

## 159. 長期記憶の迅速な形成メカニズムの解析

山方 恒宏

東北大学 大学院生命科学研究科 生命機能科学専攻

Key words : ドーパミン, 長期記憶, 報酬, 学習記憶

### 緒言

我々の記憶は短期記憶、作業記憶、長期記憶に分類され、それぞれ保持時間や安定性が異なる。一般に長期記憶は学習訓練の繰り返しによって生じると考えられているが、食物や毒など生物学的に重要な刺激の場合、一度の学習によって長期記憶が形成されてしまう。だが一度の学習が長期記憶を形成する脳神経メカニズムについては、今のところよくわかっていない。ショウジョウバエにおいても、匂いと糖報酬の連合学習は一回の条件付けで長期記憶を誘導する<sup>1)</sup>。本研究は、このハエの嗅覚連合学習をモデルとし、一回条件付けによる長期記憶形成の神経基盤を明らかにすることを目的とした。

ショウジョウバエでは、そのシンプルな脳と、GAL4/UAS 遺伝子発現調節システムに代表される多彩な遺伝子工学ツールという利点を生かし、学習の脳神経基盤が神経回路レベルで明らかとなりつつある。特にキノコ体と呼ばれる脳領域において、匂い情報と糖情報が統合され、報酬記憶が形成されること、また Protocerebral Anterior Medial (PAM) クラスタと呼ばれるドーパミン細胞群が報酬情報をキノコ体に伝達していること<sup>2)</sup>が近年の筆者らの成果により明らかとなってきた。更に最近筆者は、PAM 細胞群のうち、2つの異なるサブグループがそれぞれ短期、長期記憶の形成に関与することを見出した。しかし、それぞれの記憶の形成に関わる細胞の同定までには至っていなかった。これを受け、本研究では、PAM 細胞群の単一細胞レベルでの網羅的な形態-機能解剖を実施し、長期記憶の形成に関わる単一ドーパミン細胞種を同定したので報告する<sup>3)</sup>。

### 方法、結果および考察

PAM 細胞群は 100 以上の細胞からなるクラスターである。そのうち、報酬短期・長期記憶形成に関わるドーパミン細胞を同定するには、個々の細胞タイプを特異的に、かつ網羅的に機能解析する必要があった。その為、米 HHMI Janelia Research Campus の Rubin 氏、Aso 氏との共同研究により、個々の PAM 細胞タイプを特異的に標識する GAL4 系統のシリーズ<sup>4)</sup>を実験に用いた。これらの系統は Split-GAL4 法<sup>5)</sup>と呼ばれる手法を用いて作製されており、従来の GAL4 細胞標識系統に比べ、発現特異性が非常に高いことが特徴である。

まずそれぞれの Split-GAL4 系統において発現する PAM 細胞のタイプとそれらの GAL4 発現量を評価するために、すべての系統に GFP を発現させた。共焦点レーザー顕微鏡を用いて各 PAM 細胞タイプの GFP 発現強度を同一条件下で測定し（各細胞タイプは形態の違いによって識別可能）、Split-GAL4 系統による各 PAM 細胞タイプの発現パターンマトリクスを作成した（図 1）。

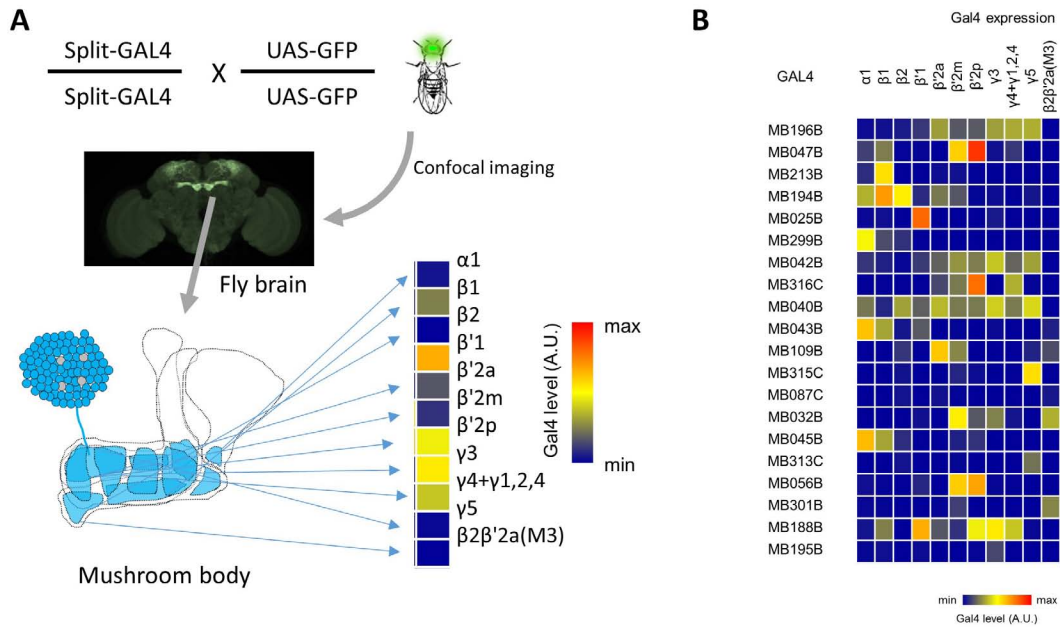


図1. Split-GAL4 系統に標識される各 PAM 細胞種のパターンマトリクス

(A) 各 Split-GAL4 系統を GFP 標識し、共焦点レーザー顕微鏡によって細胞形態の三次元画像を得る。このイメージをもとに、標識される各細胞種の発現量を評価する。(B) 各 Split-GAL4 系統に標識された PAM 細胞種の発現パターンマトリクス。文献3より抜粋・改変。

次いで各 PAM 細胞種の記憶誘導能を明らかとするため、それぞれの GAL4 系統に標識される細胞種が誘導できる記憶量を行動学的に定量した。温度感受性チャネル dTrpA1<sup>6)</sup> は、特定の温度帯において標的細胞の神経興奮を引き起こすことができる。これを標的細胞に発現させ、匂い提示時に細胞を活性化することで、人工的な記憶の誘導が可能である<sup>7)</sup>。この記憶誘導実験系をすべての GAL4 系統に対し行った。特に記憶量を学習訓練後即座にテストするか、あるいは 24 時間後にテストするかで、短期・長期記憶の形成に十分な細胞種を調べることができる。その結果、短期・長期記憶を誘導する系統が多く見出された (図2)。

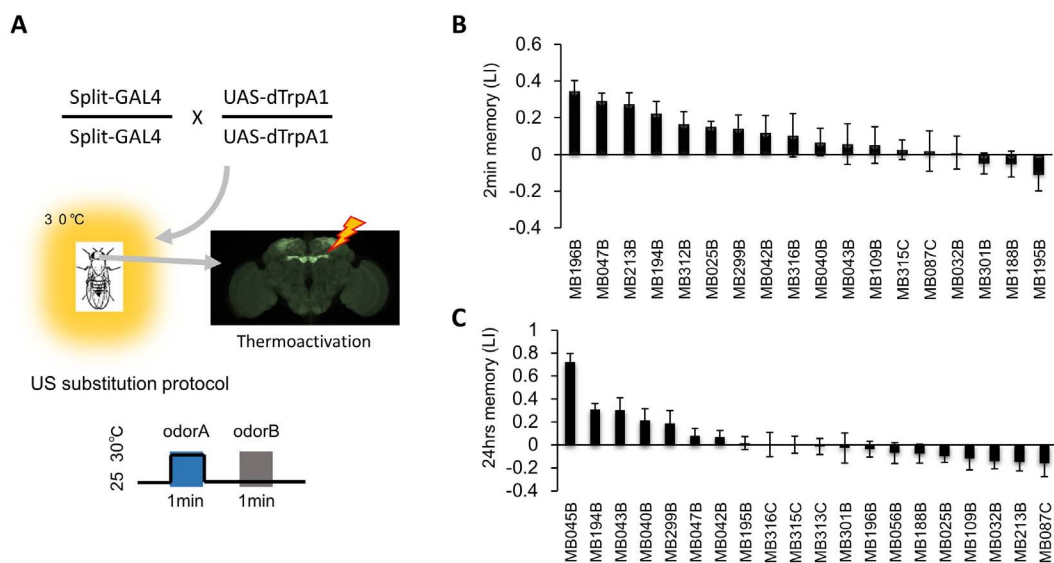


図2. 各 Split-GAL4 系統による記憶誘導能の行動学的評価

(A) 各 Split-GAL4 系統に温度感受性陽イオンチャネル (dTrpA1) を発現させ、記憶誘導実験を行う。(B) 各 Split-GAL4 系統によって誘導された短期記憶。(C) 各 Split-GAL4 系統によって誘導された長期記憶。

報酬短期・長期記憶をそれぞれ誘導する細胞種を同定するため、上記によって得られた行動スコアと発現レベルの相関解析を行った。その結果、PAM-*a*1 と呼ばれる単一の細胞タイプにおいてのみ、行動スコアと発現レベルに強い相関がみられた ( $R^2 = 0.79$ ,  $p < 0.001$ , 図3)。すなわち、PAM-*a*1 は長期記憶の誘導に関与する唯一の PAM 細胞種であることが示唆された。糖報酬学習時、これら PAM-*a*1 細胞のシナプス伝達をダイナミン GTPase の温度感受性優性変異<sup>8)</sup> (*Shi<sup>ts</sup>*) によって阻害すると、長期記憶の形成特異的に問題が生じた。以上の結果より、PAM-*a*1 細胞は報酬長期記憶の形成に特に重要であると考えられる。本成果は記憶の長期安定化における細胞内分子・生理メカニズムの解明に向けた重要な足掛かりになると期待される。

短期記憶細胞について、同様な解析を進行中である。

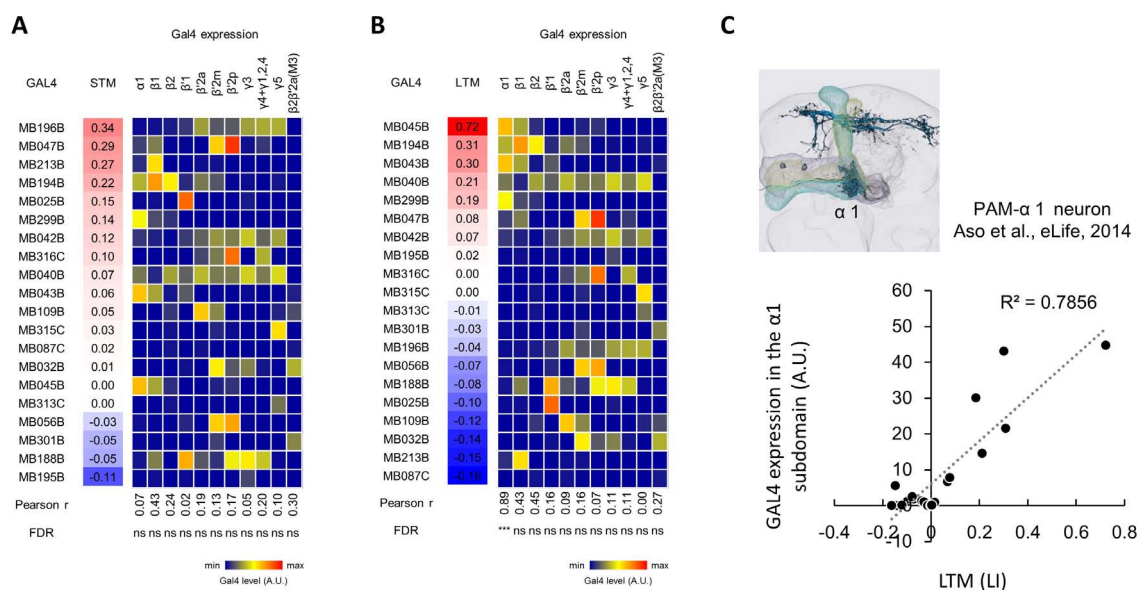


図3. 各PAM細胞種のGAL4発現量と記憶誘導能の相関解析

(A) 短期記憶の誘導能順にソートしたGAL4発現パターンマトリクス。(B) 長期記憶の誘導能順にソートしたGAL4発現パターンマトリクス。(C) PAM- $\alpha 1$ においてのみ、各Split-GAL4系統のGAL4発現量と長期記憶誘導能の間に強い相関が認められた。n = 20、 $R^2 = 0.79$ 、 $p < 0.001$ 。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、東北大学大学院生命科学研究科の市之瀬敏晴、谷本拓、独マックスプランク研究所のAnja B. Friedrich、Richard J. Sima、仏国立科学研究センターのPierre-Yves Plaçais、Thomas Preat、米ハワード・ヒューズ医学研究所/ジャネリアファーム研究所の麻生能功、Gerald M. Rubinである。

### 文献

- 1) Krashes MJ, Waddell S. Drosophila appetitive olfactory conditioning. Cold Spring Harb Protoc. 2011 May 1;2011(5):pdb.prot5609. doi: 10.1101/pdb.prot5609. PMID: 21536767.
- 2) Liu C, Plaçais PY, Yamagata N, Pfeiffer BD, Aso Y, Friedrich AB, Siwanowicz I, Rubin GM, Preat T, Tanimoto H. A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in Drosophila. Nature. 2012 Aug 23;488(7412):512-6. doi:10.1038/nature11304.
- 3) Yamagata N, Ichinose T, Aso Y, Plaçais PY, Friedrich AB, Sima RJ, Preat T, Rubin GM, Tanimoto H. Distinct dopamine neurons mediate reward signals for short- and long-term memories. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jan 13;112(2):578-83. doi: 10.1073/pnas.1421930112. Epub 2014 Dec 29.
- 4) Aso Y, Hattori D, Yu Y, Johnston RM, Iyer NA, Ngo TT, Dionne H, Abbott LF, Axel R, Tanimoto H, Rubin GM. The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. Elife. 2014 Dec 23;3:e04577. doi:10.7554/eLife.04577.
- 5) Luan H, Peabody NC, Vinson CR, White BH. Refined spatial manipulation of neuronal function by combinatorial restriction of transgene expression. Neuron. 2006 Nov 9;52(3):425-36. PubMed PMID: 17088209; PubMed Central PMCID: PMC1713190.
- 6) Hamada FN, Rosenzweig M, Kang K, Pulver SR, Ghezzi A, Jegla TJ, Garrity PA. An internal thermal sensor controlling temperature preference in Drosophila. Nature. 2008 Jul 10;454(7201):217-20. doi: 10.1038/nature07001. Epub 2008 Jun 11.
- 7) Aso Y, Siwanowicz I, Bräcker L, Ito K, Kitamoto T, Tanimoto H. Specific dopaminergic neurons for the formation of labile aversive memory. Curr Biol. 2010 Aug 24;20(16):1445-51. doi: 10.1016/j.cub.2010.06.048. Epub 2010 Jul 15.
- 8) Kitamoto T. Conditional modification of behavior in Drosophila by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. J Neurobiol. 2001 May;47(2):81-92. PubMed PMID: 11291099.