

## 新規カルシウムレポーターCaMPARI を使用したショウジョウバエ報酬神経系の解析

佐藤 智士 (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)

## [ 背景・目的 ]

報酬系はそれ自体が外界からの刺激を判断し、行動を決定する要因である一方で記憶の形成にもかかわり、このメカニズムを解明することは神経科学の重要な課題である。ショウジョウバエは冗長性のない単純な神経系を持ちながら高度な認知能力を持ち、報酬・罰といった無条件刺激(US)を匂いなどの条件刺激(CS)と関連付けて学習する古典的条件付けによる連合学習が可能であり、また優れた遺伝的操作・解析手法を適応することが可能なため、近年、記憶が細胞・回路レベルでどのように形成されているかについて盛んに研究されており、同時に報酬系についても解析されている。

しかしながら従来神経活動の解析に用いられてきた、電気生理学的手法やカルシウムイメージングでは、神経活動を調べる際に個体の行動を制限しなくてはならない事や、シグナルや活動電位が短時間で消失してしまう事、あらかじめターゲットとする神経細胞を絞りこむ必要がある事などによって、広範囲にわたる解析や新たな回路、神経活動の探索が困難である事などといった問題点があった。

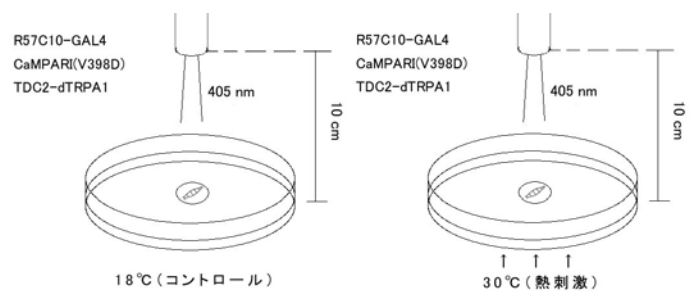
最近この問題を解決するために *Janelia research campus* によって CaMPARI が開発された<sup>[1]</sup>。CaMPARI はイシサングの持つ蛍光タンパク質、EosFP を利用した新規カルシウムレポーターであり、発現後は緑色蛍光タンパクとして機能するが、紫外線を吸光することにより、カルシウム濃度に依存した速度で赤色蛍光を発色する構造へと不可逆的に変化する(Photo conversion, PC)。そのため解析したい自由行動中の個体に UV を照射することにより、CaMPARI は *in vivo* で PC を起こす。この際の緑色から赤色へ蛍光の変化量は UV の照射時間とカルシウム濃度に依存し、これを定量することによって、CaMPARI を発現している細胞内のカルシウム濃度、すなわち活動レベルに対応する値を測定することが出来る。この PC は不可逆的なため、一度に多くの神経細胞の活動を記録し、その後免疫染色といった手法と組み合わせることで細胞種を後から推定することが可能である。この性質により従来の方法では発見することの難しかった神経回路や神経活動を解析することが出来る。

この手法により成虫よりもより冗長性が少なく解析のしやすい幼虫の脳を用いて、報酬系の活動が関与する回路や神経活動を CaMPARI により解析することを目的とし、GAL4-UAS システムによる CaMPARI の特定の細胞集団での発現と、熱感受性イオンチャンネル(dTrpA1)が報酬刺激を伝えるオクトパミン作動性ニューロンで発現するトランスジェニックを用いた熱遺伝学的手法を組み合わせることで解析を行っている。

## [ 材料・方法 ]

まずは CaMPARI が機能していることを確かめ、解析に適した条件を検討するために、オクトパミン作動性ニューロンで dTrpA1 を発現する TDC2-dTrpA1 をもつ系統と、CaMPARI と pan-neuronal ドライバーである R57C10-GAL4 を持つ系統

を掛け合わせることによって、熱刺激により報酬系が活性化し、全神経で CaMPARI を発現する幼虫を用意した。幼虫を一匹ずつコントロールである 18 °C もしくは dTrpA1 が十分に開口する温度である 30 °C のアガープレート上に置き、中枢神経系まで温度を伝えるために 5 分間放置した後、自由運動中の幼虫に 10 cm の高さから UV (405 nm レーザー 100 mW) を 0 秒, 10 秒, 20 秒, 30 秒, 60 秒, 180 秒間照射した。



その後幼虫を解剖、脳のサンプルを作成し共焦点顕微鏡により観察した。

## [ 結果・考察 ]

UV 照射によって PC が起きていることを確認することが出来た。神経活動を異なる条件下で比較するためには、同細胞の個体間での PC 率の比率が重要であると考えられる。

## [ 今後の展望 ]

条件の異なるサンプル間で神経活動に差がある事を正確に確かめるためには画像解析や統計処理を行う必要があるため、今後はサンプル数を増やすとともに、他の GAL4 ドライバーを利用したり、抗体染色を利用したりすることで PC 率に差異のある細胞種を特定していく予定である。また、さらには報酬系だけでなく、嗅覚情報の処理や、嗅覚刺激と報酬刺激による連合学習の際の神経活動の解析を行っていく予定である。

## [ 参考文献 ]

[1] Fosque *et al.* (2015) Labeling of active neural circuits in vivo with designed calcium integrators. *Science* Vol. 347 no. 6223 99. 755-760 DOI: 10.1126/science.1260922