

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03268

研究課題名(和文) 記憶の獲得、保持、想起、全ての過程に不断の出力が必要な神経細胞の行動遺伝学的解析

研究課題名(英文) Behavioral genetics of the neuronal system required for memory acquisition, consolidation and retrieval

研究代表者

多羽田 哲也 (Tabata, Tetsuya)

東京大学・定量生命科学研究所・教授

研究者番号：10183865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの匂い学習記憶は匂い(CS)と、ドーパミンを介して電気ショックまたはショ糖報酬(US)を連合することで成立する。(1)ドーパミン神経はグルタミン酸及びGABAをcotransmitterとして放出し、記憶を調節していることを見出した。(2)Ca<sup>2+</sup>/calmodulin依存性アデニル酸シクラーゼ(AC)が、CSによるCa<sup>2+</sup>を介した活性化とUSによるドーパミンシグナル経路の活性化によりcAMPを生成することが連合の実体と考えられてきた。しかしCSのみでもUSを介する同じドーパミンシグナルが動員されcAMPが生成されることを発見し、この概念を見直す必要性を提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1)知的障害が見られる脆弱X症候群の原因遺伝子FMRPのショウジョウバエ相同遺伝子の変異によって代謝型グルタミン酸受容体がKCsで過剰発現し記憶障害を引き起こすことが報告されているが、それはCotransmitterとしてのグルタミン酸シグナルの本研究により生理的機構として説明される。(2)匂い刺激がドーパミンシグナルを誘導しKCsでcAMPを生成することの発見は、現在広く受け入れられているメカニズムでは匂いを受容したKCsを他のKCsから区別することができ無いことを示唆し、数十年にわたって信奉されてきた同時検出機構の検証が必要である。

研究成果の概要(英文)：Flies can be conditioned by the association of an odorant or conditioned stimulus (CS) with electric shock or an unconditioned stimulus (US) reinforced with dopaminergic neurons. (1) We found that glutamate is a cotransmitter in a subset of dopaminergic neurons and partially attenuates memory performance. (2) The type I Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated adenylylase (AC) in Kenyon cells (KCs) is thought to act as the coincidence detector that integrates Ca<sup>2+</sup> influx in a restricted population (5-10%) of KCs, which is specific to each odorant (CS) and G protein activation resulting from the dopamine reception (US) in all KCs, and thus increases the cAMP concentration in the KCs that receive both CS and US relative to the rest of the KCs. However, the increase in the cAMP concentration resulting from the CS alone was also mediated by the same dopamine neurons that reinforce the US and thus in all KCs, which is inconsistent with the notion that AC acts as the coincidence detector.

研究分野：神経科学

キーワード：記憶 ドーパミン グルタミン酸 GABA アデニル酸シクラーゼ 同時検出器 cAMP ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエの3次嗅覚神経群は合計2200個のケニオン細胞(KCs)からなるキノコ体と呼ばれる特異な形をした神経叢をなし、匂い記憶形成の同時検出器として働くと考えられている。この時、ドーパミン神経は罰記憶と報酬記憶の非条件刺激を伝達する。KCsは3種の細胞群からなり、そのうちgammaに分類される細胞群は、cAMP responsive element (CRE)を用いた転写応答性を指標とすることにより、CRE-pとCRE-nに二分されること、CRE-pは忌避記憶の獲得、保持、想起全ての過程で必要であり、CRE-nは報酬記憶の獲得、保持、想起全ての過程で必要であることを明らかにしていた。

(1) 記憶の保持のステージにおけるCRE-pとCRE-nの機能を調べる過程で、罰非条件刺激を伝達するドーパミン神経群(便宜的にPPL1とする)を人為的に活性化すると罰記憶の保持が阻害されること、また報酬非条件刺激を伝達するドーパミン神経群(便宜的にPAMとする)を人為的に活性化すると報酬記憶の保持が阻害されることを見出した。ドーパミンはDop1R2受容体経路で忘却を促進することが知られているが、この記憶阻害はKCsのDop1R2受容体変異でも観察されたことから忘却以外の機構の存在が示唆された。

(2) ライブイメージングによりcAMP濃度を観察していたところ、匂い刺激によるcAMPの上昇がドーパミンに依存していることがわかり従来の同時検出器の概念を検証する必要があることがわかった。

## 2. 研究の目的

(1) ドーパミン神経群が記憶の獲得に必要であると同時に、(忘却とは異なった)記憶の抑制にも機能していると考えられる結果を得た。この抑制の機構を明らかにするためにドーパミン神経群と認識されている神経細胞がcotransmitterとしてドーパミン以外を放出している可能性を検証する。

(2) ショウジョウバエの匂い記憶においてその要となる機構はアデニル酸シクラーゼが同時検出器として働くことであると長い間考えられてきた。しかし匂い刺激によるcAMPの上昇がドーパミンに依存していることの発見はこの考えと大きく矛盾している。この点を中心に同時検出機構を再検討する。

## 3. 研究の方法

(1) ドーパミン神経群のcotransmitterとしてグルタミン酸とGABAを想定し、それぞれの受容体及びトランスポーター変異等を作成し記憶パフォーマンスを調べる。

(2) Ca<sup>2+</sup>センサーとcAMPセンサーを同時に発現させ、匂い、電気ショック及びそれらを連合した場合のKCsの応答を調べる。またcAMP産生を制御し、同時検出の機構を探る。

## 4. 研究成果

(1) 代謝型グルタミン酸受容体とGABA受容体をノックダウンするために該当するUAS-RNAiをCRE-nとCRE-pに発現し2時間記憶を計測した。その結果、CRE-nでGABA受容体をノックダウンすると報酬記憶のパフォーマンスが上昇し、CRE-pで代謝型グルタミン酸受容体をノックダウンすると罰記憶のパフォーマンスが上昇した。PAMドーパミン神経細胞でGABA合成に必要なGADをノックダウンすると報酬記憶のパフォーマンスが上昇し、PPL1ドーパミン神経細胞でグルタミン酸トランスポーターをノックダウンすると罰記憶のパフォーマンスが上昇した。これらの結果はGal80を用いて、UAS-RNAiの発現を成虫に限定しても変わらなかったことから神経発生の影響は無いものと考えられる。また、この研究の契機となった実験-ドーパミン神経群を人為的に活性化すると記憶の保持が阻害される-を上記の受容体ノックダウン下で行ったところ、報酬記憶及び罰記憶ともに阻害がレスキューされた。以上のことからPAMドーパミン神経細胞から放出されるGABAとPPL1ドーパミン神経細胞から放出されるグルタミン酸はcotransmitterとしてそれぞれ報酬記憶及び罰記憶を抑制していることが示された。

PPL1ドーパミン神経細胞群のグルタミン酸cotransmitterの役割についてさらに解析を進めた。ショウジョウバエの罰記憶パラダイムでは匂いと電気ショックの条件付けについて詳細に調べられている。1回の条件付けでは数時間持続する記憶が形成されるが、15分の間隔をあけた5回以上の連続した条件付けによって蛋白合成を必要とし、数日継続する長期記憶が形成されることが知られている。PPL1ドーパミン神経細胞のグルタミン酸トランスポーター・ノックダウン検体あるいはCRE-pの代謝型グルタミン酸受容体・ノックダウン検体では1回の条件付けで長期記憶が形成されることがわかった。PPL1ドーパミン神経細胞群は投射先によって細分類されているので個々の神経細胞を調べた。片脳半球あたり1ないし2細胞からなる2つのグループそれぞれ単独にグルタミン酸トランスポーター・ノックダウン検体を調整し、調べたところ、1回の条件付けによって長期記憶が形成された。従来、飢餓条件、E3 ubiquitin ligase変異などでも1回の条件付けによって長期記憶が形成されることが知られていたが、これらとグルタミン酸cotransmitterとの役割は不明である。ここにもう一つ示唆的な変異の報告がある。cAMPを分解するphosphodiesteraseをコードするdunce(dnc)変異では記憶のパフォーマンスが低下することが古くから知られていた。ところがdnc変異では1回の条件付けによって長期記憶が形成されることがThomas Preatの研究室から報告されている(Neuron 98, 350-365, 2018)。彼らは以前に長期記憶を形成する連続した条件付けによってPPL1ドーパミン神経群に分類され

る2種のドーパミン神経が特有の oscillation を示すことを報告しており (Nat. Neurosci 15, 592-599, 2012) dnc 変異では1回の条件付けによってこの特有の oscillation が、この同じ2種のドーパミン神経で見られるようになることを報告している (Neuron 98, 350-365, 2018)。そして、この2種のドーパミン神経こそ、本研究で述べている上記のグルタミン酸トランスポーターのノックダウンにより長期記憶を形成するようになる神経細胞に他ならない。以上のことからグルタミン酸シグナルは長期記憶のゲーティングに何らかの役割を果たしており、それは条件付け及び dnc の機能と交差するという仮説を立てている。

知的障害が見られる脆弱 X 症候群の原因遺伝子 FMRP のショウジョウバエ相同遺伝子の変異によって代謝型グルタミン酸受容体が KCs で過剰発現し記憶障害を引き起こすことが報告されている (J. Neurosci, 32, 13111-13124, 2012)。これは代謝型グルタミン酸受容体の機能獲得変異であり、本稿は代謝型グルタミン酸受容体の機能喪失変異の側面とも言えよう。ただ、この2012年に報告されている KCs の細胞種は本稿のそれとは異なっているという相違点がある。

(2) 本稿で扱っている匂い記憶形成の要となっている分子は同時検出器として機能するタイプ I Ca<sup>2+</sup>/calmodulin 依存性アデニル酸シクラーゼ (AC)、Rutabaga (Rut) である。ショウジョウバエが匂い分子を受容すると約 2200~ある KCs の 5~10%の細胞が応答する。応答する細胞の population は個々の匂いに特有で、この sparse coding により外界のさまざまな匂い情報を区別している。受容した匂い (CS) により KCs の一部の細胞が応答しその結果 Ca<sup>2+</sup>の濃度が上昇する。電気ショック (US) は上述の通りドーパミン神経によりほぼ全ての KCs で reinforce される。RutAC はその名の通り CS により上昇した Ca<sup>2+</sup>に依存して cAMP を産生する。また US によりドーパミン受容体が活性化されると共役する Gas の働きによっても cAMP を産生する。条件付けにより匂い応答した KCs では cAMP 産生が CS と US 両者の刺激により加算され、他の KCs と区別されることにより、その匂い特有の記憶が形成されると長い間考えられてきた。事実、ライブイメージングの結果、CS と US をほぼ同時刻に提示すると cAMP 産生は最大値を示し (Cell, 178, 1-16, 2019) この概念は今も広く受け入れられている。しかしこの論文を含め現在までの多くの類似論文には大きな問題がある。それはイメージングの結果が個々の神経繊維を解像していないことである。本研究ではこの点を重視し、現有2光子顕微鏡の最大限の解像力を用いて Ca<sup>2+</sup>と cAMP 濃度をそれぞれ GCaMP6f 及び pink flamindo を用いて同時に計測した。その結果、匂い刺激では一部の KCs で Ca<sup>2+</sup>の上昇が観察される一方で、ほぼ全ての KCs で cAMP の上昇が観察された。この cAMP の上昇はドーパミン受容体 Dop1R1 変異では観察されなかった。すなわち CS の提示だけで、ドーパミンが放出され、ほぼ全ての KCs で cAMP が上昇しており、上記の同時検出の概念が根本から揺らぐものである。ドーパミン神経にはアセチルコリン受容体が発現しており、KCs から放出されるアセチルコリンに反応してドーパミンを放出することが近年、示された。本研究で観察された CS に依存したドーパミンシグナルがこの機構によるか調べるためにテタヌス毒素を発現し KCs の出力を阻害しても cAMP の上昇が観察されたので、KCs からの直接の逆行シグナルとは異なる経路によるものと考えている。また PPL1 あるいは PAM の出力を阻害して観察すると、それぞれの投射先での cAMP 上昇が抑えられたことから、US の reinforcer として働く同じドーパミン神経からのシグナルが機能していることが推察される。つまり cAMP の濃度上昇は CS と US を区別していないかのように見える。事実、ほぼ同時に CS と US を提示しても Ca<sup>2+</sup>の濃度が上昇する KCs で特異的に cAMP が上昇する様子は観察されない。現時点ではまだ実験例も少なく解析も緒についたばかりであるので軽々な結論は出せない段階ではあるが根本から問い直す必要があるように思う。詳細な解析を続けたい。最近示唆的な報告がなされた。2回匂い提示をするだけでその匂いに対して忌避記憶ができる、そしてそれは PPL1 ドーパミン神経に依存する (Current Biol, 39, 3490-3503, 2021) 匂いによって誘導されるドーパミンが US として機能している可能性がある。

上記に関連して、光遺伝学的に cAMP を産生する bPAC を CRE-p で発現し cAMP 産生を匂いと連合すると罰記憶が形成されることを見出した。このことは cAMP が US のように振舞っていることを示唆している。この結果はより多くの種類の KCs で bPAC を発現させて検証する必要があるが、この観点からも同時検出機構に関して検討を要することは間違いないものと思う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎 大介
2. 発表標題 ショウジョウバエの嗅覚記憶情報のデコーディング
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 大介
2. 発表標題 ショウジョウバエの嗅覚記憶における価値情報のデコーディング
3. 学会等名 NEURO2019（第42回日本神経科学大会）
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	阿部 崇志  (Abe Takashi)  (70756824)	東京大学・定量生命科学研究所・助教   (12601)	
研究分担者	山崎 大介  (Yamazaki Daisuke)  (80588377)	東京大学・定量生命科学研究所・講師   (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	清水 一道  (Shimizu Kazumichi)  (50808095)	東京大学・定量生命科学研究所・助教    (12601)	
研究分担者	廣井 誠  (Hiroi Makoto)  (80597831)	東京大学・定量生命科学研究所・助教    (12601)	

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