

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750410

研究課題名(和文) ショウジョウバエの短期記憶を支える神経情報処理

研究課題名(英文) Neural computations that underlie short-term memory in Drosophila

研究代表者

塩崎 博史 (Shiozaki, Hiroshi)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：50630571

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)：短期記憶を担う神経回路の動作機構を解明するために、豊富な遺伝学的手法が利用できるキイロショウジョウバエを対象とした新規実験系を構築した。この実験系を用いて、バエが視覚物体の位置を数秒間記憶し、飛行方向の選択に利用していることを見出した。また、短期記憶課題を行うバエの脳から神経活動を記録することで、バルブと呼ばれる脳領域が、視覚刺激、飛行方向および短期記憶に関連する活動を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To study how the neural circuits that underlie short-term memory operate, we focused on rich genetic tools available in *Drosophila melanogaster* and developed a novel experimental system. Using this system, we found that flies remember the position of a visual object for several seconds and use this memory for flight orientation. By recording the neural activity while a fly was performing a short-term memory task, we revealed that neurons in the brain region called bulb carry signals related to visual stimuli, turn direction, and short-term memory.

研究分野：複合領域

キーワード：作動記憶 視覚 *Drosophila melanogaster* 行動選択 意思決定 神経活動 神経回路 感覚運動変換

1. 研究開始当初の背景

動物は外界の情報を一時的に記憶することで、食べ物や交配相手を効率的に見つける。数秒から数分という短期間保持される記憶（短期記憶）のひとつであるワーキングメモリは、行動選択のみならず、言語、推論といった、幅広い認知機能の基礎であると考えられている。過去40年にわたる哺乳類を対象とした実験により、短期記憶に関連する神経活動が記録され、短期記憶の脳内表現様式についての理解が得られた。しかし、短期記憶関連活動の生成機構および、短期記憶関連活動から行動への変換機構についてはいまだ不明な点が多く、短期記憶の神経機構が解明されたとは言い難い状況である。

短期記憶の神経機構の解析を進めるためには、短期記憶関連活動を示すニューロンが、どのニューロン群から入力を受け取り、どのニューロン群に情報を送るのか、すなわち短期記憶を担う神経回路の機能と構造を解明することが重要である。しかし、現在のところ、哺乳類を用いた実験では、対象とするニューロンの活動と形態の両方を調べることが難しいため、神経回路の解析は容易ではない。一方、近年の技術的革新により、ショウジョウバエ成虫を対象にして、ニューロンの活動と形態の両方を効率よく解析することが可能となった。また、特定のニューロン群の活動を遺伝学的に阻害することで、ハエの短期記憶に関わるニューロン群が同定されている。しかし、行動課題を行うハエから神経活動を記録する方法が確立されていないため、ハエの脳における短期記憶の表現様式は不明である。

2. 研究の目的

短期記憶に関連する神経活動の生成機構および行動への変換機構を理解するために、行動課題を行うキロショウジョウバエ成虫から神経活動を記録できる実験系を構築し、ハエの脳における短期記憶の表現様式を明らかにすることを目的とした。特に、先行研究によって短期記憶に関わることが示唆されているニューロン群に着目し、これらのニューロン群が短期記憶に関連する活動を示すか、もし示すとすればどのような活動かの解明を目指した。

3. 研究の方法

短期記憶にもとづいて行動するハエ成虫から神経活動を記録するために、ハエの頭部を顕微鏡下に固定した状態で、ハエに仮想的な視覚環境を飛行させる実験系を構築した。この実験系を用いて、ハエの短期記憶の性質を行動学的に解析した。次に、顕微鏡下で羽ばたくハエから、電気生理学的手法およびカルシウムイメージング法を用いて神経活動を記録するための実験系を作成した。この実

験系を用いて、記憶課題を行うハエの脳から神経活動を記録した。

4. 研究成果

(1) 仮想飛行システムの構築

ハエの脳から神経活動を記録するためには、ハエの頭部を固定する必要がある。そこで、頭部を固定した状態でハエに行動課題を行わせる実験系を構築した(図1)。

翅が自由に動く状態を保ったまま、ハエの体の一部を顕微鏡下に固定した。頭のまわりを取り囲むように発光ダイオード(LED)を配置し、視野の広範囲に視覚刺激を呈示できるようにした。マイクを用いて、左右の翅の羽音を計測し、ハエが左右どちらに曲がるかとしているかを実時間で推定した。推定した飛行方向にもとづき、視覚パターンを回転させることで、ハエが仮想的な空間を飛行する状況をつくりだした(図1B)。

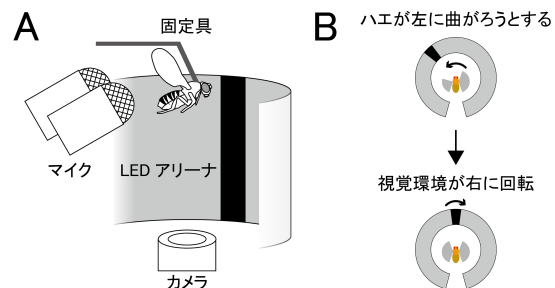


図1 仮想飛行システム

(2) 短期記憶の行動学的解析

ハエの短期記憶を評価するために、仮想飛行システムを用いた新しい行動課題を開発した。

ハエは、低コントラストの縦長の視覚物体（棒状刺激）に向かって飛ぶ習性をもつ。そこで、仮想飛行中に2つの棒状刺激を左右の視野に同時に呈示したところ、ハエはどちらか一方の棒状刺激に向かって飛行した。このとき、ハエは左右それぞれの刺激を同確率で選んだ。この飛行方向選択が、過去数秒間の視覚経験にどのように依存するかを検討した(図2)。試行のはじめに、左右の視野どちらかに1本の棒状刺激（先行刺激）を2秒間呈示した。次に、視覚刺激を呈示しない状態（遅延期間）を1秒間設けた。最後に、左右の視野に棒状刺激（選択刺激）を呈示し、ハエが左右どちらの刺激を選ぶかを検討した。先行刺激と片方の選択刺激は、同じ視野位置に呈示した。その結果、ハエは先行刺激とは逆の視野に呈示された選択刺激に向かって飛行する傾向があることを見出した。課題を改変し、先行刺激と同じ場所にのみ選択刺激が呈示されるようにしたところ、ハエは選択刺激に向かって飛行した。つまり、ハエは先行刺激と同じ位置にあらわれる刺激を避けているわけではない。先行刺激による選択確率の変化を解析したところ、先行刺激に

よって、同じ位置に呈示される選択刺激に向かう傾向が減少することが明らかとなった。

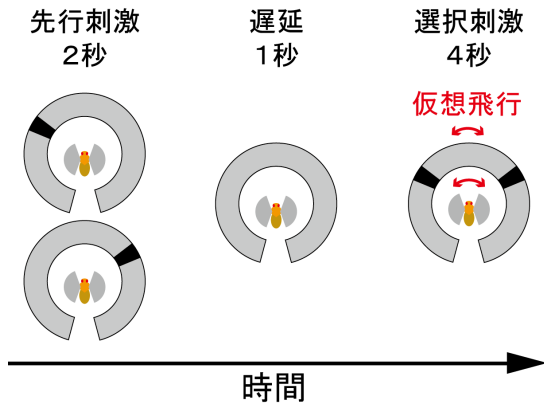


図2 短期記憶課題

先行刺激の影響がどれくらいの期間持続するのかを調べるために、遅延期間の長さを変化させたところ、8秒間の遅延期間のあとも、ハエは先行刺激とは逆の位置に呈示される選択刺激に向かう傾向を示した。次に、先行刺激の影響が空間的にどの程度の広がりをもつかを検討するため、先行刺激の位置と選択刺激の位置を系統的に変化させた。その結果、先行刺激による飛行方向判断への効果は、先行刺激と選択刺激が同じ位置に呈示されたときに最も強いものの、両者の水平位置が15度ずれていても判断に偏りが生じた。

以上の結果は、ハエが視覚物体の位置を数秒間記憶し、飛行方向の選択に利用していることを示している。

(3) 神経活動と行動の同時計測系の構築

短期記憶に関連する神経活動を記録するために、仮想飛行システムを改変した(図3)。

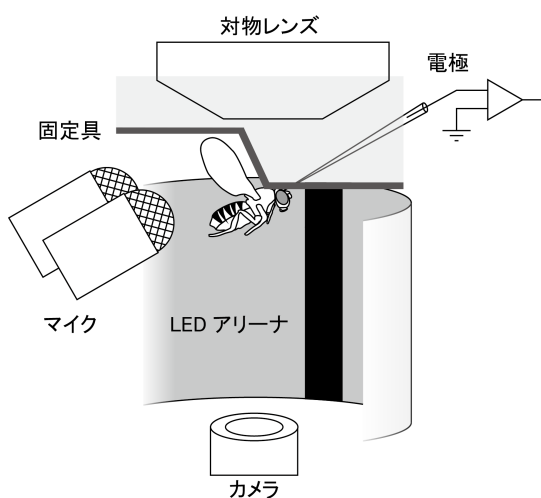


図3 行動と神経活動の同時計測系

板状のハエ固定具に小さな穴を開け、対物レンズを通してハエの脳を観察できるようにした。固定具の上で、生理食塩水をかん流し、脳の状態を保った。固定具の形状を工夫し、固定具下でハエが翅を動かし、仮想飛行

できるようにした。穴を通して、ガラス電極を用いた電気生理学および2光子励起顕微鏡を用いたカルシウムイメージングを行うことができるようにした。

作成した実験系を用いて、固定具下で飛行するハエの脳から、セル・アタッチド法およびホールセル・パッチクランプ法を用いて、単一ニューロンの活動を記録することに成功した。しかし、多くのハエは、記録開始から数分以内に飛行を停止してしまっただ。原因を検討したところ、電極を刺入するために行う外科的措置(脳を覆う膜の除去)によってハエの飛行時間が短くなることが示唆された。そこで、そのような外科的処置を必要としない、カルシウムイメージング法により、神経活動を計測した。その結果、神経活動を記録しながら、ハエに10分以上行動課題を行わせることに成功した。

構築した実験系を用いることで、仮想飛行するショウジョウバエ成虫から神経活動を記録することが可能となった。この実験系は、短期記憶の研究のみならず、学習、意思決定、運動といった、脳神経機能の動的な側面の研究一般に有用であると考えられる。

(4) 短期記憶課題遂行中の神経活動

物体位置の短期記憶が、ハエの脳内でどのように表現されているかを解明するために、短期記憶課題を行うハエから、神経活動を記録した。

先行研究により、リングニューロンという神経細胞(図4)の活動を止めると、ハエの視覚短期記憶が阻害されることが知られている。そこで、リングニューロンが短期記憶に関連する活動を示すか、もし示すとすればどのような活動かを検討した。

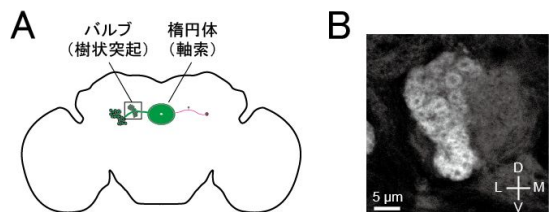


図4 短期記憶に関わることが示唆されているニューロン(リングニューロン)群

リングニューロンは、バルブという脳領域に樹状突起を持つ(図4)。バルブは、微糸球体という直径2マイクロメートル程度の構造体で構成されており(図4B)、各リングニューロンは、単一の微糸球体にのみ樹状突起を伸ばす。このような解剖学的特徴を持つことから、微糸球体はバルブにおける情報処理の単位と考えることができる。そこで、すべてのニューロンにカルシウム指示蛍光タンパク質を発現させた遺伝子改変ハエを作成し、記憶課題遂行中の各微糸球体の活動を記録した。すると、先行刺激によって活性化される微糸球体や、ハエが曲がるようになっている方向によって活動を変化させる微糸球

体が見つかった。先行刺激によって活性化される微系球体は、遅延期間においてもその活動の一部を維持していた。この結果は、ハエの脳において、空間短期記憶が持続神経活動によって表現されている可能性を示唆する。哺乳類の脳でも、遅延期間にも持続する神経活動によって短期記憶が表現されていることが報告されていることから、短期記憶の神経表現には種を超えた普遍性があるのかもしれない。

視覚情報を伝える微系球体とハエ自身の運動に関する情報を伝える微系球体は、バルブ内において異なる位置に集まって分布していた。リングニューロンの形態を解析したところ、バルブ内で異なる位置に樹状突起を伸ばすリングニューロン群は、楕円体内においても異なる位置に軸索を伸ばしていた。これらの結果は、視覚情報と運動情報が、異なる神経回路によって伝達されている可能性を示唆する。

まとめ

行動課題を行うキイロショウジョウバエ成虫から神経活動を記録する方法を確立したことで、認知機能の基盤となる神経回路の構造と機能を詳細に調べることが可能となった。感覚運動変換に関わるニューロン群の解析を、ハエを用いて進めることで、記憶および意思決定を担う神経回路の動作原理の理解が進展することが期待できる。

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)

[学会発表](計2件)

塩崎博史、風間北斗 ショウジョウバエを用いた飛行方向選択における短期記憶の検討 Short-term memory during navigational decision-making in flying *Drosophila*, 第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2014.9.11-13(発表日2014.9.12)

塩崎博史、風間北斗 仮想飛行システムを用いたショウジョウバエ短期空間記憶の検討、脳と心のメカニズム第14回 冬のワークショップ、ルスツリゾート、北海道虻田郡、2014.1.8-10(発表日2014.1.9)

6. 研究組織

(1)研究代表者

塩崎 博史 (SHIOZAKI, Hiroshi)
理化学研究所・脳科学総合研究センター・
基礎科学特別研究員
研究者番号：50630571