

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25250010

研究課題名(和文) ショウジョウバエで見出された酸化ストレス非依存性の新規脳老化機構

研究課題名(英文) Glial dysfunction causes age-related memory impairment in Drosophila

研究代表者

齊藤 実 (SAITOE, Minoru)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・基盤技術研究センター長

研究者番号：50261839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 26,700,000円

研究成果の概要(和文)：加齢性記憶障害は脳老化の重要な表現型である。これまでの研究からピルビン酸カルボキシラーゼのショウジョウバエ相同タンパクdPCの加齢による活性上昇が、酸化ストレスとは無関係に、加齢性記憶障害を引き起こすことが示唆された。本研究ではdPCがグリア細胞で生化学、遺伝学的にDCO-PKAの下流として働き加齢性記憶障害を起こすことを示した。dPCの活性が上昇によりD-セリン合成酵素が阻害される。野生型では脳内D-セリンレベル加齢により低下していること、dPC変異体では加齢によるD-セリンレベルの低下が抑制されていること、さらにD-セリンを摂取させることで加齢性記憶障害が顕著に改善することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Age-related memory impairment (AMI) is a debilitating consequence of brain aging that can be suppressed in Drosophila by reducing PKA activity. However, the molecular mechanisms underlying AMI remain unclear. In the previous study, we found that age-associated increase in the activity of Drosophila pyruvate carboxylase (dPC), a mitochondrial anaplerotic enzyme, causes AMI. In this study, we clarify that dPC functions downstream of DCO-PK; DCO mutations decrease expression of dPC and AMI in DCO mutants is restored by expressing dPC in the glial cells whereas memory defects caused by overexpression of DCO is suppressed by dPC mutations. Given that dPC activity suppresses serine racemase, enzyme that convert L-serine to D-serine, D-serine level was decreased upon aging in the wild type brain, while it was not altered in dPC/+ brain. Similarly, D-serine level was not changed upon aging in DCO/+ brain. Remarkably, AMI was significantly improved in wild-type by fed them with D-serine.

研究分野：神経科学

キーワード：老化 記憶 ショウジョウバエ D-セリン

1. 研究開始当初の背景

加齢とともに起こる記憶力の低下(加齢性記憶障害)は「脳の老化」の重要な表現型である。ショウジョウバエでは匂い条件付けにより形成される各種記憶成分の中で、中期記憶と長期記憶に分類される2成分が特異的に障害されることが我々(*Neuron* 2003)と Mery (*Exp Gerontol* 2007)により見出されている。さらに我々は加齢性記憶障害の抑制変異体の検索から、PKA 触媒部位をコードする DCO 遺伝子の抑制変異体 DCO/+では中期記憶の加齢による形成障害が抑制されることも見出した(*Nat Neurosci* 2007; *J Neurosci* 2010)。そこで野生型と DCO/+とで比較プロテオーム解析を行い、加齢性記憶障害の発現と特異的に相関した発現上昇を示すタンパクとして Pyruvate Carboxylase (PC)を見出した。我々はショウジョウバエ PC(dPC)の変異体 dPC/+で加齢性記憶障害の解析を行い、dPC タンパクの増加が少なくとも中期記憶の加齢性障害に因果関係を持つことを見出した。PCはピルビン酸からオキサロ酢酸を合成する酵素であり、TCA cycle へ中間産物を補充してエネルギー産生と、糖新生・アミノ酸産生のバランスを制御しているが、哺乳類脳ではグリアで特異的な発現が報告されている(Shank et al, *Brain Res* 1985)。

2. 研究の目的

哺乳類では酸化ストレスマーカーの上昇と抗酸化剤による高齢体の記憶改善などから、加齢による酸化ストレスの増加が加齢性記憶障害の原因とされている(Bishop, *Nature* 2010)。しかしショウジョウバエと酸化ストレスの関係を調べたところ、少なくとも中期記憶の加齢性障害は酸化ストレスには依存しない脳老化機構によることが示唆された(Hirano et al, *Genes, Brain and Behav.* 2012)。さらに記憶障害が起こるほど脳内で酸化ストレスを増加させても dPC の発現は上昇しないことを見出した。また逆に dPC の発現を強制的に上昇させて記憶障害を起こしても酸化ストレスの増加は見られなかった。以上の結果は dPC が酸化ストレスに依存しない、全く新しい脳老化機構に含まれていることを示している。ではこの新しい脳老化機構はどのような老化シグナル(内的・外的要因)により活性化されるのか？またどのようにして記憶形成を障害するのだろうか？本研究はこれらの課題の解決を通して酸化ストレス非依存性の新規脳老化機構の実体を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

グリア細胞における dPC の役割の立証：

1) ショウジョウバエ PC(dPC)もグリア細胞で特異的に発現しているか抗 dPC 抗体を用いて免疫染色で発現細胞を調べた。

2) dPC/+変異体のグリア細胞に dPC を発現させた加齢性記憶障害の回復実験でグリア dPC と加齢性記憶障害との関係を検証した。

3) 既に加齢性記憶障害の抑制変異体 DCO/+との関わりを遺伝学的に検証した。

D-セリン仮説の検証：高齢体では dPC の活性上昇により D-セリンの合成と放出が低下したため記憶形成が障害されたとする「D-セリン仮説」を以下の方法で詳細に検討・検証した。

1) 加齢により D-セリン合成が低下するか高齢脳を単離して集め D-Ser を高速液体クロマトグラフィーで分離同定して定量した。

2) dPC の発現上昇が加齢性記憶障害の原因であれば、dPC の過剰発現体では若齢体でも高齢野生型と同様の記憶障害が現れるだろう。そこでこの過剰発現体で学習記憶行動を解析すると共に、脳内 D-セリンの定量、さらに D-セリン摂取により過剰発現体の記憶障害が改善するかなどを検証した。

dPC の加齢性長期記憶障害への関わり：中期記憶は長期記憶形成に重要な記憶成分である。そこで加齢性中期記憶障害を抑制する dPC/+変異が加齢性長期記憶障害も抑制するか検証した。

4. 研究成果

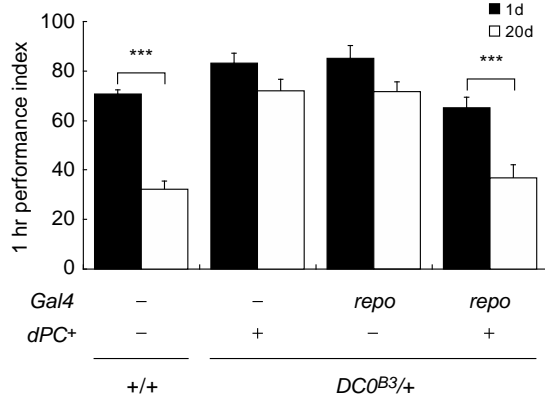
グリア細胞における dPC の役割の立証：

1) ショウジョウバエ PC(dPC)特異的な抗体を作成し、dPC の発現領域をショウジョウバエ脳で調べた。その結果哺乳類同様、ショウジョウバエにおいても dPC はグリア細胞で特異的に発現していることを野生型と dPC 変異体で確認した。

2) 上記の結果をもとに dPC/+変異体のグリア細胞特異的に dPC を発現させたところ、抑制されていた加齢性記憶障害が野生型同様に現れた。さらに高齢期特異的にグリア細胞で dPC 発現を薬理的に誘導したときも、野生型と同様の加齢性記憶障害が dPC/+変異体で現れた。以上の結果から加齢性記憶障害は加齢による dPC 活性上昇が原因の一つであることが明らかになった。

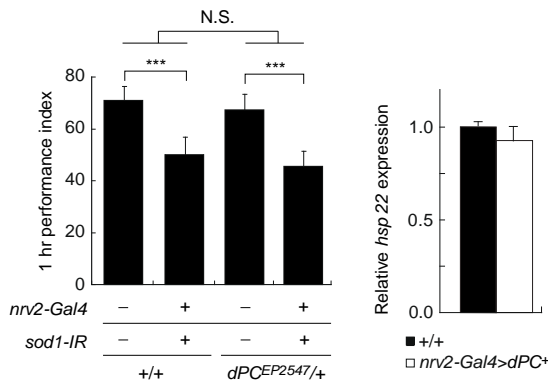
さらに DCO/+変異体のグリア細胞で dPC を発現させたところ DCO/+でも正常な加齢性記憶

障害が現れ(下図)、且つ DCO 遺伝子の強制発現による記憶障害が dPC[EP]/+変異により抑制された。dPC の活性を調べたところ DCO/+変異体では若齢期に野生型の約半分に低回していた。



また老齢期においても野生型の約半分の活性であったことから、DCO は dPC の発現には必要ではあるが、加齢による発現上昇には関与していないことが示唆された。

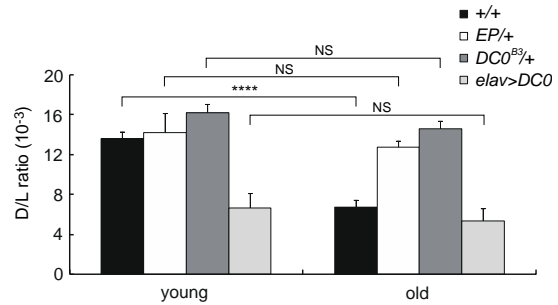
一方グリア細胞で酸化ストレスを上昇させると記憶障害が起こるが、これは dPC/+変異バックグラウンドでも抑制されず(下左図)、グリア細胞で dPC を強制発現してもストレスの蓄積(hsp22 発現上昇)は見られなかった(下右図)。以上とこれまでの結果から、酸化ストレスにより dPC 活性が上昇することはなく、逆に dPC 活性の上昇により酸化ストレスが上昇することも無いことが分かった。



D-セリン仮説の検証: 加齢体では dPC の活性上昇により D-セリンの合成と放出が低下したため記憶形成が障害されたとする「D-セリン仮説」を以下の方法で詳細に検討・検証した。

1) 加齢により D-セリン合成が低下するか老齢脳を単離して集め D-セリンを高速液体クロマトグラフィーで分離同定して定量した。その結果、野生型加齢体では D-セリン量の顕著な低下が認められた。しかし dPC[EP]/+変異体、さらに DCO/+変異体の加齢体では D-セリンの量が野生型若齢体と変わらなかった。また野生型の神経細胞で DCO を過剰発現すると

D-セリンの顕著な低下が見られた。(下図)



2) dPC の発現上昇が加齢体での記憶障害の原因か、dPC の過剰発現体で記憶行動を調べたところ、若齢体でも老齢野生型と同様の記憶障害が現れた。さらに過剰変異体では脳内 D-セリンの量が低下し、D-セリン摂取により記憶障害が改善した。

dPC の加齢性長期記憶障害への関わり: 中期記憶は長期記憶形成に重要な記憶成分である。そこで加齢性中期記憶障害を抑制する dPC/+変異が加齢性長期記憶障害も抑制するか検証した。その結果 dPC/+変異体でも加齢性長期記憶障害は正常に現れた。同様に DCO/+変異体でも正常な加齢性長期記憶障害が現れた。また D-セリンを摂取させても加齢性長期記憶障害は改善されなかった。以上の結果から加齢性長期記憶障害は DCO-PKA/dPC/D-セリン経路とは異なる遺伝子経路活性により現れることが示唆された。

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10件)

1. Ueno K*, Suzuki E, Naganos S, Ofusa K, Horiuchi J, Saitoe M*. (2017). Coincident postsynaptic activity gates presynaptic dopamine release to induce plasticity in *Drosophila* mushroom bodies. *eLife*, 6, e21076. doi: 10.7554/eLife.21076. (査読有)
2. Hirano Y, Ihara K, Masuda T, Yamamoto T, Iwata I, Takahashi A, Awata H, Nakamura N, Takakura M, Suzuki Y, Horiuchi J, Okuno H, Saitoe M*. (2016). Shifting transcriptional machinery is required for long-term memory maintenance and modification in *Drosophila* mushroom bodies. *Nat Commun*. 7, 13471. doi: 10.1038/ncomms13471. (査読有)
3. Naganos S, Ueno K, Horiuchi J, Saitoe

- M*. (2016). Learning defects in *Drosophila* growth restricted *chico* mutants are caused by attenuated adenylyl cyclase activity. *Mol Brain* **9**, 37. doi: 10.1186/s13041-016-0217-3. (査読有)
4. Nonaka T, Suzuki G, Tanaka Y, Kametani F, Hirai S, Okado H, Miyashita T, Saitoe M, Akiyama H, Masai H, Hasegawa M. (2016). Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1 Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43. *J Biol Chem* **291**, 5473-5483. doi: 10.1074/jbc.M115.695379. (査読有)
 5. Matsuno M, Horiuchi J, Yuasa Y, Ofusa K, Miyashita T, Masuda T, Saitoe M*. (2015). Long-term memory formation in *Drosophila* requires training-dependent glial transcription. *J Neurosci* **35**, 5557-5565. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3865-14.2015. (査読有)
 6. Yamazaki D, Horiuchi J, Ueno K, Ueno T, Saeki S, Matsuno M, Naganos S, Miyashita T, Hirano Y, Nishikawa H, Taoka M, Yamauchi, Y, Isobe T, Honda Y, Kodama T, Masuda T, Saitoe M*. (2014). Glial dysfunction causes age-related memory impairment in *Drosophila*. *Neuron* **84**, 753-763. doi: 10.1016/j.neuron.2014.09.039. (査読有)
 7. Saitoe M, Saeki S, Hirano Y, Horiuchi J. Age-related memory impairment in *Drosophila*. *Behavioral Genetics of the Fly*. 177-182. (Cambridge Univ press). 2014. (査読無)
 8. Hirano Y, Saitoe M (2014). Hunger-driven modulation in brain functions. *Brain Nerve*. **66**, 41-48. (査読無)
 9. Hirano Y, Saitoe M. (2013). Hunger and memory; CRTC coordinates long-term memory with the physiological state, hunger. *Commun Integr Biol*. **6**, e25152. doi: 10.4161/cib.25152. (査読有)
 10. 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**, 443-446. doi: 10.1126/science.1227170. (査読有)
- [学会発表](計 32 件)
1. 松野元美、堀内純二郎、大房京子、増田朋子、齊藤 実 加齢体では繰り返し学習後の神経細胞過興奮により長期記憶が障害される 第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 神奈川県横浜市 2016.12.2)
 2. 村上佳奈子、宮下知之、菊池絵美、宮地孝明、森山芳則、齊藤 実 グリア細胞からの小胞性グルタミン酸放出は連合学習に必要である 第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 神奈川県横浜市 2016.12.1)
 3. Ueno K, Saitoe M. Pre-synaptic dopamine release is regulated by post-synaptic activity to induce neural plasticity in *Drosophila*. in Neuroscience 2016 (San Diego, CA, USA 2016.11.15).
 4. Kori K, Ueno K, Saitoe M. Pyridoxamine deficiency induces carbonyl stress and schizophrenia-like phenotypes in *Drosophila*. in Neuroscience 2016 (San Diego, CA, USA 2016.11.14).
 5. Saitoe M. A history of memory and dopamine signaling in the fruit fly. in Developmental Neurobiology Course (Okinawa Inst Sci Tech Graduate Univ, Okinawa, 2016. 8. 2).
 6. 長野慎太郎、平野恭敬、齊藤 実 空腹によるドーパミンシグナルの活性化がショウジョウバエの匂い学習を亢進する 第 39 回日本神経科学学会 (パシフィコ横浜 神奈川県横浜市 2016.7.20)
 7. 齊藤 実 ドーパミン放出の標的細胞による新たなゲーティング機構 第 46 回日本神経精神薬理学会シンポジウム (ソウル COEX 韓国ソウル市 2016.7.2) 招待講演
 8. 齊藤 実 Genetics of age-related memory impairment 第 14 回医学研国際シンポジウム (東京都医学総合研究所 東京都世田谷区 2016. 6. 30)
 9. 齊藤 実 Synaptic transmission directed by postsynaptic neurons 新学術領域班会議 (掛川ヤマハリゾートつま恋 静岡県掛川市 2016. 6.28)
 10. Ueno K, Horiuchi J, Saitoe M. Dopamine release is gated by coincidentally activated postsynaptic mushroom body neurons to establish plasticity. in Chronological change in Brain function (Chiba Univ, Chiba, Japan 2016. 3. 8)
 11. 喜田聡、小林和人、齊藤 実 “マイクロ精神病態・適応回路シフト・記憶ダイナミズム三領域合同若手シンポジウム”

- 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム（東京学術総合センター 東京都千代田区 2015.12.19）
12. Naganos S, Saitoe M. Dopamine receptor activities regulate learning-dependent odor preference changes in *Drosophila*. in *Neuroscience* 2015. (Chicago, IL, USA 2015.10.20).
 13. Ueno K, Saitoe M. Dopamine release is gated by coincidentally stimulated postsynaptic neurons to reinforce plasticity. in *Neuroscience* 2015 (Chicago, IL, USA 2015.10.19)
 14. 齊藤 実 “新規 On-demand 型ドーパミン放出機構について” 新学術領域「記憶ダイナミズム」数理シンポジウム「記憶のメカニズムを理解する - 数理解析からのアプローチ」(東京大学 東京都文京区 2015. 9.18)
 15. 齊藤 実 “Neuron-glia interactions involved in memory formation and age-related memory impairment in *Drosophila*” 新学術領域「グリアアセンブリ」夏の国際ワークショップ(岡崎コンファレンスセンター 愛知県岡崎市 2015. 7.11)
 16. 齊藤 実、本多祥子 各種モデル動物による記憶過程の可視化 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会/第 92 回日本生理学会大会（神戸国際会議場・展示場 兵庫県神戸市 2015. 3. 22）
 17. 上野耕平、齊藤 実 “Presynaptic dopamine release is gated by postsynaptic activity in *Drosophila* brain” 第 38 回日本神経科学大会（神戸コンベンションセンター 兵庫県神戸市 2015.7.29）
 18. 宮下知之、齊藤 実 “繰り返し学習の休息は長期記憶符号化神経細胞において c-fos/creb 転写サイクル生成のために必要である” 第 38 回日本分子生物学会年会（神戸ポートアイランド 兵庫県神戸市 2015.12.3）
 19. 上野耕平、齊藤 実 “単離脳解析から見出されたドーパミン放出の新機構” 平成 26 年度包括脳ネットワーク冬のシンポジウム（東京ホテルガーデンパレス 東京都文京区 2014. 12. 12）
 20. 上野耕平、齊藤 実 “Dopamine release is gated by coincident stimulation of mushroom body neurons to establish plasticity” 第 37 回日本分子生物学会年会（パシフィコ横浜 神奈川県横浜市 2014.11.26）
 21. 松野元美、堀内純二郎、齊藤 実 “Aging reduces glial protection from memory-induced cell death” 第 37 回日本分子生物学会年会（パシフィコ横浜 神奈川県横浜市 2014.11.25）
 22. Saitoe M, Ueno K. Dopamine release is gated by coincident stimulation of postsynaptic mushroom body neurons to establish plasticity. in *Learning and Memory: A Synthesis of Flies and Honeybees* Janelia Farm HHMI Conference. (Janelia Farm Research Campus, VA, USA 2014.9.21).
 23. 長野慎太郎、上野耕平、川端有紀、齊藤 実 “The mechanisms of learning dependent odor preference changes following olfactory conditioning” 第 37 回 日本神経科学大会(パシフィコ横浜 神奈川県横浜市 2014.9.12)
 24. 宮下知之、齊藤 実 “Formation of c-fos /CREB transcription cycle during spaced training” 第 37 回日本神経科学学会（パシフィコ横浜 神奈川県横浜市 2014.9.12）
 25. Saitoe M. Age-related impairment of long-term memory is caused by reduced neuron-glia interaction. in 2014 Yonsei BK21 plus-IGAKUKEN Joint symposium. (Yonsei Univ, Seoul, Korea 2014. 6. 19).
 26. 齊藤 実 A novel mode of dopamine release identified from brain in a vat. 記憶ダイナミズム班会議（シェラトンホテル札幌 北海道札幌市 2014. 6. 16）
 27. 平野恭敬、齊藤 実 Dual role of CREB/CRTC in long-term memory maintenance and extinction. 記憶ダイナミズム班会議（シェラトンホテル札幌 北海道札幌市 2014. 6. 16）
 28. 上野 太郎、桑和彦、齊藤 実 Controlling sleep in *Drosophila* using a homolog of AWP1, a potential gene for sensitivity to anesthetics. 記憶ダイナミズム班会議（シェラトンホテル札幌 北海道札幌市 2014. 6. 16）
 29. 堀内純二郎、松野元美、増田友子、齊藤 実 Memory-induced cell death increases with age. 記憶ダイナミズム班会議（シェラトンホテル札幌 北海道札幌市 2014. 6. 16）
 30. 上野耕平、堀内純二郎、大房京子、齊藤 実 Dopamine release is gated by coincident stimulation of postsynaptic mushroom body neurons to establish plasticity. 記憶ダイナミズム班会議（シェラトンホテル札幌 北海道札幌市 2014. 6. 16）
 31. 松野元美、齊藤 実 長期記憶形成に必

要なグリア転写因子 Repo による遺伝子発現 記憶回路研究会 (岡崎生理学研究所 愛知県岡崎市 2013.12.12)

32. 上野耕平、堀内純二郎、齊藤 実 神経可塑性に必要なドパミン放出はどのように決定されるのか 第36回日本神経科学大会 (国立京都国際会館 京都府京都市 2013. 6.22)

〔図書〕(計 5件)

1. 平野恭敬、齊藤 実 (2016) 高次脳機能に関わる転写因子「基礎分子生物学: 遺伝子発現制御機構 クロマチン, 転写制御, エピジェネティクス」18章 1節東京化学同人
2. 長野慎太郎、齊藤 実 (2016). ショウジョウバエだから分かる学習記憶のメカニズム 生体の科学 67(1) 13-16.
3. 齊藤 実・堀内純二郎・山崎大介 (2015). 加齢による記憶力の低下とグリア細胞 *Clinical Neuroscience 月刊臨床神経科学* 33(9), 1084-5.
4. 堀内純二郎・山崎大介・齊藤 実 加齢による記憶力の低下はグリア細胞の機能の不全による **ライフサイエンス新着論文レビュー** 2014年11月19日
5. 平野恭敬、齊藤 実 (2013). 記憶改善に向けた新たな進展: 軽度の空腹状態は長期記憶形成を促進する **細胞工学** 32, 452-453.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/memory/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 実 (SAITOE, Minoru)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・基盤技術研究センター長

研究者番号: 50261839

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宮下知之 (MIYASHITA, Tomoyuki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・主席研究員

研究者番号: 70270668

上野耕平 (UENO, Kohei)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・副参事研究員

研究者番号: 40332556

松野元美 (MATSUNO, Motomi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・主席研究員

研究者番号: 90392365

平野恭敬 (HIRANO, Yukinori)

京都大学・医学研究科メディカルイノベーションセンター・准教授

研究者番号: 40580121

長野慎太郎 (NAGANOS, Shintaro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・主任研究員

研究者番号: 30631965

(4) 研究協力者

なし