

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500376

研究課題名(和文) 発現変動情報を元にしたショウジョウバエ変異体解析による嗅覚記憶制御分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism underlying *Drosophila* olfactory memory by the mutant analysis based on gene expression profiles

研究代表者

村上 智史 (Murakami, Satoshi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：10463902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエ嗅覚学習記憶を支える微小脳領域に対する発現解析の結果をもとに新規記憶遺伝子としてrgk1を同定し、変異体解析、免疫抗体染色解析等によりrgk1が成虫キノコ体領域で働きintermediate memoryの維持に必要であることを明らかにした。Rgk1はカルシウムチャネルを介して神経活動を制御する因子で、欠損体において中期記憶の障害が見られた。また過剰発現により、記憶のenhancement、rac依存的に起こる忘却の抑制が見られた。キノコ体神経内での分布は出力側に偏っており、ドメイン欠損により局在を変化させると麻酔耐性記憶に特異的に障害が出ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Based on the previously collated data of gene expressions in a small region of *Drosophila* brain that is responsible for the olfactory memory, I identified rgk1 as a novel memory gene. rgk1 expresses specifically in the mushroom body (MB) and is required in the MB for the maintenance of inter-mediate memory (IMM). rgk1 encodes a small-GTPase protein homologous to mammalian REM family proteins and was reported to regulate neural activities through the regulation of voltage-gated calcium channels. miRNA-dependent knockdown or a deletion of the rgk1 gene resulted in decreased IMM. Rgk1 function was localized in the MB and forced-expression of rgk1 in the MB resulted in memory enhancement. Antibody analysis of Rgk1 expression within the single MB neurons revealed that Rgk1 localizes to synapses and artificial retrieval of synaptic Rgk1 led to a failure in maintaining olfactory memory after cold-shock treatment.

研究分野：神経生物

キーワード：記憶 嗅覚 ショウジョウバエ 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエ嗅覚学習系はこれまでに記憶形成過程における cAMP 経路や CREB の重要性など先駆的な知見を明らかにしてきた。回路レベルでも解析が進んでおり、本研究で用いる嗅覚忌避学習を担う神経回路について詳細な解析が進んでいる。申請者はこれまでに遺伝子発現をもとにして記憶形成を支える分子機構を解明するための実験系を構築した(若手 B,H22-H23)。具体的には、嗅覚記憶形成の中核であるキノコ体(約 2,500 個の細胞からなる)を摘出し、RNA-seq によりキノコ体における遺伝子発現を調べた。頭部全体を用いた発現解析がこれまでに報告されているが、記憶中枢に絞った発現解析はこれまで行われていない。微量 mRNA を正確に増幅する方法を用いることで微小脳領域での高感度な発現解析が可能となり、記憶中枢で発現する遺伝子のリスト、記憶形成前後で記憶中枢において発現変動する遺伝子のリスト、を得ることができた。

2. 研究の目的

記憶固定化過程では特定遺伝子の活性化が重要であると考えられている。本研究では遺伝学的解析において優れたモデルであるショウジョウバエを用い記憶を制御する分子機構の解明を目指す。すでに一部の候補遺伝子については解析を始めており(約 20 遺伝子)、これまでに *pde1c* や *rgk1* について *in situ hybridization* によりキノコ体での特異的に発現していることを明らかにした。本研究では、独自に取得したこれらの記憶依存的な発現に関する情報を元に、変異体解析と記憶依存的な転写制御領域の同定を行い、記憶形成過程において重要な働きをする分子機構、特に転写活性化機構の解明を目指す。ショウジョウバエにおいて記憶形成分子機構を調べる利点としては比較的単純な神経構造が挙げられるが、生化学的な解析においてはその微小さがネックとなっていた(キノ

コ体はわずか 2,500 細胞のみからなる)。本実験で使用する発現情報は微量転写産物の安定的増幅法に支えられており部位特異性と感度においてこれまでにないものである。本研究で変異体解析を行うことにより記憶形成分子機構に新しい視点をもたらすことが期待される。変異体解析では、多くの検体を効率的に処理するため独自に開発した半自動条件付け装置を用いる。本解析を通じ、記憶依存的に変動しかつ記憶形成に重要な働きを持つ遺伝子が新たに特定されることで、記憶依存的転写制御因子の下流因子の同定や、記憶依存的に活性化される転写制御カスケードの解明が期待される。

3. 研究の方法

(1) RNA-seq 解析の結果得られた候補遺伝子が記憶形成過程に関与しているかどうかを調べ、記憶形成に深く関与する新規遺伝子同定を目指す。RNA-seq 解析により得られた記憶依存的に発現上昇する遺伝子について、まず当該遺伝子が記憶形成に必要であるかどうかについて、RNAi を用いた記憶中枢特異的な変異体解析により明らかにする。解析対象は、RNA-seq 解析により長期記憶形成時に特異的に上昇してくるもののうちドメイン構造や予測される遺伝子機能から記憶形成への関与が疑われる因子をまずは対象とする。発現レベルの高いものから順に解析を行う。本研究では記憶形成依存的に発現変動する遺伝子の同定とともに、キノコ体で強く発現する遺伝子の解析も順次進める。キノコ体で特異的に発現する遺伝子を元にした解析はこれまでに多くの重要な記憶因子、Adenylate cyclase や Dopamine receptor などの同定につながっており、発現情報を元にした解析の有効性を示している。

(2) 変異体解析の結果同定された遺伝子について、その作用機構を詳細に調べる。本研究では記憶形成と深く関わる遺伝子の特定が主要な目的であり、遺伝子と記憶形成との

関わりについて確実に証明することを第一とする。その上で、得られた因子がどのように記憶形成を制御するのかについて詳しい解析を行う。まず発現部位の特定を行い、遺伝子発現がキノコ体特異的であるのか、または脳神経系に広く発現しているのか (ubiquitous か) を確認する。そして、ショウジョウバエ嗅覚系では cAMP 経路に加えて軸索輸送因子など多くの分子機構の関与が報告されているため、同定された遺伝子とこれら経路との関わりについて遺伝学的解析や抗体を用いたタンパク局在解析を通じて明らかにする。

4. 研究成果

(1) Rgk1タンパクに対する特異的な抗体を用いた免疫組織染色実験

rgk1-RBの14 bp上流に挿入のあるGal4エンハンサートラップ系統 (NP5225) の発現を膜結合型GFPを用いて調べたところ、キノコ体において強い発現が見られキノコ体のサブセット (alpha/betaとgamma neuron) で強いことが分かった。Rgk1-RBのN末領域を認識するペプチド抗体を作成したところ、この抗体ではalpha/betaとgammaにおいてキノコ体のサブセット特異的な発現が見られた。キノコ体以外の脳領域では強い発現は見られず、Rgk1は成虫において非常に限局した形でキノコ体に発現していることが分かった。このシグナルは*rgk1*-miRNAを発現させた個体では検出されなかった。免疫染色によると、Rgk1はキノコ体の軸索に多く存在し、樹状突起が存在するCalyxや、細胞体ではシグナルが弱い。

(2) *rgk1*欠損体と、*rgk1*遺伝子に対するmiRNAを用いた時期・組織特異的遺伝子障害実験

*rgk1*の組織特異性と時期特異性を調べるために、*rgk1*をターゲットするように人工的にデザインしたmiRNA (*rgk1*-miRNA) を作成した。神経細胞ドライバーを用いて

rgk1-miRNAを発現させたところ、*rgk1*の転写産物が減少することを確認した。また成虫期のみのconditionalなmiRNAの発現誘導によっても*rgk1*の転写量が減少することを確認した。*rgk1*-miRNAは、アノテートされているすべての*rgk1*遺伝子をターゲットする。OK107-Gal4エンハンサートラップドライバーを用いて*rgk1*-miRNAをキノコ体特異的に発現誘導したところ、記憶形成障害が見られた。嗅覚能と電気刺激反応性については、野生型と比較して異常がないことを確認した。またキノコ体の形態異常も観察されなかった。*rgk1*の時期特異的な働きを調べるために、*tubGal80ts*を用いて*rgk1*-miRNAの発現を温度依存的に制限し、嗅覚学習アッセイを行った。その結果、記憶障害には、成虫期のみの*rgk1*-miRNAの発現で十分であることが分かった。免疫染色によると、Rgk1はキノコ体の一部のサブセットに限局している。キノコ体のサブセットで発現するGal4エンハンサートラップ系統を用いて*rgk1*-miRNAを発現誘導したところ、alpha-prime/beta-prime neuronのみで発現する系統とalpha/betaのcore以外で発現する系統では、記憶障害が見られなかった。これらの結果はRgk1の発現パターンと整合しており、alpha/beta coreにおけるRgk1の発現が重要であることが分かった。*rgk1*-miRNAによる記憶障害が不可逆的な効果を神経細胞に及ぼしたのかどうかを調べるために、一度*rgk1*-miRNAを発現誘導させた個体において*rgk1*-miRNAの誘導を止め、記憶アッセイを行った。その結果記憶障害の回復が見られたことから、*rgk1*の欠損による記憶障害は可逆的であることが分かった。

*rgk1*の嗅覚記憶形成への関与を調べるために、P-elementのimprecise excision法を利用して*rgk1*の欠損体を作成した。得られた欠損系統 (*rgk1*-ex) では転写開始点と最初のexonを欠いている。この系統のホモ体では*rgk1*の転写産物が見られるが短くなっており、

欠損はアミノ酸配列のフレームシフトを起こす。*rgk1-ex*ホモ体におけるキノコ体の形態を、キノコ体あるいはシナプスマーカー (FasII, BRP) により観察したところ、特に異常は検出されなかった。また主要なキノコ体マーカー (*eyeless*, *damb*, *fasII*) の発現レベルにも変化は見られなかった。この欠損体の嗅覚学習記憶能を調べたところ、中期記憶に強い障害が見られた。短期記憶はわずかな障害が見られた。1日後の記憶には変化は見られなかったため、*rgk1*は中期記憶において特異的に働いている可能性が示唆される。*rgk1-ex*の個体に対してゲノム欠損系統 (Deletion lines) を用いて complementation testを行った。*rgk1*を含む18K bpの領域を欠損している Df(2R)BSC26と*rgk1-ex*のtranshetero体において記憶異常が観察されたことから、*rgk1*遺伝子座の嗅覚記憶における重要性が確認された。これら一連の結果から、*rgk1*遺伝子が記憶形成時にMB神経細胞において必要であることを明らかにした。

(3) *rgk1*遺伝子を時期・組織特異的に強制発現させる実験

*rg1-RB*を*rgk1*欠損体のキノコ体で強制発現させたところ、2時間後における記憶障害が完全に回復した。また、野生型においてOK107-Gal4エンハンサートラップドライバーを用いて*rgk1*を強制発現させたところ、通用よりも2時間記憶のスコアが上昇した(記憶のエンハンスメント)。成虫期特異的な*rgk1*の強制発現でも、記憶のエンハンスメントが見られた。c739を用いた*rgk1*の強制発現により*rgk1-ex*の記憶障害を部分的に回復させることができた。Rgk1強制発現による記憶のエンハンスメントは、記憶形成における*rgk1*機能の重要性をより強く示す結果である。cAMP経路において働くAdenylate cyclaseをコードする*rutabaga*変異体においてRgk1を強制発現させたところ、記憶のエンハンスメント

効果が見られた。このことから、*rgk1*はcAMP経路とは独立の分子機構に作用していることが考えられる。

(4) Rgk1のドメイン欠損コンストラクトとGFP融合タンパクを用いた、記憶回復アッセイとタンパク局在の観察

Rgk1のsmall-GTPaseの必要性を調べるため、small-GTPaseドメインを欠いたコンストラクトと、small-GTPaseドメインにsingle mutationを持つコンストラクトを作成し、変異体rescue実験を行った。GTPaseドメインのSerine残基をasparagine残基に変換させるpoint mutationを導入した*rgk1*コンストラクト(*rgk1-DN*)をキノコ体で発現させたところ、記憶障害がドミナントに起こされることが分かった。GTPase domainを完全に欠失した*rgk1*コンストラクトでは、*rgk1-ex*の記憶障害の回復はできなかった。N末領域の大部分を欠くがGTPaseドメインは保持したコンストラクトでは、*rgk1-ex*の記憶障害の回復ができた。これらのことから、記憶形成維持過程において、*rgk1*はRasやRacなどのようにsmall GTPase活性により細胞内シグナル因子として働いていると考えられる。学習後にcold shockを行うprotocolによる記憶アッセイでは、full-length Rgk1のみが記憶回復能を示し、 ΔN と ΔC コンストラクトはいずれも変異体の記憶障害を回復できなかった。このことから、cold shockを伴うdemandingな条件では、N末側に存在する機能未知のドメインが必要であると考えられる。

Rgk1-GFP融合タンパクを作成し、神経細胞内での局在を観察した。野生型Rgk1は神経細胞内で、シナプスに強く局在し樹状突起におけるシグナルは比較的弱かった。一方で、Rgk1のN末側に存在する機能未知のドメイン(N1 domain)を欠損させたコンストラクトでは、シナプスよりも樹状突起において強い局在が見られた。各ドメインを欠いたRgk1のGFP

融合タンパクを、キノコ体の1つの神経細胞のみで発現させ、同時に発現させたシナプスマーカーとの局在の関係を調べた。

full-length, N末側欠損(ΔN)、GTPaseドメイン欠損(ΔC)いずれも神経細胞内でpunctate上の局在を示し、シナプスと共局在した。

ΔC -GFPはシナプスとの共局在度が、full-lengthと ΔN に比べて低かったことから、GTPaseドメインがRgk1のシナプスへの局在に関与している可能性が示唆された。

(5) Rgk1過剰発現によるRac依存的な忘却促進の抑制

Racが記憶のエンハンスメントに関与していることを考えると、*rgk1*はRacによって制御を受ける分子機構に関与している可能性が考えられる。哺乳類において、Rgk1と相同性を示すタンパクが cytoskeletal remodelingに関与するという報告があることから、この仮説は支持される。そこでRacとRgk1の関係を調べるために、Racの constitutively-active form Rac (Rac-V12)とRgk1を共発現させその影響を調べた。RacV12のみの発現では、これまでの報告通り記憶障害が見られるが、同時にRgk1を発現させた個体では、記憶障害が全く起こらなくなることが分かった。

(6) Rgk1の作用機序

Rgk1は、Rad, RIM, GEMなどの哺乳類タンパクと相同性があり、これら哺乳類タンパクの知見から、Rgk1は神経活動の調節に働く可能性が考えられる。特に14-3-3や Calmodulin, 電位作動性カルシウムチャンネル beta subunitなどとinteractionすることが考えられる。哺乳類REM familyタンパクは voltage-gated calcium channelを介して神経活動を調節していることが分かっているが、この機能がショウジョウバエRgk1において種間を超えて保存されていることが明らかとな

った(phul III, et al, 2014)。したがってRgk1がどのようにキノコ体神経細胞内で働くのかというモデルとしては、voltage-gated calcium channel (特にbeta subunit)を介した神経活動の制御が最も有力である。

Rgk1-GFPの局在がシナプスに強く見られることはこの可能性を示唆する。一方で、REM familyがcytoskeletal remodelingを介して働くという知見と、Rac依存的な忘却促進効果をRgk1が打ち消すという実験結果を合わせて考えると、Rgk1は記憶維持過程においてRacの機能を抑制し、忘却を防いでいるというモデルも考えられる。樹状突起におけるカルシウムシグナルの区画化が記憶形成に重要であるとの報告(Cichon et al., 2015)を考慮すると、記憶形成過程においてRgk1が神経細胞内におけるシグナルの区画化(または限局)に働いている可能性も考えられる。

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 1 件)

Abe T, Yamazaki D, Murakami S, Hiroi M, Nitta Y, Maeyama Y, Tabata T. The NAV2 homolog Sickie regulates F-actin-mediated axonal growth in *Drosophila* mushroom body neurons via the non-canonical Rac-Cofilin pathway. 査読有 *Development* 2014, Dec, 141(24), 4716-28.

doi: 10.1242/dev.113308

[学会発表](計 6 件)

第37回日本神経科学大会、「A mushroom-body-specific small GTPase Rgk1 regulates the anesthesia-resistant memory in *Drosophila*」、Satoshi Murakami, Maki Minami, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige, Tetsuya Tabata, 2014.9.11-13、

パシフィコ横浜（神奈川県）

新学術領域『多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理』班会議、「A mushroom-body-specific small GTPase Rgk1 regulates the anesthesia-resistant memory in *Drosophila*」、Satoshi Murakami, Maki Minami, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige, Tetsuya Tabata、2014.6.16-6.18、シェラトンホテル札幌（北海道）

第36回日本分子生物学会年会、「The requirement of a mushroom-body-specific RGK family protein in *Drosophila* olfactory memory」、Satoshi Murakami, Maki Minami, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige, Tetsuya Tabata、2013.12.3-2013.12.6、神戸ポートアイランド（兵庫県）

平成25年度『包括脳科学研究推進支援ネットワーク』夏のワークショップ、「The requirement of a mushroom-body-specific RGK family protein in *Drosophila* olfactory memory」、Satoshi Murakami, Maki Minami, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige, Tetsuya Tabata、2013.8.29-9.1、名古屋国際会議場（愛知県）

第5回分子高次機能研究会、「Identification of novel genes in olfactory memory formation by RNA-seq analysis」、Satoshi Murakami, Maki Minami, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige, Tetsuya Tabata、2012.8.27-29、滋賀県大津（滋賀県）

2012年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ、「ショウジョウバエ嗅覚記憶回路の機能解析」、多羽田哲也、村上智史、山崎大介、廣井誠、阿部崇志、新田陽平、上岡雄太郎、2012.7.24-27、仙台国際センター（宮城県）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 智史 (MURAKAMI, Satoshi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：10463902