

博士学位論文

ショウジョウバエにおける求愛歌情報を処理する
聴覚神経回路の進化的保存性と多様性

名古屋大学大学院 理学研究科 理学専攻 生命理学領域

大橋 拓朗

目次

要旨	3
序論	4
第1章 ショウジョウバエの求愛歌選好性の種間比較	9
概要	9
背景と目的	10
材料と方法	12
結果	16
考察	21
第2章 ショウジョウバエの聴覚神経回路の種間比較	23
概要	23
背景と目的	24
材料と方法	25
結果	33
考察	51
第3章 2次聴覚ニューロン群への神経入力 の推定	54
概要	54
背景と目的	55
材料と方法	57
結果	59
考察	64
総括	69
補遺資料	71

参考文献	75
謝辞	82
副論文・参考論文	85

要旨

聴覚コミュニケーションに用いられる音シグナルは近縁種間でも多様化している。キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエのオスは、求愛中に、異なるパターンの「求愛歌」と呼ばれる音シグナルを発する。メスは同種の時間的パターンの求愛歌を聞いたときに選択的に交尾受容性が上昇する。キイロショウジョウバエにおいては求愛歌情報を処理する神経回路についての研究が進んできたが、この神経回路がどのように種間で多様化したかについてはわかっていない。そこで私は本研究において、この謎の解明に取り組んだ。

第1章では、求愛歌のリズム選択性に種間差があることを示した。オナジショウジョウバエはキイロショウジョウバエよりも遅いリズムの求愛歌を好んだ。

第2章では、相同な聴覚神経回路を種間比較した。1次聴覚ニューロン群と2次ニューロン群の形態や神経伝達物質は種間で高度に保存されていた。しかし、オナジショウジョウバエの2次聴覚ニューロン群の短いリズムの求愛歌に対する応答がキイロショウジョウバエよりも著しく低減していた。

第3章では第2章で発見した種間差がどのようなメカニズムで起きたかに迫るため、階層ベイズモデルを用いて、2次聴覚ニューロン群への神経入力を推定した。オナジショウジョウバエにおける速いリズムの求愛歌を聞いたときの局所介在ニューロン群から抑制性入力キイロショウジョウバエよりも強い可能性が示唆された。また、オナジショウジョウバエの2次聴覚ニューロン群のリズム選択性のピークがオナジショウジョウバエよりも遅いリズムにシフトしていた。このシフトの方向は、行動レベルにおけるリズム選好性の種間の違いと一致していた。

これらの結果により私は、キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエの脳における求愛歌情報処理の分化が比較的末梢器官に近い2次聴覚ニューロン群ですでに存在することを示した。本研究は、同種の音シグナルを処理する聴覚神経回路がどのように種間で多様化したのかについての最初の証拠を示すものである。

序論

多くの動物は音を用いたコミュニケーションを行う。コミュニケーションに使われる音シグナルは進化の過程で近縁種間においても多様化している (Wilkins et al., 2013)。実際、複数種の音シグナルを聞かせた行動実験によって、多くの動物種 (例: ヨザル、ヤナギムシクイ、ダーウィンフィンチ、ショウジョウバエ) で求愛歌の種間の違いが種や交配相手の識別に貢献していることが分かっている (Braune et al., 2008; Irwin et al., 2001; Podos, 2010; Ritchie et al., 1999; Seddon and Tobias, 2010)。また、音シグナルの多様化が生殖隔離を通じて種分化を促進する可能性も示唆されている (例: セミ、コオロギ、Henry, 1994; Marshall et al., 2008; Mendelson and Shaw, 2005 ; ただし Chen and Wiens, 2020 は違う説を提唱)。したがって、音コミュニケーションの多様化は動物の種分化に重要な役割を果たしている。そのため音シグナルを処理する機構もまた、音シグナルの多様化に合わせて進化してきたと考えられる。しかし、この音シグナルの多様化に従って、求愛歌を処理する聴覚神経回路がどのように進化してきたのかは、未だ明らかになっていない。

これまでいくつかの動物種で聴覚情報を処理する神経機構の比較研究が行われてきた。これらの比較研究では、主に神経機構の進化メカニズムの責任遺伝子座や感覚器官が対象となってきた (Frishkopf et al., 1968; McGrath et al., 2011; Wilczynski and Ryan, 2010)。例えば、聴覚受容細胞は、同種のシグナルの範囲の周波数で最も良く応答するように最適化されている (例: ショウジョウバエ、蚊、鳥類、Riabinina et al., 2011; Su et al., 2018; Wilczynski and Ryan, 2010)。しかし、種特異性を特徴づけることが多い振幅変調や音の間隔といった複雑な特徴は、聴覚受容細胞単独で処理することは難しい。実際、受容細胞よりも中枢のニューロンがこのような複雑な音の特徴の認識において主要な役割を担っていることが分かっている (Hildebrandt, 2014; Mizrahi et al., 2014; Schöneich et al., 2015; Schulze and Langner, 1997)。そのため、同種の求愛歌の複雑な特徴を処理する神経回路がどのように多様化したかを理解するには、中枢神経回路の種間比較が必要である (Neuhofner et al., 2008)。

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は聴覚コミュニケーションを行うことや、遺伝的・神経解剖学的ツールが豊富に揃っていることから聴覚研究のモデル生物として用いられてきた (Kamikouchi et al., 2009; Kamikouchi

and Ishikawa, 2016)。キイロショウジョウバエを始めとする多くのショウジョウバエ (*Drosophila*) 属のオスは翅の振動により求愛歌を発する (Bastock and Manning, 1955; Ewing and Bennet-Clark, 1968; Spieth, 1974)。一方メスは、同種の求愛歌を聞いたときに交尾受容性を上昇させることから (Ritchie et al., 1999, 1998)、同種の特徴を持つ求愛歌を識別する能力を持つことが示唆される。

キイロショウジョウバエ種群 (*D. melanogaster* species group; キイロショウジョウバエ、オナジショウジョウバエ-*D. simulans*、モーリシャスショウジョウバエ-*D. mauritiana*) の求愛歌は一般的にパルス音の連なりであるパルス歌 (pulse song) と翅の単調な振動によって生み出される音であるサイン歌 (sine song) で構成される (図 1、von Schilcher, 1976)。

同種の識別に重要な特徴のほとんどは、パルス歌に含まれている (Ritchie et al., 1999)。パルス歌において、「2つのパルスの間隔 (IPI; inter-pulse interval)」と「個々のパルスの主要な周波数成分 (IPF; intra-pulse frequency)」という2つの要素が主要な特徴であり、キイロショウジョウバエ種群でそれぞれ多様化している (図 1、Cowling and Burnet, 1981; Riabinina et al., 2011)。キイロショウジョウバエにおいて、同種の IPI や、平均 IPI の周期的変化 (Kyriacou & Hall cycles と呼ぶ) を持つ求愛歌を聞いたメスは、異種の特徴を持つ求愛歌を聞いたときよりも交尾受容性を上昇させる (Bennet-Clark and Ewing, 1969; Deutsch et al., 2019; Vaughan et al., 2014; Wang et al., 2021; Yamada et al., 2018)。一方、同種の IPF に対する、メスの選択的な交尾受容性は検出されていない (Bennet-Clark and Ewing, 1969)。このことから、求愛歌の IPI がメスの交尾受容性における主要なパラメータであり、キイロショウジョウバエは同種のパルス歌の IPI を識別する神経回路を持つことが示唆される。

キイロショウジョウバエの最近縁種であるオナジショウジョウバエは進化学研究における卓越したモデル生物である (Barbash, 2010; Gaspar et al., 2020; Nolte and Schlötterer, 2008; Seeholzer et al., 2018)。キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエの2種は 250~340 万年前に分化し、生殖隔離している (Hey and Kliman, 1993; Sturtevant, 1920)。また、両種で全ゲノムが解読され、遺伝子導入やゲノム編集の技術が利用可能である (Hu et al., 2013; Stern et al., 2017)。この2種における比較研究によって、表現型の種間差をもたらした責任遺伝子座や関連遺伝子、神経機能の解明が進んでいる (Gaspar et al., 2020; Seeholzer et al., 2018)。

近年では、キイロショウジョウバエの特定のニューロンで遺伝子発現を誘導する制御配列をオナジショウジョウバエに導入することで、相同なニューロン群の様々な特徴を詳細かつ定量的に種間比較することが可能になった(Seeholzer et al., 2018)。このような特徴と、急速に蓄積が進むキイロショウジョウバエの神経回路についての知見を合わせることで(Fan et al., 2013; Seeholzer et al., 2018)、オナジショウジョウバエは感覚情報処理の進化を神経回路レベルで理解するための非常に強力なモデル生物となっている。

キイロショウジョウバエと同様に、オナジショウジョウバエのオスもパルス歌を用いてメスに求愛する。しかし、パルス歌の IPI や IPF は、2 種で明確に異なる。オナジショウジョウバエの IPI や IPF はそれぞれ、約 55 ms、約 320 Hz であるのに対し、キイロショウジョウバエでは約 35 ms、約 170 Hz である(図 1、Cowling and Burnet, 1981; Riabinina et al., 2011)。オナジショウジョウバエのメスも異種よりも同種の IPI のパルス歌を聞いたときに交尾受容性を上昇させる(Ritchie et al., 1999)。先行研究では、行動実験に用いられたパルス歌のパラメータは種特異的な IPI と Kyriacou & Hall cycle の両方が含まれていたものの、オナジショウジョウバエでキイロショウジョウバエよりも長い IPI を好む傾向にあった(Ritchie et al., 1999)。そのため、聴覚情報処理の結果である行動レベルでの IPI 選好性は種間で異なる可能性が示唆された。このことから、IPI 情報を処理する聴覚神経回路もまた分化しているという仮説が導かれる。しかし、求愛歌を処理する神経回路の種間比較は、これまでに行われてこなかった。

キイロショウジョウバエでは、音は触角に位置するジョンストン器官(JO; Johnston's organ)で受容される(Eberl et al., 2000)。この JO に内包される機械感覚受容ニューロンは JO ニューロンと呼ばれている。これらは、ショウジョウバエの聴覚経路の一次ニューロン群である(Kamikouchi et al., 2009; Matsuo and Kamikouchi, 2013; Yorozu et al., 2009)。音情報は一部の JO ニューロン群(JO-B ニューロン群)から主要な二次聴覚ニューロン群である AMMC-B1 ニューロン群に伝達され、さらに高次のニューロン群へと伝達される(Baker et al., 2022)。JO-B ニューロン群は短い IPI のパルス歌ほど強く応答する一方、AMMC-B1 ニューロン群では 15-ms の IPI のパルス歌に対する応答が低減し、長い IPI (25-ms) のパルス歌に対して応答のピークを示す(Yamada et al., 2018)。つまり、JO-B ニューロン群から AMMC-B1 ニューロン群の伝達が、キイロショウジョウバエの聴覚

神経回路における IPI 情報処理の最初の段階である。しかし、この情報処理がオナジショウジョウバエにおいても保存されているか、もしくは分化しているかは調べられていない。

本研究では、1 章でキイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエのメスの IPI 選好性を、求愛歌への応答行動を指標として体系的に比較した。これにより私は、キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエがそれぞれ同種の IPI の求愛歌に選好性を持つ傾向にあることを確認した。2 章では、オナジショウジョウバエの JO ニューロン群や AMMC-B1 ニューロン群を標識する系統を作成し、これらのニューロン群の形態や神経伝達物質を種間比較した。さらに私は、AMMC-B1 ニューロン群の周波数応答特性や様々な IPI のパルス歌に対する応答を種間で比較した。その結果、両種の JO ニューロン群と AMMC-B1 ニューロン群の形態・神経伝達物質など基本的な特性は保存されていたものの、AMMC-B1 ニューロン群の IPI 応答特性にわずかな種間差が見られた。3 章ではこの種間差をもたらしたメカニズムを推察するため、階層ベイズモデルを用いて AMMC-B1 ニューロン群が受ける神経入力成分を推定した。オナジショウジョウバエにおいて、短いパルス間隔の求愛歌を聞いたときの局所介在ニューロン群からの抑制性入力が入力がキイロショウジョウバエよりも強い可能性が示唆された。これらの実験およびそれを受けた統計モデリングにより、私は、非常に近縁な 2 種の聴覚神経回路における情報処理の初期段階は、種間でほとんど保存されているものの、わずかに分化していることを明らかにした。

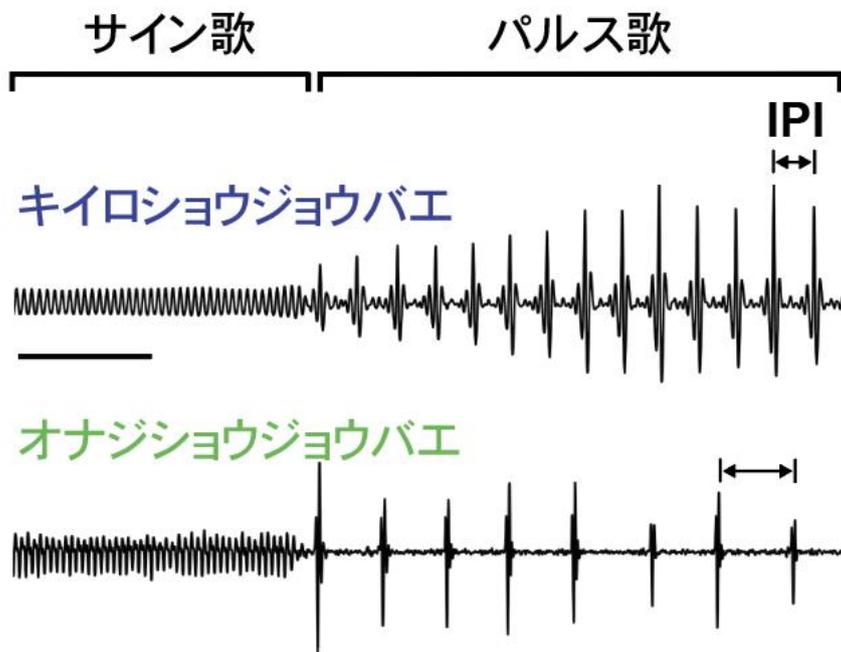


図1 キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエの求愛歌
 求愛歌はサイン歌とパルス歌で構成されている。パルス歌のパルス間隔 (Interpulse interval; IPI) はキイロショウジョウバエでは約 35 ms、オナジショウジョウバエでは約 55 ms である。黒いスケールバーは 100 ms を表す。図は Kamikouchi and Ishikawa, 2016 を改変。

第1章 ショウジョウバエの求愛歌選好性の種間比較

概要

多くの動物において、コミュニケーションに用いられる音シグナルは近縁種間で多様化している。キイロショウジョウバエと姉妹種であるオナジショウジョウバエも、種間で異なる音シグナルを用いてコミュニケーションを行う。両種のオスはメスに求愛する際、求愛歌と呼ばれる音シグナルを発する。一方、メスは同種の求愛歌を聞いたときに交尾受容性が上昇する。従来の研究では、求愛歌のパルス間隔 (IPI) が種特異的な求愛歌の認識における決定的なパラメータであることが提案されたが、IPI のみに焦点を当てた実験は行われていないため、十分な根拠が得られていない。そこで本章で私は、ショウジョウバエのメスの IPI 選好性を種間で比較するため、両種のメスに様々な IPI の人工求愛歌を聞かせたときの交尾率の推移を観察した。キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエは、それぞれ同種の IPI (35-ms、55-ms) の人工求愛歌で最も高い交尾率を示す傾向にあった。この傾向を統計学的に種間比較するため、Cox 比例ハザードモデルを用いて検定した。その結果、オナジショウジョウバエはキイロショウジョウバエよりも IPI 35ms の求愛歌への選好性と比較したときの IPI 55ms の求愛歌への選好性が有意に高いことがわかった。

背景と目的

多くの動物は近縁種間で異なる音シグナルを用いてコミュニケーションを行っている(Wilkins et al., 2013)。特に生殖行動においては、求愛歌の種間の違いが同種の交配相手の識別に貢献している(Braune et al., 2008; Irwin et al., 2001; Podos, 2010; Ritchie et al., 1999; Seddon and Tobias, 2010)。したがって、音シグナルを処理する聴覚神経回路も音シグナルの多様化に合わせて進化してきたと考えられる。しかし、この求愛歌を処理する聴覚神経回路がどのように進化してきたのかについては明らかになっていない。これに迫るため、キイロショウジョウバエと姉妹種オナジショウジョウバエに着目した。キイロショウジョウバエは、音を用いたコミュニケーションや分子遺伝学的ツールの豊富さから、聴覚神経回路に関する知見が蓄積している(Kamikouchi et al., 2009; Kamikouchi and Ishikawa, 2016)。一方、オナジショウジョウバエでも、全ゲノムの解読やゲノム変種技術の確立により、神経回路の詳細な種間比較に用いられるようになった(Hu et al., 2013; Seeholzer et al., 2018; Stern et al., 2017)。そのため、キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエは聴覚神経回路の進化研究に適したモデル生物である。

キイロショウジョウバエやオナジショウジョウバエのオスはメスに求愛する際、種間で異なる特徴を持つ求愛歌を発する(Bastock and Manning, 1955; Cowling and Burnet, 1981; Ewing and Bennet-Clark, 1968; Riabinina et al., 2011; Ritchie et al., 1998; Spieth, 1974)。一方メスは、同種の求愛歌を聞いた時に交尾受容性が上昇するため(Ritchie et al., 1999)、同種の特徴を持つ求愛歌を識別できる能力を持つことが示唆される。

両種のショウジョウバエの求愛歌は、パルス音の連なりであるパルス歌と翅の単調な振動によって生み出されるサイン歌で構成される(von Schilcher, 1976)。パルス歌には、種特異的な主要な2つの特徴が含まれている。1つ目は、2つのパルスの間隔である IPI で、キイロショウジョウバエでは約 35 ms、オナジショウジョウバエでは約 55 ms である(Cowling and Burnet, 1981)。2つ目は個別のパルスの主要な周波数成分である IPF で、キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエでそれぞれ約 170 Hz、約 320 Hz である(Riabinina et al., 2011)。このうち IPI が同種の求愛歌を認識するための決定的なパラメータだと考えられ、キイロショウジョウバエにおいて、同種の IPI を認識する神経回路の同定が

進んできた(Baker et al., 2022; Vaughan et al., 2014; Wang et al., 2021; Yamada et al., 2018; Zhou et al., 2015, 2014)。

しかし以前の報告では、キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエはそれぞれ同種の IPI や平均 IPI の周期的変化である Kyriacou & Hall cycles を持つ人工求愛歌を聞いたメスが異種の特徴を持つ求愛歌を聞いたときよりも交尾受容性が上昇することが示されたものの、Kyriacou & Hall cycles を除いた IPI のみの効果が比較された例がない(Ritchie et al., 1999)。

そこで本章で私は、ショウジョウバエのメスの IPI 選好性を種間で比較するため、両種のメスに様々な IPI の人工求愛歌を聞かせたときの交尾率の推移を観察した。

材料と方法

実験動物

キイロシヨウジヨウバエ (*Drosophila melanogaster*) の系統 *Canton-S* とオナジシヨウジヨウバエ (*D. simulans*) の系統 *2034 w4 pBac (GCamp6F)5* (David Stern 博士由来) を実験動物として使用した。未交尾の状態で行うため、羽化後 8 時間以内のハエを集め、氷上麻酔下で雌雄に分別した。オスが求愛歌を発せないようにするため、オスの翅をピンセットで除去した。オスは一匹ずつ、メスは 6~8 匹の集団で、25°C、相対湿度 40~60%、12h/12h 明暗周期の条件下で標準的な酵母ベースの培地上で羽化後 5~7 日間飼育した。

交尾実験

交尾実験については、先行研究に記載された方法の一部を改変して行った(Li et al., 2018; Yamada et al., 2018)。明期開始後 4 時間以内に 24~26°C、相対湿度 40~60%の条件下で行った。雌雄 1 匹ずつをチャンバー(直径 15mm、深さ 3mm)に、吸虫管を用いて非麻酔で静かに移した。チャンバーはスピーカー(ダイトーボイス AR-10N、東京コーン紙製作所)の上 39 mm の位置に設置した(図 2A)。ハエを移し終えた直後に音刺激を開始した。ウェブカメラ(Logicool HD Webcam C270)を用いて 15 fps で 35 分間ハエの行動を録画した。交尾開始時間については下記の条件を基に手動で決定した(Manning, 1967; Yamada et al., 2018)。

- (1) オスがメスの上に 5 分以上乗っている
- (2) オスに乗られたメスの移動速度が低下している
- (3) オスに乗られている間メスの翅が開いている

音刺激

Audacity (<https://www.audacityteam.org/>) を用いて、5 つの異なる IPI (15, 35, 55, 75, 95 ms) の人工パルス音からなる 3 秒間の音ファイルを作成した。3 秒間のファイルは、1 秒間の連続パルス音とそれに続く 2 秒間の無音から構成されている。IPI の異なる連続パルス音を生成するため、正弦波 1 周期分でパルスを形成し、パルスとパルスの間は無音を挿入した。挿入する無音の長さを変えるこ

とで、様々な IPI のパルス音シリーズを作成した。先行研究で、正弦波の 1 周期の主要な周波数である IPF は応答行動に有意な影響を与えないことが示されている(Bennet-Clark and Ewing, 1969)。そのため、人工パルス歌の設計に用いた IPF はそれぞれの種の求愛歌と一致するように、キイロショウジョウバエでは 167 Hz、オナジショウジョウバエでは 333 Hz とした。

再生された音の実際の IPF はキイロショウジョウバエでは 170 Hz、オナジショウジョウバエでは 310 Hz であったが、それぞれの種の IPF の範囲内には収まっていた(Riabinina et al., 2011)。これらの IPF は録音された 3 つのパルス音の波形のピークボトム間の平均時間から推定された。再生音の波形は図 2B に記載した。実際に与えた音の平均粒子速度は 24.8 mm/s であった。

統計解析

Restricted mean time lost (RMTL、Uno et al., 2014) は R のパッケージ' survRM2' (<https://cran.r-project.org/web/packages/survRM2/index.html>) を用いて算出した。RMTL が大きい場合、ハエが早く良く交尾する傾向にあることを示す。

IPI 選好性を種間で比較するため、メスの交尾受容性に対する IPI と種の交互作用を評価した。RMTL は多変数解析に用いることができないため、R パッケージ' survival' (<https://cran.r-project.org/web/packages/survival/index.html>) を用いて Cox 比例ハザード解析を行った。解析時間を通じたハザード比例性を維持するため、観察時間を音刺激開始後 0-7 分、7-30 分の 2 つのフェーズに分けた。IPI と種の交互作用のハザード比は、交尾率に対する IPI の効果の種差を表す。ハザード比を算出するため、キイロショウジョウバエの 35 ms の IPI に対するハザードを基準とした。ハザード比は両方のフェーズで算出され、図 3 には、0-7 分におけるハザード比のみ示した。ハザード比が 1 よりも大きい場合、オナジショウジョウバエにおける 35 ms IPI のパルス歌を与えたときに対するその他の任意の IPI (15, 55, 75, 95 ms) のときの交尾率の増加程度がキイロショウジョウバエよりも大きいことを示す。

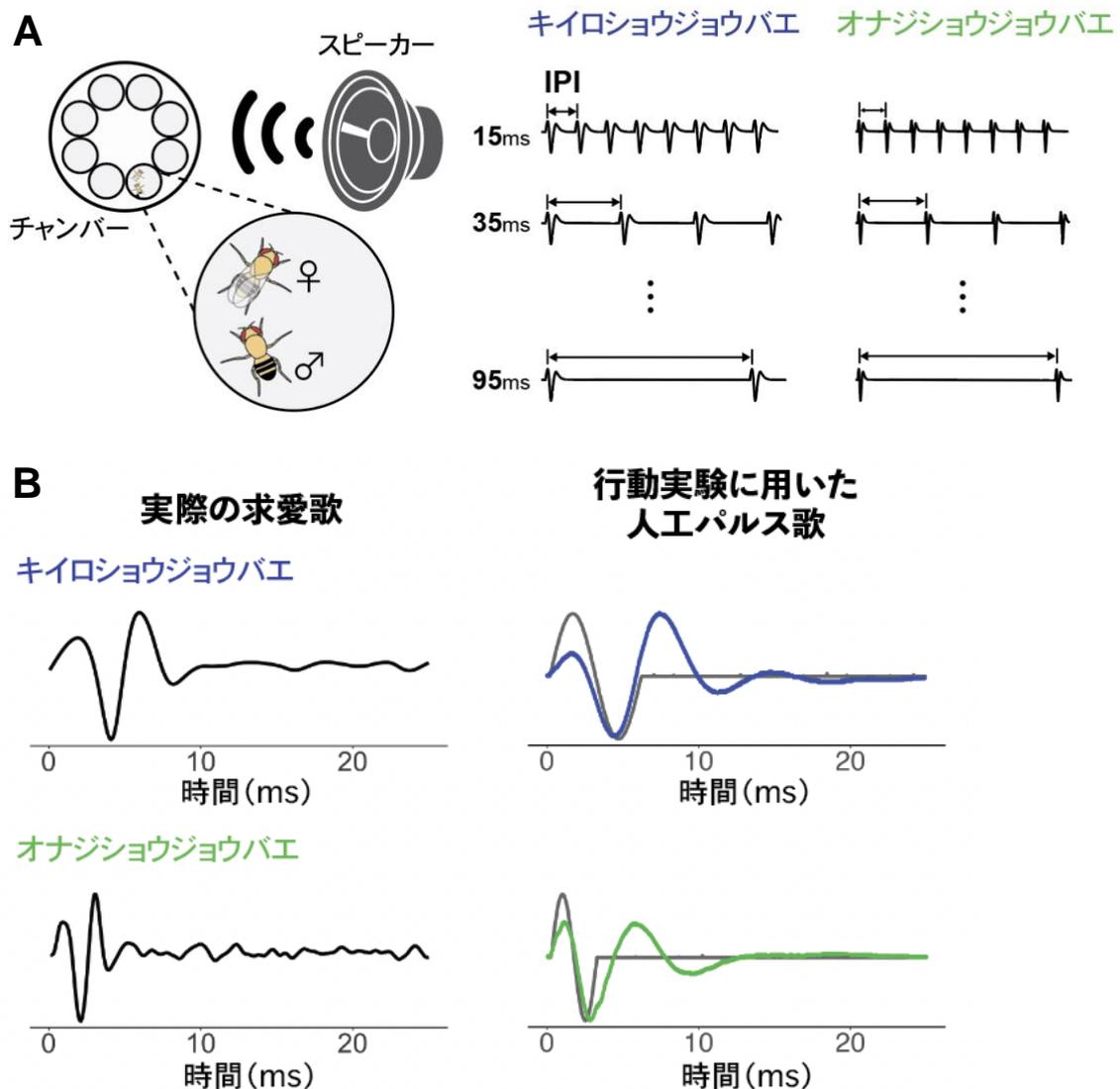


図2 メスの交尾実験

(A) 交尾実験のセットアップ。スピーカーから人工パルス歌（右図）をチャンバー（左図）内の雌雄のショウジョウバエに聞かせた。同種のパルス内周波数（Intra-pulse frequency; IPF）で設計されたパルス歌を使用した。Yamada et al., 2018 を改変。(B) 実際の求愛歌の波形と交尾実験に使用したパルス歌の波形。上段にキイロショウジョウバエ、下段にオナジショウジョウバエを示す。左図：それぞれの種の実際の求愛歌 1 パルス分の波形。右図：本研究で人工パルス歌を生成するために使用したパルス波形（サイン波 1 周期分の後に無音時間を結合した）を灰色線で示し、音圧傾度マイクロフォン（An Emkav NR3158, Knowles Electronics Inc., Itasca, IL）で録音された波形を色線で示す。スピーカーから出力された再生音の

IPFは、キイロシヨウジヨウバエで約 170 Hz、オナジシヨウジヨウバエで約 320 Hzであった。

結果

キイロシヨウジョウバエとオナジシヨウジョウバエのメスの IPI 選好性を比較するため、私は、様々な IPI の人工パルス歌に曝露したときのメスの交尾受容性を種間で比較した (図 3)。

全体として、オナジシヨウジョウバエはキイロシヨウジョウバエよりも交尾成立が遅い傾向にあった。キイロシヨウジョウバエは 35-95 ms IPI の人工パルス歌で高い交尾率を示したのに対し、オナジシヨウジョウバエは 35, 55 ms IPI で高い交尾率を示した (図 3A)。

様々な IPI の求愛歌を与えたときの交尾率を評価するため、累積交尾率の経時変化曲線の下側の面積である Restricted mean time lost (RMTL) を指標とした (図 3B、Uno et al., 2014)。本研究では、RMTL が大きいほど早くよく交尾することを表す。両種とも 15 ms IPI の求愛歌で最も低い RMTL を示したため、短い IPI の求愛歌に対する選好性が最も低いことが示唆された。一方、最も高い RMTL は種間で異なっていた。キイロシヨウジョウバエの RMTL は 35 ms IPI で最大で、長い IPI になるにつれて徐々に減衰した。オナジシヨウジョウバエでは、55 ms IPI の求愛歌で RMTL が最も高く、35 ms IPI は 2 番目に高い RMTL を示した。これらの傾向は、同種の求愛歌の IPI (キイロシヨウジョウバエでは約 35 ms、オナジシヨウジョウバエでは約 55 ms) と一致していた。

この違いを統計学的に解析するため、私は、Cox 比例ハザードモデルを用いて、種と IPI の交互作用のハザード比を検定した (図 3B インセット)。IPI (35-55 ms) と種 (キイロシヨウジョウバエ-オナジシヨウジョウバエ) に有意な交互作用が検出されたため ($p=0.043$ 、表 1)、オナジシヨウジョウバエの 35 ms と比較したときの 55 ms に対する選好性がキイロシヨウジョウバエよりも高いと結論づけた。このことは、2 種の IPI 選好性が、同種の求愛歌の IPI を好むように多様化していることを示唆している。

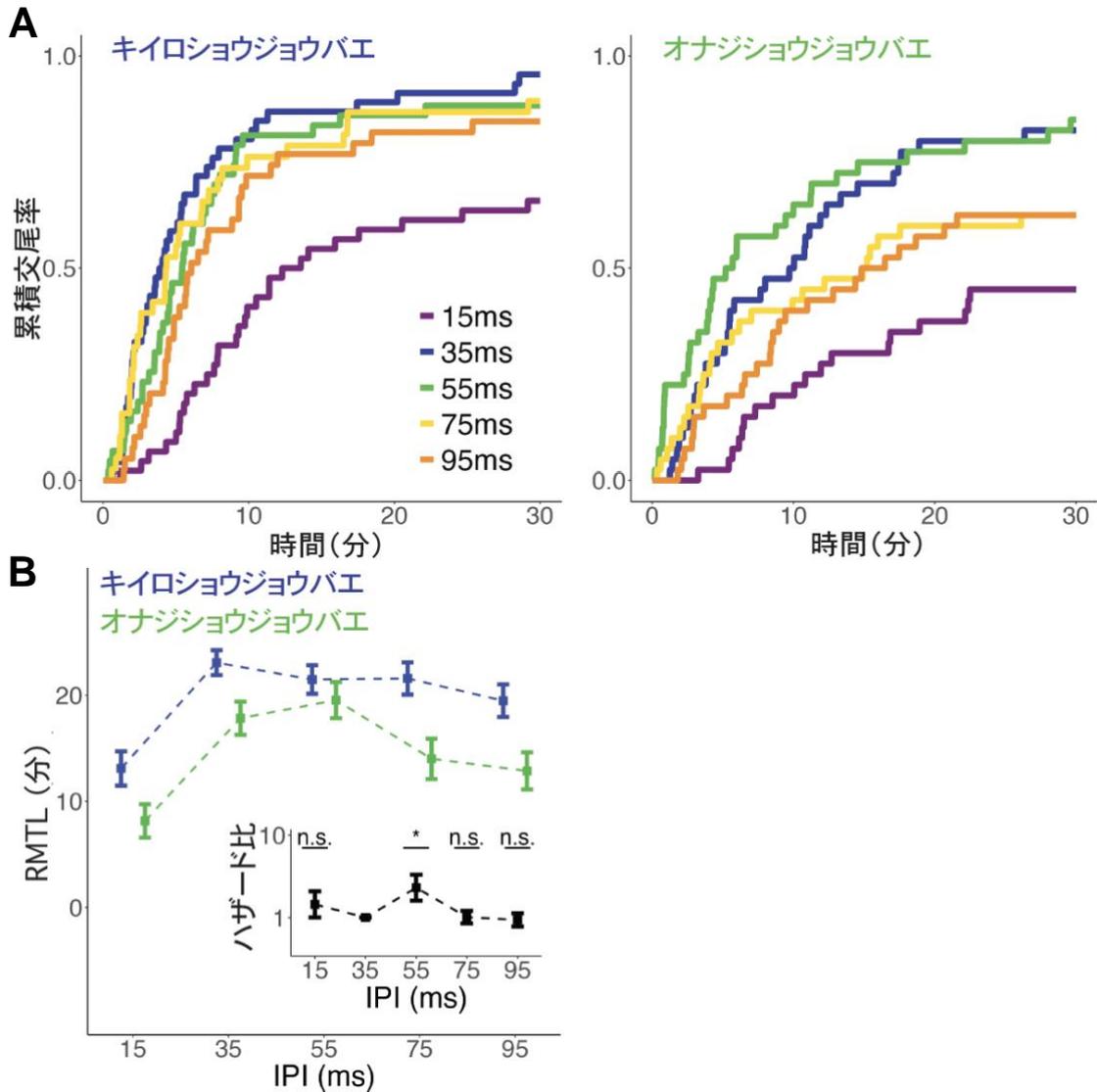


図3 ショウジョウバエの様々な IPI の人工パルス歌に対する応答行動
(A) 様々な IPI の人工パルス歌を聞かせている間の累積交尾率の時間経過（交尾曲線）。左図：キイロショウジョウバエ、右図：オナジショウジョウバエ。1 種類の IPI あたり $n=38\sim46$ ペア。**(B)** 各パルス歌の交尾曲線の Restricted mean time lost (RMTL)。点とエラーバーはそれぞれ平均 RMTL と標準誤差を示す。インセットは交尾曲線の IPI (35 ms と X ms) と種 (キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエ) の交互作用のハザード比を示す。キイロショウジョウバエの 35-ms IPI のパルス歌におけるハザードを標準値として使用した。ハザード比が 1 より大きいとき、オナジショウジョウバエの 35 ms IPI のパルス歌を聞いたときのハザードから任意の IPI (15, 55, 75, 95 ms) パルス歌におけるハザードの増加率がキイロショウジョウバエより大きいことを示す。IPI 15, 55, 75, 95 ms にお

いて、それぞれハザード比 =1.44, 2.30, 1.01, 0.93、 $P=0.538, 0.043, 0.979, 0.890$ (表 1)。比例ハザード性を維持するため、実験開始後 0-7 分を使用した (表 2)。点とエラーバーはそれぞれ平均と標準誤差を示す。n.s.: $P>0.05$ 、*: $P<0.05$; Cox 比例ハザードモデル。

Time window	Explanatory variable	HR	5% CI	95% CI	p value
0-7 min	IPI (35-15ms)	0.19	0.09	0.39	5.04E-06
	IPI (35-55ms)	0.73	0.44	1.21	0.217
	IPI (35-75ms)	0.87	0.52	1.46	0.598
	IPI (35-95ms)	0.55	0.32	0.95	0.033
	melanogaster-simulans	0.43	0.24	0.77	0.005
	(35-15)*(mel-sim)	1.44	0.45	4.65	0.538
	(35-55)*(mel-sim)	2.30	1.02	5.15	0.043
	(35-75)*(mel-sim)	1.01	0.42	2.41	0.979
	(35-95)*(mel-sim)	0.93	0.36	2.43	0.890
7-30 min	IPI (35-15ms)	0.51	0.24	1.08	0.078
	IPI (35-55ms)	0.85	0.37	1.95	0.696
	IPI (35-75ms)	0.70	0.29	1.70	0.432
	IPI (35-95ms)	0.72	0.32	1.63	0.427
	melanogaster-simulans	0.68	0.32	1.47	0.328
	(35-15)*(mel-sim)	0.74	0.26	2.12	0.574
	(35-55)*(mel-sim)	0.98	0.31	3.05	0.971
	(35-75)*(mel-sim)	0.64	0.20	2.09	0.459
	(35-95)*(mel-sim)	0.88	0.30	2.58	0.809

表1 メスの交尾実験のハザード比

(35-X)*(mel-sim)は IPI (35 ms と X ms) と種 (キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエ) の交互作用を表す。HR : ハザード比。CI : 信頼区間

Time window	Explanatory variable	chi-square	Df	p value
0-30 min	IPI	0.15	4	5.5E-03
	Species	5.88E-04	1	0.98
	IPI*Species	9.72	4	4.5E-02
	GLOBAL	0.17	9	4.6E-02
0-7 min	IPI	3.53	4	0.47
	Species	2.19	1	0.14
	IPI*Species	3.96	4	0.41
	GLOBAL	7.83	9	0.55
7-30 min	IPI	4.09	4	0.39
	Species	0.39	1	0.53
	IPI*Species	4.61	4	0.33
	GLOBAL	7.26	9	0.61

表 2 交尾実験におけるグループ間のハザード比例性

GLOBAL の p 値が 0.05 未満の場合、ハザード比例性が棄却されている。Df : 自由度

考察

今回私は、オナジショウジョウバエの 35ms に対する 55ms の IPI への選好性がキイロショウジョウバエよりも大きいことを明らかにした。これは、先行研究で示された、これら 2 種の求愛歌選好性に関する報告とも一致する結果である(Ritchie et al., 1999)。この先行研究で報告された交尾実験では、IPI と Kyriacou & Hall cycles を合わせた効果を対象としていた(Ritchie et al., 1999)。しかし近年、Kyriacou & Hall cycles は録音された求愛歌の折り返し雑音によるアーティファクトである可能性が指摘されている(Kyriacou et al., 2017; Stern, 2014)。そのため、実際にはショウジョウバエには Kyriacou & Hall cycles に対する選好性がない可能性がある。本研究は、Kyriacou & Hall cycles を除いても IPI に対する選好性が種間で異なることを確認した最初の例である。

交尾受容性実験は、メスの IPI 選好性を調べるための指標として広く使われているが(Li et al., 2018; Yamada et al., 2018)、実際はオスも求愛歌に反応してメスの追跡行動を始めるため、雌雄の応答を合わせた結果を反映している。そのため、本研究の結果は、雌雄の IPI 選好性が複合した結果であることを考慮しなければならない。ただし、先行研究において、オスには明確な IPI 選択性の種間差が検出されないことが報告されているため(Yoon et al., 2013)、オスの IPI 選好性の効果は限定的であると考えられる。

オナジショウジョウバエはキイロショウジョウバエよりも全体的に交尾成立が遅い傾向にあった(図 3A)。Kyriacou & Hall cycles を含んだ求愛歌を用いた先行研究でも同様の傾向が見られた(Ritchie et al., 1999)。両種のオスは求愛歌を聞いた時にメスに対する追跡行動が上昇する(Crossley et al., 1995)。キイロショウジョウバエのオスでは、求愛歌を聞かせ始めると追跡行動が急激に上昇する。一方、オナジショウジョウバエのオスでは、求愛歌開始後 10 分以上かけてゆっくり応答行動が上昇する(Yoon et al., 2013)。このことを考慮すると、オスのメスに対する求愛行動の上昇速度の種差が、交尾成立時間の違いをもたらしているかもしれない。

本研究で私は IPI のみに対する選好性を調べ、IPI が同種の求愛歌の識別に重要なパラメータであることを確認した。これまで、IPF に対する選好性について有意な種差は見つかっていない。しかし、キイロショウジョウバエにおいて、同種の IPF のパルス歌を聞いた時にメスの行動量が下がることが報告されてい

る(Deutsch et al., 2019)。メスは交尾を受け入れる際、行動量が低下するため(Crossley et al., 1995)、キイロショウジョウバエでは、同種の IPF に選好性を持つ可能性がある。様々な IPF のパルス歌を聞かせたときの交尾率を種間で比較することで、オナジショウジョウバエではキイロショウジョウバエと異なる IPF に対する選好性を持つかについても検証することができる。

第2章 聴覚神経回路の種間比較

概要

第1章ではオナジショウジョウバエがキイロショウジョウバエよりも長い IPI に選好性を持つことを示した。このことから、求愛歌の IPI 情報を処理する聴覚神経回路が種間で異なると考えられる。しかし、両種の聴覚神経回路が詳細に比較された例はない。本章では、この神経回路の最も末梢のニューロン群である JO ニューロン群と主要な二次聴覚ニューロン群である AMMC-B1 ニューロン群を体系的に種間比較した。

比較の結果、JO ニューロン群や AMMC-B1 ニューロン群の形態がよく類似していた。これらのニューロン群は両種ともコリン作動性ニューロン群であると推定された。これらのことは、JO ニューロン群と AMMC-B1 ニューロン群の基本的特性は種間でよく保存されていることを示唆している。一方で、キイロショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群はオナジショウジョウバエよりも低周波数の音にわずかに強く応答した。さらに、AMMC-B1 ニューロン群の IPI 応答特性は種間でほぼ保存されているものの、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群の 15 ms の IPI のパルス歌に対する応答がキイロショウジョウバエよりも低減していた。

以上の結果は、両種の聴覚神経回路の低次部分の特性は種間でほぼ保存されているものの、わずかに分化していることを示唆している。

背景と目的

第1章では私は、2種のショウジョウバエがそれぞれ同種の IPI のパルス歌でよく交尾し、特に、オナジショウジョウバエがキイロショウジョウバエよりも長い IPI に選好性を持つことを示した。本章では私は、この IPI 選好性の種間差の背景にある神経機構の保存性と多様性を明らかにするため、求愛歌情報を処理する神経回路の体系的な種間比較を行った。

キイロショウジョウバエでは、求愛歌は触角に内包される JO ニューロン群で電気化学的信号に変換される(Eberl et al., 2000; Kamikouchi et al., 2009)。JO ニューロン群は求愛歌情報を処理する聴覚神経回路の一次ニューロン群である(Kamikouchi et al., 2009; Matsuo et al., 2014; Yorozu et al., 2009)。求愛歌情報は一部の JO ニューロン群 (JO-B ニューロン群) から主要な二次聴覚ニューロン群である AMMC-B1 ニューロン群に伝達され、さらに高次のニューロン群へと伝達される(Baker et al., 2022; Vaughan et al., 2014; Yamada et al., 2018)。JO-B ニューロン群は短い IPI のパルス歌ほど強く応答し、15-ms の IPI のパルス歌に対して最も強い応答を示す(Yamada et al., 2018)。一方、AMMC-B1 ニューロン群では 15-ms の IPI のパルス歌に対する応答が低減し、25-ms の IPI のパルス歌で最大応答量を示す(Vaughan et al., 2014; Yamada et al., 2018)。つまり、JO-B ニューロン群から AMMC-B1 ニューロン群に求愛歌情報が伝達される過程で、最初の IPI 情報処理が行われる。しかし、この情報処理を担う2つのニューロン群がオナジショウジョウバエにおいても保存されているか、もしくは分化しているかは調べられていない。

そこで本章では、JO ニューロン群と AMMC-B1 ニューロン群の基本的性質がキイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエで異なるか調べるため、形態、神経伝達物質、純音に対する応答特性を種間で比較した。次に、AMMC-B1 ニューロン群までの情報処理が分化しているか調べるため、AMMC-B1 ニューロン群の様々な IPI の人工パルス音に対する応答特性を比較した。

材料と方法

実験動物

キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエを実験動物として使用した。ハエは、25°C、相対湿度 40~60%、12h/12h 明暗周期の条件下で標準的な酵母ベースのショウジョウバエ培地上で飼育された。異なる条件で飼育した場合は、その都度記載した。各実験について、下記の系統を使用した。

- JO ニューロン群の細胞数の計測、ニューロトレーサー実験

キイロショウジョウバエ： *Canton-S*

オナジショウジョウバエ： Yoon et al., 2013 で使用された野生型系統

- JO ニューロン群の抗 ChAT 抗体染色

キイロショウジョウバエ： *UAS-GCaMP6f*(RRID:BDSC_42747)

オナジショウジョウバエ： *2034 w4 pBac (GCamp6F)5*

- オナジショウジョウバエ *nanchung-GAL4* の標識パターンの観察、JO ニューロン群のカルシウムイメージング

オナジショウジョウバエ： *w/yw; +; UAS-GCaMP6f(2034)/nanchung-GAL4 (TG-S15)*

【ドライバー系統：*nanchung-GAL4*（本研究で作製）、レポーター系統：*2034 w4 pBac (GCamp6F)5*】

- 行動実験、AMMC-B1 ニューロン群の形態比較・カルシウムイメージング

キイロシヨウジヨウバエ： *w; UAS-GCaMP6f/+; R49F09-GAL4/+*

【ドライバー系統：*R49F09-GAL4* (RRID:BDSC_38699)、レポーター系統：
UAS-GCaMP6f】

抗体染色

触角と脳の抗体染色については、Matsuo et al., 2016 に従って行った。羽化後 5~12 日のメスの触角または脳を解剖し、4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝生理食塩液 (#163-201454, FUJIFILM) に入れて 4°C で 1 時間固定した。0.5% Triton-リン酸緩衝生理食塩液 (PBT) (#X100-500ML, Sigma-Aldrich) に入れ、4°C で一晩静置し、一次抗体や二次抗体で、3 日間 4°C で染色した。その後、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) や PBT ですすぎ、50%グリセロール (#079-06611, FUJIFILM) -PBS 中で 30 分、80%グリセロールで一晩脱水してスライドガラスにマウントした。使用した抗体を以下に記す。

一次抗体

- Rat anti-GFP (rat monoclonal, NACARAI TESQUE, RRID: AB_221569 1:1000 dilution) は GCaMP6f シグナルを増幅するために使用した。
- Rat anti-elav (rat monoclonal; supernatant, Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), RRID: AB_528218, 1:250 dilution) は JO ニューロン群や AMMC-B1 ニューロン群の核を可視化するために使用した。
- Mouse anti-Bruchpilot nc82 (mouse monoclonal; supernatant, DSHB, RRID: AB_2314866, 1:20 dilution) は脳のシナプス部位を検出するために使用した。
- Mouse anti-Choline acetyltransferase (mouse monoclonal; supernatant, DSHB, RRID: AB_528122 1:50 dilution) は JO ニューロン群や AMMC-B1 ニューロン

群に発現したコリンアセチルトランスフェラーゼを可視化するために使用した。

二次抗体

- Alexa Fluor 488-conjugated anti-rat IgG (goat polyclonal, Jackson, RRID: AB_2338362, 1:300 dilution)
- Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (goat polyclonal, Thermo Fisher, RRID: AB_2534088, 1:300 dilution)
- Alexa Fluor 555-conjugated anti-rat IgG (goat polyclonal, Thermo Fisher, RRID: AB_2535855, 1:300 dilution)
- Alexa Fluor 647-conjugated anti-mouse IgG (goat polyclonal, Thermo Fisher, RRID: AB_2535805, 1:300 dilution)

ChAT 染色については少なくとも4個体について行い、すべてについて一致した結果が得られた。

ニューロトレーサー実験

羽化後5~10日齢のメスを、腹側を上にしてスライドグラスに固定した。触角内部の軸索束 (Antennal nerve) を露出させるため、触角を鋭いピンセットで取り除いた。PBS で希釈したニューロトレーサー (tetramethylrhodamine, and biotin, 3000 MW, Lysine Fixable; D7162, Invitrogen) を、触角を取り除いて作った穴の上に置いた。Antennal nerve にニューロトレーサーを浸透させるため、ハエを4°C で2~3時間静置した。脳を解剖して4%パラホルムアルデヒド-PBSに入れて4°C で1時間固定した。その後、PBS や PBT ですすぎ、50%グリセロール-PBS 中で

30分、80%グリセロールで一晩脱水してスライドグラスにマウントした。この試行は6個体について行い、すべてのサンプルで一致した結果を得た。

共焦点顕微鏡での撮影と画像処理

触角と脳の連続光学切片像を $0.84\ \mu\text{m}$ (脳) または $0.57\ \mu\text{m}$ (触角と脳) 間隔で 30x (脳; NA = 1.05) または 60x (触角と脳; NA = 1.3) シリコンオイルレンズ (Plan-Apochromat) を搭載した FV1000-D または FV1200 共焦点レーザー顕微鏡で撮影した。ニューロトレーサー実験に関して、脳の AMMC に投射するニューロン群を JO ニューロン群として判断した (Kamikouchi et al., 2006)。AMMC の各 zone は nc82 の標識パターンをもとに同定した。三次元画像再構築については、共焦点画像のデータセットを三次元再構築ソフトウェア VVD Viewer で処理した。AMMC-B1 ニューロン群の投射パターンを抽出するため、*R49F09-GAL4* の標識画像から AMMC-B1 ニューロン群由来でないシグナルを VVD Viewer を用いて手動で除去した。

JO ニューロン群の細胞数は EVEA (Excluded-Volume-Embedding Algorithm) で数え、目視で補正した (Kamikouchi et al., 2006)。AMMC-B1 ニューロン群の数については手動で数えた。細胞数の統計解析については、R パッケージ 'ARTool' (<https://cran.r-project.org/web/packages/ARTool/index.html>) を用いて整列ランク変換分散分析 (ART ANOVA) を行った (Wobbrock et al., 2011)。

NBLAST

AMMC-B1 ニューロン群の形態的特徴を定量的に比較するため、以下の方法で NBLAST similarity スコアを取得した。まず、Computational Morphometry Toolkit (RRID: SCR_002234, Jefferis et al., 2007) の非剛体レジストレーションを用いて、脳のスタック画像を標準脳で正規化した。正規化脳を 3 次元画像に再構築し、AMMC-B1 ニューロン群以外のニューロン群を VVD Viewer で除去した。抽出されたニューロン群をベクター化し、R パッケージ 'nat.nblast' (<https://cran.r-project.org/web/packages/nat.nblast/index.html>) で比較した。キイロショウジョウバエの脳の 1 つをリファレンスとして、その他のキイロショウジョウバエの脳やオナジショウジョウバエの脳をクエリとして解析した。得られた NBLAST similarity スコアを ART ANOVA で統計解析した (Costa et al., 2016)。

オナジショウジョウバエ形質転換系統の作製

オナジショウジョウバエ *nanchung-GAL4* 系統を作製するため、*GAL4* コーディング配列の上流に *nanchung* 遺伝子の制御配列を挿入したプラスミドをオナジショウジョウバエに導入した。

オナジショウジョウバエ *nanchung* 遺伝子の 555 kb 上流配列を、EcoRI と NaeI で直鎖化した pBPGUw (Catalog#17575, RRID: Addgene_17575, Addgene) と、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara) を用いて結合させた。

Nanchung 制御配列を増幅するためのプライマー配列を下記に記す。

Forward プライマー: TCGTCTTCAAGAATTGAATTCAAATTCATTTGTAAAAG

Reverse プライマー: CGGGCGAGCTCGGCCCGATCCCGAATTCAC TTT

注：下線は直鎖化プラスミドの末端部位と相補的な 15 bp の拡張配列を示す。

作製したプラスミドを ϕ C31 組み換えシステムを用いてオナジショウジョウバエ *TG-S15 attP* 系統 (栗崎健博士由来) に導入した。*nanchung-GAL4* 系統の作製におけるインジェクションは栗崎健博士が行った。

オナジショウジョウバエ *R49F09-GAL4* 系統を作製するため、*R49F09-GAL4* プラスミドを *attP2176* 系統 (Stern et al., 2017) に ϕ C31 組み換えシステムを用いて導入した。*R49F09-GAL4* 系統の作製におけるインジェクションは Rainbow Transgenic Flies が行った。

交尾実験

交尾実験は第 1 章と同様に行った。音刺激に関しては、第 1 章で用いたもののうち、15, 35, 55-ms IPI の人工パルス歌からなる音ファイルを用いた。統計解析については、第 1 章で示した方法の一部を改変して行った。RMTL は R のパッケージ 'survRM2' を用いて算出した。

IPI 選好性を種間で比較するため、R パッケージ 'survival' を用いた Cox 比例ハザード解析によってメスの交尾受容性に対する IPI と種の交互作用を評価した。解析時間を通じたハザード比例性を維持するため、観察時間を音刺激開始

後 0-7 分、7-30 分の 2 つのフェーズに分けた。ハザード比を算出するため、キイロショウジョウバエの 35 ms の IPI に対するハザードを基準とした。ハザード比は両方のフェーズで算出され、図 15 には、7-30 分におけるハザード比のみ示した。

カルシウムイメージングデータの取得

カルシウムイメージングは Yamada et al., 2018 の一部を改変して行った。羽化後 8 時間以内にメスを集め、6~8 匹を集団で飼育した。GCaMP6f の発現を強めるため、29°C、12 h/12 h 明暗周期の条件下で羽化後 9~12 日間維持した。ハエを氷上で麻酔し、シリコングリス (#SH 44M, Toray) を用いてイメージングプレートの上に腹側を上にして固定した。ハエの口吻を精巧なピンセットで除去し、その穴から脳からの GCaMP 蛍光を観察できるようにした (図 8A)。脱水を防ぐために、成虫のキイロショウジョウバエのリンガー液 (108mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 8.2mM MgCl₂, 4mM NaHCO₃, 1mM NaH₂PO₄, 5mM trehalose, 10mM sucrose, and 5 mM HEPES, pH 7.5, 265 mOsm) を適宜与えた (Wang et al., 2003)。20x 液浸対物レンズ [W Achroplan/W N-Achroplan, numerical aperture (NA) = 0.5; Carl Zeiss]、共焦点スキャナユニット (CSU-W1, 横河電機)、488 nm 励起光レーザー (OBIS 488 LS laser, Coherent) を取り付けた蛍光顕微鏡 (Axio Imager.A2, Carl Zeiss) で観察した。

音刺激を与えるために、スピーカー (ダイトーボイス AR-10N、東京コーン紙製作所) をハエの触角から約 11 cm の位置に設置した。純音に対するカルシウム応答を観察するため、JO ニューロン群に対しては 167, 333 Hz、AMMC-B1 ニューロン群に対しては 100, 200, 300 Hz の組み合わせの純音をランダムに与えた。

AMMC-B1 ニューロン群の IPI 特性を観察するため、20 パルス分の人工パルス音をスピーカーから与えた。録音されたパルス音の実際の IPF はキイロショウジョウバエで 170 Hz、オナジショウジョウバエで 310 Hz だったが、それぞれの種の求愛歌と同程度であった (Riabinina et al., 2011)。各試行において、10 種の IPI (15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105 ms) の一連のパルス音をランダムに与えた。AMMC-B1 ニューロン群に対する IPF の影響を評価するため、2 種の IPF

(170, 310 Hz) と 3 種の IPI (15, 25, 35 ms) の組み合わせで構成された 6 種の人工パルス歌 (20 パルス分) をランダムに与えた。

純音とパルス音のピーク-ピーク間の平均粒子速度は 47.2 mm/s だった。この粒子速度は高周波数の純音 (200, 300 Hz) に対する応答を安定して観察するために設定した。AMMC-B1 ニューロン群は低周波数に強く応答するので、各試行の最後にポジティブコントロールとして 40 Hz の純音を与えた。40 Hz の純音に対する応答よりも他の音刺激 (100, 200, 300 Hz の純音とパルス歌) に対する応答が小さいことを確認し、これらの音刺激に対する応答が飽和していないことを確かめた。

カルシウムイメージングは 24-26°C、相対湿度 40-60% の条件下で行われた。それぞれの刺激の間に少なくとも 5 秒間の間隔を空けて、各個体それぞれパルス歌については 3 試行、純音については 4 試行、カルシウム応答を観察した。蛍光画像については、水冷モード、512×512 ピクセルの空間解像度で EM-CCD カメラ (ImagEM, C9100-13; Hamamatsu Photonics) を用いて 100 ms の露光時間で毎秒 10 フレーム撮影した。

カルシウムイメージングデータの解析

カルシウムイメージングデータは、Python、Fiji (Schindelin et al., 2012)、Excel (Microsoft)、R を用いて解析した。ハエの動きによる画像のぶれは Python の scikit-image ライブラリを用いて補正された (Guizar-Sicairos et al., 2008; van der Walt et al., 2014)。

JO ニューロン群の解析については、対象領域 (Region of interest; ROI) を JO ニューロン群の神経束の音刺激中に蛍光シグナルが観察可能な領域に設定した (図 7C 右図、8A 右図)。AMMC-B1 ニューロン群の ROI については、(Yamada et al., 2018) で記載された通り、AMMC 内の樹状突起領域に設定した (図 9B 右図、9C 右図)。この ROI は AMMC-B1 でないニューロンを含まない。各フレームにおける ROI 中の平均蛍光強度は Fiji で測定された。カルシウム蛍光の経時変化におけるノイズを低減するため、3 フレームごとの移動平均を解析に用いた。

退色による蛍光強度の減衰は下記のように補正され、補正後輝度とした。

- (1) 0-1、4-5 秒 (パルス歌)、0-2、13-15 秒 (純音) における蛍光強度を用い

て線形関数でフィッティングした。

(2) 蛍光強度からフィッティング関数を引くことで補正した。

上記の減衰補正は R パッケージ 'stats' (<https://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/00Index.html>) で行った。カルシウム応答を示すのに用いられる GCaMP6f の相対輝度変化 ($\Delta F/F$) は

$$\Delta F/F = (F_n - F_{Base})/F_{Base}$$

と定義した。ただし、 F_n は音刺激開始後 n 秒における補正後輝度を、 F_{Base} は音刺激開始前 1 秒間の補正後輝度の平均を表す。各刺激における最大応答量は各刺激時間中の最大 $\Delta F/F$ として定義した。

周波数特性の解析のため正規化輝度を

$$(peak\Delta F/F_{FrequencyX}) / (peak\Delta F/F_{Total})$$

として定義した。ただし、 $peak\Delta F/F_{FrequencyX}$ は X -Hz の純音に対する最大応答量を、 $peak\Delta F/F_{Total}$ をポジティブコントロールである 40 Hz の純音を除いたすべての周波数の純音に対する最大応答量の合計を表す。

また、IPI 特性と IPF の影響の解析に関して、正規化輝度を

$$(peak\Delta F/F_{IPI=X}) / (peak\Delta F/F_{Total})$$

として定義した。ただし、 $(peak\Delta F/F_{IPI=X})$ は X -ms IPI における最大応答量を、 $(peak\Delta F/F_{Total})$ はすべての IPI における最大応答量の総和を表す。IPF の影響の評価に関しては、IPF ごとに $peak\Delta F/F_{Total}$ を算出した。

カルシウムイメージングの統計解析

AMMC-B1 ニューロン群の周波数特性は一般化線形モデル (Generalized linear model; GLM) を用いて解析した。「刺激に用いた純音の周波数」と「種 (キイロショウジョウバエ or オナジショウジョウバエ)」を説明変数として用い、正規化輝度を応答変数とした。誤差構造としてガンマ分布を用い、リンク関数に対数関数を設定した。

AMMC-B1 ニューロン群の IPI 特性と IPF の影響の評価は、まず、25 ms IPI に対する応答とその他の IPI に対する応答の差分を Δ 応答として算出した。 Δ 応答の統計解析を行うため、まずは正規性の検定を行った。すべてのデータセットが Shapiro-Wilk 検定と Bartlett 検定で棄却されなかったため、正規性を前提

とした検定が適用可能だと判断した。そこで、IPI 応答特性については両側 t 検定、IPF の影響についてはペアワイズ t 検定を行った後、ボンフェローニ補正を行った。

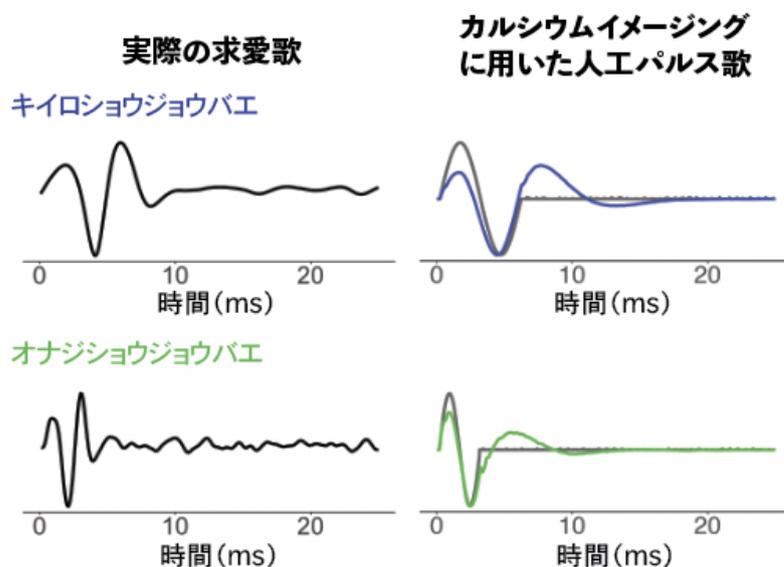


図4 実際の求愛歌の波形とカルシウムイメージングに使用したパルス歌の波形。

上段にキイロショウジョウバエ、下段にオナジショウジョウバエを示す。左図：それぞれの種の実際の求愛歌 1 パルス分の波形。右図：本研究で人工パルス歌を生成するために使用したパルス波形（サイン波 1 周期分の後に無音時間を結合した）を灰色線で示し、音圧傾斜型マイクロフォン（An Emkav NR3158, Knowles Electronics Inc., Itasca, IL）で録音された波形を色線で示す。スピーカーから出力された再生音の IPF は、キイロショウジョウバエで約 170 Hz、オナジショウジョウバエで約 320 Hz であった。

結果

種間での JO ニューロン群の進化的保存性

まず私は、JO ニューロン群の細胞数 (図 5A)、神経伝達物質 (図 5B)、投射パターン (図 6) を種間で比較した。JO ニューロン群の細胞体を同定するため、細胞体を抗 Elav 抗体で標識した (図 5B)。触角第二節でクラスターを形成している、標識された細胞集団を、JO ニューロン群の細胞体であると判断した。触角第二節の外感覚毛の下にある細胞体は外感覚器に属するニューロンであるため、細胞数の計測から除外した (Kamikouchi et al., 2006)。キイロショウジョウバエのメスでは、JO ニューロンの数は 481 ± 6.3 個 (平均 \pm 標準偏差、 $n=6$) であった (図 5A)。一方オナジショウジョウバエのメスでは、 435 ± 9.4 個 (平均標準偏差、 $n=6$) で、キイロショウジョウバエよりも 8% ほど少なかった (図 5A)。また、オナジショウジョウバエの JO ニューロン群のほとんどの細胞体は、抗コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 抗体で標識された。先行研究で報告されている通り、キイロショウジョウバエの JO ニューロン群も ChAT 抗体で標識された (Azevedo and Wilson, 2017; Ishikawa et al., 2017; Yasuyama and Salvaterra, 1999)。そのため、両種の JO ニューロン群はともに、コリン作動性ニューロンであると考えられる (図 5B)。

キイロショウジョウバエでは、JO ニューロン群は解剖学的、機能的に A ~ E の 5 つのサブグループに分類される (Kamikouchi et al., 2009, 2006、ただし Hampel et al., 2020 は新たにサブグループ F の存在を報告している)。JO ニューロン群の軸索は脳の触角機械感覚野 (Antennal mechanosensory and motor center; AMMC) の 5 つの領域に投射する (図 6A)。それぞれの領域は 5 つのサブグループのうち 1 つからの入力を受ける (Kamikouchi et al., 2006)。私は、ニューロトレーザー法を用いて、JO ニューロン群の軸索の構造を種間で比較した。キイロショウジョウバエで標識されたニューロンの AMMC の 5 領域への分岐パターンは、先行研究 (Kamikouchi et al., 2006) とよく似ていたため、このニューロトレーザー法が JO ニューロンの投射パターンを調べる方法として適切であり、種間比較に利用可能であると判断した (図 6B 上段)。

オナジショウジョウバエのメスにおいても、標識された軸索が AMMC の 5 領域に投射していた。これらの軸索は触角神経 (Antennal nerve; AN) から単一の神経束として脳に入り、A 領域と Main trunk (MT) に分岐した。その後、

MT から分岐した 2 つ目の側索が B 領域に投射し、領域 E と Lateral core region (LC) に分かれた。LC は領域 C と D に枝分かれし、領域 D は脳の最後部に到達した (図 6B 下段)。これらの分岐パターンはキイロシヨウジョウバエで観察されたものとよく似ていた。これらのことから私は、JO ニューロン群の数にわずかな違いがあるものの、神経伝達物質と軸索の構造が種間で保存されていると結論づけた。

次に、カルシウムイメージングを用いて、オナジシヨウジョウバエの JO ニューロン群が音に対して神経応答するか観察した。JO ニューロン群を遺伝的に標識するため、キイロシヨウジョウバエのほとんどの JO ニューロン群を標識する *nanchung* 遺伝子上流配列 (Kim et al., 2003) と相同な配列 555 kb を導入して、オナジシヨウジョウバエの *nanchung-GAL4* 系統を作製した (材料と方法参照)。作製した系統の標識されたニューロンの投射パターンを観察するため、抗 GFP 抗体で抗体免疫染色を行った。JO ニューロン群の一部のみが標識され、標識されたニューロンはほとんどの AMMC の領域に投射していた (図 7)。

オナジシヨウジョウバエの音に対する神経応答を観察するため、私はカルシウムインディケータ GCaMP6f (Chen et al., 2013) を用いてカルシウムイメージングを行った。キイロシヨウジョウバエでは、JO ニューロン群のサブグループ A と B (それぞれ JO-A、JO-B) が主要な聴覚受容ニューロン群で、その中でも JO-B は求愛歌情報伝達経路を構成する (Kamikouchi et al., 2009; Kim et al., 2020)。オナジシヨウジョウバエの JO-B の軸索を観察するため、キイロシヨウジョウバエでの先行研究 (Yamada et al., 2018) で行われたとおり、JO-B の投射領域である、AMMC の zone B に着目した。しかし、オナジシヨウジョウバエの *nanchung-GAL4* はキイロシヨウジョウバエに比べて GCaMP シグナルの蛍光強度が低く、GAL4 の標識パターンからは zone B も含めた AMMC のすべての領域構造を特定することができなかった (図 7C)。そのため、この *nanchung-GAL4* 系統を用いて JO-B の応答特性を種間で比較することはできないと判断した。

しかし、JO ニューロン群の軸索の一部では、音刺激中のカルシウム応答に伴って増加した GCaMP 蛍光を検出することができた (図 7C, 8B)。この結果は、少なくともオナジシヨウジョウバエ *nanchung-GAL4* で標識されたニューロンは聴覚刺激に応答することを示している。

2種の AMMC-B1 ニューロン群の進化的保存性

キイロショウジョウバエでは、JO-B ニューロン群は求愛歌情報処理の重要な二次聴覚ニューロン群である AMMC-B1 ニューロン群に聴覚情報を伝達する(Kamikouchi et al., 2009; Matsuo et al., 2016; Yamada et al., 2018)。先行研究では、メスにおける求愛歌への応答行動に AMMC-B1 ニューロン群が必要であることが示された(Yamada et al., 2018; Zhou et al., 2014)。まず、AMMC-B1 ニューロン群の形態を種間で比較するため、キイロショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群を標識する *R49F09-GAL4* をオナジショウジョウバエに導入することで、両種の AMMC-B1 ニューロン群を標識した (図 9A、Jenett et al., 2012; Zhou et al., 2015)。

R49F09-GAL4 はキイロショウジョウバエでは2つのタイプのニューロン群を標識する (図 9B 左図、Zhou et al., 2015)。一方は AMMC-B1 ニューロン群で、両方の脳半球の AMMC や wedge (WED) に接続する両側性のニューロン群である(Matsuo et al., 2016)。もう一方は、片側性のニューロン群 (非 AMMC-B1 ニューロン群) で、触角葉 (Antennal lobe) と側角 (Lateral horn) を接続する Olfactory ventral projection neurons に類似する形態をしている(Lai et al., 2008)。オナジショウジョウバエの *R49F09-GAL4* においても、キイロショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群と非 AMMC-B1 ニューロン群双方とよく似た形態のニューロン群が標識された (図 9C 右図)。そのため私は、オナジショウジョウバエへの *R49F09-GAL4* の導入によってキイロショウジョウバエと相同なニューロン群が標識されたと結論づけた。

標識されたオナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群の細胞体は、キイロショウジョウバエと同様に、触角葉の背側側方に位置していた。標識されたニューロンの数は、キイロショウジョウバエでは 9~12 個 (n=6) であるのに対し、オナジショウジョウバエでは 5~8 個 (n=8) であった。オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群の神経突起はキイロショウジョウバエと同じく AMMC と WED に投射していた (図 9A、Matsuo et al., 2016)。この形態学的な相似性を定量的に評価するため、NBLAST スコアを種間と種内で比較した (図 10、Costa et al., 2016)。種内と種間の NBLAST スコアを得るため、一匹のキイロショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群をリファレンスとして設定し、それぞれ他のキイロショウジョウバエまたはオナジショウジョウバエ

の AMMC-B1 ニューロン群をクエリとして設定した (図 10 右図)。キイロショウジョウバエ内での NBLAST スコアは 0.67 ± 0.015 であるのに対し、種間でのスコアは 0.68 ± 0.017 であり、この 2 つには有意な統計学的種間差が検出されなかった ($p=0.82$, ART ANOVA, 図 10 左図)。これらの結果は、少なくとも *R49F09-GAL4* で標識された AMMC-B1 ニューロン群の形態が種間で保存されていることを示唆している。先行研究では、キイロショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群がコリン作動性であることが報告されている (Tootoonian et al., 2012)。オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群も抗 ChAT 抗体で標識されたため、オナジショウジョウバエにおいても、AMMC-B1 がコリン作動性であると考えられる (図 11)。

オナジショウジョウバエのメスの AMMC-B1 ニューロン群の聴覚応答特性を調べるため、100-300 Hz の純音に対するカルシウム応答を観察した (図 12)。両種の AMMC-B1 ニューロン群は低周波数の音ほど強い応答を示し、300 Hz の純音に対してはわずかな応答しか見られなかった ($p < 0.029$, 一般化線形モデル, 図 11)。この応答特性に関して、周波数と種にわずかだが有意な交互作用が検出されたため、(種*周波数; estimate = $3.30E-03$, $p = 5.587E-03$) キイロショウジョウバエはオナジショウジョウバエよりも低周波数に対するわずかに強い選択性があると考えられる。これらの結果から私は、AMMC-B1 ニューロン群の周波数特性にわずかな種間差があるものの、形態や神経伝達物質など基本的な特性はキイロショウジョウバエと似ていると結論づけた。

AMMC-B1 ニューロン群の IPI 応答特性の進化的保存性と多様性

次に、AMMC-B1 ニューロン群のパルス歌に対する応答特性を調べた。キイロショウジョウバエでは、15-105 ms の範囲の IPI のパルス歌を聞かせたとき、JO-B ニューロン群は短い IPI ほど強く応答する (Yamada et al., 2018)。対照的に、JO-B ニューロン群から主に聴覚入力を受ける AMMC-B1 ニューロン群では 15 ms の IPI で応答が低減する (Yamada et al., 2018)。このような JO-B ニューロン群から AMMC-B1 ニューロン群への IPI 選択性の変化は、キイロショウジョウバエにおける IPI 情報処理の最初の段階だと考えられている。この段階における情報処理が種間で異なるかどうか調べるため、私は、様々な IPI (15-105 ms) の人工パルス歌に対する AMMC-B1 ニューロン群の応答を種間比較した (図 13)。

両種の AMMC-B1 ニューロン群は、与えたすべての人工パルス歌に対してカルシウム応答を示した（図 13A）。

AMMC-B1 ニューロン群の IPI 応答特性を調べるため、音刺激時間中の最大応答量をすべての IPI に対する最大応答量の総和で正規化した「正規化最大応答量」を指標として用いた（図 13B）。両種において、AMMC-B1 の IPI 応答特性は非対称的なバンドパス特性を示した。パルス歌を 15-105 ms の範囲で 10 ms おきに与えると、25 ms IPI で最も高い応答が観察された。25 ms IPI から短い IPI への低減が、長い IPI への低減よりも急峻だった。これらの全体的な応答パターンは、キイロショウジョウバエでの先行研究(Vaughan et al., 2014; Yamada et al., 2018)と一致しており、種間で保存されていた。

このような全体的な類似性の一方で、15 ms IPI での応答特性にわずかだが有意な種間差が検出された。25 ms IPI からその他の IPI への減少幅を種間で比較すると、15 ms IPI でのみ、オナジショウジョウバエでの減少幅がキイロショウジョウバエよりも有意に大きかった（15 ms; $p=0.01$ 、図 13C）。このことは、AMMC-B1 ニューロン群の短い IPI への応答がオナジショウジョウバエでキイロショウジョウバエよりも著しく低減していることを示唆している。また、パルス歌の IPF の違いは AMMC-B1 ニューロン群の IPI 応答特性に有意な影響を与えなかった（15 ms; $p=0.113$, 35 ms; $p=0.990$ 、図 14）。これらのことから、AMMC-B1 ニューロン群の応答特性は種間でわずかな違いが検出されたものの、ほぼ保存されていることが示された。

カルシウムイメージングに用いた系統において、行動レベルでの IPI 選好性の種間差が存在していることを確かめるため、実験に用いたハエと同じ遺伝型のハエで第 1 章と同様の交尾実験を行った（図 15）。これらのハエにおいても、オナジショウジョウバエの 35 ms と比較したときの 55 ms に対する選好性がキイロショウジョウバエよりも高かった（種*IPI35-55; $p=0.011$ 、図 15B インセット）。このことから、カルシウムイメージングに用いた系統ペアにおいても IPI 選択性の種間差は存在していることが確かめられた。

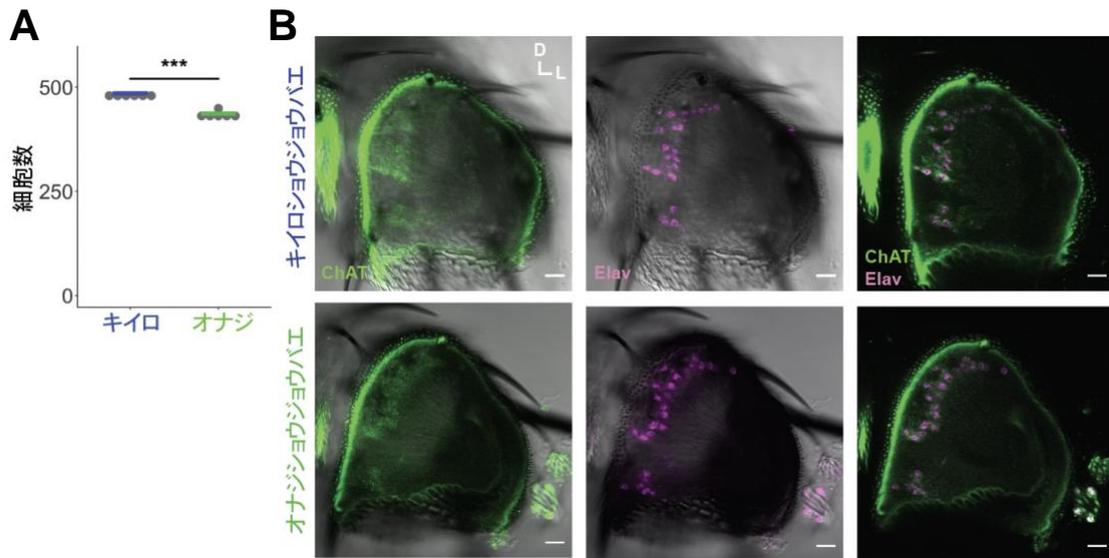


図5 JOニューロン群の細胞数と神経伝達物質

(A) JOニューロン群の細胞数。灰色の点と色線はそれぞれ、各サンプルの細胞数と中央値を示す。***: $P < 0.001$; ART ANOVA。(B) 抗 ChAT 抗体で標識された (緑) 両種の JO ニューロン群の細胞体 (マゼンタ)。触角第二節に内包された JO ニューロン群の正面から撮影した共焦点画像を示した。上段にキイロショウジョウバエ、下段にオナジショウジョウバエを示した。左図: ChAT シグナル (緑) と共焦点透過画像 (灰)。中央図: elav シグナル (マゼンタ) と共焦点透過画像 (灰)。右図: ChAT シグナル (緑) と elav シグナル (マゼンタ) を重ねた画像。D: 背側、L: 側方、スケールバー: 20 μm 。

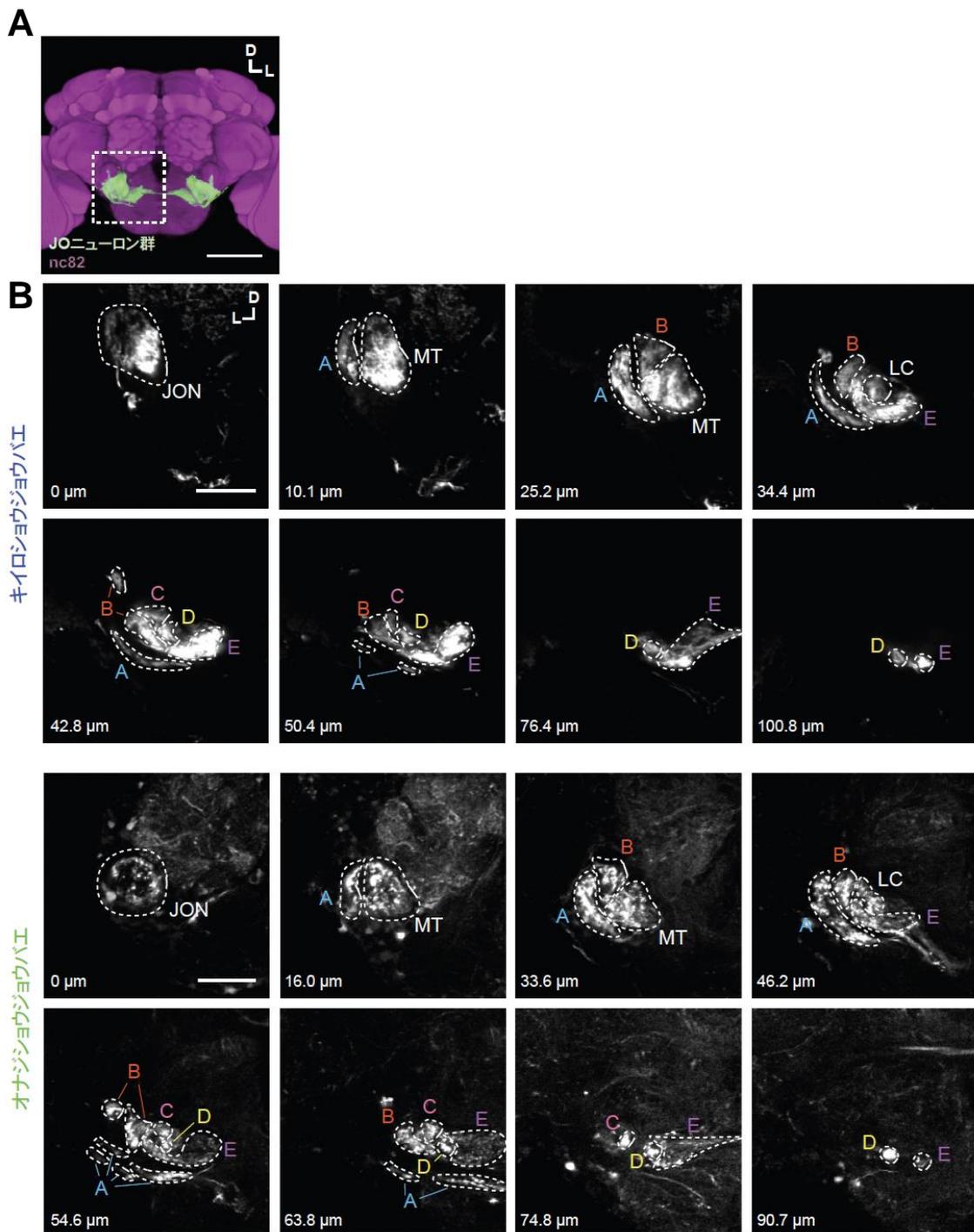


図6 JOニューロン群の投射パターン

(A) 脳の AMMC 領域に投射している JO ニューロン群の軸索。キイロショウジョウバエの *nanchung-GAL4* ドライバーによって GFP を発現している JO ニューロン群の軸索が緑色で示されている。マゼンタのシグナルは、nc82 抗体で可視化された神経線維を示す。白い破線で囲まれた領域が(B)で示されている。(B) キ

イロシヨウジョウバエ（上段）とオナジシヨウジョウバエ（下段）のメスの JO ニューロン群の軸索の投射パターンに沿った AMMC の正面から撮影した共焦点画像。破線で囲まれた蛍光シグナルが示す AMMC に投射している神経突起を JO ニューロン群の軸索であると同定した（材料と方法参照）。D : 背側、L : 側方。JON : JO ニューロン群、MT : Main trunk、LC : lateral core region、A : zone A、B : zone B、C : zone C、D : zone D、E : zone E。スケールバー : 20 μm 。最上部の共焦点画像からの深度 (μm) がそれぞれのパネルの左下に示されている。

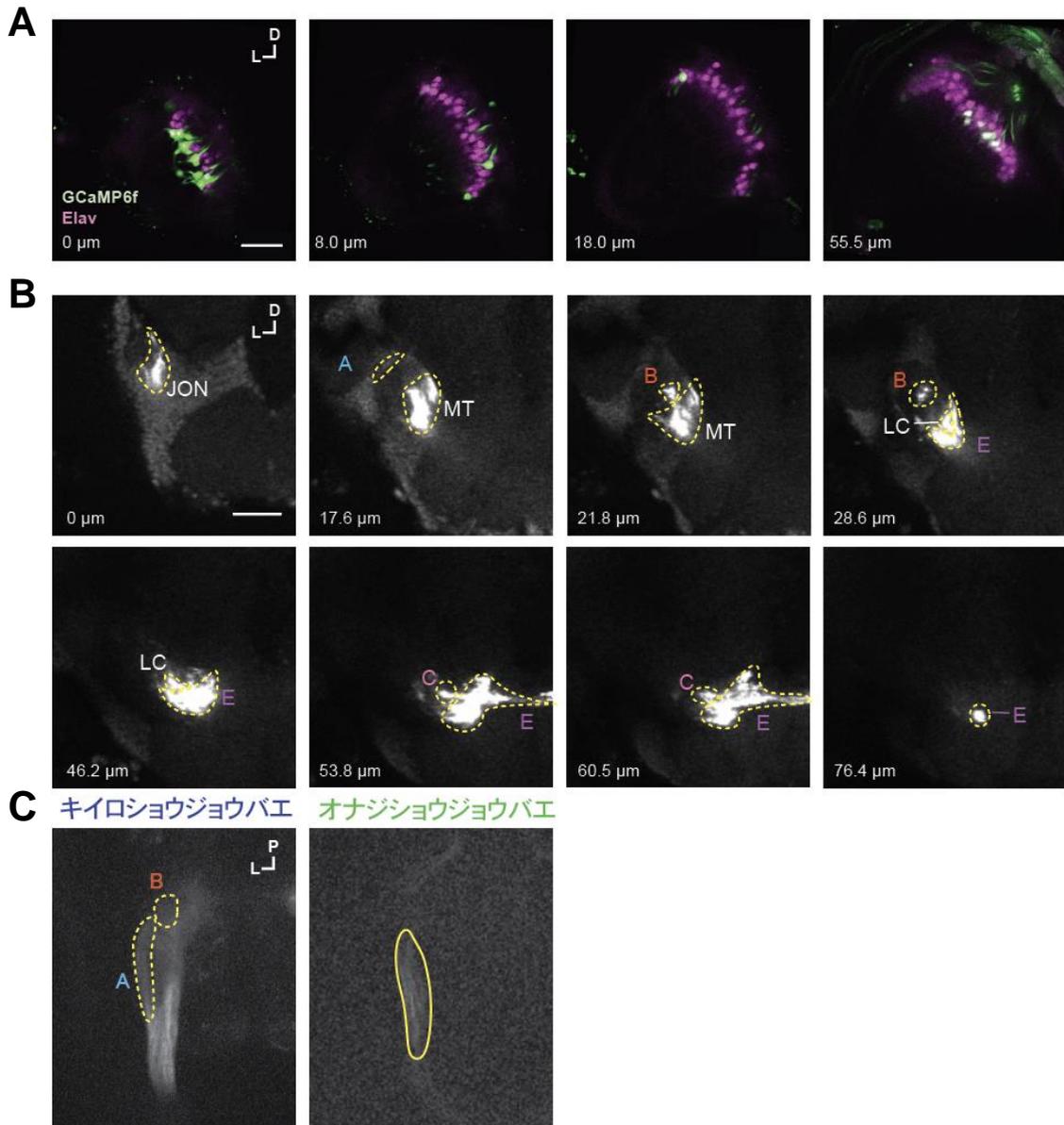


図7 *nanchung-GAL4* で標識されたオナジショウジョウバエの JO ニューロン群

(A) オナジショウジョウバエの *nanchung-GAL4* によって発現した GCaMP6f で標識された JO ニューロン群 (緑)。触角第二節内の JO ニューロン群の細胞体の正面からの免疫染色画像。マゼンタは抗 *elav* 抗体で標識された JO ニューロン群の細胞体を示す。D : 背側、L : 側方、スケールバー : 20 μm 。最上部の共焦点画像からの深度 (μm) がそれぞれのパネルの左下に示されている。(B) オナジショウジョウバエの JO ニューロン群の軸索の投射パターンに沿った AMMC の正面から撮影した共焦点画像。GCaMP6f マーカーを発現させるドライバーとして、

nanchung-GAL4 を使用した。GCaMP6f シグナルは抗 GFP 抗体で増幅された。破線で囲まれた蛍光シグナルが示す AMMC に投射している神経突起を JO ニューロン群の軸索であると同定した（材料と方法参照）。D : 背側、L : 側方。JON : JO ニューロン群、MT : Main trunk、LC : lateral core region、A : zone A、B : zone B、C : zone C、D : zone D、E : zone E。スケールバー : 20 μm 。最上部の共焦点画像からの深度 (μm) がそれぞれのパネルの左下に示されている。(C) カルシウムイメージング装置で検出された JO ニューロン群の軸索における GCaMP シグナルを腹側から撮影した図。左図にキイロショウジョウバエ、右図にオナジショウジョウバエを示した。破線はキイロショウジョウバエの JO ニューロン群の特定の領域を示す。A : zone A、B : zone B。実線はオナジショウジョウバエの JO ニューロン群の軸索束で囲った ROI を示す。音刺激中に蛍光強度の増加が観察された領域を ROI として設定した。P : 後方、L : 側方。

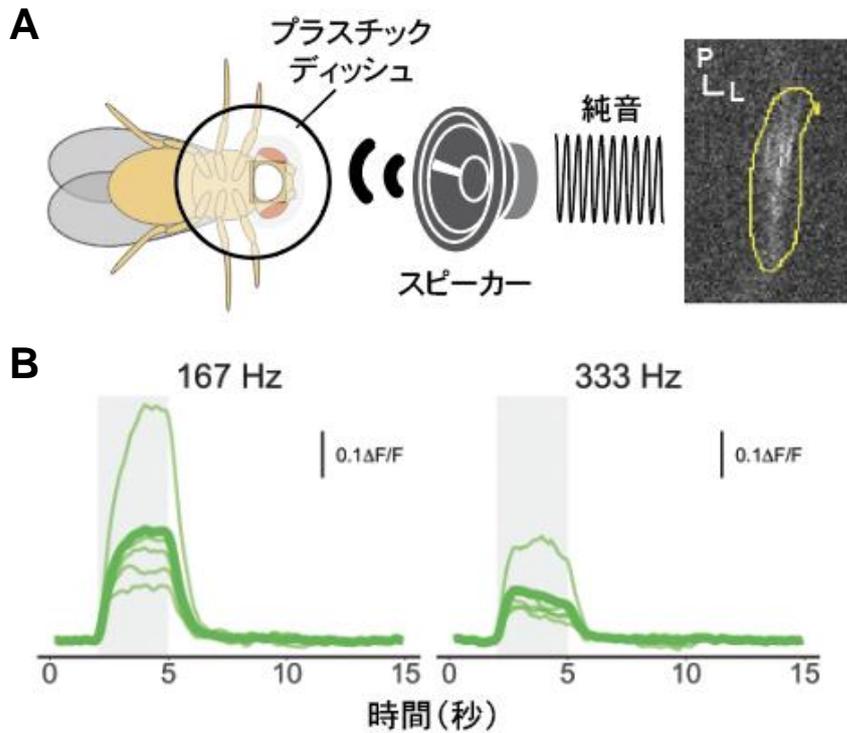


図8 JOニューロン群のカルシウムイメージング

(A) 左図：カルシウムイメージングのセットアップ。右図：オナジショウジョウバエのJOニューロン群の軸索束で囲ったROI。音刺激中に蛍光強度の増加が観察された領域をROIとして設定した。P：後方、L：側方。(B) 純音に対するオナジショウジョウバエのJOニューロン群の軸索のカルシウム応答。167 Hzか333 Hzの純音を3秒間再生した（灰色の領域）。細い線と太い線はそれぞれ、各個体と全個体平均のカルシウム応答の時間経過を表す。

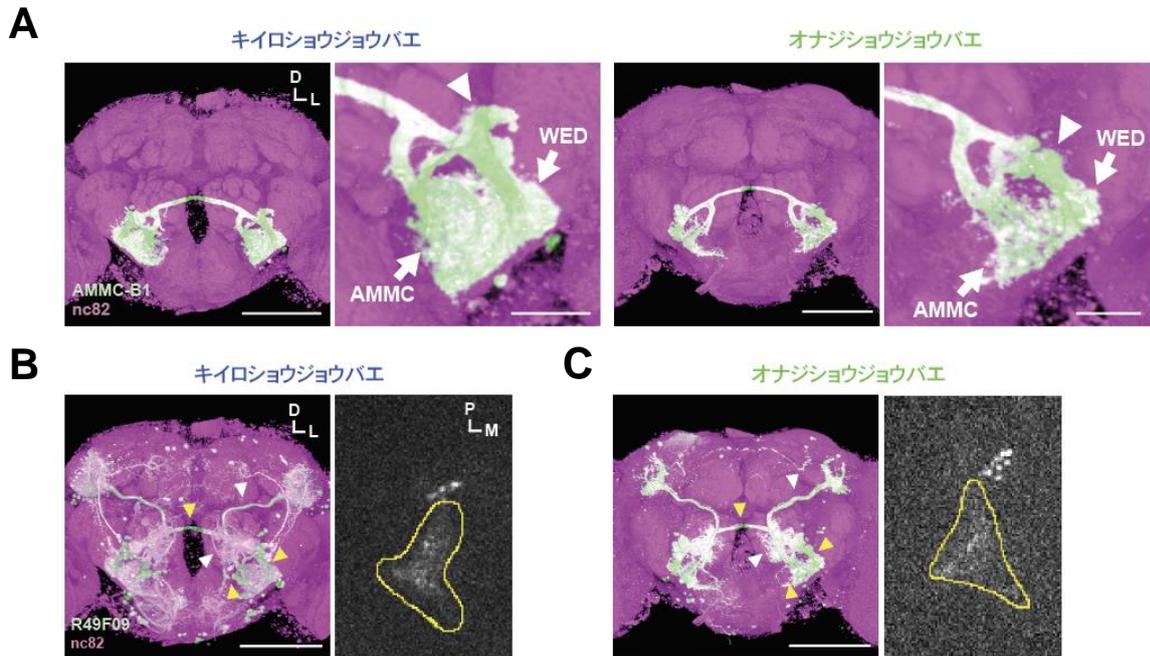


図9 AMMC-B1ニューロン群の形態と *R49F09-GAL4* の標識パターン

(A) メスの AMMC-B1 ニューロン群の形態。 *R49F09-GAL4* ドライバーで GFP を AMMC-B1 ニューロン群で発現させた (緑)。マゼンタは nc82 シグナルを示す。白い矢尻は AMMC-B1 ニューロン群の細胞体を示す。矢印は AMMC と WED に投射する神経突起を表す。スケールバー：100 μm (全体像)、30 μm (拡大像)。

キイロショウジョウバエ(B)とオナジショウジョウバエ(C)の *R49F09-GAL4* で標識されたニューロン群。左図：黄色の矢尻は AMMC-B1 ニューロン群を表し、白色の矢尻は非 AMMC-B1 ニューロン群を表す。右図：カルシウムイメージングにおいて、ROI は標識されたニューロンのうち、非 AMMC-B1 ニューロン群が投射しない AMMC に設定された。D：背側、L：側方、P：後方、M：内側。スケールバー：100 μm 。

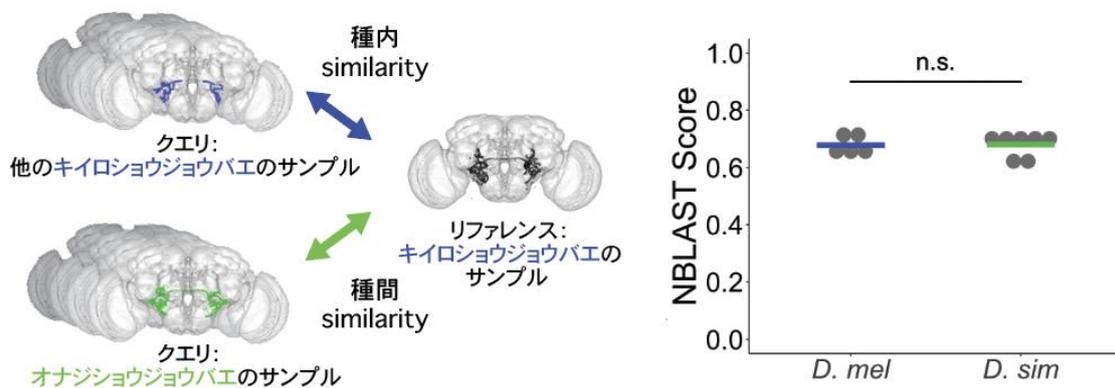


図 10 NBLAST による AMMC-B1 ニューロン群の形態の種間比較

左図：NBLAST スコアの比較方法。キイロショウジョウバエのサンプルのうちひとつをリファレンスとして使用した（右側、黒）。種内の AMMC-B1 ニューロン群の形態の類似度を定量するため、7匹の他のキイロショウジョウバエのサンプルをクエリとして使用した（左上、青）。種間の類似度を解析するため、5匹のオナジショウジョウバエのサンプルをクエリとして使用した（左下、緑）。n.s.: $P > 0.05$; ART ANOVA。右図：キイロショウジョウバエ（青）とオナジショウジョウバエ（緑）の AMMC-B1 ニューロン群の NBLAST スコア。灰色の点と色線はそれぞれ、各サンプルの NBLAST スコアと中央値を示す。

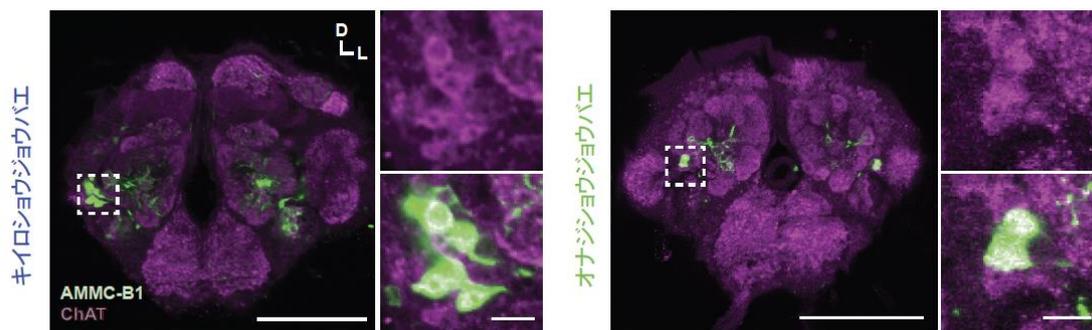


図 11 抗 ChAT 抗体で標識された AMMC-B1 ニューロン群

緑色のシグナルは *R49F09-GAL4* ドライバーで標識された AMMC-B1 ニューロン群を、紫色は ChAT シグナルを示す。破線で囲まれた領域は右図に示した。右上: ChAT シグナルのみ、右下: ChAT シグナルと AMMC-B1 ニューロン群。スケールバー: 100 μm (全体図)、10 μm (拡大図)。

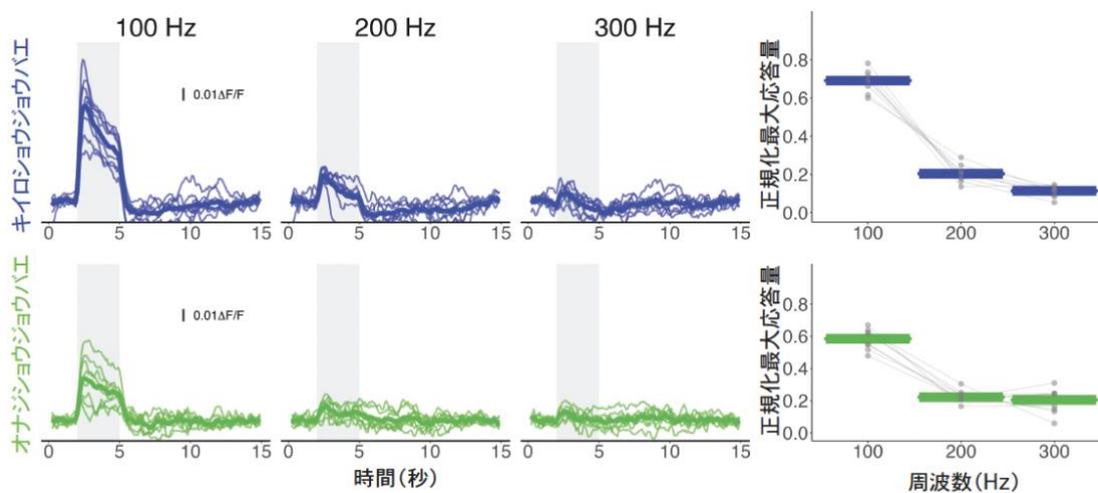


図 12 キイロシヨウジョウバエ(上)とオナジシヨウジョウバエ(下)の AMMC-B1 ニューロン群の純音に対するカルシウム応答の時間経過

音刺激は 3 秒間再生した (灰色の領域)。細い線は各個体の応答の時間経過を、太い線は全個体の平均を示す。

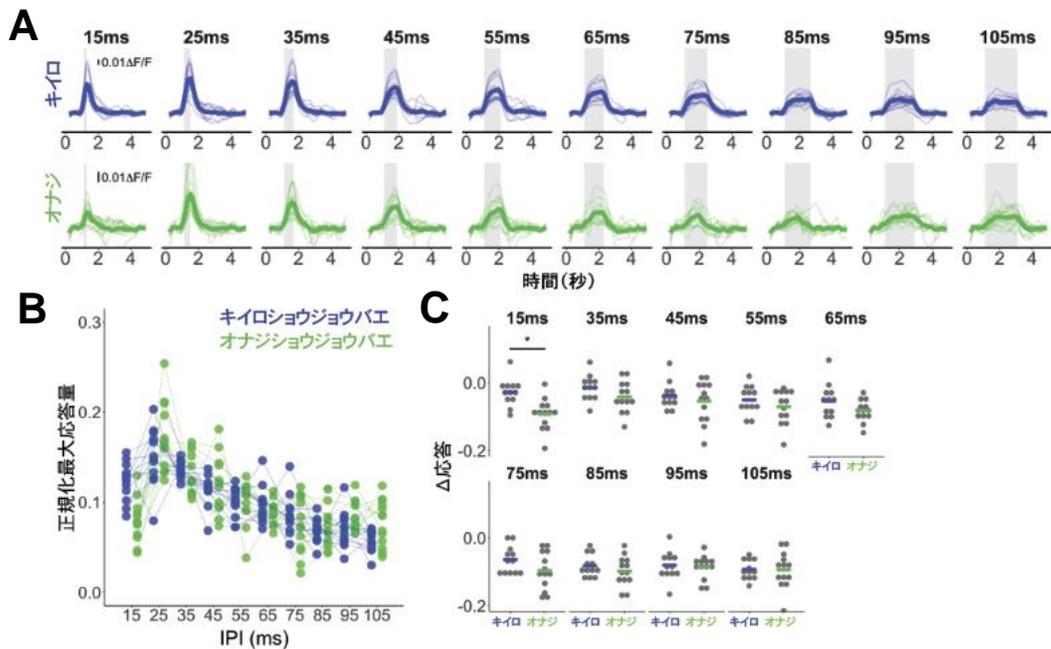


図 13 AMMC-B1 ニューロン群の IPI 応答特性の種間比較

(A) 様々な IPI の人工パルス歌に対する AMMC-B1 ニューロン群の応答の経時変化。それぞれの IPI について 20 パルス分の音刺激を与えた (灰色の領域)。パルス歌は同種の IPF で設計された (図 4 参照)。細い線は 1 個体の応答の経時変化を、太い線は全個体の平均を表す。(B) キイロシヨウジョウバエ (青) とオナジシヨウジョウバエ (緑) の AMMC-B1 ニューロン群のパルス歌に対する応答の正規化最大応答量。点は各個体の正規化最大応答量を表し、同個体の点は線で結ばれている。(C) キイロシヨウジョウバエ (青) とオナジシヨウジョウバエ (緑) の 25 ms IPI のパルス歌に対する正規化最大応答量と各 IPI に対する応答量の差 (Δ 応答)。点は各個体を、線は全個体の中央値を表す。* : $P < 0.05$ 、両側 t 検定の後ボンフェローニ補正。

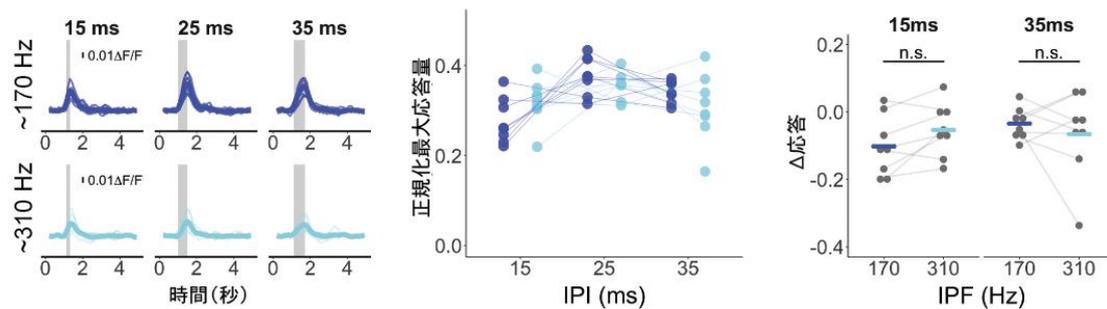


図14 キイロショウジョウバエ AMMC-B1 ニューロン群の IPI 応答特性に対する IPF の影響

左図：2つの異なる IPF（約 170 Hz と約 310 Hz）の人工パルス歌に対する応答。各 IPI につき 20 パルス分の音刺激を与えた（灰色の領域）。細い線は各個体の応答の経時変化を、太い線は全個体の平均を表す。中央図：約 170 Hz（青）と約 310 Hz（シアン）の IPF のパルス歌に対する AMMC-B1 ニューロン群の正規化最大応答量。点は各個体の正規化最大応答量を表し、同個体の点は線で結ばれている。右図：約 170 Hz（青）と約 310 Hz（シアン）の IPF の 25 ms IPI のパルス歌に対する正規化最大応答量と各 IPI に対する応答量の差（ Δ 応答）。点は各個体を、線は全個体の中央値を表す。n.s. : $P > 0.05$ 、ペアワイズ t 検定の後ボンフェローニ補正。

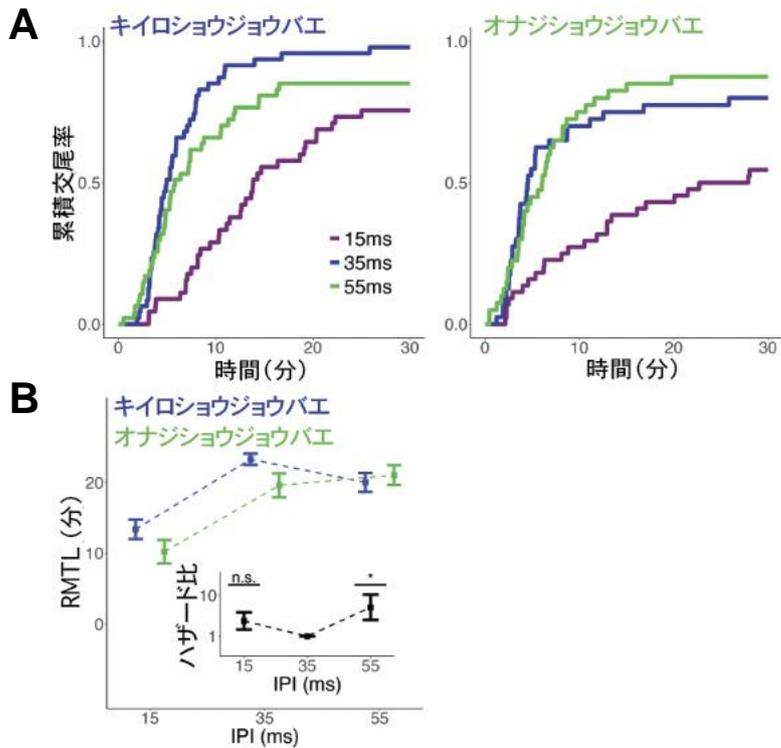


図 15 AMMC-B1 ニューロン群のカルシウムイメージングに用いた系統におけるメスの交尾実験

(A) 様々な IPI の人工パルス歌を聞かせたときの累積交尾率。左図：キイロショウジョウバエ、右図：オナジショウジョウバエ。IPI あたり $n = 40\sim 47$ ペア。(B) 各パルス歌の累積交尾率の RMTL。点は RMTL の平均を、エラーバーは標準誤差を表す。インセットは交尾曲線の IPI (35 ms と X ms) と種 (キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエ) の交互作用のハザード比を示す。IPI 15, 55 において、それぞれハザード比 = 2.37, 5.09、 $P = 0.144, 0.011$ (表 3)。比例ハザード性を維持するため、実験開始後 0-7 分を使用した (表 4)。点とエラーバーはそれぞれ平均と標準誤差を示す。n.s.: $P > 0.05$ 、*: $P < 0.05$; Cox 比例ハザードモデル。

Time window	Explanatory variable	HR	5% CI	95% CI	p value
0-7 min	IPI (35-15ms)	0.16	0.07	0.35	8.76E-06
	IPI (35-55ms)	0.73	0.43	1.22	0.229
	melanogaster-simulans	1.05	0.62	1.76	0.864
	(35-15)*(mel-sim)	1.51	0.50	4.51	0.463
	(35-55)*(mel-sim)	1.20	0.56	2.55	0.643
7-30 min	IPI (35-15ms)	0.38	0.20	0.72	0.003
	IPI (35-55ms)	0.43	0.21	0.90	0.025
	melanogaster-simulans	0.19	0.07	0.49	0.001
	(35-15)*(mel-sim)	2.37	0.74	7.52	0.144
	(35-55)*(mel-sim)	5.09	1.46	17.80	0.011

表3 カルシウムイメージングに用いた遺伝型の交尾実験のハザード比 (35-X)*(mel-sim)は IPI (35 ms と X ms) と種 (キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエ) の交互作用を表す。HR : ハザード比。CI : 信頼区間

Time window	Explanatory variable	chi-square	Df	p value
0-30 min	IPI	10.92	2	0.0042
	Species	12.55	1	0.0004
	IPI*Species	1.72	2	0.4235
	GLOBAL	27.02	5	5.6e-05
0-7 min	IPI	0.556	2	0.76
	Species	2.398	1	0.12
	IPI*Species	0.936	2	0.63
	GLOBAL	4.758	5	0.45
7-30 min	IPI	6.718	2	0.035
	Species	0.223	1	0.636
	IPI*Species	2.927	2	0.231
	GLOBAL	7.133	5	0.211

表4 カルシウムイメージングに用いた遺伝型の交尾実験におけるグループ間のハザード比例性 GLOBAL の p 値が 0.05 未満の場合、ハザード比例性が棄却されている。Df : 自由度

考察

JO ニューロン群と AMMC-B1 ニューロン群の体系的な種間比較によって、これらのニューロン群の形態や神経伝達物質が種間でよく保存されていることが明らかになった。このような高い保存性の一方で、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群の短い IPI への応答は、キイロショウジョウバエよりも著しく低減していた (図 13)。

本研究で発見した AMMC-B1 ニューロン群の IPI 特性の僅かな種差は、低次部分においてもわずかな情報処理の分化が始まっていることの強力な証拠である。本研究で見つかった求愛歌情報処理経路の初期段階における小さな分化は、神経回路における情報処理の分化全体の最初の構成要素かもしれない。そのため、音コミュニケーションの進化をもたらした神経基盤を調べるには、聴覚神経回路のわずかな種間差を精密に比較する手法が今後重要になってくると考えられる。

キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエの行動レベルにおける IPI 選好性は異なっていたものの、JO ニューロン群と AMMC-B1 ニューロン群の全体的な特徴は非常によく保存されていた。このことは、ショウジョウバエの聴覚神経回路の末梢部分が進化的に保存されていることを示唆している。ゼブラフィンチでは、同種の求愛歌に選択的に応答するニューロンは聴覚神経回路の中核部分に位置している (Grace et al., 2003; Stenstrom et al., 2022)。これらの研究と本研究を合わせて考えると、聴覚神経回路の末梢ニューロンは高次のニューロンよりも進化的可塑性が低く、聴覚情報処理の初期段階では種特異性が生じにくいのかかもしれない。

AMMC-B1 ニューロン群の周波数特性は種間でよく似ていたが、キイロショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群はオナジショウジョウバエよりもわずかに強く低周波数側に選択性を示した (図 12)。この結果は、パルスソングの IPF の違い (キイロショウジョウバエ: 約 170 Hz、オナジショウジョウバエ: 約 320 Hz) とも、方向性としては一致している (Riabinina et al., 2011)。しかし、2 種類の IPF (約 170 Hz と約 320 Hz) のパルス歌で実験した限りでは、キイロショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群の IPI 特性に有意な影響がなかった (図 14)。これは、AMMC-B1 ニューロン群の IPI 選択性はそれぞれのパルスの主要周波数成分とは独立である可能性を示唆している。

ただし、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群でも IPF によって IPI の応答特性が変わらないかどうかについては明らかになっていない。今後は、IPI 特性と IPF 特性を体系的に比較することで、AMMC-B1 ニューロン群の IPI/IPF 特性の全体像を明らかにできると考えられる。

キイロショウジョウバエでは、AMMC-B1 ニューロン群は純音よりもパルス歌に強く応答する「パルス歌選好性ニューロン」として報告されている (Baker et al., 2022)。本研究で行ったカルシウムイメージングでは、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群は 310 Hz の IPF のパルス歌に対して明確な応答を示した (図 12)。一方、近い周波数である 300 Hz の純音に対してはほとんど応答しなかった (図 13)。このことから、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群も、キイロショウジョウバエと同様の「パルス歌選好性ニューロン群」であることを示唆している。また、純音に対する周波数特性と同様に、パルス歌の IPF においてもオナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群が低周波数選好性を示すかどうかはわかっていない。これを明らかにするため、種間で保存されたパルス歌選好性の神経基盤や IPF 特性について今後の研究が期待される。

電子顕微鏡データを用いて網羅的にニューロンを同定解析した最近の研究で、ショウジョウバエ脳の前半球には約 60 個の AMMC-B1 ニューロン群があることが発見された (Dorkenwald et al., 2022)。また、形態学的・機能的観点から AMMC-B1 ニューロン群は複数のサブタイプに分類された (Azevedo and Wilson, 2017; Dorkenwald et al., 2022)。本研究で標識された AMMC-B1 ニューロン群は 60 個には遠く及ばないため (キイロショウジョウバエ : 9~12 個、オナジショウジョウバエ : 5~8 個)、本研究で解析した AMMC-B1 ニューロン群は全体の一部に過ぎない。解剖学的には、(Dorkenwald et al., 2022) が AMMC-B1 ニューロン群を AMMC の他のどのニューロン群に接続するかによって 4 つのサブタイプに分類した。この分類方法では、ひとつひとつの AMMC-B1 ニューロンのシナプス構造からどのニューロンとシナプス接続しているかを判断する必要があるため、電子顕微鏡による解析が必要である (Baker et al., 2022; Dorkenwald et al., 2022)。したがって、本研究で標識した AMMC-B1 ニューロン群を解剖学的分類方法に基づいて分けることは不可能であった。

機能的には、AMMC-B1 ニューロン群は周波数特性ごとに低・中・高周波数タイプに分類される(Azevedo and Wilson, 2017)。本研究で使用した GAL4 ドライバー (*R49F09-GAL4*) でこのような機能的解析が行われたことはないため、本研究で観察したニューロン群がどのタイプに属するか完全には特定できない。が、本研究ではこのニューロン群が明らかな低周波数特性を示したことから (図 12)、これらは先行研究で分類された中の低周波数タイプに近いと推定できる。

第3章 2次聴覚ニューロン群への神経入力の推定

概要

第2章で観察された AMMC-B1 ニューロン群の IPI 応答特性は、2種の ショウジョウバエで大まかには保存されていたものの、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群の短い IPI への応答がキイロショウジョウバエよりも強く低減していた。この結果は、聴覚神経回路の末梢から AMMC-B1 ニューロン群までの IPI 情報処理がすでに分化していることを示唆している。本章では、この IPI 情報処理がどのようにしてもたらされているかを、既知の回路構造をベースにした数理モデリングで推定した。

AMMC-B1 ニューロン群の応答特性に JO-B ニューロン群からの興奮性入力と局所介在ニューロン群からの抑制性入力を組み合わせた山なりの曲線となる関数をフィッティングした。その結果、オナジショウジョウバエの応答曲線のピークがキイロショウジョウバエよりも長い IPI 側にシフトしていた。また、個々のパラメータを比較すると、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群への抑制性入力を表すパラメータのひとつがキイロショウジョウバエより2倍ほど大きいと推定された。このことは、短い IPI を聞いたときのオナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群に対する局所介在ニューロン群からの抑制性入力がキイロショウジョウバエよりも強く働いている可能性を示唆している。

背景と目的

第2章では、キイロシヨウジョウバエとオナジシヨウジョウバエの JO ニューロン群と AMMC-B1 ニューロン群が高度に保存されている一方、オナジシヨウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群の短い IPI への応答が、キイロシヨウジョウバエよりも強く低減していることを示した。本章では、この種間差がどのようにしてもたらされているのかに迫るため、数理モデリングを用いて AMMC-B1 ニューロン群に対する神経入力の強さを推定して比較した。

キイロシヨウジョウバエにおいて、AMMC-B1 ニューロン群の IPI 特性は、JO-B ニューロン群からの興奮性入力と、2つの GABA 作動性局所介在ニューロン群 (AMMC-B2/AMMC-LN ニューロン群) の短い IPI (15 ms 付近) に対する抑制性入力で構成されるフィードフォワード回路によって形成される (図 16、Yamada et al., 2018)。JO-B ニューロン群と GABA 作動性介在ニューロン群は短い IPI のパルス歌ほど強く応答しパルス歌の IPI が長くなるほど応答が弱くなる、減衰曲線のような応答パターンを示す (Yamada et al., 2018)。そこで私は、両種の AMMC-B1 ニューロン群の応答特性を、JO ニューロン群からの興奮性神経入力を示す減衰曲線 $y = ae^{-x/\tau_b}$ から AMMC-B2/AMMC-LN ニューロン群からの抑制性神経入力を示す減衰曲線 $y = ce^{-x/\tau_d}$ を減算する

$$y = ae^{-x/\tau_b} - ce^{-x/\tau_d}$$

でフィッティングした。フィッティングによって得られたパラメータを種間で比較することで、AMMC-B1 の IPI 応答特性の種間差がどのような神経入力の強さの違いに由来するのか推定することを試みた。

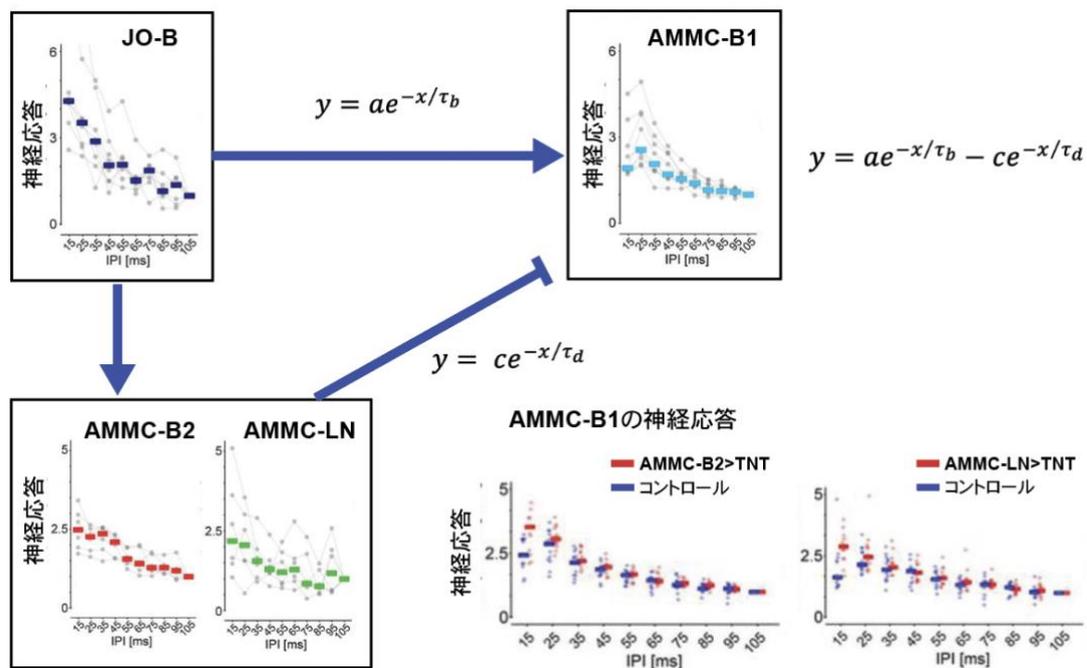


図 16 先行研究で推定されたキイロシヨウジョウバエのフィードフォワード聴覚経路モデル

JO-B ニューロン群と 2 つの抑制性ニューロン群である AMMC-B2、AMMC-LN ニューロン群が AMMC-B1 ニューロン群の IPI 応答特性を形成する。JO-B、AMMC-B2/LN ニューロン群は 15 ms IPI のパルス歌で最も強く応答し、IPI が長くなるにつれて徐々に低減する、減衰曲線のような応答特性を示す。一方、AMMC-B1 ニューロン群も長い IPI ほど徐々に弱く応答するが、15 ms IPI のパルス歌に対しては、応答が低減する。抑制性ニューロン群である AMMC-B2/LN ニューロン群からの抑制性入力を、テタヌストキシン (TNT) を発現させて阻害すると、AMMC-B1 の 15 ms IPI のパルス歌における応答の低減が失われ、JO-B ニューロン群とよく似た応答特性を示す (右下、Yamada et al., 2018)。そのため、この 2 つの抑制性ニューロン群の抑制性入力に AMMC-B1 ニューロン群の 15 ms IPI における応答の低減に必要である。本研究では、AMMC-B1 ニューロン群の応答特性に、JO-B ニューロン群からの興奮性入力を示す減衰曲線 $y = ae^{-x/\tau_b}$ から、AMMC-B2/LN ニューロン群からの抑制性入力を示す減衰曲線 $y = ce^{-x/\tau_d}$ を減算した

$$y = ae^{-x/\tau_b} - ce^{-x/\tau_d}$$

をフィッティングした。図は Yamada et al., 2018 を改変。

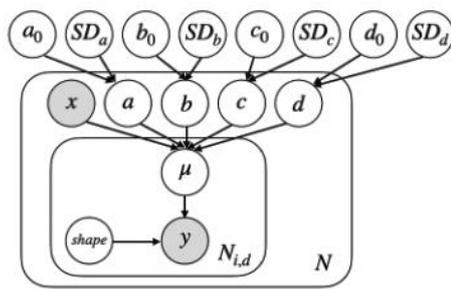
材料と方法

階層ベイズモデル

第2章で得られた正規化最大応答量を、階層ベイズモデルを用いて関数

$$y = ae^{-x/\tau_b} - ce^{-x/\tau_d}$$

でフィッティングした (図 17)。個体ごとのパラメータを推定するため、ベイジアンネットワークを設計した。それぞれのパラメータについては R をインターフェースとした stan パッケージ 'Rstan' (https://mc-stan.org/docs/2_27/stan-users-guide/index.html) を用いて、マルコフ連鎖モンテカルロ法 (Markov chain Monte Carlo methods; MCMC) で推定した。MCMC で用いた初期値は $a=0.1$ 、 $b=0.01$ 、 $c=0.1$ 、 $d=0.1$ とした (表 5)。すべての収束後のパラメータの R-hat 値が 1.1 以下であったため、MCMC がよく収束していると判断した。それぞれのパラメータの初期値を 0.1 から 1.0 まで振って MCMC を行ったところ、R-hat 値が 1.1 を超えることもあったが、収束後のパラメータがほとんど変わらないことを確かめた。パラメータやピーク IPI の比較には、R パッケージ 'exactRankTests' (<https://cran.r-project.org/web/packages/exactRankTests/index.html>) を用いてウィルコクソンの順位和検定を行った。



$$\begin{aligned}
 a_0 &\sim \text{exponential}(1) & a_i &\sim \mathcal{N}(a_0, SD_a) \\
 b_0 &\sim \text{exponential}(1) & b_i &\sim \mathcal{N}(b_0, SD_b) \\
 c_0 &\sim \text{exponential}(1) & c_i &\sim \mathcal{N}(c_0, SD_c) \\
 d_0 &\sim \text{exponential}(1) & d_i &\sim \mathcal{N}(d_0, SD_d) \\
 \mu_{i,j} &= a_i e^{-b_i x} - c_i e^{-d_i x} \\
 \text{shape} &\sim \text{exponential}(0.001) \\
 y &\sim \text{Gamma}(\text{shape}, \text{shape}/\mu)
 \end{aligned}$$

図 17 フィッティングに用いた階層ベイズモデル

灰色は入力したデータを、白色は推定されたパラメータを表す。各個体と全個体におけるパラメータを推定した。

Parameter	Starting value
a0	0.1
b0	0.01
c0	0.1
d0	0.1
a	0.1
b	0.01
c	0.1
d	0.1
SD_a	0.005
SD_b	0.005
SD_c	0.005
SD_d	0.005
shape	50

表 5 MCMC によるフィッティングに用いたパラメータの初期値

結果

AMMC-B1 ニューロン群へのどのニューロン群からの入力に種間差があるか調べるため、AMMC-B1 ニューロン群の様々な IPI に対する正規化最大応答量に関数

$$y = ae^{-x/\tau_b} - ce^{-x/\tau_d}$$

をフィッティングした (図 18A-C)。ここで、興奮性入力は減衰関数 ce^{-x/τ_d} で表現され、抑制性入力は ae^{-x/τ_b} で表現されている。パラメータ a と c はそれぞれの減衰関数の初期値を表し、 τ_b や τ_d は減衰関数の時定数を表す。各個体についてフィッティング関数を推定し、パラメータやフィッティングカーブのピーク IPI を種間比較した (図 18D)。フィッティングカーブは実際の値をよく再現し、0.01~1 の範囲でパラメータの初期値を変えても、収束した範囲において ($R_{hat} < 1.1$ 、材料と方法参照)、推定されたパラメータはほとんどが 2% 未満の違いであった (c の一部に約 10% の違いがあった)。フィッティング関数のすべてのパラメータがオナジショウジョウバエでキイロショウジョウバエよりも有意に大きかった (a ; $p=3.85E-07$ 、 τ_b ; $p=1.54E-06$ 、 c ; $p=3.85E-07$ 、 τ_d ; $p=0.011$ 、図 18D)。中でも、パラメータ c は最大の種間の違いを示した (オナジショウジョウバエ/キイロショウジョウバエ = ~1.925、表 6)。この結果から、少なくとも本研究で推定したパラメータの範囲では、短い IPI において、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群はキイロショウジョウバエよりも強い抑制性入力を受けていると推論できる。

推定されたピーク IPI (フィッティングカーブのピークとなる IPI) は両種で 25 ms IPI 周辺に収束したものの、オナジショウジョウバエでキイロショウジョウバエよりもわずかに大きかった ($p = 3.85E-07$ 、キイロショウジョウバエの平均値: 21.64 ms、オナジショウジョウバエ: 25.04 ms、図 18D)。このことから、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群の IPI 選択性がキイロショウジョウバエよりも長い IPI に、わずかにシフトしている可能性がある。また、オナジショウジョウバエの a や τ_b はキイロショウジョウバエよりも有意に大きいため (図 18D)、AMMC-B1 ニューロン群の長い IPI に対する応答がオナジショウジョウバエでキイロショウジョウバエよりも相対的に大きいと推測できる。2 種の AMMC-B1 ニューロン群のピーク IPI は 25 ms 周辺であったため、行動レベルでの IPI 選好性 (キイロショウジョウバエでは 35 ms、オナジショウジョウ

バエでは 55 ms) と異なるが (図 3)、この AMMC-B1 ニューロン群の推定ピーク IPI の種間の違いは、行動レベルでの IPI 選好性のシフトの方向と一致していた。これらのことから、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群の IPI 特性がキイロショウジョウバエよりもわずかに長い IPI にシフトしていること、このシフトの背景には AMMC-B1 ニューロン群に対する抑制性入力の強さの違いがある可能性があることが示された。

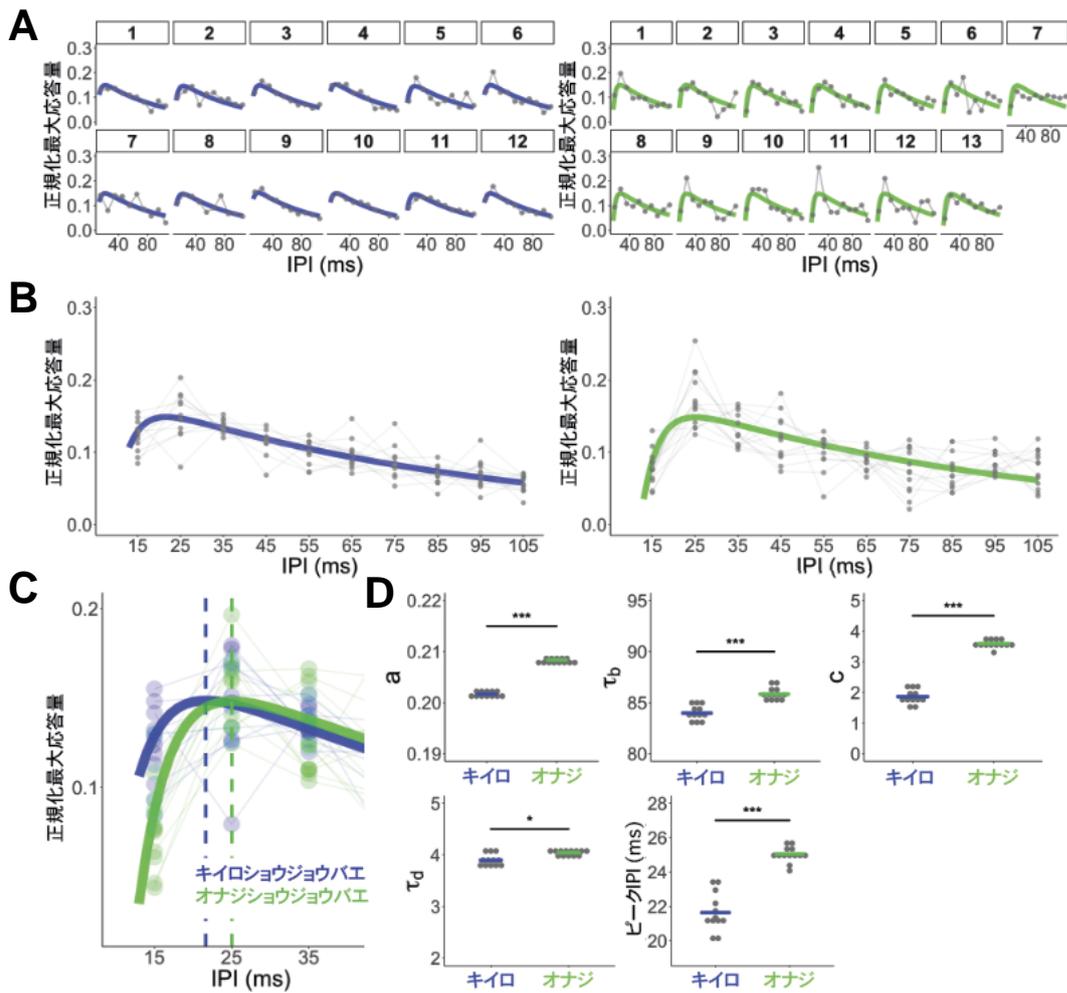


図 18 正規化最大応答量のフィッティング

各個体(A)と全個体(B)の正規化最大応答量のフィッティングカーブ。左図：キイロシヨウジョウバエ（青）、右図：オナジシヨウジョウバエ（緑）。実線はフィッティングカーブを表す。点は各個体の正規化最大応答量を表す。同個体から得られた点を線で結んだ。(C) 短い IPI の範囲（15-35 ms）におけるキイロシヨウジョウバエ（青）とオナジシヨウジョウバエ（緑）の正規化最大応答量のフィッティングカーブ。実線はフィッティングカーブを表す。点は各個体の正規化最大応答量を表し、同個体から得られた点を線で結んだ。破線はキイロシヨウジョウバエ（青）とオナジシヨウジョウバエ（緑）で推定されたフィッティングカーブのピークとなる IPI を示す。(D) キイロシヨウジョウバエ（青）とオナジシヨウジョウバエ（緑）で推定されたパラメータとフィッティングカーブのピーク IPI。点は各個体の、線は全個体の推定値を表す。* : $P < 0.05$ 、*** : $P < 0.001$ 、ウィルコクソンの順位和検定。

Species	ID	a	tau_b	c	tau_d	peak
<i>D. melanogaster</i>	average	0.2017	83.9797	1.8644	3.8980	21.6406
	1	0.2013	84.0215	1.7965	3.8674	21.3527
	2	0.2009	85.0849	2.1112	4.0494	22.9484
	3	0.2021	83.7082	1.9231	3.8965	21.7417
	4	0.2024	83.0712	1.5545	3.7737	20.2818
	5	0.2014	84.8900	2.2657	4.1005	23.4844
	6	0.2023	83.3108	1.8304	3.8540	21.3208
	7	0.2011	84.3212	1.6926	3.8470	21.0305
	8	0.2013	84.4185	2.0044	3.9433	22.1793
	9	0.2024	82.8497	1.4995	3.7473	20.0106
	10	0.2017	83.7572	1.7758	3.8357	21.1392
	11	0.2013	84.9794	2.1943	4.1031	23.3643
	12	0.2020	83.6037	1.8060	3.8435	21.2328
<i>D. simulans</i>	average	0.2084	85.8339	3.5893	4.0434	25.0429
	1	0.2085	85.0732	3.4764	3.9527	24.3868
	2	0.2088	85.0319	3.3028	3.9362	24.0791
	3	0.2081	86.4459	3.7934	4.1125	25.6852
	4	0.2086	85.8512	3.5614	4.0390	24.9814
	5	0.2083	86.1206	3.6220	4.0441	25.0961
	6	0.2079	85.9810	3.6284	4.0277	25.0185
	7	0.2074	87.1292	3.6964	4.0882	25.4785
	8	0.2083	85.8879	3.5869	4.0156	24.8923
	9	0.2083	85.5537	3.6050	4.0428	25.0496
	10	0.2085	85.3784	3.5757	4.0142	24.8486
	11	0.2088	85.4958	3.6800	4.0551	25.1912
	12	0.2082	85.7921	3.6087	4.0395	25.0463
13	0.2079	86.7457	3.7893	4.1084	25.6735	
<i>D. simulans</i> / <i>D. melanogaster</i>		1.0331	1.0221	1.9252	1.0373	1.1572

表6 フィッティング関数のパラメータ

MCMC で推定された個体ごとのパラメータと平均パラメータが示されている。キイロショウジョウバエ (n=12) とオナジショウジョウバエ (n=13) のカルシウムイメージングのデータセットを使用した。個体ごとのデータセットには ID

を割り振った。最下行には、種間の平均パラメータの比が示されている（オナジ
ショウジョウバエ/キイロショウジョウバエ）。

考察

本章で私は、AMMC-B1 ニューロン群の短い IPI のパルス列に対する応答の種間差がどのようにしてもたらされるのか、数理モデリングを用いて推定した。キイロショウジョウバエにおいて、AMMC-B1 ニューロン群の IPI 特性は、JO-B ニューロン群からの興奮性入力と、2 つの GABA 作動性局所介在ニューロン群 (AMMC-LN/AMMC-B2 ニューロン群) の短い IPI (15 ms 付近) に対する抑制性入力で構成されるフィードフォワード経路によって形成される (図 19A、Yamada et al., 2018)。本研究で得られた、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群は短い IPI に対してキイロショウジョウバエよりも強い抑制が入っているという予測を考慮すると、AMMC-B1 ニューロン群の IPI 選択性の種間差は AMMC-LN/AMMC-B2 ニューロン群の特性の違いによってもたらされている可能性がある (図 19)。

具体的には、短い IPI における AMMC-LN/AMMC-B2 ニューロン群の抑制性出力がオナジショウジョウバエでキイロショウジョウバエよりも強いかもしれない (図 18B)。コオロギやショウジョウバエにおいては、種特異的な時間パターン選択性を生み出すフィードフォワード経路が報告されているが (Hedwig, 2016; Yamada et al., 2018)、それが実際に情報処理の種間の多様性に貢献しているかどうかについては証明されていない。それゆえ、これらの GABA 作動性局所介在ニューロン群の応答特性や神経回路構造を種間比較することでこの証明に貢献すると考えられる。

長い IPI (55-105 ms) に関しては、フィッティング関数のパラメーターにわずかだが有意な種間差が検出された (図 18D)。これは、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群の長い IPI に対する相対的な応答がキイロショウジョウバエよりも強い可能性を示唆している。本研究で用いたモデルを考慮すると、AMMC-B1 ニューロン群の長い IPI に対する強い応答は、より末梢の JO-B ニューロン群からの興奮性入力があるオナジショウジョウバエで強いかもしれない。この仮説を検証するためには、JO-B ニューロン群の IPI 応答特性の種間比較が必要である。しかし、オナジショウジョウバエ *nanchung-GAL4* が JO ニューロン群をまばらで弱く標識したため (図 7)、本研究では JO-B ニューロン群のカルシウム応答を観察することができなかった。この問題点を解決するには、

JO-B ニューロン群を特異的に標識するオナジショウジョウバエの系統を作製することが望ましい。

本章で私は、AMMC-B1 ニューロン群の神経応答にある減衰曲線から別の減衰曲線を引いてできた関数をフィッティングした。これは、キイロショウジョウバエで見つかったフィードフォワード経路を構成する興奮性および抑制性ニューロン群の応答特性に着想を得たものである(Yamada et al., 2018)。そのため、このモデルはオナジショウジョウバエにも同様のフィードフォワード経路が存在し、構成ニューロン群の基本的特性や応答パターンが保存されているという仮定を前提としている。本研究で明らかにした JO ニューロン群や AMMC-B1 ニューロン群の形態や細胞数、神経伝達物質の高い種間保存性は、これらのニューロン群の基本的特性や応答パターンが保存されているはずであるという仮定を支持している。しかしながら、これらの仮定の妥当性を検証するためには、今後、オナジショウジョウバエの JO-B ニューロン群や AMMC-LN/AMMC-B2 ニューロン群の応答特性を調べることを望ましい。

第 1 章で私は、オナジショウジョウバエの行動レベルの IPI 選好性がキイロショウジョウバエに比べて長い IPI にシフトしていたことを確かめた (図 3)。本章においても、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群の神経応答に行動レベルと同方向のシフトが見られたが、行動レベルの IPI 選好性の種間差を説明できるほど十分な大きさのシフトではなかった (図 18C、D)。これらの結果は、おそらく聴覚神経回路の中樞のニューロン群の種間差も IPI 選好性の種間差に貢献していることを示唆している。近年のキイロショウジョウバエの研究では、オスの求愛歌に応答してメスの *Virginal plate* の開閉を制御する vpoEN ニューロン群が同種の 35 ms IPI の求愛歌に選好性を持つことが報告されている(Wang et al., 2021)。AMMC-B1 ニューロン群が求愛歌に対する応答行動に必要な主要な 2 次聴覚ニューロン群であることを考えると、AMMC-B1 ニューロン群から情報を受け取り vpoEN ニューロン群に出力する神経回路が同種の IPI 選好性をさらに形成すると考えられる。実際、先行研究では、キイロショウジョウバエにおいて AMMC-B1 ニューロン群と vpoEN ニューロン群に接続するいくつかのニューロン群が同定されている(Baker et al., 2022)。もし、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群より中枢部分に、これらと相同なニューロン群が存在すれば、オナジショウジョウバエの vpoEN ニューロン群は 55 ms IPI

のパルス歌に選択的に応答し、同種の IPI に対する行動レベルの選好性を決定しているかもしれない。その場合、vpoEN ニューロン群の応答特性の違いは、AMMC-B1 ニューロン群と vpoEN ニューロン群の間の神経回路で形成される可能性がある。このような中枢のニューロン群の応答特性を種間で比較することで、AMMC-B1 ニューロン群より中枢の神経回路が行動レベルの IPI 選好性の種間差にどのように貢献しているか明らかにできるかもしれない。

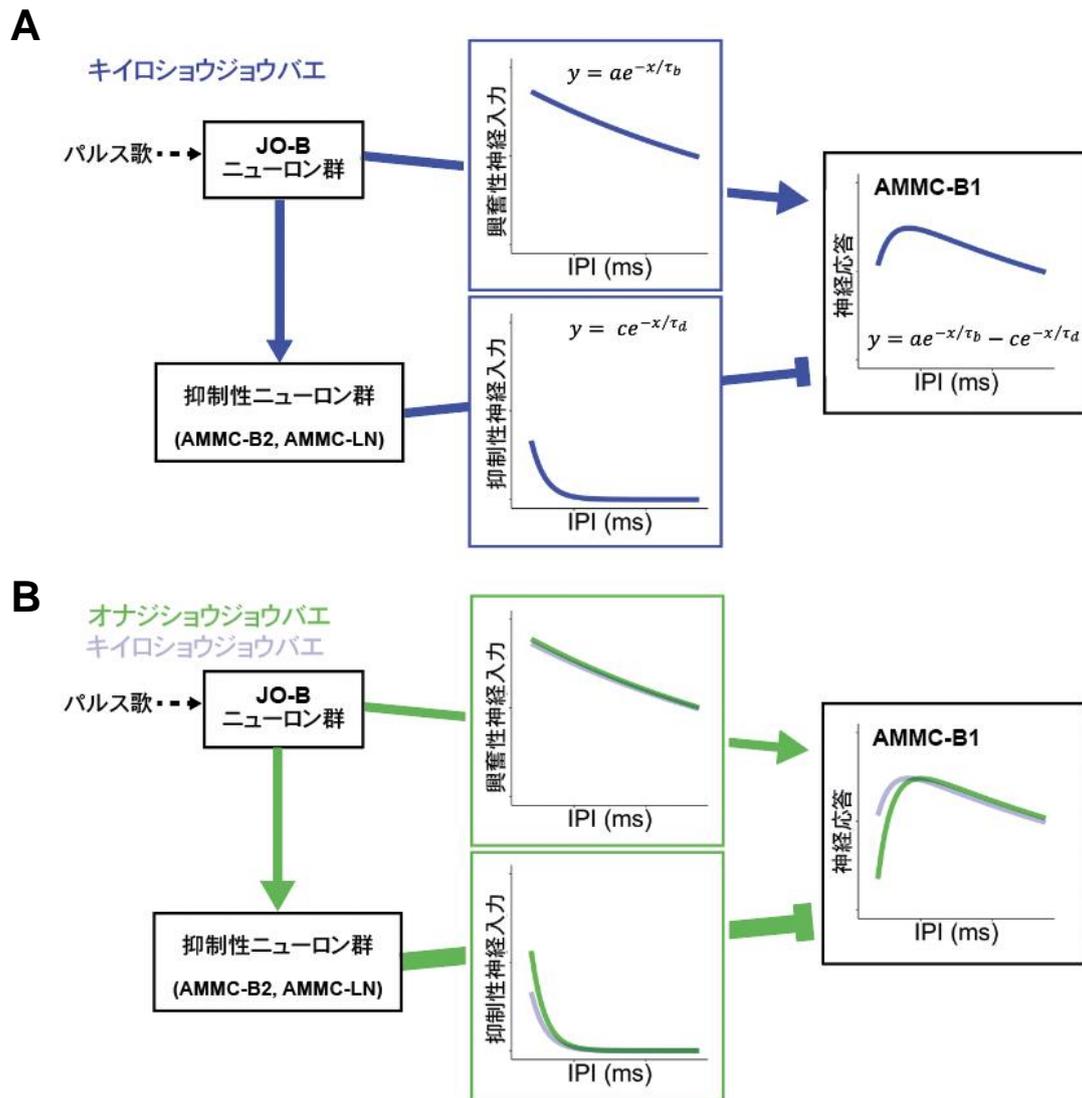


図 19 AMMC-B1 ニューロン群の IPI 特性の種差をもたらしたメカニズムのモデル図

(A) 先行研究で推定されたキイロショウジョウバエにおけるフィードフォワード聴覚経路のモデル。JO-B ニューロン群の興奮性入力と AMMC-LN、AMMC-B2 ニューロン群の抑制性入力が AMMC-B1 ニューロン群の応答特性を形成する。階層ベイズモデルを用いて推定したキイロショウジョウバエのパラメーター (図 18D) を基に AMMC-B1 ニューロン群と興奮性入力と抑制性入力のフィッティングカーブを描いた。JO-B ニューロン群と AMMC-B2/LN ニューロン群は短い IPI のパルス歌で AMMC-B1 ニューロン群に強く神経入力する。興奮性入力と抑制性入力の双方が 15 ms IPI のパルス歌に対する AMMC-B1 ニューロン群の応答の低減を形成する。(B) JO-B ニューロン群と AMMC-B1 ニューロン群の神

経入力によって形成される AMMC-B1 ニューロン群の IPI 特性の種間差。AMMC-B1 ニューロン群と神経入力のフィッティングカーブはキイロシヨウジョウバエ（薄い青）とオナジシヨウジョウバエ（緑）における階層ベイズモデルで推定されたパラメーターを基に作成された（表 6）。

総括

本研究で私は、異なる音への選好性を持つ近縁種間における相同な神経回路の精密な比較を初めて行った。

第1章では、キイロショウジョウバエと姉妹種であるオナジショウジョウバエのメスの様々な IPI の求愛歌を聞いたときの累積交尾率を種間で比較した。これにより、2種のショウジョウバエのメスが同種の IPI の求愛歌に対して選好性を持つ傾向にあることが確認された。特に、オナジショウジョウバエがキイロショウジョウバエよりも長い IPI のパルス歌に対して選好性を持つことが示された。

第2章では、IPI 情報を処理する聴覚神経回路の末梢部分に着目し、オナジショウジョウバエの JO ニューロン群、AMMC-B1 ニューロン群を遺伝的に標識するシステムを作成した。これにより、JO、AMMC-B1 ニューロン群の特性の詳細な比較が可能になった。2つのニューロン群の形態、神経伝達物質は種間で高度に保存されていたものの、JO ニューロン群の細胞数、AMMC-B1 ニューロン群の周波数、IPI 特性にはわずかな種間差が見られた。特に、オナジショウジョウバエの AMMC-B1 ニューロン群の 15 ms IPI のパルス歌に対する応答がキイロショウジョウバエよりも強く低減されていることを発見した。

第3章では、2種の AMMC-B1 ニューロン群の IPI 特性の種間差をもたらした神経メカニズムを、階層ベイズモデルにより推定した。これにより、オナジショウジョウバエで、AMMC-B2、AMMC-LN ニューロン群から AMMC-B1 ニューロン群への短い IPI のパルス歌における抑制性入力キイロショウジョウバエよりも強い可能性が示唆された。

本研究により、私は、(1) キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエは IPI 選好性が種間で異なること、(2) 聴覚神経回路の末梢部分は種間で保存されているものの、AMMC-B1 ニューロン群の短い IPI のパルス歌に対する応答が種間でわずかに異なることを示した。また、ベイズモデリングを用いて、この IPI 応答特性の種間差をもたらした神経メカニズムを推定した。

本研究で行ったような、キイロショウジョウバエの豊富な神経回路に関する知見と、キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエの相同なニューロン群を標識できる遺伝的ツールを組み合わせる研究手法は聴覚神経回路全体に適用することができる。それゆえ、本研究は種特異的な聴覚情報処理が進化

の過程でどのように多様化してきたかを解き明かす空前の機会にむけた基盤を作るものである。

補遺資料

図	実験	解析方法	Group	p value	Statistics	Value
4	細胞数	ART ANOVA	-	2.29E-04	Df.res	1
					Df.res	10
					F value	3.13E+01
9	NBLAST	ART ANOVA	-	0.821	Df.res	1
					Df.res	10
					F value	5.42E-02
11	AMMC-B1 ニューロ ン群の周 波数特性 の種間比 較	GLM (distribution = Gamma , link function = log)	Intercept	5.35E-04	Estimate	-0.65
					Standard error	0.17
					t value	-3.74
			Frequency	0.029	Estimate	-0.553
					Standard error	0.24
					t value	-2.26
			Species	8.54E-15	Estimate	-9.18E-03
					Standard error	8.01E-04
					t value	-11.46
			Species*Frequency	5.59E-03	Estimate	3.30E-03
					Standard error	1.13E-03
		t value	2.91			
12C	Δ応答	t-test adjusted by Bonferroni	IPI 15 and 25 ms	0.01	t value	-3.73
					Df.res	22.92
					p value before adjusted	1.12E-03
					t value	-1.6
			IPI 35 and 25 ms	1	Df.res	22.6
					p value before adjusted	0.12
					t value	-0.83
			IPI 45 and 25 ms	1	Df.res	20.57
					p value before adjusted	0.42
			IPI 55 and 25 ms	1	t value	-1.09

					Df.res	22.77
					p value before adjusted	0.29
					t value	-1.65
			IPI 65 and 25 ms	1	Df.res	18.04
					p value before adjusted	0.12
					t value	-1.67
			IPI 75 and 25 ms	0.993	Df.res	21.64
					p value before adjusted	0.11
					t value	-1.01
			IPI 85 and 25 ms	1	Df.res	22.22
					p value before adjusted	0.32
					t value	-0.35
			IPI 95 and 25 ms	1	Df.res	21.49
					p value before adjusted	0.73
					t value	-0.049
			IPI 105 and 25 ms	1	Df.res	18.89
					p value before adjusted	0.96
					t value	-2.28
13	Δ response	pairwise t-test adjusted by Bonferroni	IPI 15 and 25 ms	0.113	Df.res	7
					p value before adjusted	0.056
					t value	0.72
			IPI 35 and 25 ms	0.99	Df.res	7
					p value before adjusted	0.49
17	フィッティングカーブのパラメータ	Exact Wilcoxon rank sum test	a	3.85E-07		0
			tau_b	1.54E-06	W	154
			c	3.85E-07		0
			tau_d	0.011		32

推定値の 種間比較	peak	3.85E-07	0
--------------	------	----------	---

補表 1 統計解析の結果

統計解析の詳細な結果を列挙した。Df.res : 残差の自由度

図	実験	種	Group	サンプルサイズ
3	交尾実験	<i>D. melanogaster</i>	15ms-IPI	44
			35ms-IPI	46
			55ms-IPI	43
			75ms-IPI	38
			95ms-IPI	39
		<i>D. simulans</i>	15ms-IPI	40
			35ms-IPI	40
			55ms-IPI	40
			75ms-IPI	40
4	細胞数	<i>D. melanogaster</i>	-	6
		<i>D. simulans</i>	-	6
7	JON のカルシウム応答	<i>D. simulans</i>	-	5
9	NBLAST	<i>D. melanogaster</i>	-	5
		<i>D. simulans</i>	-	7
11	AMMC-B1 の周波数特性	<i>D. melanogaster</i>	-	8
		<i>D. simulans</i>	-	8
12, 17	AMMC-B1 の IPI 特性	<i>D. melanogaster</i>	-	12
		<i>D. simulans</i>	-	13
13	AMMC-B1 の IPF 特性	<i>D. melanogaster</i>	-	8
14	メスの交尾実験	<i>D. melanogaster</i>	15ms-IPI	45
			35ms-IPI	47
			55ms-IPI	47
		<i>D. simulans</i>	15ms-IPI	44
			35ms-IPI	40
			55ms-IPI	40

補表 2 サンプルサイズ

参考文献

- Azevedo AW, Wilson RI. 2017. Active mechanisms of vibration encoding and frequency filtering in central mechanosensory neurons. *Neuron* **96**:446-460.e9. doi:10.1016/j.neuron.2017.09.004
- Baker CA, McKellar C, Pang R, Nern A, Dorkenwald S, Pacheco DA, Eckstein N, Funke J, Dickson BJ, Murthy M. 2022. Neural network organization for courtship-song feature detection in *Drosophila*. *Curr Biol* **32**:3317-3333.e7. doi:10.1016/j.cub.2022.06.019
- Barbash DA. 2010. Ninety years of *Drosophila melanogaster* hybrids. *Genetics* **186**:1–8. doi:10.1534/genetics.110.121459
- Bastock M, Manning A. 1955. The courtship of *Drosophila melanogaster*. *Behaviour* **8**:85–111.
- Bennet-Clark HC, Ewing AW. 1969. Pulse interval as a critical parameter in the courtship song of *Drosophila melanogaster*. *Anim Behav* **17**:755–759. doi:10.1016/S0003-3472(69)80023-0
- Braune P, Schmidt S, Zimmermann E. 2008. Acoustic divergence in the communication of cryptic species of nocturnal primates (*Microcebus* spp.). *BMC Biol* **6**:19. doi:10.1186/1741-7007-6-19
- Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS. 2013. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* **499**:295–300. doi:10.1038/nature12354
- Costa M, Manton JD, Ostrovsky AD, Prohaska S, Jefferis GSXE. 2016. NBLAST: Rapid, sensitive comparison of neuronal structure and construction of neuron family databases. *Neuron* **91**:293–311. doi:10.1016/j.neuron.2016.06.012
- Cowling DE, Burnet B. 1981. Courtship songs and genetic control of their acoustic characteristics in sibling species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Anim Behav* **29**:924–935.
- Crossley SA, Bennet-Clark HC, Evert HT. 1995. Courtship song components affect male and female *Drosophila* differently. *Anim Behav* **50**:827–839.
- Deutsch D, Clemens J, Thiberge SY, Guan G, Murthy M. 2019. Shared song detector neurons in *Drosophila* male and female brains drive sex-specific behaviors. *Curr Biol* **29**:3200-3215.e5. doi:10.1016/j.cub.2019.08.008
- Dorkenwald S, McKellar CE, Macrina T, Kemnitz N, Lee K, Lu R, Wu J, Popovych S, Mitchell E, Nehoran B, Jia Z, Bae JA, Mu S, Ih D, Castro M, Ogedengbe O, Halageri A, Kuehner K, Sterling AR, Ashwood Z, Zung J, Brittain D, Collman F,

- Schneider-Mizell C, Jordan C, Silversmith W, Baker C, Deutsch D, Encarnacion-Rivera L, Kumar S, Burke A, Bland D, Gager J, Hebditch J, Koolman S, Moore M, Morejohn S, Silverman B, Willie K, Willie R, Yu S chieh, Murthy M, Seung HS. 2022. FlyWire: online community for whole-brain connectomics. *Nat Methods* **19**:119–128. doi:10.1038/s41592-021-01330-0
- Eberl DF, Hardy RW, Kernan MJ. 2000. Genetically similar transduction mechanisms for touch and hearing in *Drosophila*. *J Neurosci* **20**:5981–5988.
- Ewing AW, Bennet-Clark HC. 1968. The courtship songs of *Drosophila*. *Behaviour* **31**:288–301.
- Fan P, Manoli DS, Ahmed OM, Chen Y, Agarwal N, Kwong S, Cai AG, Neitz J, Renslo A, Baker BS, Shah NM. 2013. Genetic and neural mechanisms that inhibit *Drosophila* from mating with other species. *Cell* **154**:89–102. doi:10.1016/j.cell.2013.06.008
- Frishkopf LS, Capranica RR, Goldstein MH. 1968. Neural coding in the bullfrog's auditory system a teleological approach. *ProcIEEE* **56**:969–980. doi:10.1109/PROC.1968.6448
- Gaspar P, Arif S, Sumner-Rooney L, Kittelmann M, Bodey AJ, Stern DL, Nunes MDS, McGregor AP. 2020. Characterization of the genetic architecture underlying eye size variation within *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *G3-GENES GENOM GENET* **10**:1005–1018. doi:10.1534/g3.119.400877
- Grace JA, Amin N, Singh NC, Theunissen FE. 2003. Selectivity for conspecific song in the zebra finch auditory forebrain. *J Neurophysiol* **89**:472–487. doi:10.1152/jn.00088.2002
- Guizar-Sicairos M, Thurman ST, Fienup JR. 2008. Efficient subpixel image registration algorithms. *Opt Lett* **33**:156–158.
- Hampel S, Eichler K, Yamada D, Bock DD, Kamikouchi A, Seeds AM. 2020. Distinct subpopulations of mechanosensory chordotonal organ neurons elicit grooming of the fruit fly antennae. *elife* **9**:1–55. doi:10.7554/eLife.59976
- Hedwig BG. 2016. Sequential filtering processes shape feature detection in crickets: A framework for song pattern recognition. *Front Physiol* **7**:46. doi:10.3389/fphys.2016.00046
- Henry CS. 1994. Singing and cryptic s ion in insects. *Trends Ecol Evol* **9**:388–392.
- Hey J, Kliman RM. 1993. Population genetics and phylogenetics of DNA sequence variation at multiple loci within the *Drosophila melanogaster* species complex. *Mol Biol Evol* **10**:804–822.

- Hildebrandt KJ. 2014. Neural maps in insect versus vertebrate auditory systems. *Curr Opin Neurobiol.* doi:10.1016/j.conb.2013.08.020
- Hu TT, Eisen MB, Thornton KR, Andolfatto P. 2013. A second-generation assembly of the *Drosophila simulans* genome provides new insights into patterns of lineage-specific divergence. *Genome Res* **23**:89–98. doi:10.1101/gr.141689.112
- Irwin DE, Bensch S, Price TD. 2001. Speciation in a ring. *Nature* **409**:333–337.
- Ishikawa Y, Okamoto N, Nakamura M, Kim H, Kamikouchi A. 2017. Anatomic and physiologic heterogeneity of subgroup-a auditory sensory neurons in fruit flies. *Front Neural Circuits* **11**. doi:10.3389/fncir.2017.00046
- Jefferis GSXE, Potter CJ, Chan AM, Marin EC, Rohlfsing T, Maurer CR, Luo L. 2007. Comprehensive maps of *Drosophila* higher olfactory centers: Spatially segregated fruit and pheromone representation. *Cell* **128**:1187–1203. doi:10.1016/j.cell.2007.01.040
- Jenett A, Rubin GM, Ngo TTB, Shepherd D, Murphy C, Dionne H, Pfeiffer BD, Cavallaro A, Hall D, Jeter J, Iyer N, Fetter D, Hausenfluck JH, Peng H, Trautman ET, Svirskas RR, Myers EW, Iwinski ZR, Aso Y, DePasquale GM, Enos A, Hulamm P, Lam SCB, Li HH, Lavery TR, Long F, Qu L, Murphy SD, Rokicki K, Safford T, Shaw K, Simpson JH, Sowell A, Tae S, Yu Y, Zugates CT. 2012. A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology. *Cell Rep* **2**:991–1001. doi:10.1016/j.celrep.2012.09.011
- Kamikouchi A, Inagaki HK, Effertz T, Hendrich O, Fiala A, Göpfert MC, Ito K. 2009. The neural basis of *Drosophila* gravity-sensing and hearing. *Nature* **458**:165–171. doi:10.1038/nature07810
- Kamikouchi A, Ishikawa Y. 2016. Hearing in *Drosophila* In: Pollack GS, Mason AC, Popper AN, Fay RR, editors. *Insect Hearing*. Springer, Cham. pp. 239–262.
- Kamikouchi A, Shimada T, Ito K. 2006. Comprehensive classification of the auditory sensory projections in the brain of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* **499**:317–356. doi:10.1002/cne.21075
- Kim H, Horigome M, Ishikawa Y, Li F, Lauritzen JS, Card G, Bock DD, Kamikouchi A. 2020. Wiring patterns from auditory sensory neurons to the escape and song-relay pathways in fruit flies. *J Comp Neurol* **528**:2068–2098. doi:10.1002/cne.24877
- Kim J, Chung YD, Park D, Choi S, Shin DW, Soh H, Lee HW, Son W, Yim J, Park C-S, Kernan MJ, Kim C. 2003. A TRPV family ion channel required for hearing in *Drosophila*. *Nature* **424**:81–84.

- Kyriacou CP, Green EW, Piffer A, Dowse HB, Takahashi JS, contributions A, designed research H, performed research H, analyzed data H. 2017. Failure to reproduce period-dependent song cycles in *Drosophila* is due to poor automated pulse-detection and low-intensity courtship. *PNAS* **114**. doi:10.5061/dryad.80c1f
- Lai SL, Awasaki T, Ito K, Lee T. 2008. Clonal analysis of *Drosophila* antennal lobe neurons: Diverse neuronal architectures in the lateral neuroblast lineage. *Development* **135**:2883–2893. doi:10.1242/dev.024380
- Li X, Ishimoto H, Kamikouchi A. 2018. Auditory experience controls the maturation of song discrimination and sexual response in *Drosophila*. *elife*. doi:10.7554/eLife.34348.001
- Manning A. 1967. The control of sexual receptivity in female *Drosophila*. *Anim Behav* **5**:2–9.
- Marshall DC, Slon K, Cooley JR, Hill KBR, Simon C. 2008. Steady Plio-Pleistocene diversification and a 2-million-year sympatry threshold in a New Zealand cicada radiation. *Mol Phylogenet Evol* **48**:1054–1066. doi:10.1016/j.ympev.2008.05.007
- Matsuo E, Kamikouchi A. 2013. Neuronal encoding of sound, gravity, and wind in the fruit fly. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. doi:10.1007/s00359-013-0806-x
- Matsuo E, Seki H, Asai T, Morimoto T, Miyakawa H, Ito K, Kamikouchi A. 2016. Organization of projection neurons and local neurons of the primary auditory center in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* **524**:1099–1164. doi:10.1002/cne.23955
- Matsuo E, Yamada D, Ishikawa Y, Asai T, Ishimoto H, Kamikouchi A. 2014. Identification of novel vibration- and deflection-sensitive neuronal subgroups in Johnston's organ of the fruit fly. *Front Physiol* **5**. doi:10.3389/fphys.2014.00179
- McGrath PT, Xu Y, Ailion M, Garrison JL, Butcher RA, Bargmann CI. 2011. Parallel evolution of domesticated *Caenorhabditis* species targets pheromone receptor genes. *Nature* **477**:321–325. doi:10.1038/nature10378
- Mendelson TC, Shaw KL. 2005. Rapid speciation in an arthropod. *Nature* **433**:375–376. doi:10.1038/nature03320
- Mizrahi A, Shalev A, Nelken I. 2014. Single neuron and population coding of natural sounds in auditory cortex. *Curr Opin Neurobiol*. doi:10.1016/j.conb.2013.09.007
- Nolte V, Schlötterer C. 2008. African *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* populations have similar levels of sequence variability, suggesting comparable effective population sizes. *Genetics* **178**:405–412. doi:10.1534/genetics.107.080200

- Podos J. 2010. Acoustic discrimination of sympatric morphs in Darwin's finches: A behavioural mechanism for assortative mating? *Proc Royal Soc B* **365**:1031–1039. doi:10.1098/rstb.2009.0289
- Riabinina O, Dai M, Duke T, Albert JT. 2011. Active process mediates species-specific tuning of *Drosophila* ears. *Curr Biol* **21**:658–664. doi:10.1016/j.cub.2011.03.001
- Ritchie MG, Halsey EJ, Gleason JM. 1999. *Drosophila* song as a species-specific mating signal and the behavioural importance of Kyriacou and Hall cycles in *D. melanogaster* song. *Anim Behav* **58**:649–657. doi:10.1006/anbe.1999.1167
- Ritchie MG, Townhill RM, Hoikkala A. 1998. Female preference for fly song: playback experiments confirm the targets of sexual selection. *Anim Behav* **56**:5651.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**:676–682. doi:10.1038/nmeth.2019
- Schöneich S, Kostarakos K, Hedwig B. 2015. An auditory feature detection circuit for sound pattern recognition. *Sci Adv* **1**:1–8. doi:10.1126/sciadv.1500325
- Schulze H, Langner G. 1997. Periodicity coding in the primary auditory cortex of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): two different coding strategies for pitch and rhythm? *J Comp Physiol A* **181**:651–663.
- Seddon N, Tobias JA. 2010. Character displacement from the receiver's perspective: Species and mate recognition despite convergent signals in suboscine birds. *Proc Royal Soc B* **277**:2475–2483. doi:10.1098/rspb.2010.0210
- Seeholzer LF, Seppo M, Stern DL, Ruta V. 2018. Evolution of a central neural circuit underlies *Drosophila* mate preferences. *Nature* **559**:564–569. doi:10.1038/s41586-018-0322-9
- Spieth HT. 1974. Courtship behavior in *Drosophila*. *Annu Rev Entomol* **19**:385–405.
- Stenstrom K, Voss HU, Tokarev K, Phan ML, Hauber ME. 2022. The direction of response selectivity between conspecific and heterospecific auditory stimuli varies with response metric. *Behav Brain Res* **416**. doi:10.1016/j.bbr.2021.113534
- Stern DL. 2014. Reported *Drosophila* courtship song rhythms are artifacts of data analysis. *BMC Biol* **12**. doi:10.1186/1741-7007-12-38
- Stern DL, Crocker J, Ding Y, Frankel N, Kappes G, Kim E, Kuzmickas R, Lemire A, Mast JD, Picard S. 2017. Genetic and transgenic reagents for *Drosophila simulans*, *D. mauritiana*, *D. yakuba*, *D. santomea*, and *D. virilis*. *G3-GENES GENOM GENET* **7**:1339–1347. doi:10.1534/g3.116.038885

- Sturtevant AH. 1920. Genetic Studies on *Drosophila simulans*. I. Introduction. Hybrids with *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **5**:488–500.
- Su MP, Andrés M, Boyd-Gibbins N, Somers J, Albert JT. 2018. Sex and species specific hearing mechanisms in mosquito flagellar ears. *Nat Commun* **9**. doi:10.1038/s41467-018-06388-7
- Tootoonian S, Coen P, Kawai R, Murthy M. 2012. Neural representations of courtship song in the *Drosophila* brain. *J Neurosci* **32**:787–798. doi:10.1523/JNEUROSCI.5104-11.2012
- Uno H, Claggett B, Tian L, Inoue E, Gallo P, Miyata T, Schrag D, Takeuchi M, Uyama Y, Zhao L, Skali H, Solomon S, Jacobus S, Hughes M, Packer M, Wei LJ. 2014. Moving beyond the hazard ratio in quantifying the between-group difference in survival analysis. *J Clin Oncol* **32**:2380–2385. doi:10.1200/JCO.2014.55.2208
- van der Walt S, Schönberger JL, Nunez-Iglesias J, Boulogne F, Warner JD, Yager N, Gouillart E, Yu T, the scikit-image contributors. 2014. Scikit-image: image processing in Python. *PeerJ* **2**:e453. doi:10.7717/peerj.453
- Vaughan AG, Zhou C, Manoli DS, Baker BS. 2014. Neural pathways for the detection and discrimination of conspecific song in *D. melanogaster*. *Curr Biol* **24**:1039–1049. doi:10.1016/j.cub.2014.03.048
- von Schilcher F. 1976. The role of auditory stimuli in the courtship of *Drosophila melanogaster*. *Anim Behav* **24**:18–26.
- Wang JW, Wong AM, Flores J, Voshall LB, Axel Richard. 2003. Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell* **112**:271–282.
- Wang K, Wang F, Forknall N, Yang T, Patrick C, Parekh R, Dickson BJ. 2021. Neural circuit mechanisms of sexual receptivity in *Drosophila* females. *Nature* **589**. doi:10.1038/s41586-020-2972-7
- Wilczynski W, Ryan MJ. 2010. The behavioral neuroscience of anuran social signal processing. *Curr Opin Neurobiol* **20**:754–763.
- Wilkins MR, Seddon N, Safran RJ. 2013. Evolutionary divergence in acoustic signals: causes and consequences. *Trends Ecol Evol* **28**:156–166. doi:10.1016/J.TREE.2012.10.002
- Wobbrock JO, Findlater L, Gergle D, Higgins JJ. 2011. The Aligned Rank Transform for nonparametric factorial analyses using only ANOVA procedures. *Proceedings of the ACM Conference on Human Factors in Computing Systems* 143–146.
- Yamada D, Ishimoto H, Li X, Kohashi T, Ishikawa Y, Kamikouchi A. 2018. GABAergic local interneurons shape female fruit fly response to mating songs. *J Neurosci* **38**:4329–4347. doi:10.1523/JNEUROSCI.3644-17.2018

- Yasuyama K, Salvaterra PM. 1999. Localization of choline Acetyltransferase-expressing neurons in *Drosophila* nervous system. *Microsc Res Tech* **45**:65–79.
- Yoon J, Matsuo E, Yamada D, Mizuno H, Morimoto T, Miyakawa H, Kinoshita S, Ishimoto H, Kamikouchi A. 2013. Selectivity and plasticity in a sound-evoked male-male interaction in *Drosophila*. *PLoS One* **8**.
doi:10.1371/journal.pone.0074289
- Yorozu S, Wong A, Fischer BJ, Dankert H, Kerman MJ, Azusa K, Ito K, Anderson DJ. 2009. Distinct sensory representations of wind and near-field sound in the *Drosophila* brain. *Nature* **458**:201–5.
- Zhou C, Franconville R, Vaughan AG, Robinett CC, Jayaraman V, Baker BS. 2015. Central neural circuitry mediating courtship song perception in male *Drosophila*. *elife* **4**. doi:10.7554/eLife.08477
- Zhou C, Pan Y, Robinett CC, Meissner GW, Baker BS. 2014. Central brain neurons expressing *doublesex* regulate female receptivity in *Drosophila*. *Neuron* **83**:149–163. doi:10.1016/j.neuron.2014.05.038

謝辞

本論文は、筆者が名古屋大学理学部生命理学科の学部4年生、理学研究科生命理学専攻博士前期課程、博士後期課程の研究成果をまとめたものである。同専攻教授の上川内あづさ教授には、本研究を遂行する機会を与えていただいた。研究の遂行にあたっては、私が名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻脳回路構造学グループに所属してからの長きにわたり、実験計画、研究への取り組み方、論理の組み立て方など丁寧なご指導を頂いた。また、学会参加の機会や学外の研究者の方々と接する機会をたくさん与えていただき、研究を紹介することの難しさや奥深さ、新しい考え方と接したときの興奮を経験させていただいた。ここに深謝の意を表す。

また、同専攻の石川由希講師には学部3年生から現在まで、全方面で大変丁寧な指導をしていただいた。特に、文章の書き方、図表のデザイン、表現の強弱など、研究発表に関して非常に丁寧な指導をしていただいた。研究遂行においても、非常に細かいポイントまで議論させていただいた。石川先生の妥協を許さない姿勢に接し、徹底的に調べることを学んだ。その結果、これまで接したことのない統計解析や数理モデリングを研究に取り入れることができた。学会参加も積極的に促していただき、データのない初年度から、学会でのポスター発表を経験させていただいた。ここに深謝の意を表す。

同専攻の Matthew Paul Su 特任助教には、博士後期課程から現在まで、先生として、先輩として多くの面で助言やサポートをいただいた。研究に関しては統計解析や数理モデリングについて多くの助言をいただいた。論文執筆に関しては、英語表現や使い方について助言をいただいた。また、先輩としての Matthew の友情のおかげで非常に充実した研究生活を送ることができ、ワクワクしながら新しいことに取り組むことができた。ここに深謝の意を表す。

同専攻の田中良弥助教や杏林大学医学部、栗崎健教授には、オナジショウジョウバエの遺伝子組み換え体の作成について助言や支援をいただいた。また、栗崎先生には、論文執筆や研究生活についても助言をいただき、自分の考えを表現する能力が研究者に必要な資質であることを学ばせていただいた。ここに深謝の意を表す。

名古屋大学大学院創薬科学研究科の小坂田文隆准教授、理学研究科の大澤志津江教授、岩見真吾教授には、副指導教員として、定期的に、研究内容につ

いて議論する時間を割いていただいた。この時に、論文構成や実験、解析に関するご助言をいただいた。小坂田先生には、お忙しい中何時間も割いていただき、研究方針、研究生活についても相談させていただいた。岩見先生には統計解析について研究室のみなさんと一緒に議論させていただき、有意義な助言をたくさん頂いた。ここに深謝の意を表す。

名古屋大学理学研究科の小田洋一名誉教授には、副論文執筆において、非常に丁寧な添削、助言をしていただいた。ここに深謝の意を表す。

北海道大学大学院生命科学院の森本菜央助教、ノースカロライナ大学チャペルヒル校の山田大智博士には、分子生物学実験の基礎や、カルシウムイメージングの技術、研究生活について指導をしていただいた。ここに深謝の意を表す。

東北大学生命科学研究科の岩寄航特任助教、パナソニック株式会社の中野智文さんには、階層ベイズモデルの構築と Stan コードのプログラミングについて多大な助言と支援をいただいた。名古屋大学創薬科学研究科の竹内遼介助教には、カルシウムイメージング画像のブレ補正を行う Python プログラムの設計をしていただいた。名古屋大学大学院理学研究科の卒業生である米山祐輔さんには、JO ニューロン群のニューロトレーサー実験をしていただいた。これらの方々に深謝の意を表す。

本研究は、文部科学省 The Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT)からの、上川内あづさ教授に対する、基盤研究 (B) : JP20H03355; 新学術領域研究「共創的コミュニケーションのための言語進化学」: JP20H04997、新学術領域研究「生物ナビゲーションのシステム科学」: JP19H04933、新学術領域研究「脳の若返りによる生涯可塑性誘導— iPlasticity — 臨界期機構の解明と操作」: JP21H05689、石川由希講師に対する、基盤研究 (B) : JP18H02488、新学術領域研究「進化の制約と方向性」: JP20H04865、挑戦的研究 (萌芽) : JP19K22453、Matthew Paul Su 助教に対する、研究活動スタート支援: JP22K15159; 大橋拓朗に対する、特別研究員奨励費: 19J23514、そして、科学技術振興機構からの、上川内あづさ教授に対する、創発的研究支援事業: JPMJFR2147、石川由希講師に対する、戦略的創造研究推進事業: JPMJPR21S2、名古屋大学からの、Matthew Paul Su 助教に対する T-GEEx – 世界的課題を解決する知の「開拓者事業」からの助成を受けた。ここに感謝の意を表す。

また、卓越大学院 トランスフォーマティブ化学生命融合研究大学院プログラムには、国内学会への参加費、旅費の支援をしていただいた。また、院生企画の開催費の支援もしていただいた。ここに感謝の意を表す。

本研究を行うにあたり、技術補佐員の久野美季さん、牧弓さん、石川有紀さんには、キイロショウジョウバエ系統の維持にご協力いただいた。これらの方々を含め、名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻脳回路構造学グループの皆様とともに充実した研究生生活を過ごすことができた。ここに感謝の意を表す。

最後に、研究室に配属されてから現在まで、両親である大橋博信と大橋久美子には、常に、経済的、精神的に支援していただいた。妹も含め、家族全員で応援してくれたからこそ、博士前後課程への進学を決意できた。ここに深謝の意を表す。

以上の方々や、ここに書ききれなかった研究者、先輩、友人など多くの方々との関わりのおかげで成長することができました。これに満足することなく、これからも成長できるよう精進していきます。皆様、本当にありがとうございました。

副論文

Ohashi TS, Ishikawa Y, Awasaki T, Su MP, Kamikouchi A. *in press*. Evolutionary conservation and diversification of auditory neural circuits that process courtship songs in *Drosophila*. *Sci. Rep.*

参考論文

Xu YYJ, Loh YM, Lee T-T, Ohashi TS, Su MP, Kamikouchi A. 2022. Serotonin modulation in the male *Aedes aegypti* ear influences hearing. *Front Physiol* **13**:931567. doi: 10.3389/fphys.2022.931567