

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20115005

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Molecular basis for structure and function of memory circuits in *Drosophila*研究代表者 多羽田 哲也（Tabata Tetsuya）
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：10183865

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエのキノコ体の内在神経である KCs は 3 次嗅覚神経を形成し匂い記憶形成に機能する。Ca イメージング法を用いて KCs の活動を一細胞レベルでモニターすることによって匂いコーディングを解析し、記憶形成により応答パターンが変化すること（記憶痕跡）を見いだした。また、KCs に発現する遺伝子群の解析を通して、記憶形成に機能する遺伝子群を同定した。さらに CREB を指標として記憶形成に必要な神経群の同定も行った。

研究成果の概要（英文）：

Olfactory information in *Drosophila* is conveyed by projection neurons from olfactory sensory neurons to Kenyon cells (KCs) in the mushroom body. KCs function as coincidence detectors for memory formation, associating odor information with a coincident punishment or reward stimulus. We monitored the neuronal activity after training flies under the microscope with the calcium indicator GCaMP and identified olfactory memory traces in the KCs and in 4th-order neurons that innervate KCs. We also identified the genes required for olfactory memory formation by studying transcriptome of KCs and identified a group of cells required for memory formation by devising a CREB reporter gene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	45,600,000	13,680,000	59,280,000
2009 年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
2010 年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
2011 年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
2012 年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
総計	96,400,000	28,920,000	125,320,000

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：神経生理学・神経科学一般

キーワード：①ショウジョウバエ ②記憶 ③mushroom body ④Ca²⁺イメージング
⑤CREB ⑥記憶痕跡 ⑦匂いコーディング

1. 研究開始当初の背景

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

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)。記憶形成機構を細胞レベルで論じることができるモデル系であるが、KCs の個々の細胞レベルでの匂いコーディングや記憶痕跡についてはわかっていなかった。

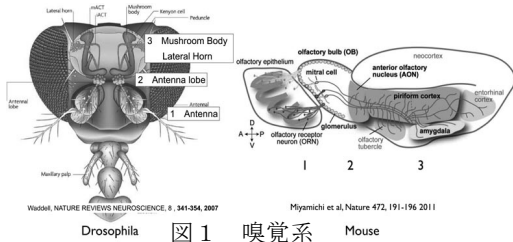


図 1 嗅覚系

2. 研究の目的

(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) 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。

3. 研究の方法

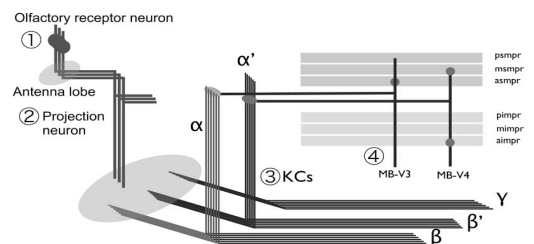


図 2 ショウジョウバエの嗅覚神経回路

(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) 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。

4. 研究成果

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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。

(4) 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。

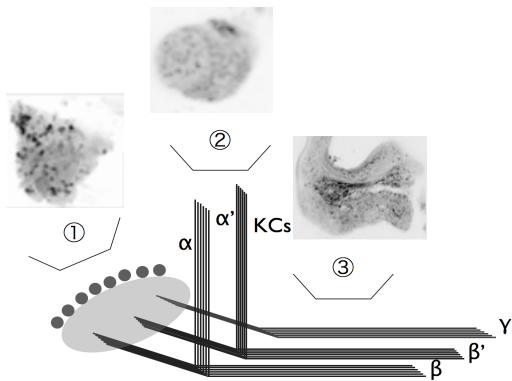


図3 KCsのイメージング

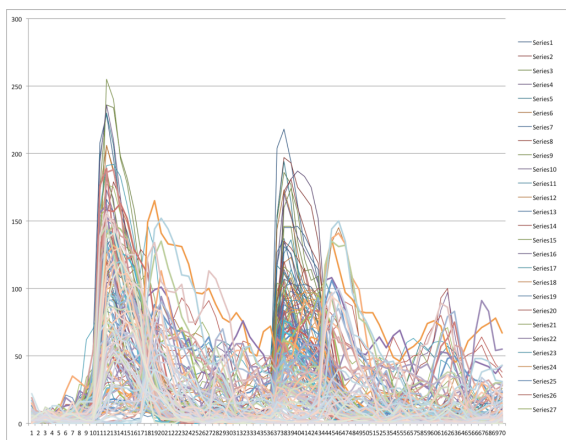


図4 各ROIのCaシグナルの定量化

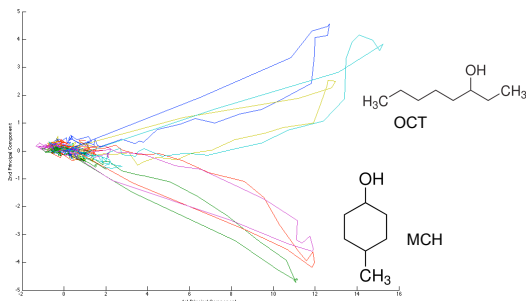


図5 異なる匂い物質に対する応答のPCA分析

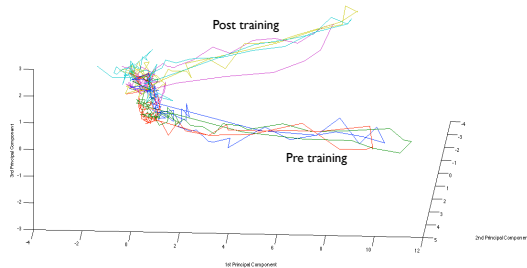


図6 PCAによる記憶痕跡の分析

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3①)。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ことができる(図3②)。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ことが可能である(図3③)。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に、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、標準化した(図4)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5は匂い学習記憶に頻用される2種の異なる匂い分子(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6)。

(5) 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。

(6) 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に反応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。

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 6 件)

- 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 development of 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
- [学会発表] (計 36 件)
- 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回日本ショウジョウバエ研究会 (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”. Today

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

[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

多羽田 哲也 (Tabata Tetsuya)
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
研究者番号：10183865

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

村上 智史 (Murakami Satoshi)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：10463902

八杉 徹雄 (Yasugi Tetsuo)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：90508110