好を調べた。

アミノ酸に対する嗜好度を検出するために絶食を行わずに摂食テストをした。赤青の食用色素を用いてアミノ酸混液と D-グルコースの 2 者選択嗜好実験をシャーレを用いたアッセイ法で行った。2 時間の摂食後に腹部の着色からハエがどちらの溶液を摂取したかを調べたところ、雌雄とも aa[-]のハエのアミノ酸の選択率が有意に上昇した（図１）。一方、D-グルコースを選択したハエの比率には両グループで変化はなかった。通常培地で育てられた aa[+]のハエはすべての栄養素に満足しているため、グルコースに対してもアミノ酸に対しても、あまり摂食を示さない。aa[-]のハエが体内で不足しているアミノ酸を選んで摂食していることは、物質特異的な ” specific hunger” の状態があることを明らかにした。

アミノ酸混液を単独で与えた場合はどうなるのかを知るために、摂取量を経時的にカフェアッセイ法で定量した。aa[+]のハエは 6 時間の間、ほとんどアミノ酸溶液を摂取しないが、aa[-]のハエは 4 時間以降、有意にアミノ酸溶液を摂取した。20 種類アミノ酸のなかでハエが識別しているのはどのアミノ酸であるかを知るために、20 種類の個別のアミノ酸について、D-グルコースとの 2 者選択嗜好実験を aa[+]と aa[-]のハエを用いて行った。その結果、システイン、フェニルアラニン、スレオニンについては aa[-]のハエの嗜好度が増加していた。しかし、嗜好度が高いアミノ酸が必ずしも必須アミノ酸ではなく、アミノ酸の構造や化学的性質などとの共通点もなかった。

アミノ酸欠乏時にアミノ酸の摂食量が増える理由のひとつの可能性はアミノ酸に対する味覚感度が上昇することである。このことを調べるために、アミノ酸混液および行動テストで嗜好度の上昇が確認されたフェニルアラニン、システイン、アミノ酸混液を刺激溶液として吻伸展反射を調べた。跗節の刺激では吻伸展はおきなかったことから跗節味覚感覚子のアミノ酸に対する感度は低いと思われる。一方、唇弁を刺激したところ、アミノ酸欠乏状態の aa[-]ハエにおいて、アミノ酸混液およびフェニルアラニン、システインに対して aa[+]より有意に高い吻伸展反射を示した。したがって、アミノ酸の味覚感度がアミノ酸欠乏状態で唇弁の感覚子において上昇することを示している。同様の現象はすでにバッタでも報告されている。感度の上昇がどのような分子レベルのメカニズムによっているかは今後解明すべき興味ある課題である。アミノ酸受容体遺伝子の発現が誘導される可能性と神経伝達レベルの制御が想定される。これらの成果は、国内外の学術集会で発表し、論文として公表した(Toshima and Tanimura, 2012)。

つぎの課題はアミノ酸受容体を同定することである。大型のハエでは、アミノ酸は糖受容細胞や塩受容細胞を刺激することがわかっているが、ショウジョウバエではどの味細胞でどのアミノ酸の味を感じているのかはわかっていない。これまでショウジョウバエでは 68 個の味覚受容体候補遺伝子(Gr)が見つかっているが、リガンドが同定されたのはわずかである。これらの Gr の中にアミノ酸受容体があるのかを解析する必要がある。しかし、アミノ酸受容体が外部の味覚感覚子以外で機能している可能性もある。そこで、跗節および唇弁のすべての味覚感覚子が機械感覚子に転換した poxn 突然変異体を 2 者選択嗜好テストで調べたところ、外部感覚子からの入力が全くなくても、poxn 突然変異体はアミノ酸欠乏状態でアミノ酸を好んで摂取した。このことは、体内にも味覚センサーがあってアミノ酸を感知していることを示している。そのセンサーの候補は、咽頭内の味細胞と消化管の味覚センサーである。実際、最近の研究によって消化管の特定の細胞で発現している Gr が同定されている。哺乳類での消化管における味覚受容体の発現に類似しており、消化管における Gr の機能の解明が待たれる。ショウジョウバエの利点である遺伝的手法を用いてアミノ酸受容機構の解明を行うことができるだろう。

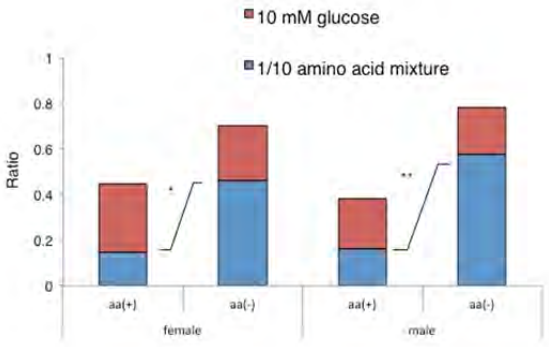


図２　グルコース：アミノ酸混液の 2 者選択嗜好実験
縦軸は摂食したハエの割合を示す。カラムの上部はグルコース、下部はアミノ酸を摂取したハエの比率を示す。アミノ酸を選んだハエの割合が欠乏状態の aa[-]で有意に増加している。

メスのハエでは、アミノ酸の嗜好性の変化は、交尾と卵の産生とリンクしていると考えられる。実際、メスでは、アミノ酸に対する嗜好性の上昇が、体内のアミノ酸欠乏だけではなく交尾によっても引き起こされることを発見した。交尾後のアミノ酸嗜好の上昇が、卵の形成という内的な要求度にも制御されているかを、卵が形成できない ovo 突然変異体を用いて調べたところ、ovo 突然変異体も交尾によって嗜好性が変化したことから、sex peptide による行動修飾がアミノ酸に対する嗜好性の上昇に重要であることがわかった。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)は、ショウジョウバエの栄養学と摂食行動に関する先駆け的研究として注目された。この論文は、同様な結果を得ていた Scott Waddell との協議によって同時投稿したものである。その後、われわれの結論を支持する３編ほどの論文が発表された。われわれの論文をヒントとして、Amrein らは、味覚受容体 Gr43a が、脳内のニューロンで発現しており体内のフラストース濃度をモニターしている栄養センサーとして機能していることを発表した。

研究成果の B)は、ショウジョウバエがアミノ酸を感知して摂食すること、欠乏状態にあるハエは、アミノ酸に対する嗜好度を上昇させるという初めての成果となった。最近、発表された総説において、画期的な成果として紹介されている。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

アミノ酸の受容の電気生理学的解析、イメージングの手法を用いた研究を進展させていたが、年度内に成果をまとめることができなかった。メスにおける交尾によって変化する食行動は、sex peptide receptor を介した経路が関わっていることがわかったが、その神経機構を解析するには至らなかった。多くの課題を同時進行させるための人材不足がその理由であるが、次年度には新たな成果が期待できる。

＜今後の課題、展望＞

アミノ酸の受容体の同定が優先すべき課題である。GRに加えて、最近、味覚受容体遺伝子の新しい候補として同定された、IR(ionotrophic receptor)についても同時にスクリーニングを行う必要がある。さらに、電気生理学的記録によって、アミノ酸に応答する味細胞を同定しなければならない。体内のアミノ酸のセンサーについては、イメージングを行う必要がある。さらに自然集団由来のisogenic lineの間でアミノ酸の嗜好度変化に遺伝的な変異があることを見いだしたので、今後、アミノ酸応答に関わる遺伝子の網羅的同定を行うことができる。

公募研究：平成 21 年度-平成 22 年度

ゼブラフィッシュ摘出脳脊髄標本を利用した眼球運動とロコモーションの統合機構の解明

研究代表者：齋藤　和也 [1)]

1）熊本大学教育学部

＜研究の目的と進め方＞

複数の基本的運動パターンを統合して意味のある行動にする脳内機構については不明の点が多い。本計画では、小型魚類の眼球運動とロコモーション（遊泳）の統合をモデルとして、この機構の解明を目指した。この問題では、広範囲にわたる中枢神経活動を運動中の動物から同時に記録することが必須であり、適切な動物と標本の選択が要求される。そこで最終的な目標を小型魚類成魚の脳眼球脊摘出髄標本を作製し、仮想眼球運動および仮想遊泳時の中枢神経系の広範囲の活動を時間解像度に優れる膜電位感受性色素を用いて光計測することに定めた。本研究はパーキンソン病や脳梗塞でみられる運動の統合障害の病態解明にも貢献することが期待され、当該領域の臨床医学研究における重要性を高めるものと考える。

＜研究計画＞

1)　頭部を固定した小型魚類成魚に対し、視覚刺激を与えた時の行動を観察・記録する。

2)　非動化した動物において、1）と同じ視覚刺激を与えた時の中枢神経系の活動を膜電位感受性色素を用いた光イメージングで計測する。

3)　ゼブラフィッシュおよびメダカ *Oryzias latipes* における脳眼球脊髄摘出標本の作製。

4) 脳眼球脊髄摘出標本おいて1）と同じ視覚刺激を与えた時の仮想眼球運動および仮想遊泳を外転（または動眼）神経および脊髄腹根から記録しながら同時に中枢神経系の活動を膜電位感受性色素を用いた光イメージングで計測する。

＜得られた研究成果＞

当初、本研究はゼブラフィッシュを主な実験動物として計画された。しかし数カ月の試行錯誤の後、対象をメダカに変更することになった（後述、**“達成できなかったこと、予想外の困難、その理由”**参照）。そこで以下の結果はすべてメダカ *Oryzias latipes* 成魚による実験から得られたものを示す。

A）視覚誘導性運動（研究計画 1））

無麻酔のメダカ成魚を下顎で固定し、胸鰭の尾側体幹部分は鉛板で緩やかに動きを制限する。これは、動物が暴れた際に下顎が割れて固定が外れるのを防ぐためのものであり、通常の遊泳行動では体幹は鉛板に強く当たることはない。実験水槽の下方に設置したコンピュータモニタにより正弦波状に明暗が変化する縞模様が縞と直行する向きに動く画像を提示する。正弦波縞の進行方向を 0°（動物の尾側から吻側に向かう方向）、以下時計回りに 90°、180°、270°と変化させた時、それぞれ前進、右ターン、後退、左ターンと考えて矛盾しない体幹尾側および胸鰭の動きが観察された（図 1）。また正弦波縞の進行方向が 90°いし 270°の時には、正弦波縞の進行を追う方向に両側眼球が conjugate な運動をするのが観察され、0°、180°では特異的な眼球運動は認められなかった。これらの運動はこれまで主にゼブラフィッシュの稚魚で報告されてきた体幹運動（optomotor response : OMR）および眼球運動（optokinetic response : OKR）と同様の運動と考えられる。

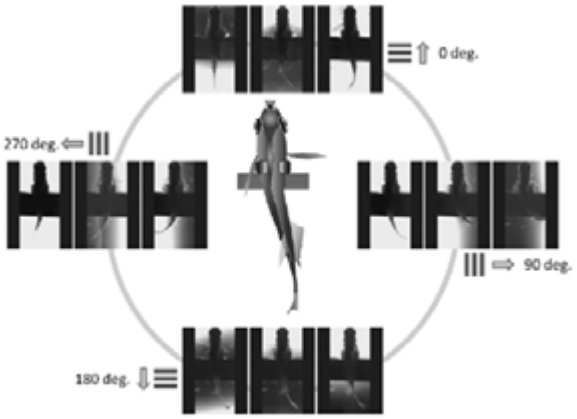


図 1　視覚誘導性運動　　下顎を固定されたメダカ成魚の下方から正弦波状に明暗が変化するパターンを提示．正弦波縞の各方向（0°、90°、180°、270°）に特異的に、optomotor response と optokinetic response の反応パターンが変化する．

B）視覚刺激に対する中脳視蓋の応答（研究計画 2））

無麻酔で d-tubocurarine 筋注によって非動化したメダカ成魚に対し、視覚刺激に対する中脳視蓋における神経活動を、膜電位感受性色素 RH1691 を用いた実時間光計測法によって記録した。

B-1)　メダカの脳組織に対する膜電位感受性色素 RH1691 の有効性を確認するために、緑 LED によるスポット光を提示した時の視蓋の応答をイメージングした（図 2）。LED の点灯する位置の変化に応じて視蓋の活動部位がレチノトピカルに移動するのが観察された。併せて、メダカ成魚の中枢神経細胞が膜電位感受性色素 RH1691 に感受性を有することも確認された。これまで RH1691 はげっ歯類を中心に使用されてきたが、今回の結果から小型魚類成魚の神経細胞にも有用であることが明らかになった。

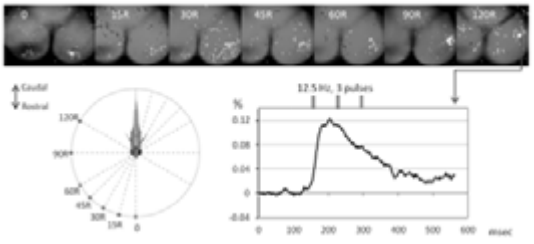


図 2　スポット光に対する視蓋の応答の 1 例　　非動化したメダカ成魚に対し、latitude 0°で水平に右方向 0°、15°、30°、45°、60°、90°、120°の各位置で緑 LED を 80 ミリ秒の時間間隔で 3 回点滅させたときの視蓋の応答を RH1691 を用いて光計測した．左視蓋において活性化された領域が吻内側から尾外側へ徐々に移動している．

B-2)　B -1 と同じ標本で、A)と同様に動物の下方から正弦波状に明暗が変化する正弦波縞が移動する刺激パターンを提示したときの中脳視蓋の応答を光計測した。図 3 に 1 例を示す。正弦波縞を 270°の方向に動かした時の両側の中脳視蓋の光イメージングの時間的推移を示している。両側視蓋の吻側にやや優位な活動が認められる。

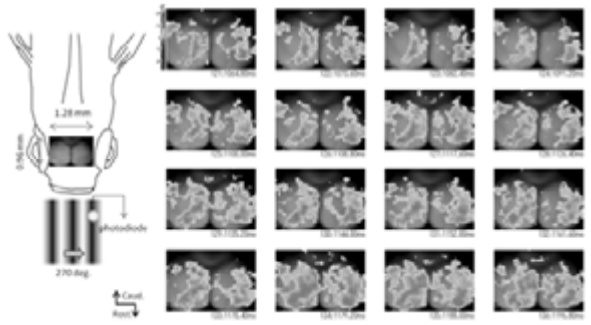


図 3　正弦波縞を 270°の方向に移動させたときの視蓋応答の 1 例　メダカは非動化されている．各画像は 8.8 ミリ秒ごとにサンプリングされている．

同じ動物の左右視蓋の吻側と尾側で強い反応を示す各 1 ピクセルを選び、活動の時間経過を図 4 に示した。吻側（図 4A、1 および 2）では正弦波縞の時間周波数に一致した信号強度のオシレーションが観られた。一方、尾側（図 4A、3 および 4）ではオシレーションは不明瞭であった。正弦波縞の時間周波数に同期した信号のオシレーションは約 5Hz まで確認できた（図 4B）。

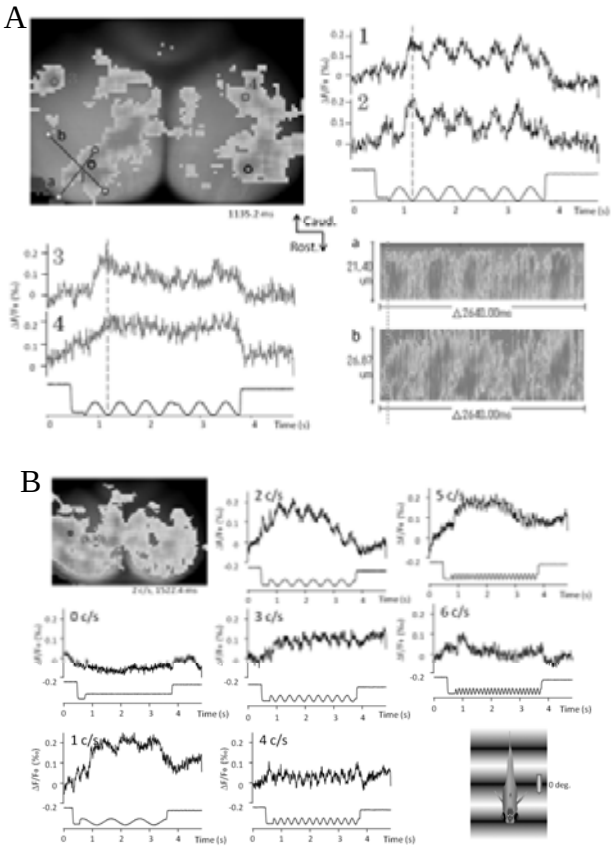


図 4　正弦波縞の時間周波数に一致してオシレーションする中脳被蓋の光信号　A　正弦波縞を 270°の方向に移動させたときの視蓋応答の 1 例．B　正弦波縞の時間周波数を増加させた時の視蓋活動のオシレーションの変化．正弦波縞は 0°の方向に移動している．

また視蓋上で光信号がオシレーションする領域は帯状を呈し(図 4A-a)、その長軸とほぼ直行する方向に繰り返し移動する（図 4A-b）例が多く観られた。長軸の向きはコンピュータディスプレイ上の正弦波縞の向きに概ね一致し、正弦波縞が 0°または 180°の方向に移動する場合には、視蓋上の信号の帯も同じ方向に移動を繰化した。また正弦波縞が 90°または 270°の方向に移動する場合には、視蓋上の信号は、おのおの逆の方向に移動を繰り返した（図 5）。

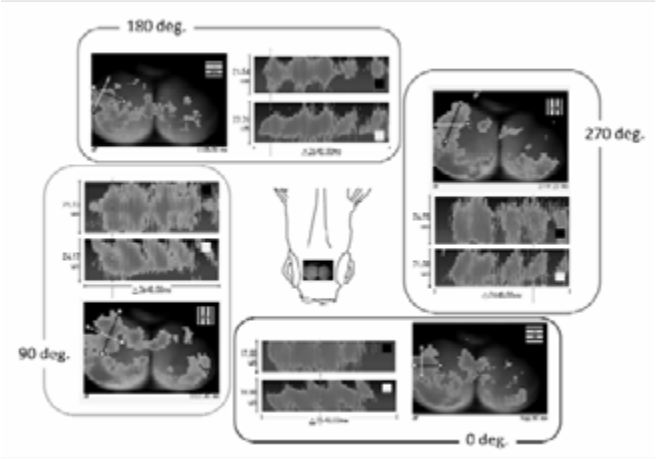


図 5　正弦波縞の移動方向に依存して変化する中脳被蓋の光信号の時空間パターン．

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画3)、4）の脳眼球脊髄摘出標本については当初ゼブラフィッシュ成魚での作製を試みた。しかしながら手術操作やRH1691の染色を行っている間に、視蓋および前脳の反応性が著しく低下し、脳眼球脊髄摘出標本から満足のいく神経活動を記録することが難しかった。これは熱帯魚であるゼブラフィッシュ成魚では、神経組織の酸素需要が高く脆弱なためと考えられた。そこで年度途中から、ゼブラフィッシュよりも酸素需要が低いと考えられるメダカを用いて同様の脳眼球脊髄摘出標本の作製に着手した。メダカ成魚を用いた同標本では、視蓋等への電気刺激により良好な神経応答を観察できた。その後も手術手技については改善を重ね、可能な限り短時間で侵襲の少ない方法を模索してきたが、最終的に計画1）および2）と同様の視覚刺激に対して、視蓋から十分な応答を得るまでには至らなかった。ある程度の反応が得られた標本においても、その後1時間程のうちに急激に光信号の振幅は小さくなった。この主な理由として血流途絶後の網膜の機能を維持することが困難であった可能性が考えられた。代表者はいわゆるyoung-adultのヤツメウナギ *Petromyzon marinus* の脳眼球脊髄標本において少なくとも4 - 5時間程度は、LEDのスポット光による視覚刺激に対する十分な応答が網膜脊髄路細胞から記録できることをかつて経験している。したがって本研究においても比較的若いメダカで同様の標本を作製すればある程度の信号を得ることが可能であったかもしれない。しかし本研究は最終的にパーキンソン病や脳梗塞などの運動統合障害の病態解明への応用を念頭に置いている点から、adultの動物で標本作製を成功させるべく試行錯誤を続けた。しかし本研究期間中に良い結果を得ることはできなかった。

＜国内外での成果の位置づけと今後の課題、展望＞

眼球運動やロコモーションといった運動プログラムの制御機構を小型魚類の脳を利用して神経回路レベルで明らかにしてゆこうという試みは、ここ数年Engert, F.のグループなどを中心に精力的に行われてきている。しかし実験モデルとしてはこれまでの

ところ、larvae を利用したものにほぼ限られている。

また本研究のように複数の運動プログラムが協調的に実行される機序について明らかにしようとする試みはまだ少ないが、最近では Simmers, J.と Straka, H.のグループが共同で larval *Xenopus laevis*（2012）や juvenile toad *Xenopus laevis*（2013）で脳眼球脊髄標本を作製し、電気生理学的方法でロコモーションと眼球運動の協調機構に関する研究を開始しており、この方向性は今後一層強まってくるものと考えられる。

こうした流れの中で、本研究は現在、adult の動物による実験モデル作製に拘ってきたが、前述の如く網膜の機能を維持するための方法を確立できず、当初の目的を十分に達成できず研究期間を終えることになった。しかしながら本研究で得られた多くの経験と教訓をもとに、研究期間終了後、改めて adult のヤツメウナギ *Lethenteron japonicum* を利用した脳眼球脊髄摘出標本の作製に着手し、現在、大動脈から氷冷した人工脳脊髄液を灌流することで神経活動の著しい向上が得られることも確認でき、adult 動物での実験モデル確立が期待できる段階まで来ている。

公募研究：2009 年度-2012 年度

行動・イメージング解析による長期記憶プロセスの分子・細胞基盤の解明

研究代表者：坂井　貴臣 [1)]

1）首都大学東京理工学研究科生命科学専攻

＜研究の目的と進め方＞

神経系の発達した動物は学習を通じて記憶を脳神経系に獲得し、その記憶を保持して必要に応じて想起することができる。動物の記憶は主に短期記憶と長期記憶に大別される。ショウジョウバエではキノコ体と呼ばれる脳領域が短期記憶中枢であると考えられているが、長期記憶中枢に関しては厳密に特定されていない。本研究の大きな目標は，長期記憶のプロセス（獲得，保持，想起）にかかわる分子および脳神経細胞・回路の同定とその動作原理の解明である。

我々はこれまで，ショウジョウバエの記憶測定法である「求愛条件付け」により３つの長期記憶遺伝子[period (per), painless (pain), apterous (ap)]を同定した。これらの変異体は短期記憶が正常であるものの,長期記憶が形成できないという共通の表現型を示す。一方，各遺伝子は脳内の多くのニューロンで発現しており,発現しているニューロンの種類や数も各遺伝子毎に異なっていた。これらの結果から，長期記憶は短期記憶よりもより複雑な神経回路を利用していると予想される。しかし，3つの長期記憶遺伝子において,どのニューロンが長期記憶に必要であるのか,また，長期記憶の獲得，保持，想起のどのプロセスに関与しているのかが分かっていないことが課題であった。

そこで本研究では，per, pain, ap 遺伝子の発現ニューロンの中から長期記憶に必要であるニューロンを詳細に解析した。そして，3つの長期記憶遺伝子とそれらの発現ニューロンが長期記憶のいずれのプロセスに関与しているのかを明らかにした。

＜研究計画＞

1）長期記憶遺伝子の脳発現ニューロンの同定

各遺伝子のプロモーターを利用してGFPレポーターを発現させる手法と抗体による免疫染色により３つの長期記憶遺伝子の発現ニューロンを詳細に解析した。抗Per抗体にはsanta cruz 社 d-300を，および抗Pain抗体にはOsenses社 OST00140Wおよび OSP00019Wを利用した。抗Ap抗体に関しては，ap特異的な配列(約120aa)を利用して作製した。

2）RNAiによる特定ニューロンの発現抑制実験

同定したニューロン特異的に長期記憶遺伝子の発現を抑制し，短期記憶や長期記憶におよぼす影響を明らかにする。温度シフトにより遺伝子発現のタイミングを制御できる遺伝子発現システム（TARGETシステム）を利用し，記憶の獲得，保持，想起の各段階で発現抑制を行った。また，温度依存的にシナプス伝達を阻害する技術を利用し,同定したニューロンのシナプス伝達阻害が長期記憶のどのプロセス（獲得・保持・想起）に影響を及ぼすか検証した。

3）pain遺伝子変異が神経活動におよぼす影響の検証

pain遺伝子はTRPチャネルをコードしている。培養細胞を用いた解析では，Pain TRPチャネルはCa^{2+}を選択的に透過することがすでに証明されている。我々は，脳で発現するPainが実際にCa^{2+}流入を調節しているかどうかを明らかにするため，ハエの摘出脳を用いたイメージング解析の実験系を確立し，KCl刺激や刺激電極を用いた電気刺激により１)で同定したニューロンにおけるCa^{2+}反応を測定する実験系を確立した。また，pain変異によりCa^{2+}反応が低下するかどうかを検証した。

＜得られた研究成果＞

A）per 遺伝子の脳発現ニューロンの同定

平成 21 年度から 23 年度までに、研究計画の項目 1)および 2)について研究を進め、per 遺伝子の発現ニューロンのうち，長期記憶に必要であるニューロン（Fan shaped body neurons）を同定した（図１）。これらのニューロンで発現する per は長期記憶の獲得段階に必要であることが明らかとなった。また，同定したニューロンのシナプス伝達阻害は長期記憶の想起を阻害することも見出した。

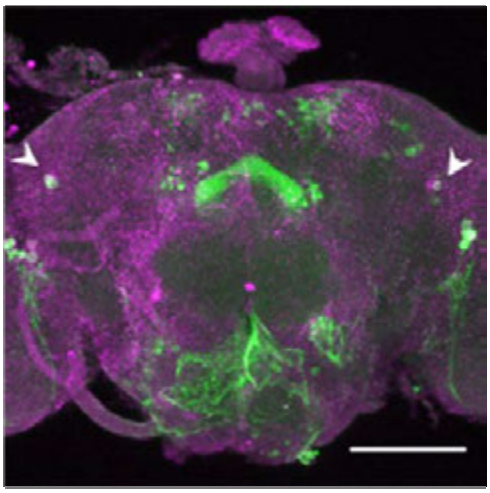


図 1 ハエ成虫脳の Fan-shaped body neorons
矢頭で示した左右 2 つのニューロンは PER の発現している Fan-shaped body neurons。

per 遺伝子はショウジョウバエのサーカディアンリズムの発生に必須な遺伝子であり，PDF ニューロンと呼ばれる時計中枢における per の発現がリズム形成には極めて重要である。しかし，PDF ニューロン特異的に per の発現を抑制しても長期記憶が確認された。これらの結果は，PER 依存的な長期記憶には時計中枢が関与していないことを示唆している。

台湾と米国の研究グループが平成 24 年度にハエの「匂いと電子刺激の連合学習」による長期記憶形成にも per が必須であり，かつ，DAL ニューロンと呼ばれるこれまで見同定であったニューロンで発現する per が長期記憶形成に必要であることを報告した。そこで，我々も DAL ニューロンについて検証した。興味深

いことに，DAL ニューロンにおける per 発現抑制は求愛条件付による長期記憶に影響を与えなかった。これらの結果は，匂いの記憶と求愛の記憶では利用している神経細胞・回路が異なっていることを示唆している。

これらの結果をまとめ、学術論文として発表した（Sakai et al., Learning & Memory, 2012)。

B) pain 遺伝子の脳発現ニューロンの同定

平成 21 年度から 23 年度までに、研究計画の項目 1)および 2)について研究を進めた。まず，抗 Pain 抗体(Osenses 社 OST00140W および OSP00019W）による免疫染色を実施したが，成虫脳においてシグナルを検出するには至らなかった。そこで，pain プロモター活性を利用して GFP リポーターを発現させ，pain 発現ニューロンを推定する実験を行った。その結果，キノコ体，中心体，インスリン分泌細胞を含む，脳の様々な領域において GFP シグナルが観察された（図 2)。

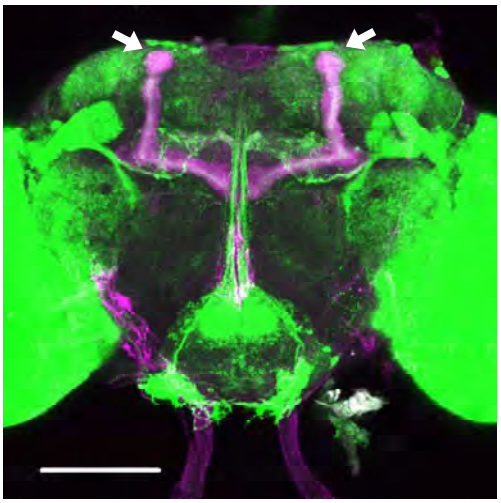
図 2 ハエ成虫脳の *pain*-positive neurons
矢印：キノコ体，*：インスリン分泌細胞。

次に，キノコ体，中心体，インスリン分泌細胞特異的に pain の発現を抑制して長期記憶を測定したところ，キノコ体およびインスリン分泌細胞が Pain 依存的な長期記憶に関与していることが明らかとなった。また，これらのニューロンで発現する pain も長期記憶の獲得段階に必要であることが明らかとなった。

これらの結果をまとめ、学術論文として発表した（Sakai et al., Learning & Memory, 2013)。

C) ap 遺伝子の脳発現ニューロンの同定

平成 21 年度から 24 年度までに、研究計画の項目 1)および 2)について研究を進め、ap 遺伝子の発現ニューロンのうち，長期記憶に必要であるニューロン群を複数同定した。平成 21 年度から抗 Ap 抗体の作製に着手し，平成 22 年度に完成した。ウェスタンブロッティング法によりシングルバンドが検出されることを確認した。この抗体を利用して，成虫脳を用いた免疫染色を行ったところ，複数のニューロンでシグナルが検出された。同定したニューロンは以下の通りである：キノコ体ニューロン，神経ペプチド PDF 産生ニューロン，神経ペプチド NPF 産生ニューロン。次に，ap プロモター活性を利用して GFP リポーターを発現させ，ap 発現ニューロンを推定する実験を行った。その結果，キノコ体や PDF 産生ニューロンを含む，脳の様々な領域において GFP



シグナルが観察された（図 3)。

図 3 ハエ成虫脳の *ap*-positive neurons
矢印：キノコ体

ap 遺伝子は長期記憶の獲得や保持の段階で必要であることも明らかとなった。これらの結果をまとめ、現在投稿準備中である。

D) pain 遺伝子変異が神経活動におよぼす影響

平成 21 年度から 22 年度にかけて、ハエの摘出脳を用いたイメージング解析のセットアップを行った。平成 22 年度には KCl 刺激による Ca2+反応を効率よく測定できる実験系を確立できた。また，平成 23 年度には電気刺激による Ca^{2+}反応を測定する実験系を確立し，さらに KCl 刺激によりインスリン分泌細胞の Ca^{2+}反応の測定も可能となった。平成 24 年度には pain 変異によりキノコ体やインスリン分泌細胞の Ca^{2+}反応が低下するかどうか検証を進めてきたが，現在までに pain 変異による Ca^{2+}反応の低下を示す直接的な証拠を得るにはいたっていない。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)と B)では，求愛条件付けによる長期記憶に必要な新しいニューロン（Fan-shaped body およびインスリン分泌細胞）を同定した世界でも例のない報告となり、当該分野の新たな流れを作るきっかけになるものと予想される。

また，研究成果 A)では，匂いの記憶と求愛の記憶では利用している神経細胞・回路が異なっていることを示した。このことは，記憶を作るために利用される外部環境からの刺激の種類が異なれば，記憶が作られる脳領域がことなることを初めて示した研究である。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画 3)で実施した摘出脳イメージングは，機器のセットアップは概ね順調に進んだが，脳を外科的に摘出して培養する技術の習得に予想以上の時間がかかった。脳摘出の技術を獲得した後，蛍光プローブとして GCaMP1 を用いて実験を行っていたが，我々のセットアップでは GCaMP1 の蛍光強度変化を検出することが困難であり，蛍光強度変化率が GCaMP1 よりも大きな GCaMP3 に変更することによって問題を克服した。また，電気刺激装置により摘出脳を直接電気刺激する実験系では，経験不足により機器のセットアップにも手間取り，野生型で効率よく Ca^{2+}反応を測定できるようになるまでに 1 年以上かかった。最終年である平成

24年度にはpain mutationを持つGCaMP3発現系統を作製してKCl刺激，電気刺激共に野生型と比較する実験を遂行したが，pain変異によるキノコ体ニューロンの Ca^{2+}反応の低下を示す直接的な証拠を得るにはいたらなかった。今回の研究ではキノコ体エンハンサートラップ系統を利用してキノコ体全体にGCaMP3を発現させているため，pain が発現しているキノコ体ニューロンの数が少ない場合，Ca^{2+}反応の低下を検出できない可能性がある。今後は，蛍光 Ca^{2+}プローブの pain 遺伝子座へのノックイン系統などを利用し，pain-positive neurons に限定した Ca^{2+}反応を計測する必要がある。また，インスリン分泌細胞はキノコ体と比べると細胞数が圧倒的に少なく（10 個程度），クリアな蛍光強度変化を捉えられていないという問題がある。今後は，GCaMP3 よりもさらに蛍光強度変化率の大きな Ca^{2+}センサータンパク質（GECOシリーズなど）を利用することでこの問題を解決できるかもしれない。

研究計画 3）以外は概ね順調に進んだ。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果により、目的遺伝子の発現する脳神経細胞を同定する技術を確立することができた。また，摘出脳イメージング技術により，脳神経活動を解析する技術も確立した。今後，長期記憶遺伝子の神経細胞内の生理機能を解析する研究をさらに進める基盤となった。また、本研究により，長期記憶に必要な脳領域・神経回路はキノコ体以外にも存在することが明らかとなった。しかし，キノコ体以外のニューロンがなぜ長期記憶の獲得に影響を与えるのか，その生理的なメカニズムは何か？という新たな疑問が生じ、今後の研究によりこれが解明されることが期待される。

公募研究：2011 年度-2012 年度

摂食行動を創出する新規分子と神経回路の解明

研究代表者：矢田俊彦

自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門

＜研究の目的と進め方＞

摂食行動は哺乳動物においては視床下部と脳幹の摂食中枢により制御されている。摂食に関連する複数の神経核の情報は室傍核(PVN)で統合されて摂食行動が司令されると考えられるが、室傍核の機能を説明するニューロンは明らかにされていなかった。申請者は、新規満腹因子 Nesfatin-1(Nesf)の摂食抑制経路として、新規の＜室傍核 Nesf・オキシトシン(Oxt)→孤束核 Proopiomelanocorin (POMC)＞神経回路を報告した (Cell Metab. 2009)。

本研究では、Nesf による摂食行動制御とその神経回路を解明することにより、摂食行動が室傍核分子と単純な神経回路により制御されていることを示し、システム分子行動学のモデルを提供することを目的とする。

＜研究計画＞

１．Nesf による摂食行動概日リズムの制御

(1)Nesf mRNA 発現概日リズムが摂食概日リズムと逆相関するかを検討する。(2)ラット室傍核への Nesf shRNA 局所投与により Nesf mRNA 発現を抑制する手法を確立する。これを用いて、Nesf mRNA 発現のリズムの抑制により摂食量の増加（過食）または摂食概日リズムの障害がもたらされるかを調べる。(3)過食・肥満を呈する Zucker-Diabetic fatty ラットで、Nesf 概日リズムが障害されているかを検討する。さらに、Nesf 発現が低下している時間帯に Nesf を室傍核に投与してリズムを構築し、摂食リズム障害さらには過食・肥満が改善するかを検討する。

２．＜食-Nesf-Oxt-POMC＞神経回路の検証

(1)絶食後の再摂食により、室傍核 Nesf ニューロンが活性化されるかを cFOS 発現により測定する。(2)Nesf ニューロンが食事誘導因子のグルコース、インスリン、消化管ホルモンの CCK、脂肪ホルモンのレプチンによって制御されるかを調べ、Nesf・Oxt の食事性の上流制御経路を明らかにする。(3) 室傍核 Oxt が、孤束核に加えて弓状核 (ARC) の POMC ニューロンにシグナル伝達して摂食を抑制する回路を検証する。

３．末梢投与 Oxt の中枢情報伝達と抗肥満効果の検討

Oxt を末梢から投与して肥満を改善できるかを検証するため、高脂肪食負荷により肥満・メタボリックシンドロームを誘導したマウスに 2 週間末梢 Oxt 投与して効果を検討する。

＜得られた研究成果＞

A) PVN Nesf リズムによる摂食調節

(1) 正常 Wistar ラットにおいて暗期に摂食が亢進し、明期に摂食が抑制される摂食パターンを示す。一方 PVN Nesf mRNA の発現を調べたところ、明期の初期に発現が亢進し、暗期に発現が低下することが明らかになり、摂食量と PVN Nesf mRNA 発現は逆相関することを見出した（図１）。さらに AAV ウイルスベクターで Nesf shRNA を PVN に局所投与して Nesf mRNA 発現を低下させると摂食が亢進することを見出した。

(2)肥満モデル Zucker fatty(ZF)ラットにおいて、正常ラットで見られる PVN Nesf mRNA の明期の発現上昇が障害されており、明期ならびに 24 時間の累積摂食量が増加していることを見出し、明期の Nesf を脳室内投与することで、それらの過食は抑制されたことから、明期の Nesf 発現上昇の障害が過食・肥満の成因として関与する可能性が示唆された。これらの結果まとめ学術論文として発表した (Sedbazar, Yada et al., Biochem Biophys Res Commun. 2013)

B) 末梢投与 Oxt の中枢情報伝達と抗肥満効果

(1) 食事誘導因子のグルコース、インスリンが PVN Nesf ニューロンを直接活性化することを見出し、学術論文として発表した (Gantulga, Yada et al., Biochem Biophys Res Commun. 2012)。さらに満腹物質の CCK、レプチンが PVN Nesf ニューロンを直接活性化することを見出した。(2)Oxt ニューロン軸索突起が弓状核 (ARC) の POMC ニューロン細胞体に近接することを形態学的に見出した。PVN Oxt ニューロンの ARC POMC ニューロンへの投射が共焦点蛍光観察により示された。Oxt の脳室内投与により ARC に c-FOS 発現が誘導された。さらに単離した ARC POMC ニューロンに Oxt を作用させ、Oxt は単離 ARC POMC ニューロンに直接作用して細胞内 Ca2+を増加させた。以上の結果から、定説を塗り替える、二次中枢 PVN から一次中枢 ARC へのシグナル伝達が示唆された。

C) 末梢投与による中枢神経伝達と抗肥満効果の検討

高脂肪食負荷による肥満マウスに 2 週間末梢 Oxt 投与(皮下および浸透圧ポンプ) すると、延髄と PVN が活性化され、摂食抑制・エネルギー消費亢進による抗肥満効果を示し、内臓脂肪蓄積・脂肪肝・高血糖を改善し、抗メタボリックシンドローム効果を示すことを明らかにした。これらの結果まとめ学術論文として発表した (Maejima, Yada et al., Aging (Albany NY). 2011) (図２)

＜国内外での成果の位置づけ＞

ほぼすべての研究成果が世界でも例のない報告となり、Nesf-Oxt-POMC により駆動される摂食代謝神経回路と役割に関する新たな研究分野を創出するものと予想される。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

当初計画した Nesf-Oxt-NTS POMC 神経回路の役割の更なる解明は、特異的な PVN Oxt shRNA 処理および NTS POMC shRNA 処理が予定通り進まず、達成できなかった。他はおおむね順調に進んだ。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果により、Nesf-Oxt系が食事因子により活性化され、また概日リズムを持つことが明らかとなった。これを基に、今後食事および光で駆動される神経経路を解析することによりNesf-Oxtの上流神経回路を解明する研究をさらに進める基盤となった。また、本研究により、末梢Oxt投与による中枢Oxt神経回路の活性化が可能となり、これを利用してOxt作用増強による摂食障害・精神疾患・自閉症の治療の基盤が得られ、今後の研究によりこれが実現されることが期待される。

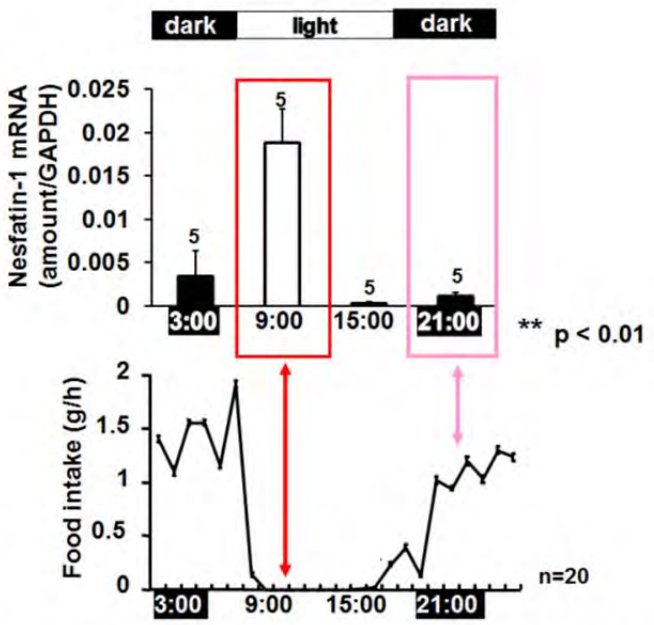


図1. 正常Wistar Ratにおける室傍核(PVN) Nesfatin-1 (Nesf) mRNA発現(上図)と摂食量 (下図) PVN Nesfと摂食量は逆相関を示す。
(Sedbazar, Yada et al. 2013, Biochem Biophys Res Commun.)

図2. オキシトシン末梢投与の効果

(Maejima, Yada et al. 2011 ,Aging.)

記憶想起の分子制御基盤解明と記憶想起障害を示すモデルマウス開発の試み

研究代表者：喜田　聡

東京農業大学バイオサイエンス学科

＜研究の目的と進め方＞

記憶制御は動物において重要な本能行動の一つである。記憶は脳に保持される時間で、数時間程度の短期記憶と最大一生保持される長期記憶に分けられる。短期記憶が長期記憶に変換されるには「固定化」と呼ばれるプロセス（反応）が必要となる。固定化では、脳内に遺伝子発現が誘導され、神経回路に可塑的な変化が起こり、脳内の神経回路に記憶が保持される状態になると考えられている。このような記憶の「固定化」に加えて、「保存」、そして、「想起」は記憶制御における中心的プロセスである。記憶研究の多くは、約 100 年前に提唱された「固定化仮説(Consolidation theory)」に基づき、記憶「形成」と「保存」にフォーカスした研究がほとんどである。一方、記憶「想起」のメカニズムは国内外共に、ほとんど明らかにされていないのが現状である。

現在までに、研究代表者らによって、転写調節因子 cAMP-responsive element binding protein (CREB)の機能を阻害した変異型マウスが開発され、この変異型マウスでは短期記憶は正常であるものの、長期記憶に障害を示すことから、CREB による遺伝子発現誘導が固定化に必須であることが明らかにされていた。しかし、CREB の機能を強化した場合の記憶能力に対する影響はほとんど解析されていなかった。

一方、1997 年に高等動物においてサーカディアンリズム産生に必須である時計遺伝子群が発見されて以来、サーカディアンリズム制御基盤研究は飛躍的に進展しており、生物学における最もホットな研究領域の一つである。高等動物では時計遺伝子の発見当初、生物時計の中枢である視交叉上核における時計遺伝子群の機能にフォーカスされていた。しかし、末梢細胞においても、サーカディアン転写リズムの存在が証明され、生体内の様々な機能調節にも直接的なサーカディアン制御基盤の存在が示唆された。その後、代謝機能を中心に末梢組織におけるサーカディアン転写リズムの重要性が示され、末梢組織のサーカディアンリズムの意義が明らかにされつつある。

以上の背景の中で、学習記憶制御に対するサーカディアン制御機構の存在が予想され、記憶プロセスにおけるサーカディアン制御機構に注目が集まっている。これまでに、ショウジョウバエにおいて記憶形成に必須な CREB 活性の変化に 24 時間周期のリズムの存在が示され(Neuron 22, 777-87, 1999)、高等動物においても、サーカディアンリズムが記憶保持に重要な役割を果たすことが示唆されている(Nat. Neurosci. 11, 1074-82, 2008)。しかし、どのような記憶プロセスにサーカディアン制御機構が存在するのかといった根本的な疑問は未だ解明されていないのが現状である。

以上の背景より、申請者は、記憶プロセスに対するサーカディアンリズムの役割の解明を試みてきた。実際には、サーカディアンリズム産生に必須な時計遺伝子である bHLH-PAS 型転写調節因子 BMAL1 に着目し、独自にドミナントネガティブ型 BMAL1 変異体（dnBMAL1）を開発し(***Gene***, **338**, 235-41,2004)、テトラサイクリン依存性発現誘導システムを用いて、前脳領域特異的に dnBMAL1 を過剰発現するマウスを開発した。本課題では、BMAL1 変異型マウスを用いて、記憶想起制御に対する BMAL1 の役割を明らかにして、記憶に対するサーカディアンリズムの役割を解明することを目的とする。

また、本研究では、CREB が記憶固定化に対して真に正の制御因子であるのならば、CREB の機能を高めれば記憶能力が向上するはずであると考え、トランスジェニックマウス（遺伝子操作マウス）を新たに開発して、この仮説を検討した。さらに、記憶固定化に対する転写調節因子 Retinoic Acid Receptor (RAR)の役割の解析も進めた。

＜研究計画＞

1) dnBMAL1 マウスにおける記憶制御の行動学的解析

恐怖条件付け文脈学習課題、新規物体認識課題、恐怖音条件付け課題等も用いて、dnBMAL1 マウスにおける記憶制御を詳細に解析し、恒常暗条件下においても同様の表現型が観察されるか検討する。また、野生型マウスを用いて、記憶制御とサーカディアンリズムとの関係性を行動学的に解析する。さらに、dnBMAL1 マウスが示す日内活性変動及び基本的な行動様式を詳細に解析する。

2) dnBMAL1 マウスが示す記憶表現型の組織学・生化学的解析

申請者の解析では、恐怖条件付け文脈記憶を想起した場合には、海馬及び扁桃体で CREB 標的遺伝子である c-fos の発現が誘導されることが示されている（*J. Neurosci*. 29, 402-13, 2009）。dnBMAL1 において記憶障害が観察された場合には、学習記憶制御時に活性化が認められない領域を CREB 標的遺伝子である c-fos の発現誘導を指標に解析し、障害を導く脳領域を同定する。さらに、dnBMAL1 マウスの生化学的解析を行い、この変異型マウスにおける BMAL1 標的遺伝子群の発現解析等を行い、BMAL1 ドミナントネガティブ型変異体発現の影響を解析する。さらに、記憶と BMAL1 結ぶ情報伝達経路の同定も試みる。

3) 記憶固定化制御機構の解析

CREB が記憶固定化に対して真に正の制御因子であるのならば、CREB の機能を高めれば記憶能力が向上するはずである。そこで、CREB 活性を高めたトランスジェニックマウス（遺伝子操作マウス）を用いて、この仮説を検討した。実際には、CREB 変異体（Y134F）、あるいはリン酸化を受けなくとも恒常的に活性型である CREB 変異体(DIEDML)をカルシウムカルモジュリン依存性キナーゼ II のプロモーター制御下で発現するトランス

ジェニックマウスを生化学的解析、電気生理学的解析、行動学的解析に供し、表現型の解析を進めた。

さらに、テトラサイクリン応答領域制御下で dnRAR、RAR を発現するトランスジェニックマウス群を用いて、学習・記憶能力、の行動学的解析を行った。また、電気生理学的手法を用いて、変異型マウス群の海馬 CA1 領域におけるシナプス伝達及び長期増強 LTP を中心とした神経可塑的変化に対するレチノイド情報伝達経路の役割も解析した。

＜得られた研究成果＞

A)dnBMAL1 マウスにおける時間依存的な記憶想起の障害

前脳特異的にドミナントネガティブ型 BMAL1(dnBMAL1)を発現するマウスを２ライン作製し、解析を進めた。dnBMAL1 発現マウスでは、前脳領域において CLOCK/BMAL1 標的遺伝子群の mRNA 発現レベルが有意に減少していたものの、サーカディアンリズム中枢である視交叉上核（SCN）を含む視床下部ではこれらの発現異常は観察されなかった。さらに、SCN に依存する日内行動活性リズムにも異常は認められなかった。以上の結果から、dnBMAL1 発現マウスは前脳領域特異的にサーカディアン転写リズムが破壊されていることが示唆された。

行動解析の結果、dnBMAL1 発現マウスは、記憶形成には障害を示さないものの、明期開始 10 時間後（ZT10）付近においてのみ、社会的認知記憶、恐怖条件付け文脈記憶及び物体認識記憶などの様々なタイプの記憶の想起に障害を示すことが示された。また、dnBMAL1 を成体となってから発現誘導しても、ZT10 において記憶想起の障害が観察されることを示し、dnBMAL1 は脳の発達等に影響を与えずに、記憶想起を直接的に障害したことを強く示唆した。さらに、恒常暗条件下においても、ZT10（CT10）付近で記憶想起の障害が観察されることが明らかとなった。

さらに、c-fos 遺伝子発現を指標にして、記憶想起時の dnBMAL1 発現マウス海馬の活性化状態を評価した結果、dnBMAL1 発現マウスでは、ZT10 において、野生型マウスに比べて、恐怖記憶を形成させた文脈への再エクスポージャーに反応した c-fos 発現誘導が有意に低かった。さらに、野生型マウスも時間帯依存的に記憶想起能力に差異が存在することを新たに見いだした。従って、dnBMAL1 発現マウスでは ZT10 付近で記憶表出に障害が起こっているのではなく、記憶回路の再活性化，すなわち、記憶想起自体に障害が起こっていることが強く示唆された。以上の結果から、記憶想起のサーカディアン制御基盤が存在し、この制御に BMAL1 が中心的役割を果たすことが明らかとなった。以上の結果は投稿中である。

B)CREB 活性化マウスにおける記憶固定化の向上

CREB Y134F 変異体は 134 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換されており、CREB キナーゼである PKA との親和性が高まっている。一方、CREB DIEDML 変異体は S133 を含む 6 アミノ酸(RRPSYR)が、転写調節因子 SREBP における CBP との相互作用部位の 6 アミノ酸(DIEDML)に置換されており、CBP と恒常的に相互作用できる。我々は、Y134F あるいは DIEDML 変異体を CaMKII プロモーター制御下で前脳領域特異的に発現するトランスジェニックマウスを計４ライン作製し（Y134F マウス、DIEDML マウス）、本研究に用いた。

生化学的解析の結果、変異型マウス海馬及び大脳では CREB の標的遺伝子である c-fos の高い発現が認められ、CREB の活性が高まっていることが明らかとなった。また、電気生理学的解析の結果、これら変異型マウス海馬 CA1 領域において、記憶形成の細胞モデルと考えられている海馬 CA1 領域ニューロンの長期増強（Long-term potentiation; LTP）にさらなる増強が観察された。

表　CREB活性型変異マウスの表現型のまとめ
全4ラインの遺伝子変異マウスの結果を示したものであり、社会的認知記憶と恐怖条件付け文脈学習の結果を記した。

	Y134Fマウス!		DIEDMLマウス!
	ライン A!	ライン C!	ライン α, β#
CREB活性型変異体の発現量!	+（低）!	++ !	+++ (高)!
海馬BDNF発現の増加!	No!	Yes! +!	Yes! +++(高)!
短期記憶の向上!	No!	Yes! (2時間記憶)!	Yes! (30分-2時間記憶)!
長期(24時間)記憶の向上!	Yes!	Yes!	Yes!

た。

変異型マウスの記憶能力を測定した結果、恐怖条件付け記憶、社会認識記憶、空間記憶などの種々の記憶課題において、変異型マウス群は優れた記憶固定化能力を示すことが明らかとなった。例えば、野生型のマウスはある箱に入れられてから 1 ヶ月経過すると、別の箱と見分けがつかなくなるのに対して、変異型マウスは記憶直後と同じように見分けることができた。以上の結果から、変異型マウスは記憶（固定化）能力が著しく向上したマウスであると結論した。

さらに、予想外の結果として、これらの変異型マウスでは 30 分から２時間程度の短期記憶に関しても、野生型のマウスよりも強い短期記憶を保持できることが明らかとなった。そこで、この短期記憶向上のメカニズムの解明を試みた。学習直後の CREB による転写活性化が短期記憶向上を導いた可能性は低いため、CREB 標的遺伝子群の恒常的な高発現が短期記憶向上を導いたものと考察し、CREB 標的遺伝子の一つである神経栄養因子 BDNF に着目し、海馬 BDNF の発現レベルを解析した。その結果、BDNF の発現量が高いトランスジェニックマウスである程、短期記憶が向上していることが判明した。さらに、BDNF 及び BDNF 阻害剤を海馬に直接注入する薬理学的解析から、BDNF の発現量増大が短期記憶向上に貢献していることが明らかとなり、CREB 活性化による BDNF 発現量の増加が短期記憶の向上を導いたと考察した。更なる解析から、BDNF 発現が高い変異型マウスでは、BDNF と活性型 CREB との相乗的な作用が、長期記憶をさらに向上させていることも判明した。以上の結果は J.

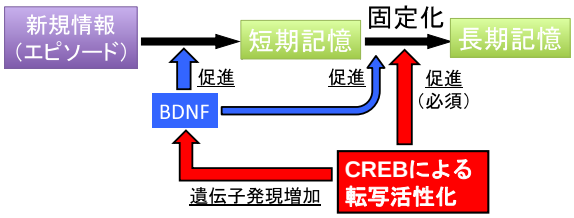


図　CREB活性化による記憶能力向上のメカニズム
CREBは記憶固定化（長期記憶形成）を正に制御する。さらに、BDNF発現を増加させて短期記憶も促進する。発現増加したBDNFはポジティブフィードバックループ的に記憶固定化促進にも貢献する。

Neurosci. *31*, 8786-8802.（2011）に掲載された。

C)dnRAR 発現マウスにおける記憶形成能力の障害

前脳特異的ドミナントネガティブ変異型 RARα 発現マウス(dnRAR マウス)を用いて解析を進めた。まず、電気生理学的手法により記憶形成の中枢である海馬のニューロン機能を解析した。入出力関係を評価した結果、dnRAR マウスは野生型に比べて PSFV に対する AMPA fEPSP が有意に小さく、AMPA 受容体

を介したシナプス伝達に障害を示すことが示唆された。続いて、1 回のコンディショニング刺激により誘導される LTP を解析した。その結果、dnRAR マウスでは LTP の誘導は正常であったものの、LTP の維持に障害が観察された。さらに、4 回のコンディショニング刺激により誘導される LTP を解析した。その結果、1 回のコンディショニング刺激を用いた結果とは対照的に、dnRAR マウスでは誘導直後から 3 時間後まで野生型との間に差異は観察されず、dnRAR マウスにおいて観察された LTP の障害はより強い LTP 誘導条件により解消されることが示唆された。以上より、レチノイン酸情報伝達経路の loss-of-function は、過去の報告と一致して海馬 LTP の障害に加えて、AMPA 受容体を介したシナプス伝達の減弱を導くことが初めて明らかとなった。さらに、この LTP の障害はより強い LTP 誘導条件により解消されることが明らかとなった。一方、dnRAR マウスを用いた行動学的解析から、この変異型マウスは海馬依存性の記憶形成能力に障害を示すことが明らかとなった。しかも、dnRAR マウスは社会認知記憶課題およびモリス水迷路課題において記憶障害を示すものの、これらの記憶障害も学習強度を高めたことで改善されたことから、LTP と記憶能力の間に相関性が認められた。従って、レチノイン酸情報伝達経路は神経可塑的変化を介して記憶形成を制御することが示唆された。以上の結果は、Mol. Brain. 5, 8 (2012)に掲載された。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)は、記憶想起にサーカディアン制御が存在することを発表するものであり、発表後には世界的にも注目され、記憶研究分野、さらには、時間生物学分野において、新たな流れを作るきっかけになるものと予想される。

一方、これまで、CREB は記憶固定化を正に制御することが世界的にも信じられていたが、行動レベルで CREB 活性化の影響を解析した例は少なかった。本発表によって、世界で初めて遺伝子操作マウスを用いて、CREB 活性化により記憶固定化が向上することが示された。この研究成果の記憶研究分野における意義は大きい。

C) は、脳特異的レチノイン酸受容体不活性化の影響を海馬依存性記憶課題と海馬の電気生理学的解析法を用いて詳細に解析した例であり、行動レベルとニューロンレベルの現象の相関性を明らかにした最初の例となった。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

おおむね順調に進み、大きな問題は生じなかった。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果により、記憶想起にサーカディアンリズム制御が存在することが明らかとなり、本研究を基盤として、これまで解析が困難であった記憶想起の分子基盤の解明が飛躍的に進展することが期待される。特に、次世代シークエンサーを用いた詳細遺伝子発現プロファイルなどの網羅的解析を通して、記憶想起を制御する新たな遺伝子群が発見されることが期待される。

聴覚情報処理を担う機能モジュールの体系的な同定と解析

研究代表者：上川内あづさ [1)2)]

1）名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻　2）JST さきがけ「脳情報の解読と制御」

＜研究の目的と進め方＞

動物の脳は、感覚器によって受容された音がその個体にとって意味を持つか否かを瞬時に判別できる。しかし、どのような神経回路がどのような組み合わせで動作した結果、そのような判断を導いているのだろうか。

聴覚は，地上生物では脊椎動物と昆虫類で大幅に進化を遂げた感覚モダリティである。これまで，猫やコウモリなどの哺乳動物や，コオロギやバッタなどの「鳴く」昆虫を用いて聴覚研究が進められてきた。しかし，分子遺伝学的操作が行いづらいこれら生物では、単一神経回路レベルでの神経機能の解析を，全聴覚系に渡って体系的に行うことは難しい。そのため、脳が音情報を判断する神経過程の全体像はあまり良く分かっていない。

モデル生物であるキイロショウジョウバエは、古くから研究材料として用いられている実験動物である。小規模な脳を持ち、神経機能を操作するための多様な分子遺伝学ツールが整備されている。さらに近年、遺伝子発現を時空間的に限定する手法が飛躍的に整備されたため、実験時のみで遺伝子発現を制御する必要がある神経行動学的研究や感覚情報処理研究など神経科学分野においても非常に良く使われる実験動物となっている。実際、脳内の神経回路を高い解像度で同定した後、個々の神経細胞の生理学的解析や、神経活動を制御した個体を解析することで行動発現に対する役割を解明する、といった一連の解析が効率よく行えるのである。このショウジョウバエは、配偶行動時にオスがメスに対して「求愛歌」と呼ばれる羽音を奏でることが知られている。この羽音は種に固有の音パターンを持ち、同種個体間での配偶行動促進効果を持つ。しかし、ショウジョウバエの脳が，どのようにこの特別な音パターンを他の雑音から識別して配偶行動を変化させるのか，その聴覚情報処理機構は不明である。

我々はこれまでに、動物脳における聴覚情報処理の神経回路基盤を理解する目的で、キイロショウジョウバエの脳における聴覚神経細胞の網羅的な同定を行ってきた（Kamikouchi et al, 2006; 2009など）。これらの研究により、音刺激を脳に伝える神経回路構造は解明された。しかし、受け取った音情報が脳内部のどのような神経回路の組み合わせでどのように処理され，「求愛歌音に対する配偶行動の活性化」などといった特定の行動出力に至るのか，その情報処理過程は未解明である。脳内部の聴覚神経は互いの神経連絡を介して、複雑な神経回路を形成していると考えられる。このような複雑な神経回路構造の構成要因であるそれぞれの神経細胞は、音の弁別や認識に関わる機能モジュールであると予想されるが、その具体的な神経回路構造や機能的役割は不明である。また，音刺激を脳に伝える神経経路の前段階として、音刺激がどのようにショウジョウバエの音受容器を振動させるか、という機構の理解も必要である。私たちの鼓膜が音に応じて振動するように，ショウジョウバエの音受容器である触角先端部も音に応じて振動する（図１）。その振動の大きさは能動的に制御されていることが知られている（Göpfert et al, 2006など）が、その制御機構には未解明な点も多い。

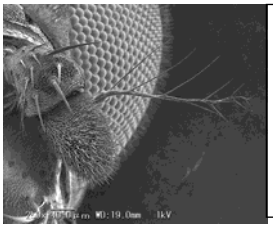


図１　ショウジョウバエの音受容器。音を構成する空気振動エネルギーは、触角先端部のアリスタと呼ばれる羽毛状の突起物を介して触角先端部を回転振動させる。

そこで本研究では、キイロショウジョウバエの聴覚行動を利用して、神経解剖学、神経生理学，行動解析と分子遺伝学を組み合わせることで、個体にとって意味のある音とそれ以外の雑音を弁別する脳内機構の神経回路基盤を解明することを目的とした。また、ハエが音を受け取る能動的機構を理解する目的で，音受容器の音刺激に対する振動がどのように調節されるか、の解明にも取り組んだ。

＜研究計画＞

1）二次聴覚神経細胞の網羅的な同定

これまでに解剖学的に同定されているショウジョウバエの一次聴覚神経の線維と、空間的に接する神経線維を高精度でスクリーニングする。これにより、二次聴覚経路を形成する神経細胞を全て同定する。ショウジョウバエで確立されている、２種類の分子遺伝学的手法である「GAL4/UAS法」と「LexA/lexAop法」を組み合わせると、1個体の中で異なる細胞群を二種類のマーカータンパク質で独立に標識することができる。そこで本研究では、LexAエンハンサートラップ系統を利用することで、LexAにより一次聴覚野があらかじめGFP標識され、かつGAL4依存に赤色標識タンパク質DsRedを発現する系統を遺伝学的に作成する。次に約4,000種類の GAL4 系統群の標識パターンが可視化された脳画像データベースを用いて、二次聴覚神経の候補を標識するGAL4系統群をスクリーニングする。同定した系統群を先に作成したLexA由来の系統と交配し、一次聴覚野をGFPで、二次聴覚神経の候補細胞をDsRedで標識した個体を作成する（図２）。このようにして二種類の神経線維を独立に標識し、一次聴覚神経の軸索との直接接触を指標にして確かに二次神経を標識している系統を絞り込み、二次神経を様々に標識するGAL4系統群を得る。これら同定したGAL4 系統群を用いて、二次聴覚神経回路を構成する神経細胞を体系的に同定し，神経回路地図を作製する。

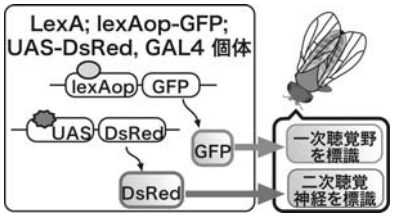


図２　異なる細胞群を別々に標識する個体。一次聴覚野を標識する LexA 系統を用いて、一次聴覚野が GFP で、二次聴覚神経の候補が DsRed で標識される個体を遺伝学的に作成する。

2）聴覚行動実験系の確立

キイロショウジョウバエの求愛歌はサインソングとパルスソング、という２種類のパターンを持つ羽音の組み合わせから構成される。これを利用して、Eberlらは、人工音を用いたショウジョウバエの聴覚行動実験を確立した（Eberl et al, 1997)。この実験系は、羽を切除したオス集団にショウジョウバエが求愛時に発するパルスソングに似せた人工パルス音を聞かせると、オス個体どうしでの配偶行動が誘発される、という野生型ショウジョウバエが示す本能行動を利用し,様々な遺伝子変異体における聴覚の有無を解析する実験系であった。そこで本研究計画では、この実験系の改変および動画解析の自動化を行うことで、求愛歌を構成する様々な音要素の改変効果を体系的に解析するための聴覚行動実験系を確立する。次に確立した聴覚行動実験系を用いて、求愛歌を構成する音要素の特定部分を段階的に改変した一連の人工音に対する、野生型ショウジョウバエの聴覚行動をそれぞれ定量化する。以上，一連の聴覚行動実験の結果から、野生型個体の配偶行動促進における各音要素の効果を解明する。それぞれの音要素がハエ個体の行動にどのような組み合わせでどのように影響を与えるかを解析することで、求愛歌を認識する高次聴覚神経回路を構成する機能モジュールの組み合わせを推定する。

3) 生理学的解析

カルシウムイメージング法を用いて、これまでに同定されている聴覚神経細胞が、振動や一定方向への傾きなど、どのような種類の機械刺激に応答を示すのか,その応答性の特異性や閾値を解明する。「GAL4/UAS法」と呼ばれる，任意の遺伝子を特定の細胞だけに発現させることができる分子遺伝学方法を利用して、カルシウム濃度変化依存に蛍光強度が変化するGCaMP3やCameleonといった遺伝子コード型カルシウムプローブを、研究計画の項目1)で同定したそれぞれの聴覚神経細胞を選択的に標識するショウジョウバエGAL4系統と掛け合わせて発現させる。スピーカーからの再生音を利用した音刺激や、静電気を用いてハエの触角音受容器を自在に動かす方法を利用し、蛍光顕微鏡下に固定したショウジョウバエ成虫の聴覚器や脳内部の神経活動をライブで可視化する。これにより，それぞれの細胞群がどのような触角の動きに選択的に応答するのかを解明し、その応答特性により聴覚神経細胞群を分類する。

次に、音受容器の振動制御機構を解明する。私たち哺乳類の音受容細胞である有毛細胞の振動の大きさは、脳を介して能動的に制御されている。そこで本研究計画では、ショウジョウバエの触角音受容器の振動も、哺乳類のシステムと同じように脳を介して制御されるか否かを解析する。GAL4/UAS法を用いて、神経伝達を阻害するテタヌス毒素を実験時のみ全神経細胞に発現させることで、脳由来の神経伝達を全て阻害したショウジョウバエ個体を作成する。この実験個体の触角音受容器の自発振動パターンを、微細な動きの観察に適した測定機器である「レーザードップラー振動計」を用いて解析する。この自発振動の測定では，能動的な振動制御の有無を推定することができる。これにより，脳を介した振動制御の有無を解明する。さらに、音受容器の最適周波数の純音を用いた音刺激に対する振動応答の非線形性,ならびに触角神経軸索に生じる複合活動電位を測定し、音への感度やその音量依存性を検討する。

4) 神経機能操作に伴う行動変化の解析

GAL4/UAS法を用いて、神経伝達を阻害するテタヌス毒素を、それぞれの聴覚神経細胞に選択的に発現させる。これにより，特定の聴覚神経経路が遮断されたショウジョウバエ個体を作成する。次にそれらの実験個体を用いて、先に確立した聴覚行動実験を行う。音要素を様々に改変した一連の人工音に対して、書く聴覚神経の伝達遮断がどのような効果をもたらすかを,聴覚行動を指標として定量的、定性的に解明する。この解析により、推測した機能モジュールと各二次聴覚経路との対応関係を解明する。

＜得られた研究成果＞

A) 二次聴覚神経細胞群の大規模同定

平成 21 年度から 24 年度までに、研究項目 1)について研究を進めた。当初の研究計画で予定していた約 4000 種類の GAL4 系統に加えて，平成 24 年にアメリカの Janelia farm から新たに公開された約 7000 系統も用いて大規模なスクリーニングを行い、二次聴覚神経を標識する GAL4 系統群を同定した。これら系統群を用いて単一細胞レベルでの神経回路構造解析を行い、低周波数の刺激を伝達する経路，高周波数の刺激を伝達する経路，およびそれら両方を伝達する経路を発見した。これら解析結果を基にして、二次聴覚神経細胞群が形成する神経回路地図を作製した。以上の成果を国際会議にて発表した（Kamikouchi A. Janelia Farm Workshop: The Neurobiology and Evolution of Insect Acoustic Communication, 2012)。

B) 聴覚行動実験系の確立

平成 21 年度から 22 年度までに、研究項目 2)4)について研究を進めた。これまでに確立されている実験系を応用して、神経機能を阻害した個体を用いた聴覚行動実験法を確立した。この方法では、聴感覚神経細胞の特定サブグループの神経伝達のみを阻害するテタヌス毒素の発現を、高温感受性型 GAL4 抑制因子 GAL80ts を利用して抑制することができる。実験時直前に高温条件下で飼育すると GAL4 活性が回復し、テタヌス毒素の発現が初めて誘導される。この方法を使うことで、発生過程などでの毒素発現を抑制することが可能となり、特定の聴感覚神経細胞の遮断が行動にどのように影響を与えるか，その効果を厳密に調べることができる。これらの方法論を結果としてまとめ、学術論文にて発表した（Inagaki, Kamikouchi & Ito, 2010)。引き続いて、平成 23 年度から 24 年度までに、研究項目 2)について研究を進めた。キイロショウジョウバエを用いたこれまでの聴覚行動実験系で使われていた人工パルス音に加えて，サインソングを模した人工音や、周波数やパルス間隔を体系的に変化させた人工音に対する野生型個体の応答行動を測定し，定量化した。これにより、体系的に改変した多様な人工音に対する聴覚行動実験系を確立することができた。この成果を国際学会にて発表した（Kamikouchi, International Symposium on Organization and Function of the Nervous System, 2012)。

C) 聴覚器の振動制御機構を解明

平成 21 年度から 22 年度までに、研究計画の項目 2)について研究を進めた。ショウジョウバエの音受容器である触角先端部は、自発的に振動することで、周波数選択的に微弱な音への感度を上げることが知られている。全神経細胞の神経伝達を遮断した実験個体の音受容器の自発振動は、対照個体と比較して同程度であっ

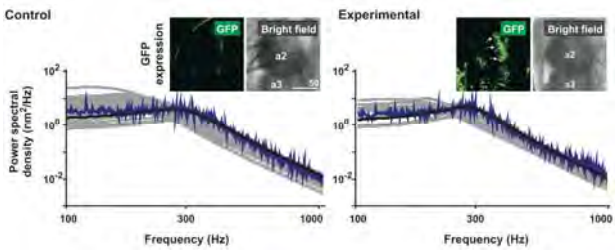


図３　ショウジョウバエの聴覚器振動の制御。
対照群個体（左図、Control）と同じように，全ての神経細胞での神経伝達を遮断した実験群個体（右図、Experimental）でも、ショウジョウバエの音受容器である触角先端部の正常な自発振動が観察された。Kamikouchi et al, 2010 より改変。

た（図３）。次に、スピーカーから再生した純音に対する振動の音量依存性を解析した。この実験でも、対照個体と同じように、全神経伝達を遮断した実験個体においても、音量に依存した非線形な振動増幅が観察された。触角神経軸索において計測される複合活動電位の音量依存曲線も、実験個体と対照個体との間で差が見られなかった。以上の結果から、ショウジョウバエの聴覚器の振動は、私たち哺乳類の聴覚器振動とは異なり、脳を介さずに聴覚器内部で自律的に制御されていることを発見した。この結果をまとめて、学術論文として発表した（Kamikouchi et al, 2010）。

D) カルシウムイメージング法の確立

平成 21 年度から 22 年度までに、研究計画の項目 3)について研究を進め、触角先端部（音受容器）を自在に動かした際の聴感覚神経の活動を可視化する実験手法を確立した（図４）。この方法は、帯電させたショウジョウバエを蛍光顕微鏡下に固定し、触角先端部近傍に設置した電極にサイン波や矩形波といった電圧信号を流すことで、触角先端部を静電気により駆動する、といった音受容器操作法と、カルシウム濃度変化により蛍光強度比が変化する Cameleon プローブをコードする遺伝子を特定の感覚神経のみに発現させる、といった分子遺伝学的手法を組み合わせることにより達成された。この方法論を結果としてまとめ、学術論文にて発表した（Kamikouchi et al, Nat Protocols, 2010）。さらに、平成 23 年度から 24 年度までに、この方法を応用して、機能未同定の機械感覚細胞の活動の可視化を行い、その応答特性を解明し、その成果を国際学会にて発表した（Kamikouchi A. 4th International Symposium on Photonic Bioimaging, 2012）。

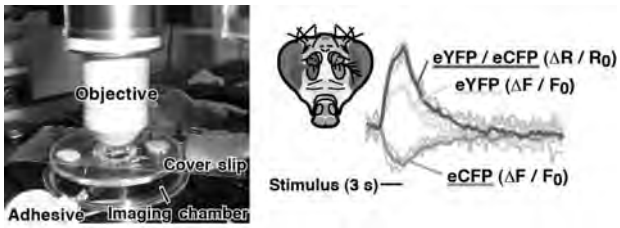


図４　聴感覚神経の活動可視化法の確立。カメレオンタンパク質を特定種類の神経細胞に発現させたショウジョウバエを顕微鏡下に固定し，静電気により音受容器を振動させた際のカルシウム応答を可視化した。Kamikouchi et al, 2010 より改変。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)により、二次聴覚神経細胞群が形成する神経回路地図の単一細胞レベルでの整備が進んだ。聴覚行動制御システムの動作原理を解明するためには、どのような神経細胞集団がどのような組み合わせで情報処理を担っているか、その神経回路構造をまず始めに理解する必要がある。本研究成果は、今後、脳における聴覚情報処理研究を進める上での必要不可欠な情報を提供することで、今後さらに発展する分野の重要な礎となることが予想できる。

研究成果の B)により、従来から使われていた聴覚行動実験法を改変することで、特定の神経細胞機能を行動レベルで大規模解析することが可能になった。従来の遺伝子変異体の聴覚行動解析で問題であった、発生過程での影響を、今回確立した方法では除去することができる。また、従来使われていた人工音以外の多彩な音を用いた聴覚行動解析も可能となった。以上、本発見はこれまでの当該研究分野の方法論をさらに発展させた報告となり、ショウジョウバエを用いた聴覚研究分野を加速させるきっかけとして重要な位置を占める。

研究成果の C)では、音受容器振動の能動的な制御のメカニズムに分子遺伝学を駆使して迫ることで、聴覚器の自律的な振動制御、という新たな特性を発見することができた。ショウジョウバエで発見されたこの特性は、哺乳類が持つ聴覚特性とは異なっており、聴覚器制御メカニズムの進化、という観点からもたいへん興味深い。以上、本研究は、競争が激化している聴覚器の振動制御機構の新たな側面を見いだした独創的な研究であり、今後の新たな研究展開の起爆剤になることが期待できる。

研究成果の D)については、ショウジョウバエの聴覚器内部の活動をそのまま可視化する、という世界初の実験系の方法論を発表する、という成果が得られた。神経活動を可視化するカルシウムイメージング法は,近年の蛍光イメージング技術の発展に伴い急速に発達してきた手法であり、従来の電気生理学的方法と比較すると、複数の神経細胞の活動を同時にライブ観測できる、という強みがある。この方法と、静電気で触角先端部を動かす、という技術を組み合わせることで初めて、本研究成果が達成された。その成果は今後、当該分野で汎用される一般的な手法として多大な影響をもたらすと予想される。カルシウムイメージング法を用いた神経活動の可視化は近年競争が激化している分野であり、今後益々の発展が期待される。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画の2）について、当初は雌雄間の配偶行動の促進効果を指標とした聴覚行動解析も計画していた。しかし雌雄間においては、求愛歌が全くない状態でもある程度配偶行動が活発であり、音への応答行動を解析する実験系としては不適当であることが判明した。よって本研究では、オス集団を用いた聴覚行動解析を中心に進めた。また、神経伝達を遮断するエフェクター因子として、当初の計画では高音条件下（３０℃）で化学シナプス伝達を遮断するShibire^{ts}を用いる予定であった。しかし、オス集団での行動活性化は、３０℃、というショウジョウバエにとって高温の条件では観察することができなかった。そこで、テタヌス毒素をGAL80^{ts}制御下で発現させ、行動実験自体はショウジョウバエの至適温度である２５℃で行う、という方法を採択した。

研究計画の3）について、脳深部に存在する聴覚神経の活動イメージングを試みたところ、私たちが保有している設備（横河電機、スピンディスク型共焦点レーザー顕微鏡）では充分な空間解像度を得ることが困難であることが分かった。今後、共同利用施設の利用などにより,より深部観察に適した２光子顕微鏡を用いた解析を進める必要がある。現在、愛知県岡崎市にある基礎生物学研究所との共同利用研究により、２光子レーザー顕微鏡を用いた解析の条件検討を進めている。パイロット実験を行ったところ、深部にある神経細胞の画像取得にも成功しているため、今後近いうちに脳深部のイメージングも可能になると予想される。

他の研究計画は、おおむね順調に進んだ。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果により、ショウジョウバエの聴覚系を行動レベル、神経細胞レベルの両側面から解析する技術が確立し、聴覚情報処理の研究をさらに進める基盤となった。今後引き続いて研究を進めることにより,さらなる高次での神経情報処理機構が解明されることが期待される。

＜引用文献＞

Eberl DF, Duyk GM, Perrimon N. A genetic screen for mutations that disrupt an auditory response in Drosophila

melanogaster. Proc Natl Acad Sci (USA) *94* pp14837-14842. 1997.

Göpfert MC, Albert JT, Nadrowski B, Kamikouchi A. Specification of auditory sensitivity by *Drosophila* TRP channels. **Nat Neurosci.** *9,* pp999-1000. 2006.

Inagaki HK, Kamikouchi A, Ito K. Protocol for quantifying sound-sensing ability of *Drosophila melanogaster.* **Nat Protocols** *5*, pp26-30. 2010.

Kamikouchi A, Shimada T, Ito K. Comprehensive classification of the auditory sensory projections in the brain of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **J Comp Neurol.** *499,* pp317-356. 2006.

Kamikouchi A, Inagaki HK, Effertz T, Fiala A, Hendrich O, Göpfert MC, Ito K. The neural basis of *Drosophila* gravity sensing and hearing. **Nature** *458*, pp165-171. 2009.

Kamikouchi A, Albert JT, Göpfert MC. Mechanical feedback amplification in *Drosophila* hearing is independent of synaptic transmission. **Eur J Neurosci** *31*, pp697-703. 2010.

Kamikouchi A, Wiek R, Effertz T, Göpfert MC, Fiala A. Transcuticular optical imaging of stimulus-evoked neural activities in the Drosophila PNS. **Nat Protocols** *5*, pp1229-1235. 2010.

Kamikouchi A. Neuroanatomy of the Drosophila auditory system. Janelia Farm Workshop: The Neurobiology and Evolution of Insect Acoustic Communication, Janelia Farm, USA. May 14-16, 2012.

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.

Kamikouchi A. The auditory system of fruit flies. 4th International Symposium on Photonic Bioimaging. Sapporo, Sep. 17, 2012.

嫌悪刺激回避行動の学習機構

研究代表者：中村加枝

関西医科大学生理学第二講座

＜研究の目的と進め方＞

報酬に接近し、嫌悪刺激に対して行動を抑制または回避する、という報酬獲得･罰回避行動のメカニズムは種を超えて存在している。さらに、新しく経験する手掛かり刺激への価値評価と行動の「学習」は生体の生存に必須である。哺乳類の大脳基底核は感覚・運動系と辺縁系の情報が収束する位置にあり、この価値に基づく行動学習の神経メカニズムの中心であると考えられる。しかし、報酬の情報の具体的な内容や、特に、負の情報（嫌悪刺激）が大脳基底核で処理されているのかについて未だ不明である。

そこで、申請者はこれまで、眼球運動課題を行っている霊長類の大脳基底核の入力チャンネルである「線条体」の神経活動を計測した。注目点は以下の 2 点である。

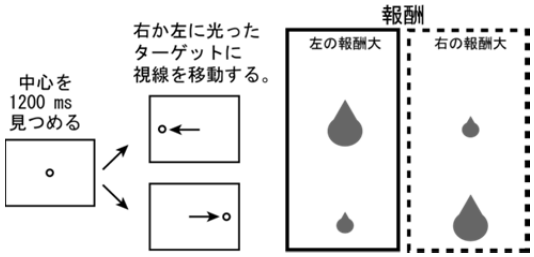
（1）行動課題では、（A）コンテキストによって、眼球運動の（B）方向（右か左か）が（C）異なる報酬（多いか少ないか）と関連付けられている。また、一回のコンテキストの中での試行数が一定であるので､これまでの試行の数から次の試行の報酬の量がある程度予測できる。つまり、（D）試行のヒストリーによる報酬の予測が可能である。これらＡ－Ｄの情報がどの様に細胞レベルで計算されているかに着目した。

（2）線条体内の機能マップの存在を明らかにする。これまで、霊長類では、眼球運動課題において、線条体の中の中でも背外側が主に調べられてきたが、異なる線条体領域（背外側・腹側・腹内側）が異なる脳の領域と解剖学的な結合があることから、機能も異なると予想される。

＜研究計画＞

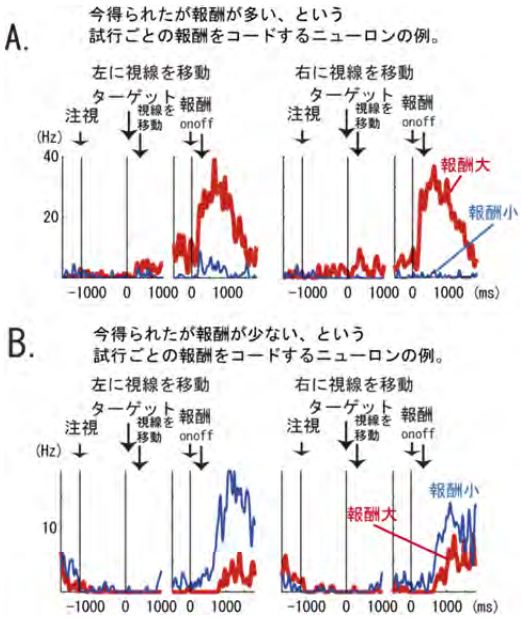
行動課題：　サルに視線を移動する、すなわち眼球運動により報酬を獲得する課題を行わせる。中心の注視点から右や左に出た白い点（ターゲット）に視線を移動すると、ジュースの報酬が与えられる。ここで、20 試行から成る一つの「ブロック」では右のターゲットの試行では多くのジュースが、左では少ない量のジュースが与えられるとする。次の 20 試行は左が多く右が少ないジュースが与えられる。この課題を学習すると、サルは「現在どちらの方向が報酬が多いか」を予測して眼球運動を行い、方向によって異なる量の報酬を得る。

神経生理:この課題を行っているサル 2 頭の大脳基底核線条体のうち､眼球運動に関連の深い尾状核の背外側から腹内側まで広範囲に、神経細胞一個一個の発火を記録した。深さにより背外側、中央、腹内側の 3 つの領域に分けて解析を行った。



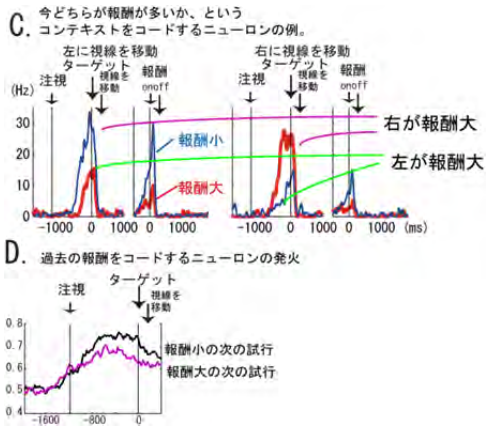
＜得られた研究成果＞

尾状核には以下のような異なる報酬の信号が見られた。



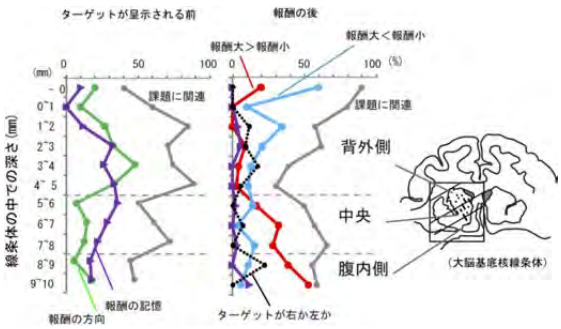
A のように、線条体腹内側の細胞は報酬が多く与えられる時点で強く発火し、少ない時はあまり発火しない傾向があった。逆に、背外側の細胞はＢのように報酬が少ない場合に発火する傾向があった。これは、一回一回の試行の報酬の情報である。

背外側の細胞は例えばＣのように、「右のほうが報酬が多い」という報酬の予測に特異的に反応していた。つまり、一回一回の報酬の量ではなく､状況またはコンテキストに特異的な発火である。さらに､D のように線条体細胞の中には前の試行で得た報酬の量、さらには 2 試行以上前の報酬の量まで記憶しているものもあった。



下の図は、これら異なる報酬情報を担う細胞の分布を課題の期間別にあらわしたものである。重要なことはこれらの情報が一つの細胞ではなく、別々の細胞で処理されることによって、異なる種類の報酬の並列処理が行われていることを示唆した。また、それぞれの報酬情報に特徴づけられた細胞は異なる活動電位の持続時間と課題を行っていない場合の基底の発火頻度を示していることも明らかになり、解剖学的または物質的な違いが報酬情報の違いの基盤になっている可能性も示唆した。

これらのデータは J.Neuroscience (Nakamura et al.2012) に掲載された。



＜国内外での成果の位置づけ＞

異なる種類の報酬の情報がある領域の平均的な機能を調べるには fMRI (核磁気共鳴法) などの方法がある。しかし、時間・空間分解能の高いより詳細な機能の解明のためには、一個一個の神経細胞 (ニューロン) の発火の強さやパターンを調べる必要がある。今回は、報酬条件として、報酬量の大小、報酬を得られる場所、報酬に対する期待の強さなどを変え、これらの情報が線条体でどの様に処理されているのかを個別の神経細胞レベルで線条体の背側から腹側まで調べた初めての記録である。

その結果、大脳基底核線条体の中で、報酬の大小、報酬を得られる場所、期待の強さ、過去の報酬の情報などがそれぞれ個別の細胞によって処理されることがわかった。さらに、それぞれの情報を処理する細胞は特定の部位に集中して存在することも明らかになった。これは、線条体では報酬の情報処理は並列的に行われていることを示している。これまで大脳基底核が報酬の情報を処理していることは知られてきたが、今回の実験結果から具体的な処理過程が明らかになった。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

報酬を得るための行動のみならず、嫌悪刺激の回避におけるメカニズムをあきらかにしたかった。しかし、動物の回避行動をエアパフで起こすのは非常に困難で、回避行動における神経活動は十分記録できていない。

＜今後の課題、展望＞

今回の結果は、個別の細胞が異なる報酬の情報を処理していることを示唆したが。例えば、線条体は様々な神経伝達物質（ドパミン、セロトニンなど）が投射しており、細胞によって伝達物質の受容体や作用機序が異なる可能性がある。今後これらの点を明らかにすることによって、細胞レベルの情報処理に対する個別の治療なども行えるようになると予想される。例えば、薬物に異常な執着を持ってしまう依存症の治療に際し、薬物とは関係のない正常な「やる気」は維持するというように、個々の報酬経路に対して特異的な治療を考慮する必要がある。本研究はこのような治療法の基礎になることが期待される。

公募研究：平成 21 年度-平成 22 年度

野生型および変異マウスにおけるバレル回路形成素過程の解析

研究代表者：岩里　琢治

1）国立遺伝学研究所　形質遺伝研究部門

＜研究の目的と進め方＞

哺乳類の大脳皮質は複雑かつ精密な神経回路を有するが、その発達には、生後、動物が環境から刺激を受けることにより、神経活動依存的に精緻化される過程が重要と考えられている。しかしながら、その機構の理解は不十分である。

「バレル」はげっ歯類（マウス、ラット）の大脳皮質体性感覚野の第 4 層にみられる、顔におけるヒゲの配置に対応した、組織学的構造であるが（図１）、主に３つの特徴を持つ：（１）視床－皮質軸索の終末は第 4 層で分枝を形成するが、同じヒゲからの入力を伝える軸索同士で対応するバレルの中心にクラスターを形成する。（２）ヒゲからの入力を受ける第 4 層のバレル細胞（spiny stellate neuron）は視床－皮質軸索終末のクラスターを取り囲むように、その細胞体をバレル辺縁に配置する。（３）そして、バレル細胞は樹状突起をバレル中心へと非対称的に伸ばし、視床－皮質軸索とシナプスを形成する（図２）。こうした特徴的な構造によって、1 個のバレル細胞には 1 本のヒゲからの入力のみがはいることが可能となる。これらの特徴の発達には新生仔期におけるヒゲからの入力が重要な役割を担うことが知られている。こうした知見からバレルは、活動依存的神経回路発達のモデルとして注目されてきた。

われわれはバレル発達をモデルとして、最先端のマウス遺伝学を用いることにより活動依存的回路発達の研究を行ってきた。たとえば、NMDA 型グルタミン酸受容体（NMDAR）の必須サブユニットである NR1 を大脳皮質特異的にノックアウトすると、上で述べたバレルの３つの特徴のすべてに顕著な障害がみられ、バレル発達における NMDAR の重要性が明らかになった

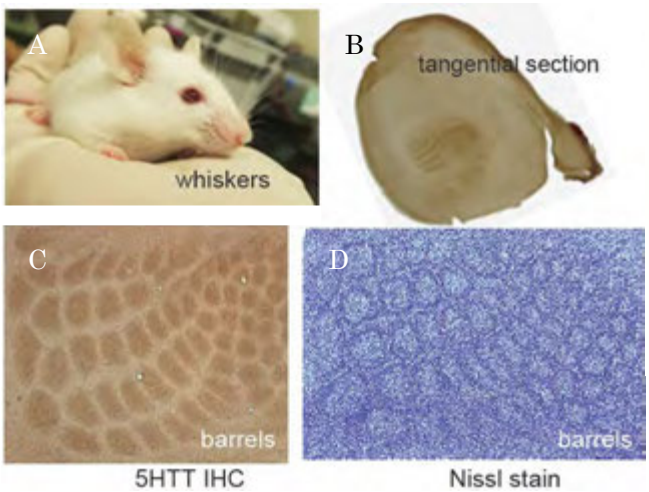


図１：マウスのヒゲとバレル地図

(A) マウスの頬ヒゲ。 (B)大脳皮質第 4 層の tangential 切片の CO 染色。体性感覚野にヒゲの配置に対応したパターン（バレル地図）が見える。(C) 視床－皮質軸索終末の染色によるバレル地図。(D) 大脳皮質第 4 層細胞の細胞体の染色によるバレル地図。

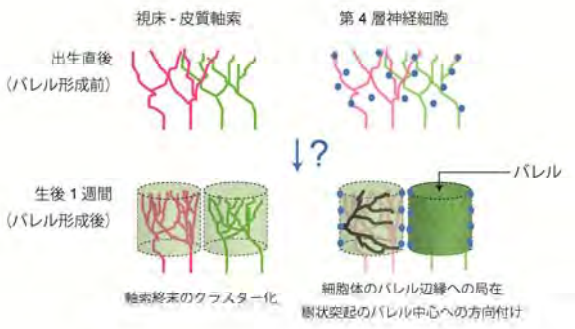


図２：バレル形成の模式図

個々のバレルにおいて、対応するヒゲからの入力を伝える視床－皮質軸索の終末がバレル中心にクラスターを形成する。バレル細胞（第 4 層興奮性神経細胞）はバレル辺縁に細胞体を配置し、樹状突起をバレル中心にむかって非対称的に伸ばし、視床－皮質軸索とシナプスを形成する。こうした特徴的な組織学的構造は新生仔期のヒゲからの入力依存的に形成される。しかしながら、その途中の過程については不明である。

（Iwasato et al., Nature 2000, Datwani et al., Mol. Cell. Neurosci. 2002, Lee et al., J. Comp. Neurol. 2005）。こうした研究の成果としてバレル形成に関与する分子群が明らかになってきた。しかしながら、われわれ自身を含め従来のバレル発達の研究は専ら固定サンプルを用いた組織学的解析、あるいは切片での電気生理学によって行われてきており、バレル形成過程を直接観察した例はない。したがって、バレルがまさに形成されている新生仔期に脳の中で実際に何が起きているのか、さらには、特定の遺伝子がノックアウトされバレル形成が障害されたときに脳の中で実際に何が異常となっているのかはまったく不明であった。

バレル形成の分子機構をより本質的に理解するために、バレル形成過程を in vivo で直接観察することが有効と考えられる。本研究課題はそうしたバレル発達の in vivo イメージングに挑戦するものである。ただし、バレル形成は生後数日間に起きる現象であるが、新生仔マウスの脳での in vivo 観察の例は、バレル皮質に限らず、これまでに存在していない。したがって、実際の観察を行う前に、観察を可能とする技術開発から始める必要があった。

＜研究計画＞

具体的な項目は以下のとおり：（1）二光子顕微鏡タイムラプス観察のための、新生仔マウスでの適切な手術および麻酔方法の検討。（2）バレル細胞の形態を観察するために、大脳皮質で層特異的に疎らに明るく蛍光標識する技術の開発。（3）細胞自律的な遺伝子の働きを検討するために、疎らに標識された細胞特異的に遺伝子をノックアウトするシステムの開発。（4）視床-皮質軸索終末のを in vivo で蛍光標識するためのトランスジェニックマウスの開発。（5）二光子顕微鏡によるバレル細胞とバレル地図の同時観察。最初に野生型マウスの解析を行うが、それに成功すれば遺伝子変異におけるバレル形成異常の解析に応用する。最初に解析するのは NMDAR の役割である。解析項目は野生型と同じであり，両者の結果を比較することにより，視床-皮質シナプスのポスト側にある NMDAR が，バレル形成のどの素過程にどのように働くのか明らかにする。

＜得られた研究成果＞

1．新生仔マウスの脳をイメージングするための観察システムの確立

マウス脳深部のイメージングを行うには、正立の二光子励起レーザー顕微鏡を使用する必要がある。国立遺伝学研究所の共通機器として、二光子レーザー顕微鏡（Zeiss LSM7MP）と超短パルスフェムト秒チタンサファイアレーザー（MaiTai eHP DeepSee）を導入していただけることになり、その機種選定とセットアップを行った。

生体内イメージングを行う際に重要なことの一つは、マウスを適切に麻酔し、対物レンズ下に固定して、観察対象を動かないようにすることである。バレルが形成される新生仔マウスを麻酔するのに、どのような方法が良いのか、どのくらいの時間の麻酔が可能か、といった条件を検討し、マウスが死なず、かつ長い時間不動化できるような麻酔条件を検討した。また、動物の負担を軽減するために、手技に熟練し手術時間を短縮する必要があった。幼若マウスの頭蓋骨は薄いのでそのまま観察することを当初予定していたが、検討の結果、硬膜を傷つけないように頭蓋骨を除去する方が観察に適していることが明らかとなった。マウスをステージに固定するためのチタンバーも、当初デザインしたものは重すぎて仔マウスが弱る原因になったので、軽量のものをデザインした。

2．バレル大脳皮質第４層神経細胞の標識

バレル構造のポストシナプス側である、大脳皮質第４層の神経細胞を標識するため、子宮内胎仔脳エレクトロポレーション法を用いた。胎生 14 日目（E14）のマウス胎仔の脳室にプラスミドを導入し、電気パルスを与えることにより第４層興奮性神経細胞を標識することができるが、体性感覚野に遺伝子導入するための電気パルスを与える角度などの条件検討を行った。

イメージングの際には、標識された細胞の密度が観察目的に適していることが重要である。本研究ではバレル細胞の樹状突起方向性獲得過程に焦点を絞って解析を行うことにした。標識細胞の密度が樹状突起の動態の観察に最適になるプラスミドの組み合わせと濃度を検討し適切なものを得ることができた。蛍光蛋白質として RFP を選択したが、神経細胞の形態が可視化できることを組織切片の作製と解析によって確認した。

また、このシステムでは RFP を発現する細胞で同時に Cre も強く発現する。これを flox マウスに導入することにより、標

識細胞特異的に遺伝子ノックアウトを行うことも理論的に可能である。このことを Rosa-loxP-CAT-loxP-GFP レポータマウスを用いて確認した。さらに、NR1flox マウスを用いて NR1 アレルも標識細胞特異的に効率よくノックアウトされることを確認した。

３．バレル地図を in vivo で可視化するマウスの作製

バレル細胞の樹状突起の動態とバレルの位置の関係を in vivo で調べるためには、プレシナプス側である視床－皮質軸索終末を in vivo で可視化することが必要である。そのために、視床の神経細胞特異的に蛍光物質を発現するトランスジェニックマウスを作製した。我々はこれに先だって、視床特異的に発現するセロトニントランスポーター遺伝子のプロモータ（5-HTT プロモータ：発表準備中）の同定に成功しており、それを用いた。Red/ET recombination system（Gene Bridge 社）を用いて 5HTT プロモータを含む BAC（Bacteria artificial chromosome）クローン上の 5HTT 遺伝子開始コドン周辺と膜移行型 GFP を入れ替えた。その BAC クローンから薬剤耐性遺伝子を除去したものを直鎖化し、マイクロインジェクションによって B6 受精卵に導入した。得られたトランスジェニックのファウンダーマウスを野生型マウスと交配し、その子供の脳の切片を作製し、GFP 発現を観察した。その結果、視床の VB 核（体性感覚系）、LGN 核（視覚系）、MGN 核（聴覚系）から皮質に投射する軸索が標識されることにより体性感覚野、視覚野、聴覚野が明るく標識される系統の存在を確認した。

この系統のトランスジェニックマウスの E14 の胎仔にエレクトロポレーション法で DNA を導入することにより、バレル細胞とバレルのパターンをそれぞれ RFP と GFP で同時に標識することに成功した。

４．その後の展開

バレル細胞の樹状突起が細胞自律的な NMDAR の働きによってバレル内側への方向性を形成することがわかっているが、発達期のいつ、それが形成されるかは知られていない。したがって、二光子顕微鏡を用いた in vivo イメージングを行うべき発達段階を特定するために、組織学的に新生仔期（P4. P5, P6）と成熟後（P16）の樹状突起方向性を野生型細胞と NR1 欠損細胞で比較した。その結果、生後 4 日目（P4）では野生型も NR1 欠損細胞もどちらも同等の内向き方向性をもっていることが明らかになった。それが P5、P6 となるにしたがって野生型では内向き方向性が増大するが NR1 欠損細胞では増大しない。その結果、P5,P6 ではゲノタイプ間で有意差が検出された。すなわち、P4 から P6 の間に NMDAR 依存的に内向き方向性の強化が起きることが明らかになった。

上記の解析結果をうけて、P4 および P5 から二光子顕微鏡を用いて in vivo イメージングを行った（図３）。9 時間または 18 時間のイメージングを行ったが、野生型では P5 から 18 時間イメージングした細胞で、樹状突起の内向き方向性が増大することが観察された。一方、NR1 欠損細胞ではそのような増大が見られなかった。これらの結果により、我々の 18 時間の in vivo 観察の条件下でバレル細胞が正常に内向き方向性を獲得していることを確認することができた。これらの予備的結果をうけて、野生型細胞における正常なバレル発達過程および NR1 欠損細胞におけるバレル発達の異常の過程の詳細な解析を行った。これらの結果は、北米神経科学学会（2011 年、2012 年、2013 年）、日本神経科学学会（2011 年、2012 年、2013 年）など国内外の学会で発表している。学術論文は現在投稿準備中である。

＜国内外での成果の位置づけ＞

二光子顕微鏡を用いたマウス脳の in vivo イメージングは世界中で活発に行われているが、そのほとんどは成体あるいは生後 2 週目以降を対象としており、新生仔マウスのイメージングはい

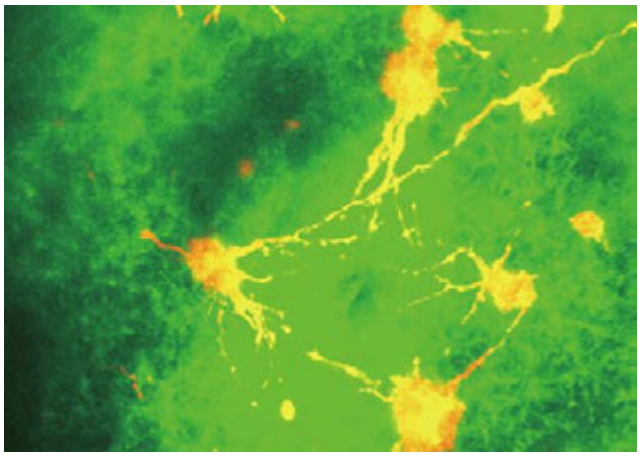


図３　バレル地図とバレル細胞

視床－皮質軸索終末のクラスターが GFP、バレル細胞が RFP で標識されている。生体新生仔での二光子顕微鏡観察。

まだにほとんど存在しない。また、そうした数少ない新生仔期のイメージングももっぱら短時間のイメージングあるいは軸索のイメージングであり、技術的により困難な樹状突起の長期イメージングは私の知る限りこれまでには存在しない。

また、バレル形成機構研究の観点から考えると、これまでに我々や他グループの研究により、様々な分子の全身性ノックアウトマウスや大脳皮質特異的ノックアウトマウスが作製され解析されたことにより、バレル形成に関与する分子群の同定は進んでいる。しかしながら、これまでの解析はすべて固定脳での組織学的解析あるいは切片での電気生理学であり、バレル形成がまさに起きている時期の脳で実際に何が起きているのかをみた例はいまだに存在しない。本研究は私の知る限り世界初の「バレル発達の in vivo イメージング」である。

さらに、方法論的側面から考えると、本研究の過程で開発した「大脳皮質細胞をまばらに標識し、標識細胞特異的に特定の遺伝子をノックアウトする手法」は、厳密に比較することはできないのであくまでも文献や学会での発表内容からの推測ではあるが、国内外で開発されている様々な同目的のシステムと比較して、使用の容易さと精度の高さの観点から、最高クラスと自負している。また、今回の研究で開発した視床－皮質軸索を GFP で標識するトランスジェニックマウスも私の知る限り世界初であり、今後、大脳皮質神経回路発達における視床からの影響を研究する上で普遍的なツールとして有効であることが期待される。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

困難としては、当初、生後 4 日目など新生仔期に手術したマウスがイメージングの途中で死んだり、頭につけた観察窓が長時間にわたるイメージングの途中で曇るなどの問題が多発したことが挙げられる。これに対しては、頭蓋骨の削り方を工夫したり、麻酔の強さを工夫するなど、細かく一つずつ対応することによって、現実的に解析できるレベルまで改善することができた。また、死亡率に関しては、当初は近交系である C57B l /6 の遺伝的背景でマウスを準備していたが、死亡率をさげるため、途中から、体が大きく丈夫な ICR の遺伝的背景をもつマウスに変更したことも改善に役立った。しかしながら、こうしたマウスの準備は時間的に大きなロスとなった。その他の多くの実験も細かい条件検討が必要だったが、一つずつ解決した。

＜今後の課題、展望＞

今回、二光子顕微鏡を用いて P4 あるいは P5 から 9 時間あるいは 18 時間の間の樹状突起精緻化のイメージングをおこなった。今後これを発展させて取り組むべき課題をいくつか提案する。一つは、より早期である P3 からのイメージングである。バレル細胞が視床－皮質軸索クラスターの周りにその細胞体を配置させる現象は P3 から P4 の間にもっとも顕著に起きる。したがって、その過程を観察するためには P3 からのイメージングが必要である。P3 からのイメージングはマウスが小さいため多くの技術的困難が予想される。しかしながら、これまでに P4 イメージングで多くの経験を積むことができたので、解決可能と考えている。また、今回は 3 点あるいは 4 点のタイムポイントでイメージングをしているが、より細かく、さらにより長くイメージングをしたい。これも技術的習熟によって可能な段階まできていると考えている。さらに、今回のイメージングは形態に限定するものであったが、エレクトロポレーションで GCaMP などをを導入することによって神経活動のパターンと形態変化との関連を解析するなど、今後の広がりが期待される。分子機構の解析に関しても、バレル形成に関与することが知られている分子は多く見つかっているが、その互いの関係については不明の点が多い。それらの分子をノックアウトあるいはノックダウンし、バレル発達中の in vivo での表現型を比較することにより、分子間の関係が明らかになることが期待される。

一方、方法論的には、今回の研究の過程で開発した「視床－皮質軸索を GFP で標識するトランスジェニックマウス」は、今後、大脳皮質神経回路発達における視床からの影響を研究する上で有益なツールとして貢献することが期待される。さらに、本研究で開発した「大脳皮質神経細胞を疎らに標識すると同時に標識細胞特異的に特定の遺伝子をノックアウトできるシステム」も、子宮内エレクトレポレーションを用いる簡便なものであり、効率が非常によい。バレル発達の研究に限定されない幅広い脳神経回路発達の研究に貢献することが期待される。

公募研究：2011 年度-2012 年度

ロコモーション発達過程におけるグリシン作動性シナプスの形成

研究代表者：平田　普三[1)]

1）国立遺伝学研究所新分野創造センター

＜研究の目的と進め方＞

ロコモーション制御においてグリシン作動性の抑制性シナプス伝達が重要であることは昔から知られており、マウス、イヌ、ヒツジ、ウシなどの動物でグリシン受容体の自然発祥変異がstartle reflex と呼ばれる運動異常を起こすことが報告されている。この異常はヒトでもJumping Frenchman of Maineとよばれるフランス系カナダ人に多い遺伝性運動障害として古くから知られていたが、現在では過剰驚愕症Hyperekplexia、通称ビックリ病として認知されている。神経科学の研究において、グルタミン酸作動性シナプスに代表される興奮性シナプスが精力的に研究され、その形成機構や可塑性の分子基盤が明らかにされてきたのに比べ、抑制性のグリシン作動性シナプスについてはシナプスに存在する分子の知見も少なく、形成や制御についても不明の点が多い。研究代表者はゼブラフィッシュの逃避運動や泳動を指標にグリシン作動性シナプスに異常のある変異体を得て、シナプスの染色、電気生理を取り入れることで、グリシン作動性シナプスの形成・制御機構の研究を進めてきた。ゼブラフィッシュは発生が速く、変異体スクリーニングが可能で、受精後わずか１７時間後から運動をすることが知られており、ロコモーションの研究に適した脊椎動物である。研究代表者はこれまでにゼブラフィッシュをグリシン受容体の特異的阻害剤であるストリキニーネの存在下で発生させると、グリシン作動性シナプス伝達が阻害されるだけでなく、グリシン作動性シナプスの形成が障害を受けるという予備データを得ており、この結果はグリシン作動性シナプスの形成にはグリシン作動性シナプス伝達が必要である、すなわち、グリシン作動性シナプスは発生期の個体で活動依存的に形成されることを示唆している。

本研究で研究代表者はグリシン作動性シナプスが形成される過程を同定可能な単一のニューロンで観察し、シナプス形成過程を記述する。また、さまざまな阻害剤を作用させた条件でシナプス形成を観察することで、シナプス形成に必要なシグナル系、分子を同定する。これまでグリシン作動性シナプスを形成する分子としてはグリシン受容体とその足場タンパクであるゲフィリンが知られているだけであり、グリシン作動性シナプスに関わる新規の構成分子、あるいは制御因子の探索も行う。これらと平行してグリシン受容体やゲフィリンに緑色蛍光タンパク（GFP）や赤色蛍光タンパク（mCherry）を付加したものをグリシン作動性シナプスを受容するポスト側のニューロンに発現させることでグリシン作動性シナプスのライブイメージングを行う。これができれば、グリシン作動性シナプスの形成・脱形成のダイナミクスを可視化できるだろう。研究代表者はこれらの研究から発生期の個体におけるグリシン作動性シナプスの構成、制御、機能の全体像解明を目指している。

＜研究計画＞

1)　平成２３年度

グリシン作動性シナプスの構成分子あるいはグリシン作動性シナプス伝達に必須の制御因子を同定する目的で、ゼブラフィッシュ胚にさまざまな阻害剤を作用させ、グリシン作動性シナプスに障害がある時に見られるロコモーション異常と同じ運動異常が見られるかを観察する。研究代表者は過去の研究でグリシン受容体の特異的阻害剤であるストリキニーネにより体の左右の運動リズムが消失するというロコモーション異常を見出しており、これをポジティブコントロールとして指標にする。グリシン作動性シナプスの形成あるいはグリシン作動性シナプス伝達に必須の因子を同定する他の手法として、ENUを変異原として用いた、オーソドックスな変異体スクリーニングをF3世代で行い、グリシン作動性シナプスに障害がある時に見られる典型的な運動異常を示すホモ変異体を探索する。

ゼブラフィッシュでグリシン作動性シナプスを可視化する目的でグリシン受容体、足場タンパクであるゲフィリンをゼブラフィッシュでクローニングし、それぞれにGFP, mCherryを蛍光タンパクタグとして付加する。これらをUASプロモーター下で発現するコンストラクトを作製し、Tol2トランスポゾンを用いてゼブラフィッシュゲノムに組み込み、トランスジェニックゼブラフィッシュを作製する。GAL4を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュは国立遺伝学研究所の川上浩一教授、浅川和秀助教（当新学術領域研究のメンバー）が膨大な系統を作製しているので、これを利用する。これらを組み合わせてGAL4とUASのダブルトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を作製することで、グリシン作動性シナプスを受容する特定のニューロンで蛍光タグ付きのグリシン受容体やゲフィリンを発現させることが可能になる。また、膜局在型GFPや膜局在型mCherryをUASプロモーターで発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統も作製し、膜上でのグリシン受容体の側方拡散やエンドサイトーシス・エキソサイトーシスといったダイナミックな変化をライブイメージングで解析する。

2)　平成２４年度

平成２３年度に同定するグリシン作動性シナプスの形成あるいはグリシン作動性シナプス伝達に必須な因子を解析する。特に当該分子の特異的阻害剤を用いたり、dominant negative を発現させることでグリシン作動性シナプスの形成や機能に変化がないかを観察することで、当該分子の機能を明らかにする。また、変異体スクリーニングで得られるグリシン作動性シナプスの形成や機能に異常のあるゼブラフィッシュ変異体については、ゲノム上の整備されているマイクロサテライトマーカーを用いたマッピングを行い変異の責任領域を狭めた上で、cDNA クローニングを野生型と変異体で行い、表現型の原因となる責任遺伝子の変異を同定する。さらにその遺伝子の異常がなぜグリシン作動性シナプスの異常を起こすかを染色や電気生理などの解析手法から明らかにする。

平成２３年度に作製するグリシン作動性シナプスを可視化するトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて、グリシン作動性シナプスの形成の過程を生体内ライブイメージングで詳細に解析する。また、カルシウムチャネル、キナーゼ、フォスファターゼなどの阻害剤を発生期のゼブラフィッシュに作用させ、グリシン作動性シナプスの経時変化を解析し、脱形成の動的過程でエン

ドサイトーシス・エキソサイトーシスが起きるかなども明らかにする。

＜得られた研究成果＞

A) グリシン受容体のシナプス凝集におけるグリシン作動性シナプス伝達とポストシナプスでの CaMKII 活性化の重要性

平成２３年度から２４年度までに名古屋大学の山中衣織さん（大学院生）、三木麻莉子さん（大学院生）、小田洋一教授、国立遺伝学研究所の浅川和秀助教、川上浩一教授と研究を進め、以下の成果を得た。グリシン作動性シナプスを単一神経細胞で解析するために、ゼブラフィッシュ個体の後脳に１対のみ存在し、逃避行動を制御することが知られるマウスナー細胞に注目して、グリシン受容体のシナプス凝集を抗グリシン受容体抗体で免疫染色することで経時解析する実験系を構築した（図１）。マウスナー細胞においては受精後２日以内にグリシン受容体がシナプスに凝集し、機能的なグリシン作動性シナプスが形成される。しかし、グリシン受容体の特異的阻害剤であるストリキニーネ存在下でゼブラフィッシュを発生させると、グリシン受容体のシナプス凝集は見られなかった。グリシン作動性シナプスが形成された２日胚以降のステージでストリキニーネを作用させると、それまでに形成された受容体凝集が消失することも確認され、グリシン作動性シナプス伝達はシナプスにおけるグリシン受容体凝集の形成と維持の両方に必須であることが確認できた。ストリキニーネ以外にもさまざまな阻害剤をゼブラフィッシュに作用させる実験を行い、L 型カルシウムチャネル阻害剤であるニフェディピン、カルシウムカルモジュリン依存的タンパク質リン酸化酵素（CaMKII）阻害剤である KN93 を作用させると受容体凝集が阻害されることが確認された。さらに、マウスナー細胞特異的に転写因子 GAL4 を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて CaMKII 阻害ペプチドをマウスナー細胞で発現させるとマウスナー細胞での受容体凝集が阻害されたことから、ポストシナプスの細胞における CaMKII 活性化が受容体凝集に必要であることが分かった。これらの結果から研究代表者らは以下のモデルを提唱するに至った（図２）。プレシナプス末端から放出された伝達物質であるグリシンがポストシナプス膜にある受容体を活性化して塩素イオンの透過性を高めるが、この時期の若いニューロンは細胞内に塩素イオンが多く、チャネルの開口は脱分極に作用すると考えられる。ポストシナプス膜の脱分極は近位にあるＬ型カルシウムチャネルを活性化し、これがカルシウム流入を起こし、細胞内カルシウム濃度が上昇する。カルシウムはカルモジュリンに結合し、CaMKII を活性化する。CaMKII はなんらかの下流仲介分子を介してグリシン受容体のシナプス凝集を促進すると考えられる。研究代表者らはこれらの結果を学術論文として国際誌に発表した（Yamanaka et al., Genes Cells, 2013）。

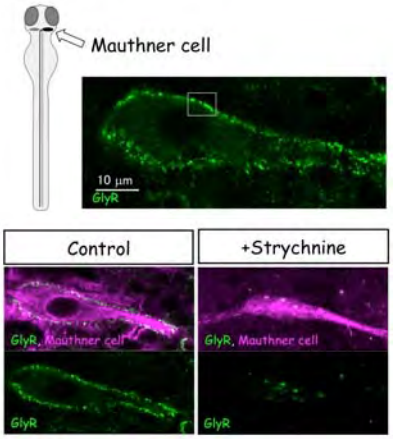


図１　グリシン受容体のシナプス凝集
ゼブラフィッシュマウスナー細胞は後脳にあり、グリシン受容体抗体でラベルすると受容体凝集が観察できる。ストリキニーネによるシナプス伝達阻害は受容体凝集も阻害する。

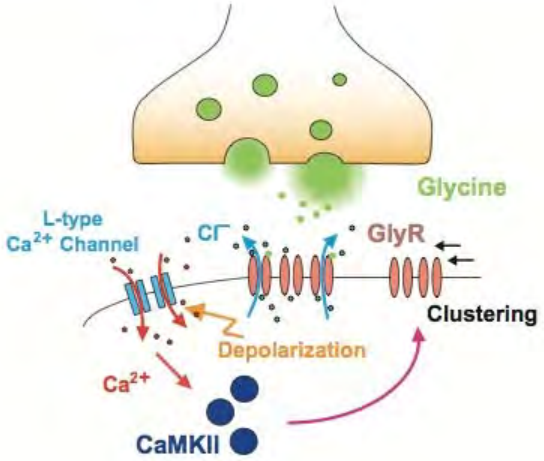


図２　グリシン受容体凝集のモデル
グリシンはプレシナプス末端から放出され、ポストシナプス膜上で近位にあるグリシン受容体を活性化する。局所的な脱分極はL型カルシウムチャネルによる局所的カルシウム上昇を引き起こし、これがCaMKIIを介してポストシナプスで局所的なグリシン受容体凝集を誘導する。

B) グリシン作動性シナプスに関連する遺伝子のクローニングとグリシン作動性シナプスのライブイメージング

平成２３年度から２４年度までに国立遺伝学研究所の荻野一豊さん（博士研究員）、山田健太さん（博士研究員）、University College London のサラ・ラムスデンさん（大学院生）、ロバート・ハーヴィー教授、国立遺伝学研究所の浅川和秀助教、川上浩一教授と研究を進め、以下の成果を得た。哺乳動物は５つのグリシン受容体遺伝子（α1, α2, α3, α4, β）と１つのゲフィリン遺伝子をもつが、ゼブラフィッシュは一部で遺伝子重複が起きており、７つのグリシン受容体遺伝子（α1, α2, α3, α4a, α4b, βa, βb）と２つのゲフィリン遺伝子（gphna, gphnb）をもつ。研究代表者らはまずこれらゼブラフィッシュの遺伝子を全てクローニングした。ゼブラフィッシュはアンチセンスモルフォリノを用いた任意の遺伝子の機能阻害実験が可能なので、次にこれらの遺伝子のノックダウンを行い、ロコモーションを解析したところ、グリシン受容体のうちαサブユニットとしてはα1, α3, α4a が胚期のロコモーション制御に必要であることが分かった。同様にβサブユニットとしてはβb が重要だった。グリシン受容体にはシナプスに局在しないものとシナプスに局在するものがあり、前者はαサブユニット５分子から成るホモ５量体であるのに対し、後者はαサブユニットとβサブユニットから成るヘテロ５量体であると報告されている。これまでそのサブユニット組成は不明のままだったが、研究代表者らの発見により、シナプスに局在するグリシン受容体にα1, α3, α4a, βb が寄与することが明らかになった。ゲフィリンについてはａとｂの両方をノックダウンした場合のみ受容体凝集の異常、行動の異常が見られたことから、これらが相補的に機能していると言える。また、ゲフィリンには多様なスプライシングアイソフォームが存在し、神経細胞で多いアイソフォームが存在することを確認した。ゲフィリンにはグリシン受容体の足場タンパクとしての機能以外に、モリブデン補因子の合成酵素として機能することも報告されているが、ゲフィリンのこの酵素機能についてもａとｂが相補的にはたらいていることが確認された。研究代表者らはグリシン受容体α1サブユニット、βbサブユニット、ゲフィリンａについてそれぞれ GFP タグ、mCherry タグをつけて UAS プロモーターで発現できるようなコンストラクトを作製し、トランスジェニックゼブラフィッシュ系統の樹立を行った。マウスナー細胞で GAL4 を発現

する GAL4 トランスジェニック系統と交配してダブルトランスジェニックを作製することで、マウスナー細胞特異的に蛍光タグ付きのグリシン受容体、ゲフィリンを発現させることに成功した。シナプスに局在することはシナプスマーカーとの二重免疫染色で確認できた。現在、これらのライブイメージング可能な個体を用いて、グリシン作動性シナプスの動的変化の解析を進めている。また、UAS プロモーターで膜結合型 GFP や膜結合型 mCherry を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統も作製した。これらの結果は国際学会で発表した（平田、2013）。

C) RNA ヘリカーゼ Dhx37 によるグリシン受容体の制御

平成２３年度から２４年度までに国立遺伝学研究所の荻野一豊さん（博士研究員）、山田健太さん（博士研究員）、University College London のソフィー・リーコックさん（大学院生）、ロバート・ハーヴィー教授と研究を進め、以下の成果を得た。ゼブラフィッシュに低濃度のストリキニーネを作用させると、ロコモーション開始時に背側に反る異常な運動をするが、これとよく似た運動異常を示すゼブラフィッシュ変異体を得た。この変異体に低濃度のストリキニーネを作用させると、野生型個体に高濃度のストリキニーネを作用させるのと同じ startle reflex が観察されることから、変異体はグリシン作動性シナプス伝達が低下していると推測されたが、実際に運動ニューロンで電気生理記録を行うと、グリシン作動性シナプス伝達の低下が確認できた。抗グリシン受容体抗体で染色を行うと変異体ではシナプス部位におけるグリシン受容体の凝集が低下していることが分かった。変異体を遠系統のゼブラフィッシュと交配してマイクロサテライトマーカーを用いたマッピングを行うと変異は第８染色体にあることが分かり、さらにマイクロサテライトマーカーをデザインしてマッピングを進めると候補遺伝子が３つにしぼられた。cDNA クローニングを行い、DEAH-box 型 RNA ヘリカーゼである Dhx37 にミスセンス変異が同定された。グリシン作動性シナプスに関連する分子を予想していたのに対し、RNA ヘリカーゼに変異が同定されたのは意外であったが、変異体に試験管内合成した mRNA を導入するレスキュー実験、野生型個体にアンチセンスを導入する表現型コピーの実験から、Dhx37 が変異体の責任遺伝子であることは確認された。Dhx37 は RNA の制御に関わると予想されるので、グリシン作動性シナプスに関連するグリシン受容体（α1, α2, α3, α4a, α4b, βa, βb）、ゲフィリン（a, b）、グリシントランスポーター（GlyT1, GlyT2）、抑制性アミノ酸トランスポーター（VIAAT）の mRNA レベルを定量的 PCR で見積もると、いくつかのグリシン受容体とゲフィリン転写産物が少ないことが分かった。Northern blot をして詳細に RNA を比較すると、グリシン受容体（α1, α3, α4a）の転写産物量が少ないことが分かった。また、RT-PCR から、これらの遺伝子のスプライシングが影響を受けていることも確認された。興味深いことに、Dhx37 変異体にグリシン受容体α1 の mRNA を導入すると、ロコモーションの回復が見られ、同様の結果はグリシン受容体α3 の mRNA を導入した時でも、グリシン受容体α4a の mRNA を導入した時でも見られた。逆に、野生型個体にグリシン受容体（α1, α3, α4a）のアンチセンスモルフォリノを導入して機能阻害しさせた場合には、導入量に依存して、あるいは複数のサブユニットを阻害することで表現型が亢進し、Dhx37 変異体のロコモーション異常に近づくことが分かった。これらの結果は Dhx37 がグリシン受容体（α1, α3, α4a）の RNA 制御に重要で、少なくともスプライシングに関与し、完成型の転写産物の発現量に必要であることが明らかになった。RNA ヘリカーゼは数多くあるが、その特異的ターゲットが同定された報告はきわめて少なく、研究代表者らのこの発見は、RNA ヘリカーゼの欠損による特異的ターゲット分子の欠乏とその結果起こる神経病態をつなぐはじめての報告である。これらの結果は国際学会で発表した（平田、2013）。

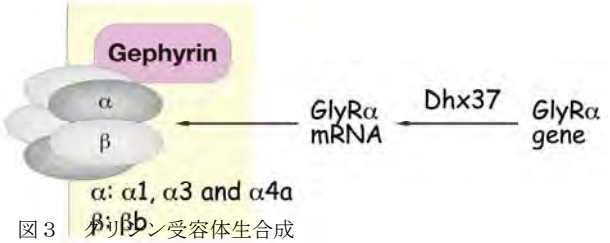


図３　グリシン受容体生合成

グリシン受容体のサブユニットのうち、a1, a3, a4aのmRNA生合成にはDHAH-box型のRNAヘリカーゼDhx37が必要である。これらのaサブユニットはbbサブユニットと５量体を形成してシナプスに局在する。Dhx37を欠く個体ではグリシン受容体aサブユニットが欠乏し、ロコモーションに異常があらわれる。

D) グリシン作動性シナプスを構成する新規分子の探索

平成２３年度から２４年度までに国立遺伝学研究所の山田健太さん（博士研究員）、荻野一豊さん（博士研究員）と研究を進め、以下の成果を得た。グリシン作動性シナプスのポストシナプス部位にある分子としてはゲフィリンが知られているが、他には報告がなく、グリシン作動性シナプスの構成と制御に関する知見はきわめて乏しい。研究代表者らはゲフィリンに結合するタンパクを同定する目的でスクリーニングを行い、既知のダイニンを含むゲフィリン結合分子を同定した。それらの解析は現在進行中である。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)はグリシン受容体のシナプス凝集にグリシン作動性シナプス伝達、さらにポストシナプスの CaMKII が必要であるという報告であり、これを試験管内ではなく生体内で明らかにした意義は大きい。B)についてはライブイメージング個体によりグリシン作動性シナプスを観察したはじめての報告であり、グリシン受容体がダイナミックに制御されていることが明らかになった。この実験系はこれから先のシナプス可塑性の in vivo での研究に大いに役立つだろう。C)の研究は RNA ヘリカーゼ Dhx37 がグリシン受容体の生合成に特異的に必要で、Dhx37 の異常がグリシン作動性シナプスの異常という特異的な表現型を引き起こすことを明らかにしたものである。Dhx37 は機能が全く解明されていなかったヘリカーゼ分子であり、ほとんど全ての RNA ヘリカーゼのターゲットが未解明である中、そのターゲットを同定し、シナプスの異常からロコモーションの異常までの病態原因を解明できたはじめての例である。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

D)の研究はいくつかの結合分子を同定したものの、擬陽性も含めてその数が多く、結合の確認に予想外に時間がかかったため、その後の解析が遅れており、研究の完了には至っていない。他はおおむね順調に進んだといえる。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果により、グリシン作動性シナプスを生体内でライブ解析する技術が確立し、本研究をさらに進める基盤となった。本研究によりグリシン作動性シナプスを制御する新規の分子の候補が得られ、その機能解析の解明から、活動依存的シナプス制御の分子基盤理解が期待される。また、RNA ヘリカーゼ Dhx37 がグリシン受容体の生合成に必須であることが分かったが、グリシン作動性シナプス伝達の低下によるヒトの運動障害 Hyperekplexia には未解明（既知の遺伝子の変異が同定できなかった）の疾患家系があり、これらの患者で Dhx37 の変異がある可能性がある。国内外の臨床グループと患者ゲノムの解析を進めているが、本研究はヒトの疾患解明とその治療に役立つ可能性にも期待している。

後脳を介した感覚運動制御系の構築メカニズムの解明

研究代表者：浅川　和秀[1, 2]　連携研究者：川上浩一[1, 2]

1）国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・初期発生研究部門　2）総合研究大学院大学（SOKENDAI）・遺伝学専攻

＜研究の目的＞

環境中を移動する動物は、意識的に、あるいは反射的に、絶えず移動方向（ロコモーションの方向）を選択している。直進的なロコモーションを生み出す肢や体幹の基本的な運動リズムは、脊髄に存在するセントラルパターンジェネレーター（CPG）によって形成されうるのに対して、ロコモーションの方向の維持や転換は、脳による感覚情報の処理と運動指令に大きく依存している。哺乳類においては脳と脊髄の間に数百万のオーダーの数の神経繊維が走行しているといわれるように、一般に脊椎動物において脳脊髄神経回路は解剖学的に非常に複雑である。このため、ロコモーションの方向制御に必要な脳脊髄神経回路の機能的構造の多くは未解明である。本研究は、脳から脊髄へ軸索を投射する神経細胞が２００～３００個程度と見積もられているゼブラフィッシュ胚をモデルに用いて、触覚刺激によって駆動される逃避ロコモーションの方向制御に焦点を当てた。ゼブラフィッシュ胚の逃避行動において、ロコモーションの方向（逃避の軌跡）は、触覚刺激を感知した直後に起こる体幹の反り運動の角度（C ベンドの角度）によって、大きく決定づけられる。興味深いことに、身体の前後軸に沿って触覚刺激の位置を変化させると、それに応じて C ベンドの角度も変化することから、触覚刺激の位置情報を C ベンドの角度に変換する脳脊髄神経回路が存在すると予想された。本研究では、この神経回路の構造を、Gal4-UAS 法、レーザーアブレーション法、カルシウムイメージングを駆使して明らかにすることで、脳によるロコモーションの方向制御の神経メカニズムに迫ることを目標にした。

＜研究計画＞

1) ゼブラフィッシュ胚に準定量的な触覚刺激を与えるために、ピエゾ電圧素子駆動の触覚刺激装置を開発する。

2) 本研究に先立って、後脳の分節構造ロンボメア２から６の cyp26c1遺伝子陽性細胞に破傷風神経毒素軽鎖（Tetanus toxin light chain、以下、TeTxLC）を誘導すると、胚が刺激方向に体幹を旋回させる、という現象を捉えていた。Gal4 トラップスクリーニングによって、後脳の特異的領域に Gal4発現を示すトランスジェニック系統を網羅的に単離、樹立する。後脳Gal4系統とUAS-TeTxLC系統を交配して得られるGal4;UAS-TeTxLC二重トランスジェニック胚の逃避行動を解析し、Cベンドの角度に異常を示すGal4系統を選別する。

3) Cベンドの角度に異常を示した系統のGal4発現細胞に、UAS-GCaMP系統を用いてカルシウムインディケーターGCaMP を発現させ、触覚刺激に反応して活動する後脳細胞を同定する。同定された後脳細胞を、２光子レーザーを用いたアブレーションによって阻害し、Cベンドの角度に変化を与える後脳神経細胞集団を同定する。触覚刺激の位置と後脳の活動パターンを対比させ、身体表面と後脳との間に形成されるソマトトピック地図を描く。

＜得られた研究成果＞

A) 2011 年度に、電圧変化によって準定量的、かつ可変的な触覚刺激をゼブラフィッシュ胚に与えることのできるピエゾ素子駆動の機械刺激装置を開発した。この装置を用いて、受精後４８時間のゼブラフィッシュ胚に触覚刺激を与え、ハイスピードカメラによって逃避行動を解析した。ゼブラフィッシュ胚は、尾部に触覚刺激を感知すると、刺激とは反対方向に１１５度まで体幹を反せる C ベンドを示し、その後、１００度反り返すことで、体軸を前方へ向け、逃避する（図１）。一方、頭部への触覚刺激に対しては、C ベンドの角度を１７５度まで大きくすることで、体軸を後方へ向け、より後方へと逃避することが分かった。

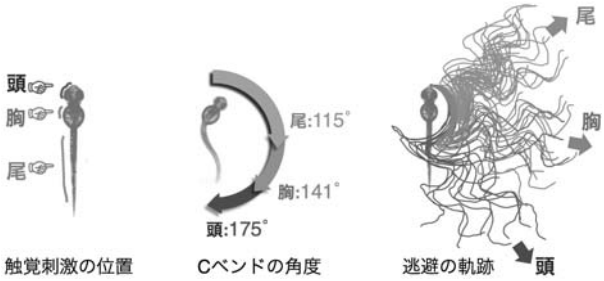


図１、触覚刺激の位置、C ベンドの角度、ロコモーションの方向の関係

B) 2011 年度から 2012 年度までに、研究計画の項目 2)に基づいて Gal4 トラップスクリーニングを実施した。一細胞期に Gal4 トラップコンストラクトを注入したおよそ１５００匹の成魚を、UAS-GFP レポーター系統を掛け合せ、GFP 蛍光を指標に F1 子孫における Gal4 発現パターンを解析した。その結果、後脳に Gal4 を発現する F1 を５２種類同定した。単離された Gal4 系統を UAS-TeTxLC 系統を掛け合わせて、機能阻害実験を行なった。転写因子遺伝子 mafb のプロモーター／エンハンサーの活性に依存して、後脳ロンボメア４から６にかけて多くの細胞で Gal4 を発現する系統（mafb-Gal4 系統）と UAS-TeTxLC 系統を掛け合わせて、mafb 陽性細胞に TeTxLC を発現させると、C ベンドの角度が野生型より増大することを見いだした（図２）。阻害胚においては、頭部への刺激、尾部への刺激のいずれに対しても C ベンドの角度が増大することから、体表に与えられた触覚刺激は後脳 mafb 陽性領域に伝達され、C ベンドの角度が決定されると考えられた。

成果 A)、B)については、以下の４つの学会において発表を行なった（Asakawa K et al., 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists 2011, Asakawa K et al., 7th European Zebrafish Meeting 2011,

浅川和秀，阿部玄武，川上浩一 第３４回日本神経科学大会 2011，Asakawa K et al.，Neuroscience 2011)。

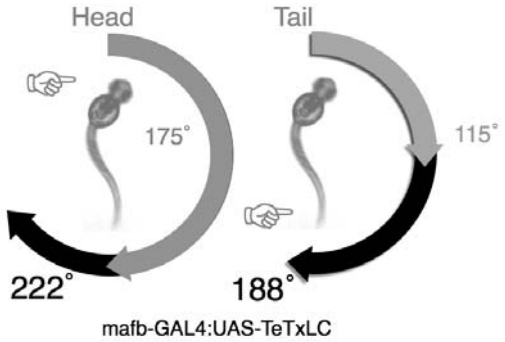


図２　mafb-GAL4;UAS-TeTxLC 胚（黒）においては、C ベンドの角度が増大する。

C)　mafb-Gal4 系統においては C ベンドの角度制御に関与する神経細胞が Gal4 によってラベルされている可能性が強く示唆された。研究計画の項目 3)に基づいて、2012 年度から、mafb 陽性領域の神経活動を中心に、触覚刺激によって活性化される後脳の活動を GCaMP を用いたカルシウムイメージングによって解析した。もし、後脳の mafb 陽性領域に含まれる神経細胞の活動によって、C ベンドの角度が決定されるならば、後脳の mafb 陽性領域は頭部と尾部それぞれの刺激に対して異なる神経活動を示すはずであると考えた。そこで、まず mafb-Gal4 系統と UAS-GCaMP 系統を掛け合せて得られる、mafb-Gal4;UAS-GCaMP 二重トランスジェニック胚の頭部と尾部にそれぞれ、触覚刺激装置を用いて刺激を与えた。同一個体において、頭部と尾部それぞれの刺激によって活性化される細胞集団を同定し、比較した。その結果、少なくともロンボメア６の mafb 陽性領域には、頭部への刺激によってのみ活性化される細胞、尾部への刺激によってのみ活性化される細胞、頭部と尾部いずれの部位への刺激に対しても活性化される細胞の、大きくわけて３種類の細胞集団が存在することが分かった（図３）。

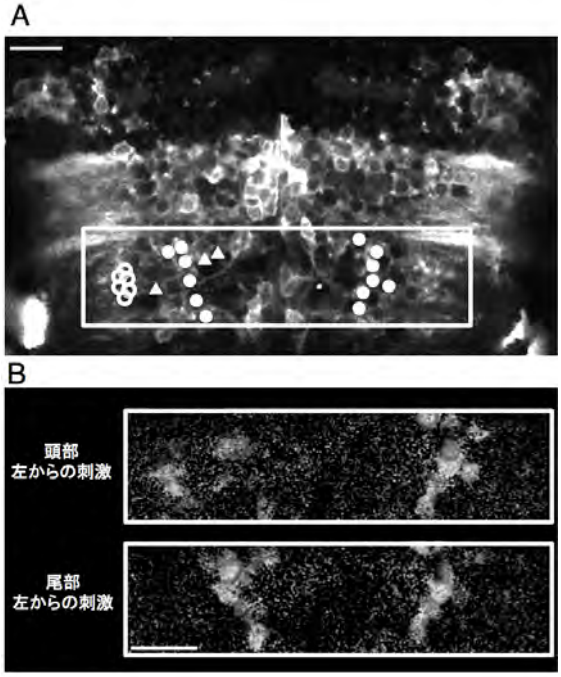


図３　カルシウムイメージングによる触覚刺激に対する後脳 mafb 陽性領域の神経活動。(A) mafb-Gal4;UAS-GCaMP 胚の後脳ロンボメア４から６の領域を、背面から見た図。ロンボメア６の細胞集団には、頭部への刺激によってのみ活性化される細胞（open circle）、尾部への刺激によってのみ活性化される細胞（triangle）、頭部と尾部いずれの部位への刺激に対しても活性化される細胞（filled circle）が存在した。(B) A において四角で囲まれた領域の GCaMP の蛍光強度変化（ΔF/F）。図の上部が吻側。スケールバーは 20μm.

D)　幼魚期や成魚期の逃避行動の開始時に活性化されることが知られているロンボメア４に存在するMauthner細胞（以下、M細胞）や、その推定機能ホモログMiD2cm細胞（ロンボメア５）、MiD3cm細胞（ロンボメア６）は、mafb陽性であった（以下、これらの３種類の細胞を総称してMアレイと呼ぶ）。このことから、mafb-Gal4;UAS-TeTxLC胚が示したCベンドの角度が増大する表現型は、Mアレイの阻害によるものである可能性が考えられた。Gal4トラップ法によって樹立した系統群のうち、MアレイがGFPで可視化される系統を利用して、２光子レーザー照射によってM細胞、あるいはMアレイを阻害し、Cベンドの角度制御への寄与を検証した（図４）。その結果、M細胞単独の阻害、Mアレイの阻害の両方において、触覚刺激に対する逃避行動が起こらない頻度が上昇した。一方で、逃避行動が開始された場合には、阻害胚は、野生型と同様な角度のCベンドを示すことが分かった。これらの結果は、胚のMアレイは、逃避行動の開始に重要な役割を果たすことが分かった。また、Cベンドの角度はMアレイとは独立に決定されうることが分かった。

成果 D)において用いた M アレイを染色する系統を用いて、２報の学術論文が発表された（Pujol-Marti J et al.，Journal of Neuroscience 2012，Yamanaka I et al.，Genes to Cells 2013)。

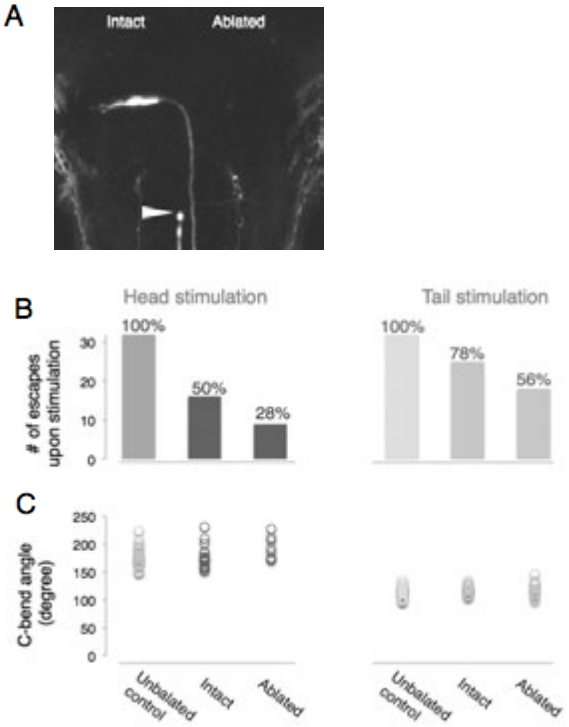


図４　M 細胞のアブレーションが、逃避行動に与える影響。右側の M 細胞のみがアブレーションによって阻害された胚の頭部背

面図(A、矢頭はアブレーションによって退縮している軸索。上側が吻側)。(B) 触覚刺激を与えた時に、逃避行動が起こる割合。(C) 逃避行動が起こった際に観察された C ベンドの角度。Unablated control は、アブレーションをしていない野生型。Intact は、阻害胚の阻害されていない M 細胞側から刺激した場合。Ablated は、阻害された M 細胞側から刺激した場合。

＜国内外での成果の位置づけ＞

ゼブラフィッシュの胚や幼魚は、中枢神経系の細胞数が他のモデル脊椎動物と比較して少ないことや、胚の透明性によって細胞が観察、操作し易いという利点などから、ロコモーションの神経基盤を研究するための優れた脊椎動物モデルとして盛んに用いられている。一方で、ロコモーションの方向制御の神経メカニズムに関しては、ゼブラフィッシュにおいてすら理解の大きな進展が無い。その原因の一つは、M アレイを含め、逃避行動において活動する既知の神経細胞を阻害しても、C ベンドの角度、すなわちロコモーションの方向性に変化が見られないことが挙げられる。本研究でモデルとして用いた胚の逃避行動においても、M アレイの阻害によって、ロコモーションの方向性に変化が見られなかった。本研究は、同定された mafb 陽性の後脳領域の阻害によって、C ベンドの角度が変化する表現型を見いだした数少ない例の一つであり意義深い。また、トランスジェニック技術に根ざした研究であるため、再現性よく神経細胞集団を操作し、またその活動をイメージングすることが可能である。ロコモーションの方向制御において、脳の活動パターンと体軸の制御を細胞レベルの解像度で理解する基盤が整いつつあるという点で意義深い。

＜課題＞

当初、逃避方向の制御に関与する少数の細胞がラベルされた多様な系統の単離を期待したが、膨大な労力と時間を要する脊椎動物を用いた遺伝学的スクリーニングの難しさから、少数の細胞でGal4を発現した多様な系統によって後脳全体を網羅するには至らなかった。一方で、本研究で樹立された Gal4 系統群は、既に世界でも例を見ない優れた研究リソースとして国内外から高い評価を受けている。今後も Gal4 トラップ法の改良とスクリーニングの継続により、ゼブラフィッシュにおいても、ショウジョウバエと同様に Gal4-UAS 法に基づいた神経機能解析法をより洗練する必要がある。

＜今後の展望＞

本研究によって、C-ベンドの角度を制御するニューラルネットワークの少なくとも一部が、４００-５００個の分化した神経細胞を含むといわれる後脳mafb陽性領域に含まれることが強く示唆された。GCaMPを用いたイメージングは、既に細胞レベルの解像度を達成しているので、今後、触覚刺激によって活動するmafb細胞を包括的に同定し、アブレーションによってその機能を解析することで、C-ベンドの角度制御にかかわる細胞を同定したい。本研究は、単一の感覚モダリティー（触覚刺激のみ）によって駆動される初期胚の逃避ロコモーションのシンプルさを活かして、感覚刺激の位置情報をロコモーションの方向性に対応させる脳神経回路の理解に主眼を置いた。ゼブラフィッシュは初期胚期以降に順次、聴覚、視覚、嗅覚に対する逃避能力を獲得していくため、本研究の成果は、野生環境下でより重要性を増す複数の感覚モダリティーに基づいたロコモーションの方向制御を担う脳神経回路の構造や、その発生過程を理解するための重要な基盤を与える。

公募研究：2011 年度 - 2012 年度

遺伝子改変マウスの神経活動を覚醒下で記録し、大脳基底核の運動制御機構を解明する

研究代表者：知見　聡美

生理学研究所・生体システム

＜研究の目的と進め方＞

大脳基底核は、大脳皮質との間でループ回路を形成し、運動の発現や制御に寄与していると考えられている。大脳基底核の主要な入力部である線条体は、大脳皮質の広い領域からの入力を受けると同時に中脳ドーパミン作動性の投射を受けている。パーキンソン病において線条体内のドーパミンが枯渇すると重篤な運動障害が生じることから、大脳基底核におけるドーパミン神経伝達が運動制御において極めて重要な役割を果たすことは明らかである。線条体の投射ニューロンには、大脳基底核の出力部である淡蒼球内節に投射するもの（直接路ニューロン）と、介在部である淡蒼球外節に投射するもの（間接路ニューロン）の２種類に分けられている。直接路を介した情報伝達は、淡蒼球内節の活動を抑制し、視床を脱抑制することにより運動を惹起し、一方、間接路を介した情報伝達は逆に、淡蒼球内節の活動を高めるため、視床の活動を抑制して運動を抑制するというように、両者は逆の機能を持つと考えられている。ドーパミンは直接路ニューロンに対してはD1受容体を介して興奮性に働き、間接路ニューロンに対してはD2受容体を介して抑制性に働くというモデルが、現在、広く認められているが、このモデルの証拠としては、mRNA の発現量やグルコース代謝を調べた間接的なもののみであり、実際にニューロン活動を記録して証明した例はない。したがって、当然ながら、D1およびD2受容体を介したドーパミン神経伝達がそれぞれ、直接路および間接路ニューロンの自発発火の頻度やパターン、刺激に対する応答パターンに対してどの様に作用するかなど、詳細については全く不明であり、運動制御における機能の解析も進んでいない。

近年、ドーパミン受容体の各サブタイプが欠失した遺伝子改変マウスが作製されている。しかしながら、マウスにおける電気生理学的解析は in vivo におけるスライス実験がほとんどで、個体そのものから神経活動を記録した例は、世界的にみても非常に少なく、実験方法も確立しているとは言い難い状況であった。我々は、麻酔薬のニューロン活動に対する影響を排除し、マウスの頭部を無痛的に固定して覚醒条件下においてニューロン活動を記録するためのシステム確立することに成功し、ニューロン活動の記録・解析を行ってきた。

そこで本研究では、ドーパミン受容体ノックアウトマウスをはじめとする遺伝子改変マウスにおいて、覚醒下神経活動の記録を行うことにより、大脳基底核内情報伝達におけるドーパミン神経伝達の機能と、大脳基底核－大脳皮質ループ回路による運動制御機構の解明を目指す。

＜研究計画＞

1）大脳基底核内情報伝達におけるドーパミンD1受容体の機能の解析。

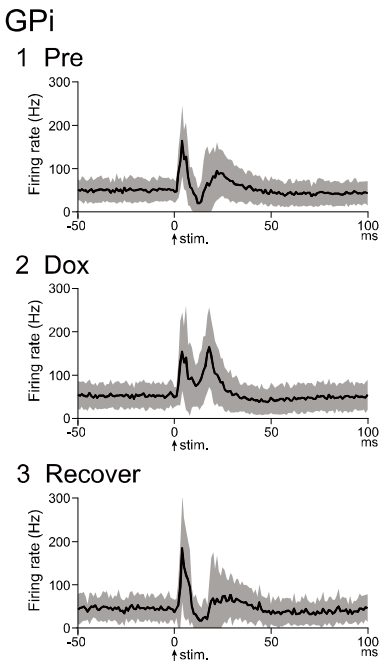
最近、ドキシサイクリンの投与によってドーパミンD1受容体の発現を制御することが可能な遺伝子改変マウス（D1Rレスキューマウス）が、北里大学の笹岡俊邦教授らによって作製された。このマウスを用い、D1受容体が発現している状態と発現していない状態において、線条体直接路ニューロンの投射先である淡蒼球内節と、間接路ニューロンの投射先である淡蒼球外節の神経活動を覚醒下で記録する。正常なサルやげっ歯類において、淡蒼球内節および外節のニューロンは、大脳皮質の電気刺激に対して、「早い興奮－抑制－遅い興奮」という３相性の応答パターンを示し、早い興奮は大脳皮質－視床下核－淡蒼球内節/外節路を、抑制は大脳皮質－線条体－淡蒼球内節/外節路を、遅い興奮は大脳皮質－線条体－淡蒼球外節－視床下核－淡蒼球内節/外節路を介して伝達されることが明らかにされている。したがって、淡蒼球内節および外節ニューロンの大脳皮質の電気刺激に対する応答パターンを比較することにより、D1受容体を介したドーパミン神経伝達の消失によって、どの経路を介した情報伝達がどのように変化しているのかを調べることが出来る。それを解析することにより、D1受容体を介したドーパミン神経伝達が、直接路および間接路を介した情報伝達に対して、どのように作用するかを明らかにする。また、D1受容体が発現している状態と、発現していない状態とにおける運動の変化も観察し、直接路および間接路を介した情報伝達の運動制御における機能も明らかにする。

2）大脳基底核内情報伝達におけるドーパミンD2受容体の機能の解析。

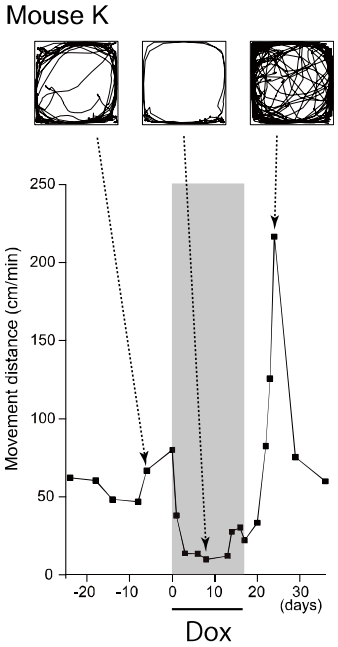
ドーパミンD2受容体のノックアウトマウス（D2Rノックアウトマウス）において、1)と同様の方法により淡蒼球内節および外節ニューロンの活動を記録し、自発発火様式と、大脳皮質の電気刺激に対する応答様式を調べる。野生型マウスと比較することにより、D2受容体を介したドーパミン神経伝達が、直接路および間接路を介した情報伝達に対して、どのように作用するかを明らかにする。

＜得られた研究成果＞

A）2011年度に研究計画項目1)について研究を進めた。その結果、ドーパミンD1受容体の発現を停止させても、淡蒼球内節および外節ニューロンにおける自発発火の頻度とパターンは変化しないことがわかった。次に、大脳皮質の電気刺激に対する応答について調べたところ、D1 受容体の発現を停止させると、淡蒼球内節ニューロンで観察される３相性応答のうち、抑制が著しく減弱することがわかった（図 1）。淡蒼球内節で観察される抑制は、大脳皮質－線条体－淡蒼球内節路（直接路）を介して伝達されることから、線条体の直接路ニューロンの興奮性が低下していると考えられる。一方、淡蒼球外節ニューロンでは変化は見られなかった。また、このような状態のマウスの自発運動量を測定したところ、低下していることがわかった（図２）。以上の結果より、D1 受容体を介したドーパミン神経伝達は、線条体の直接路ニューロンに対して興奮性に作用することにより、運動の発現を促進するように働くことが示唆された。これらの結果を国際学会で発表した（Chiken S, Ohta C, Sato A, Sasaoka T, Kurokawa M, Nambu A, Neuroscience 2012, SfN’s 42nd annual meeting, 2012)。

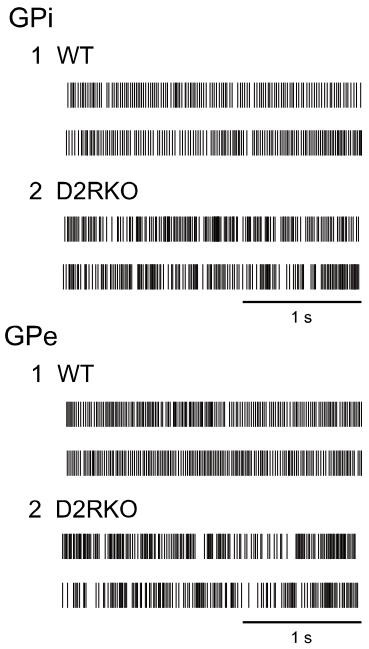


（図 1）大脳皮質の電気刺激に対する D1R レスキューマウスの淡蒼球内節ニューロンの応答を示したポピュレーションヒストグラム。ドキシサイクリンを投与する前は、刺激（矢印）に対して興奮―抑制－興奮の３相性応答を示したが（Pre）、ドキシサイクリンを投与して D1 受容体の発現を無くすと、抑制が著しく減弱した（Dox）。

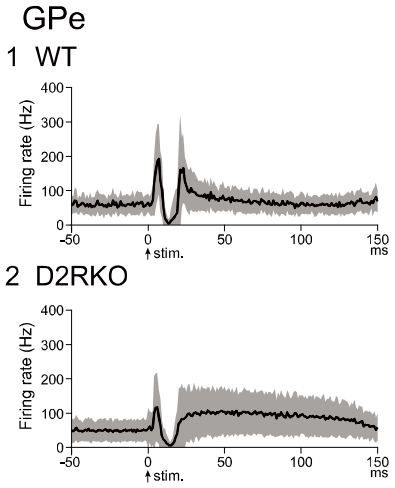


（図 2）D1R レスキューマウスの自発運動量の変化。ドキシサイクリンを投与期間中（下線 Dox）、自発運動量が低下した。ドキシサイクリン投与を中止した後、一過性に自発運動量が増大したが、再び元のレベルに戻った。

B) 2012 年度に研究計画項目 1) について研究を進めた。その結果、ドーパミン D2 受容体ノックアウトマウスでは、淡蒼球内節および外節ニューロンにおいて、バーストやポーズを含む発火が観察され、野生型マウスとは異なる発火パターンを示すことがわかった（図３）。次に、大脳皮質の電気刺激に対する応答について調べたところ、淡蒼球外節ニューロンでは、３相性応答のうち抑制と、それに続く興奮が著しく増強されていることがわかった（図 4）。淡蒼球外節で観察される抑制とその後の興奮は、それぞれ、大脳皮質－線条体－淡蒼球外節路と、大脳皮質－線条体－淡蒼球外節－視床下核－淡蒼球外節路を介して伝達されるので、D2 受容体ノックアウトマウスでは、線条体から淡蒼球外節に投射するニューロン、すなわち間接路ニューロンの興奮性が亢進していると考えられる。以上の結果より、D2 受容体を介したドーパミン神経伝達は、線条体の間接路ニューロンに対して抑制性に作用することが示唆された。これらの結果を国際学会で発表した（Chiken S, Ohta C, Sato A, Sasaoka T, Kurokawa M, Nambu A, 11th Triennial meeting of International Basal Ganglia Society, 2013）。また、研究計画項目 1) と 2) で得られた結果を合わせて、現在、学術論文作成中である。



（図 3）野生型マウス（WT）と D2R ノックアウトマウス（D RKO）の淡蒼球内節（GPi）および淡蒼球外節（GPe）の自発発火様式。淡蒼球内節と外節の両者において、バーストとポーズを含む異常な発火が観察された。



（図 4）大脳皮質の電気刺激に対する野生型マウス（WT）と D2R ノックアウトマウス（D2RKO）の淡蒼球外節ニューロンの応答を示したポピュレーションヒストグラム。D2R ノックアウトマウス

では、刺激（矢印）に対する応答のうち、抑制とそれに続く興奮が増強されていた。

＜国内外での成果の位置づけ＞

パーキンソン病において線条体のドーパミンが枯渇すると重篤な運動障害が生じることから、大脳基底核内情報伝達におけるドーパミン神経伝達の機能については、大きな関心が向けられてきた。しかしながら、D1 受容体を介した神経伝達は線条体の直接路ニューロンに対して興奮性に作用し、D2 受容体を介した神経伝達は線条体の間接路ニューロンに対して抑制性に作用するということを、実際にニューロン活動を記録することによって証明したのは、本研究が最初であり、今後の大脳基底核研究に大きい影響を与えると考えられる。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画項目 1）の中で、運動中のマウスから神経活動と筋電図とを同時記録することを計画していた。テレメトリーシステムを用いて記録することを計画していたが、1 チャネル記録用のシステムは完成したが、複数チャネルを同時に記録するシステムに改良することが予想外に難しく、期間内に実験を遂行することが出来なかった。これについては、今後の課題としたい。

＜今後の課題、展望＞

本研究により、大脳基底核内情報伝達における D1 および D2 受容体を介したドーパミン神経伝達の機能を明らかにすることが出来た。しかし、今後の課題としては、今回達成出来なかった運動中のマウスにおける神経活動の記録を行うことが不可欠である。淡蒼球内節は、大脳基底核の出力部であるが、D1 受容体レスキューマウスにおいて、実際に運動を行っている状態で淡蒼球内節の活動と筋電図との同時記録を行い、ニューロン活動と運動障害との関係を詳細に解析する。この解析を行うことより、大脳基底核による運動制御機構と、運動制御におけるドーパミン神経伝達の機能についての理解を、大きく進めることが出来ると考えている。さらに、6-OHDA を用いてパーキンソン病モデルを作成して同様の解析を行うことにより、D1 受容体を介したドーパミン神経伝達の消失が、パーキンソン病における症状の発現に、どのように関与しているかも明らかにすることが出来る。今回、テレメトリーシステムによって記録を行うことが予想以上に難しいとわかったため、現在、頭部を固定した状態でマウスに運動を行わせる方法も試みている最中である。

公募研究：H21 年度-H24 年度

先天的な「冷たい恐怖」と後天的な「温かい恐怖」を制御する神経メカニズムの解明

研究代表者：小早川　高

（公財）大阪バイオサイエンス研究所・神経機能学部門

＜研究の目的と進め方＞

様々な感覚入力が先天的と後天的な恐怖情動を誘発する。後天的に誘発された恐怖は、脳内に存在する先天的な恐怖を制御する神経回路を後天的に活用することで誘発されるのか、先天的な恐怖とは異なる神経回路によって制御されるのかは不明である。

猫の付けていた首輪の匂いや、肉食動物の尿などの自然物に由来する匂いは恐怖誘発活性を持つ。しかし、これらの匂い発生源において生理活性の中心となる匂い分子は未同定である。単一の匂い分子で恐怖誘発活性を有するものもこれまでに報告されている。2,4,5-trimethyl-3-thiazoline(TMT)はキツネの分泌物に含まれる 70 種類以上の匂い分子の中から最も忌避誘発活性の高い匂い分子として同定された。2-phenyl-ethyl-amine（2PEA)はボブキャットの尿の成分から忌避行動を誘発する匂い分子として同定された。このように少数の匂い分子が恐怖誘発活性を持つことは知られているものの、恐怖誘発活性の鍵となる匂い分子の性質の有無はこれまでには知られていない。

多くの哺乳類は通常の揮発性匂い分子を感知する主嗅覚系と、種特異的なフェロモンを感知する鋤鼻嗅覚系の2つの嗅覚系を持っている。主嗅覚系は鼻腔内の嗅上皮に存在する背側と腹側の双方のゾーンから始まる背側と腹側の2つの経路によって匂い情報を脳へ伝達している。私たちは、嗅上皮の背側ゾーンに存在する嗅細胞を特異的に除去したミュータントマウスを開発した。このミュータントマウスでは肉食動物の尿や TMT の匂いを感知することができるにも関わらず、これらの匂いに対する忌避行動を示さなかった。この結果は、背側嗅覚神経径路が天敵の匂いに対する恐怖反応を先天的に制御することを示唆している。また、鋤鼻嗅覚系の情報伝達を担う Trp2 チャネル KO マウスでは TMT に対する忌避行動は正常であることが報告されている。これらの結果は、マウスの天敵の匂いに対する忌避や恐怖反応が主嗅覚系によって制御されることを示唆する。

恐怖反応は Freezing 行動を指標に定量的に計測されている。天敵の匂いはマウスに対して忌避行動や警戒行動を誘発することができるものの、Freezing 行動を誘発する活性は低いことが多くの論文によって報告されている。匂い分子と電気ショックなどの嫌悪刺激との関連学習によって後天的な恐怖反応を誘発できる。後天的な恐怖では強力なFreezing行動が誘発される。恐怖反応の誘発活性の低さなどから、天敵の匂いは真に恐怖を誘発しているのではなく、単に嫌な匂いの一種に過ぎないのではないかという議論が続いている。匂いに対する先天的と後天的な恐怖が異なる行動を誘発することは知られている。両者の行動の違いは、両者の情動が本質的に異なることに起因するのか、両者の恐怖情動の誘発レベルが異なることを反映しているのに過ぎないのかを区別することは困難である。

創薬の領域では、生理活性を持つ天然物の化学構造を最適化することで、より望ましい生理活性を持つ化合物が開発されている。本研究では、天然物に由来する匂い成分と類似した化学構造を持つ人工匂い分子ライブラリーを用いて、Freezing 誘発活性の最適化を実施した。その結果、単純な化学構造ルールを満たす人工物由来の一連の匂い分子「恐怖臭」によって極めて強力な Freezing 行動が誘発されることを初めて解明した。人工物由来恐怖臭の発見により、様々な強度で先天的な Freezing を誘発する技術が確立された。ここで確立した技術を活用して、同一の感覚入力が誘発し、同等レベルの Freezing 行動を伴う、先天的と後天的な恐怖を制御する神経メカニズムの共通性と相違点の解明を目指した。

＜研究計画＞

１.先天的な恐怖反応を誘発する匂い分子の同定

嗅覚入力による先天的な恐怖反応を誘発する匂い分子の特異性は不明である。本計画では匂い分子の化学構造の最適化を図ることで、先天的な恐怖情動を誘発する匂い分子の条件を決定すると共に、既知の匂い分子を用いる手法では不可能であった極めて強力な先天的恐怖を誘発する技術の確立を目指す。

２.嗅覚による先天的と後天的な恐怖に伴う生理応答の解析

同一感覚入力によって、同等レベルの Freezing 行動を伴う恐怖は、既知の恐怖の指標では同等の恐怖と評価される。本研究では先天的と後天的な恐怖を特異的に評価する新たな指標の探索を行い、両者の恐怖が区別できる可能性を検証する。

３．先天的と後天的な恐怖を制御する神経メカニズムの解析

嗅覚入力によって誘発される先天的と後天的な恐怖を制御する神経メカニズムの全貌を解明するために、両者の恐怖を誘発した条件での全脳神経活性化マッピングによる比較解析を実施する。全脳神経活性化マッピングにより同定された、先天的と後天的な恐怖の制御に特異的に関与する候補脳領域の機能を薬理阻害実験により解明する。また、両者の恐怖の制御に関与する分子ターゲットの共通性と相違点を解明する。

上記の1から3の研究計画を通して、同一の感覚入力によって誘発され、同等の行動応答を伴う条件においても、先天的と後天的な恐怖は異なる情動であることを示す。ここで示された例から、恐怖情動には複数種類の異なる様相が存在するという新たな概念の確立を目指す。

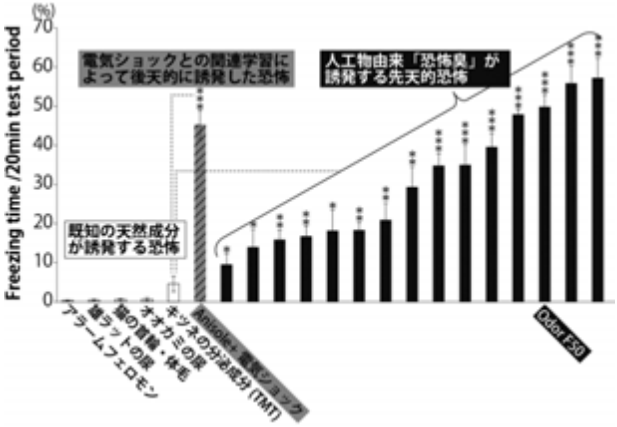
＜得られた研究成果＞

１.先天的な恐怖反応を誘発する匂い分子の同定

既知の肉食動物などの天敵の分泌物や、分泌物に含まれる単一活性成分に対する Freezing 誘発レベルを定量的に計測した。比較対象として、先天的な恐怖や嫌悪情動を誘発しないスパイス臭と電気ショックとを関連学習させることで、嗅覚入力に対する後天的な Freezing を誘発した。既知のいずれの匂い分子を用いても先天的に誘発可能な Freezing レベルは、嗅覚入力による後天的な Freezing レベルに比較すると 1/10 程度以下に留まった。

自然物に由来する匂い分子では低いレベルの Freezing しか誘発できなかったために、人工物匂い分子ライブラリーの中から強力な Freezing 誘発活性を持つ匂い分子の探索を行った。私たちは、嗅細胞の遺伝子発現系譜ラベルにより、嗅球のクラス I 型嗅覚受容体投射領域と、クラス II 型受容体投射領域は分離できることを解明した。天敵に由来する匂い分子は、嗅球の背側ドメインに存在するクラス II 型受容体投射領域の中の後方領域に存在する糸球を活性化する傾向が認められた。この天敵臭に対する恐怖誘発候補領域を効率的に活性化する匂い分子をスクリーニングした。このスクリーニングによって得られた複数の匂い分子から先天的な恐怖反応を誘発する化学構造の特徴ルールを抽出した。この特徴ルールを満たす匂い分子の化学合成を進め、これまでに報告されている自然物に由来する匂い分子に比較して、10倍以上の Freezing 誘発活性を持つ一連の人工物由来の匂い分子「恐怖臭」を開発することに成功した(図1)。

図1 恐怖臭が誘発する強力な Freezing 行動



恐怖情動のレベルは Freezing 行動を指標に定量的に評価される。匂い分子を呈示してから 20 分間における平均 Freezing 時間を計測した。Freezing は一定時間の間マウスが全く動かない状態として定義できる。既知の天然成分に由来する匂い分子が誘発する先天的な Freezing は白抜きグラフで示した。既知の天然物由来の匂い分子の中では最大の活性をもつ TMT であっても、Freezing 誘発活性は 5%程度に過ぎない。匂い分子による後天的な Freezing はスパイス臭の一種である Anisole と電気ショックとを関連学習させることで誘発した。後天的な Freezing は灰色斜線のグラフで示した。後天的な恐怖条件により誘発される Freezing レベルは 40%～50%程度である。キツネの分泌物由来で最大の Freezing 誘発活性を持つ TMT に比較して有意に高いレベルの Freezing を誘発できる人工物由来の匂い分子を黒色のグラフで示した。OdorF50 は Freezing 誘発レベルが 50%の匂い分子を示す。

２.嗅覚による先天的と後天的な恐怖に伴う生理応答の解析

恐怖臭の発見により、同一感覚入力によって誘発され、同等レベルの Freezing 行動を伴う先天的と後天的な恐怖を制御するメカニズムを比較することが初めて可能になった。後天的な恐怖は先天的な恐怖を誘発しない匂い分子である Anisole と電気ショック、または、腹腔内への LiCl 注入を組み合わせることで誘発した。両者の条件による後天的な Freezing の誘発レベルを比較した結果、電気ショックと組み合わせた条件において、匂いによる後天的な Freezing 誘発レベルが高いことが判明した。そこで、本研究では後天的な恐怖の標準的な誘発方法として、匂いと電気ショックとの関連学習の手法を採用し、必要な場合において匂いと LiCl の腹腔内注射の手法を用いた。

恐怖情動は Freezing レベル以外にも、ストレスホルモンの血中濃度や、筋緊張レベルを指標にしても計測できることが報告されている。嗅覚入力による先天的と後天的に誘発した恐怖に関して、(1) Freezing 行動、(2) 血中ストレスホルモン量、(3) 首の筋電位を計測した。その結果、これら3種類の既存の恐怖指標のいずれを用いても、先天的と後天的な恐怖との間には有意な違いは認められなかった。従って、嗅覚入力による先天的と後天的な恐怖は既存の指標では同等の情動反応であるとみなすことができる。

しかし、同等の情動反応であるとみなされる嗅覚入力による先天的と後天的な恐怖との間には重要な相違点が存在することが明らかになった。繰り返しの匂い刺激に対する恐怖応答の馴化を解析するために、毎日1回ずつ一週間に渡って先天的と後天的な恐怖を誘発する匂い分子を嗅がせた。後天的な恐怖を誘発する匂い分子を繰り返して嗅がせると感覚刺激に対する馴化が起こり、その結果、Freezing レベルが低下した。これに対して、恐怖臭による先天的な恐怖に関しては繰り返しの感覚刺激による馴化が起こらず、逆に、強化が起こった。その結果、Freezing レベルが上昇した。先天的と後天的な恐怖とでは、繰り返しの感覚刺激に対して逆方向の変化が起こると言える。特に、馴化が生じ難い先天的な恐怖は、PTSD などの容易に消去できない強力な恐怖情動に起因する精神疾患のこれまでにないモデルとなる可能性があり重要である。

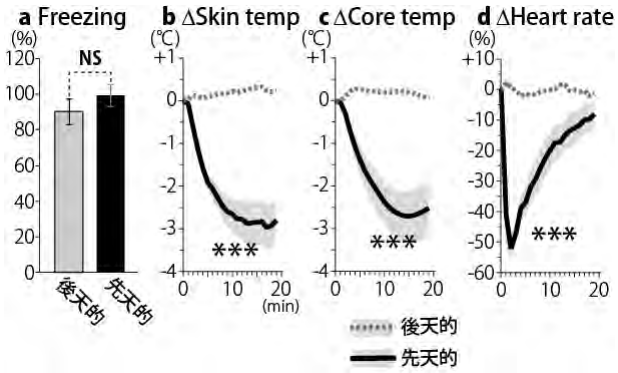
嗅覚入力による先天的と後天的な恐怖は、既存の恐怖指標では区別する事ができないが、馴化の有無において明確な差異が存在した。両者の恐怖は何らかの指標に基づいて区別できる可能性があるものの、これまでには先天的と後天的な恐怖を区別する指標は知られていない。本研究では、先天的と後天的な恐怖を誘発したマウスにおいて、Freezing 行動の計測と同時に、様々な生理指標の計測を同時に行った。

恐怖刺激によってマウスやラットでは尻尾や手足の温度が低下することや、サルでは顔面の表面温度が低下することが報告されている。そこで、先天的と後天的な恐怖を誘発した条件においてマウスの背中の体表面温度をサーモグラフィーカメラを用いて計測した。先天的と後天的な恐怖は共に同等の Freezing 行動を示しているにもかかわらず、先天的な恐怖条件においてのみ背筋周辺の体表面温度が3℃程度も低下することが判明した。このように体の中心部分における体表面温度の低下はこれまでには報告されていない新たな現象である。その一方で、恐怖の形容をする際には様々な言語で「背筋が凍る」という表現が用いられている。「背筋が凍る」という表現は単なる比喩ではなく、先天的な恐怖に伴う体表面温度の低下と結びついている可能性があるだろう。

恐怖刺激は末梢の血流減少を誘発することで中心部の血流を増大させ、危険を回避する行動を促進すると考えられている。この原則が恐怖臭による先天的恐怖に当てはまるか否かを検討するため、マウスの腹腔内に無線式送信機を埋め込み、中心部体温を計測した。これまでの報告と同じく、嗅覚入力による後天的恐怖でも体深部温度の上昇が観察された。ところが、驚くべきことに先天的恐怖では体深部温度についても3℃もの低下が観察された。また、同じく無線式送

信機を用いて心拍数の変動を解析した。後天的恐怖では心拍数の変化は認められなかった。これに対して、先天的な恐怖条件では匂いを嗅がせ始めてから数分以内に心拍数が半減するという極めて強力な応答が観察された(図2)。

図2 先天的と後天的な恐怖に伴う特異的な生理応答の誘発

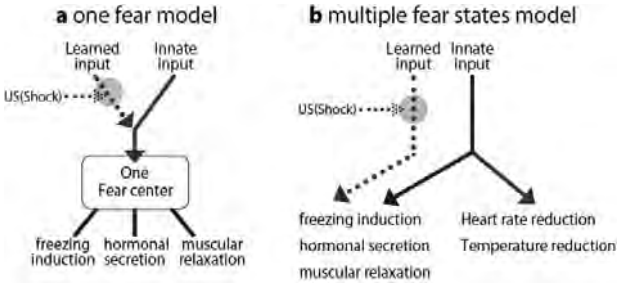


恐怖臭による先天的な恐怖と、匂いと電気ショックとの関連学習による後天的な恐怖情動を誘発した。a 後天的な恐怖(灰色)と先天的な恐怖(黒)において誘発される Freezing には有意な差は認められなかった。同等レベルの Freezing を伴う先天的と後天的な恐怖に関して、b 体表面温度、c 体深部温度、d 心拍数の変化を示した。匂い分子を呈示し始めてから20分間における各生理指標の変動をグラフで示した(先天的恐怖:黒線, 後天的恐怖:点線)。先天的恐怖においてのみ、体表面と体深部温度の3℃もの低下、心拍数の急速な半減が認められる。

後天的な Freezing 誘発のために、無条件刺激として用いた電気ショックは体温や心拍数の低下を誘発しない。これに対して、同じく無条件刺激として用いられる LiCl の腹腔内注入は体温や心拍数の低下を誘発することが知られている。匂いと LiCl の腹腔内注入とを関連学習させることで誘発した後天的な Freezing に伴う生理応答の変化を解析した。LiCl の腹腔内注入は Freezing を誘発し、かつ、体温や心拍数を低下させた。しかし、匂いと LiCl の腹腔内注入とを関連学習させた条件で、匂いに対する後天的な Freezing を誘発しても体温や心拍数の低下は認められなかった。

以上の結果から、嗅覚入力による恐怖は体温や心拍数の低下を伴う先天的な冷たい恐怖と、これらの生理応答を伴わない後天的な温かい恐怖の少なくとも2種類のモードが存在するという、multiple fear states model が提唱される(図 3)。

図3 先天的と後天的な恐怖に伴う特異的な生理応答の誘発

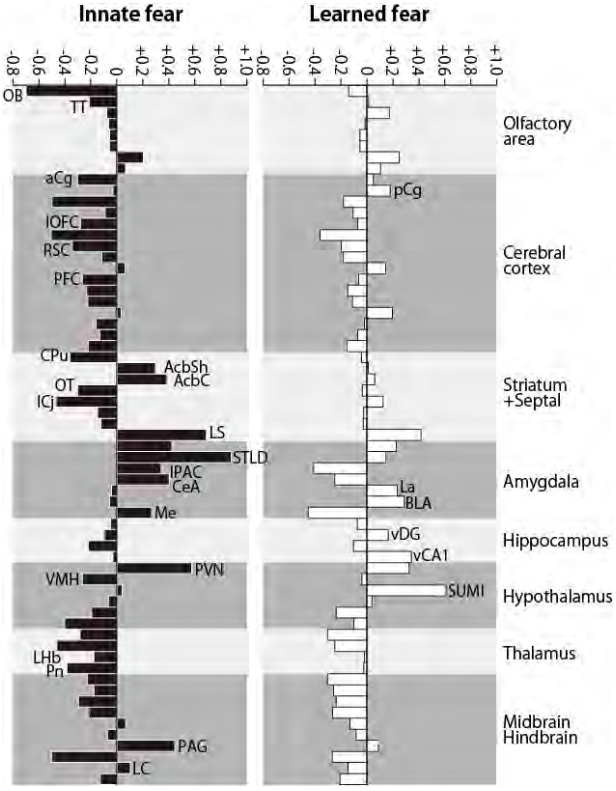


2 つの異なる嗅覚入力に対する恐怖モデル。a 単一の恐怖モデルでは後天的な嗅覚入力は無条件刺激(US: shock)と組み合わされた後に先天的な恐怖を制御する神経メカニズムに統合される。このモデルでは先天的と後天的な恐怖は同一の恐怖中枢によって制御されるので、同一の恐怖応答を誘発すると考えられる。b 複数の恐怖状態モデルでは先天的と後天的な恐怖は、単一の恐怖中枢において統合されることなく、異なる恐怖応答を誘発する。このモデルでは、先天的な恐怖は Freezing 行動などに加え、体温や心拍数の低下を伴う「冷たい恐怖」であるのに対して、後天的な恐怖は体温低下を伴わない「温かい恐怖」であるという現象が説明できる。

3．先天的と後天的な恐怖を制御する神経メカニズムの解析

嗅覚入力に対する先天的と後天的な恐怖は明らかに異なる生理応答を伴う異なる情動状態であることが明らかになった。両者の恐怖を制御する神経回路にはどのような違いがあるのかを明らかにするために、嗅覚入力による先天的と後天的な恐怖を誘発した条件で、c-fos と arc mRNA(IEGs)の発現を全脳の63領域で比較した。全脳 63 領域の中では 28 領域において先天的と後天的な恐怖における arc mRNA 発現に有意な差が認められた(図4)。これらの領域における先天的と後天的恐怖条件による arc mRNA 変動は以下のようになる。

図4 先天的と後天的な恐怖に伴う arc mRNA の発現変動



嗅覚入力による先天的と後天的な恐怖を誘発したマウスの全脳領域における coronal section 上で arc mRNA の発現を *in situ* hybridization 法を用いて検出した(n=6)。Freezing を誘発しない匂い条件での arc mRNA の発現レベルを基準とし、arc mRNA の発現増加(+)、または、発現低下(−)を対数グラフに示した。先天的と後天的な恐怖において arc mRNA の発現レベルに有意な差がある領域をグラフに略号で示した。OB(olfactory bulb)、TT(tenia tecta)、aCg(anterior cingulate cortex)、pCg(posterior cingulate cortex)、lOFC(Lateral orbital cortex)、RSC(Retrosplenial cortex)、PFC(Frontal cortex area)、CPu(Dorsal striatum)、AcbSh(Nucleus accumbens shell)、AcbC(Nucleus accumbens core)、OT(Olfactory tubercle)、ICj(Island of Calleja, major island)、LS(Lateral septal nucleus)、STLD(Lateral bed nucleus stria terminalis)、IPAC(Interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure)、CeA(Amygdala central nucleus)、La(Amygdala lateral nucleus)、BLA(Amygdala basomedial nucleus)、Me(Amygdala medial nucleus)、vDG(Hippocampus ventral dentate gyrus)、vCA1(Hippocampus ventral CA1 field)、PVN(Para ventricular hypothalamic nucleus)、VMH(Ventromedial hypothalamic nucleus)、SUMl(Supramammillary area)、LHb(Lateral habenula)、Pn(Posterior intralaminar nuclei)、PAG(Periaqueductal gray)、LC(Locus coeruleus)

後天的恐怖の誘発のためには恐怖記憶の想起と、恐怖情動の誘発

の双方の脳活動が必要になる。これに対して先天的恐怖では、記憶の想起に関与する脳領域の活動は不必要である。しかし、先天的恐怖と後天的恐怖における arc mRNA の発現変動を比較すると、先天的な恐怖においてより多くの脳領域においてより大きなIEG発現変動が認められた。この事はより多くの生理応答を伴う先天的な冷たい恐怖の誘発には多くの脳領域の神経活動が必要である可能性を示している。

嗅覚領域(olfactory area)では、先天的恐怖条件では嗅球(OB)とtenia tecta(TT)におけるarc mRNAの発現レベルが有意に低かった。特に嗅球におけるarc mRNAの発現低下は顕著である。その一方で、嗅球からの入力を受ける APC や PPC などの多くの嗅皮質領域では arc mRNA の発現へ低下は認められなかった。また、嗅球における arc mRNA 発現レベルはより強い先天的恐怖を誘発する恐怖臭においてより低い傾向が認められた。この結果は、嗅球の arc mRNA の発現低下は、単に情報入力レベルの低さを反映するのではなく、先天的な恐怖情報処理の結果を表現している可能性がある。

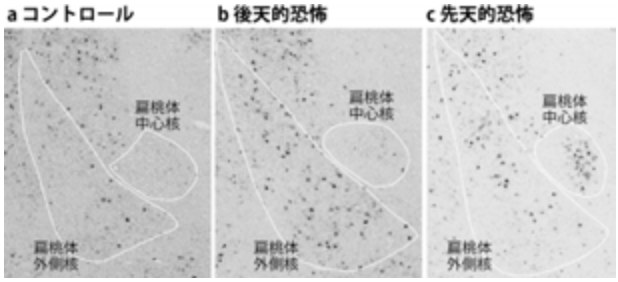
大脳皮質領域(Cerebral cortex)では、先天的恐怖条件で前帯状回皮質(aCg)、側方眼窩前頭皮質(lOFC)、後帯状皮質(RSC)、前頭皮質(PFC)の各領域における arc mRNA の発現レベルが有意に低かった。後天的恐怖条件では後帯状回皮質(pCg)において arc mRNA の発現レベルが有意に高かった。大脳皮質領域における arc mRNA の発現レベルは先天的な恐怖においてより低下する傾向が認められた。先天的恐怖では大脳の活動を低下させることで、Freezing 行動の安定した継続を達成している可能性が考えられる。

線条体と中隔領域や扁桃体領域においては先天的と後天的な恐怖との間で arc mRNA の発現に大きな差異が認められた。背側線条体(CPu)、嗅結節、カエハ島では先天的恐怖において arc mRNA の発現が有意に低かった。逆に、側坐核と中隔外側核では先天的恐怖において arc mRNA の発現が優位に高かった。

扁桃体と拡張扁桃体においては先天的と後天的な恐怖においてコントロールに比較した arc mRNA の増減が逆転している領域が多い。分界条床核外側核(STLD)では先天的恐怖条件において、外側扁桃体と扁桃体基底外側部では後天的恐怖条件においてそれぞれ arc mRNA の発現レベルが有意に高い。また、IPAC、扁桃体中心核、内側扁桃体の各領域では先天的恐怖条件で arc mRNA の発現が上昇するのに対して、後天的恐怖条件では arc mRNA の発現レベルが低下した(図4)。また、扁桃体中心核からの出力先で Freezing 行動を制御する中脳水道周囲灰白質(PAG)でも先天的な恐怖において arc mRNA の発現レベルが高かった。先天的と後天的な恐怖情報は共に扁桃体で処理されるが、扁桃体における両者の恐怖の情報処理メカニズムは大きく異なっていると考えられる。

これまでにも異なる種類の感覚入力や、異なる行動応答を誘発する恐怖刺激によって扁桃体の神経核における IEG 発現が異なることは知られていた。しかし、神経活動に差があることは、感覚入力や行動出力の相違を反映するのか、恐怖情動の相違を反映するのかを区別することは困難であった。本研究の結果から、同一の状況において同一の感覚入力が誘発し、同等の Freezing 行動を伴う条件であっても、先天的と後天的な恐怖では扁桃体を含む全脳領域に渡って arc mRNA の発現変動が大きく異なることが初めて明らかになった。神経活動マーカーの指標に基づいても、嗅覚入力による先天的と後天的な恐怖は明確に異なる情動状態であると考えることができる。

図4 先天的と後天的な恐怖に伴う特異的な生理応答の誘発



扁桃体外側核と中心核における arc mRNA の発現を *in situ* hybridization 法を用いて検出した。a コントロールは Freezing を誘発しない匂い分子を嗅がせた条件、b 後天的恐怖は電気ショックと匂いとの関連学習によって Freezing を後天的に誘発した条件、c 先天的恐怖は恐怖臭を用いて先天的 Freezing を誘発した条件。後天的恐怖条件においては扁桃体外側核の arc mRNA 発現レベルが上昇するが、扁桃体中心核での arc mRNA の上昇は検出されない。これに対して、先天的恐怖条件では扁桃体中心核の arc mRNA が上昇するのに対して、扁桃体外側核では arc mRNA の発現上昇は検出されなかった。先天的と後天的な恐怖では扁桃体における情報処理メカニズムが明確に異なる。

＜国内外での成果の位置づけと今後の展望＞

既知の天敵に由来する匂い分子では恐怖情動反応の誘発活性が低いことから、真に嗅覚入力は先天的な恐怖情動を誘発する活性を有するのか、嫌悪反応を誘発できるに留まるのかという議論が続いている。恐怖臭の発見により、嗅覚入力は極めて強力な恐怖情動反応を誘発する活性を持つことが確実なものとなった。匂い分子は嗜好性や感情に影響を与えるというこれまでの認識を越えて、行動や生理応答までも強力に制御するという新たな認識が得られた。

これまでには匂い分子の化学構造と特異的な情動反応との対応関係の有無は解明されていなかった。その大きな理由は、特定の情動を誘発する匂い分子が殆ど知られていなかったことと、情動を特異的に計測する指標が存在しなかったことにある。本研究では特異的な情動を誘発する匂い分子群を一気に数十種類発見すると同時に、新たな恐怖指標を開発することで、これまでの計測技術では区別できなかった複数の恐怖を区別して計測することを可能にした。これらの成果により、匂い分子の化学構造ルールと特異的な行動との間の相関関係が初めて示された。恐怖臭の発見は、匂い分子と行動や情動を結びつけるメカニズムを解明する重要なツールとして国内外の嗅覚研究領域において大きなインパクトを与える。

また、本研究では恐怖臭を駆使することで、先天的と後天的な恐怖が異なる神経メカニズムによって処理される異なる情動状態であることを明確に示すことができた。恐怖臭によって誘発される冷たい恐怖はこれまでに解析が進んでいる後天的な恐怖とは生理応答や脳活動領域などが大きく異なる新たな恐怖状態である。先天的な冷たい恐怖の発見は、嗅覚研究領域に留まらず、恐怖情動の研究領域や、抗不安薬開発領域を含む広範な研究領域に対して、新たな恐怖研究の視点を与えるという点も重要である。

今後は、匂い分子の化学構造の特異性を特定の種類の恐怖情動に結びつけるメカニズムの研究を進め、脳が意味情報を生み出す未知のメカニズムの解明を目指す。恐怖臭による先天的恐怖の分子ターゲット候補は得られているので、新たな抗不安薬開発を目指す。

公募研究：平成 21 年度-平成 24 年度

ゼブラフィッシュ嗅覚行動を司る神経回路メカニズムの分子遺伝学的解明

研究代表者：吉原　良浩 [1)]

1）理化学研究所 脳科学総合研究センター シナプス分子機構研究チーム

＜研究の目的と進め方＞

嗅覚系は物体から発せられる匂い分子を受容し、その情報を鼻から脳へと伝え、匂いのイメージを脳内に表現・創造・記憶あるいは快・不快の感情を誘起して、様々な行動を発現する神経システムである。1991 年の嗅覚受容体遺伝子群の発見（Richard Axel, Linda Buck: 2004 年ノーベル医学生理学賞）が契機となり、嗅覚研究は飛躍的な発展を遂げてきた。特に、嗅上皮の嗅細胞における嗅覚受容体の発現と機能、嗅球における『匂い受容体地図』の存在が証明され、鼻から脳の入口に至るまでの一次嗅覚神経系の匂い情報コーディング様式については、その全体像が解明されてきた。しかしながら、嗅球の『匂い地図』は匂い分子の構造（例えば炭化水素の長さ、官能基など）を基にした化学構造のマップであり、匂いのイメージ形成、記憶、情動発現などは嗅皮質を介してさらに高次の嗅覚中枢において創造されると考えられる。また、「好き」な匂い物質への誘引反応、「嫌い」な匂い物質からの逃避反応、「性フェロモン」によって惹起される性行動などは、線虫や昆虫などのから哺乳類に至るまでの多くの生物に共通の行動原理であるが、入力から出力へと至る化学感覚の神経伝達経路の全貌が明らかとなった例は未だ報告されていない。

そこで我々は、多様な実験手法を統合的に利用可能なモデル脊椎動物としてのゼブラフィッシュの利点を最大限に活かし、好きな匂いへの誘引・嫌いな匂いからの逃避・フェロモンを介した性行動など嗅覚行動の基礎となる神経回路メカニズム解明へ向けて、以下の研究を行った。

＜研究計画＞

1）ゼブラフィッシュ嗅球における匂い地図の全体像の解明

魚が感知する様々な匂い分子・フェロモン分子の情報が、嗅覚一次中枢である嗅球においてどのように表現されているのかを明らかにする。GCaMP発現トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた糸球体活動イメージングと、神経活動マーカーとしての抗リン酸化Erk抗体を用いた免疫組織化学染色を組み合わせた包括的かつ系統的な解析を行うことで、嗅球における匂い地図の全体像を解明する。

2）ゼブラフィッシュ二次嗅覚神経回路の包括的可視化解析

遺伝学的単一ニューロン標識法、image registration system、Brainbowゼブラフィッシュ系統の樹立など最新の発生工学・画像解析技術を駆使することにより、嗅球から高次嗅覚中枢（終脳・右手綱核・視床下部など）へと至る軸索投射パターンの全貌を明らかにする。これら研究戦略で得られたデータを統合し、それぞれの嗅覚二次ニューロンが樹状突起を伸ばして匂い情報を受け取る糸球体と、軸索を投射してその情報を伝達する高次嗅覚中枢領域の関連性を見出し、「嗅球に展開された匂い地図が、高次嗅覚中枢でどのようにdecodeされるのか？」という嗅覚研究の最も重要な疑問の解明に挑む。

3）匂い入力から行動出力へと至る嗅覚神経回路機能素子の同定

発生工学・神経解剖学・神経活動イメージング技術・行動学的手法を組み合わせることによって、ゼブラフィッシュ嗅覚神経系における匂い入力から行動出力までの神経回路基盤の解明を目指す。特に個体の生存・種の保存に重要な以下の３つの嗅覚行動に着目して研究を遂行する。

3)-1「好き」：餌抽出物やアミノ酸への誘引行動

3)-2「嫌い」：警報フェロモンからの逃避行動

3)-3「性行動」：雌の性フェロモンによる雄の誘引作用

これらの行動に関わる神経回路、ニューロン、分子を、GAL4/UASシステムを用いた細胞特異的遺伝子操作法を駆使することによって解明する。具体的には、嗅覚神経系の一部のニューロンでGAL4を発現するジーントラップ系統と様々なUASレポーター系統（蛍光蛋白質，経シナプス性トレーサー分子、神経活動モニター分子，神経活動操作チャネルなど）を交配させ、解剖学的解析によるGAL4発現ニューロンの詳細な形態解析、特定の嗅覚情報を受容・伝達・処理するニューロンの神経活動イメージング、GAL4発現ニューロンの神経活動の強制興奮あるいは抑制による嗅覚行動変化の解析を行い、それぞれの行動発現に重要な役割を果たす神経回路素子を明らかにする。

＜得られた研究成果＞

A）ゼブラフィッシュ嗅球における匂い地図の全体像の解明

平成 23 年度から 24 年度まで、研究計画の項目 1)について研究を進め、ゼブラフィッシュ嗅球における匂い地図の包括的解明に成功した（図１）。まず、各種マーカー抗体を用いた免疫組織化

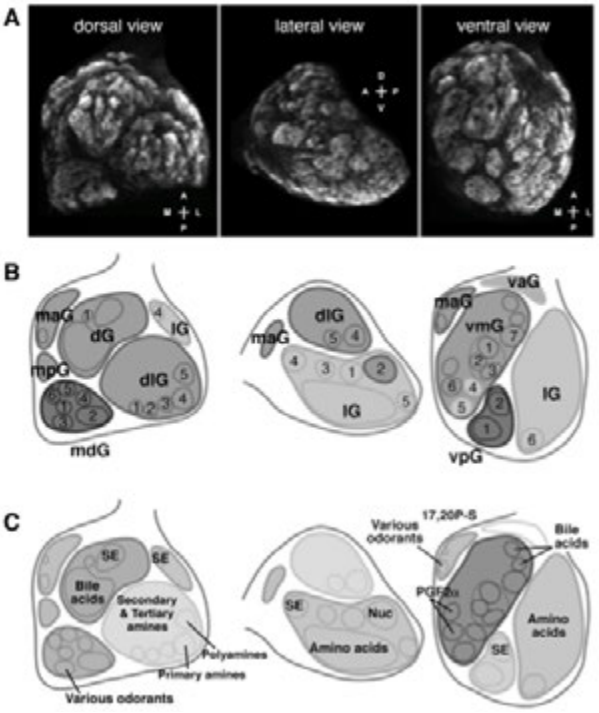


図１　ゼブラフィッシュ嗅球の糸球体クラスターと匂い地図
（A）抗SV2抗体を用いた嗅球のホールマウント免疫組織化学染色。
（B）９つの糸球体クラスターと同定可能な 26 個の糸球体。
（C）各糸球体クラスターの匂い・フェロモン分子応答性。

学染色および異なったタイプの嗅細胞に Gal4 を 発現するトランスジェニック系統を用いての遺伝学的神経回路可視化法によって、Braubach ら(2012)が報告しているように、ゼブラフィッシュ嗅球の糸球体（総数約 140 個）を９つのクラスターに分類でき、同定可能な 26 個の糸球体を確認した（図１Ａ、Ｂ）。次に GCaMP 発現トランスジェニックフィッシュを用いた嗅球のカルシウムイメージング及び神経活動マーカーとしてのリン酸化 Erk 免疫組織化学法によって、各々の糸球体クラスターが異なった構造の匂い分子カテゴリーに対応することを発見した。例えば、背側クラスター（dG）は胆汁酸に、背外側クラスター（dlG）はアミン類に、外側クラスター（lG）はアミノ酸に対して、おもに反応することが分かった。また、背外側クラスター内の異なった糸球体において、アミンの化学構造の違い（一級アミン、二級アミン、三級アミン、ポリアミンなど）が系統的にマップされていることを見出した。一方、魚類の性フェロモンとして知られているプロスタグランジン F2α（PGF2 α）及び 17α,20β-dihydroxy-4-pregnene-3-one-20-sulfate（17,20P-S）は、それぞれ２つあるいは１つの特異的な糸球体を活性化した。さらに、様々な匂い分子に対して選択性なしに応答する２つの「Generalist 糸球体」を発見した（図１Ｃ）。以上の結果から、異なった種類の匂い分子あるいはフェロモン分子の情報が、嗅球の糸球体地図の上に機能的に展開されており、それぞれの嗅覚入力から誘起される異なった出力反応（行動の誘起、内分泌系の変化など）に合目的性の匂い情報コーディング様式が存在することが明らかとなった。以上の結果について国際学会で発表を行い（Koide et al., International Symposium on Olfaction and Taste, 2012: Yoshihara, Cold Spring Harbor Asia Conference, 2012)、論文を現在作成中である（Koide et al., in preparation)。

B) ゼブラフィッシュ二次嗅覚神経回路の包括的可視化解析

平成 21 年度から 24 年度まで、研究計画の項目 2)について研究を進めた。一次嗅覚神経系に比して、嗅球から終脳へと至る二次嗅覚ニューロン（僧帽細胞）の軸索投射パターンとその形成メカニズムおよび高次嗅覚中枢における匂い情報のコーディング様式については、ほとんど何も解明されていない。そこで本項目では、二次嗅覚神経系の分子発現・細胞構築・軸索投射パターン・神経回路形成・神経活動さらには匂いイメージ形成に至るまでの神経機構を分子レベル及び回路レベルでアプローチし、高次嗅覚中枢における匂い情報コーディング原理の解明を目指した。まず、嗅球出力ニューロンの異なるサブセットで選択的に遺伝子発現を誘導できる lhx2a エンハンサー及び tbx21 エンハンサーを同定した（理研 BSI・岡本仁博士との共同研究)。これらの遺伝子発現エンハンサーと Gal4/UAS システムを組み合わせることによって、嗅球から高次嗅覚中枢へと至る二次嗅覚神経回路の全体像を可視化することができた（図２)。次に、lhx2a 及び tbx21 エンハンサーと Gal4/UAS システムを用いた遺伝学的単一ニューロン標識法を駆使し、image registration system による最新の画像解析技術を組み合わせることによって、個々の嗅球出力ニューロンの詳細な解剖学的解析を行った（図３)。特に各ニューロンが樹状突起を伸ばす糸球体（あるいは糸球体クラスター）を同定して、嗅球出力ニューロンのグループ化を行い、個々の軸索投射領域との相関性を検証した。その結果、ゼブラフィッシュ二次嗅覚神経回路の軸索投射パターンを系統的かつ包括的に解析することができ、以下のような新知見が得られた。

１．ゼブラフィッシュ嗅球出力ニューロンの主要な投射領域は、(1)終脳背側後方部（posterior telencephalon: pTel あるいは Dp)、(2)終脳腹側前方部（ventral telencephalon: vTel あるいは Vv)、(3)右手綱核（right habenula: rHb）及び(4)間脳後結節（posterior tuberculum: PT）の４つの脳部位である。

２．終脳背側後方部（pTel）の中心領域はすべての糸球体クラスター

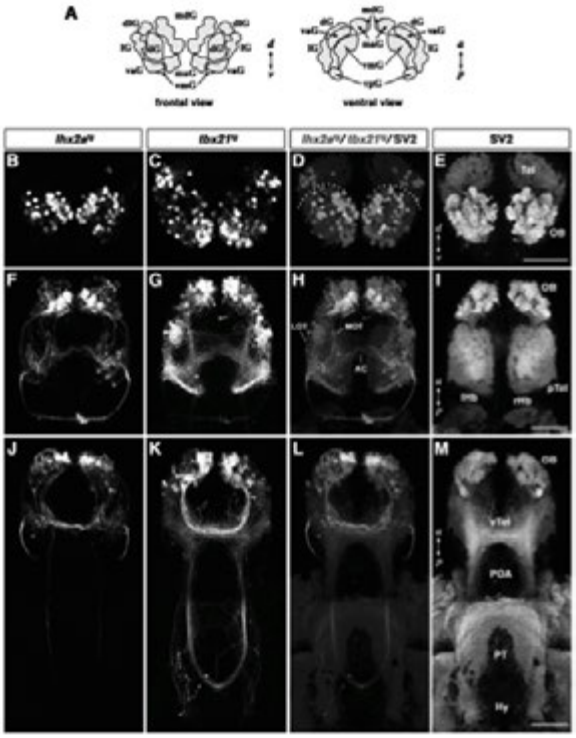


図２ ゼブラフィッシュ二次嗅覚神経回路の遺伝学的蛍光可視化解析
（Ａ）嗅球の糸球体クラスターの模式図。
（Ｂ，Ｆ，Ｊ）lhx2a エンハンサー支配下に嗅球出力ニューロンの一部で GFP を発現するトランスジェニックフィッシュの脳。
（Ｃ，Ｇ，Ｋ）tbx21 エンハンサー支配下に嗅球出力ニューロンの一部で RFP を発現するトランスジェニックフィッシュの脳。
（Ｅ，Ｉ，Ｍ）抗 SV2 抗体（シナプス小胞のマーカー）の染色パターン。
（Ｄ，Ｈ，Ｌ）GFP、RFP、SV2 を重ね合わせたイメージ。
嗅球の僧帽細胞から投射する軸索および終脳内の神経終末がラベルされている。さらに一部の軸索は右の手綱核（rHb）及び間脳後結節（PT）まで到達していることがわかる。

からの入力を一見ランダムに受けており、哺乳類の梨状皮質（piriform cortex）や昆虫のキノコ体（mushroom body）に相当する嗅覚中枢であると考えられる。おそらくこの領域は、様々な匂い情報の識別や後天的な記憶に関わると予想される。

３．終脳腹側前方部（vTel）は、おもに腹側前方クラスター（vaG)、内側前方クラスター（maG)、腹内側クラスター（vmG）及び背側クラスター(dG)から神経投射を受ける。これらの糸球体クラスターへは、OR タイプ受容体を発現する繊毛嗅細胞からの入力を受けるので、特定の匂い分子カテゴリーの情報が vTel で処理されると考えられる。

４．嗅球から手綱核へと直接かつ左右非対称な神経投射があることが本研究により初めて明らかとなった。嗅球出力ニューロンは右の手綱核に選択的に神経投射する。また右手綱核（rHb）は、内背側クラスター(mdG)および腹内側クラスター(vmG)の２つの糸球体クラスターからのみ投射を受ける。哺乳類の手綱核は恐怖反応や報酬機能などの情動的価値判断に関わると考えられている。ゼブラフィッシュにおける嗅球から手綱核への直接的神経入力の機能的意義解明が今後の課題である。

５．間脳後結節（PT）はすべての糸球体クラスターからの入力を受ける。また、PT に到達した嗅球出力ニューロンの軸索と、ドーパミン作動性ニューロンの密なコンタクトが観察された。PT 内ドーパミン作動性ニューロンは、中脳から延髄・脊髄へと至る運動システムの駆動を行うことから、嗅球から PTm への入力は様々な匂い分子の知覚に伴う誘引や忌避の遊泳運動に関わる可能性が示唆される。

６．すべての嗅球出力ニューロンは同側の終脳領域ともに、前交連を経由して反対側の終脳領域にも軸索を投射している。また一部のニューロンは反対側の嗅球へも投射している。哺乳類ではこのような嗅球出力ニューロンの反対側への直接の神経支配は全く見られない。

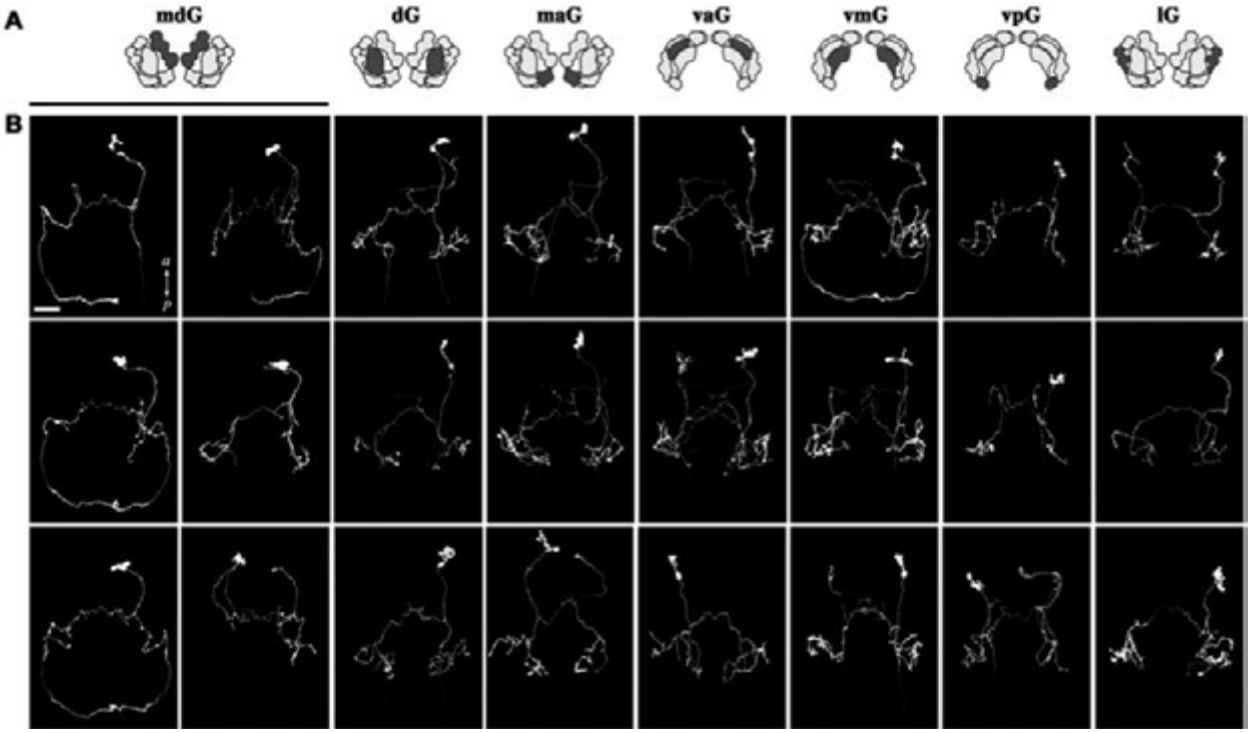


図３ 遺伝学的単一細胞標識法によるゼブラフィッシュ嗅球出力ニューロンの蛍光可視化解析
（A）嗅球の糸球体クラスターの模式図。
（B）GFP でラベルされた嗅球出力ニューロン。糸球体クラスターごとに特徴的な軸索投射パターンが観察される。

本研究は、二次嗅覚神経投射マップを脊椎動物で包括的に示した初めての例であり、高次嗅覚中枢における匂い情報のコーディング、プロセシング様式を考える上で重要な基礎データとなるものである。以上の結果を国際学会で発表し（Miyasaka et al., International Symposium on Olfaction and Taste, 2012: Yoshihara, Cold Spring Harbor Asia Conference, 2012)、その内容の一部は Journal of Neuroscience 誌に原著論文として掲載され（Miyasaka et al., 2009)、２報目の論文を現在執筆中である（Miyasaka et al. in preparation)。

C) アミノ酸への誘引行動を司る神経回路メカニズム

平成 21 年度から 23 年度まで、研究計画の項目 3)-1 について研究を進めた。すべての生物にとって嗅覚は、索餌行動・危険回避行動・性行動など、生命活動の維持・種の保存に不可欠な役割を果たしている。本項目では、餌から溶け出すアミノ酸にゼブラフィッシュが誘引される神経回路メカニズムを解析した。まず、嗅細胞の異なったサブセットに Gal4 を発現するトランスジェニック系統を樹立・収集した（遺伝学研究所・川上浩一博士との共同研究）（図４Ａ)。SAGFF27A 系統においてはおもに嗅球の外側部に、SAGFF179A 系統では内背側部に、そして OMP:GFF 系統では前方部と腹側部に軸索投射する嗅細胞サブセットがそれぞれ Gal4 を発現することがわかった（図４Ｂ)。また、アミノ酸への誘引行動（好き反応）を再現性良くかつ定量的に解析できる行動実験システムを確立した。１匹のゼブラフィッシュを水槽に入れ、片側にアミノ酸混合溶液をポンプで投与し、遊泳行動を経時的に上方からビデオカメラでモニターし、全自動行動解析システムを用いて魚の位置をトラッキングして１分間ごとにその軌跡をプロットした（図４Ｃ)。野生型のゼブラフィッシュはアミノ酸に強く誘引されるが、外科的に嗅上皮を除去した魚はまったく誘引行動を示さなかった。すなわちアミノ酸への誘引行動が嗅覚神経系に依存していることが確認された。次に上記トランスジェニック系統を UAS:TeTxLC 系統と交配させ、Gal4 を発現する異なった嗅細胞サブセットで破傷風毒素

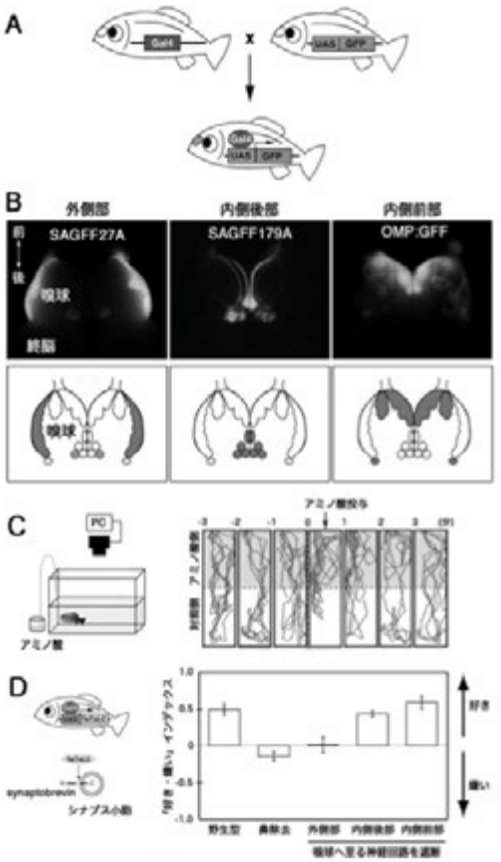


図４ アミノ酸への誘引反応を司る神経回路メカニズムの解析
（A）Gal4/UAS システムの原理。
（B）異なる嗅細胞サブセットに Gal４(GFP)を発現し、嗅球の異なった領域に軸索を投射するトランスジェニック系統。
（C）嗅覚行動自動解析システム。
（D）破傷風毒素(TeTxLC)トランスジーンを用いた遺伝学的神経伝達遮断法。外科的に鼻を除去した魚および嗅球の外側部に至る神経回路を遮断した魚においてのみ、アミノ酸への誘引反応は完全に消失している。

(Tetanus toxin: TeTxLC) を強制発現する魚を作製した。TeTxLC はシナプス小胞の機能蛋白質 synaptobrevin を特異的に限定分解することにより、そのニューロンからのシナプス伝達を選択的に遮断する毒素である。これらの魚を行動実験に供したところ、嗅球の外側部に軸索を投射する嗅細胞からの神経伝達を遮断した系統 (SAGFF27A; UAS:TeTxLC) において、アミノ酸への誘引行動が完全に消失した。一方、嗅球の別の領域へと投射する神経回路を遮断しても正常にアミノ酸へと誘引された (図４Ｄ)。以上の結果から、嗅球の外側部へと軸索を投射する微絨毛嗅細胞からの神経回路が、アミノ酸の匂い情報を伝達し、誘引行動を引き起こしていることが明らかとなった。以上の結果を国際学会で発表し (Yoshihara, Janelia Farm Conference, 2010)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 誌に原著論文が掲載された (Koide et al., 2009)。

D) 性フェロモン PGF2αへの誘引行動を司る神経回路メカニズム

平成 23 年度から 24 年度まで、研究計画の項目 3)-3 について研究を進めた。脂質メディエーターであるプロスタグランジン F2α (PGF2 α)が多くの魚種において排卵時の雌魚から放出され、雄魚の嗅覚系を刺激して性行動を誘発する『性フェロモン』として機能することが 1988 年以来報告されてきた。しかしながら、その受容体および神経回路メカニズムについてはこれまでほとんど何も解明されていなかった。本項目では、性フェロモン PGF2 αが結合する嗅覚受容体の同定とその生理的役割の解明、PGF2 αによって活性化される嗅覚神経回路の同定と性行動発現メカニズムの解明に向けての研究を行った。まず、抗リン酸化 Erk 抗体を用いた免疫組織化学的染色法を嗅上皮切片で行い、PGF2 α刺激によって少数の繊毛嗅細胞が活性化することを見出した。次に、繊毛嗅細胞に発現する約 140 種類の OR タイプ嗅覚受容体遺伝子をすべてクローニングし、神経活動マーカーc-Fos mRNA との蛍光二重 in situ ハイブリダイゼーションを行うことで、PGF2 α刺激によって活性化される嗅細胞に発現する１種類の嗅覚受容体#1-1 を同定した。この受容体が PGF2 αの受容体として機能することを、COS7 細胞への強制発現系での cAMP 産生能により確認した (熊本大・杉本幸彦博士との共同研究)。さらに GCaMP 発現トランスジェニックフィッシュの嗅球におけるカルシウムイメージングによって、腹内側部の２つの糸球体 (vmG) が PGF2 α特異的に反応することを見出した。また PGF2 αに対して雄ゼブラフィッシュが顕著な誘引行動を発現することを明らかにした (図５)。本研究により、性フェロモン PGF2 αの受容体及び神経回路メカニズムの一端が解明された。以上の結果を国際学会で発表し(Yoshihara , Cold Spring Harbor Asia Conference, 2012)、原著論文を現在執筆中である (Yabuki et al. in preparation)。

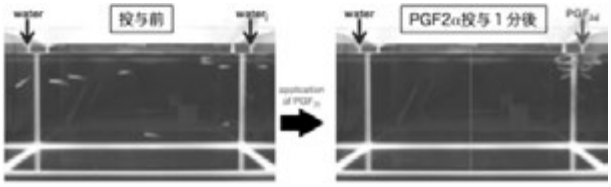


図５ PGF2αへの雄ゼブラフィッシュの誘引行動

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究成果の A)については同様の結果がスイスの Friedrich のグループにより報告されており、今後の競争の激化が予想される。

B)については、脊椎動物において初めての二次嗅覚神経回路の包括的可視化解析として、世界でも例のない報告となり、当該分野の新たな流れを作るきっかけになっている。

C)については、ゼブラフィッシュにおける遺伝学的神経回路可視化と神経活動操作法を行動学的解析と組み合わせた独創的な成果として、高く評価されている。

D)については、性フェロモンとしてのプロスタグランジンの役割を受容体・神経回路レベルで解明した新知見として、嗅覚研究の新たな地平を切り開くと期待される。

なお研究代表者の吉原は、Janelia Farm Conference (USA, 2010)、UCSF Neuroscience Seminar (2010, USA)、Cold Spring Harbor Asia Conference (China, 2012)、International Symposium on Olfaction and Taste (Sweden, 2012)など多くの国際シンポジウムにおいての招待講演者として、本領域の研究成果についての発表を行った。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画2)については、Brainbowゼブラフィッシュ系統の樹立が予想外に遅れてしまい、米国の研究グループに先を越されてしまった。もし同一個体において複数の嗅球出力ニューロンを多重蛍光で標識・区別できれば、より速やかな研究進展が達成されたはずである。また、研究計画3)-2については、警報フェロモンおよびその受容体が未だ同定されておらず、研究が遅滞してしまった。他の研究はおおむね計画通りに順調に進んだ。

＜今後の課題、展望＞

1991年の嗅覚受容体の発見以来、１嗅細胞−１受容体ルール、同一受容体を発現する嗅細胞の特定糸球体への軸索集束、嗅球における匂い情報の表現様式など、嗅上皮から嗅球へと至る一次嗅覚神経系の機能構築については多くの知見が報告されてきた。しかしながら、嗅球から高次嗅覚中枢へと至る二次嗅覚神経系、さらには行動出力や内分泌系変化などを誘起する高次嗅覚メカニズムについては、ほとんど何も分かっていないのが現状である。本研究により、嗅覚神経系の全体像を俯瞰でき、遺伝学的操作・神経活動イメージング・神経行動学的解析などの技術を組み合わせて駆使できるモデル脊椎動物としてのゼブラフィッシュの有用性を証明することができた。今後は、匂いやフェロモンの入力が誘起する情動反応、性行動さらには嗅覚記憶などの神経回路メカニズムの解明が期待される。

公募研究：２１年度-２２年度

ゼブラフィッシュ手綱核による恐怖行動制御

研究代表者：岡本仁

理化学研究所、脳科学総合研究センター

＜研究の目的と進め方＞

手綱核の最背側部に両側性に存在し、脳の情動系神経核群(いわゆる大脳辺縁系の一部を含む)と、中脳と後脳の境界部に接する腹側正中線上に1つだけ存在する脚間核を中継する神経回路を構成する。我々は、手綱核を経由する神経回路が、サカナからヒトまで保存されていることを証明し、手綱核の機能を明らかにするために、ゼブラフィッシュを使って研究を進めた。

哺乳類では、手綱核は内側核と外側核からなる(図 1A)。内側手綱核には、外界の物理的状況とその情動的価値の情報が、海馬と扁桃体から、中隔核と分界線条核を介して伝わる(図1B)。左右の内側手綱核は、反屈束に沿って伸びる神経によって、脚間核とつながっている。脚間核は、更に腹側被蓋野のドーパミン神経細胞や、縫線核のセロニン神経細胞などのモノアミン神経細胞とつながっている。 一方外側手綱核には、選択された行動プログラムに関わる大脳皮質・基底核・視床ループの細胞集団の興奮に関する情報が、腹側淡蒼球から運ばれる(図1C)。外側手綱核から伸びる神経は、脚間核を介さずに直接に、腹側被蓋野や縫線核に投射している。このような神経回路の特徴から、我々は、内側手綱核と外側手綱核とは，何らかの相互作用によって、価値判断を伴った外界状況に関する情報(外部環境情報)と、それによって喚起された目的を持った行動に関する情報(内部行動プログラム情報)との照合が行われ、照合がうまくいかなかったときに、行動プログラムの改変がおこなわれるのではないかと考えた。実際に、彦坂らを含む複数のグループの研究によって、外側手綱核の神経細胞は、報酬を期待する行動で、報酬が得られなかった時に興奮し、ドーパミン神経細胞の活動を抑制することが示されている[Hikosaka et al., J. Neurosci. 28:11825-11829, 2008]。しかしながら、内側手綱核を脚間核と結合する神経回路の役割や、内側手綱核と外側手綱核の相互作用の実態などは、殆ど分かっていなかった。

我々は、ゼブラフィッシュでは背側手綱核と腹側手綱核が、マウスの内側手綱核と外側手綱核に相当することを発見した（Amo et al., J. Neurosci, 2010）（図２左，中）。更に我々は、ゼブラフィッシュの背側手綱核が、更に外側と内側の亜核に分かれており、外側亜核は脚間核の背側半分に、内側亜核は脚間核の腹側半分に選択的に投射すること、左側の手綱核では外側亜核が内側亜核よりも有意に大きく、右側の手綱核ではその反対であることを発見した（Aizawa et al., Current Biology, 2005; Devel. Cell, 2007）（図２左、中）。

図１　内側手綱核と外側手綱核の神経投射パターン

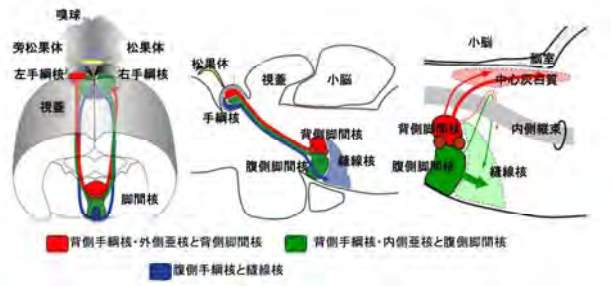


図2　ゼブラフィッシュの手綱核神経結合

本研究では、このような神経回路を特異的に操作するために、これまでに、背側手綱核の全体や、外側亜核だけに特異的にGal4-VP16を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュを作成し、これらの系統を使って、背側手綱核や、外側亜核だけを選択的に破壊したり、神経活動を抑制できるようにすることを目指した。更に、このようなゼブラフィッシュ系統をお用いて、どのような行動異常が引き起こされるかを明らかにすることを目的として研究を行った。

＜研究計画＞

我々はこれまでに、マウスにいて手綱核に特異的に発現する遺伝子を文献的に検索し、それらの相同遺伝子をゼブラフィッシュで同定し、発現パターンを調べた。この中で NARP (neuronal-activity regulated pentraxin または NPTX2, neuronal pentraxin II ともよばれる)は、ゼブラフィッシュの脳の中で、手綱核とそのほかのごく限られた部分のみで発現していることが確認された。我々は、この遺伝子を含む BAC ゲノムクローンを単離し、大腸菌内での遺伝子組換えによって遺伝子のコーディング領域を転写因子 Gal4-VP16 と置換した。さらに、この組換え BAC クローンをゲノムに組込んだトランスジェニック・ゼブラフィッシュを作製している。この系統と、Gal4-VP16 の標的配列である UAS(upstream activating sequence)の下流に DsRed の遺伝子を持つトランスジェニック系統とを掛け合わせて作製した２重トランスジェニック系統の脳では、DsRed は背側手綱核の外側亜核に特異的に発現していることが確認された。

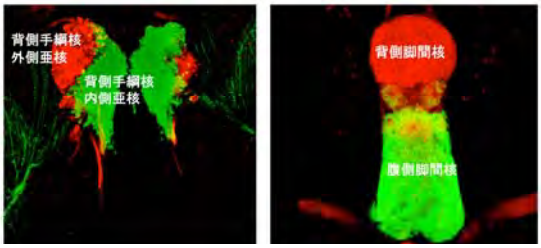


図３ トランスジェニック･ゼブラフィッシュにおける RFP と GFP の発現

さらに、UAS の下流に、Nitroreductase 遺伝子を持つトランスジェニック系統とかけ合わせた２重トランスジェニック系統の成魚では、飼育水に Metronidazole を加えることによって、背側手綱核の外側亜核の神経細胞とそこから脚間核の背側へと伸びでる神経軸索を特異的に除去できることを確認した。また、UAS の下流に Tetanus Toxin の遺伝子を持つトランスジェニック系統とかけ合わせた２重トランスジェニック系統の成魚では、Tetanus Toxin の mRNA が、背側手綱核の外側亜核の神経細胞のみで発現しており、この神経細胞から脚間核の背側の神経細胞への神経連絡が、特異的に遮断されていることが期待された。NARP 遺伝子そのものは、手綱核のほかにも、脳の少数の部位で発現しているが、我々が作製した２重トランスジェニック系統では、背側手綱核の外側亜核以外では、UAS の下流におかれた遺伝子の発現は見られなかった。

NARP は、当初神経細胞の興奮に伴って発現が誘導される immediate early gene の一つとして同定されたが、シナプス間隙に分泌されて AMPA 型グルタミン酸受容体と結合して、この受容体分子をシナプス後膜に集積させる働きを持つことが示されている。NARP 遺伝子をノックアウトしたマウスは、恐怖学習で、記憶の消去に障害があることが報告されているが、それがどの神経回路の欠陥によるのかは、全く明らかではなかった。手綱核は NARP を特異的に発現しており、この結果は、恐怖学習の制御と深く関わっているのではないかという、我々の予測と一致している。更に、背側手綱核の外側亜核が投射する背側脚間核は、脅威や性的衝動に基づく本能的行動の中枢である中心灰白質に投射し、内側亜核が投射する腹側脚間核は、セロトニン神経細胞を含み戦略的行動プログラムの成立に関わる縫線核に投射することも予備的実験結果として得ていた（Agetsuma et al., 2010）（図２右）。

従って、我々は、背側手綱核の外側亜核で Tetanus Toxin を特異的に発現する系統の成魚を用いて、特異程の色の光の提示を条件刺激として、電気ショックを非条件刺激とする恐怖学習を行った。野生型の魚では、条件刺激（光）を提示している間のみ、行動量が増える（恐怖反応）ことが確認されていた。また、条件刺激の提示のみで、非条件刺激（電気ショック）を与えないという試行を繰り返すと、このような恐怖反応が減弱すること（恐怖記憶の消去）が知られていた。学習の成立後、非条件刺激の提示のみで、背側手綱核外側亜核と脚間核との神経連絡を遮断した魚の行動が、野生型の魚の行動とどのように異なるかを観察した。

＜得られた研究成果＞

背側手綱核の外側亜核の神経細胞で，特異的に破傷風毒素を産生し、背側脚間核への神経伝達が特異的に遮断されたトランスジェニック・セブラフィッシュでは、恐怖学習の成立後の、恐怖反応が、異常に亢進していることが明らかになった（図４）。即ち、野生型のゼブラフィッシュでは、恐怖学習の後に条件刺激を提示すると、一時的な遊泳活動の亢進が見られるだけだが、このようなトランスジェニック系統は、条件刺激と提示後、完全に行動を停止した（フリージング）。この状態は、条件刺激の提示終了後も数分間持続した。このことから我々は、**背側手綱核（哺乳類の内側手綱核）の外側亜核が、恐怖学習の成立や消去と密接に関わっているのではないかと考えられるようになった。**この結果は、平成２２年度に Nature Neuroscience 誌に発表した（Agetsuma et al., Nature Neurosci., 2010）。

図４

＜国内外での成果の位置づけ＞

我々の発表の直後に、シンガポールのグループが、同じくゼブラフィッシュを使って、我々の結果を支持する論文を発表している（Lee et al., Current Biology 2010）．更に、２０１３年になって、日本の中西他のグループが、マウスで、ゼブラフィッシュの背側手綱核外側亜核に相当する、内側手綱核背側亜核への中隔核からの投射を遮断すると、我々がゼブラフィッシュで見たので同じ症状が見られることを報告し、この神経回路の機能が，進化的に保存されていることを示した（Yamaguchi et al., Neuron, 2013）。岡本は、この論文が掲載されている号に、手綱核機能の進化的保存に関する解説文の寄稿を依頼された（Okamoto and Aizawa, Neuron, 2013）。岡本は、2009 年以後４１回、国際的なシンポジウムでの講演に招待されており、我々の仕事への関心が、非常に高いことを示している。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究期間内に、背側手綱核外側亜核と腹側手綱核を操作できる系統を作製することができなかった。その後これらの系統を作製でき、現在解析中である。

＜今後の課題、展望＞

本研究は、ゼブラフィッシュ成魚を使って、恐怖条件付け学習後の恐怖行動の選択に、手綱核･脚間核神経回路がかかわっていることを、世界で初めて示せた。今後、この神経回路が他にどのような行動の制御に関わっているのかや、手綱核の他の部分の働きは何かなど、さまざま研究課題が山積しているが、いずれも恐怖行動の制御機構を明らかにする上で、大変重要である。

公募研究： 2011 年度-2012 年度

レム睡眠における大脳賦活化の意義とメカニズム

研究代表者：林　悠[1) 2)]

1）筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構　2）理化学研究所脳科学総合研究センター

＜研究の目的と進め方＞

私たちヒトの睡眠は一様な生理状態ではなく、レム（急速眼球運動）睡眠と徐波睡眠という2種類の非常に特徴的な睡眠ステージが存在する。ヒトは眠りに落ちると浅い睡眠ステージを経た後、この2種類のステージの間を朝まで行ったり来たりする。レム睡眠は夢を生じることでよく知られ、感覚入力がないにも関わらず脳では覚醒時と似た活動状態が観測される。一方、徐波睡眠はいわゆる深い眠りに相当し、徐波とよばれる大脳皮質などの非常にゆっくりとした同調的神経活動を特徴とする。このように睡眠が複雑な生理状態へと進化した動物種は一部の脊椎動物に限られている。中でも夢を生じるレム睡眠は広く一般に知られ、様々な分野の人の注目を集めてきた。しかしながら、その発見から50年以上経った今なおその生理的意義はほとんど分かっていない。本研究では、なぜこのような生理状態が生まれたのか、その進化的起源や生理的意義の解明を目指してきた。

これまで本研究では次のような戦略を取ってきた:レム睡眠と徐波睡眠の間を切り替えるスイッチ回路を同定し、その発生学的起源を解明するとともに、その活動を人為的に操作できることを目指す。発生過程に注目してレム・徐波睡眠のスイッチ回路がどのような細胞系譜に由来するかを解明すれば、レム睡眠の進化的起源に関するヒントが得られると期待される。また、この回路の活動を操作することで非侵襲的にレム睡眠を阻害できれば、レム睡眠の生理的意義に関するヒントが得られると期待される。

レム・徐波睡眠のスイッチ回路を担う脳部位については、ネコの生理学的な研究に基づく様々な知見が存在する。レム睡眠や徐波睡眠は進化的に新しい現象だが、そのスイッチ回路は脳幹の橋という系統発生的に非常に古い脳部位に存在する。ネコにおいて、ここにある橋網様体と呼ばれる部位に特定の薬剤を注入すると、直ちにレム睡眠に陥る。しかしながら、古典的な生理学的手法では、橋網様体に混在する様々なニューロンのうち、どのサブタイプがレム睡眠の制御に関わるかは不明であった。

我々はマウスを利用し、遺伝学的手法を利用することで、レム・徐波睡眠のスイッチ回路を決定するとともに、その発生学的起源の解明を試みた。また、レム・徐波睡眠のスイッチを担うニューロンの活動操作を通じて、レム睡眠を人為的に阻害することを試みた。

＜研究計画＞

1）レム・徐波睡眠を制御する橋網様体の発生過程の解析

橋網様体は脳幹の大きな部分を占め、神経線維が網の目状に通る中に、様々なサブタイプのニューロンが散在している。我々は一見明確な神経核の構造を持たない橋網様体を、細胞系譜に着目することで領域や機能による細分化ができないかと考えた。後脳（将来脳幹と小脳に分化する領域）の様々な細胞増殖群に一過的に発現する遺伝子プロモーターをCre-loxPシステムと組み合わせることで、各増殖細胞群に由来するニューロン群を標識した。

2）胎児期に一過的に標識したニューロンを成体において活動操作できる技術の確立

1)の続きとして、特定の細胞系譜に由来するニューロンを後天的に機能操作できる系を確立した。これには、一過的に神経興奮を引き起こすことの可能な DREADD-hM3Dq という組換え G タンパク質共役型受容体を利用した。DREADD-hM3Dq を細胞系譜特異的に発現させるために、Cre-loxP システムとテトラサイクリン誘導系、さらにはアデノ随伴ウイルスベクターを利用した三重トランスジェニック系を開発した。

3）DREADD-hM3Dq発現マウスからの睡眠記録

マウスの通常の飼育状況に近い条件下で、脳波・筋電図を測定し、かつDREADD-hM3DqのリガンドであるCNOという化合物を投与できるシステムを確立した。このシステムを利用し、特定の脳部位の一過的な活性化が睡眠・覚醒サイクルに及ぼす影響や、レム睡眠を阻害した影響を評価した。

＜得られた研究成果＞

A）橋網様体の発生過程

胎児期の後脳（将来小脳と脳幹になる領域）の様々な増殖細胞群を遺伝学的に標識し、各細胞群がどのようなニューロンへと分化するかを検討した。その結果、一見明確な神経核の構造を持たない橋網様体も、実は様々な細胞系譜に由来する細胞群の集まりであることが判明した。なかでも小脳菱脳唇と呼ばれる神経上皮組織が、レム睡眠時に強く発火するニューロンが存際する橋網様体背側領域の興奮性ニューロンに貢献することが判明した。これらの結果は国際シンポジウムで発表した(Hayashi, The 1st Annual WPI-IIIS Symposium, 2013)。

B）レム・徐波睡眠のスイッチ回路の遺伝学的同定

前述の理由から、小菱脳唇由来のニューロンがレム・徐波睡眠のスイッチ回路に貢献する可能性を検討した。そのために、特定の細胞系譜に由来するニューロンのみを後天的に活動操作できる方法を確立した。実際のニューロンの活動操作には、一過的に神経興奮を引き起こす DREADD-hM3Dq という組換え G タンパク質共役型受容体を細胞系譜特異的に発現させた。

DREADD-hM3Dq を用いて小菱脳唇由来のニューロンの内、内腹側のグルタミン作動性ニューロンを興奮させたところ、ただちにレム睡眠のような状態が誘発された。逆に、内背側のグルタミン作動性ニューロンを活性化したところ、レム睡眠が強く抑制され、徐波睡眠のみからなる睡眠が生じた（図 A)。これらの結果から、小脳菱脳唇由来のグルタミン酸作動性ニューロンがレム・徐波睡眠のスイッチ回路に貢献することが明らかとなった。これらの結果は国際シンポジウムで発表した(Hayashi, The 1st Annual WPI-IIIS Symposium, 2013)。

C）レム・徐波睡眠のスイッチ回路のニューロンは覚醒中枢と同じ細胞系譜に由来

小脳菱脳唇由来の細胞の内、内腹側および内背側のニューロンはレム・徐波睡眠のスイッチ回路に貢献するが、大半を占める外側のニューロンについても機能を検討した。これらのニューロンを活性化したところ覚醒が著しく増加し、逆に睡眠の合計時間が大きく減少した。このことから、小脳菱脳唇の主要な細胞は覚醒中枢となり、一部がレム・徐波睡眠のスイッチ回路へと分化することが判明した。これらの結果を踏まえると、進化の過程で覚

醒中枢に分化する予定運命の細胞の一部が新しい機能を獲得し、その結果レム睡眠や徐波睡眠が生じた可能性が考えられる。これらの結果は国際シンポジウムで発表した(Hayashi, The 1st Annual WPI-IIIS Symposium, 2013)。

D) レム睡眠を人工的に阻害できる動物モデルの確立

小脳菱脳唇由来の細胞群の内、内背側のニューロンはレム睡眠を強く抑制することが今回判明した。これらのニューロンにDREADD-hM3Dq を発現させて人為的に興奮させると、レム睡眠が失われた（図 A)。このように任意のタイミングで一過的にレム睡眠を阻害できる遺伝学的モデルは過去に例がなく、レム睡眠の生理的意義の解明のための非常に有用なツールとなると期待される。これらの結果は国際シンポジウムで発表した(Hayashi, The 1st Annual WPI-IIIS Symposium, 2013)。

E) レム睡眠は徐波睡眠時の徐波の発生に必要？

上記のマウスを利用することで、これまで謎であったレム睡眠の生理的意義に関するヒントが得られると期待された。そこで1日おきにレム睡眠を1週間にわたって阻害したところ、次第に徐波睡眠にも変化が現れた。徐波睡眠を特徴付ける大脳皮質のゆっくりと同期した活動（徐波）が著しく低下してきたのである（図 B)。近年の研究から、徐波睡眠時にシナプス強度の変化や記憶の固定化が起こることが分かっている。そして、こうした徐波睡眠時の脳の変化は徐波に依存するとされている。今回の結果から、この徐波の正常な生成に、レム睡眠時の大脳の不連続的な賦活化が重要であると考えられる（林ら、未発表)。

＜国内外での成果の位置づけ＞

レム･徐波睡眠の制御機構に関する研究で遺伝学的アプローチが取られた例は世界的にみてもほとんど例がない。これまで、こうした役割を担うニューロンのサブタイプに関して論争が繰り返されてきたが、諸説がどれも因果関係に基づく強い根拠を欠いてきた。さらには、本研究のように発生過程・細胞系譜と関連付けてレム・徐波睡眠の中枢回路を解析した研究は前例がない。

レム睡眠の生理的意義に関しても統一的見解は全くない。レム睡眠を任意のタイミングで阻害できるトランスジェニックマウスもこれまで全く前例がなく、非常に大きなインパクトをもたらすものと期待される。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

これまでに確立したレム睡眠阻害マウスは、三重トランスジェニックマウスであり、複雑な掛け合わせを経る必要がある。さらに、3つ目の組換え遺伝子はアデノ随伴ウイルスベクターを用いて導入するため、出生前後の早い成長段階でのレム睡眠阻害が困難であるという欠点がある。今後、特異性の高いプロモーターを同定することで、より単純なトランスジェニックマウスで同等のレム睡眠阻害効果を得ることが課題の一つである。

＜今後の課題、展望＞

レム睡眠･徐波睡眠はどちらもヒトを含む一部の脊椎動物に固有の生理状態である。今回この2種類の睡眠状態を生み出す神経細胞群の発生学的起源が明らかとなった。これは複雑な睡眠が生じた進化の過程を理解するための重要な手掛かりとなると期待される。今後、どのような遺伝子がこれらのニューロンのレム睡眠や徐波睡眠の制御中枢としての機能獲得に重要かを解明したい。

また、2種類の睡眠状態の中でも、特に夢を生じるレム睡眠の生理的意義は大きな謎であった。今回、レム睡眠を特定のタイミングで人為的に阻害できるようになったことから、今後レム睡眠の役割に関する研究が躍進すると期待される。

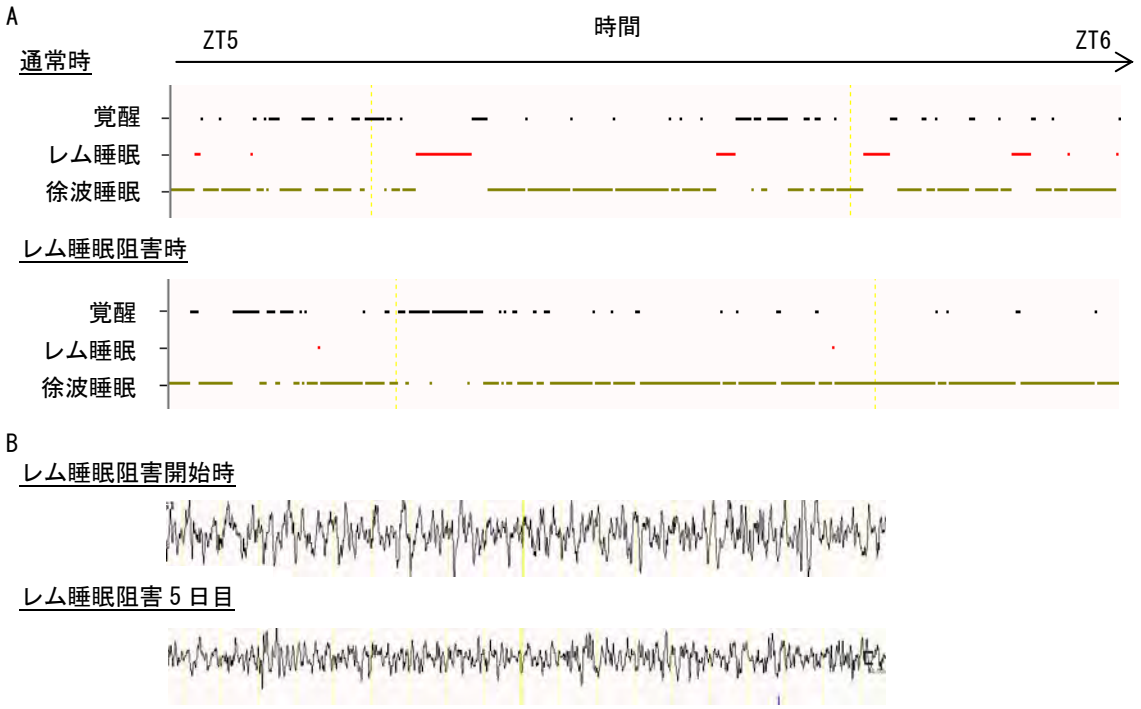


図　レム睡眠阻害マウスの確立（林ら、未発表）

A) 小脳菱脳唇由来の細胞のうち、内背側のニューロン群に人工Ｇタンパク質共役型受容体 DREADD-hM3Dq を発現させたマウスの明期の睡眠覚醒パターン。上段は通常時、下段はリガンド投与によるレム睡眠阻害時。

B) 上記のマウスの徐波睡眠時の大脳皮質の脳波パターン。上段はレム睡眠阻害開始時、下段は１日おきにレム睡眠を阻害した５日目。レム睡眠の阻害により徐波（振幅の大きいゆっくりとした活動）が減少した。

公募研究：2009 年度-2010 年度

シナプス接続とシナプス小胞放出の可視化による機能性神経回路網の解明

研究代表者：戸井　基道 [1)]

1）独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門

＜研究の目的と進め方＞

動物の様々な生命現象を制御する神経回路網は、個々の神経細胞がシナプスを介して接続する事で情報処理を担う機能的素子として機能する。特に中枢神経系のように多数の神経細胞が存在する場合、適切な神経間でのシナプス形成がその回路の特性や処理情報を既定し、行動や学習といった高次脳機能を産み出すための重要な制御要因となる。したがって、個体におけるシナプス接続パターンがどの様に形成･機能しているのかを網羅的に理解することは、神経回路の形成メカニズムとその情報処理メカニズムを理解するための大きな手掛りとなる。モデル生物線虫（*C. elegans*）は、電子顕微鏡の連続切片解析に基づいて、約 300 個の神経細胞が形成するほぼ全てのシナプスの位置やその標的細胞が推定されている唯一の動物である。しかしながら、これらのシナプスは小胞の集積と膜の電子密度を指標として推定されたものであり、実際には各シナプスが個体の様々な情報処理にどの様に寄与しているのかを明確にした研究例はほとんどない。

そこで本研究課題では、動物の行動に伴い実際に機能・活動する個々のシナプスを特定し、その数や位置、また刺激に伴う活動量の変化がどの様に神経情報処理に寄与しているのかを個体レベルで明らかにすることを目的とした。そのために、①神経活動依存的に機能する個々のシナプスの可視化、②特異的細胞間で形成されるシナプスの可視化、を可能する技術を開発する。また、③神経回路内のシナプス数や特異的な位置が有する情報処理のための機能的意義、について解析することを試みた。上記の解析を行う系として、線虫の水溶性化学物質に対する化学走性を制御する ASER 感覚神経に注目した。ASER は、特に NaCl 濃度変化に応じて活動し、その情報を下流の介在神経に伝達することで化学走性に関与することが分かっている。また、6 種のポストシナプス神経とシナプス接続することが、上記の電子顕微鏡解析の結果から推測されている。この ASER のシナプス形成をモデルシステムとして、特異的な神経間のシナプス形成を制御する分子機構と、その特異的シナプスの量的、質的性質と神経情報処理、すなわち個体の行動との関係を解析した。

＜研究計画＞

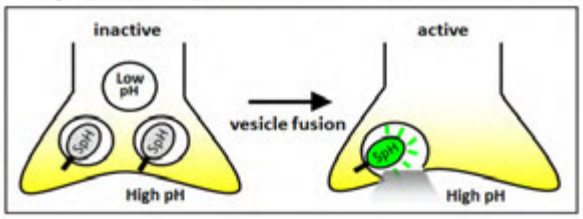
1）神経活動依存的に活動するシナプスの可視化。従来シナプス部位の同定には、シナプス構成タンパク質やシナプス小胞の集積といった形態的な特徴に基づいて行われてきた。これらの指標から線虫ASER神経上で推定されているプレシナプス部位のうち、実際の活動に依存して機能している部位を可視化する手法を作製する。活動に伴って起こるシナプス小胞とシナプス前膜との融合を指標にするため、細胞外環境に依存して蛍光強度が変化する蛍光タンパク質とシナプス小胞膜に挿入されるタンパク質を融合させる。この融合タンパク質をASER神経に発現させ、その局在パターンや刺激が入力した際の蛍光変化を解析する。

2）特異的細胞間で形成されるシナプスの可視化。活動依存的なシナプス部位の同定技術と並行して、どのポストシナプスとの間のシナプスであるかを識別可能なイメージングを行う。シナプス形成が推定されている両神経にGFPを分割した断片をそれぞれ発現させ、シナプス間隙に分泌された際に蛍光団を形成させる。発現させるGFP断片の長さやリンカー長、融合させる膜タンパク質を選択し、最適な融合タンパク質の設計を行う。可能であれば、異なる神経間のシナプスを異なる蛍光波長でラベルするため、GFP以外の蛍光タンパク質を用いた融合タンパク質の作製を試みる。また、神経の種類を変えた際の普遍性も検討する。

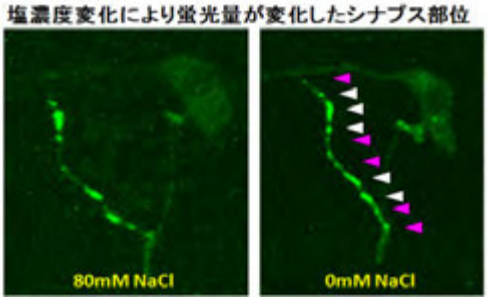
3）特異的シナプス形成を制御する分子メカニズムの解明。シナプス数やシナプス部位の変化がどの様に個体内の情報処理に影響を及ぼすのかを理解するための第一段階として、ある特異的な神経間のシナプス形成を制御する分子を単離する。そのために、上記研究２)から得られる特異的な神経間のシナプスを可視化させた系統、あるいは通常のシナプス局在タンパク質を用いてシナプスを可視化させた系統を用い、特異的な神経間のシナプス形成のみが異常になった突然変異体の単離を行う。得られた突然変異体の表現型解析と原因遺伝子の機能解析を行い、その分子メカニズムの解明を試みる。また、突然変異体のシナプス接続パターンと行動解析をリンクさせ、シナプス数や活動量、位置が有する生体内での意義を明らかにすることを目指す。

並行して、特異的なターゲットへの投射に重要な役割を果たす軸索伸長制御因子の解析を行い、投射制御と特異的シナプス接続との関係を明らかにする。軸索投射パターンが異常になる変異体を用いて、ガイダンス分子シグナルと投射の関係を調べる。特に、細胞骨格であるアクチンとその制御因子の分子遺伝学的メカニズムを解析し、軸索伸長からシナプス形成に至るまでの一連において働く細胞外シグナルと、神経形態変化を司るメカニズムの解明を目指す。

図１pH感受性GFPを用いたシナプス活動の可視化の模式図



塩濃度変化により蛍光量が変化したシナプス部位



＜得られた研究成果＞

1)　神経活動依存的に活動するシナプスの可視化。まず、ASER 神経軸索における個々のシナプス単位でその活動（シナプス小胞放出）をモニターする系の構築を行った。シナプス小胞の放出に伴い蛍光強度が変化する pH 感受性 GFP タンパク質とシナプス小胞に局在する Synaptobrevin との融合遺伝子を作製し、ASER 神経特異的に発現させた。pH 感受性 GFP は小胞内膜側に配置されるよう設計してあるので、小胞がプレシナプス膜に融合して伝達物質を放出するのに併せて、細胞外の高 pH により GFP 蛍光量が増大する（図 1 上参照）。実際に 80mM NaCl 溶液中で形質転換体の GFP 蛍光パターンを観察した後、0mM NaCl 溶液に置換した際の蛍光パターンを比較すると、蛍光量が明確に増大した GFP 集積部位が複数存在することが分かった。これらの蛍光集積部位は、NaCl 濃度変化に応じて ASER 神経からシナプス小胞が放出されたプレシナプス部位だと推測される。このような蛍光量変化が観察される GFP 集積部位以外にも、多数の蛍光集積部位が存在するがそれらでは有意な蛍光量変化が観察されなかった。その理由として、Synaptobrevin が伝達物質放出後にも神経終末の膜上に多量に残存してしまうため、放出による変化量を測定できないためだと推測された。この問題を解決するために、次に微量の蛍光量変化も観測することを目的として、4 回膜貫通型の 2 次構造を有するシナプス小胞局在タンパク質 Synaptogyrin に pH 感受性 GFP を複数融合させた可視化マーカー遺伝子を作製した。この融合タンパク質を ASER 神経特異的に発現させた結果、刺激前に GFP が強く集積している部位はほとんど見られず、刺激によりより SN 良く蛍光の増大を観察することができた。したがってこの系を用いて、NaCl 濃度変化に伴うシナプス活動の詳細な観察を進めた。

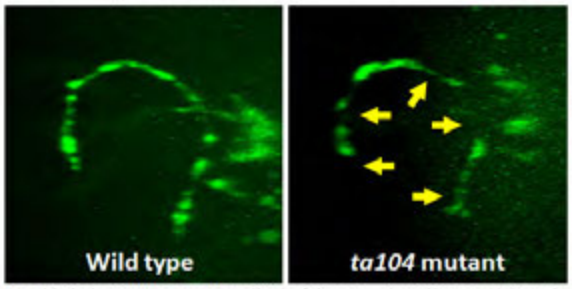
2)　特異的細胞間で形成されるシナプスの可視化。Synaptobrevin の集積により ASER 神経のプレシナプスであると推定された部位の中で、シナプス接続しているポストシナプス神経を明らかにする必要がある。特に、pH 感受性 GFP を用いて小胞放出を行っていると推測される集積部位以外にも、GFP が集積する部位が多数存在することを踏まえると、その集積部位のポストシナプスを特定することが重要である。そのために、Feinberg ら (2008) が開発した Split-GFP を用いて標的細胞特異的なシナプスのみを可視化するシステムにより、ASER/AIY 間のシナプスを特異的に可視化することを試みた。最初に、プレシナプス側 ASER にシナプス前膜に局在する PTP-1 の細胞外ドメインに GFP の N 末断片を融合させたもの、ポストシナプス側 AIY に GFP の C 末断片を融合させたものを発現させて蛍光を観察した。しかしながら、DNA 量を増やしたり、多数の形質転換体を解析したりしたが明瞭な蛍光は観察されなかった。さらに、逆の組合せで融合タンパク質を発現させたがやはり蛍光は観察されなかった。断片化した GFP ではなく、GFP を融合させた場合は蛍光を観察できることから、融合タンパク質の発現は確認できる。これらの結果から、現時点ではその理由は不明であるが、ASER と AIY 間に形成されるシナプスを Split-GFP のシステムを用いて可視化する事は困難であると思われた。

3)　シナプス数や位置が有する情報処理のための機能的意義。ASER 神経は、AIY 神経を含む 6 種の神経とシナプスを形成するが、約半数のプレシナプス部位は AIY とのシナプスに相当する。これらのシナプスの数や形成される位置、その接続強度の変化等が神経情報処理にどのように寄与するのか、その解明に繋がる解析を試みた。そのために、前述の Synaptobrevin と GFP との融合タンパク質の局在を指標に用い、ASER 神経と AIY 神経間のシナプス部位が特異的に変化した突然変異体をスクリーニングした。得られた変異体は、電子顕微鏡解析から推定された AIY 神経とのシナプス接続部位に相当する GFP の集積が特異的に消失しているように観察された（図２）。しかしながら、その他の神経（AIA や AIB と呼ばれる神経等）とのシナプスに相当する GFP の集積には大きな異常は見られない。また他の神経細胞に GFP 融合タンパク質を発現させた際にも、正常個体と比べてその集積に大きな差異は観察されない。これらの事から、この変異体では ASER/AIY 神経細胞間のシナプス形成が特異的に異常になっていると推測した。このようなシナプス形成異常が化学走性にどの様に影響を与えるかを明らかにするために、変異体のおける NaCl に対する走化性を調べたところ、野生型に比べて 5 割程度の走化性しか示さない。研究１）および２）の手法をこの変異体に適用させ、実際に ASER/AIY 間のシナプス形成のみが特異的に異常になっているのか、また、その場合に NaCl 濃度変化に依存したシナプス小胞の放出量はどうなっているのかの解析を試みたが、現段階では明確な成果は得られていない。並行して、この変異体の原因遺伝子をホールゲノムシークエンスにより解析した。見つかった塩基置換部位の中から細胞接着に関与する膜タンパク質をコードする遺伝子内の突然変異に注目し、詳細な解析を進めた。

その結果、細胞外マトリックスをコードするラミニンの 1 つ *epi-1* 遺伝子がこの変異体の原因遺伝子であると推定された。線虫の EPI-1 タンパク質は哺乳類の Laminin α5 と良く似たドメイン構造を持ち、ヒトの Laminin α5 と 32%のアミノ酸が相同性を示す。*ta104* 変異体の突然変異部位は、ラミニンタンパク質の５つのラミニン G ドメインの１つに起きた点変異であった。この変異が実際に *ta104* 変異体に見られるシナプス形成異常に対応するのかを明らかにするために、レスキュー実験を行った。*epi-1* のプロモータ領域の下流に EPI-1 cDNA を繋ぎ、*ta104* 変異体に導入したところ、約半数の形質転換体でシナプス異常の表現型の回復が見られた。したがって、*ta104* 変異体に見られるシナプス形成異常は、ラミニンをコードする *epi-1* 遺伝子の異常だと結論した。Epi-1 の発現パターンをプロモータと GFP との融合遺伝子を用いて解析したが、体壁筋細胞に強い発現が見られるものの ASER や AIY を含む神経細胞にはほとんど発現が見られなかった。しかしながら、EPI-1 cDNA を筋肉特異的なプロモータの下流で発現させてもシナプス異常は回復しないが、神経特異的プロモータや ASER 特異的プロモータ、AIY 特異的プロモータの下流で発現させるとシナプス異常は回復させる事が出来た。したがって、EPI-1 は、プレシナプスあるいはポストシナプスどちらから発現しても、そのシナプス間隙で機能し、シナプス形成に関与すると思われた。

さらに、神経軸索投射パターンを制御する新規因子として単離した *rin-1* 変異体の解析を行った。RIN-1 タンパク質は、アクチン制御の中心的役割を果たす Rac1 の線虫ホモログである CED-10 と相互作用する。この相互作用がシナプス接続パターンにどのように関係するのかを調べるために、*rin-1* が関与するガ

図2　ASER/AIY神経間のシナプス特異的形成異常



ASER軸索上のSNB-1::GFPの集積パターン。変異体では黄色の矢印で示すAIYとのシナプスに相当するGFPの集積が消失している。

イダンスシグナルの遺伝学的経路の同定を試みた。RIN-1 タンパク質は CED-10 の活性化型と特異的に相互作用し、また遺伝学的にも *ced-10* と同じシグナル経路で機能していた。したがって、RIN-1 は CED-10 の特異的エフェクターだと言える。さらに、ガイダンスシグナル分子との遺伝学的解析から、*rin-1* は反発性ガイダンス分子 *slt-1*（線虫の slit ホモログ）の下流で機能している事が分かった。以上の結果から、RIN-1 は反発性ガイダンス分子依存的に細胞内のアクチン動態を負に制御することで、標的特異的な軸索誘導を制御している可能性が示唆された（Doi et.al., Development, 印刷中）。

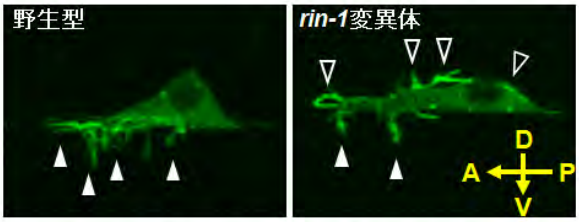


図3 ***rin-1*変異体におけるアクチンの局在異常**

野生型の神経細胞体では軸索が伸張する腹側に強いアクチンの局在が観察されるが、*rin-1*変異体では背側にもアクチンが局在し、異常なフィロポディア様構造が観察される。

＜国内外での成果の位置づけ＞

個々のシナプスの活動や接続パターンを生体内で明瞭に可視化する技術は、線虫のみならずマウスの神経回路に適用する試みもなされているが、十分な精度や光量を発しているとは言えない。報告例も数件のみであり、より効率的なこの技術の発展に期待は高い。残念ながら現時点での研究計画１）および２）からの成果は、まだ国内外からの評価に値するところまで到達していないが、今後さらに研究を進め、画期的な技術へと発展させたい。

研究成果の２）に関しては、シナプス形成における標的特異性を制御する新規分子としての関心は高いと思われる。Nishimune らのグループがラミニンを含む細胞外マトリックスがアクティブゾーンへのシナプス構成分子の集積に重要な役割を果たしている事を示しており、本研究の成果もラミニンが持つ新たな機能として興味深い。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画の2）で試みた特異的シナプスの可視化については、最初の報告例に従ってASERとAIY間のシナプスをラベルするように融合遺伝子を作製した。膜タンパク質、GFP-N末端フラグメント、GFP-C末端フラグメントの組合せを様々に入れ替えてASERとAIYに発現させたが、明確な蛍光シグナルを発する形質転換体を得る事は出来なかった。GFP断片と膜タンパク質を繋ぐリンカーの長さも、オリジナルのものより20アミノ酸長くしたが、蛍光は観察されなかった。

このため、ASER/AIY間のシナプスのみをラベルすることが出来ず、シナプス形成異常のスクリーニングもシナプス小胞タンパク質の集積異常を指標に行わざるを得なかった。得られた変異体は、失われた蛍光の位置から、おそらくAIY上のシナプスに相当する物と推測したが立証できている訳ではないのが残念であった。そのため、突然変異体の行動解析についても、ASER/AIY間のシナプスが失われることによる行動異常だという推測で結果を解釈せざるを得なかった。今後この結果を報告して上で、上記方法に拘らない新たな特異的シナプス可視化技術の開発により、シナプスの特定が必要である。また、神経の組合せにより使える技術が存在することも考慮して開発に繋げたい。

＜今後の課題、展望＞

特異的神経間のシナプスを可視化する技術は、今後より複雑なネットワーク形成メカニズムを解析したり、別のシナプス間の認識機構を解明したりするためには必須となる。そのため、この技術の改良・開発によりどの様な神経間に置いても明瞭に特異的にシナプスを可視化する事が可能な手法の確立を目指したい。

この技術を特異的シナプス形成異常変異体に応用し、ラミニン等の分子によるシナプス特異性の制御機構の解明に繋げたい。また、より多数の神経間ネットワーク形成の分子機構に迫り、各シナプスの有する個体の情報処理における意義を明らかにする研究へと展開してゆきたい。

モデル生物の行動を制御する未知の神経ペプチド探索と機能解析

研究代表者：児島　将康[1)]

1）久留米大学分子生命科学研究所遺伝情報研究部門

＜研究の目的と進め方＞

本研究計画ではショウジョウバエや線虫などのモデル生物において、未知の神経ペプチドを発見し、生物の行動、運動、学習・記憶、生殖行動、摂食行動、睡眠・覚醒、生体リズムなどの、神経回路や制御機構を明らかにする。

ほ乳類において生物の本能行動に影響を与える神経ペプチドの制御システムを解明するには、神経回路が複雑すぎて行動制御の解析が非常に困難である。そのためにも、ほ乳類よりももっと単純なシステムで本能行動の制御システムを解明することが望まれる。

本研究計画ではショウジョウバエおよび線虫のオーファン受容体をターゲットにして、申請者らがほ乳類で行ってきた方法論を使って、ショウジョウバエや線虫の組織から本能行動を制御する未知の神経ペプチドの発見を目指す。発見した神経ペプチドの遺伝子改変や神経回路網の同定などによって、その機能を解明していく。

＜研究計画＞（年度ごとに分けても結構です）

1）ショウジョウバエ新規生理活性ペプチドの探索

リガンド不明なショウジョウバエオーファンGタンパク質共役型受容体(GPCR) をデータベースより検索し、リガンドがペプチド性と想定されるオーファンGPCRを選択し、その遺伝子をCHO細胞に導入し安定発現細胞株を樹立する。ペプチド抽出材料としてショウジョウバエを大量に飼育し、回収後、ペプチドを抽出し、先に作成したオーファンGPCR安定発現細胞株を用い、細胞内カルシウムの上昇を指標としたスクリーニングを行う。活性が出た物について、順次、単離･精製を進めていき、新規生理活性ペプチドを同定する。

2）ショウジョウバエ新規生理活性ペプチドの機能解析

1)で同定した新規生理活性ペプチドの機能解析を行うため、ペプチド、受容体の発現調節機構の検討、また遺伝子組換えショウジョウバエを作成し、様々な行動実験を行う。

3）線虫新規生理活性ペプチドの探索

ショウジョウバエと同様な方法で線虫においても新規生理活性ペプチドの探索を行う。

＜得られた研究成果＞

A）ショウジョウバエ新規生理活性ペプチドの発見

研究計画の項目 1)について研究を進め、ショウジョウバエ新規生理活性ペプチドを 5 種類発見した。(図１)。これらの結果をまとめ、学術論文として 3 本発表した（Ida et al, *Biochem Biophys Res Commun*,, 2011. Ida et al, *Biochem Biophys Res Commun*,, 2011. Ida et al, *Frontiers in Eendocrinol*,, 2013.）。

B）ショウジョウバエ新規生理活性ペプチドの機能解析

研究計画の項目 2)について研究を進め、各ペプチド、受容体の過剰発現、発現抑制ショウジョウバエを作成した。そのうちのいくつかについては、摂食行動や運動に異常が見られることを見出した。この結果を学会で発表した（井田,日本獣医学会 2010, 2011.日本比較内分泌学会　2012)。

C）線虫新規生理活性ペプチドの探索

研究計画の項目 2)について研究を進め、線虫オーファン GPCR 発現細胞株を 30 種類作成した。また線虫を大量に培養し２００ｇ回収し、ペプチド抽出、スクリーニングを行った。

＜国内外での成果の位置づけ＞

ショウジョウバエにおける新規生理活性ペプチドの探索は、遺伝子レベルで行われるのみで、そのペプチドが実際に生体内存在しているかどうかは不明なことが多かった。研究成果の A)は、ショウジョウバエの生体よりペプチドを抽出してくるという手法のため、世界でも例のない報告となり、当該分野の新たな流れを作るきっかけになるものと予想される。

一方、B)についてはショウジョウバエ研究を行っている者ならば容易に進めることができるので今後の競争の激化が予想される。

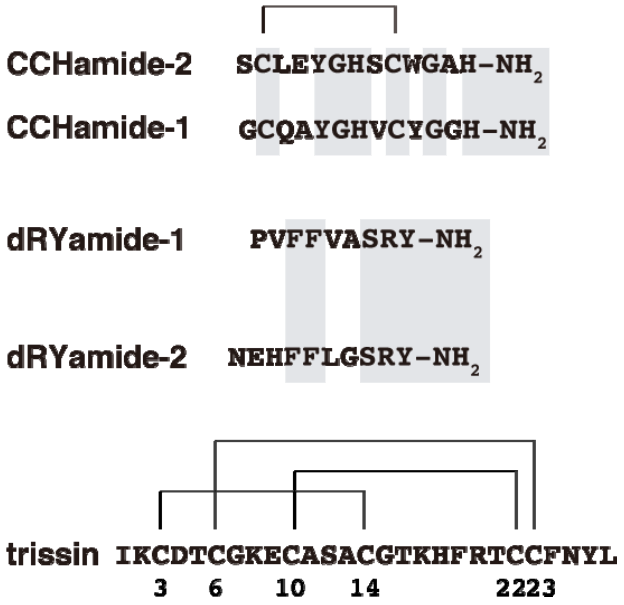
＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

研究計画の3）については予備実験を進めた結果、線虫よりペプチドを抽出する点で困難があることがわかり、様々な破砕方法の検討、また量的な問題を克服するためにブタ回虫を用いた代替法によりこれを回避することを試みたが有効な方法とならなかったため、継続を断念した。他はおおむね順調に進んだ。

＜今後の課題、展望＞

本研究の結果により、ショウジョウバエより新規生理活性ペプチドを探索する技術が確立し、ショウジョウバエペプチド研究、つまりペプチドと受容体によるシグナル伝達機構の研究をさらに進める基盤となった。また、本研究によりショウジョウバエにおける生理活性ペプチドが食欲などの本能行動にどにょうに関わっているかという新たな疑問が生じ、今後の研究によりこれが解明されることが期待される。

図1：同定したショウジョウバエ新規生理活性ペプチド



＜連絡先＞
「分子行動学」領域代表 飯野 雄一
東京大学 大学院理学系研究科 生物化学専攻
〒113-0032 東京都文京区弥生 2-11-16
Tel/Fax 03-5841-8293