

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

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：25115010

研究課題名（和文）学習記憶に関わる新規分子の発見と神経系における動態・機能の解明

研究課題名（英文）Discovery of new molecules involved in learning and memory and study of their mode of action

研究代表者

飯野 雄一（IINO, YUICHI）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・教授

研究者番号：40192471

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 82,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では神経系の機能解析に多くの利点を持つ線虫を用い、新規分子を発見し、その分子動態を調べることにより、細胞内分子のダイナミクス、回路のダイナミクス、行動のダイナミクス、という各階層で学習・記憶の機構を包括的に理解することを目指した。その結果、短期記憶・特に刺激強度の記憶の機構、記憶シグナルの細胞間転移、一細胞での分別記憶の機構などについて、分子神経機構が多く明らかになった。

研究成果の概要（英文）：By using *C. elegans*, we tried to reveal molecular dynamics, circuit dynamics and behavioral dynamics for learning and memory. We found multiple molecular-neural mechanisms for short term memory, memory of stimulus strength, inter-cellular transfer of memory signal and single-cell differential memory.

研究分野：神経科学

キーワード：線虫 *C. elegans* 化学走性 インスリン/PI3キナーゼ 経路 遺伝子改変マウス カルシンテニン 学習
長期記憶 TOR経路

1. 研究開始当初の背景

線虫 *C.エレガンス* は神経機能の研究において以下の利点を持っている。

1) 神経細胞がすべて同定されており、それらが作る神経回路の構造が完全にわかっているため、神経回路の動作特性を一細胞レベルでの正確さで研究できること。

2) 万単位の個体をスクリーニングして行動を指標に突然変異体を取得することができ、それによって学習に関わる新規遺伝子を発見できること。

研究開始当初、我々を含む、世界の主要な研究室から Cell, Nature, Science, Neuron などの主要雑誌に論文が多数出され、最近では回路レベルの解析に研究の焦点が移りつつあった。

2. 研究の目的

このようなバックグラウンドをもとに、本研究ではイメージング技術を駆使して神経回路の動作、特に学習による変化を可視化し、情報の流れのダイナミックな変化を明らかにする。同時に、変異体の分離により新規分子を発見し、その分子動態を調べることにより、細胞内分子のダイナミクス 回路のダイナミクス 行動のダイナミクス という各階層で学習・記憶の機構を包括的に理解することを目指した。

また、線虫で発見した遺伝子のマウスホモログの機能解析を行うことにより種を超えて保存した機構の有無を検討することとした。

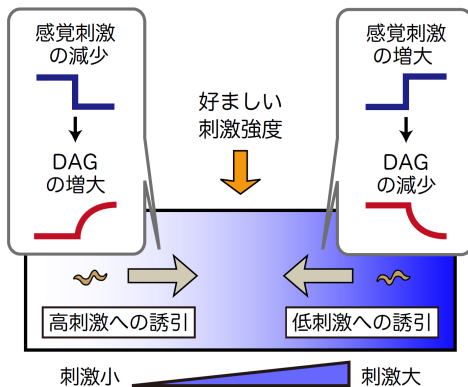
3. 研究の方法

線虫においては、突然変異体の解析、遺伝子改変、カルシウムイメージング、分子イメージングを、マウスにおいては CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子ノックアウトを主に用いた。

4. 研究成果

・短期記憶・特に刺激強度の記憶の機構

線虫は、餌を与えて飼育されていた際の塩濃度を記憶し、その塩濃度に向かう。この行動に重要な PLC/DAG/PLC 経路の動態を知るため、FRET により DAG 量に応じて蛍光が変化する Downward DAG2 プローブを ASEL 神経に発

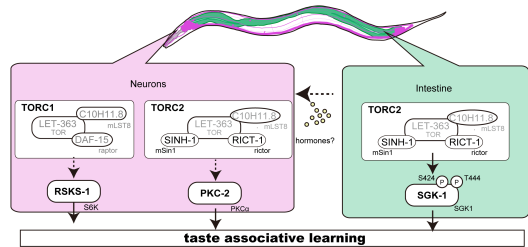


現させて蛍光測光を行った。ASEL 感覚神経のシナプス部位でのジアシルグリセロール量が感覚入力により両方向に変化することを観測した。さらに、飢餓によりこの変化が小さく短くなることを明らかにし、これらの結果を論文発表した。

さらに、濃度記憶依存の塩走性の神経機構を調べるため、自由行動中の線虫を追尾しながらカルシウムイメージングにより神経活動を測定する装置を用いて実験を行った。その結果、感覚神経から介在神経に至る段階で、神経応答が経験により正逆に変化することを見出した (未発表)。

・記憶シグナルの細胞間転移

化学走性行動とその可塑性に異常を示す変異体として TOR 経路の変異体を見出した。塩濃度記憶には TORC1、TORC2 の両複合体が関わっていたが、TORC2 については腸で働くことにより頭部感覚神経による塩嗜好性を調節することがわかった。この結果を論文に発表した。

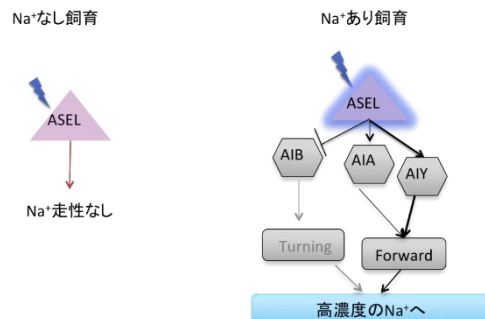


・長期記憶、短期から長期への固定化

長期記憶の実験系の構築を試み、塩濃度学習に関する新たなパラダイムを考案した。間を置いた繰り返し条件付けにおいて 2 時間および 4 時間の時点での記憶の保持が向上することを見出した。さらに、CREB 転写因子の変異体が塩濃度への適応に異常が見られることを明らかにした (未発表)。

・一細胞での分別記憶の機構

線虫は Na⁺イオンに予め曝されたときにのみ Na⁺への走性を示すことを見出した。Na⁺は ASEL 感覚神経により受容されるので、ASEL および介在神経を光刺激する実験とカルシウムイメージングの実験を行い、ASEL 神経の興奮性が Na⁺イオン暴露により変化することがこの行動可塑性の主たる機構であることを明らかにし、論文発表した。



・マウスにおける学習関連遺伝子の機能解析線虫のカルシネニンが塩の学習に必須であることを見出し論文発表した。さらに、マウスが持つ3つのカルシネニン遺伝子のCRISPR/Cas9法による破壊を行った。3つの遺伝子に対するguide RNAとCas9を微小注入し、いろいろな組み合わせで3つの遺伝子に変異をもつ集団が得られていることを確認した。RT-PCRや組織染色により、各カルシネニンのmRNAや蛋白質が消失していることも確認した。これらの掛け合わせにより得た3重遺伝子破壊マウスで、脳の組織染色と行動バッテリーテストを行った。この結果、パルプアルブミン陽性神経の顕著な減少が見られるとともに、過活動性や、不安情動、社会性行動など複数の行動に異常が見られた。これにより、3つのカルシネニンは一部重複した機能を持ち、多くの高次脳機能に重要な働きをすることが明らかとなった(未発表)。

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 28 件)

1. Sudo Atsushi, Kanagawa Motoi, Kondo Mai, Ito Chiyomi, Kobayashi Kazuhiro, Endo Mitsuharu, Minami Yasuhiro, Aiba Atsu, Toda Tatsushi, Temporal requirement of dystroglycan glycosylation during brain development and rescue of severe cortical dysplasia via gene delivery in the fetal stage. *Human molecular genetics*, 査読有, 27, 2018, 1174-1185, 10.1093/hmg/ddy032
2. Kanayama Mayuko, Hayano Toshiya, Koebis Michinori, Maeda Tatsuya, Tabe Yoko, Horie Shigeo, Aiba Atsu. Hyperactive mTOR induces neuroendocrine differentiation in prostate cancer cell with concurrent up-regulation of IRF1. *Prostate*, 査読有, 77, 2017, 1489-1498, doi: 10.1002/pros.23425
3. Ohno H, Sakai N, Adachi T, Iino Y. Dynamics of Presynaptic Diacylglycerol in a Sensory Neuron Encode Differences Between Past and Current Stimulus Intensity. *Cell Reports*, 査読有, 20, 2017, 2294-2303, doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.038.
4. Hayao Ohno, Morikatsu Yoshida, Takahiro Sato, Johji Kato, Mikiya Miyazato, Masayasu Kojima, Takanori Ida, Yuichi Iino, Luqin-like RYamide peptides regulate food-evoked responses in *C. elegans*. *eLife*, 査読有, 6, 2017, e28877, DOI: 10.7554/eLife.28877
5. Sakai Naoko, Ohno Hayao, Tomioka Masahiro, Iino Yuichi, The intestinal TORC2 signaling pathway contributes to associative learning in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE*, 査読有, 12, 2017, e0177900, DOI: 10.1371/journal.pone.0177900
6. Nakamura Takashi, Ueyama Takehiko, Ninoyu Yuzuru, Sakaguchi Hirofumi, Chojjookhuu Narantsog, Hishikawa Yoshitaka, Kiyonari Hiroshi, Kohta Masaaki, Sakahara Mizuho, de Curtis Ivan, Kohmura Eiji, Hisa Yasuo, Aiba Atsu, Saito Naoaki, Novel role of Rac-Mid1 signaling in medial cerebellar development. *Development*, 査読有, 144, 2017, 1863-1875, doi: 10.1242/dev.147900
7. Lifang Wang, Hirofumi Sato, Yohsuke Satoh, Masahiro Tomioka, Hirofumi Kunitomo and Yuichi Iino, A Gustatory Neural Circuit of *Caenorhabditis elegans* Generates Memory-Dependent Behaviors in Na(+) Chemotaxis. *J Neurosci*, 査読有, 37, 2017, 2097-2111, 10.1523/JNEUROSCI.1774-16.2017
8. Narushima M, Uchigashima M, Yagasaki Y, Harada T, Nagumo Y, Uesaka N, Hashimoto K, Aiba A, Watanabe M, Miyata M, and Kano M., The Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 1 Mediates Experience-Dependent Maintenance of Mature Synaptic Connectivity in the Visual Thalamus. *Neuron*, 査読有, 91, 2016, 1097-1109, 10.1016/j.neuron.2016.07.035
9. Kikuchi I, Takahashi-Kanemitsu A, Sakiyama N, Tang C, Tang PJ, Noda S, Nakao K, Kassai H, Sato T, Aiba A, and Hatakeyama M., Dephosphorylated parafibromin is a transcriptional coactivator of the Wnt/Hedgehog/Notch pathways. *Nat Commun*, 査読有, 7, 2016, 12887, 10.1038/ncomms12887
10. Toyoshima, Y., Tokunaga, T., Hirose, O., Kanamori, M., Teramoto, T., Jang, M.S., Kuge, S., Ishihara, T., Yoshida, R., and Iino, Y., Accurate Automatic Detection of Densely Distributed Cell Nuclei in 3D Space. *Plos Computational Biology*, 査読有, 12, 2016, e1004970, 10.1371/journal.pcbi.1004970
11. Tomioka, M., Naito, Y., Kuroyanagi, H., and Iino, Y., Splicing factors control *C. elegans* behavioural learning in a single neuron by producing DAF-2c receptor. *Nat Commun*, 査読有, 7, 2016, 11645, 10.1038/ncomms11645
12. Endo, M., Hattori, M., Toriyabe, H.,

- Ohno, H., Kamiguchi, H., Iino, Y., and Ozawa, T., Optogenetic activation of axon guidance receptors controls direction of neurite outgrowth., *Sci Rep*, 査読有, 6, 2016, 23976, 10.1038/srep23976.
13. Ryoichi Ichikawa, Kouichi Hashimoto, Taisuke Miyazaki, Motokazu Uchigashima, Miwako Yamasaki, Atsu Aiba, Masanobu Kano, and Masahiko Watanabe, Territories of heterologous inputs onto Purkinje cell dendrites are segregated by mGluR1- dependent parallel fiber elimination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有, 113, 2016, 2282-2287, 10.1073/pnas.1511513113.
 14. Harumi Nakao, Takeshi Harada, Kazuki Nakao, Hiroshi Kiyonari, Kenichi Inoue, Yasuhide Furuta and Atsu Aiba, A possible aid in targeted insertion of large DNA elements by CRISPR/Cas in mouse zygotes. *Genesis*, 査読有, 54, 2016, 65-77, 10.1002/dvg.22914
 15. Matsuda, I; Shoji, H; Yamasaki, N; Miyakawa, T; Aiba, A, Comprehensive behavioral phenotyping of a new Semaphorin 3F mutant mouse. *Mol Brain*, 査読有, 9, 2016, 10.1186/s13041-016-0196-4.
 16. Yamazoe-Umemoto, A., Fujita, K., Iino, Y., Iwasaki, Y., and Kimura, K.D., Modulation of different behavioral components by neuropeptide and dopamine signalings in non-associative odor learning of *Caenorhabditis elegans*. *Neuroscience Research*, 査読有, 99, 2015, 22-33, 10.1016/j.neures.2015.05.009
 17. Hamakawa, M., Uozumi, T., Ueda, N., Iino, Y., and Hirotsu, T., A role for Ras in inhibiting circular foraging behavior as revealed by a new method for time and cell- specific RNAi. *Bmc Biology*, 査読有, 13, 2015, 10.1186/s12915-015-0114-8
 18. Kato, H.E., Inoue, K., Abe-Yoshizumi, R., Kato, Y., Ono, H., Konno, M., Hososhima, S., Ishizuka, T., Hoque, M.R., Kunitomo, H., Ito, J., Yoshizawa, S., Yamashita, K., Takemoto, M., Nishizawa, T., Taniguchi, R., Kogure, K., Maturana, A.D.; Iino, Y., Yawo, H., Ishitani, R., Kandori, H., Nureki, O., Structural basis for Na⁺ transport mechanism by a light-driven Na⁺ pump. *Nature*, 査読有, 521, 2015, 48-U347, 10.1038/nature14322
 19. 富岡征大・飯野雄一, シナプスにおけるインスリン/PI3K 経路と記憶学習-インスリン経路が線虫の味覚学習を制御する仕組み -, *糖尿病学*, 査読無, 2015, 45-52
 20. Mizutani, E., Oikawa, M., Kassai, H., Inoue, K., Shiura, H., Hirasawa, R., Kamimura, S., Matoba, S., Ogonuki, N., Nagatomo, H., Abe, K., Wakayama, T., Aiba, A., Ogura, A., Generation of Cloned Mice from Adult Neurons by Direct Nuclear Transfer. *Biol Reprod*, 査読有, 92, 2015, 1-11, 10.1095/biolreprod.114.123455
 21. Suzuki, W., Kassai, H., Harada, T., Yamada, A., Aizawa, R., Suzuki, D., Nakayama, M., Maki, K., Takeda, S., Yamamoto, M., Aiba, A., Baba, K., Kamijo, R., Cdc42 is essential for cartilage development during endochondral ossification. *Endocrinology*, 査読有, 156, 2015, 314-322, 10.1210/en.2014-1032
 22. Takenaka, N., Yasuda, N., Nihata, Y., Hosook, T., Noguchi, T., Aiba, A., Satoh, T., Role of the guanine nucleotide exchange factor in Akt2-mediated plasma membrane translocation of GLUT4 in insulin-stimulated skeletal muscle. *Cell Signal*, 査読有, 26, 2014, 2460-2469, 10.1016/j.cellsig.2014.07.002
 23. Yohsuke Satoh, Hirofumi Sato, Hirofumi Kunitomo, Xianfeng Fei, Koichi Hashimoto and Yuichi Iino, Regulation of experience-dependent bidirectional chemotaxis by a neural circuit switch in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 査読有, 34, 2014, 15631-15637, 10.1523/JNEUROSCI.1757-14.2014
 24. 大野速雄・富岡征大・飯野雄一, カルシニンに依存したシナプス領域のインスリン/PI3K 経路の活性化が線虫の学習を制御する, *実験医学*, 査読無, 32, 2014, 3094-7
 25. Hamada, S., Ogawa, I., Yamasaki, M., Kiyama, Y., Kassai, H., Watabe, A. M., Nakao, K., Aiba, A., Watanabe, M., and Manabe, T, The glutamate receptor GluN2 subunit regulates synaptic trafficking of AMPA receptors in the neonatal mouse brain. *Eur. J. Neurosci*, 査読有, 40, 2014, 3136-3146, 10.1111/ejn.12682
 26. Hayao Ohno, Shinya Kato, Yasuki Naito, Hirofumi Kunitomo, Masahiro Tomioka and Yuichi Iino, Role of synaptic phosphatidylinositol 3-kinase in a behavioral learning response in *C. elegans*. *Science*, 査読有, 345, 2014, 313-317, 10.1126/science.1250709
 27. Kassai, H., Sugaya, Y., Noda, S., Nakao,

- K., Maeda, T., Kano, M., and Aiba, A., Selective Activation of mTORC1 Signaling Recapitulates Microcephaly, Tuberos Sclerosis, and Neurodegenerative Diseases. *Cell Rep*, 査読有, 7, 2014, 1626-1639, 10.1016/j.celrep.2014.04.048
28. Uesaka, N., Uchigashima, M., Mikuni, T., Nakazawa, T., Nakao, H., Hirai, H., Aiba, A., Watanabe, M., and Kano, M., Retrograde Semaphorin Signaling Regulates Synapse Elimination in the Developing Mouse Brain. *Science*, 査読有, 344, 2014, 1020-1023, 10.1126/science.1252514

〔学会発表〕(計 66 件)

1. Keita Mori, Michinori Koebisu, Shizuka Kobayashi, Yuji Kiyama, Toshiya Manabe, Atsu Aiba, Yuichi Iino, Generation and characterization of calsyntenin triple knockout mice. "Principles of memory dynamism elucidated from a diversity of learning systems"2018 Workshop & Meeting, 2018
2. Masahiro TOMIOKA and Yuichi IINO, Regulation of behavioral plasticity by insulin-like signaling in *C. elegans*. 新学術領域研究「多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理」2018 Workshop & Meeting, 2018
3. Yasuaki Ike, Tao Jiang, Masahiro Tomioka, Yuichi Iino, E3 ubiquitin ligases regulate taste avoidance learning in *C. elegans*. 新学術領域研究「多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理」2018 Workshop & Meeting, 2018
4. Park ChanHyun(パク チャンヒョン)、櫻井裕樹、飯野雄一、國友博文, Roles of the CLC chloride channel CLH-1 in salt chemotaxis learning of *Caenorhabditis elegans*. 新学術領域研究「多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理」2018 Workshop & Meeting, 2018
5. Takashi Nagashima, Masahiro Tomioka, Yuichi Iino, The DAF-16/FOXO transcription factor controls associative learning in *C. elegans*. 新学術領域研究「多様性から明らかにする記憶ダイナミズムの共通原理」2018 Workshop & Meeting, 2018
6. 國友博文、佐藤博文、飯野雄一, 線虫 *C. Elegans* の塩濃度の記憶と走化性の分子・神経機構. 次世代脳プロジェクト・冬のシンポジウム 4 領域合同若手シンポジウム, 2017
7. 森 啓太、古戎 道典、小林 静香、城山 優治、真鍋 俊也、饗場 篤、飯野 雄一, 哺乳類におけるカルシンテニンの機能:トリプルノックアウト マウスを用いた解析. ConBio2017(第40回日本分子生物学会年会), 2017
8. 富岡 征大、永嶋 宇、後屋敷 舞、飯野 雄二, 多彩なインスリン様シグナル伝達により制御される *C. elegans* の学習記憶. ConBio2017, 2017
9. 森 啓太、古戎 道典、大野 速雄、小林 静香、真鍋俊也、饗場 篤、飯野 雄一, Generation and characterization of calsyntenin triple knockout mice. 第40回 日本神経科学大会, 2017
10. Masahiro Tomioka, Takashi Nagashima, Mai Goyashiki, Yuichi Iino, A versatile role of insulin-like signaling in learning behavior in *C. elegans*. 第40回 日本神経科学大会, 2017
11. Takashi NAGASHIMA, Masahiro TOMIOKA, Yuichi IINO, Multiple isoforms of a DAF-16/FOXO transcription factor are involved in learning and memory in *C. elegans*. 第40回 日本神経科学大会, 2017
12. Hayao Ohno, Naoko Sakai, Takeshi Adachi, and Yuichi Iino, Diacylglycerol encodes differences between past and current stimulus intensity. 21st International *C. elegans* Meeting, 2017
13. Masahiro Tomioka and Yuichi Iino, A versatile insulin-like signaling regulates taste avoidance learning, 21st International *C. elegans* Conference, 2017
14. M.S. Jang, Y. Toyoshima, H. Kunitomo, Y. Iino, Identification of neurons and analysis of the neural circuit involved in the learned salt-avoidance behavior in *C. elegans*. 21st International *C. elegans* Meeting, 2017
15. ChanHyun Park, Yuki Sakurai, Yuichi Iino, Hirofumi Kunitomo, Roles of the CLC chloride channel clh-1 in food-associated salt chemotaxis learning of *Caenorhabditis elegans*. , 21st International *C. elegans* conference, 2017
16. Takashi NAGASHIMA, Masahiro TOMIOKA, Yuichi IINO, Multiple isoforms of the DAF-16/FOXO transcription factor regulate taste avoidance learning. 21st International *C. elegans* Meeting, 2017
17. YUICHI IINO, Molecular and neural circuit mechanisms for

- experience-dependent behavioral switching in *C. elegans*. 37th Blankenese Conference, 2017
18. Shuichi Yanagi, Mai Uemura, Yuichi Iino, Hirofumi Kunitomo, Long-lasting memory of salt chemotaxis learning in *C. elegans*. 37th Blankenese Conference, 2017
19. ChanHyun Park, Yuki Sakurai, Yuichi Iino, Hirofumi Kunitomo, Roles of the ClC chloride channel clh-1 in salt chemotaxis learning of *Caenorhabditis elegans*. 第17回東京大学生命科学シンポジウム, 2017
20. Keita Mori, Michinori Koebis, Hayao Ohno, Shizuka Kobayashi, Toshiya Manabe, Atsu Aiba, Yuichi Iino, Generation and characterization of calyntenin triple knockout mice. 第94回日本生理学会大会, 2017
21. Masahiro Tomioka, Takashi Nagashima, Yuichi Iino, Role of the insulin-like signaling pathway in learning in *C. elegans*, Gordon Research Conferences IGF & Insulin System in Physiology & Disease, 2017
22. Masahiro Tomioka, The role of insulin-like signaling in learning behavior in *C. elegans*. JSPS Core-to-Core Project International Seminar, 2016
23. Yasuaki Ike, Tao Jiang, Masahiro Tomioka, Yuichi Iino, Analysis of a regulatory mechanism of taste avoidance learning in *C. elegans*. The 15th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (ISMNTOP), 2016
24. Takashi NAGASHIMA, Masahiro TOMIOKA, Yuichi IINO, Roles of FOXO transcription factor in taste avoidance learning in *C. elegans*. The 15th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, 2016

(以下ページ数制約のため省略)

〔図書〕(計 1 件)

1. 富岡征大、飯野雄一, 診断と治療社, 糖尿病学 2015(6 章シナプスにおけるインスリン/PI3K 経路と記憶学習), 2015, 168(うち8)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯野 雄一 (IINO, Yuichi)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号: 40192471

(2) 研究分担者

饗場 篤 (AIBA, Atsu)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 20271116

(3) 連携研究者

國友 博文 (KUNITOMO, Hirofumi)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号: 20302812

富岡 征大 (TOMIOKA, Masahiro)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号: 40466800

豊島 有 (TOYOSHIMA, Yu)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号: 10632341

大野 速雄 (OHNO, Hayao)
東京大学・大学院理学系研究科・特任助教
研究者番号: 00747272

佐藤 博文 (Sato, Hirofumi)
東京大学・大学院理学系研究科・特任研究員
研究者番号: 40779435

(4) 研究協力者

Lifang Wang (WANG, Lifang)
東京大学・大学院理学系研究科・大学院生
森 啓太 (MORI, Keita)

東京大学・大学院理学系研究科・大学院生
柳 秀一 (YANAGI, Shuichi)

東京大学・大学院理学系研究科・大学院生
酒井 奈緒子 (SAKAI, Naoko)

東京大学・大学院理学系研究科・特任研究員