

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82609

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25115006

研究課題名(和文)記憶情報の変換ダイナミズムを担うショウジョウバエ神経・分子マシナリーの解明

研究課題名(英文)Molecular and neural bases of memory dynamism 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) 113,200,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの特長を生かし、1)記憶情報が生まれる過程、2)不安定な記憶が長期記憶へと変換され、維持される仕組み、3)加齢に伴う記憶機構の変化による記憶障害を担う分子・神経機構の動態と特性を解き明かすことを目的とした。本研究から、1)情報の連合過程でのドーパミン作動性神経の動作原理、2)間を空けた繰り返し学習により長期記憶情報が特定の細胞集団にコードされるメカニズム、神経-グリア相互作用によるグリア細胞での長期記憶関連遺伝子の発現、形成された長期記憶情報を維持するために必要な遺伝子発現機構、3)グリア細胞の代謝機能変性による加齢性記憶障害の発生機構などが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Taking advantages of Drosophila, we discovered how dopaminergic neurons reinforce association of sensory information to produce associative memory and identified novel mode of dopamine release induced by activity of postsynaptic neurons. Regarding consolidation of labile short-term memory to stable long-term memory, we found that c-fos/CREB transcriptional cycling formed by MAPK, which is activated during resting intervals of spaced training, encodes long-term memory in memory engram neurons, and identified a novel neuron-glia interaction by which glial cells express genes required for long-term memory formation. We also identified novel transcriptional machineries required for maintenance of long-term memory. Regarding alternation of memory mechanism upon aging, we found that age-related increase in activity of pyruvate carboxylase attenuates production D-serine in glial cells thereby impairs middle-term memory in aged flies.

研究分野：神経科学

キーワード：記憶 ショウジョウバエ ドーパミン 老化 グリア

## 1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエでは分子遺伝学的解析により、記憶獲得から長期記憶形成に至る各過程を担う遺伝子が多数同定され、キノコ体、中心体を始め学習記憶に関与する脳領域や細胞集団の同定も進んでいる。しかし感覚情報から記憶情報へ、また短期記憶から長期記憶へといった情報の変換ダイナミズムが、いかなる動作機序を持つどのような(同定された脳領域・細胞集団で構成される)神経回路に担われているのか? 学習記憶関連遺伝子として同定された遺伝子経路がこうした神経回路の動作特性をどのように規定するのか? といった記憶情報変換ダイナミズムの理解は進んでいない。また我々は加齢により記憶機構に可逆的な変調が起こることに加え、若齢体でも軽度な空腹状態では従来とは異なる転写機構を立ち上げて長期記憶形成を亢進させることも見出しており、若齢体の学習記憶機構も固定化されたものでなく、内的・外的環境に応じて可塑的に変化することが示されている。

## 2. 研究の目的

上記の学術的背景から本研究では、①感覚情報から記憶情報への変換、②短期記憶から長期記憶への変換といった「記憶情報の変換ダイナミズム」と、③内的・外的環境に応じた学習記憶機構の変換といった「学習記憶機構の変換ダイナミズム」の実体を、分子・回路レベルでの動態解析から明らかにすることを目的とする。

1) 感覚情報から記憶情報への変換: 嫌悪性匂い条件付けでは匂い情報と電気ショック情報がキノコ体に入力し、匂い感覚情報が匂い記憶情報へと変換される。ショウジョウバエにおいても連合学習の重要な強化シグナルとしてドーパミン(DA)が働くことが知られている。しかし匂い情報をキノコ体に伝達する匂い中枢、ショック情報を伝達する体性感覚上行神経路、キノコ体、DA神経で構成される情報変換の神経回路がどのような時系列で動作し、記憶痕跡をキノコ体に形成するのか不明である。そこで強化シグナルドーパミンの放出機序を中心に情報変換を担う回路の動作機序をシナプスレベルで明らかにすると共に、DAシグナルにより誘起される細胞内情報伝達系を明らかにする。また嫌悪性記憶への変換機構がショウジョウバエで特徴的な求愛記憶にも適用されるのか同様の解析で検証する。

2) 長期記憶への変換: 嫌悪性の匂い長期記憶への変換には通常、間を空けた繰り返し条件付け(長期記憶学習)が必要だが、何故“間”

が必要なのか? 不明である。我々は生化学的解析から、長期記憶学習の“間”で MAPK の ERK が特異的に上昇すること、さらに繰り返し学習中に c-fos と転写因子 CREB 間で転写サイクルが形成されることを見出した(未発表)。“間”に応じた ERK 活性上昇と転写サイクルの形成が何処で起こり長期記憶への変換とどのような因果関係を持つのか? 全脳を俯瞰した ERK 活性および転写サイクル動態から明らかにする。また形成された長期記憶情報がどのような仕組みにより保持されるのか? 新規遺伝子発現の要・不要の検証などから明らかにする。

2) 内的・外的環境に応じた学習記憶機構の変換: 加齢体では中期記憶と長期記憶が選択的に障害される。加齢による中期記憶機構と、長期記憶機構の変化は同一のものか否か? 先に我々が見出した、加齢性中期記憶障害の抑制変異体を起点に、実体を分子・神経レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

リアルタイムに局所回路の活性を調べた研究では、頭に観察窓を空けたショウジョウバエに、顕微鏡下で嫌悪性匂い条件付けを行い、条件刺激の匂いに対するキノコ体の  $Ca^{2+}$  応答が上昇する、記憶痕跡の形成を見た例がある。しかし顕微鏡下の *in vivo* 学習系では、観察中の脳の動きによりシナプスレベルでの解析が困難であり、観察可能な脳部位、高い時間分解能での遺伝子の ON/OFF、生理学・薬理学的手法の適用や解析可能な時間などに高い制約があった。こうした問題点を補うため“単離培養脳”で疑似的な匂い条件付けを行う“*in vitro* イメージング”解析系を開発し、*in vivo* イメージングと併用して目的を達成する。

1) 感覚情報から記憶情報への変換: *in vivo* 及び *in vitro* 高速 4 次元イメージングを、顕微鏡下で連合学習中の個体、及び疑似的連合学習中の単離培養脳からそれぞれ行う。*in vivo* 及び *in vitro* での相補的イメージング解析から、情報変換を担う神経回路の動作機序をシナプスレベルで明らかにする。併せてプロテオミクス解析などにより連合強化シグナルにより誘起される生化学的情報伝達経路を明らかにする。

2) 長期記憶情報への変換: “間”を空けた繰り返し学習による嫌悪性匂い長期記憶への変換過程を対象に、長期記憶形成に重要な役割を果たす ERK、c-fos、CREB の活性動態をモニターすると共に、全脳を俯瞰しての *in vivo* 及び *in vitro* イメージングを行う。

3) 内的・外的環境に応じた記憶機構の変換：加齢性記憶障害の発現が遅延する DC0/+ は PKA 触媒ユニットの変異体である。DC0/+ を利用したプロテオミクス解析などから、加齢性記憶障害の原因となる記憶機構の変容を分子・神経レベルで明らかにすると共に、加齢性記憶障害への関与が示される神経細胞の  $Ca^{2+}$  動態などを若齢体と加齢体とで比較し、学習記憶機構の変換原理を明らかにする。

#### 4. 研究成果

1) 感覚情報から記憶情報への変換：単離培養脳で、記憶中枢キノコ体に入力する匂い情報と体性感覚情報の上行経路を、同期して刺激すると、匂い情報経路とキノコ体間のシナプス伝達が DA 依存性に亢進するが、DA は匂い情報経路、体性感覚情報経路のいずれを単独で刺激しても放出されない。しかし、二つの経路を同時に刺激すると、同期刺激されたキノコ体神経細胞に投射する DA 神経終末から選択的に DA が放出されることが分かった (Ueno et al, eLife 2017)。一方匂い情報経路を単独で頻回刺激すると逆にキノコ体とのシナプス伝達が抑制されることも分かった (Sato et al, J Physiol 2018)。匂い情報と体性感覚情報の上行経路の刺激は嫌悪性匂い条件付けを模したものであるが、報酬性条件付けを模して、匂い情報と甘味情報の上行経路を同期刺激すると、摂食のために必要な運動神経の活動が上昇する報酬性記憶の痕跡も単離培養脳で形成できることを示した (Suzuki-Sawano et al, Sci Rep 2017)。

2) 長期記憶情報への変換：間によって上昇する MAPK 活性依存性に、c-fos と CREB 間の転写サイクルを形成したキノコ体神経細胞に長期記憶情報がコードされること、転写サイクルの形成を阻害すると、長期記憶が形成されないことなどが分かった。さらに長期記憶学習を行わずとも、人為的に転写サイクルが形成されるようにすると、長期記憶が形成されることも分かった。以上の結果から記憶痕跡細胞の形成は種を越えて保存された記憶機構であること。長期記憶学習中の“間”は ERK 活性を上昇させ、c-fos と CREB の転写サイクルを形成させることで、長期記憶情報をコードする神経細胞で CREB 依存性に長期記憶関連遺伝子の発現を誘導することが示唆された (投稿中)。

長期記憶への記憶情報の変換には、あらゆる動物において、神経細胞での遺伝子発現が必要なが示されている。これに加えて我々はグリア細胞においても、遺伝子の新規発現が必要なが見出した。我々は既に細胞接着因子 Klg が長期記憶形成に必要なことを見

出していたが、Klg が長期記憶形成に必要な神経-グリア細胞間相互作用を担うこと、長期記憶学習により Klg を介した神経-グリア間相互作用が上昇し、グリア細胞特異的な転写因子 Repo の転写活性を上昇させることが、長期記憶形成に必要なことが分かった (Matsuno et al, J Neurosci 2015)。

形成された長期記憶情報の維持にも、継続的な遺伝子発現が必要なが明らかになった。さらに記憶情報の形成には CBP/CREB による遺伝子発現が必要だが、維持には、これとは異なる遺伝子の発現機構が必要ながも分かった。即ち形成後 4 日迄の初期維持過程では CRTC/CREB による遺伝子発現が必要であり、4 日以降は CRTC/CREB 依存性に発現した転写因子 Bx が CREB 非依存性に遺伝子を発現することで記憶情報が維持されることを明らかにした。さらに消去学習により有効に記憶が消去されるのは CRTC/CREB 依存性に長期記憶が保持されている期間であることも明らかとなり、形成された記憶情報の流動性が実証された (Hirano et al, Nat Commun 2016)。

3) 内的・外的環境に応じた記憶機構の変換：加齢による中期記憶機構の変化の実体を明らかにするため行ったプロテオミクス解析から、グリア細胞に発現するミトコンドリアタンパクのピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) を見出し、加齢により PC 発現量が増加すること、PC の変異体では加齢による中期記憶障害が抑制されることを見出した。さらに加齢による PC の上昇は一般に老化リスク因子と言われている酸化ストレス非依存性に起こること、PC の上昇によりグリア細胞での D-セリン産生が低下することが分かった。D-セリンは記憶形成に重要な NMDA 受容体の活性化因子であり、中期記憶が障害された加齢体に D-セリンを投与すると記憶が顕著に改善した。以上の結果から加齢による PC の上昇が正常な D-セリン産生を障害するため中期記憶が損なわれることが示唆された (Yamazaki et al, Neuron 2014)。

ショウジョウバエ加齢体では中期記憶のみならず長期記憶も障害される。そこで中期記憶の障害が長期記憶の障害に繋がるのか？または長期記憶障害は、中期記憶障害とは異なるメカニズムにより起こるのか？検証するため、加齢性中期記憶障害の抑制変異体 PC で加齢性長期記憶障害を調べたところ、野生型と変わらず加齢性長期記憶障害が現れた。この結果から、加齢性長期記憶障害は、加齢性中期記憶障害とは異なるメカニズムにより発生することが分かった。現在その詳細な分子・神経機構を調べているところである。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計18件)

1. Sato, S., Ueno, K., Saitoe, M., and Sakai, T. (2018). Synaptic depression induced by postsynaptic cAMP production in the *Drosophila* mushroom body calyx. *J. Physiol.* 2018Apr16. 査読有  
doi: 10.1113/JP275799.
2. Suzuki-Sawano, E., Ueno, K., Naganos, S., Sawano, Y., Horiuchi, J., and Saitoe, M. (2017). A *Drosophila* ex vivo model of olfactory appetitive learning. *Sci. Rep.* 7, 17725. 査読有  
doi: 10.1038/s41598-017-17955-1.
3. \*Ueno, K., Suzuki, E., Naganos, S., Ofusa, K., Horiuchi, J., and \*Saitoe, M. (2017). Coincident postsynaptic activity gates presynaptic dopamine release to induce plasticity in *Drosophila* mushroom bodies. *Elife* 6. 査読有  
doi: 10.7554/eLife.21076.
4. Hirano, Y., Ihara, K., Masuda, T., Yamamoto, T., Iwata, I., Takahashi, A., Awata, H., Nakamura, N., Takakura, M., Suzuki, Y., Horiuchi, J., Okuno, H., and \*Saitoe, M. (2016). Shifting transcriptional machinery is required for long-term memory maintenance and modification in *Drosophila* mushroom bodies. *Nat. Commun.* 7, 13471. 査読有  
doi: 10.1038/ncomms13471.
5. Naganos, S., Ueno, K., Horiuchi, J., and \*Saitoe, M. (2016). Learning defects in *Drosophila* growth restricted chico mutants are caused by attenuated adenylyl cyclase activity. *Mol. Brain* 9, 37. 査読有  
doi: 10.1186/s13041-016-0217-3.
6. Nonaka, T., Suzuki, G., Tanaka, Y., Kametani, F., Hirai, S., Okado, H., Miyashita, T., Saitoe, M., Akiyama, H., Masai, H., and Hasegawa, M. (2016). Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1 $\delta$  Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43. *J. Biol. Chem.* 291, 5473–5483. 査読有  
doi: 10.1074/jbc.M115.695379.
7. Matsuno, M., Horiuchi, J., Yuasa, Y., Ofusa, K., Miyashita, T., Masuda, T., and \*Saitoe, M. (2015). Long-Term Memory Formation in *Drosophila* Requires Training-Dependent Glial Transcription. *J. Neurosci.* 35, 5557–5565. 査読有  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.3865-14.2015.
8. 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., and \*Saitoe, M. (2014). Glial Dysfunction Causes Age-Related Memory Impairment in *Drosophila*. *Neuron* 84, 753–763. 査読有  
doi: 10.1016/j.neuron.2014.09.039.
9. Hirano, Yukinori, and Saitoe, M. (2013). Hunger and memory; CRTC coordinates long-term memory with the physiological state, hunger. *Commun. Integr. Biol.* 6, e25152. 査読有  
doi: 10.4161/cib.25152.
10. Kamimura, K., Ueno, K., Nakagawa, J., Hamada, R., Saitoe, M., and Maeda, N. (2013). Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 200, 219–233. 査読有  
doi: 10.1083/jcb.201207036.

### 〔学会発表〕(計30件)

1. 齊藤 実、飯野雄一 記憶を作り出す分子と細胞ネットワーク ConBio2017 第40回日本分子生物学会年会(2017)
2. 松野元美、堀内純二郎、増田朋子、大房京子、齊藤 実 加齢性長期記憶障害は記憶固定時のドーパミン神経の過剰活性化による 第40回日本神経科学学会(2017)
3. 齊藤 実 ショウジョウバエ微小脳による記憶回路動作機構の分子生理学的解析 第40回日本神経科学学会(2017)
4. 長野慎太郎、齊藤 実 電気化学的手法を用いたショウジョウバエの脳内モノアミン放出のリアルタイム定量解析 第40回日本神経科学学会(2017)
5. 上野耕平、齊藤 実 共役入力を受けた後シナプス神経細胞はシナプス前終末cGMP/リアノジン受容体シグナルを活性化しドーパミンを放出する 第40回日本神経科学学会(2017)
6. 宮下知之、村上佳奈子、齊藤 実 グリアのグルタミン酸小胞放出はショウジョウバエの連合学習に必要な嫌悪情報を伝達する 第40回日本神経科学学会(2017)
7. 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(2016)
8. 村上佳奈子、宮下知之、菊地絵実、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なである 第39回日本分子生物学会年会(2016)
9. 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(2016)
10. 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(2016)
11. 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(2015)
  12. 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(2015)
  13. 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(2015)
  14. 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(2014)
  15. 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(2014)
  16. 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 ” 日本神経科学大会(2014)
  17. 宮下知之、齊藤 実 “Formation of c-fos /CREB transcription cycle during spaced training”日本神経科学大会(2014)

〔図書〕(計5件)

1. 平野恭敬、齊藤 実 (2017) 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. 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
3. Hirano Y, Saitoe M (2014). Hunger-driven modulation in brain functions. **Brain Nerve**. **66**, 41-48.

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：リアノジン受容体活性化剤及びその利用  
 発明者：上野耕平、齊藤 実、平井志伸、岡戸晴生  
 権利者：公益財団法人東京都医学総合研究所  
 種類：特許  
 番号：特願2017-221312  
 出願年月日：平成29年11月16日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕  
 ホームページ等  
<http://www.igakuken.or.jp/memory/>  
<http://memory-dynamism.jp/index.html>

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

桑 和彦 (KUME, Kazuhiko)  
 名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・教授  
 研究者番号：30251218

上野 太郎 (UENO, Taro)  
 東邦大学・理学部・講師  
 研究者番号：30648267

坂井 貴臣 (SAKAI, Takaomi)  
 首都大学東京・理工学研究科・准教授  
 研究者番号：50322730

(3)連携研究者  
 なし

(4)研究協力者  
 なし