

## 自己評価報告書

平成23年 5月13日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20115005

研究課題名（和文）ショウジョウバエの記憶形成回路の構造および機能発現の分子基盤

研究課題名（英文）Mechanisms underlying development and function of neural circuit for memory formation in *Drosophila*

研究代表者 多羽田 哲也

（タバタ テツヤ）

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：10183865

研究分野：分子行動学

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：長期記憶、ショウジョウバエ、Mushroom body、CREB、cAMP、転写解析

## 1. 研究計画の概要

脳機能を支える神経回路パターンは長い進化の過程で脳機能による淘汰のフィードバックを受けており、神経回路の発生メカニズムは、脳の機能発現を最適化するようにデザインされている。神経回路の機能と、それを形成するメカニズムの両者を有機的に理解することが必要であると考え。本研究は、ショウジョウバエの匂い記憶中枢であるMushroom body (MB) をモデルとして、神経回路形成と匂い記憶形成機構の統合的な理解をはかる。ショウジョウバエの匂い記憶形成において中心的な役割を担っているmushroom body (MB) の形成機構と、そこにおける長期記憶形成の分子メカニズムを明らかにする。

(1) 長期記憶形成に伴い発現する遺伝子の同定

匂いと電気ショックを連合させた忌避記憶学習において記憶の前夜でMBからRNAを抽出し、記憶形成により転写される遺伝子を同定し、その機能を明らかにする。

(2) MB形成に機能する遺伝子群の同定

MBの形態形成に機能する様々な転写因子、細胞認識に関わる因子などを選別し、その遺伝子に対応するヘアピンループRNAをMBに発現させ、表現型を観察し、MB形成に機能する遺伝子を明らかにし、形成メカニズムを理解する。

(3) イメージングによる神経機能の解析

記憶に伴う遺伝子機能を解析するためにCREBの発現、Ca<sup>2+</sup>レベルなどを指標に記憶形成に機能するMBの神経細胞を同定し、記憶形成メカニズムを明らかにする。

## 2. 研究の進捗状況

(1) 長期記憶形成に伴い発現する遺伝子の同定

3つのMBからRNAを抽出し、リニアに増幅する事によって、シーケンサーで解析できる量のcDNAを合成する手法を確立した。記憶形成時から3、6、12時間後のトランスクリプトーム解析を行っている。

(2) MB形成に機能する遺伝子群の同定  
RNAiスクリーニングにより1200を超える遺伝子のMB形成における機能を調べ、いくつかの候補遺伝子を得て、解析を進めている。

PCP経路のシグナルがMB軸索の正常な投射に必要なことを明らかにし、そのリガンドの候補がWnt5であることを報告した。

発現パターンから新規の遺伝子を同定し、それがアクチン繊維再構成を通して、MBの軸索形成に働くことを明らかにした。さらにこの遺伝子はコフィリンのリン酸化を制御しており、成体での発現が記憶形成に必要なことも示した。

(3) イメージングによる神経機能の解析  
CRE配列を結合した制御領域を、GFP蛋白質の上流に置いた。キノコ体を構成するKenyon細胞群の中で主にγ細胞でのシグナルの増強が観察された。間隔を開けない学習を繰り返した個体（長期記憶は形成されない）ではnaïveと同等あるいはそれ以下のシグナルを観察したこと、また、PKAを活性化およびphosphataseを阻害する薬剤を投与したところシグナルの上昇が観察され、cAMP/PKAシグナル系により活性化されることが示唆された。このシグナルは固定したサンプルのみならず、生きた個体を2光子顕微鏡下で観察しても検出することができる。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

記憶のトランスクリプトームの解析は、6時間後のサンプルが最も充実して得られている。これは困難なプロジェクトで、MBからの微量のRNAサンプルから安定したシークエンスデータを得るのは難しく注意深い実験が必要である。また、Deep-sequenceの結果を得るには、専用のシークエンサーを持っていないために予想よりはるかに時間がかかっている。シークエンスを依頼している研究室に、まもなく、最新のシークエンサーが2台納入されるので、この点は改善される予定である。

MBの発生機構の研究では、いくつかの遺伝子の作用機序を明らかにし、RNAiスクリーニングもほぼ予定とおりの遺伝子数をカバーしている。得られた候補遺伝子に関して、2011年度に機能解析が本格化する予定である。

CREリポーターの結果は記憶痕跡を解析する手段が得られたことを意味しており、今後の解析に期待している。また、2光子顕微鏡下で、CREリポーターおよびCaシグナルを検出できることを確認した。

### 4. 今後の研究の推進方策

トランスクリプトーム解析を続けながら、候補遺伝子の機能解析を行っており、この解析を続ける。Deep-sequenceは費用と時間の関係から、記憶形成後6時間のサンプルを中心に解析を行い、massed training(長期記憶は形成されない)のデータも収集したい。可能であれば、6時間の前後の時間のサンプルの解析も行いたい。

RNAiスクリーニングによって得られたMB形成に関わる遺伝子は2、3の候補に関して詳細な機能解析を続けて行く。アクチン繊維再構成を制御する遺伝子については、蛍光ラベルしたアクチンを使った細胞生物学的な解析も取り入れ2011年度中に成果を公表したい。

CREリポーターを用いて、同じ匂い物質あるいは異なった匂い物質で記憶形成を繰り返した時に、共通の神経細胞が機能するか否か、など様々な記憶痕跡の研究を行う。これによって、個々の記憶形成に働く神経細胞をマップすることが可能であると考えている。その神経細胞の活動レベルを特異的に調節して、記憶形成能を解析する。また、顕微鏡下で学習記憶を可能にするシステムの構築を行い、記憶におけるCREリポーターの発現をライブイメージングにより解析する。また、CREリポーターとCaイメージングを組み合わせ、記憶想起と記憶形成細胞の機能連関に関して研究を行う。今まで忌避記憶でのみ解析してきたが、同じ匂い物質をCSとして、糖

をUSにすることで、報酬記憶学習を形成することができる。忌避記憶と報酬記憶を形成する神経細胞の異同に関して解析する。

### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文](計6件)全て査読あり

1. Shimizu, K., Sato, M. and Tabata, T. The Wnt5/Planar cell polarity pathway regulates axonal development of the Drosophila mushroom body neuron. *J. Neuroscience*, 31, 4944-4954, 2011.

2. Kawamori, H., Tai, M., Sato, M., Yasugi, T., Tabata, T. The Fat/Hippo pathway regulates the progress of neural differentiation signaling in the Drosophila optic lobe. *Dev. Growth Diff. in press.*

3. Sugie, A., Umetsu, D., Yasugi, T., Fischbach, K.-F. and Tabata, T. Recognition of pre- and postsynaptic neurons via nephrin/NEPH1 homologs is a basis for the formation of the Drosophila retinotopic map. *Development*, 137, 3303-3313, 2010

4. Yasugi, T., Sugie, A., Umetsu, D. and Tabata, T. Coordinated sequential action of EGFR and Notch signaling pathways regulates proneural wave progression in the Drosophila optic lobe. *Development*, 137, 3193-3203, 2010

5. Murakami, S., Dan, C., Zagaeski, B., Maeyama, Y., Kunes, S. and Tabata, T. Optimizing Drosophila Olfactory Learning with a Semi-automated Training Device. *Journal of Neuroscience Methods*. 188, 195-204, 2010.

[学会発表](計26件)

1. 多羽田哲也, Mechanisms underlying Drosophila memory formation, 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010/12/7, 神戸

2. 村上智史, Transcriptome analysis of olfactory aversive memory in Drosophila mushroom body, 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010/12/7, 神戸

3. 多羽田哲也, Cellular and molecular mechanisms underlying neural formation in Drosophila visual system development, International Symposium on Drosophila Bio-Resource: Pioneering life science research with Drosophila Genetic Resources, 2010/3/17, 京都

4. 多羽田哲也, Spatio-temporal regulation of DER and Notch signaling pathways organizes the proneural wave progression in medulla neuroblast development, *Neurobiology of Drosophila*, 2009/9/29, Cold Spring Harbor