

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月27日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14331

研究課題名(和文)単離培養脳を用いた報酬記憶形成の全脳イメージング

研究課題名(英文)Whole-brain imaging for olfactory appetitive memory formation in isolated *Drosophila* brains.

研究代表者

鈴木 恵雅 (SUZUKI, Ema)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・研究員

研究者番号：70723675

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)：ショウジョウバエの単離脳に対し、匂い中枢への電気刺激(匂い刺激)と、チャンネルロドプシンを発現した甘味中枢への光刺激(甘味刺激)を同時に行うと、報酬学習後の匂い刺激に対して吻伸展ニューロンの応答が上昇し、単離脳で報酬記憶が形成されるシステムを考案した。また、この単離脳には空腹や満腹情報も保存されていた。空腹や満腹は甘味に対する学習・記憶に影響を与える。そこで、空腹・満腹脳に対し報酬学習が可能か否かを検討した結果、空腹脳でのみ報酬学習が成立し、単離脳が真に報酬記憶を形成し得たことを証明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コンパクトで光透過性が高いショウジョウバエの脳は、全脳イメージング解析が可能である。薬理操作が容易な同一の脳標本で、報酬記憶の形成過程を全脳レベルで連続可視化解析を可能にした当研究は、ショウジョウバエの多大な遺伝学的データを活用することで、学習記憶ネットワークの動作原理を解明する為の技術基盤の確立に一役買う点で意義が大きい。また約1000億のヒトの脳の神経細胞と比較し約10万のショウジョウバエはこのコンパクトな脳で多様な学習を達成している。当該研究で構築した報酬記憶形成モデルをプロトタイプとして、限られた素子で多様な学習を可能とする人工知能の解析に向けても手がかりの一つになり得ると期待出来る。

研究成果の概要(英文)：We developed a model of olfactory appetitive learning in isolated *Drosophila* brains where we simultaneously stimulated olfactory center and sweetness center. Significantly, olfactory center stimulation-evoked Ca²⁺ responses in the motor neuron involved in the proboscis extension response (PER) were increased after simultaneous stimulation. Notably, appetitive learning is promoted in the fasting status, while it is suppressed in the satiated status. Consistently, simultaneous stimulation failed to produce enhanced olfactory center stimulation-evoked Ca²⁺ responses in the motor neuron in the brain from satiated flies, while it produced enhanced responses in the brain from starved flies. These results suggest that appetitive information in the isolated brain and affect association of two sensory pathways. Our system is useful to investigate the neural circuits and plasticity underlying olfactory appetitive learning.

研究分野：神経科学

キーワード：ショウジョウバエ カルシウムイメージング 単離培養脳 報酬学習 吻伸展ニューロン パーチャル報酬記憶の形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエの学習記憶の生理学的解析は不十分であり、多大な遺伝学的データを十分に活用できていないと言いがたい。匂いと電気ショックによる嫌悪性連合学習を行ったショウジョウバエの記憶中枢で、匂いに対する Ca^{2+} 応答が上昇することを明らかにした知見があるが、これは学習群 vs 非学習群の比較であり、顕微鏡下で、同一個体で記憶痕跡が形成される過程を連続して観察することは困難であった。そこで、当研究室では、ショウジョウバエの脳を単離培養し、脳神経の活動を Ca^{2+} 指示蛍光物質を用いて観察することで、嫌悪記憶に相関するシナプス可塑性の形成過程を連続観察できる解析系を確立してきた。しかし嫌悪性連合学習は匂いからの忌避行動で学習の成立が判断されるため、観察された可塑的变化が真に記憶痕跡が否かを顕微鏡下の固定標本から判断することは難しい。一方、匂いと砂糖水による報酬性連合学習も、匂いに近づくアプローチ行動で学習成立を判断するが、砂糖水を摂取するために口吻を伸ばす動作（吻伸展反射）が現れるか否かで、固定標本でも、学習成立の判断が出来ると考えた。そこで当該研究は、嫌悪性連合学習に替わり、アプローチ行動の代わりに新たな指標による報酬性連合学習法を考案し、さらにそれを単離培養脳で再現することで、同一標本で学習前後（記憶の形成-保持-読み出し）の神経活動の測定を可能にする新たなシステムの構築を試みることにした。

2. 研究の目的

ショウジョウバエの脳は、縦 0.3 mm × 横 0.6 mm、厚みは僅か 200 μ m と非常にコンパクトなため、顕微鏡下で一視野内に脳全体を俯瞰出来る。これに加えて光透過性が高いため、脳標本の表面から底面までを透過観察することも可能である。また単離培養脳であれば外界からの感覚入力によるノイズも少なく精度の高い同定が期待される。全脳解析が出来れば、神経間、脳領域間での繋がりを明瞭にし、高次脳機能を担う神経ネットワークの全容と活性動態を見出すことが出来る。背景に示した通り、アプローチ行動の代わりに口吻を伸ばす動作を用いた報酬性連合学習法の考案により、固定下のショウジョウバエでも学習成立の判断が出来るため脳内イメージング解析が可能である。また近年、吻伸展に関わるニューロンがいくつか同定されている。従って、学習後の吻伸展ニューロンの神経活動から *in vivo*、*in vitro* いずれでも顕微鏡下で学習成立が確認出来る。当該研究は、吻伸展ニューロンの神経活動を指標に、同一の単離培養脳標本で報酬記憶が形成される過程を全脳レベルで連続可視化し、報酬記憶の形成を担う神経ネットワークを明らかにするシステムの構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 吻伸展反射を用いた新たな報酬性連合学習の検討

吻伸展反射を用いた報酬性連合学習は成立するか否かを調べるために、匂いを呈示中に砂糖水を含ませた濾紙を口吻に近づけることで条件付けを行った(図1)。両者の報酬関係を学ばせた後、報酬記憶を覚えているかどうかの想起テストでは、再度同じ匂いを呈示し、その間の吻伸展反射の回数を測定することで、新たな報酬性連合学習になり得るかどうかを検討した。

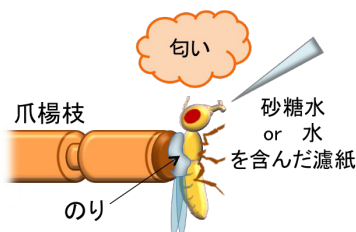


図1 *in vivo* 報酬性連合学習の方法。匂いと甘味の連合グループは、匂い呈示中に、砂糖水を含んだ濾紙を口吻に近づけることで、匂いと砂糖水の報酬関係を学ばせた。非連合グループは、水を含んだ濾紙を使用した。

(2) 単離脳における報酬性連合学習の再現の検討

ショウジョウバエから単離した脳は、顕微鏡下で、組織液を模した緩衝液を用いて長時間培養した。匂い刺激は匂い中枢をガラス電極により電気刺激することで、甘味刺激はチャンネルロドプシンを発現した甘味感覚ニューロンを青色光刺激することで再現した(図2)。条件付けは、人為的な匂い刺激と甘味刺激を同時に行った。単離脳では、学習成立の指標となる吻伸展反射は観察出来ないため、報酬記憶テストは、条件付け前後の匂い刺激に対する吻伸展ニューロンの神経応答の変化をカルシウムイメージングで検証し、報酬記憶の形成の有無を検討した。

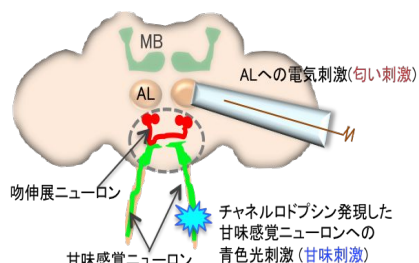


図2 *in vitro* 報酬性連合学習の方法。人為的な匂い情報の入力は匂い中枢 (AL) への電気刺激で、人為的な甘味情報の入力はチャンネルロドプシンを発現させた甘味感覚ニューロンへの光刺激で再現し同時刺激により単離脳に匂いと甘味情報を連合させ報酬関係を学ばせた。想起テストでは、 Ca^{2+} 指示蛍光物質を発現させた吻伸展ニューロンの条件付け前後の匂いに対するカルシウム応答の変化を観察した。MB: 記憶中枢。

4. 研究成果

(1) 吻伸展反射を用いた新たな *in vivo* 報酬性連合学習の検討

匂い呈示と口吻への甘味呈示を同時に行ったショウジョウバエは、匂いあるいは甘味のみ呈示されたグループより吻伸展応答率が高く、匂いに対して報酬があることを予測できており、アプローチ行動の代わりに吻伸展反射を用いることで、固定標本でも学習成立の判断が可能な報酬性連合学習法を新たに考案することが出来た。

(2) 単離脳における報酬性連合学習の再現の検討

人為的な匂いと甘味情報の入力方法

単離脳では、匂い中枢への電気刺激によって人為的な匂い情報の入力が可能であることが既に確立している。そこでまず、人為的な甘味情報の入力方法を検討するため、チャンネルロドプシンを吻に局在する甘味感覚ニューロンに発現させ、匂い呈示中に光活性を行うことで(1)の報酬性連合学習が成立出来るかを調べた。その結果、同時刺激グループは、匂いあるいは光刺激による甘味のみを単独刺激グループに比べて顕著に高い吻伸展応答率を示し、匂い刺激と甘味感覚ニューロン光刺激による報酬性連合学習が成立した。この結果より、チャンネルロドプシンを発現した甘味感覚ニューロン(ChR-甘味感覚ニューロン)への光刺激が、単離脳での人為的な甘味情報の入力方法となり得ることがわかった。

報酬性連合学習成立の判断方法

単離脳では、吻伸展そのものが観察出来ない。そこで次に、単離脳において吻伸展を再現するため、吻伸展反射に関与するニューロン(吻伸展ニューロン)にCa²⁺指示蛍光物質を発現させ、ChR-甘味感覚ニューロンを光活性した時のカルシウム応答を検証した。その結果、人為的な甘味情報の入力でも吻伸展ニューロンの神経応答が顕著に確認出来たことから、前述のと組み合わせることで、単離脳でも、吻伸展を学習成立の指標とする報酬性連合学習が成立すると示唆された。

プロトコルの作成

そこで、すでに確立済みの匂い中枢への電気刺激方法を取り入れ、匂い中枢と甘味中枢への同時刺激により人為的な匂いと甘味情報の連合を試みた。学習過程の吻伸展ニューロンの神経活動を記録した結果、条件付け後の匂い刺激に対してカルシウム応答が上昇したことから、単離脳で報酬記憶が形成されたと示唆するデータを得ることができた(図3)。そこで、申請書に記した通り、単離脳で報酬性連合学習が形成されたという裏付けとして、頭に小さな観察窓を開けた状態のバエを顕微鏡下に固定し、報酬性連合学習後に吻伸展ニューロンが活性化するかどうかを脳内イメージングする予定だったが、脳内の吻伸展ニューロンの位置と、脳の組織構造が原因で、2光子顕微鏡を用いても観察が困難であった。そのため、申請時とは異なる方法で、単離脳で報酬性連合学習が形成される裏付けを取ることに変更した。空腹や満腹は甘味に対する吻伸展や学習・記憶に影響を与える。そこで、空腹あるいは満腹個体から脳を単離し、甘味中枢刺激時の吻伸展ニューロン応答を観察したところ、空腹脳のみ応答し、単離脳に空腹・満腹情報が保存されていることが示唆された。そこで、空腹・満腹脳に対し、報酬性連合学習が形成されるかについて検証した結果、空腹脳でのみ報酬性連合学習が成立し、単離脳が真に報酬記憶を形成し得たことを証明することができた。

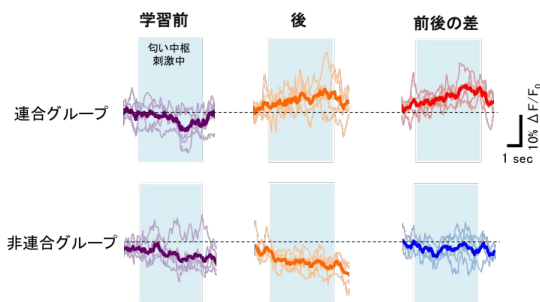


図3 単離脳における報酬性連合学習前後の吻伸展ニューロン応答。人為的な匂いと甘味情報を同時入力した連合グループは、非連合グループと比べ、条件付け後の匂い刺激に対して吻伸展ニューロンのカルシウム応答が上昇した。

以上より、同一標本で、報酬性連合学習前後の神経活動の測定が可能となる新たなシステムを考案することに成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Emma Suzuki-Sawano, Kohei Ueno, Shintaro Naganos, Yoshihiro Sawano, Junjiro Horiuchi, Minoru Saitoe, A drosophila ex vivo model of olfactory appetitive learning., Scientific Reports, 7: 17725 (2017), 査読有.

doi: 10.1038/s41598-017-17955-1.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当者なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：上野 耕平

ローマ字氏名：(UENO, Kohei)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。