

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700283
 研究課題名（和文） ショウジョウバエ嗅覚学習系を用いた記憶形成を支える神経ネットワークの解明
 研究課題名（英文） Novel neuronal network underlying *Drosophila* olfactory learning and memory
 研究代表者
 村上 智史 (MURAKAMI SATOSHI)
 東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
 研究者番号：10463902

研究成果の概要（和文）：

動物は生後様々な学習を通してその行動パターンを劇的に変化させる。この現象を理解するためには、その基盤となる神経回路を数多くの神経細胞の中から特定する必要がある。本研究では「半自動条件付け装置の開発」と「一部の神経細胞を遺伝学的に操作するためのエンハンサーとラップシステムスクリーニング」を行うことにより、ショウジョウバエ嗅覚学習・記憶形成に働く神経回路を効率的に同定する実験系を確立した。そしてこの系を用いることにより、中期（学習後数時間の）記憶が維持される神経回路の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Drosophila olfactory aversive conditioning has served as a powerful model system with which to elucidate the molecular and neuronal mechanisms underlying memory formation. I have devised a simple, low-cost semi-automated conditioning apparatus that computationally controls the delivery of odor and shock. The system is applicable to the study of olfactory memory formation and to the examination of conditioning parameters at a level of detail not practical with a manual apparatus.

To identify a novel neuronal network underlying *Drosophila* olfactory memory, I conducted a Gal4 enhancer-trap screening and identified a pair of neurons innervating onto the mushroom body (MB) in which olfactory memory is encoded. Transient silencing of synaptic transmissions from identified neurons, we call them PMO neurons, with Shibire^{ts} showed that these neurons are specifically involved in the formation of the late stage of (3 hr) olfactory aversive memory. They were not required for the early stage (1 hr) of olfactory memory. These data imply the presence of a neuronal circuit for memory consolidation that function downstream of the MB.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：行動生物学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学

1. 研究開始当初の背景

動物は環境からのさまざまな刺激に応じてその行動を変化させる。脳はこのような可塑性を担う器官であり、刺激に関する情報（すなわち記憶）を蓄えることによって動物の環境への適応を支えている。この記憶形成の分子機構や神経回路については多くのモデル生物を用いて研究がなされ、種を超えて保存された機構の存在が明らかにされてきた。その中でショウジョウバエの嗅覚記憶に関する研究は、記憶形成に関わる遺伝子の同定などを通じて記憶の形成メカニズム一般の解明に貢献してきた。

それと同時にショウジョウバエの嗅覚学習に関わる回路についても精力的な解明が行われ、特に Mushroom Body (MB) と呼ばれる神経網が嗅覚記憶形成の場であるという知見が数多く得られている。しかしながら MB 内、あるいは MB とより高次の脳領域との相互作用についてはほとんど研究がなされていない。MB は前大脳に存在する神経網の一部であり、周囲の神経網と MB を接続するような神経細胞が数多く見つかっている。さらに近年 DPM neuron と名付けられた神経細胞が記憶固定に必要であるという報告がなされた。DPM neuron は MB 外から MB 内に投射する神経 (MB-extrinsic neuron) である。この発見は、MB と周囲の神経細胞 (群) との相互作用が嗅覚記憶形成に重要であることを明確に示している。

私は Gal4 エンハンサースクリーニングによ

り、MB に投射する extrinsic neuron に特異的な Gal4 系統を単離している。この神経細胞は MB と MB 近傍の神経網に投射しており、MB と高次の脳領域との情報のやり取りを担うと考えられる。また私はこれまでに嗅覚記憶研究に必要な実験系を確立しており、上記のような背景をふまえてショウジョウバエ嗅覚記憶形成における MB extrinsic neuron の働きを解明するための実験を計画した。本研究の結果として嗅覚学習に関わる新たな神経回路の解明が進むことで、記憶関連遺伝子の働きをより詳細に解析できるようになり、その結果得られる神経回路と分子機構をもとに、総合的な記憶メカニズムの理解が可能になると期待される。

2. 研究の目的

ショウジョウバエ嗅覚記憶の形成過程では、
①記憶獲得時に匂い情報と忌避情報を MB に伝える神経細胞、
②獲得された刺激情報を MB 内に固定する神経細胞、
③記憶の読出時に MB から運動中枢に情報を伝える神経細胞、
がそれぞれ必要であると考えられる。しかしながらそのほとんどは未だ未同定である。本研究では、Gal4/UAS システム と *in vivo* 神経機能阻害法を用いることで、新たな神経細胞の同定と、その記憶形成過程における役割の解析を行う。神経細胞の同定だけでなくその機能の解析までを行うことにより、機能的な神経回路マップの作製を目指す。

3. 研究の方法

(1) piggyBac エンハンサートラップスクリー

ニングと解剖学的解析

新たな MB extrinsic neuron を同定するため、Gal4 エンハンサートラップスクリーニングを行う。各系統について GFP により Gal4 タンパクの発現を可視化し、発現部位を調べる。スクリーニング後、MB 特異的なマーカーを用いた免疫抗体染色法により、神経細胞が MB のどの部位に投射しているのかを明らかにする。MB 以外への投射については、ショウジョウバエ脳において視覚系神経細胞の投射パターンを詳細に記述した例を参考に、その投射先を明らかにする。

(2) Labview を用いた条件付け手順の自動化
嗅覚記憶研究、特に長期記憶の誘導においては、手作業による冗長な条件付け操作がネックとなっていた。この方法では取得できるデータ数が限られる上に、誤操作によるデータの信頼性低下が避けきれない。そこでショウジョウバエ嗅覚記憶研究で実績のある Harvard 大 Sam Kunes 研からの技術供与により、条件付け操作の自動化を行う。計測機器の自動制御に使用されるソフトウェア Labview (National Instruments 社) を用いて①匂い経路の開閉、②電気刺激装置の on/off、をコンピューターから任意のタイミングで制御する。変異体解析を行うのに十分な条件付け効果を得るための条件検討と、複数のサンプル (10 サンプル程度) を同時に条件付けするためのシステムの拡張を行う。

(3) *shi^{ΔS}* を用いた部位特異的神経機能阻害

本年度は、*shi^{ΔS}* の利点を最大限に生かし、スクリーニングにより同定した神経細胞の機能の解明を行う。年度前半においては嗅覚記憶形成への寄与の有無を判定することの的を絞り、本年度後半に機能時期の詳細な解析を行う。

嗅覚記憶の条件付けでは、特定の匂い物質と電気ショックを同時に与え、一定時間後にその匂いからの忌避反応を定量することで記憶形成を調べる。本研究では短期・中期記憶に加えて長期記憶への関与についても調べる。前述した条件付け自動化により誤差の少ないデータを十分量得ることで、微細な記憶形成障害でも検出することが可能となる。

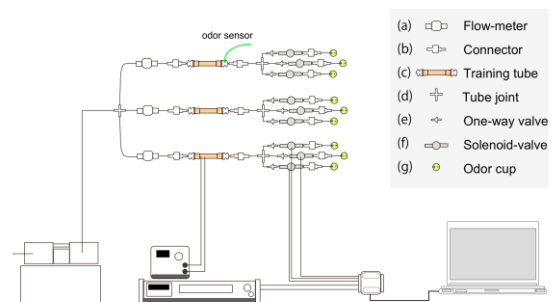
(4) *shi^{ΔS}* を用いた時期特異的神経機能阻害

記憶の形成過程は、いくつかのステップからなる。同定した神経細胞がどのステップで働くのかを特定することによって初めて、嗅覚記憶形成に関わる神経回路の作動原理についての考察が可能になる。そこで上述した *shi^{ΔS}* を用いることにより①記憶の獲得期 (条件付け時) ②固定期 (条件付け終了後、テストまでの間) ③読出し期 (テスト時)、それぞれの時期特異的な神経機能阻害を行う。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ嗅覚条件付けの半自動化

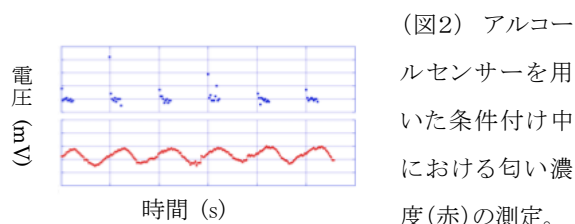
従来手作業で行われていたショウジョウバエ条件付けを自動で行う装置を製作した。電磁弁と電気刺激装置を機器制御ソフトウェアである Labview により動作制御し、ハエへの匂い提示と電気ショックを、0.1 秒単位で細かく設定できる系を構築した (Murakami et al. J. Neurosci. Methods, 2010)。



(図1) 半自動条件付け装置の概略図

(2) ショウジョウバエ嗅覚条件付けプロトコルの最適化

上記条件付け装置に半導体アルコールセンサーを付加することにより、電気刺激と匂い濃度変化のタイミングを詳細に検討した。従来のプロトコルでは匂いを1分間提示し続ける間に12回の電気刺激を与える方法が取られていたが、間歇的な匂い提示 (pulsed odor flow) により短期記憶のスコアが有意に上昇することを見いだした。



(3) ショウジョウバエ嗅覚記憶研究を効率化する系の確立

ショウジョウバエ嗅覚学習記憶系は学習記憶を司る分子機構や神経回路を解析する上で非常に強力なモデルであるが、条件付けに要する手間がネックとなっていた。特に長期記憶の誘導には刺激を数時間にわたって繰り返す必要があり、条件付け操作を自動化する手軽な系が求められていた。今回開発した装置の組み立てに必要なパーツはすべて商社等から容易に入手可能であり、Lebview のソースファイルは Web 上に公開している。

(<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/fly/htmls/download.html>)

したがって機器制御に関する知識がなくとも比較的容易に製作が可能であり、ショウジョウバエ学習記憶研究を促進するツールとなると期待される。

またこの装置では複数(本系では現在9つ)のサンプルを同時に条件付けすることができ、記憶変異体のスクリーニング効率が飛躍的に向上す

ると期待される。

本装置では半導体アルコールセンサーを付加することにより、条件付け時の匂い濃度変化を経時的に計測することも可能である。これまで嗅覚学習の成立過程を詳細に研究した例は少なく、本系を用いることにより匂い学習過程に関してシステマティックな解析が可能となった。本研究ではこの点を活用し、刺激提示タイミングの最適化を行った((2)参照)。

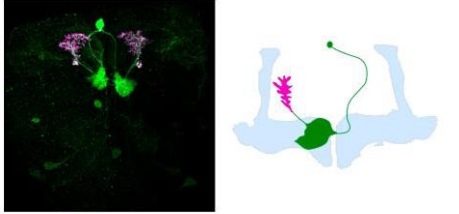
(4) 一部の神経細胞で発現するエンハンサートラップシステムの単離

嗅覚学習を担う神経回路を特定するために、エンハンサートラップスクリーニングを行った。独自に樹立した3,000系統の中から、脳に発現が見られた系統について共焦点顕微鏡を用いた詳細な観察を行った。その結果、(a)キノコ体を構成する一部の細胞群で特異的に発現する系統、(b)キノコ体に投射するキノコ体接続神経細胞で特異的に発現する系統、(3) Central complex, Fan-shaped body, Antennal lobe など、脳の特定領域に特異的に発現する系統を複数取得することができた。

(5) 新規キノコ体接続神経 (PMO neuron) の同定

上記スクリーニングにより取得したエンハンサートラップ系統のうち、キノコ体と接続する神経細胞で特異的に発現する系統について、免疫抗体染色を用いた詳細な解剖学的解析を行ったところ、脳頭頂部に存在する一対の神経細胞 (PMO neuron と命名) がキノコ体の γ lobe と α'/β' lobe に接続していることを見いだした。PMO neuron はキノコ体の近傍領域にも神経突起を伸ばしていた。前シナプス領域をマーキングする HA-tagged Synaptotagmin を用いた解析

の結果、PMO neuron はキノコ体から情報を受け取り、キノコ体近傍領域に情報を送る出力神経細胞であることが示唆された。



(図3) PMO neuron の投射パターン。マゼンタ＝前シナプス領域。

(6) PMO neuron は中期記憶の維持に働く

PMO neuron の嗅覚記憶形成過程への関与を調べるために、*shi^{ΔS}*法を用いた神経活動阻害実験を行った。*shi^{ΔS}*法はシナプス活動特異的作用・即効性・可逆性・簡便性など、生体内における神経活動阻害法として理想的な特徴を持つ。さらに温度を変えるだけで数分以内に *shi^{ΔS}*による阻害効果をキャンセルできるため、神経細胞が記憶形成のどの過程に働くのかを細かく調べることが可能である。実験の結果、PMO neuron が中期嗅覚記憶(学習後3時間の記憶)形成に必須であることを見いだした。さらに、神経阻害のタイミングを時間的に狭めた解析からこの神経細胞は記憶の獲得期・読み出し期には不要であり、嗅覚記憶が固定される時期(consolidation phase)に働くことを明らかにした。

(7) 匂い記憶維持に働く新たな神経回路の特定

キノコ体出力神経 (MB output neurons) についてはこれまで機能面からの研究報告がないため、キノコ体を中心とした嗅覚記憶神経回路の全貌解明に向けて本発見は重要な端緒となると考えている。またヒトやマウスなどほ乳類においては獲得された記憶が時間の経過とともに初期脳領

域から別の領域へ移動することが報告されており、本研究で同定した PMO neuron はこの現象を回路レベルで研究する上での有用なモデルになると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Satoshi Murakami, Chuntao Dan, Brendan Zagaeski, Yuko Maeyama, Sam Kunes, Tetsuya Tabata.

Optimizing Drosophila olfactory learning with a semi-automated training device. Journal of Neuroscience Methods, 188(2), 195-204, 2010. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① Satoshi Murakami, Kohei Sekiguchi, Toshiharu Ichinose, Yuko Maeyama, Tetsuya Tabata.

Identification of a mushroom body output neuron required during the consolidation phase for odor memory

匂い記憶の固定期に働くキノコ体出力神経の同定

International bioresource symposium

"Drosophila"

2010/3/17-18

② Satoshi Murakami, Kohei Sekiguchi, Kazumichi Shimzu, Yuko Maeyama, Tetsuya Tabata.

Identification of mushroom body-associated neurons that regulate the formation of Drosophila olfactory aversive memory

新学術領域研究班会議 静岡

2009/11/18-20

③ Satoshi Murakami and Tetsuya Tabata.

Cellular mechanism underlying olfactory memory formation in *Drosophila*

第二回分子高次機能研究会 福島

2009/11/3-5

④ 村上智史、関口 紘平、市之瀬、前山有子、多羽田哲也.

Identification of mushroom body-associated neurons that regulate the formation of

Drosophila olfactory aversive memory

第32回日本分子生物学会 横浜

2009/12/9-12

⑤ Satoshi Murakami, Yuko Maeyama, Tetsuya Tabata.

Transcriptome analysis of olfactory aversive memory in *Drosophila* mushroom body

第32回神経科学大会 名古屋

2009/9/16-18

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 智史 (SATOSHI MURAKAMI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：10463902

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：