

令和 6 年 8 月 27 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、匂い刺激と忌避/報酬性刺激の連合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、各軸索束は複数の出力領域に区画化され固有の制御をうける。2光子顕微鏡を用い、軸索領域における学習前の匂い応答をライブイメージングし、プレシナプス可塑性解析の基盤となる基本的応答プロファイルを得ることを計画し実行した。その後、連合学習の同時性検出器と考えられているcAMPの高感度センサーを導入し、連合時のカルシウムとcAMPの同時イメージングを行ったところ、従来考えられていた古典的連合モデルでは説明できない現象が観察され、種々の解析の後、新規のモデルを提起した。

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、可塑性変化も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可塑性があるのかどうかは未解明の部分が多かった。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制御機構が存在するのかについて多くが未知であり、可塑性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た。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応答プロファイル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た。

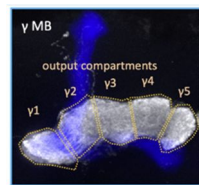
研究成果の概要（英文）：The *Drosophila* mushroom body (MB) is the site of memory formation through the association of olfactory stimuli with aversive/attractive stimuli. The MB neurons consist of functionally distinct subtypes, and each axonal bundle is compartmentalized into multiple output regions, receiving distinct regulation. Using two-photon microscopy, we conducted experiments to obtain basic response profiles through in vivo imaging of odor responses in axonal regions before associative conditioning, aiming to establish a foundation for presynaptic plasticity analysis. Subsequently, we introduced a highly sensitive sensor for cAMP, which is thought to act as a coincidence detector in associative learning, and conducted simultaneous imaging of calcium and cAMP during association. This led to the observation of phenomena that could not be explained by the classical associative model. After further detailed experiments and analysis, we proposed a new model and submitted a paper on this to bioRxiv

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 嗅覚記憶連合学習 ショウジョウバエ キノコ体 cAMP Calucium Dopamine ACh PKA

1. 研究開始当初の背景

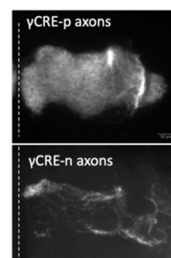
ショウジョウバエキノコ体(MB)は匂い刺激と忌避性および報酬性の刺激との連合学習による記憶形成の場である。MBのケニオン細胞(KCs)にはサブタイプ(γ , α'/β' , α/β)が存在し、記憶学習の素過程で異なる機能を有することが知られていた。MBKCsの神経軸索は種類ごとに束状化し、さらに接続先に応じて複数の出力領域に区画化され、コンパートメント単位で固有の制御がなされていることが次第に明らかになってきた(右図)。



本研究では、2光子 *in vivo* 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、かつ、複数コンパートメントを同時に観察することで、可塑性解析の基盤となる機能的神経回路図を得ることを目標とした。開始当初、Janelia により公開された split-gal4 系統を用いた γ KCs のイメージングにおいて、匂い刺激によりカルシウムレベルが上昇する神経群と低下する神経群が存在することを明らかにしていた。並行して、所属研究室において γ MBKCs を転写因子 CREB の発現レベル依存的に標識、分離した系統である、 γ CREp-gal4 および γ CREn-gal4 系統が作出されていた。これらによって標識される神経群は記憶形成に必須であり、行動遺伝学的には好悪の価値情報をコードし、忌避(嫌悪)性および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ていた。

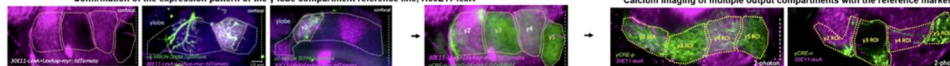
2. 研究の目的

シナプスプレ側である MBKCs にも可視的に検出可能なレベルの神経可塑性があるのかどうかに関しては、研究開始時には報告が少数であった。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平常時どのような活動が起こり、制御を受けるか、多くが未知であり、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要因の一つと考えられた。脳片半球あたりの細胞数が数十個である MBON に比べ、MBKCs 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、かつ、神経群としての匂い応答比率は 5~20%と疎らであることが知られている。先述の、 γ MBKCs 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、可視的で時空間的分解能が高い情報を統合し、機能的な神経回路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(右図)。

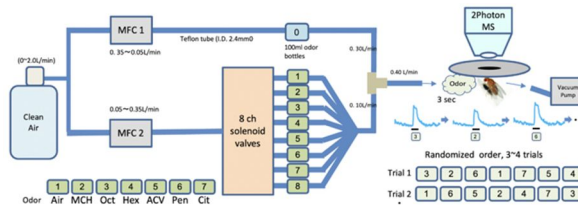


3. 研究の方法

学習依存的可塑性を検証するためには、連合前の匂い応答様式を正確に捉え、記述しておくことが重要である。しかし、行動遺伝学的に異なる性質を持つ神経群が混在する軸索が密集した領域では、シグナルの混交により、本来起きている変化を捉えられなくなるリスクが生じうる。したがって、この影響を排除することが重要であると考えた。このため性質の異なる γ CREp, γ CREn の各 gal4 系統で独立に、カルシウムレポーター UAS-GCaMP6f の発現を誘導することとした。軸索束のコンパートメントの区別は、接続先の DAN、MBON 神経の一部で飛び石様に発現する 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。最終的に採用した R30E11-lexA 系統は γ 2 及び γ 4 コンパートメントでの tdTomato の発現を誘導したため、全ての γ コンパートメントを区別したイメージングが可能となった(右図)。

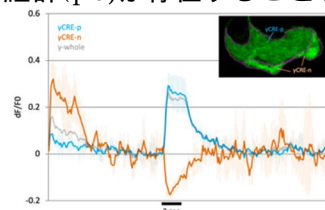


次に、匂い濃度や流速の条件の最適化が完了した刺激システムと 2 光子顕微鏡を組み合わせ、種々の匂い物質に対する応答様式を網羅的に取得することとした(右図)。

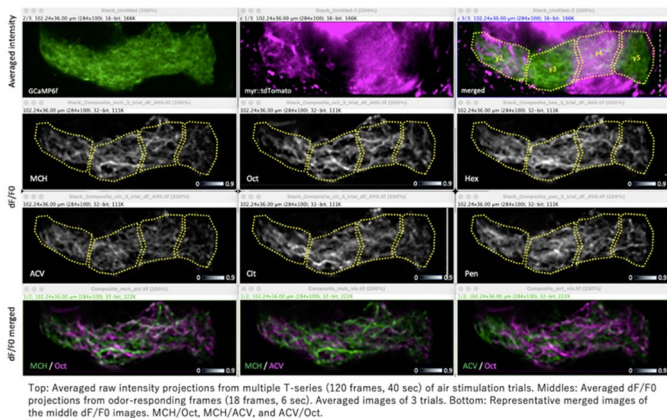


4. 研究成果

1-1. Janelia により作製、公開された γ MBKCs の 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 (γ -main) と低下する神経群(γ -d)が存在することをこれまで明らかにしていた。その後、これらがそれぞれ、本研究室で同定した行動遺伝学的に相反的機能を持つ γ MBKC サブタイプである、 γ CREp KCs および γ CREn KCs に相当することを、免疫組織染色と匂い刺激時のカルシウムイメージングにより見出した(右図)。

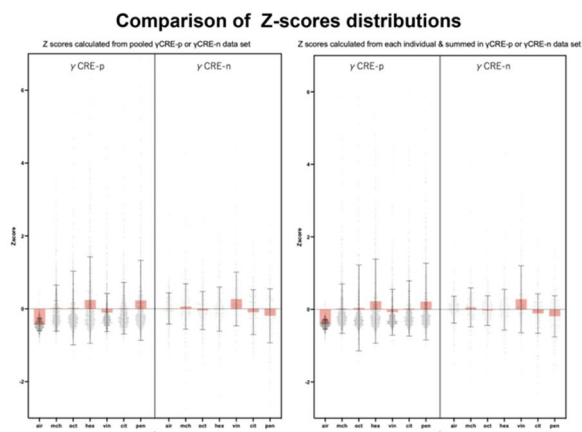


1-2. 軸索束コンパートメント領域のイメージングの結果、異なる匂いの識別が少なくとも γ CREp-KC 群単独でも既になされていることを示す結果を得た(右図、上部)。また、細胞体領域でのイメージングの結果、種々の匂い物質(4-MCH, 3-Oct, 1-Hexanol, Apple Cider Vinegar, Citronella, Pentanone)に対する応答性に関しても、 γ CREp 神経群と γ CREn 神経群において逆の傾向を見出した(同右図、下部)。

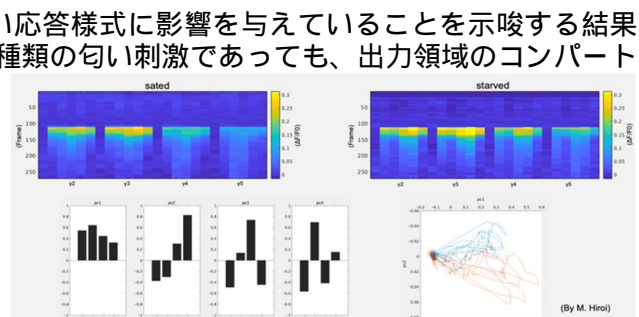


Top: Averaged raw intensity projections from multiple T-series (120 frames, 40 sec) of air stimulation trials. Middle: Averaged dF/F0 projections from odor-responsive frames (18 frames, 6 sec). Averaged images of 3 trials. Bottom: Representative merged images of the middle dF/F0 images. MCH/Oct, MCH/ACV, and ACV/Oct.

1-3. 匂い刺激(CS)と嫌悪性刺激(US)との条件付け学習時には、摂餌環境下においていた個体(Sated)を用いるが、報酬性記憶の条件付けにおいては、空腹状態のハエ(Starved)を用いている。先行研究により、満腹状態または飢餓状態で機能する神経ペプチドシグナル経路の活性化状態が、MBKCsで異なっていることが示唆される報告がなされていた。このため、条件付け学習前の匂い応答に関しても、嫌悪性連合学習用には摂餌飼育下の、報酬性連合学習用には絶食状態飼育下にあった個体における匂い刺激のデータを取得し、プロファイルを構築しておくことが必要と考えた。実験の結果、摂食状態に依存する内的状態が学習前の匂い応答様式に影響を与えていることを示唆する結果を得た。 γ 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の相対的なカルシウム応答強度の関係性が変化していることを見出した。具体的には Sated では γ 2,3 領域の応答強度に比して γ 4,5 領域の応答強度が低いのに対し、Starved では γ 4,5 領域の応答が相対的に上昇していることが明らかになった(右図)。



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 averaged (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.

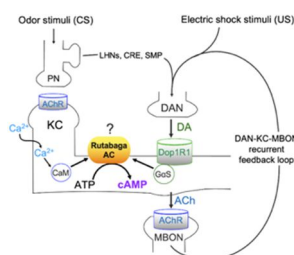


1-4. 1~3 までが明らかになったことで、当初の目的である、連合学習時のシナプスプレ側における可塑性検出の前提となる基本的応答プロファイルは一定程度得られたと判断した。このため顕微鏡下での嫌悪性連合学習の実験システムを構築した。マイクロマニピレータを用い、顕微鏡下のハエの胸部および腹部遠位領域に白金電極を接触させ、60v で極短時間の電気ショックを与えることで、その後のハエの自律的活動性を損なわずに、嫌悪性刺激(US)を再現性良く供与可能なパラメータを得た。

以上より、顕微鏡下で匂い刺激と同時に嫌悪性刺激も与えることが可能となった。本研究の長期的目標であるプレシナプス可塑性の検証のための、CS と US の連合による条件付け学習の過程の経時的イメージングのための準備が整った。

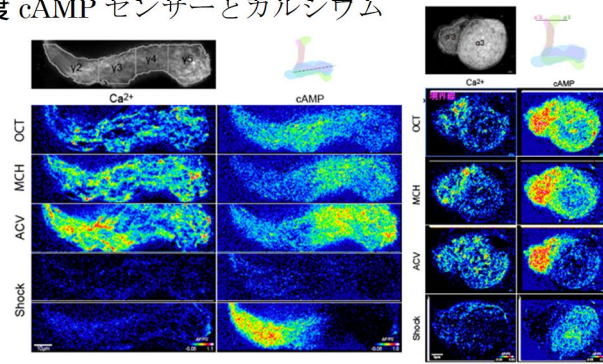
また同時期に、cAMP に対する高感度センサーが複数公開され、これらの蛍光プローブのショウジョウバエへの導入のための各種 UAS 系統を入手、または作成した。これまで基本的な応答様式の知見を蓄積してきたカルシウムセンサーGCaMP と、赤色 cAMP プローブ Pink Flamindo を同時に MBKCs で発現する系統、または赤色カルシウムプローブ jRGECO1b と緑色 cAMP プローブ G-Flamp1 を同時に発現する系統を樹立し、顕微鏡下での嫌悪性匂い連合学習実験を行い、新たに次の結果を得た。

2-1. ショウジョウバエにおける匂い刺激と嫌悪性刺激の連合学習では、キノコ体において CS である匂いと US である電気ショックの刺激の連合が起こるとされる。古典的には、MBKC では、匂いによって活性化される少数の細胞(5~20%)においてカルシウムシグナルが上昇し、これらにさらに電気ショックによって活性化される Dopamine シグナルが同時に入力されることにより、特異的に Rutabaga Adenylyl Cyclase(Rut-AC)が活性化されると考えられてきた(右図)。結果、cAMP レベルが相乗的效果をもつ



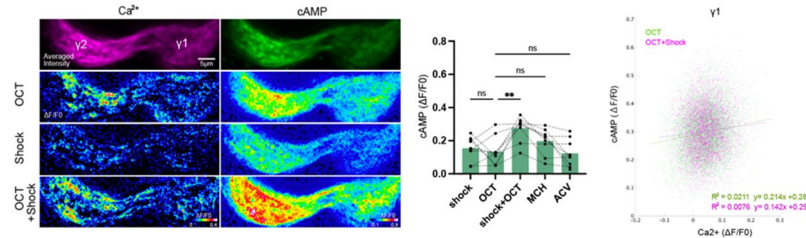
て上昇し下流にシグナルを送るため、Rutabaga 及び cAMP が、連合学習における同時性検出器として機能する分子実体であると長らく考えられてきた。先行研究での ex vivo による実験データもこの説を支持するものであった。

しかし、我々が今回新たに導入した高感度 cAMP センサーとカルシウムレポーターの同時観察による in vivo イメージングを行った結果、カルシウムは匂い刺激により少数の神経繊維での特異的上昇を示し、この結果は過去の知見と矛盾しなかった（右図、Ca²⁺パネル）。一方で、cAMP はほぼ全ての γ MBKC コンパートメントで、かつ、カルシウムのような選択的応答性は示さずより広範な領域で、匂いの種類に応じた固有の応答強度で、コンパートメント単位の変化を示すことが明らかになった（右図、cAMP パネル）。



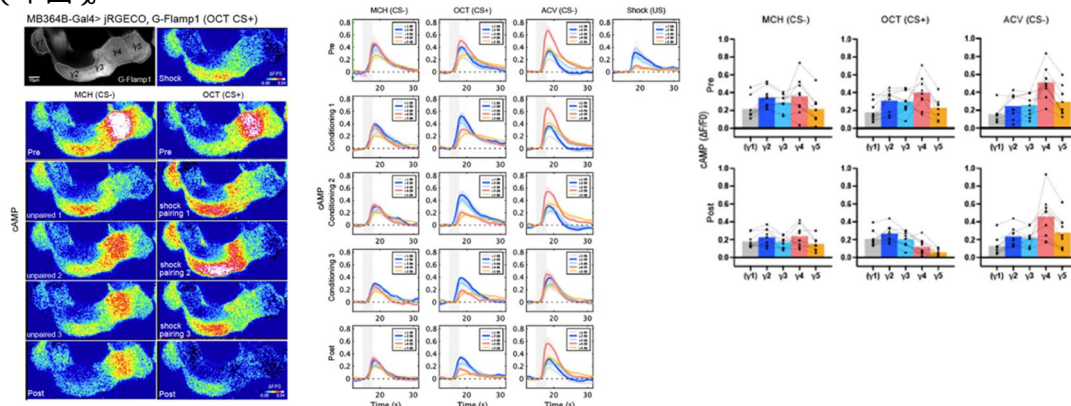
2-2. さらに、匂いとショックの同時呈示による連合学習実験を行ったところ、これまで古典的モデルで考えられてきたような、カルシウムレベルが上昇した一部の MBKC 神経軸索での cAMP レベルの特異的上昇は検出されなかった（下図、左部）。またコンパートメントレベルの平均値の比較をした場合においても、連合時に特異的に起こるとされる相乗的 cAMP 上昇は観察されず、むしろ匂い刺激単独による cAMP の上昇と、US 刺激単独による cAMP 上昇の和に等しい程度までの上昇にとどまった（同図、中央部）。

また、刺激情報の連合が起こると考えられる γ 1、 γ 2 コンパートメントを高解像度イメージングしたデータにおいて単一ピクセルごとのカルシウムと cAMP の相関解析を行ったところ、cAMP の上昇はカルシウムの上昇に依存しないことを強く示唆する結果が得られた（同図、右部）。



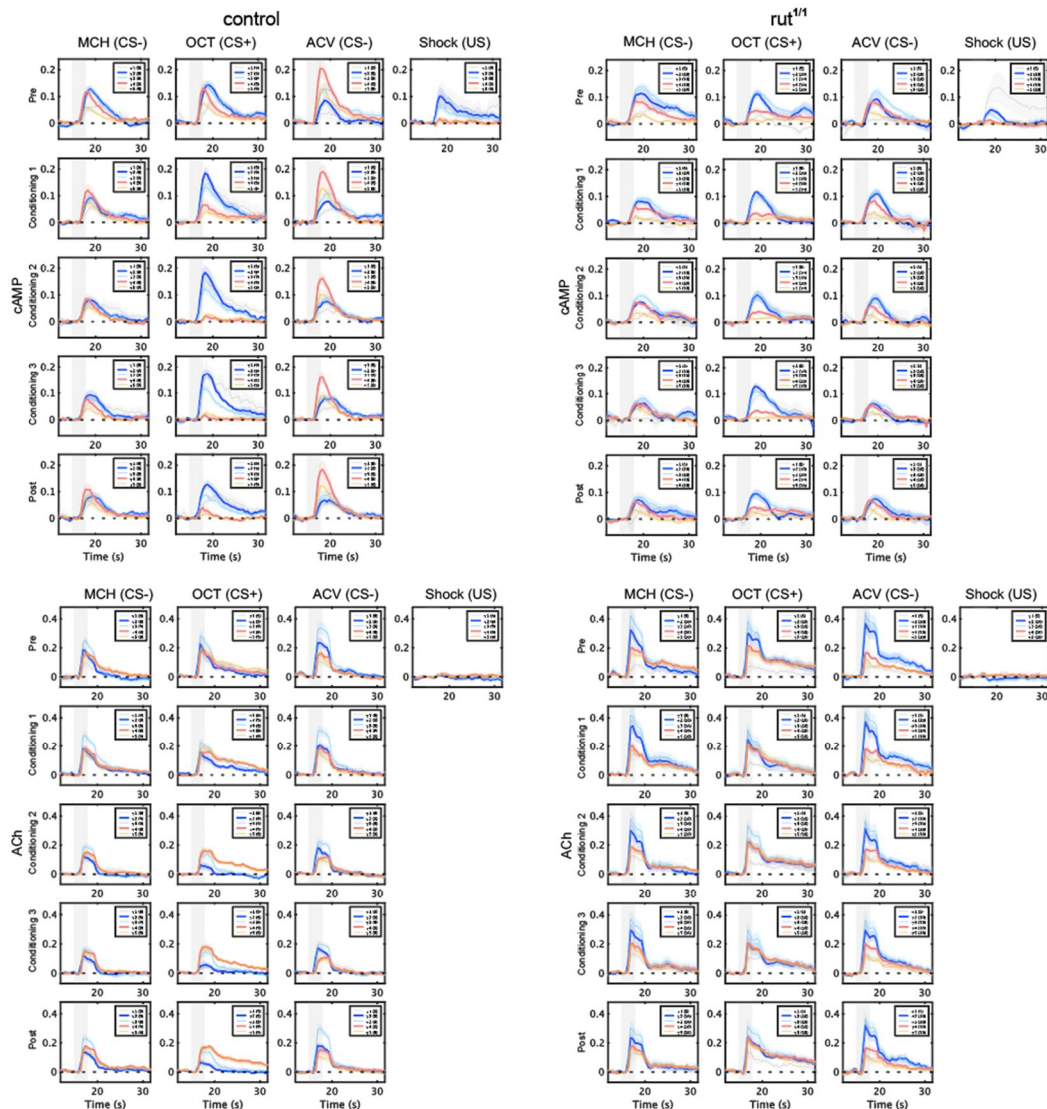
以上より、KC での cAMP レベルが記憶学習を担う神経での記憶学習のエングラムとして機能している可能性は低く、これまで提唱されていたような同時検出器としての機能を Rut-AC が有していることは再考する必要があることが示唆された。

2-3. 次に、連合学習の過程において変動する cAMP にはどのような性質、機能があるのかを詳細に解析することとした。新たに顕微鏡下での応答様式の変遷を解析するための連合パラダイムを構築し、実験を行った。結果、cAMP は条件付けの過程で γ MBKC のコンパートメント単位で動的に変動し、条件付けに用いた匂いで特異的に、より嫌悪的な valence をもつ刺激情報の応答パターンへと遷移し、 γ コンパートメント上で表現される現象を見出した（下図）。

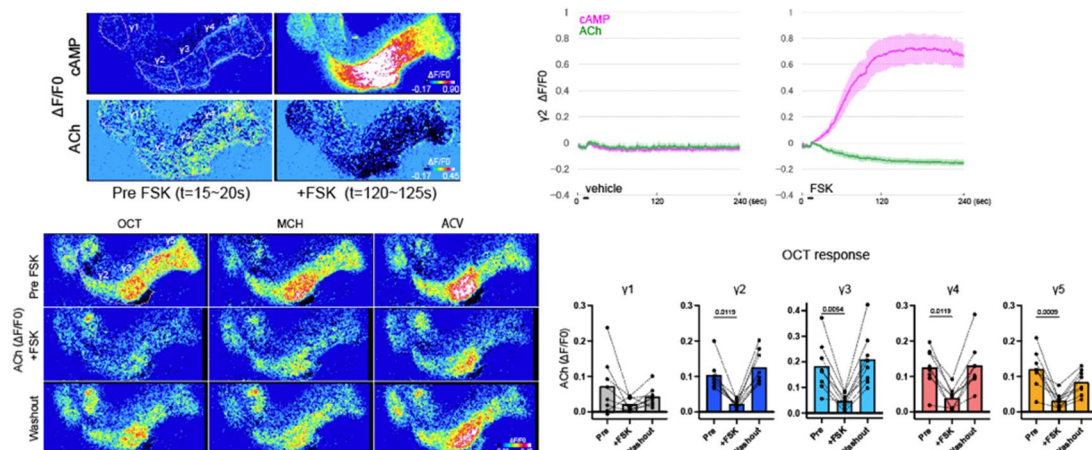


2-4. 上記の cAMP に加え、MBKCs から MBON への出力時に放出されるアセチルコリン (ACh) の変化の同時に観察した。本顕微鏡下の連合実験パラダイムにおいても、条件付けされた匂いにおいて特異的に、MBKC において Depression 様の ACh 応答の変化を示すことが確認され（下図、左側下部） in vivo の先行研究の結果と矛盾しなかった。さらに、これらの変化が Rut-AC の変異体である rut¹ では観察されないことを明らかにした（同下図、右側下部）。詳細な制御機構は依然として不明なものの、Rut-AC そのものは、連合学習に依然として重要な役割を持つことが in vivo の生理的レベルでも初めて確認された。

以上より、今回明らかにされた連合学習の過程におけるコンパートメント単位の cAMP 変化は、プレシナプス側での可塑性様式の新規の特徴の一つであることが強く示唆された。



2-5. 最後に、 γ MBKC からの ACh の放出において cAMP が抑制的に機能することを示唆する結果を得た。アデニリルシクラーゼの活性化により細胞内 cAMP 濃度を上昇させることが知られている Forskolin (FSK) を、in vivo での Bath application により投与したところ、cAMP の上昇に伴い、ベースレベルでの ACh 放出が抑制されることを見出した(下図、上段部)。さらに、FSK 存在下では、匂い刺激によってコンパートメント単位で誘発される ACh の放出が減少することを明らかにした(下図、下段部)。



以上、本研究によって、これまで支持されてきた古典的連合学習の分子メカニズムの再考を促すための知見が複数得られた。このほか、Dopamine と cAMP の関係、cAMP と PKA の関係などにも関してもさらに解析を行い新規のモデルを提示し、詳細をまとめた論文を bioRxiv に投稿した。今後は査読誌でのレビューを経たのち受理、公開を目指す。

(doi: <https://doi.org/10.1101/2023.06.26.545795>)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takashi Abe, Daisuke Yamazaki, Makoto Hiroi, Yutaro Ueoka, Yuko Maeyama, Tetsuya Tabata	4. 巻 -
2. 論文標題 Revisiting the role of cAMP in Drosophila aversive olfactory memory formation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.06.26.545795	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2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（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部 崇志、山崎 大介、廣井 誠、上岡雄太郎、前山 有子、多羽田 哲也
2. 発表標題 Revisiting the role of cAMP in Drosophila aversive olfactory memory formation
3. 学会等名 Neuro 2024（国際学会）
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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