

令和元年6月24日現在

機関番号：82636

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18375

研究課題名（和文）摂食神経回路をモデルとした連合学習に伴うシナプス可塑性の単一細胞レベルでの解析

研究課題名（英文）The analysis of synaptic plasticity induced by Pavlovian conditioning in Drosophila feeding neural circuits at the single cell level

研究代表者

櫻井 晃 (Sakurai, Akira)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所フロンティア創造総合研究室・主任研究員

研究者番号：50749041

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、連合学習による動物行動の変化と、それを担うシナプスの可塑的变化を明確な因果関係のもとに単一細胞レベルで対応付けて理解することを目指した。そして、ショウジョウバエの摂食行動が変化する独自の新しい連合学習実験系を確立し、学習後には条件刺激のみで摂食神経回路の要に位置するFeeding neuronが活動し、摂食行動が起こるようになることがわかった。さらに、それらの変化は、少なくとも部分的には、Feeding neuronへと入力するシナプスの可塑的变化によることが示唆された。Feeding neuronを対象とした遺伝子機能の操作により、学習の分子細胞メカニズムを解明する道が拓かれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプス可塑性と記憶の因果関係の解明については、「現在、我々の前に立ちはだかっている最大の問題は、ミクロな研究と、マクロな脳機能の研究との間に横たわっている深い溝を、繋げていく方法が必ずしも明確でないことである（塚原伸晃、脳の可塑性と記憶）」と指摘されている。本研究では、Feeding neuronという同定された中枢単一神経細胞上のシナプス入力の変化によって記憶が形成されることが示唆された。そのため、遺伝子機能の操作を行いながら、そのシナプスをリアルタイム観察することで、連合学習の分子細胞メカニズムについて、ミクロからマクロまで横断的な理解が得られることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed at connecting synaptic plasticity to memory at the single cell level. For this purpose, we have established a novel conditioning protocol to associate somatosensory stimuli (CS) with a feeding behavior (proboscis extension) induced by sucrose stimulation (US) in Drosophila brain. After repeated pairing of the CS and US, a pair of command neurons that control feeding behavior ("Feeding neuron") were activated to extend proboscis in response to the CS, whereas they were not before the conditioning. These results suggest that a new connection from the CS-conveying circuit to the feeding circuit was created at the Feeding neuron and/or upstream of the Feeding neuron. To pinpoint where the new connection is generated, we inactivated the Feeding neuron during conditioning, leading to suppression of the conditioned response. These results are consistent with an assumption that the new connection was formed, at least partly, on the Feeding neuron.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス可塑性 連合学習 記憶 カルシウムイメージング オプトジェネティクス 摂食神経回路 ショウジョウバエ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シナプスの可塑的变化によって記憶はつくられると考えられているが、両者の因果関係の解明については、「現在、我々の前に立ちほだかっている最大の問題は、ミクロな研究と、マクロな脳機能の研究との間に横たわっている深い溝を、繋げていく方法が必ずしも明確でないことである(塚原伸晃、脳の可塑性と記憶)」と指摘されている。ミクロとマクロの溝が生じる1つの要因は脳神経回路の複雑さにあり、学習の神経基盤を理解するためには、まず学習による行動変化をとらえ、その行動を制御する神経回路を同定し、行動の変化を担う主要な site を同定した後に、学習の細胞メカニズムの解析へと進む必要がある (Tsukahara *et al.*, 1981)。そのためには、比較的シンプルな神経回路をモデルとすることも重要である。そこで申請者の所属研究室では、優れた遺伝学的 tool を駆使することによって、行動を制御する神経回路の構造及び動作原理を単一細胞レベルで解析可能であるキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において、特定の行動を司令するニューロンの探索を行い、摂食神経回路の要に位置すると想定される Feeding neuron を同定した (Flood *et al.*, Nature 2013)。Feeding neuron は脳の左右に1つずつ存在し、自然な摂食行動の際に活性化され、摂食行動の全ての要素を引き起こす一方で、破壊されると摂食行動が完全に起こらなくなる。以上から、摂食行動の制御に関わるほとんどの情報が Feeding neuron において統合されるということが示唆される。そのため、Feeding neuron で観察される可塑性は、摂食行動の変化として検出される記憶と対応させることができると期待される (図1)。

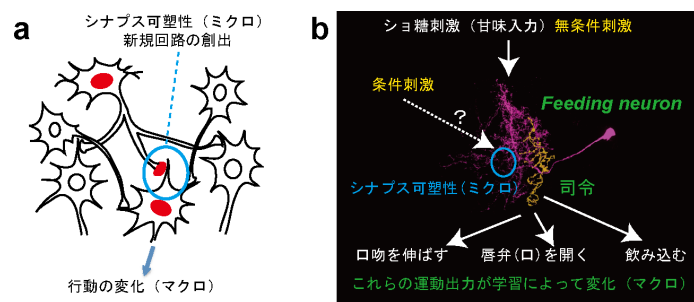


図1 シナプス可塑性 (ミクロ) と記憶 (マクロ) を結びつけるためのストラテジー。(a) ミクロとマクロを同時観察し、同定された神経回路の上で結びつける。(b) ミクロとマクロを結ぶ Feeding neuron。摂食に関するほぼ全ての入力統合され、摂食行動を形成する全ての行動要素が出力される。そのため、Feeding neuron に統合されるシナプス入力の変化は、摂食行動の変化 (記憶) と、よく相関することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、キイロショウジョウバエ摂食神経回路をモデルに、連合学習による動物行動の変化と、それを担うシナプスの可塑的变化を明確な因果関係のもとに対応付けて理解することを目指した。摂食神経回路において、Feeding neuron を興奮させる新しい神経接続ができれば、摂食行動が変化すると予想される。そこで、パプロフの犬のように、条件刺激を呈示した際の摂食行動が変化する連合学習実験系の開発を試みた。次に、カルシウムイメージング法を用いて、学習中に同時に Feeding neuron の活動を観察し、記憶形成との対応関係を検討した。そして、光遺伝学的手法を用いて、学習中に Feeding neuron の活動を抑制する実験を行い、学習後に観察された神経活動と動物行動の変化が Feeding neuron へと入力するシナプスの変化によって起きているのかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験に用いたキイロショウジョウバエ

実験にはキイロショウジョウバエの成虫を用い、野生型としては Canton-S 系統を実験に供した。Feeding neuron の活動をモニターするためには、カルシウム指示タンパク質 GCaMP6m を遺伝学的手法により (GMR81E10-GAL4 を使用) Feeding neuron に発現させた。そして、光遺伝学的手法を用いて Feeding neuron の活動を抑制するためには、同様の遺伝学的手法を用いて、ハロロドプシン eNpHR3.0 を Feeding neuron に発現させた。

(2) 脳と行動の同時観察及び神経活動の操作

摂食行動と神経活動の同時記録には、所属研究室で開発された FLIES (Fly brain Live imaging and Electrophysiology Stage) システム (Yoshihara *et al.*, 2012) を用いた。解剖によって脳を対物レンズの下に露出させる一方で、口吻や体は無傷なまま保ち、学習実験を行った (図2)。対物レンズを介して、Feeding neuron の活動に起因するカルシウム指示タンパク質の蛍光強

度の変化をモニターした。また、光遺伝学的手法を用いた実験においては、対物レンズを介して 545nm のレーザー光を脳に照射した。

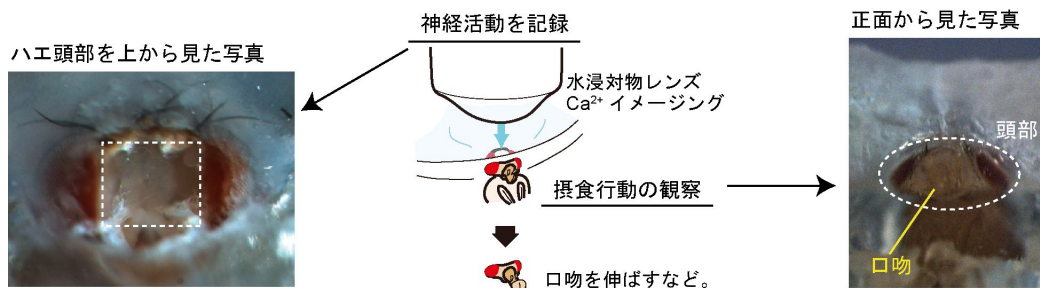


図2 脳と摂食行動の同時観察。(中央) 実験系の全体像模式図。(左) ハエ頭部上方は生理食塩水で満たされている。破線で囲まれた領域の外骨格を除去し、脳を露出させ、水浸対物レンズを通して神経活動をモニターする。また対物レンズを介してレーザー光を脳へ照射することで、光遺伝学的手法を用いた神経活動の操作を同時に行うことも可能である。(右) ハエ頭部下方(破線で囲んで示されている)は、生理食塩水で満たされた上方とは隔離され、無傷に保たれており、口吻の伸展などの摂食行動を観察できる。

4. 研究成果

(1) 新規連合学習実験系の確立

ハエがつかんでいる木製の棒を人為的にハエから引き離すという条件刺激(以下「棒を離す刺激」)の直後に、無条件刺激としてシヨ糖溶液を与えるという操作を、間隔をあけて繰り返したところ、学習後には条件刺激によって口吻の伸展(代表的な摂食行動)が引き起こされるようになった。棒を動かす際にはモーターを使用し、LabVIEW ソフトウェアを用いて一定の速度で駆動するようにした。棒を離す刺激について、複数の条件(速度や方向など)を試し、記憶形成の効率が最も良かった条件を今後の実験に採用した。また、無条件刺激についても、シヨ糖溶液の濃度を複数試したところ、濃度が低いと記憶形成の効率が低いが、一方で高いと habituation が起こりやすくなり、かえって記憶形成効率が低下する場合もあることがわかり、記憶の実験に最適な濃度を求めることができた。条件刺激と無条件刺激を呈示する回数や間隔についても、habituation を避けることを念頭に複数のパターンを試した。最終的には、記憶がトレーニング後 1 時間は検出されるようなプロトコルを確立することができた。

また、条件刺激を呈示するタイミングと、無条件刺激を呈示するタイミングをずらす「Unpaired protocol」を行ったところ、条件刺激の呈示を開始した直後に無条件刺激の呈示を行う「Paired protocol」を行ったハエに比べ、記憶形成の効率は顕著に低かった。条件刺激と無条件刺激の連合が記憶形成に重要であることが示唆された。

(2) 学習による Feeding neuron の活動変化

Feeding neuron の活動をカルシウムイメージング法によって観察するために、脳を露出させた状態のハエに対して、研究成果(1)で記した連合学習を施した。学習前は、棒を離す刺激による Feeding neuron の活動は観察されなかった。一方で、学習後には棒を離す刺激の開始直後に GCaMP6m の顕著な蛍光増大が観察され、口吻の伸展も観られた。学習前は、条件刺激の情報を伝達する神経回路と、無条件刺激によって活動する摂食神経回路はそれぞれ独立に機能していたが、学習によってこれら二つの神経回路間に、Feeding neuron を活動させる新たな機能的なつながりが形成されたことが示唆される(図3)。Feeding neuron が、摂食神経回路内において Feeding neuron の上流に位置するニューロンへと入力するシナプスの変化によって記憶が形成されていると考えられる。



図3 連合学習後には条件刺激(棒を離す刺激)のみで Feeding neuron が活動するようになる。学習前はそれぞれ独立に機能していた棒を離す刺激によって活性化する神経回路とシヨ糖刺激によって活性化する摂食神経回路という二つの神経回路間に、新しく機能的なつながりが生じたことが示唆される。

(3) 記憶形成における Feeding neuron へと入力するシナプスの寄与

学習後には条件刺激によって Feeding neuron が活動するようになるが、記憶形成を担うシナプスの変化が Feeding neuron 上で起きているかは不明であった。Feeding neuron は、既に同定されている感覚ニューロンとは直接には接続しないが (Flood *et al.*, Nature 2013) 申請者の所属研究室における予備的観察において、それらの間をつなぐ二次味覚ニューロン群がほぼ同定されている。条件刺激の情報を伝達するニューロンが摂食神経回路を構成するどのニューロンに入力するのかわからず、直接 Feeding neuron にシナプス接続を持っていないという可能性も考えられる。例えば、二次味覚ニューロンにシナプス接続を持ち、学習によってそのシナプスが強化されることで、学習後には二次味覚ニューロンが条件刺激によって発火するようになり、その結果として Feeding neuron が活動するようになっていくという可能性も考えられる (図 4a)。そこで、Feeding neuron の活動を、光遺伝学的手法を用いて学習中に抑制し (ハロロドプシン eNpHR3.0 を使用) Feeding neuron に入力するシナプスの強化を特異的に阻害する実験を行った (図 4b)。条件刺激と無条件刺激の対呈示中に Feeding neuron の活動を抑制すると、記憶形成が観察されなかった。その後、Feeding neuron への光照射をせずに、同一個体を学習させたところ記憶形成が観察された。学習する能力はありながら、Feeding neuron の活動抑制によって、記憶形成が阻害されていたと推察される。さらに、対照実験として、活動抑制のために Feeding neuron に光を照射する時間の長さは変えずに、そのタイミングを条件刺激と無条件刺激の対呈示からずらした場合には、記憶形成が観察された。以上から、少なくとも部分的には Feeding neuron へと入力するシナプスの強化によって記憶が形成されることが示唆された。

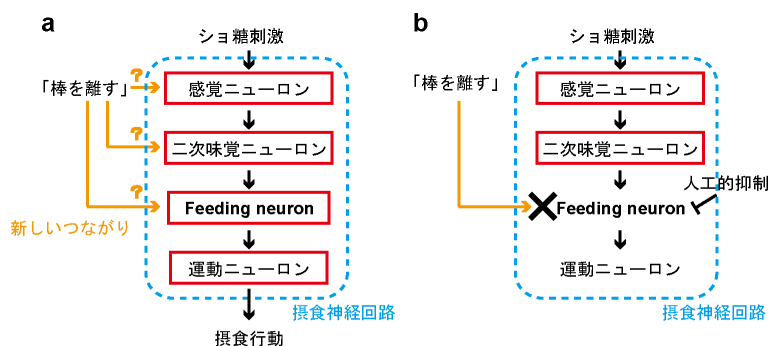


図 4 記憶形成における Feeding neuron へと入力するシナプスの寄与。活動するニューロンを長方形で囲んで示す。(b) 中の × 印はシナプスの強化が抑制されることを示す。(a) 棒を離す刺激で活性化される新しい機能的な接続は摂食神経回路のどこに生じるのか。(b) 連合学習中に、ハロロドプシン (eNpHR3.0) を用いて Feeding neuron の活動を抑制したところ記憶形成が阻害された。少なくとも部分的には、Feeding neuron へと入力するシナプスの強化によって記憶が形成されることが示唆された。

(4) 成果の意義と今後の展望

本研究では、独自の連合学習実験系を確立し、摂食行動制御の要に位置する Feeding neuron という同定された中枢単一ニューロン上のシナプスが、記憶形成 (摂食行動の変化) を担うということを明らかにした。行動を制御する神経回路、そしてその中で学習による行動変化を担う部位を同定したうえで、連合学習のメカニズム解明を試みるという手法は、赤核において塚原伸晃元大阪大学教授によって為された研究や、瞬目反射条件付けをモデルとした Richard F. Thompson らの研究などがある。そして、アメフラシを用いて単一細胞レベルでこれを行ったのが、Eric R. Kandel である。Kandel は、2000 年にノーベル医学生理学賞を受賞しており、これは単一細胞レベルで学習による行動変化を担うシナプスを同定し、学習の細胞メカニズムを解析するというアプローチの有効性を裏付けている。ただし、Kandel が明らかにした学習の細胞メカニズムとは、感覚ニューロンから運動ニューロンへの神経伝達物質の放出を、感覚ニューロンのシナプス前末端に接する介在ニューロンがセロトニンによって修飾するというものであり、シナプス後細胞である運動ニューロンは可塑的過程に関与していない。一方で、本研究でモデルとした実験系では、条件刺激の入力を受けるシナプス後細胞である Feeding neuron におけるシナプスの強化が学習に寄与することが示唆されている。そのため、Kandel の実験系とは異なるシナプス前細胞とシナプス後細胞の相互作用による学習、例えば Hebb 則の基礎となるような分子細胞メカニズムを明らかにできる可能性がある。cAMP-PKA シグナル伝達系など、記憶・学習の分子メカニズムには進化的によく保存されている面も多いため、普遍的な記憶・学習の分子メカニズムの解明に資する可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

〔学会発表〕(計5件)

- (1) Sakurai A, Kojima H and Yoshihara M. Identification of primary modification sites in the *Drosophila* feeding neural circuit, which is responsible for behavioral change induced by Pavlovian conditioning. ショウジョウバエを使った古典的条件付けによる行動変化を担う摂食神経回路路上に生じる可塑的变化部位の同定. 第41回日本分子生生物学会年会. パシフィコ横浜. 2018年11月28日-30日.
- (2) Sakurai A, Kojima H and Yoshihara M. Feeding command neuron is activated to trigger proboscis extension in response to conditioned stimulus alone after Pavlovian conditioning in *Drosophila*. Cold Spring Harbor Asia meeting “Latest Advances in Development and Function of Neuronal Circuits”. Awaji Yumebutai Conference Center, Japan. 2018年9月25日-28日.
- (3) Sakurai A, Kojima H and Yoshihara M. Activation of Feeding command neuron by conditioned stimulus alone after Pavlovian conditioning. パブロフの条件反射に伴う摂食コマンドニューロンの活動変化. 第41回日本神経科学大会. 神戸ポートアイランド. 2018年7月26日-29日.
- (4) Sakurai A, Littleton JT, Kojima H and Yoshihara M. A new paradigm of Pavlovian conditioning for correlating synaptic plasticity to memory at the feeding command neuron in *Drosophila*. ショウジョウバエ摂食コマンドニューロン上のシナプス可塑性と記憶をつなぐ古典的条件付けの新規パラダイム. 第40回日本分子生生物学会年会. 神戸ポートアイランド. 2017年12月6日-9日.
- (5) Sakurai A, Littleton JT, Kojima H and Yoshihara M. A neural correlate of Pavlovian conditioning in *Drosophila* brain. Society for neuroscience (46th annual meeting). San Diego Convention Center, San Diego, United States of America. 2016年11月12-16日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.nict.go.jp/frontier/memory/MotoPage2.html>

6. 研究組織

- (1) 研究分担者：なし
- (2) 研究協力者：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。