

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430029

研究課題名(和文)リン酸化プロテオミクス解析から予測される短期記憶保持機構のイメージング解析

研究課題名(英文)The physiological and biochemical studies of short-lasting memory

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：記憶形成の基盤は神経細胞間シナプスの可塑的变化にある。近年、この可塑的变化においてドパミンが重要な働きをしていることが示唆されている。しかし、ドパミン依存的神経可塑性においては大きく2つの不明な点がある。1つはドパミンがどのような分子経路によってシナプスの可塑的变化を引き起こすのか、もう1つはドパミンがどのように放出されているのか、という問題である。研究代表者が開発した単離脳実験系を用いてこの2つの問題に取り組んだ。その結果、ドパミンはハエの匂い記憶中枢であるキノコ体において様々な分子のリン酸化を引き起こすこと、一方、ドパミンの放出は後シナプスであるキノコ体の活動性が重要であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The physiological and structural changes upon synapses are underlying memory formation. Recent studies suggest that dopamine plays important role for the plastic change. However it is unclear which molecular pathway is activated by dopamine and how dopamine is released during memory formation. Previously, I successfully induced plastic change in the synaptic transmission between olfactory central and mushroom body, olfactory memory core, in the isolated *Drosophila* brain. We used the isolated brain system and found that dopamine signaling phosphorylates various molecules in the mushroom body. Moreover, we found that dopamine release during memory formation is regulated not only dopaminergic neurons but also mushroom body neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：ショウジョウバエ 神経可塑性 ドパミン

1. 研究開始当初の背景

現在の神経科学において記憶は最終的には神経細胞間にあるシナプスの活動性変化がその細胞学的基盤であると考えられている。記憶に関連したシナプスの可塑的变化の1つに long-term potentiation (LTP) があるが、この実体は後シナプスの肥大化とそれに伴う神経伝達物質受容体数の増大にあると考えられている。

記憶のモデル動物として有名なショウジョウバエは、匂いと電気ショック(罰)もしくは砂糖水(報酬)を連合学習し、その匂いに対し嫌悪もしくは嗜好的な記憶を形成することができる。この記憶は条件付けの方法により異なるが、通常の1回条件付けではまず短期記憶(short lasting memory, SLM)として保持される。その後、STMは消失し、代わりに1日から1週間ほど保持される長期記憶(long-lasting memory, LLM)へと固定化される。ハエの強力な遺伝学により、SLM・LLM 共に関連する遺伝子が同定されてきた。この遺伝子群の中においても特に注目されるのがドパミンとその下流にある分子経路である。すなわち、D1 ドパミン受容体(D1R)、Gタンパク(Gs)、1型cAMP産生酵素(Rut-AC)およびcAMP依存性キナーゼ(PKA)である(Nature reviews 2003)。これら分子の変異体は重篤な記憶欠損を引き起こすことからこの分子経路の下流にシナプスの可塑的变化を直接引き起こす分子があると推定される。形態学的やイメージング解析からハエの匂い記憶はキノコ体(mushroom body, MB)と呼ばれる構造で形成・保持・読み出しがされると考えられている(Science 1994, Nature 2001)。しかし、LTPのような分子的な変化がどのようにMBで起きているのかは不明である。

一方、匂い記憶に必須なドパミンの挙動についても不明な点が多い。特に、ドパミン作動精神系は脳に僅かな数しかない一方(脳あ

たり数百個)非常に大きな終末を持つ。このことから、単純に神経興奮によってその前シナプスから斉一的にドパミンを放出するのではなく、各々の部位によって何らかの修飾がされているのではないかと示唆する報告がある。しかし、その直接的な証拠は無い。

2. 研究の目的

若手研究(B)(2009年度~2010年度)において研究代表者はハエ脳を単離し、匂い中枢(antennal lobe、以下AL)と電気ショックを脳に伝える体性感覚上行繊維(ascending fibers of ventral nerve cord、以下AFV)をガラス電極により同時に刺激すると(図1)、その後AL刺激による記憶中枢でのCa²⁺応答が長期にわたって増強するという現象を見出した(long-term enhancement、以下LTE)。具体的には、ALを刺激すると、匂い記憶中枢であるMBのCa²⁺蛍光プローブのシグナルが上昇する(図2 Pre)。その後、ALとAFVを同時に繰り返し刺激し(図2、AL+AFV)、15分後に改めてALだけを刺激すると、蛍光変化が増強するというものである(図2、15min)。

このLTEは、数時間に渡って維持され、また入力特異性や連合性などのさまざまな生理学的特性が匂い記憶と極めて高い相関性を示した。さらに、匂い記憶同様にD1ドパミン受容体(D1R)欠損変異体の脳においてこのLTEは形成されないことからドパミン依存的事であることも示している。

図1

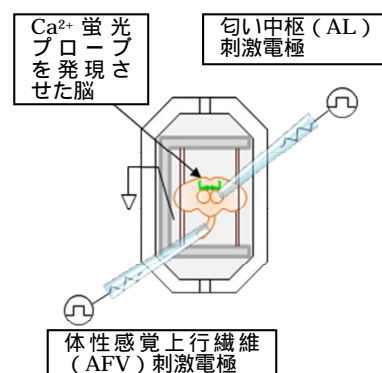


図 2

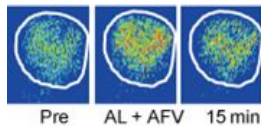


図 2 刺激に応じた MB の Ca^{2+} 蛍光プローブ G-CaMP の応答。Pre と 15min は AL 刺激による MB 応答、AL+AFV は AL と AFV の同時刺激による MB の Ca^{2+} 応答例である。

その後の研究から、AFV 刺激は NMDA 受容体の活性化によって置き換えられることを見出した、すなわち AL 刺激をすると同時に脳を NMDA によって刺激することで (AL+NMDA 刺激) LTE を形成できる。さらに、驚くべき事にこの AL+NMDA 刺激をせずとも D1R を活性化するだけで LTE を形成できることを見出した (図 3)。

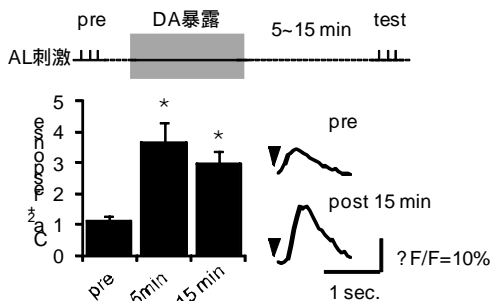


図 3 DA による MB 神経可塑的变化 MB でのみ D1R を発現した八工脳を用いた AL 刺激による MB の Ca^{2+} 応答。DA 投与前 (pre) と DA 暴露後の 5 分、15 分で Ca^{2+} 応答は顕著に増大する。

これらの結果から 2 つの大きな知見が得られた。1 つは D1R の活性化は MB の可塑的变化の最終的なトリガーとなっていること。もう 1 つは AL 刺激と NMDA 刺激によって MB が活性化することがドパミン放出の前段階となっていることである。これらの結果から、D1R 活性化後のキノコ体におけるリン酸化タンパクの同定および、AL+AFV もしくは AL+NMDA 刺激時におけるドパミンの放出機構の解明が本研究の目的である。

3. 研究の方法

ドパミンシグナリングによるリン酸化タンパクの同定はリン酸化タンパク分離アクリルアミドゲル (phos-tag gel) と

LC/MC/MC (液体クロマトグラフィー質量分析) を組み合わせによって行う (図 4)。この際、MB でのドパミンシグナリングによるリン酸化タンパクを同定するため、MB でのみ D1R を発現している遺伝子組換え体を用いて解析を行う。

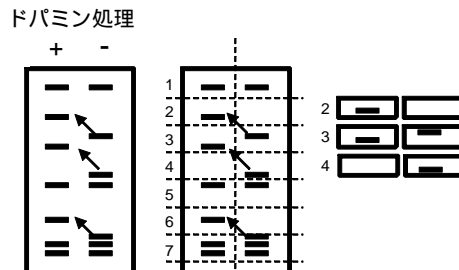


図 4 リン酸化タンパク同定の概念図 ドパミン処理脳と非処理脳を phos-tag gel で泳動すると、リン酸化タンパクは泳動が遅くなるため、バンドが上へと移行する (矢印)。ゲルを適当な大きさに切り出し、それぞれからタンパクを抽出して質量分析を行うことで、本来 3 番と 4 番のゲル分画にあるタンパクが 2 番と 3 番で検出される。

ドパミン放出がどのような機構によって引き起こされているのかは、ドパミン作動精神の exocytosis を可視化することで解析する。spH はシナプス小胞に貫通したシナプスタンパクの細胞外部位に pH 感受性の pHluorin を融合させた分子である。図 5 に示すように、シナプス小胞が細胞内に留まっている際は pHluorin 部位は小胞内にある。この時、シナプス小胞内は H^+ ポンプによって pH が 4 程度に低く保たれており、結果的に蛍光は暗くなる。この小胞が exocytosis を引き起こしシナプス伝達物質を放出すると pHluorin 部位もシナプス間隙に露出する。シナプス間隙は pH が 7 程度と高く維持されているため蛍光強度が増強する。

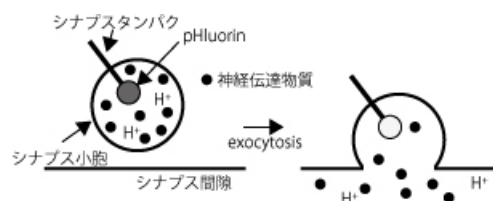


図 5 spH による神経伝達物質放出の可視化 小胞内液は H^+ 濃度が高く低 pH に保たれている。exocytosis を起こすと H^+ 濃度の低い細胞外液と混合することで spH 近傍の pH が上昇し、spH の蛍光強度が増強し、これにより exocytosis を検出する。

4. 研究成果

1) ドパミンシグナリングによるMBのリン酸化タンパクの同定 MBでのみD1Rを発現した遺伝子組換え体から脳を摘出し、ドパミンによる刺激後、研究の方法に記載した手法によりリン酸化タンパクの同定を行った。その結果、242種類のタンパクが同定され、内リン酸化状態が増減した分子は34種類見出された。

2) 候補分子の発現抑制による記憶への影響 リン酸化状態に変化が見られた34種類のうち28種類の分子に関してMBにおいてその発現を抑制した遺伝子組換え体を作成した。作成した組換え体において匂い嫌悪学習を行い記憶のスコアを求めた。その結果、6系統において有意な記憶の低下が見出された(図6)。

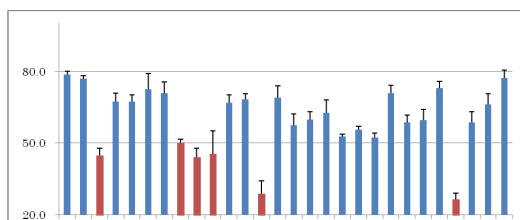


図6 MB特異的に発現抑制を行った変異体の匂い記憶(学習後3分)スコア。縦軸は記憶のスコアを定量化したもの。左端のバーは野生型の記憶スコアであり、これに対して有意に記憶スコアが低下した系統を赤で示した。

6系統の中でも特に記憶スコアが低かったのはDap160分子の発現抑制体であった。Dap160は神経伝達物質放出に重要なダイナミン分子に関連する分子である。今後の解析によりどのような機構によってシナプス可塑性と連関するのかを明らかにしたい。

3) MB-ドパミン作動性神経の連絡解析 前述したようにMBをAL+AFVもしくはAL+NMDA刺激にを行うことでMBに投射しているドパミン作動性神経からのexocytosisが観察される。まず真にMBが活性化された後にドパミン放出が起きている

のか、それともAL+NMDA刺激が直接ドパミン作動性神経を活性化しているのかを調べるために、ALからの入力を抑制する実験を行った。ALからの出力ニューロンはコリン作動性ニューロンであることが報告されている。そこで、ドパミン作動性神経にアセチルコリン受容体のドミナントネガティブを発現させた。もしALから直接ドパミン作動性神経を活性化する経路があれば、これによりAL+NMDA刺激によるドパミン放出が抑制されるはずである。しかし、放出抑制は観察されなかった。一方、MBのNMDA受容体の発現を抑制し、この変異体でAL+NMDA刺激を行ったところドパミン放出は抑制された。従って、まずAL+NMDA刺激によって直接MBが活性化し、その後活性化したMBから何らかのシグナルによってドパミン作動性神経が活性化していると考えられる。

次にMBからのexocytosisを熱により止めることのできる遺伝子組換え体を準備し、これに対し加熱した状態でAL+NMDA刺激を行った。しかし、このような条件においてもドパミン放出は観察された。このことは、MBからドパミン作動性神経への伝達はexocytosisを介さない逆行性シグナルによるのではないかということが示唆された。

4) 活性化したMBは局所的にドパミン放出を誘導する MBは脳に1対存在し、ALからの入力は同側のMBにのみ伝達される。すなわち片側のAL刺激は同側のMBのみを活性化する。一方、個々のドパミン作動性神経は両側のMBに投射している(図7)。

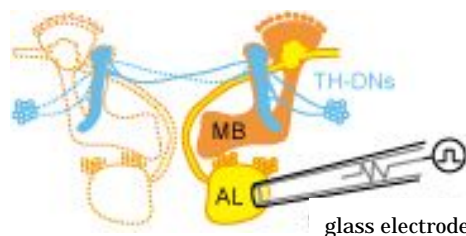


図7 八工脳の模式図 MBとALは1対存在し同側同士で連結している。ドパミン作動性神経(青)は両側に投射している。

もし、逆行性シグナルにより活性化した MB がドパミン放出を誘導するとすれば、片側の MB のみを活性化すれば両側に投射しているドパミン作動性神経において活性化している MB 上でのみドパミン放出を引き起こす可能性がある。このことを検証した結果、確かにドパミン放出は活性化した MB 上でのみ起きていた (図 8)。

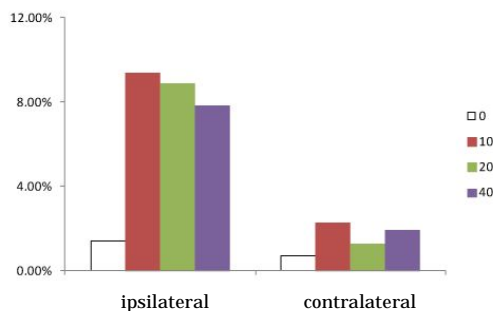


図 8 AL+NMDA 刺激によるドパミン放出は同側でのみ観察され (左)、反対側では観察されなかった (右)

以上の結果から、ドパミン放出はドパミン作動性神経だけでなく、ドパミンを受け取る後シナプスからの調節を受けていることが示唆された。今後は、この調節機構を明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Naganos S, Ueno K, Horiuchi J, Saitoe M.、 Learning defects in Drosophila growth restricted chico mutants are caused by attenuated adenylyl cyclase activity.、 Mol Brain、 査読有、 s13041-016-0217-3 DOI: 10.1186 (2016)
- (2) 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.、 Glial dysfunction causes age-related memory impairment in Drosophila.、 Neuron、 査読有、 84(4):753-63 DOI: 10.1016

(2014)

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) Kohei Ueno and Minoru Saitoe、 Dopamine release is gated by coincidentally stimulated postsynaptic neurons to reinforce plasticity.、 Neuroscience 2015, Chicago, USA 2015 年 10 月
- (2) 上野耕平、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 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 年 6 月
- (3) 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 年 11 月
- (4) Kohei Ueno、Minoru Saitoe、Coincident stimulation induces dopamine release required for long-term enhancement of Ca²⁺ influx in mushroom body neurons.、Neurobiology of Drosophila、Cold Spring Harbor Laboratory, USA, 2013 年 10 月
- (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 36 回日本神経科学大会、京都国際会議場、京都府京都市、2013 年 6 月

〔図書〕(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

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