

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H00998

研究課題名(和文) “記憶の局所フィードバック仮説” –その中枢単一同定ニューロンでの検証

研究課題名(英文) Testing the "local feedback hypothesis" as a basic mechanism of memory in the single identified neuron

研究代表者

吉原 基二郎 (Yoshihara, Motojiro)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所神戸フロンティア研究センター・上席研究員

研究者番号：80222397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,200,000円

研究成果の概要(和文)：記憶の仕組みの候補として、研究代表者は”ローカルフィードバック仮説”を案出し、この細胞変化を行動変化に対応させるため、ショウジョウバエの脳内で細胞の活動が摂食行動を司令する”フィーディング・ニューロン(FN)”を発見した。本研究では、FNを観察しながら機械刺激を摂食行動に連合するパブロフの条件付けの実験系を確立し、機械刺激がFNを操るように入力が変化することを発見した(Curr. Biol., 2021)。さらに、この記憶を担うシナプスの可塑的变化を世界初の細胞内レベルのエンGRAMとしてリアルタイム観察した(発表準備中)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、記憶の細胞レベルでのリアルタイム観察を初めて可能にする実験系を確立したことである。それは、歴史上初めての記憶の脳内実体(エンGRAM)の発見につながり、さらには研究代表者が案出した仮説を検証することを可能にするため、記憶の基本原理が明らかになることが期待される。その学術的意味にとどまらず、本研究は、脳内記憶素子であるニューロンの情報処理の記憶時の変化を初めて明らかにすることができる研究であるため、その知見をAIなどの情報工学ならびに、医学へも応用可能という社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：As a basic principle of memory, I have thought out “local feedback hypothesis” (Science, 2005). To correlate the cellular change depicted in the hypothesis to behavioral changes, we have identified the feeding neuron, which commands feeding behavior in *Drosophila* brain (Nature, 2013). In this study, we have established an experimental system of Pavlovian conditioning, where mechanical stimulation is associated to feeding behavior. We found that mechanical stimulation highjacks the feeding neuron through change in input onto the feeding neuron during the conditioning (Curr. Biol., 2021). Taking advantage of this experimental system, which allows subcellular analysis of the feeding neuron during the conditioning, we discovered the first “engram synapse” carrying the memory at the real time.

研究分野：記憶神経生物学

キーワード：ローカルフィードバック仮説 フィーディング・ニューロン ショウジョウバエ 記憶 シナプス可塑性 連合学習 パブロフ条件反射 コマンドニューロン

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

1) シナプス可塑性のプロトコル作成と記憶形成の作業仮説考案

シヨウジヨウバエ胚神経筋シナプスでの微小シナプス電流の研究(Yoshihara et al., 1999; Yoshihara et al., 2000)に基づき、長期増強を模倣

したシナプス可塑性のプロトコルを新規に作成した。先行研究で cAMP 濃度を上昇させた時と同様、高頻度刺激を与えると**微小シナプス電流の頻度が数 100 倍にも上昇**した (図 1)。この

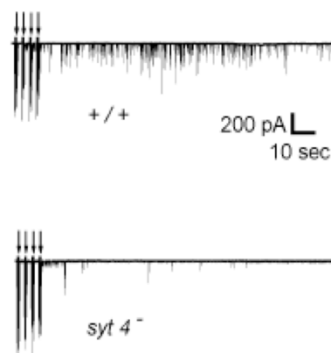


図 1. 高頻度刺激で誘起される微小シナプス電流 (High frequency stimulation-induced miniature release; HFMR)。野生型では、**微小シナプス電流の頻度が数 100 倍にも増加**するが (上)、*syt 4* 突然変異体では HFMR が見られない (下)。Syt 4 はポスト側の筋細胞から**逆行性シグナル**を放出させ、プレからの伝達物質を放出させる (Yoshihara et al., *Science* 2005)。

プレ側の可塑的变化は、ポスト側の  $Ca^{2+}$  センサー分子シナプトタグミン 4 (Syt 4) を介して放出される逆行性シグナルがプレ側の cAMP シグナルを活性化することによって、プレ側からの伝達物質放出を増大させることによってつくられる。この**ポスト側の  $Ca^{2+}$  に依存するプレ側の著しい可塑的变化**を説明する為、**プレ側とポスト側が相互に強め合うこと**によって、**単一シナプスに限局された正のフィードバックが形成、維持される**ことを仮定した (“ローカルフィードバック仮説”; Yoshihara et al., *Science*, 2005; 図 2)。さらに、シナプスの形態観察(Yoshihara et al., 1997)の結果から、このローカルフィードバックが**局所的なシナプスの発達を促す**と仮定した。

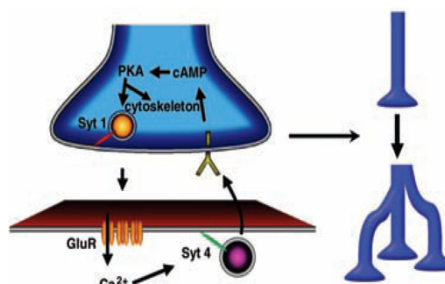


図 2. “ローカルフィードバック” 仮説 (Yoshihara et al., *Science* 2005)。

この仮説は、Hebb (1949)が記憶の原理として想定したプレとポストの連続した発火によるシナプス増強、特に、**即時的に起こるシナプス特異的な生理学的な変化**と、それに続く**永続的な記憶を担う形態的な変化**への移行をうまく説明できるので、記憶を担う中枢シナプスにこの仮説を応用することを考えた。**小胞トラフィッキング**による伝達物質の放出は、生物が広く利用する**時間空間解像度が極めて高い局所的細胞間コミュニケーション法**である。これを活かして、**微小シナプス電流**をつくるプレからの伝達物質放出とポストからの**逆行性シグナル**の放出が**お互いに強め合**って**単一シナプスがタグされた状態**を形成することが、**瞬時に起こる短期記憶の素過程**であると仮定した。このローカルフィードバックによってポストの  $Ca^{2+}$  上昇とプレの cAMP 上昇を保った状態が、細胞骨格のリアレンジメントによる形態変化を促すことによって、**永続的な長期記憶へと移行**させると予想される。また、この仮説は、受容体挿入や局所的タンパク合成などの今まで想定されている記憶のシナプス機構も、このタグされた状態によって誘起されると考えると、包括することができる。また、プレとポストの相乗効果によって両者が同時進行的に変化していくことを想定しているため、“プレかポストか”という、かつて白熱した論争もこの仮説によって包括可能である。よって、この仮説は、**脳内の記憶を形成維持するシナプス強化の一般原理となる可能性が期待される**。しかし、**記憶時のシナプス活動をリアルタイムで追跡できないかぎり、この仮説を検証することは不可能であった**。そこで、研究代表者の研究室の総力をもって仮説発表後の 13 年間で費やし、同定単一ニューロン上のシナプスにおける記憶時の可塑的变化をリアルタイムで追跡可能な実験系を確立した (以下に詳述)。

## 2) 記憶の実験系のための摂食コマンドニューロンの発見

パブロフの条件反射に伴うシナプス可塑性を単一細胞レベル/シナプスレベルで研究するため(以下、図 5

参照)、**摂食を司令するニューロン**を探索した。

研究代表者らがかつて日本のショウジョウバエ研究室を組織して確立したショウジョウバエの Gal4 を持つ NP(=Nippon)系統 (Yoshihara and Ito, 2000) のハエに低温感受性チャンネル (Peabody et al., 2009)、あるいは、熱感受性チャンネル (Hamada et al., 2008) をもつハエを掛け合わせ、Gal4 を発現する脳のサブセットでチャンネルを発現する F1 ハエの大規模な**行動スクリーニング**を、マサチューセッツ大学において研究代表者の主宰する研究室の総力を挙げて行った (Flood et al., G3, 2013)。引き起こされる行動の中から食べる行動を示すハエを選び出し、**摂食行動を司令する一対の摂食コマンドニューロン**、**“フィーディング・ニューロン”**を同定することに成功した (Flood et al., *Nature* 2013; 図 3)。

### 3) 摂食行動観察と脳内の同時観察を行うライブ実験系確立

図 4 に示したライブ実験系 (Yoshihara, *JoVE*, 2012) を開発し、ミクロのニューロン活動/シナプス可塑性とマクロの行動変化としての記憶をリアルタイム同時観察することで、**条件付け時の脳内可塑的変化の観察**を可能にした。

#### 2. 研究の目的

記憶の分子細胞機構については、多くの研究が行われ数々の分子が関与していることが示唆されているものの、“どのような神経細胞の変化(おそらく、形態的变化をともしないシナプスの生理的変化)によって瞬時に短期記憶がつくられるのか、また、その短期記憶がどのような神経細胞の営みによって、おそらくシナプスの形態変化をともし長期記憶に変換されるのか”は未だ明らかでない。これが、本研究課題の核心をなす問いである。研究代表者が *Science*(2005)に発表した**独自の仮説“ローカルフィードバック仮説”**はこの問いに答えを与える。この問いに答えるため、上の“背景”に述べた**新しい仮説と独自の研究法**により、**記憶形成のための一般的な分子細胞メカニズム**を世界に先駆けて日本から提出する。ショウジョウバエ遺伝学によって明らかにな

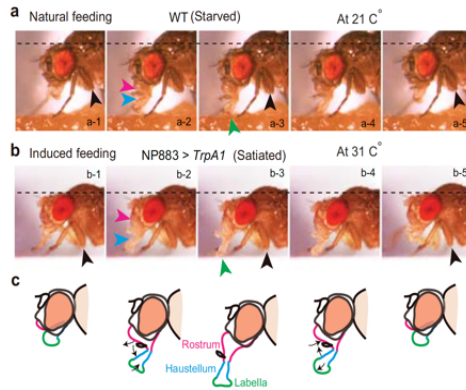


図 3. **フィーディング・ニューロン**の活性化により、自然な摂食に酷似した行動が遺伝学的に誘起された。 **a**, エサの上の自然な摂食行動。 **b**, **フィーディング・ニューロン**に TrpA1(熱感受性チャンネル)を発現させたハエの、31°C に温度を上げて誘起された”摂食行動”。床に向かって極めて自然に吻を伸ばした後(マゼンタ、青矢尻)、吻の先を適切なタイミングで開き(緑矢尻)、エサもない床をなめる。 **c**, 吻の動きを示す模式図。(Flood et al., *Nature*, 2013)

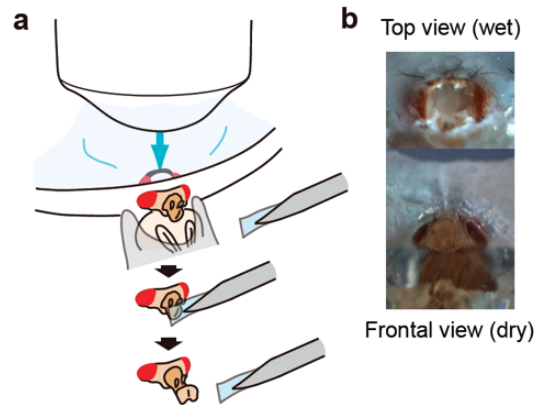


図 4. “Feeding circuit/ Flybrain Live Imaging and Electrophysiology Stage (FLIES)”。ハエの”顔”側はドライで、ショ糖で刺激すると吻伸展がみられる。同時に、生理食塩水中に露出している脳細胞の活動を  $Ca^{2+}$  イメージング法で観察できるし、シナプスの変化をライブイメージングすることも可能である。また、二光子顕微鏡下で、赤外線照射によって個々のニューロンを狙った**活性化**、破壊実験もできる。電極を導入して**電気生理実験**も可能である。(Yoshihara, *JoVE*, 2012)

る各分子の機能は、創薬ターゲットに直結し、記憶障害の難病治療に道を拓く。

### 3. 研究の方法

1) 条件反射のプロトコル確立および条件反射に伴う神経回路の新しい神経回路形成の確認

① プロトコル作成；研究代表者の研究室で発見されたショウジョウバエのフィーディング・ニューロンを要とする摂食神経回路に着目すると、**単一細胞レベルでパブロフの条件反射に伴うシナプス可塑性**を解析することができる(図5)。パブロフの実験では、イヌの摂食行動(エサが無条件刺激)にベルの音などの条件刺激を連合したが、行動実験をシナプスの観察と同時に行うには、**一匹のハエを定位した状態でパブロフのイヌが示したような条件刺激への反応の変化**を起こさせる必要がある。

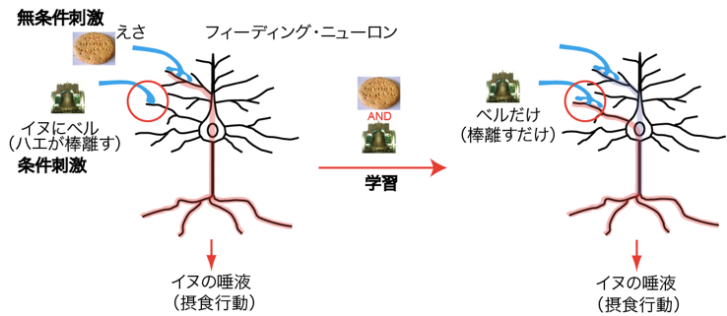


図5. パブロフの条件反射で予想される摂食神経回路の変化。学習後(右)、条件刺激のみによりフィーディング・ニューロンが発火し、摂食行動の一部が引き起こされる。その行動変化をおこす神経回路の変化が、フィーディング・ニューロンに入力するシナプスの変化(赤円)としてライブで観察可能である。

米国マサチューセッツ大学において研究代表者が主宰する研究室のポストドクターであった櫻井晃博士(現在、当研究所主任研究員。研究代表者の協力研究者として共同研究を続けている)は、”**あらかじめハエに持たせておいた棒を離す**”という条件刺激を、口吻へのショ糖水溶液の刺激(無条件刺激)による摂食行動に連合する**条件反射の新規パブプロトコルを作成**することに成功した(図6)。このプロトコルの実験条件、例えば、条件付けの繰り返し回数、繰り返しの時間間隔、無条件刺激の強さなどを、記憶の強さや持続時間への影響に関して調べ、システムティックに検討する。

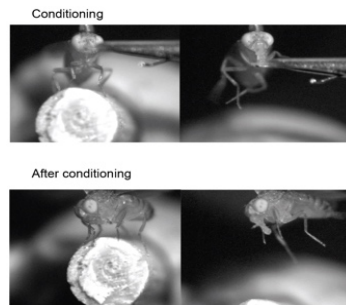


図6. 機械的刺激を条件刺激としたショウジョウバエのパブロフ条件反射。木製の棒を離す刺激を条件刺激とし、その直後にショ糖水溶液を吻に触れさせて吻伸展を誘起した(上)。これを繰り返すと、**棒を離すだけで吻を伸ばすように学習した**(下)。(Sakurai and Yoshihara, 未発表予備実験データ)

② 細胞発火の  $Ca^{2+}$  イメージングによる新しい神経回路形成の確認；研究代表者が開発したライブ実験系(図4)を利用し、フィーディング・ニューロンの細胞体で  $Ca^{2+}$  イメージングをしながら、この条件反射実験を行う。**条件付け成立後**には、**条件刺激のみによってフィーディング・ニューロンが発火**することを、予備実験における **GCaMP6m の蛍光増大**として既に確認している(図7)。さらに、条件付け後の経過について、このフィーディング・ニューロンの条件刺激への反応性を追跡する。

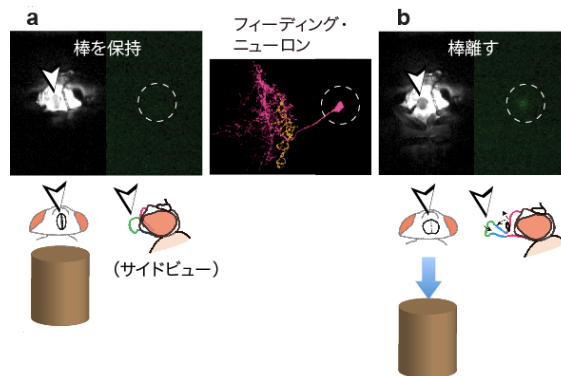


図7. 条件付け後、棒を離すだけで口吻を伸ばす(矢尻)と同時にフィーディング・ニューロン細胞体での **GCaMP の蛍光増大**(破線円)が見られた。**a**, 棒を離す前と、**b**, 離した直後。(Sakurai and Yoshihara, 未発表予備実験データ)

は、条件刺激のみによってフィーディング・ニューロンが発火することを、予備実験における **GCaMP6m の蛍光増大**として既に確認している(図7)。さらに、条件付け後の経過について、このフィーディング・ニューロンの条件刺激への反応性を追跡する。

## 2) 記憶分子候補突然変異体を使ったシナプス可塑性の分子メカニズム解析

ショウジョウバエ孵化時刻の卵の神経筋シナプスから電気生理記録をおこなうことにより、各分子のシナプスでの働きを調べることができる。記憶分子候補であるシナプトタグミン7などの突然変異、強制発現個体から電気生理記録を行う。

### 4. 研究成果

#### 1) 条件反射時の細胞変化を観察する実験系確立

シナプスのマイクロ変化をマクロの行動変化としての記憶に結びつけるため、フィーディング・ニューロン (FN) 上に作られる**シナプス変化が担う記憶を行動として表現する**実験系を確立した。研究協力者である櫻井晃博士と共同で、“**あらかじめハエに持たせておいた棒を離す**”という**条件刺激**を、口吻へのショ糖水溶液の刺激（無条件刺激）による摂食行動に連合する**新規条件反射プロトコル**を考案し、**Current Biology** 誌に論文を発表した（図 8; Sakurai et al., 2021）。図 4 の脳内と行動の同時記録実験系を使った FN での

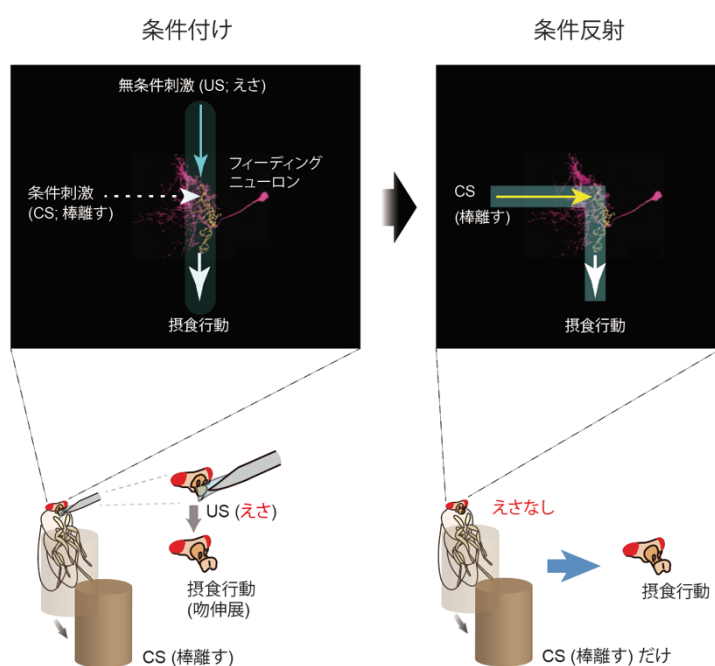


図 8. ショウジョウバエを使ったパブロフの条件反射実験。棒を離す刺激を条件刺激とし、その直後にショ糖溶液を吻に触れさせて吻伸展を誘起した。これを繰り返すと、FNの入力が変化して棒を離すだけで吻を伸ばすように学習した。(Sakurai et al., 2021 *Curr. Biol.*)

Ca<sup>2+</sup>イメージング実験と遺伝学的な FN の不活性化実験などの一連の実験により、「**条件刺激が FN を操るように変化した**」ことがこの条件反射の神経機構であることがわかった。オプトジェネティクスによる FN の活性化が FN を操って摂食行動をコマンドした実験（図 3; 2013 *Nature*）のように、**条件刺激からの入力が FN を活動させて摂食行動をコマンドした**のである。この結果は、パブロフの犬の実験でも、同様なコマンドニューロン群による情報処理の変化がそのベースにあることを示唆する。この条件付け実験において、FN への条件刺激の**入力に変化した**ことが示唆されるので、本研究の主眼である**記憶を担うシナプス変化の直接追跡と仮説の検証**への道が開かれた。

#### 2) シナプトタグミン7のシナプス短期可塑性における機能解析

記憶分子候補であるシナプトタグミン7(Syt7)のはたらきをショウジョウバエ embryo の電気生理記録によって解析した。**Syt7 はシナプス伝達を抑えることによってシナプス促進(刺激を連発するにつれてシナプス伝達が強まること)を可能にしている**、ということを見出し、Sci. Rep. 雑誌に報告した（研究協力者である MIT の Littleton 教授との共同研究）。この結果は、短期記憶において Syt7 が重要な働きをしていることを示唆する。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujii T, Sakurai A, Littleton JT, Yoshihara M	4. 巻 11
2. 論文標題 Synaptotagmin 7 switches short-term synaptic plasticity from depression to facilitation by suppressing synaptic transmission.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4059
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83397-5	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 該当する

1. 著者名 Sakurai A, Littleton JT, Kojima H, Yoshihara M	4. 巻 31
2. 論文標題 Alteration in information flow through a pair of feeding command neurons underlies a form of Pavlovian conditioning in the Drosophila brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 4163-4171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2021.07.021	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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Fujii T, Sakurai A, Littleton JT, Yoshihara M
2. 発表標題 Synaptotagmin 7 switches short-term synaptic plasticity from depression to facilitation by suppressing synaptic transmission
3. 学会等名 第14回日本ショウジョウバエ研究集会(JDRC14)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakurai A, Littleton JT, Kojima H, Yoshihara M
2. 発表標題 Information processing by a pair of feeding command neurons is altered during Pavlovian conditioning in the Drosophila brain
3. 学会等名 第14回日本ショウジョウバエ研究集会(JDRC14)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakurai A, Littleton JT, Kojima H, Yoshihara M
2. 発表標題 Change in information processing by a pair of feeding command neurons underlies Pavlovian conditioning in the Drosophila brain
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshihara M, Sakurai A
2. 発表標題 Subcellular engram, a synaptic memory trace locally formed in the feeding command neuron during Pavlovian conditioning.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Symposium, Neurobiology of Drosophila (talk) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakurai A, Littleton JT, Kojima H, Yoshihara M
2. 発表標題 Change in information processing by a pair of feeding command neurons underlies Pavlovian conditioning in the Drosophila brain
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakurai A, Littleton JT, Kojima H, Yoshihara M
2. 発表標題 Information processing by a pair of feeding command neurons is altered during Pavlovian conditioning in the Drosophila brain
3. 学会等名 第14回日本ショウジョウバエ研究集会(JDRC14)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujii T, Sakurai A, Littleton JT, Yoshihara M
2. 発表標題 Synaptotagmin 7 switches short-term synaptic plasticity from depression to facilitation by suppressing synaptic transmission
3. 学会等名 第14回日本ショウジョウバエ研究集会(JDRC14)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Sakurai1,, J. Troy Littleton, Hiroaki Kojima, and Motojiro Yoshihara
2. 発表標題 A neural correlate of Pavlovian conditioning in the Drosophila brain
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Symposium, Neurobiology of Drosophila (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaaki Fujii, Akira Sakurai, Akemi Kishi, J. Troy Littleton, and Motojiro Yoshihara
2. 発表標題 Synaptotagmin 7 suppresses synaptic transmission and is not the high affinity Ca <sup>2+</sup> sensor for facilitation or asynchronous release at Drosophila embryonic NMJs
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Symposium, Neurobiology of Drosophila (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Sakurai, Hiroaki Kojima, Motojiro Yoshihara.
2. 発表標題 Feeding command neuron is a modification site in the Drosophila feeding neural circuit.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Motojiro Yoshihara.
2. 発表標題 The Drosophila feeding circuit to connect synaptic plasticity to memory
3. 学会等名 新学術"スクラップ&ビルド"班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motojiro Yoshihara.
2. 発表標題 Functional change of a feeding command neuron underlies Pavlovian conditioning in the Drosophila brain
3. 学会等名 新学術"スクラップ&ビルド"班会議
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吉原基二郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 2
3. 書名 「遺伝学の百科事典」学習と記憶の行動遺伝学	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 先合いばさみ	発明者 吉原基二郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-029436	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 条件付けに用いる刺激の付与方法、試験の方法、方法を実施する装置、及び、脳灌流液	発明者 櫻井晃、吉原基二郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-171185	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

Yoshihara lab  
<http://www2.nict.go.jp/neuro/memory/MotoPage2.html>  
 プレスリリース、「脳の短期記憶のスイッチメカニズムを発見」  
<https://www.nict.go.jp/press/2021/03/01-2.html>  
 プレスリリース、「パブロフ条件反射の正体を発見」  
<https://www.nict.go.jp/press/2021/08/05-1.html>

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
研究協力者	櫻井 晃  (Sakurai Akira)		
研究協力者	リトルトン トロイ  (Littleton Troy)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	マサチューセッツ工科大学		