

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17681

研究課題名(和文) 嗅覚記憶中枢キノコ体の複数出力域の網羅的同時観測による匂い地図作成と可塑性の解明

研究課題名(英文) Comprehensive mapping of odor-evoked activity underlying presynaptic plasticity in compartmentalized axonal lobes of Drosophila mushroom body

研究代表者

阿部 崇志 (Abe, Takashi)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：70756824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエのキノコ体は、忌避/報酬刺激と嗅覚刺激の連合学習による記憶形成の場である。キノコ体神経には機能が異なるサブタイプが存在し、各々の軸索束は投射先別に複数の出力領域に区画化され制御をうけると考えられている。2光子顕微鏡を用い、サブタイプを分離した軸索束の複数出力領域における学習前の匂い応答をカルシウムイメージングし、可塑性解析の基盤となる神経科学的回路地図を構築することを計画した。発現特異性の高いキノコ体神経のsplit-Gal4系統と、それらの出力領域を区画化標識するために適したLexA系統の組み合わせを見出し、匂い刺激へのカルシウム応答をサブタイプ毎に記録して解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キノコ体のポストシナプス側であるMBON神経においては、網羅的に単一神経レベルの解像度で匂い応答が調べられ、可塑的变化が顕微鏡下で示された。一方、プレシナプス側であるKCsにも可視的に検出可能なレベルの可塑性があるのかどうかは未だはっきりしていない。これには、それぞれのKCサブタイプの区画化された出力域においてどのような活動や制御があるのかについて多くが未知であり、変化の検出の前提となる生理学的知見が不足していることが一因として考えられる。サブタイプを分離した発現系統を用いることで、可視的に、時空間的分解能が高い回路地図の構築が可能となり、匂い記憶の形成メカニズムの理解に近づけると考える。

研究成果の概要(英文)：In Drosophila, the mushroom body (MB) has been studied for its essential role in olfactory associative memory. It has been known that Kenyon cells (KCs), the 3rd-ordered intrinsic neurons, are anatomically subdivided into distinct 7 subtypes and each type seems to play different functional role during the memory. Their output sites, called  $m$  and  $d$ ,  $ap$  and  $s$ , and  $p$ ,  $s$ , and  $c$  lobes, are compartmentalized into 15 sub-regions by their synaptic partners, MBONs and DANs. Moreover, post-synaptic plasticity has been shown in several types of MBONs by 2-photon calcium imaging with single cell level resolution.

However, it is not clear whether such plasticity is also detectable in the pre-synaptic sites of MB, the axonal lobes of KCs. To address this question, we first aimed to describe dynamics of the innate odor responses of the 7 KC subtypes using cell type specific split-gal4 drivers, combining with the *lexA*-based compartment labeling in their output regions.

研究分野：神経生物学

キーワード：2光子顕微鏡カルシウムイメージング 嗅覚記憶学習 ショウジョウバエ キノコ体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエの嗅覚系3次神経であるキノコ体(MB)は、脊椎動物における海馬や扁桃体のように、連合学習による記憶形成が起こる脳領域と考えられており、匂いによる刺激と忌避性または誘引性の刺激を連合させる行動学的実験系が確立している。従来、MBを構成するケニオン細胞(KCs)は解剖学的に3つのタイプ(、' / '、 / MB神経)に分類され、各々が記憶の獲得、固定、想起の各段階で固有の機能を持つことが示されてきた。実験的には、各タイプの神経群全体の出力抑制や強制活性化による遺伝学的摂動が記憶過程のどの段階に影響するのかに着目し、神経回路の知見が多く蓄積されてきた。

その後、米JaneliaのAso、Rubinらによって公開されたsplit-GAL4系統では、より細胞特異性が高く、KCsの古典的3タイプをさらに7つのサブタイプに細分化してラベル可能になった(1)。またKCsの軸索領域は、投射先であるMBON神経やドーパミン神経によって区画化され、局所的な調節を受けることが明らかになった(2,3)。MBにおけるポストシナプスであるMBON神経においては、単一神経レベルの解像度で網羅的に神経活動を調べた報告がHigeらによってなされ(4)、他にもいくつかのMBON神経において可塑的な活動の変化が顕微鏡下で示されている(5,6)。

2. 研究の目的

しかしながら、プレシナプスであるKCs側にも可視的に検出可能なレベルの可塑性があるのかどうかに関しては、未だ明快な報告がなされていない。これは、細分化されたサブタイプのKCsの各々の出力領域においてはどのような活動が起こり、制御を受けるか、またその程度や様式の差異の有無についてほとんどが未知であり、学習、記憶にともなう可塑的变化検出の前提となる基本的な生理学的知見が不足していることがその要因の一つとして考えられる。

片半球あたりの細胞数が34個であるMBONに比べ、KCsは約2,000個と多数であるが、軸索領域はタイプごとにまとまり束状化し、神経群としての匂い応答は疎らであることが知られている(図1左)。このため全神経イメージングが可能であると考えた。先述の、サブタイプを分離した特異性の高い発現システムを用いることで、これまで蓄積されてきた行動遺伝学的な知見に、可視的でより時空間的分解能が高い情報を統合し、機能的な神経回路地図を構築していくことで、匂い記憶の形成メカニズムを理解することを目指した。

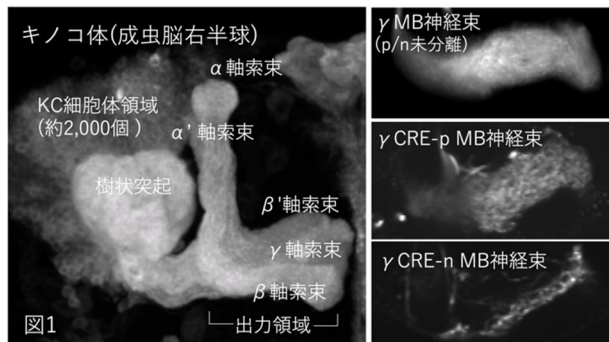


図1

3. 研究の方法

所属研究室では、匂い刺激の詳細な制御が可能な2光子顕微鏡システムが構築され稼働している。本研究の最終的な目標は、学習前後の同一個体のMBの区画化された複数の出力領域での活動を同時にイメージングし、記憶形成におけるMB神経回路のプレシナプス可塑性を検証することである。その前段階として、細胞内カルシウムレベルのインジケータである緑色蛍光タンパク質GCaMP6fを用い、匂い刺激のみの神経活動の様式を観察する。その際、区画化される出力領域を赤色蛍光タンパク質で局所的に標識することで区別し、条件付け学習前の基本的な匂い応答プロファイル(応答強度や領域の違い、匂い情報の分離度合い等)を、サブタイプ毎に記述することを計画した。具体的には、MBKCsの各サブタイプに対応するSplit-Gal4ドライバ系統と、それらにおける区画化された出力領域のうちの、1つの区画にのみ接続する、あるいは1区画あいたを空けることで連続しない2領域以上の領域に接続するようなMBON神経やドーパミン神経をラベルするLexAドライバ系統をデータベースから探索した。条件に適している可能性のある系統の選択後、GCaMP6f, tdTomatoなどの蛍光タンパク質遺伝子の載せ替えを行い、それらの交配により多重組替体を作成し、区画化標識された出力領域を各KCsサブタイプにおいて観察することとした(図2)。

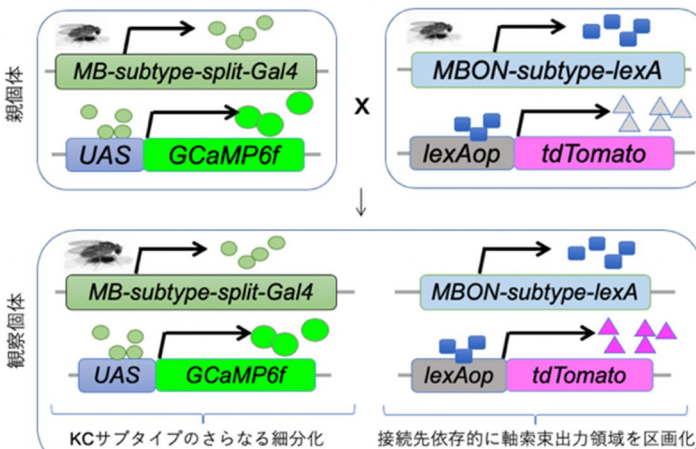


図2

#### 4. 研究成果

免疫組織染色や、2光子顕微鏡による事前実験の結果、実際の解析に使用可能な発現強度や特異性を有する系統に関して、表1に示すような組み合わせが得られた(表1および図3)。また神経のサブタイプに関して、解剖学的には -main( -m)および -dorsal( -d)神経が報告されていたが、研究の過程で、これらがそれぞれ所属研究室において記憶学習時に行動学的に機能の異なる KCs のサブタイプとして新たに同定した、CREp、CREn と対応することが明らかとなった(図1右パネル)。

さらに CREp、CREn は好悪の価値情報(valence)をコードしていることも明らかになり(7)、匂い刺激の種類によって、匂い情報の処理様式に違いがあるのかどうかを明らかにしておくことは、忌避あるいは誘引といった異なる記憶形成機構それぞれにおいて可塑性を検証する際に有用

であると考えたため、刺激に用いる匂いの種類を増やすこととした。これに伴い、同研究室所属の廣井助教の協力のもと、種々の匂いの On/Off に用いる電磁バルブチャンネルの増設、流路の改良、流量のパラメータの更新がなされ、濃度を变化させた連続した刺激実験でも、安定した流量の匂い刺激を呈示可能な実験系の構築が実現した(図4)。

現在までに、KCs 全体をラベルする系統において、匂い呈示時に -mの領域ではカルシウムレベルが上昇するのに対し、-dの領域では一過的に低下した後に上昇することを見出している(図5)。その後、KCのうち -m に対応する系統として CREp-split-Gal4 系統を、-d をラベルする系統としては MB607B-split-Gal4 を用い、それぞれにおいて区画化された出力領域を標識した状態で匂い応答を記録した。CRE-p の出力領域において、異なる匂い刺激の情報が出力領域の区画の違いにかかわらず分離されていることや、空腹などの観察個体の内的状態の違いが、出力領域間の相対的な神経活動の大きさに影響を与えることを示唆する結果が得られている(未発表データ)。その他、-d においても固有の応答様式が観察されており、これらの成果をまとめ論文として投稿すべく、現在解析を進めている。

KC-Subtype	splitGal4/Gal4	Reference lexA	Labelled compartment
$\gamma$ main	$\gamma$ CREp, MB108B	R30E11	$\gamma$ 1,2,3,4,5
$\gamma$ dorsal	$\gamma$ CREn, MB607B	R30E11	$\gamma$ 1,2,3,4,5
$\alpha'$ anteroposterior	MB463B, NP6522	R20G03	$\alpha'$ 1,2,3
$\beta'$ anteroposterior	MB463B, NP6522	R12C11	$\beta'$ 2
$\alpha'$ middle	MB418B	R20G03	$\alpha'$ 1,2,3
$\beta'$ middle	MB418B	R12C01	$\beta'$ 2
$\alpha$ posterior	MB371B, NP3208	R20G03	$\alpha$ 1,2,3
$\beta$ posterior	MB371B, NP3208	R12C11	$\beta$ 1,2
$\alpha$ surface	MB477B, MB185	50A05, R20G03	$\alpha$ 1,2,3
$\beta$ surface	MB477B, MB185	R12C11	$\beta$ 1,2
$\alpha$ core	MB594B	50A05, R20G03	$\alpha$ 1,2,3
$\beta$ core	MB594B	R12C11	$\beta$ 1,2

表1. サブタイプを分離したイメージングに使用可能な発現レベルであることが明らかになったGal4系統と、区画化される出力域識別のための赤色蛍光Referenceタンパク質を発現させるためのLexA系統の組み合わせ

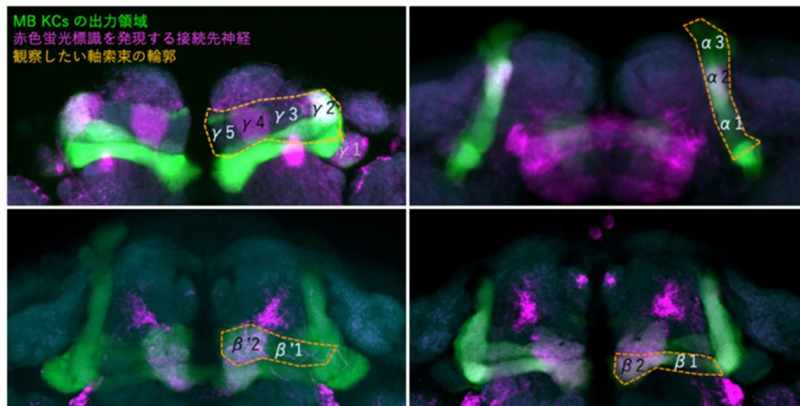


図3 種々のKCサブタイプにおける複数出力領域のうちの一部で、接続先の神経依存的に赤色蛍光蛋白質を発現させ標識して区別することで、区画化された複数領域を同時にイメージングすることが可能となった。

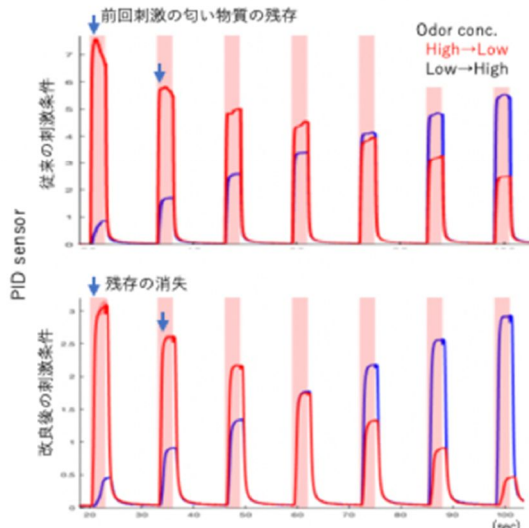
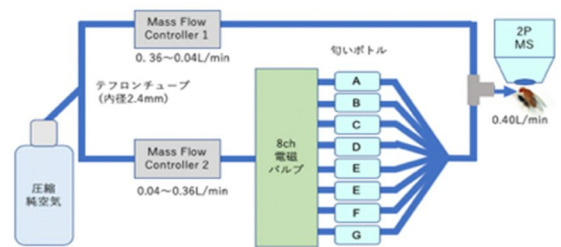


図4 匂い刺激の種類追加のため、電磁バルブのchの増設、流路の改良、流量のパラメータの更新がなされた実験系

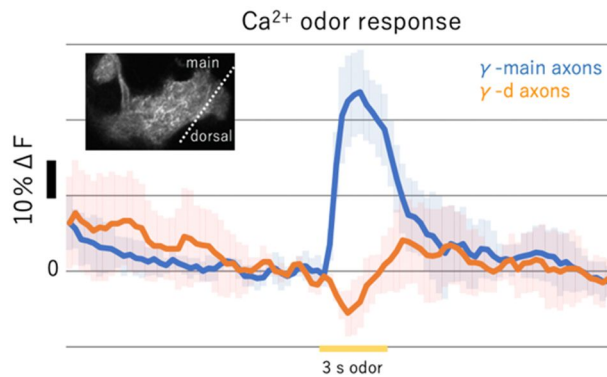


図5  $\gamma$  MB KCs全体でGCaMPを発現させるGal4ドライバを用いた匂い応答の記録。 $\gamma$ -main(CREpに相当)では匂い刺激によりカルシウムレベルが上昇するが、 $\gamma$ -d(CREnに相当)では一過的に低下後、上昇する。

#### <引用文献>

- (1) Aso, Y., Hattori, D., Yu, Y., Johnston, R. M., Iyer, N. A., Ngo, T.-T., et al. (2014). The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *eLife*, 3, e10806-47. <http://doi.org/10.7554/eLife.04577>
- (2) Aso, Y., Sitaraman, D., Ichinose, T., Kaun, K. R., Vogt, K., Belliart-Guérin, G., et al. (2014). Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila*. *eLife*, 3, 363-42. <http://doi.org/10.7554/eLife.04580>
- (3) Cohn, R., Morantte, I., & Ruta, V. (2015). Coordinated and Compartmentalized Neuromodulation Shapes Sensory Processing in *Drosophila*. *Cell*, 163(7), 1742-1755. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.019>
- (4) Hige, T., Aso, Y., Rubin, G. M., & Turner, G. C. (2015). Plasticity-driven individualization of olfactory coding in mushroom body output neurons. *Nature*, 526(7572), 258-262. <http://doi.org/10.1038/nature15396>
- (5) Hige, T., Aso, Y., Modi, M. N., Rubin, G. M., & Turner, G. C. (2015). Heterosynaptic Plasticity Underlies Aversive Olfactory Learning in *Drosophila*. *Neuron*, 88(5), 985-998. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.003>
- (6) Berry, J. A., Phan, A., & Davis, R. L. (2018). Dopamine Neurons Mediate Learning and Forgetting through Bidirectional Modulation of a Memory Trace. *CellReports*, 25(3), 651-662.e5. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.051>
- (7) Yamazaki, D., Hiroi, M., Abe, T., Shimizu, K., Minami-Ohtsubo, M., Maeyama, Y., et al. (2018). Two Parallel Pathways Assign Opposing Odor Valences during *Drosophila* Memory Formation. *CellReports*, 22(9), 2346-2358. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.012>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamazaki D, Hiroi M, Abe T, Shimizu K, Minami-Ohtsubo M, Maeyama Y, Horiuchi J, Tabata T	4. 巻 22 (9)
2. 論文標題 Two Parallel Pathways Assign Opposing Odor Valences during Drosophila Memory Formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2346-2358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1016/j.celrep.2018.02.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueoka Yutaro, Hiroi Makoto, Abe Takashi, Tabata Tetsuya	4. 巻 7
2. 論文標題 Suppression of a single pair of mushroom body output neurons in Drosophila triggers aversive associations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 562 ~ 576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----