

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82636

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891030

研究課題名(和文)条件反射に伴う神経回路可塑性の遺伝生理学的研究

研究課題名(英文)Genetic and physiological study of plasticity in neural circuit during Pavlovian conditioning.

研究代表者

吉原 基二郎 (Yoshihara, Motojiro)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所・バイオICT研究室・主任研究員

研究者番号：80222397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者が主催していた米国マサチューセッツ大学の研究室の総力を挙げて、細胞レベルでの記憶の研究を行うため、ショウジョウバエの食べる行動をコマンドする神経細胞、フィーディング・ニューロン(Fdg neuron)を発見した(2013, Nature)。本研究では、Fdg neuronを要とする神経回路で起こるシナプスの可塑的な変化が行動になって現れるパブロフの条件反射の行動実験パラダイムを確立し、さらに、Fdg neuronの反応性が実際に条件付けによって変化するという事をカルシウムイメージング法により確認した。(Sakurai et al., 発表準備中)。

研究成果の概要(英文)：In order to study memory mechanism at the cell level, we identified the "Feeding neuron", a pair of neurons to command feeding behavior in the Drosophila brain (Nature, 2013). In this study, we have established a behavioral paradigm for Pavlovian conditioning, which allows us to study synaptic plasticity on the feeding circuit including the Feeding neuron. By calcium imaging at Feeding neuron during the conditioning, we have found that responsiveness of Feeding neuron is altered through the conditioning (Sakurai et al., in preparation).

研究分野：記憶神経生物学

キーワード：記憶 シナプス可塑性 ショウジョウバエ コマンドニューロン 遺伝解析

1. 研究開始当初の背景

(1) シナプス可塑性のプロトコル作成と記憶形成の作業仮説考案

ショウジョウバエ胚神経筋接合部でのシナプス伝達、シナプス形成、シナプス可塑性に関する申請者がそれまでに行ってきた研究を基礎として、長期増強を模倣した神経刺激プロトコルを新規に作成した。cAMP シグナルによる変化 (Yoshihara et al., 1999; Yoshihara et al., 2000) と同様、高頻度刺激を与えると微小シナプス電流の頻度が数 100 倍に上昇した (Fig. 1; Yoshihara et al., *Science*, 2005)。

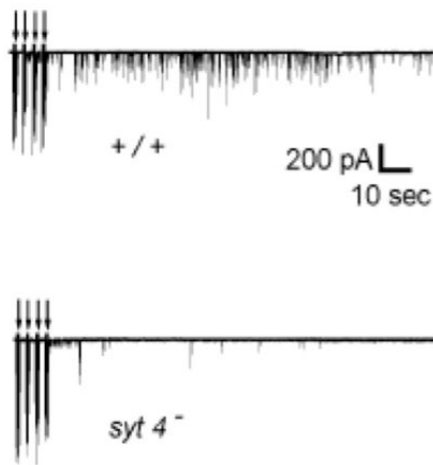


Fig. 1. 高頻度刺激で誘起される微小シナプス電流 (High frequency stimulation-induced miniature release; HFMR)。野生型では、微小シナプス電流の頻度が数 100 倍にも増加するが (上)、*syt 4* 突然変異体では HFMR が見られな

この著しい可塑的变化を説明する為、プレ側とポスト側が相互に強め合うことによって、限局された正のフィードバックが形成、維持されることを仮定した(“ローカルフィードバック仮説”; Fig. 2)。

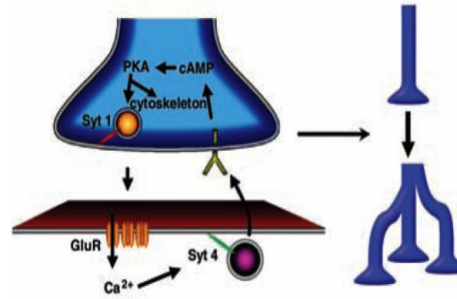


Fig. 2. “ローカルフィードバック” 仮説 (Yoshihara et al., *Science* 2005)。

ポスト側のカルシウムセンサー分子シナプトタグミン 4 (Syt 4) を介して放出される逆行性シグナルがプレ側の cAMP シグナルを活性化することによって、神経終末部からの伝達物質放出を増大させる。さらに、突然変異体の形態観察から、このローカルフィードバックが局所的なシナプスの発達を促すと仮定した。この仮説は神経筋接合部の現象を説明するものであり、現在のところ、この仮説を検証できる実験系が存在しないために、脳の記憶とこの仮説を関係づける証拠を提出することはできないが、この仮説は脳のシナプス特異的な増強についてのこれまでの知見を矛盾なく説明できる。そこで、この作業仮説を中枢シナプスでテストすることを目指し、記憶とシナプス可塑性を関係づけて研究する為の実験系を確立した (次セクション)。

(2) 記憶の実験系のための摂食コマンドニューロンの発見

申請者らがかつて日本のショウジョウバエ研究室を組織して確立したショウジョウバエの Gal4 系統、NP (=Nippon) 系統 (Yoshihara and Ito, 2000) のハエに低温感受性チャネル (NIH, Ben White 博士から未発表だった実験材料の供与をうけた共同研究; Peabody et

al., 2009) あるいは、熱感受性チャネル (Hamada et al., 2008) をもつハエを掛け合わせて得られる F1 ハエの大規模な行動スクリーニングを、マサチューセッツ大学において申請者の主宰する研究室の総力を挙げて行った (Flood et al., 2013a; 東大伊藤啓博士の協力による)。そこで選ばれた NP 系統において Gal4 を発現している細胞から、ショウジョウバエ遺伝学を駆使して細胞を絞り込み、摂食行動を引き起こす一対のコマンドニューロン、“Feeding (Fdg) neuron” を同定することに成功した (Flood et al., *Nature* 2013b; Fig. 3;)

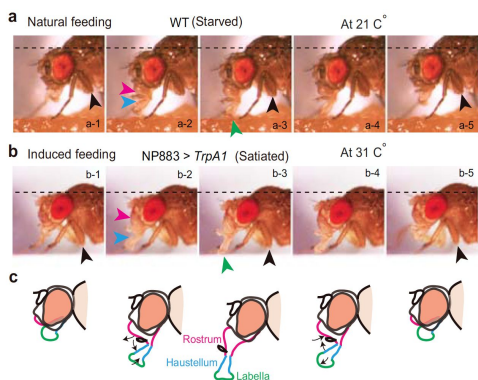


Fig. 3. Fdg neuron の活性化により、自然な摂食に酷似した行動が遺伝学的に誘起された。 **a**, エサの上で飢餓状態の野生型ハエが示す自然な摂食行動。 **b**, Fdg neuron に TrpA1 (熱感受性チャネル) を発現させたハエの、31°C に温度を上げて誘起された “摂食行動”。床に向かって極めて自然に吻を伸ばした後 (マゼンタ、青矢尻) 吻の先の labella を適切なタイミングで開き (緑矢尻) エサもない床をなめる。 **c**, 吻の各体節の動きを示す模式図。 (Flood et al., *Nature*, 2013)

行動観察と同時に脳内のニューロンにアクセスできるライブ実験系 (Yoshihara, *JoVE*, 2012; Fig. 4) を開発し、Fdg neuron の活動をカルシウムイメージング法によって調べ、ショ糖によって誘起される自然な摂食行

動においても、Fdg neuron がショ糖に反応して活性化していることを確認した。同実験系を使って、レーザーによる任意のニューロンを活性化、破壊する方法を考案し、それを使って、この一対の Fdg neuron が摂食神経回路の要に位置することを明らかにした。

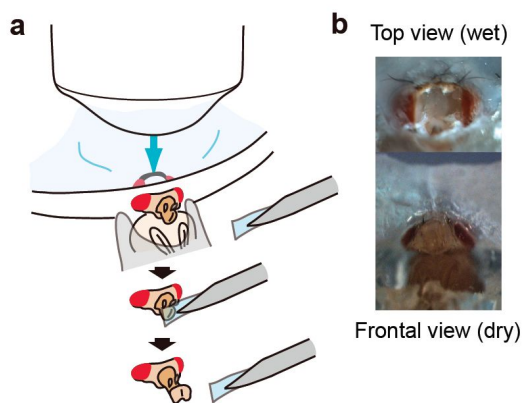


Fig 4. “Feeding circuit/ Flybrain Live Imaging and Electrophysiology Stage (FLIES)”。ハエの “顔” はドライで、ショ糖で刺激すると吻伸展がみられる。同時に、生理食塩水中に露出している脳細胞の活動をカルシウムイメージング法で観察できるし、シナプスの変化をライブイメージングすることも可能である。また、2光子顕微鏡下で、赤外線照射によって個々のニューロンを狙った活性化、破壊実験もできる。 (Yoshihara, *JoVE*, 2012)

2. 研究の目的

Fdg neuron を要とする神経回路で起こるシナプスの可塑的な変化が行動になって現れるパブロフの条件反射の行動実験パラダイムを確立し、さらに、Fdg neuron の活動が実際に条件付けによって変化することを確認して、背景 1 で説明したミクロのシナプス可塑性と背景 2 に述べたマクロの行動の変化をつなげるための基盤を築く。

3. 研究の方法

ショウジョウバエにあらかじめ棒をもたせ

ておき、その棒を動かして離させた直後に砂糖水を与えるという条件付けをおこなった。また、研究代表者が開発した摂食行動と脳内を同時観察する実験系 (2012, JOVE; Fig. 4) を使ったカルシウムイメージング法によりこの学習実験の最中の Fdg neuron の活動を追跡した。条件刺激による Fdg neuron の活性化はショ糖刺激による活性化と比較してさらに弱いので、申請者のグループが発表した論文 (Flood et al., *Nature*, 2013b) において使用した GCaMP3 (Tian et al., 2009) に頼ってはいない検出感度に問題があることが予測される。そこで、本研究では、Oregon Green BAPTA などの合成カルシウム指示分子と同レベルまで感度が上げられた GCaMP6 を使用することにした。

4. 研究成果

申請者の研究室で発見されたショウジョウバエの Fdg neuron を要とする摂食神経回路を実験系として用いると、同定されたニューロンからなる神経回路上で、パブロフの条件反射に伴うシナプス可塑性を解析することができる。パブロフの実験では、イヌの摂食行動 (エサが無条件刺激) にベルの音などの条件刺激を連合した。ハエで同様な行動実験をシナプスの観察と同時に行う為には、**一匹のハエを定位した状態でパブロフのイヌが示したような行動変化**を起こさせる必要がある。

米国マサチューセッツ大学および MIT において申請者が主宰する研究室のポストドクであった櫻井晃博士 (当研究所の研究者として 2014 年 8 月就職し、申請者と共同研究を行っている) による本研究の予備実験において、「**あらかじめハエに持たせておいた棒を離す」という条件刺激**を、吻へのショ糖水溶液の刺激 (無条件刺激) による吻伸展に連合するという**全く新しい条件反射のパラダイム**を作

成することに成功した (Fig. 5)。

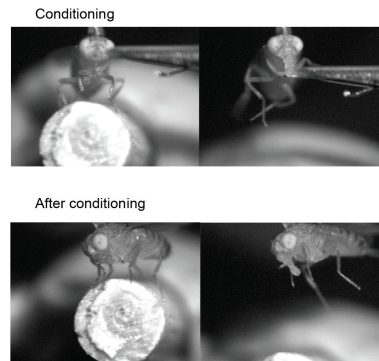


Fig. 5. 機械的刺激を条件刺激としたショウジョウバエのパブロフ条件反射。木製の棒を離す刺激を条件刺激とし、その直後にショ糖溶液を吻に触れさせて吻伸展を誘起した (上)。これを 20 回繰り返したところ、棒を離すだけで、吻を伸ばすように学習した (下) (Sakurai and Yoshihara, 未発表)

実験系 (Fig. 4) を利用して、Fdg neuron の細胞体からの Ca^{2+} イメージング法により、Fdg neuron の活性をモニターしながら、この条件反射実験を行った。**条件付け成立後には、条件刺激のみによる Fdg neuron の活性化が GCaMP6m (Chen et al., 2013) の蛍光増大として明瞭に検出されることを確認した (Fig. 6)。**

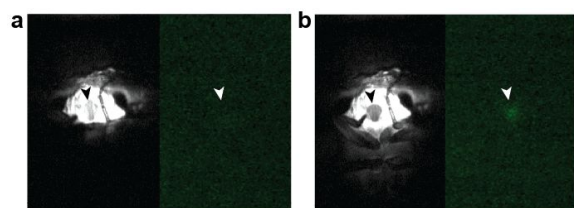


Fig. 6. Fig. 3 に示した「棒を離す」条件刺激の直後に無条件刺激としてのショ糖刺激を与える条件付けを繰り返すと条件反射が成立し、棒を離すだけで口吻を伸ばす (黒矢尻) と同時に Fdg neuron で GCaMP の蛍光増大 (白矢尻) が見られた (棒を離す前 (a) と後 (b))。Fig. 4 に示した行動と脳活動の同時記録。 (Sakurai and Yoshihara, 未発表)

この結果は条件づけの過程で神経回路が実

際に変化したことを示しており、条件反射にともなう脳内変化を単一細胞レベルで明確に観察した世界で最初の例として発表を準備している。

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)

[学会発表](計5件)

吉原基二郎、「脳が記憶をつくる”現場”をおさえる」、未来ICTシンポジウム、2016年1月27日、東京ビッグサイト(東京都江東区)

Akira Sakurai, J. Troy Littleton, Hiroaki Kojima, and Motojiro Yoshihara, “A neural correlate of Pavlovian conditioning in Drosophila brain”. Cold Spring Harbor Symposium, Neurobiology of Drosophila, 2015年9月29日～2015年10月3日

櫻井晃、J. Troy Littleton, 小嶋寛明、吉原基二郎、「パブロフの条件反射に伴う摂食コマンドニューロンの可塑的变化」、神経科学学会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)、2015年7月28日～2015年7月31日

吉原基二郎、「シナプス可塑性と記憶をつなぐ摂食コマンドニューロン-記憶のできる瞬間を捉えるための新しいころみ」、第1048回生物科学セミナー、2015年7月10日、東京大学本郷2号館講堂(東京都文京区)

吉原基二郎、「シナプス可塑性と記憶をつなぐ摂食コマンドニューロン」、自然科学研究機構新分野創成センターシンポジウム「生命現象を全体として理解する新しい科学の創成」、2015年1月17日、自然科学研究機構岡崎カンフェレンスセンター(愛知県岡崎市)

[その他]

ホームページ等

http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/bio/w131102/MotoPage2.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉原基二郎 (YOSHIHARA, Motojiro)
国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所・バイオICT研究室・主任研究員
研究者番号：80222397

(2)研究協力者;

櫻井晃 (SAKURAI, Akira)
国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所・バイオICT研究室・研究員
研究者番号：50749041