

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370002

研究課題名(和文) 記憶の忘却を制御する分子・神経回路メカニズムの遺伝学的解析

研究課題名(英文) Genetic analyses of the molecular and neuronal mechanisms for the regulation of forgetting

研究代表者

石原 健 (Ishihara, Takeshi)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10249948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円、(間接経費) 4,140,000円

研究成果の概要(和文)：動物は、経験に依存して様々な行動を変化させることによって、環境に適応している。このような行動可塑性は、適切な時間だけ保持されることが、生存にとって重要であるが、記憶を忘却する分子・神経回路メカニズムはほとんど明らかになっていない。私達は、線虫*C. elegans*の嗅覚順応を主なモデルとして、忘却のメカニズムの解析を行った。その結果、忘却は、記憶を形成する前後の環境によって制御されていること、記憶を忘れさせる細胞があり、その細胞から忘却促進シグナルが分泌されることによって、記憶を保持している神経細胞の応答を変化させていること等を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Animals show a variety of behavioral plasticity, in which animals change their behavior dependent on their environments. Those behavioral plasticity must be sustained for an appropriate time to survive. However, the neuronal and molecular mechanisms of forgetting of memories are poorly understood. Therefore, we studied on the forgetting of olfactory adaptation in *C. elegans* as a model for the behavioral plasticity. We found that the forgetting of the olfactory adaptation is actively regulated by the environmental conditions before and after conditioning. In addition, we identified a pair of neurons that secrete signals for the forgetting of the olfactory adaption in other sensory neurons. These results suggested that the forgetting is actively regulated by the neuronal communications.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：行動遺伝 線虫 記憶 カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

動物は、外界や体内から様々な情報を受容し中枢神経系において適切に情報処理したのち、行動や体内環境の制御などとして出力している。動物が環境に適応して生存したり子孫を残したりするためには、このような情報処理が適切に行われることが重要である。

本研究では、情報処理の一つである学習に関わる現象のうち、これまでほとんど解析が進んでいない記憶の忘却のメカニズムに焦点を絞って研究を進める。これまで学習や記憶に関する研究が盛んに行われているが、その多くは記憶の形成や固定化に関する研究である。一方、刻々と変化する環境に適応するためには、記憶の形成だけでなく記憶の保持時間も適切に制御される必要がある。これまで、「記憶の忘却」に関しては、マウスにおいてホスファターゼ阻害タンパク質の発現によるホスファターゼの関与を示す研究や、ショウジョウバエにおける Rac の関与などが知られているだけであり、そのメカニズムはほとんど不明であった。

線虫は、様々な行動可塑性を示すことが知られており、慣れのような単純な学習だけではなく、塩と飢餓や匂い物質と餌による条件付けによって連合学習も示す。このような学習の多くにおいて、変化した行動は長くても数時間以内に学習前の行動に戻ることから、短期記憶が形成されたと考えられる。我々は、これまでに忘却に関わる研究がほとんど存在しないことから、線虫をモデルとした順遺伝学的手法を用いて未知の分子を同定する手法が有効であると考へた。本研究を開始するまでに、記憶を忘れにくい変異体をスクリーニングにより同定し、その原因遺伝子 *tir-1* の決定と、働く細胞を同定していた。

2. 研究の目的

本研究においては、それまでの研究をさらに発展させ、記憶の忘却に関わる制御機構を明らかにすることを目的として研究を進めることとした。

(1) 神経活動のイメージングなどによって忘却を制御する神経回路の働きを明らかにする。

(2) 本研究では、記憶の忘却を制御する TIR-1 が担う役割を明らかにするため、その下流のシグナル経路を遺伝学的に明らかにする。

(3) 連合学習の一種である塩走性学習の忘却に関わる TIR-1 の役割を明らかにする。

(4) 記憶の忘却の環境による制御機構について、TIR-1 シグナル経路との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究においては、主に、ジアセチルに対

する嗅覚順応を記憶のモデル系として用いた。ジアセチルは、餌となるバクテリアの代謝物の一つであって、線虫は誘引性の応答行動を示す。線虫は、餌がない条件で高濃度のジアセチルに曝すと、ジアセチルに対する応答が弱くなるという嗅覚順応と行動可塑性をしめす。この行動可塑性は、4 時間ほどで失われ、ジアセチルに対する応答を回復する。一方、記憶を忘れにくい *tir-1* 変異体では、ジアセチルによる条件付け後 4 時間飼育しても、ジアセチルに対する応答が回復しない。

ブタノンエンハンシメントの記憶の忘却についても解析を進めた。ブタノンエンハンシメントは、餌がある条件でブタノンに曝すと、ブタノンに対する誘引応答が強くなるという行動可塑性である。

(1) 線虫の感覚ニューロンの匂い物質に対する応答を、感覚ニューロンに Ca^{2+} センサーを発現させた線虫に匂い物質で刺激し、イメージングによって解析した。

(2) TIR-1 が神経伝達を制御している可能性について、神経伝達の阻害などを行うことによって解析した。

記憶の忘却を *tir-1* の下流で働く制御機構を明らかにするために、*tir-1* 経路の変異体の抑圧変異をスクリーニングした。得られた変異体について、全ゲノムシークエンスと遺伝子マッピングにより、原因遺伝子の同定をすすめた。

(3) *tir-1* 変異体は、塩走性学習の記憶の保持時間も長い。そこで、*tir-1* 変異体において、野生型 cDNA を細胞特異的に発現させることによって、表現型の回復を調べた。

(4) 野生型と変異体において、条件付け後における環境を変化させることによって、記憶の保持時間を解析した。

4. 研究成果

(1) ジアセチルの嗅覚順応に関わる感覚神経細胞の応答を詳細に解析した。ジアセチルの受容に関わる AWA ニューロンは、ジアセチル刺激により、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇するが、嗅覚順応の条件付けによって、 Ca^{2+} 濃度変化が見られなくなり、4 時間の飼育後に刺激による Ca^{2+} 濃度変化が回復する。このような応答の回復は、*tir-1* 変異体では見られない。そこで、このような応答の回復がどのニューロンで起きているかを調べたところ、AWC ニューロンでの TIR-1 の働きが重要であることがわかった。従って、AWC ニューロンが AWA ニューロンにおける忘却を制御していることが示唆された。

(2) TIR-1 シグナル経路は、AWC ニューロンのどのような機能を介して忘却を制御しているのかを明らかにするために、AWC ニュ

ーロンの活動を機能獲得型 K⁺チャネルを発現させて抑制したところ、野生型においても記憶を忘れにくくなった。このことは、AWCニューロンの活動が忘却を促進するために重要であることを示唆している。

つぎに、AWCニューロンの神経伝達を阻害するまたは亢進した線虫の忘却を解析した。その結果、野生型においてAWCニューロンの神経伝達を阻害すると記憶の保持時間が延びるが、*tir-1*変異体においてAWCニューロンの神経伝達を亢進させると、変異体の忘却が野生型と同じように起きた。これらの結果は、AWCニューロンから忘却促進シグナルが分泌されることによって、AWAニューロンの忘却を制御していることを示唆している。

(3) つぎに、TIR-1の下流で忘却を制御している因子を探索するため、機能獲得型 *tir-1* 変異体の抑圧変異体の探索を行った。機能獲得型 *tir-1* 変異体は、忘却が過剰に促進される結果、嗅覚順応が起きにくいという表現型を示す。この変異体の抑圧変異をスクリーニングしたところ、71株の変異体候補を得ることができた。これらの変異体は、表現型によりジアセチルに対する嗅覚順応の記憶を忘れにくくなっているものと、ほかの記憶も忘れにくくなっているものとの2種類に分類できた。このことは、TIR-1シグナル経路は、複数の忘却を制御しているが、その下流で、記憶の種類によって実際に忘却を実行している経路は異なっていることを示唆している。

これらのうち、表現型が強い20株について、次世代シーケンサによる全ゲノム塩基配列の決定を行った。その結果、変異体ゲノムのエクソン中に多くの変異があることが分かったので、その変異をもとに表現型の原因となる遺伝子の同定を進めた。その結果、これまでに神経系で行動制御に関わっている2つの遺伝子が忘却を担っていることが明らかになった。

(4) AWCニューロンは、忘却促進シグナルを分泌することによって、AWAニューロンにおける忘却を制御している。機能的なAWCニューロンを持たない *ceh-36* 変異体では、忘却が起きにくい。そこで、*ceh-36* 変異体の忘却表現型の抑圧変異を同定することによって、忘却促進シグナルの標的となる記憶を維持する機構を明らかにできると考え、スクリーニングを進めた。その結果7株の変異体候補を得ることができた。

(5) TIR-1シグナル経路は、連合学習である塩走性学習の忘却も制御している。そこで、*tir-1* 変異体において、細胞特異的にTIR-1を発現させることによって、どの神経細胞での働きが重要であるか検討した。その結果、塩を感じるニューロンに発現させても表現型の回復は見られなかったが、介在ニューロ

ンを含む複数のニューロンで発現させた場合にのみ表現型の回復が見られた。これらのことは、塩走性学習の忘却の制御には複数のニューロンが働いている可能性があることを示唆している。

(6) 我々が単離したブタノンエンハンスメントの忘却の制御に関与する変異体の原因遺伝子は、シナプス伝達の制御に関わる因子であることが分かっている。野生型とこの変異体において、ブタノンエンハンスメントに伴う、ブタノン感覚ニューロンの応答をCa²⁺イメージングによって解析した。その結果、ブタノンに対する感覚応答は、ブタノンエンハンスメントの条件付けによって強くなることが分かった。また、その後のブタノン非存在下の培養によって、野生型でも変異体でも、感覚応答の変化は維持されていた。これらの結果は、ブタノンエンハンスメントの記憶の忘却は、感覚応答より下流において起きていると考えられた。

(7) ブタノンエンハンスメントの忘却の制御に関する変異体について、シナプス伝達に異常がないかを、シナプス放出されたアセチルコリンの分解を阻害する薬剤を用いることによって解析した。その結果、この変異体では、シナプス放出が亢進していることが示唆された。このことは、この変異体の原因遺伝子が、シナプス伝達に必要な遺伝子の働きを抑制していることを示唆している。

(8) ジアセチルに対する嗅覚順応について、条件付け前後の環境が忘却に及ぼす影響について解析を行った。条件付け前に、線虫を飢餓させると、嗅覚順応の記憶の保持時間が長くなることがわかった。この保持時間は、飢餓時間の長さに依存して伸びたことから、条件付け前の線虫の状態によって、忘却が制御されていることが示唆された。

次に、嗅覚順応後の飼育条件の影響を解析した。嗅覚順応の条件付け後に、餌の上で飼育すると、野生型線虫では、約4時間で嗅覚順応の記憶は失われるが、*tir-1* 変異体や *ceh-36* 変異体では、約1日記憶が保持され、記憶を忘れにくくなる。そこで、条件付け後に餌がない条件で飼育したところ、野生型と *tir-1* 変異体では、嗅覚順応の記憶が失われたが、*ceh-36* 変異体では、記憶が保持されたままだった。これらのことは、条件付け後に餌がない条件にいと、AWCニューロンにそのシグナルがはいり、TIR-1に依存しないで忘却促進シグナルが分泌されることを示唆している(次ページ図1)。さらに、これらのことから、線虫の嗅覚順応において、忘却が環境に依存して制御される機構があることも示された。

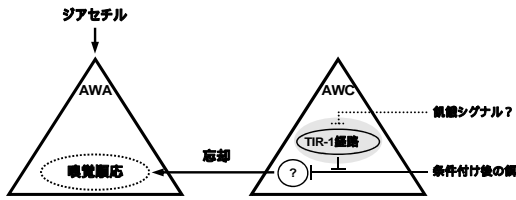


図1 嗅覚順応の忘却は、条件付け前後の環境によって制御されている。

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 4件)

1. "Forgetting in *C. elegans* is accelerated by neuronal communication via the TIR-1/JNK-1 pathway." Inoue, A., Sawatari, E., Hisamoto, N., Kitazono, T., Teramoto, T., Fujiwara, M., Matsumoto, K., Ishihara, T. Cell Reports, 3, 808-819 (2013) DOI:10.1016/j.celrep.2013.02.019 査読有り

2. "An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators." Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang, Y. F., Nakano, M., Abdelfattah, A. S., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T., Campbell, R. E. Science 333, 1888-1891 (2011) DOI: 10.1126/science.1208592 査読あり

[学会発表](計 21件)

- 北園 智弘、井上 明俊、石原 健 「線虫 *C. elegans* における忘却を制御する TIR-1/JNK-1 経路の下流因子の探索」第 36 回日本分子生物学会年会(2013 年 12 月 3-6 日) 神戸
- Kitazono, T., Inoue, A., Ishihara, T., "Identification of regulatory factors for forgetting in *C. elegans*" 19th International *C. elegans* Meeting (2013 年 6 月 26-30 日)アメリカ合衆国ロサンゼルス
- 井上 明俊、猿渡悦子、寺本 孝行、石原 健 「線虫 *C. elegans* において記憶の忘却は ASK/JNK 経路を介した神経間シグナル分泌により促進される」第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 11 日-14 日) 福岡
- 猿渡 悦子、海江田兼次、寺本 孝行、石原 健 「シナプトタグミン類似タンパク質 SNT-3 は線虫 *C. elegans* においてブタノンエンハンシメントの記憶の消去を制御する」第 35 回日本分子生物学会年会(2012 年 12 月 11 日-14 日) 福岡
- Ishihara, T. "Acceleration of forgetting by neuronal communication in *C. elegans*" INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON

ORGANIZATION AND FUNCTION OF THE NERVOUS SYSTEM(2012 年 11 月 27-28 日) 東京

6. 北園 智弘、井上 明俊、石原 健 「線虫 *C. elegans* を用いた忘却シグナルの探索」第 36 回日本分子生物学会年会(2012 年 9 月 24-26 日) 福岡

7. Inoue, A., Sawatari, E., Teramoto, T., Ishihara, T. "Forgetting in *C. elegans* is accelerated by neuronal communication via the p38 MAPK pathway" EMBO Conference Series *C. elegans* Neurobiology (2012 年 6 月 14 日-17 日) ドイツ ハイデルベルグ

8. Sawatari, E., Kaieda, K., Teramoto, T., Ishihara, T. "snt-3 regulates memory erasing for butanone enhancement in *Caenorhabditis elegans*" EMBO Conference Series *C. elegans* Neurobiology (2012 年 6 月 14 日-17 日) ドイツ ハイデルベルグ

9. Sawatari, E., Teramoto, T., Ishihara, T. "Changes in responsivity of olfactory neurons to odor during olfactory adaptation and recovery in *Caenorhabditis elegans*" 18th International *C. elegans* Meeting(2011 年 6 月 23 日) アメリカ合衆国ロサンゼルス

10. Inoue, A., Ishihara, T. "The P38/JNK MAP kinase pathway regulates forgetting in *Caenorhabditis elegans*" 18th International *C. elegans* Meeting(2011 年 6 月 24 日) アメリカ合衆国ロサンゼルス

[その他]

ホームページ等

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~bunsiide/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石原 健 (ISHIHARA, Takeshi)
九州大学・理学研究院・教授
研究者番号: 10249948

(2)研究分担者

藤原 学 (FUJIWARA, Manabi)
九州大学・理学研究院・助教
研究者番号: 70359933

猿渡 悦子 (Sawatari, Etsuko)
九州大学・基幹教育院・助教
研究者番号: 60456605
(平成 24 年度より研究分担者)