

論文の内容の要旨

論文題目

Functional analysis of a mushroom body output neuron involved in olfactory memory in *Drosophila*

(シヨウジョウバエ嗅覚記憶に関わるキノコ体出力神経の機能解析)

氏名 上岡 雄太郎

序論

何を記憶し、何を記憶しないかの選択は生物の生存にとって重要である。適切な記憶を取得することは生存に有利に働くが、不適切な記憶の取得は不適切な行動を生む可能性があるからだ。また一度取得した記憶を消去するためには特定のプロセスに従って細胞内のリソースを割く必要があるため、予め必要な情報を絞って記憶することが大切である。

シヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) では古典的条件づけを用いた嗅覚記憶の研究が進められてきた。嗅覚記憶は記憶取得・固定・想起の3つのプロセスに分かれ、各プロセスにおいて嗅覚三次神経である約2000個のケニオン細胞 (KC; Kenyon cell) から成るキノコ体 (MB; Mushroom body) が記憶中枢として重要であることが示されてきた (図1)。近年このKCから入力を受ける約30個のMB出力神経 (MBON; MB output neuron) が包括的に同定された。このKCからMBONへの入力は嫌悪刺激を媒介する100個以上のドーパミン作動性神経 (DAN; Dopaminergic neuron) によって修飾される。つまり記憶によってMBONの応答は変化することが示されてきた。また、DANの活動は持続的に変動しており、MBONの影響下にあると言われる。このため、KC、DAN、MBONから成る微小回路の詳細な解析が記憶取得のプロセスを理解するためには必要である。

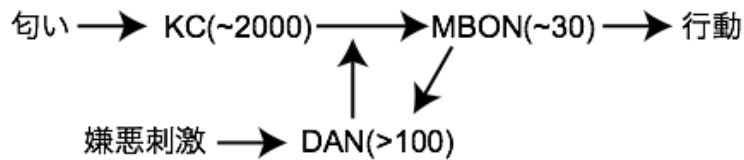


図 1. 嗅覚嫌悪記憶に関わる神経微小回路の模式図

矢印は情報の流れを示す

本研究では嫌悪記憶取得時の神経微小回路の機能を理解するために、時間解像度を上げた行動実験の手法を用いて MBON の一つである MBON- γ 1pedc と DAN からなる回路を調べた。MBON- γ 1pedc は嫌悪記憶の取得時に DAN から入力が入る MBON として知られており、ある匂いに対して嫌悪記憶を形成するとその匂いに対する応答が減少することが分かってきている。しかしその記憶取得への関与は不明であった。

結果

1: MBON- γ 1pedc は短期記憶取得、想起の両方で必要

嗅覚嫌悪記憶を取得させる際、CS+フェーズと CS-フェーズから成る条件づけをハエに行う。CS+フェーズでは一つの匂いと嫌悪刺激（電気ショック）が同時に提示され、CS-フェーズでは二つの匂いのみが提示される。その後、ハエは二種類の匂い間でどちらかに寄るか、逃げるか選択させられる（図 2A）。

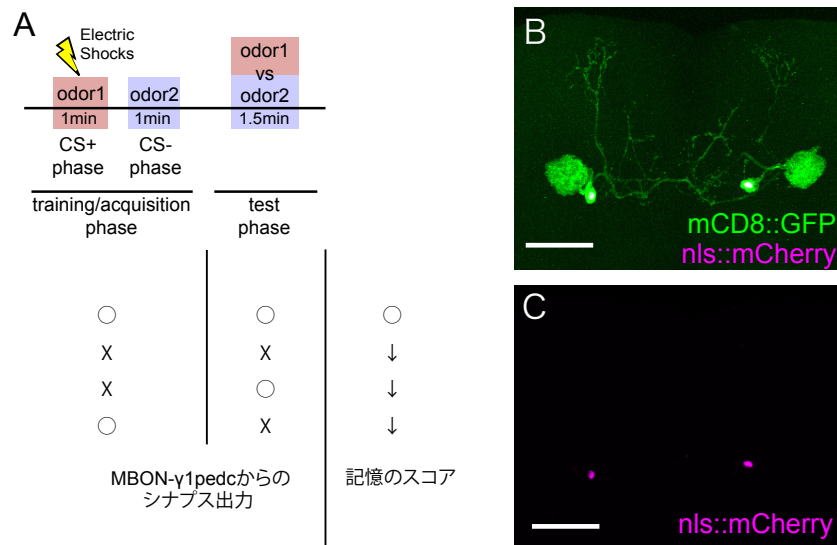


図 2. MBON- γ 1pedc は短期記憶へ関わる

(A) 嗅覚記憶条件づけとテストの概要及び結果。記憶取得・想起で MBON- γ 1pedc の出力を

抑制しないと短期記憶は正常。抑制すると短期記憶は阻害された。記憶取得時または記憶想起時に抑制すると、どちらの場合でも記憶は阻害された。

(B,C) 行動実験で用いた MBON- γ 1pedc 特異的な Gal4 系統で発現させた膜移行型 GFP (B) と核移行型 mCherry (C) スケールバーは 50 μ m

この嗅覚記憶の系で MBON- γ 1pedc の関与を調べるために、MBON- γ 1pedc 神経特異的な発現パターン (図 2B, C) を持つ Gal4 系統を用いて、温度感受性優性阻害型ダイナミン変異体の Shi^{ts} を発現させた。これによって制限温度 (33°C) にハエを移すことで MBON- γ 1pedc からの神経出力を特異的に抑制することができる。

短期記憶の取得から想起まで継続して MBON- γ 1pedc のシナプス出力を抑制した結果、短期記憶が完全に阻害されることが分かった (図 2A)。また、一過的に抑制した実験から MBON- γ 1pedc のシナプス出力は記憶の取得時と想起時どちらでも必要であることが分かった (図 2A)。これは、従来記憶想起に必要と言われた MBON- γ 1pedc のシナプス出力が記憶想起だけでなく、記憶取得にも必要なことを示している。

2: MBON- γ 1pedc シナプス出力は CS-フェーズで必要

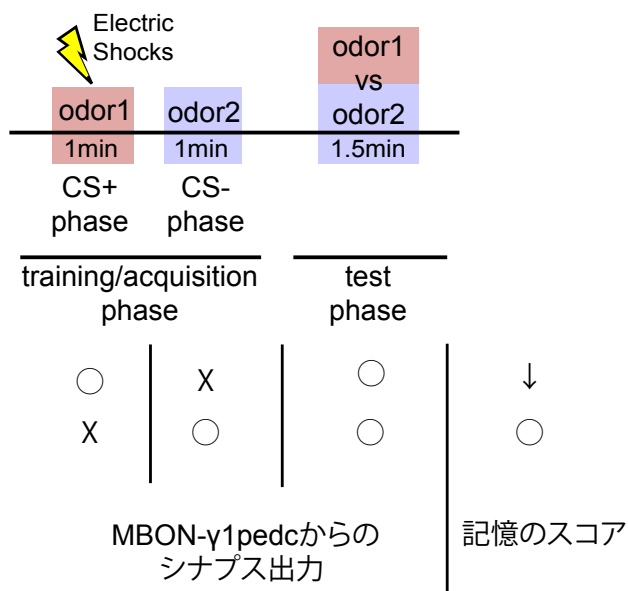


図 3. CS-フェーズにおける MBON- γ 1pedc の出力抑制が記憶阻害を引き起こす

CS-フェーズもしくは CS+フェーズでのみ MBON- γ 1pedc の神経出力を抑制し、短期記憶を見た。CS-フェーズでの出力抑制で記憶が阻害された。

記憶取得時の MBON- γ 1pedc の機能を詳細に理解するために、時間解像度を上げ、CS+フェーズと CS-フェーズそれぞれで MBON- γ 1pedc の神経出力を抑制した。すると CS-フェーズで神経出力を抑制した時のみ記憶の欠損が見られた (図 3)。これは MBON- γ 1pedc のシナプス出力が CS-フェーズにおいて必要であることを示している。

3: MBON- γ 1pedc の出力抑制は DAN の出力と協調して嫌悪記憶を形成する

次に CS-フェーズにおける MBON- γ 1pedc のシナプス出力抑制が記憶阻害につながった理由を調べた。CS-フェーズの匂いに対して嫌悪記憶が形成され、CS+フェーズの匂いに対しての嫌悪記憶と競合してしまった可能性を考え、電気ショックなしで図 3 と同じ手順の実験を行った。つまり、22°C で一つの匂いを嗅がせた後に、二つ目の匂いを 33°C でかがせた。この結果、MBON- γ 1pedc で Shi^{TS} を発現したハエは 33°C で嗅いだ匂い、つまり、MBON- γ 1pedc のシナプス出力が抑制されている時に提示された匂いに対して嫌悪記憶を形成していることが分かった (MBON- γ 1pedc を抑制することで形成される記憶を BGAM; Blockade-of-MBON- γ 1pedc induced aversive memory とする)。

様々な嫌悪情報は DAN を経由して MB へ入力されていることがこれまでの研究で明らかになってきているため、BGAM の形成も DAN からの入力に依存しているかどうかを調べた。このために DAN 特異的な発現系統である TH-Gal4 を用いた。この結果、DAN からのシナプス出力を MBON- γ 1pedc のシナプス出力と同時に抑制すると、BGAM は形成されないことが分かった。このことから BGAM は DAN を介して形成されていることが分かった。

考察

以上の結果から、MBON- γ 1pedc の出力は DAN の不用意な活性化を防ぎ不適切な嫌悪記憶の形成を防止するために必要であることが示唆された。

BGAM のような嫌悪記憶の形成は、電気ショックと匂いの連合から形成されるような本来重要な嫌悪記憶をマスキングしてしまう可能性がある。BGAM の形成を抑制する MBON- γ 1pedc は生存に重要な嫌悪記憶に対するコントラストを強める働きがあると考えられる。

今回行った記憶取得プロセスの時間的細分化によって、微小回路を構成する KC、DAN、MBON がそれぞれ相互作用して記憶形成が行われることが分かった。今後、他の MBON や DAN の機能を調べる際にも本手法を用いることで回路の新たな特性が解明されると期待される。

記憶のようなマクロな現象は多くの神経が相互作用し回路全体の機能として作り出される。このような回路の挙動を解明するには、高時間解像度で各神経を操作し、解析することが必要である。本研究はその回路の特性を一つ明らかにした点で、記憶形成のシステム全体を理解する一つの足がかりとなるだろう。