

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82636

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16275

研究課題名（和文）連合学習過程で摂食コマンドニューロンに生じる可塑的变化のリアルタイム解析

研究課題名（英文）In vivo real-time observation of plastic changes in information flow through a pair of feeding command neurons during Pavlovian conditioning

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研究所神戸フロンティア研究センター・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）：機械的な刺激がショ糖刺激によって引き起こされる摂食行動に連合される独自のパブロフ型連合学習実験系について、学習後は条件刺激に対して特異的に摂食行動が起こりやすくなること、記憶形成への甘味感覚の寄与、そしてショ糖刺激に应答して摂食行動を司令する摂食コマンドニューロンが学習によって条件刺激に対する反応性を獲得すること、その反応性の獲得がシナプス後ニューロンである摂食コマンドニューロンの活動に依存することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

音とエサの情報を連合する実験に代表されるパブロフ条件反射は、一般に良く知られており記憶研究のモデルとして広く用いられている。本研究では、ショウジョウバエの脳と行動の同時リアルタイム観察により、その脳内機構を明らかにした。この機構の鍵となる摂食行動を司令するニューロンは哺乳類にも存在するため、進化的に保存された一般性の高い機構である可能性も考えられる。また、シナプス後ニューロンの活動が条件反射成立に必要であることから、記憶の一般仮説とされるHebb則で想定されるシナプス前後の相互作用の実態解明に今後資することが期待される。

研究成果の概要（英文）：To correlate synaptic plasticity to memory, we established a novel Pavlovian conditioning protocol in which a tactile signal (conditioned stimulus: CS) is associated with feeding behavior induced by sucrose stimulation (unconditioned stimulus: US). In this study, we demonstrated the conditioning results in altered information processing by a pair of feeding command neurons (FNs) that respond to a sweet gustatory stimulus that is indispensable for forming a conditioned response. Calcium imaging of the FN revealed that it acquires responsiveness to CS during conditioning, with inactivation of the feeding neuron during conditioning suppressing plasticity. Moreover, we found the input from the CS is specifically intensified for the feeding behavior during conditioning compared to the sucrose signal. These results suggest conditioning alters signals flowing from the CS into the feeding circuit, with the FN functioning as a key integrative hub for Hebbian plasticity.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス可塑性 パブロフ条件反射 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 摂食コマンドニューロン ショウジョウバエ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

記憶は、脳を構成する神経細胞同士のつながり(シナプス)の変化によって、新しい神経回路が誕生し、脳の情報処理が変わることで形成されると考えられている。そのため、記憶研究にはシナプスの分子レベルのミクロな変化を追跡する方法と、脳機能の最終出力の1つである動物行動を解析対象とするマクロなアプローチが存在する。しかし、「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あいだ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」(塚原仲晃、「脳の可塑性と記憶」)と指摘されているように、ミクロな変化とマクロな変化の同時観察は容易ではない。

そこで、本研究開始前に、ショウジョウバエの摂食行動が連合学習によって変化するパプロフ条件付けの新しい実験系を確立した。「つかんでいる棒をハエから離す」という機械的な刺激(条件刺激)の直後に、ショ糖溶液を与え(無条件刺激)、間隔をあけてこの操作をくり返すことによって、棒を離すという刺激がショ糖刺激によって起こる摂食行動に連合される(Sakurai et al., 2021)。本来は、棒を離すだけでは摂食行動は起こらないが、これが起こるようになる。条件刺激が活性化する神経回路と、無条件刺激が活性化する摂食神経回路という、二つの独立な神経回路の間に機能的なつながりが形成されたことが示唆される。

また、所属研究室では摂食神経回路の要に位置すると想定される摂食コマンドニューロン(feeding neuron、以降はFNと表記する)を同定済みであった(Flood et al., 2013)。コマンドニューロンとは、神経行動学の分野で定義されており(Wiersma and Ikeda, 1964)、特定の刺激に対して一連の行動を起こす引き金となるものである。そのため、連合学習によってこれを興奮させる新しい神経接続ができれば、行動が変化すると期待される。FN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FNにおいて統合されるということが示唆される。そのため、FN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。そこで、FNの活動の変化によって連合学習による摂食行動の変化を説明することができるのか、そしてFNが記憶形成を担う主要な部位であるのかという問いに答えるために本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、同定された中枢単一ニューロンと行動の同時リアルタイム観察によって、連合学習による行動変化を担うシナプスを同定し、シナプスのミクロな変化がマクロな脳機能の変化としての記憶へとつながる過程を明らかにすることを目的とした。

本研究のために確立した連合学習実験系において、条件付けに伴い生じる脳神経回路の変化についてさらに理解を深めるために、以下の点を明らかにすることを目指した。無条件刺激としてショ糖溶液をハエの吻に接触させているが、これは「甘味」、「機械感覚」、「水」の複合刺激であるので、まず甘味刺激が実際に記憶形成に寄与しているのか追及した。また、条件付け後には条件刺激のみで摂食行動が起こるようになるが、これは条件刺激に対する反応性が特異的に上昇した結果であるのか、それとも非特異的にあらゆる刺激に対して摂食行動が起こりやすくなっているのかを調べた。次に、条件刺激を呈示した際のFNの活動を、カルシウムイメージング法を用いて観察して摂食行動との対応関係を調べ、ショ糖刺激の場合のFN活動と摂食行動の対応関係と比較した。さらに、光遺伝学的手法を用いてFNの活動を条件刺激と無条件刺激の対呈示中に抑制し、記憶形成への影響を調べることで、FNが記憶形成を担う場所

である可能性を検討した。

3. 研究の方法

連合学習の実験中に、FN の活動を記録及び操作（抑制）するために、解剖によってハエの頭部に観察窓を開け、二光子顕微鏡下で脳と行動の同時観察を行った（図 1 参照）。神経活動の記録には、神経活動に伴い細胞内にカルシウムイオンが流入すると、その蛍光強度を増すタンパク質 GCaMP6m を用いた。神経活動の抑制には、光によって駆動する塩化物イオンポンプであるハロロドプシン eNpHR3.0 を用いた。588nm のレーザー光の照射によって細胞内に塩化物イオンを流入させることで神経活動を抑制した。

条件刺激を与えるために、ハエにつかませた竹製の棒を、ステッピングモーター（LabView で駆動）を用いて動かした。ハエから棒を離れた直後に、シヨ糖溶液の染み込んだ和紙をハエの吻に接触させた。シヨ糖溶液はインジェクターを用いて、注射針の先端に固定した和紙へと刺激の直前に供給した。この操作を 30 秒おきに 5 回くり返した。

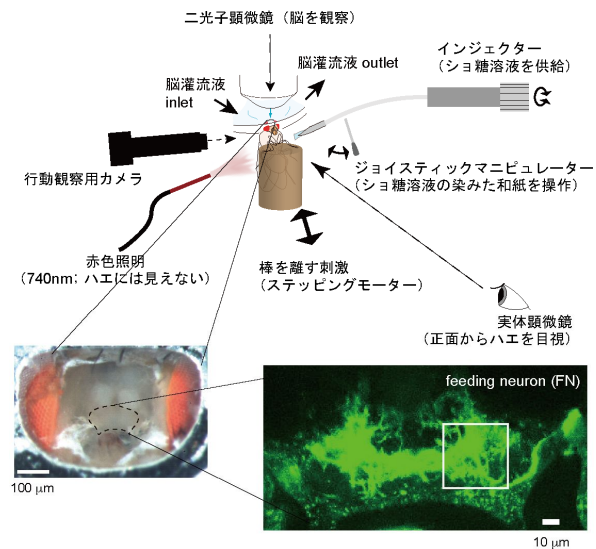


図 1 連合学習過程における脳と行動の同時リアルタイム観察

4. 研究成果

(1) 脳と行動の同時長時間観察のための生理食塩水の開発

シヨウジョウバエにおいては、脳の観察のために開頭した状態での行動観察は、多くの場合では 30 分程度が限度であった。本研究課題の遂行のために、脳の灌流に使用する生理食塩水の成分について検討し、脳と行動の同時観察可能時間を伸ばすことに成功した。体液（細胞外液）の組成を模した水溶液を灌流するのが常套手段であるが、シヨウジョウバエの場合は体長が 2-3mm と小さいため、細胞を壊さずに体液を回収することが困難であり（細胞内と細胞外では液体成分の組成が異なり、すりつぶしてしまうと両者が混ざるため）、正確な体液組成の測定は困難であった。そこで、様々な組成を試した結果、下記の SY2020 と命名した生理食塩水を用いると、開頭後 24 時間以上ハエを行動可能な状態で生存させ続けることができるようになった。脳への光照射をくり返しても、安定した脳と行動の同時観察を行うことが可能となった。

「SY2020」(mM) : NaCl, 85; KCl, 1; MgCl₂, 2.5; CaCl₂, 3; NaHCO₃, 10; HEPES-NaOH, 5; Trehalose, 5; Sucrose, 35 (pH 7.2, 242 mOsm).

(2) 甘味の記憶形成への寄与について

「棒を離す」条件刺激の直後に、無条件刺激として 1M のシヨ糖溶液を吻の先端に触れさせるという操作をくり返すと、条件刺激のみで摂食行動の一部である吻伸展が起こるようになる（記憶形成）。一方で、1M のシヨ糖溶液の代わりにシヨ糖を含まない Milli-Q 水を用いて実験を行うと、記憶形成はほとんど観察されなかった。前者の実験では「甘味 + 水 + 機械感覚」刺激が、そして後者の実験では「水 + 機械感覚」刺激がハエに与えられている。前者の場合は強

く覚え、後者の場合はほとんど覚えなかったことから、水と機械感覚が弱く記憶形成に寄与している可能性は否定できないが、甘味情報の貢献が大きいことがわかった。なお、食道は切除しているため、本実験においては栄養（糖のカロリー）の寄与は一切排除されている。

(3) 連合学習による FN 活動の変化と摂食行動の対応関係について

甘味は Gr5a などの味覚受容体を発現するニューロンによって受容される。Gr5a ニューロンは、FN が樹状突起を広げる脳領域へ投射しており、直接あるいは間接的に FN を活動させ、吻伸展などの摂食行動を引き起こす。条件付け成立後に、条件刺激のみでハエが吻伸展を行う際に、FN が活動しているのかを図 1 に示される方法を用いて調べた。条件付け成立の前は、条件刺激を与えても FN は活動せず、また吻伸展も観察されなかったのに対して、条件付け成立後は条件刺激を与えると FN が活動するようになり、その活動のタイミングに対応して吻伸展が起こる様子が観察された(図 2 参照)。条件刺激の情報を伝えるニューロンは未同定ではあるが、以上の結果から、FN が摂食神経回路内で FN の上流に位置するニューロンに対して入力を持つことが示唆される。また、このときの FN の活動の大きさ (GCaMP6m の蛍光上昇の大きさ) は、吻伸展を引き起こすことが可能な濃度のショ糖溶液 (10mM) で吻を刺激した際の活動と同等かそれ以上であった。

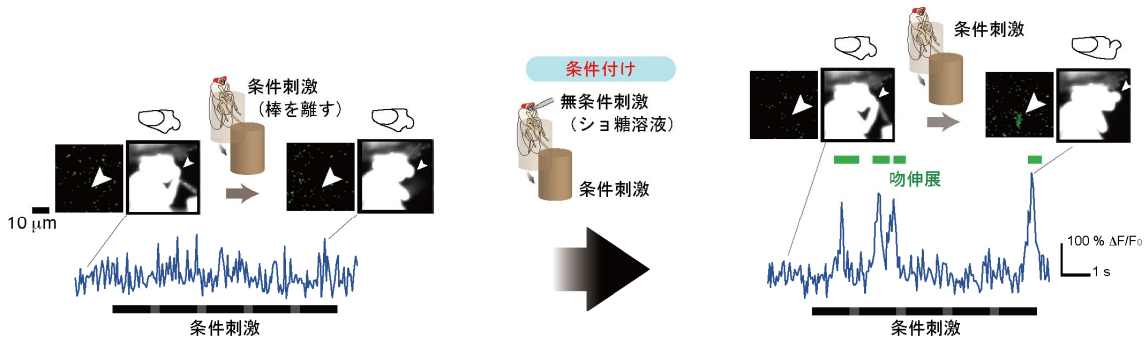


図 2 Ca²⁺ イメージングによる連合学習過程における feeding neuron の活動記録

(4) 条件刺激に対して特異的に摂食行動が起こりやすくなる

条件刺激の入力に対して特異的に FN の反応性が強化されているのか、または無条件刺激であるショ糖刺激の繰り返しにより FN が感作し、あらゆる刺激への反応性が非特異的に強化されたのかを調べるために 2 種類の実験を行った。1 つ目は、条件刺激は与えずにショ糖刺激のみを繰り返す実験である。感作によって摂食行動が起こりやすくなっているのであれば、ショ糖刺激のみを繰り返した場合でも、条件刺激とショ糖刺激を対呈した場合と同様に条件刺激のみで摂食行動が起こるようになるかと予想されるが、実際にはこれは起こらなかった。2 つ目の実験として、1mM、10mM、100mM のショ糖溶液に対する摂食行動を条件刺激と無条件刺激の対呈 (訓練) の前後でそれぞれ比較したところ、統計学的に有意な差は検出されなかった(図 3 参照)。以上から、

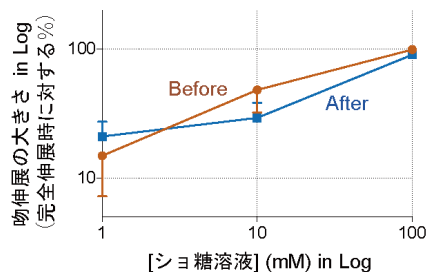


図 3 ショ糖溶液 (無条件刺激に使用) による吻伸展の訓練前後での比較
条件刺激と無条件刺激の対呈 (訓練) を行う前後で 1mM、10mM、100mM のショ糖溶液に対する吻伸展の大きさを比較した。それぞれ 6 個体から得られた結果を Student's t test を用いて比較したところ、統計学的に有意な差は検出されなかった ($p > 0.05$)。正規性の検定には Kolmogorov-Smirnov test を用いた。エラーバーは標準誤差を示す。

ショ糖刺激（無条件刺激）による FN への入力強化は強化されておらず、条件刺激による入力の特異的に強化されていることが示唆される。

（ 5 ）訓練中に FN の活動を抑制すると記憶形成が阻害される

連合学習によって FN は条件刺激への反応性を獲得するが、これが FN へと入力するシナプスの強化によるのか、あるいは FN の上流に位置するニューロン（例えば Gr5a ニューロン）へのシナプス入力強化された結果なのかは不明であった。そこで、光遺伝学的手法を用いて条件刺激と無条件刺激の対呈示（訓練）中に FN の活動を抑制することで（ハロロドプシン eNpHR3.0 を FN に発現させ、588nm のレーザー光を照射）FN におけるシナプスの強化を特異的に阻害する実験を行ったところ（Simultaneous グループ）FN へと光を照射するタイミングを 10 秒ずらした対照実験（Shifted グループ）の場合と比べて記憶形成が阻害されることがわかった（図 4 参照）。少なくとも部分的には FN へのシナプス入力の変化によって記憶が形成されていることが示唆される。

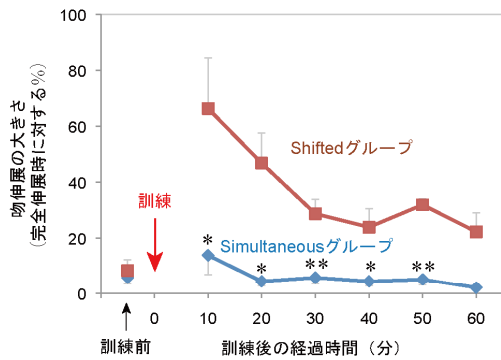


図 4 ハロロドプシンを用いた feeding neuron (FN) の活動抑制による記憶形成への影響。条件刺激と無条件刺激の対呈示中にハロロドプシン (eNpHR3.0) を発現させた FN に 588nm の光を照射して FN の活動を抑制したグループ (Simultaneous) と、光照射のタイミングを 10 秒前にずらしたグループ (Shifted) とで、条件刺激に対する吮伸 (記憶) の比較を行った。各タイムポイントごとに、Student's t test を用いて検定を行った。正規性の検定は、Kolmogorov-Smirnov test を用いて行ったところ、Simultaneous グループの訓練後 60 分のデータには正規性が認められなかったため、Mann-Whitney U test を用いて比較したところ、統計学的に有意な差は検出されなかった ($p > 0.05$)。それぞれのタイムポイントにつき 5 個体で実験を行った。エラーバーは標準誤差を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

（ 6 ）コマンドニューロンの可塑的变化による連合学習機構

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の変化をとらえ、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部位を同定した後に、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) と指摘されている。本研究により、機械的な刺激が摂食行動に連合される独自の実験系について、摂食行動を引き起こすコマンドニューロンである FN に統合されるシナプス入力の強化によって訓練前には無反応であった条件刺激に対して FN が活動するようになり、摂食行動が起こるようになるという神経機構 (図 5 参照) が明らかとなった。今後は、FN 上の記憶形成の現場となっている同定されたシナプスをモデルとすることで、シナプスの可塑的变化を生み出す分子細胞メカニズムを、記憶との因果関係を明確にしながら理解することが可能になると期待される。

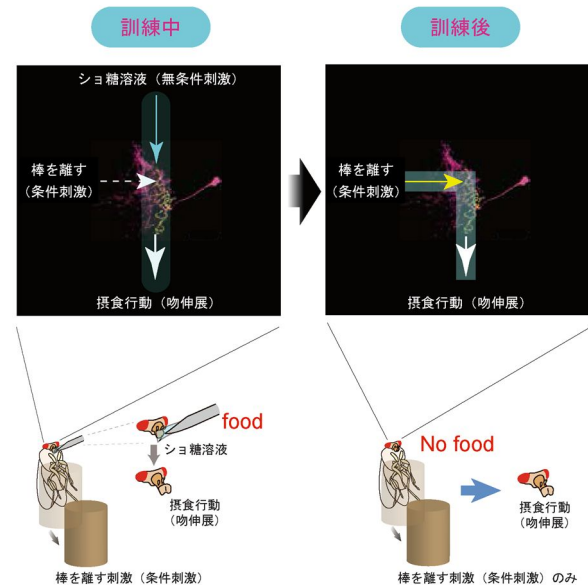


図 5 feeding neuron の可塑的变化による連合学習機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakurai Akira, Littleton J. Troy, Kojima Hiroaki, Yoshihara Motojiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Alteration in information flow through a pair of feeding command neurons underlies a form of Pavlovian conditioning in the Drosophila brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 4163 ~ 4171.e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.07.021	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 Fujii Takaaki, Sakurai Akira, Littleton J. Troy, Yoshihara Motojiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Synaptotagmin 7 switches short-term synaptic plasticity from depression to facilitation by suppressing synaptic transmission	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83397-5	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Akira Sakurai, J. Troy Littleton, Hiroaki Kojima, Motojiro Yoshihara
2. 発表標題 Change in information processing by a pair of feeding command neurons underlies Pavlovian conditioning in the Drosophila brain
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 CJK第1回国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takaaki Fujii, Akira Sakurai, J. Troy Littleton, Motojiro Yoshihara
2. 発表標題 Synaptotagmin 7 switches short-term synaptic plasticity from depression to facilitation by suppressing synaptic transmission
3. 学会等名 14th Japanese Drosophila Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Sakurai, J. Troy Littleton, Hiroaki Kojima, Motojiro Yoshihara
2. 発表標題 Information processing by a pair of feeding command neurons is altered during Pavlovian conditioning in the Drosophila brain
3. 学会等名 14th Japanese Drosophila Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Motojiro Yoshihara, Akira Sakurai
2. 発表標題 Subcellular engram, a synaptic memory trace locally formed in the feeding command neuron during Pavlovian conditioning.
3. 学会等名 Neurobiology of Drosophila (Cold Spring Harbor Laboratory meeting) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takaaki Fujii, Akira Sakurai, Troy J. Littleton, Motojiro Yoshihara.
2. 発表標題 Synaptotagmin 7 switches short-term synaptic plasticity from depression to facilitation by suppressing synaptic transmission.
3. 学会等名 新学術領域研究「スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御」第5回領域会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akira Sakurai, Hiroaki Kojima, Motojiro Yoshihara.
2. 発表標題 Feeding command neuron is a modification site in the Drosophila feeding neural circuit, which represents behavioral change through Pavlovian conditioning.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Sakurai, Troy J. Littleton, Hiroaki Kojima, Motojiro Yoshihara.
2. 発表標題 A neural correlate of Pavlovian conditioning in the Drosophila brain.
3. 学会等名 Neurobiology of Drosophila Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaaki Fujii, Akira Sakurai, Akemi Kishi, J. Troy Littleton, Motojiro Yoshihara.
2. 発表標題 Synaptotagmin 7 suppresses synaptic transmission and is not the high affinity Ca2+ sensor for facilitation or asynchronous release at Drosophila embryonic NMJs.
3. 学会等名 Neurobiology of Drosophila Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 条件付けに用いる刺激の付与方法、試験の方法、方法を実施する装置、及び、脳灌流液	発明者 櫻井晃、吉原基二郎	権利者 国立研究開発法人 情報通信研究機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-171185	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>脳の短期記憶のスイッチメカニズムを発見 https://www.nict.go.jp/press/2021/03/01-2.html</p> <p>パブロフ条件反射の正体を発見 https://www.nict.go.jp/press/2021/08/05-1.html</p>
--

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			
米国	Massachusetts Institute of Technology			