

機関番号：82609

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700376

研究課題名 (和文) 摘出脳を用いた長期記憶形成の可視化モデル開発

研究課題名 (英文) Development of new model to examine LTM formation *in vitro*

研究代表者 上野 耕平 (UENO KOHEI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

研究者番号：40332556

研究成果の概要 (和文)：記憶がどのように脳の中で形成され、保持されているのかという問題は依然として不明な点が多い。本研究は、単純な脳構造を持つショウジョウバエから脳を摘出し、脳神経細胞の活動性に伴い変化する蛍光を共焦点 LASER 顕微鏡によって観察した。さらに、その脳神経細胞を外部から刺激することで、ハエの匂い嫌悪学習と密接に関連した神経活動の変化を引き起こさせることに成功した。この変化は培養した単離脳で見出された。さらに LASER とチャンネルロドプシンによる神経細胞の興奮を誘導することにも成功した。これらの知見により、将来的に長期記憶形成と関連した神経活動可塑的变化のリアルタイム解析系開発に先鞭を付けた。

研究成果の概要 (英文)：The physiological mechanisms of memory formation and storage is still unclear. In this report, I tried to examine the mechanisms by using isolated brain of *Drosophila melanogaster*. I found that the fly brain expressing fluorescent probe to monitor neural activity responded by electrical stimulation. Finally, I found that the electrical stimulation successfully induced the neural plasticity associate odor-avoidance memory in fly. By some experiments, I propose the new neural model to explain the odor-avoidance memory.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

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

学習や記憶によって引き起こされる神経の可塑的变化は、主に神経の活動性に帰着すると考えられている。ショウジョウバエは匂いと電気ショックを呈示されると、その匂いを忌避するようになるという条件学習が可能である。この学習によって形成される記憶は

通常数時間から 1 日程度しか保持されないが、さらに、この学習を繰り返して行うことで、タンパク合成を必要とする長期記憶を形成することが可能である。この記憶は 1 週間以上保持される。

このショウジョウバエの匂い嫌悪学習において重要な働きをされると考えられている

のが、キノコ体と呼ばれる脳部位である。その理由として、この脳部位におけるタンパク合成を阻害することで、長期記憶が形成できなくなる、さらには、テスト時にこの部位における神経活動を抑制すると記憶が保持されていても読み出しが出来なくなるという知見がある。さらに、Ca⁺⁺指示蛍光タンパクを発現させたハエに長期記憶を形成させ、その数日後にハエ頭部に穴を開け、そこから匂いを嗅がせた時のキノコ体神経活動を測定した実験がある。その結果、長期記憶を形成したハエの条件付けされた匂いに対するキノコ体 Ca⁺⁺流入量が、無処理のハエに比べて有意に上昇していることが見出された。すなわち、長期記憶形成に伴い、キノコ体神経活動性が可塑的に上昇したと言える。この Ca⁺⁺反応性の上昇は、記憶痕跡であることが示唆されている。

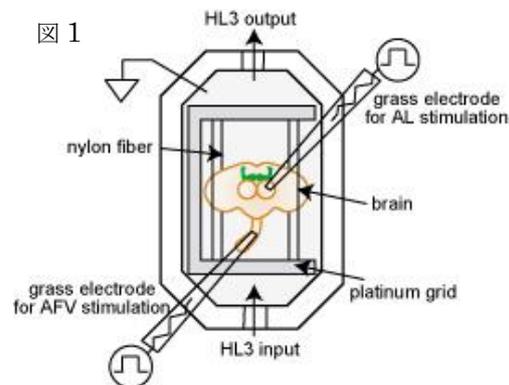
2. 研究の目的

上述した記憶痕跡の解析は、ハエを拘束し頭部に穴を開けて顕微鏡下で観察するものである。従って、単一の個体において、学習前から学習時、さらには記憶保持を経て最終的にテストの時まで継続的に観察することは難しい。そこで、申請者はハエの脳を単離し、その脳を培養しながら脳神経活動を Ca⁺⁺指示蛍光タンパク (G-CaMP) を指標として解析できないかと考えた。

匂いや電気ショック刺激は、それぞれの中枢を刺激することで行い、この同時刺激前に比べて同時刺激後では匂い中枢刺激に対するキノコ体ニューロンの Ca⁺⁺応答性が上昇することが期待される。長期記憶解析を行うためには、日数をおいて繰り返し匂い中枢刺激を再現性高く行えねばならない。匂い中枢にチャンネルロドプシンを発現させ、それを LASER により刺激することで行う。

以上の手技を組み合わせ、*in vitro* 環境における長期記憶様の神経活動可塑的变化を引き起こし観察できるモデル系を構築することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法



ハエの単離脳を長期間培養する技術は既に確立しており、これを利用する。大まかな実験装置を図1に示す。

ハエの単離脳を白金グリッドにナイロンファイバーで固定し、観察チャンバーに沈めた。実験中は、HL3というハエの組織液を模した緩衝液を循環させている。匂い中枢であるALとショック中枢であるVNCから脳に至るAFVをガラス電極もしくは光により刺激を行いながら、同一視野にあるキノコ体（図中緑）の蛍光強度を観察した。

4. 研究成果

単離脳における神経活動可塑的变化

LASERによるチャンネルロドプシンを介した神経刺激を行う装置の開発は、Nikon社に依頼したが、技術的な困難なためなかなか進展しなかった。

そこで、まず匂いとショックの受容中刺激によりキノコ体ニューロンの Ca⁺⁺応答性が可塑的に変化するか否か、そしてその変化がどの程度実際の行動レベルでの記憶と相関があるのかを解析した。その結果、匂い中枢とショック中枢の同時刺激前に比べて刺激後では匂い中枢刺激に対するキノコ体ニューロンの Ca⁺⁺応答性が有意に増大しており（図2）、その増大性は数時間保持された（図3）。

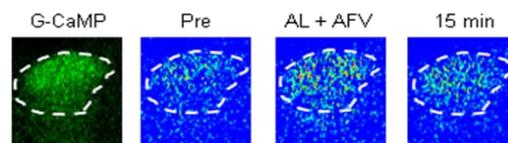


図2 キノコ体ニューロンの G-CaMP 蛍光（左）変化を疑似カラーで示した。匂い中枢とショック中枢の同時刺激中 (AL+AFV) および同時刺激前 (Pre) と刺激後 15 分後 (15 min) の匂い中枢刺激に対するキノコ体ニューロンの Ca⁺⁺応答性。Pre に対して、15 min の変化が大きくなっている。

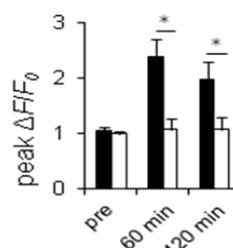


図3 匂い中枢とショック中枢の同時刺激を行った脳（黒バー）と行っていない脳（白バー）における、匂い中枢刺激に対するキノコ体ニューロンの Ca⁺⁺応答性。同時刺激を行った脳では2時間以上も応答性の増大が保持された。

実際のハエの記憶も数時間以上保持されることから、相同性の高さが伺えた。

保持時間の他にも、以下の共通点を行動実験と Ca⁺⁺応答性に相関を見出した。(1) 協同性: ハエの記憶は、匂いと電気ショックのタイミングをずらし、電気ショックを匂いに対して先行させると記憶が出来ない。同様に、

ショック中枢刺激を匂い中枢刺激に先行させると Ca^{++} 応答性の増大は見られなかった (図 4)。(2) 入力特異性: 匂いとショックで条件付けたハエは、その匂いに対して忌避するようになるが、別の匂いや電気ショック

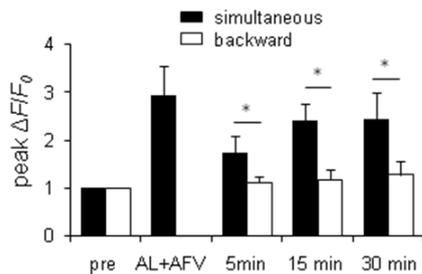


図 4 匂い中枢とショック受容中枢を同時刺激した脳 (黒バー) と、ショック中枢刺激を先行して刺激した脳 (白バー) のそれぞれ、匂い中枢刺激に対するキノコ体ニューロンの Ca^{++} 応答性変化。同時刺激した脳は、5、15 および 30 分において高い応答性を示した。

クそのものに対する忌避性は変化しない。同様に、 Ca^{++} 応答性の増大は、匂い中枢刺激に対してのみ引き起こされ、ショック中枢刺激に対しては起きなかった (図 5)。(3) 記憶の消去: 条件付けたハエに対して、繰り返し匂いだけを嗅がせると、次第に忌避性は消

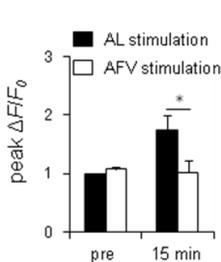


図 5 匂い中枢とショックの同時刺激した後、匂い中枢を刺激した場合 (黒バー) とショック中枢を刺激した場合 (白バー) のキノコ体ニューロンの Ca^{++} 応答性。ショック中枢刺激に対する応答性は上昇しなかった。

失する。これは記憶の消去と呼ばれる生理的な反応である。匂い中枢とショック中枢の同時刺激後、 Ca^{++} 応答性が増大した脳に対して、繰り返し匂い中枢を刺激すると、その増大は減弱し、最終的には消失した (図 6)。(4) 記憶変異体: ショウジョウバエの記憶変異体

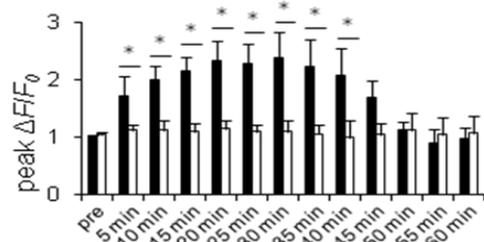


図 6 匂い中枢とショックの同時刺激した脳 (黒バー)、および同時刺激しなかった脳 (白バー) へ匂い中枢を繰り返し刺激した時とのキノコ体ニューロンの Ca^{++} 応答性。応答性増大は、繰り返し刺激により一時間以内に消失した。

として有名な、ドーパミン受容体の変異体は、

野生型で見られる Ca^{++} 応答性の増大は生じなかった。

以上の点から、単離脳における匂いとショック中枢同時刺激によるキノコ体ニューロンの Ca^{++} 応答性可塑的变化は、極めて行動レベルの反応性変化と相関性が高いことを見出した。

単離脳の長期培養

長期記憶形成および保持を観察するためには、単離脳が数日以上は生理的な機能を保持した状態で培養されなくてはならない。単離した脳を、培養液で一週間培養し、その培養脳の匂い中枢刺激を行い、キノコ体ニューロンの Ca^{++} 応答性を測定したところ、5 日以内の培養では応答性の変化は見られなかった。1 週間経つと応答性がやや増大することが見られた。次いで、5 日以内の培養脳に対し、匂い中枢とショック中枢の同時刺激によって匂い中枢刺激に対する Ca^{++} 応答性が増大するか否かを解析したところ、急性単離脳と同様に応答性の増大が見られた。以上の結果から、少なくとも単離後 5 日以内の脳であれば急性単離脳と同様の生理学的な解析が可能であることが示された。培養した昆虫脳での生理学的な解析はこれまでに無く、重要な知見である。

LASER とチャネルロドプシンによる神経活動の誘発

チャネルロドプシンを痛み感受性ニューロンに発現させ、その個体に LASER を照射すると、その光から忌避する行動を誘発することに成功した。

同じ長さの波長を用いてチャネルロドプシン刺激と G-CaMP の蛍光観察するには、レゾナントミラーを用いて正確に異なる 2 地点に光を振り分けながら XY 方向にスキヤニングするという機能が必要となり、結局このシステムは満足に稼働することができなかつた。

そこで、チャネルロドプシンを活性化するのに、より波長の短い LASER を使い、チャネルロドプシン活性化にはガルバノミラーを用い、スキヤニングにはレゾナントミラーを使うという方法を用いたところ成功した。

一方、キノコ体に G-CaMP を、匂い中枢にはチャネルロドプシンを発現させ、それぞれが混ざって発現しないハエの作成を行い、最終的に匂い中枢には GAL4/UAS システムという酵母の遺伝子発現系を、キノコ体には LexA/LexAOp システムという大腸菌の遺伝子発現系を用いることでこの問題を克服した。このハエから単離脳を作成し、LASER により匂い中枢を刺激したところ、キノコ体ニューロンで電極刺激と同様の Ca^{++} 応答性を測定することに成功した。しかし、チャネ

ルロドプシンはビタミン A を強制摂取させないと機能することができないため、個体によってチャンネルロドプシンの活性化が大きく異なり、この問題は研究期間において克服することができなかつた。この問題は、23年度以降の問題点として克服していきたいと考えている。

以上の研究から、ハエ単離脳において匂い嫌悪学習に重要なキノコ体ニューロンに人為的に可塑的な神経活動変化を引き起こすことに成功した。また、その可塑的变化は行動レベルでの変化と多くの一致点があることを見出し、少なくとも短期・中期的な記憶の基盤となっていることを示唆した。また、培養脳においても可塑的变化が見出されることや、LASERによりチャンネルロドプシンを活性化できることを見出した。生体組織においてLASERによるチャンネルロドプシンの活性化に成功した例はほとんどなく、重要な知見である。

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)

Kuromi H, Ueno K, Kidokoro Y., Two types of Ca²⁺ channel linked to two endocytic pathways coordinately maintain synaptic transmission at the Drosophila synapse. Eur. J. Neurosci. 32(3):335-46 (2010)

[学会発表] (計3件)

上野耕平、齊藤実「一過性ドパミン処理はキノコ体ニューロンの反応性を増強させる」第33回 日本神経科学会 神戸コンベンションセンター 平成22年9月

上野耕平、齊藤実「遺伝子と行動を繋ぐ脳機能の蛍光イメージング解析 (ワークショップ: 行動は遺伝子にどこまで規定されるか)」第33回 日本分子生物学会年会 神戸コンベンションセンター 平成22年12月

上野耕平、齊藤実「培養ショウジョウバエ脳における神経応答の高速スキヤニング共焦点レーザー顕微鏡による可視化」第32回日本神経科学会 名古屋国際センター 平成21年9月

[図書] (計1件)

上野耕平、齊藤実「記憶学習の精緻な理解に向けてのモデル動物: ハエ」 生体の科学

61(1) 17-23 (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 耕平 (UENO KOHEI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

研究者番号: 40332556

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし