

平成21年 5月27日現在

研究種目:基盤研究(B)

研究期間:2007~2008

課題番号:19300137

研究課題名(和文)加齢性記憶障害抑制変異体 DC0/+を用いた脳老化分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Genetic dissection of age-related memory impairment

研究代表者

齊藤 実 (Saitoe, Minoru)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員

研究者番号:50261839

研究成果の概要:

加齢による学習記憶力の低下(加齢性記憶障害)は脳老化の重要な表現型である。我々は世界で初めてとなる加齢性記憶障害の特異的な抑制変異体 DC0/+を単離し、PKA 活性が加齢性記憶障害を発生させることを明らかにした。本研究では加齢性記憶障害と関連するタンパクの動態をプロテオミクス解析により調べた。その結果、Pyruvate Carboxylase (PCx)に高いホモロジーを持つCG1516によりコードされるタンパクの発現動態とリン酸化動態に加齢性記憶障害との高い相関を見出した。CG1516 の機能欠失型変異体を用いて加齢性記憶障害を調べたところ、顕著な加齢性記憶障害の抑制がみられた。さらに PKA の過剰発現による加齢性記憶障害様の記憶障害が、CG1516 の機能欠失型変異体ではみられなかった。以上の結果から、加齢に伴う PKA 依存性の PCx の活性上昇が加齢性記憶障害の原因であることが示唆された。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総 計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野:総合領域

科研費の分科・細目:神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード:老化、学習記憶、遺伝子、ショウジョウバエ、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

加齢性記憶障害はショウジョウバエにもみられる脳老化の重要な表現型であり、生物学的観点だけでなく、高齢化社会の対策からもその発生メカニズムの解明が期待されている。分子メカニズムを解明するには変異体の同定とそれを用いた遺伝学的解析が有効であるが、従来の哺乳類モデルでは長い寿命が障害となり、効率的な解析が困難である。我々は世界で初めとなる加齢性記憶障害の特異的な(寿命が延長していない)抑制変異体 DC0/+ を同定した。DC0 は PKA の触媒部位をコードしており、DC0-PKA は学習記憶に必須のリン酸化タンパクである。DC0-PKA 活性が 20% 以下に低下すると顕著な記憶障害が起こるが、DC0/+ では PKA 活性が野生型の約 50% である。一方、DC0/+ では加齢性記憶障害が抑制されるにも関わらず、加齢に伴う DC0-PKA の活性は加齢による上昇は見られなかった。以上のことから加齢により発現が上昇し、PKA によりリン酸化されることで記憶障害を起こすタンパクの存在が想定された。

2. 研究の目的

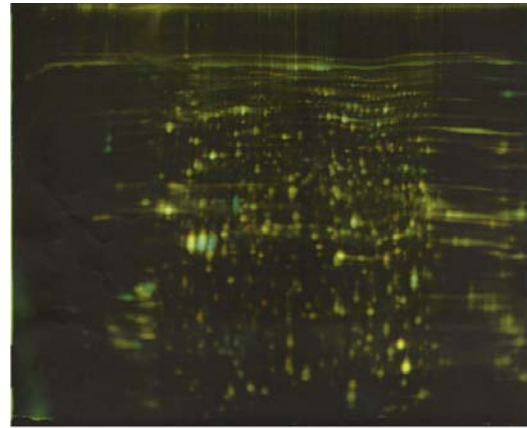
先の研究から、DC0-PKA 活性が加齢により上昇するのではないこと、加齢により発現が上昇し、PKA 依存性にリン酸化が亢進することで加齢性記憶障害を起こすタンパクが存在することが示唆された。そこでこのようなタンパクを見出すことを目的として、加齢に伴うリン酸化タンパクの動態変化を野生型と DC0/+ とで比較した。

3. 研究の方法

プロテオミクス解析

2 サンプル間でのタンパクの定量的解析は、蛍光プローブ付加型プロテオミクスイメー

ジング解析法(EttanDige)に沿って行った。即ち各サンプル由来のタンパクを別々の蛍光プローブで標識し、2 次元電気泳動後の泳動像からイメージング解析により発現の差異を検出した(下図)。



加齢に伴う脳タンパクの発現変動
若齢脳から抽出したタンパク(緑蛍光)と加齢脳から抽出したタンパク(赤蛍光)を同一ゲル上で2次元泳動し発現量を比較する。若齢期に発現量が多いタンパクは緑傾向のスポットとして、老齢期に発現量が増加するタンパクは赤傾向のスポットとなる。発現変動が起きないタンパクは黄色スポットとなる。

この手法により、加齢に伴うタンパク動態の比較を野生型と DC0/+ で行った。

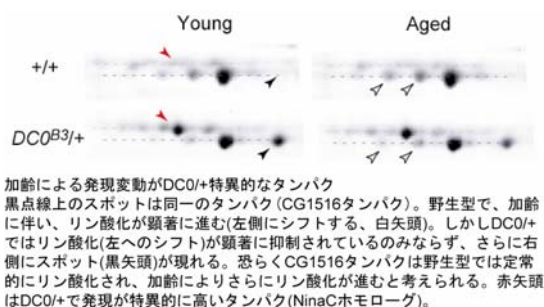
行動解析

匂いと電気ショックを組み合わせた匂い条件付け連合学習課題を用いて記憶力の定量的解析を行った。具体的にはティーチングマシーンという学習装置で、約 100 匹のハエに 2 種類の匂いのうち一つを電気ショックと共に 1 分間与え、他方の匂いはショックなしで矢張り 1 分間与える。記憶テストではどちらがショックと連合していたか弁別させ、正解したハエの比率から記憶スコアを算出した。

4. 研究成果

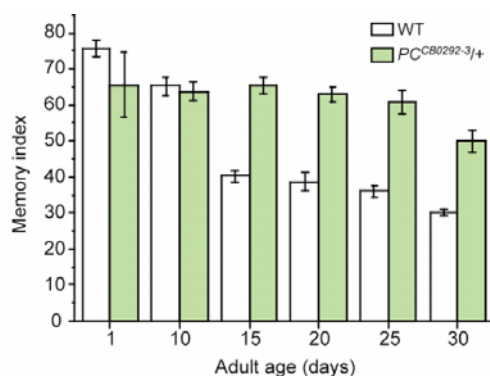
2 次元電気泳動とイメージング解析により、加齢に伴うリン酸化タンパクの動態比較を加齢性記憶障害が正常に起こる野生型と、抑制される DC0/+ で行った。その結果、加齢性

記憶障害の発現に伴い発現が上昇し、且つリン酸化に伴うと思われるスポットシフトが亢進するタンパクを見出した(下図)。



そこでこれらスポットを採取して質量分析によりタンパクの同定を行った。質量分析の結果、これらスポットはピルビン酸カルボキシラーゼ(PCx)遺伝子と高い相同性を持つCG1516にコードされるタンパクであることが分かった。

プロテオミクス解析の結果から、CG1516タンパクの加齢に伴う発現上昇と、リン酸化亢進が加齢性記憶障害に強い相関を持つことが分かったので、CG1516が加齢性記憶障害と因果関係を持つか、CG1516の変異体で匂い条件付け連合学習課題により、加齢性記憶障害の解析を行った。



CG1516変異による加齢性記憶障害(AMI)の抑制
野生型(WT)では15日齢から顕著な記憶スコアの低下がみられるが、CG1516の変異体PC[CB80292-3]/+では30日齢になるまで顕著な記憶スコアの低下が起こらない。

その結果上図に示すように、野生型では15日齢から顕著に現れる記憶スコアの低下が、CG1516のヘテロ変異体では30日齢になるまで現れなかった。加えて、このヘテロ変異

体では寿命の延長は見られなかった。このことはヘテロ変異体での加齢性記憶障害の抑制は、寿命の延長(個体老化の抑制)によるものでないことを示している。一方、DC0-PKAを過剰発現させると加齢性記憶障害と良く似た記憶障害が現れる。しかし、CG1516のヘテロ変異体では、DC0-PKAを過剰発現しても記憶障害が起こらなかった。以上の結果から、PCxに高い相同性を持つCG1516が加齢により発現増加し、且つPKA依存性にリン酸化が亢進することで活性が上昇すること、その結果、加齢性記憶障害を引き起こすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](6件)

- ① Matsuno M, Horiuchi J, Tully T, Saitoe M. The *Drosophila* CAM Klingleon is required for long-term memory formation and is regulated by Notch. **Proc Natl Acad Sci USA** **106**, 310-315 (2009). 査読有
- ② Horiuchi J, Yamazaki D, Naganos S, Aigaki T, Saitoe M. PKA inhibits a consolidated form of memory in *Drosophila*. **Proc Natl Acad Sci USA** **105**, 20976-20981 (2008). 査読有
- ③ Yamazaki D, Saitoe M. (2008). cAMP/PKA signaling underlies age-related memory impairment. **Brain Nerve** **60**, 717-724. 査読無
- ④ Qi ML, Tagawa K, Enokido Y, Yoshimura N, Wada YI, Watase K, Ishiura SI, Kanazawa I, Botas J, Saitoe M, Wanker EE, Okazawa H. Proteome analysis of soluble nuclear proteins reveals that HMGB1/2 suppress genotoxic stress in polyglutamine diseases. **Nat Cell Biol** **9**, 402-414 (2007). 査読有

- ⑤ Yamazaki D, Horiuchi J, Nakagami Y, Nagano S, Tamura T, Saitoe M. The *Drosophila* DC0 mutation suppresses age-related memory impairment without affecting lifespan. **Nat Neurosci** **10**, 478-484 (2007). 査読有
- ⑥ 齊藤 実 学習記憶を担う生化学的情報伝達系のショウジョウバエによる解析 **細胞工学** **27**, 1118-1124 (2008). 査読無

〔学会発表〕（計 13 件）

- ① Yamazaki D, Saitoe M. Pyruvate Carboxylase, a downstream candidate for cAMP/PKA signaling pathway that regulates age-related memory impairment in *Drosophila*. 11th Meeting of Hirosaki International Forum of Medical Science (Hirosaki 2009.3.27)
- ② 齊藤 実 cAMP/PKA signaling pathway that regulates age-related memory impairment in *Drosophila*. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 シンポジウム「老化と代謝」（神戸 2008.12.9）
- ③ 栗山祐二、宮下知之、堀内純二郎、上野耕平、齊藤 実 酸化ストレスの記憶に与える影響 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会（神戸 2008.12.11）
- ④ 堀内純二郎、山崎大介、長野慎太郎、相垣敏郎、齊藤 実 (2008) Improving memory in *Drosophila* by decreasing PKA activity. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会（神戸 2008.12.11）
- ⑤ 吉野木綿子、齊藤 実 Identification of a *Drosophila* mutant that shows accelerated memory loss upon aging. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会（神戸 2008.12.11）
- ⑥ 長野慎太郎、齊藤 実 chico, a *Drosophila* insulin receptor substrate homolog, is required for olfactory learning. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会（神戸 2008.12.11）
- ⑦ 山崎大介、齊藤 実 (2008) ショウジョウバエの加齢性記憶障害に関連する新規因子の同定と解析 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会（神戸 2008.12.11）
- ⑧ Miyashita T, Horiuchi J, Saitoe M. (2008). Functional significance of Mg^{2+} block in associative learning and memory. in *Learning and Memory: A Synthesis of Flies and Honeybees* Janelia Farm HHMI Conference. (Janelia Farm Research Campus, VA, USA) (2008.11.12)
- ⑨ 山崎大介、中神泰子、齊藤 実 cAMP/PKA activity at old aged is a causal factor for age-related memory impairment in *Drosophila*. 第 85 回日本生理学会（東京 2008.3.25）
- ⑩ 齊藤 実 加齢性記憶障害を指標とした脳老化抑制機構の解明 第 7 回日本抗加齢医学会総会 ワークショップ「メラトニンー骨と脳への作用ー」（京都 2007.7.20）.
- ⑪ 松野元美、Tim Tully、齊藤 実 ショウジョウバエ細胞接着因子Klingleonは長期記憶形成に必要であり、Notchシグナリング活性により制御されている 第 30 回日本神経科学学会大会（横浜 2007.9.10）

⑫ 長野慎太郎、齊藤 実 ショウジョウバエchico変異体による学習不全と加齢性記憶障害の抑制 第 30 回日本神経科学大会 (横浜 2007.9.10)

⑬ 堀内純二郎、山崎大介、齊藤 実 Improvement of memory in Drosophila by specific point mutation in PKA 第 30 回日本神経科学大会 (横浜 2007.9.11)

〔図書〕(計 1 件)

Horiuchi J, Saitoe M. Modeling cognitive and neurodegenerative disorders in *Drosophila melanogaster*. In **Sourcebook of model organisms in biomedical research** (2008). (Ed. by Michel Conn). Humana Press. pp121-128.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称 加齢性記憶障害マーカーとしてのリン酸化ピルビン酸カルボキシラーゼ

発明者 齊藤実、山崎大介

権利者 財団法人 東京都医学研究機構

種類 特許

番号 特願 2009-112761

出願年月日 平成 21 年 5 月 7 日

〔その他〕

HP:

<http://www.tmin.ac.jp/research/project/a/a03.html>

報道関連:

物忘れ仕組み解明期待 読売新聞(多摩版)
2009.2.18

6. 研究組織

(1)研究代表者

齊藤 実 (Saitoe, Minoru)

(財)東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員
研究者番号: 50261839

(2)研究分担者

宮下知之 (Miyashita, Tomoyuki)

(財)東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
研究者番号: 70270668

堀内純二郎 (Horiuchi, Junjiro)

首都大学東京大学院・理工学研究科・准教授
研究者番号: 80392364