

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06496

研究課題名(和文) Mapping working memory networks in the Drosophila brain

研究課題名(英文) Mapping working memory networks in the Drosophila brain

研究代表者

堀内 純二郎 (HORIUCHI, Junjiro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳・神経科学研究分野・主席研究員

研究者番号：80392364

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)：物忘れの細胞基盤を理解するために、若いハエと年老いたハエの記憶エンGRAM細胞を調べた。若いハエと比較して、年老いたハエは物忘れが増加し、記憶力が低下する。若いハエも年老いたハエも、訓練後に同じ数のエンGRAM細胞を生成することを発見した。しかし、若いハエのエンGRAM細胞は記憶に関連した刺激によってのみ活性化されるが、年老いたハエのエンGRAM細胞は無関係な刺激にも活性化することを発見した。したがって、年齢に応じた物忘れは、無関係な刺激によって記憶が活性化される記憶の一般化によって引き起こされる。この記憶の一般化に関与する細胞と神経伝達物質を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちの性格は経験と記憶で形成される。現在、社会を悩ませている病気の中で自分の性格を失う認知症は特に恐ろしい。認知症で何が起こるかを理解するには、物忘れが脳内でどのように起こるかを理解する必要がある。忘れることは単なる記憶の喪失か？それとも、記憶に関する不確実性が段階的に増大する現象か？私たちの研究では記憶の不確実性が高まることで忘れの原因だということを明らかにした。さらに、記憶の不確実性を引き起こす細胞および分子の変化を特定した。これらの発見は、物忘れを理解することに役立ち、さらに高齢者の物忘れを改善するための新しい戦略の開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We characterized forgetting in Drosophila using behavioral and mathematical methods and found that a major component of forgetting is an increase in uncertainty regarding a memory. This increase results in a reduction in the ability of a memory to influence memory-related behaviors. To understand the cellular basis of forgetting and memory uncertainty, we examined memory engram cells in young and old flies. Compared to young flies, old flies have increased forgetting and reduced memory scores. We found that both young and old flies produce similar numbers of engram cells after training. Cues that activate memory recall induce reactivation of engram cells in both young and old flies. However, unrelated cues activate engram cells in old, but not young flies. Thus, a major component of age-dependent forgetting is memory generalization where memories are activated by inappropriate stimuli. We identified the cells and neurotransmitters responsible for memory generalization.

研究分野：Drosophila neurobiology

キーワード：Drosophila forgetting aging learning and memory

様式、C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエは他の動物と同様に学習し、記憶を形成することができる。例えば、ショウジョウバエに匂いと痛みの電気ショックを同時に与えると、その匂いを痛みと関連付け、その後、匂いを避けることを学習する。この関連付けの記憶は、キノコ体と呼ばれる脳の構造で形成される。キノコ体へ匂いの情報伝達経路はアセチルコリンという神経伝達物質によってよく知られているが、ショック情報の伝達経路はまだ解明されておらず、ドーパミンとグルタミン酸の両方が重要であるとされている。

記憶がどのように脳に蓄積されるかについては、まだ解明されていないことが多いが、匂いと衝撃の情報収束することで、記憶を符号化するキノコ体の可塑的変化が誘発されると考えられています。実際、長期記憶のための可塑的変化が起こる細胞が同定されており、長期記憶エンGRAM細胞と呼ばれている。記憶形成時には、これらの細胞で転写活性の変化として測定される可塑的な変化が起こる。後に記憶を呼び起こすと、記憶エンGRAM細胞が再活性化する。エンGRAM細胞の再活性化を防ぐと記憶の想起が抑制され、エンGRAM細胞を人工的に活性化すると、記憶想起の手がかりがなくても記憶に関連する行動が誘発される。

ショウジョウバエをはじめとする動物では、時間の経過とともに、学習したことを忘れていくため、記憶力が低下する。即ちトレーニング後の時間の間隔が長くなると物忘れは進み、さらに年齢が高くなるにつれて物忘れが進む。しかし、正確な細胞や分子的、行動的原因は未だ不明である。

2. 研究の目的

総合的な目標は、物忘れのメカニズムを理解することである。そこで2つのタイプの物忘れに焦点を当てた。1つ目は、時間の経過による正常な忘却である。訓練とテストの時間の間隔が長くなるにつれて、ハエの記憶スコアは低下する。この減少がなぜ起こるのかを明らかにすること。2つ目は、生物の加齢に伴う忘却の増加である。若いハエは年老いたハエに比べて長期記憶のスコアが非常に優れている。これは、若いハエに比べて年老いたハエは物忘れが進んでいることを意味すると解釈されている。そこで、老いたハエは何故、若いハエに比べて長期記憶に乏しくなるのか、すなわち老化の過程で何が起きているのかを解明することである。

3. 研究の方法

我々は、パプロフ型連想学習・記憶パラダイムを用いて、ハエの学習と記憶を測定している。このパラダイムでは、ハエに特定の匂いを苦痛や安全と関連付けるようにトレーニングを行う。まず、ハエを1分間匂いにさらすと同時に5秒ごとに痛みを伴う電気ショックを与える。このとき、ハエは匂いを痛みと関連付けることを学習する。最初の匂いを消した後、今度は電気ショックを与えない状態で2つ目の臭いを嗅がせる。このとき、ハエは2つ目の匂いが安全であることを学習する。トレーニング直後に2つの匂いのどちらかを選択させることで、ハエがこうした関連付けを学習したかどうかを測定することができる。正しく学習したのであれば、ハエはショックを与えない2番目の匂いを、ショックを与えた最初の匂いより好むはずである。この課題の学習は、ショックを与えない匂いを選んだハエからショックを与えた匂いを選んだハエの割合を差し引くことで、このタスクにおけるハエの学習能力を定量化することができる。同様に、訓練後の異なる時間の間隔でハエをテストすることにより、ハエが時間とともにこの関連付けをどのように忘れていくのか記憶の減退を追跡し、物忘れのプロセスを定量化することができる。

上記のようなトレーニングにより、ハエは短期的な記憶を生成するようになる。また、トレーニングとトレーニングの間に15分の休憩を挟みながら10回トレーニングを行うと、ハエは24時間から1週間持続する長期記憶を形成することができる。

短期的な記憶は、ニューロンの転写の変化を必要としないが、長期的な記憶の形成には、キノコ体の長期記憶エンGRAM細胞において、c-Fosを含む特定の転写因子の活性化が必要である。したがって、c-FosプロモーターからGFPを発現させ、スパーシングトレーニング後にGFP陽性になる細胞を特定することで、長期的な記憶エンGRAM細胞を可視化することができる。さらに、細胞キナーゼであるERKは、活性化されたニューロンで一時的にリン酸化されcFos>GFPを使用して長期的な記憶エンGRAMを特定し、抗-pERK抗体を使用して異なる匂いによって活性化されるニューロンを同定す

ることができる。これらの技術を使用し、若いハエと同様に老化したハエでも長期的な記憶エンGRAMが形成されるかどうかを調べると同時に、老化したハエで形成された長期的な記憶エンGRAMが特定の匂いによって再活性化されるかどうかを調べることにした。

4. 研究成果

物忘れとは、学習後の記憶力が徐々に低下することである。ほとんどのハエがトレーニング直後はショックと関連付けられた匂いを避けるが、時間の経過とともにこの匂いを避けるハエの割合は減少した。なぜこのような減少が起こるのか？物忘れに関する数理モデルを開発し、2つの可能性を考慮した。第一に、物忘れは確率的に集団全体で記憶が完全に喪失することから成り立つ可能性がある。この場合、ハエが記憶を保持する確率 ($P(M)$) は時間とともに減少する。第二に、物忘れは記憶に関する不確実性の増加から成り立つ可能性が示唆された。つまり、すべてのハエは記憶を保持しているが、時間の経過とともにこの記憶は曖昧になり、正しい匂いを選ぶ確率 ($P(C/M)$) が減少する。実際の行動データとモデルリング予測を組み合わせることで、物忘れの主要な要素は記憶に関する不確実性の増加から成り立つことを実証した (図 1)。ハエは関連性の記憶を保持しているが、その記憶についてますます不確実性が増し、その結果、記憶が行動に影響を与える確率が減少するということが明らかになった。

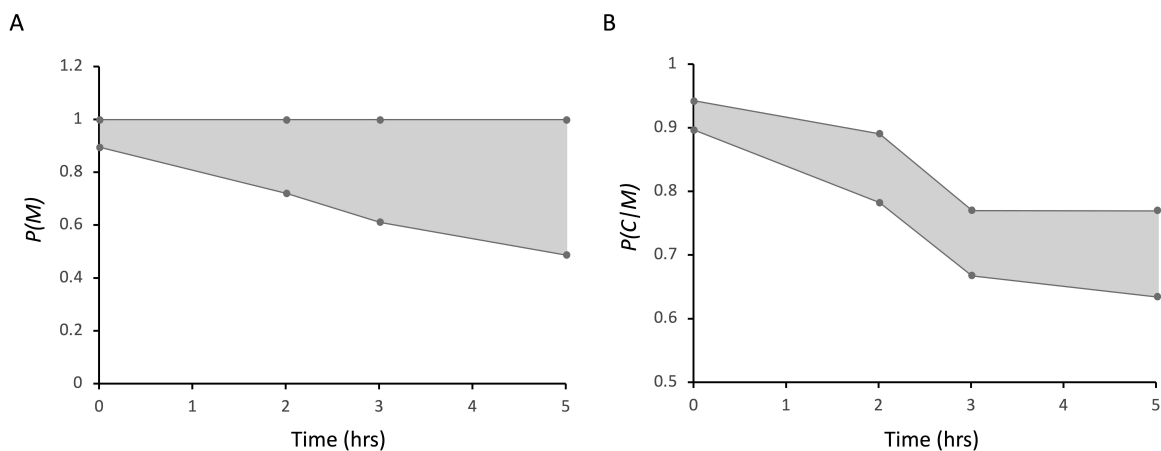


図 1. 忘却の特徴。(A) ハエが時間の経過とともに記憶を保持する確率 ($P(M)$)。 (B) 記憶のあるハエが時間の経過とともに非ショックペアの匂いを選択する確率 ($P(C/M)$)。時間の経過とともに忘れる主要な要素は $P(C/M)$ の減少であることを示している。記憶の不確実性の増加を減少と呼ぶ。

記憶の不確実性と物忘れの細胞および分子的な原因は何か？加齢によって長期記憶の物忘れが増加することは知られている。スペースドトレーニングは、キノコ体の神経細胞に可塑性を誘発し、長期記憶エンGRAM細胞の形成をもたらす。最初に、長期記憶エンGRAM細胞の喪失が物忘れの原因になっている可能性を検証した。しかし、年老いたハエでは若いハエと比較して長期記憶スコアが著しく低下する 24 時間後のスペースドトレーニングにおいて、エンGRAM細胞を可視化した結果、エンGRAM細胞の数には違いが見られなかった (図 2)。次に、これらのエンGRAM細胞を人工的に活性化させたところ、年老いたハエと若いハエの間で類似した回避行動が観察された。これは、年老いたハエのエンGRAM細胞が若いハエのエンGRAM細胞と同様に嫌悪記憶に関連した行動を引き起こすことを示している。エンGRAM細胞がショックと関連付けられた匂いによって両方のハエで再活性化されることを発見し、適切な手がかりによってエンGRAMが記憶の呼び出しを誘発することを示した (図 2)。さらに、関連のない匂いにも年老いたハエではエンGRAM細胞が再活性化される一方、若いハエでは再活性化されないことを明らかにした。

したがって、若いハエではショックと関連付けられた匂いのみによって再活性化されるが、年老いたハエではショックと関連付けられた匂いとショックと関連のない匂いの両方によってエンGRAMが再活性化することを見つけた。この結果と一致して、年老いたハエはスペースドトレーニング後に多くの匂いを避ける一方、若いハエは匂いと関連付けられたショックのみを避けることも発見した。年老いたハエは嫌悪的な関連付けそのものの記憶を失わないが、記憶の特異性を失うため、このタイプの物忘れを「記憶の一般化」と呼んでいる。記憶の一般化は記憶の不確実性に似ており、物忘れの主要

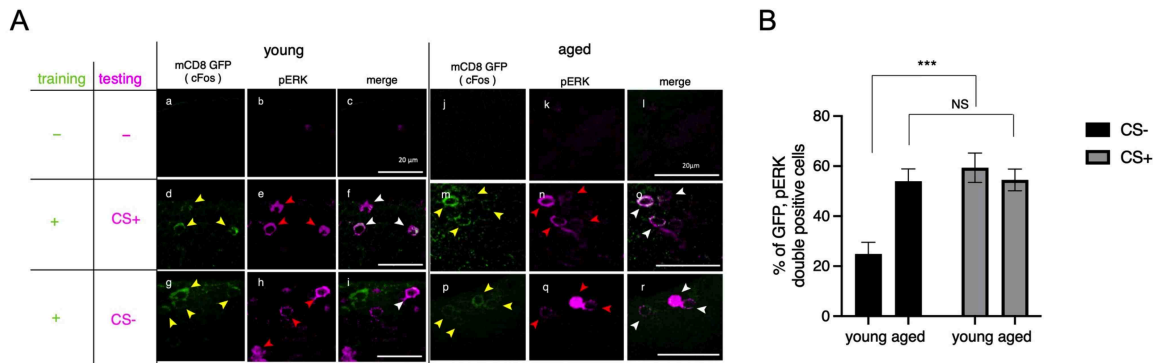


図 2. 年老いたハエでは、不適切な刺激でも記憶エンGRAM細胞が活性化される。(A) 若いハエと年老いたハエの両方では、スペースドトレーニング (+ training) 後にエンGRAM細胞 (緑色の mCD8 GFP positive 細胞) が生成される。このエンGRAM細胞は、ショックと関連付けられた匂い (CS+ testing) にさらされると再活性化される (緑と赤の信号 merge)。しかし、年老いたハエでは不適切な匂い (CS- testing) もエンGRAM細胞 (緑と赤の信号 merge) を再活性化する。(A) に示された結果を定量化したグラフが(B)。適切な匂い (CS+) と不適切な匂い (CS-) は両方とも、年老いたハエではエンGRAM細胞を同等に活性化するが、適切な匂い (CS+) は若いハエのエンGRAM細胞を優先的に活性化する。

な要素であることが示唆される。研究代表者は東京都医学総合研究所の松野元美研究員と共同で、記憶の一般化の細胞メカニズムを研究しており、記憶の一般化は記憶の定着中にキノコ体でのドーパミンシグナルの増加によって引き起こされることを発見した。我々が特定したドーパミン経路を活性化するグルタミン酸シグナルは、若いハエでは定着中に抑制されるが、年老いたハエでは抑制されず、それによって記憶の一般化が生じる。現在、この結果の公表のために準備を進めている。

また、東京都医学総合研究所の長野慎太郎研究員と共に、安堵記憶と知られる一種の記憶が、ドーパミン活性と感覚受容野と呼ばれるキノコ体とは異なる脳の構造である触角葉での可塑性に依存することを示す論文作成を補佐した。さらに、宮下知之研究員と共同で、嫌悪情報がグリア細胞から放出されるグルタミン酸を介してキノコ体へ伝達されることを示す論文投稿の準備も行った。研究代表者はグリア細胞から放出されるグルタミン酸が体積伝達として知られるプロセスを介して多くのニューロンに同時に広範に放出される可能性があることを提案した。嫌悪情報は多くの異なる匂いと関連付けられることがあるため、多くのニューロンへの伝達が必要とされる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Naganos S, Ueno K, Horiuchi J, Saitoe M.	4. 巻 Vol 56, Issue 5
2. 論文標題 Dopamine activity in projection neurons regulates short-lasting olfactory approach memory in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Eur J Neurosci.	6. 最初と最後の頁 4558-4571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.15766	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hirai S, Miwa H, Tanaka T, Toriumi K, Kunii Y, Shimbo H, Sakamoto T, Hino M, Izumi R, Nagaoka A, Yabe H, Nakamachi T, Shioda S, Dan T, Miyata T, Nishito Y, Suzuki K, Miyashita M, Tomoda T, Hikida T, Horiuchi J, Itokawa M, Arai M, Okado H.	4. 巻 Vol 7, Issue 46
2. 論文標題 High-sucrose diets contribute to brain angiopathy with impaired glucose uptake and psychosis-related higher brain dysfunctions in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 SCIENCE ADVANCES	6. 最初と最後の頁 eab16077
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abl6077	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 該当する
1. 著者名 Ueno, K., Morstein, J., Ofusa, K., Naganos, S., Suzuki-Sawano, E., Minegishi, S., Rezgui, S.P., Kitagishi, H., Michel, B.W., Chang, C.J., Horiuchi, J., Saitoe, M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Carbon Monoxide, a Retrograde Messenger Generated in Postsynaptic Mushroom Body Neurons, Evokes Noncanonical Dopamine Release	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 3533-3548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.2378-19.2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Horiuchi, J.	4. 巻 18
2. 論文標題 Recurrent loops: Incorporating prediction error and semantic/episodic theories into <i>Drosophila</i> associative memory models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Brain Behav.	6. 最初と最後の頁 e12567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gbb.12567.	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 該当する

1. 著者名 Matsuno, M., Horiuchi, J., Ofusa, K., Masuda, T., Saitoe, M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Inhibiting Glutamate Activity during Consolidation Suppresses Age-Related Long-Term Memory Impairment in Drosophila	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 55-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.04.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyashita, T., Kikuchi, E., Horiuchi, J., Saitoe, M.	4. 巻 25
2. 論文標題 Long-Term Memory Engram Cells Are Established by c-Fos/CREB Transcriptional Cycling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 2716-2728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.11.022	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 該当する

1. 著者名 Yamazaki, D., Hiroi, M., Abe, T., Shimizu, K., Minami-Ohtsubo, M., Maeyama, Y., Horiuchi, J., Tabata, T.	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 Rep	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Learning and Memory Project (英語サイト)
<https://www.igakuken.or.jp/english/project/detail/memory.html>
学習記憶プロジェクト
<https://www.igakuken.or.jp/memory/index.html>

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
---------	---------