

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14307

研究課題名(和文) 単一脳構造からの多様な機能発現メカニズムの解明

研究課題名(英文) Neural circuits that distinguish memory processes in the fly brain

研究代表者

谷本 拓 (Tanimoto, Hiromu)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70714955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系に存在する多くの神経構造は、多様な情報を処理・出力する。ショウジョウバエの記憶学習の中枢であるキノコ体は、正と負の嗅覚連合記憶を制御する。さらに各記憶について、その形成、保持、読み出しといった異なる素過程を制御する。

本研究では、キノコ体出力神経を単一細胞種レベルで網羅的に標識・操作し、キノコ体の機能多様性を出力神経細胞種の形態と機能の両面から解析した。各細胞におけるシナプスの位置を定量的に可視化するとともに、各素過程における各出力神経の重要性を定量化することで、各素過程における情報出力を担う神経回路構造の特徴を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Fruit flies *Drosophila melanogaster* bidirectionally adapt the response to an odor based on appetitive and aversive memories of sugar reward and electric shock punishment, respectively. Accumulating evidence suggest that the output from a brain structure called the mushroom body (MB) is necessary for acquisition, consolidation, and retrieval of appetitive and aversive memories. However, it is largely unclear how the common MB circuit operates these distinct memory processes. To comprehensively characterize the organization of the MB output, we anatomically identified all the MB output neuron types in *Drosophila*. By measuring the behavioral importance of each output pathway, we found that the different sets of the MB output neurons are recruited in appetitive and aversive memories. Furthermore, our comprehensive behavioral analysis revealed acquisition, consolidation and retrieval of memories are characterized by the combinatorial functions of MB output neurons.

研究分野：神経行動学

キーワード：神経情報処理

1. 研究開始当初の背景

海馬や扁桃体といった脳構造は一般的に、記憶、場所情報、感情など様々な情報を処理し、多様な機能を発現する。このように、中枢神経系に存在する多くの神経構造は、処理する情報の種類が限られた末梢神経と異なり、様々な情報を処理・出力する。単一脳構造の機能の多様性を理解するためのモデルとして、本研究ではショウジョウバエのキノコ体に着目した。

キノコ体は報酬・罰記憶の形成、維持に必要であり、記憶に応じて相反する行動出力を制御している。キノコ体は匂い、砂糖報酬、電気ショック罰を受容し、連合記憶を形成する。キノコ体は複数の領域から構成され、我々の最近の研究により、各領域から脳内の様々な領域に出力神経が投射することが判明した。記憶は、その形成、保持、想起（読み出し）の段階に分解することが可能であり、ここではこれらを記憶の素過程と呼ぶ。これまでの研究により、ショウジョウバエの嗅覚記憶の各素過程には、キノコ体の異なる出力パターンが必要であることが示唆されている (Krashes et al., 2007, *Neruo*; Sejourné et al., 2011, *Nat. Neurosci.*; Plaçais et al., 2013, *Cell Rep.*)。このように、多くの脳構造で、複数の神経細胞が集団で情報をコードしていることが知られており、多様な機能発現を理解するためには出力神経を集団として解析する必要がある。

高次機能を理解するためのアプローチとして、各神経細胞の投射パターンを詳細に記述し、その活動を人工的に操作した場合の行動変化を観察する手法の有効性が示されてきた。しかし技術的困難さから、そのような手法の適用は個々の神経細胞種に限られ、断片的な知識しか得られていない。

2. 研究の目的

本研究は、キノコ体の機能多様性を、出力神経細胞種の形態と機能の両面から解明する。解剖学と行動における機能の両面から網羅的に解析することで、記憶中枢からの「機能コード」を理解することを目的とする。

(1) キノコ体出力回路地図の作製

各神経細胞種を標識、さらにシナプスマーカーなどを発現させ、細胞構造を異なる指標で網羅的に定量化する。細胞種をクラスター解析することにより、キノコ体からの出力の構造的な特徴を定量的に理解する。

(2) 各出力神経必要性パターン解析

報酬、忌避記憶の形成、保持、読み出しにおける各細胞種の阻害効果を定量化することで、「機能コード」を定量化する。素過程間で機能コードによるクラスター解析を行い、機能発現の多様性を定量化する。

(3) 統合的解析

上記で得られた情報から、機能コードを出力地図に投射して可視化する。この解析により各素過程において、どこからどこへ情報が出力されるのが肝要であるかを回路地図上で比較する。

3. 研究の方法

ショウジョウバエは匂い刺激と砂糖報酬（あるいは電気ショック罰）を連合させて嗅覚報酬記憶（あるいは嗅覚忌避記憶）を形成することができる（図1）。この実験系は、同じ匂いを使って相反する連合記憶を形成させることができるだけでなく、遺伝学的手法により、各神経細胞種を記憶の形成、保持、読み出しの各素過程特異的に阻害することができる。

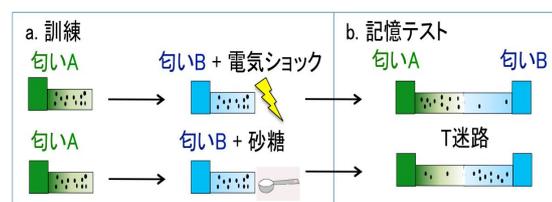


図1 ショウジョウバエにおける嗅覚連合学習

a. 訓練：チューブ内のハエに対し、嗅覚刺激と電気ショックまたは砂糖を対提示する。
b. 記憶テスト：T迷路を使い、連合した匂いに対する選択行動により連合記憶を測定する。

(1) 我々はアメリカ Janelia Research Campus との共同研究により、大規模データベースを活用して、キノコ体から全部で約 20 種類の出力神経が投射することを明らかにした。さらに、Split GAL4 という新しい手法を適用することにより、各神経細胞種を個別的に標識・操作することのできる遺伝学的リソースを確立した (Aso et al., 2014, *eLife*)。本研究ではこの Split GAL4 リソースを用いて、各出力神経に前シナプスマーカー、後シナプスマーカーを発現させることにより、各細胞におけるシナプスの位置を定量的に可視化した。

さらに詳細な視点で、各細胞の構造を基に解析を行う。先行研究により、樹状突起・軸索終末部位の形態（枝分かれ密度、各枝の長さなど）と、その神経細胞が情報処理において担う役割（同時発火検出、スパイクタイミング検出など）に相関が見られることが示されている (Cuntzet et al., 2010, *PLoS Comput. Biol.* など)。このような各細胞種の複数の構造的な特徴を、カーネル密度推定法などを用い定量化し、クラスター解析を行った。

(2) キノコ体の異なる記憶の素過程における必要性パターンを調べるために、嗅覚報酬・嗅覚罰記憶の各素過程（形成、保持、読み出し）における各出力神経の必要性を定量的に解析した。

した。約 20 種類の出力神経について、その神経伝達を報酬学習、忌避学習の各素過程特異的に阻害し、記憶学習実験を行った。

具体的には上記の split GAL4 系統を用いて、高温時のみ一時的に神経阻害を行うことのできる *shibire[ts1]* を発現させ (Kitamoto, 2001, *J Neurobiol.*) 温度を変化させながら記憶学習実験を行うことで、各神経細胞種を各素過程特異的に阻害する。対照群としては、同じ系統を用いて、訓練、記憶保持、読み出しを全て低温で行った際の記憶スコアを用いる。これらを相対的に比較することにより、完全に同じ遺伝的バックグラウンドの実験動物に対し、神経阻害による記憶学習行動への効果を定量することができる。

このプロジェクトの遂行には、網羅的な遺伝学的リソースと共に大量の行動実験が必要となる。期間内の実験を遂行するため、我々は匂い記憶の定量を自動で行う実験システムを構築した (Ichinose and Tanimoto 2016, *Proc Japan Acad B*)。

このような実験系で出力神経の阻害実験を行い、それぞれの記憶の素過程に必要なキノコ体出力を出力神経のパターン (機能コード) を同定した。この機能コードを用いて、各機能をクラスター解析および主成分分析を行った。クラスター解析により機能ごとの出力多様性を定量することができ、主成分分析により、各機能の違いを分ける決定因子を推定することができる。この結果、報酬と罰記憶に関する素過程において、キノコ体の出力が最も大きく異なることが明らかになった。これにより、細胞種レベルでの必要性という観点から、キノコ体の機能多様性を定量的に理解することに成功した初めての研究例である。

(3) 統合的解析

(1) により得た各出力神経細胞種の形態的特徴と、(2) により得た記憶の各素過程の機能コードという二つの情報を統合し、より包括的な理解を試みた。具体的には、各素過程の機能コードを実際の顕微鏡画像上にプロットし、重要な出力神経を実際の脳の三次元画像上に重ね合わせることで、その出力先、放出される神経伝達物質を可視化した。これにより、異なる記憶の各素過程において、キノコ体から出力される情報の様式を画像上で比較検討することができる。

4. 研究成果

(1) 予備データにより、ほとんどの出力神経は脳内の非常に限られた領域に投射していることが分かっていた。ここに本研究で得た神経伝達物質のデータを加えて、各領域からの情報出力の様式を神経細胞の構造の面から解析した。複数の細胞種について、その三次元画像を実際の脳の三次元顕微鏡画像上に数学的に重ね合わせることで、同一画像上で比較した。さらに、これを各神経細胞種

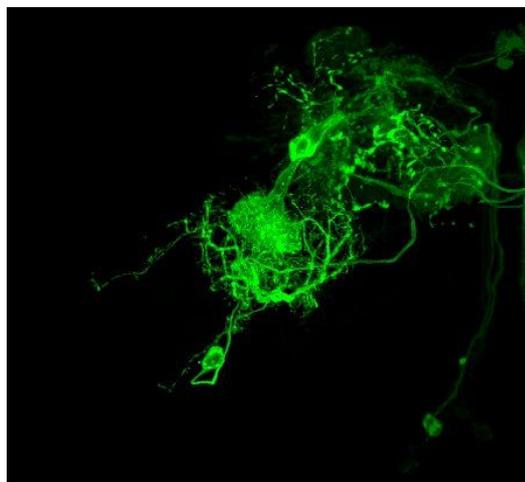
に対して網羅的に行うことで、キノコ体内の各領域から、キノコ体外のどの領域へ出力されているのかを定量的に記述した (Aso et al., 2014, *eLife*)。

また、各出力神経の細胞体はそれぞれ物理的に離れた細胞クラスターに属することが予備データより判明している。本研究の各細胞種構造のクラスター解析により、細胞クラスターごとの投射パターン、神経構造の特徴を定量的に比較することが可能となった。

(2) 嗅覚報酬記憶と嗅覚罰記憶の形成・保持・読み出しのそれぞれの段階において各出力神経細胞種の阻害による記憶障害の度合いを定量したところ、各素過程には複数の異なる出力神経が必要であり、特に報酬記憶と罰記憶の間で大きく異なる出力神経セットが必要であることが示唆された。

また、各出力神経の記憶に対する阻害効果から定量した各素過程における必要性スコアをクラスター解析することで、報酬記憶と罰記憶には互いに異なるキノコ体出力神経回路が必要であり、記憶保持には形成と読み出しとは異なる回路が必要であることが明らかとなった。

(3) 形態解析から明らかにしたキノコ体からの出力神経構造の特徴と、記憶学習における機能解析結果とを比較することで、統合的な解析を行った。先行研究により、報酬記憶と罰記憶には異なるセットのドーパミン神経が必要であることが示されてきた。本研究ではこれに加えて、記憶の各素過程における情報出力を同一脳画像上で可視化したところ、出力神経レベルでもこの二つの記憶が異なる神経回路で処理されていることを見出した (図 2)。



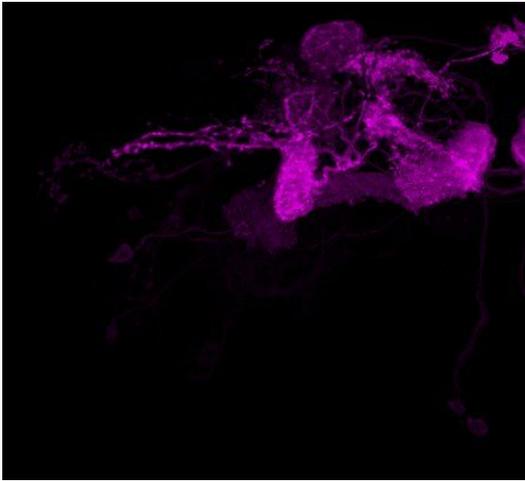


図 2 各記憶学習に必要なキノコ体出力神経回路

(上) 報酬記憶に必要な神経回路; (下) 罰記憶に必要な神経回路。報酬記憶と罰記憶は互いに異なる神経回路で処理される。

本研究により、これらの出力神経セットはそれぞれ脳の異なる領域に投射していることが明らかになり、報酬記憶と罰記憶を処理する脳領域を区分することが可能となった。今後は本研究成果を発展させ、報酬・忌避記憶の形成、保持、読み出しという時間の流れにおいて、情報出力の様式がどのように変化するかを推定するモデルを構築する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)すべて査読有り

Yamagata N, Hiroi M, Kondo S, Abe A, Tanimoto H. (2016) Suppression of dopamine neurons mediates reward. *PLoS Biol* 14(12):e1002586.

DOI: 10.1371/journal.pbio.1002586

Ichinose T, Tanimoto H. (2016) Dynamics of memory-guided choice behavior in *Drosophila*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 92 (8) 346-357.

DOI: 10.2183/pjab.92.346

Vogt K, Aso Y, Hige T, Knapek S, Ichinose T, Friedrich AB, Turner GC, Rubin GM, Tanimoto H. (2016) Direct neural pathways convey distinct visual information to *Drosophila* mushroom bodies. *eLife* 5:e14009.

DOI: 10.7554/eLife.14009

Ichinose T, Aso Y, Yamagata N, Abe A, Rubin GM, Tanimoto H. (2015) Reward signal in a recurrent circuit drives appetitive long-term memory formation. *eLife* 4:e10719.

DOI: 10.7554/eLife.10719

[学会発表](計8件)

Tanimoto H. Visualization and

neuronal control of memory-guided choice behaviour. *Janelia Spring Conference "Structure and Function of the Insect Mushroom Body"*, Virginia, USA (2017/3/5~8)

Tanimoto H. Neural pathways for the formation, consolidation, and retrieval of memory in the fly brain. *The 6th International Symposium on "Biology of Decision Making"*, Paris, France (2016/5/25~27)

菅野舞、市之瀬敏晴、谷本拓. 嗅覚連合記憶の異なる素過程におけるキノコ体出力パターンの解析. 第38回日本分子生物学会、神戸(2016/12/1~4)

Tanimoto H. Dopamine circuits and memory formation. *14th European Symposium for Insect Taste and Olfaction*, Cagliari, Italy (2015/9/20~25)

Tanimoto H. Mapping neural circuits for memory formation. *The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society*, Kobe, Japan (2015/7/30)

Tanimoto H. Mapping circuits for memory formation. *Tohoku Forum for Creativity Thematic Program "Frontiers of Brain Science: Symposium on Tools and Technologies"*, Sendai, Japan (2015/7/25~27)

Tanimoto H. Mushroom body reward circuits. *The EMBO-Kavli meeting "Neural circuits and behaviour of *Drosophila*"*, Crete, Greece (2015/7/5~9)

Tanimoto H. Dopamine circuits for memory formation. *3rd Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference*, Beijing, China (2015/5/11~14)

[その他]

ホームページ等(プレスリリース)

ドーパミン神経の抑制による報酬シグナルの発見-報酬伝達におけるドーパミンの機能多様性-

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2017/01/press20170104-03.html>

https://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press20170104_03web.pdf

脳内の報酬のフィードバックが記憶を長期化する

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2015/11/press20151117-03.html>

http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press_20151117_03web.pdf

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷本 拓 (TANIMOTO, Hiromu)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：70714955

(4)研究協力者

山方 恒宏 (YAMAGATA, Nobuhiro)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：50716248

市之瀬 敏晴 (ICHINOSE, Toshiharu)
東北大学・生命科学研究科・研究支援者
研究者番号：20774748