

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目: 基盤研究(C)  
 研究期間: 2007-2008  
 課題番号: 19500265  
 研究課題名(和文) ショウジョウバエの幼虫キノコ体において匂い識別学習に関わる神経回路の機能研究  
 研究課題名(英文) Functional studies on the neuronal network of odor discrimination learning in larval *Drosophila*  
 研究代表者  
 増田 リリア(中川 リリア)(Liria Masuda-Nakagawa)  
 東京大学・分子細胞生物学研究所・博士研究員  
 研究者番号: 80300888

## 研究成果の概要:

ショウジョウバエの幼虫脳をモデルとして、嗅覚一次中枢と嗅覚二次中枢の一つであるキノコ体カリックスの神経結合様式を投射神経細胞の単一クローンを誘導する手法で解析し、一次中枢の感覚地図を作成し、二次中枢においてその対応関係を明らかにした。幼虫脳のカルシウムイメージングの系を確立して匂い刺激応答をカリックスで解析し、解剖学的な解析結果の検証を行った。この研究結果により始めて単一細胞レベルで高次脳において匂い地図を作成した。

## 交付額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野: 総合領域

科研費の分科・細目: 神経科学・神経科学一般

キーワード: 分子・細胞神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

ほ乳類と昆虫の嗅覚系では、同一の匂い受容体を発現する嗅細胞(OSN)の軸索は嗅覚一次中枢の機能的なユニットである糸球体に収斂する共通の原理に従って情報が流れる。これらの脳中枢であるほ乳類の嗅球と昆虫の触角葉(AL)において、匂い地図が報告されている(Uchida et al., 2001; Kreher et al., 2005)。しかし、高次脳の二次嗅覚中枢における神経細胞の連絡様式と情報処理機構についてはまだその原理は不明である。

ショウジョウバエのキノコ体(MB)は嗅覚二次中枢の一つであり、匂い識別学習に必須

である。解剖学的な解析により触角葉とキノコ体の神経連絡様式は成虫(Tanaka et al., 2004)および幼虫(Masuda-Nakagawa et al., 2005, Ramaekers et al., 2005)においてステレオタイプックであることが示されている。電気生理学的手法と神経活動のイメージング手法によって触角葉とカリックスを連絡する投射神経細胞(PN)は多種類の匂い物質に応答性を示すが、キノコ体構成細胞のケニオン細胞(KC)は選択性の高い応答性を示す事が明らかになっており、ケニオン細胞は一次中枢由来のいくつかの匂い情報チャネルの組み合わせに応答することが考えられる

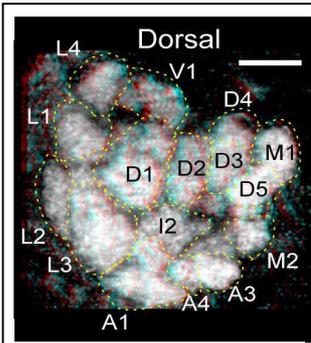


Fig. 1. 幼虫カリックス系球体地図. Bar, 10  $\mu$ m.

細胞の組み合わせによる匂い応答機構を支持する解剖学的な基盤を示した

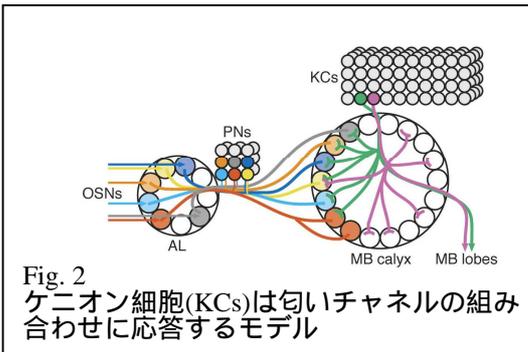


Fig. 2 ケニオン細胞(KCs)は匂いチャンネルの組み合わせに応答するモデル

(Masuda-Nakagawa et al., 2005, Fig. 2). 投射神経細胞はステレオタイプ的にカリックスに入力をするがケニオン細胞はランダムであることが明らかになった (Fig.2). 従って私の研究は嗅覚二次中枢において匂い識別学習に関わる匂い情報の暗号化機構の研究基盤を提供した。

Fig1, Fig2 は Masuda-Nakagawa et al., 102, 19027-19032, 2005 の引用である。Copyright は Proc. Natl. Acad. Sci. USA のものである。

参考文献: 1.Kreher, S. A., Kwon, J. Y., & Carlson, J. R. Neuron 46, 445-456, 2005. 2.Masuda-Nakagawa L.M., Tanaka N.K. & O'Kane C.J. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102, 19027-19032, 2005. 3.Perez-Orive, J., Mazor, O., Turner, G. C., Cassenaer, S., Wilson, R. I., & Laurent, G. Science 297, 359-365, 2002. 4.Ramaekers, A., Magnenat, E., Marin, E. C., Gendre, N., Jefferis, G. S. X. E., Luo, L., & Stocker, R. F. Curr. Biol. 15, 982-992, 2005. 5.Tanaka, N. K., Awasaki, T., Shimada, T., & Ito K. Curr. Biol. 14, 449-457, 2004. 6.Uchida, N., Takahashi, Y. K., Tanifuji, M., & Mori, K. Nat Neurosci. 3, 1035-1043, 2001. 7.Wang, Y., Guo, H. F., Pologruto, T. A., Hannan, F., Hakker, I., Svoboda, K. & Zhong, Y. J. J Neurosci. 24, 6507-6514, 2004. 8.Wilson, R., Turner G. C. & Laurent G. Science 303, 366-370, 2004.

## 2. 研究の目的

ショウジョウバエのキノコ体は嗅覚連合学習に必須な嗅覚二次脳中枢であり、高次脳における匂い表現の機構を解析するためのすぐれたモデルである。幼虫の嗅覚系では嗅細胞から触角葉への情報は成虫と同じ原理に従って流れるが、特定の種類の受容体を

(Perez-Orive et al., 2002; Wang et al., 2004; Wilson et al., 2004)。

私は解剖学的手法によってカリックス系球体地図を作成し (Fig. 1)、これを基盤に用いて投射神経細胞とケニオン細胞の連絡様式を明らかにし、ケニオン

発現するユニークな 21 個の嗅細胞が 21 個の触角葉系球体に投射をする一層シンプルな系である。更に、一個の投射神経細胞が触角葉の系球体とカリックス系球体を連絡している。

私は、幼虫キノコ体の嗅覚情報の入力領域であるカリックスにおいて系球体構造が存在することを発見し、34 個の系球体を同定した (Fig.1)。また、嗅覚系の二次神経細胞はステレオタイプ的にカリックスに入力することが分かり、個々のキノコ体神経細胞は約 6 個のカリックス系球体にランダムに樹状突起末端を持つことを明らかにした。これらの結果からケニオン細胞は匂い情報の組み合わせに応答するモデルが考えられる (Fig.2)。

電気生理学的な実験及び機能イメージングの手法による投射神経細胞は広い匂い応答性を示すことが明らかにされている、一方キノコ体のケニオン細胞は選択性が高いと示されている。従ってカリックスにおいては、匂い表現は根本的に転換されることが示されている。この転換の基盤を理解する為には、投射神経細胞とケニオン細胞の連絡様式とその情報の流れを単一細胞レベルにおいて追跡する必要がある。

そこで本研究では、幼虫嗅覚系の神経解剖学的解析を行い、投射神経細胞の触角葉系球体とカリックス系球体の結合様式を明らかにすることによって解剖学的基盤を作成して、さらに生きた幼虫のカルシウムイメージングの系を確立して神経連絡様式の機能的な検証を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 幼虫触角葉の 3 次元感覚地図の作成

幼虫嗅細胞は一つの特定の匂い受容体を発現する。匂い受容体のプロモーター領域をレポーター遺伝子に融合した構造が導入されている既存のハエ系統を用いて幼虫触角葉の 3 次元感覚地図を作成した。感覚地図の作成と解析はスイスのフリブルグ大学の R. Stocker, N. Gendre の海外共同研究者と行った。さらに、抗 dlg 抗体で染めた触角葉を解析し、21 個の触角葉系球体を同定した。

### (2) 投射神経細胞の連絡様式の解析

触角葉の系球体とカリックス系球体を連絡する投射神経細胞は一对一の連絡様式を示すことが明らかにされている。単一細胞の投

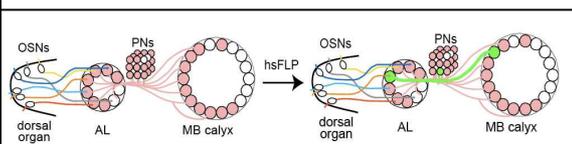
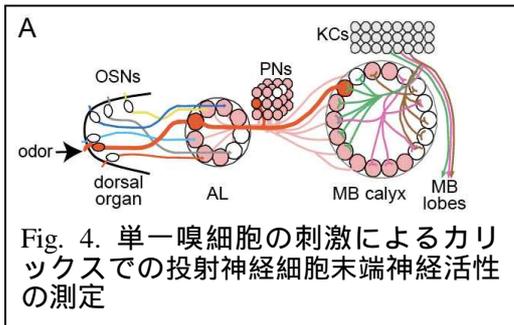


Fig. 3. Heat shock 誘導 Flip-out 法による投射神経細胞の標識単一細胞クローンの生成 (緑、右パネル)。

射を追跡することによって触角葉系球体とカリックス系球体の対応関係が可能になった (Fig.3, Masuda-Nakagawa et al. 2009)。*GH146-GAL4* 系統は投射神経細胞に特異的な発現を示す。従って、*GH146-GAL4* の蛍光色素の GFP 融合膜結合タンパク質の発現で可視化が可能なハエを用いて単一細胞クローンを Flip-out 法 (Wong et al., 2003) で作成し、脳を解剖、固定と染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察と画像取得を行った。単一細胞クローンはスイスのフリブルグ大学の R. Stocker, N. Gendre の共同研究者が作成し、サンプルを日本で解析した。投射神経細胞単一細胞クローンの樹状突起が投射をする触角葉系球体の同定、および、神経末端が投射をするカリックス系球体を同定した。参考文献：1. Masuda-Nakagawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009 in press. 2. Wong et al., Cell 109, 229-241, 2002.

(3) カリックスでの投射神経細胞末端のカルシウムイメージングによる解析  
単一の嗅細胞が機能するハエ系統を作成し、さらに、カルシウムイオンの上昇によって GFP 信号の強度が増加するセンサー *GCaMP* を投射神経細胞に導入したハエ系統を作成し、生きた幼虫の匂い応答をスピンドイスコンフォーカル顕微鏡と CCD カメラで画像



を取得した (Fig.4, Masuda-Nakagawa et al. 2009)。ハエ系統はケンブリッジ大学の Cahir O'Kane 共同研究者が作成した。カルシウムセンサー (*GCaMP*) を投射神経細胞に発現をして特定の単一の嗅細胞が機能するハエ系統のカリックスでの匂い応答を調べた。参考文献：Masuda-Nakagawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009 in press.

#### 4. 研究成果

(1) 嗅細胞の投射による幼虫触角葉の 3 次元地図  
幼虫触角葉において嗅細胞から投射神経細胞への主要神経経路を明らかにするため、幼虫触角葉の 3 次元地図を作成した。単一の嗅細胞に発現が見られる 22 個の *OrX-GAL4* 系統の触角葉での投射を解析した。単一の嗅細胞は単一の触角葉系球体に投射をした。投射神経細胞は触角葉の個々の系球体の全領域に広がって投射が見られた。系球体の位置、形

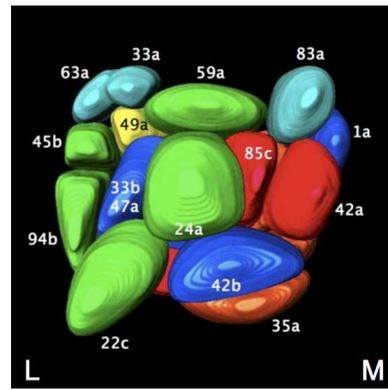
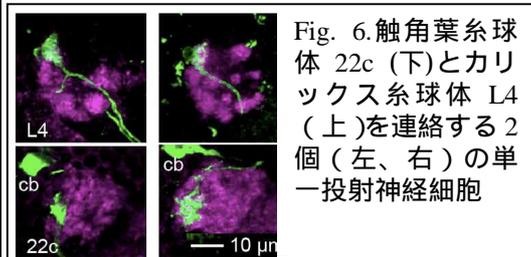


Fig. 5. 幼虫触角葉における嗅細胞の投射図, 前頭面. L, 外側; M, 内側.

状及び大きさは個体間で保存していた。嗅細胞末端の投射及び抗 *dlg* 抗体で可視化した触角葉系球体の輪郭を用いて触角葉の 3 次元の系球体地図を作成した (Fig.5, Masuda-Nakagawa et al. 2009)。

(2) 単一触角葉系球体における投射神経細胞樹状突起の投射  
単一投射神経細胞を Flip-out 法で作成し、樹状突起の触角葉系球体投射を解析した。*GH146-GAL4* 系統では全ての 21 個の系球体のうち 19 個の触角葉系球体の解析が可能である。単一投射神経細胞の樹状突起は特定の触角葉系球体に投射をし、19 個の投射神経細胞種を同定した (Fig. 6, Masuda-Nakagawa et al. 2009)。



(3) キノコ体カリックスにおいて投射神経細胞を介した嗅細胞の入力表現  
幼虫触角葉の感覚地図のカリックス系球体での表現様式を *GH146* の投射神経細胞クローンをを用いて解析した (Masuda-Nakagawa et al. 2009, Fig.7)。大部分の投射神経細胞は触角葉の特定の系球体とカリックスの特定の系球体の投射様式は個体間で保存されていた。19 個の触角葉系球体の入力を受ける 23 個のカリックス系球体を同定した。解剖学的に同定したカリックス系球体 (Masuda-Nakagawa et al. 2005) の数と一致した。今回の解析でカリックスに入力を示す新たな 2 種類の *GH146* で標識される細胞も見いだされた。1 個は食道下神経節よりカリックスに入力する細胞であった。

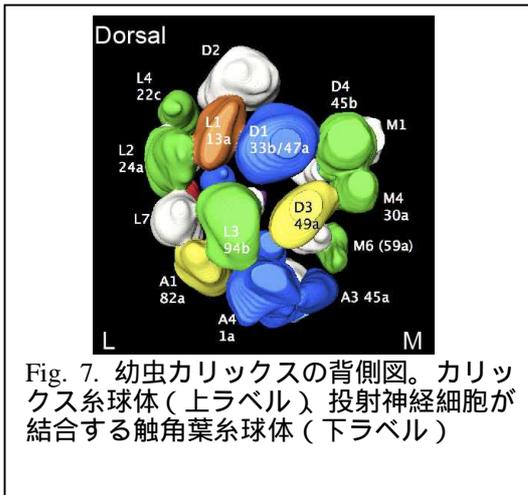


Fig. 7. 幼虫カリックスの背側図。カリックス系球体（上ラベル）と投射神経細胞が結合する触角葉系球体（下ラベル）

(4) キノコ体カリックスにおいて単一嗅細胞の神経活性

幼虫の触角葉は単一の嗅細胞の投射と単一の投射神経細胞の投射を受けることから単一の嗅細胞の活性化によって単一のカリックス系球体の活性化が起こることが仮定される。このことを検証するため、単一の嗅細胞が機能する幼虫を作成してカリックスにおける匂い応答をカルシウムセンサー *GCaMP* を用いて解析した。3種類の単一嗅細胞活性化の解析結果により2通りの結果が得られた。42a 嗅細胞の活性化は解剖学的解析の1対1の連絡様式と一致し、一つのカリックス系球体が活性化された。45b および 47a 嗅細胞の活性化は二つのカリックス系球体を活性化し、解剖学的解析とは一致しなかった (Masuda-Nakagawa et al. 2009, Fig. 8)。

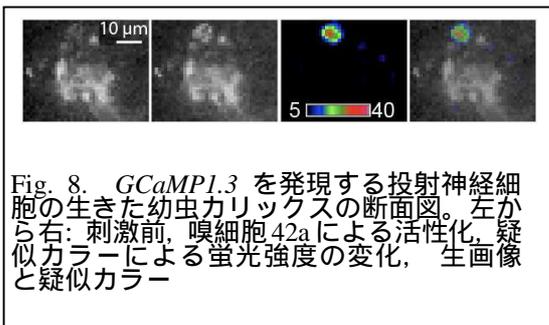


Fig. 8. *GCaMP1.3* を発現する投射神経細胞の生きた幼虫カリックスの断面図。左から右: 刺激前、嗅細胞42aによる活性化、疑似カラーによる蛍光強度の変化、生画像と疑似カラー

これらの結果により単一の嗅覚細胞の情報はカリックス系球体において局所的に表現されるというモデルを提案し、嗅覚一次中枢において匂い情報の特異的な広がり存在が示唆された。

本研究で確立した匂い情報モデルとライブイメージングを用いた解析系はカリックス系球体の感覚地図を単一細胞レベルで正確に記述することを国内外で始めて可能にし、嗅覚情報処理機構を解析するための重要な研究基盤を確立したといえる。

Figs1-2 は Masuda-Nakagawa et al. Proc.Natl.

Acad. Sci. USA 102, 19027-19032, 2005, より引用している。 Fig. 3,4,5,6,7,8 は Masuda-Nakagawa et al. 2009, Proc.Natl. Acad. Sci. USA in press, より引用しているものであり、copyright は Proc.Natl. Acad. Sci. USA のものである。Copyright of Figs. 1 -8 belong to Proc.Natl. Acad. Sci. USA.

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. Liria M. Masuda-Nakagawa\*, Nanaë Gendre, Cahir J. O’Kane and Reinhard F. Stocker. Localized olfactory representation in mushroom bodies of *Drosophila* larvae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA in press. 査読有。

[学会発表](計4件)

1. LM.Masuda-Nakagawa. Stereotypic input into the larval mushroom body calyx revealed by odor-induced neuronal activity.日本分子生物学会、2008年12月10日、神戸ポートアイランド。
2. L.M.Masuda-Nakagawa. Stereotypic input into the larval mushroom body calyx revealed by odor-induced neuronal activity. Behavioral Neurogenetics of *Drosophila* Larva, 2008年10月20日, HHMI Janelia, USA.
3. LM.Masuda-Nakagawa. Representation of input from identified olfactory sensory neurons in the larval mushroom body calyx of *Drosophila*. Neurofly, 2008年9月9日, Würzburg, Germany.
4. LM.Masuda-Nakagawa. Connectivity in the larval mushroom body calyx, a secondary olfactory center of *Drosophila*. Functional Anatomy of the Arthropod Central Complex and Motor System Conference, 2008年5月11日, HHMI Janelia, USA.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

増田リリア (中川 リリア)

(Liria Masuda-Nakagawa)

東京大学・分子細胞生物学研究所・博士研究員

研究者番号 : 80300888

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

伊藤 啓

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号 : 00311192

(4) 研究協力者

Cahir J.O'Kane  
イギリスケンブリッジ大学・遺伝学部門・(准  
教授) Reader  
Reinhard F. Stocker  
スイスフリブルグ大学・生物学部門・准教授