

「シナプス可塑性を記憶に結びつけるための分子細胞学的研究」

国立研究開発法人情報通信研究機構 未来 ICT 研究所

櫻井 晃

1 研究の背景と目的

どのようにして記憶は形成されるのかという問いは、神経科学における主要なテーマの1つである。現在、我々の前に立ちはだかっている最大の問題は、ミクロな研究と、マクロな脳機能の研究との間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（塚原伸晃、「脳の可塑性と記憶」）。例えば、犬にベルの音を聞かせた後にエサを与えると、ベルの音を聞くだけでエサがなくとも唾液を分泌するようになるという「パブロフの犬」は、記憶を実験科学として定量した例であるが、このとき脳神経回路にどのような変化が起きた結果として記憶が形成されるのかについてはほとんどわかっていない。これは、犬の脳を構成する神経細胞の数は膨大であり、行動を制御する脳神経回路の実態について十分に理解されていないため、学習による行動の変化を神経回路レベル、神経細胞レベルの変化と対応付けることが困難なためである。

そこで本研究では、学習に伴う分子・細胞レベルでのシナプスの可塑的变化（ミクロ）と、脳機能の発露としての行動の変化（マクロ）とを横断的に解析し、統一的な理解を得ることを目指した（図1a）。

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、行動の変化を主に担う site 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）。そのためには、比較的シンプルな神経回路をモデルとすることも重要である。本研究では、キイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）の摂食神経回路に着目した。キイロショウジョウバエは遺伝学のモデル生物として100年以上の研究の歴史があり、優れた遺伝学的な tool が揃っているため、行動を制御する神経回路の構造及び動作原理を単一細胞レベルで解析可能である。研究代表者の所属する研究室では、それらの tool を用いて、特定の行動を司令するニューロンの探索を行い、摂食神経回路の要に位置すると想定される Feeding neuron (Fdg neuron) を同定した（Flood et al., Nature 2013）。Fdg neuron 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 Fdg neuron において統合されるということが示唆される。そのため、Fdg neuron 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（図1b）。記憶の分子細胞メカニズムの実態解明を目指し、本研究では Fdg neuron を要とするキイロショウジョウバエ摂食神経回路の上でミクロとマクロを結びつける新しい学習実験系の開発を試みた。

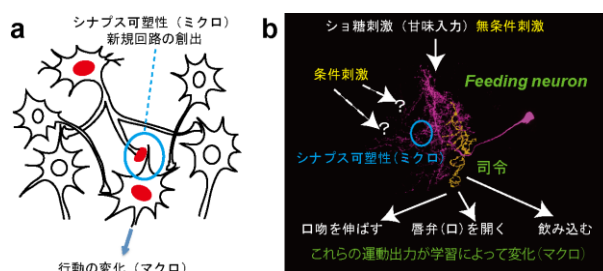


図1 シナプス可塑性(ミクロ)と記憶(マクロ)を結びつけるためのストラテジー。

(a) ミクロとマクロを同時観察し、同定された神経回路の上で結びつける。(b) ミクロとマクロを結ぶ Fdg neuron。摂食に関するほぼ全ての入力統合され、摂食行動を形成する全ての行動要素が出力される。そのため、Fdg neuron に統合されるシナプス入力の変化は、摂食行動の変化(記憶)と、よく対応することが期待される。

2 研究方法・研究内容

キイロショウジョウバエにおいて、学習による摂食行動の変化が Fdg neuron の可塑的变化と対応するかを検討するために、前述のパブロフの犬の学習実験を模した新しい実験パラダイムの開発を試みた。具体的には、ベルの音のような元々それ自体は摂食行動を引き起こさないような感覚刺激（条件刺激）の直後にそれ自体が摂食行動を引き起こすショ糖刺激（無条件刺激）を与えるという操作を繰り返し、学習後には条件刺激のみで摂食行動が起こるようにハエをトレーニングする。その際に、条件刺激によって Fdg neuron が活動するようになるのかを、摂食行動（とくに口吻の伸展）と同時に観察した（図1b）。

Fdg neuron の応答は、カルシウムイメージング法によって観察した。神経細胞が活動する際に細胞内に流入するカルシウムイオンの動態を、カルシウム指示タンパク質の最新版の1つである GCaMP6m を用いてリアルタイムイメージングした。カルシウムイオン濃度に応じて GCaMP6m の緑色蛍光強度が変化するため、蛍光顕微鏡下で、神経活動を緑色蛍光強度として定量できる。遺伝学的な tool を用いて GCaMP6m を Fdg neuron 特異的に発現させることによって、Fdg neuron の活動のみを反映した蛍光強度の変化を測定することが可能である。

摂食行動と神経活動の同時記録には、所属研究室で開発された FLIES (Fly brain Live imaging and Electrophysiology Stage) システム (Yoshihara *et al.*, 2012) を用いた。解剖によって脳を対物レンズの下に露出させる一方で、口吻や体は無傷なまま保つことが可能である（図2）。この状態のハエに対して、学習させながら同時に神経活動の変化を記録した。

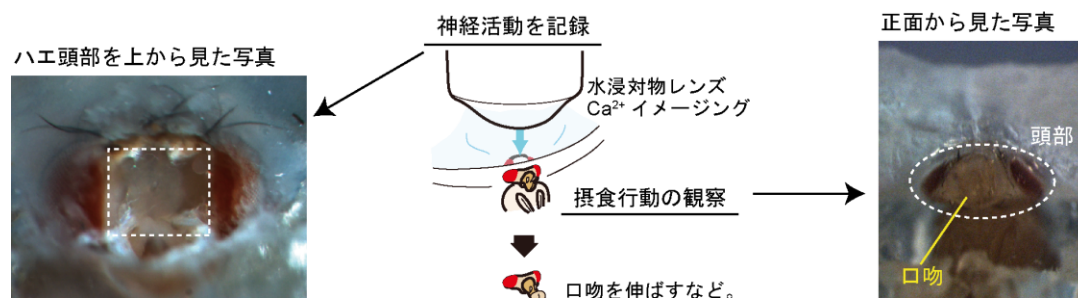


図2 神経活動と摂食行動の同時観察。

（中央）実験系の全体像模式図。（左）ハエ頭部上方は生理食塩水で満たされている。開頭手術により、破線で囲まれた領域の外骨格を除去し、脳を露出させ、水浸レンズを通して神経活動をモニターする。（右）ハエ頭部下方（破線で囲んで示されている）は、生理食塩水で満たされた上方とは隔離され、無傷に保たれており、口吻の伸展などの摂食行動を観察できる。

3 研究成果

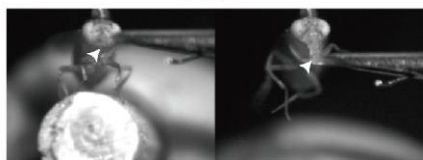
（1）新規学習実験系の確立

Fdg neuron を記憶研究に活用するために、新しい独自の学習実験パラダイムを開発した。パブロフの犬が、「ベルの音」を聞いた直後に「エサ」を与えられるということを繰り返されると、ベルの音が鳴るとエサがもらえることを学習し、唾液を分泌するようになったように、「ハエがつかんでいる棒を人為的にハエから離す」という刺激の直後にエサである「ショ糖溶液」を与えるという操作を繰り返すことによって、棒が離れるとショ糖溶液がもらえることを学習させ、記憶させた。学習前は棒が離れても口吻を伸ばすことはなかったが、学習後には棒が離れるとショ糖溶液を飲もうとして口吻を伸ばすようになった（図3）。

学習実験前にハエを絶食状態（水のみを与える）におき、ショ糖溶液に対する欲

求を高くしておく必要がある。絶食時間と、学習に用いるショ糖溶液の濃度条件の組合せを検討した結果、24 時間の絶食を行ったハエに対しては 200mM のショ糖溶液を用いると学習効率が良く、また 28 時間の絶食を行ったハエに対しては 100mM のショ糖溶液を用いて学習させたときに最も記憶形成の成功率が高かった。ショ糖溶液に対するハエの反応性が高過ぎても、また低過ぎても学習の成功率は低く、絶食時間とショ糖刺激の強さをコントロールする必要があることがわかり、その諸条件を確立できた。

学習中



学習完了後



図3 つかんでいた棒をマニピュレーターを用いてハエから離すという条件刺激と、ショ糖による無条件刺激を用いた連合学習。

木製の棒にハエをつかまらせておき（上段左）、その棒をハエから離れた直後にショ糖溶液がしみ込んだ紙をハエの口吻の先に触らせ、口吻の伸展（摂食行動）を引き起こす（上段右）という操作をくり返すと、ショ糖刺激がなくとも、棒を離すだけで口吻の進展が起こるように学習した（下段）。矢尻は口吻の先端の位置を示す。

（2）学習による Fdg neuron の機能的変化の観察

学習前においては、棒を離すという刺激そのものはハエの摂食行動を引き起こさず、また GCaMP6m を用いたカルシウムイメージングにおいても Fdg neuron の顕著な活動は観察されなかった。一方、学習後は棒を離す刺激に対して口吻を伸ばす際に、Fdg neuron の活動を反映した顕著な GCaMP6m の蛍光増大が観察された。棒を離すという刺激が活性化する神経回路と、ショ糖刺激が活性化する Fdg neuron を含む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（図4）。（1）で検討した絶食時間とショ糖濃度を変えた諸条件においても、記憶が形成された際には棒を離す刺激に対して Fdg neuron が活動する様子が観察され、また条件によっては覚えないこともあったが、そのときは棒を離しても学習前同様に Fdg neuron の活動は観察されなかった。

以上から、記憶形成による摂食行動の変化を担うシナプスの可塑的变化は、Fdg neuron か、あるいは摂食神経回路内において Fdg neuron の上流に位置するニューロンで起きていることが予想される。今後、Fdg neuron 上のシナプスの記憶形成への寄与を調べるために、ハロロドプシン (eNpHR3.0) による Fdg neuron の不活性化を学習中に行い、記憶形成への影響を調べる必要がある。この場合、Fdg neuron 上ではシナプスの強化は起こらないため、Fdg neuron 上のシナプスの変化が記憶形成に重要な役割を担っているかを評価することができる。

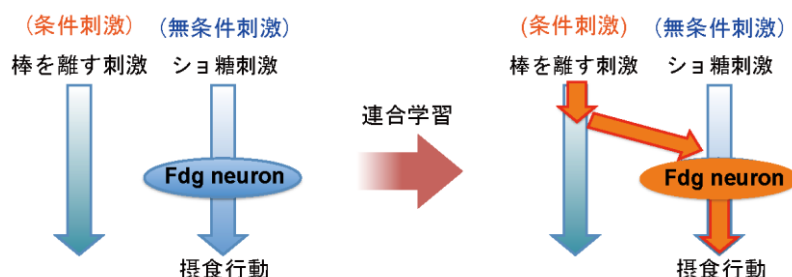


図4 学習によって生じた Fdg neuron を通る新しい情報処理経路。

学習前はそれぞれ独立に機能していた棒を離す刺激によって活性化する神経回路とショ糖刺激によって活性化する摂食神経回路という二つの神経回路間に、新しく機能的なつながりが生じたことが示唆される。

(3) 学習過程における神経活動のリアルタイムイメージング

次に学習中に Fdg neuron の活動がどのように変化していくのかを追跡した。具体的には、棒を離す刺激の直後にショ糖を与えるというトレーニングを 5 回行うごとに、棒を離すだけで Fdg neuron が活動し、摂食行動が引き起こされるかをテストした。その結果、Fdg neuron の応答が学習の過程で徐々に大きくなり、あるところで閾値を超え、摂食行動（口吻の伸展）が起こるようになる様子が観察された。図 5 に代表的な同一個体の結果を示す。例えば、この個体ではトレーニング 10 回後から、棒を離す刺激に対して明確な Fdg neuron の応答と摂食行動を示すようになり、15 回後ではより顕著な Fdg neuron の応答と摂食行動が観察された。さらに興味深いことに、トレーニング 5 回後では、棒を離す刺激に対して摂食行動は観察されなかったが、Fdg neuron は微弱ではあるがトレーニング前に比べると大きな活動を示した。これは、行動レベルでは顕在化しない「閾値未満」の記憶形成過程を捉えているのかもしれない。ただし、蛍光強度測定ノイズを減らし、より安定して蛍光強度を測定できる状態で再確認する必要がある。記憶の形成過程を単一細胞レベルで明確に捉えることに成功した。

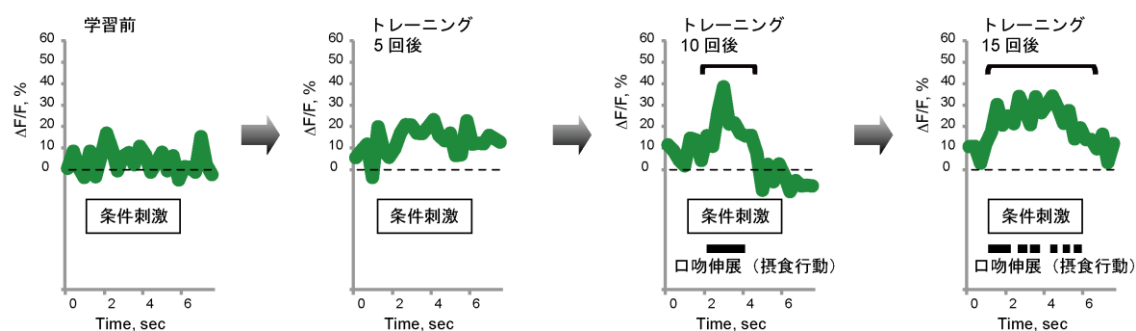


図5 条件刺激（棒を離す刺激）に対する Fdg neuron のカルシウム応答と摂食行動の学習過程における変化。学習前に棒を離すという条件刺激に対する応答を調べた後、同じ個体に対して条件刺激直後にショ糖による無条件刺激を与えるというトレーニングをくり返した。5 回ごとに条件刺激のみを提示し（5 秒間、図中 white bar）、Fdg neuron のカルシウム応答（GCaMP 蛍光強度の変化として計測、縦軸の $\Delta F/F$, %）と摂食行動を記録した。この個体では、トレーニング 10 回後から、Fdg neuron の顕著な応答と、摂食行動（口吻の伸展）が観察された。1 回の口吻伸展をそれぞれ black bar で示した。

4 生活や産業への貢献および波及効果

記憶のメカニズム解明が人類の生活に及ぼす影響は大きい。例えば、有益な記憶の強化やトラウマ記憶の忘却、認知症の予防と治療などである。本研究では、独自の新規学習実験系の開発に成功したが、その最大の利点は単一細胞レベルで記憶形成と神経活動の変化を同時に観察し、結びつけられるということである。さらには、同様の実験を記憶の忘却についても行うことが可能である。脳を露出させた状態で記憶をテストできるので、薬剤を生理食塩水に混ぜて流すことで簡便に薬理実験を行うことも可能である。キイロショウジョウバエはヒトに比べれば単純な脳神経回路を持つが、cAMP-PKA シグナル伝達系など記憶についてヒトと共通の分子メカニズムも多く、将来的には本研究の医療分野への貢献も期待できる。

また、脳の動作原理に関する知見はコンピュータの設計原理への応用も期待されており、例えばアメリカ合衆国 IBM 社は生物脳の構造をモデルとしたコンピュータチップを販売している。本研究は、現状ではコンピュータには再現困難な人間の能力だとされる、過去の経験や現在おかれている状況から、柔軟に行動を変化させるシステムの開発に寄与する可能性も秘めている。キイロショウジョウバエの遺伝学的な tool を用いれば、単一細胞レベルで脳神経回路内の情報の流れを追跡すること、そして操作することも可能であり、記憶をつくる神経回路の動作原理に迫れるかもしれない。