

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06700

研究課題名(和文) シナプスレベルでのRgk1機能解析による記憶成分特異的神経子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of memory-component-specific neural mechanism through the synaptic-level analysis of Rgk1 function

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： ショウジョウバエ嗅覚記憶中枢であるキノコ体における遺伝子発現解析をもとに特定した遺伝子rgk1について、成虫期キノコ体で特異的に発現しており、かつ、ショウジョウバエの嗅覚記憶の維持に必要であること、rgk1がシナプス領域に特異的に局在していることなどを明らかにした。トランスジーンを用いた詳細な解析により、rgk1が記憶成分である麻酔感受性記憶ASM及び麻酔耐性記憶ARMの両方において重要な働きを有する因子であることを明らかにした。本研究により、Rgk1は、異なる強度を有している記憶成分の制御を介して嗅覚記憶の安定性を規定する、記憶維持機構における重要な分子ファクターであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： In order to elucidate the mechanism governing olfactory memory maintenance, the function of rgk1 gene was studied. rgk1 is a gene that was originally identified by the whole-genome transcriptome analysis in the Drosophila olfactory memory center, the mushroom body. Our study demonstrated that the rgk1 gene is specifically expressed in the adult mushroom body and is required there for the maintenance of the olfactory memory. Detailed analysis using various rgk1 transgenes showed that rgk1 is essential in a plurality of memory components, especially ASM and ARM. It was also found that Rgk1 has a domain which acts exclusively in ARM. This study established Rgk1 as an important molecular factor that controls the stability of olfactory memory through the regulation of different memory components with different robustness.

研究分野：分子行動学

キーワード：ショウジョウバエ 嗅覚記憶 シナプス small GTPase

1. 研究開始当初の背景

(1) 一般に、記憶は複数の構成要素からなっている。ショウジョウバエ嗅覚記憶は、記憶形成に關与する機構の研究のモデルとしての役割を果たしており、記憶の構成要素、すなわち、短期記憶、中期記憶、長期記憶等を特定するための遺伝学的手段及び分子レベルでの手段を提供してきた。これらの記憶の構成要素のうち、特に、中期記憶は、麻醉感受性記憶 (ASM) 及び麻醉耐性記憶 (ARM) へと、さらに分けることができる。

(2) 我々のこれまでの成果として、効率的な変異体記憶解析系の構築 (Murakami et al., 2010) と、ショウジョウバエ嗅覚記憶中枢であるキノコ体における網羅的な転写産物解析 (RNA-seq) により、新規記憶遺伝子として *rgk1* を同定していた。また、独自に作成した抗体などを用いた組織観察により、*rgk1* 遺伝子及び Rgk1 タンパクが成虫期キノコ体において特異的にしていることが確認されていた。さらに、*rgk1* を欠損している変異体を作成し、嗅覚忌避記憶を調べたところ、特に中期記憶において異常が見られることが確認されていた。

2. 研究の目的

Rgk1 に関してすでに作成済みの RNAi、GFP 融合タンパクなどを利用することで、詳細なレベルでの記憶成分、忘却回路の解明を目指す。RGK は新規の記憶関連遺伝子であり、解析を通じていまだ明らかとなっていない記憶分子機構の解明が期待される。また Rgk1 のシナプス局在性を利用しシナプスレベルでの記憶形成機構の解析系を行う。

3. 研究の方法

(1) *rgk1* 異所発現体と候補遺伝子の変異体を用いた遺伝学的に相互作用する因子の探索を行った。全神経発現ドライバを用いて *rgk1* を誘導すると、致死性を示す。また特定の神経で異所的に強制発現すると羽の形成異常が見られる。そこで、これら容易に定量可能な表現系を用いて、*rgk1* と遺伝学的に相互作用する因子の探索を行った。ラットやショウジョウバエにおいて voltage-gated calcium channel (VGCC) を制御するという報告があり、特にこの因子との関連を調べた。actin cytoskeleton 関連因子についても変異体を調べた。

(2) *rgk1* と相互作用する遺伝子の記憶形成過程における働きと *rgk1* との関連性の解析を行った。RNA-seq によるキノコ体 (MB) subset 発現情報と modifier screening により絞り込んだ遺伝子について、変異体の嗅覚忌避条件付けアッセイを行い嗅覚記憶形成過程への関与、*rgk1* との関わりを調べた。アッセイでは、匂いと電気刺激の連合学習系を用いた。ショウジョウバエにおいては匂いと電気刺激による忌避記憶において短期

(STM)、麻醉感受性 (ASM)、麻醉耐性 (ARM)、長期 (LTM) という複数の記憶成分が形成され、それぞれ独立な神経/分子機構により制御されている。そこで、どの嗅覚記憶成分に働くのかを明らかにするため、まず短期記憶への関与の有無を調べ、その後 cold shock による麻醉を行い、これに耐性のある記憶成分 (ARM) と感受性記憶成分 (ASM) にわけてどの過程に關与があるかを調べた (記憶成分の絞り込み)。 *rgk1* は ARM 特異的に働くため ARM への関与が予測された。

(3) 可塑性と安定性の trade-off を制御する機構の解析を行った。ショウジョウバエにおいて嗅覚記憶は自然に減衰するのではなく Rac を中心とした回路により積極的に消去されている (Shuai et al., 2010)。これまでに行った解析から Rgk1 がこの Rac 依存的な忘却経路に拮抗することがわかっている。Rac と Rgk1 がどのように相互作用するのかはまだ未解析であり、上記に加えて Rac との相互作用の解析も平行して行った。

4. 研究成果

(1) Rgk1 の putative GTPase domain に変異を導入した Dominant-negative transgene によるレスキュー実験を行った。その結果 *rgk1* 変異体の機能が回復しなかったことから、Rgk1 の GTPase domain が記憶形成に重要であることが示唆された。

rgk1 変異体における微小な神経構造変化を検出するために、single cell 標識により樹状突起と軸索部位それぞれの長さや形態を調べた。軸索についてはシナプスマーカー (synaptotagmin-HA) を用いることでシナプス数の計測も行った。その結果、*rgk1* 変異体のキノコ体 gamma 神経において異常伸張と、シナプス数の増加が観察された。*rgk1* 変異体では記憶形成能が低減するためこのシナプスの増加は一見して相反するが、記憶形成においてはシナプスの turn over が重要であることを考えると、*rgk1* 変異体においてはこのサイクルに異常があり、本来消失すべきシナプスが除去されずに残っているという仮説が成り立つ。

(2) *rgk1* 変異体において、蛹期の腸における老廃物が異常集積していることが確認された。腸の収縮運動では GPCR 経路、cAMP 経路等の関与が重要であり、*rgk1* が関与する分子機構を解明する上で一つの手がかりとなる。

キノコ体における遺伝子発現プロファイルの結果と、これまでに得られた *rgk1* に関する表現系 (記憶形成異常の他、過剰発現体における羽の伸展異常、腸内老廃物の除去異常) をもとに、選択的な変異体スクリーニングを行い、*rgk1* と相互作用する遺伝子の探索を行った。その結果、G-protein, cAMP 経路、長期記憶に關与する因子など 5 遺伝子につ

いて相互作用が示唆された。

(3) 一部ドメインを欠いた Rgk1 配列に GFP を付加したコンストラクトを用いて、各ドメインがシナプスレベルでの Rgk1 の局在(図1)にどの様に働くのかを調べた。具体的には、Brp 抗体で可視化したシナプスに対して GFP 融合コンストラクトのシグナルがどの様に局在するのかを調べた。その結果、N 末部位にあるドメインを欠いた Rgk1 は、野生型 Rgk1 で見られる様な凝集体が見られないことがわかった。次に、その凝集体がどこに局在するのかを、NMDAR や Drep-2 などのポストシナプスマーカーを用いて調べたところ、凝集体はポストシナプスには存在せず、プレシナプスの active zone に隣接した領域 (peri-active zone) に局在する可能性が示唆された。

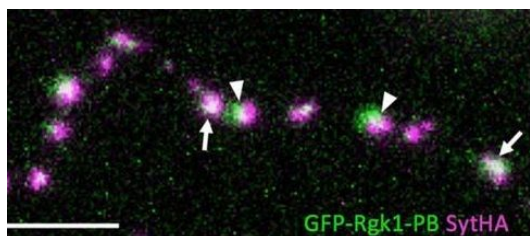


図1 キノコ体神経における Rgk1 の局在

(4) これまでに、過剰発現させた Rgk1 によって Rac 依存的な忘却が抑制されることを示唆するデータが得られていた。そこで、内在的な Rgk1 が野生型において同様の働きを持つかどうかを調べるために、Rac を恒常活性化させた個体で内在 *rgk1* レベルを落とす実験を行った。

その結果、内在 *rgk1* レベルを下げると Rac 恒常活性による影響がさらに強く見られるようになった。したがって、Rgk1 は Rac 依存的な忘却を抑えることにより、記憶の維持に働いていると考えられた。

(5) これまでの成果から、*rgk1* が、anesthesia-sensitive memory (ASM) と anesthesia-resistant memory (ARM) の両方を制御している可能性が示唆されている。そこで、それぞれの memory component に特異的に働くことが知られている *rutabaga* と *dunce* 遺伝子の変異体を用いて、*rgk1* が記憶を制御する分子機構に属するかどうかを調べた。その結果、cold shock 後の記憶において、*rgk1* 変異体のスコアが、*rutabaga* と *dunce* の中間程度の値を示した。したがって、*rgk1* はこれら既知の経路とは独立に記憶を制御している可能性が示唆された。

(6) *rgk1* は、記憶依存的に変動する遺伝子の一つとして得られてきた。Rgk1 の哺乳類ホモログではその発現が MAPK 経路によって制御されているという知見があるため、*rgk1* においてもその様な制御が見られる可能性が

考えられる。

上記 *rgk1* についての実験により明らかになったことと、Rgk1 の哺乳類ホモログにおける知見から、Rgk1 が Rac/Pak/LIMK/Cofilin 経路で働いている可能性が示唆される。今後この経路に属する遺伝子との相互作用を調べることにより、Rgk1 が関与している分子機構をより詳細に明らかにすることができると考えられる。

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)

Satoshi Murakami, Maki Minami-Ohtsubo, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige Tetsuya Tabata.

Two Components of Aversive Memory in *Drosophila*, Anesthesia-Sensitive and Anesthesia-Resistant Memory, Require Distinct Domains Within the Rgk1 Small GTPase

The Journal of Neuroscience, 査読有、37 (22) 5496-5510, 2017

(10.1523/JNEUROSCI.3648-16.2017)

[学会発表](計4件)

村上智史, 大坪真樹, 中戸隆一郎, 白髭克彦, 多羽田哲也

Two components of aversive memory in *Drosophila*, anesthesia-sensitive and anesthesia-resistant memory, require distinct domains within the Rgk1 small GTPase

東京大学生命科学シンポジウム
2017年

Satoshi Murakami

A small GTPase Rgk1 regulates *Drosophila* olfactory intermediate memory through a novel cAMP pathway

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

2016年

Satoshi Murakami

rgk1, which encodes a RGK family small GTPase protein, regulates *Drosophila* olfactory memory

第9回分子高次機能研究会

2016年

Satoshi Murakami, Maki Minami, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige, Tetsuya Tabata

REM ファミリーに属する small GTPase Rgk1 は ショウジョウバエ嗅覚記憶の維持に必要である

第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会

2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 智史 (Satoshi Murakami)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：10463902

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし