

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06328

研究課題名(和文) 嗅覚連合記憶の長期固定化に寄与するキノコ体リカレント神経回路の集団機能解析

研究課題名(英文) Functional population analysis of the recurrent network in the Drosophila mushroom bodies as the basis of the olfactory memory consolidation.

研究代表者

廣井 誠 (Hiroi, Makoto)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：80597831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：条件刺激の強度・時間的な制御をより細かく行うために、光遺伝学によって任意の嗅覚受容体を発現する神経群を人工的に活性化させる連合学習の系の立ち上げた。ドーパミン神経などの活性化によるリカレント回路の解析が可能となった。光遺伝学用の行動実験のデバイスを用いて、実験時間・光強度・匂い濃度と、それぞれの刺激を与えるタイミングの条件を複数試験し、学習スコアが安定する条件を探った。人工的に活性化する嗅覚神経細胞を変えることによって、低スコアから高スコア様々な学習パフォーマンスが確認された。条件づけする際に活性化するドーパミン神経群を変え、忌避・リワード学習の両方で安定して連合学習ができています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

数百におよぶ脳神経の生理活性を同時記録し自発的な活性から学習依存的に変化する神経応答を解析するためには、厳密な実験条件の検討とデータ取得が必須である。本研究は、光遺伝学的手法による特定神経の活性化を用いることで、嗅覚神経入力を高い精度で制御することができた。また、キノコ体神経のカルシウム応答を学習前後にわたって安定して記録できる系を組み合わせた。このスキームは嗅覚関連学習だけでなく幅広い分野で活用できる。

研究成果の概要(英文)：To tune the intensity and temporal control of the conditioned stimuli, we have set up a system of associative learning that artificially activates a group of nerves expressing arbitrary olfactory receptors by means of optogenetics. It is now easier to analyze recurrent circuits by activating dopaminergic nerves. This year, we tested several conditions of the timing of each stimulus in addition to the experimental time, light intensity, and odor concentration for the device of behavioral experiments for photogenetics, and explored the conditions under which the learning scores obtained are stable. By artificially changing olfactory neurons to be activated, a variety of learning performances from low to high scores were confirmed. By changing the dopaminergic neurons activated during conditioning, we were able to achieve stable associative learning in both avoidance and reward learning.

研究分野：Neuroscience

キーワード：associative memory olfaction Drosophila

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエを用いて、外界の異なる化学物質情報がいかに受容されているか、化学感覚を支える神経機構を主に情報の入力面から研究してきた。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目の当たりにした。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い至った。可塑性モデルとして匂い記憶中枢として機能するショウジョウバエのキノコ体神経の実験系を用いる。

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。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。

### 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、その活動をスパースモデリング(計算論的推定)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。さらに近年記憶の固定化に寄与することが明らかになったキノコ体を中心としたリカレント神経回路と、長期記憶の中心的役割を担う転写因子 CREB 活性化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

#### 複数の細胞集団の活性解析

条件付け依存的に誘導された細胞が本当に記憶の形成・維持のステップにおいて重要な機能を担っているのかを調べることが本研究の最重要課題である。そこで研究期間内には以下の 2 点を明らかにする。

#### (1) ショウジョウバエの短期記憶細胞の同定

予備実験で得られた結果を確かにするため、キノコ体細胞集団全体を対象として「誘導される細胞の数」や「活性化されるキノコ体の部位」などを定量化する。また忌避・報酬記憶学習どちらにもドーパミンシグナルの重要性が示唆されていることから、ドーパミン神経から誘導されるキノコ体細胞への「入力接続と活性化されるシナプスの位置関係」を比較する。

(2) 「短期記憶」「長期記憶」までの神経接続回路を明らかにする。当研究室では長期記憶に必須の内在性の cAMP 活性や CREB 活性をモニターできるハエを作製している。条件付け後ラベルされる細胞は長期記憶に必須の細胞であると考えられる。1)で同定した初期記憶細胞と CREB 活性化細胞との接続を追うことで、短期記憶の獲得(学習)から、より長期へ記憶情報の固定への遷移を細胞レベルで明らかにすることが期待できる。

#### 学習初期フェーズにおいて活性誘導される神経細胞群の同定

(3) 活性化されるキノコ体の部位(入力・出力部) ショウジョウバエのキノコ体は 3 種類( / , / , ) に分類される。これら細胞は垂直方向( / )と平行方向( / / ) に軸索束を形成している。予備実験で観察された学習後誘導された細胞は / 出力部で観察されている。他の部位でも学習によって活性化される軸索がないか入力部においても計測を行う。

#### CREB 活性化細胞と短期記憶痕跡細胞の比較

(4) ショウジョウバエでは長期記憶が形成された場合、24 時間後でも記憶は保持されている。予備実験で、還流生理食塩水の温度・成分調整、固定方法などを最適化した結果、準備後 20 時間後までは通常の匂い応答が記録できることを確認しており、短期記憶から長期記憶までを同一個体で観察できる。キノコ体の部分的な機能抑制実験から、短期から長期への記憶のフェーズには異なる細胞群(キノコ体へのドーパミン神経)が関わっていることが知られている。またキノコ体の出力神経を人工的に刺激するとこのキノコ体への入力神経を興奮・抑制する回路が存在ことが近年明らかになってきた。キノコ体周辺のこのリカレントネットワークが記憶の固定化に関与しているが、出力神経だけでも少なくとも 30 種類以上あり、全ての組み合わせを試すのは不可能である。そこで当研究室で作成した長期記憶に必須の因子である CREB レポータ系

統を用いて、長期記憶に関わる神経細胞群までの回路を調べる。CREB のレポータには G-CaMP の蛍光波長と重ならないよう tdTomato (赤色蛍光) を作製する。ある匂いで長期記憶を形成させた後に、一部の CREB 活性化細胞が赤色に染まる。この状態で、新たな匂いで条件刺激を行った時の細胞応答を比較することができる。

#### 4. 研究成果

計算論的モデルの導入。

申請者の実験系は約 1000 本の神経繊維束の活動計測がシナプス単位で可能だが、反面、莫大なデータ(主にノイズ)に見出すべき変化が埋もれてしまう危険性が高くなる。キノコ体細胞の発火がスパースであることを利用し、人的バイアスのない情報の圧縮、応答パターンを特徴付ける少数のシナプス部位の分離法に成功している。図1ではドーパミン細胞の匂い応答を主成分分析と t-SNE を用いて 2次元に圧縮した結果である。Ca<sup>2+</sup> 応答の大小だけでなく応答ピークの時間的な違いも表しており、空間および時系列の情報をバイアスなしで効率よくクラスタリングできることを示している。本課題は生物学が直面している「大量のデータは取得できるが処理できない」典型的な問題であり、成果の波及効果は大きい。活性依存的なラベル法。古典的な神経細胞のラベル法は、発生学的な細胞系譜を利用したものであった。我々の研究室ではライブイメージングでも利用可能な CREB 活性の蛍光レポーターを世界に先駆けて構築し、既に長期記憶依存的なシグナル増加を既に観察できている(Yamazaki, 2017)。この活動依存的な細胞ラベル法と本研究の Ca<sup>2+</sup> 計測解析を組み合わせることにより、約 4000 個のキノコ体神経から効率的に細胞を同定し、長期記憶固定までの遷移を細胞レベルで追跡できる可能性がある。

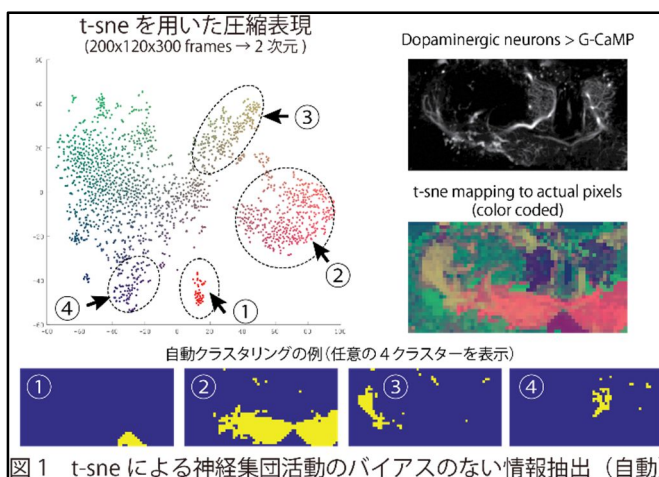


図1 t-sneによる神経集団活動のバイアスのない情報抽出 (自動)

異なった個体間における記憶前後の差 (CS + と CS - )

顕微鏡下で電気ショックと連合させた匂い CS + 及び連合させなかった匂い CS - に対する匂い応答を計測した。異なった個体間でも CS + と CS - の差をとることで記憶前後の差 (記憶痕跡) を検出することが可能であった。通常の行動実験装置で学習させた個体群でも再現されたことから、顕微鏡下で記憶を形成することが可能となった。匂い物質を用いた連合学習に加えて、特定の嗅覚受容体を発現する神経群を光遺伝学によって人工的に活性化させる連合学習の系の立ち上げを試みた。これは条件刺激の強度・時間的な制御をより細かく行うことができ、ドーパミン神経の活性化のタイミングと合わせてリカレント回路の解析がやりやすくするためである。また同じ遺伝型の個体で連合学習ができる光遺伝学用の行動実験のデバイスを製作した。現在、忌避・リワード学習の両方で安定して連合学習ができている。これによって、生理学的な応答と行動実験のパフォーマンスを相互に比較・解析が可能となる。MBONs の応答を指標とすることによって顕微鏡下で匂い学習が形成されうることを示すことができたのは大きな進歩である。異なった波長特性の活性化・抑制チャンネル (Chrimson/Chronos/GtACR) を発現させることで、複数の神経群の応答を操作できるようになった。これにより、条件刺激 (CS) と無条件刺激 (US) の両方を人工的にかつ強度・時間的に精密な操作でき、回路の生理学的な解析が可能となった。顕微鏡下では、KCs にドーパミン依存的に US シグナルを伝達すると考えられる DANs を安定的に活性化することによって、電気ショックの条件制御が繊細で難しかった。光刺激によってこの DANs を活性化することによって、人工的ではあるが安定して実験が行えている。上記の光遺伝学的手法を行動実験でも行えるように新たにデバイスを製作した。忌避・リワードの両方で学習パフォーマンス指標が 0.3-0.4 で安定して観測できている。

行動実験で確かめた忌避性・誘引性のある匂い物質まで 6 種類の匂い応答を解析したところ、それぞれ特有の応答が観察された。観察されたパターンは、リカレント回路を形成するキノコ体の入出力神経の分布と CREB 活性化細胞の分布によって特徴付けできた。生得的な嗜好性がある匂い応答パターンと学習によって形成される匂い応答パターン、CREB 活性化細胞の分布、キノコ体の入出力細胞の分布を詳しく解析していくことが可能となった。

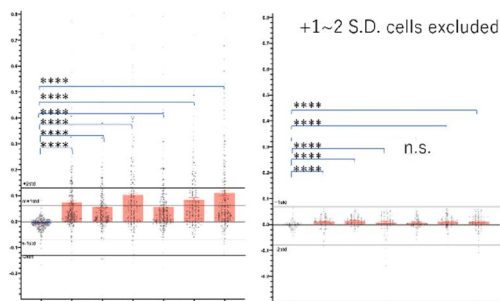


図2 忌避性・誘引性の匂い特有の応答パターン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamazaki Daisuke, Hiroi Makoto, Abe Takashi, Shimizu Kazumichi, Minami-Ohtsubo Maki, Maeyama Yuko, Horiuchi Junjiro, Tabata Tetsuya	4. 巻 22
2. 論文標題 Two Parallel Pathways Assign Opposing Odor Valences during Drosophila Memory Formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2346 ~ 2358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2018.02.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takashi Abe, Tetsuya Tabata, Makoto Hiroi
2. 発表標題 Analysis of state-dependent odor response in compartmentalized Drosophila mushroom body neurons
3. 学会等名 OIST meeting
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/people/people000305.html">https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/people/people000305.html</a> <a href="https://researchmap.jp/hiroi/">https://researchmap.jp/hiroi/</a> <a href="http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/jp/fly/">www.iam.u-tokyo.ac.jp/jp/fly/</a> <a href="https://publons.com/researcher/259315/makoto-hiroi">https://publons.com/researcher/259315/makoto-hiroi</a>
---

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------