

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21700425

研究課題名(和文) 長期記憶形成における神経・グリア相互作用の分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of neuron-glia interaction in long-term memory formation

研究代表者 松野 元美 (MATSUNO MOTOMI)

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・研究員

研究者番号：90392365

## 研究成果の概要(和文)：

近年、グリア細胞が神経細胞との相互作用を通してシナプス形成や可塑性に関与していることが示唆されている。しかし、グリア細胞が長期記憶にどのように関与しているのかについてはよくわかっていない。私達は以前、ショウジョウバエのホモフィリック細胞接着因子Klgingon (Klg) がトレーニング依存的に増加することが長期記憶形成に必要であることを見いだしている。本研究ではKlgの機能解析を通して長期記憶形成における神経・グリア相互作用の機能解明を目標とした。Klgは神経とグリア両細胞で発現しており、Klgを介した神経・グリア相互作用のトレーニング依存的な増加は、長期記憶形成に必要であった。さらに私達はKlgを介した神経・グリア相互作用は長期記憶形成に必要なグリアの遺伝子発現を調節することを見いだした。

## 研究成果の概要(英文)：

Recent studies suggest that glia are implicated in synapse formation and plasticity through neuron-glia interaction. However, how they contribute to the long-lasting memory is not clear. Previously we found that training-dependent increase in *Drosophila* Klgingon (Klg), a homophilic cell adhesion molecule, is required for long-term memory (LTM) formation. In this study we purposed to elucidate the function of neuron-glia interaction in LTM formation through the functional analysis of Klg. Klg protein was expressed in both neurons and glia, and a training-dependent increase in neuron-glia interactions mediated by Klg was required to form LTM. Furthermore, we identified that neuron-glia interactions via Klg modulate glial-gene expression required for LTM formation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：グリア細胞

## 科学研究費補助金研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

近年、グリア細胞が神経細胞との相互作用を介して神経・シナプスの形態的・機能的可塑性の発現に積極的に関与することが明らかとなってきた。特に発生期だけでなく、成熟後もグリアがシナプスの局所的な修正や微調整を適宜おこなっているということが明らかとなり、学習記憶など脳高次機能の解明にも神経回路だけでなく、神経・グリア回路という、より包括的なレベルでの解析が必要となってきた。しかし、どのような分子を介した神経・グリア間の相互作用が、学習記憶などの高次機能にどのように関わっているのか *in vivo* で調べた例はまだ少ない。

近年私達はショウジョウバエ学習記憶変異体の網羅的検索から、長期記憶変異体 *ruslan (rus)* を単離し、*rus* が IgG スーパーファミリーの細胞接着因子 *Klingon (klg)* の変異体のひとつであることを見いだした。成虫脳の *neuropil* は *neuropil-glia* と接しているが、私達は抗 *Klg* 抗体を作成して免疫組織染色を行い、*Klg* が *neuropil* と *neuropil-glia* の接合部に局在していること、*Klg* タンパクは長期記憶学習後、時間経過とともに長期記憶形成シグナルのひとつである *Notch* 依存的に増加することを生化学的手法により見いだした。私達の結果は、長期記憶学習後、新たに合成された *Klg* が神経・グリア相互作用を仲介することにより、長期記憶形成に寄与することを示唆している。本研究では細胞接着因子 *Klg* の機能解析を中心として長期記憶形成に関わる神経・グリア相互作用の実体を *in vivo* で明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

長期記憶形成における神経・グリア相互作用の機能について明らかにすることを目的とする。以前私達は *Klg* タンパクが神経・グリア接合部に存在すること、*Klg* タンパクが長期記憶学習後、時間経過とともに *Notch* シグナル依存的に増加することを生化学的手法により見いだした。しかし、増加した *Klg* タンパクが細胞表面でどのような相互作用を行うことで長期記憶形成に寄与しているのか不明である。そこで本研究では以下のことについて明確にする。

- (1) 細胞接着因子 *Klg* は神経・グリア接合部に存在することが観察されているが、長期記憶形成時に神経/グリアのどちらで必要なのか？ (*Klg* の脳内の局在の詳細)
- (2) 長期記憶学習後、細胞接着因子 *Klg* を介した神経・グリア相互作用は脳内のどこで特に必要なのか？ (長期記憶学習後

の脳内の局在と量変化を経時観察する)

- (3) 長期記憶学習後、*Klg* はどのような分子と相互作用を行い、長期記憶形成に寄与しているのか？

## 3. 研究の方法

長期記憶形成時における神経・グリア相互作用の役割について細胞接着因子 *Klg* の機能解析を中心に研究を進めた。

- (1) *Klg* が脳内の神経細胞、グリア細胞のどちらに局在しているか？成虫脳初代培養細胞を用いた免疫組織染色法により明らかにした。また *klg RNAi* を神経細胞またはグリア細胞に発現し、*klg* の発現を細胞種特異的に抑制することで、長期記憶形成時に *klg* はどちらの細胞で必要なか？行動遺伝学的手法により明らかにした。
- (2) 長期記憶学習させた個体の脳を固定し、免疫組織染色法により長期記憶学習後の *Klg* の脳内局在・量変化を観察した。また長期記憶学習後の *Klg* のタンパク量の増加とシナプスマーカーの量変化の相関について同じく免疫組織染色法を使って調べることで、*Klg* がいつ必要であるか、シナプス形成に必要なのか、それとも形成されたシナプスの維持に必要なのか確認する。
- (3) 当初は *Klg* と直接相互作用する分子の探索を行う予定であったが、*Klg* が細胞内領域を持たない分子であり、技術的な困難が認められたため、*klg* 遺伝子の下流分子の探索に変更した。免疫組織染色法を用い、*klg* 変異体で発現が減少しているものを既知遺伝子の中から探索・同定し、その遺伝子の変異体の長期記憶及び、長期記憶学習後の発現変化を生化学的手法により観察した。

## 4. 研究成果

- (1) *Klg* タンパクは神経細胞及びグリア細胞をレポーター遺伝子によりそれぞれ判別可能にした細胞において、どちらの細胞のレポーターとも共存していた (図1)。更に神経細胞又はグリア細胞

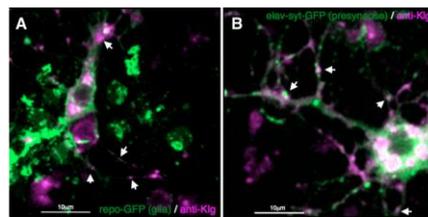


図1 ショウジョウバエ成虫脳初代培養細胞における *Klg* の局在  
 A) グリア細胞は GFP (緑色) でマークされている (*repo-GAL4*; *UASmCD8GFP*)。 *Klg* (マゼンタ) は突起を出すようなグリア細胞に局在していた。矢印はグリアの突起。  
 B) 神経細胞のプレシナプスが GFP (緑色) でマークされている (*elav-GAL4*; *UAS-syt-GFP*)。 *Klg* (マゼンタ) は一部の神経細胞のシナプス部位に局在していた (矢印)。

で klg の発現を落とすと、いずれの場合も長期記憶形成が特異的に障害されることを示した (図2)。私達は以前、Klg タンパクが長期記憶学習後、時間経過と共に増加することを見いだしている。また、Klg はホモフィリックに結合する細胞接着因子である。これらの結果は klg が神経とグリア両細胞で発現しており、長期記憶学習後、新たに合成された Klg が神経・グリア相互作用を仲介することにより、長期記憶形成に寄与することを示唆している。

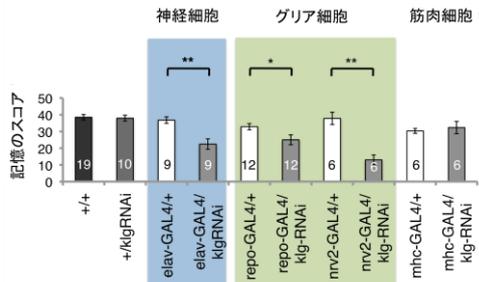


図2 klg の発現をRNAiを用いて神経細胞またはグリア細胞で抑制するとどちらにおいても長期記憶が障害された(薄い灰色のバー)。一方、klg の発現を筋肉細胞で抑制しても長期記憶は障害されなかった。klg の抑制にはGAL4/UASシステムを用い、klg RNAiはelav(神経)、repoまたはnr2(グリア)、mhc(筋肉)のGAL4で誘導を行った。

- (2) Klg は長期記憶学習後 24 時間までに脳全体でタンパク量が増加することを示した。この結果は Klg がショウジョウバエの記憶形成に必要なキノコ体のみならず、脳内の様々な部位で神経・グリア相互作用を制御すること、そしてそれにより長期記憶形成に貢献していることを示唆している。長期記憶学習後の Klg の量変化とシナプス形成の関係については期間内に結論できなかった為、これは今後の課題である。

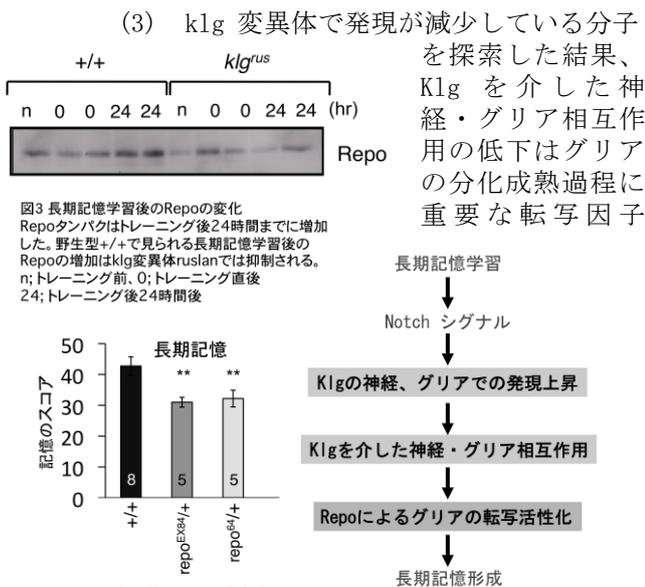


図3 長期記憶学習後のRepoの変化  
Repoタンパクはトレーニング後24時間までに増加した。野生型+/+で見られる長期記憶学習後のRepoの増加はklg変異体ruslanでは抑制される。n; トレーニング前、0; トレーニング直後、24; トレーニング後24時間後

図4 repo変異体のヘテロ接合体は長期記憶特異的な障害を示す。

を探索した結果、Klg を介した神経・グリア相互作用の低下はグリアの分化成熟過程に重要な転写因子

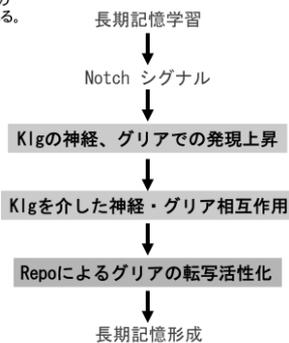


図5 細胞接着因子Klgを介した神経・グリア相互作用の結果生じる、Repo依存的なグリア転写活性化と長期記憶形成

Repo の発現低下を引き起こすことを組織染色法及び生化学的手法により見いだした (図3)。次にKlg を介した細胞接着性と長期記憶形成の関係を理解する為の手がかりとして、長期記憶学習後の Repo の量変化を調べ、Repo タンパクが長期記憶トレーニング後特異的に増加することを示した (図3)。さらに klg 変異体、または神経とグリア各細胞で klg の発現を落としたノックダウン個体を用いた実験により、この長期記憶学習後の Repo タンパクの増加は Klg を介した神経・グリア相互作用依存であることを示唆するデータを得た (図3)。また Repo 変異体が長期記憶形成を特異的に障害していることも同時に示した (図4)。このことから、1) 長期記憶形成には神経細胞での新たな遺伝子発現だけではなく、グリア細胞での新たな Repo 依存性の遺伝子発現も必要なこと、2) この Repo 依存性の遺伝子発現には Klg を介した神経・グリア相互作用が重要な働きを担っていることが示唆された (図5)。

## 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1件)

松野元美、齊藤実 “学習・記憶と分子マーカー” *Clinical Neuroscience*, vol 28 (12), 1375-1379 (2010) 査読無し

[学会発表] (計3件)

①. 松野元美、齊藤実 “Neuron-glia interaction via *Drosophila* CAM Klinton modulates glial transcription required for long-term memory formation” 第33回 日本分子生物学会、神戸コンベンションセンター、平成22年12月

②. Motomi Matsuno、Junjiro Horiuchi、Tim Tully、Minoru Saitoe “The *Drosophila* CAM Klinton is required for memory consolidation via neuron-glia interaction” 第32回 日本分子生物学会、シンポジウム、パシフィコ横浜、平成21年12月

③. 松野元美、堀内純二郎、Tim Tully、齊藤実 “The *Drosophila* CAM Klinton is required for Notch-dependent long-term memory formation” 第32回 日本神経科学会、名古屋国際会議場、平成21年9月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松野 元美 (MOTOMI MATSUNO)

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・研究員

研究者番号：90392365

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし