

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770066

研究課題名(和文) 嗅覚学習系ライブイメージングによる記憶形成を支える神経回路の同定と解明

研究課題名(英文) Ca<sup>2+</sup> imaging analysis of neural circuitry that supports olfactory memory formation in *Drosophila*

研究代表者

廣井 誠 (Hiroi, Makoto)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：80597831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの記憶形成機構を研究するため、学習が行われている最中の個体の脳の神経活動を観察し、記憶に必要な神経活動の同定を目的とした。

1) 嗅覚記憶中枢約2000個の細胞から同時に細胞レベルで解析できる系を確立し、顕微鏡下で生きたまま匂い学習中の脳内の変化を解析できるようになった。脳内での匂いコーディングや記憶痕跡を解析できると期待できる。2) 複数の匂いの種類に対する神経応答を多変量解析することで、匂いの種類と濃度は異なる様式でコーディングされていることを示唆した。3) 顕微鏡下で匂いと電気ショックの連合学習を行い学習前後で異なる応答パターン(記憶痕跡)をより安定して観察できるようになった。

研究成果の概要(英文)：To identify neural circuitry that support the memory formation in *Drosophila*, I analyzed Ca imaging from the brain during olfactory conditioning. I first established a functional imaging system to monitor neuronal activities in the brain of awake, behaving animals responding to sensory stimuli. The in vivo preparation to be established here should provide a consistent way of analyzing gene function during olfactory learning and memory. The functional imaging allows us to analyze temporal and spatial dynamics of many neurons simultaneously. This is an important feature because populations of the ~2500 intrinsic mushroom body neurons will be largely heterogeneous in function and fate after training. In addition, I adopted principal component analysis on the data that provides the opportunity for more comprehensive and detailed analyses of cell physiology that will expand our understanding of memory storage.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：動物生理・行動

キーワード：ショウジョウバエ 匂い記憶 Caイメージング 記憶痕跡 学習・記憶

## 1. 研究開始当初の背景

外界の異なる化学物質情報がいかに受容されているか、ショウジョウバエを用いて化学感覚を支える神経機構を主に情報の入力の面から研究してきた (Zool. Sci. 2004, Nature 2010, Nat. Neurosci. 2011)。甘味や苦味、フェロモンなどが常に一定の行動を引き出す一方で、同じ入力に対しても経験によって異なる行動を起こす場合も多く目の当たりにした。生物の行動はこのような神経の恒常性と可塑性とのバランスの上に成り立っていることから、その神経基盤を研究することにより、意思決定などの行動の仕組みを問うことができると思い至った。可塑性モデルとして匂い記憶中枢として機能するショウジョウバエのキノコ体神経を実験系として用いる。

匂い分子は触覚にある受容体に補足され、その情報は、触覚葉を経由しキノコ体に送られる。ここで匂いの情報と同時に報酬 (罰) 情報が入力されると、条件付けされた匂い情報はキノコ体細胞に保持される (Davis, 2011 総説)。キノコ体は両側で約 4000 個の細胞で構成されているが、記憶形成を行ったときに記憶細胞となれるのはこの内の一部であると考えられている。しかしこれまでに細胞レベルでの入出力の神経回路は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では 4000 個のキノコ体細胞を中心に、その中から少数の記憶細胞の同定を第一の目的とする。記憶は学習後数分で起こることから、細胞同定には学習をさせながら神経活動を経時的にモニターすれば記憶の最初のフェーズ、短期記憶細胞を見つけることが期待できる。そこで研究期間内には以下の 2 点を明らかにする。

(1) 脳内多細胞同時活動記録のためのカルシウムイメージング系の確立

申請者の研究室で新たに神経細胞のカルシウム濃度による多細胞活動計測系を立ちあげる。計測しながら学習できるよう各種刺激を顕微鏡下で行いつつ、かつ細胞レベルで解析できる安定した記録を行えるように準備する。

(2) ショウジョウバエの短期記憶細胞の同定

キノコ体全体を対象として「誘導される細胞の数」や「活性化されるキノコ体の部位」など詳細を確認する。また電気ショックによる匂い学習にはドーパミンシグナルの関わりが示唆されていることから、ドーパミン神経から誘導されるキノコ体細胞への「入力接続と活性化されるシナプスの位置関係」を比較する。

## 3. 研究の方法

ハエを生きたまま固定し、匂い刺激と電気ショックを組み合わせ、顕微鏡下で匂い学習ができる系を立ち上げ、同一個体で条件付け前後を比較する。個体間のばらつきに寄る影響を最小限に押さえることができる。神経活動の計測するために  $Ca^{2+}$  蛍光レポーター G-CaMP をキノコ体で発現させて、細胞体および軸索束を 4 次元イメージング (立体タイムラプス) で観察することにより匂いコーディングや記憶痕跡を解析することができると考えている。

キノコ体における記憶細胞 (痕跡) を同定・機能解析するために以下の 2 つの研究を計画している。

(1) 安定した観測系を確立するため匂い刺激・電気刺激に対する多細胞の応答性を定量化する。

(2) ショウジョウバエの短期記憶細胞の同定。顕微鏡下で学習をさせながら、学習前後の匂い応答を比較することによって短期の記憶痕跡細胞を同定する。またドーパミン神経と同定された細胞の接続を調べ「入力接続と活性化されるシナプスの位置関係」を比較する。

## 4. 研究成果

(1) 予備実験としてキノコ体軸索束において匂い刺激と電気ショックに対する学習を行い、その前後を比較したところキノコ体の一部で条件付け特異的なシグナルの増加・減衰が観察された (図 1)。この変化は条件付けをしない場合を与えても新規の細胞が活性化することはなかったことから、観察された新規細胞は条件付けに増強される初期の記憶細胞である可能性がある。これらのことは、顕微鏡下での匂い学習による可塑性を軸索やシナプスレベルでトレースできている事を示唆している。

しかしながら軸索部での神経応答パターンは個体毎に大きく異なるため、単純にシナプス活動部位の増減でみるのが難しいという問題点が出てきた。学習前後の変化を定

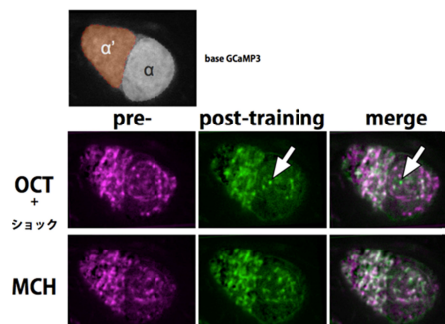
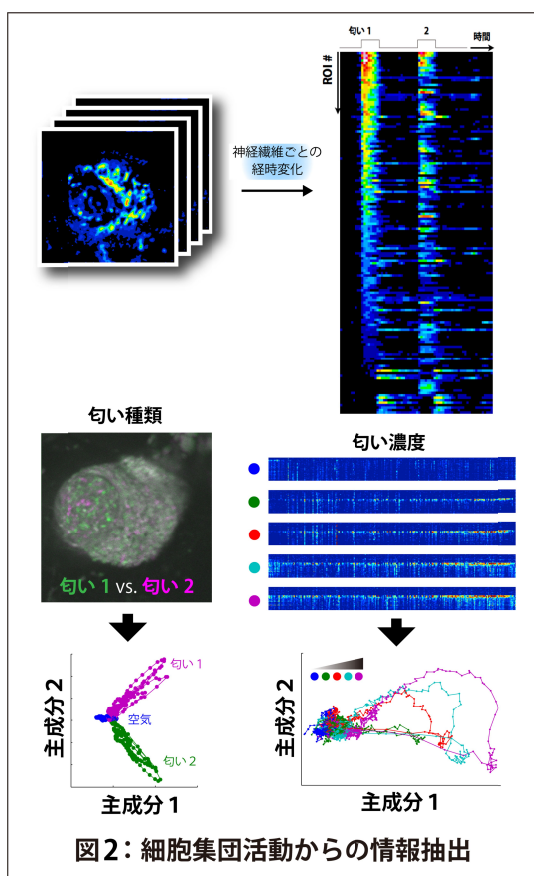


図 1: トレーニングによって新たに発火するようになった神経繊維

量化し一般化するために計算論的モデルの導入を試みた(図2)。

多光子レーザー顕微鏡によるライブイメージングは脳深部での分解能が高く、~1000本の神経細胞からなる繊維束をシナプス単位で観察を可能とした(図1)。その反面、莫大なデータに見出すべき変化が埋もれてしまう危険性が高くなる。統計力学の専門家(増田直紀博士)と協力し、キノコ体細胞の発火がスパースであること利用した(Laurent等, 2007)、人的バイアスのない情報の圧縮を目指し(Hiroi *et al.*, 2013)、現在は応答パターンを特徴付ける少数のシナプス部位の分離に挑戦している。本課題は生物学が直面している「大量のデータは取得できるが処理できない」典型的な問題であり、成果の波及効果は大きい。



(2) ショウジョウバエ嗅覚記憶中枢(キノコ体周辺)でのライブ  $Ca^{2+}$  イメージングを細胞レベルで解析する系を確立

これまで学習初期フェーズにおこる神経活動変化として、キノコ体垂直出力部(lobe)での条件刺激に対する  $Ca^{2+}$  応答上昇が挙げられていたが細胞レベルでの変化は明らかになっていなかった。確立した系では、画像安定化、神経興奮部の分画化を新たに改良することによって、約1000~1400細胞からの軸索繊維が集まっている部分で細胞レベルに近づいた観察が可能となり、キノ

コ体出力部での様々な匂い(匂い物質・濃度)の representation を計測できるようになった(Hiroi *et al.*, 2013、図2)。主成分分析を行った結果、キノコ体垂直出力部において、第1主成分に匂い全般的な神経活性の強さ、第2主成分で匂いの種類が分けられることを見出した(Hiroi *et al.*, 2013、図2)。これはこれら2つの情報が別々の細胞群にコードされていることを示唆する。

### (3) 顕微鏡下での匂い嫌悪学習誘導

電気ショックによる学習前後での匂い応答を比較したところ、新たに発火する部位と発火しなくなる部位が合わさって観察された。これは学習によって新規の神経細胞が発火するという単純なモデルではないことが示唆された。先行研究に示されたように、出力部全体の  $Ca^{2+}$  応答平均を計算すると条件刺激/無条件刺激の応答比が最大1割上昇しており、嫌悪学習は誘導できていると考えられる。各分画の  $Ca^{2+}$  応答を多変量解析(主成分分析)を用いて解析したところ、条件刺激特異的に変化する特徴が観察された。電気ショックのみでの刺激ではこの変化は起きないことから、学習特異的な神経発火変化をとらえていることが示唆された。

今回当初予定していた、キノコ体への入力・出力神経との活動応答の関連性を解析するまでには至らなかった。キノコ体の応答解析対象が~2000個と大きく個々の応答性も確率的な要素が入り従来解析方法では難しく、定量化の確立(研究成果1、およびHiroi *et al.*, 2013)に時間を要したためである。

今後は本研究のキノコ体細胞レベルイメージングを学習直後から24時間ほど観察することにより、短期~長期記憶の遷移が細胞レベルで明らかにできると期待している。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. 廣井誠、大倉正道、中井淳一、増田直紀、橋本浩一、井上輝一、Fiala A、多羽田哲也

Principal component analysis of odor coding at the level of third-order olfactory neurons in *Drosophila*. *Genes to Cells* (査読あり) 18巻12号、1070-1081

DOI: 10.1111/gtc.12094

[学会発表](計5件)

1. 廣井誠、大倉正道、中井淳一、増田直紀、橋本浩一、井上輝一、Fiala A、多羽田哲也  
Principal component analysis of odor coding at the level of third-order olfactory neurons in Drosophila. 2013年12月3日 第36回分子生物学会年会(神戸)
2. 山崎大介、廣井誠、一之瀬敏晴、大坪真樹、多羽田哲也  
Functional analysis of CREB reporter positive mushroom body neurons. 2013年12月4日 第36回分子生物学会年会(神戸)
3. 上岡雄太郎、廣井誠、大倉正道、中井淳一、多羽田哲也  
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. 2013年3月27日 日本生理学会年会(東京)
4. 廣井誠、前山有子、多羽田哲也  
Cellular-resolution imaging of olfactory memory in the Drosophila Mushroom body and its efferent neurones. 2012年12月14日 第35回分子生物学会年会(福岡) 口頭発表
5. 上岡雄太郎、山崎大介、一之瀬敏晴、大坪真樹、廣井誠、多羽田哲也  
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. 2012年12月14日 第35回分子生物学会年会(福岡)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/fly/htmls/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣井 誠(Hiroi, Makoto)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号：80597831

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし