

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：82609

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20115006

研究課題名（和文） 学習記憶とその障害の遺伝子経路解明と動態解析

研究課題名（英文） Molecular bases and dynamisms of learning and memory.

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・運動・感覚システム研究分野・参事研究員

研究者番号：50261839

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエは行動遺伝学的解析により、学習記憶関連遺伝子の分子生理学的機能を解明するに適したモデル動物である。本研究において我々は以下のことを明らかにした。1) NMDA受容体の Mg²⁺ブロックは長期記憶形成に特異的に必要であり、定常状態での抑制型 CREB の発現を抑える。2) 細胞接着因子 Klinglein (Klg) の発現が長期記憶学習により Notch 依存性に増加することが長期記憶形成に必須である。3) PKA には記憶形成だけでなく、記憶統合を抑制する機能も持っている。4) 長期記憶形成は空腹により CRTC 依存性に亢進する。また学習記憶障害に関連して以下の結果を得た。5) PKA 活性を急性に阻害することで加齢性記憶障害が改善する。6) ショウジョウバエでは酸化ストレス非依存性に加齢性記憶障害が起こる。7) 発育不全を起こすインスリンシグナル変異により学習障害が起こる。7) 単離培養脳のキノコ体で起こる長期シナプス伝達亢進は連合記憶の細胞モデルとなる。

研究成果の概要（英文）：

Drosophila is an ideal animal model to investigate molecular and physiological function of memory-related genes. In this study, using *Drosophila*, we demonstrate following results. 1) Mg²⁺ block of NMDA receptors is specifically required for long-term memory (LTM) formation through inhibiting expression of suppressor isoform of CREB. 2) increase in cell adhesion molecule, Klinglein (Klg) after induction of LTM is an essential for LTM formation and is dependent on Notch. 3) PKA has an inhibitory function in memory consolidation. 4) mild starvation enhance LTM formation via activating CRTC/CREB transcriptional pathway. Regarding memory disorders we show following results. 5) acute inhibition of PKA can ameliorate memory impairment in aged flies. 6) age-related memory impairment (AMI) is not caused by age-related increase in oxidative stress in *Drosophila*. 7) insulin signaling-dependent developmental defects causes mental retardation. 8) long-term enhancement (LTE) formed in the mushroom bodies of cultured isolated brain is a cellular model of olfactory associative memory.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	14,200,000	4,260,000	18,460,000
2009年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
2010年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
2011年度	16,400,000	4,920,000	21,320,000
2012年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
総計	68,700,000	20,610,000	89,310,000

研究分野：生物学

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：ショウジョウバエ、学習記憶、遺伝子、イメージング

1. 研究開始当初の背景

我々を含む国内外の研究から、学習記憶に関わる遺伝子、いわゆる記憶関連遺伝子の同定が進んでいる。しかしこれら遺伝子の学習記憶における機能を十分に理解しているとは言いがたく、各種認知機能障害との関わりについても不明な点が多い。また NMDA 受容体の持つ Mg²⁺ブロックなどのように長いことその生理学的役割が不明なものも多い。ショウジョウバエは哺乳類モデルと多くの点で共通した学習記憶機構を持つ一方で、ショウジョウバエ独自の表現型も持つことから、哺乳類モデルでは解決や発見が難しい解析が可能な例が多くある。

また近年顕微鏡下で固定したハエからの *in vivo* でのイメージングが行われるようになったが、より詳細な神経連絡や回路動態を知るには哺乳類モデルで発達しているような *in vitro* での解析系の開発が不可欠である。幸いなことにショウジョウバエの脳は光透過性が高く、神経回路での分子動態を可視化して解析することは理論的には可能である。

2. 研究の目的

本研究において我々はショウジョウバエのモデル動物としての特長（高度な遺伝学的手法、光透過性の高い脳、記憶過程の行動遺伝学的分離）を利用することで次の3つの課題にアプローチしていく。

(1) PKA, NMDA 受容体など、動物種を超えて学習記憶に関与する分子の機能をより詳細に調べることで、新たな記憶パラダイ

ムの創出につなげ、(2) 加齢性記憶障害に焦点を当ててその分子神経機構を明らかにする。さらに(3) 学習記憶過程における神経・分子動態をリアルタイムに調べる、新規のショウジョウバエ学習記憶解析系として、“取り出した培養脳神経系”に顕微鏡下で学習記憶を成立させる「*in vitro* 学習系」の開発に挑戦する。

3. 研究の方法

記憶関連遺伝子の機能解析

NMDA 受容体、PKA は学習記憶への関与がよく知られているが、いくつかの未解決な重要課題がある。例えば Mg²⁺ブロックは NMDA 受容体が持つ、他のイオン透過型受容体には無い特徴であるが、未だに学習記憶における役割は明らかになっていない。また PKA は記憶形成に必須であるにも関わらず、その機能が亢進すると却って記憶障害を起こす。そこでこれらをコードする遺伝子を初め、各記憶関連遺伝子に変異を入れた遺伝子改変体を作成し、詳細な行動遺伝学的解析に加えて、適宜電気生理学的解析、生化学的解析を組み合わせ、記憶関連遺伝子の新たな役割を明らかにする。

加齢性記憶障害の分子・神経機構の解明

我々は加齢性記憶障害の抑制変異体 DC0+ (DC0 は PKA 触媒サブユニット PKA-C1 をコードする遺伝子) の解析から、cAMP/PKA シグナリング活性が老齢期では加齢性記憶障害（中期記憶障害）の原因となっているこ

とを明らかにした。我々は DC0/+ 変異体を用いたプロテオミクス解析から、cAMP/PKA シグナリングの下流タンパクの候補として、ミトコンドリアタンパク Pyruvate Carboxylase (PC) とホモログを持つタンパクを同定した。このタンパクの変異体解析を行い、加齢性記憶障害の発現に関わる分子・神経機構を明らかにする。

in vitro 学習系の開発

通常の匂い条件付けでは、条件刺激の匂い (CS+) と無条件刺激の電気ショック (US) を同時に与え、CS+ と US の連合学習を成立させるが、この条件付けによりキノコ体という記憶中枢で匂いに対する Ca²⁺ 応答が上昇する記憶痕跡が形成される。また多くの学習記憶関連遺伝子がキノコ体に発現することなどから、匂い情報とショック情報はキノコ体で連合されると考えられている。匂い情報は触角葉 (AL) を経てキノコ体に投射する一方、ショック情報は腹側神経節 (VNC) を上行して脳に入る。そこで取り出した脳に、匂いの代わりに AL 刺激を、電気ショックの代わりに VNC 刺激をすることで、キノコ体に記憶痕跡が現れるか？キノコ体に Ca²⁺ プローブを発現したトランスジェニックフライを作成し検証すると共に、記憶痕跡の形成機構を電気生理学・薬理的に調べる。

4. 研究成果

(1) PKA, NMDA 受容体などの機能解析

PKA は学習記憶に必須のリン酸化酵素であり、その欠失体では記憶の獲得・保持不全が起こる。その一方で、加齢性記憶障害は PKA 活性を下げると抑制できることなどから、単に PKA は記憶形成にポジティブに働くだけで無いことが予想されていた。そこで PKA の活性が抑制された変異体を使い、記憶行動の詳細な解析を行った。その結果、PKA 活性が約半分に低下した変異体では記憶保持が亢進することが分った (図 1)。

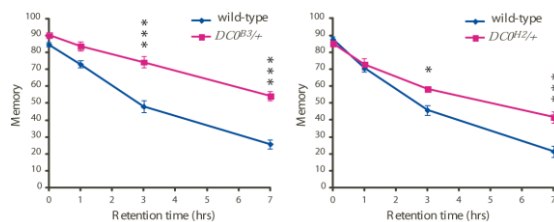


図 1 学習後の記憶スコアは PKA の変異体

DC0/+ の方が野生型と比べて高いスコアを 7 時間以上維持している。

NMDA 受容体を介した Ca²⁺ 透過は、Mg²⁺ ブロックがあるため、シナプス後細胞の脱分極と同期しない定常状態では抑制されている (図 2)。しかしこうした整流機構の生理的意義は不明であった。そこで Mg²⁺ ブロックが欠失した NMDA 受容体のトランスジェニックフライを作成し、電気生理学、行動学的解析を行った。その結果 Mg²⁺ ブロックは従来考えられていた連合学習のスイッチとして働くのではなく、長期記憶形成のゲート機構として働くことが分った。さらに Mg²⁺ ブロックによる定常状態での Ca²⁺ 透過抑制は、定常状態における転写因子 CREB の抑制型イソフォームの発現を抑制するために機能しており (図 2)、この抑制が無くなると長期記憶学習で活性型 CREB が機能できなくなることが明らかになった。

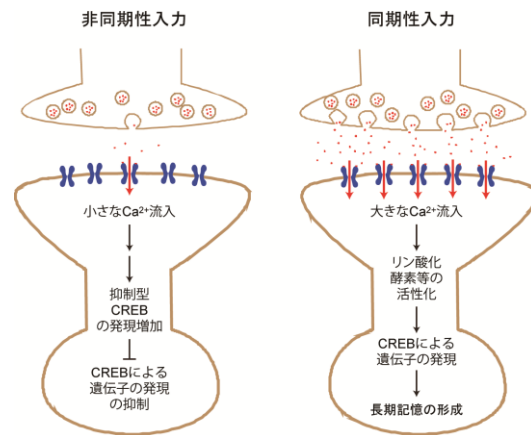


図 2 Mg ブロックによる定常状態での Ca 流入 (非同期性入力) の抑制と CREB による遺伝子発現

記憶変異体の検索から我々は長期記憶に障害を持つ細胞接着因子 Klinglein (Klg) の変異体を単離した。詳細な行動解析を行った結果、klg 変異体では長期記憶過程が特異的に障害されること、Klg の発現量は長期記憶形成に伴い上昇することなどが分った。また Klg の発現レベルが受容体型転写因子 Notch により調節されていることも分った。より詳しく調べたところ、長期記憶学習によりプレセニリン依存性に Notch の細胞内ドメインが遊離して転写を開始すること、これにより Klg の発現量が上昇し長期記憶の形成に寄与すると

いったシグナル経路が明らかとなった。

ショウジョウバエでは、匂いとショックの組み合わせによる嫌悪性長期記憶の形成には、間隔を空けた繰り返し学習が必要な一方、匂いと砂糖など報酬を組み合わせた報酬性長期記憶の形成は一回の学習で充分である。我々はこうした違いが生まれる理由が、報酬性学習前の空腹状態にあること、即ち、空腹状態であれば嫌悪性の長期記憶も1回の学習で形成されることを見出した。さらに非空腹状態での繰り返し学習による長期記憶形成と、空腹状態での一回学習による長期記憶では、関与する神経回路と長期記憶関連遺伝子の転写機構が異なることを明らかにした(図3)。

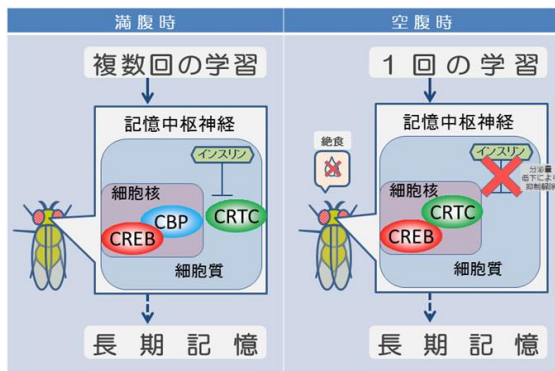


図3 空腹による長期記憶の形成亢進。満腹時は CBP/CREB 複合体による長期記憶関連遺伝子の発現が起こるのに対して、空腹時は CRTC/CREB 複合体による遺伝子発現が起こり、一回の学習で長期記憶となる。

(2) 加齢性記憶障害の発生機序の解明

酸化ストレスを生む活性酸素はエネルギー代謝の副産物であり、最も主要な老化のリスクファクターとして知られている。加齢性記憶障害は脳老化の典型的な表現型である。そこで酸化ストレスと加齢性記憶障害との関わりを明らかにするため、酸化ストレスの負荷を薬理的、遺伝学的に与えて加齢性記憶障害を調べた。その結果意外なことに、ショウジョウバエで観られる加齢性記憶障害の発現契機は、酸化ストレスに依らないことが示唆された。

ショウジョウバエの PC ホモログ dPC の生化学的性質を明らかにし、dPC 加齢に伴う発現レベルの上昇が、PKA 活性と相まって加齢

性記憶障害を引き起こすこと、この dPC 依存性の加齢性記憶障害が酸化ストレス非依存性の脳老化シグナルであることを明らかにした。

(3) 学習記憶過程における神経・分子動態をリアルタイム解析

薬理的解析により、触角葉からの匂い情報はニコチン性アセチルコリン受容体を介してキノコ体に入力する一方、ショック情報は従来考えられていたドーパミンで無く、NMDA 受容体を介して入力することが示唆された。また触角葉と、腹側神経節から脳への入力経路である上行神経路を同時刺激すると、触角葉とキノコ体間のシナプス伝達が2時間以上にわたり亢進すること(図4)、このシナプス伝達の長期亢進が匂い記憶と極めてよく似た生理学的特徴を持つことを明らかにした。

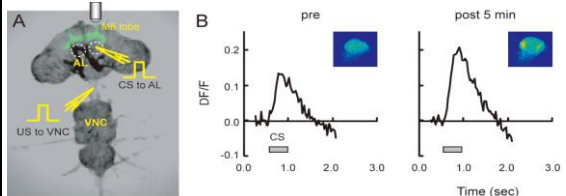


図4 in vitro 学習系による触角葉-キノコ体間シナプス伝達の長期亢進。触角葉 (AL) 刺激に対するキノコ体 (MB) の Ca²⁺ 応答をみた。同期刺激後は前より Ca²⁺ 応答が亢進している。

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15件)

1. 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. 査読無
2. Hirano, Y., Masuda, T., Naganos, S., Matsuno, M., Ueno, K., Miyashita, T., Horiuchi, J., and Saitoe M. (2013). Fasting Launches CRTC to Facilitate Long-term Memory Formation in Drosophila. Science 339, 443-446. 査読有
3. Ueno, K, Naganos, S., Hirano, Y., Horiuchi, J., and Saitoe M. (2013). Long-term enhancement of synaptic transmission between antennal lobe and mushroom body

- in cultured *Drosophila* brain. *J. Physiol.* 591, 287-302. 査読有
4. Kamimura K, Ueno K, Nakagawa J, Hamada R, Saitoe M, Maeda N (2013). Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Cell Biol.* 200, 219-233. 査読有
 5. Miyashita, T., Oda, Y., Horiuchi, J., Yin, J.C., Morimoto, T., and Saitoe M. (2012). Mg²⁺ block of *Drosophila* NMDA receptors is required for long-term memory formation and CREB-dependent gene expression. *Neuron* 74, 887-898. 査読有
 6. Naganos, S., Horiuchi, J., and Saitoe, M. (2012). Mutations in the *Drosophila* insulin receptor substrate, CHICO, impair olfactory associative learning. *Neurosci. Res.* 73, 49-55. 査読有
 7. Hirano, Y., Kuriyama, Y., Miyashita, T., Horiuchi, J., and Saitoe, M. (2012). Reactive oxygen species are not involved in the onset of age-related memory impairment in *Drosophila*. *Genes, Brain and Behavior* 11, 79-86. 査読有
 8. 平野恭敬、齊藤 実 (2010). 脳の老化：加齢性記憶障害とその分子機構 *メディカルバイオ* 7, 24-29. 査読無
 9. 松野元美、齊藤 実 (2010) 学習・記憶と分子マーカー *月刊臨床医学* 12, 1375-1379. 査読無
 10. 上野耕平、齊藤 実 (2010). 記憶学習の精緻な理解に向けてのモデル動物：ハエ *生体の科学* 61, 17-23. 査読無
 11. Tamura T, Horiuchi D, Chen, Y.C, Sone M, Miyashita T, Saitoe M, Yoshimura N, Chiang A.S, Okazawa H. (2010). *Drosophila* PQBP1 regulates learning acquisition at projection neurons in aversive olfactory conditioning. *J Neurosci.* 30, 14091-14101. 査読有
 12. Yamazaki, D., Horiuchi, J., Miyashita, T., and Saitoe, M. (2010). Acute inhibition of PKA activity at old ages ameliorates age-related memory impairment in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 30, 15573-15577. 査読有
 13. Yamazaki, D., Horiuchi, J., and Saitoe, M. (2010). Genetic dissection of age-related memory impairment in *Drosophila*. *Hirosaki Med. J.* 61, S26-S33. 査読有
 14. Matsuno, M., Horiuchi, J., Tully, T., and Saitoe, M. (2009). The *Drosophila* CAM Klingleon is required for long-term memory formation and is regulated by Notch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 310-315. 査読有
 15. Horiuchi, J., Yamazaki, D., Naganos, S., Aigaki, T., and Saitoe, M. (2008). PKA inhibits a consolidated form of memory in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 20976-20981. 査読有
- [学会発表] (計43件)
1. 宮下知之、齊藤 実 The rest interval dependent MAPK activation forms and sustains c-fos and CREB transcriptional cycling required for long-term memory. 第35回日本分子生物学会年会ワークショップ「遺伝子発現とタンパク質分解によって産み出される記憶制御のダイナミクス」、2012年12月11日、福岡
 2. Ueno K, Saitoe M. Long-term enhancement in the mushroom body in cultured *Drosophila* brain: Cellular substrate for olfactory learning. *International symposium on organization and function of the nervous system*, 2012年11月27日、東京
 3. 松野元美、齊藤 実 長期記憶形成に必要な神経-グリア相互作用 *日本神経科学大会シンポジウム「個々の神経細胞の働きを俯瞰して見る脳機能」*、2012年9月19日、名古屋
 4. Hirano Y, Naganos S, Matsuno M, Ueno K, Miyashita T, Horiuchi J, Saitoe M. Food deprivation facilitates long-term memory formation through activation of the CREB co-activator, CRTC in *Drosophila*. in *Neurofly*, 2012年9月5日、Padua, Italy
 5. 上野耕平、齊藤 実 in vivo imaging analysis of neural plasticity in mushroom body neurons. 「Visualization and optic control of neural circuit underlying behavior」第34回日本分子生物学会年会ワークショップ、2011年12月13日、横浜
 6. Saitoe M. Regulation of *Drosophila* age-related memory impairment by glial cells. in *Learning and Memory: A Synthesis*

- of *Flies and Honeybees* Janelia Farm HHMI Conference, 2011年5月16日、Janelia Farm Research Campus, VA, USA
7. 上野耕平、齊藤 実 遺伝子と行動を繋ぐ脳機能の蛍光イメージング解析。「行動は遺伝子でどこまで規定されるか」第33回日本分子生物学会年会ワークショップ、2010年12月8日、神戸
 8. Ueno K, Naganos S, Saitoe M. Associative neural plasticity in the mushroom body of *Drosophila*. in *System molecular ethology and beyond*、2010年11月10日、東京
 9. 齊藤 実 加齢に伴う記憶力低下の分子機序 年齢軸生体恒常性研究会シンポジウム 年齢・健康・疾患—生命の統合的理解にむけて、2010年3月5日、つくば
 10. Matsuno M, Horiuchi J, Tully T, Saitoe M. (2009) The *Drosophila* CAM Klingleon is required for memory consolidation via neuron-glia interaction. 第32回日本分子生物学会年会シンポジウム「神経回路を基盤とするシステム分子行動学」、2009年12月9日、横浜
 11. 齊藤 実 cAMP/PKA シグナリングによる脳の老化機構 第31回日本基礎老化学会シンポジウム「老化に伴う生体ネットワーク変化の解明に向けた新たなトレンド」、2009年10月31日、東京
 12. Nagano S, Saitoe M. *chico*, a *Drosophila* insulin receptor substrate homolog is required for olfactory learning. in *Neurobiology of Drosophila.*、2009年10月1日、Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA
 13. Yamazaki D, Saitoe M. Pyruvate Carboxylase, a downstream candidate for cAMP/PKA signaling pathway that regulates age-related memory impairment in *Drosophila*. 11th Meeting of Hiroasaki International Forum of Medical Science、2009年3月27日、弘前
 14. 齊藤 実 cAMP/PKA signaling pathway that regulates age-related memory impairment in *Drosophila*. 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会 シンポジウム「老化と代謝」2008年12月9日、神戸
 15. Miyashita T, Horiuchi J, Saitoe M.

Functional significance of Mg²⁺ block in associative learning and memory. in *Learning and Memory: A Synthesis of Flies and Honeybees* Janelia Farm HHMI Conference, 2008年11月12日、Janelia Farm Research Campus, VA, USA

〔その他〕

ホームページ等

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

マスコミ報道その他

1. Learning and memory: Austerity measures for memory: Research Highlight in *Nature Rev Neurosci* 14, 159 (2013).
2. 「空腹時記憶向上」科学新聞 (2013. 2. 8)
3. 「記憶力は“空腹状態で向上”」NHK おはよう日本 (2013. 2.1)
4. 「おなか空くと記憶力アップ 都医学総研、ハエで確認」他。日本経済新聞、時事通信、読売新聞(夕刊)、毎日新聞 (2013. 1.25)
5. Tabone CJ, Ramaswami M. *Neuron* 74, 767-769 (2012)にて同号に発表した論文の特集を組まれる Is NMDA Receptor-Coincidence Detection Required for Learning and Memory?
6. 「マグネシウムにより記憶を調節」東京新聞 (2012. 6. 7)
7. 「マグネシウムブロックによる記憶調節」NHK おはよう日本他 研究紹介 (2012. 6. 7)
8. 物忘れ仕組み解明期待 読売新聞(多摩版) 2009.2.18

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・運動・感覚システム研究分野・参事研究員
研究者番号：50261839

(2)研究分担者

宮下 知之 (MIYASHITA TOMOYUKI)
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・主任研究員
研究者番号：70270668