

博士論文（要約）

加齢性長期記憶障害は記憶の汎化によって起こる

(Age-related long-term memory impairment is caused by memory generalization)

上村 望

目次

1 章 序論 1

2 章 実験材料と実験方法 7

3 章 結果 21

 1 節 22

 2 節 29

 3 節 31

 4 節 35

4 章 考察 38

結論..... 47

謝辞..... 48

引用文献..... 50

図表..... 67

1 章 序論

生物は生存するため経験から学習し記憶を形成する。記憶は生物の個性を表出し、行動の基盤となる重要な高次脳機能である。記憶の喪失はその個体のパーソナリティをなくし、適切な判断ができずに死に至る恐ろしい事態を招きかねない。生物の加齢は生存に不可欠である記憶を低下させる。それゆえ、記憶に関する研究は無脊椎動物から脊椎動物まで盛んに研究されてきた。記憶には短期記憶、中期記憶及び長期記憶がある。その中でも長期記憶は唯一新規に転写翻訳を必要とし（Tully et al., 1994）、転写因子 cAMP-response element binding protein（CREB）（Beck et al., 2000 ; Hirano et al., 2013 ; Pagani et al., 2009 ; Tully et al., 1994 ; Yin et al., 1994）や記憶形成初期から発現する転写因子 cFos の発現が知られている（Fleischmann et al., 2003 ; Geer and Greenberg, 2008 ; Katche et al., 2010 ; Liu et al., 2014）。長期記憶の成立過程には、記憶の形成（記憶の獲得）、記憶の保持及び記憶の想起の過程が含まれる。また忘却が促進すると長期記憶を低下させる。加齢個体の長期記憶はこれらの過程のどこに障害が起こるのだろうか？

加齢個体の記憶障害についてはマウス等の哺乳類で研究されている。しかしながらマウスでの研究は加齢処理に長い時間を要し、遺伝子改変マウス等の作製では 1 年

以上要することもある。この欠点はキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)

(図 1) (以下ショウジョウバエ) によって解決される。ショウジョウバエは羽化して 20 日で加齢し、記憶が低下 (図 2) することが分かっている (Matsuno et al., 2019 ; Tamura et al., 2003 ; Tonoki and Davis, 2012 ; Tonoki and Davis, 2015)。また、古典的条件づけ (図 3) が可能なモデル生物であり、電気刺激と組み合わせる匂い (Conditioned Stimulus ; CS+) と組み合わせない匂い (Conditioned Stimulus ; CS-) を 15 分の時間間隔をおいて繰り返し提示する長期記憶学習を行うと少なくとも 7 日間持続する長期嫌悪記憶が形成される (Tully et al., 1994 ; Yin et al., 1994 ; Yin et al., 1995)。

ショウジョウバエの記憶中枢はキノコ体 (Mushroom Body, MB) と呼ばれる。キノコ体を構成するケニオン細胞はタイプ別に大きく α/β 、 α'/β' 、 γ の 3 つのローブに分かれている。また、各ローブは記憶の獲得、記憶の保持、記憶の想起の異なった記憶過程で機能する (Crittenden et al., 1998 ; Isabel et al., 2004 ; Yu et al., 2006 ; Krashes et al., 2007 ; Tanaka et al., 2008 ; Blum et al., 2009 ; Huang et al., 2012, 2013 ; Qin et al., 2012 ; Cervantes-sandoval et al., 2013 ; Perisse et al., 2013 ; Aso et al., 2014)。長期記憶学習 24 時間後のケニオン細胞の匂い応答性から α/β ケニオン細胞が長期記憶を形成するのに必要であると分かっている (Akaral et al., 2011 ; Pascual and Preat, 2001 ; Yu et al., 2006)。嗅覚情報は約 50 個の触覚葉にある糸球体に伝わり、投射ニューロンを介して約 2000 個

のケニオン細胞のうち、いくつかの細胞に伝達される (Laissue et al., 1999; Vossall et al., 2000; Aso et al., 2009; Caron et al., 2013; Gruntman and Turner, 2013) (図 4 A)。情報を受けたケニオン細胞はキノコ体からの入力を受ける 34 個の出力神経 (Mushroom Body Output Neuron, MBON) のいずれかにに情報を伝達する (Tanaka et al., 2008; Aso et al., 2014)。キノコ体に投射するドーパミン作動性神経がキノコ体と MBON のシナプス伝達を調節する (Claridge-Chang et al., 2009; Mao et al., 2009; Yamagata et al., 2015; Aso et al., 2016) (図 4 B)。

Heisenberg (2003) は CS+の匂い情報 (アセチルコリン) と電気刺激の情報 (ドーパミン) がキノコ体で連合すると嫌悪記憶が成立するモデルを構築した (図 5)。また、Ueno (2013, 2017) らは匂い情報の伝達物質はアセチルコリンであるが、電気刺激の情報はドーパミンではなくグルタミン酸の放出を伴い、さらにアセチルコリンとグルタミン酸がキノコ体のケニオン細胞に同期して入力すると、ドーパミン作動性神経からドーパミンを放出する新規機構を発見した (図 6)。Matsuno ら (2019) は 加齢ショウジョウバエ (以下加齢体) ではグルタミン酸シグナルが上昇すること、また、グルタミン酸シグナルを薬理的に抑制すると加齢体でも記憶が改善することを報告している。

Richard Semon は刺激によって生じた興奮が生体組織（特に神経系）内に残った痕跡を「エングラム」と定義した。その後、Donald Hebb は学習時に同期活動した神経細胞集団が物理的な痕跡として記憶が残ると提唱した（Hebb の法則）。マウスをある部屋に入れて電気刺激を与えると、マウスはその部屋に入っただけですぐみ行動をとる（恐怖条件付け）。恐怖条件付けで同期活動した神経細胞を、cFos プロモーターを利用して細胞特異的に可視化できる技術が開発された（Matsuo et al., 2008）。Tonegawa らはこの技術を応用して恐怖条件付けで同期活動した細胞特異的にチャネルロドプシンが発現する遺伝子改変マウスを作製した（Redondo et al., 2014）。チャネルロドプシンは 7 回膜貫通型タンパクで青色光によって活性化し、陽イオンが細胞内に流入してその細胞が興奮する。彼らはこの方法を利用して恐怖条件付けしたマウスのチャネルロドプシン発現細胞に青色光を照射するだけで人為的に恐怖記憶を呼び起こすことに成功し、記憶痕跡細胞の存在を明らかにした（Tonegawa et al., 2015）（図 7A）。つまり、記憶の獲得時に同期活動した神経細胞が記憶痕跡細胞となり記憶情報が神経ネットワークにコードされる。記憶保持過程で記憶痕跡細胞が適切にメンテナンスされ、想起時に記憶の手がかりとなる情報の提示で再活性化して記憶が思い出される（図 7B）。

当研究室においても、若齢ショウジョウバエ（以下若齢体）の記憶痕跡細胞が可視化された（Miyashita et al., 2018）。cFos プロモーターの下流で mCD8::GFP が発現する

トランスジェニックハエを作製し、長期記憶学習によって cFos 陽性細胞が GFP によってラベルされた。想起時のテスト（記憶テスト）において CS+ 及び CS- の匂いで活性化される細胞は細胞外シグナル調節キナーゼ (Extracellular signal-Regulated Kinase ; ERK) のリン酸化抗体 pERK で可視化され、cFos 陽性細胞が CS+ の匂いで再活性化された。

ショウジョウバエは通常青色光を好む。cFos が活性化してチャネルロドプシンが発現した細胞を人為的に青色光で活性化すると、チャネルロドプシンが嫌悪記憶を呼び起こし青色光に対して忌避性を示す。これらの結果は、記憶痕跡細胞の機能の十分性を示している。同様の方法を用いれば、加齢体においても記憶痕跡細胞が形成されるか検証できる。

ショウジョウバエは遺伝学的に優れたモデル生物である。GAL4 UAS システム（詳細は実験方法を参照）によって、遺伝学的に特定の組織で目的の遺伝子発現を操作できるため比較的容易に機能解析が可能である。このシステムを利用して記憶痕跡細胞を若齢体と加齢体で比較して長期記憶障害の原因を明らかにできると考えた。加齢体の記憶痕跡細胞については、ショウジョウバエはおろか他の生物でもほとんど報告がない。

本研究の目的は、ショウジョウバエにおいて、加齢性長期記憶障害の分子神経メカ

ニズムを解明することにある。具体的には、加齢性長期記憶障害は記憶の獲得、記憶の保持、記憶の想起のどの過程が障害されているのか、どのように障害されているのか、をショウジョウバエの遺伝学、行動学、分子生物学及び薬理学的に検証する。

3章1節では、加齢体の記憶痕跡細胞が形成されるか検証した。2節では、加齢体の匂いに対する応答性が特異的でなくなる記憶の汎化を起こすことについて検証した。3節では、加齢体においてグルタミン酸シグナルを抑制すると記憶の汎化が改善されるか検証した。4節では、ドーパミン作動性神経の興奮は若齢体であっても長期記憶を低下させるか検証した。

4章では本研究で得られた結果から加齢体の記憶障害がこれまでの知見とどのように関連するか考察した。また、3章で触れていない忘却の可能性についても考察した。さらに先行研究及び本研究の結果から加齢性記憶障害が生じるモデルについて考察した。そして、本研究では未解決である重要な問題点を明らかにし、今後どのように解決できるか考察した。最後に、本研究で得られた知見はどのような意義をもち、どのような発展性があるのかを考察した。

2 章 実験材料と実験方法

実験材料

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の成虫 (以下ショウジョウバエ) を使用した (図 1)。明期 12 時間、暗期 12 時間のサイクル 25 °C にて飼育した。若齢体は 25 °C において羽化後 3-5 日、加齢体は 25 °C において 20 日後に実験に用いた。ただし、実験上温度シフトが必要な加齢個体は 25 °C で 16 日、18 °C で 7 日の加齢処理をして実験した。実験に用いたショウジョウバエを表 1 に示した。特別な記載のないショウジョウバエは標準コーンミール飼料 (表 2A) で飼育した。

実験方法

GAL4 UAS システム

ショウジョウバエの遺伝学 GAL4 UAS システムを用いて実験で使用するトランスジェニックハエを作製した。GAL4 UAS システムは、酵母由来の転写調節因子 GAL4 発現誘導系統と GAL4 タンパク質が特異的に結合する UAS (Upstream Activation Sequence) プロモーター配列の下流に任意の遺伝子をもつレポーター系統を掛け合わ

せ、GAL4タンパクが発現している特定の細胞にのみレポーター遺伝子を発現させるシステムである (Rorth, 1996) (図 8)。本研究では、レポーターとして緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein: GFP)、や光作動性チャネルタンパク質であるチャネルロドプシン (後述)、温度作動性チャネルタンパク質であるdTrpA1、シナプスの伝達物質を阻害する (Shibire) Shi^{ts} (後述) を用いた。また、GAL4の転写活性を抑制する目的でTubp GAL80^{ts}を用いた。Tubpはチューブリンプロモーターで、その下流に酵母の転写因子GAL80 (Ma and Ptashne, 1987) が結合している。GAL80^{ts}は25 °C以下ではGAL4の活性化を抑制するが、32 °Cになると抑制が解除されてGAL4の転写活性化が促進する。このため、長期記憶学習中に温度を上昇し、温度依存的に目的の遺伝子を発現できる。

RNA 抽出

長期記憶学習終了後直ちに 1.5 mL チューブにショウジョウバエ (*UAS mCD8::GFP; kayak GAL4 / Tubp GAL80^{ts}*)を集めて液体窒素で凍らせた。以下の操作は適当な大きさの発泡スチロール容器内に粉末状ドライアイスを入れて試料が溶けないようにして行った。凍ったショウジョウバエを網目の開き 600 μ m、線径 400 μ m ふるい (TOKYO SCREEN) に入れた。網目の開き 425 μ m、線径 280 μ m ふるい (TOKYO SCREEN) を下に重ね蓋をし実験台に数回素早く叩きつけ、頭部が下のふ

るいに分離された。200 μ L の TRIzol reagent (ライフテクノロジーズ)に頭部を入れベッスルでホモジナイズした。十分粉碎してからさらに TRIzol reagent を 800 μ L 追加し軽く混ぜ室温で 5 分静置した。クロロホルム (シグマ-アルドリッチ) を 200 μ L 加え、15 秒間ヴォルテックスした後、室温で 5 分静置した。4 °C、15000 rpm、15 分間遠心した後、上層を注意深く 200 μ L ピペットで吸い上げ新しい 1.5 mL チューブに移した。フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール 25：24：1 pH 5.2 (ナカライテスク) を当量加え、4 °C、15000 rpm、1 分間遠心し、上層を注意深く 200 μ L ピペットで吸い上げ新しい 1.5 mL チューブに移した。イソプロピルアルコール (ナカライテスク) を当量加え、転倒混和し室温で 10 分静置した。4 °C、15000 rpm、10 分間遠心し沈殿物を得た。70%エタノール (ナカライテスク) を 1000 μ L 加え軽くヴォルテックスした後、4 °C、15000 rpm、1 分間遠心し洗浄した。DNA の混入を防ぐため、もう一度フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール 25：24：1 pH 5.2 と RNase フリーの純水を当量加えよくヴォルテックスした。4 °C、15000 rpm、1 分間遠心し上層を注意深く新しい 1.5 mL チューブに移し、70%エタノールで 4 °C、15000 rpm、1 分間遠心し洗浄した。沈殿に 100%エタノール (ナカライテスク) 250 μ L 及び 3M 酢酸ナトリウム水溶液 10 μ L を加え、-20 °C で 15 分インキュベートした。4 °C、15000 rpm、15 分間遠心して集めた沈殿物に 70%エタノールを加え 4 °C、15000 rpm、1 分間遠心し洗浄した。沈殿に RNase フリーの純水を 10 μ L 加え、RNA 溶液とした。

RNA 濃度は分光光度計 NanoDrop ND-1000（サーモフィッシャー）で測定した。

cDNA 合成

トータル RNA の 1 μg 分を鋳型に ReverTra Ace（東洋紡）のプロトコールに従い ProFlex（ライフテクノロジーズ）を使用して 30 °C 10 分、42 °C 60 分で cDNA を合成した。その後 99 °C 5 分間で酵素を失活させた。これに超純水 90 μL を加え 1 サンプルあたり 100 μL とした。

定量的 RT-PCR

CFX96 Deep Well Real-Time System（バイオ・ラッド ラボラトリーズ）を使用し、添付の解析ソフトに従って、相対標準曲線法により解析を行った。PCR 反応には THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix（東洋紡）を使用し、95 °C 10 分、95 °C 15 秒、60 °C 30 秒を 40 サイクル、その後融解曲線作成のため 95 °C 15 秒、65 °C 1 分、95 °C 15 秒の条件で行った。cDNA 溶液を 4 倍希釈した 2 μL を鋳型にして cFos、GFP 及び Gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2（GAPDH2）を同じプレートで増幅した。GAPDH2 は相対評価するための内部標準コントロールとして使用した。使用したプライマーは表 3 に示した。標準曲線を描くために cDNA 溶液を原液、2 倍、4 倍、8 倍、16 倍希釈して 5 点を結ぶスタンダードカーブを 2 本描いて R^2 値が 0.95 以上で解析が妥

当であることを確認した。

免疫化学組織染色

試料の固定

0.1 M リン酸緩衝液 (0.1 M Na_2HPO_4 : 0.1 M NaH_2PO_4 (3 : 1)) で 16% パラホルムアルデヒド (Electron Microscopy Sciences) 終濃度 4%、飽和ピクリン酸終濃度 15% になるように希釈し固定液とした。この溶液に ERK の脱リン酸化を防ぐため Phosphatase Inhibitor Cocktail (サーモサイエンティフィック) (1 : 100) を加えた。

前日に長期記憶学習したショウジョウバエ (*UAS mCD8::GFP; kayak GAL4 / Tubb GAL80^{ts}*) を室内気温 25 °C、湿度 65% で匂いテストを行い、ERK がリン酸化される 8 分後、速やかに氷上の 100% エタノール中に投入した。その後 1 x PBS で 1 回洗浄し、氷上に置いた解剖皿の固定液にショウジョウバエを投入した。解剖の際、鋭利なピンセットを 2 本用いて脳に固定液が侵入しやすくするため口吻部分を 5 分以内に取り除き、さらに気管や脂肪体など脳以外の組織をできるだけきれいに取り除き 2 時間固定した。

その後 1xPBS 0.02% Triton-X (ナカライテスク) で 3 回ピペッティング洗浄し、1xPBS 0.02% Triton-X で希釈した 10% イムノブロック (DS ファーマバイオメディカル) で 1-3 時間ブロッキングした。1xPBS 0.02% Triton-X で希釈した 10% イムノブロックに GFP 一次抗体 (1 : 500) 及び pERK 一次抗体 (1 : 500) を加え、4 °C で 3-5 日インキ

ュベートした。一次抗体溶液を除去し、1xPBS 0.02% Triton-X で 3 回ピペッティング洗淨した。二次抗体（1：800）のインキュベートは、室温で 2.5 時間行った。二次抗体溶液を除去し、1xPBS 0.02% Triton-X で 3 回ピペッティング洗淨した。一次抗体及び二次抗体の詳細は表 4 に示した。

試料のマウント

上記で処理した脳を実験区毎にマイクロカバーガラス NEO 24 x 60 mm（厚さ 0.12-0.17 mm）（マツナミガラス）にビニールパッチ孔径 6 mm（コクヨ）を 1 枚貼り付けた中に置いた。Mount Perma Fluor（サーモサイエンティフィック）13 μ L を加えマウントした。この際、できるだけ脳の前後軸が一致するように向きを揃えた。マイクロカバーガラス 0.13 mm（厚さ 0.12-0.17 mm）（マツナミガラス）を気泡が入らないようにゆっくり乗せ、縁を透明マニキュア（井田ラボラトリーズ）で封入した。

試料の観察

ショウジョウバエ (*UAS mCD8::GFP; kayak GAL4 / Tubp GAL80^{ts}*) 脳の蛍光画像は、共焦点レーザー顕微鏡 LSM780 (ZEISS) を用いて 40 倍で観察した。観察には Windows ソフト Zen 2010 (ZEISS) を使用した。

cFos 陽性細胞、pERK 陽性細胞のカウント

撮影した画像のコントラスト、明暗を最適にして Calyx (図 12B) より蛍光強度の強い細胞をカウントした。シグナル陽性細胞のカウントは Miyashita et al., 2018 に準じた。また細胞の大きさ (約 $5 \mu\text{m}$) を維持しているかも基準とした。水平面の範囲は Calyx の中心から垂直方向の四分円、垂直軸の範囲は Calyx が確認できる Z 軸の範囲 (約 $10\text{-}20 \mu\text{m}$) でケニオン細胞が見られる場所とした。画像処理には GIMP-2.10 (フリーソフト) を用いた。

嫌悪記憶長期記憶学習

温度シフトのない 2202u 系統、*repo*^{EX84} 系統

長期記憶学習前日に匂いとショウジョウバエの準備をした。匂いは 3-octanol (OCT) (東京化成工業) と 4-methylcyclohexanol (MCH) (東京化成工業) を流動パラフィン mineral oil (サーモフィッシャーサイエンティフィック) でそれぞれ 0.05%、0.09% に希釈し、8-12 mL を使用した。事前に 1 つのバイアル内に集めた約 80 匹のショウジョウバエのエサを長期記憶学習の前日に新しくした。当日、温度シフトのない行動実験は赤色光、湿度約 65%、室温 25 °C で行った。ショウジョウバエを銅線の巻かれた電気刺激チューブに入れ、750 mL/分の空気を 90 秒流した後、はじめに 1 分間提示する匂いと同時に 1.5 秒間 60 V の直流電流を 5 秒間隔で 12 回流した。匂いを除

去するため 1 分間空気を流した後もう一つの匂いのみを 1 分間流して 15 分間の休憩をはさみ 1 回のトレーニングとし、これを 10 回繰り返した（長期記憶学習）。長期記憶学習の操作はコンピューターから信号を送って自動化した。プログラムは渋谷敏英氏（ハナブサ電子工業）が作成したコード、もしくは LabVIEW 2010（National Instruments）で作成したコードを使用した。実験で使用する半分のグループは OCT と電気刺激を、残りのグループは MCH と電気刺激を連合させた。長期記憶学習終了後ショウジョウバエを新しいエサに入れて 18 °C に設定したインキュベーター内に静置した。長期記憶学習装置の一例を示した（図 9）。

UAS mCD8::GFP; kayak GAL4 / Tubp GAL80^{ts} 系統

記憶痕跡細胞を可視化するための長期記憶学習を以下のように実施した。ショウジョウバエを電気刺激チューブにセットする前に室温を 18 °C に設定した。長期記憶学習開始と同時に 32 °C に温度を上げると GAL80^{ts} の抑制が解除され、長期記憶学習依存的に GAL4 が発現できるようにした。長期記憶学習終了後、エサを与えてできるだけ GAL4 の転写が促進するように 90 分間 32 °C の部屋に静置した。その後、18 °C に設定したインキュベーター内に静置する前に温度差でエサの入ったバイアル内の結露でショウジョウバエが動けなくなるのを防ぐために新しいエサの入ったバイアルに移し替えた。バイアル内が結露していないことを確認して 18 °C 設定のインキュベータ

一内に静置した。

UAS ChR2::YFP / + ; kayak GAL4 / Tubb GAL80^{ts} 系統

記憶痕跡細胞の機能を確認するために kayak(ショウジョウバエでは cFos と相同遺伝子)が発現した細胞で光感受性受容体チャネルロドプシン (Channelrhodopsin-2、ChR2) が発現するトランスジェニックハエを用いた。チャネルロドプシン発現のための長期記憶学習は *UAS mCD8::GFP; kayak GAL4 / Tubb GAL80^{ts}* 系統の実験方法と同様に行った。ショウジョウバエはチャネルロドプシンを活性化するために必要な補因子 All trans-Retinal がない。このため、長期記憶学習後に 200 mM の All trans-Retinal (シグマ-アルドリッチ) (1 : 1000) を混和したエサを与え (表 2B)、できるだけ光刺激が入らないように行動実験室からショウジョウバエを搬出する前にアルミホイルでバイアル全体を覆った。その後 18 °C 設定のインキュベーター内に静置した。

UAS dTrpA1; TH GAL4 系統

記憶保持過程のドーパミン作動性神経の興奮が長期記憶に与える影響を若齢体で調べるため、内在性ドーパミン作動性神経マーカー Tyrosine Hydroxylase GAL4-transgene (TH GAL4) (Friggi-Grelin et al., 2003) を使用した。温度感受性遺伝子 TrpA1 は、カチオンチャネルで 29 °C を超えると温度依存的に (可逆的に) ドーパミン作動性

神経を興奮できる (Hamada et al., 2008)。

長期記憶学習前日に羽化後 3-5 日の若齢体に新しいエサを与えて準備した。長期記憶学習は 18 °C で行い、長期記憶学習後 3 時間後に 1 時間 32 °C に温度を上げた。その後 18 °C に戻し 24 時間インキュベーター内に静置した。できるだけ温度シフトの影響がないように匂い想起テストは 18 °C で行った。

UAS shi^{ts1}; TH GAL4 系統

記憶保持過程のドーパミン作動性神経の抑制が長期記憶に与える影響を若齢体で調べるため内在性ドーパミン作動性神経マーカー TH GAL4 を使用した。エンドサイトーシスに關与する GTPase、ダイナミンのオーソログ shibire (*shi*) (Chen et al., 1991; van der Bliek and Meyerowitz, 1991; Damke et al., 1994) は、22 °C の温度で正常なエンドサイトーシスをおこなすが、30 °C を超えると神経伝達物質の放出を低下させる温度感受性遺伝子である (Kosaka and Ikeda 1983)。GAL4 UAS システムにより *shi^{ts1}* (Kitamoto, 2001) を活性化させシナプス伝達を温度依存的に (可逆的に) 遮断できる。

長期記憶学習前日に羽化後 3-5 日の若齢体を新しいエサを与えて準備した。長期記憶学習は 18 °C で行った。長期記憶学習後 3 時間後に 5 時間 32 °C に温度を上げ、その後 18 °C に戻し 24 時間静置した。できるだけ温度シフトの影響がないように匂い想起テストは 18 °C で行った。

匂い想起テスト（記憶テスト）

OCT-MCH 記憶想起テスト

長期記憶学習 24 時間後に CS+と CS-の 2 つの匂いを同時に与えてショウジョウバエがどちらの匂いを選択するか 25 °C（TH GAL4 ドライバーを用いた行動実験は 18 °C）でテストした（図 10）。18 °C 設定のインキュベーターからショウジョウバエを 30 分間、25 °C に順応させた。ショウジョウバエをテスト用の T-maze にローディングし、テスト開始と同時に 2 つの匂いを与えて 90 秒間テストした。電気刺激と OCT を連合した長期記憶学習のスコアを Performance Index OCT とすると式（1）で表される。

$$\text{Performance Index OCT} = \frac{\text{MCH を選択した個体数} - \text{OCT を選択した個体数}}{\text{全個体数}} \times 100 \quad (1)$$

電気刺激はOCTまたはMCHと組み合わせているので、実際のスコアは式（1）で求めた2つのスコアの平均で算出した。例えば、合計100匹のショウジョウバエを長期記憶学習すると、OCTをCS+として連合学習したショウジョウバエが記憶テストでOCT選択10匹、MCH選択90匹だったとする。式（1）よりこのスコアは80となる。同様にMCHをCS+として連合学習してMCH選択 8 匹、OCT選択92匹だったとき、式（1）よりス

コアは84となる。この2つのスコアを平均すると82となる。

光刺激テスト

18 °C設定のインキュベーターから前日長期記憶学習したショウジョウバエをアルミホイルで覆ったままの状態で行動実験室に搬入した。テストチューブに巻きつけたテープ状LEDライトの熱発生を防ぐため室内は気温18 °C、湿度65%に設定した。青色LED (品番5050) 波長465-470 nm (ジェイダブルシステム) と緑色LED (品番53528) 波長522.5-525 nm (ジェイダブルシステム) をコントローラー (DC12 V、最大負荷電流8 A、96 W) (ジェイダブルシステム) で最適光 (Miyashita et al., 2018) に調節できるようにした (図 18 B)。ショウジョウバエをT-mazeにローディングし待機した状態で、光を点灯した後に60秒間テストした。これまで記憶テストは90秒間実施したが、各LEDライトが60秒以上経つと熱を発生するため30秒間短くした。また、連続して実験をした場合、各LEDライトが熱を発生した。この場合、保冷剤を用いてLEDライトを直接冷却して熱を冷ましてから実験を再開した。記憶スコアは式 (1) に準じた。

匂い-空気 記憶テスト

記憶の汎化を確認する記憶テストではそれぞれの匂いに対する忌避行動を調べるため空気と匂いで実施した。長期記憶学習したショウジョウバエを24時間後にOCTと

空気、MCHと空気、あるいはショウジョウバエがテストのとき初めて経験する0.025%ベンズアルデヒド（ナカライテスク）と空気でテストした。長期記憶学習による匂いの影響を見るためにコントロール実験（unpaired実験）（König et al., 2017）を行った（図 19B）。unpaired実験は750 mL/分の空気を90秒間ショウジョウバエの入ったチューブに流した後、1分間1.5秒間60 Vの直流電流のみを5秒間隔で12回流した。匂いとの連合を避けるため2分後一つ目の匂いのみを1分間、匂い終了後45秒間で匂いを除去し、もう一つの匂いのみを1分間流した後、15分間の休憩をはさみ1回のトレーニングとし、これを10回繰り返した（10 x unpaired conditioning）。用意した実験の半分は先にOCT次にMCHを、残りの半分は先にMCH次にOCTにした。それぞれの実験終了後ショウジョウバエを新しいエサの入ったバイアルに入れて18 °C設定のインキュベーター内に静置した。長期記憶学習の忌避性スコアから10 x unpaired trainingの忌避性スコアを減じた。その差分を匂いに対する忌避性の変化を表すスコアとして用いた（図 19C）。スコアは式（1）を適用した。

メマンチン投与実験

長期記憶学習を始める 3 時間前から空バイアルにショウジョウバエを入れて絶食させた。長期記憶学習後に 5%ショ糖水溶液に DMSO で溶解した 20 mg/mL メマンチン無水塩化物（シグマ-アルドリッチ）（1:1000）1 mL をろ紙（3 cm x 9 cm）にしみ

込ませて与えた（表 3C）。対照実験群はメマンチン溶液 1 mL の代わりに DMSO 1 mL を同様の方法で与え、その後、各実験群のショウジョウバエを 18°C 設定のインキュベーター内に静置した。24 時間後の記憶テストは匂い-空気 記憶テスト、抗体染色は免疫化学組織染色の方法に従った。

統計解析

統計量は平均値±SEM で表した。統計解析は 2 標本を比較する場合、表計算ソフトエクセル 2016（マイクロソフト）の Student's T Test を行った。2 群以上、2 標本以上の場合、統計ソフト Prism 8（Graph Pad）を用いた。two-way ANOVA、Tukey's Test 及び Dunnett's Test を必要に応じ適用した。有意差は* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ で表した。各検定で算出された統計値の詳細は表 5～15 で示した。

3 章 結果

3 章 p21 から p47 までは雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表
できません。

謝辞

博士課程在学中、多くの方々からご支援を頂きありがとうございました。心より御礼申し上げます。まず本研究の場を与えてくださった東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻客員教授で指導教官糸川昌成先生に感謝申し上げます。また、博士論文審査を担当して下さいました東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻教授伊藤耕一先生、同専攻教授合山進先生、東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命専攻准教授久恒辰博先生、東京都医学総合研究所副所長齊藤実先生には、お忙しい中時間を作って頂き私の博士研究に対して大変なご教示を頂きました。深く感謝申し上げます。特に齊藤先生には実験場所を提供して頂きかつ研究の進捗に関してもご指導下さいました。心より感謝申し上げます。

また、東京都医学総合研究所学習記憶プロジェクトの上野耕平博士、宮下知之博士、松野元美博士、長野慎太郎博士、鈴木力憲博士及び黒見坦博士には研究を進める上で示唆に富むアドバイスをいただきました。ありがとうございました。同プロジェクトのテクニシャン大房京子さん、菊地絵実さん、小宮佐紀さんにはショウジョウバエの飼育法や実験技術を丁寧に教えて頂きました。ありがとうございました。同プロジェクトの秘

書高見澤友子さんには書類提出や試薬購入手続きなど支援して頂きありがとうございました。東京都医学総合研究所基盤技術支援センター学術支援室秘書西山由美さんには研究結果の解析を進める環境を整え、また、美味しい差し入れを頂きました。ありがとうございました。同支援室堀内純二郎博士には、科学的思考に基づき研究をどのように推進するかをご教示頂きました。さらに研究発表や論文作成にあたり、論理的思考法を徹底的にご指導下さいました。心より感謝申し上げます。最後に私が博士過程に進学する際に一言も不平不満を言わず、支えてくれた妻の恵と娘の怜に心から感謝致します。

2020 年 12 月

上村 望

引用文献

- Akalal, David Benjamin G., Dinghui Yu, and Ronald L. Davis. 2011. "The Long-Term Memory Trace Formed in the *Drosophila* α / β Mushroom Body Neurons Is Abolished in Long-Term Memory Mutants." *Journal of Neuroscience* 31 (15): 5643–47. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3190-10.2011>.
- Aso, Yoshinori, Kornelia Grübel, Sebastian Busch, Anja B. Friedrich, Igor Siwanowicz, and Hiromu Tanimoto. 2009. "The Mushroom Body of Adult *Drosophila* Characterized by GAL4 Drivers." *Journal of Neurogenetics* 23 (1–2): 156–72. <https://doi.org/10.1080/01677060802471718>.
- Aso, Yoshinori, Daisuke Hattori, Yang Yu, Rebecca M. Johnston, Nirmala A. Iyer, Teri T B Ngo, Heather Dionne, et al. 2014. "The Neuronal Architecture of the Mushroom Body Provides a Logic for Associative Learning." *ELife* 3: e04577. <https://doi.org/10.7554/eLife.04577>.
- Aso, Yoshinori, and Gerald M. Rubin. 2016. "Dopaminergic Neurons Write and Update Memories with Cell-Type-Specific Rules." *ELife* 5 (JULY): 1–15. <https://doi.org/10.7554/eLife.16135>.

- Aso, Yoshinori, Divya Sitaraman, Toshiharu Ichinose, Karla R. Kaun, Katrin Vogt, Ghislain Belliard-Guérin, Pierre Yves Plaçais, et al. 2014. "Mushroom Body Output Neurons Encode Valence and Guide Memory-Based Action Selection in *Drosophila*." *ELife* 3 (3): e04580. <https://doi.org/10.7554/eLife.04580>.
- Awata, Hiroko, Mai Takakura, Yoko Kimura, Ikuko Iwata, Tomoko Masuda, and Yukinori Hirano. 2019. "The Neural Circuit Linking Mushroom Body Parallel Circuits Induces Memory Consolidation in *Drosophila*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (32): 16080–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901292116>.
- Beck, C. D.O., Bradley Schroeder, and Ronald L. Davis. 2000. "Learning Performance of Normal and Mutant *Drosophila* after Repeated Conditioning Trials with Discrete Stimuli." *Journal of Neuroscience* 20 (8): 2944–53. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-08-02944.2000>.
- Berry, Jacob A., Isaac Cervantes-Sandoval, Molee Chakraborty, and Ronald L. Davis. 2015. "Sleep Facilitates Memory by Blocking Dopamine Neuron-Mediated Forgetting." *Cell* 161 (7): 1656–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.027>.
- Berry, Jacob A., Isaac Cervantes-Sandoval, Eric P. Nicholas, and Ronald L. Davis. 2012. "Dopamine Is Required for Learning and Forgetting in *Drosophila*." *Neuron* 74

(3): 530–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.007>.

Berry, Jacob A., Anna Phan, and Ronald L. Davis. 2018. “Dopamine Neurons Mediate Learning and Forgetting through Bidirectional Modulation of a Memory Trace.” *Cell Reports* 25 (3): 651–662.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.09.051>.

Bliek, Alexander M. Van Der, and Elliot M. Meyerowitz. 1991. “Dynamin-like Protein Encoded by the *Drosophila* Shibire Gene Associated with Vesicular Traffic.” *Nature* 351 (6325): 411–14. <https://doi.org/10.1038/351411a0>.

Blum, A L, W Li, M Cressy, and J Dubnau. 2009. “Short- and Long-Term Memory in *Drosophila* Require cAMP Signaling in Distinct Neuron Types.” *Curr Biol* 19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.016>.

Caron, Sophie J.C., Vanessa Ruta, L. F. Abbott, and Richard Axel. 2013. “Random Convergence of Olfactory Inputs in the *Drosophila* Mushroom Body.” *Nature* 497 (7447): 113–17. <https://doi.org/10.1038/nature12063>.

Cervantes-Sandoval, Isaac, Alfonso Martin-Peña, Jacob A. Berry, and Ronald L. Davis. 2013. “System-like Consolidation of Olfactory Memories in *Drosophila*.” *Journal of Neuroscience* 33 (23): 9846–54. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0451-13.2013>.

Cervantes-Sandoval, Isaac, Molee Chakraborty, Courtney MacMullen, and Ronald L.

- Davis. 2016. "Scribble Scaffolds a Signalingosome for Active Forgetting." *Neuron* 90 (6): 1230–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.010>.
- Claridge-Chang, Adam, Robert D. Roorda, Eleftheria Vrontou, Lucas Sjulson, Haiyan Li, Jay Hirsh, and Gero Miesenböck. 2009. "Writing Memories with Light-Addressable Reinforcement Circuitry." *Cell* 139 (2): 405–15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.034>.
- Crittenden, Jill R., Efthimios M.C. Skoulakis, Kyung An Han, Daniel Kalderon, and Ronald L. Davis. 1998. "Tripartite Mushroom Body Architecture Revealed by Antigenic Markers." *Learning and Memory* 5 (1–2): 38–51. <https://doi.org/10.1101/lm.5.1.38>.
- Damke, Hanna, Takeshi Baba, Dale E. Warnock, and Sandra L. Schmid. 1994. "Induction of Mutant Dynamin Specifically Blocks Endocytic Coated Vesicle Formation." *Journal of Cell Biology* 127 (4): 915–34. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.4.915>.
- Davis, Ronald L. 2010. "Rac in the Act of Forgetting." *Cell* 140 (4): 456–58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.004>.
- . 2011. "Traces of *Drosophila* Memory." *Neuron* 70 (1): 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.012>.

Davis, Ronald L., and Yi Zhong. 2017. "The Biology of Forgetting—A Perspective."

Neuron 95 (3): 490–503. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.039>.

Fleischmann, Alexander, Oivind Hvalby, Vidar Jensen, Tatyana Strekalova, Christiane

Zacher, Liliana E. Layer, Ane Kvello, et al. 2003. "Impaired Long-Term Memory and NR2A-Type NMDA Receptor-Dependent Synaptic Plasticity in Mice Lacking c-Fos in the CNS." *Journal of Neuroscience* 23 (27): 9116–22.

<https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-27-09116.2003>.

Friggi-Grelín, Florence, Hélène Coulom, Margaret Meller, Delphine Gomez, Jay Hirsh,

and Serge Birman. 2003. "Targeted Gene Expression in *Drosophila* Dopaminergic Cells Using Regulatory Sequences from Tyrosine Hydroxylase." *Journal of Neurobiology* 54 (4): 618–27.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/neu.10185>.

Greer, Paul L., and Michael E. Greenberg. 2008. "From Synapse to Nucleus: Calcium-

Dependent Gene Transcription in the Control of Synapse Development and Function." *Neuron* 59 (6): 846–60.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.002>.

Gruntman, Eyal, and Glenn C. Turner. 2013. "Integration of the Olfactory Code across

Dendritic Claws of Single Mushroom Body Neurons." *Nature Neuroscience* 16

(12): 1821–29. <https://doi.org/10.1038/nn.3547>.

Hamada, Fumika N., Mark Rosenzweig, Kyeongjin Kang, Stefan R. Pulver, Alfredo

Ghezzi, Timothy J. Jegla, and Paul A. Garrity. 2008. “An Internal Thermal Sensor

Controlling Temperature Preference in *Drosophila*.” *Nature* 454 (7201): 217–20.

<https://doi.org/10.1038/nature07001>.

Heisenberg, Martin. 2003. “Mushroom Body Memoir: From Maps to Models.” *Nature*

Reviews Neuroscience 4 (4): 266–75. <https://doi.org/10.1038/nrn1074>.

Hirano, Yukinori, Kunio Ihara, Tomoko Masuda, Takuya Yamamoto, Ikuko Iwata, Aya

Takahashi, Hiroko Awata, et al. 2016. “Shifting Transcriptional Machinery Is

Required for Long-Term Memory Maintenance and Modification in *Drosophila*

Mushroom Bodies.” *Nature Communications* 7: 1–14.

<https://doi.org/10.1038/ncomms13471>.

Hirano, Yukinori, Tomoko Masuda, Shintaro Naganos, Motomi Matsuno, Kohei Ueno,

Tomoyuki Miyashita, Junjiro Horiuchi, and Minoru Saitoe. 2013. “Fasting

Launches CRTC to Facilitate Long-Term Memory Formation in *Drosophila*.”

Science 339 (6118): 443–46. <https://doi.org/10.1126/science.1227170>.

Horiuchi, Junjiro, Daisuke Yamazaki, Shintaro Naganos, Toshiro Aigaki, and Minoru

Saitoe. 2008. “Protein Kinase A Inhibits a Consolidated Form of Memory in

- Drosophila.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (52): 20976–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810119105>.
- Huang, Cheng, Pengzhi Wang, Zhiyong Xie, Lianzhang Wang, and Yi Zhong. 2013. “The Differential Requirement of Mushroom Body α / β Subdivisions in Long-Term Memory Retrieval in Drosophila.” *Protein and Cell* 4 (7): 512–19. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-3035-8>.
- Huang, Cheng, Xingguo Zheng, Hong Zhao, Min Li, Pengzhi Wang, Zhiyong Xie, Lei Wang, and Yi Zhong. 2012. “A Permissive Role of Mushroom Body α / β Core Neurons in Long-Term Memory Consolidation in Drosophila.” *Current Biology* 22 (21): 1981–89. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.048>.
- Ichinose, Toshiharu, Yoshinori Aso, Nobuhiro Yamagata, Ayako Abe, Gerald M. Rubin, and Hiromu Tanimoto. 2015. “Reward Signal in a Recurrent Circuit Drives Appetitive Long-Term Memory Formation.” *ELife* 4 (NOVEMBER2015): 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.10719>.
- Isabel, Guillaume, Alberto Pascual, and Thomas Preat. 2004. “Phases in Drosophila.” *Science* 304 (May): 2002–5.
- Katche, Cynthia, Pedro Bekinschtein, Leandro Slipczuk, Andrea Goldin, Ivan A. Izquierdo, Martin Cammarota, and Jorge H. Medina. 2010. “Delayed Wave of C-

Fos Expression in the Dorsal Hippocampus Involved Specifically in Persistence of Long-Term Memory Storage.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (1): 349–54.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0912931107>.

Kim, Young Cho, Hyun Gwan Lee, and Kyung An Han. 2007. “D1 Dopamine Receptor DDA1 Is Required in the Mushroom Body Neurons for Aversive and Appetitive Learning in *Drosophila*.” *Journal of Neuroscience* 27 (29): 7640–47.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1167-07.2007>.

Kitamoto, Toshihiro. 2001. “Conditional Modification of Behavior in *Drosophila* by Targeted Expression of a Temperature-Sensitive Shibire Allele in Defined Neurons.” *Journal of Neurobiology* 47 (2): 81–92.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/neu.1018>.

König, Christian, Emmanuel Antwi-Adjei, Mathangi Ganesan, Kasyoka Kilonzo, Vignesh Viswanathan, Archana Durairaja, Anne Voigt, and Ayse Yarali. 2017. “Aversive Olfactory Associative Memory Loses Odor Specificity over Time.” *Journal of Experimental Biology* 220 (9): 1548–53.

<https://doi.org/10.1242/jeb.155317>.

Kosaka, T., and K. Ikeda. 1983. “Reversible Blockage of Membrane Retrieval and

- Endocytosis in the Garland Cell of the Temperature-Sensitive Mutant of *Drosophila Melanogaster*, Shibirets1.” *The Journal of Cell Biology* 97 (2): 499–507. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.499>.
- Krashes, Michael J., Alex C. Keene, Benjamin Leung, J. Douglas Armstrong, and Scott Waddell. 2007. “Sequential Use of Mushroom Body Neuron Subsets during *Drosophila* Odor Memory Processing.” *Neuron* 53 (1): 103–15. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.021>.
- Laissue, P. P., C. Reiter, P. R. Hiesinger, S. Halter, K. F. Fischbach, and R. F. Stocker. 1999. “Three-Dimensional Reconstruction of the Antennal Lobe in *Drosophila Melanogaster*.” *Journal of Comparative Neurology* 405 (4): 543–52. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990322\)405:4<543::AID-CNE7>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990322)405:4<543::AID-CNE7>3.0.CO;2-A).
- Li, Zhaoyu, Jie Liu, Maohua Zheng, and X. Z. Shawn Xu. 2014. “Encoding of Both Analog- and Digital-like Behavioral Outputs by One *C. Elegans* Interneuron.” *Cell* 159 (4): 751–65. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.056>.
- Luan, Haojiang, Nathan C. Peabody, Charles R R. Vinson, and Benjamin H. White. 2006. “Refined Spatial Manipulation of Neuronal Function by Combinatorial Restriction of Transgene Expression.” *Neuron* 52 (3): 425–36.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.028>.

Ma, Jun, and Mark Ptashne. 1987. "The Carboxy-Terminal 30 Amino Acids of GAL4 Are Recognized by GAL80." *Cell* 50 (1): 137–42. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90670-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90670-2).

Mao, Zhengmei, and Ronald L. Davis. 2009. "Eight Different Types of Dopaminergic Neurons Innervate the Drosophila Mushroom Body Neuropil: Anatomical and Physiological Heterogeneity." *Frontiers in Neural Circuits* 3 (JUL): 1–17. <https://doi.org/10.3389/neuro.04.005.2009>.

Matsuno, Motomi, Junjiro Horiuchi, Kyoko Ofusa, Tomoko Masuda, and Minoru Saitoe. 2019. "Inhibiting Glutamate Activity during Consolidation Suppresses Age-Related Long-Term Memory Impairment in Drosophila." *IScience* 15: 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.04.014>.

Matsuno, Motomi, Junjiro Horiuchi, Yoshihiro Yuasa, Kyoko Ofusa, Tomoyuki Miyashita, Tomoko Masuda, and Minoru Saitoe. 2015. "Long-Term Memory Formation in Drosophila Requires Training-Dependent Glial Transcription." *The Journal of Neuroscience* 35 (14): 5557 LP – 5565. <http://www.jneurosci.org/content/35/14/5557.abstract>.

Miyashita, Tomoyuki, Emi Kikuchi, Junjiro Horiuchi, and Minoru Saitoe. 2018. "Long-

Term Memory Engram Cells Are Established by c-Fos/CREB Transcriptional Cycling.” *Cell Reports* 25 (10): 2716-2728.e3.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.022>.

Nagel, Georg, Tanjef Szellas, Wolfram Huhn, Suneel Kateriya, Nona Adeishvili, Peter Berthold, Doris Ollig, Peter Hegemann, and Ernst Bamberg. 2003. “Cation-Selective Membrane Channel.” *Pnas* 100 (24): 13940–45.

Naoki matsuo, Leon Reijmers, Mark Mayford. 2008. “Spine-Type – Specific Recruitment of Newly Synthesized AMPA Receptors with Learning.” *SCIENCE* 319 (February): 1104–8.

Pagani, Mario R., Kimihiko Oishi, Bruce D. Gelb, and Yi Zhong. 2009. “The Phosphatase SHP2 Regulates the Spacing Effect for Long-Term Memory Induction.” *Cell* 139 (1): 186–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.033>.

Pascual, A., and T. Pr  at. 2001. “Localization of Long-Term Memory within the Drosophila Mushroom Body.” *Science* 294 (5544): 1115–17.
<https://doi.org/10.1126/science.1064200>.

Perisse, Emmanuel, Yan Yin, Andrew C. Lin, Suewei Lin, Wolf Huetteroth, and Scott Waddell. 2013. “Different Kenyon Cell Populations Drive Learned Approach and Avoidance in Drosophila.” *Neuron* 79 (5): 945–56.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.045>.

Qin, Hongtao, Michael Cressy, Wanhe Li, Jonathan S. Coravos, Stephanie A. Izzi, and

Joshua Dubnau. 2012. "Gamma Neurons Mediate Dopaminergic Input during Aversive Olfactory Memory Formation in *Drosophila*." *Current Biology* 22 (7): 608–14. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.014>.

Redondo, Roger L., Joshua Kim, Autumn L. Arons, Steve Ramirez, Xu Liu, and Susumu

Tonegawa. 2014. "Bidirectional Switch of the Valence Associated with a Hippocampal Contextual Memory Engram." *Nature* 513 (7518): 426–30. <https://doi.org/10.1038/nature13725>.

Rørth, P. 1996. "A Modular Misexpression Screen in *Drosophila* Detecting Tissue-

Specific Phenotypes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (22): 12418–22. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.22.12418>.

Schroeder, MS Chen, RA Obar, and CC Schroeder. 1991. "Multiple Forms of Dynamin

Are Encoded by Shibire, a *Drosophila* Gene Involved in Endocytosis." *Nature* 351 (6327): 583–86. <https://doi.org/10.1038/351583a0>.

Schwaerzel, M, M Monastirioti, H Scholz, F Friggi-Grelín, S Birman, and M

Heisenberg. 2003. "Dopamine and Octopamine Differentiate between Aversive and Appetitive Olfactory Memories in *Drosophila*." *J Neurosci* 23.

Shuai, Yichun, Binyan Lu, Ying Hu, Lianzhang Wang, Kan Sun, and Yi Zhong. 2010.

“Forgetting Is Regulated through Rac Activity in *Drosophila*.” *Cell* 140 (4): 579–89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.044>.

Siegenthaler, Dominique, Benjamin Escibano, Vanessa Bräuler, and Jan Pielage. 2019.

“Selective Suppression and Recall of Long-Term Memories in *Drosophila*.” *PLoS Biology* 17 (8): 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000400>.

Soustelle, Laurent, Marie Thérèse Besson, Thomas Rival, and Serge Birman. 2002.

“Terminal Glial Differentiation Involves Regulated Expression of the Excitatory Amino Acid Transporters in the *Drosophila* Embryonic CNS.” *Developmental Biology* 248 (2): 294–306. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0742>.

Takemura, Shin-ya, Yoshinori Aso, Toshihide Hige, Allan Wong, Zhiyuan Lu, C Shan

Xu, Patricia K Rivlin, et al. 2017. “A Connectome of a Learning and Memory Center in the Adult *Drosophila* Brain.” *eLife* 6 (July). <https://doi.org/10.7554/eLife.26975>.

Tamura, T, A S Chiang, N Ito, H P Liu, J Horiuchi, T Tully, and M Saitoe. 2003.

“Aging Specifically Impairs Amnesiac-Dependent Memory in *Drosophila*.” *Neuron* 40. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00732-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00732-3).

Tanaka, Nobuaki K., Hiromu Tanimoto, and Kei Ito. 2008. “Neuronal Assemblies of

- the Drosophila Mushroom Body.” *Journal of Comparative Neurology* 508 (5): 711–55. <https://doi.org/10.1002/cne.21692>.
- Tian, Lin, S. Andrew Hires, Tianyi Mao, Daniel Huber, M. Eugenia Chiappe, Sreekanth H. Chalasani, Leopoldo Petreanu, et al. 2009. “Imaging Neural Activity in Worms, Flies and Mice with Improved GCaMP Calcium Indicators.” *Nature Methods* 6 (12): 875–81. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1398>.
- Tonegawa, Susumu, Xu Liu, Steve Ramirez, and Roger Redondo. 2015. “Perspective Memory Engram Cells Have Come of Age.” *Neuron* 87 (5): 918–31. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.002>.
- Tonoki, a., and R. L. Davis. 2012. “Aging Impairs Intermediate-Term Behavioral Memory by Disrupting the Dorsal Paired Medial Neuron Memory Trace.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (16): 6319–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118126109>.
- Tonoki, A., and R. L. Davis. 2015. “Aging Impairs Protein-Synthesis-Dependent Long-Term Memory in Drosophila.” *Journal of Neuroscience* 35 (3): 1173–80. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0978-14.2015>.
- Tully, T., T. Preat, S. C. Boynton, and M. Del Vecchio. 1994. “Genetic Dissection of Consolidated Memory in Drosophila.” *Cell* 79 (1): 35–47.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90398-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90398-0).

Ueno, K, S Naganos, Y Hirano, J Horiuchi, and M Saitoe. 2013. “Long-Term Enhancement of Synaptic Transmission between Antennal Lobe and Mushroom Body in Cultured *Drosophila* Brain.” *J Physiol* 591.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.242909>.

Ueno, Kohei, Johannes Morstein, Kyoko Ofusa, Shintaro Naganos, Ema Suzuki-Sawano, Saika Minegishi, Samir P. Rezgui, et al. 2020. “Carbon Monoxide, a Retrograde Messenger Generated in Postsynaptic Mushroom Body Neurons, Evokes Noncanonical Dopamine Release.” *Journal of Neuroscience* 40 (18): 3533–48. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2378-19.2020>.

Ueno, Kohei, Ema Suzuki, Shintaro Naganos, Kyoko Ofusa, Junjiro Horiuchi, and Minoru Saitoe. 2017. “Coincident Postsynaptic Activity Gates Presynaptic Dopamine Release to Induce Plasticity in *Drosophila* Mushroom Bodies.” *eLife* 6: 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.21076>.

Vanderheyden, William M, Hans P A Van Dongen, Marcos G Frank, and Jason R Gerstner. 2020. “Interactions in *Drosophila*.” <https://doi.org/10.19185/matters.201903000008.Sleep>.

Vosshall, Leslie B., Allan M. Wong, and Richard Axel. 2000. “An Olfactory Sensory

Map in the Fly Brain.” *Cell* 102 (2): 147–59. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00021-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00021-0).

Wise, Roy A. 2004. “Dopamine, Learning and Motivation.” *Nature Reviews Neuroscience* 5 (6): 483–94. <https://doi.org/10.1038/nrn1406>.

Yamagata, Nobuhiro, Toshiharu Ichinose, Yoshinori Aso, Pierre-Yves Plaçais, Anja B.

Friedrich, Richard J. Sima, Thomas Preat, Gerald M. Rubin, and Hiromu

Tanimoto. 2015. “Distinct Dopamine Neurons Mediate Reward Signals for Short- and Long-Term Memories.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (2): 578–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421930112>.

Yin, J. C.P., J. S. Wallach, M. Del Vecchio, E. L. Wilder, H. Zhou, W. G. Quinn, and T.

Tully. 1994. “Induction of a Dominant Negative CREB Transgene Specifically Blocks Long-Term Memory in *Drosophila*.” *Cell* 79 (1): 49–58.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90399-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90399-9).

Yu, Dinghui, David Benjamin G. Akalal, and Ronald L. Davis. 2006. “*Drosophila* α / β

Mushroom Body Neurons Form a Branch-Specific, Long-Term Cellular Memory Trace after Spaced Olfactory Conditioning.” *Neuron* 52 (5): 845–55.

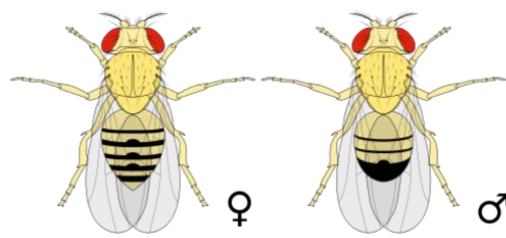
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.030>.

Zhang, Xuchen, Qian Li, Lianzhang Wang, Zhong Jian Liu, and Yi Zhong. 2016.

“Cdc42-Dependent Forgetting Regulates Repetition Effect in Prolonging Memory

Retention.” *Cell Reports* 16 (3): 817–25.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.041>.



出典：ウィキペディア

図1. キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)

体調約3mm前後。ライフサイクルが短く産卵後約12日で成虫になり、羽化後約20日で加齢体となる。遺伝学的な解析に優れ、分子生物学の実験、組織免疫学的解析、行動実験のすべてを若い成虫（羽化後5以内：若齢体）と加齢した成虫（羽化後20日以上：加齢体）で比較した。

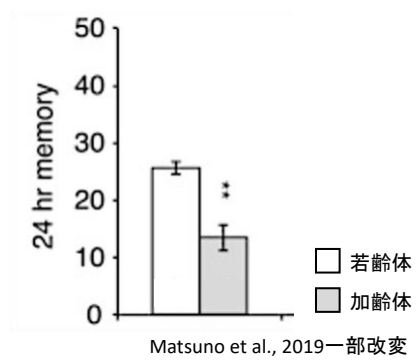


図2. 加齢体の24時間後の記憶は低下する

白い棒グラフは若齢体、灰色棒グラフは加齢体の長期記憶学習24時間後の記憶スコアを表す。****** $P < 0.01$ 。

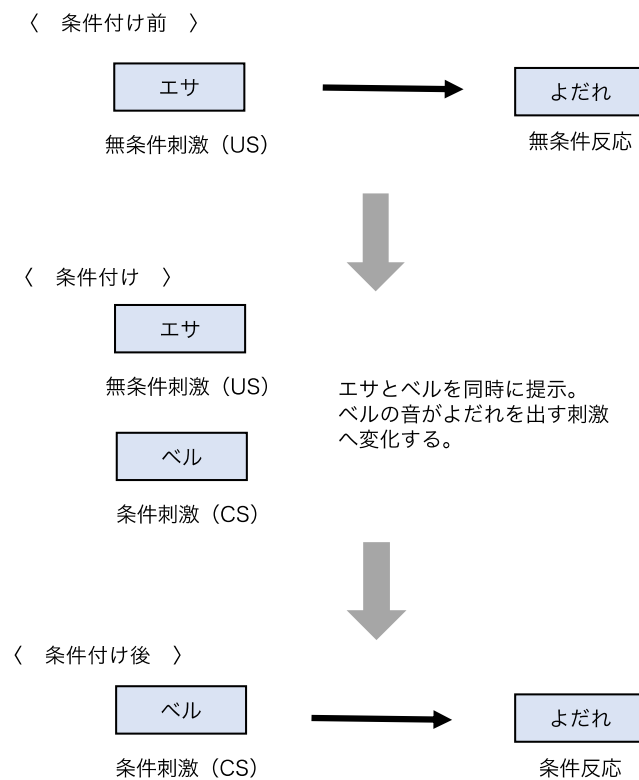


図3. 古典的条件付け

犬はエサ（無条件刺激）をみると無条件によだれが出る（無条件反応）。エサと同時にベル（条件刺激）を鳴らすと、犬はベルの音がすれば、エサがもらえると学習する。その結果、ベルの音を聞いただけでよだれを垂らすようになる。

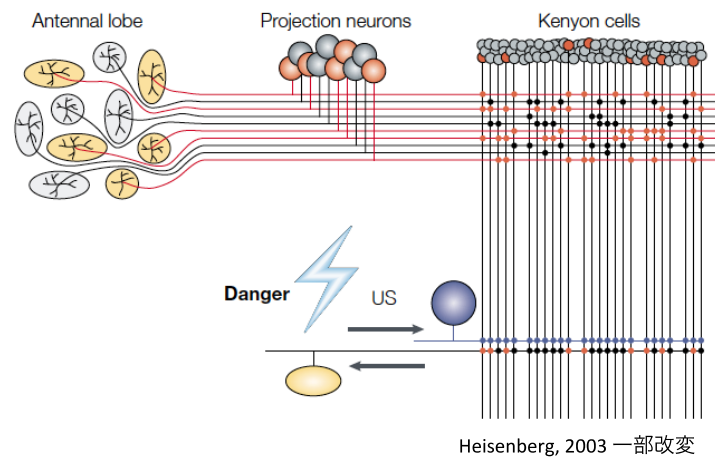


図5. ショウジョウバエ連合学習モデル1

匂い情報は触覚葉（Antennal lobe）から投射ニューロン（Projection neurons）を経て、いくつかのケニオン細胞（Kenyon cells）（図の赤丸）に伝達される。電気ショックの情報と匂い情報が同時に入力されるシナプスの可塑性が強化される。

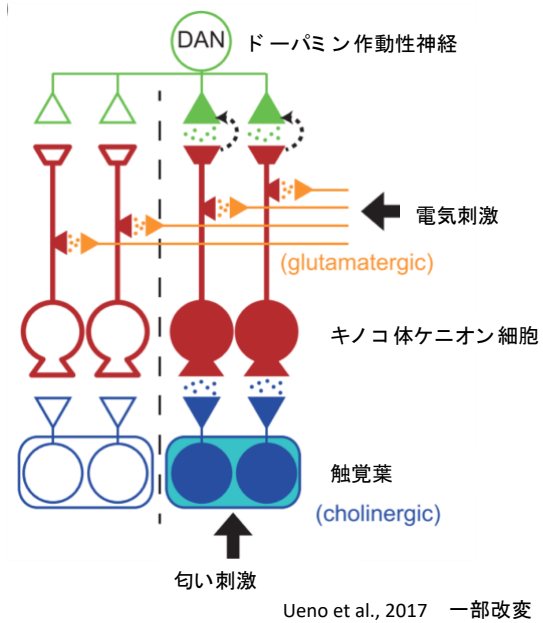


図6. ショウジョウバエ連合学習モデル2

匂い情報の伝達物質はアセチルコリン（青）であるが、電気刺激の伝達物質はグルタミン酸（オレンジ）であることを見出した。さらにアセチルコリンとグルタミン酸がキノコ体のケニオン細胞に入力されると、ドーパミン作動性神経を活性化しドーパミン（緑）を放出する。

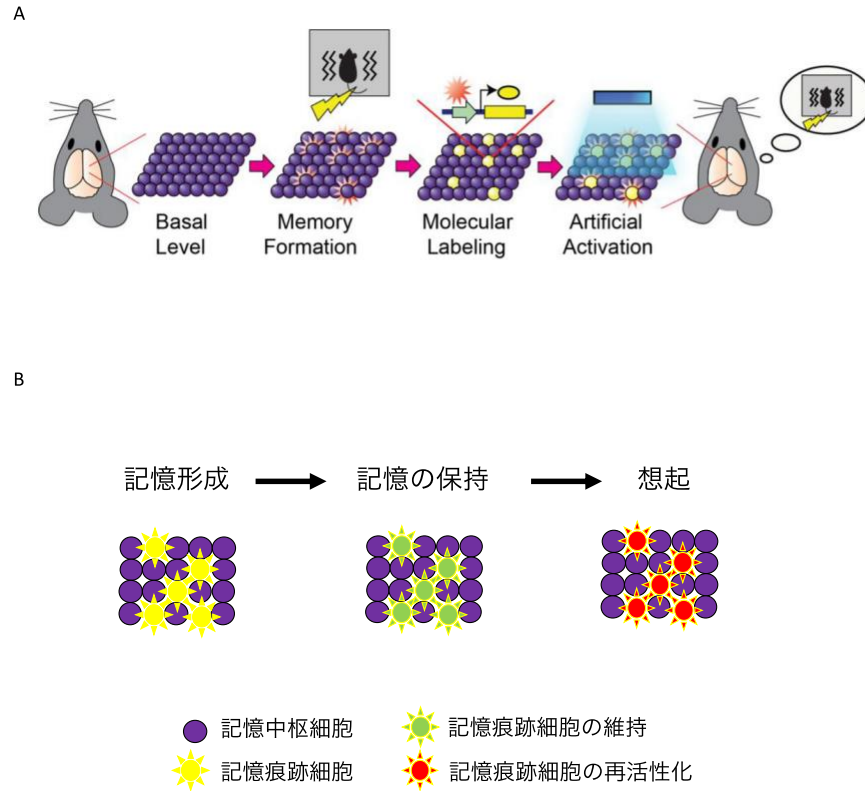
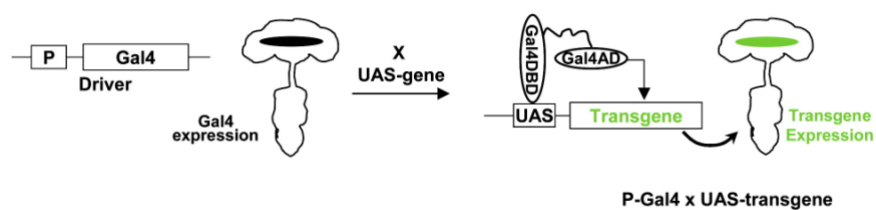


図7. 記憶痕跡細胞細胞

Tonegawa博士らは人為的に記憶痕跡細胞を活性化させることに成功した（A）。学習時に同期活動した神経細胞が記憶痕跡細胞となり記憶情報が神経ネットワークにコードされる。記憶の保持過程では記憶痕跡細胞が適切にメンテナンスされ、想起時に匂いのような手がかりとなる情報の提示で記憶痕跡細胞が再活性化され記憶が思い出される（B）。



Luan et al., 2006

図8. GAL4 UASシステム

ショウジョウバエの遺伝学を利用したシステム。プロモーターもしくはエンハンサー (P) により酵母の転写因子 Gal4 は、細胞特異的に Gal4 の発現を促進する。Gal4 を保有する個体と Gal4 認識部位 Upstream Activation Sequence (UAS) の下流に配置されたレポーター遺伝子を保有する個体が交配して、レポーター遺伝子が細胞特異的に発現する。このため、目的遺伝子の可視化や機能解析が比較的容易にできる。

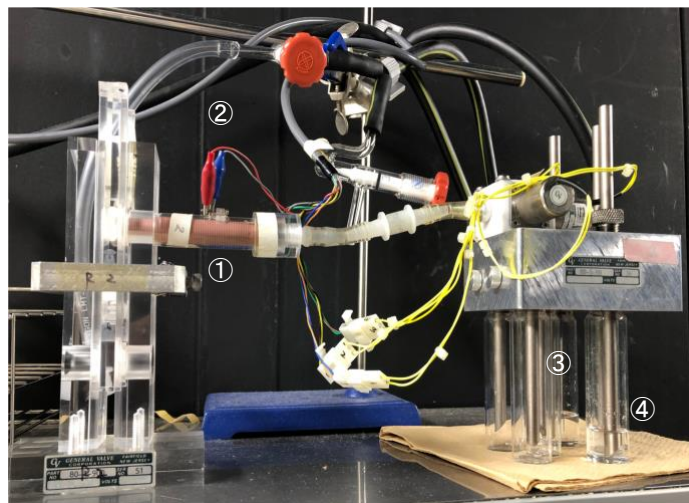


図9. トレーニング装置の一例

長期記憶学習を自動化する実験装置。①ショウジョウバエ約80匹をトレーニングする銅線を巻いたトレーニングチューブ。②直流電流を流すための電極（赤：＋、青：－）。③MCH 12 mLを入れたガラス管。④ OCT 12 mLを入れたガラス管。プログラムによるコンピュータ制御で一連のトレーニングが実行される。

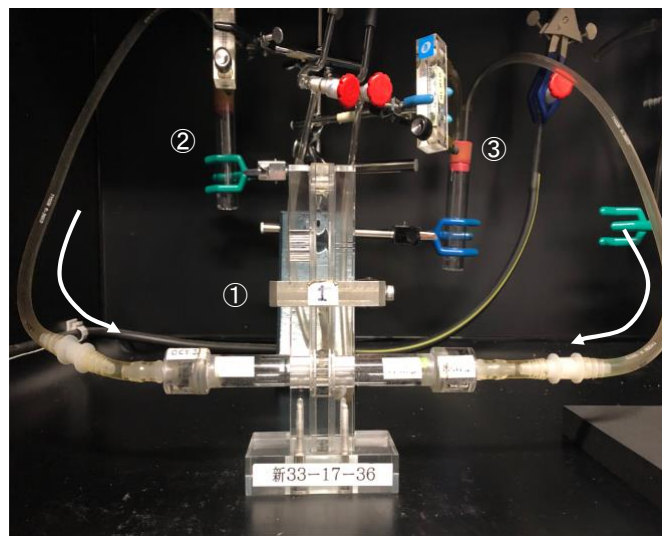


図10. 匂い記憶テスト装置

①アクリル製のT-maze中央にショウジョウバエを集め、②OCT、③MCH を同時にショウジョウバエに与えて90秒間記憶テストを行った。匂い-空気テストは②に匂い、③にミネラルオイルのみでテストした。矢印は匂いの向かう方向を示す。

図表 p77 から p95 まで雑誌掲載等の形で刊行される予定のため、インターネット公表
できません。

A 系統維持及び通常実験

品目	容量	メーカー
D - (+) - グルコース	912g	ナカライタスク
グラニュー糖	455g	三井製糖
酒石酸カリウム水和物(2/1)	131g	シグマアルドリッチ
塩化カルシウム	10.8g	ナカライタスク
粉末寒天	126g	大信
乾燥酵母エビオス	462g	田辺三菱製薬
コーンミール	1104g	オリエンタル酵母工業
p-ヒドロキシ安息香酸メチル	28.8g	富士フィルム和光純薬
エタノール	288 mL	ナカライタスク
純水 (DW)	12.8 L	ミリポア
水道水	0.4 L	東京都水道局

B チャネルロドプシン活性化実験

100%エタノールで溶解した200mMnのATRを1：1000で上記餌に混合した。

C メマンチン投与実験

5%ショ糖水溶液にジメチルスホキシド (DMSO) で溶解した20 mg/mLのメマンチン塩酸塩を1：1000で混合し濾過フィルター (縦3 x 横7 cm) に染み込ませた。

表2. キイロショウジョウバエのエサの構成

遺伝子	上段：Forward 下段：Reverse
cFos	5' - GCACCTTCAACTTCGACTCC - 3' 5' - GAGGAGCTGTTCGGTACGAG - 3'
GFP	5' - AGGGTGAAGGTGATGCAACA - 3' 5' - TGACAAGTGTGGCCATGGA - 3'
GAPDH2	5' - GCGGTAGAATGGGGTGAGAC - 3' 5' - TGAAGAGCGAAAACAGTAGC - 3'

表3. primer配列一覧

抗体名	メーカー	製品番号
Rabbit polyclonal anti-phospho-p44/42 MAPK	Cell Signaling Technology	Cat#4370
Chick polyclonal anti-GFP	AbCam	ab13970
Alexa Fluor 488 donkey anti-chicken IgG (H+L)	Thermo Fisher	A11039
Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Thermo Fisher	A31572

表4. 抗体一覧

図11A

Two-way ANOVA	Alpha	% of total variation	有意差	P値
	0.05	1.966	**	0.0023
Dunnett's multiple comparisons test	最小二乗平均の差	95%信頼区間	有意差	P値
cFos/GAPDH2 (young):naive vs. cFos/GAPDH2 (young):trained	-0.3956	-0.6000 to -0.1911	***	0.0001
cFos/GAPDH2 (young):naive vs. cFos/GAPDH2 (old):naive	-1.105	-1.328 to -0.8822	****	<0.0001
cFos/GAPDH2 (young):naive vs. cFos/GAPDH2 (old):trained	-1.921	-2.144 to -1.698	****	<0.0001

図11B

Two-way ANOVA	Alpha	% of total variation	有意差	P値
	0.05	14.05	<0.0001	****
Dunnett's multiple comparisons test	最小二乗平均の差	95%信頼区間	有意差	P値
GFP/GAPDH2 (young):naive vs. GFP/GAPDH2 (young):trained	-0.8581	-1.280 to -0.4366	****	<0.0001
GFP/GAPDH2 (young):naive vs. GFP/GAPDH2 (old):naive	-0.3766	-0.8359 to 0.08268	ns	0.1287
GFP/GAPDH2 (young):naive vs. GFP/GAPDH2 (old):trained	-3.013	-3.473 to -2.554	****	<0.0001

表5. 統計詳細 (図11)

図13

Student's t-test	平均の差 ± SEM	95%信頼区間	有意差	Alpha	P値
young vs. old	-14.94 ± 4.831	-25.57 to -4.309	**	0.05	0.0091

表6. 統計詳細（図13）

図15A, B

Two-way ANOVA	Alpha	% of total variation	有意差	P値
	0.05	0.3645	ns	0.9044
Tukey's multiple comparisons test	最小二乗平均の差	95%信頼区間	有意差	P値
cFos(GFP)				
young CS+ vs. young CS-	0.96	-11.53 to 13.45	ns	>0.9999
young CS+ vs. old CS+	-0.01	-11.07 to 11.05	ns	>0.9999
young CS+ vs. old CS-	2.04	-9.577 to 13.66	ns	>0.9999
young CS- vs. old CS+	-0.97	-12.56 to 10.62	ns	>0.9999
young CS- vs. old CS-	1.08	-11.04 to 13.20	ns	>0.9999
old CS+ vs. old CS-	2.05	-8.597 to 12.70	ns	>0.9999
pERK				
young CS+ vs. young CS-	5.19	-7.298 to 17.68	ns	0.9605
young CS+ vs. old CS+	-0.34	-11.40 to 10.72	ns	>0.9999
young CS+ vs. old CS-	-0.52	-12.14 to 11.10	ns	>0.9999
young CS- vs. old CS+	-5.53	-17.12 to 6.061	ns	0.9021
young CS- vs. old CS-	-5.71	-17.83 to 6.413	ns	0.9095
old CS+ vs. old CS-	-0.18	-10.83 to 10.47	ns	>0.9999
merge				
young CS+ vs. young CS-	5.619	-6.869 to 18.11	ns	0.9323
young CS+ vs. old CS+	0.8857	-10.18 to 11.95	ns	>0.9999
young CS+ vs. old CS-	2.286	-9.332 to 13.90	ns	>0.9999
young CS- vs. old CS+	-4.733	-16.32 to 6.858	ns	0.9652
young CS- vs. old CS-	-3.333	-15.46 to 8.789	ns	0.9987
old CS+ vs. old CS-	1.4	-9.247 to 12.05	ns	>0.9999

図15C, D

Two-way ANOVA	Alpha	% of total variation	有意差	P値
	0.05	7.356	*	0.0142
Tukey's multiple comparisons test	最小二乗平均の差	95%信頼区間	有意差	P値
young CS+ vs. young CS-	-34.56	-59.70 to -9.421	**	0.0024
young CS+ vs. old CS+	-4.888	-27.16 to 17.38	ns	0.9856
young CS+ vs. old CS-	-5.48	-28.87 to 17.91	ns	0.9807
young CS- vs. old CS+	-29.67	-53.01 to -6.338	**	0.0059
young CS- vs. old CS-	29.08	4.677 to 53.49	*	0.0115
old CS+ vs. old CS-	-0.5914	-22.03 to 20.84	ns	>0.9999

表7. 統計詳細 (図15)

図17

Student's t-test	平均の差 ± SEM	95%信頼区間	有意差	Alpha	P値
young vs. old	-11.66 ± 3.344	-18.83 to -4.489	**	0.05	0.0036

表8. 統計詳細（図17）

図18C

Two-way ANOVA	Alpha	% of total variation	有意差	P値
	0.05	58.33	****	<0.0001
Dunnett's multiple comparisons test	最小二乗平均の差	95%信頼区間	有意差	P値
young				
trained(+) vs. naive(-)	-41.64	-56.76 to -26.51	****	<0.0001
trained(+) vs. naive(+)	-39.57	-54.70 to -24.45	****	<0.0001
trained(+) vs. trained(-)	-37.43	-52.56 to -22.31	****	<0.0001
old				
trained(+) vs. naive(-)	-60.06	-75.71 to -44.41	****	<0.0001
trained(+) vs. naive(+)	-45.74	-61.39 to -30.09	****	<0.0001
trained(+) vs. trained(-)	-35.82	-51.47 to -20.17	****	<0.0001

表9. 統計詳細 (図18)

図20

Two-way ANOVA	Alpha	% of total variation	有意差	P値
	0.05	23.82	****	<0.0001
Tukey's multiple comparisons test	最小二乗平均の差	95%信頼区間	有意差	P値
young:CS+ vs. old:CS+	13.13	0.3508 to 25.91	*	0.0409
young:CS- vs. old:CS-	-21.56	-34.34 to -8.779	***	0.0001
young:new odor vs. old:new odor	-31.59	-44.37 to -18.81	****	<0.0001

表10. 統計詳細 (図20)

図21A

Student's t-test	平均の差 ± SEM	95%信頼区間	有意差	P値
CS+ vs. CS-	-27.04 ± 6.955	-43.08 to -11.00	**	0.0046

図21B

Student's t-test	平均の差 ± SEM	95%信頼区間	有意差	P値
CS+ vs. CS-	-6.545 ± 4.907	-17.07 to 3.980	ns	0.2036

図21C

Student's t-test	平均の差 ± SEM	95%信頼区間	有意差	P値
CS+ vs. CS-	-13.47 ± 9.575	-34.01 to 7.066	ns	0.1813

表11. 統計詳細 (図21)

図22B

Two-way ANOVA	Alpha	% of total variation	有意差	P値
	0.05	19.34	**	0.0092
Tukey's multiple comparisons test	最小二乗平均の差	95%信頼区間	有意差	P値
memantine -:CS+ vs. memantine -:CS-	3.184	-14.72 to 21.09	ns	0.9617
memantine +:CS+ vs. memantine +:CS-	22.75	4.844 to 40.65	**	0.0087

表12. 統計詳細 (図22)

図24A, B

Two-way ANOVA	Alpha	% of total variation	有意差	P値
	0.05	0.5827	ns	0.5311
Tukey's multiple comparisons test	最小二乗平均の差	95%信頼区間	有意差	P値
cFos(GFP)				
memantine- CS+ vs. memantine- CS-	-2.67	-12.81 to 7.474	ns	0.9989
memantine- CS+ vs. memantine+ CS+	-3.07	-13.71 to 7.569	ns	0.9974
memantine- CS+ vs. memantine+ CS-	-2.47	-13.11 to 8.169	ns	0.9996
memantine- CS- vs. memantine+ CS+	-0.4	-11.04 to 10.24	ns	>0.9999
memantine- CS- vs. memantine+ CS-	0.2	-10.44 to 10.84	ns	>0.9999
memantine+ CS+ vs. c-Fos:memantine+ CS-	0.6	-10.51 to 11.71	ns	>0.9999
pERK				
memantine- CS+ vs. memantine- CS-	-7.34	-17.48 to 2.804	ns	0.3794
memantine- CS+ vs. memantine+ CS+	-3.97	-14.61 to 6.669	ns	0.979
memantine- CS+ vs. memantine+ CS-	-5.17	-15.81 to 5.469	ns	0.8781
memantine- CS- vs. memantine+ CS+	3.37	-7.269 to 14.01	ns	0.9943
memantine- CS- vs. memantine+ CS-	2.17	-8.469 to 12.81	ns	0.9999
memantine+ CS+ vs. memantine+ CS-	-1.2	-12.31 to 9.912	ns	>0.9999
merge				
memantine- CS+ vs. memantine- CS-	-0.3333	-10.48 to 9.811	ns	>0.9999
memantine- CS+ vs. memantine+ CS+	-3.5	-14.14 to 7.139	ns	0.9922
memantine- CS+ vs. memantine+ CS-	1.9	-8.739 to 12.54	ns	>0.9999
memantine- CS- vs. memantine+ CS+	-3.167	-13.81 to 7.472	ns	0.9966
memantine- CS- vs. memantine+ CS-	2.233	-8.406 to 12.87	ns	0.9999
memantine+ CS+ vs. memantine+ CS-	5.4	-5.712 to 16.51	ns	0.878

図24C, D

Two-way ANOVA	Alpha	% of total variation	有意差	P値
	0.05	28.93	**	0.0051
Tukey's multiple comparisons test	最小二乗平均の差	95%信頼区間	有意差	P値
memantine -:CS- vs. memantine -:CS+	0.3333	-3.097 to 3.763	ns	0.9925
memantine -:CS- vs. memantine +:CS-	2.233	-1.364 to 5.831	ns	0.3262
memantine -:CS- vs. memantine +:CS+	-3.167	-6.764 to 0.4307	ns	0.096
memantine -:CS+ vs. memantine +:CS-	1.9	-1.697 to 5.497	ns	0.462
memantine -:CS+ vs. memantine +:CS+	-3.5	-7.097 to 0.09741	ns	0.0582
memantine +:CS- vs. memantine +:CS+	-5.4	-9.157 to -1.643	**	0.0037

表13. 統計詳細 (図24)

図25B

Two-way ANOVA	Alpha	% of total variation	有意差	P値
	0.05	22.18	**	0.0014
Tukey's multiple comparisons test	最小二乗平均の差	95%信頼区間	有意差	P値
32°C:TH GAL4/+ vs. 32°C:dTRPA1/+	0	-12.76 to 12.76	ns	>0.9999
32°C:TH GAL4/+ vs. 32°C:TH GAL>UAS dTRPA1	18	5.235 to 30.76	**	0.0017
32°C:TH GAL4/+ vs. 18°C:TH GAL4/+	2	-10.76 to 14.76	ns	0.997
32°C:TH GAL4/+ vs. 18°C:dTRPA1/+	3	-9.765 to 15.76	ns	0.9807
32°C:TH GAL4/+ vs. 18°C:TH GAL>UAS dTRPA1	0	-12.76 to 12.76	ns	>0.9999
32°C:dTRPA1/+ vs. 32°C:TH GAL>UAS dTRPA1	18	5.235 to 30.76	**	0.0017
32°C:dTRPA1/+ vs. 18°C:TH GAL4/+	2	-10.76 to 14.76	ns	0.997
32°C:dTRPA1/+ vs. 18°C:dTRPA1/+	3	-9.765 to 15.76	ns	0.9807
32°C:dTRPA1/+ vs. 18°C:TH GAL>UAS dTRPA1	0	-12.76 to 12.76	ns	>0.9999
32°C:TH GAL>UAS dTRPA1 vs. 18°C:TH GAL4/+	-16	-28.76 to -3.235	**	0.0068
32°C:TH GAL>UAS dTRPA1 vs. 18°C:dTRPA1/+	-15	-27.76 to -2.235	*	0.013
32°C:TH GAL>UAS dTRPA1 vs. 18°C:TH GAL>UAS dTRPA1	-18	-30.76 to -5.235	**	0.0017
18°C:TH GAL4/+ vs. 18°C:dTRPA1/+	1	-11.76 to 13.76	ns	0.9999
18°C:TH GAL4/+ vs. 18°C:TH GAL>UAS dTRPA1	-2	-14.76 to 10.76	ns	0.997
18°C:dTRPA1/+ vs. 18°C:TH GAL>UAS dTRPA1	-3	-15.76 to 9.765	ns	0.9807

表14. 統計詳細 (図25)

図26B

Two-way ANOVA	Alpha	% of total variation	有意差	P値
	0.05	18.11	**	0.0035
Tukey's multiple comparisons test	最小二乗平均の差	95%信頼区間	有意差	P値
32°C:TH GAL4/+ vs. 32°C:UAS Shi ^{ts} /+	-4	-16.94 to 8.944	ns	0.9402
32°C:TH GAL4/+ vs. 32°C:TH GAL4>UAS Shi ^{ts}	-17	-29.94 to -4.056	**	0.0039
32°C:TH GAL4/+ vs. 18°C:TH GAL4/+	-2	-14.94 to 10.94	ns	0.9973
32°C:TH GAL4/+ vs. 18°C:UAS Shi ^{ts} /+	-4	-16.94 to 8.944	ns	0.9402
32°C:TH GAL4/+ vs. 18°C:TH GAL4>UAS Shi ^{ts}	1	-11.94 to 13.94	ns	>0.9999
32°C:UAS Shi ^{ts} /+ vs. 32°C:TH GAL4>UAS Shi ^{ts}	-13	-25.94 to -0.05552	*	0.0485
32°C:UAS Shi ^{ts} /+ vs. 18°C:TH GAL4/+	2	-10.94 to 14.94	ns	0.9973
32°C:UAS Shi ^{ts} /+ vs. 18°C:UAS Shi ^{ts} /+	0	-12.94 to 12.94	ns	>0.9999
32°C:UAS Shi ^{ts} /+ vs. 18°C:TH GAL4>UAS Shi ^{ts}	5	-7.944 to 17.94	ns	0.8593
32°C:TH GAL4>UAS Shi ^{ts} vs. 18°C:TH GAL4/+	15	2.056 to 27.94	*	0.0145
32°C:TH GAL4>UAS Shi ^{ts} vs. 18°C:UAS Shi ^{ts} /+	13	0.05552 to 25.94	*	0.0485
32°C:TH GAL4>UAS Shi ^{ts} vs. 18°C:TH GAL4>UAS Shi ^{ts}	18	5.056 to 30.94	**	0.0019
18°C:TH GAL4/+ vs. 18°C:UAS Shi ^{ts} /+	-2	-14.94 to 10.94	ns	0.9973
18°C:TH GAL4/+ vs. 18°C:TH GAL4>UAS Shi ^{ts}	3	-9.944 to 15.94	ns	0.9825
18°C:UAS Shi ^{ts} /+ vs. 18°C:TH GAL4>UAS Shi ^{ts}	5	-7.944 to 17.94	ns	0.8593

表15. 統計詳細 (図26)