

光と熱で神経回路を活性化、生きた昆虫の脳に人工的な記憶の形成に成功  
異なる情報を連合して学習する神経回路メカニズムを解明

研究成果のポイント

1. 光遺伝学<sup>注1</sup>と熱遺伝学<sup>注2</sup>を組み合わせることで、匂いを伝える神経回路は光で、報酬を伝える神経回路は熱によって操作できる遺伝子組み換えショウジョウバエを作製しました。
2. それぞれの神経回路をそれぞれ光と熱によって活性化させ、人工的に脳内で連合記憶を形成させることに成功しました。
3. 独自の行動実験システムの開発により、連合学習行動を支える神経回路が、生きた個体の脳内で機能していることを実験的に示すことに成功しました。
4. 本研究で開発された手法は、学習記憶障害をもたらすリスク遺伝子の行動学的解析や、効率的なドラッグスクリーニング等の応用も期待されます。

国立大学法人筑波大学（以下「筑波大学」という）生命環境系の古久保-徳永克男 教授と学群生の本多隆利（現在は大学院生）と李其育らは、匂いを伝える神経回路と報酬刺激を伝える神経回路を、それぞれ光刺激と熱刺激によって操作可能にした遺伝子組み換えショウジョウバエを作製し、物理的な刺激（光や熱）で神経回路を直接活性化することにより、生きた個体の脳内に人工的に報酬記憶を形成させることに成功しました。

匂いと食物といった異なる2つの刺激を関連付けて記憶・学習する「連合学習」は、無脊椎動物から脊椎動物まで、動物界で広く知られている行動です。しかし、そのような学習行動がどのような神経回路に基づいて構築されているのかは未だ不明です。本研究では、単純な神経回路をもつショウジョウバエの幼虫を用い、匂いと報酬を伝える神経回路を光あるいは熱によって操作できる遺伝子組み換えショウジョウバエを作製しました。作成した遺伝子組み換え幼虫に光や熱という物理的な刺激を与えて神経回路を同時に活性化させたところ、人工的に連合記憶が形成されていることを、独自に開発した行動実験システムを用いて実証しました。これは、これまで理論的に提唱されてきた連合記憶の神経回路が、実際に生きた個体の脳内で機能していることを実験的に示した成果です。本研究では、連合学習を支える最小の機能的神経回路ユニットの同定に成功しており、昆虫からヒトに至るまで、生物種を超えて保存された高次行動「学習・記憶」を制御する神経回路を単一の神経細胞レベルでアプローチできる新たな技術として期待されます。

本研究成果は、ネイチャー出版グループ（Nature Publishing Group）の電子ジャーナル Scientific Reports に、4月25日付けで掲載されました。

## 研究の背景

学習・記憶は、ヒトを含めたあらゆる動物において生存繁殖に欠かせない機能です。生物は「記憶」によって外界からの情報を蓄積し、後の行動に役立てます。情報を記憶する過程が「学習」であり、過去の記憶と照合して正しい行動を選択することは、脳の最も重要な機能の一つと言えます。

パブロフの犬で知られる古典的条件付けによる「連合学習」では、動物は、学習行動を引き起こす音や匂いといった外部からの刺激(条件刺激)と、先天的反応を引き起こす食物や電気刺激などの刺激(無条件刺激)を関連付け、その記憶をもとに条件刺激から無条件刺激の存在を予測できるようになります。このような古典的条件付けは、無脊椎動物から脊椎動物まで、動物界で広く報告されており、その重要性は明らかです。

しかしながら、脊椎動物の脳と比べて極めて単純な構造であるショウジョウバエの脳においてさえ、連合学習行動がどのような神経回路に基づいて織り成されているのか、その包括的な理解はこれまで達成されていませんでした。

## 研究内容と成果

ショウジョウバエでは、成虫に比べて単純な脳しかもたない幼虫にも、特定の匂いと食物などの報酬刺激を連合して覚える(嗅覚連合学習)能力があります。そこで本研究では、単純な神経回路をもつショウジョウバエの幼虫をモデルとして、連合学習行動を支える神経回路の同定を試みました。

ショウジョウバエ幼虫において、匂い刺激は、嗅覚受容体神経(ORN)および糸球体(AL)を介して、記憶の中核である脳内のキノコ体へ伝わります。幼虫における嗅覚受容体(Or)は21種類と少なく、各々がどの匂いに反応するかが分かっています。一方、報酬刺激は脳内でオクトパミン神経(OA)を介して伝わり、キノコ体で匂い情報と統合され、連合記憶が形成されると提唱されてきました。

これらの回路が生きた個体で実際に機能していることを実験的に示すためには、自由行動下の幼虫において、嗅覚受容体神経とオクトパミン神経を同時に活性化させて条件付けを成立させた上で、行動の変化を指標に連合学習が成立することを確かめる必要がありました。本研究グループは、光遺伝学と熱遺伝学という最先端の手法を組み合わせた新たな行動実験系を開発することで、この2つの異なる回路を活性化させることに成功しました。

まず、光遺伝学の手法を用いて、青い光を受けて細胞を活性化させる機能をもつタンパク質を、遺伝子組み換えにより、特定の嗅覚受容体神経細胞に発現させました。この幼虫は、青色光を照射すると特定の匂いを感じている状態になります(図1左下)。続いて、熱遺伝学の手法を用いて、高温条件になると細胞を活性化させる機能をもつタンパク質を、遺伝子組み換えにより、オクトパミン神経細胞に発現させました。この幼虫は、熱刺激を与えると報酬を受けている状態になります(図1右下)。

このようにして、匂い刺激は光刺激、報酬刺激は熱刺激で反応するようそれぞれ置き換えられた遺伝子組み換えショウジョウバエを作製しました。このショウジョウバエを用いて、光と熱を同時に与えることによって、匂いと報酬を伝える2つの異なる回路を同時に活性化させることに成功しました。

本来、ショウジョウバエは青い光を避ける習性を持ちます。しかし、作製したショウジョウバエは、条件付けの際に、光と熱の両方を同時に経験させた場合、有意に青色光に寄る行動を示しました(図2)。条件付けの際に、光か熱のどちらか一方の刺激のみを与えた場合には、青色光に対する行動の変化は見られませんでした。さらに、匂い刺激あるいは報酬刺激のどちらか一方だけを光または熱刺激と置き換えた幼虫では、光と熱による条件付けを行っても、有意に青色光へ寄る行動は確認されませんでした。

これらの結果から、光と熱の同時刺激により両回路が活性化され、条件付けに伴う嗅覚連合記憶が誘起されたと考えることができます。このようにして、特定の嗅覚受容体神経とオクトパミン神経の活性化が嗅覚連合学習の成立に十分であることを世界で初めて実験的に直接示すことに成功しました。

## 今後の展開

本研究により、ショウジョウバエ幼虫において、光と熱を用いて特異的神経回路を人為的に活性化することで、嗅覚連合学習を効率よく誘導する技術が確立されました。その結果、報酬記憶を制御する神経回路を探るための基礎となる知見が得られました。

神経系のみを単離・培養し、最新のイメージング技術と組み合わせる上で、顕微鏡下で光と熱によって神経回路を活性化することで、連合学習の際に神経細胞が活性化する過程や情報の流れを可視化できることが期待されます。

また、本実験の手法は、匂い物質や食物などを必要とせず、神経回路を直接活性化するものです。これにより、条件付けに要する時間の大幅な短縮が実現したことで、従来の行動実験系を飛躍的に改良することができました。このような手法は、学習記憶機能に障害をもたらすと推測されるリスク遺伝子等の行動学的解析や、効率的なドラッグスクリーニング等への応用も可能と考えられます。

## 参考図

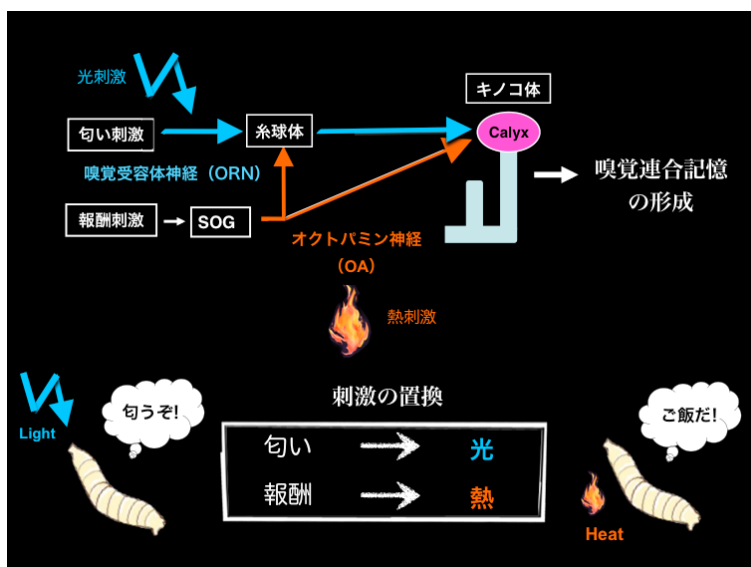


図1. 光遺伝学と熱遺伝学の技術を組み合わせ、刺激の置換によって2つの異なる回路の活性化に成功

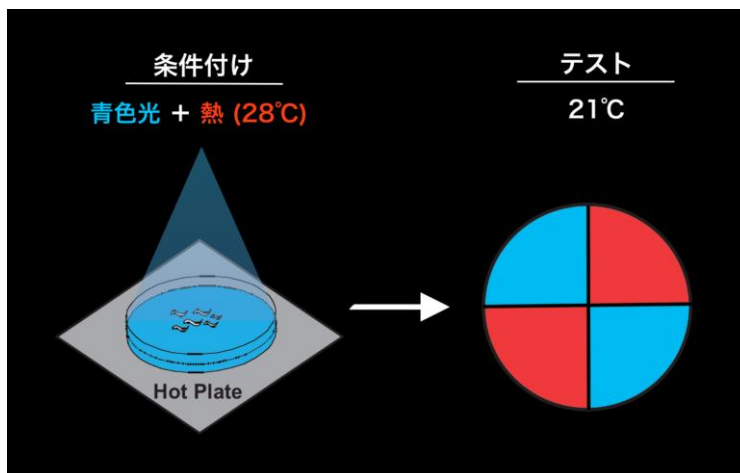


図2. 遺伝子組み換えショウジョウバエでは、光と熱を同時に与えることで擬似的に条件付けが成立。青色光と赤色光を照射して分けした寒天培地(右図)上でのテストでは、有意に青側に寄る行動を示した(この行動変化が連合学習の成立を意味する)。

## 用語解説

### 注1) 光遺伝学(オプトジェネティクス)

遺伝学工学の手法で、特定の神経細胞の活動を光によって操作し神経回路機能を調べる研究分野。本研究では、青色光によって開閉するイオンチャネル「チャンネルロドプシン2」(channelrhodopsin-2, ChR2)を特定のニューロンに発現させ、これらの細胞に青色光を照射することで、可逆的に興奮させる技術を用いた。

### 注2) 熱遺伝学(サーモジェネティクス)

遺伝学工学の手法で、特定の神経細胞の活動を熱によって操作し神経回路機能を調べる研究分野。本研究では、温度依存的に開閉するイオンチャネル「TRP チャネル」を特定のニューロンに発現させ、これらの細胞に28°C以上の熱刺激を与えることで、可逆的に興奮させる技術を用いた。

## 掲載論文

【題名】 Induction of Associative Olfactory Memory by Targeted Activation of Single Olfactory Neurons in *Drosophila* Larvae

(和訳) ショウジョウバエ幼虫における単一嗅覚受容体ニューロンの特異的活性化による嗅覚連合記憶の誘導

【著者名】 Takato Honda(本多 隆利), Chi-Yu Lee(李 其育), Maki Yoshida-Kashikawa(榎川-吉田 真樹), Ken Honjo(本庄 賢)& Kastuo Furukubo-Tokunaga(古久保-徳永 克男)

【掲載誌】 Scientific Reports

## 問い合わせ先

古久保-徳永 克男(ふるくぼ-とくなが かつお)

筑波大学 生命環境科学系 教授

本多 隆利(ほんだ たかと)

筑波大学 グローバル教育院 ヒューマンバイオロジー学位プログラム

文部科学省 / 日本学術振興会 博士課程教育リーディングプログラム