

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300117

研究課題名（和文） ショウジョウバエキノコ体の嗅覚連合学習に不可欠な嗅覚以外の感覚情報伝達経路の解析

研究課題名（英文） Analysis of non-olfactory sensory pathways that are necessary for the olfactory associative learning of the Drosophila mushroom body

研究代表者

伊藤啓（ITO, Kei）

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：00311192

研究成果の概要（和文）：

昆虫の嗅覚連合学習の主要な中枢として知られているキノコ体に嗅覚以外の情報が送られる過程を調べるため、まず嗅覚学習に不可欠ながら解析が遅れていた味覚一次中枢の構造を、始めて詳細に解析した。さらに、キノコ体入出力神経が投射する脳領域が脳のどこと接続されているかを細胞系譜に基づいて神経を体系的にラベルして解析し、味覚聴覚視覚の中枢との直接連絡がないこと、高次中枢からの投射が集中する場所があることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

The mushroom body is known to be an important center for associative olfactory memory in the insect brain. To understand the neural pathways of information other than the olfactory signals toward this center, we first analyzed the organization of the primary gustatory center, whose structure was hardly known despite the importance of gustatory information in associative olfactory learning. We also analyzed the neural connections of the brain regions that receive the arborizations of the input/output neurons of the mushroom body. By systematically labeling neurons according to cell lineage, we found that no neurons from the gustatory, auditory and visual centers directly project to these regions and that there are distinct regions that receive the projections from putative higher-associative centers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
H21 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
H22 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
H23 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：ショウジョウバエ、嗅覚系、味覚系、投射神経、情報の統合、学習記憶、GAL4 エンハンサートラップ、LexA エンハンサートラップ

1. 研究開始当初の背景

脳の情報処理のパラダイムを明らかにするには、個々の神経細胞や一部の小さな神経経

路領域の機能だけでなく、多数の素子が組み合わせられた情報処理システムとしての脳の神経回路全体について体系的に理解する必要が

ある。しかし数億以上の細胞を持つ哺乳類脳回路の全貌を体系的に理解するには、現時点では大きな困難がある。そこで我々は、脳の細胞数が片半球 5 万個と比較的少ないキョウジョウバエに着目し、これまで、感覚情報の入力処理部について研究を進めてきた。この結果、嗅覚系と視覚系については 1 次感覚中枢から高次中枢へ伸びる投射神経を網羅的に同定し、それまで知られていなかった 2 次感覚中枢の内部構造を解析して、情報の流れを明らかにすることができた。また、これまで知見がほとんどなかった聴覚・重力の 1 次感覚中枢の細かい構造を始めて解明した。

2. 研究の目的

しかし、高次の脳機能に必要な情報が、これらの入力処理部からどのようにして高次処理部に伝えられるのかは、まだほとんど分かっていない。特に重要な問題は、嗅覚連合学習の中枢として活発な研究が進められているキノコ体への情報伝搬経路が、未だに分からない点である。キノコ体は特定の匂いと、甘み報酬やショックによる罰刺激を連合して学習する能力を持ち、嗅覚 1 次中枢から太い神経束が投射している。しかし連合学習が成立するためには、罰や報酬となる匂い以外の情報もキノコ体に入射することが不可欠である。さらに近年の研究で、キノコ体神経は匂いだけでなく視覚刺激や音など幅広い刺激に応答し、嗅覚学習だけでなく睡眠制御・脳活動の活性制御・視覚学習の一部の制御などの幅広い機能にも関与することが分かってきた。このような高次機能のメカニズムを理解するためには、嗅覚以外の多様な感覚情報がどのようにしてキノコ体に供給されるのかを知ることが欠かせない。

3. 研究の方法

これまで我々の研究では、酵母の転写調節因子 GAL4 の遺伝子をゲノムの様々な場所に挿入した GAL4 エンハンサートラップシステムを大量に用意して、様々なタイプの高次神経の特異的なラベルを行なってきた。これらの GAL4 システムでは、挿入部位に応じて異なる細胞群で GAL4 が発現している。GAL4 タンパクの標的配列である UAS の下流にクラゲ蛍光タンパク GFP やサンゴ蛍光タンパク DsRed をつなげた遺伝子を持つシステムと掛け合わせると、その子供では GAL4 に依存して GFP や DsRed が細胞特異的に発現するので、これを蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡で観察して、可視化された細胞の構造を解析する。

ところが、本研究で扱う味覚・聴覚・重力等の低次中枢や、キノコ体の入出力神経が広が

るキノコ体周囲の領域には、明瞭な区画が存在しない。従って、これらの領域の神経とその間を結ぶ介在神経との空間的相関を解析するには、GAL4 システムと何らかの他の細胞ラベル法を組み合わせ、2 種の神経を染め分けて解析する必要がある。しかし、GAL4 以外に神経を特異的にラベルできる手段としては、これまでにはわずかな種類の抗体しか存在せず、この目的にはほとんど利用できなかった。

そこで本研究では、GAL4 に替わる新たなエンハンサートラップ法を用いて、脳の神経を二重にラベルした。LexA エンハンサートラップ法は、酵母由来の転写調節因子 GAL4 のかわりに大腸菌由来の転写調節因子 LexA::VP16 の遺伝子をゲノム内でジャンプさせる。LexA の標的配列である lexAop の下流に GFP などをつなげた遺伝子を持つシステムと掛け合わせると、その子供では LexA に依存して GFP が細胞特異的に発現する。GAL4 と LexA は異なる遺伝子の発現を互いに独立に誘導するので、2 種類の細胞の染め分けが可能になる。我々はこのシステムを用いて、世界で初めての大規模なシステム作成を行った。

さらに、遺伝子の特異的発現パターンを利用するエンハンサートラップ法とは全く別個の原理で脳の神経を体系的に可視化して解析するため、成虫の神経細胞を細胞系譜に従ってラベルする実験を行った。ショウジョウバエの脳は片半球約 100 個の神経幹細胞によって形成されるので、成虫脳には各幹細胞に由来する合計約 100 個の子孫細胞グループが存在する。神経発生の途中で神経幹細胞にランダムに染色体組み換えを誘発すると、ひとつの幹細胞に由来する子孫細胞群が作る神経回路ユニット（クローナルユニット）だけをラベルすることができる。これを解析することで、従来ラベルし難かった脳領域の神経も体系的に解析できるようになった。

4. 研究成果

① GAL4 システムに加えて新たに作成した大腸菌転写調節因子 LexA を用いたエンハンサートラップシステムを使って、脳の神経を二重にラベルすることにより、まず従来解析が難しかった感覚中枢の構造を詳しく調べた。特に味覚一次中枢は、嗅覚と関係の深い味に関する情報を受け取って処理するが、嗅覚中枢と異なり明瞭な区画構造が存在しないため、一次中枢内部のきちんとした構造が判明しておらず、どのような味覚神経が中枢内のどの部分に投射するのかが分からなかった。そこで、味覚感覚神経を LexA システムと GAL4 システムのさまざまな組み合わせでラベルし、同定された

各種の感覚神経の投射パターンを詳細に解析した。これによって、味覚感覚神経が投射する領域の全貌を明らかにすることができた。

さらに、甘み、苦み、炭酸、水など特定の味覚情報を受容する神経と、味覚の検知に不可欠の「口が対象物と接触した」という情報を検出する触覚神経の投射部位とを、詳しく比較した。その結果、甘みと水の情報は一次中枢の同じ場所に送られること、甘み・水／苦み／炭酸の3つの情報はそれぞれ異なる場所に送られること、味覚情報と触覚情報は隣接するが異なる場所に送られること、という味覚情報処理の基本構造が分かった。このような味覚一次中枢の詳細なマップが確立したのは、全動物種の中で初めてである。

さらに、同定された味覚一次中枢の各領域から味覚情報を脳の高次領域に送る二次神経をラベルするシステムのスクリーニングを開始した。候補系統が数十見いだされたが、この中にキノコ体周辺領域に投射する神経は見いだされなかった。それ以外の場所に投射する神経については、引き続き解析を進めている。

② キノコ体とキノコ体以外の脳領域を結ぶ入出力神経群は、われわれが以前の研究ですでに体系的に同定していた。これらのキノコ体入出力神経群が集中して投射する領域は、キノコ体の vertical lobe 周辺の superior intermediate protocerebrum (SIP) と呼ばれる領域と、medial lobe 周辺の crepine (CRE) と呼ばれる領域に限られている。しかしこれらの領域に投射するキノコ体入出力神経以外の神経は、極めて雑多な形状をしており、体系的な解析が難しかった。GAL4 や LexA エンハンサートランプシステムによる解析でもさまざまな神経は見つかったものの、それらがどの程度全体を代表する神経群になっているか分からないため、体系的な理解が難しかった。

そこで、単一の神経幹細胞に由来する子孫細胞群をラベルする手法を用いて、これらの神経を細胞系譜的観点から整理して理解する解析を行った。まず、これまで同定したキノコ体と周囲を結ぶ入出力神経は全部で十数種類あるが、これらのほとんどは数個のクロールナルユニットによって特異的に形成されることが分かった。学習中枢への入出力を担う神経が特定の少数の神経幹細胞によって作られていることは、脳の発生過程と機能分担の関わりを知る上で重要な知見である。

また、これらのキノコ体入出力神経が集中的に投射する、キノコ体周囲のSIPやCREの領域には、それぞれ10以上のクロールナルユニット殻の神経線維が重複して投射していた。こ

れらの神経のほとんどは特定の一次感覚中枢には投射しておらず、従ってSIPやCRE領域には感覚系からの情報は直接送られてきていないことが分かった。一方SIPやCRE領域には、脳の高次中枢と目される領域と結ぶ神経が多数見つかった。特にCRE領域の中には、脳後部から中心複合体を貫いて投射する4つのクロールナルユニットの投射末端が集中して出力シナプスを形成する特異的な小領域が見つかり、その形状からrubusと命名した。中心複合体は運動制御などの高次機能に関与していると考えられているが、中心複合体とキノコ体を結ぶ直接の神経経路はない。rubusは両者を結ぶ重要な情報伝達ポイントになっている可能性があり、今後の詳しい解析が期待される。

③ 我々は、これまでキノコ体や嗅覚系に関する神経を含め多数の神経を同定してきたが、これらの構造や相互の投射パターンを統一的に概観する方法はなかった。また、ショウジョウバエの脳ではこれまで数百種類の神経が同定され、構造や機能が解析されている。しかしそれらはさまざまな論文にばらばらに発表されていて、全貌を知ることが困難だった。この問題を解決するため、神経に関するさまざまな情報を網羅したデータベースFlybrain Neuron Databaseを作成し、公開した。このデータベースでは既知のほぼ全てのショウジョウバエ脳神経の情報を統一した様式で閲覧できる「ニューロンデータベース」と、さまざまな抗体や発現誘導系等による脳のラベルパターンを提供する「システム／抗体データベース」、さらに脳のさまざまな断面をインタラクティブに眺めることができる「ブレインエクスプローラー」を提供し、相互をリレーショナルにリンクすることによって、ショウジョウバエ脳を解析するさまざまな研究者の利便に供している。

④ 並行して、キノコ体へ入出力する神経の中を伝わる情報の本質を詳しく調べるため、これらの神経の生理学的解析を指向する独仏の研究グループに協力して共同研究を行った。キノコ体への入力神経の一部はドーパミン性神経であることが分かっていたが、これらの神経の一部を特異的にブロックすると匂いと電気ショックの連合学習記憶の特定のフェーズが選択的に阻害され、逆にこれらの神経を特異的に刺戟すると、電気刺激なしでも連合学習を惹き起こすことができた。これによって、キノコ体に入出力する神経の特異的な一部が、特異的な学習記憶に必要な信号を担っていることが明らかになった。またコリン性出力神経の中の1種類を特異的にブロックす

ると、匂いと電気ショックの連合学習記憶の中で記憶呼び出しのフェーズだけが選択的に阻害されることが分かった。これによって、キノコ体を介して蓄えられた記憶が想起される際の情報伝達経路の一端が明らかになった。

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7件)

1. Endo, K., Karim, M.R., Taniguchi, H., Krejci, A., Kinameri, E., Siebert, M., Ito, K., Bray, S.J., Moore, A.W. Chromatin modification of Notch targets in olfactory receptor neuron diversification. *Nat Neurosci* (15) 224-233, 2012.
2. Shinomiya, K., Matsuda, K., Oishi, T., Otsuna, H., and Ito, K. Flybrain neuron database: a comprehensive database system of the *Drosophila* brain neurons. *J Comp Neurol* (519) 807-833, 2011.
3. Sejourne, J., Placais, P. Y., Aso, Y., Siwanowicz, I., Trannoy, S., Thoma, V., Tedjakumala, S. R., Rubin, G. M., Tchenio, P., Ito, K., Isabel, G., Tanimoto, H., Preat, T. Mushroom body efferent neurons responsible for aversive olfactory memory retrieval in *Drosophila*. *Nat Neurosci* (14) 903-910, 2011.
4. Miyazaki, T. and Ito, K. Neural architecture of the primary gustatory center of *Drosophila melanogaster* visualized with GAL4 and LexA enhancer-trap systems. *J Comp Neurol* (518) 4147-418, 2010
5. Aso, Y., Siwanowicz, I., Bracker, L., Ito, K., Kitamoto, T., and Tanimoto, H. Specific dopaminergic neurons for the formation of labile aversive memory. *Curr Biol* (20) 1445-1451, 2010
6. Okada, R., Awasaki, T. and Ito, K. GABA-mediated neural connections in the *Drosophila* antennal lobe. *J Comp Neurol* (514) 74-91, 2009
7. Tanaka, N. K., Ito, K. and Stopfer, M. Odor-evoked neural oscillations in *Drosophila* are mediated by widely branching interneurons. *J Neurosci* 29, 8595-2603 (2009)

[学会発表] (計10件)

1. 遠藤啓太, MD Rezaul Karim, Alena Krejci, Emi Kinameri, Hiroaki Taniguchi, Matthias

Siebert, 伊藤啓, Sarah J. Bray, Adrian W. Moore. Olfactory Receptor Neuron Identity is Diversified by the *Drosophila* Evi1/Prdm16 Homologue Hamlet that Mediates Chromatin Modification at Notch-Target Loci. 第44回発生生物学会大会 (2011.05.18~21) 沖縄コンベンションセンター

2. 遠藤啓太, MD Rezaul Karim, Alena Krejci, Emi Kinameri, Hiroaki Taniguchi, Matthias Siebert, 伊藤啓, Sarah J. Bray, Adrian W. Moore. Olfactory Receptor Neurons are Diversified by the Prdm Protein Hamlet that Mediates Chromatin Modification at Notch-Target Loci. 1st Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference (2011.05.22~25) 台湾・台北・Chientan Youth Activity Center
3. 伊藤正芳, 遠藤啓太, 伊藤啓. Projectome mapping of neural circuits in the *Drosophila* brain based on the neuroblast lineages. 第44回日本発生生物学会大会 (2011.05.18~21) 沖縄・沖縄コンベンションセンター
4. 伊藤正芳, 遠藤啓太, 伊藤啓. Projectome Analysis of the Lineage-Dependent Neural Circuits in the *Drosophila* Brain. 1st Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference (2011.05.22~25) 台湾・台北・Chientan Youth Activity Center
5. 伊藤正芳, 遠藤啓太, 伊藤啓. Projectome Mapping of the Lineage-Dependent Neural Circuits in the *Drosophila* Brain. 2011 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Neurobiology of *Drosophila* (2011.10.03~07) 米・コールドスプリングハーバー
6. 宮崎隆明, 伊藤啓. Neural Structure of the *Drosophila* primary gustatory center revealed with GAL4 and LexA enhancer-trap systems. *Functional Neurobiology in Minibrains: From Flies to Robots and Back Again* (2010.10.17~22) スペイン・サン・フェリウ・デ・ギホルス
7. 宮崎隆明, 伊藤啓. Systematic analysis of the projection map of the primary gustatory center using two enhancer-trap systems in *Drosophila melanogaster*. 第48回日本生物物理学会年会 (2010.09.20~22) 仙台・東北大学川内キャンパス
8. 伊藤正芳, 遠藤啓太, 伊藤啓. Comprehensive analysis of the neural network in *Drosophila* brain on the neuroblast lineages. 第43回日本発生生物学会年会 (2010.06.20

～23) 京都・京都大学

9. 伊藤啓、遠藤啓太、栗崎健、伊藤正芳.
Understanding the brain composition from the
viewpoint of cell lineage. 第43回日本発生
生物学会年会 (2010.06.20～23) 京都・京
都大学
10. 伊藤啓, 宮崎隆明. Systematic mapping of
the primary gustatory center in the Drosophila
brain. European Society for Insect Taste and
Olfaction Meeting (2009.9.23) イタリア・サ
ルジニア

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ndb.flybrain.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤啓 (ITO, Kei)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号 : 00311192

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし