

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500394

研究課題名(和文) 記憶統合における睡眠の役割 - ショウジョウバエによる解析

研究課題名(英文) Mechanisms involved in age-related memory impairment and sleep in Drosophila

研究代表者

堀内 純二郎 (HORIUCHI, Junjiro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・主席研究員

研究者番号：80392364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：加齢性記憶障害(AMI)は老化現象の中でも重要な問題である。ショウジョウバエを用いてAMIの起こる原因を研究した結果、老化に伴ってピルビン酸カルボキシラーゼ(PC)が増加することを発見した。PCはニューロン活動を制御するD-セリンの生産を阻害し、これがAMIの原因であることを示した。第2の研究課題として睡眠の機構をバエを用いて遺伝学的に研究し、睡眠がCa²⁺/カルモジュリン-シグナル伝達系によって制御されることを発見した。この伝達系は種々の生物活性を制御しており、睡眠がこの伝達系を通じて様々な生物活性の制御に与っている仕組みを示すものである。

研究成果の概要(英文)：As we age, we suffer a decrease in memory. This phenomenon is known as age-related memory impairment (AMI). AMI is a serious social and medical problem, and it becomes more severe as we age. To understand the causes of AMI, we studied it in Drosophila. We found that aging causes an increase in a protein, pyruvate carboxylase (PC). PC is found in glia, cells that interact with neurons. Increasing PC activity in glia inhibits production of D-serine, a neuromodulator that regulates neuronal activity. Feeding D-serine to old flies decreases AMI. This indicates that decreased glial production of the neuromodulator D-serine is a cause of AMI.

In a second project, we studied sleep in Drosophila. Sleep is essential for many organisms, but its regulation is still unclear. We found that sleep is regulated by the Ca²⁺/calmodulin signaling pathway, a pathway known to control many biological processes. Our results suggest a mechanism through which sleep may be linked to other biological processes.

研究分野：神経科学一般

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：学習 記憶 加齢性記憶障害 睡眠

1. 研究開始当初の背景

すべての生物は年と共に老化しやがて死に到るが、加齢に伴う形質の変化の普遍的なメカニズムは未だ明らかでない。我々はショウジョウバエをモデル生物として、加齢に伴う行動変化の原因を研究したいと考えた。

まずショウジョウバエにおいて、老化に伴って記憶力が減退すること(加齢性記憶障害)を見出し、次いで加齢性記憶障害の起こらない突然変異体を分離し、これらの変異体ではプロテインキナーゼA(PKA)の活性が低下していることを発見した。更に、加齢性記憶障害は、PKA活性を低下させると促進され、PKA活性を上昇させると遅延されることを示した。この点で、最も単純な仮説は、PKA活性が加齢と共に上昇し、これが加齢性記憶障害を惹き起すというものであったが、我々の測定結果では、PKA活性が加齢に伴って上昇することはなかった。PKAは、他の蛋白質をリン酸化することによってそれら蛋白質の活性を制御するものであるから、我々が次に考えた可能性は、加齢に伴って活性の変化する何らかの蛋白質が存在し、それがPKAに依存したメカニズム(おそらくリン酸化)を通じて加齢性記憶障害を起こすのであろうというものであった。そして、プロテオミクス法を用いて、ピルビン酸カルボキシラーゼをそのような蛋白質として同定することができた。我々はピルビン酸カルボキシラーゼ活性の上昇が加齢性記憶障害の一つの原因であろうと考えた。

第二のプロジェクトとして、ショウジョウバエの老化に伴って変化する他の形質についても調べている。睡眠は動物に普遍的な現象であり、睡眠量は老化に伴って減少すると報告されている。しかし、睡眠の制御機構については未知の点が極めて多い。我々はショウジョウバエを用いて睡眠の制御機構について解析を進めたいと考えた。

2. 研究の目的

加齢性記憶障害プロジェクトにおける総合的な目標は、ピルビン酸カルボキシラーゼと加齢性記憶障害との関係を解明することである。このために、以下の4項目の研究目標を定めた。

- 1) ピルビン酸カルボキシラーゼ活性を低下させれば八工の加齢性記憶障害が減退もしくは遅延するか。
- 2) 脳のいかなる部位のいかなる細胞でピルビン酸カルボキシラーゼが発現するか。

- 3) 脳の当該部位においてピルビン酸カルボキシラーゼ活性の促進が加齢性記憶障害の開始を促進するか。
- 4) ピルビン酸カルボキシラーゼ活性の増大が加齢性記憶障害をもたらすメカニズムの解明。

睡眠プロジェクトにおける研究目標は、睡眠異常を示すショウジョウバエ変異体の分離、同定と、その変異によって変化したプロセスを同定することである。

3. 研究の方法

ショウジョウバエの系統

ピルビン酸カルボキシラーゼ変異体はショウジョウバエ系統センターから分与を受け、過剰発現の実験用には、同酵素がGal4転写因子の制御下に発現するtransgenic系統を我々の研究室で作成し、これをニューロンあるいはグリア細胞でGal4を発現するいくつかのdriver系統の八工と交配した。

学習記憶の測定法

学習と記憶の測定は、においと衝撃の結合法(odor/shock associative training paradigm)(OSATP)を用いた。八工を1つのにおいに1分間さらし、同時に電気刺激を12回与えた。学習記憶の定量測定は、学習後の様々な時点で同じにおいを与え、そのにおいを忌避した八工の数を測定することによって行った。

免疫組織化学的方法

我々はピルビン酸カルボキシラーゼのC-末端ペプチドに対する抗体を作成し、これを用いて八工の脳におけるピルビン酸カルボキシラーゼの分布を免疫組織化学的に解析した。

D-セリンの測定

八工の脳を切り出し、5%のperchloroacetic acid中ですりつぶした。D-セリンは4nMのo-phthalaldehyde処理によって蛍光性derivativeに変換し、これをhigh-performance chromatographyと蛍光検出器によって測定した。測定値は、L-セリンの量によって平均化した。

睡眠の測定

八工の睡眠は、ショウジョウバエ活動モニター(Drosophila activity monitors)(DAMs)を用いて測定した。八工は1匹づつ、餌を含んだガラス管(6.5cm x 3mm)に入れ、これをDAMsに装着した。DAMsは各ガラス管の中央を照射する赤外線ビームを八工が横切る時刻と頻度を記録することによって、八工の移動活動を測定する。睡

眠は、5分間以上連続した無活動と定義する。

4. 研究成果

1) 年取ったハエは、若いハエと殆ど同程度の学習能力を示すが、学習した内容を速やかに忘れてしまう。ショウジョウバエの成虫の寿命は平均約45日であるが、年取ったハエの記憶は、学習1時間後には若いハエに較べて有意に低い値を示す。すなわち、野生型のハエでは加齢性記憶障害は、学習1時間後の記憶を変態後20日目のハエと3日目の若いハエと比較することで示すことができる。我々はピルビン酸カルボキシラーゼ活性の低下した変異体では野生型に較べ加齢性記憶障害が軽減していることを示すことができた。我々は更に、本来は加齢性記憶障害の見られないPKA変異体において、ピルビン酸カルボキシラーゼを過剰発現させると加齢性記憶障害が起こるようになることを示した。この結果はPKAとピルビン酸カルボキシラーゼとが加齢性記憶障害を制御する同一の遺伝学的パスウェイ (genetic pathway) の部分を成していることを示すものである。

2) 我々は次いで、ショウジョウバエのピルビン酸カルボキシラーゼに対する抗体を作製し、これを用いてハエの脳においてピルビン酸カルボキシラーゼが発現している部位を特定した。哺乳類においては、この酵素はグリア細胞のミトコンドリアに発現していると報告されている。ショウジョウバエでも同じか否かを明らかにするために、我々はハエのグリア細胞のミトコンドリアにGFP蛋白を発現する系統を作製した。Whole mount immunohistochemistry法を用いることによって、GFP蛋白とピルビン酸カルボキシラーゼとがハエの脳内で常に同部位に発現していることを明らかにした。さきに我々はニューロンのPKA活性が加齢性記憶障害に重要な役割を果たしていることを示しているため、この新たな研究結果は、ニューロンにおけるPKA活性がグリア細胞のピルビン酸カルボキシラーゼ活性を制御することによって加齢性記憶障害に関与していることを示すものである。

3) 我々はピルビン酸カルボキシラーゼ変異体のハエを用い、そのグリア細胞あるいはニューロン細胞にピルビン酸カルボキシラーゼを発現させる実験を行った結果、グリア細胞に同酵素を発現させた場合に限って、加齢性記憶障害が見られるようになることを示した。すなわち、グリア細胞に発現したピルビン酸カルボキシラーゼだけが加齢性記憶障害を惹き起すのである。我々は更に、PKA変異体に加齢性記憶障害を惹き起すには、グリア細胞にピルビン酸カ

ルボキシラーゼを過剰発現させればよいことを示した。

4) 記憶形成におけるグリア細胞の一つの役割は、ニューロン活性を調節するneuromodulators (gliotransmitters) の供給である。そこで我々は老化に伴うneuromodulatorsの量的変化の有無を測定した結果、NMDA-type glutamate receptor co-agonistであるD-セリンが、若いハエでは年取ったハエの2.5倍も高いことを見出した。更に、PKAやピルビン酸カルボキシラーゼの変異体では、年取っても高いD-セリン量を保っていることを見出した。他方、PKAあるいはピルビン酸カルボキシラーゼを過剰発現させると、若いハエでもD-セリンの量の減少が見られた。これらの結果は、加齢性記憶障害がD-セリンの量の低下によって起こることを強く示すものである。これらの結果に基づいて我々は、ニューロンの興奮がPKA活性を上昇させるというモデルを提唱した。ニューロンのPKAはグリア細胞のピルビン酸カルボキシラーゼを上昇させ、これがD-セリン生成を低下させて、以後のニューロン活性を抑制する。この系路は、普段はニューロンの過剰興奮を阻止する役割を果たしているが、老化に伴って効果過剰となり、記憶力の減退をもたらすのである。

5) 睡眠プロジェクトにおいては、我々は、睡眠量の著しく減少したハエ突然変異体としてsarah (sra)変異体を同定した。sra遺伝子は、Ca²⁺ / カルモジュリン (calmodulin)によって調節される蛋白質フォスファターゼ (protein phosphatase)であるカルシニューリン (calcineurin)の遺伝子である。この発見は、カルシニューリンが睡眠を制御する役割を果たしていることを示唆するものである。我々は、カルシニューリン活性の増大と減少がいずれもハエの睡眠量を低下させることを示した。Ca²⁺ / カルモジュリン - シグナルは多くの生物学的プロセスを制御していることが知られているが、睡眠を制御していることを示したのは本研究が初めてである。

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6件)

- (1) Hirano, Y., Masuda, T., Naganos, S., Matsuno, M., Ueno, K., Miyashita, T., Horiuchi, J., Saitoe, M. (2013) Fasting launches CRTC to facilitate long-term memory formation in Drosophila. Science. 339 (6118), 443-6. 査読有
- (2) Ueno, K., Naganos, S., Hirano, Y., Horiuchi, J., Saitoe, M. (2013)

Long-term enhancement of synaptic transmission between antennal lobe and mushroom body in cultured *Drosophila* brain. *J Physiol.* 591(Pt 1), 287-302. 査読有

- (3) Miyashita, T., Oda, Y., Horiuchi, J., Yin, J. C-P., Morimoto, T., Saitoe, M. (2012) Mg²⁺ block of *Drosophila* NMDA receptors is required for long-term memory formation and CREB-dependent gene expression. *Neuron.* 74(5), 887-98. 査読有
- (4) Naganos, S., Horiuchi, J., Saitoe, M. (2012) Mutations in the *Drosophila* insulin receptor substrate, CHICO, impair olfactory associative learning. *Neurosci Res.* 73(1), 49-55. 査読有
- (5) Hirano, Y., Kuriyama, Y., Miyashita, T., Horiuchi, J., Saitoe, M. (2012) Reactive oxygen species are not involved in the onset of age-related memory impairment in *Drosophila*. *Genes Brain Behav.* 11(1), 79-86. 査読有
- (6) Nakai*, Y., Horiuchi*, J., Tsuda, M., Takeo, S., Akahori, S., Matsuo, T., Kume, K., Aigaki, T. (2011) Calcineurin and its regulator Sra/DSCR1 are essential for sleep in *Drosophila*. *J Neurosci.* 31(36), 12759-12766. * co-first authors. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) Horiuchi, J., Yamazaki, Y., Saitoe, M. Age-related memory impairment in *Drosophila* is caused by an oxidative stress-independent impairment of glial neuromodulator release. 2013 Neurobiology of *Drosophila* meeting at Cold Spring Harbor Laboratory. (Cold Spring Harbor, NY, USA. 2014. 10. 4).
- (2) Naganos, S., Ueno, K., Horiuchi, J., Saitoe, M. Olfactory aversive conditioning forms two distinct memory components in *Drosophila*. 2013 Neurobiology of *Drosophila* meeting at Cold Spring Harbor Laboratory. (Cold Spring Harbor, NY, USA. 2014. 10. 3).
- (3) Matsuno, M., Horiuchi, J., Saitoe, M. Neuron-glia communication induces glial protein synthesis required for formation of long-term memories. 第36回日本分子生物学会 (神戸ポートアイランド 2013. 12. 4).
- (4) Matsuno, M., Horiuchi, J., Saitoe, M. Long-term memory formation requires neuron-glia signaling to induce protein synthesis. CSFN2013 Cell Symposia – The Networked Brain. (San Diego, USA. 2013. 11. 8).
- (5) 上野耕平、堀内純二郎、齊藤実

Coincident stimulation of two independent pathways triggers dopamine release which enhances synaptic transmission in *Drosophila* mushroom bodies. 第11回世界生物学の精神医学会国際会議 (国立京都国際会館 2013. 6. 22).

- (6) Horiuchi, J. Improving memory in *Drosophila*. 2011 Senryaku Kenkyu Center Symposium, Tokyo Metropolitan University. (Tokyo, Japan. 2011. 11. 22).
- (7) Horiuchi, J., Nakai, Y., Akahori, S., Aigaki, T. Regulation of sleep in *Drosophila* by components of the Ca²⁺/calmodulin signaling pathway. 2011 Neurobiology of *Drosophila* meeting at Cold Spring Harbor Laboratory. (Cold Spring Harbor, NY, USA. 2011. 10. 5).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 純二郎 (HORIUCHI, Junjiro)
公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・主席研究員
研究者番号：80392364

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし