

光及び熱遺伝学によるショウジョウバエ幼虫学習パラダイムの開発

本多 隆利 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 古久保-徳永 克男 (筑波大学 生命環境系)

目的・背景

学習・記憶といった高次行動がいかなる神経回路に基づき制御されているか解明することは、神経科学における重要な課題である。光遺伝学 (Optogenetics) は、分子遺伝学的手法により、光で特定のニューロンの活動を操作可能にした革新的技術である。光遺伝学では、青色光に反応するイオンチャネル (ChR2) を、熱遺伝学では、温度依存性イオンチャネル (dTrpA1) を特定のニューロンで発現させることで、可逆的に標的ニューロンを興奮させることができる。本研究では、上記の両技術を駆使した行動実験系の開発を行い、ショウジョウバエの学習に関わる神経回路基盤を明らかにすることを目的とする。ショウジョウバエ幼虫の脳における神経回路は、成虫のものに比べ、その数的規模の小ささと重複性の少なさから、学習・記憶行動を裏打ちする機能的神経回路を探るうえで有効である。嗅覚連合学習においては、報酬記憶の形成にはオクトパミン神経の出力が必要で、そのシグナルはキノコ体で嗅覚情報と統合されて記憶が定着する。また、嗅覚受容体 (Or) の全容が明らかとなり、各々がどの匂いに反応するか分かっている。従って、餌刺激の代わりにオクトパミン神経を興奮させ、匂い刺激の代わりに Or ニューロンを興奮させることで、光や熱といった物理的な刺激のみで記憶を定着させることができるかと期待される (図1)。上記2種類の神経を光及び熱刺激で操作可能にした幼虫を用い、新たな学習パラダイムの開発を行う。

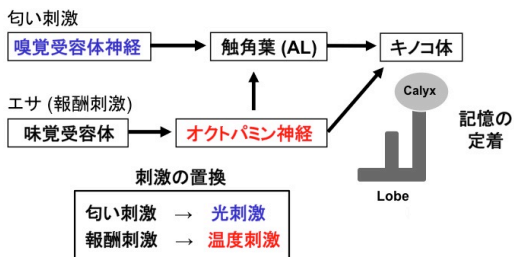


図1: 嗅覚連合学習の神経回路と新たな学習パラダイムの構築

材料・方法

匂い刺激を青色光の刺激に置換するために、Or 遺伝子のプロモーター下で ChR2 を発現させた系統 Or-ChR2 を作成した。Or の種類は、幼虫が学習できる匂いに反応するもの (Or82a, Or42b, Or47a, Or24a) と全ての Or ニューロンで発現するもの (Or83b) を用いた。一方、餌刺激を温度刺激に置換するべく、オクトパミン神経で特異的に発現する TDC2 遺伝子のプロモーター下で dTrpA1 を発現させた系統 TDC2-dTrpA1 を作成した。かけ合わせにより、TDC2-dTrpA1 と Or-ChR2 両方をもつ系統を作成した。3 齢前半 (産卵後 72-76 時間) の幼虫を用い、RI (Response Index) を反応の指標として以下の通り算出した。

$$RI = (N_x - N_y) / (N_x + N_y)$$

N_x : 刺激下 (白色光、青色光、高い温度) にいる幼虫数
 N_y : 非刺激下 (無光、赤色光、低い温度) にいる幼虫数

I. 走光性試験

A. 白色光に対する走光性試験

作成した幼虫が光に対して正常な負の走性を示すか調べた。面積の半分に白色光を当てた実験プレートを用意し、中心に数十匹の幼虫を放ち、3分後にRIを測定し系統間で比較した。

B. 青色光に対する走光性試験

導入したChR2が機能しているか調べた。面積の半分に青色光を、もう半分に赤色光をあてた実験プレートを用意し、中心に数十匹の幼虫を放ち、1分後にRIを測定し系統間で比較した。

II. 温度走性試験

導入したdTrpA1が機能しているか調べた。実験プレートを部分的にホットプレートに乗せ、約22°C~28°Cの温度勾配をつくり、中心に数十匹の幼虫を放ち、3分後にRIを測定し系統間で比較した。

III. 連合学習テスト

TDC2-dTrpA1 と Or-ChR2 両方をもつ幼虫において学習が成立するか解析した。青色光及び熱刺激を同時に経験させ、条件付けをした場合 (trained 群) と、青色光や熱刺激のみを独立に経験させた場合で、経験後の青色光に対する RI を測定した。もし学習が成立すれば、trained 群の方がより青色光による傾向を示す。

結果・考察

I. A. コントロールを含めた全ての系統間で RI 値に有意差はなかった。作成した幼虫は白色光に対して正常な反応を示している。B. 全ての Or-ChR2 をもつ幼虫はコントロールに比べ、有意に青色光の方へよる傾向を示した。この結果から、導入した ChR2 は正常に機能していることが確かめられた (図2a)。

II. 全てのTDC2-dTrpA1をもつ幼虫はコントロールに比べ、有意に高温側へ寄る傾向を示した。この結果から、導入したdTrpA1は正常に機能していることが確かめられた (図2b)。

III. 発表時に示す。今後は、学習が成立した系統に対し、摘出した脳の神経回路をCa²⁺ imagingにより可視化し、顕微鏡下で温度と光で記憶を定着させ、学習に関わる機能的神経回路を解析する。

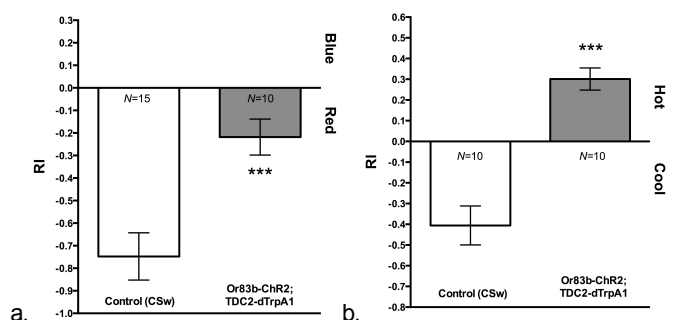


図2: Or-ChR2 と TDC2-dTrpA1 両方をもつ幼虫の RI 値 (N=10~15)
 a. 光走性試験, b. 温度走性試験 (1 試行につき 50~70 匹, P*** < 0.001)