

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16254

研究課題名（和文）好悪の価値情報を持つMB神経の複数出力域の動的匂い応答地図の構築と学習機構の解明

研究課題名（英文）A comprehensive odor mapping of compartmentalized and valence-encoding MB intrinsic neurons in *Drosophila*

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） 3,400,000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システムを用いることで、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 (KC), 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

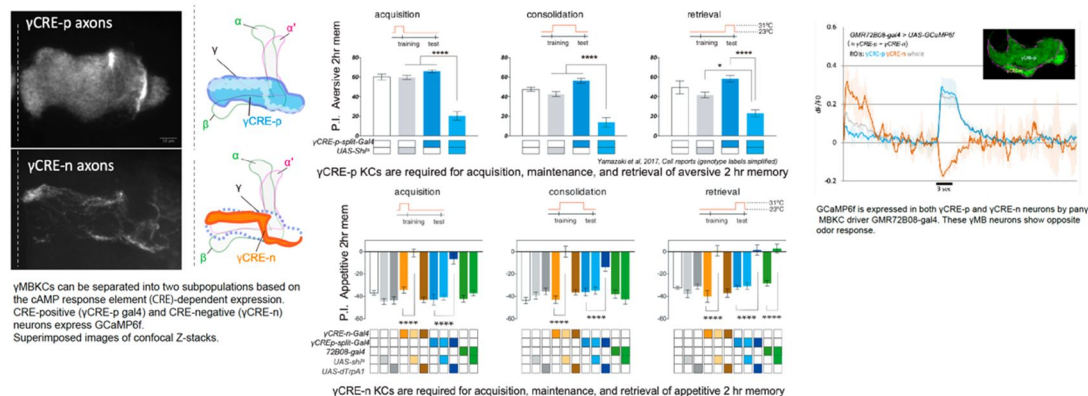
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエキノコ体(MB)は忌避/報酬性の刺激と嗅覚刺激の連合学習による記憶形成の場である。MBのケニオン細胞(KCs)にはサブタイプ(  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$  )が存在し、記憶学習の各過程で異なる機能を有することが知られている。MBKCsの神経軸索はタイプごとに束状化し、各々の中でさらに接続先依存的に複数の出力領域に区画化(コンパートメント)され、固有の制御がなされ機能していると考えられている。

2 光子カルシウムイメージングにより、学習前のMBKCsにおいてサブタイプを区別し且つ、複数コンパートメントを同時観察することで、可塑性解析の基盤となる神経回路地図を得ることを目標とした。KCのイメージングにおいて当初は split-gal4 系統を用い、匂い刺激によりカルシウムレベルが上昇する神経群と一過的に低下する神経群が存在することを明らかにした。並行して、所属研究室において KCsを転写因子 CREBの発現レベル依存的に標識、分離した系統(-CREp, -CREn)の gal4 系統が作出されていた。これらによってラベルされる神経群は記憶形成に必須であり、好悪の価値情報をコードし、忌避/報酬性のパラダイムにおいて相反的に機能する重要なサブタイプであることが明らかとなった(下図)。

### γMBKCs consist of functionally heterogeneous subpopulations γCRE-p and γCRE-n, which encode opposite valences



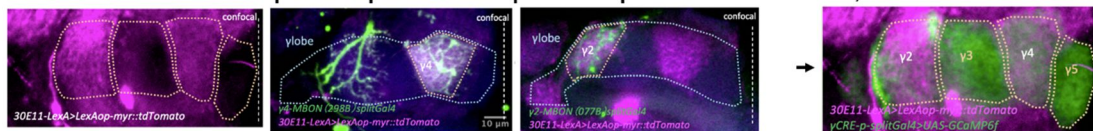
### 2. 研究の目的

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、未だ明快な報告が少ない。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系統を用いることで、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。

### 3. 研究の方法

可塑性検証の前提となる匂い応答の様式を、密に束状化した軸索領域において正確にとらえ記述するには、シグナルの混交による解像度低下の可能性を排除することが重要と考え、γ-CREp, -CREn, -dの各 gal4 系統を GCaMP の発現ドライバーとして個別に採用した。コンパートメントの区別は、接続先の DAN/MBON 神経の一部で発現する LexA 系統によって、赤色蛍光タンパク質 tdTomato を特異的に発現させることにより実現した。匂いの濃度や流速の最適化が完了した刺激システムと 2 光子顕微鏡を組み合わせ、種々の匂い物質に対する応答様式を網羅的に取得することとした。

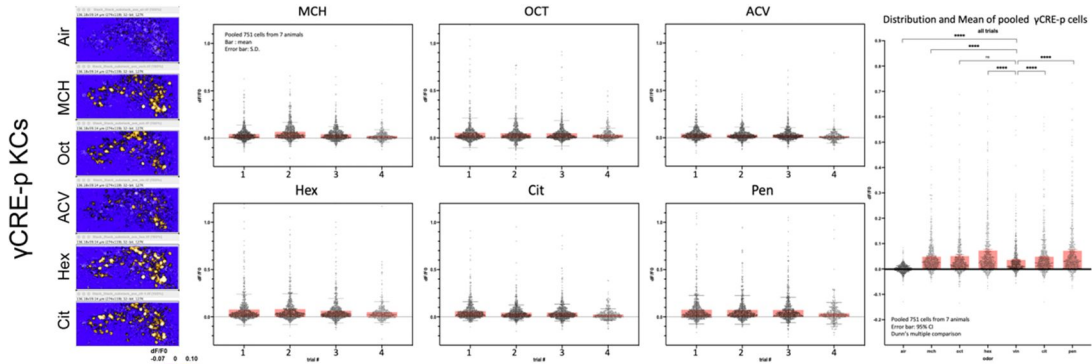
### Confirmation of expression pattern of the γ lobe compartment reference line, R30E11-lexA



We found R30E11 driver line express LexA in every other γ lobe compartment. To confirm that the labelled regions correspond to the γ2 and γ4 compartments. We co-expressed γ2-MBON-split-gal4 or γ4-MBON-split-gal4 with UAS-GCaMP in R30E11-lexA-LexAop-myr::tdTomato genetic background. As expected, MBON's dendrites and neurite were observed in tdTomato-positive γ2 and γ4 compartments, respectively. We adopted this lexA driver line for the subsequent 2-photon calcium imaging of γCREp and γCRE-n MB axons.

#### 4. 研究成果

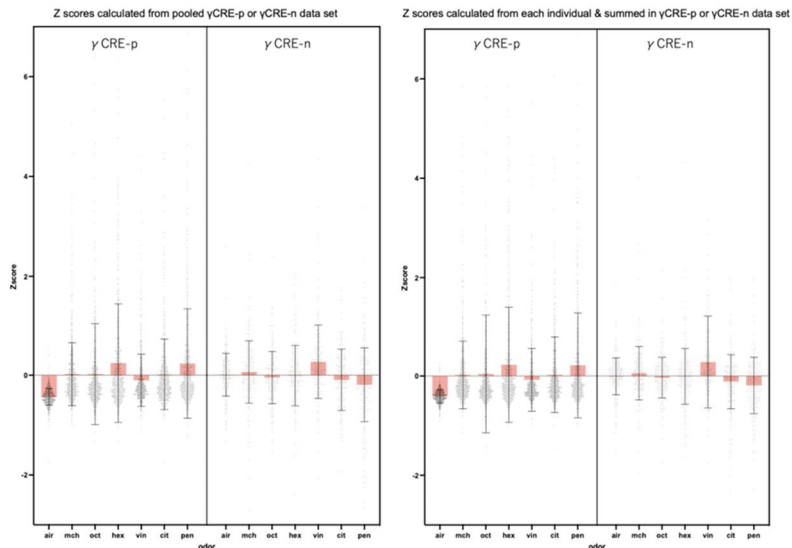
細胞体における応答の記録も年度末までに完了し、現在解析を行なっている。コンパートメントの概念を含めた解析はまだ十分ではないが、少なくとも、異なる匂いの識別が  $\gamma$ KC 細胞群レベルですでになされており、グループ化もなされている可能性を示す結果が得られてきていると考えている。(下図)。



特定の匂い物質に関して、 $\gamma$ -CREp、 $\gamma$ -CREn(d)での応答性に逆の傾向が見られる現象を見出し、近年米 Janelia によりさらに詳細に明らかされたコネクトームの知見も参考にして考察していきたい(下図)。

忌避性行動の記憶の条件付け学習には、十分な摂餌環境下の個体を用いるが、報酬性記憶の条件付けにおいては絶食状態のハエを用いている。このため満腹/飢餓状態で作用する種々のペプチドシグナル経路の活性化状態が、条件付け前のハエ個体の MB ではあらかじめ異なっていることが予想された。実際、近年の先行研究では、KCs の投射先である DAN や MBON 神経において、イーストなどの食物の匂いへの学習前の生得的な応答が、空腹状態依存的に変化することが報告されている。本研究においてもこれらに対応する形で、飢餓状態が学習前の KCs の匂い応答に影響を与えることを示唆する結果を得ている。 $\gamma$ CREp 神経においては同一の種類の匂い刺激であっても、出力領域のコンパートメント間で、相対的応答強度の関係性が摂餌状態によって変化することを確認している(下図)。

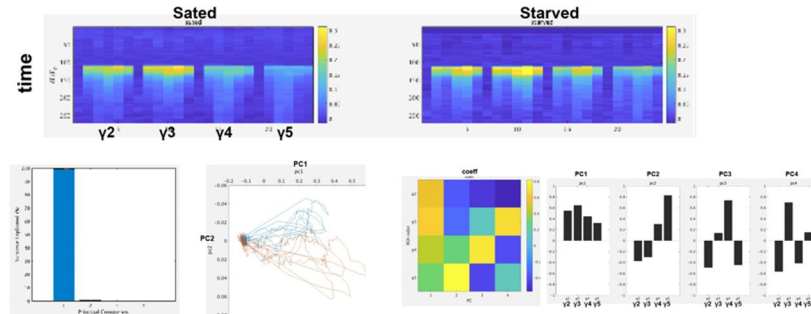
#### Comparison of Z-scores distributions



Z-scores were calculated by two different methods. On the left panel, scores were calculated from the pooled data set of mean dF/F0 values of (CRE-p: 751 cells from 7 flies; CRE-n: 280 cells from 8 flies) individuals. On the right panel, Z-scores were calculated in each fly and converged (yCRE-p: from 82, 107, 143, 86, 88, 90, and 155 cells data sets; yCRE-n: from 55, 16, 25, 20, 68, 31, 41, and 24 cells data sets). These results suggest that relative relationships among the Z-score averages of each odor are conserved across animals.

上記をより詳細に解析し、 $\gamma$ KCs のサブタイプである  $\gamma$ -CREp、 $\gamma$ -CREn(d) KCs に関し、シナプス可塑性検証の前提となる動的な匂い応答プロファイルをまとめていく。またその

#### Effect of internal state difference on relative activity of $\gamma$ CRE-p compartments



知見をもとに、顕微鏡下で条件付け学習を行なった個体の出力コンパートメントにおいてどのような変化が現れてくるかを慎重に検証していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿部 崇志、山崎 大介、前山 有子、多羽田 哲也、廣井 誠
2. 発表標題 好悪の価値情報を持つショウジョウバエキノコ体 神経における匂い応答様式の解析
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室WEBページ <a href="https://www.iqb.u-tokyo.ac.jp/lab/tabata/">https://www.iqb.u-tokyo.ac.jp/lab/tabata/</a>
--

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------