

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14306

研究課題名(和文) ニューロンゲノムの不安定化は記憶の不安定化をひき起こすか

研究課題名(英文) Is genomic instability causally related to memory instability?

研究代表者

山元 大輔 (Yamamoto, Daisuke)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：50318812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Tecファミリーに属する非受容体型チロシンキナーゼであるショウジョウバエのBtk29Aはその変異によってトランスポゾンの転移を促すことが見出されている。トランスポゾンの転移はゲノム不安定化の主要因である。我々はBtk29A変異により雄の求愛記憶に障害がもたらされることを発見していた。このことはゲノム不安定性と記憶不安定性に相互関係があることを支持する。これらの過程におけるBtk29Aの作用機序を明らかとするために、我々はBtk29A変異の表現型を修飾する遺伝子のゲノムワイドスクリーニングを行った。

研究成果の概要(英文)：The Tec family non-receptor-type tyrosine kinase Btk29A in *Drosophila* was found to induce transposon mobilization when mutated. Transposon mobilization is a major mechanism to induce genomic instability. We discovered that the Btk29A mutation also induces a deficit in courtship memory in male flies. This supports the notion that genomic instability and memory instability are related to each other. To obtain insights into the mechanism of action of Btk29A in these processes, we are conducting genome wide screens for phenotypic modifiers of Btk29A mutants.

研究分野：総合生物

キーワード：Btkチロシンキナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

Transposon の転移抑制は生殖細胞維持に必須である。その主役は、Argonaute タンパク質の Piwi とそれに結合する多数の microRNA、piRNA であり、卵巣の体細胞ではクロマチン制御を介し、また生殖細胞では transposon 由来 RNA の分解によって transposon の活動を抑止する。最近になり、*Aplysia* では Piwi/piRNA がシナプス可塑性に関与すると報告された。ヒトの神経細胞のゲノムで transposon の転移が起きることは既に知られており、加齢や疾病によるその増加がゲノム損傷を介して認知機能の変化を齎す可能性が指摘されてきた。またアルツハイマーの病因として、クロマチン制御の異常の関与も疑われている。一方 *Drosophila* において、加齢に伴い脳の記憶の座、キノコ体で transposon 転移が上昇し、ゲノムの機能的遺伝子に損傷が生ずると共に、徐々にニューロンが失われてゆくことがごく最近見出された。しかし、学習・記憶に対するその影響についての報告はない。申請者は、性行動異常変異体として自ら分離した *lingerer* (*lig*) 変異体の解析の過程で、既に長期記憶障害を引き起こすことの知られている *orb2* 変異と *lig* 変異とが相互作用し、前者による求愛条件付けの異常を後者が回復させることを見出した。また、*lig* と共に性行動異常突然変異体として分離した *fickle* は *Btk29A* 遺伝子座の変異であり、*Btk29A* の欠損が *piwi* の転写低下を起こす可能性が支援された。そこで *lig* 及び *Btk29A* 変異体で transposon のレポーターの活性を調べたところ、その活性が著明に増大していることを発見し、本提案の着想につながった。

## 2. 研究の目的

記憶する“能力”には個人差があり、また加齢や疾患、各種環境条件によって変化する。そこに関与する要因と作用機構の解明によって、記憶の改善に寄与することを目指す。加齢に伴って transposon 転移の確率は高まり、ゲノムの不安定性は増すと考えられる。また、クロマチン因子の異常が、アルツハイマー病発症に関わるとの示唆もあり、ゲノム安定性と記憶の正常な保持とが因果関係を持つとの仮説を立てた。そこで、遺伝子から行動までを統合的に解析可能な *Drosophila* を用いてこの仮説の検証を行うのが、本申請の目的である。長期記憶の障害を示す突然変異体の表現型を優性に抑圧する *lingerer* 変異や生殖細胞の過剰誘導を起こす *fickle* 変異の原因遺伝子産物が、トランスポゾン転移の制御に関与するとの予備的知見を突破口として、ゲノムと記憶をつなぐ隠れた因果の糸を解き明かす。

## 3. 研究の方法

ゲノム安定性と記憶の健全性との間の因果関係を検討するため、*fickle* 変異の記憶保持に対する効果並びに transposon 転写活性と転移頻度に対する効果を分析する。さらに、*Btk29A* の下流因子を探索するため、全ゲノム欠失スクリーニングにより表現型を修飾する領域を同定する。

## 4. 研究成果

(1) ゲノム不安定化の主要因と目されているトランスポゾンの転移が *Btk29A*<sup>[*fickle*]</sup> ホモ接合体に於いて上昇している可能性を、組織レベルでは *gypsy-lacZ* 形質転換バエのレポーター発現により検討し、また分子レベルでは ZAM, DM412, mdg1 トランスポゾンの転写物を RT-PCR によって測定することによって検討した。その結果、いずれも *Btk29A*<sup>[*fickle*]</sup> ホモ接合体に於いて有意に上昇しており、ゲノムの不安定化が確かめられた。一方で雄個体を用いて求愛記憶アッセイを行い、*Btk29A*<sup>[*fickle*]</sup> ホモ接合体で短期記憶が障害される反面、長期記憶は正常であるとの結果が得られた。

(2) ゲノム不安定化の第一の要因はトランスポゾンの転移であり、その抑制機構の要にあるのが Piwi タンパク質と piRNA の複合体である。我々は、Tec ファミリーに属する非受容体型チロシンキナーゼ、*Btk29A* が Piwi の発現制御を介してこの系の調節に関わることを見出し、さらに *Btk29A* の変異によって記憶障害が起こることを発見した。この *Btk29A* の作用機構を解明するため、*Btk29A* の下流で働く因子群を同定することを目指した。その戦術は、ゲノムワイドの表現型スクリーニングである。まず、*Btk29A* の常時活性型変異を設計して個体に発現させるトランスジーン、pUASp2-*Btk29A*-11 (E639G) を構築した。それを複数の GAL4 系統と交配して発現させた結果、優性表現型として不妊形質が生じた。この不妊表現型を優性に抑圧する欠失をゲノムワイドでスクリーニングし、約 10 の染色体欠失を同定した。*Btk29A* の下流因子をコードする遺伝子群を含む染色体領域の特定に至ったことから、今後、その実体解明を行うための基盤が確立できた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Higuchi, T., Kohatsu, S., Yamamoto, D. (2017) Quantitative analysis of visually induced courtship elements in *Drosophila subobscura*. J.

- Neurogenet. 31, 49-57. DOI: 10.1080/01677063.2017.129061 査読あり
2. Yilmazer, Y. B., Koganezawa, M., Sato, K., Xu, J., Yamamoto, D. (2016). Serotonergic neuronal death and concomitant serotonin deficiency curb copulation ability of *Drosophila* platonic mutants. Nat. Commun. 7, 13792. DOI: 10.1038/ncomms13792. (国際共著、オープンアクセス) 査読あり
  3. Ote, M., Ueyama, M., Yamamoto, D. (2016). *Wolbachia* protein TomO targets *nanos* mRNA and restores germ stem cells in *Drosophila Sex-lethal* mutants. Curr. Biol. 26, 2223-2232. PMID: 27498563 DOI: 10.1016/j.cub.2016.06.054 査読あり
  4. Ito, H., Sato, K., Kondo, S., Yamamoto, D. (2016) Fruitless represses *robo1* transcription to shape male-specific neural morphology and behavior in *Drosophila*. Curr. Biol. 26, 1532-1542. PMID: 27265393 DOI: 10.1016/j.cub.2016.04.067 査読あり
  5. Koganezawa, M., Kimura, K-i., Yamamoto, D. (2016) The neural circuitry that functions as a switch for courtship versus aggression in *Drosophila* males. Curr. Biol. 26, 1395-1403. PMID: 27185554 DOI: 10.1016/j.cub.2016.04.017 査読あり
  6. Tanaka, R., Murakami, H., Ote, M. Yamamoto, D. (2016) Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-mediated mutagenesis and phenotype rescue by *piggyBac* transgenesis in a nonmodel *Drosophila* species. Insect Mol. Biol. 25, 355-361. DOI: 10.1111/imb.12232. 査読あり
  7. Sunouchi, K. Koganezawa, M. and Yamamoto, D. (2016) Requirement of the Tec family tyrosine kinase Btk29A for courtship memory in *Drosophila* males. Arch. Insect Biochem. Physiol. 91, 165-174. DOI: 10.1002/arch.21316 査読あり
- 〔学会発表〕(計 16 件)
1. Hara, H., Ojima, N., Yaoita, S., Ito, H., Yamamoto, D. Brain insulin cells sense cold via Gustatory Receptor 28b for the control of diapause in *Drosophila*. 58th Annual Drosophila Research Conference. Town & Country Resort & Convention Center, San Diego, USA. 2017.3.29-4.2.
  2. Yamamoto, D. Brains insulin cells and the control of diapause. Invertebrate Neuropeptide Conference 2017. The Patios de Cafayate Hotel, Cafayate, Argentina. 2017. 2.17-3.3.
  3. 山元大輔. Nature vs. nurture in fly courtship. Foreign Expert Project Seminar at Plant Protection Research Institute, Guangzhou, China. 広東省農業科学院・植物保護研究所, 中国. 2016.11.14-12.2.
  4. Koganezawa, M., Yamamoto, D. Sexually dimorphic neural circuitry that functions as a switch for courtship versus aggression in *Drosophila*. The 22<sup>nd</sup> International Congress of Zoology. The 87<sup>th</sup> meeting of Zoological Society of Japan. (Joint events). 沖縄科学技術大学院大学, 沖縄. 2016.11.14-19.
  5. 田中良弥, 村上日向, 佐藤耕世, 山元大輔. ショウジョウバエにおける求愛行動の種特異性を生み出す神経基盤の探索. 行動遺伝学研究会. 国立遺伝学研究所, 静岡. 2016.10.13-14.
  6. 山元大輔. ショウジョウバエ *fruitless* 変異体の雄同士の求愛と遺伝子-環境相互作用. 行動遺伝学研究会. 国立遺伝学研究所, 静岡. 2016.10.13-14.
  7. Tanaka, R., Murakami, H., Sato, K., Yamamoto, D. Phenotypic analysis of a *fruitless* mutant and CRISPR-mediated transgenesis in *D. subobscura*. 第12回日本ショウジョウバエ研究会. 立教大学, 東京. 2016.9.9-11.
  8. 村上日向, 田中良弥, 樋口智大, 伊藤弘樹, 佐藤耕世, 山元大輔. *Drosophila subobscura*に特異的な性行動解析のための体細胞モザイクシステムの作成. 日本遺伝学会第88回大会. 日本大学国際関係学部北口校舎, 静岡. 2016.9.7-9.
  9. Koganezawa, M., Yamamoto, D. Central brain neurons controlling courtship and aggression in *Drosophila melanogaster*. 第38回日本比較生理生化学学会. 玉川大学, 東京. 2016.9.2-4.
  10. 田中良弥, 村上日向, 佐藤耕世, 山元大輔. *Drosophila subobscura*における *fruitless* 変異体の作製と遺伝学的ツールの適用～行動の種間差を生み出す神経基盤を探る. 日本進化学会第18回大会. 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京. 2016.8.25-28.
  11. Nakamura, Y., Ito, H., Yamamoto, D. Identification of the *fruitless* gene cis element that induces male-specific muscle in *Drosophila*. 第39回日本神経科学大会. パシフィコ横浜, 神奈川. 2016.7.24-29.

12. Yamamoto, D. The circuit mechanism for courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. 第8回アジアオセアニア比較内分泌学会議. 高麗大学校医科大学. 韓国. 2016. 6. 20-24

〔図書〕(計 1 件)

1. Yamamoto, D. (2016) Male fruit fly 's courtship and its double control by the *fruitless* and *doublesex* genes. In: *Animal Models of Behavior Genetics*. Gewirtz, J. C. and Kim, Y-K. Eds., pp. 3-33. Springer: New York.

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/yamamoto\\_lab/](http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/yamamoto_lab/)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

山元 大輔 (YAMAMOTO, Daisuke)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：50318812

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )