

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23680044

研究課題名(和文)匂い記憶を支える神経機構の解明

研究課題名(英文)Understanding the neural basis of olfactory memory

研究代表者

風間 北斗(Kazama, Hokto)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：90546574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,900,000円、(間接経費) 6,270,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの活動を支える記憶は、細胞の活動や形態の変化として脳内に刻み込まれると考えられている。しかしながら、記憶のメカニズムに関しては未知な部分が多い。本研究は、ショウジョウバエ成虫の匂い記憶をモデルとし、細胞・シナプス・回路レベルで記憶のメカニズムを解明することを目指した。その結果、単一動物を対象にして匂い記憶を形成させる手法を確立すること、記憶に関わる複数の神経細胞群から同時に活動を記録すること、匂い記憶に必要な脳領域に存在する細胞の電気的性質やシナプスの性質を調べることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Memory that supports human activity is thought to be embedded in the brain as changes in cellular morphology and activity. However, the mechanisms underlying memory is not well understood. By focusing on olfactory memory in the adult *Drosophila*, this study aimed to understand the mechanisms of memory at cellular, synaptic, and circuit levels. We were able to develop a method to create memories in individual animals, to record the activity simultaneously from an ensemble of neurons involved in memory, and to analyze electrical properties of neurons and synapses in a brain region responsible for olfactory memory.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：記憶 ショウジョウバエ オペラント条件付け イメージング 電気生理学

### 1. 研究開始当初の背景

記憶は、突き詰めると、神経活動の変化として脳内に表現されると考えられている。しかし、記憶のメカニズムはその一端が理解されたに過ぎなかった。これは、記憶の研究には、以下に述べる困難な状況が積みまとう為だと考えられた。まず、記憶の痕跡は複数の脳領域に分散して存在している可能性がある。我々の脳内には何千億という神経細胞が詰まっているため、痕跡を網羅的に把握することは非常に難しい。また、記憶の神経機構を解析するためには、生きた個体から神経活動を記録することが求められるが、これは容易ではない。実際、特定のシナプスや神経細胞の性質の変化を調べることは、*in vitro* の系では盛んに行われてきたが、生体内ではあまり報告がなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエ成虫の匂い記憶をモデルとすることで、上記の記憶研究特有の困難を回避し、シナプス・細胞・回路レベルで記憶のメカニズムを理解することを目指した。ショウジョウバエを用いた理由は以下の通りである。第一に、成虫は頑強な匂い記憶を短い期間で形成できるので、記憶形成の過程全体が研究しやすい。第二に、ショウジョウバエの脳は人の脳と比べて少ない細胞から成り立っており、しかも、嗅覚一次細胞から三次細胞までを各個体で同定できるので、匂い記憶の痕跡を効率よく領域横断的に探索できる。第三に、これらの細胞を遺伝学的に同定・操作できるので、それぞれの機能解析が容易である。第四に、電気生理学やイメージングを用いて生体内の神経細胞から活動を記録する技術が開発されている。これらの利点を活かして、具体的に以下の目的を達成することを計画した。

#### (1) 固定された単一個体を対象にした学習法の確立

ショウジョウバエは、対提示された匂いと電気刺激を連合し、学習後はその匂いを特異的に忌避することが40年前から知られていたが、実験には100匹程の動物がまとめて用いられ、集団としての行動が評価されていた。しかし、学習過程の神経活動を調べる為には、固定された単一個体を対象とする必要があるため、新たな学習法を確立する。

#### (2) 多数の神経細胞からの活動記録法の確立

匂いの情報は複数の神経細胞群に表現されているので、一次から三次細胞までの各階層において、細胞群総体から活動を経時的に記録するシステム及び、得られた四次元画像データを解析するアルゴリズムを作成する。

#### (3) 記憶痕跡のシナプス・細胞レベルでの解析

学習後、嗅覚二次細胞と、記憶に必要な脳領

域に属する三次細胞間のシナプス、及び三次細胞の内因的性質に変化があるかどうかを調べる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 仮想空間での学習過程の追跡

視覚刺激、匂い刺激、罰刺激を特定のタイミングもしくは、動物の行動に応じて与えられる仮想空間を作成した。その中でショウジョウバエ成虫を行動させ、学習法の最適化を行った。

#### (2) カルシウムイメージング

カルシウム濃度に応じて蛍光強度が変化するタンパク質を、特定の神経細胞に遺伝学を用いて発現させた。細胞の樹状突起や細胞体における蛍光強度の変化を二光子顕微鏡で観察した。MatlabやFijiを用いたプログラムでデータを解析した。

#### (3) 光遺伝学を用いた神経刺激とパッチクランプ法によるシナプス電流の記録

嗅覚二次細胞において活動電位を発生させるために、光受容チャネルであるチャンネルロドプシンを発現させ、それを光刺激した。シナプス電流や細胞の内因的性質の測定には、細胞体からのホールセルパッチクランプ法を用いた。

### 4. 研究成果

(1) ハエの飛行行動を詳細に解析するための仮想空間を構築した。この空間では、視覚刺激、匂い刺激、罰刺激を特定のタイミングで与えられるようにした。固定下のハエは、空間内で自由に羽ばたける。羽ばたきの様子は、マイクロフォンとCCDカメラで計測した。続いて、匂いを条件刺激、熱を与える赤外線レーザーを無条件刺激とした古典的条件付けを行った。学習後、ハエは与えられた匂いに対して、遠ざかるように体の向きを変えたり、左右の羽ばたきの振幅を変えたりする、条件反応を示すようになったので、匂い記憶が形成されたと判断できた。

続いて、より効率よく強固な匂い記憶を形成させるために、オペラント条件付けの手法を開発した。オペラント条件付けを行うためには、動物の特定の行動に応じて罰又は報酬を与え、その行動を強化する必要がある。そこで、固定下のハエの行動に応じて匂い刺激とパノラマを更新できる様に仮想空間を改変した。具体的には、ハエの羽ばたきの左右差に応じてパノラマを回転させ、仮想空間を行き来できるようにした。特定の空間を飛行している際には匂いと罰を与え、他の空間を飛行している際には別の匂いのみを与えるようにした。罰には赤外光レーザーによってもたらされる熱を用いた。その結果、ハエは学習に用いた匂いを特異的に忌避するよう

になった。古典的条件付けの場合と比べて、より強固な記憶を形成させることに成功した。更に学習効率を上げるための取り組みを継続している。

(2) ショウジョウバエ嗅覚神経系を構成する細胞群の匂い応答が、学習を通してどの様に变化するかを調べるための手法を開発した。神経活動の記録には、カルシウムイメージングを用いた。ハエは、顕微鏡下で記録用プラットフォームに固定した。頭部を覆う表皮をはがして脳を露出させるが、それ以外は操作を加えなかった。遺伝学を用いて、嗅覚一次、二次、三次細胞それぞれの大半にカルシウム指示薬を発現させた。イメージングは二光子顕微鏡を用いて行った。その結果、匂いに対する応答を複数の細胞から同時に記録することに成功した。

データ解析に関しては、脳振動の影響を軽減させるために、画像を時間や試行を超えてアラインメントする様にした。また、イメージングした脳を標準脳にレジストレーションするソースコードを作成し、各微小脳領域や細胞体における蛍光強度変化を自動的にかつ客観的に抽出することを可能にした。

(3) 記憶のメカニズムを細胞とシナプスのレベルで調べる為に、嗅覚三次細胞の活動を電気生理学的手法で記録する系を構築した。具体的には、パッチクランプ法を用いて細胞体からホールセル記録を行った。まず、細胞の内因的性質の変化が関与するかどうかを評価するために、細胞への注入電流と活動電位の発火頻度の関係性を解析した。

続いて、嗅覚二次細胞と三次細胞をつなぐシナプスの性質変化が関わる可能性を検討するために、シナプス伝達を調べる実験方法を確立した。二次細胞で活動電位を誘起させるために、光遺伝学を用いた。光受容チャネルであるチャンネルロドプシンをコードする遺伝子改変動物を作成し、それを二次細胞に発現させた。特定の二次細胞のみを興奮させるために、高い空間分解能で光刺激ができるパルスレーザーによる二光子励起の現象を用いた。その結果、二次細胞を効率的に発火させられることが分かった。発火により引き起こされる、二次細胞から三次細胞へのシナプス入力の強度と短期可塑性を、学習前後で解析する試みを継続している。

#### 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2件)

Masafumi Oizumi, Ryota Sato, Hokto Kazama, Masato Okada (2012). Functional differences between global pre- and postsynaptic inhibition in the *Drosophila* olfactory circuit. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 査読

有, 6:14. 10.3389/fncom.2012.00014

Hokto Kazama, Emre Yaksi, Rachel I. Wilson (2011). Cell death triggers olfactory Circuit plasticity via glial signaling in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 査読有, 31, 7619-7630. 10.1523/JNEUROSCI.5984-10.2011

[学会発表](計15件)

遠藤啓太、風間北斗、キイロショウジョウバエの嗅覚連合学習に関わるキノコ体における匂い情報コーディング、神戸大学大学院理学研究科後期課程(博士課程)生命情報伝達特論(招待講演)2014年1月31日、神戸

塩崎博史、風間北斗、仮想飛行システムを用いたショウジョウバエ短期空間記憶の検討、脳と心のメカニズム第14回冬のワークショップ、2014年1月9日、留寿都

風間北斗、ショウジョウバエにおける匂いの神経表現の解読、都医学研セミナー(招待講演)2013年11月27日、東京都医学総合研究所

風間北斗、匂い認識の神経システム機構、新学術領域「メソスコピック神経回路から探る脳の情報処理基盤」平成25年度第1回領域会議(招待講演)2013年9月22日、熱海

塩崎博史、風間北斗、視覚学習・選択行動の回路機構の解明に向けたショウジョウバエ行動実験系、新学術領域「メソスコピック神経回路から探る脳の情報処理基盤」平成25年度第1回領域会議、2013年9月22日、熱海

Laurent Badel, Kazumi Ohta, Yoshiko Tsuchimoto, Hokto Kazama, Towards understanding the neuronal basis of olfactory perception in the *Drosophila* antennal lobe, *Neuro* 2013, 2013年6月22日、京都、日本

風間北斗、匂い認識を支える神経回路基盤、脳と心のメカニズムワークショップ(招待講演)2013年1月10日、北海道ルスツ

Hokto Kazama, Neural basis of olfactory perception in *Drosophila*, *Neuroscience*2012(招待講演)2012年9月18日、名古屋国際会議場

風間北斗、ショウジョウバエにおける匂い認識の神経機構、包括脳ワークショップ(招待講演)2012年9月15日、東京大学

風間北斗、嗅覚情報処理のメカニズム、大阪大学セミナー(招待講演)2011年12月21日、大阪

風間北斗、嗅覚情報処理の信頼性と柔軟性を支えるメカニズム、富山大学セミナー(招待講演)2011年11月7日、富山

風間北斗、嗅覚回路の配線図を電極のみで解き明かす、日本神経回路学会オースタムスクール(招待講演)2011年11月4日、かたから諏訪湖ホテル、諏訪

風間北斗、ショウジョウバエの匂い受容の神経機構、日本動物学会(招待講演)2011年9月21日、旭川市大雪クリスタルホール、

旭川

風間北斗、Linking ensemble neural activity with olfactory perception in the fly、包括脳夏のワークショップ（招待講演）、2011年8月24日、国際会議場、神戸

風間北斗、ショウジョウバエ嗅覚情報処理の信頼性と柔軟性、シナプス研究会（招待講演）、2011年6月17日、生理学研究所、岡崎

〔その他〕

研究室ホームページ

[http://kazama.brain.riken.jp/index\\_jp.php](http://kazama.brain.riken.jp/index_jp.php)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

風間 北斗 (KAZAMA, Hokto)  
独立行政法人理化学研究所・  
脳科学総合研究センター・チームリーダー  
研究者番号：90546574

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

遠藤 啓太 (ENDO, Keita)  
独立行政法人理化学研究所・  
脳科学総合研究センター・研究員  
研究者番号：40425616

塩崎 博史 (SHIOZAKI, Hiroshi)  
独立行政法人理化学研究所・  
脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員  
研究者番号：50630571

BADEL Laurent  
独立行政法人理化学研究所・  
脳科学総合研究センター・研究員  
研究者番号：50599123

高木 佳子 (TAKAGI, Yoshiko)  
独立行政法人理化学研究所・  
脳科学総合研究センター・研究員  
研究者番号：30415210