

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840112

研究課題名(和文) 嗅覚連合学習を支える神経回路機能同定のためのキノコ体細胞集団活動解析

研究課題名(英文) Population analysis of the neuronal activity in the Drosophila Mushroom bodies underlying olfactory memory

研究代表者

廣井 誠 (HIROI, MAKOTO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：80597831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの嗅覚関連学習をなす神経回路を同定するために、学習が行なわれている最中の脳の神経活動を蛍光カルシウムセンサーで記録し、記憶に必要な神経細胞の同定を目的とした。約2000個のキノコ体細胞のうち、CREB活性化神経細胞(CRE-p細胞)に注目した。

1) CRE-p細胞へ入力するドーパミン神経の応答パターン記録・解析、2) CRE-p細胞から出力する神経MBONsの応答パターン記録・解析、3) 2)の出力神経のうち、2つの神経においてトレーニング依存的な可塑的なカルシウム応答を確認した、4) 2つの出力神経のは、忌避学習後にそれぞれ応答性の増強と減少という相反する可塑性を示すことを確認した

研究成果の概要(英文)：Neural plasticity is a key feature of neurons to establish learning and memory and, in Drosophila olfactory memory, it has been known that the Mushroom body (MB) plays a pivotal role. To understand the neural circuits, I established a live calcium imaging setup where cellular activities from neurons of MB are simultaneously being monitored before, during and after a training session. Our lab has focused on MB cells with CREB-positive (CRE-p cells) and analyzed activities on the CRE-p related cells in this study. 1) Recordings from dopaminergic neurons that sends their dendrites to CRE-p cells. 2) Recordings from output neurons (MBONs) from CRE-p MB cells. 3) I found that at least 2 MBONs showed training-related plasticity. 4) The 2 MBONs shows an opposite plasticity after a training - one increases and the other decreases responses to a learned odor.

研究分野：神経生物学

キーワード：記憶・学習 ショウジョウバエ 嗅覚 味覚 神経可塑性 カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

動物が外界の異なる化学物質情報をどのように受容しているか、化学感覚を支える神経機構は味覚・嗅覚受容体細胞の解析が盛んに行なわれている。甘味や苦味、フェロモンなどが常に一定の行動を引き出す一方で、同じ入力に対しても経験によって異なる行動を起こす場合も多く知られている。**生物の行動はこのような神経の恒常性と可塑性とのバランスの上に成り立っていることから、その神経基盤を研究することにより、意思決定などの行動の仕組みを回路の働きとして問うことができる**と思に至った。可塑性モデルとして匂い記憶のセンターとして機能するショウジョウバエのキノコ体神経を実験系と

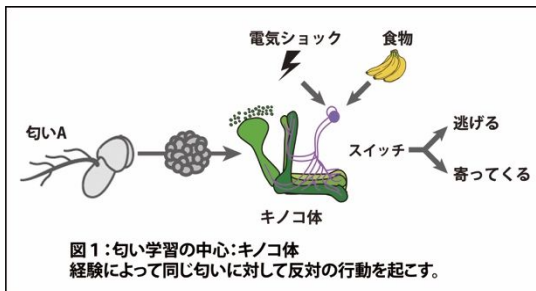


図1: 匂い学習の中心:キノコ体
経験によって同じ匂いに対して反対の行動を起こす。

して用いる。

匂い分子は触覚にある受容体に補足され、その情報は、触覚葉を経由しキノコ体に送られる。ここで匂いの情報と同時に報酬(罰)情報が入力されると、条件付けされた匂い情報はキノコ体細胞に保持される(図1)。キノコ体は両側で約4000個の細胞で構成されているが、記憶形成を行ったときに記憶細胞となれるのはこの内の一部であると考えられている。しかしこれまでに細胞レベルでの入出力の神経回路は明らかになっていない。従来からキノコ体への匂い以外のドーパミン入力神経(Dopaminergic Neurons, DANs)が学習行動へ重要な働きをすることが示唆されていた。近年、キノコ体から出力する神経細胞(Mushroom Body Output Neurons, MBONs)が同定された。MBONsは30個程度/片側の数であり、それらの出力先は高次の神経部位に加え、キノコ体へ投射されるものが存在していた。4000個のキノコ体細胞から約30個への情報が集約され、部分的にキノコ体へ情報を戻し、幾重にわたる計算を行っているとは推測される。本研究では**4000個のキノコ体細胞の中から学習後に特異的に可塑性を示す細胞の同定**を目的とした。同時に**出力信号であるMBONsが持つ匂い応答性、その可塑性を持つか**を検索する。

2. 研究の目的

学習記憶のメカニズムを知るためには脳のどの細胞が記憶の形成・維持・読み出しに関わるかを知ることが不可欠である。本研究では学習が行われている最中の個体の脳の神経集団活動をライブでモニターし、その活動を主成分分析(計算論的推定)などによって

少数に絞り、記憶細胞を同定することを主な目的とする。さらに、長期記憶の中心的役割を担う転写因子 CREB 活性細胞との関連について解析することで、短期記憶から安定した長期記憶を形成する遷移を、生理学的に明らかにしていく。

3. 研究の方法

申請者の研究室では、顕微鏡下で匂い学習ができる系を立ち上げており、同一個体で条件付け前後を比較できる。神経活動の計測するために Ca^{2+} 蛍光レポーター-G-CaMP をキノコ体で発現させて、細胞体および軸索束を4次元イメージング(立体タイムラプス)で観察することにより匂いコーディングや記憶痕跡を解析することができる。記憶細胞(痕跡)を同定・機能解析するために以下の2つの研究を計画している。

1) ショウジョウバエの短期記憶細胞群の同定(可塑的变化の効率)

顕微鏡下で学習をさせながら、短期フェーズの記憶痕跡細胞を同定する。その際、キノコ体に入力する神経(DANs)や出力する神経(MBONs)と同定された細胞の接続を調べる。

2) 長期記憶 CREB 活性化細胞までの接続回路

短期記憶からより長期の記憶情報の固定への遷移を細胞レベルで明らかにする。CREB 活性化細胞の匂い応答、および非条件刺激(忌避刺激・電気ショック)への応答を観察する。

3) 忌避記憶で誘導される可塑性を示す細胞と CREB 細胞と比較する

4. 研究成果

ドーパミン神経 DANs からキノコ体部位への信号は報酬学習・忌避学習のどちらにも必要であることが知られているが、その応答性は詳しく解析されていない。ここでは、CRE-p 細胞付近での DANs の忌避刺激(電気ショック)、匂い刺激への応答を観察した(図2)。キノコ体を細かいコンパートメントごとに領域を区切り応答性をみると、忌避刺激に対してはおおよそ全て(1を除く)のコンパートメントで応答が観察されたのに対し、2種類の匂い刺激に関してはより分科した応答性を示した。さらに経時的な変化に注目するとより複雑な応答パターンを示してい

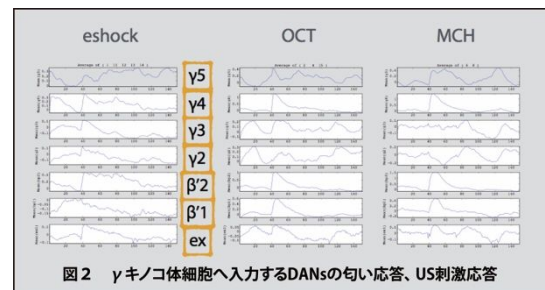


図2 γキノコ体細胞へ入力するDANsの匂い応答、US刺激応答

るのがわかった。

これは一過性の匂い刺激入力に対して、情報が幾度かにわたって同じ DANs を経由してい

る可能性を示唆する。少なくともコンパートメントごとに特異的な応答パターンを示すには、ある時間的なギャップをもった経時的成分にも注目する必要がある。

次に、キノコ体の出力神経 MBONs の匂い刺激・忌避刺激への応答を観察した。約 30 個ある MBONs は匂い刺激に対しておおそ正のカルシウム応答を示すが、ここでは学習特異的に可塑性を示した 2 つの神経について報告する(図 3、4、5)。いずれも、CRE-p 細胞と接続していると考えられる出力神経で

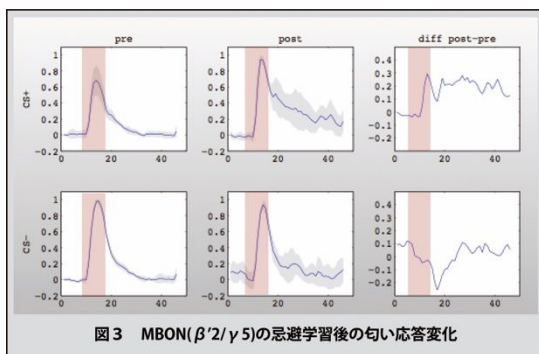


図 3 MBON($\beta 2/\gamma 5$)の忌避学習後の匂い応答変化

ある。

一つは $\beta 2/\gamma 5$ から出力する MBON で、この神経では忌避学習後に学習した匂い刺激 (CS+、図 3) に対して有意にカルシウム応答が増加した。忌避刺激と連合させていない匂い刺激 (CS-、図 3) では有意な変化は観察されなかったが、学習後の個体では応答の振幅が減少する傾向が観察される。匂い刺激 (図 3 のピンク帯) が終わってカルシウムシグナルが徐々に減少するが、しばらくは学習後の方が大きくなっている傾向がある。しかし個体ごとの振れ (図 3 のグレー帯、標準偏差) は大きくなるためか、統計的に有意な差は見られなかった。連合させていない CS- に関しては匂い刺激直後に学習前後の変化がピークを持っているが、同様に統計的な差は見られない。

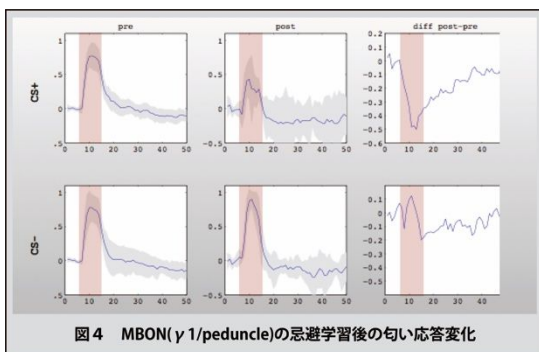


図 4 MBON($\gamma 1/\text{peduncle}$)の忌避学習後の匂い応答変化

別のコンパートメントである $\gamma 1/\text{peduncle}$ から出力する MBON の学習前後の変化は、図 3 に示した MBON とは異なるものであった(図 4)。この MBON ($\gamma 1/\text{peduncle}$) は忌避刺激と同時に匂い刺激を受容すると、その匂いに対して有意に応答振幅が減少した。連合していない匂い刺激に対しては有意な学習前後

の変化は見られなかった。匂い刺激に対する応答は図 3 の MBON に比べると個体ごとの違いが大きい傾向がある(図 3、4 のグレー帯幅の違い)。

学習前後の匂い応答を総合的に評価するために、連合刺激 (CS+) と非連合刺激 (CS-) それぞれの学習前後変化を合わせたカルシウム応答の経時変化を図 5 に示す。

図 3 と図 4 で示した 2 つの MBONs はともに CRE-p を含むキノコ体神経と接続していると考えられる。実際のところ、匂い刺激に対して、キノコ体細胞と同様に正の応答性を示している。しかし、忌避学習という一つの学習によって一方で増強され、他方は有意に応答が減少するという正反対の可塑性を示した(図 5)。

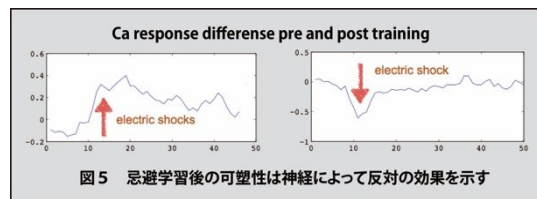


図 5 忌避学習後の可塑性は神経によって反対の効果を示す

これらが示す可能性としては、忌避刺激によるシナプスの応答性への修飾がコンパートメントごとに異なっていることが考えられる。図 2 の結果で DANs が匂い刺激に対して様々な応答パターンを示すことから、キノコ体細胞の中でも、コンパートメントによってドーパミンが放出される量が異なっていると思われる。これが示唆する可能性は、匂い刺激のみでもドーパミンの作用をキノコ体細胞が受け、さらにはコンパートメントごとに sub-cellular な修飾を受けることである。同じ匂い刺激でも受容する回数を追うごとにシナプス修飾を受けその効果がどのように、将来の応答性に影響するかは今後の課題の一つであろう。少なくとも本研究結果では、忌避刺激 (電気ショック) によって cre-p 細胞の多くのコンパートメントがドーパミン入力を受け、その結果、一つのコンパートメント ($\beta 2/\gamma 5$) ではカルシウムシグナルが増強されるように働き、別のコンパートメント ($\gamma 1/\text{peduncle}$) では減少するという結果を得た。

学習によるキノコ体細胞のカルシウム応答の可塑性の報告は初めてではない。しかしながら、顕微鏡下で条件付けを行い同一個体の匂い刺激応答の可塑性を示したのは本研究が初めてである。同一個体で可塑性を観察するメリットは、学習前後の変化を細胞レベルで追い解析できることである。4000 個というキノコ体細胞の中で、匂いがどのようにコーディングされ、学習の可塑性が担保されているか、今後解析を続けていく。今回報告した 2 つの MBONs は顕微鏡下で個体が学習したかどうかの指標として用いることで、可塑性の大小とキノコ体細胞の匂い刺激応答への変化を関連づけられることで、機械学習を用いた分析も今後加速できると考えている。

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 1 件)

1. Abe T, Yamazaki D, Murakami S, Hiroi M, Nitta Y, Maeyama Y, Tabata T. The NAV2 homolog Sickie regulates F-actin-mediated axonal growth in *Drosophila* mushroom body neurons via the non-canonical Rac-Cofilin pathway. *Development*. (査読あり) 2014, 141(24):4716-28. DOI: 10.1242/dev.113308

[学会発表](計 12 件)

1. 廣井誠、多羽田哲也、ショウジョウバエ嗅覚連合学習における3次及び4次神経の細胞集団応答解析、第3回ケモビ研究会 2015、2015年11月13日~15日、KKR宮の下(神奈川県箱根)
2. 廣井誠、阿部崇志、上岡雄太郎、多羽田哲也、In vivo calcium imaging analysis on dynamics of associative plasticities on Mushroom body output neurons and Kenyon cells in *Drosophila*、新学術領域研究「多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理」平成27年度班会議、2015年11月4日、京都ガーデンパレス(京都市)
3. 廣井誠、Functional imaging of the third-order olfactory neurons Kenyon cells in the mushroom body of *Drosophila*、第13回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」、2015年11月3日、九州大学馬出キャンパス(福岡県福岡市)
4. 廣井誠、多羽田哲也、Functional imaging of the third-order olfactory neurons Kenyon cells in the mushroom body of *Drosophila*、14th European Symposium for Insect Taste and Olfaction(ESITO)、2015年9月20日~25日、RESIDENCE HOTEL CORMORAN(イタリア)
5. 廣井誠、多羽田哲也、ショウジョウバエのキノコ体軸索部における匂い情報受容の定量的解析、シンポジウム「記憶のメカニズムを理解するー数理解析からのアプローチ」、2015年9月18日、東京大学中島董一郎記念ホール(東京都文京区)
6. 多羽田哲也、阿部崇志、上岡雄太郎、廣井誠、ショウジョウバエ3次嗅覚神経の機能イメージング-嗅覚コードと嗅覚記憶をめぐって、第38回日本神経科学大会シンポジウム「全神経系の活動イメージングによる脳機能の俯瞰的な理解へ」、2015年7月28日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
7. 阿部崇志、山崎大介、村上智史、廣井誠、新田陽平、前山有子、多羽田哲也、The NAV2 homolog Sickie regulates F-actin-mediated axonal growth in *Drosophila* mushroom body neurons via the non-canonical Rac-Cofilin pathway、2015 Annual *Drosophila* Research Conference、2015年3月4~8日、シカゴ(アメリカ)
8. 廣井誠、多羽田哲也、キイロショウジョウバエ嗅覚記憶中枢における匂い応答のライブイメージング解析、第37回日本神経科学大会、2014年9月11日~13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
9. 上岡雄太郎、山崎大介、市之瀬敏晴、大坪真紀、廣井誠、多羽田哲也、CREB レポーターを用いたショウジョウバエ嗅覚記憶に関わる神経の解析、第37回日本神経科学大会、2014年9月11日~13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
10. 廣井誠、Ca²⁺ imaging analysis of olfactory memory representation in the *Drosophila* mushroom body、新学術領域研究「多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理」平成26年度班会議、2014年6月16~18日、シェラトンホテル札幌(北海道札幌市)
11. 阿部崇志、山崎大介、村上智史、廣井誠、新田陽平、前山有子、多羽田哲也、Sickie, a human MAP Nav2 homolog, facilitates F-actin-mediated axonal growth in *Drosophila* MB neurons by relaying non-canonical Rac signaling to the Cofilin pathway、第11回日本ショウジョウバエ研究会、2014年6月4~6日、金沢歌劇座(石川県金沢市)
12. Daisuke Yamazaki, Makoto Hiroi, Maki Ohtsubo-minami, Tetsuya Tabata、Genetic dissection of the mushroom bodies by CREB reporter flies that causes unique phenotypes in aversive olfactory memory、79th CSHL Symposium: Cognition、2014年5月30日、Cold Spring Harbor Laboratory(アメリカ)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/hiroi/>

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/fly/htmls/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣井 誠 (HIROI, Makoto)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：80597831

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし